



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107402300 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201710650822.8

(22)申请日 2017.08.02

(71)申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路20号

(72)发明人 邹贤 朱利国 程晓青 范俊
朱国华 戴军 包建东 高芸
王国瑞 孙志强 李秀龙 周彬
曹亚琴 杨克勤

(74)专利代理机构 常州佰业腾飞专利代理事务
所(普通合伙) 32231

代理人 刘娟娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种快速鉴别人甲状旁腺的方法

(57)摘要

本发明公开一种快速鉴别人甲状旁腺的方法,其以甲状旁腺激素(PTH)荧光免疫层析试纸测定待测液中PTH含量的方式实现,该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人PTH,所述抗体是利用特定的抗原表位肽制备获得。本发明能够准确地检测待测物中的人PTH,操作简便、快速,检测范围宽、特异性高、灵敏度好。



1. 一种快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将离体疑似甲状旁腺组织用注射器针头细针穿刺取样,取样后针头后方连接注射器;

2) 取含PBS缓冲液的溶液管,平衡至室温,将细针穿刺后的注射器伸入缓冲液中,通过抽吸方式充分洗涤混匀,制成待测样品;

3) 在人甲状旁腺激素(PTH)荧光免疫层析试纸的加样区加入上述待测样品,于孵化器中薄膜层析反应;

4) 将反应后的荧光免疫层析试纸及校准卡插入便携式荧光免疫定量分析仪的插卡口,运行仪器,仪器自动读卡给出荧光免疫层析试纸中的质控带C值和检测带T值;

5) 当 $C < 10000$ 时,表示结果为无效检测,需要重新更换试纸检测;

当 $T/C \geq 0.2$ 时,结果为阳性,表明穿刺物为甲状旁腺组织;

当 $T/C < 0.2$ 时,结果为阴性,表明穿刺物非甲状旁腺组织。

2. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,步骤1)中的穿刺次数为3次,注射器针头为26-gauge,注射器体积为1ml。

3. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,步骤2)中溶液管中PBS缓冲液体积为 $200\mu\text{l}$,步骤3)加入待测样品的体积为 $60\mu\text{l}$ 。

4. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述荧光免疫层析试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人PTH,其中:

所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体作为检测抗体,所述第一PTH单克隆抗体利用人PTH抗原表位肽(1)和(2)中的一个作为抗原制备获得;并且

所述双抗体夹心法采用第二PTH单克隆抗体作为捕获抗体,所述第二单克隆抗体利用人PTH抗原表位肽(1)和(2)中的另一个作为抗原制备获得;

所述人PTH抗原表位肽(1)和(2)分别为:

(1): ERVEWLRKKLQ (SEQ ID NO:2)

(2): RKKEDNVLVESHEKSLGEAD (SEQ ID NO:3)。

5. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述单克隆抗体是由PTH抗原表位肽与载体蛋白偶联制备而成的抗原制备而得。

6. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述荧光微球上的荧光物质为稀土离子铕。

7. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述荧光微球的微球材料为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚物。

8. 根据权利要求1所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述试纸具有底板(1),并且在底板(1)上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有:样品垫(4)、结合垫(5)、硝酸纤维素膜(2)、吸水纸(3),所述结合垫(5)设置有所述标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜(2)包括检测带(7)和质控带(6),所述检测带(7)固定有所述第二PTH单克隆抗体,所述质控带(6)包被有能与所述标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体特异性结合的抗体。

9. 根据权利要求8所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述底板(1)不具有荧光性质。

10. 根据权利要求8所述的快速鉴别人甲状旁腺的方法,其特征在于,所述抗体为羊抗鼠IgG多克隆抗体或兔抗鼠IgG多克隆抗体。

一种快速鉴别人甲状旁腺的方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,具体涉及一种快速鉴别人甲状旁腺的方法。

背景技术

[0002] 甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,也是近年来发病率增长速度最快的恶性肿瘤之一,甲状腺癌已经成为女性第五大常见恶性肿瘤。甲状腺癌的治疗主要以外科手术治疗为主,行甲状腺全切术后应尽快确定甲状旁腺功能情况,采取针对性措施进行防治甲状旁腺功能减退。手术时如果意外切除了甲状旁腺,患者的血钙浓度会明显降低,引发手足抽搐,甚至危及生命。文献报道甲状腺术后暂时性低钙血症的发生率为0.3~86%,永久性的低钙血症为0~13%。

