



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105467137 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201510834583. 2

(22) 申请日 2015. 11. 26

(71) 申请人 北京豪迈生物工程有限公司

地址 101318 北京市顺义区空港物流开发区  
B 区裕华路 28 号院 7 号楼三层东侧

(72) 发明人 朱驰 王键

(74) 专利代理机构 北京奥翔领智专利代理有限  
公司 11518

代理人 路远

(51) Int. Cl.

G01N 33/76(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书4页 说明书13页

(54) 发明名称

游离人绒毛膜性腺激素  $\beta$  亚单位测试试剂盒及其测试方法

(57) 摘要

本发明公开了一种游离人绒毛膜性腺激素  $\beta$  亚单位 (F- $\beta$ -hCG) 测试试剂盒, 该试剂盒由磁分离试剂, 试剂  $R_1$ , 试剂  $R_2$ , 标准品, 质控品, 校准品, 清洗浓缩液及发光底物组成, 本发明还公开了该试剂盒的制备方法。本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合, 提供了一种接近均相的反应体系, 与现有酶联免疫的技术相比, 本发明具有更高的特异性, 灵敏度, 获得检测结果的时间短, 操作方式简便, 检测结果准确可靠, 大大降低了产品成本。

1. 一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,该试剂盒由磁分离试剂,试剂R<sub>1</sub>,试剂R<sub>2</sub>,标准品,质控品,校准品,清洗浓缩液及发光底物组成,其中:磁分离试剂:标记有小鼠抗人F-β-hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球,所述标记有小鼠抗人F-β-hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球浓度为100μg/ml;试剂R<sub>1</sub>:含有碱性磷酸酶标记的F-β-hCG抗体,所述碱性磷酸酶标记的F-β-hCG抗体的浓度为0.2μg/ml;试剂R<sub>2</sub>:含有牛γ球蛋白组分的缓冲液;标准品,质控品和校准品:含有一定量F-β-hCG抗原的小牛血清溶液,所述标准品的浓度为0(S<sub>0</sub>)、5(S<sub>1</sub>)、15(S<sub>2</sub>)、40(S<sub>3</sub>)、80(S<sub>4</sub>)、200(S<sub>5</sub>)mIU/ml,所述质控品浓度为10,80mIU/ml,所述校准品浓度为15,80mIU/ml;清洗浓缩液:含有Tween-20和Proclin-300的缓冲液;发光底物:金刚烷的衍生物IUMIPHOS530,所述金刚烷的衍生物IUMIPHOS530的浓度为10μg/ml。

2. 根据权利要求1所述的一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由下述体积分数组成的:磁分离试剂5%-7%,试剂R<sub>1</sub>5%-7%,试剂R<sub>2</sub>5%-7%,标准品5%-7%,质控品1%-3%,校准品3%-6%,清洗浓缩液20%-40%,发光底物30%-50%。

3. 根据权利要求2所述的一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由下述体积分数组成的:磁分离试剂5%,试剂R<sub>1</sub>5%,试剂R<sub>2</sub>5%,校准品5%,质控品1%,校准品3%,清洗浓缩液26%,发光底物50%。

4. 根据权利要求2所述的一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由下述体积分数组成的:磁分离试剂6%,试剂R<sub>1</sub>6%,试剂R<sub>2</sub>6%,校准品6%,质控品2%,校准品4%,清洗浓缩液30%,发光底物40%。

5. 根据权利要求2所述的一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由下述体积分数组成的:磁分离试剂7%,试剂R<sub>1</sub>7%,试剂R<sub>2</sub>7%,校准品7%,质控品3%,校准品6%,清洗浓缩液33%,发光底物30%。

6. 根据权利要求1-5任一所述的一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中各组分按照如下制备方法制得:

第一步:磁分离试剂的制备过程

一、磁珠缓冲液配制操作规程:

(1)称取Tris 4.58g和NaCl6.81g于1L容器中,称取0.96g Tween-20于20ml容器中加适量水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

(2)用移液器将Proclin-300量取0.2ml于10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;然后在1L容器中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

(3)调节PH计测量其PH值;用4M HCl或4M NaOH调PH,测量其PH在7.95-8.05之间即符合要求;

(4)称取BSA V(牛血清白蛋白(第五组分))3g倒入上述1L容器中;

(5)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.95-8.05之间即符合要求,用0.2um滤器过滤即得;过滤完后贴好标签于2-8℃冷库贮存;

二、磁分离试剂的配制:

(1)将1.0mg DSS(辛二酸二琥珀酰亚胺)溶于50ul DMSO中,即浓度为20mg/mL;取2mgF-β-hCG抗体溶于PH 9.5的0.1mol/L PB缓冲液中至总体积为1ml;

(2)计算DSS的投入量,按照以下公式计算:(抗体质量/16000)×10×368/C<sub>DSS</sub>,其中

$C_{DSS}$ 指代DSS的物质的量浓度mol/L;

(3)用移液枪吸取相应体积的DSS加入到步骤1的抗体溶液中,置室温90min;

(4)将步骤3抗体溶液加入到Centricon-10浓缩管中,然后放入到sigma2-16k高速冷冻离心机中在3000g的离心力下浓缩约30min至体积为0.5ml;

(5)取0.5ml磁珠,所述的磁珠直径在0.9-1.5 $\mu$ m之间,加入5ml反应杯中,放入专用试管架,经磁铁吸附2分钟后吸取上清;

(6)每次加入1.5ml PH9.50.1mol/L PB,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;将步骤4获得的抗体溶液加入到磁珠中,混匀后室温反应4小时,保持混匀状态;

(7)加入0.3ml 1mol/L的Tris溶液37 $^{\circ}$ C 15分钟,其中Tris的加样量为1mg抗体加0.15mlTris;

(8)每次加入1.5ml PH 7.20.1mol/L PB清洗已经标记的磁珠,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;

(9)用100ml磁珠保存液将磁珠转入125ml玻璃瓶,即为0.05%的F- $\beta$ -hCG磁分离试剂;

(10)将步骤9获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照1:2.3的比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂;

