



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108982880 A

(43)申请公布日 2018.12.11

(21)申请号 201810550556.6

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 湖南远璟生物技术有限公司

地址 410154 湖南省长沙市开福区沙坪街  
道中青路1048号山河医药健康产业园  
4栋6楼

(72)发明人 李明勇 姜雪莲 黄金浪 张玲  
胡洁 黄伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

### (54)发明名称

一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

### (57)摘要

本发明涉及一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括:链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物,生物素标记的睾酮抗体,测试稀释液,睾酮校准品,睾酮质控品。本发明的试剂盒与现有试剂盒相比,制备工艺更简单,成本更低,检测范围宽,稳定性好。

1. 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:它包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物,生物素标记的睾酮抗体,测试稀释液,睾酮校准品,睾酮质控品。

2. 根据权利要求1所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁颗粒悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的磁微粒悬浮液,所述磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液;

所述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物为碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物,其中睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和睾酮的化学合成物质;

所述生物素标记的睾酮抗体为生物素和睾酮抗体的偶联物,其中睾酮抗体为小鼠单克隆抗体;

所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,所述解离剂为2-甲氧基雌二醇,所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液;所述睾酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液;所述睾酮质控品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液。

3. 根据权利要求2所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁颗粒悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的磁微粒悬浮液,所述四氧化三铁颗粒的粒径为1 $\mu$ m~1.5 $\mu$ m,所述磁微粒悬浮液浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL;所述磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM 三羟甲基氨基甲烷缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为100mM,优选的PH为7.0。

4. 根据权利要求2所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物为稀释于酶标记物缓冲液中的碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物,其中睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和睾酮的化学合成物质;所述碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物稀释于酶标记物缓冲液中的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;所述酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

5. 根据权利要求2所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述生物素标记的睾酮抗体为稀释于生物素标记物缓冲液中的生物素和睾酮抗体的偶联物,所述生物素和睾酮抗体的偶联物稀释于生物素标记物缓冲液中的稀释比例为1:200~1:1000,优选的稀释比例为1:500;所述生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为8.0;所述睾酮抗体为小鼠单克隆抗体。

6. 根据权利要求2所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为2-甲氧基雌二醇,所述测试稀释液的浓度范围为0.01%~1%,优选的浓度为0.1%;所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;

所述睾酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,所述校准品缓冲液为 Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0;所述睾酮校准品的浓度分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/

mL;

所述睾酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液;所述质控品缓冲液为 Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;所述睾酮质控品的浓度分别为0.5,15.0ng/mL。

7. 根据权利要求2所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 和睾酮的化学合成物质。

8. 根据权利要求2所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述睾酮衍生物是通过以下工艺步骤制备的:

S1. 睾酮琥珀酸酯的制备:将睾酮加入到二氯甲烷琥珀酸酐中,再加入4-二甲氨基吡啶,在油浴中回流4-6小时,冷却至室温后,冰浴降温至有结晶析出,然后用乙醇重结晶,得到白色片状结晶睾酮琥珀酸酯;

S2. N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与睾酮合成物的制备:取步骤S1制备的睾酮琥珀酸酯溶解于磷酸盐溶液中,加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC),避光条件下2~8℃进行反应,过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与睾酮合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与睾酮合成物,即得睾酮衍生物。

9. 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,其特征在于,它包括:

(1) 碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入睾酮衍生物 (T-NHS),在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化酶标抗体,得到睾酮酶结合物,然后将睾酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:400~1:2000;其中,所述酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0;

(2) 生物素标记的睾酮抗体制备方法:将睾酮抗体 (小鼠单克隆抗体) 加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入生物素衍生物,在温度为4℃~37℃反应0.5~24小时后,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化生物素标记抗体,得到睾酮生物素结合物,再将睾酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:200~1:1000;所述生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0;

(3) 测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液 (PH7.4) 将2甲基雌二醇稀释至工作浓度为0.1%;

(4) 睾酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL;

(5) 睾酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0.5, 15.0ng/mL;

(6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物、生物素标记的睾酮抗体、测试稀释液、睾酮校准品、睾酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

10. 根据权利要求9所述的一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,其特征在于,它包括:

(1) 碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0)

