



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102520196 B

(45) 授权公告日 2013.06.26

(21) 申请号 201110394196.3

(22) 申请日 2011.12.02

(73) 专利权人 广州市丰华生物工程有限公司
地址 510730 广东省广州市广州经济技术开发区银谊街6号

(72) 发明人 吴道贫 冯健明 汪勤 沈健
何海荣 孙勇 谭玉华 鲍冬芹

(51) Int. Cl.

G01N 33/78 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 9320054 A1, 1993.10.14,
Feng-Bo Wu et al..Sensitive
time-resolved fluoroimmunoassay for
simultaneous detection of serum
thyroid-stimulating hormone and total
thyroxin with Eu and Sm as labels..
《Analytical Biochemistry》.2003, 第314卷

张丽民等. 甲状腺素的时间分辨荧光免疫测定.《第二军医大学学报》.1991,(第06期),

Katsutoshi Ito et al..Simultaneous
determination of alpha-fetoprotein, human
chorionic gonadotropin and estriol
in serum of pregnant women by
time-resolved fluoroimmunoassay..
《Journal of Pharmaceutical and Biomedical

Analysis》.1999, 第20卷

付志锋等. 多组分免疫传感及其应用.《化学传感器》.2006,(第04期),

马智鸿等. 尿清蛋白、β₂微球蛋白的双标记 TrFIA 法的建立.《临床检验杂志》.2009,(第05期),

田国力,朱伟明,朱蕾,仇效坤. 国产筛查滤纸与进口滤纸制备促甲状腺素(TSH)标准干血片的方法及比较.《光电子技术与信息》.1994,(第05期),

Kauko Matsumoto et al..Simultaneous
determination of α-fetoprotein and
carcinoembryonic antigen in human serum
by time-resolved fluoroimmunoassay..
《Analytical Biochemistry》.1999, 第276卷

Ilkka Hemmla et al..Europium as a
label in time-resolved immunofluorometric
assays..
《Analytical Biochemistry》.1984, 第137卷

审查员 毕秀华

《Journal of Pharmaceutical and Biomedical

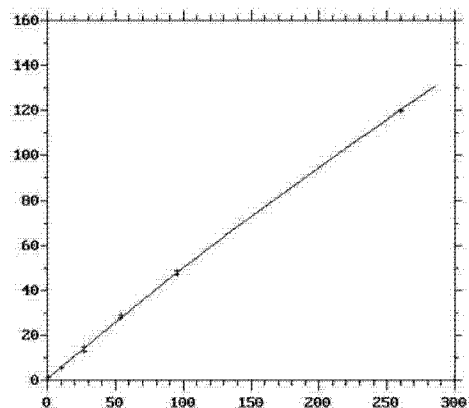
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒及相应的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒及相应的检测方法。本发明所述方法不仅能提高检出率,还能省时、省工、省试剂和样品,具有经济高效的优点,适合在全国大量样品筛查中应用。



1. 一种新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒的制备方法, 其特征在于所述试剂盒的组成为:

- (1) 实验缓冲液;
- (2) 浓缩洗液;
- (3) 增强液;
- (4) 同时包被促甲状腺素单克隆抗体和游离甲状腺素 BSA 连接物的微孔反应板;
- (5) 同时含有促甲状腺素和游离甲状腺素的滤纸干血片标准品和质控品;
- (6) Eu^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记的促甲状腺素单克隆抗体和 Sm^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记的游离甲状腺素单克隆抗体;

所述新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒的制备方法包括如下步骤:

(a) 制备实验缓冲液、浓缩液、增强液; 所述实验缓冲液用 1~20g/L 的牛血清白蛋白和缓冲液制成; 所述浓缩液用 1.0~10.0ml/L 的 Tween-20 和缓冲液制成; 所述增强液用 1~5mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L 的三正辛基氧化磷和缓冲液制成;

(b) 制备包被板: 将 TSH 单克隆抗体、FT4-BSA 连接物分别用缓冲液稀释成浓度为 1~10 $\mu\text{g/ml}$ 的包被液; 在 96 孔的微孔空白板中加入包被液 100~200 μl /孔, 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜; 孵育好的包被板用工作洗涤液洗板 1 次, 拍干; 将洗涤过的包被板按 250~280 μl /孔加入封闭液, 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜; 甩干, 过夜晾干; 用铝箔袋真空密封; 置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存;

其中 TSH 单克隆抗体、FT4-BSA 连接物采用棋盘滴定法确定包被浓度, 包被抗体稀释液为含 5ppm Proclin300 的 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液; 封闭液为含 5.0g/L 海藻糖、0.5%BSA, 0.05mol/L、pH 9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;

