



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108982836 A

(43)申请公布日 2018.12.11

(21)申请号 201810550552.8

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 湖南远璟生物技术有限公司

地址 410154 湖南省长沙市开福区沙坪街
道中青路1048号山河医药健康产业园
4栋6楼

(72)发明人 李明勇 姜雪莲 周燕香 张玲
胡洁 黄伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/63(2006.01)

权利要求书4页 说明书9页

(54)发明名称

一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量
检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种总甲状腺素磁微粒化学发
光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,所述试剂
盒包括:链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性
磷酸酶标记的甲状腺素衍生物,生物素标记的甲
状腺素抗体,测试稀释液,甲状腺素校准品,甲
状腺素质控品。本发明的试剂盒与现有试剂盒相
比,制备工艺更简单,成本更低,检测范围宽,稳
定性好。

1. 一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:它包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物,生物素标记的甲状腺素抗体,测试稀释液,总甲状腺素校准品,总甲状腺素质控品。

2. 根据权利要求1所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为 $1\mu\text{m}\sim 1.5\mu\text{m}$ 的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的悬浮液,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为 $0.1\text{mg}/\text{mL}\sim 1.0\text{mg}/\text{mL}$,优选的浓度为 $0.5\text{mg}/\text{mL}$;所述磁微粒包被物缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$,优选的浓度为 100mM ,优选的PH为 7.0 ;

所述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物为碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物,其中甲状腺素衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和甲状腺素的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和甲状腺素的化学合成物质;

所述生物素标记的甲状腺素抗体为生物素和甲状腺素抗体的偶联物,其中甲状腺素抗体为小鼠单克隆抗体;

所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为8-苯胺-1-萘磺酸(ANS),测试稀释液的浓度范围为 $0.01\%\sim 1\%$;所述缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$;

所述甲状腺素校准品为含 20% 胎牛血清的校准品缓冲液,所述甲状腺素校准品的工作浓度分别为 $0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00$ nmol/L;所述校准品缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$;

所述甲状腺素质控品为含 20% 胎牛血清的质控品缓冲液,所述甲状腺素质控品的工作浓度分别为 $50.00,200.00$ nmol/L;所述质控品缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH值范围为 $6.5\sim 8.0$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为 $1\mu\text{m}\sim 1.5\mu\text{m}$ 的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的悬浮液,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为 $0.5\text{mg}/\text{mL}$;所述磁微粒包被物缓冲液为 100mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH为 7.0 。

4. 根据权利要求1或2所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物为稀释于酶标记物缓冲液中的碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物,其中甲状腺素衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和甲状腺素的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和甲状腺素的化学合成物质;所述碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物与酶标记物缓冲液的稀释比例为 $1:400\sim 1:2000$,优选的稀释比例为 $1:800$;所述酶标记物缓冲液为 20mM Tris缓冲液,PH为 7.4 。

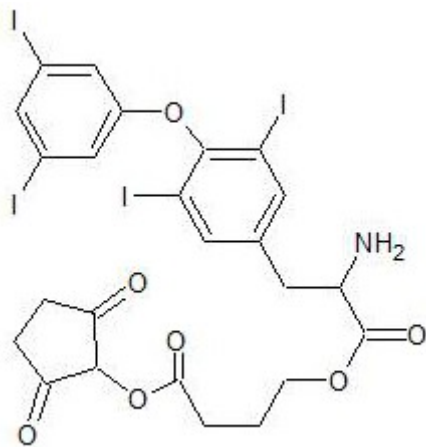
5. 根据权利要求1或2所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述生物素标记的甲状腺素抗体为稀释于生物素标记物缓冲液中生物素和甲状腺素抗体的偶联物,其中甲状腺素抗体为小鼠单克隆抗体;所述生物素和甲状腺素抗体的偶联物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为 $1:200\sim 1:1000$,优选的稀释比例为 $1:500$;所述生物素标记物缓冲液为 20mM Tris缓冲液,PH为 8.0 。

6. 根据权利要求1或2所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为8-苯胺-1-萘磺酸(ANS),所述测试稀释液的浓度范围为0.1%;所述缓冲液为20mM Tris缓冲液,PH为7.4;

