



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239371 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811067391.3

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2018.09.13

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 刘子菱 刘婷婷 何浩会 王香琪
阚洪晶 丛凡溟 付莉莉

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 刘微

(51)Int.Cl.

G01N 33/78(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法,属于体外检验技术领域,解决现有技术反应时间长、测量速度慢、线性范围窄、在被测物质浓度高时易发生勾状效应等技术问题。试剂盒包括以下试剂:固相试剂R1:含有T3类似物包被的顺磁性微球的悬液;液相试剂R2:含有吲哚酯标记的T3抗体的悬液;其中,R1中的顺磁性微球是表面包裹带有羧基活性基团的四氧化三铁,顺磁性微球的粒径大小为0.1~5 μm。本发明提供的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法,采用化学发光免疫分析法定量检测血清/血浆中的游离三碘甲状腺原氨酸,具有操作简便、灵敏度高、检测快速、线性范围宽、费用低廉、便于自动化等优点。

1. 一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,包括以下试剂:

固相试剂R1:含有T3类似物包被的顺磁性微球的悬液;

液相试剂R2:含有吡啶酯标记的T3抗体的悬液;

其中,R1中的顺磁性微球是表面包裹带有羧基活性基团的四氧化三铁,顺磁性微球的粒径大小为0.1~5 μ m。

2. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,T3抗体为鼠单克隆游离T3抗体。

3. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,固相试剂R1的制备方法为:

A、顺磁性微球活化:取顺磁性微球用pH6.0~8.0、10mM的磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中;采用浓度为0.5%~5%的EDC溶液活化,在30~40 $^{\circ}$ C条件下,震荡混匀30~40分钟,得到顺磁性微球重悬液;

B、包被抗原:将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中,投料比为0.2%~2%,在25~37 $^{\circ}$ C条件下反应2~3小时;再在25~37 $^{\circ}$ C条件下封闭20~40分钟;将包被好的顺磁性微球用pH6.0~8.0,10mM磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中,得到含有浓度为0.05~0.5mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液。

4. 根据权利要求1或2所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,液相试剂R2的制备方法为:

取T3抗体,用pH9.5,0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml,加入吡啶酯,标记比例为1:3,缓慢震荡,避光反应过夜;混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吡啶酯标记的T3抗体的悬液。

5. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,还包括校准品,所述校准品为含一定量T3抗原的去T3、T4人血清基质,其中低值校准品含T3抗原的浓度为1~2pg/ml,高值校准品含T3抗原的浓度为6~8pg/ml。

6. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,还包括质控品,所述质控品为含一定量T3抗原的去T3、T4人血清基质,质控水平1的靶值范围为1~2pg/ml,质控品水平2的靶值范围为5~8pg/ml。

7. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,还包括酸性激发液和碱性激发液;

酸性激发液由氧化氢和硝酸水溶液组成,其中过氧化氢的质量浓度在0.5%~5%之间,硝酸的摩尔浓度在1~10mM之间;

碱性激发液由氢氧化钠水溶液组成,其中氢氧化钠的摩尔浓度在0.05~1M之间。

8. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,还包括清洗液,所述清洗液是含50g/L磷酸氢二钠、10g/L磷酸二氢钠、100g/L NaCl和2%表面活性剂的缓冲液。

9. 根据权利要求1所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂为Triton-100。

10. 根据权利要求1或2所述的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 固相试剂R1的制备

A、顺磁性微球活化：取顺磁性微球，用pH6.0~8.0、10mM的磷酸缓冲液清洗，重悬于上述缓冲液中；采用浓度为0.5%~5%的EDC溶液活化，在30~40℃条件下，震荡混匀30~40分钟，得到顺磁性微球重悬液；

B、包被抗原：将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中，投料比为0.2%~2%，在25~37℃条件下反应2~3小时；再在25~37℃条件下封闭20~40分钟；将包被好的顺磁性微球用pH6.0~8.0，10mM磷酸缓冲液清洗，重悬于上述缓冲液中，得到含有浓度为0.05~0.5mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液；

(2) 液相试剂R2的制备

取T3抗体，用pH9.5，0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml，加入吖啶酯，标记比例为1:3，缓慢震荡，避光反应过夜；混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吖啶酯标记的T3抗体的悬液。

