

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910091849.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月3日

[11] 公开号 CN 101639481A

[22] 申请日 2009.8.27

[21] 申请号 200910091849.3

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市 100084 - 82 信箱

[72] 发明人 林金明 靳辉 肖勤

[74] 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司

代理人 史双元

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 1 页

[54] 发明名称

游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种属于免疫分析医学领域的游离甲状腺素 (free thyroxine, FT₄) 的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒。该试剂盒包括: 1) 游离甲状腺素系列校准品; 2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液; 3) 异硫氰酸荧光素标记的游离甲状腺素抗体溶液; 4) 辣根过氧化物酶标记的游离甲状腺素; 5) 化学发光底物液; 6) 浓缩洗涤液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、稳定等优点。

1、一种游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：

- 1) 游离甲状腺素系列校准品；
- 2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液；
- 3) 异硫氰酸荧光素标记的游离甲状腺素抗体溶液；
- 4) 辣根过氧化物酶标记的游离甲状腺素；
- 5) 化学发光底物液；
- 6) 浓缩洗涤液。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括反应管。

3、根据权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒中反应管的材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

4、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述游离甲状腺素抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

5、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物液包含 A 液和 B 液，其中，

A 液为 0.05~0.1M、pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 3.0~4.0 mg/mL 的鲁米诺或异鲁米诺和终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的对碘苯酚；

B 液是 0.05~0.1M、 pH 值为 4.0~5.0 的柠檬酸缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 100~200 mg/mL 的过氧化氢。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物液包含 A 液和 B 液，其中，

A 液是 0.1M pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液，包含终浓度为 4.0mg/mL 的鲁米诺或异鲁米诺和 0.3mg/mL 的对碘苯酚；

B 液是 0.1M pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液，包含终浓度为 200mg/mL 的过氧化氢。

7、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述浓缩洗涤液为 0.01~0.05 M、 pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液，且该缓冲液中含有体积百分比浓度为 0.01~0.05 %的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠。

8、根据权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于，所述浓缩洗涤液为 0.01M 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，且该缓冲液中含有体积百分比浓度为 0.01%的吐温 20 和终浓度为 9g/L 的氯化钠。

9、权利要求 1 所述试剂盒的制备方法，其特征在于，包括以下操作步骤：

1) 游离甲状腺素系列校准品的制备：用去激素人血清将游离甲状腺素纯品稀释成校准品，其浓度范围为 0~122 pg/mL；

- 2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液的制备：将粒径为 2~3 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，静置 20~25min，倒掉上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3~5 次，并用该溶液进行悬浮，磁微粒浓度为 50~100mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 60~100 μg ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后，加磁场，静置 10~15min，倒掉上清，用封闭缓冲液于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.1~0.3 % 的吐温-20 和质量百分比浓度为 0.05~0.1 % 的叠氮化钠防腐剂的 0.01~0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次，并用该缓冲液将包被抗体的磁微粒制成 5~10 mg/mL 的工作液；
- 3) 异硫氰酸荧光素标记的 FT4 抗体标记物的制备：将 FT4 抗体置于透析袋在 pH 9.0~9.5、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中过夜透析后，置于异硫氰酸荧光素浓度为 0.01~0.03 mg/mL、pH 9.0~9.5 的 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中，其中，FT4 抗体与异硫氰酸荧光素的摩尔用量比为 1:5~1:12，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 16-20 小时后，将缓冲液更换为 pH 7.4、0.01 mol·L⁻¹ PBS 液，然后每隔 4-6 小时更换 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 液一次，共更换 4~5 次，将反应液置于离心管中，3000rpm 离心 30min，弃去沉淀，上清液为 FITC 标记物，用 FITC 标记物稀释液进行稀释，稀释比例为 1: 4000；

4) 辣根过氧化物酶标记游离甲状腺素标记物的制备: 采用改良过碘酸钠法以辣根过氧化物酶标记游离甲状腺素, 采用方阵法选择酶标记物的工作浓度, 用酶标记物稀释液进行稀释, 稀释比例为 1:500~1:5000;

5) 化学发光底物液的制备:

A 液为用 0.05-0.1M、pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制鲁米诺或异鲁米诺终浓度为 3.0~4.0 mg/mL、对碘苯酚终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的溶液;

B 液为用 0.05-0.1M、pH 值为 4.0~5.0 的柠檬酸缓冲液配制过氧化氢终浓度为 100~200 mg/mL 的溶液;

6) 浓缩洗涤液的配制:

向 0.01~0.05 M、pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比浓度为 0.01~0.05 % 的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠;

7) 分装步骤 1)~6) 制备的产物;

8) 组装成试剂盒。

10、根据权利要求 9 所述的制备方法, 其特征在于, 所述磁微粒为 2~3 μ m 粒径、四氧化三铁内核、表面包裹带有氨基活性基团的聚合物。

11、根据权利要求 9 所述的制备方法, 其特征在于, 所述封闭缓冲液是含有质量百分比浓度为 0.2%~1.0%牛血清白蛋白和 0.5%~1.0%酪蛋白的 pH 为 7.2 的 0.02mol/L 的磷酸缓冲液。

