



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308677 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310236056. 2

(22) 申请日 2013. 06. 14

(71) 申请人 南京医科大学第二附属医院

地址 210011 江苏省南京市下关区姜家园
121 号

申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司

(72) 发明人 苏东明 刘萍 梁秀彬 栾大伟

郭万华 刘云

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理

有限公司 12211

代理人 李莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

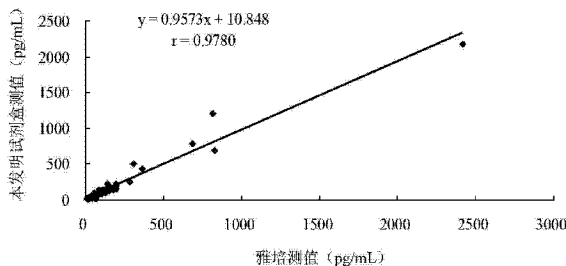
(54) 发明名称

一种雌二醇纳米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

本发明公开了一种雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:雌二醇校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的雌二醇抗体;雌二醇抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 RZ ≥ 3. 0, 活性 ≥ 250U/mL;雌二醇质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20 倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比操作简便,安全无环境污染。此外,本发明还具有稳定性好、成本低、检测范围宽等优点。

E₂ 临床对比试验 (n=116)



1. 一种雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒包括:

- 1) 雌二醇校准品;
- 2) 偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;
- 3) 生物素标记的雌二醇抗体;
- 4) 雌二醇抗原酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;
- 5) 雌二醇质控品;
- 6) 化学发光液 A 液和 B 液;
- 7) 20 倍浓缩洗液;
- 8) 反应管。

2. 根据权利要求 1 所述的雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的发光液 A 液的主要成分为鲁米诺,B 液的主要成分是过氧化脲;A 液中鲁米诺的质量-体积浓度为 $0.7g/L$,B 液中过氧化脲的质量-体积浓度为 $0.675g/L$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 $20-50nm$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的雌二醇质控品包括低值质控品和高值质控品,低值质控品的浓度是 $10pg/mL$ 、高值质控品的浓度是 $500pg/mL$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

6. 一种制备权利要求 1-5 任一权利要求所述试剂盒的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 雌二醇校准品的配制:

将雌二醇抗原用含 $1\%BSA$ 的校准品稀释液配制成校准品浓储液,以国家校准品进行定标,将校准品浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 $0, 30, 100, 300, 1000, 3500pg/mL$;

(2) 雌二醇质控品的配制:

用校准品稀释液将上述(1)配制的校准品浓储液分别稀释至 $10pg/mL$ 和 $500pg/mL$; $10pg/mL$ 作为低值质控品, $500pg/mL$ 作为高值质控品;

(3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 $1L$:

A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1) 将 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 以摩尔比 $2:1$ 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2) 在氮气氛下加 $0.5M$ 氨水于上述铁盐溶液中,调 $pH9-10$,反应温度 $65^\circ C$,反应时间 $45min$;3) 反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 $60^\circ C$ 烘干,即得 $10-50nm$ 的四氧化三铁纳米磁微粒;

B、纳米磁珠表面羧基的偶联

采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 $10\%PEG8000$ 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 $1:10$ 加入无水乙醇,搅拌

30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺,用量不能超过磁流体的 5%;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$,恒温搅拌 30min,之后依次加入过氧化苯甲酰、苯乙烯、丙烯酸,过氧化苯甲酰用量为磁流体用量 3%,苯乙烯体积同磁流体溶液,丙烯酸体积为磁流体溶液的 1/4,搅拌速度约为 500rpm 保持氮气气流,其余与上述条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50°C 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

取 100mL 0.1M MES 缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 链霉亲和素,然后加入 8mg/mL EDC 溶液, $2-8^\circ\text{C}$ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

(4) 生物素标记的雌二醇抗体的制备

取 1mg 雌二醇抗体,用硼酸盐缓冲液在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 55ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜终质量浓度为 5-10%, $2-8^\circ\text{C}$ 缓慢振荡,避光反应 2h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 45min;用 0.01M PBS 溶液在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下透析 2 天,期间换液 3 次;

