



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114460300 B

(45) 授权公告日 2023.01.24

(21) 申请号 202111523581.3

(22) 申请日 2021.12.14

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114460300 A

(43) 申请公布日 2022.05.10

(73) 专利权人 苏州东尼生物技术有限公司  
地址 215300 江苏省苏州市昆山开发区中  
小企业园风琴路108号5号房

(72) 发明人 程若川

(74) 专利代理机构 武汉谦源知识产权代理事务  
所(普通合伙) 42251  
专利代理师 尹伟

(51) Int. Cl.  
G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 113358871 A, 2021.09.07  
CN 103674657 A, 2014.03.26  
CN 113156121 A, 2021.07.23  
CN 106198992 A, 2016.12.07  
US 6054297 A, 2000.04.25  
CN 101759804 A, 2010.06.30

CN 109187986 A, 2019.01.11  
JP H1194833 A, 1999.04.09  
CN 113292658 A, 2021.08.24  
CN 104004093 A, 2014.08.27  
程少浩等. TgAb干扰血清Tg检测的相关因素研究进展.《山东医药》.2021, (第11期),  
Kumarasamy J等. Production, characterization and in-vitro applications of single-domain antibody against thyroglobulin selected from novel T7 phage display library.《J Immunol Methods》.2021,  
宋晓荣等. 生物素-链霉亲和素技术一步法检测人心肌肌钙蛋白T.《郑州大学学报(医学版)》.2004, (第02期), 第241-243页.  
吴蓉等. 人源化甲状腺球蛋白单链抗体FR区突变对其抗原结合力的影响.《现代免疫学》.2010, (第02期), 第99-103页.  
程若川, 李恩全, 张建明. 血清甲状腺球蛋白的临床观测及应用研究.《昆明医学院学报》.1996, (第04期), 第36-38页.

审查员 李若琳

权利要求书1页 说明书4页  
序列表3页 附图2页

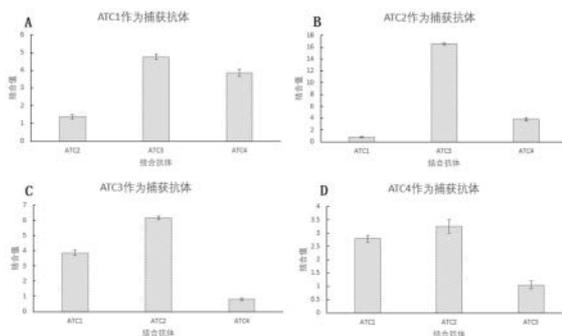
## (54) 发明名称

一种可检出Tg与抗Tg抗体的结合复合物的胶体金试剂盒

## (57) 摘要

本发明涉及一种可检出Tg与抗Tg抗体的结合复合物的胶体金试剂盒,包括试纸条和样品稀释液,样品稀释液中含有二硫苏糖醇和尿素,试纸条上设置有结合抗体和捕获抗体,结合抗体标记在胶体金颗粒上,捕获抗体锚定在结合抗体的下游。结合抗体CDR区序列如SEQ ID NO:6-8所示,捕获抗体CDR区序列如SEQ ID NO:2-4所示。本发明通过对样品稀释液中添加一些成分使Tg-抗Tg复合物上的一些抗原位点暴露,并用暴露抗原位点的复合物进行了抗体库筛选,制备了有效

的单克隆抗体。通过反复试验发现该样品稀释液的处理能够可重复地暴露上述位点,并且,该样品稀释液不影响我们制备的单克隆抗体的结合,从而使得我们的试剂盒能够灵敏特异地定性和定量检测Tg-抗Tg复合物。



CN 114460300 B

1. 一种可检出Tg与抗Tg抗体的结合复合物的胶体金试剂盒,包括试纸条和样品稀释液,其特征在于,所述样品稀释液中含有二硫苏糖醇和尿素,所述试纸条上设置有结合抗体和捕获抗体,所述结合抗体标记在胶体金颗粒上,所述捕获抗体锚定在所述结合抗体的下游;

所述结合抗体为纳米抗体,包含三个CDR区,序列依次如SEQ ID NO:6-8所示;

所述捕获抗体为纳米抗体,包含三个CDR区,序列依次如SEQ ID NO:2-4所示。

2. 根据权利要求1所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述结合抗体的序列如SEQ ID NO:5所示。

3. 根据权利要求1所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述捕获抗体的序列如SEQ ID NO:1所示。

