



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109342718 A

(43)申请公布日 2019.02.15

(21)申请号 201811149655.X

(22)申请日 2018.09.29

(71)申请人 宁波奥丞生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市海曙区望春工
业园区春华路885号

(72)发明人 黄丹娣 俞辰泽 董文霞 周义正

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理
有限公司 11616

代理人 梁永昌

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种磁微粒化学发光检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种磁微粒化学发光检测方法,将磁性分离技术、化学发光技术、免疫分析技术三者结合起来,该方法充分利用了磁性分离技术的快速易自动化性,化学发光技术的高灵敏度性,以及免疫分析的特异性,在生物分析领域展现了不可替代的作用,较以前的膜条免疫法和酶联免疫吸附法,在检测灵敏度、检测范围、检测时间及自动化操作上有了大大提高,本发明磁微粒化学发光检测方法,抗原抗体结合表面积大,通过增加抗原抗体的结合量,提高检测灵敏度,同时反应速度快,能够迅速捕获抗原抗体;结合相、游离相易分离,能够提高检测准确性,采用碱性磷酸酶发光体系,稳定性好。

1. 一种磁微粒化学发光检测方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 将待测样品与荧光素标记的抗体混合并使其充分结合,得到抗原-抗体混合物,将抗原-抗体混合物与与包被有抗荧光素抗体的磁微粒混合,得到磁微粒-抗原-抗体复合物;

(2) 将磁微粒-抗原-抗体复合物置于磁场中,使磁微粒-抗原-抗体复合物在磁场中沉降,去除上清并用洗涤液洗涤磁微粒-抗原-抗体复合物;

(3) 向洗涤后的磁微粒-抗原-抗体复合物中加入碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体,温育使其充分结合,得到磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物;

(4) 将磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物置于磁场中,使磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物在磁场中沉降,去除上清并用洗涤液洗涤磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物,向洗涤后的磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物中加入发光底物和增强剂,使用发光免疫分析仪测定发光反应后的吸光度。

2. 如权利要求1所述的一种磁微粒化学发光检测方法,其特征在于,所述磁微粒为磁性琼脂糖微球、磁性聚丙烯酰胺微球、聚丙烯酸类高分子微球中的一种。

3. 如权利要求1所述的一种磁微粒化学发光检测方法,其特征在于,步骤(1)中,所述荧光素为异硫氰酸荧光素。

4. 如权利要求1所述的一种磁微粒化学发光检测方法,其特征在于,步骤(2)和步骤(4)中,所述洗涤液为含0.05%TW-20的0.01M,pH为7.2的PBS缓冲液。

5. 如权利要求1所述的一种磁微粒化学发光检测方法,其特征在于,步骤(4)中,所述发光底物为1,2-二氧环己烷衍生物。

6. 如权利要求1所述的一种磁微粒化学发光检测方法,其特征在于,步骤(4)中,所述增强剂为聚氯苄乙烯、苄基二甲基铵(BDMQ)、牛血清白蛋白(BSA)中的一种。

一种磁微粒化学发光检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂领域,具体涉及一种磁微粒化学发光检测方法。

背景技术

[0002] 自身免疫性疾病是自身免疫反应达到一定程度而导致的疾病。免疫系统最基本的功能是认识自身和识别异物,达到保护自身和排斥异体的目的。正常人体血清中可存在多种针对自身抗原的抗体,但它们的水平极低,不足以破坏自身成分,可清除衰老退变的自身组织,这就是自身免疫反应。当这种反应过强,导致严重组织损伤,表现出临床症状时就为自身免疫病。对于这些指标的检测可以作为辅助疾病诊断的参考,但是单独一种指标的检测并不能直接得出疾病诊断的结果,必须综合临床症状等多种指标才能得出疾病诊断的结论。

[0003] 目前用于检测自身免疫疾病的免疫分析方法主要有膜条法,酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法等。膜条法是定性检测,酶联免疫分析法存在灵敏度低,线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析技术因其有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0004] 磁微粒化学发光免疫分析是将磁性分离技术、化学发光技术、免疫分析技术三者结合起来的一种新兴分析方法,该技术充分利用了磁性分离技术的快速易自动化性,化学发光技术的高灵敏度性,以及免疫分析的特异性,在生物分析领域展现了不可替代的作用,较以前的膜条免疫法和酶联免疫吸附法,在检测灵敏度、检测范围、检测时间及自动化操作上有了大大提高,且没有污染,临床应用广。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种磁微粒化学发光检测方法,具有磁性分离技术的快速易自动化性,化学发光技术的高灵敏度性,以及免疫分析的特异性。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种磁微粒化学发光检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0007] (1) 将待测样品与荧光素标记的抗体混合并使其充分结合,得到抗原-抗体混合物,将抗原-抗体混合物与与包被有抗荧光素抗体的磁微粒混合,得到磁微粒-抗原-抗体复合物;