(5) 雌二醇抗原酶结合物的制备

A、酶稀释液配制:其成分包括 5g/L MES, 10mL/L 2M NaOH, 15g/L NaCl, 10g/L BSA, 5g/L Dextran T-2000, 1.05g/L Triton X-100, 2.5mL/L 硫酸庆大霉素, 1mL/L 胭脂红, 2g/L Tween20, 1mL/L ProClin300;

B、采用改良高碘酸钠氧化法将雌二醇抗原与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4500,并加入 12% 酶稳定剂,储存于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$;

(6) 20 倍浓缩洗液的配制

20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

(7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚, 缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl, 避光保存; B 液为 0.675g/L 过氧化脲, 用工艺用水配制; A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

(8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$;

(9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品浓度和稳定性进行测定。

一种雌二醇纳米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] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体的,本发明提供了一种雌二醇(Estradiol)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 雌二醇(E_2),雌激素主要来源于卵泡内膜细胞和卵泡颗粒细胞。在卵泡发育过程中,先经促黄体生成素(LH)刺激卵泡内膜分泌睾酮,再经颗粒细胞在促卵泡激素(FSH)刺激下转化为雌二醇,雌二醇是妇女体内生物活性最强的雌激素。雌二醇值增高的病理病因 1)卵巢疾患:卵巢颗粒层细胞瘤、卵巢胚瘤、卵巢脂肪样细胞瘤、性激素生成瘤等,均表现卵巢功能亢进,雌二醇分泌量增加。2)心脏病:心肌梗塞、心绞痛、冠状动脉狭窄。3)其它:系统性红斑狼疮、肝硬化、男性肥胖症。雌二醇降低的病理原因 1)卵巢疾病:卵巢缺如或发育低下,原发性卵巢衰竭、卵巢囊肿。2)垂体性闭经或不孕。3)其它:甲低或甲亢、柯兴氏综合征、阿狄森氏病、恶性肿瘤、较大范围的感染、肾功能不全、脑及垂体的局灶性病变等。

[0003] 目前常用的检测雌二醇的方法有:

[0004] (1)放射免疫分析技术(RIA):较早的临床定量检测方法,灵敏度高,特异性高,但因为放射性污染,且操作繁琐,市场逐渐萎缩。

[0005] (2)酶联免疫分析法(ELISA):RIA之后出现的分析方法,因操作简单,无放射性污染,价格较低,现在有一定的市场占有率,但ELISA灵敏度不如RIA。

[0006] (3)化学发光免疫分析(CLIA):CLIA为当今最为敏感的微量免疫测定法,具有灵敏度高、稳定性好,无污染等优点,目前以广泛应用到基础和临床医学的各个领域,但是多以化学发光板为载体,检测的灵敏度和准确度还是不高。

[0007] 目前已有多个磁微粒化学发光方法检测雌二醇的专利申请,如申请号(200910200391)的专利申请是化学发光板的方法,板间差异较大,申请号(201110227587和201110257932)的专利申请使用的是微米级磁微粒,检测灵敏度较低。

发明内容

[0008] 本发明要解决的问题是提供雌二醇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,检测范围窄,成本高的缺陷。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:雌二醇校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的雌二醇抗体;雌二醇酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;雌二醇质控品;化学发光液A液和B液;20倍浓缩洗液;反应管。

[0010] 进一步,所述的发光液A液的主要成分为鲁米诺,B液的主要成分是过氧化脲;A液中鲁米诺的质量-体积浓度为 $0.7g/L$,B液中过氧化脲的质量-体积浓度为 $0.675g/L$ 。

[0011] 进一步,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 0.3-0.5 μm 。

[0012] 进一步,所述的雌二醇质控品包括低值质控品和高值质控品,低值质控品的浓度是 10pg/mL、高值质控品的浓度是 500pg/mL。

[0013] 进一步,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

[0014] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1) 雌二醇校准品的配制:

[0016] 将雌二醇抗原用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的校准品稀释液配制成校准品浓储液,以国家校准品进行定标,将校准品浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0,30,100,300,1000,3500pg/mL;

[0017] (2) 雌二醇质控品的配制:

[0018] 用校准品稀释液将上述(1)配制的校准品浓储液分别稀释至 10pg/mL 和 500pg/mL;10pg/mL 作为低值质控品,500pg/mL 作为高值质控品;

[0019] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L:

[0020] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0021] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1)将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2)在氮气氛下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65 $^\circ\text{C}$,反应时间 45min;3)反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 60 $^\circ\text{C}$ 烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0022] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0023] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10% 聚乙二醇(PEG8000)溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺,用量不能超过磁流体的 5%;在氮气的保护下,升温至 60 \pm 1 $^\circ\text{C}$,恒温搅拌 30min,之后依次加入过氧化苯甲酰、苯乙烯、丙烯酸,过氧化苯甲酰用量为磁流体用量 3%,苯乙烯体积同磁流体溶液,丙烯酸体积为磁流体溶液的 1/4,搅拌速度约为 500rpm 保持氮气气流,其余与上述条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50 $^\circ\text{C}$ 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0024] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

[0025] 取 100mL0.1M2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 链霉亲和素,然后加入 8mg/mL 碳二亚胺(EDC)溶液,2-8 $^\circ\text{C}$ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

[0026] (4) 生物素标记的雌二醇抗体的制备

[0027] 取 1mg 雌二醇抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8 $^\circ\text{C}$ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 55 μg 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终质量浓度为 5-10%,2-8 $^\circ\text{C}$ 缓慢振荡,避光反应 2h;在上述溶液中加入 250 μL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 45min;用 0.01M PBS 溶液在 2~8 $^\circ\text{C}$ 下透析 2 天,期间换液 3 次;

[0028] (5) 雌二醇抗原酶结合物的制备

[0029] A、酶稀释液配制：其成分包括 5g/LMES,10mL/L2M NaOH,15g/L NaCl,10g/LBSA,5g/L Dextran T-2000,1.05g/L Triton X-100,2.5mL/L 硫酸庆大霉素,1mL/L 胭脂红,2g/LTween20,1mL/L ProClin300；

[0030] B、采用改良高碘酸钠氧化法将雌二醇抗原与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4500,并加入 12% 酶稳定剂,储存于 2 ~ 8℃；

[0031] 改良过碘酸钠氧化法步骤包括：

[0032] A:HRP 活化

[0033] 1) 配置 10mg/mL HRP 溶液；

[0034] 2) 配置 12.8mg/mL 过碘酸钠 NaIO₄ 溶液；

[0035] 3) 将上述 1) 和 2) 配制溶液按体积比 1:1 混匀,4℃ 避光反应 30min；

[0036] 4) 配置浓度为 20uL/mL 的乙二醇水溶液,与上述溶液 3) 以相同体积混合,常温避光反应 20min,活化即完成,放 -20℃ 保存(保存时间不超过 3 个月)。

[0037] B、雌二醇抗原标记

[0038] 1) 将待标记原料装入透析袋中,用 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,透析 30min；

[0039] 2) 将标记原料与活化的 HRP 按质量比 1:2 进行混合,之后用 0.05M 碳酸盐缓冲液于 4℃ 透析 24h (期间换液 2-3 次)；

[0040] 3) 配置浓度为 2mg/mL 的 NaBH₄ 水溶液,按 1mgHRP 加 80uL 配制好的 NaBH₄ 水溶液的比例进行混合,并于 4℃ 避光反应 2h；

[0041] 4) 将上述步骤 3) 完成的标记液用 0.01M PBS 于 4℃ 透析 24h,加入等体积甘油,-20℃ 保存。

[0042] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0043] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 2%Proclin300；

[0044] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0045] A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl,避光保存；B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制；A 液和 B 液在使用前 5min 混合；

[0046] (8) 组装：将上述试剂组装成盒,储存于 2 ~ 8℃；

[0047] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量 - 反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品浓度和稳定性进行测定。

[0048] 本发明的原理是,本试剂盒采用竞争法原理测定血清或血浆中的雌二醇,血样中的雌二醇与酶标雌二醇竞争数量有限的生物素 - 雌二醇抗体,该抗体与纳米磁微粒链霉亲和素结合,纳米磁微粒在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的纳米磁微粒 - 亲和素 - 生物素 - 雌二醇抗体 - 雌二醇 -HRP 复合物与未结合的其它物质分离。洗掉游离成分,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,于第 5 分钟测定各加样孔的发光值 RLU。样本中的雌二醇浓度依据由校准品雌二醇浓度和对应的 RLU 建立的 Log (X) -Logit (Y) 数学模型进行定量,从而检测人血清、血浆中的雌二醇含量。

