



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633164 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811535050.4

(22)申请日 2018.12.14

(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 闻玉莉

(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 于晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

### (54)发明名称

一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品  
及其制备工艺

### (57)摘要

一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品及其制备工艺,属于医学体外诊断领域。本发明首先利用硫酸铵沉淀法对甲状腺球蛋白抗体高值血清中的甲状腺球蛋白抗体进行粗提,得到甲状腺球蛋白抗体的粗提液;然后采用亲和层析提纯工艺-免疫磁珠分离法对甲状腺球蛋白抗体的粗提液进行纯化,得到高纯度的甲状腺球蛋白抗体;最后利用高纯度甲状腺球蛋白抗体制备甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。通过本发明的制备方法获得的甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品具有较高的稳定性、特异性、准确度和纯度,并且本发明中所采用的原材料容易获得,解决了现有aTG体外诊断试剂盒存在的原材料可获得性较难的问题。

1. 一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品的制备工艺,其特征在于,包括以下步骤:  
步骤一、采用硫酸铵沉淀法对甲状腺球蛋白抗体高值血清中的甲状腺球蛋白抗体进行粗提,得到甲状腺球蛋白抗体的粗提液;  
步骤二、采用免疫磁珠分离法对粗提液进行纯化,得到高纯度的甲状腺球蛋白抗体;  
步骤三、利用高纯度甲状腺球蛋白抗体制备甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。
2. 根据权利要求1所述的制备工艺,其特征在于,步骤一的具体过程如下:
  - (1) 筛选甲状腺球蛋白抗体高值血清;
  - (2) 采用胶体金试纸检测法筛选乙肝表面抗原、梅毒抗体、艾滋抗体和丙肝抗体全阴性血清;
  - (3) 将以上血清混合均匀,以3000r/min离心15~30min,去沉淀后获得混合血清;
  - (4) 按照混合血清与生理盐水的体积比为1:1的比例稀释混合血清;
  - (5) 饱和硫酸铵分级沉淀
    - 1) 50%饱和硫酸铵沉淀:加入等体积的100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,以3000r/min离心15~30min,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解;
    - 2) 33%饱和硫酸铵沉淀:按照溶解体积的1/2加入100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,以3000r/min离心15~30min,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解;
  - (6) 将沉淀放入透析袋,室温流水中透析4~12h;
  - (7) 将透析袋转移到盛有pH 7.2、20mM PBS的烧杯中,磁力搅拌过夜;取出后以3000r/min离心10~15min,收集上清,即为甲状腺球蛋白抗体的粗提液;
  - (8) 取20~100uL透析过的甲状腺球蛋白抗体的粗提液,加入5~20uL的1%氯化钡,再加入1~10uL浓盐酸溶解沉淀;
  - (9) 取聚乙二醇20000干粉放到透析袋上,浓缩25~35min;
  - (10) 用0.22um滤膜过滤,然后加入proclin300,4℃保存备用。
3. 根据权利要求2所述的制备工艺,其特征在于,所述100%饱和硫酸铵的配制过程如下:称取硫酸铵 $420.00 \pm 0.01$ g,用60~70℃、300ml纯化水溶解;70℃水浴加热,不断搅拌直至完全溶解;采用双层滤纸,用隔膜真空泵过滤饱和硫酸铵到无菌蜀牛瓶中,室温静止1~2天,有结晶析出后,用浓氨水调pH至7.0~7.6,室温保存备用。
4. 根据权利要求2所述的制备工艺,其特征在于,所述生理盐水在使用前,用0.22um滤膜和隔膜真空泵过滤,121℃高温灭菌15min,冷却后保存备用。
5. 根据权利要求2所述的制备工艺,其特征在于,所述透析袋在使用前需进行以下处理:
  - (1) 将透析袋裁成长为10cm的长条;
  - (2) 将2%碳酸氢钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min,取出透析袋,纯化水洗3遍;
  - (3) 将1mmol/L乙二胺四乙酸二钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min,取出透析袋,纯化水洗3遍;
  - (4) 将透析袋放入20%乙醇中,4℃保存备用。
6. 根据权利要求1所述的制备工艺,其特征在于,步骤二的具体过程如下:
  - (1) 取免疫亲和磁珠,用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3次;
  - (2) 加入100μl甲状腺球蛋白抗体的粗体液,4℃冷藏柜中混匀过夜;

