



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103760350 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201410008407. 9

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所  
(普通合伙) 32104

(22) 申请日 2014. 01. 09

代理人 时旭丹 刘品超

(71) 申请人 朱宝

地址 214023 江苏省无锡市清扬路 299 号无  
锡市人民医院

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

申请人 谢国强

肖华龙

黄飏

邵科晶

许亚丰

张艺

蒋孟军

(72) 发明人 朱宝 谢国强 肖华龙 黄飏

邵科晶 许亚丰 张艺 蒋孟军

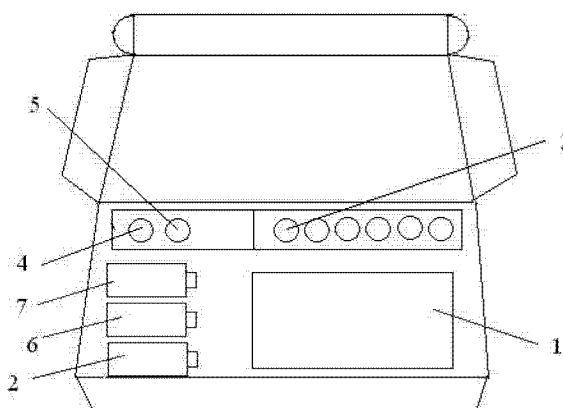
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析技术领域。其采用生物素-亲和素系统 TRFIA 检测乙酰肝素酶 HPA,测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有纯化的 HPA 单克隆抗体,加入 HPA 标准或样品,再加入生物素标记的 HPA 抗原;加入  $\text{Eu}^{3+}$ -亲和素,标记免疫反应后没有连接的  $\text{Eu}^{3+}$ -亲和素被洗涤除去。加增强液后,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的 HPA 浓度成反比,对照标准曲线即可确定被测样品中 HPA 的含量。本发明提供的检测 HPA 试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,用于对血清、血浆、胸水、腹水、组织培养物上清液以及组织裂解液中 HPA 含量的检测。



1. 一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于:试剂盒由以下部分:包被板(1),缓冲液(2),6×HPA 标准液(3),生物素标记的 HPA (4),铕标记的亲合素(5),洗涤液(6)和增强液(7)所组成;

所述包被板(1)直接放置于试剂盒中,缓冲液(2)、洗涤液(6)和增强液(7)依次排列位于包被板(1)的一侧;生物素标记的 HPA (4),铕标记的亲合素(5)以及 6×HPA 标准液(3)均依次排列安放于试剂架上,所述试剂架同样放置于试剂盒中。

2. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于所述包被板(1)的制备如下:包被板(1)包被固相 HPA 单克隆抗体,用 50mmol/L pH 9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液将 HPA 单克隆抗体稀释至 0.5mg/L 作为包被液,96 孔或 48 孔微孔板各孔加 100  $\mu\text{L}$ ,4℃放置过夜;弃去包被液,用洗涤液(6)洗涤两次;然后加 200  $\mu\text{L}$ /孔小牛血清封闭过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃冷冻保存待用。

3. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于:按质量百分比计所述缓冲液(2)的制备如下:8mmol/L NaCl、0.1% BSA、50  $\mu\text{mol/L}$  二乙烯三胺五乙酸、0.1mL/L Tween-80 和 0.1%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl。

4. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于:6×HPA 标准液(3)的制备如下:从 HPA 纯品中稀释得到,稀释液为 0.01 mmol/L、pH 7.4 的 PBS,共 6 瓶,1.0mL/瓶,每瓶的 HPA 浓度分别为:0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL。

5. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于生物素标记的 HPA (4)的制备如下:将 HPA 溶解于 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 、pH8.5 缓冲液中,加入经二甲基甲酰胺溶解的 N-羧琥珀酰亚胺 NHSB 活化生物素,即 NHSB 50 $\mu\text{L}$ ,其中 NHSB 的浓度为 20g/L;室温反应 4h 后,用预先经 0.9%NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl、pH7.8 的缓冲液平衡过的 Sephadex G-50 进行柱层析,紫外  $A_{280}$  检测收集洗脱蛋白质峰,稀释、分装并置 -20℃保存。

6. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于铕标记的亲合素(5)的制备如下:将亲合素经 PD-10 柱转换缓冲条件至 pH 9.0,洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L pH8.5 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液,收集蛋白峰,取已转换的亲合素用上述洗脱液稀释亲合素至 2g/L;加入 0.2-0.4mg 的  $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸}$ ,反应过夜,反应液经柱层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用。

7. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于洗涤液(6)的制备如下:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl。

8. 根据权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于增强液(7)的制备如下:含 15 $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮、50 $\mu\text{mol/L}$  三正辛基氧化膦和 1mL/L 曲拉通 X-100 的 pH 3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液。

9. 权利要求 1 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,其特征在于:取包被有 HPA 单克隆抗体的包被板(1),加入 50 $\mu\text{L}$  HPA 标准液(3)或处理好的样品到各自的微孔中;加 50 $\mu\text{L}$  以缓冲液(2)1:100 稀释的生物素标记的 HPA(4),37℃反应 1 小时,用洗涤液(6)洗涤三次;加以缓冲液(2)1:100 稀释的 100 $\mu\text{L}$  铕标记的亲合素(5),37℃

反应 45 分钟,洗涤液(6)洗五次;加 100 $\mu$ L 增强液(7),5 分钟后测量荧光强度 cps,以加入 HPA 标准的检测数据绘制标准曲线,以加入被测样品的检测数据从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。

10. 根据权利要求 9 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,其特征在于:所述样品的处理方法具体如下:

a、全血标本:全血标本放置 2 小时后于 1000g 离心 15 分钟,取上清液即可检测,或进行分装,并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,但应避免反复冻融,解冻后的样本应再次离心,然后检测;

b、血浆标本:采用 EDTA 作为抗凝剂,标本采集后 30 分钟内于  $2-8^{\circ}\text{C}$  1000g 离心 15 分钟,取上清液即可检测,或进行分装,并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,但应避免反复冻融,解冻后的样本应再次离心,然后检测;

c、胸、腹水标本:标本于  $2-8^{\circ}\text{C}$  4000g 离心 10 分钟,仔细收集上清液,如有沉淀,可再次离心;取上清液立即用于检测,或分装后放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,但应避免反复冻融,解冻后的样本应再次离心,然后检测;

d、细胞培养物上清液:标本于 1000g 离心 15 分钟,取上清液即可检测,或进行分装,并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,但应避免反复冻融,解冻后的样本应再次离心,然后检测;

e、组织裂解液:取 100mg 组织,用缓冲液(2)洗去血污,剪成小块放入组织研磨器或匀浆管中,加入 1mL 缓冲液(2),制成匀浆,然后置于  $-20^{\circ}\text{C}$  过夜;经反复冻融 2 次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆于  $2-8^{\circ}\text{C}$  5000g 离心 5 分钟,取上清液即可检测,或进行分装,并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,但应避免反复冻融,解冻后的样本应再次离心,然后检测。

## 一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 一种乙酰肝素酶 (HPA) 的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其检测方法,具体涉及对血清、血浆、胸水、腹水、组织培养物上清液以及组织裂解液中乙酰肝素酶(简称 HPA)含量的检测,属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域。

### 背景技术

[0002] 乙酰肝素酶 (Heparanase , HPA) 是目前为止在哺乳动物中发现的唯一可以降解硫酸肝素蛋白聚糖 (HSPG) 上硫酸乙酰肝素 (HS) 侧链的水解酶,HPA 活化与肿瘤生长、血管新生、炎症和自身免疫相关。与大多数蛋白酶能裂解位于细胞外基质的多肽不同,该酶倾向于在细胞内降解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素侧链。HPA 可不依赖细胞外基质降解而发挥非酶活性作用,调节与组织重塑、血管新生及细胞浸润相关的细胞外微环境。

