

[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 200510017943.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年3月7日

[11] 公开号 CN 1924582A

[22] 申请日 2005.8.30

[21] 申请号 200510017943.6

[71] 申请人 郑州安图绿科生物工程有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区
第五大街经北一路87号

[72] 发明人 付光宇 项立红 张泉 李彬
赵鹏 马建军 陈晓玲

[74] 专利代理机构 郑州联科专利事务所

代理人 田小伍

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

睾酮化学发光定量检测试剂盒

[57] 摘要

睾酮(Testosterone)化学发光定量检测试剂盒,属于临床血液检测分析技术领域。主要由包被第二抗体的不透明聚苯乙烯板、睾酮系列标准品、抗睾酮抗体溶液、辣根过氧化物酶标记睾酮溶液、发光底物A液和发光底物B液组成。本发明检测精密度、灵敏度和稳定性较高,特异性和准确性较好。

1、辜酮化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，主要由包被第二抗体的不透明聚苯乙烯板、辜酮系列标准品、抗辜酮抗体溶液、辣根过氧化物酶标记辜酮溶液、发光底物 A 液和发光底物 B 液组成。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，包被第二抗体的不透明聚苯乙烯板为包被羊抗兔 / 鼠免疫球蛋白 G 抗体的不透明聚苯乙烯板；辜酮系列标准品用去激素血清作为基质，加入经无水乙醇溶解的辜酮纯品配制而成；抗辜酮抗体溶液用分析缓冲液作为基质，加入一定浓度的兔抗辜酮多克隆抗体或鼠抗辜酮单克隆抗体配成；辣根过氧化物酶标记辜酮溶液用分析缓冲液作为基质，加入一定浓度的辣根过氧化物酶标记辜酮；发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸组成；发光底物 B 液由氨基酸氧化酶及稳定剂组成。

3、如权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于，分析缓冲液由 0.05M tris-HCl 盐溶液和 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 组成，pH7.5；辣根过氧化物酶标记辜酮使用时的工作浓度为 1:300000-500000；发光底物 A 液配方为：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M，pH 9.4；发光底物 B 液配方为：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M，pH 6.5。

睾酮化学发光定量检测试剂盒

技术领域

本发明属于临床血液检测分析技术领域，特别涉及一种用酶促化学发光法定量检测人血清中睾酮（Testosterone）含量的试剂盒。

背景技术

睾酮是广泛存在于人和动物体内的一种类固醇类激素，准确测定其在生物体内的含量，在判断其生殖功能、正常生理指数及病理浓度而用于疾病的诊断方面有重要作用。男性体内睾酮由睾丸间质细胞产生，男性血清中的睾酮含量是证实可疑睾丸功能紊乱，证明雄性激素缺乏以及检测睾酮代替治疗最重要的检测参数。女性体内睾酮主要在卵巢中合成，也在肾上腺皮质内合成，女性血清中的睾酮含量用于确定女性雄激素过多症。

目前对睾酮激素检测，多是采用自60年代发展起来的放射免疫分析方法和80年代兴起的酶联免疫分析法。放射免疫分析法必须使用放射性标记物，检测设备复杂，必需用专门的放射性探测器对检测结果进行测定。同时，对操作人员也存在有放射性污染与伤害，需要特殊的防护和去污设备。此外，因所使用放射性标记物的放射性核素时刻都在发生衰变，特别是如常用的碘-125、碘-131和磷-32等半衰期短的核素，其保存时期不长，也给临床使用带来了不便。酶联免疫分析法虽然避免了放射免疫分析法的污染、繁琐、保存期短等问题，但由于其检测范围窄、灵敏度低等缺点仍不能满足临床的需求。

常规的一类固醇激素检测所建立的免疫学方法，多是直接用抗该激素的抗体，即所谓的第一抗体对所用微孔板的板孔进行包被。由于竞争法要求限量包被，直接包被的效果孔间常存在有较明显的差异，变异系数约为5-20%，直接影响测定的精密度（即重现性）；若包被过量又会降低试剂的灵敏度。

化学发光免疫分析法以标记方法的不同而分为直接标记法和化学发光酶免疫分析法两种。其中，直接标记法多采用的是吖啶酯或鲁米诺直接标记在

抗原或抗体上用于检测。由于其发光是闪烁光，不宜捕获，适用于全自动化学发光免疫分析仪器。本发明的设计是针对临床检验实验室，为其提供一种既可手工操作，又可用于某些全自动检测仪器的检测试剂，因此，本发明采用标准的 96 孔微孔板为固相载体，以辣根过氧化物酶标记睾酮，催化发光底物发光作为示踪信号用以检测。

