



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108181464 A

(43)申请公布日 2018.06.19

(21)申请号 201711485605.4

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 广州优迪生物科技股份有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城掬泉路3号广州国际企  
业孵化器D区D502号

(72)发明人 李来庆

(74)专利代理机构 东莞市神州众达专利商标事  
务所(普通合伙) 44251

代理人 陈世洪

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

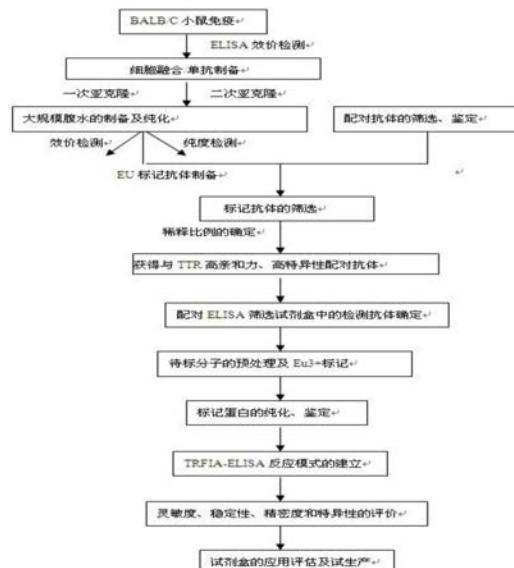
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方  
法

(57)摘要

本申请一般涉及一种TTR时间分辨免疫荧光  
试剂盒的制备方法,该试剂盒主要应用于川崎病  
(KD)临床患儿血清中分子标记物的检测与诊断  
应用,为推广静注丙种球蛋白(IVIG)敏感型及无  
反应型的KD患儿检测成为一个常规的临床普查  
项目提供技术基础。包括步骤:(1)抗人甲状腺素  
运载蛋白TTR单克隆抗体的制备;(2)抗TTR配对  
抗体的筛选及检测条件的优化;(3)建立TRFIA-  
ELISA方法并进行评估;(4)将医院保存的KD患儿  
阳性样本,用于试剂盒的大规模样本考核验证试  
验。



1. 一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:

包括步骤:(1)抗人甲状腺素运载蛋白TTR单克隆抗体的制备;(2)抗TTR配对抗体的筛选及检测条件的优化;(3)建立TRFIA-ELISA方法并进行评估;(4)将医院保存的KD患儿阳性样本,用于试剂盒的大规模样本考核验证试验。

2. 根据权利要求1所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:其中步骤(1)包括BALB/C小鼠免疫并随后制备抗TTR单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:其中步骤(2)包括:从制备的抗TTR单克隆抗体中,以双抗体夹心ELISA法为原理,以TTR为靶蛋白,经过2-3轮筛选,通过交叉配对实验,获得能特异结合TTR靶蛋白的配对抗体数对,通过抗体配对实验,粗配对和精确配对实验筛选能在双抗夹心ELISA中应用的配对抗体,优化双抗夹心ELISA检测条件:确定包被抗体和检测抗体浓度,确定洗涤液、洗涤强度和反应条件,从而获得与TTR高亲和力、高特异性配对抗体。

4. 根据权利要求1所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:建立TRFIA-ELISA方法并进行评估的准备工作包括1、固相包被抗体的制备,2、Eu3+标记抗体的制备,3、Eu3+标记抗体的纯化。

5. 根据权利要求1所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:其中步骤(4)包括与ELISA检测方法、实时荧光定量PCR和胶体金检测方法进行比较,分析评价该试剂盒对IVIG敏感型和IVIG无反应型的KD患儿的综合检测效果。

6. 根据权利要求2所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:其中BALB/C小鼠免疫为以TTR蛋白作为免疫原,进行BALB/C小鼠免疫,首次免疫背部多点皮下注射,完全抗原与等量弗氏完全佐剂混合乳化,以后各次免疫,完全抗原与等量弗氏不完全佐剂混合乳化,免疫时间间隔为14天。

