



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111351924 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201811565498.0

审查员 刘彦宁

(22) 申请日 2018.12.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111351924 A

(43) 申请公布日 2020.06.30

(73) 专利权人 中国科学院福建物质结构研究所

地址 350002 福建省福州市杨桥西路155号

(72) 发明人 刘樊 陈学元 柯建熙 卢珊

黄萍 周山勇

(74) 专利代理机构 北京知元同创知识产权代理

事务所(普通合伙) 11535

代理人 刘元霞

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

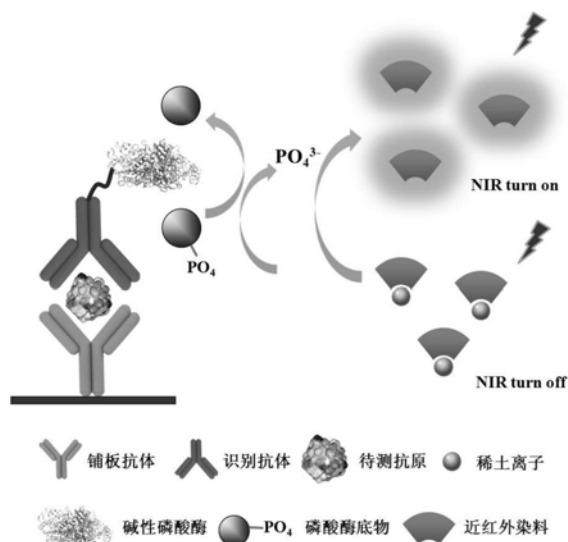
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外
荧光免疫分析试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于酶诱导磷酸根离子作为近红外染料荧光激活剂的免疫分析试剂盒及检测方法,属于有机染料发光和生物分析技术领域。该方法通过待测物结合抗体的标记磷酸酶催化磷酸酶底物产生磷酸根离子,并与稀土离子和带有配位基团的近红外染料共混,利用二者的相互作用对近红外荧光强度的影响实现待测标志物的定量分析。本发明的免疫分析方法可用于血清中低丰度疾病标志物含量的检测。由于使用近红外染料作为荧光信号发生体,克服了常规荧光免疫分析易受到生物组织自发荧光、光散射和检测信号干扰等缺点,因此该检测方法具备灵敏度高、操作简便、荧光响应快速等优点,为临床免疫学检测提供了一种灵敏且性能稳定的新方法。



1. 一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外染料荧光免疫分析试剂盒, 其特征在于: 包括酶标板、捕获抗体或抗原、封闭液、磷酸酶标记抗体、磷酸酶底物、稀土离子溶液和近红外染料; 所述捕获抗体或抗原以及磷酸酶标记抗体和待测样品中的标志物特异性结合; 所述磷酸酶标记抗体为碱性磷酸酶标记二抗; 所述磷酸酶底物为AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、UMP、UDP、UTP、dTTP、pNPP、PPi中的一种或两种以上; 所述近红外染料带有配位官能团, 所述配位官能团选自羧基、羟基、氨基、磺酸基、氰基、叠氮配位官能团中的一种或两种以上, 与稀土离子发生配位而造成近红外发光强度的变化, 所述近红外染料为菁染料类、BODIPY类、罗丹明类、方酸类或卟啉类化合物中的一种或两种以上; 所述稀土离子选自镧、铈、镨、钕、钐、铕、钆、铈、钪、钇、镱、铟、铊、铋、镱、铟和铊中的一种或两种以上。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒还包括清洗缓冲液和样本稀释液, 所述清洗缓冲液或样本稀释液独立的选自碳酸盐缓冲液、PBS缓冲液、PBST缓冲液、Tris-HCl缓冲液。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述磷酸酶标记抗体由戊二醛交联法将磷酸酶与抗体进行交联形成。

4. 根据权利要求1或2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述捕获抗体或抗原、待测样品的标志物抗原或抗体以及磷酸酶标记抗体依次形成夹心复合物。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒, 其特征在于, 所述待测样品为离体血清、唾液或其他指标标志物样品。

6. 根据权利要求1或2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述封闭液选用BSA、酪蛋白、脱脂奶粉、蔗糖、葡聚糖、PEG、明胶或非离子表面活性剂作为封闭剂加入缓冲液进行配制。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒, 其特征在于, 所述封闭液中封闭剂的质量浓度为1-10%。

8. 如权利要求1-7任一项所述试剂盒的使用方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 包被: 将捕获抗体或抗原固定在酶标板上;

(2) 封闭: 加入封闭液封闭;

(3) 加样: 加入含有待测样品的溶液;

(4) 制备免疫复合物: 加入磷酸酶标记抗体, 形成免疫复合物;

(5) 酶诱导近红外荧光反应: 在酶标板中依次加入含有磷酸酶底物和稀土离子的混合溶液, 进行酶催化反应;

(6) 检测: 将酶催化反应后的溶液与近红外染料混匀, 检测近红外荧光信号。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法, 其特征在于, 所述步骤(1)为用样品稀释液将与待测标志物对应的捕获抗体或抗原稀释后加入在酶标板中, 4℃孵育过夜, 弃去孔内液体, 用清洗缓冲液洗涤。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法, 其特征在于, 所述步骤(1)捕获抗体或抗原的固定方式为物理吸附或共价偶联。

11. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法, 其特征在于, 所述步骤(2)为封闭液加入步骤(1)的酶标板中, 37℃孵育, 去孔内液体, 用清洗缓冲液洗涤。

12. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法, 其特征在于, 所述步骤(3)为用样品稀释液配制待测样品的溶液, 加入步骤(2)的酶标板中, 37℃孵育, 弃去孔内液体, 用清洗缓冲

液洗涤。

13. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(4)为加碱性磷酸酶标记抗体:用样品稀释液配制碱性磷酸酶标记抗体,加入步骤3)的酶标板中,37 °C 孵育,弃去孔内液体,用清洗缓冲液洗涤。

14. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(5)为酶诱导近红外荧光:加入含碱性磷酸酶底物与稀土离子的混合溶液,37 °C 孵育,进行酶催化反应。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(5)中碱性磷酸酶底物用量1-100 μL ,浓度为0.1-10 mM;稀土离子用量为1-100 μL ,浓度为100-500 μM 。

16. 根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(6)中近红外染料用量1-100 μL ,浓度为0.1-10 mM。

17. 根据权利要求16所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(6)为取酶催化反应后溶液,加入含有近红外染料的缓冲溶液,测定荧光强度。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(6)检测近红外荧光信号的步骤包括绘制浓度依赖型标准曲线:根据需要配制待测抗原或抗体的标准品溶液进行检测,以待检测标志物在混合液中的浓度为横坐标,荧光强度变化值为纵坐标,绘制标准曲线;再将待测样品的混合液置于荧光光谱仪中读取反应混合液的近红外荧光强度值,依据标准曲线计算待测样品中标志物的含量。

19. 根据权利要求8-18任一项所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述试剂盒在使用时,各步骤所用的样品稀释液和清洗缓冲液可以相同或不同。

20. 一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外荧光免疫分析检测方法,其特征在于,采用权利要求1-7任一项所述的试剂盒进行检测,包括如下步骤:

- (1) 将捕获抗体或抗原固定在酶标板上;
- (2) 封闭液封闭;
- (3) 加入含有待测样品的溶液;
- (4) 加入磷酸酶标记抗体,形成免疫复合物;
- (5) 在酶标板中依次加入含有磷酸酶底物和稀土离子的混合溶液,进行酶催化反应;
- (6) 将酶催化反应后的溶液与近红外染料混匀,检测近红外荧光信号。

一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外荧光免疫分析试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析技术领域,涉及免疫分析检测技术,具体涉及一种基于酶诱导磷酸根离子作为近红外染料荧光激活剂的免疫分析试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 目前,癌症、艾滋病、心脑血管疾病、糖尿病等重大疾病严重危害人类健康。解决这些健康问题的前提是具有可靠的疾病早期预警和诊断技术,以及精准的健康状况评估方法。疾病标志物是反映疾病发生、发展的化学物质,针对疾病标志物的早期检测可以辅助疾病的早期发现与诊断,能够实现对重大疾病的及早治疗或预防。基于生物体系成分复杂、疾病早期标志物浓度很低等原因,针对疾病标志物的高灵敏特异性检测面临着巨大的挑战。

[0003] 免疫分析是最为重要的生物分析方法之一,具备特异性强,灵敏度高,经济简便等特点,近年来成为世界广泛研究的热门课题。它主要通过借助抗原和抗体间的特异性识别反应来实现对疾病标志物的检测。传统的比色酶联免疫吸附测定(ELISA)灵敏度较低,而荧光免疫分析在保留传统免疫分析法高特异性优势的同时,又具备灵敏度高的优势,为检测疾病标志物提供有效的手段。目前,基于碱性磷酸酶(ALP)的荧光免疫分析法仍主要聚焦于新型荧光底物的设计或利用荧光纳米材料进行信号转化,其合成、修饰和信号产生步骤复杂费时,并且目前该类免疫分析体系的荧光响应信号均位于可见光区域(400~600nm),会受到生物组织自发荧光和光散射等的影响,对免疫分析造成了严重干扰,灵敏度大大降低,检测效果不佳,难以实现对微量抗原抗体的检测识别。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供了一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外荧光免疫分析试剂盒以及检测方法。本发明的试剂盒和检测方法可用于生物样品中低丰度疾病标志物含量的检测,是一种高灵敏度、特异性好且性能稳定的近红外荧光免疫分析方法。

[0005] 本发明的第一方面,提供一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外荧光免疫分析试剂盒,包括酶标板、捕获抗体或抗原、封闭液,还包括磷酸酶标记抗体、磷酸酶底物、稀土离子溶液和近红外染料。

[0006] 根据本发明,所述试剂盒还包括清洗缓冲液和样本稀释液。作为示例,所述清洗缓冲液或样本稀释液可以独立的选自碳酸盐缓冲液、PBS缓冲液、PBST缓冲液、Tris-HCl缓冲液。

[0007] 根据本发明,所述捕获抗原或抗体以及所述磷酸酶标记抗体可以和待测样品中的标志物特异性结合。所述磷酸酶标记抗体可以为磷酸酶标记二抗,其中磷酸酶可以催化磷酸底物水解释放磷酸根离子。所述磷酸酶可以为碱性磷酸酶或酸性磷酸酶。所述磷酸酶经本领域已知的交联方法与抗体进行交联,形成磷酸酶标记抗体,例如可经由戊二醛交联法进行交联。

