

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610027229.X

[43] 公开日 2007年1月31日

[11] 公开号 CN 1904614A

[22] 申请日 2006.6.2

[21] 申请号 200610027229.X

[71] 申请人 上海新波生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江郭守敬路
351号2号楼502室

共同申请人 苏州新波生物技术有限公司

[72] 发明人 吴冯波 张小寒 沈正阳 唐晓燕

[74] 专利代理机构 上海浦东良风专利代理有限责任
公司

代理人 陈志良

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分
析校准品

[57] 摘要

本发明为使用动物血清或血浆配制甲状腺激素
免疫分析校准品，包括动物血清或血浆的种类、处
理方式、适用范围。由于本发明使用动物血清或血
浆代替人血清或血浆配制甲状腺激素免疫诊断试剂
盒校准品，从而使得血清的处理、校准品的配制和
使用都更为安全，诊断试剂成本显著降低。

1. 使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品，包括人血清或血浆替代品的种类、处理方式和适用范围，其特征在于：所述的动物血清或血浆的处理方式包括稀释、添加试剂、去激素或去除某种或某几种组分，处理方法可采用活性炭吸附法，具体操作为，以含 0.9%NaCl 的蒸馏水稀释动物血清或血浆至原浓度的 80%~90%；加入活性炭，混匀 24~48 小时；加入助沉剂，混匀 24~48 小时；离心去除活性炭和助沉剂，分离血清或血浆；动物血清或血浆的处理方法也可以采用阴离子交换树脂法，具体操作为，用酸、碱法处理阴离子交换树脂；将阴离子交换树脂与动物血清或血浆混合，搅拌 48 小时；过滤分离血清或血浆。
2. 根据权利要求 1 所述的使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品，其特征在于：所述的动物血清或血浆的种类包括牛、马、猪、羊、兔、鼠的动物血清或血浆。
3. 根据权利要求 1 所述的使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品，其特征在于：所述的适用范围指适用于本发明的免疫诊断待测物的类型或种类，特指目前仍使用人血清或血浆配制校准品的甲状腺激素，包括用于甲状腺功能评估的 FT3、FT4、TT3、TT4、rT3。

使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品

一、技术领域：

本发明涉及一种以动物血清或血浆替代人血清或血浆配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品的方法，该校准品是免疫诊断试剂盒的一个重要组件。

二、背景技术：

免疫诊断试剂对待测物的定量测定基于校准品与待测样本之间的比较，通过对比免疫反应后二者信号的强弱，从而对样本中的待测物进行定量。无论对于样本或校准品，二者的介质（或基质，指除了待测物以外的所有其它组分的总和）都会对免疫分析信号的强弱产生影响，从而影响待测物定量结果的准确性。不同的介质参数、不同的免疫分析模式、以及不同的待测物种类对免疫诊断产生的结果可能相似也可能截然不同，但对于免疫诊断试剂盒校准品的配制，一个总的原则是校准品介质要尽可能地与待测物标本相一致，即：二者介质在组份种类、含量、介质粘度、酸碱性、干扰物质类型、浓度等各方面保持一致，以便使校准品、样本之间的信号具有可比性。目前免疫诊断试剂大多以人血清或血浆作为标本，因此原理上也要求使用相应的人血清或血浆配制校准品；但由于人血清或人血浆来源困难，成本高，而且较大量的人血清或血浆往往来源于多个不同个体，其中可能存在多种复杂、未知的潜在病原体（如各种肝炎病毒、性传播疾病病原体等），处理和使用这种人血液制品均存在一定程度的风险；尽管目前几乎所有免疫诊断试剂中的人血液组分都经过了HBsAg、抗HCV、HIV、TP等常见病原体的检测，均为检测阴性制品，但由于检测方法的局限（存在假阴性）以及众多未经检测的其它病原体存在的可能性，人血液制品的处理和使用仍存在相当程度的危险。基于上述原因，目前国内外的某些免疫诊断试剂盒校准品的配制使用含蛋白质的缓冲液或动物血液制品（全血、血清或血浆），通过模拟，使缓冲液或动物血液等替代品与待测样本的介质具有相似的蛋白含量、酸碱性、粘度，从而使校准品不仅能满足准确检测的目的，还使校准品的处理、配制和使用更容易、更安全，同时也降低了试剂盒成本。

但使用上述替代品配制的免疫诊断试剂盒校准品目前仅限于部分蛋白质类待测物的检测，如AFP、CEA、TSH、INSULIN等。一些受样本基质成分影响较大的待测物，如：

