



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101929997 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 200810207959. 7

JP 2004073065 A, 2004. 03. 11,

(22) 申请日 2008. 12. 26

CN 1202935 A, 1998. 12. 23,

(73) 专利权人 上海透景生命科技有限公司

胡洁等. 蛋白质芯片技术在过敏原特异性

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区松
涛路 646 号 3 楼

IgE 检测中的初步应用. 《中国皮肤性病学杂
志》. 2009, 第 19 卷 (第 5 期),

(72) 发明人 李久彤 姚见儿 白艳军 周雪雷
张晓峰 周伟

于晓波等. 生物素-亲和素偶联探针蛋白芯
片检测技术. 《生物工程学报》. 2008, 第 24 卷 (第
3 期),

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务有限公
司 31100

审查员 刘文瀚

代理人 徐迅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1415759 A, 2003. 05. 07,

CN 1534295 A, 2004. 10. 06,

权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

一种提高免疫检测灵敏度的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种提高免疫检测灵敏度的方法。具体地,本发明提供了一种生物素-亲和素的复合物,所述复合物包括:(i) 引发序列;(ii) 第 n 级亲和素,其中 n 为 1-20 的正整数;并且当 n 为 1 时,则第 1 级亲和素结合于所述引发序列上的生物素;和 (iii) 生长序列,所述的生长序列是两端标记有生物素的寡核苷酸单链,所述生长序列中位于一端的生物素与第 n 级亲和素结合,而位于另一端的生物素与第 n+1 级亲和素结合或处于未结合状态,其中 n 为 1-20 的正整数。本发明的复合物可有效提高免疫检测的灵敏度,并且可以基本上不改变也不增加原有的免疫检测试验操作程序。

1. 一种生物素 - 亲和素的复合物, 其特征在于, 所述复合物包括:
 - (a) 固相载体;
 - (b) 根序列, 所述的根序列是固定于所述固相载体表面上的寡核苷酸单链;
 - (c) 引发序列, 所述的引发序列是互补结合于所述根序列的、并且在一端标记有生物素的寡核苷酸单链;
 - (d) 生物素 - 亲和素的 n 级复合物, 其中 n 为 2-20 的正整数; 并且第 1 级亲和素结合于所述引发序列上的生物素; 和
 - (e) 生长序列, 所述的生长序列是两端标记有生物素的寡核苷酸单链, 所述生长序列中位于一端的生物素与第 n 级亲和素结合, 而位于另一端的生物素与第 $n + 1$ 级亲和素结合或处于未结合状态, 其中 n 为 2-20 的正整数。
2. 如权利要求 1 所述的复合物, 其特征在于, 所述的固相载体是微球。
3. 如权利要求 1 所述的复合物, 其特征在于, n 为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 或 19。
4. 如权利要求 1 所述的复合物, 其特征在于, 所述的根序列的长度为 20-60 个碱基。
5. 如权利要求 4 所述的复合物, 其特征在于, 所述的根序列的长度为 25-50 个碱基。
6. 如权利要求 1 所述的复合物, 其特征在于, 所述的引发序列的长度为 10-50 个碱基。
7. 如权利要求 6 所述的复合物, 其特征在于, 所述的引发序列的长度为 15-40 个碱基。
8. 如权利要求 1 所述的复合物, 其特征在于, 所述的生长序列的长度为 8-30 个碱基。
9. 如权利要求 8 所述的复合物, 其特征在于, 所述的生长序列的长度为 10-20 个碱基。
10. 一种生物素 - 亲和素的复合物, 其特征在于, 所述复合物包括:
 - (i) 引发序列, 所述的引发序列是在一端标记有生物素的寡核苷酸单链;
 - (ii) 生物素 - 亲和素的 n 级复合物, 其中 n 为 2-20 的正整数; 并且第 1 级亲和素结合于所述引发序列上的生物素; 和
 - (iii) 生长序列, 所述的生长序列是两端标记有生物素的寡核苷酸单链, 所述生长序列中位于一端的生物素与第 n 级亲和素结合, 而位于另一端的生物素与第 $n + 1$ 级亲和素结合或处于未结合状态, 其中 n 为 2-20 的正整数。
11. 一种权利要求 1 或 10 所述的生物素 - 亲和素的复合物的用途, 其特征在于, 用于制备提高免疫检测灵敏度的灵敏度增强剂。
12. 一种制备的生物素 - 亲和素的复合物的方法, 包括步骤:
 - (a) 将用作根序列的第一寡核苷酸单链固定于固相载体,
 - (b) 将用作引发序列的第二寡核苷酸单链与所述根序列接触, 所述的第二寡核苷酸单链是在一端标记有生物素的寡核苷酸单链, 从而形成相对稳定的“根序列 - 引发序列”杂合体, 其中所述的引发序列互补结合于所述的根序列; 随后去除过量的引发序列;
 - (c) 将亲和素与所述引发序列上的生物素接触并结合; 随后去除过量的、未结合的亲和素, 从而获得第 1 级生物素 - 亲和素的复合物;或者所述步骤 (c) 还包括重复以下步骤 (c1)-(c2) 共 1 至 $n-1$ 次, 从而获得第 n 级生物素 - 亲和素的复合物, 其中, n 为 3-20 的正整数:
 - (c1) 将用作生长序列的第三寡核苷酸单链与上一步骤获得的生物素 - 亲和素的复合物接触, 其中所述第三寡核苷酸单链是两端标记有生物素的寡核苷酸单链, 从而使得所述

生长序列中位于一端的生物素与上一步骤中形成的结合状态的亲和素形成结合 ;随后去除过量的、未结合的生长序列 ;

(c2) 将亲和素与步骤 (c1) 中所述生长序列另一端的生物素接触并结合 ;随后去除过量的、未结合的亲和素。

一种提高免疫检测灵敏度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,具体地涉及一种提高免疫分析检测灵敏度的方法。

