



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109001472 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201810880155.7

(22)申请日 2018.08.03

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 孙天旭 李婷 孙成艳 高威
何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 张伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

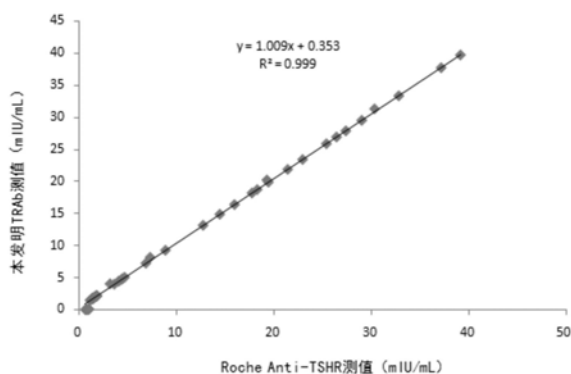
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法,属于免疫分析医学检测技术领域。解决现有检测人促甲状腺素受体抗体的免疫分析方法无法区分人促甲状腺素受体刺激性、抑制性、中和性抗体,检测灵敏度、准确性差的技术问题。本发明试剂盒使用链霉亲和素-生物素体系,链霉亲和素和生物素的结合比例为1:4,使得信号进一步放大,提高试剂灵敏度。通过改变标记抗体及抗原,特异性检测促甲状腺素受体刺激性抗体,增强了检测的特异性,为临床诊断提供更为精确、更具针对性的体外诊断试剂。本发明的试剂盒采用一步法竞争法的反应模式,定量检测人体血清中促甲状腺素受体刺激性抗体的含量,确保检测的灵敏度、特异性。



1. 一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于,包括:校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂;

所述R1试剂为包被有链霉亲和素的磁珠溶液;

所述R2试剂为用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释的吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液;

所述R3试剂为用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释的生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端溶液。

2. 根据权利要求1所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

3. 根据权利要求1所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液中促甲状腺素受体刺激性抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

4. 根据权利要求1所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端溶液中促甲状腺素受体蛋白N端与生物素的摩尔比为1:3-1:15。

5. 一种权利要求1-4任意一项所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 以人血清基质的人促甲状腺素刺激性抗体配制校准品;

2) 以人血清基质的人促甲状腺素刺激性抗体配制质控品;

3) R1试剂的制备

用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释后,制备得到包被有链霉亲和素的磁珠溶液,即为R1试剂;

4) R2试剂的制备

使用超滤离心管将促甲状腺素受体刺激性抗体缓冲液置换为PBS缓冲液,加入吖啶酯,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记抗体,将收集到的吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释,即为R2试剂;

5) R3试剂的制备

使用超滤离心管将促甲状腺素受体蛋白N端缓冲液置换为PBS缓冲液,加入生物素,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记抗体,将收集到的生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释,即为R3试剂;

6) 分装校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂,组装为成品。

6. 根据权利要求5所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤3)中所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

7. 根据权利要求5所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤4)中所述促甲状腺素受体刺激性抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

8. 根据权利要求5所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤5)中所述促甲状腺素受体蛋白N端与生物素的摩尔比为1:3-1:15。

9. 根据权利要求5所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 步骤4) 和步骤5) 中所述R2试剂和R3试剂的浓度均为0.05-1.0 μ g/mL。

10. 一种权利要求1-4任意一项所述的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的使用方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

将待测样本与R2试剂孵育10min, 加入R3及R1试剂孵育10min, 洗涤, 加入激发液记录相对发光强度。

人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和 使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫分析医学检测技术领域,具体涉及一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法,用于人体内促甲状腺素受体刺激性抗体的定量检测。

