

[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 200810105415. X

[51] Int. Cl.

*G01N 33/74 (2006.01)*

*G01N 33/577 (2006.01)*

*G01N 21/76 (2006.01)*

*G01N 33/535 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101368973A

[22] 申请日 2008.4.29

[21] 申请号 200810105415. X

[71] 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中  
路7号北科技园

[72] 发明人 王宏锐 应希堂 宋胜利 胡国茂  
唐宝军 于尚永

权利要求书2页 说明书15页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定  
试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及免疫分析领域，具体地公开了一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒利用酶促化学发光原理，采用微孔板为固相载体实现批量检测，将单克隆抗体标记碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，本试剂盒性能稳定，操作简单、结果准确灵敏、反应速度快、无放射性污染。

1、一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：1) 生长激素校准品；2) 生长激素抗体包被的微孔板；3) 碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记抗体；4) 洗涤液；5) 上述酶标记抗体作用的化学发光底物液。

2、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述碱性磷酸酶的化学发光底物液配方为15%的4-甲氧基-4-(3-磷酸氧基苯)-螺旋-(1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-金刚烷)、0.05mol/L PH 7.8 Tris-HCl、0.15g/L 氯化镁、9g/L 氯化钠。

3、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述辣根过氧化物酶的化学发光底物液包含A液和B液，其中，化学发光底物A液，包括1.7716g/L 鲁米诺、0.051g/L 4-羟基联苯、0.012g/L 4-碘苯硼酸、11.4g/L 硼酸、4.9g/L 硼砂，其pH值为8.0~8.5；化学发光底物B液，包括0.329g/L 过氧化脲、0.01%Tween20、51.58g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.74g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，其pH值为7.0~7.5。

4、一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：制备生长激素校准品；制备生长激素单克隆抗体包被的微孔板；制备碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记抗体；配制洗涤液；配制化学发光底物液；及组装各组分成为试剂盒。

5、如权利要求4所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，所述制备生长激素校准品，其基质配方为：30%马血清，10%山羊血清，1g/L 酪蛋白，0.1%Proclin300。

6、如权利要求4所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，所述制备生长激素单克隆抗体包被的微孔板，其包被缓冲液为0.05M 磷酸盐缓冲液。

7、如权利要求4所述试剂盒的制备方法，其特征在于，所述制备碱性磷酸酶标记抗体，标记方法为戊二醛交联法；所述制备辣根过氧化物酶标记抗体，标记方法为过碘酸钠法，用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记物稀释液将标记抗体稀释成工作浓度。

8、如权利要求 7 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，所述碱性磷酸酶标记物稀释液，其配方为：0.05M pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液，25%新生牛血清。

9、如权利要求 7 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，所述辣根过氧化物酶标记物稀释液，其配方为：0.05M pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液，15%新生牛血清。

10、如权利要求 4 所述的试剂盒制备方法，其特征在于，所述配制洗涤液，其配方为：0.01M pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液，0.01%Tween20，1g/L KCl。

## 一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒

### 技术领域

本发明涉及免疫分析领域，具体地，本发明公开了一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

人生长激素 (Human Growth Hormone, hGH) 分泌于脑垂体前叶，是一种包含两个分子链内二硫键的多肽，单独存在或与一些生长激素结合蛋白结合。生长激素主要形式包含 191 个氨基酸，分子量约为 22000。生长激素的主要生物学活性在于直接促进生长，它通过直接促进骨骼和肌肉生长以及间接在肝脏中促进释放生长调节素 (一组类胰岛素生长因子, insulin-like growth factor, IGF) 来发挥其生物学效应，尤其是生长调节素 C (IGF-1) 对儿童的骨骼生长是很必要的。

对儿童生长激素的临床测定研究目前已经建立了生长激素与骺板骨骼生长很好的线性关系。hGH 含量很低会导致生长速度减缓至正常人的三分之一至二分之一。因成人的骺板骨骼已经融合，生长激素过量会逐渐形成肢端肥大，以头骨、手骨和足骨增生明显。

