



## (12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 202794191 U

(45) 授权公告日 2013. 03. 13

(21) 申请号 201220399454. 7

(22) 申请日 2012. 08. 07

(73) 专利权人 天津中新科炬生物制药有限公司

地址 300457 天津市开发区第 6 大街 65 号

(72) 发明人 李洲 许俊艳 杨发青

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006. 01)

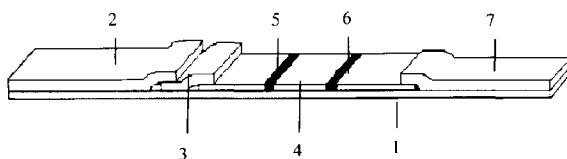
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### (54) 实用新型名称

促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒

### (57) 摘要

本实用新型专利公开了一种促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒,其特征就在于试剂盒由试纸卡、比色卡和免疫层析结果判读记录仪组成。试纸卡结构为:在塑料底板(1)一端粘贴上样垫(2),上样垫的一端紧密压接含有标记促甲状腺激素(TSH) $\beta$ 亚单位特异性抗体的胶体金垫(3),胶体金垫一端紧密压接硝酸纤维素NC膜(4),NC膜上包被有相互分离的检测线T(5)和质控线C(6),T线为TSH $\alpha$ 亚单位抗体,C线为抗鼠IgG抗体,NC膜的另一端连接吸样垫(7)形成试纸,试纸装入塑料卡内形成试纸卡。检测时用免疫层析结果判读记录仪或比色卡对结果进行定量或半定量判定,具有操作简便、快速、适合现场检测和经济实用等优点。



1. 一种促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒,其特征在于试剂盒由试纸卡、比色卡和免疫层析结果判读记录仪构成。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于试纸卡结构为:在塑料底板(1)一端粘贴上样垫(2),上样垫的一端紧密压接含有标记促甲状腺激素(TSH) $\beta$ 亚单位特异性抗体的胶体金垫(3),胶体金垫一端紧密压接硝酸纤维素NC膜(4),NC膜上包被有相互分离的检测线T(5)和质控线C(6),T线为TSH $\alpha$ 亚单位抗体,C线为抗鼠IgG抗体,NC膜的另一端连接吸样垫(7)形成试纸,试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

3. 根据权利要求1和2所述的试剂盒,其特征在于所述试纸卡的抗体为分别TSH $\beta$ 亚单位和 $\alpha$ 亚单位配对抗体,抗体可以为纯化的单克隆抗体或多克隆抗体。

4. 根据权利要求1和2所述的试剂盒,其特征在于所述试纸卡的NC膜为孔径8-12微米的多孔样结构膜,上样垫为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫由吸水滤纸构成。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述比色卡是白色背景上印有系列不同深浅红色线条的纸板,用于对检测结果的对比判定。不同深浅的红色线条共5条,分别对应2.5、5、10、20、50uIU/mL的TSH浓度。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于免疫层析结果判读记录仪是一种光学检测系统,用于对检测结果的定量判定,对TSH的检测范围为0-100uIU/mL。

## 促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本实用新型是涉及生物应用技术领域,特别是涉及一种以胶体金免疫层析法制备的促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 促甲状腺激素(TSH)是垂体分泌的促进甲状腺的生长和机能的激素。人类的TSH为一种糖蛋白,含211个氨基酸,糖类约占整个分子的15%。整个分子由 $\alpha$ 亚单位和 $\beta$ 亚单位2条肽链组成。TSH全面促进甲状腺的机能:包括加强碘泵活性,增强过氧化物酶活性,促进甲状腺球蛋白合成及酪氨酸碘化等各个环节。垂体分泌TSH,一方面受下丘脑分泌的促甲状腺激素释放激素(TRH)的促进性影响,另一方面又受到T3、T4反馈性的抑制性影响,二者互相拮抗,它们组成下丘脑-腺垂体-甲状腺轴。正常情况下,下丘脑分泌的TRH量,决定腺垂体甲状腺轴反馈调节的水平。TRH分泌多,则血中T3、T4水平的调定点高,当血中T3、T4超过此调定点水平时,则反馈性抑制腺垂体分泌TSH,并降低腺垂体对TRH的敏感性,从而使血中T3、T4水平保持相对恒定。TSH参考值:2~10uIU/mL。

