

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/538 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510083930.9

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100406889C

[22] 申请日 2005.7.15

[21] 申请号 200510083930.9

[73] 专利权人 北京倍爱康生物技术股份有限公司
地址 100071 北京市丰台区海鹰路一号 4 号楼 2 层

[72] 发明人 刘振世 周 昊 王法龙 王 东
张 波 谢 晶 陈海生 胡晓焱
张小平 孙海涛 张玉庆 杨祥良

[56] 参考文献

CN 1067119 A 1992.12.16

US 5580741 A 1996.12.3

CN1595161 A 2005.3.16

化学发光免疫分析. 赵利霞等. 《世界科学研究与发展》, 第 26 卷第 4 期. 2004

酶联免疫分析法研究进展. 孙伟等. 《青岛化工学院学报》, 第 22 卷第 3 期. 2001

审查员 黄 磊

[74] 专利代理机构 北京华谊知识产权代理有限公司

代理人 刘月娥

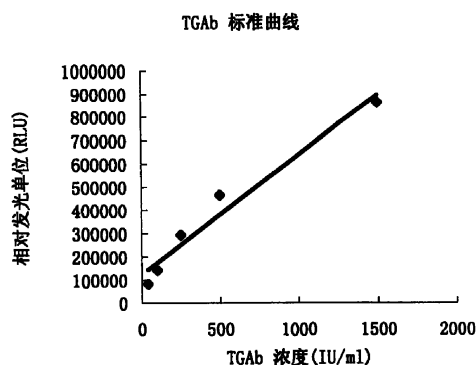
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法, 属于免疫检测分析技术领域。将抗原人甲状腺球蛋白连接在四氧化三铁微球表面作为固相试剂, 四氧化三铁微球的直径在 0.1-5.0 微米之间, 经捕捉样本中的自身抗体人甲状腺球蛋白抗体以及二抗酶标试剂后, 形成固相-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫复合物。本发明的优点在于: 使用磁珠为固相, 使免疫反应更接近液相, 反应更充分和迅速, 而且使结合的免疫复合物更加容易分离, 降低了非特异性吸附。使用的二抗为单克隆抗体混合物, 使免疫反应的亲和力更高, 而且单抗的生产批间差异相对小, 更容易保证产品的批间稳定。



1、一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法，其特征在于：将抗原人甲状腺球蛋白连接在四氧化三铁微球表面作为固相试剂，四氧化三铁微球的直径在 0.1-5.0 微米之间，经捕捉样本中的自身抗体人甲状腺球蛋白抗体以及二抗酶标试剂后，形成固相-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫复合物；所述的抗原与四氧化三铁微球的连接为直接的；所述的二抗酶标试剂中使用的酶是碱性磷酸酶 EC3.1.3.1；所述的二抗酶标抗体试剂中使用的二抗为动物抗人免疫球蛋白的多克隆抗体，所述的二抗酶标试剂的偶联方法是使用活化剂 N-琥珀酰胺 3-(2-吡啶二巯基)丙酸[SPDP]活化抗体，使用 Traut's 试剂活化碱性磷酸酶，然后二者以 1: 2~2: 1 的比例混合，并使用凝胶层析纯化酶标偶联物；所使用的底物溶液为环二氧化乙烷类衍生物。

2、按照权利要求 1 所述的方法，其特征在于：抗原与四氧化三铁微球连接通过化学交联剂戊二醛以共价键的形式偶联。

一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法

技术领域

本发明属于免疫检测分析技术领域，特别是提供了一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法，适用于自身抗体的磁分离酶促化学发光检测分析。

背景技术

在临床检测分析中，由于体液中许多物质的含量很低，使用普通的化学分析方法难以达到检测的要求。1959年，Yalow和Berson使用放射性标记技术和抗原抗体的免疫反应原理检测血清中的胰岛素，建立了灵敏的免疫分析的新方法(R. S. Yalow, S. A. Berson. *Nature*, 1959, 184:1648)，并得到了广泛的应用，成为上世纪60年代以来发展最为普及的临床免疫检测技术。但近年来，放射免疫的缺点越来越受到人们的关注。这些缺点包括健康危害、废物处理问题、货架期较短、放射性偶连物不稳定以及公众的反核压力(C. Dodeigue, L. Thunus, R. Lejeune. *Talanta*, 2000, 51:415-439.)。因此，必需寻找更为安全、可靠和灵敏的免疫检测分析方法。

