

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810148852.X

[43] 公开日 2009年5月20日

[11] 公开号 CN 101435825A

[22] 申请日 2008.9.27

[21] 申请号 200810148852.X

[30] 优先权

[32] 2007.9.28 [33] JP [31] 2007-255331

[71] 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神户市中央区脇浜海岸通1
丁目5番1号

[72] 发明人 藤本裕之 松江美幸

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 梁朝玉 刘良勇

权利要求书3页 说明书15页

[54] 发明名称

夹心免疫检测法及用该法检测抗原的方法

[57] 摘要

本发明提供一种夹心免疫检测法及用该法检测抗原的方法。夹心免疫检测法包括以下步骤：(a) 让抗原与识别上述抗原并由可测标记物标记的第一抗体接触，形成抗原和第一抗体的复合物；及(b) 用识别上述抗原并可结合到固相上的第二抗体将上述(a)步骤中形成的复合物固定到固相。

1. 一种夹心免疫检测法，包括以下步骤：
 - (a) 让抗原与可识别所述抗原的并由可测标记物标记的第一抗体接触，形成抗原和第一抗体的复合物；及
 - (b) 用可识别所述抗原的并可结合到固相上的第二抗体将所述(a)步骤中形成的复合物固定到固相。
2. 权利要求1所述方法，其特征在于：所述抗原为甲状腺刺激激素。
3. 权利要求1所述方法，其特征在于：实施所述(b)步骤使得在(a)步骤形成的复合物、抗体与固相三者接触。
4. 权利要求1所述方法，其特征在于：实施所述(b)步骤使得在使(a)步骤形成的复合物与固相接触后并在所述复合物和固相存在的情况下，加入第二抗体。
5. 权利要求1所述方法，其特征在于：实施所述(b)步骤使得在使(a)步骤形成的复合物与第二抗体接触后并在所述复合物和第二抗体存在的情况下，加固相。
6. 权利要求1所述方法，其特征在于：实施所述(b)步骤使得在使第二抗体与固相接触后并在该第二抗体与固相存在的情况下，加入(a)步骤形成的复合物。
7. 权利要求1~6中任一所述方法，其特征在于：所述标记物为酶。
8. 权利要求1~6中任一所述方法，其特征在于：所述第二抗体和固相的结合是亲和素-生物素的结合或链霉亲和素-生物素的结合。

9. 权利要求 1~6 中任一所述方法，其特征在于：所述固相是磁性粒子。

10. 权利要求 1~6 中任一所述方法，其特征在于：（b）步骤之后还有测定固定在固相上的第一抗体标记物的步骤。

11. 一种检测标本试样中的抗原的方法，包括以下步骤：

（A）混合标本试样和可识别所述抗原的并由可测标记物标记的第一抗体；

（B）添加固相和可识别所述抗原的并能结合到固相上的第二抗体到在（A）步骤所得混合物中；及

（C）检测通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体标记物。

12. 权利要求 11 所述方法，其特征在于：所述抗原为甲状腺刺激激素。

13. 权利要求 11 所述方法，其特征在于：实施（B）步骤使得向（A）步骤所得混合物中同时添加固相和第二抗体。

14. 权利要求 11 所述方法，其特征在于：实施（B）步骤使得向（A）步骤所得混合物中添加固相之后，再添加第二抗体。

15. 权利要求 11 所述方法，其特征在于：实施（B）步骤使得向（A）步骤所得混合物添加第二抗体之后，再添加固相。

16. 权利要求 11 所述方法，其特征在于：实施（B）步骤使得在混合固相和第二抗体后，向（A）步骤所得混合物添加固相和第二抗体的混合物。

17. 权利要求 11~16 中任一所述方法，其特征在于：所述标记物为酶。

18. 权利要求 11~16 中任一所述方法，其特征在于：所述第二抗体和固相通过亲和素-生物素结合或链霉亲和素-生物素结合而结合。

19. 权利要求 11~16 中任一所述方法，其特征在于：所述固相为磁性粒子。

20. 权利要求 11~16 中任一所述方法，其特征在于：还包含清洗在 (B) 步骤所得混合物的步骤，以除去未起反应的第一抗体，其中在 (C) 步骤检测已清洗的混合物中的通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体标记物。

