



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114236115 A

(43) 申请公布日 2022.03.25

(21) 申请号 202111537069.4

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.13

G01N 33/531 (2006.01)

(71) 申请人 泰州泽成生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城
泰路西侧、陆家路东侧G59幢62号西半
侧一至四层

(72) 发明人 邵飞飞 刘振世

(74) 专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

代理人 崔自京

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

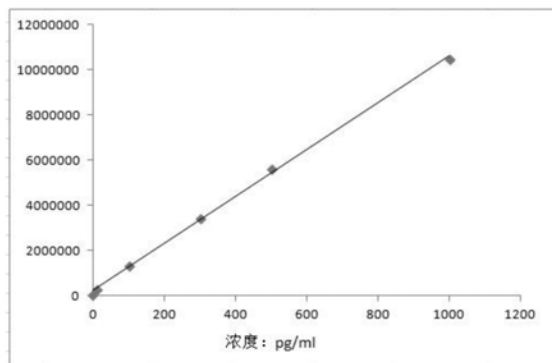
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒及制备方法。涉及生物试剂技术领域。包括以下组分：链霉亲和素磁微粒，生物素化的TNF α 抗体，TNF α 衍生物酶标试剂，校准品和质控品。本发明反应时间短，避免了放射性污染，延长了试剂效期，灵敏度高，测试结果准确，简化了实验操作流程。亲和素与生物素间的结合具有极高的亲和力，其反应呈高度专一性。在提高灵敏度的同时，并不增加非特异性干扰。而且结合特性不会因反应试剂的高度稀释而受影响，在实际应用中可最大限度地降低反应试剂的非特异作用。



1. 一种磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒,其特征在于,包括以下组分:链霉亲和素磁微粒,生物素化的TNF α 抗体,TNF α 衍生物酶标试剂,校准品和质控品。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述生物素化TNF α 抗体制备步骤如下:

- 1) 量取TNF α 抗体;
- 2) 根据TNF α 抗体分子量和生物素-NHS分子量进行计算,称量生物素-NHS;
- 3) 称取生物素-NHS,并用DMSO进行溶解;
- 4) 在TNF α 抗体中加入DMSO溶解的生物素,充分混匀后反应;
- 5) 透析步骤4) 中的反应产物得混合物;
- 6) 用抗试剂缓冲液将混合物稀释即得生物素化TNF α 抗体。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述TNF α 抗体为TNF α 单克隆抗体;

步骤2) 抗TNF α 抗体分子量按30000计算,生物素-NHS分子量按587计算,按照摩尔比1:20的投料量称量生物素-NHS;

步骤3) 所述溶解的程度至生物素-NHS终浓度为5mg/ml;

步骤4) 反应时间为2h;

步骤5) 透析采用截留分子量为500的透析袋;透析缓冲液为pH 7.5的0.15M PBS缓冲液;

步骤6) 所述稀释的程度至混合物终浓度为0.5 μ g/ml。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述TNF α 衍生物酶标试剂制备步骤如下:

- 1) 将TNF α 衍生物透析后,进行活化;
- 2) 将碱磷酶进行活化;
- 3) 将含有TNF α 的抗原,抗体活化得反应物;
- 4) 将反应物用层析柱进行纯化,收集I峰II峰进行混合,得碱磷酶标记的TNF α 衍生物;
- 5) 用抗试剂缓冲液将碱磷酶标记的TNF α 衍生物稀释至0.1 μ g/ml即为TNF α 衍生物酶标试剂。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,步骤1) 所述透析采用0.1M PBS;所述活化采用活化剂2-Iminothiolane.HCl;

步骤2) 所述活化采用SMCC,碱磷酶和SMCC的质量体积比为5mg/ml;

步骤3) 所述活化:将含有TNF α 的抗原、抗体,分别和碱磷酶按质量体积比1:1mg/ml进行混合,2-8 $^{\circ}$ C反应18小时;

步骤4) 流动相为Tris缓冲液;流速0.75ml/min;收集I峰时间:第70min;收集II峰时间:第90min。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述校准品制备步骤如下:

1) 配制TNF α 校准品缓冲液:0.05M的pH 7.4的TRIS缓冲液中加入体积比0.5%的牛血清白蛋白,体积比0.2%防腐剂;