[0003] PTH是由甲状旁腺主细胞分泌,具有调节和保持血清钙在正常水平的作用。如何在手术过程中有效避免损伤甲状旁腺是一大难题。甲状旁腺术中保护技术包括甲状旁腺的识别、精细化甲状旁腺保护操作技术、补救性甲状旁腺自体移植技术三方面。甲状旁腺的识别是术中甲状旁腺保护最关键的一步。由于甲状旁腺体积小,其周围有甲状腺、脂肪、淋巴结、胸腺、肌肉等组织,在术中辨认存在困难。即使有经验的外科医生肉眼识别的准确率也只有近70%,甲状腺术中存在高达9~19%的甲状旁腺意外切除率。

[0004] 目前冰冻病理仍是鉴别甲状旁腺的金标准。但这需要切除部分甲状旁腺组织,术中等待时间长,费用贵,还存在1.3%错误率,细针穿刺组织洗脱液的甲状旁腺激素(PTH)检测,用于术前和术中鉴别甲状旁腺的方法,已有文献报道。多项研究表明甲状旁腺穿刺组织洗脱液的PTH值明显高于非甲状旁腺组织,通过细针穿刺组织洗脱液的PTH检测在术中鉴别甲状旁腺组织,操作简单,敏感性和特异性高,并十分安全。目前PTH的检测一般是通过电化学发光进行,需大型的检测设备,检测时间加上运送时间需半小时以上,如此推广应用有难度。

[0005] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维素层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测带),通过酶反应或直接运用可目测的标记物(如胶体金)而得到直观的实验结果(如显示出不同的颜色)。而游离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪标记粒子有胶体金,乳胶,胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但是,胶体金免疫层析试纸条存在以下缺陷:

[0006] (1) 胶体金标记过程是静电吸附过程,是一种物理吸附,故在液相中稳定性较差,往往造成已标记上的蛋白分子又再次脱落。

[0007] (2) 检测结果通过显示单一的紫红色条带来判断,颜色单一,难以实现多检和联检。

[0008] (3) 只有当金颗粒集聚到一定量时,人肉眼才能观察到紫红的条带,且该颜色条带

与背景对比度不大,从而限制了检测灵敏度。

[0009] (4) 不同的材料基质效应明显,背景干扰非常大。

[0010] (5) 检测灵敏度较低。

[0011] (6) 无法实现定量检测。

[0012] 目前也出现了利用量子点标记快速免疫层析试纸条的检测方法,但是此方法并不能实现对检测物的定量检测。

[0013] 此外,在检测PTH水平的免疫测定方法中,尚缺乏能够在双抗体夹心测定中可高灵敏、高特异性检测的组合,寻找更为合适的具有免疫原性的PTH抗原表位肽、制备特异性的PTH抗原及抗体也是需要解决的重点。

发明内容

[0014] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术存在的上述不足,提供一种高灵敏度和高特异性,批内、批间误差小、操作简单、成本低的快速鉴别甲状旁腺的方法。

[0015] 具体地,提供一种快速鉴别甲状旁腺的方法,其包括以下步骤:

[0016] 1) 将离体疑似甲状旁腺组织用注射器针头细针穿刺取样,取样后针头后方连接注射器;

[0017] 2) 取含PBS缓冲液的溶液管,平衡至室温,将细针穿刺后的注射器伸入缓冲液中,通过抽吸方式充分洗涤混匀,制成待测样品;

[0018] 3) 在人甲状旁腺激素 (PTH) 荧光免疫层析试纸的加样区加入上述待测样品,于孵化器中薄膜层析反应;

[0019] 4) 将反应后的荧光免疫层析试纸及校准卡插入便携式荧光免疫定量分析仪的插卡口,运行仪器,仪器自动读卡给出荧光免疫层析试纸中的质控带C值和检测带T值;

[0020] 5) 当 $C < 10000$ 时,表示结果为无效检测,需要重新更换试纸检测;

[0021] 当 $T/C \geq 0.2$ 时,结果为阳性,表明穿刺物为甲状旁腺组织;

