

[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 200910089583.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月30日

[11] 公开号 CN 101614742A

[22] 申请日 2009.7.23

[21] 申请号 200910089583.9

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市 100084 - 82 信箱

[72] 发明人 林金明 肖勤

[74] 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司

代理人 史二元

权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图 1 页

[54] 发明名称

促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了属于免疫分析医学领域的一种促黄体生成激素(LH)磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒。该试剂盒包括：1) 促黄体生成激素系列校准品；2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液；3) 异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体；4) 辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体；5) 化学发光底物液；6) 浓缩洗涤液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法，本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、稳定等优点。

1、一种促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：

1) 促黄体生成激素系列校准品；2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液；3) 异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体；4) 辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体；5) 化学发光底物液；6) 浓缩洗涤液。

2、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括反应管。

3、根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒中反应管的材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或者玻璃。

4、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物液包含A液和B液，其中，

A液为0.05~0.1M、pH值为8.0~10.0的Tris-HCl缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为3.0~4.0 mg/mL的鲁米诺和终浓度为0.1~0.3 mg/mL的对碘苯酚；

B液是0.05~0.1M pH值为4.0~5.0的柠檬酸缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为100~200 mg/mL的过氧化氢溶液。

5、根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物液：

A液为0.1M、pH值为8.5的Tris-HCl缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为4.0 mg/mL的鲁米诺和终浓度为0.3 mg/mL的对碘苯酚；

B液是 0.1M、pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 200 mg/mL 的过氧化氢溶液。

6、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述浓缩洗涤液为 0.01~0.05 M、pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液，且该缓冲液中含有体积百分比为 0.01~0.05 % 的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠。

7、根据权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于，所述浓缩洗涤液为 0.01M、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，且该缓冲液中含有体积百分比为 0.01% 的吐温 20 和终浓度为 9g/L 的氯化钠。

8、一种根据权利要求 1 所述试剂盒的制备方法，其特征在于，包括以下操作步骤：

1) 促黄体生成激素系列校准品的制备：用马血清将促黄体生成激素纯品稀释成校准品，其校准品浓度范围为 0~200 mIU/ mL；

2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液的制备：将粒径为 2~3 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，静置 20~25 min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3~5 次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 50~100mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 60~100 μg ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后，加磁场，静置 10-15 min，倒出上清，用封闭缓冲液于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百

分比为 0.1~0.3 %的吐温-20 和质量百分比为 0.05~0.1 %的叠氮化钠防腐剂的 0.01~0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次,并用该缓冲液将包被抗体的磁微粒制成 5~10 mg/mL 的工作液;

3) 异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体制备: 将抗促黄体生成激素单克隆抗体置于透析袋, 在 pH 9.0~9.5、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中过夜透析后, 置入溶有 0.01~0.03 mg/mL 的异硫氰酸荧光素的 pH 9.0~9.5、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中, 其中, 抗促黄体生成激素单克隆抗体与异硫氰酸荧光素的摩尔用量比为 1:7~1:12, 在 4°C 下搅拌反应 16~20 小时后, 将缓冲液更换为 pH 7.0~7.5、0.01 mol/L PBS 液, 然后每隔 4~6 小时更换 pH 7.0~7.5、0.01 mol/L PBS 液一次, 共更换 4~5 次, 将反应液置于离心管中, 3000 rpm 离心 30 min, 弃去沉淀。上清液为相应标记物, 用 20%的小牛血清稀释标记物, 工作浓度为 0.5~1.0 $\mu\text{g/mL}$;

4) 辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体的制备: 采用改良过碘酸钠法以辣根过氧化物酶标记促黄体生成激素, 采用方阵法选择酶标记物的工作浓度, 将制备的酶标记物用稀释液按 1:1000~1:3000 比例稀释成工作浓度;

5) 化学发光底物液的配制:

A 液为用 0.05~0.1 M、pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制鲁米诺终浓度为 3.0~4.0 mg/mL、对碘苯酚终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的溶液;

B 液为用 0.05~0.1 M、pH 值为 4.0~5.0 的柠檬酸缓冲液配制过氧化氢终浓度为 100~200 mg/mL 的溶液;

6) 浓缩洗涤液的配制:

向 0.01~0.05 M、 pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比为 0.01~0.05 %的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠;

7) 分装上述 1) ~6) 步骤制备的产物和反应管;

8) 组装为成品。

9、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述磁微粒为 2~3 μ m 粒径、四氧化三铁内核、表面包裹带有活性基团的聚合物。

10、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述封闭缓冲液为含有质量百分比为 0.2~1.0%的牛血清白蛋白和 0.5~1.0%酪蛋白的 pH7.2 的 0.02mol/L 的磷酸缓冲液。

11、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述化学发光底物液:

A 液为用 0.1 M、 pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液配制鲁米诺终浓度为 4.0 mg/mL、对碘苯酚终浓度为 0.3 mg/mL 的溶液;

B 液为用 0.1 M、 pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液配制过氧化氢终浓度为 200 mg/mL 的溶液。

