

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810143876.6

[43] 公开日 2009 年 4 月 22 日

[11] 公开号 CN 101413942A

[22] 申请日 2008.12.9

[21] 申请号 200810143876.6

[71] 申请人 王克超

地址 410008 湖南省长沙市湘雅路凯达园 A
栋 10-04

[72] 发明人 王克超

[74] 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
代理人 颜 勇

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种时间竞争放射免疫反应检测待测抗原浓度的方法

[57] 摘要

一种时间竞争放射免疫反应检测待测抗原浓度的方法，采用足量浓度的抗体，用对倍稀释法，稀释成不同倍数浓度的抗体，分别与标记抗原进行放射免疫反应，测定放射性强度，找出最大结合率 B_0 在 75-95% 的稀释倍数浓度的抗体；用此稀释倍数浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应，测放射性强度，找出最大结合率在 30-60% 范围内的恒温温育时间；用此温育时间和最大结合率在 75-95% 的稀释倍数浓度的抗体进行放射免疫反应，测定待测抗原浓度；所述足量浓度的抗体是指能与标记抗原进行充分放射免疫反应的抗体。本发明可有效地克服原有的平衡法检测待测抗原浓度时，在温育过程中所需时间长的状况，通过本发明的方法都

1、一种时间竞争放射免疫反应检测待测抗原浓度的方法，其特征在于，采用足量浓度的抗体，用对倍稀释法稀释成不同倍数浓度的抗体，分别与标记抗原进行放射免疫反应，测定放射性强度，找出最大结合率 B_0 在 75-95% 的稀释倍数浓度的抗体；用此稀释倍数浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应，测放射性强度，找出最大结合率在 30-60% 范围内的恒温温育时间 T ；用此温育时间 T 和最大结合率在 75-95% 的稀释倍数浓度的抗体进行放射免疫反应，测定待测抗原浓度；所述足量浓度的抗体是指能与标记抗原进行充分放射免疫反应的抗体；所述的最大结合率是指固定量标记抗原与抗体反应，结合达到平衡后，分离抗原的结合部分和游离部分，用放射性探测器分别测定结合部分的标记抗原的放射性强度，结合部分的标记抗原放射性强度 B 与固定量的标记抗原的放射性强度比率。

一种时间竞争放射免疫反应检测待测抗原浓度的方法

技术领域

本发明涉及放射免疫反应中快速检测待测抗原浓度的方法。

背景技术

放射免疫反应（RIA）是标记抗原*Ag 和非标记抗原 Ag(待测抗原或其标准品)对有限量的特异性抗体 Ab 进行竞争性结合反应,终产物中标记抗原抗体复合物的放射性强度与非标记抗原的含量呈逆相关的数学关系。示意图-1 如下:



*Ag-Ab 代表标记抗原抗体复合物,Ag-Ab 代表非标记抗原抗体复合物。在上式的反应体系中 *Ag 和 Ag 彼此竞争与有限量的 Ab 起结合反应,分别形成相应的复合物。*Ag 和 Ag 的免疫性完全相同,对 Ab 具有同样的亲和力,当*Ag 与 Ab 为恒量,*Ag 与 Ag 的总量大于 Ab 上的有效结合位点时,*Ag、Ag、Ab 三者混合后,*Ag-Ab 的形成量与 Ag 量成反比,剩下的未结合或游离的*Ag 则与 Ag 成正比。因此,在反应达到平衡时*Ag 的放射性强度按一定比例在游离(F)和结合(B)两种状态之间。如 Ag 量增加,将抑制 *Ag 与 Ab 的结合,游离的*Ag 量相对增加,Ag-Ab 的形成量则增加。由此测定 *Ag-Ab 或*Ag 的放射性强度,即可推算出未 Ag 的量。这种现象称竞争结合反应,这种*Ag-Ab 的量(从变量)与 Ag 的量(自变量)之间存在的竞争性抑制的数量函数关系是放射免疫的定量基础。

