(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2016 年 8 月 18 日 (18.08.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/127301 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 21/76* (2006.01)
G01N 33/78 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/072616

(22) 国际申请日: 2015 年 2 月 10 日 (10.02.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: **深圳市新产业生物医学工程股份有限公司 (SHENZHEN NEW INDUSTRIES BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。

(72) 发明人: **饶微 (RAO, Wei)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。 **徐红 (XU, Hong)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。 **梁咏秋 (LIANG, Yongqiu)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。 **罗凯 (LUO, Kai)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。 **杨雅丽 (YANG, Yali)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。 **李婷华 (LI, Tinghua)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。 **袁锦云 (YUAN, Jinyun)**; 中国广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号, Guangdong 518122 (CN)。

(74) 代理人: **广州华进联合专利商标代理有限公司 (ADVANCE CHINA IP LAW OFFICE)**; 中国广东省广州市天河区花城大道 85 号 3901 房, Guangdong 510623 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) **Title**: RT3 CHEMILUMINESCENT IMMUNOLOGICAL DETECTION REAGENT KIT, AND DETECTION METHOD AND APPLICATION THEREFOR

(54) **发明名称** : rT3 化学发光免疫检测试剂盒及其检测方法和应用

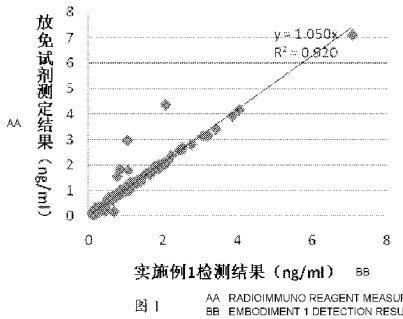


图 1 AA RADIOIMMUNO REAGENT MEASUREMENT RESULT
BB EMBODIMENT 1 DETECTION RESULT

(57) **Abstract**: Provided are an rT3 chemiluminescent immunological detection reagent kit, and an application therefor. The detection reagent kit comprises the following components: 1) a marker system, comprising a reverse triiodothyronine antigen or an anti-reverse triiodothyronine antibody directly or indirectly connected to a marking tracer; 2) a magnetic microsphere system, comprising the corresponding directly or indirectly connected anti-reverse triiodothyronine antibody or the reverse triiodothyronine antigen. The detection reagent kit may be used for the chemiluminescent immunological detection of reverse triiodothyronine.

(57) **摘要**: 提供一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒及其应用。该检测试剂盒包括以下组分：1）标记物体系：包括直接或间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原或抗反三碘甲状腺原氨酸抗体；2）磁性微球体系：包括相应的直接或间接连接的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体或反三碘甲状腺原氨酸抗原。该检测试剂盒可用于反三碘甲状腺原氨酸的化学发光免疫检测。

WO 2016/127301 A1

rT3 化学发光免疫检测试剂盒及其检测方法和应用

技术领域

本发明涉及体外诊断检测技术领域，特别是涉及一种 rT3（反三碘甲状腺原氨酸）化学发光免疫检测试剂盒及其检测方法和应用。

背景技术

反三碘甲状腺原氨酸（rT3）又称 3，3′,5′-三碘甲腺原氨酸，是正常人血清中存在的一种甲状腺激素，是 T4（甲状腺素）在肝、肾、垂体及心肌等组织中，经 5-脱碘酶脱去酪氨酸环上的一个碘而生成的。rT3 在体内降解速度较快，其半寿期为 30-60 分钟。它在血液中含量甚微，生物活性很低，但在不同的生理及病理状况下，血清含量有显著区别，因此，测定血清中 rT3 水平在临床上仍有一定意义。例如：妊娠时，脐血及羊水 rT3 含量较高，能反映胎儿甲状腺功能状态。总体来说，血清中 rT3 浓度男女间无差异，从儿童到 40 岁之间随年龄增长呈下降趋势，而 40 岁以后又随年龄增长呈上升趋势。

具体来说，当 rT3 增高或降低，有助于以下几种情况的判断：

A，甲状腺功能亢进或减退症：甲亢时 rT3 升高，而且比 T3，T4 灵敏。当用抗甲状腺药物治疗时，T3 降低较快，而 rT3 下降缓慢，当 T3 和 rT3 都正常，表示用药适当；若 rT3 和 T4 均低于正常，则表示用药过量。rT3 的降低对于轻型或亚临床型甲状腺功能减退的判断有非常重要的意义。

B，甲状腺疾病：急性心肌梗塞，肝硬变、糖尿病、尿素症、脑血管病、胃癌等类疾病还可出现 T3 下降，故显示出 T3/rT3 比值降低。

C.替代治疗的观察：甲状腺机能减退症服用甲状腺素替代治疗后，rT3、T3均升高提示用量过大，而甲状腺功能减退症在使用抗甲亢药物后出现rT3下降，则提示药物用量过大，故rT3测定可用于监测用药。

D.药物引起的高rT3现象：使用乙胺碘呋酮、糖皮质激素、丙基硫氧嘧啶、心得胺等药物可出现高rT3现象，故rT3还可用于监测上述药物的使用。

目前，临床上测定血清反三碘甲状腺原氨酸（rT3）的方法主要有放射性免疫法、酶联免疫法等，而放射性免疫法及酶联免疫法存在诸多不足。如：传统的放射性免疫法或酶联免疫法方法检测时间长，同时主要依靠纯手工加样等系列繁琐操作，效率低，容易导致实验结果误差大；由于酶促反应不够彻底，且易受外部干扰因素影响，如温度、时间及材料浓度影响，因此检测时特异性低，灵敏度差，检测范围窄。并且，放射性免疫法还存在放射性污染、标记物半衰期短、对操作者具有放射性损伤等缺陷。

发明内容

基于此，本发明的目的在于克服现有技术的缺陷，提供一种rT3化学发光免疫检测试剂盒，该化学发光免疫检测试剂盒是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合，具有灵敏度高，特异性好和检测范围宽的优点。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

一种rT3化学发光免疫检测试剂盒，包括以下组分：

1）标记物体系：包括直接连接或间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原或抗反三碘甲状腺原氨酸抗体；

2）磁性微球体系：包括相应的直接连接或间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸

抗体或反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球。

并且，当标记物体系包括直接连接或间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原，则磁性微球体系包括直接连接或间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体的磁性微球；当标记物体系包括直接连接或间接连接标记示踪物的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，则磁性微球体系包括直接连接或间接连接反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球。

