



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104237513 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201410522895. 5

(22) 申请日 2014. 09. 30

(71) 申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司
地址 300300 天津市东丽区开发区四纬路
10号

(72) 发明人 刘萍 栾大伟 盛尚春 俸家富

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理
有限公司 12211

代理人 杨慧玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/573(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

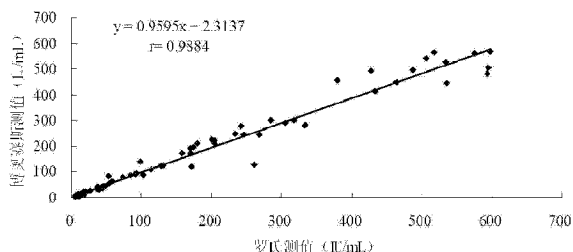
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种甲状腺过氧化物酶抗体磁微粒化学发光
免疫定量检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种甲状腺过氧化物酶抗体
(TPO-Ab) 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,
所述试剂盒包括:甲状腺过氧化物酶抗体校准
品;偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;生物素
标记的甲状腺过氧化物酶抗原;鼠抗人酶标结合
物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶
纯度 RZ ≥ 3. 0,活性 ≥ 250U/mL;甲状腺过氧化物
酶抗体质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20 倍浓缩
洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂
盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比
灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操
作简单、检测自动化程度高等优点。



1. 一种甲状腺过氧化物酶抗体磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- 1) TPO-Ab 校准品,浓度为 0, 10, 25, 100, 200, 500IU/mL;
- 2) TPO-Ab 样本稀释液;
- 3) 偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;
- 4) 生物素标记的 TPO-Ab 抗原;
- 5) 鼠抗人酶标结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;
- 6) TPO-Ab 质控品;质控品包括浓度 18IU/mL 的低值质控品和 350IU/mL 的高值质控品;
- 7) 化学发光液 A 液和 B 液;A 液为 5mmol/L, pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 0.7g/L 鲁米诺和终浓度 0.165g/L 对碘酚;B 液为 0.675g/L 过氧化脲;
- 8) 20 倍浓缩洗液;
- 9) 反应管。

2. 根据权利要求 1 所述的 TPO-Ab 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 10-50nm。

3. 根据权利要求 1 所述的 TPO-Ab 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

4. 根据权利要求 1 所述的 TPO-Ab 样本稀释液,是含溴甲酚紫的 Tris 盐酸缓冲液。

5. 一种制备所述权利要求 1-4 任一权利要求所述的试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) TPO-Ab 校准品的配制:

将 TPO-Ab 用校准品稀释液配置成校准品浓储液,所述校准品稀释液是用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液配制而成,以企业校准品进行定标,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 10, 25, 100, 200, 500IU/mL;

(2) TPO-Ab 质控品的配制:

用校准品稀释液将上述浓储液稀释至 18IU/mL 和 350IU/mL, 18IU/mL 为低值质控, 350IU/mL 为高值质控;

(3) 生物素标记的 TPO-Ab 的制备

取 0.5mg TPO-Ab 抗原,用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8°C 下透析 1 ~ 3h;将透析后的抗原加入 45ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终浓度为 5-10%,缓慢振荡,避光反应 3h;在上述溶液中加入 300uL1M 氯化铵溶液,常温避光反应 2h;用 0.01M PBS 溶液在 2 ~ 8°C 下透析 24h,期间换液 2-4 次;

(4) 鼠抗人酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将鼠抗人抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:5000,并加入 8%酶稳定剂,储存于 2 ~ 8°C;

(5) 20 倍浓缩洗液的配制

20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

(6) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

A液为0.7g/L鲁米诺,0.165g/L对碘酚,缓冲液为pH8.6的5mmol/L Tris-HCl,避光保存;B液为0.675g/L过氧化脲,用工艺用水配制;

(7) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于2~8℃,每种试剂各一瓶;

