[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910091848.9

[43] 公开日 2010 年 2 月 3 日

[11] 公开号 CN 101639478A

[22] 申请日 2009.8.27
[21] 申请号 200910091848.9
[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 辛天兵 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 史双元

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种属于免疫分析领域的利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇(E_2)的试剂盒。该试剂盒包括雌二醇系列校准品、二抗包被的磁微粒溶液、辣根过氧化酶标记的雌二醇、雌二醇抗体、化学发光底物液以及浓缩洗涤液。 本发明还公开了所述试剂盒的制备方法。 本发明试剂盒可定量检测人体血清、血浆样品中雌二醇的含量。 可同时检测大量样品，具有简便、快速、灵敏、稳定、高灵敏度等优点，为临床诊断和科研工作提供一种非常有价值的检测手段。

1、一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括雌二醇系列校准品、二抗包被的磁微粒溶液、辣根过氧化酶标记的雌二醇、雌二醇抗体、化学发光底物液以及浓缩洗涤液。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述二抗为多克隆抗体。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于，所述二抗为羊抗兔的多克隆抗体。

4、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述雌二醇抗体为兔抗雌二醇多克隆抗体。

5、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为 A 液和 B 液，其中：

化学发光底物 A 液是 pH 值为 8.0～10.0 的含有 8～10 mM 鲁米诺、0.1～0.3 mM 4-羟基联苯和 0.05～0.1 mM 4-碘苯硼酸的 0.1～0.2 M 硼酸-硼砂缓冲液；

化学发光底物 B 液是 pH 值为 7.0～7.6 的含有 3.5～5 mM 过氧化脲和体积百分比浓度为 0.1～0.5 %的 Tween20 的 0.1～0.2 M 磷酸盐缓冲液。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物 A 液是 pH 值为 8.5 的含有 10mM 鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯和 0.05mM 4-碘苯硼酸的 0.2M 硼酸-硼砂缓冲液；

所述化学发光底物 B 液是 pH 值为 7.4 的含有 3.5mM 过氧化脲和体积百分比浓度为 0.1%Tween20 的 0.2M 磷酸盐缓冲液。

7、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述浓缩洗涤液是 pH 为 7.2～7.4 的含有质量百分比浓度为 10～20% 的 NaCl、体积百分比浓度为 0.05～0.1%的吐温 20 和 0.05～0.1%的防腐剂 Proclin 300 的 0.1～0.25M 磷酸盐缓冲液。

8、根据权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于，所述浓缩洗涤液为 25 倍浓缩洗涤液，该洗涤液是 pH 为 7.4 的含有质量百分比浓度为 20% 的 NaCl、体积百分比浓度为 0.1%的吐温 20 和 0.1%的防腐剂 Proclin 300 的 0.25M 磷酸盐缓冲液。

9、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）雌二醇系列校准品的制备：用去激素人血清将雌二醇纯品稀释成校准品，其校准品的浓度范围为 0～1000pg/mL；

2）羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液的制备：通过戊二醛两步法制备羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒，并溶于 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.1~0.3 %的吐温-20 和质量百分比浓度为 0.05~0.1 %的叠氮化钠防腐剂的 0.01~0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液中，制备浓度为 5~10 mg/mL 的工作液；

3）雌二醇多克隆抗体的制备：

a)雌二醇抗原的制备：使用混合酸酐方法制备雌二醇活性酯，再用雌二醇活性酯与 BSA 在磷酸缓冲液的条件下制备雌二醇-BSA 复合物；

b）雌二醇多克隆抗体的制备：选取新西兰兔，用步骤 a）制备的雌二醇-BSA 复合物进行免疫，首次剂量为 2.0 mg/只，四周后加强一次剂量为 1.0 mg/只，第二次注射后，每间隔两个月加强注射一次剂量均为 1.0 mg/只，再连续注射 3 次，三周后，心脏采血，分离血清，纯化而得雌二醇多克隆抗体，使用抗体稀释液将其稀释，稀释比例为 1:1000~1:3000；

4）辣根过氧化酶标记雌二醇的制备：采用改良的戊二醛法制备辣根过氧化酶标记雌二醇，得到的酶标记物用酶标记物稀释液按体积比将其稀释成 1:1000～1:3000 的工作液；

5）化学发光底物液的制备：

a）化学发光底物液 A：

向 0.1~0.2 M 硼酸-硼砂缓冲液中加入终浓度如下的成分：8~10 mM 鲁米诺、0.1~0.3 mM 4-羟基联苯和 0.05~0.1 mM 4-碘苯硼酸，调节 pH 值至 8.0～10.0；

b）化学发光底物液 B：

向 0.1~0.2 M 磷酸盐缓冲液中加入终浓度为 3.5~5 mM 过氧化脲，然后加入 Tween20 使其在缓冲液中的体积百分比浓度为 0.1~0.5 %，调节 pH 值至 7.0～7.6；

