



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102654452 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201110051120. 0

(22) 申请日 2011. 03. 03

(73) 专利权人 上海鑫谱生物科技有限公司  
地址 201100 上海市闵行区莘北路 518 号 2 号楼 103 室

(72) 发明人 李久彤

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 祝莲君

(51) Int. Cl.

G01N 21/25(2006. 01)

G01N 33/536(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101243321 A, 2008. 08. 13,  
CN 101387645 A, 2009. 03. 18,  
WO 2007/002178 A2, 2007. 01. 04,

审查员 李婷

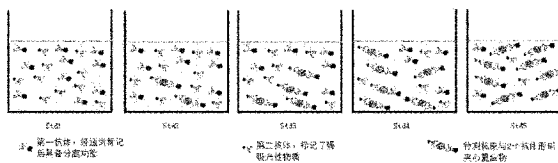
权利要求书2页 说明书14页 附图5页

(54) 发明名称

基于测量吸光度的免疫反应分析方法

(57) 摘要

本发明提供了一种基于测量吸光度的免疫反应分析方法。具体地,本发明提供了一种测量同一混合溶液在 2 个不同反应阶段的吸光度,然后求比值确定待测物存在与否和 / 或数量的免疫分析方法。本发明方法的免疫反应在液溶胶均相反应体系中进行,因此反应均匀迅速、定量准确、全过程无需洗涤,此外还可调节检测灵敏度、多指标联检。



1. 一种非治疗性非诊断性的检测待测物存在与否和 / 或数量的免疫分析方法, 其特征在于, 包括步骤:

(a) 提供一检测混合物, 其中所述检测混合物中含有针对所述待测物的第一结合物, 以及含有针对所述待测物的第二结合物, 其中第二结合物标记有吸光物质, 并且所述的第一结合物和第二结合物可同时结合于所述待测物;

(b) 将待测物或含待测物的样品溶液加入检测混合物, 从而形成含“第一结合物-待测物-第二结合物”三元复合物的混合溶液;

(c) 用光线照射步骤 (b) 的混合溶液, 使得所述光线透过所述混合溶液, 并测量透射光线而获得所述混合溶液的吸光度, 记为第一吸光度 A1;

(d) 从上一步骤的混合溶液中捕获或分离出所述的三元复合物, 从而使得所述三元复合物与所述混合溶液的液相分开;

(e) 用光线照射步骤 (d) 的混合溶液, 使得所述光线透过所述混合溶液, 并测量透射光线而获得所述混合溶液的吸光度, 记为第二吸光度 A2;

(f) 将第一吸光度 A1 和第二吸光度 A2 进行比较, 从而确定所述待测物存在与否和 / 或数量。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的待测物包括: 蛋白、核酸。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的吸光物质指摩尔吸收系数  $\epsilon > 10^8 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  的物质。

4. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的吸光物质选自下组: 胶体金、纳米金棒、纳米银棒或其组合。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的第一结合物标记有捕获剂。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述的捕获剂包括: 生物素、磁性微球, 或者组合。

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 (f) 中还包括: 将第一吸光度 A1 和第二吸光度 A2 的比值与标准曲线或对照进行比较, 从而确定待测物的数量。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的待测物是抗原, 且所述的第一结合物和第二结合物是可同时结合于所述抗原的抗体; 或者

所述的待测物是抗体, 且所述的第一结合物和第二结合物是可同时结合于所述抗体的抗原或所述抗体的抗体 (抗抗体)。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 (e) 中, 所述的光线透射通过所述混合溶液的光程为 0.1-200 厘米。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的待测物包括 2-10 种不同的物质, 并且所述的检测混合物含有分别针对这些不同待测物的第一结合物和第二结合物。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的检测混合物是液相、悬浮液或固相。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其特征在于, 当检测混合物为固相时, 步骤 (b) 还包括加入溶剂。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述溶剂包括水或缓冲液。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的待测物包括肿瘤标志物。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述肿瘤标志物选自下组: 甲胎蛋白

(AFP)、癌胚抗原 (CEA)、癌抗原 125 (CA125)、糖抗原 19-9 (CA19-9)、总前列腺特异性抗原 (PSA)、游离前列腺特异性抗原 (f-PSA)、神经原特异性烯醇化酶 (NSE)、糖链抗原 (CA242)、癌抗原 (CA15-3)、人绒毛膜促性腺激素 ( $\beta$ -HCG)。

16. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的纳米金棒的纵横比为 1.5-10。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,纳米金棒的纵横比为 1.5-5。

18. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的纳米金棒的长度为 10-200nm。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其特征在于,所述的纳米金棒的长度为 20-100nm。

20. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的胶体金是平均粒径为 10-70nm 的胶体金颗粒。

21. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的待测物是抗体,所述的第一结合物是可与所述抗体结合的抗原,而所述的第二结合物是针对所述检测物(抗体)的抗体。

22. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,光线透射通过所述混合溶液的光程为 0.2-100 厘米。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,光线透射通过所述混合溶液的光程为 0.5-50 厘米。

24. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,光线透射通过所述混合溶液的光程为 1.0-20 厘米。

25. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述光线包括可见光、红外线。

26. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述光线的波长为 300-1500nm。

27. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的方法还包括用已知浓度的待测物标准品进行测量,从而制作标准曲线的步骤。

28. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在步骤 (d) 中所述的三元复合物与混合溶液的液相分开,指在照射通过液相的光线通路上,不存在所述三元复合物。

29. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述的分别针对这些不同待测物的第二结合物上标记纵横比不同的纳米金棒。

30. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述的分别针对这些不同待测物的第一结合物上标记有相同的捕获剂。

## 基于测量吸光度的免疫反应分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,具体地涉及一种基于测量吸光度的免疫反应分析方法。

### 背景技术

[0002] 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(Clin. Chem. 1978, 24 :342-344)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。通常的作法是:将捕获抗体固定于固相载体,然后与抗原(目标蛋白)反应,洗涤后再与标记抗体反应,洗涤,加入底物检测光电等信号。这些方法都是固相与液相之间的非均相反应,且一次实验报告一个项目的检测结果,所以有进一步提高反应速度和一次试验可检测多个项目的实际需求。

[0003] 近几年出现的液相芯片技术,一次试验可检测多个项目,且无需洗涤,其原理是把不同编码微球共价交联上针对特定检测物的探针、抗原或抗体。应用时,先把针对不同检测物的编码微球混合,再加入微量待检样本,在悬液中靶分子与微球表面交联的分子进行特异性地结合,在一个反应体系内可以同时完成多种不同的生物学反应。最后用流式细胞检测类仪器进行分析,仪器通过两束激光分别识别编码微球和检测微球上报告分子的荧光强度,报告多个检测项目的结果,因还是非均相反应,所以报告结果的时间一般为1-1.5小时,不能满足临床快速报告结果的要求(中华检验医学杂志,2006,29(5):431-432;分析仪器,2008年,第1期,22-24)。

[0004] 因此,本领域迫切需要开发一种操作简便(例如,不必洗涤),并且反应均匀和/或快速的检测方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的就是提供一种在检测过程中不必人工洗涤、操作简便且反应均匀和/或快速的检测方法。

[0006] 在本发明的第一方面,提供了一种检测待测物存在与否和/或数量的免疫分析方法,包括步骤:

