



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104034906 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410284459. 9

(22) 申请日 2014. 06. 24

(71) 申请人 广西博士海意信息科技有限公司

地址 530022 广西壮族自治区南宁市民族大道 38-2 号 1211 室

(72) 发明人 李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云
蓝文苑

(74) 专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司
44214

代理人 李珊

(51) Int. Cl.

G01N 33/76 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

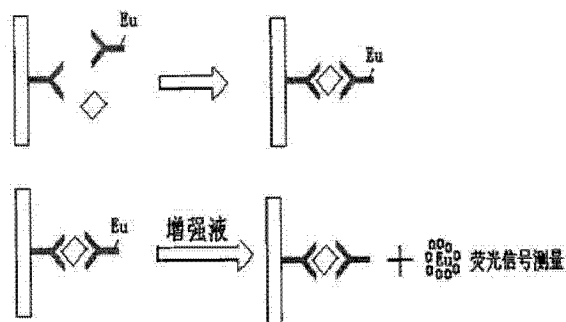
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于 β -HCG 检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于 β -HCG 检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒,其选用抗 β -HCG 单克隆抗体作为包被抗体,用碳酸钠缓冲溶液稀释至 1 - 10 μ g/ml 作为包被液;配对抗 β -HCG 单克隆抗体用镧系元素离子标记作为标记抗体;实验时用反应缓冲液按 1 : 20 稀释使用;在包被抗体的反应板上,每孔依次加入 25 μ l 的 β -HCG 的标准品或待测样品、以及稀释的标记抗体,孵育后进行荧光检测。本发明还提供相应的试剂盒。本发明具有较高的灵敏度、特异性及稳定性;且分析系统高度自动化,可提高临床检验结果的速度,可大幅度降低人为误差和增加检出结果的可靠性。



1. 一种用于 β -HCG 检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒,其特征是:所述分析法包括下列步骤:

①固相抗体制备:将抗 β 人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)单克隆抗体用碳酸钠缓冲溶液稀释至 1-10 μ g/mL

作为包被液,包被反应板,并用封闭液封闭;

②镧系元素离子标记抗体制备:选用配对抗 β -HCG 单克隆抗体用镧系元素离子标记;

③在步骤①制得的具有固相抗体的反应板上,每孔加入 β -HCG 标准品或待测样品,以及用反应缓冲液稀释的标记抗体进行孵育,最后进行荧光测定。

2. 根据权利要求 1 所述 β -HCG 时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤②中的镧系元素离子为 Eu^{3+} 。

3. 根据权利要求 1 所述 β -HCG 时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤③中的反应缓冲液为 PH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl,内含 0.9% NaCl,1% BSA,0.05% 牛 IgG,200 μ M DTPA,0.05% Tween20 和 0.1% NaN_3 ;且该步骤③在时间分辨荧光免疫分析仪器上自动完成。

4. 如权利要求 1 所述的 β -HCG 时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤②中镧系元素离子标记抗体制备是采用如下方法进行:

(1) 取待标记抗体加入透析袋中,放入配制好的 PH 9.5 的碳酸盐缓冲液中,室温透析过夜,其间多次换透析液;

(2) 次日,取出抗体,稀释至 0.2-5 μ g/mL,DTTA-Eu:抗体按质量比为 2:1 的比例边振荡边加入 DTTA-Eu,室温下在振荡过夜,然后在黑暗中静置 48 小时;

(3) 标记好的抗体与游离 DTTA-Eu 通过 1 $\times$ 30cm 的 Sephadex G50 色谱柱分离,分离过程用核酸蛋白仪监控;分离所用洗脱液为 pH7.8 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液;

(4) 用小试管依次分段接受流出物,用分光光度计,在 280nm 处测吸光度,同时测荧光强度,计算出 Eu^{++} 标抗体浓度;

(5) 用 0.22 μ m 的滤器过滤;

(6) 加入 0.5% BSA,2-8 $^{\circ}$ C 保存。

5. 一种 β -HCG 定量检测试剂盒,其特征是试剂盒包括:包被抗体的缓冲液、封闭液、反应缓冲液、洗液、增强液,以及作为包被抗体的抗 β -HCG 单克隆抗体,镧系元素离子标记的抗 β -HCG 单克隆抗体和 β -HCG 标准品。

6. 根据权利要求 5 所述的一种 β -HCG 定量检测试剂盒,其特征是标准品为用含 6% BSA,4% 蔗糖,0.1% NaN_3 ,50mmol/L Tris-HCl 缓冲液将 β -HCG 蛋白配制成标准品。

一种用于 β -HCG 检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于 β -HCG 检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒,属于时间分辨免疫荧光分析法检测领域。

