



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110456073 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 22

(21) 申请号 201910772077.3
 (22) 申请日 2019.08.21
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 110456073 A
 (43) 申请公布日 2019.11.15
 (73) 专利权人 广东菲鹏生物有限公司
 地址 523000 广东省东莞市松山湖高新技术产业开发区花莲路5号1号厂房7楼
 (72) 发明人 周峻 黄记有 潘少丽 程珍珠 池朗山
 (74) 专利代理机构 北京超凡宏宇知识产权代理有限公司 11463
 专利代理师 王焕
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/68 (2006.01)
 G01N 33/543 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 109613240 A, 2019.04.12

US 2003232386 A1, 2003.12.18
 US 6613530 B1, 2003.09.02
 CN 101287989 A, 2008.10.15
 US 6096319 A, 2000.08.01
 CN 109991405 A, 2019.07.09
 CN 109444434 A, 2019.03.08
 CN 1885039 A, 2006.12.27
 CN 101363848 A, 2009.02.11
 CN 101160413 A, 2008.04.09
 CN 108700584 A, 2018.10.23
 CN 104697988 A, 2015.06.10
 US 2008193955 A1, 2008.08.14
 US 2010311185 A1, 2010.12.09
 WO 9512126 A1, 1995.05.04
 JP 2016031334 A, 2016.03.07
 CN 101968483 A, 2011.02.09
 CN 104698172 A, 2015.06.10
 CN 109705197 A, 2019.05.03
 CN 104698184 A, 2015.06.10

审查员 李倩

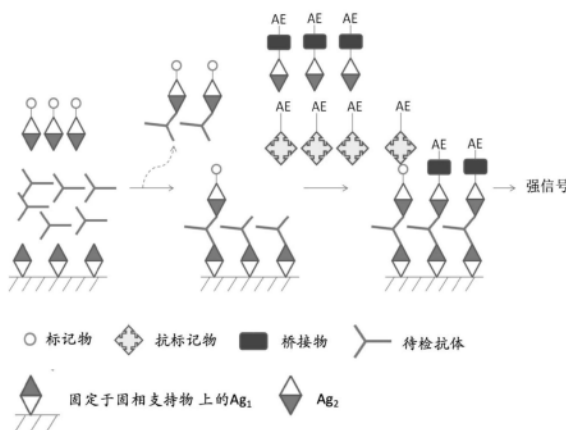
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

双抗原夹心检测抗体的方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种双抗原夹心检测抗体的方法及试剂盒。所述方法在现有“一步两步结合法”双抗原夹心的基础上进行了改进,通过形成标记物-抗标记物复合物以放大信号,本方法能够同时改善hook问题以及低浓度样本漏检问题。



1. 一种双抗原夹心检测抗体的方法,所述方法以形成第一抗原 Ag_1 -待检测抗体-第二抗原 Ag_2 的形式完成检测,其中 Ag_1 偶联有固相支持物,且所述第二抗原 Ag_2 包含两种形式,所述方法包括以下步骤:

a) 将 Ag_1 、第一形式 Ag_2 与待检物在足以发生抗体/抗原结合反应的条件接触,形成免疫复合物;

其中以摩尔数计, Ag_1 的含量多于第一形式 Ag_2 ,且所述第一形式 Ag_2 为偶联有标记物的 Ag_2 ;

b) 洗去未结合的待检测抗体;

c) 加入第二形式 Ag_2 并使其与所述免疫复合物中剩余的抗原结合位点结合;所述第二形式 Ag_2 为偶联有信号指示物的 Ag_2 ;

d) 加入偶联有信号指示物的抗标记物,所述抗标记物能够与所述标记物形成特异的标记物-抗标记物复合物并进行信号放大;

步骤c)与d)无先后顺序;

e) 检测所述标记剂,以指示所述待检测抗体的存在和/或含量;

所述标记物-抗标记物复合物中标记物/抗标记物的组合选自生物素或其衍生物/链霉亲和素、生物素或其衍生物/亲和素;

其中生物素的衍生物为D-生物素、活化生物素、生物胞素、乙二胺生物素、尸胺生物素或脱硫生物素中的任一种;

所述第二形式 Ag_2 中,标记剂偶联到 Ag_2 是通过桥接物间接实现的;

所述桥接物选自牛血清白蛋白、卵白蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、多聚赖氨酸或MPBH中的一种或多种;

在步骤c)和d)中,所述信号指示物独立的选自发色团、地高辛标记探针、电子致密物质、胶体金或酶中的任一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述固相支持物为磁珠、玻片、膜式基片或设置有加样孔的板材。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述磁珠为 γFe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,或它们与有机高分子材料的复合体。

