



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727871 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710915787.8

G01N 33/544(2006.01)

(22)申请日 2017.09.30

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司

地址 236000 安徽省合肥市包河经济开发区繁华大道与吉林路交口东南角联东U谷第一期18号楼1-4层

(72)发明人 吴泽东 庄庆华 吴铮 丁先骏  
朱雨 周珍珍

(74)专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务所(普通合伙) 34124

代理人 王志兴

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种孕酮检测试剂盒的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种孕酮检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:(1)按试剂R1组分含量,将MOPSO溶于纯化水,调节pH,制成R1缓冲液;将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液,得试剂R1;(2)按试剂R2组分含量,将MOPSO溶于纯化水,调节pH,制成R2缓冲液;将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液,得R2分散液;制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体;用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体,超声分散,得试剂R2。本发明的优点在于:(1)制备的试剂盒灵敏度高,操作简单、快速;(2)制备的试剂盒稳定性佳,特异性强;(3)制备的试剂盒可用于全自动生化分析仪上。

1. 一种孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 按照下列组分含量配制试剂R1:

试剂R1:

MOPSO 缓冲液	100-110 mM
NaN <sub>3</sub>	0.2-1 g/L
海藻糖	20-30 g/L
曲拉通	4-6 g/L
PEG-2000	8-12g/L

其溶剂为纯化水;

①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液;

②按照上述试剂R1的组分含量,将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1;

(2) 按照下列组分含量配制试剂R2:

试剂R2:

MOPSO 缓冲液	60-80 mM
NaCl	100-110 mM
NaN <sub>3</sub>	0.2-0.8 g/L
酪蛋白	15-25 g/L
甘油	1-3 ml/L
胶乳包被的孕酮多克隆抗体	0.5%-3%

其溶剂为纯化水;

①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;

②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;

③制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体:

a. 取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于MES缓冲液中,加入EDAC溶液混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清;再加入NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;

b. 在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,共聚80nm和120nm粒径的胶乳;离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复2-4次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入孕酮多克隆抗体,于37℃下反应3-4h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复2-4次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA;

c. 2-8℃封存45-50h,得最终所需的胶乳包被的孕酮多克隆抗体;

④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为9%-11%。

2. 根据权利要求1所述的孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,试剂R1的MOPS0缓冲液的pH为6.8。

3. 根据权利要求1所述的孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,试剂R2的MOPS0缓冲液的pH为6.8。

4. 根据权利要求1所述的孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤a中,采用的MES缓冲液为100mM MES缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤a中,采用的EDAC溶液为50g/L的EDAC溶液。

6. 根据权利要求1所述的孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤a中,采用的NHS溶液为50g/L的NHS溶液。

7. 根据权利要求1所述的孕酮检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤b中,加入的BSA为30g/L的BSA。

## 一种孕酮检测试剂盒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术领域,尤其涉及一种孕酮检测试剂盒的制备方法。

### 背景技术

[0002] 孕酮,亦称为黄体酮、孕甾酮、黄体甾酮、黄体激素、助孕激素、助孕素或助孕酮,是卵巢分泌的具有生物活性的主要孕激素。在排卵前,每天产生的孕酮激素量为2-3mg,主要来自卵巢;排卵后,上升为每天20-30mg,绝大部分由卵巢内的黄体分泌。

[0003] 孕酮可以保护女性的子宫内膜,在女性怀孕期间,孕酮激素可以给胎儿的早期生长及发育提供支持和保障,而且能够对子宫起到一定的镇定作用。另外,孕酮激素和雌性激素的关系密不可分,两者都是相当重要的女性激素。雌性激素的作用主要是促使女性第二性征发育成熟,而孕酮激素则是在雌性激素作用的基础上,进一步促进第二性征的发育成熟,两者之间有协同作用。孕酮检查主要用于了解黄体的功能及卵巢有无排卵。

[0004] 目前,检测检测孕酮的方法主要还是放射免疫分析法,但众所周知,放射免疫分析法具有一定的放射性污染,且应用仪器比较昂贵。

[0005] 因此,目前急需一种无污染、操作成本低的孕酮检测试剂盒。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供了一种无污染、操作成本低的孕酮检测试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种孕酮检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1)按照下列组分含量配制试剂R1:

[0009] 试剂R1:

MOPSO 缓冲液	100-110 mM
NaN <sub>3</sub>	0.2-1 g/L
[0010] 海藻糖	20-30 g/L
曲拉通	4-6 g/L
PEG-2000	8-12g/L

