



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105467122 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201510788484. 5

(22) 申请日 2015. 11. 17

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米园 C6 栋 101

(72) 发明人 徐顺澍 李永红 周超 高金艳
吴荣桂 李庆春

(74) 专利代理机构 苏州广正知识产权代理有限
公司 32234

代理人 徐萍

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/553(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

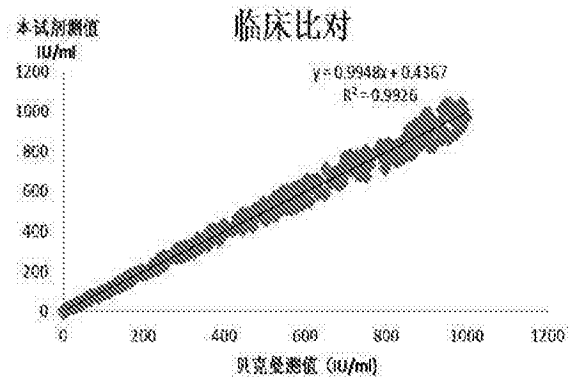
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法,试剂盒包括甲状腺过氧化物酶抗体系列标准品;磁分离试剂:偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;第一试剂:含 N- 羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原溶液;第二试剂:含碱性磷酸酶标记的鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液,并采用此试剂盒进行甲状腺过氧化物酶抗体检测。通过上述方式,本发明采用生物素链霉亲和素信号放大系统、碱性磷酸酶标记,解决了传统的 ELISA 灵敏度较低的问题;纳米磁微粒分离系统能达到放射免疫分析(RIA)的高灵敏度,但没有放射性污染,有效期、安全性、环保性能大大提高。



1. 一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,其特征在于,包括第一试剂、第二试剂、质控品、标准品、磁分离试剂、样本稀释液,所述第一试剂为含N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原溶液,所述第二试剂为含碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG单克隆抗体溶液,所述磁分离试剂为偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液。

2. 根据权利要求1所述的检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,其特征在于,所述第一试剂的浓度为5~1000ng/ml;所述第一试剂中所述甲状腺过氧化物酶抗原与所述N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯的摩尔比为1:15~50;所述第一试剂中的所述甲状腺过氧化物酶抗原的纯度大于95%。

3. 根据权利要求1所述的检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,其特征在于,所述第二试剂的浓度为10~1000ng/ml;所述第二试剂中所述鼠抗人IgG单克隆抗体与所述碱性磷酸酶的摩尔比为1:1~2;所述第二试剂中的所述碱性磷酸酶的纯度大于95%,比活性大于1000 U/mg,浓度大于5mg/ml;所述第二试剂中的所述鼠抗人IgG单克隆抗体的纯度大于95%,浓度大于1mg/ml。

4. 根据权利要求1所述的检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,其特征在于,所述磁分离试剂的浓度为0.05~1.0mg/ml;所述磁分离试剂中的所述磁微粒具有超顺磁性,所述磁微粒的直径为0.5~2 μ m,每克磁微粒表面的羧基含量不低于0.4毫摩尔;所述质控品为甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品;所述标准品为甲状腺过氧化物酶抗体系列标准品。

5. 根据权利要求1所述的检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,其特征在于,所述样本稀释液为含质量百分比为0.1%~5%的牛血清白蛋白、pH值为7~8、0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求1所述的检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,其特征在于,所述第一试剂的制备方法为:将所述甲状腺过氧化物酶抗原用0.01~0.03mol/L、pH为7~7.5的磷酸盐缓冲液,在2~8 $^{\circ}$ C下透析过夜,配置成甲状腺过氧化物酶抗原溶液;将N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯溶于二甲基亚砷中配置成N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯溶液,其中所述N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯的物质的量浓度为8~12mM;将所述N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯溶液加入到所述甲状腺过氧化物酶抗原溶液中,混合均匀,在15~40 $^{\circ}$ C下放置20~40分钟;加入0.9~1.1M的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,终止反应,在15~40 $^{\circ}$ C下放置8~12分钟,然后用含质量比为0.4~3.2%的牛血清白蛋白、pH为7~7.5、物质的量浓度为0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液稀释到含N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原的浓度为5~1000ng/ml,即得所述第一试剂;

