



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103293323 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201310237681. 9

(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 33/74 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

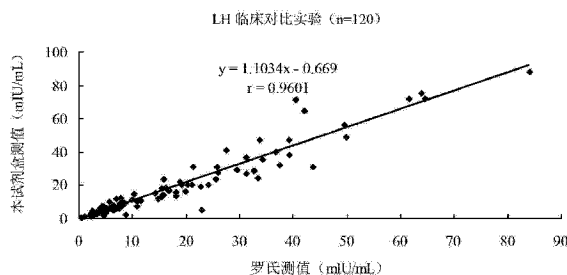
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种促黄体生成素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

本发明公开了一种促黄体生成素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:促黄体生成素校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的促黄体生成素抗体;促黄体生成素抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;促黄体生成素质控品;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敏感性高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测自动化程度高等优点。



1. 一种促黄体生成素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) 促黄体生成素校准品,浓度为 0, 2, 10, 25, 100, 250mIU/mL;

2) 偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;

3) 生物素标记的促黄体生成素抗体;

4) 促黄体生成素抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;

5) 促黄体生成素质控品;质控品包括浓度 5mIU/mL 的低值质控品和 120mIU/mL 的高值质控品;

6) 化学发光液 A 液和 B 液;A 液为 5mmol/L, pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 0.7g/L 鲁米诺和终浓度 0.08g/L 对碘酚;B 液为 0.675g/L 过氧化脲;

7) 20 倍浓缩洗液;

8) 反应管。

2. 根据权利要求 1 所述的促黄体生成素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 10-50nm。

3. 根据权利要求 1 所述的促黄体生成素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。

4. 一种制备所述权利要求 1-3 任一权利要求所述的试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 促黄体生成素校准品的配制:

将促黄体生成素抗原用山羊血清配制成校准品浓储液,以国家校准品进行定标,将浓储液用山羊血清稀释至工作浓度,分别为 0, 2, 10, 25, 100, 250mIU/mL;

(2) 促黄体生成素质控品的配制:

用山羊血清将上述浓储液分别稀释至 5mIU/mL 和 120mIU/mL,并以国家校准品进行定标;将 5mIU/mL 作为低值质控品,120mIU/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:

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) 在氮气环境下加 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;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ C$,恒温搅拌 30min,之后依次加入过氧化苯甲酰,用量为磁流体用量 3%,搅拌速度约为 500rpm,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,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 $50^{\circ}C$ 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, $2-8^{\circ}C$ 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) 生物素标记的促黄体生成素抗体的制备

取 0.5mg 促黄体生成素抗体,用硼酸盐缓冲液在 $2-8^{\circ}C$ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 25ug 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%,缓慢振荡,避光反应 3h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 30-60min;用 0.01M PBS 溶液在 $2-8^{\circ}C$ 下透析 2 天,期间换液 3-5 次;

(5) 促黄体生成素抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将促黄体生成素抗体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 1:3000-5000,并加入 15% 酶稳定剂,储存于 $2-8^{\circ}C$;

(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, 0.08g/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 $2-8^{\circ}C$;

(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、质控品的测定值和稳定性进行测定。

一种促黄体生成素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,本发明提供了一种促黄体生成素(LH) 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] 促黄体生成素(Luteotropic hormone, LH)由腺垂体嗜碱粒细胞分泌。在男性中能刺激睾丸间质细胞分泌男性激素,在女性中刺激卵巢分泌女性雌激素。促黄体生成素(LH) 在女性协同卵泡刺激素(FSH) 共同作用维持卵巢的月经周期,导致排卵与黄体形成。LH 的产生受下丘脑促性腺释放激素的控制,同时受卵巢的正、负反馈调控。LH 与 FSH 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。

[0003] 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。该检测结果以毫国际单位 / 毫升(MIU/ML) 表示。

[0004] 目前检测促黄体生成素(LH) 的方法有时间分辨免疫荧光分析法(专利申请号: 200810043552.5),采用长效荧光标记物如稀土金属(Eu、Tb、Sm、Dy) 标记,通过明间分辨非特异性荧光,但是此方法需要利用稀土金属,成本高,标记难度达,不易得。

[0005] 另外检测 LH 的最常用方法是化学发光免疫分析法,磁微粒化学发光免疫分析法,较以前的放射免疫分析法、酶联免疫分析法,在检测灵敏度、检测范围、检测时间及自动化操作上有了大大提高,且没有污染,得到临床工作者的青睐。

[0006] 现有技术普遍采用荧光素体系(专利申请号:200910089583.9、201210571305.9),此体系试剂盒有效期短,不稳定,测值上仍然不够精确;

