



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103048477 A

(43) 申请公布日 2013.04.17

(21) 申请号 201210550222.1

(22) 申请日 2012.12.18

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218号C6栋

(72) 发明人 于大为 程晓蕾

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103
代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/78(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

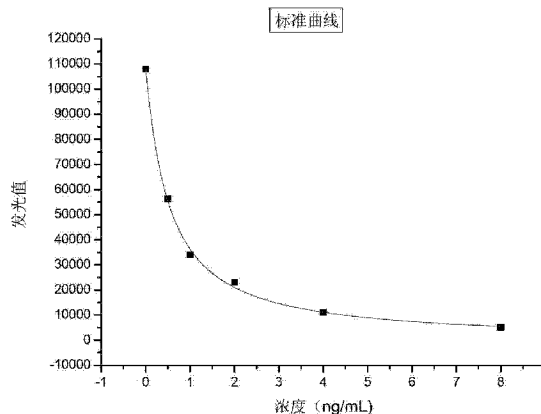
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法,该试剂盒包括:第一试剂:含荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液;第二试剂:含碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液;磁分离剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。本发明使得能够以更低成本和更高准确度和精密度对三碘甲状腺原氨酸进行定量检测。



1. 一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,所述试剂盒包括:
第一试剂:含荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液;
第二试剂:含碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液;
磁分离剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。
2. 根据权利要求1所述的三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于:所述碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原由碱性磷酸酶与三碘甲状腺原氨酸抗原通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接构成。
3. 根据权利要求1或2所述的三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于:所述第一试剂中的荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的浓度为 $0.5\sim 1\mu\text{g/mL}$,所述第一试剂的pH为7-9;所述第二试剂中的碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的浓度为 $0.02\sim 0.1\mu\text{g/mL}$,所述第二试剂的pH为7-9。
4. 一种如权利要求3所述的三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述含有荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液、所述含有碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液以及所述包被有荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的步骤,其特征在于:所述含有碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液的制备过程如下:
 - ①使三碘甲状腺原氨酸抗原与交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯在二甲基亚砷溶剂中,在室温下反应,使生成三碘甲状腺原氨酸抗原与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物,于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存备用,其中:所述的三碘甲状腺原氨酸抗原、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过1000u/mg;
 - ②将含有碱性磷酸酶的缓冲液与步骤①所得溶液按照碱性磷酸酶与三碘甲状腺原氨酸抗原与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的摩尔比为 $1:1.1\sim 1.3$ 的比例混合,在室温下反应,使生成所述碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原,反应结束,将反应液通过G-25凝胶柱除盐,选择具有适当pH值的缓冲液调整浓度和pH值即得,其中碱性磷酸酶的缓冲液的浓度为 $0.5\sim 1.5\text{mg/ml}$ 。
5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:步骤①中,取三碘甲状腺原氨酸抗原,加入二甲基亚砷溶解该抗原至浓度为 $20\sim 50\text{mg/mL}$,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯,室温反应 $2\sim 3$ 小时,用二甲基亚砷将反应液1:10稀释,于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。
6. 根据权利要求4或5所述的制备方法,其特征在于:步骤②中,取浓度大于等于 5mg/ml 的碱性磷酸酶的磷酸盐缓冲液,用pH $9\sim 10$ 的碳酸氢钠缓冲液稀释至 $0.5\sim 1.5\text{mg/ml}$,加入步骤①所得反应液,室温静置反应 $20\sim 60\text{min}$ 。
7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述第一试剂的制备方法如下:配制含有荧光素的pH为 $7\sim 9$ 的缓冲液,然后按照荧光素与三碘甲状腺原氨酸抗体的分子比为 $20\sim 200:1$ 的比例,将所述含有荧光素的pH为 $7\sim 9$ 的缓冲液与三碘甲状腺原氨酸抗体的pH为 $7\sim 9$ 的缓冲液混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过G-25凝胶柱进行分离,除去荧光素,得到含有荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液,接着用具有适当pH值的缓冲液调整浓度和pH,即得第一试剂。
8. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述磁分离剂的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下,室温反应 $2\sim 18$ 小时,

