



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105651990 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201511019364. 5

(22) 申请日 2015. 12. 30

(71) 申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518122 广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号

(72) 发明人 饶微 余慧玲 李婷华 彭国涛 罗凯 杜凯

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

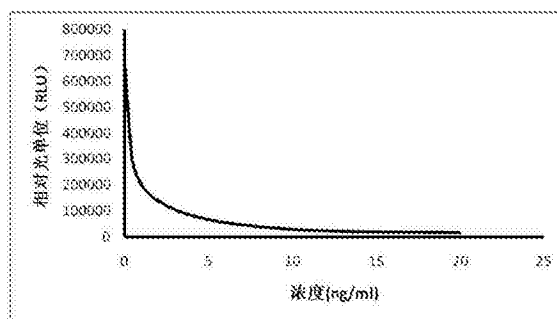
权利要求书2页 说明书19页 附图4页

(54) 发明名称

一种 17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种 17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,所述试剂盒包括组分 A 和组分 B,所述组分 A 为 17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,所述 17 α -羟孕酮抗原衍生物由 17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成,所述组分 B 为标记 17 α -羟孕酮抗体的化学发光标记物溶液。本发明还提供了一种 17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒的制备和检测方法及其应用,利用本发明提供的化学发光检测试剂盒,根据竞争法原理,准确、灵敏地测定样本中的 17 α -羟孕酮含量。



1. 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,所述试剂盒包括组分A和组分B,所述组分A为17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,所述17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成,所述组分B为标记17 α -羟孕酮抗体的化学发光标记物溶液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述蛋白载体选自牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白、牛IgG、人IgG、卵清蛋白、肌红蛋白和甲状腺球蛋白中的任一种。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯中的任一种。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述磁球为经过表面修饰使其表面带有活性基团的磁性微粒,并具有0.5-5 μ m的粒径。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述活性基团与所述蛋白载体偶联。

7. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述活性基团选自下列组中的至少一种:巯基、羟基、羧基、氨基、环氧基、醛基、异氰酸酯基、氰酸酯基、氰基、异氰基、马来酰亚胺基、N-羟基琥珀酰亚胺酯基、酚羟基,以及其衍生基团。

8. 根据权利要求1至7任一项所述的试剂盒,其特征在于,

所述化学发光标记物直接或间接标记所述17 α -羟孕酮抗体,所述间接标记的方式包括通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接标记所述17 α -羟孕酮抗体。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括选自B1-B3中的任意一种组分,其中

B1为直接标记化学发光标记物的17 α -羟孕酮抗体溶液;

B2为标记化学发光标记物的链霉亲和素溶液和生物素化的17 α -羟孕酮抗体溶液;

B3为标记化学发光标记物的抗异硫氰酸荧光素抗体溶液和标记异硫氰酸荧光素的17 α -羟孕酮抗体溶液。

10. 根据权利要求1至7任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述17 α -羟孕酮抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

11. 根据权利要求1至7任一项所述的试剂盒,其特征在于,在所述试剂盒中,17 α -羟孕酮抗原的浓度为5-200ng/ml,蛋白载体的浓度为2-50 μ g/ml,17 α -羟孕酮抗体的浓度为0.01-1 μ g/ml;磁球的浓度为0.1-10mg/ml;化学发光标记物的浓度为0.2-1mg/l。

12. 根据权利要求1至7任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括底物1和底物2,所述底物1为含有血红素衍生物的碱性溶液,底物2为含有过氧化氢的溶液。

13. 根据权利要求1至7任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括17 α -羟孕酮抗原的低点校准品和高点校准品,并任选地包括缓冲液。

14. 一种如权利要求1-13中任一项所述的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒的制备方法,包括使用所述17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的衍生物包被磁球。

15. 根据权利要求14所述的制备方法,其特征在于,所述方法还包括在包被磁球之前,使用第一活化剂将磁球进行活化处理,将经所述活化处理后的磁球分散于缓冲液中,并加

入17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的17 α -羟孕酮抗原衍生物进行反应,经固液分离,清洗固体,得到所述磁球与所述衍生物形成的分散体系;其中,所述第一活化剂为N,N-二环己基碳二亚胺和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐中的至少一种或其与N-羟基琥珀酰亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐中的至少一种的混合物。

16. 根据权利要求14所述的制备方法,其特征在于,所述方法还包括17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成衍生物的制备步骤,所述制备步骤包括使所述17 α -羟孕酮抗原与所述蛋白载体在偶联剂和溶剂的存在下进行偶联反应生成所述衍生物;其中,所述偶联剂选自戊二醛、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯中的至少一种;和/或所述溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、丙酮、氯仿中的至少一种。

17. 检测待测样品中17 α -羟孕酮抗原的方法,其特征在于,所述方法包括使用如权利要求1-13中任意一项所述的试剂盒或者使用如权利要求14-16中任意一项所述的试剂盒制备方法制备得到的试剂盒,通过直接化学发光免疫法对待测样品中的17 α -羟孕酮抗原浓度进行检测。

18. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述待测样品为血液、血清、尿或血浆中的任一种。

19. 诊断装置,其特征在于,包括使用如权利要求1-13中任意一项所述的试剂盒或者使用如权利要求14-16中任意一项所述的试剂盒制备方法制备得到的试剂盒,并采用如权利要求17或18所述的检测方法来检测待测样品中的17 α -羟孕酮抗原浓度的结构。

20. 根据权利要求19所述的装置,其特征在于,所述装置进行化学发光测定。

一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物物质检测的技术领域,具体涉及一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒及其制备方法,以及应用该试剂盒检测17 α -羟孕酮的方法和装置。

背景技术

[0002] 17 α -羟孕酮(17 α -Hydroxyprogesterone, 17 α -OHP)是肾上腺皮质激素生物合成过程中一种重要的小分子中间产物。正常肾上腺以胆固醇为原料合成糖皮质激素、盐皮质激素、性激素(雄、雌激素和孕激素)三类主要激素,都是胆固醇的衍生物,其过程极为复杂,每一步骤都要经过一系列酶催化。这些酶包括21-羟化酶、11 β -羟化酶、3 β -类固醇脱氢酶、17 α -羟化酶等。17 α -羟孕酮可以在17- α 羟化酶作用下由孕酮转化,或者在3 β -类固醇脱氢酶作用下由17- α 羟孕烯醇酮转化,主要产于肾上腺皮质,部分产生于性腺。血清中的17 α -羟孕酮主要与性激素共同作用,促进个体器官的发育。

[0003] 类固醇21-羟化酶由CPY21A2编码,也称为CYP21或P450c1,是位于肾上腺皮质内质网的一种细胞色素P450酶,它能催化17-羟孕酮转化11-脱氧皮质醇,孕酮转化为去氧皮质酮。21-羟化酶活性的减少或缺失将阻碍皮质醇的合成皮质醇合成不足,血中浓度降低,由于负反馈作用刺激垂体,分泌促肾上腺皮质激素(ACTH)增多,刺激性肾上腺皮质增生并分泌过多皮质醇前身物,某些前体可转化为雄激素,而发生一系列临床症状。检测17 α -羟孕酮的测定主要用于新生儿先天性肾上腺皮质增生症(CAH)的筛查和诊断,防止新生儿肾上腺危象、休克及其后遗症的产生,降低死亡率,防止女性男性化,减轻过量雄激素作用的后果(包括最终导致身材矮小、性别不明及性心理障碍等)。17 α -羟孕酮的测定也用于分析男性和女性的普通痤疮、男性秃顶以及一些不明原因的不育症。

[0004] 近年来,17 α -羟孕酮的测定方法主要有时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)和酶联免疫吸附试验法(ELISA)。时间分辨荧光免疫测定(TRFIA)是一种非同位素免疫分析技术,它用镧系元素标记抗原或抗体,根据镧系元素螯合物的发光特点,用时间分辨技术测量荧光,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨,其主要缺陷是荧光的产生需要激发光激发,显著增加仪器成本;产生的激发荧光寿命短,长度仅有几十个纳秒;荧光信号的信噪比高,非特异增加;产生的荧光信号属不可见光波长范围,探测困难。而酶联免疫吸附试验法(ELISA)的测定原理是采用竞争法进行测定,以微孔板包被17 α -羟孕酮的一株多克隆抗体,样本中的17 α -羟孕酮抗原和标记有辣根过氧化物酶的17 α -羟孕酮抗原竞争结合微孔板包被的抗体。但是,该技术方案存在三大缺点:(1)采用上述竞争法时标记抗原与待测抗原均为液相,与固相抗体的结合机会相同,当待测样本中17 α -羟孕酮抗原浓度较低时,灵敏度差;(2)17 α -羟孕酮抗原为一种小分子,将抗体固相化容易造成一些结合位点被掩盖或被改变,使其检测易受到干扰,亲和力下降;(3)酶联免疫吸附试验法检测时间长,至少需要6个小时,甚至过夜反应才能完成测试,效率低,且由于酶易受外部干扰因素影响,如温度、时间及材料浓度影响,导致其稳定性差,进而检测时特异性低,灵敏度差。