7. 根据权利要求2所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,其特征在于:抗TTR单克隆抗体的制备包括在无菌条件下,对融合小鼠取脾,剪碎脾脏,过200目筛网备用;选择处于对数生长期的SP2/0细胞,与脾细胞混合后离心数次,在1min内加入已预热的PEG,边加边迅速搅拌,然后终止PEG的反应,静置数分钟;离心后重悬于HAT培养基中,加入到已铺有饲养细胞的培养板中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,采用ELISA法筛选阳性孔,对其进行数次有限稀释亚克隆,以得到能稳定分泌所需抗体的单株细胞;选择8~10周龄健康BALB/C小鼠,提前7~10天腹腔两点注射石蜡油作为免疫抑制剂,腹腔两点注射处于对数期单株细胞,腹水经过亲和层析柱纯化,鉴定效价、纯度。

8. 根据权利要求4所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,特征在于:其中固相包被抗体的制备包括用碳酸盐缓冲液将包被抗体稀释成适当浓度,加入到96孔板中、4℃过夜,倾去包被液,加入封闭液封闭,真空-20℃冷冻保存。

9. 根据权利要求4所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,特征在于:Eu3+标记抗体的制备包括将标记抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,离心,再用标记缓冲液重复洗涤数次,将标记抗体和铕标记试剂充分混匀,室温震荡过夜。

10. 根据权利要求4所述的一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,特征在于:TRFIA-ELISA方法的建立及评估为优化TRFIA检测TTR的反应条件,确定标记抗体浓度、反应缓冲液pH值、封闭液组成、储存液配方,建立最优的TRFIA-ELISA反应模式,按照最优的

TRFIA-ELISA反应模式,确定检测性能指标,不同批次的试剂盒测定同一样品的结果进行精密度的比较;将试剂盒在不同温度下放置不同时间后,测定其检测性能,从而得出其稳定性;将TTR标准品进行不同浓度的稀释,测定不同浓度TTR的检测数值,从而获得线性范围,检测与TTR类似的甲状腺素T4蛋白(T4)、C反应蛋白(CRP)、甲状腺球蛋白(Tg)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)蛋白或者在样品中同时存在的其他蛋白,确定试剂盒的检测特异性。

## 一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本申请一般涉及一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法,该试剂盒主要应用于川崎病(KD)临床患儿血清中分子标记物的检测与诊断应用,为推广静注丙种球蛋白(IVIG)敏感型及无反应型的KD患儿检测成为一个常规的临床普查项目提供技术基础。

### 背景技术

[0002] 我们的前期工作中,通过蛋白质组学2D电泳及Western Blot技术对丙种球蛋白治疗川崎病患儿(血清样本)前后监测指标的筛选(图1-2为部分KD患儿的实验结果),筛选到了RBP4,APCS和TTR等蛋白有显著差异,通过统计分析发现,IVIG敏感型KD患儿在IVIG治疗前血清中的TTR含量显著低于正常儿童,而在用药后血清中蛋白TTR基本恢复到正常水平;对于IVIG无反应型KD患儿在用药前后,血清中的TTR含量基本不发生变化。由此可见,血清中的蛋白TTR可以作为一种特异性的分子标记物,开发用来快速区分IVIG敏感型及无反应型的KD患儿的早期诊断试剂盒将具有很好的应用前景,相关结果发表在《Biochem Biophys Res Commun》。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是建立一种简便、快速诊断IVIG敏感型和IVIG无反应型的KD患儿的试剂盒,通过分析血清中TTR含量,快速区分IVIG敏感型及无反应型的KD患儿,从而快速准确评价IVIG对KD患儿的治疗效果,及时调整IVIG无反应型KD患儿的治疗方案,避免冠状动脉病变的出现,为提高患儿的生存质量奠定基础。

[0004] 本申请的TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法包括:

[0005] 一、抗人甲状腺素运载蛋白TTR单克隆抗体的制备

[0006] 1、BALB/C小鼠免疫:以TTR蛋白作为免疫原,进行BALB/C小鼠免疫。首次免疫背部多点皮下注射,完全抗原与等量弗氏完全佐剂混合乳化,以后各次免疫,完全抗原与等量弗氏不完全佐剂混合乳化,免疫时间间隔为14d。

[0007] 2、抗TTR单克隆抗体的制备:无菌条件下,对融合小鼠取脾,剪碎脾脏,过200目筛网备用;选择处于对数生长期的SP2/0细胞,与脾细胞混合后离心数次,在1min内加入已预热的PEG,边加边轻轻地迅速搅拌,然后终止PEG的反应,静置数分钟;离心后重悬于HAT培养基中,加入到已铺有饲养细胞的培养板中,37℃、5%CO2培养箱中培养。EL I SA法筛选阳性孔,对其进行数次有限稀释亚克隆,以得到能稳定分泌所需抗体的单株细胞;选择8~10周龄健康BALB/C小鼠,提前7~10d腹腔两点注射石蜡油作为免疫抑制剂,腹腔两点注射处于对数期单株细胞,腹水经过亲和层析柱纯化,鉴定效价、纯度等。

