



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101201354 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 02

(21) 申请号 200610165848. 5

JP 1018057 A, 1989. 01. 20, 全文.

(22) 申请日 2006. 12. 14

审查员 杨冀川

(73) 专利权人 北京科美东雅生物技术有限公司
地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中
路 7 号北科园

(72) 发明人 林斯 胡国茂 应希堂

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0103469 A2, 1984. 03. 21, 全文.

EP 0298708 A2, 1989. 01. 11, 全文.

US 2006193865 A1, 2006. 08. 31, 全文.

CN 1474185 A, 2004. 02. 11, 全文.

CN 1540348 A, 2004. 10. 27, 全文.

DE 19519973 A1, 1996. 12. 05, 全文.

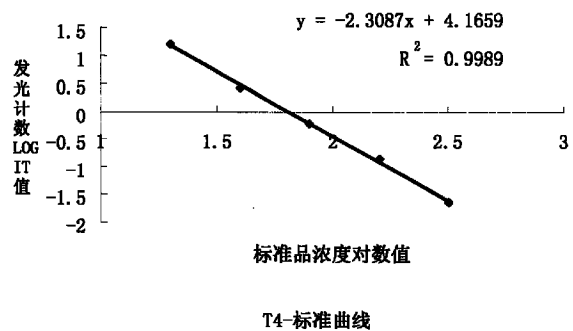
权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

甲状腺素化学发光免疫分析定量测定试剂盒
及制备方法

(57) 摘要

本发明属于免疫诊断技术领域, 本发明公开了一种甲状腺素 (T4) 酶促化学发光定量测定试剂盒, 本发明的试剂盒由 T4 标准品, 抗体预包被反应板, 辣根过氧化物酶标记物, 稀释液, 洗涤液和化学发光底物液组成。本发明试剂盒具有快速, 简便, 灵敏, 价廉, 重复性好的优点, 是甲状腺功能亢进 (甲亢) 和减退 (甲减) 的诊断和疗效评价的重要指标, 有较高的临床使用价值, 本发明提供了这种试剂盒的制备方法。

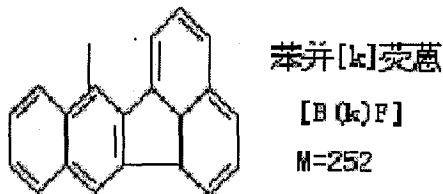


1. 一种甲状腺素 T4 化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于,包含 T4 标准品、抗体预包被反应板、稀释液、洗涤液、化学发光底物液,用辣根过氧化物酶 HRP 标记 T4 抗原,其中化学发光底物液通过以下方法制备:

A 液:在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中加入 Luminol、Tween20 以及苯并荧蒹,苯并荧蒹结构如下图所示,混合均匀;

B 液:在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸,配制成 0.1M pH4.6 的柠檬酸缓冲液,在此溶液中加入 30%过氧化氢溶液;

使用前将 A 液与 B 液按 1 : 1 比例混合后使用;



2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于其中辣根过氧化物酶 HRP 标记 T4 抗原是通过以下方法制备的:

一. 生物素化 T4

(1) T4 与 BSA 的连接

取羧基已经被甲酯化的 T4 1mg 溶于 0.2mL DMF 中成 5mg/mL 的溶液,加入 1mL 浓度为 0.5mg/mL 的 BSA,混匀后加入 200 μ L 的戊二醛,混匀室温搅拌反应过夜,次日取出装入透析袋并对 0.05M pH9.4 的 CB 液透析 24 小时,中间换液 3 次,然后取出转入玻璃瓶中;

(2) 生物素化 T4

取 N 羟基琥珀酰亚胺酯化的生物素溶于 0.2mL DMF 中,搅拌下逐滴加入到上 (1) 的透析液中,室温搅拌反应 1 小时后装入透析袋对 0.02M pH7.4PB 液透析过夜;

二. HRP 标记亲和素

取 HRP 溶于蒸馏水中,加入新鲜配制的过碘酸钠,混匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟,然后加入 160mM 乙二醇,室温放置 30 分钟,将 5mg/mL 的亲和素蒸馏水溶液加入到上述溶液中,混匀后装入透析袋对 0.05M pH9.5 的 CB 液中 4 $^{\circ}$ C 搅拌透析过夜;