[0007] (a) 提供一检测混合物,其中所述检测混合物中含有针对所述待测物的第一结合物,以及含有针对所述待测物的第二结合物,其中第二结合物标记有吸光物质,并且所述的第一结合物和第二结合物可同时结合于所述待测物;

[0008] (b) 将待测物或含待测物的样品溶液加入检测混合物,从而形成含“第一结合物-待测物-第二结合物”三元复合物的混合溶液;

[0009] (c) 用光线照射步骤(b)的混合溶液,使得所述光线透过所述混合溶液,并测量透射光线而获得所述混合溶液的吸光度,记为第一吸光度A1;

[0010] (d) 从上一步骤的混合溶液中捕获或分离出所述的三元复合物,从而使得所述三

元复合物与所述混合溶液的液相分开；

[0011] (e) 用光线照射步骤 (d) 的混合溶液,使得所述光线透过所述混合溶液,并测量透射光线而获得所述混合溶液的吸光度,记为第二吸光度 A2；

[0012] (f) 将第一吸光度 A1 和第二吸光度 A2 进行比较,从而确定所述待测物存在与否和 / 或数量。

[0013] 在另一优选例中,所述的检测混合物是液相 (溶液)、悬浮液或固相。

[0014] 在另一优选例中,当检测混合物为固相时,步骤 (b) 还包括加入溶剂 (如水或缓冲液)。

[0015] 在另一优选例中,所述的待测物包括:蛋白和 / 或核酸。

[0016] 在另一优选例中,所述的待测物包括肿瘤标志物等特异性的蛋白。

[0017] 在另一优选例中,所述肿瘤标志物选自下组:甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、癌抗原 125 (CA125)、糖抗原 19-9 (CA19-9)、总前列腺特异性抗原 (PSA)、游离前列腺特异性抗原 (f-PSA)、神经原特异性烯醇化酶 (NSE)、糖链抗原 (CA242)、癌抗原 (CA15-3)、人绒毛膜促性腺激素 ( $\beta$ -HCG)。

[0018] 在另一优选例中,所述的吸光物质指摩尔吸收系数  $\epsilon > 10^8 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  的物质。

[0019] 在另一优选例中,所述的吸光物质选自下组:胶体金、纳米金棒、纳米银棒或其组合。

[0020] 更佳地,所述的吸光物质为纳米金棒。

[0021] 在另一优选例中,所述的纳米金棒的纵横比为 1.5-10,较佳地为 1.5-5。

[0022] 在另一优选例中,所述的纳米金棒的长度为 10-200nm,较佳地为 20-100nm。

[0023] 在另一优选例中,所述的胶体金是平均粒径为 10-70nm 的胶体金颗粒。

[0024] 在另一优选例中,所述的第一结合物标记有捕获剂;更佳地,所述的捕获剂包括:生物素、磁性微球,或者组合。

[0025] 在另一优选例中,在步骤 (f) 中还包括:将第一吸光度 A1 和第二吸光度 A2 的比值与标准曲线或对照进行比较,从而确定待测物的数量。

[0026] 在另一优选例中,所述的待测物是抗原,且所述的第一结合物和第二结合物是可同时结合于所述抗原的抗体;或者

[0027] 所述的待测物是抗体,且所述的第一结合物和第二结合物是可同时结合于所述抗体的抗原或所述抗体的抗体 (抗抗体)。

[0028] 在另一优选例中,所述的待测物是抗体,所述的第一结合物是可与所述抗体结合的抗原,而所述的第二结合物是针对所述检测物 (抗体) 的抗体,反之亦然。例如,当待测物是某种人抗体时,第一结合物是该人抗体所针对的抗原,而第二结合物是抗该人抗体的鼠源或兔源抗体。

[0029] 在另一优选例中,在步骤 (e) 中,所述的光线透射通过所述混合溶液的光程为 0.1-200 厘米。

[0030] 在另一优选例中,所述的光程为 0.2-100 厘米,较佳地 0.5-50 厘米,更佳地为 1.0-20 厘米。

[0031] 在另一优选例中,所述光线包括可见光、红外线。

[0032] 在另一优选例中,所述光线的波长为 300-1500nm。

[0033] 在另一优选例中,所述的方法还包括用已知浓度的待测物标准品进行测量,从而制作标准曲线的步骤。

[0034] 在另一优选例中,在步骤(d)中所述的三元复合物与混合溶液的液相分开,指在照射通过液相的光线通路上,不存在所述三元复合物。

[0035] 在另一优选例中,所述的待测物包括 2-10 种不同的物质,并且所述的检测混合物含有分别针对这些不同待测物的第一结合物和第二结合物。

[0036] 在另一优选例中,所述的分别针对这些不同待测物的第二结合物上标记纵横比不同的纳米金棒。

[0037] 在另一优选例中,所述的分别针对这些不同待测物的第一结合物上标记有相同的捕获剂。

[0038] 在本发明的第二方面,提供了一种可用于本发明第一方面中所述方法的、用于检测待测物存在与否和 / 或数量的免疫分析检测装置,所述的装置包括:

[0039] (a) 一容器,所述的一容器用于放置检测混合物,其中所述检测混合物中含有针对所述待测物的第一结合物,以及含有针对所述待测物的第二结合物,其中第二结合物标记有吸光物质,并且所述的第一结合物和第二结合物可同时结合于所述待测物;

[0040] (b) 用于检测吸光度的检测器;和

[0041] (c) 描述权利要求 1 所述方法的使用说明。

[0042] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

#### 附图说明

[0043] 图 1A 显示了在本发明方法中,混合溶液中第一抗体、待测物、第二抗体形成了“三元复合物”。

[0044] 图 1B 显示了在本发明方法中,从混合溶液中捕获或分离“三元复合物”后,混合溶液中留下了部分第二抗体。

[0045] 图 2 显示了不同纵横比的纳米金棒的可见 / 红外光谱。

[0046] 图 3 显示了本发明一个实例中得到的 CEA 的标准曲线,其中 x 轴为对数浓度,y 轴为  $A1/A2$  的比值。

[0047] 图 4 显示了本发明一个实例中得到的 AFP 的标准曲线。

[0048] 图 5 显示了本发明一个实例中得到的 CEA 的标准曲线。

[0049] 图 6 显示了本发明一个实例中得到的 AFP 的标准曲线。

[0050] 图 7 显示了本发明一个实例中得到的 CEA 标准曲线。

[0051] 图 8 显示了本发明一个实例中得到的 AFP 标准曲线。

[0052] 图 9 显示了本发明一个实例中得到的 PSA 标准曲线。

#### 具体实施方式

[0053] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次开发了一种测量同一混合溶液在 2 个不同反应阶段的吸光度,然后求比值确定待测物存在与否和 / 或数量的免疫分析方法。在本发

明的检测方法中,反应均匀迅速;全过程无需洗涤,可进行多指标联检。此外,可根据实际需要方便地调节检测灵敏度,且定量准确。在此基础上完成了本发明。

[0054] 基本原理

[0055] 现结合附图阐述本发明检测方法的基本原理。

[0056] (a) 单一指标检测原理

[0057] 以“双抗体夹心”法为基础,“第一抗体”经适当标记后具备分离功能,第二抗体标记具有强吸光性的物质(如胶体金、Nanorod),“第一抗体”、“第二抗体”与样本混匀,从而形成“第一抗体-抗原-第二抗体”夹心复合物。测混合溶液的最大吸收峰处的吸光度,记为  $A_1$ ;

