



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106199012 A

(43)申请公布日 2016.12.07

(21)申请号 201610506673.3

(22)申请日 2016.06.30

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区南山街
道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 钱纯巨 夏福臻 王刚 祝亮
刘美婷

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 徐春祺

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

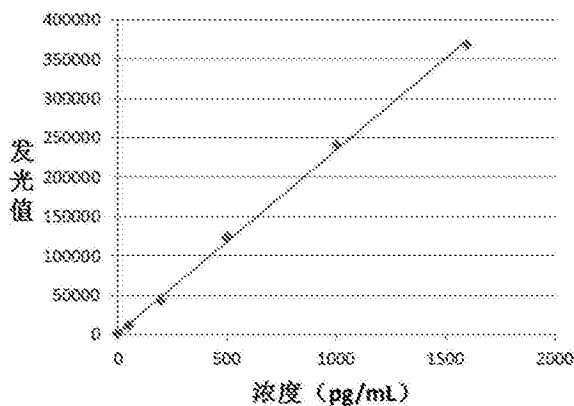
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,抑制素B化学发光免疫检测试剂盒包括:抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成抑制素B的检测这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到10pg/mL,相对于传统的抑制素B的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。



1. 一种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,所述抑制素B单克隆抗体与所述羧基化的磁微粒的质量比为1:25~35。

3. 根据权利要求1所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体中,所述抑制素B单克隆抗体与所述化学发光标记物的质量比为50:1~10。

4. 根据权利要求1所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述羧基化的磁微粒的粒径为 $0.05\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。

6. 根据权利要求1所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

7. 根据权利要求6所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述A液为 H_2O_2 溶液,所述B液为NaOH溶液。

8. 根据权利要求1所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括抑制素B定标品。

9. 根据权利要求8所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抑制素B定标品为浓度分别为 0pg/mL 、 50pg/mL 、 200pg/mL 、 500pg/mL 、 1000pg/mL 和 1600pg/mL 的抑制素B的溶液。

10. 一种根据权利要求1~9中任一项所述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入抑制素B单克隆抗体,室温下混悬 $2\text{h}\sim 10\text{h}$,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒;以及

取抑制素B单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应 $1\text{h}\sim 2\text{h}$ 后除杂,得到化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。

抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测领域,尤其涉及一种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 抑制素(inhibin,INH)是一种由女性卵巢颗粒细胞及男性睾丸支持细胞分泌的异二聚体蛋白质激素,属于转化生长因子B家族,主要包括INHA和INH-B(分别由 α 和BA或BB亚基构成)。抑制素选择性抑制卵泡刺激素(FSH)的分泌,对性腺也有局部旁分泌作用。

[0003] 抑制素B是睾丸来源的糖蛋白激素,成年男性体内血清抑制素B水平与FSH呈显著负相关,对FSH起负反馈作用。男性出生后不久,血清抑制素B水平逐渐上升,于青春期II期达到成年人水平,从青春期III期至成年,抑制素B与FSH之间一直维持负相关关系。20岁~30岁时,抑制素B水平到达另一个高峰,此后抑制素B水平随年龄增加逐渐降低。抑制素B的主要作用是通过对FSH的负反馈作用调节配子发育。抑制素B可作为一种内分泌标记物,通过对它的检测,可以监测男性或女性的性腺功能。因此,抑制素B在男性不育检测中也是非常重要的。

[0004] 抑制素B是卵巢储备功能和睾丸曲细精管功能的主要标记物,可以用于卵巢因素引起的女性不孕和曲细精管功能障碍引起的男性不育检测,也可用于评价儿童隐睾、性早熟的诊断,监测放、化疗对男性生精功能的损伤等。

[0005] 传统的抑制素B的检测方法包括酶联免疫吸附法和化学发光法,然而,传统的抑制素B的检测方法检测灵敏度较差。

发明内容

[0006] 基于此,有必要提供一种检测灵敏度较高的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0007] 一种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,包括:抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。

[0008] 在一个实施例中,所述抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,所述抑制素B单克隆抗体与所述羧基化的磁微粒的质量比为1:25~35。

[0009] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体中,所述抑制素B单克隆抗体与所述化学发光标记物的质量比为50:1~10。

[0010] 在一个实施例中,所述羧基化的磁微粒的粒径为0.05 μm ~1 μm 。

[0011] 在一个实施例中,所述化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。

[0012] 在一个实施例中,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

[0013] 在一个实施例中,所述A液为 H_2O_2 溶液,所述B液为NaOH溶液。

[0014] 在一个实施例中,还包括抑制素B定标品。

[0015] 在一个实施例中,所述抑制素B定标品为浓度分别为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL和1600pg/mL的抑制素B的溶液。