三. 生物素-亲和素系统放大的 T4-HRP 标记物

将上述步骤一中的生物素化 T4 的产物和上述步骤二中 HRP 标记亲和素的产物完全混合,在 37 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 1 小时后加入等体积的甘油,保存于 -20 $^{\circ}$ C。

3. 如权利要求 1,2 中任意一个所述的试剂盒,其特征在于抗体预包被反应板是不透光的白色微孔板。

4. 一种如权利要求 1-3 中任意一个试剂盒的制备方法,其特征在于,该方法包括下列步骤:

(1) T4 标准品制备

取一定量的 T4 原料溶解于 DMF 中,然后以人去激素血清将 T4 原料稀释成一系列浓度,即可作为标准品使用;

(2) 酶标物的制备

采用前述的辣根过氧化物酶 HRP 标记 T4 的标记方法;

(3) 酶标记物稀释液的制备

以 0.1M pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液为稀释液,加入 0.2% BSA 以及一定量的阻断剂;

(4) 包被抗体成为预包被反应板

以 0.06M PH4.8 的柠檬酸缓冲液为稀释液将羊抗 T4 多抗稀释至一定浓度,每个微孔加 100 微升,4°C 静置过夜,次日用含 1% BSA 的 0.02M PH 7.4 的 PB 液封闭未结合位点,37°C 1 小时后拍干,真空包装;

(5) 分装试剂盒其余各种组份,按试剂盒需要量分装在小瓶中;

(6) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格;

(7) 组装成为成品。

5. 一种应用权利要求 1-4 中任意一项的试剂盒的检测方法,其检测步骤为:

(1) 自 4°C 冰箱中取出试剂盒,室温平衡 15 分钟;

(2) 取出包被板条,插入板架上;

(3) 在反应孔中分别加一定量的各浓度标准品和样本,每次实验设空白 1 孔,然后除空白孔外各孔均加入相同体积的酶标记物,用微量震荡器充分振荡混匀,37°C 温育 1 小时;

(4) 甩去反应液,每孔加满稀释后的洗涤液,洗板 5 次,最后在干净的吸水纸上扣干;

(5) 各孔均加入相同体积的化学发光底物液,用微量震荡器充分振荡混合均匀,室温避光反应;

(6) 在发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 RLU;

(7) 以标准品浓度和 RLU 值绘制标准曲线,以各待测样本的 RLU 值在标准曲线上查出该样本的 T4 浓度。

6. 一种采用酶促化学发光免疫分析的原理定量测定甲状腺素 T4 的方法,其特征在于采用权利要求 1-4 中任意一项中所述的试剂盒作为工具。

7. 一种使用辣根过氧化酶标记 T4 抗原的方法,其包括以下步骤:

一. 生物素化 T4

(1) T4 与 BSA 的连接

取羧基已经被甲酯化的 T4 1mg 溶于 0.2mL DMF 中成 5mg/mL 的溶液,加入 1mL 浓度为 0.5mg/mL 的 BSA,混匀后加入 200 μ L 的戊二醛,混匀室温搅拌反应过夜,次日取出装入透析袋并对 0.05M pH9.4 的 CB 液透析 24 小时,中间换液 3 次,然后取出转入玻璃瓶中;

(2) 生物素化 T4

取 N 羟基琥珀酰亚胺酯化的生物素溶于 0.2mL DMF 中,搅拌下逐滴加入到上 (1) 的透析液中,室温搅拌反应 1 小时后装入透析袋对 0.02M pH7.4PB 液透析过夜;

二. HRP 标记亲和素

取 HRP 溶于蒸馏水中,加入新鲜配制的过碘酸钠,混匀后 4°C 放置 30 分钟,然后加入 160mM 乙二醇,室温放置 30 分钟,将 5mg/mL 的亲和素蒸馏水溶液加入到上述溶液中,混匀后装入透析袋对 0.05M pH9.5 的 CB 液中 4°C 搅拌透析过夜;