所述第二试剂的制备方法为:将鼠抗人IgG单克隆抗体加入到浓度为8~12mg/ml的2-亚胺基硫烷盐酸盐偶联剂中,在15~40 $^{\circ}$ C下静置18~25分钟,加入0.09~0.11mol/L的甘氨酸溶液,在15~40 $^{\circ}$ C下静置4~5分钟,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后鼠抗人IgG单克隆抗体,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;将碱性磷酸酶溶液加入到4~5mg/ml的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液中,在15~40 $^{\circ}$ C下静置25~35分钟,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;将活化后的鼠抗人IgG单克隆抗体和活化后的碱性磷酸酶混合,在2~8 $^{\circ}$ C下静置12~24h,用Superdex200凝胶纯化柱纯化,获得连接物浓溶液,在2~8 $^{\circ}$ C保存备用;将所述连接物浓溶液用含质量比为0.4~3.2%的牛血清白蛋白、pH为5.8~8.0、物质的量浓度为0.04~0.11mol/L的2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液稀释到含碱性磷酸酶标记的鼠抗人

IgG单克隆抗体的浓度为10~1000ng/ml,即得所述第二试剂;

所述磁分离试剂的制备方法为:将所述磁微粒用0.04~0.06mol/L、pH4.5~5 的2-吗啉乙磺酸缓冲液重悬,重悬后磁微粒的浓度为8~12mg/ml;然后加入所述链霉亲和素,在15~40℃下混悬30~60分钟,其中所述磁微粒与所述链霉亲和素的质量比为25~50:1;然后再加入新鲜配置的8~12mg/ml的碳二亚胺水溶液,在15~40℃下混悬2~12h,其中所述2-吗啉乙磺酸缓冲液与所述碳二亚胺水溶液的体积比为10~20:1;磁分离,去上清,用含质量比为0.04~5%的牛血清白蛋白、pH为7~7.5、物质的量浓度为0.004~0.05mol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲液重悬到所述偶联有链霉亲和素的磁微粒的浓度为0.2~1.0mg/ml,即得所述磁分离试剂;

所述甲状腺过氧化物酶抗体系列校准品的制备方法为:将甲状腺过氧化物酶抗体阳性商业血清用pH值为7~7.5、0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液分别稀释到多个浓度后,即得所述甲状腺过氧化物酶抗体系列校准品;

所述甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品的制备方法为:将甲状腺过氧化物酶抗体阳性商业血清用pH值为7~7.5、0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液分别稀释到两个浓度后,即得所述甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品;

所述样本稀释液的制备方法为:将0.1%~5%的牛血清白蛋白加入0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液中,得到的所述样本稀释液的pH值为7~8。

7.一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的方法,其特征在于,包括步骤为:

(1)将待测稀释样本、第一试剂和磁分离试剂混匀并孵育得到第一溶液;

(2)将所述第一溶液在磁场中沉降并洗涤,去除磁场后得到第二溶液;

(3)向所述第二溶液中加入第二试剂,混匀并孵育得到第三溶液;

(4)将所述第三溶液在磁场中沉降并洗涤得到第四溶液;

(5)向所述第四溶液中加入发光底物,去除磁场,充分混悬后孵育,检测3秒内相对发光强度值。

8.根据权利要求7所述的检测甲状腺过氧化物酶抗体的方法,其特征在于,包括步骤为:

(1)将样本原液与样本稀释液按体积比1:15~50混匀得到待测稀释样本,在检测管中加入待测稀释样本,然后依次加入第一试剂和磁分离试剂,混匀,在36~38℃下温育5~30分钟得到第一溶液,其中所述待测稀释样本、所述第一试剂和所述磁分离试剂的体积比为1:0.9~1.1:0.9~1.1;

(2)添加磁场,使所述第一溶液在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场后得到第二溶液;

(3)向所述第二溶液中加入第二试剂,混匀,在36~38℃下温育4~16分钟得到第三溶液,所述待测稀释样本与所述第二试剂的体积比为1:1.5~3;

(4)添加磁场,使所述第三溶液在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除上清液得到第四溶液;

