Тиреотропный гормон человека (ТТГ)

Тиреотропный гормон (ТТГ) вырабатывается гипофизом. Молекулярная масса ТТГ составляет около 28 000 Да. ТТГ является членом семейства гликопротеиновых гормонов, которое состоит из ТТГ, лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликуло-стимулирующего гормона (ФСГ) и хорионического гонадотропина (ХГ). Гликопротеиновые гормоны представляют собой гетеродимеры, состоящие из α- и β-субъединиц. α-субъединица одинакова для всех гликопротеиновых гормонов, тогда как β-субъединица специфична для каждого гормона. Несмотря на это, между последовательностями β-субъединиц ТТГ, ЛГ, ФСГ и ХГ человека существует высокая степень гомологии.

«Золотой стандарт» для диагностики дисфункции щитовидной железы

Определение уровня ТТГ в крови является наиболее чувствительным и специфичным методом диагностики нарушений функции щитовидной железы (1). Уровень ТТГ в сыворотке крови в норме составляет 0,58–4,1 мкМЕ/мл (2). Концентрация ТТГ в крови увеличивается у больных гипотиреозом и снижается у больных гипертиреозом.

Высокочувствительные методы для определения ТТГ

Определение концентрации ТТГ в образцах крови человека проводят методом сэндвич-иммуноанализа. Данный метод основан на использовании пары антител, одно из которых иммобилизуют на твердой фазе, а второе антитело конъюгируют с меткой.

Большинство современных тест-систем относятся к третьему поколению с функциональной чувствительностью 0,01–0,02 мкМЕ/мл. Такие тест-системы позволяют достоверно дифференцировать гипертиреоз от эутиреоза.

Тест-системы четвертого поколения обладают в 10 раз более высокой чувствительностью (0,001–0,002 мкМЕ/мл), обеспечивая высокую точность измерений у пациентов с низким уровнем ТТГ.

Чувствительность тест-систем определяется аффинностью используемых антител и возможностями системы детекции. Для разработки тест-систем для определения ТТГ четвертого поколения необходимы высокоаффинные антитела, способные обеспечить высокий уровень чувствительности.

Высокая специфичность

Для точного определения концентрации ТТГ в образцах сыворотки необходимо, чтобы пара антител, используемых в тест-системе, не взаимодействовала с другими гликопротеиновыми гормонами (ЛГ, ФСГ и ХГ). Кроме того, при проведении одностадийного иммуноанализа, при котором захватывающие и детекторные антитела одновременно инкубируются с образцами сыворотки, ни одно из антител, используемых в иммуноанализе, не должно обладать перекрестной реактивностью с ЛГ, ФСГ и ХГ.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

- **Диагностика нарушений функции щитовидной железы**
- **Мониторинг состояния щитовидной железы во время беременности и после родов, а также у новорожденных**

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

Вариант ТТГ R55G

Для точного определения концентрации ТТГ в сыворотке крови тест-система должна детектировать все формы ТТГ в крови. В 2014 году была описана новая точечная мутация в β-субъединице ТТГ, приводящая к замене аргинина на глицин в положении 55 (R55G) (3).

Эта мутация изменяет эпитоп ТТГ, что препятствует связыванию антител, специфичных к этому эпитопу. У пациентов, гомозиготных по мутации R55G, ТТГ не детектировался четырьмя широко используемыми тест-системами. При применении этих тест-систем было невозможно отличить носителей варианта ТТГ R55G от пациентов с субклиническим гипертиреозом. Пациентам с мутацией ТТГ R55G был ошибочно диагностирован гипертиреоз и назначено лечение.

Для точного измерения концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови у пациентов, гомозиготных по мутации R55G, тест-системы должны детектировать данный вариант гормона. Для этого используемые в тест-системах антитела не должны распознавать эпитоп β-субъединицы ТТГ, содержащий аргинин в положении 55 (R55G).

Рекомендации по парам антител

Компания Хайтест предлагает шесть новых моноклональных антител (МАт) для разработки высокочувствительных и специфичных тест-систем для измерения концентрации ТТГ. Данные МАт были разработаны для создания тест-систем для определения ТТГ четвертого поколения, не обладающих перекрестной реактивностью с другими гликопротеиновыми гормонами и способных распознавать вариант ТТГ R55G. МАт TS13, TS18 и TS25 специфичны к β субъединице ТТГ; МАт TS21, TS31 и TS32 специфичны к димеру ТТГ.

Антитела не обладают перекрестной реактивностью со свободной α-субъединицей (данные не представлены), а также с ЛГ, ФСГ и ХГ человека (см. Рисунок 1).

Свойства антител были охарактеризованы методом хемилюминесцентного сэндвич-иммуноанализа. Захватывающие антитела биотинилировали и конъюгировали с магнитными частицами, покрытыми стрептавидином. Детектирующие антитела конъюгировали со щелочной фосфатазой. Рекомендованные пары антител представлены в Таблице 1.

Таблица 1.
Рекомендуемые пары моноклональных антител для детекции ТТГ.

