



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109406772 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811286030.8

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.10.31

(71)申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业
开发区科学大道100号

(72)发明人 吴拥军 于斐 刘贝贝 玉崧成
何磊良 刘利娥 屈凌波 田咏梅
王佳 王威 王艺琳

(74)专利代理机构 郑州德勤知识产权代理有限
公司 41128

代理人 王莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

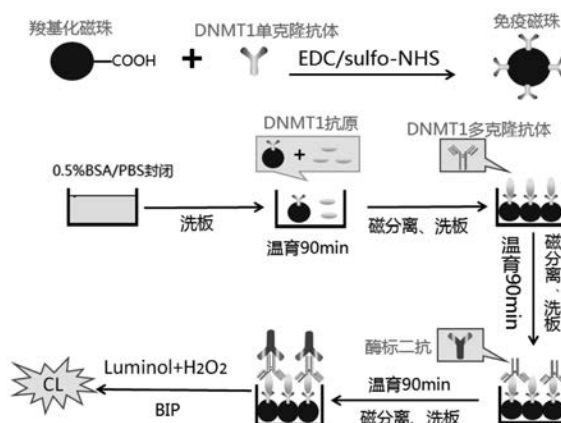
权利要求书3页 说明书12页 附图7页

(54)发明名称

基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测
DNMT1的方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,包括:封闭预处理、加磁性单克隆抗体、加抗原、加多克隆抗体、加酶标二抗、加化学发光底液、发光检测及建立回归方程等步骤。本发明提供的上述方法构建一种新型的化学发光新体系HRP-Luminol-H₂O₂-BIP,以免疫磁珠作为固相载体,结合聚苯乙烯微孔板多样本同时检测的统一性和磁珠磁分离的优点,将化学发光的高灵敏性、抗原抗体反应的高特异性和酶催化的高效专一性三者有机结合起来,建立双抗夹心法对DNMT1进行测定。



1. 一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,包括以下步骤:

封闭预处理将封闭液加到聚苯乙烯微孔板中依次进行温育和第一阶段洗板处理;

加磁性单克隆抗体向经过第一阶段洗板处理的聚苯乙烯微孔板中加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液并进行磁分离和第二阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第一复合物,所述第一复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 结构,且所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 为表面被DNMT1小鼠抗人单克隆抗体共价修饰的 Fe_3O_4 纳米免疫磁珠;

加抗原向悬浮有所述第一复合物的聚苯乙烯微孔板中加入DNMT1标准抗原溶液或待测抗原溶液,并依次进行温育、磁分离和第三阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第二复合物,该第二复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}$ 结构;

加多克隆抗体向悬浮有所述第二复合物的聚苯乙烯微孔板中加入兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液,并依次进行温育、磁分离和第四阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第三复合物,该第三复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}@\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 结构;

加酶标二抗向悬浮有所述第三复合物的聚苯乙烯微孔板中加入酶标二抗稀释液,并依次进行温育、磁分离和第五阶段洗板处理,且所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有第四复合物,该第四复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}@\text{PAb}_{\text{DNMT1}}@\text{酶标二抗}$ 结构;

加化学发光底液向悬浮有所述第四复合物的聚苯乙烯微孔板中依次加入发光底液A和过氧化氢溶液进行化学发光处理,形成化学发光溶液,其中,所述发光底液A中包括鲁米诺和羟基联苯;

发光检测及建立回归方程利用化学发光检测仪检测所述化学发光溶液的发光强度,根据检测的所述发光强度与所述DNMT1标准抗原溶液或待测抗原溶液浓度之间的关系,建立检测DNMT1的回归方程。

2. 根据权利要求1所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述封闭预处理的步骤包括:将浓度为0.5%的BSA/PBS封闭液以每孔250~350 μL 加入到所述聚苯乙烯微孔板中,再置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育60~120 min,然后再用PBST溶液进行所述第一阶段的洗板处理,并拍干。

3. 根据权利要求1或2所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述加入单克隆抗体的步骤包括:用0.008~0.012 mmol/L pH 7~7.5的PBS溶液以1 : 35~45的稀释比稀释 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液,制得所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液,并将所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液以每孔100 μL 加入到所述聚苯乙烯微孔板中,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第二阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第一复合物。

4. 根据权利要求3所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液的配制方法包括以下步骤:

清洗:将羧基化 Fe_3O_4 纳米颗粒悬浮液经超声、磁分离弃上清处理后采用浓度为0.01~0.015 mol/L、pH为6.0的MES缓冲液对其平衡2~5 min,然后进行磁分离弃上清得到第一沉淀物;

活化:向所述第一沉淀物中依次加入浓度为8~10 mg/mL的EDC溶液和浓度为8~11 mg/mL的NHS溶液进行涡旋反应10~15 min,磁分离、弃上清处理后采用MES缓冲液对其洗涤3次,然后再进行磁分离、弃上清处理得到第二沉淀物;

缓冲体系转换:采用PBS缓冲液对所述第二沉淀物洗涤3~4次,磁分离得到第三沉淀物;

偶联:向所述第三沉淀物中加入DNMT1单克隆抗体和PBS缓冲液进行涡旋反应1.5~2h,经磁分离、弃上清处理后采用PBS缓冲液对其清洗2次,磁分离、弃上清得到第四沉淀物;

封闭:向所述第四沉淀物中加入BSA封闭液,进行涡旋反应0.5~1 h,磁分离、弃上清处理后,采用PBST缓冲液清洗3~4次,磁分离、弃上清得到第四沉淀物即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$;

保存:在偶联产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 中加入PBS缓冲液,轻晃摇匀,制得出所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液。

5. 根据权利要求1或4所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述加抗原的步骤包括:用0.008~0.012 mmol/L pH 7~7.5的 PBS的缓冲溶液将DNMT1抗原标准品稀释为多个不同浓度的DNMT1标准抗原溶液,以相同的pH值的PBS缓冲溶液为空白对照溶液;将所述DNMT1标准抗原溶液和空白对照溶液以每孔100 μL 加入到悬浮有所述第一复合物的所述聚苯乙烯微孔板中,置于37℃恒温培养箱中温育60~120 min,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第三阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第二复合物。

6. 根据权利要求5所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述加多克隆抗体的步骤包括:用含0.5% BSA/PBS缓冲溶液将浓度为1 mg/mL的兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 溶液稀释1500~2500倍制得兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液,然后将所述兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液以每孔100 μL 加入到悬浮有所述第二复合物的所述聚苯乙烯微孔板中,置于37℃恒温培养箱中温育60~120 min,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第四阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第三复合物。

7. 根据权利要求1或6所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述加酶标二抗的步骤包括:用含0.5% BSA/PBS缓冲溶液将浓度为2 mg/mL的酶标二抗溶液稀释3500~4500倍制得酶标二抗稀释液,将所述酶标二抗稀释液以每孔100 μL 加入到吸附有所述第三复合物所述聚苯乙烯微孔板中,置于37℃恒温培养箱中温育60~120 min,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第五阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第四复合物。

8. 根据权利要求7所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述加化学发光底液的步骤包括:将所述发光底液和所述过氧化氢溶液分别以每孔100 μL 加入到悬浮有所述第四复合物的聚苯乙烯微孔板中,在所述聚苯乙烯微孔板中形成所述化学发光溶液,其中,所述发光底液包括浓度为0.001 mol/L的鲁米诺和 5×10^{-5} mol/L的发光增强剂羟基联苯。

9. 根据权利要求8所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,其特征在于,所述发光检测及建立回归方程的步骤包括:先采用化学发光检测仪检测所述聚苯乙烯微孔板各孔中的所述化学发光溶液的RLU值或 RLU_0 ,再在抗原浓度为0.5~128 ng/mL的范围内,建立检测DNMT1的线性回归方程: $y=0.50143x+1.76886$,其中, y 为 RLU/RLU_0 , x 为 $\log C_{\text{DNMT1}}$,相关系数 R 为0.9907,RLU代表DNMT1待测抗原的发光强度值, RLU_0 代表空白试验测定的发光强度值, C_{DNMT1} 代表DNMT1待测抗原浓度。

10. 根据权利要求9所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法, 其特征在于, 所述DNMT1待测抗原浓度的最低检测限为0.01 ng/mL。

基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测技术领域,具体的说,涉及了一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法。

背景技术

[0002] 在检测领域中,常常需要对各类大分子抗原或抗体进行定性或定量检测。现有技术中,已经以“双抗夹心”为基础衍生出多种免疫反应分析方法,如:放射免疫法、酶联免疫法、化学发光法、时间分辨荧光法和荧光免疫法等,可用于确定病原微生物,对人体的特异性蛋白定量检测从而对疾病进行辅助诊断或监测等等,用途非常广泛。但采用双抗夹心法测定大分子抗原时,有时酶标抗体需要自标,耗时费力不经济,而且成本高等缺点。

[0003] 为了解决以上存在的问题,人们一直在寻求一种理想的技术解决方案。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明确有必要提供一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1方法,以解决上述问题。

[0005] 为了解决上述问题,本发明所采用的技术方案是:一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,具体步骤包括:

封闭预处理将封闭液加到聚苯乙烯微孔板中依次进行温育和第一阶段洗板处理;

加磁性单克隆抗体向经过第一阶段洗板处理的聚苯乙烯微孔板中加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液并进行磁分离和第二阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第一复合物,所述第一复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 结构,且所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 为表面被DNMT1小鼠抗人单克隆抗体共价修饰的 Fe_3O_4 纳米免疫磁珠;

加抗原向悬浮有所述第一复合物的聚苯乙烯微孔板中加入DNMT1标准抗原溶液或待测抗原溶液,并依次进行温育、磁分离和第三阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第二复合物,该第二复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}$ 结构;

加多克隆抗体向悬浮有所述第二复合物的聚苯乙烯微孔板中加入兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液,并依次进行温育、磁分离和第四阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第三复合物,该第三复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}@\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 结构;