一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检验技术领域,尤其涉及一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 甲状腺是一个内分泌腺体,它分泌的具有生物活性的甲状腺激素对机体的生理作用广泛而强烈。它能促进生长发育和组织分化,促进糖、脂肪、蛋白质的氧化分解,增大耗氧和产热效应,增加机体基础代谢率,对中枢神经系统、心血管及消化系统等均具有重要作用。甲状腺激素分泌量增加或减少均可导致甲状腺功能失调,内分泌代谢紊乱。因此,正确检测甲状腺相关激素,对诊断治疗甲状腺疾病具有重要意义。

[0003] 三碘甲状腺原氨酸(3,5,3'-L-三碘甲状腺原氨酸,T3)是由甲状腺合成、分泌,以及外围四碘甲状腺原氨酸(T4)转化而成的一种激素。在循环中99.7%的T3与运转蛋白(主要是甲状腺素结合球蛋白)可逆性地结合在一起,剩余少量的T3不与转运蛋白结合,这部分未结合的T3就是游离T3(FT3),FT3可以通过细胞膜与受体结合发挥生理效应,因此它是甲状腺激素发生生理效应的真正活性部分,能较确切地反映甲状腺的功能状态及其他对人体技能的影响。且甲状腺的机制状态与循环中FT3的水平密切相关。所以FT3可以作为区别甲亢、甲减及甲状腺功能亚临床状态的重要指标。

[0004] 检测样品中FT3目前多采用标记T3类似物的方法。使用这种方法要求类似物与所测激素具有充分的化学相似性,即类似物要具有与T3抗体结合的活性,并且结合能力应与T3分子相同或相近,但却没有与TBG(甲状腺素结合球蛋白)及THBP等结合蛋白的结合活性,或者虽然有结合活性,但结合能力远远低于与T3抗体结合的能力。

[0005] 测定游离激素方法学的准确性与其它测定激素的方法的准确性概念上有差别,因为测定的是平衡体系中的游离部分,回收率和样品稀释都不好评估。在测定过程中结合激素对测定存在干扰。样品中激素的结合部分与游离部分处于一种动态平衡状态,而且结合部分的激素浓度远大于游离部分的浓度,与蛋白结合的T3浓度为FT3浓度的3000-5000倍。测定时,抗体结合游离激素就会对这种平衡造成微扰,体系要重新建立平衡,即结合的激素要解离一部分变成游离的,这样的结果是增加了游离激素的总量。然而这种平衡的变化对测定造成多大的干扰主要取决于二个因素,一个是激素与结合蛋白之间的结合常数和解离常数以及抗体与游离激素之间的结合常数,另一个是整个分析操作时间的长短。结合激素的解离常数要小,但无法改变这个常数,所以唯一可做的是选择高亲合力的抗体,它与激素的结合常数要大,这样也可以使分析过程在尽可能短的时间内完成,使结合激素对测定的干扰减少到最低水平。

[0006] 发光免疫分析是将发光分析和免疫反应相结合而建立起来的一种新的检测微量抗原或抗体的新型标记免疫分析技术,以发光物质作为底物,并借助其自身的发光强度直接进行测定。在反应条件一定时,免疫反应的速度则只决定于分子的运动速度和反应的表面积。目前在ELISA和时间荧光分辨检验技术中,其固相载体都是使用聚苯乙烯小杯状板

条,这种固相载体的吸附表面是平整而光滑的,其反应的表面积和包被的表面积均十分有限,所以反应时间长,测量速度慢,线性范围窄,在被测物质浓度高时,易发生勾状效应而出现错误结果由于包被的固相载体又是反应杯,所以反应杯就决定了测定的项目,从而不利于流水线似的自动化定量分析。根据标记反应体系又可分为酶促和非酶促两种,酶促反应检测方式较简单,却存在工作曲线随时间漂移、低端斜率呈非线性下移等不足。

发明内容

[0007] 本发明针对上述技术问题,提供一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法,该试剂盒采用化学发光免疫法定量检测血清/血浆中的游离三碘甲状腺原氨酸,具有操作简便、灵敏度高、检测快速、费用低廉、便于自动化等优点。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,包括以下试剂:

[0010] 固相试剂R1:含有T3类似物包被的顺磁性微球的悬液;

[0011] 液相试剂R2:含有吡啶酯标记的T3抗体的悬液;

