



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102375063 A

(43) 申请公布日 2012.03.14

(21) 申请号 201010259888.2

(22) 申请日 2010.08.23

(71) 申请人 湖州赛尔迪生物医药科技有限公司

地址 313000 浙江省湖州市红丰路 1366 号
南太湖科技创新中心八楼

(72) 发明人 许洋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

一种常见蛋白质的免疫质谱试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种常见蛋白质的免疫质谱试剂盒及制备方法,属于蛋白质检测技术领域,该试剂盒包括一小管含等摩尔标准蛋白质的质控品;一小管含等摩尔标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的抗体的磁珠;一小管粘合液;一小管清洗液;一小管洗提液;一小管稳定剂;上述各小管置于 4~8℃ 冷藏盒中。本发明可用于体外生物样品检测和预后判断的免疫质谱试剂盒。本方法比等重量标记抗体的免疫质谱试剂盒更准确、更优化。

1. 一种检测常见蛋白质的免疫质谱试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:

一小管含质控品,含九种等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基等标准蛋白质的质谱标准化质控血清(浆), $10 \sim 30 \mu\text{l}$;

一小管含等摩尔标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体的磁珠 $30 \sim 50 \mu\text{l}$;

一小管粘合液 $300 \sim 500 \mu\text{l}$,该粘合液为 $50 \sim 100\text{mM}$ PBS, pH 值为 $7.0 \sim 7.4$;

一小管清洗液 $10 \sim 50 \mu\text{l}$,该清洗液为 dH₂O 溶液;

一小管洗提液 $10 \sim 50 \mu\text{l}$,该洗提液为 $1 \sim 5\%$ 三氟乙酸的水溶液;

一小管稳定剂(能量吸收分子饱和溶液) $5 \sim 10 \mu\text{l}$,该溶液由能量吸收分子溶解在含 $30 \sim 60\%$ 乙腈和 $0.5 \sim 1\%$ 三氟乙酸的水溶液中构成,该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种;上述各小管置于 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏盒中。

2. 如权利要求 1 所述的免疫质谱试剂盒,其特征在于,所述能量吸收分子采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种。

3. 一种制备如权利要求 1 所述的免疫质谱试剂盒的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 质谱标准化质控血清(浆)的制备:将男性、女性等量的 O 型血清(浆)稀释在缓冲溶液中制成质谱的标准化质控血清(浆),并将该稀释的血清(浆)分装成 $10 \sim 30 \mu\text{l}$ 小管中;加入等摩尔九种标准转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基;

2) 制备含九种等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体的磁珠:将转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基免疫小鼠,待免疫反应出现后,从外周血中分离 B 细胞,按标准的单克隆抗体的制备方法制备;

将购买的蛋白 A-磁珠(Protein A-磁珠)或蛋白 G-磁珠(Protein G-磁珠) $30 \sim 50 \mu\text{l}$ 标记上等摩尔的抗体;

3) 将购买的 $50 \sim 100\text{mM}$ PBS(Phosphate-Buffered Saline), pH 值为 $7.0 \sim 7.4$ 缓冲液、 $1 \sim 5\%$ 三氟乙酸的洗脱液分别分装成 $300 \sim 500 \mu\text{l}$ 小管和 $10 \sim 50 \mu\text{l}$ 小管;

4) 将能量吸收分子溶解 $30 \sim 60\%$ 乙腈和 $0.5 \sim 1\%$ 三氟乙酸的水溶液中制成能量吸收分子饱和溶液,并分装成 $5 \sim 10 \mu\text{l}$ 小管,该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种;

5) 将上述分装好的各小管置于 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏箱中。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述磁珠可用 C8 及 C18 疏水基质、WCX 基质、或 IMAC 基质之中的任一种。

5. 一种如权利要求 1 所述免疫质谱试剂盒对离体生物样品(包含,但不限于体液、血液、尿液等)的应用。

一种常见蛋白质的免疫质谱试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质检测技术领域,特别涉及基于抗体与质谱技术用于对生物样品中蛋白质分析的试剂盒制备方法。