[0008] 根据本发明,所述磷酸酶底物为带有磷脂键的有机化合物或其盐,可以被磷酸酶水解而释放磷酸根离子。具体地,所述磷酸酶底物可以为AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、UMP、UDP、UTP、dTTP、pNPP、PPi中的一种或两种以上。

[0009] 根据本发明,所述近红外染料可以为菁染料类、BODIPY类、罗丹明类、方酸类或卟啉类化合物中的一种或两种以上。作为本发明的示例性技术方案,所述近红外染料带有配位官能团,例如羧基、羟基、氨基、磺酸基、氰基、叠氮官能团中的一种或两种以上,可以与稀土离子发生配位而造成近红外发光强度的变化。

[0010] 根据本发明,所述稀土离子可选自镧、铈、镨、钕、钐、铕、钆、铈、钇、镱、镱、铟、铊、铋、镱、铋和钷中的一种或两种以上。

[0011] 根据本发明,所述封闭液由本领域已知的常规封闭剂加入缓冲液进行配制,例如可选用BSA、酪蛋白、脱脂奶粉、蔗糖、葡聚糖、PEG、明胶或非离子表面活性剂作为封闭剂配制所述封闭液。示例性地,所述封闭液中封闭剂的质量浓度为1-10%。

[0012] 本领域技术人员应当理解,所述酶标板可以为本领域常用的酶标板,例如96孔酶标板或48孔酶标板,可选用高结合力、中结合力或者氨基化酶标板。

[0013] 根据本发明,所述试剂盒在使用时,所述捕获抗体或抗原、待测样品的标志物以及磷酸酶标记抗体依次形成夹心复合物。

[0014] 本发明的第二方面还提供所述试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0015] (1) 包被:将捕获抗体或抗原固定在酶标板上;

[0016] (2) 封闭:加入封闭液封闭;

[0017] (3) 加样:加入含有待测样品的溶液;

[0018] (4) 制备免疫复合物:加入磷酸酶标记抗体,形成免疫复合物;

[0019] (5) 酶诱导近红外荧光反应:在酶标板中依次加入含有磷酸酶底物和稀土离子的混合溶液,进行酶催化反应;

[0020] (6) 检测:将酶催化反应后的溶液与近红外染料混匀,检测近红外荧光信号。

[0021] 根据本发明的试剂盒使用方法,所述步骤(1)可以为用样品稀释液将与待测标志物对应的捕获抗体或抗原稀释后加入在酶标板中,4℃孵育过夜,弃去孔内液体,用清洗缓冲液洗涤。作为本发明的示例性技术方案,所述步骤(1)捕获抗体或抗原的固定方式可以为物理吸附或共价偶联。

[0022] 根据本发明的试剂盒使用方法,所述步骤(2)可以为封闭液加入步骤(1)的酶标板中,37℃孵育,弃去孔内液体,用清洗缓冲液洗涤;

[0023] 根据本发明的试剂盒使用方法,所述步骤(3)可以为用样品稀释液配制待测样品的溶液,加入步骤(2)的酶标板中,37℃孵育,弃去孔内液体,用清洗缓冲液洗涤。所述待测样品可以为离体血清、唾液或其他指标标志物样品。

[0024] 根据本发明的试剂盒使用方法,所述步骤(4)可以为加碱性磷酸酶标记抗体:用样品稀释液配制碱性磷酸酶标记抗体,加入步骤(3)的酶标板中,37℃孵育,弃去孔内液体,用清洗缓冲液洗涤;

[0025] 根据本发明的试剂盒使用方法,所述步骤(5)可以为酶诱导近红外荧光:加入含磷酸酶底物与稀土离子的混合溶液,37℃孵育,进行酶催化反应。作为本发明的示例性方案,所述步骤(5)中磷酸酶底物用量1-100μL,例如20-80μL、30-50μL,浓度为0.1-10mM,例如

1-8mM、2-6mM；稀土离子用量为1-100 μ L，例如20-80 μ L、30-50 μ L，浓度为100-500 μ M，例如150-400 μ M、150-350 μ M、150-250 μ M；所述步骤6)中近红外染料用量1-100 μ L，例如为20-80 μ L、30-50 μ L，浓度为0.1-10mM，例如为1-2mM。

[0026] 根据本发明的试剂盒使用方法，所述步骤(6)可以为：取酶催化反应后溶液，加入含有近红外染料的缓冲溶液，测定荧光强度。

[0027] 作为本发明的示例性方案，所述步骤(6)检测红外荧光信号的步骤包括绘制浓度依赖型标准曲线：可根据需要配制待测抗原或抗体的标准品溶液进行检测，以待检测标志物在混合液中的浓度为横坐标，荧光强度变化值为纵坐标，绘制标准曲线。再将待测样品的混合液置于荧光光谱仪中读取反应混合液的近红外荧光强度值，依据标准曲线计算待测样品中标志物的含量。

