



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102735833 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201210235362. X

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 07. 09

(71) 申请人 沃克(天津)生物科技有限公司

地址 300384 天津市南开区华苑产业园区榕苑路 16 号鑫茂科技园 A 座 IJ 单元 6 层右侧

(72) 发明人 李会强 孙颖 张明华 王高升 单立新 苑凤君 薛寒

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司 12103

代理人 董光仁

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

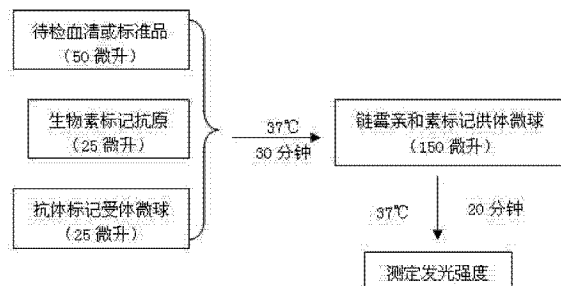
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开一种甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法。本发明包括均相发光 96 孔测定板, 甲状腺过氧化物酶抗体标准品, 链霉亲和素包被供体微球溶液和生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原, 还包括甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液。本发明样本中的甲状腺过氧化物酶抗体和受体微球上甲状腺过氧化物酶抗体竞争结合生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原。测量已知不同含量标准品的发光信号, 绘制标准曲线并获得数学函数, 未知样本含量通过数学函数获得。本发明集酶免疫分析和化学发光免疫分析的优点于一体, 准确测定血清中甲状腺过氧化物酶抗体水平, 应用于自身免疫性甲状腺疾病高危人群筛查、诊断和治疗效果评估。



1. 一种甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒,包括均相发光 96 孔测定板,甲状腺过氧化物酶抗体标准品,链霉亲和素包被供体微球溶液和生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原,其特征在于:该试剂盒还包括甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液。

2. 根据权利要求 1 所述甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒,其特征在于:甲状腺过氧化物酶抗体包被受体微球溶液是按照以下配比的原料制成的,

a. 将欲标记的甲状腺过氧化物酶抗体装入透析袋中,置于 0.1M pH 8.0 磷酸盐缓冲液透析,去除 Tris、甘氨酸等含有氨基的成分,透析后的抗体溶液,用紫外分光光度计测定抗体含量,调整浓度至 1-2 毫克 / 毫升 ;

b. 受体微球加入 0.1M pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水溶液,离心洗涤 1-2 次,每次 16000×G 15 分钟,吸干上清液,将微球浓度调整至 10-20 毫克 / 毫升待用 ;

c. 按受体微球:透析后甲状腺过氧化物酶抗体为 1:10 的质量比混合于 0.1M pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水溶液中,再依次加入体积百分比 0.6-0.625% 的 10% 吐温 20 溶液、4-5% 新鲜配制的 400 mM 氰基硼氢化钠溶液,充分混匀置 37°C 温箱内反应 48 小时以上 ;

d. 用 800mM 氢氧化钠溶液配制浓度为 65 毫克 / 毫升的羧甲氨基胺溶液,加体积百分比为 4-5% 的羧甲氨基胺溶液于标记后的离心管内,置 37°C 温箱内反应 1 小时 ;

e. 将离心管置于离心机内,16000×G 离心 15 分钟 ;用移液管吸取上清溶液,再加入 100mM Tris-HCl pH 8.0 溶液,重新悬浮微球 ;重复离心,最终调整浓度至 5-10 微克 / 毫升备用 ;

f. 用 pH 8.0 0.1 M Tris-HCl 缓冲液将标记后受体微球稀释至 20 微克 / 毫升,制备受体微球溶液。

3. 一种甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析的检测方法,其是按以下步骤进行的,

a. 将分别瓶装的甲状腺过氧化物酶抗体标准品、链霉亲和素包被供体微球溶液、生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原和甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液取出,至室温平衡 20 分钟 ;并将均相发光 96 孔测定板根据需要做好标记 ;

