



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103575876 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201310606411. 0

(22) 申请日 2013. 11. 25

(71) 申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司  
地址 300300 天津市东丽区开发区四纬路  
10 号

(72) 发明人 张振斌 辛志勇 汪艳培 李克锦  
刘萍 栾大伟

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理  
有限公司 12211

代理人 李莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

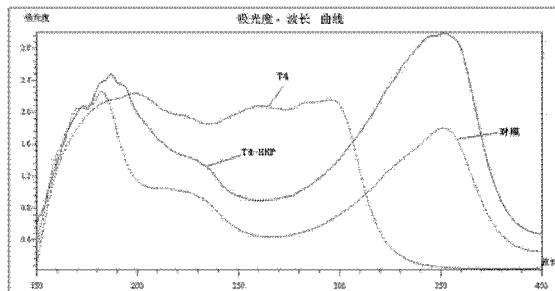
权利要求书1页 说明书2页 附图1页

(54) 发明名称

一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,包括以下步骤:(1)将 T4 与 HRP 分别溶于二甲基亚砷溶液和碳酸盐缓冲液中,分别制备 A 溶液和 B 溶液,然后在 A 溶液中加入正三丁胺溶液,冰浴持续搅拌一定时间,得溶液 C,溶液 C 再加入氯甲酸异丁酯溶液,室温搅拌一定时间后,得溶液 D,将 B 溶液加入溶液 D 进行偶联反应,得到反应混合液 E。(2)反应混合液 E 通过透析处理除去反应混合物中未参与偶联的小分子物质,缓冲液采用 pH7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液,得偶联物。本发明的优点是提供一种制备方法简单、生产周期短,生产成本低的用于甲状腺素免疫学检测的甲状腺素标记辣根过氧化物酶。



1. 一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将 T4 溶于二甲基亚砷溶液制备 A 溶液,HRP 溶于碳酸盐缓冲液中制备 B 溶液,然后在 A 溶液中加入正三丁胺溶液,冰浴持续搅拌一定时间,得溶液 C,溶液 C 再加入氯甲酸异丁酯溶液,室温搅拌一定时间后,得溶液 D,将 B 溶液加入溶液 D 进行偶联反应,得到反应混合液 E;

(2)反应混合液 E 通过透析处理除去反应混合物中未参与偶联的小分子物质,缓冲液采用 pH7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液,得偶联物。

2. 根据权利要求 1 所述一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,其特征在于,步骤(1)中制备的 A 溶液和 B 溶液的浓度分别为 1mg/ml 和 5mg/ml。

3. 根据权利要求 1 所述一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,其特征在于,所述溶液 C 中 T4 与 HRP 摩尔比 5-10:1。

4. 根据权利要求 1 所述一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,其特征在于,步骤(1)中正三丁胺加入 T4 溶液需冰浴。

5. 根据权利要求 1 所述一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,其特征在于,氯甲酸异丁酯加入量大于 T4 的物质的量。

6. 根据权利要求 1 所述一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,其特征在于,步骤(1)中 HRP 溶液缓慢滴加到溶液 D 中,边滴边震荡,滴加完成后 4℃持续震荡,反应 20 小时以上,得到反应混合液 E。

## 一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,具体的是一种 T4-HRP 的制备方法。

### 背景技术

[0002] 甲状腺素即 3,5,3',5'-四碘甲状腺原氨酸,简称 T4(Thyroxine,T4),是由甲状腺滤泡上皮细胞合成和分泌的甲状腺激素。甲状腺素的基本结构是由一个酪氨酸残基和一个酚环构成。正常人平均每日的 T4 分泌量为(90±9) μg,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% 与甲状腺素结合球蛋白(TBG)结合,30% 与甲状腺素结合前白蛋白(TBPA)结合,其余与白蛋白结合。