第二步:试剂 $R_1$ 的制备过程

一、试剂 $R_1$ 稀释液配制操作规程:

(1)取Tris 6.06g、NaCl 13.0g、ZnCl<sub>2</sub>0.05g、Proclin-3000.2ml和MgCl<sub>2</sub>0.05g于烧瓶中;然后在烧瓶中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

(2)用4M HCl或4M NaOH调PH,测量使PH在7.35-7.45范围内;

(3)称取BSA 3g倒入上述烧瓶中;

(4)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,用0.2 $\mu$ m滤器过滤;过滤完后,贴好标签于2-8 $^{\circ}$ C冷库贮存;

二、试剂 $R_1$ 的配制(碱性磷酸酶(ALP)与F- $\beta$ -hCG单克隆抗体的偶联)

(1)取10mgALP加入5ml生理盐水中,加入到Centricon-10浓缩管中,3000rpm离心大约20分钟,浓缩至1毫升;

(2)于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO<sub>4</sub>溶液,室温下避光搅拌20分钟;

(3)将上述溶液装入透析袋中,用1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

(4)加20 $\mu$ l 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化ALP的PH升高到9.0~9.5,然后立即加入2.5mg IgG抗体,在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2小时;

(5)加0.1ml新配的4mg/ml NaBH<sub>4</sub>液,混匀,再置4 $^{\circ}$ C 2小时;

(6)将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

(7)在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4 $^{\circ}$ C 1小时;

(8)3000rpm离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15M PH7.4的PBS中;

(9)将上述溶液装入透析袋中,对0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析约5个小时,去除铵离子后,10000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入体积1/100的1M MgCl<sub>2</sub>溶液4 $^{\circ}$ C保存;收集到的碱性磷酸酶(ALP)与F- $\beta$ -hCG单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以1:3000的体积比混合均匀,即得本发明试剂盒中试剂 $R_1$ ;

### 第三步:试剂R<sub>2</sub>的制备

#### 试剂R<sub>2</sub>配制操作规程:

(1)称取Tris(三羟甲基氨基甲烷,分子式:(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)1.56g和NaCl 4.23g于1L烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2ml于少量纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

(2)用量筒量取800ml纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用4M HCL或4M NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

(3)称取牛γ球蛋白(IgG)1.8g于800ml纯化水的烧杯中;

(4)最后定容1000ml,完全溶解后,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,用0.2um滤器过滤;过滤完后,贴好标签于2-8℃冷库贮存;

#### 第四步:标准品、质控品和校准品的配制:

(1)游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)定量测定试剂盒F-β-hCG标准品原料配制成浓度点为0,5,15,40,80,200mIU/ml;质控品配制的浓度点为10,80mIU/ml,校准品的浓度点为15,80μIU/ml;

(2)充分混匀后,贴好标签于2-8℃冷库贮存;

#### 第五步:清洗浓缩液配制操作规程:

(1)称取Tris 12.54g和NaCl 325.6g于1L容器中;

(2)称取5g Tween-20于100ml容器中加20ml水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

(3)用移液器将Proclin-300量取0.2ml于盛有10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

(4)用量筒量取800ml纯化水于上述1L容器中,充分搅拌,直至完全溶解;

(5)用4M HCL或4M NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

(6)最后定容1000ml,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,完全溶解后用0.2um滤器过滤即得;过滤完后,贴好标签于2-8℃冷库贮存;

#### 第六步:发光底物配制

##### 发光底物配制操作规程:

(1)称取Tris 2.35g、NaCl 6.41g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>0.002g和Proclin-3000.2ml于1L烧杯中;

(2)用量筒量取800ml纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用4M HCL或4M NaOH调PH,测量其范围在7.95-8.05之间;

(3)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.95-8.05之间即符合要求,用0.2um滤器过滤;过滤完后,加入250ml IUMIPHOS530,混匀后,贴好标签于2-8℃冷库贮存。

#### 7.一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)的测试方法,包括下列步骤:

(1)使用前,需使用试剂盒内校准品(选)进行曲线校正,并用质控品进行质量控制,测试结果在质控范围内方可进行样本的检测;

(2)加F-β-hCG标准品、质控品、待测标本至对应试管底部;

(3)加试剂R<sub>1</sub>至每一试管中;

(4)加试剂R<sub>2</sub>至每一试管中;

(5)加磁分离试剂至每一试管中;

(6)用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30秒后,置37℃水浴30分钟;

(7) 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;

(8) 清洗浓缩液用纯化水稀释7倍后, 加稀释后的清洗液至每一试管中, 置多管混匀器上轻轻振荡混匀30s; 加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出, 混匀要彻底;

(9) 重复步骤6、7、6一遍;

(10) 加发光底物溶液至试管中混匀3秒, 迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

## 游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位测试试剂盒及其测试方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及测定血清的试剂盒及其测试方法,尤其是涉及测定血清中游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位含量的试剂盒及其测试方法。

### 背景技术

[0002] 人绒毛膜促性腺激素(hCG)是一种胎盘滋养层细胞分泌的糖蛋白激素,由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基组合而成。两种亚基均可以游离态出现在血液中。hCG $\alpha$ 亚基与垂体糖蛋白激素的 $\alpha$ 亚基相同,用免疫学方法无法将它们区别开,而hCG的 $\beta$ 亚基是hCG的特有结构,也决定了其分子的生物学和免疫学特性,分子量为22.2KD。在整个怀孕过程中,游离F- $\beta$ -hCG通常是随完整的hCG一起出现和增长,所以游离 $\beta$ -hCG是诊断早孕的一项重要检测指标,其分泌与滋养细胞的数量密切相关。血清F- $\beta$ -hCG测定还能诊断异位妊娠、先兆流产、葡萄胎及滋养细胞肿瘤,而且也是治疗后的及预后观察的重要检测指标,对其他疾病如卵巢生殖细胞肿瘤、男性睾丸肿瘤,非滋养细胞疾病、非生殖细胞也有辅助诊断意义。从检测角度上来说,目前临床上用于测定F- $\beta$ -hCG的方法主要有放免法、ELISA法、化学发光法等。