上述“直接连接”为直接结合的连接，上述“间接连接”为通过生物素和链霉亲和素，或异硫氰酸荧光素和抗异硫氰酸荧光素抗体等能够相互结合的搭桥物以间接结合的方式连接。

本发明提供了一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，利用化学发光免疫的方法来检测 rT3，具有灵敏度高，特异性好和检测范围宽的优点，并且，本发明中的试剂盒，以磁性微球作为检测中的固相体系，既能在与待测物反应时均匀的悬浮于反应体系中，与待测物更好的结合，又能在分离时外加磁场即可方便的实现分离，具有操作方便的特点。更为重要的是，该检测试剂盒能与常规技术中的化学发光分析仪配合使用，实现全自动化检测，避免了人为因素可能导致的实验误差，并提高了分析效率。

在其中一个实施例中，所述 2）磁性微球体系中，所述间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体的磁性微球由生物素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和链霉亲和素包被的磁性微球组成；或所述间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体的磁性微球由异硫氰酸荧光素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和抗异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微球组成。

在其中一个实施例中，所述 2）磁性微球体系中，所述间接连接反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球由异硫氰酸荧光素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，

和抗异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微球组成；或所述间接连接反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球由生物素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和链霉亲和素包被的磁性微球组成。

在其中一个实施例中，所述1）标记物体系中，所述间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原由生物素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和链霉亲和素标记的标记示踪物组成；或所述间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原由异硫氰酸荧光素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和抗异硫氰酸荧光素抗体标记的标记示踪物组成。

在其中一个实施例中，所述1）标记物体系中，所述间接连接标记示踪物的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体由生物素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和链霉亲和素标记的标记示踪物组成；或所述间接连接标记示踪物的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体由异硫氰酸荧光素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和抗异硫氰酸荧光素抗体标记的标记示踪物组成。

上述抗异硫氰酸荧光素抗体既可以为单克隆抗体，也可以为多克隆抗体。

上述方案丰富了检测所使用的标记物体系和磁性微球体系，可根据不同需求灵活选择。例如可以在磁性微球体系中直接将反三碘甲状腺原氨酸抗原（或抗反三碘甲状腺原氨酸抗体）连接磁性微球，也可以通过上述的间接搭桥方式连接反三碘甲状腺原氨酸抗原（或抗反三碘甲状腺原氨酸抗体）和磁性微球。同样，可以在标记物体系中将标记示踪物直接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（或反三碘甲状腺原氨酸抗原），也可以通过上述的间接搭桥方式连接标记示踪物和抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（或反三碘甲状腺原氨酸抗原）。并且，上述磁性微球体系和标记物体系中采用何种连接方式（直接连接或间接连接）并无相互影响或限定，既可在磁性微球体系和标记物体系中同时采用直接连接方式或

同时采用间接连接方式，也可磁性微球体系选用直接连接，标记物体系采用间接连接，或者磁性微球体系选用间接连接，标记物体系采用直接连接。可以理解的，上述间接搭桥连接方式还可采用其它间接标记体系进行间接连接。

上述标记示踪物包括以下几种：1、化学发光免疫分析使用的能够直接发光的标记物，如鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺或其衍生物、吖啶酯等；2、化学发光酶免疫分析使用的配合相应底物可以发光的标记物，如碱性磷酸酶或过氧化物酶等。

在其中一个实施例中，所述标记示踪物为发光标记物，选自：金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯。优选 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI)，与上述发光标记物配合的底物包括 H_2O_2-微过氧化物酶、H_2O_2-过氧化氢酶、H_2O_2-乳过氧化物酶、H_2O_2-次氯血红素、H_2O_2-氯化血红素、次氯酸盐-$CoCl_2$、过硫酸盐、过氧化钾、高碘酸钠、H_2O_2-$K_3Fe(CN)_6$、黄嘌呤-次黄嘌呤氧化酶、叔丁醇钾中的至少一种。

上述发光标记物是指在发光反应中参与能量转移并最终以发射光子的形式释放能量的化合物，该化合物能够经催化剂的催化和氧化剂的氧化，形成一个激发态的中间体，当这种激发态中间体回到稳定的基态时，同时发射出光子(hM)。

在其中一个实施例中，所述标记示踪物为化学发光催化剂，选自：碱性磷酸酶、过氧化物酶。使用时，配合相应的化学发光底物即可发光被定量检测，所述化学发光底物包括 NaOH 和 H_2O_2，还包括金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺或其衍生物中的至少一种，优选 N-(4-氨丁基)-N-乙基异鲁米诺（ABEI）。

在其中一个实施例中，所述磁性微球上直接连接或间接连接一种或多种抗反三碘甲状腺原氨酸抗体。并且，可以理解的，当磁性微球上直接连接或间接

连接多种抗反三碘甲状腺原氨酸抗体时，该多种（即至少两种）抗反三碘甲状腺原氨酸抗体与反三碘甲状腺原氨酸抗原的结合位点互不相同。

其中一个实施例中，所述抗反三碘甲状腺原氨酸抗体为单克隆抗体和/或多克隆抗体。

适用于本发明的磁性微球也称为磁珠或磁球，可以是本领域中常用的磁性微球。优选的是，本发明使用的磁球，是将纳米级的 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性粒子和有机高分子材料进行复合，形成具有超顺磁性和极大量蛋白吸附容量的微米级的固相微球，具有在外加磁场作用下可迅速被磁化，在撤走磁场后剩磁为零的属性。其中，所述有机高分子材料的种类没有特别限制，可根据需要进行选择。

本发明所使用的磁性微球应能满足直径为 0.1-5 μ m，磁性微球还可以通过表面改性而带有多种活性功能基团，包括但不限于-OH、-COOH、$-NH_2$。

在其中一个实施例中，所述磁性微球为 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体，并具有 0.1-5 μ m 的粒径，并且，所述磁性微球任选地通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团。

在其中一个实施例中，该检测试剂盒还包括以下组分：

3）校准品溶液：包括反三碘甲状腺原氨酸抗原浓度为 0.2-6ng/mL 的校准品溶液和浓度为 8-20ng/mL 的校准品溶液。本发明人考察了大量的真实样本反三碘甲状腺原氨酸抗原浓度范围后，结合该检测试剂盒的特点，将校准品浓度设置于上述范围内，具有较佳的检测效果。

本发明还公开了一种上述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

抗体或抗原的标记：将抗原或抗体放入透析袋中，置于透析液中进行透析，随后往透析好的溶液中加入标记物，反应后经纯化，即得；

磁性微球的包被：以缓冲液悬浮磁性微球，再加入包被物，组成反应体系，经反应后再进行纯化，即得。

所述抗原为反三碘甲状腺原氨酸抗原；

所述抗体为抗反三碘甲状腺原氨酸抗体。

上述抗体既可以为单抗，也可以为多抗。上述包被磁性微球的反应体系中，还可加入 1-环已基-2-吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐（CMC）进行包被连接，其浓度优选 10mg/mL，可以增加包被效果。经标记的抗体或抗原的纯化优选采用 G-25 凝胶柱进行纯化。所述标记示踪物的活化酯可以为 ABEI-半琥珀酰胺酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯（ABEI-hemisuccinimide N-Hydroxysuccinimide）等，仅需满足能与抗原或抗体结合即可。