6）25 倍浓缩洗涤液的配制：

向 0.1~0.25M 磷酸盐缓冲液中加入 NaCl、吐温 20 和防腐剂 Proclin 300，其中，NaCl 的质量百分比浓度为 10~20%、吐温 20 的体积百分比浓度为 0.05~0.1%、防腐剂 Proclin 300 的体积百分比浓度为 0.05~0.1%，然后调节缓冲液 pH 至 7.2～7.4；

7）分装步骤 1）~6）制备的试剂并装入试剂盒中。

10、根据权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于，所述载体磁微粒为 2~3μm 粒径、四氧化三铁内核、表面包裹带有氨基活性基团的聚合物。

一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒

技术领域

本发明属于免疫分析领域，具体涉及一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒结合了免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术。

背景技术

雌二醇（E_2）是女性激素中生物活性最强的一种，主要由卵巢合成，少数由肾上腺分泌，其生理效应主要促使女性生殖器官的生长发育、促使第二性征的发育、对下丘脑—垂体轴的影响。血清中雌二醇浓度检查下视丘—垂体—生殖腺轴功能指标之一，对诊断某些内分泌及妇科疾病有一定的价值和重要意义。雌二醇含量的改变会表现出不同的病变。雌二醇增高可见女性性早熟、双胎妊娠或多胎妊娠、卵巢性索间质细胞瘤、子宫内膜癌、乳腺癌、男性乳房发育、男性冠心病、男性系统性红斑狼疮(SLE)、肝硬变；雌二醇降低表现为女性性发育不全、先天性卵巢发育不全(Turner's Syndrome)、闭经、女性不孕、多囊卵巢综合征、席汉氏综合征、完全性或部分性葡萄胎、异位妊娠。另外，人体雌二醇对促进女性生殖系统的生长发育、维持生育力以及对物质代谢有着重要影响。近年来，人们研究发现人体中雌二醇含量水平与某些肿瘤，如乳腺癌、子宫癌、肝癌等有显著的相关性，欧美等国家已相继禁止或严格禁止使用。因此，发明一种灵敏度高，操作简便，费用较低且适用的分析方法和国产试剂，对于国内临床诊断的推广和普及，以及计划生育的研究都是很有意义的。

目前，免疫分析方法可以提供分析物的宽范围检测和很低的检测限，并且费用低廉，为分析物的检测提供了一个快速、简便、高灵敏度的分析方法。因此，免疫分析法作为一种重要的分析方法已广泛应用于临床诊断和生物化学等方面的研究。常用雌二醇检测的方法有放射免疫分析法(radioimmunoassay，RIA)、酶免疫分析法(enzyme linked immunosorbentassay，ELISA)和化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay，CLIA)等。然而，放射性元素对环境的污染及半衰期短等因素限制 RIA 与 IRMA 的广泛应用；酶免疫吸附分析法因灵

敏度低、检测范围窄等无法满足临床要求。化学发光免疫分析技术是把高灵敏的化学发光分析方法和特异性强的免疫分析方法相结合发展起来的一项具有化学发光分析的高灵敏度和免疫分析法的高选择性的新的免疫分析技术。该法具有特异性高、灵敏度高、快速、简便及无放射性污染等优点，已广泛应用于医学、生物和化学等领域。

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。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），使其致敏为免疫磁微粒，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，在外加磁场作用下定向运动，使得某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。采用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。该技术的新颖之处在于：采用微小的磁微粒作为固相载体，可增加包被表面积，从而增加了抗体的有效包被量，增加了抗原、抗体的接触面积及底物发光面积，提高反应的灵敏度和检测范围。

本发明试剂盒是将化学发光免疫分析与免疫磁微粒分离技术相结合，灵敏度高、检测时间短，无需昂贵的仪器，还可以大大节省原料，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，有助于促进化学发光免疫分析技术在临床检验、检测中的应用与发展。

发明内容

本发明的目的在于提供一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒。

本发明的目的还在于提供一种上述试剂盒的制备方法。

一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒，所述试剂盒包括雌二醇系列校准品、二抗包被的磁微粒溶液、辣根过氧化酶标记的雌二醇、雌二醇抗体、化学发光底物液以及浓缩洗涤液。

所述二抗为多克隆抗体，优选羊抗兔的多克隆抗体。

所述雌二醇抗体为兔抗雌二醇多克隆抗体。

所述化学发光底物液为 A 液和 B 液，其中：

化学发光底物 A 液是 pH 值为 8.0～10.0 的含有 8～10 mM 鲁米诺、0.1～0.3 mM 4-羟基联苯和 0.05～0.1 mM 4-碘苯硼酸的 0.1～0.2 M 硼酸-硼砂缓冲液。