4. 根据权利要求1所述的双抗原夹心检测抗体的方法,其特征在于,在步骤c)和d)中,所述信号指示物为吖啶酯。

5. 试剂盒,其包括权利要求1~4任一项中所定义的抗标记物、第一抗原 Ag_1 以及第二抗原 Ag_2 。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括样品预处理液、缓冲液以及显色剂中的一种或多种。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗原 Ag_1 以及第二抗原 Ag_2 为能够与疾病病原体所产生的抗体结合的抗原。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述疾病病原体包括病毒、细菌、真菌或寄生虫中的一种或多种。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述病毒包括:腺病毒科、沙粒病毒科、星状病毒科、本雅病毒科、杯状病毒科、黄病毒科、肝炎病毒科、单分子负链RNA病毒目、网巢

病毒目、小RNA病毒科、正黏液病毒科、乳头瘤病毒科、细小病毒科、多瘤病毒科、痘病毒科、呼肠孤病毒科、反转录病毒科以及披膜病毒科中的一种或多种。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在於,所述细菌包括:葡萄球菌属、链球菌属、李氏杆菌属、丹毒丝菌属、肾杆菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、分支杆菌属、放线菌属、奴卡菌属、棒状杆菌属、红球菌属中的一种或多种,和/或,炭疽杆菌、丹毒杆菌、破伤风杆菌、李氏杆菌、气肿疽杆菌结核杆菌、大肠杆菌外、变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、布氏杆菌、产气荚膜杆菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、卡他摩拉克氏菌、不动杆菌属、耶尔森菌属、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、副百日咳杆菌、志贺菌属、巴斯德菌属、霍乱弧菌以及副溶血性杆菌中的一种或多种。

11. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在於,所述真菌包括:粗球孢子菌、普赛德斯球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、杜氏组织胞浆菌、洛博芽生菌、巴西副球孢子菌、皮炎芽生菌、申克氏孢子丝菌、马尔尼菲青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙假丝酵母、曲霉菌、甄氏外瓶霉、裴氏着色霉、紧密着色霉、疣状着色霉、皮炎着色霉、白地霉、波氏足肿菌、新型隐球菌、丝孢酵母菌、米根霉、印度毛霉、伞枝犁头霉、总状共头霉、蛙粪霉、冠状耳霉、异孢耳霉、西伯鼻孢子菌、透明丝孢霉以及暗色丝孢霉中的一种或多种。

12. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在於,所述寄生虫包括:消化道内寄生虫、肝内寄生虫、肺内寄生虫、脑组织寄生虫、血管内寄生虫、淋巴管内寄生虫、肌肉组织寄生虫、细胞内寄生虫、骨组织寄生虫以及眼内寄生虫中的一种或多种。

双抗原夹心检测抗体的方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种双抗原夹心检测抗体的方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 双抗原夹心法是利用标记抗原代替间接法中的标记二抗,从方法学上解决间接法的缺陷,具有高灵敏度、高特异性和窗口期进一步缩短的特点。双抗原夹心法的常规检测模式可以分为“一步法”、“二步法”和“三步法”。因为简便、耗时短的特点,“一步法”试剂盒受到临床检测市场的青睐。但是“一步法”存在一个弊端:“钩状效应(hook效应)”,当抗体浓度过高时容易出现假阴性结果。

[0003] 在传统的一步法中,受检样本和标记抗原是同时加入,即反应体系中同时存在游离的标记抗原和受检抗体,受检抗体部分与包被抗原形成“包被抗原-抗体”复合物,部分与标记抗原形成“标记抗原-抗体”复合物。尤其当反应体系中受检抗体的含量很高时,受检抗体与游离的标记抗原形成的“标记抗原-抗体”复合物严重影响了“包被抗原-抗体-标记抗原”夹心结构的形成,从而形成钩状效应,甚至造成假阴的漏检现象。

[0004] 为了解决hook效应,申请人此前发明了一种“一步两步结合法”(CN109444434A),即第一步将包被抗原、标记抗原与待检物在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下接触,形成免疫复合物;洗去未结合的待检测抗体;第二步再次加入标记抗原并使其与所述免疫复合物中剩余的抗原结合位点结合,该方法能有效改善HOOK问题,但是当待检抗体浓度过低时仍有漏检问题出现。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种双抗原夹心检测抗体的方法,所述方法以形成第一抗原 Ag_1 -待检测抗体-第二抗原 Ag_2 的形式完成检测,其中 Ag_1 偶联有固相支持物,且所述第二抗原 Ag_2 包含两种形式,所述方法包括以下步骤:

[0007] a) 将 Ag_1 、第一形式 Ag_2 与待检物在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下接触,形成免疫复合物;

[0008] 其中以摩尔数计, Ag_1 的含量多于第一形式 Ag_2 ,且所述第一形式 Ag_2 为偶联有标记物的 Ag_2 ;

[0009] b) 洗去未结合的待检测抗体;

[0010] c) 加入第二形式 Ag_2 并使其与所述免疫复合物中剩余的抗原结合位点结合;所述第二形式 Ag_2 为偶联有信号指示物的 Ag_2 ;

[0011] d) 加入偶联有信号指示物的抗标记物,所述抗标记物能够与所述标记物形成特异的标记物-抗标记物复合物并进行信号放大;

[0012] 步骤c)与d)无先后顺序;

- [0013] e) 检测所述信号指示物,以指示所述待检测抗体的存在和/或含量。
- [0014] 上述方法能够同时改善hook问题以及低浓度样本漏检问题。
- [0015] 本发明还涉及用于实现上述方法的试剂盒。

附图说明

[0016] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,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。

[0017] 图1为本发明一个实施方式的原理示意图(信号指示物以AE为例)。

具体实施方式

[0018] 本发明涉及一种双抗原夹心检测抗体的方法,所述方法以形成第一抗原 Ag_1 -待检测抗体-第二抗原 Ag_2 的形式完成检测,其中 Ag_1 偶联有固相支持物,且所述第二抗原 Ag_2 包含两种形式,所述方法包括以下步骤:

[0019] a) 将 Ag_1 、第一形式 Ag_2 与待检物在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下接触,形成免疫复合物;

[0020] 其中以摩尔数计, Ag_1 的含量多于第一形式 Ag_2 ,且所述第一形式 Ag_2 为偶联有标记物的 Ag_2 ;

[0021] b) 洗去未结合的待检测抗体;

[0022] c) 加入第二形式 Ag_2 并使其与所述免疫复合物中剩余的抗原结合位点结合;所述第二形式 Ag_2 为偶联有信号指示物的 Ag_2 ;

[0023] d) 加入偶联有信号指示物的抗标记物,所述抗标记物能够与所述标记物形成特异的标记物-抗标记物复合物并进行信号放大;

[0024] 步骤c)与d)无先后顺序;

[0025] e) 检测所述信号指示物,以指示所述待检测抗体的存在和/或含量。

[0026] 在本发明中,第一抗原 Ag_1 和第二抗原 Ag_2 的抗原可以相同,也可以不同。

[0027] 在一些实施方式中,在步骤a)中,以摩尔比计, $Ag_1:Ag_2=6:2\sim 6:5$;也可以选择3:2或者2:1。

[0028] 合适的 Ag_1 与 Ag_2 的添加比例能在保证灵敏度的前提下避免勾状效应。根据具体的抗原抗体特性不同,该比值可能有一些差别,但经过发明人验证,绝大多数抗原均满足上述比例。