b. 测定板微孔内依次加入 50 微升待测样本或标准品、25 微升生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原、25 微升甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液,混匀后置 37°C 温箱或水浴,温育 30 分钟 ;

c. 各孔再加入 150 微升链霉亲和标记供体微球溶液,混匀后置 37°C 温箱或水浴,继续温育 20 分钟 ;

d. 应用均相发光免疫分析仪测定各孔发光强度,激发波长采用 680 纳米,检测波长采用 615 纳米 ;

e. 标准品测定结果采用四参数拟合方式绘制标准曲线或获得数学函数,通过标准曲线或数学函数计算未知样品甲状腺过氧化物酶抗体浓度。

甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及光激发偶联免疫检测技术,具体为甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 甲状腺过氧化物酶(TPO)是一种含有血红素辅基的膜结合糖蛋白,整个分子分为膜内区、跨膜区和膜外区,伸向充满胶质滤泡腔的部分具有催化活性。TPO作为甲状腺激素合成过程中一种重要的酶,能催化碘的活化、甲状腺球蛋白上酪氨酸残基的碘化及碘化酪氨酸残基的偶联,最终生成甲状腺素(T_3 、 T_4)。当甲状腺发生病变,滤泡细胞结构受到破坏时,TPO于甲状腺滤泡细胞腔的边缘即甲状腺细胞顶部向外周血溢漏,刺激机体免疫系统产生TPO抗体(anti-TPO抗体)。TPO抗体可通过激活补体系统引起甲状腺细胞损伤。因此,血清TPO抗体定量分析可用于自身免疫性甲状腺疾病的诊断、预测疾病发展等方面。

[0003] 目前有3种试剂用于TPO抗体的定量分析:酶联免疫吸附试验、酶促发光免疫分析和化学发光免疫分析。①酶联免疫吸附试验以酶标反应板为固相载体,采用传统间接反应模式:将已知抗原(TPO)吸附在固相载体上,加待测抗体,再加酶(如辣根过氧化物酶)标记抗人IgG,最终形成抗原-待测抗体-酶标记抗体复合物;加入酶显色底物(如四甲基联苯胺),借助酶标仪测定吸光度值,待测抗体的含量与吸光度值呈正比。②酶促发光免疫分析测定原理基本同酶联免疫吸附试验。但有两点不同:其一采用微球作为固相载体;其二采用酶的发光底物。以美国德普公司(DPC)生产的TPO抗体试剂为例,采用碱性磷酸酶标记的抗人IgG作为标记抗体,使用金钢烷-1,2-二氧乙烷衍生物(AMPPD)作发光底物。在碱性磷酸酶的作用下,AMPPD迅速脱去磷酸基团,生成不稳定的中间体AMPD,AMPD很快自行分解,从高能激发态回到低能稳定态时发出光子。这种化学发光稳定,持续时间可达数小时,容易测定,也容易控制。③电化学发光免疫分析采用三联吡啶钌或其衍生物NHS作为标记物。以罗氏公司生产的TPO抗体试剂为例,此方法以磁微粒作为固相载体包被链霉亲和素,用生物素标记TPO抗原,在反应体系内标记了三联吡啶钌的羊抗人TPO抗体与待测抗体竞争结合生物素化抗原,形成磁性微粒包被链霉亲和素-生物素化抗原-三联吡啶钌标记羊抗人TPO抗体复合物,将复合物吸入流动室,同时引入三丙胺(TPA)缓冲液。当磁性微粒流经电极表面时,被安装在电极下面的电磁铁吸引住,而未结合的标记抗原和标本被缓冲液冲走。与此同时电极加压,启动电化学发光反应,使三联吡啶钌和TPA在电极表面进行电子转移,产生电化学发光,光的强度与待测抗体的浓度呈反比。患者血样中的TPOAb含量与系统所检测的相对光单位(RLU)数量呈正比关系,根据标准曲线可以算出患者血样中的TPOAb浓度。

[0004] 酶免疫分析检测甲状腺过氧化物酶抗体的主要优势表现在:检测试剂已实现国产化、酶标仪普及程度高;因此,酶免疫分析具有较低检测成本,能够在基层医院开展工作。但是,由于采用酶作为示踪物质,稳定性较差且酶活性干扰因素较多,导致酶免疫分析的精密

