



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103592431 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201310480961. 2

(22) 申请日 2013. 10. 15

(71) 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路
135 号

(72) 发明人 易长青 张恒 时宇鹏 张肇敏
潘益 蒋庆

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

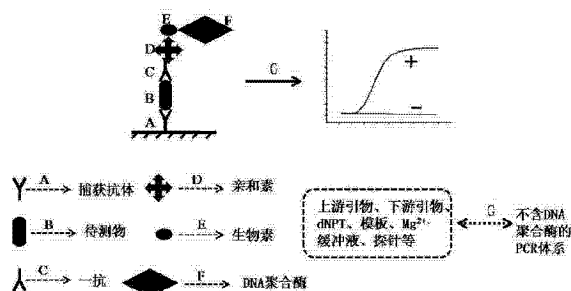
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于核酸酶信号放大的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫检测与核酸技术交叉领域,具体公开了一种基于核酸酶信号放大的超灵敏检测方法;所述方法是将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸扩增、连接或剪切技术对信号进行放大。该发明属于对传统酶联免疫吸附法的革新,能最大限度地提高检测灵敏度。



1. 一种基于核酸酶信号放大的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. 抗原或抗体包被微孔板;

S2. 核酸酶标记抗原或抗体;

S3. 向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入核酸酶标记抗原或抗体反应形成核酸酶复合物;

S4. 洗板后,向微孔板中加入核酸连接、扩增或剪切反应试剂,通过核酸酶复合物对核酸的连接、扩增或剪切反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

2. 根据权利要求1所述检测方法,其特征在于,所述核酸酶为核酸连接酶、核酸聚合酶、核酸内切酶或核酸外切酶。

3. 根据权利要求1或2所述检测方法,其特征在于,当核酸酶为DNA聚合酶时,所述的检测方法包括如下步骤:

S1. 抗原或抗体包被微孔板;

S2. DNA聚合酶标记抗原或抗体;

S3. 先向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入DNA聚合酶标记抗原或抗体反应形成DNA连接酶复合物;

S4. 洗板后,向微孔板中加入引物、模板、探针、dNTP mixture、 Mg^{2+} 和水,通过DNA聚合酶复合物对核酸的扩增反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

4. 根据权利要求1或2所述检测方法,其特征在于,当核酸酶为DNA连接酶时,所述的检测方法包括如下步骤:

S1. 抗原或抗体包被微孔板;

S2. DNA连接酶标记抗原或抗体;

S3. 先向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入DNA连接酶标记抗原或抗体反应形成DNA连接酶复合物,

S4. 洗板后,向微孔板中加入引物、模板、探针、 Mg^{2+} 、水,通过DNA连接酶复合物对核酸的连接反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

5. 根据权利要求1或2所述检测方法,其特征在于,当核酸酶为DNA内切酶时,所述的检测方法包括如下步骤:

S1. 抗原或抗体包被微孔板;

S2. DNA内切酶标记抗原或抗体;

S3. 先向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入DNA内切酶标记抗原或抗体形成DNA内切酶复合物;

S4. 洗板后,向微孔板中加入金纳米-核酸复合物,通过DNA内切酶复合物对核酸的剪切反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

一种基于核酸酶信号放大的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测与核酸技术交叉领域,具体涉及一种基于核酸酶信号放大的检测方法;特别涉及将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸扩增技术对信号进行放大,该发明属于对传统酶联免疫吸附法的革新,能最大限度地提高检测灵敏度。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附试验(ELISA)是现代免疫分析中最为重要的技术之一,基于 ELISA 的各种试剂盒在临床检验、食品安全检测、卫生防疫等领域得到广泛的应用。该项技术常用的酶是辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)等,整个检测技术中有 3 项必要的试剂:①固相的抗原或抗体;②酶标记的抗原或抗体;③酶作用的底物。根据试剂的来源和标本的性状以及检测的具备条件,可设计出各种不同类型的检测方法,如双抗体夹心测抗原、双抗原夹心测抗体、间接法测抗体、竞争法等模式。传统的 ELISA 技术是让抗体与酶复合物结合,然后通过酶催化底物成为有色产物,根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量。而随着检验检疫要求越来越严格,对方法灵敏度的要求越来越高,而基于传统的 ELISA 技术由于在读出方式的缺陷,使其在灵敏度方面往往提高空间有限,很难满足一些高灵敏度的检测需要。