[0008] (2) 将磁微粒-抗原-抗体复合物置于磁场中,使磁微粒-抗原-抗体复合物在磁场中沉降,去除上清并用洗涤液洗涤磁微粒-抗原-抗体复合物;

[0009] (3) 向洗涤后的磁微粒-抗原-抗体复合物中加入碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体,温育使其充分结合,得到磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物;

[0010] (4) 将磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物置于磁场中,使磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物在磁场中沉降,去除上清并用洗涤液洗涤磁微粒-抗原-抗

体-酶标二抗夹心免疫结合物,向洗涤后的磁微粒-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫结合物中加入发光底物和增强剂,使用发光免疫分析仪测定发光反应后的吸光度。

[0011] 所述磁微粒为磁性琼脂糖微球、磁性聚丙烯酰胺微球、聚丙烯酸类高分子微球中的一种。

[0012] 步骤(1)中,所述荧光素为异硫氰酸荧光素。

[0013] 步骤(2)和步骤(4)中,所述洗涤液为含0.05%TW-20的0.01M,pH为7.2的PBS缓冲液。

[0014] 步骤(4)中,所述发光底物为1,2-二氧环己烷衍生物(AMPPD)。

[0015] 步骤(4)中,所述增强剂为聚氯苄乙烯、苄基二甲基铵(BDMQ)、牛血清白蛋白(BSA)中的一种;增强剂能明显增强AP酶解AMPPD的发光强度,增强因素达100-100000倍。

[0016] 本发明具有有益效果:本发明磁微粒化学发光检测方法,抗原抗体结合表面积大,通过增加抗原抗体的结合量,提高检测灵敏度,同时反应速度快,能够迅速捕获抗原抗体;结合相、游离相易分离,能够提高检测准确性,采用碱性磷酸酶发光体系,稳定性好。

具体实施方式

[0017] 下面将结合本发明实施例对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0018] 实施例1

[0019] 一种磁微粒化学发光检测方法,包括以下步骤:

[0020] (1)在反应杯中依次加入100ul对照品及待测样本,然后加入100ul含异硫氰酸荧光素标记的抗体溶液,异硫氰酸荧光素标记的抗体溶液的浓度为1ug/ml,100ul碱性磷酸酶标记的抗体溶液,碱性磷酸酶标记的抗体溶液浓度为1ug/ml,混匀,37℃条件下温育30min;加入50ul包被着异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液,包被着异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液浓度为1ug/ml,混匀,37℃条件下温育5min;

[0021] (2)使用磁分离器洗涤反应杯,使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入300ul的含0.05%TW-20的0.01M,pH为7.2的PBS缓冲液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清,重复清洗3次;

[0022] (3)在反应杯中加入100ul碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体溶液,碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体溶液浓度为0.7ug/ml,37℃温育15min;

[0023] (4)使用磁分离器洗涤反应杯,使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入300ul的含0.05%TW-20的0.01M,pH为7.2的PBS缓冲液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清,重复清洗3次;

[0024] (5)在反应杯中加入100ul1,2-二氧环己烷衍生物溶液、20ul聚氯苄乙烯溶液,震荡使磁微粒充分混悬,混匀后室温避光反应5分钟;

[0025] (6)使用化学发光检测仪检测发光信号值并记录,绘制校准品标准曲线,计算测定结果;使用本发明检测方法按照上述程序检测,所用时间较短,且准确性和特异性均高,同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0026] 实施例2

[0027] 一种磁微粒化学发光检测方法,包括以下步骤:

[0028] (1)在反应杯中依次加入50ul对照品及待测样本,然后加入50ul含异硫氰酸荧光

素标记的抗体溶液,异硫氰酸荧光素标记的抗体溶液的浓度为1ug/ml,50ul碱性磷酸酶标记的抗体溶液,碱性磷酸酶标记的抗体溶液浓度为1ug/ml,混匀,37℃条件下温育30min;加入50ul包被着异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液,包被着异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液浓度为1ug/ml,混匀,37℃条件下温育5min;

[0029] (2) 使用磁分离器洗涤反应杯,使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入200ul的含0.05%TW-20的0.01M,pH为7.2的PBS缓冲液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清,重复清洗3次;

[0030] (3) 在反应杯中加入50ul碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体溶液,碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体溶液浓度为0.5ug/ml,37℃温育15min;

[0031] (4) 使用磁分离器洗涤反应杯,使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入300ul的含0.05%TW-20的0.01M,pH为7.2的PBS缓冲液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清,重复清洗3次;

