



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104062429 B

(45) 授权公告日 2016.02.17

(21) 申请号 201410261089.7

(22) 申请日 2014.06.12

(73) 专利权人 美艾利尔(上海)诊断产品有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区李冰路151号7号楼

(72) 发明人 张展英 赵金博 田丰 周蓓昕

(74) 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司 31211

代理人 王函

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102192983 A, 2011.09.21, 全文.

CN 103323599 A, 2013.09.25, 全文.

CN 101857866 A, 2010.10.13, 说明书第0013、0035、0037-0041段.

EP 1245957 A2, 2002.10.02, 全文.

CN 1963506 A, 2007.05.16, 全文.

CN 1979171 A, 2007.06.13, 全文.

US 2009/0130662 A1, 2009.05.21, 全文.

CN 101750502 A, 2010.06.23, 全文.

朱岚等. 甲状腺球蛋白抗体竞争 TRFIA 技术的建立及临床应用. 《检验医学》. 2013, 第 28 卷(第 4 期), 305-307.

田华. 戊型肝炎病毒中和抗体竞争酶联免疫检测方法的建立及评价. 《医药卫生科技辑》. 2007, (第 4 期), E059-33.

冯誉龄等. 动物狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒的研制. 《军事医学科学院院刊》. 2010, 第 34 卷(第 2 期), 摘要部分, 材料与方法部分.

审查员 李宏悦

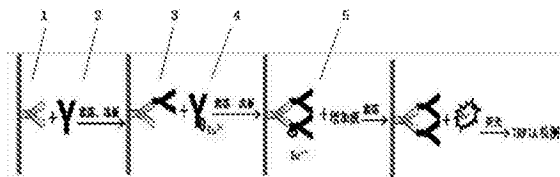
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,包括以下组分:包被羊抗鼠多克隆抗体的酶标板;镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物;鼠单克隆抗体校准品;清洗液;分析液;增强液。此外,本发明还公开了该试剂盒的制备方法及其在定量检测鼠源抗体中的应用。本发明解决了“免疫诊断技术中定量检测未有效包被到固体载体上的鼠源抗体浓度,从而计算有效包被到固体载体上的抗体包被率,以评估包被效果”的技术难题,该试剂盒能够定量检测鼠源抗体,具有检测灵敏度高,操作简单,操作流程短,储存时间长等优点。



1. 一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下组分:

包被羊抗鼠多克隆抗体的酶标板;  
镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物;  
鼠单克隆抗体校准品;  
清洗液;  
分析液;  
增强液。

2. 根据权利要求1所述的一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于,所述羊抗鼠多克隆抗体的包被浓度为1-100  $\mu\text{g/ml}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于,所述镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物中抗体是鼠单克隆抗体,所述标记示踪物是镧系元素金属离子及其螯合物中的一种,包括铕 Eu、铽 Tb、钐 Sm 和镝 Dy。

4. 根据权利要求1或2所述的一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于,所述镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物中镧系元素离子与鼠单克隆抗体的摩尔比例是6-10:1。

5. 一种权利要求1所述试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1. 羊抗鼠多克隆抗体包被酶标板的制备:

将羊抗鼠多克隆抗体在包被液中透析,用包被液将羊抗鼠多克隆抗体稀释到1-100  $\mu\text{g/ml}$ ,然后包被到96孔酶标板中,再用封闭保护液封闭,最后甩干封闭保护液干燥密封备用;

步骤2. 镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物的制备:

将鼠单克隆抗体用标记液进行透析,取透析好的鼠单克隆抗体加入到镧系元素离子或其螯合物中进行标记,然后纯化,收集标记物;

步骤3. 鼠单克隆抗体校准品的制备:用鼠单克隆抗体和PBS配制浓度为0.1、0.5、1.0、2.0、5.0和10ng/ml的鼠单克隆抗体校准品;

所述清洗液、分析液和增强液为市售商品。

6. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤2中,所述取透析好的鼠单克隆抗体加入到镧系元素离子中进行标记,所述镧系元素离子与鼠单克隆抗体的摩尔比例是6-10:1。

7. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤1中,所述的包被液采用如下方法制得:在900ml去离子水中依次加入35.08g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、15.91g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和9.00g NaCl,待完全溶解后用1M HCl或1M NaOH调整pH值至 $6.8 \pm 0.1$ 。

8. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤1中,所述的封闭保护液采用如下方法制得:将8.77g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和3.98g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加入到600ml去离子水中,再依次加入1g BSA,60g Trehalose和1g Diazolidinyl Urea,待完全溶解后调整pH值至 $6.8 \pm 0.1$ ,定容到1L。

9. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤2中,所述的标记液采用如下方法制得:在900ml去离子水中依次加入2.12g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和6.72g  $\text{NaHCO}_3$ ,待完全溶解后用1M HCl

或 1M NaOH 调整 pH 值至  $9.2 \pm 0.2$ 。

10. 一种如权利要求 1 所述的试剂盒在定量检测鼠源抗体中的应用,其特征在於,包括如下步骤:

步骤 1. 待检样品的制备:将鼠源抗体包被到固体载体上后,收集其废弃液,测量废弃液的体积并用分析液稀释作为待检样品;

步骤 2. 将鼠单克隆抗体校准品和待检样品依次加入到羊抗鼠多克隆抗体包被的酶标板上,每个校准品和待检样品重复三孔,再加入分析液,震荡孵育;

步骤 3. 将清洗液用去离子水进行稀释,然后用已稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干;

步骤 4. 将纯化好的镧系元素离子标记的鼠单克隆抗体,用分析液稀释,加入酶标板中,震荡孵育;

步骤 5. 用稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干;

步骤 6. 每孔加入增强液,在时间分辨荧光检测仪上按所编程序检测荧光信号;

步骤 7. 根据荧光数值建立标准曲线,将待检样品的荧光信号代入到标准曲线中,求得待检样品中鼠源抗体的检测浓度,再按照公式“ $100\% - \text{废弃液中鼠源抗体检测浓度} * \text{废弃液体积} * \text{稀释倍数} / \text{鼠源抗体投入量} * 100\%$ ”计算鼠源抗体的包被率。

## 一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种时间分辨免疫荧光试剂盒,尤其涉及一种检测鼠源抗体时间分辨免疫荧光试剂盒;此外,本发明还涉及该检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 近年来,免疫诊断方法已经广泛应用于医学和生物学领域的研究,免疫诊断技术主要有以下几种类型:荧光标记免疫技术、同位素标记免疫技术、酶标记免疫技术、胶体金标记免疫技术和发光免疫技术等。鼠源抗体(尤其是鼠单克隆抗体)已广泛应用在免疫诊断试剂盒的开发和制备过程中,鼠源抗体常用于包被酶标板、芯片、胶体金颗粒、乳胶微球颗粒和磁性微球颗粒等固体载体上,然后用BSA(Bovine Serum Albumin,即牛血清白蛋白)或OVA(Ovalbumin,即鸡卵白蛋白)等其它蛋白封闭抗体未结合的载体位点,洗脱,从而完成了抗体的包被。鼠源抗体包被效果的判断标准是产品性能能否达到其设计要求或者判定标准。

[0003] 由于产品的性能受到很多因素的影响,因此单纯地以产品性能能否达到设计要求或判定标准来判断在固体载体上抗体的包被效果并不科学。鼠源抗体结合在固体载体上的比率是反映抗体包被效果的一个非常重要的而且直接的指标,更直接地反映了鼠源抗体结合在固体载体上的具体抗体量,因此,亟需开发一种鼠源抗体快速定量检测新产品。

