



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106645692 B

(45)授权公告日 2018.05.11

(21)申请号 201611243251.8

(22)申请日 2016.12.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106645692 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(73)专利权人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(72)发明人 朱雪明 虞留明

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

CN 103760348 A,2014.04.30,权利要求1-10,说明书第1-58、67-74段.

CN 1227349 A,1999.09.01,全文.

CN 101324590 A,2008.12.17,全文.

US 4952569 A,1990.08.28,全文.

US 5902888 A,1999.05.11,全文.

真仁田英明 等.尿中エストロゲンの免疫学的測定法の研究(第1報)抗体の作製とその免疫学的性質およびラジオイムノアッセイ.《YAKUGAKU ZASSHI》.1980,第100卷(第10期),1019-1027.

审查员 胡晓佳

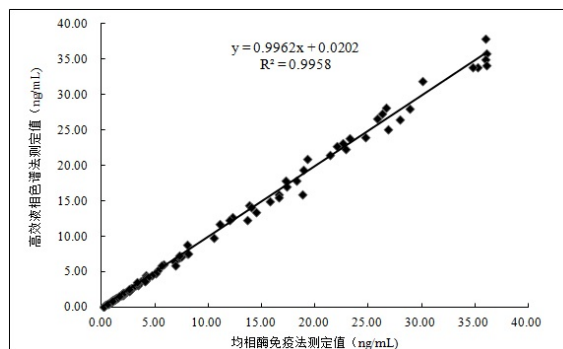
权利要求书3页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

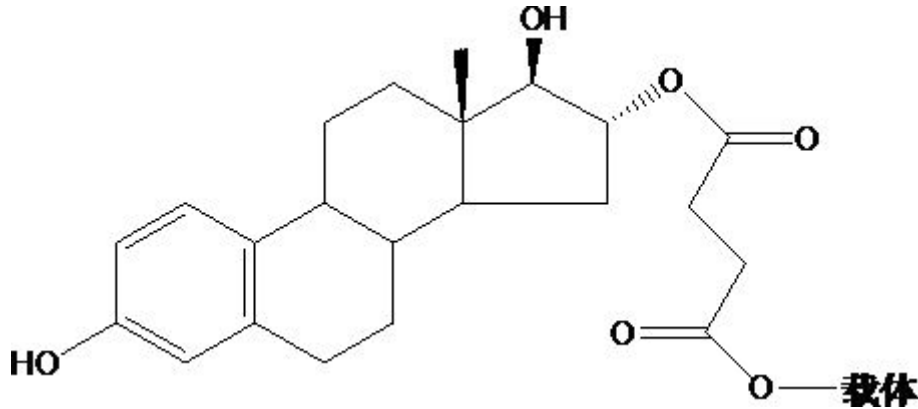
雌三醇均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法

(57)摘要

本发明公开了雌三醇均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法,属于免疫检测试剂技术领域。本发明制备的雌三醇免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗雌三醇特异性抗体,并且与常见的62种药物无任何交叉反应;由该抗体制备得到的雌三醇检测试剂,可以精确快速地确定尿液、血液等生物样品中的雌三醇含量。与市场现有的检测试剂、检测方法、制备方法比较,本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低雌三醇检测成本,有利于临床大规模推广使用。



1. 一种雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于:
 所述的雌三醇均相酶免疫检测试剂含有抗雌三醇特异性抗体和指示试剂;
 所述的抗雌三醇特异性抗体为由雌三醇免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,
 或者为保留与雌三醇特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;
 所述的雌三醇免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽;

所述的指示试剂为由雌三醇酶标偶联物和酶的底物组成的酶试剂,酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,酶的底物为葡萄糖-6-磷酸;

所述的雌三醇均相酶免疫检测试剂分为试剂A和试剂B;

所述的雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备步骤为:

(1) 试剂A:将2.018~8.072g、5.625~22.50 mM氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和0.856~3.422g、5.625~22.50 mM葡萄糖-6-磷酸用0.5~2 L 55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将抗雌三醇特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗雌三醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:200~1:7500;

(2) 试剂B:将雌三醇酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,雌三醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:200~1:7500;

其中,雌三醇酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

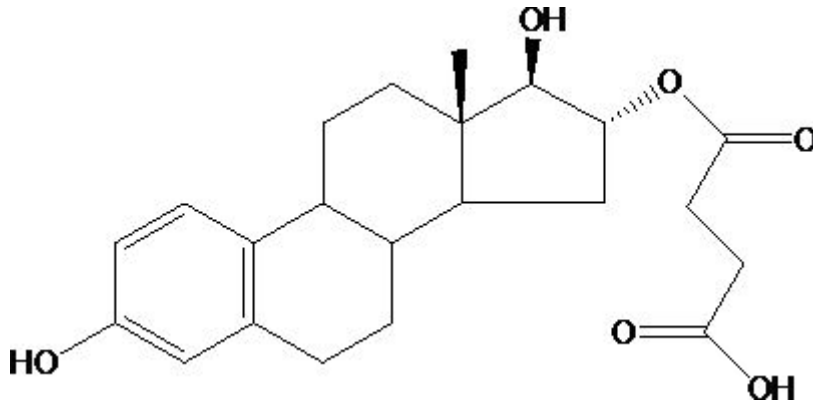
(a) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:称取7.5~22.5 mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于6~18 mL含有 72.6 mg 0.05 M Tris、8mg 3.3 mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中, pH=8.5~9.0;在溶液中加入112.5~337.5 mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5~202.5 mg 葡萄糖-6-磷酸以及0.375~1.125 mL卡必醇;加热到30-35摄氏度,再一次性加入1~3 mL 二甲基亚砷,摇匀后静置5-15s;