[0007] 另有技术(专利申请号:201110257444.X)是在磁微粒上直接联抗体,操作难度高,不易得。

发明内容

[0008] 本发明要解决的问题是提供促黄体生成素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,测值不够精确,检测范围窄,成本高,保质期短的缺陷,。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:促黄体生成素纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:促黄体生成素校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的促黄体生成素抗体;促黄体生成素抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;促黄体生成素质控品,质控品包括浓度 $5mIU/mL$ 的低值质控品和 $120mIU/mL$ 的高值质控品;化学发光液 A 液和 B 液, A 液为 $5mmol/L$, pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 $0.7g/L$ 鲁米诺和终浓度

0.08g/L 对碘酚 ;B 液为 0.675g/L 过氧化脲 ;20 倍浓缩洗液 ;反应管。

[0010] 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 10-50nm。

[0011] 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。

[0012] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 促黄体生成素校准品的配制:

[0014] 将促黄体生成素抗原用山羊血清配制成校准品浓储液,以国家校准品进行定标,将浓储液用山羊血清稀释至工作浓度,分别为 0, 2, 10, 25, 100, 250mIU/mL,即为校准品浓度;

[0015] (2) 促黄体生成素质控品的配制:

[0016] 用山羊血清将上述浓储液分别稀释至 5mIU/mL 和 120mIU/mL,并以国家校准品进行定标;将 5mIU/mL 作为低值质控品,120mIU/mL 作为高值质控品;

[0017] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

[0018] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0019] 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) 在氮气环境下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65℃,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℃ 烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0020] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0021] 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;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,用量为磁流体用量 3%,搅拌速度约为 500rpm,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,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℃ 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0022] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

[0023] 取 100mL 0.1M2-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℃ 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;

[0024] (4) 生物素标记的促黄体生成素抗体的制备

[0025] 取 0.5mg 促黄体生成素抗体,用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8℃ 下透析 1 ~ 3h;将透析后的抗体加入 25ug 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%,缓慢振荡,避光反应 3h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 30-60min;用 0.01M PBS 溶液在 2 ~ 8℃ 下透析 2 天,期间换液 3-5 次;

[0026] (5) 促黄体生成素抗体酶结合物的制备

[0027] 采用改良高碘酸钠氧化法将促黄体生成素抗体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 1:3000-5000, 并加入 15% 酶稳定剂, 储存于 2 ~ 8℃ ;

[0028] 改良过碘酸钠氧化法步骤包括 :

[0029] A :HRP 活化

[0030] 1) 配置 10mg/mL HRP 溶液 ;

[0031] 2) 配置 12.8mg/mL 过碘酸钠 NaIO_4 溶液 ;

[0032] 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 ;

[0033] 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)。

[0034] B、促黄体生成素单克隆抗体标记

[0035] 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 ;

[0036] 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) ;

[0037] 3) 配置浓度为 2mg/mL 的 NaBH_4 水溶液, 按 1mgHRP 加 80uL 配制好的 NaBH_4 水溶液的比例进行混合, 并于 4℃ 避光反应 2h ;

[0038] 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。

[0039] 酶稀释液中包括 10mL/L2M NaOH, 15g/L NaCl, 10g/LBSA, 5g/L Dextran T-2000(购自 Sigma 公司), 1.05g/L 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) ;

[0040] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0041] 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 ;

[0042] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0043] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.08g/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 ;

[0044] (8) 组装 : 将上述试剂组装成盒, 储存于 2 ~ 8℃ ;

[0045] (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、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0046] 本发明的原理是, 采用双抗体夹心法测定血清或血浆中的 LH, 在亲和素 - 纳米磁微粒悬浮液中加入生物素 - LH 抗体结合物, 通过亲和素和生物素的亲和反应, 形成磁微粒 - 亲和素 - 生物素 - 促黄体生成素抗体复合物, 加入样本和酶, 通过抗原抗体反应, 形成磁微粒 - 亲和素 - 生物素 - 促黄体生成素抗体 - 促黄体生成素 - 促黄体生成素抗体 - HRP 复合物, 用磁场将复合物吸附在试管底部, 清洗掉游离的成分, 加入底物工作液, 在氧化剂作用下, HRP 催化鲁米诺生成处于激发态的氨基邻苯二甲酸离子, 其恢复到基态时, 释放出 425nm 的光子, 于第 5 分钟测定各加样孔的发光值 RLU。样本的 RLU 与样本促黄体生成素浓度呈正相关。样本中的促黄体生成素浓度依据由校准品促黄体生成素浓度和对应的 RLU 建立的 $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$ 数学模型进行定量, 从而检测人血清、血浆中的促黄体生成素含量。