[0012] 其中,R1中的顺磁性微球是表面包裹带有羧基活性基团的四氧化三铁,顺磁性微球的粒径大小为0.1~5 μ m。

[0013] 优选地,T3抗体为鼠单克隆游离T3抗体。

[0014] 上述固相试剂R1的制备方法为:

[0015] A、顺磁性微球活化:取顺磁性微球,用pH6.0~8.0、10mM的磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中;采用浓度为0.5%~5%的EDC溶液活化,在30~40 $^{\circ}$ C条件下,震荡混匀30~40分钟,得到顺磁性微球重悬液;

[0016] B、包被抗原:将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中,投料比为0.2%~2%,在25~37 $^{\circ}$ C条件下反应2~3小时;再在25~37 $^{\circ}$ C条件下封闭20~40分钟;将包被好的顺磁性微球用pH6.0~8.0,10mM磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中,得到含有浓度为0.05~0.5mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液。

[0017] 上述液相试剂R2的制备方法为:

[0018] 取T3抗体,用pH9.5,0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml,加入吡啶酯,标记比例为1:3,缓慢震荡,避光反应过夜;混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吡啶酯标记的T3抗体的悬液。

[0019] 上述游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,还包括校准品,所述校准品为含一定量T3抗原的去T3、T4人血清基质,其中低值校准品含T3抗原的浓度为1~2pg/ml,高值校准品含T3抗原的浓度为6~8pg/ml。

[0020] 上述游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,还包括质控品,所述质控品为含一定量T3抗原的去T3、T4人血清基质,质控水平1的靶值范围为1~2pg/ml,质控品水平2的靶值范围为5~8pg/ml。

[0021] 上述游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,还包括酸性激发液和碱性激发液;

[0022] 酸性激发液由氧化氢和硝酸水溶液组成,其中过氧化氢的质量浓度在0.5%~5%之间,硝酸的摩尔浓度在1~10mM之间;

[0023] 碱性激发液由氢氧化钠水溶液组成,其中氢氧化钠的摩尔浓度在0.05~1M之间。

[0024] 上述游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,还包括清洗液,所述清洗液是含50g/L磷酸氢二钠、10g/L磷酸二氢钠、100g/L NaCl和2%表面活性剂的缓冲液。

[0025] 优选地,所述表面活性剂为Triton-100。

[0026] 本发明还提供了上述游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0027] (1) 固相试剂R1的制备

[0028] A、顺磁性微球活化:取顺磁性微球,用pH6.0~8.0、10mM的磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中;采用浓度为0.5%~5%的EDC溶液活化,在30~40℃条件下,震荡混匀30~40分钟,得到顺磁性微球重悬液;

[0029] B、包被抗原:将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中,投料比为0.2%~2%,在25~37℃条件下反应2~3小时;再在25~37℃条件下封闭20~40分钟;将包被好的顺磁性微球用pH6.0~8.0,10mM磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中,得到含有浓度为0.05~0.5mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液;

[0030] (2) 液相试剂R2的制备

[0031] 取T3抗体,用pH9.5,0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml,加入吖啶酯,标记比例为1:3,缓慢震荡,避光反应过夜;混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吖啶酯标记的T3抗体的悬液。

[0032] 本发明还提供了上述游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒的检测方法,步骤如下:

[0033] 1) 将待测样本与R2试剂孵育10min;

[0034] 2) 再加入R1试剂孵育10min;

[0035] 3) 加入清洗缓冲液洗涤,将未反应的溶液清洗去除;

[0036] 4) 加入酸性激发液,使吖啶酯标记物游离;加入碱性激发液,使吖啶酯发射光子。

[0037] 本发明的试剂盒检测采用竞争法,首先将T3类似物包被到顺磁性磁球上作为固相,以吖啶酯标记的T3抗体作为液相,使样本中的游离T3和顺磁性微球上的T3类似物共同竞争吖啶酯标记的T3抗体,形成吖啶酯抗原抗体复合物,吖啶酯在H₂O₂的稀碱溶液中发生氧化还原反应生成N-甲基吖啶酮,当它恢复到基态时发光,根据发光强度测定样本中游离T3的浓度,样本中游离T3的含量与系统所检测的发光信号值(S)呈负相关,发光强度越高表明样品游离T3浓度越低,根据发光曲线可得出游离T3浓度值。