(c) 制备以促甲状腺素纯品、游离甲状腺素纯品配制的滤纸干血片标准品、质控品;

(d) 标记物的制备: 将 1mg TSH 单克隆标记抗体加入 1mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠中混匀, 28 $^{\circ}\text{C}$ 反应 44h; 反应液经 Sephadex G-50 柱用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 分离 Eu^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Eu^{3+} , 采用全自动部分收集器 2ml/管进行液体收集; 于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数, 收集第一峰中荧光计数大于 10000000 的洗脱液, 加等体积甘油, 混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 采用棋盘滴定法确定标记工作液浓度;

将 1mg FT4 单克隆抗体加入 1mg 的 Sm^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠中混匀, 28 $^{\circ}\text{C}$ 反应 44h; 反应液经 Sephadex G-50 柱用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 分离 Sm^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Sm^{3+} , 采用全自动部分收集器 2ml/管进行液体收集; 于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数, 收集第一峰中荧光计数大于 1000000 的洗脱液, 加等体积甘油, 混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 采用棋盘滴定法确定标记工作液浓度;

(e) 分装上述实验缓冲液、浓缩洗液、增强液、标准品和标记物;

(f) 贴标签;

(g) 组装为成品;

所述新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒的操作方法包括如下步

骤：

(i) 试剂准备：将试剂所需数量的微孔反应板条平衡至室温；将 40ml 上述浓缩洗液和 960ml 纯化水混合成工作洗涤液；使用前，将镎及钷标记物各自用实验缓冲液按体积比 1:100 稀释成标记物工作液；

(ii) 将标准品、质控品或样本用直径 3.0mm 打孔器打入包被反应板的微孔中，向每孔中分别加入 100~200 μ l 上述的镎及钷的标记物工作液；反应板在室温下，缓慢振荡孵育 1~4h；用上述的工作洗涤液洗板 6 次，拍干；向每孔中加入 100~200 μ l 增强液，缓慢振荡 5min，于时间分辨荧光免疫分析仪内进行荧光计数；按测定参数进行拟合分析，得到定量结果。

一种新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒 及相应的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测试剂盒领域,具体涉及一种新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒及相应的检测方法。

背景技术

[0002] 先天性甲状腺功能低下症(CH, 简称先天性甲低或甲减),是由于各种先天因素使甲状腺激素合成障碍、分泌减少,导致患儿生长障碍,智能落后的临床综合征。它是儿科最常见的内分泌疾病之一,曾经包括多项疾病分类名称:克汀病、地方性克汀病、甲状腺肿性克汀病和散发性克汀病。目前CH定义为任何出生时即发生的甲状腺功能低下。

[0003] 世界各地的新生儿疾病筛查结果表明,先天性甲低的发病率在不同国家,不同民族之间差异较小,一般为1:3 000~1:4 000。CH患儿在出生后往往缺乏疾病的特异表现,一般要到6月龄才逐渐出现固有的临床症状,并且趋加重,然而,一旦出现了疾病的临床症状,表明疾病已进入了晚期。即使治疗,治疗低下也难以恢复;相反,若能在出生不久发现疾病,确诊治疗,那么绝大多数患儿的身心将得到正常的发育,其智力亦可达到正常人的水平。

[0004] 新生儿疾病筛查,就是用一种尽可能简单的方法,对全部的新生婴儿进行普查,以期及早发现患儿,确诊后给予有效的治疗,从而保证了患儿的健康成长,疾病的疗效和预后如何,完全取决于确诊和治疗的早晚。据报道,CH患儿如能在出生3个月内得到确诊和治疗,80%以上的患儿智力发育正常或接近正常。

[0005] CH的筛查,Dussault于1993年首先在北美用滤纸血斑放射免疫法检测4-7天的新生儿末梢血中的甲状腺素(T4),1975年Lrie和Naruse等用滤纸血斑测定促甲状腺素(TSH)进行CH的筛查,此后,CH的筛查在美国各州、欧洲、澳大利亚等国家迅速开展。在亚太地区,日本于1966年开始了有关新生儿疾病的研究,并从1977年起,率先进行了CH的非放射性筛查法——TSH的酶联免疫测定法,至1983年,全日本已筛查出CH病例400例。

[0006] 我国的新生儿疾病筛查工作起步较晚。自1989年起,北京、上海、广州、天津等省市逐步开展了CH常规筛查。1994年国家颁布的《母婴保护法》中已明确提出“逐步开展新生儿疾病筛查”的条文,使新生儿疾病筛查走上了法制化轨道。目前,我国已有27个省市、81个实验室开展了新生儿CH等疾病的筛查,诊断和治疗水平也有了较大提高。但从总体来说,我国的新生儿疾病筛查工作还比较落后,全国每年出生2100万活产儿,仅有54万接受这一筛查,覆盖率只有2.5%,仍有很多患儿因未能及时诊断和治疗而留有严重的智力残疾,严重影响了出生人口素质的提高。