发明内容

[0005] 为解决上述现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,利用17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成的衍生物包被磁球,后与标记化学发光标记物的17 α -羟孕酮抗体特异性结合,准确且高灵敏的测定待测样本中的17 α -羟孕酮含量。

[0006] 本发明的目的还在于提供一种上述试剂盒的制备方法,包括使用所述17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的衍生物包被磁球。利用17 α -羟孕酮抗原小分子与蛋白载体连接形成的偶联物来包被磁球,旨在对小分子抗原进行衍生放大,提高后续检测17 α -羟孕酮的准确度和灵敏度。

[0007] 本发明的目的还在于提供一种检测待测样品中17 α -羟孕酮抗原的方法,包括通过直接化学发光免疫法使用上述试剂盒对待测样品中的17 α -羟孕酮抗原浓度进行检测。相对于酶免吸附试验法,采用直接化学发光免疫分析法不仅缩短检测时间、适于大批量检测,也避免了由于酶的不稳定性导致特异性低、灵敏度差的问题,且通过包被磁球的固相抗原与待测样品中的液相抗原竞争液相抗体的相对结合率的差异,提高待测样品中低浓度17 α -羟孕酮抗原的检出率。

[0008] 本发明的目的还在于提供一种诊断装置,其包括使用上述试剂盒并采用上述检测方法检测待测样品中17 α -羟孕酮抗原浓度的结构。该检测装置利用上述试剂盒及其检测方法,不仅缩短检测时间,且可全自动、批量化检测样本。

[0009] 根据本发明的一方面,提供一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,所述试剂盒包括组分A和组分B,所述组分A为17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,所述17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成,所述组分B为标记17 α -羟孕酮抗体的化学发光标记物溶液。

[0010] 应理解,在本发明提供的上述试剂盒中,所述17 α -羟孕酮抗体可以是一种或多种17 α -羟孕酮单克隆抗体和/或17 α -羟孕酮多克隆抗体。实际上,在本发明中所提及的抗体都可以是单克隆抗体和/或多克隆抗体。

[0011] 在本发明提供的上述试剂盒中,按照竞争法的原理对试剂盒组成进行配制,竞争法中包被纳米磁性微球(在本发明中均简称为磁球)的17 α -羟孕酮抗原与待测样本中的17 α -羟孕酮抗原竞争液相中的17 α -羟孕酮抗体,磁球均匀分散在整个反应体系中,由于接触面的影响,待测样本中的17 α -羟孕酮抗原与17 α -羟孕酮抗体特异性结合速率明显快于固相抗原与液相抗体的结合;速率差异越明显,抑制率越大,即灵敏度越高,越利于检出低浓度的待测抗原。反之,采用的标记抗原与待测抗原均为液相时,与固相抗体的结合机会相同,且将抗体固相化容易造成一些结合位点被掩盖或被改变,易受到干扰,导致检测灵敏度较低。

[0012] 在本发明提供的上述试剂盒中,由于小分子的自由度大,不利于与抗体结合的位点的暴露,也就不利于抗原与抗体的结合,因此为提高测定结果的准确性,使测定结果更加接近真实值,需要对抗原小分子进行衍生放大。另一方面,由于小分子抗原与固相化的抗体结合时,其接触面小,导致亲和力下降,因此需要提高其与固相结合的面积。为解决该问题,本发明对小分子17 α -羟孕酮抗原进行衍生放大,即将小分子17 α -羟孕酮抗原与蛋白

载体优先形成衍生物再包被磁球;还采用纳米级磁球增大接触面积,蛋白载体起到连接17 α -羟孕酮抗原与磁球的桥梁作用,通过蛋白载体与磁球的协同作用,使所述抗原与蛋白载体偶联之后进一步与磁球结合形成一个整体,从而提高抗原的稳定性和检测的准确性。

[0013] 根据本发明,由于酶在检测中易受环境因素的影响,温度及pH值对酶的稳定性都有很大影响,而采用化学发光检测是通过过氧化氢的碱性底物溶液催化抗体上的化学发光标记物发光,受环境影响较小,且化学发光标记物线性影响范围宽;而酶联免疫吸附试验法(ELISA)是在酶的作用下进行显色反应,因此优先选择化学发光检测方法。

[0014] 现有技术中,多采用酶作为蛋白载体,本发明也可采用现有技术中的酶作为蛋白载体。但本发明通过大量实验发现酶作为蛋白载体时试剂盒的分析灵敏度和精密度较差。因此,适合用于本发明的蛋白载体优选为动物源性或人源性蛋白,包括但不限于牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、兔血清白蛋白(RSA)、血蓝蛋白(KLH)、牛IgG、人IgG、卵清蛋白(OVA)、肌红蛋白和甲状腺球蛋白中的任一种。

[0015] 根据本发明,所述化学发光标记物选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯中的任一种,优选为N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI)。

[0016] 根据本发明,所述化学发光标记物直接标记或者间接标记17 α -羟孕酮抗体,其中,间接标记包括但不限于通过异硫氰酸荧光素(FITC)与抗FITC抗体体系或链霉亲和素(SA)与生物素(Biotin)体系间接标记。所述“直接标记”是指化学发光标记物直接与待测抗原或针对待测抗原的抗体连接进行标记;所述“间接标记”是指通过中间媒介链接体系使得化学发光标记物标记17 α -羟孕酮抗体,所述中间媒介链接体系包括但不限于FITC与抗FITC抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。

[0017] 根据本发明的一些实施方案,所述试剂盒包括选自B1-B3中的任意一种组分,B1为直接标记化学发光标记物的17 α -羟孕酮抗体溶液;B2为标记化学发光标记物的链霉亲和素溶液和生物素化的17 α -羟孕酮抗体溶液;B3为标记化学发光标记物的抗异硫氰酸荧光素抗体溶液和标记异硫氰酸荧光素的17 α -羟孕酮抗体溶液。

[0018] 根据本发明,所述组分A为17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,所述17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成。由于受17 α -羟孕酮抗原结合位点数的限制,为保证17 α -羟孕酮抗原与抗体结合,17 α -羟孕酮抗原衍生物与磁球直接包被。

[0019] 本发明将纳米级的磁性粒子和有机高分子材料进行复合,形成具有超顺磁性和极大蛋白吸附容量的微米级的固相微球,具有在外加磁场作用下可迅速被磁化,在撤走磁场后剩磁为零的属性,也增大与小分子抗原的接触面积。其中,所述未修饰的磁性微粒可以是 γ -Fe₂O₃,MeFe₂O₃(Me=Co、Mn、Ni),Fe₃O₄,Ni、Co、Fe、Fe-Co和Ni-Fe合金等纳米粒子,优选为 γ -Fe₂O₃和/或Fe₃O₄纳米粒子。

[0020] 根据本发明,为与抗原衍生物连接,在包被磁球之前所述磁球为经过表面修饰使其表面带有活性基团的磁性微粒。所述活性基团包括下列组中的至少一种:巯基、羟基、羧基、氨基、环氧基、醛基、异氰酸酯基、氰酸酯基、氰基、异氰基、马来酰亚胺基、N-羟基琥珀酰亚胺酯基、酚羟基,以及其衍生基团。当磁球表面带有例如羧基、氨基、巯基等官能团时,磁球可以直接与所述蛋白载体缩合连接;当磁球表面带有其他官能基团时,通常需要通过本领域中公知技术手段将磁球进一步修饰活化,使其带有能够与所述偶联物化学键合的官能基团。

[0021] 在本发明中,磁球优选粒径为 $0.5\mu\text{m}$ – $5\mu\text{m}$,并进一步优选为 0.8 – $3.0\mu\text{m}$ 的磁球。该粒径范围既能使磁球在本发明的试剂盒中具有良好的分散性,又能满足免疫分析对固相载体粒径范围的要求,且保证了较大的比表面积。磁球可以是实心的或空心的,还可以是多孔的。磁球的形状优选为球形。球形的磁球体,其表面积大,吸附效果最佳。

[0022] 根据本发明,磁球表面的活性基团与所述蛋白载体偶联。

[0023] 本发明中,17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液为一分散体系,该体系中磁球的浓度为 0.5 – 80mg/mL 。在分散体系中,磁球的浓度太大容易产生聚集沉淀,浓度太小则结合抗原的效果不佳。因此,本发明的发明人经过大量实验后,将分散体系中的磁球浓度选择为 0.1 – 200mg/mL ,并优选为 0.1 – 100mg/mL ,还优选为 0.1 – 80mg/mL ,进一步优选为 0.1 – 10mg/mL 。在该浓度范围中,磁球能够在分散体系中均匀稳定地分散,又能获得较佳的聚合效果。

