

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810104141.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月4日

[11] 公开号 CN 101377496A

[22] 申请日 2008.4.16

[21] 申请号 200810104141.2

[71] 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中
路7号北科技园

[72] 发明人 辛天兵 应希堂 宋胜利 胡国茂
郑金来 于尚永

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测甲状腺过氧化物酶自身抗体的化学
发光免疫分析测定试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种甲状腺过氧化物酶自身抗体
(TPOAb)的化学发光免疫测定试剂盒及制备方法。
本发明的优点在于：采用“双抗原夹心法”的反应
模式，有效地利用了化学发光技术和生物素-亲和
素免疫放大技术原理，并采用了辣根过氧化物酶作为
标记酶，定量检测人体血清样品中甲状腺过氧化物酶
自身抗体的含量，确保了检测的灵敏度。本发明的
试剂盒具有灵敏度高，重复性好，稳定性好，检测
效率高，可为临床诊断、治疗甲状腺疾病提供及
时、可靠的实验依据。

1、一种甲状腺过氧化物酶自身抗体(TPOAb)化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:甲状腺过氧化物酶自身抗体校准品、甲状腺过氧化物酶抗原包被的微孔板、生物素化的甲状腺过氧化物酶抗原、辣根过氧化物酶标记的链亲和素、上述辣根酶所作用的化学发光底物液以及25倍浓缩洗涤液。

2、如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包含A液和B液,其中:

所述化学发光底物A液,包括10mM鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯、0.05mM 4-碘苯硼酸、0.2M pH8.7硼酸-硼砂缓冲液,其pH值为8.0~10.0;

所述化学发光底物B液,包括3.5mM过氧化脲、0.1% Tween20、0.2M pH7.2磷酸盐缓冲液,其pH值为7.0~7.6;

使用前将A液与B液按1:1比例混合后使用。

3、如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述25倍浓缩洗涤液包含0.25M pH7.4磷酸盐缓冲液、20% NaCl、0.1% Tween-20、0.1% Proclin 300,调整pH至7.2~7.4,使用时用蒸馏水稀释25倍。

4、一种制备权利要求1所述试剂盒的方法,其特征在于包括以下步骤:

a)以甲状腺过氧化物酶自身抗体配制校准品;b)以甲状腺过氧化物酶抗原包被微孔板;c)生物素化标记甲状腺过氧化物酶抗原;d)用辣根过氧化物酶标记链亲和素;e)配制化学发光底物液;f)配制25倍浓缩洗涤液;g)分装组分并组装为成品。

5、如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述甲状腺过氧化物酶抗原包被微孔板的步骤b)采用以下方法:采用0.05M pH7.2的PBS缓冲液与适当浓度的甲状腺过氧化物酶抗原混合制成包被液,并将其负载于微孔板上;用洗涤缓冲液洗涤后,再用水解明胶封闭液进行封闭2小时,干燥封板后保存备用。

6、如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述水解明胶封闭液包含:1.28mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.0%水解明胶, 0.1% Proclin300,其pH为7.2~7.4。

7、如权利要求4所述的方法,其特征在于,在所述制备生物素标记TPO抗原的步骤c)中是通过生物素琥珀酰亚胺酯在微碱性条件下与抗原发生偶联反应

而实现的。

8、如权利要求4所述的方法，其特征在于，在所述以辣根过氧化酶标记链亲和素的步骤d)中，采用改良的戊二醛法以辣根过氧化酶标记链亲和素。

9、如权利要求4所述的方法，其特征在于，所述化学发光底物液包含A液和B液，其中：

所述化学发光底物A液，包括10mM鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯、0.05mM 4-碘苯硼酸、0.2M pH8.7硼酸-硼砂缓冲液，其pH值为8.0~10.0；

所述化学发光底物B液，包括3.5mM过氧化脲、0.1% Tween20、0.2M pH7.2磷酸盐缓冲液，其pH值为7.0~7.6；

使用前将A液与B液按1:1比例混合后使用。

10、如权利要求4所述的方法，其特征在于，所述25倍浓缩洗涤液步骤f)包含0.25M pH7.4磷酸盐缓冲液、20% NaCl、0.1% Tween-20、0.1% Proclin 300，调整pH至7.2~7.4，使用时用蒸馏水稀释25倍。