[0007] 时间分辨免疫荧光测定技术(Time Resolved Immunofluorometric assay, TRIFMA)是八十年代初问世的一项新型的超微量免疫分析技术。荧光的时间分辨技术是利用荧光发射体的荧光寿命差别,将其荧光分开的荧光光谱技术。以镧系元素为示踪剂代替放射性同位素,用具有双功能基团的镧系元素来标记抗原或抗体,当解离下来的镧系元素

与特制的扩增液形成新的螯合物时,其荧光明显增强而持久。用延迟测量的办法可消除样品自身的本底荧光,从而大大提高检测灵敏度。

[0008] 目前欧美、日本等不少国家对新生儿甲减进行地区性的普遍筛查,方法不断改进,结果的判断也更为准确。现在使用的筛查方法有以下3种:

① 甲状腺素低时再查促甲状腺激素;② 甲状腺素和促甲状腺激素同时检测;③ 单查促甲状腺激素。新生儿 TSH 常用的检测方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、酶免疫荧光测定(EFIA)、时间分辨免疫荧光测定(Tr-FIA)及化学发光免疫测定。

[0009] 目前国内均以测定 TSH 作为 CH 的筛查方法,但此法不能检出甲状腺球蛋白缺乏和下丘脑垂体性甲低,也会漏检 TSH 延迟升高的亚临床 CH。理想的筛查方法是同时检测 TSH 和 FT4,但成本大大提高。

[0010] 时间分辨双标记技术是利用不同镧系离子间的荧光波长和荧光衰变时间不同,用两种镧系元素分别标记不同的抗体,来检测不同的抗原,该方法能省时、省工、省试剂和样品,具有经济和高效等突出优点。特别用于多项目的联合筛查实验和一些珍贵样品的检测,是标记免疫学分析的发展方向。镧系元素中 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 是常用于双重标记分析的一对镧系离子,激发波长均为 340nm,均能利用 β -NTA 螯合剂进行解离和增强荧光强度。 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 的最大发射波长分别为 615nm 和 643nm,由于窄峰发射,能够充分分辨。另外的荧光寿命相差显著,分别为 820 μs 和 88 μs ,检测时彼此的干扰比较小。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于根据现有的检测试剂盒中存在的不足,提供一种不仅能提高检出率,而且还能省时、省工、省试剂和样品的试剂盒,具有经济和高效的优点,很适合在全国大量样品筛查中应用。

[0012] 本发明另一目的在于提供上述试剂盒的制备方法。

[0013] 本发明还有一个目的在于提供上述试剂盒的检测方法。

[0014] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现:

[0015] 本发明所提供的试剂盒用于新生儿甲状腺功能低下症筛查中;提供了一种能识别促甲状腺激素分子上不同抗原决定簇的两个不同的单克隆抗体,以双抗体夹心法定量分析滤纸干血片中的促甲状腺素。还能识别游离甲状腺素分子上抗原决定簇的一个单克隆抗体,及甲状腺素-BSA 连接物,以竞争法定量分析滤纸干血片中的游离甲状腺素。同时提供了以制造标准血液斑点和质控血液斑点的方法,以及用镧标记促甲状腺素单克隆抗体和钐标记的游离甲状腺素单克隆抗体,通过解离增强的时间分辨荧光免疫技术,以夹心法/竞争法,制作标准浓度曲线的方法。

[0016] 本发明上述检测试剂盒可以提供与现今使用的检测方法有区别的、从新生儿足跟滤纸干血片中,通过双标记的时间分辨荧光免疫技术,同时定量分析促甲状腺素和游离甲状腺素的方法,从而在筛查过程中不必采集大量血液,就可以区别出 CH 和高 TSH 血症。

[0017] 一种新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法),其特征就在于所述试剂盒包括如下组分:

[0018] (1) 实验缓冲液;

[0019] (2) 浓缩洗液；

[0020] (3) 增强液；

[0021] (4) 同时包被促甲状腺素单克隆抗体和游离甲状腺素 BSA 连接物的微孔反应板；

[0022] (5) 同时含有促甲状腺素和游离甲状腺素的滤纸干血片标准品和质控品；

[0023] (6) Eu^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记的促甲状腺素单克隆抗体和 Sm^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记的游离甲状腺素单克隆抗体。