反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得所述的磁分离剂;其中所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 $0.5\sim 2\mu\text{m}$,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量大于等于 0.4mmol ;所述的荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,纯度大于等于 $90\text{wt}\%$,稀释效价大于 $1:100$ 万。

9. 根据权利要求 4 或 7 或 8 所述的制备方法,其特征在于:所述的具有适当 pH 值的缓冲液为含有 0.5% 牛血清白蛋白、 $\text{pH}8.0$ 的 TRIS 缓冲液。

10. 采用权利要求 1~3 中任一项权利要求所述的试剂盒用于对三碘甲状腺原氨酸定量检测的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)免疫反应:在检测管中加入待测样本原液,依次加入第一试剂和第二试剂,混匀,在 $25\sim 40^{\circ}\text{C}$ 下进行第一次温育,然后加入磁分离试剂,混匀,在 $25\sim 40^{\circ}\text{C}$ 下进行第二次温育;

(2)洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清;

(3)加底物溶液检测发光强度:在检测管中加入碱性磷酸酶催化的化学发光底物,去除磁场,充分混悬后检测发光强度值。

一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒 及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种结合了免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术的三碘甲状腺原氨酸(T₃)的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 三碘甲状腺原氨酸(3,5,3'-三碘甲状腺原氨酸,T₃)是一种分子量为651的碘化酪氨酸,与甲状腺素(T₄)一样是一种重要的甲状腺激素。T₃、T₄在循环中均有结合态和游离态两种形式,正常情况下两种形式之间保持着动态平衡。

[0003] T₃的测定对诊断甲状腺机能紊乱和监测甲状腺机能低下非常有意义。对甲状腺机能亢进的病人来讲,大多数患者的总T₃和总T₄的水平是一致的。不过在某些病例中,甲状腺机能亢进仅仅是由于T₃的产生增多引起的(T₃型甲亢症),因此在FT₃(血清游离甲状腺素)正常的甲亢患者,建议检测T₃,尤其对于FT₃和TSH(促甲状腺激素)均正常的患者(一般患者常首先检测FT₃和TSH),更应进一步检测T₃。

[0004] 严重甲状腺机能减退患者的总T₃水平通常偏低而中度甲状腺机能减退患者总T₃水平可能正常。非甲状腺疾病的严重病人或是在术后,可见T₃水平偏低而反T₃的水平升高。新生儿及婴儿的T₃水平一般较高,但在某些老年病例中T₃水平也会偏低。

[0005] 目前T₃的检测方法目前全部采用免疫学方法。临床免疫检测技术是利用抗原抗体反应原理检测生物体内物质的技术,该技术的引入使临床化学检验发生了革命性的变化:检测项目不断增加,方法的灵敏度更高、特异性更强,自动化程度更高。自上世纪80年代以后,免疫学检测技术随着单克隆抗体、人工合成多肽、基因工程表达抗原及各种标记技术的成熟而迅速发展,放射免疫测定(RIA)和酶免疫测定(EIA)逐渐取代传统的免疫沉淀和免疫凝聚,使检测的敏感性、特异性都大大提高,随后化学发光技术的应用使免疫学检测的敏感性和线性范围得到进一步的提高。这些技术在临床检验中的应用为疾病的定量检测、疗效观察及病因探讨提供了更直接和客观的资料。

[0006] T₃是目前医院开展的常规免疫检测项目,对甲状腺疾病的诊断有无可替代的重要参考价值。目前我国已批准上市的T₃免疫检测试剂有进口和国产两大类,其中进口试剂有贝克曼等跨国定量检测公司的产品,采用的方法学多为化学发光,而国产试剂中采用的方法学多数为放免法,近两年开始出现化学发光类产品。

[0007] 放免分析法存在线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。而化学发光免疫分析法具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析技术因其有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0008] 然而,在实际的免疫检测中,由于待测样品中所含的杂质成分较多,一定程度上影响了检测灵敏度和准确性,所以从复杂的样品基质中快速分离、纯化出目的待测物,是临床检验工作者面临的难题之一。

[0009] 磁微粒免疫检测技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、可重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学性状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,使得某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。

