



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101046479 B

(45) 授权公告日 2011.08.31

(21) 申请号 200710067299.2

1 期), 第 89-90 页.

(22) 申请日 2007.02.25

沈洪征等. 胰岛素放射免疫分析质控血清的研制. 《同位素》. 1998, 第 11 卷 (第 1 期), 第 24-28 页.

(73) 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华大学

专利权人 浙江清华长三角研究院

审查员 王航

(72) 发明人 胡卫江 周海梦 孟凡国 李海龙

(74) 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公司 33101

代理人 翁霁明

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 87100515 A, 1988.08.31, 全文.

童军等. 国产免疫磁珠与溴化氢活化

Sepharose 4B 亲和层析分离羊抗人 IgG 的比

较. 《中国生物制品学杂志》. 2006, 第 19 卷 (第

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

不含目标蛋白质人血清基体物质的制备方法

(57) 摘要

一种不含目标蛋白质人血清基体物质的制备方法,它是依据免疫学反应原理和目标蛋白质在血清中的含量,使一定量结合于不同介质上的抗目标蛋白质的多或单克隆抗体与人血清中的目标蛋白质反应,形成抗原抗体复合物后,通过不同的方法去除含目标蛋白质及其抗体的免疫复合物,从而得到不含目标蛋白质人血清基体物质,它能使标准物质制备用基体物质尽量与实际检测标本的基体物质一致,降低由标准物质与实际检测标本在测试中由于基体物质不一致产生的基体效应,确保检测结果的准确。

1. 一种不含目标蛋白质人血清基体物质的制备方法,它是依据免疫学反应原理和目标蛋白质在血清中的含量,使一定量结合于不同介质上的抗目标蛋白质的多或单克隆抗体与人血清中的目标蛋白质反应,形成抗原抗体复合物后,通过不同的方法去除含目标蛋白质及其抗体的免疫复合物,从而得到不含目标蛋白质人血清基体物质;其特征在于当所述目标蛋白质在血清中含量大于 300mg/L 时,将一定量的抗目标蛋白质的抗体与 2.5%戊二醛溶液混合,放置于冰箱过夜,使血清成为胶冻状,打碎后用生理盐水洗涤,成为颗粒状的可以与目标蛋白质反应的固体免疫介质,选用该蛋白质的特异性固体免疫介质以 1 : 60 ~ 1 : 10 比例加入至正常人混合血清中,置于磁力搅拌器上,4℃反应,过液,以 10000 转 / 分钟的转速离心;检测离心上清,直至不含目标蛋白质,并保持白蛋白与球蛋白的正常比例;此离心上清为不含目标蛋白质的人血清基体物质;当所述的目标蛋白质在血清中含量小于 300mg/L 的时候,选取该目标蛋白质相应的抗体与功能化的磁珠偶联形成免疫磁珠,将以上免疫磁珠以 1 : 40 ~ 1 : 100 比例投入正常人混合血清中,置于一定转速的摇床上,37℃反应 1 ~ 2 小时,4℃冰箱放置 1 ~ 4 小时,将反应混合物置于磁场中,使含目标蛋白质及其抗体的免疫磁珠与人血清分离,将血清再以 10000 转 / 分钟的转速离心,检测离心上清,直至不含目标蛋白,并保持白蛋白与球蛋白的正常比例;此离心上清为不含目标蛋白质的人血清基体物质。

不含目标蛋白质人血清基体物质的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种主要用于医学检验的不含目标蛋白质人血清基体物质的制备方法,属于医学检验的标准物质制备技术领域。

背景技术:

[0002] 标准物质是指具有一种或多种足够均匀和很好确定了特性值,用来校准设备、评价测量方法或给材料赋值的材料和物质。标准物质研制的发展趋势包括两个方向:其一为传统领域到生物、临床等新兴领域;其二为高纯与复杂基体的两极发展。

[0003] 蛋白质类标准物质是生物、临床等领域中重要的标准物质,我国的标准物质研究中心目前没有适用于医学检验用蛋白质类标准物质。国内临床检验中习惯使用纯分析物质配制于纯溶剂(如水)后形成的标准或参考液,以这样的标准液为标准,求得各标本的分析结果。这样的做法忽视了标本和标准处于完全不同的基体状态所产生的基体效应(matrixeffect)。