化学发光的原理是在化学反应中生成的不稳定的激发态中间体，当其回到基态时，释放光子。在免疫检测分析中，使用化学发光技术，可以使检测的范围达到6个数量级，而且灵敏度很高，达 10^{-18} 摩尔水平，加上标记物稳定，有效期长，使其受到越来越多的关注与应用。

在已经商品化的试剂盒中，采用的化学发光技术主要有以下几种：(1) 丫啶酯(acridinium ester)直接标记技术：当丫啶酯标记物暴露在碱性过氧化物溶剂中时，将促发化学发光，发光迅速，灵敏度很高。(2) 辣根过氧化物酶(HRP)标记的酶促化学发光：这类化学发光常用的底物为鲁米诺类(luminol)衍生物，在氧化剂(如过氧化氢)存在下，HRP催化鲁米诺类衍生物发光，发光的强度与参与反应的HRP的量成正比。鲁米诺的发光属于辉光型，发射波长在425nm。通常，光泽精以及苯酚类物质会增强发光。(3) 碱性磷酸酶(AP)标记发光技术：AP的发光底物主要为环二氧乙烷类衍生物(dioxetanes)，如AMPPD、CSPD和CDP-Star等。它们在AP的催化下，底物形成不稳定的中间体，当中间体回到基态时发出光子。常用的增强剂有荧光素衍生物和表面活性剂，它们会增强并延长发光(L. J. Kricka, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 500 : 279-283.)。

发明内容

本发明的目的在于提供一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法，使对人甲状腺球蛋白抗体定量检测实现了高灵敏度、准确性和稳定性。

所述的人甲状腺球蛋白抗体酶促化学发光检测操作方法如下：

1、加样与免疫反应：在平底试管中加入5-100 μ L血清或血浆样本(预先用样本稀释液进行1:20-100稀释)，标准品，或质量控制血清，加入30-120 μ L 1-15mg/mL固相试剂(表面连接人甲状腺球蛋白抗原)，混匀后，37 $^{\circ}$ C温育5-45分钟。

2、洗涤：将平底试管放在磁分离器上分离2分钟，然后用一大而缓慢的圆周运

动倒转分离器倒出上清液，把倒转的试管放在滤纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。每管中加入清洗液100-500 μ L，充分混匀后，将平底试管放在磁分离器上分离2分钟，然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液，把倒转的试管放在滤纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。重复两次。

3、加入二抗酶标试剂：在每一试管中加入加入二抗酶标试剂 30-120 μ L，混匀后，37°C温育 5-15 分钟。

4、洗涤：同（2）步骤。

5、加入发光底物工作液：每管加入 50-400 μ L 发光底物工作液，混匀后，37°C温育 10-40 分钟。

6、读取发光值：在发光测定仪测定每管的发光值，测定时间为 1-10 秒钟，测定前混匀试管。

以上检测操作方法与现有技术操作基本相同。

本发明的特征在于：检测人甲状腺球蛋白抗体的方法使用了以下试剂：

本发明使用了鼠抗人免疫球蛋白单克隆抗体的混合物作为二抗，碱性磷酸酶标记的抗人免疫球蛋白混合物为二抗酶标试剂。

本发明使用人甲状腺球蛋白偶连的四氧化三铁微球为反应的固相试剂。

本发明使用常用的磷酸盐缓冲液或三氨基羟基甲烷-盐酸（Tris-HCl）缓冲液为洗涤液，含有 0.1-0.5%的牛血清白蛋白（BSA）。

本发明使用环二氧化乙烷类衍生物（dioxetanes）如 AMPPD[®]、CSP[®]D、CDP-Star[®]、Lumi-Phos 480、Lumi-Phos 530 及 Lumi-Phos PPD 等为底物溶液，在增强液的作用下发光，发光的强度与样本中人甲状腺球蛋白抗体的含量成正比。