[0010] 中国发明专利公开C N101949944A公开了一种了三碘甲状腺原氨酸定量检测试剂盒及其制备方法,其中,试剂盒包括包被有二碘甲状腺原氨酸-明胶的磁微粒混悬液、三碘甲状腺原氨酸系列校准品、辣根过氧化物酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗体、发光底物A液、发光底物B液及浓缩洗液。使用该专利公开的试剂盒成功利用了磁微粒免疫检测技术实现了对三碘甲状腺原氨酸的准确检测。然而,该试剂盒的制备成本和使用成本高,原因是,一方面,在进行包被有二碘甲状腺原氨酸-明胶的磁微粒混悬液的制备时,不仅过程复杂,而且直接将二碘甲状腺原氨酸-明胶包被于磁微粒上的包被率较低,导致较高的成本;另一方面,其采取辣根过氧化物酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗体,该抗体的制备也是非常繁琐,且标记率低,限制其检测效果和导致成本增加。此外,试剂盒在制备工艺上所存在的不易控和稳定性较差的因素,除了导致如前所述的成本增加的问题外,还使得检测的批间差大,限制了检测方法的精密度。

发明内容

[0011] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其能够以较低的成本制备得到,且能够实现三碘甲状腺原氨酸准确和高精确地定量测定。

[0012] 本发明同时还提供一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法,该方法工艺稳定,成本低,且所得试剂盒的精密度高。

[0013] 癌抗原所用的试剂盒的简便和低成本的制备方法。

[0014] 一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:

[0015] 第一试剂:含荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液;

[0016] 第二试剂:含碱性磷酸酶(ALP)标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液;

[0017] 磁分离剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。

[0018] 优选地,该碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原由碱性磷酸酶与三碘甲状腺原氨酸抗原通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接构成。

[0019] 进一步地,所述磁微粒试剂中,包被有荧光素抗体的磁微粒由荧光素抗体与磁微粒通过偶联剂相化学偶联。

[0020] 进一步地,所述第一试剂中的荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的浓度为 $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$,所述第一试剂的pH为7-9;所述第二试剂中的碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的浓度为 $0.02 \sim 0.1 \mu\text{g/mL}$,所述第二试剂的pH为7-9。

[0021] 本领域技术人员应知晓,本发明的试剂盒还可以进一步包括有其它检测所需的试剂,例如底物溶液。但是诸如底物溶液等其它试剂可以另行购买或配制,因此,虽然试剂盒中可以包括这些试剂,但它们对于本发明试剂盒来说并非必不可少。

[0022] 本发明采取的又一技术方案是：一种上述的三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法，其包括分别制备所述第一试剂、所述第二试剂以及磁分离剂的步骤，其中：所述第二试剂的制备过程如下：

[0023] ①使三碘甲状腺原氨酸抗原与交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯在二甲基亚砜溶剂中，在室温下反应，使生成三碘甲状腺原氨酸抗原与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物，于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存备用，其中：所述的三碘甲状腺原氨酸抗原、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于95wt%，且所述碱性磷酸酶的比活性超过

[0024] 1000u/mg；

[0025] ②将含有碱性磷酸酶的缓冲液与步骤①所得溶液按照碱性磷酸酶与三碘甲状腺原氨酸抗原与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的摩尔比为1:1.1~1.3的比例混合，在室温下反应，使生成所述碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原，反应结束，将反应液通过G-25凝胶柱除盐，选择具有适当pH值的缓冲液调整浓度和pH值即得，其中碱性磷酸酶的缓冲液的浓度为0.5~1.5mg/ml。

[0026] 优选地，步骤①中，取三碘甲状腺原氨酸抗原，加入二甲基亚砜溶解该抗原至浓度为 $20\sim 50\text{mg/mL}$ ，加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯，室温反应 $2\sim 3$ 小时，用二甲基亚砜将反应液1:10稀释，于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0027] 优选地，步骤②中，取浓度大于等于5mg/ml的碱性磷酸酶的磷酸盐缓冲液，用pH9~10的碳酸氢钠缓冲液稀释至0.5~1.5mg/ml，加入步骤①所得反应液，室温静置反应 $20\sim 60\text{min}$ 。