背景技术

[0002] 免疫分析法 (immunoassay, IA) 是基于抗原和抗体特征性反应的一种技术。由于免疫分析试剂在免疫反应中所体现出的独特的选择性和极低的检测限,使这种分析手段在临床、生物制药和环境化学等领域得到广泛应用。

[0003] 生物素 (biotin)-亲和素 (avidin) 是免疫分析技术中的重要工具,主要是因为其有下述几个特点:

[0004] ①亲和素对生物素的亲和力极高,为抗原抗体反应的百万倍,具高度特异性和稳定性。

[0005] ②生物素分子小,结构简单,极易与抗体、核酸、多糖及多种酶等生物大分子以共价键稳定结合,同时对结合物的原始生物活性无不良影响。

[0006] ③亲和素性质极为稳定,每分子可结合 4 个生物素衍生物,其作为生物素化分子与信号物之间的桥,起到信号放大作用,从而提高检测的灵敏度。

[0007] 由生物素-亲和素反应建立信号放大系统,一般有两种方法:一是用生物素标记抗体,与固相抗原结合后,再加入亲和素-酶结合物,从而使测定反应放大;二是使用生物素-抗体、游离亲和素和生物素-酶结合物三种试剂,于固相抗原中加入试剂的顺序为生物素-抗体、亲和素和生物素-酶。

[0008] 上述方法之所以可行,在于亲和素对生物素的 4 价结合能力,上述多步模式也可通过预先制成可溶的亲和素-生物素化酶复合物而得到简化,亦即所谓的 ABC (avidin-biotin-complex) 方法 (参见 US 专利 4684609),这种生物素-亲和素放大系统可使常规的酶免疫分析法 (EIA) 或荧光免疫分析法 (fluorescence immunoassay, FIA) 的检测灵敏度提高 2 ~ 100 倍。然而,目前现有的这些检测方法还不能令人满意地满足临床上检测人血清中极低含量生物分子的需求。

[0009] 因此,本领域迫切需要开发进一步提高免疫检测灵敏度的方法。

发明内容

[0010] 本发明的目的就是提供一种进一步提高免疫检测灵敏度的方法。

[0011] 在本发明的第一方面,提供了一种生物素-亲和素的复合物,所述复合物包括:

[0012] (a) 固相载体;

[0013] (b) 根序列,所述的根序列是固定于所述固相载体表面上的寡核苷酸单链;

[0014] (c) 引发序列,所述的引发序列是互补结合于所述根序列的、并且在一端标记有生物素的寡核苷酸单链;

[0015] (d) 第 n 级亲和素,其中 n 为 1-20 的正整数;并且当 n 为 1 时,则第 1 级亲和素结

合于所述引发序列上的生物素 ;和

[0016] (e) 生长序列,所述的生长序列是两端标记有生物素的寡核苷酸单链,所述生长序列中位于一端的生物素与第 n 级亲和素结合,而位于另一端的生物素与第 n+1 级亲和素结合或处于未结合状态,其中 n 为 1-20 的正整数。

[0017] 在另一优选例中,所述的固相载体是微球 ;更佳地,所述的固相载体为磁性微球,例如微米级微球、纳米颗粒、或荧光微球。

[0018] 在另一优选例中,n 为 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,或 19。

[0019] 在另一优选例中,所述的根序列的长度为 20-60 个碱基,更佳地为 25-50 个碱基。

[0020] 在另一优选例中,所述的引发序列的长度为 10-50 个碱基,更佳地为 15-40 个碱基。

[0021] 在另一优选例中,所述引发序列与根序列的互补结合区的长度为 20-40bp,更佳地为 20-30bp。

[0022] 在另一优选例中,所述的生长序列的长度为 8-30 个碱基,更佳地为 10-20 个碱基。

[0023] 在另一优选例中,所述的生长序列是长度为 8-20 个碱基的 polyT。

[0024] 在本发明第二方面,提供了一种生物素 - 亲和素的复合物,所述复合物包括 :

[0025] (i) 引发序列,所述的引发序列是在一端标记有生物素的寡核苷酸单链 ;

[0026] (ii) 第 n 级亲和素,其中 n 为 1-20 的正整数 ;并且当 n 为 1 时,则第 1 级亲和素结合于所述引发序列上的生物素 ;和

[0027] (iii) 生长序列,所述的生长序列是两端标记有生物素的寡核苷酸单链,所述生长序列中位于一端的生物素与第 n 级亲和素结合,而位于另一端的生物素与第 n+1 级亲和素结合或处于未结合状态,其中 n 为 1-20 的正整数。

[0028] 在本发明的第三方面,提供了一种免疫检测分析方法,在本发明第一或第二方面中所述的生物素 - 亲和素的复合物存在下进行免疫分析检测。

[0029] 在本发明的第四方面,提供了一种在本发明第一或第二方面中所述的生物素 - 亲和素的复合物的用途,它用于制备提高免疫检测灵敏度的灵敏度增强剂。

[0030] 在本发明的第五方面,提供了一种制备的本发明所述生物素 - 亲和素的复合物的方法,包括步骤 :

[0031] (a) 将用作根序列的第一寡核苷酸单链固定于固相载体,

[0032] (b) 将用作引发序列的第二寡核苷酸单链与所述根序列接触,所述的第二寡核苷酸单链是在一端标记有生物素的寡核苷酸单链,从而形成相对稳定的“根序列 - 引发序列”杂合体,其中所述的引发序列互补结合于所述的根序列 ;随后去除过量的引发序列 ;

[0033] (c) 将亲和素与所述引发序列上的生物素接触并结合 ;随后去除过量的、未结合的亲和素,从而获得第 1 级生物素 - 亲和素的复合物 ;

[0034] 或者所述步骤 (c) 还包括重复以下步骤 (c1)-(c2) 共 1 至 n-1 次,从而获得第 n 级生物素 - 亲和素的复合物,其中,n 为 2-20 的正整数 :