[0058] 将反应生成的“第一抗体-抗原-第二抗体”夹心复合物捕获或分离后,测峰位处混合溶液的吸光度,记为  $A_2$ ;

[0059] 以  $A_1/A_2$  的比值作为样本中待测抗原量所产生的效应。由于夹心复合物被分离,所以  $A_1 \geq A_2$ ,即  $A_1/A_2$  值  $\geq 1$ ,且样本中待测抗原的量越多, $A_1/A_2$  值越大。

[0060] 参见图 1A 和 1B,图中 Std1-5 是待测抗原的标准系,Std1 中没有待测抗原,未形成夹心复合物。

[0061] Std2-Std5 中分别象征性示出了 2、4、6、8 个待测物,因此,Std2-Std5 中夹心复合物的数量随待测抗原浓度的增加而增加,但其中第二抗体的量并未改变。此时,分别测量 Std1-5 的吸光度,记为  $A_{i1}$  ( $i = 1-5$ )。

[0062] 采用适宜的方法将游离的第一抗体及含第一抗体的“夹心复合物”分离去除后测量混合溶液的吸光度,记为  $A_{i2}$  ( $i = 1-5$ ),与图 1A 进行对比,随着待测抗原的增加,Std2-5 中标记了吸光性物质的第二抗体随之减少,吸光度依次降低, $A_{i1}/A_{i2}$  ( $i = 1-5$ ) 依次增大。

[0063] (b) 多指标联检检测原理

[0064] 针对不同抗原的不同“第一抗体”可采用相同的标记方法,从而便于分离或捕获。

[0065] 针对这些抗原的不同“第二抗体”分别被具有不同纵横比的 Nanorod 标记。例如,用 3 种纵横比的 Nanorod(图 2 中的 Nanorod 2、3、4) 分别标记针对 3 种抗原的 3 种“第二抗体”,使这些被 Nanorod 标记的“第二抗体”在光谱上相互区别。

[0066] 应用时,多指标检测的原理与单指标检测的原理完全相同。针对不同待测物的“第一抗体”、“第二抗体”与样本混匀,从而形成“第一抗体-抗原-第二抗体”夹心复合物。一般,扫描混合溶液在一定波长(如 500-1000nm)的吸收光谱,记录各峰位处的吸光度  $A_{1i}$  ( $i = 1-$ 不同的抗体种类数)。

[0067] 将反应生成的不同“第一抗体-抗原-第二抗体”夹心复合物捕获或分离后,测各相应峰位处混合溶液的吸光度,得  $A_{2i}$  ( $i = 1-$ 不同的抗体种类数)。

[0068] 以各个  $A_{1i}/A_{2i}$  的比值作为样本中待测抗原量所产生的效应。由于夹心复合物被分离,所以  $A_{1i} \geq A_{2i}$ ,且  $A_{1i}/A_{2i} \geq 1$ ,样本中待测抗原的量越多, $A_{1i}/A_{2i}$  值越大。

[0069] 第一抗体的标记

[0070] 有多种标记方式可使第一抗体具备分离功能,如:将抗体通过化学或物理方法直接固定于固相载体,其中固相载体可以是玻片、膜、本领域使用的各种酶标板以及各种微球等;更优地,用生物素(Biotin)标记第一抗体,使免疫反应在均相环境中发生,再与链亲和素(Streptavidin)修饰的磁性微球或酶标板或膜连接,达到分离的目的。

[0071] 吸光物质

[0072] 如本文所用,术语“吸光物质”指摩尔吸收系数  $\epsilon > 10^8 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  的物质,代表性的物质包括(但并不限于):胶体金、纳米金颗粒(包括 Nanorod)、纳米银颗粒。

[0073] 如本文所用,术语“纳米金棒”或“Nanorod”指具有一定纵横比、且横轴和纵轴处于 5-200 纳米范围的金颗粒。图 2 给出了不同纵横比的纳米金棒的可见/红外光谱(Biotechnology and Genetic Engineering Reviews-Vol. 25, 93-112, 2008),其中不同的纳米金棒具有不同的可见/红外光谱特性,据此可互相区分。

[0074] 纳米金棒(Nanorod)是近几年来研发成功的一种纳米材料,其吸收光谱以及荧光光谱与金棒长短有关,各向异性及独特的光谱特征可被应用于诊断、纳米材料组装、癌细胞成像和 DNA 分析等,成为医学领域的研究热点之一。可用常规方法制备或市售获得,例如可购自 Nanopartz Inc. 公司(美国,科罗拉多州)。

[0075] 适用于本发明的纳米金棒没有特别限制,优选的纳米金棒的纵横比为 1.5-10,较佳地为 1.5-5。

[0076] 在另一优选例中,所述的纳米金棒的长度为 10-200nm,较佳地为 20-100nm。

[0077] 第二抗体的标记

[0078] 为了能检测到图 1A 和 1B 所示因免疫反应引起的混合溶液吸光度的变化,标记第二抗体的物质须有强的吸光特性,如:摩尔吸收系数  $\epsilon > 10^8 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  的物质。

[0079] 在优选例中,用纳米金颗粒和纳米金棒标记第二抗体,它们的物理尺寸约为 10-100nm,为稳定的胶体溶液,最大吸收波长为 500-1500nm,标记的第二抗体可与第一抗体、抗原在均相溶液中形成夹心复合物。

[0080] 一种特别优选的吸光物质是胶体金,尤其是粒径为 20-40nm 的胶体金。

[0081] 标准曲线

[0082] 在本发明中,可以直接通过第一吸光度  $A_1$  和第二吸光度  $A_2$  的比较,确定所述待测物存在与否和/或数量。

[0083] 在优选例中,可通过与标准曲线进行比较,从而获得定量结果。

[0084] 标准曲线可用以下方法获得:待测抗原标准系的第一点溶液 Std1 与标记的第一抗体、第二抗体溶液混匀,反应后,测量混合溶液的吸光度,为  $A_{1_i}$  ( $i = 1$ -不同的抗体种类数);

[0085] 分离或捕获“第一结合物-待测物-第二结合物”三元复合物后,再次测量混合溶液的吸光度,为  $A_{2_i}$  ( $i = 1$ -不同的抗体种类数);

[0086] 求  $A_{1_i}/A_{2_i}$  的值。

[0087] 同样操作,分别得到待测抗原标准系其他点的  $A_{1_i}/A_{2_i}$  比值,以标准系  $i$  种抗原各点浓度的对数值对相应的  $A_{1_i}/A_{2_i}$  对数值作图,得到  $i$  条标准曲线。

[0088] 捕获和分离三元复合物

[0089] 在本发明中,可采用常规方法捕获和分离“第一结合物-待测物-第二结合物”三元复合物。

[0090] 一种常用方法是将复合物捕获固定于固相载体,常用的固相载体有玻片、膜片、酶标板和各种微球。例如,第一抗体用生物素(biotin)标记,形成“夹心复合物”后再与链亲和素(Streptavidin)包被的固相载体结合,从而从液相中捕获或分离三元复合物。

[0091] 此外,也可通过磁性微球(结合磁场)或其他手段从液相中捕获或分离三元复合物。

[0092] 光源

[0093] 在本发明方法中,光源用于提供某一发射波长的光线,从而发出照射并通过检测溶液的光线。

[0094] 在本发明中,可选用任何可以提供合适波长的光源。合适的波长范围包括在另一优选例中,所述光线的波长为 300-1500nm,较佳地为 400-1000nm。