[0028] 本领域技术人员可以理解，所述试剂盒在使用时，各步骤所用的样品稀释液和清洗缓冲液可以相同或不同。

[0029] 本发明的第三方面，提供一种基于酶诱导磷酸根离子激活的近红外荧光免疫分析检测方法，具体步骤如下：

[0030] (1) 将捕获抗体或抗原固定在酶标板上；

[0031] (2) 封闭液封闭；

[0032] (3) 加入含有待测样品的溶液；

[0033] (4) 加入磷酸酶标记抗体，形成免疫复合物；

[0034] (5) 在酶标板中依次加入含有磷酸酶底物和稀土离子的混合溶液，进行酶催化反应；

[0035] (6) 将酶催化反应后的溶液与近红外染料混匀，检测近红外荧光信号。

[0036] 根据本发明的检测方法中各步骤和试剂具有如上文所述的含义。

[0037] 本发明中，酶诱导磷酸根作为近红外染料荧光激活剂实现标志物的荧光免疫分析检测。本发明的测定原理是：首先将铺板抗体(捕获抗体或抗原)，待测标志物，作为识别抗体的磷酸酶标记抗体依次加入酶标板，形成抗体-抗原-抗体夹心型免疫复合物。磷酸酶标记抗体的含量与待测标志物正相关，当待测样品含量低时，结合在酶标板上的磷酸酶标记抗体就少，磷酸酶催化磷酸酶底物产生的磷酸根离子就少，与染料竞争稀土离子的能力就小，荧光恢复能力较弱，近红外荧光信号低。反之结合在酶标板上的酶标记抗体多，酶催化产生的磷酸根离子就多，从而与染料分子竞争稀土离子的能力就大，荧光恢复能力增强，近红外荧光信号升高。磷酸根离子具备较近红外染料更强的配位能力，反应中与近红外染料竞争稀土离子配位，从而实现基于近红外荧光定量分析的目的。

[0038] 术语定义与说明：

[0039] 术语“抗体”以最宽泛的意义使用，具体地涵盖合成抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、灵长类抗体、Fab片段、F(ab')片段、单链FvFc(scFvFc)、单链Fv(scFv)、抗独特型(抗Id)抗体和任何其他免疫活性抗体片段，只要它们展示出所希望的生物活性(即，标记相关或结合)即可。在更广的意义上，本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子(即，含有抗原结合部位的分子)的免疫活性片段，其中这些片段可以或不与另一个免疫球蛋白结构域(包括但不限于Fc区或其片段)融合。术语“二抗”表示可和

抗体特异性结合的抗体。进一步地,术语“捕获抗体或抗原”应理解为可以和待测标志物特异性结合的抗体或者抗原,本领域技术人员应当可以理解,当所检测的目标标志物为抗原时,捕获抗体可以为待测抗原的多克隆或单克隆抗体;当所检测的目标标志物为抗体时,可选用该抗体能够特异性结合的抗原作为捕获抗原。

[0040] 术语“标志物”是指被测定活性的化学物质,包括但不限于小分子化合物,核酸(DNA或RNA),蛋白质或多肽(例如配体、抗体、融合蛋白等)等。

[0041] 术语“特异性”是指在可预期存在的干扰成分存在下明确识别或评估分析物或标志物的能力。典型地,这些干扰成分可能包括杂质、降解产物(如改性的分析物、分析物的片段、或分析物的聚集体等)、基质成分(例如来自血清)、副产物(例如分析物的多聚体)等。

[0042] 术语“样品”理解包括可以根据本发明和要求保护的方案利用的任何类型的生物样品,实例包括但不限于全血或其任何部分(血浆或血清)、唾液、痰液、脑脊髓液(CSF)、皮肤、间质液、泪液、粘液、尿液、拭子或上述类型的组合。

[0043] 术语“检出限”是指通过免疫测定可检出的标志物的最小量。

[0044] 有益效果

[0045] (1) 本发明设计了一种近红外荧光免疫分析策略代替传统的酶联免疫分析策略应用于定量分析血清中低丰度蛋白或RNA等疾病标志物检测的方法。与现有的基于酶的免疫分析相比,本发明基于酶诱导磷酸根作为近红外荧光染料的激活剂,可实现样品中痕量标志物的检测,具有检测限低、灵敏度和稳定性高等优点。

[0046] (2) 本发明通过酶诱导磷酸根的生成量来调控近红外染料的发光,克服了可见区荧光易受生物自发荧光、生物自吸收、光散射影响大等缺点,可望为免疫分析等重要领域提供技术基础,具备显著的经济效益和社会效益。

[0047] (3) 结合酶反应和抗原-抗体识别的特异性及近红外荧光的抗干扰性与高灵敏性,本发明所用试剂简单,成本低,信号产生方式简单直接,在可控性上更稳定、操作更方便。

[0048] (4) 本发明的可适用于多种抗原或抗体的分析检测,应用范围广泛,可以为多种疾病标志物的确认提供参考,具备良好的医学运用前景。

附图说明

[0049] 图1是基于酶诱导磷酸根作为近红外荧光激活剂的免疫分析的示意图;

[0050] 图2是不同组分反应物对免疫分析体系中近红外染料荧光信号响应;

[0051] 图3是免疫分析体系中不同浓度前列腺特异抗原的近红外荧光发射谱;

[0052] 图4是近红外免疫分析方法针对前列腺特异抗原标准工作曲线图;

[0053] 图5是本发明近红外免疫分析体系针对前列腺特异抗原的特异性验证结果;

[0054] 图6是近红外免疫分析方法针对癌胚抗原的标准工作曲线图。

具体实施方式

[0055] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步的详细说明,但本发明的保护范围不仅限于以下实施例。根据本发明公开的内容,本领域技术人员将认识到在不脱离本发明技术方案所给出的技术特征和范围的情况下,对以上所述实施例做出许多变化和修改都属于本发明的保护范围。

