



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310108264.0

[43] 公开日 2004 年 10 月 27 日

[11] 公开号 CN 1540348A

[22] 申请日 2003.10.30

[21] 申请号 200310108264.0

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

[72] 发明人 郑伟明 高峰 张玲 古宏晨

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

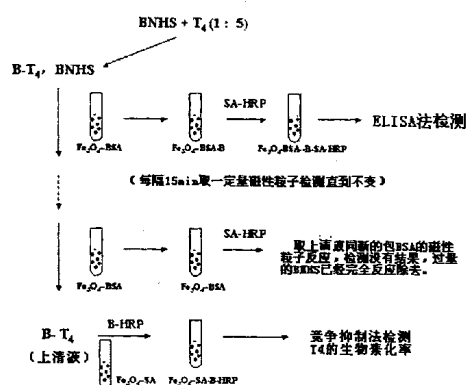
代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法

[57] 摘要

一种生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，属于生化领域。使用固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白同甲状腺素生物素标记反应后混合液中过量的生物素试剂生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯反应，形成磁性粒子-牛血清白蛋白-生物素复合物，在外加磁场的帮助下快速分离除去过量的生物素试剂，并用酶联免疫分析方法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和磁性粒子的反应程度，判断最后得到的溶液是高纯度生物素标记的甲状腺素，甲状腺素的生物素化率用固定在磁性粒子上的链酶亲和素来竞争检测。本发明具有简单快速、高效的优点，也适用于蛋白质、多肽、短肽、寡聚核苷酸或激素等生物分子的生物素标记后的分离纯化，进一步拓展了生物素-亲和素系统的应用范围。



1、一种生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征在于，使用固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白同甲状腺素生物素标记反应后混合液中过量的生物素试剂生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯反应，形成磁性粒子-牛血清白蛋白-生物素复合物，在外加磁场的作用下快速分离除去过量的生物素试剂，并用酶联免疫分析方法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和磁性粒子的反应程度，判断最后得到的溶液是高纯度生物素标记的甲状腺素，甲状腺素的生物素化率用固定在磁性粒子上的链酶亲和素来竞争检测。

2、根据权利要求 1 所述的生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征是，以下对本发明方法作进一步的限定，方法步骤如下：

(1) 甲状腺素的生物素标记反应：将甲状腺素和过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯溶液按摩尔比 1:3~1:8 混合，在室温下振荡反应使甲状腺素充分生物素化；

(2) 磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯，酶联免疫分析法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯同磁性粒子上的牛血清白蛋白反应程度，磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯采取以下两种分离检测方法中任一种：

① 一步反应分离检测法：取反应混合液加入到过量的包被牛血清白蛋白的磁性粒子中，振荡反应使混合液中过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应结合到磁性粒子上，每隔 15min 取出 50 μ g 的磁性粒子检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和磁性粒子的反应程度，反应完全后用磁铁吸附，将上清液转移出，待检测；用辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素与上述隔时取出的磁性粒子反应，经显色后，测 A_{450} 值；

② 多步反应分离检测法：取反应混合液加入到包被牛血清白蛋白的磁性粒子中，充分振荡反应后用磁铁吸附，将上清液转移到另一批包被牛血清白蛋白的磁性粒子中，继续振荡反应，如此连续几次同样的操作，最后用磁铁吸附，将上清液转移出，待检测；用辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素与上述反应过的各批磁性粒子反应，经显色后，测 A_{450} 值。

(3) 竞争抑制反应法检测甲状腺素生物素化率：

① 做生物素和辣根过氧化物酶标记的生物素对固定在磁性粒子上的链酶亲和

素竞争抑制标准曲线：取生物素标准品和辣根过氧化物酶标记的生物素等体积混合加入到包被链酶亲和素的磁性粒子中，振荡反应，经显色后，测 A_{450} 值，做 A_{450} 值对生物素标准品的对数浓度曲线；