[0004] 分析样品中除了目标分析物以外的所有其他物质和组分称为该分析物的基体,基体(matrix)亦称为基质。基体效应是检测系统检测标本中的目标分析物时,处于目标分析物周围的所有非分析物质(基体)对分析物参与反应的影响。临床实验室测定血液标本中各种蛋白质含量时,所用标准物质的基体应当是除目标蛋白以外的人血清物质,但目前并非如此。制备不含目标蛋白质的血清基体物质是研制目标蛋白质标准物质的基础。

[0005] 据文献报道:临床检验溯源用蛋白质类标准物质的制备方法如下:得到高纯度的目标产物后,添加40%左右的牛血清白蛋白或人血清白蛋白以及其他血清类物质,总之使目标蛋白质的存在基质类似于人血清的成分。但是人血清是一种很复杂的混合物,其成份可能有几百种之多,目前对其准确的成份、含量及作用机制仍不清楚,尤其对于多肽类生长因子、激素和脂类等尚未充分认识。因此添加物不能代表真正的血清内含物。研制尽可能与人类血清成分一致的基体物质,降低临床用标准物质的基体效应是临床检测结果准确性的必要保证。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于研制用于制备标准物质的、与血清成分基本一致的不含目标蛋白质人血清基体物质的制备方法;使目标蛋白质标准物质的基体尽量与实际检测标本的基体一致,降低由标准物质与实际检测标本基体不一致产生的基体效应。

[0007] 本发明的目的是通过如下技术方案来完成的,它是依据免疫学反应原理和目标蛋白质在血清中的含量,使一定量结合于不同介质上的抗目标蛋白质的多或单克隆抗体与人血清中的目标蛋白质反应,形成抗原抗体复合物后,通过不同的方法去除含目标蛋白质及其抗体的免疫复合物,从而得到不含目标蛋白质人血清基体物质。

[0008] 当所述目标蛋白质在血清中含量大于300mg/L时,将该目标蛋白质相应的抗体用双功能试剂交联,使之成为可以与目标蛋白质反应的特异性固体免疫介质,与人血清中的

目标蛋白质反应后除去目标蛋白质；当所述的目标蛋白质在血清中含量小于 300mg/L 的时候，选取该目标蛋白质相应的抗体与功能化的磁珠偶联形成免疫磁珠，再与人血清中的目标蛋白质反应后除去目标蛋白质。

[0009] 当目标蛋白质含量大于 300mg/L 时，选用该蛋白质的特异性固体免疫介质以 1:60 ~ 1:10 比例加入至正常人混合血清中，置于磁力搅拌器上，4℃ 反应，过夜，以 10000 转 / 分钟的转速离心；检测离心上清，直至不含目标蛋白质，并保持白蛋白与球蛋白的正常比例；此离心上清为不含目标蛋白质的人血清基体物质。

[0010] 当目标蛋白质含量为 300mg/L 以下时，选用目标蛋白质的抗体与功能化的磁珠偶联，制备含抗目标蛋白质抗体的免疫磁珠；将以上免疫磁珠以 1:40 ~ 1:100 比例投入正常人混合血清中，置于一定转速的摇床上，37℃ 反应 1 ~ 2 小时，4℃ 冰箱放置 1 ~ 4 小时，将反应混合物置于磁场中，使含目标蛋白质及其抗体的免疫磁珠与人血清分离，将血清再以 10000 转 / 分钟的转速离心，检测离心上清，直至不含目标蛋白，并保持白蛋白与球蛋白的正常比例；此离心上清为不含目标蛋白质的人血清基体物质。

[0011] 本发明利用免疫学原理，根据目标蛋白质在正常人血清中的含量，选用不同的方法，得到不含目标蛋白质的人血清基体物质；它能使标准物质制备用基体物质尽量与实际检测标本的基体物质一致，降低由标准物质与实际检测标本在测试中由于基体物质不一致产生的基体效应，确保检测结果的准确。

具体实施方式

[0012] 下面将结合具体实施例对本发明作详细的介绍：

[0013] 1. 正常人混合血清分析：取若干正常人混合血清，离心后分析血清的理化性质：如血清黏度、pH 值、蛋白含量等。其中蛋白含量分析包括血清总蛋白（双缩脲法）、白蛋白（溴甲酚绿法）、球蛋白（按照常规方法，总蛋白与白蛋白的差值）、常见的特种蛋白例如：转铁蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白 A/G/M、补体 C₃/C₄ 以及目标蛋白质等（免疫比浊法分析）。分析仪器为全自动生化分析仪（日立 7080 型）。