(3) 用磁分离器分离,弃上清,分离磁珠与甲状腺球蛋白抗体的粗提液,用1ml PBST洗涤3次,再用pH 7.2、1ml、20mM的PBS洗涤3~5次;

(4) 用pH2.2、100 $\mu$ l、0.1M的Gly-HCl洗脱,用磁分离器分离磁珠,收集上清,转移到无菌EP管中,然后加入中和缓冲液中中和pH至7.2。

7. 根据权利要求6所述的制备工艺,其特征在于,所述免疫亲和磁珠的制备过程为:

(1) 取100 $\mu$ l羧基磁性颗粒,用pH5.0、25mM的MES溶液洗涤3~5次,1ml/次,然后用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液重悬;

(2) 用pH5.0、25mM的MES溶液配置50mg/mlEDC溶液和50mg/mlNHS溶液;

(3) 活化:取50 $\mu$ l EDC溶液和50 $\mu$ lNHS溶液,依次加入到已洗好的羧基磁性颗粒中,室温用血液混合仪混合反应30min;

(4) 用磁分离器上分离磁珠,弃上清,用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液洗涤3~5次,用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液重悬;

(5) TG抗原溶液的配制:用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液配制成终浓度为0.6 $\mu$ g/ $\mu$ l的TG抗原溶液;

(6) 将配制的TG抗原溶液加入到活化好的羧基磁性颗粒中,充分混匀,室温反应2h或4℃反应过夜;

(7) 用磁分离器分离磁珠,用100 $\mu$ l封闭液重悬羧基磁性颗粒,室温混合反应2h;

(8) 用磁分离器分离磁珠,弃上清,并用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3~5次,再用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3~5次,500 $\mu$ l/次;

(9) 预洗:用pH2.2、0.1M的Gly-HCl和pH8.0、0.1M的Tris-HCl交替洗涤6~10次,200~500 $\mu$ l/次;

(10) 用20mM PBS洗涤2次,最后用100 $\mu$ l免疫亲和磁珠的保存液重悬,4℃保存备用。

8. 根据权利要求1所述的制备工艺,其特征在于,步骤三的具体过程如下:

(1) 配制校准品基质;

(2) 用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤校准品基质;

(3) 将步骤二所得高纯度的甲状腺球蛋白抗体加入到校准品基质中获得一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。

9. 根据权利要求8所述的制备工艺,其特征在于,所述校准品基质为20mM的磷酸盐缓冲液或20mM的Tris-HCl。

10. 如权利要求1至9中任意一项所述的制备工艺制备的一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。

## 一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品及其制备工艺

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学体外诊断技术领域,具体涉及一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品及其制备工艺。

### 背景技术

[0002] 甲状腺球蛋白抗体是1956年Roitt等在对自身免疫性甲状腺炎进行血清学研究时发现的。甲状腺球蛋白抗体的靶抗原甲状腺球蛋白(TG)是一种甲状腺上皮细胞合成和分泌的可溶性的碘化糖蛋白,分子量660kD,由2748个氨基酸组成。它是三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine,T3)、甲状腺素(thyroxine,T4)的生物合成前体,主要是以胶体形式贮存于甲状腺滤泡腔中,正常人血清中含量极微。甲状腺球蛋白抗体是一种疾病指标,没有致病性,用于辅助诊断患者是否患有自身免疫性甲状腺疾病。一般认为甲状腺球蛋白抗体对甲状腺无损伤作用。甲状腺球蛋白抗体与甲状腺球蛋白结合后,可通过Fc受体与结合的抗体相互作用激活NK细胞,而攻击靶细胞,导致甲状腺细胞破坏。甲状腺球蛋白抗体还影响TG抗原的摄取、加工,催化TG水解,因而可以影响非显著性T细胞抗原决定簇的自身免疫反应,从而导致自身免疫性甲状腺疾病发生恶化。甲状腺球蛋白抗体是自身免疫性甲状腺疾病病人血清中的一种常见的自身抗体,它主要由IgG1、IgG2、IgG4组成,少部分为IgA和IgM。