② 取经磁分离除去过量生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯的上清液和辣根过氧化物酶标记的生物素等体积混合加入到包被链酶亲和素的磁性粒子中，振荡反应，经显色后，测 A_{450} 值，对应竞争抑制标准曲线换算出生物素标记甲状腺素的浓度，计算甲状腺素生物素化率。

3. 根据权利要求 2 所述的生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征是，所述的包被牛血清白蛋白的磁性粒子为牛血清白蛋白通过偶联剂戊二醛固定到氨基化磁性粒子上的，粒径为 $0.1\mu\text{m}$ ，牛血清白蛋白包被量大为 $80\mu\text{g/mg}$ 磁性粒子，磁性粒子分散在缓冲液中，使用前用磁铁吸附去上清液。

4. 根据权利要求 2 所述的生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征是，所述的磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯是根据磁性粒子上包被的牛血清白蛋白能够同生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯反应结合到磁性粒子上，通过外加磁场分离除去，最后的上清液就是高纯度的生物素标记甲状腺素。

5. 根据权利要求 2 所述的生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征是，所述的包被牛血清白蛋白磁性粒子的总量是根据生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯的量和包被的牛血清白蛋白的量确定的，是 $100\mu\text{l}$ 反应混液： 5mg 磁性粒子。

6. 根据权利要求 2 所述的生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征是，所述的竞争抑制反应法检测甲状腺素生物素化率中包被链酶亲和素的磁性粒子为链酶亲和素通过偶联剂戊二醛固定到氨基化磁性粒子上的，粒径为 $0.1\mu\text{m}$ ，链酶亲和素包被量为 $60\mu\text{g/mg}$ 磁性粒子。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，其特征是，或者用于分离纯化生物素标记的大分子蛋白，或者用于分离纯化其他的生物素标记的小分子物质，如短肽、寡聚核苷酸或激素小分子，或者其他活性生物素试剂，如生物素酰肼，生物素对硝基酚酯或活化长臂生物素所标记的生物分子。

生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法

技术领域

本发明涉及一种快速磁性分离纯化方法，具体是一种生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法。属于生化领域。

背景技术

生物素-亲和素系统是近年来发展迅速的新型生物反应放大系统，已在免疫学、分子生物学和临床医学等领域得到广泛应用。应用生物素-亲和素系统进行生物学分析时，必须对生物分子进行生物素标记，同时必须分离除去生物素标记反应后过量的生物素试剂，因为过量的生物素试剂会和生物素标记物竞争结合亲和素，从而使得随后的分析结果不准确。如当将生物素-亲和素系统引入人血清甲状腺素测定，建立甲状腺素-生物素亲和素系统-酶联免疫分析方法时，需要对甲状腺素进行生物素标记并分离纯化，这是该分析方法的一个关键技术。当生物素标记大分子物质如蛋白质时，通常的分离纯化方法是基于蛋白质和生物素试剂的分子量差别，如透析、超滤或凝胶电泳等方法。但是当用于标记小分子物质时，如甲状腺素，由于两者的分子量差别很小，用上述的方法就很难达到分离纯化效果。目前常用的分离方法是色谱柱层析，有的必须用高压液相层析来分离，但操作复杂，仪器昂贵。由于生物素标记生物分子的反应在一定条件下是不可逆的，因此可以用固定化蛋白如牛血清白蛋白，继续与反应后过量的生物素试剂反应从而除去反应混合液中过量的生物素试剂，同时生物素标记物不受影响。

经文献检索发现，LI Tian-yu 等人在《Chemical Research in Chinese Universities》(Vol.14, No.4, 1998) P420-422 上介绍：使用固定在酶标板上的牛血清白蛋白来分离纯化出生物素标记的白介素-2 (IL-2, 分子量:15 420)，并与用透析的分离方法相比较，结果是等效的。但是用酶标孔板固定牛血清白蛋白的分离纯化方法，反应量有限，不适合大批量的分离操作过程。

