

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810051303.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月18日

[11] 公开号 CN 101387645A

[22] 申请日 2008.10.22

[21] 申请号 200810051303.0

[71] 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130033 吉林省长春市东南湖大路16号

[72] 发明人 孔祥贵 张友林 曾庆辉 孙雅娟
刘晓敏

[74] 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务所
代理人 赵炳仁

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称

夹心免疫检测方法

[57] 摘要

本发明涉及生物分子检测方法，特别是一种用已知抗体定量检测相应抗原的夹心免疫检测方法，是将捕获抗体直接或间接包被在聚苯乙烯板的微孔，形成夹心发光免疫复合体，用荧光酶标仪激发并检测所形成的捕获抗体—抗原—检测抗体三层夹心发光免疫复合物的荧光强度，通过与标准溶液对比求出待测抗原的浓度，所述的检测抗体是用上转换纳米晶标记的抗待测抗原的单克隆抗体，选用发射不同光的上转换纳米晶标记针对不同抗原的抗体可同时检测同一样品中的多种抗原。具有狭窄的荧光谱峰，发射光谱可调，对化学物质和生理代谢的降解有很强的抵抗力，光漂白域值高、荧光背景低。克服了以往的夹心免疫检测法显色单一，在多种待测物同时检测方面存在的局限性。

1. 一种夹心免疫检测方法，是将捕获抗体直接或间接包被在聚苯乙烯板的微孔，形成夹心发光免疫复合体，用荧光酶标仪激发并检测所形成的捕获抗体—抗原—检测抗体三层夹心发光免疫复合物的荧光强度，通过与标准溶液对比求出待测抗原的浓度，其特征在于：所述的检测抗体是用上转换纳米晶标记的抗待测抗原的单克隆抗体，选用发射不同光的上转换纳米晶标记针对不同抗原的抗体可同时检测同一样品中的多种抗原。

夹心免疫检测方法

技术领域

本发明涉及生物分子检测方法，特别是一种用已知抗体定量检测相应抗原的夹心免疫检测方法。

背景技术

传统的免疫检测方法是双抗体夹心酶联免疫分析法（ELISA）。这类方法是将抗待测抗原的多克隆或单克隆抗体作为捕获抗体，用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的另一株单克隆抗体作为检测抗体，最后加入酶的底物，通过酶标仪检测酶作用于底物引起的颜色变化计算出待测抗原的种类及浓度。该法的灵敏度为 0.2—1 μ g/L 不等。

在上述的双抗体夹心酶联免疫分析法中，所用的标记物是酶，测量的信号是吸光度，因此导致其具有如下的缺点：操作烦琐、费时、检测周期长、显色不稳定、灵敏度低。

发明内容

本发明的目的是为克服现有技术存在的上述缺点，提出一种改进的夹心免疫检测方法，以实现多成分标记同时检测同一样品中的多种抗原成分。

本发明夹心免疫检测方法，是将捕获抗体直接或间接包被在聚苯乙烯板的微孔，形成夹心发光免疫复合体，用荧光酶标仪激发并检测所形成的捕获抗体—抗原—检测抗体三层夹心发光免疫复合物的荧光强度，通过与标准溶液对比求出待测抗原的浓度，其特点是所述的检测抗体是用上转换纳米晶标记的抗待测抗原的单克隆抗体，选用发射不同光的上转换纳米晶标记针对不同抗原的抗体可同时检测同一样品中的多种抗原。

所说的包被是利用常规的方法（ELISA）将抗待测抗原的单克隆或多克隆抗体作为捕获抗体直接或通过亲和素—生物素系统以及 protein A 或 protein G 间接固定在聚苯乙烯微孔上。

所说的三层夹心发光免疫复合体的形成是指加入待测样品后，捕获抗体—抗原先反应形成二元免疫复合物，加入检测抗体后，再通过抗原与检测抗体的特异性结合形成捕获抗体—抗原—检测抗体三层夹心的发光免疫复合体。

