



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103048446 B

(45) 授权公告日 2015.02.04

(21) 申请号 201210571305.9

第 5-17 段, 实施例 1-3, 权利要求 1-8.

(22) 申请日 2012.12.25

US 2012141375 A1, 2012.06.07, 全文.

WO 2011159835 A1, 2011.12.22, 全文.

CA 2668714 A1, 2008.05.22, 全文.

(73) 专利权人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号 C6 栋

审查员 胡晓佳

(72) 发明人 于大为 程晓蕾 李冬冬

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101614742 A, 2009.12.30, 摘要, 说明书
第 2 页第 2 段至第 7 页第 4 段, 实施例 1-4, 权利
要求 1-12.

CN 101937000 A, 2011.01.05, 摘要, 说明书

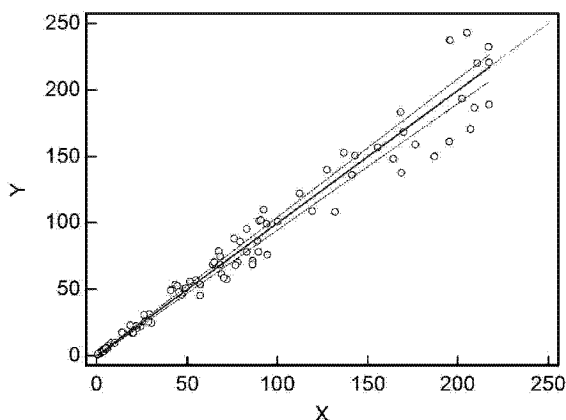
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种促黄体生成激素的纳米磁微粒化学发光
测定试剂盒及其制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种促黄体生成激素的纳米磁微粒
化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法,
试剂盒包括含有荧光素标记的促黄体生成激素
抗体的溶液、包被有抗荧光素抗体的磁微粒的
悬浮液, 以及含有碱性磷酸酶标记的促黄体生
成激素抗体的溶液, 该碱性磷酸酶标记的促黄
体生成激素抗体由碱性磷酸酶与促黄体生成激
素抗体通过 SMCC 和 2IT 连接构成。本发明使
得能够以更低成本和更高准确度和精密度对促
黄体生成激素进行定量检测。



1. 一种促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒,所述试剂盒包括用于免疫反应步骤的免疫反应试剂,所述的免疫反应试剂包括含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液和包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液,其特征在于:所述的免疫反应试剂还包括含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液,该碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体由碱性磷酸酶与促黄体生成激素抗体通过 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯和 2-亚氨基硫烷盐酸盐连接构成,所述的含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液的 pH 为 7~9,其中碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的浓度为 0.5~1 μg/ml;

所述的包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与抗荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下,室温反应 2~18 小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得,其中所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 0.5~2 μm,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于 0.4mmol;所述的抗荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,纯度大于等于 90wt%,稀释效价大于 1:100 万。

2. 根据权利要求 1 所述的促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:所述的含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液的 pH 为 7~9,其中的荧光素标记的促黄体生成激素抗体的浓度为 0.5~1 μg/ml。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:所述包被有抗荧光素抗体的磁微粒中,抗荧光素抗体与磁微粒之间相化学偶联。

4. 一种如权利要求 1~3 中任一项权利要求所述的促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液、所述含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液以及所述包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的步骤,其特征在于:所述含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液的制备过程如下:

①取促黄体生成激素抗体的磷酸盐缓冲液,加入 2-亚氨基硫烷盐酸盐,在室温下静置反应 15~25min,加入甘氨酸溶液,室温静置 3~10min,通过 G-25 凝胶柱除盐,收集活化的促黄体生成激素抗体,2~8℃下保存备用;

②取碱性磷酸酶的磷酸盐缓冲液,加入 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯,室温静置反应 25~35min,通过 G-25 凝胶柱除盐,收集活化的碱性磷酸酶,2~8℃下保存备用;

③将步骤①所得活化的促黄体生成激素抗体与步骤②所得活化的碱性磷酸酶按照促黄体生成激素抗体与碱性磷酸酶的分子比为 1:1~2 的比例混合,在 2~8℃下静置 12~24h,通过 Supperdex200 凝胶纯化柱进行纯化,纯化的溶液选择具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH 值,即得所述含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液;

