



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110244040 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201910483367.6

(22)申请日 2019.06.04

(71)申请人 江苏泽成生物技术有限公司

地址 214000 江苏省无锡市江阴市东盛西路6号(扬子江生物医药加速器A4-1)

(72)发明人 刘振华 刘振世 曾云 于晨

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理事务所(普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

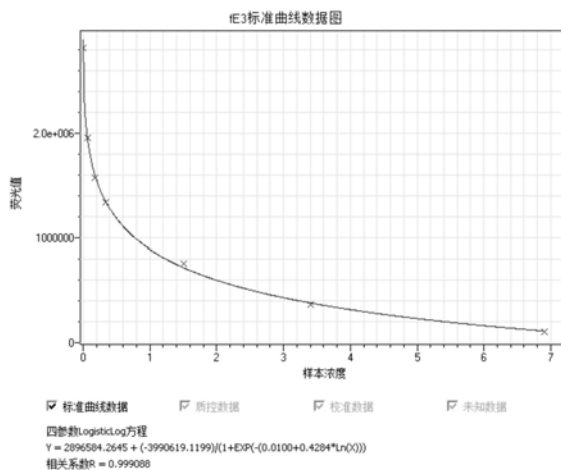
权利要求书3页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种游离雌三醇(fE3)检测试剂盒及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种游离雌三醇(fE3)检测试剂盒及其制备方法与应用,所述试剂盒包括以下试剂组分:校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂和发光底物;本发明的试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽,可配合半自动、全自动仪器使用;提高检测灵敏度及可靠性,并降低成本,延长有效期。本发明以碱性磷酸酶(AP)为标记酶,通过化学反应标记fE3抗原衍生物,并使用凝胶层析分离未反应的酶或抗原衍生物,提高反应的灵敏度;以免疫磁微粒为固相载体,以羊抗异硫氰酸荧光素抗体偶联磁性微球,作为通用的分离试剂,不仅使免疫反应更容易混匀和分离,而且大大提高了反应速度。



1. 一种游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒包括以下试剂组分: 校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂和发光底物;

所述校准品和质控品是用含蛋白的缓冲液溶解fE3抗原后稀释至含去皮质醇人血清的缓冲液中配制得到;

所述抗试剂A是碱性磷酸酶标记的fE3抗原衍生物;

所述抗试剂B是异硫氰酸荧光素标记的fE3单克隆抗体;

所述磁微粒试剂是由抗异硫氰酸荧光素抗体与磁微粒偶联制得;

所述发光底物为碱性磷酸酶体系的底物液。

2. 根据权利要求1所述的游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒还包括清洗液。

3. 一种如权利要求1或2所述的游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒的制备方法, 其特征在于: 包括如下步骤:

(a) 制备所述校准品和质控品:

采用含蛋白的缓冲液溶解fE3抗原后稀释至含去皮质醇人血清的缓冲液中, 稀释成不同浓度点, 通过定标得到;

(b) 制备所述抗试剂A: 将碱性磷酸酶标记的fE3抗原衍生物按照一定浓度加入到Tris盐缓冲液中制得, 具体包括如下步骤:

(b-1) 碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联:

(b-1-1) 取适量fE3抗原衍生物用DMSO:Dioxane=1:1溶解至4-6mg/ml, 充分混匀, 得到第一混合物;

(b-1-2) 向所述第一混合物中加入一定比例的氯甲酸乙酯 (ECF) 和三乙基胺 (TEA) 36-38°C水浴20-40min, 得到第二混合物;

(b-1-3) 将碱性磷酸酶用0.025M硼酸盐缓冲液配制浓度为1.0-5.0mg/mL, 进行稀释, 使用分光光度计在280nm处读取吸光值, 使得吸光值乘以稀释倍数所得的浓度值与配制目标浓度偏差小于10%, 得到第三混合物;

(b-1-4) 取所述第二混合物和第三混合物, 按所述fE3抗原衍生物和碱性磷酸酶摩尔比为20:1~40:1的量转移到棕色玻璃瓶内, 室温下搅拌4-5小时, 得到所需的碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物;

(b-2) 所述碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物的纯化: 使用pH=7-9的Tris盐缓冲液对G25色谱柱进行平衡, 使用pH=7-9的Tris盐缓冲液进行洗脱, 紫外监测, 分部收集洗脱液, 记录仪记录纯化图谱, 确认含有所述碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物的试管, 注意、避光防护, 用紫外分光光度计测试其浓度;

(b-3) 将所述纯化后的碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物按照一定比例加入到含表面活性剂的Tris盐缓冲液中制得抗试剂A;

(c) 制备所述抗试剂B: 将异硫氰酸荧光素标记的fE3单克隆抗体按照一定浓度加入到Tris盐缓冲液中制得, 具体包括如下步骤:

(c-1) 异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体的偶联:

(c-1-1) 将异硫氰酸荧光素用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液配制成浓度为0.4-0.8mg/mL, 对异硫氰酸荧光素进行10倍稀释, 使用分光光度计在495nm处读取吸光值, 使得吸光值控制

在0.92-1.08范围内,得到第四混合物;

(c-1-2) 将fE3单克隆抗体用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液更换保存液并转移到棕色玻璃瓶内保存,得到第五混合物;