所说的荧光强度的检测是用荧光酶标仪激发并检测所形成的捕获抗体—抗原—检测抗体三层夹心发光免疫复合物的荧光强度，发不同光的抗体，选用不同波长的光进行检测，通常样品中待测抗原的浓度越大，被捕获抗体捕获的待测抗原的量越多，与之结合的检测抗体越多，则测得的荧光强度值越大。

上述的待测抗原可以是任何一种蛋白、肽类或其他小分子抗原，可以是 HbsAg、TNT、Ricin、Ovalbumin 等；相应的捕获抗体和检测抗体应为特异性抗每种待测抗原的多克隆或单克隆抗体，使用不同的单克隆或多克隆抗体，就可检测不同的相应的待测抗原。

上转换发光材料（Up-converting phosphor, 简称 UCP）是一种可对能量进行上转的无机合成物，即 UCP 可吸收低能量的（长波长）红外光，但却发射高能量的（短波长）可见光。UCP 是由几种稀土元素掺杂于某些晶体的晶格中构成的。在这种材料中有两种主要成分：基质材料和稀土掺杂材料。

上转换发光材料发出的磷光光子能量高于激发光，即发射波长短于激发光。具有上转换发光性能的材料是由稀土元素掺杂于晶体的晶格中而构成的化合物，其发光机理是上转换发光材料通过吸收两个红外光子发出一个可见光子。将这种上转换发光材料制备成纳米级颗粒，标记于生物分子，在红外光激发下该颗粒将发出可见光。根据光的有无及其强弱，可判断被检测生物

分子的属性及其含量。与传统标记物相比，将上转换发光材料作为标记物用于生物分析中，具有无本底干扰、无淬灭。可进行多重分析和定量分析等优点。

本发明以 UCP 纳米晶作为标记物，应用于抗原抗体特异性夹心反应的一种新型夹心免疫检测法。由于每种 UCP 纳米晶具有狭窄的荧光谱峰，选用发射不同光的 UCP 纳米晶标记针对不同抗原的抗体可同时检测同一样品中的多种待测抗原，为解决一种疾病多致病因素同时需做多次检测诊断问题提供可能。

所说的检测抗体是指用 UCP 纳米晶标记的抗待测抗原的单克隆抗体，如果捕获抗体也是抗待测抗原的单克隆抗体，这两株单抗应识别待测抗原分子上不同的抗原表位，即具有互补性，能同时结合到同一抗原分子上；UCP 纳米晶是指一种可对能量进行上转的无机合成物，即上转换纳米晶可吸收低能量的（长波长）红外光，但却发射高能量的（短波长）可见光。上转换（UCP）纳米晶以氧化物、氟化物、氯化物和硫化物为基质材料，在基质材料上进行稀土掺杂，实现上转换发光，其发光颜色因掺杂离子不同而异。

本发明与传统荧光染料标记的免疫荧光分析法相比，具有以下积极效果：具有狭窄的荧光谱峰；发射光谱可调；对化学物质和生理代谢的降解有很强的抵抗力，光漂白阈值高；荧光背景低。克服了以往的夹心免疫检测法显色单一，在多种待测物同时检测方面存在的局限性。

附图说明

图 1 是聚苯乙烯微孔中三层夹心结构的样品及其形成过程示意图；

图 2 是聚苯乙烯微孔中 protein A 或 protein G 连接层及三层夹心结构的样品及其形成过程示意图；

图 3 是用 UCP 纳米晶标记的夹心免疫法检测 HbsAg 标准曲线。

具体实施方式

本发明的三层夹心结构的样品及其形成过程可以用图 1 和图 2 形象的表述，所说的三层夹心结构就是捕获抗体—抗原—检测抗体的三层分子的夹心结构。

图 1 中，1 为 UCP 纳米晶标记的检测抗体，2 为待测抗原，3 为捕获抗体，4 为聚苯乙烯板的微孔，11 是三层夹心免疫复合物的形成。

图 2 中，5 为 UCP 纳米晶标记的检测抗体，6 为待测抗原，7 为捕获抗体，8 为 protein A，9 为聚苯乙烯板的微孔，10 为三层夹心免疫复合物的形成。三层夹心结构中，第一层为捕获抗体，第二层为待测抗原，第三层为检测抗体。

