

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810000592.1

[51] Int. Cl.
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月16日

[11] 公开号 CN 101221170A

[22] 申请日 2008.1.23
[21] 申请号 200810000592.1
[71] 申请人 深圳华英生物技术有限公司
地址 518057 广东省深圳市高新技术园南区
深圳清华大学研究院 C719 室
[72] 发明人 何 询 白仲虎 周鹏飞

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司
代理人 张广育 姜建成

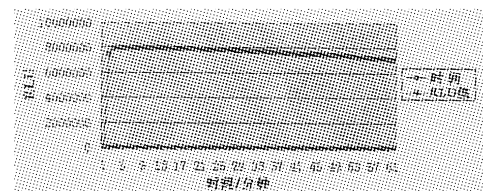
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

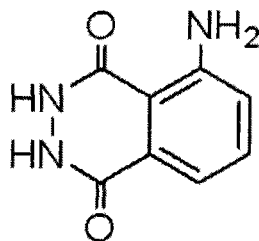
高效酶促化学发光底物系统

[57] 摘要

本发明涉及一种高效稳定的酶促化学发光底物系统。所述酶促化学发光底物系统由 A 液和 B 液两组组份构成，A 液中含化学发光底物，B 液中含有复合增强剂，在临用前将 A 液与 B 液等体积混合。其中 A 液中的化学发光底物为鲁米诺钠盐或其衍生物，B 液中的复合增强剂为 3-氯-4-羟基乙酰苯胺和四水合过硼酸钠。该底物系统具有发光信号强，起效迅速，2 分钟内可达发光平台，发光持续时间长等多种优点。另外还提供了含有该底物系统的化学发光免疫检测试剂盒。

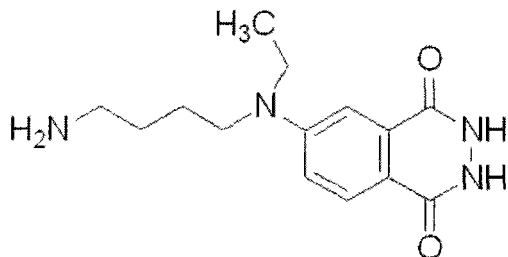


1. 一种酶促化学发光底物系统，其特征在于所述酶促化学发光底物系统由 A 液和 B 液两组组份构成，A 液中含化学发光底物，B 液中含有复合增强剂，在临用前将 A 液与 B 液等体积混合。
2. 根据权利要求 1 所述的酶促化学发光底物系统，其特征在于所述化学发光底物选自鲁米诺钠盐、氨丁基乙基异鲁米诺或氨己基乙基异鲁米诺，它们的结构式分别为：

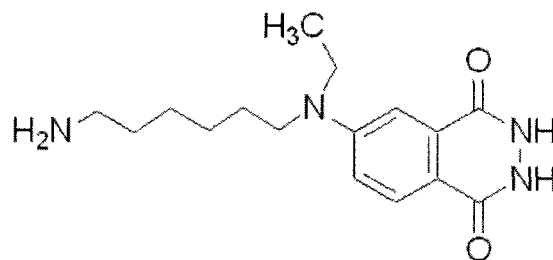


NaH

鲁米诺钠盐



氨丁基乙基异鲁米诺



氨己基乙基异鲁米诺。

3. 根据权利要求 2 所述的酶促化学发光底物系统，其特征在于所述 A 液中的化学发光底物为鲁米诺钠盐，其浓度为 0.005% - 0.09%。
4. 根据权利要求 2 所述的酶促化学发光底物系统，其特征在于所述 B 液中的复合增强剂为 3-氯-4-羟基乙酰苯胺和四水合过硼酸钠，浓度分别为 0.003% - 0.09% 和 0.002% - 0.05%。
5. 根据权利要求 4 所述的酶促化学发光底物系统，其特征在于所述 A 液和 B 液的配方如下：

A 液：

鲁米诺钠盐，浓度为 0.005% - 0.09%；

甘氨酸，浓度为 0.003% - 0.07%；

DTPA，浓度为 0.0001% - 0.07%；

二水合柠檬酸三钠，浓度为 0.025% - 0.9%；

苯甲酸钠, 浓度为 0.001% - 0.02%;
叠氮钠, 浓度为 0.002% - 0.045%;
pH 值为 8.5 的硼酸-硼酸钠缓冲液;

B 液:

3-氯-4 羟基乙酰苯胺, 浓度为 0.003% - 0.09%;
四水合过硼酸钠, 浓度为 0.002% - 0.05%;
NaCl, 浓度为 0.02 - 0.9%;
苯甲酸钠, 浓度为 0.001% - 0.02%;
叠氮钠, 浓度为 0.002% - 0.045%;
pH 值为 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠盐缓冲液。