4. 根据权利要求1所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液为含有50 mM二硫苏糖醇和2 g/ml尿素的0.2 M磷酸缓冲液,pH为8.3。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述试纸条包括底板(1),以及设置在所述底板(1)上依次连接的样品垫(2)、胶体金结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),所述硝酸纤维膜(4)上设置有检测线(41);所述胶体金结合垫(3)中含有结合抗体标记的胶体金颗粒;所述检测线(41)中锚定了捕获抗体。

6. 根据权利要求5所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维膜(4)上还设置有质控线(42),所述质控线(42)比所述检测线(41)远离所述胶体金结合垫(3)。

7. 根据权利要求6所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述质控线(42)中锚定了鼠抗羊驼IgG。

8. 根据权利要求5所述的胶体金试剂盒,其特征在于,所述样品垫(2)与所述胶体金结合垫(3)交界处设置有滤血膜(6)。

## 一种可检出Tg与抗Tg抗体的结合复合物的胶体金试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及甲状腺癌诊断领域,更特别地,涉及一种可检出Tg与抗Tg 抗体的结合复合物的胶体金试剂盒。

### 背景技术

[0002] 甲状腺球蛋白 (Tg) 是一种由甲状腺滤泡上皮细胞分泌的糖蛋白,分子量约660kD,是甲状腺滤泡内胶质的主要成分。分化型甲状腺癌 (DTC) 患者体内的Tg含量升高,因此Tg是DTC的关键血清学指标,可协助DTC的初诊和确诊。DTC患者康复后,由于血清中曾经出现过高浓度的Tg,所以在免疫系统的作用下,诱导出了抗Tg抗体 (TgAb)。所以,当DTC康复者复发DTC 时,虽然Tg的分泌量升高,但是由于体内存在TgAb的原因,导致了Tg迅速被抗体结合,并形成复合物。在这种情况下,使用常规的Tg检测试剂盒检测不到血清Tg含量。医生往往据此误判,认为受检者的体内没有发生Tg 含量上升,不存在复发的情况。

[0003] 本团队已经申请了一种可检测出Tg-抗Tg复合物的试剂盒(申请号:CN202110616262.0),通过使用多物种抗血清混合物作为结合抗体和捕获抗体,取得了较好的效果。但是,在使用过程中我们发现,由于不同批次的抗血清存在一定差异,而该试剂盒同时涉及了多种抗血清,导致每批试剂盒的调校比较复杂,影响了试剂盒的产能。因此,需要一种新的可检测出Tg-抗 Tg复合物的试剂盒。

### 发明内容

[0004] 我们对Tg抗原抗体复合物进行了进一步研究,发现通过使用一种孵育液可使Tg抗原抗体复合物上的一些抗体脱落,暴露出一些抗原位点。同时,我们还通过使用Tg免疫羊驼,并构建噬菌体文库,筛选到了一些可与暴露的抗原位点结合的纳米抗体。

[0005] 基于上述研究,本发明提供了一种可检出Tg与抗Tg抗体的结合复合物的胶体金试剂盒,包括试纸条和样品稀释液,所述样品稀释液中含有二硫苏糖醇和尿素,所述试纸条上设置有结合抗体和捕获抗体,所述结合抗体标记在胶体金颗粒上,所述捕获抗体锚定在所述结合抗体的下游。

[0006] 在一个具体实施方案中,所述结合抗体为纳米抗体,包含三个CDR区,序列依次如SEQ ID NO:6-8所示。

[0007] 在一个具体实施方案中,所述结合抗体的序列如SEQ ID NO:5所示。

[0008] 在一个具体实施方案中,所述捕获抗体为纳米抗体,包含三个CDR区,序列依次如SEQ ID NO:2-4所示。

[0009] 在一个具体实施方案中,所述捕获抗体的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0010] 在一个具体实施方案中,所述样品稀释液为含有50mM二硫苏糖醇和2 g/ml尿素的0.2M磷酸缓冲液,pH为8.3。

[0011] 在一个具体实施方案中,所述试纸条包括底板(1),以及设置在所述底板(1)上依次连接的样品垫(2)、胶体金结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),所述硝酸纤维膜(4)

