(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101949941 A
(43) 申请公布日 2011.01.19

(21) 申请号 201010242998.8

(22) 申请日 2010.08.03

(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 靳增明 陈晓玲 付光宇 渠海 马建军 项立红 吴学炜 苗拥军

(74) 专利代理机构 郑州异开专利事务所（普通合伙） 41114
代理人 王霞

(51) Int.Cl.
G01N 33/535(2006.01)
G01N 33/78(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

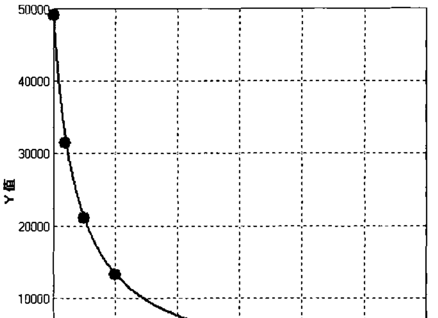
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，包括偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液、甲状腺素系列校准品、辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液、发光底物 A 液和发光底物 B 液以及浓缩洗液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法。本发明的优点在于采用磁微粒化学发光法结合了磁微粒固相偶联技术，使其检测速度快、稳定；在没有磁场存在时，磁性微粒悬浮在液体中，抗原抗体反应类似于均相反应；磁性微粒在外加磁场的作用下可方便地分离，洗涤快速，明显提高检测的精密性、稳定性。本试剂盒组成简单，操作方便，结果稳定可靠，相对市面上同类试剂盒，反应时间仅为其 1/8 ～ 1/4 的时间，且在试剂组份简化，操作易用性上有所超越。



1. 一种以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，其特征在于：它包括偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液、甲状腺素系列校准品、辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液、发光底物 A 液和发光底物 B 液以及浓缩洗液。

2. 根据权利要求 1 所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，其特征在于：所述抗甲状腺素抗体为鼠抗甲状腺素单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，其特征在于：所述的甲状腺素系列校准品以去甲状腺素血清或分析缓冲液为校准品基质，加入甲状腺素纯品配制而成。

4. 根据权利要求 1 所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，其特征在于：所述辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液是将甲状腺素与辣根过氧化物酶共价偶联在一起，制备成辣根过氧化物酶标记的甲状腺素，使用时用缓冲液稀释至工作浓度即可。

5. 根据权利要求 1 所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，其特征在于：所述发光底物 A 液由 luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、pH 9.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 0.2M 组成；所述发光底物 B 液由氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温 -200.8％ v/v、二乙烯三胺五乙酸 0.5mM、维生素 C 0.12mM、pH 6.5 的乙酸 - 乙酸盐缓冲液 0.2M 组成。

6. 根据权利要求 1 所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，其特征在于：所述的浓缩洗液由 0.1M 磷酸盐缓冲液和 1％ Tween-20 组成。

7. 根据权利要求 1 所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒的制备方法，其特征在于：它包括下述步骤：

第一步，偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液的制备

取磁性微粒，用 0.02M PH7.6 磷酸盐缓冲溶液清洗备用；用 0.05M 醋酸 - 醋酸钠缓冲液分别配制成 5mg/ml 浓度的碳二亚胺溶液和琥珀酰亚胺溶液，然后按照每 3mg 磁微粒加入 50ul 碳二亚胺溶液和 50ul 琥珀酰亚胺溶液的比例加入上述配制的碳二亚胺溶液和琥珀酰亚胺溶液，室温振荡反应；用 0.02M PH7.6 磷酸盐缓冲溶液清洗，去除多余的碳二亚胺和琥珀酰亚胺；按照 100ul/3mg 磁微粒的比例加入 0.02M PH7.6 磷酸盐缓冲溶液，再按比例 45ug/3mg 磁微粒的比例加入鼠抗甲状腺素单克隆抗体，室温振荡反应；用 pH 为 7.4-7.6，含 1％牛血清白蛋白 W/V，0.01％ -0.02％的叠氮钠的磷酸盐缓冲液洗涤，室温振荡；用 pH 为 7.4-7.6，含 1％牛血清白蛋白，0.01％ -0.02％的叠氮钠的磷酸盐缓冲液将偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液稀释至 0.5-1mg/ml 的工作液；