化学发光底物 B 液是 pH 值为 7.0～7.6 的含有 3.5～5 mM 过氧化脲和体积百分比浓度为 0.1～0.5 %的 Tween20 的 0.1～0.2 M 磷酸盐缓冲液。

所述化学发光底物 A 液优选 pH 值为 8.5 的含有 10mM 鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯和 0.05mM 4-碘苯硼酸的 0.2M 硼酸-硼砂缓冲液。

所述化学发光底物 B 液优选 pH 值为 7.4 的含有 3.5mM 过氧化脲和体积百分比浓度为 0.1%Tween20 的 0.2M 磷酸盐缓冲液。

所述浓缩洗涤液是 pH 为 7.2～7.4 的含有质量百分比浓度为 10～20% 的 NaCl、体积百分比浓度为 0.05～0.1%的吐温 20 和 0.05～0.1%的防腐剂 Proclin 300 的 0.1～0.25M 磷酸盐缓冲液。

所述浓缩洗涤液为 25 倍浓缩洗涤液，优选该洗涤液为 pH 为 7.4 的含有质量百分比浓度为 20% 的 NaCl、体积百分比浓度为 0.1%的吐温 20 和 0.1%的防腐剂 Proclin 300 的 0.25M 磷酸盐缓冲液。

上述试剂盒的制备方法，包括以下操作步骤：

1）雌二醇系列校准品的制备：用去激素人血清将雌二醇纯品稀释成校准品，其校准品的浓度范围为 0-1000pg/mL；

2）羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液的制备：通过戊二醛两步法制备羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒，并溶于 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.1~0.3 %的吐温-20 和质量百分比浓度为 0.05~0.1 %的叠氮化钠防腐剂的 0.01~0.05 M 磷酸盐洗涤缓冲液中，制备浓度为 5~10 mg/mL 的工作液，具体操作步骤如下：将粒径为 2~3μm 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 2000 高斯），静置 20~25min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/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纯化的羊抗兔多克隆抗体 60~100μg，在 4℃下搅拌过夜后，加磁场，静置 10~15min，倒出上清，用含有 0.2%~1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、0.02mol/L 的磷酸缓冲液（pH 为 7.2）于室温封闭 3~4 小时；最后用 pH 值为 7.4、并溶于 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 的磷酸盐洗涤缓冲液清洗 3~5 次，并用该溶液配制羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒浓度为 5~10 mg/mL 的工作液；磁微粒溶液在 4℃保存。

3）雌二醇多克隆抗体的制备：

a）雌二醇抗原的制备：使用混合酸酐方法制备雌二醇活性酯，再用雌二醇活性酯与 BSA 在磷酸缓冲液的条件下制备雌二醇-BSA 复合物；

b）雌二醇多克隆抗体的制备：选取新西兰兔，用步骤 a）制备的雌二醇-BSA 复合物进行免疫，首次剂量为 2.0 mg/只，四周后加强一次剂量为 1.0 mg/只，第二次注射后，每间隔两个月加强注射一次剂量均为 1.0 mg/只，再连续注射 3 次，三周后，心脏采血，分离血清，纯化而得雌二醇多克隆抗体，使用抗体稀释液将其稀释，稀释比例为 1:1000～1:3000；

4）辣根过氧化酶标记雌二醇的制备：采用改良的戊二醛法制备辣根过氧化酶标记雌二醇，得到的酶标记物用酶标记物稀释液按体积比将其稀释成 1:1000～1:3000 的工作液。

5）化学发光底物液的制备：

a）化学发光底物液 A：

向 0.1～0.2 M 硼酸-硼砂缓冲液中加入终浓度如下的成分：8～10 mM 鲁米诺、0.1～0.3 mM 4-羟基联苯和 0.05～0.1 mM 4-碘苯硼酸，调节 pH 值至 8.0～10.0；

b）化学发光底物液 B：

向 0.1～0.2 M 磷酸盐缓冲液中加入终浓度为 3.5～5 mM 过氧化脲，然后加入 Tween20 使其在缓冲液中的体积百分比浓度为 0.1～0.5 %，调节 pH 值至 7.0～7.6。

6）25 倍浓缩洗涤液的配制：

向 0.1～0.25M 磷酸盐缓冲液中加入 NaCl、吐温 20 和防腐剂 Proclin 300，其中，NaCl 的质量百分比浓度为 10～20%、吐温 20 的体积百分比浓度为 0.05～0.1%、防腐剂 Proclin 300

的体积百分比浓度为 0.05～0.1%，然后调节缓冲液 pH 至 7.2～7.4。

7）分装步骤 1）～6）制备的试剂并装入试剂盒中。

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

所述抗体稀释液为含质量百分比浓度为 1%BSA 和 0.5%水解明胶的 0.01M PBS。

本发明试剂盒还可以包括反应管，酶标记物稀释液等方便试剂盒使用的一些试剂，反应管的材料为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

