



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 112986221 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202110176338.2

(22) 申请日 2017.12.15

(62) 分案原申请数据

201711344978.X 2017.12.15

(71) 申请人 利多(香港)有限公司

地址 中国香港上环德辅道中199号无限极
广场12楼55室

(72) 发明人 毛丽敏 吴炜 汤海霞

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 徐关寿

(51) Int.Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

检测样品中待测物的方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明提供用于检测样品中待测物的方法和试剂盒,其改进之处均在于组合使用两种化学发光增强剂:邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚。这两种增强剂发挥协同增强效应,显著降低本底信号,而且也能让鲁米诺发光信号在较长时间内保持稳定。本发明所述检测方法和试剂盒可与化学发光分析仪配套使用,可用于肿瘤标记物、传染病、激素类及其他酶促免疫化学发光类产品的检测。

1. 一种检测样品中待测物的试剂盒,所述试剂盒含有化学发光增强液,其特征在于,所述化学发光增强液包括邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.04g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.125g/L。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括发光剂和过氧化物,所述发光剂选自鲁米诺、异鲁米诺以及衍生物,其浓度为0.2g/L~5g/L,所述过氧化物选自过氧化氢、过氧化脲和过硼酸盐,其浓度为0.2g/L~2.0g/L。

4. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述发光剂、邻苯基苯酚、4-咪唑苯酚以混合物的形式存在。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述待测物选自AFP、CEA、铁蛋白、PSA、NSE、CYFRA21-1、CA19-9、CA50、CA125、CA153、CA724、FSH、LH、催乳素、孕酮、睾酮、雌二醇、雌三醇、 β -HCG、TT3、TT4、FT3、FT4、TSH、甲状腺球蛋白、甲状腺球蛋白抗体、甲状腺过氧化物酶抗体、HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg、抗-HBe、HCV抗原、HCV抗体、梅毒螺旋体抗原、梅毒螺旋体抗体、TORCH IgG、TORCH IgM、HIV抗原、HIV抗体、胰岛素、C-肽、胰岛素自身抗体、胰岛细胞抗体、谷氨酸脱羧酶抗体、层粘连蛋白、透明质酸、IV型胶原和III型前胶原N端肽。

6. 一种检测样品中待测物的方法,其步骤包括:(1)提供一种化学发光底物,所述化学发光底物包括发光剂和过氧化物,其特征在于,所述化学发光底物还包括邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚。

7. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,其步骤还包括:(2)让可能含有待测物的样品与包被着特异性结合所述待测物的捕获组分的固相一起温育后,加入洗涤液清洗固相;(3)加入HRP标记的特异性结合所述待测物或所述捕获组分的检测组分,进行温育后,加入洗涤液清洗固相;(4)加入化学发光底物后,检测发光信号。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.04g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.125g/L。

9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述化学发光底物还包括 9.0 ± 0.1 的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液。

10. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述发光剂选自鲁米诺、异鲁米诺以及衍生物,所述发光剂的浓度为0.2g/L~5g/L,所述过氧化物选自过氧化氢、过氧化脲或过硼酸盐,所述过氧化物的浓度为0.2g/L~2.0g/L。

检测样品中待测物的方法及其试剂盒

[0001] 本申请为申请号:201711344978.X,申请日:2017.12.15的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于检测样品中待测物的方法及其试剂盒,均涉及组合使用邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚这两种化学发光增强剂,属于免疫技术领域。

背景技术

[0003] 自从化学发光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay,CLIA)于上个世纪七八十年代问世以来,因其采用非放射性标记,且将抗原抗体免疫反应和化学发光信号相结合,因而具有优良的特异性和显著提高的灵敏度,在药物分析、环境分析、食品分析和生物医学等领域都得到了广泛的应用,如在生物医学领域中用于检测肿瘤类生物标志物,如甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、铁蛋白、前列腺特异抗原(PSA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、CYFRA21-1、CA19-9、CA50、CA125、CA153、CA724等;性腺类生物标志物,如促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、催乳素、孕酮、睾酮、雌二醇、雌三醇、 β -绒毛膜促性腺激素(β -HCG);甲功类生物标志物,如总三碘甲腺原氨酸(TT3)、总甲状腺素(TT4)、游离三碘甲腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、促甲状腺激素(TSH)、甲状腺球蛋白、甲状腺球蛋白抗体和甲状腺过氧化物酶抗体等;传染病类生物标志物,如乙肝五项(HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg、抗-HBe)、HCV抗原、HCV抗体、梅毒螺旋体抗原、梅毒螺旋体抗体、TORCH IgG/IgM、HIV抗原/抗体等;糖尿病类生物标志物,如胰岛素、C-肽、胰岛素自身抗体、胰岛细胞抗体、谷氨酸脱羧酶抗体;肝纤维化类生物标志物,如层粘连蛋白、透明质酸、IV型胶原和III型前胶原端肽等。

[0004] 目前,在市场产品中主要利用的CLIA技术可分为三大类:(1)酶促化学发光免疫分析法,化学发光底物经酶的降解作用而发光,根据酶类型不同,主要分为:a)辣根过氧化物酶(HRP)化学发光免疫分析法,其常用的化学发光底物可选自鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物;b)碱性磷酸酶(ALP)化学发光免疫分析法,其常用的化学发光底物为1,2-二氧乙烷类衍生物;(2)电化学发光免疫分析法,如Roche公司的Elecsys系列和Cobas系列电化学发光免疫分析系统就是采用这种方法;(3)基于吖啶酯(acridinium ester)或吖啶磺酰胺(acridinium sulfonylamide)的化学发光免疫分析法,其化学发光试剂为吖啶酯或吖啶磺酰胺。