所述的包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与抗荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下,室温反应 2~18 小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得,其中所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 0.5~2 μm,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于 0.4mmol;所述的抗荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,纯度大于等于 90wt%,稀释效价大于

1:100 万。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述的促黄体生成激素抗体、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于 95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过 1000u/mg。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的制备方法,其特征在于:步骤②中,碱性磷酸酶的磷酸盐缓冲液中碱性磷酸酶的浓度为 5 ~ 10mg/ml。

7. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述的含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液的制备方法如下:配制含有荧光素的 pH 为 9 ~ 10 的缓冲液,然后按照荧光素与抗促黄体生成激素抗体的分子比为 20 ~ 200:1 的比例,将所述含有荧光素的 pH 为 9 ~ 10 的缓冲液与抗促黄体生成激素抗体的 pH 为 9 ~ 10 的缓冲液混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去游离的荧光素,得到含有荧光素标记的抗促黄体生成激素抗体的溶液,接着用具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH,即得。

8. 根据权利要求 4 或 7 所述的制备方法,其特征在于:所述的具有适当 pH 值的缓冲液为含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

一种促黄体生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种结合了免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术的促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。本发明还特别涉及该试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 促黄体生成激素(Luteinizing Hormone, LH)是由垂体前叶嗜碱细胞分泌产生的一种糖蛋白激素,分子量约为 30,000 道尔顿,由两个非共价结合的不同亚单位组成。其 α 亚单位有 92 个氨基酸残基,与 LH、TSH、hCG 的相同。 β 亚单位的氨基酸序列与 LH、TSH 有很大的不同,但又与 hCG 的很相似。

[0003] LH受下丘脑产生的促性腺激素释放激素(Gn-RH)的调控。对正常妇女的研究表明垂体分泌 LH分为两个相,即在基础分泌相的同时约每 2 个小时呈现间歇性脉冲分泌。在女性正常月经周期中,LH 与 LH 协同作用引起卵巢的周期变化。2 者在月经周期中期出现的高峰会引起卵泡破裂,释放出成熟的卵子。残余的卵泡成为功能性黄体,分泌孕酮和雌二醇,这些类固醇对下丘脑和垂体施加正、负二种反馈调节从而影响 LH 的进一步分泌。至绝经期,卵巢功能减退,雌二醇的分泌减少直至最终结束。由于解除了施加在下丘脑上的负反馈使得循环中 LH 的水平显著增加。在男性体内,LH 促进睾丸间质细胞生成的睾酮。并同样与 LH 一起协调维持输精管中的精子生成。睾丸类固醇激素通过对下丘脑和垂体应答 Gn-RH 的负反馈作用来调节循环中的 LH 水平。垂体机能障碍引起的垂体机能减退能引起 LH 水平下降而导致不育。在给服 Gn-RH 后,测定血清 LH 含量可以有效判断垂体的功能状态。另有一种动态功能试验是给闭经妇女服用雌二醇,通过测定 LH 含量来预测患者对克罗米酚治疗的反应性。LH 与 LH 联合检测,在女性主要鉴别原发性(卵巢性)或继发性(垂体性)闭经;在男性用于鉴别原发性或继发性睾丸功能低下;同时可鉴别青春期前儿童真性或假性早熟。在月经周期 LH 的释放高峰与卵巢排卵有着密切关系,LH 高峰一经出现,预示 24-36 小时卵巢排卵,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。

[0004] 目前用于促黄体生成激素(LH)的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法等。酶联免疫分析法存在灵敏度低,线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析技术因其有上述诸多有点得到了广泛的应用。

[0005] 然而,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。磁微粒免疫检测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和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,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