[0008] 二、抗TTR配对抗体的筛选及检测条件的优化

[0009] 从上述制备的抗TTR单克隆抗体中,以双抗体夹心EL I SA法为原理,以TTR为靶蛋白,经过2-3轮筛选,通过交叉配对实验,获得能特异结合TTR靶蛋白的配对抗体数对。通过抗体配对实验:粗配对和精确配对实验筛选能在双抗夹心EL I SA中应用的配对抗体。优化

双抗夹心EL I SA检测条件:确定包被抗体和检测抗体浓度,确定洗涤液、洗涤强度和反应条件等。从而获得与TTR高亲和力、高特异性配对抗体。

[0010] 三、TRF IA-EL I SA方法的建立及评估

[0011] 1、固相包被抗体的制备:碳酸盐缓冲液将包被抗体稀释成适当浓度,加入到96孔板中,4℃过夜,倾去包被液,加入封闭液封闭,真空-20℃冷冻保存。

[0012] 2、Eu3+标记抗体的制备:将标记抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,离心,再用标记缓冲液重复洗涤数次。将标记抗体和铕标记试剂充分混匀,室温震荡过夜。

[0013] 3、Eu3+标记抗体的纯化:标记完成后用Sephadex G-50层析柱分离纯化,洗脱液洗脱,同时收集流出液,逐管测量吸光度,合并峰管,测定蛋白含量,根据Eu3+标记试剂盒说明书所提供的公式测定标记率和蛋白回收率。

[0014] 4、TRF IA-EL I SA方法的建立及评估:优化TRF IA检测TTR的反应条件,确定标记抗体浓度、反应缓冲液pH值、封闭液组成、储存液配方等,建立最优的TRF IA-EL I SA反应模式。按照最优的TRF IA-EL I SA反应模式,确定检测性能指标。不同批次的试剂盒测定同一样品的结果进行精密度的比较;将试剂盒在不同温度下放置不同时间后,测定其检测性能,从而得出其稳定性;将TTR标准品进行不同浓度的稀释,测定不同浓度TTR的检测数值,从而获得线性范围。检测与TTR类似的蛋白或者在样品中同时存在的其他蛋白,确定试剂盒的检测特异性。

[0015] 四、将医院保存的KD患儿阳性样本,用于试剂盒的大规模样本考核验证试验;与ELISA检测方法、实时荧光定量PCR和胶体金等多种检测方法进行比较,分析评价该试剂盒对IVI G敏感型和IVI G无反应型的KD患儿的综合检测效果。

[0016] 3.发明的优点:

[0017] 1、针对目前对于KD包括临床指征、超声影像和实验室检查的诊断方法的局限性以及主观性等不足之处,利用拥有自主知识产权的血清分子标记物TTR蛋白快速评估IVI G对KD患儿的治疗效果,是一种重要的方法创新。

[0018] 2、自行构建的抗TTR蛋白的抗体文库,不但拥有自主知识产权,抗体生产成本低廉,大大降低了试剂盒的成本。

[0019] 3、检测试剂盒操作简便、成本低,适合我国当前的临床诊断需求,有广阔的市场前景。

[0020] 4、将TRF IA技术应用到甲状腺素运载蛋白TTR的EL I SA检测试剂盒上,集中了TRF IA敏感、定量和EL I SA简便、快速这两种技术的优势,实现了定量、快速、简便、敏感的临床诊断要求。

## 附图说明

[0021] 图1:对IVIG敏感型的KD患儿在IVIG治疗前(-IVIG)和IVIG治疗后(+IVIG)血清中RBP4、APCS和TTR的表达量的变化:(A) RBP4、APCS和TTR蛋白的表达量的变化;(B)和(C)对Western Blot结果进行灰度扫描后的统计学分析,B是配对分析,C是非配对分析;通过分析发现,在IVI G治疗前(-IVIG)和IVIG治疗后(+IVIG)血清中只有TTR的表达量变化无论是配对和非配对分析,在统计上都是差异极显著的。

