



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107765010 A

(43)申请公布日 2018.03.06

(21)申请号 201710952412.9

(22)申请日 2017.10.13

(71)申请人 中国医学科学院放射医学研究所
地址 300000 天津市南开区天津南开区白堤路238号

(72)发明人 周晓靓 王浩 杨福军 宋娜玲

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事务
所(普通合伙) 12219

代理人 陈松

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

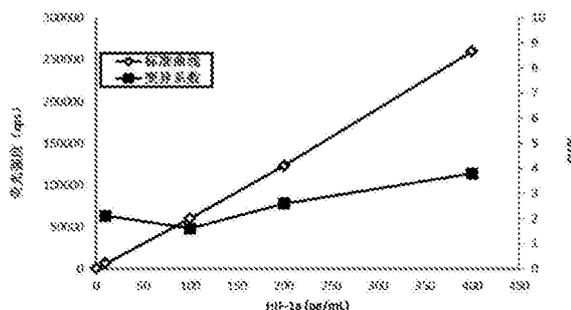
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒,该技术方案首先基于实验手段确定了H1 α 67、1A3两株具有良好免疫活性的抗乏氧诱导因子单克隆抗体。在此基础上,以TRFIA法测得荧光值和检测本底为依据确定将H1 α 67株作为包被抗体、将1A3株作为标记抗体,能获得更加灵敏的检测效果。与此同时,本发明对包被条件、镧系元素标记方法以及检测条件等进行了针对性设计,同时围绕上述抗体及待测抗原的生物学特性给出了适宜的缓冲液、洗涤液、增强液成分,有效保证了检测的灵敏性和结果的稳定性。而且可依托于检测设备实现高度的自动化,为临床中乏氧指标的精确检测提供了一种切实可行的方法。



1. 用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 取克隆号为H1α67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,用第一缓冲液稀释其浓度至1~10mg/L,作为包被液,包被反应板,而后加入封闭液封闭,再抽干封闭液;其中,所述第一缓冲液是浓度为50mmol/L、pH为9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液是含有3g/L牛血清白蛋白的第一缓冲液;

2) 取与步骤1)所述抗乏氧诱导因子单克隆抗体具有不同抗原表位的另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体,利用镧系元素离子标记,得到标记抗体;

3) 将步骤2)所得的标记抗体用反应缓冲液以1:(25~100)的体积比稀释,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体与待测样品以(5~10):1的体积比共同加入至步骤1)所得反应板的同一孔中,混合后于25℃孵育2h;其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50μmol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值为7.8;

4) 洗涤液洗涤反应板,而后加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,于25℃振荡反应5min,进行荧光检测;其中所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、14.5mmol/L NaCl的水溶液;所述增强液是含有15μmol/Lβ-萘甲酰三氟丙酮、50μmol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.0~3.2。

2. 根据权利要求1所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于步骤1)包被液中克隆号为H1α67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的浓度为5mg/L。

3. 根据权利要求1所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于步骤3)中稀释的体积比为1:50。

4. 根据权利要求1所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于步骤3)中稀释的标记抗体与待测样品之间体积比为3:1。

5. 根据权利要求1所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于步骤2)所述镧系元素离子选自Eu³⁺或Sm³⁺之一。

6. 根据权利要求5所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于步骤2)具体包括以下操作:将镧系元素离子的水溶液与所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体共孵育,螯合反应产物经柱层析分离,即得到所述标记抗体;其中所述镧系元素离子的水溶液中镧系元素离子的质量为所述另一种乏氧诱导因子单克隆抗体质量的1/5~1。

7. 根据权利要求1所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于步骤2)中所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体是克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于所述单克隆抗体均为鼠抗人单克隆抗体。

9. 一种基于权利要求1分析方法的检测试剂盒,其特征在于包括反应缓冲液,洗涤液,增强液,包被有克隆号为H1α67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的反应板,由镉离子或钐离子标记的克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,乏氧诱导因子重组蛋白标准品及质控品;

其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50μmol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值

为7.8;

所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、14.5mmol/L NaCl的水溶液;

所述增强液是含有15μmol/Lβ-萘甲酰三氟丙酮、50μmol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.0~3.2。

10. 权利要求9所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

- 1) 分别配制所述反应缓冲液、洗涤液、增强液;
- 2) 以克隆号为H1α67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体包被微孔反应板;
- 3) 以乏氧诱导因子重组蛋白制备标准品、质控品;
- 4) 以铈或钐的离子溶液标记克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体;
- 5) 分装上述各成分,再组装得到成品试剂盒。

