



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110187132 A

(43)申请公布日 2019.08.30

(21)申请号 201910398648.1

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2019.05.14

(71)申请人 太原瑞盛生物科技有限公司

地址 030000 山西省太原市太原不锈钢产业园区钢园北路10号(办公楼二层)

(72)发明人 徐兵 曹晶 杜爱铭

(74)专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理事务所(特殊普通合伙)
11465

代理人 崔自京

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

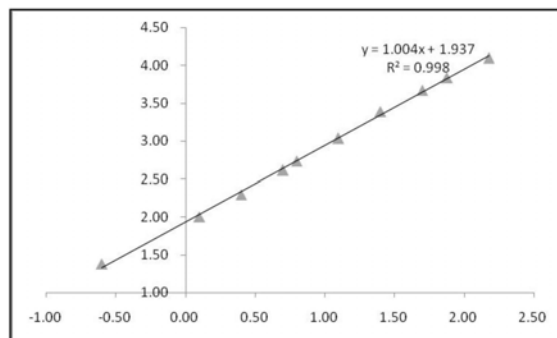
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种检测促甲状腺激素的分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测促甲状腺激素的分析方法,将表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素特异性IgY抗体作为捕获抗体并与磁颗粒偶联,将吖啶酯与抗促甲状腺激素配对的IgG抗体偶联作为示踪物,通过设计建立双抗体夹心法检测促甲状腺激素。本发明可以有效排除内源性干扰因素的影响,并且IgY抗体经过特定表面活性剂的处理后,偶联效率和发光值均大大提高,从而使检测结果更加准确。



1. 一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

(1) 将经促甲状腺激素抗原免疫处理得到的鸡蛋进行除脂和纯化,得到抗促甲状腺激素IgY抗体,-20℃保存;

(2) 将步骤(1)中得到的抗促甲状腺激素IgY抗体与表面活性剂混合反应,然后加入缓冲液超滤清洗,再将抗促甲状腺激素IgY抗体吸出,得到经表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素IgY抗体;

(3) 向经预处理后的磁微粒中加入偶联试剂进行第一次室温孵育,然后加入步骤(2)中得到的经表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素IgY抗体进行第二次室温孵育,弃去上清液、洗涤,得到磁微粒混悬液,2-8℃保存备用;

(4) 向标记缓冲液中加入抗促甲状腺激素IgG抗体混匀,再加入吡啶酯震荡混匀反应,加入赖氨酸至标记反应终止,超滤,得到吡啶酯标记物,2-8℃保存备用;

(5) 制备促甲状腺激素校准品,然后分别将校准品、步骤(3)中得到的磁微粒混悬液依次加入反应管中,振荡混匀,第一次孵育,分离,清洗,然后加入步骤(4)中得到的吡啶酯标记物,第二次孵育,分离,清洗,放入发光仪中进行检测其发光强度,建立发光强度和校准品浓度的标准曲线;

(6) 将待测样本按照步骤(5)中的方法检测其发光强度,根据标准曲线即可计算出待测样本中促甲状腺激素的含量。

2. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(2)中,所述表面活性剂为N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐或十烷基二甲基氧化铵。

3. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(2)中,所述抗促甲状腺激素IgY抗体与表面活性剂的质量比为0.02-1.5:1。

4. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(2)中,所述混合反应时间为0.5-1h。

5. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(3)中,所述磁微粒与偶联试剂的质量比为1-10:1;所述偶联试剂与抗促甲状腺激素IgY抗体的质量比为10-30:1。

6. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(3)中,所述第一次室温孵育时间为15-60min,所述第二次温室孵育时间为1-4h。

7. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(4)中,每1mg的抗促甲状腺激素IgG抗体加入500-2000μl标记缓冲液;所述吡啶酯与抗促甲状腺激素IgG抗体的摩尔比为5-40:1;每1mg的抗促甲状腺激素IgG抗体加入10-200μL浓度为10%的赖氨酸溶液。

8. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(4)中,所述混匀反应为室温下反应0.5-3h。

9. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(5)中,所述校准品的用量为10-200μL,所述磁微粒混悬液的用量为10-100μL,所述吡啶酯标记物的用量为10-200μL。

10. 根据权利要求1所述的一种检测促甲状腺激素的分析方法,其特征在于,步骤(5)中,所述第一次孵育温度为37℃,时间为5-10min;所述第二次孵育温度为37℃,时间为10-

20min。

一种检测促甲状腺激素的分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析技术领域,更具体的说是涉及一种检测促甲状腺激素的分析方法。