[0024] 上述同时检测新生儿促甲状腺素和游离甲状腺素的试剂盒(时间分辨荧光免疫法)的制备方法包括如下步骤：

[0025] (1) 制备实验缓冲液、浓缩液、增强液；所述实验缓冲液用 1~20g/L 的牛血清白蛋白和缓冲液制成；所述浓缩液用 1.0~10.0ml/L 的 Tween-20 和缓冲液制成；所述增强液用 1~5mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L 的三正辛基氧化磷和缓冲液制成；

[0026] (2) 制备以促甲状腺素单克隆抗体和游离甲状腺素 BSA 连接物同时包被的微孔反应板；所述反应板用含有 1~10ppm 防腐剂的缓冲液将 TSH 单克隆抗体、FT4-BSA 连接物稀释成 1~10 $\mu\text{g/ml}$ 的包被液，包被空白微孔反应板，并用含有 1.0~10.0g/L 的保护剂的封闭液封闭后干燥制成；

[0027] (3) 制备以促甲状腺素纯品、游离甲状腺素纯品配制的滤纸干血片标准品、质控品；

[0028] (4) 制备以 Eu^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记促甲状腺素单克隆抗体、 Sm^{3+} - N_2 -[P- 异氰酸 - 苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记游离甲状腺素单克隆抗体；

[0029] (5) 分装上述实验缓冲液、浓缩洗液、增强液、标准品和标记物；

[0030] (6) 贴标签；

[0031] (7) 组装为成品；

[0032] 其中，步骤(3)中滤纸干血片标准品、质控品的制备方法如下：标准品和质控品制成滤纸干血片的基质为人红细胞和去激素人阴性血清；基质包括但不限于人红细胞和去激素人阴性血清；其中基质的血细胞比容为 45~90%；其中血细胞比容为 50~55%；纸片标准品为 3~10 个不同浓度的点；其中以 6 个不同浓度的标准点为主，但不限于 6 个；质控品为 1~5 个不同浓度的点；其中以 2 个不同浓度的为主，但不限于 2 个；外包装为铝箔袋；促甲状腺素、游离甲状腺素标准品、质控品的制作，是以 TSH 国家标准品和 FT4 国家标准品为参照，用 50~55% 的血细胞比容的人红细胞和去激素阴性血清的混合基质将促甲状腺素或游离甲状腺素纯品分别制备成 A、B、C、D、E、F 六个适当浓度的标准品和 C1、C2 (低、高) 两个浓度的质控品，以适当体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 位置和 C1、C2 位置上，经室温自然干燥后得到的干血滤纸片标准品、质控品，用铝箔袋真空密封。

[0033] 本发明所述新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒的工作原理是时间分辨荧光免疫法，具体的操作方法包括如下步骤：

[0034] (1) 试剂准备：将试剂所需数量的微孔反应板条平衡至室温；将 40ml 上述浓缩洗液和 960ml 纯化水混合成工作洗涤液；使用前，将钕及钐标记物各自用实验缓冲液按体积比 1:100 稀释成标记物工作液；

[0035] (2) 将标准品、质控品或样本用直径 3.0mm 打孔器打入包被反应板的微孔中，向每

孔中分别加入 100~200 μ l 上述的铈及钐的标记物工作液；反应板在室温下，缓慢振荡孵育 1~4h；用上述的工作洗涤液洗板 6 次，拍干；向每孔中加入 100~200 μ l 增强液，缓慢振荡 5min，于时间分辨荧光免疫分析仪内进行荧光计数；按测定参数进行拟合分析，得到定量结果。

[0036] 本发明试剂盒适用于新生儿 CH 的筛查，定量检测新生儿滤纸干血片中的 TSH 和 FT4 含量。

[0037] TSH 检测灵敏度可达到 2.0 μ U/mL；特异性方面，检测 250 U/L 国家标准品 hLH，250 U/L 国家标准品 hFSH，10000 U/L 国家标准品 hCG，TSH 表观值均不高于 0.25 μ U/mL；线性相关系数：试剂盒的测量范围 1-260 μ U/mL 内，剂量-反应曲线线性相关系数应不低于 0.9900；HOOK 效应：检测的 HOOK 效应高达 1000 μ U/mL。

[0038] FT4 检测灵敏度：不高于 5pmol/L；特异性方面，与三碘甲状腺原氨酸(T3)的交叉反应率不高于 20%，与反甲状腺原氨酸(rT3)的交叉反应率不高于 20%；线性相关系数：试剂盒的测量范围内，剂量-反应曲线线性相关系数应不低于 0.9900。

[0039] 测量准确度：分别以 TSH 国家标准品和 FT4 国家标准品为对照，试剂盒校准品的实测效价与标示效价比平均值应在 0.900 ~ 1.100 范围内；测量精密性：分析内不超过 15.0%；分析间不超过 20.0%；质控品测定值：用两个不同浓度质控品进行测定，测值在允许范围内；稳定性：37 $^{\circ}$ C 3 天烘烤后，检测结果符合以上技术性能指标。