加酶标二抗向悬浮有所述第三复合物的聚苯乙烯微孔板中加入酶标二抗稀释液,并依次进行温育、磁分离和第五阶段洗板处理,且所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有第四复合物,该第四复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}@\text{PAb}_{\text{DNMT1}}@\text{酶标二抗}$ 结构;

加化学发光底液向悬浮有所述第四复合物的聚苯乙烯微孔板中依次加入发光底液A和过氧化氢溶液进行化学发光处理,形成化学发光溶液,其中,所述发光底液A中包括鲁米诺和羟基联苯;

发光检测及建立回归方程利用化学发光检测仪检测所述化学发光溶液的发光强度,根据检测的所述发光强度与所述DNMT1标准抗原溶液或待测抗原溶液浓度之间的关系,建立

检测DNMT1的回归方程。

[0006] 基于上述,所述封闭预处理的步骤包括:将浓度为0.5%的BSA/PBS封闭液以每孔250~350 μ L加入到所述聚苯乙烯微孔板中,再置于37℃恒温培养箱中温育60~120 min,然后再用PBST溶液进行所述第一阶段的洗板处理,并拍干。

[0007] 基于上述,所述加入单克隆抗体的步骤包括:用0.008~0.012 mmol/L pH 7~7.5的PBS溶液以1 : 35~45的稀释比稀释 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液,制得所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液,并将所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液以每孔100 μ L加入到所述聚苯乙烯微孔板中,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第二阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第一复合物。

[0008] 基于上述,所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液的配制方法包括以下步骤:

清洗:将羧基化 Fe_3O_4 纳米颗粒悬浮液经超声、磁分离弃上清处理后采用浓度为0.01~0.015 mol/L、pH为6.0的MES缓冲液对其平衡2~5 min,然后进行磁分离弃上清得到第一沉淀物;

活化:向所述第一沉淀物中依次加入浓度为8~10 mg/mL的EDC溶液和浓度为8~11 mg/mL的NHS溶液进行涡旋反应10~15 min,磁分离、弃上清处理后采用MES缓冲液对其洗涤3次,然后再进行磁分离、弃上清处理得到第二沉淀物;

缓冲体系转换:采用PBS缓冲液对所述第二沉淀物洗涤3~4次,磁分离得到第三沉淀物;

偶联:向所述第三沉淀物中加入DNMT1单克隆抗体和PBS缓冲液进行涡旋反应1.5~2 h,经磁分离、弃上清处理后采用PBS缓冲液对其清洗2次,磁分离、弃上清得到第四沉淀物;

封闭:向所述第四沉淀物中加入BSA封闭液,进行涡旋反应0.5~1 h,磁分离、弃上清处理后,采用PBST缓冲液清洗3~4次,磁分离、弃上清得到第四沉淀物即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$;其中BSA封闭液代表牛血清白蛋白封闭液;

保存:在偶联产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 中加入PBS缓冲液,轻晃摇匀,制得出所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液。

[0009] 基于上述,所述加抗原的步骤包括:用0.008~0.012 mmol/L pH 7~7.5的PBS的缓冲溶液将DNMT1抗原标准品稀释为多个不同浓度的DNMT1标准抗原溶液,以相同的pH值的PBS缓冲溶液为空白对照溶液;将所述DNMT1标准抗原溶液和空白对照溶液以每孔100 μ L加入到悬浮有所述第一复合物的所述聚苯乙烯微孔板中,置于37℃恒温培养箱中温育60~120 min,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第三阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第二复合物。

[0010] 基于上述,所述加多克隆抗体的步骤包括:用含0.5% BSA/PBS缓冲溶液将浓度为1 mg/mL的兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 溶液稀释1500~2500倍制得兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液,然后将所述兔抗人多克隆抗体 $\text{PAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液以每孔100 μ L加入到悬浮有所述第二复合物的所述聚苯乙烯微孔板中,置于37℃恒温培养箱中温育60~120 min,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第四阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第三复合物。

[0011] 基于上述,所述加酶标二抗的步骤包括:用含0.5% BSA/PBS缓冲溶液将浓度为2 mg/mL的酶标二抗溶液稀释3500~4500倍制得酶标二抗稀释液,将所述酶标二抗稀释液以

每孔100 μL 加入到吸附有所述第三复合物所述聚苯乙烯微孔板中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育60~120 min,然后依次进行磁分离处理和利用PBST溶液进行所述第五阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有所述第四复合物。

[0012] 基于上述,所述加化学发光底液的步骤包括:将所述发光底液A和所述过氧化氢溶液分别以每孔100 μL 加入到悬浮有所述第四复合物的聚苯乙烯微孔板中,在所述聚苯乙烯微孔板中形成所述化学发光溶液,其中,所述发光底液A包括浓度为0.001mol/L的鲁米诺和 5×10^{-5} mol/L的发光增强剂羟基联苯。

[0013] 基于上述,所述发光检测及建立回归方程的步骤包括:先采用化学发光检测仪检测所述聚苯乙烯微孔板各孔中的所述化学发光溶液的RLU值或RLU₀,再在抗原浓度为0.5~128 ng/mL的范围内,建立检测DNMT1的线性回归方程: $y=0.50143x+1.76886$,其中, y 为RLU/RLU₀, x 为 $\log C_{\text{DNMT1}}$,相关系数 R 为0.9907,RLU代表DNMT1待测抗原的发光强度值,RLU₀代表空白试验测定的发光强度值, C_{DNMT1} 代表DNMT1待测抗原浓度。基于上述,所述的基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法,所述DNMT1待测抗原浓度的最低检测限为0.01 ng/mL。

[0014] 需要说明的是,上述各步骤中,McAb_{DNMT1}代表DNMT1小鼠抗人单克隆抗体、PcAb_{DNMT1}代表DNMT1兔抗人多克隆抗体、HRP-Second-Ab代表羊抗兔酶标二抗。CB代表碳酸盐缓冲液、PBS代表磷酸盐缓冲溶液、PBST代表添加Tween-20非离子表面活性剂的磷酸盐缓冲溶液。

[0015] 本发明相对现有技术具有突出的实质性特点和显著的进步,具体的说,本发明提供的上述基于磁性分离的化学发光酶免疫检测DNMT1的方法构建一种新型的化学发光新体系HRP-Luminol-H₂O₂-BIP,以免疫磁珠作为固相载体,结合聚苯乙烯微孔板多样本同时检测的统一性和磁珠磁分离的优点,将化学发光的高灵敏性、抗原抗体反应的高特异性和酶催化的高效专一性三者有机结合起来,建立双抗夹心法对DNMT1进行测定,无需进行酶标记抗体,省时省力,经济,成本低。

[0016] 进一步,本发明提供的上述检测DNMT1的方法,可以根据检测的发光强度与所述DNMT1标准样或待测目标物浓度之间的关系,建立检测DNMT1的回归方程,从而利用该方法计算样品中DNMT1的含量,方法步骤简单且由该方法建立的回归方程对DNMT1检测的线性范围宽、检测限低、精密度高、准确度高且具有良好的特异性。

附图说明

[0017] 图1是本发明提供的基于磁性分离的化学发光磁酶联免疫检测DNMT1的原理示意图。

[0018] 图2是本发明中HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系中HRP的浓度与RLU的关系图。

[0019] 图3是本发明中HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系中Luminol的浓度与RLU的关系图。

[0020] 图4是本发明中HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系中H₂O₂的浓度与RLU的关系图。

[0021] 图5是本发明中HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系和HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的动力学曲线对比图。

[0022] 图6是本发明中HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系中BIP的浓度与RLU的关系图。

[0023] 图7是本发明中HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系中不同缓冲溶液作为稀释液与RLU的关系图。

- [0024] 图8是本发明提供的免疫磁珠的稀释倍数与化学发光体系中的RLU的关系图。
- [0025] 图9是本发明提供的当免疫磁珠的稀释比不同时,检测出的RLU值的对比图。
- [0026] 图10是本发明提供的固相抗体捕获抗原作用时间与反应体系的RLU的关系图。
- [0027] 图11是本发明提供的当多克隆抗体PcAb_{DNMT1}的稀释比不同时,检测出的RLU值的对比图。
- [0028] 图12是本发明提供的当酶标二抗HRP-Second-Ab的稀释比不同时,检测出的RLU值的对比图。
- [0029] 图13是本发明建立的DNMT1浓度检测标准曲线示意图。

具体实施方式

[0030] 下面通过具体实施方式,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

[0031] 本发明中所用的试剂及仪器种类如下:人源DNMT1 (Abcam, OriGene); DNMT1小鼠抗人单克隆抗体 (McAb_{DNMT1}, Abcam); DNMT1兔抗人多克隆抗体 (PcAb_{DNMT1}, Abcam); 羊抗兔酶标二抗 (HRP-Second-Ab, Abcam); 30%双氧水 (昊天试剂化学有限公司); 鲁米诺 (英文Luminol) ($\geq 98\%$, Sigma); 乙醇 (天津市博迪化工有限公司); 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris, 索莱宝科技有限公司); 人DNA甲基化转移酶3a ELISA试剂盒; 人DNA甲基化转移酶3b ELISA试剂盒 (上海康朗生物科技有限公司); Fe₃O₄纳米颗粒 (自制); 牛血清白蛋白 (BSA, 北京索莱宝科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。如非特殊说明,实验用水均为Milli-Q超纯水 (电阻率大于18.2 M Ω · cm)。

[0032] 本发明中所用的仪器如下:板式化学发光检测仪 (LB960, 德国Berthold公司); 96孔聚苯乙烯白色板 (深圳市金灿华实业有限公司); 多功能聚苯乙烯微孔板读数仪 (SpectraMax M2e, 美国); 电热恒温培养箱 (DHG-9080型, 上海精宏实验设备有限公司); 数控超声波清洗仪 (KQ-300DE型, 昆山市超声仪器有限公司); 可调微量加样器 (Eppendorf, 德国); XH-C型涡旋混匀仪 (金坛市国旺实验仪器厂); 低温离心机 (Centrifuge 5424 R, Eppendorf)。