(b) 雌三醇衍生物的激活:在无水状态下称取5~15 mg 雌三醇衍生物,溶解于300~900 μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到 -10 ~ -14℃;加入1.5~4.5 μL 三丁胺;加入0.75~2.25 μL氯甲酸异丁酯;加入0.1~2 μL 碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;-10 ~ -14℃搅拌30~60分钟;

(c) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与雌三醇衍生物的连接:将步骤(b)激活的温度为-10 ~ -14℃的雌三醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(a)溶解的温度为30-35摄氏度的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8℃搅拌过夜;

(d) 纯化产物:通过G-25凝胶层析柱纯化连接产物,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存;

所述的雌三醇衍生物结构式如式(II)所示:



式(II)。

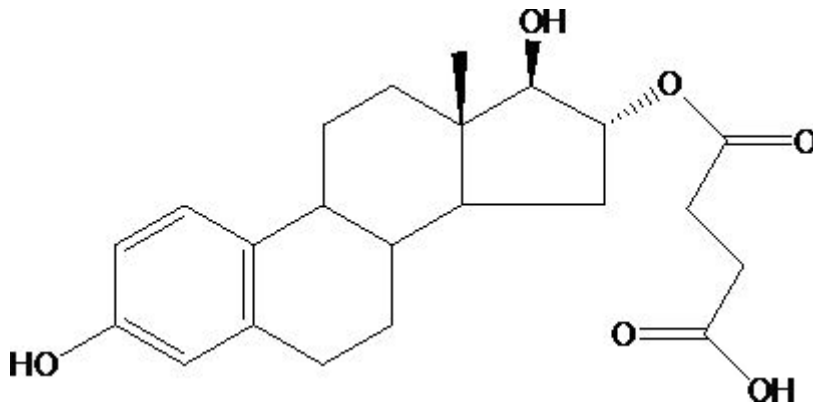
2. 根据权利要求1所述的雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的雌三醇免疫原的制备步骤如下:

①将载体蛋白100~300g溶解于25~75 mL 0.2 M, pH 8.5的磷酸缓冲液中;

②将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100~300 mg 雌三醇衍生物、1.75~5.25 mL 二甲基甲酰胺、1.75~5.25 mL 乙醇、3.5~10.5 mL 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、100~300 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60 min;

③将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到雌三醇免疫原;

所述的雌三醇衍生物结构式如式(II)所示:



式(II)。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于:所述的抗雌三醇特异性抗体的制备过程包含以下步骤:

(I) 用PBS将雌三醇免疫原稀释至0.1~3.0 mg/mL,得到抗原溶液,然后用0.5~5.0 mL 抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

(II) 2~3周后,再用0.5~5.0 mL 相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射3~6次;

(III) 对步骤(II)的实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗雌三醇

特异性抗体。

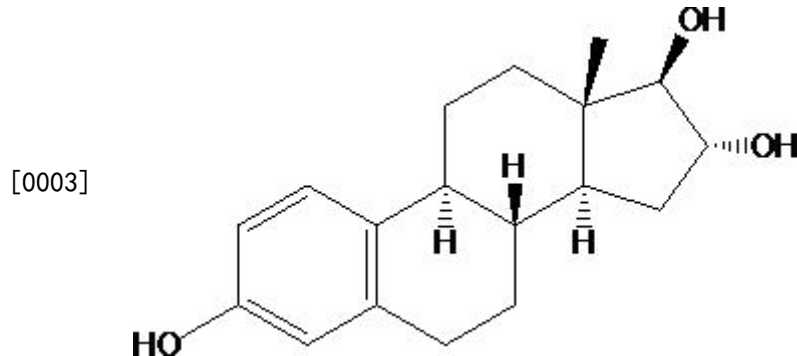
雌三醇均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测试剂领域,具体涉及一种雌三醇均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法。

背景技术

[0002] 雌三醇(Estriol,E3),其结构式如式(III)所示:



[0004] 式(III)

[0005] 雌三醇(Estriol,E3)是重要的内源性雌性激素之一。人体内存在游离雌三醇和结合雌三醇,通常男性及未孕妇女体内的雌三醇含量低于2.2 ng/mL,而妊娠期妇女体内的雌三醇含量一般高于31.6 ng/mL。在妊娠期检查时,可以通过检测孕妇血清或尿液中E3的含量来判断胎儿的发育情况。正常孕龄女性体内雌三醇的主要来源是雌二醇和雌酮的代谢产物,因而在血清样品中的含量很低;孕妇体内雌三醇的主要来源是婴儿和胎盘,且含量一般较高(10 ng/mL)。孕妇血清中游离态雌三醇含量为临床上指示胎盘功能的重要参数。通过检测孕妇血清或尿液中雌三醇的含量,可以判断胎儿的发育状况。因此,快速、准确地检测血清或尿液中雌三醇的含量对于科学研究和临床诊断都具有重要意义。