一种检测甲状腺过氧化物酶自身抗体的化学发光免疫分析测定 试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫分析领域，具体涉及到一种甲状腺过氧化物酶自身抗体测定试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒结合了生物素-亲和素免疫放大技术和化学发光免疫分析技术。

背景技术

人体甲状腺是内分泌系统中重要的组成部分，甲状腺激素参与许多重要的生理反应。它们在人体生长发育、细胞代谢和体内激素平衡，以及对维持代谢、骨骼肌和各器官系统的发育都起着重要的调节作用。自身免疫性甲状腺疾病(AITD)是由T细胞所介导的器官特异自身免疫性疾病，患者血清中存在多种针对甲状腺抗原的自身抗体，甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)是其中最重要的一种，普遍存在于自身免疫性甲状腺疾病中。近年来研究证实，TPO是一种膜整合蛋白，其分子量为110KD，TPO在滤泡细胞中由甲状腺激素合成，是甲状腺微粒体(TM)的主要抗原成分，存在于患者体内的TPOAb就是甲状腺微粒体抗体(TMAb)。一般认为，对于AITD的诊断，测定血清TPOAb比测定TMAb更可靠。TPOAb还是AITD患者体内一种重要的免疫学指标，而且对甲状腺疾病的诊断有较好的特异性。对原发性甲减患者，结合hTSH升高，可以发现早期甲减病人。TPOAb的测定还可作为Graves病、桥本甲亢等诊断和鉴别诊断的首选指标。

目前，免疫分析方法可以提供分析物的宽范围检测和很低的检测限，并且费用低廉，为分析物的检测提供了一个快速、简便、高灵敏度的分析方法。因此，免疫分析法作为一种重要的分析方法已广泛应用于临床诊断和生物化学等方面的研究。常用TPOAb检测的方法有放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)、酶免疫分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)等。然而，放射性元素对环境的污染及半衰期短等因素限制RIA与IRMA的广泛应用；酶免疫吸附分析法因灵敏度低、检测范围窄等无法满足临床要求。化学发光免疫分析技术是把高灵敏的化学发光

分析方法和特异性强的免疫分析方法相结合发展起来的一项具有化学发光分析的高灵敏度和免疫分析法的高选择性的新的免疫分析技术。该法具有特异性高、灵敏度高、快速、简便及无放射性污染等优点，已广泛应用于医学、生物和化学等领域。

生物素-亲和素 (biotin-avidin system, BAS) 之间的亲和常数远大于抗原-抗体间亲和常数，且每个亲和素能结合 4 个分子的生物素。它们之间一旦发生结合，则很难分离，且受 pH、有机溶剂的影响很小。生物素的分子量小，生物素的蛋白标记过程简单，对蛋白活性影响小，单位蛋白上可实现多个生物素标记。该系统具有多级的信号放大作用，并且不增加非特异性干扰，且具有灵敏度高、特异性好、稳定性高、适用性强和实验成本低等特点。待测反应体系可以利用生物素化的抗原，使得亲和素-生物素系统与免疫分析检测体系偶联，放大终反应。

本发明采用“双抗原夹心法”的化学发光免疫分析技术测定人血清中的甲状腺过氧化物酶自身抗体，两个特异抗原分别针对抗体形成夹心复合物。如果单纯利用直接化学发光免疫分析的方法，则方法的灵敏度比较低，而采用生物素-亲和素系统就可以避免这样的缺点。本发明就是利用链亲和素标记的酶与生物素化的甲状腺过氧化物酶抗原结合，当血清样品和标准加入固相载体后，包被好的抗原与血清中的 TPO 抗体形成特异性的夹心复合物，然后加入化学发光底物，利用化学发光仪检测相对发光强度，就可以定量分析人血清中的甲状腺过氧化物酶自身抗体。

化学发光免疫分析结合生物素-亲和素系统体系是一种检测 TPOAb 的先进而有效的方法，无需昂贵的仪器，还可以大大提高灵敏度，并且操作简便、适用性广，既可应用于开放式的半自动化学发光测量仪，也可用于全自动的测量系统，更加有助于促进化学发光免疫分析技术在临床检验、检测中的应用与发展。