发明内容

本发明的目的在于提供一种采用第二抗体预包被板的方式检测睾酮用的化学发光定量检测试剂盒，检测精密度、灵敏度和稳定性较高，特异性和准确性较好。

为达上述目的，本发明采用如下技术方案：睾酮（Testosterone）化学发光定量检测试剂盒，主要由包被第二抗体的不透明聚苯乙烯板、睾酮系列标准品、抗睾酮抗体溶液、辣根过氧化物酶标记睾酮溶液、发光底物 A 液和发光底物 B 液组成。

包被第二抗体的不透明聚苯乙烯板为包被羊抗兔 / 鼠免疫球蛋白 G 抗体的不透明聚苯乙烯板；睾酮系列标准品用去激素血清作为基质，加入经无水乙醇溶解的睾酮纯品配制而成；抗睾酮抗体溶液用分析缓冲液作为基质，加入一定浓度的兔抗睾酮多克隆抗体或鼠抗睾酮单克隆抗体配成；辣根过氧化物酶标记睾酮溶液用分析缓冲液作为基质，加入一定浓度的辣根过氧化物酶标记睾酮；发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸组成；发光底物 B 液由氨基酸氧化酶及稳定剂组成。

分析缓冲液由 0.05M tris-HCl 盐溶液和 1% 牛血清白蛋白（BSA）组成，pH 7.5；辣根过氧化物酶标记睾酮使用时的工作浓度为 1:300000-500000；发光底物 A 液配方为：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-HCl 缓冲液 0.2M, pH 9.4；发光底物 B 液配方为：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8%（V/V）、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M, pH 6.5。

本发明睾酮（Testosterone）化学发光定量检测试剂盒，由免疫反应滴定微孔板和检测试剂两部分组成。其中的免疫反应滴定微孔板采用标准的 96

孔的不透明聚苯乙烯白色微孔板；检测试剂包括作为第一抗体的抗睾酮抗体、睾酮标准品、酶标睾酮、发光底物 A 和发光底物 B 等试剂。不透明聚苯乙烯白色微孔板为预先包被了第二抗体的微孔板，包被液为 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液，包被浓度为 2-5ug/ml，包被量 100ul/孔，0℃-4℃孵育过夜；弃去孔内液体，用 PBS-Tween 洗液洗板孔两次；用 pH7.4PBS-1%BSA，150ul/孔封闭，室温孵育 3 小时；弃去孔内液体，用 pH7.4PBS-2.5%蔗糖，150ul/孔保护；弃去孔内液体，经干燥后装入隔潮的铝箔袋中密封保存。

本发明中包被所用第二抗体，可用目前常规的方法自行制备，也可选用市购的羊抗兔免疫球蛋白 G 或羊抗鼠免疫球蛋白 G。提高所用第二抗体的纯度有利于保证和提高测试效果。

检测试剂中所用的兔抗睾酮多克隆抗体可以采用常规方法自行制备，如：用睾酮-3-羧甲基-BSA 作为抗原，对家兔进行免疫，可获得特异性强的抗血清。也可以采用市购的成品。提高所用兔抗睾酮抗体的滴度可以提高检测的特异性与准确性。

检测试剂中所用的鼠抗睾酮单克隆抗体，用睾酮-3-羧甲基-BSA 作为抗原，采用常规的细胞杂交瘤技术制备。也可以采用市购的成品。

检测试剂中所用的酶标睾酮，可采用混合酸酐法用辣根过氧化物对睾酮-3-羧甲基肟进行标记，此方法获得的酶标睾酮的工作浓度为 1:30 万-50 万。

本发明采用化学发光免疫分析方法，利用辣根过氧化物酶催化发光底物，发光底物发生化学反应并释放出大量的能量，产生激发态中间体。这种激发态中间体，当其回到稳定的基态时，可同时发射出光子，利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额，该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比。由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。