发明内容

本发明针对现有技术的不足和缺陷，提供一种生物素标记甲状腺素的快速磁性

分离纯化方法,使其具有简单快速、高效的优点,也适用于蛋白质、多肽、短肽、寡聚核苷酸或激素等生物分子的生物素标记后的分离纯化。

本发明是通过以下技术方案实现的,本发明方法使用固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白同甲状腺素生物素标记反应后混合液中过量的生物素试剂生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯反应,形成磁性粒子-牛血清白蛋白-生物素复合物,在外加磁场的作用下快速分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯,并用酶联免疫分析方法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和磁性粒子的反应程度,判断最后得到的溶液是高纯度生物素标记的甲状腺素,甲状腺素的生物素化率用固定在磁性粒子上的链酶亲和素来竞争检测,高达 98.8%。该分离方法可以很好的分离纯化生物素标记的生物分子,特别适用于分离纯化生物素标记小分子物质,进一步拓展了生物素-亲和素系统的应用范围。

以下对本发明方法作进一步的说明,方法步骤如下:

(1). 甲状腺素的生物素标记反应

将甲状腺素和过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯溶液按摩尔比 1:3~1:8 混合,在室温下振荡反应使甲状腺素充分生物素化。

(2). 磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯,酶联免疫分析法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯同磁性粒子上的牛血清白蛋白反应程度。

磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯采取两种分离检测方法:

① 一步反应分离检测法:取反应混合液加入到过量的包被牛血清白蛋白的磁性粒子中,振荡反应使混合液中过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应结合到磁性粒子上,每隔 15min 取出 50 μ g 的磁性粒子检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和磁性粒子的反应程度。反应完全后用磁铁吸附,将上清液转移出,待检测。

用辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素与上述隔时取出的磁性粒子反应,经显色,测 A_{450} 值。

② 多步反应分离检测法:取反应混合液加入到一定量的包被牛血清白蛋白的磁性粒子中,振荡反应一段时间后,用磁铁吸附,将上清液转移到另一批包被牛血清白蛋白的磁性粒子中,继续振荡反应,如此连续几次同样的操作。最后用磁铁吸附,将上清液转移出,待检测。

用辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素与上述反应过的各批磁性粒子反应,经显

色后，测 A_{450} 值。

(3) 竞争抑制反应法检测甲状腺素生物素化率。

① 做生物素和辣根过氧化物酶标记的生物素对固定在磁性粒子上的链酶亲和素竞争抑制标准曲线：取不同浓度生物素标准品和辣根过氧化物酶标记的生物素等体积混合加入到包被链酶亲和素的磁性粒子中，振荡反应，经显色后，测 A_{450} 值。做 A_{450} 值对生物素标准品的对数浓度曲线。

② 取经磁分离除去过量生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯的上清液和辣根过氧化物酶标记的生物素等体积混合加入到包被链酶亲和素的磁性粒子中，振荡反应，经显色后，测 A_{450} 值。对应竞争抑制标准曲线换算出生物素标记甲状腺素的浓度，计算甲状腺素生物素化率。

所述的包被牛血清白蛋白的磁性粒子为牛血清白蛋白通过偶联剂戊二醛固定到氨基化磁性粒子上的，粒径约为 $0.1\ \mu\text{m}$ ，牛血清白蛋白包被量大约为 $80\ \mu\text{g/mg}$ 磁性粒子。磁性粒子分散在缓冲液中，溶液中不能含有游离蛋白，使用前用磁铁吸附去上清液。

所述的磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯是根据磁性粒子上包被的牛血清白蛋白能够同生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯反应而不影响生物素标记的甲状腺素，通过外加磁场可以分离除去，最后的上清液就是高纯度的生物素标记甲状腺素。