(c-1-3) 按所述fE3单克隆抗体体积量:异硫氰酸荧光素体积量为5:1-20:1计算所需要的异硫氰酸荧光素的体积,取所述第四混合物加入到第五混合物中,室温下搅拌10-12小时,反应过程严格避光,得到异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物;

(c-2) 所述异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物的纯化:使用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液对G25色谱柱进行平衡,使用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液进行洗脱,收集第一个有颜色的洗脱峰,注意避光防护,用紫外分光光度计测试其蛋白浓度及FITC浓度,并计算其F/P, F/P要在1.5-9范围内才可判定为合格;

(c-3) 将得到的所述异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物按照一定比例加入到含表面活性剂的Tris盐缓冲液中制得抗试剂B;

(d) 制备所述磁微粒试剂:将羊抗异硫氰酸荧光素抗体与磁微粒偶联制得,通过羊抗异硫氰酸荧光素抗体与所述异硫氰酸荧光素的特异性结合使抗原抗体免疫复合物固定在磁微粒上,具体包括如下步骤:

(d-1) 将羧基磁珠浓缩液充分混匀,在充分混匀后取出羧基磁珠浓缩液至反应瓶中,将反应容器置于磁场12-18min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清液;

(d-2) 清洗羧基磁珠:加入羧基磁珠体积2-5倍的MES缓冲液,混匀20-30min,再置于磁场中待所述羧基磁珠全部沉降12-18min后吸去上清液;

(d-3) 重复所述清洗步骤(d-2)若干遍,充分清洗所述羧基磁珠后将羧基磁珠溶液定容到10-50mg/mL,持续混匀;

(d-4) 连接反应:按照羧基磁珠:羊抗异硫氰酸荧光素抗体质量比为100:1~50:1的量在所述步骤(d-3)的羧基磁珠溶液中加入用保存在MES缓冲液体系中羊抗异硫氰酸荧光素抗体,保持混匀状态下2~8℃反应16-20小时;

(d-5) 使用磁珠封闭剂对所述步骤(d-4)中的羧基磁珠表面裸露的羧基进行封闭3-8小时,得到免疫磁珠;

(d-6) 用磁珠缓冲液将得到的所述免疫磁珠清洗若干遍后定容至8-12mg/mL,2~8℃保存待用;

(d-7) 用磁珠缓冲液将所述步骤(d-6)中的定容后的免疫磁珠稀释至一定浓度,制得磁微粒试剂;

(e) 将制备得到的所述校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B和磁微粒试剂及市售的碱性磷酸酶体系的底物液独立地置于包装容器内,即得到所需的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒。

4. 根据权利要求3所述的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述步骤(a)中的含去皮质醇人血清的缓冲液内添加有防腐剂,并使用0.22μm滤膜过滤处理后得到。

5. 根据权利要求4所述的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述防腐剂为:四环素和硫酸新霉素,其中所述四环素的用量为所述去皮质醇人血清缓冲液质量分数的0.01%-0.05%;所述硫酸新霉素的用量为所述去皮质醇人血清缓冲液质量分数的0.1-0.5%。

6. 根据权利要求3所述的游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (b) 和步骤 (c) 中的Tris盐缓冲液是由0.1-0.4mM Tris盐, 0.02%-0.05% 体积百分数的四环素、1%-5% 体积百分数的绵羊血清、3%-10% 体积百分数的新生牛血清、1%-5% 体积百分数的马血清配制而成。

7. 根据权利要求3所述的游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 (b) 或步骤 (c) 中的表面活性剂为Tween 20、Triton X-100或Bronidox中的至少一种。

8. 一种如权利要求1或2所述的游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒的使用方法, 其特征在于: 使用所述试剂盒定量检测fE3, 具体包括如下步骤:

(A) 向三根试管内分别加入50-70 μ L所述校准品、质控品和待测样本;

(B) 向所述步骤 (A) 中的三根试管内分别再加入20-40 μ L所述抗试剂A;

(C) 向所述步骤 (B) 中的三根试管内分别再加入20-40 μ L所述抗试剂B;

(D) 用塑料薄膜分别覆盖所述步骤 (C) 的三根试管, 使用多管混匀器轻度振荡20-40s后, 置于36-38 $^{\circ}$ C水浴10-20分钟;

(E) 向所述步骤 (D) 中的三根试管内分别再加入20-40 μ L所述磁微粒试剂;

(F) 用塑料薄膜分别覆盖所述步骤 (E) 的三根试管, 使用多管混匀器轻度振荡20-40s后, 置于36-38 $^{\circ}$ C水浴1-10分钟;

(G) 将所述步骤 (F) 中的三根试管放置在磁分离器上, 确保每根试管都与分离器表面接触, 沉淀1-3分钟; 缓慢的倒转所述磁分离器, 倒出试管内的上清液, 把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上, 用力拍击所述磁分离器底部以除去粘在所述管壁上的所有液滴;

(H) 向所述步骤 (G) 中的三根试管内加入200-400 μ L清洗液, 用塑料薄膜覆盖所述三根试管, 使用多管混匀器轻度振荡20-40s, 至彻底混匀, 操作3次;