[0003] 在检测分析中,如何有效的提高检测灵敏度是最为重要的一环,尤其在临床诊断上,检测的灵敏度意味着更早的诊断疾病,更好更早的使患者接受治疗。所以,在原有的 ELISA 检测体系基础之上,开发一种更高的检测灵敏度的方法才能满足临床需要。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是为了克服现有技术中酶联免疫检测方法检测灵敏度不高的缺陷,提供一种基于核酸酶信号放大超灵敏检测方法。所述方法是将核酸酶应用于传统 ELISA 技术中,将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸扩增技术对信号进行放大,从而提高检测灵敏度。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现:

一种基于核酸酶信号放大的检测方法,包括如下步骤:

S1. 抗原或抗体包被微孔板;

S2. 核酸酶标记抗原或抗体;

S3. 向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入核酸酶标记抗原或抗体反应形成核酸酶复合物;

S4. 洗板后,向微孔板中加入核酸连接、扩增或剪切反应应用试剂,通过核酸酶复合物对核酸的连接、扩增或剪切反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

[0006] 所述核酸酶为核酸连接酶、核酸聚合酶、核酸内切酶或核酸外切酶。

[0007] 本发明通过制备抗体(抗原)-核酸酶复合物,取代传统 ELISA 技术中的常用酶,将

免疫检测转变为核酸检测,利用核酸扩增技术对信号进行放大。针对 DNA 连接酶,制备抗体(抗原)-DNA 连接酶复合物;针对 DNA 聚合酶,制备抗体(抗原)-DNA 聚合酶复合物;针对 DNA 内切酶,制备抗体(抗原)-DNA 内切酶复合物;针对 DNA 外切酶,制备抗体(抗原)-DNA 外切酶复合物;也可能制备其他类型抗体(抗原)-核酸酶复合物及其不同类型抗体核酸-酶交叉制备的复合物,此类复合物能够实现 ATGC 碱基的互补配对、短链 DNA 的连接、长链 DNA 的断裂等,通过核酸信号的变化及聚合酶链式反应(PCR)循环放大,提高传统 ELISA 检测体系的灵敏度,本说明书以 DNA 聚合酶、DNA 连接酶及 DNA 内切酶为例进行来描述本发明的设计模型。

[0008] 本发明的技术方案中涉及到的抗体-核酸酶复合物,可以通过直接化学交联,使二者进行有效地连接起来,也可通过生物素-亲和素系统,或其他可能的连接方式,如基于多肽的交联,其关键是在传统 ELISA 检测体系中最终形成基于核酸酶的复合物,其核心思想就是用核酸酶替代传统的 HRP 或 ALP 等类型的蛋白酶,引入核酸放大体系,从而实现检测体系信号的放大。本发明选取双抗夹心法检测乙肝表面抗原(HBsAg),建立基于核酸信号放大的新型 ELISA 免疫检测体系模型。

[0009] 基于 DNA 连接酶的免疫检测体系:先将纯化的抗体(抗原)包被在酶标板上,用于捕获待测样本中的抗原(抗体),再用核酸连接酶标记的抗体(可采用生物素-亲和素系统,或其他类型的交联方式)与抗原或抗体反应形成抗体-抗原-核酸连接酶标抗体复合物;加入 DNA 模板、引物、dNTP、探针等溶液进行核酸扩增,如滚环扩增(Rolling Circle Amplification, RCA)、连接酶链反应(Ligase Chain Reaction, LCR)等,通过电泳来实现检测。