一般利用测定 hGH 反应的激发实验来评价脑垂体前叶的功能水平。刺激措施可以衡量脑垂体前叶的 hGH 分泌功能，怀疑患有生长延迟的儿童通常是这类测试的对象。目前有几种动态测试引诱释放 hGH，如运动、注射左旋多巴、胰岛素耐量试验和精氨酸静脉滴注。抑制实验可以鉴定脑垂体前叶 hGH 分泌功能的遏制，它可以确定生长激素过量以及其导致的肢端肥大症。

目前用于检测生长激素的免疫分析方法主要有放射免疫分析 (RIA)、酶联免疫分析 (ELISA)。根据大量的试验结果及临床应用资料，从实用性、稳定性、准

确性及发展前景来看，化学发光免疫分析（CLIA）要大大优于酶免疫分析、放射免疫分析。

放射免疫分析技术因其使用放射性元素作为标记物，因此对环境有放射性污染，并存在灵敏度不高，操作复杂，试剂保存时间短等缺点；酶免疫分析法存在灵敏度低，信噪比不高，灰区附近难以判定等方法学制约因素；化学发光免疫分析法是一种较先进而有效的方法，可使检测灵敏度达到  $10^{-18}$  摩尔水平，其酶标记物稳定，可长期使用。较 RIA 和 ELISA 优势明显。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒

根据本发明一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒，其中，所述试剂盒包括：1) 生长激素校准品；2) 生长激素抗体包被的微孔板；3) 碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记抗体；4) 洗涤液；5) 上述酶标记抗体作用的化学发光底物液。

根据本发明的试剂盒，其中，所述微孔板为 48 孔、96 孔微孔板。

根据本发明的试剂盒，其中，所述碱性磷酸酶的化学发光底物液配方为 15% 的 4-甲氧基-4-(3-磷酰氧基苯)-螺旋-(1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-金刚烷)、0.05mol/L PH 7.8 Tris-HCL、0.15g/L 氯化镁、9g/L 氯化钠。

根据本发明的试剂盒，其中，所述辣根过氧化物酶的化学发光底物液包含 A 液和 B 液，其中：

化学发光底物 A 液，包括 1.7716g/L 鲁米诺、0.051g/L 4-羟基联苯、0.012g/L 4-碘苯硼酸、11.4g/L 硼酸、4.9g/L 硼砂，其 pH 值为 8.0~8.5；

化学发光底物 B 液，包括 0.329g/L 过氧化脲、0.01%Tween20、51.58g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

•12H<sub>2</sub>O、8.74g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O，其 pH 值为 7.0~7.5。

化学发光底物液包含 A 液和 B 液使用方法：A、B 液双组分试剂，在使用前根据使用量计算完毕后 A：B 为 1：1 混合，应保证在 6h 内使用。

本发明的另一个目的是提供一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，其包括以下步骤：

**A：制备生长激素校准品**

根据本发明试剂盒制备方法中，所述制备生长激素校准品，其基质配方为：30%马血清，10%山羊血清，1g/L 酪蛋白，0.1%Proclin300。

配制基质液后，将生长激素抗原纯品参照国家标准品稀释成浓度为 5 μIU/ml、10 μIU/ml、25 μIU/ml、50 μIU/ml、100 μIU/ml，分装成 1ml/瓶，-20℃保存。

**B：制备生长激素单克隆抗体包被的微孔板**

根据本发明试剂盒制备方法中，所述制备生长激素单克隆抗体包被的微孔板，其包被缓冲液为 0.05M 磷酸盐缓冲液。包被浓度 0.5~2.5 μg/ml 生长激素单克隆抗体，4℃24h 后，去离子水洗涤 2 次，2%BSA 室温封闭 3h 后，在温度 20-28℃及湿度小于或等于 30%条件下干燥 12h，装袋封口。

**C：制备碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记抗体**

根据本发明试剂盒制备方法中，所述制备碱性磷酸酶标记抗体，标记方法为戊二醛交联法，其具体步骤为：

(1)称取碱性磷酸酶 5mg 溶于 0.1mL 含 2.5% 戊二醛的 pH6.8 0.1M PBS 溶液中，于 4℃静置过夜。

(2)将酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / min，收集流出液。如体积大于 2ml，则以聚乙二醇 6000 浓缩至 2ml。放置 10ml