(8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

一种甲状腺过氧化物酶抗体磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体的,本发明提供了一种甲状腺过氧化物酶抗体(TPO-Ab)磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 甲状腺过氧化物酶(TPO)是催化甲状腺激素的重要酶。TPO由甲状腺滤泡细胞合成,它是由933个氨基酸残基组成的分子量为103kD的10%糖化的血色素样蛋白质,在滤泡腔面的微绒毛处分布最为丰富。甲状腺过氧化物酶抗体(TPO-Ab)是甲状腺自身抗体的一种,TPO-Ab作为甲状腺疾病的主要自身抗体可引起甲状腺滤泡损伤,导致甲状腺功能减退。临床上对TPO-Ab进行检测,有助于对原发和继发甲减进行鉴别,且在自身免疫性甲状腺疾病(如有桥本甲状腺炎、Graves病)的鉴别和诊断中具有重要的临床意义。通过检测TPO-Ab可以提高对AITD的诊断率,具有重要的参考价值。

[0003] 目前,临床领域应用的TPO-Ab检测方法主要有放射免疫法、酶联免疫测定法和化学发光免疫测定法等。

[0004] 酶联免疫测定法具备其操作简单、试剂有效期长无污染、特异性好、结果可用仪器测定等特点得以推广,但由于敏感性相对较低,所用标记酶与底物可定量测定范围窄,及仪器测定范围窄等缺点,限制了其在微量免疫定量测定中的应用。

[0005] 化学发光免疫测定研究起步于80年代初,快速发展应用于90年代,具有高灵敏度、高特异性,操作简便、快速,标记结合物稳定,同时无放射性同位素损伤和污染等特点,因此近年来在临床检测分析中被广泛推广使用。

发明内容

[0006] 本发明要解决的问题是提供TPO-Ab的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了测值重复性差,酶联免疫法灵敏度低,检测范围窄,无全自动化操作等缺陷。

[0007] 本发明采用的技术方案是:TPO-Ab磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:TPO-Ab校准品;偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;生物素标记的TPO-Ab;鼠抗人抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;TPO-Ab质控品,质控品包括浓度18IU/mL的低值质控品和350IU/mL的高值质控品;化学发光液A液和B液,A液为5mmol/L,pH8.6的Tris-HCl缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度0.7g/L鲁米诺和终浓度0.165g/L对碘酚;B液为0.675g/L过氧化脲;20倍浓缩洗液;反应管。

[0008] 进一步,所述的磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径100-500nm。

[0009] 进一步,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

[0010] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) TPO-Ab 校准品的配制：

[0012] 将 TPO-Ab 用校准品稀释液配置成校准品浓储液，所述校准品稀释液是用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液配制而成，以企业校准品进行定标，将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度，分别为 0, 10, 25, 100, 200, 500IU/mL；

[0013] (2) TPO-Ab 质控品的配制：

[0014] 用校准品稀释液将上述浓储液稀释至 18IU/mL 和 350IU/mL, 18IU/mL 为低值质控, 350IU/mL 为高值质控；

[0015] (4) 生物素标记的 TPO-Ab 的制备

[0016] 取 0.5mg TPO 抗原, 用硼酸盐缓冲液在 2~8℃ 下透析 1~3h; 将透析后的抗原加入 45ug 生物素, 同时加入二甲基亚砜, 使二甲基亚砜最终浓度为 5-10%, 缓慢振荡, 避光反应 3h; 在上述溶液中加入 300uL 1M 氯化铵溶液, 常温避光反应 2h; 用 0.01M PBS 溶液在 2~8℃ 下透析 24h, 期间换液 2-4 次；

[0017] (5) 鼠抗人酶结合物的制备

[0018] 采用改良高碘酸钠氧化法将鼠抗人抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后, 用酶稀释液 (含 12% BSA, 0.5% 胭脂红, 9g/L NaCl, 1g/L Dextran T-2000, 1.1g/L Tween-20, 1% ProClin00) 将其稀释至工作浓度 1:5000, 并加入 8% 酶稳定剂, 储存于 2~8℃；

[0019] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0020] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300；

[0021] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0022] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚, 缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl, 避光保存; B 液为 0.675g/L 过氧化脲, 用工艺用水配制；