[0035] (c1) 将用作生长序列的第三寡核苷酸单链与上一步骤获得的生物素 - 亲和素的复合物接触,其中所述第三寡核苷酸单链是两端标记有生物素的寡核苷酸单链,从而使得所述生长序列中位于一端的生物素与上一步骤中形成的结合状态的亲和素形成结合 ;随后去除过量的、未结合的生长序列 ;

[0036] (c2) 将亲和素与步骤 (c1) 中所述生长序列另一端的生物素接触并结合;随后去除过量的、未结合的亲和素。

[0037] 在另一优选例中,还包括步骤:将形成的第 n 级生物素-亲和素复合物与结合于固相载体的根序列解离开,从而获得不含固相载体和根序列的生物素-亲和素复合物。

[0038] 应理解,在本发明范围内,本申请上述以及下述的各技术特征可以各种方式进行组合,以构成各种优选例。例如,根序列的长度一般范围的下限 20 个碱基可以与优选范围的上限 50 个碱基进行组合,从而构成范围 20-50 个碱基。

附图说明

[0039] 图 1 至图 5 显示了本发明一个实例中生物素-亲和素 n 级复合物的制备示意图。

[0040] 图 6 显示了常规的免疫分析法产生信号的机制。

[0041] 图 7 显示了在本发明的免疫分析法中“生物素-亲和素 n 级复合物”产生信号的机制。

具体实施方式

[0042] 本发明人经过广泛而深入的研究,基于生物素/亲和素反应的特性,首次提供了一种新的生物素-亲和素复合物的生产方法。利用该复合物,可进一步显著提高免疫检测灵敏度,通常可提高 1000 倍至 10000 倍或更多(理论上,对免疫反应信号的放大倍数可达 10^6 或更高)。与现有技术相比,本发明方法使免疫检测灵敏度提高了至少 1-2 个数量级,从而可以较好地满足临床上检测人血清中极低含量生物分子的需求。

[0043] 如本文所用,术语“根序列”指可通过例如共价键固定于固相载体的寡核苷酸单链。此外,该术语还包括用于形成根序列或用作根序列的寡核苷酸单链。

[0044] 如本文所用,术语“引发序列”指互补结合于所述根序列的、并且在一端标记有生物素的寡核苷酸单链。此外,该术语还包括用于形成引发序列或用作引发序列的寡核苷酸单链。

[0045] 如本文所用,术语“生长序列”指两端标记有生物素的寡核苷酸单链,所述生长序列中位于一端的生物素与第 n 级亲和素结合,而位于另一端的生物素与第 n+1 级亲和素结合或处于未结合状态,其中 n 为 1-20 的正整数。此外,该术语还包括用作引发序列的寡核苷酸单链。

[0046] 如本文所用,术语“亲和素”包括亲合素(avidin)和链亲和素(streptavidin)。该术语还包括野生型、突变型以及衍生型的亲和素。

[0047] 在本发明的复合物中,以引发序列上的生物素为起点,可一层一层地通过“生物素-亲和素-生长序列”方式连接的大的 n 级复合物。

[0048] 为了便于理解本发明,本发明人提供了以下基本原理。然而,应理解,本发明的保护范围并不受限于本发明的基本原理。

[0049] 参见附图 1~5。将根序列固定于固相载体,在适宜的条件下引发序列与根序列形成相对稳定的杂合体(图 1);去除过量的引发序列后,加入亲和素与固相载体上引发序列的生物素稳定结合(图 2);去除过量的、未结合的亲和素,加入生长序列,在固相载体上形成“生物素-亲和素 1 级复合物”,单个复合物的生物素的数量为 3^1 (图 3);去除过量的生

长序列,加入亲和素,与固相载体上生长序列的生物素稳定结合(图4);去除过量的、未结合的亲和素,加入生长序列,在固相载体上形成“生物素-亲和素2级复合物”,单个复合物的生物素数为 3^2 (图5),依此类推,当生成“生物素-亲和素n级复合物”时,单个复合物的生物素数为 3^n ,此时适当地改变溶液条件,使引发序列脱离根序列,经过分离得到处于稳定的溶液状态下的“生物素-亲和素n级复合物”,用于免疫反应的信号放大,提高检测的灵敏度。

[0050] 参见图6,图中显示了常规的免疫反应产生信号的机制。捕获抗体经共价键固定于固相载体,和相应的抗原反应后再与标记了生物素的第二抗体反应,夹心后再与连接了酶或荧光染料的亲和素稳定结合,酶催化底物显色或直接检测荧光强度对抗原进行定量,信号强度(灵敏度)取决于经一系列反应后最终结合酶的量或荧光染料的量,图示中第二抗体标记的生物素与最终的酶或荧光染料的量的比例关系为1:1。

[0051] 参见图7,图中显示了本发明方法中,免疫反应应用了“生物素-亲和素n级复合物”后产生信号的机制:

[0052] 形成夹心的步骤与图6完全一致,夹心后经连接有酶或荧光染料的亲和素将“生物素-亲和素n级复合物”桥连于第二抗体,这样图示中第二抗体标记的生物素与最终的酶或荧光染料的量的比例关系约为1: 3^n ,相应地,灵敏度约为原来的 3^n 倍。

[0053] (1) 生物素-亲和素n级复合物的制备

[0054] 1.1 根序列固定于固相载体

[0055] 合成5'端修饰的一段寡核苷酸序列(如:-NH₂、生物素、-SH修饰等),使其与完全匹配的互补链形成的杂合体相对稳定(如:Tm在50~70℃之间);

[0056] 选择合适的商业化的表面经相应修饰(如:羧基/亲和素化的聚苯乙烯微球、羧基/亲和素化的磁性微球等)的固相载体,按其使用说明或有关文献将跟序列稳定地固定于固相载体;