度不够理想。此外,酶免疫分析采用微孔反应版作为固相材料,微孔内用于包被抗体面积有限,不能包被足够的抗体,不能实现理想检测范围。化学发光免疫分析是目前检测性能较高标记免疫分析技术,具有较高的自动化水平,较高的检测性能(敏感度、精密度、稳定性等方面)。但是,化学发光检测仪比较昂贵,且检测试剂依赖进口,从而使检测成本很高,基础医疗单位很难开展。

[0005] 此外,现有 TPO 抗体检测方法或诊断试剂仍然存在以下两个方面的缺陷。

[0006] 第一:非均相免疫分析模式带来的固有缺陷

就标记免疫分析原理而言,上述三种诊断试剂均属于非均相免疫分析模式。未与待测物质结合的游离状态标记物,和与待测物质结合的结合状态标记物中示踪剂特性完全相同,测定前必须去除游离状态标记物,通常测定结合状态标记物才能反映抗原抗体反应的强度。非均相免疫分析采用固相吸附法分离结合标记物和游离标记物。固相吸附分离法是将抗原(抗体)吸附在固相载体表面,使免疫反应在固相载体表面上进行,待测物质(抗体或抗原)、标记抗体(抗原)均可通过免疫反应结合在固相材料表面,未结合物质(含游离标记物)存在于液相中。此时,弃去液相并经洗涤,便可去除游离标记物。一般情况下,酶免疫分析采用酶联免疫反应板作为固相材料,发光免疫分析采用磁性微球作为固相材料。

[0007] 固相吸附分离方法有两个重要环节:包被和洗涤。包被是指将捕获抗原(或抗体)在不影响其生物活性的前提下连接在固相载体表面,可采用电荷吸附方法或化学键连接方法。无论物理吸附还是化学连接,固相材料表面(包被后)的抗原(或抗体)分子其构象不同于处于液相中天然构象,其结合能力因空间位阻效应将受到一定损失。洗涤是指对固相材料洗涤,以去除体系中未结合的标记抗体或二抗。“洗板”或“洗球”是均相免疫分析中的重要环节且多次出现。洗涤过程增加检测程序的复杂性,增加检测时间并给实现自动化带来障碍。此外,由于洗涤过程难于实现标准化(特别是酶免疫分析),每个测试孔之间洗涤效果不同,将严重影响检测的精密度(批间、批内)。

[0008] 第二:间接法反应模式带来的固有缺陷

无论采用何种标记免疫分析技术,现有 TPO 抗体试剂均采用经典间接法模式:用已知抗原包被固相材料,与待检特异性抗体结合,再通过酶标抗人 IgG 进行检测。此种间接法检测模式存在固有缺陷,表现为:① 由于酶标记抗体只针对 IgG,不能检测其它类别抗体(如 IgM 类或 IgA 类);② 待检抗体和标记抗体为种属间特异,非特异性抗体会导致一些交叉反应,待检血清需进行稀释才能降低非特异性结合,而血清稀释会带来一定误差。

发明内容

[0009] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种对血清甲状腺过氧化物酶抗体含量能够进行方便、快速和准确检测的基于光激发偶联免疫分析原理的甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法。

[0010] 本发明是采用以下技术方案实现的。

[0011] 一种甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒,包括均相发光 96 孔测定板,甲状腺过氧化物酶抗体标准品,链霉亲和素包被供体微球溶液和生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原,该试剂盒还包括甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液。