夹心免疫检测法及用该法检测抗原的方法

技术领域：

本发明涉及一种能够灵敏地检测出标本试样中所含微量抗原的夹心免疫检测法及用该法检测抗原的方法。

背景技术：

作为检测试样中所含物质（抗原）的方法，夹心法已为人所知。夹心法是在能识别抗原不同表位的二个抗体之间夹入抗原，检测抗原。通常夹心法首先让抗原与已结合于固相上的一次抗体结合。以此在固相上形成抗原和一次抗体的复合物。然后让经可检测标记物标记的二次抗体与固相上的抗原结合，检测抗原。

比如，专利公开昭和 57-074663 号公开了一种 TSH 的测定方法，该法是运用酶联免疫夹心检测法，使含有 TSH 的标本作用于有抗体结合的固相上后，再让酶标记抗体作用。即，专利公开昭和 57-074663 号上公开了一种传统的夹心法，在用结合在固相上的抗体将抗原固定在固相上后，让酶标记抗体发挥作用，检测该抗原。

然而，传统的夹心法存在当用于测定的抗体对抗原的亲合性不太高时以及标本中抗原极少时，难以进行高灵敏度测定的问题。

发明内容：

本发明的范围只由后附权利要求书所规定，在任何程度上都不受这一节发明内容的陈述所限。

本发明的目的是提供一种能够高灵敏度地检测抗原的夹心免疫检测法及其在检测抗原中的应用。

即，本发明提供一种夹心免疫检测法，包括以下步骤：

(a) 让抗原与识别上述抗原并由可测标记物标记的第一抗体接触，形成抗原和第一抗体的复合物；及

(b) 用识别上述抗原并可结合到固相上的第二抗体将上述

(a) 步骤中形成的复合物固定到固相。

其中所述抗原是甲状腺刺激激素。

所述(b)步骤实现在(a)步骤形成的复合物与第2抗体与固相三者接触。

所述(b)步骤在使(a)步骤形成的复合物与固相接触后，在该复合物和固相存在的情况下，加入第二抗体。

所述(b)步骤在使(a)步骤形成的复合物与第二抗体接触后，在该复合物和第二抗体存在的情况下，加固相。

所述(b)步骤在使第二抗体与固相接触后，在该第二抗体与固相存在的情况下，加入(a)步骤形成的复合物。

所述方法中所述标记物为酶。

所述第二抗体和固相的结合是亲和素-生物素的结合或链霉亲和素-生物素的结合。

所述固相为磁性粒子。

所述方法中(b)步骤之后还有测定固定在固相上的第一抗体标记物的步骤。

本发明另提供一种检测标本试样中抗原的方法，包括以下步骤：

(A) 混合标本试样和识别上述抗原并经可测标记物标记的第一抗体；

(B) 在 (A) 步骤所得混合物中添加认识固相和上述抗原、并能结合到固相上的第二抗体；及

(C) 检测通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体标记物。

其中所述抗原为甲状腺刺激激素。

(B) 步骤可向 (A) 步骤所得混合物同时添加固相和第二抗体。

(B) 步骤可向 (A) 步骤所得混合物添加固相之后，再添加第二抗体。

(B) 步骤可向 (A) 步骤所得混合物添加第二抗体之后，再添加固相。

(B) 步骤可在固相和第二抗体混合后，再向 (A) 步骤所得混合物添加固相和第二抗体的混合物。

所述标记物为酶。

所述第二抗体和固相通过亲和素—生物素结合或链霉亲和素—生物素结合而结合。

所述固相为磁性粒子。

所述方法，还包含清洗 (B) 步骤所得混合物的步骤，以除去未起反应的第一抗体，在此，(C) 步骤检测经清洗的混合物中通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体标记物。

具体实施方式：

在本说明书中，所谓“夹心免疫检测法”指通过固相上的抗体和标记物标记的抗体两种抗体检测抗原的方法。

本发明的夹心免疫检测法包含 (a) 步骤：让抗原与认识该抗原、并经可测标记物标记的第一抗体接触，形成抗原—第一抗体复合物。

上述抗原只要是以检测为目的的物质即可，无特别限定，但最好是甲状腺刺激激素（TSH）。

诸如 Graves 病这种甲状腺疾病通过检测血样中的 TSH 量是否降低来进行诊断。然而，TSH 在健康人血液中也只有很少量。而甲状腺疾病的诊断必须检测出 TSH 量下降。用本发明的夹心免疫检测法，就可以高灵敏度地测定 TSH。