胞或其他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。

[0006] 中国发明专利公开中国发明专利公开 CN101614742A 公开了一种促黄体生成激素的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒,该试剂盒包括促黄体生成激素系列校准品,抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液,异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体,化学发光底物液,浓缩洗涤液。该试剂盒中抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体包被的磁微粒溶液、异硫氰酸荧光素标记的促黄体生成激素抗体以及辣根过氧化物酶标记的促黄体生成激素单克隆抗体构成免疫反应步骤用的免疫反应试剂。该试剂盒虽然能够实现快速、准确地检测,但是其中,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过程非常繁琐,工艺稳定性不好,且标记率低,限制其检测效果特别是分析间精密度和导致成本增加。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒,其能够以较低的成本制备得到,且能够实现促黄体生成激素准确和高精确地定量测定。

[0008] 本发明同时还提供一种促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,该方法工艺稳定,成本低,且所得试剂盒的精密度特别是分析间精密度高。

[0009] 为解决以上技术问题,本发明采取的一种技术方案是:

[0010] 一种促黄体生成激素(LH)的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其包括用于免疫反应步骤的免疫反应试剂,该免疫反应试剂包括含有荧光素(FITC)标记的促黄体生成激素抗体的溶液(简称第一试剂)和包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液(简称磁分离试剂),特别是,所述的免疫反应试剂还包括含有碱性磷酸酶(ALP)标记的促黄体生成激素抗体的溶液(简称第二试剂),该碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体由碱性磷酸酶与促黄体生成激素抗体通过 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)和 2-亚氨基硫烷盐酸盐(2IT)连接构成。

[0011] 进一步地,所述的含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液的 pH 为 7~9,其中的荧光素标记的促黄体生成激素抗体的浓度为 $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 。所述的含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液的 pH 为 7~9,其中碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的浓度为 $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 。

[0012] 根据本发明,所述的含有荧光素标记的抗促黄体生成激素抗体能够通过成熟和稳定的工艺容易地制备。

[0013] 根据本发明,所述包被有抗荧光素抗体的磁微粒的制备也是较为容易的,且现有技术已有成熟的制备工艺可以参照。例如可以通过常规的物理吸附或化学偶联包被方式制备,没有特别限制。作为本发明的一种优选实施方案:该包被有抗荧光素抗体的磁微粒中,抗荧光素抗体与磁微粒之间相化学偶联。所述包被有抗荧光素抗体的磁微粒中,抗荧光素抗体与磁微粒之间相化学偶联。

[0014] 本领域技术人员应知晓,本发明的试剂盒还可以进一步包括有其它检测所需的试剂,例如底物溶液。但是诸如底物溶液等其它试剂可以另行购买或配制,因此,虽然试剂盒

中可以包括这些试剂,但它们对于本发明试剂盒来说并非必不可少。

[0015] 本发明采取的又一技术方案是:一种上述的促黄体生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液、所述含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液以及包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的步骤,其中:所述含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液的制备过程如下:

[0016] ①取促黄体生成激素抗体的磷酸盐缓冲液,加入 2IT,在室温下静置反应 15~25min,加入甘氨酸溶液,室温静置 3~10min,通过 G-25 凝胶柱除盐,收集活化的促黄体生成激素抗体,2~8℃下保存备用;

[0017] ②取碱性磷酸酶的磷酸盐缓冲液,加入 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯,室温静置反应 25~35min,通过 G-25 凝胶柱除盐,收集活化的碱性磷酸酶,2~8℃下保存备用;

[0018] ③将步骤①所得活化的促黄体生成激素抗体与步骤②所得活化的碱性磷酸酶按照促黄体生成激素抗体与碱性磷酸酶的分子比为 1:1~2 的比例混合,在 2~8℃下静置 12~24h,通过 Supperdex200 凝胶纯化柱进行纯化,纯化的溶液选择具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH 值,即得所述含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液。

[0019] 优选地,所述的促黄体生成激素抗体、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于 95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过 1000u/mg。

[0020] 优选地,步骤②中,碱性磷酸酶的磷酸盐缓冲液中碱性磷酸酶的浓度为 5~10mg/mL。

[0021] 进一步地,所述的含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液的制备方法如下:配制含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液,然后按照荧光素与抗促黄体生成激素抗体的分子比为 20~200:1 的比例,将所述含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液与抗促黄体生成激素抗体的 pH 为 9~10 的缓冲液混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去游离的荧光素,得到含有荧光素标记的抗促黄体生成激素抗体的溶液,接着用具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH,即得。其中适当 pH 值的缓冲液可以为例如含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

