



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102901812 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210452015. 2

(22) 申请日 2012. 11. 13

(71) 申请人 江阴泽成生物技术有限公司

地址 214434 江苏省无锡市江阴市澄江中路
159 号 D405 室

(72) 发明人 汪丹 丁建华

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理
有限公司 11401

代理人 皋吉甫

(51) Int. Cl.

G01N 33/538(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

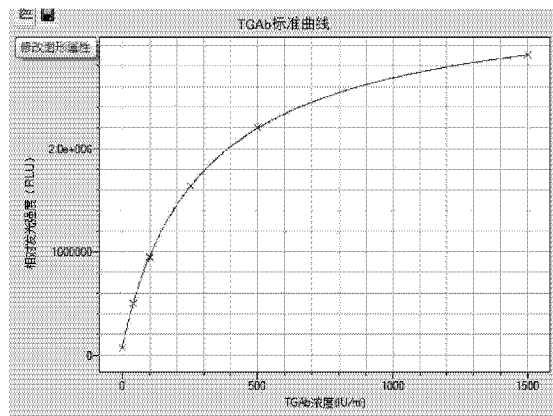
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种人甲状腺球蛋白抗体(TGAb)的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种人甲状腺球蛋白抗体(TGAb)的磁微粒化学发光免疫检测方法,属于免疫检测分析技术领域。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的TG抗原和碱性磷酸酶(AP)标记的人IgG抗体结合,形成抗原-抗体-酶标二抗的夹心免疫复合物,类似“三明治”结构。随后加入连有抗FITC抗体的磁性微粒,通过抗FITC抗体与FITC的特异性结合使抗原抗体复合物连接在磁颗粒上,在外加磁场中直接沉淀,不需离心即可将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离。本发明试剂盒将化学发光与磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,与现有技术相比,本发明试剂盒具有更高的灵敏度、线性范围宽、快速等诸多优点,并且大大降低了产品成本,在临床检验等方面具有广阔的应用前景。



1. 一种人甲状腺球蛋白抗体 TGAb 的磁微粒化学发光免疫检测方法,其特征在于:将羊抗 FITC 抗体与直径为 0.1-5 微米的磁微粒连接组成固相试剂,经捕捉反应体系中的 FITC 标记抗原、人甲状腺球蛋白抗体以及二抗酶标记试剂后形成固相-抗原-抗体-酶标二抗夹心复合物;所述的二抗酶标抗体中使用的酶是碱性磷酸酶 AP;所述的二抗酶标试剂的偶联方法是将 N-琥珀酰胺 3-(2-吡啶二巯基)丙酸活化的抗体与 Traunt's 试剂活化的碱性磷酸酶以 1:0.5-2 的比例混合,并用凝胶层析柱分离纯化;所使用的底物溶液为环氧乙烷类衍生物。

2. 如权利要求 1 所述的 TGAb 磁微粒化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:磁微粒试剂;TGAb 校准品;TGAb 质控品;TGAb 试剂 A;TGAb 试剂 B;清洗浓缩液;发光底物溶液;样本稀释液;

所述的磁微粒试剂为连接羊抗 FITC 抗体的磁微粒溶液;

所述的校准品及质控品为含有一定量 TGAb 的 BSA 缓冲液;

所述的试剂 A 为含有一定量 FITC 标记的 TG 抗原溶液;

所述的试剂 B 即二抗酶标试剂,是碱性磷酸酶 AP 标记的人 IgG 抗体的混合物;

所述的清洗浓缩液是含有 Tris、NaCl 和表面活性剂等缓冲液;

所述的发光底物溶液是含 Lumigen APS-5 发光液的缓冲液;

所述的样本稀释液是含有 BSA 的溶液。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法如下:

(1) 加样与免疫反应:在每一平底试管中加入 15 μ l TGAb 校准品、质控品或待测样本,其均预先用样本稀释液进行 1:20-100 稀释;30 μ l 试剂 A,混匀后,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;加入 30 μ l 磁微粒试剂,混匀后,37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟;

(2) 洗涤:将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后弧线倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入 300 μ l 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后弧线倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;重复两次;

(3) 加入二抗酶标试剂:在每一平底试管中加入 60 μ l 试剂 B,混匀后,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;

(4) 洗涤:同(2)步骤;

(5) 加入发光底物溶液:每个试管加入 200 μ l 发光底物;