[0003] 目前,体外诊断试剂aTG的测定多采用免疫化学发光测定,但是,试剂盒中校准品的原材料可获得性有一定的难度,这为体外诊断试剂的研发和制备带来很多不便。

[0004] 因此,探索一种稳定的高纯度的特异性强的人源一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品在体外诊断试剂的应用中具有很大的意义。

### 发明内容

[0005] 为了解决现有aTG体外诊断试剂盒存在的原材料可获得性较难的问题,本发明提供一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品及其制备工艺。

[0006] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0007] 本发明的一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品的制备方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤一、采用硫酸铵沉淀法对甲状腺球蛋白抗体高值血清中的甲状腺球蛋白抗体进行粗提,得到甲状腺球蛋白抗体的粗提液;

[0009] 步骤二、采用免疫磁珠分离法对粗提液进行纯化,得到高纯度的甲状腺球蛋白抗体;

[0010] 步骤三、利用高纯度甲状腺球蛋白抗体制备甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。

[0011] 作为优选的实施方式,步骤一的具体过程如下:

[0012] (1) 筛选甲状腺球蛋白抗体高值血清;

[0013] (2) 采用胶体金试纸检测法筛选乙肝表面抗原、梅毒抗体、艾滋抗体和丙肝抗体全阴性血清;

- [0014] (3) 将以上血清混合均匀,以3000r/min离心15~30min,去沉淀后获得混合血清;
- [0015] (4) 按照混合血清与生理盐水的体积比为1:1的比例稀释混合血清;
- [0016] (5) 饱和硫酸铵分级沉淀
- [0017] 1) 50%饱和硫酸铵沉淀:加入等体积的100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,以3000r/min离心15~30min,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解;
- [0018] 2) 33%饱和硫酸铵沉淀:按溶解体积的1/2加入100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,以3000r/min离心15~30min,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解;
- [0019] (6) 将沉淀放入透析袋,室温流水中透析4~12h;
- [0020] (7) 将透析袋转移到盛有pH 7.2、20mM PBS的烧杯中,磁力搅拌过夜;取出后以3000r/min离心10~15min,收集上清,即为甲状腺球蛋白抗体的粗提液;
- [0021] (8) 取20~100 $\mu$ L透析过的甲状腺球蛋白抗体的粗提液,加入5~20 $\mu$ L的1%氯化钡,再加入1~10 $\mu$ L浓盐酸溶解沉淀;
- [0022] (9) 取聚乙二醇20000干粉放到透析袋上,浓缩25~35min;
- [0023] (10) 用0.22 $\mu$ m滤膜过滤,然后加入proclin300,4℃保存备用。
- [0024] 作为优选的实施方式,所述100%饱和硫酸铵的配制过程如下:称取硫酸铵420.00 $\pm$ 0.01g,用60~70℃、300ml纯化水溶解;70℃水浴加热,不断搅拌直至完全溶解;采用双层滤纸,用隔膜真空泵过滤饱和硫酸铵到无菌蜀牛瓶中,室温静止1~2天,有结晶析出后,用浓氨水调pH至7.0~7.6,室温保存备用。
- [0025] 作为优选的实施方式,所述生理盐水在使用前,用0.22 $\mu$ m滤膜和隔膜真空泵过滤,121℃高温灭菌15min,冷却后保存备用。
- [0026] 作为优选的实施方式,所述透析袋在使用前需进行以下处理:
- [0027] (1) 将透析袋裁成长为10cm的长条;
- [0028] (2) 将2%碳酸氢钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min,取出透析袋,纯化水洗3遍;
- [0029] (3) 将1mmol/L乙二醇四乙酸二钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min,取出透析袋,纯化水洗3遍;
- [0030] (4) 将透析袋放入20%乙醇中,4℃保存备用。
- [0031] 作为优选的实施方式,步骤二的具体过程如下:
- [0032] (1) 取免疫亲和磁珠,用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3次;
- [0033] (2) 加入100 $\mu$ L甲状腺球蛋白抗体的粗提液,4℃冷藏柜中混匀过夜;
- [0034] (3) 用磁分离器分离,弃上清,分离磁珠与甲状腺球蛋白抗体的粗提液,用1ml PBST洗涤3次,再用pH 7.2、1ml、20mM的PBS洗涤3~5次;
- [0035] (4) 用pH2.2、100 $\mu$ L、0.1M的Gly-HCl洗脱,用磁分离器分离磁珠,收集上清,转移到无菌EP管中,然后加入中和缓冲液中和pH至7.2。
- [0036] 作为优选的实施方式,所述免疫亲和磁珠的制备过程为:
- [0037] (1) 取100 $\mu$ L羧基磁性颗粒,用pH5.0、25mM的MES溶液洗涤3~5次,1ml/次,然后用pH5.0、100 $\mu$ L、25mM的MES溶液重悬;
- [0038] (2) 用pH5.0、25mM的MES溶液配置50mg/mlEDC溶液和50mg/mlNHS溶液;
- [0039] (3) 活化:取50 $\mu$ L EDC溶液和50 $\mu$ L NHS溶液,依次加入到已洗好的羧基磁性颗粒中,

