



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111381027 A

(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 201811642385.6

(22)申请日 2018.12.29

(71)申请人 深圳市帝迈生物技术有限公司

地址 518055 广东省深圳市南山区桃源街道留仙大道4093号南山云谷创新产业园南风楼2楼B

(72)发明人 马志亚 张文琪 崔晓磊 刘治志

(74)专利代理机构 深圳市威世博知识产权代理事务所(普通合伙) 44280

代理人 李庆波

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页 附图7页

(54)发明名称

免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒

(57)摘要

本申请公开了一种免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒,该免疫捕获组合物包括:至少第一抗体和第二抗体,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,其中,第一抗体和第二抗体与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用;至少一个固相载体,固相载体表面固定有第一抗体和/或第二抗体。通过上述方式,能够降低待测抗原的检测阈值,明显提高检测灵敏度;同时可用于检测浓度较高的待测抗原,进而能够提高检测的线性范围。



1. 一种免疫捕获组合物，其特征在于，所述免疫捕获组合物包括：

至少一组抗体对，所述抗体对包括第一抗体和第二抗体，所述第一抗体具有第一亲和力，所述第二抗体具有第二亲和力，所述第一亲和力高于所述第二亲和力，其中，所述第一抗体和所述第二抗体与同种待测抗原发生特异性结合作用；

至少一个固相载体，所述固相载体表面固定有所述第一抗体和/或第二抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫捕获组合物，其特征在于，

所述免疫捕获组合物包括第一固相载体和第二固相载体，所述第一固相载体表面固定有所述第一抗体，所述第二固相载体表面固定有所述第二抗体。

3. 根据权利要求1所述的免疫捕获组合物，其特征在于，

所述第一抗体和所述第二抗体均固定于同一所述固相载体表面；

所述第一抗体和所述第二抗体的质量比例为1:1-1:9。

4. 根据权利要求1所述的免疫捕获组合物，其特征在于，

所述第一亲和力的亲和力常数范围为： $10^{-6}$ - $10^{-9}$ M；

所述第二亲和力的亲和力常数范围为 $10^{-9}$ - $10^{-12}$ M。

5. 根据权利要求1所述的免疫捕获组合物，其特征在于，所述免疫捕获组合物进一步包括：

修饰于所述固相载体表面的至少第一封闭化合物和第二封闭化合物，所述第一封闭化合物和所述第二封闭化合物用于封闭所述固相载体表面的活性位点；

其中，所述第一封闭化合物为所述多羟基糖类化合物，所述多羟基糖类化合物为葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、葡聚糖、甘露醇或聚蔗糖中的至少一种；

所述第二封闭化合物为所述蛋白质类化合物，所述蛋白质类化合物为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、酪蛋白、明胶、酪蛋白水解物、免疫球蛋白、奶粉、人或动物血清中的至少一种。

6. 根据权利要求5所述的免疫捕获组合物，其特征在于，所述免疫捕获组合物进一步包括：

修饰于所述固相载体表面的第三封闭化合物；

其中，所述第三封闭化合物为含有伯氨基的小分子化合物，所述含有伯氨基的小分子化合物为三羟甲基氨基甲烷、乙醇胺、羟胺、己胺或甘氨酸中的至少一种。

7. 根据权利要求1所述的免疫捕获组合物，其特征在于，

所述固相载体包括非磁性或磁性的高分子微球、非磁性或磁性的无机微球、或高分子和无机分子杂化微球中的至少一种；

其中，所述非磁性或磁性的高分子微球包括聚苯乙烯微球、聚丙烯酸酯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚丙烯酰胺微球、或聚甲基丙烯酰胺微球中的一种；

所述非磁性或磁性的无机微球包括二氧化硅微球、二氧化钛微球、或二氧化锆微球中的一种。

8. 根据权利要求7所述的免疫捕获组合物，其特征在于，所述固相载体为所述高分子微球，所述高分子微球的粒径为1-10μm，所述高分子微球的表面具有功能基团，所述功能基团用于共价偶联所述第一抗体和所述第二抗体。

9. 根据权利要求8所述的免疫捕获组合物，其特征在于，

所述功能基团为羧基、羟基、氨基、甲苯磺酰基、氯甲基、巯基、醛基、酰肼、硅羟基、琥珀酰亚胺酯、环氧基中的至少一种。

10. 一种免疫捕获组合物的制备方法,其特征在于,用于制备如权利要求1-9任一项所述的免疫捕获组合物,所述免疫捕获组合物的制备方法包括:

提供一固相载体;

将第一抗体和/或第二抗体固定于所述固相载体表面,其中,所述第一抗体具有第一亲和力,所述第二抗体具有第二亲和力,所述第一亲和力高于所述第二亲和力,所述第一抗体和所述第二抗体可与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用。

11. 根据权利要求10所述的免疫捕获组合物的制备方法,其特征在于,

所述将第一抗体和/或第二抗体固定于所述固相载体表面的步骤包括:将所述第一抗体和所述第二抗体均固定于同一所述固相载体表面;

或者,所述免疫捕获组合物包括第一固相载体和第二固相载体,所述将第一抗体和/或第二抗体固定于所述固相载体表面的步骤包括:将所述第一抗体固定于所述第一固相载体表面,将所述第二抗体固定于所述第二固相载体表面。

12. 如权利要求1-9任一项所述的免疫捕获组合物在心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测中的应用。

13. 一种免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:如权利要求1-9任一项所述的免疫捕获组合物以及免疫检测组合物;

所述免疫检测组合物包括:至少第三抗体和第四抗体、信号示踪物;

所述信号示踪物为酶示踪物、化学发光示踪物、或荧光示踪物中的至少一种。

14. 根据权利要求13所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,

所述第三抗体具有第三亲和力,所述第四抗体具有第四亲和力,所述第三亲和力高于所述第四亲和力;

所述第三亲和力的亲和力常数范围为: $10^{-6}$ - $10^{-9}$ M;

所述第四亲和力的亲和力常数范围为 $10^{-9}$ - $10^{-12}$ M。

15. 根据权利要求13所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,

所述免疫检测试剂盒进一步包括:至少一个试剂管,所述试剂管内设有悬浮液;

所述免疫捕获组合物以及所述免疫检测组合物溶于所述悬浮液内。

16. 如权利要求13-15任一项所述的免疫检测试剂盒在心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测中的应用。

17. 一种免疫检测方法,所述免疫检测方法基于权利要求13-15任一项所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述免疫检测方法包括:

提供一免疫捕获组合物,其中,所述免疫捕获组合物包括:至少一组抗体对,所述抗体对包括第一抗体和第二抗体,所述第一抗体具有第一亲和力,所述第二抗体具有第二亲和力,所述第一亲和力高于所述第二亲和力,其中,所述第一抗体和所述第二抗体可与同种待

测抗原发生特异性结合作用；至少一个固相载体，所述固相载体表面固定有所述第一抗体和/或第二抗体。

向检测体系中加入待测样本和所述免疫捕获组合物；

向所述检测体系中加入免疫检测组合物；

向所述检测体系中加入信号示踪物，以使所述至少一个第二抗体与所述信号示踪物结合；

分别检测所述免疫捕获组合物和所述免疫检测组合物的荧光强度值。

18. 根据权利要求17所述的免疫检测方法，其特征在于，

所述第一抗体和所述第二抗体为NT-ProBNP捕获抗体、肌钙蛋白捕获抗体、甲胎蛋白捕获抗体、癌胚抗原捕获抗体、HIV抗原捕获抗体、乙肝表面抗原捕获抗体、甲状腺球蛋白捕获抗体、肌钙蛋白I或T捕获抗体或肌红蛋白捕获抗体中的至少两种。

19. 一种免疫荧光分析系统，其特征在于，包括：

如权利要求13-15任一项所述的免疫检测试剂盒；

以及用以检测所述免疫检测试剂盒的荧光信号的光学检测机构；

所述免疫荧光分析系统用于心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测。

## 免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本申请涉及体外诊断领域,特别是涉及免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 免疫分析因其简单、特异性高、灵敏、易自动化等特点,在临床诊断中具有重要的应用价值。高性能的免疫试剂应具备灵敏度高、线性范围宽、特异性高等性能。对超出线性范围的样本,进行稀释后使其落入线性范围内再测试,是一种最直接的提高线性范围的方法。然而这种方法需要频繁的稀释样本,既浪费了试剂又增加了检测的时间。尤其是对于一些检测药物浓度的项目来说,大多数病人的样本都超过了线性范围。对于临床检验的某些项目,如N末端B型利钠肽(NT-ProBNP)和肌钙蛋白等除了对线性范围有要求外,对灵敏度也有很高的要求。因此如何在保持宽线性范围的同时实现高的灵敏度要求,是迄待解决的问题。

### 发明内容

[0003] 本申请主要解决的技术问题是提供一种免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒,能够解决现有技术无法满足高灵敏度和线性范围宽的要求的问题。

[0004] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种免疫捕获组合物,免疫捕获组合物包括:至少一组抗体对,抗体对包括第一抗体和第二抗体,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,其中,第一抗体和第二抗体与同种待测抗原发生特异性结合作用;至少一个固相载体,固相载体表面固定有第一抗体和/或第二抗体。

[0005] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种免疫捕获组合物的制备方法,用于制备如前述的免疫捕获组合物,免疫捕获组合物的制备方法包括:提供一固相载体;将第一抗体和/或第二抗体固定于固相载体表面,其中,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,第一抗体和第二抗体可与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用。

[0006] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供如前述的免疫捕获组合物在心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测中的应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种免疫检测试剂盒,包括:如前述的免疫捕获组合物以及免疫检测组合物;免疫检测组合物包括:至少第三抗体和第四抗体、信号示踪物;信号示踪物为酶示踪物、化学发光示踪物、或荧光示踪物中的至少一种。

[0008] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供如前述的免疫检测试

剂盒在心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测中的应用。

[0009] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种免疫检测方法,免疫检测方法基于前述的免疫检测试剂盒,免疫检测方法包括:提供一免疫捕获组合物,其中,免疫捕获组合物包括:至少一组抗体对,抗体对包括第一抗体和第二抗体,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,其中,第一抗体和第二抗体可与同种待测抗原发生特异性结合作用;至少一个固相载体,固相载体表面固定有第一抗体和/或第二抗体;缓冲液,用于混合至少一组抗体对和至少一个固相载体,以形成免疫捕获组合物悬浮液;向检测体系中加入待测样本和免疫捕获组合物;向检测体系中加入至少一个第二抗体;向检测体系中加入信号示踪物,以使至少一个第二抗体与信号示踪物结合;检测检测体系的荧光强度值。

[0010] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种免疫荧光分析系统,包括:如前述的免疫检测试剂盒;以及用以检测免疫检测试剂盒的荧光信号的光学检测机构;免疫荧光分析系统用于心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测。

[0011] 本申请的有益效果是:区别于现有技术的情况,本申请中免疫捕获组合物包括:至少第一抗体和第二抗体,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,其中,第一抗体和第二抗体可与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用,即第一抗体和第二抗体均可识别同种待测抗原,由于本申请的第一抗体具有与抗原结合的高亲和力,同时,本申请的第二抗体具有与待测抗原结合的低亲和力,有利于提高检测的线性范围,由此,本申请通过采用两种不同亲和力的捕获抗体,实现了灵敏度高和线性范围宽的目的。

