



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108761085 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810506744.9

(22)申请日 2018.05.24

(71)申请人 成都医学院

地址 610083 四川省成都市金牛区蓉都大道天回路601

(72)发明人 兰长贵 张涛 潘克俭 李玉璞  
史育红

(74)专利代理机构 成都正华专利代理事务所  
(普通合伙) 51229

代理人 何凡

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

### (54)发明名称

能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的  
酶联免疫试剂盒及检测方法

### (57)摘要

本发明公开了一种能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法,该试剂盒包括:包被抗原、预包被酶标板、漂洗液、促甲状腺激素受体抗体标准品、酶标液、样品稀释液、漂洗液、封闭液、显色液和终止液。检测方法包括:包被、洗涤、加样、洗涤、显色和终止。该试剂盒灵敏度高、特异性好、操作简单,可用于定量检测促甲状腺激素受体分型抗体的浓度。采用该试剂盒及检测方法检测的结果具有重要的临床参考价值,且试剂盒价格低廉,便于临床大范围推广,为临床医师诊断疾病提供精准参考。

1. 能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 包括: 包被抗原、预包被酶标板、漂洗液、促甲状腺激素受体抗体标准品、酶标液、样品稀释液、漂洗液、封闭液、显色液和终止液;

其中, 包被抗原为促甲状腺激素受体重组抗原, 通过以下方法制备得到:

(1) 将TSHR片段通过PCR扩增后连接到PMD19-T上, 再转入大肠杆菌中, 于37℃培养过夜;

(2) 提取克隆质粒, 酶切, 然后连接到pet-32a表达质粒上, 最后转入感受态细胞中, 通过IPTG诱导, 于37℃进行蛋白表达;

(3) 加入裂解液, 在4℃进行超声, 裂解包涵体后离心, 取上清, 纯化;

(4) 将纯化物梯度透析复性, 浓缩, 获取纯度高于90%的重组蛋白, 制得;

酶标液为辣根过氧化物酶标记的促甲状腺激素受体重组抗原。

2. 根据权利要求1所述的能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 预包被酶标板通过以下方法制备得到:

(1) 用样品稀释液将促甲状腺激素受体重组抗原稀释至50-150ng/0.1mL, 然后加入酶标孔内, 于37℃, 孵育2h;

(2) 甩掉酶标板中的液体, 用漂洗液洗涤酶标板, 拍干, 然后加入封闭液, 置于4℃封闭过夜;

(3) 将封闭液甩干, 用漂洗液洗涤酶标板, 拍干备用。

3. 根据权利要求1或2所述的能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 漂洗液的pH值为7.4, 1L漂洗液含有以下组分: 5-50mM磷酸二氢钠、5-50mM磷酸氢二钠、0.05wt%-0.5wt%NaCl、体积分数为0.01%-0.2%的吐温-20, 余量为去离子水。

4. 根据权利要求1或2所述的能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 样品稀释液为5-50mM, pH=9.6的碳酸盐缓冲液; 封闭液为含5wt%-25wt%牛血清的20mM, pH=9.0磷酸盐缓冲液; 终止液为1-3M浓硫酸。

5. 根据权利要求1所述的能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 显色液为显色液A和显色液B按体积比为1:1混合的混合液; 其中, 1L显色液A包括0.1-0.25M三水合醋酸钠、0.5-5w/v%柠檬酸、0.1-1ml 30%双氧水, 余量为去离子水; 1L显色液B包括1-10mM乙二胺四乙酸二钠、0.5-5w/v%柠檬酸、0.01-0.1w/v%TMB, 余量为去离子水。

6. 根据权利要求1所述的能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 促甲状腺激素受体抗体标准品通过以下方法制备得到: 将人血清中促甲状腺激素受体经纯化, 使其纯度 $\geq 99\%$ , 然后用样品稀释液将其稀释成浓度为5IU/L、10IU/L、20IU/L、40IU/L、80IU/L、160IU/L, 制得。

7. 采用权利要求1-6任一项所述的酶联免疫试剂盒同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的方法, 其特征在于, 依次包括以下步骤:

(1) 包被: 对预包被酶标板设置标准品孔、空白孔和样品孔, 用样品稀释液将待测样品稀释10倍, 然后加入样品孔内, 不同浓度的标准品加入标准品孔内, 空白孔加等体积的样品稀释液, 然后于37℃孵育30min;