发明内容

本发明的目的是提供一种生物素-亲和素免疫放大技术和化学发光免疫分析技术相结合定量检测人血清中甲状腺过氧化物酶自身抗体的化学发光免疫分析测定试剂盒。

根据本发明的试剂盒包括：甲状腺过氧化物酶自身抗体校准品、甲状腺过氧化物酶包被的微孔板、生物素化的甲状腺过氧化物酶抗原、辣根过氧化物酶标记的链亲和素、上述辣根过氧化物酶所作用的化学发光底物液以及 25 倍浓缩洗涤液。

本发明的再一目的是提供一种制备上述试剂盒的方法。

根据本发明制备上述试剂盒的方法包括以下步骤：

a) 以甲状腺过氧化物酶自身抗体配制校准品，用马血清将 TPOAb 纯品稀释成不同浓度的校准品。

b) 甲状腺过氧化物酶抗原包被微孔板，具体地包被方法包括：采用 0.05 M pH 7.2 的 PBS 缓冲液与适当浓度的甲状腺过氧化物酶抗原混合制成包被液，并将其负载于微孔板上；用洗涤缓冲液洗涤后，再用水解明胶封闭液进行封闭 2h；然后洗涤五次，干燥封袋后保存备用。

c) 生物素化标记甲状腺过氧化物酶抗原，是通过生物素琥珀酰亚胺酯在微碱性条件下与抗原发生偶联反应而实现的。

d) 辣根过氧化物酶标记链亲和素，是采用改良的戊二醛法以辣根过氧化物酶标记链亲和素。

e) 配制化学发光底物液包含 A 液和 B 液，其中：所述化学发光底物 A 液，包括 10mM 鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯、0.05mM 4-碘苯硼酸、0.2M pH8.7 硼酸-硼砂缓冲液，其 pH 值为 8.0~10.0；所述化学发光底物 B 液，包括 3.5mM 过氧化脲、0.1% Tween20、0.2M pH7.2 磷酸盐缓冲液，其 pH 值为 7.0~7.6。

f) 配制 25 倍浓缩洗涤液包含 0.25M pH7.4 磷酸盐缓冲液、20% NaCl、0.1% Tween-20、0.1% Proclin 300，调整 pH 至 7.2~7.4，使用时用蒸馏水稀释 25 倍。

g) 分装上述组分并组装为成品。

具体的上述试剂盒采用“双抗原夹心法”的反应模式，有效地利用了化学发光技术结合生物素-亲和素免疫放大技术原理，确保了检测的灵敏度。本发明试剂盒对于自身免疫性甲状腺疾病、原发和继发性甲减、Graves 病、桥本甲亢等疾病的诊断提供了可靠的依据。本发明试剂盒灵敏度高，重复性好，具有良好的稳定性和较高的检测效率。

附图说明

图1为实施例1所制备的试剂盒的校准曲线图(log-log标准曲线)。

具体实施方式

实施例1 制备本发明的TPOAb化学发光免疫分析测定试剂盒

一、TPOAb校准品的制备

用马血清将TPOAb纯品稀释成校准品，浓度分别为0、25、50、150、300、600 IU/mL。

二、TPO抗原包被微孔板的制备

a) 包被

采用0.05 M pH 7.2的PBS缓冲液与适当浓度的甲状腺过氧化物酶抗原混合制成包被液，并将其负载于发光微孔板上；

b) 用洗涤液洗涤上述微孔板；以及

c) 封闭

配制水解明胶封闭液，基于1000mL所述封闭液包含：1.28mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，8.10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，1.0%水解明胶，0.1%Proclin300，其pH为7.2~7.4，然后将所得封闭液负载于上述洗涤后的微孔板上封闭2小时，甩掉封闭液，干燥封袋后保存备用。。

三、生物素标记的TPO抗原的制备

生物素标记TPO以生物素琥珀酰亚胺酯在微碱性条件下与抗原发生偶联反应而制得，具体的标记过程如下：

TPO抗原在0.05 M碳酸盐缓冲液中透析4小时；用二甲基亚砷溶解生物素琥珀酰亚胺酯后，将其投进适当浓度的TPO抗原溶液中，室温静置反应2小时后，转移该溶液至0.01 M的磷酸盐缓冲液中透析；最后往结合物内加入等量甘油，于4℃保存备用。