在其中一个实施例中，所述标记物为：标记示踪物的活化酯，异硫氰酸荧光素或生物素；所述包被物为：抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，反三碘甲状腺原氨酸抗原，抗异硫氰酸荧光素抗体或链霉素亲和素。上述方案丰富了检测所使用的标记物体系和磁性微球体系，可根据不同需求灵活选择。

在其中一个实施例中，所述抗体或抗原的标记中，所述标记物的加入量为每 100 μg 抗原加入 200-400 μg 标记物，优选 300 μg 标记物；每 1 mg 抗体加入 200-400 μg 标记物，优选 300 μg 标记物；反应温度为 35-40℃，优选 37℃，反应时间为 1-3 小时，优选 2 小时；所述磁性微球的包被中，所述包被物的加入量为每 20 mg 磁性微球加入 100-140 μg 包被物，优选 120 μg 包被物，反应温度为 35-40℃，优选 37℃，反应时间为 12-36 小时，优选 24 小时。采用上述参数配比，能够具有最佳的标记率及发光效率。

在其中一个实施例中，所述抗体或抗原的标记中，将纯化后经标记的抗原或抗体稀释 150-250 倍，优选稀释 200 倍，待用；所述抗体或抗原的标记中，将

纯化后经包被的磁性微球稀释至 0.5-1.5mg/mL，优选 1mg/mL，待用；上述经标记的抗原或抗体溶液与经包被的磁性微球溶液的使用体积比为 60-100:20，优选 80:20。以上述比例配合使用，能获得较佳的检测效果。

在其中一个实施例中，所述抗体或抗原的标记中，所述透析液优选 0.1mol/L 的 pH9.5 碳酸缓冲液；磁性微球的包被中，所述缓冲液优选 pH3.6 醋酸缓冲液。上述透析液和缓冲液能够促使标记和包被反应进行得更好。

本发明还公开了一种 rT3 化学发光免疫检测方法，采用上述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，包括以下步骤：

1）反应：将待测样本与标记物体系和磁性微球体系混合，温育，得到反应产物；

2）检测：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，清洗后，加入化学发光激发物，检测发出的相对光强度，计算得到反三碘甲状腺原氨酸的含量。

本发明的检测方法，采用了化学发光免疫竞争法进行检测，具有灵敏度高，特异性好和检测范围宽的优点。

在其中一个实施例中，上述 rT3 化学发光免疫检测方法，是利用化学发光分析仪进行反三碘甲状腺原氨酸的检测。具有操作规范，无人为引入误差及全自动化的优点。

本发明还公开了一种上述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒在化学发光分析仪中的应用。将该试剂盒应用于化学发光平台，具有操作规范，无人为引入误差及全自动化的优点。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明的一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合，具有灵敏度高，特异性好和检测范围

宽的优点。并且，本发明中的试剂盒，以磁性微球作为检测中的固相体系，既能在与待测物反应时均匀的悬浮于反应体系中，与待测物更好的结合，又能在分离时外加磁场即可方便的实现分离，具有操作方便的特点。更为重要的是，该检测试剂盒能与常规技术中的化学发光分析仪配合使用，实现全自动化检测，避免了人为因素可能导致的实验误差，并提高了分析效率。

该检测试剂盒结合真实样本中待测物可能的浓度，以及该试剂盒中标记物体系和磁性微球体系的特点，对其中各组分进行了优选，得到了最佳的检测用量范围。

本发明的 rT3 化学发光免疫检测方法，具有灵敏度高，特异性好和检测范围宽的优点。并且，还可将该检测试剂盒与常规技术中的化学发光分析仪配合使用，实现全自动化检测，避免了人为因素可能导致的实验误差，并提高了分析效率。

附图说明

图 1 为本发明实验例中实施例 1 制备的检测试剂盒与参比的放免试剂盒的检测结果对比图；

图 2 为本发明实验例中实施例 1 和 2 制备的检测试剂盒的检测结果对比图；

图 3 为本发明实验例中实施例 1 和 3 制备的检测试剂盒的检测结果对比图；

图 4 为本发明实验例中实施例 1 和 4 制备的检测试剂盒的检测结果对比图。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明做进一步的说明，但并不对本发明造成任何限制。

以下实施例中：

反三碘甲状腺原氨酸抗原，来源：从 Sigma 公司采购，货号：T0281。

抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，来源：从 Biogenesis 公司采购，克隆号：9160-7004。

羊抗 FITC 多克隆抗体，来源：美国 Jackson 公司。

FITC:购自美国 Sigma 公司。

ABEI：为深圳新产业生物医学股份有限公司生产。

磁性微球，来源：深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产，80%粒径分布为 1-5μm，磁化强度为 4000 高斯时沉淀时间为 10-15 秒，BSA 为 30mg 时蛋白吸附浓度为 0.8mg-1.2mg。

Maglumi2000 化学发光分析仪，来源：深圳市新产业生物医学工程股份有限公司。

实施例 1

一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，包括以下组分：

1）标记物体系：包括标记发光标记物（ABEI）的反三碘甲状腺原氨酸抗原（rT3 抗原）的溶液。

其中，标记 ABEI 的 rT3 抗原以 pH7.4 的 0.5M 磷酸盐缓冲稀释液按照 1:200 的比例稀释。

2）磁性微球体系：包括连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（抗 rT3 抗体）的磁性微球的溶液。

其中，抗 rT3 抗体包被的磁性微球以 pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 1mg/mL。

3）校准品溶液：包括反三碘甲状腺原氨酸抗原浓度为 0.326ng/mL 的低点校

准品溶液和浓度为 8.132ng/mL 的高点校准品溶液。

本实施例的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法如下:

一、标记物体系的制备。

1） 透析液的配制: 在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, $NaHCO_3$ 26.46g, 加水定容至 4500ml, 即得 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液。上述配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

2） 选用截留量为 14000 的透析袋, 量取合适的尺寸, 取 100μg 的 rT3 抗原用透析液调整到 1ml, 放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300μg ABEI-半琥珀酰胺酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯（ABEI-hemisuccinimide N-Hydroxysuccinimide）, 37℃反应 2 小时。

3）以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的标记 ABEI 的 rT3 抗原。

4） D2 溶液的配制: 加入 200ml 0.5M 磷酸盐缓冲液、20g 牛血清白蛋白（ BSA）、8g NaN_3（防腐剂）、2g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$、600ml 甘油, 定容到 2000mL, 过滤, 即得。

5）将上述步骤 3）纯化好的连接产物用 D2 溶液按 1:2 稀释, 即可。

二、磁性微球体系的制备。

1）配制缓冲液（A 溶液）: 称取 2.55g 三水合乙酸钠用 4500ml 纯化水溶解后再加如 14ml 乙酸混匀后, 定容至 5000ml, 即得 pH 为 3.6 的醋酸缓冲液。