(I) 把所述步骤 (H) 中的三根试管从所述磁分离器上取下, 再分别加入100-200 μ L所述发光底物, 振荡混匀2-4s, 用化学发光仪检测发光强度。

一种游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及游离雌三醇 (fE3) 检测技术领域,特别涉及一种游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 母体血清中的游离雌三醇 (1,3,5 (10)-三烯甲雌醇核-3,16 α ,17 β -三醇) 主要是由胎儿肝脏和胎盘分泌的雌三醇。雌三醇前体、胆固醇及孕烯醇酮源自母体和胎盘。胎儿肾上腺将孕烯醇酮转换为脱氢表雄酮 (DHEA),之后,脱氢表雄酮又被胎儿肝脏转换为16-OH-DHEA-硫酸。随后,硫酸盐衍生物转到胎盘,在这里它被转换为雌三醇并进入母体血浆。一旦进入母体血液循环,在肝脏内结合前,它的半衰期大约为20分钟。在正常妊娠期,雌三醇含90%循环雌激素。测定游离形式的血清水平,是判断胎儿健康和胎盘功能的灵敏指标。

[0003] 游离雌三醇 (fE3) 的含量是判断胎盘功能和胎儿发育状况的重要依据,血清雌三醇的含量随着妊娠期进展而不断增加,直到分娩前才稍降,当血清雌三醇下降并同时伴有雌二醇升高时,提示胎盘功能不良,常预示早产。妊娠高血压综合征、先兆子痫、胎儿宫内生长迟缓、过期妊娠、胎儿宫内窒息、葡萄胎、胎儿先天畸形等情况,都会表现为游离雌三醇含量下降。若连续测定下降达50%,表示胎儿宫内有窘迫现象。

[0004] 如果孕妇血清雌三醇升高,有可能是多胎妊娠、糖尿病合并妊娠及胎儿先天性肾上腺皮质功能亢进症等。

[0005] 在国内,游离雌三醇 (fE3) 检测临床上主要以放射免疫试验 (RIA);酶联免疫吸附试验 (ELISA);进口化学发光法应用为主,国外进口试剂价格非常昂贵,给患者带来很大的经济负担,不利于在基层普及。其它方法技术灵敏度较低、线性窄、特异性较差,也不利于高通量的全自动检测。因此,有待开发对游离雌三醇 (fE3) 检测灵敏度高与可靠性并能降低检测成本的检测技术。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒及其制备方法与应用。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案为:

[0008] 一种游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒,所述试剂盒包括以下试剂组分:校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂和发光底物;

[0009] 所述校准品和质控品是用含蛋白的缓冲液溶解fE3抗原后稀释至含去皮质醇人血清的缓冲液中配制得到;

[0010] 所述抗试剂A是碱性磷酸酶标记的fE3抗原衍生物;

[0011] 所述抗试剂B是异硫氰酸荧光素标记的fE3单克隆抗体;

[0012] 所述磁微粒试剂是由抗异硫氰酸荧光素抗体与磁微粒偶联制得;

[0013] 所述发光底物为碱性磷酸酶体系的底物液。

- [0014] 优选的,所述试剂盒还包括清洗液。
- [0015] 一种所述的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:
- [0016] (a) 制备所述校准品和质控品:
- [0017] 采用含蛋白的缓冲液溶解fE3抗原后稀释至含去皮质醇人血清的缓冲液中,稀释成不同浓度点,通过定标得到;
- [0018] (b) 制备所述抗试剂A:将碱性磷酸酶标记的fE3抗原衍生物按照一定浓度加入到Tris盐缓冲液中制得,具体包括如下步骤:
- [0019] (b-1) 碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联:
- [0020] (b-1-1) 取适量fE3抗原衍生物用DMSO:Dioxane=1:1溶解至4-6mg/ml,充分混匀,得到第一混合物;
- [0021] (b-1-2) 向所述第一混合物中加入一定比例的氯甲酸乙酯(ECF)和三乙基胺(TEA)36-38℃水浴20-40min,得到第二混合物;
- [0022] (b-1-3) 将碱性磷酸酶用0.025M硼酸盐缓冲液配制浓度为1.0-5.0mg/mL,进行稀释,使用分光光度计在280nm处读取吸光值,使得吸光值乘以稀释倍数所得的浓度值与配制目标浓度偏差小于10%,得到第三混合物;
- [0023] (b-1-4) 取所述第二混合物和第三混合物,按所述fE3抗原衍生物和碱性磷酸酶摩尔比为20:1~40:1的量转移到棕色玻璃瓶内,室温下搅拌4-5小时,得到所需的碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物;
- [0024] (b-2) 所述碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物的纯化:使用pH=7-9的Tris盐缓冲液对G25色谱柱进行平衡,使用pH=7-9的Tris盐缓冲液进行洗脱,紫外监测,分部收集洗脱液,记录仪记录纯化图谱,确认含有所述碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物的试管,注意、避光防护,用紫外分光光度计测试其浓度;
- [0025] (b-3) 将所述纯化后的碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物按照一定比例加入到含表面活性剂的Tris盐缓冲液中制得抗试剂A;
- [0026] (c) 制备所述抗试剂B:将异硫氰酸荧光素标记的fE3单克隆抗体按照一定浓度加入到Tris盐缓冲液中制得,具体包括如下步骤:
- [0027] (c-1) 异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体的偶联:
- [0028] (c-1-1) 将异硫氰酸荧光素用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液配制成浓度为0.4-0.8mg/mL,对异硫氰酸荧光素进行10倍稀释,使用分光光度计在495nm处读取吸光值,使得吸光值控制在0.92-1.08范围内,得到第四混合物;
- [0029] (c-1-2) 将fE3单克隆抗体用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液更换保存液并转移到棕色玻璃瓶内保存,得到第五混合物;
- [0030] (c-1-3) 按所述fE3单克隆抗体体积量:异硫氰酸荧光素体积量为5:1-20:1计算所需要的异硫氰酸荧光素的体积,取所述第四混合物加入到第五混合物中,室温下搅拌10-12小时,反应过程严格避光,得到异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物;
- [0031] (c-2) 所述异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物的纯化:使用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液对G25色谱柱进行平衡,使用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液进行洗脱,收集第一个有颜色的洗脱峰,注意避光防护,用紫外分光光度计测试其蛋白浓度及FITC浓度,并计算其F/P,F/P要在1.5-9范围内才可判定为合格;