四、辣根过氧化物酶标记的链亲和素的制备

以辣根过氧化物酶标记链亲和素采用改良的戊二醛法，具体标记过程如下：

称取将5mg HRP溶于0.1ml含1.25%戊二醛的PH 6.8 0.1mol/L PBS中，置室温18小时，经葡聚糖凝胶G-25层析除去多余戊二醛，加生理盐水至0.5ml，然后加入5mg纯化的链亲和素及0.05ml PH 9.6的1 mol/L碳酸盐缓冲液，混合后于4℃冰箱放置24小时，加入0.05ml 0.2 mol/L的赖氨酸溶液，室温置2小时，

用 PH 7.2、0.15 mol/L PBS 充分透析，离心除去沉淀，上清即为酶结合物，加入等体积甘油，混匀后，密闭冷冻保存。使用时用酶稀释液（包含 0.1M 三羟甲基氨基甲烷、150 mM 氯化钠、1% BSA 和 0.1% Proclin300，0.005% 食品红，pH 值约为 7.5）稀释浓酶标记物成工作浓度为 1:3000~5000。

五、化学发光底物 A 液

鲁米诺	10mM	1.7716g
4-羟基联苯	0.3mM	0.051g
4-碘苯硼酸	0.05mM	0.012g
硼酸		11.4g
硼砂		4.9g
蒸馏水	定溶	1000mL
pH		8.0~10.0

六、化学发光底物 B 液

过氧化脲	3.5mM	0.329g
Tween20	0.1%	1mL
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O		51.58g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O		8.74g
蒸馏水	定溶	1000mL
pH		8.0~10.0

使用时 A 液与 B 液等比例混合。

七、25 倍浓缩洗涤缓冲液

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	72.5g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2.5g
NaCl	200g
Tween-20	1mL
Proclin 300	1mL
蒸馏水	定溶至 1000mL

调整 pH 至 7.2~7.4

使用时用蒸馏水稀释 25 倍。

八、半成品及成品组成

上述步骤所得产品分装即为半成品，组装成试剂盒抽检合格后即可作为成品使用。

实施例 2 本发明试剂盒的使用方法

一、样品前处理

取人的空腹晨血清样品，3000 rpm 离心 5 min，取上层血清进行分析。

二、检测方法

使用本试剂盒按照如下步骤操作：

- 1) 洗涤缓冲液配制：将试剂盒提供的洗涤液缓冲液加蒸馏水 25 倍稀释；
- 2) 将校准品、包被的微孔板、生物素标记物和酶标记物从 4℃ 冰箱中取出，放置 20 min，平衡至室温；
- 3) 反应孔中分别加待测样品和各浓度校准品每孔加 0、25、50、150、300、600 IU/mL 各 25 μ L，每次试验设空白 1 孔，然后除空白孔外各孔加生物素标记物溶液 100 μ L，37℃ 反应 30 min；
- 4) 弃去孔中溶液，用稀释好的洗涤缓冲液洗涤 5 次，在吸水纸上拍干；
- 5) 除空白孔外每孔加入辣根过氧化酶标记的亲合素溶液 100 μ L，37℃ 反应 30 min；
- 6) 弃去孔中溶液，用稀释好的洗涤缓冲液洗涤 5 次，在吸水纸上拍干；
- 7) 化学发光底物 A、B 液使用前 1: 1 混合配置，每孔加混合液 100 μ L，充分混匀，暗处放置 15 min；
- 8) 在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU)，测量时间 1 S/孔；
- 9) 分别对校准品浓度和对应 RLU 取对数，在双对数坐标图上建立标准曲线，以校准品浓度的 Log 值为横坐标，RLU 的 Log 值为纵坐标绘出标准曲线，以各待测血清 RLU 值在标准曲线上查出该血清甲状腺过氧化酶自身抗体的浓度，其中，RLU 为发光强度，Concentration 为 TPOAb 浓度 (单位为 IU/mL)，见附图 1；
- 10) 打印检测结果报告。

实施例 3 本发明的试剂盒的方法学检定

按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定，本发明对试剂盒的精密度、准确度、灵敏度、特异性以及稳定性等都进行了具体

