



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212196 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811213297.4

G01N 33/76(2006.01)

(22)申请日 2018.10.18

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 汤久停 朱宇皇 陶慧娟 孙理智

谢颖华 张跃峰 刘功成 渠海

郑业焕 付光宇

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通

合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种快速检测游离雌三醇的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测游离雌三醇的试剂盒,包括包被有E3的鼠抗羊IgG-Fc单抗的磁微粒,标记被载体蛋白修饰过的E3衍生物酶结合物,E3兔多抗抗体溶液,含有E3抗原的校准品溶液,浓缩洗液和底物;其中E3衍生物酶结合物先由E3半抗原与载体蛋白偶联,然后载体通过过碘酸钠氧化辣根过氧化酶标记;E3兔多抗抗体由E3衍生物半抗原偶联大分子蛋白质作为免疫原制备而成。本发明采用磁微粒化学发光的方法定量检测样品中E3的含量,对样品的前处理要求不高,能同时快速检测大批量的样本;试剂以工作液形式提供,检验方法易行,灵敏度高,特异性强,操作简便;且试剂盒结构简单,使用方便,储存运输方便,检测准确、快速、省时高效,适用于大批样品的检测。

1. 一种快速检测游离雌三醇的试剂盒,其特征在于:包括包被有E3的鼠抗羊IgG-Fc单抗的磁微粒,标记被载体蛋白修饰过的E3衍生物酶结合物,E3兔多抗抗体溶液,含有E3抗原的校准品溶液,浓缩洗液和底物;其中所述的E3衍生物酶结合物先由E3半抗原与载体蛋白偶联,然后载体通过过碘酸钠氧化辣根过氧化酶标记;所述E3兔多抗抗体由E3衍生物半抗原偶联大分子蛋白质作为免疫原制备而成。

2. 根据权利要求1所述的快速检测游离雌三醇的试剂盒,其特征在于:所述E3半抗原是通过假象方案对E3不同位点的分子结构的设计,在E3-3-CMO后连接载体蛋白再进行过碘酸钠方法标记而成;所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白或者纤维蛋白原。

3. 根据权利要求1所述的快速检测游离雌三醇的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗液为含有2%Tween20、1%Procline300 的 pH7.5、2mol/L的磷酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的快速检测游离雌三醇的试剂盒,其特征在于:所述底物由鲁米诺和双氧水组成。

一种快速检测游离雌三醇的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其是涉及一种利用磁微粒化学发光法快速检测游离雌三醇的试剂盒。

背景技术

[0002] 雌三醇(E3)是人体合成的三种雌激素之一,雌激素的代谢主要发生在肝脏和胃肠道组织,绝大部分代谢和结合过程都在肝脏完成。主要的一个代谢途径是从雌二醇到雌一醇,然后,雌一醇可以进一步代谢为16-羟雌(甾)酮(16-hydroxyestrone),最后16-羟雌(甾)酮(16-hydroxyestrone)转化为雌三醇。在孕期,雌三醇的合成量比较显著,能够达到非孕期的1000倍。妊娠期主要由胎儿胎盘合成,合成后通过母体血循环,在肝脏代谢,和硫酸或葡萄糖醛酸结合形成结合型雌三醇,从尿中排出。雌三醇在调节胎儿宫内发育的过程中起重要作用,并能影响妊娠子宫对催产素的敏感性。

[0003] 母体血清中E3水平随着孕周的增长而增加,其检测可以作为胎儿生长和胎盘功能的良好指标。当孕妇胎儿患唐氏综合征(21-三体)时,由于胎儿生长发育迟缓,肝脏、胎盘的功能不良,合成E3能力降低,致使孕中期母血清E3水平下降。连续监测孕妇血清中的E3,还可用于高危妊娠及过期妊娠的监护。

[0004] 临床上,检测人体中游离雌三醇的作用主要有以下几点:1、监测胎盘功能:胎盘功能不良,胎盘硫酸脂酶缺乏症以及妊娠高血压综合征影响子宫胎盘血液循环者,均可导致雌三醇值下降。2、监护高危妊娠:定期动态检测孕妇血或尿液雌三醇含量,可帮助估计孕期;雌三醇继续上升,提示妊娠未足月;若几次检测均在同一水平,提示为足月妊娠;如测定值逐渐下降则常为过期妊娠;明显降低,提示胎儿宫内窘迫,临床应严密监测胎动、胎心等指标,并针对实际情况积极采取相应措施;血浆雌三醇含量 $<2\text{mg/L}$,则胎儿宫内死亡的可能性很大。3、协助诊断胎儿疾病:胎儿宫内生长发育迟缓、因孕妇吸烟过多或营养不良而影响胎儿发育者,雌三醇下降;胎儿先天性肾上腺发育不全或因无脑儿等畸形影响肾上腺功能者,雌三醇下降,而仅为正常值的10%左右。4、协助诊断其他疾病:冠心病、肝硬化等疾病时,雌三醇含量增高。5、联合AFP和 $\beta\text{-HCG}$ 进行唐氏综合症患儿的筛查,当患唐氏综合征时,患儿母血E3下降,可能是由于胎儿的肾上腺皮质发育不良,导致E3的前体—硫酸脱氢表雄酮的合成减少,进而使E3减少。