用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及时间分辨荧光免疫分析技术领域,进一步涉及乏氧水平的检测技术,具体涉及一种用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 肿瘤的放射治疗仍然是目前临床上应用最广泛和最重要的治疗手段之一,然而各种肿瘤甚至同种肿瘤不同病理类型、不同病人其治疗效果却很大差异,其中一个重要原因就是肿瘤细胞对射线作用的敏感性不同,但是目前所采用的各种肿瘤的常规放疗方案,大都基于把某一类型的肿瘤患者看作是放疗反应相同的个体,而同一类型间存在的固有放射敏感性的差异,显著地影响了肿瘤的放疗疗效。此问题在结直肠癌中更加突出,由于结直肠在腹腔的解剖位置限制,获得较宽的阴性切缘较困难,因此局部复发率高,一个Meta分析表明术前放疗的有效剂量可减少57%的局部复发。但是,术前放疗提高了肿瘤患者的局部控制和生存率同时也增加了术后并发症和死亡率,放疗前必需有较精确的分期选择病人,确立放疗敏感病人的选择标准是关键。

[0003] 放疗利用电离辐射引起的自由基爆发杀死癌细胞,这一过程与肿瘤部位的氧分压密切相关,与大多数实体瘤一样,结直肠癌细胞存在不同程度的乏氧区,也是放疗抵抗的根本原因之一。因此,乏氧程度与放疗敏感性呈现高度负相关,乏氧微环境是目前肿瘤治疗的研究热点。HIF-1 α 是细胞缺氧时产生,精确调节细胞代谢中的氧含量,为放疗下存在的肿瘤细胞提供能量,从而诱导肿瘤组织产生放疗抵抗性。对比实验表明,HIF-1 α 表达水平与体内氧分压水平密切相关,与肿瘤预后有高度的相关性,因此,HIF-1 α 是目前放疗敏感性评价特异性最好的分子靶标之一。然而,HIF-1 α 在体外检测时受到环境氧分压影响, β 亚基通过泛素化被迅速降解,含量很低。目前血清乏氧诱导因子的检测主要有酶联免疫法(ELISA),由于收到示踪剂形状的限制,ELISA的灵敏度不高(灵敏度 $<10^{-15}$),范围有限,不能够满足临床检测的要求,需要灵敏度更高的超微量检测技术。

[0004] 时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay,简称TRFIA)是上世纪80年代初发展起来的一项非放射性超微量免疫分析技术,它的独特技术有别于传统的荧光免疫标记技术的特点和优势。与现代应用的放射免疫分析(RIA),酶免分析(EIA),新兴的化学发光免疫分析(CLIA)及电化学发光免疫分析(ECLIA)相比,TRFIA具有灵敏度高,操作简单,整合试剂稳定,标准曲线范围宽,不受样品自然荧光干扰,无放射性污染,可进行多标记等优点,正逐渐成为替代传统的放免分析和酶免分析的新一代超微量测定技术。由于克服了酶标物不稳定、化学发光只能一次发光、易受环境干扰等缺点,TRFIA是目前免疫检测方法中灵敏度与特异性最好的微量分析方法,目前已应用于临床微量物质检测,如乙肝病毒标记、PSA、AFP等癌胚抗原的定量测定。

[0005] 然而当应用于具体物质的检测时,并不存在一种通用性的TRFIA检测方法,而需要根据待测物质的生物学特性进行针对性设计;其中,在实验框架层面就包括双抗夹心法、中和法以及小分子抗原竞争法等,而具体到某种抗原的检测时,还需要根据待测抗原的特性,

从抗体选择、包被条件、镧系元素标记方法以及检测条件等角度进行设计,同时给出各反应物的适宜成分,以满足检测方法的准确性和稳定性。然而,由于检测效果优劣与方法条件之间并不存在明显的指向性关联,因此,依据现有技术的常规TRFIA方法难以得到一种适宜乏氧诱导因子检测的具体方法条件。

发明内容

[0006] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒,以解决现有技术中缺乏一种适用于乏氧诱导因子的高效TRFIA检测方法的技术问题。

[0007] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术中针对乏氧诱导因子的常规检测方法灵敏度、特异性以及检测结果的稳定性均有待改善。

[0008] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术中缺乏一种基于TRFIA分析方法高效检测乏氧诱导因子的具体试剂盒产品。

[0009] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0010] 用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 取克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,用第一缓冲液稀释其浓度至1~10mg/L,作为包被液,包被反应板,而后加入封闭液封闭,再抽干封闭液;其中,所述第一缓冲液是浓度为50mmol/L、pH为9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液是含有3g/L牛血清白蛋白的第一缓冲液;