本发明还提供了相应的诊断试剂盒。

本发明的技术解决方案如下：

首先，将抗原（人甲状腺球蛋白）连接在四氧化三铁微球表面作为固相试剂。四氧化三铁微球的直径在 0.1-5.0 微米之间，具有超顺磁性和磁场响应性。所述的抗原与四氧化三铁微球的连接，可以是直接的，也可以是间接的（如通过生物素-亲和素系统等）；可以通过物理吸附（静电作用、离子键或疏水作用等），也可以通过化学交联剂（戊二醛等）以共价键的形式偶联。

所述的二抗酶标试剂中使用的酶是碱性磷酸酶（EC3.1.3.1）。

所述的二抗酶标试剂中使用的二抗可以是动物抗人免疫球蛋白的多克隆抗体如兔抗人免疫球蛋白抗体，也可以是上述的鼠抗人免疫球蛋白单克隆抗体的混合物。这些混合物包括鼠抗人免疫球蛋白 A 单克隆抗体，鼠抗人免疫球蛋白 E 单克隆抗体，鼠抗人免疫球蛋白 M 单克隆，抗体鼠抗人免疫球蛋白 G 单克隆抗体，鼠抗人免疫球蛋白 D 单克隆抗体，鼠抗人免疫球蛋白 κ 链单克隆抗体，以及鼠抗人免疫球蛋白 λ 链单克隆抗体。

所述的二抗酶标试剂的偶联方法是使用活化剂 N-琥珀酰胺 3-（2-吡啶二巯基）丙酸[SPDP]活化抗体，使用 Traut's 试剂活化碱性磷酸酶，然后二者以 1:2 至 2:

1 的比例混合，并使用凝胶层析纯化酶标偶联物。

本发明提供的人甲状腺球蛋白抗体酶促化学发光检测试剂盒，包括以下组分：

固相试剂：连接人甲状腺球蛋白的磁珠；

二抗酶标试剂：碱性磷酸酶标记的鼠抗人免疫球蛋白单克隆抗体混合物试剂；

人甲状腺球蛋白标准品：浓度分别为：0，40，100，250，500，1500IU/mL；

样本稀释液：正常人血清，加 0.1%NaN₃ 作为防腐剂；

质量控制血清；

洗涤液；

发光底物工作液。

本发明具有以下优点：

1、使用磁珠为固相，使免疫反应更接近液相，反应更充分和迅速，而且使结合的免疫复合物更加容易分离，降低了非特异性吸附。

2、使用的二抗为单克隆抗体混合物，使免疫反应的亲和力更高，而且单抗的生产批间差异相对小，更容易保证产品的批间稳定。

3、使用化学发光底物溶液，使检测的灵敏度得到了提高，而且线性范围更宽。

4、本发明提供的人甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒，对甲状腺疾病患者和正常人血清进行甲状腺球蛋白抗体的定量测定，结合其他临床症状（如甲状腺过氧化物酶抗体）就可以判断检查者是否患有自身免疫性甲状腺疾病。

5、本方法的建立可以为其他试剂盒的开发提供一种方便、高灵敏度、准确性和稳定性的免疫检测方法。

附图说明

图 1 为本发明的 TGAb 化学发光酶促检测标准曲线，其中，横坐标为 TGAB 的浓度，纵坐标为相对发光强度（RLU）。

图 2 为人甲状腺过氧化物酶（TPOAB）化学发光酶促检测标准曲线，其中，横坐标为 TPOAB 的浓度，纵坐标为相对发光强度（RLU）。

具体实施方式

实施例 1：二抗酶标试剂的制备

将鼠抗人免疫球蛋白 A、G、E、M、D、 κ 链和 λ 链单克隆抗体混合，浓度浓缩至 5 mg/mL；加入 20 mmol/L 活化剂 N-琥珀酰亚胺 3-（2-吡啶二巯基）丙酸[SPDP]二甲亚砜溶液 20 μ L，室温放置 45 分钟；通过 Sephadex G25 柱子除去活化剂，收集蛋白峰；每毫升活化的抗体溶液中加入 500 μ L 24mg/mL 二硫苏糖醇（DTT）0.01 mol/L PBS pH7.4 溶液，混匀后，室温放置 30 分钟；通过 Sephadex G25 柱子除去游离的二硫苏糖醇，收集蛋白峰。

将碱性磷酸酶溶于 2 mmol/L EDTA 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0 溶液中，浓度 5 mg/mL；加入 0.10 mg/mL Traut 试剂（巯基活化试剂）室温放置 1 小时；通过 Sephadex G25 柱子除去游离的活化剂，收集蛋白峰。