室温用血液混合仪混合反应30min;

[0040] (4) 用磁分离器上分离磁珠,弃上清,用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液洗涤3~5次,用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液重悬;

[0041] (5) TG抗原溶液的配制:用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液配制成终浓度为0.6 $\mu$ g/ $\mu$ l的TG抗原溶液;

[0042] (6) 将配制的TG抗原溶液加入到活化好的羧基磁性颗粒中,充分混匀,室温反应2h或4 $^{\circ}$ C反应过夜;

[0043] (7) 用磁分离器分离磁珠,用100 $\mu$ l封闭液重悬羧基磁性颗粒,室温混合反应2h;

[0044] (8) 用磁分离器分离磁珠,弃上清,并用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3~5次,再用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3~5次,500 $\mu$ l/次;

[0045] (9) 预洗:用pH2.2、0.1M的Gly-HCl和pH8.0、0.1M的Tris-HCl交替洗涤6~10次,200~500 $\mu$ l/次;

[0046] (10) 用20mM PBS洗涤2次,最后用100 $\mu$ l免疫亲和磁珠的保存液重悬,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0047] 作为优选的实施方式,步骤三的具体过程如下:

[0048] (1) 配制校准品基质;

[0049] (2) 用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤校准品基质;

[0050] (3) 将步骤二所得高纯度的甲状腺球蛋白抗体加入到校准品基质中获得一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。

[0051] 作为优选的实施方式,所述校准品基质为20mM的磷酸盐缓冲液或20mM的Tris-HCl。

[0052] 作为优选的实施方式,所述20mM的Tris-HCl缓冲液包括:150mMNaCl、1%蔗糖、3%牛血清白蛋白、1%的明胶和0.5%液体生物防腐剂。

[0053] 作为优选的实施方式,所述20mM的磷酸盐缓冲液包括:150mMNaCl、2%蔗糖、0.5%牛血清白蛋白、1%的明胶和0.3%液体生物防腐剂。

[0054] 作为优选的实施方式,所述20mM的磷酸盐缓冲液包括:150mMNaCl、0.5%蔗糖、5%牛血清白蛋白、0.5%的明胶和0.1%液体生物防腐剂。

[0055] 作为优选的实施方式,所述液体生物防腐剂优选为proclin300或叠氮钠。

[0056] 本发明还提供一种通过上述的制备方法制备的甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。

[0057] 本发明的有益效果是:本发明首先利用硫酸铵沉淀法对甲状腺球蛋白抗体高值血清中的甲状腺球蛋白抗体进行粗提,得到甲状腺球蛋白抗体的粗提液;然后采用亲和层析提纯工艺-免疫磁珠分离法对甲状腺球蛋白抗体的粗提液进行纯化,得到高纯度的甲状腺球蛋白抗体;最后利用高纯度甲状腺球蛋白抗体制备甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。通过本发明的制备方法获得的甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品具有较高的稳定性、特异性、准确度和纯度,并且本发明中所采用的原材料容易获得,解决了现有aTG体外诊断试剂盒存在的原材料可获得性较难的问题。