[0038] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0039] 1、本发明提供的铁蛋白化学发光检测试剂盒,以发光物质作为底物,并借助其自身的发光强度直接测定样本中游离T3的含量。吖啶酯量子产率高;发光效率高,作为化学发光标记物发光体系简单,自然本底低,受干扰少,信噪比较高;用作化学发光标记物时,除具有上述优点外还易于偶联、标记简单且稳定性好、标记后对其发光性能影响少。

[0040] 2、本发明检测游离T3的化学发光免疫微粒分析试剂盒采用竞争法对游离T3含量进行定量检测;采用高特异性的单克隆抗体和顺磁性微球,检验方法简单,自动化程度高。

[0041] 3、本发明将化学发光和免疫微粒相结合,提供一种接近均相的反应体系,与现有技术相比,本发明试剂盒有更高的检测灵敏度和特异性。

[0042] 发明的检测游离T3用的化学发光微粒检测试剂盒具有以下优点:

[0043] 1、使用的抗体为鼠单克隆抗体,提高反应的特异性,使免疫反应的亲和力更高,而

且单抗生产批间差异相对小,易于保证产品批间稳定。

[0044] 2、使用吡啶酯为发光标记物,发光强度稳定,反应速度快且与抗体连接后不会对待测物的结合产生影响。

[0045] 3、使用顺磁性微球为固相载体,免疫反应更接近均一液相,反应更充分和迅速,而且使结合的免疫复合物更加容易分离,降低非特异性吸附。

[0046] 4、检测范围宽,0.2~20pg/mL。

[0047] 5、成本低,与市场上同类产品比较,本试剂盒性能良好,成本低,具有临床应用价值。

[0048] 综上,本发明提供的铁蛋白化学发光检测试剂盒的制备方法,该方法简单易操作,制备得到的试剂盒,灵敏度高、线性范围广、稳定性好。

具体实施方式

[0049] 本发明提供了一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒,包括以下试剂:

[0050] 固相试剂R1:含有T3类似物包被的顺磁性微球的悬液;

[0051] 液相试剂R2:含有吡啶酯标记的T3抗体的悬液;

[0052] 校准品:校准品为含一定量T3抗原的的去T3、T4人血清基质,低值校准品含T3抗原的浓度为1~2pg/ml,高值校准品含T3抗原的浓度为6~8pg/ml;

[0053] 质控品:质控品为含一定量T3抗原的的去T3、T4人血清基质,质控水平1的靶值范围为1~2pg/ml,质控品水平2的靶值范围为5~8pg/ml;

[0054] 酸性激发液:由氧化氢和硝酸水溶液组成,其中过氧化氢的质量浓度在0.5%~5%之间,硝酸的摩尔浓度在1~10mM之间;

[0055] 碱性激发液:由氢氧化钠水溶液组成,其中氢氧化钠的摩尔浓度在0.05~1M之间;

[0056] 清洗液:所述清洗液是含50g/L磷酸氢二钠、10g/L磷酸二氢钠、100g/LNaCl和2%表面活性剂的缓冲液,表面活性剂优选Triton-100,所述清洗液中还含有2%的Proclin-300,Proclin-300作为防腐剂。

[0057] 其中,R1中的顺磁性微球是表面包裹带有羧基活性基团的四氧化三铁,顺磁性微球的粒径大小为0.1~5 μ m;T3抗体为鼠单克隆游离T3抗体。

[0058] 固相试剂R1的制备方法为:

[0059] A、顺磁性微球活化:取顺磁性微球,用pH6.0~8.0、10mM的磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中;采用浓度为0.5%~5%的EDC溶液活化,在30~40℃条件下,震荡混匀30~40分钟,得到顺磁性微球重悬液;

[0060] B、包被抗原:将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中,投料比为0.2%~2%,在25~37℃条件下反应2~3小时;再在25~37℃条件下封闭20~40分钟;将包被好的顺磁性微球用pH6.0~8.0,10mM磷酸缓冲液清洗,重悬于上述缓冲液中,得到含有浓度为0.05~0.5mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液;

[0061] 液相试剂R2的制备方法为:

[0062] 取T3抗体,用pH9.5,0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml,加入吡啶酯,标记比例为1:3,缓慢震荡,避光反应过夜;混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吡啶酯标记的T3抗体的悬液。