背景技术

[0002] 促甲状腺激素(Thyroid-stimulating hormone,TSH)是一种由垂体前叶分泌的糖蛋白激素,由两种不同的亚单位 α 、 β 组成。它的主要生理作用是调节甲状腺激素的合成与分泌,甲状腺功能改变时,血清促甲状腺激素的波动较甲状腺激素更迅速且显著,因此,临床上测定血清TSH对诊断甲状腺功能亢进(甲亢)和减退(甲减)、原发与继发性甲减的鉴别、监测甲亢和甲减的疗效、亚临床甲亢的诊断、新生儿甲低的筛查以及垂体TSH瘤的实验诊断等具有重要意义。

[0003] 目前用于检测促甲状腺激素(TSH)的方法主要有免疫层析法、时间分辨荧光免疫分析法、酶联免疫分析法、电化学和化学发光法等。传统的双抗体夹心法检测TSH所用的配对抗体均为IgG抗体,由于血液样本中存在较多的内源性干扰因素,比如嗜异性抗体、类风湿因子、自身抗体、补体等,检测结果经常受到干扰而无法获得准确的结果。如发明专利CN101949943A(2011.01)公开了一种促甲状腺激素定量检测试剂盒及其制备方法,发明专利CN102426249A(2012.04)公开了促甲状腺激素定量测定试剂盒及其检测方法,这些专利中所用的一对抗体均为IgG抗体,理论上仍然受到内源性干扰因素的印象,分析结果不可靠。

[0004] 因此,如何提供一种能够准确检测促甲状腺激素并且检测灵敏度高、检测范围广的分析方法是本领域技术人员亟需解决的问题。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了一种检测促甲状腺激素的分析方法,将表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素特异性IgY抗体作为捕获抗体并与磁颗粒偶联,将吡啶酯与抗促甲状腺激素配对的IgG抗体偶联作为示踪物,通过两步法设计建立双抗体夹心法检测促甲状腺激素。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种检测促甲状腺激素的分析方法,具体包括以下步骤:

[0008] (1) 将经促甲状腺激素抗原免疫处理得到的鸡蛋进行除脂和纯化,得到抗促甲状腺激素IgY抗体,-20℃保存;

[0009] (2) 将步骤(1)中得到的抗促甲状腺激素IgY抗体与表面活性剂混合反应,然后加入缓冲液超滤清洗,再将抗促甲状腺激素IgY抗体吸出,得到经表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素IgY抗体;

[0010] (3) 向经预处理后的磁微粒中加入偶联试剂进行第一次室温孵育,然后加入步骤(2)中得到的经表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素IgY抗体进行第二次室温孵育,去上清

液、洗涤,得到磁微粒混悬液,2-8℃保存备用;

[0011] (4) 向标记缓冲液中加入抗促甲状腺激素IgG抗体混匀,再加入吡啶酯震荡混匀反应,加入浓度为10%的赖氨酸反应15min使标记反应终止,超滤处理,转移到新的离心管中,得到吡啶酯标记物,2-8℃保存备用;

[0012] (5) 制备促甲状腺激素校准品,然后分别将校准品、步骤(3)中得到的磁微粒混悬液依次加入反应管中,振荡混匀,第一次孵育,分离,清洗,然后加入步骤(4)中得到的吡啶酯标记物,第二次孵育,分离,清洗,放入发光仪中进行检测其发光强度,建立发光强度和校准品浓度的标准曲线;

[0013] (6) 将待测样本按照步骤(5)中的方法检测其发光强度,根据标准曲线即可计算出待测样本中促甲状腺激素的含量。

[0014] 本发明检测促甲状腺激素的原理是双抗夹心法中的两步法:首先将待测样本与偶联有经表面活性剂处理的IgY抗体的磁微粒混合,捕获待测样本中的促甲状腺激素,反应后进行第一步清洗,去除没有结合的物质;第二步加入偶联吡啶酯的配对IgG示踪抗体,反应完成后,进行第二步清洗;加入激发液后进行光子测量,根据标准曲线即可计算出待测样本中促甲状腺激素的含量。

[0015] 本发明的有益效果在于:

[0016] 本发明采用卵黄抗体IgY作为捕获抗体,IgY的结构特点可以有效避免内源性干扰因素的影响,但若直接应用IgY,其与靶标的结合效率不高,并不能应用于夹心法免疫分析中;本发明通过长时间的曲折研究,创造性地将表面活性剂处理的IgY抗体与磁微粒进行偶联,IgY抗体经表面活性剂处理之后可以保持其立体结构,因而更易与靶标进行有效结合,在免疫发光分析中能大大地提高偶联效率和发光值,且经过处理后的IgY在免疫发光分析中的灵敏度、检测范围均有很大提高。