[0004] 时间分辨荧光免疫分析方法(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是1982年发展起来的一种新型的非放射性标记技术。TRFIA利用镧系元素金属的三价离子及其螯合物作为荧光标记,常用的镧系元素为铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)和镝(Dy),最常用的是铕、铽,镧系元素标记物比较稳定,可以保存1-2年,克服了同位素、酶标等不稳定的缺点。TRFIA现已成为免疫检测中一项非常有应用前景的分析手段,具有操作简便、灵敏度高、示踪物稳定、不受样品自然荧光干扰、多标记、无放射性污染等优点。在抗体检测方面,时间分辨荧光免疫分析方法的检测目标物通常是针对某一抗原包括小分子抗原的抗体,一般不会采用该方法来检测某一种属动物的抗体(例如鼠源抗体)。目前,对于采用时间分辨荧光免疫分析方法定量检测鼠源抗体尚未见报道。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,解决免疫诊断技术中定量检测未有效包被到固体载体上的鼠源抗体浓度,从而计算有效包被到固体载体上的抗体包被率,以评估包被效果,该试剂盒能够定量检测鼠源抗体,具有检测灵敏度高,操作简单,操作流程短,储存时间长等优点。此外,本发明还提供该试剂盒的制备方法和应用。

[0006] 本发明的原理是竞争免疫荧光分析法,如图1所示,具体包括如下步骤:将羊抗鼠

多克隆抗体包被到酶标板上,形成包被羊抗鼠多克隆抗体的酶标板 1,待测样品中的鼠源抗体 2 先与包被在酶标板 1 上的羊抗鼠多克隆抗体反应(震荡、洗板),形成鼠单克隆抗体/羊抗鼠多克隆抗体免疫复合物 3,然后加入镧系元素标记的鼠单克隆抗体 4 反应(震荡、洗板)形成鼠源抗体/羊抗鼠多克隆抗体/镧系元素免疫复合物 5,加入增强液震荡反应,在荧光检测设备如 AutoDELFI A1235 上读荧光信号,从而确定标准品中鼠源抗体的浓度。当镧系元素离子在荧光增强液中从鼠单克隆抗体上解离后发出强荧光,荧光强度与样品中的鼠源抗体浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中鼠源抗体的浓度,再按照公式“100% - 鼠源抗体浓度 \* 待检样品体积 / 鼠源抗体投入量 \* 100%”计算鼠源抗体的包被率。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒,包括以下组分:

[0008] 包被羊抗鼠多克隆抗体的酶标板;

[0009] 镧系元素离子标记的鼠单克隆抗体标记物;

[0010] 鼠单克隆抗体校准品(浓度已知,用于建立标准曲线);

[0011] 清洗液(市售商品);

[0012] 分析液(市售商品);

[0013] 增强液(市售商品)。

[0014] 作为本发明优选的技术方案,所述羊抗鼠多克隆抗体的包被浓度为 1-100  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0015] 作为本发明优选的技术方案,所述镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物中抗体是鼠单克隆抗体,所述标记示踪物是镧系元素金属离子及其螯合物中的一种,包括铕 Eu、铽 Tb、钐 Sm 和镝 Dy。

[0016] 作为本发明优选的技术方案,所述镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物中镧系元素离子与鼠单克隆抗体的摩尔比例是 6-10:1。

[0017] 此外,本发明还提供了一种制备上述试剂盒的方法,包括以下步骤:

[0018] 步骤 1. 羊抗鼠多克隆抗体包被酶标板的制备:

[0019] 将羊抗鼠多克隆抗体在包被液中透析,用包被液将羊抗鼠多克隆抗体稀释到 1-100  $\mu\text{g/ml}$ ,然后包被到 96 孔酶标板中,再用封闭保护液封闭,最后甩干封闭保护液干燥密封备用;

[0020] 步骤 2. 镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物的制备:

[0021] 将鼠单克隆抗体用标记液进行透析,取透析好的鼠单克隆抗体加入到镧系元素离子中进行标记,然后纯化,收集标记物;

[0022] 步骤 3. 鼠单克隆抗体校准品的制备:用鼠单克隆抗体和 PBS 配制浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10ng/ml 的鼠单克隆抗体校准品;

[0023] 所述清洗液、分析液和增强液为市售商品。

[0024] 作为本发明优选的技术方案,步骤 2 中,所述取透析好的鼠单克隆抗体加入到镧系元素离子中进行标记,所述镧系元素离子与鼠单克隆抗体的摩尔比例是 6-10:1。