[0012] 2) 取与步骤1)所述抗乏氧诱导因子单克隆抗体具有不同抗原表位的另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体,利用镧系元素离子标记,得到标记抗体;

[0013] 3) 将步骤2)所得的标记抗体用反应缓冲液以1:(25~100)的体积比稀释,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体与待测样品以(5~10):1的体积比共同加入至步骤1)所得反应板的同一孔中,混合后于25℃孵育2h;其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50μmol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值为7.8;

[0014] 4) 洗涤液洗涤反应板,而后加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,于25℃振荡反应5min,进行荧光检测;其中所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、14.5mmol/L NaCl的水溶液;所述增强液是含有15μmol/L β-萘甲酰三氟丙酮、50μmol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.0~3.2。

[0015] 作为优选,步骤1)包被液中克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的浓度为5mg/L。

[0016] 作为优选,步骤3)中稀释的体积比为1:50。

[0017] 作为优选,步骤3)中稀释的标记抗体与待测样品之间体积比为3:1。

[0018] 作为优选,步骤2)所述镧系元素离子选自Eu³⁺或Sm³⁺之一。

[0019] 作为优选,步骤2)具体包括以下操作:将镧系元素离子的水溶液与所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体共孵育,螯合反应产物经柱层析分离,即得到所述标记抗体;其中所述镧系元素离子的水溶液中镧系元素离子的质量为所述另一种乏氧诱导因子单克隆抗

体质量的1/5~1。

[0020] 作为优选,步骤2)中所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体是克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体。

[0021] 作为优选,所述单克隆抗体均为鼠抗人单克隆抗体。

[0022] 作为优选,所述反应板是48孔板或96孔板。

[0023] 作为优选,以上步骤3)和步骤4)是在时间分辨荧光免疫分析仪器上完成的。

[0024] 同时,本发明还提供了一种基于上述分析方法的检测试剂盒,包括反应缓冲液,洗涤液,增强液,包被有克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的反应板,由铈离子或钐离子标记的克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,乏氧诱导因子重组蛋白标准品及质控品;

[0025] 其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值为7.8;

[0026] 所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、14.5mmol/L NaCl的水溶液;

[0027] 所述增强液是含有15 μ mol/L β -萘甲酰三氟丙酮、50 μ mol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.0~3.2。

[0028] 同时,本发明提供了上述试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0029] 1) 分别配制所述反应缓冲液、洗涤液、增强液;

[0030] 2) 以克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体包被微孔反应板;

[0031] 3) 以乏氧诱导因子重组蛋白制备标准品、质控品;

[0032] 4) 以铈或钐的离子溶液标记克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体;

[0033] 5) 分装上述各成分,再组装得到成品试剂盒。

[0034] 以上所提供的试剂盒,可用于对肿瘤、心肌缺血等病人血清中乏氧诱导因子进行定量测定,其检测结果可以作为病人组织乏氧水平的评价指标之一。

[0035] 本发明还提供了上述试剂盒的一种使用方法:

[0036] 1) 取由铈离子或钐离子标记的克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,与反应缓冲液以1:(25~100)的体积比混合稀释,得到稀释的标记抗体;

[0037] 2) 将所述稀释的标记抗体与待测样品以(5~10):1的体积比共同加入至包被有克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的反应板同一孔中,混合后于25 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0038] 3) 洗涤液洗涤反应板,而后加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,于25 $^{\circ}$ C振荡反应5min,进行时间分辨荧光检测。

[0039] 本发明进一步提供了上述试剂盒的另一种使用方法:

[0040] 1) 向包被有克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的反应板中加入待测样品,再加入反应缓冲液,室温振荡反应1h,洗涤;

[0041] 2) 取由铈离子或钐离子标记的克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,与反应缓冲液以1:(25~100)的体积比混合稀释,得到稀释的标记抗体;

[0042] 3) 向步骤1)洗涤后的反应板中加入步骤1)所述待测样品体积5~10倍的所述标记抗体,室温振荡反应1h,洗涤;

[0043] 4) 向其中加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,室温振荡5min,进行时间分辨

荧光检测。

[0044] 在以上技术方案中,所述第一缓冲液中的“第一”、以及所述反应缓冲液中的“反应”,仅用于将其各自与本发明中的其他缓冲液加以区分,而并不具有技术意义;因此所述定语“第一”及“反应”,并不构成对缓冲液本身技术特征的限定作用,而缓冲液的技术特征应当依据其成分及含量、结合本领域的一般技术常识加以确定。