[0056] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0057] 实施例1:近红外荧光免疫分析法检测前列腺特异抗原

[0058] 1.样品准备

[0059] 取临床静脉血2mL(福建省肿瘤医院,血样为血常规检测后的残留血),置于未加抗凝剂的试管中,室温下静置半小时,以3000rpm离心5分钟,提取血清,置于-70度冰箱保存待检。

[0060] 2.碱性磷酸酶标记二抗的制备

[0061] 利用东仁化学科技(上海)有限公司的碱性磷酸酶标记抗体试剂盒Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂,按照试剂盒提供的操作步骤,制备前列腺特异抗原的碱性磷酸酶标记二抗。

[0062] 3.前列腺特异抗原检测

[0063] 1)包被:用0.05mol/L的碳酸盐缓冲液将前列腺特异抗原的抗体(购于上海领潮生物科技有限公司)稀释至10μg/mL,在96孔氨基化高亲板中,每孔加入100μL,4℃孵育过夜,弃去孔内液体,用PBST洗涤缓冲液洗3次。

[0064] 2)封闭:用0.05mol/L的碳酸盐缓冲液配制10%的胎牛血清,每孔加入300μL,37℃孵育1小时,去孔内液体,用PBST洗涤缓冲液洗3次。

[0065] 3)加样:用PBS缓冲液配制0-50ng/mL的前列腺特异抗原系列标准溶液,使其浓度分别为:0ng/mL、0.000125ng/mL、0.00025ng/mL、0.0005ng/mL、0.0125ng/mL、0.25ng/mL、0.5ng/mL、0.75ng/mL、1.0ng/mL、1.5ng/mL、2ng/mL、2.5ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、50ng/mL的标准品,37℃孵育1小时,弃去孔内液体,用PBST洗涤缓冲液洗3次。

[0066] 4)制备免疫复合物:

[0067] 用PBS缓冲液配制2μg/mL的碱性磷酸酶标记二抗,每孔加入100μL,37℃孵育1小时,弃去孔内液体,用PBST洗涤缓冲液洗3次。

[0068] 5)酶诱导近红外荧光反应:加入200μL含磷酸供体的Tris-HCl缓冲液,其中包含50μL浓度1mM的单磷酸腺苷,100μL浓度为250μM的铈离子和50μL浓度为50mM pH9.0的Tris-HCl缓冲液,37℃孵育半小时。

[0069] 6)检测:取酶水解后溶液50μL,加入含有100μM吡啶菁绿近红外染料Cypate的Tris-HCl缓冲液(50mM,pH 9.0)950μL,测定位于780-900nm的荧光强度。

[0070] 7)绘制标准曲线:以前列腺特异抗原标准溶液浓度为横坐标,以每一浓度标准溶液的对应的荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线,见图4,在0-1.6ng/ml范围内,前列腺特异抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=864.33x+1302.11$, $R^2=0.992$,以空白平均值加3倍SD计,最低检测限为3.9pg/mL。

[0071] 8)样品血清中检出其荧光强度为2475,根据图4的标准曲线计算,该样品血清中前列腺特异抗原的浓度约为1.41ng/mL。

[0072] 实施例2:前列腺特异抗原的检测特异性验证

[0073] 为了说明本发明所述免疫分析方法检测结果的特异性,分别用人血清白蛋白、癌胚抗原、亲和素、甲胎蛋白、人绒毛膜促性腺激素、牛血清白蛋白、p24抗原和免疫球蛋白G作

为样品代替前列腺特异抗原作为待测标志物进行免疫检测,重复实施例1中的步骤。由于所用的前列腺特异抗原的抗体与前述样品不是可配对的抗原抗体或相关抗体,不具有选择性的识别作用,因此不能特异性结合,也无法形成三层夹心的免疫复合物,因此不能检测到荧光,说明样品中不含有待检测的目标标志物前列腺特异抗原(图5)。实验结果表明,样品中的非相关蛋白质不会引起非特异性反应,本发明的免疫分析方法具有高度特异性。

[0074] 实施例3:近红外荧光免疫分析法用于癌胚抗原检测

[0075] 为了说明本发明所述免疫分析方法检测结果的普适性,选取癌胚抗原作为待检测物,特异性识别癌胚抗原不同位点的单克隆抗体分别作为铺板抗体与识别抗体,重复实施例1中的步骤对癌胚抗原进行免疫检测。以癌胚抗原标准溶液浓度为横坐标,以每一浓度标准溶液的对应的近红外荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线。实验结果表明(图6),在0-2.0ng/ml范围内,前列腺特异抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=720.82x+1287.14$, $R^2=0.989$,以空白平均值加3倍SD计,最低检测限为4.7pg/mL。

[0076] 该方法与传统可见光荧光免疫分析方法相比,将近红外染料作为荧光信号发生体引入到免疫分析体系,克服了免疫分析荧光响应常位于紫外可见光区域,易受到生物组织自发荧光、光散射和检测信号干扰等缺点,并且具备灵敏度高、低成本、操作简便、荧光响应快速等优点,因而能有效改善荧光免疫分析技术的灵敏度和检测效果,本发明的目的在于提供一种疾病标志物的免疫分析方法,不可仅凭本方法得出的值作出诊断,仅作为中间数据参考作用,为疾病标志物早期诊断提供基础。

[0077] 以上,对本发明的实施方式进行了说明。但是,本发明不限定于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