[0047] 本专利发明的促黄体生成素纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒, 具有以下

优点：

[0048] (1) 灵敏度高,本试剂盒的分析灵敏度不高于 0.2mIU/mL。

[0049] (2) 特异性良好,本产品对人绒毛膜促性腺激素(200000mIU/mL)、促甲状腺激素(500 μ IU/mL)、促卵泡激素(500mIU/mL) 未出现交叉反应。

[0050] (3) 精密性良好,批内不精密度不高于 5%,批间不精密度不高于 10%。

[0051] (4) 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。

[0052] (5) 稳定性良好,本产品可在 37℃可存放 7 天以上,在 2 ~ 8℃可存放 1 年。

附图说明

[0053] 图 1 是本发明的试剂盒测定促黄体生成素与罗氏测定促黄体生成素的测定结果比较图,其中纵坐标为本试剂盒测得的促黄体生成素值,横坐标为罗氏试剂盒测定促黄体生成素值,两种方法相关系数(r)=0.9601,直线方程 $y=1.1034x-0.669$ 。

具体实施方式

[0054] 实施例 1:制备促黄体生成素纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

[0055] (1) 促黄体生成素校准品的配制：

[0056] 将促黄体生成素抗原(Fitzgerald 公司生产)用山羊血清(购自郑州益康生物工程有限公司)配制成校准品浓储液,以国家校准品(批号:150531-0211,规格:530mIU/支)进行定标,将浓储液用山羊血清稀释至工作浓度,分别为 0,2,10,25,100,250mIU/mL,即为校准品浓度；

[0057] (2) 促黄体生成素质控品的配制：

[0058] 用山羊血清将上述浓储液分别稀释至 5mIU/mL 和 120mIU/mL,并以国家校准品进行定标；将 5mIU/mL 作为低值质控品,120mIU/mL 作为高值质控品；

[0059] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备：

[0060] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0061] 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) 在氮气环境下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65℃,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℃烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒；

[0062] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0063] 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;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,用量为磁流体用量 3%,搅拌速度约为 500rpm,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,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℃下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳

米磁微粒；

[0064] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

[0065] 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℃ 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;

[0066] (4) 生物素标记的促黄体生成素抗体的制备

[0067] 取 0.5mg 促黄体生成素抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8℃ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 25μg 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%,缓慢振荡,避光反应 3h;在上述溶液中加入 250μL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 30-60min;用 0.01M PBS 溶液在 2~8℃ 下透析 2 天,期间换液 3-5 次;

[0068] (5) 促黄体生成素抗体酶结合物的制备

[0069] 采用改良高碘酸钠氧化法将促黄体生成素抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液(其成分包括 5g/L MES, 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))将其稀释至工作浓度 1:3000-5000,并加入 15% 酶稳定剂,储存于 2~8℃;

[0070] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0071] 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;

[0072] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0073] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.08g/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;

[0074] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃;

[0075] (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、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0076] 实施例 2:本发明试剂盒的检查

[0077] (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。

[0078] (2) 准确性:试剂盒校准品与国家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, $|t| < 2.447$);以促黄体生成素国家标准品为对照品,用双对数数学模型拟合,试剂盒校准品的实测值与标示值比值的平均值应在 0.90~1.10 范围内。

[0079] (3) 剂量-反应曲线的线性:用双读数数学模型拟合,剂量-反应曲线在 0.2-250mIU/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0080] (4) 分析灵敏度:试剂盒分析灵敏度不高于 0.2mIU/mL。

[0081] (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($CV\%$) = $SD / \bar{X} \times 100\%$;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($CV\%$) = $SD / \bar{X} \times 100\%$,结果应符合

合批内不精密度(CV%)应不高于5%;批间不精密度(CV%)应不高于10%。

[0082] (6) 质控品的测定值:平行测定10孔高值和低值的质控品,用 $\text{Log}(X)-\text{Log}(Y)$ 数学模型拟合,质控品测值应在允许范围内,低值质控品测值在4-6mIU/mL,高值质控品测值在96-144mIU/mL。

[0083] (7) 特异性:

[0084] 交叉反应符合下表要求:

[0085]

交叉反应因子	浓度	测定值
人绒毛膜促性腺激素(hCG)	200000mIU/mL	<0.5 mIU/mL
促甲状腺激素(TSH)	500 μ IU/mL	<0.5mIU/mL
促卵泡激素(FSH)	500mIU/mL	<0.5 mIU/mL