实施例 1

乙型肝炎表面抗原（HBsAg）的 UCP 纳米晶标记的夹心免疫检测

1、Yb, Er 共掺的 UCP 纳米晶标记抗 HbsAg 多克隆抗体，制备检测抗体。

方法 1：表面为羧基的 Er,Yb 共掺的纳米晶标记抗 HbsAg 多克隆抗体，制备检测抗体；

取浓度为 10^{-7} M 的 UCP 纳米晶溶液 2 mL，向 UCP 纳米晶中分别加入 20 μ L 0.05M 的 NHS 以及 20 μ L 的 0.5M 的 EDC 溶液，搅拌 30—60 分钟；之后向 UCP 纳米晶溶液中加入 10^{-5} M 的 HbsAg 多克隆抗体 20 μ L。

方法 2：表面为氨基的 Er,Yb 共掺的纳米晶标记抗 HbsAg 多克隆抗体，制备检测抗体；

取浓度为 10^{-7} M 的 UCP 纳米晶溶液 2 mL，向 UCP 纳米晶中加入 20 μ L 0.05M 的戊二醛溶液，搅拌 30—60 分钟；之后向 UCP 纳米晶溶液中加入加入 10^{-5} M 的 HbsAg 多克隆抗体 20 μ L。

2、捕获抗体的包被。

方法 1：直接将捕获抗体吸附到聚苯乙烯微孔上；

用包被缓冲液将捕获抗体稀释至 1—50 μ g/mL，每孔 100 μ L，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜

或 37℃2 小时，用磷酸盐缓冲液（PBS，10mmol/L，pH7.2-7.4，含 NaCl 8.5g/L）洗 3 次，按 200μL/孔加 3%BSA，封闭剩余的位点。

方法 2：将 protein A 或 protein G 吸附到聚苯乙烯微孔上；

用包被缓冲液将 protein A 或 protein G 稀释至 1—50μg/mL，孔 100μL，4℃冰箱过夜或 37℃2 小时，用磷酸盐缓冲液（PBS，10mmol/L，pH7.2-7.4，含 NaCl 8.5g/L）洗 3 次，按 200μL/孔加 3%BSA，封闭剩余的位点。依靠 protein A 或 protein G 与抗体的高度趋向型结合力将捕获抗体—抗原—检测抗体三元发光免疫复合体结合到聚苯乙烯微孔上。

3、捕获抗体—抗原—检测抗体夹心三元发光免疫复合体的形成。

检测抗体是能与捕获抗体同时结合到同一 HbsAg 分子上的另一株单抗，两者结合 HbsAg 分子上的不同抗原表位。

在上述的包被方式中，加入待测样品后，37℃1 小时，包被在聚苯乙烯微孔上的捕获抗体与 HbsAg 抗原特异性结合，在聚苯乙烯微孔表面形成捕获抗体—抗原二元免疫复合物，用磷酸盐缓冲液（PBS，10mmol/L，pH7.2-7.4，含 NaCl 8.5g/L）洗 3 次，去掉非特异性吸附；加入检测抗体，37℃1 小时，后者通过与 HbsAg 抗原特异性结合在聚苯乙烯微孔表面形成捕获抗体—抗原—检测抗体三元免疫荧光复合物，然后用磷酸盐缓冲液（PBS，10mmol/L，pH7.2-7.4，含 NaCl 8.5g/L）洗 3 次，去掉非特异性吸附。