[0032] (c-3) 将得到的所述异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物按照一定比例加入到含表面活性剂的Tris盐缓冲液中制得抗试剂B;

[0033] (d) 制备所述磁微粒试剂:将羊抗异硫氰酸荧光素抗体与磁微粒偶联制得,通过羊抗异硫氰酸荧光素抗体与所述异硫氰酸荧光素的特异性结合使抗原抗体免疫复合物固定在磁微粒上,具体包括如下步骤:

[0034] (d-1) 将羧基磁珠浓缩液充分混匀,在充分混匀后取出羧基磁珠浓缩液至反应瓶中,将反应容器置于磁场12-18min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清液;

[0035] (d-2) 清洗羧基磁珠:加入羧基磁珠体积2-5倍的MES缓冲液,混匀20-30min,再置于磁场中待所述羧基磁珠全部沉降12-18min后吸去上清液;

[0036] (d-3) 重复所述清洗步骤(d-2)若干遍,充分清洗所述羧基磁珠后将羧基磁珠溶液定容到10-50mg/mL,持续混匀;

[0037] (d-4) 连接反应:按照羧基磁珠:羊抗异硫氰酸荧光素抗体质量比为100:1~50:1的量在所述步骤(d-3)的羧基磁珠溶液中加入用保存在MES缓冲液体系中羊抗异硫氰酸荧光素抗体,保持混匀状态下2~8℃反应16-20小时;

[0038] (d-5) 使用磁珠封闭剂对所述步骤(d-4)中的羧基磁珠表面裸露的羧基进行封闭3-8小时,得到免疫磁珠;

[0039] (d-6) 用磁珠缓冲液将得到的所述免疫磁珠清洗若干遍后定容至8-12mg/mL,2~8℃保存待用;

[0040] (d-7) 用磁珠缓冲液将所述步骤(d-6)中的定容后的免疫磁珠稀释至一定浓度,制得磁微粒试剂;

[0041] (e) 将制备得到的所述校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B和磁微粒试剂及市售的碱性磷酸酶体系的底物液独立地置于包装容器内,即得到所需的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒。

[0042] 优选的,所述步骤(a)中的含去皮质醇人血清的缓冲液内添加有防腐剂,并使用0.22μm滤膜过滤处理后得到。

[0043] 优选的,所述防腐剂为:四环素和硫酸新霉素,其中所述四环素的用量为所述去皮质醇人血清缓冲液质量分数的0.01%-0.05%;所述硫酸新霉素的用量为所述去皮质醇人血清缓冲液质量分数的0.1-0.5%。

[0044] 优选的,所述步骤(b)和步骤(c)中的Tris盐缓冲液是由0.1-0.4mM Tris盐,0.02%-0.05%体积百分数的四环素、1%-5%体积百分数的绵羊血清、3%-10%体积百分数的新生牛血清、1%-5%体积百分数的马血清配制而成。

[0045] 优选的,所述步骤(b)或步骤(c)中的表面活性剂为Tween 20、Triton X-100或Bronidox中的至少一种。

[0046] 一种所述的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒的使用方法,使用所述试剂盒定量检测fE3,具体包括如下步骤:

[0047] (A) 向三根试管内分别加入50-70μL所述校准品、质控品和待测样本;

[0048] (B) 向所述步骤(A)中的三根试管内分别再加入20-40μL所述抗试剂A;

[0049] (C) 向所述步骤(B)中的三根试管内分别再加入20-40μL所述抗试剂B;

[0050] (D) 用塑料薄膜分别覆盖所述步骤(C)的三根试管,使用多管混匀器轻度振荡20-

40s后,置于36-38℃水浴10-20分钟;

[0051] (E) 向所述步骤(D)中的三根试管内分别再加入20-40μL所述磁微粒试剂;

[0052] (F) 用塑料薄膜分别覆盖所述步骤(E)的三根试管,使用多管混匀器轻度振荡20-40s后,置于36-38℃水浴1-10分钟;

[0053] (G) 将所述步骤(F)中的三根试管放置在磁分离器上,确保每根试管都与分离器表面接触,沉淀1-3分钟;缓慢的倒转所述磁分离器,倒出试管内的上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上,用力拍击所述磁分离器底部以除去粘在所述管壁上的所有液滴;