[0032] (5) 在反应杯中加入100ul1,2-二氧环己烷衍生物溶液、20ul苄基二甲基铵溶液,震荡使磁微粒充分混悬,混匀后室温避光反应5分钟;

[0033] (6) 使用化学发光检测仪检测发光信号值并记录,绘制校准品标准曲线,计算测定结果;使用本发明检测方法按照上述程序检测,所用时间较短,且准确性和特异性均高,同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0034] 实施例3

[0035] 含异硫氰酸荧光素标记的抗体溶液的制备方法为:用0.1mol/L pH=9.0的碳酸盐缓冲液配制0.5mg/mL的异硫氰酸荧光素溶液;按照抗体与FITC分子比为1:10的比例在抗体溶液中加入异硫氰酸荧光素溶液,混合均匀,室温静置12h小时,反应生成抗体-荧光素复合物;将抗体-荧光素连接物通过G-25凝胶柱进行分离,除去未反应的异硫氰酸荧光素,得到纯化抗体-荧光素复合物;将纯化抗体-荧光素复合物用含0.5%牛血清白蛋白pH=8.0的0.1mol/L的Tris缓冲液稀释到抗体-荧光素复合物浓度为1ug/mL。

[0036] 实施例4

[0037] 碱性磷酸酶标记的抗体溶液的制备方法为:取0.2ml浓度为0.1ug/ul的碱性磷酸酶溶液,与0.1ml浓度为0.1ug/ul的抗体混合,加PBS缓冲液(10mM,pH7.2)至0.5ml,混匀,加4ul 25%的戊二醛,室温反应2h,反应完成后,加PBS缓冲液(10mM,pH7.2)至2ml,4℃透析过夜,透析物用含0.5%牛血清白蛋白pH=8.0的0.1mol/L的TRIS缓冲液稀释到1ug/mL。

[0038] 实施例5

[0039] 包被异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液的制备方法为:取100mg磁性琼脂糖微球的悬浮液,磁分离去上清,用10mL MES缓冲液(0.05mol/L,pH=5)重悬,加入4mg的抗荧光素抗体,室温混悬60min,加入1mL新鲜配制的10mg/mL的EDC溶液,室温混悬6h,使用磁分离器分离,去上清,用含0.5%牛血清白蛋白pH=8.0的0.1mol/L的TRIS缓冲液重悬到1mg/mL。

[0040] 实施例6

[0041] 包被异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液的制备方法为:取100mg磁性聚丙烯酰胺微球的悬浮液,磁分离去上清,用10mL MES缓冲液(0.05mol/L,pH=5)重悬,加入4mg的抗荧光素抗体,室温混悬60min,加入1mL新鲜配制的10mg/mL的EDC溶液,室温混悬6h,使用磁分离器分离,去上清,用含0.5%牛血清白蛋白pH=8.0的0.1mol/L的TRIS缓冲液重悬到

1mg/mL。

[0042] 实施例7

[0043] 包被异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒悬浮液的制备方法为：取100mg聚丙烯酸类高分子微球悬浮液，磁分离去上清，用10mL MES缓冲液(0.05mol/L, pH=5)重悬，加入4mg的抗荧光素抗体，室温混悬60min，加入1mL新鲜配制的10mg/mL的EDC溶液，室温混悬6h，使用磁分离器分离，去上清，用含0.5%牛血清白蛋白pH=8.0的0.1mol/L的TRIS缓冲液重悬到1mg/mL。

[0044] 本发明提供的生物制剂、试剂、仪器均可由市场购得。

[0045] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例，对于本领域的普通技术人员而言，可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型，本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

专利名称(译)	一种磁微粒化学发光检测方法		
公开(公告)号	CN109342718A	公开(公告)日	2019-02-15
申请号	CN201811149655.X	申请日	2018-09-29
[标]发明人	黄丹娣 俞辰泽 董文霞 周义正		
发明人	黄丹娣 俞辰泽 董文霞 周义正		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326		
代理人(译)	梁永昌		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种磁微粒化学发光检测方法，将磁性分离技术、化学发光技术、免疫分析技术三者结合起来，该方法充分利用了磁性分离技术的快速易自动化性，化学发光技术的高灵敏度性，以及免疫分析的特异性，在生物分析领域展现了不可替代的作用，较以前的膜条免疫法和酶联免疫吸附法，在检测灵敏度、检测范围、检测时间及自动化操作上有了大大提高，本发明磁微粒化学发光检测方法，抗原抗体结合表面积大，通过增加抗原抗体的结合量，提高检测灵敏度，同时反应速度快，能够迅速捕获抗原抗体；结合相、游离相易分离，能够提高检测准确性，采用碱性磷酸酶发光体系，稳定性好。