所述雌二醇纯品的纯度大于 90%。

本发明试剂盒采用"竞争法"的反应模式，有效地利用了化学发光技术结合免疫磁微粒技术原理，定量检测人体血清、血浆样品中 E_2 的含量，可同时检测大量样品，具有简便、快速、灵敏、稳定、高灵敏度等优点，检测的灵敏度高于同类试剂盒。本发明的试剂盒结构简单，使用方便，价格便宜，携带便利，与市场上的酶免疫试剂盒相比，线性表现均很好，并且临床符合率也大大提高，该试剂盒适于产业化，具有良好的市场应用前景，特别适合广大的中小医院推广使用，为临床诊断和科研工作提供一种非常有价值的检测手段。

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，即 logit-log 标准曲线；

图 2 为本发明的试剂盒同国外 RIA 试剂盒对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试剂来源如下：

雌二醇纯品购自美国 Fitzgerald 公司，纯度 99%；

纯化的羊抗兔多克隆抗体购自意大利的 Adaltis 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；

辣根过氧化物酶购自美国 Sigma 公司；

正常混合人血清来自医院血库。

以下实施例中使用的部分试剂的配制：

封闭液：向 0.02mol/L 磷酸缓冲液中加入牛血清白蛋白和酪蛋白，使二者的质量百分比浓度分别为 1.0%和 0.5%，溶解后调节 pH 至 7.2。

酶标记物稀释液的配制：向 0.02M 磷酸盐缓冲液中加入如下组分并使其在缓冲液中的质量百分比浓度为：0.076%氯化钾、1% BSA 和 0.1% Proclin300，0.05‰ 食品红，调节 pH 值至 7.5。

抗体稀释液的配制：向 0.01M PBS 中加入质量百分比浓度为 1%BSA 和 0.5%水解明胶。

实施例 1 本发明试剂盒的制备 I

1)、雌二醇系列校准品的制备

A）去激素人血清的制备：

将 60mL 的正常混合人血清等份装入四个容量瓶中，然后分别加入 8.0g 活性炭，倒置用旋涡混合器混合均匀，振荡 8h 后，以 6000rpm 离心 20min，将上清液过滤，滤液中加体积百分比浓度为 0.5 ‰的防腐剂 Proclin-300，冷冻保存。

B）雌二醇校准品的配制：

用步骤 A）制备的去激素人血清将 E_2 纯品稀释成校准品，分装 E_2 纯品浓度分别为 0、15、50、150、500、1000 pg/mL 的校准品共 6 瓶。

2)、羊抗兔多克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

通过戊二醛两步法制备羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液，具体操作步骤如下：将粒径为 2.8μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场强度为 2000 高斯的磁场，静置 25min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 100mg/mL；每毫升悬浮液中加入纯化的羊抗兔多克隆抗体 100μg，在 4℃下搅拌过夜后，加磁场，磁场强度为 2000 高斯，静置 10min，倒出上清，用封闭液于室温封闭 3 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.3 %吐温-20 和质量百分比浓度为 0.1 %叠氮化钠防腐剂的 0.05 M 磷酸盐缓冲液清洗 4 次，并用该缓冲液配制成 5mg/mL 的工作液，该抗体包被的磁微粒溶液在 4℃保存。

3)、E_2 多克隆抗体的制备

a）雌二醇抗原的制备：使用混合酸酐方法制备雌二醇活性酯，再用雌二醇活性酯与 BSA 在磷酸缓冲液的条件下制备雌二醇-BSA 复合物；

b）雌二醇多克隆抗体的制备：选取两只新西兰兔（雌、雄各一只，体重 1.5～2.0 kg），用步骤 a）中制备的雌二醇-BSA 复合物进行免疫，首次剂量为 2.0 mg/只，四周后加强一次剂量为 1.0 mg/只，第二次注射后，每间隔两个月加强注射一次剂量均为 1.0 mg/只，再连续注射 3 次，三周后，心脏采血，离心分离血清，采用饱和硫酸铵（saturated ammonium sulfate，SAS）法纯化而得雌二醇多克隆抗体，使用抗体稀释液将其稀释，稀释比例为 1:2000。