[0016] 一种上述的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0017] 取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入抑制素B单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒;以及

[0018] 取抑制素B单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。

[0019] 这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成抑制素B的检测。这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到10pg/mL,相对于传统的抑制素B的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

附图说明

[0020] 图1为一实施方式的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的制备方法的制备流程示意图;

[0021] 图2为实施例3得到的抑制素B标准曲线图。

具体实施方式

[0022] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进,因此本发明不受下面公开的具体实施的限制。

[0023] 一实施方式的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,包括:抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。

[0024] 优选的,抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,抑制素B单克隆抗体与羧基化的磁微粒的质量比为1:25~35。

[0025] 优选的,化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体中,抑制素B单克隆抗体与化学发光标记物的质量比为50:1~10。

[0026] 抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体中,各自使用的抑制素B单克隆抗体可以相同,也可以不相同。

[0027] 优选的,羧基化的磁微粒的粒径为0.05 μ m~1 μ m。

[0028] 化学发光标记物可以为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。其中,化学发光标记物优选为吖啶酯。

[0029] 在其他的实施例中,上述抑制素B化学发光免疫检测试剂盒还包括化学发光底物液。

[0030] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液,B液可以为NaOH溶液。

[0031] 本实施例中,A液为浓度为0.1mol/L的H₂O₂溶液,B液为浓度为0.25mol/L的NaOH溶液。

[0032] 在其他的实施例中,上述抑制素B化学发光免疫检测试剂盒还包括抑制素B定标品。

[0033] 抑制素B定标品为浓度分别为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL和1600pg/mL的抑制素B的溶液。

[0034] 具体的,抑制素B定标品可以采用定标品缓冲液将抑制素B配制成浓度分别为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL和1600pg/mL的抑制素B的溶液。

[0035] 这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒用于抑制素B检测时,利用全自动化学发光免疫分析仪对抑制素B定标品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;接着测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度;最后对抑制素B全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、精密度、干扰性)的评价。

[0036] 这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成抑制素B的检测。这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到10pg/mL,相对于传统的抑制素B的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

[0037] 此外,这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒还具有以下优点:

[0038] 1、选择吖啶酯作为标记材料,并应用于化学发光免疫分析系统,该发光体系为直接化学发光,与传统的酶促化学发光相比,该反应不需要酶的参与,更加节约成本;

[0039] 2、选用吖啶酯的化学发光免疫分析系统线性范围宽,能达到10pg/mL~1300pg/mL,而传统的抑制素B的检测方法的检线性范围为20pg/mL~1000pg/mL;

[0040] 3、吖啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

[0041] 4、化学发光免疫分析系统已实现样本的定量,通过内置标准曲线到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的浓度值;

[0042] 5、化学发光免疫分析系统可以实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

[0043] 结合图1,上述抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0044] 取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入抑制素B单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒;以及

[0045] 取抑制素B单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。

[0046] MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液的浓度为0.02M,pH为5.5。

[0047] Tris缓冲液的浓度为0.1M并且含有2%BSA,pH为8.0。

[0048] EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺)水溶液的浓度为10mg/mL~20mg/mL,EDC与羧基化的磁微粒的质量比为0.05:0.1~1。

[0049] 优选的,抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,抑制素B单克隆抗体与羧

基化的磁微粒的质量比为1:25~35。

[0050] 优选的,羧基化的磁微粒的粒径为0.05 μm ~1 μm 。

[0051] 碳酸盐缓冲液浓度为0.1M,pH为9.0~9.5,

[0052] 除杂的操作为离心脱盐柱脱盐,具体操作为:先分别用纯净水及TBS缓冲液(40mM Tris-HCl,0.5%BSA,1%NaCl,pH 8.0)处理离心脱盐柱,最后加入得到的抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒的溶液,最后收集离心管中的液体。

[0053] 优选的,化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体中,抑制素B单克隆抗体与化学发光标记物的质量比为50:1~10。

[0054] 化学发光标记物可以为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。其中,化学发光标记物优选为吖啶酯。

[0055] 得到的抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体组合即可得到上述抑制素B化学发光免疫检测试剂盒。

[0056] 这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒在使用时,还需要化学发光底物液和抑制素B定标品。

[0057] 化学发光底物液和抑制素B定标品可以自行配制得到。

[0058] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为 H_2O_2 溶液,B液可以为NaOH溶液。

[0059] 本实施例中,A液为浓度为0.1mol/L的 H_2O_2 溶液,B液为浓度为0.25mol/L的NaOH溶液。

[0060] 具体的,抑制素B定标品可以采用定标品缓冲液将抑制素B配制成浓度分别为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL和1600pg/mL的抑制素B的溶液。