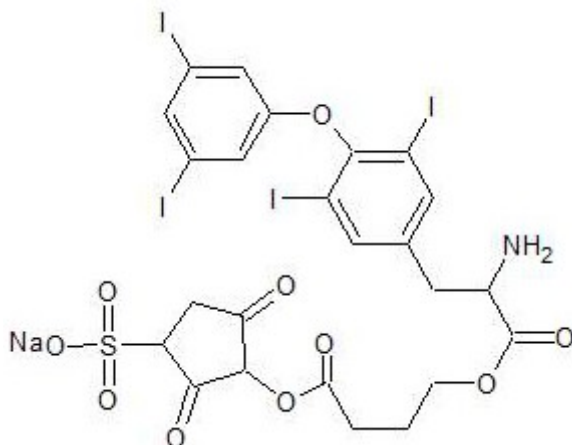
所述甲状腺素校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L;所述校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;

所述甲状腺素质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液,将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为50.00,200.00 nmol/L;所述质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH值范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH值为7.4。

7. 根据权利要求1或2所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述四碘甲状腺原氨酸衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和四碘甲状腺原氨酸的化学合成物质,其化学结构式如下:



或所述四碘甲状腺原氨酸衍生物为N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和四碘甲状腺原氨酸的化学合成物质,其化学结构式如下:



8. 根据权利要求1或2所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述四碘甲状腺原氨酸衍生物是通过以下工艺制备的:

S1. 四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯的制备:取四碘甲状腺原氨酸(采购自Sigma公司)3.5g于200mL蒸馏水中,加入硫酸铜800mg,在100℃水浴中回流反应5小时,冷却至室温后,过滤除去固体杂质,然后将滤液冰浴降温2小时有结晶析出,用乙醇重结晶,得到白色片状

结晶四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯2.6g;

S2. N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与四碘甲状腺原氨酸合成物的制备:取1.2g的四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯溶解于50mM 柠檬酸溶液 (PH4.0) 中,加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 600mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 200mg,避光条件下2~8℃反应8h,过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与四碘甲状腺原氨酸合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与四碘甲状腺原氨酸合成物160mg,即得T4-NHS。

9. 一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括:

(1) 碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入甲状腺素衍生物 (T4-NHS),在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化酶标抗体,得到甲状腺素酶结合物,将甲状腺素酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述甲状腺素酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000;

(2) 生物素标记的甲状腺素抗体制备方法:将甲状腺素抗体 (小鼠,单克隆) 加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入生物素衍生物,在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化生物素标记抗体,得到甲状腺素生物素结合物,将甲状腺素生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述甲状腺素生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000;

(3) 测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液 (PH7.4) 将ANS稀释至工作浓度为0.1%;

(4) 甲状腺素校准品的制备方法:用校准品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L;

(5) 甲状腺素质控品的制备方法:用质控品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为50.00,200.00 nmol/L;

(6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物、生物素标记的甲状腺素抗体、测试稀释液、甲状腺素校准品、甲状腺素质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

10. 根据权利要求9所述的一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括:

(1) 碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入甲状腺素衍生物 (T4-NHS),37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化酶标抗体,得到甲状腺素酶结合物,将甲状腺素酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述甲状腺素酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;

(2) 生物素标记的甲状腺素抗体制备方法:将甲状腺素抗体 (小鼠,单克隆) 加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入生物素衍生物,37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化生物素标记抗体,得到甲状腺素生物素结合物,将甲状腺素生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述甲状腺素生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:500;

(3) 测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液 (PH7.4) 将ANS稀释至工作浓度为

0.1%;

(4) 甲状腺素校准品的制备方法:用校准品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L;

(5) 甲状腺素质控品的制备方法:用质控品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为50.00,200.00 nmol/L;

(6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物、生物素标记的甲状腺素抗体、测试稀释液、甲状腺素校准品、甲状腺素质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及检测血清中总甲状腺素 TT4 含量的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 四碘甲腺原氨酸(Tetraiodothyronine,T4)是甲状腺分泌的主要激素,分子量为777,半衰期为6-7天,是通过甲状腺球蛋白酪氨酸残基的碘化合成的,经过酶解从甲状腺球蛋白解离进入血液循环,T4的形成和释放受到促甲状腺激素(Thyroid Stimulating Hormone,TSH)的调节。