[0023] (8) 组装: 将上述试剂组装成盒, 储存于 2~8℃, 每种试剂各一瓶；

[0024] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查, 对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0025] 本发明的原理是, 采用间接法测定血清或血浆中的 TPO-Ab, 在亲和素-磁微粒悬浮液中加入生物素-TPO-Ab 结合物, 通过亲和素和生物素的亲和反应, 形成磁微粒-亲和素-生物素-TPO-Ag 复合物, 加入样本和酶, 通过抗原抗体反应, 形成磁微粒-亲和素-生物素-TPO-Ab-TPO-Ab-鼠抗人 HRP 复合物, 用磁场将复合物吸附在试管底部, 清洗掉游离的成分, 加入底物工作液, 在氧化剂作用下, HRP 催化鲁米诺生成处于激发态的氨基邻苯二甲酸离子, 其恢复到基态时, 释放出 425nm 的光子, 于第 2 分钟测定各加样管的发光值 RLU。样本的 RLU 与样本 TPO-Ab 浓度呈正相关。样本中的 TPO-Ab 浓度依据由校准品 TPO-Ab 浓度和对应的 RLU 建立的 $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$ 数学模型进行定量, 从而检测人血清、血浆中的 TPO-Ab 含量。

[0026] 本专利发明的 TPO-Ab 磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒, 具有以下优点：

[0027] (1) 灵敏度高, 本试剂盒的分析灵敏度不高于 5IU/mL。

[0028] (2) 特异性良好, 本产品对甲状腺球蛋白抗体 (TG-Ab) (10000IU/mL) 未出现交叉反应。

[0029] (3) 精密性良好, 批内不精密度不高于 5%, 批间不精密度不高于 10%。

- [0030] (4) 成本低,与市场上同类产品比较,本试剂盒性能良好,成本低,具有临床应用价值。
- [0031] (5) 稳定性良好,本产品可在 37℃ 可存放 7 天以上,在 2 ~ 8℃ 可存放 1 年。
- [0032] (6) 本试剂盒可实现全自动化操作,检测方便,快速。

附图说明

[0033] 图 1 是本发明的试剂盒测定 TPO-Ab 与罗氏测定 TPO-Ab 的测定结果比较图,其中纵坐标为本试剂盒测得的 TPO-Ab 值,横坐标为罗氏试剂盒测得的 TPO-Ab 值,两种方法相关系数 $r = 0.9884$,直线方程 $y = 0.9595x - 2.3137$ 。

具体实施方式

[0034] 实施例 1:制备 TPO-Ab 磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

[0035] (1) TPO-Ab 校准品的配制:

[0036] 将 TPO-Ab 用校准品稀释液配置成校准品浓储液,所述校准品稀释液是用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液配制而成,以企业校准品进行定标,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 10, 25, 100, 200, 500 IU/mL;

[0037] (2) TPO-Ab 质控品的配制:

[0038] 用校准品稀释液将上述浓储液稀释至 18 IU/mL 和 350 IU/mL, 18 IU/mL 为低值质控, 350 IU/mL 为高值质控;

[0039] (3) 生物素标记的 TPO-b 的制备

[0040] 取 0.5 mg TPO 抗原,用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8℃ 下透析 1 ~ 3 h;将透析后的抗原加入 45 μg 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终浓度为 5-10%,缓慢振荡,避光反应 3 h;在上述溶液中加入 300 μL 1 M 氯化铵溶液,常温避光反应 2 h;用 0.01 M PBS 溶液在 2 ~ 8℃ 下透析 24 h,期间换液 2-4 次;

[0041] (4) 鼠抗人酶结合物的制备

[0042] 采用改良高碘酸钠氧化法将鼠抗人抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液(含 12% BSA, 0.5% 胭脂红, 9 g/L NaCl, 1 g/L Dextran T-2000, 1.1 g/L Tween-20, 1% ProClin300)将其稀释至工作浓度 1:5000,并加入 8% 酶稳定剂,储存于 2 ~ 8℃;

[0043] (5) 20 倍浓缩洗液的配制

[0044] 20 倍浓缩洗液包括 58 g/L 磷酸氢二钠, 5.92 g/L 磷酸二氢钠, 180 g/L NaCl, 10 mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