背景技术

[0002] 促甲状腺激素受体自身抗体 (TRAb) 是一组多克隆抗体,具有异质性,主要有三种:(1) 甲状腺刺激性抗体 (TSAb),其可模拟促甲状腺激素 (TSH) 作用刺激甲状腺细胞的功能和生长,引起甲状腺功能亢进与甲状腺肿大。(2) 甲状腺阻滞性抗体 (TBA b),其具有阻滞TSH或TSAb对甲状腺的兴奋作用,可引起加减。(3) 中和性自身抗体,其与促甲状腺激素受体 (TSHR) 结合后既不激活TSHR也不阻滞TSAb对TSHR的激活作用。

[0003] Graves病是一种器官特异性自身免疫性疾病,在疾病的活动期血循环中,存在自身抗体及激活的T细胞。TRAb中的刺激性抗体TSAb与TSH受体结合后刺激甲状腺,引起甲状腺功能亢进。临床上TRAb的测定度Graves甲状腺具有早期诊断意义,其特异性可达到90%以上,甚至100%,即患有此病者TRAb的测定绝大多数为阳性。检测Graves病患者治疗和复发情况,对临床治疗管理具有重要指导作用。Graves病抗甲状腺药物治疗期间TRAb浓度常下降。药物治疗后TRAb低浓度或消失可能提示疾病缓解,可以考虑终止治疗。

[0004] 孕期后三个月的TRAb测定。TRAb是IgG类抗体,可通过胎盘并引起新生儿甲状腺疾病。孕妇TSAb高则婴儿可能罹患甲亢,新生儿TSAb高可能患甲亢,因此有甲状腺疾病史的患者在怀孕期间测定TRAb对于评估新生儿甲状腺疾病危险程度非常重要。

[0005] 此外,临床上对TSAb的检测还有其他重要意义:初发未治患者阳性率大于80%,因此对不典型GD的诊断有重要价值;用于与其它型甲亢的鉴别;检测GD患者家属有无自身免疫性甲状腺疾病的倾向。

[0006] 目前用于检测人促甲状腺素受体抗体的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法。酶联免疫分析法存在灵敏度低,线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析因其有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0007] 然而,在实际的免疫检测中,由于待测血清样品中所含的干扰成分较多,一定程度上影响了检测的灵敏度和准确性。从复杂的血清样品中,快速分离,纯化出目的待测物是临床体外诊断面临的重大难题。

发明内容

[0008] 本发明要解决现有技术中检测人促甲状腺素受体抗体的免疫分析方法无法区分人促甲状腺素受体刺激性、抑制性、中和性抗体,检测灵敏度、准确性差的技术问题,提供一

种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法。

[0009] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案具体如下:

[0010] 一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒,包括:校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂;

[0011] 所述R1试剂为包被有链霉亲和素的磁珠溶液;

[0012] 所述R2试剂为用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释的吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液;

[0013] 所述R3试剂为用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释的生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端溶液。

[0014] 在上述技术方案中,所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

[0015] 在上述技术方案中,所述吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液中促甲状腺素受体刺激性抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

[0016] 在上述技术方案中,所述生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端溶液中促甲状腺素受体蛋白N端与生物素的摩尔比为1:3-1:15。

[0017] 一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0018] 1) 以人血清基质的人促甲状腺素刺激性抗体配制校准品;

[0019] 2) 以人血清基质的人促甲状腺素刺激性抗体配制质控品;

[0020] 3) R1试剂的制备

[0021] 用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释后,制备得到包被有链霉亲和素的磁珠溶液,即为R1试剂;

[0022] 4) R2试剂的制备

[0023] 使用超滤离心管将促甲状腺素受体刺激性抗体缓冲液置换为PBS缓冲液,加入吖啶酯,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记抗体,将收集到的吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释,即为R2试剂;

[0024] 5) R3试剂的制备

[0025] 使用超滤离心管将促甲状腺素受体蛋白N端缓冲液置换为PBS缓冲液,加入生物素,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记抗体,将收集到的生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释,即为R3试剂;