[0005] 鲁米诺(luminol)、异鲁米诺(isoluminol)及其衍生物是最早在化学发光免疫分析法中使用的化学发光物质。不过,如果不使用增强剂,鲁米诺体系的发光为闪光型、强度弱、持续时间短。通过加入增强剂,发光时间明显延长,使其从短暂的闪光型改进为持续时间长的辉光型,增强了发光信号强度和提高了信噪比及灵敏度。提高灵敏度最有效的方法是在反应体系中加入增强剂以提高发光信号强度。增强剂的种类十分广泛,最初的增强剂包括荧光素、取代酚、萘酚和六羟基苯并噻唑,后来又发现了其它增强剂物质,如芳香胺、取代硼酸、靛酚等。

[0006] 中国专利申请CN1067257A提及使用增强剂邻苯基苯酚的一种受保护的化合物,在检测时,加入相对应的水解酶,移除保护基团,产生实际发挥作用的增强剂邻苯基苯酚,提高鲁米诺的发光信号。但是这需要额外加入一种水解酶,从而导致反应体系复杂化,而且还会提高检测成本。再者,仅使用邻苯基苯酚一种增强剂虽然可提高鲁米诺的发光信号,但是仍然导致HRP-鲁米诺化学发光体系存在本底信号偏高和发光信号稳定性较差等问题。此外,邻苯基苯酚本身因某种未知的原因,使得增强的鲁米诺发光信号很难在较长的时间内保持稳定,发光信号衰减得比较快。这就使得很多人放弃使用这种增强剂。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足之处,本发明在HRP-鲁米诺化学发光体系中,同时加入两种化学发光增强剂:邻苯基苯酚(o-phenylphenol)和4-咪唑苯酚(4-(imidazol-1-yl)phenol)。令人意料之外的是,这两种化学发光增强剂发挥协同增强效应。此外,同时加入这两种化学发光增强剂,可显著地降低免疫分析中的本底信号,同时让产生的化学发光信号在较长时间内保持稳定。这些优点会提高检测准确性和灵敏度。

[0008] 本发明提供一种化学发光增强液,包括邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚。所述化学发光增强液用于增强HRP-鲁米诺化学发光体系的发光信号。

[0009] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.16g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025~0.5g/L。

[0010] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.04g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.125g/L。

[0011] 进一步地,所述化学发光增强液还包括缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液。

[0012] 本发明还提供一种组合物在增强HRP-鲁米诺化学发光体系的发光信号中的应用,所述组合物包括所述的化学发光增强液。

[0013] 本发明还提供一种化学发光底物,所述化学发光底物包括A液和B液,A液包括发光剂,B液包括过氧化物,其中,A液还包括所述的化学发光增强液。

[0014] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.16g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025~0.5g/L。

[0015] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.04g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.125g/L。

[0016] 进一步地,A液还包括缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液。

[0017] 进一步地,所述发光剂选自鲁米诺、异鲁米诺以及衍生物,其浓度为0.2g/L~5g/L,所述过氧化物选自过氧化氢、过氧化脲或过硼酸盐,其浓度为0.2g/L~2.0g/L。

[0018] 进一步地,所述发光剂为鲁米诺。

[0019] 进一步地,所述过氧化物为过氧化脲。

[0020] 进一步地,所述发光剂的浓度为0.6g/L~1.0g/L,所述过氧化物的浓度为0.2g/L~0.3g/L。

[0021] 一种检测样品中待测物的方法,其步骤包括:(1)提供包被着捕获组分的固相;(2)

加入不同浓度的待测物校准品或可能含有待测物的样品,与固相一起温育后,加入洗涤液清洗固相;(3)加入HRP标记的检测组分,进行温育后,加入洗涤液清洗固相;(4)加入化学发光底物后,检测发光信号;(5)利用检测到的不同浓度待测物校准品的发光信号及其对应的待测物校准品浓度绘制标准曲线;(6)根据检测到的样品发光信号和(5)中的标准曲线,计算样品中的待测物浓度,其中所述捕获组分特异性地结合到待测物上,所述HRP标记的检测组分特异性地结合到待测物或者所述捕获组分上,所述化学发光底物包括A液和B液,A液含有发光剂、邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚,B液含有过氧化物。

[0022] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.16g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025~0.5g/L。

[0023] 进一步地,当待测物为抗原时,所述捕获组分和检测组分为特异性地结合所述抗原的抗体。

[0024] 进一步地,当待测物为抗体时,所述捕获组分和检测组分为特异性地结合所述抗体的抗原。

[0025] 进一步地,当待测物为半抗原时,所述捕获组分为特异性地结合所述半抗原的抗体,所述HRP标记的检测组分为HRP标记的半抗原或其类似物。

[0026] 进一步地,所述固相选自微孔板、塑胶微粒、磁珠、弹性塑料管或塑料珠。

[0027] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.04g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.125g/L。

[0028] 进一步地,A液还包括所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液。

[0029] 进一步地,所述发光剂选自鲁米诺、异鲁米诺以及衍生物,其浓度为0.2g/L~5g/L,所述过氧化物选自过氧化氢、过氧化脲或过硼酸盐,其浓度为0.2g/L~2.0g/L。

[0030] 进一步地,所述发光剂为鲁米诺。

[0031] 进一步地,所述过氧化物为过氧化脲。

[0032] 进一步地,所述发光剂的浓度为0.6g/L~1.0g/L,所述过氧化物的浓度为0.2g/L~0.3g/L。

[0033] 一种检测样品中待测物的试剂盒,所述试剂盒包括捕获组分、HRP标记的检测组分、洗涤液、化学发光底物和待测物校准品,其中所述捕获组分特异性地结合到待测物上,所述HRP标记的检测组分特异性地结合到待测物或者所述捕获组分上,所述化学发光底物包括A液和B液,A液含有发光剂、邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚,B液含有过氧化物。