上述抗原也可以是标本试样中所含抗原。标本试样只要不是妨碍夹心免疫检测法的试样均可，无特别限定。比如作为含有抗原 TSH 的标本试样有血液。作为血液，有全血、血浆和血清。

认识上述抗原的第一抗体可以是单克隆抗体也可以是多克隆抗体。尤以单克隆抗体为好。第一抗体的类型可以是在该技术领域常用类型的抗体，比如 IgG、IgM 等。第一抗体只要能认识抗原，也包含抗体片段及其衍生物。作为抗体片段如有 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fab' 片段和 sFv 片段等。

比如，当抗原是 TSH 时，作为第一抗体可以是抗 TSH 单克隆抗体抗-TSH 5409（Medix Biochemica 公司制）。抗-TSH 5409 具有优秀的特异性和保存稳定性，但对 TSH 的亲合性不太高。因此，用抗-TSH 5409 进行夹心免疫检测时，难以高灵敏度地检测 TSH。不过，用本发明的夹心免疫检测法则可以高灵敏度地检测出 TSH。

上述第一抗体可以通过该技术领域众所周知的方法获得。比如已知有一种方法是用检出的抗原对马、牛、羊、兔、山羊、大鼠、小鼠等哺乳动物进行免疫，从免疫的动物身上采集血清，提炼抗体。还有一种方法是使从免疫的小鼠身上采集的抗体产生细胞与鼠的肿瘤细胞融合，获得杂交瘤，从杂交瘤获得抗体。

上述第一抗体用可测标记物标记，标记物可以是普通免疫测定法使用的标记物，无特别限定，比如可以是酶、荧光物质和放射性同位素等。作为酶如有碱性磷酸酶、过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶等。作为荧光物质如有异硫氰酸荧光素（FITC）、绿色荧光蛋白质（GFP）、萤光素等。作为放射性同位素如有 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等。

标记物标记抗体的方法用该领域常用的方法即可，如众所周知的用抗体中的硫醇（-SH 基）使标记物与抗体结合的方法。具体而言，使导入了可与硫醇基反应的官能基的标记物与抗体反应，即可用标记物标记抗体。作为官能基如有马来酰亚胺基。

本发明的夹心免疫检测法除上述（a）步骤外，还包括（b）步骤：用识别上述抗原、可与固相结合的第二抗体将（a）步骤形成的复合物固定到固相。即，抗原比第二抗体先与第一抗体反应，形成抗原—第一抗体复合物。

以这种顺序进行反应，即使是标本中仅有的微量抗原，也能够灵敏地检测出来。还可以延长第一抗体与抗原的反应时间。因此，尽管第一抗体与抗原的亲合性低，也能够使第一抗体与抗原充分结合。其结果，能够在较短的测定时间内进行高灵敏度的测定。

识别上述抗原并能与固相结合的第二抗体可以在不同于第一抗体的位点（表位）识别抗原。

第二抗体与第一抗体一样，可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体，最好是单克隆抗体。第二抗体的类型可以用该技术领域常用的类型，如 IgG、IgM 等。且第二抗体只要能识别抗原，也可含有抗体的片段及其衍生物。作为抗体的片段如有 Fab 片

段、F(ab)₂片段、Fab'片段及 sFv 片段等。获得第二抗体的方法也与以上关于第一抗体的叙述一样。

当抗原是 TSH 时，作为第二抗体最好是以 NITE BP-399 托管的杂交瘤产生的单克隆抗体。该杂交瘤于 2007 年 8 月 21 日以保藏号 NITE BP-399 由日本国家技术评估研究所专利微生物寄存中心(NPMD)保存，系由用 TSH 免疫的 BALB/C 鼠脾脏细胞与鼠骨髓瘤细胞 (P3-X63-Ag8-653) 融合而得。