[0057] 通过离心或施加磁场将固相载体与过量的游离的跟序列分离,固相载体经洗涤后存于缓冲液中备用。

[0058] 1.2 引发序列与根序列形成相对稳定的杂合体

[0059] 合成5'端经生物素修饰的一段寡核苷酸,其序列与跟序列完全互补;

[0060] 在适宜离子强度和温度的缓冲液中,引发序列与固相载体表面的跟序列杂交1小时后形成相对稳定的杂合体;

[0061] 通过离心或施加磁场将固相载体与过量的游离的引发序列分离,固相载体经洗涤后存于缓冲液中备用。

[0062] 1.3 连接亲和素

[0063] 在含有固相载体的缓冲液中加入游离的亲和素溶液适量,静置30min,固相载体表面引发序列的生物素与亲和素稳定地结合;

[0064] 通过离心或施加磁场将固相载体与过量的游离的亲和素分离,固相载体经洗涤后存于缓冲液中备用。

[0065] 1.4 生物素-亲和素1级复合物的生成

[0066] 合成3'、5'均经生物素修饰的一段寡核苷酸(生长序列),碱基数10~20个;

[0067] 在含有固相载体的缓冲液中加入游离的生长序列溶液适量,生长序列一端的生物

素与固相载体表面的亲和素稳定地结合；

[0068] 通过离心或施加磁场将固相载体与过量的游离的生长序列分离，固相载体经洗涤后存于缓冲液中备用；

[0069] 将含有固相载体缓冲液的温度升高到根序列与引发序列杂合体的 T_m 以上，使引发序列与根序列解离（也可采用改变溶液的离子强度或酸碱度等方法），脱离固相载体，在保持该温度的条件下进行离心或施加磁场，吸取上清液，得到生物素 - 亲和素 1 级复合物。

[0070]

[0071] 如此反复，得到固相载体表面“长出”的生物素 - 亲和素 n 级复合物。

[0072] (2) 生物素 - 亲和素 n 级复合物用于免疫分析法的信号放大

[0073] 2.1 捕获抗体固定于固相载体（以羧基化的聚苯乙烯微球为例）

[0074] 针对某种抗原 Ag 的捕获抗体 (anti_1Ag) 与羧基化的聚苯乙烯微球 (Beads) 共价交联的详细操作程序请登录 Luminex 公司网站：www.luminexcorp.com 上的技术支持，得到 Beads 与捕获抗体的耦联物 anti_1Ag -Beads，为 A 液，同时记录与 Beads 共价交联加入一抗的质量为 M_1 。

[0075] 2.2 第二抗体的生物素标记

[0076] 取质量为 M_1 经透析纯化后的针对 Ag 的第二抗体，加入生物素的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液，避光反应，透析去除未反应的生物素，保存备用。

[0077] 2.3 荧光染料标记第二抗体

[0078] 取生物素标记的第二抗体，加入亲和素标记的荧光染料，使生物素与亲和素结合，生成第二抗体 - 荧光染料，为 C 液。

[0079] 2.4 抗原标准品溶液的配制

[0080] 用 Ag 的标准品配制一定浓度的标准品溶液，为 B 液。

[0081] 2.5 免疫反应及信号检测

[0082] 将 A、B、C 液体混匀， 37°C 反应 30min，离心洗涤后得到图 6 所示的复合物缓冲液（此时可按常规做法检测荧光信号）；

[0083] 加入生物素 - 亲和素 n 级复合物，使生物素与图 6 固相载体上的亲和素连接，离心洗涤后再加入亲和素标记的荧光染料，离心洗涤后得到图 7 所示的复合物后即可检测经放大的荧光信号。

[0084] 本发明的主要优点在于：

[0085] (a) 可有效提高免疫检测的灵敏度。

[0086] (b) 基本上不改变也在不增加原来的免疫检测试验操作程序。

[0087] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0088] 实施例 1

[0089] 生物素 - 亲和素 1 级复合物用于甲胎蛋白抗原免疫分析检测

[0090] 1、生物素 - 亲和素 1 级复合物的制备

[0091] 1.1 根序列固定于羧基修饰的磁颗粒

- [0092] 1.1.1 原料
- [0093] 根序列:5' NH₂-(T₁₅)GACCAATGCATGGTCCAGAC3' (SEQ ID NO:1);
- [0094] 粒径为 1 μm 表面羧基化的磁微球;
- [0095] EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺);
- [0096] MES(吗啉乙磺酸)
- [0097] 1.1.2 操作步骤
- [0098] 01. 将根序列寡核苷酸用双蒸水溶解,浓度为 0.01mM;
- [0099] 02. 用振荡器将磁微球混合均匀;
- [0100] 03. 取 50 μl (约 6.0×10⁶ 磁微球),放入洁净的 Ep 管中;
- [0101] 04. 施加磁场沉淀磁微球,小心弃取上清液;
- [0102] 05. 取消磁场,加入 100 μl 双蒸水,充分振荡悬浮磁微球,施加磁场沉淀磁微球;
- [0103] 06. 弃去上清液,取消磁场,用 50 μl 0.1M MES(pH 4.5) 重新悬浮磁微球,并用振荡器混匀;
- [0104] 07. 取 10 μl 根序列溶液加到上步骤中的磁微球悬液中,用振荡器混匀;
- [0105] 08. 按 10mg/mL 新鲜配制 EDC 溶液;
- [0106] 09. 取 2.5 μl 上步骤的 EDC 溶液加入磁微球悬液中,用振荡器混匀;
- [0107] 10. 避光,37℃静置 30 分钟;
- [0108] 11. 施加磁场沉淀磁微球;
- [0109] 12. 弃去上清液,取消磁场,用 1.0mL 0.1% SDS 重新悬浮磁微球,并用振荡器混匀;
- [0110] 13. 施加磁场沉淀磁微球;
- [0111] 14. 弃去上清液,取消磁场,用 100 μl TE(pH 8.0) 重新悬浮磁微球,并用振荡器混匀;
- [0112] 15. 将固定了根序列的磁微球避光保存在 2-10℃环境中。
- [0113] 1.2 引发序列与根序列形成相对稳定的杂合体
- [0114] 1.2.1 原料
- [0115] 引发序列:3' CTGGTTACGTACCAGGTCTG(T₁₀)-生物素 5' (或表示为 5'-生物素-tttttttttt gtctggaccatgcattggtc-3', SEQ ID NO:2);
- [0116] 固定了根序列的磁微球混悬液。
- [0117] 1.2.2 操作步骤
- [0118] 01. 将引发序列用 TE(pH 8.0) 溶解,浓度为 0.01mM;
- [0119] 02. 用振荡器将磁微球混悬液混合均匀;
- [0120] 03. 取 10 μl 引发序列溶液加入 50 μl 磁微球混悬液中,混匀后室温放置 30min;
- [0121] 04. 施加磁场,弃去上清液;
- [0122] 05. 取消磁场,加入 1ml TE 缓冲液洗涤磁微球;
- [0123] 06. 施加磁场,弃去上清液,反复几次得到如图 1 复合物的 TE 混悬液 100 μl。
- [0124] 1.3 连接亲和素
- [0125] 1.3.1 原料
- [0126] 市售亲和素;