[0095] 本发明检测方法的主要优点包括:

[0096] (a) 溶液中抗原抗体等的物理大小均 $\leq 100\text{nm}$ ,故反应在液溶胶均相反应体系中进行,反应均匀迅速;

[0097] (b) 检测全过程无需洗涤;

[0098] (c) 可在同一检测体系中进行多指标检测。

[0099] (d) 检测灵敏度高,且定量准确。

[0100] 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不适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。除非另外说明,否则重量份和百分比按重量计。

[0101] 实施例 1:血清中癌胚抗原(CEA)的检测

[0102] 针对 CEA 的成对抗体 A1/C9 购自上海第二医科大学;

[0103] CEA 抗原购自中国药品生物制品检定所;

[0104] Streptavidin 包被的酶标板,市售品;

[0105] 30nm 的胶体金为市售品;

[0106] 检测器:USB4000-FL(美国海洋光学公司)

[0107] 卤钨灯光源,波长 350 ~ 2000nm

[0108] 1、金标抗体(第二抗体)的制备

[0109] 1.1 胶体金-抗体保存液

[0110] 四硼酸钠 0.1g

[0111] 小牛血清白蛋白(BSA) 0.25g

[0112]  $\text{NaN}_3$  0.025g

[0113] 加水溶解后用 6N HCL 调 pH 至 7.4,补水至 250ml,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,4-8 $^{\circ}\text{C}$  保存;

[0114] 1.2 工作液

[0115]

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	6.1g
NaCl	8.5g
PVP40(聚乙烯吡咯烷酮 40)	5.0g
硼酸	2.1g
PEG	1.0g
10%BSA	50ml
NaN <sub>3</sub>	0.2g

[0116] 加水溶解后用 6N HCL 调 pH 至 7.0-7.5 补水至 1000ml, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 4-8℃ 保存;

[0117] 1.3 金标抗体(第二抗体)的制备

[0118] 1.3.1 取 20-30nm 颗粒胶体金液 20ml, 在磁力搅拌下缓慢加入已纯化的 A1 抗体 1.0ml (0.6mg/ml), 在室温下搅拌 30min;

[0119] 1.3.2 加 10% 的 BSA 0.8ml (终浓度 0.4%), 室温搅拌 5min;

[0120] 1.3.3 加 10% 的 PEG 0.4ml (终浓度 0.2%), 室温搅拌 5min;

[0121] 1.3.4 12000-1500r/min 离心 60-40min, 小心去除上清, 沉淀溶于 20ml 保存液中, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 置 4℃ 保存备用;

[0122] 1.3.5 测量上述金标抗体溶液在 530nm 处的 OD 值为 1.5, 每毫升金标抗体溶液约相当于 36 μg 的 A1 抗体。

[0123] 2、Biotin 标记 C9 抗体(第一抗体)

[0124] 2.1 C9 抗体预处理

[0125]

抗体中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用纯水充分透析。
抗体中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A 柱或其它柱子纯化。
抗体浓度标定	分光光度计测其 OD <sub>280</sub> (10D <sub>280</sub> 相当于 0.7mg/ml 单克隆抗体)。最终用 1×PBS, pH7.4 将浓度定于 2mg/ml (浓缩使用 Pall 公司脱盐离心柱)。

[0126] 2.2 Biotin 标记 C9 抗体

[0127] 取上述预处理的 C9 抗体, 加入 25 μL 的 1mg/ml NHSS-Biotin DMSO 溶液, 混匀, 4℃ 冰箱避光反应 2 小时, 透析过夜备用, 终浓度为 550 μg/ml。

[0128] 3、标准曲线的绘制

[0129] 3.1CEA 标准溶液的配制

[0130] 用 PBS(pH7.4) 将 CEA 抗原稀释成标准系列, 浓度为: 0(Std1)、10(Std2)、

30(Std3)、100(Std4)、350(Std5)ng/ml；

[0131] 3.2 形成夹心复合物及吸光度测量

[0132] 取第二抗体溶液 10  $\mu$ l、标准品溶液 Std1 290  $\mu$ l、第一抗体溶液 1  $\mu$ l，混匀，37 $^{\circ}$ C 反应 10min，形成夹心复合物，测量混合溶液在 530nm 的吸光度，为 A1；

[0133] 将混合溶液转移至酶标板孔，37 $^{\circ}$ C 反应 15min 后，测量混合溶液在 530nm 的吸光度，为 A2；

[0134] 求 A1/A2 的值。

[0135] 用其他标准品溶液进行同样操作，分别得到 CEA 标准系其他点 Ai1/Ai2(i = 2-5) 的比值，结果见表 1。

[0136] 表 1 :CEA 标准系检测结果

[0137]

	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
CEA 浓度	C = 0ng/ml	C = 10ng/ml	C = 30ng/ml	C = 100ng/ml	C = 350ng/ml

[0138]

A1/A2	1.01	1.10	1.22	1.43	1.63
-------	------	------	------	------	------

[0139] 以上表结果作图，得标准曲线（图 3）。

[0140] 4、样本检测

[0141] 用 6 个未知的血清样本替代标准系列溶液，重复 3.2 的步骤，将 A1/A2 代入标准曲线，测得 6 个样本的 CEA 值分别为：12.2、43.9、32.6、78.8、103.3、211.6ng/ml。

[0142] 实施例 2 :血清中甲胎蛋白 (AFP) 的检测

[0143] 1、原材料

[0144] 针对 AFP 的成对抗体 G4/C2 购自上海第二医科大学；

[0145] AFP 抗原购自中国药品生物制品检定所；

[0146] Streptavidin 包被的酶标板，市售品；

[0147] 横轴为 10nm，纵轴为 41nm 的纳米金棒，纵横比为 4.1，市售品；

[0148] 检测器 :USB4000-FL(美国海洋光学公司)

[0149] 卤钨灯光源，波长 350 ~ 2000nm

[0150] 2、抗体标记

[0151] 2.1 纳米金棒标记 G4 抗体（第二抗体）的制备

[0152] 200  $\mu$ l 的纳米金棒，加入 1ml 0.1mg/ml 的第二抗体，振摇，静置 30min，

[0153] 用 1% 的 BSA 洗涤 3 次，第二抗体通过非特异性的物理吸附固定于纳米金棒表面；

[0154] 沉淀溶于适量保存液（配制同前一实施例）中，用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤，使其在 -830nm 处的吸光度为 -1.0，每毫升纳米金棒标记的 G4 抗体溶液约相当于 30  $\mu$ g 的 G4 抗体。

[0155] 2.2 Biotin 标记 C2 抗体（第一抗体）

[0156] 2.2.1 C2 抗体的预处理

[0157]	抗体中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用纯水充分透析。
	抗体中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A 柱或其它柱子纯化。
[0158]	抗体浓度标定	分光光度计测其 OD280 (10D280 相当于 0.7mg/ml 单克隆抗体)。最终用 1×PBS, pH7.4 将浓度定于 2mg/ml (浓缩使用 Pall 公司脱盐离心柱)。

[0159] 2.2.2 生物素标记反应

[0160] 取上述预处理的 C2 抗体, 加入 25 μL 的 1mg/ml NHSS-Biotin DMSO 溶液, 混匀, 4℃ 冰箱避光反应 2 小时, 透析过夜备用, 终浓度为 650 μg/ml。