三. 生物素-亲和素系统放大的 T4-HRP 标记物

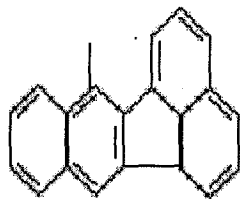
将上述步骤一中生物素化 T4 的产物和上述步骤二中 HRP 标记亲和素的产物完全混合,在 37°C 下搅拌反应 1 小时后加入等体积的甘油,保存于 -20°C。

8. 一种用于 T4 试剂盒的发光底物的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

A 液 : 在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 在此缓冲液中加入 Luminol、Tween20 以及苯并荧蒽, 苯并荧蒽结构如下图所示, 混合均匀;

B 液 : 在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸, 配制成 0.1M pH4.6 的柠檬酸缓冲液, 在此溶液中加入 30% 过氧化氢溶液;

使用方法 : 使用前将 A 液与 B 液按 1 : 1 比例混合后使用;



苯并[a]荧蒽

[B(a)F]

M=252

甲状腺素化学发光免疫分析定量测定试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种甲状腺素(T4)定量测定试剂盒(化学发光法)及制备方法以及应用它来测定甲状腺素的方法。

背景技术

[0002] 甲状腺素又称四碘甲腺原氨酸(T4)是由甲状腺主动捕获无机碘经有机化后与酪氨酸结合而成的,分子量为777,循环血中 $T_{1/2}$ 为6~7天。在外周血中99.96%与结合蛋白结合。T4在外周组织中经5-脱碘酶和5'-脱碘酶作用分别形成反T3和T3。甲状腺素对身体机能重要的作用,故测定甲状腺素能够反映甲状腺功能是否正常。增高多见于甲状腺机能亢进症,降低多见于甲状腺机能减退症。

[0003] 甲状腺素(T4)含量过高(甲亢)或过低(甲减)是一种较常见的疾病,长期以来,临床医生是根据酶免疫分析或放射免疫分析检测结果来判断甲亢或甲减患者的病情。但是这两种方法分别有其缺点,如放射免疫分析操作复杂,时间长,有放射性污染问题,而酶免疫分析灵敏度低,检测范围窄等。化学发光免疫分析在酶免疫分析基础上结合了化学发光技术使得检测灵敏度和检测范围得到大幅度提高。

[0004] 化学发光免疫分析(Chemiluminescence Immunoassay, CLIA)于1977年问世,1985年第一代化学发光免疫试剂盒研制成功并投放市场。进入九十年代,化学发光免疫分析试剂盒的研制和自动化测量仪的生产取得了突破性进展,从而进入高速发展阶段。化学发光免疫分析是继荧光、放射性同位素和酶免疫分析之后发展起来的一项新的免疫分析技术,根据大量的实验结果及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性及发展前景来看,在非放射性标记分析技术中化学发光免疫分析处于领先地位,代表了当今世界发展的方向和潮流,它不仅具有免疫反应的特异性,而且具有化学发光反应的高灵敏性(检测限度可达 $10^{-15} \sim 10^{-18}$ mol/L)。化学发光免疫分析技术具有灵敏度高、快速、准确、重复性好、效期长并安全无毒无污染等优点,成为取代放射免疫分析和酶免疫分析技术的首选。

[0005] 化学发光标记免疫分析是用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法。常用于标记的化学发光物质有吖啶酯类化合物-acridinium ester(AE),是有效的发光标记物,其通过启动发光试剂($\text{NaOH-H}_2\text{O}_2$)作用而发光,强烈的直接发光在一秒钟内完成,为快速的闪烁发光。还有以三联吡啶钌($\text{Ru}(\text{byp})_3^{2+}$)标记物为发光底物,用另一反应物三丙胺(TPA)来激发光反应,在电极表面反复进行氧化还原反应从而产生高效稳定连续发光的电化学发光免疫分析。这些免疫分析方法都需要高精度复杂的自动测量仪器,目前在国内还难以实现。