[0003] 过去以放免为代表的人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)测定试剂盒受方法学的限制,其灵敏度和抗干扰能力严重不足,存在很大的弊端,已基本上退出市场;酶联免疫法(ELISA)作为定性检测的方法,抗原、抗体的结合反应是在固相(ELISA板反应孔)表面进行的,其灵敏度、特异性均较好,且经济实惠,所以是应用得最广、最多的方法。化学发光法其灵敏度高,从化学角度和自动化程度看,化学发光法优于酶联免疫法。这些方法虽然都有很多优点,但在检测的灵敏度、特异性、稳定性、检测用时等方面还有待进一步提高。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明所要解决的技术问题是克服上述现有技术的不足,提供一种特异性强,灵敏度高,获得检测结果的时间短,操作方式简便,检测结果稳定可靠的游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)的测试试剂盒及其测试方法。

[0005] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)测试试剂盒,该试剂盒由磁分离试剂,试剂R<sub>1</sub>,试剂R<sub>2</sub>,标准品,质控品,校准品,清洗浓缩液及发光底物组成,其中:磁分离试剂:标记有小鼠抗人F- $\beta$ -hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球,所述标记有小鼠抗人F- $\beta$ -hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球浓度为100 $\mu$ g/ml;试剂R<sub>1</sub>:含有碱性磷酸酶标记的F- $\beta$ -hCG抗体,所述碱性磷酸酶标记的F- $\beta$ -hCG抗体的浓度为0.2 $\mu$ g/ml;试剂R<sub>2</sub>:含有牛 $\gamma$ 球蛋白组分的缓冲液;标准品,质控品和校准品:含有一定量F- $\beta$ -hCG抗原的小牛血清溶液,所述标准品的浓度为0(S<sub>0</sub>)、5(S<sub>1</sub>)、15(S<sub>2</sub>)、40(S<sub>3</sub>)、80(S<sub>4</sub>)、200(S<sub>5</sub>)mIU/ml,所述质控品浓度为10,80mIU/ml,所述校准品浓度为15,80 $\mu$ IU/ml;清洗浓缩液:含有Tween-20和Proclin-300的缓冲液;发光底物:金刚烷的衍生物IUMIPHOS530,所述金刚烷的衍生物IUMIPHOS530的浓度为10 $\mu$ g/ml。

[0007] 一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)测试试剂盒,由下述体积分数组成:磁分离试剂5%-7%,试剂R<sub>1</sub> 5%-7%,试剂R<sub>2</sub> 5%-7%,标准品5%-7%,质控品1%-3%,校准品3%-6%,清洗浓缩液20%-40%,发光底物30%-50%。

[0008] 优选地,一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,由下述体积分数组成:磁分离试剂5%,试剂R<sub>1</sub> 5%,试剂R<sub>2</sub> 5%,校准品5%,质控品1%,校准品3%,清洗浓缩液26%,发光底物50%。

[0009] 优选地,一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,由下述体积分数组成:磁分离试剂6%,试剂R<sub>1</sub> 6%,试剂R<sub>2</sub> 6%,校准品6%,质控品2%,校准品4%,清洗浓缩液30%,发光底物40%。

[0010] 优选地,一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒,由下述体积分数组成:磁分离试剂7%,试剂R<sub>1</sub> 7%,试剂R<sub>2</sub> 7%,校准品7%,质控品3%,校准品6%,清洗浓缩液33%,发光底物30%。

[0011] 所述试剂盒中各组分按照如下制备方法制得:

[0012] 第一步:磁分离试剂的制备过程

[0013] 一、磁珠缓冲液配制操作规程:

[0014] (1)称取Tris 4.58g和NaCl6.81g于1L容器中,称取0.96g Tween-20于20ml容器中加适量水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

[0015] (2)用移液器将Proclin-300量取0.2ml于10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;然后在1L容器中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0016] (3)调节PH计测量其PH值;用4M HCl或4M NaOH调PH,测量其PH在7.95-8.05之间即符合要求;

[0017] (4)称取BSA V(牛血清白蛋白(第五组分))3g倒入上述1L容器中;

[0018] (5)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.95-8.05之间即符合要求,用0.2um滤器过滤即得;过滤完后贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0019] 二、磁分离试剂的配制:

[0020] (1)将1.0mg DSS(辛二酸二琥珀酰亚胺)溶于50ul DMSO中,即浓度为20mg/mL;取2mg F-β-hCG抗体溶于PH 9.5的0.1mol/L PB缓冲液中至总体积为1ml;

[0021] (2)计算DSS的投入量,按照以下公式计算:(抗体质量/16000)×10×368/C<sub>DSS</sub>,其中C<sub>DSS</sub>指代DSS的物质的量浓度mol/L;

[0022] (3)用移液枪吸取相应体积的DSS加入到步骤1的抗体溶液中,置室温90min;

[0023] (4)将步骤3抗体溶液加入到Centricon-10浓缩管中,然后放入到sigma2-16k高速冷冻离心机中在3000g的离心力下浓缩约30min至体积为0.5ml;

[0024] (5)取0.5ml磁珠,所述的磁珠直径在0.9-1.5μm之间,加入5ml反应杯中,放入专用试管架,经磁铁吸附2分钟后吸取上清;

[0025] (6)每次加入1.5ml PH9.5 0.1mol/L PB,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;将步骤4获得的抗体溶液加入到磁珠中,混匀后室温反应4小时,保持混匀状态;

[0026] (7)加入0.3ml 1mol/L的Tris溶液37°C15分钟,其中Tris的加样量为1mg抗体加0.15mlTris;

[0027] (8)每次加入1.5ml PH 7.2 0.1mol/L PB清洗已经标记的磁珠,混匀30秒,上架,

去上清,重复操作3次;

[0028] (9)用100ml磁珠保存液将磁珠转入125ml玻璃瓶,即为0.05%的F- $\beta$ -hCG磁分离试剂;

[0029] (10)将步骤9获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照1:2.3的比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂;