[0028] 进一步地，所述的第一试剂的制备方法如下：配制含有荧光素的pH为9~10的缓冲液，然后按照荧光素与三碘甲状腺原氨酸抗体的分子比为 $20\sim 200:1$ 的比例，将所述含有荧光素的pH为9~10的缓冲液与三碘甲状腺原氨酸抗体的pH为9~10的缓冲液混合，混匀后，室温静置反应，然后将反应液通过G-25凝胶柱进行分离，除去游离的荧光素，得到含有荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液，接着用具有适当pH值的缓冲液调整浓度和pH，即得所述的第一试剂。其中适当pH值的缓冲液可以为例如含有0.5%牛血清白蛋白、pH8.0的TRIS缓冲液。

[0029] 进一步地，所述磁分离剂的制备方法如下：将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下，室温反应 $2\sim 18$ 小时，反应结束，磁分离，去上清，用具有适当pH值的缓冲液调整pH和浓度，即得所述的磁分离剂。其中所述的磁微粒具有超顺磁性，其直径为 $0.5\sim 2\mu\text{m}$ ，每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于 0.4mmol ；所述的荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体，纯度大于等于90wt%，稀释效价大于1:100万。

[0030] 优选地，上述的具有适当pH值的缓冲液为含有0.5%牛血清白蛋白、pH8.0的TRIS缓冲液。

[0031] 本发明所述的荧光素可以是已知的各种荧光素，常用的有例如异硫氰酸荧光素，四乙基罗丹明，四甲基异硫氰酸罗丹明等。

[0032] 本发明同时还提供了一种采用上述的试剂盒应用于三碘甲状腺原氨酸定量检测的检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0033] (1) 免疫反应：在检测管中加入待测样本原液，依次加入第一试剂和第二试剂，混匀，在 $25\sim 40^{\circ}\text{C}$ 下进行第一次温育，然后加入磁分离试剂，混匀，在 $25\sim 40^{\circ}\text{C}$ 下进行第二次温

育；

[0034] (2) 洗涤：使磁微粒在磁场中沉降，去除上清，加入清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬，然后磁分离，去除上清；

[0035] (3) 加底物溶液检测发光强度：在检测管中加入碱性磷酸酶催化的化学发光底物，去除磁场，充分混悬后检测发光强度值。

[0036] 进一步地，步骤(1)中所述第一次温育的时间可以为 5 ~ 30min，通常为 15min；第二次温育的时间可以为 2~10min，通常为 5min。

[0037] 由于以上技术方案的实施，本发明与现有技术相比具有如下优点：

[0038] 1. 申请人发现，采取辛二酸二琥珀酰亚胺酯作为交联剂进行碱性磷酸酶和三碘甲状腺原氨酸抗原的偶联时，具有和其它交联剂相比更高的偶联效率，在降低制备成本的同时，有利于提高检测效果。因此，本发明的试剂盒中的三种试剂均可以通过稳定的制备工艺制备得到，生产成本低，且由于制备工艺的稳定性，试剂盒分析批间差小，检测的分析间精密度提高。

[0039] 2. 本发明的试剂盒中的含有碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液的制备方法，能够有效将三碘甲状腺原氨酸抗原与碱性磷酸酶偶联，偶联效率高，进一步降低试剂盒的成本和确保试剂盒的检测效果。

[0040] 3、采取本发明的试剂盒进行检测，准确度好，精密度高，灵敏度高，检测范围宽，样品无需预稀释，操作简单省时。与采用进口试剂盒进行检测的方法相比，本发明的检测方法在成本上具有显著的优势。

附图说明

[0041] 图 1 为测试校准品标准曲线；

[0042] 图 2 为灵敏度评价拟合曲线；

[0043] 图 3 为血清样本检测结果相关性(其中横坐标 x 为实施例 4 制备得的试剂盒样本测值，浓度单位为 ng/mL，纵坐标 y 为雅培公司试剂盒样本测值，浓度单位为 ng/mL)。

具体实施方式

[0044] 实施例 1 第一试剂的制备

[0045] (1) 材料与仪器：以磷酸盐缓冲液保存的三碘甲状腺原氨酸(T3)单克隆抗体(纯度超过 95wt%，浓度为 2mg/mL)；异硫氰酸荧光素(FITC)，碳酸钠等试剂应达到化学纯；G-25 凝胶纯化柱采购自 GE 公司。