上设置有检测线(41);所述胶体金结合垫(3)中含有结合抗体标记的胶体金颗粒;所述检测线(41)中锚定了捕获抗体。

[0012] 在一个具体实施方案中,所述硝酸纤维膜(4)上还设置有质控线(42),所述质控线(42)比所述检测线(41)远离所述胶体金结合垫(3)。

[0013] 在一个具体实施方案中,所述质控线(42)中锚定了鼠抗羊驼IgG。

[0014] 在一个具体实施方案中,所述样品垫(2)与所述胶体金结合垫(3)交界处设置有滤血膜(6)。

[0015] 本发明通过对样品稀释液中添加一些成分使Tg-抗Tg复合物上的一些抗原位点暴露,并用暴露抗原位点的复合物进行了抗体库筛选,制备了有效的单克隆抗体。通过反复试验发现该样品稀释液的处理能够可重复地暴露上述位点,并且,该样品稀释液不影响我们制备的单克隆抗体的结合,从而使得我们的试剂盒能够灵敏特异地定性和定量检测Tg-抗Tg复合物。

### 附图说明

[0016] 图1为单克隆抗体ATC1-4对不同底物的结合活性统计图。

[0017] 图2为使用ATC1-4中的一种作为捕获抗体,另一种作为结合抗体,以双抗夹心的方式检测Tg-抗Tg复合物的统计图。

[0018] 图3为试纸条的结构示意图。

[0019] 图4为定量检测试纸条的硝酸纤维膜的俯视图。

[0020] 图5为样品垫、滤血膜、胶体金结合垫的示意图。

[0021] 其中,1、底板、2、样品垫,3、胶体金结合垫,4、硝酸纤维膜,41、检测线,42、质控线,5、吸水垫,6、滤血膜。

### 具体实施方式

[0022] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0023] 1、抗体库的制备

[0024] 制备甲状腺球蛋白Tg用于免疫羊驼,制备抗人Tg抗体。用250 $\mu$ g抗原与250 $\mu$ L弗氏完全佐剂混合乳化,将混合物用于免疫羊驼,完成初免。在初免2周后和4周后,对羊驼各进行一次加强免疫,加强免疫时使用1250  $\mu$ g抗原和250 $\mu$ L弗氏不完全佐剂的混合物进行。二免和三免一周后,采血测定抗血清效价。

[0025] 结果显示,抗原二免和三免引发的抗血清效价分别为 $4.15 \times 10^6$ 和 $8.29 \times 10^6$ 。可见抗原诱导羊驼产生了针对相应抗原肽的高滴度抗血清。取三免一周后的外周血,分离外周血单核细胞(PBMC),提取RNA,反转录后使用通用引物扩增,并克隆至噬菌粒上,转化TG1菌株,建立噬菌体库用于筛选单克隆抗体。

[0026] 2、Tg-抗Tg复合物的获得和处理以及抗体筛选

[0027] 招募抗Tg抗体阳性志愿者,抽取外周血,分离抗血清。将合成的Tg蛋白偶联到磁珠上,用抗血清在4 $^{\circ}$ C下孵育4h,得到偶联到磁珠上的Tg-抗 Tg复合物。

[0028] 将带有Tg-抗Tg复合物的磁珠用含有25mM二硫苏糖醇和1g/ml尿素的 0.1M磷酸缓

冲液(Ph 8.3)处理,于室温孵育5min,然后将磁珠用于筛选抗体库。

[0029] 经过多轮淘选,我们得到4个具有高度亲和力和特异性的单克隆抗体,分别为ATC1-4。使用ATC1-4以酶联免疫吸附的方式检测与Tg、Tg-抗Tg复合物和处理后的Tg-抗Tg复合物的结合活性,结果如图1所示,ATC1-4对 Tg和处理后的Tg-抗Tg复合物均有较高的结合活性,结合值均达到4以上,而对未处理的Tg-抗Tg复合物没有结合活性。这说明,经过处理后的Tg-抗 Tg复合物上的一些抗体掉落,暴露了相应的抗原位点。

[0030] 3、用于ELISA检测双抗筛选

[0031] 分别使用ATC1-4中的一个作为捕获抗体,其他作为结合抗体,测试 ELISA双抗配对情况,结果如图2所示,使用ATC2作为捕获抗体,ATC3作为结合抗体,具有很高的结合值,可见两者结合不同的抗原位点,可用于双抗夹心的免疫检测。

[0032] ATC2的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,包括3个CDR区,CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2-4所示。ATC3的氨基酸序列如SEQ ID NO:5 所示,包括3个CDR区,CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6-8所示。