第二步，甲状腺素系列校准品的制备

用去甲状腺素人血清将甲状腺素高值抗原溶液稀释成校准品，配制后的系列浓度为 0ug/dl、1ug/dl、2.5ug/dl、5ug/dl、15ug/dl、30ug/dl；

第三步，辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液的制备

采用化学连接剂碳二亚胺将甲状腺素与辣根过氧化物酶共价偶联在一起，制备成辣根过氧化物酶标记的甲状腺素，使用时用缓冲液稀释至工作浓度即可；

第四步，发光底物 A 液和发光底物 B 液的配制

发光底物 A 液由 luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、pH 9.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 0.2M 配制而成；

发光底物 B 液由氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温 -200.8％ v/v、二乙烯三胺五乙酸 0.5mM、

维生素 C 0.12mM、pH 6.5 的乙酸 - 乙酸盐缓冲液 0.2M 配制而成；

第五步，浓缩洗液的配制

浓缩洗液由 0.1M 磷酸盐缓冲液，1% Tween-20 配制而成。

以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床免疫检测技术，尤其是涉及一种以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，本发明还涉及该试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 甲状腺素(T4)是由甲状腺滤泡上皮细胞合成和分泌的甲状腺激素，其结构由一个酪氨酸残基和一个酚环组成，与T3的区别仅在于多一个碘原子。正常人平均每日的T4分泌量为90±9μg，约为甲状腺内贮存量的1％。T4进入血液循环后约99.96％与结合蛋白结合，其中约60％与甲状腺结合球蛋白(TBG)结合，30％与甲状腺结合前白蛋白(TBPA)结合，其余与白蛋白结合。结合T4与游离T4之间呈可逆的平衡状态。结合状态的甲状腺素不能发挥其生理功能，而只有游离T4方能进入靶细胞与T4受体结合并发挥其生理功能。甲状腺外T4的循环总量为900μg，半衰期为7天。T4是具有生物活性的甲状腺激素，能促进糖、脂肪、蛋白质代谢，产生能量和热，并促进生长发育。近年来有人认为T4是T3的前激素，是其储备形式。血清中总的T4称为总T4(TT4)，游离部分的T4称为游离T4(FT4)。

[0003] 甲状腺疾病会引起血清TT4的变化。甲状腺机能亢进时，包括原发性，二发性，三发性甲亢，以及高功能腺瘤、自主功能结节、T4型甲亢等，均有甲状腺合成和分泌T4增多，导致血清TT4增高。而亚急性甲状腺炎和慢性淋巴细胞性甲状腺炎的早期，因甲状腺滤泡受破坏，T4溢出，使血中TT4一过性升高产生暂时性的轻度甲亢。大量服用甲状腺素，或误食动物甲状腺，致使血中TT4增高，可产生医源性或中毒性甲亢，甚至甲亢危象。当靶组织对甲状腺激素不敏感时，虽然机体无甲亢症状，但外周血T4增高；若是下丘脑，垂体对甲状腺激素不敏感，则外周血T4增高，并有甲亢症状，且促甲状腺激素(TSH)亦增高。

[0004] 甲状腺机能减退时，无论是原发，继发或其它原因，TT4均减低。且T4的降低先于T3的降低，因此，测定T4(配合TSH的测定)能较好地及早发现甲低病人。

[0005] 正确检测总甲状腺素水平，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，临床检测总甲状腺素的试剂多采用放射免疫分析法和酶联免疫分析法，这两种方法中，前者操作繁琐、耗时，试剂存在放射性污染，且因放射性元素天然存在的半衰期，试剂有效期一般较短，仅能维持1-3个月；后者线性范围较窄，灵敏度较低。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，该试剂盒反应快速，检测灵敏度高且准确；本发明还涉及该试剂盒的制备方法。

[0007] 为实现上述目的，本发明可采取下述技术方案：

[0008] 本发明所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，它包括偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液、甲状腺素系列校准品、辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶

液、发光底物A液和发光底物B液以及浓缩洗液。

[0009] 所述抗甲状腺素抗体为鼠抗甲状腺素单克隆抗体。

[0010] 所述的甲状腺素系列校准品以去甲状腺素血清或分析缓冲液为校准品基质，加入甲状腺素纯品配制而成。

[0011] 所述辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液是将甲状腺素与辣根过氧化物酶共价偶联在一起，制备成辣根过氧化物酶标记的甲状腺素，使用时用缓冲液稀释至工作浓度即可。

[0012] 所述发光底物A液由luminol 0.15mM、羟基香豆素0.59mM、没食子酸0.35mM、pH 9.4的Tris-Hcl缓冲液0.2M组成；所述发光底物B液由氨基酸氧化酶0.85mM、吐温-200.8% v/v、二乙烯三胺五乙酸0.5mM、维生素C 0.12mM、pH 6.5的乙酸-乙酸盐缓冲液0.2M组成。

[0013] 所述的浓缩洗液由0.1M磷酸盐缓冲液和1% Tween-20组成。

[0014] 本发明所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒的制备方法，包括下述步骤：

[0015] 第一步，偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液的制备

[0016] 取磁性微粒，用0.02M PH7.6磷酸盐缓冲溶液清洗备用；用0.05M醋酸-醋酸钠缓冲液分别配制成5mg/ml浓度的碳二亚胺溶液和琥珀酰亚胺溶液，然后按照每3mg磁微粒加入50ul碳二亚胺溶液和50ul琥珀酰亚胺溶液的比例加入上述配制的碳二亚胺溶液和琥珀酰亚胺溶液，室温振荡反应；用0.02M PH7.6磷酸盐缓冲溶液清洗，去除多余的碳二亚胺和琥珀酰亚胺；按照100ul/3mg磁微粒的比例加入0.02M PH7.6磷酸盐缓冲溶液，再按比例45ug/3mg磁微粒的比例加入鼠抗甲状腺素单克隆抗体，室温振荡反应；用pH为7.4-7.6，含1%牛血清白蛋白，0.01%-0.02%的叠氮钠的磷酸盐缓冲液洗涤，室温振荡；用pH为7.4-7.6，含1%牛血清白蛋白，0.01%-0.02%的叠氮钠的磷酸盐缓冲液将偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液稀释至0.5-1mg/ml的工作液；

[0017] 第二步，甲状腺素系列校准品的制备

[0018] 用去甲状腺素人血清将甲状腺素高值抗原溶液稀释成校准品，配制后的系列浓度为0ug/dl、1ug/dl、2.5ug/dl、5ug/dl、15ug/dl、30ug/dl；

[0019] 第三步，辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液的制备

[0020] 采用化学连接剂碳二亚胺将甲状腺素与辣根过氧化物酶共价偶联在一起，制备成辣根过氧化物酶标记的甲状腺素，使用时用缓冲液稀释至工作浓度即可；

[0021] 第四步，发光底物A液和发光底物B液的配制

[0022] 发光底物A液由luminol 0.15mM、羟基香豆素0.59mM、没食子酸0.35mM、pH 9.4的Tris-Hcl缓冲液0.2M配制而成；

[0023] 发光底物B液由氨基酸氧化酶0.85mM、吐温-200.8% v/v、二乙烯三胺五乙酸0.5mM、维生素C 0.12mM、pH 6.5的乙酸-乙酸盐缓冲液0.2M配制而成；

[0024] 第五步，浓缩洗液的配制

[0025] 浓缩洗液由0.1M磷酸盐缓冲液，1% Tween-20配制而成。

[0026] 本发明的优点在于采用磁微粒化学发光法结合了磁微粒固相偶联技术，在酶联免疫分析的基础上结合化学发光信号放大技术，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出光量子产额，该光量子产额与样品中的待测物质的量成比例关系，由此可以建立校准曲线并计算出样品中待测物质的含量。