(5)加入发光底物,去除磁场,充分混悬后,在36~38℃下温育1~10分钟,检测3秒内相对发光强度值。

检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术领域,特别是涉及一种基于纳米磁微粒化学发光及碱性磷酸酶标记检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 甲状腺过氧化物酶(TPO)是一种结合糖基化亚铁血红素的膜蛋白质,位于甲状腺卵泡细胞的顶膜中。TPO是一种甲状腺微粒体抗原大蛋白质的主要成分,在甲状腺球蛋白中的酪氨酸基团的碘化反应中起催化剂的作用,促进甲状腺激素、T3和T4的合成。甲状腺过氧化物酶自身抗体的检测是鉴定患者是否患有自身免疫性甲状腺疾病的一种有效手段。90%以上患有自身免疫性甲状腺炎的病人,其体内的抗TPO抗体水平非常高。抗TPO抗体可以激活补体,被认为是导致甲状腺机能失调和甲状腺机能减退的主要致病原因。在患有自身免疫性甲状腺疾病的人群中,几乎每个淋巴瘤性甲状腺炎的患者和70%以上的甲状腺机能亢进患者体内都存在抗TPO抗体。

[0003] 目前用于检测甲状腺过氧化物酶抗体(anti-TPO)的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法等。酶联免疫分析法存在灵敏度低,线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析技术因其有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0004] 然而,在实际的免疫检测中,由于待测样品中所含的杂质成分较多,一定程度上影响了检测灵敏度和准确性,所以从复杂的样品基质中快速分离、纯化出目的待测物,是临床检验工作者面临的难题之一。磁微粒免疫检测技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、可重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学性状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,使得某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。

[0005] 磁分离化学发光免疫分析法综合采用了目前国际上的两大主流免疫分析尖端技术—悬浮磁微粒载体技术、化学发光检测技术,使系统能够充分满足临床对检测结果的要求。

[0006] 现有技术,如公开号为CN1595161A、公开日为2005-3-16的发明专利公开了一种甲状腺过氧化物酶抗体磁分离酶联免疫检测方法,但是该专利中的试剂盒的灵敏度仍然较低(5IU/ml),且试剂盒检测时间太长(>90min);再如公开号为CN103336115A、公开日为2013-10-02的发明专利公开了一种甲状腺过氧化物酶抗体磁分离酶联免疫检测方法,但是该专利中的试剂盒的灵敏度仍然较低(1IU/ml),试剂盒检测时间太长(>90min),且检测范围较窄(1-400IU/ml)。

发明内容

[0007] 本发明主要解决的技术问题是提供一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法,其极易实现全自动化,具有灵敏度高、精密度高、线性范围宽、检测时间短等优点。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒,包括第一试剂、第二试剂、质控品、标准品、磁分离试剂、样本稀释液,所述第一试剂为含N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原溶液,所述第二试剂为含碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG单克隆抗体溶液,所述磁分离试剂为偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液。

[0009] 在本发明一个较佳实施例中,所述第一试剂的浓度为5~1000ng/ml;所述第一试剂中所述甲状腺过氧化物酶抗原与所述N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯的摩尔比为1:15~50;所述第一试剂中的所述甲状腺过氧化物酶抗原的纯度大于95%。

[0010] 在本发明一个较佳实施例中,所述第二试剂的浓度为10~1000ng/ml;所述第二试剂中所述鼠抗人IgG单克隆抗体与所述碱性磷酸酶的摩尔比为1:1~2;所述第二试剂中的所述碱性磷酸酶的纯度大于95%,比活性大于1000 U/mg,浓度大于5mg/ml;所述第二试剂中的所述鼠抗人IgG单克隆抗体的纯度大于95%,浓度大于1mg/ml。

[0011] 在本发明一个较佳实施例中,所述磁分离试剂的浓度为0.05~1.0mg/ml;所述磁分离试剂中的所述磁微粒具有超顺磁性,所述磁微粒的直径为0.5~2 μ m,每克磁微粒表面的羧基含量不低于0.4毫摩尔;所述质控品为甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品;所述标准品为甲状腺过氧化物酶抗体系列标准品。

[0012] 在本发明一个较佳实施例中,所述样本稀释液为含质量百分比为0.1%~5%的牛血清白蛋白、pH值为7~8、0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0013] 在本发明一个较佳实施例中,所述第一试剂的制备方法为:将所述甲状腺过氧化物酶抗原用0.01~0.03mol/L、pH为7~7.5的磷酸盐缓冲液,在2~8 $^{\circ}$ C下透析过夜,配置成甲状腺过氧化物酶抗原溶液;将N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯溶于二甲基亚砷中配置成N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯溶液,其中所述N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯的物质的量浓度为8~12mM;将所述N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯溶液加入到所述甲状腺过氧化物酶抗原溶液中,混合均匀,在15~40 $^{\circ}$ C下放置20~40分钟;加入0.9~1.1M的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,终止反应,在15~40 $^{\circ}$ C下放置8~12分钟,然后用含质量比为0.4~3.2%的牛血清白蛋白、pH为7~7.5、物质的量浓度为0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液稀释到含N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原的浓度为5~1000ng/ml,即得所述第一试剂;

