



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104007102 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

---

(21) 申请号 201310055070. 2

(22) 申请日 2013. 02. 21

(71) 申请人 林斯

地址 100078 北京市房山区新镇泳池路 3 号  
楼

(72) 发明人 林斯

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

---

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板  
及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板的制备方法，该方法可以使不同的检测试剂用同一种通用包被板，该通用包被板可以与链亲和素和荧光素结合。然后在不同的检测项目的包被抗体上标记上生物素或者荧光素，间接的将包被抗体固定在通用包被板上。采用此发明前的包被板随着项目不同而需要单独生产，或者生物素标记成功率低，或者荧光素结合速率慢，分别有各自的缺点。采用本发明后能最大限度的提高标记成功率以及结合速率，还可以通用包被板，提高生产和应用简便性。

1. 一种板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

步骤1:取0.5~1.5mg分子量66KDa的链亲和素和2.0~2.8mg分子量160KDa的抗荧光素抗体溶解于0.05~0.15ml、0.05M、pH9.6的碳酸缓冲液中,加入搅拌子备用;

步骤2:取70%的戊二醛0.05~0.15ml用蒸馏水稀释70倍成0.5~1.5%浓度备用;

步骤3:在步骤1制得的溶液中加入新鲜配制的1%戊二醛溶液0.05~0.15ml,室温搅拌1小时。取出反应液加入透析袋,对0.05M、pH9.6的碳酸缓冲液透析过夜,期间换液3次;要求透析袋透过直径为160KDa;将透析后的反应液加入等量甘油保存于-15~25℃;

步骤4:将新合成的包被蛋白甘油溶液用0.05M、pH9.6的碳酸缓冲液稀释到1:1000,在96孔化学发光板中每孔加入50~150μl稀释溶液,3~5℃静置过夜;次日将板子拍干,加入含有1%牛血清白蛋白的溶液150~250μl,37℃封闭反应0.5~1.5小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装,得到板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板。

2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤1中,取1mg分子的链亲和素和2.4mg的抗荧光素抗体溶解于0.1ml的碳酸缓冲液中。

3. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤2中,取戊二醛0.1ml稀释成1%浓度备用。

4. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤3中,加入戊二醛溶液0.1ml。

5. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤3中,将透析后的反应液加入等量甘油保存于-20℃。

6. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤4中,在化学发光板中每孔加入100μl稀释溶液,4℃静置过夜。

7. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤4中,加入含有1%牛血清白蛋白的溶液200μl,37℃封闭反应1小时。

8. 一种板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

步骤1:取1mg分子量66KDa的链亲和素和2.4mg分子量160KDa的抗荧光素抗体溶解于0.1ml、0.05M、pH9.6的碳酸缓冲液中,加入搅拌子备用;

步骤2:取70%的戊二醛0.1ml用蒸馏水稀释70倍成1%浓度备用;

步骤3:在步骤1制得的溶液中加入新鲜配制的1%戊二醛溶液0.1ml,室温搅拌1小时。取出反应液加入透析袋,对0.05M pH9.6的碳酸缓冲液透析过夜,期间换液3次;要求透析袋透过直径为160KDa;将透析后的反应液加入等量甘油保存于-20℃;;

步骤4:将新合成的包被蛋白甘油溶液用0.05M pH9.6的碳酸缓冲液稀释到1:1000;在96孔化学发光板中每孔加入100μl,4℃静置过夜;次日将板子拍干,加入含有1%牛血清白蛋白的溶液200μl,37℃封闭反应1小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装,得到板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板。

9. 一种板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板,其特征在于,根据权利要求1或8所述的方法制备。

10. 一种板式化学发光免疫诊断试剂盒,其特征在于,包括权利要求9所述的包被板。

## 板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域，应用于医疗检验机构。

### 背景技术

[0002] 目前国内外使用的板式化学发光免疫诊断试剂盒一般有两种，一种是按检测内容物不同包被不同的包被抗体，进而制成不同的固相包被板。每种固相包被板只能对应应用于一种检测项目。人体可以用免疫诊断的指标有数百种。因此要想全部生产出对应的诊断试剂就需要生产数百种固相包被板。这对于生产和应用都带来了复杂性。另一种方法进行了改良：将原来用于直接制备包被板的包被抗体标记上荧光素或者生物素，然后将抗荧光素抗体或链亲和素包被在固相板上。由于抗荧光素抗体会特异性的结合荧光素（或者链亲和素会特异性的结合生物素）这样就间接的将原来不同检测项目的不同固相包被板简化成统一的抗荧光素抗体包被板或者链亲和素包被板。但是这里又引入了新的问题。由于抗体的空间结构的多样性导致生物素标记包被抗体成功率只有 50% 左右，经常会出现抗体与抗原特异性结合的可变区上的特异性氨基位点被生物素结合从而失去与抗原结合的能力。而荧光素标记抗体虽然是与抗体上的二硫键结合不影响抗体与抗原结合的特异性，一般成功率大于 90%。但是荧光素抗体与荧光素的反应速率仅有链亲和素与生物素结合反应速率的万分之一。