[0034] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.16g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025~0.5g/L。

[0035] 进一步地,当待测物为抗原时,所述捕获组分和检测组分为特异性地结合所述抗原的抗体。

[0036] 进一步地,当待测物为抗体时,所述捕获组分和检测组分为特异性地结合所述抗体的抗原。

[0037] 进一步地,当待测物为半抗原时,所述捕获组分为特异性地结合所述半抗原的抗体,所述HRP标记的检测组分为HRP标记的半抗原或半抗原衍生物。

[0038] 进一步地,A液还包括缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液。

[0039] 进一步地,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.04g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.125g/L。

[0040] 进一步地,所述发光剂选自鲁米诺、异鲁米诺以及衍生物,其浓度为0.2g/L~5g/L,所述过氧化物选自过氧化氢、过氧化脲或过硼酸盐,其浓度为0.2g/L~2.0g/L。

[0041] 进一步地,所述发光剂为鲁米诺。

[0042] 进一步地,所述过氧化物为过氧化脲。

[0043] 进一步地,所述发光剂的浓度为0.6g/L~1.0g/L,所述过氧化物的浓度为0.2g/L~0.3g/L。

[0044] 本发明的有益效果:(1)本发明并不使用受到保护的化学发光增强剂,因而也就无需使用相对应的水解酶移除保护基团,因而使得反应体系简单化,同时降低检测成本;(2)本发明组合使用两种化学发光增强剂:邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚,意外发现这两种增强剂发挥协同增强效应,不仅两者在一起时产生的化学发光信号大于它们各自存在时产生的化学发光信号之和,而且两者在一起时产生的信噪比也远远大于它们各自存在时产生的信噪比之和;(3)本发明组合使用两种化学发光增强剂:邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚,可有效克服仅使用邻苯基苯酚时发光信号不稳定和本底信号较高的问题,而且也可有效克服4-咪唑苯酚增强的化发光信号强度较差一些的问题,从而确保本发明的发光信号得到显著增强,保持比较好的发光信号稳定性,同时具有较低的本底信号;(4)本发明的化学发光增强液和化学发光底物具有良好的保存稳定性,可在37℃下至少保存31天,在2~8℃下至少保存18个月;(5)采用本发明的化学发光增强液、化学发光底物、检测方法和试剂盒,可显著提高检测准确性、灵敏度和线性检测范围;(6)本发明通过组合使用邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚,令人意料之外地解决了当仅加入邻苯基苯酚时,增强的鲁米诺发光信号衰减得比较快难以在较长时间内保持稳定从而使得很多人放弃使用邻苯基苯酚的问题。

附图说明

[0045] 图1.利用本发明的化学发光底物检测AFP500校准品的结果。

[0046] 图2.不同浓度的邻苯基苯酚(用字母D表示)和4-咪唑苯酚(用字母E表示)时测量的信噪比计算结果图。

具体实施方式

[0047] 当利用HRP-鲁米诺化学发光体系检测样品中的待测物时,若待测物为抗体(IgE、HCV抗体、HBeAb、HBsAb、HBcAb、HIV抗体等)时,可采用双抗原夹心法检测,这时结合到固相上的捕获抗原与HRP标记的检测抗原结合到待测抗体上,加入化学发光底物,测定每孔发光值,发光信号强度与样本中抗体的含量成正比;若待测物为抗原(如AFP、CEA、PSA等)时,可采用双抗体夹心法检测,这时结合到固相上的捕获抗体和HRP标记的检测抗体结合到待测物的不同位点上,加入化学发光底物,测定每孔发光值,发光信号强度与样本中抗原的含量成正比;当待测物为半抗原(如雌二醇、雌三醇、T3和T4等)时,可采用竞争抑制法进行检测,这时HRP标记的半抗原和样品中存在的半抗原都会去竞争结合固定到固相上的这种半抗原的检测抗体,加入化学发光底物,测定每孔发光值,发光信号强度与样本中半抗原的含量成反比。

[0048] 在检测血清或血浆等样品中的待测物浓度时,应先利用待测物校准品制作标准曲线。为此,需要利用校准品稀释液将事先配好的高浓度待测物校准品进行一系列稀释,从而获得不同浓度的待测物校准品,或者直接利用校准品稀释液和待测物校准品直接配制不同浓度的待测物校准品,另外将不含待测物的校准品稀释液作为零浓度的待测物校准品。所述校准品稀释液可选自小牛血清、新生牛血清或胎牛血清,也可选自ddH₂O、磷酸盐缓冲液(PBS)、生理盐水、HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、Tricine缓冲液、三乙醇胺-盐酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液或巴比妥钠-盐酸缓冲液等。在所述校准品稀释液中,可根据需要加入适量的BSA、明胶蛋白或酪蛋白等稳定剂,也可根据需要加入适量的防腐剂,如叠氮钠、硫柳汞、Proclin-150、Proclin-200、Proclin-300或Proclin-5000等。根据样品中的待测物在利用HRP酶促化学发光免疫分析中获得的测量值,以及所获得的标准曲线,就可计算出样品中的待测物浓度。

[0049] 此外,为了进一步提高检测的灵敏度,可将蛋白A、蛋白G、生物素-亲和素/链霉亲和素/中性亲和素系统、异硫氰酸荧光素(FITC)-抗FITC抗体或荧光素-抗荧光素抗体或其他类似的系统整合到HRP-鲁米诺化学发光体系之中。