6. 根据权利要求 5 所述的酶促化学发光底物系统, 其特征在于所述 A 液和 B 液的配方如下:

A 液:

鲁米诺钠盐, 浓度为 0.082%;
甘氨酸, 浓度为 0.016%;
DTPA, 浓度为 0.035%;
二水合柠檬酸三钠, 浓度为 0.025%;
苯甲酸钠, 浓度为 0.001%;
叠氮钠, 浓度为 0.002%;
pH8.5 的硼酸-硼酸钠缓冲液;

B 液:

3-氯-4 羟基乙酰苯胺, 浓度为 0.0716%;
四水合过硼酸钠, 浓度为 0.0052%;
NaCl, 浓度为 0.033%;
苯甲酸钠, 浓度为 0.001%;
叠氮钠, 浓度为 0.002%;
pH5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠盐缓冲液。

7. 一种化学免疫检测试剂盒, 其特征在于所述试剂盒含有根据权利要求 1 - 6 任一项所述的酶促化学发光底物系统。
8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒, 其特征在于所述试剂盒还包括检测分析试剂和酶标复合物。

高效酶促化学发光底物系统

技术领域

本发明涉及免疫检测技术领域，特别涉及可用于化学发光免疫检测的一种高效酶促化学发光底物系统。

背景技术

本世纪 70 年代中期 Arakawa 首次报道用发光信号进行酶免疫分析，利用发光的化学反应分析超微量物质，特别是用于临床免疫分析中检验超微量活性物质。目前，这一技术已从实验室的稀有技术过渡到临床医学的常规检测手段。化学发光免疫分析 (CLIA) 是将化学发光或生物发光体系与免疫反应相结合，用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术。其检测原理与放射免疫 (RIA) 和酶免疫 (EIA) 基本相似，但与放射免疫试剂 (RIA) 比较，化学发光避免了放射性核素的污染以及对操作人员的伤害，大大缩短了反应时间，同时兼具高灵敏度的优势。化学发光的灵敏度与可测范围远远高于酶免疫产品，同时兼具 ELISA 法简便的操作方法与较短的反应时间。

化学发光免疫分析既具有放射免疫的高灵敏度，又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点，易于标准化操作，且测试中不使用有害的试剂，试剂保质期长，应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作，成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。

常规的化学发光免疫检测试剂盒通常包括包被待测物抗体的聚苯乙烯板或板条、待测物系列标准品、检测试剂以及酶促化学发光底物系统。

目前市售的化学发光免疫检测试剂盒中的酶促化学发光底物系统的缺点在于：检测的灵敏度和特异性不够高、试剂稳定性不够、成本较高、检测不够简便快捷等等。

为解决上述问题，本发明提供了一种酶促化学发光底物系统以及含有该底物系统的增强型化学发光免疫检测试剂盒。

发明内容

本发明提供了一种酶促化学发光底物系统，所述酶促化学发光底物系统

由 A 液和 B 液两组组份构成，A 液中含化学发光底物，B 液中含有复合增强剂，在临用前将 A 液与 B 液混合。

在本发明的另一方面，还提供了含有上述酶促化学发光底物系统的化学发光免疫检测试剂盒。

本发明酶促化学发光底物系统以及含有该底物系统的免疫检测试剂盒在用于免疫检测时具有如下优点：精确性和特异性强、灵敏度和稳定性高、污染小，成本低、检测简便快捷等，适合于医院检验部门对患者的血清进行人体免疫分析，为临床大夫提供诊断信息。

附图说明

图 1 示出了用某市售酶促化学发光底物系统进行 HRP 催化化学发光反应的动力学曲线。

图 2 示出了用本发明的酶促化学发光底物系统进行 HRP 催化化学发光反应的动力学曲线。

图 3 示出了本发明的酶促化学发光底物系统的标准曲线。

图 4 示出了使用本发明的一种示例性试剂盒进行雌二醇 (E2) 检测的标准曲线。

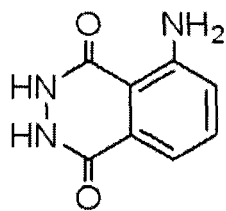
图 5 示出了使用本发明的一种示例性试剂盒进行三碘甲状腺原氨酸 (T3) 检测的标准曲线。

具体实施方式

由于酶促化学发光底物系统直接影响检测信号的大小，检测灵敏度及测量范围。因此，本发明提供了一种高效稳定的酶促化学发光底物系统，所述酶促化学发光底物系统由 A 液和 B 液两组组份构成，A 液中含化学发光底物，B 液中含有复合增强剂，在临用前将 A 液与 B 液等体积混合。