[0054] (H) 向所述步骤(G)中的三根试管内加入200-400μL清洗液,用塑料薄膜覆盖所述三根试管,使用多管混匀器轻度振荡20-40s,至彻底混匀,操作3次;

[0055] (I) 把所述步骤(H)中的三根试管从所述磁分离器上取下,再分别加入100-200μL所述发光底物,振荡混匀2-4s,用化学发光仪检测发光强度。

[0056] 采用上述技术方案,本发明的试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽,可配合半自动、全自动仪器使用;提高检测灵敏度及可靠性,并降低成本,延长有效期。(1) 本发明以碱性磷酸酶(AP)为标记酶,通过化学反应标记fE3抗原衍生物,并使用凝胶层析分离未反应的酶或抗原衍生物,提高反应的灵敏度;(2) 以免疫磁微粒为固相载体,以羊抗异硫氰酸荧光素抗体偶联磁性微球,作为通用的分离试剂,不仅使免疫反应更容易混匀和分离,而且大大提高了反应速度;(3) 以新型化学发光底物ALPS为底物,该底物是辉光性底物,而且快速达到平台期,有利于信号的检测,提高了最终试剂盒的灵敏度和特异性性能;并进一步优化了化学发光增强体系,保证了终产品的信号灵敏度高和稳定性好、变异小;(4) ALPS底物的优点在于灵敏度高和平台稳定期长;(5) 本发明的各试剂组分包括校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂和发光底物等稳定性良好,效期可至一年以上;检测灵敏度高,特异性能好且变异小;(6) 本发明经过大量实验的工艺优化,得到完善统一工艺,并严格按照标准生产操作规程和质量控制规程进行生产,用户仅需按照操作说明进行规范操作,就可得到可靠的结果,在临床研究中与国外进口试剂的符合相关性高达95%以上,且费用仅为其1/5~1/6。

附图说明

[0057] 图1为本发明的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒的荧光标准曲线图;

[0058] 图2为本发明的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒与进口试剂盒的性能对比图。

具体实施方式

[0059] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步说明。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0060] 实施例1

[0061] fE3单克隆抗体为能与人体内游离雌三醇(fE3)抗原特异结合的单克隆抗体;fE3抗原为雌三醇(fE3)的6位CMO衍生物(ESTRIOL-6-ONE-6-(O-CARBOXYMETHYL)OXIME);游离雌三醇(fE3)抗原衍生物采购自国外Steraloids公司;游离雌三醇(fE3)单克隆抗体采购自国内Biospacific公司。本发明的试剂盒中未详细提及的试剂组分(例如清洗液、一些必要的

缓冲液等)、试剂盒的外包装以及各试剂组分的独立包装容器等均可以按照所属领域的常规操作进行,符合相关行业规定即可。本发明的方法中未详细提及的操作步骤也可参照所属领域的常规操作进行,例如,在检测前,可将各试剂放至室温(18~25℃),加样前充分混匀;所用检测仪器设备例如化学发光类测定仪的使用按照说明书操作进行;本发明中,未特别注明单位的比例与含量,固体组分为质量比例与含量,液体组分为体积比例与含量。

[0062] 各种缓冲液的配方如下:

[0063] 【含去皮质醇人血清的缓冲液】

[0064]

试剂名称	生产商	浓度	1L缓冲液用量
去皮质醇人血清	Sigma	100%	1000mL
四环素	Sigma	0.01%	10mg
硫酸新霉素	Sigma	0.01%	10mg

[0065] 【Tris盐缓冲液】

[0066]

试剂名称	生产商	浓度	1L缓冲液用量
Tris	Sigma	0.1M	12.12
氯化钠	Sigma	0.9%	5.82
绵羊血清	广州蕊特	10%	100mL
新生牛血清	广州蕊特	10%	100mL

[0067] 【磁珠缓冲液】

[0068]

试剂名称	生产商	浓度	1L缓冲液用量
Tris	Sigma	0.1M	12.12
氯化钠	Sigma	0.9%	5.82
甲基纤维醚	Sigma	5%	50g

[0069] 一种游离雌三醇(fE3)检测试剂盒,所述试剂盒包括以下试剂组分:

[0070] 校准品(A,B,...,G):用所述含去皮质醇人血清的缓冲液稀释fE3抗原得到;

[0071] 质控品(Q1,Q2):用所述含去皮质醇人血清的缓冲液稀释fE3抗原得到;

[0072] 抗试剂A:用所述Tris盐缓冲液稀释碱性磷酸酶(AP)标记的fE3抗原衍生物;

[0073] 抗试剂B:用所述Tris盐缓冲液稀释异硫氰酸荧光素(FITC)标记的fE3单克隆抗体;

[0074] 磁微粒试剂:用磁微粒缓冲液稀释抗异硫氰酸荧光素抗体与磁微粒偶联物;

[0075] 发光底物:所述发光底物直接选用江苏泽成生物技术有限公司生产的全自动免疫检测系统用底物液(专利申请号:201310300623.6),也可选用其他厂家生产的碱性磷酸酶体系的底物液。

[0076] 实施例2

[0077] 一种所述的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0078] (a) 校准品和质控品的制备

[0079] -将游离雌三醇(fE3)抗原溶解于含蛋白的缓冲液中至0.3mg/mL溶液处理30分钟;