[0050] 当检测的待测物是抗原或半抗原时,本发明所使用针对待测物的捕获抗体和检测抗体可选自抗待测物单克隆抗体(简称单抗)或多克隆抗体(简称多抗),是利用分离的待测物或其片段(针对抗原而言)或者半抗原-载体蛋白偶联物(针对半抗原而言,将半抗原与BSA、KLH、BGG或OVA等载体蛋白偶联在一起形成的)免疫非人的动物所产生的。另外,所述捕获抗体和检测抗体也可以是抗待测物单抗或多抗经化学试剂或酶处理后仍然具有待测物结合活性的片段,如经木瓜蛋白酶消化后所产生的Fab片段,或者经胃蛋白酶消化后产生的F(ab')₂,或者是F(ab')₂经酶IdeS消化后产生的Fab'片段。所述的非人动物可选自小鼠、大鼠、豚鼠、兔、鸡、猪、绵羊、山羊、马、骡和骆驼等动物。

[0051] 当检测的待测物是抗体时,本发明所使用针对待测物的捕获抗原和检测抗原是从样品中分离出来的,或者化学手段合成出的,或者利用基因工程手段在微生物细胞或真核生物细胞中重组表达而产生的(当捕获抗原和检测抗原为蛋白时)。

[0052] 不论是结合到固相上的捕获抗体,还是结合到固相上的捕获抗原,所述固相选自微孔板、塑胶微粒、磁珠、弹性塑料管、塑料珠等,优选为微孔板。微孔板可选自常见的16孔酶标板、48孔酶标板和96孔酶标板等,而塑料珠可选自深圳纽邦生物科技有限公司的PS02N/PS03N/PS04N/PS05N/PS06N/PS07N/PS08N型号聚苯乙烯微球等。磁珠是以四氧化三铁等顺磁性物质作为内核、表面经过氨基、羧基、羟基、巯基等活性基团修饰的磁性微粒或磁性微球。

[0053] 当利用HRP-鲁米诺化学发光体系检测样品中的待测物时,化学发光底物包括A液和B液,A液含有发光剂,B液含有过氧化物,其中所述发光剂选自鲁米诺(luminol)、异鲁米诺(isoluminol)及其衍生物,其浓度为0.2g/L~5g/L,优选为0.6g/L~1.0g/L;所述过氧化物选自过氧化氢、过氧化脲和过硼酸盐,其浓度为0.2g/L~2.0g/L,优选为0.2g/L~0.3g/L。为了增强发光信号强度和发光稳定性,A液还含有邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚。在A溶液中,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.16g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025g/L~0.5g/L。优选地,A液还含有pH为9.0±0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为酸盐缓冲液。

[0054] 经过大量的研究和实践发现,往化学发光底物中加入本发明的两种化学发光增强剂,出人意料地发挥协同增强效应,显著地增强HRP-鲁米诺化学发光体系的发光信号强度和信噪比,同时提高发光稳定性。

[0055] 以下实施例进一步说明本发明。这些实施例不是用来限制本发明范围,而是提供对本发明的进一步理解。

[0056] 实施例1化学发光试剂及其检测方法

[0057] 在本发明中,待测物为抗原、抗体或半抗原,这里以抗原AFP为例进行说明。固相可选自微孔板、塑胶微粒、磁珠、弹性塑料管或塑料珠,这里以微孔板为例进行说明。

[0058] 1.HRP标记物制备方法

[0059] HRP标记物指的是HRP标记的抗原、抗体或半抗原,常用的标记方法有戊二醛法和高碘酸钠氧化法。这里以高碘酸钠氧化法为例进行说明。其详细步骤为:

[0060] (1) 称取5mg HRP,溶解于1ml蒸馏水中,形成浓度为5mg/ml的HRP溶液;

[0061] (2) 往HRP溶液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20min;

[0062] (3) 将(2)中搅拌后的溶液装入透析袋中,利用1mM的醋酸钠缓冲液(pH4.4)进行透析,在4℃下过夜,获得透析后的醛化HRP溶液;

[0063] (4) 加入20 μ l 0.2M碳酸钠缓冲液(pH 9.5),让(3)中的醛化HRP溶液的pH上升到9.0~9.5,然后加入含10mg抗AFP抗体的1ml 0.01M碳酸盐缓冲液,室温避光轻轻搅拌2小时;

[0064] (5) 加入0.1ml新配的4mg/ml NaBH_4 溶液,混匀,在4℃下放置2小时;

[0065] (6) 将(5)中的溶液装入透析袋中,利用0.15M PBS缓冲液(pH 7.4)进行透析在4℃下过夜;

[0066] (7) 将(6)中透析后的溶液用Sephedex G-75凝胶层析进行纯化,获得HRP标记抗AFP抗体溶液。

[0067] 2.化学发光增强液和化学发光底物

[0068] 本发明的化学发光底物包括A液和B液。

[0069] 在本发明的一个实施方案中,一种化学发光增强液,包括邻苯基苯酚和4-咪唑苯酚,邻苯基苯酚的浓度为0.008g/L~0.16g/L,4-咪唑苯酚的浓度为0.025~0.5g/L。所述化学发光增强液用于增强HRP-鲁米诺体系的发光信号。优选地,所述化学发光增强液还包括pH为9.0 $\pm$ 0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为碳酸盐缓冲液。

[0070] 在本发明的另一个实施方案中,所述A液和B液的配方如下所示:A液:鲁米诺0.2g/L~5g/L、邻苯基苯酚0.008g/L~0.16g/L、4-咪唑苯酚0.025g/L~0.5g/L、pH为9.0 $\pm$ 0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为碳酸盐缓冲液;B液:过氧化脲0.2g/L~2.0g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为7.4 $\pm$ 0.1)。

[0071] 在本发明的另一个实施方案中,所述A液和B液的配方如下所示:A液:鲁米诺0.2g/L~5g/L、邻苯基苯酚0.008g/L~0.04g/L、4-咪唑苯酚0.025g/L~0.125g/L、pH为9.0 $\pm$ 0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为碳酸盐缓冲液;B液:过氧化脲0.2g/L~2.0g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为7.4 $\pm$ 0.1)。