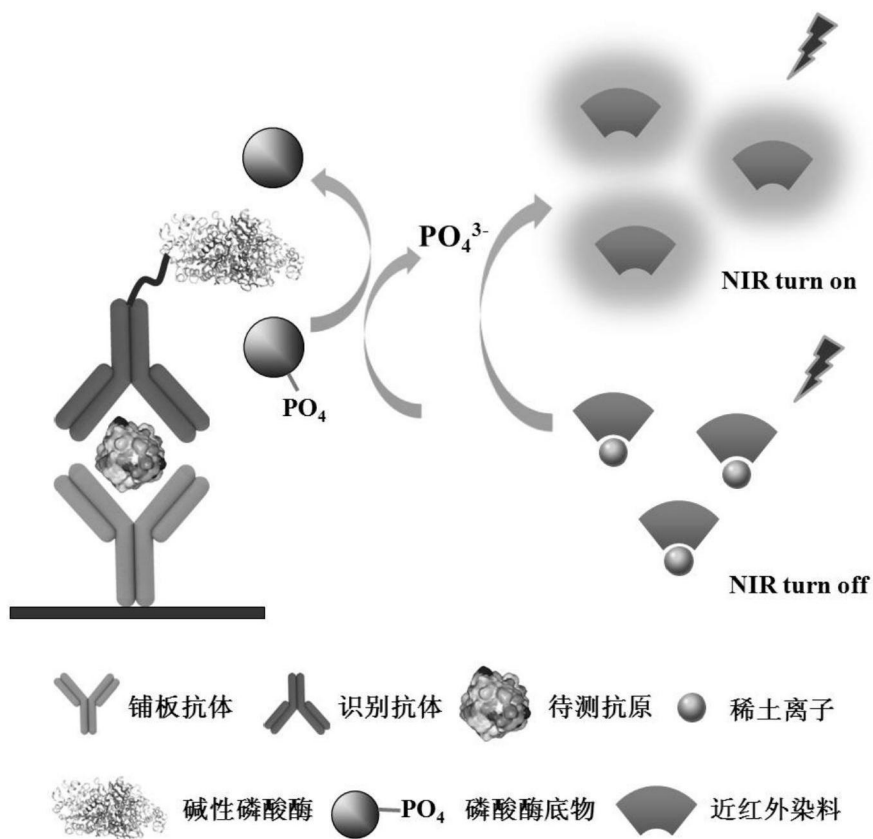


图1

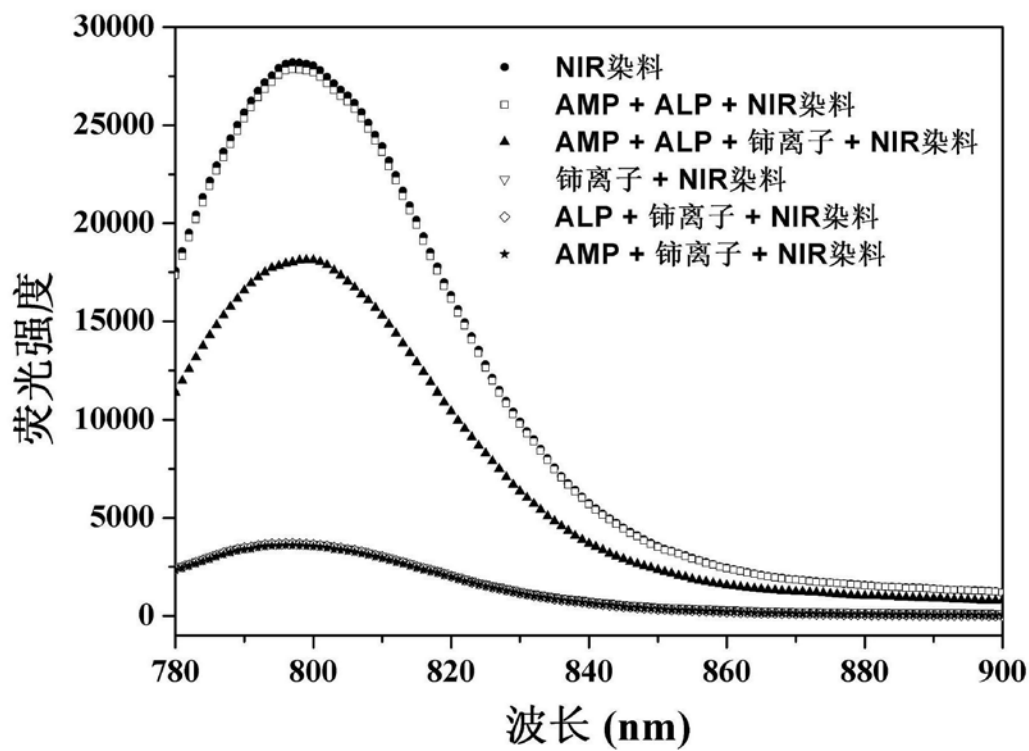


图2