背景技术

[0002] 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 在人体内以多种形式存在,其中游离 β 亚基是 HCG 在新陈代谢过程中 β 亚基的 44-45 位置肽连接处断开所形成,是一种应用于产前筛查的血清标志物。妊娠期母血清中 β -HCG 水平呈双峰曲线,第 1 峰于妊娠 12 周前后,15 周后出现生理性下降,20 ~ 32 周维持低而平稳水平,26 周达最低。第 2 峰于妊娠 37 周,明显低于第 1 峰,至妊娠足月时稍有下降。在妊娠 11 周内,血清 β -HCG 的含量与孕龄密切相关,随妊娠进展呈直线上升,孕龄每增加 1 天, β -HCG 平均增加 1.53IU/ml,分娩后急剧下降,产后 4 天降至 1IU/ml,产后 9 天基本消失。

[0003] 1987 年 Barget 发现怀有唐氏综合症 (DS) 胎儿的孕妇血清中的 hCG 的水平是正常孕妇的 2 倍。以孕妇年龄再结合血清中 hCG 等指标检测,DS 的筛查率可达到 63%。1988 年,伦敦 Bartholomews 医院 Wald 提出 AFP、 β -HCG、uE3 三联的筛查方法,得到广泛应用,一直用到至今。胎儿患唐氏综合症时,胎盘重量低于正常水平,组织器官发育不全,肝脏、胎盘的功能不良,因此孕妇血清中 hCG 浓度下降要比怀正常胎儿的孕妇晚 3 周左右,致使孕中期 (约 20 周左右) 母血清中的 hCG 浓度呈高水平状态,怀唐氏综合症儿孕妇血清中 β -HCG 浓度比正常孕妇至少高 2 倍 (一般 $> 2.5\text{MOM}$)。因此,孕妇血清中 β -HCG 浓度可以作为筛选孕妇所怀胎儿是否患有唐氏综合症的一个辅助指标。

[0004] 目前血清的 β -HCG 检测主要有酶联免疫法 (ELISA)、免疫放射法 (IRMA)。由于受示踪剂性状的限制,ELISA 的灵敏度不高,检测范围有限,IRMA 试剂盒受同位素半衰期的影响,有效期短,此外还有一定的放射性污染。时间分辨免疫荧光分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 利用具有独特荧光特性的镧系元素,代替酶、同位素等,做为发光免疫分析中的一种重要方法,具有灵敏度高、示踪物稳定、不受样品自然荧光干扰、无放射性污染等许多优点。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种用于 β -HCG 检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒,主要解决现有技术存在的灵敏度低、稳定性差、操作烦琐及污染环境等技术问题。本发明采用标记技术,提供标记试剂盒,以提高方法的灵敏度及稳定性。

[0006] 本发明的技术方案是:在进行时间分辨免疫荧光分析检测法前需完 β -HCG 成下列准备工作:

首先制备包被板,所用的包被板为特异性抗体包被的板, β -HCG 包被板条的制备包括以下步骤:

(1) 将纯化的 β -HCG 单克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释, 然后加入包被板条各孔内, 经吸附、洗涤、封闭、干燥后获得 β -HCG 单克隆抗体包被板条;

(2) 将 β -HCG 单克隆抗体包被板条装入专用的铝箔包装袋, 封口并冷藏备用。

[0007] 其次是 β -HCG 标记的制备, 包括以下步骤:

(1) 取待标记抗体加入透析袋中, 放入配制好的 PH 9.5 的碳酸盐缓冲液中, 室温透析过夜 (其间多次换透析液);

(2) 次日, 取出抗体, 稀释至 0.2-5 ug/mL, 按质量比为 2 : 1 的比例 (DTTA-Eu : 抗体) 边振荡边加入 DTTA-Eu, 室温下在振荡过夜, 然后在黑暗中静置 48 小时;

(3) 标记好的抗体与游离 DTTA-Eu 通过 Sephadex G50 色谱柱 (1×30cm) 分离, 分离过程用核酸蛋白仪监控; 分离所用洗脱液为 pH7.8 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液。

[0008] (4) 用小试管依次分段接受流出物, 用分光光度计, 在 280nm 处测吸光度, 同时测荧光强度, 计算出 Eu 标抗体浓度;

(5) 用 0.22um 的滤器过滤;

(6) 加入 0.5% BSA, 2-8℃ 保存。

[0009] β -HCG 时间分辨免疫荧光分析法, 包括下列步骤:

①固相抗体制备: 将抗 β -HCG 单克隆抗体用碳酸钠缓冲溶液稀释至 1-10ug/mL 作为包被液, 包被反应板, 并用封闭液封闭;