游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒

技术领域

本发明属于免疫分析医学领域，具体的说涉及一种游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。该试剂盒结合了免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术，检测范围宽，灵敏度高。

背景技术

甲状腺是人体内最大的内分泌腺，成人平均生理重量约为 20-25g。甲状腺内含有许多大小不等的圆形或椭圆形腺泡。腺泡是由单层的上皮细胞围成，腺泡腔内充满胶质。胶质是腺泡上皮细胞的分泌物，主要成分为甲状腺球蛋白。腺泡上皮细胞是甲状腺激素的合成与释放的部位，而腺泡腔的胶质是激素的贮存库。甲状腺激素影响所有组织的成熟、生长、代谢活动和功能，是很重要的激素。

甲状腺素，又称四碘甲腺原氨酸（thyroxine, 3, 5, 3', 5'-tetraiodothyronine, T₄），分子量大小为 776.93。甲状腺素经甲状腺分泌释放进入血液循环后，立即与血浆中甲状腺素结合球蛋白结合，处于结合态的激素失去活性，仅少量处于游离状态而发挥生理作用。在正常的生理状况下，血液循环中的 T₄ 有 99.97% 与蛋白结合；游离甲状腺素 (free thyroxine, FT₄) 只占 0.03%。在结合型的 T₄ 中，有 60% 与甲状腺素结合球蛋白 (thyroxine binding globulin, TBG) 结合，30% 与甲状腺结合清前白蛋白 (thyroid binding prealbumin, TBPA) 结合，另有 9.97%

与清蛋白(albumin, Alb)结合。血清游离甲状腺素 FT₄ 的生理浓度, 不受机体甲状腺结合球蛋白浓度的影响, 无论是生理性的增加, 还是病理性的减少, 对 FT₄ 的生理浓度均无影响。FT₄ 可作为下丘脑-垂体-甲状腺轴疾病可疑患者的筛选指标之一, 测定血清 FT₄ 对诊断甲状腺功能性疾, 具有重要的临床价值。

免疫学测定是以抗体-抗原的特异性识别、抗体标记技术和示踪技术为基础的定量技术, 在肿瘤标志物的体液检测中具有广泛应用。现有的甲状腺激素的测定方法有平衡透析法、放射免疫分析法、酶联免疫吸附分析法、时间分辨荧光免疫分析法、电化学发光检测法及微孔板酶促化学发光免疫分析法等。但这些方法都具有一定局限性, 如, 平衡透析法操作步骤繁琐, 操作时间长; 放射免疫分析方法的试剂具有放射性, 会对操作人员的身体健康产生影响, 操作不能实现自动化; 酶联免疫分析方法灵敏度低, 步骤繁琐; 时间分辨荧光免疫分析法与电化学发光检测法都需要较为昂贵的稀土元素作为试剂, 不利于大范围的推广使用; 微孔板酶促化学发光免疫分析法则受到固相载体表面积的限制, 无法实现较宽范围的检测。

在实际的免疫检测中, 由于待测样品中所含的杂质成分较多, 一定程度上影响了检测灵敏度和准确性, 所以从复杂的样品基质中快速分离、纯化出目的待测物, 是临床检验工作者面临的难题之一。免疫磁微粒技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的磁性固相微粒作载体, 以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲合力的各种免疫活性物质(抗原或抗体), 使其致敏为免疫磁微粒, 具有分离速度快、效率高、可重复性好; 操作简单; 不影响

被分离细胞或其它生物材料的生物学性状和功能等特点，在外加磁场作用下定向运动，使得某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。

免疫磁微粒技术与化学发光免疫分析技术结合检测待测物，可大大提高检测的灵敏度和准确性，它以微米级磁微粒为载体，利用表面有机物提供的羧基活性基团与蛋白质氨基共价结合，采用抗体进行“搭桥”成免疫磁微粒，可进行抗原、抗体反应。该技术的新颖之处有：
(1)采用微小的磁微粒作为固相可增加包被表面积，从而增加了抗体的有效包被量，不仅节省了抗体，而且有助于建立宽范围的免疫检测方法，尤其适合于高浓度临床样本的测定，避免弯钩效应的发生；(2)利用顺磁铁微粒为固相载体，外包被单克隆抗体，增加抗原、抗体的接触面积及底物发光面积，提高反应的灵敏度，并采用旋转磁场使磁微粒起搅拌作用及分离结合抗原-抗体与游离抗体的作用；(3)在液相反应中，使用发光增强剂，将水分子从发光底物的发光位点排开，同时还可缩短发光的达峰时间。

现有技术中检测 FT_4 的化学发光免疫分析试剂盒为封闭式全自动化学发光测量系统，需要昂贵的全自动化学发光测量仪，从而限制了推广使用，无法广泛地应用于临床诊断和科研工作。本发明是在酶免疫分析的基础上应用酶催化发光底物，通过检测发光底物产生的光信号代替酶免疫分析中的显色底物，因而其灵敏度大大提高，并且操作简便适用性广，既可应用于开放式的半自动化学发光测量仪，也可用于全自动的测量系统，可实现大批量、快检测，使用成本低，更易推广应用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒。