[0040] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0041] 本发明试剂盒采用双标记时间分辨荧光分析法，一次测量可以同时得到 TSH、FT4 值，可提高临床检验速度和检验数量，大幅度降低人为误差，减轻临床工作强度；且待检标本用量少，在同一反应体系中，还降低了系统干扰对双指标检测的影响，并提高鉴别诊断的特异度，为双标记 TRFIA 检测奠定了良好的技术基础，同时填补了国内该类试剂的空白，降低了成本。

附图说明

[0042] 图 1 为本发明试剂盒中 TSH 纸片标准品曲线图；

[0043] 图 2 为本发明试剂盒中 TF4 纸片标准品曲线图；

[0044] 图 3 为本发明试剂盒与市场上 PE 公司的新生儿促甲状腺素检测试剂盒检测新生儿滤纸干血片样品值的比较，关系系数为 $r=0.995$ ；

[0045] 图 4 为本发明试剂盒与市场上广州市丰华生物工程公司的甲状腺素检测试剂盒检测对应滤纸干血片的血清样品值的比较，关系系数为 $r=0.995$ 。

具体实施方式

[0046] 以下结合实施例来进一步解释本发明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。

[0047] 实施例中的促甲状腺素、游离甲状腺素纯品，促甲状腺素、游离甲状腺素单克隆抗体，游离甲状腺素连接物购于 Sigma 公司；96 孔微孔空白板(8 \times 12 孔)为 Therom 产品；Sephadex G-50 为 Pharmacia 公司产品；国家标准品购自中国药品生物制品检定所； β -萘甲酰三氟丙酮、三正辛基氧化磷、TritonX-100 购于 Sigma 公司；其他试剂为国产分析

纯;时间分辨荧光免疫分析仪(PE公司1420型),恒温振荡仪、全自动酶标洗板机均购于广州市丰华生物有限公司。

[0048] 实施例1 制备本发明的新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)

[0049] 组分包括:

[0050] 实验缓冲液:用1 g/L~20g/L的牛血清白蛋白和缓冲液制成;

[0051] 浓缩洗液:用1.0ml/L~10.0ml/L的Tween-20和缓冲液制成;

[0052] 增强液:用1~5mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L的三正辛基氧化磷和缓冲液制成。

[0053] 反应板:反应板用含有1~10ppm防腐剂的缓冲液将TSH单克隆抗体、FT4-连接物稀释成1~10 μ g/ml的包被液,包被空白微孔反应板,并用含有1.0g/L~10.0g/L的保护剂的封闭液封闭后干燥制成。

[0054] 纸片标准品、质控品:按50%~55%的血细胞比容由人血红细胞和去激素阴性血清混合基质将TSH、FT4纯品制备成6个适当浓度的标准品和低、高两个适当浓度的质控品,以50 μ l体积分别滴加在滤纸上,经室温自然干燥后得到。

[0055] 标记物:TSH、FT4标记物用TSH单克隆抗体、FT4单克隆抗体分别与镧系元素离子螯合物按1:1~1:6(m/m)标记制得母液,母液再用标记物稀释液按1:10~1:25倍稀释而成。

[0056] 本发明的同时检测TSH、FT4试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)的主要工艺制备如下:

[0057] 1)通用试剂的制备:实验缓冲液为在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-Hcl溶液中加入1.0g/L~20.0g/L的牛血清白蛋白;浓缩洗液为含1.0ml/L~10.0ml/L Tween-20的0.15mol/L、pH7.8的Tris-Hcl缓冲液;增强液为在含有1ml/L TritonX-100的0.1mol/L邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入1mg/L~5mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、15mg/L~30mg/L的三正辛基氧化磷。其中实验缓冲液的牛血清白蛋白为10.0g/L;浓缩洗液中的Tween-20为4.0ml/L。增强液中的 β -萘甲酰三氟丙酮4.0mg/L、三正辛基氧化磷20mg/L、TritonX-100为1ml/L;

[0058] 2)包被板的制备:将TSH单克隆抗体、FT4-BSA连接物分别用缓冲液稀释成浓度为1~10 μ g/ml的包被液;在96孔的微孔空白板中加入包被液100~200 μ l/孔,35 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜;孵育好的包被板用工作洗涤液洗板1次,拍干;将洗涤过的包被板按250~280 μ l/孔加入封闭液,25 \pm 2 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜;甩干,过夜晾干;用铝箔袋真空密封;置2~8 $^{\circ}$ C条件下保存。