[0003] HPA 能破坏基质分子筛的结构,降低基质的防御屏障功能,使肿瘤浸润扩散,近年来研究结果显示越来越多的癌症组织中有 HPA 的表达上调,HPA 在多种恶性肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用,其表达与肿瘤的发生、发展、局部侵犯和远处转移呈正相关,与术后的生存率呈负相关,提示 HPA 作为肿瘤的侵袭和转移预后标志物的可能。

[0004] HPA 检测技术主要为:免疫组化、RT-PCR、Western blot 和 ELISA 等检测法。这些方法大都需要通过手术等方法从患者身上取得肿瘤标本或癌旁组织,给患者带来较大的身体损伤和心理负担。常因取材部位、取样大小、非特异性反应及人为因素造成很大误差。RT-PCR 虽然解决了灵敏度、准确性和标准化问题,但它存在着需要贵重仪器,操作繁琐,对待检样品预处理要求高,使用多种毒性有机溶剂,检测成本高等缺点。酶联免疫检测法 (ELISA),取材方便,方法简单,容易操作。尽管如此,ELISA 存在标记酶分子较大,活性易受环境因素的影响从而降低检测的灵敏度和精密度,且测量范围窄。

[0005] 时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 是上世纪八十年代初发展起来的新的免疫测定技术。TRFIA 以其操作简便、快速,标记物制备简便和有效期长,标准曲线剂量范围宽,不污染环境,自动化程度高,适合临床大量样品的检测等多种优点,是一项具有广泛应用前景的超灵敏度检测方法。其原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂,其一端和镧系元素结合,另一端和亲和素分子上的自由氨基联接,制成  $\text{Eu}^{3+}$  标记亲和素,它与待测样品中的生物素形成复合物。理想情况下,测定复合物中镧系元素的荧光强度就能确定样品中抗原的量,但实际上这种复合物的荧光强度相当弱,只有再加入一种增强溶液 (Enhancement solution),使镧系元素从复合物中解离下来,并与增强液中所含的  $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮 ( $\beta$ -NTA) 重新形成微胶囊,在紫外等光的激发下发射很强的荧光,增强效果上百万倍。用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,即可确定样品中抗原的量。

[0006] 采用生物素-亲和素 (BSA) 信号放大系统结合建立宽范围的 TRFIA 检测方法,其特点是,亲和素与生物素专一性结合,其亲和力为抗原-抗体反应的 (10 ~ 100) 万倍。因不含寡聚糖基,故能降低非专一性结合,减少背景,提高检测的分辨率。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种检测 HPA 的试剂盒及其检测方法,用于对血清、血浆、胸水、腹水、组织培养物上清液以及组织裂解液中 HPA 含量的检测。

[0008] 本发明的技术方案:一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,试剂盒由以下几个部分:包被板 1,缓冲液 2,6×HPA 标准液 3,生物素标记的 HPA4,铕标记的亲合素 5,洗涤液 6 和增强液 7 所组成;

所述包被板直接放置于试剂盒中,缓冲液、洗涤液和增强液从上到下依次排列位于包被板的一侧;生物素标记的 HPA,铕标记的亲合素以及 6×HPA 标准液均依次排列安放于试剂架上,所述试剂架同样放置于试剂盒中。

[0009] 所述包被板的制备如下:包被板包被固相 HPA 单克隆抗体,用 50mmol/L pH 9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液将 HPA 单克隆抗体稀释至 5mg/L 作为包被液,96 孔或 48 孔微孔板各孔加 100  $\mu\text{L}$ ,4°C 放置过夜;弃去包被液,用洗涤液洗涤两次;然后加 200  $\mu\text{L}$ /孔小牛血清封闭过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20°C 冷冻保存待用。