12、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述浓缩洗涤液的配制为：向 0.01M 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比为 0.01 % 的吐温 20 和终浓度为 9g/L 的氯化钠。

促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒

技术领域

本发明属于免疫分析医学领域，具体地涉及一种促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒结合免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术。

背景技术

促黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)是垂体分泌的一种生殖激素，它是在下丘脑产生促性腺释放激素(Gn-RH)的条件下，刺激垂体分泌的一种有两条多肽链通过非共价键结合的糖蛋白激素。其分子量约为 30kDa。LH 的产生受下丘脑促性腺释放激素的控制，同时又受性腺的正、负反馈调控。在女性，LH 促进卵泡发育与成熟、诱发排卵、促进黄体生成、并合成与分泌孕酮，刺激卵泡的颗粒细胞产生并释放雌激素。在男性，LH 主要刺激睾丸间质细胞分泌睾酮。

LH 检测的临床意义，在女性，月经周期 LH 的释放高峰与卵巢排卵有着密切关系，因此可以在月经周期中监测血清 LH 峰值，以确定最佳受孕时间。同时还可以鉴别原发性（卵巢性）或继发性（垂体性）闭经；在男性主要用于鉴别原发性或继发性睾丸功能低下；另外，可鉴别青春期前儿童真性或假性早熟。如果血清促黄体生成激素检测异常，如 LH 水平的增高可见于：原发性性腺功能减退症，卵巢功能衰竭所致闭经，多囊卵巢综合征等。LH 的降低可见于：垂体一下丘脑病变，闭经—乳溢综合征，Kallman 综合征，精神性厌食，垂体单纯 LH 缺乏，青春期延期等。因此，血清 LH 含量测定对于预测排卵，诊断不孕症，研究和判断下丘脑-垂体-性腺轴功能及有关内分泌疾病的治疗监测等方面有重要意义。

目前用于检测 LH 的免疫分析方法主要有放射免疫分析、酶联免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、化学发光免疫分析等。根据大量的试验结果及临床应用资料，从实用性、稳定性、准确性及发展前景来看，优先顺序依次为：化学发光免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、放

射免疫分析以及酶免疫分析。放射免疫分析技术因其使用放射性元素作为标记物，对环境有放射性污染，并存在灵敏度不高，操作复杂，试剂保存时间短以及检测成本高等缺点；酶免疫分析法存在灵敏度低，信噪比不高，线性范围窄等方法学制约因素；时间分辨荧光免疫分析对检测环境的要求较高，易受空气尘埃的干扰；化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLEIA)是一种综合了化学发光的高灵敏性和免疫反应的高特异性的检测技术，可使检测灵敏度达到 10^{-18} 摩尔水平，而且检测范围可达 6 个数量级。它是在放射免疫分析和酶免疫分析基础之上发展起来的一种高灵敏度，高特异性，检测线性范围宽，标记物稳定，仪器结构简单，操作简便，自动化程度高，应用广泛，安全无放射性污染的免疫分析技术。目前化学发光免疫分析技术因其具有上述诸多优点得到了广泛的应用。

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。免疫磁微粒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合力的各种免疫活性物质（抗原或抗体），使其为免疫磁微粒，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它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。

免疫磁微粒技术与化学发光免疫分析技术结合检测待测物，可大大提高检测的灵敏度和准确性，它以微米级磁微粒为载体，利用表面有机物提供的羧基活性基团与蛋白质氨基共价结合，采用抗体进行“搭桥”成免疫磁微粒，可进行抗原、抗体反应。该技术的新颖之处有：(1)采用微小的磁微粒作为固相可增加包被表面积，从而增加了抗体的有效包被量，不仅节省了抗体，而且有助于建立宽范围的免疫检测方法，尤其适合于高浓度临床样本的测定，避免弯钩效应的发生；(2)利用顺磁铁微粒为固相载体，外包被单克隆抗体，增加抗原、抗体的接触面积及底物发光面积，提高反应的灵敏度，并采用旋转磁场使磁微粒起搅拌作用及分离结合抗原-抗体与游离抗体的作用；(3)在液相反应中，使用发光增强剂，将水分子从发光底物的发光位点排开，同时还可缩短发光的达峰时间；(4)使用单克隆抗体，提高了反应的特异性。

本发明的试剂盒利用化学发光免疫分析结合免疫磁微粒固相分离技术检测 LH，有助于促进化学发光免疫分析技术在临床检验中的应用与发展。现有技术中的化学发光免疫分析试剂盒为封闭式全自动化学发光测量系统，需要昂贵的全自动化学发光测量仪，从而限制了推广使用，无法广泛地应用于临床诊断和科研工作。本发明是结合磁微粒免疫分离技术在酶免疫分析的基础上应用酶催化发光底物，通过检测发光底物产生的光信号代替酶免疫分析中的显色底物，因而其灵敏度大大提高，并且操作简便适用性广，既可应用于开放式的半自动化学发光测量仪，也可用于全自动的测量系统，可实现大批量、快检测，使用成本低，更易推广应用。