中,加入睾酮衍生物(T-NHS),37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到睾酮酶结合物,然后将睾酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:1000;其中,所述酶标记物缓冲液为20mM Tris缓冲液,优选的PH为7.4;

(2)生物素标记的睾酮抗体制备方法:将睾酮抗体(小鼠单克隆抗体)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到睾酮生物素结合物,将睾酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:500;所述生物素标记物缓冲液为20mM Tris缓冲液,PH为8.0;

(3)测试稀释液的制备方法:用PH为7.4的20mM Tris缓冲液将2甲基雌二醇稀释至工作浓度为0.1%;

(4)睾酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL;

(5)睾酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0.5, 15.0ng/mL;

(6)组装:将上述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物、生物素标记的睾酮抗体、测试稀释液、睾酮校准品、睾酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

## 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及检测血清中睾酮 T 含量的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 睾酮含量过高或过低都会引起相应的疾病,因此检测睾酮浓度有助于评价性腺及机体机能的状态。

[0003] 睾酮(T)是含19个碳原子的类固醇激素,血液循环中的雄性激素主要是睾酮。因为睾酮的可溶性较小,在血液中的游离睾酮约占2%。约60%的睾酮与肝脏合成的性激素结合球蛋白(SHBG)结合,由于结合力较强,这种结合态睾酮无生物活性。睾酮最主要的生理作用是促进男性性器官的发育和成熟并维持第二性征,在代谢方面,睾酮可促进肌肉的增长和蛋白的合成,同时抑制糖皮质激素引起的蛋白分解。在男性体内,睾酮主要由睾丸大量合成;而男性和女性的肾上腺都可合成部分睾酮;另外,女性的卵巢也可分泌少量的睾酮。很多情况下都会对男性、女性和儿童进行睾酮检测。男孩出现青春期延迟或发育迟缓,常同时测定睾酮、FSH和LH。判断青少年男性性早熟也需要检测睾酮,睾酮升高引起的男性性早熟原因常包括各种肿瘤和先天性肾上腺肥大。成年男性检测睾酮,常是在怀疑不育症、性功能下降和勃起障碍疾病的情况下。在女性,出现不规则月经或无月经,不孕症或者男性化特征如多毛症、声音低沉等,常要检测睾酮。睾酮升高的肿瘤主要发生在卵巢或肾上腺,其他还有多囊卵巢综合征(POCS)。

[0004] 用于体内睾酮测定的主要方法有放射免疫分析法、酶联免疫吸附分析法、化学发光免疫分析法等。目前常用的放射免疫分析法(RIA)是用 $I^{125}$ 标记睾酮半抗原来实现的,其合成工艺复杂,有效期短,对环境有一定污染,影响检测结果的因素较多。近几年来,化学发光免疫分析技术发展迅速,灵敏度、特异性以及自动化程度均达到或超过了RIA水平,特别是标记物的稳定性和不污染环境是RIA法无法比拟的。

[0005] 目前各大中型医院均进口了全自动化学发光免疫分析系统,但是仪器和试剂价格昂贵。

[0006] 目前已有多件磁微粒化学发光方法检测睾酮的专利申请,如申请号(200510017943)的专利申请是化学发光板的方法,板间差异较大;申请号(201110257888和201410091245)的专利申请使用的是异鲁米诺发光标记物标记睾酮抗体,检测灵敏度较低,稳定性较差。

### 发明内容

[0007] 本发明要解决的问题是提供睾酮的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了放射性免疫分析的试剂有效期短、存在放射性污染、操作繁琐等缺点,且解决了灵敏度低,稳定性差,成本高的缺陷。本发明公开了一种制备工艺简单、成本低廉、稳定性好的睾酮的化学发光免疫定量检测试剂盒以及制备方法。

[0008] 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物,生物素标记的睾酮抗体,测试稀释液,睾酮校准品,睾酮质控品。

[0009] 优选地,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁颗粒悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的磁微粒悬浮液,所述磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液;

所述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物为碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物,其中睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和睾酮的化学合成物质;

所述生物素标记的睾酮抗体为生物素和睾酮抗体的偶联物,其中睾酮抗体为小鼠单克隆抗体;所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,所述解离剂为2-甲氧基雌二醇,所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液;所述睾酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液;所述睾酮质控品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液。

