



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112904025 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(21) 申请号 202110143817.4

G01N 21/76 (2006.01)

(22) 申请日 2021.02.02

(71) 申请人 广东云墨医疗科技有限公司

地址 510000 广东省广州市荔湾区花地大道中228号自编03荔湾科创广场二楼2023号

(72) 发明人 李云

(74) 专利代理机构 广州云领专利代理事务所

(普通合伙) 44441

代理人 张莲珍

(51) Int. Cl.

G01N 33/76 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

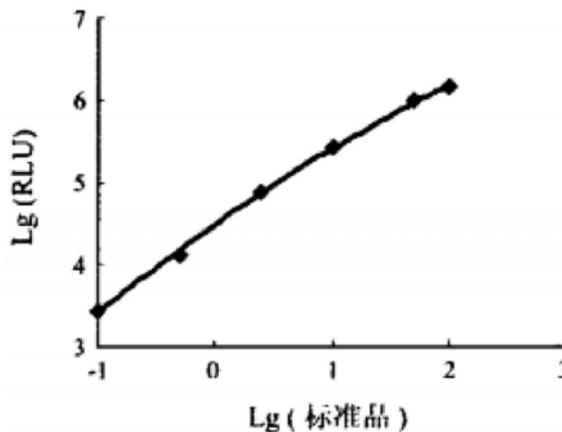
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于化学发光法的测定试剂盒及其测定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于化学发光法的测定试剂盒,所述测定试剂盒包括吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液、磁微粒溶液和化学发光激发液。本发明将吡啶酯作为信号物质与促甲状腺素进行标记,引入磁微粒作为固相载体,开发出性能优良的TSH检测试剂。吡啶酯标记物背景信号低、发光效率高,且不需要酶催化,受环境因素干扰较小,且其底物比酶促系统底物更加稳定。因此,吡啶类物质作为信号标记物,对试剂的灵敏度、精密度等都有很大提高。



1. 一种基于化学发光法的测定试剂盒,其特征在于,所述测定试剂盒包括吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液、磁微粒溶液和化学发光激发液。

2. 根据权利要求1所述的基于化学发光法的测定试剂盒,其特征在于,所述吡啶酯-TSH标记抗原溶液通过以下方法制得:

取适量TSH单克隆抗体溶于二甲基亚砷中,配置浓度为0.2mmol/L的A溶液;

取适量吡啶盐-DMAE-NHS溶于无水N,N-二甲基甲酰胺中,配置浓度为20mmol/l的B溶液;

往10mlB溶液中加入三乙胺4mg,加入10mlA溶液混合,再加入碳酸盐缓冲液稀释;

在室温条件下搅拌反应8h,经纯化后即得吡啶酯-TSH标记抗原溶液。

3. 根据权利要求2所述的基于化学发光法的测定试剂盒,其特征在于:

所述碳酸盐缓冲液采用0.1mol/L PH9.6的碳酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的基于化学发光法的测定试剂盒,其特征在于:

所述化学发光激发液包括A激发液和B激发液,所述A激发液含0.1M硝酸和1% (质量体积百分比,g/mL) 过氧化氢,所述B激发液含0.25M氢氧化钠和0.1% (质量体积百分比,g/mL) tritonx-100。

5. 根据权利要求1所述的基于化学发光法的测定试剂盒,其特征在于,所述生物素化抗体溶液通过以下方法制备:

取适量TSH单克隆抗体,经PH7.4的磷酸缓冲盐溶液透析纯化后,加入活化的生物素,在8°C下反应1h;

转入室温继续反应1h,加入赖氨酸反应15min,反应液用脱盐柱纯化后,加入甘油和叠氮钠-磷酸缓冲盐溶液。

6. 一种根据权利要求1至5任意一项所述的基于化学发光法的测定试剂盒的测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) TSH标准品制备:取TSH标准品溶解于量无激素血清中,配制成浓度为0.02mmol/L的TSH标准品;

(2) 向试剂盒中依次加入50 μ L的TSH标准品、吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液和磁微粒溶液,在37°C下温育15min,洗涤5次后加入化学发光激发液200 μ L,读取相对发光值。

7. 根据权利要求6所述的基于化学发光法的测定试剂盒的测定方法,其特征在于:

所述化学发光激发液包括100 μ L的A激发液和 μ L的B激发液。

一种基于化学发光法的测定试剂盒及其测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光法测定的技术领域,具体涉及一种基于化学发光法的测定试剂盒及其测定方法。

背景技术

[0002] 促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone,TSH)是腺垂体分泌的一种糖蛋白,分子量约28000。它由 α 和 β 两个亚单位组成。TSH的 α 亚单位与由垂体分泌的促黄体生成激素(luteinizing hormone,LH)和促卵泡激素(follicle-stimulating hormone,FSH),以及由胎盘产生的人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,HCG)基本相同。它们的差别主要是在 β 亚单位的氨基酸序列上,使得这些激素有着各不相同的生物学特性,并且可以用免疫分析方法把它们区别开来。