[0012] 所述甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒,其甲状腺过氧化物酶抗体

包被受体微球溶液是按照以下配比的原料制成的,

a. 将欲标记的甲状腺过氧化物酶抗体装入透析袋中,置于0.1M pH 8.0 磷酸盐缓冲液透析,去除 Tris、甘氨酸等含有氨基的成分,透析后的抗体溶液,用紫外分光光度计测定抗体含量,调整浓度至 1-2 毫克 / 毫升 ;

b. 受体微球加入 0.1M pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水溶液,离心洗涤 1-2 次,每次 16000×G 15 分钟,吸干上清液,将微球浓度调整至 10-20 毫克 / 毫升待用 ;

c. 按受体微球 : 透析后甲状腺过氧化物酶抗体为 1:10 的质量比混合于 0.1M pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水溶液中,再依次加入体积百分比 0.6-0.625% 的 10% 吐温 20 溶液、4-5% 新鲜配制的 400 mM 氰基硼氢化钠溶液,充分混匀置 37℃ 温箱内反应 48 小时以上 ;

d. 用 800mM 氢氧化钠溶液配制浓度为 65 毫克 / 毫升的羧甲氨基胺溶液,加体积百分比为 4-5% 的羧甲氨基胺溶液于标记后的离心管内,置 37℃ 温箱内反应 1 小时 ;

e. 将离心管置于离心机内,16000×G 离心 15 分钟 ;用移液管吸取上清溶液,再加入 100mM Tris-HCl pH 8.0 溶液,重新悬浮微球 ;重复离心,最终调整浓度至 5-10 微克 / 毫升备用 ;

f. 用 pH 8.0 0.1 M Tris-HCl 缓冲液将标记后受体微球稀释至 20 微克 / 毫升,制备受体微球溶液。

[0013] 一种甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析的检测方法,其是按以下步骤进行的,

a. 将分别瓶装的甲状腺过氧化物酶抗体标准品、链霉亲和素包被供体微球溶液、生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原和甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液取出,至室温平衡 20 分钟 ;并将均相发光 96 孔测定板根据需要做好标记 ;

b. 测定板微孔内依次加入 50 微升待测样本或标准品、25 微升生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原、25 微升甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液,混匀后置 37℃ 温箱或水浴,温育 30 分钟 ;

c. 各孔再加入 150 微升链霉亲和素标记供体微球溶液,混匀后置 37℃ 温箱或水浴,继续温育 20 分钟 ;

d. 应用均相发光免疫分析仪测定各孔发光强度,激发波长采用 680 纳米,检测波长采用 615 纳米 ;

e. 标准品测定结果采用四参数拟合方式绘制标准曲线或获得数学函数,通过标准曲线或数学函数计算未知样品甲状腺过氧化物酶抗体浓度。

[0014] 基于上述设计的甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒的优势体现在如下几个方面 :

1. 均相免疫分析是一种“混合后测量”的检测方法,不需要分离或洗涤步骤,速度快,单位时间可检测大量标本,节省时间。同时,因没有洗涤过程可减少由于“洗涤”而造成的偏差,使检测结果具有较高精度。因此,同批试剂可共用一条标准曲线(酶免试剂每次测定均需随待检标本一起制作标准曲线)。

[0015] 2. 与酶免疫分析相比,本技术发明提供的均相发光免疫分析系统,具有很强抗干扰能力,较低背景信号,使测定方法具有很高敏感度。特别是对含量处于“灰区(临界点)”标本,均相发光免疫分析具有很高的分辨率。

[0016] 总之,本技术发明提供的甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂,集酶免疫分析和化学发光免疫分析的优点于一体,并能克服两种方法的缺点,可准确测定血清或血浆中甲状腺过氧化物酶抗体水平,帮助临床医生诊断桥本氏甲状腺炎、突眼性甲状腺肿(Graves 病)等自身免疫性甲状腺疾病的,应用于自身免疫性甲状腺疾病高危人群筛查、诊断和治疗效果评估。

附图说明

[0017] 图 1-1 甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂的发光原理示意图;

图 1-2 甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂的发光原理示意图;

图 2 甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂的检测原理示意图;

图 3 甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒检测流程图;

其中:

1:待检血清(或标准品)

2:受体微球(预包被 TPO 抗体)

3:生物素标记抗原

4:供体微球(预包被链霉亲和素)。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图及实施例对本发明进行详细说明。