小烧杯中，缓慢搅拌。

(3) 将待标记的抗体 3mg 用 pH6.8 0.1MPBS 稀释至 2ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。

(4) 用 1M PH9.6 碳酸缓冲液 0.5ml，继续搅拌 1 小时。

(5) 加 0.2M 赖氨酸 0.1ml，混匀后，置室温 2 小时。

(6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃1 小时。

(7) 3000rpm 离心 30min，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗 3 次，最后沉淀物溶于少量 0.15M PH7.4 的 PBS 中。

(8) 将上述溶液装入透析袋中，0.15M PH7.4 的 PB 缓冲盐水透析，去除铵离子后(用茌氏试剂检测)，10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀，上清液即为酶结合物，加入等体积丙三醇分装成适合体积后，-20℃冰冻保存。

根据本发明试剂盒制备方法中，所述制备辣根过氧化物酶标记抗体，标记方法为过碘酸钠法，其具体方法为：称 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 1ml 双蒸水中，加入 0.2ml 新配的 0.1M NaIO<sub>4</sub> 溶液，室温避光 20min。1mM pH4.4 醋酸钠缓冲液透析，4℃过夜。加入 20μl 0.2M pH9.6 碳酸盐缓冲液，加入 1ml 0.01M 碳酸盐缓冲液含 5mg 抗体，室温 2h。再加 0.1ml 新配 4g/L NaBH<sub>4</sub>，混匀，4℃2h。0.15M pH7.4 PBS 透析 4℃过夜。搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，4℃1h。3000rpm 离心 0.5h，弃上清。沉淀物溶于 1ml 0.15M pH7.4PBS。0.15M pH7.4 的 PBS 透析 4℃4h，10,000rpm 离心 30min，上清液即为酶结合物，加入等量丙三醇，-20℃保存。

用酶标记物稀释液将标记抗体稀释成工作浓度。用酶标记物稀释液进行 1: 1,000 ~ 1: 100,000 之间的一个适当稀释比例进行稀释。

上述稀释碱性磷酸酶标记抗体所用的稀释液，其配方为：0.05M pH 值为 7.2

的磷酸盐缓冲液，25%新生牛血清。

上述稀释辣根过氧化物酶标记抗体所用的稀释液，其配方为：0.05M pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液，15%新生牛血清。

配制完成后，应混匀，放置 30 分钟后用肉眼观察无晶体或沉淀析出，应采用电子 pH 计或中性 pH 试纸进行检验 pH 应控制在 7.0-7.5 之间，最佳 pH 为 7.2。然后分装到适当体积的聚乙烯塑料瓶中。

#### D: 配制洗涤液

根据本发明试剂盒制备方法中洗涤液的配方为：0.01M pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液，0.01%Tween20，1g/L KCl。

#### E: 配制化学发光底物液

根据碱性磷酸酶化学发光底物液配方 15%的 4-甲氧基-4-(3-磷酰氧基苯)-螺旋-(1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-金刚烷)、0.05mol/L PH 7.8 Tris-HCl、0.15g/L 氯化镁、9g/L 氯化钠，定容 1L 后，观察溶液须澄清无混浊，配制完成后用深色聚乙烯塑料瓶分装，每瓶 10ml。

根据辣根过氧化物酶的化学发光底物液配方，其中，化学发光底物 A 液包括 1.7716g/L 鲁米诺、0.051g/L 4-羟基联苯、0.012g/L 4-碘苯硼酸、11.4g/L 硼酸、4.9g/L 硼砂，其 pH 值为 8.0~8.5；化学发光底物 B 液包括 0.329g/L 过氧化脲、0.01%Tween20、51.58g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.74g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，其 pH 值为 7.0~7.5。配制完成后观察溶液须澄清无混浊，用深色聚乙烯塑料瓶分装，每瓶 10ml。

以及根据 A—E 的所得到的半成品，组装各组分成为试剂盒。

综上，在本发明的研究过程中，本发明的发明人首先对所用的原材料进行了筛选实验和质量检定，包括抗原的纯度、标记抗体的活性、微孔板的吸附性能和

、变异大小、碱性磷酸酶的活性、辣根过氧化物酶的活性、化学发光底物的发光强度及发光持续时间等。对于碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶的标记可以有不同的方法，通过反复探索和对比实验最终找到了性能稳定、质量可靠的标记方法。