[0010] 具体地,当核酸酶为 DNA 连接酶时,所述的检测方法包括如下步骤:

- S1. 抗原或抗体包被微孔板;
- S2. DNA 连接酶标记抗原或抗体;
- S3. 先向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入 DNA 连接酶标记抗原或抗体反应形成 DNA 连接酶复合物,
- S4. 洗板后,向微孔板中加入引物、模板、探针、 Mg^{2+} 、水,通过 DNA 连接酶复合物对核酸的连接反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

[0011] 基于 DNA 聚合酶的免疫检测体系:先将纯化的抗体(抗原)包被在酶标板上,用于捕获待测样本中的抗原(抗体),再用核酸聚合酶标记的抗体(可采用生物素-亲和素系统,或其他类型的交联方式)与抗原或抗体反应形成抗体-抗原-核酸聚合酶标抗体复合物;加入 DNA 模板、引物、dNTP mixture、 Mg^{2+} 、探针和水等核酸扩增反应应用试剂,进行核酸扩增,通过实时荧光 PCR 反应(RT-PCR)来实现检测。

[0012] 具体地,当核酸酶为 DNA 聚合酶时,所述的检测方法包括如下步骤:

- S1. 抗原或抗体包被微孔板;
- S2. DNA 聚合酶标记抗原或抗体;
- S3. 先向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入 DNA 聚合酶标记抗原或抗体反应形成 DNA 连接酶复合物;
- S4. 洗板后,向微孔板中加入引物、模板、探针、 Mg^{2+} 、dNTP mixture 和水,通过 DNA 聚合

酶复合物对核酸的扩增反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

[0013] 基于 DNA 内切酶、外切酶的免疫检测体系:先将纯化的抗体(抗原)包被在酶标板上,用于捕获待测样本中的抗原(抗体),再用核酸聚合酶标记的抗体(可采用生物素-亲和素系统,或其他类型的交联方式)与抗原或抗体反应形成抗体-抗原-核酸聚合酶标抗体复合物;向体系中加入带有酶切断位点的金纳米-核酸复合物团簇,如体系存在 DNA 外切酶或内切酶,能够把连接胶体金的 DNA 链剪切,从而改变金纳米溶液的颜色,通过颜色的变化,来实现检测。

[0014] 当核酸酶为 DNA 内切酶时,所述的检测方法包括如下步骤:

S1. 抗原或抗体包被微孔板;

S2. DNA 内切酶标记抗原或抗体;

S3. 先向包被有抗原或抗体的微孔板中加入待测样本反应,洗板、甩干后加入 DNA 内切酶标记抗原或抗体形成 DNA 内切酶复合物;

S4. 洗板后,向微孔板中加入金纳米-核酸复合物,通过 DNA 内切酶复合物对核酸的剪切反应将免疫检测转变为核酸检测,利用核酸放大体系从而高灵敏地检测出待测抗原或抗体。

[0015] 对以上提及的检测模型,如下文图示。但该发明不仅仅局限于此,其发明的核心思想是用核酸酶(DNA 核酸酶、RNA 核酸酶等)替代传统 ELISA 体系中所使用的 HRP,ALP 等,以期能把对蛋白或小分子的免疫检测体系,转变为核酸模式的信号放大,从而能大大提高检测的灵敏度。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

本发明是对传统酶联免疫吸附法的革新,通过创新性设计以获得更高的检测灵敏度。本发明的创新主要在于将原有的 ELISA 检测体系中的 HRP、ALP 等转换成核酸酶(DNA 酶, RNA 酶等),如核酸连接酶、核酸聚合酶、核酸内切酶、核酸外切酶等,通过引入各种类型的核酸扩增技术,利用核酸信号的产生及放大的读出模式来替代原有的基于底物显色的读出模式,从而实现将对蛋白的免疫检测转变为核酸检测模式,以达到更高的检测灵敏度。