### 发明内容

[0003] 针对现有技术中存在的缺陷，本发明公开了一种板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板的制备方法，该方法可以使不同的检测试剂用同一种通用包被板，大大减少生产的复杂性和增强应用的简便性。

[0004] 本发明是合成一种新的蛋白用以制备一种通用包被板，这种通用包被板可以与链亲和素和荧光素结合。然后在不同的检测项目的包被抗体上标记上生物素或者荧光素，间接的将包被抗体固定在通用包被板上。采用此发明前的包被板随着项目不同而需要单独生产，或者生物素标记成功率低，或者荧光素结合速率慢，分别有各自的缺点。采用本发明后能最大限度的提高标记成功率以及结合速率，还可以通用包被板，提高生产和应用简便性。

[0005] 本发明的板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板的制备方法包括如下步骤：

[0006] 步骤 1：取 0.5 ~ 1.5mg 分子量 66KDa 的链亲和素和 2.0 ~ 2.8mg 分子量 160KDa 的抗荧光素抗体溶解于 0.05 ~ 0.15ml、0.05M、pH9.6 的碳酸缓冲液中，加入搅拌子备用；

[0007] 优选取 1mg 分子的链亲和素和 2.4mg 的抗荧光素抗体溶解于 0.1ml 的碳酸缓冲液中；

[0008] 步骤 2：取 70% 的戊二醛 0.05 ~ 0.15ml 用蒸馏水稀释 70 倍成 0.5 ~ 1.5% 浓度备用；

[0009] 优选取戊二醛 0.1ml 稀释成 1% 浓度备用；

[0010] 步骤3：在步骤1制得的溶液中加入新鲜配制的1%戊二醛溶液0.05~0.15ml，室温搅拌1小时。取出反应液加入透析袋，对0.05M、pH9.6的碳酸缓冲液透析过夜，期间换液3次；要求透析袋透过直径为160KDa；将透析后的反应液加入等量甘油保存于-15~25℃；

[0011] 优选加入戊二醛溶液0.1ml；优选将透析后的反应液加入等量甘油保存于-20℃；

[0012] 步骤4：将新合成的包被蛋白甘油溶液用0.05M、pH9.6的碳酸缓冲液稀释到1：1000，在96孔化学发光板中每孔加入50~150μl稀释溶液，3~5℃静置过夜；次日将板子拍干，加入含有1%牛血清白蛋白的溶液150~250μl，37℃封闭反应0.5~1.5小时；将板子再次拍干，置于烘干间抽湿烘干后真空包装，得到板式化学发光诊断试剂通用固相包被板。

[0013] 优选在化学发光板中每孔加入100ul稀释溶液，4℃静置过夜；优选加入含有1%牛血清白蛋白的溶液200μl，37℃封闭反应1小时。

[0014] 通过本发明的方法制得的包被板，可以使得生产企业无论生产哪种类型的板式化学发光检测试剂，都可以使用通用包被板。有利于扩大生产规模，减少半成品类型和批次，减少质量检验步骤，可提高产品稳定性和质量。

[0015] 对于使用者，所有的检测项目的固相包被板通用可减少同时检测多个项目导致操作失误。

## 具体实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下通过具体实施例对本发明的制备方法进一步详细说明。

[0017] 实施例1：

[0018] 取1mg链亲和素（分子量66KDa）和2.4mg抗荧光素抗体（分子量160KDa）溶解于0.1ml0.05M pH9.6的碳酸缓冲液中，加入搅拌子备用。

[0019] 取70%的戊二醛0.1ml用蒸馏水稀释70倍成1%浓度备用。

[0020] 在链亲和素和抗荧光素混合的溶液中加入新鲜配制的1%戊二醛溶液0.1ml，室温搅拌1小时。取出反应液加入透析袋，对0.05M pH9.6的碳酸缓冲液透析过夜，期间换液3次。要求透析袋透过直径为160KDa。将透析后的反应液加入等量甘油保存于-20℃。.