[0045] 在利用本发明方法执行分析时,可以先利用该方法对一组具有浓度梯度且已知浓度的抗原标准溶液进行分析,以绘制出抗原浓度与荧光强度值之间的线性关系(即标准曲线),而后再对待测样品执行检测,将检测结果带入上述线性关系以获得实际检测值。其中标准曲线的绘制是利用本发明方法绘制的,而其中抗原标准溶液浓度梯度的选择、图表模式的选择、误差的校正等可以依照本领域的一般技术常识确定。

[0046] 本发明提供了一种用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒,该技术方案首先进行了抗乏氧诱导因子单克隆抗体的免疫活性测定与筛选。在这一过程中,利用ELISA方法对乏氧诱导因子重组抗原包被,HRP标记兔抗鼠二抗作为检测抗体,邻苯二胺作为显色剂,分别检测单克隆抗体的免疫活性,结果发现,H1 α 67和1A3两株单克隆抗体可以与乏氧诱导因子发生抗原抗体反应;在此基础上,以TRF1A法测得荧光值和检测本底为依据确定将H1 α 67株作为包被抗体、将1A3株作为标记抗体,能获得更加灵敏的检测效果。

[0047] 在此基础上,本发明对包被条件、镧系元素标记方法以及检测条件等进行了针对性设计,同时围绕上述抗体及待测抗原的生物学特性给出了适宜的缓冲液、洗涤液、增强液成分,有效保证了检测的灵敏性和结果的稳定性。本发明采用高灵敏的TRF1A,建立体内检测乏氧诱导因子的超微量检测方法,具有结果准确、灵敏度高、稳定性好等优势,而且可依托于检测设备实现高度的自动化,为临床中乏氧指标的精确检测提供了一种切实可行的方法。

[0048] 本发明方法可以血清样本作为检测对象,对其中乏氧诱导因子进行准确定量。由于乏氧诱导因子是目前放疗敏感性评价特异性最好的分子靶标之一,同时还参与风湿性关节炎和心肌缺血等疾病的预后评价,因而有望成为肿瘤和相关疾病诊断新的分子标志及其潜在治疗靶点。在这种情况下,本发明方法及试剂盒产品有望成为研究肿瘤转移及预测肿瘤患者预后的重要手段。

附图说明

[0049] 图1是本发明具体实施方式中乏氧诱导因子TRF1A典型标准曲线图及精密度图。

[0050] 图2是本发明具体实施方式中TRF1A检测试剂盒与ELISA试剂盒的检测结果比较图。

具体实施方式

[0051] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中对于属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0052] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围

内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0053] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解相同含义。

[0054] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0055] 以下实施例中,抗H1F-1 α 单克隆抗体(克隆号分别为H1 α 67和1A3),抗原溶液、Tween-20、Triton X-100、BSA、 β -萘甲酰三氟丙酮、三正辛基氧化膦购于Sigma公司;Sephadex G-50、PD-10为Pharmacia公司产品;ELISA试剂盒购自Cayman Chemical公司;DTTAEuNa由本单位课题组自行合成,其他试剂均为国产分析纯;时间分辨荧光免疫分析仪(TALENT-11)、恒温振荡仪、全自动酶标洗板机均为广州丰华生物有限公司产品。

[0056] 实施例1

[0057] 1、试剂盒的制备及检测

[0058] 试剂盒组成(96人份)包括:96孔板包被有抗鼠抗人H1F-1 α 单克隆抗体;标准品冻干品(使用前用蒸馏水溶解);铕标抗体冻干品;稀释包被抗体的缓冲液;洗涤液;增强液。

[0059] 1) 微孔反应板制备

[0060] 用50mmol/L pH9.6 Na₂CO₃-NaHCO₃的缓冲液将鼠抗人H1F-1 α 单克隆抗体稀释至1 μ g/mL作为包被液,96孔微孔板每孔各加入100 μ L,4 $^{\circ}$ C放置过夜,弃去包被液,用洗涤液(14.5mmol/L NaCl,0.2mL/L Tween-80和0.2wt%NaN₃的50mmol/L Tris-HCl pH7.2)冲洗四次,加200 μ L含0.2wt%明胶和2wt%蔗糖的50mmol/L pH7.2的Tris-HCl缓冲液封闭,4 $^{\circ}$ C放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条封闭后置-20 $^{\circ}$ C冷冻保存。

[0061] 2) 标准品制备

[0062] 取30份肺癌患者(来自天津市某医院)的血清,将其混合后离心(4000rpm,20min,离心后取上清)。用Cayman Chemical公司的H1F-1 α ELISA试剂盒分别对其中的H1F-1 α 含量进行定值。用含0.2wt%BSA,0.1wt%NaN₃的50mmol/L pH7.8 Tris-HCl缓冲液将上述定值血清稀释为:0、1.21、12.1、121、605、1210ng/mL系列标准液,每瓶1mL分装冻干,-20 $^{\circ}$ C干燥保存。