[0006] 目前,检测游离雌三醇或总雌三醇的常用方法有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、酶联免疫分析法(ELISA)、放射免疫法(RIA)、时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)和化学发光免疫分析法(CLIA)等,但是这些方法在临床大规模推广应用方面均具有一定的局限性。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的雌三醇检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。因此,研发一种质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的雌三醇测定试剂盒已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对雌三醇的高通量、快速化检测,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,能有效满足国内日益增长的临床检测需求。

发明内容

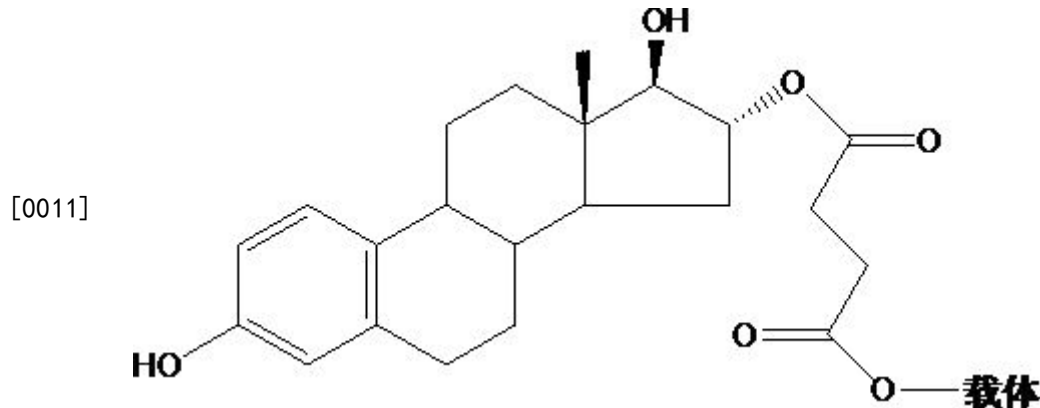
[0007] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用独特的雌三醇制备免疫原性强的雌三醇免疫原及其抗体,用该抗体制备的雌三醇均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对雌三醇高通量、快速化的检测。该检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结

果准确等优点,还能有效降低雌三醇检测成本,有利于临床推广使用。

[0008] 本发明的一个目的在于提供一种雌三醇均相酶免疫检测试剂,含有抗雌三醇特异性抗体和指示试剂,所述的指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或发光试剂中的一种,优选为酶试剂;所述的酶试剂由雌三醇酶标偶联物和酶的底物组成,酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,酶的底物为葡萄糖-6-磷酸;

[0009] 所述的抗雌三醇特异性抗体由雌三醇免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与雌三醇特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

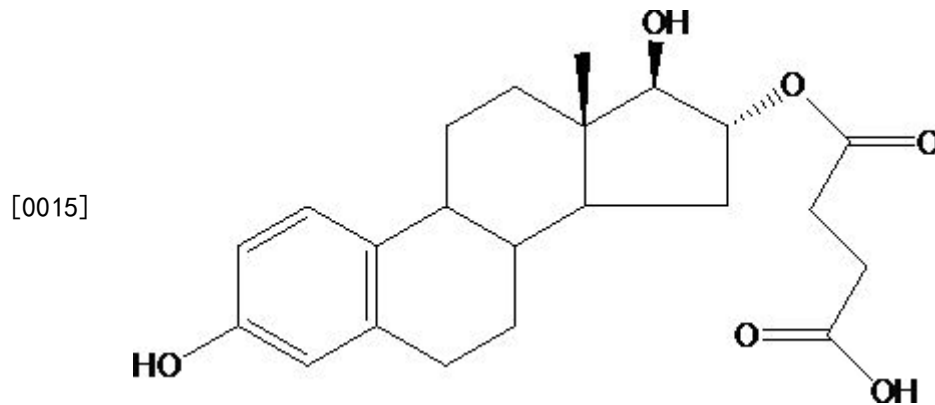
[0010] 所述的雌三醇免疫原,其结构式如式(I)所示:



[0012] 式(I)

[0013] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽。优选为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白,更优选为血清白蛋白,进一步优选为牛血清白蛋白。

[0014] 所述的雌三醇免疫原由雌三醇衍生物与上述载体连接而成,雌三醇衍生物的化学结构如式(II)所示:



[0016] 式(II)。

[0017] 所述的雌三醇免疫原的制备步骤如下:

[0018] (1)将载体蛋白100~300g溶解于25~75 mL 0.2 M, pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0019] (2)将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100~300 mg 雌三醇衍生物、1.75~5.25 mL 二甲基甲酰胺、1.75~5.25 mL 乙醇、3.5~10.5 mL 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、100~300 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60 min;

[0020] (3)将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到雌三醇免疫原。

[0021] 一种抗雌三醇特异性抗体,由上述的雌三醇免疫原免疫实验动物后生产得到。

[0022] 所述的抗雌三醇特异性抗体由上述制得的雌三醇免疫原采用常规方法接种实验动物,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0023] (1)用PBS将上述合成的BSA-雌三醇免疫原稀释至0.1~3.0 mg/mL,得到抗原溶液,然后用0.5~5.0 mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