本发明的另一目的在于提供上述试剂盒的制备方法。

一种游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒，包括：

- 1) 游离甲状腺素(free thyroxine, FT₄)系列校准品；
- 2) 抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)单克隆抗体包被的磁微粒溶液；
- 3) 异硫氰酸荧光素标记的游离甲状腺素抗体溶液；
- 4) 辣根过氧化物酶标记的游离甲状腺素；
- 5) 化学发光底物液；
- 6) 浓缩洗涤液。

所述试剂盒还包括反应管。

所述试剂盒中反应管的材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

所述游离甲状腺素抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

所述化学发光底物液包含 A 液和 B 液，其中，

A 液为 0.05~0.1M、pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为

3.0~4.0 mg/mL 的鲁米诺或异鲁米诺和终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的对碘苯酚；

B液是0.05~0.1M pH值为4.0~5.0的柠檬酸缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度为100~200 mg/mL的过氧化氢。

所述化学发光底物液包含A液和B液,其中,

A液优选是0.1M pH值为8.5的Tris-HCl缓冲液,包含终浓度为4.0mg/mL的鲁米诺或异鲁米诺和0.3mg/mL的对碘苯酚;

B液优选是0.1M pH值为4.6的柠檬酸缓冲液,包含终浓度为200mg/mL的过氧化氢。

所述浓缩洗涤液为0.01~0.05 M、pH值为7.0~7.5的磷酸盐缓冲液,且该缓冲液中含有体积百分比浓度为0.01~0.05%的吐温20和终浓度为9~10 g/L的氯化钠。

所述浓缩洗涤液优选为0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,且该缓冲液中含有体积百分比浓度为0.01%的吐温20和终浓度为9g/L的氯化钠。

上述试剂盒的制备方法,包括以下操作步骤:

- 1) 游离甲状腺素系列校准品的制备: 用去激素人血清将游离甲状腺素纯品稀释成校准品, 其浓度范围为0~122 pg/mL;
- 2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液的制备: 通过戊二醛两步法制备抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒, 并溶于pH值为7.4、含体积百分比浓度为0.1~0.3%的吐温-20和质量百分比浓度为0.05~0.1%的叠氮化钠防腐剂的0.01~0.05 M磷酸盐洗涤缓冲液中以制备浓度为5~10 mg/mL的工作液; 具体方法如下:

将粒径为 2~3 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，静置 20~25min，倒掉上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3~5 次，并用该溶液进行悬浮，浓度为 50~100mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 60~100 μg ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后，加磁场，静置 10~15min，倒掉上清，用封闭缓冲液于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.1~0.3 % 的吐温-20 和质量百分比浓度为 0.05~0.1 % 的叠氮化钠防腐剂的 0.01~0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次，并用该缓冲液将包被抗体的磁微粒制成 5~10 mg/mL 的工作液；

3) 异硫氰酸荧光素标记的 FT4 抗体标记物的制备：将 FT4 抗体置于透析袋在 pH 9.0~9.5、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中过夜透析后，置于异硫氰酸荧光素浓度为 0.01~0.03 mg/mL、pH 9.0~9.5 的 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中，其中，FT4 抗体与异硫氰酸荧光素的摩尔用量比为 1:5~1:12，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 16~20 小时后，将缓冲液更换为 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 液，然后每隔 4~6 小时更换 pH 7.4、0.01 mol·L⁻¹ PBS 液一次，共更换 4~5 次，将反应液置于离心管中，3000rpm 离心 30min，弃去沉淀，上清液为 FITC 标记物，可用 FITC 标记物稀释液将其稀释成工作浓度，稀释比例为 1:4000；

4) 辣根过氧化物酶标记游离甲状腺素标记物的制备：采用改良过碘酸钠法以辣根过氧化物酶标记游离甲状腺素，采用方阵法选择酶标记物的工作浓度，用酶标记物稀释液进行稀释，稀释比例为 1:500~1:5000；

5) 化学发光底物液的制备:

A 液为用 0.05~0.1M、pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制鲁米诺或异鲁米诺终浓度为 3.0~4.0 mg/mL、对碘苯酚终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的溶液;

B 液为用 0.05~0.1M、pH 值为 4.0~5.0 的柠檬酸缓冲液配制过氧化氢终浓度为 100~200 mg/mL 的溶液;

使用前根据使用量进行等体积混合;

6) 浓缩洗涤液的配制:

向 0.01~0.05 M、pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比浓度为 0.01~0.05 % 的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠;

使用时用去离子水稀释 20 倍;

7) 分装步骤 1) ~6) 制备的产物;

8) 组装为试剂盒。

所述磁微粒为 2~3 μm 粒径、四氧化三铁内核、表面包裹带有氨基活性基团的聚合物。

所述封闭缓冲液是含有质量百分比浓度为 0.2%~1.0%牛血清白蛋白和 0.5%~1.0%酪蛋白的 pH 为 7.2 的 0.02mol/L 的磷酸缓冲液。

具体的上述试剂盒包括 FT₄ 系列校准品; 抗 FITC 单克隆抗体包被的磁微粒溶液; FITC 标记的 FT₄ 抗体溶液; 辣根过氧化物酶标记的 FT₄; 化学发光底物液; 浓缩洗涤液; 反应管。