[0006] 化学发光酶免疫分析是以酶标记生物活性物质(如酶标记的抗原或抗体)进行免疫反应,免疫反应复合物上的酶再作用于发光底物,在信号试剂作用下发光,用发光信号测定仪进行发光测定。目前常用的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP),它们有各自的发光底物。HRP常用的底物为鲁米诺(3-氨基邻苯二甲酰肼, luminol)或其衍生物如异鲁米诺(4-氨基邻苯二甲酰肼)等,鲁米诺的氧化反应在碱性缓冲液中进行,在过氧

化物酶及活性氧的存在下,生成激发态中间体,当其回到基态时发光,其波长为 425nm。发光强度依赖于酶免疫反应物中酶的浓度。如果不使用增强剂,鲁米诺体系的发光基本上为闪光型且信号弱,通过加入某些特殊的增强剂可增强发光的信号并可大大延长发光的持续时间。

[0007] 碱性磷酸酶体系相对于辣根过氧化物酶具有稳定,发光持续时间长的优点,因此,国外生产的自动化学发光酶免疫分析仪及与之相匹配的试剂盒多数采用了这种发光系统。但是,国外的这些自动化学光酶免疫分析仪及与之相匹配的试剂盒多采用封闭体系配合使用,价格昂贵,操作复杂,在国内不易推广。

发明内容

[0008] 为了克服上述不足,本发明提供一种采用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗原的开放式操作化学发光免疫分析系统,它简便快速,适用性广,试剂成本低并不需要昂贵的全自动化学发光测量仪,因此,在我国具有广阔的应用前景。由于采用了独创的化学发光底物液和标记方法,因此,其稳定性和各项指标都大幅提高,从实际测试看,其性能与进口试剂盒相似。

[0009] 本发明提供了一种甲状腺素 (T4) 酶促化学发光法定量测定试剂盒。本发明的试剂盒包括 T4 标准品、抗体预包被反应板、酶标记物、稀释液、20 倍浓缩洗涤液、化学发光底物液。酶标记物为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 T4 抗原。

[0010] 本发明提供了一种辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 T4 的标记方法 (生物素 - 亲和素放大系统),其包括:

[0011] 1. 生物素化 T4

[0012] (1) T4 与 BSA 的连接

[0013] 取羧基已经被甲酯化的 T4 1mg 溶于 0.2mL DMF 中成 5mg/mL 的溶液,加入 1mL 浓度为 0.5mg/mL 的 BSA (溶于 0.05M pH6.8 的 PB 中),混匀后加入 200 μ L 的戊二醛,混匀室温搅拌反应过夜。次日取出装入透析袋并对 0.05M pH9.4 的 CB 液透析 24 小时,中间换液 3 次,然后取出转入玻璃瓶中。

[0014] (2) 生物素化 T4

[0015] 取 N 羟基琥珀酰亚胺酯化的生物素溶于 0.2mL DMF 中,搅拌下逐滴加入到上 (1) 的透析液中,室温搅拌反应 1 小时后装入透析袋对 0.02M pH7.4PB 液透析过夜。

[0016] 2. HRP 标记亲和素

[0017] 取 HRP 溶于蒸馏水中,加入新鲜配制的过碘酸钠,混匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟,然后加入 160mM 乙二醇,室温放置 30 分钟。将 5mg/mL 的亲和素蒸馏水溶液加入到上述溶液中,混匀后装入透析袋对 0.05M pH9.5 的 CB 液中 4 $^{\circ}$ C 搅拌透析过夜。

[0018] 3. 生物素 - 亲和素系统放大的 T4-HRP 标记物

[0019] 将 1. 生物素化 T4 的产物和 2. HRP 标记亲和素的产物完全混合,在 37 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 1 小时后加入等体积的甘油,保存于 -20 $^{\circ}$ C。

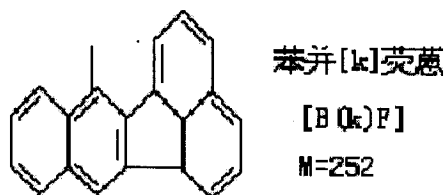
[0020] 本发明提供了一种辣根过氧化物酶 (HRP) 的化学发光底物液,其通过如下方法配制:

[0021] A 液:在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入 Luminol、Tween20 以及苯并荧蒽 (结构如下图所示),混合均匀。

[0022] B液：在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸，配制成 0.1M pH4.6 的柠檬酸缓冲液，在此溶液中加入 30%过氧化氢溶液。

[0023] 使用方法：使用前将 A 液与 B 液按 1 : 1 比例混合后使用。

[0024]



[0025] 本发明还提供一种甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法) 的制备方法, 该方法包括下列步骤:

[0026] (1) T4 标准品制备

[0027] 取一定量的 T4 原料溶解于 DMF 中, 然后以人去激素血清将 T4 原料稀释成一系列浓度。即可作为标准品使用。

[0028] (2) 酶标记物的制备

[0029] 采用前述的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 T4 的标记方法。

[0030] (3) 酶标记物稀释液的制备

[0031] 以 0.1M pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液为稀释液, 加入 0.2% BSA 以及一定量的阻断剂。

[0032] (4) 包被抗体成为预包被反应板

[0033] 以 0.06M PH4.8 的柠檬酸缓冲液为稀释液将羊抗 T4 多抗稀释至一定浓度, 每个微孔加 100 微升, 4°C 静置过夜。次日用含 1% BSA 的 PH 7.4, 0.02M 的 PB 液封闭未结合位点, 37°C 1 小时后拍干, 真空包装。

[0034] (5) 分装试剂盒其余各种组份, 按试剂盒需要量分装在小瓶中。

[0035] (6) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格。

[0036] (7) 组装成为成品。

[0037] 本发明同时提供了一种使用本发明甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法) 的检测方法, 其步骤为:

[0038] (1) 自 4°C 冰箱中取出试剂盒, 室温平衡 15 分钟。

[0039] (2) 取出包被板条, 插入板架上。

[0040] (3) 在反应孔中分别加一定量的各浓度标准品和样本, 每次实验设空白 1 孔, 然后除空白孔外各孔均加入相同体积的酶标记物, 用微量震荡器充分振荡混匀, 37°C 温育 1 小时。

[0041] (4) 甩去反应液, 每孔加满稀释后的洗涤液, 洗板 5 次, 最后在干净的吸水纸上扣干。

[0042] (5) 各孔均加入相同体积的化学发光底物液, 用微量震荡器充分振荡混合均匀, 室温避光反应。

[0043] (6) 在发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU)。

[0044] (7) 以校准品浓度和 RLU 值绘制标准曲线, 以各待测样本的 RLU 值在标准曲线上查出该样本的 T4 浓度。

[0045] 对本发明的试剂盒进行了一系列的测试检验,具体如下:

[0046] 一、甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法) 的具体操作如下:

[0047] (1) 取出已包被条孔,插入支架上。

[0048] (2) 反应孔中分别加各浓度标准品或待检样本每孔 25 μ l,再加入稀释好的酶标记物液 100 μ l/孔,置 37 $^{\circ}$ C 中反应 1 小时。

[0049] (3) 甩去反应孔内的液体,然后用洗涤液洗 5 次,每孔中加满洗涤液后停留 30 秒钟,甩去洗涤液后在吸水纸上拍干。

[0050] (4) 各孔加入化学发光底物液 50 μ l。在暗处放置 10 分钟后放入发光检测仪进行检测。

[0051] (5) 以标准品浓度的对数值为横坐标,以标准品的发光值做 Logit 变换值为纵坐标,用各待测样本的发光值在标准曲线上查出该样本的 T4 浓度。其中 $\text{Logit} = \ln[(B/B_0)/(1-B/B_0)]$ 。

[0052] 二、甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法) 的方法学鉴定

[0053] 用中国药品生物制品检定所提供的标准品和质控品进行检定,结果见下表 1:

[0054] 表 1 检定实验结果

[0055]