[0029] 在本发明中,“摩尔比”也可以为抗原的活性比,具有与待检测抗体结合的抗原表位的一个蛋白质可以认为是一个活性单位。

[0030] 在一些实施方式中,以摩尔比计,步骤a)中加入的 Ag_2 与步骤c)中加入的 Ag_2 的比例为6:2~6:4。

[0031] 在一些实施方式中,以摩尔比计,步骤a)中加入的 Ag_2 与步骤c)中加入的 Ag_2 的比例为2:1。

[0032] 步骤c)中的 Ag_2 以适当比例添加能够有效减少标记物的残留,以降低背景。

- [0033] 在本发明中, (抗标记物/标记物) 组合意思是能以特异性方式结合两种化合物。
- [0034] 在一些实施方式中, 所述标记物-抗标记物复合物中标记物/抗标记物的组合选自生物素或其衍生物/链霉亲和素(streptavidin), 生物素或其衍生物/亲和素(avidin), 生物素或其衍生物/中性抗生物素蛋白(NeutrAvidin), 生物素或其衍生物/抗生物素或其衍生物抗体, 半抗原/抗体, 抗原/抗体, 肽/抗体, 受体/配体, 地高辛/地高辛配基, 碳水化合物/凝集素和多核苷酸/互补的多核苷酸。
- [0035] 这些不同的组合和其他组合是已知的, 为本领域技术人员所熟知。
- [0036] 本发明优选生物素/生物素集合的蛋白家族。
- [0037] 生物素结合的蛋白家族包括上述的链霉亲和素(streptavidin)、亲和素(avidin)和NeutrAvidin蛋白, 每个蛋白都能够以高度的亲和力和特异性结合四个生物素分子。其中最常使用的是链霉亲和素, 它未经糖基化且具有很低的非特异性结合水平。亲和素则是一种高度阳离子化的糖蛋白, 等电点在10.5左右, 它的正电荷残基和低聚糖成份能够介导非特异性结合, 从而在某些应用中导致本底过高的问题。NeutrAvidin蛋白经过去糖基化处理和降低等电势点, 从而减少了其背景着色。
- [0038] 此外, 本领域技术人员公知生物素也可用其同功能衍生物所替代, 例如D-生物素、活化生物素、生物胞素、乙二胺生物素、尸胺生物素或脱硫生物素。
- [0039] 在一些实施方式中, 所述第二形式Ag₂中, 信号指示物偶联到Ag₂是通过桥接物间接实现的。
- [0040] 在一些实施方式中, 所述桥接物选自蛋白、蛋白复合物或双功能交联剂中的一种或多种。
- [0041] 在一些实施方式中, 所述桥接物选自标记物-抗标记物复合物, 所述标记物-抗标记物复合物为如上内容中所定义。
- [0042] 在一些实施方式中, 所述蛋白或蛋白复合物中含有牛血清白蛋白、卵白蛋白、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、多聚赖氨酸中的至少一种。
- [0043] 在优选的技术方案中, 桥接物选自牛血清白蛋白。牛血清白蛋白不仅为本领域所常用, 且本身具有一定的降低非特异性信号的作用, 可以增加实验的信噪比。
- [0044] 在一些实施方式中, 所述双功能交联剂选自:
- [0045] 1) MPBH(4-[4-N-maleimidophenyl]butyric acid hydrazide hydrochloride)、MPEG2A(1-[2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethyl]maleimide hydrochloride)、BMPH(N-[β-maleimidopropionic acid]hydrazide, trifluoroacetic acid salt)、EMCH(N-[ε-Maleimidocaproic acid]hydrazide, trifluoroacetic acid salt)、KMUH(N-[κ-maleimidoundecanoic acid]hydrazide, trifluoroacetic acid salt)中的任一种;
- [0046] 2) 或1) 中物质的含马来酰亚胺基团和氨基或酰肼基团的衍生物中的任一种;
- [0047] 3) 或由1)、2) 中物质组成的组。
- [0048] 在本发明中, 桥接物通常也具有放大信号的作用, 例如, 桥接物可以偶联更多的信号指示物以放大信号。
- [0049] 在本发明中, 抗原Ag₁通常被预先固定于固相支持物上, 术语“固定”意思是创建共价或非共价键。在一些实施方式中, 所述固相支持物为磁珠、玻片、膜式基片或设置有加样孔的板材。

[0050] 在一些实施方式中,所述磁珠为 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,或它们与有机高分子材料的复合体。

[0051] 在本发明中,信号指示物指能够提供被检测的信号的物质,在一些实施方式中,在步骤c)和d)中,所述信号指示物独立的选自发色团、地高辛标记探针、电子致密物质、胶体金或酶中的任一种或多种。下面非限定部分列出这些标记:

[0052] 产生可检测信号的酶,如通过比色法、荧光和发光来检测,如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

[0053] 发色团,如荧光、量子点、荧光微球、发光化合物和染料。

[0054] 具有能被电子显微镜或通过其电特性,如传导性、电流分析、电压测量和电阻等检测的电子密度的基团。

[0055] 可检测基团,如其分子大小足以诱导在其物理和/或化学特性上可检测的修饰;这种检测可通过光学方法(如衍射、表面胞质团共振,表面变异和接触变异角度)或物理方法(如原子力谱学和隧道效应)实现。

[0056] 电子致密物质,如放射性分子(如 ^{32}P , ^{35}S 或 ^{125}I)。

[0057] 在一些实施方式中,所述信号指示物为吖啶酯(AE)。

[0058] 本发明还提供试剂盒,其包括如上所定义的抗标记物、第一抗原 Ag_1 以及第二抗原 Ag_2 。

[0059] 在一些实施方式中,所述试剂盒还包括样品预处理液、缓冲液以及显色剂中的一种或多种。

[0060] 预处理液可以包括裂解液(裂解组织或细胞)、蛋白特别是抗体的提纯试剂,蛋白酶抑制剂等能够释放、纯化、保护抗体的试剂。预处理液优选不会引起抗体变性的试剂。

[0061] 在一些实施方式中,所述第一抗原 Ag_1 以及第二抗原 Ag_2 为能够与疾病病原体所产生的抗体结合的抗原;