用一系列已知的不同浓度标准抗原(Ag)与固定量的*Ag 和 Ab 进行反应,待竞争结合反应平衡后,分离抗原结合部分 B 和游离部分 F,用放射性探测器分别测定*Ag-Ab 和*Ag 的放射性,则其不同浓度标准抗原就得到相应的不同的*Ag-Ab 复合物放射性计数。计算出 B%【 $B/(B+F) \times 100$; 称结合率】或 $B/B_0\%$ (B_0 为不含非标记 Ag 的最大结合放射性)。用横坐标表示标准抗原的浓度,纵坐标表示 B%或 $B/B_0\%$ 绘制出 B%或 $B/B_0\%$ 随 Ag 量变化的曲线即为标准曲线(图 1)。在相同条件下,测得被测样品的 B%或 $B/B_0\%$ (或其他指标),与标准曲线对照,即可查出未知样品的抗原(Ag)浓度,也就是将实验测得的未知样品的直接结果(即反应值)换算成剂量,故标准曲线也称剂量反应曲线(dose response

curve)。

RIA 测得的数据可用作图法和数学模型法处理。实践结果及数学推导表明,RIA 的标准曲线都是曲线,由于标准曲线的绘制是以少数离散点为依据的,所以绘图求值难免人为误差,因此提出一些变换坐标和曲线直线化的作图方法。目前公认以结合率的 logit 值为纵坐标,标准 Ag 浓度的 log 值为横坐标,用最小二乘法对各离散点进行直线回归得出标准曲线(也称剂量反应曲线)(图 2)是较好的方法。

本发明中名词解释:

标记抗原:是指抗原分子结构中某一原子被放射性核素原子取代的抗原;

放射性强度:单位时间内核素的衰变数;

结合率:用不同浓度的非标记抗原与固定量的标记抗原和相应的抗体反应,待竞争结合达到平衡后,分离抗原的结合部分和游离部分,用放射性探测器分别测定结合部分的标记抗原和固定量的标记抗原的放射性强度,结合部分的标记抗原放射性强度(B)与固定量的标记抗原的放射性强度比率称结合率。

最大结合率:不含非标记抗原管的最大结合放射性(B_0),即,固定量标记抗原与抗体反应,结合达到平衡后,分离抗原的结合部分和游离部分,用放射性探测器分别测定结合部分的标记抗原的放射性强度,结合部分的标记抗原放射性强度 B 与固定量的标记抗原的放射性强度比率。

现有的放射免疫实验操作流程是:

1. 把不同浓度标准品(或待测血清)相对应编号试管放入试管架;
2. 加入一定量标准品(或待测样品)。
3. 加入固定量的标记抗原(与标准品相同的抗原)。
4. 加入固定量的抗体。
5. 混匀,37℃温育 45 分钟或 45 分钟以上,4℃18 小时或 4℃18 小时以上。
6. 加入分离试剂混匀静置 15 分钟。
7. 3500 转/分离心 15 分钟—20 分钟(如磁性分离置于磁性试管架上静置 10 分钟)。
7. 抽取上清液。

最后放入 γ -计数器测量沉淀物的放射性强度。根据标准品的放射计数制作出标准曲线。标准曲线的绘制:准品管浓度的 log 值为横坐标,相对百分结合率 (B/B_0) 的 logit 值为纵坐标,绘制出标准曲线,根据待测样品的放射性强度

在标准曲线上找出相应的浓度。这样就求得待测样品的浓度。

目前 γ -计数器全部由微电脑控制、管理以及数据处理。

γ -计数器操作流程:

把不同浓度标准品(或待测样品)相对应编号试管放入待测地方,接通电源,屏幕显示不同测量程序,键入放射免疫实验测量程序;屏幕显示标准管复管数、测量时间、数据处理模式、标准品浓度编号数、质量控制管数、待测样品起始管数,键入标准管复管数 1 (如有要求做双管则键入 2);移动光标到测量时间,键入 30 秒;移动光标到数据处理模式,键入 logit-log 数据处理模式(以 B/B₀ 的 logit 值为纵坐标,标准 Ag 浓度的 log 值为横坐标);移动光标到标准品浓度编号数,依次键入标准品浓度数;移动光标到质量控制管数,键入质量控制管数;移动光标到待测样品起始管数,键入 1。再次键入,屏幕显示是否开始测量,如开始测量则再次键入,测量开始。当标准品测量完毕,屏幕显示标准品曲线和是否修改数据,如修改则移动光标到修改位置,按提示修改数据,修改完毕,键入确定,如不修改再次键入屏幕显示是否打印标准曲线,键入确定,打印标准品曲线,再次键入,样品测量开始,每测量一个样品自动打印出待测样品的浓度。

