



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106896229 A

(43)申请公布日 2017.06.27

(21)申请号 201710204763.1

(22)申请日 2017.03.31

(66)本国优先权数据

201611060121.0 2016.11.28 CN

(71)申请人 江西科技师范大学

地址 330000 江西省南昌市红谷滩新区红
角洲学府大道589号

(72)发明人 刘仁荣

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

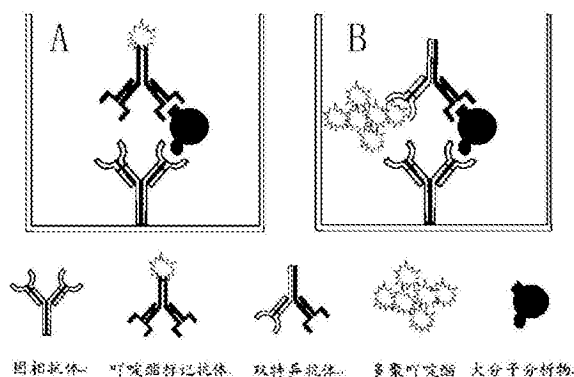
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法

(57)摘要

本发明提供了一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,该方法在常规双抗夹心型CLIA方法基础上针对化学发光剂和抗体结构加以改进,采用了与待测抗原、吖啶酯均有抗原抗体反应活性的双特异性抗体,使吖啶酯与抗体间的结合避免了化学偶联的模式,从而克服了化学偶联模式下抗体上吖啶酯结合量较低的技术问题。再加之本发明所选用的双特异性抗体对吖啶酯具有较高的亲和力(解离常数小于 2×10^{-8}),从而进一步提升了化学发光剂的标记水平。在此基础上,本发明改进了化学发光剂的结构,以多聚体的形式替代单分子的吖啶酯,所得的多聚吖啶酯中单体数量大于20,提高了抗体上结合的吖啶酯数量,从而提高发光强度,可进一步提高CLIA方法的灵敏度。



1. 一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

- 1) 包被待分析抗原的抗体;
- 2) 加入待测样品,混匀;
- 3) 洗涤,而后加入标记有化学发光剂的抗体,混匀;
- 4) 洗涤,而后加入发光启动试剂,检测发光强度;

其特征在于:所述化学发光剂是多聚吖啶酯;步骤3)所述抗体是同时与多聚吖啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述多聚吖啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吖啶酯为单体的多聚体。

3. 根据权利要求1所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述多聚吖啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与吖啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚吖啶酯。

4. 根据权利要求2或3所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述吖啶酯选自吖啶酯AE-NHS,吖啶酯DMAE-NHS,吖啶酯NSP-DMAE-NHS或吖啶磺酰胺内盐NSP-SA-NHS。

5. 根据权利要求2或3所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述多聚吖啶酯分子中,吖啶酯单体的数量大于20。

6. 根据权利要求1所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于步骤3)所述抗体是通过以下方法制备的:

A) 取吖啶酯与载体蛋白偶联,得到吖啶酯人工抗原,利用所述吖啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吖啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A)所得的分泌抗吖啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗吖啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

C) 培养步骤B)所得的四源杂交瘤细胞,收集所述双特异性抗体。

7. 根据权利要求6所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于步骤A)中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吖啶酯单克隆抗体的解离常数小于 2×10^{-8} 。

8. 根据权利要求6所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于步骤C)完成后继续执行步骤D):分别制备所述抗原偶联琼脂糖亲和柱和吖啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用所述抗原\吖啶酯双亲和柱纯化步骤C)所得的双特异性抗体。

9. 根据权利要求1所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于所述分析方法的分析对象是蛋白质,激素或微生物。

10. 根据权利要求1所述的一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,其特征在于该方法的分析对象是甲胎蛋白,该方法具体包括以下操作:取抗甲胎蛋白抗体4℃包被过夜,3%脱脂牛奶封闭半小时后洗板并拍干,而后加入100μL待测样品,37℃保持1h,利用

PBST溶液洗涤4次,而后分半加入50 μ L抗甲胎蛋白\抗吡啶酯双特异性抗体、50 μ L多聚吡啶酯,混匀后于37℃保持1h,利用PBST溶液洗涤4次,而后以100 μ L/孔的量加入NaOH溶液或H₂O₂溶液,检测发光强度RLU。

一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,进一步涉及在CLIA方法框架下对化学发光剂的优化和被标记抗体的结构改良,具体涉及一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法。