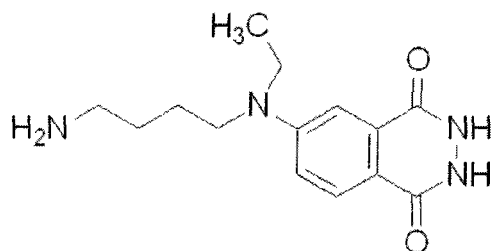
本发明的酶促化学发光底物系统为基于 HRP-鲁米诺的发光系统，包括化学发光底物和复合增强剂。

在本发明的一个实施方案中，所使用的化学发光底物为鲁米诺钠盐，其分子式为： $C_8H_6N_3O_2Na$ ，结构式为：

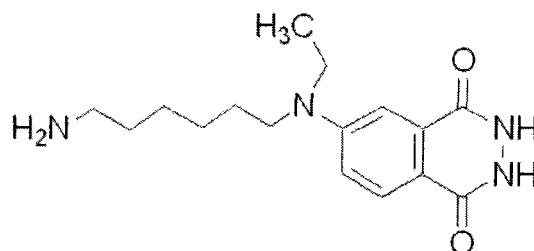


NaH

在本发明的另一个实施方案中，所使用的化学发光底物为鲁米诺衍生物，鲁米诺衍生物的实例例如氨丁基乙基异鲁米诺和氨己基乙基异鲁米诺，它们结构式分别如下：



氨丁基乙基异鲁米诺



氨己基乙基异鲁米诺。

在本发明的一个优选实施方案中，A液中的化学发光底物为鲁米诺钠盐，其浓度为 0.005% - 0.09%。

在本发明的另一个优选实施方案中，B液中的复合增强剂为 3-氯-4-羟基乙酰苯胺和四水合过硼酸钠，浓度分别为 0.003% - 0.09% 和 0.002% - 0.05%。

在本发明的另一个优选实施方案中，上述 A 液和 B 液中还含有稳定剂、防腐剂、金属螯合剂或离子强度调节剂等辅助物质。

在本发明的一个更优选的实施方案中，所述 A 液和 B 液的配方如下：

A 液：

发光底物：鲁米诺钠盐，浓度为 0.001% - 0.8%；

稳定剂：甘氨酸，浓度为 0.003% - 0.7%；

金属螯合剂：DTPA，浓度为 0.0001% - 0.5%；

二水合柠檬酸三钠，浓度为 0.001% - 0.9%；

防腐剂：苯甲酸钠，浓度为 0.001% - 0.8%；

叠氮钠，浓度为 0.001% - 0.07%；

缓冲系统：pH8.5 的硼酸-硼酸钠缓冲液；

B 液：

复合增强剂: 3-氯-4-羟基乙酰苯胺, 浓度为 0.001% - 0.9%;
四水合过硼酸钠, 浓度为 0.001% - 0.9%;
离子强度调节剂: NaCl, 浓度为 0.01 - 0.9%;
防腐剂: 苯甲酸钠, 浓度为 0.001% - 0.8%;
叠氮钠, 浓度为 0.001% - 0.07%;
缓冲系统: pH5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠盐缓冲液。

在本发明的一个特别优选的实施方案中, 所述 A 液和 B 液的配方如下:

A 液:

化学发光底物: 鲁米诺钠盐, 浓度为 0.005% - 0.09%;
稳定剂: 甘氨酸, 浓度为 0.003% - 0.07%;
金属螯合剂: DTPA, 浓度为 0.0001% - 0.07%;
二水合柠檬酸三钠, 浓度为 0.025% - 0.9%;
防腐剂: 苯甲酸钠, 浓度为 0.001% - 0.02%;
叠氮钠, 浓度为 0.002% - 0.045%;
缓冲系统: pH 值为 8.5 的硼酸-硼酸钠缓冲液;

B 液:

复合增强剂: 3-氯-4-羟基乙酰苯胺, 浓度为 0.003% - 0.09%;
四水合过硼酸钠, 浓度为 0.002% - 0.05%;
离子强度调节剂: NaCl, 浓度为 0.02 - 0.9%;
防腐剂: 苯甲酸钠, 浓度为 0.001% - 0.02%;
叠氮钠, 浓度为 0.002% - 0.045%;
缓冲系统: pH 值为 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠盐缓冲液。

上述的底物系统在碱性条件下被 HRP 催化, 发生偶合反应, 产生光子, 通过化学发光仪检测发光信号, 根据光信号的强弱来进行 HRP 配合物定量检测。该底物系统具有如下优点: 发光信号强, 起效迅速, 2 分钟内可达发光平台, 发光持续时间长, 平台期约为 150 分钟, 试剂在 4°C 可保存达 15 个月以上。