[0062] 在一些实施方式中,所述疾病病原体包括病毒、细菌、真菌或寄生虫中的一种或多种;

[0063] 在一些实施方式中,所述病毒包括:腺病毒科(adenoviridae)、沙粒病毒科(arenaviridae)、星状病毒科(astroviridae)、本雅病毒科(bunyaviridae)、杯状病毒科(caliciviridae)、黄病毒科(flaviviridae)、肝炎病毒科(hepeviridae)、单分子负链RNA病毒目(mononegavirales)、网巢病毒目(nidovirales)、小RNA病毒科(picornaviridae)、正黏液病毒科(orthomyxoviridae)、乳头瘤病毒科(papillomaviridae)、细小病毒科(parvoviridae)、多瘤病毒科(polyomaviridae)、痘病毒科(poxviridae)、呼肠孤病毒科(reoviridae)、反转录病毒科(retroviridae)以及披膜病毒科(togaviridae)中的一种或多种;

[0064] 在一些实施方式中,所述细菌包括:葡萄球菌属、链球菌属、李氏杆菌属、丹毒丝菌属、肾杆菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、分支杆菌属、放线菌属、奴卡菌属、棒状杆菌属、红球菌属中的一种或多种,和/或,炭疽杆菌、丹毒杆菌、破伤风杆菌、李氏杆菌、气肿疽杆菌结核杆菌、大肠杆菌外、变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、布氏杆菌、产气荚膜杆菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、卡他摩拉克氏菌、不动杆菌属、耶尔森菌属、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、副百日咳杆菌、志贺菌属、巴斯德菌属、霍乱弧菌以及副溶血性杆菌中的一种或多种;

[0065] 在一些实施方式中,所述真菌包括:粗球孢子菌、普赛德斯球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、杜氏组织胞浆菌、洛博芽生菌、巴西副球孢子菌、皮炎芽生菌、申克氏孢子丝菌、马尔尼菲青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙假丝酵母、曲霉菌、甄氏外瓶霉、裴氏着色霉、紧密着色霉、疣状着色霉、皮炎着色霉、白地霉、波氏足肿菌、新型隐球菌、丝孢酵母菌、米根霉、印度毛霉、伞枝犁头霉、总状共头霉、蛙粪霉、冠状耳霉、异孢耳霉、西伯鼻孢子菌、透明丝孢霉以及暗色丝孢霉中的一种或多种;

[0066] 在一些实施方式中,所述寄生虫包括:消化道内寄生虫、肝内寄生虫、肺内寄生虫、脑组织寄生虫、血管内寄生虫、淋巴管内寄生虫、肌肉组织寄生虫、细胞内寄生虫、骨组织寄生虫以及眼内寄生虫中的一种或多种。

[0067] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0068] 实施例1

[0069] 1. 磁珠HCV抗原包被(MP-HCVAg)

[0070] 用EDC和NHS活化羧基磁珠,然后加入HCV抗原与活化的羧基磁珠共孵育偶联,磁分离除去上清,将HCV抗原包被的磁珠保存在磁珠保存液中。

[0071] 2. HCV抗原生物素标记(HCVAg-bio)

[0072] 将HCV抗原与活化的生物素(Bio-NHS)混匀反应。用透析袋进行过夜透析,回收透析袋中残余物即得到纯化的生物素标记HCV抗原。

[0073] 3. 链酶亲和素AE标记(SA-AE)

[0074] 将链酶亲和素与活化的吡啶酯(AE-NHS)混匀反应。用透析袋进行过夜透析,回收透析袋中残余物即得到纯化的链酶亲和素AE标记物(SA-AE)。

[0075] 4. 牛血清白蛋白AE标记(BSA-AE)

[0076] 称取BSA固体,加缓冲液溶解。向BSA溶液中加入活化的吡啶酯(AE-NHS)。室温条件下反应。用透析袋过夜透析样品。回收透析袋中残余物即得到牛血清白蛋白AE标记物(BSA-AE)。

[0077] 5. 马来酰亚胺活化酯活化BSA-AE

[0078] 向BSA-AE样品中加入马来酰亚胺活化酯活化。将样品转入透析袋透析。回收透析袋中残余物即得到马来酰亚胺活化的BSA-AE。

[0079] 6. HCVAg-BSA-AE的偶联

[0080] 将马来酰亚胺活化的BSA-AE样品与HCVAg样品混合反应。将样品转入透析袋透析,回收透析袋中剩余物即得到HCV抗原AE交联物(HCVAg-BSA-AE)。