2） 向装有磁性微球的瓶中加入上述 pH3.6 醋酸缓冲液悬浮磁性微球浓度为 20mg/mL, 再加入 1-环已基-2-吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐（CMC）（浓度为 10mg/ml）, 加入 100μg 纯化的抗 rT3 抗体, 组成反应体系。

3）将上述反应体系放入恒温震荡水浴箱中 37℃反应 24 小时(震荡水浴锅振摇速度为 260rpm）。

4）磁珠清洗液的配制：在 0.05M pH7.4 的 PBS 中溶入 BSA，使 BSA 的浓度为 0.5 g/ml，即为磁珠清洗液。

5）将反应好的反应体系倒入烧杯中，然后置于磁铁上沉淀后，倒掉上清，加入 5 倍体积的磁珠清洗液搅拌清洗，然后放置在磁铁上，待上清液清亮后倒掉上清液。

6）清洗完毕后，加入磁珠悬浮液，其中磁珠悬浮液的制备方法为：在 0.05M pH7.4 的 PBS 中溶入 BSA 和甲基纤维素（MC），使 BSA 的浓度为 0.5 g/ml，MC 的浓度为 0.4 g/ml，悬浮浓度为 20mg/ml，即得到抗 rT3 抗体包被的磁性微球溶液。

三、校准品溶液的制备。

将 rT3 抗原用 50%牛血清制品按不同比例稀释成浓度为 0.326ng/mL 的低点校准品溶液和浓度为 8.132ng/mL 的高点校准品溶液。

采用本实施例的检测试剂盒进行 rT3 化学发光免疫检测的方法，包括以下步骤：

1）获取待测样本：待测样本可为直接得到的血清、血浆及全血，也可以是通过抽取人体血样进行分离得到。

2）反应：将上述待测样本与标记物体系和磁性微球体系混合，温育，使待测样本中的反三碘甲状腺原氨酸与经 ABEI 标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原竞争结合抗反三碘甲状腺原氨酸抗体包被的磁性微球，得到反应产物。

3）检测：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗后，加入化学发光激发物（NaOH 和 H_2O_2），检测发出的相对光强度，通过计算得到反三碘甲状腺原氨酸的含量。

上述检测方法还可与化学发光分析仪配合，具体步骤如下：

1、在样本架上依次加载校准品或待测样本，待测样本为血清或者血浆。

2、将样本架插入 Maglumi2000 化学发光分析仪样本仓，编辑标本号开始运行试验，具体加样步骤为：校准品或待测样本加 50 μl，然后加标记物体系（标记 ABEI 的 rT3 抗原）溶液 80 μl，加 0.1g/ml 8-苯胺基萘磺酸镁（ANS）的稀释液 80 μl，加入磁性微球体系溶液 20 μ l，混匀，37℃温育 15 分钟，仪器自动清洗两遍后直接进入测量室得到各个标本的光强度信号，通过十点曲线及两点定标自动拟合出待测样本的 rT3 浓度值。

实施例 2

一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，与实施例 1 的检测试剂盒基本相同，不同之处在于：

2）磁性微球体系：连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（抗 rT3 抗体）的磁性微球由抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（抗 rT3 抗体）标记的异硫氰酸荧光素（FITC）溶液，和羊抗异硫氰酸荧光素多克隆抗体包被的磁性微球溶液组成。

其中：抗 rT3 多克隆抗体标记的 FITC 以 0.5M 的 pH7.4 磷酸盐缓冲稀释液按照 1：200 的比例稀释，羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁性微球以 C 溶液稀释至 1mg/mL。

本实施例的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法与实施例 1 的制备方法基本相同，不同之处在于：

二、磁性微球体系中：

抗 rT3 抗体标记的 FITC 通过以下方法制备：

3） 取 1mg 抗 rT3 抗体用透析液调整到 1ml。放入透析液中，室温搅拌透析 2 小时，将透析好的溶液加入 300μg FITC，室温边摇边反应 24h。

羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁性微球通过以下方法制备:

3）加入上述 pH3.6 醋酸缓冲液悬浮磁珠浓度 20mg/mL，再加入 CMC（浓度为 10mg/ml），加入纯化的羊抗 FITC 抗体，组成反应体系。

采用本实施例的检测试剂盒进行 rT3 化学发光免疫检测的方法与实施例 1 的方法基本相同，不同之处在于:

2）反应：先将抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（抗 rT3 抗体）标记的异硫氰酸荧光素（FITC）溶液，和羊抗异硫氰酸荧光素多克隆抗体包被的磁性微球溶液混合，得到连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（抗 rT3 抗体）的磁性微球，再将此磁性微球体系与待测样本与标记物体系混合。

实施例 3

一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，与实施例 1 的检测试剂盒基本相同，不同之处在于:

1）标记物体系：包括标记标记示踪物（ABEI）的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体（抗 rT3 抗体）的溶液。

其中，标记 ABEI 的抗 rT3 抗体以 0.5M 的 pH7.4 磷酸盐缓冲稀释液按照 1:200 的比例稀释。

2）磁性微球体系：包括连接反三碘甲状腺原氨酸抗原（rT3 抗原）的磁性微球的溶液。

其中，rT3 抗原包被的磁性微球以 pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 1mg/mL。

本实施例的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法与实施例 1 的制备方法基本相同，不同之处在于:

一、标记物体系的制备。

3） 取 1mg 的抗 rT3 抗体用透析液调整到 1ml，放入透析液中，室温搅拌透析 2 小时，将透析好的溶液加入 300μg ABEI 活化酯 4-（氨丁基）-N-乙基异鲁米诺，37℃反应 2 小时。

二、磁性微球体系的制备。

3）加入 pH3.6 醋酸缓冲液悬浮磁性微球浓度为 20mg/mL，再加入 CMC（浓度为 10mg/ml），加入 100μg 纯化的 rT3 抗原，组成反应体系。

采用本实施例的检测试剂盒进行 rT3 化学发光免疫检测的方法与实施例 1 的方法基本相同，不同之处在于：

2）反应：采用本实施例中的标记物体系和磁性微球体系。

实施例 4

一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，与实施例 3 的检测试剂盒基本相同，不同之处在于：

2）磁性微球体系：连接反三碘甲状腺原氨酸抗原（rT3 抗原）的磁性微球由反三碘甲状腺原氨酸抗原（rT3 抗原）标记的异硫氰酸荧光素（FITC）溶液，和羊抗异硫氰酸荧光素多克隆抗体包被的磁性微球溶液组成。

其中：rT3 抗原标记的 FITC 以 0.5M 的 pH7.4 磷酸盐缓冲稀释液按照 1: 200 的比例稀释，羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁性微球以 pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 1mg/mL。