[0033] 各种溶液的配制

(1) 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲溶液:准确称取3.0285 g三(羟甲基)氨基甲烷,用MilliQ水溶解后用1.0 mol/L HCl调节pH为8.5 (用之前转移至干净的高压瓶中,经高温高压灭菌处理后,冷却至室温后方可使用)。

[0034] (2) 0.01 mol/L Luminol储备液:准确称取Luminol 0.1772 g,用1 mol/L NaOH定容于100 mL棕色容量瓶中,避光4℃放置3~5天后使用,使用时用0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲溶液稀释至所需浓度。

[0035] (3) BIP (对羟基联苯) 储备液:准确称取0.0596 g BIP,用N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解定容于100 mL棕色容量瓶中,配成 3.5×10^{-3} mol/L的储备液,4℃保存备用。

[0036] (4) 化学发光底液A:取1 mL Luminol储备液,143 μ L 3.5×10^{-3} mol/L的BIP溶液,用1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 的缓冲溶液稀释定容至10 mL棕色容量瓶中,现配现用。

[0037] (5) 化学发光底液B:取30%的H₂O₂溶液15.3 μ L,用Milli-Q超纯水溶解,定容于25 mL容量瓶中,现配现用。

[0038] (6) Fe₃O₄@McAb_{DNMT1}原液的配制方法包括以下步骤:

1) 清洗: 将羧基化 Fe_3O_4 纳米颗粒悬浮液经超声、磁分离弃上清处理后采用浓度为 $0.01 \sim 0.015 \text{ mol/L}$ 、 pH 为6.0的MES缓冲液对其平衡2 min~5 min, 然后进行磁分离弃上清得到第一沉淀物; 其中MES代表吗啉乙磺酸缓冲液;

2) 活化: 向所述第一沉淀物中依次加入浓度为 $8 \sim 10 \text{ mg/mL}$ 的EDC溶液和浓度为 $8 \sim 11 \text{ mg/mL}$ 的NHS溶液进行涡旋反应 $10 \sim 15 \text{ min}$, 磁分离、弃上清处理后采用MES缓冲液对其洗涤3次, 然后再进行磁分离、弃上清处理得到第二沉淀物; 其中, EDC代表(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液、NHS代表N-羟基琥珀酰亚胺溶液、MES代表吗啉乙磺酸缓冲液、 mg/mL 代表毫克每毫升;

3) 缓冲体系转换: 采用PBS缓冲液对所述第二沉淀物洗涤3~4次, 磁分离得到第三沉淀物;

4) 偶联: 向所述第三沉淀物中加入DNMT1单克隆抗体和PBS缓冲液进行涡旋反应 $1.5 \sim 2 \text{ h}$, 经磁分离、弃上清处理后采用PBS缓冲液对其清洗2次, 磁分离、弃上清得到第四沉淀物;

5) 封闭: 向所述第四沉淀物中加入BSA封闭液, 进行涡旋反应 $0.5 \sim 1 \text{ h}$, 磁分离、弃上清处理后, 采用PBST缓冲液清洗3~4次, 磁分离、弃上清得到第四沉淀物即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$; 其中BSA封闭液代表牛血清白蛋白封闭液;

6) 保存: 在偶联产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 中加入PBS缓冲液, 轻晃摇匀, 制得出所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液, 4°C 保存备用。

[0039] 本发明提供一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法, 该检测DNMT1方法对应的检测原理如图1所示。该检测DNMT1的方法具体步骤包括: 封闭预处理、加磁性单克隆抗体、加抗原、加多克隆抗体、加酶标二抗、加化学发光底液、发光检测及建立回归方程等步骤。其中, 各个步骤具体内容如下:

封闭预处理将封闭液加到聚苯乙烯微孔板中依次进行温育和第一阶段洗板处理, 具体地, 向所述聚苯乙烯微孔板——96孔聚苯乙烯白色板中的每孔加入 $300 \mu\text{L}$ 封闭液(0.5% BSA/PBS溶液), 置于 37°C 恒温培养箱中温育 90 min , PBST洗板3次, 拍干, 以避免包被不均的问题, 同时解决了非特异性吸附。

[0040] 加磁性单克隆抗体向经过第一阶段洗板处理的聚苯乙烯微孔板中加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释液并进行磁分离和第二阶段洗板处理, 使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第一复合物, 该第一复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 结构, 其中, 所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 为表面被DNMT1小鼠抗人单克隆抗体共价修饰的 Fe_3O_4 纳米免疫磁珠; 具体地, 用 0.01 mmol/L $\text{pH} 7.4$ 的PBS以 $1:40$ 的稀释比稀释 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 原液, 每孔加 $100 \mu\text{L}$, 磁分离, PBST洗板3次, 在所述聚苯乙烯微孔板的各孔中形成所述第一复合物。

[0041] 加抗原向悬浮有所述第一复合物的聚苯乙烯微孔板中加入DNMT1标准抗原溶液或待测抗原溶液, 并依次进行温育、磁分离和第三阶段洗板处理, 使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第二复合物, 该第二复合物具有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{McAb}_{\text{DNMT1}}@\text{Ag}_{\text{DNMT1}}$ 结构; 具体地, 用 0.01 mmol/L PBS $\text{pH} 7.4$ 的缓冲溶液将DNMT1抗原标准品稀释为 0.001 、 0.005 、 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.5 、 1 、 2 、 4 、 8 、 16 、 32 、 64 、 128 ng/mL 等15个不同浓度, 以 $\text{pH} 7.4$ PBS缓冲溶液为空白对照, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 置于 37°C 恒温培养箱中温育 90 min , 磁分离, 用PBST洗板3次, 在所述聚苯乙烯微孔板的各孔中形成所述第二复合物。

[0042] 加多克隆抗体向悬浮有所述第二复合物的聚苯乙烯微孔板中加入兔抗人多克隆

抗体PAb_{DNMT1}稀释液,并依次进行温育、磁分离和第四阶段洗板处理,使得所述聚苯乙烯微孔板悬浮有第三复合物,该第三复合物具有Fe₃O₄@McAb_{DNMT1}@Ag_{DNMT1}@PAb_{DNMT1}结构;具体地,用含0.5% BSA/PBS缓冲溶液将浓度为1 mg/mL的兔抗人多克隆抗体PAb_{DNMT1}溶液稀释2000倍,每孔加入100 μL,置于37℃恒温培养箱中温育90 min,磁分离,用PBST洗板3次,在所述聚苯乙烯微孔板的各孔中形成所述第三复合物。

[0043] 加酶标二抗向悬浮有所述第三复合物的聚苯乙烯微孔板中加入酶标二抗稀释液,并依次进行温育、磁分离和第五阶段洗板处理,且所述聚苯乙烯微孔板中悬浮有第四复合物,该第四复合物具有Fe₃O₄@McAb_{DNMT1}@Ag_{DNMT1}@PAb_{DNMT1}@酶标二抗结构;具体地,用含0.5% BSA的PBS溶液将浓度为2 mg/mL的HRP-Second-Ab溶液稀释4000倍,每孔加入100 μL,置于37℃恒温培养箱中温育90 min,磁分离,用PBST洗板5次,在所述聚苯乙烯微孔板的各孔中形成所述第四复合物。

[0044] 加化学发光底液向悬浮有所述第四复合物的聚苯乙烯微孔板中依次加入发光底液和过氧化氢溶液进行化学发光处理,形成化学发光溶液,其中,所述发光底液中包括鲁米诺和羟基联苯;具体地,聚苯乙烯微孔板上每孔各加入100 μL所述化学发光底液A和所述化学发光底液B,在所述聚苯乙烯微孔板的各孔中形成所述化学发光溶液,其中,所述化学发光底液A包括浓度为0.001mol/L的鲁米诺和 5×10^{-5} mol/L的发光增强剂羟基联苯。

[0045] 发光检测及建立回归方程采用化学发光检测仪上检测所述聚苯乙烯微孔板上各孔中的化学发光溶液的发光强度值,每个浓度的标准抗原溶液或待测抗原溶液平行6个孔,根据检测的所述发光强度与所述DNMT1标准抗原溶液或待测抗原溶液浓度之间的关系,建立检测DNMT1的回归方程。

[0046] 由此可见,本发明提供的一种上述基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法主要涉及化学发光体系HRP-Luminol-H₂O₂-BIP体系和免疫反应体系,该两个体系对检测结果有重要的影响。下面就这两个体系的影响因素对检测结果的影响,进一步阐述本发明提供的上述基于磁性分离的化学发光酶免疫检测DNMT1的方法。

[0047] 化学发光体系的影响因素

对于一个化学发光体系来说,化学发光强度易受到化学反应条件,如pH、离子强度、溶液组成、温度等影响。通常Luminol和H₂O₂的化学反应速率相对缓慢,但在HRP的催化作用下,反应速率大大提高。HRP活性高,稳定性好,是CLEIA方法中最常用的酶。利用Luminol、H₂O₂作为化学发光底物,发光强度依赖于免疫反应中酶的浓度,因此对HRP进行考察,验证HRP-Luminol-H₂O₂发光体系作为反应体系的可行性。在碱性水溶液中,Luminol可以被氧化生成激发态的中间体,该中间体通过发射光辐射跃迁回到基态;H₂O₂作为化学发光体系的反应物,将Luminol氧化成激发态的氧化剂,又被HRP专一性催化,使化学发光强度增大。因此,需要对二者进行考察。苯酚类物质作为Luminol-H₂O₂-HRP体系的增强剂,加入后化学发光强度增强,发光时间更持久,在短时间内保持稳定,所以,BIP作为增强剂对该发光体系产生影响;Luminol的最适化学发光pH为11.5,但HRP的最适pH为7.0,在室温下,几周内保持稳定,两者的最适pH值不一样,所以不同的pH对RLU有一定的影响,因此,也需要对该发光体系的pH(即Luminol的稀释液)进行考察。