本发明公开了基于上述摸索试验得到的各种试剂配方，包括：化学发光底物液配方、校准品基质配方、洗涤液的配方、碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶标记抗体的稀释液配方。

本发明试剂盒利用酶促化学发光原理，采用微孔板为固相载体实现批量检测，将单克隆抗体标记碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，本试剂盒性能稳定，操作简单、结果准确灵敏、反应速度快、无放射性污染。

#### 附图说明

图 1 为实施例 9 所得到的校准品线性图（双对数标准曲线）。

图 2 为实施例 11 中本发明的试剂盒同国外放免试剂盒临床血样测值比对的相关曲线图。

#### 具体实施方式

实施例 1 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒碱性磷酸酶发光底物液的制备

碱性磷酸酶化学发光底物液配方：

三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 6.06g

0.1mol/L 盐酸 (HCl) 3.45ml

4-甲氧基-4-(3-磷酸氧基苯)-螺旋-(1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-金刚烷)

150ml

---

氯化镁 (MgCl <sub>2</sub> )	0.15g
氯化钠 (NaCl)	9g
双蒸水定容	1000ml

配制完成后肉眼观察澄清无混浊物，用棕黑色聚乙烯塑料瓶分装，每瓶 10ml。

### 实施例 2 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒辣根过氧化物酶发光底物液的制备

按照辣根过氧化物酶化学发光底物液 A 液配方：

硼酸	11.4g
硼砂	4.9g
鲁米诺	1.7716g
4-羟基联苯	0.051g g
4-碘苯硼酸	0.012g
双蒸水定容	1000ml

配制完成后用聚乙烯塑料瓶，每瓶分装 10ml。

化学发光底物液 B 液配方：

磷酸二氢钠 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O)	8.74 g
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O)	51.58 g
过氧化脲 (CH <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0.329g
Tween20	0.1ml

双蒸水定容	1000ml
-------	--------

配制完成后用棕黑色聚乙烯塑料瓶，每瓶分装 10ml。

### 实施例 3 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒校准品的制备

根据本发明校准品的基质配方：

马血清	300ml
山羊血清	100ml
酪蛋白	1g
Proclin300	1ml
双蒸水定容	1000ml

配制基质液后，将生长激素抗原纯品参照国家标准品稀释成浓度为 5  $\mu$  IU/ml、10  $\mu$  IU/ml、25  $\mu$  IU/ml、50  $\mu$  IU/ml、100  $\mu$  IU/ml，配制完毕后，使用 3ml 容积的西林瓶，每瓶分装 1 ml，贴签后，-20℃冷冻保存。

### 实施例 4 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒包被微孔板的制备

取生长激素单克隆抗体浓原料 5mg，使用 0.05M 磷酸盐缓冲液将原料稀释到包被浓度 1.5  $\mu$  g/ml，摇匀，取 96 孔微孔板，每微孔中加入 150  $\mu$  l，4℃24h 后，去离子水洗涤 2 次，2%BSA 室温封闭 3h，在温度 20-28℃及湿度小于或等于 30%条件下 12h 后，用铝箔袋热封口封装。

### 实施例 5 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒碱性磷酸酶标记抗体的制备

碱性磷酸酶标记抗体具体标记步骤为：

(1)称取碱性磷酸酶 5mg 溶于 0.1mL 含 2.5% 戊二醛的 pH6.8 0.1M PBS 溶液中，于 4℃ 静置过夜。

(2)将酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / min，收集流出液。如体积大于 2ml，则以聚乙二醇 6000 浓缩至 2ml。放置 10ml 小烧杯中，缓慢搅拌。

(3)将待标记的抗体 3mg 用 pH6.8 0.1MPBS 稀释至 2ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。

(4)用 1M PH9.6 碳酸缓冲液 0.5ml，继续搅拌 1 小时。

(5)加 0.2M 赖氨酸 0.1ml，混匀后，置室温 2 小时。

(6)在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃1 小时。

(7)3000rpm 离心 30min，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗 3 次，最后沉淀物溶于少量 0.15M PH7.4 的 PBS 中。