[0022] 图2:对IVIG无反应型的KD患儿在IVIG治疗前(-IVIG)和IVIG治疗后(+IVIG)血清

中TTR的表达量的变化: (A) TTR蛋白的表达量的变化; (B) 和 (C) 对Western Blot结果进行灰度扫描后的统计学分析,B是配对分析,C是非配对分析;通过分析发现,在IVIG治疗前(-IVIG)和IVIG治疗后(+IVIG)血清中TTR的表达量变化无论是配对和非配对分析,在统计上都是没有差异的。

[0023] 图3为试剂盒技术路线图。

[0024] 图4为TTR-TRF IA标准曲线。

### 具体实施方式

[0025] 参考附图,本申请的TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法包括:

[0026] 一、抗人甲状腺素运载蛋白TTR单克隆抗体的制备

[0027] 1、BALB/C小鼠免疫:以TTR蛋白作为免疫原,进行BALB/C小鼠免疫。首次免疫背部多点皮下注射,完全抗原与等量弗氏完全佐剂混合乳化,以后各次免疫,完全抗原与等量弗氏不完全佐剂混合乳化,免疫时间间隔为14d。

[0028] 2、抗TTR单克隆抗体的制备:无菌条件下,对融合小鼠取脾,剪碎脾脏,过200目筛网备用;选择处于对数生长期的SP2/0细胞,与脾细胞混合后离心数次,在1min内加入已预热的PEG,边加边轻轻地迅速搅拌,然后终止PEG的反应,静置数分钟;离心后重悬于HAT培养基中,加入到已铺有饲养细胞的培养板中,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。EL ISA法筛选阳性孔,对其进行数次有限稀释亚克隆,以得到能稳定分泌所需抗体的单株细胞;选择8~10周龄健康BALB/C小鼠,提前7~10d腹腔两点注射石蜡油作为免疫抑制剂,腹腔两点注射处于对数期单株细胞,腹水经过亲和层析柱纯化,鉴定效价、纯度等。

[0029] 二、抗TTR配对抗体的筛选及检测条件的优化

[0030] 从上述制备的抗TTR单克隆抗体中,以双抗体夹心EL ISA法为原理,以TTR为靶蛋白,经过2-3轮筛选,通过交叉配对实验,获得能特异结合TTR靶蛋白的配对抗体数对。通过抗体配对实验:粗配对和精确配对实验筛选能在双抗夹心EL I SA中应用的配对抗体。优化双抗夹心ELI SA检测条件:确定包被抗体和检测抗体浓度,确定洗涤液、洗涤强度和反应条件等。从而获得与TTR高亲和力、高特异性配对抗体。

[0031] 三、TRFIA-ELISA方法的建立及评估

[0032] 1、固相包被抗体的制备:碳酸盐缓冲液将包被抗体稀释成适当浓度,加入到96孔板中,4℃过夜,倾去包被液,加入封闭液封闭,真空-20℃冷冻保存。

[0033] 2、Eu3+标记抗体的制备:将标记抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,离心,再用标记缓冲液重复洗涤数次。将标记抗体和铕标记试剂充分混匀,室温震荡过夜。

[0034] 3、Eu3+标记抗体的纯化:标记完成后用Sephadex G-50层析柱分离纯化,洗脱液洗脱,同时收集流出液,逐管测量吸光度,合并峰管,测定蛋白含量,根据Eu3+标记试剂盒说明书所提供的公式测定标记率和蛋白回收率。

[0035] 4、TRFIA-ELISA方法的建立及评估:优化TRFIA检测TTR的反应条件,确定标记抗体浓度、反应缓冲液pH值、封闭液组成、储存液配方等,建立最优的TRFIA-ELISA反应模式。按照最优的TRFIA-ELISA反应模式,确定检测性能指标。不同批次的试剂盒测定同一样品的结果进行精密度的比较;将试剂盒在不同温度下放置不同时间后,测定其检测性能,从而得出其稳定性;将TTR标准品进行不同浓度的稀释,测定不同浓度TTR的检测数值,从而获得线性

范围。检测与TTR类似的蛋白或者在样品中同时存在的其他蛋白,确定试剂盒的检测特异性。

[0036] 四、将医院保存的KD患儿阳性样本,用于试剂盒的大规模样本考核验证试验;与ELISA检测方法、实时荧光定量PCR和胶体金等多种检测方法进行比较,分析评价该试剂盒对IVIG敏感型和IVIG无反应型的KD患儿的综合检测效果。