Захватывающие антитела	Детектирующие антитела
TS21	TS18
TS21	TS13
TS21	TS25
TS32	TS13
TS31	TS13

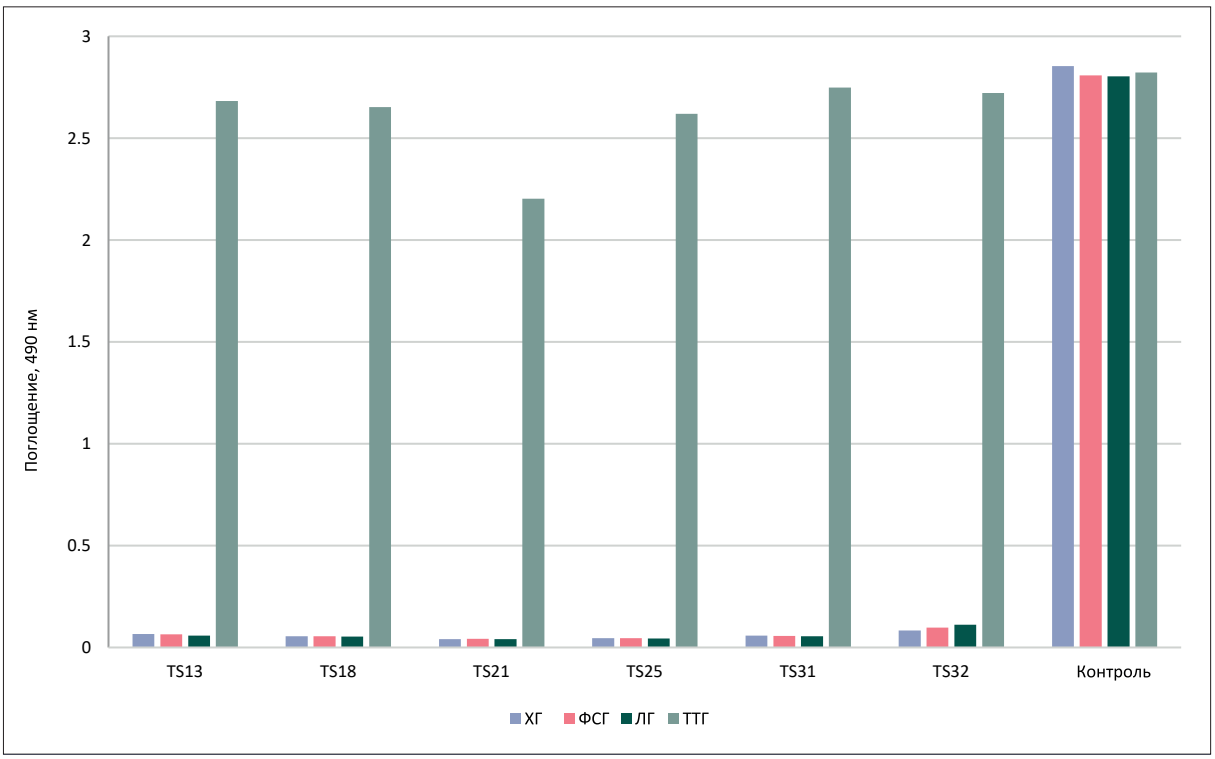

Рисунок 1.
Анализ перекрестной реактивности МАт с гликопротеиновыми гормонами человека ТТГ, ФСГ, ЛГ и ХГ.
Специфичность МАт определяли методом ИФА. В качестве положительного контроля для подтверждения иммунореактивности ФСГ, ЛГ и ХГЧ использовали МАт, специфичное к α-субъединице.

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

Типичные калибровочные кривые для рекомендуемых пар представлены на Рисунке 2.