[0024] (2)2~3周后,再用0.5~5.0 mL相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射3~6次;

[0025] (3)对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗雌三醇特异性抗体。

[0026] 本发明的抗雌三醇特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与雌三醇特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0027] 本发明的抗体为采用单一的雌三醇免疫原对实验动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种,优选为兔。

[0028] 本发明的另一个目的在于提供雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备方法。

[0029] 雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0030] (1)试剂A:将2.018~8.072g、5.625~22.50 mM氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和0.856~3.422g、5.625~22.50 mM葡萄糖-6-磷酸用0.5~2 L 55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将抗雌三醇特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗雌三醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:200~1:7500,优选为1:1200;

[0031] (2)试剂B:将雌三醇酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,雌三醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:200~1:7500,优选为1:2500;

[0032] 其中,雌三醇酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

[0033] (1)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:称取7.5~22.5 mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于6~18 mL含有 72.6 mg 0.05 M Tris、8mg 3.3 mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中,pH=8.5~9.0;在溶液中加入112.5~337.5 mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5~202.5 mg 葡萄糖-6-磷酸以及0.375~1.125 mL卡必醇;加热到30-35摄氏度,再一次性加入1~3 mL 二甲基亚砷,摇匀后静置5-15s;

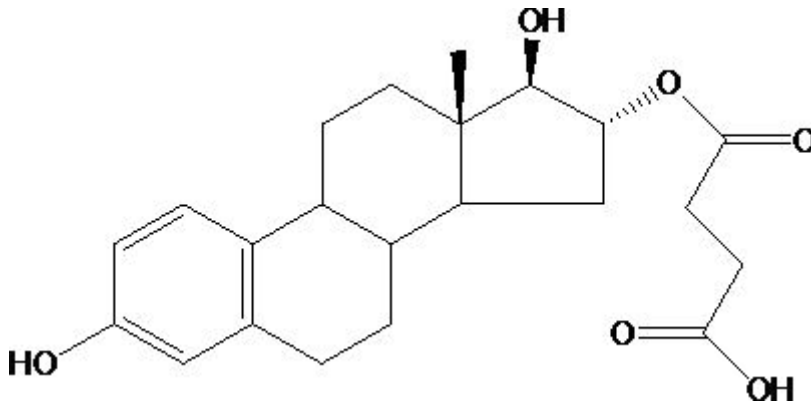
[0034] (2)雌三醇衍生物的激活:在无水状态下称取5~15 mg 雌三醇衍生物,溶解于300~900 μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到 -10 ~ -14℃;加入1.5~4.5 μL 三丁胺;加入0.75~2.25 μL氯甲酸异丁酯;加入0.1~2 μL 碳二亚胺(EDC);5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;-10~ -14℃搅拌30~60分钟;

[0035] (3)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与雌三醇衍生物的连接:将步骤(2)激活的温度为-10 ~ -14℃的雌三醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的温度为30-35摄氏度的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8℃搅拌过夜;

[0036] (4)纯化产物:通过G-25凝胶层析柱纯化连接产物,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存。

[0037] 所述的雌三醇衍生物结构式如式(II)所示:

[0038]



[0039]

式(II)。

[0040] 本发明的又一个目的在于提供雌三醇含量的检测方法。雌三醇含量的检测方法，采用前述的制备方法制备得到雌三醇均相酶免疫检测试剂并用于雌三醇含量的检测，包括如下步骤：

[0041] 1) 将待测样本与抗雌三醇特异性抗体接触；

[0042] 2) 根据待测样本中雌三醇与抗雌三醇特异性抗体的结合情况，利用指示试剂判断样本中雌三醇的含量；

[0043] 所述的待测样本为生理样本，所述的生理样本为尿液样本或者血液样本，优选尿液样本。

[0044] 本发明的雌三醇免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗雌三醇特异性抗体。该抗体特异性高，与雌三醇的结合力强。由该抗体制备得到的雌三醇检测试剂，可以快速、准确地确定样品中的雌三醇含量。

[0045] 雌三醇均相酶免疫检测试剂在使用之前，为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应，酶标偶联物和酶的底物是不混合的且分开放置，所以将酶的底物与上述抗雌三醇特异性抗体混合在一起。

[0046] 本发明的制备方法中，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备时，加热到30-35摄氏度，再一次性而非逐滴加入1~3 mL 二甲基亚砜，摇匀后静置5-15s，采用相对室温更高的温度，使得一次性加入二甲基亚砜成为可行，且静置时间也比较短，节约了操作时间，且有助于实现雌三醇的高通量快速化测定，准确度高，特异性强。雌三醇衍生物的激活过程选取-10 ~ -14℃的温度范围，低于常规的-2至-8摄氏度，有助于提高雌三醇衍生物的激活效率且使得雌三醇衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液混合时，混合溶液的温度接近于室温。

[0047] 本发明的雌三醇免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗雌三醇特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；含有上述抗雌三醇特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定尿液、血液等生物样品中的雌三醇含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现雌三醇的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。