[0048] 所以,下面就HRP浓度、Luminol浓度、H₂O₂浓度、BIP的浓度以及Luminol的稀释液等影响因素,对HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系的影响作进一步分析。

[0049] 1.1 HRP浓度对HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的催化作用

在其它条件相同的情况下,对浓度范围在 1×10^{-6} mol/L $\sim 15 \times 10^{-6}$ mol/L之间的HRP对HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的催化影响进行检测,检测结果如图2所示:随着HRP浓度的增大,HRP-Luminol-H₂O₂体系的RLU值先增大,后趋于平稳,呈现正相关性。因此,用HRP-Luminol-H₂O₂体系作为反应体系具有可行性。

[0050] 1.2 Luminol浓度对HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的影响

在其它条件相同的情况下,对浓度范围为0.4 mmol/L ~ 1.4 mmol/L的Luminol对HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的影响进行检测,检测结果如图3所示:RLU值随着Luminol浓度的增加而增大,Luminol浓度在1.4 mmol/L处RLU达到最大,但考虑到实际情况,选择增速最快的1.0 mmol/L为Luminol的最优浓度。

[0051] 1.3 H₂O₂浓度对HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的影响

在其它条件相同的情况下,对浓度范围为0.5 mmol/L ~ 12 mmol/L的H₂O₂对HRP-Luminol-H₂O₂发光体系的影响进行检测,检测结果如图4所示:H₂O₂浓度为6 mmol/L时RLU值相对较高且精密度良好,浓度为12 mmol/L时RLU值增幅不明显,故选择6 mmol/L为H₂O₂的最优浓度。

[0052] 1.4 BIP浓度对HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系的影响

在其它条件相同的情况下,以BIP浓度为 5×10^{-5} mol/L的HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系作为测定实验组(加BIP),以HRP-Luminol-H₂O₂发光体系作为对照组(不加BIP),测定时间1 s,来测定动力学时间与RLU值的关系以考察BIP对发光体系的增强作用,测定结果如图5所示。图5的动力学曲线表明,相对于对照组化学发光强度,BIP的加入使RLU值明显增大,可见BIP对化学发光体系增强效果明显。

[0053] 在其它条件相同的情况下,浓度范围为 0.5×10^{-5} mol/L $\sim 10 \times 10^{-5}$ mol/L的BIP对HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系的影响进行检测,检测结果如图6所示:在最优Luminol及H₂O₂浓度条件下,当BIP的浓度为 5×10^{-5} mol/L时,RLU值达到最大,浓度越大,反而抑制了化学发光,因此选择BIP浓度为 5×10^{-5} mol/L。

[0054] 1.5 pH值对HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系的影响

分别采用实验室常用的4种缓冲溶液:pH 7.4的PBS、pH 8.5的Tris-HCl、pH 9.6的CB、pH 10.2的Tris-HCl来稀释HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系来考察pH值对HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系的影响。考察结果如图7所示。从图7中可以看出:用pH 8.5的Tris-HCl稀释Luminol,RLU值最大;因此选择pH 8.5的Tris-HCl作为HRP-Luminol-H₂O₂-BIP发光体系的稀释液。

[0055] 免疫反应体系的影响因素

免疫反应体系的各因素对RLU值影响很大。本发明提供的检测方法中的免疫反应体系引入了免疫磁珠作为固相载体,可能会对发光强度产生影响;免疫试剂相互作用的时间是决定检测灵敏度的关键参数之一,固相抗体与抗原作用时间也影响着捕获效率,进而影响着检测灵敏度;多克隆抗体、酶标二抗是影响灵敏度和线性范围两个重要因素;因此下面需要对免疫磁珠的浓度对化学发光体系的作用及稀释比、免疫反应时间、多克隆抗体稀释比、酶标二抗稀释比等因素。

[0056] 2.1 免疫磁珠Fe₃O₄@McAb_{DNMT1}对HRP-Luminol-H₂O₂-BIP化学发光体系的影响及稀

释比优化

按照1:320、1:160、1:80、1:40、1:20、1:10、1:5的比例配制一系列羧基化免疫磁珠，Luminol、 H_2O_2 、BIP按照上述“1. 化学发光体系的影响因素”中的优化浓度进行测定，每个稀释浓度平行3个孔，然后测定不同稀释比的免疫磁珠下，化学发光体系的RLU值。测定结果图8所示：随着免疫磁珠浓度的不断增大，RLU依次降低，背景值的降低，有利于提高方法的灵敏度；但免疫磁珠不是越多越好，越多反而使化学发光强度降低。可能是由于 Fe_3O_4 具有一定的粒径而且 Fe_3O_4 颜色略深，对发射光吸收造成的（主要原因在于光通过固体后，其强度会减弱，是因为一部分光能量被固体吸收）；或者对化学发光产生的光量子效应有一定的淬灭作用，或者对光有一定的遮蔽效应，使化学发光强度降低的机理尚不明确。因此，必须对免疫磁珠的浓度进行优化。

[0057] 在DNMT1抗原浓度为0 ng/mL和100 ng/mL，且其它条件相同的情况下，测定不同稀释倍数1:5、1:10、1:20、1:40、1:80的免疫磁珠 $Fe_3O_4@McAb_{DNMT1}$ 对化学发光强度的影响，测定结果如图9所示。理论上，稀释比越小，负载的抗体量越多，RLU应该越大，但是，从图9中可以看出：稀释比低时， Fe_3O_4 的量越多，RLU反而越低，呈一定的负相关性。 $Fe_3O_4@McAb_{DNMT1}$ 的稀释比为1:80时，负载的 $McAb_{DNMT1}$ 量少，RLU同样减弱。 $Fe_3O_4@McAb_{DNMT1}$ 的稀释比为1:40时，RLU达到最大，且与背景的差值也最大，因此选择1:40作为 $Fe_3O_4@McAb_{DNMT1}$ 的最优稀释比。

[0058] 2.2 免疫反应时间的优化

在DNMT1抗原液的浓度为100 ng/mL和其他条件相同的情况下，分别对免疫反应作用时间30 min、60 min、90 min、120 min时的RLU值进行了测定，测定结果如图10所示。从图10中可以看出：固相抗体与待测抗原DNMT1的反应时间为90 min、120 min时RLU值相对较高，但90 min之后RLU值变化不明显，表明抗原-抗体复合物的结合达到了平衡，考虑到时间成本，因此反应时间选择90 min。同时，后续与 $PcAb_{DNMT1}$ 、HRP-Second-Ab作用时间均选择为90 min。

[0059] 2.3 多克隆抗体 $PcAb_{DNMT1}$ 稀释比的优化

用pH 7.4的0.5% BSA/PBS将 $PcAb_{DNMT1}$ 稀释5个不同的倍数，分别为500、1000、2000、3000、4000，然后分别测定不同稀释倍数下DNMT1抗原浓度为100 ng/mL的化学发光值RLU；同时以DNMT1抗原浓度为0 ng/mL为空白对照，测定 RLU_0 ；然后以二者差值 ΔRLU 作图，如图11所示。从图11中可以看出：当多克隆抗体的稀释比1:2000时，二者的差值 ΔRLU 最大，因此，多克隆抗体的最佳稀释比为1:2000。

[0060] 2.4 酶标二抗HRP-Second-Ab稀释比的优化

用pH 7.4的0.5% BSA/PBS将HRP-Second-Ab稀释5个不同的倍数，分别为1000、2000、4000、6000、8000，然后分别测定不同稀释倍数下DNMT1浓度为100 ng/mL的化学发光值RLU；同时以DNMT1浓度为0 ng/mL为空白对照，测定 RLU_0 ；再以二者差值 ΔRLU 作图，如图12所示。从图12中可以看出：当HRP-Second-Ab的稀释比1:4000时，二者的差值 ΔRLU 最大，因此，酶标抗体的最佳稀释比为1:4000。

[0061] 标准曲线的建立

用pH 7.4的PBS缓冲溶液将DNMT1标准品稀释为9个不同浓度，分别为0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、8.0 ng/mL、16 ng/mL、32 ng/mL、64 ng/mL、128 ng/mL；同时测定了5个低浓度的DNMT1，浓度分别为：0.001 ng/mL、0.005 ng/mL、0.01 ng/mL、0.05 ng/mL、

mL、0.1 ng/mL;然后按上述“1. 化学发光体系的影响因素”和“2. 免疫反应体系的影响因素”中优化后的实验条件进行测定,每个浓度平行6次,测定结果如下表1所示:

表1 DNMT1的MCLEIA数据 (n=6)

C (ng/mL)	lgC	RLU(平均值)	lgRLU
0.001	-3	86410.67	4.9366
0.005	-2.301	91671.67	4.9622
0.01	-2	97256	4.9879
0.05	-1.301	101291.33	5.0056
0.1	-1	103208.67	5.0137
0.5	-0.30103	112793.33	5.0523
1	0	126400.67	5.1018
2	0.30103	147232	5.1680
4	0.60206	154995.33	5.1903
8	0.90309	166701	5.2219
16	1.20412	178942.33	5.2527
32	1.50515	186859	5.2715
64	1.80618	196395.33	5.2931
128	2.10721	216303.67	5.3351

抗原DNMT1浓度在0.001~128 ng/mL范围内,以 C_{DNMT1} 为横坐标,RLU为纵坐标绘制曲线如图13所示。根据表1所测定的数据,将抗原DNMT1浓度在0.5~128 ng/mL范围内及其所对应的RLU/RLU₀,分别用四种不同的形式进行线性拟合,得到不同的线性方程及其相关系数 R ,选取 R 最接近1的线性曲线作为最终的标准曲线。四种不同方法拟合的标准曲线及其对应的相关系数 R ,如下表2所示。在0.5~128 ng/mL浓度范围内,RLU/RLU₀与lgC呈良好的线性关系,线性方程为 $y=0.50143x+1.76886$ (y 为RLU/RLU₀, x 为 $\log C_{DNMT1}$),相关系数 R 为0.9907。