2) 将TNF α 纯品用TNF α 校准品缓冲液进行稀释,校准品浓度分别为0pg/ml、10pg/ml、100pg/ml、300pg/ml、500pg/ml和1000pg/ml的TNF α 溶液,即得校准品。

7. 一种利用权利要求1~6任一所述的试剂盒在非诊断治疗目的的检测 α 肿瘤坏死因子的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 将样本、生物素化的TNF α 抗体、TNF α 衍生物酶标试剂混合孵育；
- 2) 加入链霉亲和素磁微粒，孵育；
- 3) 磁分离，去上清；
- 4) 洗涤；
- 5) 加入发光底物液，测值。

8. 根据权利要求7所述的方法，其特征在于，样本、生物素化的TNF α 抗体、TNF α 衍生物酶标试剂和链霉亲和素磁微粒的体积比为1:1:1:1；

- 步骤1) 孵育温度37 $^{\circ}$ C，时间为30min；
- 步骤2) 孵育温度37 $^{\circ}$ C，时间为5min；
- 步骤3) 磁场为2000GS，磁分离时间为2min；
- 步骤4) 洗涤：3次，每次300 μ l洗液。

磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物试剂技术领域,更具体的说是涉及磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子(TNF)是一种由巨噬细胞对细菌感染或其他免疫源反应自然产生的细胞因子。是由巨噬细胞分泌的一种小分子蛋白。是一类能直接造成肿瘤细胞死亡的细胞因子。肿瘤坏死因子与干扰素协同作用可杀死肿瘤细胞。根据其来源和结构不同分为两种类型,即TNF- α 和TNF- β 。前者主要由巨噬细胞产生,LPS是诱导其产生的较强刺激剂,T细胞和NK细胞在某些刺激因子(如PMA)作用下也可分泌TNF- α ;后者主要由活化T细胞产生,T细胞在抗原、丝裂原等刺激下可产生高水平的TNF- β 。TNF- β 原称淋巴毒素(Lymphotoxin,LT)。TNF- α 主要由单核-巨噬细胞分泌;TNF- β 主要由活化的T淋巴细胞分泌,两者有相似致热性。小剂量呈单峰热,大剂量呈双峰热;TNF在体内外均能刺激IL-1的产生。不耐热,70°C30min失活。

[0003] 但是,现有检测方法反应时间长,或有放射性危害,且灵敏度、检测准确率有待提高。

[0004] 因此,如何更为准确高效的测定 α 肿瘤坏死因子是本领域技术人员亟需解决的问题。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒及制备方法

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒,包括以下组分:链霉亲和素磁微粒,生物素化的TNF α 抗体,TNF α 衍生物酶标试剂,校准品和质控品。

[0008] 进一步的,链霉亲和素磁微粒购自北京泽诚生物技术有限公司。

[0009] 优选的:生物素化TNF α 抗体制备步骤如下:

[0010] 1) 量取TNF α 抗体;

[0011] 2) 根据TNF α 抗体分子量和生物素-NHS分子量进行计算,称量生物素-NHS;

[0012] 3) 称取生物素-NHS,并用DMSO进行溶解;

[0013] 4) 在TNF α 抗体中加入DMSO溶解的生物素,充分混匀后室温反应2h;

[0014] 5) 透析步骤4)中的反应产物得混合物;

[0015] 6) 用抗试剂缓冲液将混合物稀释即得生物素化TNF α 抗体。

[0016] 进一步的,TNF α 抗体、抗试剂缓冲液购自北京泽诚生物技术有限公司。

[0017] 优选的:TNF α 抗体为TNF α 单克隆抗体;

[0018] 步骤2) 抗TNF α 抗体分子量按30000计算,生物素-NHS分子量按587计算,按照摩尔

比1:20的投料量称量生物素-NHS;

[0019] 步骤3) 溶解的程度至生物素-NHS终浓度为5mg/ml;

[0020] 步骤4) 反应时间为2h;

[0021] 步骤5) 透析采用截留分子量为500的透析袋;透析缓冲液为pH7.5的0.15M PBS缓冲液;