- (2) 洗涤:甩掉酶标板中的液体,用漂洗液洗涤,拍干;
- (3) 加样:加入辣根过氧化物酶标记的促甲状腺激素受体重组抗原,于37℃孵育30min;
- (4) 洗涤:甩掉酶标板中的液体,用漂洗液洗涤,拍干;
- (5) 显色:加入显色液,于37℃孵育15min;
- (6) 终止:加入终止液终止反应,然后在450nm下测定OD<sub>450nm</sub>值,以标准品浓度为横坐标,以OD<sub>450nm</sub>值为纵坐标,绘制标准曲线,根据标准曲线计算出促甲状腺激素受体分型抗体的浓度。

## 能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于酶联免疫检测技术领域,具体涉及一种能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法。

### 背景技术

[0002] 自身免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid disease, AITD) 是一组复杂的器官特异性自身免疫疾病,患者体内存在多种甲状腺特异性抗体,其中以促甲状腺激素受体抗体 (TRAb) 与疾病的发生、发展及愈后疗效有重要的关系。几乎在90%以上的GD患者中均能检出TSAb。TSAb与甲减的发生具有重要的关系,TSAb可抑制TSHR,导致甲状腺功能减退的产生。

[0003] 促甲状腺激素受体 (TSHR) 存在于甲状腺滤泡细胞膜上,在正常情况下,促甲状腺激素受体 (TSHR) 是AITD的主要靶抗原,发生自身免疫时产生促甲状腺激素受体抗体 (TRAb),在自身免疫性甲状腺疾病的患者体内能检测到,被认为参与了AITD及其相关疾病的发生。

[0004] 胫前粘液水肿 (pretibial myxedema, PTM) 是一种与自身免疫性甲状腺疾病相重叠的自身免疫性皮肤病,最常发生在Graves病 (毒性弥漫性甲状腺肿)。现我们研究发现除最轻的结节型可自然消退外,其余的斑块、肿瘤样、弥漫肿胀、混合型和象皮腿均会在反复的活跃与稳定的交替过程中逐渐加重。在PTM疾病中,除透明质酸 (HA) 大量沉积这一显著特征外,有研究报道促甲状腺激素受体TSHR的自身抗体TSAb在患者血液中的浓度显著上升。我们前期已收集并建立了超过1000例的PTM样本资源库,并从中选取具有典型特征的216例PTM患者临床样本开展了初步研究,发现TRAb与PTM的分型、分期、复发等密切相关。

[0005] 在TSHR的膜外区,TSH有广泛的、多个不连续的结合位点。TSHR的膜外区在与TSH结合过程中各个部分都起着作用。研究表明,TSHR中TSAb的结合表位存在于膜外区的N-端,TSAb的结合表位存在于膜外区的C-端。

[0006] 促甲状腺激素受体 (TSHR) 存在于甲状腺滤泡细胞膜上,在生理情况下,促甲状腺激素 (TSH) 与TSHR结合,通过腺苷环化酶-cAMP通路和磷脂酶C-二酰甘油及磷酸肌醇通路调节甲状腺细胞的功能和生长。TRAb是多克隆抗体,依其功能主要包括:(1) 甲状腺刺激抗体 (TSAb) 通过激活腺苷环化酶-cAMP通路过度刺激甲状腺滤泡的功能和生长,可以引起甲状腺功能亢进;(2) 甲状腺刺激阻滞抗体 (TSBAb),其具有阻滞TSH或TSAb对甲状腺的兴奋作用,可以引起甲减。由于TRAb被认为参与了AITD的发病,故有人又将AITD称为“自身免疫性促甲状腺激素受体疾病”。

[0007] Graves病是常见病和多发病,但其发病机理尚不十分清楚。Graves病作为自身免疫性疾病,患者体内存在着针对自身甲状腺滤泡细胞膜上TSHR的TSAb。TSAb与TSHR结合后引起甲状腺滤泡细胞增生和功能增强,被认为是导致Graves病患者发病的主要原因。由于TSHR膜外区是TSH及TSHR自身抗体的主要作用部位,并拥有多个TSH的结合位点、自身抗体

的结合表位、特异的免疫原肽以及两个不同的Graves病致免疫区。因此TSHR膜外区的基因突变,导致TSHR初始结构的改变,是否可作为抗原引起TSAb的产生进而导致Graves病被怀疑参与了Graves病的发病机制,故对TSHR膜外区基因突变的研究在了解Graves病等AITD发病的分子机理上十分重要。