附图说明

[0048] 图1是雌三醇的ELISA检测反应曲线；

[0049] 图2是雌三醇的均相酶免疫反应曲线;

[0050] 图3是雌三醇均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0051] 实施例一:雌三醇免疫原的合成

[0052] 雌三醇免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(II)所示的雌三醇衍生物的末端羧基连接而成,具体步骤如下:

[0053] 1. 将牛血清白蛋白200 mg溶解于50 mL 0.2 M,pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0054] 2. 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200 mg雌三醇衍生物、3.5 mL 二甲氨基酰胺、3.5 mL 乙醇、7.0 mL 10mM,pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30 min;

[0055] 3. 将溶解好的溶液滴加至BSA溶液中,并在2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到雌三醇免疫原。

[0056] 实施例二:抗雌三醇特异性抗体的制备

[0057] 将实施例一制备得到的雌三醇免疫原采用常规方法接种实验动物兔,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0058] 1. 用PBS将上述合成的雌三醇免疫原稀释至1.0 mg/mL,得到抗原溶液,然后用1.0 mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射。

[0059] 2. 2~3周后,再用1.0 mL 相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射4次。

[0060] 3. 对步骤2的实验动物兔取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗雌三醇特异性抗体。

[0061] 实施例三:雌三醇的ELISA检验

[0062] 1. 雌三醇的ELISA检测标准曲线的建立

[0063] (1) 标准品的制备

[0064] 将雌三醇粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液,制备成1 mg/mL 的储存液。用ELISA 缓冲液将储存液依次稀释为16.00ng/mL、8.00ng/mL、4.00ng/mL、2.00ng/mL、1.00ng/mL和0.00ng/mL的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0 mM Tris,145mM NaCl 和0.25%的BSA。

[0065] (2) 利用雌三醇的ELISA检验方法制备标准曲线

[0066] 用PBS将实施例二中所制备的抗雌三醇特异性抗体稀释成1 : 7500的终浓度溶液,100 μ L /孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24h ;用PBS将上述包被有抗雌三醇抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200 μ L /孔的0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16 h。然后用PBS洗涤3次,加入20 μ L /孔的标准品。再加入100 μ L /孔工作浓度的HRP-雌三醇偶联物;室温下孵育30min 后PBS 洗板5次;然后每孔加入100 μ L TMB 底物,室温孵育30 min。再每孔加入100 μ L 终止液(2 M 硫酸)。测定450 nm 的吸光值。根据各标准品所对应的450 nm 的吸光值定标,制作标准曲线,结果如附图2所示。

[0067] 2. 待测样品中雌三醇含量的检测

[0068] (1) 制作待测样品

[0069] 制备方法:将雌三醇粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1 mg/mL 的储存液,并将此储存液稀释于空白尿液中,至终浓度分别为0.00,2.00,8.00,16.00ng/mL,形成空白、低、中、高浓度的尿液样本。该空白尿液为不含雌三醇的健康人尿液。

[0070] (2) 测试方法

[0071] 利用上述雌三醇的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的尿液样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的尿液样本在450nm 的吸光值。

[0072] (3) 测试结果

[0073] 对照图1中所示的雌三醇的ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中雌三醇含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中雌三醇的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0074] 表1雌三醇的ELISA检测回收实验

[0075]

尿液样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/mL)	0.00	2.00	8.00	16.00
测试1	0.00	2.15	7.79	16.29
测试2	0.01	1.93	7.99	16.46
测试3	0.01	2.21	8.12	16.11
平均值 (ng/mL)	0.01	2.09	7.97	16.29
回收率 (%)	-	104.8	99.6	101.8

[0076] 由表1中结果可知:采用本发明雌三醇的ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的雌三醇回收率都较高,均>95%,说明本发明所述的抗雌三醇特异性抗体可以用于样本中雌三醇的检测,并且结果准确度高。

[0077] 实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0078] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0079] (1) 准确称取15 mg规格为100KU的 G6PDH,室温溶解于12mL含有 72.6 mg(0.05 M)Tris、8mg MgCl₂(3.3 mM)和100mg NaCl的溶液中,该溶液 pH=8.9,本步骤在烧杯C中进行。

[0080] (2) 在上述烧杯C中加入225 mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),135 mg葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)以及0.75 mL卡必醇(Carbitol)。

[0081] (3) 加热到35摄氏度,在上述烧杯C中一次性加入2 mL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO),摇匀后静置5-15s。

[0082] 雌三醇衍生物的激活:

[0083] (1) 在无水状态下称取10 mg上述雌三醇衍生物,溶解于600 μ L DMF中。

[0084] (2) 使上述溶液温度降到 -10 $^{\circ}$ C。

[0085] (3) 加入3 μ L 三丁胺(tributylamine)。

[0086] (4) 加入1.5 μ L氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0087] (5) 加入0.1~2 μ L 碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;

[0088] (6) -12 $^{\circ}$ C搅拌30分钟。

[0089] 值得一提的是,另选取-4摄氏度、-8摄氏度两个不同温度进行雌三醇衍生物的激

活,且在室温下逐滴加入二甲基亚砷,其余条件相同。

[0090] 与雌三醇衍生物的连接:

[0091] (1)将上述激活的雌三醇衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0092] (2)2-8℃搅拌过夜。