本实施例的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法与实施例 3 的制备方法基本相同，不同之处在于：

二、磁性微球体系中：

rT3 抗原标记的 FITC 通过以下方法制备:

3） 取 100μg rT3 抗原用透析液调整到 1ml。放入透析液中，室温搅拌透析 2 小时，将透析好的溶液加入 300μg FITC，室温边摇边反应 24h。

羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁性微球按照实施例 2 中的方法制备。

采用本实施例的检测试剂盒进行 rT3 化学发光免疫检测的方法与实施例 3 的方法基本相同，不同之处在于:

2）反应：先将反三碘甲状腺原氨酸抗原（rT3 抗原）标记的异硫氰酸荧光素（FITC）溶液，和羊抗异硫氰酸荧光素多克隆抗体包被的磁性微球溶液混合，得到连接反三碘甲状腺原氨酸抗原（rT3 抗原）的磁性微球，再将此磁性微球体系与待测样本与标记物体系混合。

实验例

采用上述实施例的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒及检测方法，与化学发光分析仪配合，进行临床测试比对，参比试剂盒为相应的市面上主流商品化放射免疫检测试剂盒（简称放免试剂盒），样本为深圳北大医院核医学科收集样本，共 140 例，具体结果如下表所示。

表 1 临床样本测定对比结果(单位：ng/ml)

标本号	放免试剂盒测定值	实施例 1 试剂盒测定值	实施例 2 试剂盒测定值	实施例 3 试剂盒测定值	实施例 4 试剂盒测定值	标本号	放免试剂盒测定值	实施例 1 试剂盒测定值	实施例 2 试剂盒测定值	实施例 3 试剂盒测定值	实施例 4 试剂盒测定值
1	0.33	0.23	0.21	0.20	0.29	71	1.07	1.07	1.07	1.09	1.07
2	0.43	0.19	0.17	0.20	0.16	72	1.77	1.94	1.94	1.98	1.99
3	0.17	0.18	0.18	0.17	0.16	73	0.98	0.95	0.95	0.94	0.95
4	0.28	0.29	0.24	0.30	0.19	74	1.29	1.32	1.32	1.28	1.32
5	0.15	0.12	0.15	0.13	0.17	75	1.06	1.78	1.77	1.77	1.72
6	0.21	0.2	0.18	0.19	0.16	76	2.02	2.08	2.08	2.07	2.07

7	0.13	0.16	0.14	0.17	0.13	77	1.03	1.09	1.09	1.08	1.06
8	0.37	0.34	0.35	0.29	0.34	78	1.08	0.98	0.98	0.94	0.93
9	0.22	0.08	0.08	0.10	0.03	79	1.08	1.11	1.11	1.10	1.11
10	0.21	0.13	0.11	0.16	0.18	80	0.25	0.29	0.28	0.19	0.36
11	0.39	0.23	0.24	0.32	0.25	81	2.43	2.57	2.57	2.57	2.58
12	0.26	0.14	0.18	0.16	0.14	82	1.03	2.95	2.95	2.90	2.90
13	0.22	0.21	0.22	0.22	0.25	83	0.71	0.8	0.8	0.81	0.82
14	0.09	0.04	0.07	0.06	0.11	84	1.03	1.1	1.1	1.01	1.11
15	0.16	0.03	0	0.00	0.00	85	0.62	0.59	0.59	0.65	0.52
16	0.36	0.35	0.4	0.42	0.38	86	1.01	1	1	1.07	0.96
17	0.14	0.14	0.16	0.16	0.13	87	0.44	0.46	0.46	0.55	0.43
18	0.49	0.23	0.25	0.21	0.33	88	0.98	1.02	1.02	1.06	1.07
19	0.32	0.3	0.31	0.33	0.25	89	1.09	1.22	1.21	1.21	1.20
20	0.32	0.31	0.31	0.29	0.34	90	1.95	1.95	1.96	1.94	1.91
21	0.29	0.24	0.23	0.25	0.21	91	1.4	1.48	1.47	1.48	1.43
22	0.2	0.16	0.12	0.12	0.13	92	1.7	1.7	1.7	1.67	1.67
23	0.33	0.29	0.29	0.34	0.24	93	1.77	1.81	1.81	1.86	1.74
24	0.28	0.27	0.25	0.27	0.29	94	1.9	1.86	1.86	1.78	1.86
25	0.28	0.26	0.24	0.23	0.28	95	1.73	1.74	1.7	1.67	1.64
26	0.38	0.35	0.33	0.36	0.32	96	1.066	1.22	1.21	1.24	1.28
27	0.29	0.3	0.3	0.32	0.29	97	0.594	0.69	0.69	0.70	0.66
28	0.31	0.25	0.27	0.23	0.29	98	1.231	1.25	1.23	1.23	1.23
29	0.19	0.27	0.28	0.31	0.34	99	2.497	2.58	2.58	2.61	2.56
30	0.68	0.15	0.17	0.23	0.13	100	0.754	0.77	0.81	0.82	0.80
31	0.66	0.8	0.8	0.77	0.81	101	1.607	1.68	1.71	1.69	1.71
32	0.66	0.63	0.65	0.66	0.63	102	7.068	7.1	7.09	7.16	7.11
33	0.56	0.64	0.62	0.56	0.64	103	2.049	2.02	2.02	2.05	2.01
34	0.55	0.72	0.73	0.78	0.71	104	1.046	1.1	1.1	1.08	1.13
35	0.78	0.77	0.8	0.74	0.86	105	3.052	3.13	3.11	3.12	3.15
36	0.55	0.57	0.57	0.52	0.61	106	2.054	2.09	2.1	2.12	2.07
37	1.04	1.03	1.04	0.98	1.05	107	4.03	4.15	4.16	4.13	4.17
38	0.63	0.72	0.73	0.67	0.74	108	0.865	0.85	0.81	0.83	0.83
39	0.52	0.53	0.52	0.43	0.46	109	0.873	0.92	0.91	0.85	0.91
40	0.55	0.67	0.64	0.57	0.64	110	1.312	1.4	1.4	1.50	1.37
41	0.17	0.12	0.09	0.10	0.06	111	1.191	1.19	1.16	1.16	1.25
42	0.18	0.31	0.31	0.35	0.25	112	2.759	2.8	2.8	2.87	2.76
43	0.87	1.03	1.02	1.11	1.02	113	1.309	1.35	1.33	1.34	1.36