## 附图说明

[0012] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。其中:

- [0013] 图1是本申请免疫捕获组合物的制备方法一实施方式的流程示意图;
- [0014] 图2是本申请免疫捕获组合物的制备方法另一实施方式的流程示意图;
- [0015] 图3是本申请免疫捕获组合物的制备方法又一实施方式的流程示意图;
- [0016] 图4是本申请免疫检测方法一实施方式的流程示意图;
- [0017] 图5是本申请免疫检测方法另一实施方式的流程示意图;
- [0018] 图6是实施例4所测得的校准曲线;
- [0019] 图7是实施例4的线性回归分析结果;
- [0020] 图8是实施例6所测得的校准曲线;
- [0021] 图9是实施例6的线性回归分析结果;

- [0022] 图10是实施例8所得的测得的校准曲线；
- [0023] 图11是实施例8的线性回归分析结果；
- [0024] 图12是实施例10所测得的校准曲线；
- [0025] 图13是实施例10的线性回归分析结果；
- [0026] 图14是对照组所测得的校准曲线；
- [0027] 图15是对照组的线性回归分析结果；
- [0028] 图16是实施例15所测得的校准曲线；
- [0029] 图17是实施例15线性回归分析结果。

## 具体实施方式

[0030] 下面将结合本申请实施例中的附图，对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性的劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。

[0031] 本申请提供的免疫捕获组合物包括：至少一组抗体对，抗体对包括第一抗体和第二抗体，第一抗体具有第一亲和力，第二抗体具有第二亲和力，第一亲和力高于第二亲和力，其中，第一抗体和第二抗体与同种待测抗原发生特异性结合作用；至少一个固相载体，固相载体表面固定有第一抗体和/或第二抗体；缓冲液，用于混合至少一组抗体对和至少一个固相载体，以形成免疫捕获组合物悬浮液。

[0032] 具体的，抗体的亲和力是确定抗体性质的重要参数之一，亲和力是指抗体分子上一个抗原结合点与相应的抗原决定簇之间相适应而结合的强度，它是抗原抗体间固有的结合力，它是一个抗体分子与整个抗原表位之间结合的强度，与抗体结合价直接相关，常用亲和力常数 $K_D$ 表示，指达到平衡后，结合半数抗原分子时所需抗体的浓度。

[0033] 亲和力具有多价优势，由于抗原抗体的特异性结合反应为非共价的可逆结合，它们空间构象的互补程度不同，结合力强弱也不同，互补程度越高，亲和力越高，与抗原结合更牢固，不易解离；反之就容易解离。亲和力常数越大，亲和力越高。其中，抗原抗体的特异性反应的灵敏度与亲和力直接相关，在抗原抗体反应中，通常单价抗体特异性高，但亲和力相对小，检测抗原灵敏度相对低；而多价抗体特异性较弱，但亲和力相对强，检测抗原灵敏度高。

[0034] 其中，第一抗体和第二抗体为与同种待测抗原发生特异性结合作用的一组抗体对，即第一抗体和第二抗体为具有不同亲和力的同一种类抗体。在本实施例中，免疫捕获组合物可以具有1组、2组、3组或多组抗体对。第一抗体具有与抗原结合的高亲和力，其极易与待测抗原发生抗原抗体结合作用，因此，能够降低待测抗原的检测阈值，明显提高检测灵敏度；同时，本申请的第二抗体具有与待测抗原结合的低亲和力，可用于检测浓度较高的待测抗原，进而能够提高检测的线性范围。

[0035] 同一个固相载体可以具有设置在其上的第一抗体和第二抗体。或者，第一抗体和第二抗体可以分别固定在两个固相载体，其中，两个固相载体可以以不同比例混合，在此不做限定。第一抗体和第二抗体均特异性结合相同的待测抗原。

[0036] 区别于现有技术的情况，本实施例中免疫捕获组合物包括：至少第一抗体和第二

抗体,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,其中,第一抗体和第二抗体可与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用,即第一抗体和第二抗体均可识别同种待测抗原,由于本实施例的第一抗体具有与抗原结合的高亲和力,同时,本申请的第二抗体具有与待测抗原结合的低亲和力,有利于提高检测的线性范围,由此,本实施例通过采用两种不同亲和力的捕获抗体,实现了灵敏度高和线性范围宽的目的。

[0037] 在一实施例中,免疫捕获组合物包括第一固相载体和第二固相载体,第一固相载体表面固定有第一抗体,第二固相载体表面固定有第二抗体。第一抗体和第二抗体的质量比例为1:1-1:9(例如,1:1、1:3、1:6、或1:9)。

[0038] 通过上述方式,可以准确控制第一固相载体和第二固相载体的不同比例,进而准确控制第一抗体和第二抗体的不同比例。

[0039] 在一实施例中,第一抗体和第二抗体均固定于同一固相载体表面;第一抗体和第二抗体的质量比例为1:1-1:9(例如,1:1、1:3、1:6、或1:9)。

[0040] 具体的,亲和力具有多价优势,由于抗原抗体的特异性结合反应为非共价的可逆结合,它们空间构象的互补程度不同,结合力强弱也不同,互补程度越高,亲和力越高,与抗原结合更牢固,不易解离;反之就容易解离。亲和力常数越大,亲和力越高。其中,抗原抗体的特异性反应的灵敏度与亲和力直接相关,在抗原抗体反应中,通常单价抗体特异性强,但亲和力相对小,检测抗原灵敏度相对低;而多价抗体特异性较弱,但亲和力相对强,检测抗原灵敏度高。因此,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一抗体的第一亲和力高于第二抗体的第二亲和力,在第一抗体的质量比例占比越高时,检测抗原灵敏度越高。

[0041] 在一实施例中,第一亲和力的亲和力常数范围为: $10^{-6}$ - $10^{-9}$ M(例如, $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M或 $10^{-9}$ M);第二亲和力的亲和力常数范围为 $10^{-9}$ - $10^{-12}$ M(例如, $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M或 $10^{-12}$ M)。

[0042] 在一实施例中,第一抗体和第二抗体均固定于同一固相载体表面。

[0043] 在一实施例中,免疫捕获组合物进一步包括:修饰于固相载体表面的至少第一封闭化合物和第二封闭化合物,第一封闭化合物和第二封闭化合物用于封闭固相载体表面的活性位点。其中,第一封闭化合物为多羟基糖类化合物,多羟基糖类化合物为葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、葡聚糖、甘露醇或聚蔗糖中的至少一种;第二封闭化合物为蛋白质类化合物,蛋白质类化合物为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、酪蛋白、明胶、酪蛋白水解物、免疫球蛋白、奶粉、人或动物血清中的至少一种。

[0044] 具体的,活性位点为固相载体上未固定有抗体的吸附位点。在包被过程中,通过这种吸附,固相载体不仅与目标蛋白结合同时也与非特异性蛋白结合,从而干扰随后的实验结果,为此必须对这些非特异性结合位点进行封闭(blocking)。封闭是继包被之后用高浓度的第一封闭化合物、第二封闭化合物溶液再包被的过程,就是让大量不相关的第一封闭化合物、第二封闭化合物充填这些空隙,从而排斥在其后的免疫反应步骤中干扰物质的再吸附,增加特异反应得专一性和灵敏度。

[0045] 封闭的程序与包被过程相类似。现有技术中最常用的封闭剂是0.05%-5%的牛血清蛋白(BSA),本申请发明人发现,在传统免疫亲和反应中,对于某些特定的项目来说,单独使用牛血清蛋白(BSA)进行封闭时,并没有很好的封闭效果,且会影响检测的灵敏度以及

检测结果的准确性。因此,本实施例可以通过使用两种封闭化合物或两种以上(例如多羟基糖类化合物、蛋白质类化合物、含伯胺基的小分子化合物)封闭固相载体表面中大多数甚至全部活性位点,因此干扰物质对固相载体的非特异性吸附被有效抑制。第一封闭化合物、第二封闭化合物可以通过静电作用、疏水作用、生物分子间的特异作用或化学连接剂中的至少一种修饰于固相载体表面。

[0046] 区别于现有技术的情况,本申请中固相载体表面修饰有第一封闭化合物和第二封闭化合物,该第一封闭化合物和第二封闭化合物用于封闭活性位点,其中,第一封闭化合物为多羟基糖类化合物,第二封闭化合物为蛋白质类化合物,因此能够通过两种封闭化合物封闭固相载体表面中大多数甚至全部活性位点,因此干扰物质对固相载体的非特异性吸附被有效抑制。采用本申请的封闭策略对固相载体进行封闭的效果显著优于传统的蛋白质作为单一封闭剂的封闭策略,有效提高封闭效果,且减少对获得的有效数据量的影响,以及提高检测的灵敏度和特异性。

[0047] 进一步地,免疫捕获组合物可以包括:修饰于固相载体表面的第三封闭化合物;其中,第三封闭化合物为含有伯氨基的小分子化合物,含有伯氨基的小分子化合物为三羟甲基氨基甲烷、乙醇胺、羟胺、己胺或甘氨酸中的至少一种。

[0048] 在一实施例中,固相载体包括非磁性或磁性的高分子微球、非磁性或磁性的无机微球、或高分子和无机分子杂化微球中的至少一种;其中,非磁性或磁性的高分子微球包括聚苯乙烯微球、聚丙烯酸酯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚丙烯酰胺微球、聚乙烯微球、或聚甲基丙烯酰胺微球中的一种;非磁性或磁性的无机微球包括二氧化硅微球、二氧化钛微球、或二氧化锆微球中的一种,在此不做限定。

[0049] 进一步地,非磁性或磁性的高分子微球、非磁性或磁性的无机微球、或高分子和无机分子杂化微球上可以结合荧光染料分子(Fluorescent Dyes)或其它荧光探针分子,便可以得到从纳米至微米级尺度的荧光高分子微球。荧光分子与微球的结合方式可分为吸附和化学键合两种。

[0050] 具体的,高分子微球的粒径可以为1-10 $\mu\text{m}$ ,如1 $\mu\text{m}$ 、4 $\mu\text{m}$ 、6 $\mu\text{m}$ 或10 $\mu\text{m}$ 。高分子微球可通过其表面的功能基团将多种生物活性物质以共价键偶联在其表面,生物活性物质可以包括:抗原、抗体、激素、酶、核酸、寡核苷酸等。例如,高分子微球的表面具有功能基团,功能基团共价偶联第一抗体和第二抗体。

[0051] 其中,功能基团为羧基、羟基、氨基、甲苯磺酰基、氯甲基、巯基、醛基、酰肼、硅羟基、琥珀酰亚胺酯、环氧基中的至少一种。

[0052] 本申请提供一种免疫捕获组合物的制备方法,用于制备前述免疫捕获组合物,免疫捕获组合物具体请参见上述实施例中的免疫捕获组合物,在此不做赘述。

[0053] 参阅图1,该免疫捕获组合物的制备方法包括以下步骤:

[0054] S101:提供一固相载体。

[0055] 具体的,固相载体包括非磁性或磁性的高分子微球、非磁性或磁性的无机微球、或高分子和无机分子杂化微球中的至少一种;其中,非磁性或磁性的高分子微球包括聚苯乙烯微球、聚丙烯酸酯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚丙烯酰胺微球、聚乙烯微球、或聚甲基丙烯酰胺微球中的一种;非磁性或磁性的无机微球包括二氧化硅微球、二氧化钛微球、或二氧化锆微球中的一种,在此不做限定。

[0056] 可以选用表面羧基化的超顺磁性微球(以下简称磁珠)。该磁珠可以是荧光标记的荧光磁珠。

[0057] S102:将第一抗体和/或第二抗体固定于固相载体表面。

[0058] 其中,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,第一抗体和第二抗体可与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用。

[0059] 其中,参阅图2,步骤S102包括以下步骤:S102A:将第一抗体和第二抗体均固定于同一固相载体表面。

[0060] 或者,参阅图3,其在其他实施例中,免疫捕获组合物包括第一固相载体和第二固相载体,步骤S102包括以下步骤:S102B:将第一抗体固定于第一固相载体表面,将第二抗体固定于第二固相载体表面。

[0061] 具体的,提供步骤S101制备得到的荧光标记的高分子微球作为第一固相载体。先用MES缓冲液清洗1mg磁珠两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮荧光标记的高分子微球,分别加入NHS和EDC各100 $\mu$ g,室温下活化30分钟。磁分离,用PBS缓冲液清洗两次。加入第一抗体 40 $\mu$ g,室温反应2个小时。磁分离后用PBS清洗两次。加入0.5mL封闭剂,室温封闭0.5个小时;然后加入0.5mL 1% BSA溶液室温封闭3 小时;封闭完成后,磁分离清洗两次。加入PBS-TBN缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL,2-8°C避光保存。

[0062] 进一步地,提供步骤S102制备得到的荧光标记的高分子微球作为第二固相载体。先用MES缓冲液清洗1mg磁珠两次,磁分离后,用MES 缓冲液重新悬浮荧光标记的高分子微球,分别加入NHS和EDC各100 $\mu$ g,室温下活化30分钟。磁分离,用PBS缓冲液清洗两次。加入第二抗体 40 $\mu$ g,室温反应2个小时。磁分离后用PBS溶液清洗两次。加入0.5mL 封闭剂,室温封闭0.5个小时;然后加入0.5mL 1% BSA溶液室温封闭3 小时;封闭完成后,磁分离清洗两次。加入PBS-TBN缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL,2-8°C避光保存。制得的免疫捕获组合物可以用Mag1-Ab1 和Mag2-Ab2表示。

[0063] 其中,抗体包被方法包括直接包被法和间接包被法,直接包被法为将第一抗体和/或第二抗体直接固定于固相载体表面;间接包被法为通过蛋白A和/或蛋白G、二抗与一抗、亲和素和生物素的特异性亲和反应将至少一个第一抗体间接固定于固相载体上。例如通过生物素与链霉亲和素之间的特异性反应将第一抗体和/或第二抗体间接固定于固相载体表面。

[0064] 本申请提供一种前述免疫捕获组合物在心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测中的应用。

[0065] 本申请提供一种免疫检测试剂盒,该免疫检测试剂盒包括:如前述的免疫捕获组合物、免疫检测组合物。免疫检测组合物包括:至少第三抗体和第四抗体、信号示踪物。信号示踪物可以为酶示踪物、化学发光示踪物、或荧光示踪物中的至少一种。

[0066] 可以先用固定捕获抗体结合待测抗原,形成的抗原抗体复合物与检测抗体结合,反应过程中会形成固相载体-捕获抗体-待测抗原-检测抗体复合物。

[0067] 在一实施例中,第三抗体具有第三亲和力,第四抗体具有第四亲和力,第三亲和力高于第四亲和力。第三亲和力的亲和力常数范围为: 10<sup>-6</sup>-10<sup>-9</sup>M;第四亲和力的亲和力常数范围为10<sup>-9</sup>-10<sup>-12</sup>M。

[0068] 具体地,第三抗体具有与抗原结合的高亲和力,其极易与待测抗原发生抗原抗体结合作用,因此,能够降低待测抗原的检测阈值,明显提高检测灵敏度;同时,本申请的第四抗体具有与待测抗原结合的低亲和力,可用于检测浓度较高的待测抗原,进而能够提高检测的线性范围。

[0069] 为了进一步提高上述免疫检测试剂盒在自动化免疫检测设备中的应用便利性,在本申请一种优选的实施例中,上述试剂盒可以包括抗原标准品和质控品。

[0070] 在一实施例中,抗原标准品用于配备校准品,以制作免疫检测标准曲线。

[0071] 具体的,抗原标准品可以与第一抗体和第三抗体发生抗原抗体结合作用形成第一夹心免疫复合物:固相载体-第一抗体-抗原标准品-第三抗体。抗原标准品可以与第二抗体和第四抗体发生抗原抗体结合作用形成第二夹心免疫复合物:固相载体-第二抗体-抗原标准品-第四抗体。

[0072] 在一实施方式中,免疫检测试剂盒进一步包括:至少一个试剂管,试剂管内设有悬浮液;免疫捕获组合物以及免疫检测组合物溶于悬浮液内。悬浮液包括缓冲液、表面活性剂、无机盐、稳定剂以及防腐剂。可以理解的,悬浮液可以包含多个捕获免疫组合物和检测免疫组合物,每一捕获免疫组合物和检测免疫组合物内又可分别包含多个第一抗体/第二抗体和第三抗体/第四抗体。

[0073] 其中,缓冲液的pH范围在7.0-9.0之间,缓冲液的浓度范围为 10-100mmol/L。缓冲液为3-(N-吗啉基)丙磺酸-氢氧化钠缓冲液 (MOPS-NaOH)、3-[N,N-二(羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液 (DIPS0-NaOH)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸-氢氧化钠缓冲液 (HEPPS-NaOH)、三羟甲基氨基甲烷-HCl缓冲液 (Tris-HCl)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸-NaOH缓冲液 (HEPES-NaOH)、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、咪唑缓冲液、柠檬酸缓冲液、甘氨酸-NaOH缓冲液或巴比妥缓冲液中的至少一种。稳定剂为明胶、牛血清白蛋白或酪蛋白。无机盐为氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化铵、氯化镁、硫酸钠或硫酸钾中的至少一种。表面活性剂为吐温20或曲拉通X-100。稳定剂为浓度1%-5%的蔗糖、海藻糖、甘油、甘露醇、聚乙二醇、聚乙烯比咯烷酮或乙二胺四乙酸二钠的至少一种。防腐剂为叠氮钠、硫柳汞或Proclin-300中的至少一种。

[0074] 本申请提供一种前述的免疫检测试剂盒在心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症检测或肿瘤检测中的应用。

[0075] 本申请提供一种免疫检测方法,该免疫检测方法基于前述的免疫检测试剂盒。免疫检测试剂盒具体请参见上述实施例中的免疫检测试剂盒,在此不做赘述。

[0076] 参阅图4,该免疫检测方法包括以下步骤:

[0077] S201:提供一免疫捕获组合物。

[0078] 其中,免疫捕获组合物包括:至少一组抗体对,抗体对包括第一抗体和第二抗体,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第一亲和力高于第二亲和力,其中,第一抗体和第二抗体可与同种待测抗原发生特异性结合作用;至少一个固相载体,固相载体表面固定有第一抗体和/或第二抗体;缓冲液,用于混合至少一组抗体对和至少一个固相载体,以形成免疫捕获组合物悬浮液。免疫捕获组合物具体请参见上述实施例中的免疫捕获组合物,在此不做赘述。

[0079] S202:向检测体系中加入待测样本和免疫捕获组合物。

[0080] 具体的,向检测体系中加入步骤S102A制得的免疫捕获组合物以及待测样本,反应10-30分钟(例如10分钟、20分钟或30分钟)后可以形成:待测抗原-第一抗体-固相载体-第二抗体-待测抗原。

[0081] 在其他实施例中,向检测体系中加入步骤S102B制得的免疫捕获组合物以及待测样本,反应10-30分钟(例如10分钟、20分钟或30分钟)后形成:固相载体-第一抗体-待测抗原、固相载体-第二抗体-待测抗原。

[0082] S203:向检测体系中加入至少一个检测抗体(第三抗体)。

[0083] 具体的,第三抗体可以为生物素化检测抗体,例如,将检测抗体与生物素反应,制备得到生物素标记的检测抗体,即为生物素化检测抗体。其中,生物素化抗体的制备为本领域常规技术手段,在此不做赘述。加入生物素化检测抗体,室温孵育,形成固相载体-第一抗体-待测抗原-检测抗体-生物素复合物、固相载体-第二抗体-待测抗原-检测抗体-生物素复合物、或生物素-检测抗体-待测抗原-第一抗体-固相载体-第二抗体-待测抗原-检测抗体-生物素复合物。

[0084] S204:向检测体系中加入信号示踪物,以使至少一个第三抗体与信号示踪物结合。

[0085] 具体的,信号示踪物为酶示踪物、化学发光示踪物、或荧光示踪物中的至少一种。优选地,信号示踪物可以为链霉亲和素-藻红蛋白,向检测体系中加入链霉亲和素-藻红蛋白,以使检测抗体与链霉亲和素-藻红蛋白结合。

[0086] 加入链霉亲和素-藻红蛋白(SAPE),室温孵育,可以形成固相载体-第一抗体-待测抗原-检测抗体-生物素-SAPE复合物、固相载体-第二抗体-待测抗原-检测抗体-生物素-SAPE复合物、或SAPE-生物素-检测抗体-待测抗原-第一抗体-固相载体-第二抗体-待测抗原-检测抗体-生物素-SAPE复合物。

[0087] S205:检测检测体系的荧光强度值。

[0088] 具体的,可以以流式细胞仪为检测工具,方法学模式为双抗体夹心法,检测光敏物质SAPE产生的信号强度。

[0089] 在一实施例中,在步骤S205之前,免疫检测方法进一步包括以下步骤:

[0090] S301:配备校准品稀释液。

[0091] S302:制作免疫检测标准曲线。

[0092] 具体的,将校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,进行五参数拟合,得到校准曲线。

[0093] 在一实施例中,第一抗体和第二抗体为NT-ProBNP捕获抗体。抗原标准品为NT-ProBNP重组抗原。

[0094] 本申请提供一种免疫荧光分析系统,包括:如前述的免疫检测试剂盒;以及用以检测免疫检测试剂盒的荧光信号的光学检测机构;免疫荧光分析系统用于心肌检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症监测或肿瘤检测。

[0095] 进一步地,本申请提供一种检测抗体组合物,检测抗体组合物包括:检测抗体,以及分别与检测抗体连接的荧光标记物或荧光增强颗粒;检测抗体以及如前述的免疫捕获组

合物中的抗体对可与待测抗原发生特异性结合作用；其中，荧光增强颗粒包括金属纳米颗粒；荧光增强颗粒表面上设有功能基团，荧光增强颗粒通过功能基团与检测抗体连接。

[0096] 具体的，链霉亲和素连接的荧光标记物包括自荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，花菁类荧光染料，香豆素类荧光染料，氟硼类荧光染料，酞菁类荧光染料中的一种或以上的组合。荧光染料的具体种类可根据待标记的抗体的种类，检测条件等指标具体确定，此处不再限定。