背景技术

[0002] 化学发光标记免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA),是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。CLIA是继放免分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。化学发光标记免疫分析包含两个部分,即免疫反应系统和化学发光分析系统,免疫反应系统是利用抗原与抗体的特异性结合原理,特异性的识别待分析物,化学发光分析系统则是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化,形成一个激发态的中间体,当这种激发态中间体回到稳定的基态时,同时发射出光子(hM),利用发光信号)测量仪器可测量光量子产额。将发光物质(可在反应剂激发下生成激发态中间体直接标记在抗原或抗体上,抗体与待测分析物特异性结合,再加入催化剂或氧化剂,通过测定发光强度就可特异性测定待测分析物。

[0003] 化学发光标记免疫分析是通过化学发光物(吖啶酯类化合物等)共价偶联标记抗原或抗体,经启动发光试剂(NaOH、H₂O₂等)作用而发出强闪光的化学发光免疫分析方法。根据取代基的不同,常用作化学发光标记物的吖啶酯类化合物分为两类:吖啶酯和吖啶磺酰胺。它们的结构中都有共同的吖啶环。它们的发光机理相同:在碱性H₂O₂溶液中,分子受到过氧化氢离子进攻时,生成不稳定的二氧乙烷,此二氧乙烷分解为CO₂和电子激发态的N-甲基吖啶酮,当其回到基态时发出最大发射波长为430nm的光子。这类化合物从发光的机理来说特点是:①发光反应中在形成电子激发态中间体之前,联结于吖啶环上的不发光的取代基部分从吖啶环上脱离开来,即未发光部分与发光部分分离,因而其发光效率基本不受取代基结构的影响。②吖啶酯或吖啶磺酰胺类化合物化学发光不需要催化剂,在有H₂O₂的稀碱性溶液中即能发光。因此应用于化学发光检测具有许多优越性。吖啶酯类化合物作为标记物用于免疫分析具有非特异性结合少、与大分子偶联不影响光量和光强度高等特点。

[0004] CLIA方法化学反应简单、灵敏度高、快速、无须催化剂,检测小分子抗原采用竞争法,检测大分子抗原则采用夹心法。传统的双抗体夹心CLIA方法的工作原理是:利用连接于固相载体上的抗体和吖啶酯标记抗体(液相抗体)分别与样品中被检测抗原分子上两个不同的抗原决定簇结合,形成固相抗体-抗原-吖啶酯标记抗体免疫复合物。由于反应系统中固相抗体和吖啶酯标记抗体的量相对于待测抗原是过量的,因此复合物的形成量与待测抗原的含量成正比(在方法可检测范围内)。测定复合物的发光强度,即可确定待测抗原含量。

[0005] 然而,Weeks等在发明CLIA方法时就发现:在双抗体夹心CLIA中,抗体上偶联标记的吖啶酯的量不能太高(n<2.8),否则易造成抗体失活;Hage研究也发现,当提高吖啶酯与抗甲状旁腺激素抗体反应的比例时(2.5μg:50μg),有72%以上的抗体失活,当这一比例降

到0.625 μ g:50 μ g时,仍有30%的抗体失活,需采用亲和柱纯化未失活抗体,操作繁琐、重复性不好。在这种情况下,现有技术中以吖啶酯为发光物的化学发光免疫分析方法普遍仅能在抗体上偶联低剂量的吖啶酯,这导致了检测过程中发光信号的强度较低、直接影响了检测的灵敏性。此外,现有技术中常规的吖啶酯类化合物单位剂量发光水平仍有待提升,如果能在保证抗体结合性能的基础上通过结构改进以提升其化学发光水平,无疑将提升检测的灵敏性。

发明内容

[0006] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,以解决现有技术以吖啶酯为发光物的双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法中,抗体上无法结合较高剂量的吖啶酯类化合物从而制约了检测灵敏性的技术问题。

[0007] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术以吖啶酯为发光物的双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法中,常规的吖啶酯类化合物其发光水平有待提升。

[0008] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术的双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法检测灵敏性较低。

[0009] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0010] 一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 包被待分析抗原的抗体;

[0012] 2) 加入待测样品,混匀;

[0013] 3) 洗涤,而后加入标记有化学发光剂的抗体,混匀;

[0014] 4) 洗涤,而后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0015] 其中:所述化学发光剂是多聚吖啶酯;步骤3)所述抗体是同时与多聚吖啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0016] 作为优选,所述多聚吖啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吖啶酯为单体的多聚体。

[0017] 作为优选,所述多聚吖啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与吖啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚吖啶酯。