(6) 读取发光值:用化学发光仪测定每管的发光值。

一种人甲状腺球蛋白抗体(TGAb)的磁微粒化学发光免疫 分析试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及检测血清中人甲状腺球蛋白抗体(TGAb)含量的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其测试方法

背景技术

[0002] 甲状腺球蛋白(Thyroglobulin, TG)是甲状腺滤泡柱状细胞内的一种糖蛋白,分子量为 660KD,在甲状腺激素的合成、储存中有重要作用。在体内,甲状腺球蛋白以胶质形式包含着 T3 和 T4,储存在滤泡腔内,在酶的作用下, T3 和 T4 游离到细胞浆内进入血液循环。同时少量的 TG 也释放入血,正常人也能检测到 TG,浓度为 3-40ug/l。但当甲状腺因病理原因受损,大量的 TG 释放进入血液中, TG 作为自身抗原,诱发产生抗 TG 抗体(TGAb)。

[0003] TGAb 作为甲状腺球蛋白的自身抗体,在自身免疫性甲状腺疾病(如有桥本甲状腺炎、Graves 病)中有较高阳性率如在甲状腺炎出现频率约 80%, Graves 病 TGAB 的阳性率约为 60%(Rosenbaum D and Davies TF., 1992; Nordyke RA *et al.*, 1993; Jean Ruf *et al.*, 1994),在其他甲状腺疾病及健康人群血清中亦可检出,但滴度较低。所以临床上,甲状腺球蛋白抗体的定量检测对甲状腺疾病的诊断治疗有重要意义(Feldt-Rasmussen U., 1996)。另外,甲状腺癌与 TGAb 呈一定的相关性, TGAb 值的升高是肿瘤恶化的一种标志(Schaadt B. *et al.*, 1995)。

[0004] 化学发光免疫检测技术于上个世纪 80 年代,继酶联免疫技术和放免技术之后发展起来的新兴技术,相对于后两者化学发光免疫技术具有高灵敏度、高特异性,操作简便、快速,标记结合物稳定,同时无放射性同位素损伤和污染等特点,因此近年来在临床检测分析中被广泛推广使用。

发明内容

[0005] 本发明需要解决的技术问题在于提供一种人甲状腺球蛋白抗体(TGAb)定量测定试剂盒及其检测方法,采用该试剂盒进行 TGAb 检测具有较高的灵敏度和特异性,操作更简便,检测时间更短。

[0006] 本发明提供了检测 TGAb 化学发光免疫分析试剂盒,其特征就在于,该试剂盒包括:磁微粒试剂;TGAb 校准品;TGAb 质控品;TGAb 抗试剂 A;TGAb 抗试剂 B;清洗浓缩液;发光底物溶液;样本稀释液。

[0007] 所述的磁微粒试剂为连接羊抗 FITC 抗体的磁微粒溶液;

所述的校准品及质控品为含有一定量 TGAb 的 BSA 缓冲液;

所述的试剂 A 为含有一定量异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 TG 抗原溶液;

所述的试剂 B 即二抗酶标试剂,是碱性磷酸酶(AP)标记的人 IgG 抗体的混合物;

所述的清洗浓缩液是含有 Tris、NaCl 和表面活性剂等缓冲液;

所述的发光底物溶液是含 Lumigen APS-5 发光液的缓冲液;

所述的样本稀释液是含有 BSA 的溶液。

[0008] 本发明所提供的检测 TGA_b 的样品前处理方法,包括以下步骤:

1、样品前处理

对临床血清,3000rpm 离心 5 分钟,取上层液即可进行分析测定。待测样品 2-8℃ 存放不得超过 48 小时,若 48 小时未检测,应于 -20℃ 以下保存,但不应超过 30 天。

[0009] 2、实验前准备

实验前需将所有试剂放置至室温;准备好一次性平底试管和磁分离器及温育时用于覆盖磁分离器的塑料膜;调节水浴箱温度为 37℃;准备化学发光测定仪,并仔细阅读仪器使用说明书。

[0010] 3、试剂准备

实验前将试剂盒中各试剂在置混匀仪上充分混匀;磁微粒试剂混匀后应为均匀悬浊液,无明显凝集。

[0011] 4、利用上述检测 TGA_b 的化学发光免疫分析试剂盒检测样品。

[0012] 本发明的检测方法如下:

(1) 加样与免疫反应:在每一平底试管中加入 15 μl TGA_b 校准品、质控品或待测样本(预先用样本稀释液进行 1:20-100 稀释);30 μl 试剂 A,混匀后,37℃ 温育 30 分钟;加入 30 μl 磁微粒试剂,混匀后,37℃ 温育 15 分钟;

(2) 洗涤:将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后弧线倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入 300 μl 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后弧线倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;重复两次;

(3) 加入二抗酶标试剂:在每一平底试管中加入 60 μl 试剂 B,混匀后,37℃ 温育 30 分钟;

(4) 洗涤:同(2)步骤;

(5) 加入发光底物溶液:每个试管加入 200 μl 发光底物;

(6) 读取发光值:用化学发光仪测定每管的发光值。

[0013] 本发明具有以下优点:

1、使用磁珠为固相,使免疫反应更接近液相,反应更充分和迅速,而且使结合的免疫复合物更加容易分离,降低了非特异性吸附。

[0014] 2、使用的试剂 B 为单克隆抗体混合物,使免疫反应的亲和力更高,而且单抗的生产批间差异相对小,更容易保证产品的批间稳定。

[0015] 3、使用化学发光底物溶液,使检测的灵敏度得到了提高,而且线性范围更宽。

[0016] 4、本方法的建立可以为其他试剂盒的开发提供一种方便、高灵敏度、准确性和稳定性的免疫检测方法。

[0017] 本发明的主要创新之处在于:

1、本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,与现有技术相比,本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和特异性,并达到了较佳的性能参数。

[0018] 2、试剂盒中的磁微粒试剂、试剂 A、试剂 B、校准品、质控品、清洗浓缩液、发光底物

溶液及样本稀释液是该反应体系下的最优配方,给试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0019] 本发明的检测 TGA_b 的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒主要采用间接法定量检测人血清等样品中 TGA_b 的含量;对样品的前处理要求低,前处理过程简单,能快速、高通量检测大批样品;采用了高特异的单克隆抗体和超顺磁、高分散、比表面积大的磁微粒子,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高特点。本发明的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利,与市场上的酶联免疫试剂盒等相比,线性范围宽,有效避免钩状效应,不需样品稀释,适用于大批量样品筛选的定量。

附图说明

[0020] 图 1 为本发明的 TGA_b 化学发光免疫检测标准曲线,其中,横坐标为 TGA_b 的浓度,纵坐标为相对发光强度(RLU)。

具体实施方式

[0021] 实施例 1

一、磁珠缓冲液配制操作规程:以配制 1L 为例:

- 1、根据配制量,选择合适容器,加入 700ml 的纯水;
- 2、称取 Tris 6.02g, NaN₃ 0.99g 于容器中,混匀,室温搅拌 2 小时;
- 3、检测溶液 pH,应在 10 左右;
- 4、调制 pH 值为 8.0;
- 5、量取 Tween-20 2.76ml;称取硫酸新霉素 0.99g;四环素 0.03g;BSA 4.97g 于容器中,搅拌 1 小时,调 pH 值至 8.0±0.05;
- 6、定容至 1L,调 pH 值至 8.0±0.05;
- 7、用 0.22um 滤器过滤,贮存于 4℃。

[0022] 二、磁微粒试剂的制备过程

将直径为 0.1 微米的四氧化三铁微球用戊二醛进行活化,室温混匀 4 小时后,用 0.01mol/L PBS pH7.4 缓冲液清洗三次,并用该溶液进行悬浮,浓度为 50-100mg/ml;然后,每毫升悬液中加入羊抗 FITC 抗体 100 μg,于 37℃混匀温育 3-8 小时;用等体积的 0.01mol/L PBS 5%BSA pH7.4 缓冲液于 37℃封闭 40 分钟;最后,用 0.5%BSA 0.02mol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液清洗三次,并用上述磁珠缓冲液配制一定浓度的工作液。

[0023] 实施例 2

一、碱性磷酸酶 AP 与人 IgG 抗体的偶联

抗体为免疫球蛋白,含有氨基(-NH₂),使用 SMCC 活化剂进行活化,生成马来酰亚胺-免疫球蛋白;马来酰亚胺-免疫球蛋白含有可以与 -SH 基团反应的马来酰亚胺基团,加入含有 -SH 的碱性磷酸酶,可以将抗体与碱性磷酸酶连接在一起。