[0022] 进一步地,所述的包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与抗荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下,室温反应 2~18 小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得,其中所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 0.5~2 μm,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于 0.4mmol;所述的抗荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,纯度大于等于 90wt%,稀释效价大于 1:100 万。其中适当 pH 值的缓冲液可以为例如含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

[0023] 优选地,上述的具有适当 pH 值的缓冲液为含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

[0024] 本发明所述的荧光素可以是已知的各种荧光素,常用的有例如异硫氰酸荧光素,四乙基罗丹明,四甲基异硫氰酸罗丹明等。

[0025] 本发明的试剂盒应用于化学发光免疫检测时的步骤与传统的检测方法一样,即包

括依次进行的免疫反应步骤、使用磁分离及洗涤设备对免疫反应的反应液进行洗涤的步骤以及向洗涤后的反应液内加入底物溶液并利用化学发光检测仪检测发光强度的步骤。

[0026] 优选地,所述的免疫反应步骤具体实施如下:在检测样管中加入例如 $10\sim 30\ \mu\text{l}$ 待测样本原液或稀释液,然后依次加入 $30\sim 100\ \mu\text{l}$ 含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液、 $30\sim 100\ \mu\text{l}$ 含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液,混匀,在 $25\sim 40^\circ\text{C}$ 下进行第一次温育,然后加入 $30\sim 100\ \mu\text{l}$ 包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液,混匀,在 $25\sim 40^\circ\text{C}$ 下进行第二次温育;所述的底物溶液为碱性磷酸酶化学发光底物溶液。

[0027] 进一步地,所述第一次温育的时间可以为 $10\sim 20\text{min}$,通常为 15min ;第二次温育的时间可以为 $3\sim 15\text{min}$,通常为 5min 。

[0028] 上述的使用磁分离及洗涤设备对免疫反应的反应液进行洗涤的步骤以及向洗涤后的反应液内加入底物溶液并利用化学发光检测仪检测发光强度的步骤均可参照常规方法实施,所用的设备以及装置也是常规的。其中,碱性磷酸酶化学发光底物溶液对于本领域人员来说也是已知的,可商购获得。

[0029] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0030] 1. 申请人发现,采取 SMCC 和 2IT 来进行碱性磷酸酶和促黄体生成激素抗体的偶联时,具有和其它方法相比更高的偶联效率,在降低制备成本的同时,有利于提高检测效果。因此,本发明的试剂盒中的三种试剂均可以通过稳定的制备工艺制备得到,生产成本低,且由于制备工艺的稳定性,试剂盒分析批间差小,检测的分析间精密度提高;

[0031] 2. 本发明的试剂盒中的含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液的制备方法,能够有效将促黄体生成激素抗体与碱性磷酸酶偶联,偶联效率高,进一步降低试剂盒的成本和确保试剂盒的检测效果。

[0032] 3、采取本发明的试剂盒进行检测,准确度好,精密度高,灵敏度高,检测范围宽,样品无序预稀释,操作简单省时。与采用进口试剂盒进行检测的方法相比,本发明的检测方法在成本上具有显著的优势。

附图说明

[0033] 图 1 为测试校准品标准曲线;

[0034] 图 2 为灵敏度评价拟合曲线;

[0035] 图 3 为血清样本检测结果相关性(其中横坐标 x 为实施例 4 制备得的试剂盒样本测值,浓度单位为 mIU/mL ,纵坐标 y 为贝克曼公司试剂盒样本测值,浓度单位为 mIU/mL)。

具体实施方式

[0036] 为描述方便,下文中,用第一试剂、第二试剂以及磁分离试剂分别代表本发明中的含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液、含有碱性磷酸酶(ALP)标记的促黄体生成激素抗体的溶液和包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。

[0037] 实施例 1 第一试剂的制备

[0038] (1) 材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的抗 LH 单克隆抗体(纯度超过 $95\text{wt}\%$,浓度为 2mg/mL ,下称 LH 抗体);异硫氰酸荧光素(FITC),碳酸氢钠等试剂应达到化学纯;G-25 凝胶纯化柱采购自 GE 公司。