[0127] 步骤 1.2 中制备复合物 (图 1) 的 TE 混悬液。

[0128] 1.3.2 操作步骤

[0129] 01. 取 10 μ l 市售亲和素溶液加入图 1 复合物的 100 μ l TE 混悬液中, 混合均匀, 室温静置 30min;

[0130] 02. 施加磁场, 沉淀磁微球, 弃去上清液;

[0131] 03. 取消磁场, 加入 1ml TE 缓冲液洗涤磁微球;

[0132] 04. 施加磁场, 弃去上清液, 反复几次得到如图 2 复合物的 TE 混悬液 100 μ l。

[0133] 1.4 生物素-亲和素 1 级复合物的生成

[0134] 1.4.1 原料

[0135] 生长序列: 3' 生物素-TTTTTTTTTTTTTTT-生物素 5' (SEQ ID NO:3);

[0136] 图 2 复合物的 TE 混悬液。

[0137] 1.4.2 操作步骤

[0138] 01. 将生长序列用 TE 缓冲液配制成终浓度为 10 μ M;

[0139] 02. 取 10 μ l 生长序列溶液加入图 2 复合物的 TE 混悬液 100 μ l 中, 混合均匀, 室温静置 30min;

[0140] 03. 施加磁场, 沉淀磁微球, 弃去上清液;

[0141] 04. 取消磁场, 加入 1ml TE 缓冲液洗涤磁微球;

[0142] 05. 施加磁场, 弃去上清液, 反复几次得到如图 3 复合物的 TE 混悬液 100 μ l;

[0143] 06. 施加磁场, 沉淀磁微球, 弃去上清液;

[0144] 07. 取消磁场, 加入 100 μ l 纯水, 混合均匀, 提高温度至 50°C, 静置 5min;

[0145] 08. 施加磁场, 沉淀磁微球, 吸取上清液, 得到生物素-亲和素 1 级复合物, 2-8°C 保存备用。

[0146] 2、生物素-亲和素 1 级复合物用于免疫分析法的信号放大

[0147] 此处以 Luminex 流式荧光法检测甲胎蛋白抗原为例说明本专利放大检测信号提高灵敏度的有效性。

[0148] 根据基本原理的阐述, 生物素-亲和素 1 级复合物用于免疫分析, 对信号的放大倍数理论上应是常规信号检测方法的 3 倍, 为此用 2 种方法分别平行检测同样浓度的甲胎蛋白抗原 5 次, 求各自的平均数, 观察 2 个平均数的比值是否接近于 3。

[0149] 2.1 常规方法检测甲胎蛋白抗原

[0150] 2.1.1 原料

[0151] 市售“甲胎蛋白定量检测试剂盒 (流式荧光免疫法)”。

[0152] 2.1.2 操作 (反应原理如图 6 所示)

[0153] 01. 将试剂盒中 16ng/ml 的校准品复溶;

[0154] 02. 分别吸取 5 次, 每次 20 μ l, 置于 5 个 EP 管中;

[0155] 03. 按试剂盒使用说明书操作, 获取这 5 个平行样的荧光信号, 结果见下表:

[0156] 表 1: 16ng/ml 的校准品的荧光信号值

[0157]		1	2	3	4	5
	浓度 (ng/ml)	16	16	16	16	16

[0158]	荧光信号值	1050.4	998.6	1123.8	1007.5	986.9
	荧光信号平均值	1033.5 (对照)				

[0159] 2.2 生物素 - 亲和素 1 级复合物配合常规方法检测甲胎蛋白抗原

[0160] 2.2.1 原料

[0161] 使用上述同一试剂盒；

[0162] 生物素 - 亲和素 1 级复合物纯水溶液。

[0163] 2.2.2 操作（反应原理如图 7 所示）

[0164] 01. 分别吸取上述复溶的同一校准品溶液 5 次，每次 20 μ l，置于 5 个 EP 管中；

[0165] 02. 按试剂盒使用说明书操作至反应结束，不要上机检测荧光信号；

[0166] 03. 将 5 个 EP 管离心，弃去上清液；

[0167] 04. 用试剂盒提供的反应缓冲液配合离心操作洗涤如图 6 所示的复合物 2 次后，加入反应缓冲液 100 μ l，振荡，使复合物悬浮；

[0168] 05. 复合物悬浮液中加入 10 μ l 生物素 - 亲和素 1 级复合物溶液，混合均匀，37℃ 静置 30min；

[0169] 06. 重复“03,04”的操作；

[0170] 07. 加入标记了藻红蛋白 (PE) 的链亲和素，混合均匀，37℃ 静置 30min，得到如图 7 所示的复合物；

[0171] 08. 上机检测荧光信号，结果见下表：

[0172] 表 2：生物素 - 亲和素 1 级复合物配合常规方法检测 16ng/ml 的校准品的荧光信号值

[0173]