还可以包括其他相关试剂，比如酶标记物稀释液、FITC 标记物稀释液和用于稀释抗体包被的磁微粒溶液的缓冲液等。试剂盒中的各种试剂可以是浓缩液，使用时再进行稀释，也可以是稀释好的工作液，直接使用。

其中，所述校准品 FT₄ 为标准级，纯度大于 90%。

本发明试剂盒的原理为，抗 FITC 单克隆抗体包被的磁微粒作为固相载体和分离剂，待测样品中的 FT₄ 与酶标记的 FT₄ 竞争结合 FITC 标记的 FT₄ 多克隆抗体，形成“双抗原竞争机制”，之后抗 FITC 抗体标记的磁微粒再与 FITC 标记的 FT₄ 多克隆抗体结合，形成“磁微粒-抗体-待测抗原或者酶标记物的 FT₄ 校准品”复合物，最后与化学发光底物作用而产生光信号，在管式发光仪中对 FT₄ 进行检测。

本发明采用“竞争法”反应模式，有效地利用了化学发光技术结合磁微粒和高特异的免疫反应原理，定量检测人体血清、血浆样品中 FT₄ 含量，确保了检测的灵敏度。

本发明的有益效果：本发明使用的磁微粒具有超顺磁、高分散、表面积大的特点。对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单可靠，可快速、高通量检测大批样品，便于操作和生产。各项指标均达到同类进口试剂盒的分析法水平。本发明的试剂盒结构简单，使用方便，价格便宜，携带便利，与市场上的酶免疫试剂盒、板式化学发光试剂盒相比，线性范围宽，灵敏度高，不需样品稀释，适用于大批量检测样品。根据本发明的检测系统为开放式操作，

简便快速，不需要昂贵的全自动化学发光测量仪，特别适合广大的中小医院推广使用，为临床诊断和科研工作提供一种非常有价值的检测手段。

附图说明

图 1 为实施例 1 所制备的试剂盒中的校准品线性图 (Logit(Y)-Log(X)标准曲线);

图 2 为本发明的试剂盒同国外试剂盒 (Monobind 公司微板式化学发光试剂盒) 临床血样测值比对的相关曲线。

具体实施方式

以下实施例中试剂来源:

FT₄ 纯品购自 Sigma 公司, 纯度为 99%; 抗 FITC 单克隆抗体购自美国 Fitzgerald 公司; 羊抗 FT₄ 多克隆抗体购自四川双流正龙生化制品研究室; 磁微粒购自意大利 Adaltis 公司, 磁微粒表面包裹带有氨基活性基团的聚合物; 异硫氰酸荧光素购自美国 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶购自美国 Sigma 公司。正常人血清来自医院血库。

下述实施例中试剂的配制:

酶标记物稀释液: 称取 Tris 12.12g、BSA 5g、量取防腐剂 Proclin 1 mL, 溶解后用双蒸水定容至 1000 mL。

FITC 标记物稀释液: 向 pH7.4 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液中加入质量百分比浓度为 1.5% 的牛血清白蛋白。

所述 FITC 标记物为 FITC 标记的羊抗 FT₄ 多克隆抗体；所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的 FT₄。

实施例 1 本发明的 FT₄ 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒的制备 I

1)、FT₄ 校准品的制备

A) 去激素人血清的制备：将 60mL 的正常人血清等份装入四个容量瓶中，然后分别加入 8.0 g 活性炭，倒置用旋涡混合器混合均匀，振荡 8h 后，以 6000rpm 离心 20min，将上清液过滤，向滤液中加入体积百分比浓度为 0.5 % 的防腐剂 Proclin-300，冷冻保存。

B) 向 A) 步骤得到的去激素人血清中投加不同量的 FT₄ 纯品稀释成校准品，经放免分析法测定浓度后，分装成浓度依次为：0 pmol/L, 1.59 pmol/L, 3.45 pmol /L, 15.6 pmol /L, 37.5 pmol/L, 和 122 pmol/L 的 6 瓶 FT₄ 校准品。

2)、抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

将粒径为 2.8 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加强度为 2000 高斯的磁场，静置 25 min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 100 mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 100 μg，在 4℃ 下搅拌过夜后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 10 min，倒出上清，用含有质量百分比浓度为 1.0% 牛血清白蛋白和 0.5 % 酪蛋白的 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 3 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.1% 的吐温 20 和质量百分比

浓度为 0.05% 的叠氮化钠防腐剂的 0.01M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 4 次，并用该溶液将其配制成 5 mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4℃ 保存，用时轻轻摇匀。

3)、FITC 标记的羊抗 FT4 多克隆抗体的制备

将 1 mL、浓度为 3mg/mL 的羊抗 FT4 多克隆抗体置于透析袋中，在 50 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.3)中过夜透析后，置入 10 mL FITC 浓度为 0.03 mg/mL 的 50 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.5)中，在 4℃ 下搅拌反应 20 小时。更换缓冲液为 0.01 mol·L⁻¹ PBS 液(pH 7.4)，之后每隔 5 小时更换一次上述 PBS 液，共更换 5 次。将反应液置于离心管中，3000rpm 离心 30min，弃去沉淀。上清液为 FITC 标记物，用上述 FITC 标记物稀释液对制备的标记物进行稀释，稀释比例为 1:4000。