[0063] 游离T3校准品的制备方法为：

[0064] 取浓度为20ug/ml的T3抗原36ul加入到50ml的去激素血清中，充分混匀，通过标定，得到浓度为20pg/ml的校准品原液。(注：T3可与蛋白结合在一起，剩余少量的T3不与蛋白结合，这部分未结合的T3就是游离T3(FT3)。因此FT3校准品配制后得到的浓度不是其理论浓度，需要通过标定得到浓度值)。用校准合格的对照测试系统对一级校准品进行测试，每天测试5次，连续测试3天。计算测试结果的平均值 \bar{x} 和标准差SD后，对数据进行离群值检验，依据格拉布斯剔除原则剔除离群数据，重新计算余下数据的平均值和标准差，此平均值即为一级校准品的定值结果。

[0065] 产品校准品的制备方法为：

[0066] 将去激素人血清添加三碘甲状腺原氨酸配制成校准品低值和校准品高值，用校准后的机器，FT3试剂经多次测定后，统计结果为校准品赋值。校准品低值浓度为1~2pg/ml，校准品高值浓度为6~8pg/ml。

[0067] 质控品的制备方法为：

[0068] 将去激素人血清添加三碘甲状腺原氨酸配制成质控品水平1和质控品水平2，用校准后的机器，FT3试剂经多次测定后，统计结果为质控品赋值。质控水平1靶值范围为1~2pg/ml，质控品水平2的靶值范围为5~8pg/ml。

[0069] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案，下面将结合实施例对本发明作进一步的详细介绍。

[0070] 实施例1游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒的制备

[0071] 固相试剂R1的制备：

[0072] A、顺磁性微球活化：取表面-COOH基团的顺磁性微球，用pH6.0、10mM的磷酸缓冲液清洗两次，磁分离后移除上清；加入上述磷酸缓冲液配制的EDC(浓度为0.5%)溶液，涡旋混匀，30℃下活化40分钟；磁分离移除上清，再加入上述磷酸缓冲液清洗3次后即可，得到顺磁性微球重悬液；

[0073] B、包被抗原：将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中，投料比为0.2%，在25℃条件下反应3小时，磁分离移除上清；再加入封闭剂如含蛋白或氨基酸(浓度为10%)的TRIS缓冲溶液，在25℃条件下封闭40分钟；将包被好的顺磁性微球用pH6.0,10mM磷酸缓冲液清洗，重悬于上述缓冲液中，得到含有浓度为0.05mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液；4℃保存。

[0074] 液相试剂R2的制备：

[0075] 取T3抗体，用pH9.5,0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml，加入吡啶酯，标记比例为1:3，缓慢震荡，4℃避光反应过夜；用含氨基酸(浓度为10%)的PBS缓冲液封闭；混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吡啶酯标记的T3抗体的悬液。

[0076] 实施例2游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒的制备

[0077] 固相试剂R1的制备：

[0078] A、顺磁性微球活化：取表面-COOH基团的顺磁性微球，用pH8.0、10mM的磷酸缓冲液清洗两次，磁分离后移除上清；加入上述磷酸缓冲液配制的EDC(浓度为5%)溶液，涡旋混匀，40℃下活化30分钟；磁分离移除上清，再加入上述磷酸缓冲液清洗2次后即可，得到顺磁

性微球重悬液；

[0079] B、包被抗原：将T3抗原类似物加入至顺磁性微球重悬液中，投料比为2%，在37℃条件下反应2小时，磁分离移除上清；再加入封闭剂如含蛋白或氨基酸（浓度为10%）的TRIS缓冲溶液，在37℃条件下封闭20分钟；将包被好的顺磁性微球用pH8.0, 10mM磷酸缓冲液清洗，重悬于上述缓冲液中，得到含有浓度为0.5mg/ml的T3类似物包被的顺磁性微球的悬液；4℃保存。

[0080] 液相试剂R2的制备：

[0081] 取T3抗体，用pH9.5, 0.5M/L的磷酸缓冲液稀释至终浓度为20mg/ml，加入吖啶酯，标记比例为1:3，缓慢震荡，4℃避光反应过夜；用含氨基酸（浓度为10%）的PBS缓冲液封闭；混合液经过葡聚糖凝胶G-25柱纯化后得到的含有浓度为1mg/ml的吖啶酯标记的T3抗体的悬液。

[0082] 实施例3试剂盒性能实验

[0083] 1、线性的检测：将线性样本浓度为0.0pg/mL、1.44pg/mL、3.52pg/mL、6.97pg/mL、13.89pg/mL、27.73pg/mL和34.64pg/mL作标准曲线，得到线性相关系数 $r=0.998$ ，线性范围为0.2~20pg/mL。参见表1。