	1	2	3	4	5
浓度 (ng/ml)	16	16	16	16	16
荧光信号值	3812.6	4122.3	3908.6	4008.4	3886.3
荧光信号平均值	3947.6				

[0174] 2 种方法荧光信号的比值约为 3.82，这提示：对于 1 个反应单元（图 6、7 所示），常规方法下只有 1 个荧光染料分子报告信号，而使用了生物素 - 亲和素 1 级复合物后，加原来的 1 个共有 4 个荧光染料分子报告信号，所以比值应接近 4，因此本专利方法能够有效放大免疫分析方法的信号，提高检测灵敏度。

[0175] 实施例 2：生物素 - 亲和素 8 级复合物用于甲胎蛋白抗原免疫分析检测

[0176] 1、生物素 - 亲和素 8 级复合物的制备

[0177] 参照实施例 1 中生物素 - 亲和素 1 级复合物的制备方法和附图 1-5，增加循环反应的次数得到生物素 - 亲和素 8 级复合物溶液。

[0178] 2、生物素 - 亲和素 8 级复合物用于免疫分析法的信号放大

[0179] 仍以 Luminex 流式荧光法检测甲胎蛋白抗原为例说明本专利放大检测信号提高灵敏度的有效性，本实施例仍以实施例 1 中 16ng/ml 的校准品为样品。

[0180] 根据基本原理的阐述,生物素-亲和素 8 级复合物用于免疫分析,对信号的放大倍数理论上应是常规信号检测方法的 3^8 倍,即:6561 倍。

[0181] 为此用常规方法平行检测 16ng/ml 的甲胎蛋白校准品 5 次,求荧光信号的平均数;将 16ng/ml 的甲胎蛋白校准品用试剂盒提供的反应缓冲液稀释 1000 倍后(即:16pg/ml),再用生物素-亲和素 8 级复合物配合常规方法,平行检测 16pg/ml 的甲胎蛋白校准品 5 次,求荧光信号的平均数。

[0182] 原料、操作步骤与实施例 1 中的相应部分完全一致,结果见表 3、4。

[0183] 表 3:常规方法检测 16ng/ml 的校准品的荧光信号值

[0184]

	1	2	3	4	5
浓度 (ng/ml)	16	16	16	16	16
荧光信号值	1123.6	976.5	1021.8	1007.5	986.9
荧光信号平均值	1023.3				

[0185] 表 4:生物素-亲和素 8 级复合物配合常规方法检测 16pg/ml 的校准品的荧光信号值

[0186]

	1	2	3	4	5
浓度 (pg/ml)	16	16	16	16	16
荧光信号值	2653.5	2235.3	2845.7	1896.9	2497.2
荧光信号平均值	2425.7				

[0187] 2 种方法荧光信号平均值的比值约为:2.4,因后者测的样本的浓度为前者的 1/1000,所以将 $2.4 \times 1000 = 2400$,虽与理论值有较大的差距,但还是大幅提高了检测的灵敏度。

[0188] 实施例 3:生物素-亲和素 8 级复合物用于甲胎蛋白抗原免疫分析检测

[0189] 重复实施例 1 和 2,不同点在于,制备生物素-亲和素 2 级复合物、生物素-亲和素 3 级复合物、生物素-亲和素 4 级复合物、生物素-亲和素 5 级复合物、生物素-亲和素 6 级复合物、和生物素-亲和素 7 级复合物。并测试各级复合物的检测灵敏度。

[0190] 结果如表 5 所示。

[0191] 表 5 各级复合物的检测灵敏度

[0192]

复合物的级数 (n)	与对照相比的相对灵敏度倍数 (复合物 / 对照的比值)
0(对照)	1
1	3.82

2	14
3	40
4	110
5	275
6	630
7	1320
8	2425

[0193] 上述结果表明,本发明的 2 级复合物可以提高灵敏度约 15 倍,而 4 级复合物可以提高灵敏度约 100 倍,而 6 级复合物可以提高灵敏度约 1000 倍。随着 n 级数的增加,虽与理论值有较大的差距,但仍可大幅提高的检测的灵敏度。

[0194] 实施例 4-5 :不同序列长度的根序列

[0195] 重复实施例 1 和 2,制备 $n = 4$ 的 4 级复合物。不同点在于:用 5' $\text{NH}_2-(\text{T}_{13})$ GACCAATGCATGGTCCAGA3' (SEQ ID NO :4) 或 5' $\text{NH}_2-(\text{T}_{20})$ GACCAATGCATGGTCCAGAC3' (SEQ ID NO :5) 分别替换 SEQ ID NO :1 所示的根序列。

[0196] 测试结果表明,实施例 4 和 5 的二种 4 级复合物可以提高灵敏度约 100 倍和 105 倍。

[0197] 实施例 6-7 :不同序列长度的引发序列

[0198] 重复实施例 1 和 2,制备 $n = 3$ 的 3 级复合物。不同点在于:用 5' - 生物素 -tttttttttt gtctggaccatgcattggt-3' (SEQ ID NO :6) 或 5' - 生物素 -tttttttttttttttt gtctggaccatgcattggtc-3' (SEQ ID NO :7) 分别替换 SEQ ID NO :2 所示的引发序列。

[0199] 测试结果表明,实施例 6 和 7 的二种 3 级复合物可以提高灵敏度约 38 倍和 42 倍。

[0200] 实施例 8 :不同序列长度的生长序列

[0201] 重复实施例 1 和 2,制备 $n = 4$ 的 4 级复合物。不同点在于用 ttttttttttttt (SEQ ID NO :8) 替换 SEQ ID NO :3 所示的生长序列。