上述第二抗体可与固相结合。第二抗体与固相之间的结合是通过附加在该第二抗体的固相结合物与结合在固相上的结合物之间的结合来实现的。

关于上述固相结合物与结合物无特别限定，只要是在上述夹心免疫检测法实施的条件下能特异性结合的物质组合即可。作为这些组合，如有生物素与亲和素或链霉亲和素、半抗原和抗半抗原抗体、镍和组氨酸标签、谷胱甘肽和谷胱甘肽-S-转移酶等。作为半抗原和抗半抗原抗体如有二硝基酚钠 (DNP) 和抗 DNP 抗体。

上述第二抗体与固相之间最好通过生物素与亲和素或链霉亲和素结合而结合。因此，固相结合物与结合物的组合最好是生物素与亲和素或链霉亲和素的组合。

用于上述固相结合物与结合物组合的各种物质哪一个附加到第二抗体均可。最好是固相结合物含生物素，结合物为亲和素或链霉亲和素。

将固相结合物附加到第二抗体的方法是该领域中众所周知的。比如，可以将含有对抗体中的一级氨基 (-NH₂ 基) 和硫醇基等有反应性的基的固相结合物附加到抗体上。作为与一级氨基

有反应性的基如有琥珀酰亚胺基（NHS 基）等，作为与硫醇基有反应的基如有马来酰胺基等。

上述固相材料是免疫测定用的普通固相材料即可，无特别限定。比如可以是胶乳、橡胶、聚乙烯、聚丙烯、苯乙烯树脂、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、苯乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸环氧丙酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物、聚偏氟乙烯（PVDF）、硅等聚合物材料；琼脂糖；明胶；红细胞；硅胶、玻璃、无活性矾土、磁体等无机材料等。也可以将其中的一种或二种以上组合起来使用。

固相的形状只要是用于免疫测定的普通固相形状，无特别限定，可以是微量滴定板、试管、微球、粒子、纳米粒子等。作为粒子如有磁性粒子、象苯乙烯树脂胶乳那样的疏水性粒子、粒子表面有氨基、羧基等亲水基的共聚胶乳粒子、红细胞、明胶粒子等。

上述固相最好是磁性粒子。该磁性粒子是以有磁性的材料为基材的粒子。这种磁性粒子在该技术领域已周知，作为基材已知使用 Fe_2O_3 及/或 Fe_3O_4 、钴、镍、铁酸盐、磁铁矿等。为了使蛋白质等结合到磁性粒子表面，最好使用用聚合物等包被基材表面的磁性粒子。

让上述结合物结合在固相上的方法为在该技术领域众所周知的方法。该固定可采用物理吸附法、共有结合法、离子结合法和这些方法的组合等。如当结合物为亲和素或链霉亲和素时，用生物素结合的固相即可将亲和素或链霉亲和素固定在固相上。

上述（b）步骤最好以下述四种方式之一进行。

(b1) 让 (a) 步骤中形成的复合物与上述第二抗体和固相接触；

(b2) 让 (a) 步骤中形成的复合物与固相接触后，再在该复合物和固相都存在的情况下添加第二抗体；

(b3) 让 (a) 步骤中形成的复合物与上述第二抗体接触后，在该复合物和第二抗体都存在的情况下添加固相；

(b4) 让上述第二抗体与固相接触后，再在该第二抗体和固相都存在的情况下添加 (a) 步骤中形成的复合物。

上述各种情况下可能出现的反应如下：

(b1) 让 (a) 步骤中形成的复合物与上述第二抗体和固相接触：

让 (a) 步骤中形成的复合物同时与上述第二抗体和上述固相接触。以此，第二抗体与抗原-第一抗体的复合物结合形成第一抗体-抗原-第二抗体复合物后与固相结合，从而得以在固相上形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物。第二抗体也可以与固相结合后，与抗原-第一抗体的复合物结合，形成第一抗体-抗原-第二抗体复合物。

(b2) 使 (a) 步骤中形成的复合物与固相接触后，在该复合物和固相都存在的情况下添加第二抗体：

使 (a) 步骤中形成的抗原-第一抗体复合物与固相接触。此时，抗原-第一抗体复合物没有与固相的结合位点。因此，抗原-第一抗体复合物与固相之间不发生反应。接着提供第二抗体。于是，第二抗体与抗原-第一抗体复合物结合后，与固相结合，从而在固相上形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物。第二抗体也可以与固相结合后，再与抗原-第一抗体复合物结合，从而在固相上形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物。