发明内容

本发明目的在于提供一种促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒。

本发明的另一目的在于提供上述试剂盒的制备方法。

一种促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒，所述试剂盒包括：

- 1) 促黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)系列校准品；
- 2) 抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)单克隆抗体包被的磁微粒溶液；
- 3) 异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体(简称：FITC 标记物)；
- 4) 辣根过氧化物酶(HRP)标记的促黄体生成激素单克隆抗体(简称：酶标记物)；
- 5) 化学发光底物液；
- 6) 浓缩洗涤液；

所述试剂盒还包括反应管。

所述试剂盒中反应管的材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或者玻璃。

所述化学发光底物液包含 A 液和 B 液，其中，

A 液为 0.05~0.1M、 pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 3.0~4.0 mg/mL 的鲁米诺和终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的对碘苯酚；

B 液是 0.05~0.1M pH 值为 4.0~5.0 的柠檬酸缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 100~200 mg/mL 的过氧化氢溶液。

所述化学发光底物液优选：A 液为 0.1M 、 pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 4.0 mg/mL 的鲁米诺和终浓度为 0.3 mg/mL 的对碘苯酚；B 液是 0.1M pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度为 200 mg/mL 的过氧化氢溶液。

所述浓缩洗涤液为 0.01~0.05 M、 pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液，且该缓冲液中含有体积百分比为 0.01~0.05 %的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠。

所述浓缩洗涤液优选为 0.01M 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，且该缓冲液中含有体积百分比为 0.01%的吐温 20 和终浓度为 9 g/L 的氯化钠。

上述试剂盒的制备方法，包括以下操作步骤：

- 1) 促黄体生成激素系列校准品的制备：用马血清将促黄体生成激素纯品稀释成校准品，其校准品浓度范围为 0-200 mIU/ mL；
- 2) 抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液的制备：将粒径为 2~3 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，静置 20~25 min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3~5 次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 50~100mg/mL；

每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 60~100 μg ，在 4℃ 下搅拌过夜后，加磁场，静置 10-15 min，倒出上清，用封闭缓冲液于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比为 0.1~0.3 % 的吐温-20 和质量百分比为 0.05~0.1 % 的叠氮化钠防腐剂的 0.01~0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次，并用该缓冲液将包被抗体的磁微粒制成 5~10 mg/mL 的工作液；

3) 异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体制备：将抗促黄体生成激素单克隆抗体置于透析袋，在 pH 9.0~9.5、50 mmol/L NaHCO_3 缓冲液中过夜透析后，置入溶有 0.01~0.03 mg/mL 的异硫氰酸荧光素的 pH 9.0~9.5、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中，其中，抗促黄体生成激素单克隆抗体与异硫氰酸荧光素的摩尔用量比为 1:7~1:12，在 4℃ 下搅拌反应 16~20 小时后，将缓冲液更换为 pH 7.0~7.5、0.01 mol/L PBS 液，然后每隔 4~6 小时更换 pH 7.0~7.5、0.01 mol/L PBS 液一次，共更换 4~5 次，将反应液置于离心管中，3000 rpm 离心 30 min，弃去沉淀。上清液为相应标记物，用 20% 的小牛血清对制备的标记物进行稀释且工作浓度为 0.5~1.0 $\mu\text{g/mL}$ ；

4) 辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体的制备：采用改良过碘酸钠法以辣根过氧化物酶标记促黄体生成激素，采用方阵法选择酶标记物的工作浓度，将制备的酶标记物用稀释液按 1:1000~1:3000 比例稀释成工作浓度；

5) 化学发光底物液的配制：

A 液为用 0.05~0.1 M、pH 值为 8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制鲁米诺终浓度为 3.0~4.0

mg/mL、对碘苯酚终浓度为 0.1~0.3 mg/mL 的溶液；

B 液为用 0.05~0.1 M 、 pH 值为 4.0~5.0 的柠檬酸缓冲液配制过氧化氢终浓度为 100~200 mg/mL 的溶液；

6) 浓缩洗涤液的配制：向 0.01~0.05 M pH 值为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液中加入体积百分比为 0.01~0.05 %的吐温 20 和终浓度为 9~10 g/L 的氯化钠；

7) 分装上述 1) ~6) 步骤制备的产物和反应管；

8) 组装为成品。

所述浓缩洗涤液使用时用去离子水稀释 20 倍。

所述载体磁微粒为 2~3 μ m 粒径、四氧化三铁内核、表面包裹带有活性基团的聚合物。

所述活性基团为氨基。

所述封闭缓冲液为含有质量百分比为 0.2~1.0%的牛血清白蛋白和 0.5~1.0%酪蛋白的 pH7.2 的 0.02mol/L 的磷酸缓冲液。

所述化学发光底物液优选配制：A 液为用 0.1 M 、 pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液配制鲁米诺终浓度为 4.0 mg/mL、对碘苯酚终浓度为 0.3 mg/mL 的溶液；B 液为用 0.1 M、 pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液配制过氧化氢终浓度为 200 mg/mL 的溶液。