[0010] 优选地,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁颗粒悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成的磁微粒悬浮液,所述四氧化三铁颗粒的粒径为1 $\mu$ m~1.5 $\mu$ m,所述磁微粒悬浮液浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL;所述磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM 三羟甲基氨基甲烷缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为100mM,优选的PH为7.0。

[0011] 优选地,所述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物为稀释于酶标记物缓冲液中的碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物,其中睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和睾酮的化学合成物质;所述碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物稀释于酶标记物缓冲液中的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;所述酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0012] 优选地,所述生物素标记的睾酮抗体为稀释于生物素标记物缓冲液中的生物素和睾酮抗体的偶联物,所述生物素和睾酮抗体的偶联物稀释于生物素标记物缓冲液中的稀释比例为1:200~1:1000,优选的稀释比例为1:500;所述生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为8.0;所述睾酮抗体为小鼠单克隆抗体。

[0013] 优选地,所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为2-甲氧基雌二醇,所述测试稀释液的浓度范围为0.01%~1%,优选的浓度为0.1%;所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;所述睾酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,所述校准品缓冲液为 Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0;所述睾酮校准品的浓度分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL;所述睾酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液;所述质控品缓冲液为 Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;所述睾酮质控品的浓度分别为0.5, 15.0ng/mL。

[0014] 进一步地,所述睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和睾酮的化学合成物质。

[0015] 所述睾酮衍生物是通过以下工艺步骤制备的:

S1. 睾酮琥珀酸酯的制备:将睾酮加入到二氯甲烷琥珀酸酐中,再加入4-二甲氨基吡啶,在油浴中回流4-6小时,冷却至室温后,冰浴降温至有结晶析出,然后用乙醇重结晶,得到白色片状结晶睾酮琥珀酸酯;

S2.N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与睾酮合成物的制备:取步骤S1制备的睾酮琥珀酸酯溶解于磷酸盐溶液中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),避光条件下2~8℃进行反应,过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与睾酮合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与睾酮合成物,即得睾酮衍生物。

[0016] 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,其特征在于,它包括以下步骤:

(1)碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入睾酮衍生物(T-NHS),在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到睾酮酶结合物,然后将睾酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:400~1:2000;其中,所述酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0。

[0017] (2)生物素标记的睾酮抗体制备方法:将睾酮抗体(小鼠单克隆抗体)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,在温度为4℃~37℃反应0.5~24小时后,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到睾酮生物素结合物,再将睾酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:200~1:1000;所述生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0。

[0018] (3)测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液(PH7.4)将2甲基雌二醇稀释至工作浓度为0.1%。

[0019] (4)睾酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL。

[0020] (5)睾酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0.5, 15.0ng/mL。

[0021] (6)组装:将上述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物、生物素标记的睾酮抗体、测试稀释液、睾酮校准品、睾酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0022] 优先地,一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,包括:

(1)碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入睾酮衍生物(T-NHS),37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到睾酮酶结合物,然后将睾酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:1000;其中,所述酶标记物缓冲液为20mM Tris缓冲液,优选的PH为7.4。

[0023] (2)生物素标记的睾酮抗体制备方法:将睾酮抗体(小鼠单克隆抗体)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,37℃反应4小时后,用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到睾酮生物素结合物,将睾酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:500。所述生物素标记物缓冲液为20mM Tris缓冲液,PH为8.0。

[0024] (3)测试稀释液的制备方法:用PH为7.4的20mM Tris缓冲液将2甲基雌二醇稀释至工作浓度为0.1%。

[0025] (4) 睾酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL。

[0026] (5) 睾酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0.5, 15.0ng/mL。

[0027] (6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物、生物素标记的睾酮抗体、测试稀释液、睾酮校准品、睾酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0028] 本发明涉及的试剂盒反应原理:以磁微粒子作为免疫反应的固相,利用化学发光免疫分析方法与化学发光类测定仪配合,用于测定人体血清/血浆中的睾酮含量。反应的技术原理为:待测样本、校准品或质控品中的睾酮与碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物竞争结合生物素标记的睾酮单克隆抗体,随后加入包被链霉亲和素的磁微粒,通过链霉亲和素与生物素结合使抗原抗体复合物连接在磁微粒上,在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的复合物与未结合的其它物质分离。清洗沉淀的复合物,加入酶促化学发光底物,底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,利用发光仪测定反应的发光强度。在测定范围内,发光强度与样本中的睾酮浓度成反比,使用改良的四参数Logistic方程拟合可定量测算出待测样本中睾酮浓度。