[0017] 以检测乙肝表面抗原(HBsAg)为例,本发明方法的检测灵敏度达到 0.1 pg/mL,而传统的 ELISA 试剂盒检测 HBsAg 的灵敏度则为 0.2ng/mL,可见,该发明方法的检测灵敏度远远高于传统的检测方法。

[0018] 说明书附图

图 1. 基于 DNA 聚合酶 ELISA 式信号放大模型。

[0019] 图 2. 基于 DNA 连接酶 ELISA 式信号放大模型。

[0020] 图 3. 基于 DNA 内切酶 ELISA 式检测模型。

具体实施方式

[0021] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步详细说明本发明。除非特别说明,本发明采用的试剂、设备为本技术领域常规试剂和设备。

[0022] 实施例 1 基于 DNA 聚合酶 ELISA 式信号放大检测方法,利用本实施例方法进行信号放大的模型如图 1 所示。

[0023] S1. HBsAg 包被板:取抗 HBsAg 多抗,用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释终浓度 5 ~ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被体积为 100 ~ 150 μL /孔。包被条件 4℃过夜。1% BSA,0.01 M PBS,pH7.4,37℃封闭 2h,甩干备用。

[0024] S2. 抗 HBsAg-亲和素结合物的制备:①取 5 mg 亲和素溶于 0.5mL 双馏水中,加入新配制的 0.06 M NaIO_4 水溶液 0.5 mL,混匀,置 4℃ 30 min;②取出后加入 0.16 M 乙二醇水溶液 0.5 mL,室温放置 30 min;③加入含 5 mg 纯化 HBsAg 抗体的水溶液 1 mL,混匀,并装入透析袋,对 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌透析 6 h,使之结合;④加入 NaBH_4 溶液 (5 mg/mL) 0.2 mL,混匀,置 4℃ 2 h;⑤在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀,4℃ 30 min,离心,去上清,沉淀以少许 0.02 M pH7.4 PBS 液溶解,装入透析袋,以同样液体在 4℃透析除盐过夜;⑥次日取出离心,以除去不溶物,即得抗 HBsAg-亲和素结合物,以 0.02 M pH 7.4 PBS 液加至 5 mL;⑦加入等量优质甘油,分装小瓶,低温保存。

[0025] S3. 生物素化 DNA 聚合酶的制备:①取 DNA 聚合酶用 0.1 M 碳酸氢钠溶液 (pH8.0) 或 0.5 M 硼酸缓冲液 (pH8.6) 稀释到 1.0 mg/mL,并用相应的缓冲体系对其进行充分透析;②用 1 mL 二甲亚砜 (DMSO) 溶液 N-羧基琥珀酰亚胺生物素 (NHS-Biotin) 1.0 mg;③向 1 mL DNA 聚合酶溶液中加入 100 ~ 200 μL NHS-Biotin 溶液,室温下搅拌反应 2 ~ 4 小时;④加入一定量的 1 M NH_4Cl (每 25 μg NHS-Biotin 加 1 μL),室温下搅拌 10 分钟;⑤在 4℃下,用 PBS 充分透析,除去多余的游离生物素,进行纯化后,避光保存备用。

[0026] 该体系所使用的 DNA 聚合酶为 Taq DNA 聚合酶。引物、探针等制备:检测体系中加入的模板及对应的引物和探针,可以根据实际情况自由调整;若采用普通 PCR 检测平台,则探针无需加入。以加入大肠杆菌 0157:H7 的核酸模板为例,并以 rfbE 基因为对象进行引物及探针的设计:

上游引物 F: 5' AAGATT GCGCT GAAGCC TTTG3' ;

下游引物 R: 5' GCCAATATTGCCTATGTACAGC3' ;