[0003] 血浆中大部分三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine,T3)是由T4在外周组织中经5'脱碘作用代谢而来,虽然T3是比T4更具有活性的甲状腺激素,但T4在血清中循环的含量远远超过T3.T4和T3都起着调节体内的各种生化过程的作用,对正常的生理代谢和神经系统活性是必须的。

[0004] T4在体内循环中大部分与蛋白质结合,只有0.04%的T4处于游离状态,目前认为游离的T4才具有生物学活性。与蛋白结合的T4与游离的激素保持动态平衡,保证甲状腺的正常功能。T4结合蛋白主要有甲状腺结合球蛋白(TBG),前白蛋白及白蛋白,分别占到了大约60%,30%和10%。T4的水平会随着TBG浓度的改变而变化,例如,怀孕或服用避孕药,长期肝炎和胆硬化等会增加TBG的水平,肾病和雄激素治疗等则会降低。

[0005] 血清/血浆TT4的浓度与甲状腺功能有密切的关系,TT4的定量检测是评估甲状腺功能和病理状态的一个重要的临床指标,为确保甲状腺功能诊断的准确性,TT4应该同TSH,Free T4,TT3和Free T3等激素联合检测。

[0006] 用于体内总甲状腺素测定的主要方法有放射免疫分析法、酶联免疫吸附分析法、化学发光免疫分析法等。目前常用的放射免疫分析法(RIA)是用I¹²⁵标记甲状腺素半抗原来实现的,其合成工艺复杂,有效期短,对环境有一定污染,影响检测结果的因素较多。近几年来,化学发光免疫分析技术发展迅速,灵敏度、特异性以及自动化程度均达到或超过了RIA水平,特别是标记物的稳定性和不污染环境是RIA法无法比拟的。

[0007] 目前各大中型医院均进口了全自动化学发光免疫分析系统,但是仪器和试剂价格昂贵。

[0008] 目前已有多件磁微粒化学发光方法检测甲状腺素的专利申请,申请使用的是异鲁米诺发光标记物标记甲状腺素抗体,检测灵敏度较低,稳定性较差。

发明内容

[0009] 本发明要解决的问题是提供总甲状腺素的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了放射性免疫分析的试剂有效期短、存在放射性污染、操作繁琐等缺点,且解决了灵敏度低,稳定性差,成本高的缺陷。本发明公开了一种制备工艺简单、成本低廉、稳定

性好的总甲状腺素的化学发光免疫定量检测试剂盒以及制备方法。

[0010] 本发明采用的技术方案为：

一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒，包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液，碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物，生物素标记的甲状腺素抗体，测试稀释液，总甲状腺素校准品，总甲状腺素质控品。

[0011] 优选地，所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为1 μ m~1.5 μ m的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的悬浮液，所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL，优选的浓度为0.5mg/mL；所述磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液，PH范围为6.5~8.0，优选的浓度为100mM，优选的PH为7.0。

[0012] 所述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物为碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物，其中甲状腺素衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和甲状腺素的化学合成物质，或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和甲状腺素的化学合成物质。

[0013] 所述生物素标记的甲状腺素抗体为生物素和甲状腺素抗体的偶联物，其中甲状腺素抗体为小鼠单克隆抗体。

[0014] 所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液，其中解离剂为8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)，测试稀释液的浓度范围为0.01%~1%；所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液，PH范围为6.5~8.0。

[0015] 所述甲状腺素校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液，所述甲状腺素校准品的工作浓度分别为0, 30.00, 50.00, 100.00, 200.00, 400.00 nmol/L；所述校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液，PH范围为6.5~8.0。

[0016] 所述甲状腺素质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液，所述甲状腺素质控品的工作浓度分别为50.00, 200.00 nmol/L；所述质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液，PH值范围为6.5~8.0。

[0017] 优选地，所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为1 μ m~1.5 μ m的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的悬浮液，所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为0.5mg/mL；所述磁微粒包被物缓冲液为100mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液，PH为7.0。