[0039] (2) 制备步骤：

[0040] ①用 0.1~0.2mol/L pH9.0~10.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/mL 的 FITC 溶液；

[0041] ②按照 LH 抗体与 FITC 分子比为 1:20 的比例在抗体溶液中加入步骤①所配 FITC 溶液，混合均匀，室温静置 12h 小时，反应生成 LH 抗体-FITC 连接物；

[0042] ③将经过步骤②的反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离，除去未反应的 FITC，得到含有 LH 抗体-FITC 连接物(即 FITC 标记的 LH 抗体)的溶液；

[0043] ④将步骤③所得含有 LH 抗体-FITC 连接物的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 LH 抗体-FITC 连接物浓度为 0.5~1 μg/mL, pH 为 7~9, 即为第一试剂。

[0044] 实施例 2 第二试剂的制备

[0045] (1) 材料与仪器：以磷酸盐缓冲液保存的抗 LH 单克隆抗体(纯度超过 95wt%，浓度为 2mg/mL，下称 LH 抗体溶液)；以磷酸缓冲液保存的碱性磷酸酶(ALP 溶液，ALP 纯度为约 99%，比活性为约 1500U/mg，浓度为 10mg/mL)；5mg/mL SMCC 溶液、10mg/mL 2IT 溶液(SMCC 和 2IT 固体粉末，用 DMF 配成上述溶液使用)(购自 THERMO 公司)；TRIS 等化学试剂应达到化学纯；G-25 凝胶纯化柱、AKTA-purifier100 蛋白纯化仪和 Superdex200 凝胶纯化柱均为 GE 公司产品。

[0046] (2) 制备步骤：

[0047] ①取 1mg LH 抗体溶液，加 10mg/mL 的 2IT 溶液 2~4 μl，室温静置 20min，加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μl，室温静置 5min。用 G-25 凝胶柱除盐，收集活化的抗体，2-8℃ 保存备用；

[0048] ②取 1.5mg ALP 溶液，加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10~20 μl，室温静置 30min，用 G-25 凝胶柱除盐，收集活化的 ALP 抗体，2-8℃ 保存备用；

[0049] ③将上述活化的 LH 抗体与活化的 ALP 抗体混合，2-8℃ 条件下静置 12~24h，通过 Superdex200 凝胶纯化柱进行纯化，获得含有抗体 LH-ALP 连接物(ALP 标记的 LH 抗体)的溶液，2-8℃ 保存备用；

[0050] ④将抗体 LH-ALP 连接物的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5~1 μg/mL, pH7~9, 即为第二试剂。

[0051] 实施例 3 磁分离试剂的制备

[0052] (1) 材料与仪器：

[0053] 磁微粒的悬浮液：磁微粒含量 5wt%，磁微粒含羧基(COOH)活性集团，每克(g)磁微粒(干重)羧基含量不低于 0.4 毫摩尔(mmol)，具有超顺磁性，直径在 0.5-2 μm 之间；

[0054] 抗 FITC 抗体：可以是多克隆抗体，也可以是单克隆抗体，纯度为 90wt% 以上，稀释效价超过 1:100 万；

[0055] 2- 吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS 和其他试剂应达到化学纯。

[0056] (2) 制备步骤：

[0057] ①取 100mg 磁微粒的悬浮液，磁分离去上清，用 0.05mol/L, pH4.5~5MES 缓冲液 10mL 重悬；

[0058] ②加入 2~4mg 的抗 FITC 抗体，室温混悬 30~60min；

[0059] ③加入 0.5~1mL 新鲜配制的 10mg/mL 的 EDC 水溶液，室温混悬 2~12h；

[0060] ④磁分离,去上清,用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液重悬到 1mg/mL, pH8.0,即为磁分离试剂。

[0061] 实施例 4 促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒

[0062] 该试剂盒包括:

[0063] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 0.75 μ g/mL),50mL;

[0064] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 0.75 μ g/mL),50mL;

