

[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 200510017941.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年3月7日

[11] 公开号 CN 1924580A

[22] 申请日 2005.8.30

[21] 申请号 200510017941.7

[71] 申请人 郑州安图绿科生物工程有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区  
第五大街经北一路87号

[72] 发明人 付光宇 陈晓玲 张莹 于鹏举  
项立红 李晓霞

[74] 专利代理机构 郑州联科专利事务所

代理人 田小伍

权利要求书1页 说明书5页

[54] 发明名称

定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析  
试剂盒

[57] 摘要

定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒，属于临床血液免疫检测技术领域。主要由包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板、三碘甲状腺原氨酸系列标准品、酶标记三碘甲状腺原氨酸、发光底物A液和发光底物B液组成，发光底物A液由高效发光剂、复合增强剂和氨基酸配成，发光底物B液由氨基酸氧化酶及稳定剂配成。利用该试剂盒进行检测污染小，灵敏度高，准确、方便、快捷。

1、定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒，其特征在于，主要由包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板、三碘甲状腺原氨酸系列标准品、酶标记三碘甲状腺原氨酸、发光底物 A 液和发光底物 B 液组成，发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂和氨基酸配成，发光底物 B 液由氨基酸氧化酶及稳定剂配成。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板为包被有抗三碘甲状腺原氨酸单克隆抗体不透明聚苯乙烯板；三碘甲状腺原氨酸系列标准品以去激素血清或分析缓冲液为基质、加入三碘甲状腺原氨酸纯品配制而成；酶标记三碘甲状腺原氨酸为辣根过氧化物酶标记的三碘甲状腺原氨酸，使用前可用三碘甲状腺原氨酸酶稀释液稀释；发光底物为 HRP-鲁米诺发光系统。

3、如权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于，包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板为包被有兔抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板；分析缓冲液由 0.01M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.05M 的氯化钠和 3%牛血清白蛋白组成，PH7.4；三碘甲状腺原氨酸酶稀释液由磷酸盐缓冲液和 1%牛血清白蛋白组成，含 0.8‰ANS；辣根过氧化物酶标记三碘甲状腺原氨酸的工作浓度为 1：500000—1000000。

4、如权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于，包被有兔抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板采用桥抗法，先过量包被羊抗鼠 IgG，再间接包被抗三碘甲状腺原氨酸单克隆抗体；发光底物 A 液由下列成分组成：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M；发光底物 B 液由下列成分组成：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M。

## 定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒

### 技术领域

本发明属于临床血液免疫检测技术领域，特别涉及一种用酶促化学发光法定量检测三碘甲状腺原氨酸（T3）含量的试剂盒。

### 背景技术

人体甲状腺是内分泌系统中重要的组成部分，甲状腺激素参与许多重要的生理反应。它们在人体生长发育、细胞代谢和体内激素平衡，对维持代谢、骨骼肌和各器官系统的发育都起着重要的调节作用。血循环中的甲状腺素（T4）和 3, 5, 3' -甲状腺原氨酸(T3)，绝大部分与血浆蛋白—甲状腺结合球蛋白（TBG）结合。T3 浓度远低于 T4，但它具有更强的生理活性，故血清中三碘甲状腺原氨酸（T3）的浓度是评价甲状腺功能的重要参数。T3 检测在诊断甲状腺疾病中是一重要手段，它能发现许多 T4 正常而 T3 增高的毒性甲状腺肿伴甲亢病人。T3 升高而 T4 正常往往是经治疗病人甲亢复发的先兆，虽然 T4 低于正常，而 T3 值正常，表明病人甲状腺机能已恢复正常。

T3 检测可用于治疗期甲亢病人和停止进行抗甲状腺药物治疗病人的监测，它对于鉴别甲状腺功能正常和甲亢状态尤其有价值。除甲亢外，在女性孕期和口服避孕药及雌激素治疗期，T3 水平也会升高，TBG 水平在某种程度上类似于 T4 水平。同样，减少 TBG 浓度，T3 水平降低，然而，这些 T3 水平改变，不能作为甲状腺功能状态的正确反映。

正确检测 T3 水平，对甲状腺疾病的诊断、疗效判断及帮助医生排除非甲状腺疾病均有重要意义。目前检测 T3 所普遍采用的，仍多是自 60 年代发展起来的放射免疫分析方法。由于其必须使用放射性标记物，检测设备复杂，必须用专门的放射性探测器对检测结果进行测定。同时，对操作人员也存在放射性污染与伤害，需要特殊的防护和去污设备。此外，因所使用的放射性标记物的放射性核素时刻都在发生衰变，其保存时期不长，给使用带来了不便。