(8)将上述溶液装入透析袋中，0.15M PH7.4 的 PB 缓冲盐水透析，去除铵离子后(用萘氏试剂检测)，10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀，上清液即为酶结合物，加入等体积丙三醇分装成适合体积后，-20℃冰冻保存。

根据碱性磷酸酶标记抗体稀释液配方：

磷酸二氢钠 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O)	2.19 g
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O)	12.9 g
新生牛血清	250ml
去离子水定容	1000ml



磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	12.9 g
新生牛血清	150ml
去离子水定容	1000ml

配制完成后, 应混匀, 放置 30 分钟后用肉眼观察无晶体或沉淀析出, 应采用电子 pH 计或中性 pH 试纸进行检验 pH 应控制在 7.0-7.5 之间, 最佳 pH 为 7.2。

采用平行试验法将辣根过氧化物酶标记抗体用上述稀释液进行不同稀释度对比, 以最高信噪比大于 200, 最低信噪比大于 5 为基准, 优化选择成本最低的稀释比例。

将辣根过氧化物酶标记抗体以 1/1000、1/2000、1/4000、1/8000、1/16000、1/32000、1/64000 的不同稀释度, 进行条件对比实验, 发现满足最高信噪比大于 200, 最低信噪比大于 5 的比例中, 将辣根过氧化物酶标记抗体 1/32000 的比例所用成本最低。故选择这个稀释比例。

将辣根过氧化物酶标记抗体用上述稀释液以 1/32000 比例进行稀释后, 混匀放置 30 分钟后, 用肉眼观察无晶体或沉淀析出, 用白色聚乙烯塑料瓶, 每瓶分装 10ml, 4℃ 保存。

#### 实施例 7 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒洗涤液的制备

根据洗涤液的配方进行配制:

磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1 g
磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	1.28 g
氯化钾 (KCl)	1g
Tween20	0.1ml

去离子水定容

1000ml

配制完成后，应混匀，放置 30 分钟后用肉眼观察无晶体或沉淀析出，应采用电子 pH 计或中性 pH 试纸进行检验 pH 应控制在 7.0-7.5 之间，最佳 pH 为 7.2。

#### 实施例 8 生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒半成品及成品组成

根据上述实施例 1、3、4、5、7 等步骤所得半成品在组装前抽检经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒（碱性磷酸酶），按照标准操作规程进行组装成品，并经过质量人员复核后记录、入库。

根据上述实施例 2、3、4、6、7 等步骤所得半成品在组装前抽检经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒（辣根过氧化物酶），按照标准操作规程进行组装成品，并经过质量人员复核后记录、入库。

#### 实施例 9 本发明的试剂盒的使用方法

##### 一、实验前准备

- 1、蒸馏水或去离子水；
- 2、吸水纸：结实、耐用、使用中不脱落纤维，用于板条冲洗后的拍干；
- 3、封口膜：在反应过程中覆盖板条；
- 4、用于混合或稀释溶液的容器；
- 5、微量加样器：可以满足试验加样量要求的可调或固定量程的加样器带有 10  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l 吸液 Tip 头，精确度优于 1.5%；
- 6、微孔板冲洗机或冲洗瓶；
- 7、计时器。

##### 二、标本采集

病人标本无需特殊处理，采用常规医用技术收集全血标本，离心分离后吸取血清用于检测。待测血清如在 24 小时之内使用，可于 2-8℃ 保存，若需长期存放应保存在 -20℃ 以下，并避免反复冻溶。