[0003] 在病理情况下,TSH含量发生变化。增高:原发性甲状腺功能减退、伴有甲状腺功能低下的桥本病、外源性促甲状腺激素分泌肿瘤(肺、乳腺)、亚急性甲状腺炎恢复期。摄入金属锂、碘化钾、促甲状腺激素释放激素可使促甲状腺激素增高;减低:垂体性甲状腺功能低下、非促甲状腺激素瘤所致的甲状腺功能亢进,以及摄入阿司匹林、皮质激素等。

[0004] TSH是先天性甲状腺机能低下症检查的首选指标。大约每4千位新生儿中会有一位新生儿的甲状腺机能有严重的缺陷,其他有更多的新生儿有轻微或程度不一的缺陷。几乎所有的发达国家包括我国都实施新生儿筛检,以便发现并治疗先天性甲状腺机能低下症。新生儿甲状腺机能低下TSH的参考值一般为小于10uIU/mL。

[0005] 目前对TSH的检测方法主要是发学发光法及ELISA方法,这些方法适合在大医院进行大样本的检测。新生儿TSH检测主要用纸片ELISA方法,可以集中标本大量检测,但检测得到结果时间漫长。尚未有采用免疫层析胶体金技术制备的可定量检测TSH的检测试剂盒。

[0006] 免疫层析胶体金技术是新型的诊断技术,基本原理如下:利用胶体金标记一种抗原或抗体,在试剂的NC膜上包被相应的配对抗原或抗体,检测时当样品中含相应的特异性抗体或抗原时,胶体金标记颗粒和样品中配体相结合形成复合物,然后在NC膜上层析,再被包被抗原或抗体捕获,形成肉眼可见的检测T线,在一定的条件下,T线的强弱和样品中的浓度呈正相关或负相关,从而实现检测。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

### 发明内容

[0007] 本实用新型的目的是提供促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒,具有定量或半定量检测血清、血浆和全血中TSH的能力,具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性

强、适合现场检测和经济实用等优点。

[0008] 促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒,其特征在于试剂盒由试纸卡、比色卡和免疫层析结果判读记录仪构成。

[0009] 所述试纸卡结构为:在塑料底板(1)一端粘贴上样垫(2),上样垫的一端紧密压接含有标记促甲状腺激素(TSH) $\beta$ 亚单位特异性抗体的胶体金垫(3),胶体金垫一端紧密压接硝酸纤维素NC膜(4),NC膜上包被有相互分离的检测线T(5)和质控线C(6),T线为TSH $\alpha$ 亚单位抗体,C线为抗鼠IgG抗体NC膜的另一端连接吸样垫(7)形成试纸,试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0010] 所述试纸卡的抗体为分别TSH $\beta$ 亚单位和 $\alpha$ 亚单位配对抗体,抗体可以为纯化的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0011] 所述试纸卡的NC膜为孔径8-12微米的多孔样结构膜,上样垫为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫由吸水滤纸构成。

[0012] 所述比色卡是白色背景上印有系列不同深浅红色线条的纸板,用于对检测结果的对比判定。不同深浅的红色线条共5条,分别对应2.5、5、10、20、50uIU/mL的TSH浓度。

[0013] 所述免疫层析结果判读记录仪是一种光学检测系统,用于对检测结果的定量判定,对TSH的检测范围为0-100uIU/mL。

[0014] 所述试纸卡,NC膜抗体的包被过程为:以0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)将TSH $\alpha$ 亚单位抗体配制成1-3mg/ml的溶液,将抗鼠IgG配制成1-2mg/ml的溶液,用喷膜仪在NC膜上部和下部以1-1.5 $\mu$ l/cm的参数进行分别划线,包被C、T线,划线后将NC膜在干燥间,温度20-25 $^{\circ}$ C,湿度小于30%,干燥2-5小时。