含有本发明的酶促化学发光底物系统的化学发光免疫检测试剂盒。

本发明还提供了含有上述酶促化学发光底物系统的化学发光免疫检测

试剂盒。在所述试剂盒中包括上述的高效稳定的酶促化学发光底物系统、检测分析试剂以及酶标记复合物。

优选地，本发明的化学发光免疫检测试剂盒包括如下组成部分：箱体、用于包被待测物的微孔板和多个装有多种试剂的小瓶，在所述装有多种试剂的小瓶中提供了高效稳定的酶促化学发光底物系统、检测分析试剂、酶标记复合物以及待测物系列标准品。任选地，试剂盒中还包括该试剂盒的使用说明书。

本发明试剂盒中的用于包被待测物的微孔板可以是聚苯乙烯板或板条，也可以是本领域已知的任何其他合适的板或板条。

一般实验方案

本发明的实验方案基于抗原-抗体的免疫反应和酶促化学发光反应，从而对特异性的抗原或抗体进行检测。除本说明书所给出的检测方法以外，可以使用本领域技术人员认为合适的其他任何方法。

下面给出一种示例性的实验方案：

将抗体包被于白色不透明聚苯乙烯微孔板或可拆卸板条中，标记物为HRP标记的抗原或抗体，温育反应采用37℃恒温箱。使用时，取患者血清适量加入包被孔中，同时加入酶标记物及分析检测试剂，放小型振荡器上振荡1分钟，放恒温箱内温育，这时反应微孔中发生抗原抗体反应，形成免疫复合物，用洗板机洗板，多余的酶标记物及未反应物被除去，然后加入提前等量混合好的化学发光底物，振荡1分钟，放入化学发光仪，读取每孔的相对发光值，然后与标准曲线对照，化学发光仪自动换算成相应的被测物的具体含量，然后通过打印机将结果打印。

应当理解的是，上述实验方案以及在本说明书实施例中所使用的实验方案及有关参数并不是限制性的。本领域技术人员能够根据具体情况以及待测物质选择合适的实验方案以及有关参数。

本发明试剂盒的应用

使用本发明的检测试剂盒，可以进行如下各类体外检测：

(1) 肿瘤标志物系列：甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、血清铁蛋白(SF)、 β 2微球蛋白(β 2-MG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、前列腺特异性抗原(PSA)、游离前列腺特异性抗原(F-PSA)、癌抗125(CA125)、癌抗原

15-3 (CA15-3)、癌抗原 19-9 (CA19-9)、CA50;

(2) 甲状腺功能系列: 甲状腺素 (T4)、游离甲状腺素 (F-T4)、三碘甲腺原氨酸 (T3)、游离三碘甲腺原氨酸 (F-T3)、促甲状腺素 (TSH)、抗-TG、抗-TPO;

(3) 生殖内分泌激素系列: 垂体泌乳素 (PRL)、促黄体生成素 (LH)、促卵泡生成素 (FSH)、孕酮 (P)、睾酮 (T)、雌二醇 (E2);

(4) 传染病系列: 甲肝 (HAV)、乙肝五项 (HBsAg, 抗-HBs, HBeAg, 抗-HBe, 抗-HBc)、丙肝 (HCV)、丁肝 (HDV)、庚肝 (HGV)、HIV (1+2)、TORCH;

(5) 心肌标志物系列: cTnI, cTnT, Mb, CK-MB, TNP;

(6) 糖尿病系列: 胰岛素、血清 C 肽;

(7) 其他检测系列: 皮质醇、总 IgE。

应当理解的是, 在上述应用中, 本领域技术人员能够根据具体待测物质选择合适的抗原或抗体以及合适的实验方案。

实施例

提出以下实施例, 以便为本领域技术人员更好地理解 and 实施本发明, 这仅是出于示例性目的, 并非意在限制本发明的范围。

对比实施例: 现有技术的酶促化学发光底物系统的发光效力。

方法: 商购某市售含有酶促化学发光底物系统的试剂盒。按其实验说明书, 在微孔板中加入 150 μ L 该化学发光底物系统的底物液, 再加入 50 μ L HRP (50ng/L), 混匀, 使用石家庄康普生科技有限公司 KPS-II 型化学发光免疫分析仪测量光子, 每 60 秒测量一次, 测量 1 小时。

结果: 在图 1 中示出了该市售化学发光底物系统的 HRP 催化化学发光反应的动力学曲线。图 1 中横坐标为测试时间 (分钟), 纵坐标为发光值 (RLU 值)。

实施例 1: 本发明的酶促化学发光底物系统的发光效力。

方法: 在微孔板中加入如下配方的本发明的底物液:

A 液 (75 μ L):

鲁米诺钠盐, 浓度为 0.082%;

甘氨酸, 浓度为 0.016%;