[0063] 3) 铕标记的鼠抗人H1F-1 α 单克隆抗体制备

[0064] 取鼠抗人H1F-1 α 单克隆抗体1mg溶于0.25mol/L NaHCO₃液200 μ L中,加入0.2mg ETTAEuNa充分混匀,4 $^{\circ}$ C反应24小时。反应液用Sephadex G-50柱层析,用50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl缓冲液洗脱,收集A280蛋白峰,合并峰管,采用棋盘滴定法确定铕标蛋白含量,加入等体积甘油,混匀后-20 $^{\circ}$ C保存。

[0065] 4) 测定方法

[0066] 先在包被有单克隆抗体的96孔板上,每孔依次加入50 μ L的H1F-1 α 参考标准或待测血清,150 μ L用反应缓冲液以体积比1:50稀释的铕标记抗体,25 $^{\circ}$ C振荡孵育2小时后,洗涤6次。再加入增强液200 μ L,25 $^{\circ}$ C振荡反应5分钟,荧光检测。检测在TALENT-11上完成,软件中的参数根据实施例中的条件进行相应设置。数据分析有Graphpad Prism 5软件处理,数据

统计用t检验。

[0067] 2、试剂盒及检测方法可靠性评价

[0068] 2.1灵敏度和线性范围

[0069] 以零参考标准品当作样品测量20次,计算其荧光均值及标准差。以该点荧光测定值减去2倍标准差所得的荧光值带入标准方程计算得出的浓度值为其灵敏度,经测定本实验的灵敏度为0.56ng/mL。将标准品抗原稀释成不同浓度进行测定,测得标准曲线线性范围为1-1000pg/mL,两项指标都优于ELISA试剂盒。检测标准曲线及及精密度图如图1所示。

[0070] 2.2准确度(回收试验)

[0071] 将实施例1中制备的标准品稀释为HIF-1 α 浓度分别为:10pg/mL,30pg/mL,100pg/mL,加入至3个已知HIF-1 α 浓度(50.23 \pm 2.11pg/mL)的高、中、低浓度血清样本中。通过计算实测值与理论值的比值,得出本实验在可测范围内其回收率(见下表1)。HIF-1 α 回收率为99.7-102.4%,符合试剂盒规定要求。

[0072] 表1 回收实验结果

[0073]

	加入值 (pg/mL)	实测值 (pg/mL)	回收率 (%)
[0074]	10	61.29 \pm 1.26	101.7
	30	82.14 \pm 4.34	102.4
	100	149.79 \pm 2.52	99.7

[0075] 2.3精密度

[0076] 将5份不同浓度的血清样本按照相同的实验条件,每份标本重复测10次,计算批内批间的变异系数(见下表2)。本方法的批内变异系数和批间变异系数均小于10%,符合试剂盒规定要求。

[0077] 表2 批内批间变异系数测定结果

[0078]

	批内 (n=10)		批间 (n=3)	
	HIF-1 α (pg/mL) ($\bar{X}\pm SD$)	CV%	HIF-1 α (pg/mL) ($\bar{X}\pm SD$)	CV%
样本 1	58.59 \pm 2.67	4.56	59.43 \pm 2.68	4.50
样本 2	189.46 \pm 6.48	3.42	194.72 \pm 4.11	2.11
样本 3	84.28 \pm 2.90	3.44	84.90 \pm 2.94	3.47
样本 4	132.33 \pm 3.27	2.47	130.28 \pm 5.59	4.29
样本 5	49.27 \pm 0.80	1.62	46.48 \pm 2.66	5.72

[0079] 3、本试剂盒与市售ELISA试剂盒的对比检测

[0080] 分别将本发明的实施例1的试剂盒与Human Total HIF-1 α ELISA (Cayman Chemical) 进行比较,分别用于测定实施例3中血清标本(n=70)中的HIF-1 α 浓度。经相关性分析,得出本发明检测结果与上述两个现有试剂盒的结果线性回归方程和相关系数(r)为: $y=0.9859x+4.1145$, $r=0.9984$;可见本发明的试剂盒的检测结果的检测结果的检测结果的相关性很高,本发明的试剂盒及其方法十分可靠。