4)、辣根过氧化物酶标记的 FT₄ 的制备

以辣根过氧化物酶标记 FT₄ 采用改良过碘酸钠法，具体标记过程如下：

称取 4mg 辣根过氧化物酶溶解于 1.5mL 双蒸水，加入新鲜配制的 0.05mol/L NaIO₄ 0.4mL，室温搅拌 10min；经 1mmol/L、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液于 4℃ 透析 8h 后，加入 FT₄ (5mg/mL) 1.5mL，搅拌 3h；用 6mg/mL 的 NaBH₄ 0.15mL 进行还原；经 0.01mol/L、pH 7.2 PBS 缓冲液透析过夜后，离心去除沉淀，上清液为酶标记物，以酶标记物稀释液对上述酶标记物进行稀释，稀释比例为 1:1000。

5)、化学发光底物液的制备：

A 液：在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入终浓度为 4.0 mg/mL 鲁米诺和终浓度为 0.3mg/mL 的对碘苯酚发光增强剂。

B 液：在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸，配制成 0.1M pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液，再向此溶液中加入终浓度为 200mg/mL 的过氧化氢。

6)、浓缩洗涤液的制备

浓缩洗涤液是向 0.05 M pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比浓度为 0.05 % 的 Tween 20 和终浓度为 10 g/L 的 NaCl。

7)、将用上述方法制备的各组分分装并装入试剂盒中，以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

A) FT₄ 系列校准品共 6 瓶，1.5 mL/瓶；

B) 抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液 1 瓶，共 6 mL；

C) FITC 标记的 FT₄ 多克隆抗体 1 瓶，3mL；

D) 辣根过氧化物酶标记的 FT₄ 1 瓶，3mL；

E) 化学发光底物 A 液 1 瓶，12 mL、B 液 1 瓶，12 mL；在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合；

F) 浓缩洗涤液 1 瓶，6mL，使用时用新鲜制备的去离子水稀释 20 倍；

G) 聚苯乙烯材料的反应管 1 袋，50 个，每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 2 本发明的 FT₄ 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒的制备 II

1)、FT₄ 校准品的制备, 同实施例 1

2)、抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

将粒径为 2.0 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化, 室温搅拌, 混匀 2 小时后, 加强度为 2000 高斯的磁场, 静置 25 min, 倒出上清, 用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 4 次, 并用该溶液进行悬浮, 浓度为 50 mg/mL; 每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 80 μg , 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后, 加磁场, 磁场强度为 2000 高斯, 静置 15 min, 倒出上清, 用含有质量百分比浓度为 0.5 % 牛血清白蛋白和 1.0 % 酪蛋白的 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.2) 于室温封闭 4 小时; 最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.3 % Tween 20 和质量百分比浓度为 0.1% 叠氮化钠防腐剂的 0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3 次, 并用该溶液配制成 7.5 mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用时轻轻摇匀。

3)、FITC 标记的羊抗 FT₄ 多克隆抗体的制备

将 2 mL、浓度为 2 mg/mL 的羊抗 FT₄ 多克隆抗体置于透析袋中, 在 50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.0)中过夜透析后, 置入 10 mL FITC 浓度为 0.03 mg/mL 的 50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.0)中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 20 小时。更换缓冲液为 0.01 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 液(pH 7.4), 之后每隔 4 小时更换一次上述 PBS 液, 共更换 4 次。将反应液置于离心管中, 3000rpm 离心

30min, 弃去沉淀, 上清液为 FITC 标记物, 用 FITC 标记物稀释液对制备的标记物进行稀释, 稀释比例为 1:4000。

4)、辣根过氧化物酶标记的 FT₄ 的制备

以辣根过氧化物酶标记 FT₄ 采用改良过碘酸钠法, 具体标记过程如下:

称取 6mg 辣根过氧化物酶溶解于 1.5mL 双蒸水, 加入新鲜配制的 0.05mol/L NaIO₄ 0.5mL, 室温搅拌 10min; 经 1mmol/L、pH 5.0 的醋酸盐缓冲液于 4℃透析 10h 后, 加入 FT₄ (8mg/mL) 1.5mL, 搅拌 5h; 用 8mg/mL 的 NaBH₄ 0.15mL 进行还原; 经 0.01mol/L、pH 7.2 PBS 缓冲液透析过夜后, 离心去除沉淀, 上清液为酶标记物, 用酶标记物稀释液进行稀释, 稀释比例为 1:500。

5)、化学发光底物液的制备:

A 液: 在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.05 M pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入终浓度为 3.0 mg/mL 的鲁米诺和终浓度为 0.1 mg/mL 的对碘苯酚等发光增强剂。

B 液: 在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸, 配制成 0.05M pH 值为 4.0 的柠檬酸缓冲液, 再向此溶液中加入终浓度为 100 mg/mL 的过氧化氢。

6)、浓缩洗涤液的制备

浓缩洗涤液是向 0.05 M pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比浓度为 0.05 % 的 Tween 20 和终浓度为 10 g/L 的 NaCl。