[0008] 目前国内临床用于检测抗TSHR抗体主要为TRAb抗体检测试剂盒,尚无促甲状腺激素受体抗体分型(TSAb和TBAb)定量检测试剂盒。因此,临床上尚无有批文的诊断TSAb和TBAb的试剂盒可用。

## 发明内容

[0009] 针对现有技术中的上述不足,本发明提供了一种能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法,该试剂盒灵敏度高、特异性好、操作简单,可用于定量检测促甲状腺激素受体分型抗体的浓度。

[0010] 为实现上述目的,本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0011] 能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒,包括:包被抗原、预包被酶标板、漂洗液、促甲状腺激素受体抗体标准品、酶标液、样品稀释液、漂洗液、封闭液、显色液和终止液;

[0012] 其中,包被抗原为促甲状腺激素受体重组抗原,通过以下方法制备得到:

[0013] (1) 将TSHR片段通过PCR扩增后连接到PMD19-T上,再转入大肠杆菌中,于37℃培养过夜;

[0014] (2) 提取克隆质粒,酶切,然后连接到pet-32a表达质粒上,最后转入感受态细胞中,通过IPTG诱导,于37℃进行蛋白表达;

[0015] (3) 加入裂解液,在4℃进行超声,裂解包涵体后离心,取上清,用Ni离子亲和柱纯化,获得高纯度重组蛋白;

[0016] (4) 梯度透析复性,浓缩,获取纯度高于90%的重组蛋白,制得;

[0017] 酶标液为辣根过氧化物酶标记的促甲状腺激素受体重组抗原。

[0018] 进一步地,预包被酶标板通过以下方法制备得到:

[0019] (1) 用样品稀释液将促甲状腺激素受体重组抗原稀释至50-150ng/0.1ml,然后加入酶标孔内,于37℃,孵育2h;

[0020] (2) 甩掉酶标板中的液体,用漂洗液洗涤酶标板,拍干,然后加入封闭液,置于4℃封闭过夜;

[0021] (3) 将封闭液甩干,用漂洗液洗涤酶标板,拍干备用。

[0022] 进一步地,漂洗液的pH值为7.4,1L漂洗液含有以下组分:5-50mM磷酸二氢钠、5-50mM磷酸氢二钠、0.05wt%-0.5wt%NaCl、体积分数为0.01%-0.2%的吐温-20,余量为去离子水。

[0023] 进一步地,样品稀释液为5-50mM,pH=9.6的碳酸盐缓冲液;封闭液为含5wt%-25wt%牛血清的20mM,pH=9.0磷酸盐缓冲液;终止液为1-3M浓硫酸。

[0024] 进一步地,显色液为显色液A和显色液B按体积比为1:1混合的混合液;其中,1L显色液A包括0.1-0.25M三水合醋酸钠、0.5-5w/v%柠檬酸、0.1-1ml 30%双氧水,余量为去离子水;1L显色液B包括1-10mM乙二胺四乙酸二钠、0.5-5w/v%柠檬酸、0.01-0.1w/v%TMB,余

量为去离子水。

[0025] 进一步地,促甲状腺激素受体抗体标准品通过以下方法制备得到:将人血清中促甲状腺激素受体经纯化,使其纯度 $\geq 99\%$ ,然后用样品稀释液将其稀释成浓度为5IU/L、10IU/L、20IU/L、40IU/L、80IU/L、160IU/L,制得。

[0026] 采用上述的酶联免疫试剂盒同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的方法,依次包括以下步骤:

[0027] (1) 包被:对预包被酶标板设置标准品孔、空白孔和样品孔,用样品稀释液将待测样品稀释10倍,然后加入样品孔内,不同浓度的标准品加入标准品孔内,空白孔加等体积的样品稀释液,然后于37℃孵育30min;

[0028] (2) 洗涤:甩掉酶标板中的液体,用漂洗液洗涤,拍干;

[0029] (3) 加样:加入辣根过氧化物酶标记的促甲状腺激素受体重组抗原,于37℃孵育30min;

[0030] (4) 洗涤:甩掉酶标板中的液体,用漂洗液洗涤,拍干;

[0031] (5) 显色:加入显色液,于37℃孵育15min;

[0032] (6) 终止:加入终止液终止反应,然后在450nm下测定OD<sub>450nm</sub>值,以标准品浓度为横坐标,以OD<sub>450nm</sub>值为纵坐标,绘制标准曲线,根据标准曲线计算出促甲状腺激素受体分型抗体的浓度。