[0030] 第二步:试剂R<sub>1</sub>的制备过程

[0031] 一、试剂R<sub>1</sub>稀释液配制操作规程:

[0032] (1)取Tris 6.06g、NaCl 13.0g、ZnCl<sub>2</sub> 0.05g、Proclin-300 0.2ml和MgCl<sub>2</sub> 0.05g于烧瓶中;然后在烧瓶中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0033] (2)用4M HCl或4M NaOH调PH,测量使PH在7.35-7.45范围内;

[0034] (3)称取BSA 3g倒入上述烧瓶中;

[0035] (4)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,用0.2 $\mu$ m滤器过滤;过滤完后,贴好标签于2-8 $^{\circ}$ C冷库贮存;

[0036] 二、试剂R<sub>1</sub>的配制(碱性磷酸酶(ALP)与F- $\beta$ -hCG单克隆抗体的偶联)

[0037] (1)取10mgALP加入5ml生理盐水中,加入到Centricon-10浓缩管中,3000rpm离心大约20分钟,浓缩至1毫升;

[0038] (2)于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO<sub>4</sub>溶液,室温下避光搅拌20分钟;

[0039] (3)将上述溶液装入透析袋中,用1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0040] (4)加20 $\mu$ l 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化ALP的PH升高到9.0~9.5,然后立即加入2.5mg IgG抗体,在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2小时;

[0041] (5)加0.1ml新配的4mg/ml NaBH<sub>4</sub>液,混匀,再置4 $^{\circ}$ C2小时;

[0042] (6)将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0043] (7)在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4 $^{\circ}$ C1小时;

[0044] (8)3000rpm离心半小时,弃上清;沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15M PH7.4的PBS中;

[0045] (9)将上述溶液装入透析袋中,对0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析约5个小时,去除铵离子后,10000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入体积1/100的1M MgCl<sub>2</sub>溶液4 $^{\circ}$ C保存;收集到的碱性磷酸酶(ALP)与F- $\beta$ -hCG单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以1:3000的体积比混合均匀,即得本发明试剂盒中试剂R<sub>1</sub>;

[0046] 第三步:试剂R<sub>2</sub>的制备

[0047] 试剂R<sub>2</sub>配制操作规程:

[0048] (1)称取Tris(三羟甲基氨基甲烷,分子式:(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)1.56g和NaCl 4.23g于1L烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2ml于少量纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

[0049] (2)用量筒量取800ml纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用4M HCl或4M NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

[0050] (3)称取牛 $\gamma$ 球蛋白(IgG)1.8g于800ml纯化水的烧杯中;

[0051] (4)最后定容1000ml,完全溶解后,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,用0.2 $\mu$ m滤器过滤;过滤完后,贴好标签于2-8 $^{\circ}$ C冷库贮存;

[0052] 第四步:标准品、质控品和校准品的配制:

[0053] (1)游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)定量测定试剂盒F- $\beta$ -hCG标准品原料配制成浓度点为0,5,15,40,80,200mIU/ml;质控品配制的浓度点为10,80mIU/ml,校准品的浓度点为15,80mIU/ml;

[0054] (2)充分混匀后,贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0055] 第五步:清洗浓缩液配制操作规程:

[0056] (1)称取Tris 12.54g和NaCl 325.6g于1L容器中;

[0057] (2)称取5g Tween-20于100ml容器中加20ml水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

[0058] (3)用移液器将Proclin-300量取0.2ml于盛有10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

[0059] (4)用量筒量取800ml纯化水于上述1L容器中,充分搅拌,直至完全溶解;

[0060] (5)用4M HCL或4M NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

[0061] (6)最后定容1000ml,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,完全溶解后用0.2 $\mu$ m滤器过滤即得;过滤完后,贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0062] 第六步:发光底物配制

[0063] 发光底物配制操作规程:

[0064] (1)称取Tris 2.35g、NaCl 6.41g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.002g和Proclin-300 0.2ml于1L烧杯中;

[0065] (2)用量筒量取800ml纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用4M HCl或4M NaOH调PH,测量其范围在7.95-8.05之间;

[0066] (3)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.95-8.05之间即符合要求,用0.2 $\mu$ m滤器过滤;过滤完后,加入250ml IUMIPHOS530,混匀后,贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0067] 1.一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)的测试方法,包括下列步骤:

[0068] (1)使用前,需使用试剂盒内校准品(选)进行曲线校正,并用质控品进行质量控制,测试结果在质控范围内方可进行样本的检测;

[0069] (2)加F- $\beta$ -hCG标准品、质控品、待测标本至对应试管底部;

[0070] (3)加试剂R<sub>1</sub>至每一试管中;

[0071] (4)加试剂R<sub>2</sub>至每一试管中;

[0072] (5)加磁分离试剂至每一试管中;

[0073] (6)用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30秒后,置37°C水浴30分钟;

[0074] (7)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;

[0075] (8)清洗浓缩液用纯化水稀释7倍后,加稀释后的清洗液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀30s;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;混匀要彻底;

[0076] (9)重复步骤6、7、6一遍;

[0077] (10)加发光底物溶液至试管中混匀3秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

[0078] 本发明的有益效果在于:

[0079] (1)本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,与现有技术相比,在出结果时间上较传统酶联免疫法少10-20分钟,同时抗体的用量降低了20%以上,在提高产品性能的同时,大大降低了产品成本。

[0080] (2)本发明公开了一种新的专用试剂R<sub>2</sub>,使得反应过程更加稳定可靠,具有更高的检测灵敏度和特异性,并达到了较佳的性能参数。

[0081] (3)试剂盒中的磁分离试剂,试剂R<sub>1</sub>,试剂R<sub>2</sub>,标准品,质控品,校准品,清洗浓缩液、稀释液以及发光底物的配比均是反应体系下的最优配方,给该试剂盒的使用有效期及检测性能提供了有力保障。

[0082] (4)本发明试剂盒的精确度、灵敏度以及稳定性均优于市场同类产品,并且成本低廉,操作简单,应用前景广阔。

### 具体实施方式

[0083] 下面将结合具体实施方式,对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0084] 实施例1:

[0085] 一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)测试试剂盒,该试剂盒由磁分离试剂,试剂R<sub>1</sub>,试剂R<sub>2</sub>,标准品,质控品,校准品,清洗浓缩液及发光底物组成,其中:磁分离试剂:标记有小鼠抗人F-β-hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球,所述标记有小鼠抗人F-β-hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球浓度为100μg/ml;试剂R<sub>1</sub>:含有碱性磷酸酶标记的F-β-hCG抗体,所述碱性磷酸酶标记的F-β-hCG抗体的浓度为0.2μg/ml;试剂R<sub>2</sub>:含有牛γ球蛋白组分的缓冲液;标准品,质控品和校准品:含有一定量F-β-hCG抗原的小牛血清溶液,所述标准品的浓度为0(S<sub>0</sub>)、5(S<sub>1</sub>)、15(S<sub>2</sub>)、40(S<sub>3</sub>)、80(S<sub>4</sub>)、200(S<sub>5</sub>)mIU/ml,所述质控品浓度为10,80mIU/ml,所述校准品浓度为15,80mIU/ml;清洗浓缩液:含有Tween-20和Proclin-300的缓冲液;发光底物:金刚烷的衍生物IUMIPHOS530,所述金刚烷的衍生物IUMIPHOS530的浓度为10μg/ml;

[0086] 本实施例游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)测试试剂盒,由下述体积分数组成:磁分离试剂5%,试剂R<sub>1</sub> 5%,试剂R<sub>2</sub> 5%,校准品5%,质控品1%,校准品3%,清洗浓缩液26%,发光底物50%。

[0087] 本发明上述游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)测定试剂盒的制备方法,其具体步骤如下:

[0088] 第一步:磁分离试剂的制备过程

[0089] 一、磁珠缓冲液配制操作规程:配方见表1,以配制1L为例:

[0090] (1)称取Tris 4.58g和NaCl6.81g于1L容器中,称取0.96g Tween-20于20ml容器中加适量水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

[0091] (2)用移液器将Proclin-300量取0.2ml于10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;然后在1L容器中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0092] (3)调节PH计测量其PH值;用4M HCl或4M NaOH调PH,测量其PH在7.95-8.05之间即符合要求;

[0093] (4)称取BSA V(牛血清白蛋白(第五组分))3g倒入上述1L容器中;

[0094] (5)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.95-8.05之间即符合要求,用0.2um滤器

过滤即得;过滤完后贴好标签于2-8℃冷库贮存;

[0095] 磁珠缓冲液(表1)

[0096]

| 试剂          | 1000ml 用量      | 试剂级别 |
|-------------|----------------|------|
| TRIS        | 4.58g          | 分析纯  |
| NaCl        | 6.81g          | 分析纯  |
| TWEEN-20    | 0.96g          | 分析纯  |
| Proclin-300 | 0.2ml          | /    |
| 加水至         | 加至 800ml, 溶解混匀 |      |
| PH          | 8.0±0.05       |      |
| 加水至         | 加至 1000ml      |      |
| BSA V       | 3.0g           |      |
| 验证 PH       | 8.0±0.05       |      |
| 0.2um 滤器过滤  |                |      |

[0097] 二、磁分离试剂的配制

[0098] (1)将1.0mg DSS(辛二酸二琥珀酰亚胺)溶于50ul DMSO中,即浓度为20mg/mL;取2mgF-β-hCG抗体溶于PH 9.5的0.1mol/L PB缓冲液中至总体积为1ml;

[0099] (2)计算DSS的投入量,按照以下公式计算:(抗体质量/16000)×10×368/C<sub>DSS</sub>,其中C<sub>DSS</sub>指代DSS的物质的量浓度mol/L;

[0100] (3)用移液枪吸取相应体积的DSS加入到步骤1的抗体溶液中,置室温90min;

[0101] (4)将步骤3抗体溶液加入到Centricon-10浓缩管中,然后放入到sigma2-16k高速冷冻离心机中在3000g的离心力下浓缩约30min至体积为0.5ml;

[0102] (5)取0.5ml磁珠,所述的磁珠直径在0.9-1.5μm之间,加入5ml反应杯中,放入专用试管架,经磁铁吸附2分钟后吸取上清;

[0103] (6)每次加入1.5ml PH9.5 0.1mol/L PB,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;将步骤4获得的抗体溶液加入到磁珠中,混匀后室温反应4小时,保持混匀状态;

[0104] (7)加入0.3ml 1mol/L的Tris溶液37℃15分钟,其中Tris的加样量为1mg抗体加0.15mlTris;

[0105] (8)每次加入1.5ml PH 7.2 0.1mol/L PB清洗已经标记的磁珠,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;

[0106] (9)用100ml磁珠保存液将磁珠转入125ml玻璃瓶,即为0.05%的F-β-hCG磁分离试剂;

[0107] (10)将步骤9获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照1:2.3的比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂;

[0108] 第二步:试剂R<sub>1</sub>的制备过程

[0109] 一、试剂R<sub>1</sub>稀释液配制操作规程:配方见表2,以配制1L为例:

[0110] (1)取Tris 6.06g、NaCl 13.0g、ZnCl<sub>2</sub> 0.05g、Proclin-300 0.2ml和MgCl<sub>2</sub> 0.05g于烧瓶中;然后在烧瓶中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0111] (2)用4M HCl或4M NaOH调PH,测量使PH在7.35-7.45范围内;

[0112] (3)称取BSA V 3g倒入上述烧瓶中;

[0113] (4)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,用0.2um滤器过滤;过滤完后,贴好标签于2-8℃冷库贮存;

[0114] 试剂R<sub>1</sub>稀释液(表2)

[0115]

| 试剂          | 1000ml 用量 | 试剂级别 |
|-------------|-----------|------|
| TRIS        | 6.06g     | 分析纯  |
| NaCl        | 13.0g     | 分析纯  |
| Proclin-300 | 0.2ml     | /    |