[0017] 进一步,上述步骤(2)中,表面活性剂可以是阳离子表面活性剂十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),两性表面活性剂N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐(DDAPS)、十烷基二甲基氧化铵(DDAO),非离子表面活性剂Triton X-100或阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS),优选为两性表面活性剂,更优选为N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐(DDAPS)或十烷基二甲基氧化铵(DDAO),更优选为N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐(DDAPS);浓度为0.01%-0.5%,优选为0.1%。

[0018] 采用上述进一步的有益效果在于,加入表面活性剂处理之后可以使抗促甲状腺激素IgY抗体保持其立体结构,从而更易与靶标进行有效结合。

[0019] 进一步,上述步骤(2)中,抗促甲状腺激素IgY抗体与表面活性剂的质量比为0.02-1.5:1。

[0020] 进一步,上述步骤(2)中,混合反应时间为0.5-1h,优选为0.5h。

[0021] 采用上述进一步的有益效果在于,混合反应使表面活性剂与抗促甲状腺激素IgY抗体充分作用。

[0022] 进一步,上述步骤(2)中,缓冲液为MES缓冲液,MES缓冲液的浓度为0.05-0.2mol/L,优选为0.1mol/L;MES缓冲液的pH为5.0-6.5,优选为5.0。

[0023] 采用上述进一步的有益效果在于,此浓度和pH值范围下的MES缓冲液可以更好地洗掉残留的表面活性剂。

[0024] 进一步,上述步骤(3)中,偶联试剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)。

[0025] 采用上述进一步的有益效果在于,EDC可以活化羧基磁微粒表面的官能团羧基,活化后可以接连特定抗体。

[0026] 进一步,上述步骤(3)中,磁微粒与偶联试剂的质量比为1-10:1,优选为1:1;偶联试剂与抗促甲状腺激素IgY抗体的质量比为10-30:1。

[0027] 进一步,上述步骤(3)中,第一次室温孵育时间为15-60min,优选为30min;第二次温室孵育时间为1-4h,优选为2h。

[0028] 采用上述进一步的有益效果在于,第一次室温孵育的作用是使羧基磁微粒上的羧基充分活化,孵育时间过长反而会降低偶联效率;第二次室温孵育的作用是使抗体可以有效充分地结合到活化后的羧基磁微粒上。

[0029] 进一步,上述步骤(3)中,进行第二次温室孵育后,加入含1%BSA的Tris缓冲液(浓度为50mmol/L)进行封闭,时间为1h;去上清液,加入清洗缓冲液(TBS+0.05%Tween-20)洗涤3次,将制备好的磁微粒混悬液置于保存液(Tris-HCl)中,2-8℃保存。

[0030] 采用上述进一步的有益效果在于,加入Tris缓冲液用来封阻磁微粒上空余的结合位点。

[0031] 进一步,上述步骤(4)中,标记缓冲液为 Na_2CO_3 - NaHCO_3 溶液,浓度为0.5-0.05M,优选为0.1M;pH为8-10,优选为8.5。

[0032] 进一步,上述步骤(4)中,每1mg的抗促甲状腺激素IgG抗体加入500-2000 μl 标记缓冲液;吡啶酯与抗促甲状腺激素IgG抗体的摩尔比为5-40:1,优选为10:1;每1mg的抗促甲状腺激素IgG抗体加入10-200 μL 浓度为10%的赖氨酸溶液。

[0033] 采用上述进一步的有益效果在于,找到吡啶酯与抗促甲状腺激素IgG抗体反应的最适宜的缓冲环境和浓度。

[0034] 进一步,上述步骤(4)中,混匀反应为室温下反应0.5-3h,优选为2h。

[0035] 采用上述进一步的有益效果在于,使吡啶酯与抗促甲状腺激素IgG抗体充分反应。

[0036] 进一步,上述步骤(5)中,校准品的用量为10-200 μL ,磁微粒混悬液的用量为10-100 μL ,吡啶酯标记物的用量为10-200 μL 。

[0037] 进一步,上述步骤(5)中,第一次孵育温度为37℃,时间为5-10min,优选为9min;第二次孵育温度为37℃,时间为10-20min,优选为10min。

[0038] 采用上述进一步的有益效果在于,第一次孵育使磁微粒上的抗体与校准品中的抗原充分结合形成结合物;第二次孵育使吡啶酯上的抗体与第一次孵育形成的结合物充分反应。