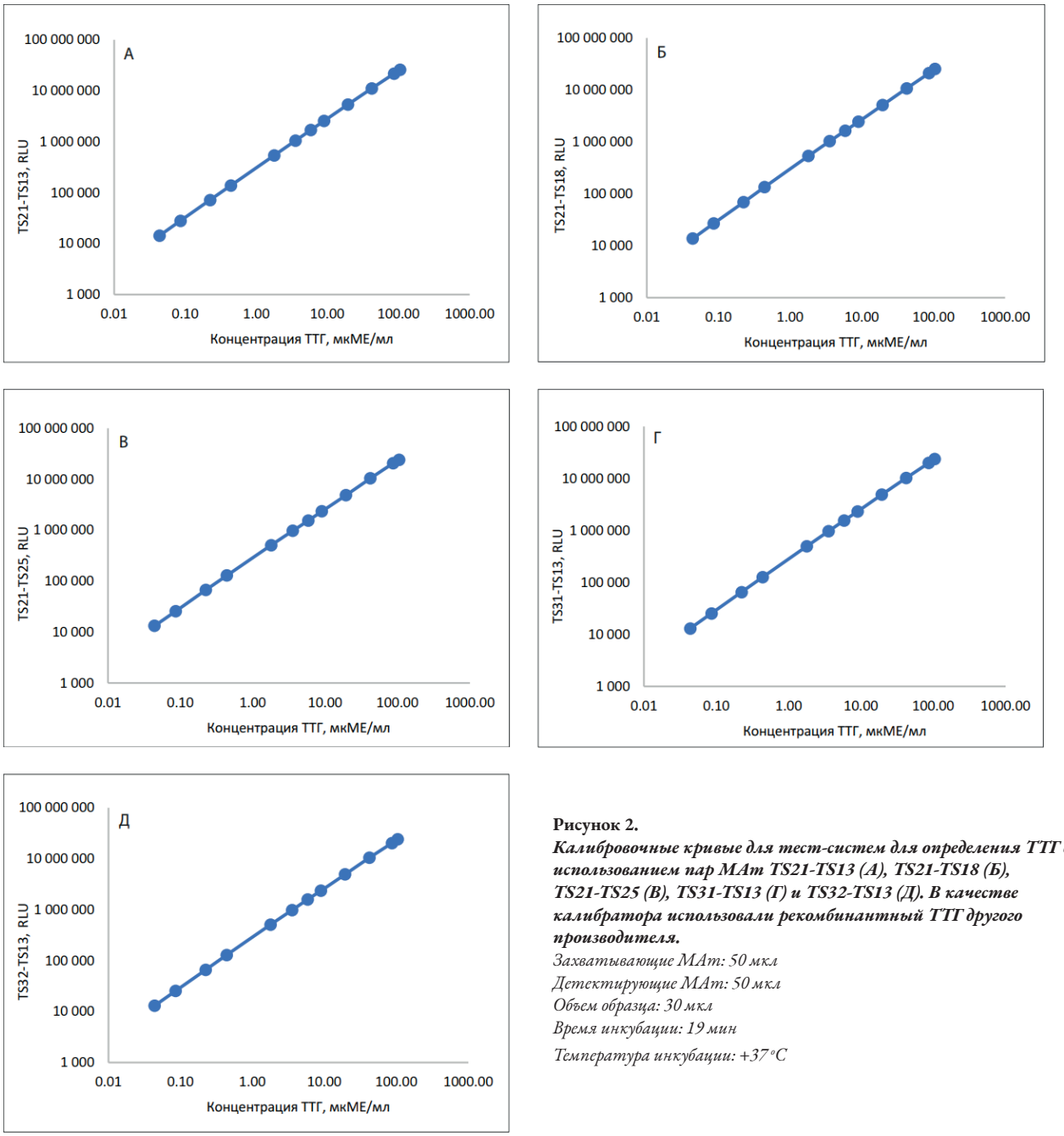

Рисунок 2.
Калибровочные кривые для тест-систем для определения ТТГ с использованием пар МАт TS21-TS13 (А), TS21-TS18 (Б), TS21-TS25 (В), TS31-TS13 (Г) и TS32-TS13 (Д). В качестве калибратора использовали рекомбинантный ТТГ другого производителя.
Захватывающие МАт: 50 мкл
Детектирующие МАт: 50 мкл
Объем образца: 30 мкл
Время инкубации: 19 мин
Температура инкубации: +37°С

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

Определение предела обнаружения

Для определения предела обнаружения (limit of detection, LoD) для рекомендованных пар антител использовали нативный ТТГ человека (3й международный стандарт ВОЗ, код NIBSC 81/565), разведенный в буфере до концентраций 0,0024, 0,0018, 0,0014, 0,001, 0,00077 и 0,00059 мкМЕ/мл. В рамках одного эксперимента тестировали по 20 повторностей чистого буфера и разведений ТТГ. Предел бланка (limit of blank, LoB) и предел обнаружения рассчитывали по формулам, представленным ниже:

Предел бланка = “среднее значение бланка” + 1,645•(стандартное отклонение)

Предел обнаружения = Предел бланка + 1,645•(стандартное отклонение образца с низкой концентрацией)

Эксперименты проводили в следующих условиях:

Захватывающие МАт: 50 мкл

Детектирующие МАт: 50 мкл

Объем образца: 50 мкл

Время инкубации: 16 мин

Температура инкубации: +37 °C

Значение предела обнаружения было идентичным для всех пар МАт и составило 0,001 мкМЕ/мл . Коэффициент вариации (coefficient of variation, CV) для всех протестированных разведений ТТГ составил < 2,16%. Эти данные показывают, что рекомендованные пары антител обладают чувствительностью, эквивалентной тест-системам четвертого поколения.

Сравнение методов для определения концентрации ТТГ

Концентрацию ТТГ в образцах сыворотки крови человека (n = 50) определяли с использованием рекомендованных пар МАт и референсной тест-системой Roche Elecsys TSH. Наблюдалась высокая корреляция между концентрациями ТТГ, определенными с использованием рекомендуемых пар антител и референсного метода (Рисунок 3).