背景技术

[0002] 不论是细胞的正常功能还是病理特性都在一定程度上取决于细胞所表达的蛋白质功能。因此,鉴定人体内表达的蛋白质的区别,可用于体外疾病样本诊断及筛查,并最终用于药物开发和疾病治疗。而要进行蛋白质表达和功能的差异化分析,要求能够达到分辨细胞内分子的复杂混合物的程度。但细胞内许多物质往往以微量存在,目前用于分析蛋白的方法在上述各方面都有局限,用这些常规手段难以进行化学结构及蛋白质序列鉴定分析。用抗体和质谱联合可克服这一技术缺点。

[0003] 免疫质谱(IMS)的概念是利用磁珠等将血清样本中的相关蛋白质固定在磁珠表面的特异性抗体上,通过洗提液获取目的蛋白质并点样于钢芯片上,由蛋白指纹图谱仪(质谱仪)以图谱形式读取钢芯片上的样本所含蛋白信息(许洋,蛋白质指纹图谱技术在实验诊断与临床医学中的研究进展,基础医学与临床,2007,27(2):134-142)。传统用于蛋白质检测试剂盒及制备方法为ELISA等传统免疫分析技术。ELISA等传统免疫分析技术主要依靠间接的化学或放射测定法,因而无法直接鉴定抗原的变异。举例讲, β 2微球蛋白的检测试剂盒制备方法为先将抗 β 2微球蛋白抗体(第一个抗体)结合至固相表面(如玻璃),然后将含 β 2微球蛋白的样品(如血清),加至这个已标有抗 β 2微球蛋白抗体的容器中;这样, β 2微球蛋白就会结合至抗体上,然后洗脱未结合的物质。再加上已标有酶、放射性或化学发光性的抗 β 2微球蛋白抗体(第二个抗体),这样就可以检测出 β 2微球蛋白的总含量。这种方法学的缺点是无法测出 β 2微球蛋白的变异(如 β 2微球蛋白的N或C端丢失了一个或数个氨基酸, β 2微球蛋白被甲基,酰基等修饰, β 2微球蛋白的异构体)。即通常被用于传统检测 β 2微球蛋白试验是检测所谓的总 β 2微球蛋白,而不是 β 2微球蛋白变异或 β 2微球蛋白亚单位等浓度。传统 β 2微球蛋白检测试剂盒无法同时检测差别性的 β 2微球蛋白异构体。

[0004] 目前在进行蛋白质质谱分析时还缺乏标准化、优化的免疫质谱试剂盒。在临床工作中发现有相当比例的蛋白异构体无法检测,这对于患者的预后评估则缺乏有效的早期监测手段。

发明内容

[0005] 科学上把含有 6.02×10^{23} 个微粒的集体作为一个单位,叫摩尔或摩。摩尔是表示物质的量(符号是n)的单位,简称为摩,单位符号是mole(mol)。1mol的碳原子含 6.02×10^{23} 个碳原子,质量为12g。1mol的硫原子含 6.02×10^{23} 个硫原子,质量为32g,同理,1摩任何原子的质量都是以克为单位,数值上等于该种原子的相对原子质量。同样我们可以推算出,1摩任何物质的质量,都是以克为单位,数值上等于该种物质的分子量。水的

分子量是 18, 1mol 的质量为 18g, 含 6.02×10^{23} 个水分子。通常把 1mol 物质的质量, 叫做该物质的摩尔质量 (符号是 M), 摩尔质量的单位是克 / 摩 (符号是“g/mol”) 例如, 水的摩尔质量为 18g/mol, 写成 $M(H_2O) = 18g/mol$ 。等质量 (或重量) 的不同的原子或分子, 其摩任数不同; 如 12g 的碳原子和 12g 的硫原子的摩任数不同。等摩任的不同的原子或分子, 其数量相同; 如 1mol 的碳原子和 1mol 的硫原子的原子数量相同, 均为 6.02×10^{23} 个原子。本发明的目的是克服已有技术的不足之处, 提出一种用于检测九种蛋白质 (转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基标志物) 的免疫质谱试剂盒及制备方法, 该试剂盒为早期检测疾病提供了新的途径, 并为进一步发现新的标志提供了基础。常见蛋白质的免疫质谱试剂盒 (蛋白指纹法) 采用磁珠 - 多种已知等摩尔抗体组 (转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的抗体) 特异性结合血清中的疾病相关标志物 (转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基); 用等摩尔抗体组 (转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的抗体) 标记的磁珠用比等重量或等量 (如等 μg) 抗体组 (转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的抗体) 标记的磁珠更好。等摩尔抗体的结合蛋白质或抗原的位点是一致的或相等的; 而等重量 (如等 μg) 抗体, 由于每种或每个抗体的重量不同, 故等重量抗体 (如每种抗体糖基化的量不同、故重量不同) 结合蛋白质或抗原的位点数不一定相等的, 造成结合力不均匀。本试剂盒适用于常见心血管疾病、异位妊娠等高危人群的筛查、对无症状人群进行普查、预测预后和追踪疾病的复发; 可作为常见心血管疾病、异位妊娠等早期辅助诊断、预测预后和追踪疾病的复发。