[0062] 表2 四种不同形式拟合的标准曲线及相关系数

拟合曲线	线性方程	相关系数 R
RLU/RLU ₀ -C	$y=0.00853x+1.96342$	0.8173
lgRLU/RLU ₀ -C	$y=0.00163x+0.28888$	0.7615
RLU/RLU ₀ -lgC	$y=0.50143x+1.76886$	0.9907
lgRLU/RLU ₀ -lgC	$y=0.10933x+0.23649$	0.9846

4. 本发明提供的检测DNMT1的方法验证试验

4.1 灵敏度

测定6个低浓度的DNMT1抗原样品的RLU值,检测结果见表3,同时检测6个DNMT1空白样品,为74887.67,SD为6479.979,求出+3SD的值为94327.607,RLU_(0.01)>94327.607,因此该方法的检测限为0.01 ng/mL。

[0063] 表3 低浓度DNMT1的MCLEIA检测结果

C _{DNMT1} (ng/mL)	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5
RLU (平均值)	86410.67	91671.67	97256	101291.33	103208.67	112793.33

注:MCLEIA为基于磁性分离的化学发光酶联免疫分析,即本发明提供的检测方法

4.2 精密度和准确度

在96聚苯乙烯微孔板中分别加入100 μL浓度为0.5 ng/mL、4.0 ng/mL、32.0 ng/mL三个浓度的DNMT1标准样品,每个浓度平行6次;另取一个96聚苯乙烯微孔板同样分别加入100 μL低、中、高三个浓度的DNMT1标准样品,浓度分别为0.5 ng/mL、4.0 ng/mL、32.0 ng/mL,每个浓度平行6次,分别检测它们的RLU值,然后分别计算板内和板间的RSD及回收率,结果如表4所示。该检测DNMT1的方法的板内和板间RSD范围分别为14.3%~18.1%和15.8%~16.9%(n=6),精密度良好;板内和板间回收率范围分别为70.0%~106.2%、78.4%~116.8%(n=6),浓度为4.0 ng/mL和32.0 ng/mL时中、高浓度的回收率较好,低浓度的回收率偏低。

[0064] 表4 板内和板间精密度及准确度(n=6)

DNMT1的 量(ng/mL)	板内			板间		
	$\bar{X} \pm SD$	回收率 (%)	RSD (%)	$\bar{X} \pm SD$	回收率 (%)	RSD (%)
0.5	0.350±0.064	70.0	18.1	0.392±0.066	78.4	16.8
4.0	4.248±0.609	106.2	14.3	4.671±0.788	116.8	16.9
32.0	33.305±5.228	104.1	15.7	34.184±5.388	106.8	15.8

4.3 特异性

建立的基于磁性分离的化学发光酶联免疫分析(MCLEIA)方法要用于血清样品中DNMT1的检测,由于血清中的成分复杂,要求建立的MCLEIA方法对DNMT1具有较高的特异性,因此选择了两种与DNMT1结构相似的,可能与DNMT1抗体发生特异性反应的同族DNMTs,如DNMT3A和DNMT3B,分别配制64 ng/mL的DNMT1, DNMT3A, DNMT3B,验证特异性;将测得的RLU/RLU₀值带入到标准曲线 $y=0.50143x+1.76886$ 中,计算交叉反应率,结果如表5所示。

[0065] 从表5的数据可以看出:64 ng/mL的DNMT3A, DNMT3B与DNMT1交叉反应率分别为0.31%和0.34%,交叉反应率低,说明McAb_{DNMT1}对其它DNMTs无特异性反应,因此建立的MCLEIA方法测定DNMT1特异性良好,可以用于实际样品的检测。

[0066] 表5 MCLEIA测定DNMT1的特异性(n=6)

DNMT 种类	加入量 (ng/mL)	RLU _{平均}	RLU _{平均} /RLU ₀	相对 DNMT1 值	交叉反应率 (%)
DNMT1	64.0	189384.83	2.65	57.98	90.6
DNMT3A	64.0	94463.83	1.42	0.20	0.31
DNMT3B	64.0	95749.33	1.44	0.22	0.34

注:MCLEIA为基于磁性分离的化学发光酶联免疫分析,即本发明提供的检测方法

4.4 血清样品的加标回收率

由于血清中DNMT1的含量较低,加上个体的差异性,有时无法对其进行定量分析,所以在选择加标回收率的本底样品时,本实验采用试剂盒检测出的低值血清:DNMT1浓度为0.24 ng/mL作为本底对照,分别在低值血清中加入低、中、高三个浓度的DNMT1标准样品,浓度分别为1 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL,测定加标血清的RLU,每个浓度样品平行3次,根据下面的公式(1)计算血清样品中的加标回收率,结果如表6所示,MCLEIA的加标回收率范围为66.8%~118.8%之间,与无血清的板内加标回收率70.0%~106.2%、板间加标回收率78.4%~116.8%相比,都是低浓度样品加标回收率低,中、高浓度的回收率较好。

$$[0067] \quad \text{加标回收率} = \frac{\text{加标血清测定值} - \text{样本本底值}}{\text{加标量}} \times 100\% \quad \text{公式 (1)}$$

表6 MCLEIA 血清样本中的加标回收率 (n=3)

DNMT1 浓度 (ng/mL)	实测值(ng/mL)	本底值(ng/mL)	回收率(%)
1	0.908	0.24	66.8
50	59.16	0.24	118.8
100	97.6	0.24	97.36

注:MCLEIA为基于磁性分离的化学发光酶联免疫分析,即本发明提供的检测方法

从上面的各种试验可以看出:本发明实施例提供的检测DNMT1的方法构建了一种新型的化学发光新体系HRP-Luminol-H₂O₂-BIP,以免疫磁珠作为固相载体,结合微孔板聚苯乙烯微孔板多样本同时检测的统一性和磁珠磁分离的优点,将化学发光的高灵敏性、抗原抗体反应的高特异性和酶催化的高效专一性三者有机结合起来,建立双抗夹心法对DNMT1进行测定。

[0068] 通过对影响体系发光的各项因素进行优化,最优反应条件为:Luminol浓度为1.0 mmol/L,H₂O₂的浓度为6 mmol/L,BIP的浓度为 5×10^{-5} mol/L,反应体系缓冲液为pH为8.5的Tris-HCl;同时对免疫反应体系的各项因素进行了优化,最优反应条件为:Fe₃O₄@McAb_{DNMT1}稀释比为1:40,孵育时间90 min,PcAb_{DNMT1}稀释比为1:2000,HRP-Second-Ab稀释比为1:4000。在优化后条件下,DNMT1在0.5~128 ng/mL浓度范围内,RLU/RLU₀与lgC呈良好的线性关系,线性方程为 $y=0.50143x+1.76886$ (y为RLU/RLU₀,x为logC_{DNMT1}),相关系数R为0.9907,检测限为0.01 ng/mL;板内和板间精密度分别为14.3%~18.1%和15.8%~16.9%(n=6);板内和板间回收率范围分别为70.0%~106.2%、78.4%~116.8%(n=6);与DNMT3A,DNMT3B的交叉反应率分别为0.31%和0.34%,交叉反应率低,特异性好;通过向血清样本中加入一定量的

DNMT1进行加标回收率的计算,加标回收率范围在66.8%~118.8%之间,在免疫试剂盒的开发中,是可以接受的。利用BIP放大化学发光信号,提高化学发光免疫检测的灵敏度。

[0069] 因此,本发明提供的上述检测DNMT1的方法,引入磁性纳米颗粒作为免疫固相,使得HRP-Luminol-H₂O₂-BIP增强化学发光酶联免疫分析体系检测DNMT1的检测限又降低了一个数量级,并将线性范围限定在一个较低的浓度范围,和人体内的常量范围一致,表明该方法用于DNMT1的检测是可行的。

[0070] 最后应当说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其限制;尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明,所属领域的普通技术人员应当理解:依然可以对本发明的具体实施方式进行修改或者对部分技术特征进行等同替换;而不脱离本发明技术方案的精神,其均应涵盖在本发明请求保护的技术方案范围当中。