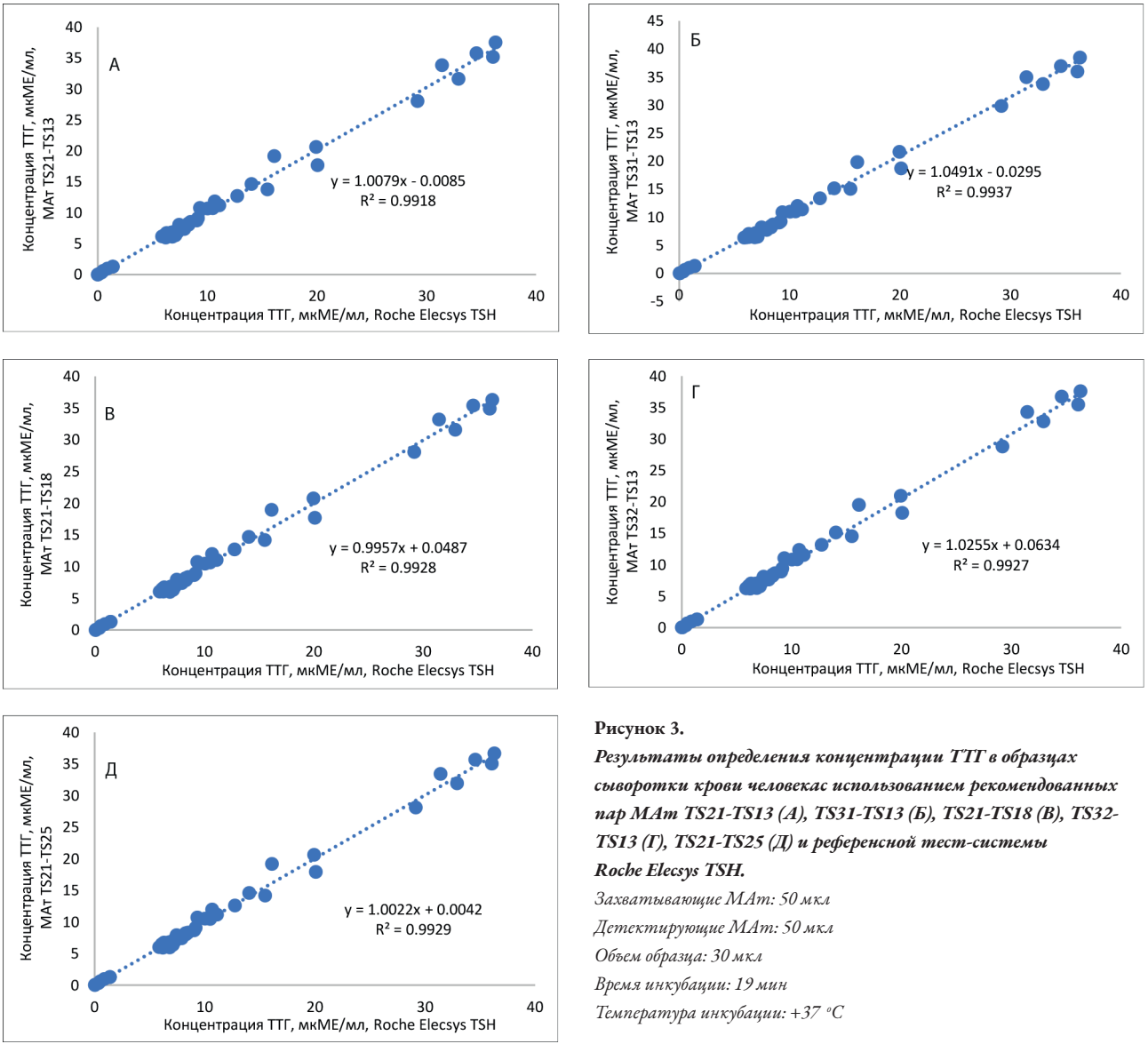

Рисунок 3.

Результаты определения концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови человекас использованием рекомендованных пар МАт TS21-TS13 (А), TS31-TS13 (Б), TS21-TS18 (В), TS32-TS13 (Г), TS21-TS25 (Д) и референсной тест-системы Roche Elecsys TSH.

Захватывающие МАт: 50 мкл

Детектирующие МАт: 50 мкл

Объем образца: 30 мкл

Время инкубации: 19 мин

Температура инкубации: +37 °C

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

Тестирование перекрестной реактивности с вариантом ТТГ R55G

Для тестирования взаимодействия антител с вариантом ТТГ R55G мы получили рекомбинантный ТТГ человека дикого типа и вариант ТТГ R55G. При тестировании методом ИФА все МАт распознавали вариант ТТГ R55G, сорбированный на поверхность планшета, так же эффективно, как ТТГ дикого типа (данные не представлены). Результаты детекции ТТГ дикого типа и варианта R55G с использованием рекомендованных пар МАт представлены на Рисунке 4.