[0025] 作为本发明优选的技术方案,步骤 1 中,所述的包被液采用如下方法制得:在 900ml 去离子水中依次加入 35.08g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、15.91g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和 9.00g  $\text{NaCl}$ ,待完全溶解后用 1N  $\text{HCl}$  或 1N  $\text{NaOH}$  调整 PH 值至  $6.8 \pm 0.1$ 。

[0026] 作为本发明优选的技术方案,步骤 1 中,所述的封闭保护液采用如下方法制得:将

8.77g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 3.98g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  加入到 600ml 去离子水中,再依次加入 1g BSA, 60g Trehalose 和 1g Diazolidinyl Urea,待完全溶解后调整 PH 值至  $6.8 \pm 0.1$ ,定容到 1L。

[0027] 作为本发明优选的技术方案,步骤 2 中,所述的标记液采用如下方法制得:在 900ml 去离子水中依次加入 2.12g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 6.72g  $\text{NaHCO}_3$ ,待完全溶解后用 1N HCl 或 1N NaOH 调整 PH 值至  $9.2 \pm 0.2$ 。

[0028] 此外,本发明还提供了试剂盒在定量检测鼠源抗体中的应用,包括如下步骤:

[0029] 步骤 1. 待检样品的制备:将鼠源抗体包被到酶标板、芯片、胶体金颗粒、乳胶微球颗粒和磁性微球颗粒等固体载体上后,收集其废弃液,测量废弃液的体积并用分析液稀释作为待检样品;

[0030] 步骤 2. 将鼠单克隆抗体校准品和待检样品依次加入到羊抗鼠多克隆抗体包被的酶标板上,每个校准品和待检样品重复三孔,再加入分析液,震荡孵育;

[0031] 步骤 3. 将清洗液用去离子水进行稀释,然后用已稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干;

[0032] 步骤 4. 将纯化好的镧系元素离子标记的鼠单克隆抗体,用分析液稀释,加入酶标板中,震荡孵育;

[0033] 步骤 5. 用稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干;

[0034] 步骤 6. 每孔加入增强液,在时间分辨荧光检测仪上按所编程序检测荧光信号;

[0035] 步骤 7. 根据荧光数值建立标准曲线,将待检样品的荧光信号代入到标准曲线中,求得待检样品中鼠源抗体的检测浓度,再按照公式“ $100\% - \text{废弃液中鼠源抗体检测浓度} * \text{废弃液体积} * \text{稀释倍数} / \text{鼠源抗体投入量} * 100\%$ ”计算鼠源抗体的包被率。

[0036] 本文中出现的术语“分析液”、“清洗液”、“增强液”、“包被液”、“封闭保护液”、“标记液”、“洗脱液”具体说明见表 1:

[0037] 表 1

[0038]

	用途	成分
分析液	为抗原抗体反应提供所需的溶液环境	NaN <sub>3</sub> , BSA, bovine gamma globulins, Tween 40, DTPA, inert red dye
增强液	在时间分辨荧光检测仪检测时将镧系元素离子从反应复合物上解离下来, 增强荧光信号	Triton X-100, 乙酸和螯合剂
包被液	提供抗体包被在酶标板上所需溶液环境	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, NaCl
封闭保护液	用于将包被在酶标板上的抗体封闭保护在酶标板上	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, Trehalose, BSA, Diazolidinyl Urea
标记液	为抗原与镧系元素结合提供所需要的溶液环境	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub>
洗脱液	用于洗脱平衡 PD10 纯化柱	Tris, NaCl, HCl
清洗液	用于酶标板清洗	Tween 20, Germall II

[0039] 和现有技术相比, 本发明具有以下有益效果:

[0040] 本发明利用竞争法时间分辨免疫荧光技术的原理定量检测鼠源抗体, 能够有效测定没有有效包被酶标板、芯片、胶体金颗粒、乳胶微球颗粒和磁性微球颗粒等固体载体上的鼠源抗体的浓度, 从而计算出有效包被到酶标板、芯片、胶体金颗粒、乳胶微球颗粒和磁性微球颗粒等固体载体上的鼠源抗体的比率, 直接反映了鼠源抗体的包被效果, 而且检测试剂盒操作简便、检测时间短、检测灵敏度高和储存时间长等优点, 为诊断试剂的开发和生产提供了一项重要的性能指标和质量控制手段, 可广泛应用于鼠源抗体的检测。