44	0.29	0.31	0.29	0.35	0.27	114	0.841	1.81	1.78	1.80	1.72
45	0.63	0.63	0.64	0.69	0.68	115	1.11	1.3	1.27	1.29	1.26
46	0.6	0.68	0.69	0.75	0.66	116	1.924	1.92	1.92	1.94	1.85
47	0.42	0.36	0.37	0.36	0.33	117	1.402	1.32	1.34	1.34	1.39
48	0.1	0.14	0.15	0.12	0.15	118	1.641	1.63	1.62	1.56	1.61
49	0.86	0.85	0.85	0.88	0.85	119	2.517	2.68	2.71	2.63	2.73
50	0.62	0.66	0.66	0.72	0.64	120	3.195	3.16	3.2	3.20	3.19
51	0.36	0.38	0.37	0.30	0.38	121	1.047	1.18	1.2	1.17	1.22
52	1.11	1.14	1.14	1.18	1.14	122	1.432	1.47	1.52	1.56	1.55
53	0.64	0.66	0.66	0.64	0.72	123	1.54	1.65	1.64	1.66	1.65
54	0.26	0.31	0.31	0.31	0.34	124	1.871	1.99	2	1.98	1.95
55	0.63	0.74	0.74	0.70	0.75	125	0.868	0.91	0.91	0.94	0.90
56	0.64	0.73	0.72	0.77	0.74	126	1.306	1.38	1.4	1.46	1.41
57	0.53	0.69	0.69	0.66	0.70	127	3.849	3.91	3.91	3.92	3.88
58	0.84	0.96	0.95	0.92	0.92	128	1.631	1.6	1.56	1.53	1.52
59	1.15	1.21	1.21	1.21	1.14	129	0.925	1.04	1.07	1.05	1.02
60	0.77	0.81	0.81	0.80	0.72	130	3.174	3.13	3.11	3.09	3.14
61	1.2	1.31	1.31	1.28	1.36	131	2.061	4.35	4.38	4.41	4.45
62	1.87	1.99	1.99	2.04	1.96	132	0.949	1	0.97	1.05	0.98
63	2.22	2.36	2.36	2.31	2.29	133	1.124	1.15	1.15	1.10	1.14
64	1.31	1.39	1.39	1.41	1.38	134	0.524	0.55	0.57	0.51	0.52
65	0.59	0.68	0.68	0.75	0.70	135	1.13	1.12	1.12	1.17	1.12
66	1.69	1.72	1.72	1.73	1.67	136	0.897	0.97	0.96	0.96	0.89
67	3.41	3.4	3.4	3.48	3.42	137	0.69	0.72	0.76	0.80	0.81
68	0.93	0.92	0.93	1.01	0.90	138	0.772	1.53	1.52	1.56	1.51
69	2.11	2.15	2.15	2.18	2.14	139	0.549	0.56	0.56	0.58	0.61
70	1.63	1.65	1.65	1.63	1.66	140	1.284	1.24	1.22	1.24	1.22

上述 140 例临床样本，其中 1、2、11、18、30 号标本为甲减确诊患者， 75、82、114、138 号标本为甲减确诊患者。通过上述对比实验结果可以证明，除去确诊的 9 例标本，实施例 1 与参比试剂盒两种方法得到的结果直线方程为 y = 1.050x，相关系数 R=0.920，如图 1 所示，可见实施例 1 制备的检测试剂盒与参比的放免试剂盒有较好的一致性。

而将实施例 2 与实施例 1 得到的结果相对比，二者的直线方程为 y = 1.000x，

相关系数 R=0.999，如图 2 所示，可见本方法制备的检测试剂盒，无论是采用直接连接方式，或是间接连接方式，其检测结果具有较好的一致性，检测结果稳定。而对于 9 例甲减、甲亢确诊患者，放免试剂盒未检出但是有偏低或偏高的趋势，但用本实施例 1、2 的试剂盒和检测方法均能全部检出。

并且，本发明中还将实施例 3 和实施例 4 的试剂盒用于上述样本检测，实施例 3 和实施例 4 得到的结果与实施例 1 相比，其相关系数均在 0.99 以上，如图 3、图 4 所示，具有较好的一致性。

综上所述，本发明的检测试剂盒的测量值与实际值符合程度更好，临床符合率更高，说明本发明检测试剂盒的检测能力更强。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

1、一种 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，包括以下组分：

1）标记物体系：包括直接连接或间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原或抗反三碘甲状腺原氨酸抗体；

2）磁性微球体系：包括相应的直接连接或间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体或反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球。

2、根据权利要求 1 所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述 2）磁性微球体系中，所述间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体的磁性微球由生物素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和链霉亲和素包被的磁性微球组成；或所述间接连接抗反三碘甲状腺原氨酸抗体的磁性微球由异硫氰酸荧光素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和抗异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微球组成。

3、根据权利要求 1 所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述 2）磁性微球体系中，所述间接连接反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球由异硫氰酸荧光素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和抗异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微球组成；或所述间接连接反三碘甲状腺原氨酸抗原的磁性微球由生物素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和链霉亲和素包被的磁性微球组成。

4、根据权利要求 1 所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述 1）标记物体系中，所述间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原由生物素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和链霉亲和素标记的标记示踪物组成；或所述间接连接标记示踪物的反三碘甲状腺原氨酸抗原由异硫氰酸荧光素标记的反三碘甲状腺原氨酸抗原，和抗异硫氰酸荧光素抗体标记的标记示踪物组成。

5、根据权利要求 1 所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述 1）标记物体系中，所述间接连接标记示踪物的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体由

生物素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和链霉亲和素标记的标记示踪物组成；或所述间接连接标记示踪物的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体由异硫氰酸荧光素标记的抗反三碘甲状腺原氨酸抗体，和抗异硫氰酸荧光素抗体标记的标记示踪物组成。

6、根据权利要求 1-5 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述标记示踪物为发光标记物，选自：金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯。

7、根据权利要求 1-5 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述标记示踪物为化学发光催化剂，选自：碱性磷酸酶、过氧化物酶。

8、根据权利要求 1-5 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述磁性微球上直接连接或间接连接一种或多种抗反三碘甲状腺原氨酸抗体。

9、根据权利要求 1-5 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述抗反三碘甲状腺原氨酸抗体为单克隆抗体和/或多克隆抗体。

10、根据权利要求 1-5 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述磁性微球为 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体，并具有 0.1-5 μm 的粒径，并且，所述磁性微球任选地通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团。

11、根据权利要求 1-5 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，还包括以下组分：

3）校准品溶液：包括反三碘甲状腺原氨酸抗原浓度为 0.2-6 ng/mL 的校准品溶液和浓度为 8-20 ng/mL 的校准品溶液。

12、一种 rT3 化学发光免疫检测方法，其特征在于，采用权利要求 1-11 任

一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒，包括以下步骤：

1）反应：将待测样本与标记物体系和磁性微球体系混合，温育，得到反应产物；

2）检测：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，清洗后，加入化学发光激发物，检测发出的相对光强度，计算得到反三碘甲状腺原氨酸的含量。