[0033] 4、检测试剂盒的制备

[0034] 1) 试剂盒的组成

[0035] 本试剂盒包括样品稀释液和胶体金试纸条。

[0036] 其中,样品稀释液为含有50mM二硫苏糖醇和2g/ml尿素的0.2M磷酸缓冲液。

[0037] 胶体金试纸条如图3-5所示,包括长方形的底板1,以及设置在所述0 底板1上依次搭接的样品垫2、胶体金结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5。在一个优选实施方案中,样品垫2与胶体金结合垫3之间的交界面增大,以提高样品扩散效率。优选地,样品垫2与胶体金结合垫3的交界处做成上部突出的形状,胶体金结合垫3与样品垫2的交界处做成下部突出的形状,并且这两个部分相互契合,以增大接触面,并且,由于交界处,样品垫2在上,胶体金结合垫3在下,在重力的作用下有利于样品从样品垫2扩散到胶体金结合垫3上。样品垫2为经过磷酸缓冲液处理的玻璃纤维膜,所述磷酸缓冲液为含有1-5%BSA和表面活性剂的磷酸缓冲液。

[0038] 胶体金结合垫3为涂覆了抗体ATC2标记的胶体金颗粒的玻璃纤维膜。胶体金结合垫3中含有胶体金颗粒,胶体金颗粒上结合抗体ATC3。样品垫2 与胶体金结合垫3交界面上设置有滤血膜6。该设置使得本发明的试纸条可用于检测全血样品,而非局限于血清。

[0039] 检测时,首先将血液样品与样品稀释液以1:1的体积混合,在室温下孵育5min,然后滴加在样品垫2上。如果样品中存在Tg-抗Tg复合物,Tg- 抗Tg复合物扩散至胶体金结合垫3中后,可通过ATC3耦合到胶体金颗粒上。带有胶体金颗粒的Tg-抗Tg复合物继续向硝酸纤维膜4扩散,并在硝酸纤维膜4上聚集显示。

[0040] 胶体金颗粒标记ATC3抗体的方法如下:

[0041] 胶体金的配制:用双蒸水将1%的氯金酸溶液稀释成0.01%,煮沸,加入柠檬酸三钠溶液,继续煮沸,知道液体呈亮红色,停止加热,补足因煮沸而损失的水分,即得到胶体金;在胶体金加入ATC3抗体,混匀后静置,离心取沉淀,洗涤两遍后,得到标记了ATC3的胶体金颗粒。将标记了ATC3的胶体金颗粒喷涂在玻璃纤维膜上,制备成胶体金结合垫3。

[0042] 在具体的实施方案中,我们优化了胶体金的pH值,当胶体金pH值为 7.05-7.35时,标记效率最高。

[0043] 硝酸纤维膜4上设置有检测线41。检测线41上锚定了包被抗体ATC2,与胶体金颗粒偶联的Tg-抗Tg复合物在硝酸纤维膜4上扩散时,遇到检测线 41时,与检测线41中锚定的包被抗体ATC2结合,聚集于检测线41上,带有胶体金颗粒的Tg-抗Tg复合物在检测线上聚集越多,则显色越深。

[0044] 硝酸纤维膜4上还设置有质控线42,质控线42比检测线41远离胶体金结合垫3。质控线42上锚定了鼠抗羊驼IgG。当胶体金颗粒扩散至质控线42 处时,聚集于质控线42上。因此,胶体金颗粒在扩散过程中,先遇到检测线41,结合了Tg-抗Tg复合物的胶体金颗粒聚集于检测线41上,没有集合 Tg-抗Tg复合物的胶体金颗粒继续向前扩散,在遇到质控线42时,聚集于质控线42上。由于胶体金颗粒丰度远大于Tg-抗Tg复合物,因此无论样品中是否存在Tg-抗Tg复合物,质控线42都将显色。

[0045] 硝酸纤维膜4的制备方法如下:

[0046] 1) 将硝酸纤维膜在封闭液中封闭60min,封闭液为含有1%BSA和0.1%吐温-20的0.01M的磷酸缓冲液(pH 7.0);