4）、辣根过氧化酶（HRP）标记雌二醇的制备

以辣根过氧化酶标记雌二醇采用改良的戊二醛法，具体标记过程如下：

称取将 5mg HRP 溶于 0.1ml 含 1.25%戊二醛的 PH 6.8 0.1mol/L PBS 中，置室温 18 小时，经葡聚糖凝胶 G-25 层析除去多余戊二醛，加生理盐水至 0.5ml，然后加入 5mg 雌二醇纯品及 0.05ml PH 9.6 的 1 mol/L 碳酸盐缓冲液，混合后于 4℃冰箱放置 24 小时，加入 0.05ml 0.2 mol/L 的赖氨酸溶液，室温置 2 小时，用 PH 7.2、0.15 mol/L PBS 透析过夜，离心除去沉淀，上清即为酶标记物（可加入等体积甘油，混匀后，密闭冷冻保存），用酶标记物稀释液稀释上述酶标记物制成工作液，稀释比例为 1:1000；

5）、化学发光底物液

A）A 液的配制

鲁米诺	1.7716g（10mM）
4-羟基联苯	0.051g (0.3mM)
4-碘苯硼酸	0.012g（0.05mM）
硼酸	11.4g
硼砂	4.9g
蒸馏水	定容至 1000mL
pH	调节至 8.5

B）、B 液的配制：

过氧化脲 0.329g（3.5mM）

Tween20 1mL（体积百分比 0.1%）

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 51.58g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.74g

蒸馏水 定容至 1000mL

pH 调节至 7.4

使用时 A 液与 B 液等比例混合。

6)、25 倍浓缩洗涤液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 72.5g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5g

NaCl 200g

Tween-20 1mL

Proclin 300 1mL

蒸馏水 定容至 1000mL

调整 pH 至 7.4

使用时用蒸馏水稀释 25 倍。

7)、上述步骤所得产品分装后装入试剂盒即为本发明试剂盒。以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

A）校准品共 6 瓶，3 mL/瓶;

B) 羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液 1 瓶，共 6 mL;

C）辣根过氧化酶标记雌二醇溶液 1 瓶，6mL;

D）E_2 多克隆抗体溶液 1 瓶，6 mL;

F）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;

G）浓缩洗涤液 1 瓶，5mL，使用时用去离子水稀释 25 倍;

H）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 本发明试剂盒的制备Ⅱ

1)、雌二醇系列校准品的制备，同实施例Ⅰ

2)、羊抗兔多克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

通过戊二醛两步法制备羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液，具体操作步骤如下：将粒径为 2.0μm 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场强度为 2000 高斯的磁场，静置 25min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 50mg/mL；每毫升悬浮液中加入纯化的羊抗兔多克隆抗体 80μg，在 4℃下搅拌过夜后，加磁场，其中，磁场强度为 2000 高斯，静置 15min，倒出上清，用封闭液将磁微粒于室温封闭 4 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.2 %的吐温-20 和质量百分比浓度为 0.1 %的叠氮化钠防腐剂的 0.01 M 的磷酸盐洗涤缓冲液清洗 4 次，并用该缓冲液将抗体包被的磁微粒配制成 7.5mg/mL 的工作液。磁微粒溶液在 4℃保存。

3)、E_2 多克隆抗体的制备，除将制得的抗体稀释且稀释比例为 1:3000 外，其他同实施例Ⅰ。

4)、辣根过氧化酶标记雌二醇（酶标记物）的制备同实施例Ⅰ，用酶标记物稀释液将酶标记物稀释，稀释比例为 1:2000；

5)、化学发光底物液

A) A 液的配制：

鲁米诺	1.4173g (8mM)
4-羟基联苯	0.017g (0.1mM)
4-碘苯硼酸	0.024g (0.1mM)
硼酸	1 1.4g
硼砂	4.9g
蒸馏水	定容至 1000mL
pH	调节至 9 .0

B)、B 液的配制：

过氧化脲 0. 470g（5 mM）

Tween20 2 mL（体积比百分比 0.2%）

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 51.58g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.74g

蒸馏水 定容至 1000mL

pH 调节至 7.6

使用时 A 液与 B 液等比例混合。

6)、25 倍浓缩洗涤液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 36.25g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.25 g

NaCl 1 00g

Tween-20 0.5 mL

Proclin 300 0.5mL

蒸馏水 定容至 1000mL

调整 pH 至 7.4

使用时用蒸馏水稀释 25 倍。

7)、上述步骤所得产品分装后装入试剂盒即为本发明试剂盒。以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

A）校准品共 6 瓶，3 mL/瓶;

B) 羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液 1 瓶，共 6 mL;

C）辣根过氧化酶标记雌二醇溶液 1 瓶，6mL;

D）E_2 多克隆抗体溶液 1 瓶，6 mL;

F）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;

G）浓缩洗涤液 1 瓶，5mL，使用时用去离子水稀释 25 倍；

H）聚乙烯材料的反应管 1 袋，50 个，每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 3 本发明试剂盒的制备III