[0003] T4 具有生物活性,促进糖,脂肪,蛋白质代谢,产生能量和热,促进生长发育。甲状腺机能亢进时,甲状腺合成和分泌 T4 增多,血清 T4 增高。亚急性甲状腺炎,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 T4 升高产生暂时性的轻度甲亢。甲状腺机能减退时,无论是原发,继发或其它原因,T4 均减低,甲状腺缺乏或先天性发育不良,及甲状腺全切除后,血清 T4 降低。

[0004] 临床上血清 T4 的检测主要采用免疫法,而且固相包被 T4 抗体是 T4 检测试剂盒的常用方式,这就需要对 T4 抗原进行标记以达到检测血清 T4 的目的。而目前市场上的 T4 标记抗原多要先偶联一个载体蛋白才能有效进行标记,此种方法在空间上对针对 T4 的抗原抗体反应必然会产生较大影响,从而导致检测结果出现偏差。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决上述技术问题,提供一种制备方法简单、生产周期短,生产成本低廉的用于 T4 免疫学检测的 T4-HRP。

[0006] 技术方案包括下述步骤:

[0007] 一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 将 T4 与 HRP 分别溶于二甲基亚砷溶液和碳酸盐缓冲液中,分别制备 A 溶液和 B 溶液,然后在 A 溶液中加入正三丁胺溶液,冰浴持续搅拌一定时间,得溶液 C,溶液 C 再加入氯甲酸异丁酯溶液,室温搅拌一定时间后,得溶液 D,将 B 溶液加入溶液 D 进行偶联反应,得到反应混合液 E。

[0009] (2) 反应混合液 E 通过透析处理除去反应混合物中未参与偶联的小分子物质,缓冲液采用 pH7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液,得偶联物,未偶联的小分子物质包括 T4 及 DMSO、正三丁胺、氯甲酸异丁酯等。

[0010] 进一步,步骤(1)中制备的 A 溶液和 B 溶液的浓度分别为 1mg/ml 和 5mg/ml。

[0011] 进一步,所述溶液 C 中 T4 与 HRP 摩尔比 5-10:1。

[0012] 进一步,步骤(1)中正三丁胺加入 T4 溶液需冰浴。

[0013] 进一步,氯甲酸异丁酯加入量大于 T4 的物质的量。

[0014] 进一步,步骤(1)中 B 溶液缓慢滴加到溶液 D 中,边滴边震荡,滴加完成后 4℃ 持续

震荡,反应 20 小时以上,得到反应混合液 E。

[0015] 偶联完成的检测采用如下方法:

[0016] 按照上述步骤(1)和步骤(2)的方法,反应体系缺失 T4,维持其他各反应条件不变,制备实验对照组样品。

[0017] 采用紫外分光光度计对 T4、T4-HRP、实验对照在 200-400nm 之间进行扫描,在同坐标下进行图形比对,在 T4-HRP、实验对照和 T4 对照浓度相同的情况下,如果 T4-HRP 的特征峰与 T4 特征峰及实验对照组特征峰相比多出特征吸收峰,说明偶联成功。

[0018] 本发明的优点是提供一种制备方法简单、生产周期短,生产成本低的用于去甲肾上腺素抗体制备和免疫学检测的完全抗原,直接应用于免疫检测。

附图说明:

[0019] 图 1 是偶联物通过分光光度计扫描鉴定图

具体实施方式:

[0020] 实施例 1:T4 标记 HRP

[0021] (1) T4 (甲状腺素) 5mg 溶于 1ml DMSO 中得 A 溶液, HRP 5mg 溶于 1ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中得 B 溶液;