4、荧光检测

UCP 纳米晶标记的夹心免疫检测法是通过检测结合到聚苯乙烯微孔上的捕获抗体—抗原—检测抗体夹心的三元免疫复合物的荧光强度来实现对待测物质的检测的。可直接显示或与标准曲线对比求出样品中 HbsAg 抗原的浓度。结合到聚苯乙烯微孔上的 UCP 纳米晶标记的检测抗体的数量不同，产生的荧光强度不同。通常捕获抗体捕获的待测抗原的量越多，与之结合的检测抗体越多，则测得的浓度或荧光强度值越多。几乎所有的荧光酶标仪都能直接显

示浓度值，如不能显示，则需绘制标准曲线：将已知 HbsAg 含量的标准溶液配制成有底至高 5 种不同浓度（1.6, 1.9, 2.2, 2.4, 和 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），用与待测标本相同的方法，即重复 2、3 步骤的操作，测定每种浓度的标准溶液对应的荧光强度，以 HbsAg 浓度为横坐标，荧光强度为纵坐标，绘制标准曲线，见图 3。

实施例 2

HbsAg 的 UCP 纳米晶标记的夹心免疫检测法的特异性。

为了说明该夹心免疫检测结果的特异性，用 BSA 代替 HbsAg 作为待测抗原进行免疫检测，重复实施例 1 的全过程。在实施例 2 中，所用的抗 HbsAg 单克隆抗体与 BSA 是非配对抗原抗体或非相关抗体，不具有选择性的识别作用，因此不能特异性结合，也不能形成三层夹心的免疫复合体，即不能测到荧光，说明待测样品中不含有 HbsAg，实验结果表明，样品中的非相关蛋白不会引起非特异性反应，该夹心免疫检测法具有高度特异性。

实施例 3

AFP 的 UCP 纳米晶标记的夹心免疫检测。

如图实施例 1 的各步操作，不同的是捕获抗体和检测抗体为抗 AFP 的单克隆或多克隆抗体，待测抗原只能是 AFP。通过检测荧光强度，直接显示或与标准曲线对比求出样品中 AFP 的浓度。