[0022] 当 $T/C < 0.2$ 时,结果为阴性,表明穿刺物非甲状旁腺组织。

[0023] 优选地,步骤1) 中的穿刺次数为3次,注射器针头为26-gauge,注射器体积为1ml。

[0024] 优选地,步骤2) 中溶液管中PBS缓冲液体积为 $200\mu\text{l}$,步骤3) 加入待测样品的体积为 $60\mu\text{l}$ 。

[0025] 优选地,所述荧光免疫层析试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人PTH,其中:

[0026] 所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体作为检测抗体,所述第一PTH单克隆抗体利用人PTH抗原表位肽(1)和(2)中的一个作为抗原制备获得;并且

[0027] 所述双抗体夹心法采用第二PTH单克隆抗体作为捕获抗体,所述第二单克隆抗体利用人PTH抗原表位肽(1)和(2)中的另一个作为抗原制备获得;

[0028] 所述人PTH抗原表位肽(1)和(2)分别为:

[0029] (1): ERVEWLRKKLQ (SEQ ID NO:2)

[0030] (2): RKKEDNVLVESHEKSLGEAD (SEQ ID NO:3)。

[0031] 进一步地,所述单克隆抗体是由PTH抗原表位肽与载体蛋白偶联制备而成的抗原制备而得。

[0032] 优选地,所述荧光微球上的荧光物质为稀土离子铈;

[0033] 优选地,所述荧光微球的微球材料为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚物。

[0034] 优选地,所述试纸具有底板,并且在该底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸,所述结合垫设置有所述标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜包括检测带和质控带,所述检测带包被有所述第二PTH单克隆抗体,所述质控带固定有能与所述标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体特异性结合的抗抗体。

[0035] 优选地,所述底板不具有荧光性质。

[0036] 优选地,所述抗抗体为羊抗鼠IgG单克隆抗体或兔抗鼠IgG单克隆抗体。

[0037] 进一步地,本发明还提供一种制备所述荧光免疫层析试纸的方法,其包括以下步骤:

[0038] 1) 提供标记有荧光微球的第一PTH单克隆抗体;

[0039] 2) 提供结合垫,其中在所述结合垫上结合有所述标记荧光微球的第一PTH单克隆抗体;

[0040] 3) 提供硝酸纤维素膜,其中在所述硝酸纤维素膜上沿使用时的层析方向间隔固定第二PTH单克隆抗体和抗抗体,以分别形成检测带和质控带;

[0041] 4) 在底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素膜、吸水纸,从而制成所述荧光免疫层析试纸。

[0042] 所述步骤1) 包括:

[0043] 使用pH7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤荧光微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应一定时间,洗涤荧光微球,用0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入标记抗体,室温反应2小时,加入含有10%BSA的0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤荧光微球,用含有1%BSA,0.1%Tween-20,0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶至原体积,定量喷涂于结合垫上,避光35-38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用。

[0044] 在所述步骤3) 中,所述检测带和质控带间隔3mm至8mm,所述第二PTH单克隆抗体和所述抗抗体的包被浓度分别为0.5~2mg/ml。

[0045] 本发明与现有技术相比具有以下积极效果:

[0046] (1) 目前对于PTH的检测需将检测样本送到相应单位的实验室,在检验仪器中耗时15-20分钟。本发明的快速鉴别方法采用即时检验,将细针穿刺技术、快速检测技术和便携式仪器分析相结合,整个检测过程时间短,可使手术医生无需离开手术室就能快速完成甲状旁腺的鉴别。

[0047] (2) 本发明的人PTH抗原表位肽具有良好的抗原性,用其制备的抗原免疫动物能够产生高度特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。所述抗体能够高度特异地与样本中的PTH结合。

[0048] (3) 本发明将荧光分析技术与快速层析免疫技术相结合,通过人PTH荧光免疫层析试纸检测待测物中的人PTH,操作简便、快速,在5分钟内快速检测穿刺组织液中的PTH,并且检测范围宽、特异性高、灵敏度好,为外科医生提供快速、准确、并且在手术室就能实现的科