[0018] 优选地，所述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物为稀释于酶标记物缓冲液中的碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物，其中甲状腺素衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和甲状腺素的化学合成物质，或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和甲状腺素的化学合成物质；所述碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000，优选的稀释比例为1:800；所述酶标记物缓冲液为20mM Tris缓冲液，PH为7.4。

[0019] 优选地，所述生物素标记的甲状腺素抗体为稀释于生物素标记物缓冲液中生物素和甲状腺素抗体的偶联物，其中甲状腺素抗体为小鼠单克隆抗体；所述生物素和甲状腺素抗体的偶联物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000，优选的稀释比例为1:500；所述生物素标记物缓冲液为20mM Tris缓冲液，PH为8.0。

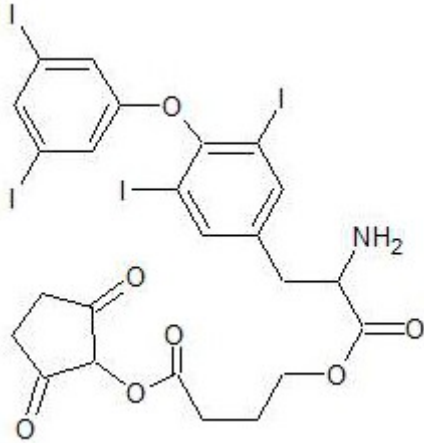
[0020] 优选地，所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液，其中解离剂为8-苯胺-1-萘磺酸

(ANS),所述测试稀释液的浓度范围为0.1%;所述缓冲液为20mM Tris缓冲液,PH为7.4。

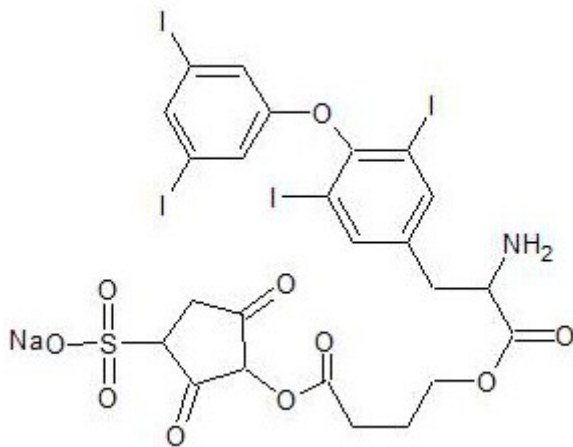
[0021] 所述甲状腺素校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L;所述校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0022] 所述甲状腺素质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液,将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为50.00,200.00 nmol/L;所述质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH值范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH值为7.4。

[0023] 优选地,所述四碘甲状腺原氨酸衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和四碘甲状腺原氨酸的化学合成物质,其化学结构式如下:



或所述四碘甲状腺原氨酸衍生物为N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和四碘甲状腺原氨酸的化学合成物质,其化学结构式如下:



优选地,所述四碘甲状腺原氨酸衍生物是通过以下工艺制备的:

S1. 四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯的制备:取四碘甲状腺原氨酸(采购自Sigma公司)3.5g于200mL蒸馏水中,加入硫酸铜800mg,在100℃水浴中回流反应5小时,冷却至室温后,过滤除去固体杂质,然后将滤液冰浴降温2小时有结晶析出,用乙醇重结晶,得到白色片状结晶四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯2.6g;

S2. N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与四碘甲状腺原氨酸合成物的制备:取1.2g的四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯溶解于50mM 柠檬酸溶液(PH4.0)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)600mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)200mg,避光条件下2~8℃反应

8h,过色谱柱收集N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)与四碘甲状腺原氨酸合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)与四碘甲状腺原氨酸合成物160mg,即得T4-NHS。

[0024] 一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括:

(1)碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入甲状腺素衍生物(T4-NHS),在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到甲状腺素酶结合物,将甲状腺素酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述甲状腺素酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000;

(2)生物素标记的甲状腺素抗体制备方法:将甲状腺素抗体(小鼠,单克隆)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到甲状腺素生物素结合物,将甲状腺素生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述甲状腺素生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000;

(3)测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液(PH7.4)将ANS稀释至工作浓度为0.1%;

(4)甲状腺素校准品的制备方法:用校准品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L;