[0006] 本发明提出的免疫质谱试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒包括:

[0007] 一小管含质控品, 含九种等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的质谱标准化质控血清 (浆), $10 \sim 30 \mu l$;

[0008] 一小管含等摩尔标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体的磁珠 $30 \sim 50 \mu l$;

[0009] 一小管粘合液 $300 \sim 500 \mu l$, 该粘合液为 $50 \sim 100mM$ PBS, pH 值为 $7.0 \sim 7.4$;

[0010] 一小管清洗液 $10 \sim 50 \mu l$, 该清洗液为 dH_2O 溶液;

[0011] 一小管洗提液 $10 \sim 50 \mu l$, 该洗提液为 $1 \sim 5\%$ 三氟乙酸的水溶液;

[0012] 一小管稳定剂 (能量吸收分子饱和溶液) $5 \sim 10 \mu l$, 该溶液由能量吸收分子溶解在含 $30 \sim 60\%$ 乙腈和 $0.5 \sim 1\%$ 三氟乙酸的水溶液中构成, 该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种; 上述各小管置于 $4 \sim 8^\circ C$ 冷藏盒中。

[0013] 本发明提出的上述试剂盒制备方法, 其特征在于, 该方法包括以下步骤:

[0014] 1) 质谱标准化质控血清 (浆) 的制备: 将男性、女性等量的 O 型血清 (浆) 稀释在缓冲溶液中制成质谱的标准化质控血清 (浆), 并将该稀释的血清 (浆) 分装成 $10 \sim 30 \mu l$ 小管中; 加入等摩尔九种标准蛋白质: 转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基;

[0015] 2) 制备含九种等摩尔标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋

白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体的磁珠；将转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基免疫小鼠，待免疫反应出现后，从外周血中分离 B 细胞，按标准的单克隆抗体的制备方法制备；将购买的蛋白 A-磁珠 (Protein A-磁珠) 或蛋白 G-磁珠 (Protein G-磁珠) 30 ~ 50 μ l 标记上等摩尔的抗体；

[0016] 3) 将购买的 50 ~ 100mM PBS (Phosphate-Buffered Saline), pH 值为 7.0 ~ 7.4 缓冲液、1 ~ 5% 三氟乙酸的洗脱液分别分装成 300 ~ 500 μ l 小管和 10 ~ 50 μ l 小管；

[0017] 4) 将能量吸收分子溶解 30 ~ 60% 乙腈和 0.5 ~ 1% 三氟乙酸的水溶液中制成能量吸收分子饱和溶液，并分装成 5 ~ 10 μ l 小管，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；

[0018] 5) 将上述分装好的各小管置于 4 ~ 8 $^{\circ}$ C 冷藏箱中。

[0019] 本发明还提出所述的试剂盒对常见心血管疾病、异位妊娠等高危人群的筛查的应用。

[0020] 所述的检测试剂盒对常见心血管疾病、异位妊娠等高危人群判断为：

[0021]

标志物	峰值 (m/z \pm Da)	信噪比
转甲状腺素蛋白	13761 \pm 100	> 5
载脂蛋白 A	28078 \pm 600	> 5
β 2 微球蛋白	11731 \pm 100	> 5
转铁蛋白	75000 \pm 5000	> 5
补体 C3a	8938 \pm 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	37580 \pm 750	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 α (hCG- α)	14509 \pm 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 β (hCG- β)	23570 \pm 500	> 5
载脂蛋白 C 亚基	6600 \pm 60	> 5