[0072] 在本发明的另一个实施方案中,所述A液和B液的配方如下:A液:鲁米诺0.6g/L~

1.0g/L、邻苯基苯酚0.008g/L~0.16g/L、4-咪唑苯酚0.025g/L~0.5g/L、pH为9.0±0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为碳酸盐缓冲液;B液:过氧化脲0.2g/L~2.0g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为7.4±0.1)。

[0073] 在本发明的另一个实施方案中,所述A液和B液的配方如下:A液:鲁米诺0.6g/L~1.0g/L、邻苯基苯酚0.008g/L~0.04g/L、4-咪唑苯酚0.025g/L~0.125g/L、pH为9.0±0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为碳酸盐缓冲液;B液:过氧化脲0.2g/L~0.3g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为7.4±0.1)。

[0074] 在本发明的另一个实施方案中,所述A液和B液的配方如下:A液:鲁米诺0.8g/L、邻苯基苯酚0.04g/L、4-咪唑苯酚0.125g/L、pH为9.0±0.1的缓冲液,所述缓冲液选自Tris-HCl、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液,优选为碳酸盐缓冲液;B液:过氧化脲0.3g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为7.4±0.1)。

[0075] 在本发明的另一个实施方案中,所述A液和B液的配方如下:A液:鲁米诺0.8g/L、邻苯基苯酚0.008g/L、4-咪唑苯酚0.025g/L、pH为9.0±0.1的碳酸盐缓冲液;B液:过氧化脲0.3g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为7.4±0.1)。

[0076] 3.待测物校准品配制

[0077] 称取一定量的待测物(如AFP、CEA、IgE、T4等),利用含50%小牛血清的PBS缓冲液(pH 7.2)进行一系列稀释,获得不同浓度的待测物校准品。对AFP而言,获得浓度为0ng/mL的AFP校准品(AFP0)、浓度为5ng/mL的AFP校准品(AFP5)、浓度为10ng/mL的AFP校准品(AFP10)、浓度为20ng/mL的AFP校准品(AFP20)、浓度为120ng/mL的AFP校准品(AFP120)和浓度为500ng/mL的AFP校准品(AFP500)。

[0078] 4.待测物检测方法

[0079] 当待测物为抗原或抗体,常采用夹心法进行检测。这里以检测血清中的抗原AFP浓度为例进行说明。详细检测步骤如下所示:

[0080] (1)制备包被着捕获抗体的固相

[0081] 将抗AFP捕获抗体溶解于pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,获得浓度为10μg/ml的抗AFP捕获抗体包被液,往酶标板孔中加入包被液50μl,在4℃下放置过夜;将酶标板孔中的液体甩干或抽吸出,在室温下往酶标板孔中加入洗涤液(可选自pH 7.2的磷酸盐缓冲液、pH 7~8的Tris-HCl缓冲液和pH 9.6的碳酸盐缓冲液等)洗涤3~5次;洗涤完后,将酶标孔中的洗涤液甩干或抽吸出,加入5%BSA,以封闭酶标板孔表面上多余的结合部位,在4℃下放置过夜;封闭完后,利用洗涤液洗涤3~5次,以除去未结合的封闭试剂;洗涤完后,将酶标孔中的洗涤液甩干或抽吸出,获得包被着抗AFP抗体的酶标板,备用。

[0082] (2)加入校准品或血清样品以及检测抗体

[0083] 将50μl AFP校准品或可能含有AFP的血清样品,以及50μl HRP标记的抗AFP检测抗体加入到(1)中获得的包被着抗AFP抗体的酶标板孔内,在37℃下温育30min,随后加入洗涤液,洗涤3~5次。

[0084] (3)加入化学发光底物

[0085] 往(2)中洗涤后的酶标板每孔中加入50μl A液和50μl B液,混匀后,室温避光反应5min后,放入化学发光分析仪中,测定各孔发光信号强度(RLU)。

[0086] (4)绘制标准曲线

[0087] 利用测定的不同浓度AFP校准品的发光信号强度及其对应的AFP校准品浓度建立标准曲线。

[0088] (5) 计算血清中的AFP浓度

[0089] 根据测定的血清样品发光信号强度和(4)中的标准曲线,计算血清样品中的AFP浓度。

[0090] 当待测物为抗体时,将本检测方法中的捕获抗体和检测抗体替换为结合所述抗体的捕获抗原(Ag1)和检测抗原(Ag2),此外酶标板孔中包被的是Ag1。

[0091] 当待测物半抗原(hapten)时,将本检测方法中的捕获抗体替换为结合所述半抗原的捕获抗体(anti-hapten),HRP标记的抗AFP检测抗体替换为HRP标记的hapten或其类似物,此外酶标板孔中包被的是anti-hapten。

[0092] 实施例2:化学发光底物实验

[0093] (1) 化学增强剂实验

[0094] 化学发光底物由A液和B液组成。在A液中,缓冲液:pH为 9.0 ± 0.1 的碳酸盐缓冲液,鲁米诺(LS):0.6g/L;在B液中,过氧化脲(UP):0.3g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为 7.4 ± 0.1)。通过改变A液中的邻苯基苯酚(D)浓度和4-咪唑苯酚(E)浓度,按照实施例1中的检测三个参数:反应体系本底信号、阳性信号值和线性宽度,其中反应体系本底信号,即空白发光值,指的是反应孔中不添加待检样本等试剂,仅加入化学发光底物,检测产生的发光信号;阳性信号值,这里以浓度为500ng/mL的AFP校准品(AFP500)为例,指的是AFP500校准品的发光信号强度(RLU),同时监测不同时间的发光稳定性;线性宽度,这里以AFP为例,指的是AFP500校准品的发光信号与浓度为0ng/mL的AFP校准品(AFP0)发光信号的比值。检测结果如表1、表2和图1所示。