[0046] (2) 制备步骤：

[0047] ①用 0.1 ~ 0.2mol/L pH9.0~10.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/mL 的 FITC 溶液；

[0048] ②按照三碘甲状腺原氨酸单克隆抗体与 FITC 分子比为 1:20 的比例在抗体溶液中加入步骤①所配 FITC 溶液，混合均匀，室温静置 12h 小时，反应生成 T3 抗体-FITC 连接物；

[0049] ③将经过步骤②的反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离，除去未反应的 FITC，得到含有 T3 抗体-FITC 连接物(即 FITC 标记的 T3 抗体)的溶液；

[0050] ④将步骤③所得含有 T3 抗体-FITC 连接物的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 T3 抗体-FITC 连接物浓度为 0.5 ~ 1 μg/mL，即

为第一试剂。

[0051] 实施例 2 第二试剂的制备

[0052] (1) 材料与仪器 :T3 抗原(固体粉末,纯度超过 95wt%);以磷酸缓冲液保存的碱性磷酸酶(ALP 溶液,ALP 纯度为约 99%,比活性为约 1500U/mg,浓度为 10mg/mL);交联剂 DSS 购自 THERMO 公司,TRIS 等化学试剂应达到化学纯;G-25 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0053] (2) 制备步骤:

[0054] ①取 1mg T3 抗原,加入 DMSO 溶解该抗原至浓度为 20~50mg/mL,加入 DSS0.5mg,室温反应 2 小时,用 DMSO 将反应液 1:10 稀释,2-8℃保存备用;

[0055] ②取 1mg 的 ALP 溶液,用 0.1M pH9.5 的 NaHCO₃ 缓冲液将 ALP 溶液稀释到 1mg/ml,稀释后的 ALP 缓冲液中加入步骤①制备的 T3-DMSO 溶液进行连接反应,加入 T3-DMSO 溶液体积为 ALP 缓冲液体积的 1/20,室温静置反应 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,2-8℃保存备用;

[0056] ③将步骤②的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.02~0.1 μg/ml 和 pH9~10,即为第二试剂。

[0057] 实施例 3 磁分离试剂的制备

[0058] (1) 材料与仪器:

[0059] 磁微粒的悬浮液:磁微粒含量 5wt%,磁微粒含羧基(COOH)活性集团,每克(g)磁微粒(干重)羧基含量不低于 0.4 毫摩尔(mmol),具有超顺磁性,直径在 0.5-2 μm 之间。

[0060] 抗 FITC 抗体:可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,纯度为 90wt% 以上,稀释效价超过 1:100 万;

[0061] 2- 吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS 和其他试剂应达到化学纯。

[0062] (2) 制备步骤:

[0063] ①取 100mg 磁微粒的悬浮液,磁分离去上清,用 0.05mol/L, pH4.5~5MES 缓冲液 10mL 重悬;

[0064] ②加入 2~4mg 的抗 FITC 抗体,室温混悬 30~60min;

[0065] ③加入 0.5~1mL 新鲜配制的 10mg/mL 的 EDC 水溶液,室温混悬 2~12h;

[0066] ④磁分离,去上清,用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液重悬到 1mg/mL, pH8.0,即为磁分离试剂。

[0067] 实施例 4 三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒

[0068] 该试剂盒包括:

[0069] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 0.75 μg/mL),5mL;

[0070] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 0.06 μg/mL),5mL;

[0071] 按照实施例 3 方法制备的磁分离试剂 5mL。

[0072] 实施例 5 三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒

[0073] 该试剂盒包括:

[0074] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 0.5 μg/mL),5mL;

[0075] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 0.02 μg/mL),5mL;

[0076] 按照实施例 3 方法制备的磁分离试剂 5mL。

[0077] 实施例 6 三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒

[0078] 该试剂盒包括:

[0079] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$), 5mL ;

[0080] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$), 5mL ;

[0081] 按照实施例 3 方法制备的磁分离试剂 5mL。

[0082] 实施例 7 采取实施例 4 的试剂盒进行三碘甲状腺原氨酸的定量检测

[0083] (1) 检测步骤 :