[0039] 进一步,上述步骤(5)中,校准品的配制和标准曲线的建立方法为:

[0040] 用含有0.5%BSA的PBS缓冲液将促甲状腺激素纯品配制成标示浓度为0 $\mu\text{IU/mL}$ 、0.25 $\mu\text{IU/mL}$ 、1.25 $\mu\text{IU/mL}$ 、2.5 $\mu\text{IU/mL}$ 、5 $\mu\text{IU/mL}$ 、6.25 $\mu\text{IU/mL}$ 、12.5 $\mu\text{IU/mL}$ 、25 $\mu\text{IU/mL}$ 、50 $\mu\text{IU/mL}$ 、75 $\mu\text{IU/mL}$ 、150 $\mu\text{IU/mL}$ 的一系列校准品,分别将校准品50 μL 、偶联磁微粒混悬液150 μL 依次加入反应管中,振荡混匀,37℃孵育9min,分离,清洗;向洗涤后的反应容器继续加入100 μL 吡啶酯标记物继续孵育10min,分离,清洗;放入发光仪中进行检测其发光强度,对所测结果采用双对数线性拟合,建立发光强度和校准品浓度的标准曲线和标准方程。

[0041] 标准曲线的标准方程为： $y=1.004x+1.937$ 。

[0042] 经由上述的技术方案可知，与现有技术相比，本发明公开提供了一种检测促甲状腺激素的分析方法，经过表面活性剂处理后的抗促甲状腺激素IgY抗体可以保持抗体形态，更易于与靶标结合，在免疫发光分析中可以大大提高偶联效率和发光值，且经过处理后抗促甲状腺激素IgY抗体在免疫发光分析中的灵敏度、检测范围均有很大提高，在线性范围内具有很好的线性关系， R^2 可达到0.99以上。

附图说明

[0043] 图1为本发明实施例5中不同表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体后其发光值、灵敏度和线性关系图；

[0044] 图2为本发明实施例5中不同浓度的DDA0表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体后其发光值、灵敏度和线性关系图；

[0045] 图3为本发明实施例5中不同浓度的DDAPS表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体后其发光值、灵敏度和线性关系图；

[0046] 图4为本发明实施例5中校准品的发光强度和校准品浓度的标准曲线图。

具体实施方式

[0047] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，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他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0048] 实施例1抗促甲状腺激素IgY抗体的制备

[0049] 1. 对鸡进行初次免疫

[0050] 用弗氏完全佐剂乳化后，采用胸肌及颈部皮下多点注射法，用制备好的促甲状腺激素抗原在胸肌注射4个点，颈部皮下1个点，每点0.2mL，每隔六周加强免疫一次。

[0051] 2. IgY抗体的提取

[0052] 首次免疫2周后收集鸡蛋，通过除脂、纯化提取IgY抗体。

[0053] (1) 除脂

[0054] 使用蛋黄分离器去除鸡蛋中的蛋白，之后将促甲状腺激素卵黄于滤纸上滚动，吸干蛋清，用无菌蒸馏水彻底冲洗卵黄，等到把蛋清冲除净后刺破卵黄膜，收集卵黄；然后用9倍体积的蒸馏水稀释卵黄，搅拌10min，使水溶性IgY充分溶出，然后用1mol/L的HCl调节pH至5.2，冻融2次（-20℃存放20h，取出放37℃烘箱融化），4℃下12000r/min离心30min，再将上清液用抽滤装置过滤除脂。

[0055] (2) 纯化：硫酸铵盐析法

[0056] 将上清液置于烧杯中，于搅拌器上边搅拌边缓慢加入20%的硫酸铵粉末，静置1h后4℃下12000r/min离心30min，取白色沉淀，然后将白色沉淀溶于浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸缓冲液PB中，透析、过滤、除菌后得到提取物，即为抗促甲状腺激素IgY抗体，-20℃保存。