[0011] 其溶剂为纯化水;

[0012] ①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液;

[0013] ②按照上述试剂R1的组分含量,将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1;

[0014] (2) 按照下列组分含量配制试剂R2:

[0015] 试剂R2:

MOPSO 缓冲液	60-80 mM
NaCl	100-110 mM
NaN <sub>3</sub>	0.2-0.8 g/L
[0016] 酪蛋白	15-25 g/L
甘油	1-3 ml/L
胶乳包被的孕酮多克隆抗体	0.5%-3%

[0017] 其溶剂为纯化水;

[0018] ①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;

[0019] ②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;

[0020] ③制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体:

[0021] a. 取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于MES缓冲液中,加入EDAC溶液混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清;再加入NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;

[0022] b. 在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,共聚80nm和120nm粒径的胶乳;离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复2-4次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入孕酮多克隆抗体,于37℃下反应3-4h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复2-4次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA;

[0023] c. 2-8℃封存45-50h,得最终所需的胶乳包被的孕酮多克隆抗体;

[0024] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为9%-11%。

[0025] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(1)中,试剂R1的MOPSO缓冲液的pH为6.8。

[0026] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(2)中,试剂R2的MOPSO缓冲液的pH为6.8。

[0027] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤a中,采用的MES缓冲液为100mM MES缓冲液。

[0028] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤a中,采用的EDAC溶液为50g/L的EDAC溶液。

[0029] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤a中,采用的NHS溶液为50g/L的NHS溶液。

[0030] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体的步骤b中,加入的BSA为30g/L的BSA。

[0031] 本发明相比现有技术的优点在于:

[0032] (1) 采用本方法制备的试剂盒具有较高的检测灵敏度,操作简单、快速,从检测到出结果只需10分钟;

[0033] (2) 本方法采取了不同粒径的胶乳微球混合使用,大大提高了试剂盒的灵敏度和线性范围;

[0034] (3) 采用本方法制备的试剂盒与样品所形成的抗原抗体复合物,稳定性佳,在特定波长下有一定的吸光度,特异性强;

[0035] (4) 采用本方法制备的试剂盒可用于全自动生化分析仪上,适合全自动测试,可大规模的开展和推广。

### 具体实施方式

[0036] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0037] 实施例1

[0038] 本实施例的一种孕酮检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0039] (1) 按照下列组分含量配制试剂R1:

[0040] 试剂R1:

MOPSO 缓冲液 (pH 6.8) 100 mM

NaN<sub>3</sub> 0.2 g/L

[0041] 海藻糖 20 g/L

曲拉通 4 g/L

PEG-2000 8 g/L

[0042] 其溶剂为纯化水;

[0043] ①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液;

[0044] ②按照上述试剂R1的组分含量,将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1;

[0045] (2) 按照下列组分含量配制试剂R2:

[0046] 试剂R2:

- |        |                    |         |
|--------|--------------------|---------|
|        | MOPSO 缓冲液 (pH 6.8) | 60 mM   |
|        | NaCl               | 100 mM  |
| [0047] | NaN <sub>3</sub>   | 0.2 g/L |
|        | 酪蛋白                | 15 g/L  |
|        | 甘油                 | 1 ml/L  |
|        | 胶乳包被的孕酮多克隆抗体       | 0.5%    |
- [0048] 其溶剂为纯化水;
- [0049] ①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;
- [0050] ②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;
- [0051] ③制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体:
- [0052] a.取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于100mM MES缓冲液中,加入50g/L的EDAC溶液,混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清;再加入50g/L的NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;
- [0053] b.在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,在一定条件下共聚80nm和120nm粒径的胶乳,离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复2次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入孕酮多克隆抗体,于37℃下反应3h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复2次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA 30g/L;
- [0054] c.2℃封存45h,得最终所需的胶乳包被的孕酮多克隆抗体;
- [0055] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为9%。
- [0056] 实施例2
- [0057] 本实施例的一种孕酮检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:
- [0058] (1)按照下列组分含量配制试剂R1:
- [0059] 试剂R1:
- |        |                    |        |
|--------|--------------------|--------|
|        | MOPSO 缓冲液 (pH 6.8) | 110 mM |
|        | NaN <sub>3</sub>   | 1 g/L  |
| [0060] | 海藻糖                | 30 g/L |
|        | 曲拉通                | 6 g/L  |
| [0061] | PEG-2000           | 12g/L  |
- [0062] 其溶剂为纯化水;