[0010] 按质量百分比计所述缓冲液的制备如下:8mmol/L NaCl、0.1% BSA、50  $\mu\text{mol/L}$  二乙烯三胺五乙酸、0.1mL/L Tween-80 和 0.1%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl。

[0011] 6×HPA 标准液的制备如下:从 HPA 纯品中稀释得到,稀释液为 0.01 mmol/L、pH 7.4 的 PBS,共 6 瓶,1.0mL/瓶,每瓶的 HPA 浓度分别为:0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL。

[0012] 生物素标记的 HPA 的制备如下:将 HPA 溶解于 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ 、pH8.5 缓冲液中,加入经二甲基甲酰胺溶解的 N-羧琥珀酰亚胺活化生物素,即 NHSB 50 $\mu\text{L}$ ,其中 NHSB 的浓度为 20g/L;室温反应 4h 后,用预先经 0.9%NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl, pH7.8 的缓冲液平衡过的 Sephadex G-50 进行柱层析,紫外 A280 检测收集洗脱蛋白质峰,稀释、分装置并保存。

[0013] 铕标记的亲合素的制备如下:将亲合素经 PD-10 柱转换缓冲条件至 pH 9.0,洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L pH8.5 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液,收集蛋白峰,取已转换的亲合素用上述洗脱液稀释亲合素至 2g/L;加入 0.2-0.4mg 的  $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸,反应过夜,反应液经柱层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用。

[0014] 洗涤液的制备如下:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl。

[0015] 增强液的制备如下:每升含 15 $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮、50 $\mu\text{mol/L}$  三正辛基氧化膦和 1mL/L 曲拉通 X-100 的 pH 3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液。

[0016] 所述乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,取包被有 HPA 单克隆抗体的包被板,加入 HPA 标准液或处理好的样品到各自的微孔中;加 50 $\mu\text{L}$  以缓冲液 1:100 稀释的生物素标记的 HPA,37°C 反应 1 小时,用洗涤液洗涤三次;加以缓冲液 1:100 稀释的 100 $\mu\text{L}$  铕标记的亲合素,37°C 反应 45 分钟,洗涤液洗五次;加 100 $\mu\text{L}$  增强液,5 分钟后测量荧光强度 cps,以加入 HPA 标准的检测数据绘制标准曲线,以加入被测样品的检测数据从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。

[0017] 所述样品的处理方法具体如下:

a、全血标本：全血标本放置 2 小时后于 1000g 离心 15 分钟，取上清液即可检测，或进行分装，并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，但应避免反复冻融，解冻后的样本应再次离心，然后检测；

b、血浆标本：采用 EDTA 作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于  $2-8^{\circ}\text{C}$  1000g 离心 15 分钟，取上清液即可检测，或进行分装，并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，但应避免反复冻融，解冻后的样本应再次离心，然后检测；

c、胸、腹水标本：标本于  $2-8^{\circ}\text{C}$  4000g 离心 10 分钟，仔细收集上清液，如有沉淀，可再次离心；取上清液立即用于检测，或分装后放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，但应避免反复冻融，解冻后的样本应再次离心，然后检测；

d、细胞培养物上清液：标本于 1000g 离心 15 分钟，取上清液即可检测，或进行分装，并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，但应避免反复冻融，解冻后的样本应再次离心，然后检测；

e、组织裂解液：取 100mg 组织，用缓冲液(2)洗去血污，剪成小块放入组织研磨器或匀浆管中，加入 1mL 缓冲液(2)，制成匀浆，然后置于  $-20^{\circ}\text{C}$  过夜；经反复冻融 2 次处理破坏细胞膜后，将组织匀浆于  $2-8^{\circ}\text{C}$  5000g 离心 5 分钟，取上清液即可检测，或进行分装，并将标本放于  $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，但应避免反复冻融，解冻后的样本应再次离心，然后检测。