如现有技术中甲状腺素的实验操作流程如下:

1. 把不同浓度标准品(或待测血清)相对应编号试管放入试管架;
2. 加入 0.1ml 不同浓度甲状腺素标准品(或待测血清)。
3. 加入 0.1ml 标记甲状腺素。
4. 加入 0.1ml 甲状腺素抗体。
5. 混匀 37℃恒温箱温育 45 分钟。
6. 加入 0.5ml 分离试剂。
7. 混匀静置 15 分钟。
8. 3500 转/分离心 15 分钟。
9. 抽取上清液。
10. 用 γ -计数器测量沉淀物的放射性强度。

甲状腺素标准品浓度分别为: 20. 40. 80. 160. 320nmol/ml, 如图 2, 样品的浓度自动打印出来。

目前的放射免疫实验技术是用不足量的抗体(最大结合率在 30%—60%左右)经过 37℃45 分钟或 45 分钟以上温育, 4℃18 小时或 18 小时以上温育, 待反应达到平衡后加入分离试剂, 离心或磁性分离, 去掉游离的标记抗原和待测抗原(或

其标准品),然后测其放射性强度。根据标准品放射性强度制作标准曲线,待测样品的放射性强度在标准曲线中有相应的浓度,这样求得待测样品的浓度。目前这种方法稳定性好,重复性好,但反应时间长,出结果慢,只能手工操作,不能实现自动化。

发明内容

本发明的目的旨在提供一种时间竞争放射免疫反应测待测抗原浓度的方法,可有效地克服原有的平衡法测待测抗原浓度时,在温育过程中所需时间长,通过本发明的方法都能在短小时内获得满意的检测结果。

本发明的目的是通过下述方式实现的:

采用足量浓度的抗体,用对倍稀释法,稀释成不同倍数浓度的抗体,分别与标记抗原进行放射免疫反应,测定放射性强度,找出的最大结合率 B_0 在 75-95% 的稀释倍数浓度的抗体;用此稀释倍数浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应,测放射性强度,找出最大结合率在 30-60% 范围内的恒温温育时间 T ;用此温育时间 T 和最大结合率在 75-95% 的稀释倍数浓度的抗体进行放射免疫反应,测定待测抗原浓度;所述足量浓度的抗体是指能与标记抗原进行充分放射免疫反应的抗体;最大结合率:固定量标记抗原与抗体反应,结合达到平衡后,分离抗原的结合部分和游离部分,用放射性探测器分别测定结合部分的标记抗原的放射性强度,结合部分的标记抗原放射性强度 B 与固定量的标记抗原的放射性强度比率。

本发明所用浓度的抗体(是最大结合率在 75-95% 时,所选用的抗体的浓度),经过 37℃3—10 分钟温育即可加入分离试剂。

本发明的时间竞争放射免疫反应基本操作方法如下:

首先用对倍稀释法稀释足量的抗体,用对倍稀释法稀释 4 个点,制作出抗体浓度与最大结合率的曲线(如图 3),找出最大结合率在 75-95% 左右的抗体的稀释倍数的浓度 M 。这个稀释倍数必须是整数。用这种浓度的抗体制作出时间与最大结合率的曲线(如图 4),找出最大结合率在 30-60% 左右的时间点作为温育的时间 T ,这个时间必须是分的整数。即可用所述的抗体的浓度 M 和温育时间 T 检测待测抗原的浓度。