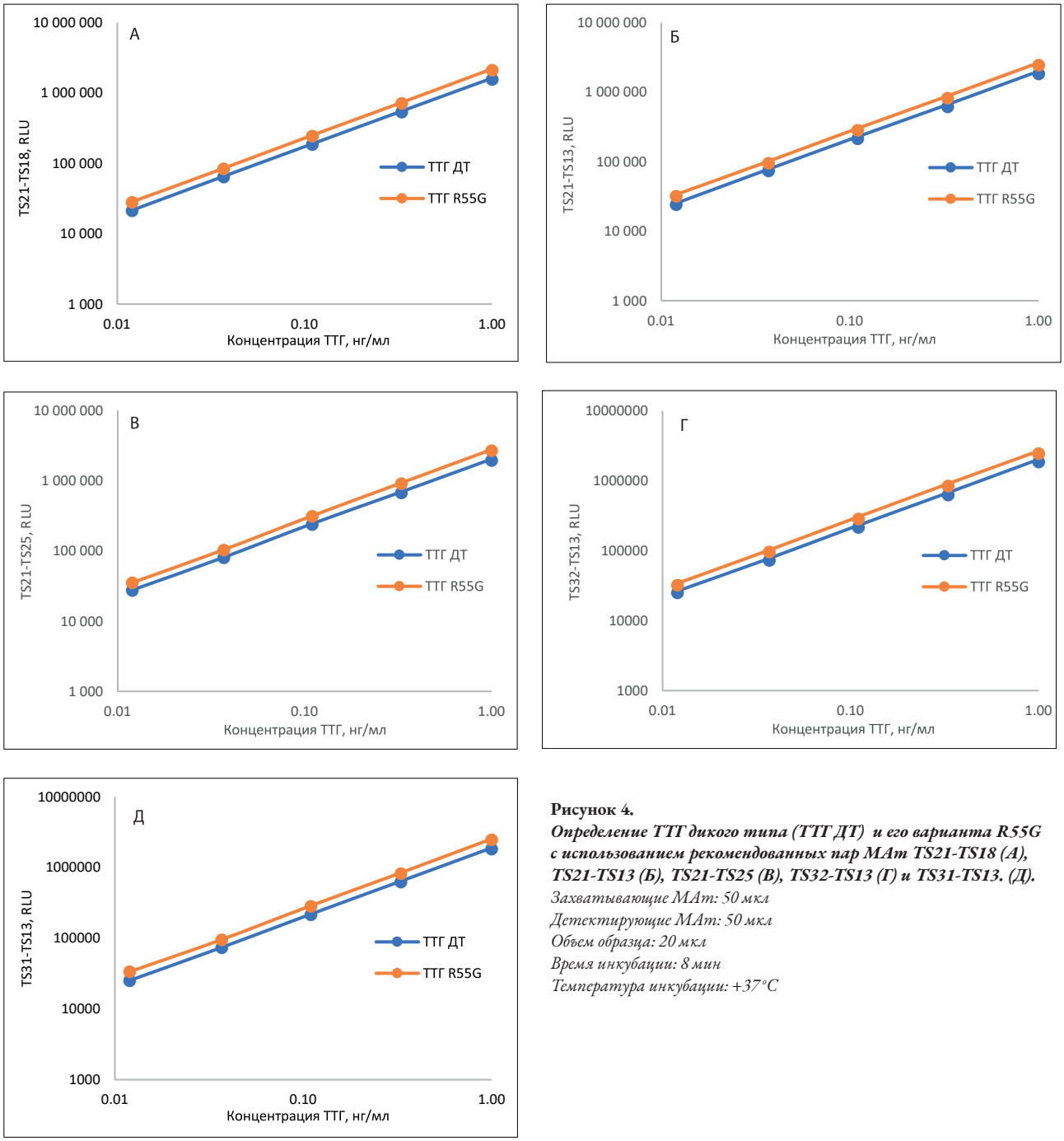

Рисунок 4.
Определение ТТГ дикого типа (ТТГ ДТ) и его варианта R55G с использованием рекомендованных пар МАт TS21-TS18 (А), TS21-TS13 (Б), TS21-TS25 (В), TS32-TS13 (Г) и TS31-TS13. (Д).
Захватывающие МАт: 50 мкл
Детектирующие МАт: 50 мкл
Объем образца: 20 мкл
Время инкубации: 8 мин
Температура инкубации: +37°С

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

Тестирование перекрестной реактивности с ЛГ, ФСГ и ХГ человека.

Тестировали перекрестную реактивность рекомендуемых пар антител с ЛГ, ФСГ и ХГЧ человека методом сэндвич-иммуноанализа.

Гормоны разводили в буфере до концентрации 10 МЕ/мл (ЛГ, ФСГ), либо 1000 МЕ/мл (ХГ). Перекрестная реактивность с ЛГ, ФСГ и ХГ составляла <0,0001% для всех рекомендуемых пар.

Измерение аффинности антител

Константу ассоциации (Ka), константу диссоциации (Kd) и константу равновесной диссоциации (KD) определяли с помощью Octet Bio-Layer Interferometry platform (Таблица. 2).

Таблица 2.

Константы аффинности антител.

