



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102539761 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201010578157. 4

(22) 申请日 2010. 12. 08

(71) 申请人 北京协和洛克生物技术研究开发中心

地址 100142 北京市海淀区恩济庄 18 号院 4 号楼 2 单元 302 室

(72) 发明人 王晓华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

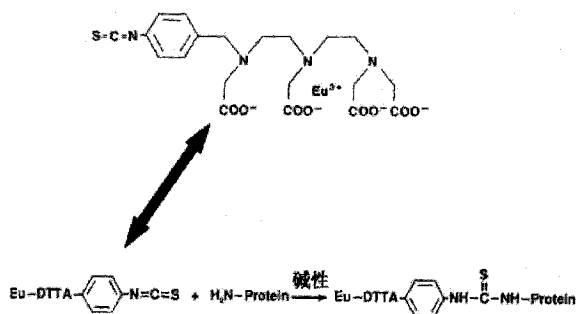
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种促甲状腺素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法）制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种促甲状腺激素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法），适用于新生儿甲状腺素低下的临床筛查。其特征在于包括下述步骤：(1) 通过特定色谱柱分离抗体结合物（Eu-Anti-TSH）与游离稀土离子（Eu³⁺）；(2) 标记时采用双功能螯合剂（DTTA），其一端螯合稀土离子（Eu），另一段可与蛋白质的 -NH₂ 连接；(3) 在增强液中加入 β-NTA，通过调整其浓度使得最终试剂的荧光强度得到提高；(4) 在分析缓冲体系中加入叠氮钠替代品 Proclin300。根据本发明上述步骤中的各项特征，可用来生产促甲状腺素定量检测试剂盒“时间分辨荧光免疫法”，也可用于开发其它项目的体外诊断检测试剂。



1. 促甲状腺素定量检测试剂盒“时间分辨荧光免疫法”，其特征在于包括下述步骤：
 - (1) 通过色谱柱分离抗体结合物与游离稀土离子；
 - (2) 标记时采用双功能螯合剂，其一端螯合稀土离子，另一端可与蛋白质的 $-NH_2$ 连接，在中性或接近中性 PH 条件下，双功能螯合剂对稀土离子具有足够高的络合稳定性；
 - (3) 在增强液中加入 β -NTA，通过调整其浓度使得最终试剂的荧光强度得到提高；
 - (4) 在分析缓冲体系中替换传统生产中常规使用的叠氮钠。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述的标记有稀土离子的双功能螯合物有氯磺化邻三联苯 (BTBCT)，二乙三胺五乙酸 (DTPA)，异硫氰酸苄基二乙胺四乙酸 (EDTA)，优选异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸 (DTTA)。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的稀土离子有 Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} ，优选 Eu^{3+} 。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的增强液中加入 β -NTA，通过调整其浓度使得最终试剂的荧光强度得到极大提高，同时也提高了试剂的反应灵敏度。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述步骤 (1) 的分离方法是通过色谱柱分离优选的是 Sephadex G-50 色谱柱。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述步骤 (4) 的叠氮钠替代物为 Proclin 300，在分析缓冲液体系中加入 Proclin300，防止了叠氮钠在生产配置和试验废弃物排放时对环境造成的危害。
7. 根据权利要求 6 所述的 Sephadex G-50 色谱柱可用来生产促甲状腺素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法），也可用来制备其它稀土离子标记的抗体。
8. 根据权利要求 4 所述的增强液 β -NTA 可用来生产促甲状腺素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法）中的增强液，也可用来制备其它时间分辨荧光免疫法试剂盒中的增强液。
9. 根据权利要求 6 所述的叠氮钠的替代品 Proclin300，可用来生产促甲状腺素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法）中的缓冲液体系，也可用来制备其它时间分辨荧光免疫法试剂盒中的缓冲液体系。
10. 根据权利要求 1 所述制备标记抗体的方法，可用来生产促甲状腺素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法）中的 Eu-TSH 抗体，也可用来研发新的时间分辨荧光免疫法定量检测试剂盒中的 Eu- 抗体。