[0081] 4、临床应用

[0082] 采用本发明试剂盒检测40例健康体检人员和30例肺癌患者的血清样品,其中30例肺癌患者的血清样品,其中30例肺癌血清标本取自天津市人民医院放疗科病人,所有病例均经手术或相关检查确诊40例正常对照为近期来本单位体检的健康体检者(其中男性25名,女性15名,年龄20-60岁),经血液、B超、X线等检查未发现良恶性肿瘤。所有研究对象于清晨空腹抽取静脉血2mL,低速离心后分离血清,放置-20 $^{\circ}$ C保存待测。

[0083] 检测方法为:取包被有抗HIF-1 α 单克隆抗体的微孔反应板,加入标准品抗原或待测样品至各自的微孔中,每个标准品和样品必须使用新的吸头,加入100 μ L缓冲液,室温振荡反应1hr,洗涤4次。再加入200 μ L以缓冲液作稀释剂,按体积比1:50稀释的钡标抗体,室温振荡反应1hr,用洗涤液洗涤6次,加增强液200 μ L振荡5min后测量荧光强度,利用标准曲线计算HIF-1 α 含量。结果显示健康体检人员为 80.45 ± 16.78 pg/mL,肺癌患者为 164.71 pg/mL ± 20.46 pg/mL,经t检验分析, $p < 0.001$ 。以100pg/mL为临界值,诊断有效率为74%。上述血清用ELISA Kit检测后结果与TRF1A检测结果基本相符,相关系数为0.998, $p < 0.0001$ (见图2)。

[0084] 现有研究表明,结直肠癌,乳腺癌,肺癌等多种肿瘤患者血清HIF-1 α 明显高于健康对照组,血清HIF-1 α 水平及阳性率与肿瘤分期,肿瘤组织氧合程度密切相关,因此血清HIF-1 α 检测日益受到临床重视。本试剂盒的研制成功,为血清HIF-1 α 定量分析提供了可靠的保障,必将对临床诊断和治疗产生深远的影响。

[0085] 实施例2

[0086] 用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0087] 1) 取克隆号为H1 α 67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,用第一缓冲液稀释其浓度至1mg/L,作为包被液,包被反应板,而后加入封闭液封闭,再抽干封闭液;其中,所述第一缓冲液是浓度为50mmol/L、pH为9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液是含有3g/L牛血清白蛋白的第一缓冲液;

[0088] 2) 取与步骤1)所述抗乏氧诱导因子单克隆抗体具有不同抗原表位的另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体,利用镧系元素离子标记,得到标记抗体;

[0089] 3) 将步骤2)所得的标记抗体用反应缓冲液以1:25的体积比稀释,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体与待测样品以5:1的体积比共同加入至步骤1)所得反应板的同一孔中,混合后于25 $^{\circ}$ C孵育2h;其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值为7.8;

[0090] 4) 洗涤液洗涤反应板,而后加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,于25 $^{\circ}$ C振荡反应5min,进行荧光检测;其中所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、

14.5mmol/L NaCl的水溶液;所述增强液是含有15 μ mol/L β -萘甲酰三氟丙酮、50 μ mol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.0。

[0091] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0092] 步骤2)所述镧系元素离子为Eu³⁺。

[0093] 步骤2)具体包括以下操作:将镧系元素离子的水溶液与所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体共孵育,整合反应产物经柱层析分离,即得到所述标记抗体;其中所述镧系元素离子的水溶液中镧系元素离子的质量为所述另一种乏氧诱导因子单克隆抗体质量的1/5。

[0094] 步骤2)中所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体是克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体。

[0095] 所述单克隆抗体均为鼠抗人单克隆抗体。

[0096] 一种基于上述分析方法的检测试剂盒,包括反应缓冲液,洗涤液,增强液,包被有克隆号为H1 α 67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的反应板,由镧离子或钐离子标记的克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,乏氧诱导因子重组蛋白标准品及质控品;

[0097] 其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值为7.8;

[0098] 所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、14.5mmol/L NaCl的水溶液;

[0099] 所述增强液是含有15 μ mol/L β -萘甲酰三氟丙酮、50 μ mol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.0。

[0100] 实施例3

[0101] 用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0102] 1) 取克隆号为H1 α 67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,用第一缓冲液稀释其浓度至10mg/L,作为包被液,包被反应板,而后加入封闭液封闭,再抽干封闭液;其中,所述第一缓冲液是浓度为50mmol/L、pH为9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液是含有3g/L牛血清白蛋白的第一缓冲液;

[0103] 2) 取与步骤1)所述抗乏氧诱导因子单克隆抗体具有不同抗原表位的另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体,利用镧系元素离子标记,得到标记抗体;