[0026] 6) 分装校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂,组装为成品。

[0027] 在上述技术方案中,步骤3)中所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

[0028] 在上述技术方案中,步骤4)中所述促甲状腺素受体刺激性抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

[0029] 在上述技术方案中,步骤5)中所述促甲状腺素受体蛋白N端与生物素的摩尔比为1:3-1:15。

[0030] 在上述技术方案中,步骤4)和步骤5)中所述R2试剂和R3试剂的浓度均为0.05-1.0

μg/mL。

[0031] 一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0032] 将待测样本与R2试剂孵育10min,加入R3及R1试剂孵育10min,洗涤,加入激发液记录相对发光强度(RLU)。

[0033] 本发明的有益效果是:

[0034] 本发明提供的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒采用一步竞争法的反应模式,定量检测人体血清中促甲状腺素受体刺激性抗体的含量,确保检测的灵敏度、特异性。本发明的各项检测指标均达到同类进口试剂盒的分析水平。

[0035] 本发明提供的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒使用链霉亲和素-生物素体系,与现有磁珠体系相比,链霉亲和素和生物素的结合比例为1:4,使得信号进一步放大,提高试剂灵敏度。通过改变标记抗体及抗原,与原有检测技术相比,特异性检测促甲状腺素受体刺激性抗体,增强了检测的特异性,为临床诊断提供更为精确、更具针对性的体外诊断试剂。

附图说明

[0036] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0037] 图1为采用本发明人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的测试校准品检测相对发光值的标准曲线,横坐标为浓度,单位为mIU/mL,纵坐标为发光值。

[0038] 图2为本发明人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的血清检测结果与Roche公司试剂盒检测结果的相关性,横坐标X为Roche公司试剂盒样本测值,浓度为mIU/mL,纵坐标y为实施例1制备的的试剂盒样本值,浓度单位为mIU/mL。

具体实施方式

[0039] 本发明的发明思想为:本发明采用链霉亲和素-生物素体系,具有信号放大作用,进一步提高试剂灵敏度。磁珠免疫检测技术是利用高分子合成的微米级磁珠作为载体,通过化学偶联包被链霉亲和素,生物素标记抗体,通过链霉亲和素与生物素结合使得免疫复合物与磁珠连接。通过外加磁场、清洗分离未结合物质,具有分离速度快,特异性强等特点,能够有效提升试剂的灵敏度及特异性。基于此,本发明提供了一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒。本发明的试剂盒测定原理是竞争法。样本与生物素标记抗体R3溶剂共同孵育10min,加入吖啶酯标记抗体R2试剂与包被有链霉亲和素的磁珠溶液R1试剂共同孵育10min,样本与吖啶酯标记抗体及生物素标记抗体形成免疫复合物,通过生物素与链霉亲和素结合到磁珠。通过磁分离器分离免疫复合物,清洗液洗去未结合抗体。通过酸碱激发液激发吖啶酯发光,记录相对发光强度(RLU),在线性范围内,样本中TRAb的含量与相对发光强度成反比。

[0040] 下面结合附图对本发明做以详细说明。

[0041] 本发明提供一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒,包括:校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂;所述R1试剂为包被有链霉亲和素的磁珠溶液;所述R2试剂为用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释的吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液;所述R3试剂为用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM

bistris缓冲液稀释的生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端溶液。优选所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。优选所述吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液中促甲状腺素受体刺激性抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。优选所述生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端溶液中促甲状腺素受体蛋白N端与生物素的摩尔比为1:3-1:15。

[0042] 本发明还提供一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0043] 1) 以人血清基质的人促甲状腺素刺激性抗体配制校准品;

[0044] 2) 以人血清基质的人促甲状腺素刺激性抗体配制质控品;

[0045] 3) R1试剂的制备

[0046] 用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释后,制备得到磁珠浓度为0.05%-0.1%的包被有链霉亲和素的磁珠溶液,即为R1试剂;