[0061] 这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的制备方法简单方便,制得的抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的检测灵敏度较高,具有良好的应用前景。

[0062] 以下为具体实施例。

[0063] 实施例1:抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0064] (1)抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒的制备:

[0065] 取含有50mg粒径为0.05 μm ~1 μm 的羧基化的磁微粒(MagnaBindTM,货号21353)悬浮液,磁分离去上清,用0.02M,pH为5.5MES缓冲液重悬,加入1mL新配置的10mg/mL的EDC水溶液,活化磁微粒表面羧基,加入4mg抑制素B单克隆抗体(biorbyt,货号orb48780),室温下混悬6h,磁分离,去除上清,用含2%BSA的0.1M,pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒,每瓶5mL分装保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0066] (2)抑制素B单克隆抗体标记的吖啶酯的制备:

[0067] 取50 μL 浓度为25mg/mL的抑制素B单克隆抗体(biorbyt,货号orb48780)溶液,加入150 μL 浓度为0.1M、pH为9.0~9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入1.5 μL 浓度为5mg/mL的吖啶酯溶液混匀,室温下避光反应,1.5h后取出,用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的抑制素B单克隆抗体标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到抑制素B单克隆抗体标记的吖啶酯,每瓶5mL分装保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0068] (3)抑制素B定标品的制备:

[0069] 用定标品缓冲液(40mM Tris-HCl,0.5%BSA,1%NaCl,pH 8.0)将抑制素B配置成

浓度为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL和1600pg/mL,每瓶0.5mL分装冻干,4℃保存备用。

[0070] 实施例2:抑制素B化学发光免疫检测方法

[0071] 以全自动化学发光免疫分析仪(YHL0,货号iFIash3000)为检测工具,方法学模式为双抗体夹心法,即仪器依次加入50μL的样品、50μL的抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒以及50μL的抑制素B处理液,反应20min后,再加50μL的抑制素B包被的吖啶酯,反应20min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入发光底物A液(H₂O₂)及B液(NaOH)进行发光反应,最后记录发光值。

[0072] 实施例3:抑制素B化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0073] 采用实施例2中的方法对抑制素B定标品进行检测,得到绘制标准曲线如图2所示。

[0074] 接着对接着测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度。

[0075] 灵敏度的检测:

[0076] 参照CLSI EP17-A文件推荐实验方案,计算抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为10pg/mL。

[0077] 线性的检测:

[0078] 对浓度为50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、1600pg/mL定标品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9996$,另外,该试剂盒对抑制素B样品检测的线性范围为10pg/mL~1300pg/mL。

[0079] 精密度测定:

[0080] 取浓度为500pg/mL及1000pg/mL两个抑制素B样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%。

[0081] 干扰性实验:

[0082] 取混合血清分别添加干扰物包括:结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白、抗坏血酸、甘油酯,添加质量比按照1:20进行,分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值,计算二者之间的偏差,以±10%为可接受范围。结果表明,干扰性均达到NCCLS的文件标准,可用于临床实验室抑制素B状况的准确评估。

[0083] 实施例4、抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的对比实验

[0084] 分别用化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法对浓度为50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、1600pg/mL的抑制素B样品做检测,两种方法检测灵敏度相比,数据如下表所示:

[0085]

测试次数	化学发光检测 (RLU)	酶联免疫吸附法检测 (OD)
1	1057	0.066
2	1206	0.079
3	1097	0.069
4	1063	0.081
5	1110	0.073
6	1017	0.069
7	1047	0.056
8	1107	0.074
9	989	0.063
10	1039	0.059
11	1102	0.087
12	1053	0.068
13	1004	0.074
14	1058	0.068
15	1110	0.071
16	1055	0.072
17	1048	0.067
18	1102	0.081
19	992	0.067

[0086]

20		1080	0.069
Mean		1067	0.071
SD		50	0.007
M+2SD		1168	0.086
50pg/mL	1	11206	0.133
	2	10936	0.141
	3	10498	0.142
	Mean	10880	0.139
灵敏度 (pg/mL)		0.51	10.42

[0087] 由上表可以看出,化学发光检测方法的灵敏度较酶联免疫吸附法提高了约20倍。

[0088] 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,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