将活化的抗体混合物和活化的碱性磷酸酶溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩

尔比 1: 1 混合, 室温放置 4 小时, 然后使用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化, 收集第一和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将连接物保存于 4℃。

使用含 0.1% 牛血清白蛋白的 Tris-HCl 缓冲液, pH8.0 稀释到 1.0 ug/mL 作为工作液。

实施例 2: 固相试剂的制备

将直径范围 0.1 μm 的四氧化三铁微球用戊二醛进行活化, 室温混匀 4 小时后, 用 0.01 mol/L PBS pH7.4 缓冲液清洗三次, 并用该溶液进行悬浮, 浓度为 50-100 mg/mL; 然后, 每毫升悬液中加入人甲状腺球蛋白抗原 100 μg, 于 37 °C 混匀温育 3-8 小时; 用等体积的 0.01 mol/L PBS 5% BSA pH7.4 缓冲液于 37°C 封闭 40 分钟; 最后, 用 0.5% BSA 0.02 mol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液清洗三次, 并用该溶液配制成 8 mg/mL 的工作液。

实施例 3: 人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测

材料与仪器

- 1、标准品 0, 40, 100, 250, 500, 1500 IU/mL (参照 WHO 1ST IRP 66/387 标准)
- 2、固相试剂: 具体见实施方式之二。
- 3、二抗酶标试剂: 具体见实施方式之一。
- 4、洗涤液 100mL;
- 5、CSPD®底物溶液: 购自美国 Applied Biosystems 公司
- 6、增强剂溶液购自美国 Applied Biosystems 公司
- 7、样本稀释液
- 8、甲状腺自身免疫疾病患者血清 100 份, 正常人血清 100 份。
- 9、BPCL 化学发光测定仪 (中科院生物物理研究所生产)。
- 10、水浴箱 (用于 37°C 温浴)。

试剂制备:

标准品的配制为: 2g 氯化钠, 2.42 三羟基氨基甲烷, 5g 牛血清白蛋白, 0.5mL 普劳可林 300 用 1000mL 纯化水溶解, 用盐酸调 pH 至 7.6, 0.2 μm 过滤器过滤, 于 4 °C 保存, 作为标准品的缓冲液, 参照 WHO 1ST IRP 66/387 标准配制标准品 (标准品范围为 0-1500 IU/mL), 于 4°C 保存, 用于制作标准曲线。

洗涤液的配制组成:

氯化钠 (NaCl) 2g, 磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄·12H₂O) 2.9g, 磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 0.2g, 氯化钾 (KCl) 0.2g, 曲拉通 X-100 0.5mL, 吐温 20 0.2mL, 布兰尼道克斯 (Bronidox-L) 5g, 用纯化水配成 1000mL, 用 0.2 μm 过滤器过滤, 于室温保存。

稀释液的配制如下: 使用小牛血清加入 0.2% 的叠氮钠, 用 0.45 μm 过滤器过滤
操作步骤:

首先, 将血清样本用样本稀释液进行 1: 100 的稀释。然后, 按照下面的操作步骤进行。

- 1、加样与免疫反应: 在平底试管中加入 15 μL 血清样本, 标准品, 或质量控制

血清，加入 60 μ L 8 mg/mL 磁分离试剂（表面偶联人甲状腺球蛋白抗原），混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。

2、洗涤：将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟，然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液，把倒转的试管放在滤纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。每管中加入清洗液 150 μ L，充分混匀后，将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟，然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液，把倒转的试管放在滤纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。重复两次。

3、加入二抗酶标试剂：在每一试管中加入二抗酶标试剂工作液 30 μ L，混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

4、洗涤：同（2）步骤。

5、加入 CSPD[®]底物溶液和增强剂溶液：每管加入 200 μ L CSPD 底物溶液和 200 μ L 增强剂溶液，混匀后，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。

6、读取发光值：在发光测定仪测定每管的发光值，测定时间为 1 秒钟，测定前混匀试管。

检测结果：

检测曲线见图 1。

对零标准点进行 20 次重复测试，取零标准点测定的平均值加上 2 倍的标准差，即为其灵敏度。本方法的灵敏度为 <5 IU/mL。

对 7 个不同浓度的病人血清使用两批试剂分别进行 20 次重复测试，病人血清的浓度范围为 5-1500 IU/mL，计算其批内变异。结果批内变异（CV）平均为 4.5%。