[0047] 4) R2试剂的制备

[0048] 使用50KDa孔径超滤离心管将促甲状腺素受体刺激性抗体缓冲液置换为50mM-200mM PBS缓冲液,加入吖啶酯,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记抗体,将收集到的吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释至浓度为0.05-1.0 μ g/mL,即为R2试剂;所述促甲状腺素受体刺激性抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15;

[0049] 5) R3试剂的制备

[0050] 使用10KDa孔径超滤离心管将促甲状腺素受体蛋白N端缓冲液置换为50mM-200mM PBS缓冲液,加入生物素,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记抗体,将收集到的生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端用含有1%BSA、pH为6.0-8.0的100mM-400mM bistris缓冲液稀释至浓度为0.05-1.0 μ g/mL,即为R3试剂;所述促甲状腺素受体蛋白N端与生物素的摩尔比为1:3-1:15;

[0051] 6) 分装校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂,组装为成品。

[0052] 本发明还提供一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0053] 将待测样本与R2试剂孵育10min,加入R3及R1试剂孵育10min,洗涤,加入激发液记录相对发光强度(RLU),在一定范围内,TRAb的含量与相对发光强度成反比。

[0054] 实施例1制备本发明的TRAb化学发光检测试剂盒

[0055] 一、校准品的制备

[0056] 用含有20%人血清的100mM PBS缓冲液将TRAb稀释成校准品,分装成0mIU/mL、0.3mIU/mL、2.5mIU/mL、5mIU/mL、10mIU/mL、20mIU/mL、40mIU/mL。

[0057] 二、质控品的制备

[0058] 用含有20%人血清的100mM PBS缓冲液将TRAb抗体稀释成质控品,分装成浓度为1mIU/mL、25mIU/mL的两点质控品。

[0059] 三、包被有链霉亲和素的磁珠溶液R1试剂的配制

[0060] 用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释至磁珠浓度为0.1%,4 $^{\circ}$ C保存。

[0061] 四、吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体R2试剂的制备

[0062] 将促甲状腺素受体刺激性抗体500 μ g加入50KDa超滤离心管内,加入500 μ L的100mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为吖啶酯标记缓冲液。收取置换后溶液,按促甲状腺素受体刺激性抗体:吖啶酯=1:3摩尔比加入吖啶酯,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA,pH为6.0的100mM bistris缓冲液将纯化后抗体配制为0.05 μ g/mL的R2试剂,4 $^{\circ}$ C保存。

[0063] 五、生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端R3试剂的制备

[0064] 将促甲状腺素受体蛋白N端500 μ g加入10KDa超滤离心管内,加入500 μ L的100mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液,按促甲状腺素受体蛋白N端:生物素=1:15摩尔比加入生物素,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA,PH为6.0的100mM Bistris缓冲液将纯化后抗体配制为0.5 μ g/mL的R3试剂,4 $^{\circ}$ C保存。

[0065] 六、半成品及成品组成

[0066] 上述步骤所得产品分装即为半成品,抽出三份经过特异性、精密性、灵敏度、稳定性检定合格后,再与质控品组装成为人促甲状腺素受体抗体化学发光试剂盒。

[0067] 七、按照本领域常规的制造及检定规程对制备试剂盒进行检定,结果见下

[0068] 表1:

[0069]

检验项目	检验标准	检验结果
灵敏度	$\leq 0.3\text{mIU/mL}$	0.148mIU/mL
特异性	与其类似自身免疫抗体的交叉反应率 $\leq 0.01\%$	与促甲状腺素(TSH)交叉反应率为0.001%、促卵泡生成素(FSH)交叉反应率为0.001%、黄体生成素(LH)交叉反应率为0.002%、人绒毛促性腺激素(HCG)交叉反应率为0.001%、甲状腺球蛋白抗体(Anti-TG)交叉反应率为0.005%、抗甲状腺过氧化物酶抗体(Anti-TPO)交叉反应率为0.005%。