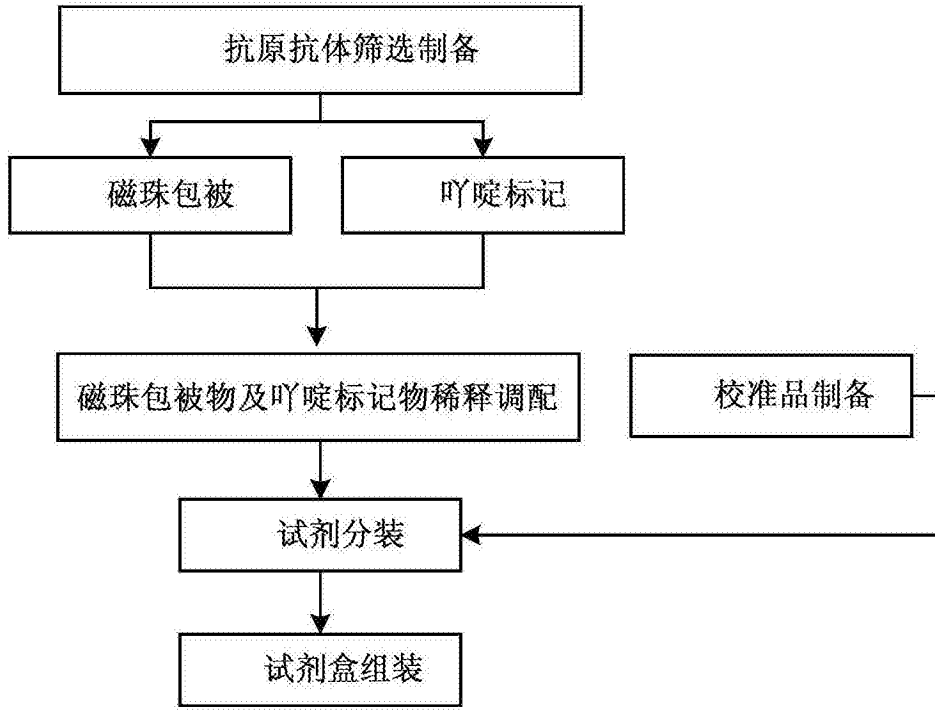


图1

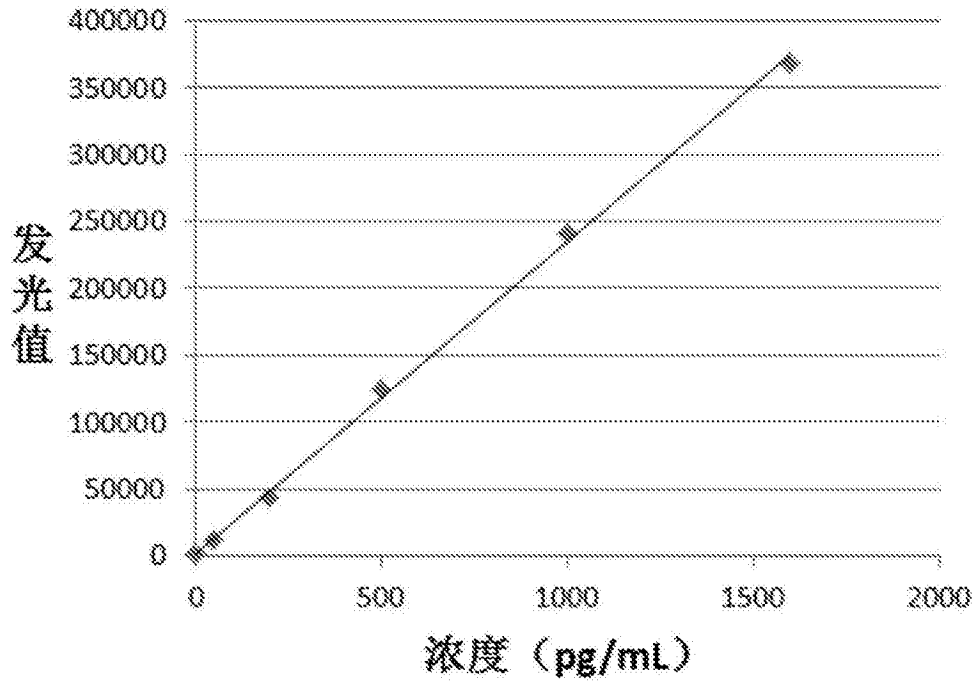


图2

专利名称(译)	抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106199012A	公开(公告)日	2016-12-07
申请号	CN201610506673.3	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	钱纯亘 夏福臻 王刚 祝亮 刘美婷		
发明人	钱纯亘 夏福臻 王刚 祝亮 刘美婷		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/74 G01N2333/495 G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/582		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，抑制素B化学发光免疫检测试剂盒包括：抑制素B单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和化学发光标记物标记的抑制素B单克隆抗体。这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具，完成抑制素B的检测这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒，经过实验，其检测灵敏度达到10pg/mL，相对于传统的抑制素B的检测方法灵敏度至少提高了10倍，这种抑制素B化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