[0027] 本发明采用的磁微粒固相偶联技术，由于磁性微粒是由超顺磁性纳米粒子（包括磁性金属如 Fe、Co、Ni 或其金属氧化物等）与高分子或无机材料等形成的一种胶态液体复合物，可通过表面的功能基团进行各种表面的功能化修饰；在外加磁场的作用下通过吸附、清洗、解吸等操作快速移动和分离，具有磁性分离简便、亲和吸附高特异性以及巨大表面积等优点。本发明检测试剂盒反应时间仅需 15 分钟，分析总耗时不超过 30 分钟，方便快速，既适用于半自动大通量检测，也适用于全自动检测系统使用。

[0028] 实验表明，使用本试剂盒检测总甲状腺素具有如下优点：

[0029] 1. 检测速度快，稳定、无放射性污染等，在没有磁场存在的情况下，磁性微粒悬浮在液体中，使得抗原抗体反应类似于均相反应；磁性微粒在外加磁场的作用下可方便地分离，洗涤快速。

[0030] 2. 磁性微粒做为免疫学载体，可明显提高检测的精密性、稳定性。磁性微粒的粒径达到纳米级，使得包被固相接近于液相状态，相对微孔板式，减少了包被，封闭等多个影响精密性的操作步骤，分析精密性和稳定性得到极大的提升。

[0031] 3. 本试剂盒组成简单，操作方便，结果稳定可靠，相对市面上的酶联免疫试剂盒和板式化学发光试剂盒，反应时间仅为其 1/8 ～ 1/4 的时间，但试剂性能和操作简便性却不输于这些试剂盒，而且在试剂组份简化，操作易用性上有所超越。

附图说明

[0032] 图 1 是本发明试剂盒中的校准品曲线图。

具体实施方式

[0033] 本发明所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，它包括偶联有鼠抗甲状腺素单克隆抗体的磁微粒混悬液；以去甲状腺素血清或分析缓冲液为校准品基质，加入甲状腺素纯品配制而成的甲状腺素系列校准品；将甲状腺素与辣根过氧化物酶共价偶联在一起，制备成辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液，使用时用缓冲液稀释至工作浓度即可；由 luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、pH 9.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 0.2M 组成的发光底物 A 液和由氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温 -200.8% v/v、二乙烯三胺五乙酸 0.5mM、维生素 C 0.12mM、pH 6.5 的乙酸 - 乙酸盐缓冲液 0.2M 组成的发光底物 B 液以及由 0.1M 磷酸盐缓冲液和 1% Tween-20 组成的浓缩洗液。

[0034] 本发明所述的以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒的制备方法，包括下述步骤：

[0035] 第一步，偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液的制备

[0036] 取磁性微粒，用 0.02M PH7.6 磷酸盐缓冲溶液清洗 3 ～ 5 次备用；用 0.05M 醋酸 - 醋酸钠缓冲液分别配制成 5mg/ml 浓度的碳二亚胺 (EDC) 溶液和琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液，然后按照每 3mg 磁微粒加入 50ul EDC 溶液和 50ul NHS 溶液的比例加入上述配制的 EDC

溶液和 NHS 溶液，室温振荡反应 15-60 分钟；用 0.02M PH7.6 磷酸盐缓冲溶液清洗两次，去除多余的 EDC 和 NHS；按照 100ul/3mg 磁微粒的比例加入 0.02M PH7.6 磷酸盐缓冲溶液，再按比例 45ug/3mg 磁微粒的比例加入鼠抗甲状腺素单克隆抗体，室温振荡反应 1-3 小时；用 pH 为 7.4-7.6，含 1％牛血清白蛋白 (W/V)，0.01％ -0.02％的叠氮钠的磷酸盐缓冲液洗涤，室温振荡；用 pH 为 7.4-7.6，含 1％牛血清白蛋白 (W/V)，0.01％ -0.02％的叠氮钠的磷酸盐缓冲液将偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液稀释至 0.5-1mg/ml 的工作液；

[0037] 第二步，甲状腺素系列校准品的制备

[0038] 用去甲状腺素人血清将甲状腺素高值抗原溶液稀释成校准品，配制后的系列浓度为 0ug/dl、1ug/dl、2.5ug/dl、5ug/dl、15ug/dl、30ug/dl；