[0059] 其中TSH单克隆抗体、FT4-BSA连接物采用棋盘滴定法确定包被浓度,用缓冲液稀释成浓度为10 μ g/ml的包被液包被效果为最佳。包被抗体稀释液为含5ppm Proclin300[®]的0.05mol/L、pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;封闭液为含5.0g/L海藻糖、0.5%BSA,0.05mol/L、pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;包被板的热稳定性良好。

[0060] 4)标准品、质控品的制备:以TSH国家标准品和FT4国家标准品为参照,按50%~55%的血细胞比容由人血红细胞和去激素阴性血清混合基质将TSH、FT4纯品混合制备成6个适当浓度的标准品和低、高两个适当浓度的质控品,以50 μ l体积分别滴加在滤纸的A、B、

C、D、E、F 位置和 C1、C2 位置上,经室温自然干燥后得到的干滤纸片标准品和质控品,用铝箔袋真空密封。

[0061] 5)标记物的制备:将 1mg TSH 单克隆标记抗体加入 1mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠中混匀,28℃反应 44h;反应液经 Sephadex G-50 柱(1×40cm)用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,分离 Eu^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Eu^{3+} ,采用全自动部分收集器 2ml/管进行液体收集;于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数,收集第一峰中荧光计数大于 10000000 的洗脱液,加等体积甘油,混匀后 -20℃保存;采用棋盘滴定法确定铕标记工作液浓度,用实验缓冲液再按 1:100 稀释检测效果最佳;

[0062] 将 1mg FT4 单克隆抗体加入 1mg 的 Sm^{3+} - N_2 -[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠中混匀,28℃反应 44h;反应液经 Sephadex G-50 柱(1×40cm)用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,分离 Sm^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Sm^{3+} ,采用全自动部分收集器 2ml/管进行液体收集;于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数,收集第一峰中荧光计数大于 1000000 的洗脱液,加等体积甘油,混匀后 -20℃保存;采用棋盘滴定法确定标记工作液浓度,用实验缓冲液再按 1:100 稀释检测效果最佳;

[0063] 6)实验缓冲液、浓缩洗液、增强液、标准品和铕标记物分装;

[0064] 7)贴标签;

[0065] 8)成品组装。

[0066] 上述步骤所得产品分装即为半成品。抽出 3 份经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)。组装完成后还需抽检合格后才能出厂(图 1~2)。

[0067] 实施例 2 实施例 1 制得的试剂盒的使用方法

[0068] 以上实施例 1 制备的新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)的具体操作如下:

[0069] 将试剂所需数量的微孔反应板条平衡至室温;将 40ml 上述浓缩洗液和 960ml 纯化水混合成工作洗涤液;使用前,将铕标记物,钐标记物用实验缓冲液按体积比 1:100 稀释成标记物工作液。

[0070] 将标准品、质控品或样本用直径 3.0mm 打孔器打入固相包被反应板中,向每孔中加入 100~200 μl 上述的标记物工作液,缓慢振荡孵育 1~4h;用上述的工作洗涤液洗板 6 次,拍干;向每孔中加入 100~200 μl 增强液,缓慢振荡 5 分钟,于时间分辨荧光免疫分析仪内进行荧光计数;按测定参数进行结果拟合分析,得到定量结果。

[0071] 实施例 3 本发明的试剂盒的分析性能评价指标

[0072] 以上实施例 1 制备的新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素检测试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)的性能评价指标如下:

[0073] 剂量反应曲线和线性范围:采用 LOG-LOGB 轴变换模式与 SPLINE 拟合算法,标准品含量对数值为横坐标,相应反应孔荧光值对数值为纵坐标,绘制标准曲线。试剂盒的测量范围内,剂量-反应曲线线性相关系数应不低于 0.9900。

[0074] 灵敏度:以零标准检测 20 次,计算其浓度均值(\bar{x})和标准偏差(s),以 $\bar{x} + 2s$ 为检测低限,则 TSH 检测灵敏度可达到 2.0 $\mu\text{U/mL}$;FT4 检测灵敏度:不高于 5pmol/L。

[0075] 特异性:检测 250 U/L 国家标准品 hLH,250 U/L 国家标准品 hFSH,10000 U/L 国

家标准品 hCG, TSH 表观值均不高于 0.25 μ U/mL; FT4 与三碘甲状腺原氨酸(T3)的交叉反应率不高于 2%, 与反甲状腺原氨酸(rT3)的交叉反应率不高于 2%;

