



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108267574 A

(43)申请公布日 2018.07.10

(21)申请号 201711271867.0

(22)申请日 2017.11.27

(71)申请人 南京天纵易康生物科技股份有限公司

地址 210031 江苏省南京市高新区星火路
10号人才大厦E座2楼

(72)发明人 徐林

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

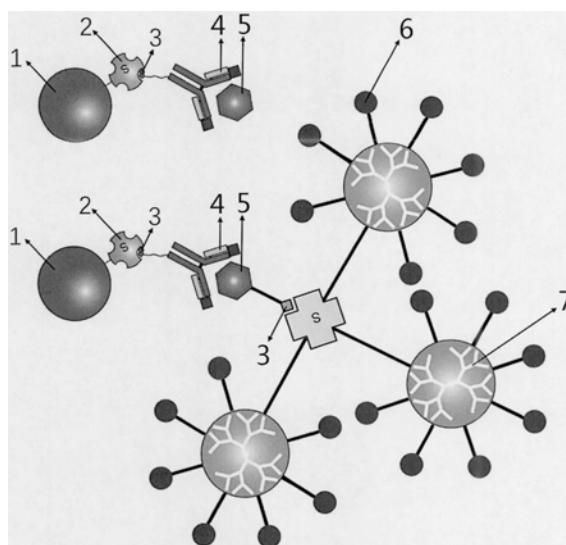
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种基于树枝状高分子双重放大标记小分子竞争探针的制备及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于树枝状高分子双重放大标记小分子竞争探针的制备及应用,属于化学发光体外诊断中的化学发光标记领域。该双增强放大小分子标记方法包括如下步骤:步骤一:树枝状高分子-链霉亲和素-化学发光信号物质复合体的制备;步骤二:竞争小分子的生物素化标记;步骤三:双重放大化学发光免疫标记检测探针复合体的制备。本发明中双重放大化学发光免疫检测探针,将增强发光强度和增加磁性微球的探测分子结合量两种方式有效结合,利用生物素亲合素间结合作用实现一次放大,同时利用标记了信号物质的树枝状高分子实现另一次放大,双重放大模式极大的提升了化学发光免疫分析信号强度。



1. 一种基于树枝状高分子双重放大标记小分子竞争探针的制备及应用, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤一: 取一定摩尔数的树枝状高分子, 加入EDC进行活化, 在碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 中, 加入竞争小分子37℃搅拌反应1h, 反应结束后按照摩尔比1:10的比例加入购置的活化信号物质37℃搅拌反应1h, 最后加入0.05mol/L Tris-HCl进行封闭反应30min, 整个反应结束后, 在PBS中透析去除未反应的小分子化学发光信号物质, 收集透析后溶液, 获得修饰化学发光信号物质-链霉亲和素-树枝状大分子复合物;

步骤二: 取购置的活化生物素, 按照摩尔比例1:3的比例同竞争小分子进行混合反应, 37℃反应1h, 得生物素化待测物质探测分子备用;

步骤三: 将步骤一制得的修饰信号物质-链霉亲和素-树枝状大分子复合物按照一定摩尔比加入到步骤二制得的生物素化竞争小分子中, 继续反应37℃反应30min, 转入偷袋袋中透析去除未反应的小分子及信号物质, 即得所述双重放大竞争探针。

2. 根据权利要求1所述的双重放大标记小分子竞争探针的制备方法, 其特征在于, 所述竞争性探针为抗原如T3、T4、T、E2、E3、P等, 所用载体为树枝状高分子, 所述信号物质为吡啶酯、三联吡啶钌、鲁米诺等化学发光物质。