学的甲状旁腺鉴别方法,以便于术中更好的保护甲状旁腺,降低患者术后甲状旁腺功能减退的发生率,缩短住院时间,减少医疗费用。

[0049] (4) 本发明在制备所述人PTH的荧光免疫层析试纸的过程中,通过大量的试验摸索,优化了各方面的制备条件,使得用本发明的荧光免疫层析试纸进行检测时,荧光信背比大大提高,从而提高了检测灵敏度和结果可信度;此外,本发明还通过试纸的检测带与质控带的荧光强度比值的变化来反应样品中PTH的含量,这与传统的层析技术只考查检测带的绝对荧光强度相比,最大程度上减少了外界条件和背景等的影响,进一步提高了检测结果可信度。

[0050] (5) 目前常用的PTH检测方法主要CLIA,CLIA法精确度和灵敏度都比较高,但对仪器设备及操作人员的要求太高,试剂成本也较贵。我们研制的荧光免疫层析试纸条具有较高的灵敏度和特异性,批内、批间误差小,与CLIA法检测所得结果没有显著差异,完全符合临床应用要求,但是操作简单,体积小、便于携带,易于保存。采用该荧光免疫层析试纸条可实现快速、单人份定量检测,更适合临床检验的需要,同时实现检测仪器和试剂的产业化,达到较好的社会效益和经济效益,值得临床推广应用。

附图说明

[0051] 图1为实施例4中荧光免疫层析试纸沿长度方向的剖面示意图;

[0052] 图2为实施例4中荧光免疫层析试纸平面示意图。

[0053] 图中附图标记表示为:1-底板,2-硝酸纤维素膜,3-吸水纸,4-样品垫,5-结合垫,6-质控带,7-检测带。

具体实施方式

[0054] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0055] 实施例1:人PTH抗原表位肽

[0056] 本文中所述的人PTH是本领域已知的,完整的PTH是含有84个氨基酸的单个多肽链构成,分子量约为9500道尔顿。其氨基酸序列是本领域已知的,可以在NCBI等专业数据库中查到,具体序列如下:

[0057] 人类PTH(1-84):

[0058]

```
SVSE1QLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAGSQRPRKKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNV  
LTKAKSQ (SEQ ID NO:1)
```

[0059] 本发明的发明人经过大量的理论研究和实验摸索,最终筛选得到两种具有良好的抗原性的抗原表位肽。

[0060] PTH抗原表位肽(1)是人PTH多肽的N端第19-29位的一段含11个氨基酸的肽段,从而构成含11个氨基酸的抗原表位肽(1):ERVEWLRKKLQ (SEQ ID NO:2)

[0061] PTH抗原表位肽(2)包含人PTH C端第52位至第71位的肽段,从而构成含21个氨基酸的抗原表位肽(2):RKKEDNVLVESHEKSLGEAD (SEQ ID NO:3)

[0062] 这两个肽段均具有亲水性、抗原性强并且易于合成的特点。

[0063] 抗原表位肽的制备利用美国ABI431A型多肽自动合成仪,通过固相法合成,并通过多肽序列测定鉴定所合成的抗原表位肽序列。肽段的纯度可用薄层色谱和高效液相色谱进行评定,并测定抗原表位肽的浓度。

[0064] 实施例2:PTH抗体的制备

[0065] 分别将实施例1所得的PTH抗原表位肽(1)和(2)与载体蛋白连接以制备免疫用抗原(1)和(2),利用所得抗原(1)和(2)分别免疫动物,从而利用抗原(1)制备特异性的单克隆抗体和多克隆抗体,并且利用抗原(2)制备特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。

[0066] 1. 抗原的制备:将PTH肽段分别与载体蛋白BSA连接制备成PTH抗原。取pH6.0 0.01mol/L PBS及二甲基亚砜(DMSO)各0.25mL将5mg BSA溶解,取MBS 1.2mg溶于100血DMSO中。将MBS加入BSA液中室温搅拌30rmin,4℃5000r/min离心留取上液。取PTH(19-29)、PTH(51-71)分别溶于0.01mol/L pH7.2PBS及DMSO共约500μL中。将BSA—MBS分别与各多肽液混合,室温搅拌60min后贮存于-20℃备用。

[0067] 在本实施例中,PBS缓冲液的配方为:0.2mol/L的Na₂HPO₄ 81ml加0.2mol/L的Na₂HPO₄19ml混合而成。

[0068] 2. 免疫动物制备单克隆抗体:

[0069] 2.1. 取上述制备的PTH抗原(免疫原)分别与等体积的弗氏完全佐剂(购自上海源聚生物公司)充分混合后,免疫Balb/c小鼠,50μg抗原/只,皮下多点注射。4周后测血清效价,选择免疫反应性好的小鼠再加强免疫:取抗原与等体积的弗氏不完全佐剂充分混合后,抗原剂量25μg/只,皮下多点注射,加强免疫的次数为6次,融合前连续加强免疫两次,之后取脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞按常规方法用50%PEG(MW4000)介导进行融合,并培养。融合后放入CO₂培养箱中37℃培养10天后,孔内出现较大的细胞克隆。用间接ELISA进行筛选,对初筛阳性的孔利用有限稀释法进行4次克隆化培养(即使筛选后的细胞大量分裂繁殖),之后扩增细胞、冻存、制备腹水。

[0070] 2.2. 将Balb/c小鼠用降植烷(购自sigma公司)0.6ml/只处理,一周后腹腔接种杂交瘤细胞3×10⁶个/只,10天后收集腹水。

[0071] 2.3. 测定抗体效价:用间接ELISA方法测定利用PTH抗原(1)制备的单克隆抗体(1)的效价,结果显示单抗的效价达到1:35000以上。

[0072] 利用PTH抗原(2)制备的单克隆抗体(2)的效价也利用相同的方法进行测定,其效价也达到1:33000以上。

[0073] 3. 免疫动物制备多克隆抗体:

[0074] 3.1. 取雄性大耳白家兔2只,体重约2Kg,随机分3组,每组2只。用两种PTH多肽抗原分别免疫每组家兔,采用皮下多点微量免疫法。①基础免疫:每只家兔注射卡介苗2.5mg持续10d;②福氏完全佐剂:用2种复合免疫原分别注射每组家兔,2mg/只兔(含BSA及多肽各约1mg),纯多肽免疫原PTH 1-84注射1mg/只兔,持续28d;③福氏不完全佐剂免疫:2种复合免疫原分别注射每组家兔1.6mg/只兔(含BSA及多肽各约0.8mg),纯多肽免疫原PTH 1-84注射0.8mg/只兔,持续28d;④加强免疫:以后每周用3种免疫原制备的水剂分别加强免疫,剂量同③。

[0075] 3.2. 测定抗体效价:用间接ELISA法测定利用PTH抗原(1)制备的多克隆抗体(1)的效价,结果显示抗体效价达到1:28000以上。

[0076] 利用PTH抗原(2)制备的多克隆抗体(2)的效价也利用相同的方法进行测定,其效价也达到1:30000以上。

[0077] 3.3.取血及分离血清:颈动脉插管取血,分离血清。

[0078] 4.分离纯化抗体:硫酸铵沉淀后,再经Protein G(购自sigma公司)亲和纯化。

[0079] 5.抗体分装后冻干,低温保存。

[0080] 实施例3:人PTH抗体(1)和(2)的特异性鉴定

[0081] 以ELISA进行检测。分别以人PTH、Actin蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE为检测抗原包被ELISA板,通过ELISA分别检测所制备的PTH单克隆抗体(1)和(2)与不同蛋白的特异性反应,以正常BALB/c小鼠血清作阴性对照,PBS液作空白对照。

[0082] 结果:PTH单克隆抗体(1)和(2)分别只与PTH反应为阳性(P/N)2.1),而与Actin蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE反应为阴性,说明利用本发明的PTH表位肽制备的单克隆抗体(1)和(2)分别具有特异性。

[0083] 利用与上述鉴定单克隆抗体特异性相同的方法进行鉴定多克隆抗体。

[0084] 结果显示:PTH多克隆抗体(1)和(2)分别与PTH反应为阳性(P/N)2.1),而与Actin蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE反应为阴性,说明本发明的PTH表位肽制备的多克隆抗体(1)和(2)分别具有特异性。

[0085] 实施例4:用于检测待测物中人PTH的荧光免疫层析试纸的制备

[0086] 1.研究对象:标本来自江原医院60例外科手术患者,均用注射器术中穿刺甲状旁腺腺体、淋巴结、肌肉组织、脂肪组织、甲状腺腺体、胸腺组织取样待用。

[0087] 2.试剂与仪器:

[0088] 免疫层析试纸分为试验组和对照组,其中试验组的标记抗体是实施例2中利用本发明的表位肽(1)制备的单克隆抗体、检测抗体是实施例2中利用本发明的表位肽(2)制备的单克隆抗体。而对照组以目前商业化的针对PTH全长的PTH抗体作为标记抗体以及针对PTH(1-34)表位的抗体作为检测抗体。免疫层析中的质控抗体(羊抗鼠IgG)、荧光微球、荧光检测仪来自无锡市江原实业技贸公司,硝酸纤维素膜(美国Merck-Millipore公司),样品垫、结合垫、底板、吸水纸采购于上海杰一公司,CLIA检测试剂盒,罗氏公司产品,其他试剂为国产分析纯。

[0089] 3.制备方法:

[0090] 3.1.1抗体标记荧光微球:

[0091] 使用pH7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤荧光微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应一定时间,洗涤荧光微球,用0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入标记抗体,室温反应2小时,加入含有10%BSA的0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤荧光微球,用含有1%BSA,0.1%Tween-20,0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶至原体积,定量喷涂于结合垫上,避光35-38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用;

[0092] 3.1.2荧光免疫层析试纸条组装部件处理:

[0093] (1)样品垫的处理

[0094] 使用含1%BSA、0.1%Triton100的0.02M pH7.4的磷酸盐缓冲液浸泡样品烘干。

[0095] (2)硝酸纤维素膜的制备

[0096] 使用含1%蔗糖的0.02M pH7.4的磷酸盐缓冲液,分别将检测抗体和质控抗体稀释到1mg/ml,将二者以0.5cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,烘干后加入干燥剂封存备用;

[0097] 3.1.3荧光免疫层析试纸条的组装:

[0098] 在湿度小于35%,稳定20-25℃的环境下,在PVC底板1上黏贴上硝酸纤维素膜2、结合了荧光微球标记的结合垫5、样品垫4和吸水纸3形成微滤体系,切割成0.3cm宽,装入卡壳中即制成试纸条(图1和图2)。

[0099] 4.检测方法:

[0100] 4.1取样:将离体疑似甲状旁腺组织用26-gauge注射器针头细针穿刺3次取样,取样后针头后方连接1ml注射器。

[0101] 4.2样品预处理:取一支含200 μ l PBS缓冲液的溶液管,平衡至室温,使用前确保所有液体都在管子的底部。将细针穿刺后的注射器伸入缓冲液中,通过抽吸方式充分洗涤混匀,制成待测样品。

[0102] 4.3加样:在PTH荧光免疫层析试纸的加样区加入上述待测样品60 μ l,于孵化器中薄膜层析反应5分钟。

[0103] 4.4检测:将反应后的荧光免疫层析试纸及校准卡插入便携式荧光免疫定量分析仪的插卡口,运行仪器,仪器自动读卡给出荧光免疫层析试纸中的质控带C值和检测带T值。

[0104] 4.5结果判断:

[0105] 当 $C < 10000$ 时,表示结果为无效检测,需要重新更换试纸检测;

[0106] 当 $T/C \geq 0.2$ 时,结果为阳性,表明穿刺物为甲状旁腺组织;

[0107] 当 $T/C < 0.2$ 时,结果为阴性,表明穿刺物非甲状旁腺组织。

[0108] 5.标准曲线的绘制:将PTH标准品制成6个不同的浓度,分别为0 μ g/L、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、200pg/mL、300pg/mL,每个浓度做5个平行样。

[0109] 6.荧光免疫层析试纸条性能测试:(1)灵敏度:测定10个空白样,取平均值(x)和标准差(s),计算 $x \pm s$,以此数值在标准曲线上查出相对应的剂量。(2)试纸条在4℃,避光条件下保存6个月后分别抽取同一批次和不同批次的PTH的荧光免疫层析试纸条,用100pg/mL浓度的标准品进行测试,计算批内和批间差CV。(3)将标准品制成与PTH标准曲线中相对应的6个浓度,进行特异性检测。

[0110] 7.与电化学发光法(CLIA)检测试剂盒比较:严格按照CLIA检测试剂盒说明书操作要求,与PTH荧光检测试纸分别同时对60例患者的穿刺甲状旁腺标本进行平行检测。

[0111] 8.统计学处理:用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析,组间用 χ^2 检验,P值小于0.05有统计学意义。用配对T检验进行相关性和差异性比较。