[0065] 按照实施例 3 方法制备的磁力分离试剂 50mL。

[0066] 实施例 5 促黄体生成激素的化学发光免疫分析试剂盒

[0067] 该试剂盒包括:

[0068] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 0.5 μ g/mL),5mL;

[0069] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 0.5 μ g/mL),5mL;

[0070] 按照实施例 3 方法制备的磁力分离试剂 5mL。

[0071] 实施例 6 采取实施例 4 的试剂盒进行促黄体生成激素的定量检测

[0072] (1) 检测步骤:

[0073] ①免疫反应:在检测管中加入 20 μ l 待测样本(血清)原液,然后加入 50 μ l 第一试剂,50 μ l 第二试剂,混匀,37 \pm 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 15min;加入 50 μ l 磁分离试剂,混匀,37 \pm 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 5min;

[0074] ②洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入 300 μ l 的清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清。此步骤重复 3 次;

[0075] ③加底物溶液检测发光强度:在检测管中加入 100 μ l 碱性磷酸酶化学发光底物溶液(北京阿匹斯生物技术有限公司 APCL- I),震荡使磁微粒充分混悬,在 5 分钟内用发光检测仪(MAGLIA60)进行检测,检测单位时间内发光强度。结果计算参阅仪器的相关说明。

[0076] (2) 绘制校准品标准曲线

[0077] 校准品标准曲线参见图 1。

[0078] (3) 灵敏度评价

[0079] 检测“0”浓度样本,重复检测 20 次,计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD),并计算 M-2SD 值,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程,将 M+2SD 值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。本方法的灵敏度不大于 0.5mIU/mL。其中:A 点发光值参见表 1:

[0080] 表 1

[0081]

LH-STD-A(RLU)			
1735	1721	1749	1694
1729	1705	1725	1689
1740	1693	1699	1683
1725	1726	1744	1688
1758	1730	1757	1695

[0082] A 点发光均值 $X=1719$

[0083] $SD=24.3$

[0084] $X+2SD=1767.7$

[0085] B 点发光值参见表 2。

[0086] B 点发光均值 $X=56478$

[0087] 表 2

[0088]

LH-STD-B(RLU)
56470
56486

[0089] A, B 点连点拟合曲线参见图 2。灵敏度 $=0.002\text{mIU/mL}$ 。

[0090] (4) 精密度评价

[0091] ①分析内精密度

[0092] 将实施例 4 的试剂盒一批, 分别测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定, 结果参见表 3, 得出批内变异系数为 2.95% ~ 6.55%。

[0093] 表 3 分析内精密度测试

[0094]

测定血清浓度(mIU/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
12.20	10	6.55
75.25	10	3.43
120.36	10	2.95

[0095] ②分析间精密度

[0096] 将实施例 4 的试剂盒取三批, 每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定。每份血清得到 30 个浓度测值, 参见表 4, 统计分析间变异系数, 为 4.70% ~ 6.95%。

[0097] 表 4 分析间精密度测试

[0098]

测定血清浓度(mIU/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
12.20	30	6.95
75.25	30	4.70
120.36	30	5.15

[0099] (5) 准确度评价

[0100] 在 2 例混合血清样本中添加不同量人 LH 标准品, 形成 3 个浓度水平的血清添加样本, 添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度, 按下述公式计算回收率。本方法血清基质回收率在 90-110% 之间。数据参见表 5。

$$[0101] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0102] R: 回收率;

[0103] V: 加入标准溶液的体积;

[0104] V_0 : 人源样品的体积;

[0105] C: 人源样品加入标准溶液后的检测浓度;

[0106] C_0 : 人源样品的检测浓度;

[0107] Cs :标准溶液的浓度。

[0108] 表 5 准确度评价—添加回收实验数据

[0109]

样品浓度 (mIU/ml)	添加浓度 (mIU/ml)	添加后终浓度 (mIU/ml)	测定平均值 (mIU/ml)	回收率(%)
7.69	10	17.69	17.98	102.9%
	40	47.69	46.66	97.4%
	120	127.69	125.14	97.9%
12.36	10	22.36	22.20	98.4%
	40	52.36	51.20	97.1%
	120	132.36	132.95	100.5%