[0202] 测试结果表明,所制备的 4 级复合物可以提高灵敏度约 100 倍。

[0203] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0204] 序列表

[0205] <110> 上海透景生命科技有限公司

[0206] <120> 一种提高免疫检测灵敏度的方法

[0207] <130>088288

[0208] <160>8

[0209] <170>PatentIn version 3.2

[0210]	<210>1	
[0211]	<211>35	
[0212]	<212>DNA	
[0213]	<213> 人工序列	
[0214]	<220>	
[0215]	<221>misc_feature	
[0216]	<223> 根序列	
[0217]	<400>1	
[0218]	tttttttttt tttttgacca atgcatgggc cagac	35
[0219]	<210>2	
[0220]	<211>30	
[0221]	<212>DNA	
[0222]	<213> 人工序列	
[0223]	<220>	
[0224]	<221>misc_feature	
[0225]	<223> 引发序列	
[0226]	<400>2	
[0227]	tttttttttt gtctggacca tgcattgggc	30
[0228]	<210>3	
[0229]	<211>15	
[0230]	<212>DNA	
[0231]	<213> 人工序列	
[0232]	<220>	
[0233]	<221>misc_feature	
[0234]	<223> 生长序列	
[0235]	<400>3	
[0236]	tttttttttt ttttt	15
[0237]	<210>4	
[0238]	<211>32	
[0239]	<212>DNA	
[0240]	<213> 人工序列	
[0241]	<220>	
[0242]	<221>misc_feature	
[0243]	<223> 根序列	
[0244]	<400>4	
[0245]	tttttttttt ttgaccaat gcatgggtcca ga	32
[0246]	<210>5	
[0247]	<211>40	
[0248]	<212>DNA	

[0249]	<213> 人工序列	
[0250]	<220>	
[0251]	<221>misc_feature	
[0252]	<223> 根序列	
[0253]	<400>5	
[0254]	tttttttttt tttttttttt gaccaatgca tgggtccagac	40
[0255]	<210>6	
[0256]	<211>28	
[0257]	<212>DNA	
[0258]	<213> 人工序列	
[0259]	<220>	
[0260]	<221>misc_feature	
[0261]	<223> 引发序列	
[0262]	<400>6	
[0263]	tttttttttg tctggacat gcattggt	28
[0264]	<210>7	
[0265]	<211>34	
[0266]	<212>DNA	
[0267]	<213> 人工序列	
[0268]	<220>	
[0269]	<221>misc_feature	
[0270]	<223> 引发序列	
[0271]	<400>7	
[0272]	tttttttttt ttttgtctgg accatgcatt ggtc	34
[0273]	<210>8	
[0274]	<211>12	
[0275]	<212>DNA	
[0276]	<213> 人工序列	
[0277]	<220>	
[0278]	<221>misc_feature	
[0279]	<223> 生长序列	
[0280]	<400>8	
[0281]	tttttttttt tt	12

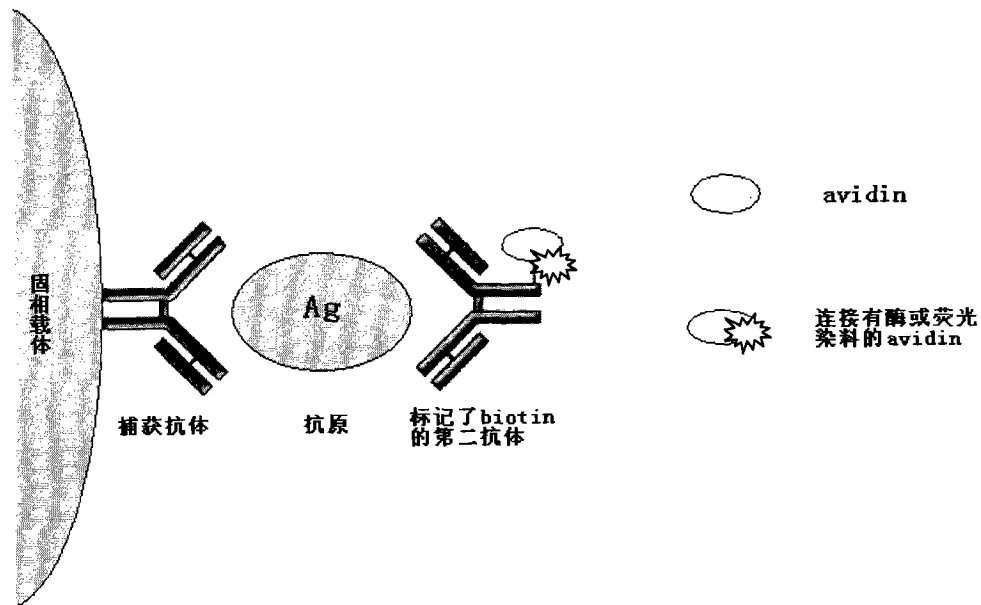
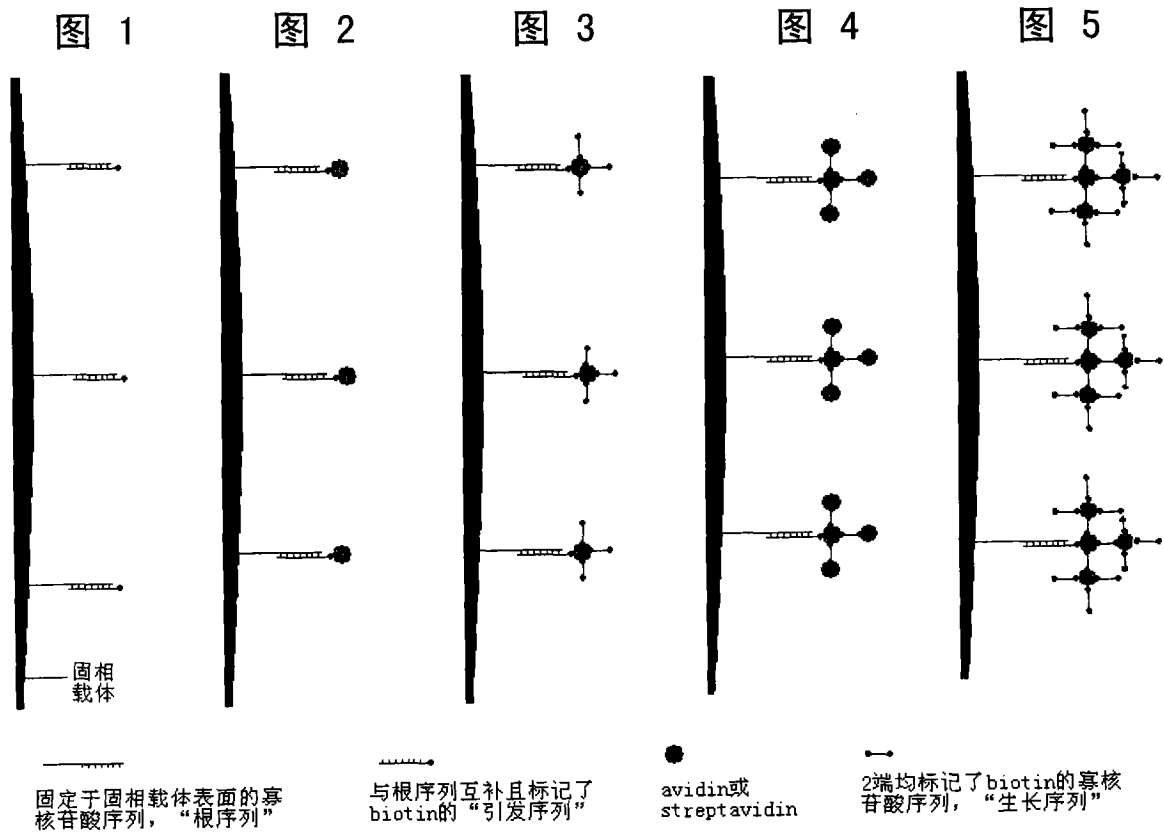