检验项目	标准规定	检验结果
批内变异	$\leq 15\%$ (n = 10)	$\leq 10\%$ (n = 10)
批间变异	$\leq 20\%$ (n = 10)	$\leq 20\%$ (n = 10)
回收试验	90% -110%	90% -110%
稀释试验	$R \geq 0.9900$	$R \geq 0.9900$
灵敏度		4.50ng/ml
与 8ng/ml T3 交叉反应 与 160ng/ml rT3 交叉反应		$\leq 1.50\text{ng/ml}$ $\leq 4.50\text{ng/ml}$
质控血清测定值		
QC-L	32.0-56.0ng/mL	45.7ng/ml
QC-M	59.0-99.0ng/mL	79.2ng/ml
QC-H	107.0-177.0ng/mL	146.8ng/ml
稳定性	37 $^{\circ}$ C 放置 3 天	符合标准

[0056] 结果说明“甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法)”的特异性、精密型、灵敏度和稳定性是良好的、合格的。

[0057] 三、甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法) 标准曲线的绘制

[0058] 用去激素血清配制成浓度为 0、20、40、80、160、320ng/ml 共 6 个标准点。以标准品浓度的对数值为横坐标,以标准品的发光值做 Logit 变换值为纵坐标,绘制成 T4 标准曲线。

[0059] 四、正常人 T4 含量的确定

[0060] 随机检测 284 例正常人血清样品,它们的浓度平均值 (X) = 82.43ng/ml,标准差 (SD) = 18.60。所以正常人血清中 T4 的含量范围为 $X \pm 2SD$,即为 45.23-119.63ng/ml。

[0061] 本发明甲状腺素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法) 的临床应用及与进口 MONOBIND 试剂盒的比较

[0062] 使用本发明的“甲状腺激素 (T4) 定量测定试剂盒 (化学发光法)”和进口 T4 (MONOBIND) 试剂盒同时检测血清样本 66 份,以比较两种试剂盒之间的相关性,实验结果见图 2 及表 2。

[0063] 表 2 两种试剂盒的结果比较

	血样数	相关系数 R	备注
[0064]	66	0.9668	非常显著相关

[0065] 比较结果表明两种方法非常显著相关,说明两种方法的检测结果较为一致。

[0066] 本发明的试剂盒能非常专一地定量检测患者血清 T4 的含量。它具有简便、灵敏和稳定等特点。且本试剂盒操作简便迅速,采用一步法可在短时间内获得实验结果,比放射免疫分析检测法快速;经临床试用结果表明本试剂盒与进口 MONOBIND 试剂盒具有很好的符合性,因而本试剂盒对甲状腺功能亢进 (甲亢) 和减退 (甲减) 的诊断和疗效评价都具有十分重要的参考价值。使用本试剂盒的整个实验过程中无需贵重仪器设备,试剂便宜且收费低廉,能适用于各级医院及临床测试中心,因而具有简便、经济、灵敏、重复性好的优点。

附图说明

[0067] 图 1 本发明试剂盒的标准曲线图;

[0068] 图 2 本试剂盒与进口 T4 试剂盒测定结果比较图,其中纵坐标 Y 为本试剂盒测得的血样中 T4 含量;横坐标 X 为进口 MONOBIND 试剂盒测得的血样中 T4 含量;两种方法相关系数 (r) = 0.9668;直线方程 $Y = 1.0167X - 2.7992$ 。

具体实施方式

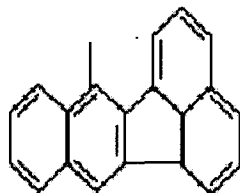
[0069] 1. 化学发光底物液的制备:

[0070] A 液:在 100ml 双蒸水中加入 1.21g Tris 和 295 μ L 浓 HCl 配成 0.1M pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入 0.5g 的 Luminol、20 μ L 的 Tween20 以及 0.1g 苯并荧蒽 (结构如下图所示),混合均匀。

[0071] B 液:在 100ml 双蒸水中加入柠檬酸三钠 0.73g 和柠檬酸 0.44g,配制成 0.1M pH4.6 的柠檬酸缓冲液,在此溶液中加入 100 μ L 30%过氧化氢溶液。

[0072] 使用方法:使用前将 A 液与 B 液按 1:1 比例混合后使用。

[0073]



苯并[k]荧蒹

[B(a)F]