[0018] 作为优选,所述吖啶酯选自吖啶酯AE-NHS,吖啶酯DMAE-NHS,吖啶酯NSP-DMAE-NHS或吖啶磺酰胺内盐NSP-SA-NHS。

[0019] 作为优选,所述多聚吖啶酯分子中,吖啶酯单体的数量大于20。

[0020] 作为优选,步骤3)所述抗体是通过以下方法制备的:

[0021] A) 取吖啶酯与载体蛋白偶联,得到吖啶酯人工抗原,利用所述吖啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吖啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0022] B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A)所得的分泌抗吖啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗吖啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

[0023] C) 培养步骤B) 所得的四源杂交瘤细胞, 收集所述双特异性抗体。

[0024] 进一步优选的, 所述小鼠是BALB/c小鼠; 步骤A) 中所述细胞融合是取所述小鼠的脾细胞在50%PEG作用下与对数期生长的SP2/0细胞融合; 细胞融合后对融合子的筛选是利用HAT和HT培养基进行选择培养实现的。

[0025] 作为优选, 步骤A) 中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吖啶酯单克隆抗体的解离常数小于 2×10^{-8} 。

[0026] 作为优选, 步骤C) 完成后继续执行步骤D): 分别制备所述抗原偶联琼脂糖亲和柱和吖啶酯偶联琼脂糖亲和柱, 采用所述抗原\吖啶酯双亲和柱纯化步骤C) 所得的双特异性抗体。

[0027] 作为优选, 所述分析方法的分析对象可以是一切具有二个及以上的不同抗原决定簇(可以与二个及以上的不同抗体结合)的大分子抗原; 具体可以是蛋白质, 激素, 病毒或微生物。

[0028] 作为优选, 该方法的分析对象是甲胎蛋白, 该方法具体包括以下操作: 取抗甲胎蛋白抗体4℃包被过夜, 3%脱脂牛奶封闭半小时后洗板并拍干, 而后加入100μL待测样品, 37℃保持1h, 利用PBST溶液洗涤4次, 而后分半加入50μL抗甲胎蛋白\抗吖啶酯双特异性抗体、50μL多聚吖啶酯, 混匀后于37℃保持1h, 利用PBST溶液洗涤4次, 而后以100μL/孔的量加入NaOH溶液或H₂O₂溶液, 检测发光强度RLU。

[0029] 作为优选, 所述具有多个氨基的蛋白选自BSA, OVA, 壳聚糖或KLH。

[0030] 作为优选, 所述多聚赖氨酸的分子量为15000~100000。

[0031] 在以上技术方案中, 所述发光启动试剂又称为启动发光试剂或启动发光试剂, 是指与作为底物的化学发光剂反应后可生成发光性物质的试剂, 就本申请而言, 以吖啶酯或多聚吖啶酯为化学发光剂时, 发光启动试剂可依据本领域的一般技术常识进行适应性选择, 所选择的发光启动试剂包括但不限于NaOH溶液、或H₂O₂溶液。

[0032] 在以上技术方案中, 所述多聚吖啶酯(Polyacridinium)可自市面购得, 亦可依据本发明提供的制备原理或具体制备方法制备获得。所述双特异性抗体可以通过化学交联法、杂合F(ab')₂分子法、杂交瘤细胞法或基因工程方法制备的, 其具体制备工艺可以依照本领域的一般技术常识进行常规选择, 当然, 也可以根据本发明所提供的制备方法制备获得。

[0033] 在利用本发明方法执行分析时, 可以先利用该方法对一组具有浓度梯度且已知浓度的抗原标准溶液进行分析, 以绘制出抗原浓度与发光强度RLU值之间的线性关系, 而后再对待测样品执行检测, 将检测结果带入上述线性关系以获得实际检测值。其中标注曲线的绘制是利用本发明方法绘制的, 而其中抗原标准溶液浓度梯度的选择、图表模式的选择、误差的校正等可以依照本领域的一般技术常识确定。

[0034] 本发明提供了一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法, 该技术方案在常规的双抗夹心型CLIA方法基础上针对化学发光剂结构和抗体类别加以改进, 采用了与待测抗原、吖啶酯均具有抗原抗体反应活性双特异性抗体, 使吖啶酯与抗体间的结合避免了化学偶联的模式, 从而克服了化学偶联模式下抗体上吖啶酯结合量较低的技术问题。再加之本发明所选用的双特异性抗体对吖啶酯具有较高的亲和力(解离常数小于 2×10^{-8}), 从而进一步提升了化学发光剂的标记水平。在此基础上, 为提升检测的灵敏性, 本发明改进了化学发