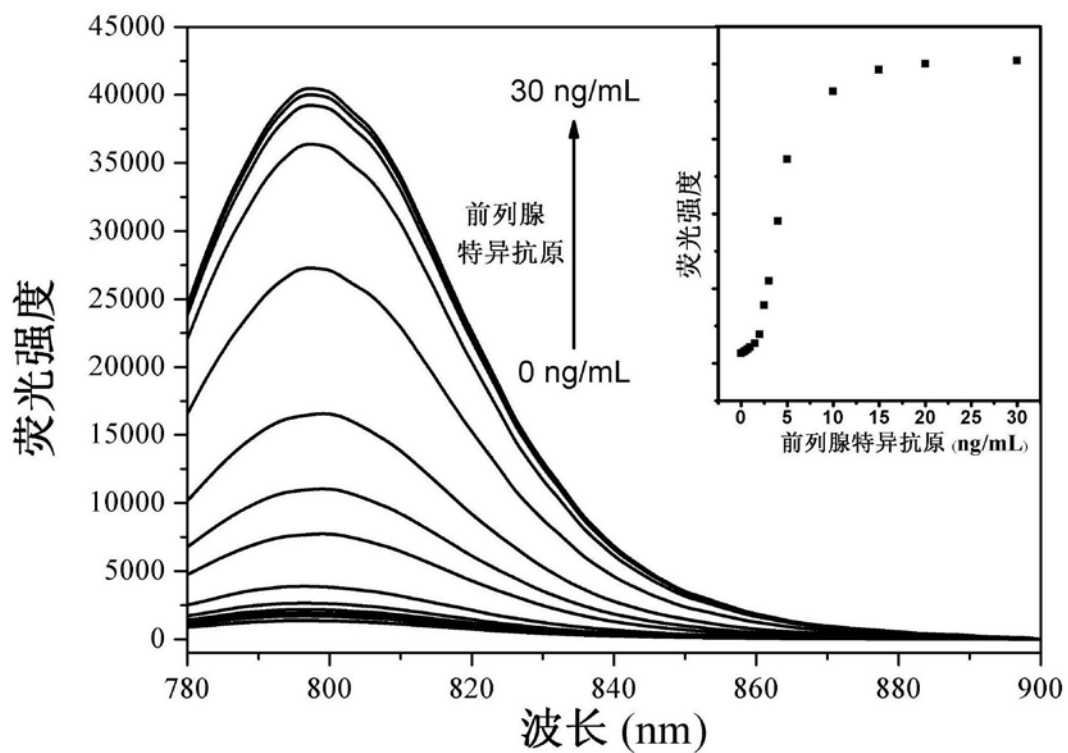


图3

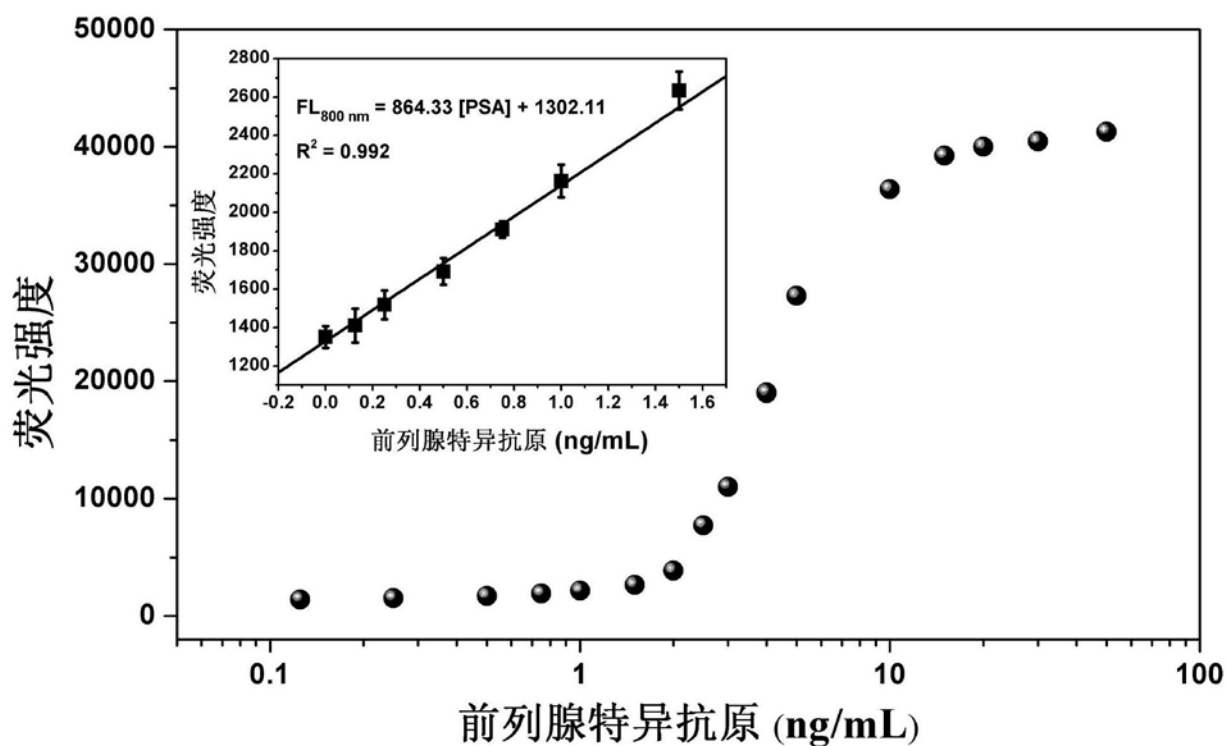


图4