[0093] 纯化产物:

[0094] 通过G-25凝胶层析柱纯化步骤3中的溶液,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存。

[0095] 分别采用-4摄氏度(逐滴加入二甲基亚砷,室温)、-8摄氏度(逐滴加入二甲基亚砷,室温)、-10摄氏度(35摄氏度一次性加入二甲基亚砷,摇匀静置)3个条件进行雌三醇衍生物的激活,最终得到的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的回收率为83.9%、88.2%、97.3%,回收率指的是加入的G6PDH最终生成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的比率。

[0096] 实施例五:雌三醇均相酶免疫检测试剂的制备

[0097] 1. 试剂A的制备:将4.036g (11.25 mM)氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.711g (11.25 mM)葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)置于烧杯D中,用1L 55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗雌三醇特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:1200。

[0098] 2. 试剂B的制备:将实施例四制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,上述偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:2500。

[0099] 实施例六:雌三醇均相酶免疫检验及结果

[0100] 1. 获得标准曲线:

[0101] (1)设置迈瑞 BS-480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0102] (2)操作步骤为:先加试剂A,再加入标准品,最后加入试剂B。加入试剂B后,测定不同时间点的OD₃₄₀吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂A和试剂B的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,如图3所示。

[0103] 表2 迈瑞 BS-480全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 HS-480 参数	
项目名称	雌三醇
试剂 1	160μL
试剂 2	40μL
样本量	10μL
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	412 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	ng/mL
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00ng/mL

[0104] [0105] 2. 样本检测:通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本10次,上述质控样本为:将雌三醇标准品溶解于人尿液中,至浓度分别为2.00,15.00,35.00ng/mL。检测数据及数据分析见表3。

[0106] 表3 样品测定及精密度和回收率评估

[0107]

尿液样品	低	中	高
样品浓度 (ng/mL)	2.00	15.00	35.00
1	2.15	15.81	34.55
2	2.04	15.62	36.31
3	2.03	16.03	35.89
4	1.90	15.33	36.07
5	1.99	15.40	36.72
6	2.06	14.79	34.15
7	2.18	15.28	37.24
8	1.93	15.00	36.10
9	2.09	14.65	35.98
10	2.02	15.35	36.00
平均值 (ng/mL)	2.04	15.33	35.90
标准差(SD)	0.09	0.43	0.92
精密度(CV%)	4.41%	2.80%	2.56%
回收率 %	102.0	102.2	102.6

[0108] 检测结果:本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高,回收率达到95%-105%,精密度高,CV均低于5%。

[0109] 实施例七:药物干扰试验

[0110] 选取62种常见药物进行干扰检测,调整浓度至1.00ng/mL,采用实施例六的均相酶免疫方法进行测定:

[0111] 1. 将待测干扰药物与实施例五制备的试剂A接触反应,再加入试剂B;

[0112] 2. 检测上述混合溶液的OD₃₄₀吸光值,根据实施例六的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0113] 常见的62种药物名称以及测定结果具体参见表4。

[0114] 表4 常见干扰药物测定结果

[0115]

ID#	化合物名称	等价于雌三醇的浓度 (ng/mL)	ID#	化合物名称	等价于雌三醇的浓度 (ng/mL)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0
2	β-苯基乙胺	0.0	33	普鲁卡因酰胺	0.0
3	安非他命	0.0	34	普鲁卡因	0.0
4	氨基青霉素	0.0	35	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	36	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	37	苯肾上腺素	0.0
7	氯拉卓酸	0.0	38	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	39	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	40	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	41	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	42	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	43	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	44	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	45	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	46	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砷	0.0	47	大麻酚	0.0
17	蔡普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	49	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	50	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	51	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0	54	甲基二乙醇胺	0.0
24	异戊巴比妥	0.0	55	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
25	甲撑二氧苯丙胺	0.0	56	琥珀酸多西拉敏	0.0
26	四氢大麻酚	0.0	57	纳布啡	0.0
27	制霉菌素	0.0	58	去甲吗啡	0.0
28	乙酰吗啡	0.0	59	羟考酮	0.0
29	苯非他明	0.0	60	克他命	0.0
30	异丙嗪	0.0	61	苯海拉明	0.0
31	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0

[0116] 测定结果显示:上述62种常见药物等价于雌三醇的浓度均小于0.01ng/mL。由此可见,本发明的抗体是抗雌三醇的特异性抗体,与其它药物无交叉反应。

[0117] 实施例八:相关性分析

[0118] 对100例临床标本分别使用高效液相色谱法和本发明的均相酶免疫法试剂进行相关性分析,测定的数据参见表5。

[0119] 表5 临床样本测定值

[0120]

样本号	均相酶免疫法测定值 (ng/mL)	高效液相色谱法测定值 (ng/mL)
1	3.26	3.30
2	1.07	1.09
3	21.37	21.56
4	2.73	2.76
5	0.68	0.66
6	1.05	1.07
7	3.66	3.73
8	1.99	1.86
9	5.24	5.22
10	11.02	11.80
11	26.79	25.25
12	1.26	1.23
13	0.95	1.00
14	2.01	2.07
15	3.33	3.26
16	35.22	33.98
17	3.99	3.89
18	13.77	14.51
19	0.35	0.36
20	1.07	1.08
21	2.22	2.20
22	5.73	6.11
23	26.25	27.43
24	14.00	14.25
25	2.52	2.45
26	1.21	1.24
27	12.22	12.79
28	19.23	21.05
29	0.22	0.23
30	25.81	26.76
31	7.99	7.66
32	18.20	17.92
33	1.23	1.23
34	0.59	0.60
35	28.80	28.07
36	30.00	31.99
37	1.78	1.77