[0081] 7. HCVAg-MPBH-AE制备

[0082] MPBH与AE活化酯混合反应。加入BSA反应除去未反应的AE活化酯。将MPBH-AE偶联物与HCVAg样品混合反应。将样品转入透析袋透析,回收透析袋中剩余物即得到HCV抗原AE标记物(HCVAg-MPBH-AE)。

[0083] 实施例2

[0084] 在本实施例中,如无特殊说明,各组均基于一歩两步结合法,关于该方法的技术细

节可参照现有技术:中国专利CN109444434A,公开日2019年03月08日。

[0085] 以(1)中的B模式为例:

[0086] 其检测流程为:

[0087] 1) 取待测样本(含HCV抗体)50uL加入包被HCV抗原的磁性微球50uL,同时加入生物素标抗原50uL,37°C孵育15min;

[0088] 2) 加入磁场进行磁分离,去上清;

[0089] 3) 洗涤4次,每次250uL洗液,重复步骤2操作;

[0090] 4) 加入SA-AE(Ag-BSA-AE)混合试剂100uL,37°C孵育10min;

[0091] 5) 加入磁场进行磁分离,去上清;

[0092] 6) 洗涤4次,每次250uL洗液,重复步骤4操作;

[0093] 7) 每孔先加入光激发A液(含H₂O₂)100uL,再加入光激发液B液(含NaOH)100uL,滴加的同时用闪光光子计数器测量各孔的相对发光单位(RLU),测量时间1秒/孔。

[0094] 8) 以阴性对照RLU平均值的4倍作为阈值(cutoff值),各孔的RLU值与阈值比较,样品测定值大于等于阈值,则判断为阳性,否则为阴性。

[0095] (1)hook问题解决效果对比

[0096] 3次试验结果如下所示:

项目	模式		
	A 模式	B 模式	C 模式
1/10	2.01E+06	5.67E+06	5.82E+06
1/100	3.64E+06	3.35E+06	1.22E+06
1/12k	84560	71903	24592
1/24k	34194	34936	14934

项目	模式		
	A 模式	B 模式	C 模式
1/10	2.02E+06	5.57E+06	4.35E+06
1/100	3.45E+06	3.11E+06	1.27E+06
1/12k	74356	76284	25386
1/24k	33402	35991	13802

项目	模式		
	A 模式	B 模式	C 模式
1/10	2.02E+06	6.01E+06	5.56E+06
1/100	3.34E+06	3.20E+06	1.11E+06
1/12k	89160	79737	19343
1/24k	37012	49548	14914

[0100] 注:第一纵列为不同稀释度的阳性质控血。

[0101] A模式:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反

应加入一定量SA-AE,用于提供信号(RLU值)。

[0102] B模式:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-BSA-AE混合物,用于提供信号(RLU值)。

[0103] C模式:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-BSA-AE,初步形成夹心;第二步反应加入一定量Ag-BSA-AE,两步共同提供信号(RLU值)。

[0104] 其中,Ag-Bio、Ag-BSA-AE都是足以与待检测抗体充分反应的量,SA-AE的量也足以与Ag-Bio充分反应,即其加入的量是过量的。下面的其他实验同理。

[0105] 结果:A、B和C检测模式数据对比,当阳性样本浓度增大到一定值时,A模式信号值发生下降,B和C模式浓度与信号值依然保持正相关。结果表明“一步两步法”是一种有效的解决hook现象的方法。

[0106] (注:包被抗原:包被有HCV抗原的磁珠;Ab:抗体;Ag-Bio:生物素化HCV抗原;SA-AE:链酶亲和素AE标记物;Ag-BSA-AE:HCV抗原牛血清白蛋白AE标记物;Ag-MPBH-AE:HCV抗原-MPBH-AE标记物;下同)

[0107] (2)低值问题解决效果对比

[0108] 3次试验结果如下所示:

[0109]

项目 \ 模式	B 模式	C 模式
1/24k (P)	34936	14934
阴性血清均值 (N)	6925	9883
P/N 值	5.0	1.5

[0110]

项目 \ 模式	B 模式	C 模式
1/24k	35991	13802
阴性血清均值	6188	10539
P/N 值	5.8	1.3

[0111]

项目 \ 模式	B 模式	C 模式
1/24k	49548	14914
阴性血清均值	6815	7098
P/N 值	7.3	2.1

[0112]

1/24k	49548	14914
阴性血清均值	6815	7098
P/N 值	7.3	2.1

[0113] 注:“1/24K”表示稀释 2.4×10^4 倍的阳性质控血。

[0114] B模式:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-BSA-AE混合物,用于提供信号(RLU值)。