三、使用本试剂盒实验的具体操作步骤如下：

1. 准备：自 4℃ 冰箱中取出试剂盒，室温（20~27℃）平衡 15 分钟。
2. 实验设计：首先，根据试验需求设计好分布图，将包被板从密封袋中取出，设空白对照一孔，校准品、样品、质控品等建议各做双孔，根据设计的数量在板架上放好微孔板条。
3. 加样：空白对照孔不加校准品或样品，取校准品 0, 5, 10, 25, 50, 100 μIU/mL 分别加 50 μL 于相对应校准孔中，其余每孔加样品或质控品 50 μL；然后每孔（除空白对照孔）加入酶标记物 100 μL。
4. 温育：用微量震荡器充分振荡混匀，用不干胶片封盖反应板，室温（20~27℃）温育 45 分钟；
5. 洗板：发光板用稀释后的洗涤液洗 5 次，每孔加满洗涤液，每次浸泡 10 秒，最后在干净的吸水纸上拍干。
6. 检测：每孔加入化学发光底物工作液 100 μL，用微量震荡器充分振荡混匀，室温（20~27℃）避光反应 20 分钟，在化学发光分析仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU)，测量时间 0.1~1.0 秒/孔。必须于加化学发光底物液后的第 20~60 分钟内测量。

四、结果分析

根据化学发光分析仪中的发光信号进行数据处理，以双对数数学模型进行拟合运算，以校准品浓度点的对数值为横坐标，发光信号强度的对数值为纵坐标，直接拟合出校准曲线，将质控品及样品的发光强度代入拟合方程  $\text{LOG}(Y) = a\text{LOG}(X) + b$  即可得到相应的计算浓度值。应用上述试剂盒所得到的校准品曲线方程为  $\text{LOG}(Y) = 2.9321\text{LOG}(X) + 1.0364$ ，相关系数 0.9976，生长激素校准品曲线图见附图 1。

### 实施例 10 本发明的试剂盒的方法学检定

按照本领域中常规的制造及检定规程对通过实施例 1~11 中制备成的试剂盒进行检定:

#### 1) 外观

组分齐全、完整; 溶液无混浊, 无沉淀或絮状物; 微孔板包装袋无破损、漏气现象。外部标识符合规定。

#### 2) 准确性

以国家标准品为对照品, 试剂盒校准品的实测值与标示值之比应在 0.900-1.10 之间。

#### 3) 剂量-反应曲线线性

剂量-反应曲线相关系数( $r$ )应不低于 0.9900。

#### 4) 精密性

CV(%) 应小于 10.0%( $n = 10$ )

#### 5) 灵敏度

应不大于  $0.2\mu\text{IU/mL}$ 。

#### 6) 特异性

交叉因子	交叉因子含量	测定值
LH	200mIU/mL	$\leq 0.5\mu\text{IU/mL}$
FSH	100mIU/mL	$\leq 0.5\mu\text{IU/mL}$
HCG	500mIU/mL	$\leq 0.5\mu\text{IU/mL}$
TSH	$120\mu\text{IU/mL}$	$\leq 0.5\mu\text{IU/mL}$ 。

#### 7) 稳定性

将试剂盒  $37^\circ\text{C}$  放置 7 天, 测定结果应符合上述 1) ~ 6) 项要求。

实施例 11 本发明的试剂盒同国外放免试剂盒临床血样测值比对

用本发明的试剂盒和国外放射免疫法试剂盒对 113 份随机血清样品同时进行检测。其检测结果见附图 2，以本发明试剂盒测定的生长激素浓度结果为横坐标，以国外放射免疫法试剂盒测定的浓度结果为纵坐标作回归分析，相关方程为： $Y = 1.3794X + 0.9772$ ，相关系数  $r = 0.9874$ 。经统计学处理结果表明，本发明方法同国外试剂盒临床血样测值相关性良好。