7)、将用上述方法制备的各组分分装后装入试剂盒中，以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

A) FT₄ 系列校准品共 6 瓶，1.5 mL/瓶；

B) 抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液 1 瓶，共 6 mL；

C) FITC 标记的 FT₄ 多克隆抗体 1 瓶，3mL；

D) 辣根过氧化物酶标记的 FT₄ 1 瓶，3mL；

E) 化学发光底物 A 液 1 瓶，12 mL、B 液 1 瓶，12 mL；在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合；

F) 浓缩洗涤液 1 瓶，6mL，使用时用新鲜制备的去离子水稀释 20 倍；

G) 聚乙烯材料的反应管 1 袋，50 个，每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 3 本发明的 FT₄ 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒的制备 III

1)、FT₄ 校准品的制备，同实施例 1

2)、抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

将粒径为 3.0 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加强度为 2000 高斯的磁场，静置 20 min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 5 次，

并用该溶液进行悬浮，浓度为 75 mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 60 μg ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 10 min，倒出上清，用含质量百分比浓度为 0.2 % 牛血清白蛋白和 0.6 % 酪蛋白的 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 3 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.2 % Tween 20 和质量百分比浓度为 0.07% 叠氮化钠防腐剂的 0.04 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 5 次，并用该溶液配制成 10 mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，用时轻轻摇匀。

3)、FITC 标记的羊抗 FT4 多克隆抗体的制备

将 1 mL、浓度为 2 mg/mL 的羊抗 FT4 多克隆抗体置于透析袋中，在 50 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.5)中过夜透析后，置入 10 mL FITC 浓度为 0.03 mg/mL 的 50 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.3)中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 16 小时。更换缓冲液为 0.01 mol·L⁻¹ PBS 液(pH 7.4)，之后每隔 6 小时更换一次上述 PBS 液，共更换 5 次。将反应液置于离心管中，3000rpm 离心 30min，弃去沉淀，上清液为 FITC 标记物，用 FITC 标记物稀释液对制备的标记物进行稀释，稀释比例为 1:4000。

4)、辣根过氧化物酶标记的 FT₄ 的制备

以辣根过氧化物酶标记 FT₄ 采用改良过碘酸钠法，具体标记过程如下：

称取 3mg 辣根过氧化物酶溶解于 1.5mL 双蒸水，加入新鲜配制的 0.05mol/L NaIO₄ 0.3mL，室温搅拌 10min；经 1mmol/L、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 6h 后，加入 FT₄

(4mg/mL) 1.5mL, 搅拌 3h; 用 4mg/mL 的 NaBH_4 0.15mL 进行还原; 经 0.01mol/L、pH 7.2 PBS 缓冲液透析过夜后, 离心去除沉淀, 上清液为酶标记物, 用酶标记物稀释液对其进行稀释, 稀释比例为 1:5000。

5)、化学发光底物液的制备:

A 液: 在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH 值为 10.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 在此缓冲液中加入终浓度为 3.5mg/mL 异鲁米诺和终浓度为 0.2mg/mL 的对碘苯酚发光增强剂。

B 液: 在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸, 配制成 0.1M pH 值为 5.0 的柠檬酸缓冲液, 再向此溶液中加入终浓度为 150mg/mL 的过氧化氢。

6)、浓缩洗涤液的制备

洗涤液是向 0.01M pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比浓度为 0.05% 的 Tween 20 和终浓度为 9.5 g/L 的 NaCl。

7)、将用上述方法制备的各组分分装后装入试剂盒中, 以检测 50 个样品的试剂盒为例, 包括:

- A) FT_4 系列校准品共 6 瓶, 1.5 mL/瓶;
- B) 抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液 1 瓶, 共 6 mL;
- C) FITC 标记的 FT_4 多克隆抗体 1 瓶, 3mL;
- D) 辣根过氧化物酶标记的 FT_4 1 瓶, 3mL;

E) 化学发光底物 A 液 1 瓶, 12 mL、B 液 1 瓶, 12 mL; 在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合;

F) 浓缩洗涤液 1 瓶, 6mL, 使用时用新鲜制备的去离子水稀释 20 倍;

G) 玻璃材料的反应管 1 袋, 50 个, 每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 4 用本发明试剂盒检测血清中 FT₄ 浓度的方法

1)、样品前处理

取人的空腹晨血清样品, 3000 rpm 离心 5 min, 取上层血清进行分析。

2)、检测方法

使用本试剂盒进行实验前, 需预先取出抗体包被的磁微粒溶液、FITC 标记物、校准品、待测血清样品、酶标记物在室温放置 15~30 分钟, 使它们平衡到室温; 之后, 将恒温温箱或者水浴锅调至 37℃; 再后, 准备好合适的微量加样器及对应吸头并且检查化学发光仪是否正常工作。

以实施例 1 制备的试剂盒为例说明使用该试剂盒检测血清中 FT₄ 的具体操作步骤:

(A) 将圆底聚苯乙烯试管编号后, 依次向各试管中加入 25 μL 步骤 1) 制备的血清样品, FT₄ 系列校准品溶液, 校准品每管加各 25μL;