[0115] C模式:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-BSA-AE,初步形成夹心;第二

步反应加入一定量Ag-BSA-AE混合物,两步共同提供信号。

[0116] 结果:P/N值数据表明检测灵敏度B模式>C模式。结果表明在“一步两步法”的基础上,采用两种不同桥连标记体系联用,特别是HCVAg-bio-标记物与HCVAg-BSA-标记物联用,能同时改善hook问题以及低浓度样本漏检问题,比单用一种桥连标记体系(如Ag-BSA-AE)的检测灵敏度高。

[0117] (3)桥连体系

项目	组合		
	A 组合	B 组合	C 组合
1/24k	36998	31535	26112
阴性血清均值	5340	5437	5208
P/N 值	6.9	5.8	5

[0119] 注:“1/24K”表示稀释 2.4×10^4 倍的阳性质控血。

[0120] A组合:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-BSA-AE混合物,用于提供信号(RLU值)。

[0121] B组合:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-MPBH-AE混合物,用于提供信号。

[0122] C组合:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-Bio/SA-AE混合物,用于提供信号。

[0123] (4)组合物中抗原AE标记方式效果比较

项目	标记方式		
	Ag-BSA-AE	Ag-MPBH-AE	Ag-AE
1/24k	14130	12200	34363
阴性血清均值	2658	2990	22546
P/N 值	5.3	4.1	1.5

[0125] 注:“1/24K”表示稀释 2.4×10^4 倍的阳性质控血。

[0126] 第2列数据测试步骤:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-BSA-AE混合物,用于提供信号(RLU值)。

[0127] 第3列数据测试步骤:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-MPBH-AE混合物,用于提供信号。

[0128] 第4列数据测试步骤:第一步反应加入包被抗原、血清和一定量Ag-Bio,初步形成夹心;第二步反应加入一定量SA-AE和Ag-AE混合物,用于提供信号。

[0129] 结果:P/N值大小顺序是Ag-BSA-AE>Ag-MPBH-AE>Ag-AE。结果表明,采用两种桥连体系时,与Ag-Bio/SA-AE联用的另一种桥连标记体系,以间接桥连方式比直接标记方式好。

[0130] (5)高值和低值样本检测

[0131] 选取20例阴性样本和20例阳性样本同时采用几种反应模式进行检测,均值各孔的RLU值与CUTOFF比较,样品测定值 $\geq 20 \times$ 阴性质控,则判断为阳性,否则为阴性,以+表示阳性,-表示阴性,结果如下:

[0132]

	方法学	传统一步法		一步两步法		本发明方法 (Bio+BSA)		本发明方法 (Bio+MPBH)	
	样本编号	结果 COI	判定	结果 COI	判定	结果 COI	判定	结果 COI	判定
阴性	N1	1.02	-	0.95	-	0.97	-	0.83	-
	N2	1.42	-	1.25	-	1.34	-	1.18	-
	N3	1.20	-	1.32	-	1.02	-	1.13	-
	N4	1.05	-	1.37	-	1.58	-	1.46	-
	N5	1.16	-	0.83	-	0.74	-	0.82	-
	N6	0.83	-	1.02	-	1.38	-	1.09	-
	N7	0.69	-	0.75	-	0.83	-	0.79	-
	N8	0.96	-	1.41	-	1.30	-	1.37	-
	N9	1.18	-	1.25	-	1.43	-	1.38	-
	N10	0.97	-	1.35	-	1.29	-	1.38	-
	N11	1.37	-	1.11	-	1.16	-	1.12	-
	N12	1.38	-	1.33	-	1.23	-	1.15	-
	N13	1.27	-	0.71	-	0.68	-	0.75	-
	N14	1.37	-	1.06	-	1.18	-	1.06	-
	N15	1.05	-	0.93	-	0.56	-	0.87	-
	N16	1.46	-	0.62	-	0.55	-	0.71	-
	N17	0.49	-	0.87	-	0.91	-	0.83	-
	N18	0.97	-	0.72	-	0.84	-	0.69	-
	N19	0.99	-	1.28	-	1.07	-	1.23	-
	N20	0.98	-	1.19	-	1.30	-	1.27	-
阳性	P1	135.93	+	207.21	+	216.83	+	237.74	+
	P2	10.46	-	343.83	+	512.85	+	502.56	+
	P3	54.34	+	95.65	+	94.95	+	97.03	+
	P4	53.66	+	93.04	+	92.13	+	93.11	+
	P5	8.5	-	11.13	-	23.74	+	20.65	+
	P6	64.69	+	104.56	+	103.65	+	102.37	+
	P7	271.44	+	212.48	+	206.03	+	215.35	+
	P8	44.21	+	131.62	+	121.24	+	101.55	+
	P9	44.69	+	82.74	+	92.23	+	88.38	+
	P10	301.59	+	253.62	+	243.45	+	241.77	+
	P11	163.08	+	243.53	+	253.64	+	247.28	+
	P12	9.19	-	20.32	+	33.16	+	29.37	+
	P13	131.70	+	208.81	+	232.75	+	219.43	+
	P14	341.20	+	254.12	+	267.48	+	259.73	+
	P15	8.65	-	337.14	+	529.35	+	537.22	+
	P16	110.29	+	157.03	+	177.61	+	166.34	+
	P17	26.84	+	37.03	+	47.62	+	43.59	+
	P18	395.17	+	231.16	+	271.23	+	241.38	+
	P19	137.41	+	238.95	+	228.23	+	218.76	+