[0063] ①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液;

[0064] ②按照上述试剂R1的组分含量,将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1;

[0065] (2)按照下列组分含量配制试剂R2:

[0066] 试剂R2:

MOPSO 缓冲液 (pH 6.8)	80 mM
NaCl	110 mM
NaN <sub>3</sub>	0.8 g/L
[0067] 酪蛋白	25 g/L
甘油	3 ml/L
胶乳包被的孕酮多克隆抗体	3%

[0068] 其溶剂为纯化水;

[0069] ①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;

[0070] ②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;

[0071] ③制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体:

[0072] a.取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于100mM MES缓冲液中,加入50g/L的EDAC溶液,混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清;再加入50g/L的NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;

[0073] b.在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,在一定条件下共聚80nm和120nm粒径的胶乳,离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复4次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入孕酮多克隆抗体,于37℃下反应4h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复4次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA 30g/L;

[0074] c.8℃封存50h,得最终所需的胶乳包被的孕酮多克隆抗体;

[0075] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为11%。

[0076] 实施例3

[0077] 本实施例的一种孕酮检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0078] (1)按照下列组分含量配制试剂R1:

[0079] 试剂R1:

	MOPSO 缓冲液 (pH 6.8)	105 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.6 g/L
[0080]	海藻糖	25 g/L
	曲拉通	5 g/L
	PEG-2000	10 g/L

[0081] 溶剂为纯化水；

[0082] ①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液；

[0083] ②按照上述试剂R1的组分含量,将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1；

[0084] (2)按照下列组分含量配制试剂R2：

[0085] 试剂R2：

	MOPSO 缓冲液 (pH 6.8)	70 mM
	NaCl	105 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.5 g/L
[0086]	酪蛋白	20 g/L
	甘油	2 ml/L
	胶乳包被的孕酮多克隆抗体	2.5%

[0087] 溶剂为纯化水；

[0088] ①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液；

[0089] ②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液；

[0090] ③制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体：

[0091] a.取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于100mM MES缓冲液中,加入50g/L的EDAC溶液,混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清；再加入50g/L的NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液；

[0092] b.在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,在一定条件下共聚80nm和120nm粒径的胶乳,离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复3次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入孕酮多克隆抗体,于37℃下反应3.5h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复3次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA 30g/L；

[0093] c.5℃封存48h,得最终所需的胶乳包被的孕酮多克隆抗体;

[0094] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为10%。

[0095] 实施例4

[0096] 本实施例的采用上述实施例方法制备得到的孕酮检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0097] (1) 将5uL待测样品与200uL试剂R1混合,37℃孵育5min;

[0098] (2) 用全自动生化分析仪在波长600nm处测定反应后的吸光度A1;

[0099] (3) 再与50uL试剂R2混合,37℃反应5min;

[0100] (4) 用全自动生化分析仪在波长600nm处测定反应后的吸光度A2;

[0101] (5) 根据吸光度变化值  $\Delta A = A_2 - A_1$ ,计算出样本中孕酮的浓度。

[0102] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种孕酮检测试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107727871A</a>	公开(公告)日	2018-02-23
申请号	CN201710915787.8	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	吴泽东 庄庆华 吴铮 丁先骏 朱雨 周珍珍		
发明人	吴泽东 庄庆华 吴铮 丁先骏 朱雨 周珍珍		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/544 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/544		
代理人(译)	王志兴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	MOPSO 缓冲液	100-110 mM
<p>本发明公开了一种孕酮检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：(1)按试剂R1组分含量，将MOPSO溶于纯化水，调节pH，制成R1缓冲液；将NaN<sub>3</sub>、海藻糖、曲拉通、PEG-2000溶于R1缓冲液，得试剂R1；(2)按试剂R2组分含量，将MOPSO溶于纯化水，调节pH，制成R2缓冲液；将NaCl、NaN<sub>3</sub>、酪蛋白、甘油溶于R2缓冲液，得R2分散液；制备胶乳包被的孕酮多克隆抗体；用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的孕酮多克隆抗体，超声分散，得试剂R2。本发明的优点在于：(1)制备的试剂盒灵敏度高，操作简单、快速；(2)制备的试剂盒稳定性佳，特异性强；(3)制备的试剂盒可用于全自动生化分析仪上。</p>	NaN <sub>3</sub>	0.2-1 g/L
	海藻糖	20-30 g/L
	曲拉通	4-6 g/L
	PEG-2000	8-12g/L
	其溶剂为纯化水；	