图 6

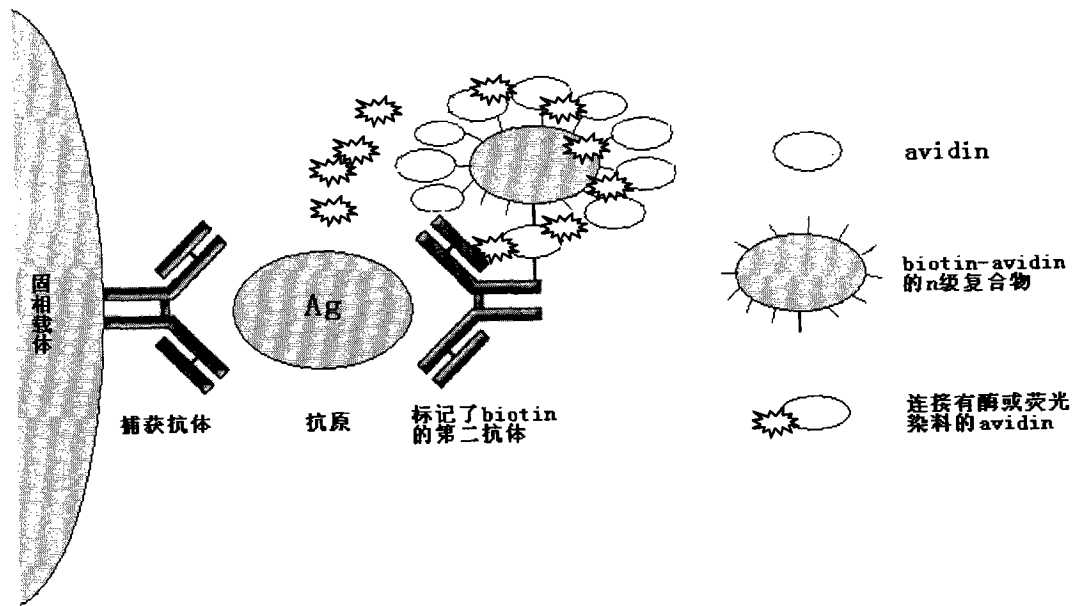


图 7

专利名称(译)	一种提高免疫检测灵敏度的方法		
公开(公告)号	CN101929997B	公开(公告)日	2014-03-19
申请号	CN200810207959.7	申请日	2008-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	上海透景生命科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海透景生命科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海透景生命科技有限公司		
[标]发明人	李久彤 姚见儿 白艳军 周雪雷 张晓峰 周伟		
发明人	李久彤 姚见儿 白艳军 周雪雷 张晓峰 周伟		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	刘文瀚		
其他公开文献	CN101929997A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种提高免疫检测灵敏度的方法。具体地，本发明提供了一种生物素-亲和素的复合物，所述复合物包括：(i)引发序列；(ii)第n级亲和素，其中n为1-20的正整数；并且当n为1时，则第1级亲和素结合于所述引发序列上的生物素；和(iii)生长序列，所述的生长序列是两端标记有生物素的寡核苷酸单链，所述生长序列中位于一端的生物素与第n级亲和素结合，而位于另一端的生物素与第n+1级亲和素结合或处于未结合状态，其中n为1-20的正整数。本发明的复合物可有效提高免疫检测的灵敏度，并且可以基本上不改变也不增加原有的免疫检测试验操作程序。

	1	2	3	4	5
浓度 (ng/ml)	16	16	16	16	16