所述的包被牛血清白蛋白磁性粒子的总量是根据生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯的量和包被的牛血清白蛋白的量确定的，大约是 $100\ \mu\text{l}$ 反应混液： 5mg 磁性粒子。

所述的酶联免疫分析法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯同磁性粒子上的牛血清白蛋白反应程度是用于判断混合液中过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯是否已经同磁性粒子上的牛血清白蛋白完全反应。对于一步反应分离法是一次性加入过量的磁性粒子反应并在反应过程中每个一定时间取一定量的磁性粒子出来检测，随着反应时间增加 A_{450} 值逐渐增大，到一定的值不再变化。再取反应上清液继续和包被牛血清白蛋白的磁性粒子反应，经检测如果没有显色反应表明过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯已经完全同固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应通过磁分离除去。而对于多步反应分离法是分几批加入磁性粒子反应，检测每批反应后的磁性粒子， A_{450} 值将逐渐减少，最后和对照值接近就表明过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯已经完全同固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应通过磁分离除去。

所述的竞争抑制反应法检测甲状腺素生物素化率中包被链酶亲和素的磁性粒子为链酶亲和素通过偶联剂戊二醛固定到氨基化磁性粒子上的, 粒径约为 $0.1\ \mu\text{m}$, 链酶亲和素包被量大约为 $60\ \mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子。

本发明分离纯化方法也可以用于分离纯化生物素标记的大分子蛋白, 也可以用于分离纯化其他的生物素标记的小分子物质如短肽、寡聚核苷酸或激素小分子等。也包括其他活性生物素试剂如生物素酰肼, 生物素对硝基酚酯或活化长臂生物素所标记的生物分子。

本发明根据生物素标记反应在一定条件下不可逆的特点, 充分利用了固相磁性分离技术简单、快速、高效的优点。只要经一步简单快速的磁分离操作, 就能得到纯度很高的生物素标记的甲状腺素。本发明也可以用于分离其他生物素标记生物分子。对于大分子蛋白标记后的分离, 和传统的基于分子量差别的分离技术如透析、超滤或凝胶电泳等方法相比, 采用该分离技术分离效果同等, 但是操作简单快速, 充分显示其优越性。而对于小分子物质如短肽、寡聚核苷酸或激素小分子等标记后的分离, 由于它们和生物素试剂分子差别不大, 无法用常规的透析、超滤或凝胶电泳等方法分离纯化, 该技术的建立, 很好的解决了这个问题。进一步拓展了生物素-亲和素系统的应用范围。例如在肽文库技术中, 可以很方便的使用生物素标记的短肽作为靶配基来获得特异分子之间的互相识别作用的信息; 而且可以很好的研究短肽之间的作用, 这是研究大分子蛋白质作用的基础。

附图说明

图 1 是本发明方法原理示意图 (一步反应分离检测法)。

具体实施方式

如图 1 所示, 以下结合附图提供实施例。

实施例 1

(1) 甲状腺素的生物素标记反应

将生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯溶于二甲亚砜配成 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 溶液; 将甲状腺素溶于 DMF 配制成 $2\text{mg}/\text{ml}$ 的储存液, 使用时用 $0.1\ \text{M}$, $\text{PH}\ 8.5$ 的 NaHCO_3 缓冲液稀释成 $0.2\text{mg}/\text{ml}$ 。取 $100\ \mu\text{l}$ 的 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯溶液缓慢加入到 $100\ \mu\text{l}$ 的 $0.2\text{mg}/\text{ml}$ 的甲状腺素溶液中, 室温下振荡反应 2h 。

生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和甲状腺素的摩尔比大约为 $5:1$ 。经过 2h 的充分反应后, 甲状腺素基本被生物素化。反应混合液基本只含有生物素标记的甲状腺素

和过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯。甲状腺素总浓度为 0.1mg/ml。

(2) 磁分离除去过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯，酶免疫分析法检测生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯同磁性粒子上的牛血清白蛋白反应程度。