[0029] 本专利发明的睾酮磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,制备工艺简单、成本低廉、稳定性好,性能达到国外知名品牌试剂的同等水平。

[0030] 本专利发明的技术效果在于:

(1) 碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物制备方法采用的是睾酮衍生物(T-NHS)直接偶联进行磷酸酶,相比较其他专利或厂家用的是睾酮-BSA衍生物(T-6-CMO-BSA)或睾酮-OVA衍生物(T-6-CMO-OVA),该方法成本更低,工艺更简单,更可控。睾酮的大分子蛋白衍生物可能存在一定的位阻干扰,影响测试结果的准确性,而本发明涉及的睾酮衍生物(T-NHS)是与睾酮结构类似的小分子物质,有效避免的位阻干扰的问题。

[0031] (2) 生物素标记抗体的制备方法采用经过活化的生物素直接与抗体进行偶联,无需添加EDC\NHS等偶联剂,工艺更简单,成本更低。

## 具体实施方式

[0032] 下面结合实例进一步说明本发明,本发明的优点和特点将被描述的更清楚。但是,应该可以理解,本实例仅仅是本发明的一种范例,并不会对本发明的范围做任何限制。

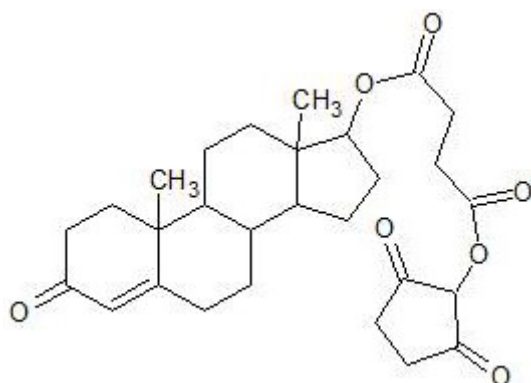
[0033] 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物,生物素标记的睾酮抗体,测试稀释液,睾酮校准品,睾酮质控品。

[0034] 本发明涉及的链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁,粒径为1 $\mu$ m~1.5 $\mu$ m,悬浮于磁微粒包被物缓冲液中,浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL,优选的浓度为0.5mg/mL;磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为100mM,优选的PH为7.0。

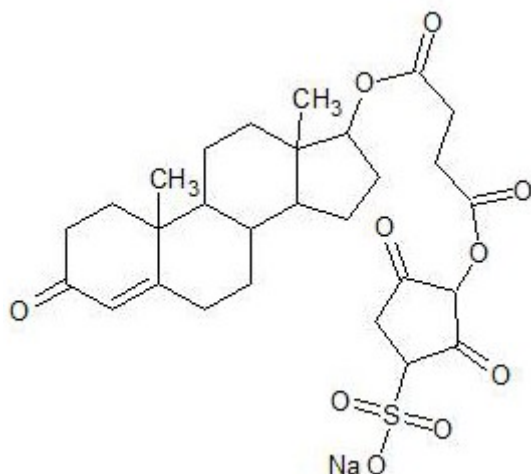
[0035] 本发明涉及的碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物为碱性磷酸酶和睾酮衍生物的偶联物,其中睾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和睾酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和睾酮的化学合成物质。稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:

400~1:2000, 优选的稀释比例为1:1000; 酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为7.4。

[0036] 本发明涉及的甾酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和甾酮的化学合成物质, 其化学结构式为:



或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 和甾酮的化学合成物质, 其化学结构式为:



本发明涉及的甾酮衍生物的制备工艺:

(1) 甾酮琥珀酸酯的制备: 取甾酮 (采购自Sigma公司) 5.0g 于200mL二氯甲烷、50mL琥珀酸酐中, 加入4-二甲氨基吡啶500mg, 在油浴中回流5小时, 冷却至室温后, 冰浴降温2小时有结晶析出, 用乙醇重结晶, 得到白色片状结晶甾酮琥珀酸酯4.2g。