[0015] 所述试纸卡,胶体金垫制备过程为:以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为30-50nm的胶体金溶液,制备完成后取100ml胶体金液放在烧杯内,用0.2M  $K_2CO_3$ 调至pH7.5,按100ml胶体金溶液加入0.75-1.25mg TSH $\beta$ 亚单位抗体,室温搅拌2小时,加入终浓度为0.5%牛血清白蛋白,0.5%聚乙二醇20000封闭20min,12000r/m离心30分钟,弃上清,用胶体金工作液复溶至50ml,按1ml溶液铺20 $cm^2$ 的比例均匀地铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置干燥间,温度20-25 $^{\circ}$ C,湿度小于30%,干燥2-5小时,制成胶体金垫。

[0016] 所述试纸卡的装配过程为:在干燥室内,温度20-25 $^{\circ}$ C,湿度小于40%,取塑料底板,将已包被的NC膜放置在塑料底板的中部粘贴,将胶体金垫裁切成合适的宽度,在NC膜T线一侧搭接胶体金垫,搭胶体金垫的1/5粘贴,在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫,搭胶体金垫的1/3粘贴;在NC膜C线一侧搭接吸样垫,搭吸样垫的1/10粘贴;最后用裁剪机将贴好的塑料板切成3-5mm宽的试纸条,再装入塑料卡内,形成试剂试纸卡。

[0017] 所述试剂盒,检测方法为:1)将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;2)精确吸取10 $\mu$ l血清、血浆样本,样本为全血时吸取20 $\mu$ l样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100 $\mu$ l样本稀释液(生理盐水或PBS),15-20分钟内用免疫层析结果判读记录仪或比色卡(半)定量判定结果;4)仪器判定时,设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示出样品浓度的定量测定结果;5)用比色卡判定结果时,将试纸卡T线的颜色和比色卡上标准线的颜色深浅进行对比,半定量判定样品的浓度区间。

[0018] 本实用新型的有益效果是:提供一种利用免疫层析胶体金技术制备的促甲状腺激

素快速定量免疫层析检测试剂盒,能定量或定量检测样本中的 TSH 含量,同时适合血清、血浆和全血样本,并适合临床上单人份检测。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

#### 附图说明:

[0019] 图 1 是促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒的试纸卡

[0020] 附图符号说明:

[0021] 1:塑料底板;2:上样垫;3:胶体金垫;4:NC 膜;

[0022] 5:检测线 T;6:质控线 C;7:吸样垫

#### 具体实施方式

[0023] 实施例:促甲状腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒制备及检测

[0024] 1 主要材料

[0025] 1.1 TSH  $\alpha$ 、 $\beta$  亚单位特异性配对抗体:芬兰 MEDIX 公司产品;TSH 标准品:中国食品药品检定研究院产品;鼠抗人 IgG 抗体:美国 Arista 公司产品;氯金酸:Sigma 公司产品;硝酸纤维素(NC)膜:Millipore 公司产品;牛血清白蛋白(BSA),聚乙二醇 PEG20000,水解酪蛋白:Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0026] 1.2 临床样本由公司在相关医院获得,共 200 份,其中血清和血浆样本各 50 份,全血样本 100 份,TSH 含量分布区间为 3-100uIU/mL 之间的定值血清。

[0027] 1.3 免疫层析结果判读记录仪:型号:NS001,天津中新科炬生物制药有限公司产品。

[0028] 2 方法

[0029] 2.1  $\beta$  TSH 抗体胶体金标记 氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 30-40nm 的胶体金溶液,制备完成后取三份胶体金,分别用 0.2M  $K_2CO_3$  将溶液调到 pH7.5、pH8.0 和 pH8.5。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每 100ml 溶液加入 0.75mg、1mg、1.25mg 将  $\beta$  TSH 抗体缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌 2 小时,再加入到终浓度为 0.5% 的 PEG2000 和 0.5% 的 BSA 进行封闭 20min,标记结束后以 12000r/m 离心,弃上清,沉淀按 50% 原体积复溶至不同配比的胶体金工作液中(pH7.6,含水解酪蛋白,蔗糖和表面活性剂)。然后将标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 20cm<sup>2</sup> 的比例加样于无纺布上,在温度 20-25℃,相对湿度在 < 30% 的干燥间干燥 2-5 小时,制成胶体金垫。