[0097] 下面结合实施例对本申请作进一步描述：

[0098] 以下所有性能参数的测试方案参照国家食品药品监督管理总局颁布的《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》执行。

[0099] 实施例1

[0100] 免疫捕获组合物1包括：

[0101] 第一NT-ProBNP捕获抗体和第二NT-ProBNP捕获抗体，第一 NT-ProBNP捕获抗体和第二NT-ProBNP捕获抗体的质量比例为1:1，第一NT-ProBNP捕获抗体具有第一亲和力(亲和力常数 $K_D1$ 为 $10^{-9}M$ )，第二NT-ProBNP捕获抗体具有第二亲和力(亲和力常数 $K_D2$ 为 $10^{-12}M$ )；

[0102] 固相载体1：表面羧基化磁珠， $5\mu m$ 。

[0103] 其中，固相载体1表面固定有第一NT-ProBNP捕获抗体和第二 NT-ProBNP捕获抗体；

[0104] 免疫捕获组合物1用Mag1-(Ab1+Ab2)表示，其中，Mag1表示固相载体1，Ab1表示第一NT-ProBNP捕获抗体，Ab2第二NT-ProBNP捕获抗体。

[0105] 免疫捕获组合物1的制备包括如下步骤：

[0106] 步骤(1)：先用MES缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠两次，磁分离后，用MES缓冲液重新悬浮磁珠，分别加入NHS和EDC各100 $\mu g$  (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解，现用现配)，室温下活化30分钟。磁分离，用磷酸(PBS)缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次，以得到荧光标记的高分子微球。

[0107] 步骤(2)：先用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠两次，磁分离后，用MES缓冲液重新悬浮磁珠，分别加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)各100 $\mu g$  (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解，现用现配)，室温下活化30分钟。磁分离，用磷酸(PBS)缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次，制得活化后的高分子微球。

[0108] 步骤(3)：向高分子微球中加入第一NT-ProBNP捕获抗体和第二 NT-ProBNP捕获抗体各20 $\mu g$  (第一NT-ProBNP捕获抗体和第二 NT-ProBNP捕获抗体溶解在PBS缓冲液中)，室温反应2个小时。进一步地，磁分离后，用PBS缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次。加入0.5mL封闭剂(5%乙醇胺，10mM PBS, pH7.4)，室温封闭0.5个小时；然后加入0.5mL 1% BSA(10mM PBS, pH7.4)室温封闭3小时；封闭完成后，磁分离清洗两次。加入PBS-TBN(10mM, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH7.4)缓冲液，磁珠浓度为0.2mg/mL, 2-8℃避光保存，制得免疫捕获组合物1。

[0109] 实施例2

[0110] 免疫捕获组合物2包括：

[0111] 第一NT-ProBNP捕获抗体和第二NT-ProBNP捕获抗体，第一 NT-ProBNP捕获抗体和

第二NT-ProBNP捕获抗体的比例为1:1第一 NT-ProBNP捕获抗体具有第一亲和力(亲和力常数 $K_D1$ 为 $10^{-9}M$ )，第二 NT-ProBNP捕获抗体具有第二亲和力(亲和力常数 $K_D2$ 为 $10^{-12}M$ )；

[0112] 固相载体1:表面羧基化磁珠,5μm;

[0113] 固相载体2:表面羧基化磁珠,5μm;

[0114] 固相载体1表面固定有第一NT-ProBNP捕获抗体,固相载体2表面固定有第二NT-ProBNP捕获抗体;

[0115] 免疫捕获组合物2用Mag1-Ab1和Mag2-Ab2表示,其中,Mag1表示固相载体1, Mag2表示固相载体2,Ab1表示第一NT-ProBNP捕获抗体,Ab2表示第二NT-ProBNP捕获抗体。

[0116] 免疫捕获组合物2的制备包括如下步骤:

[0117] 步骤(1):先用MES缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮磁珠,分别加入NHS和EDC各100μg (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解,现用现配),室温下活化30分钟。磁分离,用磷酸(PBS)缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次,以得到高分子微球。

[0118] 步骤(2):先用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮磁珠,分别加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)各100μg (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解,现用现配),室温下活化30分钟。磁分离,用磷酸(PBS)缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次,制得活化后的高分子微球。

[0119] 步骤(3):先用MES缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮荧光标记的高分子微球,分别加入 NHS和EDC各100μg (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解,现用现配),室温下活化30分钟。磁分离,用PBS缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次。加入第一NT-ProBNP捕获抗体40μg (溶解在PBS中),室温反应2个小时。磁分离后用PBS(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次。加入0.5mL封闭剂(5%乙醇胺, 10mM PBS, pH7.4),室温封闭0.5个小时;然后加入0.5mL 1% BSA(10mM PBS, pH7.4)室温封闭3小时;封闭完成后,磁分离清洗两次。加入PBS-TBN(10mM, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH7.4)缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL, 2-8°C避光保存。

[0120] 步骤(4):封闭完成后,磁分离清洗两次。

[0121] 步骤(5):加入PBS-TBN(10mM, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH7.4)缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL, 2-8°C避光保存,制得免疫捕获组合物2。

[0122] 实施例3

[0123] 免疫检测试剂盒1包括如下组分:

[0124] (1) 免疫捕获组合物1:实施例1所制备的Mag1-(Ab1+Ab2);

[0125] (2) 免疫检测组合物1:B-Ab1(亲和力常数 $K_D3$ 为 $10^{-9}M$ );

[0126] 其中,B-Ab1表示生物素化NT-ProBNP检测抗体;

[0127] (3) 链霉亲和素连接的荧光标记物:链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE);

[0128] (4) NT-ProBNP校准品。

[0129] 实施例4

[0130] 基于实施例3的免疫检测试剂盒1的免疫检测方法包括如下步骤:

[0131] 步骤(1):制备免疫捕获组合物1:Mag1-(Ab1+Ab2),具体步骤请参见实施例1,在此

不做赘述；

[0132] 步骤(2)：制备免疫捕获组合物1：B-Ab1：取0.2mg NT-ProBNP 检测抗体，用NaHCO<sub>3</sub> (100mM, pH8.3) 溶液稀释，至终浓度为2mg/mL；加入2μL, 10mM浓度的Biotin-NHS的DMSO溶液，37℃反应2h。过 Sephadex G-25层析柱，纯化生物素化的抗体；加入1mL的PBS-TBN, pH7.4溶液于2-8℃保存，制得B-Ab1；

[0133] 步骤(3)：将抗原标准品按照0、100、250、500、1000、5000、10000、15000、35000pg/mL的浓度进行稀释得到校准品。将校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标，对应的校准品浓度为横坐标，进行五参数拟合，得到校准曲线。

[0134] 步骤(4)：在检测体系中加入10μL的校准品、50μL的免疫捕获组合物1Mag-(Ab1+Ab2)，反应20分钟后，再加100μL生物素化检测抗体 B-Ab1，反应10分钟后，最后加入100μL链霉亲和素标记的藻红蛋白 (SA-PE) 溶液 (2μg/mL)，反应5分钟，磁分离后，加入100μL的PBS-TBN 清洗液，放入流式细胞仪，进行荧光强度 (MFI) 的检测；

[0135] 步骤(5)：以5g/mL牛血清白蛋白溶液为空白样本，用上述检测方法重复测定20次，以空白均值加两倍标准差报告最低检测限。

[0136] 步骤(6)：以接近线性高值的高浓度样品，用样本稀释液梯度稀释，在流式细胞分析仪上进行测定，每个浓度测定两次，将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析。

[0137] 结果分析：图6是实施例4所测得的校准曲线；图7是实施例4的线性回归分析结果。从图中可以看出试剂盒在17.2-35000pg/mL线性良好。最低检出限请见表1，可知实施例4的最低检出限为6.09pg/mL。

[0138] 实施例5

[0139] 免疫检测试剂盒2包括如下组分：

[0140] (1) 免疫捕获组合物1：实施例1所制备的Mag1-(Ab1+Ab2)；

[0141] (2) 免疫检测组合物2：B-Ab3、B-Ab4 (B-Ab3、B-Ab4质量比例为1:1)，B-Ab3具有第三亲和力(亲和力常数K<sub>D3</sub>为10<sup>-10</sup>M)，B-Ab4 具有第四亲和力(亲和力常数K<sub>D4</sub>为10<sup>-12</sup>M)，

[0142] 其中，B-Ab3表示第三NT-ProBNP生物素化检测抗体，B-Ab4表示第四NT-ProBNP生物素化检测抗体；

[0143] (3) 链霉亲和素连接的荧光标记物：链霉亲和素-藻红蛋白 (SA-PE)；

[0144] (4) NT-ProBNP校准品。

[0145] 实施例6

[0146] 基于实施例5的免疫检测试剂盒2的免疫检测方法包括如下步骤：

[0147] 步骤(1)：制备免疫捕获组合物1：Mag1-(Ab1+Ab2)，具体步骤请参见实施例1，在此不做赘述；

[0148] 步骤(2)：制备免疫捕获组合物2：B-Ab3和B-Ab4：各取0.1mg第三NT-ProBNP检测抗体和第四NT-ProBNP检测抗体，用NaHCO<sub>3</sub> (100mM, pH8.3) 溶液稀释，至终浓度为2mg/mL；加入2μL, 10mM浓度的Biotin-NHS的DMSO溶液，37℃反应2h。过 Sephadex G-25层析柱，纯化生物素化的抗体；加入1mL的PBS-TBN, pH7.4溶液于2-8℃保存，制得B-Ab1和B-Ab2；

[0149] 步骤(3)：将抗原标准品按照0、100、250、500、1000、5000、10000、15000、35000pg/mL的浓度进行稀释，将校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标，对应的校准品浓度为横坐标，进行五参数拟合，得到校准曲线。

[0150] 步骤(4):在检测体系中加入10 $\mu$ L的校准品、50 $\mu$ L的免疫捕获组合物1Mag-(Ab1+Ab2),反应20分钟后,再加50 $\mu$ L第三NT-ProBNP生物素化检测抗体B-Ab3和50 $\mu$ L第四NT-ProBNP生物素化检测抗体 B-Ab4,反应10分钟后,最后加入100 $\mu$ L链霉亲和素标记的藻红蛋白 (SA-PE) 溶液(2 $\mu$ g/mL),反应5分钟,磁分离后,加入100 $\mu$ L的PBS-TBN 清洗液,放入流式细胞仪,进行荧光强度(MFI)的检测;

[0151] 步骤(5):以5g/mL牛血清白蛋白溶液为空白样本,用上述检测方法重复测定20次,以空白均值加两倍标准差报告最低检测限。

[0152] 步骤(6):以接近线性高值的高浓度样品,用样本稀释液梯度稀释,在流式细胞分析仪上进行测定,每个浓度测定两次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析。

[0153] 结果分析:图8是实施例6所测得的校准曲线;图9是实施例6的线性回归分析结果。从图中可以看出试剂盒在8.5-35000pg/mL线性良好。最低检出限请见表1,实施例6的最低检出限为5.14pg/mL。