[0047] 2) 将捕获抗体ATC2和鼠抗羊驼IgG分别加入到点膜稀释液中,得到AP3 点膜液和鼠抗羊驼IgG抗体点膜液,将ATC2点膜液和鼠抗羊驼IgG点膜液分别按2 $\mu$ L/cm的量喷涂在相隔5mm的检测线和质控线上。其中,点膜稀释液为含有0.15M氯化钠、10mM乙二胺四乙酸、1g/L叠氮钠和25g/L 甲醇的0.01M的磷酸缓冲液(pH 7.4)。ATC2点膜液的浓度为2.5 $\mu$ g/mL,鼠抗羊驼IgG点膜液的浓度为1.5 $\mu$ g/L。

[0048] 3、Tg-抗Tg复合物检测方法

[0049] 定性检测时,将50 $\mu$ L外周血或血清样品加入到50 M1样品稀释液中,搅拌混匀后,于室温下孵育5min。取50 $\mu$ L滴加在检测试纸条的样品垫的加样区,于20-30 $^{\circ}$ C下进行层析5min。通过观察检测线和质控线即可确定样品中是否含有Tg-抗Tg复合物。即,当检测线和质控线都显色时,样品中含有Tg-抗Tg复合物;当检测线不显色,质控线显色时,样品中不含Tg-抗 Tg复合物。

[0050] 定量检测时,需要准备色值读数系统。将层析反应后的试纸条放置在色值读数系统的扫描装置下进行扫描,扫描后的图像经过色值读数系统进行处理和判定,可得出Tg-抗Tg复合物的浓度。

[0051] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



|        |   |                           |
|--------|---|---------------------------|
| [0039] | <213>   | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0040] | <400>   | 3                         |
| [0041] | Leu Ile Arg Ile Thr Ala Thr Ser Ala Ser                         |                           |
| [0042] | 1   | 5 10                      |
| [0043] | <210>   | 4                         |
| [0044] | <211>   | 18                        |
| [0045] | <212>   | PRT                       |
| [0046] | <213>   | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0047] | <400>   | 4                         |
| [0048] | Ala Ile Asp Glu Phe Arg Arg Thr Met Ser Asn Glu Ser Lys Arg Thr |                           |
| [0049] | 1   | 5 10 15                   |
| [0050] | Asn Tyr   |                           |
| [0051] | <210>   | 5                         |
| [0052] | <211>   | 142                       |
| [0053] | <212>   | PRT                       |
| [0054] | <213>   | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0055] | <400>   | 5                         |
| [0056] | Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Ser Val Gln Pro Gly Glu |                           |
| [0057] | 1   | 5 10 15                   |
| [0058] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Val Ser Arg Ala Ser Ile Gly Gly Arg |                           |
| [0059] |   | 20 25 30                  |
| [0060] | Thr Leu Thr Tyr Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu |                           |
| [0061] |   | 35 40 45                  |
| [0062] | Arg Glu Leu Val Ala Gly Arg Ser Ala Gly Ile Thr Val Ser Arg Glu |                           |
| [0063] |   | 50 55 60                  |
| [0064] | Tyr Glu Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala |                           |
| [0065] |   | 65 70 75 80               |
| [0066] | Lys Asn Thr Val Tyr Leu Arg Met Asp Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr |                           |
| [0067] |   | 85 90 95                  |
| [0068] | Ala Val Tyr Val Cys Ala Thr Leu Ala Ala His Tyr Gly Arg Glu Tyr |                           |
| [0069] |   | 100 105 110               |
| [0070] | Asp Glu Tyr Thr Asn Cys Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln |                           |
| [0071] |   | 115 120 125               |
| [0072] | Val Thr Val Ser Ser Glu His His Gly Glu Asp Pro Ser Ser         |                           |
| [0073] |   | 130 135 140               |
| [0074] | <210>   | 6                         |
| [0075] | <211>   | 12                        |
| [0076] | <212>   | PRT                       |
| [0077] | <213>   | 人工序列(Artificial Sequence) |