3. 根据权利要求1所述的双重放大标记小分子竞争探针的制备方法, 其特征在于, 步骤一中所述链霉亲和素、载体、信号物质的摩尔比为1:3:10。

4. 根据权利要求1所述的双重放大标记小分子竞争探针的制备方法, 其特征在于, 步骤二中所述生物素化竞争小分子、生物素的摩尔比为1:3。

5. 根据权利要求1所述的双重放大标记小分子竞争探针的制备方法, 其特征在于, 步骤中所述标记碳酸盐溶液的质量浓度为0.05mol/L。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的双重放大标记小分子竞争探针的制备方法, 其特征在于, 步骤三中所述修饰信号物质和链霉亲和素的树枝状大分子、链亲和素、生物素化竞争免疫探针分子的摩尔比为3:1:1。

7. 根据权利要求1所述的制得的双重放大标记小分子竞争探针制备用于化学发光检测试剂盒的方法, 其特征在于, 包括如下制备步骤:

步骤一, 链霉亲和素磁珠的制备: 取购买羧基磁性微球适量, 加入EDC进行活化, 用MES缓冲液溶解链霉亲和素, 加入活化后的磁性微球, 质量比为1:2, 37℃摇床反应3h, 置于磁力分离架, Tris-HCl缓冲液清洗1次, 加入10%BSA进行封闭, 摇床反应30min后, 置于磁力分离架Tris-HCl缓冲液清洗3次, 加入含2%BSA的Tris-HCl缓冲液2℃~8℃保存;

步骤二, 捕获探针的制备: 取步骤一获得的链霉亲和素磁珠, 加入生物素化的待测物质捕获探针分子37℃摇床反应30min, Tris-HCl缓冲液清洗三次, 加入含2%BSA的Tris-HCl缓冲液, 2℃~8℃保存, 既得含有磁微粒的分离捕获探针复合体。

8. 根据权利要求7所述的双重放大标记小分子竞争探针制备用于化学发光检测试剂盒的方法, 其特征在于, 步骤一中所述缓冲液为0.05mol/L Tris-HCl (pH7.4), 用所述缓冲液溶解的BSA浓度为2%。

9. 权利要求1所述的双重放大标记小分子竞争探针在化学发光免疫检测中的应用。

一种基于树枝状高分子双重放大标记小分子竞争探针的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光体外诊断中的化学发光标记领域,具体涉及一种双重放大化学发光免疫标记探针的制备方法及应用、用其制备化学发光检测试剂盒的方法。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA) 是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。是继放免分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。比起传统的酶免分析法, CLIA具有灵敏度更高、检测时间更短、标记方法更简单以及原料成本更低的特点。尽管如此,随着分析检验技术的逐渐普及以及临床上对于检测待测分子灵敏度需求的进一步提高,迫切需要能在CLIA基础上系统性进一步提升灵敏度,降低检测时间的新技术。目前,在免疫分析领域,常用的放大手段是生物素-亲和素放大体系,1981年,Hsu等证明了一个亲合素可以同时结合四个生物素分子,并对两者在免疫学中应用的方法做了详细介绍,通过链霉亲和素亲合素-生物素的桥接作用,分别结合抗原抗体、标记信号物质等,能极大地增强抗体结合量或信号物质结合量,起到放大的作用。

[0003] 一般的生物素、亲和素放大体系均采用的一种放大模式,仅仅利用到生物素和亲合素间的放大效果或是仅针对抗体结合量的增加和放大,不能有效将生物素和亲合素放大模式充分利用起来,往往在面对一些痕量检测时会显得束手无策。

[0004] 为解决上述问题,利用生物素-链霉亲和素的放大体系加上树枝状高分子标记发光探针来双重放大化学发光信号,研发出一种可以更灵敏、线性范围更宽的检测痕量物质的化学发光试剂盒。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足而提供一种双重放大化学发光免疫检测探针的制备方法及其制备化学发光检测试剂盒的方法,该双重放大化学发光免疫标记探针利用增强化学发光强度和增加探测分子结合量两种放大模式,使得化学发光检测试剂盒竞争信号强度较以往有更大的放大倍数,实现痕量检测。

[0006] 本发明所提供的双重放大化学发光竞争免疫探针的制备方法,具体可包括如下步骤:

[0007] 步骤一:取一定摩尔数的树枝状高分子,加入EDC进行活化,在0.05mol/L碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 中,加入链霉亲和素,37℃搅拌反应1h,反应结束后按照摩尔比1:10的比例加入购置的活化信号物质,37℃搅拌反应1h,最后加入0.05mol/L Tris-HCl进行封闭反应30min,整个反应结束后,在PBS中透析去除未反应的小分子化学发光信号物质,收集透析后溶液,获得修饰化学发光信号物质和链霉亲和素的树枝状大分子;

[0008] 步骤二:取购置的活化生物素,按照摩尔比例1:3的比例同竞争性小分子混合反应,37℃反应1h后备用;

[0009] 步骤三:将步骤一制得的修饰信号物质和链霉亲和素的树枝状大分子加入到步骤二制得的生物素化竞争性小分子,继续37℃反应30min,即得所述双重放大化学发光竞争免疫探针。

[0010] 更进一步的,所述的双重放大化学发光免疫检测探针的制备方法,其中步骤一中所述竞争性小分子为抗原如T3、T4、T、E2、E3、P等,所用载体为树枝状高分子,所述信号物质为吖啶酯、三联吡啶钌、鲁米诺等化学发光物质。

[0011] 更进一步的,所述的双重放大化学发光竞争免疫探针的制备方法,其中步骤一中所述链霉亲和素、载体、信号物质的摩尔比为1:3:10。

[0012] 更进一步的,所述的双重放大化学发光竞争免疫探针,其中步骤二中所述生物素化竞争性小分子、生物素的摩尔比为1:3。

[0013] 更进一步的,所述的双重放大化学发光竞争免疫探针,其中所述标记碳酸盐溶液的质量浓度为50mmol/L。

[0014] 更进一步的,上述的双重放大化学发光竞争免疫探针,其中步骤三中所述修饰信号物质和链霉亲和素的树枝状大分子、链亲和素、生物素化竞争小分子的摩尔比为3:1:1。

[0015] 用所述的双重放大化学发光竞争免疫探针制备用于化学发光检测试剂盒的方法,包括如下制备步骤:

[0016] 步骤一,链霉亲和素磁珠的制备:取购买羧基磁性微球,加入EDC进行活化,用MES缓冲液溶解链霉亲和素,加入活化后的磁性微球,质量比为1:2,37℃摇床反应3h,置于磁力分离架,Tris-HCl缓冲液清洗1次,加入10%BSA进行封闭,摇床反应30min后,置于磁性分离架Tris-HCl缓冲液清洗3次,加入含2%BSA的Tris-HCl缓冲液2℃~8℃保存。

[0017] 步骤二,捕获探针的制备:取步骤一获得的链霉亲和素磁珠,加入生物素化的待测物质捕获探针分子37℃摇床反应30min,Tris-HCl缓冲液清洗三次,加入含2%BSA的Tris-HCl缓冲液2℃~8℃保存,既得含有磁微粒的分离捕获探针复合体。

[0018] 步骤三,将制备的捕获分离探针以及竞争免疫探针,分别装入试剂盒中既得化学发光检测试剂盒。

[0019] 更进一步的,所述用双重放大化学发光免疫捕获探针制备用于化学发光检测试剂盒的方法,其中步骤一中所述缓冲液为0.05mol/L Tris-HCl (pH7.4),用所述缓冲液溶解的BSA 浓度为2%。

[0020] 所述的树枝状高分子接载体可任意跟含有氨基以及羧基的小分子或蛋白通过酰胺键偶联。

[0021] 有益效果:本发明双重放大化学发光免疫检测探针,在体外诊断免疫检测中将增强化学发光强度和增加磁性微球的探测分子结合量两种方式的有效结合,利用生物素亲合素间结合作用实现一次放大,同时利用树枝状高分子与信号物质偶联实现另一次放大,双重放大模式极大的提升了化学发光免疫分析发光信号强度,检测灵敏度和检测范围等免疫分析试剂性能得到显著增强。