对 7 个不同浓度的病人血清使用两批试剂和不同的操作人员分别进行 20 次重复测试，病人血清的浓度范围为 5-1500 IU/mL，计算其批间变异。结果批间变异（CV）平均为 9.6%。

对 5 份病人样本进行倍比稀释，稀释倍数从 1: 2 至 1: 32，按照标准方法进行测定，计算其稀释回收率。结果如下：

样本浓度 (IU/mL)	回收值 (IU/mL)	总回收率 (%)
225.6	244.3	108.3
436.8	442.5	101.3
725.4	659.4	90.9
1080.5	1033.0	95.6
1320.0	1251.5	94.8
平均回收率为： 103.2 \pm 8.9		

对 5 份病人样本进行添加回收试验，每份样本按照 50: 1 加入高浓度标准品，按照标准方法进行测定，计算其添加回收率。结果如下：

样本浓度 (IU/mL)	添加值 (IU/mL)	测试值 (IU/mL)	总回收率 (%)
5.2	640.5	628.3	97.3

95.2	640.5	734.9	99.9
225.6	640.5	796.8	92.0
436.8	640.5	1131.2	105.0
725.4	640.5	1415.1	103.6
平均回收率为： 99.6±5.2			

实施例4 人甲状腺过氧化物酶抗体的定量免疫分析

根据本发明提出的使用人免疫球蛋白单克隆抗体混合物代替传统二抗，然后参照实施例1的方法标记碱性磷酸酶，并配制二抗酶标试剂。人甲状腺过氧化物酶抗体的定量免疫分析中使用到的其他试剂组分参照已经受理的发明专利——人甲状腺过氧化物酶抗体磁分离酶联免疫检测方法中描述得方法进行制备。操作方法如下：

首先，将血清样本用样本稀释液进行 1:100 的稀释。然后，按照下面的操作步骤进行。

1、加样与免疫反应：在平底试管中加入 15 μ L 血清样本，标准品，或质量控制血清，加入 60 μ L 10 mg/mL 磁分离试剂（表面偶联重组人过氧化物酶抗原），混匀后，37°C 温育 30 分钟。

2、洗涤：将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟，然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液，把倒转的试管放在滤纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。每管中加入清洗液 150 μ L，充分混匀后，将平底试管放在磁分离器上分离 2 分钟，然后用一大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出上清液，把倒转的试管放在滤纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。重复两次。

3、加入单克隆抗体混合物的二抗酶标试剂：在每一试管中加入二抗酶标试剂工作液 30 μ L，混匀后，37°C 温育 15 分钟。

4、洗涤：同（2）步骤。

5、加入 CSPD®底物溶液和增强剂溶液：每管加入 200 μ L CSPD 底物溶液和 200 μ L 增强剂溶液，混匀后，37°C 温育 15 分钟。

6、读取发光值：在发光测定仪测定每管的发光值，测定时间为 1 秒钟，测定前混匀试管。

结果：

发光强度的大小与标准品中的人甲状腺过氧化物酶的含量成正比，测得数据的曲线拟和见图 2。

对零标准点进行 20 次重复测试，取零标准点测定的平均值加上 2 倍的标准差，即为其灵敏度。本方法的灵敏度为 <1 IU/mL，优于原来的灵敏度 (<5 IU/mL)。