化学发光免疫分析技术具有灵敏度高、检测范围宽、操作简便、无放射性污染等特点，现已从实验室研究进入常规临床诊断应用。

本发明检测试剂盒的使用操作程序如下：

（一）实验前准备

1、确保操作环境在室温（18-25℃），取出试剂盒及待测样品。将所有

试剂及样品恢复至室温（约需 30 分钟）；

2、将恒温箱或水浴锅调至反应温度；

3、将发光底物 A、B 液等比例混合至本次试验所需体积（每孔需 50 μ l，可按照每条包被板（8 孔）需混合后的发光底物 0.5ml 混合，依此类推）；

（二）实验步骤

1、取出一定量的包被孔编号，每孔分别加入 25 μ l 睾酮标准品或病人血清样品；

2、每孔分别加入抗睾酮抗体溶液 50 μ l（绿色液体）；

3、每孔分别加入酶标睾酮 50 μ l（红色溶液）；

4、在微量振荡器上振荡 30 秒使其充分混合均匀；

5、贴封膜后，在室温条件（18—25 $^{\circ}$ C）温育 60 分钟；

6、甩去孔内混合物，用工作浓度洗液洗涤微孔 5 次，每次冲洗后将水分甩尽，最后在吸水纸上拍干，切勿擦拭反应孔内壁；

7、每孔加入混合后的底物 50 μ l，室温（18—25 $^{\circ}$ C）反应 10 分钟；

8、化学发光检测仪检测各孔的发光强度，建立标准曲线，计算出病人血清标本中睾酮的含量。

本发明的上述检测试剂盒按上述程序进行测定所用时间很短，一批测定一般仅需一个多小时即可完成，方便快捷。

如前所述，用抗睾酮特异性抗体直接包被时，固定在各板孔内的抗体分子数量差异的变异系数较大，可达 5-20%，是影响测量精密度的一个重要因素。本发明的预包被第二抗体采用的是过量包被，即使各孔中被吸附的第二抗体分子数有一定的差异，也影响不大。在后续的操作中只要各孔中加入的第一抗体溶液的体积相同，在孔壁上被固定的第一抗体的分子数量就基本相同，各空间的差异大大减小，实测表明其变异系数一般均 $<$ 5%。从而能显著提高测定的精密度。与此同时，第二抗体价廉，价格较高的第一抗体的用量只需以第一抗体包被方法用量的 3-4%，大大节约可这一种活性材料，大幅降低整个试剂盒的成本。

经大量实验证明，本发明上述化学发光定量检测试剂在用于睾酮含量测

定时的方法学鉴定数据可达到如下指标:

灵敏度—最小检出量为 0.1ng/ml;

标准曲线范围—0-20ng/ml;

精密度—分析内精密度平均为 5.53%(n=10), 分析间精密度平均为 9.65%(n=10), 远高于国家标准, 说明本发明试剂盒在检测实验中具有很好的重复性;

特异性—与不同类固醇激素的交叉反应率为: 睾酮 100%, 二氢睾酮 5.6%, 雄酮 0.1%, 孕酮、雌二醇、雌三醇及皮质醇均<0.1%;

准确性—向血清中添加标准睾酮后的回收率为 98-110%。

实验表明, 实际应用本发明对人血清中的睾酮进行测定, 只需取少量样品即可进行, 对被检测者没有任何伤害。本发明采用的第二抗体包被法显著提高了测定的精密度, 大幅减少了价格较高的第一抗体用量。同时由于本发明采用了化学发光酶免疫分析检测方法, 在上述指标中都优于目前广泛使用的酶联免疫检测方法, 同时也不存在放射免疫法的放射性污染、有效期短、操作复杂等缺点。因此, 本发明为临床提供了一种睾酮的更廉价、准确、方便、快捷的方法, 能够更好地满足临床的需要。

具体实施方式

睾酮 (Testosterone) 化学发光定量检测试剂盒, 主要由 (1) 包被包被羊抗兔 / 鼠免疫球蛋白 G 抗体的不透明聚苯乙烯板, (2) 用去激素血清作为基质, 加入经无水乙醇溶解的睾酮纯品配制而成的睾酮系列标准品, (3) 用分析缓冲液作为基质, 加入一定浓度的兔抗睾酮多克隆抗体或鼠抗睾酮单克隆抗体配成的抗睾酮抗体溶液, (4) 用分析缓冲液作为基质, 加入一定浓度的辣根过氧化物酶标记睾酮配成的辣根过氧化物酶标记睾酮溶液, (5) 发光底物 A 液和 (5) 发光底物 B 液组成。

分析缓冲液由 0.05M tris-HCl 盐溶液和 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 组成, pH7.5;

辣根过氧化物酶标记睾酮使用时的工作浓度为 1:30 万;

发光底物 A 液配方为: luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸

0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M, pH 9.4;

发光底物 B 液配方为: 氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、
DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M, pH 6.5。

专利名称(译)	辜酮化学发光定量检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1924582A	公开(公告)日	2007-03-07
申请号	CN200510017943.6	申请日	2005-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
[标]发明人	付光宇 项立红 张泉 李彬 赵鹏 马建军 陈晓玲		
发明人	付光宇 项立红 张泉 李彬 赵鹏 马建军 陈晓玲		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/52 G01N21/64 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

辜酮(Testosterone)化学发光定量检测试剂盒，属于临床血液检测分析技术领域。主要由包被第二抗体的不透明聚苯乙烯板、辜酮系列标准品、抗辜酮抗体溶液、辣根过氧化物酶标记辜酮溶液、发光底物A液和发光底物B液组成。本发明检测精密度、灵敏度和稳定性较高，特异性和准确性较好。