[0024] 根据本发明,所述试剂盒还包括底物1和底物2,所述底物1为含有血红素衍生物的碱性溶液,底物2为含有过氧化氢的溶液。

[0025] 根据本发明,所述试剂盒还可以包括17 α -羟孕酮抗原(或其与蛋白载体偶联而成的衍生物)的低点校准品和高点校准品,并任选地包括缓冲液。本发明所述低点校准品与高点校准品是两者相对而言,其中“低点校准品”,是指将17 α -羟孕酮抗原(或其与蛋白载体的偶联物)用50%牛血清制品稀释成浓度为 0.2 – 2ng/mL 得到的校准品;而“高点校准品”是指将17 α -羟孕酮抗原(或其与蛋白载体的偶联物)用50%牛血清制品稀释成浓度为 8 – 24ng/mL 得到的校准品。

[0026] 在本发明提供的试剂盒,所包含的各成分浓度优选如下:17 α -羟孕酮抗原的浓度为 5 – 200ng/mL ;蛋白载体的浓度为 2 – $50\mu\text{g/mL}$;17 α -羟孕酮抗体的浓度为 0.01 – $1\mu\text{g/mL}$;磁球的浓度为 0.1 – 10mg/mL ;化学发光标记物的浓度为 0.2 – 1mg/L ;FITC的浓度为 0.002 – 0.01mg/mL ;抗FITC抗体的浓度为 0.01 – 1mg/mL ;链霉亲和素的浓度为 0.01 – 1mg/mL ;生物素的浓度为 0.002 – 0.01mg/mL 。上述各成分的浓度均基于包含该成分的单体的试剂盒组分的量计。

[0027] 在本发明的试剂盒中,17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成的衍生物包被磁球,17 α -羟孕酮抗体标记ABEI。

[0028] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成的衍生物包被的磁球悬浮液、标记ABEI的17 α -羟孕酮抗体溶液、低点校准品和高点校准品。

[0029] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成的衍生物包被磁球悬浮液、标记ABEI的链霉亲和素溶液、生物素化的17 α -羟孕酮抗体溶液、低点校准品和高点校准品。

[0030] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成的衍生物包被的磁球悬浮液、标记ABEI的抗异硫氰酸荧光素抗体溶液和标记异硫氰酸荧光素的17 α -羟孕酮抗体溶液、低点校准品和高点校准品。

[0031] 本发明还提供了一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒的制备方法,所述方法包括使用17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的衍生物包被磁球。应理解,该包被过程包括两种情况,一种是首先将17 α -羟孕酮抗原和蛋白载体偶联形成衍生物,然后再将其包被磁球;另一种情况是17 α -羟孕酮抗原和蛋白载体的偶联反应与对磁球的包被作用同时进行。

[0032] 根据本发明,上述制备方法还包括在包被磁球之前,使用第一活化剂将磁球进行活化处理,并将经所述活化处理后的磁球分散于缓冲液中,并加入17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的衍生物进行反应,经固液分离,清洗固体,得到包被磁球的所述检测剂;其中,所述第一活化剂为N,N-二环己基碳二亚胺和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐中的至少一种或其与N-羟基琥珀酰亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐中的至少一种的混合物。应当理解,通过该步骤的活化处理,磁球表面从而带有活性基团。

[0033] 根据本发明,上述制备方法还包括17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成衍生物的制备步骤,所述制备步骤包括使所述17 α -羟孕酮抗原与所述蛋白载体在偶联剂和溶剂的存在下进行偶联反应生成所述衍生物;其中,所述偶联剂选自戊二醛、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯中的至少一种;和/或所述溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、丙酮中的至少一种。

[0034] 在一个具体实施方案中,所述17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体的摩尔比为10-20:1,优选为15:1。本发明选择该摩尔比既保证连接到蛋白载体上的17 α -羟孕酮抗原分子的数量,又保证了后续的蛋白载体能有效连接到磁球上。

[0035] 本发明还提供了一种检测待测样品中17 α -羟孕酮抗原的方法,包括使用本发明提供的试剂盒,通过直接化学发光免疫法对待测样品中的17 α -羟孕酮抗原浓度进行检测。具体为,使包被磁球的抗原与样本中的17 α -羟孕酮抗原竞争化学发光标记物标记的17 α -羟孕酮抗体,从而测定样本中17 α -羟孕酮抗原的含量。其中,所述化学发光标记物为鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯中的任一种,优选为N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺。

[0036] 在优选的实施方案中,所述待测样本来源于人,而在检测方法中使用的生物样品可以是衍生自受试者的血液、血清、尿或血浆中的任一种。。

[0037] 在一个具体的实施方案中,上述用于检测17 α -羟孕酮的方法包括如下步骤:

[0038] a)将样本加入反应杯;

[0039] b)向步骤a)中加入本发明提供的由17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的衍生物包被的磁球悬浮液;

[0040] c)向步骤b)的混合物中加入本发明提供的17 α -羟孕酮抗体标记的化学发光标记物溶液;

[0041] d)进行温育,其中温育温度为常规的温育温度下即可,例如在4-40 $^{\circ}$ C,温育时间可以是5-30min;

[0042] e)磁分离、清洗,得到化学发光标记物标记的17 α -羟孕酮抗体与所述由17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成的衍生物包被磁球的结合物;

[0043] f)向步骤e)得到的结合物中加入激发底物1和底物2,使其产生发光信号;

[0044] g)根据步骤f)测定的发光信号的光强度计算待测样本中17 α -羟孕酮抗原含量。

[0045] 具体地,可以将测试样本所产生的发光信号强度与采用17 α -羟孕酮抗原标准品进行测试所得出的标准曲线进行对照,即可获知样本中17 α -羟孕酮抗原的含量。其中,所述待测样本含有待测的17 α -羟孕酮抗原。所述发光标记物优选为ABEI。在本发明的一个优选的实施方案中,所述检测方法通过化学发光免疫分析仪检测17 α -羟孕酮抗原的浓度。在本发明的另一个优选的实施方案中,所述方法全自动地进行。应该理解,上述检测方法的步骤a)中,样本包括但不限于待测样本、高点校准品、低点校准品、质控品或者已知浓度的校准品等。上述激发底物1为含有血红素衍生物的氢氧化钠溶液,底物2为含有过氧化氢的溶液。应

该理解,在检测步骤g)中,光强度由相对光单位(relative light unit,RLU)表示。

[0046] 本发明还提供了一种用于检测样品中17 α -羟孕酮抗原浓度的诊断装置,包括使用本发明提供的试剂盒或使用本发明的试剂盒制备方法获得的试剂盒,并采用本发明的化学发光检测方法检测待测样品中的17 α -羟孕酮抗原浓度的结构。其中,所述诊断装置包括但不限于化学发光免疫分析仪,优选为深圳新产业生物医学工程股份有限公司生产的MagLumi系列全自动化学发光免疫分析仪。

[0047] 本发明的有益效果在于:

[0048] 1.本发明通过直接化学发光免疫法检测17 α -羟孕酮抗原,避免使用特异性低、灵敏度差的酶联免疫吸附试验法以及非特异性高、探测困难的时间分辨荧光免疫分析法,且克服了酶联免疫吸附试验法等现有技术方法中使用酶作为发光标记物的不稳定、容易导致实验结果误差大的问题;

[0049] 2.本发明采用竞争法,即包被纳米磁性微球的17 α -羟孕酮抗原与待测样本中的17 α -羟孕酮抗原竞争液相中的17 α -羟孕酮抗体,利用结合速率的差异,提高低浓度抗原的检测灵敏度;

[0050] 3.本发明对小分子抗原进行衍生放大,提高信号响应的强度,且与纳米级磁球进一步结合协同提高抗原稳定性和检测的准确度;

[0051] 4.本发明的试剂盒能够与化学发光免疫分析仪(尤其是MagLumi系列化学发光免疫分析仪)配套使用,在样本测定过程中实现了全自动化,使得17 α -羟孕酮抗原浓度的检测可以简单、方便、快速、批量地进行,同时保证检测的系统误差较小。

附图说明

[0052] 图1是实施例1的17 α -羟孕酮抗原浓度和发光强度的拟合图;

[0053] 图2是实施例2的17 α -羟孕酮抗原浓度和发光强度的拟合图;

[0054] 图3是实施例3的17 α -羟孕酮抗原浓度和发光强度的拟合图;