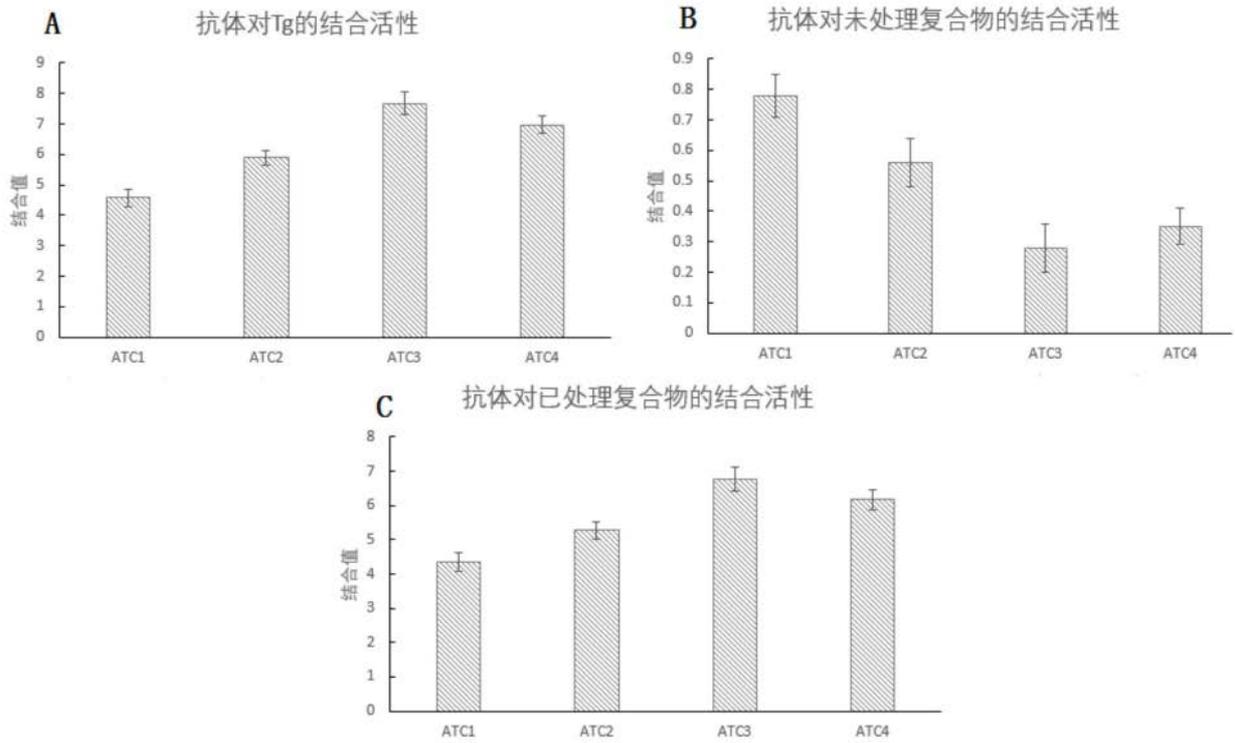


图1

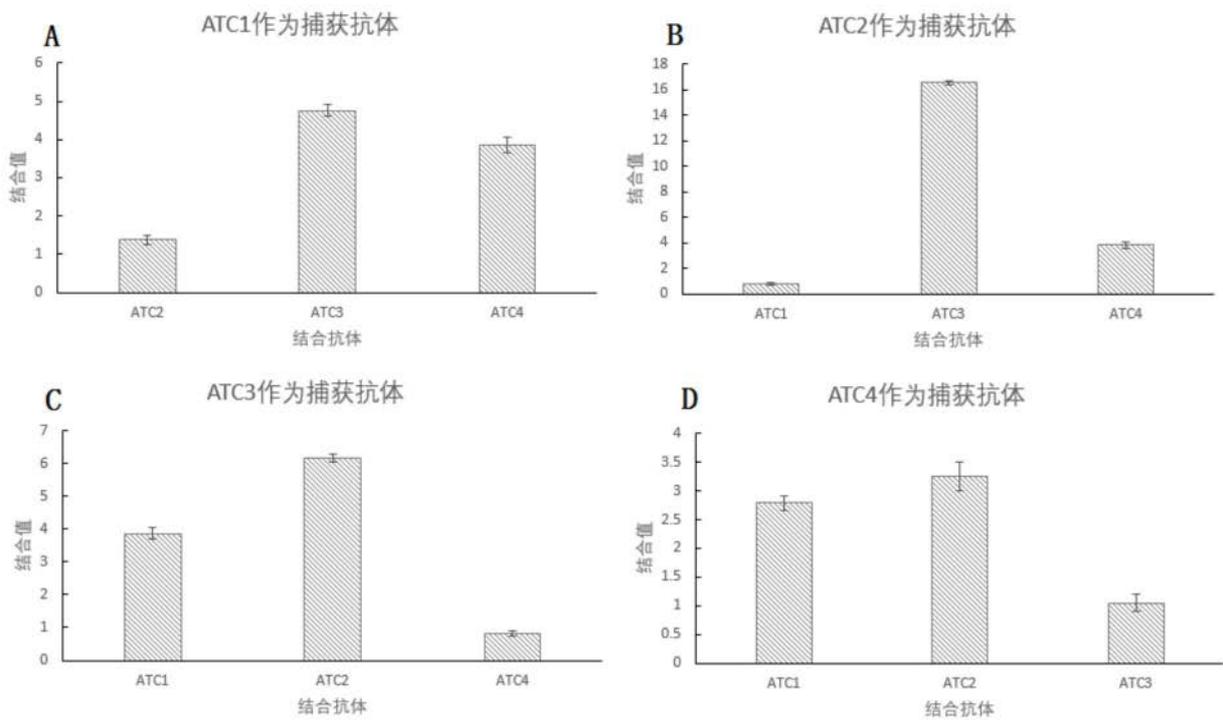


图2

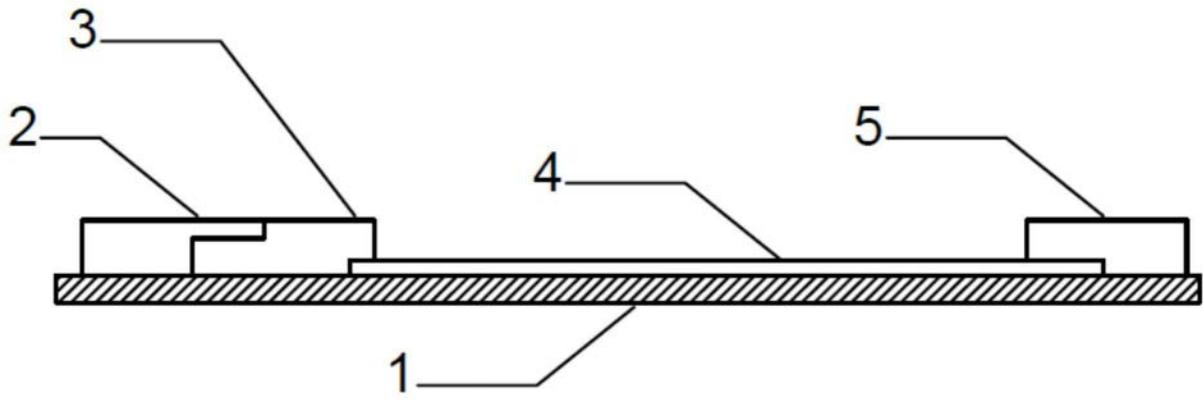