一种促甲状腺素定量检测试剂盒（时间分辨荧光免疫法） 制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫诊断应用技术领域，具体而言，本发明提供了一种利用时间分辨荧光免疫法，采用 Eu 标记的抗体与固相载体上的抗体结合抗原上不同位点的“双抗体夹心”技术，定量检测采集在 903# 滤纸上的新生儿全血样品中促甲状腺素 (TSH) 的浓度，主要用于新生儿甲状腺功能低下的筛查。

技术背景

[0002] “时间分辨荧光免疫分析”理论是芬兰的 Soini 和 Hemmila 于 1979 年在首次提出，1984 年，Hemmila 确定了时间分辨免疫分析技术方案。

[0003] 目前国内用于检测新生儿血中促甲状腺素浓度最广泛的实验方法是酶法和荧光法。虽然酶是一种理想的标记物，但对于测量酶反应生色产物 OD 值的酶法其灵敏度难以对高浓度待测物直接准确定量。常规荧光分子为标记物的传统荧光法由于受到散射光，不同来源的背景荧光以及荧光淬灭等因素的影响分析灵敏度一般为 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ mol/L，只限于测定一些对灵敏度要求不高的待测物以及某些小分子。时间分辨荧光免疫法集酶标记技术和同位素标记技术的优点于一身，其反应产物稳定性高，具有高度可检测性，高分析灵敏度一般为 10^{-18} mol/L，宽的测量范围，优良的分析精密性，试剂寿命更长，操作简便是目前最具优势的检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种采用时间分辨荧光免疫法，定量检测促甲状腺激素浓度的试剂盒。

[0005] 本发明采用时间分辨荧光免疫法，所制备的促甲状腺激素定量检测试剂盒检测灵敏度高，检测范围宽。

[0006] 本发明进一步目的是提供更适用于新生儿甲状腺功能低下症的筛查方法。

[0007] 本发明提供的采用时间分辨荧光免疫法，其包含下述步骤：

[0008] (1) 将 TSH 单克隆抗体包被到 96 孔板上；

[0009] (2) 将稀土离子 Eu 标记到 TSH 单克隆抗体上；

[0010] (3) 通过特定色谱柱分离纯化 Eu-Anti-TSH 结合物与游离 Eu^{3+} ；

[0011] (4) 增强液的制备；

[0012] (5) 在分析缓冲体系中加入叠氮钠替代品 Proclin300。

[0013] 本发明提供一种促甲状腺激素定量检测试剂盒，适用于新生儿甲状腺素低下的临床筛查。具体检测方法来源于时间分辨荧光免疫 (TRFIA) 技术。

[0014] 本发明也提供一种标记抗体的方法。将带有稀土离子的双功能螯合物标记到 TSH 抗体上，在中性或接近中性的条件下，抗体结合物具有足够高的络合稳定性。

[0015] 本发明也提供一种抗体分离纯化的方法。为了获得高活性和高纯度的抗体，本发

明通过 Sephadex G-50 色谱柱分离抗体结合物与游离稀土离子。

[0016] 根据本发明,上述用于制备时间分辨荧光免疫试剂中所需抗体结合物的提纯方法,都可以应用 Sephadex G-50 色谱柱分离抗体结合物与游离稀土离子。

[0017] 本发明以公知的方法研制用于 TSH 时间分辨荧光免疫法的试剂,通过双功能螯合物标记上稀土离子,再运用色谱柱分离抗体结合物与游离稀土离子。制备出抗体结合物。

[0018] 将标记分离抗体的方法应用于 TSH 试剂盒(时间分辨荧光免疫法)中试剂的制备,也包括任何可用于双抗夹心法原理的检测项目。例如 HCG(促性腺绒毛膜激素),AFP(甲胎蛋白),可根据需要提纯标记抗体。

[0019] 增强液的制备方法。可用于各种时间分辨荧光免疫法检测项目中的增强液效能的提高,例如 HCG, AFP。

[0020] 根据本发明,以公知的方法研发 TSH 检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)中的试剂。例如,将带有稀土离子的双功能螯合物标记到抗体上,再运用色谱柱分离抗体结合物与游离稀土离子,制备出 Eu- 抗体。增强液的制备。抗体包被培养板。