[0022] 步骤6) 稀释的程度至混合物终浓度为0.5 μ g/ml。

[0023] 优选的:TNF α 衍生物酶标试剂制备步骤如下:

[0024] 1) 将TNF α 衍生物透析后,进行活化;

[0025] 2) 将碱磷酶进行活化;

[0026] 3) 将含有TNF α 的抗原,抗体活化得反应物;

[0027] 4) 将反应物用层析柱进行纯化,收集I峰II峰进行混合,得碱磷酶标记的TNF α 衍生物;

[0028] 5) 用抗试剂缓冲液将碱磷酶标记的TNF α 衍生物稀释至0.1 μ g/ml即为TNF α 衍生物酶标试剂。

[0029] 进一步的,TNF α 衍生物、抗体(鼠抗)购自北京泽诚生物技术有限公司。

[0030] 优选的:步骤1) 透析采用0.1MPBS;活化采用活化剂2-Iminothiolane.HCl;

[0031] 步骤2) 活化采用SMCC,碱磷酶和SMCC的质量体积比为5mg/ml;

[0032] 步骤3) 活化:将含有TNF α 的抗原、抗体,分别和碱磷酶按质量体积比1:1mg/ml进行混合,2-8 $^{\circ}$ C反应18小时;

[0033] 步骤4) 流动相为Tris缓冲液;流速0.75ml/min;收集I峰时间:第70min;收集II峰时间:第90min。

[0034] 优选的:校准品制备步骤如下:

[0035] 1) 配制TNF α 校准品缓冲液:0.05M的pH7.4的TRIS缓冲液中加入体积比0.5%的牛血清白蛋白,体积比0.2%防腐剂;

[0036] 2) 将TNF α 纯品用TNF α 校准品缓冲液进行稀释,校准品浓度分别为0pg/ml、10pg/ml、100pg/ml、300pg/ml、500pg/ml和1000pg/ml的TNF α 溶液,即得校准品。

[0037] 有益效果在于:校准品形态为液态且具有良好的稳定性。

[0038] 试剂盒制备方法简单方便,检测灵敏度较高,具有良好的应用前景。

[0039] 进一步的:质控品:含有TNF α 的抗体,浓度分高低两个浓度(100pg/ml,500pg/ml),在校准品范围内。

[0040] 本发明还提供了一种利用上述的试剂盒在非诊断治疗目的的检测 α 肿瘤坏死因子的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0041] 1) 将样本、生物素化的TNF α 抗体、TNF α 衍生物酶标试剂混合孵育;

[0042] 2) 加入链霉亲和素磁微粒,孵育;

[0043] 3) 磁分离,去上清;

[0044] 4) 洗涤;

[0045] 5) 加入发光底物液,测值。

[0046] 有益效果在于:生物素化的TNF α 抗体与TNF α 衍生物酶标试剂和样本、校准品或质控品中的TNF α 抗原结合形成“三明治”复合物。随后加入连有链霉亲和素磁微粒,生物素化

的TNF α 抗体与TNF α 衍生物酶标的特异性结合使抗原抗体免疫复合物结合在磁微粒上。在外加磁场的作用下,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离,清洗复合物后,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时发出光子,形成发光反应,即可使用化学发光仪检测反应的发光强度。

[0047] 优选的:样本、生物素化的TNF α 抗体、TNF α 衍生物酶标试剂和链霉亲和素磁微粒的体积比为1:1:1:1;

[0048] 步骤1) 孵育温度37°C,时间为30min;

[0049] 步骤2) 孵育温度37°C,时间为5min;

[0050] 步骤3) 磁场为2000GS,磁分离时间为2min;

[0051] 步骤4) 洗涤:3次,每次300 μ l洗液。

[0052] 进一步的,洗液、发光底物液均购自北京泽诚生物技术有限公司。

[0053] 经由上述的技术方案可知,与现有技术相比,本发明公开提供了磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒及制备方法,取得的有益效果为反应体系反应时间短,避免了放射性污染,延长了试剂效期,灵敏度高,测试结果准确,简化了实验操作流程。亲和素与生物素间的结合具有极高的亲和力,其反应呈高度专一性。在提高灵敏度的同时,并不增加非特异性干扰。而且结合特性不会因反应试剂的高度稀释而受影响,在实际应用中可最大限度地降低反应试剂的非特异作用。