(B) 向各管中加入酶标记物 50μL 后, 加入 FITC 标记物和抗体包被的磁微粒溶液分别为 50、100μL, 室温反应 45min 之后, 置于磁分离器上分离 5min, 然后倒出上清液, 将

倒转的试管放在吸水纸上，拍击分离器以除去挂壁液体。然后每管加入稀释 20 倍后的洗涤液 500 μ L，充分混匀，置于磁分离器上分离 5min，倒出上清液，将倒转的试管放在滤纸上吸干，拍击分离器以除去挂壁液体，重复 4 次。各管加入混合后的化学发光底物液 200-400 μ L，充分混匀，置于 37 $^{\circ}$ C 温育 10min，然后置于磁分离器内暗处放置，待磁微粒富集于底部后，在管式化学发光测量仪上依序测量各管的发光强度 (RLU)。以 FT₄ 系列校准品浓度的 Log 值为横坐标，RLU 的 Logit 值为纵坐标绘出标准曲线 (Logit(Y)-Log(X)标准曲线)，以各待测血清样品 RLU 值在标准曲线上查出该血清 FT₄ 的浓度，标准曲线见附图 1，标准曲线的方程为 $\log it Y = -0.2797 \log X + 0.2859, r = 0.9976$ 。

实施例 5 本发明的试剂盒的方法学鉴定

按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定，结果如下：

1、试剂盒灵敏度测定

灵敏度是在一给定的显著性水平上可与零剂量相区别的剂量，是指分析方法的最小检出量 (记为零标准点的平均值+2SD)。平均测定 10 个 S₀ 标准点，计算其发光强度的平均值和标准偏差，带入线性方程，计算出对应的浓度值，并重复该操作 5 次，得到该试剂盒的最低检出限，本试剂盒的最低检测限为 0.25pmol/L。

表 1 本发明与其他方法的对比实验结果

方法	标准曲线	线性范围	检测限	总检测时
----	------	------	-----	------

		(pmol /L)	(pmol /L)	间 (min)
放射免疫分析 (RIA)	$\text{Logit}(Y)=1.8965-0.8458\text{Log}(x)$ ($r=0.9945$)	0-122	0.5	90
酶联免疫吸附试验 (ELISA)	$\text{Logit}(Y)=0.6632-2.5343\text{Log}(x)$ ($r=0.9934$)	0-100	1.29	100
酶放大发光免疫分析 (CLEIA)	$\text{Logit}(Y)=0.5538-2.4079\text{Log}(x)$ ($r=0.9921$)	0-99	1.16	60
本发明试剂盒所用方法 (MPs-CLIA)	$\text{Logit}(Y)=0.2853-0.2797\text{Log}(x)$ ($r=0.9976$)	0-122	0.25	60

从表 1 可看出, 本发明试剂盒的检测灵敏度比同类试剂盒高, 且检测总时间短。

2、试剂盒精密度实验

将实施例 1 制备的试剂盒分别取三批进行精密度实验, 分别测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定, 得出每次分析的批内和多次分析的批间变异。其批内和批间变异系数均小于 14.6 %。

表 2 精密度评价结果

样品	批间分析			批内分析	
	次数	SD (pmol L ⁻¹)	CV (%)	SD (pmol L ⁻¹)	CV (%)
1	1	0.23	13.1	0.24	12.9
	2	0.27	14.6		
	3	0.21	11.3		
2	1	0.45	7.62	0.47	7.81
	2	0.52	8.60		
	3	0.47	7.90		
3	1	0.59	2.30	0.93	3.58
	2	0.72	2.70		
	3	0.78	3.10		

3、试剂盒特异性实验

选取人体内与 T4 具有类似结构的物质 T3 和 rT3 来评价 FT4 抗体的特异性。交叉反应率的定义为标准抗原 IC₅₀ 与交叉反应物质 IC₅₀ 的比值 (IC₅₀ 为 50%抑制浓度即 B/B₀=50% 时所对应的浓度)。使用本发明实施例 1 试剂盒, 将含系列浓度 T3、rT3 的血清作为样本, 由其测值计算该物质 IC₅₀ 值, 进而得到各物质的交叉反应率。表 3 结果表明本研究选择的激素抗体特异性很好, 其它甲状腺激素对 FT4 的测值影响非常小。

表 3 特异性评价结果

交叉反应物	交叉反应物的加入浓度 (pmol/L)	检测出的浓度 (pmol/L)	交叉反应率 (%)
rT3	10	0.02	0.002
T3	60	0.78	0.013

4、试剂盒稳定性实验

对实施例 1 的试剂盒分别进行 4℃、37℃的 3 天和 7 天稳定性实验，结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、待测物的加标回收率、批内批间变异系数等指标均在正常范围之内。

对实施例 1 的试剂盒主要组分进行 2~8℃8 个月跟踪实验，结果表明各项指标完全符合要求。

考虑到试剂盒冷冻情况的发生，将实施例 1 的试剂盒放入-20℃冷冻 7 天，测定结果也表明试剂盒的各项指标完全正常。从以上结果可以看出试剂盒可以在 2~8℃至少可以保存 6 个月以上。