探针:5' ROX-CCGTGACAACCATTCCACCTTCACGG-Dabcyl3'。设计的模板引物及探针,交由商业公司进行人工合成。

[0027] S4. 取出抗体包被板,预留空白孔 1 孔、阴性对照 3 孔,阳性对照 2 孔,其余各孔每孔加入 50 μL 待测样本。阴阳性对照每孔加入 50 μL 对照血清。然后每孔加入 50 μL 抗 HBsAg-亲和素结合物(不包括空白孔),空白孔空置。混匀后,37℃温育 30 分钟。用稀释好的洗涤液洗板 1 ~ 2 次,甩干后加入生物素化 DNA 聚合酶。37℃温育 30 分钟。用稀释好的洗涤液洗板 4 次,洗板时洗涤液应注满板孔,但不应溢出,每次注入洗涤液后应浸泡 15 秒。每孔加入 100 μL 混合液(上述引物、模板、探针、 Mg^{2+} 、dNTP mixture 和水等),直接进行 PCR 扩增实验。

[0028] 实施例 2 基于 DNA 连接酶 ELISA 式信号放大检测方法,利用本实施例方法进行信号放大的模型如图 2 所示。

[0029] S1. HBsAg 包被板:取抗 HBsAg 多抗,用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释终浓度 5 ~ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被体积为 100 ~ 150 μL /孔。包被条件 4℃过夜。1% BSA,0.01M PBS,pH7.4,37℃封闭 2h,甩干备用。

[0030] S2. 抗 HBsAg-DNA 连接酶结合物的制备:①取 5 mg DNA 连接酶溶于 0.5 mL 双馏水中,加入新配制的 0.06 M NaIO_4 水溶液 0.5 mL,混匀,置 4℃ 30 min;②取出后加入 0.16

M 乙二醇水溶液 0.5 mL, 室温放置 30 min; ③加入含 5 mg 纯化 HBsAg 抗体的水溶液 1 mL, 混匀, 并装入透析袋, 对 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌透析 6 h, 使之结合; ④加入 NaBH₄ 溶液 (5 mg/mL) 0.2 mL, 混匀, 置 4℃ 2 h; ⑤在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 混匀, 4℃ 30 min, 离心, 去上清, 沉淀以少许 0.02 M pH7.4 PBS 液溶解, 装入透析袋, 以同样液体在 4℃ 透析除盐过夜; ⑥次日取出离心, 以除去不溶物, 即得抗 HBsAg- 连接酶结合物, 以 0.02 M pH 7.4 PBS 液加至 5 ml; ⑦加入等量优质甘油, 分装小瓶, 低温保存。

[0031] 该体系所使用的连接酶则为 Tsc DNA 连接酶。引物、探针等制备: 检测体系所需要的模版及引物可根据实际情况调整, 该实施案例中以沙眼衣原体为核酸模版, 以 omp1 基因进行引物设计:

1a: 5' TTTTACTTGCAAGACATTCCTCAGC3'

1b: 5' ATTAATTGCTACAGGACATCTTGTC3'

该引物序列, 交由商业公司进行人工合成。

[0032] S4. 取出抗体包被板, 预留空白孔 1 孔、阴性对照 3 孔, 阳性对照 2 孔, 其余各孔每孔加入 50 μL 待测样本。阴阳性对照每孔加入 50 μL 对照血清。然后每孔加入 50 μL 抗 HBsAg-DNA 连接酶结合物 (不包括空白孔), 空白孔空置。混匀后, 37℃ 温育 60 分钟。用稀释好的洗涤液洗板 3 ~ 5 次, 洗板时洗涤液应注满板孔, 但不应溢出, 每次注入洗涤液后应浸泡 15 秒。每孔加入 100 μL 混合液 (引物、模板、TaqDNA 聚合酶、Mg²⁺、水等), 直接进行 LCR 实验, 其结果可由电泳实验获得。

[0033] 实施例 3 基于 DNA 内切酶 ELISA 式检测检测方法, 利用本实施例方法进行信号放大的模型如图 3 所示。

[0034] S1. HBsAg 包被板: 取抗 HBsAg 多抗, 用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释终浓度 5 ~ 8 μg/mL, 包被体积为 100 ~ 150 μL/孔。包被条件 4℃ 过夜。1% BSA, 0.01M PBS, pH7.4, 37℃ 封闭 2h, 甩干备用。