附图说明

[0054] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0055] 图1附图为本发明提供体系1曲线拟合图。

[0056] 图2附图为本发明提供体系2曲线拟合图。

[0057] 图3附图为本发明提供体系1测试血清相关性图。

[0058] 图4附图为本发明提供体系2测试血清相关性图。

具体实施方式

[0059] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0060] 本发明实施例公开了一种磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒。

[0061] 实施例1

[0062] 磁微粒化学发光法 α 肿瘤坏死因子测定试剂盒

[0063] 包括以下几个组分:磁分离试剂(链霉亲和素磁微粒),生物素化的TNF α 单克隆抗体,TNF α 衍生物酶标试剂,校准品和质控品。

[0064] 生物素化TNF α 单克隆抗体制备步骤如下:

- [0065] 1) 量取1mgTNF α 单克隆抗体;
- [0066] 2) 通过抗体分子量(30000)和生物素-NHS分子量(587)进行计算,按照摩尔比1:20的投料量称量生物素;
- [0067] 3) 称取0.4mg的生物素-NHS,并用DMSO进行溶解至终浓度为5mg/ml;
- [0068] 4) 在TNF α 单克隆抗体中加入DMSO溶解的生物素,充分混匀后室温(22 \pm 3 $^{\circ}$ C)反应2h;
- [0069] 5) 用截留分子量为500的透析袋透析步骤4)中的反应产物,得混合物,其中透析缓冲液为pH=7.5的0.15M PBS缓冲液;
- [0070] 6) 用抗试剂缓冲液将混合物稀释至0.5 μ g/ml作为工作液使用。
- [0071] TNF α 衍生物酶标试剂制备步骤如下:
- [0072] 1) 将检测TNF α 衍生物用0.1MPBS进行透析,然后用2-Iminothiolane.HCl进行活化;
- [0073] 2) 将碱磷酶用SMCC进行活化(碱磷酶和SMCC的质量体积比为5mg/ml);
- [0074] 3) 将含有TNF α 的的抗原和抗体分别和碱磷酶进行混合活化(质量体积比1:1mg/ml),2~8 $^{\circ}$ C反应18h;
- [0075] 4) 将反应物用层析柱进行纯化(Tris缓冲液,流速0.75ml/min;收集I峰时间:第70min;收集II峰时间:第90min),收集I峰II峰进行混合后,得碱磷酶标记的TNF α 衍生物;
- [0076] 5) 用抗试剂缓冲液将抗体-碱磷酶稀释至0.1 μ g/ml即为TNF α 衍生物酶标试剂。
- [0077] 校准品制备步骤如下:
- [0078] 1) 配制TNF α 校准品缓冲液:0.05M的pH 7.4的TRIS缓冲液中加入体积比0.5%的牛血清白蛋白,体积比0.2%防腐剂。
- [0079] 2) 将TNF α 纯品用TNF α 校准品缓冲液进行稀释,校准品浓度分别为0pg/ml、10pg/ml、100pg/ml、300pg/ml、500pg/ml和1000pg/ml的TNF α 溶液,校准品形态为液态且具有良好的稳定性。
- [0080] 实施例2
- [0081] 一种利用上述的试剂盒在非诊断治疗目的的检测 α 肿瘤坏死因子的方法反应步骤如下:
- [0082] 1) 样本30 μ l、生物素化TNF α 单克隆抗体30 μ l、TNF α 衍生物酶标试剂30 μ l,孵育30min(37 $^{\circ}$ C);
- [0083] 2) 加入链霉亲和素磁珠30 μ l,孵育5min(37 $^{\circ}$ C);
- [0084] 3) 磁分离2min,去上清;
- [0085] 4) 洗涤3次,每次300 μ l洗液;
- [0086] 5) 加入底物200 μ l,测值。
- [0087] 对比实验
- [0088] 对照组:TNF α 单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒购自北京泽诚生物技术有限公司。
- [0089] 同时用实施例1(体系1),对照组(体系2),分别用两个体系对0pg/ml、10pg/ml、100pg/ml、300pg/ml、500pg/ml和1000pg/ml的TNF α 样品做检测,同时测试同一组样本,并与给值进行比对,数据如下表1所示:
- [0090] 表1不同体系下测值与给值对比以及测值之间对比