[0057] (3) 蛋白含量检测

- [0058] 采用260nm和280nm双波长测定提取物中蛋白含量。
- [0059] (4) 效价测定
- [0060] 采用琼脂双扩散法: 蛋黄液以生理盐水作倍比稀释直接测定。
- [0061] 首次免疫后两周开始收集鸡蛋, 做好编号, 每隔两周检测一次抗体效价, 每两周制备一次。
- [0062] 实施例2用不同的表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体
- [0063] 取500 μ L浓度分别为0.01%、0.05%、0.1%、0.3%、0.5%的各种不同的离子表面活性剂(阳离子表面活性剂: 十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 两性表面活性剂: N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐(DDAPS)、十烷基二甲基氧化铵(DDAO), 非离子表面活性剂: Triton X-100, 阴离子表面活性剂: 十二烷基硫酸钠(SDS))与12 μ L(5mg/mL, 60 μ g)抗促甲状腺激素IgY抗体混匀, 30min后, 加入800 μ L浓度为0.1mol/L、pH为5.0的MES缓冲液, 用超滤离心管将抗促甲状腺激素IgY抗体超滤3-4次, 再加入400 μ L浓度为0.1mol/L、pH为5.0的MES缓冲液, 将抗促甲状腺激素IgY抗体吸出, 即为表面活性剂处理的抗促甲状腺激素IgY抗体, 备用。
- [0064] 实施例3偶联有表面活性剂处理的抗促甲状腺激素IgY抗体的磁微粒混悬液的制备
- [0065] (1) 取3mg羧基磁微粒于0.5mL离心管中, 加入300 μ L浓度为0.1mol/L、pH为5.0的MES缓冲液, 涡旋混匀, 置于磁力架上, 静置5min使磁微粒与液体分开, 弃去上清液, 洗涤3次, 再加入300 μ L浓度为0.1mol/L、pH为5.0的MES缓冲液, 涡旋;
- [0066] (2) 加入50 μ L浓度为20mg/mL的偶联试剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC), 于旋转反应器上涡旋, 室温孵育30min;
- [0067] (3) 加入0.1mg实施例2中经表面活性剂处理的抗促甲状腺激素IgY抗体, 于旋转反应器上涡旋, 室温孵育2h;
- [0068] (4) 加入1mL浓度为50mmol/L含1% (质量分数) BSA的Tris缓冲液进行封闭, 时间为1h;
- [0069] (5) 去上清液, 加入300 μ L清洗缓冲液(TBS+0.05% Tween-20), 洗涤3次;
- [0070] (6) 将上述制备好的磁微粒混悬液置于1.5mL保存液(Tris-HCl)中, 2-8 $^{\circ}$ C保存。
- [0071] 其中, 保存液—25mM TBS (pH7.2) 0.15M NaCl 0.1% PC300
- [0072] 称取Tris (三羟甲基氨基甲烷) 0.605g和NaCl 1.755g, 加蒸馏水溶解, 加入0.1g Tween20及1g BSA、0.2g PC300, 再加蒸馏水至200mL, 磁性搅拌下滴加浓HCl至pH为7.2。
- [0073] 实施例4吡啶酯与抗促甲状腺激素IgG抗体偶联
- [0074] (1) 在2mL离心管中加入160 μ L的Na₂CO₃-NaHCO₃标记缓冲液, 再加入0.2mg (40 μ L) 抗促甲状腺激素IgG抗体, 混匀;
- [0075] (2) 加入2.1 μ L浓度为6.5mmol/L的NSP-SA-NHS DMF溶液进行避光反应, 使吡啶酯与抗促甲状腺激素IgG抗体的摩尔比为10:1, 震荡混匀, 室温下反应2h;
- [0076] (3) 加入10 μ L浓度为10%的赖氨酸, 反应15min使标记反应终止, 经超滤处理, 转移到新的离心管中, 得到吡啶酯标记物, 2-8 $^{\circ}$ C保存备用。
- [0077] 其中, 标记缓冲液—浓度为0.1M、pH为8.5的Na₂CO₃-NaHCO₃溶液
- [0078] A液: 称取1.06g的Na₂CO₃用蒸馏水定容至1L;

[0079] B液:称取7.56g的NaHCO₃用蒸馏水定容至100mL,调pH至8.5。

[0080] 实施例5不同表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体对实验的影响和标准曲线的建立

[0081] (1) 加入0.1%表面活性剂(阳离子表面活性剂:十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),两性表面活性剂:N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐(DDAPS)、十烷基二甲基氧化铵(DDAO),非离子表面活性剂:Triton X-100,阴离子表面活性剂:十二烷基硫酸钠(SDS))处理的抗促甲状腺激素IgY抗体后,分别与磁微粒进行偶联,之后按照上述实验步骤进行反应测试,试验结果如图1所示,其中横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值。

[0082] 由图1可知,加入不同的表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体后,其发光值、灵敏度和线性关系情况如下:DDAO(两性表面活性剂)、DDAPS(两性表面活性剂) > TritonX-100(非离子表面活性剂) > 无、SDS(阴离子表面活性剂)、CTAC(阳离子表面活性剂)、CTAB(阳离子表面活性剂)。