[0035] S2. 抗 HBsAg- 亲和素结合物的制备: ①取 5 mg 亲和素溶于 0.5 mL 双馏水中, 加入新配制的 0.06 M NaIO₄ 水溶液 0.5 mL, 混匀, 置 4℃ 30 min; ②取出后加入 0.16 M 乙二醇水溶液 0.5 mL, 室温放置 30 min; ③加入含 5 mg 纯化 HBsAg 抗体的水溶液 1 mL, 混匀, 并装入透析袋, 对 0.05 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌透析 6 h, 使之结合; ④加入 NaBH₄ 溶液 (5 mg/mL) 0.2 mL, 混匀, 置 4℃ 2 h; ⑤在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 混匀, 4℃ 30 min, 离心, 去上清, 沉淀以少许 0.02 M pH7.4 PBS 液溶解, 装入透析袋, 以同样液体在 4℃ 透析除盐过夜; ⑥次日取出离心, 以除去不溶物, 即得抗 HBsAg- 亲和素结合物, 以 0.02 M pH 7.4 PBS 液加至 5 ml; ⑦加入等量优质甘油, 分装小瓶, 低温保存。

[0036] S3. 生物素化 DNA 内切酶的制备: ①取 DNA 内切酶用 0.1 M 碳酸氢钠溶液 (pH8.0) 或 0.5 M 硼酸缓冲液 (pH8.6) 稀释到 1.0 mg/mL, 并用相应的缓冲体系对其进行充分透析; ②用 1 mL 二甲亚砜 (DMSO) 溶液 N- 羟基琥珀酰亚胺生物素 (NHS-Biotin) 1.0mg; ③向 1mL DNA 内切酶溶液中加入 100 ~ 200 μL NHS-Biotin 溶液, 室温下搅拌反应 2-4 小时; ④加入一定量的 1 M NH₄Cl (每 25 μg NHS-Biotin 加 1 μL), 室温下搅拌 10 分钟; ⑤在 4 度下, 用 PBS 充分透析, 除去多余的游离生物素, 进行纯化后, 避光保存备用。

[0037] 该实施例采用的 DNA 内切酶为 EcoR I 限制性内切酶。合成带有核酸内切酶活性位点的核苷酸序列, 5' TTTATGCTGAT GAATTC ATAGCTAG3' -SH

SH-3' TTTATGTA CTTAAG TATGCTAG5',其序列交给商业公司进行人工合成。

[0038] S4. 金纳米-核酸复合物的制备:设计合成带有选定核酸内切酶活性位点的核苷酸序列(18~30bp),并在3'端修饰巯基,与13nm大小的金纳米进行杂交合成制备出金纳米-核酸复合物,EcoR I限制性内切酶能够特异性识别5'...G↓AATTC...3',故能够打开双链酶切位点,从而控制核酸与金纳米的含量颜色的变化,用于间接测定待测物的含量。

[0039] S5. 取出抗体包被板,预留空白孔1孔、阴性对照3孔,阳性对照2孔,其余各孔每孔加入50 μL待测样本。阴阳性对照每孔加入50 μL对照血清。然后每孔加入50 μL抗HBsAg-亲和素结合物(不包括空白孔),空白孔空置。混匀后,37℃温育30分钟。用稀释好的洗涤液洗板1~2次,甩干后加入生物素化DNA内切酶。37℃温育30分钟。用稀释好的洗涤液洗板4次,洗板时洗涤液应注满板孔,但不应溢出,每次注入洗涤液后应浸泡15秒。每孔加入100 μL金纳米-核酸复合物进行孵育,观察其复合物颜色变化来间接测定HBsAg的含量。

[0040] 使用上述实施例1、2和3所述方法检测HBsAg与传统ELISA法检测HBsAg的结果进行对比,结果见表1。由表1结果可知:本发明方法的检测灵敏度达到0.1 pg/mL,而传统的ELISA试剂盒检测HBsAg的灵敏度则为0.2ng/mL,可见,该发明方法的检测灵敏度远远高于传统的检测方法。