所述第二试剂的制备方法为:将鼠抗人IgG单克隆抗体加入到浓度为8~12mg/ml的2-亚胺基硫烷盐酸盐偶联剂中,在15~40 $^{\circ}$ C下静置18~25分钟,加入0.09~0.11mol/L的甘氨酸溶液,在15~40 $^{\circ}$ C下静置4~5分钟,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后鼠抗人IgG单克隆抗体,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;将碱性磷酸酶溶液加入到4~5mg/ml的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液中,在15~40 $^{\circ}$ C下静置25~35分钟,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;将活化后的鼠抗人IgG单克隆抗体和活化后的碱性磷酸酶混合,在2~8 $^{\circ}$ C下静置12~24h,用Supperdex200凝胶纯化柱纯化,获得连接物浓溶液,在2~8 $^{\circ}$ C保存备用;将所述连接物浓溶液用含质量比为0.4~3.2%的牛血清白蛋白、pH为5.8~8.0、物质的量浓度为0.04~0.11mol/L的2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液稀释到含碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG单克隆抗体的浓度为10~1000ng/ml,即得所述第二试剂;

所述磁分离试剂的制备方法为:将所述磁微粒用0.04~0.06mol/L、pH4.5~5 的2-吗啉乙磺酸缓冲液重悬,重悬后磁微粒的浓度为8~12mg/ml;然后加入所述链霉亲和素,在15~40℃下混悬30~60分钟,其中所述磁微粒与所述链霉亲和素的质量比为25~50:1;然后再加入新鲜配置的8~12mg/ml的碳二亚胺水溶液,在15~40℃下混悬2~12h,其中所述2-吗啉乙磺酸缓冲液与所述碳二亚胺水溶液的体积比为10~20:1;磁分离,去上清,用含质量比为0.04~5%的牛血清白蛋白、pH为7~7.5、物质的量浓度为0.004~0.05mol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲液重悬到所述偶联有链霉亲和素的磁微粒的浓度为0.2~1.0mg/ml,即得所述磁分离试剂;

所述甲状腺过氧化物酶抗体系列校准品的制备方法为:将甲状腺过氧化物酶抗体阳性商业血清用pH值为7~7.5、0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液分别稀释到多个浓度后,即得所述甲状腺过氧化物酶抗体系列校准品;

所述甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品的制备方法为:将甲状腺过氧化物酶抗体阳性商业血清用pH值为7~7.5、0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液分别稀释到两个浓度后,即得所述甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品。

[0014] 所述样本稀释液的制备方法为:将0.1%~5%的牛血清白蛋白加入0.005~0.06mol/L的磷酸盐缓冲液中,得到的所述样本稀释液的pH值为7~8。

[0015] 提供一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的方法,包括步骤为:

- (1)将待测稀释样本、第一试剂和磁分离试剂混匀并孵育得到第一溶液;
- (2)将所述第一溶液在磁场中沉降并洗涤,去除磁场后得到第二溶液;
- (3)向所述第二溶液中加入第二试剂,混匀并孵育得到第三溶液;
- (4)将所述第三溶液在磁场中沉降并洗涤得到第四溶液;
- (5)向所述第四溶液中加入发光底物,去除磁场,充分混悬后孵育,检测3秒内相对发光强度值。

[0016] 在本发明一个较佳实施例中,所述检测甲状腺过氧化物酶抗体的方法包括步骤为:

- (1)将样本原液与样本稀释液按体积比1:15~50混匀得到待测稀释样本,在检测管中加入待测稀释样本,然后依次加入第一试剂和磁分离试剂,混匀,在36~38℃下温育5~30分钟得到第一溶液,其中所述待测稀释样本、所述第一试剂和所述磁分离试剂的体积比为1:0.9~1.1:0.9~1.1;

(2)添加磁场,使所述第一溶液在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场后得到第二溶液;