38	3.21	3.15
39	16.53	16.00
40	0.18	0.20
41	22.55	23.19
42	36.01	35.85
43	1.16	1.15
44	3.89	3.92
45	15.72	15.08
46	2.05	2.07
47	35.91	35.03
48	8.08	7.67
49	0.93	1.01
50	17.26	17.06
51	6.78	6.52
52	5.03	4.91
53	1.85	1.90
54	24.64	24.12
55	7.28	7.090
56	2.00	1.97
57	34.77	33.98
58	11.95	12.37
59	1.90	1.76
60	0.99	1.02
61	3.26	3.59
62	5.55	6.04
63	2.79	2.83
64	0.85	0.92
65	10.51	9.88
66	7.41	7.20
67	1.34	1.40
68	26.62	28.21
69	4.09	4.53
70	36.05	34.29
71	18.88	19.45
72	4.06	4.27
73	1.38	1.34
74	7.28	7.41
75	2.59	2.46
76	0.96	0.97

77	16.57	15.58
78	1.78	1.87
79	23.25	23.90
80	4.06	3.83
81	1.97	2.02
82	27.93	26.51
83	0.52	0.50
84	4.68	4.66
85	22.86	22.41
86	4.27	4.25
87	0.98	0.98
88	35.95	37.92
89	14.43	13.56
90	8.00	8.97
91	17.25	17.95
92	2.55	2.35
93	3.97	3.78
94	1.89	1.98
95	13.59	12.34
96	2.50	2.62
97	18.80	16.03
98	6.85	5.99
99	1.63	1.60
100	22.02	22.85

[0121] 对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y = 0.9962x + 0.0202$,相关系数 $R^2 = 0.9958$,表明本发明的检测试剂测定雌三醇临床标本的准确度高。