[0083] 以上试验结果说明,加入两性表面活性剂DDAPS和DDAO要优于加入非离子表面活性剂TritonX-100和不加表面活性剂处理的抗促甲状腺激素IgY抗体,因而选择DDAO和DDAPS两种表面活性剂,并做进一步的优化。

[0084] (2) 优化两性表面活性剂DDAO的浓度

[0085] 用浓度分别为0.01%、0.05%、0.1%、0.3%、0.5%的DDAO表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体,之后进行反应测试,试验结果如图2所示,其中横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值。

[0086] 由图2可知,随着表面活性剂浓度的增加,产物的发光值也在逐渐增加,当表面活性剂DDAO的浓度为0.1%时,其发光值达到最大;之后随着表面活性剂浓度的继续增加,其曲线开始出现倒勾现象。

[0087] 以上试验结果说明,表面活性剂DDAO的最佳使用浓度为0.1%。

[0088] (3) 优化两性表面活性剂DDAPS的浓度

[0089] 用浓度分别为0.01%、0.03%、0.05%、0.1%、0.3%的DDAPS表面活性剂处理抗促甲状腺激素IgY抗体,之后进行反应测试,试验结果如图3所示,其中横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值。

[0090] 由图3可知,随着表面活性剂浓度的增加,产物的发光值也在逐渐增加,当表面活性剂DDAPS的浓度为0.1%时,其发光值达到最大;之后随着表面活性剂浓度的继续增加,其曲线开始出现倒勾现象。

[0091] 以上试验结果说明,表面活性剂DDAPS的最佳使用浓度为0.1%。

[0092] (4) 比较0.1%DDAO和0.1%DDAPS,找出表面活性剂的最佳浓度和最佳值

[0093] 从(2)和(3)的试验结果来看,用0.1%DDAPS处理抗促甲状腺激素IgY抗体后,其发光值要高于0.1%DDAO处理过的抗促甲状腺激素IgY抗体,且在线性范围为0.25-150 μ IU/mL范围内,具有很好的线性关系, R^2 可达到0.99以上,因此最终选择用0.1%DDAPS来处理抗促甲状腺激素IgY抗体。并按实施例(3)的操作步骤制得磁微粒混悬液。

[0094] (5) 校准品的配制和标准曲线的建立

[0095] 用含有0.5%BSA的PBS缓冲液将促甲状腺激素纯品配制成标示浓度为0 μ IU/mL、

0.25 μ IU/mL、1.25 μ IU/mL、2.5 μ IU/mL、5 μ IU/mL、6.25 μ IU/mL、12.5 μ IU/mL、25 μ IU/mL、50 μ IU/mL、75 μ IU/mL、150 μ IU/mL的一系列校准品,分别将校准品50 μ L、偶联磁微粒混悬液150 μ L依次加入反应管中,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育9min,分离,清洗;向洗涤后的反应容器继续加入100 μ L吡啶酯标记物继续孵育10min,分离,清洗;放入发光仪中进行检测其发光强度,对所测结果采用双对数线性拟合,建立发光强度和校准品浓度的标准曲线和标准方程。

[0096] 得出其标准曲线如图4所示(加入0.1%DDAPS处理抗促甲状腺激素IgY抗体的结果),其中,横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值。标准方程为: $y=1.004x+1.937$ 。

[0097] 实施例6待测样本中促甲状腺激素的检测

[0098] 将待测样本50 μ L、偶联磁微粒混悬液150 μ L依次加入反应管中,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育9min,分离,清洗;向洗涤后的反应容器继续加入100 μ L吡啶酯标记物继续孵育10min,分离,清洗;放入发光仪中进行检测其发光强度,根据标准曲线即可计算出待测样本中促甲状腺激素的含量。

[0099] 实施例7性能指标检测结果

[0100] 准确度

[0101] 用上述0.1%的DDAPS表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素IgY抗体与磁微粒偶联后制得的试剂盒进行测试,向已知浓度的血清中分别加入0.7、2.9、75 μ IU/mL的校准物,测定回收率来检测试剂的准确度,计算公式如下:

$$[0102] \quad \text{回收率} = \frac{\text{实测值} - \text{原血清值}}{\text{加入量}} \times 100\%$$