[0095] 表1.反应体系本底信号

	LS:0.6g/L D:0 E:0	LS:0.6g/L D:0.04g/L E:0	LS:0.6g/L D:0 E:0.125g/L	LS:0.6g/L D:0.008g/L E:0.025g/L	LS:0.6g/L D:0.04g/L E:0.125g/L	LS:0.6g/L D:0.16g/L E:0.5g/L
0 分钟	4369	2750	380	415	567	1271
3 分钟	7792	2697	417	198	330	725
5 分钟	7646	2495	430	126	255	691
35 分钟	4045	1788	1134	235	551	1032
50 分钟	3662	1996	1205	325	682	1373

[0097] 由表1可知,当A液不含有D和E时,鲁米诺的本底信号比较高。仅加入D或E时,都可降低鲁米诺的本底信号,但是仅加E时的下降幅度更大。同时加入D和E,也可降低鲁米诺的本底信号,尤其是当D:0.008g/L,E:0.025g/L,或者D:0.04g/L,E:0.125g/L时,下降得更加显著。

[0098] 表2.AFP500校准品的阳性信号值及读数稳定性

[0099]

第 1 列	第 2 列	第 3 列	第 4 列	第 5 列	第 6 列	第 7 列
	LS:0. 6g/L D:0 E:0 (记为 I)	LS:0. 6g/L D:0. 04g/L E:0 (记为 II)	LS:0. 6g/L D:0 E:0. 125g/L (记为 III)	LS:0. 6g/L D:0. 008g/L E:0. 025g/L (记为 IV)	LS:0. 6g/L D:0. 04g/L E:0. 125g/L (记为 V)	LS:0. 6g/L D:0. 16g/L E:0. 5g/L (记为 VI)
0 分钟	88579	3106062	1839628	3367229	5916160	8104701
3 分钟	72032	3061215	1958469	3736449	6422885	8184593
5 分钟	59446	3010048	1993131	3557981	6258653	7977996
35 分钟	10724	1760021	1964521	2729128	4884283	7002717
50 分钟	5462	1271452	1921056	2142374	3859585	5471843
35 分钟/0 分钟	12%	57%	107%	81%	83%	86%
50 分钟/0 分钟	6%	41%	104%	64%	65%	68%

[0100] 由表2的第2~4列和第6列和图1的曲线I、II、III和V可知,当A液不含有D和E时,鲁米诺的发光信号很低;当仅加入D时,可增强鲁米诺的发光信号,但是在35min后,发光信号下降到57%,到50min时,下降到41%,即发光稳定性较差,发光信号衰减得很快;当仅加入E时,可增强鲁米诺的发光信号,而且在50min时的稳定性良好,但是在0~5分钟期间,E对鲁米诺的发光信号增强程度要差于D;当同时加入D和E时,可进一步增强鲁米诺的发光信号,且D和E之间产生协同增强效应,即同时加入时产生的发光信号大于单独加入D时和单独加入E时产生的发光信号之和,而且也具有较好的发光稳定性。

[0101] 表3.AFP500校准品的阳性信号值及读数稳定性

[0102]

	LS:0. 6g/L D: 0.008g/L E:0	LS:0. 6g/L D:0 E:0. 025g/L	LS:0. 6g/L D:0. 008g/L E:0. 025g/L	LS:0. 6g/L D:0. 16g/L E:0g/L	LS:0. 6g/L D:0g/L E:0. 5g/L	LS:0. 6g/L D:0. 16g/L E:0. 5g/L
0 分钟	1905841	1103619	3367229	4730241	2490315	8104701
50 分钟	609869	1081547	2142374	1655584	2462921	5471843
50 分钟 /0 分钟	32%	98%	63. 6%	35%	98. 9%	67. 5%

[0103] 再者,分别降低D和E的浓度至0.008g/L和0.025g/L,在0min和50min时的发光信号,结果如表2的第5列、图1的曲线IV和表3的第2~4列所示,可知当浓度降低时,同时加入D和E时可进一步增强鲁米诺的发光信号,D和E之间产生协同增强效应,而且也具有较好的发光稳定性;E对鲁米诺的发光信号增强程度要差于D。另外,分别增加D和E的浓度至0.16g/L和0.5g/L,结果如表2的第7列、图1的曲线VI和表3的第5~7列所示,可知当浓度增加时,同时加入D和E时可进一步增强鲁米诺的发光信号,D和E之间产生协同增强效应,而且也具有较好的发光稳定性;E对鲁米诺的发光信号增强程度要差于D。

[0104] 由表1和表2计算AFP校准品的线性宽度和信噪比(这里以为AFP500校准品为例进行说明,计算方法为AFP500校准品的发光信号与反应体系本底信号的比值),结果如表4和图2所示。

[0105] 表4.线性宽度测量值

[0106]

	LS:0.6g/L D:0 E:0	LS:0.6g/L D:0.04g/L E:0	LS:0.6g/L D:0 E:0.125g/L	LS:0.6g/L D:0.008g/L E:0.025g/L	LS:0.6g/L D:0.04g/L E:0.125g/L	LS:0.6g/L D:0.16g/L E:0.5g/L
本底信号	5502.8	2345.2	713.2	259.8	477	1018.4
AFP0	6867	4715	2143	1063	1535	2370
AFP500	1771575	3106062	2653910	2759442	4743429	5985484
AFP500/AFP0	257.98	658.76	1238.41	2595.90	3090.18	2525.52

[0107]

信噪比	321.9	1324.4	3721.13	10621.4	9944.30	5877.34
-----	-------	--------	---------	---------	---------	---------