[0022] 所述试剂盒依据上述几个特征蛋白峰，双盲测试含转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基样品的敏感性 100%，特异性 100%。

[0023] 本试剂盒检测转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的应用实验步骤包括：

[0024] 1. 将生物样品先用粘合液稀释 30 ~ 50 倍，将样品充分混匀；

[0025] 2. 将上述标本 50 ~ 100 μ l 加至已装好磁珠-Protein A-抗体或磁珠-Protein G-抗体 (等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、

hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基等抗体) 的 PCR 管中, 置磁性处理器上, 15 ~ 25°C 孵育 20 ~ 40 分钟, 除去液体;

[0026] 3. 加 10 ~ 50 μ l 清洗液至已装好磁珠的 PCR 管, 置磁性处理器上孵育 1 ~ 5 分钟, 除去液体, 重复上述操作两次;

[0027] 4. 加 10 μ l 洗提液 1 ~ 5 分钟, 洗提标本至上清液;

[0028] 5. 取 5 μ l 上清液移至另一个 PCR 管中, 加入 5 μ l 稳定剂充分混匀;

[0029] 6. 取 1 μ l 混合溶液加样至质谱专用金属片 (有 3 \times 3mm 圆孔) 上, 自然干燥金属片;

[0030] 7. 将上述金属片加入质谱仪中, 就会生成质谱图;

[0031] 8. 外部使用多肽分子质量标准来校正质量精确性, 所有样本均进行双份检测以减少实验误差。

[0032] 上述的生物标志是利用一台质谱仪来检测的。该设备的质量精确度约为 $\pm 0.1\%$ 。

[0033] 抗体提取物质是任何能与抗体选择性或特异性结合的物质, 举例说明, Protein A、Protein G, 可选择性或特异性结合抗体的 Fc 位点, 洗去未吸附的抗体, 可制作 Protein A-抗体或 Protein G-抗体复合物。任何适宜的洗液均可使用。Protein A、Protein G 可标记在磁珠上 (见 Gunn DL, et al. J Immunol Methods. 1:381-389, 1972)。

[0034] 质谱对待分析物的分析生成飞行时间谱。该飞行时间谱的最终分析并不表示离子化能量攻击一个样本产生的单独的脉冲信号, 而是一系列脉冲的信号之和。这样降低了干扰, 并增加了动态范围。该飞行时间数据受数据处理软件的影响。软件中数据处理主要包括转换飞行时间与质荷比而产生质谱, 降低基线而减少仪器的偏移量, 和过滤高频噪音而减轻高频噪音。

[0035] 通过对等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体捕获分子检测而产生的数据可利用计算机的数据分析程序进行分析。该计算机程序分析这些数据以显示检测出的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的相对摩尔数量 (由于质谱标准化质控血清 (浆) 加入等摩尔种标准转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基; 而九种物质: 转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的摩尔数是已知的; 故可用质谱相对信号的强度计算出样本中转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基相对摩尔数量), 并显示飞行时间和确定被检测的每个转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的分子量。实施例 1 中可以看到摩尔数量标记的方法比用等重量标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体来捕获样本中转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基分子更精确。

[0036] 数据分析还能包括一系列的确定转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的信号强度、信噪比和矫正数据

对预定统计分布状态的偏离。例如,通过计算与某些参数相关的每个峰值的高度、信噪比,可规范观测到的峰。该参数可能是由仪器和类似能量吸收分子等化学成分产生的不重要的干扰,这可以设置调零。

[0037] 分析一般包括展示从待分析物得到的信号的图谱中峰的鉴定。峰可以通过视图进行选择,软件是可用的,它可自动检测峰。一般情况下,该软件通过鉴定信号具有信噪比高于一个选择阈值并标记出在峰信号的质心处的峰的质量这样的方式操作。在一个有效的程序中,比较许多谱线以认定出现在质谱中某一选定范围内同样的一些峰。该软件的一个版本聚集所有出现在确定的质量范围内的各条光谱的峰,对所有在质量(质荷比)中值附近的峰指定一个质量(质荷比)簇。