[0041] 本试剂盒检测的目标物是鼠源抗体, 即用于制备单克隆抗体的小鼠的抗体。一般抗体免疫检测试剂盒的检测目标物是针对某一抗原包括小分子抗原的抗体, 而不是检测某一种属动物的抗体 (例如, 鼠源抗体), 本领域技术人员一般不会想到将时间分辨免疫荧光试剂盒用于检测鼠源抗体, 本申请发明人大胆假设将时间分辨免疫荧光试剂盒用于检测鼠源抗体, 且通过大量实验优选试剂盒组分, 并不断验证实验效果, 出乎意料地发现本发明试剂盒能够快速定量检测鼠源抗体, 解决了“免疫诊断技术中定量检测未有效包被到固体载体上的鼠源抗体浓度, 从而计算有效包被到固体载体上的抗体包被率, 以准确评估包被效果”的技术难题, 达到了现有技术所预料不到的技术效果。

#### 附图说明

[0042] 图 1 是本发明时间免疫荧光试剂盒原理示意图;

[0043] 图 2 是本发明实施例 1 中 Eu<sup>3+</sup> 标记的鼠单克隆抗体的纯化洗脱曲线图;

[0044] 图 3 是本发明实施例 2 中鼠源抗体浓度 - 反应曲线图;

[0045] 图 4 是本发明实施例 3 中标准曲线图。

[0046] 图 1 中附图标记说明如下:

[0047] 1 是包被羊抗鼠多克隆抗体的酶标板;

- [0048] 2 是待测样品中的鼠源抗体；  
[0049] 3 是鼠单克隆抗体 / 羊抗鼠多克隆抗体免疫复合物；  
[0050] 4 是镧系元素标记的鼠单克隆抗体；  
[0051] 5 是鼠源抗体 / 羊抗鼠多克隆抗体 / 镧系元素免疫复合物。

### 具体实施方式

[0052] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。

[0053] 实施例 1 试剂盒的制备

[0054] 1. 包被液的制备

[0055] 包被液 :200mM PBS,0.9% NaCl, pH6.8±0.1；

[0056] 制备方法 :在 900ml 去离子水中依次加入 35.08g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、15.91g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和 9.00g NaCl,待完全溶解后用 1N HCl 或 1N NaOH 调整 PH 值至 6.8±0.1。

[0057] 2. 标记液的制备

[0058] 标记液 :100mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH9.2±0.2；

[0059] 制备方法 :在 900ml 去离子水中依次加入 2.12g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和 6.72g  $\text{NaHCO}_3$ ,待完全溶解后用 1N HCl 或 1N NaOH 调整 PH 值至 9.2±0.2。

[0060] 3. 封闭保护液的制备

[0061] 封闭保护液 :50mM PBS,0.1% BSA,6% Trehalose 和 0.1% Diazolidinyl Urea, pH6.8±0.1；

[0062] 制备方法 :将 8.77g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 3.98g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  加入到 600ml 去离子水中,再依次加入 1g BSA(牛血清白蛋白),60g Trehalose(海藻糖)和 1g Diazolidinyl Urea(双咪唑烷基脲),待完全溶解后调整 PH 值至 6.8±0.1,定容到 1L。

[0063] 4. 羊抗鼠多克隆抗体包被酶标板的制备

[0064] 4.1 从冰箱中取出羊抗鼠多克隆抗体,用 200mmol/L pH = 6.8±0.1 的包被液进行透析,将透析好的羊抗鼠多克隆抗体在紫外分光光度计下测定浓度,然后用此包被液将抗体稀释到 8 μg/ml 备用。