[0019] 一. 检测原理

1. 光激发偶联免疫分析技术 光激发偶联免疫分析方法系统由两种 100 纳米的微球组成,利用作为供体和受体的微球来检测生物分子的相互作用。微球表面覆盖了一层水凝胶,作为生物连接的功能基因。依靠生物分子存互作用将供体和受体微球拉近,从而激发级联放大的化学反应,产生极大增强了信号。具体来说,在激光(波长 680 纳米)的照射下,供体微球上的光敏剂将周围环境中的氧气转化为更为活跃的单体氧。单体氧扩散至受体微球,与其上的化学发光剂反应,进一步激活了同样在受体上的荧光基因,使之发出荧光,波长为 520-620 纳米。具体到本发明而言,受体微球包被甲状腺过氧化物酶抗体,同时,将生物素标记在甲状腺过氧化物酶分子表面,形成生物素化甲状腺过氧化物酶。生物素化甲状腺过氧化物酶同时与甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球和链霉亲和素包被的供体微球结合。从而使供、受体相互靠近;此时,当供体微球受到激光照射而感光释放能量,此能量转移至受体微球使受体微球发光,如图 1-1 所示。如体系中不存在生物素化的甲状腺过氧化物酶,供、受体微球不能相互靠近,能量不能转移,受体微球没有光信号产生,如图 1-2 所示。

[0020] 2. 采用竞争性免疫分析的检测模式

本发明采用竞争性免疫分析的检测模式:即血清中待检甲状腺过氧化物酶抗体和受体微球表面的甲状腺过氧化物酶抗体,共同竞争限量的生物素的甲状腺过氧化物酶(抗原);血清中待检甲状腺过氧化物酶抗体的存在,中和体系中生物素化甲状腺过氧化物酶,从而抑制其与受体微球表面预包被已知甲状腺过氧化物酶抗体结合,以至抑制结合供体微球。也就是说,血清中待测抗甲状腺过氧化物酶抗体越多,荧光强度越弱,如图 2 所示。用已知的不同浓度的抗甲状腺过氧化物酶抗体为标准品,按上述模式反应、测定即可获得一条剂量-反应曲线(或数学函数关系);如将未知浓度待测标本进行同样操作,则可利用上述剂量反应曲线获得标本中待测甲状腺过氧化物酶抗体的浓度。

[0021] 二. 试剂组分

甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂主要包括以下组分：

1. 甲状腺过氧化物酶抗体标准品，
2. 链霉亲和素包被供体微球溶液，
3. 生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原，
4. 甲状腺过氧化物酶抗体包被受体微球溶液，
5. 均相发光 96 孔测定板。

[0022] 三. 制备方法**1. 关键原料**

① 受体微球 50 μ l 20 mg/ml, 购自铂金-埃尔默公司。

[0023] ② 链霉亲和素包被供体微球 200 μ l 5 mg/ml, 购自铂金-埃尔默公司。

[0024] ③ 生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原 购自美国 Sigma 公司

④ 甲状腺过氧化物酶抗体 沃克(天津)生物科技有限公司制备。

[0025] 2. 试剂组分制备**① 甲状腺过氧化物酶抗体标准品**

收集 TPOAb > 1000 IU/ml 临床标本, 混合, 经饱和度为 50% 硫酸铵溶液沉淀获得丙种球蛋白, Sephadex 4B-Protein A 亲和层析获得 IgG, 再通过重组 TPO 亲和层析柱 (重组 TPO 与溴化氰活化 Sephadex G-25 连接) 获得特异性抗 TPO (IgG), 并定量作为标准品储存液。用标准品稀释液配制不同浓度标准品, 采用 5 点定标, 标准品浓度分别是: 0 IU/ml, 5 IU/ml, 10 IU/ml, 50 IU/ml, 100 IU/ml。

[0026] ② 受体微球包被特异性抗体

a. 预处理抗体和含量测定 将欲标记的甲状腺过氧化物酶抗体装入透析袋中, 置于 0.1 M pH 8.0 磷酸盐缓冲液透析, 去除 Tris、甘氨酸等含有氨基的成分。透析后的抗体溶液, 用紫外分光光度计测定抗体含量, 调整浓度至 1-2 毫克 / 毫升。