[0039] 第三步，辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液的制备

[0040] 采用化学连接剂 EDC 将甲状腺素与辣根过氧化物酶共价偶联在一起，制备成辣根过氧化物酶标记的甲状腺素，使用时用缓冲液稀释至工作浓度即可，具体制备方法如下：

[0041] 将 5mg 甲状腺素溶于 1ml N，N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中，加入 0.5ml 20mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液，然后加入 1.5mg 碳二亚胺，随后将 0.5ml 50mg/ml 碳二亚胺溶液（溶于 0.05M 醋酸 - 醋酸钠溶液）分 3 次加入，间隔 1 小时，反应于室温振荡条件下，最后一次加入碳二亚胺溶液后继续反应 2 小时；在 0.05M PH7.4 磷酸盐缓冲液中充分透析，透析完毕等比例加入甘油，储存于 -20℃备用；辣根过氧化酶标记的甲状腺素工作溶液是用含 1％牛血清白蛋白和 0.05-0.25％阻断剂的 0.05M 磷酸盐缓冲液稀释配制而成，稀释比例为 1 ∶ 5000-1 ∶ 20000；

[0042] 第四步，发光底物 A 液和发光底物 B 液的配制

[0043] 发光底物 A 液由 luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、pH 9.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 0.2M 配制而成；

[0044] 发光底物 B 液由氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温 -200.8％ v/v、二乙烯三胺五乙酸 0.5mM、维生素 C 0.12mM、pH 6.5 的乙酸 - 乙酸盐缓冲液 0.2M 配制而成；

[0045] 第五步，浓缩洗液的配制

[0046] 浓缩洗液由 0.1M 磷酸盐缓冲液，1％ Tween-20 配制而成。

[0047] 本发明试剂盒的使用操作程序如下：

[0048] 实验准备：

[0049] 1. 取 1 瓶浓缩洗液按标签上标识的稀释要求稀释备用。

[0050] 2. 将恒温箱或恒温水浴锅温度调至 37℃，待温度稳定后使用。

[0051] 3. 将磁微粒混悬液充分混匀至无肉眼可见沉淀。

[0052] 实验操作：

[0053] 1. 取出一定量的反应容器，编号。前 6 孔依次加入 50μl 校准品，其余孔依次加入 50μl 样本。

[0054] 2. 每孔分别加入酶结合物 100μl。

[0055] 3. 摇匀磁微粒混悬液，每孔分别加入 20μl。

[0056] 4. 将反应容器内溶液混合均匀，37℃温育 15 分钟。

[0057] 5. 使用磁分离及洗涤设备，将反应容器中磁微粒用洗液洗涤 5 次。

[0058] 6. 将洗涤后的反应容器充分振荡使磁微粒散开。

[0059]　7. 每孔加入发光底物 A 和发光底物 B 各 50μl，混匀后避光室温反应 5 分钟。

[0060]　8. 化学发光检测仪检测发光强度。

[0061]　经大量实验证明，本发明试剂盒在用于总甲状腺素测定时的性能指标可达到如下状态：

[0062]　分析灵敏度——最低检出量低于 0.5ug/dl；

[0063]　校准曲线范围——0-30ug/dl，如图 1 所示（四参数 Logistic 曲线拟合 R ＝ 0.99996）。

[0064]　精密性——分析内精密度平均 3.27％ (n ＝ 10)，分析间精密度 5.57％ (n ＝ 3)，远高于国家标准，表明本试剂盒在检测实验中具有良好的重复性；