[0076] 准确性: 以国家标准品和企业标准品为对照, 试剂盒标准品的实测效价与标示效价比平均值应在 0.900 ~ 1.100 范围内。

[0077] 精密性: 试剂盒的测量精密性, 批内不超过 15.0%; 批间不超过 20.0%。

[0078] 室内质控: 三个不同浓度质控, TSH、FT4 测值均在允许范围内。

[0079] HOOK 效应: TSH 的 HOOK 效应高达 1000 μ U/mL。

[0080] 热稳定性(加速破坏试验): 试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 3 天烘烤后, 检测结果符合以上性能指标。

[0081] 以上性能指标表明“新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)”的线性范围宽、灵敏度高、特异性强、准确性好、精密性好和热稳定性好, 完全符合要求。

[0082] 实施例 4

[0083] 使用实施例 1 制得的新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)与市场上 PE 公司的新生儿促甲状腺素检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)和广州市丰华生物工程有限公司的甲状腺素检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)进行对比实验。

[0084] 将采集到的滤纸干血片样本用本专利制得的新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)和 PE 公司的新生儿促甲状腺素检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)进行检测, 将采集到滤纸干血片相对应的血清用广州市丰华生物工程有限公司的甲状腺素检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)进行检测, 将检测所得结果作相关性分析, 结果见图 3, 图 4。

[0085] 结果表明本专利制得的新生儿促甲状腺素 / 游离甲状腺素双标记检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)与现有的试剂盒检测结果相关性良好, 完全可以应用于新生儿筛查。