[0091]

体系		体系 1	体系 2
样本编 码	给值	结果	结果
1	7.15	5.95	13.585
2	6.42	5.22	12.198
3	0.15	0.16	0.285
4	0.8	0.85	1.52
5	8.19	6.99	15.561

[0092]

6	4.98	3.78	9.462
7	13.08	11.88	24.852
8	29.59	28.39	56.221
9	0.31	0.4	0.589
10	24.4	23.2	46.36
11	13.1	11.9	24.89
12	5	3.8	9.5
13	845.9	844.7	1607.21
14	710.7	709.5	1350.33
15	578.1	576.9	1098.39
16	466.7	465.5	886.73
17	468.9	467.7	890.91
18	529.4	528.2	1005.86
19	635.1	633.9	1206.69
20	637.2	636	1210.68
21	454.8	453.6	864.12
22	530.3	529.1	1007.57
23	453.7	452.5	862.03
24	437.6	436.4	831.44
25	638.8	637.6	1213.72
26	13.57	12.37	25.783
27	14.61	13.41	27.759
28	5.87	4.67	11.153
29	12.01	10.81	22.819
30	75.9	74.7	144.21
31	13.8	12.6	26.22
32	5.87	4.67	11.153
33	13.8	12.6	26.22
34	26.27	25.07	49.913
35	7.62	6.42	14.478
36	18.63	17.43	35.397
37	6.71	5.51	12.749
38	412.4	411.2	783.56
39	356.1	354.9	676.59
40	575.1	573.9	1092.69
41	369.4	368.2	701.86
42	511.7	510.5	972.23
43	674.7	673.5	1281.93
44	440	438.8	836

	45	588.1	586.9	882.15
	46	532.4	531.2	798.6
	47	440	438.8	836
	48	588.1	586.9	882.15
	49	532.4	531.2	798.6
	50	489.5	488.3	930.05
	51	19.73	18.53	37.487
	52	1.04	1.1	1.976
	53	5.15	3.95	9.785
[0093]	54	4.04	2.84	7.676
	55	3.01	1.81	5.719
	56	5.75	4.55	10.925
	57	7.22	6.02	13.718
	58	1.15	1.2	2.185
	59	2.36	1.16	4.484
	60	0.45	0.34	0.855
	相关性 R	给值-体系 1	0.999999147	
		给值-体系 2	0.994290442	
		体系 1-体系 2	0.005708705	

[0094] 由结果可以看出,不同体系测值与给值相关性都在0.9以上,说明相关性良好,且不同体系之间测值相关性大于0.9,说明2种体系测值一致(图1~图4)。

[0095] 因此,本发明的技术方案完全可行。

[0096] 本说明书中各个实施例采用递进的方式描述,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。