## 具体实施方式

[0058] 本发明的一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品的制备方法,首先利用硫酸铵沉淀法对甲状腺球蛋白抗体高值血清中的甲状腺球蛋白抗体进行粗提,得到甲状腺球蛋白抗体的粗提液;然后采用亲和层析提纯工艺-免疫磁珠分离法对甲状腺球蛋白抗体的粗提液进行纯化,得到高纯度的甲状腺球蛋白抗体;最后利用高纯度甲状腺球蛋白抗体制备甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。

[0059] 具体的工艺过程如下:

[0060] 一、甲状腺球蛋白抗体的粗提

[0061] (1) 筛选甲状腺球蛋白抗体高值血清;

[0062] (2) 采用胶体金试纸检测法筛选乙肝表面抗原、梅毒抗体、艾滋抗体和丙肝抗体全阴性血清;

[0063] (3) 将以上血清混合均匀,以3000r/min离心15~30min,去沉淀后获得混合血清;

[0064] (4) 用0.22um滤膜和隔膜真空泵过滤,121℃高温灭菌15min,冷却后保存备用;按照混合血清与生理盐水的体积比为1:1的比例稀释混合血清;

[0065] (5) 饱和硫酸铵分级沉淀

[0066] 1) 100%饱和硫酸铵的配制:称取硫酸铵 $420.00 \pm 0.01$ g,用60~70℃、300ml纯化水溶解;70℃水浴加热,不断搅拌直至完全溶解;采用双层滤纸,用隔膜真空泵过滤饱和硫酸铵到无菌蜀牛瓶中,室温静止1~2天,有结晶析出后,用浓氨水调pH至7.0~7.6,室温保存备用。

[0067] 2) 50%饱和硫酸铵沉淀:加入等体积的100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,以3000r/min离心15~30min,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解;

[0068] 3) 33%饱和硫酸铵沉淀:按溶解体积的1/2加入100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,以3000r/min离心15~30min,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解;

[0069] (6) 将沉淀放入透析袋,室温流水中透析4~12h;

[0070] (7) 将透析袋裁成长为10cm的长条;将2%碳酸氢钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min,取出透析袋,纯化水洗3遍;将1mmol/L乙二醇四乙酸二钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min,取出透析袋,纯化水洗3遍;将透析袋放入20%乙醇中,4℃保存备用;将透析袋转移到盛有pH 7.2、20mM PBS的烧杯中,磁力搅拌过夜;取出后以3000r/min离心10~15min,收集上清,即为甲状腺球蛋白抗体的粗提液;

[0071] (8) 取20~100uL透析过的甲状腺球蛋白抗体的粗提液,加入5~20uL的1%氯化钡,再加入1~10uL浓盐酸溶解沉淀;

[0072] (9) 取聚乙二醇20000干粉放到透析袋上,浓缩25~35min;

[0073] (10) 用0.22um滤膜过滤,然后加入proclin300,4℃保存备用。

[0074] 二、甲状腺球蛋白抗体的亲和层析

[0075] (1) 取100μl羧基磁性颗粒,用pH5.0、25mM的MES溶液洗涤3~5次,1ml/次,然后用pH5.0、100μl、25mM的MES溶液重悬;

[0076] (2) 用pH5.0、25mM的MES溶液配置50mg/mlEDC溶液和50mg/mlNHS溶液;

[0077] (3) 活化:取50μl EDC溶液和50μlNHS溶液,依次加入到已洗好的羧基磁性颗粒中,室温用血液混合仪混合反应30min;

[0078] (4) 用磁分离器上分离磁珠,弃上清,用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液洗涤3~5次,用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液重悬;

[0079] (5) TG抗原溶液的配制:用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液配制成分终浓度为0.6 $\mu$ g/ $\mu$ l的TG抗原溶液;

[0080] (6) 将配制的TG抗原溶液加入到活化好的羧基磁性颗粒中,充分混匀,室温反应2h或4 $^{\circ}$ C反应过夜;

[0081] (7) 用磁分离器分离磁珠,用100 $\mu$ l封闭液(例如BSA)重悬羧基磁性颗粒,室温混合反应2h;

[0082] (8) 用磁分离器分离磁珠,弃上清,并用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3~5次,再用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3~5次,500 $\mu$ l/次;