[0108] 由表4和图2可知,当D和E同时使用时,具有比较好的线性宽度,而且当同时加入D和E时产生的线性宽度要大于当仅加入D时和当仅加入E时产生的线性宽度之和。此外,当D和E同时使用时,也具有比较好的信噪比,而且具有协同增强效应,即当同时加入D和E时产生的信噪比要大于当仅加入D时和当仅加入E时产生的信噪比之和。

[0109] (2) 鲁米诺和过氧化脲实验

[0110] 化学发光底物由A液和B液组成。在A液中,邻苯基苯酚(D):0.04g/L,4-咪唑苯酚(E):0.125g/L,缓冲液:pH为 9.0 ± 0.1 的碳酸盐缓冲液,筛选不同的鲁米诺(LS)浓度;在B液中:稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为 7.4 ± 0.1),筛选不同的过氧化脲(UP)浓度。为此,改变LS和UP浓度,按照实施例1中的检测方法,检测三种不同浓度的AFP校准品,即浓度为0ng/mL的AFP校准品(AFP0)、浓度为5ng/mL的AFP校准品(AFP5)和浓度为500ng/mL的AFP校准品(AFP500),在不同时间下的发光信号强度(RLU)检测结果如表5所示。在表4中,Sens.=AFP5 RLU/AFP0 RLU,指的是AFP5校准品的RLU与AFP0校准品的RLU的比值,这种比值越高,表明灵敏度就越好,当这种比值小于2.0时,灵敏度较低,不能接受;Line.=AFP500 RLU/AFP5 RLU,指的是AFP500校准品的RLU与AFP5校准品的RLU的比值,这种比值越高,表明线性宽度越大,当这种比值小于20时,线性宽度较小,不能接受。

[0111] 表5.不同浓度的AFP校准品检测结果

[0112]

		LS: 5g/L	LS: 2g/L	LS: 1g/L	LS: 0.8g/L	LS: 0.6g/L	LS: 0.5g/L	LS: 0.4g/L	LS: 0.2g/L	LS: 0.1g/L
UP: 2g/L	Sens.	4.6	4.9	4.6	4.7	4.7	4.4	4.0	4.3	3.4
	Line.	34.0	34.2	35.5	35.3	30.2	34.5	32.7	40.6	80.6
UP: 1g/L	Sens.	5.6	4.7	5.2	5.5	5.6	5.1	5.1	4.9	3.0
	Line.	51.1	76.9	62.9	65.1	67.2	69.7	78.2	92.9	175.3
UP: 0.6g/L	Sens.	7.6	6.9	6.7	5.6	6.1	5.9	5.2	5.8	3.2
	Line.	52.5	70.3	80.5	80.6	98.4	113.8	113.5	133.3	303.7
UP: 0.4g/L	Sens.	6.6	6.2	6.6	5.5	5.5	4.9	5.5	4.3	3.1
	Line.	54.3	76.5	73.7	102.5	109.7	117.6	117.3	180.7	349.4
UP: 0.3g/L	Sens.	7.5	7.0	7.6	6.4	5.7	5.4	6.2	4.7	3.6
	Line.	62.0	88.5	105.6	117.8	140.7	145.5	143.5	215.2	412.5
UP:	Sens.	8.4	7.4	6.6	8.0	6.5	6.7	4.8	2.5	2.1

[0113]

0.2g/L	Line.	78.5	105.1	126.4	129.6	154.4	147.3	189.7	367.3	750.1
--------	-------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0114] 由表5可知,当LS浓度为0.2~5g/L,UP浓度为0.2~2g/L时,均有发光信号,LS的最优浓度范围为0.6~1.0g/L,UP的最优浓度范围是0.2~0.3g/L。(3) 化学发光底物缓冲液实验

[0115] 化学发光底物由A液和B液组成。在B液中,过氧化脲(UP):0.3g/L,稀释液:0.2M磷酸盐缓冲液(pH为 7.4 ± 0.1);在A液中,邻苯基苯酚(D):0.04g/L,4-咪唑苯酚(E):0.125g/L,鲁米诺(LS):0.8g/L,改变A液中的缓冲液,检测不同浓度的AFP校准品,结果如表6所示。在表6中,Sens.和Line.含义与表5中的相同,BB为硼酸盐缓冲液,CB为碳酸盐缓冲液。

[0116] 表6.不同缓冲液选择结果

[0117]	缓冲液	BB	CB	Tris-HCl
	pH	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1
	本底	941	676	103
	Sens.	1.96	11.61	4.84
	Line.	1947.85	394.44	437.31

[0118] 由表6可知,Sens. ≥ 2.0 、Line. ≥ 20 ,所以pH 9.0 ± 0.1 的BB、CB和Tris-HCl缓冲液都适合用于A液中,其中在pH 9.0 ± 0.1 的碳酸盐缓冲液下,测得的Sens.最高,即具有最佳的灵敏度,同时也具有比较高的Line.值,综合而言,效果最好。

[0119] 实施例3:化学发光底物存储稳定性实验

[0120] 为了测试本发明的化学发光底物的稳定性,配制A液:邻苯基苯酚(D) 0.04g/L,4-咪唑苯酚(E) 0.125g/L,鲁米诺0.8g/L,缓冲液:0.1M碳酸盐缓冲液(pH为 9.0 ± 0.1);B液:过氧化脲(UP) 0.3g/L,稀释液为0.2M磷酸盐缓冲液(pH为 7.4 ± 0.1),按照实施例1中的检测方法,在试剂存储条件2~8℃下检测实施例1中配制的5种不同浓度的AFP校准品,在不同时间下的发光信号强度(RLU),检测结果如表7所示。

[0121] 表7.AFP校准品检测结果

	2~8℃ (月)	0	3	6	9	12	15	18
[0122]	0	3973	4390	3713	3765	2808	2220	1413
	5	72250	79975	74758	61070	49698	80968	58543
	10	194285	171315	195225	148948	119023	212373	177080
[0123]	20	477720	420283	441938	309823	246605	441803	394983
	500	14262238	14643470	14906343	12794303	13162728	13325253	14199725
	相关系数(r)	1.0000	0.9999	1.0000	0.9999	0.9998	1.0000	0.9999