[0116]

|                   |                  |      |
|-------------------|------------------|------|
| MgCl <sub>2</sub> | 0.05g            | 分析纯  |
| 试剂                | 1000ml 用量        | 试剂级别 |
| ZnCl <sub>2</sub> | 0.05g            | 分析纯  |
| 纯化水               | 加至 800ml, 溶解混匀   |      |
| HCL 或者 NaOH       | 调节 PH 到 7.4±0.05 |      |
| BSA V             | 3.0g             | /    |
| 纯化水               | 加至 1000ml, 充分混匀  |      |
| 验证 PH             | 7.4±0.05         |      |
| 0.2um 滤器过滤        |                  |      |

[0117] 二、试剂R<sub>1</sub>的配制(碱性磷酸酶(ALP)标记的小鼠抗人F-β-hCG单克隆抗体)

[0118] (1)取10mgALP加入5ml生理盐水中,加入到Centricon-10浓缩管中,3000rpm离心大约20分钟,浓缩至1毫升;

[0119] (2)于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO<sub>4</sub>溶液,室温下避光搅拌20分钟;

[0120] (3)将上述溶液装入透析袋中,用1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;

[0121] (4)加20μl 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化ALP的PH升高到9.0~9.5,然后立即加入2.5mg IgG抗体,在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2小时;

[0122] (5)加0.1ml新配的4mg/ml NaBH<sub>4</sub>液,混匀,再置4℃2小时;

[0123] (6)将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4℃过夜;

[0124] (7)在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1小时;

[0125] (8)3000rpm离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15M PH7.4的PBS中;

[0126] (9)将上述溶液装入透析袋中,对0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析约5个小时,去除铵离子后,10000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入体积1/100的1M MgCl<sub>2</sub>溶液4℃保存;收集到的碱性磷酸酶(ALP)与F-β-hCG单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以1:3000的体积比混合均匀,即得本发明试剂盒中试剂R<sub>1</sub>;

[0127] 第三步:试剂R<sub>2</sub>的制备

[0128] 试剂R<sub>2</sub>配制操作规程:配方见(表3),以配制1L为例:

[0129] (1)称取Tris(三羟甲基氨基甲烷,分子式:(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)1.56g和NaCl 4.23g于1L烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2ml于少量纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述 1L容器中;

[0130] (2)用量筒量取800ml纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用4M HCL或4M NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

[0131] (3)称取牛 γ 球蛋白(IgG)1.8g于800ml纯化水的烧杯中;

[0132] (4)最后定容1000ml,完全溶解后,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,用0.2um滤器过滤;过滤完后,贴好标签于2-8℃冷库贮存;

[0133] 试剂R<sub>2</sub>的配制(表3)

[0134]

| 试剂          | 1000ml 用量                | 试剂级别 |
|-------------|--------------------------|------|
| TRIS        | 1.56g                    | 分析纯  |
| NaCL        | 4.23g                    | 分析纯  |
| Proclin-300 | 0.2ml                    | /    |
| 纯化水         | 加至 800ml, 混匀溶解           |      |
| PH          | 7.4±0.05                 |      |
| 牛 IgG       | 加牛 IgG 1.8g 于 800ml 纯化水中 |      |
| 纯化水         | 加至 1000ml, 充分混匀          |      |
| 验证 PH       | 7.4±0.05                 |      |
| 0.2um 滤器过滤  |                          |      |

[0135] 第四步:标准品、质控品和校准品的配制:

[0136] (1)最高点:最高浓度点为X,目标点浓度为A,B,C,D,E,F,配制V体积的溶液时,需加入原料的体积为分别为:(表4)

[0137]

| 浓度 | 加入标准品稀释液体积 | 加入X体积 |
|----|------------|-------|
| A  | V-A*V/X    | A*V/X |

|   |           |         |
|---|-----------|---------|
| B | $V-B*V/X$ | $B*V/X$ |
| C | $V-C*V/X$ | $C*V/X$ |
| D | $V-D*V/X$ | $D*V/X$ |
| E | $V-E*V/X$ | $E*V/X$ |
| F | $V-F*V/X$ | $F*V/X$ |

[0138] (2)游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)定量测定试剂盒F- $\beta$ -hCG标准品原料配制成浓度点为0,5,15,40,80,200mIU/ml;质控品配制的浓度点为10,80mIU/ml,校准品的浓度点为15,80mIU/ml;

[0139] (3)充分混匀后,贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0140] 第五步:清洗浓缩液配制操作规程:配方见(表5),以配制1L为例:

[0141] (1)称取Tris 12.54g和NaCl 325.6g于1L容器中;

[0142] (2)称取5g Tween-20于100ml容器中加20ml水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

[0143] (3)用移液器将Proclin-300量取0.2ml于盛有10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

[0144] (4)用量筒量取800ml纯化水于上述1L容器中,充分搅拌,直至完全溶解;

[0145] (5)用4M HCL或4M NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

[0146] (6)最后定容1000ml,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,完全溶解后用0.2 $\mu$ m滤器过滤即得;过滤完后,贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0147] 清洗浓缩液的配制(表5)

[0148]

| 试剂               | 1000ml 用量       | 试剂级别 |
|------------------|-----------------|------|
| TRIS             | 12.54g          | 分析纯  |
| NaCL             | 325.6g          | 分析纯  |
| Tween-20         | 5g              | 分析纯  |
| Proclin-300      | 0.2ml           | /    |
| 纯化水              | 加至 800ml, 混匀溶解  |      |
| PH               | 7.4 $\pm$ 0.05  |      |
| 纯化水              | 加至 1000ml, 混匀溶解 |      |
| 验证 PH            | 7.4 $\pm$ 0.05  |      |
| 0.2 $\mu$ m 滤器过滤 |                 |      |

[0149] 第六步:发光底物配制操作规程:配方见(表6),以配制1L为例:

[0150] (1)称取Tris 2.35g、NaCl 6.41g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.002g和Proclin-300 0.2ml于1L烧杯中;

[0151] (2)用量筒量取800ml纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用4M HCl或4M