[0038] 发明中使用的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基是等摩尔特异性抗体所捕获。这些转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基是进一步通过质谱(mass spectrometry)测定其不同分子量来知道它们特定的身份。

[0039] 利用 C8 及 C18 疏水基质、WCX 基质、或 IMAC 磁珠(或芯片)及用血液(血清、血浆)、尿液样本的实验结果是一致的。

[0040] 本发明可用于体外细胞和非侵入性的体外质谱检测方法的定量控制,如离体体液的试剂盒用于临床质谱的检测方法。可以检测多个蛋白质生物标志群及质谱多肽蛋白图谱。

[0041] 本发明中的试剂盒及方法与其他非侵入性的体外检测方法比较,具有以下的特点:

[0042] (1) 精确

[0043] 质谱直接分析有很强的精确性。因为蛋白质是由氨基酸组成的,而氨基酸的平均质量是已知的,如果知道了抗原或生物标志的总分子量,那么抗原的变异(指氨基酸变化)就很容易被推测出来。

[0044] (2) 方便

[0045] 所用 Protein A-抗体或 Protein G-抗体复合物的支持物是磁珠或芯片。用磁性分离器分离磁珠及样品,无需离心样品。

[0046] (3) 准确

[0047] 本发明采用了等摩尔抗体标记-质谱分析一次性、同时检测差别性的九种蛋白质的相对摩尔数量:转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基;比等重量抗体标记-质谱分析更准确。

具体实施方式

[0048] 本发明将结合具体实施例作进一步说明,这些实例仅用于说明目的,而不用于限制本发明范围。

[0049] 实施例 1

[0050] 本发明提出的免疫质谱试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:一小管含质控品,含九种等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的质谱标准化质控血清(浆), $10 \sim 30 \mu\text{l}$;

[0051] 一小管含等摩尔标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体的磁珠 30 ~ 50 μ l；

[0052] 一小管粘合液 300 ~ 500 μ l，该缓冲液为 50 ~ 100mM PBS，pH 值为 7.0 ~ 7.4；

[0053] 一小管清洗液 10 ~ 50 μ l，该清洗液为 dH₂O 溶液；

[0054] 一小管洗提液 10 ~ 50 μ l，该洗提液为 1 ~ 5% 三氟乙酸的水溶液；

[0055] 一小管稳定剂（能量吸收分子饱和溶液）5 ~ 10 μ l，该溶液由能量吸收分子溶解在含 30 ~ 60% 乙腈和 0.5 ~ 1% 三氟乙酸的水溶液中构成，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；上述各小管置于 4 ~ 8°C 冷藏盒中。

[0056] 本发明提出的上述试剂盒制备方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

[0057] 1) 质谱标准化质控血清（浆）的制备：将男性、女性等量的 O 型血清（浆）稀释在缓冲溶液中制成质谱的标准化质控血清（浆），并将该稀释的血清（浆）分装成 10 ~ 30 μ l 小管中；加入等摩尔九种标准转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基；

[0058] 2) 制备含九种等摩尔转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基抗体的磁珠：将转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基免疫小鼠，待免疫反应出现后，从外周血中分离 B 细胞，按标准的单克隆抗体的制备方法制备；将购买的蛋白 A-磁珠 (Protein A-磁珠) 或蛋白 G-磁珠 (Protein G-磁珠) 30 ~ 50 μ l 标记上等摩尔的抗体；

[0059] 3) 将购买的 50 ~ 100mM PBS (Phosphate-Buffered Saline)，pH 值为 7.0 ~ 7.4 缓冲液、1 ~ 5% 三氟乙酸的洗脱液分别分装成 300 ~ 500 μ l 小管和 10 ~ 50 μ l 小管；

[0060] 4) 将能量吸收分子溶解 30 ~ 60% 乙腈和 0.5 ~ 1% 三氟乙酸的水溶液中制成能量吸收分子饱和溶液，并分装成 5 ~ 10 μ l 小管，该能量吸收分子可采用肉桂酸衍生物、芥子酸、二羟基苯甲酸之中的任一种；