本发明对于原有技术中 4℃温育条件下的均要在 18 小时以上的反应也很适合,通过本发明的方法都能在短小时内获得满意的检测结果。

附图说明

图1为采用常规的平衡法所制得的甲状腺素标准浓度曲线图。

图2是对图1的 $B/B_0\%$ 用 $B/B_0\% \logit$ 值进行修正后甲状腺素标准浓度曲线图。

图3为实施例1足量的抗体在对倍稀释后的各自的 $B/B_0\%$ 最大结合率曲线图。其中 A_1 为最大结合率在 75-95%范围内的抗体稀释倍数的整数。

图4为实施例1中用图3所得的抗体 A_1 的浓度在不同时间段的最大结合率。其中 T_2 为最大结合率在 30-60%范围内的温育时间。

图5为实施例2足量的抗体在对倍稀释后的各自的 $B/B_0\%$ 最大结合率曲线图。其中 A_2 为最大结合率在 75-95%范围内的抗体稀释倍数的整数。

图6为实施例2中用图5所得的抗体 A_2 的浓度在不同时间段的最大结合率。其中 T_2 为最大结合率在 30-60%范围内的温育时间。

图7为实施例3足量的抗体在对倍稀释后的各自的 $B/B_0\%$ 最大结合率曲线图。其中 A_3 为最大结合率在 75-95%范围内的抗体稀释倍数的整数。

图8为实施例3中用图5所得的抗体 A_2 的浓度在不同时间段的最大结合率。其中 T_3 为最大结合率在 30-60%范围内的温育时间。

图9为实施例4足量的抗体在对倍稀释后的各自的 $B/B_0\%$ 最大结合率曲线图。其中 A_4 为最大结合率在 75-95%范围内的抗体稀释倍数的整数。

图10为实施例4中用图9所得的抗体 A_2 的浓度在不同时间段的最大结合率。其中 T_4 为最大结合率在 30-60%范围内的温育时间。

具体实施方式

实施例1.

甲状腺素的实验操作流程:

取抗体进行对倍稀释,分别与标记抗原进行放射免疫反应,制作出抗体浓度与最大结合率 B_0 的曲线,找出最大结合率在 75-95%左右的稀释倍数为 5 倍(见图3),用这种浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应,制作出不同时间下的最大结合率 B_0 的曲线,找出最大结合率 B_0 在 30-60%左右的时间点为 3 分钟,3 分钟为温育的时间(见图4)。

1. 把不同浓度标准品(或待测血清)相对应编号试管放入试管架;
2. 加入 0.1ml 不同浓度甲状腺素标准品(或待测血清)。
3. 加入 0.1ml 标记甲状腺素。

4. 加入 0.1ml 稀释倍数为 5 倍的浓度的甲状腺素抗体。

5. 混匀 37℃恒温箱温育 3 分钟。

后面的流程与平衡法相同

6. 加入 0.5ml 分离试剂。

7. 混匀静置 15 分钟。

8. 3500 转/分离心 15 分钟。

9. 抽取上清液。

10. 用 γ -计数器测量沉淀物的放射性强度。

实施例 2 白细胞介素 6 的实验操作流程：

取抗体进行对倍稀释，制作出抗体浓度与最大结合率的曲线(见图 5)，找出最大结合率在 75-95%左右的稀释倍数为 5 倍，用这种浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应，制作出不同时间与最大结合率的曲线，找出最大结合率在 30-50%左右的时间点为 10 分钟，10 分钟为温育的时间(见图 6)。

1. 把不同浓度标准品(或待测血清)相对应编号试管放入试管架；

2. 加入 0.1ml 不同浓度的白细胞介素 6 标准品(或待测血清)。

3. 加入 0.1ml 标记白细胞介素 6。

4. 加入 0.1ml 稀释倍数为 5 倍的浓度的白细胞介素 6 抗体。

5. 混匀 37℃温育 10 分钟。

后面的流程与平衡法相同

6. 加入 0.5ml 分离试剂。

7. 混匀静置 15 分钟。

8. 3500 转/分离心 15 分钟。

9. 抽取上清液。

10. 用 γ -计数器测量沉淀物的放射性强度。

实施例 3 皮质醇的实验操作流程：

取抗体进行对倍稀释，分别与标记抗原进行放射免疫反应，制作出抗体浓度与最大结合率的曲线(见图 7)，找出最大结合率在 75-95%左右的稀释倍数为 5 倍，用这种浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应，制作出不同时间与最大结合率的曲线，找出最大结合率在 30-50%左右的时间点为 5 分钟，5 分钟为温育的时间(见图 8)。

1. 把不同浓度标准品(或待测血清)相对应编号试管放入试管架;
2. 加入 0.1ml 不同浓度的皮质醇标准品 (或待测血清)。
3. 加入 0.1ml 标记皮质醇。
4. 加入 0.1ml 稀释倍数为 5 倍的浓度的皮质醇抗体。
5. 混匀 37℃温育 5 分钟。