1)、雌二醇系列校准品的制备，同实施例 I

2)、羊抗兔多克隆抗体包被磁微粒溶液的制备

通过戊二醛两步法制备羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液，具体操作步骤如下：将粒径为 3.0m 的磁微粒用戊二醛进行活化，室温搅拌，混匀 2 小时后，加磁场强度为 2000 高斯的磁场，静置 20min，倒出上清，用 pH 值为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次，并用该缓冲液进行悬浮，浓度为 75mg/mL；每毫升悬浮液中加入纯化的羊抗兔多克隆抗体 60μg，在 4℃下搅拌过夜后，加磁场，其中，磁场强度为 2000 高斯，静置 10min，倒出上清，用封闭液将磁微粒于室温封闭 3 小时；最后用 pH 值为 7.4、含体积百分比浓度为 0.1 %的吐温-20 和质量百分比浓度为 0.05 %的叠氮化钠防腐剂的 0.05 M 的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℃保存。

3)、E_2 多克隆抗体的制备，除将制得的抗体稀释且稀释比例为 1:1000 外，其他同实施例 I 。

4)、辣根过氧化酶标记雌二醇酶标记物的制备同实施例 I，用酶标记物稀释液将酶标记物稀释，稀释比例为 1:3000；

5)、化学发光底物液

A) A 液的配制：

鲁米诺	1.5944g（9mM）
4-羟基联苯	0.034g（0.2mM）
4-碘苯硼酸	0.012g（0.05mM）
硼酸	11.4g
硼砂	4.9g
蒸馏水	定容至 1000mL

pH 调节至 10

B)、B 液的配制：

过氧化脲 0.376 g （4 mM ）

Tween20 5 mL （体积百分 比为 0.5%）

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 51.58g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.74g

蒸馏水 定容至 1000mL

pH 调节至 7.0

使用时 A 液与 B 液等比例混合。

6)、25 倍浓缩洗涤液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 29g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1g

NaCl 150g

Tween-20 0.75mL

Proclin 300 0.75 mL

蒸馏水 定容至 1000mL

调整 pH 至 7.2

使用时用蒸馏水稀释 25 倍。

7)、上述步骤所得产品分装后装入试剂盒即为本发明试剂盒。以检测 50 个样品的试剂盒为例，包括：

A）校准品共 6 瓶，3 mL/瓶;

B) 羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液 1 瓶，共 6 mL;

C）辣根过氧化酶标记雌二醇溶液 1 瓶，6mL;

D）E_2 多克隆抗体溶液 1 瓶，6 mL;

F）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；

G）浓缩洗涤液 1 瓶，5mL，使用时用去离子水稀释 25 倍；

H）玻璃材料的反应管 1 袋，50 个，每管 10mm 直径×50mm 长度。

实施例 4 本 发明试剂盒的使用方法

1)、待检样品前处理

静脉抽取人空腹晨血样品，3000 rpm 离心 5 min，取上层血清进行分析。

2)、检测方法

使用实施例 1 制备的本发明试剂盒按照如下步骤对人血清样品进行分析：

A）洗涤液配制：将试剂盒提供的 25 倍浓缩洗涤液加蒸馏水稀释 25 倍变为 1 倍；

B）将雌二醇系列校准品、羊抗兔多克隆抗体包被的磁微粒溶液、辣根过氧化酶标记雌二醇和 E_2 多克隆抗体从 4℃冰箱中取出，放置 15min，平衡至室温；

C）将实验需要的圆底聚苯乙烯试管编号后固定在板架上；

D）将上述试管中依次加入待测样品和各浓度校准品各 50 μL，每次试验设空白 1 管，然后除空白管外各管加辣根过氧化酶标记雌二醇、E_2 多克隆抗体和多抗包被的磁微粒溶液各 100μL，37℃反应 50 min；

E）将试管架置于磁分离器上分离 5min，然后弃去管中溶液，用上述稀释好的洗涤液，洗涤 5 次，在吸水纸上拍干；

F）将化学发光底物液 A 和 B 按 1：1 混合后，每管加化学发光底物液 200μL，充分混匀，37℃温育 10 min,置于磁分离器内，暗处放置 10 min；

G）在化学发光测量仪上依序测量各管的发光强度（RLU），测量时间 1 秒/管；

H）建立标准曲线：分别对校准品浓度和对应 RLU 取对数，在双对数坐标图上建立标准曲线，以校准品浓度的 Log 值为横坐标，RLU 的 Logit 值为纵坐标绘出标准曲线，见附图 1，曲线方程为：$\text{logit } Y = -2.3376 \log X + 4.983$ ，　　r=0.9993。

I）以待测血清 RLU 值在标准曲线上查出该血清雌二醇的浓度。

实施例 5 本发明试剂盒的方法学检定

按照本领域中常规的检定规程对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定，分别对试剂盒的精密度、准确度、灵敏度、特异性以及稳定性进行了检定。