M=252

[0074] 2. 酶标记物的制备：

[0075] 2.1 生物素化 T4

[0076] (1) T4 与 BSA 的连接

[0077] 取羧基已经被甲酯化的 T4 1mg 溶于 0.2mL DMF 中成 5mg/mL 的溶液，加入 1mL 浓度为 0.5mg/mL 的 BSA (溶于 0.05M pH6.8 的 PB 中)，混匀后加入 200 μ L 的戊二醛，混匀室温搅拌反应过夜。次日取出装入透析袋并对 0.05M pH9.4 的 CB 液透析 24 小时，中间换液 3 次，然后取出转入玻璃瓶中。

[0078] (2) 生物素化 T4

[0079] 取 1mg 的 N 羟基琥珀酰亚胺酯化的生物素溶于 0.2mL DMF 中，搅拌下逐滴加入到上 (1) 的透析液中，室温搅拌反应 1 小时后装入透析袋对 0.02M pH7.4PB 液透析过夜。

[0080] 2.2 HRP 标记亲和素

[0081] 取 5mg HRP 溶于 0.5mL 蒸馏水中，加入新鲜配制的 60mM 过碘酸钠 0.5mL，混匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟，然后加入 160mM 乙二醇 0.5mL，室温放置 30 分钟。将 5mg/mL 的亲和素蒸馏水溶液 1mL 加入到上述溶液中，混匀后装入透析袋对 0.05M pH9.5 的 CB 液中 4 $^{\circ}$ C 搅拌透析过夜。

[0082] 2.3 生物素 - 亲和素系统放大的 T4-HRP 标记物

[0083] 将 3.1. 生物素化 T4 的产物和 2. HRP 标记亲和素的产物完全混合，在 37 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 1 小时后加入等体积的甘油，保存于 -20 $^{\circ}$ C。

[0084] 3. 酶标稀释液：

[0085] 以 0.1M pH7.5Tris-HCl 的缓冲液为稀释液，加入 0.2% BSA，以及一定量的阻断剂。

[0086] 4. 酶标记物浓度的选定：

[0087] 用前述 3 标记方法制备的酶标记物，选择不同浓度的酶标记物测定标准品的发光强度，考察信噪比。选择信噪比高的酶标记物的浓度。若都符合要求，则选择较低浓度的酶标记物以减少其使用量，从而降低成本。

[0088] 5. T4 标准品的制备：

[0089] 取 1mg 的 T4 原料溶解于 1mL 的 DMF 中，配成 1mg/mL 的溶液，然后以人去激素血清将 T4 原料稀释成浓度为 0、20、40、80、160、320ng/mL 的标准品。

[0090] 采用前述的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 T4 的标记方法。

[0091] 6. 预包被抗体板的制备：

[0092] (1) 包被

[0093] 以 0.06M pH4.8 的柠檬酸缓冲液为稀释液将羊抗 T4 多抗稀释至一定浓度，每个微孔加 100 微升，4 $^{\circ}$ C 静置过夜。

[0094] (2) 封闭

[0095] 次日用含 1% BSA 的 PH 7.4, 0.02M P.B 液封闭未结合位点。37 $^{\circ}$ C 1 小时后拍干，

真空包装。

[0096] 7. 洗涤液的配制：

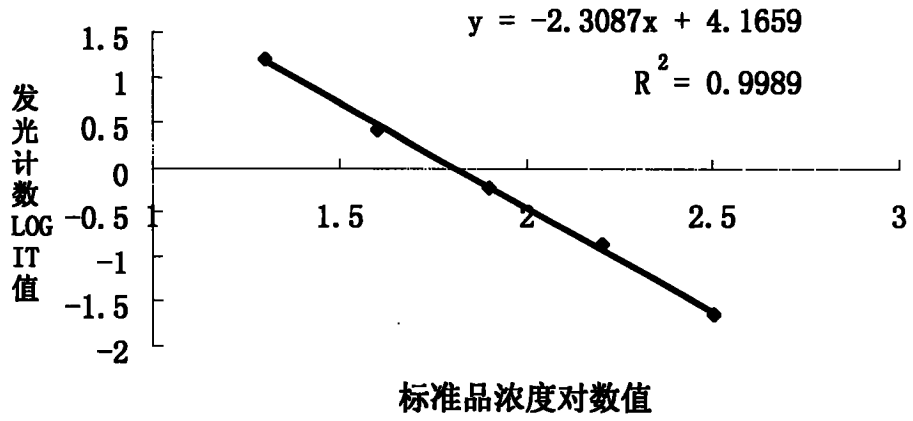
[0097] 浓缩洗涤液配方：

[0098]