[0112] 结果与分析:

[0113] 1.检测结果判读:检测时,由于层析作用液体向前移动。若试样中PTH的含量过少,试样中的PTH与结合垫上标记抗体结合的荧光微球结合形成复合物C1则相应较少,结合垫中的标记抗体与C线上的质控抗体大量结合,因此T线将比C线荧光浅很多或完全检测不到荧光,结果为阴性;若试样中PTH的浓度较大,则复合物C1相应较多,与T线处的检测抗体结合并大量形成抗体-抗原-抗体复合物C2,而且试样中PTH越高,T线显色越深,结果为阳性。无论是阳性还是阴性结果,因鼠源性抗体标记的荧光微球过量包被,因而总有未结合检测抗体的部分荧光微球与C线处的羊抗鼠IgG结合,在C线处出现荧光微球的聚集。如果C线没

有荧光条带,无论T线有无荧光条带,结果均无效。

[0114] 2. 标准曲线绘制:按照统计学方法,以检测样品荧光值信号为纵坐标,PTH标准品浓度为横坐标(表1为试验组的数据,即利用本发明所述表位的抗体),建立方程并拟合成标准曲线。该标准曲线的 R^2 为0.9996,线性较好,符合定量检测的要求。而对照组(即利用市售PTH全长抗体和PTH 1-34表位抗体)标准曲线的 R^2 为0.9207,线性相对于试验组较差。

[0115] 表1 PTH标准品检测结果

[0116]

标准品 (pg/ mL)	0	10	50	100	200	300
荧光值	0.16± 0.011	43.62± 2.208	162.66± 6.407	302.27± 10.728	585.87± 26.196	867.73± 34.917
CV	4.31%	4.07%	3.94%	3.55%	4.47%	4.02%

[0117] 3. PTH免疫层析荧光试纸条性能评价:

[0118] (1) 灵敏度:试验组的零剂量点均值读数为14.26,在标准曲线上折算为0.18pg/mL。取0.20pg/mL、1pg/mL、2pg/mL、4pg/mL、8pg/mL的样品进行检测,并利用标准曲线进行浓度换算,发现这一系列浓度梯度的PTH样品均能被准确检测出来。而对照组采用同样方式进行验证,灵敏度仅能达到2.0pg/mL,二者相差一个数量级。

[0119] (2) 稳定性和精密度:试验组的标准曲线各组对应的CV值均小于5%(表1)。4℃,避光条件下保存6个月的试纸条检测时,批内和批间CV分别为4.94%和5.26%,结果表明试纸条检测稳定性和精密度较好。对照组在稳定性和精密度上与试验组相差不大。

[0120] (3) 特异性:将配制好的PTH标准品与甲状腺素标准品同时用试验组的试纸条进行检测,各浓度点交叉反应率 $CR\% = \text{测定值甲状腺素} / \text{测定值PTH} \times 100\%$,在上述浓度范围内,与甲状腺素的交叉反应率均小于0.1%,说明两者无交叉反应,方法特异性比较好。当采用对照组试纸条时,在低浓度点与甲状腺素的交叉反应率超过3%,特异性明显不如试验组。

[0121] 4. 与CLIA方法的比较:对60例患者穿刺甲状旁腺腺体、淋巴结,肌肉组织,脂肪组织、甲状腺腺体稀释液分别用CLIA试剂盒与试验组荧光免疫层析试纸条、对照组免疫层析试纸条进行检测,取血清PTH值上限65pg/mL为本试剂盒的cut off值,并对数据进行分析。

[0122] 结果表明,试验组免疫层析试纸条与CLIA试剂盒的相关系数为0.9951,相关性曲线为 $Y = 0.9793X + 1.8376$,其中Y为本发明的荧光免疫检测试纸条检测得到的PTH浓度(pg/mL),X为CLIA试剂盒检测得到的PTH浓度(pg/mL)。可见两者的相关性很好。此外结果显示正

常甲状旁腺和非甲状旁腺组织的PTH浓度有显著性差异(表2),P值小于0.001,相关性具有统计学意义。而对照组免疫层析试纸条与CLIA试剂盒的相关系数为0.9176,相关性相比试验组较差。

[0123] 表2不同组织洗脱液PTH检测结果

[0124]