后面的流程与平衡法相同

6. 加入 0.5ml 分离试剂。
7. 混匀静置 15 分钟。
8. 3500 转/分离心 15 分钟。
9. 抽取上清液。
10. 用 γ -计数器测量沉淀物的放射性强度。

实施例 4 三碘甲状腺原氨酸的实验操作流程:

取抗体进行对倍稀释, 分别与标记抗原进行放射免疫反应, 制作出抗体浓度与最大结合率的曲线(见图 9), 找出最大结合率在 75-95%左右的稀释倍数为 4 倍, 用这种浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应, 制作出不同时间与最大结合率的曲线, 找出最大结合率在 30-50%左右的时间点为 5 分钟, 5 分钟为温育时间(见图 10)。

1. 把不同浓度标准品(或待测血清)相对应编号试管放入试管架;
2. 加入 0.1ml 不同浓度的三碘甲状腺原氨酸标准品 (或待测血清)。
3. 加入 0.1ml 标记三碘甲状腺原氨酸。
4. 加入 0.1ml 稀释倍数为 4 倍的浓度的三碘甲状腺原氨酸抗体。
5. 混匀 37℃温育 5 分钟。

后面的流程与平衡法相同

6. 加入 0.5ml 分离试剂。
7. 混匀静置 15 分钟。
8. 3500 转/分离心 15 分钟。
9. 抽取上清液。
10. 用 γ -计数器测量沉淀物的放射性强度。