图3

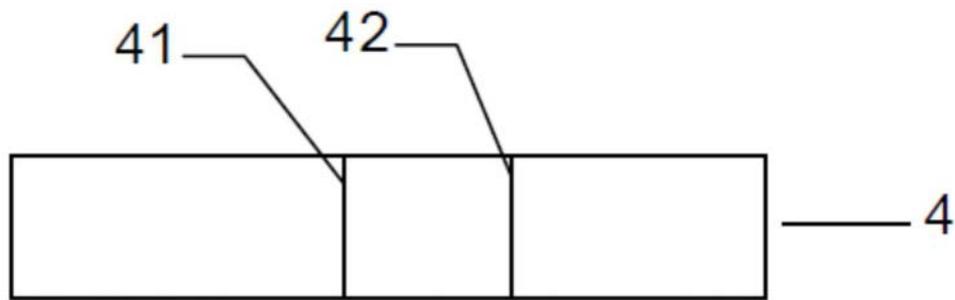


图4

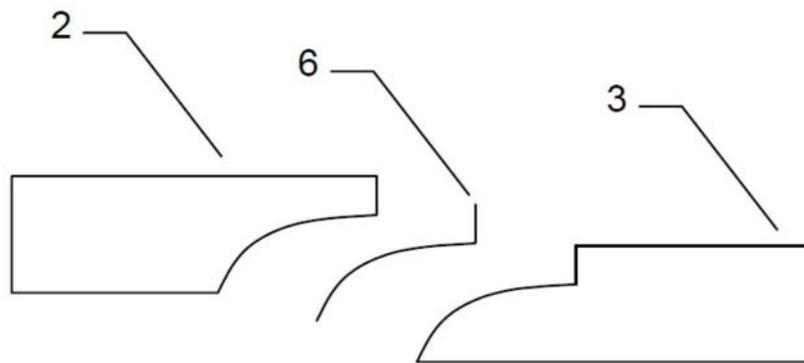


图5