②镧系元素离子标记抗体制备: 选用配对抗 β -HCG 单克隆抗体用镧系元素离子标记;

③在步骤①制得的具有固相抗体的反应板上, 每孔加入 β -HCG 标准品或待测样品, 以及用反应缓冲液稀释的标记抗体进行孵育, 最后进行荧光测定。

[0010] 步骤①中包被液中单克隆抗体的浓度为 1-10ug/mL, 步骤②中标记抗体用反应缓冲液以体积比为 1 : 20 稀释。步骤②中的镧系元素离子优选为 Eu^{3+} 。步骤③中的反应缓冲液为 PH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl, 内含 0.9% NaCl, 1% BSA, 0.05% 牛 IgG, 20uM DTPA, 0.08% Tween20 和 0.1% NaN_3 ; 且该步骤③在时间分辨荧光免疫分析仪器上自动完成。所用增强液为荧光增强液。

[0011] β -HCG 定量检测试剂盒, 其特征是试剂盒包括: 包被抗体的缓冲液、封闭液、反应缓冲液、洗液、增强液, 以及作为包被抗体的抗 β -HCG 单克隆抗体, 镧系元素离子标记的抗 β -HCG 单克隆抗体和 β -HCG 标准品。

[0012] 所述 β -HCG 标准品的制备方法为: 先分别将 β -HCG 冻干抗原溶解并稀释至所需的最高浓度, 再采用倍比稀释法稀释至所需浓度, 获得 β -HCG 标准品。

[0013] 标准品为用含 6% BSA, 4% 蔗糖, 0.1% NaN_3 , 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液将泌乳素蛋白配制成标准品。

[0014] 本发明的有益效果是: 本发明使用双抗体夹心法, 反应步骤包括: 试剂准备、加样反应、洗涤拍干、加增强液、测荧光值, 分析灵敏度高 (0.3 IU/L), 检测时间短, 特异性好, 与干扰物质的交叉反应小。

[0015] 附图说明:

图 1 为本发明的反应原理图

本发明采用双抗体夹心一步法。抗人 β -HCG 单抗包被于 96 孔荧免板, 校准品或样品中的 β -HCG 与包被单抗及镧离子 (Eu^{3+}) 标记的单抗于微孔内表面发生免疫反应, 微孔表面

的夹心免疫复合物与游离标记单抗通过洗涤分离。微孔表面免疫复合物中的 Eu^{3+} 被荧光增强液解离后形成稳定的荧光配合物, 荧光强度与校准品或样品中的 $\beta\text{-HCG}$ 浓度呈正比例, 通过剂量-反应曲线可得出样品中 $\beta\text{-HCG}$ 浓度。

[0016] 具体实施方式:

下面参照图 1 通过实施例对本发明作进一步说明。

[0017] 实施例 1: 进行时间分辨免疫荧光分析检测法前需完 $\beta\text{-HCG}$ 成下列准备工作:

首先制备包被板, 所用的包被板为特异性抗体包被的板, $\beta\text{-HCG}$ 包被板条的制备包括以下步骤:

(1) 将纯化的 $\beta\text{-HCG}$ 单克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释, 然后加入包被板条各孔内, 经吸附、洗涤、封闭、干燥后获得 $\beta\text{-HCG}$ 单克隆抗体包被板条;

(2) 将 $\beta\text{-HCG}$ 单克隆抗体包被板条装入专用的铝箔包装袋, 封口并冷藏备用。

[0018] 其次是 $\beta\text{-HCG}$ 标记的制备, 包括以下步骤:

(1) 取待标记抗体加入透析袋中, 放入配制好的 pH 9.5 的碳酸盐缓冲液中, 室温透析过夜 (其间多次换透析液);

(2) 次日, 取出抗体, 稀释至 0.2-5 $\mu\text{g/mL}$, 按质量比为 2 : 1 的比例 (DTTA-Eu : 抗体) 边振荡边加入 DTTA-Eu, 室温下在振荡过夜, 然后在黑暗中静置 48 小时;

(3) 标记好的抗体与游离 DTTA-Eu 通过 Sephadex G50 色谱柱 (1 $\times$ 30cm) 分离, 分离过程用核酸蛋白仪监控; 分离所用洗脱液为 pH7.8 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液。

[0019] (4) 用小试管依次分段接受流出物, 用分光光度计, 在 280nm 处测吸光度, 同时测荧光强度, 计算出 Eu 标抗体浓度;

(5) 用 0.22 μm 的滤器过滤;

(6) 加入 0.5% BSA, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0020] 实施例 2: $\beta\text{-HCG}$ 测定