采用一步反应分离检测法，具体如下：

取前面形成的 100 μ l 反应混合液加入到含有 5mg 的牛血清白蛋白包被的磁性粒子中(磁性粒子分散在 0.1 M, PH 8.5 的 NaHCO_3 缓冲液中，浓度为 10mg/ml)。振荡反应 1h，混合液中过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应。反应过程中每过 15min 取出 50ug 磁性粒子。反应结束后用磁铁吸附 5min，将反应上清液转移出，待检测。将反应中每隔 15min 取出的 50 μ g 的磁性粒子用 0.1 M, PH 8.5 的 NaHCO_3 缓冲液洗三次后，加入 100 μ l 的辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素，室温下振荡反应 20min。用洗液清洗 4 次，洗掉未反应的和非特异性吸附在磁性粒子上的辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素。各加入显色剂：100 μ l TMB 和 100 μ l H_2O_2 ，37℃温育 10min 显色，再加入 50 μ l 的终止剂 H_2SO_4 终止显色反应。紫外分光光度计测 450nm 下的吸光值。参照管用牛血清白蛋白包被的磁性粒子取代与混合液反应后的磁性粒子，其他操作步骤一样。

4 段时间取出的磁性粒子的检测值依次为 0.321、0.525、0.617、0.619，在前面 45min 内，检测值逐渐增加，表明甲状腺素生物素化反应后混合液中的过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯能同固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应，形成磁性粒子-牛血清白蛋白-生物素复合物。经过 45min 反应后，检测值趋于不变，表明结合量不再变化，反应已经饱和。再取上清液和新的包被牛血清白蛋白的磁性粒子反应，检测值为 0.087 和参照值 0.085 接近，说明反应液基本没有过量的生物素试剂生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯，即过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯已经同磁性粒子上的牛血清白蛋白完全反应经磁分离除去。

或者采用多步反应分离检测法，具体如下：

取前面形成的 100 μ l 反应混合液加入到含有 0.5mg 的牛血清白蛋白包被的磁性粒子中(磁性粒子分散在 0.1 M, PH 8.5 的 NaHCO_3 缓冲液中，使用前用磁铁吸附几分钟，去上清液，下面的磁性粒子使用前进行同样的操作)。振荡反应 15min，混合液中过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白反应。用磁铁吸附 5min，将反应上清液转移到另一管含有 0.5mg 牛血清白蛋白包被的磁性粒子中，继续振荡反应 15min。连续进行同样的反应 4 次，最后一管的上清

液转移出保存,待检测。将反应后各管中的磁性粒子用 0.1 M, PH 8.5 的 NaHCO_3 缓冲液分散成浓度为 0.5mg/ml。各取 100 μl (含 50 μg 磁性粒子)加入 100 μl 的辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素,室温下振荡反应 20min。用洗液清洗 4 次,洗掉未反应的和非特异性吸附在磁性粒子上的辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素。各加入显色剂: 100 μl TMB 和 100 μl H_2O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 温育 10min 显色,再加入 50 μl 的终止剂 H_2SO_4 终止显色反应。紫外分光光度计测 450nm 下的吸光值。参照管用牛血清白蛋白包被的磁性粒子取代与混合液反应后的磁性粒子,其他操作步骤一样。

4 批反应后的磁性粒子的检测值依次分别为 0.685、0.462、0.187、0.090,检测值逐渐减少,表明溶液中游离的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯量越来越少。第 4 次反应的检测值和参照值 0.087 接近,说明过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯已经完全结合到磁性粒子上经磁分离除去。

(3) 竞争抑制反应法检测甲状腺素生物素化率:

①做生物素,辣根过氧化物酶标记的生物素对包被在磁性粒子上的链酶亲和素的竞争抑制标准曲线:

标准生物素的浓度梯度为 25.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 将不同浓度的生物素和辣根过氧化物酶标记的生物素等体积混合,各取 100 μl 的生物素,辣根过氧化物酶标记的生物素混合液加入到 50 μg 的包被链酶亲和素的磁性粒子中,室温下反应 30min,生物素和辣根过氧化物酶标记的生物素竞争结合磁性粒子上的链酶亲和素,然后用酶联免疫分析法检测,经显色反应,测 A_{450} 。做 A_{450} 对生物素浓度对数曲线,得到生物素、辣根过氧化物酶标记的生物素对包被在磁性粒子上的链酶亲和素竞争抑制标准曲线。在竞争抑制标准曲线中生物素的浓度范围在 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$ 之间曲线呈良好的竞争抑制关系。

②取步骤(2)经磁分离纯化的得到的生物素标记甲状腺素用 0.1 M, PH 8.5 的 NaHCO_3 缓冲液稀释,使总甲状腺素浓度为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。取 50 μl 的稀释液和 50 μl 的辣根过氧化物酶标记的生物素混合均匀后,加入到含有 50 μg 的链酶亲和素包被的磁性粒子中,室温下振荡反应 1h,生物素标记的甲状腺素和辣根过氧化物酶标记的生物素竞争地与固定在磁粒子上的链酶亲和素结合。用洗液洗涤 4 次后,加入 100 μl 的 TMB 和 100 μl 的 H_2O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 下显色反应 10min,加入 50 μl H_2SO_4 终止反应,测 450nm 的吸光值。并与生物素、辣根过氧化物酶标记的生物素对包被在磁性粒子上链酶亲和素的竞争抑制标准曲线对照,确定对应的生物素标记的甲

甲状腺素的浓度，计算甲状腺素的生物素化效率。

经磁性分离纯化的得到的生物素标记甲状腺素和辣根过氧化物酶标记的生物素竞争结合包被在磁性粒子上的链酶亲和素后，经显色反应测得 A_{450} 值为 0.211。根据摩尔浓度关系计算其对应的生物素标记甲状腺素浓度为 $0.247 \mu\text{g/ml}$ 。而总甲状腺素浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 。所以甲状腺素的生物素化效率为 98.8%。表明经过磁性分离纯化后得到得生物素标记甲状腺素纯度很高。

实施例 2

改变生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和甲状腺素的反应摩尔比为 3: 1，分离和检测方法同实施例 1，用一步法分离检测。每隔 15min 取出的 4 批磁性粒子的检测结果依次为：0.285, 0.455, 0.579, 0.581。说明 45min 后磁性粒子上的结合生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯量不在变化，磁分离后，取上清液在和包牛血清白蛋白的磁性粒子反应，检测值为 0.084 和对照值 (0.085) 接近。说明溶液中已经没有过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯。

取分离后的上清液检测甲状腺素的生物素化率，检测方法同实施例 1，检测值为 0.212。根据摩尔浓度关系计算其对应的生物素标记甲状腺素浓度为 $0.245 \mu\text{g/ml}$ 。而总甲状腺素浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 。所以甲状腺素的生物素效率为 98.0%。

实施例 3

改变生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯和甲状腺素的反应摩尔比为 8: 1，分离和检测方法同实施例 1，用多步法分离检测。4 批反应后的磁性粒子的检测结果依次为：0.822、0.542、0.247、0.099。说明第 4 次反应后磁性粒子上的检测值和对照值 (0.086) 接近，说明溶液中过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯已完全和磁性粒子上的牛血清白蛋白反应而通过磁分离除去，即溶液中已经没有过量的生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯。

取分离后的上清液检测甲状腺素的生物素化率，检测方法同实施例 1，检测值为 0.210。根据摩尔浓度关系计算其对应的生物素标记的甲状腺素浓度为 $0.248 \mu\text{g/ml}$ 。而总甲状腺素浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 。所以甲状腺素的生物素效率为 99.2%。