13、根据权利要求 12 所述的 rT3 化学发光免疫检测方法，其特征在于，利用化学发光分析仪进行反三碘甲状腺原氨酸的检测。

14、权利要求 1-11 任一项所述的 rT3 化学发光免疫检测试剂盒在化学发光分析仪中的应用。

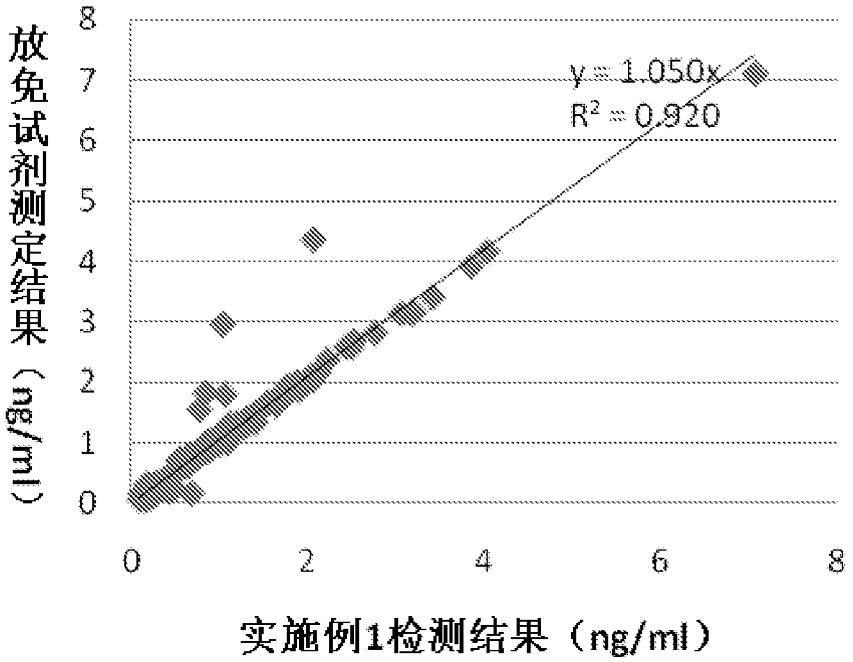

放免试剂测定结果（ng/ml）
y = 1.050x
R² = 0.920
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
实施例1检测结果（ng/ml）

图 1

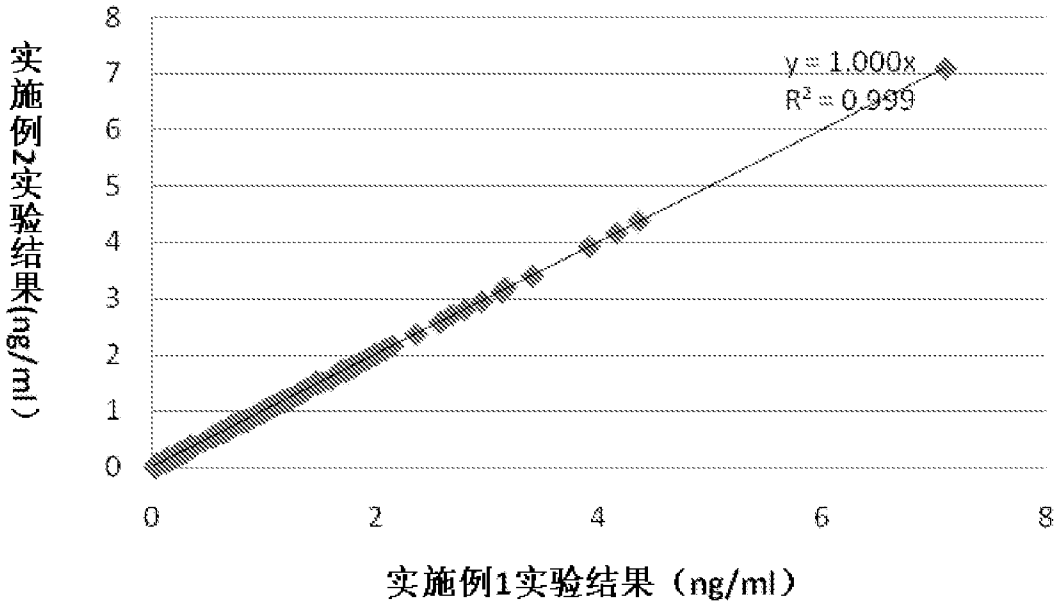

实施例2实验结果(ng/ml)
y = 1.000x
R² = 0.999
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
实施例1实验结果（ng/ml）

图 2

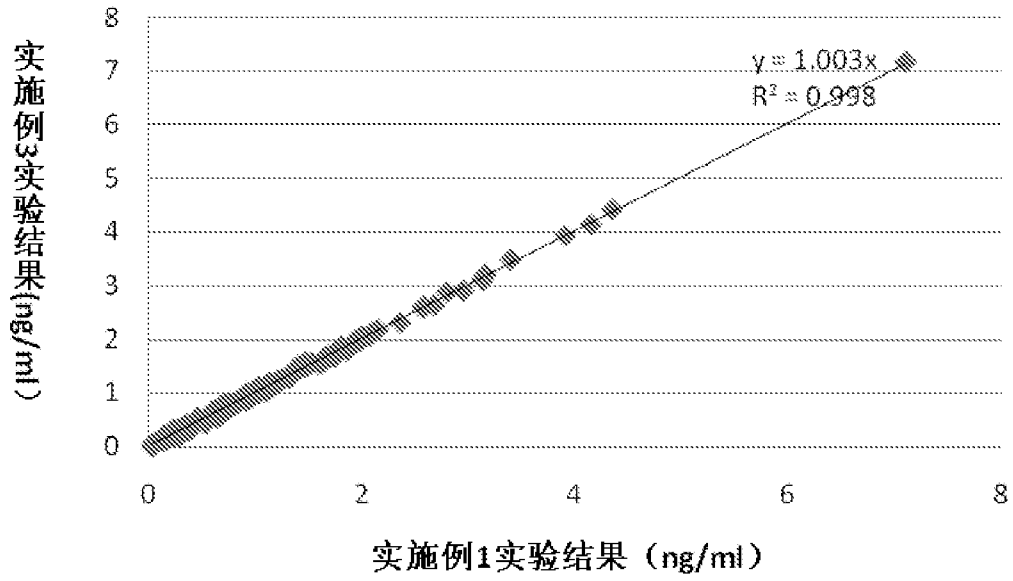

实施例3实验结果(ng/ml)
y = 1.003x
R² = 0.998
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
实施例1实验结果（ng/ml）