## 发明内容

本发明目的在于提供一种三碘甲状腺原氨酸化学发光定量检测试剂盒，利用该试剂盒进行检测污染小，灵敏度高。

为达上述目的，本发明采用如下技术方案：定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒，主要由包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板、三碘甲状腺原氨酸系列标准品、酶标记三碘甲状腺原氨酸、发光底物 A 液和发光底物 B 液组成，发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂和氨基酸配成，发光底物 B 液由氨基酸氧化酶及稳定剂配成。

包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板为包被有抗三碘甲状腺原氨酸单克隆抗体不透明聚苯乙烯板；三碘甲状腺原氨酸系列标准品以去激素血清或分析缓冲液为基质、加入三碘甲状腺原氨酸纯品配制而成；酶标记三碘甲状腺原氨酸为辣根过氧化物酶标记的三碘甲状腺原氨酸，使用前可用三碘甲状腺原氨酸酶稀释液稀释；发光底物为 HRP-鲁米诺发光系统。

包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板为包被有兔抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板；分析缓冲液由 0.01M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.05M 的氯化钠和 3%牛血清白蛋白组成，PH7.4；三碘甲状腺原氨酸酶稀释液由磷酸盐缓冲液和 1%牛血清白蛋白组成，含 0.8‰ANS；辣根过氧化物酶标记三碘甲状腺原氨酸的工作浓度为 1：500000—1000000。

包被有兔抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板采用桥抗法，先过量包被羊抗鼠 IgG，再间接包被抗三碘甲状腺原氨酸单克隆抗体；发光底物 A 液由下列成分组成：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M；发光底物 B 液由下列成分组成：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M。

本发明中，包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板可采用 48 孔或 96 孔的不透明的白色微孔板，为反应板。所用抗体采用常规的细胞杂交瘤技术制备得到的 T3 单克隆抗体，采用辛酸-硫酸铵盐析法对制备的抗体进行纯化后，再进行筛选鉴定，选出亲和常数较高、且对 T4、T3 交叉反应小

的单抗用于检测，于-20℃保存备用。所用的 T3 系列标准品，可以用去激素血清为基质，采用 SIGMA 购买的 T3 纯品以国家标准品为准稀释而成，为系列冻干品，使用前用蒸馏水复溶。所用酶标记 T3，采用碳二亚胺（EDC）方法进行，即将 T3 分子的羧基与辣根过氧化物酶（HRP）分子的氨基经 EDC 的作用缩合为酰胺化合物，透析除去未标记的游离 T3 即得 T3 酶标记物。在标记好的 T3-HRP 溶液中，等比加入甘油于-20℃保存备用。试验表明，检测试剂中所用的酶标 T3 使用的工作浓度为 1: 500000—1000000。发光底物系统采用高效稳定酶促化学发光底物系统，A 液为：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-HCl 缓冲液 0.2M，pH 9.4；B 液：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M，pH 6.5。

本发明采用的化学发光免疫分析方法，是利用辣根过氧化物酶催化发光底物，则发光底物发生化学反应并释放出大量的能量，产生激发态中间体。这种激发态中间体，当其回到稳定的基态时，可同时发射出光子，利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额，该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比。由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。

本发明采用酶促化学发光法建立 T3 定量检测试剂盒，采用间接包被限量抗体的方法，一方面能节约特异性抗体（抗 T3 抗体）的用量，另一方面增加了包被板的均一性。而且由于采用了化学发光的方法，使检测信号大大增强，使结果重现性大大提高。

本发明检测试剂盒的使用操作程序如下：

（一）实验前准备

- 1、将所有试剂恢复至室温（约半小时），整个操作环境应该控制在 20 到 25℃；
- 2、将恒温箱或水浴锅调至反应温度；
- 3、液体标准品可以直接使用；固体标准品要按要求充分溶解后使用；
- 4、准备 T3 酶结合物试剂，将 0.1ml 的 T3 酶结合物浓缩液加入到 1ml 的 T3 酶稀释液中（1: 10 稀释），并混合均匀。酶量取决于检测量，即用即配；