[0055] 图4是实施例4的17 α -羟孕酮抗原浓度和发光强度的拟合图;

[0056] 图5是实施例5的17 α -羟孕酮抗原浓度和发光强度的拟合图;

[0057] 图6是对比例1的17 α -羟孕酮浓度和发光强度的线性拟合图;

[0058] 图7是对比例2的17 α -羟孕酮浓度和发光强度的线性拟合图;

[0059] 图8是对比例3的17 α -羟孕酮浓度和发光强度的线性拟合图。

具体实施方式

[0060] 下面将通过具体实施方式和具体实施例对本发明做进一步地说明,应理解,本发明的范围并不限于此。

[0061] 以下实施例采用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的MagLumi2000pIus全自动化学发光免疫分析仪进行检测。

[0062] 17 α -羟孕酮抗体来源:购自CalBioagents公司;

[0063] 17 α -羟孕酮抗原来源:购自Sigma公司。

[0064] 生物素、链霉亲和素来源:均购自美国Biosources公司。

[0065] 羊抗FITC多克隆抗体来源:购自美国Jackson公司。

- [0066] FITC来源:购自美国Sigma公司。
- [0067] ABEI来源:深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供。
- [0068] 17 α -羟孕酮标准品来源:购自Sigma公司。
- [0069] 磁性微球:深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产,80%粒径分布为1-5 μ m,磁化强度为4000高斯时沉淀时间为10-15秒,BSA为30mg时蛋白吸附浓度为0.8mg-1.2mg。
- [0070] MagLumi 2000pIus全自动化学发光分析仪由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供。
- [0071] 以下为试剂盒各组分的制备方法:
- [0072] 制备1:17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体形成衍生物的制备
- [0073] 以牛IgG蛋白载体为例,制备17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物,具体步骤如下:
- [0074] 将1.45mg 17-OH孕酮-3-羧甲基肟、0.52mg NHS,0.85mg EDC溶于174 μ L DMSO,室温反应2h,3.6mL牛IgG溶液中(36mg牛IgG溶于0.1M碳酸氢钠),室温下搅拌反应2h后过G25凝胶柱纯化(0.1M pH7.4的PBS缓冲液洗脱),得到17-羟基孕酮和牛IgG偶联而成衍生物。
- [0075] 需要注意:当采用其他蛋白载体时,其衍生物的制备方法与上述相比,区别仅在于选用蛋白载体的种类以及抗原和蛋白的比例不同。
- [0076] 制备2:包被17 α -羟孕酮抗原衍生物的磁球悬浮液的制备
- [0077] 采用制备1获得的17 α -羟孕酮抗原衍生物包被磁球,其中,免疫磁球选择Merck公司生产的Estapor微球,其羧基含量为95 μ eq/g。具体步骤如下:
- [0078] 磁珠的处理过程:
- [0079] 1)0.05mol/L pH 3.6醋酸缓冲液的配置:
- [0080] 称取2.55g三水合乙酸钠用4500mL纯化水溶解后再加入14mL乙酸混匀后,定容至5000mL,获得0.05mol/L pH 3.6的醋酸缓冲液。
- [0081] 2)磁珠连接CMC法(磁珠-CMC-抗原/抗体)
- [0082] 向小白瓶中加入5mL的0.05mol/L且pH为3.6的醋酸缓冲液溶液和0.2mL免疫磁性微球,放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗2-3分钟,然后置于磁铁上,待上清液清亮后,倒出上清液。该步骤重复三次。
- [0083] 3)抗原/抗体加样与反应
- [0084] 加入1mL等量的pH3.6醋酸缓冲液悬浮磁珠浓度20mg/mL,再加入浓度为10mg/mL的CMC(即为N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate),按1mg:12 μ g的比例加入纯化的17-羟基孕酮-牛IgG衍生物,放入恒温震荡水浴箱中37 $^{\circ}$ C反应24小时。
- [0085] 4)磁珠的清洗:
- [0086] ①磁珠清洗液的配置
- [0087] 以P001:纯化水=1:9比率配置pH7.4PBS缓冲液,混匀后,称量0.5%的BSA(Roche生产)自溶,待用。
- [0088] ②将温浴好的磁珠置于磁铁上沉淀后,倒掉上清,加入5mL的磁珠清洗液搅拌清洗,然后放置在磁铁上,待上清液清亮后倒掉上清液,重复该清洗步骤四次。
- [0089] 5)磁珠的悬浮:
- [0090] 清洗完毕后,加入1mL的磁珠悬浮液,悬浮浓度为20mg/mL。

[0091] 需要注意:当采用其他蛋白载体时,其包被17 α -羟孕酮抗原衍生物的磁球悬浮液的制备方法与上述相方法完全相同。

[0092] 制备3:标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体的制备

[0093] 1)透析液(F溶液)的配置:

[0094] 在5000mI烧杯中加入Na₂CO₃14.31g,NaHCO₃26.46g,加水定容至4500mI。配制好的F溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0095] 2)选用合适截留量(常用14000)的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(需无漏液)

[0096] 3)取1mg17 α -羟孕酮单克隆抗体用0.1moI/L pH9.5的碳酸缓冲液(F溶液)调整到1mI。扎紧另一端放入透析液中,透析2小时(搅拌速度400)

[0097] 4)透析好的溶液装入小白瓶中(每瓶1mI),加入300 μ g ABEI活化酯,37 $^{\circ}$ C反应2小时。

[0098] 5)安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,在用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。

[0099] 6)凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的溶液。

[0100] 7)将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含50mg/mI的BSA保护液,即得。

[0101] 需要注意:17 α -羟孕酮单克隆抗体也可以替换为17 α -羟孕酮多克隆抗体,在其他制备方法中也可将17 α -羟孕酮单克隆抗体替换为17 α -羟孕酮多克隆抗体,不再赘述。

[0102] 制备4:标记FITC的17 α -羟孕酮单克隆抗体的制备

[0103] 1)透析液(F溶液)的配置

[0104] 在5000mI烧杯中加入Na₂CO₃14.31g,NaHCO₃26.46g,加水定容至4500mI。配制好的F溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0105] 2)选用合适截留量(常用14000)的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(需无漏液)。

[0106] 3)取1mg的17 α -羟孕酮单克隆抗体用0.1moI/L pH9.5的碳酸缓冲液(F溶液)调整到1mI。扎紧另一端后放入透析液中,透析2小时(搅拌速度400)。

[0107] 4)17 α -羟孕酮单克隆抗体与FITC结合

[0108] 透析好的溶液装入小白瓶中(每瓶1mI),加入100 μ g FITC,室温反应2.5小时。

[0109] 5)中间品纯化

[0110] ①平衡液的制备(pH7.4PBS缓冲液)

[0111] P001:纯化水=1:9配置pH7.4PBS缓冲液

[0112] ②层析柱的预处理

[0113] 层析柱纯化水冲洗24小时后,连接平衡液与层析柱平衡30分钟

[0114] ③纯化操作

[0115] 放干上表面液体,用1mL移液枪沿柱壁缓缓加入中间品,再次放干表面液体。沿柱壁缓缓加入适量平衡液。连通上下管道。下方连接核酸蛋白检测仪(纯化前预热2小时)调整光亮和精确度。调零,用干净的棕色瓶接峰值时间段的液体,即为所需要的标记FITC的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液。

[0116] 制备5:标记ABEI的羊抗FITC多克隆抗体溶液的制备

[0117] (1)pH9.5透析液的配制:在5000mI烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至4500mI。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0118] (2)选用截留量为14000的透析袋,量取合适的尺寸备用。取1mg羊抗FITC多克隆抗体,用上述配制的透析液溶解并调整到1mI,放入透析袋中,搅拌透析2小时。将透析好的溶液加入50 μg 的ABEI-半琥珀酰胺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯,37 $^\circ\text{C}$ 反应2小时,得到标记ABEI的羊抗FITC多克隆抗体溶液。

[0119] (3)以G-25凝胶柱纯化上述反应得到的标记ABEI的羊抗FITC多克隆抗体溶液。

[0120] (4)在纯化后的标记ABEI的羊抗FITC多克隆抗体溶液中加入等体积的含5g/mI的BSA的保护液,即得。

[0121] 制备6:标记生物素(Biotin)的17 α -羟孕酮单克隆抗体的制备

[0122] 1)透析液(F溶液)的配置:

[0123] 在5000mI烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至4500mI。配制好的F溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0124] 2)选用合适截留量(常用14000)的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(需无漏液)

[0125] 3)取1mg17 α -羟孕酮单克隆抗体用0.1mI/L pH9.5的碳酸缓冲液(F溶液)调整到1mI。扎紧另一端放入透析液中,透析2小时(搅拌速度400)