Антитела	ka (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (M)
TS13	$3{,}73\times10^{5}$	3.09×10^{-5}	8.27×10^{-11}
TS18	3.15×10^{5}	2.98×10^{-5}	9.58×10^{-11}
TS21	2.36×10^{5}	1.08×10^{-5}	4.58×10^{-11}
TS25	2.89×10^{5}	1.83×10^{-5}	6.31×10^{-11}
TS31	2.57×10^{5}	6.32×10^{-5}	2.46×10^{-10}
TS32	2.57×10^{5}	1.05×10^{-5}	4.08×10^{-11}

Рекомбинантный тиреотропный гормон (ТТГ) человека

Компания Хайтест предлагает рекомбинантный ТТГ человека (Кат. № 8HTS7), который может использоваться в качестве калибратора в тест-системах для определения ТТГ. Рекомбинантный ТТГ получают путем коэкспрессии α- и β-субъединиц в линии клеток млекопитающих. Для экспрессии использовали синтетические фрагменты ДНК, кодирующие α-субъединицу (92 аминокислотных остатка, а.к.о.; UniProtKB P01215) и β-субъединицу (118 а.к.о.; UniProtKB P01222).

Несмотря на то, что кДНК кодирует β-субъединицу длиной 118 а.к.о., нативный ТТГ, выделенный из гипофиза человека, содержит β-субъединицу, состоящую из 112 а.к.о. Было показано, что в нативном ТТГ отсутствуют 6 С-концевых остатков (113–118 а.к.о.) β-субъединицы. Предположительно, эти остатки отщепляются в ходе посттрансляционной модификации. Функция 6 С-концевых аминокислот -субъединицы остается неизвестной. Установлено, что они не влияют на ассоциацию с α-субъединицей, гликозилирование и секрецию ТТГ (4). Они также не влияют на биологическую активность гормона. Препараты рекомбинантного ТТГ, содержащие β-субъединицу длиной 112 и 118 а.к.о., демонстрировали сходную биологическую активность (5).

Ни одна из субъединиц рекомбинантного ТТГ не содержит дополнительных аффинных меток.

Чистота рекомбинантного ТТГ составляет ≥ 95%. Препарат может содержать свободную бета-субъединицу. Степень чистоты рекомбинантного ТТГ анализировали методом электрофореза в невосстанавливающих условиях. При анализе ТТГ методом электрофореза в невосстанавливающих условиях выявляются две фракции: мажорная верхняя полоса, сформированная ко-мигрирующими α- и β-субъединицами, и минорная нижняя полоса, соответствующая β-субъединице. Две полосы β-субъединицы всегда присутствуют, и соотношение между верхней и нижней полосами может варьироваться в разных партиях препарата ТТГ.

Электрофоретическая подвижность и относительное положение полос субъединиц ТТГ в геле различаются для восстанавливающих и невосстанавливающих условий. В восстанавливающих условиях верхняя полоса соответствует α-субъединице, а нижняя — β-субъединице (см. Рисунок 5).

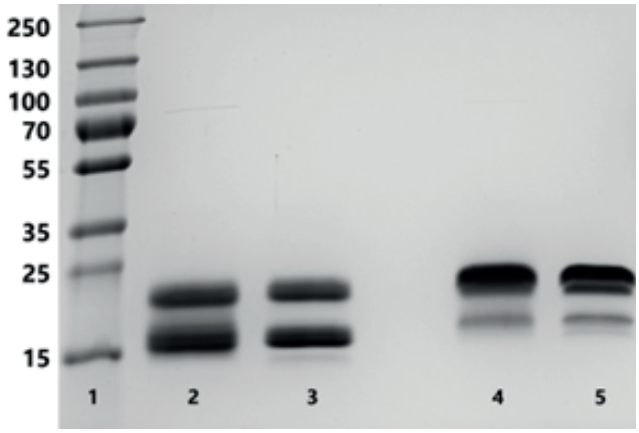

Рисунок 5.

Анализ рекомбинатного ТТГ методом электрофореза в полиакриламидном геле (10-20%) с додецилсульфатом натрия.

Дорожки 2, 3 — восстанавливающие условия; дорожки 4, 5 — невосстанавливающие условия. На дорожку 1 нанесены стандарты молекулярных масс; на дорожки 2 и 4 – нанесено по 4 мкг рекомбинантного ТТГ (кат. № 8HTS7); на дорожки 3 и 5 – по 4 мкг рекомбинантного ТТГ Thyrogen (Genzyme).

Идентификацию субъединиц ТТГ проводили методом вестерн-блоттинга с использованием МАт, специфичных к β-субъединице (кат. № 2TS11 / 2TS11cc, МАт 11E4cc) и к α-субъединице (кат. № 2H8, МАТ 77F12) (см. Рисунок 6).

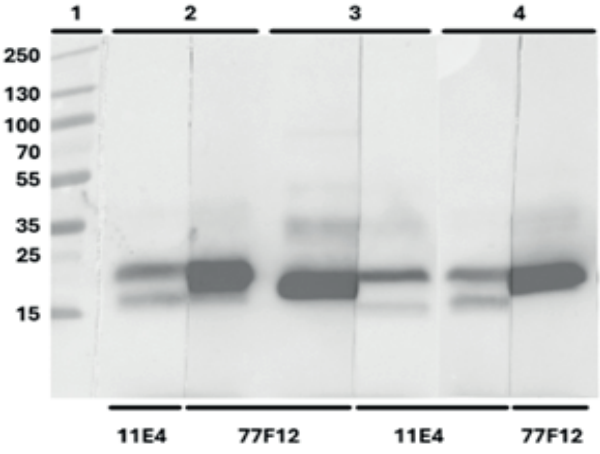

Рисунок 6.