[0061] 5) 将上述分装好的各小管置于 4 ~ 8°C 冷藏箱中。

[0062] 本发明还提出所述的试剂盒对常见心血管疾病、异位妊娠等高危人群的筛查的应用。

[0063] 所述的检测试剂盒对常见心血管疾病、异位妊娠等高危人群判断为：

[0064]

标志物	峰值 (m/z \pm Da)	信噪比
转甲状腺素蛋白	13761 \pm 100	> 5
载脂蛋白 A	28078 \pm 600	> 5
β 2 微球蛋白	11731 \pm 100	> 5
转铁蛋白	75000 \pm 5000	> 5
补体 C3a	8938 \pm 100	> 5

人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	37580 ± 750	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 α (hCG-α)	14509 ± 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 β (hCG-β)	23570 ± 500	> 5
载脂蛋白 C 亚基	6600 ± 60	> 5

[0065] 采用本发明方法制备的试剂盒的应用及效果说明如下：

[0066] 一、材料

[0067] 1. 标本来源 :A. 100 例正常人对照组的血清及尿液 ;B. 100 例含转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG-α、hCG-β、载脂蛋白 C 亚基升高病人的血清及尿液。

[0068] 2. 质量控制 :A. 人标准化质控血清 B. 质谱激光能量调控 :每次测试前,用上述标准化质控血清。

[0069] 3. 磁珠表面含已标记的等摩尔抗体 :抗转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG-α、hCG-β、载脂蛋白 C 亚基。将蛋白 A(Protein A)用 Carbodiimide 方法标记在磁珠上 (见 Gunn DL, et al. J Immunol Methods. 1 :381-389, 1972) ;蛋白 A(Protein A) 可以结合多个标有的抗体。具有吸附剂功能的 Protein A 与抗体置磁性处理器上,22℃ 孵育 30 分钟,除去液体。加 100 μ l 缓冲液 (50mM PBS, pH 7.0 ~ 7.4) 至已装好磁珠的 PCR 管,置磁性处理器上孵育 2 分钟,除去液体,重复上述操作两次。

[0070] 二、方法

[0071] 1. 样品的收集 :全血采集后吸取血清及尿液,置于 -80℃ 保存 ;-80℃ 冰箱中取出血清及尿液样品,置冰盒上融解 ;以 10,000 转 / 分,4℃ 离心 2 分钟 ;取上清液。

[0072] 2. 样品的准备 :每个吸附剂支持物点需要血清及尿液 1 μ l,将血清及尿液用缓冲液稀释,将样品充分混匀。

[0073] 3. 样品检测 :上样,将上述标本 50 ~ 100 μ l 加至已装好磁珠 -Protein A- 抗体的 PCR 管中,置磁性处理器上,22℃ 孵育 30 分钟,除去液体。加 50 ~ 100 μ l 缓冲液 (50mM PBS, pH7.0 ~ 7.4) 至已装好磁珠的 PCR 管,置磁性处理器上孵育 2 分钟,除去液体 ;加清洗液重复上述操作两次。加 10 μ l 洗提液 2 分钟,洗提标本至上清液。取 5 μ l 上清液移至另一个 PCR 管中,加入 5 μ l 能量吸收分子饱和溶充分混匀,取 1 μ l 混合溶液加样至质谱专用金属片 (有 3×3mm 圆孔) 上,自然干燥金属片。所有样本均进行双份检测以减少实验误差。

[0074] 4. 将上述样品加入质谱中,就会生成飞行时间质谱图。外部使用多肽分子质量标准来校正质量精确性。

[0075] 实验结果

[0076] 准确性

[0077] 当磁珠含已标记的等摩尔抗体 :抗转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG-α、hCG-β、载脂蛋白 C 亚基抗体,用统计学方法,通过分析血清蛋白指纹峰,所述试剂盒依据上述几个特征蛋白峰,双盲测试含转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、β 2 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG-α、hCG-β、载脂蛋白 C 亚基样品的敏