[0014] 2. 含目标蛋白质特异性抗体的固体免疫介质以及免疫磁珠的制备：

[0015] 2.1 固体免疫介质的制备：将一定量的抗目标蛋白质的抗体与 2.5% 戊二醛溶液混合，放置于冰箱过夜，使血清成为胶冻状，打碎后用生理盐水洗涤，成为颗粒状的可以与目标蛋白质反应的固体免疫介质。

[0016] 2.2 免疫磁珠的制备：主要包括以下步骤：用缓冲液对纳米磁珠进行预处理；用碳化二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化磁珠；随后将磁珠与目标蛋白质的特异性抗体偶联结合，成为含有目标蛋白质特异性抗体的免疫磁珠；用硼酸盐缓冲液纯化免疫磁珠。（详细的方法本课题组已申请专利，专利申请号为：200610053305.4）。

[0017] 3. 不含目标蛋白质的血清基体物质研制：以一定量附于不同免疫介质上的目标蛋白质抗体与人血清中目标蛋白质反应，形成免疫复合物后，通过去除含有目的蛋白质和其特异性抗体的免疫复合物，达到去除目标蛋白质的目的。

[0018] 3.1 目标蛋白质在血清中含量大于 300mg/L 时，血清基体物质研制：选用含目标蛋白质抗体的固体免疫介质以 1:60 ~ 1:1 比例加至正常人混合血清中，置于磁力搅拌器上，4℃ 反应，过夜，以 10000 转 / 分钟的转速离心；检测离心上清中的目标蛋白质，如果仍然含

有目标蛋白质,可以添加免疫介质进一步反应,直至不含目标蛋白质。

[0019] 3.2 目标蛋白质在血清中含量小于 200mg/L 以下时,血清基体物质研制:选用含目标蛋白质抗体的免疫磁珠,将以上免疫磁珠以 1:40 ~ 1:1000 比例投入正常人混合血清中,置于一定转速的摇床上,37℃ 反应 1 ~ 2 小时,4℃ 冰箱放置 1 ~ 4 小时,将反应混合物置于磁场中,使含目标蛋白质及其抗体的免疫磁珠与人血清分离,将血清再以 10000 转/分钟的转速离心,检测离心上清中的目标蛋白质,如果仍然含有目标蛋白质,可以添加免疫介质进一步反应,直至不含目标蛋白质。

[0020] 4. 已处理血清成分分析:分析以上物质的理化性质,具体内容和方法与正常人混合血清分析一致。

[0021] 5. 已处理血清成分补充:根据以上测定的结果添加被减少的蛋白质,使之与原血清成分基本一致,并保持白蛋白与球蛋白的正常比例。此物质为不含目标蛋白质的人血清基体物质。

[0022] 6. 基体物质确证试验:利用添加回收(recovery)实验对不含目标蛋白质的血清基体物质的研制结果进行确证。回收率达到 95 ~ 105%,说明已经得到不含目标蛋白质的人血清基体物质。

[0023] 实施举例一:不含载脂蛋白 B(apoB) 的人血清基体物质的制备(apoB 在血清中含量为:500 ~ 1100mg/L)

[0024] 1. 正常人血清分析:取 1ml 正常人混合血清,离心后分析血清的黏度、pH 值、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、常见特种蛋白如:转铁蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白 A/G/M、补体 C₃/C₄ 以及目标蛋白质载脂蛋白 B 等。

[0025] 2. 不含载脂蛋白 B(apoB) 血清基体物质研制:选用含有载脂蛋白 B 抗体的固体免疫介质 1g,加入至 30ml 正常人混合血清中,置于磁力搅拌器上,4℃ 反应,过夜,以 10000 转/分钟的转速离心;检测离心上清中的载脂蛋白 B,如果仍然含有载脂蛋白 B,可以添加免疫介质进一步反应,直至不含载脂蛋白 B。

[0026] 3. 已处理血清成分分析:分析以上已处理血清物质的理化性质,具体内容和方法与正常人混合血清分析一致。

[0027] 4. 已处理血清成分补充:通过测定分析发现:血清的黏度、pH 值以及所测特种蛋白如:转铁蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白 A/G/M、补体 C₃/C₄ 的含量基本保持不变,目标蛋白质载脂蛋白 B 含量为零,血清总蛋白、白蛋白含量稍有降低,血清成分和基体物质具体测试结果见下表。根据总蛋白含量,以及减少的白蛋白含量,补充加入 0.9g 白蛋白。保持总蛋白与原来血清中总蛋白含量一致,同时也保证了白蛋白/球蛋白的比例在正常范围内。此物质为不含目标蛋白质的人血清基体物质。完成不含目标蛋白质的人血清基体物质研制的基本程序。