(3)向所述第二溶液中加入第二试剂,混匀,在36~38℃下温育4~16分钟得到第三溶液,所述待测稀释样本与所述第二试剂的体积比为1:1.5~3;

(4)添加磁场,使所述第三溶液在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除上清液得到第四溶液;

(5)加入发光底物,去除磁场,充分混悬后,在36~38℃下温育1~10分钟,检测3秒内相对发光强度值。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明通过采用偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液、含N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原溶液、含碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG单克隆抗体溶液制成的试剂盒,使得灵敏度达到0.031IU/mL,并且该试剂盒准确性好、

精密度高,操作简单省时,检测范围宽,检测范围为0~1000IU/ml。本发明克服了放射免疫分析的高污染、有效期短和普通微孔板酶联免疫分析精密度差、灵敏度差的缺点,使用碱性磷酸酶酶促化学发光系统、磁微粒分离系统、独特的抗原抗体偶联技术,使得该方法的灵敏度、精密度、稳定性、有效期、安全性、环保性能大大提高。

附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例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一些实施例,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,还可以根据这些附图获得其它的附图,其中:

图1是本发明实施例中测试校准品的标准曲线图;

图2是本发明实施例中血清样本检测结果相关性图;

图3是本发明实施例中血清样本检测结果符合率图。

具体实施方式

[0019] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,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它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 实施例一:

提供一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及其配套试剂的制备。

[0021] (一)第一试剂的制备:

材料与仪器:

- 1、甲状腺过氧化物酶抗原,由Hytest LTD制备,纯度为98%,以磷酸盐缓冲液保存;
- 2、偶联剂N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯(BNHS)购自THERMO公司,二甲基亚砜(DMSO)、PBS等试剂达到化学纯;
- 3、分析天平。

[0022] 操作步骤:

- 1、将甲状腺过氧化物酶抗原用0.02mol/L、pH7.4的PBS缓冲液在4℃下透析过夜,中间换液一次;
- 2、将BNHS平衡至室温(20℃),用万分之一分析天平(最大称量200g)称取1.5mg BNHS溶于326μL DMSO中,配制成10mM的BNHS(现用现配);
- 3、按照甲状腺过氧化物酶抗原与BNHS摩尔比为1:20的比例在步骤1所得的溶液中加入步骤2所得的溶液,混合均匀,室温放置反应30分钟;
- 4、向步骤3中加入1M的TRIS缓冲液至终浓度为10mM,终止反应,室温放置反应10min,即获得生物素标记的抗体浓溶液,将该溶液用含1%牛血清白蛋白、PH 7.4、0.01mol/L的磷酸盐缓冲液稀释到50ng/ml,完成第一试剂的制备。

[0023] (二)第二试剂的制备:

材料与仪器:

1、鼠抗人IgG单克隆抗体,购自深圳菲鹏生物股份公司,纯度为98%,浓度为1mg/ml,以磷酸盐缓冲液保存;

2、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ALP)纯度为95%,比活性为1000 U/mg,浓度为5mg/ml;

3、偶联剂4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、2-亚胺基硫酸盐酸盐(2-IT)购自THERMO公司,2-吗啉乙磺酸(MES)等化学试剂达到化学纯;

4、G-25凝胶柱和Supperdex200凝胶纯化柱为GE公司产品;

5、分析天平。

[0024] 操作步骤:

1、取1mg鼠抗人IgG单克隆抗体,加入10mg/ml的偶联剂2-IT溶液3 μ l,室温静置20min,加入0.1mol/L的甘氨酸溶液10 μ l,室温静置5min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后抗体,2-8 $^{\circ}$ C保存备用;

2、取1.5mg的ALP溶液,加入5mg/ml的SMCC溶液15 μ l,室温静置30min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后抗体,4 $^{\circ}$ C保存备用;

3、将活化的鼠抗人IgG单克隆抗体与活化的ALP混合,4 $^{\circ}$ C条件下静置18h,用Supperdex200凝胶纯化柱纯化偶联物,获得连接物浓溶液,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0025] 4、将连接物浓溶液用含1%牛血清白蛋白、PH为6.0、0.05mol/L的MES缓冲液稀释到100ng/ml,完成第二试剂的制备。

[0026] (三)磁分离试剂的制备:

材料与仪器:

1、磁微粒:表面含羧基(COOH)活性集团,每克磁微粒(干重)羧基含量为0.4毫摩尔,具有超顺磁性,直径为1 μ m。

[0027] 2、链霉亲和素购自Sigma公司。

[0028] 3、2-吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)和其他试剂均为化学纯。

[0029] 4、分析天平。

[0030] 操作步骤:

1、取100mg磁微粒,磁分离去上清,用0.05mol/L、PH值为4.7的MES缓冲液10ml重悬;

2、加入3mg链霉亲和素,室温混悬50min;

3、加入0.7ml新鲜配制的10mg/ml的EDC水溶液,室温混悬8h;

4、磁分离,去上清,用含质量比1%的牛血清白蛋白、PH为7.4、0.01mol/L的磷酸盐缓冲液重悬到0.4mg/ml,完成磁分离试剂的制备。

[0031] (四)甲状腺过氧化物酶抗体系列校准品的制备:

材料与仪器:

1、甲状腺过氧化物酶抗体阳性血清,购自深圳菲鹏生物股份公司。

[0032] 2、其他试剂均为化学纯。

[0033] 3、分析天平。

[0034] 操作步骤:

1、称取适量的甲状腺过氧化物酶抗体阳性血清,用PH值为7.4、0.01mol/L的磷酸盐缓冲液分别稀释到0、5、20、75、300和1000IU/ml。

[0035] (五)甲状腺过氧化物酶抗体系列质控品的制备:

材料与仪器:

1、甲状腺过氧化物酶抗体阳性血清,购自深圳菲鹏生物股份公司。

[0036] 2、其他试剂均为化学纯。

[0037] 3、分析天平。

[0038] 操作步骤:

1、称取适量的甲状腺过氧化物酶抗体阳性血清,用PH值为7.4、0.01mol/L的磷酸盐缓冲液分别稀释到20和300IU/ml。

[0039] 实施例二:检测的实施和检测效果的评价

材料与仪器:

1、由实施例一制备得到的试剂盒;

2、发光底物、清洗液由苏州浩欧博生物医药有限公司生产。

[0040] 3、化学发光仪:北京滨松光子技术股份有限公司生产的BHP9507型化学发光免疫分析仪或深圳雷杜生命科学股份有限公司生产的Lumiray 1200、Lumiray 1220、Lumiray 1230、Lumiray 1260、Lumiray 1280型全自动化学发光分析测定仪。

[0041] 检测方法:

下述检测步骤由全自动化学发光分析仪自动完成,也可手工操作完成。

[0042] 步骤1:在检测管中加入待测稀释样本(样本原液与样本稀释液比例为1:20,混匀),然后依次加入第一试剂和磁分离试剂,混匀,在37°C下温育10分钟,其中所述的待测稀释样本、所述的第一试剂和所述的磁分离试剂的体积比为1: 1:1;

步骤2:添加磁场,使步骤1温育后的体系在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场;

步骤3:然后向步骤2洗涤后的体系中加入第二试剂,混匀,在37°C下温育5分钟,所述的待测稀释样本与所述的第二试剂的体积比为1:2;

步骤4:添加磁场,使步骤3温育后的体系在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除上清液;

步骤5:加入发光底物,去除磁场,充分混悬后,在37°C下温育5分钟,检测3秒内相对发光强度值(RLU)。

[0043] 检测的原理为:

采用间接法原理:生物素标记的甲状腺过氧化物酶抗原、血清样本中的甲状腺过氧化物酶抗体与包被链霉亲和素的磁微粒通过免疫反应,形成免疫复合物,通过磁分离系统,洗涤去除未结合的抗原、抗体和杂质后,加入碱性磷酸酶标记的鼠鼠抗人IgG单克隆抗体与上述免疫复合物结合。通过磁分离系统,洗涤去除未结合的抗体后加入发光底物,该复合物催化发光底物发出光子,发光强度与甲状腺过氧化物酶抗体的含量成正比。

[0044] (一)灵敏度评价

检测“0”浓度样本,重复检测20次,计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD),并计算M+2SD值,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。本方法的灵敏度不大于0.25IU/mL

(1)A点发光值,结果参见下表。

anti-TPO-STD-A(RLU)			
1411	1991	2038	1499
1894	2050	1991	1745
1738	1920	1578	1760
1974	1950	1643	1649
1411	1991	2038	1499