(5)甲状腺素质控品的制备方法:用质控品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为50.00,200.00 nmol/L;

(6)组装:将上述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物、生物素标记的甲状腺素抗体、测试稀释液、甲状腺素校准品、甲状腺素质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0025] 优选地,一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括:

(1)碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入甲状腺素衍生物(T4-NHS),37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到甲状腺素酶结合物,将甲状腺素酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述甲状腺素酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;

(2)生物素标记的甲状腺素抗体制备方法:将甲状腺素抗体(小鼠,单克隆)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到甲状腺素生物素结合物,将甲状腺素生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述甲状腺素生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:500;

(3)测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液(PH7.4)将ANS稀释至工作浓度为0.1%;

(4)甲状腺素校准品的制备方法:用校准品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L;

(5)甲状腺素质控品的制备方法:用质控品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分

别为50.00,200.00 nmol/L;

(6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物、生物素标记的甲状腺素抗体、测试稀释液、甲状腺素校准品、甲状腺素质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0026] 本发明涉及的试剂盒性能评价指标:对采用该方法制备的试剂盒进行准确度、线性、精密度、特异性和稳定性进行测定。

[0027] 本发明涉及的试剂盒反应原理:以磁微粒子作为免疫反应的固相,利用化学发光免疫分析方法与化学发光类测定仪配合,用于测定人体血清/血浆中的总甲状腺素含量。反应的技术原理为:待测样本、校准品或质控品中的甲状腺素与碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物竞争结合生物素标记的甲状腺素单克隆抗体,随后加入包被链霉亲和素的磁微粒,通过链霉亲和素与生物素结合使抗原抗体复合物连接在磁微粒上,在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离。清洗沉淀的复合物,加入酶促化学发光底物,底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,利用发光仪测定反应的发光强度。在测定范围内,发光强度与样本中的甲状腺素浓度成反比,使用改良的四参数Logistic方程拟合可定量测算出待测样本中甲状腺素浓度。

[0028] 本发明的总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,制备工艺简单、成本低廉、稳定性好,性能达到国外知名品牌试剂的同等水平。

[0029] 本发明的创新性在于:

(1) 碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法采用的是甲状腺素衍生物(T4-NHS)直接进行偶联磷酸酶,相比较其他专利或厂家用的是甲状腺素-BSA衍生物(T4-CMO-BSA)或甲状腺素-OVA衍生物(T4-CMO-OVA),该方法成本更低,工艺更简单,更可控。甲状腺素的大分子蛋白衍生物可能存在一定的位阻干扰,影响测试结果的准确性,而本发明涉及的甲状腺素衍生物(T4-NHS)是与甲状腺素结构类似的小分子物质,有效避免的位阻干扰的问题。

[0030] (2) 生物素标记抗体的制备方法:采用经过活化的生物素直接与抗体进行偶联,无需添加EDC\NHS等偶联剂,工艺更简单,成本更低。

具体实施方式

[0031] 下面结合实例进一步说明本发明,本发明的优点和特点将被描述的更清楚。但是,应该可以理解,本实例仅仅是本发明的一种范例,并不会对本发明的范围做任何限制。

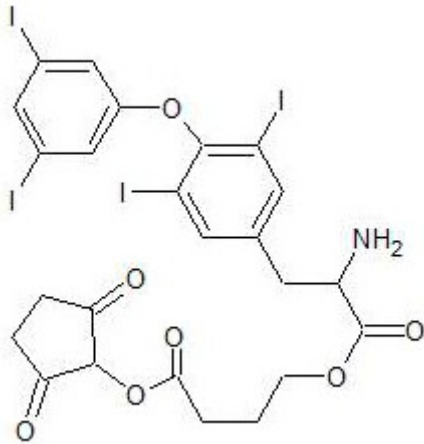
[0032] 一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物,生物素标记的甲状腺素抗体,测试稀释液,总甲状腺素校准品,总甲状腺素质控品。

[0033] 本发明涉及的链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁,粒径为1um~1.5um,悬浮于磁微粒包被物缓冲液中,浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL,优选的浓度为0.5mg/mL;磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为100mM,优选的PH为7.0。