所述浓缩洗涤液的优选配制为：向 0.01M 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入体积比为 0.01 %的吐温 20 和终浓度为 9 g/L 的氯化钠。

所述酶标记物稀释液为含有 12.12 g /L Tris, 5 g/L BSA, 体积百分比为 0.1%的 Proclin 防腐剂的水溶液。

所述促黄体生成激素校准品的原料为标准级, 纯度不低于 99%。

本发明试剂盒的检测原理: FITC 标记的促黄体生成激素单克隆抗体、酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体和待测样品中的待测抗原, 形成“双夹心免疫复合物”, 之后抗 FITC 单克隆抗体包被的磁微粒再与该复合结构结合, 形成“磁微粒-FITC 抗体-FITC 标记的 LH 抗体-待测抗原-酶标记的 LH 抗体”复合物, 最后与化学发光底物作用而产生光信号, 在管式发光仪中对 LH 进行检测。

本发明采用“双抗体夹心法”反应模式, 有效地利用了化学发光检测技术结合磁微粒免疫分离技术原理, 定量测定人体血清、血浆样品中 LH 含量, 确保了检测的灵敏度, 且各项指标均达到同类进口试剂盒的分析法水平。使用的磁微粒具有超顺磁、高分散、表面积大的特点。对样品的前处理要求低, 样品前处理过程简单可靠, 可快速、高通量检测大批样品, 便于操作和生产。本发明的试剂盒结构简单, 使用方便, 灵敏度高, 特异性强, 检测范围宽, 操作简单, 试剂盒成本低, 无放射性污染, 临床适用性强, 更适用于我国临床检测及筛查实验室。此外, 由于本发明的检测系统为开放式操作, 简便快速, 不需要昂贵的全自动化学发光测量仪, 特别适合广大的中小医院推广使用。

附图说明

图 1 为实施例 1 所制备的试剂盒中的校准品线性图（双对数标准曲线）。

图 2 为本发明的试剂盒同国外试剂盒临床血样测值比对的相关曲线。

具体实施方式

以下实施例中使用的生物试剂的来源：马血清购自北京元亨圣马生物技术研究所；LH 纯品购自美国 Fitzgerald 公司，纯度为 99.9%；抗 FITC 单克隆抗体购自美国 Fitzgerald 公司；磁微粒购自意大利 Adaltis 公司，磁微粒表面包裹带有氨基活性基团的聚合物；抗 LH 单克隆抗体来源于美国 Fitzgerald 公司；异硫氰酸荧光素购自美国 Sigma 公司；小牛血清购自兰州民海生物工程有限公司；辣根过氧化物酶购自美国 Sigma 公司。

以下实施例中所述 FITC 标记物为异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体；所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体。

以下实施例中涉及的物质的百分比如无特别说明均为质量百分比。

1000 mL 酶标记物（辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体）稀释液的配制：称取 Tris 12.12 g；BSA 5 g；量取 Proclin 防腐剂 1 mL，用双蒸水定容至 1000 mL。

实施例 1 本发明的 LH 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒的制备 I

1、LH 系列校准品的制备

用马血清将 LH 纯品稀释成校准品，分装成浓度为 0、0.5、2、10、50、100、200 mIU/mL 共 7 瓶。

2、抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

将粒径为 2.8 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 25 min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 100 mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 100 μg ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 10 min，倒出上清，用含有 1.0% 牛血清白蛋白和 0.5% 酪蛋白的 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 3 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比为 0.1% 的吐温 20 和 0.05% 的叠氮化钠防腐剂的 0.01M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 4 次，并用该溶液配制成 5 mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，不应冻存，用时轻轻摇匀。

3、FITC 标记的 LH 单克隆抗体的制备

将 2 mL、浓度为 2 mg/mL 的抗促黄体生成激素单克隆抗体置于透析袋，在 pH 9.3、50 mmol/L NaHCO_3 缓冲液中过夜透析后，置入 10 mL 溶有 0.03 mg/mL 的异硫氰酸荧光素的 pH 9.3、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 20 小时后，将缓冲液更换为 pH 7.3、0.01 mol/L PBS 液，然后每隔 5 小时更换 pH 7.3、0.01 mol/L PBS 液一次，共更换 5 次，将反应液置于离心管中，3000 rpm 离心 30 min，弃去沉淀。上清液为相应标记物，标记物可加入等体积甘油，置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待用。用 20% 的小牛血清对制备的标记物进行稀释，工作浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4、辣根过氧化物酶标记 LH 单克隆抗体的制备

采用过碘酸钠法进行标记。即利用过碘酸盐氧化糖蛋白中糖基的邻二羟基成为醛基，再经过醛基与抗体的伯氨基反应形成Schiff 碱。后者经 NaBH_4 还原 $-\text{N}=\text{C}-$ 键成为稳定的结合物。

