



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101706499 A

(43) 申请公布日 2010.05.12

(21) 申请号 200910172505.5

(22) 申请日 2009.11.06

(71) 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450001 河南省郑州市郑州国家高新技术
产业开发区银屏路 38 号

(72) 发明人 王云龙 李玉林 李恒思 王继美
王国强

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

FLAG 融合标签胶体金检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种胶体金试剂的制备及对融合标签的快速检测,属生物科研领域中 FLAG 融合标签的检测试剂。本发明采用双抗体夹心法免疫测定原理,将纯化的 Flag 单克隆抗体和 Flag 多克隆抗体分别作为胶体金结合抗体和包被抗体,对采用 FLAG 作为融合标签的基因工程表达蛋白进行快速检测。

1. 一种胶体金试剂的制备及对融合标签 Flag 的快速检测,其特征为:采用双抗体夹心法免疫测定原理,将纯化的 Flag 抗体分别作为胶体金结合抗体和包被抗体。当待检样本中含有采用 FLAG 作为融合标签的基因工程表达蛋白时,先和金标记抗体结合,由于层析作用反应复合物沿硝酸纤维膜向前移动,当遇到包被抗体时形成 Ab-Ag-Ab-Au 复合物而富集在包被线上,形成紫红色沉淀线。同时在包被膜上还有一条质控线,故当有两条紫红色线时判为阳性,只有一条紫红色线时,判为阴性。

2. 如权利要求 1 所述的 Flag 抗体,其中包括一种或多种 Flag 的单抗或多抗的混合或经过修饰的 Flag 抗体 Fab'、Fab、F(ab')₂ 片段及基因工程 Flag 抗体,其特征在于,可与 Flag 标签特异反应。

FLAG 融合标签胶体金检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体而言,涉及一种胶体金试剂的制备及对融合标签的快速检测,属生物科研领域中 FLAG 融合标签的检测试剂。

[0002] 发明背景

[0003] 融合标签是一种含有八个氨基酸的短肽 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), 作为融合标签在基因工程蛋白表达中广泛应用。随着免疫分析日益广泛应用,免疫分析向两个方向发展:一类为全自动化的免疫分析,另一类为以硝酸纤维素膜为载体的快速免疫分析。前者需要价格昂贵的全自动仪器及与仪器严格配套的各种试剂盒,受条件要求较高。随着方便、快速、大众化检测的需要,在酶免疫分析的基础上主要以硝酸纤维素膜为载体的免疫胶体金快速诊断技术迅速和广泛地发展起来。这种方法的基本原理是以微孔滤膜为载体,包被已知抗原或抗体,加入待检标本后,经滤膜的毛细管作用或渗滤作用使标本中的抗原或抗体与膜上包被的抗体或抗原结合,再用胶体金结合物标记达到检测目的。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种 FLAG 融合标签胶体金检测试纸条。

[0005] 本发明的另一目的是提供一种 FLAG 融合标签胶体金检测试纸条的制备方法。

[0006] 本试纸条采用双抗体夹心法免疫测定原理,将纯化的 Flag 单克隆抗体和 Flag 多克隆抗体分别作为胶体金结合抗体和包被抗体。用于替代酶免对采用 FLAG 作为融合标签的基因工程表达蛋白进行快速检测,检测速度达到酶免的 5 倍,并且不使用任何检测仪器。

[0007] 本发明是这样实现的:本试纸条采用双抗体夹心法免疫测定原理,将纯化的 Flag 单克隆抗体和 Flag 多克隆抗体分别作为胶体金结合抗体和包被抗体。当待检样本中含有采用 FLAG 作为融合标签的基因工程表达蛋白时,先和金标记抗体结合,由于层析作用反应复合物沿硝酸纤维素膜向前移动,当遇到包被抗体时形成 Ab-Ag-Ab-Au 复合物而富集在包被线上,形成紫红色沉淀线。同时在包被膜上还有一条质控线,故当有两条紫红色线时判为阳性,只有一条紫红色线时,判为阴性。

[0008] 本发明的积极效果:

[0009] 1、快捷迅速,大大缩短出结果时间。胶体金免疫层析法出结果的时间在几分钟之内,这是目前其它快速检测方法所无法达到的。

[0010] 2、灵敏准确。免疫胶体金快速诊断方法并不因为其快速而牺牲了它的特异性和敏感性。

[0011] 3、安全简便,不需任何仪器和设备。免疫胶体金检测方法不需任何仪器和设备,只需制备好的测试条或试剂盒即可;更由于胶体金本身具有颜色,比 ELISA 省略了加显示剂和终止液的步骤,大大简化了操作,更适合现场应用。因为没有诸如放射性同位素、邻苯二甲胺等有害物质参与,所以也不会污染环境,具有放射性同位素或酶标等检测方法所无法比拟的安全性。