[0005] 游离雌三醇(E3)是一种甾体类激素,前体来源于胎儿肾上腺和肝,由胎盘合成分泌,是妊娠期的主要雌激素。血清雌三醇水平的高低与胎盘—胎儿单位及胎儿有效的代谢功能有密切关系,直接影响胎儿的生长发育。E3不经母体的肾脏排泄,故所受干扰小,其在母血中的半衰期也只有20~30分钟,故母体血中E3的水平能准确反映胎儿胎盘功能的变化。

[0006] 在女性中,体血中E3的值随妊娠的进展而升高,在20周开始会逐渐升高,在孕晚期会增加更快,产后迅速下降。而在妊娠42周后,每周测定2次E3,若持续低水平,说明胎盘功能衰退,需短期内终止妊娠。而与甲胎蛋白(AFP)、人绒毛促性腺激素($\beta\text{-HCG}$)联合检测,可

进行中期唐氏筛查。

[0007] 目前PerkinElmer提供的检测游离雌三醇试剂盒是一种固相、时间分辨的荧光免疫测定法,它基于钨标记雌三醇和血清样本中雌三醇竞争结合雌三醇多克隆抗体上(兔源)有限的结合位点。直接针对兔IgG的第二个抗体包被于固相上,使抗体结合抗原和游离抗原易于分离。增强液将钨离子从钨标记抗原上洗脱到溶剂中,它们与增强液中的成分形成荧光螯合物。随后对每个微孔的荧光强度进行测量。每个样品中的荧光强度与样品中游离雌三醇的浓度成反比。但是此方法操作繁琐,需要时间周期较长。

[0008] 化学发光法(chemiluminescent immunoassay,CLIA)克服了RIA放射性污染的不足、酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷以及荧光标记易受环境干扰的难点的缺点,检测灵敏度高,应用范围广,能够应用于自动化和半自动化仪器,相应的磁微粒化学发光法试剂盒已成为生物医学研究和临床超微量生化检验中非常具有发展前景的产品。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种采用化学发光技术快速检测游离雌三醇的试剂盒,采用该试剂盒可以高效、准确、简便的对大批量样本进行定量检测、筛选。

[0010] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的快速检测游离雌三醇的试剂盒,包括包被有E3的鼠抗羊IgG-Fc单抗的磁微粒,标记被载体蛋白修饰过的E3衍生物酶结合物,E3兔多抗抗体溶液,含有E3抗原的校准品溶液,浓缩洗液和底物;其中所述的E3衍生物酶结合物先由E3半抗原与载体蛋白偶联,然后载体通过过碘酸钠氧化辣根过氧化酶标记;所述E3兔多抗抗体由E3衍生物半抗原偶联大分子蛋白质作为免疫原制备而成。

[0011] 所述E3半抗原是通过假象方案对E3不同位点的分子结构的设计,通过换臂换位点的方法去减少位阻效应,制备出E3衍生物,并且突破原有标记模式,在E3-3-CMO后连接载体蛋白再进行过碘酸钠方法标记而成,提高了酶结合物的亲和力;所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白或者纤维蛋白原。

[0012] 所述浓缩洗液为含有2%Tween20、1%Procline300 的 pH7.5、2mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0013] 所述底物由鲁米诺和双氧水组成。

[0014] 本发明试剂盒采用直接竞争法,用鼠抗羊IgG-Fc单抗包被磁微粒,E3兔多抗制备抗体溶液,辣根过氧化物酶标记载体蛋白修饰过的E3衍生物制备酶结合物。通过免疫反应形成二抗-抗体-酶标抗原复合物,该复合物催化发光底物液发出光子,并运用发光强度与E3的含量成反比的关系,通过校准品定标得出E3的含量,与PerkinElmer提供的检测游离雌三醇试剂盒相比,本发明可在15min内检测出人血清中游离雌三醇的含量,更加方便快捷,且灵敏度高,特异性强。