[0028]

测试项目	血清总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)	载脂蛋白 B(g/L)
人血清成分测试结果	65.9	40.8	0.9
基体物质测试结果	65	38.4	0.0

[0029] 5. 基体物质确证试验:利用回收(recovery)实验对不含目标蛋白质的血清基体物质的研制结果进行确证。将一定浓度纯化的载脂蛋白 B(apoB) 抗原、基体物质、以及纯化的载脂蛋白 B(apoB) 抗原与基体物质的混合物作为检测标本;以以载脂蛋白 B(apoB) 羊

抗人多克隆抗体和 4% 聚乙二醇 - 磷酸缓冲液配制的单试剂, 测定波长为 :340nm, 测试参数为 :3u1 标本 /300u1 剂。紫外分光光度计测定以上样品的吸光度, 每个样品测定 5 次, 并以其平均值计算回收率。

[0030] 回收率计算公式 :回收率 = $\frac{x_2 - x_1}{x} \times 100\%$

[0031] x_1 :基体物质平均吸光度

[0032] x_2 :添加物与基体物质平均吸光度

[0033] x :添加物的平均吸光度

[0034] 本实验回收率 = 98.7%

[0035] 实施举例二 :不含 B 因子 (Factor B) 的人血清基体物质的制备 (Factor B 在血清中含量为 :140 ~ 280mg/L)

[0036] 1. 正常人血清分析 :取 1ml 正常人混合血清, 离心后分析血清的黏度、pH 值、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、常见特种蛋白如 :转铁蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白 A/G/M、补体 C₃/C₄ 以及目标蛋白质 B 因子等。

[0037] 2. 不含 B 因子 (Factor B) 血清基体物质研制 :选用含有 B 因子抗体的特异性免疫磁珠 100ul, 加入至 20ml 正常人混合血清中, 置于一定转速的摇床上, 37℃ 反应 1 ~ 2 小时, 4℃ 冰箱放置 1 ~ 4 小时, 将反应混合物置于磁场中, 使含目标蛋白质 B 因子及其抗体的免疫磁珠与人血清分离, 将血清再以 10000 转 / 分钟的转速离心, 检测离心上清中的 B 因子, 如果仍然含有 B 因子, 可以添加免疫磁珠进一步反应, 直至不含 B 因子。

[0038] 3. 已处理血清成分分析 :分析以上已处理血清物质的理化性质, 具体内容和方法与正常人混合血清分析一致。

[0039] 4. 已处理血清成分补充 :通过测定分析发现 :血清的黏度、pH 值以及所测特种蛋白如 :转铁蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白 A/G/M、补体 C₃/C₄ 的含量基本保持不变, 目标蛋白质 B 因子含量为零, 血清总蛋白、白蛋白含量稍有降低, 血清成分和基体物质具体测试结果见下表。根据总蛋白含量, 以及减少的白蛋白含量, 补充加入 0.3g 白蛋白。保持总蛋白与原来血清中总蛋白含量一致, 同时也保证了白蛋白 / 球蛋白的比例在正常范围内。此物质为不含目标蛋白质 B 因子的人血清基体物质。完成不含目标蛋白质的人血清基体物质研制的基本程序。

[0040]

测试项目	血清总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	载脂 B 因子 (g/L)
人血清成分测试结果	65.9	40.8	0.2
基体物质测试结果	65.6	40.6	0.0

[0041] 5. 基体物质确证试验 :利用回收 (recovery) 实验对不含目标蛋白质 B 因子的血清基体物质的研制结果进行确证。将一定浓度的纯化的 B 因子 (Factor B) 抗原、基体物质、以及纯化的 B 因子 (Factor B) 抗原与基体物质的混合物作为检测标本 ;以 B 因子 (Factor B) 羊抗人多克隆抗体和 4% 聚乙二醇 - 磷酸缓冲液配制的单试剂, 测定波长为 :340nm, 测试参数为 :6u1 标本 /300u1 试剂。紫外分光光度计测定以上样品的吸光度, 每个样品测定 5 次, 并以其平均值计算回收率。

[0042] 回收率计算公式 :回收率 = $\frac{x_2 - x_1}{x} \times 100\%$

[0043] x_1 :基体物质平均吸光度

- [0044] x_2 : 添加物与基体物质平均吸光度
- [0045] x : 添加物的平均吸光度
- [0046] 本实验回收率 = 97.9%