DTPA, 浓度为 0.035%;

二水合柠檬酸三钠，浓度为 0.025%；
苯甲酸钠，浓度为 0.001%；
叠氮钠，浓度为 0.002%；
pH8.5 的硼酸-硼酸钠缓冲液；

B 液 (75 μ L):

3-氯-4 羟基乙酰苯胺，浓度为 0.0716%；
四水合过硼酸钠，浓度为 0.0052%；
NaCl, 浓度为 0.033%；
苯甲酸钠，浓度为 0.001%；
叠氮钠，浓度为 0.002%；
pH5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠盐缓冲液。

将上述 A 液和 B 液等体积混合即成为 150 μ L 本发明的底物液，再加入 50 μ L HRP (50ng/L)，混匀，使用石家庄康普生科技有限公司 KPS-II 型化学发光免疫分析仪测量光子，每 60 秒测量一次，测量 1 小时。

结果：在图 2 中示出了本发明化学发光底物系统的 HRP 催化化学发光反应的动力学曲线。图 2 中横坐标为测试时间 (分钟)，纵坐标为发光值 (RLU 值)。

由图 1 和图 2 的结果可以看出，在相同实验条件下，本发明化学发光底物系统的发光值与某市售化学发光底物系统相比，发光值高，发光反应达到峰值的时间缩短，且具有很好的发光持续性。这在临床诊断中具特别重要意义，可保证测量结果的准确性和可重复性。

实施例 2: 本发明的酶促化学发光底物系统的标准曲线及灵敏度

将 HRP 稀释成系列浓度: 0.04、0.02、0.4、2、4、20fmol/mL, 每孔加入如实施例 1 所述的 150 μ L 底物液, 2min 后测量发光值。以 HRP 浓度为横坐标, 发光值 RLU 为纵坐标, 取双对数作标准曲线, 示于图 3。

灵敏度: 以分析缓冲液为“0”标准, 平行测定 10 孔, 以 $\bar{x} + 2S$ 计算, 对应于标准曲线上 HRP 浓度即为分析灵敏度, 为 2.4amol/孔。

实施例 3: 雌二醇 (E2) 化学发光免疫检测试剂盒

雌二醇 (Estradiol) 为 C18 类固醇激素, 分子量为 272.4。它是雌性激素中活性最强的一种, 主要产自卵巢和胎盘, 少量产自肾上腺皮质和男性睾丸。

分泌进入血液的 E2 中 98% 与性激素结合球蛋白 (SHBG) 结合循环, 少量的与

其他血清蛋白如白蛋白结合，仅有很少部分以游离激素状态循环。雌激素的活性通过雌二醇-受体复合物在靶位上激发适当的反应。这些靶位包括卵泡、子宫、胸腺、阴道、下丘脑、垂体，对肝脏和皮肤也有较小的作用。

月经周期正常的未孕女性，E₂的分泌遵循一种循环的两阶段模式，在排卵前达到最高浓度，排卵后E₂水平快速下降，直至黄体细胞活跃产生第二次平缓的上升，并在黄体期形成平台。在孕期母亲血清E₂水平明显升高，远高于上述的排卵前峰值水平，而且高水平的E₂浓度持续整个孕期。

血清E₂测定对评价各种月经异常是非常有用的指标：如女孩青春期提前或延迟、原发性或继发性闭经、卵巢早衰等。据报道，男性患有女性化综合征、乳房女性化以及睾丸癌的病人也会有E₂升高。在不育症患者中，血清E₂的监测对于监控诱导排卵及随后的治疗，例如用柠檬酸克罗米芬、LH释放激素(LHRH)或外源性的促性腺激素的治疗是非常有用的。在体外受精(IVF)中，对卵巢进行过激刺激时，通常每天对绒毛膜促性腺激素的使用和卵母细胞的收集进行最佳的调整，也需要检测血清E₂浓度。

本试剂盒用于测定人血清或血浆中的总E₂浓度。

实验原理：

本试剂盒应用竞争抑制法测定血清中E₂的含量。将E₂标准品或病人血清、兔抗E₂抗体及E₂-HRP结合物均加入抗兔IgG包被的微孔中一起温育，血清样品中的E₂和E₂-HRP与恒定量的兔抗E₂抗体竞争结合，形成的复合物与固相上的抗兔IgG结合，最终结合在固相上的E₂-HRP的量与血清中E₂浓度成反比。加入化学发光底物，测定每孔发光值，发光强度与标本中E₂的含量成反比。以系列标准品发光值为纵坐标(y轴)，以标准品浓度为横坐标(X轴)作图，即得到标准曲线。血清样品中雌二醇浓度可相应从该标准曲线上查得。