感性 100%，特异性 100%。

[0078] 当磁珠含已标记的等重量抗体（如等量 1-5 μg ）：抗-转甲状腺素蛋白、抗-载脂蛋白 A、抗- $\beta 2$ 微球蛋白、抗-转铁蛋白、抗-补体 C3a、或抗-hCG、抗-hCG- α 、抗-hCG- β 、抗-载脂蛋白 C 亚基时，分析血清蛋白指纹峰，所述试剂盒依据上述几个特征蛋白峰，双盲测试含转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基样品的敏感性 90%，特异性 90%。

[0079] 故等摩尔抗体组（转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的抗体）标记的磁珠比等重量或等量（如等 μg ）抗体组（转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A、 $\beta 2$ 微球蛋白、转铁蛋白、补体 C3a、或 hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白 C 亚基的抗体）标记的磁珠更好

[0080] 重复性

[0081] 取样本进行重复检测三次，检测相关蛋白标志物蛋白峰，结果一致：

[0082]

标志物	峰值 ($m/z \pm Da$)	信噪比
转甲状腺素蛋白	13761 \pm 100	> 5
载脂蛋白 A	28078 \pm 600	> 5
$\beta 2$ 微球蛋白	11731 \pm 100	> 5
转铁蛋白	75000 \pm 5000	> 5
补体 C3a	8938 \pm 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	37580 \pm 750	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 α (hCG- α)	14509 \pm 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 β (hCG- β)	23570 \pm 500	> 5
载脂蛋白 C 亚基	6600 \pm 60	> 5

[0083] 灵敏度

[0084] 检测 150fmol 的牛 G 型免疫球蛋白 (IgG)，信噪比大于 300 : 1。

[0085] 特异性

[0086] 检测 100 份正常人阴性血清样本，100% 样本结果符合下表要求：

[0087]

标志物	峰值 ($m/z \pm Da$)	信噪比
转甲状腺素蛋白	13761 \pm 100	< 2
载脂蛋白 A	28078 \pm 600	< 2

β 2 微球蛋白	11731 ± 100	< 2
转铁蛋白	75000 ± 5000	< 2
补体 C3a	8938 ± 100	< 2
人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	37580 ± 750	< 2
人绒毛膜促性腺激素亚基 α (hCG-α)	14509 ± 100	< 2
人绒毛膜促性腺激素亚基 β (hCG-β)	23570 ± 500	< 2
载脂蛋白 C 亚基	6600 ± 60	< 2

[0088] 注：信噪比 < 2 代表阴性

[0089] 利用 C8 及 C18 疏水基质、WCX 基质、或 IMAC 磁珠（或芯片）及用血液（血清、血浆）、尿液样本的实验结果是一致的。

[0090] 在阅读了本发明的上述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式应当同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

专利名称(译)	一种常见蛋白质的免疫质谱试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN102375063A	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	CN201010259888.2	申请日	2010-08-23
[标]发明人	许洋		
发明人	许洋		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种常见蛋白质的免疫质谱试剂盒及制备方法，属于蛋白质检测技术领域，该试剂盒包括一小管含等摩尔标准蛋白质的质控品；一小管含等摩尔标记的转甲状腺素蛋白、载脂蛋白A、 β 2微球蛋白、转铁蛋白、补体C3a、或hCG、hCG- α 、hCG- β 、载脂蛋白C亚基的抗体的磁珠；一小管粘合液；一小管清洗液；一小管洗提液；一小管稳定剂；上述各小管置于4~8°C冷藏盒中。本发明可用于体外生物样品检测和预后判断的免疫质谱试剂盒。本方法比等重量标记抗体的免疫质谱试剂盒更准确、更优化。

[0021]

标志物	峰值 (m/z \pm Da)	信噪比
转甲状腺素蛋白	13761 \pm 100	> 5
载脂蛋白 A	28078 \pm 600	> 5
β 2 微球蛋白	11731 \pm 100	> 5
转铁蛋白	75000 \pm 5000	> 5
补体 C3a	8938 \pm 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	37580 \pm 750	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 α (hCG- α)	14509 \pm 100	> 5
人绒毛膜促性腺激素亚基 β (hCG- β)	23570 \pm 500	> 5
载脂蛋白 C 亚基	6600 \pm 60	> 5

[0022] 所述试剂盒依据上述几个特征蛋白峰，双盲测试含转甲状腺素蛋白、载脂蛋