1)、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减去 2SD)。按实施例 4 的使用方法实施例 1 制备的试剂盒测定 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，得到该试剂盒的最低检出限为 2.51 pg/mL。并与其它方法比对，见表 1。

表 1 本发明试剂盒与其他方法灵敏度对比实验结果

方法	灵敏度 (pg/mL)
RIA	5.0
ELISA	34.0
本发明试剂盒	2.51

由表 1 可以看出，本试剂盒采用的方法检测灵敏度明显高于其他方法。

2)、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，分别按实施例 4 的使用方法测定低、中、高三种不用浓度的血清，10 管平行测定，重复 3 次，得出每次分析的批内变异和多次分析的批间变异(表 2)。其批内和批间变异系数均小于 15%。

表 2 方法精密度考察

	样品	测定次数	E_2浓度 (pg/mL)	CV (%)
批内变异	1	10	38.1	6.1
	2	10	106.4	4.7
	3	10	427.5	7.3
批间变异	1	30	40.3	9.4
	2	30	104.1	5.1
	3	30	431.6	12.2

3)、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。选用三份人血清，在最佳实验条件下测定浓度，然后分别向血清内加入浓度为 0、30、80 和 200 pg/mL 的 E_2 校准品，使用实施例 1 的试剂盒实施例 4 的使用方法对每个浓度做 3 个平行，计算回收率。结果如表 3 所示，表明 E_2 的加标回收率在 93.3%~106%之间。

表 3 样品回收率

加入浓度值 (pg /mL)	测得浓度(pg/mL)	回收率(%)
0	52.3	-
30	80.3	93.3
80	137	106
200	254	101

4）试剂盒特异性实验

选取常见的雌二醇结构类似物，配制成浓度远大于生理浓度的临床样本，用实施例1的试剂盒按实施例4的使用方法进行测定。

$$\text{交叉反应率} = \frac{\text{抑制率为50\%时所需雌二醇的浓度}}{\text{抑制率为50\%时所需雌二醇结构类似物的浓度}}$$

结果表明，一些常见的类固醇激素与雌二醇抗体的交叉均小于2.0%，说明本方法所选用的抗体特异性较高，可以满足准确测定人血清中雌二醇的要求。

表 4 一些常见的雌二醇结构类似物与抗体之间的交叉反应率（n=5）

类固醇激素	交叉反应率（%）
雌二醇（E2）	100
雌酮（E1）	1.87
雌三醇（E3）	0.7
雄烯二酮	<0.03
双氢睾酮（DHT）	<0.01
睾酮	<0.1

5)、试剂盒稳定性实验

将实施例 1 的试剂盒中的各试剂在 4℃和 37℃下放置 3d、7d、10d 后进行实验。实验结

果表明，实施例 1 的试剂盒指标均在正常范围之内，不同条件对实验结果均没有明显的影响，则说明该产品的稳定性很好。

经过实验证明，本发明的试剂盒方法学指标如下：

检测范围：0~1000 pg/mL；

灵敏度：最小检出限为 2.51 pg/mL；

精密度：小于 15%（n = 3）；

准确性：平均回收率在 93.3%~106%之间；

特异性：与 E_1、E_3、T、DHT 等其他类似物的交叉反应率小于 2.0%；

稳定性：各试剂组分置 4℃和 37℃，考察 3d、7d、10d 后，各组分仍稳定。

实施例 6 本发明试剂盒同 RIA 试剂盒对临床血清样品测值的比对

分别用实施例 1 制备的试剂盒（使用方法见实施例 4）和购自法国 Cisbio International 公司的 RIA 试剂盒对 105 份临床血清样品进行检测。其检测结果见附图 2，以本发明试剂盒测定的血清样品 E_2 结果为横坐标，以 RIA 试剂盒测定的结果为纵坐标作回归分析，相关方程为：Y=1.0782X-3.2188，相关系数 r = 0.9892。经统计学处理结果表明，本发明方法同 RIA 试剂盒临床血样测值相关性良好。