[0084] ①免疫反应 : 在检测管中加入 $30 \mu\text{L}$ 待测样本(血清或血浆)原液, 然后加入 $50 \mu\text{L}$ 第一试剂, $50 \mu\text{L}$ 第二试剂, 混匀, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下温育 15min ; 加入 $50 \mu\text{L}$ 磁分离试剂, 混匀, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下温育 5min ;

[0085] ②洗涤 : 使磁微粒在磁场中沉降, 去除上清, 加入 $600 \mu\text{L}$ 的清洗液, 去除磁场, 震荡使磁微粒充分混悬, 然后磁分离, 去除上清 ; 此步骤重复 3 次 ;

[0086] ③加底物溶液检测发光强度 : 在检测管中加入 $150 \mu\text{L}$ 碱性磷酸酶化学发光底物溶液(北京阿匹斯生物技术有限公司 APCL- I), 震荡使磁微粒充分混悬, 在 5min 内检测发光强度。

[0087] (2) 绘制校准品标准曲线

[0088] 校准品标准曲线参见图 1。

[0089] (3) 灵敏度评价

[0090] 检测“0”浓度样本, 重复检测 20 次, 计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD), 并计算 $M-2SD$ 值, 根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程, 将 $M-2SD$ 值带入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为最低检测限。本方法的灵敏度不大于 5ng/mL 。其中 : A 点发光值分别参见表 1 :

[0091] 表 1

T3-STD-A (RLU)			
103692	127176	117531	113194
118408	113019	122752	115759
112461	109909	108658	109838
117797	110876	116113	119433
116331	110911	113067	116218

[0094] A 点发光均值 $X=114657$

[0095] $SD=5273$

[0096] $X-2SD=104111$

[0097] B 点发光值分别参见表 2。

[0098] B 点发光均值 $X=64179$

[0099] 表 2

[0100]

T3-STD-B(RLU)
68001
60357

[0101] A, B 点连点拟合曲线参见图 2。灵敏度 =0.104ng/mL。

[0102] (4) 精密度评价

[0103] ①分析内精密度

[0104] 将实施例 4 的试剂盒一批, 分别测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定, 结果参见表 3, 得出批内变异系数为 3.88% ~ 6.24%。

[0105] 表 3 分析内精密度测试

[0106]

测定血清浓度 (ng/mL)	测定次数	分析内 CV (%)
0.875	10	6.24
3.432	10	4.50
6.546	10	3.88

[0107] ②分析间精密度

[0108] 将实施例 4 的试剂盒取三批, 每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定。每份血清得到 30 个浓度测值, 参见表 4, 统计分析间变异系数, 为 6.04% ~ 7.22%。

[0109] 表 4 分析间精密度测试

[0110]

测定血清浓度 (ng/mL)	测定次数	分析间 CV (%)
0.875	30	7.22
3.432	30	6.65
6.546	30	6.04

[0111] (5) 准确度评价

[0112] 在 2 例混合血清样本中添加不同量 T3 标准品, 形成 3 个浓度水平的血清添加样本, 添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度, 按下述公式计算回收率。本方法血清基质回收率在 90-110% 之间。数据参见表 5。

$$[0113] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0114] R: 回收率;

[0115] V: 加入标准溶液的体积;

- [0116] V_0 :人源样品的体积；
 [0117] C :人源样品加入标准溶液后的检测浓度；
 [0118] C_0 :人源样品的检测浓度；
 [0119] C_s :标准溶液的浓度。
 [0120] 表 5 准确度评价 - 添加回收实验数据
 [0121]

样品值	添加浓度 (ng/mL)	添加后终浓度 (ng/mL)	测定平均值 (ng/mL)	回收率 (%)
1.68	1	2.68	2.58	96.5%
	2	3.68	3.59	97.4%
	4	5.68	5.89	103.7%
5.26	1	6.26	6.23	99.5%
	2	7.26	7.13	98.3%
	4	9.26	9.41	101.7%

- [0122] (6) 试剂盒特异性评价

[0123] 对试剂盒特异性检验是选取与三碘甲状腺原氨酸有类似结构的测试不同浓度甲状腺激素 (T4)、反三碘甲状腺原氨酸(rT3) 和二碘甲腺原氨酸(T2) 样本,配制成大于生理浓度的样本,以本方法进行测定。结果见表 6,本法与 T4、rT3、T2 的交叉反应率均无交叉反应。