[0124] 由表7可知,本发明的化学发光底物在2~8℃下第18个月时,仍然保持非常好的相关系数,发光信号强度保持稳定,具有非常好的储存稳定性。

[0125] 实施例4:利用化学发光底物检测待测物

[0126] 为了利用本发明的化学发光底物检测血清等样品中的待测物,配制A液:邻苯基苯酚(D) 0.04g/L,4-咪唑苯酚(E) 0.125g/L,鲁米诺0.8g/L,缓冲液:0.1M碳酸盐缓冲液(pH为 9.0 ± 0.1);B液:0.3g/L过氧化脲(UP),稀释液:0.2M磷酸盐缓冲液(pH为 7.4 ± 0.1),按照实施例1中的检测方法,检测不同浓度的AFP校准品、不同浓度的CEA校准品和不同浓度的IgE校准品,以及AFP质控品Q1(9.7ng/mL)和Q2(118.4ng/mL)、CEA质控品Q1(11.3ng/mL)和Q2(120.6ng/mL)、IgE质控品Q1(21.0IU/mL)和Q2(113.7IU/mL),检测结果如表8所示。其中,

CEA和IgE校准品配制方法,如实施例1中的AFP校准品相同:对CEA校准品而言,称取一定量的CEA,利用含50%小牛血清的PBS缓冲液(pH 7.2)进行一系列稀释,获得浓度分别为0、3、5、10、100和250ng/mL的CEA校准品。对IgE校准品而言,称取一定量的IgE,利用含50%小牛血清的PBS缓冲液(pH 7.2)进行一系列稀释,获得浓度分别为0、2.5、5、20、100和500IU/mL的IgE校准品。

[0127] 表8. 三种不同的待测物校准品及其质控品检测结果

[0128]

AFP		CEA		IgE	
浓度 (ng/mL)	RLU 均值	浓度 (ng/mL)	RLU 均值	浓度 (IU/mL)	RLU 均值
0	5870	0	6575	0	3645
5	103578	3	33820	2.5	70715
10	231920	5	74630	5	139665
20	738133	10	164730	20	588635
120	6242300	100	3116265	100	2543450
500	11843705	250	10206735	500	13951855
AFP 质控品	浓度 (ng/mL)	CEA 质控品	浓度 (ng/mL)	IgE 质控品	浓度 (IU/mL)
最低检测浓度	0.08	最低检测浓度	0.14	最低检测浓度	0.11
线性范围	0~500	线性范围	0~250	线性范围	0~500
Q1 (9.7)	10.31	Q1 (11.3)	12.31	Q1 (21.0)	19.04
Q2 (118.4)	127.23	Q2 (120.6)	122.22	Q2 (113.7)	106.46

[0129] 由表8可知,本发明的化学发光底物,除了检测抗原AFP之外,也可检测其他的待测物,如CEA和IgE,同时具有良好的检测准确性、线性范围和检测灵敏度。这就表明,它适用于检测板式化学发光平台下的不同的产品。

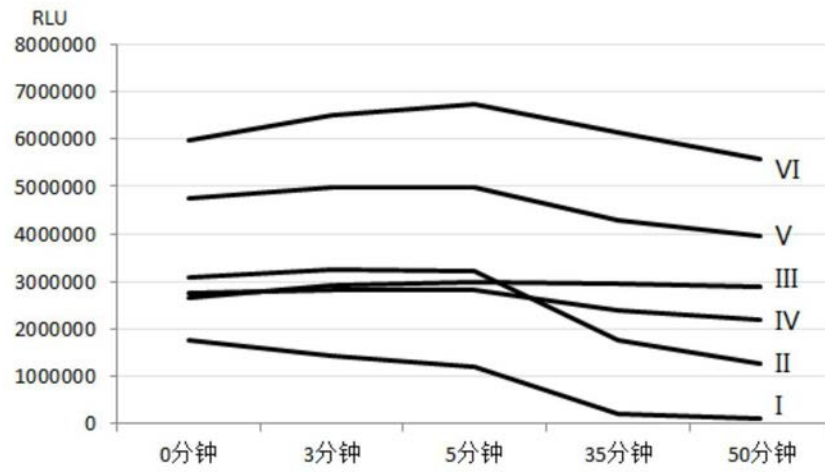


图1

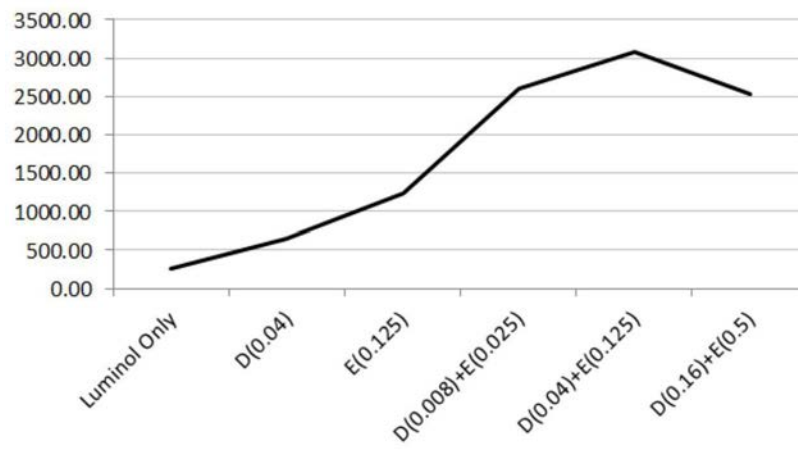


图2