[0126] 4)将活化的生物素溶于DMF中,按照生物素与17 α -羟孕酮单克隆抗体的摩尔比为20:1的比例将二者混合反应2h;

[0127] 5)将反应后的液体用0.1mI/L PBS于4 $^\circ\text{C}$ 透析24小时,即制成标记Biotin的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液。

[0128] 制备7:标记ABEI的链霉亲和素溶液的制备

[0129] (1)pH9.5透析液的配制:在5000mI烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至4500mI。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0130] (2)选用截留量为14000的透析袋,量取合适的尺寸备用。取1mg链霉亲和素,用上述配制的透析液溶解并调整到1mI,放入透析袋中,搅拌透析2小时。将透析好的溶液加入50 μg ABEI-半琥珀酰胺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯,37 $^\circ\text{C}$ 反应2小时,得到标记ABEI的链霉亲和素溶液。

[0131] (3)以G-25凝胶柱纯化上述反应得到的标记ABEI的链霉亲和素溶液。

[0132] (4)在纯化后的标记ABEI的链霉亲和素溶液中加入等体积的含5g/mI的BSA的保护液,即得。

[0133] 制备8:17 α -羟孕酮十点校准品的制备

[0134] 采用17 α -羟孕酮标准品,以牛血清为溶剂配制浓度为0ng/mI、0.25ng/mI、0.433ng/mI、0.748ng/mI、1.294ng/mI、2.238ng/mI、3.869ng/mI、6.69ng/mI、11.567ng/mI、20ng/mI十个点的校准品。

[0135] 制备9:17 α -羟孕酮低点校准品和高点校准品的制备

[0136] 采用17 α -羟孕酮标准品,以牛血清为溶剂配制浓度为0.433ng/mI和11.567ng/mI,即分别为17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0137] 实施例1

[0138] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0139] 1)组分A:17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与牛IgG蛋白载体偶联而成,其中:磁球的工作浓度:1mg/mL,17 α -羟孕酮抗原的工作浓度为50ng/mL,牛IgG蛋白载体工作浓度为10 μ g/mL;

[0140] 2)组分B:标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液,其中,ABEI的工作浓度为0.3mg/L,17 α -羟孕酮单克隆抗体工作浓度为300ng/mL;

[0141] 3)校准品溶液:浓度0.433ng/mL的低浓度校准品溶液和浓度11.567ng/mL的高浓度校准品溶液;

[0142] 上述各组分均含有BSA和防腐剂,BSA质量体积百分浓度为0.1%,防腐剂主要成分为NaN₃,质量体积百分浓度为0.2%。

[0143] 本实施例的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒各组分的制备:

[0144] 按照上述制备1制备17 α -羟孕酮抗原与牛IgG蛋白载体形成的17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物;

[0145] 按照上述制备2制备得到17 α -羟孕酮抗原-牛IgG偶联物包被的磁球悬浮液;

[0146] 按照上述制备3制备得到标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0147] 按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;

[0148] 按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0149] 检测步骤如下:

[0150] a)将40 μ L待测样本溶液分别加入到不同反应杯孔中;

[0151] b)分别加入20 μ L的包被17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物的磁球悬浮液;

[0152] c)分别加入100 μ L标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0153] d)37 $^{\circ}$ C温浴15min,置于磁环境下清洗3次;

[0154] e)加入200 μ L系统洗液;

[0155] f)分别加入发光底物1和发光底物2,检测光强度;

[0156] g)通过校准品修正获得工作曲线,根据样本检测光强度自动计算,得出待测样本的17 α -羟孕酮浓度。

[0157] 本实施例中发光底物1为含有血红素衍生物的NaOH溶液,发光底物2为含有H₂O₂的溶液,下述其他实施例的发光底物1和发光底物2均与本实施例相同。标准曲线的制定:

[0158] 采用本实施例提供的试剂盒,按照上述检测步骤测定,检测十点校准品的RLU,根据其浓度和RLU制备一条标准曲线,结果见表1和图1。

[0159] 对本实施例制备的试剂盒进行性能评估:

[0160] 1)试剂盒的分析灵敏度:

[0161] 将购买自美国Scantibodies公司的去激素的人血清样本作为待测样本,使用本实施例提供的试剂盒,按照上述测定方法对此样本检测20次,计算其RLU均值及标准差(SD),将均值RLU-2SD值带入十点曲线计算,得到的浓度减去十点曲线的任一标准点的浓度,即为分析灵敏度,检测结果如表2所示。

[0162] 2)试剂盒的精密度:

[0163] 采用17 α -羟孕酮标准品,用购买自美国scantibody公司的去激素人血清为溶剂,

配制成浓度为4ng/mL和12ng/mL的两份样品,其中,样本1为低浓度样品,样本2为高浓度样品。使用本实施例提供的试剂盒组分,按照以上测定方法进行测定,每份样品检测20次,计算其浓度的平均值、标准差以及变异系数(CV),结果如表3所示。

[0164] 3)加速稳定性分析:

[0165] 采用17 α -羟孕酮标准品,用购买自美国scantibody公司的去激素人血清为溶剂配制成浓度为4ng/mL和12ng/mL的两份样品,其中,样本1为低浓度样品,样本2为高浓度样品。为验证试剂的稳定性,将本实施例提供的试剂盒别置于37℃环境下,对样本1和样本2连续监测7天,记录其RLU值的变化,结果如表4所示。

[0166] 实施例2

[0167] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0168] 1)组分A:17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与牛血清白蛋白(BSA)载体偶联而成,其中:磁球的工作浓度:1mg/mL,17 α -羟孕酮抗原的工作浓度为50ng/mL,BSA载体工作浓度为10 μ g/mL;

[0169] 2)组分B:17 α -羟孕酮单克隆抗体标记的ABEI溶液,其中,ABEI的工作浓度为0.3mg/mL,17 α -羟孕酮单克隆抗体工作浓度为300ng/mL。

[0170] 3)校准品溶液:浓度0.433ng/mL的低浓度校准品溶液和浓度11.567ng/mL的高浓度校准品溶液。

[0171] 上述各组分均含有BSA和防腐剂,BSA质量体积百分浓度为0.1%,防腐剂主要成分为NaN₃,质量体积百分浓度为0.2%。

[0172] 本实施例的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒各组分的制备:

[0173] 按照上述制备1制备17 α -羟孕酮抗原与牛血清白蛋白(BSA)形成的17 α -羟孕酮抗原-BSA衍生物;

[0174] 按照上述制备2制备得到17 α -羟孕酮抗原-BSA衍生物包被的磁球悬浮液;

[0175] 按照上述制备3制备得到标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0176] 按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;

[0177] 按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0178] 采用实施例1中对试剂盒进行十点曲线制作的方法制作标准曲线,结果如表1和图2。

[0179] 采用实施例1中对试剂盒进行性能评估的方法,对本实施例试剂盒进行性能评估,具体如下:

[0180] 试剂盒的分析灵敏度的评估,检测结果如表2所示;

[0181] 试剂盒的精密度的评估,结果如表3所示;

[0182] 采用实施例1中对试剂加速稳定性分析的方法,对本实施例试剂盒进行稳定性的性能分析,得到的结果如表4所示。

[0183] 实施例3

[0184] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0185] 1)组分A:17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与肌红蛋白载体偶联而成,其中:磁球的工作浓度:1mg/mL,17 α -羟孕酮抗原的工作浓度为50ng/mL,肌红蛋白载体工作浓度为10 μ g/mL;

[0186] 2)组分B:17 α -羟孕酮单克隆抗体标记的ABEI溶液,其中,ABEI的工作浓度为0.3mg/mL,17 α -羟孕酮单克隆抗体的工作浓度为300ng/mL。

[0187] 3)校准品溶液:浓度0.433ng/mL的低浓度校准品溶液和浓度11.567ng/mL的高浓度校准品溶液。

[0188] 上述各组分均含有BSA和防腐剂,BSA质量体积百分浓度为0.1%,防腐剂主要成分为NaN₃,质量体积百分浓度为0.2%。

[0189] 本实施例的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒各组分的制备:

[0190] 按照上述制备1制备17 α -羟孕酮抗原与肌红蛋白形成的17 α -羟孕酮抗原-肌红蛋白衍生物;

[0191] 按照上述制备2制备得到17 α -羟孕酮抗原-牛IgG偶联物包被的磁球悬浮液;

[0192] 按照上述制备3制备得到标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0193] 按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;

[0194] 按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0195] 采用实施例1中对试剂盒进行十点曲线制作的方法制作标准曲线,结果如表1和图2。

[0196] 采用实施例1中对试剂盒进行性能评估的方法,对本实施例试剂盒进行性能评估,具体如下:

[0197] 试剂盒的分析灵敏度的评估,检测结果如表2所示;