[0161] 3、标准曲线的绘制

[0162] 3.1 AFP 标准溶液的配制

[0163] 用 PBS (pH7.4) 将 AFP 抗原稀释成标准系列, 浓度为 :0 (Std1)、10 (Std2)、20 (Std3)、100 (Std4)、400 (Std5) ng/ml ;

[0164] 3.2 形成夹心复合物及吸光度测量

[0165] 取第二抗体溶液 30 μL、标准溶液 Std1 270 μL、第一抗体溶液 1 μL, 混匀, 37℃ 反应 10min, 形成夹心复合物, 扫描混合溶液在 750-900nm 的吸收光谱, 并取最大值为 A1 ;

[0166] 将混合溶液转移至酶标板孔, 37℃ 反应 15min, 扫描混合溶液在 750-900nm 的吸收光谱, 并取最大值为 A2 ;

[0167] 求 A1/A2 的值。

[0168] 用标准溶液 Std2 至 Std5 重复上述操作, 分别得到 AFP 标准系其他点 Ai1/Ai2 (i = 2-5) 的比值, 结果见表 2。

[0169] 表 2 :AFP 标准系检测结果

[0170]

	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
AFP 浓度	C = 0ng/ml	C = 10ng/ml	C = 20ng/ml	C = 100ng/ml	C = 400ng/ml
A1/A2	1.02	1.13	1.28	1.57	1.81

[0171] 以上表结果作图, 得标准曲线 (图 4)。

[0172] 4、样本检测

[0173] 用 6 个未知的血清样本替代标准系列溶液, 重复 3.2 的步骤, 将 A1/A2 代入标准曲线, 测得 6 个样本的 AFP 值分别为 :14.2、56.9、31.6、82.8、123.3、351.6ng/ml。

- [0174] 实施例 3 :血清中癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP) 的同时检测
- [0175] 1、原材料
- [0176] 针对 CEA 的成对抗体 A1/C9 购自上海第二医科大学 ;
- [0177] CEA 抗原购自中国药品生物制品检定所 ;
- [0178] 针对 AFP 的成对抗体 G4/C2 购自上海第二医科大学 ;
- [0179] AFP 抗原购自中国药品生物制品检定所 ;
- [0180] Streptavidin 包被的酶标板,市售品 ;
- [0181] 横轴为 25nm,纵轴为 47nm 的纳米金棒,纵横比为 1.88,市售品,最大吸收峰 -600nm,以下简称 1.88Nanorod ;
- [0182] 横轴为 10nm,纵轴为 41nm 的纳米金棒,纵横比为 4.1,市售品,最大吸收峰 -800nm,以下简称 4.1Nanorod ;
- [0183] 检测器 :USB4000-FL (美国海洋光学公司)
- [0184] 卤钨灯光源,波长 350 ~ 2500nm
- [0185] 2、抗体标记
- [0186] 2.1 1.88Nanorod 标记 A1 抗体 (第二抗体) 的制备
- [0187] 200  $\mu$  L 的 1.88Nanorod,加入 1ml 0.1mg/ml 的第二抗体,振摇,静置 30min,
- [0188] 用 1% 的 BSA 洗涤 3 次,第二抗体通过非特异性的物理吸附固定于 1.88Nanorod 表面 ;
- [0189] 沉淀溶于适量保存液 (配制同前一实施例) 中,用 0.45  $\mu$  m 滤膜过滤,使其在 -630nm 处的吸光度为 -1.0,每毫升 1.88Nanorod 标记的 A1 抗体溶液约相当于 10  $\mu$  g 的 A1 抗体,得 1.88Nanorod-A1。
- [0190] 2.2 4.1Nanorod 标记 G4 抗体 (第二抗体) 的制备
- [0191] 200  $\mu$  L 的纳米金棒,加入 1ml 0.1mg/ml 的第二抗体,振摇,静置 30min,
- [0192] 用 1% 的 BSA 洗涤 3 次,第二抗体通过非特异性的物理吸附固定于纳米金棒表面 ;
- [0193] 沉淀溶于适量保存液 (配制同前一实施例) 中,用 0.45  $\mu$  m 滤膜过滤,使其在 -830nm 处的吸光度为 -1.0,每毫升纳米金棒标记的 G4 抗体溶液约相当于 10  $\mu$  g 的 G4 抗体,得 4.1Nanorod-G4。
- [0194] 2.3 Biotin 标记 C9 抗体 (第一抗体)
- [0195] 2.3.1 C9 抗体预处理
- [0196]

抗体中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用纯水充分透析。
抗体中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A 柱或其它柱子纯化。
抗体浓度标定	分光光度计测其 OD280 (10D280 相当于 0.7mg/ml 单克隆抗体)。最终用 1×PBS, pH7.4 将浓度定于 2mg/ml (浓缩使用 Pall 公司脱盐离心柱)。

[0197] 2.3.2 Biotin 标记 C9 抗体

[0198] 取上述预处理的 C9 抗体, 加入 25  $\mu$ L 的 1mg/ml NHSS-Biotin DMSO 溶液, 混匀, 4°C 冰箱避光反应 2 小时, 透析过夜备用, 得 Biotin-C9, 终浓度为 550  $\mu$ g/ml。

[0199] 2.3.3 Biotin 标记 C2 抗体 (第一抗体)

[0200] 方法同上, 得 Biotin-C2, 终浓度为 650  $\mu$ g/ml。

[0201] 3、标准曲线的绘制

[0202] 3.1 CEA、AFP 标准溶液的配制

[0203] 用 PBS (pH7.4) 配制 CEA、AFP 抗原的混合标准系列, 浓度为 :0、0 (Std1), 3.5、10.33 (Std2), 21.56、38.65 (Std3), 115.40、145.60 (Std4), 350、400.0 (Std5) ng/ml ;

[0204] 3.2 形成夹心复合物及吸光度测量

[0205] 分别取 1.88Nanorod-A1 和 4.1Nanorod-G4 溶液各 15  $\mu$ l、标准品溶液 Std1 270  $\mu$ l、Biotin-C9 和 Biotin-C2 各 1  $\mu$ l, 混匀, 37°C 反应 10min, 形成夹心复合物, 扫描混合溶液在 500-1000nm 的吸收光谱, 记录 1.88Nanorod-A1 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{1_1}$ , 4.1Nanorod-G4 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{1_2}$ ;

[0206] 将混合溶液转移至酶标板孔, 37°C 反应 15min, 扫描混合溶液在 500-1000nm 的吸收光谱, 记录 1.88Nanorod-A1 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{2_1}$ , 4.1Nanorod-G4 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{2_2}$ ;

[0207] 分别求  $A_{1_1}/A_{2_1}$  及  $A_{1_2}/A_{2_2}$  的值。

[0208] 同样操作, 得到 CEA、AFP 混合抗原标准系其他点的相应比值, 结果见表 3。

[0209] 表 3 :CEA/AFP 抗原混合标准系检测结果

[0210]

	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
CEA : $A_{1_1}/A_{2_1}$	1	1.05	1.26	1.60	1.82
AFP : $A_{1_2}/A_{2_2}$	1.02	1.12	1.33	1.55	1.76

[0211] 以上表结果作图, 分别得到 CEA 和 AFP 的标准曲线 (图 5、6)