[0003] 目前用于检测促甲状腺激素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等。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技术因其具有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0004] 然而,在实际的免疫检测中,还有待提供更为优化的测定试剂盒。

发明内容

[0005] 本发明的目的是要解决现有产品的技术问题,提供一种基于化学发光法的测定试剂盒及其测定方法。

[0006] 为了解决上述问题,本发明按以下技术方案予以实现的:

[0007] 第一方面,本发明所述的一种基于化学发光法的测定试剂盒,所述测定试剂盒包括吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液、磁微粒溶液和化学发光激发液。

[0008] 优选地,所述吡啶酯-TSH标记抗原溶液通过以下方法制得:

[0009] 取适量TSH单克隆抗体,溶于二甲基亚砷中,配置浓度为0.2mmol/L的A溶液;

[0010] 取适量吡啶盐-DMAE-NHS,溶于无水N,N-二甲基甲酰胺中,配置浓度为20mmol/l的B溶液;

[0011] 往10mlB溶液中加入三乙胺4mg,加入10mlA溶液混合,再加入碳酸盐缓冲液稀释;

[0012] 在室温条件下搅拌反应8h,经纯化后即得吡啶酯-TSH标记抗原溶液。

[0013] 优选地,所述碳酸盐缓冲液采用0.1mol/L PH9.6的碳酸盐缓冲液。

[0014] 优选地,所述化学发光激发液包括A激发液和B激发液,所述A激发液含0.1M硝酸和1% (质量体积百分比,g/mL)过氧化氢,所述B激发液含0.25M氢氧化钠和0.1% (质量体积百分比,g/mL) tritonx-100。

[0015] 优选地,所述生物素化抗体溶液通过以下方法制备:

[0016] 取适量TSH单克隆抗体,经PH7.4的磷酸缓冲盐溶液透析纯化后,加入活化的赖氨

酸反应15min,反应液用脱盐柱纯化后,加入甘油和叠氮钠-磷酸缓冲盐溶液。

[0017] 第二方面,本发明还提供一种基于第一方面所述的基于化学发光法的测定试剂盒的测定方法,包括以下步骤:

[0018] (1) TSH标准品制备:取TSH标准品溶解于量无激素血清中,配制成浓度为0.02mmol/L的TSH标准品;

[0019] (2) 向试剂盒中依次加入50 μ L的TSH标准品、吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液和磁微粒溶液,在37 $^{\circ}$ C下温育15min,洗涤5次后加入化学发光激发液200 μ L,读取相对发光值。

[0020] 优选地,所述化学发光激发液包括100 μ L的A激发液和 μ L的B激发液。

[0021] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0022] 本发明将吡啶酯作为信号物质与促甲状腺素进行标记,引入磁微粒作为固相载体,开发出性能优良的TSH检测试剂。吡啶酯标记物背景信号低、发光效率高,且不需要酶催化,受环境因素干扰较小,且其底物比酶促系统底物更加稳定。因此,吡啶类物质作为信号标记物,对试剂的灵敏度、精密度等都有很大提高。

附图说明

[0023] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明,其中:

[0024] 图1是本发明的TSH标准曲线。

具体实施方式

[0025] 以下对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0026] 促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, thyrotropin, TSH)是一种由垂体前叶分泌的糖蛋白激素,由 α 和 β 2个亚基组成,相对分子质量(M_r)为28000。TSH本身受下丘脑分泌的TSH释放激素TRH的调控,TSH的主要生理作用是调节甲状腺激素的合成与分泌,血液中甲状腺激素水平与腺垂体分泌TSH的量之间有负反馈抑制关系。甲状腺功能改变时,TSH的波动较甲状腺激素更迅速且明显,是反映下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的敏感指标,因此采用灵敏度高的TSH免疫分析法具有重要的意义。化学发光免疫分析(chemiluminescent immunoassay, CLIA)是一种灵敏的免疫分析方法,在免疫诊断试剂研制中已得到了广泛的应用。本发明致力提供一种化学发光免疫分析法的原理研制了血清TSH的检测试剂盒,与现有产品相比,具有快速、灵敏、精密度高、成本低等优点。

[0027] 本发明所述的基于化学发光法的测定试剂盒,该测定试剂盒包括吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液、磁微粒溶液和化学发光激发液。

[0028] 其中,所述吡啶酯-TSH标记抗原溶液通过以下方法制得:

[0029] S1、取适量TSH单克隆抗体,溶于二甲基亚砜中,配置浓度为0.2mmol/L的A溶液;

[0030] S2、取适量吡啶盐-DMAE-NHS,溶于无水N,N-二甲基甲酰胺中,配置浓度为20mmol/L的B溶液;

[0031] S3、往10mlB溶液中加入三乙胺4mg,加入10mlA溶液混合,再加入碳酸盐缓冲液稀释;