附图说明

[0022] 图1本发明双重放大化学发光竞争免疫探针的双重放大原理示意图,其中,1:磁性微球; 2:链霉亲和素;3:生物素;4:特异性抗体;5:竞争性抗原小分子;6:信号物质(吖啶酯、鲁米诺等);7:树枝状高分子

具体实施方式

[0023] 以下通过实施例进一步对本发明予以说明,但并不以此为限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡事未脱离本发明技术方案内容,根据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

[0024] 实施例1

[0025] 双重放大化学发光竞争免疫探针的制备:

[0026] 1) 取一定10nmol/L的树枝状高分子,加入100 μ L的10mg/mL EDC进行活化,加入3nmol/L 链霉亲和素、0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.5)补充总体积500 μ L,37 $^{\circ}$ C搅拌反应1h;

[0027] 2) 反应结束后按照摩尔比1:10的比例加入购置的100nmol/L活化信号物质,37 $^{\circ}$ C搅拌反应1 h,最后加入50 μ L的0.05mol/L Tris-HCl进行封闭反应37 $^{\circ}$ C摇床反应30min;

[0028] 3) 取购置的2mg/mL活化生物素2.7 μ L,按照摩尔比例1:10的比例同待测物质探测分子150 μ g进行混合反应,37 $^{\circ}$ C反应1h,最后加入20 μ L的0.05mol/L Tris-HCl进行封闭反应,37 $^{\circ}$ C摇床反应30min;

[0029] 4) 取制得的修饰信号物质-链霉亲和素-树枝状大分子加入到制得的生物素化竞争小分子中摩尔比1:1,继续反应37 $^{\circ}$ C反应30min

[0030] 5) 整个反应结束后,转入截留分子量8KD的透析袋中,透析液为0.1mol/L的PBS (pH 7.2),透析去除未反应的小分子化学发光信号物质,收集透析后溶液,即得所述双重放大化学发光竞争免疫探针。

[0031] 实施例2

[0032] 磁性微球捕获分离探针的制备:

[0033] 1) 取购买羧基磁性微球10mg于离心管中,在磁性分离架上静置1min,吸除磁珠保存液,加入1.5mL的0.1mol/LMES缓冲液,重悬磁珠备用。

[0034] 2) 将称好的EDC用冰反应缓冲液溶解至10mg/mL,取34 μ L迅速加入到重悬后的磁珠中,立刻震荡混匀(或者边滴加边震荡)。

[0035] 3) 将称好的链霉亲和素用反应缓冲液溶解至10mg/mL,取60 μ L加入到磁珠中,室温(25 $^{\circ}$ C) /37 $^{\circ}$ C摇床震荡3h。

[0036] 4) 超声3min~4min,置于磁性分离架上静置1min,吸除反应液,用Tris-HCl缓冲液清洗3次,加入含2%BSA的Tris-HCl缓冲液重悬(8mL,1.25mg/mL),2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

[0037] 5) 生物素化的待测物质捕获探针分子稀释200倍后取1.5mL加入到制备好的1.25mg/L链霉亲和素磁珠1mL中,37 $^{\circ}$ C摇床反应30min

[0038] 6) 反应结束后,Tris-HCl缓冲液清洗三次,加入含2%BSA的Tris-HCl缓冲液,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存,既得含有磁微粒的分离捕获探针复合体。