[0024] 二、异硫氰酸荧光素 FITC 与 TG 抗原的偶联

FITC 分子与 TG 抗原的偶联物是以常见的碱性液标记法对抗体进行标记。当 FITC 在碱性溶液中与抗原蛋白反应时,蛋白质上赖氨酸的 ε 氨基与荧光素的硫碳胺键结合,

形成 FITC-蛋白质结合物,即荧光抗体或荧光结合物。一般最多能结合 15-20 个,一个 IgG 分子可结合 2-8 个分子的 FITC,其反应式如下 $\text{FITC-N=C=S} + \text{-NH}_2\text{-蛋白质} \rightarrow \text{FITC-NS-C-NH}_2\text{-蛋白质}$

实施例 3

校准品 / 质控品的配制:

1、最高点:最高浓度点为 X,目标点浓度为 A,B,C,D,E,F,配制 V 体积溶液时,需加入原料的体积分别为:表 1

浓度	加入校准品稀释液体积	加入 X 体积
A	$V-A*V/X$	$A*V/X$
B	$V-B*V/X$	$B*V/X$
C	$V-C*V/X$	$C*V/X$
D	$V-D*V/X$	$D*V/X$
E	$V-E*V/X$	$E*V/X$
F	$V-F*V/X$	$F*V/X$

2、人甲状腺球蛋白抗体 TGA_b 测定试剂盒 TGA_b 校准品原料(浓度为 5000IU/ml)用样本稀释液(具体配方见实施例 4)配制成浓度点为 0,40,100,250,500,1500IU/ml;质控品浓度分别为 40,500IU/ml。

[0025] 3、完全溶解后,贴好标签于 2-8℃ 保存,有效期为 12 个月。

[0026] 实施例 4

一、清洗浓缩液配制操作规程:以配制 1L 为例:

1、根据配制量,选择合适的容器,加入出水 0.7kg,称取 Tris 12.11g;NaCl 312.43g;Tween-20 27.74g;Bronidox 1g;Triton X-100 1g;

2、放置 18 小时,调 pH 至 8.6 ± 0.05 ;加纯水至 1L,过滤。

[0027] 3、使用时进行 15 倍稀释。

[0028] 二、发光底物溶液配制操作规程:以配制 1L 为例:

1、根据配制量,选择合适的容器,称取 Tris 36.36g;Na₂SO₃ 10mg;SDS 1.0g;光泽精 3.27mg;Tween-20 0.31ml 调 pH 至 9.35;加纯水至 1L,过滤。

[0029] 2、测试发光值

三、样本稀释液配制操作规程:以配制 1L 为例:

1、加入 500ml 纯水于容器中,称取三羟甲基氨基甲烷 6g;NaCl 8.8g;BSA 60g;Proclin 300 1ml,调 pH 至 7.5 ± 0.05 。

[0030] 2、纯水定容至 1L,过滤。

[0031] 实施例 5

一种人甲状腺球蛋白抗体(TGA_b)的磁微粒化学发光免疫检测:

操作步骤:

(1) 加样与免疫反应:在每一平底试管中加入 15 μl TGA_b 校准品、质控品或待测样本(预先用样本稀释液进行 1:20-100 稀释);30 μl 试剂 A,混匀后,37℃ 温育 30 分钟;加入 30 μl 磁微粒试剂,混匀后,37℃ 温育 15 分钟。

[0032] (2) 洗涤:将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后弧线倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入 300 μl 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后弧线倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;

重复两次。

[0033] (3)加入二抗酶标试剂:在每一平底试管中加入 60 μ l 试剂B,混匀后,37℃温育 30 分钟。

[0034] (4)洗涤:同(2)步骤。

[0035] (5)加入发光底物溶液:每个试管加入 200 μ l 发光底物。

[0036] (6)读取发光值:用化学发光仪测定每管的发光值。

[0037] 检测结果:

检测曲线见图 1.