[0154] 实施例7

[0155] 免疫检测试剂盒3包括如下组分:

[0156] (1) 免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2(质量比例为:1:1),

[0157] 其中,Mag1表示固相载体1,Mag2表示固相载体2,Ab1表示第一 NT-ProBNP捕获抗体,Ab2表示第二NT-ProBNP捕获抗体;

[0158] (2) 免疫检测组合物1:B-Ab1(亲和力常数K<sub>D</sub>3为10<sup>-12</sup>M),

[0159] 其中,B-Ab1表示NT-ProBNP生物素化检测抗体;

[0160] (3) 链霉亲和素连接的荧光标记物:链霉亲和素-藻红蛋白 (SA-PE);

[0161] (4) NT-ProBNP校准品。

[0162] 实施例8

[0163] 基于实施例7的免疫检测试剂盒3的免疫检测方法包括如下步骤:

[0164] 步骤(1):制备免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,具体步骤请参见实施例2,在此不做赘述;

[0165] 步骤(2):制备免疫检测组合物1:B-Ab1:取0.2mg NT-ProBNP 检测抗体,用NaHCO<sub>3</sub> (100mM, pH8.3) 溶液稀释,至终浓度为2mg/mL;加入2 $\mu$ L,10mM浓度的Biotin-NHS的DMSO溶液,37℃反应2h。过 Sephadex G-25层析柱,纯化生物素化的抗体;加入1mL的PBS-TBN, pH7.4溶液于2-8℃保存,制得B-Ab1;

[0166] 步骤(3):将抗原标准品按照0、100、250、500、1000、5000、10000、15000、35000pg/mL的浓度进行稀释,将校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,进行五参数拟合,得到校准曲线。

[0167] 步骤(4):在检测体系中加入10 $\mu$ L的校准品、50 $\mu$ L的免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,反应20分钟后,再加50 $\mu$ L B-Ab1,反应10分钟后,最后加入100 $\mu$ L链霉亲和素标记的藻红蛋白 (SA-PE) 溶液(2 $\mu$ g/mL),反应5分钟,磁分离后,加入100 $\mu$ L的PBS-TBN清洗液,放入流式细胞仪,进行荧光强度(MFI)的检测;

[0168] 步骤(5):以5g/mL牛血清白蛋白溶液为空白样本,用上述检测方法重复测定20次,以空白均值加两倍标准差报告最低检测限。

[0169] 步骤(6):以接近线性高值的高浓度样品,用样本稀释液梯度稀释,在流式细胞分

析仪上进行测定,每个浓度测定两次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析。

[0170] 结果分析:图10是实施例8所得的测得的校准曲线;图11是实施例8的线性回归分析结果,从图中可以看出试剂盒在5-35000pg/mL线性良好。最低检出限请见表1,实施例8的最低检出限为5.06pg/mL。

[0171] 实施例9

[0172] 免疫检测试剂盒4包括如下组分:

[0173] (1) 免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2(质量比例为1:1),

[0174] 其中,Mag1表示固相载体1,Mag2表示固相载体2,Ab1表示第一 NT-ProBNP捕获抗体,Ab2表示第二NT-ProBNP捕获抗体;

[0175] (2) 免疫检测组合物2:B-Ab3、B-Ab4,B-Ab3具有第三亲和力(亲和力常数 $K_D3$ 为 $10^{-10}M$ )和B-Ab4具有第四亲和力(亲和力常数 $K_D4$  为 $10^{-12}M$ ) ,

[0176] 其中,B-Ab3表示第三NT-ProBNP生物素化检测抗体,B-Ab4表示第四NT-ProBNP生物素化检测抗体;

[0177] (3) 链霉亲和素连接的荧光标记物:链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE);

[0178] (4) NT-ProBNP校准品。

[0179] 实施例10

[0180] 基于实施例9的免疫检测试剂盒4的免疫检测方法包括如下步骤:

[0181] 步骤(1):制备免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,具体步骤请参见实施例2,在此不做赘述;

[0182] 步骤(2):制备免疫捕获组合物2:B-Ab3和B-Ab4:各取0.1mg第三NT-ProBNP检测抗体和第四NT-ProBNP检测抗体,用NaHCO3 (100mM, pH8.3) 溶液稀释,至终浓度为2mg/mL;加入2μL,10mM浓度的Biotin-NHS的DMSO溶液,37℃反应2h。过Sephadex G-25层析柱,纯化生物素化的抗体;加入1mL的PBS-TBN, pH7.4溶液于2-8℃保存,制得B-Ab3和B-Ab4;

[0183] 步骤(3):将校准品按照0、100、250、500、1000、5000、10000、15000、35000pg/mL的浓度进行稀释,将校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,进行五参数拟合,得到校准曲线。

[0184] 步骤(4):在检测体系中加入10μL的抗原标准品、50μL的免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,反应20分钟后,再加50μL第三 NT-ProBNP生物素化检测抗体B-Ab3和50μL第四NT-ProBNP生物素化检测抗体B-Ab4,反应10分钟后,最后加入100μL链霉亲和素标记的藻红蛋白(SA-PE)溶液(2μg/mL),反应5分钟,磁分离后,加入100μL 的PBS-TBN清洗液,放入流式细胞仪,进行荧光强度(MFI)的检测;

[0185] 步骤(5):以5g/mL牛血清白蛋白溶液为空白样本,用上述检测方法重复测定20次,以空白均值加两倍标准差报告最低检测限。

[0186] 步骤(6):以接近线性高值的高浓度样品,用样本稀释液梯度稀释,在流式细胞分析仪上进行测定,每个浓度测定两次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析。

[0187] 结果分析:图12是实施例10所测得的校准曲线;图13是实施例10 的线性回归分析结果,从图中可以看出试剂盒在8.5-35000pg/mL线性良好。最低检出限请见表1,实施例10的最低检出限为5.14pg/mL。

[0188] 实施例11

[0189] 对照组免疫检测试剂盒包括如下组分：

[0190] (1) 对照组免疫捕获组合物:Mag1-Ab1,Ab1具有第一亲和力(亲和力常数 $K_D1$ 为 $10^{-12}M$ )，

[0191] 其中, Mag1表示固相载体1,Ab1表示第一NT-ProBNP捕获抗体；

[0192] (2) 对照组免疫检测组合物:NT-ProBNP生物素化检测抗体,具有第三亲和力(亲和力常数 $K_D3$ 为 $10^{-9}M$ )，

[0193] B-Ab1表示NT-ProBNP生物素化检测抗体；

[0194] (3) 链霉亲和素连接的荧光标记物:链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE)；

[0195] (4) NT-ProBNP校准品。

[0196] 实施例12

[0197] 基于实施例11的对照组免疫检测试剂盒的免疫检测方法包括如下步骤：

[0198] 步骤(1):对照组免疫捕获组合物:Mag1-Ab1；

[0199] 步骤(2):对照组免疫检测组合物:B-Ab1:取0.1mg NT-ProBNP 检测抗体,用 $NaHCO_3$ (100mM, pH8.3)溶液稀释,至终浓度为2mg/mL;加入2 $\mu$ L,10mM浓度的Biotin-NHS的DMSO溶液,37℃反应2h。过 Sephadex G-25层析柱,纯化生物素化的抗体;加入1mL的PBS-TBN, pH7.4溶液于2-8℃保存,制得B-Ab1；

[0200] 步骤(3):将抗原标准品按照0、100、250、500、1000、5000、10000、15000、35000pg/mL的浓度进行稀释,将校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,进行五参数拟合,得到校准曲线。

[0201] 步骤(4):在检测体系中加入10 $\mu$ L的抗原标准品、50 $\mu$ L的对照组免疫捕获组合物:Mag1-Ab1;，反应20分钟后,再加50 $\mu$ L B-Ab1,反应10分钟后,最后加入100 $\mu$ L链霉亲和素标记的藻红蛋白(SA-PE)溶液(2 $\mu$ g/mL),反应5分钟,磁分离后,加入100 $\mu$ L的PBS-TBN清洗液,放入流式细胞仪,进行荧光强度(MFI)的检测；

[0202] 步骤(5):以5g/mL牛血清白蛋白溶液为空白样本,用上述检测方法重复测定20次,以空白均值加两倍标准差报告最低检测限。

[0203] 步骤(6):以接近线性高值的高浓度样品,用样本稀释液梯度稀释,在流式细胞分析仪上进行测定,每个浓度测定两次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析。

[0204] 结果分析:图14是对照组所测得的校准曲线;图15是对照组的线性回归分析结果,从图中可以看出试剂盒在12-15000pg/mL线性良好。最低检出限请见表1,对照组的最低检出限为12.18pg/mL。

[0205] 表1实施例4、6、8、10以及对照组的检出浓度值

[0206]

样本	检出浓度 ( pg/mL )				
	实施例 4	实施例 6	实施例 8	实施例 10	对照组
1	5.78	4.88	4.9	4.11	11.23
2	5.41	4.3	4.94	4.38	10.95
3	5.84	4.52	4.72	4	11.2
4	5.54	4.36	4.8	4.77	11.14
5	5.46	4.5	4.69	4.61	10.65
6	5.24	4.7	4.98	4.75	10.23
7	5.51	4.21	4.76	4.05	11.33
8	5.72	4.61	4.61	4	11.83
9	5.86	4.64	4.85	4.13	10.05
10	5.25	4.1	4.69	4.56	10.7
11	5.61	4.61	5	4.15	11.98
12	5.43	4.04	4.8	4.28	11.48
13	5.08	4.82	4.84	4.74	11.06
14	5.98	4.43	4.58	4.33	11.58
15	5.02	4.74	4.84	4.36	10.45
16	5.78	4.95	4.78	4.01	10.81
17	5.68	4.18	4.94	4.28	11.6
18	5.8	4.19	4.97	4.43	11.46
19	5.24	4.97	4.76	4.52	11.18
20	5.16	4.96	4.59	4.38	11.72
最低检出限	6.09	5.14	5.06	4.85	12.18

[0207] 由上述结果可知：

[0208] (1) 与实施例12对照组的实验结果相比,实施例4、6、8以及10 的检测范围均优于对照组的检测范围,即实施例4、6、8以及10中使用两种不同亲和力的捕获抗体和一种或两种不同亲和力的检测抗体,相比单独使用一种亲和力的捕获抗体和一种亲和力的检测抗体,可以同时实现高灵敏度和宽线性范围的要求。

[0209] (2) 与实施例4的实验结果相比,实施例6的生物素化检测抗体 B-Ab3具有第三亲和力、生物素化检测抗体B-Ab4具有第四亲和力,当使用亲和力不同的生物素化检测抗体时,可以实现更优的高灵敏度和宽线性范围的要求。

[0210] (3) 与实施例8的实验结果相比,实施例10的生物素化检测抗体 B-Ab3具有第三亲和力、生物素化检测抗体B-Ab4具有第四亲和力,当使用亲和力不同的生物素化检测抗体时,可以实现更优的高灵敏度和宽线性范围的要求。

[0211] (4) 与实施例4相比,实施例8的免疫捕获组合物2 (Mag1-Ab1 和Mag2-Ab2) 的浓度比例更容易控制,因此,也有利于筛选出最优的免疫捕获组合物2。