不同厂家的试剂温育时间略有不同, 但都适合时间竞争法。放射免疫反应能够检测的项目很多, 现仅举 4 例, 且以上实施例旨在说明本发明而不是对本发明的进一步限定。

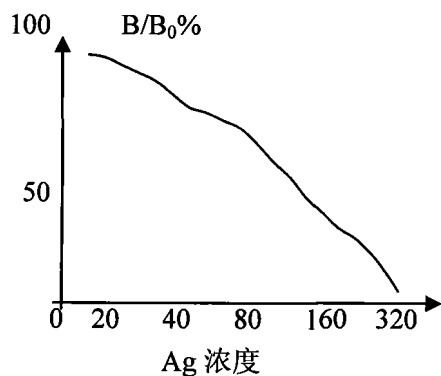


图 1

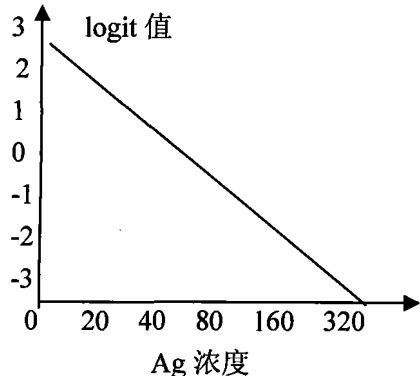


图 2

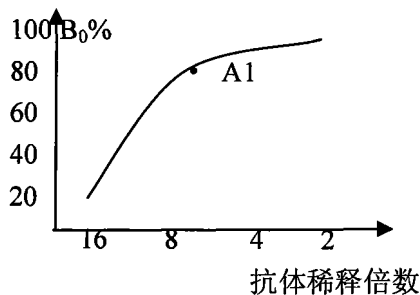


图 3

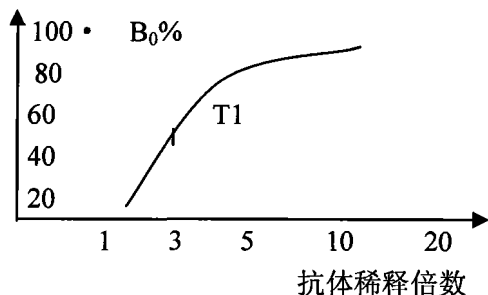


图 4

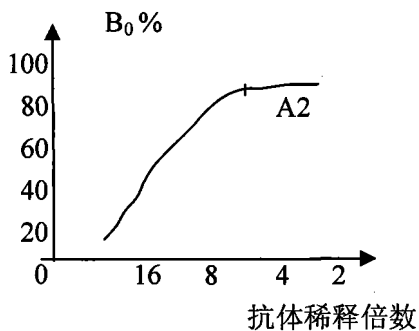


图 5

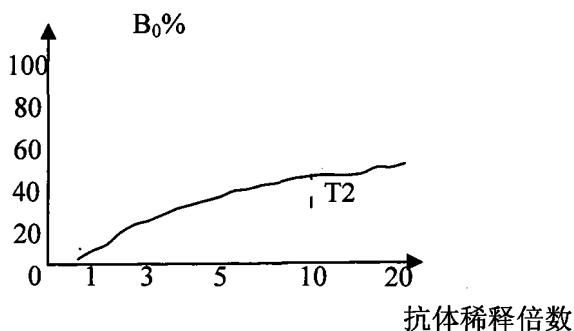


图 6

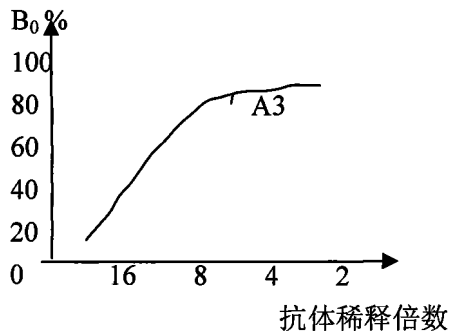


图 7

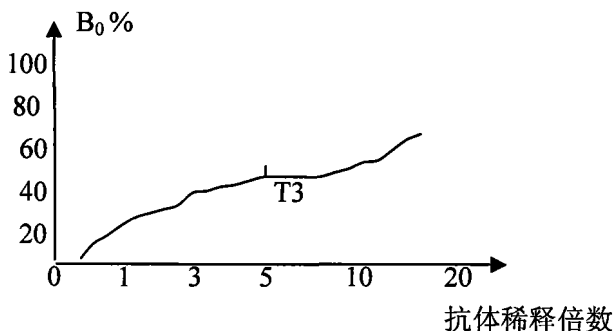


图 8

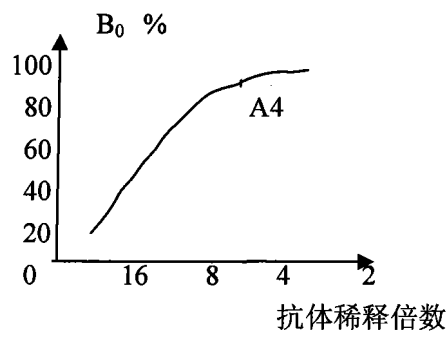


图 9

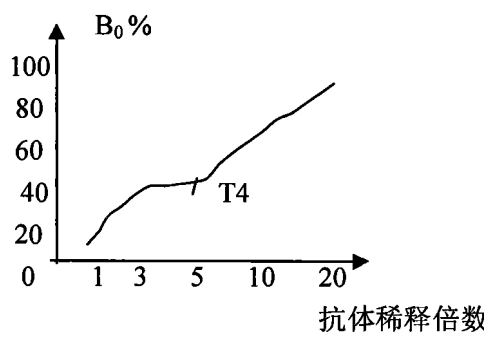


图 10

专利名称(译)	一种时间竞争放射免疫反应检测待测抗原浓度的方法		
公开(公告)号	CN101413942A	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200810143876.6	申请日	2008-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	王克超		
申请(专利权)人(译)	王克超		
当前申请(专利权)人(译)	王克超		
[标]发明人	王克超		
发明人	王克超		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	颜勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种时间竞争放射免疫反应检测待测抗原浓度的方法，采用足量浓度的抗体，用对倍稀释法，稀释成不同倍数浓度的抗体，分别与标记抗原进行放射免疫反应，测定放射性强度，找出最大结合率B₀在75 - 95%的稀释倍数浓度的抗体；用此稀释倍数浓度的抗体再与标记抗原进行放射免疫反应，测放射性强度，找出最大结合率在30 - 60%范围内的恒温温育时间；用此温育时间和最大结合率在75 - 95%的稀释倍数浓度的抗体进行放射免疫反应，测定待测抗原浓度；所述足量浓度的抗体是指能与标记抗原进行充分放射免疫反应的抗体。本发明可有效地克服原有的平衡法检测待测抗原浓度时，在温育过程中所需时间长的状况，通过本发明的方法都能在规定时间内获得满意的结果。