[0065]　准确性——将已知 T4 浓度血清用去甲状腺素血清倍比稀释后的回收率介于 90％ -110％之间。

[0066]　稳定性——将试剂盒放置于 37℃环境下考查加速稳定性 14 天，试剂盒性能无明显改变。

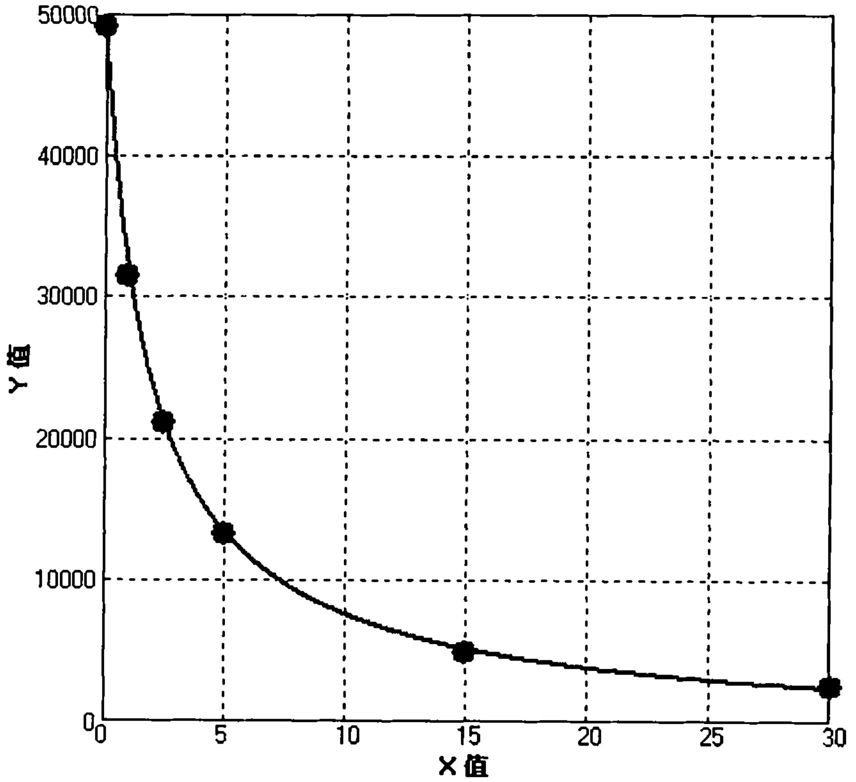
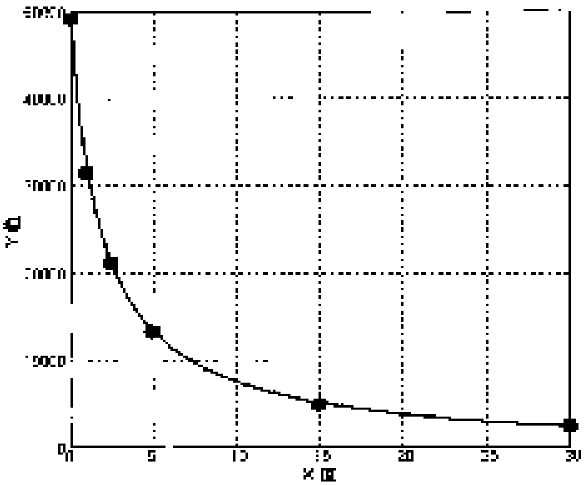


图 1

专利名称(译)	以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101949941A	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010242998.8	申请日	2010-08-03
[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	靳增明 陈晓玲 付光宇 渠海 马建军 项立红 吴学炜 苗拥军		
发明人	靳增明 陈晓玲 付光宇 渠海 马建军 项立红 吴学炜 苗拥军		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种以磁性微粒为固相载体检测总甲状腺素的试剂盒，包括偶联有抗甲状腺素抗体的磁微粒混悬液、甲状腺素系列校准品、辣根过氧化物酶标记的甲状腺素溶液、发光底物A液和发光底物B液以及浓缩洗液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法。本发明的优点在于采用磁微粒化学发光法结合了磁微粒固相偶联技术，使其检测速度快、稳定；在没有磁场存在时，磁性微粒悬浮在液体中，抗原抗体反应类似于均相反应；磁性微粒在外加磁场的作用下可方便地分离，洗涤快速，明显提高检测的精密性、稳定性。本试剂盒组成简单，操作方便，结果稳定可靠，相对市面上同类试剂盒，反应时间仅为其1/8～1/4的时间，且在试剂组份简化，操作易用性上有所超越。