[0030] 2.2 NC 膜包被用 0.01M pH7.4 PBS 将  $\alpha$  TSH 抗体稀释成 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml,鼠抗人 IgG 分别稀释成 1mg/ml、2mg/ml,然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.2u1/cm 进行分别划线包被,包被完成后将 NC 膜在在温度 20-25℃,相对湿度在 < 30% 的干燥间干燥 2-5 小时。

[0031] 2.3 试纸卡组装在干燥室内,温度 20-25℃,湿度小于 40%,取塑底板,将已包被的 NC 膜放置在塑料底板的中部粘贴,将胶体金垫裁切成合适的宽度,在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫,搭胶体金垫的 1/5 粘贴,在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫,搭胶体金垫的 1/3 粘贴;在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫,搭吸样垫的 1/10 粘贴;最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3-5mm 宽的试纸条,再装入塑料卡内,形成试纸卡。

[0032] 2.4 试纸工艺参数调试将浓度不同标记、包被的试剂进行组合配对,制备小样,利

用 TSH 标准品对试剂进行测试,寻找最佳组合。

[0033] 2.5 比色卡制备和仪器曲线参数设置确定好试纸工艺参数后,分别用 2.5、5、10、20、50uIU/mL 的 TSH 标准品对试纸进行测定,不同浓度的标准品显示出不同强度色带,将相应强度的色带印刷到比色卡上,完成比色卡制备;将相应强度的色带数字化后输入免疫层析结果判读记录仪中,完成仪器曲线参数设置。

[0034] 2.6 检测方法 1) 将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;2) 精确吸取 10  $\mu$ l 血清、血浆样本,样本为全血时吸取 20 $\mu$ l 样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入 100  $\mu$ l 样本稀释液 (PBS),10-15 分钟内用免疫层析结果判读记录仪或比色卡(半)定量判定结果;4) 仪器判定时,设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示出样品浓度的定量测定结果;5) 用比色卡判定结果时,将试纸卡 T 线的颜色和比色卡上标准线的颜色深浅进行对比,半定量判定样品的浓度区间。

[0035] 2.7 临床样本检测试剂制备完成后,按检测方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0036] 3 结果

[0037] 3.1 试纸参数确定根据小样的检测结果,确定了试纸的最佳标记 pH 值为 7.5;TSH 抗体最佳标记量为 0.75mg/100ml 胶体金溶液;最佳的胶体金工作液为 20mM 硼酸盐缓冲液,pH7.6,含 0.5%水解酪蛋白,2%蔗糖,0.2% Tween20;最佳  $\alpha$  TSH 抗体包被浓度为 2mg/ml。检测结果的最佳判定时间为 15-20 分钟。但以上参数在制备不同批次产品时可能需要适当调整。

[0038] 3.2 临床样本检测对 200 份临床定值样本检测,用仪器定量判定结果时,样本平均偏差值均小于 15%,最大偏差小于 25%, $R^2 > 0.96$ ,一致性系数  $> 0.87$ 。用比色卡判定结果时,区间判定结果和样本值的符合率为 95.5%,一致性系数  $> 0.85$ 。检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测,满足不同客户不同检测场合的差异化需要。

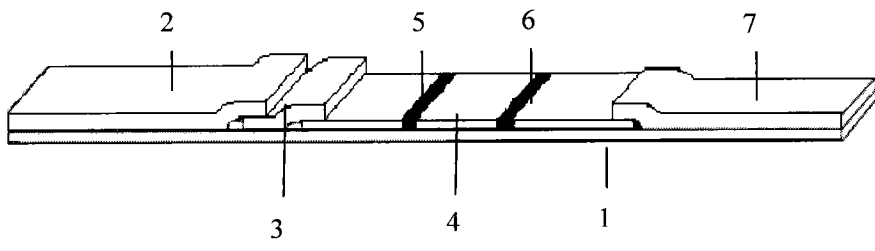


图 1