



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645689 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611018792.0

(22)申请日 2016.11.21

(66)本国优先权数据

201620676832.X 2016.06.30 CN

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区南山街  
道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 祝亮 周羽 王刚 刘湘丽  
阮秋莲

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫  
测定试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种促甲状腺激素受体抗体  
化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括:促  
甲状腺激素受体包被的磁微粒、鼠抗人IgG抗体  
包被的吖啶酯、促甲状腺激素受体抗体定标品、  
预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种促  
甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒  
的制备方法。本发明所述试剂盒与现有试剂盒相  
比操作简便,灵敏度高等特点。

1. 一种促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括:促甲状腺激素受体包被的纳米磁微粒、化学发光标记物、化学发光底物液、促甲状腺激素受体抗体定标品。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述促甲状腺激素受体包被的固相载体为磁微粒。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述促甲状腺激素受体包被的固相载体为甲苯磺酰基磁珠,粒径为 $0.05-1\mu\text{m}$ 磁微粒。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为吖啶酯、吖啶酯磺酰胺、吖啶酯甲苯磺酰胺、吖啶酯对甲基磺酰胺、吖啶酯三氟甲基磺酰胺。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物优选吖啶酯。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包括化学发光激发液、化学发光预激发液。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光预激发液为质量分数 $0.005\% \sim 0.5\%$ 的双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ )溶液,激发液为 $0.005\text{mol/L} \sim 0.025\text{mol/L}$ 的氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )溶液。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述促甲状腺激素受体抗体定标品为用标准品缓冲液将促甲状腺激素受体抗体配制成浓度为 $0.03 \text{ IU/L}$ 、 $4.1 \text{ IU/L}$ 、 $10.75 \text{ IU/L}$ 、 $24.5 \text{ IU/L}$ 、 $30.55 \text{ IU/L}$ 、 $38.56 \text{ IU/L}$ , $4^\circ\text{C}$ 保存备用。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括促甲状腺激素受体包被的磁微粒的制备、鼠抗人 $1\text{gG}$ 抗体标记的吖啶酯的制备、化学发光底物液的制备、促甲状腺激素受体抗体定标品的制备。

10. 根据权利要求1和权利要求9所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 促甲状腺激素受体包被的磁微粒的制备:

取甲苯磺酰基纳米磁珠悬浮液,磁分离去上清, MES缓冲液重悬,加入EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入促甲状腺激素受体,室温下混悬 $2-10\text{h}$ ,磁分离,去除上清, Tris缓冲液重悬,得到促甲状腺激素受体包被的磁微粒;可选的,甲苯磺酰基纳米磁珠直径为 $0.1\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$ ;MES缓冲液浓度为 $10\text{mM} \sim 100\text{mM}$ , $\text{pH} 5.5 \sim 8.5$ ;

2) 鼠抗人 $1\text{gG}$ 抗体标记的吖啶酯的制备:

取鼠抗人 $1\text{gG}$ 抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吖啶酯混匀,室温下避光反应, $1-2\text{h}$ 后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人 $1\text{gG}$ 抗体标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人 $1\text{gG}$ 抗体标记的吖啶酯;

3) 促甲状腺激素受体抗体定标品的制备:

用标准品缓冲液将促甲状腺激素受体抗体配置成浓度为 $0.03 \text{ IU/L}$ 、 $4.1 \text{ IU/L}$ 、 $10.75 \text{ IU/L}$ 、 $24.5 \text{ IU/L}$ 、 $30.55 \text{ IU/L}$ 、 $38.56 \text{ IU/L}$ , $4^\circ\text{C}$ 保存备用;

4) 化学发光预激发液的制备:

量取 $1.0$ 升纯化水,依次加入 $0.5 \sim 100\mu\text{L}$ 质量分数为 $20\%$ 的双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、 $0.5 \sim 5$ 克防腐剂、 $0.5 \sim 5$ 克表面活性剂,摇匀后避光存放;可选的,防腐剂为商品化叠氮化钠、PC300,表面活性剂为吐温20、吐温80、Triton X-100、Triton X-405;

5) 化学发光激发液的制备:

量取1.0升纯化水,依次加入0.2~1克氢氧化钠、0.5~5克防腐剂、0.5~5克表面活性剂,摇匀后避光存放;可选的,防腐剂为商品化叠氮化钠、PC300,表面活性剂为吐温20、吐温80、Triton X-100、Triton X-405。

## 一种促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断免疫测定领域,具体地,本发明提供了一种化学发光免疫测定促甲状腺激素受体抗体试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 自身免疫性甲状腺病(autoimmune thyroid disease,AITD)是一组发病机制复杂的器官特异性自身免疫疾病,包括Graves病(Graves' disease,GD)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis,HT)等。人促甲状腺激素受体(hTSHR)是AITD的主要靶抗原,在AITD的发病中起重要作用。hTSHR是存在人甲状腺滤泡上皮细胞(TEC)膜上的一种糖蛋白,它与促甲状腺素(TSH)结合后,调节TEC的生长、分化及其合成和释放甲状腺激素的功能。在环境和遗传因素基础上,机体免疫功能异常变化导致AITD,hTSHR是AITD的主要自身抗原之一,刺激机体产生促甲状腺素受体抗体(TRAb),该自身抗体属于异质性抗体,包括甲状腺阻断性抗体(TSBAb)和甲状腺刺激性抗体(TSAb),前者与TSHR特异位点结合而阻止TSH与TSHR的结合及其生理作用的发挥,导致甲状腺萎缩和功能下降,表现为甲状腺功能减退(甲减),多见于HT的后期;后者模拟TSH功能,长期持续地刺激甲状腺激素合成释放而导致GD,表现为甲状腺功能亢进。

[0003] 目前临床测定促甲状腺激素受体抗体的常见方法有酶联免疫吸附法、放射免疫分析法、酶促化学发光法,但这些方法都存在着一些不足之处。

#### [0004] 一、酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)被广泛应用,但该方法也存在着下述的不足之处:

(1) 使用12×8型、6×8型、8×12型或整板型96孔专用微孔板作为抗原包被用具和反应容器,在使用时只能分成12批次、6批次、8批次或整板一次使用,无法进行独立的、单人份的测定;

(2) 定量测定所用的试剂种类较多,每一种测定试剂都要用试剂瓶来盛装,并且每使用一种试剂时都需要更换吸液嘴来分别加注到微孔板的微孔中,不但试剂瓶种类多,加注试剂的操作也极为繁琐;

(3) 缺少对测定信息的相应标注,只能通过查看试剂盒外包装盒的标识才能了解或知悉测定试剂的生产批号及有效期信息,而且所知悉的信息在测定过程中不受控,具有很大的随意性;

(4) 测定试剂在测定过程中处于开放的空间,容易引起各种试剂之间的交叉污染而影响测定结果的准确性;

(5) 测定过程多采用手工操作,试剂或样本的加量不很精确,操作过程极为繁琐和复杂,容易发生操作差错,测定结果的准确度和精密度较差;

(6) 在测定项目成套试剂的数量配置及使用上均为项目数×48/96人份,如果需要测定10个项目,则试剂的配置及使用数须为10×48/96人份,如果只有一份样本需要测定10个

不同的项目,也需要配置10×48/96人份的试剂,存在着不够经济合理的缺点。

#### [0005] 二、放射免疫分析法

放射免疫分析方法放射性污染大、加样步骤繁琐、操作复杂、操作时间长、测定结果不稳定、试剂保存时间短、试剂盒操作自动化程度低、配套仪器价格昂贵等不足之处。

#### [0006] 三、化学发光法

化学发光法按发光原理可分为直接化学发光和酶促化学发光。

[0007] 酶促化学发光主要有辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶两种,但都有一定的局限性,辣根过氧化物酶主要缺点为:鲁米诺在没有辣根过氧化物酶存在情况下,也会被 $H_2O_2$ 氧化自身发光,本底相对较高,影响信噪比,反应动力学复杂,影响因素多,结果不够稳定,要得到灵敏度高且平台期长的底物不容易。碱性磷酸酶主要缺点为:底物达到平台期的时间长,底物成本高,导致测定成本高,患者负担重。

[0008] 吡啶酯作为标记物的直接化学发光相比酶促化学发光具有明显优势,主要表现在:反应不需要催化剂,只要碱性环境即可进行,反应迅速,背景发光低,信噪比高,干扰因素少,试剂稳定性好,可以两点定标,体系简单,激发液成本低,吡啶酯易与蛋白质联结,且联结后光子产率不减少。