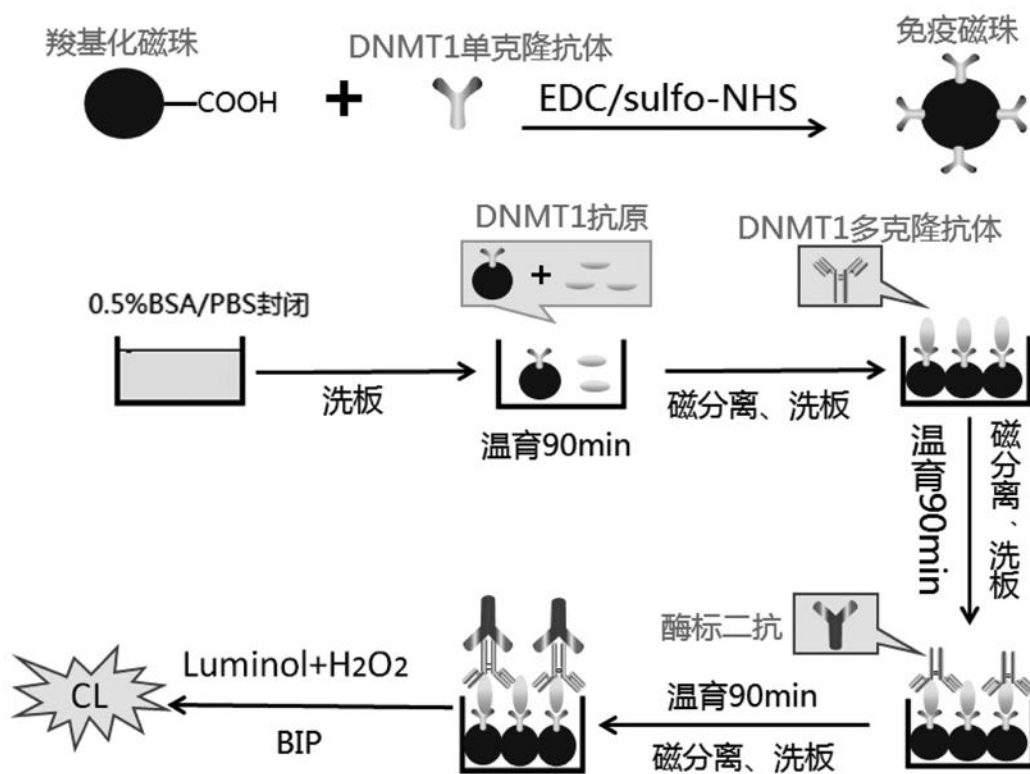


图1

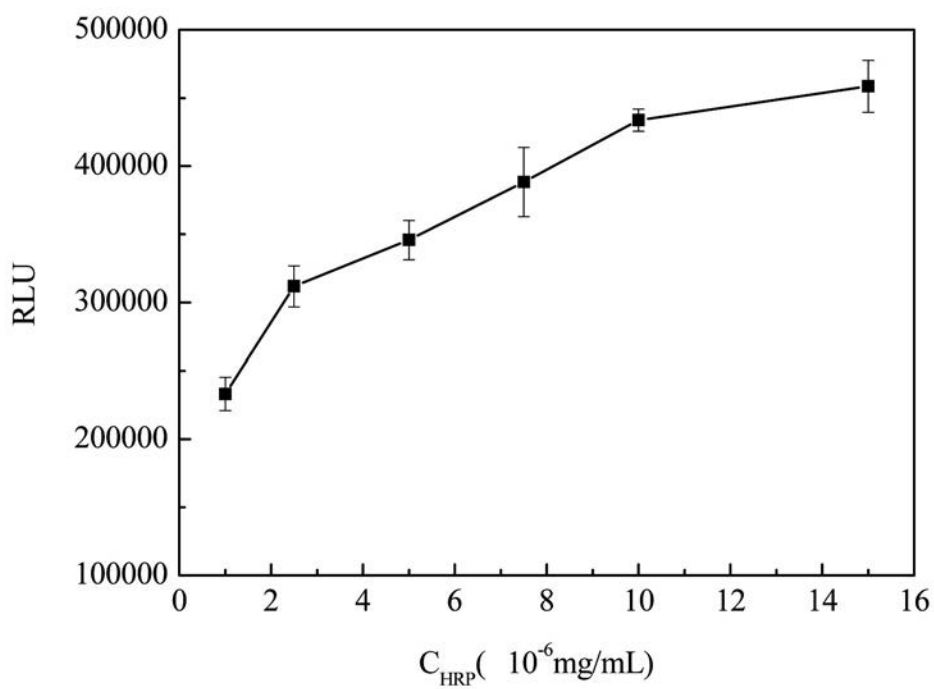


图2

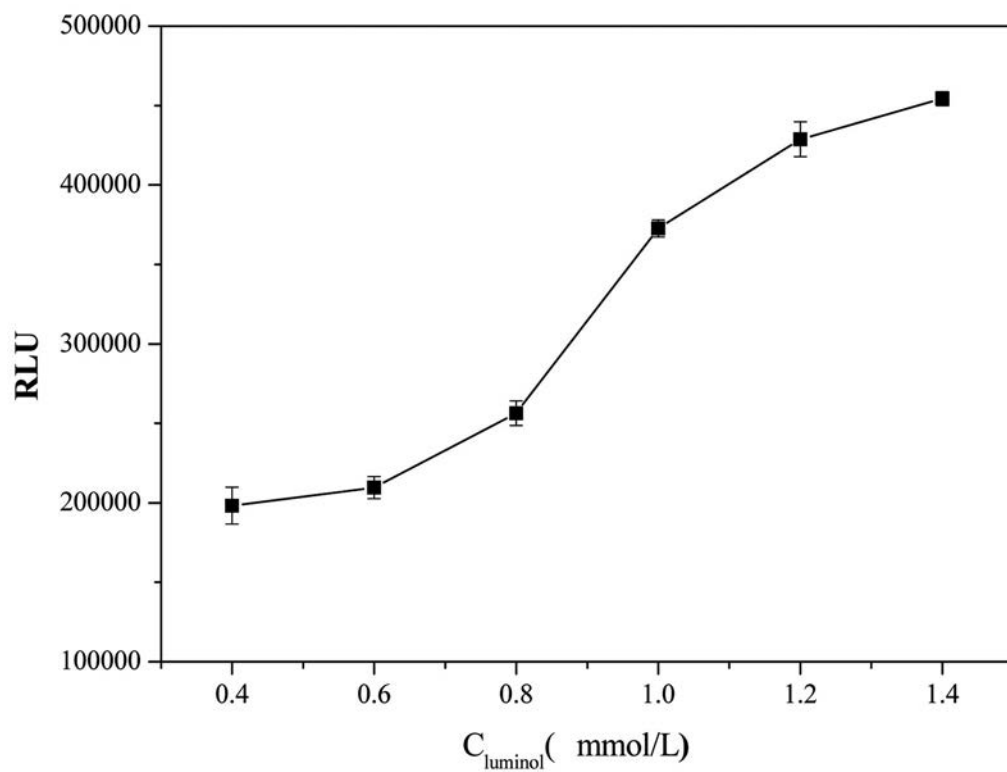


图3

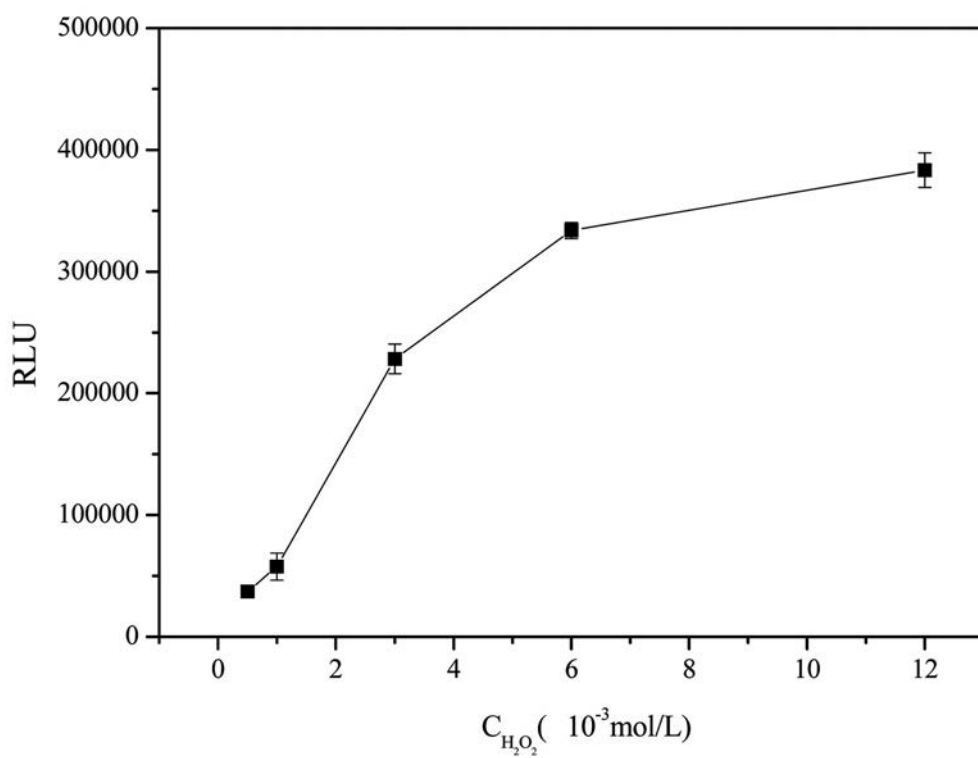


图4

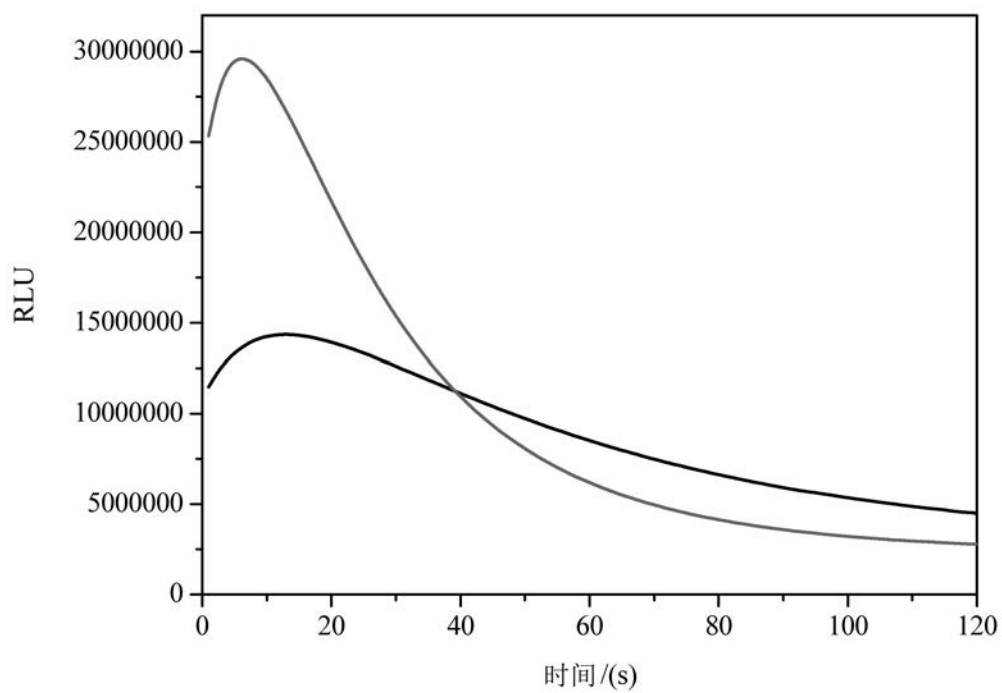


图5

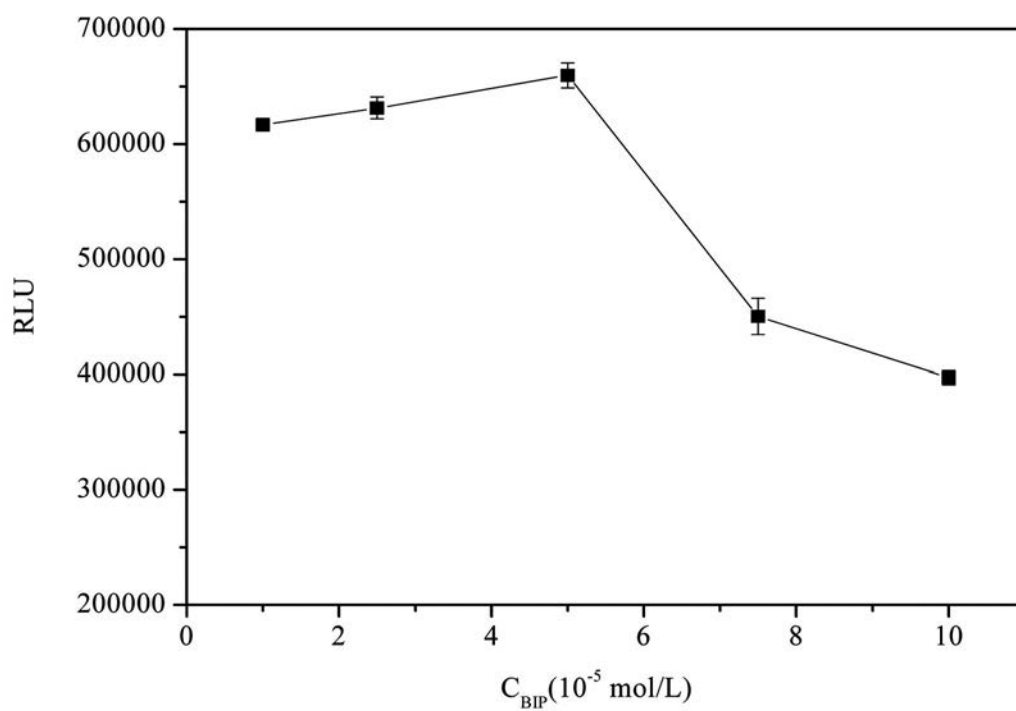


图6

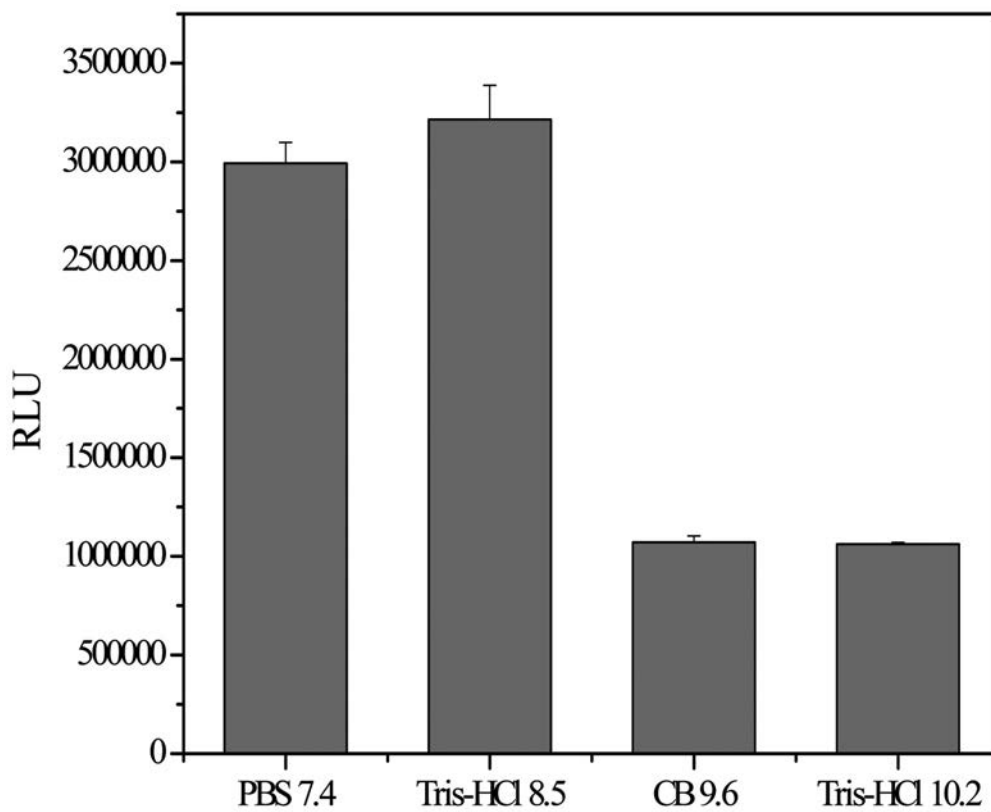


图7

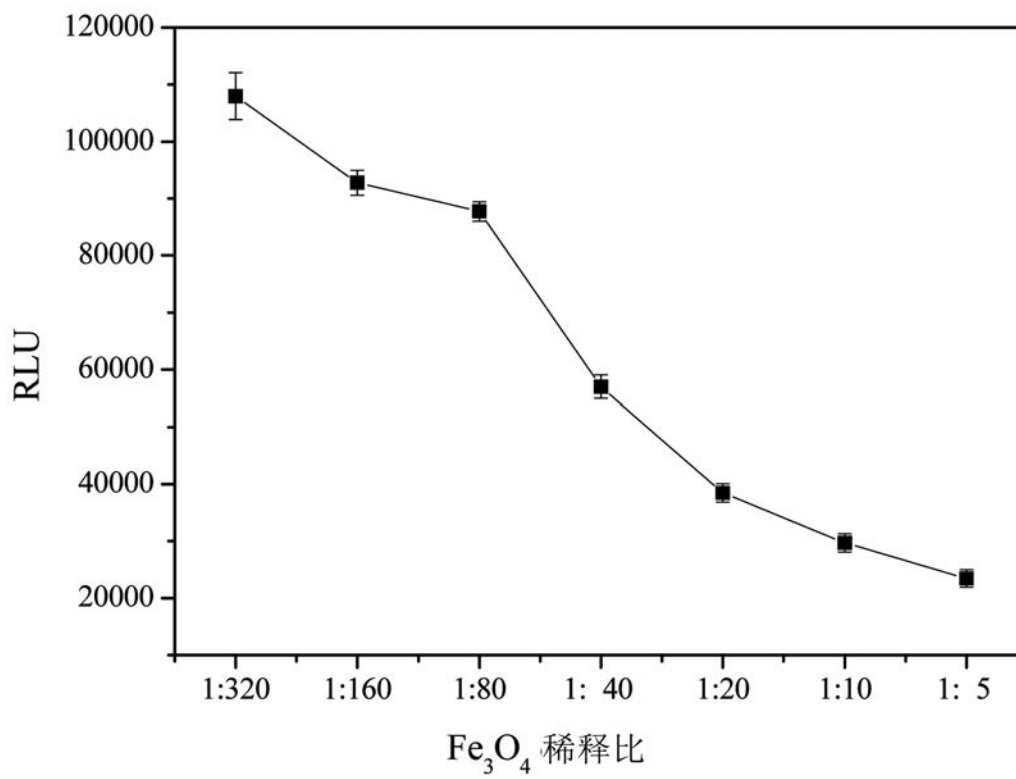


图8

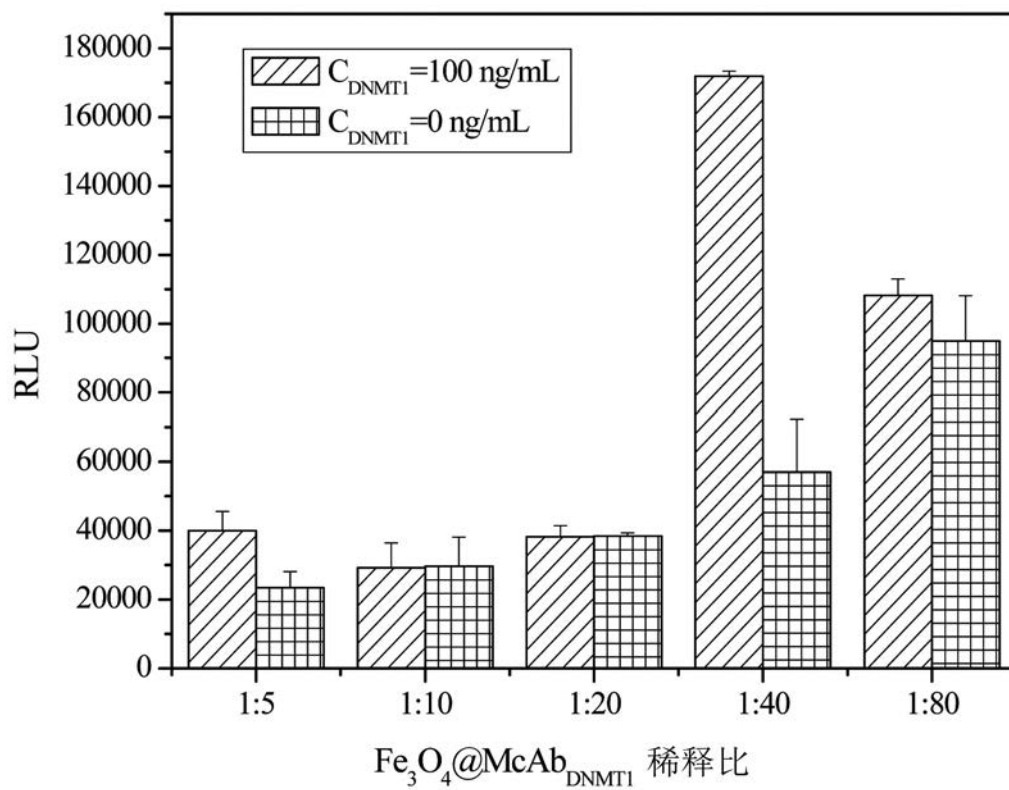


图9