[0037] 1.TTR-TRFIA标准曲线,配制TTR蛋白的标准溶液,浓度分为0、0.5、5、50、200、1000ng/ml,绘制标准曲线,其相关系数R<sup>2</sup>=0.9991,表明线性相关性良好。以零参考标准品作为标本重复测量20次,计算其荧光均值x及标准差s,x+2s所得的荧光值代入标准曲线方程计算得出其灵敏度达到0.25ng/ml。

[0038] 2.方法的特异性选取无关蛋白或者可能同时出现的蛋白当作样品,用此试剂盒测定,结果见表1,本试剂盒测定甲状腺素T4蛋白(T4)、C反应蛋白(CRP)、甲状腺球蛋白(Tg)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)蛋白时,测定浓度均远低于理论浓度,说明该方法的特异性较好。

[0039] 表1特异性实验

	检测项目	TTR	T4	CRP	Tg	RBP4
[0040]	理 论 浓 度 (ng/ml)	300	300	300	300	300
	测 定 浓 度 (ng/ml)	301.	0.22	0.42	0.36	0.77

[0041] (ng/ml) 3

[0042] 3.精密度实验采用本试剂盒对精确定量的高中低三个标准品浓度进行测定,各设置10各复孔。本试剂盒的批内变异系数和批间变异系数均≤10% (见表2),符合试剂盒规定要求。

[0043] 表2精密度实验检测结果

	样 本 名 称	平 均 浓 度 (ng/ml)	标 准 差	变 异 系 数 (%)
[0044]	批 内 (n=10)	低	2.5	0.2 3
		中	455.8	32. 68
		高	925.4	55. 55
	批 间 (n=10)	低	3.2	0.2 3
		中	456.7	30. 12
		高	922.5	57. 34

[0045] 4.精确度实验(回收实验)按照常规方法进行回收实验。结果见表3,高中低三个浓度的回收率在100.35-100.56%之间,平均回收率为100.42%。

[0046] 表3回收实验

	样 本 名 称	原 始 浓 度	理 论 浓 度	实 际 测 定 值	回 收 率
		(ng/ ml)	(ng/ ml)	(ng/ml)	(%)
[0047]	低	1.45	1000	1003.5	100 .35
	中	513.6	1000	1003.6	100 .36
	高	934.6	1000	1005.6	100 .56
平 均 回 收 率%		100.42			

[0048] 5. 健全性把高浓度的TTR蛋白按照1:2~64倍比稀释后用本试剂盒测定,换算后的TTR蛋白含量非常接近。用上述倍比稀释的蛋白样品代替TTR蛋白参考标准品绘制标准曲线,其斜率与标准品的标准曲线斜率基本一致,表明TTR-TRFIA具有良好的健全性。

[0049] 分别采集5个IVIG治疗前KD患儿、5个IVIG治疗后KD患儿和5个正常儿童的血液;2000rpm离心5min后,取出血清备用;

[0050] 具体检测步骤如下:取包被好的酶联板,加入25μl参考标准品或者待测血清,再加入200μl分析缓冲液,震荡温育1h,,洗涤液洗涤4次,再加入以分析缓冲液1:50稀释的Eu3+标记抗体200μl/孔,震荡温育1h,洗涤液洗涤6次,最后加入增强液200μl/孔震荡5min后在时间分辨荧光检测仪上进行检测。

#### [0051]

治疗前 KD 患儿	荧光强 度	TTR 浓度 (ng/ml)	治疗后 KD 患儿	荧光强度	TTR 浓 度 (ng/ml)	健康 儿童	荧光强度	TTR 浓度 (ng/ml)
1	20372.4	102.3	1	114389.4	586.3	1	88398.7	452.5
2	24840.1	125.3	2	102423.6	524.7	2	102326.5	524.2
3	28200.6	142.6	3	29715.8	150.4	3	109941.1	563.4
4	17866.6	89.4	4	18643.6	93.4	4	89000.9	455.6
5	30143.2	152.6	5	112835.4	578.3	5	124199	636.8

[0052] 与健康儿童相比,治疗前儿童的TTR水平显著降低,经过治疗后,1号、2号和5号儿童的TTR水平上升到正常水平,为IVIG敏感型患儿;而3号和4号儿童的TTR水平基本没有变化,结合其临床症状等确诊3号和4号儿童确实为IVIG无反应型的KD患儿。由此说明,可以通过治疗前后TTR的浓度变化确定患儿是否为IVIG无反应型的KD患儿。