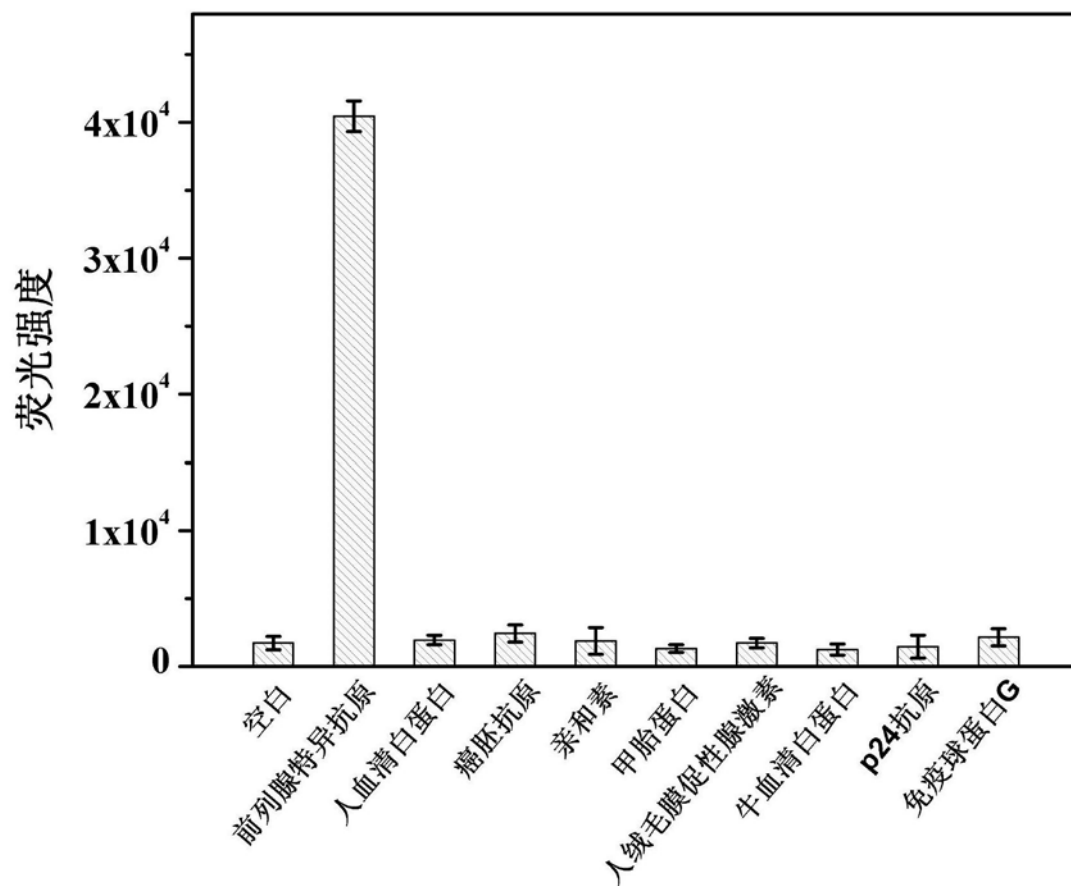


图5

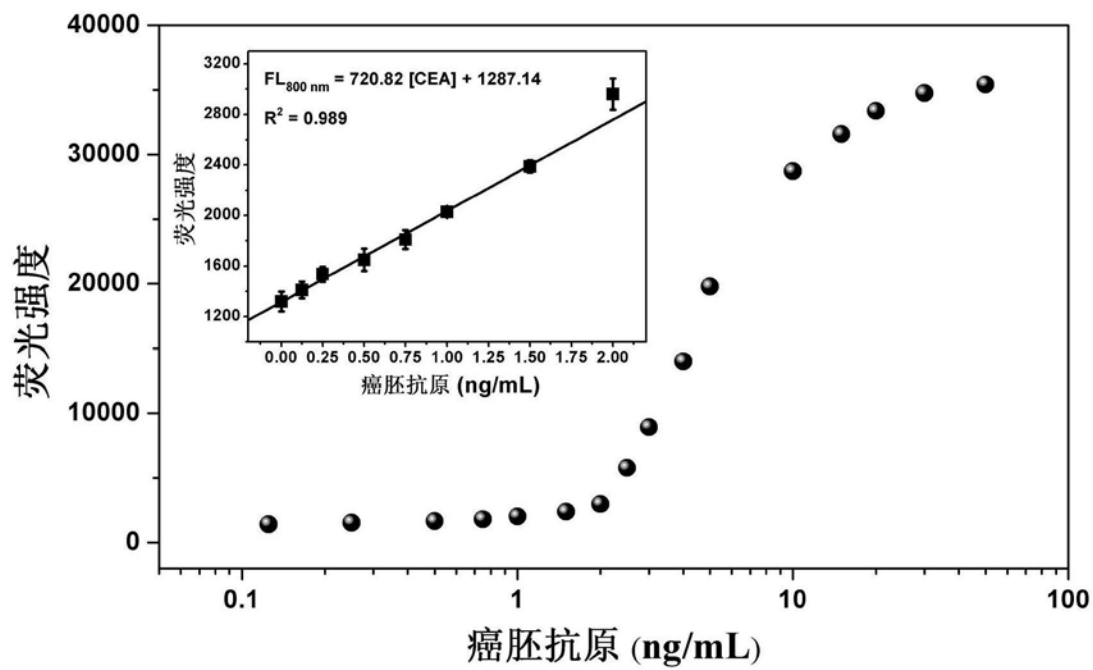


图6