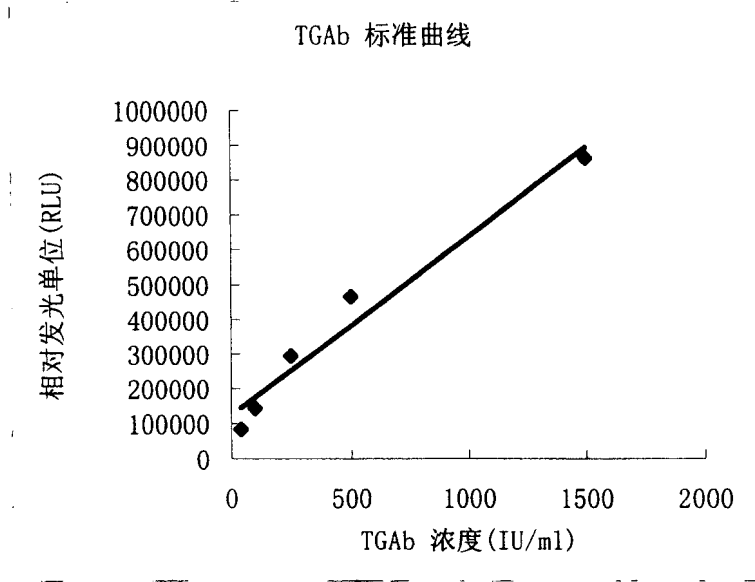


图 1

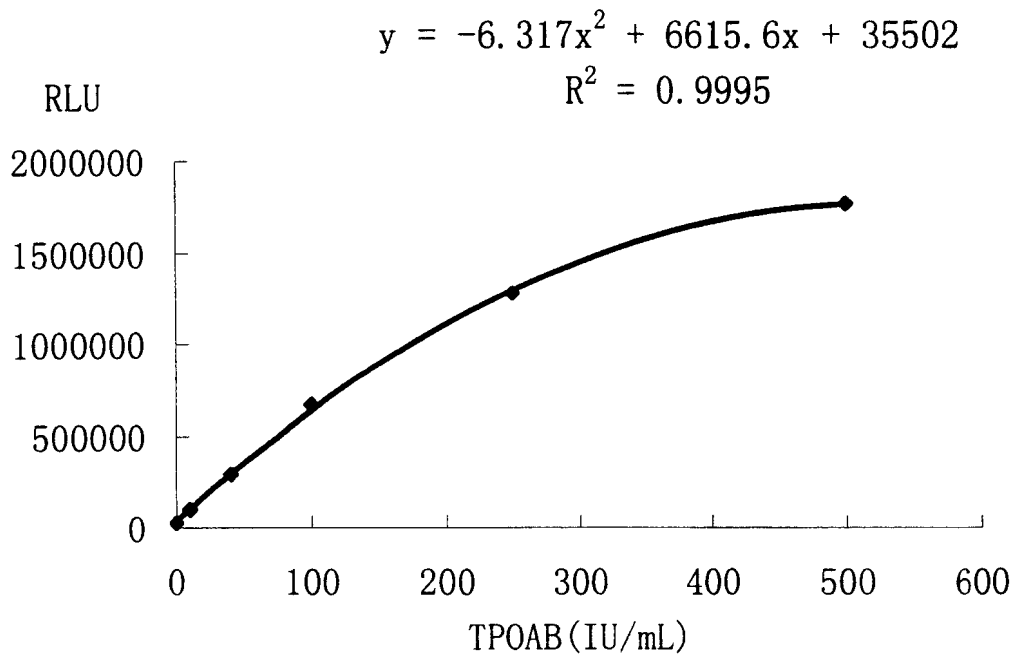


图 2

专利名称(译)	一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN100406889C	公开(公告)日	2008-07-30
申请号	CN200510083930.9	申请日	2005-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	刘振世 周昊 王法龙 王东 张波 谢晶 陈海生 胡晓焱 张小平 孙海涛 张玉庆 杨祥良		
发明人	刘振世 周昊 王法龙 王东 张波 谢晶 陈海生 胡晓焱 张小平 孙海涛 张玉庆 杨祥良		
IPC分类号	G01N33/538 G01N21/76		
代理人(译)	刘月娥		
审查员(译)	黄磊		
其他公开文献	CN1719256A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人甲状腺球蛋白抗体磁分离酶促化学发光免疫检测方法，属于免疫检测分析技术领域。将抗原人甲状腺球蛋白连接在四氧化三铁微球表面作为固相试剂，四氧化三铁微球的直径在0.1-5.0微米之间，经捕捉样本中的自身抗体人甲状腺球蛋白抗体以及二抗酶标试剂后，形成固相-抗原-抗体-酶标二抗夹心免疫复合物。本发明的优点在于：使用磁珠为固相，使免疫反应更接近液相，反应更充分和迅速，而且使结合的免疫复合物更加容易分离，降低了非特异性吸附。使用的二抗为单克隆抗体混合物，使免疫反应的亲和力更高，而且单抗的生产批间差异相对小，更容易保证产品的批间稳定。