光剂的结构,以多聚体的形式替代单分子的吡啶酯,所得的多聚吡啶酯中单体数量大于20,提高了抗体上结合的吡啶酯数量,从而提高发光强度,可进一步提高CLIA方法的灵敏度。在上述技术创新的基础上本发明以双抗体夹心的模式对抗原物质进行分析,由于需要在一个抗原上结合两种抗体(固相抗体和双特异性抗体),因此本发明适于对抗原决定簇数量不单一的抗原物质分析,尤其适用于蛋白质,激素,病毒或微生物等大分子物质。

附图说明

[0035] 图1是本发明方法与常规的双抗体夹心型CLIA分析方法的原理对比示意图;图中,A部分是常规的双抗体夹心型CLIA分析方法原理示意图,B部分是本发明方法原理示意图。

[0036] 图2是本发明实施例1中吡啶酯人工抗原的合成反应原理图。

[0037] 图3是本发明实施例1中双特异性抗体纯化的原理示意图。

[0038] 图4是本发明实施例1中多聚吡啶酯合成反应原理图。

[0039] 图5是本发明实施例1中利用本发明方法所建立的甲胎蛋白浓度-发光信号强度标准曲线图;图中,横坐标是甲胎蛋白浓度的常用对数值($\lg C$),纵坐标是发光强度RLU检测信号值。

[0040] 图6是本发明实施例2中利用常规CLIA方法建立的甲胎蛋白浓度-发光信号强度标准曲线图;图中,横坐标是甲胎蛋白浓度的常用对数值($\lg C$),纵坐标是发光强度RLU检测信号值。

具体实施方式

[0041] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0042] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0043] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义。

[0044] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0045] 实施例1(多聚吡啶酯-抗分析物/抗吡啶酯双特异性抗体的双抗体夹心CLIA方法建立及应用)

[0046] 本实施例利用抗甲胎蛋白/抗吡啶酯的双特异性抗体建立检测甲胎蛋白的化学发光标记免疫分析方法,使用的是双抗体夹心免疫检测的模式。本实施例以甲胎蛋白为分析物的代表,但不局限于甲胎蛋白,可为各种蛋白质、激素、病毒和微生物等一切具有二个及以上的不同抗原决定簇(可以与二个及以上的不同抗体结合)的大分子抗原。

[0047] 1.1 杂交瘤细胞技术制备抗吡啶酯高亲和力单克隆抗体

[0048] 制备吡啶酯与载体蛋白偶联的人工抗原(合成原理如图2所示),以优化的免疫程序、佐剂和剂量免疫BALB/c小鼠,取脾细胞在50%PEG作用下与对数期生长的SP2/0细胞融合,用HAT和HT培养基进行选择培养;建立吡啶酯人工抗原抗体捕获ELISA方法,筛选分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;采用抗体分型试剂盒鉴定抗体类型和亚类;无血清培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体;protein A或protein G亲和柱纯化单克隆抗体;竞争ELISA方法测定抗体亲和常数,筛选高亲和力抗体(解离常数小于 2×10^{-8})。

[0049] 1.2 四瘤杂交细胞技术制备双特异性单克隆抗体

[0050] 采用8-氮鸟嘌呤处理分泌抗甲胎蛋白单抗细胞株,筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型(HGPRT⁻)细胞株;5-溴-2-脱氧尿嘧啶处理分泌抗吡啶酯单抗的杂交瘤细胞,筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型(TK⁻)细胞株。取对数期生长的二种细胞株在50%PEG作用下融合,用HAT培养基进行选择培养,建立甲胎蛋白人工抗原固相捕获双特异性单抗的CLIA方法,筛选分泌抗甲胎蛋白\抗吡啶酯的双特异性单克隆抗体的四瘤杂交细胞;无血清培养杂交瘤细胞生产双特异性抗体。

[0051] 1.3 双特异性单克隆抗体的纯化

[0052] 分别制备甲胎蛋白配体偶联琼脂糖亲和柱和吡啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用甲胎蛋白\吡啶酯双亲和柱纯化抗甲胎蛋白\抗吡啶酯双特异性抗体。纯化原理如图3所示。

[0053] 1.4 多聚吡啶酯的合成

[0054] 采用多聚赖氨酸(分子量15000-100000)或具有多个氨基的蛋白(如BSA,OVA,壳聚糖和KLH等)为载体,以吡啶酯制备多聚吡啶酯,AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化多聚吡啶酯,红外光谱、紫外可见光光谱及H-NMR鉴定分析,紫外分光计测定偶联比例($n > 20$),化学发光仪测定发光强度和发光稳定性。合成原理如图4所示。