具体操作步骤如下：(1) 称取 HRP 5.0 mg，加双蒸水 250 μL 溶解；称取 NaIO_4 5.0 mg，加双蒸水 250 μL 溶解；向 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO_4 溶液，边加边搅拌；将混合好的溶液置于 4°C ，静置 30 min；取 5 mL 乙二醇溶于 25 μL 双蒸水中，逐滴加入上述混合溶液中，边加边搅拌；室温静置 30 min，将 HRP 氧化；(2) 调整 LH 单克隆抗体浓度到约 5.0 mg/mL，用 0.05 mol/L 碳酸缓冲液透析去除甘油等杂质， 4°C 过夜透析，期间换透析液 3 次；将抗体与 HRP 按体积 1:5 混合，于 0.05mol/L 碳酸缓冲液中透析 6 小时，依次换透析液；加入新配制的 NaBH_4 溶液终止反应，摇匀， 4°C 静置 2 小时，每 30 min 摇一次；用 0.02 mol/L PBS 缓冲液过夜磁力搅拌透析，期间换一次透析液；(3) 完成标记的抗体溶液中逐滴加入饱和硫酸铵溶液，边加边搅拌 30 min； 4°C 静置 1 小时，8000 rpm 离心 10 min，将上清液移至新管，沉淀用等体积 PBS 重新悬浮；重复上述操作 3 次，收集分离的各个组分，提纯的 HRP-抗体结合物用 PBS 过夜透析；可向得到的酶标记物中加入等体积甘油， -20°C 保存备用。用酶标记物稀释液进行稀释，稀释比例为 1:2000。

5、化学发光底物液的配制：

A 液：在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH 值为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入终浓度为 4.0 mg/mL 的鲁米诺和终浓度为 0.3 mg/mL 的对碘苯酚等发光增强剂。

B 液：在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸，配制成 0.1M pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液，在此溶液中加入终浓度为 200 mg/mL 的过氧化氢溶液。

在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合。

6、浓缩洗涤液的配制：

浓缩洗涤液是向 0.01M pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中加入体积比为 0.01% 的 Tween 20 和终浓度为 9 g/L 的 NaCl。

7、将用上述方法制备的各组分，组装成试剂盒，以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

- 1) LH 系列校准品共 7 瓶，3 mL/瓶；
- 2) 抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液 1 瓶，共 6 mL；
- 3) FITC 标记的 LH 单克隆抗体 1 瓶，3 mL；
- 4) 辣根过氧化物酶标记 LH 单克隆抗体 1 瓶，3 mL；
- 5) 化学发光底物 A 液 1 瓶，12 mL、B 液 1 瓶，12 mL；在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合；
- 6) 浓缩洗涤液 1 瓶，6mL，使用时用去离子水稀释 20 倍；
- 7) 聚苯乙烯材料的反应管 1 袋，50 个，每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例2 本发明的 LH 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒的制备 II

1、LH 系列校准品的制备，同实施例 1；

2、抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

将粒径为 2.0 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 25 min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 4 次，并用该溶液进行悬浮，浓度为 50 mg/mL；每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 80 μg ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 15 min，倒出上清，用含有 0.5 % 牛血清白蛋白、1.0 % 酪蛋白、0.02 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含 0.3 % Tween 20 和 0.1% 叠氮化钠防腐剂的 0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 4 次，并用该溶液配制成 7.5 mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，不应冻存，用时轻轻摇匀。

3、FITC 标记的 LH 单克隆抗体的制备

将 1mL、浓度为 1 mg/mL 的抗促黄体生成激素单克隆抗体置于透析袋在 pH 9.0、50 mmol/L NaHCO_3 缓冲液中过夜透析后，置入 10 mL 溶有 0.01 mg/mL 的异硫氰酸荧光素的 pH 9.0、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 18 小时后，将缓冲液更换为 pH 7.0、0.01 mol/L PBS 液，然后每隔 5 小时更换 pH 7.0、0.01 mol/L PBS 液一次，共更换 5 次，将反应液置于离心管中，3000 rpm 离心 30 min，弃去沉淀。上清液为相应标记物，标记物中加

入等体积甘油后，置-20℃下保存待用。用 20%的小牛血清对制备的标记物进行稀释，工作浓度为 0.5 µg/mL。

4、辣根过氧化物酶标记 LH 单克隆抗体的制备，同实施例 1，用酶标记物稀释液进行稀释，稀释比例为 1:1000。

5、化学发光底物液的配制：

A 液：在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.05 M pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入终浓度为 3.0 mg/mL 的鲁米诺和终浓度为 0.1 mg/mL 的对碘苯酚等发光增强剂。

B 液：在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸，配制成 0.05M pH 值为 4.0 的柠檬酸缓冲液，在此溶液中加入终浓度为 100 mg/mL 的过氧化氢溶液。

在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合。

6、浓缩洗涤液的配制：

浓缩洗涤液是向 0.05 M pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中加入体积比为 0.05 % 的 Tween 20 和终浓度为 10 g/L 的 NaCl。