[0012] 4、试剂稳定,外界因素影响较小。胶体金标记蛋白质时金颗粒与蛋白分子之间的

结合属于物理吸附过程,所以整个标记过程对蛋白质的生物活性影响很小,易获得较高的标记率;胶体金不属于生物活性物质,干扰检测结果的因素将大大减少,所以试剂非常稳定,受温度等外界因素影响较小,可在室温存放。

[0013] 5、成本低廉,所需试剂和样本量少。因为“免疫浓缩”,样本量可低至 10-20u1;再加上无需任何仪器和设备,并可单份标本检测,使成本大幅下降。

附图说明

[0014] 无。

具体实施方式

[0015] 1、柠檬酸三钠法制备 12-30nm 胶体金取 250ml 三角瓶一个,加 100ml 双蒸水及 1ml 1%氯化金,加热沸腾;将 1.5ml 的 1%柠檬酸钠加入上述溶液中。混匀,再保持沸腾 30min,溶液颜色首先变黑,再逐渐变红。

[0016] 2、蛋白与胶体金结合最佳 pH 测定

[0017] (1) 取若干个 1.5ml 试管,分别加入 1ml 10nm 胶体金;

[0018] (2) 用 25mM K₂CO₃ 将 pH 分别调为 3,4,5,6,7,8,9,10;

[0019] (3) 取一 96 孔培养板,按 pH 从低到高分别将上述胶体金分别取 100u1 加入孔中,重复三次;

[0020] 每孔分别加入 3u1 浓度为 1mg/ml 的 Flag 抗体,混合,室温下放置 10-15min;

[0021] 每孔分别加入 20u1 浓度为 10% NaCl 溶液,混合,室温下放置 10min;

[0022] 观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低 pH;观察胶体金颜色变化直到室温下放置 2 小时,记录仍保持红色的最低 pH。

[0023] 3、最小蛋白浓度的确定

[0024] (1) 用 0.22m 微孔滤膜过滤或高速离心去除蛋白中残物或多聚体;

[0025] (2) 取一 96 孔滴定板,每个重复为若干个孔,分别加入最佳 pH 的胶体金 100u1,重复 3 次;

[0026] (3) 各孔依次加入不同量的蛋白(一般浓度为 0.05-0.1mg/ml)1~20u1,混匀,室温下放置 15min;

[0027] (4) 加入 20u1 10% NaCl,室温下放置 10min;颜色仍保持红色的最小蛋白用量即最小蛋白浓度。

[0028] 4、金标垫制备

[0029] (1) 取两个 1.5ml 试管,分别加入 1.2ml 10nm 胶体金;

[0030] (2) 加入适量 25mM K₂CO₃ 把 pH 调整为 9.0;

[0031] (3) 分别加入 10u1 浓度为 1mg/ml IgG,混匀,室温放置 10min;

[0032] (4) 分别加入 12u1 2% PEG20000,室温放置 5min;

[0033] (5) 10000rpm 离心 20min,轻轻吸除上清;

[0034] (6) 用 20u1 50mM PBS, pH 7.0,,内含 1% BSA,0.02% PEG20000,100mMNaCl,1% NaN₃ 溶液重悬浮松散的胶体金沉淀,并集中到新管中。

[0035] (7) 按照每毫升金子铺 10cm² 玻璃纤维进行喷金后放置 37℃干燥,干燥时间设定

120 分钟。

[0036] 5、划膜

[0037] 将Flag 多克隆抗体用0.01mol/L pH7.2的磷酸盐缓冲液稀释至0.5mg/ml,按照每毫升划100cm进行包被。

[0038] 临床检测过程中,样本中的胆红素、血红蛋白以及血脂等常常对诊断结果有一定的影响,本试验将验证胆红素、血红蛋白以及血脂对乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒(胶体金法)的检测结果是否有影响。

[0039] 6、组装成试纸条

[0040] (1) 在试纸条的磁白板上依次粘贴如下组分:

[0041] ①吸水纸,

[0042] ②玻璃纤维膜,膜上吸附着干燥的金标抗体,

[0043] ③硝酸纤维素膜,膜上包被着抗体条带和能与标记物直接起反应的质控条吸水纸(手柄)。

[0044] ④上下不干胶。

[0045] (2) 组装完成后用切刀将其切成5mm的纸条,放入试纸盒中,压盖组成检测卡,连同一个干燥剂放入铝箔袋中,一袋一份。

[0046] 7、检测

[0047] (1) 从原包装铝箔袋中取出试剂条,在1小时内应尽快地使用。

[0048] (2) 将试剂条按箭头方向插入标本中。注意:标本液面不能超过试剂条的标记线。

[0049] (3) 至少10秒钟后取出平放于干净平整的台面上;亦可以不取出,一直放在标本收集容器中直到读结果。

[0050] (4) 等待紫红色条带的出现,测试结果应在5-10分钟内读取。20分钟左右观察结果无效。阴性时试纸条仅在质控线(C)位置上出现一条紫红色条带;阳性时试纸条在检测线(T)和质控线(C)位置上各出现一条紫红色条带;无效时试纸条在检测线(T)和质控线(C)位置上均未出现紫红色条带。