[0084] 表1

[0085]

浓度	光量子数
0.00	503469
1.44	239574
3.52	132846
6.97	62907
13.89	36017
27.73	20368
34.64	19845

[0086] 2、灵敏度检测：分析灵敏度的定义为对零值校准品进行20次光量子数测定，取其平均值减去两倍的标准差，所得光量子数带入标准曲线所得即为灵敏度；计算FT3化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度为0.12pg/mL，详见表2。

[0087] 表2：

[0088]

测试次数	光量子数	测试次数	光量子数
1	507505	11	494536
2	511468	12	486865
3	500199	13	486778
4	494393	14	482429
5	502286	15	480643
6	509879	16	480862

[0089]

7	497881	17	483554
8	493176	18	481744
9	500615	19	480624
10	508344	20	483421
平均值		493360	
标准差		10864	
灵敏度 (pg/mL)		0.12	

[0090] 3、重复性测试：重复性测试方法为选择高值和低值两个浓度的样本各重复检测10次，计算10次测量结果的平均值M和标准差SD，根据公式(1)得出变异系数CV，结果应符合2.7的要求。

[0091] $CV = SD/M \times 100\% \dots \dots \dots (1)$

[0092] 式中：

[0093] CV—变异系数；

[0094] SD—10次测量结果的标准差；

[0095] M—10次测量结果的平均值。

[0096] 计算FT3化学发光免疫检测试剂盒的测试低值和高值两个浓度样本的CV分别为，3.50%和2.22%。详见表3。

[0097] 表3：

[0098]

测试次数	低值光量子数	测试次数	高值光量子数
1	245859	1	57686
2	243529	2	58663
3	244755	3	57118
4	239887	4	58411
5	243656	5	57115
6	239482	6	58171
7	237852	7	56702
8	233374	8	54672
9	234473	9	56210

[0099]

10	234383	10	55697
光量均值	239725	光量均值	57045
CV	3.50%	CV	2.22%

[0100] 4、准确度检测:准确度检测方法为在校准品校准后的化学发光仪上测试配套的质控品,每个浓度重复测定3次,结果应在靶值范围之内,配套质控品C1靶值浓度为3.25pg/ml,靶值范围为2.92-3.57pg/ml;质控品C2靶值浓度为7.29pg/ml,靶值范围为6.56-8.02pg/ml;测试回值浓度分别为3.01pg/ml和8.07pg/ml。详见表4。

[0101] 表4:

[0102]

测试次数	C1测值浓度	测试次数	C2测试浓度
1	3.15	1	7.93
2	2.88	2	8.12
3	2.99	3	8.16
浓度均值	3.01	浓度均指	8.07

[0103] 将上述实施例制备的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒用于测定游离三碘甲状腺原氨酸,具有灵敏度高、重复性好、准确性强等优势。

[0104] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换,但这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

专利名称(译)	一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109239371A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811067391.3	申请日	2018-09-13
[标]发明人	刘子菱 刘婷婷 何浩会 王香琪 阚洪晶 丛凡溟 付莉莉		
发明人	刘子菱 刘婷婷 何浩会 王香琪 阚洪晶 丛凡溟 付莉莉		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/532 G01N21/76		
代理人(译)	刘微		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法，属于体外检验技术领域，解决现有技术反应时间长、测量速度慢、线性范围窄、在被测物质浓度高时易发生钩状效应等技术问题。试剂盒包括以下试剂：固相试剂R1：含有T3类似物包被的顺磁性微球的悬液；液相试剂R2：含有吲哚酯标记的T3抗体的悬液；其中，R1中的顺磁性微球是表面包裹带有羧基活性基团的四氧化三铁，顺磁性微球的粒径大小为0.1~5 μm 。本发明提供的游离三碘甲状腺原氨酸测定试剂盒及其制备方法，采用化学发光免疫分析法定量检测血清/血浆中的游离三碘甲状腺原氨酸，具有操作简便、灵敏度高、检测快速、线性范围宽、费用低廉、便于自动化等优点。

测试次数	光量子数	测试次数	光量子数
1	507505	11	494536
2	511468	12	486865
3	500199	13	486778
4	494393	14	482429
5	502286	15	480643
6	509879	16	480862