[0103] 根据公式计算所得回收率分别为:96.5%、102.1%和106.3%。

[0104] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

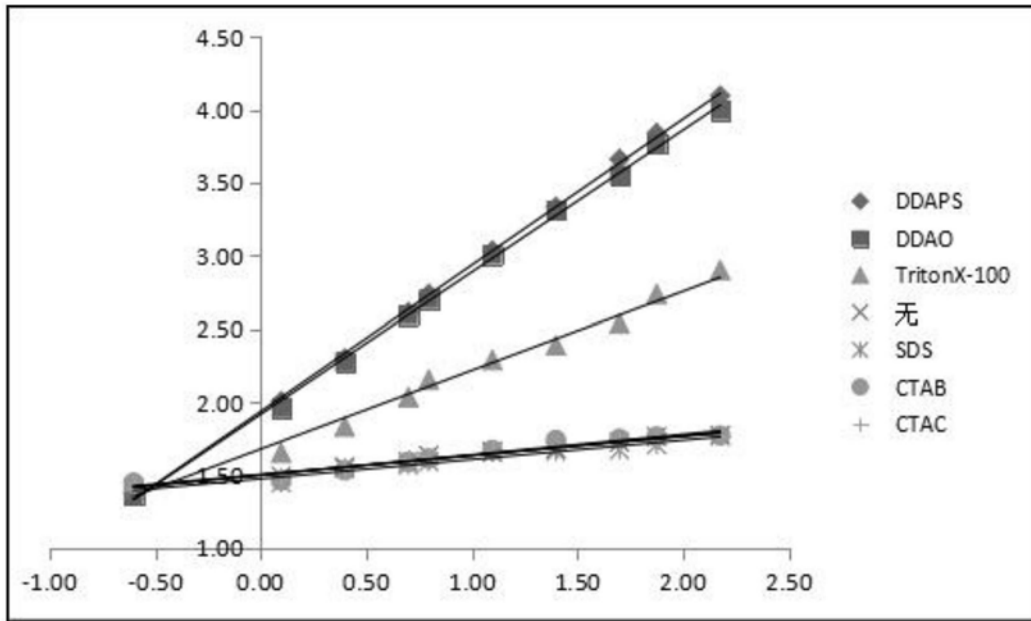


图1

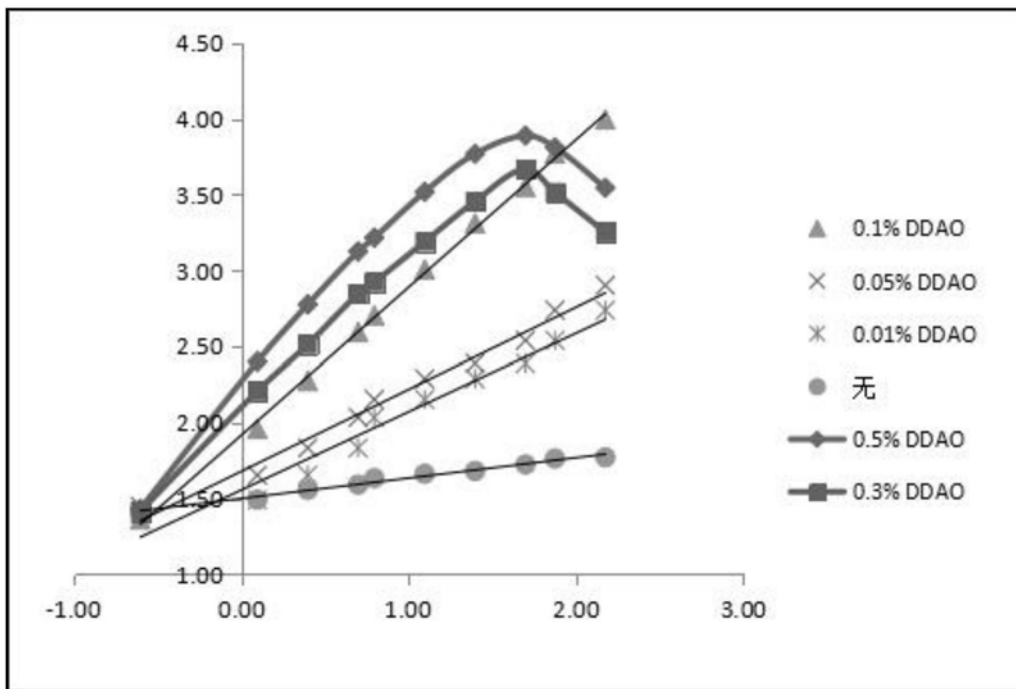


图2

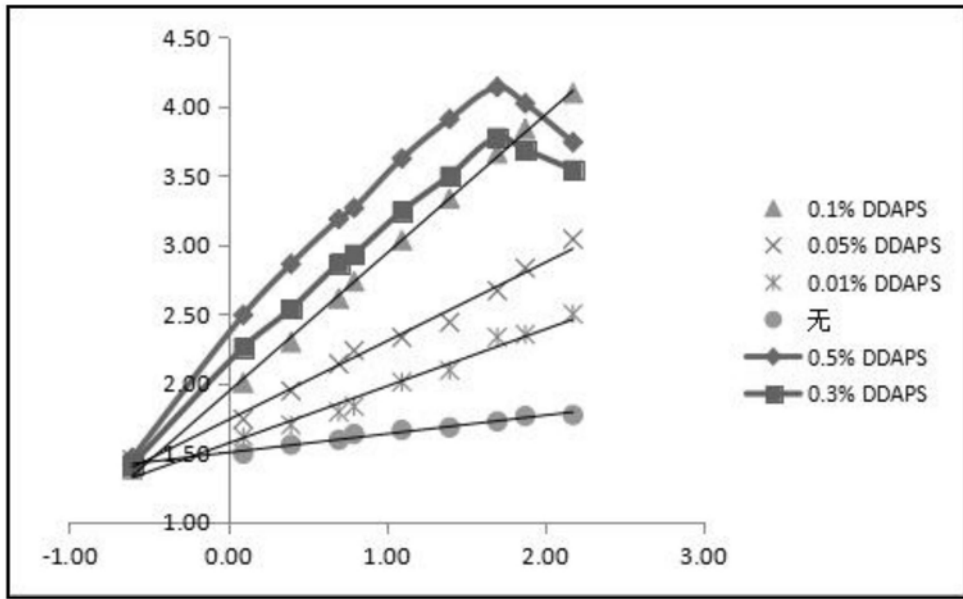


图3

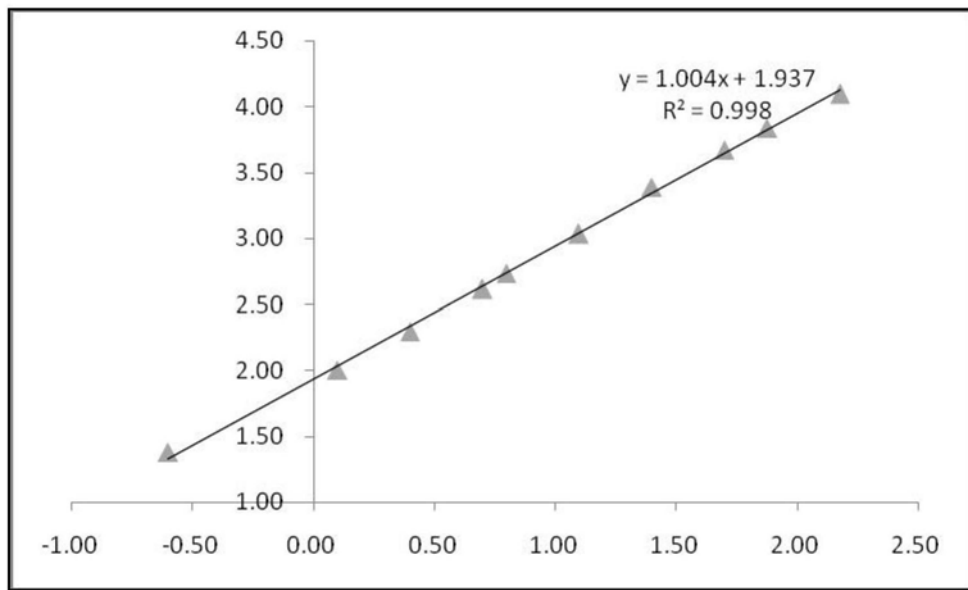


图4

专利名称(译)	一种检测促甲状腺激素的分析方法		
公开(公告)号	CN110187132A	公开(公告)日	2019-08-30
申请号	CN201910398648.1	申请日	2019-05-14
[标]发明人	徐兵 曹晶 杜爱铭		
发明人	徐兵 曹晶 杜爱铭		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/543 G01N33/532 G01N33/58 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测促甲状腺激素的分析方法，将表面活性剂处理过的抗促甲状腺激素特异性IgY抗体作为捕获抗体并与磁颗粒偶联，将吡啶酯与抗促甲状腺激素配对的IgG抗体偶联作为示踪物，通过设计建立双抗体夹心法检测促甲状腺激素。本发明可以有效排除内源性干扰因素的影响，并且IgY抗体经过特定表面活性剂的处理后，偶联效率和发光值均大大提高，从而使检测结果更加准确。