[0055] 1.5 多聚吡啶酯-抗甲胎蛋白\抗吡啶酯双特异性抗体-双抗体夹心CLIA方法的建立

[0056] 采用棋盘滴定法确定抗甲胎蛋白抗体(固相抗体)包被浓度、抗甲胎蛋白\抗吡啶酯双特异性抗体工作浓度、多聚吡啶酯的使用浓度。根据确定的最佳的固相抗体、双特异性抗体和多聚吡啶酯工作浓度,建立双抗体夹心CLIA标准曲线并检测样品;简要过程如下:纯化的抗甲胎蛋白抗体(固相抗体)4℃包被过夜,3%脱脂牛奶封闭半小时后洗板并拍干,各孔分别加入待测样本和不同浓度的甲胎蛋白标准品(0.01ng/mL,0.02ng/mL,0.05ng/mL,0.1ng/mL,0.2ng/mL,0.5ng/mL,1ng/mL,2ng/mL,5ng/mL,10ng/mL)100μL,37℃ 1h后,PBST洗涤4次,加入双特异性抗体50μL和多聚吡啶酯50μL,混匀(也可将这一步骤分为二步:先加入双特异性抗体100μL温育1h后洗板,再加入多聚吡啶酯100μL),37℃ 1h后,PBST洗涤4次,自动注射泵加入启动发光试剂(NaOH、H₂O₂等)(100μL/孔);发光仪测发光强度(RLU)。获得的各标准品的发光强度为纵坐标,以各标准品浓度的常用对数值(1gC)为横坐标,绘制一个对应标准品浓度的半对数坐标曲线图(如图5所示)并检测样品。

[0057] 实施例2(基于双特异性抗体的双抗体夹心CLIA方法与传统的双抗体夹心CLIA方法的比较)

[0058] 2.1 传统双抗体夹心CLIA方法的建立

[0059] 吡啶酯AE-NHS,吡啶酯DMAE-NHS,吡啶酯NSP-DMAE-NHS或吡啶磺酰胺内盐NSP-SA-

NHS标记抗甲胎蛋白抗体,紫外分光计测定偶联比例,化学发光仪测定发光强度,采用棋盘滴定法确定抗甲胎蛋白抗体(固相抗体)包被浓度、吖啶酯标记抗体(液相抗体)工作浓度。根据确定的最佳的抗甲胎蛋白抗体(固相抗体)包被浓度和吖啶酯标记抗体浓度,建立双抗体夹心CLIA方法标准曲线并检测样品。简要过程如下:纯化的抗甲胎蛋白抗体(固相抗体)4℃包被过夜,3%脱脂牛奶封闭半小时后洗板并拍干,各孔分别加入待测样本和不同浓度的甲胎蛋白标准品(0.01ng/mL,0.02ng/mL,0.05ng/mL,0.1ng/mL,0.2ng/mL,0.5ng/mL,1ng/mL,2ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,50ng/mL)100μL,37℃ 1h后,PBST洗涤4次,加入吖啶酯标记抗甲胎蛋白抗体100μL,混匀。37℃ 1h后,PBST洗涤4次,自动注射泵加入启动发光试剂(NaOH、H₂O₂) (100μL/孔);发光仪测发光强度(RLU)。获得的各标准品的发光强度为纵坐标,以各标准品浓度的常用对数值(lgC)为横坐标,绘制一个对应标准品浓度的半对数坐标曲线图(如图6所示)并检测样品。

[0060] 2.2以上1.5节所建立方法与2.1节所建立方法在检测限度、精密度和准确度方面的测定与比较

[0061] 检测限的测定:取20份空白样品,使用二种不同CLIA方法进行测定,平均测定值加3倍标准差为检测限。精密度和准确度的测定:在空白血清样品中添加线性范围内二个浓度(0.2ng/mL,2ng/mL)的甲胎蛋白标准品,用二种不同CLIA方法进行测定,每个添加浓度测定6个平行样,并进行3批实验。准确度:以回收率[(测定量/添加量)×100%]表示。精密度:以变异系数[(标准差/平均测定量)×100%]表示。批内变异系数:每批平行样之间的变异系数。批间变异系数:不同批次测定样品之间的变异系数值。实验结果如表1所示。

[0062] 表1两种方法在检测限、精密度和准确度方面的测定与比较

[0063]

方法	检测限	添加量	回收率	批内变异系数	批间变异系数
双特异性抗体双 抗体夹心 CLIA	0.05ng/ml	0.2ng/ml	101.5%	8.32%	9.56%
		2ng/ml	96.05%	9.82%	10.63%
传统双抗体夹心 CLIA	0.5ng/ml	0.2ng/ml	未检出	-	-
		2ng/ml	93.82%	10.36%	11.86%