[0198] 试剂盒的精密度的评估,结果如表3所示;

[0199] 采用实施例1中对试剂加速稳定性分析的方法,对本实施例试剂盒进行稳定性的性能分析,得到的结果如表4所示。

[0200] 实施例4

[0201] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0202] 1)组分A:17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与牛IgG蛋白载体偶联而成,其中:磁球的工作浓度:1mg/mL,17 α -羟孕酮抗原的工作浓度为50ng/mL,牛IgG蛋白载体工作浓度为10 μ g/mL;

[0203] 2)组分B:标记生物素的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液,标记ABEI的链霉亲和素(SA)溶液,其中,ABEI的工作浓度为0.3mg/mL,17 α -羟孕酮单克隆抗体工作浓度为300ng/mL,SA的工作浓度为0.005mg/mL,生物素的工作浓度为0.005mg/mL。

[0204] 3)校准品溶液:浓度0.433ng/mL的低浓度校准品溶液和浓度11.567ng/mL的高浓度校准品溶液。

[0205] 上述各组分均含有BSA和防腐剂,BSA质量体积百分浓度为0.1%,防腐剂主要成分为NaN₃,质量体积百分浓度为0.2%。

[0206] 本实施例的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒各组分的制备:

[0207] 按照上述制备1制备17 α -羟孕酮抗原与牛IgG蛋白载体形成的17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物;

[0208] 按照上述制备2制备得到17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物包被的磁球悬浮液;

[0209] 按照上述制备6制备得到标记生物素的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0210] 按照上述制备7制备得到标记ABEI的链霉亲和素溶液;

- [0211] 按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品；
- [0212] 按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。
- [0213] 采用实施例1中对试剂盒进行十点曲线制作的方法制作标准曲线,结果如表1和图2。
- [0214] 采用实施例1中对试剂盒进行性能评估的方法,对本实施例试剂盒进行性能评估,具体如下:
- [0215] 试剂盒的分析灵敏度的评估,检测结果如表2所示;
- [0216] 试剂盒的精密度的评估,结果如表3所示;
- [0217] 采用实施例1中对试剂加速稳定性分析的方法,对本实施例试剂盒进行稳定性的性能分析,得到的结果如表4所示。
- [0218] 实施例5
- [0219] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:
- [0220] 1)组分A:17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与牛IgG蛋白载体偶联而成,其中:磁球的工作浓度:1mg/ml,17 α -羟孕酮抗原的工作浓度为50ng/ml,牛IgG蛋白载体工作浓度为10 μ g/ml;
- [0221] 2)组分B:标记FITC的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液,标记ABEI的羊抗FITC多克隆抗体溶液,其中,ABEI的工作浓度为0.5mg/ml,17 α -羟孕酮单克隆抗体工作浓度为300ng/ml,FITC的工作浓度为0.1mg/ml,羊抗FITC多克隆抗体工作浓度为0.3mg/ml。
- [0222] 3)校准品溶液:浓度0.433ng/ml的低浓度校准品溶液和浓度11.567ng/ml的高浓度校准品溶液。
- [0223] 上述各组分均含有BSA和防腐剂,BSA质量体积百分浓度为0.1%,防腐剂主要成分为NaN₃,质量体积百分浓度为0.2%。
- [0224] 本实施例的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒各组分的制备:
- [0225] 按照上述制备1制备17 α -羟孕酮抗原与牛IgG蛋白载体形成的17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物;
- [0226] 按照上述制备2制备得到包被有17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物的磁球悬浮液;
- [0227] 按照上述制备4制备得到标记FITC的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;
- [0228] 按照上述制备5制备得到标记ABEI的羊抗FITC多克隆抗体溶液;
- [0229] 按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;
- [0230] 按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。
- [0231] 采用实施例1中对试剂盒进行十点曲线制作的方法制作标准曲线,结果如表1和图2。
- [0232] 采用实施例1中对试剂盒进行性能评估的方法,对本实施例试剂盒进行性能评估,具体如下:
- [0233] 试剂盒的分析灵敏度的评估,检测结果如表2所示;
- [0234] 试剂盒的精密度的评估,结果如表3所示;
- [0235] 采用实施例1中对试剂加速稳定性分析的方法,对本实施例试剂盒进行稳定性的性能分析,得到的结果如表4所示。
- [0236] 对比例1

[0237] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0238] 1)组分A:17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液,17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与牛血清白蛋白(BSA)载体偶联而成,其中:磁球的工作浓度:1mg/mL,17 α -羟孕酮抗原的工作浓度为50ng/mL,BSA载体的浓度为10 μ g/mL;

[0239] 2)组分B:碱性磷酸酶标记的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液,其中,AKP(碱性磷酸酶)的工作浓度为400ng/mL,17 α -羟孕酮单克隆抗体的工作浓度为300ng/mL。

[0240] 3)校准品溶液:浓度0.433ng/mL的低浓度校准品溶液和浓度11.567ng/mL的高浓度校准品溶液。

[0241] 上述各组分均含有BSA和防腐剂,BSA质量体积百分浓度为0.1%,防腐剂主要成分为NaN₃,质量体积百分浓度为0.2%。

[0242] 本实施例的17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒各组分的制备:

[0243] 按照上述制备1制备17 α -羟孕酮抗原与牛血清白蛋白(BSA)形成的17 α -羟孕酮抗原-BSA衍生物;

[0244] 按照上述制备2制备得到17 α -羟孕酮抗原-BSA衍生物包被的磁球悬浮液;

[0245] 标记有AKP的17 α -羟孕酮单克隆抗体的制备,其制备步骤与上述制备3中标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液的制备步骤大致相同,区别在于本对比例中的步骤(4)加入的是300 μ g含AKP的活化酯,步骤(6)中是将标记好AKP的17 α -羟孕酮单克隆抗体过柱纯化。

[0246] 按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;

[0247] 按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0248] 采用17 α -羟孕酮标准品,以牛血清为溶剂,配制10份不同浓度的标准品溶液,

[0249] 使用本对比例制备的试剂盒对该10份溶液进行检测,检测步骤如下:

[0250] 在Magimuzyme三波长吸光度测定仪上检测,检测步骤包括:

[0251] 1、校准品、质控、标本各加40 μ L,然后加如上述制备的AKP标记的抗体20 μ L,加上上述制备的17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液20 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C水浴15分钟。

[0252] 2、加磁性微球溶液40 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C水浴10分钟,上磁分离器分离4分钟,倒去上清。

[0253] 3、加入应用洗涤液200 μ L,混匀,上磁分离器分离4分钟,去上清。

[0254] 4、重复一次步骤3。

[0255] 5、加底物60 μ L,另准备一试管加底物60 μ L作为空白管,混匀,37 $^{\circ}$ C水浴15分钟。

[0256] 6、取出后加终止液200 μ L(包括空白管),混匀,上磁分离器分离,10分钟后转移到异型比色管比色(用空白管调零)。

[0257] 本对比例中底物为本领域技术人员公知的含单磷酸酚酞和辅酶因子的缓冲液。

[0258] 标准曲线的制定:

[0259] 采用本对比例提供的试剂盒,按照上述检测步骤测定,检测十点校准品的吸光度(以Abs表示),根据其浓度和Abs制备一条曲线,结果见表1和图6。

[0260] 采用上述实施例1中对试剂盒进行性能评估的方法,对本对比例试剂盒进行性能评估,具体如下:

[0261] 试剂盒的分析灵敏度的评估,结果如表2所示;

[0262] 试剂盒的精密度的评估,结果如表3所示;

[0263] 试剂盒的稳定性的评估,结果如表5所示。

[0264] 对比例2

[0265] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0266] 1.17 α -羟孕酮抗原包被的磁球悬浮液的制备:

[0267] 该制备方法与上述制备2中包被有17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物的磁球悬浮液的制备步骤大致相同,区别仅在于在磁球的处理过程中,第三步在抗原/抗体加样与反应时,本对比例加入的使纯化的17 α -羟孕酮,而不是17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物。

[0268] 具体为:抗原/抗体加样与反应:

[0269] 加入1mL等量的pH3.6醋酸缓冲液悬浮磁珠浓度20mg/mL,再加入浓度为10mg/mL的CMC(即为N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate),按1mg:12 μ g的比例加入纯化的17-羟基孕酮,放入恒温震荡水浴箱中37 $^{\circ}$ C反应24小时。

[0270] 2.按照上述制备3制备得到标记ABEI的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0271] 3.按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;

[0272] 4.按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0273] 标准曲线的制定:

[0274] 采用本对比例提供的试剂盒,参照实施例1的检测步骤,检测十点校准品的光强度信号(以RLU表示),根据其浓度和RLU制备一条曲线,结果见表1和图7。

[0275] 应该理解,采用本对比例的检测试剂盒进行17 α -羟孕酮化学发光免疫检测时,检测方法与实施例1大致相同,区别在于本对比例的步骤2)中加入包被17 α -羟孕酮抗原的磁球悬浮液,在此不再赘述。

[0276] 注意:从图7可知,在对比例2中,RLU值与17 α -羟孕酮浓度没有相关性,因此,后续没有对其进行灵敏度、精密度和加速稳定性的实验及分析。

[0277] 对比例3

[0278] 一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒,包括以下组分:

[0279] 1.17 α -羟孕酮抗原与酶形成衍生物的制备:

[0280] 以辣根过氧化物酶为例,制备17 α -羟孕酮抗原-辣根过氧化物酶衍生物,具体步骤如下:

[0281] 将1.45mg 17-OH孕酮-3-羧甲基肟、0.52mg NHS,0.85mg EDC溶于174 μ L DMSO,室温反应2h,3.6mL辣根过氧化物酶溶液中(36mg辣根过氧化物酶溶于0.1M碳酸氢钠),室温下搅拌反应2h后过G25凝胶柱纯化(0.1M pH7.4的PBS缓冲液洗脱),得到17-羟基孕酮和辣根过氧化物酶偶联而成的衍生物。

[0282] 2.包被有17 α -羟孕酮抗原-辣根过氧化物酶衍生物的磁球悬浮液的制备:

[0283] 该制备方法与上述制备2中包被有17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物的磁球悬浮液的制备方法大致相同,区别仅在于本对比例加入的是17 α -羟孕酮抗原-辣根过氧化物酶衍生物,而不是17 α -羟孕酮抗原-牛IgG衍生物。

[0284] 3.按照上述制备3制备得到ABEI标记的17 α -羟孕酮单克隆抗体溶液;

[0285] 4.按照上述制备8制备17 α -羟孕酮的十点校准品;

[0286] 5.按照上述制备9制备17 α -羟孕酮的低点校准品和高点校准品。

[0287] 标准曲线的制定:

[0288] 采用本对比例提供的试剂盒,参照实施例1的检测步骤,检测十点校准品的光强度信号(以RLU表示),根据其浓度和RLU制备一条曲线,结果见表1和图7。

[0289] 应该理解,采用本对比例的检测试剂盒进行17 α -羟孕酮化学发光免疫检测时,检测方法与实施例1大致相同,区别在于本对比例的步骤2)中加入包被有17 α -羟孕酮抗原-辣根过氧化物酶衍生物的磁球悬浮液。检测结果见表1和图8。

[0290] 采用实施例1中对试剂盒进行性能评估的方法,对本对比例的试剂盒进行性能评估,具体如下:

[0291] 试剂盒的分析灵敏度的评估,检测结果如表2所示;

[0292] 试剂盒的精密度的评估,结果如表3所示;

[0293] 试剂盒的稳定性的评估,结果如表5所示。

[0294] 表1 试剂盒标准曲线数据

[0295]

配制浓度 (ng/ml)	实施例 1 (RLU)	实施例 2 (RLU)	实施例 3 (RLU)	实施例 4 (RLU)	实施例 5 (RLU)	对比例 1 (Abs)	对比例 2 (RLU)	对比例 3 (RLU)
0.000	667489	635667	643463	573062	569043	2.256	12030	556893
0.25	435960	408019	356663	253056	240305	1.986	13223	243365
0.433	302548	273442	249418	193039	198792	1.796	12893	208993
0.748	231546	213449	223463	165368	169630	1.525	11256	169636
1.294	175965	174633	175513	133309	139525	1.305	13236	135636
2.238	128565	121368	119230	98360	93642	1.069	14623	100642
3.869	84105	82464	81083	78203	67953	0.869	12465	68693
6.69	48110	46383	46497	52052	49862	0.632	13209	50062
11.567	23154	15538	22504	38235	35890	0.427	13209	36890
20	15463	11872	13096	22620	20953	0.266	14562	20056

[0296] 表2 试剂盒分析灵敏度

[0297]

测试次数	实施例 1RLU	实施例 2RLU	实施例 3RLU	实施例 4RLU	实施例 5RLU	对比例 1Abs	对比例 3RLU
1	657640	662239	655435	517800	553058	1.920	693341
2	632013	635078	665976	572501	552226	1.854	417527
3	661929	630203	665216	640722	512633	1.803	438713
4	667982	688597	675046	455402	479579	1.831	418400
5	667692	638020	672476	504408	658563	1.849	376028

[0298]

6	679169	638216	600746	524990	459135	1.761	633689
7	650290	635385	600288	520125	623972	1.883	307270
8	688148	671088	660452	585124	462445	1.823	332264
9	667265	630928	617989	475922	540087	1.450	663713
10	652772	674879	638100	535073	521945	1.817	319123
11	654901	699689	629222	496040	640046	2.764	696496
12	650909	614037	662570	498598	420648	1.812	354970
13	650648	638366	609150	632525	486294	2.088	343626
14	683283	652091	679306	512093	640502	1.878	677871
15	682392	684274	639879	610900	653917	1.874	697082
16	620342	687200	592838	457306	607342	1.844	305908
17	655701	611386	636483	523464	570864	1.277	683099
18	636862	655799	628218	507167	584420	1.306	431452
19	661073	614039	644344	514534	614707	1.306	373861
20	677147	697693	593983	602098	630988	1.806	402420
mean	659908	652960	638386	534340	560669	1.797	478343
SD	17675	28613	28505	54758	73162	0.320	155456
M-2SD	624558	595735	581376	424823	414344	1.158	167431
灵敏度	0.043	0.04	0.051	0.112	0.116	1.551	0.778

[0299] 表2中:灵敏度的单位为ng/mL。

[0300] 表3试剂盒精密度

[0301]

样本编号	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	对比例 1	对比例 2	对比例 3
1	平均值	3.907	4.012	4.124	4.023	4.152	4.256	3.925
	标准差	0.192	0.183	0.153	0.106	0.176	0.408	0.396
	变异系数	4.9%	4.56%	3.71%	2.63%	4.24%	9.6%	10%
2	平均值	12.398	12.069	12.106	11.983	12.216	4.125	4.055
	标准差	0.45	0.368	0.352	0.365	0.431	0.369	0.403
	变异系数	3.63%	3.05%	2.91%	3.04%	3.53%	8.94%	9.94%

[0302] 表3中:平均值、标准差的单位为ng/mL,变异系数:%,其中:变异系数=标准差/平均值。

[0303] 表4试剂盒稳定性

天数	实施例 1		实施例 2		实施例 3		实施例 4		实施例 5	
	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU	样本 1 /RLU	样本 2 /RLU
1	304548	83105	273442	82464	249418	81083	193039	78203	199792	52052
2	309523	84256	274568	82658	250558	81356	195064	78685	199586	52468
3	309576	84365	276854	82759	252568	81592	198652	79568	209456	52689
4	315698	84458	279852	83158	256952	82256	201356	79235	205648	53621
5	316897	84658	281561	83652	258969	82513	203521	80568	215826	53895
6	318954	85587	283546	84689	263454	82654	205823	80684	206968	52516
7	321618	86512	286895	84925	265925	83059	206821	81925	210552	54682
相对偏差	5.61%	4.10%	4.92%	2.98%	6.62%	2.44%	7.14%	4.76%	5.39%	5.05%

[0304]

[0305] 注:相对偏差=(第七天RLU-第一天RLU)/第一天RLU

[0306] 表5试剂盒稳定性

[0307]

天数	对比例 1	
	样本 1(Abs)	样本 2(Abs)
1	1.736	0.869
2	1.798	0.891
3	1.802	0.915
4	1.823	0.923
5	1.846	0.958
6	1.879	0.978
7	1.947	0.982
相对偏差	12.15%	13.00%

[0308] 注:相对偏差=(第七天Abs-第一天Abs)/第一天Abs,

[0309] 其中,Abs表示吸光度。

[0310] 表6试剂盒稳定性

[0311]

天数	对比例 3	
	样本 1(RLU)	样本 2(RLU)
1	208993	68693
2	209865	70682
3	210598	72514
4	213564	74654
5	228534	78652
6	249535	80642
7	259251	83825
相对偏差	24.05%	22.03%

[0312] 注:相对偏差=(第七天RLU-第一天RLU)/第一天RLU

[0313] 由图7可知,十点曲线并无明显的趋势变化,因而可以判断,对比例2的光强度(RLU)与17 α -羟孕酮浓度没有相关性,因此在结果讨论中不涉及对对比例2的讨论,产生该结果可能由于对比例2中无载体蛋白,抗原与磁球连接的效率低,最终导致标记有ABEI的抗体无法结合到磁球上,因此整体光信号非常弱。