(b3) 使 (a) 步骤中形成的复合物与上述第二抗体接触后，再在该复合物和第二抗体都存在的情况下添加固相：

通过使 (a) 步骤中形成的抗原-第一抗体复合物与第二抗体接触，形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物。然后，提供固相，即可将第一抗体-抗原-第二抗体的复合物固定在固相上。

(b4) 让第二抗体与固相接触后，再在该第二抗体和固相都存在的情况下添加 (a) 步骤中形成的复合物：

由于第二抗体与固相接触，第二抗体的全部或部分结合到固相上。再添加 (a) 步骤中形成的复合物，由此，结合在固相上的第二抗体与复合物结合，得以在固相上形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物。未结合到固相的第二抗体与抗原-第一抗体复合物结合，形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物后，此复合物通过第二抗体结合到固相，从而也能够在固相上形成第一抗体-抗原-第二抗体的复合物。

本发明的夹心免疫检测法最好在固相上形成第一抗体-抗原-第二抗体复合物后，还有 (c) 步骤，即测定通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体的标记物。

第一抗体标记物的测定方法可根据标记物的种类适当选择。比如，当标记物为放射性同位素时，可以用测定放射能的方法，该方法应用闪烁计数器等众所周知的仪器。当标记物为荧光物质时，可以使用用化学发光酶标仪等众所周知的仪器测定荧光的方法。

当标记物为酶时，可以用催化与该酶相应的底物反应、测定其所发出的光或色的方法。作为该酶的相应底物，可以使用众所周知的发光底物、显色底物等。当上述酶为碱性磷酸酶时，比如发光底物有：CDP-star（注册商标）（4-氯-3-（甲氧基螺{1, 2-二

氧杂环丁烷-3, 2'- (5'-氯) 三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基) 苯基磷酸二钠)、CSPD (注册商标) (3- (4-甲氧基螺{1, 2-二氧杂环丁烷-3, 2- (5'-氯) 三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基) 苯基磷酸二钠) 等; 显色底物有: P-硝基苯基磷酸盐、5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸 (BCIP)、硝基蓝四氮唑 (NBT)、碘硝基四唑 (INT) 等。这些发光底物或显色底物可以用分光光度计、化学发光酶标仪等众所周知的仪器检测。

上述 (b) 步骤之后, 可以含清洗步骤。通过清洗可以除去未起反应的第一抗体。如固相是磁性粒子时, 在 (a) 步骤和 (b) 步骤中所得含磁性粒子的试样中加入清洗剂搅拌。然后, 在用磁力吸住磁性粒子的状态下, 去除清洗剂, 即可除去未起反应的第一抗体。清洗剂可以使用在该技术领域周知的清洗剂。比如, 可以使用 2-(N-吗啉) 乙磺酸缓冲液 (MES)、磷酸盐缓冲液 (PBS) 等缓冲液。作为缓冲液的 pH 最好是 pH6.0~10.0。清洗剂可以含有 Tween 20 等表面活性剂。

加入 100~700 μ L 清洗剂搅拌, 进行磁分离。此清洗处理进行四次。

上述夹心免疫检测法可以在普通免疫测定的条件下进行。所谓普通免疫测定的条件下指 pH6.0~10.0, 温度 30~45 $^{\circ}$ C。

上述 pH 可以用比如磷酸盐缓冲液 (PBS)、三乙醇胺盐酸盐缓冲液 (TEA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)盐酸缓冲液(Tris-HCl)调节。该缓冲液也可含有表面活性剂、保存剂、血清蛋白质等普通免疫测定中使用的成份。