[0064] 由表1可以发现,基于双特异性抗体的CLIA方法比传统的CLIA方法检测限明显降低,灵敏度显著提高,而准确度和精密度无显著差异。

[0065] 实施例3

[0066] 一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0067] 1) 包被待分析抗原的抗体;

[0068] 2) 加入待测样品,混匀;

[0069] 3) 洗涤,而后加入标记有化学发光剂的抗体,混匀;

[0070] 4) 洗涤,而后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0071] 其中:所述化学发光剂是多聚吖啶酯;步骤3)所述抗体是同时与多聚吖啶酯和所

述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0072] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0073] 所述多聚吡啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吡啶酯为单体的多聚体。

[0074] 所述多聚吡啶酯是通过以下方法制备的:取多聚赖氨酸与吡啶酯反应,而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化,即得到所述多聚吡啶酯。

[0075] 所述吡啶酯是吡啶酯AE-NHS。

[0076] 所述多聚吡啶酯分子中,吡啶酯单体的数量大于20。

[0077] 步骤3)所述抗体是通过以下方法制备的:

[0078] A) 取吡啶酯与载体蛋白偶联,得到吡啶酯人工抗原,利用所述吡啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0079] B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株;取步骤A)所得的分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞,从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株;将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合,而后筛选分泌抗所述抗原\抗吡啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞;

[0080] C) 培养步骤B)所得的四源杂交瘤细胞,收集所述双特异性抗体。

[0081] 步骤A)中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吡啶酯单克隆抗体的解离常数是 0.8×10^{-8} 。

[0082] 步骤C)完成后继续执行步骤D):分别制备所述抗原偶联琼脂糖亲和柱和吡啶酯偶联琼脂糖亲和柱,采用所述抗原\吡啶酯双亲和柱纯化步骤C)所得的双特异性抗体。

[0083] 所述分析方法的分析对象是蛋白质。

[0084] 实施例4

[0085] 一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法,包括以下步骤:

[0086] 1) 包被待分析抗原的抗体;

[0087] 2) 加入待测样品,混匀;

[0088] 3) 洗涤,而后加入标记有化学发光剂的抗体,混匀;

[0089] 4) 洗涤,而后加入发光启动试剂,检测发光强度;

[0090] 其中:所述化学发光剂是多聚吡啶酯;步骤3)所述抗体是同时与多聚吡啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0091] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0092] 所述多聚吡啶酯是以多聚赖氨酸或具有多个氨基的蛋白为载体,以吡啶酯为单体的多聚体。

[0093] 所述吡啶酯是吡啶酯DMAE-NHS。

[0094] 步骤3)所述抗体是通过以下方法制备的:

[0095] A) 取吡啶酯与载体蛋白偶联,得到吡啶酯人工抗原,利用所述吡啶酯人工抗原免疫小鼠,而后取所述小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,筛选分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0096] B) 取分泌与所述抗原相对应的单克隆抗体的细胞株,从中筛选次黄嘌呤-鸟嘌呤

磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株；取步骤A) 所得的分泌抗吡啶酯单克隆抗体的杂交瘤细胞，从中筛选胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株；将所述次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型细胞株与胸腺嘧啶核苷激酶缺陷型细胞株融合，而后筛选分泌抗所述抗原\抗吡啶酯的双特异性抗体的四源杂交瘤细胞；

[0097] C) 培养步骤B) 所得的四源杂交瘤细胞，收集所述双特异性抗体。

[0098] 步骤A) 中所述杂交瘤细胞所分泌的抗吡啶酯单克隆抗体的解离常数是 1.5×10^{-8} 。

[0099] 所述分析方法的分析对象是激素。

[0100] 实施例5

[0101] 一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法，包括以下步骤：

[0102] 1) 包被待分析抗原的抗体；

[0103] 2) 加入待测样品，混匀；

[0104] 3) 洗涤，而后加入标记有化学发光剂的抗体，混匀；

[0105] 4) 洗涤，而后加入发光启动试剂，检测发光强度；

[0106] 其中：所述化学发光剂是多聚吡啶酯；步骤3) 所述抗体是同时与多聚吡啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0107] 在以上技术方案的基础上，满足以下条件：