[0045] A点发光均值 $X=1837$

$SD=192$

$X+2SD=2221$ 。

[0046] (2)B点发光值,结果参见下表。

anti-TPO-STD-B(RLU)
63863
63007
69625
67824
65512

[0047] B点发光均值 $X=65961$ 。

[0048] (3)灵敏度=0.031IU/mL

(二)精密度评价

(1)分析内精密度

将实施例1中制备的试剂盒分三批,分别测定低、中、高三种不同浓度的血清,10孔平行测定,结果参见下表,得出批内变异系数为2.17%~4.89%。

测定血清浓度 (IU/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
5	10	2.17
75	10	2.52
300	10	4.89

[0049] (2)分析间精密度

将实施例1中制备的试剂盒取三批,每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清,10孔平行测定。每份血清得到30个浓度测值,统计分析间变异系数为4.5%~7.22%,结果见下表。

测定血清浓度 (IU/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
5	30	4.17
75	30	4.52
300	30	5.88

[0050] (三)准确度评价

测试用WHO 配制高、低两个点(H =300 IU/ml L =20 IU/ml),每次测试3个重复,回算浓度,计算其测量偏差,测量偏差=(回算浓度-理论浓度)/理论浓度×100%。结果见下表。

理论浓度 (IU/ml)	实际浓度 (IU/ml)	测定次数	偏差 (%)
20	19.82	3	-0.9
300	295.07	3	-1.64

[0051]

(四)方法学比对

用实施例1制备得的试剂盒和贝克曼公司的DXI 800机型试剂盒对464份人血清样品同时进行检测。其检测结果见附图2,以本发明方法的测的血清anti-TPO浓度为纵坐标,以贝克曼试剂盒测定的结果为横坐标作回归分析,相关方程为: $y = 0.9948x + 0.4367$,相关系数为:0.9963。其阴阳性符合结果见附图3,阳性符合率98.84%,阴性符合率100%,总符合率99.14%

经统计学处理结果表明,本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0052] (五)热稳定性评价

对实施例1的试剂盒分别进行4℃ 12个月和37℃ 7天的稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达12个月。

[0053] 经过大量的实验证明,本发明提供的试剂盒方法学指标如下:

1、检测范围:0 ~1000IU/mL。

[0054] 2、灵敏度:最低检测限不高于0.25IU/mL。

[0055] 3、精密度:CV<10%。

[0056] 4、准确性:偏差<10%

5、热稳定性:试剂各组分置4℃12个月和37℃7天后测定结果均符合要求,试剂盒效期可达12个月。

[0057] 6、方法学比对:与贝克曼公司的DXI 800机型试剂盒对464份人血清样品同时进行检测。以本发明方法的测的血清anti-TPO浓度为纵坐标,以贝克曼试剂盒测定的结果为横坐标作回归分析,相关方程为: $y = 0.9948x + 0.4367$,相关系数为:0.9963。其阴阳性符合结果见附图3,阳性符合率98.84%,阴性符合率100%,总符合率99.14%。经统计学处理结果表明,本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好

本发明是基于纳米磁微粒化学发光和碱性磷酸酶标记进行设计的。本发明采用生物素链霉亲和素信号放大系统、碱性磷酸酶标记,解决了传统的ELISA灵敏度较低的问题;纳米磁微粒分离系统能达到放射免疫分析(RIA)的高灵敏度,但没有放射性污染,且稳定性好。

[0058] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其它相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