[0039] 7) 将制备的捕获分离探针以及竞争免疫探针,分别装入试剂盒中密封既得化学法

发光检测试剂盒。

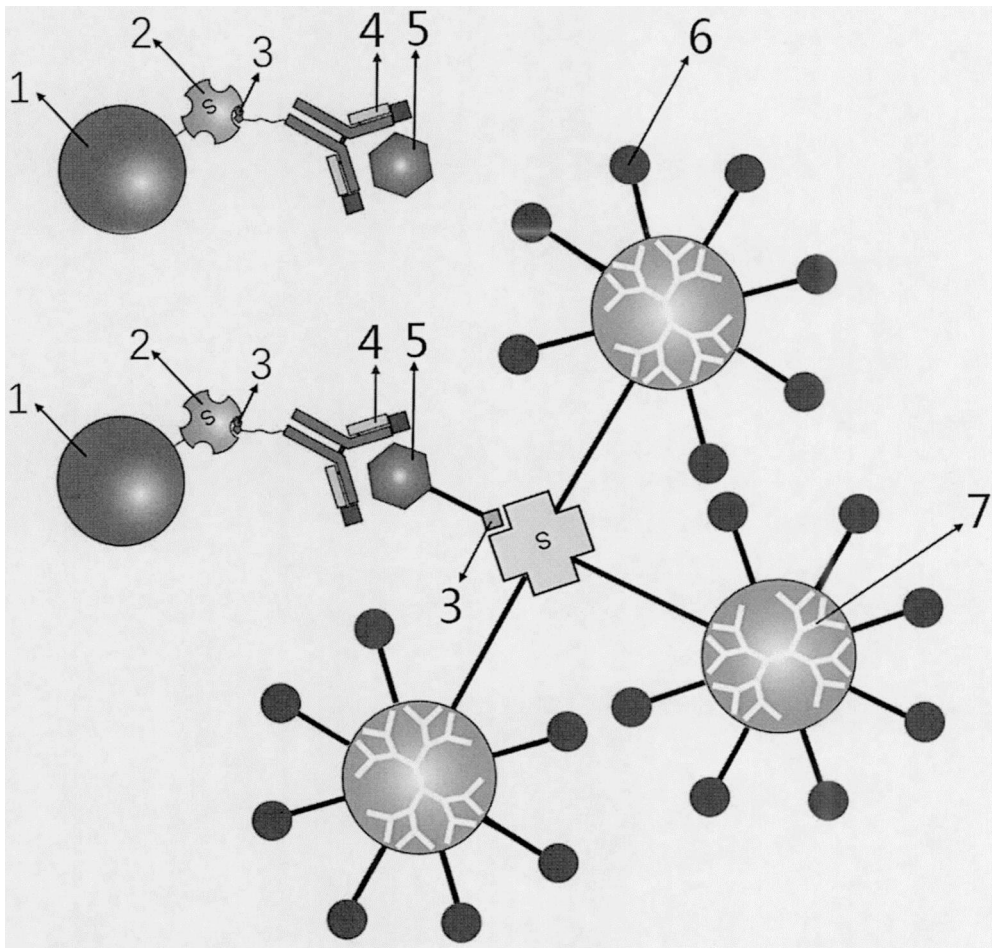


图1

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种基于树枝状高分子双重放大标记小分子竞争探针的制备及应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN108267574A | 公开(公告)日 | 2018-07-10 |
| 申请号 | CN201711271867.0 | 申请日 | 2017-11-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南京天纵易康生物科技有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 南京天纵易康科技股份有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 南京天纵易康科技股份有限公司 | | |
| [标]发明人 | 徐林 | | |
| 发明人 | 徐林 | | |
| IPC分类号 | G01N33/531 G01N21/76 | | |
| CPC分类号 | G01N21/76 G01N33/531 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种基于树枝状高分子双重放大标记小分子竞争探针的制备及应用，属于化学发光体外诊断中的化学发光标记领域。该双增强放大小分子标记方法包括如下步骤：步骤一：树枝状高分子-链霉亲和素-化学发光信号物质复合体的制备；步骤二：竞争小分子的生物素化标记；步骤三：双重放大化学发光免疫标记检测探针复合体的制备。本发明中双重放大化学发光免疫检测探针，将增强发光强度和增加磁性微球的探测分子结合量两种方式有效结合，利用生物素亲和素间结合作用实现一次放大，同时利用标记了信号物质的树枝状高分子实现另一次放大，双重放大模式极大的提升了化学发光免疫分析信号强度。