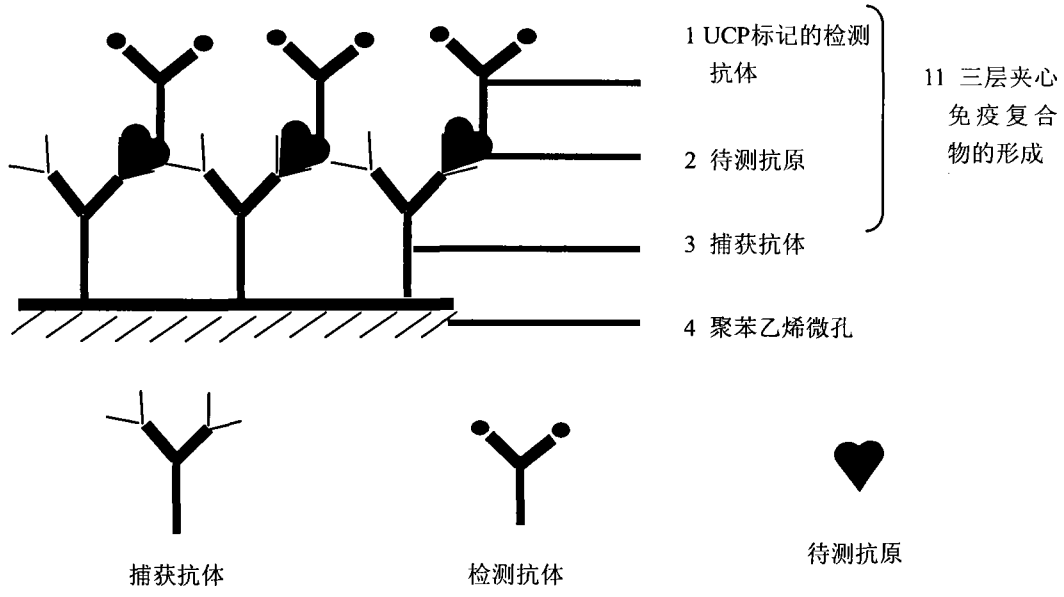


图 1

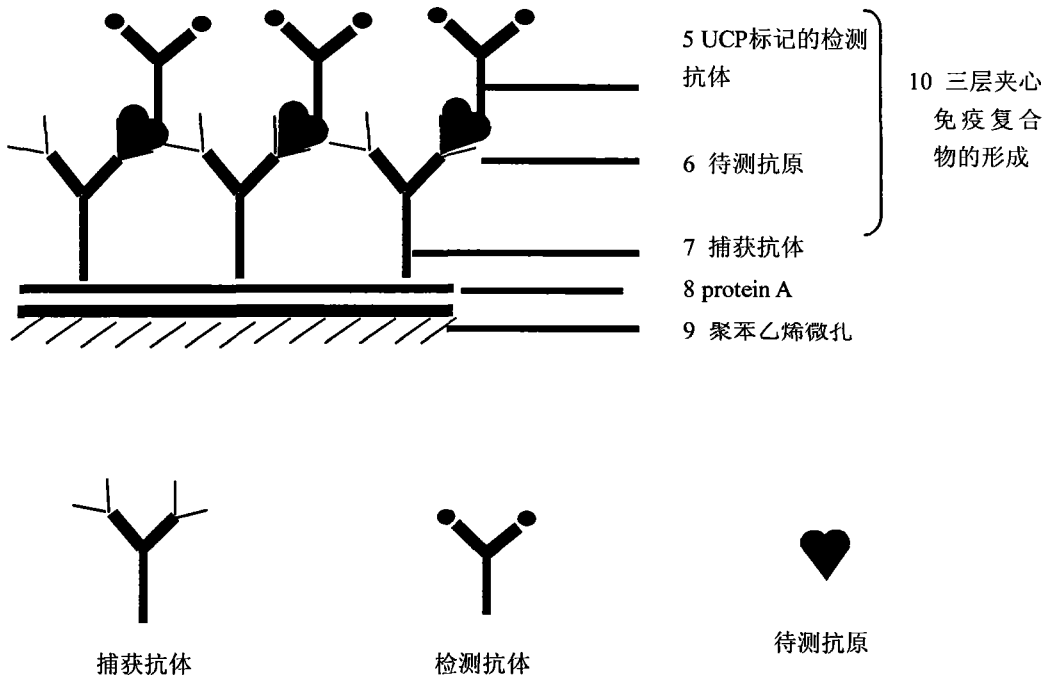


图 2

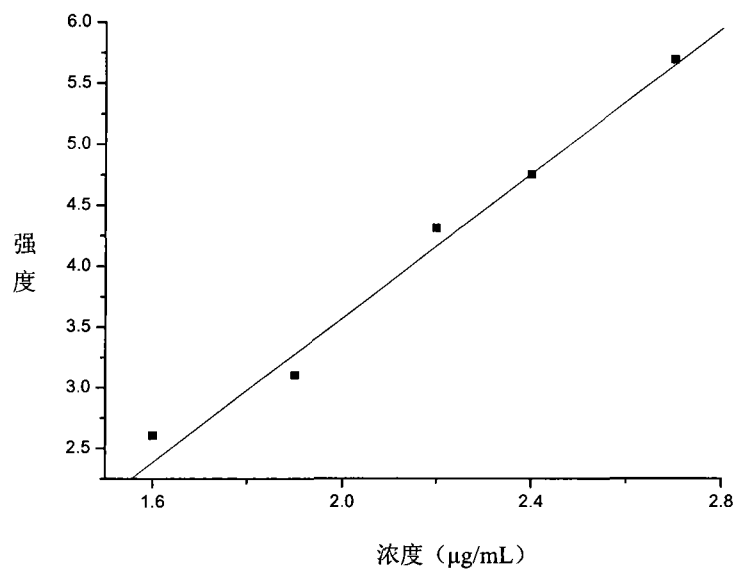


图 3