[0097] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

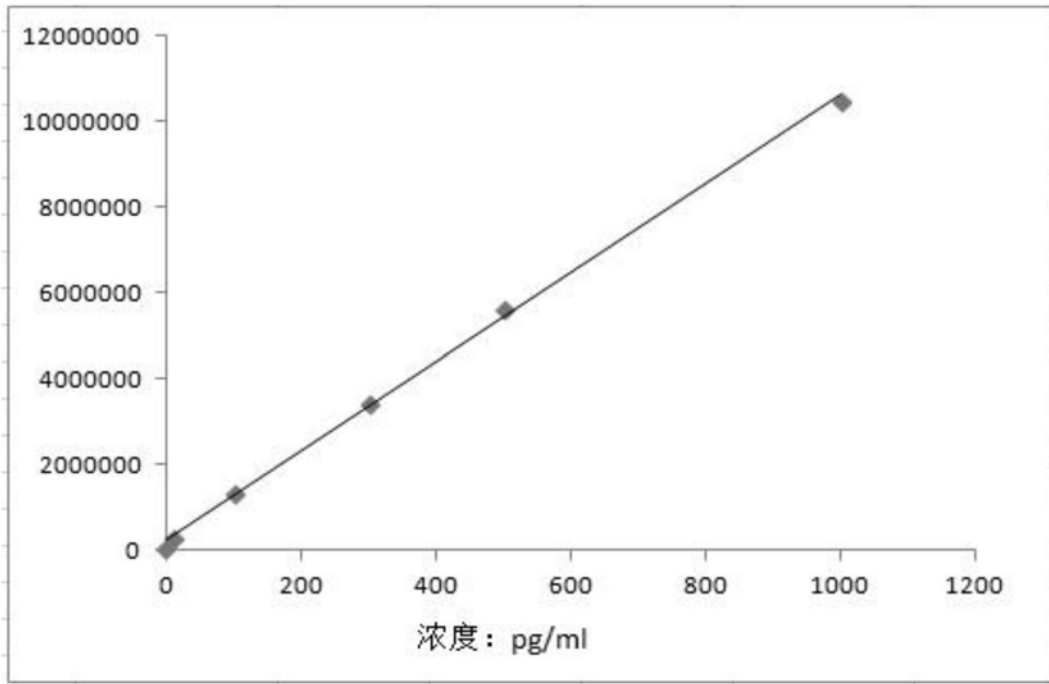


图1