组织	甲状旁腺	甲状腺	淋巴组织	肌肉组织	脂肪组织	胸腺组织
测定值	1658 ± 0.011	28.62± 2.208	26.66± 6.407	30.27± 10.728	25.87± 26.196	27.73± 34.917
CV	7.31%	5.07%	3.94%	3.55%	4.47%	4.02%

[0125] 由以上实施例及考察结果可知,通过本发明的两个PTH表位肽制备的单克隆抗体能特异性识别PTH,利用其制备的荧光免疫层析POCT定量检测方法能够在短时间准确定量PTH,与CLIA法检测所得结果没有显著差异,完全符合临床应用要求,操作简单,体积小、便于携带,易于保存,值得临床推广应用。

[0126] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用。它完全可以被适用于各种适合本发明的领域。对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改。因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

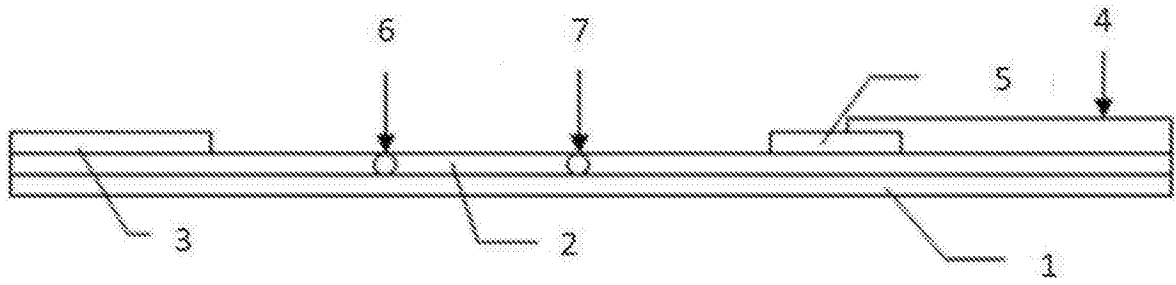


图1

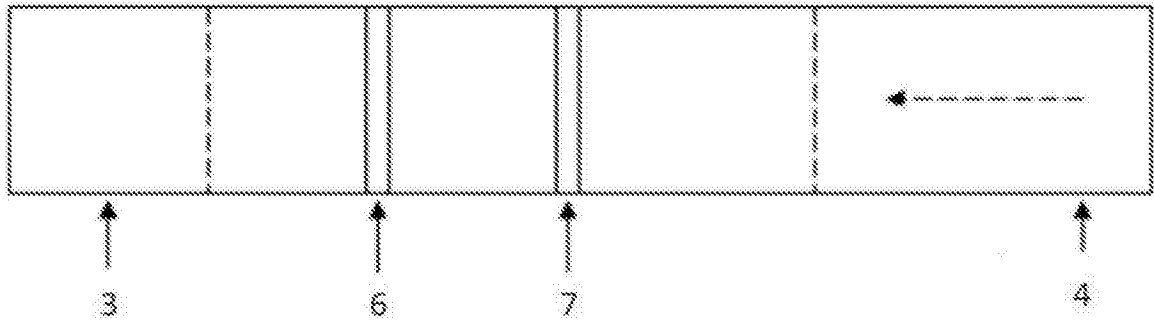


图2

专利名称(译)	一种快速鉴别人甲状旁腺的方法		
公开(公告)号	CN107402300A	公开(公告)日	2017-11-28
申请号	CN2017110650822.8	申请日	2017-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	邹贤 朱利国 程晓青 范俊 朱国华 戴军 包建东 高芸 王国瑞 孙志强 李秀龙 周彬 曹亚琴 杨克勤		
发明人	邹贤 朱利国 程晓青 范俊 朱国华 戴军 包建东 高芸 王国瑞 孙志强 李秀龙 周彬 曹亚琴 杨克勤		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	刘娟娟		
其他公开文献	CN107402300B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种快速鉴别人甲状旁腺的方法，其以甲状旁腺激素(PTH)荧光免疫层析试纸测定待测液中PTH含量的方式实现，该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人PTH，所述抗体是利用特定的抗原表位肽制备获得。本发明能够准确地检测待测物中的人PTH，操作简便、快速，检测范围宽、特异性高、灵敏度好。