[0212] (5) 与实施例6相比,实施例10的免疫捕获组合物2 (Mag1-Ab1 和Mag2-Ab2) 的浓度比例更容易控制,因此,也有利于筛选出最优的免疫捕获组合物2。

[0213] (6) 实施例10中,免疫检测组合物2——生物素化检测抗体B-Ab3 具有第三亲和力、生物素化检测抗体B-Ab4具有第四亲和力,当使用亲和力不同的生物素化检测抗体时,

可以实现更优的高灵敏度和宽线性范围的要求,并有效提高检测的灵敏度。同时。免疫捕获组合物2 (Mag1-Ab1和Mag2-Ab2) 的浓度比例更容易控制,因此,也有利于筛选出最优的免疫捕获组合物2,进而可以实现更优的高灵敏度和宽线性范围的要求,并有效提高检测的灵敏度。

[0214] 实施例13

[0215] 以实施例8为例,免疫捕获组合物2为Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,研究不同质量比例时零值样本的荧光强度 (MFI) 的检测结果。

[0216] 其中,Ab1具有第一亲和力 (亲和力常数 $K_{D1}$ 为 $10^{-9}M$ ),Ab2具有第二亲和力 (亲和力常数 $K_{D2}$ 为 $10^{-12}M$ )。检测结果见表6。

[0217] 表2不同质量比例时零值样本的荧光强度 (MFI) 的检测结果

[0218]

序号	质量比例 Mag1-Ab1: Mag2-Ab2	荧光强度 (MFI)
1	1:2	85
2	1:1.5	110
3	1:1	135

[0219] 由上表可知:抗原抗体的特异性反应的灵敏度与亲和力直接相关,在本例中,第一抗体具有第一亲和力,第二抗体具有第二亲和力,第二抗体的亲和力高于第一抗体的亲和力,在第二抗体的质量比例占比越高时,检测灵敏度越高。

[0220] 进一步地,在免疫捕获组合物2为Mag1-Ab1和Mag2-Ab2, Mag1-Ab1和Mag2-Ab2的质量比例为1:1时,研究相同质量比例时不同亲和力常数的零值样本的荧光强度 (MFI) 的检测结果。

[0221] 其中,Ab1具有第一亲和力 (亲和力常数 $K_{D1}$ ),Ab2具有第二亲和力 (亲和力常数 $K_{D2}$ )。检测结果见表3。

[0222] 表3相同质量比例时不同亲和力常数的零值样本的荧光强度 (MFI) 的检测结果

[0223]

序号	Ab1的亲和力常数 $K_{D1}$	Ab2的亲和力常数 $K_{D2}$	荧光强度 (MFI)
1	$10^{-6}$	$10^{-12}$	85
2	$10^{-7}$	$10^{-11}$	110
3	$10^{-8}$	$10^{-10}$	135
4	$10^{-9}$	$10^{-10}$	155

[0224] 由上表可知:抗原抗体的特异性反应的灵敏度与亲和力直接相关,在抗原抗体反应中,通常单价抗体特异性强,但亲和力相对小,检测抗原灵敏度相对低;而多价抗体特异性较弱,但亲和力相对强,检测抗原灵敏度高。因此,第一配体具有第一亲和力,第二配体具有第二亲和力,第一配体的第一亲和力高于第二配体的第二亲和力,在第二配体的质量比例占比相同时,第二配体的第二亲和力越高,检测抗原灵敏度越高。

[0225] 实施例14

[0226] 免疫捕获组合物3包括:第一cTnI捕获抗体和第二cTnI捕获抗体,第一cTnI捕获抗体和第二cTnI捕获抗体的比例为1:2,第一cTnI捕获抗体具有第一亲和力 (亲和力常数 $K_{D1}$ 为 $10^{-10}M$ ),第二cTnI捕获抗体具有第二亲和力 (亲和力常数 $K_{D2}$ 为 $10^{-12}M$ ) ;

- [0227] 固相载体1:表面羧基化磁珠,5μm;
- [0228] 固相载体2:表面羧基化磁珠,5μm;
- [0229] 固相载体1表面固定有第一cTnI捕获抗体,固相载体2表面固定有第二cTnI捕获抗体;
- [0230] 免疫捕获组合物3用Mag1-Ab1和Mag2-Ab2表示,其中,Mag1表示固相载体1, Mag2表示固相载体2, Ab1表示第一cTnI捕获抗体, Ab2 表示第二cTnI捕获抗体。
- [0231] 免疫捕获组合物3的制备包括如下步骤:
- [0232] 步骤(1):先用MES缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠Mag1 两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮磁珠,分别加入NHS和EDC 各100μg (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解,现用现配),室温下活化30分钟。磁分离,用磷酸(PBS)缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次,以得到高分子微球。
- [0233] 步骤(2):先用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮磁珠,分别加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)各100μg (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解,现用现配),室温下活化30分钟。磁分离,用磷酸(PBS)缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次,制得活化后的高分子微球。
- [0234] 步骤(3):加入第一cTnI捕获抗体40μg (溶解在PBS中),室温反应2个小时。磁分离后用PBS(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次。加入0.5mL封闭剂(5%乙醇胺, 10mM PBS, pH7.4),室温封闭0.5个小时;然后加入0.5mL 1% BSA(10mM PBS, pH7.4)室温封闭3小时;封闭完成后,磁分离清洗两次。加入PBS-TBN(10mM, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH7.4)缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL,2-8℃避光保存。
- [0235] 步骤(4):先用MES缓冲液(50mM, pH 6)清洗1mg磁珠Mag2 两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮微球,分别加入NHS和EDC 各100μg (NHS和EDC用50mM, pH 6的MES缓冲液溶解,现用现配),室温下活化30分钟。磁分离,用PBS缓冲液(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次。加入第二cTnI捕获抗体40μg (溶解在PBS中),室温反应2个小时。磁分离后用PBS(10mM, 0.1% Tween 20)清洗两次。加入0.5mL封闭剂(5%乙醇胺, 10mM PBS, pH7.4),室温封闭0.5个小时;然后加入0.5mL 1% BSA(10mM PBS, pH7.4)室温封闭3小时;封闭完成后,磁分离清洗两次。加入PBS-TBN(10mM, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH7.4)缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL,2-8℃避光保存。步骤(4):封闭完成后,磁分离清洗两次。
- [0236] 步骤(5):在上述两种磁珠溶液中分别加入PBS-TBN(10mM, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH7.4)缓冲液,得到磁珠浓度为0.2mg/mL,将两者按1:2的比例混合,2-8℃避光保存,制得免疫捕获组合物3。
- [0237] 实施例15
- [0238] 免疫检测试剂盒5包括如下组分:
- [0239] (1) 免疫捕获组合物3:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2(质量比例为1:2),
- [0240] (2) 免疫检测组合物3:第一cTnI生物素化检测抗体和第二cTnI 生物素化检测抗体,第一cTnI生物素化检测抗体具有第三亲和力(亲和力常数K<sub>D3</sub>为10<sup>-9</sup>M),第二cTnI生物素化检测抗体具有第四亲和力(亲和力常数K<sub>D4</sub>为10<sup>-12</sup>M),
- [0241] B-Ab3表示第一cTnI生物素化检测抗体,

- [0242] B-Ab4表示第二cTnI生物素化检测抗体；
- [0243] (3) 链霉亲和素连接的荧光标记物:链霉亲和素-藻红蛋白 (SA-PE)；
- [0244] (4) cTnI校准品。
- [0245] 实施例16
- [0246] 基于实施例15的免疫检测试剂盒5的免疫检测方法包括如下步骤：
- [0247] 步骤(1):制备免疫捕获组合物3:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,具体步骤请参见实施例15,在此不做赘述；
- [0248] 步骤(2):免疫检测组合物3:B-Ab3和B-Ab4:各取0.1mg第三cTnI检测抗体和第四cTnI检测抗体,用NaHCO3(100mM,pH8.3)溶液稀释,至终浓度为2mg/mL;加入2μL,10mM浓度的Biotin-NHS的DMSO溶液,37℃反应2h。过Sephadex G-25层析柱,纯化生物素化的抗体;加入1mL的PBS-TBN,pH7.4溶液于2-8℃保存,制得B-Ab3和B-Ab4;
- [0249] 步骤(3):将抗原标准品按照0、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50ng/mL的浓度进行稀释,校准品经过反应后在流式细胞仪上测定得到的荧光强度MFI为纵坐标,对应的抗原标准品浓度为横坐标,进行五参数拟合,得到校准曲线。
- [0250] 步骤(4):在检测体系中加入10μL的抗原标准品、50μL的免疫捕获组合物2:Mag1-Ab1和Mag2-Ab2,反应20分钟后,再加50μL第三cTnI生物素化检测抗体B-Ab3和50μL第四cTnI生物素化检测抗体B-Ab4,反应10分钟后,最后加入100μL链霉亲和素标记的藻红蛋白(SA-PE)溶液(2μg/mL),反应5分钟,磁分离后,加入100μL的PBS-TBN清洗液,放入流式细胞仪,进行荧光强度(MFI)的检测;
- [0251] 步骤(5):以5g/mL牛血清白蛋白溶液为空白样本,用上述检测方法重复测定20次,以空白均值加两倍标准差报告最低检测限。
- [0252] 步骤(6):以接近线性高值的高浓度样品,用样本稀释液梯度稀释,在流式细胞分析仪上进行测定,每个浓度测定两次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析。
- [0253] 结果分析:图16是实施例15所测得的校准曲线;图17是实施例15线性回归分析结果,从图中可以看出试剂盒在0.02-50ng/mL线性良好。表3显示最低检出限为0.02ng/mL。
- [0254] 表4实施例15的检出浓度值
- [0255]

样本	浓度(ng/mL)
1	0.017
2	0.019
3	0.017
4	0.019
5	0.017
6	0.018
7	0.01
8	0.019
9	0.019
10	0.01
11	0.019

12	0.015
13	0.016
14	0.015
15	0.018
16	0.016
17	0.012
18	0.013
19	0.015
20	0.014
最低检出限	0.02

[0256] 由上述结果可知：

[0257] 实施例15-16中,免疫检测组合物2——第一cTnI生物素化检测抗体B-Ab3具有第三亲和力、第一cTnI生物素化检测抗体B-Ab4具有第四亲和力,当使用亲和力不同的生物素化检测抗体时,可以实现更优的高灵敏度和宽线性范围的要求,并有效提高检测的灵敏度。同时。免疫捕获组合物2 (Mag1-Ab1和Mag2-Ab2) 的浓度比例更容易控制,因此,也有利于筛选出最优的免疫捕获组合物2,进而可以实现更优的高灵敏度和宽线性范围的要求,并有效提高检测的灵敏度。

[0258] 实施例17

[0259] 以实施例5的免疫检测试剂盒2为例,区别在于固相载体1上有第一封闭化合物、第二封闭化合物和第三封闭化合物作为封闭剂,第一封闭化合物:海藻糖;第二封闭化合物:牛血清白蛋白;第三封闭化合物:乙醇胺。其余组分保持不变。

[0260] 封闭过程包括如下步骤:

[0261] 步骤(1):先用MES缓冲液(50mM, pH6)清洗1mg表面羧基化磁珠(以下简称磁珠)两次,磁分离后,用MES缓冲液重新悬浮磁珠,分别加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)各100μg,其中,NHS和EDC分别用50mM, pH6的MES缓冲液溶解,室温下活化30分钟。用PBS缓冲液(10mM, 0.1%Tween20)清洗两次以进行磁分离。加入NT-ProBNP捕获抗体40μg(溶解在PBS缓冲液中),室温反应2个小时。磁分离后用PBS缓冲液(10mM, 0.1%Tween20)清洗两次,以得到包被有NT-ProBNP捕获抗体的磁珠。

[0262] 步骤(2):加入0.5mL第三封闭化合物溶液(5%乙醇胺,10mM PBS缓冲溶液,pH7.4),室温封闭0.5个小时。

[0263] 步骤(3):加入0.5mL第一封闭化合物溶液(5%海藻糖,溶解于10mM PBS缓冲溶液,pH7.4),室温封闭2小时。

[0264] 步骤(4):加入0.5mL第二封闭化合物溶液(1%牛血清白蛋白,溶解于10mM PBS缓冲溶液,pH7.4),室温封闭1小时。

[0265] 步骤(5):封闭完成后,磁分离清洗两次。

[0266] 步骤(6):加入PBS-TBN(10mM, 0.05%Tween 20, 0.1%BSA, pH7.4)缓冲液,磁珠浓度为0.2mg/mL,2-8°C避光保存。

[0267] 用实施例17的免疫检测试剂盒和实施例5的免疫检测试剂盒2同时检测零值样本、低浓度样本和高浓度样本,在流式细胞仪上检测其荧光强度(MFI),并计算其信噪比。实验

结果请见表4。

[0268] 从下表结果可以看出,同时使用三种不同类型的封闭剂可以显著降低非特异性吸附,背景信号降低,提高了检测的灵敏度。

[0269] 表5实施例5以及实施例17的样本浓度与荧光强度值

[0270]	样本浓度 (pg/mL)	荧光强度 (MFI)	实施例 5	实施例 17
	0	S0	125	90
	100	S1	1502	1635
	1000	S2	45219	48428
	信噪比	S1/S0	12.02	18.17

[0271] 以上所述仅为本申请的实施方式,并非因此限制本申请的专利范围,凡是利用本申请说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本申请的专利保护范围内。