[0083] (9) 预洗:用pH2.2、0.1M的Gly-HCl和pH8.0、0.1M的Tris-HCl交替洗涤6~10次,200~500 $\mu$ l/次;

[0084] (10) 用20mM PBS洗涤2次,最后用100 $\mu$ l免疫亲和磁珠的保存液重悬,4 $^{\circ}$ C保存;

[0085] (11) 取免疫亲和磁珠,用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3次;

[0086] (12) 加入100 $\mu$ l甲状腺球蛋白抗体的粗体液,4 $^{\circ}$ C冷藏柜中混匀过夜;

[0087] (13) 用磁分离器分离,弃上清,分离磁珠与甲状腺球蛋白抗体的粗提液,用1ml PBST洗涤3次,再用pH 7.2、1ml、20mM的PBS洗涤3~5次;

[0088] (14) 用pH2.2、100 $\mu$ l、0.1M的Gly-HCl洗脱,用磁分离器分离磁珠,收集上清,转移到无菌EP管中,然后加入中和缓冲液中和pH至7.2。

[0089] 三、甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品的制备

[0090] (1) 配制校准品基质。

[0091] 校准品基质可以为20mM的磷酸盐缓冲液或为20mM的Tris-HCl。

[0092] 其中,20mM的Tris-HCl缓冲液包括:150mMNaCl、1%蔗糖、3%牛血清白蛋白、1%的明胶和0.5%液体生物防腐剂。

[0093] 其中,20mM的磷酸盐缓冲液包括:150mMNaCl、2%蔗糖、0.5%牛血清白蛋白、1%的明胶和0.3%液体生物防腐剂。或者,20mM的磷酸盐缓冲液包括:150mMNaCl、0.5%蔗糖、5%牛血清白蛋白、0.5%的明胶和0.1%液体生物防腐剂。

[0094] 其中的液体生物防腐剂优选为proclin300或叠氮钠。

[0095] (2) 用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤校准品基质。

[0096] (3) 将步骤二所得高纯度的甲状腺球蛋白抗体加入到校准品基质中利用校准品基质进行稀释后获得一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。甲状腺球蛋白抗体的稀释比例按照实际要求进行即可,例如,所得校准品的效价可以为15IU/mL或600IU/mL,分别对应校准品1和校准品2。还可以根据需要配制成其他效价的校准品。

[0097] 通过试验证实本发明通过上述的制备方法制备的甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品,具有特异性强、稳定性好、准确度高等优点。

[0098] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。



[0099] 实施例1甲状腺球蛋白抗体(aTG)粗提液的制备

[0100] 1、筛选甲状腺球蛋白抗体高值血清；

[0101] 2、采用胶体金试纸的检测方法筛选乙肝表面抗原、梅毒、艾滋和丙肝抗体全阴性血清(约50份临床)后混合；

[0102] 3、将以上样本混合,3000r/min条件下离心20min,去沉淀；

[0103] 4、用0.22um滤膜和隔膜真空泵过滤,121℃高温灭菌15min,冷却后保存备用；按照混合血清与生理盐水的体积比为1:1的比例稀释混合血清；

[0104] 5、筛选不同浓度的硫酸铵溶液(40%、50%、55%)和不同的环境温度(4℃、25℃)进行硫酸铵分级沉淀。最终确定首先优选50%饱和硫酸铵、室温即25℃条件下进行沉淀工艺,然后选用33%饱和硫酸铵、室温即25℃条件下再进行沉淀工艺。

[0105] 1) 50%饱和硫酸铵沉淀:加入等体积的100%饱和硫酸铵,边加边混匀,室温放置1~2h,3000r/min 20min离心,弃上清,收集沉淀,加入15mL生理盐水溶解；

[0106] 2) 33%饱和硫酸铵沉淀:按溶解体积的1/2加入100%饱和硫酸铵,混匀,室温放置1~2h,3000r/min 15~30min离心,弃上清,收集沉淀,加入10~20mL生理盐水溶解；