Анализ ТТГ методом вестерн-блоттинга с использованием МАт, специфичных к β-субъединице (кат. № 2TS11 / 2TS11cc, МАт 11E4cc) и к α-субъединице (кат. № 2H8, МАт 77F12).

На дорожку 1 нанесены стандарты молекулярных масс; на дорожку 2 - рекомбинантный ТТГ (кат. № 8HTS7); на дорожку 3 - нативный ТТГ (Scripps); на дорожку 4 - рекомбинантный ТТГ Thyrogen (Genzyme). Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (10-20%) с додецилсульфатом натрия в невосстанавливающих условиях.

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

Стабильность рекомбинантного ТТГ человека

Стабильность при замораживании-оттаивании

Мы сравнили иммунохимическую активность трех отдельных партий ТТГ с концентрациями 0,78 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,58 мг/мл в буфере для хранения (PBS, 0,1 М D-маннитол, 0,1% CHAPS) после многократных циклов замораживания-оттаивания. Анализировали как нелиофилизированные, так и восстановленные после лиофилизации образцы. Иммунохимическую активность измеряли методом сэндвич-иммуноанализа с использованием пары МАт 11E4cc-77F12, специфичной к димеру ТТГ. МАт 11E4cc специфично к β-субъединице, а МАт 77F12 - к α-субъединице.

После десяти циклов замораживания-оттаивания достоверных изменений иммунохимической активности образцов обнаружено не было (см. Рисунок 7). Таким образом, рекомбинантный ТТГ сохраняет стабильность в течение как минимум 10 циклов замораживания в рекомендованном для хранения буфере.

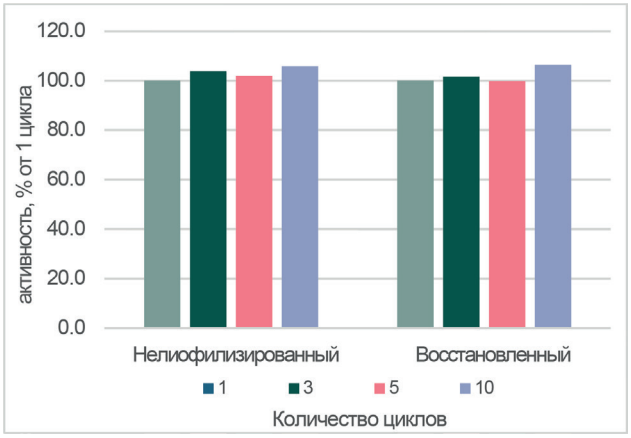

Рисунок 7.
Стабильность рекомбинантного ТТГ при замораживании-оттаивании.
Аликвоты рекомбинантного ТТГ (нелиофилизированные и восстановленные после лиофилизации образцы) подвергали десяти циклам замораживания-оттаивания. Иммунореактивность после первого, третьего, пятого и десятого циклов измеряли методом сэндвич-иммуноанализа с использованием пары МАт 11E4cc-77F12. За 100% принимали иммунохимическую активность образца после одного цикла замораживания-оттаивания.

Стабильность рекомбинантного человеческого ТТГ при различных температурах хранения

Для изучения стабильности использовали три отдельные партии ТТГ с концентрациями 0,78 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,58 мг/мл, приготовленные в буфере для хранения (PBS, 0,1 М D-маннитол, 0,1% CHAPS). Образцы в нелиофилизированной, лиофилизированной и восстановленной после лиофилизации формах инкубировали при различных температурах в течение двух недель. После завершения инкубации иммунохимическую активность ТТГ измеряли методом сэндич-иммуноанализа (пара МАТ 11E4cc–77F12) в сравнении с контрольными аликвотами, хранившимися при –70°C.

Иммунохимическая активность ТТГ во всех исследованных образцах не снижалась после двух недель инкубации при +4°C, +25°C и +37°C. Лиофилизированный препарат ТТГ сохранял активность также при температуре +45°C, в то время как в растворах нелиофилизированного и восстановленного ТТГ после двух недель при +45°C наблюдалось снижение иммунохимической активности на 10%. Результаты представлены на Рисунке 8.

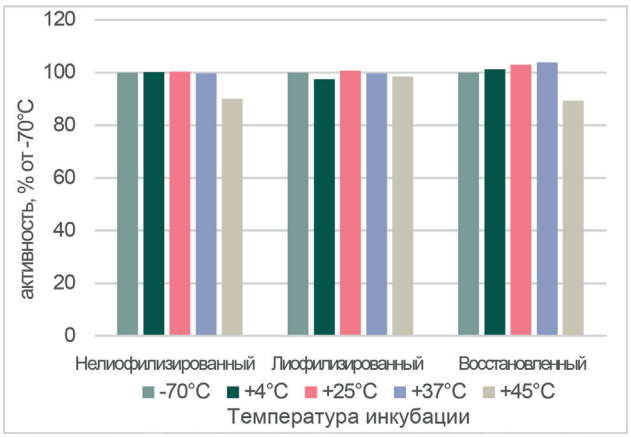

Рисунок 8.
Стабильность рекомбинантного ТТГ после двух недель хранения при различных температурах.
Иммунореактивность определяли методом сэндвич-иммуноанализа (пара МАт 11E4cc–77F12). Иммунохимическую активность образцов хранившихся при –70°C принимали за 100%.