的实验操作，实验结果见表1。结果表明“甲状腺过氧化酶自身抗体化学发光免疫分析测定试剂盒”的灵敏度、精密度、准确性、特异性和稳定性是完全合格的。

表1 试剂盒的技术指标检测结果

检验项目	检验标准	检验结果
准确性	平均回收率在 90.0~110.0%	94.2~108.6%
特异性	与其类似物的交叉反应率 $\leq 0.1\%$	$< 0.07\%$
精密性 CV (%)	$\leq 15\%$ (n=30)	8.4%
灵敏度	≤ 5.0 IU/mL	4.6 IU/mL
稳定性	各试剂组分置 37℃ 至少 7 天	符合以上检验指标

利用本发明方法进行检测，灵敏度高，特异性强，检测范围宽，操作简单，无放射性污染，试剂盒成本低，临床适用性强，更适用于我国临床检测实验室。因此本发明试剂盒可用于原发和继发甲减、Graves 病、桥本甲亢等疾病的诊断和鉴别诊断。

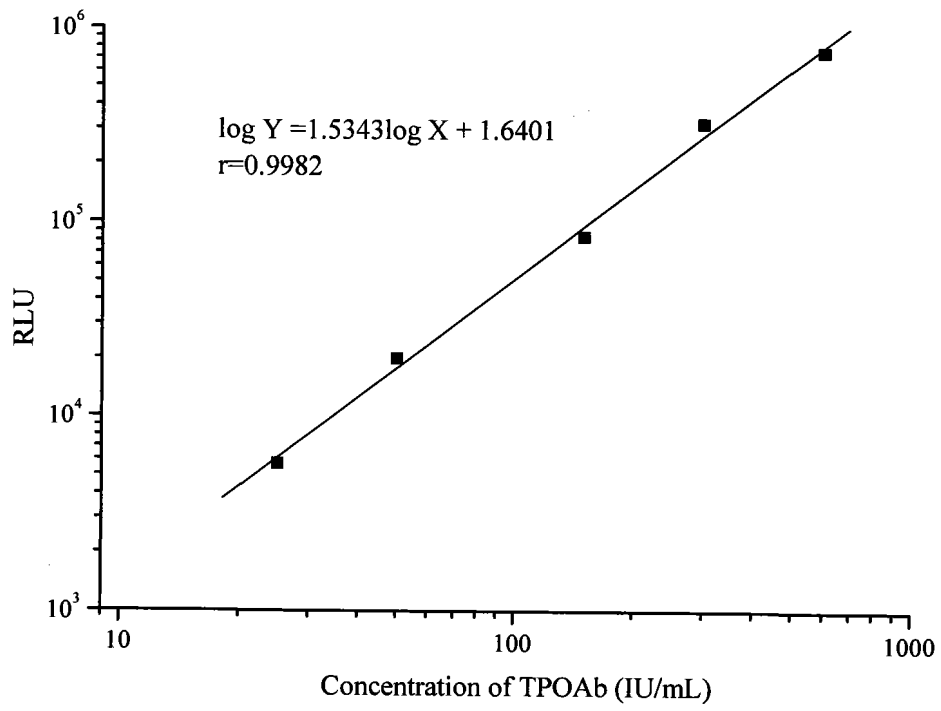


图 1

专利名称(译)	一种检测甲状腺过氧化物酶自身抗体的化学发光免疫分析测定试剂盒		
公开(公告)号	CN101377496A	公开(公告)日	2009-03-04
申请号	CN200810104141.2	申请日	2008-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
[标]发明人	辛天兵 应希堂 宋胜利 胡国茂 郑金来 于尚永		
发明人	辛天兵 应希堂 宋胜利 胡国茂 郑金来 于尚永		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种甲状腺过氧化物酶自身抗体(TPOAb)的化学发光免疫测定试剂盒及制备方法。本发明的优点在于：采用“双抗原夹心法”的反应模式，有效地利用了化学发光技术和生物素-亲和素免疫放大技术原理，并采用了辣根过氧化物酶作为标记酶，定量检测人体血清样品中甲状腺过氧化物酶自身抗体的含量，确保了检测的灵敏度。本发明的试剂盒具有灵敏度高，重复性好，稳定性好，检测效率高，可为临床诊断、治疗甲状腺疾病提供及时、可靠的实验依据。