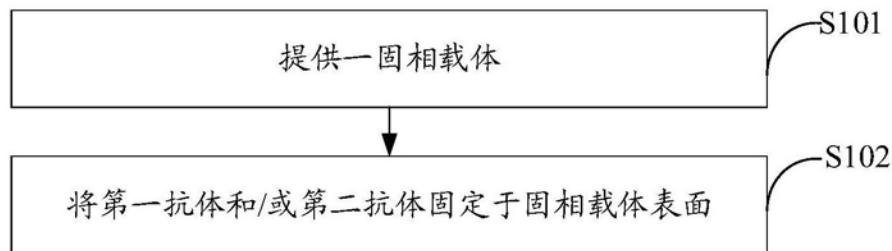


图1

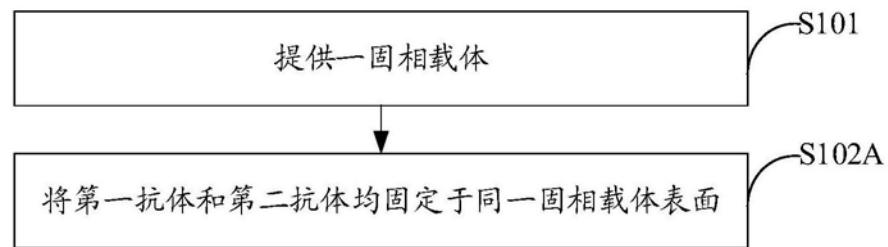


图2

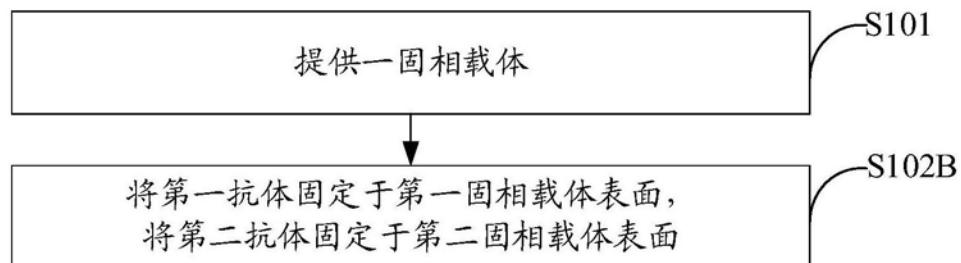


图3

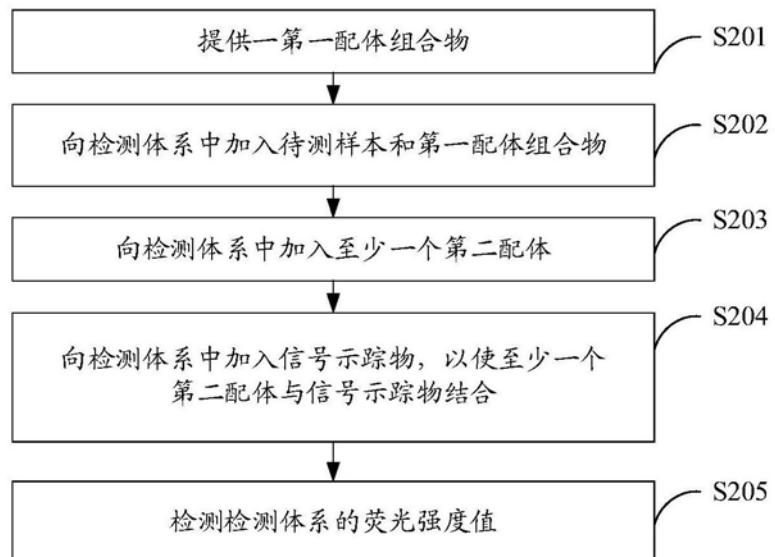


图4

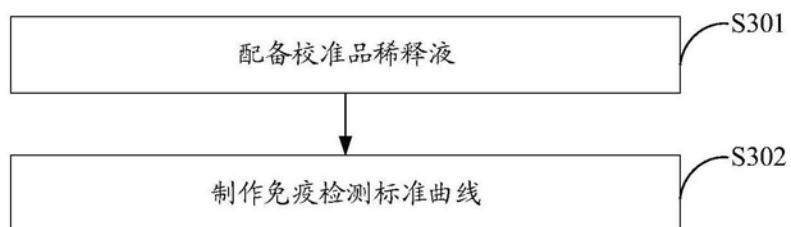


图5

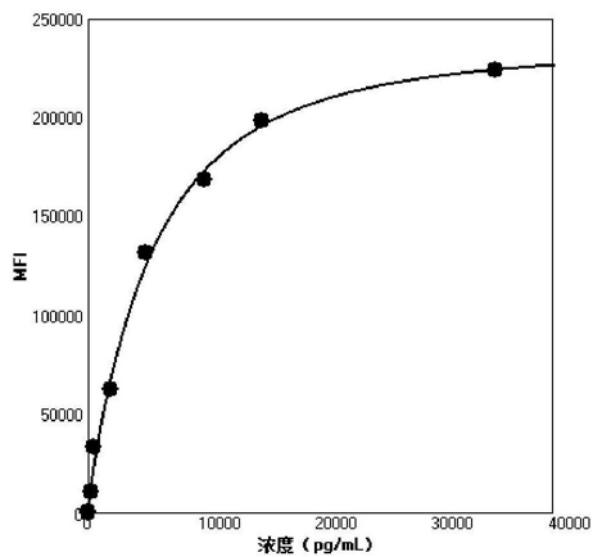


图6

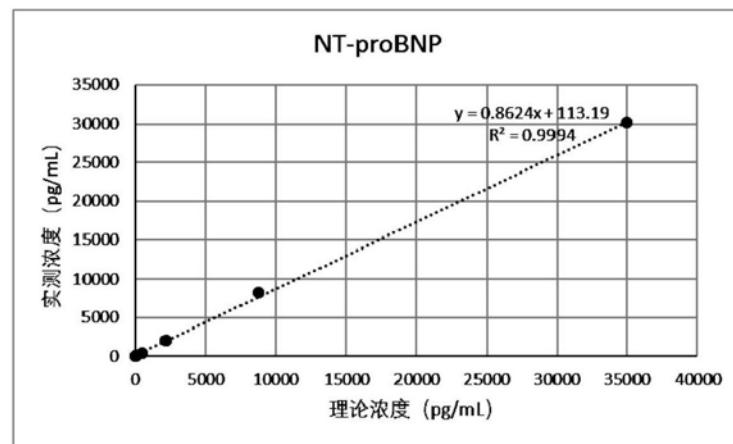


图7

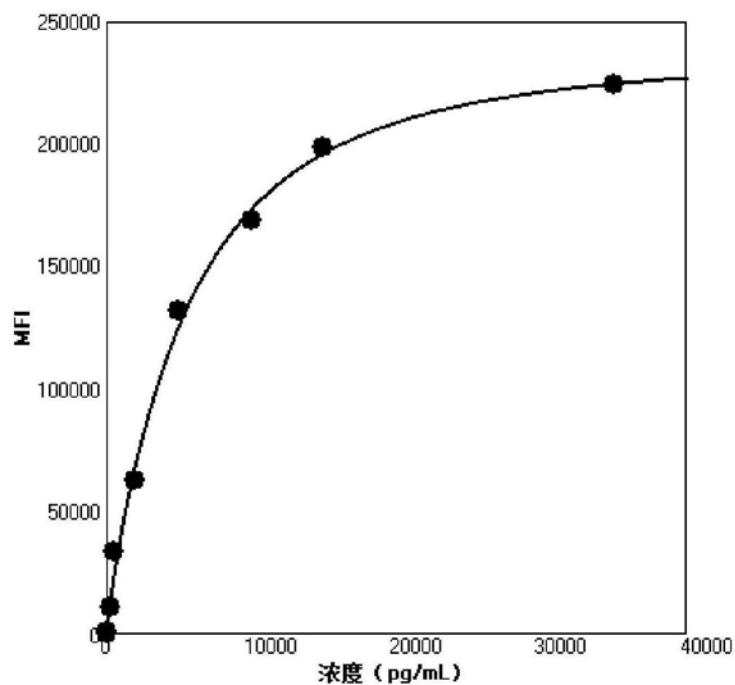


图8

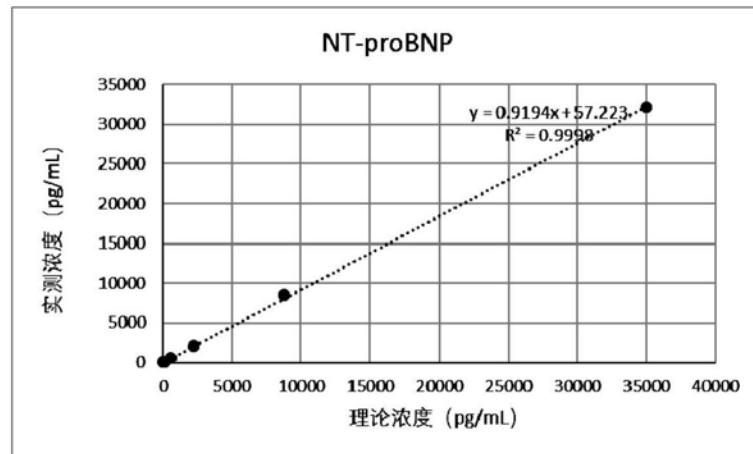


图9

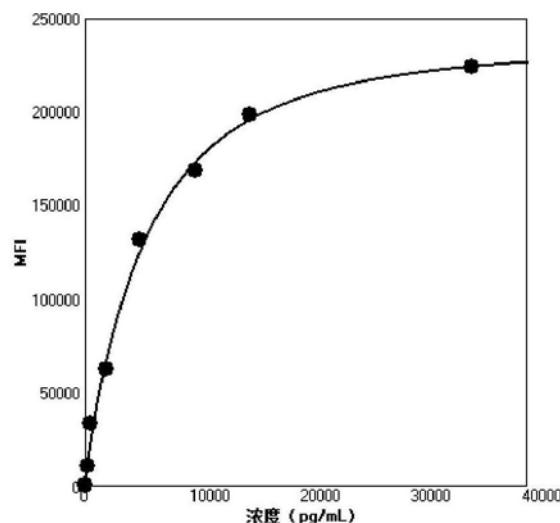


图10

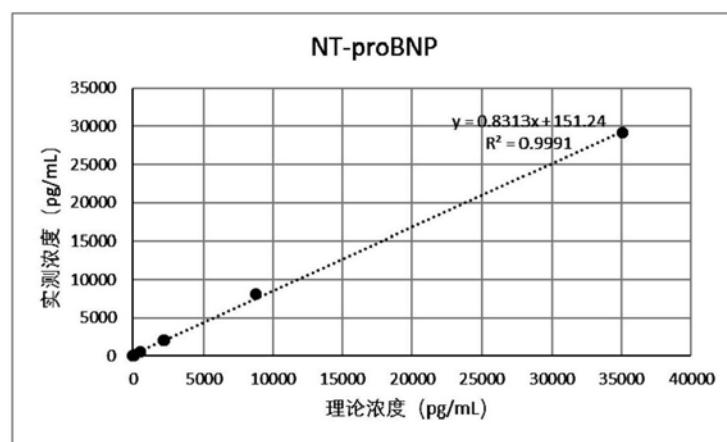


图11

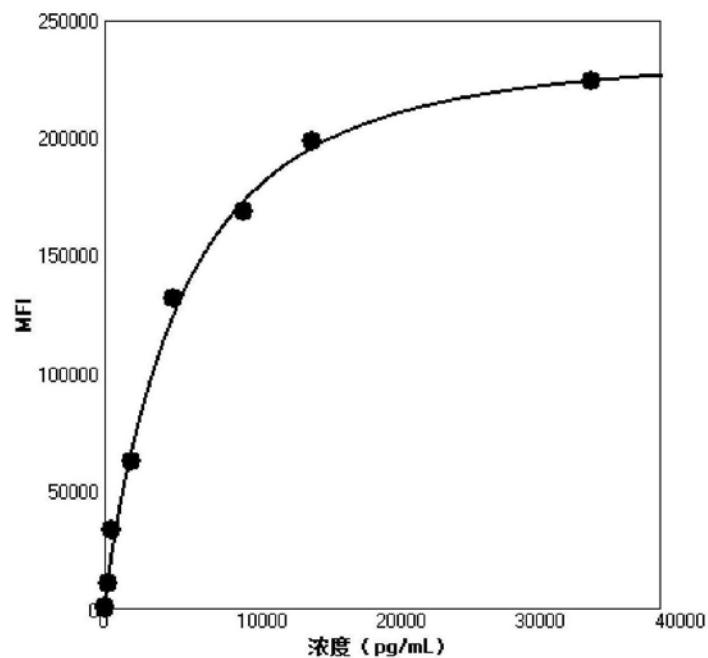


图12

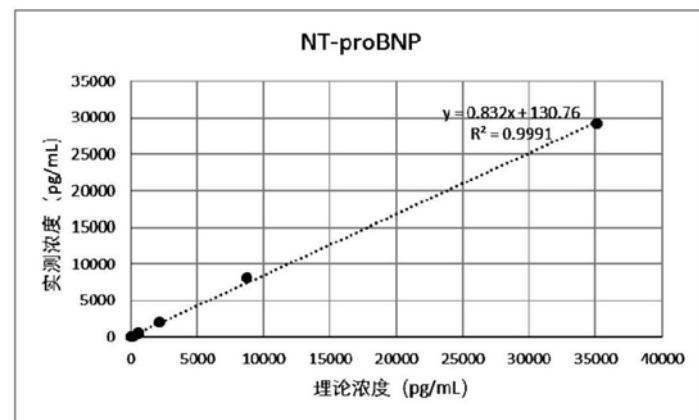


图13

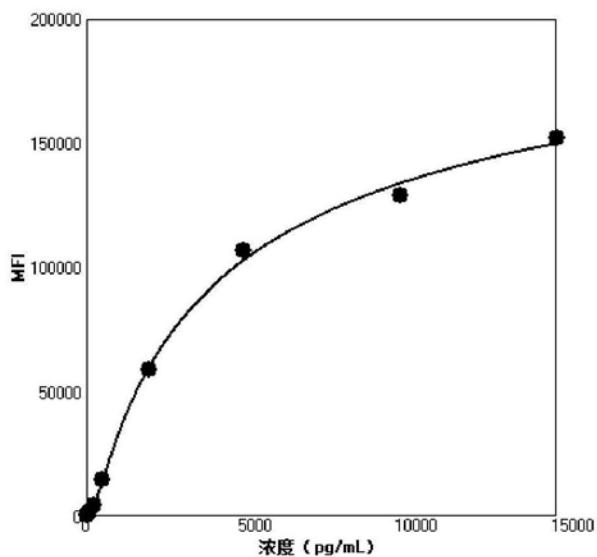


图14

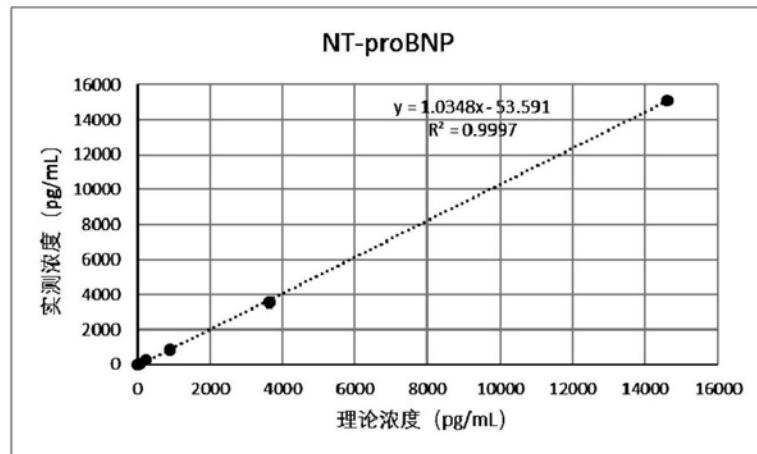


图15

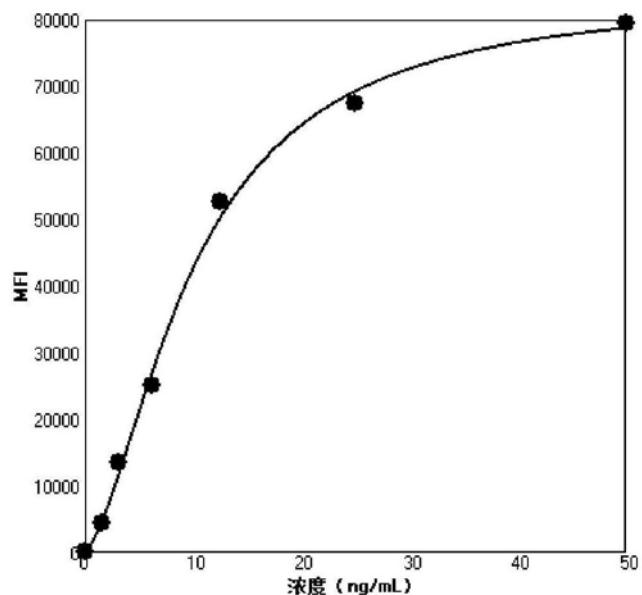


图16

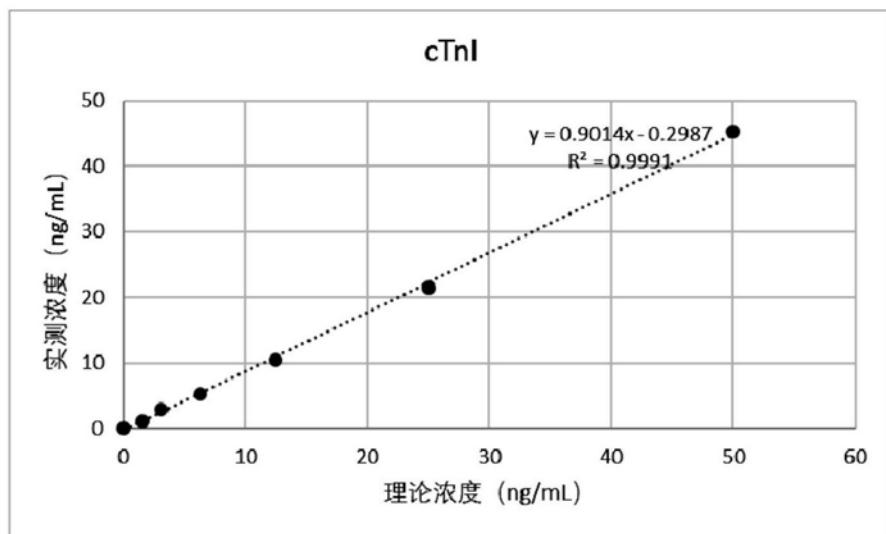


图17

专利名称(译)	免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN111381027A</a>	公开(公告)日	2020-07-07
申请号	CN201811642385.6	申请日	2018-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市帝迈生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市帝迈生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市帝迈生物技术有限公司		
[标]发明人	马志亚 张文琪 崔晓磊 刘治志		
发明人	马志亚 张文琪 崔晓磊 刘治志		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N33/532		
代理人(译)	李庆波		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本申请公开了一种免疫捕获组合物及其制备方法和应用、免疫检测试剂盒，该免疫捕获组合物包括：至少第一抗体和第二抗体，第一抗体具有第一亲和力，第二抗体具有第二亲和力，第一亲和力高于第二亲和力，其中，第一抗体和第二抗体与同种待测抗原发生抗原抗体结合作用；至少一个固相载体，固相载体表面固定有第一抗体和/或第二抗体。通过上述方式，能够降低待测抗原的检测阈值，明显提高检测灵敏度；同时可用于检测浓度较高的待测抗原，进而能够提高检测的线性范围。