### 发明内容

[0009] 目前促甲状腺激素受体抗体测定技术存在以下缺点:测定成本高、测定灵敏度低、测定线性范围窄、重现性低、不能定量、操作复杂等。

[0010] 本发明正是为了克服以上所述缺点,公开了一种测定成本低、灵敏度高、重现性高、可以定量、操作简单的促甲状腺激素受体抗体试剂盒及其制备方法。本发明首先制备化学发光免疫分析试剂盒,主要包括:促甲状腺激素受体包被的磁颗粒、促鼠抗人IgG抗体包被的吡啶酯以及促甲状腺激素受体抗体定标品;然后利用全自动化学发光免疫分析仪对定标品进行测定,绘制标准曲线,内置于电脑软件,测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度;最后对促甲状腺激素受体抗体全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、精密度、干扰性)的评价。

[0011] 本发明与目前技术相比,具有以下优点:

1、本发明选择吡啶酯作为标记材料,并应用于化学发光免疫分析系统,该发光体系为直接化学发光,与传统的酶促化学发光相比,该反应不需要酶的参与,更加节约成本;

2、本发明选用的吡啶酯化学发光免疫分析系统测定灵敏度高,能够达到0.31U/L,相比其它的促甲状腺激素受体抗体测定方法灵敏度至少提高了6倍;

3、本发明选用的吡啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

4、本发明的化学发光免疫分析系统已实现样本的定量,通过内置标准曲线到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的浓度值;

5、本发明的化学发光免疫分析系统已实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

[0012]

## 附图说明

[0013] 图1为实施例3得到的促甲状腺激素受体抗体标准曲线图。

## 具体实施方式

[0014] 实施例1:促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒制备方法

(1) 促甲状腺激素受体包被的纳米磁珠制备:

取50mg羧基化的磁微粒(粒径为0.05-1 $\mu$ m)悬浮液,磁分离去上清,用0.02 M, pH为5.5 MES缓冲液重悬,加入0.5-2mL新配置的10mg/mL的EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入3-5 mg 促甲状腺激素受体,室温下混悬2-10h,磁分离,去除上清,用含2% BSA 的0.1M pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到促甲状腺激素受体包被的磁颗粒,每瓶5mL分装保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0015] (2) 鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯的制备:

取50 $\mu$ L 25mg/mL的鼠抗人IgG抗体,加入150 $\mu$ L 0.1-0.2 M pH 9.0-9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入1-2 $\mu$ L 5mg/mL的吖啶酯混匀,室温下避光反应,1-2h后取出,用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯,每瓶5 mL分装保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0016] (3) 促甲状腺激素受体抗体定标品的制备:

用标准品缓冲液(40 mM Tris-HCl, 0.5% BSA, 1% NaCl, pH 8.0)将促甲状腺激素受体抗体配置成浓度为0.03IU/L、4.11IU/L、10.75IU/L、24.51IU/L、30.55IU/L、38.56IU/L,每瓶0.5mL分装冻干,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0017] (4) 化学发光预激发液的配制:

量取1.0升纯化水,依次加入80 $\mu$ L质量分数为20%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、1.0克叠氮化钠、1.5克吐温20,摇匀后避光存放。

[0018] (5) 化学发光激发液的配制:

量取1.0升纯化水,依次加入0.6克氢氧化钠、0.5克PC300、0.5g叠氮化钠、1.5克Triton X-405,摇匀后避光存放。

[0019] 实施例2:促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定方法:

本发明以全自动化学发光免疫分析仪为测定工具,本发明的方法学模式为间接法,即仪器依次加入预稀释后40 $\mu$ L的样品、50 $\mu$ L的促甲状腺激素受体包被的磁颗粒,反应20min后,进行磁分离,加入50 $\mu$ L的鼠抗人IgG抗体标记的吖啶酯,反应20min,再次清洗,依次加入50 $\mu$ L化学发光预激发液、50 $\mu$ L化学发光激发液进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的促甲状腺激素受体抗体含量。

[0020] 实施例3:促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒性能评价

测定曲线见附图1。

[0021] 灵敏度的测定:

参照CLSI EP17-A 文件推荐实验方案,计算促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫分析

试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.31U/L。

[0022] 线性的测定:

对浓度为0.031U/L、7.721U/L、15.411U/L、23.11U/L、30.791U/L、38.481U/L标准品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9992$ ,另外,该试剂盒对促甲状腺激素受体抗体样品测定的线性范围为0.31U/L-401U/L。

[0023] 精密度测定:

取浓度为5.981U/L及31.991U/L两个促甲状腺激素受体抗体样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行测定,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%。

[0024] 干扰性实验:

取混合血清分别添加干扰物包括:血红蛋白、胆红素、甘油三酯、RF干扰分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值,计算二者之间的偏差,以 $\pm 10\%$ 为可接受范围。结果表明,干扰性均达到NCCLS有关标准的文件,可用于促甲状腺激素受体抗体状况的准确评估。

[0025] 实施例4:促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒的灵敏度对比实验分别用化学发光测定方法和传统的酶联免疫吸附法对浓度为01U/L的校准品或样本稀释液进行测定,重复测定20次,得出20次测量结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出 $M+2SD$ ,将该发光值代入校准曲线计算得到相应的浓度值。采用化学发光测定方法得到的浓度值为0.31U/L,相对于传统的酶联免疫吸附法最低检测限2 1U/L,提高了约6倍。

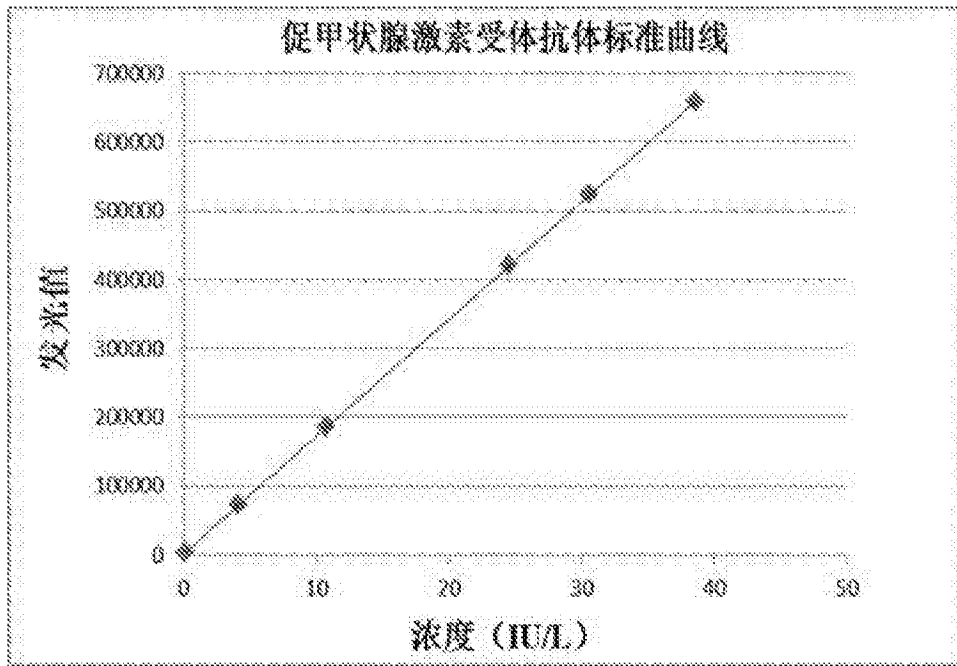


图1

专利名称(译)	一种促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106645689A</a>	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611018792.0	申请日	2016-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	祝亮 周羽 王刚 刘湘丽 阮秋莲		
发明人	祝亮 周羽 王刚 刘湘丽 阮秋莲		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/54326		
优先权	201620676832.X 2016-06-30 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒，所述试剂盒包括：促甲状腺激素受体包被的磁微粒、鼠抗人IgG抗体包被的吖啶酯、促甲状腺激素受体抗体定标品、预激发液、激发液。另外本发明还公开了一种促甲状腺激素受体抗体化学发光免疫测定试剂盒的制备方法。本发明所述试剂盒与现有试剂盒相比操作简便，灵敏度高等特点。