5、将发光底物 A、B 液等比例混合至本次试验所需体积（每孔需 100 $\mu$ l，可按照每条包被板需混合后的发光底物 1ml 混合，依此类推）；

6、将固体洗液用 500ml 蒸馏水充分溶解后使用。

（二）实验方法：

1、将所需用量的微孔条放置在支架上；

2、在反应微孔中依次加入 50 $\mu$ l 标准品或待测标本（请准确加样）；

3、每孔加入 100 $\mu$ l 酶结合物，轻轻震荡微孔支架，充分混匀；

4、贴封膜后，在 24 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 条件下，温育 60 分钟；

5、将各孔液体弃尽，用洗液洗板五次（或用洗板机洗涤），每次冲洗后将水分弃尽，最后一次冲洗后将微孔板中残余水分拍干，注意切勿擦拭反应微孔内壁；

6、每孔加混合后的底物 100  $\mu$ l，室温反应 5 分钟。

7、化学发光检测仪检测发光强度值，计算测定结果。

8、以标准品浓度值为横坐标（X 轴），以标准品发光强度值为纵坐标（Y 轴），建立标准曲线，计算测定结果。

以本发明检测试剂盒按上述程序进行测定所用时间较短，一批测定一般仅需一小时即可完成，方便快捷。

经大量实验证明，本发明上述检测试剂盒在用于三碘甲状腺原氨酸含量测定时的方法学鉴定数据可达到如下指标：

灵敏度——最小检出量为 0.15ng/ml；

标准曲线范围——0—10ng/ml；

精密度——分析内精密度平均 6.5%（n=10），分析间精密度平均为 10.2%（n=10），远高于国家标准，说明本发明试剂盒在检测实验中具有很好的重复性；

准确性——将已知 T3 浓度血清用去激素血清倍比稀释后的回收率为 95%—105%。

实验表明，应用本发明对人血清中的三碘甲状腺原氨酸进行测定，只需取少量样品即可进行，对被检测者没有任何伤害。同时由于本发明采用了化

学发光的酶免疫分析检测方法，在上述指标中都优于酶联免疫检测方法，同时也不存在放射免疫法的放射性污染、有效期短、操作复杂等缺点。本发明另一优点在于采用桥抗方法对聚苯乙烯板进行包被，不仅降低了特异性抗体的包被量，而且增加了包被的均一性。因此，本发明为临床提供了一种检测三碘甲状腺原氨酸的更准确、方便、快捷的方法，能够更好地满足临床的需要。

### 具体实施方式

定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒，主要由（1）包被有兔抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板，（2）以去激素血清或分析缓冲液为基质、加入三碘甲状腺原氨酸纯品配制而成的三碘甲状腺原氨酸系列标准品，（3）辣根过氧化物酶标记的三碘甲状腺原氨酸，（4）发光底物 A 液和（5）发光底物 B 液组成。，发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂和氨基酸配成，发光底物 B 液由氨基酸氧化酶及稳定剂配成。

包被有兔抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板采用桥抗法包被，先过量包被羊抗鼠 IgG，再间接包被抗三碘甲状腺原氨酸单克隆抗体；辣根过氧化物酶标记的三碘甲状腺原氨酸使用前可用三碘甲状腺原氨酸酶稀释液稀释，稀释液由磷酸盐缓冲液和 1%牛血清白蛋白组成，含 0.8‰ANS；辣根过氧化物酶标记三碘甲状腺原氨酸的工作浓度为 1：500000。

当以分析缓冲液配制三碘甲状腺原氨酸系列标准品时，分析缓冲液由 0.01M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.05M 的氯化钠和 3%牛血清白蛋白组成，PH7.4。

发光底物 A 液由下列成分组成：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M；发光底物 B 液由下列成分组成：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8%(V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M。

专利名称(译)	定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1924580A</a>	公开(公告)日	2007-03-07
申请号	CN200510017941.7	申请日	2005-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
[标]发明人	付光宇 陈晓玲 张莹 于鹏举 项立红 李晓霞		
发明人	付光宇 陈晓玲 张莹 于鹏举 项立红 李晓霞		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/52 G01N21/64 G01N33/531		
其他公开文献	CN1924580B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

定量检测三碘甲状腺原氨酸用化学发光分析试剂盒，属于临床血液免疫检测技术领域。主要由包被有抗三碘甲状腺原氨酸抗体的不透明聚苯乙烯板、三碘甲状腺原氨酸系列标准品、酶标记三碘甲状腺原氨酸、发光底物A液和发光底物B液组成，发光底物A液由高效发光剂、复合增强剂和氨基酸配成，发光底物B液由氨基酸氧化酶及稳定剂配成。利用该试剂盒进行检测污染小，灵敏度高，准确、方便、快捷。