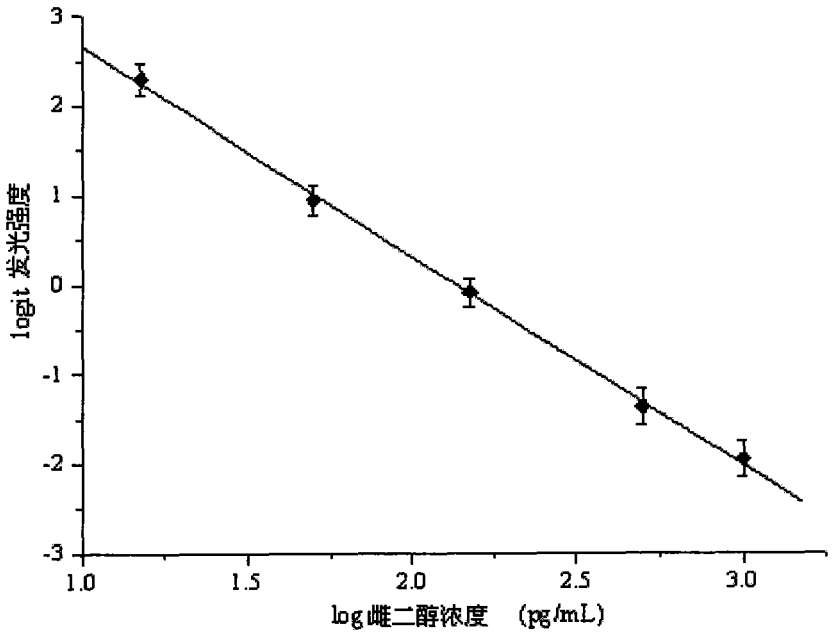

3
2
1
0
-1
-2
-3
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
logit 发光强度
log雌二醇浓度 (pg/mL)

图 1

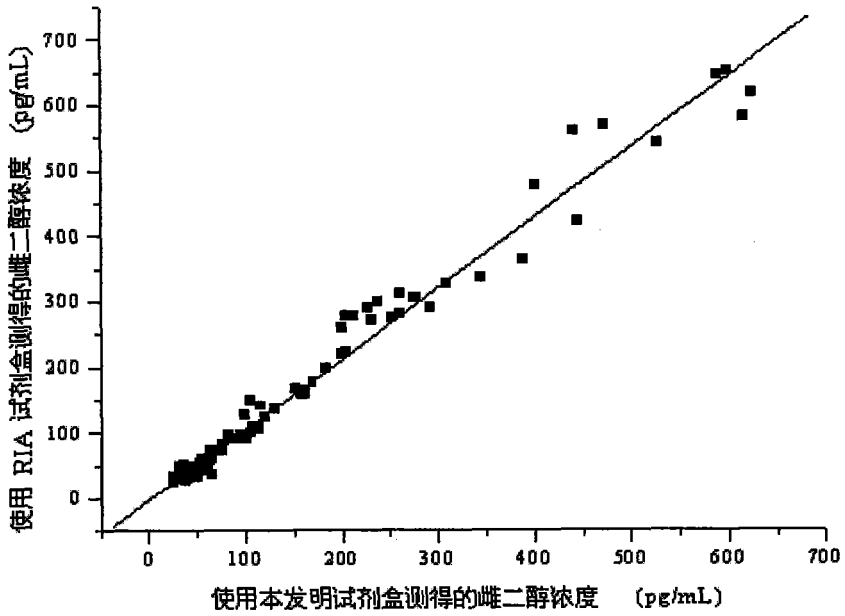
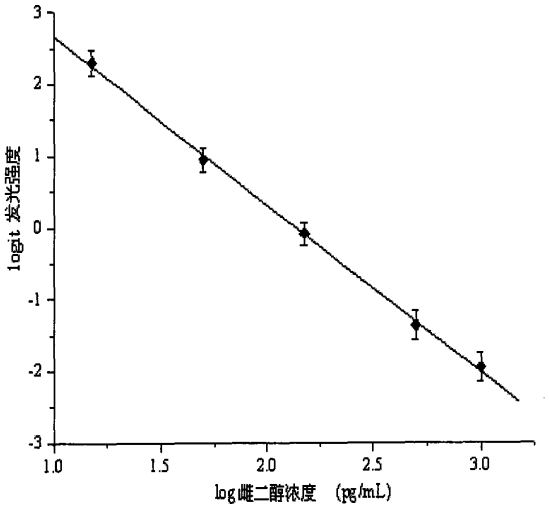

700
600
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
500
600
700
使用 RIA 试剂盒测得的雌二醇浓度 (pg/mL)
使用本发明试剂盒测得的雌二醇浓度 (pg/mL)

图 2

专利名称(译)	一种利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇的试剂盒		
公开(公告)号	CN101639478A	公开(公告)日	2010-02-03
申请号	CN200910091848.9	申请日	2009-08-27
[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 辛天兵 肖勤		
发明人	林金明 辛天兵 肖勤		
IPC分类号	G01N33/543 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种属于免疫分析领域的利用磁微粒化学发光免疫技术检测雌二醇(E2)的试剂盒。该试剂盒包括雌二醇系列校准品、二抗包被的磁微粒溶液、辣根过氧化酶标记的雌二醇、雌二醇抗体、化学发光底物液以及浓缩洗涤液。本发明还公开了所述试剂盒的制备方法。本发明试剂盒可定量检测人体血清、血浆样品中雌二醇的含量。可同时检测大量样品，具有简便、快速、灵敏、稳定、高灵敏度等优点，为临床诊断和科研工作提供一种非常有价值的检测手段。