[0108] 所述多聚吡啶酯是通过以下方法制备的：取多聚赖氨酸与吡啶酯反应，而后经AKATA蛋白纯化系统G15柱纯化，即得到所述多聚吡啶酯。

[0109] 所述吡啶酯是吡啶酯NSP-DMAE-NHS。

[0110] 所述分析方法的分析对象是微生物。

[0111] 实施例6

[0112] 一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法，包括以下步骤：

[0113] 1) 包被待分析抗原的抗体；

[0114] 2) 加入待测样品，混匀；

[0115] 3) 洗涤，而后加入标记有化学发光剂的抗体，混匀；

[0116] 4) 洗涤，而后加入发光启动试剂，检测发光强度；

[0117] 其中：所述化学发光剂是多聚吡啶酯；步骤3) 所述抗体是同时与多聚吡啶酯和所述抗原均具有抗原抗体反应活性的双特异性抗体。

[0118] 以上对本发明的实施例进行了详细说明，但所述内容仅为本发明的较佳实施例，并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

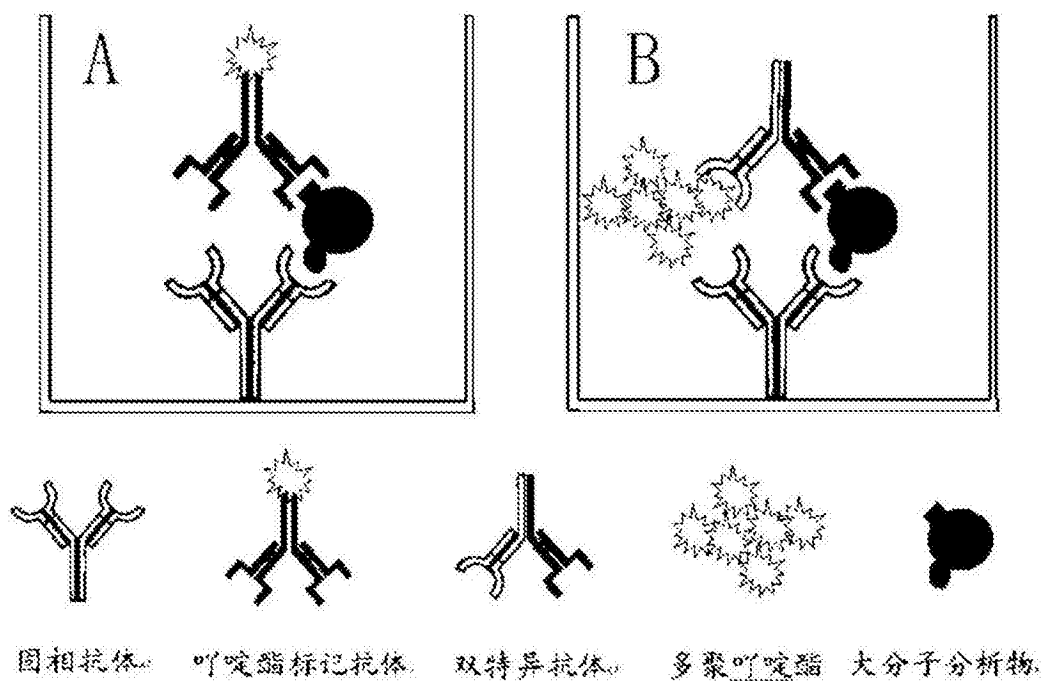


图1

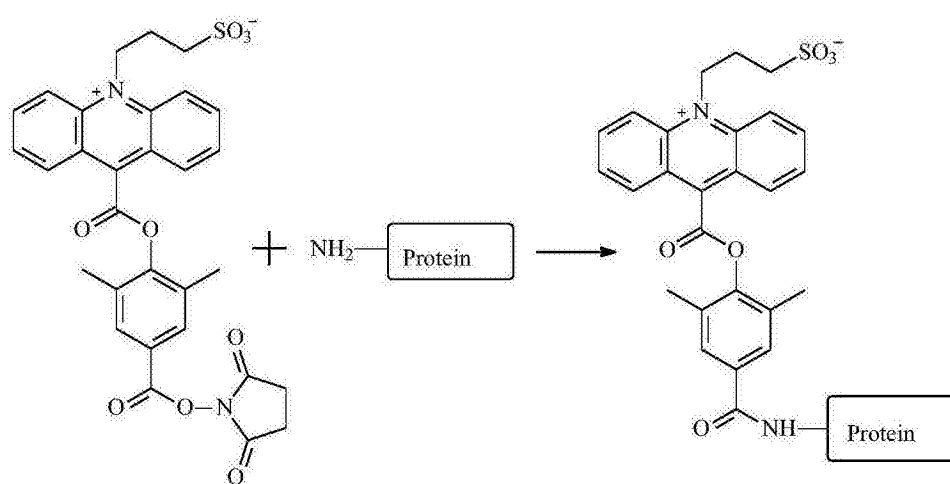


图2

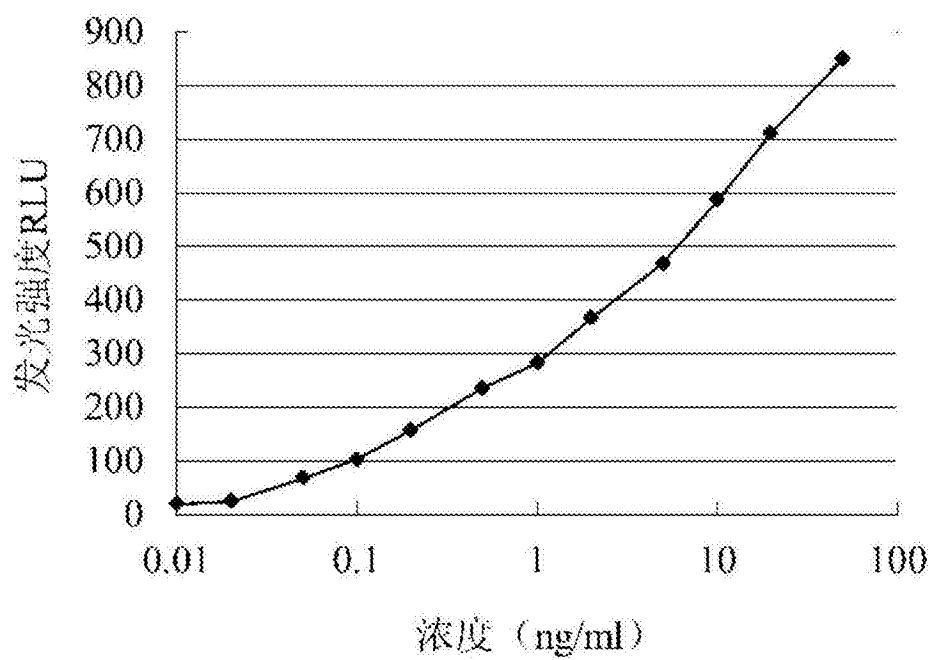


图5

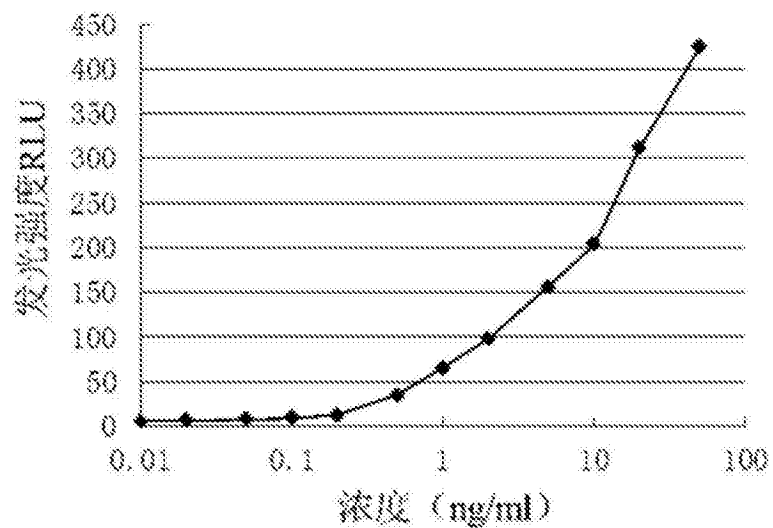


图6

专利名称(译)	一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法		
公开(公告)号	CN106896229A	公开(公告)日	2017-06-27
申请号	CN201710204763.1	申请日	2017-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
[标]发明人	刘仁荣		
发明人	刘仁荣		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/68 G01N2333/4728		
优先权	201611060121.0 2016-11-28 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种双抗体夹心型化学发光标记免疫分析方法，该方法在常规双抗夹心型CLIA方法基础上针对化学发光剂和抗体结构加以改进，采用了与待测抗原、吖啶酯均有抗原抗体反应活性的双特异性抗体，使吖啶酯与抗体间的结合避免了化学偶联的模式，从而克服了化学偶联模式下抗体上吖啶酯结合量较低的技术问题。再加之本发明所选用的双特异性抗体对吖啶酯具有较高的亲和力(解离常数小于 2×10^{-8})，从而进一步提升了化学发光剂的标记水平。在此基础上，本发明改进了化学发光剂的结构，以多聚体的形式替代单分子的吖啶酯，所得的多聚吖啶酯中单体数量大于20，提高了抗体上结合的吖啶酯数量，从而提高发光强度，可进一步提高CLIA方法的灵敏度。