[0021] 将新合成的包被蛋白甘油溶液用0.05M pH9.6的碳酸缓冲液稀释到1：1000。在96孔化学发光板中每孔加入100μl，4℃静置过夜，次日将板子拍干，加入含有1%牛血清白蛋白的溶液200μl，37℃封闭反应1小时。将板子再次拍干，置于烘干间抽湿烘干后真空包装。

[0022] 取0.1mg抗甲胎蛋白AFP包被抗体置于0.1ml0.05M pH9.6的碳酸缓冲液中，加入4μg酯化生物素和4μg荧光素，室温搅拌1小时。反应液对0.05M pH9.6的碳酸缓冲液透析过夜，中间换液3次。要求透析袋透过直径为40KDa。将透析后的反应液加入等量甘油保存于-20℃。

[0023] 将前一步骤制备得的生物素荧光素标记物用标记物稀释液稀释1000倍，再加入一定量的抗 AFP 另一株抗体辣根过氧化物酶标记物作为标记物工作液。

[0024] 往通用包被板中加入50μl标准血清或待测血清以及100μl标记物工作液后混合均匀，置于37℃恒温箱温育1小时。取出板子洗涤5次后加入发光底物，检测发光信号，

进而建立标准曲线求出待测血清中 AFP 浓度。

[0025] 以上过程中标记物工作液中事实上有 2 种抗 AFP 抗体,一株抗体标记上了生物素和荧光素,与通用包被板接触后立即与链亲和素或抗荧光素抗体结合而固定到化学发光板上。另一株抗 AFP 抗体上连接着辣根过氧化物酶,此为检测时候的示踪物。此两个抗体通过温育后形成:通用包被板 - 生物素(或荧光素)化抗体 - 抗 AFP 抗体 - AFP 抗原 - 另一株抗 AFP 抗体辣根过氧化物酶标记物的复合物。

[0026] 以上是以甲胎蛋白(英文简写 AFP)检测方法为例,类似的方法可以应用在癌胚抗原,前列腺特异性抗原等等检测项目上,只要将其中一株抗体如上处理即可。

[0027] 实施例 2:

[0028] 步骤 1:取 1mg 分子量 66KDa 的链亲和素和 2.4mg 分子量 160KDa 的抗荧光素抗体溶解于 0.1ml、0.05M、pH9.6 的碳酸缓冲液中,加入搅拌子备用;

[0029] 步骤 2:取 70% 的戊二醛 0.1ml 用蒸馏水稀释 70 倍成 1% 浓度备用;

[0030] 步骤 3:在步骤 1 制得的溶液中加入新鲜配制的 1% 戊二醛溶液 0.1ml,室温搅拌 1 小时。取出反应液加入透析袋,对 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液透析过夜,期间换液 3 次;要求透析袋透过直径为 160KDa;将透析后的反应液加入等量甘油保存于 -20℃;

[0031] 步骤 4:将新合成的包被蛋白甘油溶液用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液稀释到 1 : 1000;在 96 孔化学发光板中每孔加入 100 μl,4℃ 静置过夜;次日将板子拍干,加入含有 1% 牛血清白蛋白的溶液 200 μl,37℃ 封闭反应 1 小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装,得到板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板。

[0032] 本发明实现的有益效果是结合了链亲和素与生物素结合的高速率以及荧光素与抗荧光素抗体结合的不损失特异性的优点。在制备固相包被板之前,预先将链亲和素与抗荧光素抗体 1 : 1 偶联,合成新的蛋白。此蛋白同时具有与生物素以及荧光素结合的位点。将此蛋白包被到化学发光板上制备成通用化学发光板。然后将原来不同项目的包被抗体分别标记上生物素和荧光素,当某些抗体标记生物素导致失活时就仅用荧光素标记。这样处理过后理论上说所有的检测项目都可以采用通用固相包被板。这样无论生产还是应用都大大简化了流程,减少了出错的几率。

[0033] 以上描述了本发明的优选实施例,但本领域技术人员可以理解,在不脱离本发明设计思想的前提下,其各种变型或组合均纳入本发明的权利要求的保护范围中。

专利名称(译)	板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104007102A</a>	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201310055070.2	申请日	2013-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	林斯		
申请(专利权)人(译)	林斯		
当前申请(专利权)人(译)	林斯		
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/68 G01N33/543 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种板式化学发光免疫诊断试剂通用固相包被板的制备方法，该方法可以使不同的检测试剂用同一种通用包被板，该通用包被板可以与链亲和素和荧光素结合。然后在不同的检测项目的包被抗体上标记上生物素或者荧光素，间接的将包被抗体固定在通用包被板上。采用此发明前的包被板随着项目不同而需要单独生产，或者生物素标记成功率低，或者荧光素结合速率慢，分别有各自的缺点。采用本发明后能最大限度的提高标记成功率以及结合速率，还可以通用包被板，提高生产和应用简便性。