- [0124] 表 6 特异性实验

- [0125]

交叉反应物	实验浓度	T3 测定浓度 (ng/mL)
甲状腺激素	500ng/ml	<0.3
3、3'、5'-反三碘甲状腺原氨酸	50ng/ml	<0.3
3、3'-二碘甲状腺原氨酸	50ng/ml	<0.3

- [0126] (7) 相关性评价

[0127] 用试剂盒和雅培公司的化学发光试剂盒对 100 份人血清样品同时进行检测。其检测结果参见附图 3,以本发明方法的测的血清 T3 浓度为横坐标,以雅培公司试剂盒测定的结果为纵坐标作回归分析,相关方程为 $y=-0.02689+1.0434x$,相关系数为 $:0.9689$ 。经统计学处理结果表明,本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

- [0128] (8) 热稳定性评价

[0129] 对试剂盒分别进行 4℃ 12 个月和 37℃ 7 天的稳定性实验,结果表明试剂盒标准品

发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达12个月。

[0130] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

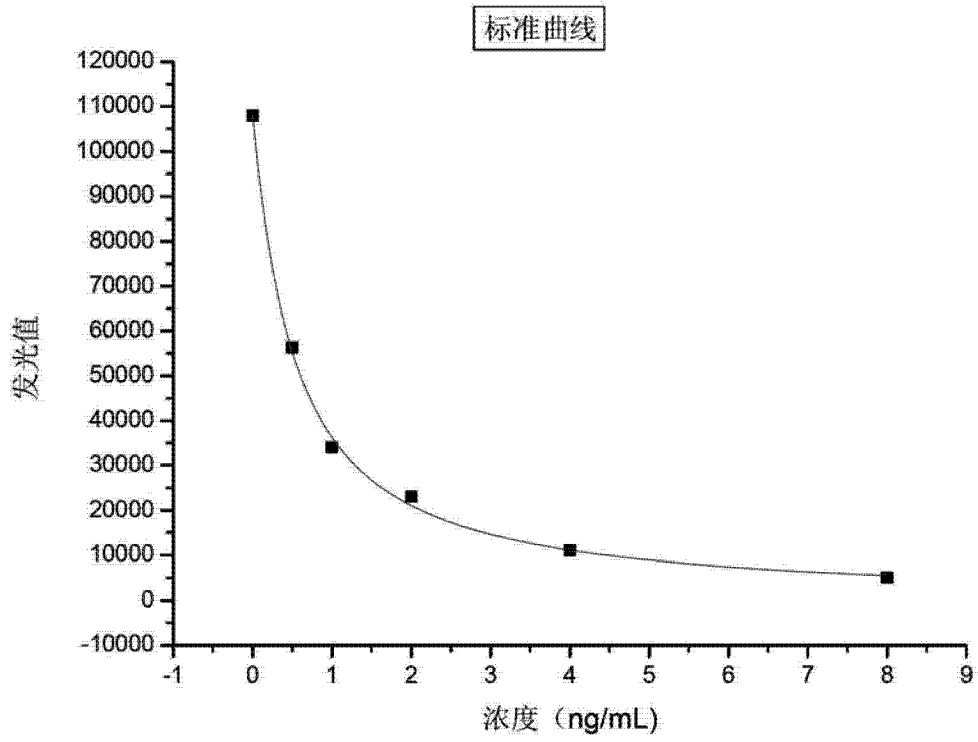


图 1

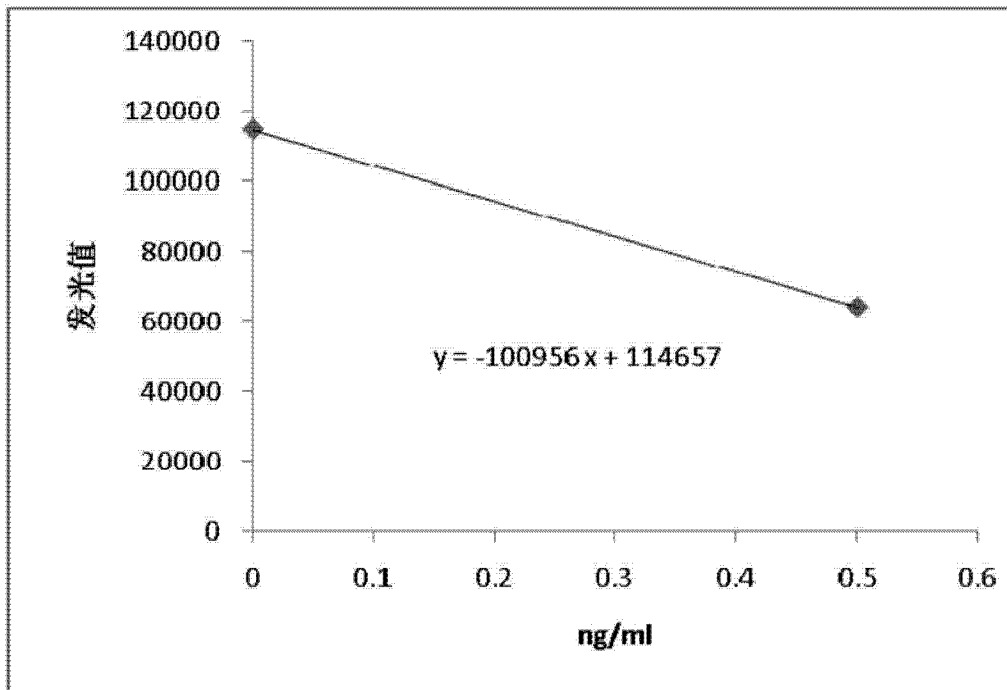