[0021] 用 TSH 单克隆抗体包被 96 孔培养板,从而制备出时间分辨荧光免疫法定量检测试剂盒中的 TSH 包被板。

[0022] 为了提高增强液的效果,在增强液中加入 β -NTA,通过调整其浓度使得最终试剂的荧光强度得到极大的提高,同时也提高了试剂的反应灵敏度。从而制备出时间分辨荧光免疫法定量检测试剂盒中的增强液试剂。

[0023] 促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)中的 Eu- 抗体制备方案,可用于生产促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法),也可用来开发新的时间分辨荧光免疫法定量检测试剂盒。

[0024] 促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)中的增强液制备方案,可用于生产促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法),也可应用于其它的时间分辨荧光免疫法定量检测试剂盒。

[0025] 促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)中的分析缓冲体系中加入叠氮钠替代品 Proclin300,可用于生产促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法),也可应用于其它检测项目的时间分辨荧光免疫法定量检测试剂盒。

附图说明

[0026] 图 1:标记免疫技术的理论检测灵敏度图示。

[0027] 图 2:抗体标记技术。

[0028] 图 3:双抗夹心法示意图。

[0029] 图 4:TRFIA 配基标记物 β -NTA。

具体实施方式

[0030] 为使本发明的内容更为明确,以下为促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)中试剂的重点制备操作过程。

[0031] 1、Eu-Anti-TSH 标记并分离抗体的流程

[0032] (1) 用双蒸水溶解 Eu^{3+} 螯合物;

[0033] (2) 待溶解后,取 1mg Eu^{3+} 螯合物溶液加入到 1mg TSH 单克隆抗体溶液中,室温反应 48h;

[0034] (3) 通过 Sephadex G-50 色谱柱分离 Eu-Anti-TSH 结合物与游离 Eu^{3+} ;

[0035] (4) 收集荧光计数大于 100 万的洗脱液,即为 Eu-Anti-TSH 结合物。

[0036] 2、制备增强液

[0037] 主要原料名称冰乙酸, Triton X-100(曲拉通 X-100, 聚乙二醇辛基苯基醚), 0.1M 邻苯二甲酸氢钾 (KHP), β -NTA(β -萘甲酰三氟丙酮), TOPO(三辛基氧化磷), Proclin300, 配置方法见下表。

[0038] 增强液配方

[0039]

主要原辅料名称	剂量
冰乙酸	5.86mL
Triton X-100	1ml
0.1M 邻苯二甲酸氢钾	调 pH 值
β -NTA	0.04g
TOPO	0.386g
Proclin300	0.5ml
去离子水	定容 1000ml

[0040] 3、制备 TSH 包被板

[0041] 以磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.02M, PH7.4) 配制待包被 TSH 单克隆抗体溶液, 浓度为 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 。向微孔板的每个微孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 包被液 (包被液的配制见表 1), 置于室温 ($18-30^\circ\text{C}$) 过夜 (16-24 小时), 弃包被液后加入封闭液 (封闭液的配制见表 2) $300 \mu\text{L}$ 置于室温过夜 (16-24 小时), 倾去封闭液, 置 $20-25^\circ\text{C}$ 室温干燥, 将干燥的包被板装在铝箔袋中, 室温真空抽干密封。

[0042] 表 1 包被液配方

[0043]

主要原辅料名称	剂量
Proclin300	0.5ml
包被用 TSH 单克隆抗体 (1.06mg/mL)	4.7ml
0.02M PB(PH = 7.4)	定容 1000ml

[0044] 表 2 封闭液配方

[0045]

主要原辅料名称	剂量
蔗糖	50g
牛血清白蛋白	2g
0.02M PB(PH = 7.4)	定容 1000ml

[0046] 3、制备实验缓冲液

[0047] 主要原料名称 NaCl(氯化钠), BSA(牛血清白蛋白), PEG6000(聚乙二醇 6000), Proclin300, Tween-40(吐温-40), EDTA(乙二胺四乙酸), 曙红(四溴荧光素二钠), Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl(盐酸), 配置方法见下表。

[0048] 表 5 实验缓冲液配方

[0049]

主要原辅料名称	剂量
NaCl	9g
BSA	10g
PEG6000	15g
0.5% Tween-40	20ml
1mM EDTA	25
Proclin300	0.5ml
1%曙红	0.5ml
0.05M Tris-HCl	定容 1000ml