[0027] b. 洗涤微球 取 50 微升 (20 毫克 / 毫升) 受体微球置于 1.5 毫升塑料离心管中, 加入 0.1 M pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水溶液, 离心洗涤 1-2 次, 每次 16000 \times G 15 分钟, 吸干上清液待用。

[0028] c. 标记 上述离心管内加入 0.1 毫克抗体并用 0.1 M pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水溶液定容至 200 微升, 再依次加入 1.25 微升 10% 吐温 20 (Tween-20) 溶液、10 微升新鲜配制的 400 mM 氰基硼氢化钠 (NaBH₃CN) 溶液。充分混匀置 37 $^{\circ}$ C 温箱内反应 48 小时以上。

[0029] d. 封闭 用 800 mM 氢氧化钠溶液配制浓度为 65 毫克 / 毫升的羧甲氨基胺溶液。加 10 微升羧甲氨基胺溶液于标记后的离心管内, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱内反应 1 小时。

[0030] e. 洗球 将离心管置于离心机内, 16000 \times G 离心 15 分钟; 用移液管吸取上清溶液, 再加入 200 微升 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液, 重新悬浮微球; 重复离心, 再次悬浮至 50 微升备用。

[0031] ③ 甲状腺过氧化物酶抗体的制备

a. 收集临床 TPO 抗体强阳性 (大于 2000 IU / 毫升) 血清标本; 共 30 例, 总量 40 毫升, 为混合血清;

b. 用磷酸盐缓冲盐水溶液 (0.01 M pH 7.4 PBS) 等体积稀释上述混合血清; 在磁力搅

拌器上缓慢加入等体积(80mL)的饱和硫酸铵溶液,于4℃继续搅拌20分钟,静置3小时;

c. 于4℃条件下,以每分钟5000转速度离心20分钟,弃上清;

d. 沉淀用10 mL磷酸盐缓冲盐水溶液复溶,装入透析袋;在0.01M PBS中4℃透析24小时;透析后溶液,再次离心,取上清备用;

e. 准备蛋白A层析柱,将上述溶液经蛋白A亲和层析柱做亲和层析,用紫外检测仪检测洗脱液蛋白含量;当未结合蛋白峰至基线时,更换pH 3.0蛋白洗脱溶液(柠檬酸21g, ACA10 g蒸馏水1000毫升,调pH至3.0。收集洗脱蛋白峰;

f. 用微粒子酶免疫法测定TPO抗体活性,分装备用。

[0032] ④ 配制受体微球溶液 用pH 8.0 0.1 M Tris-HCl 缓冲液将标记后受体微球稀释至20微克/毫升(25微升/测试,0.5微克)。

[0033] 注:10×Tris-HCl 测定缓冲液配制:1M Tris, 0.1% Tween-20, 0.05% Proclin-300,使用时用蒸馏水稀释10倍。

[0034] ⑤ 配制供体微球溶液

用pH 8.0 0.1 M Tris-HCl 缓冲液将标记后供体微球稀释至5微克/毫升(100微升/测试,0.5微克)。

[0035] 3 使用方法

甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析的检测方法,如图3所示。

[0036] ① 将分别瓶装的甲状腺过氧化物酶抗体标准品、链霉亲和素包被供体微球溶液、生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原和甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液取出,至室温平衡20分钟,将均相发光96孔测定板根据需要做好标记;

② 测定板微孔内依次加入50微升待测样本(或标准品)、25微升生物素标记抗原、25微升甲状腺过氧化物酶抗体包被受体微球溶液,混匀后置37℃温箱或水浴,温育30分钟;

③ 各孔再加入150微升链霉亲和标记供体微球溶液,混匀后置37℃温箱或水浴,继续温育20分钟;

④应用均相发光免疫分析仪测定各孔发光强度,激发波长采用680纳米,检测波长采用615纳米;