[0037] (2) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与甾酮合成物的制备: 取3.5g的甾酮琥珀酸酯溶解于50mM 磷酸盐溶液 (PH8.0) 中, 加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 100mg 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 200mg, 避光条件下2~8℃反应12h, 过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与甾酮合成物的洗脱液, 浓缩后, 用无水乙醇重结晶, 得到白色针状结晶N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与甾酮合成物890mg, 即得T-NHS。

[0038] 本发明涉及生物素标记的甾酮抗体为生物素和甾酮抗体的偶联物, 其中甾酮抗体为小鼠单克隆抗体。稀释于生物素标记物缓冲液中, 稀释比例为1:200~1:1000, 优选的稀释比例为1:500; 生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为8.0。

[0039] 本发明涉及的测试稀释液为含有解离剂的缓冲液, 其中解离剂主要成分为2甲氧基雌二醇, 浓度范围为0.01%~1%, 优选的浓度为0.1%; 缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,

PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0040] 本发明涉及的睾酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL;校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0041] 本发明涉及的睾酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液,将睾酮纯品稀释至工作浓度,分别为0.5, 15.0ng/mL;质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0042] 实施例1

一、一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒试剂盒的制备:

(1)磁微粒包被物缓冲液制备:

| 物料         | 用量     |
|------------|--------|
| 三羟甲基氨基甲烷   | 2.42g  |
| 氯化钠        | 18.00g |
| Tween-20   | 0.50g  |
| 牛血清白蛋白     | 10.00g |
| Proclin300 | 1.00g  |

将上述物料加入1000mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 $7.00 \pm 0.10$ 。

[0043] (2)酶标记物缓冲液制备:

| 物料         | 用量     |
|------------|--------|
| 三羟甲基氨基甲烷   | 2.42g  |
| 氯化钠        | 18.00g |
| Tween-20   | 1.00g  |
| 牛血清白蛋白     | 10.00g |
| Proclin300 | 1.00g  |

将上述物料加入1000mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 $7.40 \pm 0.10$ 。

[0044] (3)生物素标记物缓冲液制备:

| 物料         | 用量     |
|------------|--------|
| 三羟甲基氨基甲烷   | 2.42g  |
| 氯化钠        | 4.50g  |
| Tween-20   | 1.00g  |
| 牛血清白蛋白     | 10.00g |
| Proclin300 | 1.00g  |

将上述物料加入1000mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 $8.00 \pm 0.10$ 。

[0045] (4)测试稀释液制备:

| 物料       | 用量     |
|----------|--------|
| 三羟甲基氨基甲烷 | 2.42g  |
| 氯化钠      | 4.50g  |
| Tween-20 | 1.00g  |
| 牛血清白蛋白   | 10.00g |

|            |       |
|------------|-------|
| Proclin300 | 1.00g |
| 2甲基雌二醇     | 1.00g |

将上述物料加入1000mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 $7.40 \pm 0.10$ 。

[0046] (5) 校准品缓冲液制备:

| 物料         | 用量     |
|------------|--------|
| 三羟甲基氨基甲烷   | 2.42g  |
| 氯化钠        | 18.00g |
| Tween-20   | 1.00g  |
| 胎牛血清       | 200mL  |
| Proclin300 | 1.00g  |

将上述物料加入800mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 $7.40 \pm 0.10$ 。

[0047] (6) 质控品缓冲液制备:

| 物料         | 用量     |
|------------|--------|
| 三羟甲基氨基甲烷   | 2.42g  |
| 氯化钠        | 18.00g |
| Tween-20   | 2.00g  |
| 胎牛血清       | 200mL  |
| Proclin300 | 1.00g  |

将上述物料加入800mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 $7.40 \pm 0.10$ 。

[0048] (1) 链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液制备方法:

将商品化的链霉亲和素包被的磁微粒母液(采购于南京盘古基因纳米科技有限公司)用磁珠包被物缓冲液稀释浓度为0.5mg/mL。

[0049] (2) 碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物制备方法:

将100ug碱性磷酸酶加入1mL10mM 碳酸钠缓冲液(pH8.0) 中,加入1ug睾酮衍生物(T-NHS, 采购于深圳雅为公司), 在温度为 $4^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 的条件下反应0.5~24小时, 然后用ProteinG亲和柱(GE公司) 纯化酶标抗体, 得到睾酮酶结合物。稀释于酶标记物缓冲液中, 稀释比例为1:1000。