[0107] 其中的100%饱和硫酸铵的配制过程如下:用分析天平,称取硫酸铵

[0108] 420.00±0.01g置于500ml烧杯中,用60~70℃、300ml纯化水溶解；一边用70℃水浴锅加热,一边搅拌,直至完全溶解；采用双层滤纸,用隔膜真空泵,趁热过滤饱和硫酸铵到无菌500ml蜀牛瓶中,室温静止1~2天,有结晶析出后,用浓氨水调pH至7.0~7.6,室温保存,备用。

[0109] 6、筛选不同的透析时间(4h、8h、12h)和不同的环境温度(4℃、25℃)优选透析工艺如下:用剪刀将透析袋裁成10cm长条4个；将2%碳酸氢钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min；取出透析袋,纯化水洗3遍；将1mmol/L乙二醇四乙酸二钠煮沸,然后将透析袋放入煮沸10min；取出透析袋,纯化水洗3遍；将透析袋放入20%乙醇中,4℃保存；取透析袋,去离子水洗净,将沉淀放入透析袋,夹子夹住两端,室温(25℃)流水中透析8h；

[0110] 7、筛选不同的透析时间(4h、8h、12h)和不同的环境温度(4℃、25℃)再将透析袋转移到盛有pH 7.2、20mM PBS的烧杯中,磁力搅拌过夜(12h)。次日,取出后在3000r/min条件下离心10min,收集上清,即为aTG的粗提液；

[0111] 8、取60uL透析过的aTG粗提液,加入15uL的1%氯化钡,然后再加入6uL浓盐酸,观察沉淀是否溶解,若沉淀溶解,则说明除盐成功；若沉淀不溶解,继续放入20mM PBS透析除盐；

[0112] 9、取PEG-20000干粉放到透析袋上,浓缩30min；

[0113] 10、用0.22um滤膜过滤,然后加入proclin300,4℃保存。

[0114] 11、采用电泳法进行抗体纯度检测,抗体纯度能达到80%以上。

[0115] 实施例2甲状腺球蛋白抗体的亲和层析

[0116] (1) 取100μl羧基磁性颗粒,用pH5.0、25mM的MES溶液洗涤4次,1ml/次,然后用pH5.0、100μl、25mM的MES溶液重悬；

[0117] (2) 用pH5.0、25mM的MES溶液配置50mg/mlEDC溶液和50mg/mlNHS溶液；

[0118] (3) 活化:取50μl EDC溶液和50μlNHS溶液,依次加入到已洗好的羧基磁性颗粒中,室温用血液混合仪混合反应30min；

[0119] (4) 用磁分离器上分离磁珠, 弃上清, 用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液洗涤4次, 用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液重悬;

[0120] (5) TG抗原溶液的配制: 用pH5.0、100 $\mu$ l、25mM的MES溶液配制成终浓度为0.6 $\mu$ g/ $\mu$ l的TG抗原溶液;

[0121] (6) 将配制的TG抗原溶液加入到活化好的羧基磁性颗粒中, 充分混匀, 室温反应2h或4 $^{\circ}$ C反应过夜;

[0122] (7) 用磁分离器分离磁珠, 用100 $\mu$ l封闭液重悬羧基磁性颗粒, 室温混合反应2h;

[0123] (8) 用磁分离器分离磁珠, 弃上清, 并用pH 7.2、20mM的PBS洗涤4次, 再用pH 7.2、20mM的PBS洗涤4次, 500 $\mu$ l/次;

[0124] (9) 预洗: 用pH2.2、0.1M的Gly-HCl和pH8.0、0.1M的Tris-HCl交替洗涤8次, 350 $\mu$ l/次;

[0125] (10) 用20mM PBS洗涤2次, 最后用100 $\mu$ l免疫亲和磁珠的保存液重悬, 4 $^{\circ}$ C保存;

[0126] (11) 取免疫亲和磁珠, 用pH 7.2、20mM的PBS洗涤3次;

[0127] (12) 加入100 $\mu$ l甲状腺球蛋白抗体的粗体液, 4 $^{\circ}$ C冷藏柜中混匀过夜;

[0128] (13) 用磁分离器分离, 弃上清, 分离磁珠与甲状腺球蛋白抗体的粗提液, 用1ml PBST洗涤3次, 再用pH 7.2、1ml、20mM的PBS洗涤4次;