⑤标准品测定结果采用四参数拟合方式绘制标准曲线或获得数学函数,通过标准曲线或数学函数计算未知样品甲状腺过氧化物酶抗体浓度。

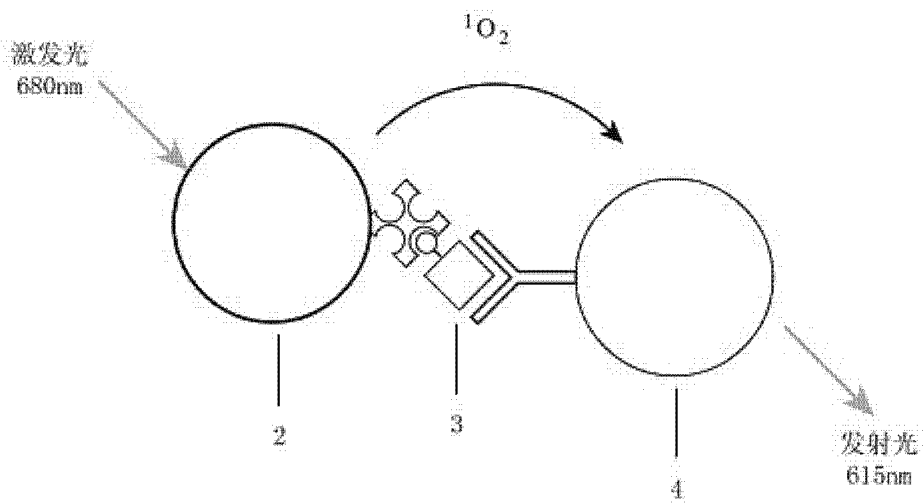


图 1-1

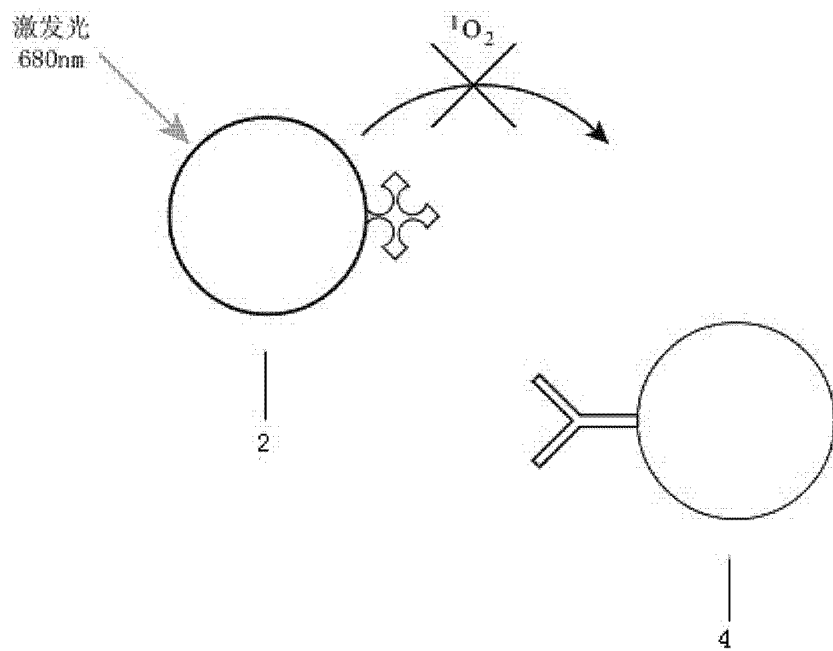


图 1-2

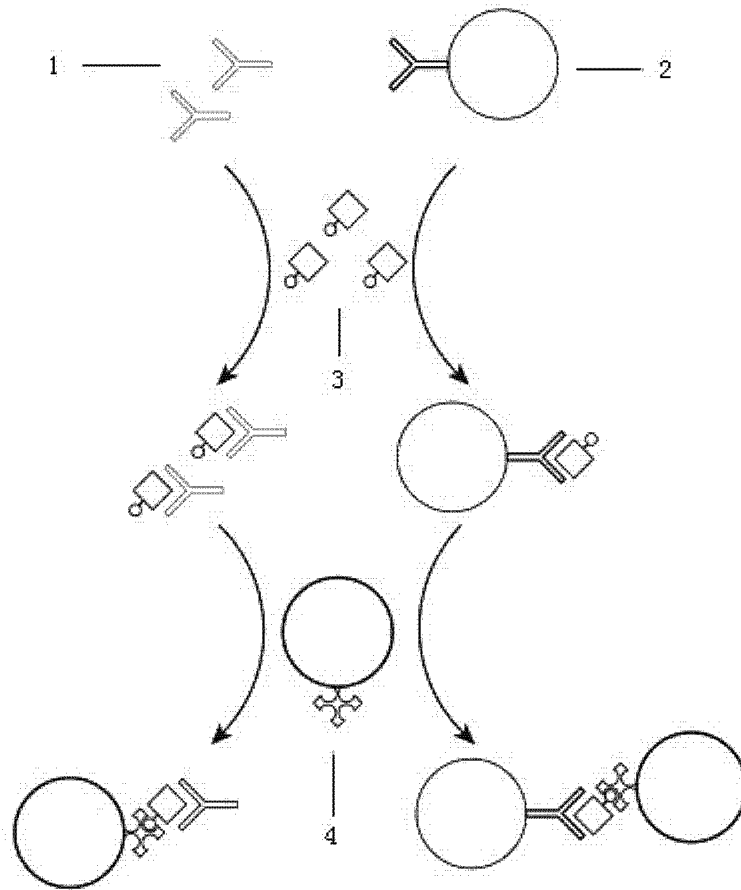


图 2

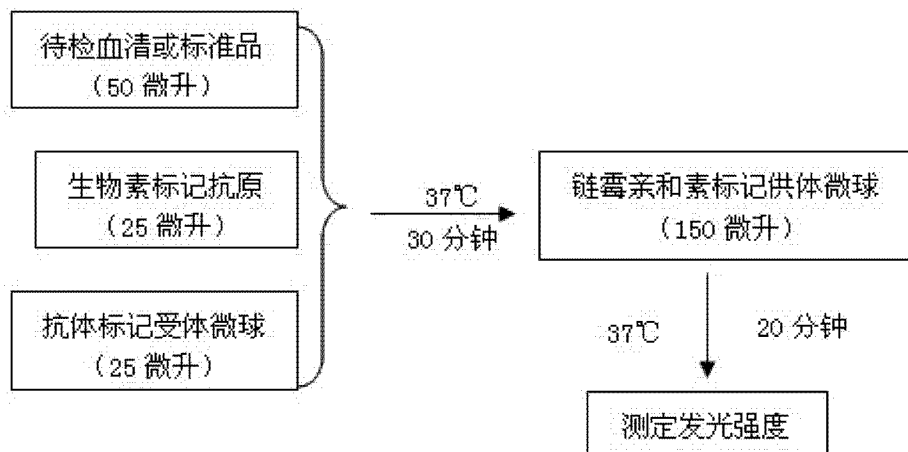


图 3

专利名称(译)	甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN102735833A	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	CN201210235362.X	申请日	2012-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	沃克(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	李会强 孙颖 张明华 王高升 单立新 苑凤君 薛寒		
发明人	李会强 孙颖 张明华 王高升 单立新 苑凤君 薛寒		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
其他公开文献	CN102735833B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种甲状腺过氧化物酶抗体均相发光免疫分析试剂盒及其检测方法。本发明包括均相发光96孔测定板，甲状腺过氧化物酶抗体标准品，链霉亲和素包被供体微球溶液和生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原，还包括甲状腺过氧化物酶抗体包被的受体微球溶液。本发明样本中的甲状腺过氧化物酶抗体和受体微球上甲状腺过氧化物酶抗体竞争结合生物素标记甲状腺过氧化物酶抗原。测量已知不同含量标准品的发光信号，绘制标准曲线并获得数学函数，未知样本含量通过数学函数获得。本发明集酶免疫分析和化学发光免疫分析的优点于一体，准确测定血清中甲状腺过氧化物酶抗体水平，应用于自身免疫性甲状腺疾病高危人群筛查、诊断和治疗效果评估。