[0065] 4.2 取出 96 孔酶标板,恢复至室温,每孔加入 150 μl 8 μg/ml 羊抗鼠多克隆抗体,将 96 孔酶标板置于 2-8℃ 包被过夜。

[0066] 4.3 取出 96 孔酶标板,将液体甩干,用 25 倍稀释的清洗液清洗 3 次,甩干,仔细检查孔中不能存有液体。每孔加入 200 μl 50mmol/L pH = 6.8±0.1 的封闭保护液,于室温封闭过夜。

[0067] 4.4 取出 96 孔酶标板,将封闭保护液甩干,放入自封袋中并同时放入适量的干燥剂,2-8℃ 冰箱干燥备用。

[0068] 5. 三价铕离子 ( $\text{Eu}^{3+}$ ) 标记的鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体的制备

[0069] 5.1 将鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体,用 100mmol/L pH = 9.2±0.2 的标记液进行透析。

[0070] 5.2 按照三价铕离子 ( $\text{Eu}^{3+}$ ) 与抗体 6-10 :1 的结合比例,将鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体加入到三价铕离子 ( $\text{Eu}^{3+}$ ) 中,缓慢摇匀,置于 2-8℃ 冰箱中过夜,待用。

[0071] 5.350mmol/L pH = 7.8±0.1 洗脱液的配制

[0072] 将 6.057g Tris,9g NaCl 和 345ml 0.1N HCl 加入 600ml 去离子水中,用 1N HCl 和

1N NaOH 调整 PH 值至  $7.8 \pm 0.1$ , 定容到 1L。

[0073] 5.4 取 PD-10 (Sephadex G-50M 填料) 纯化柱, 用  $50\text{mmol/L}$   $\text{PH} = 7.8 \pm 0.1$  的洗脱液洗脱平衡至少 2 小时。

[0074] 5.5 将步骤 5.2 中制备的标记物全部转入柱子的顶端, 重力自然洗脱, 以  $0.25\text{ml/}$ 管为单位进行收集。收集好后, 每管取  $10\ \mu\text{L}$  依次加入到 96 孔酶标板中, 用 Auto DELFIA1235 (全自动时间分辨荧光免疫分析仪) 进行荧光读数, 将所得数据利用 Excel (或其它软件) 进行描绘曲线。

[0075] 5.6 按照图 2 的洗脱曲线, 收集两个箭头中间的部分用于检测, 把两个箭头中间的部分合并后, 加入总体积 0.1% 的 BSA,  $-80 \pm 10^\circ\text{C}$  冷冻保存备用。

[0076] 6. 鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体校准品

[0077] 用鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体和  $100\text{mM}$   $\text{pH}7.2 \pm 0.2$  PBS 先后配制浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 和  $10\text{ng/ml}$  鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体校准品。

[0078] 7. 清洗液、分析液和增强液为市售商品。

[0079] 分析液 (assay buffer): 购自 Perkin Elmer, 货号: 4002-0010, 组分:  $<0.1\%$   $\text{Na}_3\text{N}$ , BSA, bovine gamma globulins, Tween40, DTPA, inert red dye. ( $\text{PH} = 7.8$ )。

[0080] 清洗液 (wash concentrate): 购自 Perkin Elmer, 货号: B117-100, 组分: tween20, Germall II。

[0081] 增强液 (enhancement solution): 购自 Perkin Elmer, 货号: B118-100, 组分: Triton X-100, 乙酸和螯合剂。

[0082] 实施例 2 试剂盒的实验室性能

[0083] 对实施例 1 的试剂盒进行实验室性能分析, 其结果如下:

[0084] 1. 最低检测量为  $0.1\text{ng/ml}$

[0085] 2. 如图 3 所示, 剂量 - 反应曲线的线性, 当样品中鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体浓度在  $0.1$ - $10\text{ng/ml}$  范围内, 鼠源抗体浓度 - 反应曲线相差系数 (r) 为 0.978。

[0086] 实施例 3 试剂盒的应用

[0087] 1. 待检样品的制备

[0088] 将  $150\ \mu\text{L}$   $110\ \mu\text{g/ml}$  鼠  $\beta$ -hCG 单克隆抗体包被到酶标板上, 包被结束后收集其废弃液, 测量废弃液的体积并用分析液稀释 1000 倍作为待检样品, 体积为  $150\ \mu\text{L}$ 。