[0129] (14) 筛选不同浓度洗脱液(0.05M、0.1M、0.15M), 不同pH值(2.2、2.6、3), 优选用pH2.2、100 $\mu$ l、0.1M的Gly-HCl洗脱, 用磁分离器分离磁珠, 收集上清, 转移到无菌EP管中, 然后加入中和缓冲液中和pH至7.2。如浓度过低, 可利用超滤离心管进行超滤浓缩, 合并浓缩液, 4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0130] (15) 采用电泳法进行抗体纯度检测, 抗体纯度能达到92.48%。

[0131] 实施例3甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品的制备

[0132] (1) 配制校准品基质。

[0133] 校准品基质可以为20mM的磷酸盐缓冲液。20mM的磷酸盐缓冲液中包括: 150mMNaCl、2%蔗糖、0.5%牛血清白蛋白、1%的明胶和0.3%proclin300。

[0134] 所添加的成分中, NaCl用于维持抗体生物活性; 蔗糖、牛血清白蛋白和明胶可以延缓抗体降解速度, 起到保护抗体的作用; 迭氮钠和proclin300主要起到防腐、抑制微生物生长的作用。

[0135] (2) 用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤校准品基质。

[0136] (3) 将步骤二所得高纯度的甲状腺球蛋白抗体按照一定比例加入到校准品基质中经过稀释后获得本发明的甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。所得校准品1的效价为15IU/mL, 所得校准品2的效价为600IU/mL。

[0137] 实施例4甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品稳定性能验证

[0138] 1、高温稳定性

[0139] 将配制完毕的aTG校准品放置于37 $^{\circ}$ C的恒温箱中7天, 14天, 分别取出与放置于2-8 $^{\circ}$ C的aTG校准品进行测定对比, 计算衰减率, 结果如下表所示。

[0140]

校准品	零时间	7天	7天衰减率	14天	14天衰减率
校准品1	12.70	12.97	2.13%	12.08	-4.88%

校准品2	589.37	591.16	0.30%	587.66	-0.29%
------	--------	--------	-------	--------	--------

[0141] 结果显示,高温7天及14天的aTG校准品衰减率均 $<5\%$ ,说明本发明的aTG校准品高温稳定性较好。

[0142] 2、开封稳定性

[0143] 将配制完毕的aTG校准品,进行开封稳定性的功能验证,结果如下表所示。

[0144]

校准品	零时间	开封 7 天	7 天 衰减率	14 天	14 天 衰减率	28 天	28 天 衰减率
校准品1	12.70	12.09	-4.80%	12.26	-3.46%	12.11	-4.65%
校准品2	589.37	587.34	-0.34%	584.95	-0.75%	583.28	-1.03%

[0145] 结果显示,开封7天、14天、28天的aTG校准品衰减率均 $<5\%$ ,说明本发明的aTG校准品开封稳定性较好。

[0146] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品及其制备工艺		
公开(公告)号	<a href="#">CN109633164A</a>	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811535050.4	申请日	2018-12-14
发明人	闻玉莉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/531 G01N2800/046		
代理人(译)	于晓庆		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品及其制备工艺，属于医学体外诊断领域。本发明首先利用硫酸铵沉淀法对甲状腺球蛋白抗体高值血清中的甲状腺球蛋白抗体进行粗提，得到甲状腺球蛋白抗体的粗提液；然后采用亲和层析提纯工艺-免疫磁珠分离法对甲状腺球蛋白抗体的粗提液进行纯化，得到高纯度的甲状腺球蛋白抗体；最后利用高纯度甲状腺球蛋白抗体制备甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品。通过本发明的制备方法获得的甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒校准品具有较高的稳定性、特异性、准确度和纯度，并且本发明中所采用的原材料容易获得，解决了现有aTG体外诊断试剂盒存在的原材料可获得性较难的问题。

校准品	零时间	开封 7天	7天 衰减率	14天	14天 衰减率	28天	28天 衰减率
校准品1	12.70	12.09	-4.80%	12.26	-3.46%	12.11	-4.65%
校准品2	589.37	587.34	-0.34%	584.95	-0.75%	583.28	-1.03%