[0018] 本发明的有益效果：本发明提供的检测 HPA 试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，用于对血清、血浆、胸水、腹水、组织培养物上清液以及组织裂解液中 HPA 含量的检测。

[0019] 本发明引入了 BSA，进一步提高了灵敏度，拓宽了检测的线性范围；另外， $\text{Eu}^{3+}$  标记亲和素有如下优点：标记亲和素较容易，且不损伤其生物活性，直接标记抗体或抗原通常会损伤它们的免疫反应活性；亲和素标记物和生物素化抗原都很稳定， $-20^{\circ}\text{C}$  保存半年以上，未发现生物活性改变和非特异升高；能起到一定的放大作用，扩展工作曲线范围。本发明工作曲线范围可达  $0 \sim 1000 \mu\text{g/L}$ ，样品直接用于测定，减少了操作误差环节，方便临床使用，测定时间仅需 1.5 小时，其结果更加直观可靠。

## 附图说明

[0020] 图 1 检测 HPA 的 TRFIA 试剂盒示意图。

[0021] 图 2 HPA-TRFIA 标准曲线图。

[0022] 附图标记说明：1、包被板，2、缓冲液，3、 $6 \times \text{HPA}$  标准液，4、生物素标记的 HPA，5、钕标记的亲和素，6、洗涤液，7、增强液。

## 具体实施方式

[0023] 实施例 1 制备试剂盒和检测血清样品

$\text{Eu}^{3+}$ -亲和素的制备：

取亲和素  $\text{Eu}^{3+}$ ，溶解于 50mmol/L pH7.0 的 PBS 缓冲液中，得到 5g/L 的亲和素溶液，取 1-2mL，经 PD-10 柱转换缓冲条件，洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L pH8.5 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量 ( $1.46A_{280}-0.74A_{260}$ )，用上述洗脱液稀释亲和素至 2g/L。取 500-1000  $\mu\text{L}$  稀释后的亲和素加入含 0.2-0.4mg 的  $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 ( $\text{Eu}^{3+}$ -DTTA) 的小瓶中， $30^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌反应 20 小时。反应

液经用 80mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱(1×40cm)层析,  $A_{280}$  监测收集蛋白峰, 稀释分装备用。

[0024] 包被板固相抗体制备:

将 HPA 用 50mmol/L pH 9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液稀释至 0.5mg/L 的包被液, 96 孔微孔板各孔加 100  $\mu\text{L}$ , 4℃放置过夜; 弃去包被液, 用洗涤液冲洗两次, 加 200  $\mu\text{L}$ /孔小牛血清, 封闭过夜; 弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20℃冷冻保存。

[0025] 生物素标记的 HPA (4) 的制备如下: 将购得的 HPA 溶解于 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ -pH8.5 缓冲液中, 加入经二甲基甲酰胺溶解的 N-羧琥珀酰亚胺活化生物素 NHSB 50 $\mu\text{L}$  (20g/L), 室温反应 4h 后, 用预先经 0.9%NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8) 缓冲液平衡过的 Sephadex G-50 进行柱层析 (1cm×40cm), 紫外  $A_{280}$  检测收集洗脱蛋白质峰。稀释、分装、置 -20℃保存。

[0026] 6×HPA 标准液: (0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mL, 1000ng/mL), 从 HPA 纯品中稀释得到, 稀释液为 PBS (0.01 mmol/L、pH 7.4)。

[0027] 缓冲液: 含 8mmol/L NaCl、0.1% BSA、50  $\mu\text{mol/L}$  二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1ml/L Tween-80 和 0.1%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl。

[0028] 洗涤液: 含 14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl。

[0029] 增强液的配制: 每升含 15 $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮( $\beta$ -NTA), 50 $\mu\text{mol/L}$  三正辛基氧化膦(TOPO), 1ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100) 的 pH 3.2 的邻苯二甲酸氢钾缓冲液。

[0030] 试剂盒的组成:

如图 1 所示, 试剂盒由以下几个部分: 由包被板 1, 缓冲液 2, 6×HPA 标准液 3, 生物素标记的 HPA 4, 钕标记的亲素 5, 洗涤液 6 和增强液 7 所组成;

所述包被板 1 直接放置于试剂盒中, 缓冲液 2、洗涤液 6 和增强液 7 依次排列位于包被板 1 的一侧; 生物素标记的 HPA 4, 钕标记的亲素 5 以及 6×HPA 标准液 3 均依次排列安放于试剂架上, 所述试剂架同样放置于试剂盒中。

[0031] (1)、1×96 孔板(8 条 ×12 孔, 可以拆分为单孔) 包被有 HPA 单克隆抗体。

[0032] (2)、6×HPA 标准液, 1.0mL/瓶, 标准液浓度为: 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/mL。

[0033] (3)、1×生物素标记的 HPA 冻干品, 用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0034] (4)、1× $\text{Eu}^{3+}$ -亲素冻干品, 用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

(5)、1×增强液: 15mL。

[0035] (6)、1×洗涤液: 30 mL, 用时以蒸馏水 1 : 25 稀释。

[0036] (7)、1×缓冲液: 30 mL。

测定之前注意事项

1、使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30℃)。

[0037] 2、使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。

[0038] 3、如果样品量大建议使用多通道移液器。

[0039] 4、在所有恒温孵育过程中避免光线照射, 用盖子盖住微孔。

[0040] 5、取出需用数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封, 保存于 2-8℃。

[0041] 具体检测步骤如下：

样品处理：全血标本放置 2 小时后于 1000g 离心 15 分钟，取上清液备用。

[0042] 取 HPA 板条，加入 50 $\mu$ L 的 HPA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头，加缓冲液 1 : 100 稀释的生物素标记的 HPA 50 $\mu$ L，移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，洗涤液洗三次，加缓冲液 1 : 100 稀释的 Eu<sup>3+</sup>-亲和素 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 反应 45 分钟，洗涤液洗五次，加 100 $\mu$ L 增强液 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。结果见表 1，根据标准曲线求得该例样品所含 HPA 浓度为 2.92ng/mL。

[0043] 表 1

HPA 标准点							血清样品
HPA 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	500	2.92
荧光值 (cps)	329746	275560	129874	78598	51595	34961	101235

实施例 2

制备试剂盒：同实施例 1。包被板固相抗体制备：同实施例 1。试剂的配制：同实施例 1。试剂盒提供的试剂：每一个盒中的试剂足够进行 48 个测量，盒中的材料如下：

(1)、1 $\times$ 48 孔板(4 条  $\times$ 12 孔，可以拆分为单孔)包被有 HPA 单克隆抗体。

[0044] (2)、6 $\times$ HPA 标准液，1.0ml/瓶，标准液浓度为：0,0.1,1,10,100,1000ng/mL。

[0045] (3)、1 $\times$ 生物素标记的 HPA 冻干品，用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0046] (4)、1 $\times$ Eu<sup>3+</sup>-亲和素冻干品，用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0047] (5)、1 $\times$ 增强液：15mL。

[0048] (6)、1 $\times$ 洗涤液：30 mL，用时以蒸馏水 1 : 25 稀释。

[0049] (7)、1 $\times$ 缓冲液：30 mL。

[0050] 实验室应自备的试剂与实施例 1 相同。

[0051] 测定之前注意事项同实施例 1。

[0052] 具体检测步骤同实施例 1。

[0053] 应用实施例 1 血浆样品测定

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同，用于检测血浆样品。

[0054] 具体检测步骤如下：

血浆标本处理：可用 EDTA 作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 2-8 $^{\circ}$ C 1000g 离心 15 分钟，取上清液备用。