[0033] 能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法,具有以下有益效果:

[0034] (1) 本发明提供的试剂盒能够定量检测促甲状腺激素受体分型抗体(TSAb和TBAb),针对不同的甲状腺疾病的发生,发展以及愈后疗效具有指导性意义。

[0035] (2) 本发明试剂盒采用精准定量,通过抗原亲和层析技术进行促甲状腺激素受体抗体进行分型纯化,获得纯度 $\geq 99\%$ 的分型抗体纯品作为标准品,绘制精确的标准曲线,可以做到精确定量待测样本中的抗体浓度。

[0036] (3) 本试剂盒操作简单,定量精准度高,特异性良好,对于AITD特别是GD、桥本氏甲状腺炎以及胫前粘液水肿等疾病诊断及治疗效果的评价具有重要的意义,检测结果具有重要的临床参考价值,且价格低廉,便于临床大范围推广,为临床医师诊断疾病提供精准参考。

## 具体实施方式

[0037] 实施例1

[0038] 能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒,包括:包被抗原、预包被酶标板、漂洗液、促甲状腺激素受体抗体标准品、酶标液、样品稀释液、封闭液、显色液和终止液。

[0039] 其中,样品稀释液为5-50mM, pH=9.6的碳酸盐缓冲液;封闭液为含5wt%-25wt%牛血清的20mM, pH=9.0磷酸盐缓冲液;酶标液为辣根过氧化物酶标记的促甲状腺激素受体重组抗原;终止液为1-3M浓硫酸。

[0040] 显色液为显色液A和显色液B按体积比为1:1混合的混合液;其中,1L显色液A包括0.1-0.25M三水合醋酸钠、0.5-5w/v (g/L) %柠檬酸、0.1-1ml 30%双氧水,余量为去离子

水;1L显色液B包括1-10mM乙二醇四乙酸二钠、0.5-5w/v (g/L) %柠檬酸、0.01-0.1w/v (g/L) %TMB,余量为去离子水。

[0041] 漂洗液(1L)含有以下组分:5-50mM磷酸二氢钠、5-50mM磷酸氢二钠、0.05wt%-0.5wt%NaCl、0.01%-0.2%吐温-20(v/v),余量为去离子水,该漂洗液的pH值为7.4。

[0042] 本发明提供的试剂盒的工作原理为:采用原核重组的TSHR片段在37℃条件下孵育2h,分别包被96孔酶标板,采用含5wt%-25wt%牛血清的封闭液在4℃封闭过夜,然后用漂洗液清洗5次,拍干待用;在检测过程中,将待测样品用样品稀释液按照10倍比例稀释,加100ul待测样本于37℃条件下孵育30min,漂洗5次拍干;加入100ul酶标抗原37℃孵育30min,漂洗5次拍干;加入100ul显色液于37℃孵育15min后加入50ul终止液,放入酶标仪在450nm条件下测定A值,通过标准曲线确定待测样本中对应抗体的浓度,具体过程如下:

[0043] 包被抗原为促甲状腺激素受体重组抗原,其制备过程为:

[0044] (1) 将TSHR的片段通过PCR扩增后连接到PMD19-T上,然后再转入大肠杆菌DH5a中,于37℃培养过夜;

[0045] (2) 提取克隆质粒后进行酶切,然后连接到pet-32a表达质粒上后转入BL21(DE3)中,通过IPTG诱导,于37℃进行蛋白表达;

[0046] (3) 加入裂解液,在4℃进行超声,裂解包涵体后离心,取上清,用Ni离子亲和柱纯化,获得高纯度重组蛋白;

[0047] (4) 梯度透析复性,浓缩,获取纯度高于90%的重组蛋白作为包被抗原待用。

[0048] 预包被酶标板的制备过程如下:

[0049] (1) 用样品稀释液将促甲状腺激素受体重组抗原稀释至50-150ng/0.1ml,然后加入酶标板的酶标孔内,每孔加入量为100μl,于37℃,孵育2h;

[0050] (2) 甩掉酶标板中的液体,用漂洗液洗涤酶标板5次,拍干,然后加入封闭液300μl,置于4℃封闭过夜;

[0051] (3) 将封闭液甩干,用漂洗液洗涤酶标板5次,拍干备用。

[0052] 促甲状腺激素受体抗体标准品通过以下方法制备得到:将人血清中促甲状腺激素受体经免疫亲和层析技术纯化,使其纯度≥99%,然后用样品稀释液将其稀释成浓度为5IU/L、10IU/L、20IU/L、40IU/L、80IU/L、160IU/L,制得。