7、将用上述方法制备的各组分，组装成试剂盒，以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

1) LH 系列校准品共 7 瓶，3 mL/瓶；

2) 抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液 1 瓶，共 4 mL；

- 3) FITC 标记的 LH 单克隆抗体 1 瓶, 3 mL;
- 4) 辣根过氧化物酶标记 LH 单克隆抗体 1 瓶, 3 mL;
- 5) 化学发光底物 A 液 1 瓶, 12 mL、B 液 1 瓶, 12 mL; 在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合;
- 6) 浓缩洗涤液 1 瓶, 6mL, 使用时用新鲜制备的去离子水稀释 20 倍;
- 7) 聚苯乙烯材料的反应管 1 袋, 50 个, 每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 3 本发明的 LH 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒的制备 III

- 1、LH 系列校准品的制备, 同实施例 1;
- 2、抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

将粒径为 3.0 μm 的磁微粒用戊二醛进行活化, 室温搅拌, 混匀 2 小时后, 加磁场, 磁场强度为 2000 高斯, 静置 20 min, 倒出上清, 用 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次, 并用该溶液进行悬浮, 浓度为 75 mg/mL; 每毫升悬浮液中加入抗 FITC 单克隆抗体 60 μg , 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜后, 加磁场, 磁场强度为 2000 高斯, 静置 10 min, 倒出上清, 用含有 0.5 %牛血清白蛋白、0.5 %酪蛋白、0.02 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.2) 于室温封闭 3 小时; 最后用 pH 值为 7.4、含 0.2 %Tween 20 和 0.1%叠氮化钠防腐剂的 0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液清洗 4 次, 并用该溶液配制成 10 mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 不应冻存, 用时轻轻摇匀。

3、FITC 标记的 LH 单克隆抗体的制备

将 1mL、浓度为 2 mg/mL 的抗促黄体生成激素单克隆抗体置于透析袋在 pH 9.5、50 mmol/L NaHCO₃ 缓冲液中过夜透析后,置入 10 mL 溶有 0.02 mg/mL 的异硫氰酸荧光素的 pH 9.5、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中,在 4℃下搅拌反应 16 小时后,将缓冲液更换为 pH 7.5、0.01 mol/L PBS 液,然后每隔 5 小时更换 pH 7.5、0.01 mol/L PBS 液一次,共更换 4 次,将反应液置于离心管中,3000 rpm 离心 30 min,弃去沉淀。上清液为相应标记物,标记物中加入等体积甘油后,置-20℃下保存待用。用 20%的小牛血清对制备的标记物进行稀释,工作浓度为 1 μg/mL。

4、辣根过氧化物酶标记 LH 单克隆抗体的制备,同实施例 1,用酶标记物稀释液进行稀释,稀释比例为 1:3000;

5、化学发光底物液的配制:

A 液:在双蒸水中加入 Tris 和浓 HCl 配成 0.1M pH 值为 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液。在此缓冲液中加入终浓度为 3.5 mg/mL 的鲁米诺和终浓度为 0.2mg/mL 的对碘苯酚等发光增强剂。

B 液:在双蒸水中加入柠檬酸三钠和柠檬酸,配制成 0.1M pH 值为 5.0 的柠檬酸缓冲液,在此溶液中加入终浓度为 150 mg/mL 的过氧化氢溶液。

在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合。

6、浓缩洗涤液的配制:

浓缩洗涤液是向 0.01M pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液中加入体积比为 0.05 % 的 Tween 20 和终浓度为 9.5 g/L 的 NaCl。

7、将用上述方法制备的各组分，组装成试剂盒，以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

- 1) LH 系列校准品共 7 瓶，3 mL/瓶；
- 2) 抗 FITC 单克隆抗体包被磁微粒溶液 1 瓶，共 3 mL；
- 3) FITC 标记的 LH 单克隆抗体 1 瓶，1.5 mL；
- 4) 辣根过氧化物酶标记 LH 单克隆抗体 1 瓶，3 mL；
- 5) 化学发光底物 A 液 1 瓶，12mL、B 液 1 瓶，12mL；在使用前根据使用量将 A 液和 B 液等体积混合；
- 6) 浓缩洗涤液 1 瓶，6mL，使用时用去离子水稀释 20 倍；
- 7) 聚苯乙烯材料的反应管 1 袋，50 个，每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 4 以实施例 1 制备的本发明试剂盒检测血清中 LH 的浓度的方法

1、样品前处理

取人的空腹晨血清样品，3000 rpm 离心 5 min，取上层血清进行分析。

2、检测方法

使用本试剂盒进行实验前，需先取出磁微粒溶液、FITC 标记物、酶标记物、校准品/待测样品、在室温放置 15~30 分钟，使它们平衡到室温；之后，将恒温温箱或者水浴锅调至 37℃；准备好合适的微量加样器及对应吸头并且检查化学发光仪是否正常工作。