[0080] -将上述反应物按不同浓度用【含去皮质醇人血清的缓冲液】稀释成不同浓度点，并定标；

[0081] -校准品和质控品的目标浓度为

[0082]

试剂名称	目标浓度 (ng/mL)
校准品A	0
校准品B	0.04
校准品C	0.1
校准品D	0.3
校准品E	1
校准品F	3
校准品G	9
质控品Q1	0.3
质控品Q2	3

[0083] 清洗浓缩液的配制，按以下配方配制：

[0084]

试剂名称	生产商	规格	1L缓冲液用量
Tris	Sigma	0.1M	12.12
氯化钠	Sigma	0.9%	5.82
Tween-20	Sigma	5%	50mL
曲拉通-100	Sigma	5%	50mL

[0085] (b) 制备抗试剂A：将碱性磷酸酶标记的fE3抗原衍生物按照一定浓度加入到Tris盐缓冲液中制得，具体包括如下步骤：

[0086] (b-1) 碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联：

[0087] (b-1-1) 取适量fE3抗原衍生物用DMSO:Dioxane=1:1溶解至4-6mg/ml，充分混匀，得到第一混合物；

[0088] (b-1-2) 向所述第一混合物中加入一定比例的氯甲酸乙酯 (ECF) 和三乙基胺 (TEA) 36-38℃水浴20-40min，得到第二混合物；

[0089] (b-1-3) 将碱性磷酸酶用0.025M硼酸盐缓冲液配制浓度为1.0-5.0mg/mL，进行稀释，使用分光光度计在280nm处读取吸光值，使得吸光值乘以稀释倍数所得的浓度值与配制目标浓度偏差小于10%，得到第三混合物；

[0090] (b-1-4) 取所述第二混合物和第三混合物，按所述fE3抗原衍生物和碱性磷酸酶摩尔比为20:1~40:1的量转移到棕色玻璃瓶内，室温下搅拌4-5小时，得到所需的碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物；

[0091] (b-2) 所述碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物的纯化：使用pH=7-9的Tris盐缓冲液对G25色谱柱进行平衡，使用pH=7-9的Tris盐缓冲液进行洗脱，紫外监测，分部收集洗脱液，记录仪记录纯化图谱，确认含有所述碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物的试管，注意、避光防护，用紫外分光光度计测试其浓度；

[0092] (b-3) 将所述纯化后的碱性磷酸酶与fE3抗原衍生物的偶联物按照一定比例加入

到含表面活性剂的Tris盐缓冲液中制得抗试剂A;

[0093] (c) 制备抗试剂B:将异硫氰酸荧光素标记的fE3单克隆抗体按照一定浓度加入到Tris盐缓冲液中制得,具体包括如下步骤:

[0094] (c-1) 异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体的偶联:

[0095] (c-1-1) 将异硫氰酸荧光素用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液配制成浓度为0.4-0.8mg/mL,对异硫氰酸荧光素进行10倍稀释,使用分光光度计在495nm处读取吸光值,使得吸光值控制在0.92-1.08范围内,得到第四混合物;

[0096] (c-1-2) 将fE3单克隆抗体用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液更换保存液并转移到棕色玻璃瓶内保存,得到第五混合物;

[0097] (c-1-3) 按所述fE3单克隆抗体体积量:异硫氰酸荧光素体积量为5:1-20:1计算所需要的异硫氰酸荧光素的体积,取所述第四混合物加入到第五混合物中,室温下搅拌10-12小时,反应过程严格避光,得到异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物;

[0098] (c-2) 所述异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物的纯化:使用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液对G25色谱柱进行平衡,使用pH=8-9的碳酸氢盐缓冲液进行洗脱,收集第一个有颜色的洗脱峰,注意避光防护,用紫外分光光度计测试其蛋白浓度及FITC浓度,并计算其F/P,F/P要在1.5-9范围内才可判定为合格;

[0099] (c-3) 将得到的所述异硫氰酸荧光素与fE3单克隆抗体偶联物按照一定比例加入到含表面活性剂的Tris盐缓冲液中制得抗试剂B;

[0100] (d) 制备磁微粒试剂:将羊抗异硫氰酸荧光素抗体与磁微粒偶联制得,通过羊抗异硫氰酸荧光素抗体与所述异硫氰酸荧光素的特异性结合使抗原抗体免疫复合物固定在磁微粒上,具体包括如下步骤:

[0101] (d-1) 将羧基磁珠浓缩液充分混匀,在充分混匀后取出羧基磁珠浓缩液至反应瓶中,将反应容器置于磁场12-18min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清液;

[0102] (d-2) 清洗羧基磁珠:加入羧基磁珠体积2-5倍的MES缓冲液,混匀20-30min,再置于磁场中待所述羧基磁珠全部沉降12-18min后吸去上清液;

[0103] (d-3) 重复所述清洗步骤(d-2)若干遍,充分清洗所述羧基磁珠后将羧基磁珠溶液定容到10-50mg/mL,持续混匀;

[0104] (d-4) 连接反应:按照羧基磁珠:羊抗异硫氰酸荧光素抗体质量比为100:1~50:1的量在所述步骤(d-3)的羧基磁珠溶液中加入用保存在MES缓冲液体系中羊抗异硫氰酸荧光素抗体,保持混匀状态下2~8℃反应16-20小时;