操作步骤：

实验前准备：

1. 确保操作环境在室温(18-25℃)，取出试剂盒及待测样品。将所有试剂及样品恢复至室温(约需30分钟)。
2. 将恒温箱或水浴锅调至反应温度。
3. 液体标准品可以直接使用；固体标准品按要求充分溶解后使用。
4. 将化学发光底物A、B液等比例混合至试验所需体积(每孔需200μl)。

实验过程：

1. 取出一定量的包被孔编号，每孔分别加入25μl标准品或血清样品。

2. 每孔分别加入待测 E2 分析物 50 μ l。
3. 每孔分别加入 E2-HRP 结合物 100 μ l，充分混匀 30 秒。
4. 37℃温育 16 分钟。
5. 洗板: 甩尽板孔内液体，用蒸馏水或去离子水注满各孔，甩去，重复 5 次，最后在吸水纸上拍干。亦可用洗板机机洗 7 次。
6. 每孔加入混合后的底物 200 μ l，室温(18-25℃)反应 5 分钟。
7. 化学发光检测仪检测发光强度。

结果计算:

本试剂盒采用 4P-Logistic-1.0 拟和方式，以标准品发光强度值为横坐标(x 轴)，以标准品浓度值为纵坐标(y 轴)，建立标准曲线，进行计算。

在图 4 中示出了 E2 检测的标准曲线。

实施例 4: 三碘甲状腺原氨酸(T3)化学发光免疫检测试剂盒

3, 5, 3' 三碘甲状腺原氨酸(T3)与 T4 相同，由甲状腺合成及分泌入血。血清中 T3 的量约是 T4 的 1/60，但其生物活性比 T4 大 5 倍。故血清中三碘甲状腺原氨酸(T3)的浓度是评价甲状腺功能的重要参数，尤其用在确诊甲状腺功能亢进和检查甲状腺毒症时。T3 的检测一般主要用于:

1. 诊断甲状腺功能亢进: 甲亢时血清中 T3 和 T4 浓度一般平行升高，但 T3 升高的幅度更明显。有些甲亢，T4 升高不明显或未见升高，但 T3 明显升高，即为 T3 型甲亢。另外，甲亢时 T3 升高可能先于 T4 升高，因此，T3 的检测对诊断及早期诊断甲亢很有意义。

2. 评价治疗甲亢的疗效: 甲亢在治疗过程中 T4 及 T3 先于临床症状的改善而下降，T4 下降的速度快于 T3，而且幅度较大，有时 T4 已降至正常范围，而 T3 仍高于正常。往往症状完全消失时，T3 大多降至正常。因此要协同观察 T3 和 T4 作为治疗效果及临床变更药物的指标。

3. 低 T3 综合症: 许多疾病如肝硬化、肾病综合征、糖尿病酮症、恶性肿瘤、传染病、手术创伤后及心肌梗死等均可导致 T3 下降，下降的程度反应病情恶化的程度。

实验原理:

本试剂盒应用竞争型化学发光免疫测定技术检测血清中 T3 含量。将抗 T3 抗体包被在微孔板上，制成固相抗体，试剂盒中的酶结合物为辣根过氧化物酶标记的 T3，往包被抗体的微孔中同时加入 T3 标准或待测血清以及酶标 T3，二

者共同与抗体竞争，反应后冲洗微孔板去掉未结合物，再加化学发光底物测定每孔发光值，其发光强度与 T3 含量成反比。

操作步骤:

实验前准备:

1. 将所有试剂恢复至室温(约半小时)，整个操作环境应该控制在 20 到 25 度。
2. 将恒温箱或水浴锅调至反应温度。
3. 液体标准品可以直接使用; 固体标准品要按要求充分溶解后使用。
4. 将化学发光底物 A、B 液等比例混合至实验所需体积(每孔需 200 μ l)。

实验过程:

1. 将所需用量的微孔条放置在支架上:
2. 在反应微孔中依次加入 20 μ l 标准品或待测标本;
3. 每孔分别加入待测 T3 分析物 80 μ l。
4. 每孔加入 80 μ l 的 T3-酶结合物，轻轻震荡微孔支架，充分混匀:
5. 贴封膜后，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;
6. 洗板，手动洗涤 5 次或洗板机机洗 7 次。
7. 每孔加混合后的底物 200 μ l，室温反应 5 分钟。
8. 化学发光检测仪检测发光强度值。

结果计算:

本试剂盒采用 4P-Logistic-1.0 拟和方式，以标准品发光强度值为横坐标(x 轴)，以标准品浓度值为纵坐标(y 轴)，建立标准曲线，进行计算。

在图 5 中示出了 T3 检测的标准曲线。

在本说明书中，除非另有说明，在表示浓度时，固体溶质在溶液中的浓度为重量百分比浓度，液体溶质在溶液中的份数为体积百分比浓度。实验温度以 $^{\circ}$ C 为单位或者为环境温度，实验压力接近或等于大气压。