[0045] (6) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0046] A 液为 0.7 g/L 鲁米诺, 0.165 g/L 对碘酚,缓冲液为 pH 8.6 的 5 mmol/L Tris-HCl,避光保存;B 液为 0.675 g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;

[0047] (7) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2 ~ 8℃,每种试剂各一瓶;

[0048] (8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0049] 实施例 2:本发明试剂盒的检查

[0050] (1) 物理检查:液体组分应澄清,无沉淀或絮状物;其他组分应无包装破损。

[0051] (2) 准确性：试剂盒校准品与国家标准品系列同时进行分析测定，用双对数数学模型拟合，要求两条剂量-反应曲线不明显偏离平行（t 检验， $|t| < 2.447$ ）；以 TPO-Ab 企业标准品为对照品，用双对数数学模型拟合，试剂盒校准品的实测值与标示值比值的平均值应在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0052] (3) 剂量-反应曲线的线性：用双对数数学模型拟合，剂量-反应曲线在 5-500IU/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0053] (4) 分析灵敏度：试剂盒分析灵敏度不高于 5IU/mL。

[0054] (5) 精密度：10 孔平行测定高值和低值质控品，计算测定结果的平均浓度 (\bar{X}) 与标准差 (SD)，批内不精密度 (CV %) = $SD / \bar{X} \times 100\%$ ；使用 3 批产品进行 3 次试验，计算测定结果的平均浓度 (\bar{X}) 与标准差 (SD)，批间不精密度 (CV %) = $SD / \bar{X} \times 100\%$ ，结果应符合批内不精密度 (CV%) 应不高于 5%；批间不精密度 (CV%) 应不高于 10%。

[0055] (6) 质控品的测定值：平行测定 10 孔高值和低值的质控品，用 $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$ 数学模型拟合，质控品测值应在允许范围内，低值质控品测值在 18IU/mL，高值质控品测值在 350IU/mL。

[0056] (7) 特异性：

[0057] 交叉反应符合下表要求：

[0058]

| 交叉反应因子 | 浓度 | 测定值 |
|------------------|------------|----------|
| 甲状腺球蛋白抗体 (TG-Ab) | 10000IU/mL | <10IU/mL |

[0059] (8) 稳定性：37℃ 放置 7 天，测定值应符合上述各项要求。

[0060] 实施例 3：本发明试剂盒的使用方法

[0061] (1) 将待检试剂盒在室温 (18 ~ 25℃) 下平衡 30 分钟。

[0062] (2) 配制洗液：用蒸馏水将浓缩洗液按 1:20 稀释 (1mL 洗液加 19mL 蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶，可将浓缩洗液置于室温或 37℃，待结晶溶解后再进行稀释。

[0063] (3) 将反应管编号，向试管中依次加入 25uL 校准品或血清标本、50uL 磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液、75uL 生物素-TPO-Ag 结合物、100uL 鼠抗人酶结合物，37℃ 下振荡反应 15min，将试管架置于磁分离器上分离 2min，然后倒出上清液，加入 500uL 洗液，充分混匀后，于磁分离器上分离，倒出洗液，重复 3 次，在各管中加入化学发光底物液 A50uL，化学发光底物液 B50uL，在管式化学发光仪上测定各管的发光值 (RLU)，以校准品浓度的 Log 值为横坐标，以发光值的 Log 为纵坐标，绘制标准曲线，根据血清标本的发光值即可计算出 TPO-Ab 的浓度。

[0064] 实施例 4：本试剂盒的方法学评价结果

[0065] 检测范围：范围为 5-500IU/mL，对于浓度大于 500ng/mL 的标本应先进行稀释后再进行测定。

[0066] 灵敏度：5IU/mL。

[0067] 精密度：小于 5%。

[0068] 准确性：回收率的平均值在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0069] 特异性:甲状腺球蛋白抗体(TG-Ab)交叉反应系数小于1%。