[0089] 2. 将浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 和  $10\text{ng/ml}$  的鼠单克隆抗体校准品和待检样品依次加入到羊抗鼠多克隆抗体包被的酶标板上, 每个校准品和待检样品重复三孔, 每孔加样  $50\ \mu\text{L}$ , 再加入  $150\ \mu\text{L}$  分析液, 震荡孵育 30 分钟。

[0090] 3. 将清洗液用去离子水进行 25 倍稀释, 然后用已稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干。

[0091] 4. 将纯化好的镧系元素离子标记的鼠抗  $\alpha$ -TSH 单克隆抗体, 用分析液 1:100 稀释,  $200\ \mu\text{L/}$ 孔加入酶标板中, 震荡孵育 30 分钟。

[0092] 5. 用 25 倍稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干。

[0093] 6. 每孔加入  $300\ \mu\text{L}$  增强液, 在时间分辨荧光检测仪上按所编程序检测荧光信号。

[0094] 7. 使用 EXCEL 或其他软件, 根据荧光数值建立标准曲线 (见图 4), 将待检样品的荧光信号 (13224) 代入到标准曲线  $Y = -5520\ln(X) + 18011$  中, 可求得待检样品中鼠源抗体

的浓度为 2.38ng/ml,再按照公式“ $100\% - \text{鼠源抗体浓度} * \text{待检样品体积} / \text{鼠源抗体投入量} * 100\%$ ”计算鼠源抗体的包被率 76.2%。