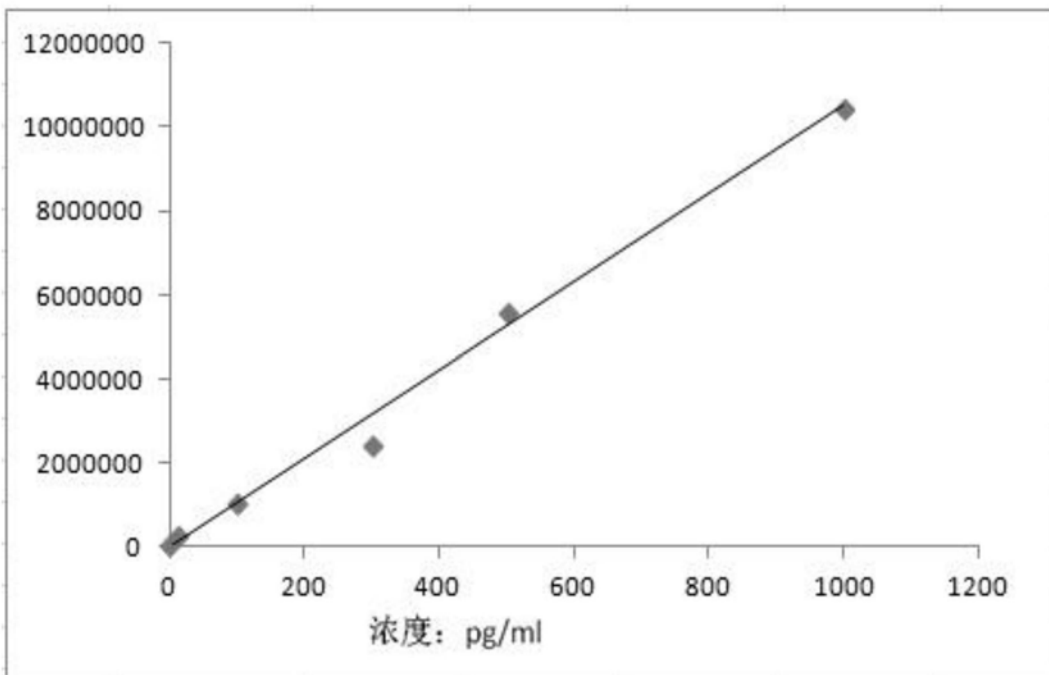


图2

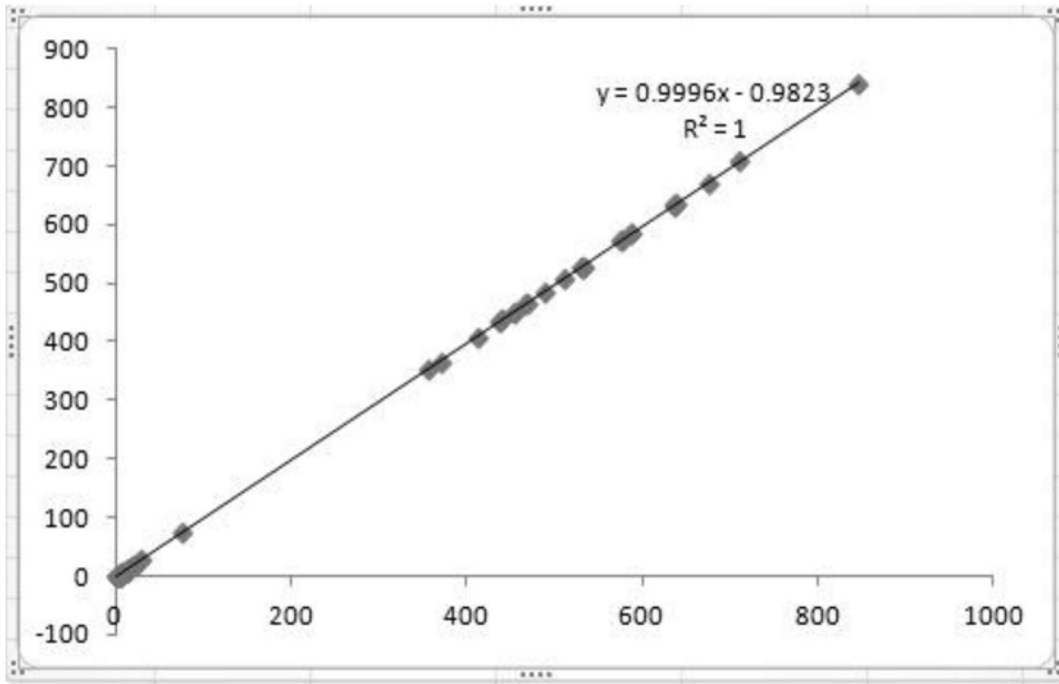


图3

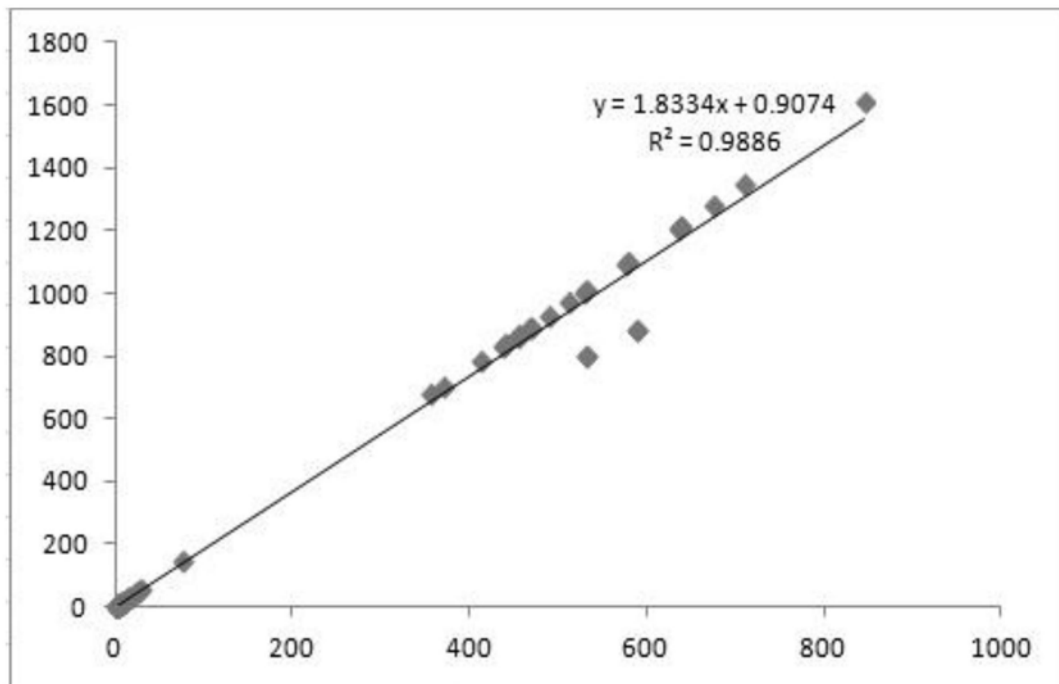


图4