[0055] 取 HPA 板条，加入 50 $\mu$ L 的 HPA 标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头，加缓冲液 1 : 100 稀释的生物素标记的 HPA 50 $\mu$ L，移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，洗涤液洗三次，加缓冲液 1 : 100 稀释的 Eu<sup>3+</sup>-亲和素 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 反应 45 分钟，洗涤液洗五次，加 100 $\mu$ L 增强液 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。结果见表 2，根据标准曲线求得该例样品所含 HPA 浓度为 5.11ng/mL。

[0056] 表 2

HPA 标准点							血浆标本
HPA 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	5.11
荧光值 (cps)	329746	275560	129874	78598	51595	34961	98125

## 应用实施例 2 胸、腹水标本测定

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同,用于检测胸、腹水标本。

[0057] 具体检测步骤如下:

胸、腹水标本处理:标本于 2-8℃ 4000g 离心 10 分钟,仔细收集上清液,如有沉淀,可再次离心。取上清液备用。

[0058] 取 HPA 板条,加入 50μL 的 HPA 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 100 稀释的生物素标记的 HPA 50μL,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37℃ 反应 1 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1 : 100 稀释的  $\text{Eu}^{3+}$ -亲和素 100μL,37℃ 45 分钟,洗涤液洗五次,加 100μL 增强液 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。结果见表 3,根据标准曲线求得该例样品所含 HPA 浓度为 27.1ng/mL。

[0059] 表 3

HPA 标准点							胸、腹水标本
HPA 浓度 (ng/ml)	0	0.1	1	10	100	1000	27.1
荧光值 (cps)	329746	275560	129874	78598	51595	34961	76267

## 应用实施例 3 细胞培养物上清液测定

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同,用于检测细胞培养物上清液标本。

[0060] 具体检测步骤如下:

细胞培养物上清液处理:标本于 2-8℃ 4000g 离心 15 分钟,仔细收集上清液,如有沉淀,可再次离心。取上清液备用。

[0061] 取 HPA 板条,加入 50μL 的 HPA 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 100 稀释的生物素标记的 HPA 50μL,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37℃ 反应 1 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1 : 100 稀释的  $\text{Eu}^{3+}$ -亲和素 100μL,37℃ 反应 45 分钟,洗涤液洗五次,加 100μL 增强液 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。结果见表 4,根据标准曲线求得该例样品所含 HPA 浓度为 167ng/mL。

[0062] 表 4

HPA 标准点							细胞培养物上清液
HPA 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	167
荧光值 (cps)	329746	275560	129874	78598	51595	34961	40498

## 应用实施例 4 组织裂解液测定

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同,用于检测组织裂解液标本。

[0063] 具体检测步骤如下:

组织裂解液处理:取 100mg 组织,用缓冲液(2)洗去血污,剪成小块放入组织研磨器(匀浆管)中,加入 1mL 缓冲液(2),制成匀浆,然后置于 -20℃ 过夜。经反复冻融 2 次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆于 2-8℃ 5000g 离心 5 分钟取上清液备用。

[0064] 取 HPA 板条,加入 50 $\mu$ L 的 HPA 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 100 稀释的生物素标记的 HPA 50 $\mu$ L,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37℃ 反应 1 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1 : 100 稀释的 Eu<sup>3+</sup>-亲和素 100 $\mu$ L,37℃ 反应 45 分钟,洗涤液洗五次,加 100 $\mu$ L 增强液 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 HPA 含量。结果见表 5,根据标准曲线求得该例样品所含 HPA 浓度为 92.6ng/mL。

[0065] 表 5

HPA 标准点							组织裂解液
HPA 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	92.6
荧光值 (cps)	329746	275560	129874	78598	51595	34961	52012