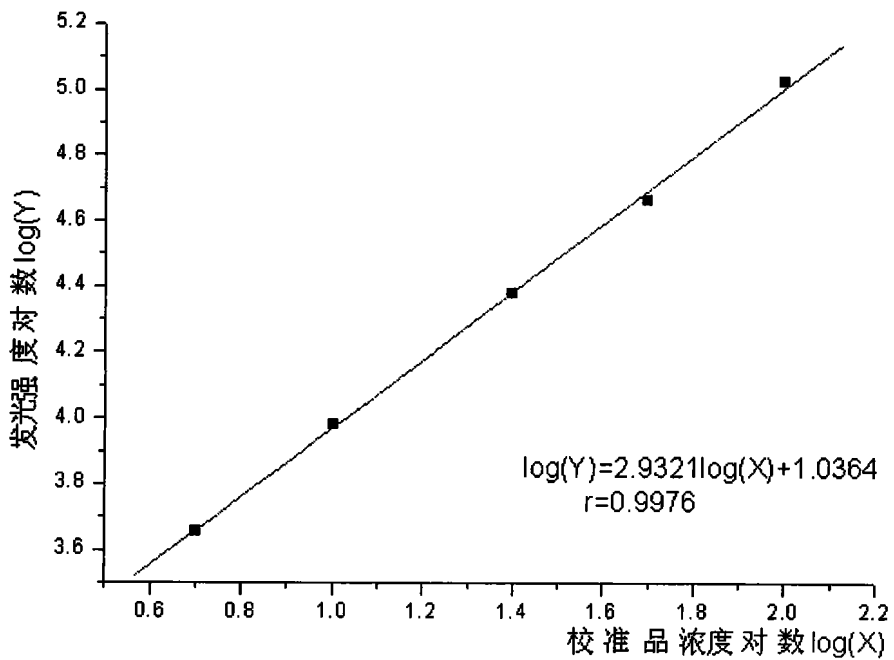


图 1

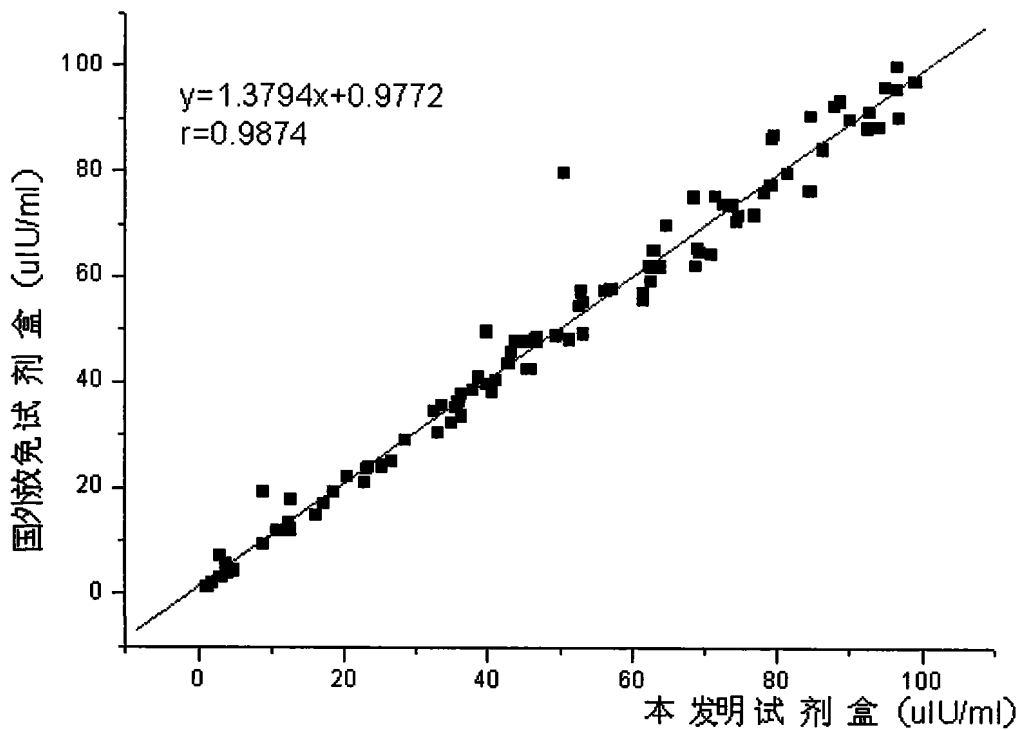


图 2

专利名称(译)	一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101368973A</a>	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200810105415.X	申请日	2008-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
[标]发明人	王宏锐 应希堂 宋胜利 胡国茂 唐宝军 于尚永		
发明人	王宏锐 应希堂 宋胜利 胡国茂 唐宝军 于尚永		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/577 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及免疫分析领域，具体地公开了一种检测人生长激素化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒利用酶促化学发光原理，采用微孔板为固相载体实现批量检测，将单克隆抗体标记碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，本试剂盒性能稳定，操作简单、结果准确灵敏、反应速度快、无放射性污染。