图 2

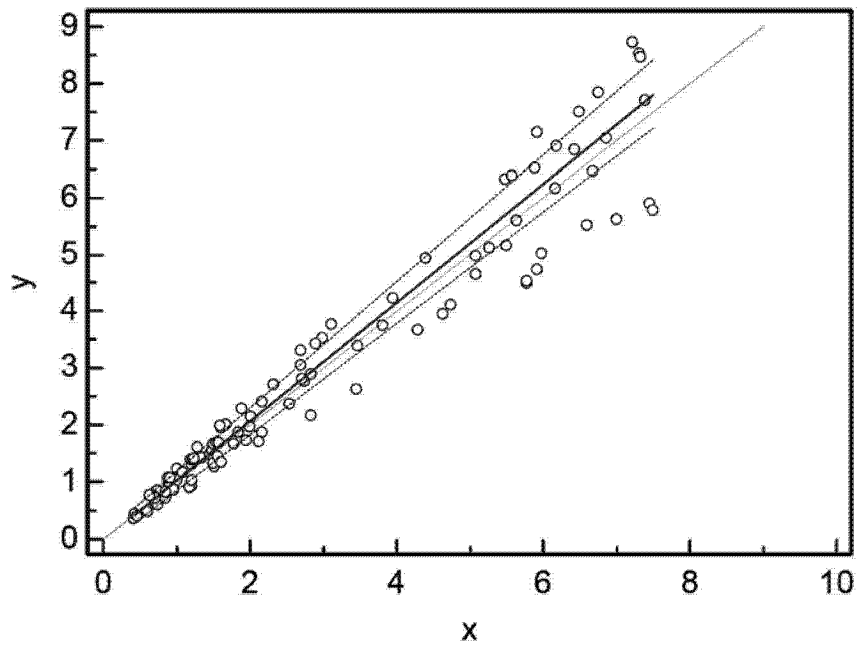


图 3

专利名称(译)	一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN103048477A	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210550222.1	申请日	2012-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	于大为 程晓蕾		
发明人	于大为 程晓蕾		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	汪青		
其他公开文献	CN103048477B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种三碘甲状腺原氨酸的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法，该试剂盒包括：第一试剂：含荧光素标记的三碘甲状腺原氨酸抗体的溶液；第二试剂：含碱性磷酸酶标记的三碘甲状腺原氨酸抗原的溶液；磁分离剂：含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。本发明使得能够以更低成本和更高准确度和精密度对三碘甲状腺原氨酸进行定量检测。