[0070] 质控品测值:QcL和QcH的测值均在允许范围内,低值质控品测值在18IU/mL,高值质控品测值在350IU/mL。

[0071] 稳定性:将试剂盒中各试剂组分子于37℃下放置7d,稳定性良好。

[0072] 实施例5:本试剂盒的临床对比实验

[0073] 本专利发明的试剂盒已进行了临床考核,本次临床试验的样本总数147例,先以TPO-Ab罗氏检测试剂盒测试后,再用本专利发明的试剂盒(化学发光)进行测定,结果表明,直线方程为 $y = 0.9595x - 2.3137$,相关系数 $r = 0.9884$ 。可见本方法制备的试剂盒与医院测值有较好的一致性。以SPSS13.0统计分析软件对相关系数进行t检验(检验水准 $\alpha = 0.05$), $P < 0.001$,两种方法测定的TPO-Ab值的相关密切程度是显著性的,可见两种方法测定的TPO-Ab值密切相关,说明试剂盒的诊断能力较强,可推广临床应用。

[0074] 为了确定本试剂盒的临床参考值,对465份正常人血清、血浆样本采用本试剂盒进行了检测,结果表明本试剂盒的参考值(参考范围)为0-30IU/mL。

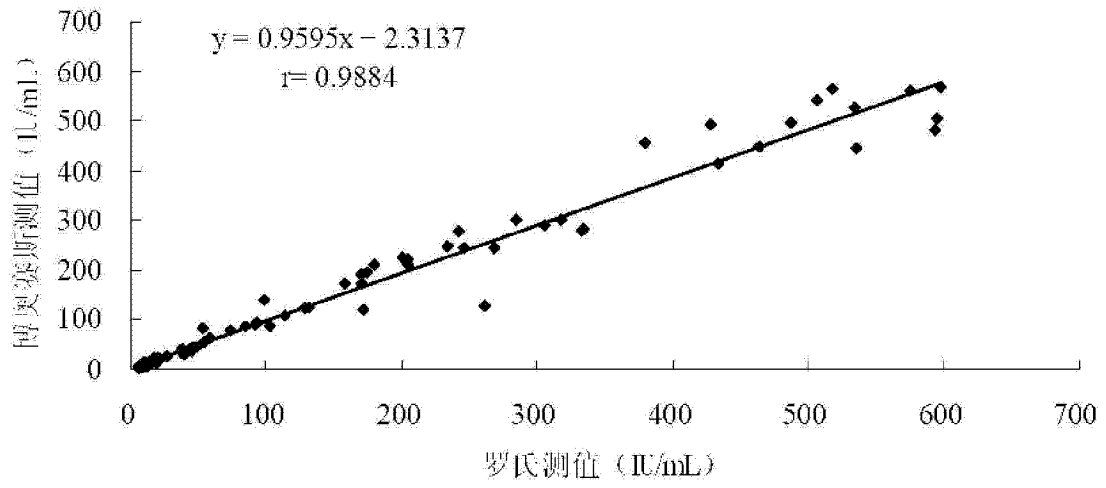


图 1

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种甲状腺过氧化物酶抗体磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN104237513A | 公开(公告)日 | 2014-12-24 |
| 申请号 | CN201410522895.5 | 申请日 | 2014-09-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司 | | |
| [标]发明人 | 刘萍 栾大伟 盛尚春 俸家富 | | |
| 发明人 | 刘萍 栾大伟 盛尚春 俸家富 | | |
| IPC分类号 | G01N33/573 G01N33/535 | | |
| CPC分类号 | G01N33/54326 G01N33/535 | | |
| 代理人(译) | 杨慧玲 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种甲状腺过氧化物酶抗体(TPO-Ab)磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:甲状腺过氧化物酶抗体校准品;偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;生物素标记的甲状腺过氧化物酶抗原;鼠抗人酶标结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度RZ≥3.0,活性≥250U/mL;甲状腺过氧化物酶抗体质控品;化学发光液A液和B液;20倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测自动化程度高等优点。

| 交叉反应因子 | 浓度 | 测定值 |
|-----------------|-----------|---------|
| 甲状腺球蛋白抗体(TG-Ab) | 10000U/mL | <10U/mL |