[0104] 3) 将步骤2)所得的标记抗体用反应缓冲液以1:100的体积比稀释,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体与待测样品以10:1的体积比共同加入至步骤1)所得反应板的同一孔中,混合后于25 $^{\circ}$ C孵育2h;其中所述反应缓冲液是含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80、0.1%NaN₃的,浓度为50mmol/L的Tris-HCl缓冲液;所述Tris-HCl缓冲液的pH值为7.8;

[0105] 4) 洗涤液洗涤反应板,而后加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,于25 $^{\circ}$ C振荡反应5min,进行荧光检测;其中所述洗涤液是含有0.2ml/L Tween-80、0.2%NaN₃、14.5mmol/L NaCl的水溶液;所述增强液是含有15 μ mol/L β -萘甲酰三氟丙酮、50 μ mol/L三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为3.2。

[0106] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0107] 步骤2)所述镧系元素离子是 Sm^{3+} 。

[0108] 步骤2)具体包括以下操作:将镧系元素离子的水溶液与所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体共孵育,螯合反应产物经柱层析分离,即得到所述标记抗体;其中所述镧系元素离子的水溶液中镧系元素离子的质量与所述另一种乏氧诱导因子单克隆抗体的质量相等。

[0109] 所述另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体是克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体。

[0110] 一种基于上述分析方法的检测试剂盒,包括反应缓冲液,洗涤液,增强液,包被有克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体的反应板,由铕离子或钐离子标记的克隆号为1A3的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,乏氧诱导因子重组蛋白标准品及质控品;

[0111] 其中所述反应缓冲液是含有 8mmol/L NaCl 、 $0.1\% \text{BSA}$ 、 $50\mu\text{mol/L DTPA}$ 、 0.1ml/L Tween-80 、 $0.1\% \text{NaN}_3$ 的,浓度为 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液;所述 Tris-HCl 缓冲液的pH值为7.8;

[0112] 所述洗涤液是含有 0.2ml/L Tween-80 、 $0.2\% \text{NaN}_3$ 、 14.5mmol/L NaCl 的水溶液;

[0113] 所述增强液是含有 $15\mu\text{mol/L } \beta\text{-萘甲酰三氟丙酮}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ 三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为3.2。

[0114] 实施例4

[0115] 用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0116] 1) 取克隆号为H1a67的抗乏氧诱导因子单克隆抗体,用第一缓冲液稀释其浓度至 5mg/L ,作为包被液,包被反应板,而后加入封闭液封闭,再抽干封闭液;其中,所述第一缓冲液是浓度为 50mmol/L 、pH为9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液是含有 3g/L 牛血清白蛋白的第一缓冲液;

[0117] 2) 取与步骤1)所述抗乏氧诱导因子单克隆抗体具有不同抗原表位的另一种抗乏氧诱导因子单克隆抗体,利用镧系元素离子标记,得到标记抗体;

[0118] 3) 将步骤2)所得的标记抗体用反应缓冲液以1:50的体积比稀释,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体与待测样品以3:1的体积比共同加入至步骤1)所得反应板的同一孔中,混合后于 25°C 孵育2h;其中所述反应缓冲液是含有 8mmol/L NaCl 、 $0.1\% \text{BSA}$ 、 $50\mu\text{mol/L DTPA}$ 、 0.1ml/L Tween-80 、 $0.1\% \text{NaN}_3$ 的,浓度为 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液;所述 Tris-HCl 缓冲液的pH值为7.8;4) 洗涤液洗涤反应板,而后加入与洗涤前孔中液体等体积的增强液,于 25°C 振荡反应5min,进行荧光检测;其中所述洗涤液是含有 0.2ml/L Tween-80 、 $0.2\% \text{NaN}_3$ 、 14.5mmol/L NaCl 的水溶液;所述增强液是含有 $15\mu\text{mol/L } \beta\text{-萘甲酰三氟丙酮}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ 三正辛基氧化磷,同时含有Triton 200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾的水溶液;所述增强液的pH值为2.6。