[0049] 本专利发明的雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,具有以下优点：

[0050] (1) 以纳米磁微粒(直径 20-50nm)作为载体,相比微米级磁微粒具有更高的比表面

积,大大增加了抗原、抗体的接触面积及底物发光面积,加之旋转磁场的灵活应用,较之酶标板或化学发光板、微米级磁微粒载体具有更高的灵敏度、更快的检测速度和更好的重复性;分析灵敏度高,本产品的分析灵敏度不低于 10pg/mL。

[0051] (2) 检测范围宽,0-3500pg/mL;

[0052] (3) 使用单克隆抗体,提高了反应的特异性,与雌三醇(E3)、睾酮(P)、孕酮(P)的交叉反应系数小于 1%。

[0053] (4) 精密度好,本产品批内不精密度不高于 5%,批间不精密度不高于 10%。

[0054] (5) 链酶亲和素与生物素级联放大体系,纳米磁微粒联链霉亲和素,生物素联单克隆抗体,较磁珠直接联雌二醇抗体,大大提高了反应效率,操作简单,产品易得,同时增加了试剂盒的有效期,经 37°C 加速稳定性及 2 ~ 8°C 真实稳定性试验证实,本产品可在 37°C 可存放 7 天以上,在 2 ~ 8°C 可存放 2 年,稳定性良好,测值上更精确,检测范围更宽(0-3500pg/mL)。

[0055] (6) 成本低,与市场上同类产品比较,本试剂盒性能良好,成本低,具有临床应用价值。

附图说明

[0056] 图 1 是本发明的试剂盒测定雌二醇与雅培试剂盒测定雌二醇的测定结果比较图,其中纵坐标为本发明试剂盒测得的雌二醇值,横坐标为雅培测定雌二醇值,两种方法相关系数(r)=0.9780,直线方程 $y=0.9573x+10.848$ 。

具体实施方式

[0057] 实施例 1:制备雌二醇磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

[0058] (1) 雌二醇校准品的配制:

[0059] 将雌二醇抗原(Fitzgerald 公司生产)用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的校准品稀释液配制成校准品浓储液,以国家校准品(批号:100182-200404,规格:100mg/支)进行定标,将校准品浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 30, 100, 300, 1000, 3500pg/mL;

[0060] (2) 雌二醇质控品的配制:

[0061] 用校准品稀释液将上述(1)配制的校准品浓储液分别稀释至 10pg/mL 和 500pg/mL;10pg/mL 作为低值质控品,500pg/mL 作为高值质控品;

[0062] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L:

[0063] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0064] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1)将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2)在氮气氛下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65°C,反应时间 45min;3)反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 60°C 烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0065] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0066] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅

拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺,用量不能超过磁流体的 5%;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$,恒温搅拌 30min,之后依次加入过氧化苯甲酰、苯乙烯、丙烯酸,过氧化苯甲酰用量为磁流体用量 3%,苯乙烯体积同磁流体溶液,丙烯酸体积为磁流体溶液的 1/4,搅拌速度约为 500rpm 保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50°C 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0067] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

[0068] 取 100mL 0.1M MES 缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 链霉亲和素,然后加入 8mg/mL EDC 溶液, $2-8^\circ\text{C}$ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

[0069] (4) 生物素标记的雌二醇抗体的制备

[0070] 取 1mg 雌二醇抗体(Fitzgerald 公司生产),用硼酸盐缓冲液在 $2-8^\circ\text{C}$ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 55ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜质量终浓度为 5-10%, $2-8^\circ\text{C}$ 缓慢振荡,避光反应 2h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 45min;用 0.01M PBS 溶液在 $2-8^\circ\text{C}$ 下透析 2 天,期间换液 3 次;

[0071] (5) 雌二醇抗原酶结合物的制备

[0072] A、酶稀释液配制:其成分包括 5g/L MES,酶稀释液中包括 10mL/L 2M NaOH, 15g/L NaCl, 10g/L BSA, 5g/L 葡聚糖 T-2000 (Dextran T-2000) (购自 Sigma 公司), 1.05g/L 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100) (购自 Sigma 公司), 2.5mL/L 硫酸庆大霉素, 1mL/L 胭脂红(胭脂红为粉末固体,配制成浓度 40mg/mL 以后使用), 2g/L Tween-20 (购自 Sigma 公司), 1mL/L ProClin300 (购自 Sigma 公司);