试剂	终浓度	1000ml 用量
Tris	198mM	24g
HCl		15ml
NaCl	2.74M	160g
KCl	54mM	4g
PH	8.0—8.5	

[0099] 8. 半成品及成品的组成

[0100] 上述（一）→（十）步骤所得产品装入小瓶及尖底离心管中，即为半成品。抽出三份经过特异性、稳定性、灵敏度及精密度检定合格才能组装成定量 T4 试剂盒。组成试剂盒后还需抽出三份同半成品一样经过检定合格才能出售。



T4-标准曲线

图 1

与进口MONOBIND试剂盒比较

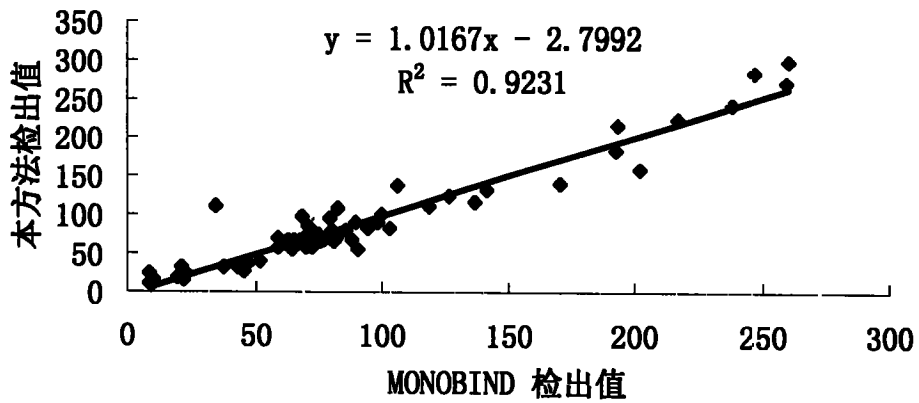
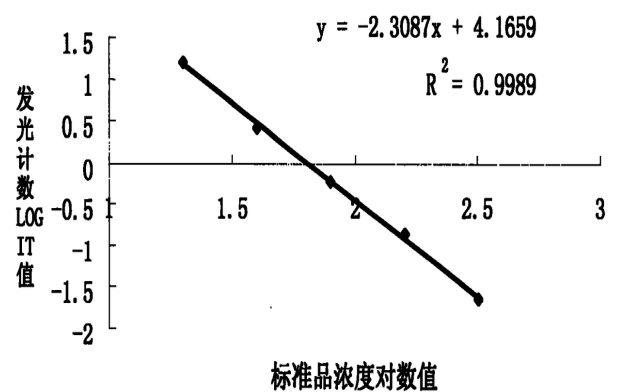


图 2

专利名称(译)	甲状腺素化学发光免疫分析定量测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN101201354B	公开(公告)日	2011-11-02
申请号	CN200610165848.5	申请日	2006-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
[标]发明人	林斯 胡国茂 应希堂		
发明人	林斯 胡国茂 应希堂		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/76		
其他公开文献	CN101201354A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫诊断技术领域，本发明公开了一种甲状腺素(T4)酶促化学发光定量测定试剂盒，本发明的试剂盒由T4标准品，抗体预包被反应板，辣根过氧化酶标记物，稀释液，洗涤液和化学发光底物液组成。本发明试剂盒具有快速，简便，灵敏，价廉，重复性好的优点，是甲状腺功能亢进(甲亢)和减退(甲减)的诊断和疗效评价的重要指标，有较高的临床使用价值，本发明提供了这种试剂盒的制备方法。



T4-标准曲线