[0212] 4、样本检测

[0213] 用 7 个未知的血清样本替代标准系列溶液,重复 3.2 的步骤,将 A1<sub>1</sub>/A2<sub>1</sub>和 A1<sub>2</sub>/A2<sub>2</sub>分别与图 5 和图 6 的标准曲线进行比较,测得 9 个样本的 CEA、AFP 值见表 4。

[0214] 表 4 :样本中 CEA/AFP 同时检测结果

[0215]

样本序号	AFP(ng/ml)	CEA(ng/ml)
1	12.14	8.12
2	65.53	28.51
3	183.25	50.76
4	13.46	106.49
5	35.36	> 350
6	15.33	35.12
7	> 400	110.45

[0216] 实施例 4 :血清中癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP)、总前列腺特异性抗原 (PSA) 的同时检测

[0217] 1、原材料

[0218] 针对 CEA 的成对抗体 A1/C9 购自上海第二医科大学 ;

[0219] CEA 抗原购自中国药品生物制品检定所 ;

[0220] 针对 AFP 的成对抗体 G4/C2 购自上海第二医科大学 ;

[0221] AFP 抗原购自中国药品生物制品检定所 ;

[0222] 针对 PSA 的第一抗体、第二抗体购自 Biodesign Inc., US ;

[0223] PSA 抗原购自中国药品生物制品检定所 ;

[0224] Streptavidin 包被的酶标板,市售品 ;

[0225] 横轴为 25nm,纵轴为 47nm 的纳米金棒,纵横比为 1.88,市售品,最大吸收峰 -600nm,以下简称 1.88Nanorod ;

[0226] 横轴为 25nm,纵轴为 73nm 的纳米金棒,纵横比为 2.92,市售品,最大吸收峰 -700nm,以下简称 2.92Nanorod ;

[0227] 横轴为 10nm,纵轴为 41nm 的纳米金棒,纵横比为 4.1,市售品,最大吸收峰 -800nm,以下简称 4.1Nanorod ;

[0228] 检测器 :USB4000-FL(美国海洋光学公司)

[0229] 卤钨灯光源,波长 350 ~ 2000nm。

[0230] 2、抗体标记

[0231] 继续使用“实施例 3”中分别针对 CEA、AFP 的 1.88Nanorod-A1 和 4.1Nanorod-G4。

[0232] 2.12.92Nanorod 标记 PSA 第二抗体

[0233] 标记方法同例 3。使其在 -730nm 处的吸光度为 -1.0,每毫升 Nanorod 标记的第二

抗体溶液约相当于 10  $\mu$ g 的 G4 抗体,得 2.92Nanorod-PSA。

[0234] 2.3 Biotin 标记第一抗体

[0235] 继续使用“实施例 3”中分别针对 CEA、AFP 的 Biotin-C9 和 Biotin-C2。

[0236] 2.3.1 Biotin 标记 PSA(第一抗体)

[0237] 标记方法同例 3,得 Biotin-PSA,终浓度为 500  $\mu$ g/ml。

[0238] 3、标准曲线的绘制

[0239] 3.1CEA、AFP、PSA 标准溶液的配制

[0240] 用 PBS(pH7.4) 配制 CEA、AFP、PSA 抗原的混合标准系列,浓度为 :0、0、0(Std1), 3.0、9.5、1.1(Std2), 24.6、37.55、4.5(Std3), 110.60、148.60、18.5(Std4), 350、400.0、50(Std5)ng/ml ;

[0241] 3.2 形成夹心复合物及吸光度测量

[0242] 分别取 1.88Nanorod-A1、4.1Nanorod-G4 和 2.92Nanorod-PSA 溶液各 15  $\mu$ l、标准品溶液 Std1 255  $\mu$ l、Biotin-C9、Biotin-C2 和 Biotin-PSA 各 1  $\mu$ l,混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 10min,形成夹心复合物,扫描混合溶液在 500-1000nm 的吸收光谱,记录 1.88Nanorod-A1 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{1_1}$ ,4.1Nanorod-G4 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{1_2}$ ,2.92Nanorod-PSA 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{1_3}$ ;

[0243] 将混合溶液转移至酶标板孔,37 $^{\circ}$ C 反应 15min,扫描混合溶液在 500-1000nm 的吸收光谱,记录 1.88Nanorod-A1 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{2_1}$ ,4.1Nanorod-G4 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{2_2}$ ,2.92Nanorod-PSA 最大吸收峰处的吸光度值  $A_{2_3}$ ;

[0244] 分别求  $A_{1_1}/A_{2_1}$ 、 $A_{1_2}/A_{2_2}$ 和  $A_{1_3}/A_{2_3}$ 的值。

[0245] 同样操作,得到 CEA、AFP、PSA 混合抗原标准系其他点的相应比值,结果见表 3。

[0246] 表 3 :CEA、AFP、PSA 混合抗原标准系检测结果

[0247]

	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
CEA : $A_{1_1}/A_{2_1}$	1.01	1.04	1.21	1.37	1.56
AFP : $A_{1_2}/A_{2_2}$	1	1.10	1.29	1.45	1.58
PSA : $A_{1_3}/A_{2_3}$	1.01	1.05	1.19	1.33	1.48

[0248] 以上表结果作图,分别得到 CEA、AFP 和 PSA 的标准曲线(图 7、8、9)。

[0249] 4、样本检测

[0250] 用 8 个未知的血清样本替代标准系列溶液,重复 3.2 的步骤,将  $A_{1_1}/A_{2_1}$ 、 $A_{1_2}/A_{2_2}$ 和  $A_{1_3}/A_{2_3}$ 分别代入图 7、8、9 的标准曲线,测得 8 个样本的 CEA、AFP、PSA 值见表 5。

[0251] 表 5 :样本中 CEA、AFP、PSA 同时检测结果

[0252]

样本序号	AFP(ng/ml)	CEA(ng/ml)	PSA(ng/ml)
1	15.2	7.12	2.4

2	66.5	31.8	6.8
3	< 9.5	< 3.5	< 1.1
4	< 9.5	< 3.5	< 1.1
5	< 9.5	< 3.5	< 1.1
6	11.8	4.1	2.5
7	154.2	42.5	10.6
8	45.3	22.6	7.6

[0253] 实施例 3 和 4 的结果表明,本发明方法不仅反应均匀迅速、全过程无需洗涤,操作简便,而且非常适用于多指标联检,并可获得准确的结果,同时大幅降低成本,节省时间。

[0254] 实施例 5

[0255] 重复实施例 2 和 3,不同点在于,对未知浓度的 4 个血清样品,分别用实施例 2 的单指标 (AFP) 检测法检测样品中 AFP 的浓度,以及用实施例 3 的双指标 (CEA/AFP) 检测法检测样品中 AFP 的浓度。每个样品重复 3 次,取平均值。

[0256] 结果表明:与用单指标检测法测得的 AFP 的浓度相比,用双指标检测法测得的 AFP 的浓度基本一致,其比值(即单指标检测法测得的 AFP 浓度 / 双指标检测法测得的 AFP 浓度)在 0.90-1.11 之间。