在上述各步骤中让各成份接触的时间可以依所测抗原、所用抗体、固相等的种类适当设定。

所用第一抗体、第二抗体和固相的量也可依所测抗原、所用抗体、固相等的种类适当设定。

本发明的抗原检测方法是一种从标本试样中检测抗原的方法。本发明的抗原检测方法包括以下步骤：

(A) 步骤：混合标本试样和识别上述抗原并经可测标记物标记的第一抗体；

(B) 步骤：在(A)步骤所得混合物中添加识别固相和上述抗原并可与固相结合的第二抗体；及

(C) 步骤：检测固定在固相上的第一抗体的标记物。

(A) 步骤相当于上述夹心免疫检测法的(a)步骤。即，当标本试样中存在待测抗原时，标本试样与第一抗体接触。以此形成抗原与第一抗体的复合物。

(B) 步骤相当于上述夹心免疫检测法的(b)步骤。即，当在(A)步骤形成抗原与第一抗体的复合物时，抗原和第一抗体复合物通过第二抗体固定在固相上。

(B) 步骤最好采取以下四种方法其中的一种：

(B1) 在(A)步骤中形成的复合物中同时添加固相和第二抗体；

(B2) 在(A)步骤形成的复合物中添加固相后，再添加第二抗体；

(B3) 在(A)步骤中形成的复合物添加第二抗体后，再添加固相；

(B4) 混合第二抗体与固相后，在(A)步骤形成的复合物中添加固相和第二抗体的混合物。

(B1) ~ (B4) 的反应与上述(b1) ~ (b4) 的反应相同。即，(B1) 的反应相当于(b1) 的反应。(B2) 的反应相当于

(b2) 的反应。(B3) 的反应相当于 (b3) 的反应。(B4) 的反应相当于 (b4) 的反应。

(C) 步骤相当于上述夹心免疫检测法的 (c) 步骤。当标本试样中存在待测抗原时, 第一抗体-抗原-第二抗体复合物固定在固相上。因此, 检测通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体标记物即可检测标本试样中的抗原。

在 (B) 步骤之后最好还有清洗固相的步骤。通过清洗可以从 (B) 步骤获得的混合物中除去未起反应的第一抗体。清洗步骤中使用的清洗剂与上述清洗剂相同。如此即可在 (C) 步骤中从除去未反应的第一抗体的混合物中检测出通过第二抗体和抗原固定在固相上的第一抗体的标记物。

举例

[实施例]

下面用实施例进一步详细说明本发明的内容, 但本发明不受以下实施例限制。

(生物素标记抗 TSH 单克隆抗体的制备)

用作生物素标记抗 TSH 单克隆抗体的单克隆抗体用以下方法制作。

将 10~100 μ gTSH 溶于 0.5mlPBS, 添加 0.5mlFCA (DIFCO 公司制) 作为佐剂, 制备油包水型基础免疫用抗原。给 BALB/C 小鼠腹腔接种基础免疫用抗原。腹腔接种每 2~4 周进行数次。使用的是 100 μ gTSH 溶解于 1mlPBS 中的加强用抗原。

以 10: 1 的比例混合免疫 BALB/C 小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞 (P3-X63-Ag8-653)。然后注入 50%聚乙二醇液 1ml, 室温搅拌 1 分钟。再边继续搅拌, 边用 2~5 分钟逐渐加入 MEM 培养基 5~10 ml。清洗后, 使融合的细胞以 3.5×10^6 个 / ml 浮游于

HAT 培养基，以平均每孔 100 μ l 分注到 96 孔微量培养板。观察杂交瘤的增殖，适当增加 HAT 培养基，培养二周左右。

将培养上清加入感作 TSH- β 链的抗原感作板，用 ELISA（酶联免疫测定法）选择产生识别 TSH- β 链的抗 TSH 单克隆抗体的杂交瘤。克隆所选杂交瘤，建立细胞株 T2-194（NITE BP-399）。

培养 T2-194，用蛋白质 A 纯化培养上清，以此获得单克隆抗体。将所得单克隆抗体按常法与生物素-马来酰亚胺反应，获得生物素标记抗 TSH 单克隆抗体。

实施例 1

用本发明的夹心免疫检测法，按以下步骤测定甲状腺刺激激素（TSH）。

按以下顺序用抗体缓冲液（0.1M MES（2-氮氧六环乙磺酸）（pH 6.0）、1%牛血清白蛋白、0.15M NaCl、0.1%叠氮钠）稀释抗体。

1) 在反应容器中加入碱性磷酸酶（ALP）标记抗 TSH 单克隆抗体（0.4U / mL、Medix Biochemica 公司制）30 μ L 作为标记物标记的第一抗体，加入 TSH 抗原溶液（浓度 0 或 2 μ IU/mL、Fitzgerald 公司制）30 μ L 作为试样，42 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟。