[0110] (6) 试剂盒特异性评价

[0111] 对试剂盒特异性检验是选取与 LH 有类似结构的促卵泡生成激素(FSH)、

[0112] 促甲状腺激素(TSH)、绒毛膜促性腺激素(HCG),配制成大于生理浓度的样本,以本方法进行测定。结果见表 6,本法与 FSH、TSH、HCG 无交叉反应。

[0113] 表 6 特异性实验

[0114]

交叉反应物	实验浓度 (mIU/ml)	LH 测定浓度 (mIU/ml)
促卵泡生成激素 (FSH)	100	< 0.5
促甲状腺激素 (TSH)	500	< 0.5
绒毛膜促性腺激素 (HCG)	500	< 0.5

[0115] (7) 相关性评价

[0116] 用实施例 4 的试剂盒和贝克曼公司的化学发光试剂盒对 100 份人血清样品同时进行检测。其检测结果参见附图 3,以本发明方法的测的血清 LH 浓度为横坐标,以贝克曼公司试剂盒测定的结果为纵坐标作回归分析,相关方程为: $y = -0.07655 + 0.9988x$, 相关系数为: 0.9831。经统计学处理结果表明,本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0117] (8) 热稳定性评价

[0118] 对试剂盒分别进行 4℃ 12 个月和 37℃ 7 天的稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达 12 个月。