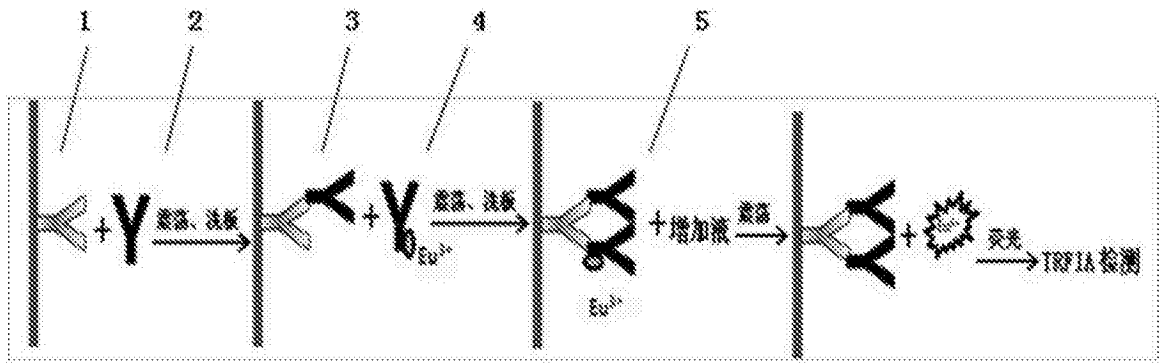


图 1

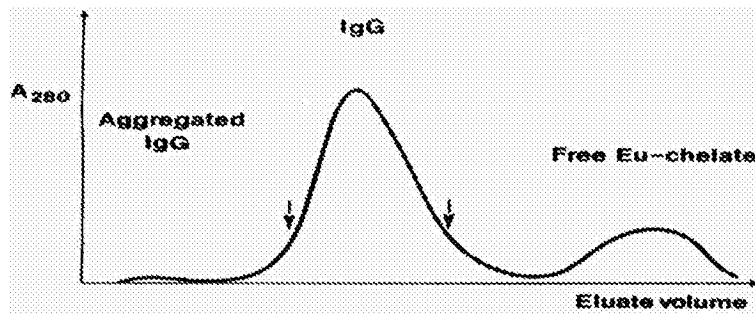


图 2

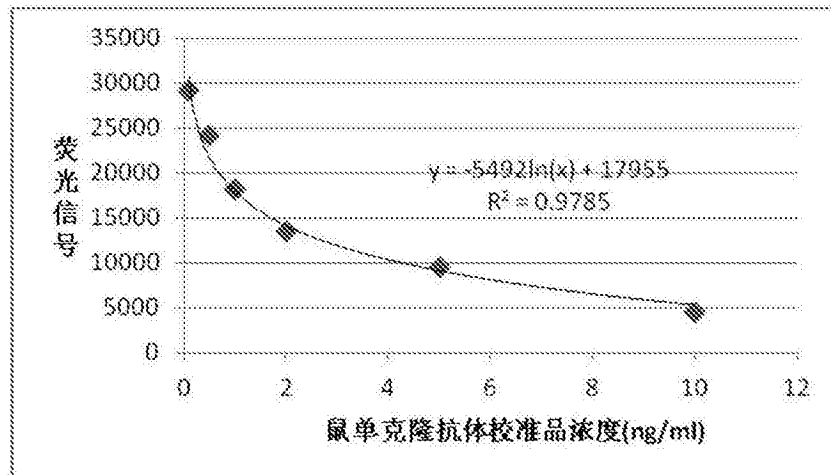


图 3

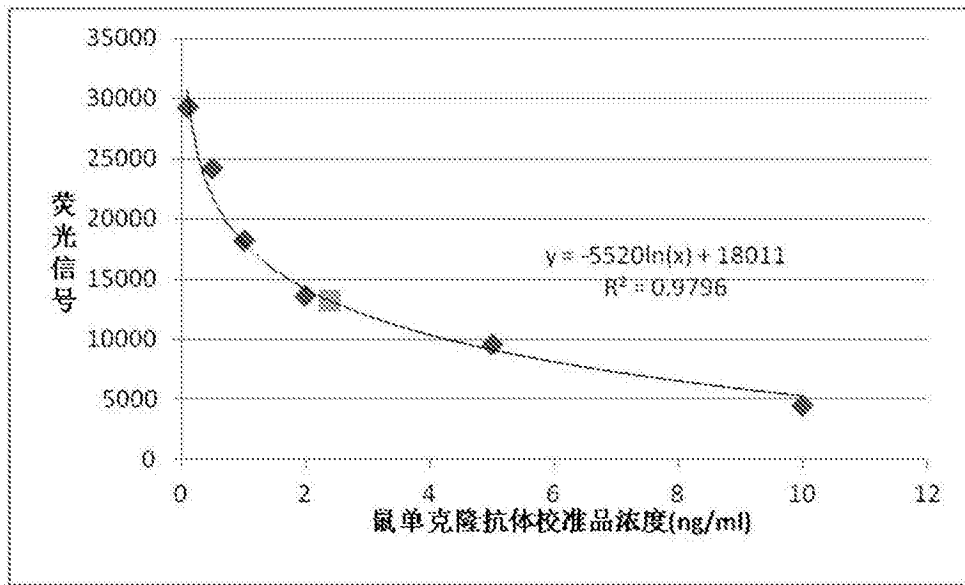


图 4

专利名称(译)	一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104062429B</a>	公开(公告)日	2016-02-17
申请号	CN201410261089.7	申请日	2014-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	美艾利尔(上海)诊断产品有限公司		
申请(专利权)人(译)	美艾利尔(上海)诊断产品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	美艾利尔(上海)诊断产品有限公司		
[标]发明人	张展英 赵金博 田丰 周禧昕		
发明人	张展英 赵金博 田丰 周禧昕		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/6809		
代理人(译)	王函		
其他公开文献	CN104062429A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测鼠源抗体的时间分辨免疫荧光试剂盒，包括以下组分：包被羊抗鼠多克隆抗体的酶标板；镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物；鼠单克隆抗体校准品；清洗液；分析液；增强液。此外，本发明还公开了该试剂盒的制备方法及其在定量检测鼠源抗体中的应用。本发明解决了“免疫诊断技术中定量检测未有效包被到固体载体上的鼠源抗体浓度，从而计算有效包被到固体载体上的抗体包被率，以评估包被效果”的技术难题，该试剂盒能够定量检测鼠源抗体，具有检测灵敏度高，操作简单，操作流程短，储存时间长等优点。

