

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102507919 A

(43) 申请公布日 2012.06.20

(21) 申请号 201110349709.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.11.08

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(71) 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路 20 号江苏省原子医学研究所(卫生部核医学重点实验室和江苏省分子核医学重点实验室)

(72) 发明人 周彬 黄飏 包建东 俞惠新 吴兴镛 张艺 王柯 张珏

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 时旭丹 刘品超

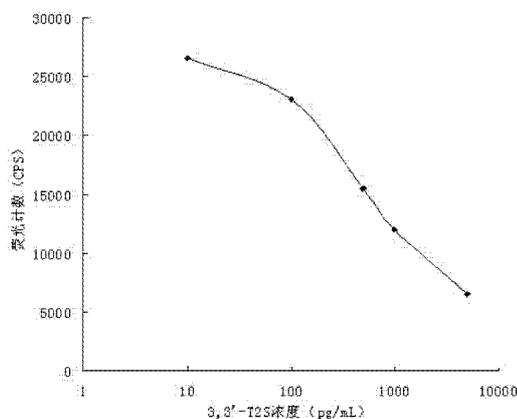
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种标记 3,3'-二碘甲腺氨酸硫酸化物的方法及检测试剂盒

(57) 摘要

一种标记 3,3'-二碘甲腺氨酸硫酸化物(3,3'-T₂S)的方法及检测试剂盒,属于光激化学发光免疫分析技术领域。本发明首先采用 3,3'-T₂S 与发光微粒偶联,将发光微粒标记到 3,3'-T₂S 上。再由白色不透明微孔板,3,3'-T₂S 标准品,包被有 3,3'-T₂S 的发光微粒,兔抗 3,3'-T₂S 抗体冻干品,生物素化羊抗兔抗体冻干品和包被有链霉亲和素的感光微粒组成检测试剂盒。发光微粒上的 3,3'-T₂S 与 3,3'-T₂S 竞争连接到 3,3'-T₂S 抗体,再与生物素化羊抗兔抗体及包被有链霉亲和素的感光微粒形成复合体,光激发下,通过单线态离子氧的产生和传递,将能量传递给发光微粒产生荧光,光信号强度与样品中 3,3'-T₂S 浓度成反比,对照标准曲线测得样品中 3,3'-T₂S 的含量。该 3,3'-T₂S 检测试剂盒结构简单,操作简便、检测时间短、灵敏度高。



1. 发光微粒标记 3,3'-T₂S 的方法,3,3'-二碘甲腺氨酸硫酸化物简称 3,3'-T₂S,其特征在於:在离心管中加入 1mg 发光微粒,加入 12.5μL 质量浓度 1% Tween-20,0.05mg 3,3'-T₂S,和 10μL 的 25mg/mL 硼氢化氰钠溶液,用 pH6.0、0.1M 的 2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液将体积补充到 200μL,37°C 避光振荡反应 48 小时,加入 10μL pH 5.0、0.3M 的羧甲氧基胺半盐酸盐溶液封闭未结合位点,37°C 避光孵育 1 小时,离心纯化,洗去未反应的试剂后,分离得到包被有 3,3'-T₂S 的发光微粒,即为用发光微粒标记的 3,3'-T₂S,稀释后备用。

2. 一种 3,3'-T₂S 的检测试剂盒,其特征在於应用了权利要求 1 所述方法制备的包被有 3,3'-T₂S 的发光微粒,该检测试剂盒由白色不透明微孔板(1),3,3'-T₂S 标准品(2),包被有 3,3'-T₂S 的发光微粒(3),兔抗 3,3'-T₂S 抗体冻干品(4),生物素化羊抗兔抗体冻干品(5),和包被有链霉亲和素的感光微粒(6)组成。

3. 根据权利要求 2 所述的检测试剂盒,其特征在於 3,3'-T₂S 标准品(2)的配制:3,3'-T₂S 标准品浓度分别为:0 pg/mL,10 pg/mL,100 pg/mL,500 pg/mL,1000 pg/mL,5000 pg/mL,从 3,3'-T₂S 纯品中稀释得到,稀释液为 30% 乙醇溶液。

4. 一种用权利要求 2 所述的检测试剂盒检测 3,3'-T₂S 的方法,其特征在於取包被有 3,3'-T₂S 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 3,3'-T₂S 标准或处理好的样品到各自的微孔中,然后各孔顺序加入兔抗 3,3'-T₂S 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应;接着在避光处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应,反应后检测光信号,对照标准曲线计算被测样品中的 3,3'-T₂S 含量。