[0050] 4、试剂盒操作流程

[0051] 1. 实验温度 18-25℃, 试剂盒及样本从 2-8℃取出恢复至室温;

[0052] 2. 浓缩洗液与去离子水 1 : 25 稀释, 稀释后 2 ~ 8℃可保存 1 个月;

[0053] 3. Eu- 抗体与实验缓冲液 1 : 150 倍稀释;

[0054] 4. 专用打孔钳打下直径 3mm 标准品、质控品和样本血片放入相应的微孔中;

[0055] 5. 每孔加 200 μ l 的 Eu- 抗体稀释液, 室温振荡 5 小时;

[0056] 6. 洗板 : 反应结束后弃去反应混合物, 每孔加洗液 400 μ l, 弃去, 共洗涤 6 次。

[0057] 7. 每孔加入 200 μ l 增强液, 室温振荡 11 分钟;

[0058] 8. 在 20 分钟内读取荧光值, 时间分辨免疫荧光分析仪激发波长 340nm, 发射波长 614nm。

[0059] 9. 利用时间分辨荧光仪所带的软件, 自动计算样品浓度值。

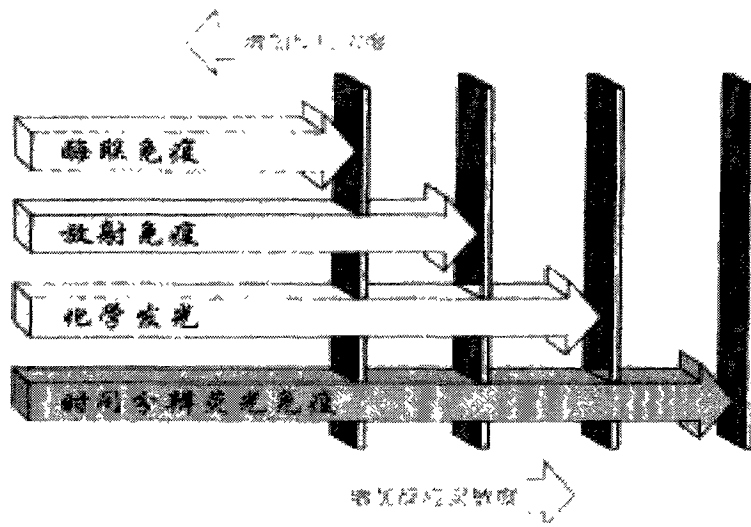


图 1

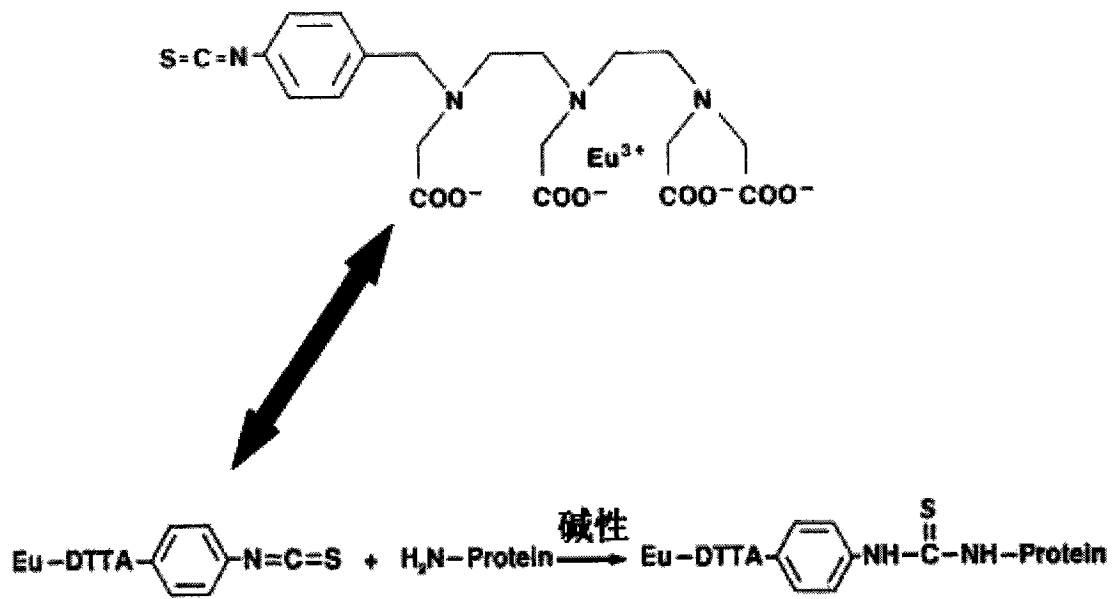


图 2

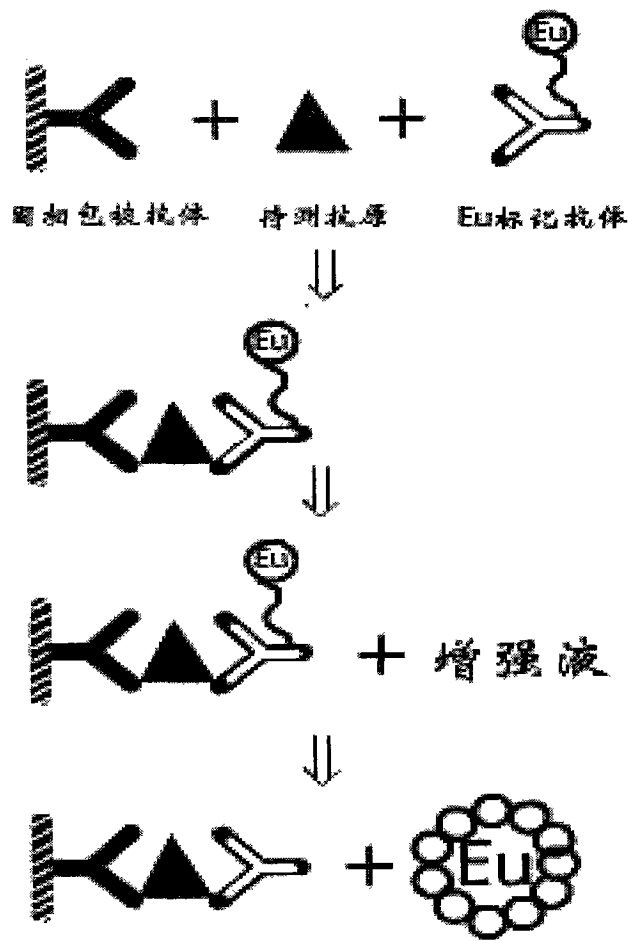


图 3

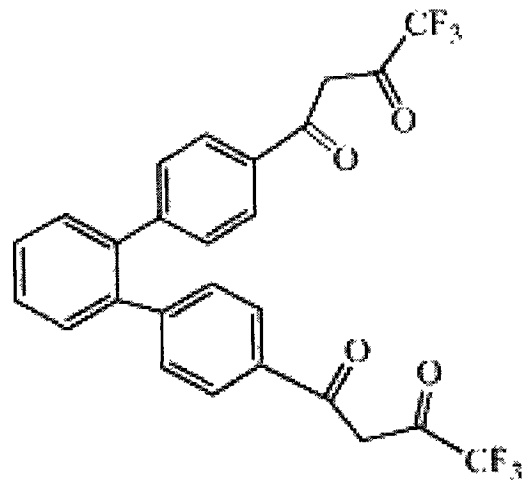


图 4

专利名称(译)	一种促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)制备方法		
公开(公告)号	CN102539761A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201010578157.4	申请日	2010-12-08
[标]发明人	王晓华		
发明人	王晓华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N1/34		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种促甲状腺素定量检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法),适用于新生儿甲状腺素低下的临床筛查。其特征在于包括下述步骤:(1)通过特定色谱柱分离抗体结合物(Eu-Anti-TSH)与游离稀土离子(Eu³⁺);(2)标记时采用双功能螯合剂(DTTA),其一端螯合稀土离子(Eu),另一段可与蛋白质的-NH₂连接;(3)在增强液中加入β-NTA,通过调整其浓度使得最终试剂的荧光强度得到提高;(4)在分析缓冲体系中加入叠氮钠替代品Proclin300。根据本发明上述步骤中的各项特征,可用于生产促甲状腺素定量检测试剂盒“时间分辨荧光免疫法”,也可用于开发其它项目的体外诊断检测试剂。