[0070] 综上,在本发明的研究过程中,本发明首先对所用的原材料进行了筛选及质量控制,包括抗体的浓度、纯度、亲和力的研究,吖啶酯及生物素标记后抗体活性。然后对吖啶酯

及生物素标记体系进行了研究,使用不同标记比例及标记缓冲液进行实验,通过反复实验及对比实验,最终找到了方法简便、产率高、成本低、质量可靠的标记方法。

[0071] 此外,本发明还对试剂盒的反应模式及条件进行了探索。通过不同的反应模式及反应时间对比实验,最终确定了本试剂盒采用竞争法一步两孵育,并最终确定了试剂孵育时间为10min,缩短了检测时间,提高了检测效率。

[0072] 实施例2本发明的TRAb化学发光检测试剂盒的方法学检定

[0073] 按照本领域中行业标准及检定规程对实施例1中制备的试剂盒进行检定,结果如下:

[0074] 1. 试剂盒线性范围测定

[0075] 将实施例1中制备的试剂盒其中1批,测定线性范围样本0mIU/mL、0.3mIU/mL、2.5mIU/mL、5mIU/mL、10mIU/mL、20mIU/mL、40mIU/mL,得出线性范围为0.3-40mIU/mL,相关系数 $R^2=0.9999$ 。

[0076] 表一试剂盒线性范围测定

[0077]

测定校准品浓度 (mIU/mL)	相对光强度 (RLU)
0	142648
0.3	125453
2.5	65633
5	38415
10	18752
20	10247
40	5410

[0078] 2. 试剂盒灵敏度的测定

[0079] 将实施例1中制备的试剂盒其中1批,测定20次零浓度样本,计算平均值(M)及标准差(SD),得出 $M+2SD$,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU进行两点回归拟合得出一次方程,将 $M+2SD$ 的RLU带入方程,得出相应浓度值即为试剂盒灵敏度0.148mIU/mL。

[0080] (1) 第一点发光值

[0081]

空白样本发光值				
142648	143874	141204	140218	141189
142384	148762	145792	141294	139824
132847	148963	135278	142871	149978
141125	142187	143471	148542	142218

[0082] 第一点发光均值 $M=142733$, $SD=4296.8$, $M-2SD=134140$

[0083] (2) 第二点发光值

[0084]

第二点校准发光值		
125578	124832	125949

[0085] 第一点与第二点连线拟合曲线,计算的灵敏度=0.148mIU/mL。

[0086] 3. 试剂盒特异性实验

[0087]

交叉反应物	实验浓度 (mIU/mL)	TRAb 测定浓度 (mIU/mL)	交叉反应率 (%)
甲状腺球蛋白抗体(Anti-TG)	4000	0.2	0.005%
抗甲状腺过氧化物酶抗体 (Anti-TPO)	600	0.03	0.005%
人黄体生成素(LH)	10000	0.2	0.002%
人促甲状腺激素(TSH)	1000	0.01	0.001%
人卵泡刺激素(FSH)	10000	0.1	0.001%
人绒毛膜促性腺激素(hCG)	50000	0.05	0.001%

[0088] 经过大量重复性实验,本发明的试剂盒指标如下:

[0089] 检测范围:0.15-40mIU/mL;

[0090] 灵敏度:最低检测限不高于0.148mIU/mL;

[0091] 特异性:与促甲状腺素(TSH)交叉反应率为0.001%、促卵泡生成素(FSH)交叉反应率为0.001%、黄体生成素(LH)交叉反应率为0.002%、人绒毛膜促性腺激素(HCG)交叉反应率为0.001%、甲状腺球蛋白抗体(Anti-TG)交叉反应率为0.005%、抗甲状腺过氧化物酶抗体(Anti-TPO)交叉反应率为0.005%。