[0053] 以上所述仅为本申请的较佳实施例,并不用以限制本申请,凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

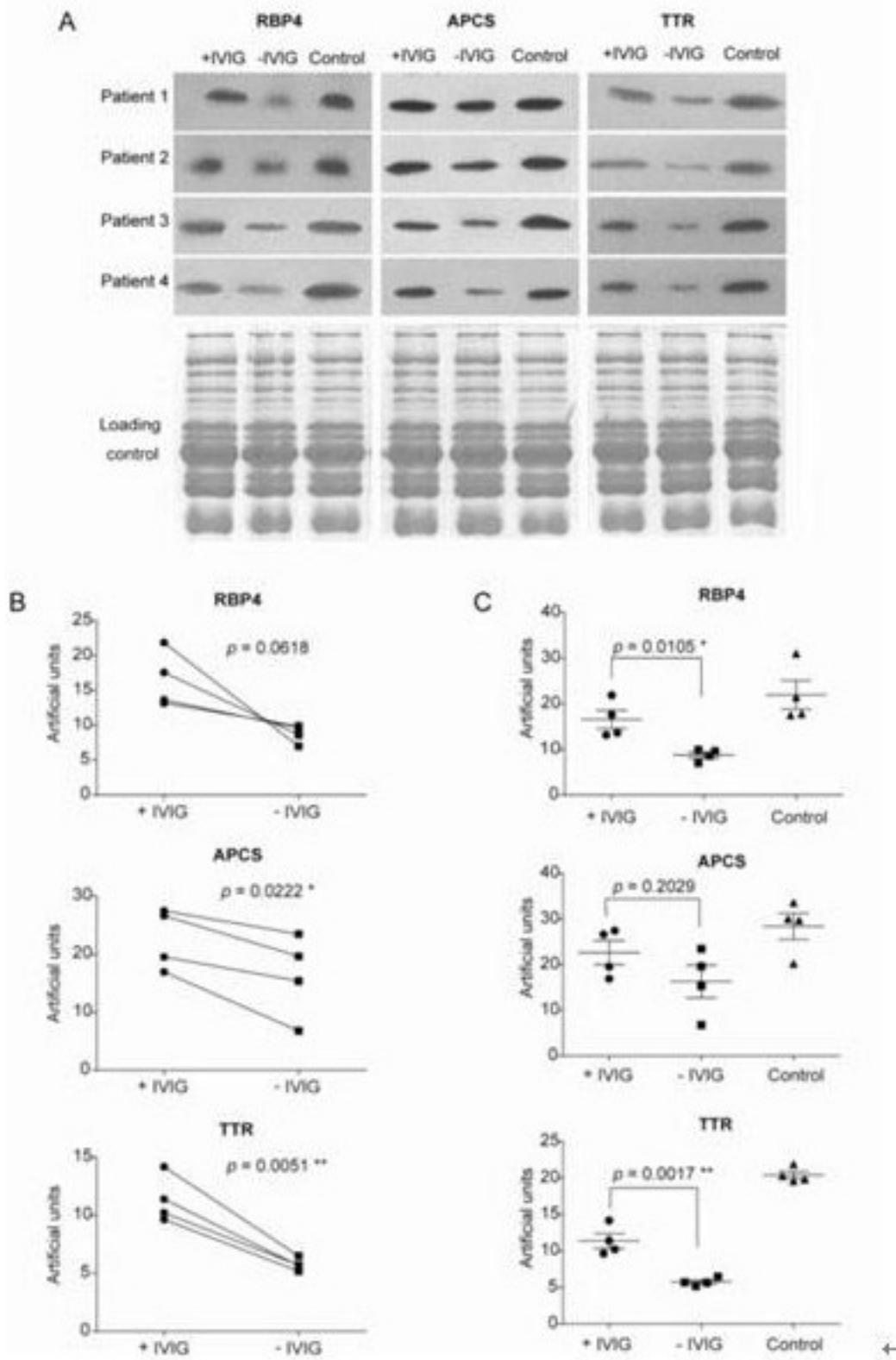


图1

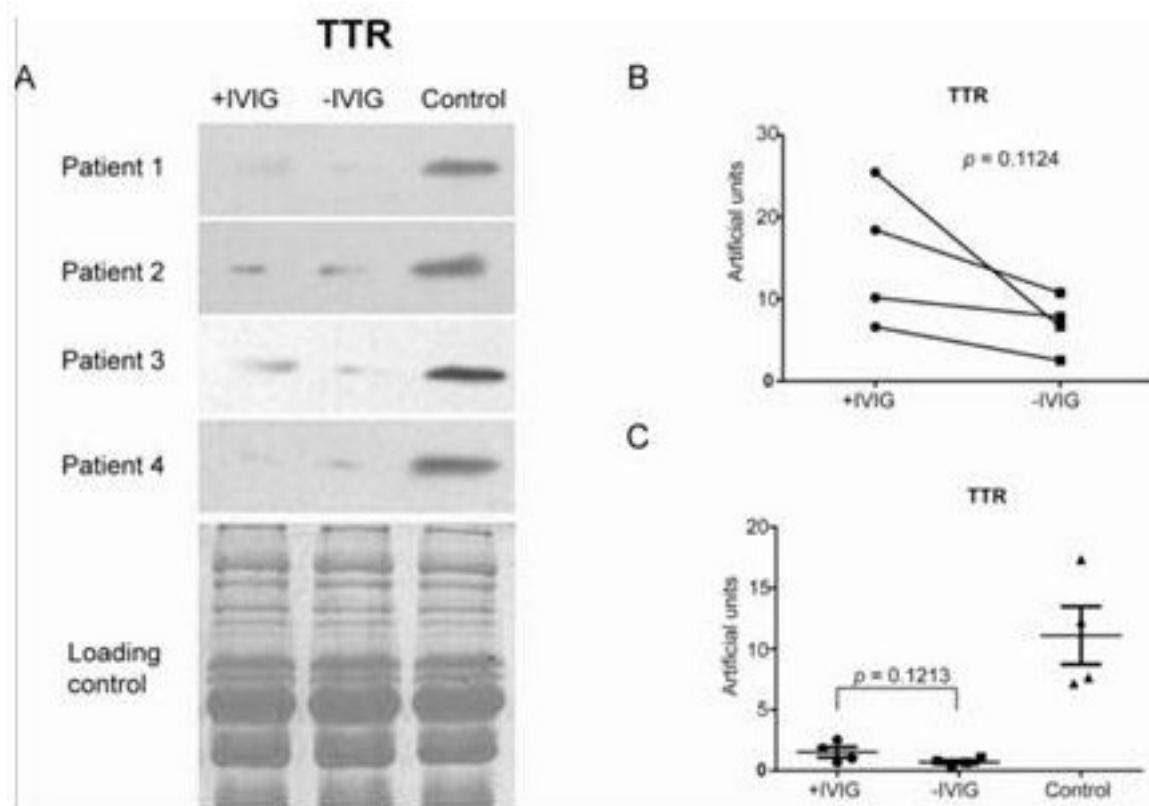


图2

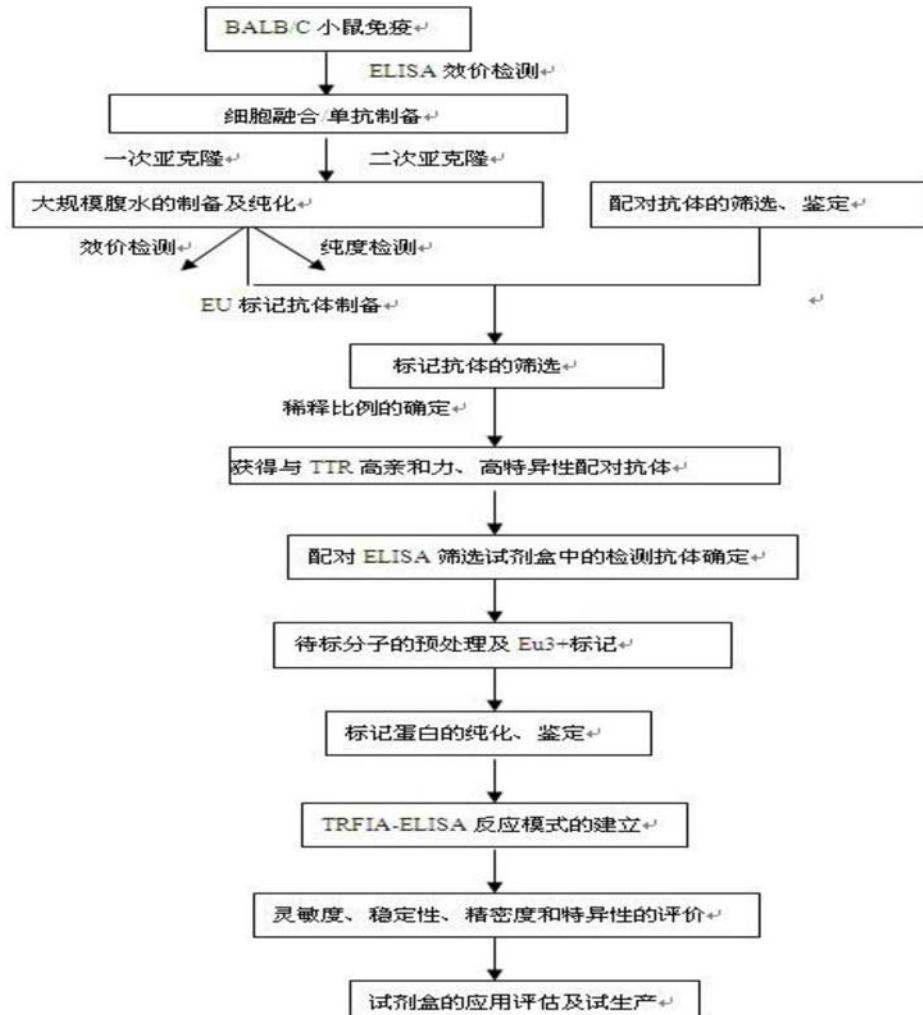


图3

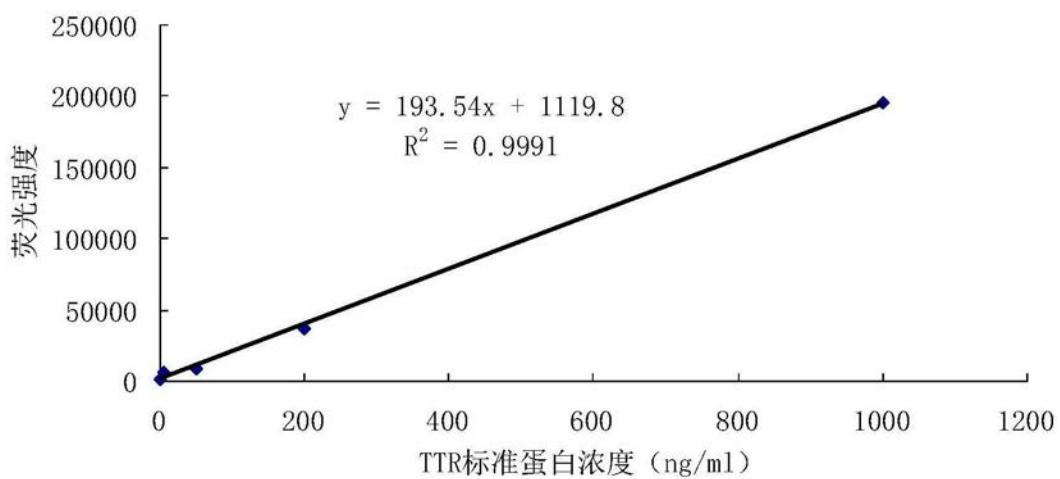


图4

专利名称(译)	一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108181464A</a>	公开(公告)日	2018-06-19
申请号	CN201711485605.4	申请日	2017-12-29
[标]发明人	李来庆		
发明人	李来庆		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	陈世洪		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

### 摘要(译)

本申请一般涉及一种TTR时间分辨免疫荧光试剂盒的制备方法，该试剂盒主要应用于川崎病(KD)临床患儿血清中分子标记物的检测与诊断应用，为推广静注丙种球蛋白(IVIG)敏感型及无反应型的KD患儿检测成为一个常规的临床普查项目提供技术基础。包括步骤：(1)抗人甲状腺素运载蛋白TTR单克隆抗体的制备；(2)抗TTR配对抗体的筛选及检测条件的优化；(3)建立TRFIA-ELISA方法并进行评估；(4)将医院保存的KD患儿阳性样本，用于试剂盒的大规模样本考核验证试验。