[0032] S4、在室温条件下搅拌反应8h,经纯化后即得吡啶酯-TSH标记抗原溶液。

[0033] 其中,所述碳酸盐缓冲液采用0.1mol/L PH9.6的碳酸盐缓冲液。

[0034] 进一步地,所述化学发光激发液包括A激发液和B激发液,所述A激发液含0.1M硝酸和1% (质量体积百分比,g/mL) 过氧化氢,所述B激发液含0.25M氢氧化钠和0.1% (质量体积百分比,g/mL) tritonx-100。

[0035] 本发明所述生物素化抗体溶液通过以下方法制备:

[0036] S1、取适量TSH单克隆抗体,经PH7.4的磷酸缓冲盐溶液透析纯化后,加入活化的生物素,在8°C下反应1h。

[0037] 在一种实施中,加入10倍(摩尔比)活化的长链碘化生物素。

[0038] S2、转入室温继续反应1h,加入赖氨酸反应15min,反应液用脱盐柱纯化后,加入甘油和叠氮钠-磷酸缓冲盐溶液。

[0039] 在一种实施中,加入50倍(摩尔比)的赖氨酸。

[0040] 第二方面,本发明还提供上述基于化学发光法的测定试剂盒的测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0041] (1) TSH标准品制备:取TSH标准品溶解于量无激素血清中,配制成浓度为0.02mmol/L的TSH标准品;

[0042] (2) 向试剂盒中依次加入50 μ L的TSH标准品、吡啶酯-TSH标记抗原溶液、生物素化抗体溶液和磁微粒溶液,在37°C下温育15min,洗涤5次后加入化学发光激发液200 μ L,读取相对发光值。

[0043] 其中,所述化学发光激发液包括100 μ L的A激发液和 μ L的B激发液。

[0044] 本发明中反应原理为,标本中待测的TSH抗原与吡啶酯标记的TSH抗原相互竞争结合有限的生物素化抗体,最终吡啶酯所产生的发光值与标本中的TSH含量呈反向相关。本发明将吡啶酯作为信号物质与TSH进行标记,并引入磁性微球作为固相载体,并结合链霉亲和素,开发出性能优良的检测试剂盒。

[0045] 测试1稳定性

[0046] 将试剂盒放置于37°C的室内环境下7天后,比较与放置前参考标准品各点RLU值,参考标准品各点RLU值未见明显降低,且本底发光值无明显升高,表明试剂盒标准曲线无明显漂移,满足稳定性要求。

[0047] 测试2标准曲线与灵敏度

[0048] 在设定的免疫反应和发光条件下,以TSH标准品的浓度(0~100mIU/L)制作的标准曲线见图1。同时测定20个零标准,用零标准均值加上2倍标准差,计算出此方法的灵敏度为0.0796mIU/L。

[0049] 测试3精密度

[0050] 取低(4.44mIU/L)、中(19.45mIU/L)和高(79.23mIU/L)3种TSH浓度各重复测定10次,测定批内CV分别为6.2%、3.3%和4.6%,平均为4.7%。隔日分别进行5次独立试验,测批间CV分别为8.3%、7.6%和9.3%,平均为8.4%。

[0051] 测试4准确性

[0052] 准确性在已知TSH浓度的血清中加入3种不同浓度的标准血清,测定加入回收率为93.05%。将TSH浓度为44.42mIU/L的血清用标准零血清分别按1/2、1/4、1/8、1/16稀释,测

量各稀释浓度的TSH含量,测定稀释回收率为99.86%。

[0053] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,故凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

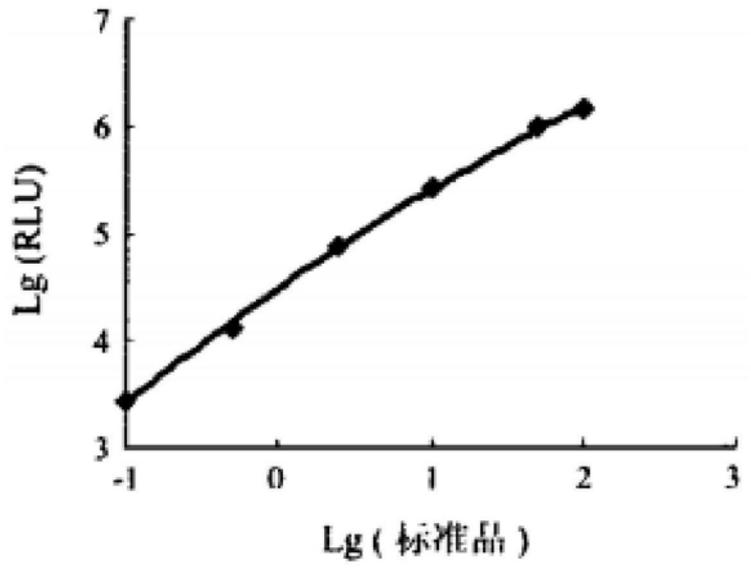


图1