[0092] 实施例3本发明的试剂盒与国外试剂盒临床样本测值比对

[0093] 用实施例1中制备的试剂盒与Roche公司试剂盒同时检测临床血清。其检测结果见图2。以Roche试剂盒测得的结果作为横坐标X,浓度为mIU/mL,以本发明测定的结果作为纵坐标y,浓度单位为mIU/mL,作回归方程,相关方程为: $y=1.009x+0.353$,相关系数为0.999。经统计学处理结果表明,本发明的试剂盒与国外试剂盒临床相关性良好。

[0094] 实施例4制备本发明的TRAb化学发光检测试剂盒

[0095] 一、校准品的制备

[0096] 用含有20%人血清的100mM PBS缓冲液将TRAb稀释成校准品,分装成0mIU/mL、0.3mIU/mL、2.5mIU/mL、5mIU/mL、10mIU/mL、20mIU/mL、40mIU/mL。

[0097] 二、质控品的制备

[0098] 用含有20%人血清的100mM PBS缓冲液将TRAb抗体稀释成质控品,分装成浓度为1mIU/mL、25mIU/mL的两点质控品。

[0099] 三、包被有链霉亲和素的磁珠溶液R1试剂的配制

[0100] 用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释至磁珠浓度为0.05%，4℃保存。

[0101] 四、吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体R2试剂的制备

[0102] 将促甲状腺素受体刺激性抗体500μg加入50KDa超滤离心管内，加入500μL的100mM PBS缓冲液，10000rpm离心10min，重复3次，将抗体内缓冲液置换为吖啶酯标记缓冲液。收取置换后溶液，按促甲状腺素受体刺激性抗体：吖啶酯=1:15摩尔比加入吖啶酯，静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对吖啶酯标记的促甲状腺素受体刺激性抗体溶液进行纯化，收取纯化后溶液，用含有1%BSA，pH为8.0的400mM bistris缓冲液将纯化后抗体配制为0.05μg/mL的R2试剂，4℃保存。

[0103] 五、生物素标记的促甲状腺素受体蛋白N端R3试剂的制备

[0104] 将促甲状腺素受体蛋白N端500μg加入10KDa超滤离心管内，加入500μL的100mM PBS缓冲液，10000rpm离心10min，重复3次，将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液，按促甲状腺素受体蛋白N端：生物素=1:3摩尔比加入生物素，静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化，收取纯化后溶液，用含有1%BSA，PH为8.0的400mM Bistris缓冲液将纯化后抗体配制为0.5μg/mL的R3试剂，4℃保存。

[0105] 本实施例制备的人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒采用一步竞争法的反应模式，定量检测人体血清中促甲状腺素受体刺激性抗体的含量，确保检测的灵敏度、特异性。本发明的各项检测指标均达到同类进口试剂盒的分析水平。