[0105] (d-5) 使用磁珠封闭剂对所述步骤(d-4)中的羧基磁珠表面裸露的羧基进行封闭3-8小时,得到免疫磁珠;

[0106] (d-6) 用磁珠缓冲液将得到的所述免疫磁珠清洗若干遍后定容至8-12mg/mL,2~8℃保存待用;

[0107] (d-7) 用磁珠缓冲液将所述步骤(d-6)中的定容后的免疫磁珠稀释至一定浓度,制得磁微粒试剂;

[0108] 上述校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、发光底物、浓缩清洗液各试剂组分配制好后,独立地置于一个包装容器内,以组成本发明的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒套组。

[0109] 实施例3

[0110] 利用本发明的磁微粒化学发光检测试剂盒检测游离雌三醇 (fE3) 时的具体操作方法如下:

[0111] -每次测定前准备下列试管,做好标记并放置在试管架上;

[0112] -各浓度校准品用试管各2支;

[0113] -待测样本(样本的采集参照常规操作:将采集的静脉血加入至试管或肝素抗凝管中,离心,取上清部分进行实验)、质控品用试管各1支;

[0114] -测定前将各试剂放至室温(18~25℃),加样前充分混匀;

[0115] -设定好37℃水浴锅;

[0116] -准备好化学发光类测定仪(请参阅仪器使用说明书);

[0117] -分别加60μL游离雌三醇(fE3)校准品、质控品、待测样本至对应试管底部;

[0118] -加30μL抗试剂A至每一试管中;

[0119] -加30μL抗试剂B至每一试管中;

[0120] -用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30s后,置37℃水浴15分钟;

[0121] -加30μL磁微粒试剂至每一试管中;

[0122] -用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30s后,置37℃水浴5分钟;

[0123] -试管连架放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀2分钟;缓慢的倒转分离器倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0124] -加300μL清洗液至每一试管中,用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30s,至彻底混匀,重复上一步操作1次;

[0125] -重复上一步操作1次;

[0126] -把试管从磁分离器上去下,加200μL发光底物溶液至每一试管中,振荡混匀3s,用化学发光仪检测发光强度;

[0127] 数据的处理:通过校准品的浓度值和检测到的发光值,通过四参数非线性拟合获得标准曲线,将样本的发光值代入上述标准曲线获得相应的浓度值。

[0128] 图1显示了按照本实施例的方法所制作的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒(磁微粒分离化学发光法)标准曲线。

[0129] 表1是本实施例的游离雌三醇(fE3)检测试剂盒分析性能和稳定性表。

[0130]

测试参数		测试值							
		0月	3月	6月	9月	12月	13月	14月	15月
外观		合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
曲线相关系数		0.9991	0.9952	0.9993	0.9992	0.9984	0.9988	0.9992	0.9986
最低检测限 (ng/mL)		0.023	0.011	0.021	0.037	0.025	0.019	0.029	0.037
准确度 (%)		98.1	99.5	102.5	101.8	101.3	98.4	103.2	105.1
重复性 (%)	Q1	5.3	4.1	6.2	7.1	5.5	6.3	4.8	6.5
	Q2	4.1	2.6	4.6	4.4	3.8	5.1	4.8	5.6

[0131] 图2显示了利用本实施例的游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒与利用进口检测试剂的检测性能对比。108份标本,将低中高值样本分离后,对低中高值样本进行单独的线性回归分析,将结果进行分析,线性回归方程 $y=1.0625x-27084$, $R^2=0.984$ 。

[0132] 从结果可以看出,本发明的试剂盒性能可靠,灵敏度高,线性范围宽,可配合全自动仪器使用。

[0133] 以上结合附图对本发明的实施方式作了详细说明,但本发明不限于所描述的实施方式。对于本领域的技术人员而言,在不脱离本发明原理和精神的情况下,对这些实施方式进行多种变化、修改、替换和变型,仍落入本发明的保护范围内。