[0015] 本发明的优点在于采用磁微粒化学发光的方法定量检测样品中E3的含量,对样品的前处理要求不高,不存在新旧样本差异,能同时快速检测大批量的样本;使用的主要试剂是以工作液的形式提供,检验方法易行,灵敏度高,特异性强,操作简便,可在15min内出结果,省时省力。与现有技术相比,本发明制备的磁微粒化学发光试剂盒,结构简单,使用方便,储存运输方便,且检测方法准确、快速、省时高效,能更快的适用于大批样品的检测。

具体实施方式

[0016] 下面通过具体实施例对本发明做更加详细的说明。如无特殊说明，实施例中所用的试剂和试验仪器均为常规的市售产品。

[0017] 实施例1 制备检测游离雌三醇的试剂盒

1、磁微粒混悬液的制备

将粒径 $1.15\mu\text{m}$ 的磁微粒原液充分混匀、洗涤后，加入EDC和NHS活化剂（用 50mmol/L pH5.0的MES溶解），混匀震荡、洗涤后，加入E3鼠抗羊IgG-Fc单抗，混匀震荡，采用两步封闭，首先用乙醇胺封闭30min，再用封闭液封闭，封闭液移除后加入含有5%蔗糖、1%BSA、1.5% EDTA、0.1% Proclin 300、0.1%蛋白保护剂的pH7.5的磷酸盐缓冲液进行储存。 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0018] 2、酶结合物的制备

1) 将E3-3-CMO的COOH端与BSA (0.01mol pH7.04的PB溶解) 按20:1的比例于 10mg/ml 的二态环氧烷下偶联过夜；

2) 然后用EDC和NHS活化30min，用过碘酸钠法进行标记；

3) 用 0.01mol pH7.4的PB于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 过夜透析2天；

4) 用紫外分光光度计测蛋白含量， -20°C 保存；

5) 称取Tris 6g、NaCl 8g，然后在烧杯中加入800mL纯化水，充分混匀，使试剂完全溶解；

6) 调整pH，使其控制在 7.4 ± 0.05 ；

7) 称取 BSA 10g、ProClin 300 2g、Bro 1.0g、胭脂红色素0.1g，倒入上述烧杯中；

8) 最后定容至1000mL，用 $0.3\mu\text{m}$ 滤器过滤，即得酶结合物稀释液；

9) 取上述获得的酶标抗原；按照1:8000的比例添加上述获得的酶反应物稀释液，混合均匀，即为酶结合物。

[0019] 3、抗体溶液的制备

1) 称取 Tris 6g、NaCl 8g、ProClin300 2g，然后在烧杯中加入800mL纯化水，充分混匀，使试剂完全溶解；

2) 调整pH，使其控制在 7.4 ± 0.05 ；

3) 称取BSA 10g，倒入上述烧杯中；

4) 最后定容至1000mL，用 $0.3\mu\text{m}$ 滤器过滤，再加入合适比例的兔多克隆抗体即得抗体溶液。

[0020] 4、校准品的制备

将孕期为14-21周的混合样本（该样本用乙肝表面抗原、艾滋、梅毒检测均为阴性）进行浓缩和亲和层析纯化，提纯后的E3抗原用含有BSA、pH7.4的PBS缓冲液稀释成编号为S0~S5的6个校准品，校准品中包含浓度分别约为0、0.2、0.4、1、4、8ng/mL。

[0021] 5、试剂盒组装完成，包括：

1) 磁微粒抗体混悬液：包被有鼠抗羊IgG-Fc的磁微粒；

2) E3校准品：校准品S1-S5中含有E3抗原；

3) 酶标记物：辣根过氧化物酶标记的修饰的E3与蛋白偶联的衍生物；

4) 抗体溶液：E3兔多抗抗体溶液；

5) 浓缩洗液:含有2% Tween20、1% Procline300 的 pH7.5、2mol/L的磷酸盐缓冲液;

6) 底物:鲁米诺和双氧水。

[0022] 实施例2 使用实施例1制备的试剂盒检测人体中E3含量的方法

1、样品前处理

普通采血管,采血结束后,37℃温育30min,然后4000rpm离心10min,要严格按照标准处理方式对样本进行处理,消除纤维蛋白原对实验的影响。

[0023] 2、检测

1) 试剂准备

标准品和磁微粒:将试剂取出并平衡至室温(20~25℃);

洗涤液:将10ml浓缩洗液和990ml纯化水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。
纯化水敬请用户自备;