1、标准品配制

用含 6% BSA, 4% 糖, 0.1% NaN_3 , 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液将 $\beta\text{-HCG}$ 蛋白配制成 0、2、10、50、250、500 IU/mL 标准液, 以国家 $\beta\text{-HCG}$ 标准品校正。分装, 于 +2 ~ +8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0021] 2、操作步骤

1) 试剂的准备

a) 洗涤液: 将 40mL 浓缩洗液和 960mL 去离子水在干净的洗液瓶中混合, 作为工作洗涤液备用。

[0022] b) 标记: 使用前一小时内, 用分析缓冲液按 1 : 20 稀释标记物。反应缓冲液为 pH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl, 内含 0.9% NaCl, 1% BSA, 0.05% 牛 IgG, 20 μM DTPA, 0.08% Tween20 和 0.1% NaN_3 。

[0023] c) 将试剂盒分析缓冲液、待测样品、校准品和所需数量的微孔反应条平衡至室温 (20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$)。

[0024] 2) 吸取 25 μL 的校准品或样品, 按顺序加入相应微孔底部。

[0025] 3) 在各微孔内加入 100 μL 已稀释的标记溶液, 室温下于慢档振动 30 分钟。

[0026] 4) 洗板 6 次, 将板条在洁净的吸水纸上拍干。

[0027] 5) 在每个微孔内加入 200 μL 的增强液, 室温下于慢档振动 5 分钟。

[0028] 6) 用时间分辨荧光测定仪检测。

[0029] 通过标准曲线计算 β -HCG 试剂盒的灵敏度达到了 0.3 IU/L

3、特异性

β -HCG 试剂盒检测 500uU/ml hTSH, 250U/L hLH, 250U/L hFSH, β -HCG 表观值均低于 2.0 U/L。

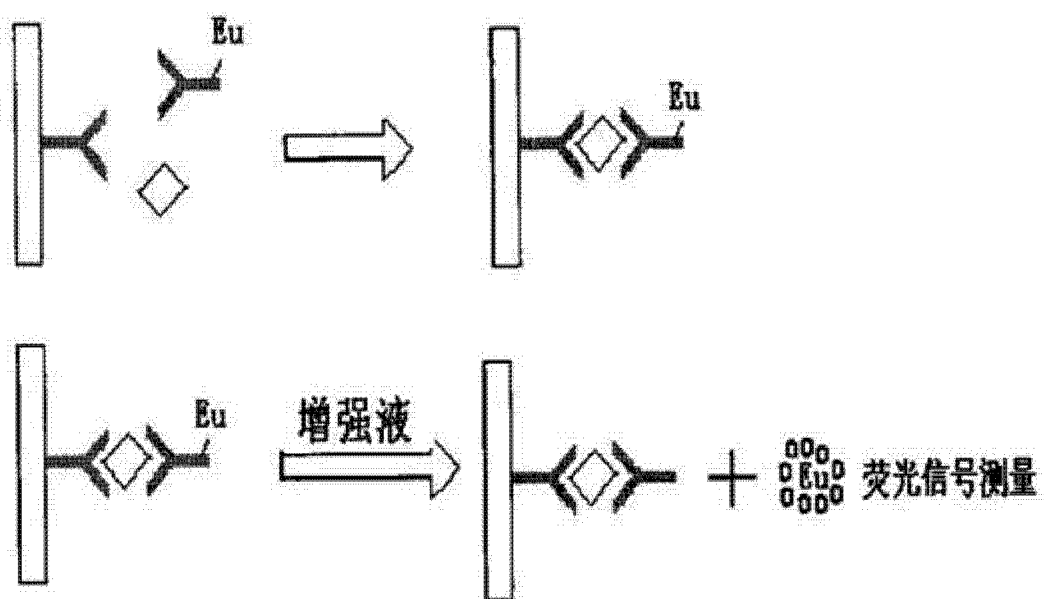


图 1

专利名称(译)	一种用于 β -HCG检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒		
公开(公告)号	CN104034906A	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201410284459.9	申请日	2014-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
[标]发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/76 G01N33/532		
代理人(译)	李珊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于 β -HCG检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒，其选用抗 β -HCG单克隆抗体作为包被抗体，用碳酸钠缓冲溶液稀释至1 - 10ug/ml作为包被液；配对抗 β -HCG单克隆抗体用镧系元素离子标记作为标记抗体；实验时用反应缓冲液按1:20稀释使用；在包被抗体的反应板上，每孔依次加入25ul的 β -HCG的标准品或待测样品、以及稀释的标记抗体，孵育后进行荧光检测。本发明还提供相应的试剂盒。本发明具有较高的灵敏度、特异性及稳定性；且分析系统高度自动化，可提高临床检验结果的速度，可大幅度降低人为误差和增加检出结果的可靠性。