[0122] 需要说明的是,以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

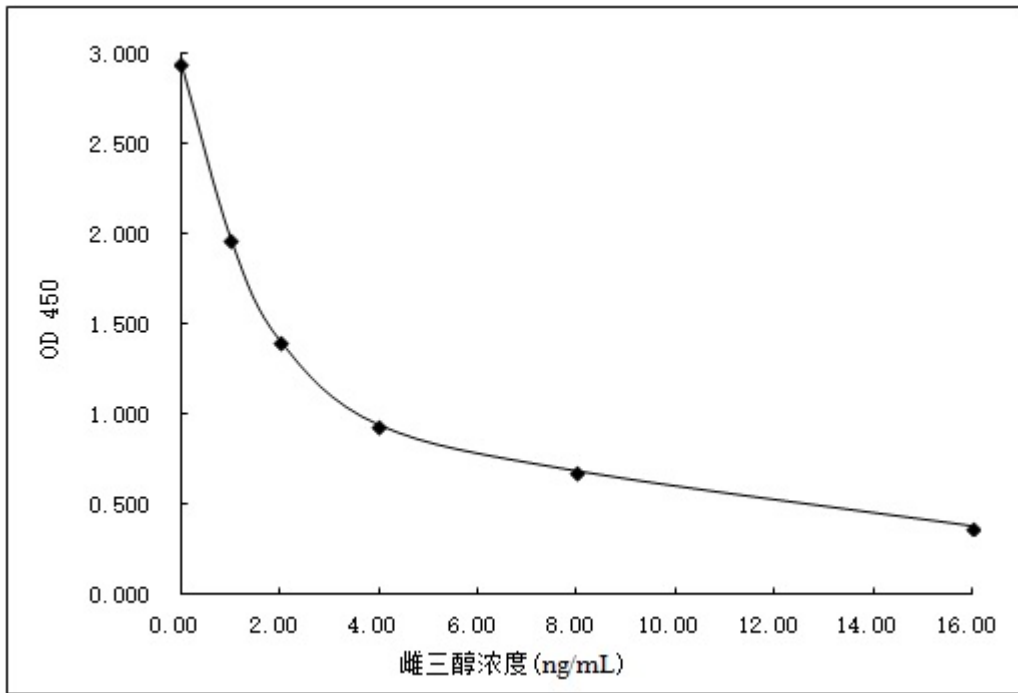


图1

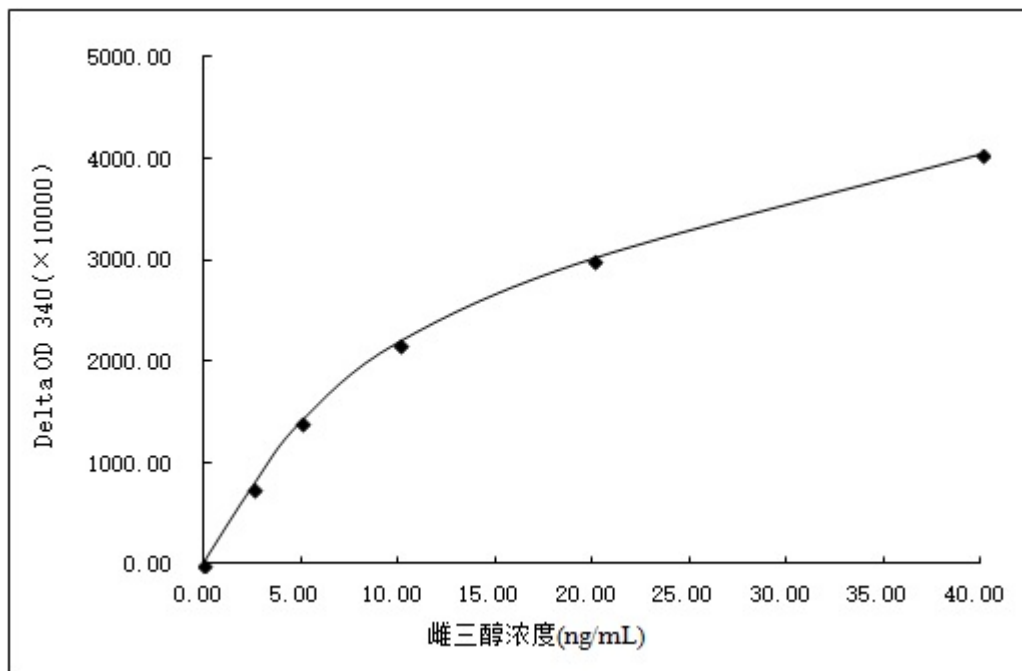


图2

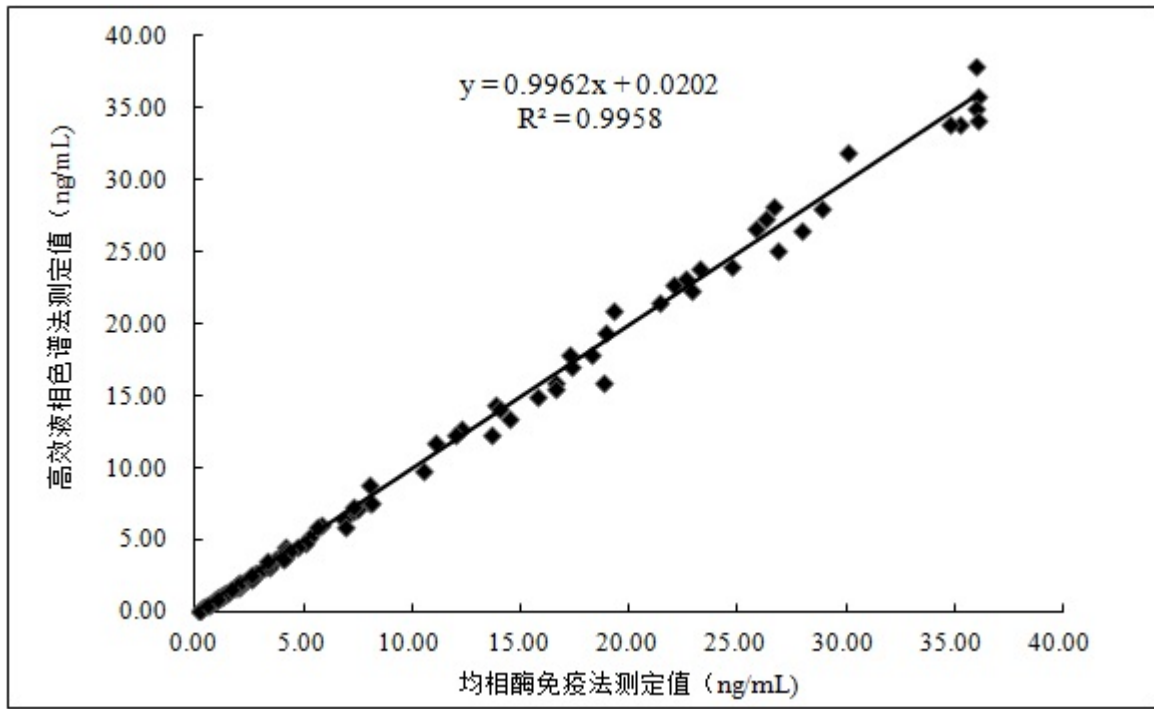


图3

专利名称(译)	雌三醇均相酶免疫检测试剂、制备方法 & 检测方法		
公开(公告)号	CN106645692B	公开(公告)日	2018-05-11
申请号	CN201611243251.8	申请日	2016-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	朱雪明 虞留明		
发明人	朱雪明 虞留明		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N2333/575		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN106645692A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了雌三醇均相酶免疫检测试剂、制备方法 & 检测方法，属于免疫检测试剂技术领域。本发明制备的雌三醇免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗雌三醇特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；由该抗体制备得到的雌三醇检测试剂，可以精确快速地确定尿液、血液等生物样品中的雌三醇含量。与市场上现有的检测试剂、检测方法、制备方法比较，本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，还能有效降低雌三醇检测成本，有利于临床大规模推广使用。