5. 根据权利要求 4 所述的检测 3,3'-T₂S 的方法,其特征在於操作为:取 20μL 包被有 3,3'-T₂S 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 20μL 的 3,3'-T₂S 标准或处理好的样品到各自的微孔中;加 20μL 兔抗 3,3'-T₂S 抗体;继续加入 20μL 生物素化羊抗兔抗体,37°C 孵育 15 分钟;避光处加 175μL 包被有链霉亲和素的感光微粒,37°C 暗处孵育 15 分钟,反应后在光激化学发光检测仪上检测光信号,从标准曲线计算被测样品中的 3,3'-T₂S 含量。

一种标记 3, 3' - 二碘甲腺氨酸硫酸化物的方法及检测试剂盒

技术领域

[0001] 一种标记 3, 3' - 二碘甲腺氨酸硫酸化物 (3, 3' -T₂S) 的方法及检测试剂盒, 属于光激化学发光免疫分析 (LICLIA) 技术领域, 用于对妊娠妇女血清中 3, 3' -T₂S 含量的检测。

背景技术

[0002] 先天性甲状腺功能减低症, 简称先天性甲减, 是由于胚胎期和出生前在某些病因的作用下引起的甲状腺轴的发生、发育和功能代谢出现异常, 引起甲状腺功能减低, 严重地影响到中枢神经系统和体格等的发育。

[0003] 目前胎儿期的甲减筛查还是个世界性难题。对此, 国内外一些学者对胎儿甲状腺功能的检测做了不少研究。

[0004] 已有大量实验显示 3, 3' -T₂S 与胎儿甲状腺激素代谢有密切关系, 3, 3' -T₂S 是胎儿甲状腺激素的代谢物, 经胎盘溢出到母体一侧, 造成母体血中其浓度升高, 因此, 孕妇血清和尿中的 3, 3' -T₂S 浓度可以反映胎儿甲状腺激素的水平, 间接反映胎儿甲状腺功能状态。目前 3, 3' -T₂S 的 RIA 检测方法十分繁琐、复杂和耗时, RIA 进行标记时标记物为 ¹²⁵I, 由于标记时会形成的 T₂S、T₃S 与 T₄S, 因此分离纯化的过程繁琐及复杂, 且放射性碘的半衰期较短, 标记物放置后因衰变使放射性降低, 因而需要经常制备标记物, 另外放射性核素对环境保护及工作人员健康都带来不利影响; RIA 操作时, 整个检测的反应时间达 48 小时, 而且方法很难自动化, 等等, 这些限制了 3, 3' -T₂S 检测的应用, 从而限制了其在胎儿和新生儿甲状腺功能筛查中的价值。

[0005] 光激化学发光免疫分析 (LICLIA) 是以纳米级高分子微粒为基础的新一代化学发光技术, 该项技术将被广泛地应用于研究生物分子的相互作用。LICLIA 技术的核心原理是单线态氧的产生和传递。在受到红色激光 (680 nm) 照射后, 感光微粒能使周围环境中的氧转化为单线态氧, 单线态氧的生存时间仅为 4 微秒。短暂的生存时间决定了单线态氧的传播直径很小 (约为 200 nm)。如果发光微粒在 200 nm 范围之内就能接受单线态氧, 并发出高能级的光 (520nm - 620nm)。相反, 如果在 200 nm 直径范围内没有发光微粒, 单线态氧就会回落到基态氧而没有信号产生。这种依赖于两种微粒相互接近的化学能量传递是 LICLIA 均相反应的基础。通常在该反应体系中, 微粒的浓度是很低的。两种微粒相互随机碰撞的几率很低, 因此, 反应体系的本底非常微弱。如果包被在微粒表面的生物分子相互作用, 拉近了两个微粒的距离, 例如形成免疫夹心复合物, 这样就能产生能量的有效传递并发出光信号。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种标记 3, 3' - 二碘甲腺氨酸硫酸化物 (3, 3' -T₂S) 的方法及检测试剂盒, 用于对妊娠妇女血清中 3, 3' -T₂S 含量的检测。

[0007] 本发明的技术方案:

发光微粒标记 3, 3'-T₂S 的方法:在离心管中加入 1mg 发光微粒,加入 12.5 μL 质量浓度 1% Tween-20, 0.05 mg 3, 3'-T₂S, 10μL 的 25mg/mL 硼氢化氰钠溶液,用 pH6.0、0.1M 的 2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液将体积补充到 200μL, 37℃ 避光振荡反应 48 小时,加入 10μL pH 5.0、0.3M 的羧甲氧基胺半盐酸盐溶液封闭未结合位点, 37℃ 避光孵育 1 小时,离心纯化,洗去未反应的试剂后,分离得到包被有 3, 3'-T₂S 抗原的发光微粒,即为用发光微粒标记的 3, 3'-T₂S, 稀释后备用。

[0008] 一种 3, 3'-二碘甲腺氨酸硫酸化物(3, 3'-T₂S)的检测试剂盒,由白色不透明微孔板 1, 3, 3'-T₂S 标准品 2, 包被有 3, 3'-T₂S 的发光微粒 3, 兔抗 3, 3'-T₂S 抗体冻干品 4, 生物素化羊抗兔抗体冻干品 5, 和包被有链霉亲和素的感光微粒 6 组成。

[0009] 3, 3'-T₂S 标准品 2 的配制:3, 3'-T₂S 标准品浓度分别为:0 pg/mL, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 5000 pg/mL, 从 3, 3'-T₂S 纯品中稀释得到, 稀释液为 30% 乙醇溶液。

[0010] 用所述的检测试剂盒检测 3, 3'-T₂S 的方法,取包被有 3, 3'-T₂S 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 3, 3'-T₂S 标准或处理好的样品到各自的微孔中,然后各孔顺序加入兔抗 3, 3'-T₂S 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应;接着在避光处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应,反应后检测光信号,对照标准曲线计算被测样品中的 3, 3'-T₂S 含量。

[0011] 所述的检测 3, 3'-T₂S 的方法,操作为:

取 20μL 包被有 3, 3'-T₂S 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 20μL 的 3, 3'-T₂S 标准或处理好的样品到各自的微孔中;加 20μL 兔抗 3, 3'-T₂S 抗体;继续加入 20μL 生物素化羊抗兔抗体, 37℃ 孵育 15 分钟;避光处加 175μL 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37℃ 暗处孵育 15 分钟,反应后在光激化学发光检测仪上检测光信号,从标准曲线计算被测样品中的 3, 3'-T₂S 含量。

[0012] 本发明的有益效果:该标记方法结构简单,操作简便、检测时间短、灵敏度高。

附图说明

[0013] 图 1:3, 3'-T₂S 检测试剂盒组成示意图。1、白色不透明微孔板,2、3, 3'-T₂S 标准品,3、包被有 3, 3'-T₂S 抗原的发光微粒,4、兔抗 3, 3'-T₂S 抗体冻干品,5、生物素化羊抗兔抗体冻干品,6、包被有链霉亲和素的感光微粒。

[0014] 图 2:3, 3'-T₂S- LICLIA 反应示意图。

[0015] 图 3:3, 3'-T₂S- LICLIA 标准曲线图。

具体实施方式

[0016] 实施例 1:发光微粒标记到 3, 3'-T₂S 并制备试剂盒及检测妊娠妇女血清样品
将发光微粒标记到 3, 3'-T₂S:

在离心管中加入 1mg 发光微粒,加入 12.5μL 1% Tween-20, 0.05mg 3, 3'-T₂S, 10μL 的 25mg/mL 硼氢化氰钠溶液,用 0.1M、pH6.0 的 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)缓冲液将体积补充到 200μL, 37℃ 避光振荡反应 48 小时。加入 10μL 0.3 M pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐(CMO)溶液封闭未结合位点, 37℃ 避光孵育 1 小时后离心,洗去未反应的试剂后,分离得到

已连接 3, 3' -T₂S 抗原的发光微粒, 稀释后备用。

[0017] 妊娠妇女血清的制备: 取妊娠妇女血清加入 2 倍体积 95% 的乙醇, -20℃ 过夜后, 4℃ 3000r/min 离心 20min, 取其上清备用。

[0018] 试剂的配制:

标准 3, 3' -T₂S 试剂的配制: 标准 3, 3' -T₂S: 0 pg/mL, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 5000 pg/mL, 从 3, 3' -T₂S 纯品中稀释得到, 稀释液为 30% 乙醇溶液。

[0019] 试剂盒的组成:

(1)、白色不透明微孔板 (12 条 × 8 孔, 可以拆分为单孔)。

[0020] (2)、6 × 3, 3' -T₂S 标准液, 1.0mL/ 瓶, 3, 3' -T₂S 标准液浓度为: 0 pg/mL, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 5000 pg/mL。

[0021] (3)、1 × 包被有 3, 3' -T₂S 的发光微粒: 2mL。

[0022] (4)、1 × 兔抗 3, 3' -T₂S 抗体冻干品, 用时 2mL 蒸馏水溶解。

[0023] (5)、1 × 生物素化羊抗兔抗体冻干品, 用时 2mL 蒸馏水溶解。

(6)、1 × 包被有链霉亲和素的感光微粒: 20mL。

[0024] 测定时注意事项

1、使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30℃)。

[0025] 2、使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。

[0026] 3、在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖子盖住微孔。

[0027] 具体检测步骤如下:

取 20μL 包被有 3, 3' -T₂S 的发光微粒加入到白色不透明微孔板; 加入 20μL 的 3, 3' -T₂S 标准或经处理后妊娠妇女血清到各自的微孔中; 加 20μL 兔抗 3, 3' -T₂S 抗体; 继续加入 20μL 生物素化羊抗兔抗体, 37℃ 孵育 15 分钟; 避光处加 175μL 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37℃ 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号, 从标准曲线计算样品中的 3, 3' -T₂S 含量。结果见表 1, 由标准曲线求得该例血样 1 所含 3, 3' -T₂S 浓度为 796pg/mL, 血样 2 所含 3, 3' -T₂S 浓度为 1851pg/mL。

[0028] 表 1

3,3'-T ₂ S 标准点							样品	样品
3,3'-T ₂ S 浓度 (pg/mL)	0	10	100	500	1000	5000	血样 1	血样 2
荧光计数 (cps)	28128	26568	23533	16541	13371	7561	15766	11199