对于本领域技术人员显而易见的是，在不背离本发明的范围和精神的前提下可对本发明进行各种修改和变动。通过本发明公开内容的教导，本发明的其他实施方案对本领域技术人员来说是显而易见的。本说明书和实施例应仅理解为用于示例，本发明实际的范围以所附的权利要求书为准。

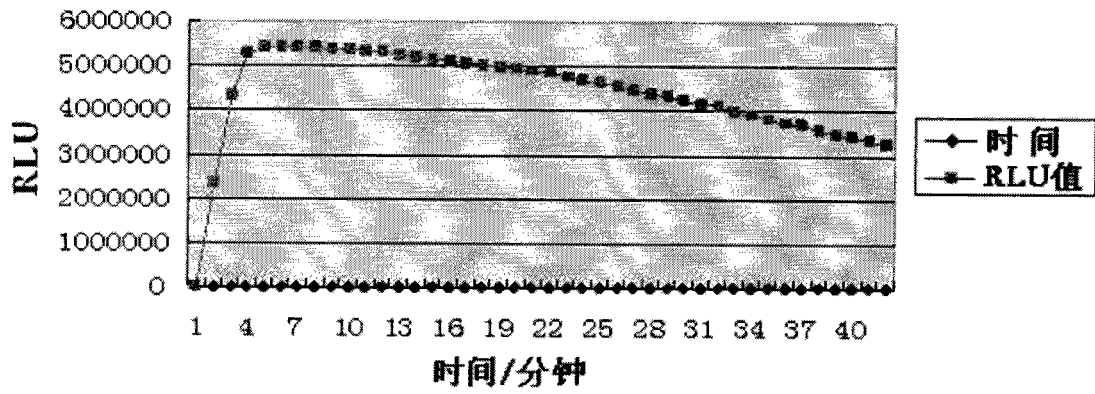


图 1

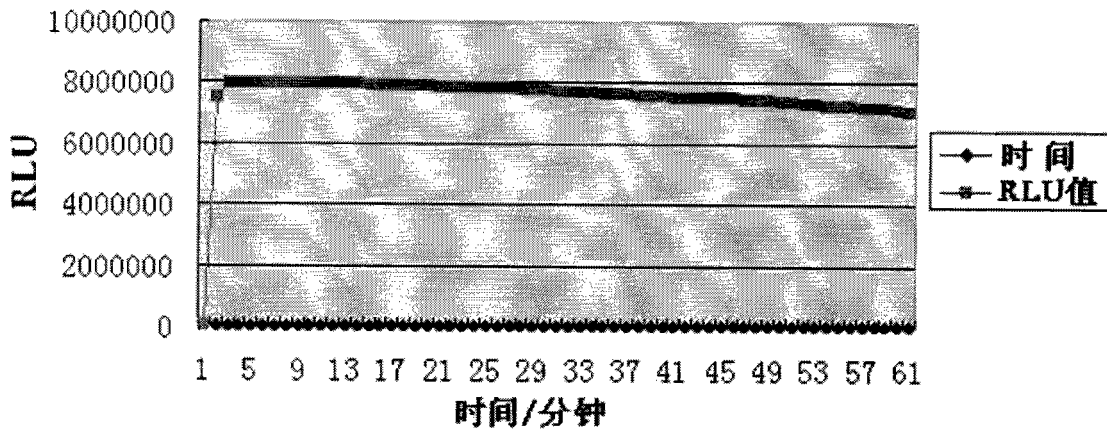


图 2

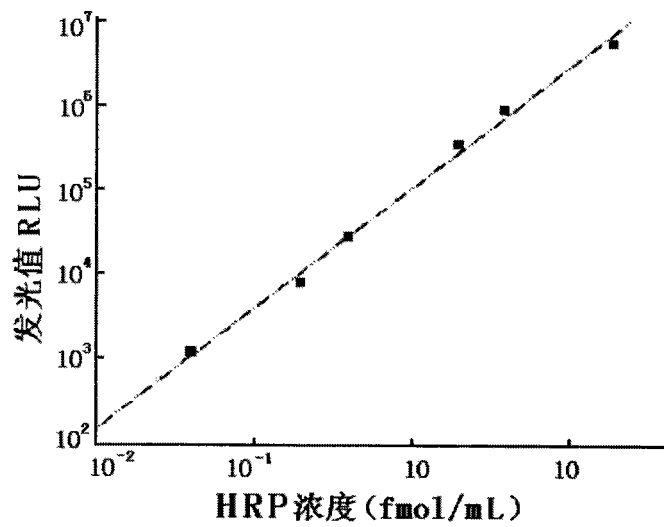


图 3

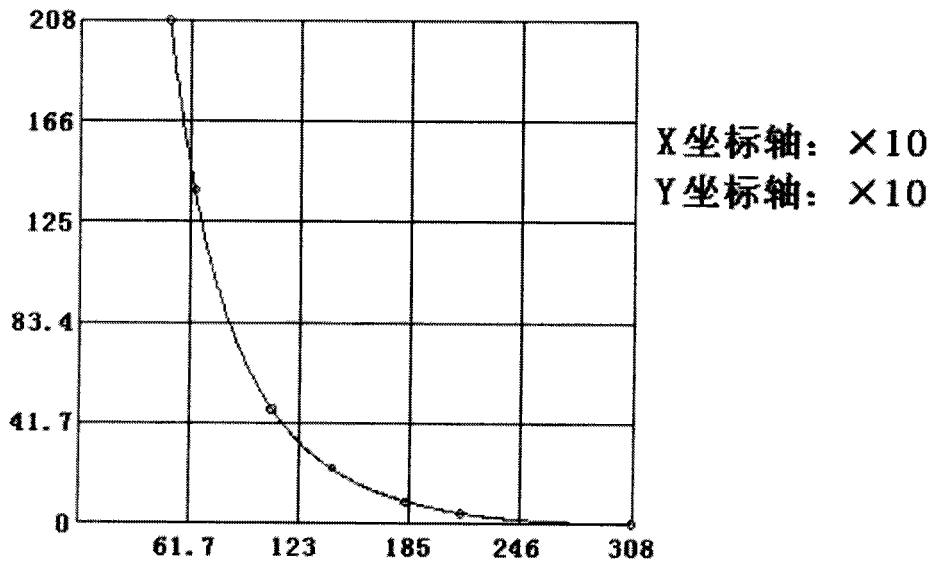


图 4

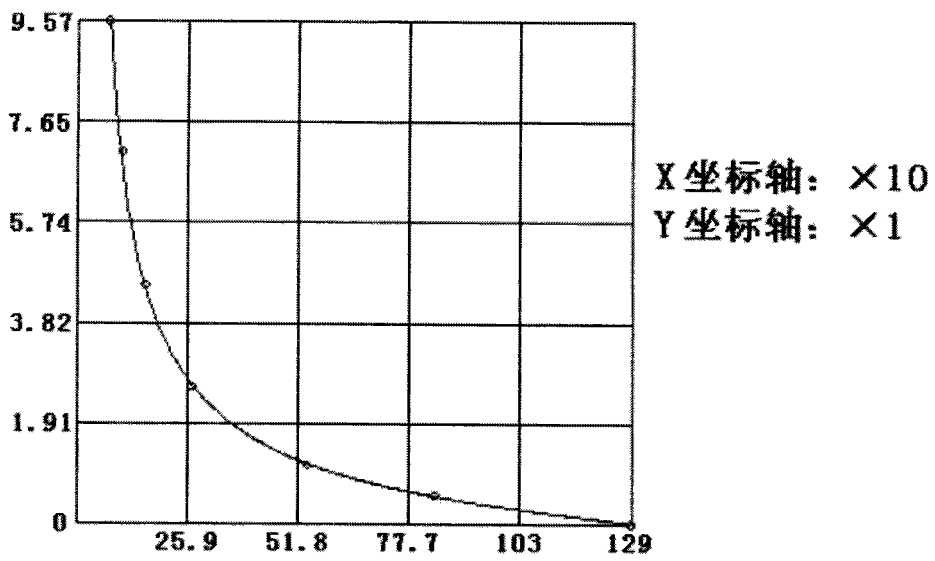


图 5

专利名称(译)	高效酶促化学发光底物系统		
公开(公告)号	CN101221170A	公开(公告)日	2008-07-16
申请号	CN200810000592.1	申请日	2008-01-23
[标]发明人	何询 白仲虎 周鹏飞		
发明人	何询 白仲虎 周鹏飞		
IPC分类号	G01N33/52 G01N21/76 G01N33/53		
代理人(译)	姜建成		
其他公开文献	CN101221170B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种高效稳定的酶促化学发光底物系统。所述酶促化学发光底物系统由A液和B液两组组份构成，A液中含化学发光底物，B液中含有复合增强剂，在临用前将A液与B液等体积混合。其中A液中的化学发光底物为鲁米诺钠盐或其衍生物，B液中的复合增强剂为3-氯-4羟基乙酰苯胺和四水合过硼酸钠。该底物系统具有发光信号强，起效迅速，2分钟内可达发光平台，发光持续时间长等多种优点。另外还提供了含有该底物系统的化学发光免疫检测试剂盒。