具体操作步骤：

将圆底聚苯乙烯试管编号后，依次向试管中加入 50 μL 血清样品和 LH 系列校准品溶液，再加入 FITC 标记物与酶标记物各 50 μL ，37℃振荡反应 30 min 后，加入 100 μL 抗 FITC 抗体包被的磁微粒溶液，室温孵育 10 min，之后每管加入稀释 20 倍后的洗涤液 500 μL ，充分混匀，置于磁分离器上分离 2 min，倒出上清液，将倒转的试管放在滤纸上吸干，拍击分离器以除去挂壁液体，重复 4 次。各管加入混合后的化学发光底物 A 和 B 液 200~400 μL ，充分混匀，置于磁分离器内，待磁微粒富集于底部后，暗处放置 5 min，而后在管式化学发光测量仪上依序测量各管的发光强度（RLU）。以校准品浓度的 Log 值为横坐标，RLU 的 Log 值为纵坐标绘出标准曲线（双对数曲线），以待测血清 RLU 值在标准曲线上查出该血清 LH 的浓度，见附图 1，其中，标准曲线方程为 $\text{Log}(Y) = 0.7241\text{Log}(X) + 3.5018$ ，相关系数 $r=0.9992$ 。

实施例 5 本发明的试剂盒的方法学检定

按照本领域中常规的制造及检定规程对通过实施例 1 中制备成的试剂盒进行方法学检定，本发明对试剂盒的精密度、准确度、灵敏度、特异性以及稳定性等都进行了具体的实验操作，结果如下：

1、试剂盒精密度测定

将实施例 1 中制备的试剂盒分别取三批进行精密度实验，分别测定低、中、高三种不同浓度的血清，10 孔平行测定，得出每次分析的批内和多次分析的批间变异(表 1)。其批内和批间变异系数均小于 9%。

表 1 方法精密度考察

	样品	测定次数	LH 浓度(mIU/mL)	CV%
批内变异	1	10	93.75	4.17
	2	10	59.13	6.27
	3	10	17.92	4.04
批间变异	1	30	97.26	6.70
	2	30	60.91	7.65
	3	30	18.41	8.30

2、试剂盒准确度测定

准确性是指测量值接近真值的程度，通常用回收率表示。取两个 LH 临床定值血清，浓度分别为 9.47 mIU/mL 和 20.5 mIU/mL，分别向其中加入终浓度为 7.5、45 和 75 mIU/mL 的 LH 标准品，按照实施例 1 的方法对每个浓度做 3 个平行，计算回收率。结果如表 2 所示，LH 的加标回收率在 97.5%~104.1% 之间。

表 2 方法准确度测定

样品值 (mIU/mL)	加入值 (mIU/mL)	测定平均值 (mIU/mL)	回收率(%)
9.47	7.5	17.09	101.6
	45	55.38	102.0
	75	87.51	104.1
	7.5	27.81	97.5

20.5	45	66.50	102.2
	75	97.5	102.7

3、试剂盒灵敏度实验

灵敏度是在一给定的显著性水平上可与零剂量相区别的剂量，是指分析方法的最小检出量(记为零标准点的平均值+2SD)。平均测定 10 个 S_0 标准点，计算其发光强度的平均值和标准偏差，带入线性方程，计算出对应的浓度值，并重复该操作 5 次，得到该方法的最低检出限为 0.2 mIU/ mL。并与其它方法比对，见表 3。

表 3 方法灵敏度实验

方法	灵敏度 (mIU/ mL)
放射免疫方法	0.3
板式化学发光方法	0.8
本发明方法	0.2

4、试剂盒特异性实验

对实施例1的试剂盒特异性检验是选取与LH具有相近结构的HCG、TSH和FSH，配制成浓度远大于生理浓度的临床样本，以本法进行测定，并按照以下公式计算抗体的交叉反应率(cross reactivity, CR):

$$CR=100 \times C_{LH} / C_{\text{cross-reactant}}$$

其中 C_{LH} 指测得的LH浓度， $C_{\text{cross-reactant}}$ 指交叉反应物的实际浓度。结果见表4，本法与HCG、TSH和FSH的交叉反应率均小于0.5%，具有良好的特异性，完全符合临床检测的要求。

表 4 方法特异性实验

交叉反应物	实验浓度	LH 测定浓度(mIU/mL)	交叉反应率(%)
HCG	500mIU/mL	2.375	0.48
	150mIU/mL	0.375	0.25
	50mIU/mL	ND*	0

TSH	120 μ IU/mL	ND*	0
	40 μ IU/mL	ND*	0
	10 μ IU/mL	ND*	0
FSH	100mIU/mL	0.258	0.26
	50mIU/mL	ND*	0
	25mIU/mL	ND*	0

ND* 未检出

5、试剂盒稳定性实验

对实施例 1 的试剂盒分别进行 4 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 的 3 天和 7 天稳定性实验，结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、待测物的加标回收率、批内批间变异系数等指标均在正常范围之内。考虑到试剂盒冷冻情况的发生，将实施例 1 的试剂盒放入-20 $^{\circ}$ C 冷冻 7 天，测定结果也表明试剂盒的各项指标完全正常。