[0073] B、采用改良高碘酸钠氧化法将雌二醇抗原与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4500,并加入 12% 酶稳定剂,储存于 $2-8^\circ\text{C}$;

[0074] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0075] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

[0076] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0077] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl, 避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0078] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 $2-8^\circ\text{C}$;

[0079] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品浓度和稳定性进行测定。

[0080] 实施例 2:本发明试剂盒的检查

[0081] (1) 物理检查:液体组分应澄清,无沉淀或絮状物;其他组分应无包装破损。

[0082] (2) 准确性:试剂盒校准品与企业标准品系列同时进行分析测定,用双对数数学模型拟合,要求两条剂量-反应曲线不明显偏离平行(t 检验, $|t| < 2.447$);以雌二醇企业标准品为对照品,对本试剂盒校准品进行测值,实测值与标示值比值的平均值应在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0083] (3) 剂量 - 反应曲线的线性 : 用 $\text{Log}(X) - \text{Logit}(Y)$ 数学模型拟合, 剂量 - 反应曲线在 10-3000pg/mL 浓度范围内, 相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0084] (4) 分析灵敏度 : 试剂盒分析灵敏度不高于 10pg/mL。

[0085] (5) 精密度 : 10 孔平行测定高值和低值质控品, 计算测定结果的平均浓度(\bar{X})与标准差(SD), 批内不精密度($\text{CV}\%$) = $\text{SD} / \bar{X} \times 100\%$; 使用 3 批产品进行 3 次试验, 计算测定结果的平均浓度(\bar{X})与标准差(SD), 批间不精密度($\text{CV}\%$) = $\text{SD} / \bar{X} \times 100\%$, 结果应符合批内不精密度($\text{CV}\%$) 应不高于 5%; 批间不精密度($\text{CV}\%$) 应不高于 10%。

[0086] (6) 质控品的测定值 : 平行测定 10 孔高值和低值的质控品, 用 $\text{Log}(X) - \text{Logit}(Y)$ 数学模型拟合, 质控品测值应在允许范围内, 低值质控品为 8-12pg/mL, 高值质控品为 400-600pg/mL。

[0087] (7) 特异性 : 交叉反应符合下表要求 :

	交叉反应因子	浓度	测定值
[0088]	雌三醇 (E_3)	1000ng/mL	<40pg/mL
	睾酮 (T)	100ng/mL	<40pg/mL
	孕酮 (P)	1000ng/mL	<40pg/mL

[0089] (8) 稳定性 : 37°C 放置 7 天, 测定值应符合上述各项要求。

[0090] 实施例 3 : 本发明试剂盒的使用方法

[0091] (1) 将待检试剂盒在室温 (18 ~ 25°C) 下平衡 30 分钟。

[0092] (2) 配制洗液 : 用蒸馏水将浓缩洗液按 1 : 20 稀释 (1mL 洗液加 19mL 蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶, 可将浓缩洗液置于室温或 37°C 待结晶溶解后再进行稀释。

[0093] (3) 配制发光液 : 使用前 5 分钟取适量发光液 A 与发光液 B 等体积混合。

[0094] (4) 将反应管编号, 向试管中依次加入 25uL 校准品或血清标本、50uL 纳米磁微粒 - 链霉亲和素悬浮液、50uL 生物素 - 雌二醇抗体结合物、50uL 雌二醇酶结合物, 37°C 下振荡反应 30min, 将试管架置于磁分离器上分离 5min, 倒出上清液, 加入 500uL 洗液, 充分混匀后, 于磁分离器上分离, 倒出洗液, 重复 3 次, 在各管中加入化学发光底物液 100uL, 充分混匀, 暗置 5min, 在管式化学发光仪上测定各管的发光值 (RLU), 以校准品浓度的 Log 值为横坐标, 以发光值的 Logit 为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据血清标本的发光值即可计算出雌二醇的浓度。

[0095] 实施例 4 : 本试剂盒的方法学评价结果

[0096] 检测范围 : 范围为 0 ~ 3500pg/mL, 对于浓度大于 3500pg/mL 的标本应先进行稀释后再进行测定。

[0097] 灵敏度 : 10pg/mL。

[0098] 精密度 : 小于 5%。

[0099] 准确性 : 回收率的平均值在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0100] 特异性 : 与雌三醇 (E_3)、睾酮 (T)、孕酮 (P) 的交叉反应系数小于 1%。