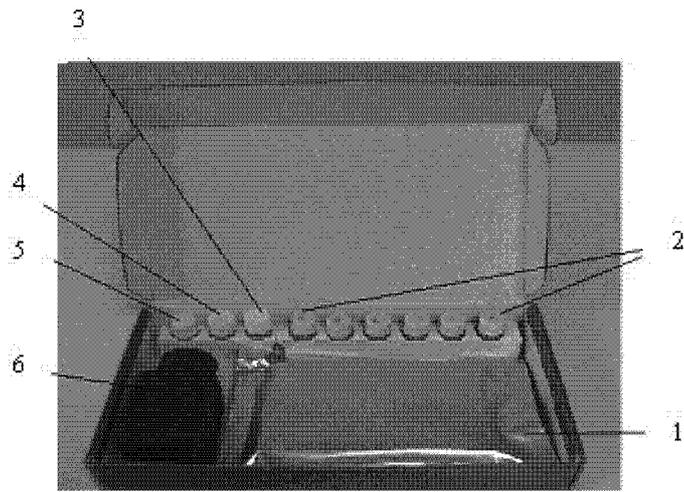


图 1

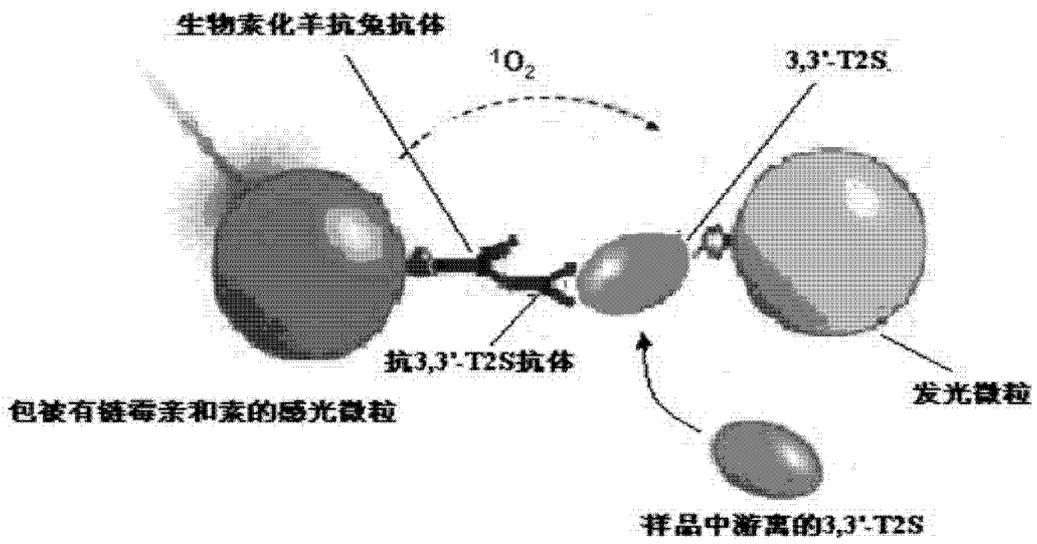


图 2

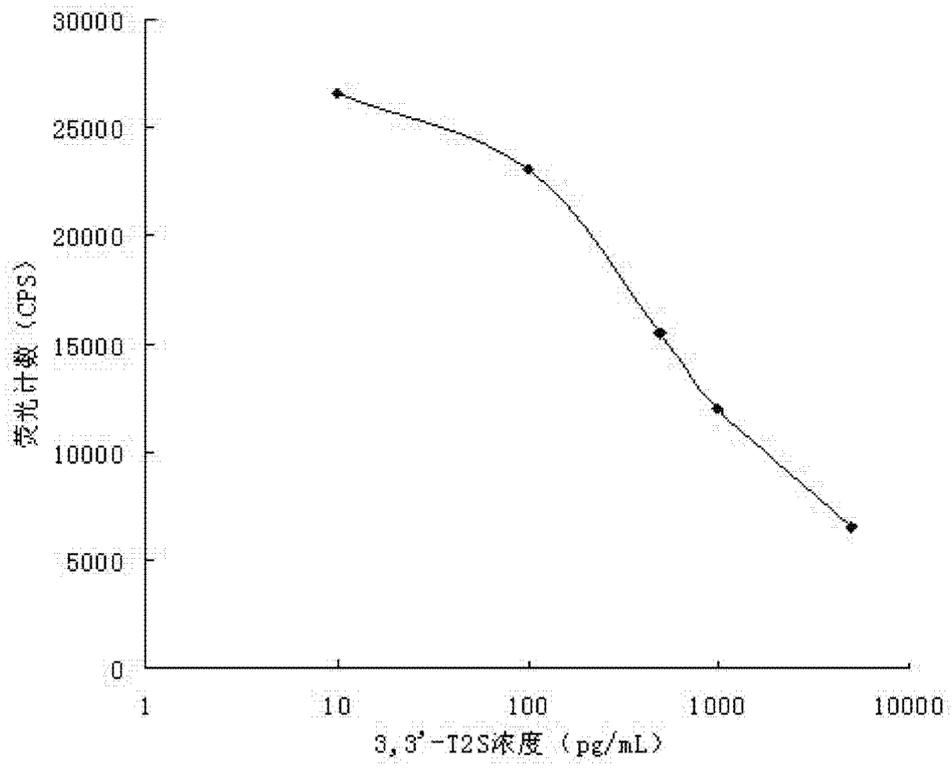


图 3

专利名称(译)	一种标记3,3'-二碘甲腺氨酸硫酸化物的方法及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102507919A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110349709.9	申请日	2011-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	周彬 黄飏 包建东 俞惠新 吴兴镛 张艺 王柯 张珏		
发明人	周彬 黄飏 包建东 俞惠新 吴兴镛 张艺 王柯 张珏		
IPC分类号	G01N33/532 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种标记3,3'-二碘甲腺氨酸硫酸化物 (3,3'-T2S) 的方法及检测试剂盒，属于光激化学发光免疫分析技术领域。本发明首先采用3,3'-T2S与发光微粒偶联，将发光微粒标记到3,3'-T2S上。再由白色不透明微孔板，3,3'-T2S标准品，包被有3,3'-T2S的发光微粒，免抗3,3'-T2S抗体冻干品，生物素化羊抗兔抗体冻干品和包被有链霉亲和素的感光微粒组成检测试剂盒。发光微粒上的3,3'-T2S与3,3'-T2S竞争连接到3,3'-T2S抗体，再与生物素化羊抗兔抗体及包被有链霉亲和素的感光微粒形成复合体，光激发下，通过单线态离子氧的产生和传递，将能量传递给发光微粒产生荧光，光信号强度与样品中3,3'-T2S浓度成反比，对照标准曲线测得样品中3,3'-T2S的含量。该3,3'-T2S检测试剂盒结构简单，操作简便、检测时间短、灵敏度高。