2) 添加链酶亲和素磁性粒子（平均粒子 2 μ m、在 20mM 磷酸钠缓冲液（pH 7.5）中 10mg / mL）30 μ L，42 $^{\circ}$ C 反应 2.5 分钟。

3) 作为能与固相结合的第二抗体添加上述生物素标记抗 TSH 单克隆抗体（10 μ g / mL）30 μ L，42 $^{\circ}$ C 反应 2.5 分钟后，进行磁分离。

4) 加入清洗剂（0.01M MES（pH 6.5）、0.1%叠氮钠）100~700 μ L 搅拌，进行磁分离。此清洗操作共进行 4 次。

5) 加入分散液 (0.01M MES(pH 6.5)、0.1%叠氮钠) 50 μ L, 分散链酶亲和素磁性粒子。

6) 加入发光底物液 (CDP-Star, Applied Biosystems 公司) 100 μ L, 搅拌, 42 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟, 用化学发光酶标仪测定发光强度。

比较例 1

按以下顺序用传统的夹心法测定 TSH。

1) 在反应容器中加入生物素标记抗 TSH 单克隆抗体 (10 μ g / mL) 30 μ L 作为在上述制作生物素标记抗 TSH 单克隆抗体步骤中获得的能与固相结合的抗体, 并作为试样加入 TSH 抗原溶液 (浓度 0 或 2 μ IU / mL) 30 μ L, 42 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟。

2) 添加链酶亲和素磁性粒子 (平均粒子 2 μ m、2.0mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中 10mg / mL) 30 μ L, 42 $^{\circ}$ C 反应 2.5 分钟。

3) 加入碱性磷酸酶 (ALP) 标记抗 TSH 单克隆抗体 (0.4U / mL、Medix Biochemica 公司制), 42 $^{\circ}$ C 反应 2.5 分钟后, 进行磁分离。

4) 加入清洗剂 100~700 μ L 搅拌, 进行磁分离。此清洗操作共进行 4 次。

5) 加入 50 μ L 分散液搅拌, 分散链酶亲和素磁性粒子。

6) 加入发光底物液 (CDP-Star, Applied Biosystems 公司) 100 μ L, 搅拌, 42 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟, 用化学发光酶标仪测定发光强度。

用含 TSH 的试样测得的发光强度及用不含 TSH 的试样测得的发光强度与用不含 TSH 的试样测得的发光强度之比 (信/噪比; S/N 比) 如表 1 所示。

[表 1]

TSH浓度 (μ IU/mL)	实施例1		比较例1	
	发光强度	S/N比	发光强度	S/N比
0	1,589	807	1,656	193
2	1,283,000		319,500	

从表 1 可以看出，用本发明的夹心免疫检测法，用含 TSH 的试样测得的发光强度增高，S/N 比也增高。

前述的详细说明及附图是通过文字解释和图示来进行的，其目的不在于限定权利要求的保护范围。本说明书中的具体实施方式的各个变种对于普通技术人员来说显而易见，并处于权利要求及其等同技术的保护范围内。

专利名称(译)	夹心免疫检测法及用该法检测抗原的方法		
公开(公告)号	CN101435825A	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200810148852.X	申请日	2008-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	藤本裕之 松江美幸		
发明人	藤本裕之 松江美幸		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/76 G01N33/54306		
代理人(译)	梁朝玉 刘良勇		
优先权	2007255331 2007-09-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种夹心免疫检测法及用该法检测抗原的方法。夹心免疫检测法包括以下步骤：(a)让抗原与识别上述抗原并由可测标记物标记的第一抗体接触，形成抗原和第一抗体的复合物；及(b)用识别上述抗原并可结合到固相上的第二抗体将上述(a)步骤中形成的复合物固定到固相。

TSH浓度 ($\mu\text{IU}/\text{mL}$)	实施例1		比较例1	
	发光强度	S/N比	发光强度	S/N比
0	1,589	807	1,656	193
2	1,283,000		319,500	