经过大量的实验证明，本发明的试剂盒方法学指标如下：

检测范围：0-122 pmol/L；

灵敏度：最小检出限为 0.25 pmol/L；

精密度：批内变异小于 12.9%（要求小于 15%）；批间变异小于 14.6%（要求小于 20%），

(n = 3)；

特异性：与 rT₃ 和 T₃ 的交叉反应率小于 0.013%；

稳定性：各试剂组分置 37℃，考察 7 天后，各组分仍稳定。

实施例 6 本发明的试剂盒与国外同类试剂盒对临床血清样品的测值比对

用实施例 1 制备的试剂盒（使用方法参照实施例 4）和美国 Monobind 公司微板式化学发光试剂盒对 130 份临床血清样品同时进行检测，所采用的 130 份临床血样来自解放军 301 医院（130 例样品由 80 例正常随机血样、25 例甲亢血样和 25 例甲减血样组成）。其检测结果见附图 2，以本发明试剂盒测定的血样 FT₄ 结果为横坐标，以 Monobind 公司微板式化学发光试剂盒测定的结果为纵坐标作回归分析，相关方程为： $Y=0.9629X+0.7973$ ，相关系数 $r^2=0.9592$ 。经统计学处理结果表明，两个试剂盒测得的临床血样 FT₄ 值相关性良好。

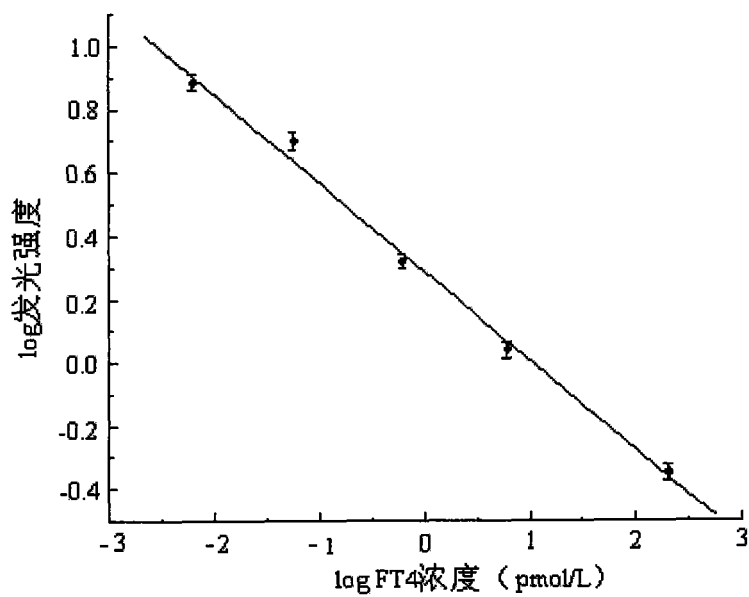


图 1

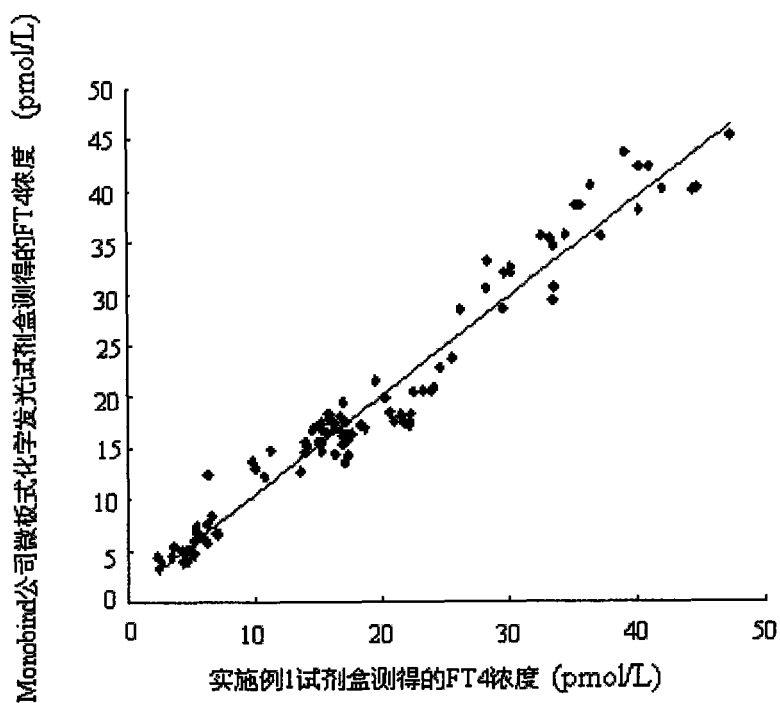


图 2

专利名称(译)	游离甲状腺素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	CN101639481A	公开(公告)日	2010-02-03
申请号	CN200910091849.3	申请日	2009-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	林金明 靳辉 肖勤		
发明人	林金明 靳辉 肖勤		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种属于免疫分析医学领域的游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒。该试剂盒包括：1) 游离甲状腺素系列校准品；2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液；3) 异硫氰酸荧光素标记的游离甲状腺素抗体溶液；4) 辣根过氧化物酶标记的游离甲状腺素；5) 化学发光底物液；6) 浓缩洗涤液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、稳定等优点。