[0086] (8.) 稳定性:37℃放置7天,测定值应符合上述各项要求。

[0087] 实施例3:本发明试剂盒的使用方法

[0088] (1) 将待检试剂盒在室温(18~25℃)下平衡30分钟。

[0089] (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℃,待结晶溶解后再进行稀释。

[0090] (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。

[0091] (4) 将反应管编号,向试管中依次加入25-50 μ L校准品或血清标本、50 μ L磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液、50 μ L生物素-促黄体生成素抗体结合物、50-100 μ L促黄体生成素抗体酶结合物,37℃下振荡反应30min,将试管架置于磁分离器上分离5min,然后倒出上清液,加入500 μ L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100 μ L,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Log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促黄体生成素的浓度。

[0092] 实施例4:本试剂盒的方法学评价结果

[0093] 检测范围:范围为0.2~250mIU/mL,对于浓度大于250mIU/mL的标本应先进行稀释后再进行测定。

[0094] 灵敏度:0.2mIU/mL。

[0095] 精密度:小于5%。

[0096] 准确性:回收率的平均值在0.90~1.10范围内。

[0097] 特异性:与促甲状腺激素(TSH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促卵泡激素(FSH)的交叉反应系数小于1%。

[0098] 质控品测值:低值质控品(QcL)和高值质控品(QcH)的测值均在允许范围内,低值质控品测值在4-6mIU/mL,高值质控品测值在96-144mIU/mL。

[0099] 稳定性:将试剂盒中各试剂组分于37℃下放置7d,稳定性良好。

[0100] 实施例5:本试剂盒的临床对比实验

[0101] 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120例,先以

促黄体生成素罗氏检测试剂盒测试后,再用本专利发明的试剂盒(化学发光)进行测定,结果表明,直线方程为 $y=1.1034x-0.669$,相关系数 $R=0.9601$ 。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 $\alpha=0.05$), $P<0.001$,两种方法测定的促黄体生成素值的相关密切程度是显著性的,可见两种方法测定的促黄体生成素值密切相关,说明试剂盒的诊断能力较强,可推广临床应用。

[0102] 为了确定本试剂盒的临床参考值,对 1033 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:1 ~ 11mIU/mL;女性:卵泡期:1 ~ 17mIU/mL、排卵期:24 ~ 98mIU/mL、黄体期:0.5 ~ 19mIU/mL、绝经期:14 ~ 54mIU/mL。

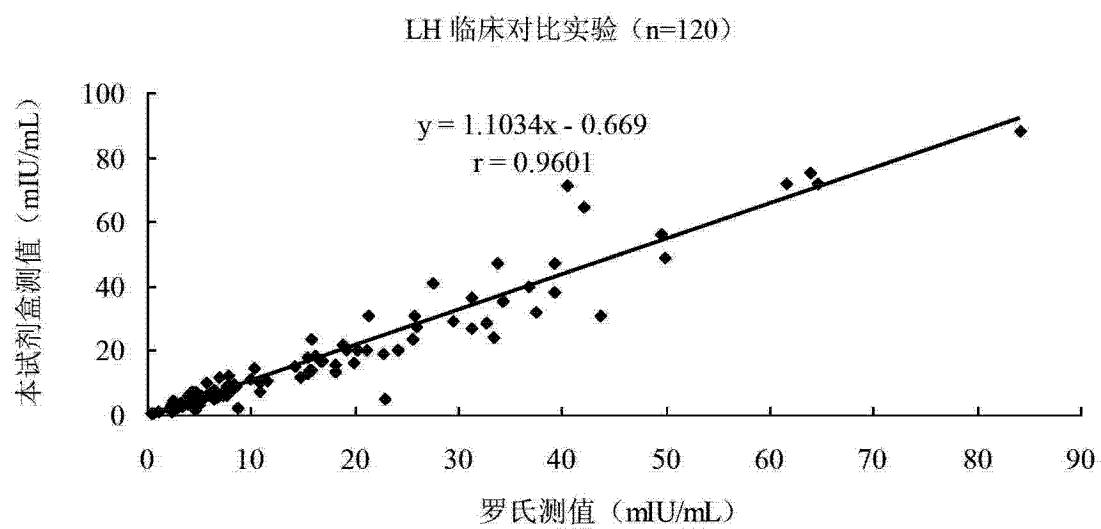


图 1

专利名称(译)	一种促黄体生成素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	CN103293323A	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	CN201310237681.9	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	G01N33/74 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	李莉华		
其他公开文献	CN103293323B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种促黄体生成素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：促黄体生成素校准品；偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液；生物素标记的促黄体生成素抗体；促黄体生成素抗体酶结合物，所用的酶为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$ ，活性 $\geq 250U/mL$ ；促黄体生成素质控品；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敏感性高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测自动化程度高等优点。

LH 临床对比实验 (n=120)