[0101] 质控品测值 : QcL (低值质控品) 和 QcH (高值质控品) 的测值均在允许范围内。

[0102] 稳定性:将试剂盒中各试剂组分子于 37℃下放置 7d,稳定性良好。

[0103] 实施例 5:本试剂盒的临床对比实验

[0104] 本专利发明的试剂盒已进行了临床考核,本次临床试验的样本总数 116 例,先以雌二醇雅培试剂盒测试后,再用本专利发明的试剂盒进行测定,结果表明,直线方程为 $y=0.9573x+10.848$,相关系数为 $R=0.9780$ 。可见本方法制备的试剂盒与医院测值有较好的一致性。以 SPSS13.0 统计分析软件对相关系数进行 t 检验(检验水准 $\alpha=0.05$), $P<0.001$,两种方法测定的雌二醇值的相关密切程度是显著性的,可见两种方法测定的雌二醇值密切相关。灵敏度(真阳性率)为 98.32%、特异性(真阴性率)为 97.52%,都较高;而假阳性率(误诊率)为 2.20%、假阴性率(漏诊率)为 1.69%,都较低,可见本试剂盒的测量值与实际值(原测值)的符合程度良好。粗一致性反映试剂盒诊断病人与非病人的能力,本试剂盒的粗一致性为 98.43%,接近于 1,说明试剂盒的诊断能力较强。

[0105] 为了确定本试剂盒的临床参考值,对 478 份正常人血清、血浆样本采用本试剂盒进行了检测,结果表明本试剂盒的参考值(参考范围)为男性:12 ~ 58pg/mL;女性:卵泡期:20 ~ 217pg/mL、排卵期:35 ~ 630pg/mL、黄体期:20 ~ 330pg/mL、绝经期:0 ~ 28pg/mL。

E₂ 临床对比试验 (n=116)

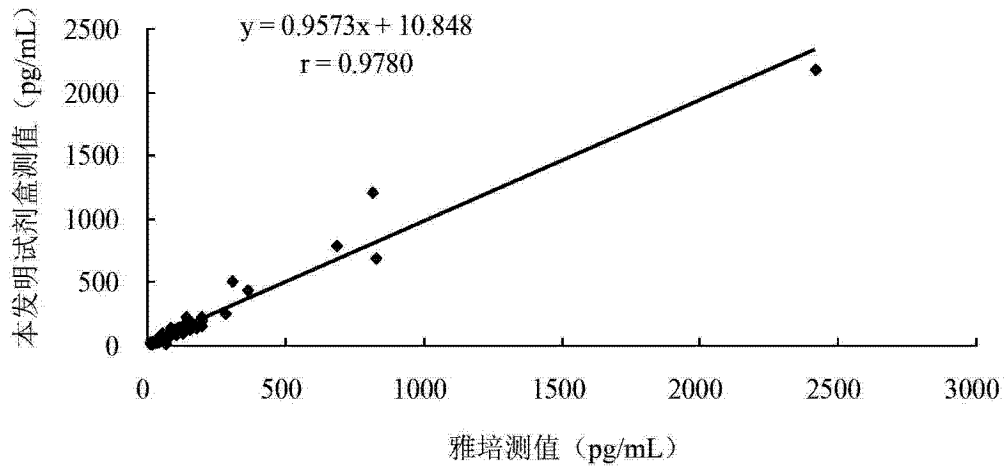


图 1

专利名称(译)	一种雌二醇纳米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	CN103308677A	公开(公告)日	2013-09-18
申请号	CN201310236056.2	申请日	2013-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	南京医科大学第二附属医院 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京医科大学第二附属医院 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京医科大学第二附属医院 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	苏东明 刘萍 梁秀彬 栾大伟 郭万华 刘云		
发明人	苏东明 刘萍 梁秀彬 栾大伟 郭万华 刘云		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	李莉华		
其他公开文献	CN103308677B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种雌二醇纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒，所述试剂盒包括：雌二醇校准品；偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液；生物素标记的雌二醇抗体；雌二醇抗体酶结合物，所用的酶为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶纯度RZ≥3.0，活性≥250U/mL；雌二醇质控品；化学发光液A液和B液；20倍浓缩洗液；反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比操作简便，安全无环境污染。此外，本发明还具有稳定性好、成本低、检测范围宽等优点。

E₂ 临床对比试验 (n=116)