[0050] (3) 生物素标记的睾酮抗体制备方法:

将20ug睾酮抗体(小鼠, 单克隆, 采购于美国Meridian公司)加入1mL10mM 碳酸钠缓冲液(pH8.0) 中, 加入50ug生物素衍生物, 在温度为 $4^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 的条件下反应0.5~24小时, 然后用ProteinG亲和柱(GE公司) 纯化生物素标记抗体, 得到睾酮生物素结合物。稀释于生物素标记物缓冲液中, 稀释比例为1:500。

[0051] (4) 睾酮校准品的制备方法:

用校准品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度, 分别为0, 0.5, 2.5, 5.0, 15.0, 30.0ng/mL。

[0052] (5) 睾酮质控品的制备方法:

用质控品缓冲液将睾酮纯品稀释至工作浓度, 分别为0.5, 15.0ng/mL。

[0053] (6) 组装: 将上述试剂组分组装成盒, 于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

[0054] 二、试剂盒的测试方法:

(1) 加样和孵育过程:吸取睾酮校准品、质控品或新鲜病人样本50uL加入反应管中,然后加入碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物50uL和生物素标记的睾酮抗体50uL,37℃孵育反应10分钟;然后加入链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液50uL,37℃孵育反应10分钟;

(2) 磁分离清洗过程:将孵育反应完成后的反应管放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第一次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第二次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第三次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;

(3) 发光过程:加入Lumi-Phos 530底物液(采购于美国Lumigen公司)200uL,37℃避光孵育5分钟后,用滨松9507半自动化学发光仪测量发光值。

[0055] 三、试剂盒的性能测试结果:

(1) 线性范围为0~30ng/mL,线性系数: $r \geq 0.9900$ ;

(2) 批内不精密度为不大于6%;

(3) 准确度:回收率在90%~110%之间;

(4) 最低检出限:测试结果不高于0.1ng/mL;

(5) 特异性:10000pg/mL的雌三醇(E3)、3000pg/mL的雌二醇(E2),测试结果不高于0.1ng/mL;

| 干扰物 | 浓度         | 测试结果      | 结论        |
|-----|------------|-----------|-----------|
| 雌三醇 | 10000pg/mL | 0.03ng/mL | <0.1ng/mL |
| 雌二醇 | 3000pg/mL  | 0.06ng/mL | <0.1ng/mL |

(6) 稳定性:37℃加速7天与2~8℃试剂测试结果偏差 $\pm 10\%$ 范围内;

| 样本   | 浓度        | 37℃加速7天相对偏差 |
|------|-----------|-------------|
| 低值质控 | 0.5ng/mL  | -2.14%      |
| 高值质控 | 15.0ng/mL | -3.38%      |

由以上的结果可以看出:本发明涉及的试剂盒与国外同类型试剂盒相比,性能测试结果很接近,达到优良结果,本发明的睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒具有很好的适用性和先进性。

[0056] 以上所述实施例仅是本发明的优选实施方式。应当指出,本发明所述的稀释比例是指按质量比稀释的比例,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术方案的前提下,还可以做出若干改进和修饰,这些改进和修饰也应视为本发明的保护范围,本实施例中未明确的部分均可用现有技术加以实现。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法                     |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108982880A</a>                   | 公开(公告)日 | 2018-12-11 |
| 申请号            | CN201810550556.6                               | 申请日     | 2018-05-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 湖南远璟生物技术有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 湖南远璟生物技术有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 湖南远璟生物技术有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 李明勇<br>姜雪莲<br>黄金浪<br>张玲<br>胡洁<br>黄伟            |         |            |
| 发明人            | 李明勇<br>姜雪莲<br>黄金浪<br>张玲<br>胡洁<br>黄伟            |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/74 G01N33/543 G01N33/535                |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/743 G01N33/535 G01N33/54326             |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种睾酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法，所述试剂盒包括：链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液，碱性磷酸酶标记的睾酮衍生物，生物素标记的睾酮抗体，测试稀释液，睾酮校准品，睾酮质控品。本发明的试剂盒与现有试剂盒相比，制备工艺更简单，成本更低，检测范围宽，稳定性好。