底物:取出并平衡至室温;

2) 试验操作

①吸取25μl的E3校准品、待测样本依次加入20μl磁微粒混悬液,同时加入50μl酶标记抗原和50μl抗体溶液;

②混合溶液在室温下,振荡孵育15min;

③孵育结束后,用洗涤工作液洗涤6次;

④向每个反应位中加入底物A和B各100μl;

⑤固相载体于室温下振荡混匀18秒后检测,并进行分析结果。

[0024] 3) 检测结果分析

本试剂盒采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以校准品发光值log值为Y轴,建立定标曲线,根据待测样本的发光值强度回算相应的浓度值。仪器自动操作系统可通过存储的定标曲线以及样本测试得到的信号值自动计算样本测试结果。

[0025] 实施例3 本发明试剂盒性能测试实验

1、试剂盒灵敏度和检测限

参照CLSI EP-17A 文件推荐的实验方案检测试剂盒的灵敏度,测得E3的最低检出量不高于0.02ng/mL,功能灵敏度为0.13ng/mL。

[0026] 2、线性

磁微粒E3在0.2~8ng/mL间,实测值与理论值的线性相关系数r大于0.99。

[0027] 3、稳定性

试剂盒自成品生产之日起于37℃放置10天(有效期为18个月);成品剩余效期内,则按37℃放置 10 天有效期为18个月推算37℃放置的时间进行检测,结果符合各项目规定的要求。

[0028] 4、特异性检测。

[0029] 1) 磁微粒化学发光法干扰物质检测结果如下表1。

[0030] 表1

干扰物	添加最高浓度
甘油三酯	1000mg/dl
血红蛋白	50mg/dl
胆红素	50mg/dl

在所示浓度检测以下内源性物质,没有发现显著的干扰性。

[0031] 2) 在所示浓度检测以下交叉物质,检测结果如表2所示。

[0032] 表2

干扰物	添加最高浓度	交叉率
孕酮	1000ng/ml	0.002%
皮质醇	12000ng/ml	0.015%
睾酮	1000ng/ml	0.008%
雌酮	1000ng/ml	0.016%
硫酸脱氢表雄酮	10000ng/ml	0.001%
雌二醇	12000ng/ml	0.012%
17 α 羟基孕酮	10000ng/ml	0.013%

没有发现显著的干扰性。

专利名称(译)	一种快速检测游离雌三醇的试剂盒		
公开(公告)号	CN109212196A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811213297.4	申请日	2018-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	汤久停 朱宇皇 陶慧娟 孙理智 谢颖华 张跃峰 刘功成 渠海 郑业焕 付光宇		
发明人	汤久停 朱宇皇 陶慧娟 孙理智 谢颖华 张跃峰 刘功成 渠海 郑业焕 付光宇		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76 G01N33/76		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测游离雌三醇的试剂盒，包括包被有E3的鼠抗羊IgG-Fc单抗的磁微粒，标记被载体蛋白修饰过的E3衍生物酶结合物，E3兔多抗抗体溶液，含有E3抗原的校准品溶液，浓缩洗液和底物；其中E3衍生物酶结合物先由E3半抗原与载体蛋白偶联，然后载体通过过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶标记；E3兔多抗抗体由E3衍生物半抗原偶联大分子蛋白质作为免疫原制备而成。本发明采用磁微粒化学发光的方法定量检测样品中E3的含量，对样品的前处理要求不高，能同时快速检测大批量的样本；试剂以工作液形式提供，检验方法易行，灵敏度高，特异性强，操作简便；且试剂盒结构简单，使用方便，储存运输方便，检测准确、快速、省时高效，适用于大批样品的检测。

干扰物 [Ⓢ]	添加最高浓度 [Ⓢ]	交叉率 [Ⓢ]
孕酮 [Ⓢ]	1000ng/ml [Ⓢ]	0.002% [Ⓢ]
皮质醇 [Ⓢ]	12000ng/ml [Ⓢ]	0.015% [Ⓢ]
睾酮 [Ⓢ]	1000ng/ml [Ⓢ]	0.008% [Ⓢ]
雌酮 [Ⓢ]	1000ng/ml [Ⓢ]	0.016% [Ⓢ]
硫酸脱氢表雄酮 [Ⓢ]	10000ng/ml [Ⓢ]	0.001% [Ⓢ]
雌二醇 [Ⓢ]	12000ng/ml [Ⓢ]	0.012% [Ⓢ]
17 α 羟基孕酮 [Ⓢ]	10000ng/ml [Ⓢ]	0.013% [Ⓢ]