Дополнительно была изучена температурная стабильность рекомбинантного ТТГ восстановленного после лиофилизации при низких концентрациях. Исследование проводили для образца с концентрацией 0,1 мг/мл в буфере для хранения, а также для рабочего раствора с концентрацией 100 нг/мл в буфере для проведения иммуноанализа, содержащего 0.05 М Трис- HCl, pH 7,8, 0.15 М NaCl, 0,5% BSA, 0,01% Tween 40, 0,05% NaN_3.

Иммунохимическая активность ТТГ в образце с концентрацией 0,1 мг/мл оставалась неизменной после двух недель инкубации при температурах +4°C, +25°C и +37°C (см. Рисунок 9). В рабочих растворах с концентрацией 100 нг/мл наблюдалось снижение активности на 5–8% после двух недель инкубации при температурах +4°C, +25°C и +37°C. При инкубации при +45°C иммунохимическая активность снизилась на 13% для образца с концентрацией 0,1 мг/мл и на 20% для образца с концентрацией 100 нг/мл (см. Рисунок 9).

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

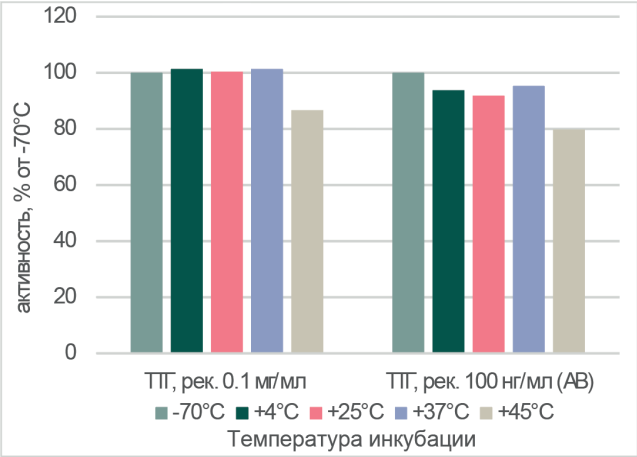

Рисунок 9.
Стабильность рекомбинантного ТТГ при различных температурах хранения.
Образцы рекомбинантного ТТГ, восстановленного после лиофилизации, инкубировали в течение двух недель при указанных температурах. Иммунохимическую активность определяли методом сэндвич-иммуноанализа (пара МАт 11E4cc–77F12). За 100% принимали иммунохимическую активность образцов, хранившихся при температуре –70°C.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Levy EG, Smith SA, Daniels GH, Cohen HD.** American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. Arch Intern Med. 2000 Jun 12;160(11):1573-5.
2. **Jensen E, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, Hansen PS, Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L.** Establishment of a serum thyroid stimulating hormone (TSH) reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. Clin Chem Lab Med. 2004;42(7):824-32.
3. **Drees JC, Stone JA, Reamer CR, Arboleda VE, Huang K, Hrynkow J, Greene DN, Petrie MS, Hoke C, Lorey TS, Dlott RS.** Falsely undetectable TSH in a cohort of South Asian euthyroid patients. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Apr;99(4):1171-9.
4. **Takata, K et al.** The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSH beta subunit. Biochemical and biophysical research communications vol. 165,3 (1989): 1035-42. doi:10.1016/0006-291x(89)92706-x
5. **Sendak RA, et al**. The effect of posttranslational modifications on the in vitro activity of recombinant human thyroid-stimulating hormone. Thyroid. 2003 Dec;13(12):1091–1101. doi:10.1089/10507250360731488.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Тиреотропный гормон (ТТГ)	2TS11cc	TS13	IgG1	ИХЛА, β-субъединица, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS18	IgG1	ИХЛА, β-субъединица, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS21	IgG1	ИХЛА, целая молекула, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS25	IgG1	ИХЛА, β-субъединица, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS31	IgG1	ИХЛА, целая молекула, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS32	IgG1	ИХЛА, целая молекула, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		10C7cc	IgG1	*In vitro*, ИФА, целая молекула, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		11E4cc	IgG1	*In vitro*, ИФА, β-субъединица, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		1CT1cc	IgG1	*In vitro*, ИФА, ВБ в невосстанавливающих условиях, β-субъединица, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		7G12cc	IgG1	*In vitro*, ИФА, целая молекула, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
	2TS11	7CT8	IgG1	ИФА, β-субъединица, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тиреотропный гормон человека	8HTS7	>95%	Рекомбинантный

© Июль 2026 ООО «Хайтест». Все права защищены.

ООО «Хайтест»
117105, Россия, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 28А
E-mail: sales@hytest.ru, www.hytest.ru