NaOH调PH,测量其范围在7.95-8.05之间;

[0152] (3)最后定容至1000ml,测PH值,范围在7.95-8.05之间即符合要求,用0.2um滤器过滤;过滤完后,加入250ml IUMIPHOS530,混匀后,贴好标签于2-8°C冷库贮存;

[0153] 发光底物的配制(表6)

[0154]

| 试剂                              | 1000ml 用量       | 试剂级别 |
|---------------------------------|-----------------|------|
| TRIS                            | 2.35g           | 分析纯  |
| NaCL                            | 6.41g           | 分析纯  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> | 0.002g          | 分析纯  |
| Proclin-300                     | 0.2ml           | /    |
| 纯化水                             | 加至 800ml, 混匀溶解  |      |
| PH                              | 8.0±0.05        |      |
| 纯化水                             | 加至 1000ml, 充分混匀 |      |
| 验证 PH                           | 8.0±0.05        |      |
| 0.2um 滤器过滤                      |                 |      |
| IUMIPHOS530                     | 250ml, 混匀       |      |

[0155] 本发明一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)的测试方法(以100μl为例),包括下列步骤:

[0156] (1)使用前,需使用试剂盒内5μl校准品(选)进行曲线校正,并用X(X<1μl)质控品进行质量控制,测试结果在质控范围内方可进行样本的检测;

[0157] (2)加5μl F-β-hCG标准品、(1-X)μl质控品、待测标本至对应试管底部;

[0158] (3)加试剂5μl R<sub>1</sub>至每一试管中;

[0159] (4)加试剂5μl R<sub>2</sub>至每一试管中;

[0160] (5)加5μl磁分离试剂至每一试管中;

[0161] (6)用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30秒后,置37°C水浴30分钟;

[0162] (7)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;

[0163] (8)将26μl清洗浓缩液用纯化水稀释7倍后,加200μl稀释后的清洗液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀30s;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出。混匀要彻底;

[0164] (9)重复步骤6、7、6一遍;

[0165] (10)加50μl发光底物溶液至试管中混匀3秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检

测。

[0166] 实施例2:

[0167] 一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)测试试剂盒,该试剂盒由磁分离试剂,试剂R<sub>1</sub>,试剂R<sub>2</sub>,标准品,质控品,校准品,清洗浓缩液及发光底物组成,其中:磁分离试剂:标记有小鼠抗人F- $\beta$ -hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球,所述标记有小鼠抗人F- $\beta$ -hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球浓度为100 $\mu$ g/ml;试剂R<sub>1</sub>:含有碱性磷酸酶标记的F- $\beta$ -hCG抗体,所述碱性磷酸酶标记的F- $\beta$ -hCG抗体的浓度为0.2 $\mu$ g/ml;试剂R<sub>2</sub>:含有牛 $\gamma$ 球蛋白组分的缓冲液;标准品,质控品和校准品:含有一定量F- $\beta$ -hCG抗原的小牛血清溶液,所述标准品的浓度为0(S<sub>0</sub>)、5(S<sub>1</sub>)、15(S<sub>2</sub>)、40(S<sub>3</sub>)、80(S<sub>4</sub>)、200(S<sub>5</sub>)mIU/ml,所述质控品浓度为10,80mIU/ml,所述校准品浓度为15,80mIU/ml;清洗浓缩液:含有Tween-20和Proclin-300的缓冲液;发光底物:金刚烷的衍生物IUMIPHOS530,所述金刚烷的衍生物IUMIPHOS530的浓度为10 $\mu$ g/ml;

[0168] 本实施例一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)测试试剂盒,由下述体积分数组成的:磁分离试剂6%,试剂R<sub>1</sub> 6%,试剂R<sub>2</sub> 6%,校准品6%,质控品2%,校准品4%,清洗浓缩液30%,发光底物40%。

[0169] 本发明一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)的测试方法(以100 $\mu$ l为例),包括下列步骤:

[0170] (1)使用前,需使用试剂盒内6 $\mu$ l校准品(选)进行曲线校正,并用X(X<2 $\mu$ l)质控品进行质量控制,测试结果在质控范围内方可进行样本的检测。

[0171] (2)加6 $\mu$ l F- $\beta$ -hCG标准品、(1-X) $\mu$ l质控品、待测标本至对应试管底部;

[0172] (3)加试剂6 $\mu$ l R<sub>1</sub>至每一试管中;

[0173] (4)加试剂6 $\mu$ l R<sub>2</sub>至每一试管中;

[0174] (5)加6 $\mu$ l磁分离试剂至每一试管中;

[0175] (6)用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30秒后,置37 $^{\circ}$ C水浴30分钟;

[0176] (7)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;

[0177] (8)将30 $\mu$ l清洗浓缩液用纯化水稀释7倍后,加200 $\mu$ l稀释后的清洗液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀30s;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出。混匀要彻底;

[0178] (9)重复步骤6、7、6一遍;

[0179] (10)加40 $\mu$ l发光底物溶液至试管中混匀3秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

[0180] 本实施例采用所述的试剂盒各组分的配制方法与实施例1相同。

[0181] 实施例3:

[0182] 一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)测试试剂盒,该试剂盒由磁分离试剂,试剂R<sub>1</sub>,试剂R<sub>2</sub>,标准品,质控品,校准品,清洗浓缩液及发光底物组成,其中:磁分离试剂:标记有小鼠抗人F- $\beta$ -hCG的单克隆抗体的纳米磁性微球,所述标记有小鼠抗人F- $\beta$ -hCG

的单克隆抗体的纳米磁性微球浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；试剂R<sub>1</sub>：含有碱性磷酸酶标记的F- $\beta$ -hCG抗体，所述碱性磷酸酶标记的F- $\beta$ -hCG抗体的浓度为0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；试剂R<sub>2</sub>：含有牛 $\gamma$ 球蛋白组分的缓冲液；标准品，质控品和校准品：含有一定量F- $\beta$ -hCG抗原的小牛血清溶液，所述标准品的浓度为0(S<sub>0</sub>)、5(S<sub>1</sub>)、15(S<sub>2</sub>)、40(S<sub>3</sub>)、80(S<sub>4</sub>)、200(S<sub>5</sub>)mIU/ml，所述质控品浓度为10，80mIU/ml，所述校准品浓度为15，80mIU/ml；清洗浓缩液：含有Tween-20和Proclin-300的缓冲液；发光底物：金刚烷的衍生物IUMIPHOS530，所述金刚烷的衍生物IUMIPHOS530的浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；