[0053] 标准曲线的建立:取AITD病人血清,通过TSHR膜外区片段重组蛋白进行亲和层析,获得高纯度的TSAb和TBAb标准品,然后用样品稀释液将标准品稀释到浓度为5IU/L、10IU/L、20IU/L、40IU/L、80IU/L、160IU/L,以标准品浓度为横坐标,在450nm吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

[0054] 采用上述酶联免疫试剂盒同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的方法,依次包括以下步骤:

[0055] (1) 包被:对预包被酶标板设置标准品孔、空白孔和样品孔,用样品稀释液将待测样品稀释10倍,然后加入样品孔内,不同浓度的标准品加入标准品孔内,每孔加入量为100μl,空白孔加等体积的稀释液,然后于37℃孵育30min;

[0056] (2) 洗涤:甩掉酶标板中的液体,每孔用300μl漂洗液洗涤5次,拍干;

[0057] (3) 加样:每孔加入辣根过氧化物酶标记的促甲状腺激素受体重组抗原100ul,于37℃孵育30min;

[0058] (4) 洗涤:甩掉酶标板中的液体,每孔用300 $\mu$ l漂洗液洗涤5次,拍干;

[0059] (5) 显色:每孔分别加入100 $\mu$ l显色液,于37 $^{\circ}$ C孵育15min;

[0060] (6) 终止:每孔加入50 $\mu$ l终止液终止反应,然后在450nm下测定OD<sub>450nm</sub>值,根据标准曲线计算出待测样品中促甲状腺激素受体刺激性抗体和促甲状腺激素受体抑制性抗体的浓度值。

[0061] 上述试剂盒性能检测:

[0062] (1) 灵敏度:根据上述检测方法,反复进行次数大于20次的检测,可得出该试剂盒的灵敏度为0.6IU/L。

[0063] (2) 特异性:通过抗体标准品与预包被酶标板进行交叉检测,同时与TPO-Ab的阳性血清进行检测,并无显色,结果显示无交叉反应,表明此试剂盒特异性良好。

[0064] (3) 精密度:

[0065] 批内差异:一次试验中用同一批试剂反复检测同一样品,检测10次,计算批内差异分别为3.86%和4.25%。

[0066] 批间差异:一次试验中用不同批次试剂反复检测同一样品,检测10次,计算批间差异分别为8.22%和9.25%。

[0067] 通过检测批内差异和批间差异可知,该试剂盒精密度高。

[0068] (4) 准确度:采用3份阴性血清为基质,确定其终浓度为30IU/L,45IU/L,65IU/L,将其与对应的抗体标准品分别在预包被酶标板中进行检测,所测得抗体浓度分别为29.8IU/L,44.8IU/L,65.2IU/L,说明该试剂盒准确度高。

[0069] (5) 稳定性:通过4 $^{\circ}$ C,常温,37 $^{\circ}$ C保存预包被酶标板,采用3份阴性血清和3份阳性血清对不同保存温度的酶标板进行检测,检测差异率(CV%)小于10%的最长保存时间为试剂盒的保质期,其在4 $^{\circ}$ C可保存一年,不会发生明显变化,说明其稳定性好。



专利名称(译)	能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108761085A</a>	公开(公告)日	2018-11-06
申请号	CN201810506744.9	申请日	2018-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	成都医学院		
申请(专利权)人(译)	成都医学院		
当前申请(专利权)人(译)	成都医学院		
[标]发明人	兰长贵 张涛 潘克俭 李玉璞 史育红		
发明人	兰长贵 张涛 潘克俭 李玉璞 史育红		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/535 G01N2800/046		
代理人(译)	何凡		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种能同时检测促甲状腺激素受体分型抗体的酶联免疫试剂盒及检测方法，该试剂盒包括：包被抗原、预包被酶标板、漂洗液、促甲状腺激素受体抗体标准品、酶标液、样品稀释液、漂洗液、封闭液、显色液和终止液。检测方法包括：包被、洗涤、加样、洗涤、显色和终止。该试剂盒灵敏度高、特异性好、操作简单，可用于定量检测促甲状腺激素受体分型抗体的浓度。采用该试剂盒及检测方法检测的结果具有重要的临床参考价值，且试剂盒价格低廉，便于临床大范围推广，为临床医师诊断疾病提供精准参考。