图 3

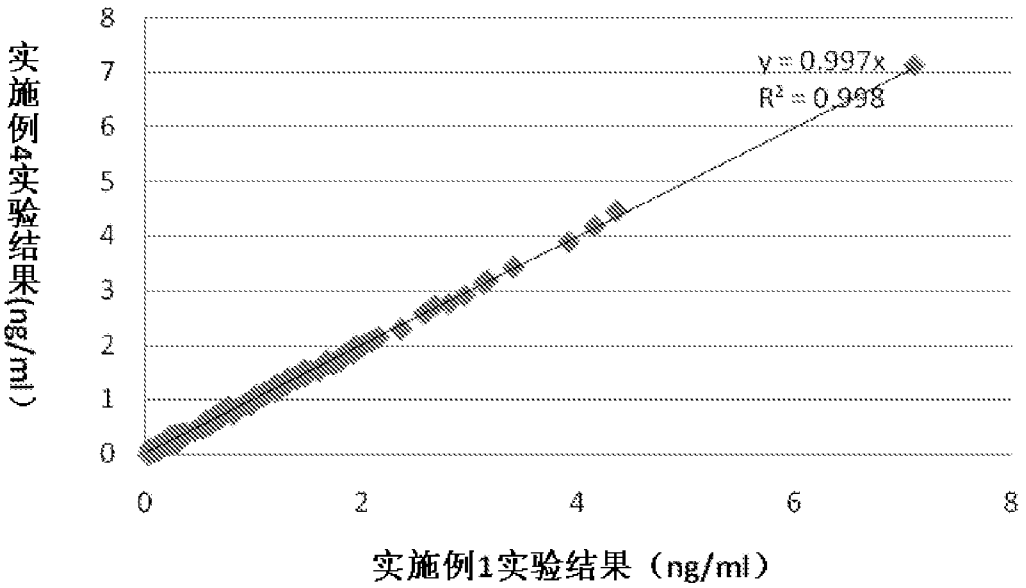

实施例4实验结果(ng/ml)
y = 0.997x
R² = 0.998
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
实施例1实验结果（ng/ml）

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/072616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543 (2006.01) i; G01N 33/78 (2006.01) i; G01N 21/76 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33, G01N 21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CNPAT, WPI, EPODOC, WANFAN, CNKI, PubMed, googlescholar, ISI web of knowledge: reverse T3, rT3, reverse triiodothyronine, magnetic bead, magnetic microparticle, chemiluminescence

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 104730257 A (SHENZHEN NEW INDUSTRIES BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD.), 24 June 2015 (24.06.2015), claims 1-14	1-14
X	CN 101377491 A (BEIJING CHEMCLIN BIOTECH CO., LTD.), 04 March 2009 (04.03.2009), claims 1-3, 5 and 7	1, 6-14
Y	CN 101377491 A (BEIJING CHEMCLIN BIOTECH CO., LTD.), 04 March 2009 (04.03.2009), claims 1-3, 5 and 7	1-14
Y	CN 101545913 A (BEIJING CHEMCLIN BIOTECH CO., LTD.), 30 September 2009 (30.09.2009), claim 1	1-14
Y	CN 103048477 A (SUZHOU HAOOUBO BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.), 17 April 2013 (17.04.2013), claims 1-10	1-14
Y	CN 103063851 A (SUZHOU HAOOUBO BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 April 2013 (24.04.2013), claims 1-10	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 September 2015 (15.09.2015)	**10 October 2015 (10.10.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **CAO, Kou** Telephone No.: (86-10) **62413565**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/072616

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013140449 A1 (BANKS, J.F. et al.), 06 June 2013 (06.06.2013), the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/072616

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104730257 A	24 June 2015	None	
CN 101377491 A	04 March 2009	None	
CN 101545913 A	30 September 2009	None	
CN 103048477 A	17 April 2013	CN 103048477 B	01 July 2015
CN 103063851 A	24 April 2013	CN 103063851 B	11 March 2015
US 2013140449 A1	06 June 2013	US 8963077 B2	24 February 2015
		EP 2788756 A4	24 June 2015
		US 2014179010 A1	26 June 2014
		US 8890061 B1	18 November 2014
		EP 2788756 A1	15 October 2014
		JP 2015500473 A	05 January 2015
		WO 2013085818 A1	13 June 2013
		CA 2856835 A1	13 June 2013
		US 2014332682 A1	13 November 2014
		US 8669519 B2	11 March 2014
		CN 104040338 A	10 September 2014

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2015/072616

A. 主题的分类

G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/78(2006.01)i; G01N 21/76(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N33, G01N21

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNPAT, WPI, EPODOC, 万方, CNKI, PubMed, googlescholar, ISI web of knowledge：反三碘甲状腺原氨酸, 反三碘甲腺原氨酸, 反T3, rT3, 磁珠, 化学发光, reverse triiodothyronine, magnetic bead, magnetic microparticle, chemiluminescence

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
E	CN 104730257 A (深圳市新产业生物医学工程股份有限公司) 2015年 6月 24日 (2015-06-24) 权利要求1-14	1-14
X	CN 101377491 A (北京科美东雅生物技术有限公司) 2009年 3月 4日 (2009-03-04) 权利要求1-3、5、7	1，6-14
Y	CN 101377491 A (北京科美东雅生物技术有限公司) 2009年 3月 4日 (2009-03-04) 权利要求1-3、5、7	1-14
Y	CN 101545913 A (北京科美东雅生物技术有限公司) 2009年 9月 30日 (2009-09-30) 权利要求1	1-14
Y	CN 103048477 A (苏州浩欧博生物医药有限公司) 2013年 4月 17日 (2013-04-17) 权利要求1-10	1-14
Y	CN 103063851 A (苏州浩欧博生物医药有限公司) 2013年 4月 24日 (2013-04-24) 权利要求1-10	1-14

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 9月 15日	2015年 10月 10日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	曹扣 电话号码 (86-10)62413565

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2013140449 A1 (BANKS J FRED等) 2013年 6月 6日 (2013 - 06 - 06) 全文	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/072616

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104730257	A	2015年 6月 24日	无			
CN	101377491	A	2009年 3月 4日	无			
CN	101545913	A	2009年 9月 30日	无			
CN	103048477	A	2013年 4月 17日	CN	103048477	B	2015年 7月 1日
CN	103063851	A	2013年 4月 24日	CN	103063851	B	2015年 3月 11日
US	2013140449	A1	2013年 6月 6日	US	8963077	B2	2015年 2月 24日
				EP	2788756	A4	2015年 6月 24日
				US	2014179010	A1	2014年 6月 26日
				US	8890061	B1	2014年 11月 18日
				EP	2788756	A1	2014年 10月 15日
				JP	2015500473	A	2015年 1月 5日
				WO	2013085818	A1	2013年 6月 13日
				CA	2856835	A1	2013年 6月 13日
				US	2014332682	A1	2014年 11月 13日
				US	8669519	B2	2014年 3月 11日
				CN	104040338	A	2014年 9月 10日