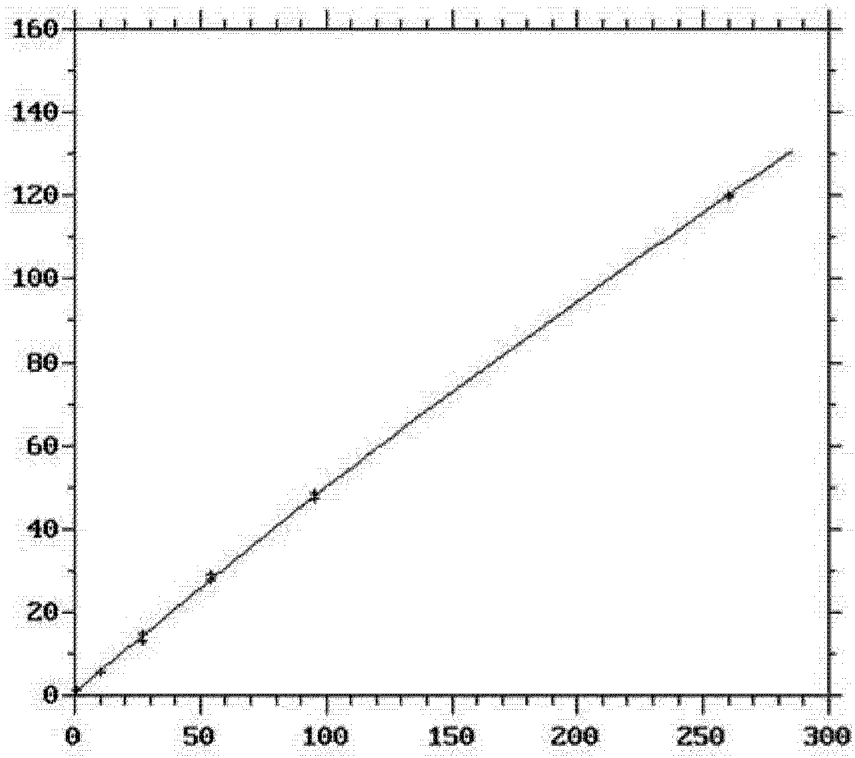


图 1

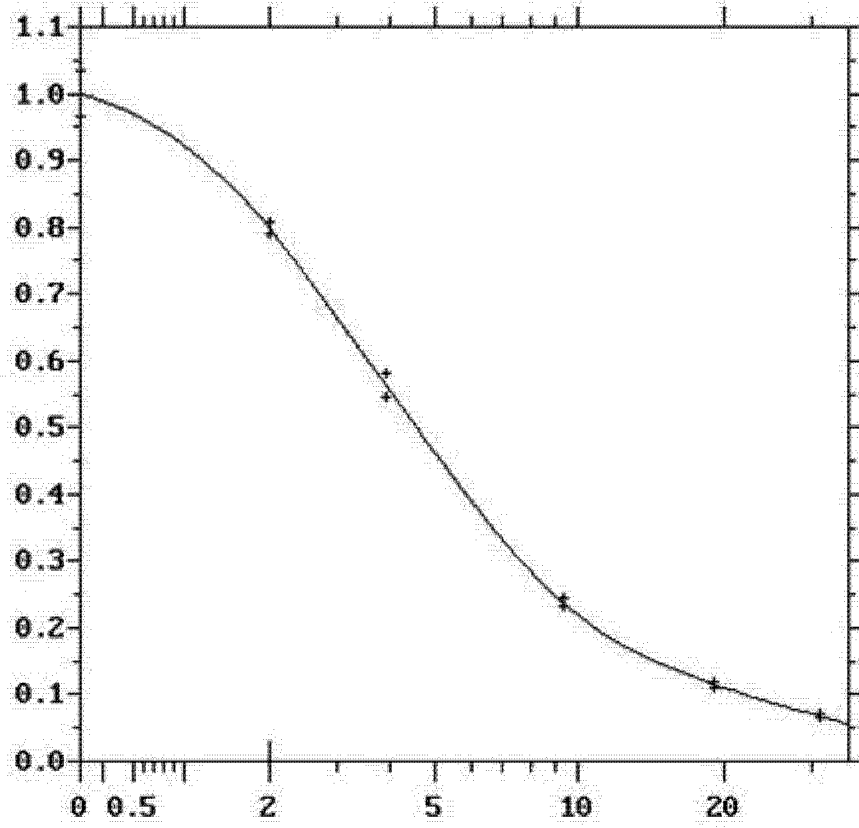


图 2

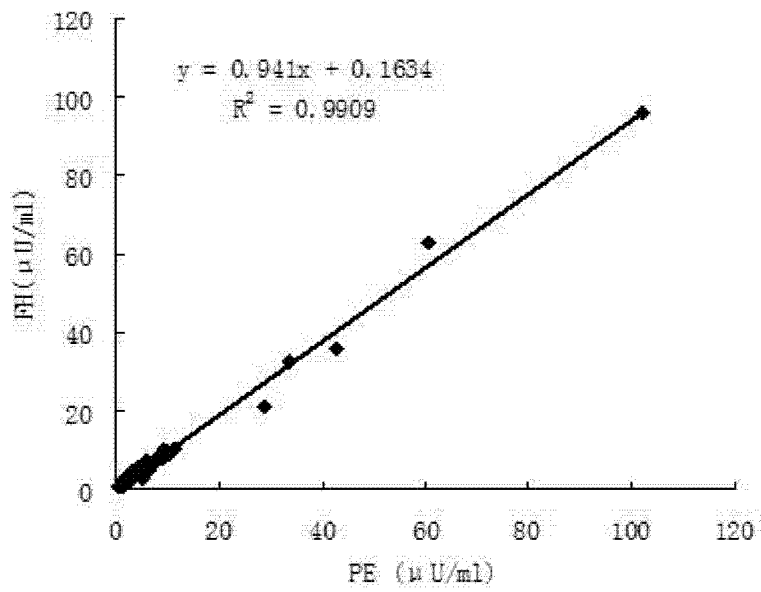


图 3

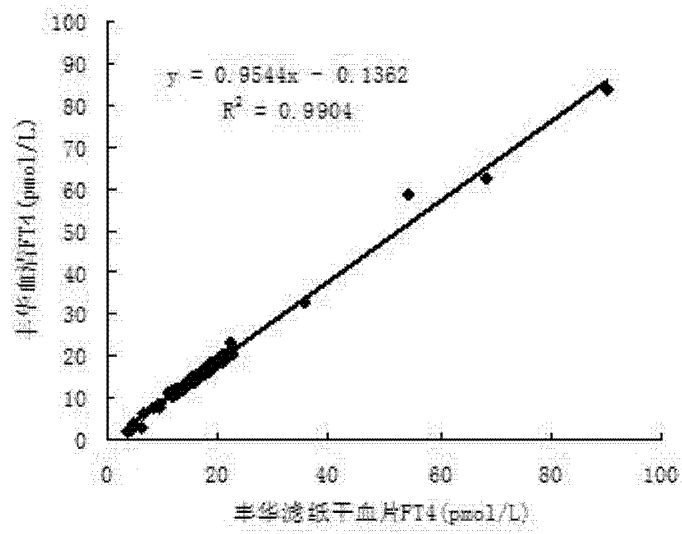


图 4

专利名称(译)	一种新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素双标记检测试剂盒及相应的检测方法		
公开(公告)号	CN102520196B	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201110394196.3	申请日	2011-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
[标]发明人	吴道贫 冯健明 汪勤 沈健 何海荣 孙勇 谭玉华 鲍冬芹		
发明人	吴道贫 冯健明 汪勤 沈健 何海荣 孙勇 谭玉华 鲍冬芹		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/531		
其他公开文献	CN102520196A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新生儿促甲状腺素/游离甲状腺素双标记检测试剂盒及相应的检测方法。本发明所述方法不仅能提高检出率，还能省时、省工、省试剂和样品，具有经济高效的优点，适合在全国大量样品筛查中应用。