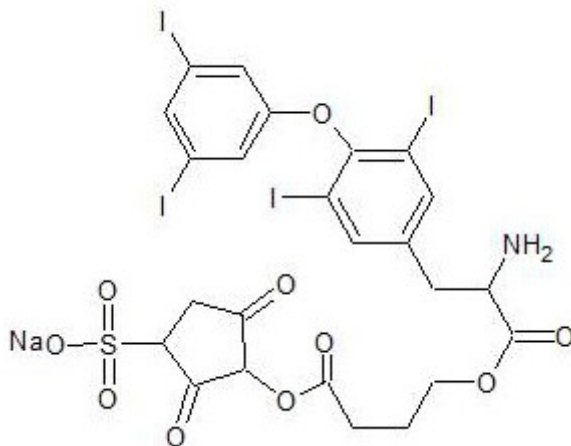
[0034] 本发明涉及的碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物为碱性磷酸酶和甲状腺素衍生物的偶联物,其中甲状腺素衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和甲状腺素的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和甲状腺素的化学合成物质。稀释于酶标记物

缓冲液中,稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:800;酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0035] 所述四碘甲状腺原氨酸衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和四碘甲状腺原氨酸的化学合成物质,其化学结构式如下:



或所述四碘甲状腺原氨酸衍生物为N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和四碘甲状腺原氨酸的化学合成物质,其化学结构式如下:



优选地,所述四碘甲状腺原氨酸衍生物是通过以下工艺制备的:(1)四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯的制备:取四碘甲状腺原氨酸(采购自Sigma公司)3.5g于200mL蒸馏水中,加入硫酸铜800mg,在100℃水浴中回流反应5小时,冷却至室温后,过滤除去固体杂质,然后将滤液冰浴降温2小时有结晶析出,用乙醇重结晶,得到白色片状结晶四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯2.6g。

[0036] (2)N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与四碘甲状腺原氨酸合成物的制备:取1.2g的四碘甲状腺原氨酸-丁二酸酯溶解于50mM 柠檬酸溶液(PH4.0)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)600mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)200mg,避光条件下2~8℃反应8h,过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与四碘甲状腺原氨酸合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与四碘甲状腺原氨酸合成物160mg,即得T4-NHS。

[0037] 本发明涉及生物素标记的甲状腺素抗体为生物素和甲状腺素抗体的偶联物,其中甲状腺素抗体为小鼠单克隆抗体。稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:200~1:

1000, 优选的稀释比例为1:500; 生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为8.0。

[0038] 本发明涉及的测试稀释液为含有解离剂的缓冲液, 其中解离剂主要成分为8-苯胺-1-萘磺酸(ANS), 浓度范围为0.01%~1%, 优选的浓度为0.1%; 缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为7.4。

[0039] 本发明涉及的甲状腺素校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液, 将甲状腺素纯品稀释至工作浓度, 分别为0, 30.00, 50.00, 100.00, 200.00, 400.00 nmol/L; 校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为7.4。

[0040] 本发明涉及的甲状腺素质控品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液, 将甲状腺素纯品稀释至工作浓度, 分别为50.00, 200.00 nmol/L; 质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH值范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH值为7.4。

[0041] 一、试剂盒的制备:

(1) 磁微粒包被物缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	0.50g
牛血清白蛋白	50.00g
Proclin300	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中, 充分搅拌溶解, 调节PH至7.00±0.10。

[0042] (2) 酶标记物缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	1.00g
牛血清白蛋白	50.00g
Proclin300	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中, 充分搅拌溶解, 调节PH至7.40±0.10。

[0043] (3) 生物素标记物缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	4.50g
Tween-20	1.00g
牛血清白蛋白	10.00g
Proclin300	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中, 充分搅拌溶解, 调节PH至8.00±0.10。

[0044] (4) 测试稀释液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g

氯化钠	4.50g
Tween-20	1.00g
牛血清白蛋白	10.00g
Proclin300	1.00g
8-苯胺-1-萘磺酸	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至7.40±0.10。

[0045] (5) 校准品缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	1.00g
胎牛血清	200mL
Proclin300	1.00g

将上述物料加入800mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至7.40±0.10。

[0046] (6) 质控品缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	2.00g
胎牛血清	200mL
Proclin300	1.00g