[0119] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

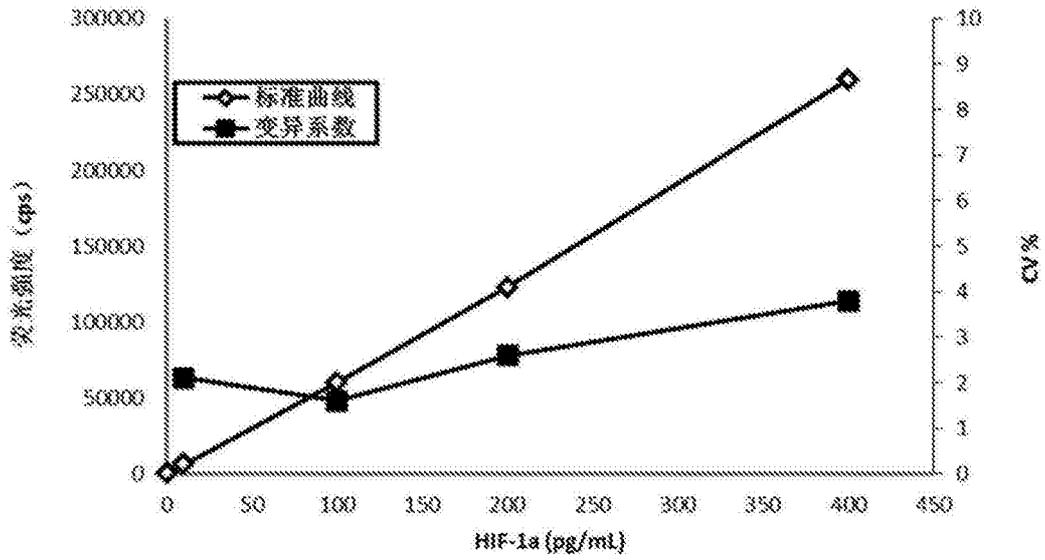


图1

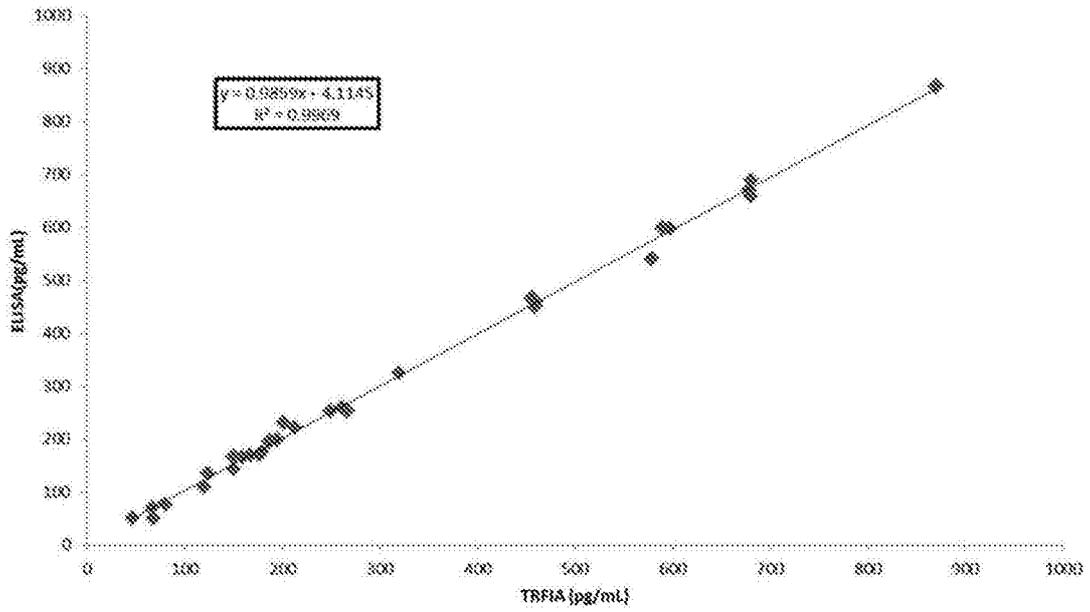


图2

专利名称(译)	用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN107765010A	公开(公告)日	2018-03-06
申请号	CN2017110952412.9	申请日	2017-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院放射医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院放射医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院放射医学研究所		
[标]发明人	周晓靓 王浩 杨福军 宋娜玲		
发明人	周晓靓 王浩 杨福军 宋娜玲		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/582 G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	陈松		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于乏氧诱导因子的时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒，该技术方案首先基于实验手段确定了H1α67、1A3两株具有良好免疫活性的抗乏氧诱导因子单克隆抗体。在此基础上，以TRFIA法测得荧光值和检测本底为依据确定将H1α67株作为包被抗体、将1A3株作为标记抗体，能获得更加灵敏的检测效果。与此同时，本发明对包被条件、镧系元素标记方法以及检测条件等进行了针对性设计，同时围绕上述抗体及待测抗原的生物学特性给出了适宜的缓冲液、洗涤液、增强液成分，有效保证了检测的灵敏性和结果的稳定性。而且可依托于检测设备实现高度的自动化，为临床中乏氧指标的精确检测提供了一种切实可行的方法。