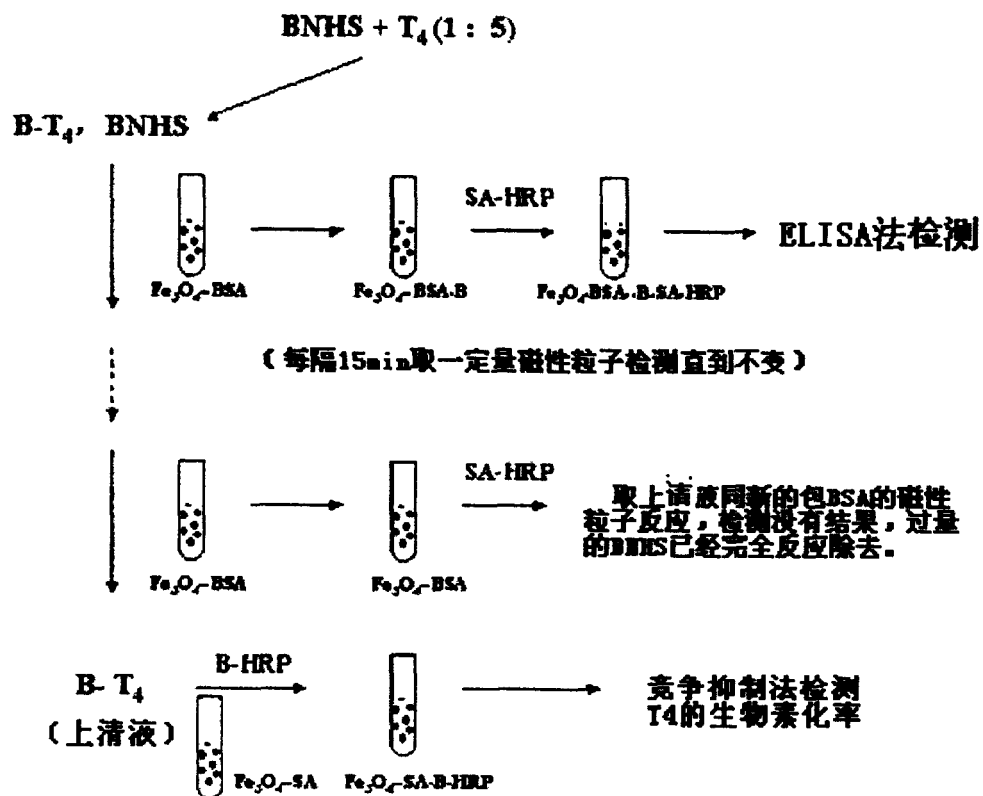


图 1

专利名称(译)	生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法		
公开(公告)号	CN1540348A	公开(公告)日	2004-10-27
申请号	CN200310108264.0	申请日	2003-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	郑伟明 高峰 张玲 古宏晨		
发明人	郑伟明 高峰 张玲 古宏晨		
IPC分类号	C07K1/14 G01N33/531		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种生物素标记甲状腺素的快速磁性分离纯化方法，属于生化领域。使用固定在磁性粒子上的牛血清白蛋白同甲状腺素生物素标记反应后混合液中过量的生物素试剂生物素N - 羟基丁二酰亚胺酯反应，形成磁性粒子 - 牛血清白蛋白 - 生物素复合物，在外加磁场的帮助下快速分离除去过量的生物素试剂，并用酶联免疫分析方法检测生物素N - 羟基丁二酰亚胺酯和磁性粒子的反应程度，判断最后得到的溶液是高纯度生物素标记的甲状腺素，甲状腺素的生物素化率用固定在磁性粒子上的链酶亲和素来竞争检测。本发明具有简单快速、高效的优点，也适用于蛋白质、多肽、短肽、寡聚核苷酸或激素等生物分子的生物素标记后的分离纯化，进一步拓展了生物素 - 亲和素系统的应用范围。