[0106] 显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

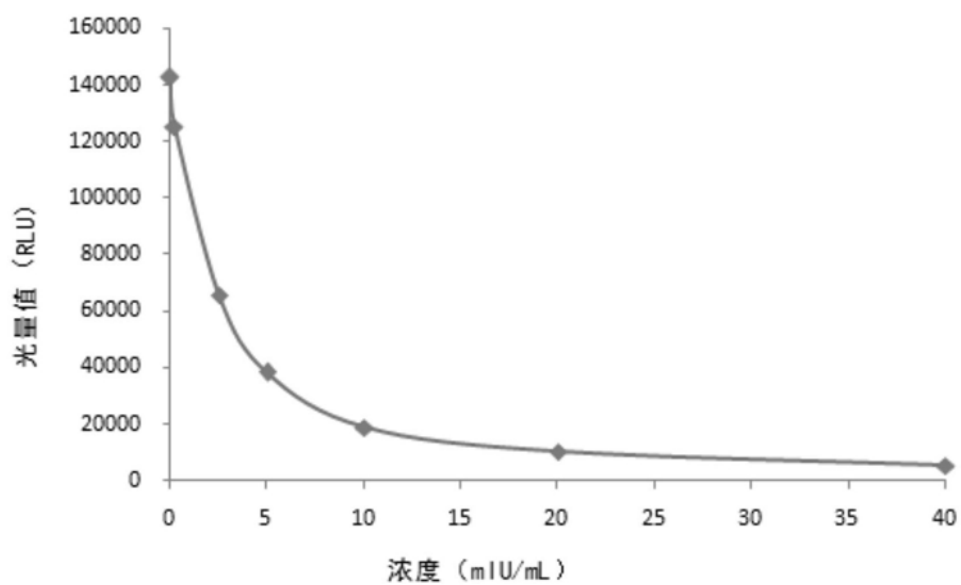


图1

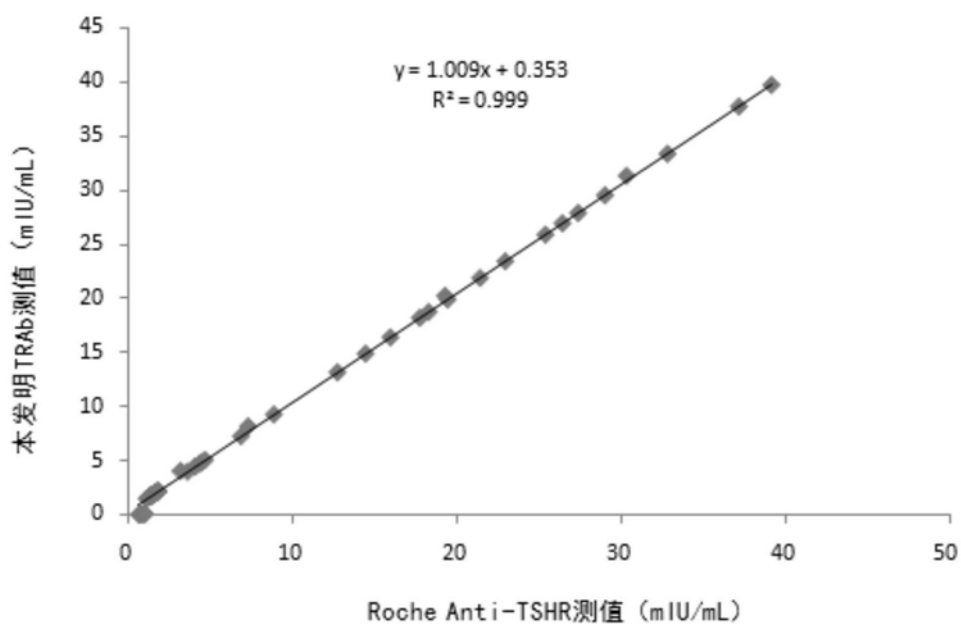


图2

专利名称(译)	人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN109001472A	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201810880155.7	申请日	2018-08-03
[标]发明人	孙天旭 李婷 孙成艳 高威 何浩会		
发明人	孙天旭 李婷 孙成艳 高威 何浩会		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/582 G01N33/583 G01N33/6854 G01N33/76 G01N2800/046		
代理人(译)	张伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种人促甲状腺素受体抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法，属于免疫分析医学检测技术领域。解决现有检测人促甲状腺素受体抗体的免疫分析方法无法区分人促甲状腺素受体刺激性、抑制性、中和性抗体，检测灵敏度、准确性差的技术问题。本发明试剂盒使用链霉亲和素-生物素体系，链霉亲和素和生物素的结合比例为1:4，使得信号进一步放大，提高试剂灵敏度。通过改变标记抗体及抗原，特异性检测促甲状腺素受体刺激性抗体，增强了检测的特异性，为临床诊断提供更为精确、更具针对性的体外诊断试剂。本发明的试剂盒采用一步法竞争法的反应模式，定量检测人体血清中促甲状腺素受体刺激性抗体的含量，确保检测的灵敏度、特异性。