对零标准点进行 20 次重复测试,取零标准点测定的平均值加上 2 倍的标准差,即为其灵敏度。本方法的灵敏度为 ≤ 5 IU/ml。

[0038] 对 7 个不同浓度的病人血清使用两批试剂分别进行 20 次重复测试,病人血清的浓度范围为 5-1500 IU/ml,计算其批内变异。结果批内变异(CV)平均为 4.5%。

[0039] 对 7 个不同浓度的病人血清使用两批试剂和不同的操作人员分别进行 20 次重复测试,病人血清的浓度范围为 5-1500 IU/ml,计算其批间变异。结果批间变异(CV)平均为 9.6%。

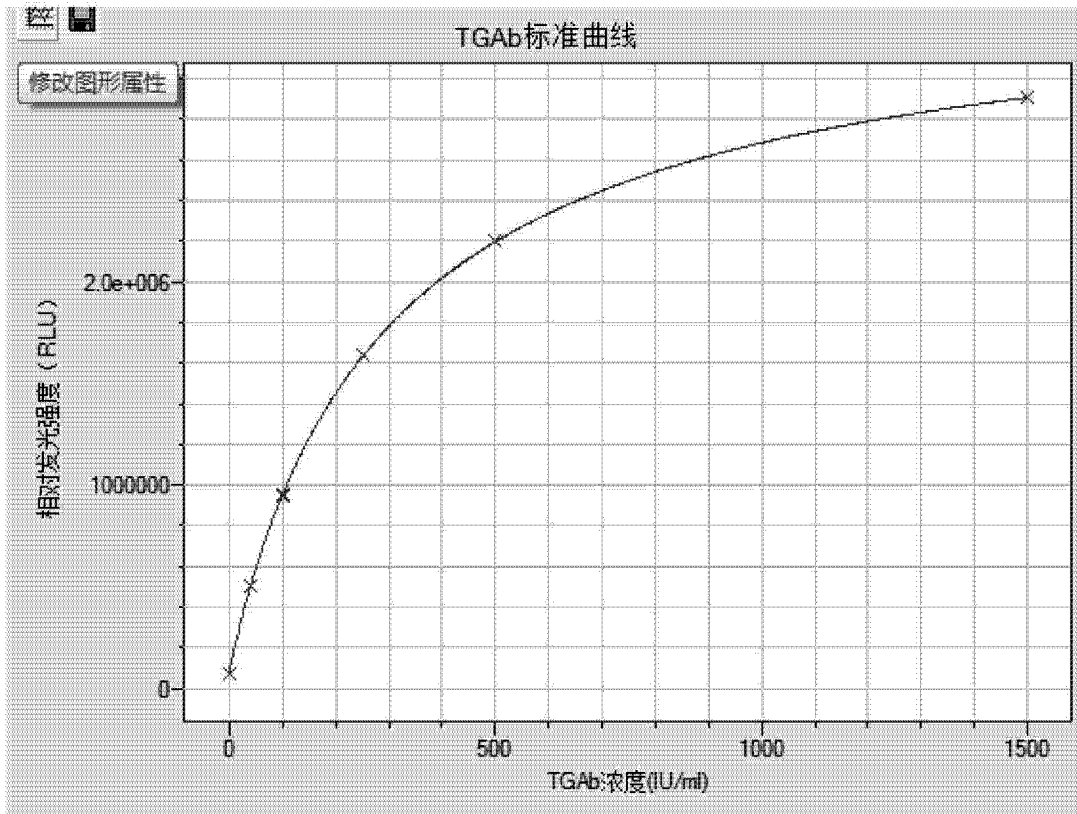


图 1

专利名称(译)	一种人甲状腺球蛋白抗体(TGAb)的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN102901812A	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN201210452015.2	申请日	2012-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	江阴泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	江阴泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江阴泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	汪丹 丁建华		
发明人	汪丹 丁建华		
IPC分类号	G01N33/538 G01N33/577 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种人甲状腺球蛋白抗体 (TGAb) 的磁微粒化学发光免疫检测方法, 属于免疫检测分析技术领域。异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 TG 抗原和碱性磷酸酶 (AP) 标记的人 IgG 抗体结合, 形成抗原-抗体-酶标二抗的夹心免疫复合物, 类似“三明治”结构。随后加入连有抗 FITC 抗体的磁性微粒, 通过抗 FITC 抗体与 FITC 的特异性结合使抗原抗体复合物连接在磁颗粒上, 在外加磁场中直接沉淀, 不需离心即可将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离。本发明试剂盒将化学发光与磁微粒相结合, 提供了一种接近均相的反应体系, 与现有技术相比, 本发明试剂盒具有更高的灵敏度、线性范围宽、快速等诸多优点, 并且大大降低了产品成本, 在临床检验等方面具有广阔的应用前景。