[0133]

	P20	30.19	+	53.77	+	64.83	+	73.95	+
--	-----	-------	---	-------	---	-------	---	-------	---

[0134] 以上结果表明,本发明方法既可以解决一步法的hook漏检问题,又可以在一步两步法的基础上进一步降低弱阳标本的漏检概率(如样本P5),提高检测灵敏度。

[0135] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

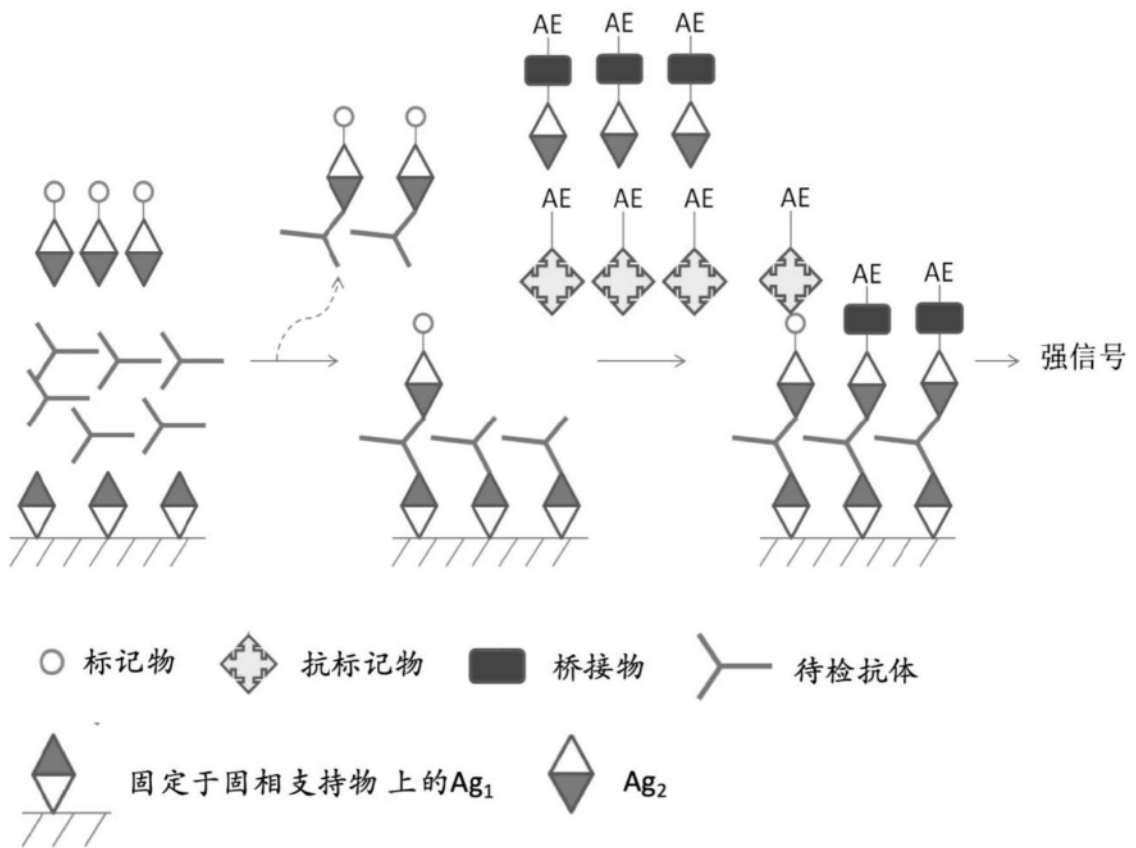


图1