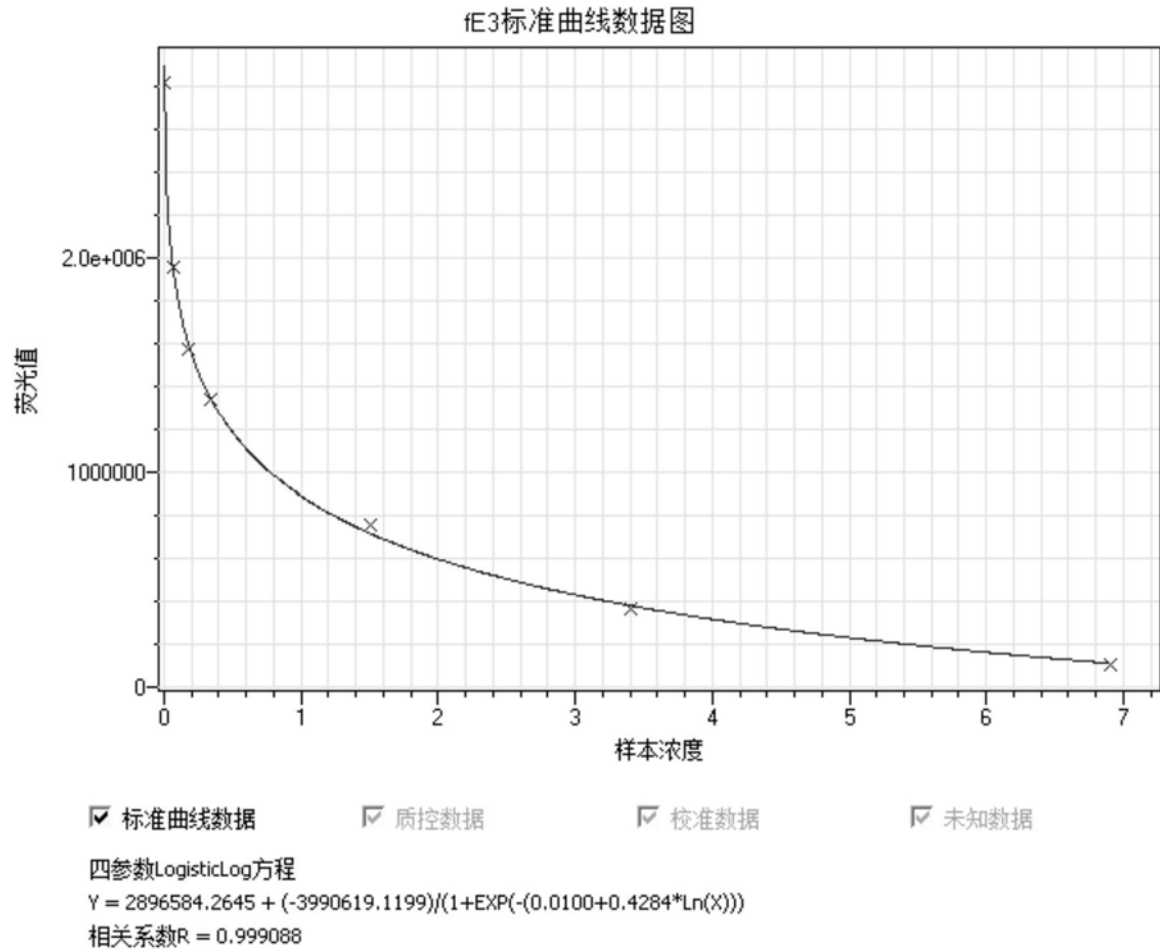


图1

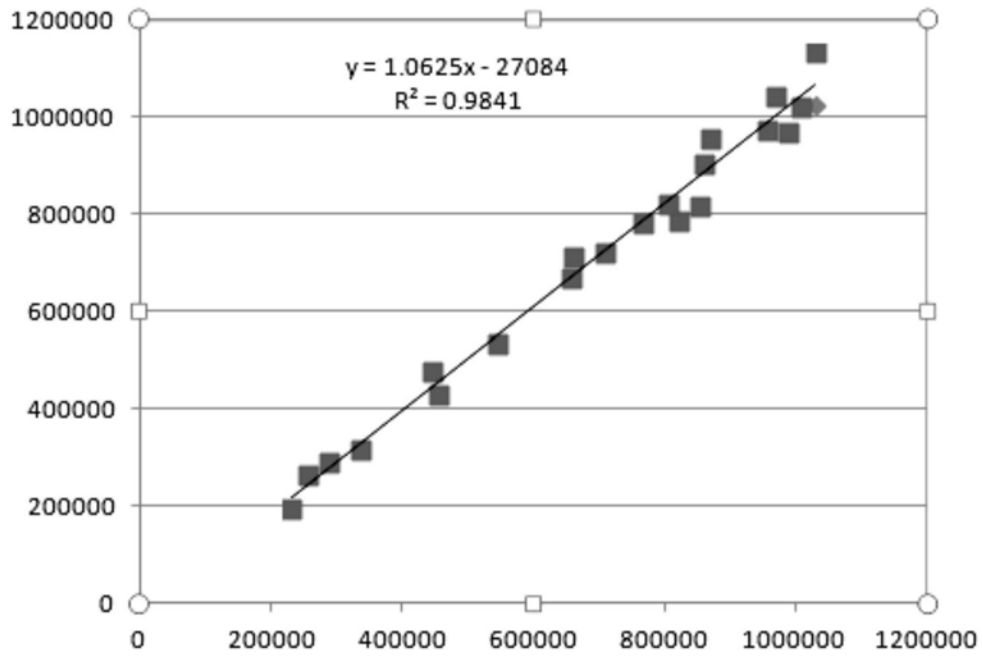


图2

专利名称(译)	一种游离雌三醇 (fE3) 检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110244040A	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910483367.6	申请日	2019-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	刘振华 刘振世 曾云 于晨		
发明人	刘振华 刘振世 曾云 于晨		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/763 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种游离雌三醇(fE3)检测试剂盒及其制备方法与应用，所述试剂盒包括以下试剂组分：校准品、质控品、抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂和发光底物；本发明的试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽，可配合半自动、全自动仪器使用；提高检测灵敏度及可靠性，并降低成本，延长有效期。本发明以碱性磷酸酶(AP)为标记酶，通过化学反应标记fE3抗原衍生物，并使用凝胶层析分离未反应的酶或抗原衍生物，提高反应的灵敏度；以免疫磁微粒为固相载体，以羊抗异硫氰酸荧光素抗体偶联磁性微粒，作为通用的分离试剂，不仅使免疫反应更容易混匀和分离，而且大大提高了反应速度。