[0183] 本实施例一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)测试试剂盒，由下述体积分数组成的：磁分离试剂7%，试剂R<sub>1</sub> 7%，试剂R<sub>2</sub> 7%，校准品7%，质控品3%，校准品6%，清洗浓缩液33%，发光底物30%；

[0184] 本发明一种游离人绒毛膜性腺激素 $\beta$ 亚单位(F- $\beta$ -hCG)的测试方法(以100 $\mu\text{l}$ 为例)，包括下列步骤：

[0185] (1)使用前，需使用试剂盒内6 $\mu\text{l}$ 校准品(选)进行曲线校正，并用X(X<3 $\mu\text{l}$ )质控品进行质量控制，测试结果在质控范围内方可进行样本的检测。

[0186] (2)加7<1 $\mu\text{l}$  F- $\beta$ -hCG标准品、(1-X) $\mu\text{l}$ 质控品、待测标本至对应试管底部；

[0187] (3)加试剂7 $\mu\text{l}$  R<sub>1</sub>至每一试管中；

[0188] (4)加试剂7 $\mu\text{l}$  R<sub>2</sub>至每一试管中；

[0189] (5)加7 $\mu\text{l}$ 磁分离试剂至每一试管中；

[0190] (6)用塑料薄膜覆盖试管，多管混匀器轻轻振荡试管架30秒后，置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30分钟；

[0191] (7)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；

[0192] (8)将33 $\mu\text{l}$ 清洗浓缩液用纯化水稀释7倍后，加200 $\mu\text{l}$ 稀释后的清洗液至每一试管中，置多管混匀器上轻轻振荡混匀30s；加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出。混匀要彻底；

[0193] (9)重复步骤6、7、6一遍；

[0194] (10)加30 $\mu\text{l}$ 发光底物溶液至试管中混匀3秒，迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

[0195] 本实施例采用所述的试剂盒各组分的配制方法与实施例1相同。

[0196] 临床试验：

[0197] 1、检测数据

[0198] 为了确定本试剂盒的临床参考值，对1270份血清、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：

[0199]

| 孕周 | 样本数 | 浓度(mIU/ml) |
|----|-----|------------|
| 14 | 120 | 4.8~65.6   |
| 15 | 140 | 6.2~52.7   |
| 16 | 200 | 5.4~43.8   |

|    |     |          |
|----|-----|----------|
| 17 | 250 | 4.2~37.0 |
| 18 | 200 | 3.6~29.9 |
| 19 | 120 | 3.5~23.9 |
| 20 | 120 | 2.7~21.9 |
| 21 | 120 | 2.2~18.5 |

[0200] 2、本发明试剂盒性能指标

[0201] 外观：试剂盒中的组分应澄清，应无沉淀和絮状物，磁分离试剂摇匀后，应为均匀悬浊液，无明显凝集；最低检出限：应不大于0.5mIU/ml；准确度：用纯品（外购于AMG公司）作回收实验，其回收率应在（85%~115%）范围内；重复性：用不同浓度的两个样本进行检测，各重复检测10次，其变异系数CV应不大于10%；线性范围：在0.5mIU/ml~200mIU/ml测量范围内，用logit-log数学模型拟合，剂量-反应曲线线性相关系数 $R \geq 0.9900$ ；批间差：用三个批号试剂盒检测同一份样本，则三批试剂盒之间的批间变异系数CV应不大于15%；特异性：测定高浓度的交叉反应物质，结果如下：

[0202]

| 交叉反应物       | 浓度              | 干扰度           |
|-------------|-----------------|---------------|
| 促甲状腺激素（TSH） | 300 $\mu$ IU/ml | $\leq 0.15\%$ |
| 促卵泡生成素（FSH） | 500mIU/mL       | $\leq 0.15\%$ |
| 促黄体生成激素（LH） | 500mIU/ml       | $\leq 0.15\%$ |

[0203] 最后说明的是，以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述，但本领域技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 游离人绒毛膜性腺激素β亚单位测试试剂盒及其测试方法                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN105467137A</a>                   | 公开(公告)日 | 2016-04-06 |
| 申请号            | CN201510834583.2                               | 申请日     | 2015-11-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京豪迈生物工程有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 北京豪迈生物工程有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 北京豪迈生物工程有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 朱驰<br>王键                                       |         |            |
| 发明人            | 朱驰<br>王键                                       |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/76 G01N33/577 G01N33/535                |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/76 G01N33/535 G01N33/577 G01N2333/59    |         |            |
| 代理人(译)         | 路远   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种游离人绒毛膜性腺激素β亚单位(F-β-hCG)测试试剂盒，该试剂盒由磁分离试剂，试剂R1，试剂R2，标准品，质控品，校准品，清洗浓缩液及发光底物组成，本发明还公开了该试剂盒的制备方法。本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系，与现有酶联免疫的技术相比，本发明具有更高的特异性，灵敏度，获得检测结果的时间短，操作方式简便，检测结果准确可靠，大大降低了产品成本。

| 试剂          | 1000ml 用量      | 试剂级别 |
|-------------|----------------|------|
| TRIS        | 12.54g         | 分析纯  |
| NaCL        | 325.6g         | 分析纯  |
| Tween-20    | 5g             | 分析纯  |
| Proclin-300 | 0.2ml          | /    |
| 纯化水         | 加至 800ml，混匀溶解  |      |
| PH          | 7.4±0.05       |      |
| 纯化水         | 加至 1000ml，混匀溶解 |      |
| 验证 PH       | 7.4±0.05       |      |
| 0.2um 滤器过滤  |                |      |