经过大量的实验证明，本发明的试剂盒方法学指标如下：

检测范围：0~200 mIU/ mL；

灵敏度：最小检出限为 0.2 mIU/ mL；

精密度：小于 9%；

准确性：平均回收率在 97.5%~104.1%之间；

特异性：与 HCG、TSH、FSH 的交叉反应率小于 0.5%；

稳定性：各试剂组分置 4 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C，考察 3d、7d 后，各组分仍稳定，测定结果符合上述要求。

实施例 6 本发明的试剂盒同国外试剂盒临床血样测值比对

用实施例 1 制得的试剂盒（使用方法见实施例 4）和购自美国 Monobind 公司的微孔板化学发光试剂盒（使用方法见说明书）对 60 份人血清样品同时进行检测。其检测结果见图 2，以本发明方法测定的血样 LH 结果为横坐标，以 Monobind 试剂盒测定的结果为纵坐

标作回归分析，相关方程为： $Y=1.0181X+0.4710$ ，相关系数 $r=0.9845$ 。经统计学处理结果表明，本发明方法同国外试剂盒临床血样测值相关性良好。

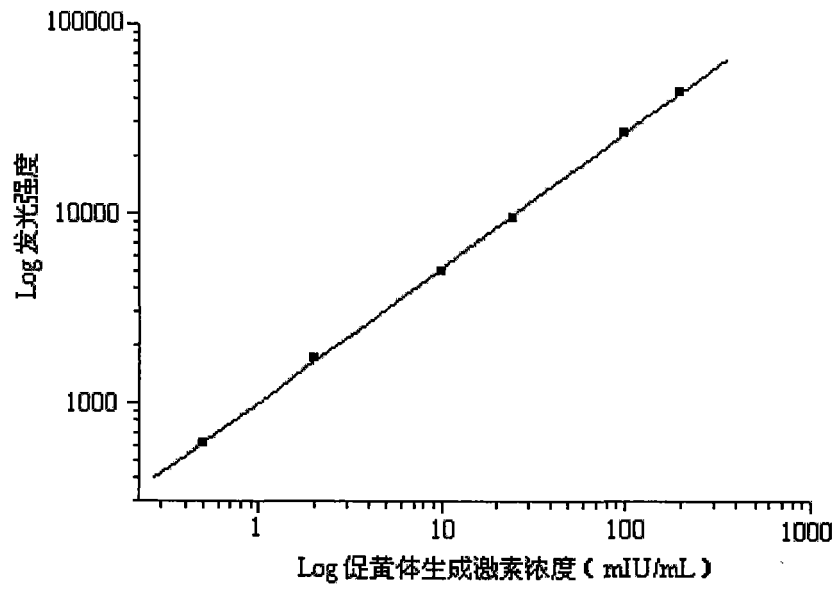


图 1

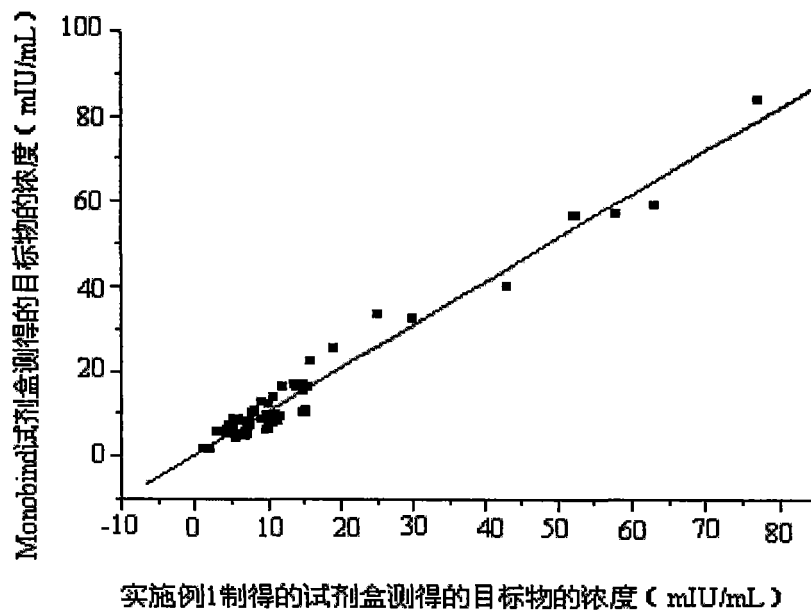


图 2

专利名称(译)	促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒		
公开(公告)号	CN101614742A	公开(公告)日	2009-12-30
申请号	CN200910089583.9	申请日	2009-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	林金明 肖勤		
发明人	林金明 肖勤		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/74 G01N33/535 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了属于免疫分析医学领域的一种促黄体生成激素(LH)磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒。该试剂盒包括：1)促黄体生成激素系列校准品；2)抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液；3)异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体；4)辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体；5)化学发光底物液；6)浓缩洗涤液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法，本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、稳定等优点。

	样品	测定次数	LH浓度(mIU/mL)	CV%
批内变异	1	10	93.75	4.17
	2	10	59.13	6.27
	3	10	17.92	4.04
批间变异	1	30	97.26	6.70
	2	30	60.91	7.65
	3	30	18.41	8.30