[0041] 表1 本发明方法与传统ELISA法检测HBsAg参数对比

项目	灵敏度	回收率	CV值(n=8)
实施例1	0.1 pg/mL	90~110%	≤10%
实施例2	0.1 pg/mL	91~105%	≤10%
实施例3	0.1 pg/mL	90~115%	≤14%
某ELISA试剂盒	0.2ng/mL	88~120%	≤12%

上述实施例为本发明的实施方式一部分,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化。均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

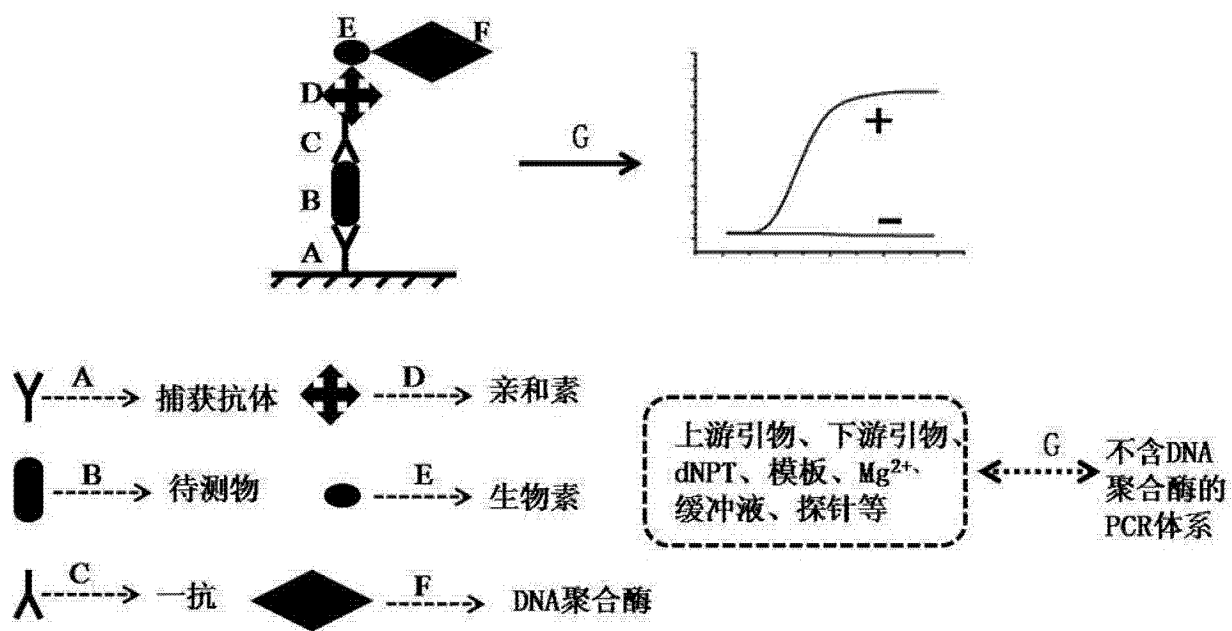


图 1

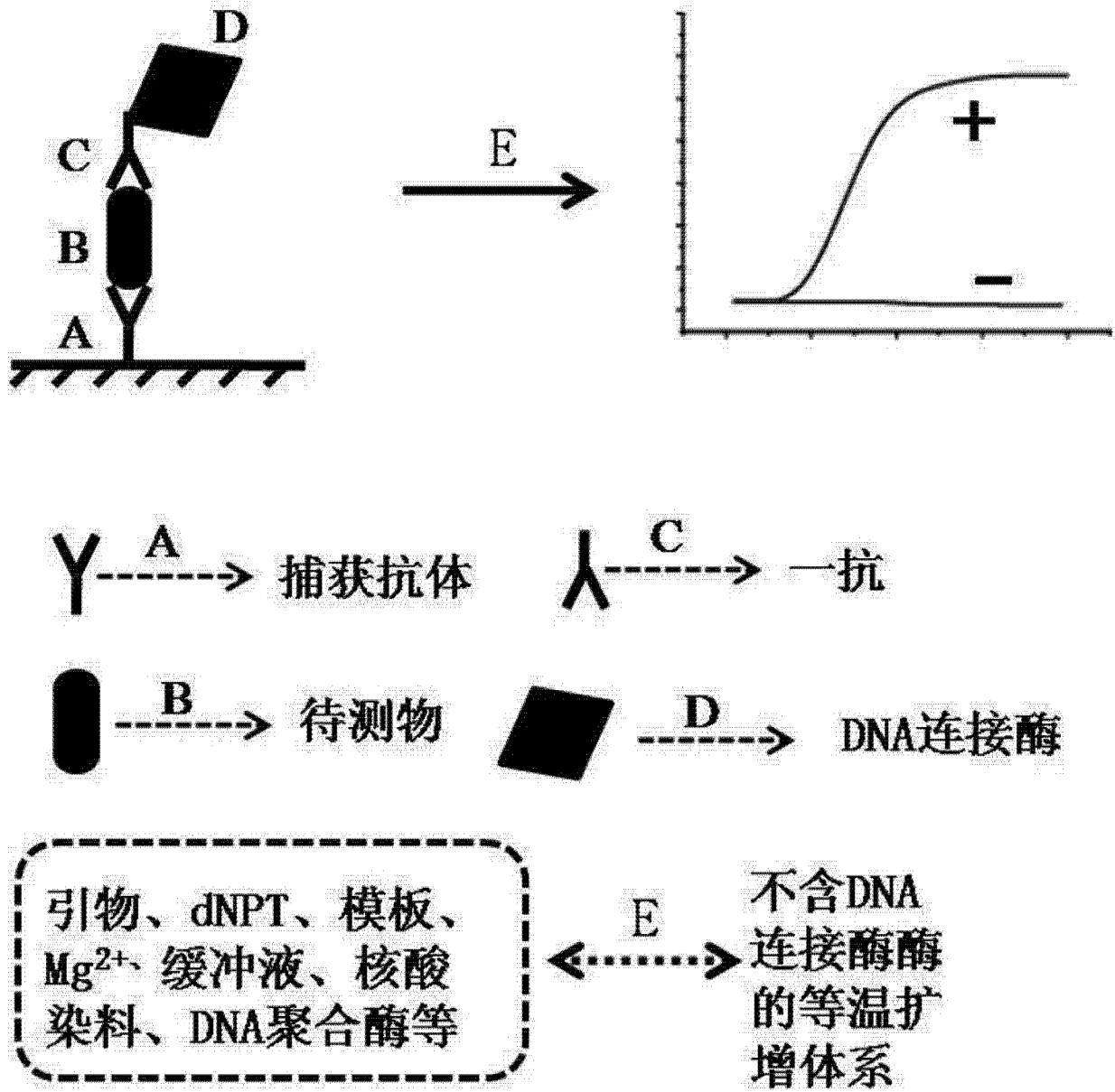


图 2

专利名称(译)	一种基于核酸酶信号放大的检测方法		
公开(公告)号	CN103592431A	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	CN201310480961.2	申请日	2013-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	易长青 张恒 时宇鹏 张肇敏 潘益 蒋庆		
发明人	易长青 张恒 时宇鹏 张肇敏 潘益 蒋庆		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/68		
代理人(译)	任重		
其他公开文献	CN103592431B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测与核酸技术交叉领域，具体公开了一种基于核酸酶信号放大的超灵敏检测方法；所述方法是将免疫检测转变为核酸检测，利用核酸扩增、连接或剪切技术对信号进行放大。该发明属于对传统酶联免疫吸附法的革新，能最大限度地提高检测灵敏度。