TT3、TT4、FT3、FT4、rT3，目前其检测试剂盒校准品的配制仍使用人血清或人血浆。

使用人血液以外替代物，如动物血清或血浆，配制TT3、TT4、FT3、FT4、rT3等待测物校准品有三个前提：1) 动物血清或血浆中的T3、T4、rT3等甲状腺激素与人血清或血浆中的待测物分子T3、T4、rT3具有完全相同的分子结构和免疫反应活性；2) 动物血清或血浆中的T3、T4、rT3与其中的甲状腺激素结合蛋白的结合行为与人血液中的结合行为相似；3) 可以通过去除人血清或血浆中T3、T4、rT3同样的方法去除动物血清或血浆中的T3、T4、rT3；上述1)、2) 二个前提使动物血清或血浆中的甲状腺激素能真实模拟人血清或血浆样本中的甲状腺激素 (T3、T4、rT3) 及其存在状态，前提3) 使动物血清或血浆能用于低浓度校准点的配制。

目前尚未见使用人血清或血浆以外的替代物配制甲状腺激素校准品的报道和实际应用。

三、发明内容：

本发明公开一种使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品。

本发明是这样实现：本发明是一种以动物血清或血浆替代人血清或血浆配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品的方法，包括人血清或血浆替代品的种类、处理方式和适用范围，通过去除动物血清或血浆中的甲状腺激素、校准品的配制、校准及方法可靠性验证等步骤配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品。

本发明所述的动物血清或血浆的种类包括牛、马、猪、羊、兔、鼠的动物血清或血浆。

本发明所述的去除动物血清或血浆中甲状腺激素的处理方式包括稀释、添加试剂、去激素等步骤；处理方法可采用活性炭吸附法，具体操作为，以生理盐水（含0.9%NaCl的蒸馏水）稀释动物血清或血浆至原浓度的 80%~90%，加入活性炭，混匀 24~48 小时；加入助沉剂，混匀 24~48 小时；离心去除活性炭和助沉剂，分离血清或血浆；动物血清或血浆的处理方法也可以采用阴离子交换树脂法，具体操作为，用酸、碱法处理阴离子交换树脂；将阴离子交还树脂与动物血清或血浆混合，搅拌 48 小时；过滤分离血清或血浆。

本发明所述的主要性能参数指血清或血浆的粘度、酸度、蛋白含量、与待测物或相关物质的结合能力、干扰物质类型、浓度。

本发明所述的适用范围指适用于本发明的免疫诊断待测物的类型或种类，特指目前仍使用人血清或血浆配制校准品的甲状腺激素，包括用于甲状腺功能评估的 FT3（游离三碘

甲状腺原氨酸)、FT4 (游离甲状腺素)、TT3 (总三碘甲状腺原氨酸)、TT4 (总甲状腺素)、rT3 (反式三碘甲状腺原氨酸)。T4、T3、rT3 是人体主要的甲状腺激素,是评价人体甲状腺功能状态的常用指标。因为血清或血浆中 FT3、FT4、TT3、TT4、rT3 的测定受多种介质因素(如蛋白对激素的结合能力)的影响,要准确测定甲状腺激素的浓度,要求校准品介质与待测标本介质具有良好的一致性,即:二者具有相似的粘度、酸度、蛋白含量、蛋白对激素的结合能力、干扰物质类型、浓度等;以前沿用人血清或人血浆配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品,本发明描述了以动物血清或血浆替代人血清或人血浆用于配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品的方法。

本发明的有益效果是:

(1) 由于本发明涉及的动物血清或血浆来源于个体单一、饲养环境可控的动物,使得动物血清或血浆的制备、处理以及制品的使用都更加安全可靠;

(2) 本发明可使用常规的人血清或血浆处理方法去除动物血清或血浆中的甲状腺激素,如活性炭吸附法:(A)以生理盐水(含 0.9%NaCl 的蒸馏水)稀释动物血清或血浆至原浓度的 80%~90%。将 1000ml 血清与 120g 活性炭(Sigma C3345)混合,置于旋转混匀器上处理 48 小时;(B)加入 200g 高岭土磨成的粉末,搅拌混匀后置于旋转混匀器上处理 48 小时;(C)取出混合物,于 40000×g 超速离心 5~8 小时,取上清,测量甲状腺激素的浓度;若甲状腺激素残留浓度仍较高,重复以上步骤。通过上述处理,本发明所用的动物血清或血浆可以不含或只含极低浓度的甲状腺激素,可有效用于低浓度甲状腺激素校准品的配制。