[0022] (2) 将体积为 5ul 的正三丁胺滴入 A 溶液中,冰浴震荡反应 20 分钟,得溶液 C。

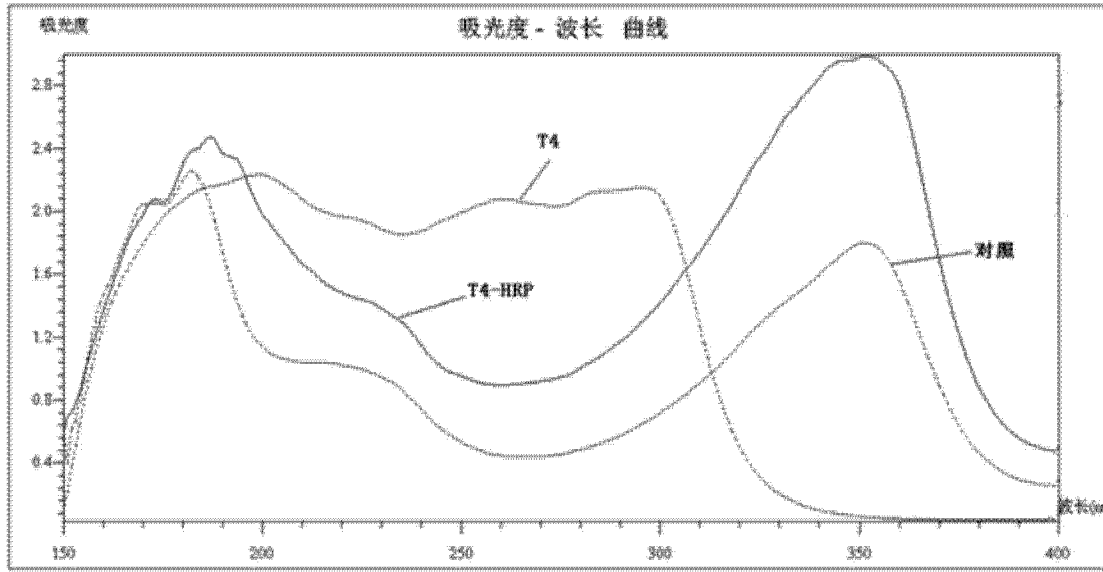
[0023] (3) 将体积为 5ul 的氯甲酸异丁酯滴入溶液 C 中,室温震荡反应 30 分钟,得溶液 D。

[0024] (4) 将溶液 D 缓慢滴入 B 溶液中,4°C 震荡反应 24 小时以上,得反应混合物 E。

[0025] (5) 反应混合物 E 通过透析处理除去反应混合物中未偶联的小分子物质,缓冲液采用 PH7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液,得偶联物 F。

[0026] (6) 按照步骤(1)(2)(3)(4)(5)的方法,反应体系缺失 T4,维持其他各反应条件不变,制备实验对照样品。

[0027] (7) 采用紫外分光光度计对载体、小分子、偶联物在 200-500nm 之间进行扫描,在同坐标下进行图形比对,在偶联物和载体对照浓度相同的情况下,如果偶联物的特征峰与载体特征峰及实验对照组特征峰相比发生明显偏移,说明偶联成功。



专利名称(译)	一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103575876A</a>	公开(公告)日	2014-02-12
申请号	CN201310606411.0	申请日	2013-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	张振斌 辛志勇 汪艳培 李克锦 刘萍 栾大伟		
发明人	张振斌 辛志勇 汪艳培 李克锦 刘萍 栾大伟		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/78		
代理人(译)	李莉华		
其他公开文献	CN103575876B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种甲状腺素标记辣根过氧化物酶的制备方法，包括以下步骤：(1) 将T4与HRP分别溶于二甲基亚砜溶液和碳酸盐缓冲液中，分别制备A溶液和B溶液，然后在A溶液中加入正三丁胺溶液，冰浴持续搅拌一定时间，得溶液C，溶液C再加入羧甲酸异丁酯溶液，室温搅拌一定时间后，得溶液D，将B溶液加入溶液D进行偶联反应，得到反应混合液E。(2) 反应混合液E通过透析处理除去反应混合物中未参与偶联的小分子物质，缓冲液采用pH7.4的0.01M磷酸盐缓冲液，得偶联物。本发明的优点是提供一种制备方法简单、生产周期短，生产成本低的用于甲状腺素免疫学检测的甲状腺素标记辣根过氧化物酶。