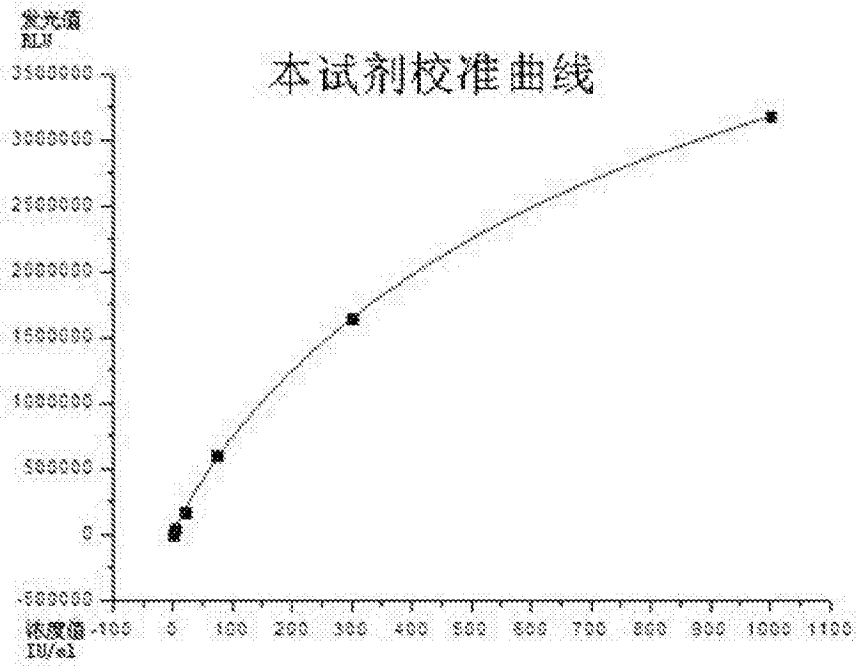


图1

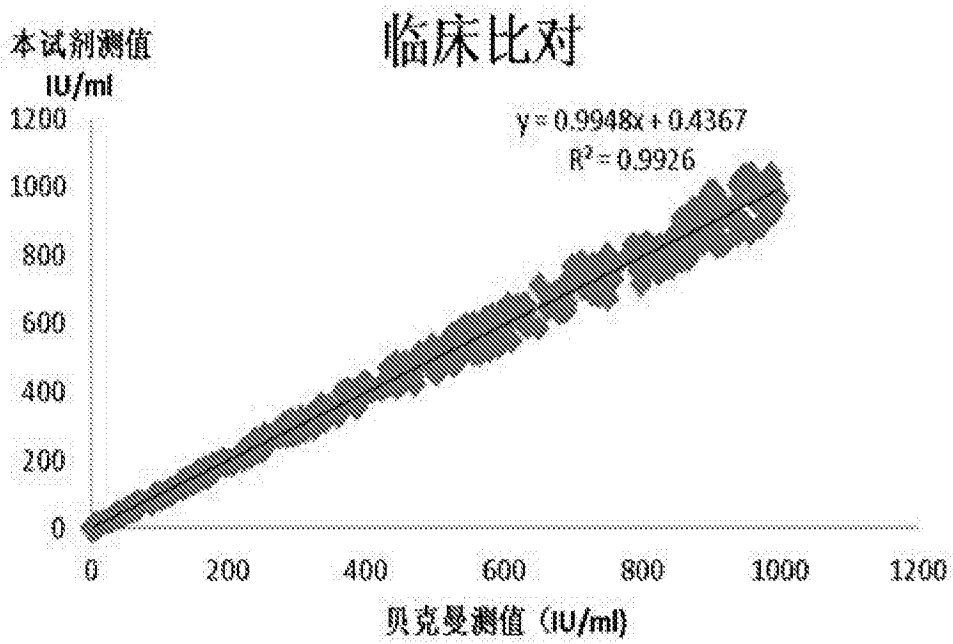


图2

		贝克曼参比试剂			
		阳性	阴性	总计	符合率
本试剂	阳性	340	0	340	阳性符合率=98.84%
	阴性	4	120	124	阴性符合率=100%
	总计	344	120	464	总符合率=99.14%

图3

专利名称(译)	检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN105467122A	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	CN201510788484.5	申请日	2015-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	徐顺澍 李永红 周超 高金艳 吴荣桂 李庆春		
发明人	徐顺澍 李永红 周超 高金艳 吴荣桂 李庆春		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/553 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/76 G01N33/531 G01N33/553		
代理人(译)	徐萍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测甲状腺过氧化物酶抗体的试剂盒及方法，试剂盒包括甲状腺过氧化物酶抗体系列标准品；磁分离试剂：偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液；第一试剂：含N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯标记的甲状腺过氧化物酶抗原溶液；第二试剂：含碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG单克隆抗体溶液，并采用此试剂盒进行甲状腺过氧化物酶抗体检测。通过上述方式，本发明采用生物素链霉亲和素信号放大系统、碱性磷酸酶标记，解决了传统的ELISA灵敏度较低的问题；纳米磁微粒分离系统能达到放射免疫分析（RIA）的高灵敏度，但没有放射性污染，有效期、安全性、环保性能大大提高。