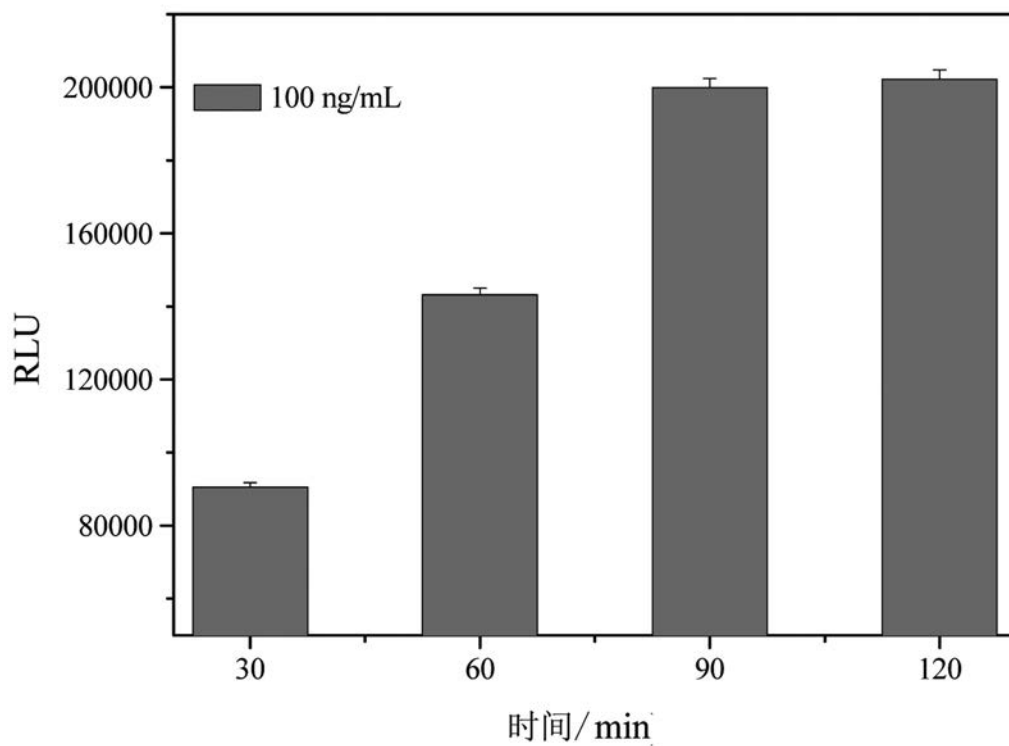


图10

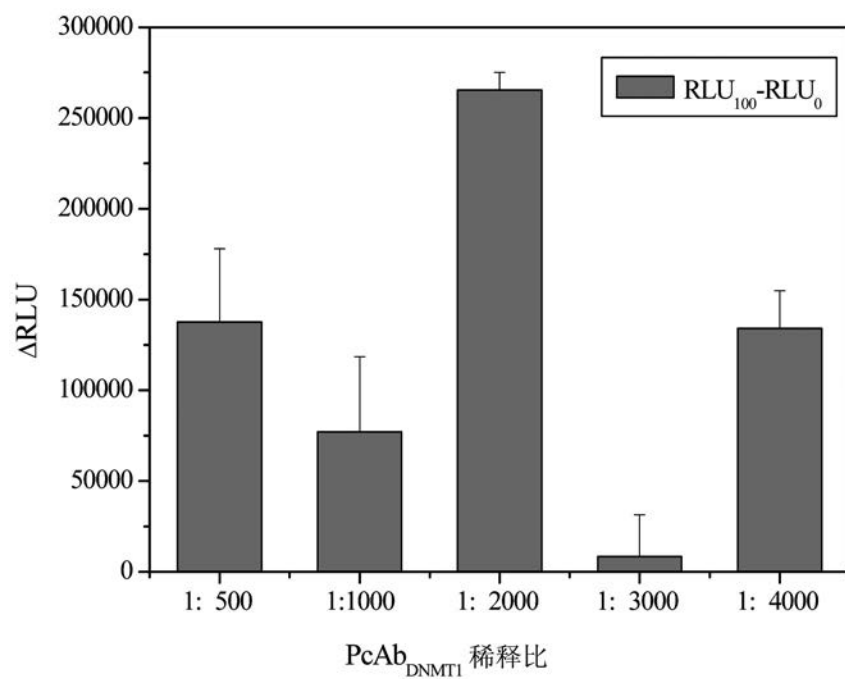


图11

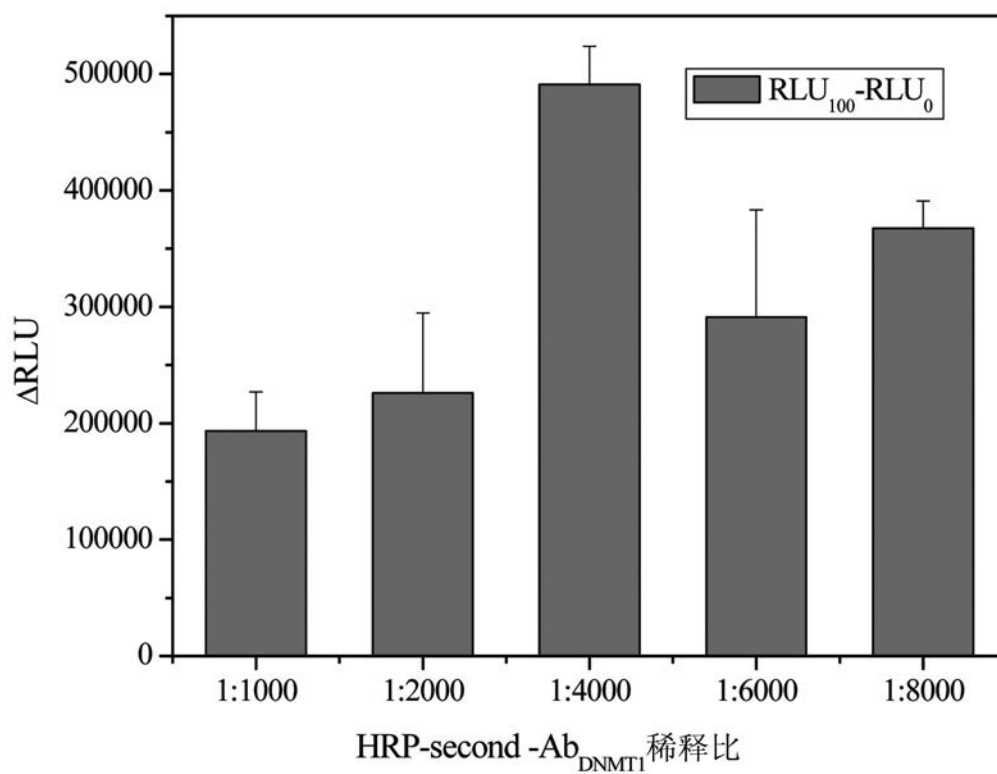


图12

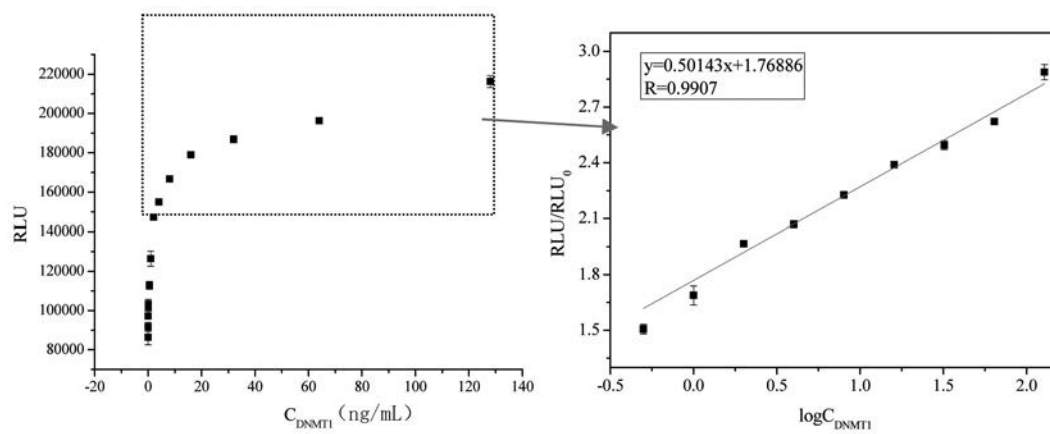


图13

专利名称(译)	基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法		
公开(公告)号	CN109406772A	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201811286030.8	申请日	2018-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	吴拥军 于斐 刘贝贝 玉崧成 何磊良 刘利娥 屈凌波 田咏梅 王佳 王威 王艺琳		
发明人	吴拥军 于斐 刘贝贝 玉崧成 何磊良 刘利娥 屈凌波 田咏梅 王佳 王威 王艺琳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/541 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/541		
代理人(译)	王莉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于磁性分离的化学发光酶联免疫检测DNMT1的方法，包括：封闭预处理、加磁性单克隆抗体、加抗原、加多克隆抗体、加酶标二抗、加化学发光底液、发光检测及建立回归方程等步骤。本发明提供的上述方法构建一种新型的化学发光新体系HRP-Luminol-H₂O₂-BIP，以免疫磁珠作为固相载体，结合聚苯乙烯微孔板多样本同时检测的统一性和磁珠磁分离的优点，将化学发光的高灵敏性、抗原抗体反应的高特异性和酶催化的高效专一性三者有机结合起来，建立双抗夹心法对DNMT1进行测定。