(3) 本发明可显著降低校准品配制成本;以动物血清或血浆配制的校准品成本大约是人血清或血浆配制的校准品的 1/10。

四、具体实施方式:

实施例 1:

基于小牛血清校准品的 FT3 TRFIA 与基于人血清校准品的 FT3 TRFIA,其使用方法为:

1、去除小牛血清中的甲状腺激素

(A) 将 1000ml 血清与 120g 活性炭(Sigma C3345)混合,置于旋转混匀器上处理 48 小时;

(B) 加入 200g 高岭土磨成的粉末,搅拌混匀后置于旋转混匀器上处理 48 小时;

(C) 取出混合物, 于 $40000\times g$ 超速离心 5~8 小时, 取上清, 测量甲状腺激素的浓度; 若甲状腺激素残留浓度仍较高, 重复以上步骤。

2、防腐与贮存

在已去除甲状腺激素的小牛血清中加入生物防腐剂 NaN_3 至终浓度 0.05%~0.1%。

3、FT3 TRFIA 校准品的配制与校正

在已去除甲状腺激素的小牛血清中加入不同量的三碘甲状腺原氨酸 (T3), 混匀后静置 12 小时。使用不受样本结合蛋白影响的 FT3 反滴定测定方法 (Wallac FT3 TRFIA) 校正上述 FT3 校准品的 FT3 浓度, 使六个 FT3 校准品的 FT3 浓度值分别为 0、1.5~3 pmol/L、6~8 pmol/L、15~18 pmol/L、35~39 pmol/L、70~80 pmol/L。

4、基于小牛血清校准品的 FT3 TRFIA

以上述基于小牛血清校准品的 FT3 TRFIA 测量 17 份待测人血清样品 FT3 浓度:

(1) 试剂的准备: 将铈标记抗 T3 单克隆抗体配制成工作浓度; 将分析缓冲液、校准品、17 份待测人血清样品和所需数量的微孔反应条平衡至室温 (20~25℃)。

(2) 吸取 25 μl 校准品和待测样品, 加入反应板微孔内。

(3) 在各微孔内加入 150 μl 已稀释的铈标记抗 T3 单克隆抗体溶液, 在室温 (20~25℃) 下慢速振动 1 小时。

(4) 洗板 6 次。将板条在洁净无尘的吸水纸上拍干。

(5) 在每个微孔内加入 150 μl 增强液, 于慢档振板 5 分钟。

(6) 将微孔反应板已固定在时间分辨荧光测定仪上进行检测; 仪器处理数据后得到样本 FT3 浓度值。

5、基于人血清校准品的 FT3 TRFIA

分别按上述 1、2、3、4 实施人血清去除甲状腺激素、防腐与贮存、FT3 TRFIA 校准品配制与校正、FT3 TRFIA 测量 17 份待测人血清样品, 得到基于人血清校准品的 17 份血清样品的 FT3 浓度值。

6、Wallac FT3 TRFIA

将上述 17 份待测人血清样品以 Wallac FT3 TRFIA (二步反滴定法) 测定, 得到基于人血清校准品的 17 人血清样品的 FT3 浓度值。

7、测量值 (pmol/L) 的准确性对比:

样本	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
1#FT3 TRFIA	2.5	3.0	4.3	5.5	6.7	6.9	8.4	15.3	16.8	18.5
2#FT3 TRFIA	2.8	2.9	4.5	5.5	6.6	6.7	9.0	16.8	18.2	20.0
3#FT3 TRFIA	2.5	3.1	4.5	5.3	6.6	7.3	8.6	17.3	17.2	17.8

样本	11#	12#	13#	14#	15#	16#	17#
1#FT3 TRFIA	20.3	20.9	27.6	35.3	40.0	49.9	61.2
2#FT3 TRFIA	20.3	22.8	30.3	35.2	42.5	50.8	63.7
3#FT3 TRFIA	20.2	21.6	28.8	35.8	43.5	51.6	64.8

注：1#FT3 TRFIA，基于小牛血清校准品的 FT3 TRFIA；2#FT3 TRFIA，基于人血清校准品的 FT3 TRFIA；3#FT3 TRFIA，Wallac FT3 TRFIA。

上述结果显示，基于小牛血清校准品的 1#FT3 TRFIA 与基于人血清校准品的 2#FT3 TRFIA、3#Wallac FT3 TRFIA 测量值显著相关；以Origin-5.0软件处理数据，相关系数均为 0.999，测量值具有一致性 ($R>0.05$)。

实施例 2:

基于小牛血清校准品的 TT4 TRFIA 与基于人血清校准品的 TT4 TRFIA，其使用方法为：

1、去除小牛血清中的甲状腺激素

方法步骤同实施例 1。

2、防腐与贮存

在已去除甲状腺激素的小牛血清中加入生物防腐剂 NaN_3 至终浓度 0.05%~0.1%。

3、TT4 TRFIA校准品的配制与校正

在已去除甲状腺激素的小牛血清中加入不同量的甲状腺素 (T4)，混匀后静置 12 小时；使用 Wallac TT4 TRFIA 校正 TT4 校准品的 TT4 浓度，使六个 TT4 校准品的 TT4 浓度值分别为 0、20-30nmol/L、50-60nmol/L、100-110nmol/L、150-160nmol/L、290-300 nmol/L。

4、基于小牛血清校准品的 TT4 TRFIA

以上述基于小牛血清校准品的 TT4 TRFIA 测量 16 份待测人血清样品 TT4 浓度：

(1) 试剂的准备：将洗涤液、铕标记准备好并将分析缓冲液、校准品、16份待测人血清样品和所需数量的微孔反应条平衡至室温（20~25℃）。

(2) 吸取 25 μ l 校准品和待测样品，加入反应板微孔内。

(3) 在各微孔内加入 150 μ l 已稀释的铕标记溶液，在室温（20~25℃）下慢速振动1小时。

(4) 洗板 6 次。将板条在洁净无尘的吸水纸上拍干。

(5) 在每个微孔内加入 150 μ l 增强液，于慢档振板 5 分钟。

(6) 确定微孔反应板已固定在时间分辨荧光测定仪上进行检测；仪器处理数据后得到样本TT4浓度值。

5、基于人血清校准品的TT4 TRFIA

分别按上述 1、2、3、4 实施人血清去除甲状腺激素、防腐与贮存、TT4 TRFIA 校准品配制与校正、TT4 TRFIA 测量 16 份待测人血清样品，得到基于人血清校准品的 16 人血清样品的 TT4 浓度值。

2、Wallac TT4 TRFIA

将上述 16 份待测人血清样品以 Wallac TT4 TRFIA（二步反滴定法）测定，得到基于人血清校准品的 16 人血清样品的 TT4 浓度值。

3、测量值（nmol/L）的准确性对比

样本	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	11#	12#	13#	14#	15#	16#
1#TT4 TRFIA	19	32	35	42	45	59	67	77	85	102	126	133	165	191	267	312
2#TT4 TRFIA	20	32	37	39	42	52	76	71	83	113	116	128	152	199	253	301
3#TT4 TRFIA	17	25	38	45	47	55	73	73	83	101	118	136	154	183	258	324

注：1#TT4 TRFIA，基于小牛血清校准品的 TT4 TRFIA；2# TT4 TRFIA，基于人血清校准品的 TT4 TRFIA；3# TT4 TRFIA，Wallac TT4 TRFIA。

上述结果显示，基于小牛血清校准品的 1#TT4 TRFIA与基于人血清校准品的 2#TT4 TRFIA、3#Wallac TT4 TRFIA 测量值显著相关，以Origin-5.0软件处理数据，相关系数分别为 0.997、0.995，测量值具有一致性（R>0.05）。

通过上述数据可看出：

本发明所用方法可成功去除动物血清或血浆中的甲状腺激素，以这种去除激素的动物血清或血浆替代人血清或血浆配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品，可以准确测定人血液样本中的总甲状腺激素或游离甲状腺激素的浓度。

专利名称(译)	使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品		
公开(公告)号	CN1904614A	公开(公告)日	2007-01-31
申请号	CN200610027229.X	申请日	2006-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司 苏州新波生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司 苏州新波生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司 苏州新波生物技术有限公司		
[标]发明人	吴冯波 张小寒 沈正阳 唐晓燕		
发明人	吴冯波 张小寒 沈正阳 唐晓燕		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	陈志良		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为使用动物血清或血浆配制甲状腺激素免疫分析校准品，包括动物血清或血浆的种类、处理方式、适用范围。由于本发明使用动物血清或血浆代替人血清或血浆配制甲状腺激素免疫诊断试剂盒校准品，从而使得血清的处理、校准品的配制和使用都更为安全，诊断试剂成本显著降低。

样本	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
1#FT3 TRFIA	2.5	3.0	4.3	5.5	6.7	6.9	8.4	15.3	16.8	18.5
2#FT3 TRFIA	2.8	2.9	4.5	5.5	6.6	6.7	9.0	16.8	18.2	20.0
3#FT3 TRFIA	2.5	3.1	4.5	5.3	6.6	7.3	8.6	17.3	17.2	17.8