将上述物料加入800mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至7.40±0.10。

[0047] (1) 链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液制备方法:

将商品化的链霉亲和素包被的磁微粒母液(采购于南京盘古基因纳米科技有限公司)用磁珠包被物缓冲液稀释浓度为0.5mg/mL。

[0048] (2) 碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物制备方法:

将100ug碱性磷酸酶加入1mL10mM 碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入1ug甲状腺素衍生物(T4-NHS,采购于深圳雅为公司),37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到甲状腺素酶结合物。稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:1000。

[0049] (3) 生物素标记的甲状腺素抗体制备方法:

将20ug甲状腺素抗体(小鼠,单克隆,采购于美国Meridian公司)加入1mL10mM 碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入50ug生物素衍生物,37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到甲状腺素生物素结合物。稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:500。

[0050] (4) 甲状腺素校准品的制备方法:

用校准品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为0,30.00,50.00,100.00,200.00,400.00 nmol/L。

[0051] (5) 甲状腺素质控品的制备方法:

用质控品缓冲液将甲状腺素纯品稀释至工作浓度,分别为50.00,200.00 nmol/L。

[0052] (6) 组装:将上述试剂组分组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0053] 二、试剂盒的测试方法:

(1) 加样和孵育过程:吸取总甲状腺素校准品、质控品或新鲜病人样本50uL加入反应管中,然后加入碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物50uL和生物素标记的甲状腺素抗体50uL,37℃孵育反应10分钟;然后加入链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液50uL,37℃孵育反应10分钟;

(2) 磁分离清洗过程:将孵育反应完成后的反应管放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第一次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第二次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第三次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;

(3) 发光过程:加入Lumi-Phos 530底物液(采购于美国Lumigen公司)200uL,37℃避光孵育5分钟后,用滨松9507半自动化学发光仪测量发光值。

[0054] 三、试剂盒的性能测试结果:

(1) 线性范围为0~400.00 nmol/L,线性系数: $r \geq 0.9900$;

(2) 批内不精密度为不大于6%;

(3) 准确度:回收率在90%~110%之间;

(4) 最低检出限:测试结果不高于5.00 nmol/L;

(5) 特异性:50ng/mL的反三碘甲状腺原氨酸(rT3)、500ng/mL的三碘甲状腺原氨酸(TT3),测试结果不高于5.0 nmol/L:

干扰物	浓度	测试结果	结论
反三碘甲状腺原氨酸	50ng/mL	3.61 nmol/L	<5.00 nmol/L
三碘甲状腺原氨酸	500ng/mL	2.88 nmol/L	<5.00 nmol/L

(6) 稳定性:37℃加速7天与2~8℃试剂测试结果偏差±10%范围内;

样本	浓度	37℃加速7天相对偏差
低值质控	50.00nmol/L	-4.12%
高值质控	200.00nmol/L	-2.96%

由以上的结果可以看出:本发明涉及的试剂盒与国外同类型试剂盒相比,性能测试结果很接近,达到优良结果,本发明的总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒具有很好的适用性和先进性。

[0055] 以上所述实施例仅是本发明的优选实施方式。应当指出,本发明所述的稀释比例是指按质量比稀释的比例,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术方案的前提下,还可以做出若干改进和修饰,这些改进和修饰也应视为本发明的保护范围,本实施例中未明确的部分均可用现有技术加以实现。

专利名称(译)	一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108982836A	公开(公告)日	2018-12-11
申请号	CN201810550552.8	申请日	2018-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	湖南远璟生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖南远璟生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖南远璟生物技术有限公司		
[标]发明人	李明勇 姜雪莲 周燕香 张玲 胡洁 黄伟		
发明人	李明勇 姜雪莲 周燕香 张玲 胡洁 黄伟		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/63		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/63 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种总甲状腺素磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法，所述试剂盒包括：链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液，碱性磷酸酶标记的甲状腺素衍生物，生物素标记的甲状腺素抗体，测试稀释液，甲状腺素校准品，甲状腺素质控品。本发明的试剂盒与现有试剂盒相比，制备工艺更简单，成本更低，检测范围宽，稳定性好。