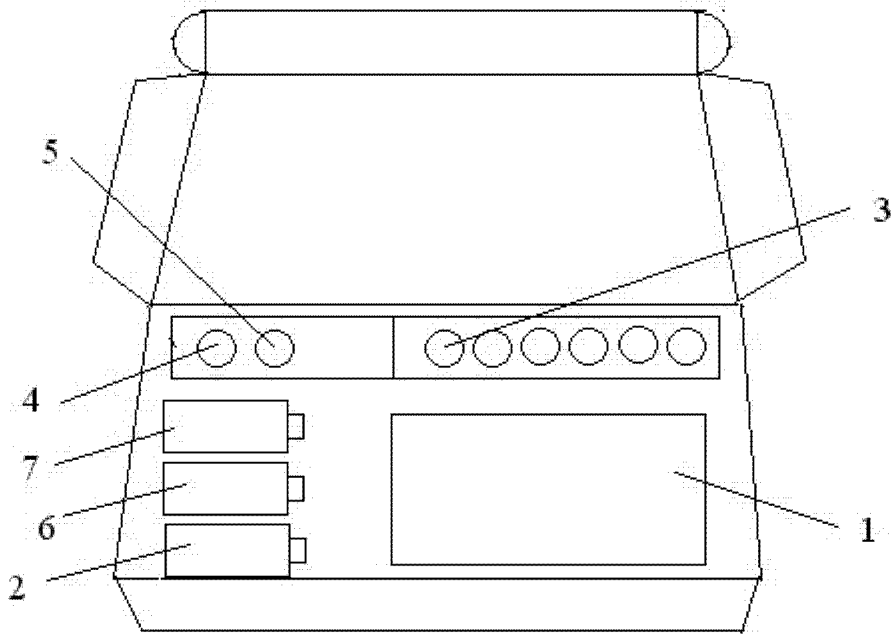


图 1

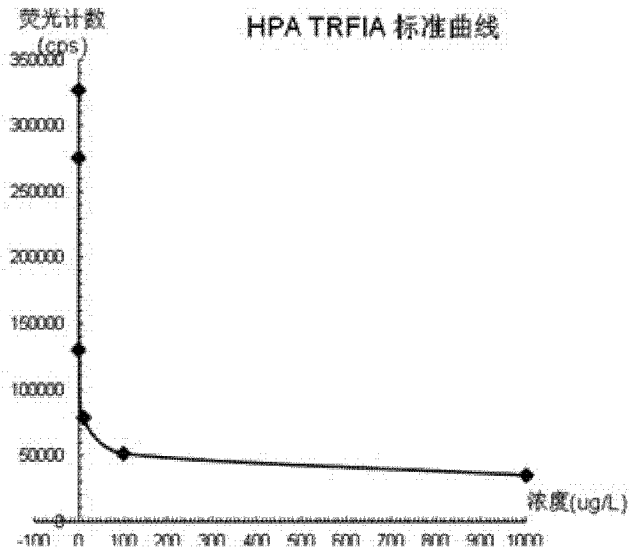


图 2

专利名称(译)	一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103760350A</a>	公开(公告)日	2014-04-30
申请号	CN201410008407.9	申请日	2014-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	谢国强 黄飏 邵科晶 张艺 蒋孟军		
申请(专利权)人(译)	朱宝 谢国强 黄飏 邵科晶 张艺 蒋孟军		
当前申请(专利权)人(译)	朱宝 谢国强 黄飏 邵科晶 张艺 蒋孟军		
[标]发明人	朱宝 谢国强 肖华龙 黄飏 邵科晶 许亚丰 张艺 蒋孟军		
发明人	朱宝 谢国强 肖华龙 黄飏 邵科晶 许亚丰 张艺 蒋孟军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/582 G01N2333/914		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种乙酰肝素酶的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析技术领域。其采用生物素-亲和素系统TRFIA检测乙酰肝素酶HPA，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有纯化的HPA单克隆抗体，加入HPA标准或样品，再加入生物素标记的HPA抗原；加入Eu3+-亲和素，标记免疫反应后没有连接的Eu3+-亲和素被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪

测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的HPA浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中HPA的含量。本发明提供的检测HPA试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，用于对血清、血浆、胸水、腹水、组织培养物上清液以及组织裂解液中HPA含量的检测。