[0257] 这表明,本发明的多指标联检法具有较高的准确性。

[0258] 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。

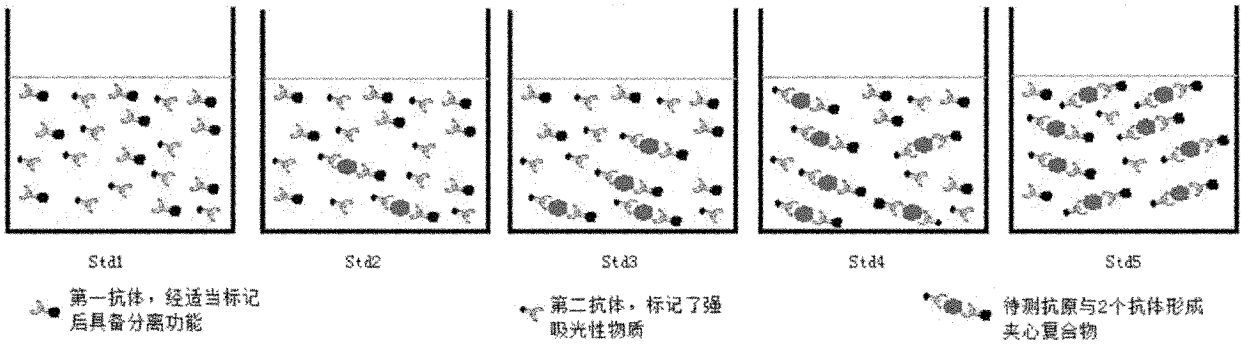


图 1A

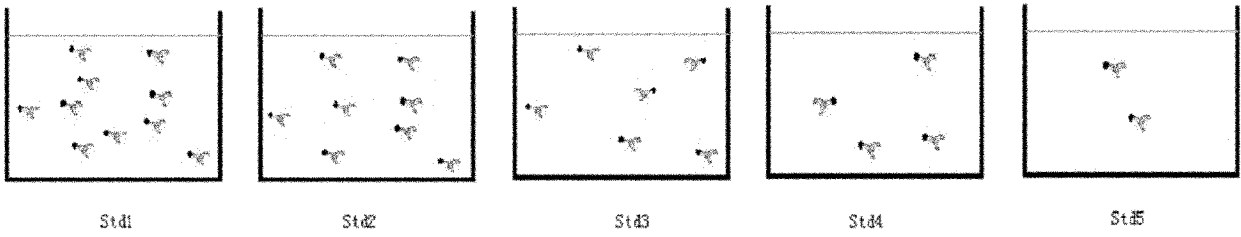


图 1B

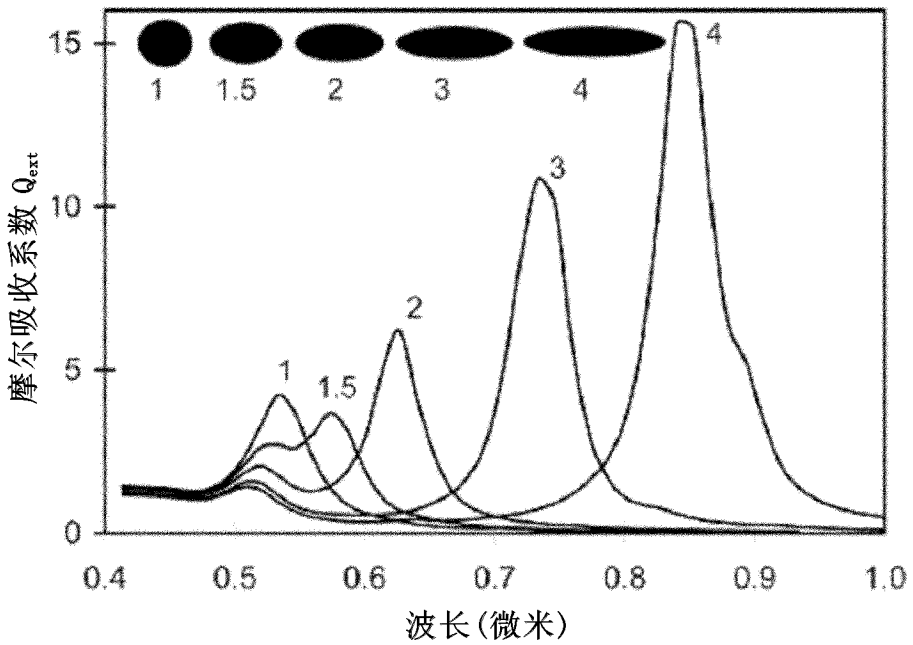


图 2

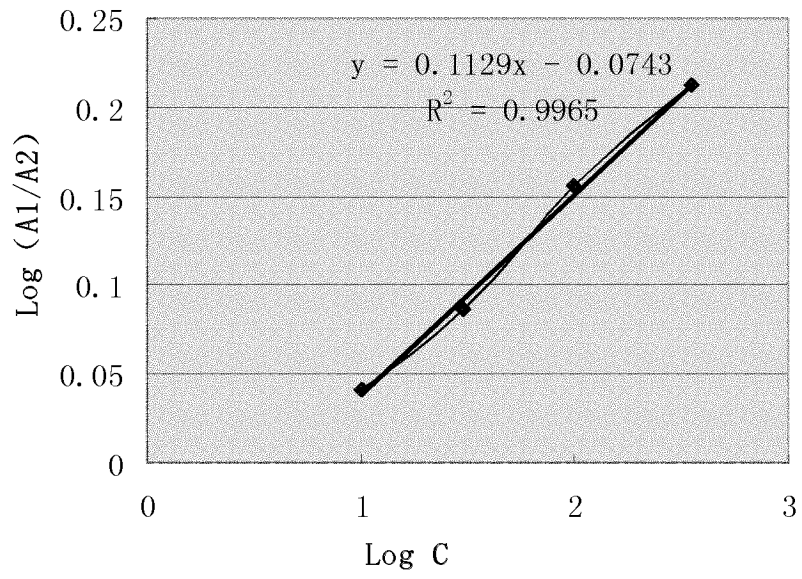


图 3

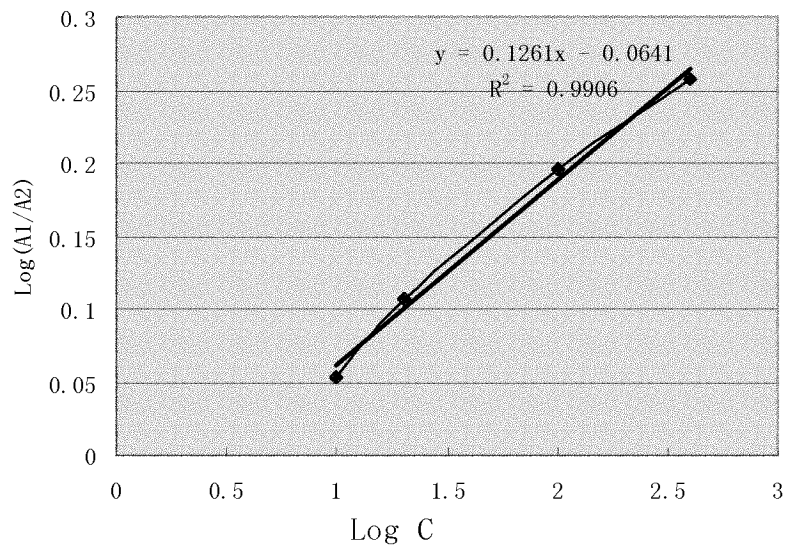


图 4

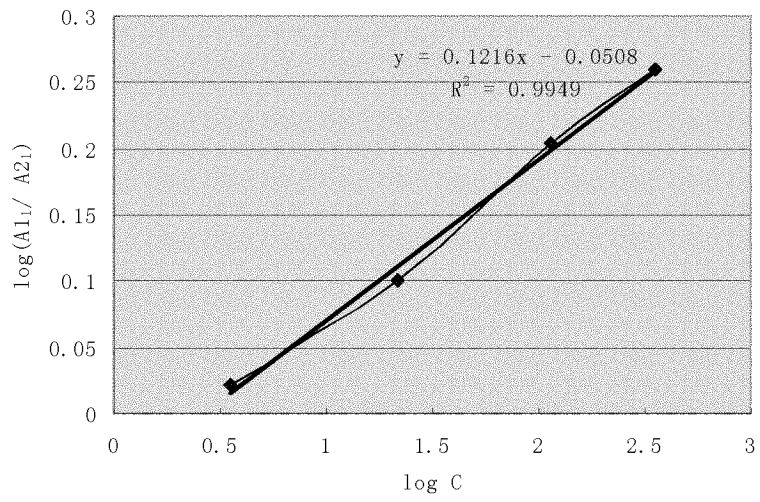


图 5

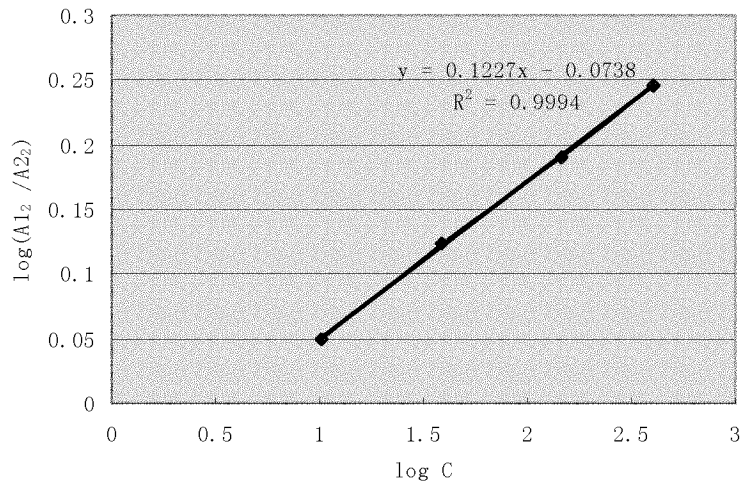


图 6

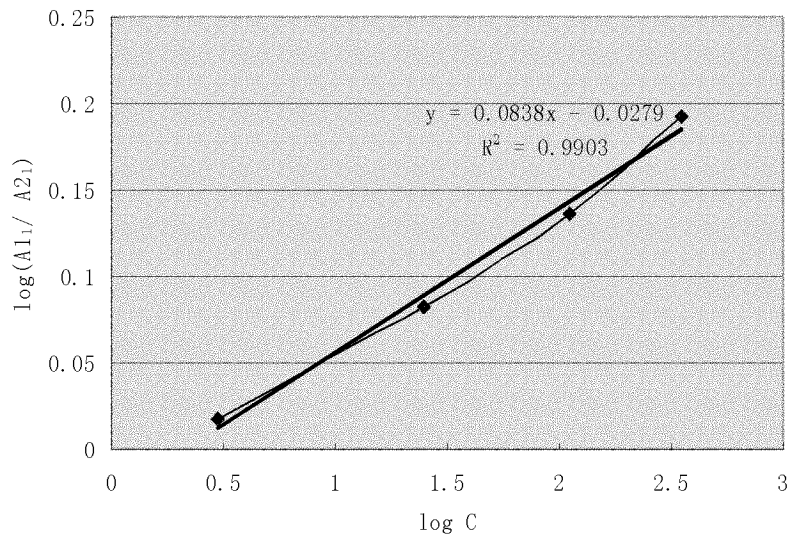


图 7

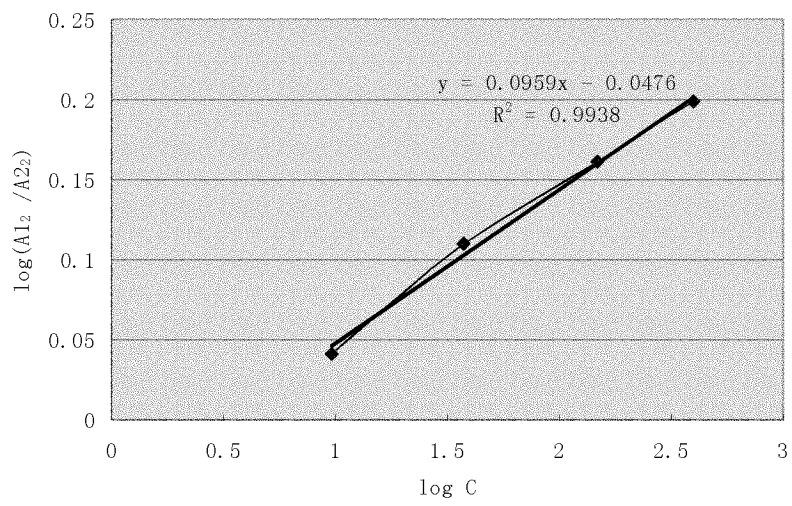


图 8

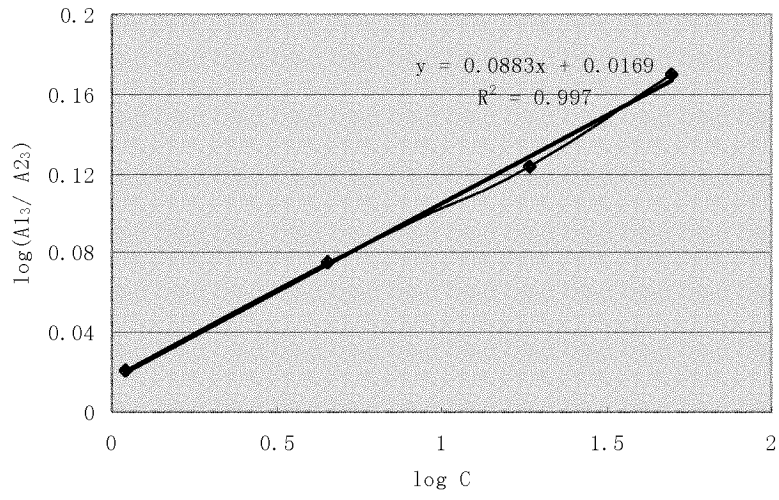


图 9

专利名称(译)	基于测量吸光度的免疫反应分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102654452B</a>	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201110051120.0	申请日	2011-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	李久彤 庞磊		
申请(专利权)人(译)	李久彤 庞磊		
当前申请(专利权)人(译)	上海鑫谱生物科技有限公司		
[标]发明人	李久彤		
发明人	李久彤		
IPC分类号	G01N21/25 G01N33/536		
审查员(译)	李婷		
其他公开文献	CN102654452A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种基于测量吸光度的免疫反应分析方法。具体地，本发明提供了一种测量同一混合溶液在2个不同反应阶段的吸光度，然后求比值确定待测物存在与否和/或数量的免疫分析方法。本发明方法的免疫反应在液溶胶均相反应体系中进行，因此反应均匀迅速、定量准确、全过程无需洗涤，此外还可调节检测灵敏度、多指标联检。