[0119] 实施例 7 采取实施例 5 的试剂盒进行促黄体生成激素的定量检测

[0120] (1) 检测步骤:同实施例 6。

[0121] (2) 灵敏度评价:该实施例中的试剂盒灵敏度为 0.002mIU/mL,达到国内外同类试

剂领先水平,较好的满足临床应用。

[0122] (3) 精密度评价 :该实施例中的试剂盒分析内和分析见精密度均小于 10%,批间差小。

[0123] (4) 准确性评价 :该实施例中的试剂盒血清添加回收率在 90-110% 之间,临床应用测值准确性可靠。

[0124] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

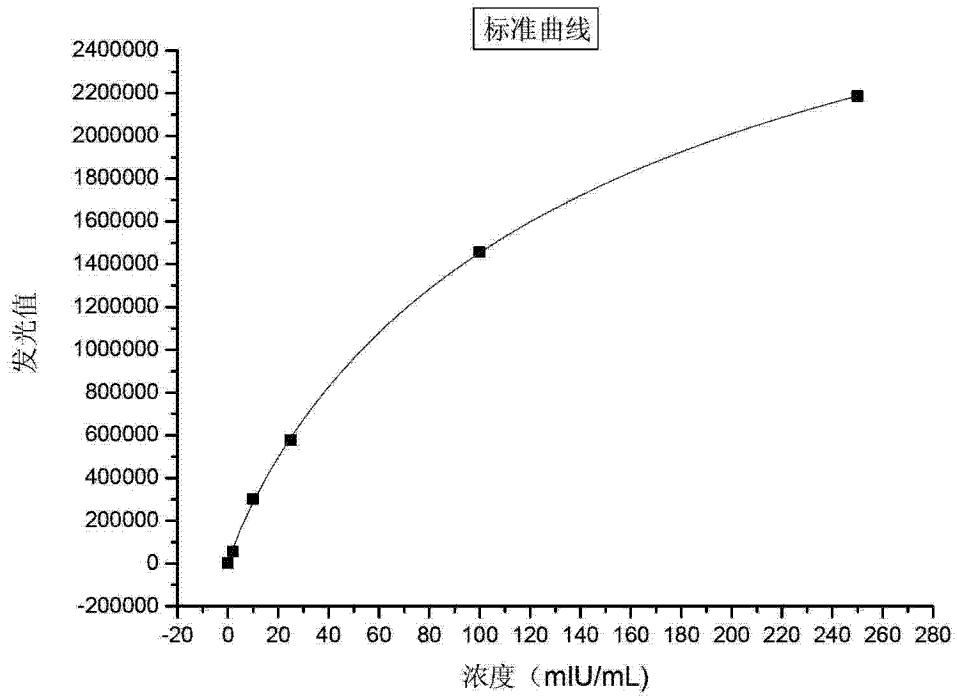


图 1

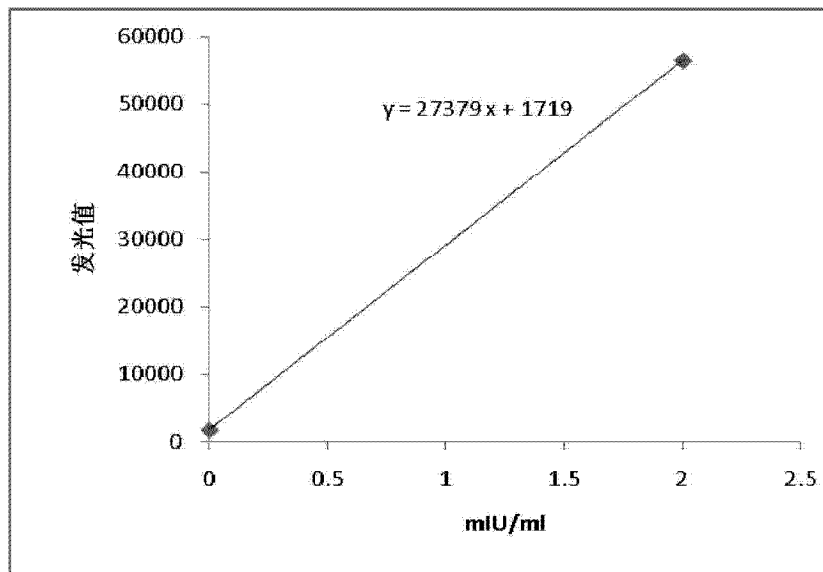


图 2

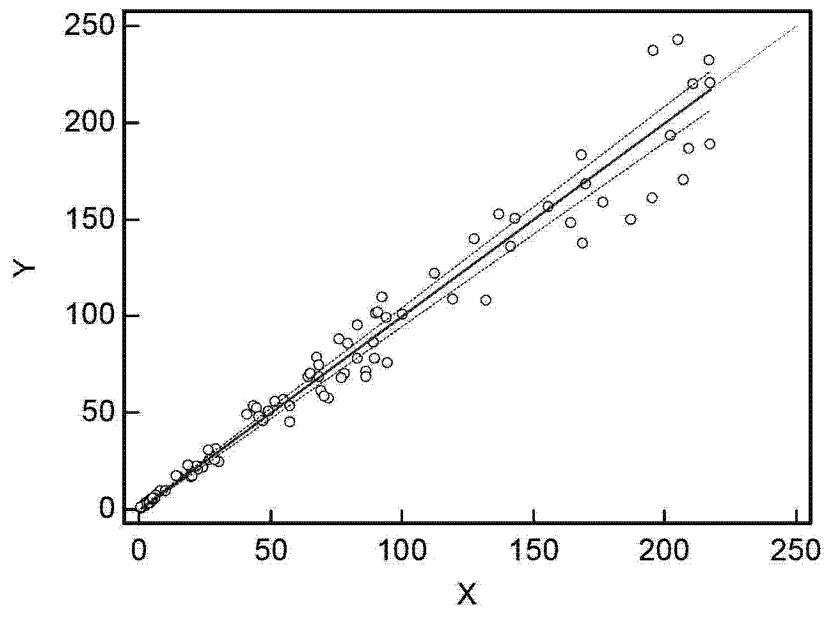


图 3

专利名称(译)	一种促黄体生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN103048446B	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	CN201210571305.9	申请日	2012-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	于大为 程晓蕾 李冬冬		
发明人	于大为 程晓蕾 李冬冬		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/76		
代理人(译)	汪青		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN103048446A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种促黄体生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法，试剂盒包括含有荧光素标记的促黄体生成激素抗体的溶液、包被有抗荧光素抗体的磁微粒的悬浮液，以及含有碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体的溶液，该碱性磷酸酶标记的促黄体生成激素抗体由碱性磷酸酶与促黄体生成激素抗体通过 SMCC 和 2IT 连接构成。本发明使得能够以更低成本和更高准确度和精密度对促黄体生成激素进行定量检测。