[0314] 以下对表1至表6的数据具体分析:

[0315] 1.灵敏度分析

[0316] 由表1可知,实施例1-3的试剂盒的蛋白载体类型发生变化,对待测样本的稀释液中17 α -羟孕酮浓度检出浓度大致相同,表明载体蛋白可以使用BSA或牛IgG或肌红蛋白,且效果均良好。

[0317] 由表2可见,实施例1-3的分析灵敏度数值均接近0.1,说明此三种试剂盒对17 α -羟孕酮浓度的检测灵敏,表明更易检出低浓度的17 α -羟孕酮。

[0318] 由表1和图1-5可知,实施例1-5中的曲线较为平滑,十点基本都分布在曲线上,因此可判断实施例1-5的每种实验方案都符合测定人体中17 α -羟孕酮浓度这一目的。但是将实施例4~5与实施例1~3的结果进行比较,可知实施例4~5的十点曲线的RLU值没有实施例1-3跨度大,因此根据十点曲线可知,实施例4和5灵敏度弱于实施例1-3。而由表2中实施例4~5的分析灵敏度数值与实施例1-3相比大很多,因此可显著表明实施例4~5的分析灵敏度弱于实施例1-3。这可能是由于实施例4和5分别加入生物素-链霉亲和素和FITC-羊抗FITC抗体作为桥联,非特异结合增加,影响灵敏度。

[0319] 由表2可知,将对比例1、对比例3与实施例1-5的结果进行比较,对比例1、对比例3的灵敏度数值更大,说明酶免检测试剂盒或酶作为载体蛋白的化学发光试剂盒在检测样本时其灵敏性差于直接化学发光试剂盒或不以酶作为蛋白载体的化学发光试剂盒。

[0320] 2. 精密度分析

[0321] 由表3可见,实施例1-5中,所有CV的值均小于5%,说明实施例1-5的精密度良好,使用同一种方式检测的17 α -羟孕酮浓度偏差不会很大。然而与实施例1-5比较,对比例1和对比例3的CV值均大于5%且接近于10%,可见对比例1和对比例3的检测精密度不如实施例1-5中的结果。

[0322] 3. 稳定性分析

[0323] 表4中,实施例1-5的相对偏差均小于10%,说明在37 $^{\circ}$ C条件下,试剂会有一定程度的变化。而表5中,对比例1的相对偏差在10%到15%之间,可知对比例1的试剂盒对于温度较为敏感,在表6中,对比例3的相对偏差大于20%,说明对比例3中的试剂对温度相当敏感,这可能是由于在37 $^{\circ}$ C下,对比例3中用于桥接磁球和抗原的酶会发生较大的变化。

[0324] 综上,上述实施例1-5结果表明,所测各项参数皆高度达标,说明试剂盒设计合理,能够满足检测17 α -羟孕酮抗原浓度的各项要求。此外,根据本发明提供的17 α -羟孕酮的检测方法,检测一次样本可在30分钟内完成,相较于传统的化学发光酶联免疫法速度提高一倍以上,可大大提高检测效率。

[0325] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式的部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

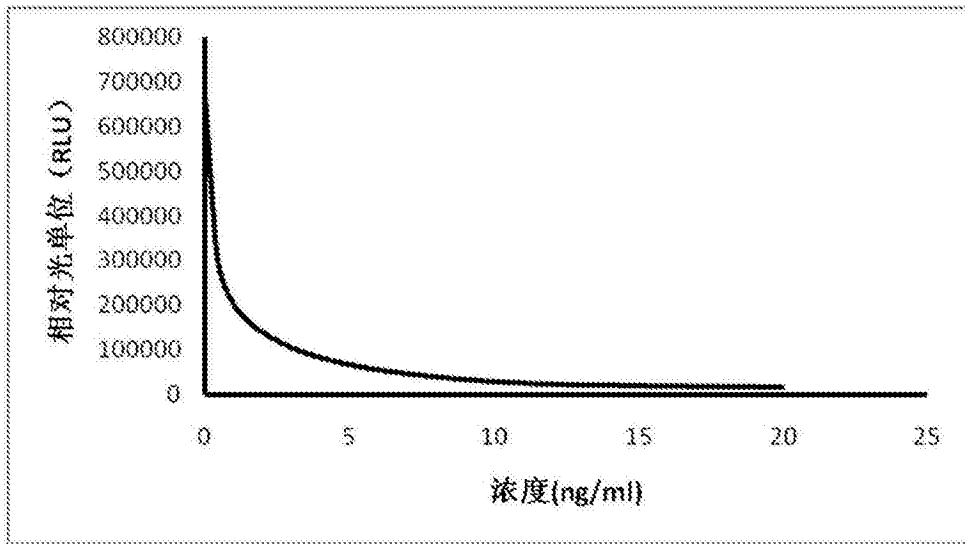


图1

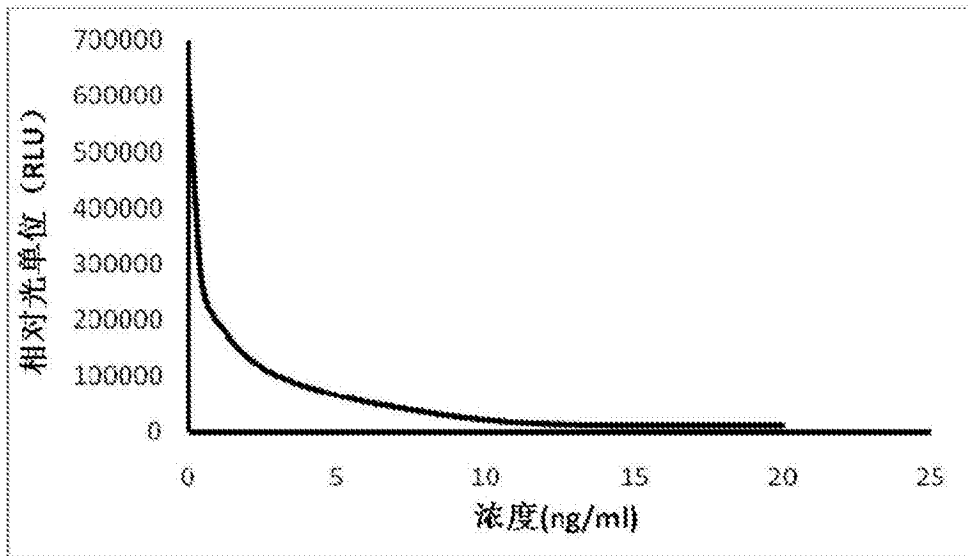


图2

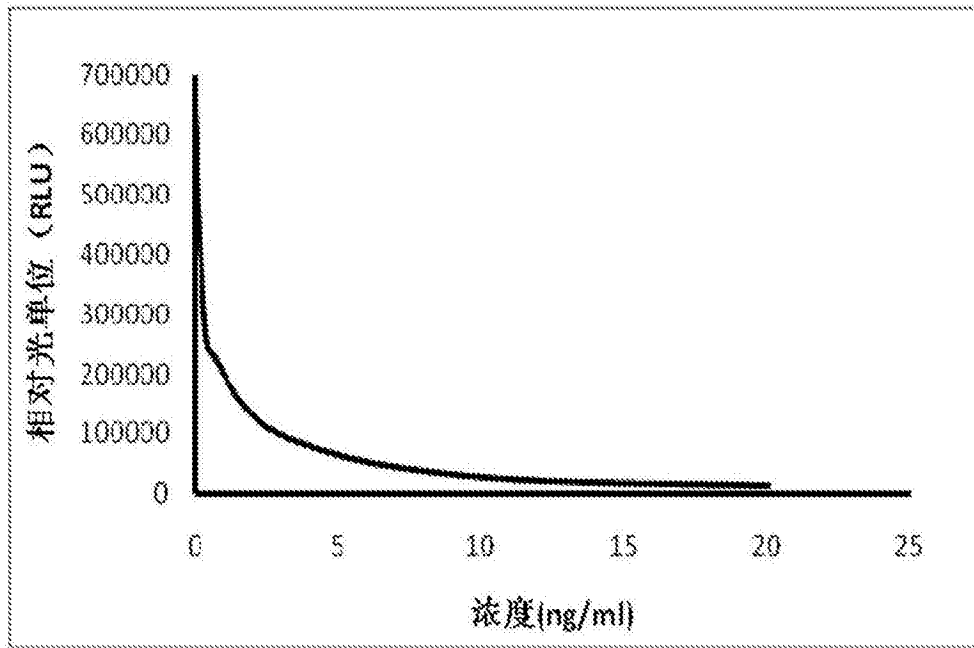


图3

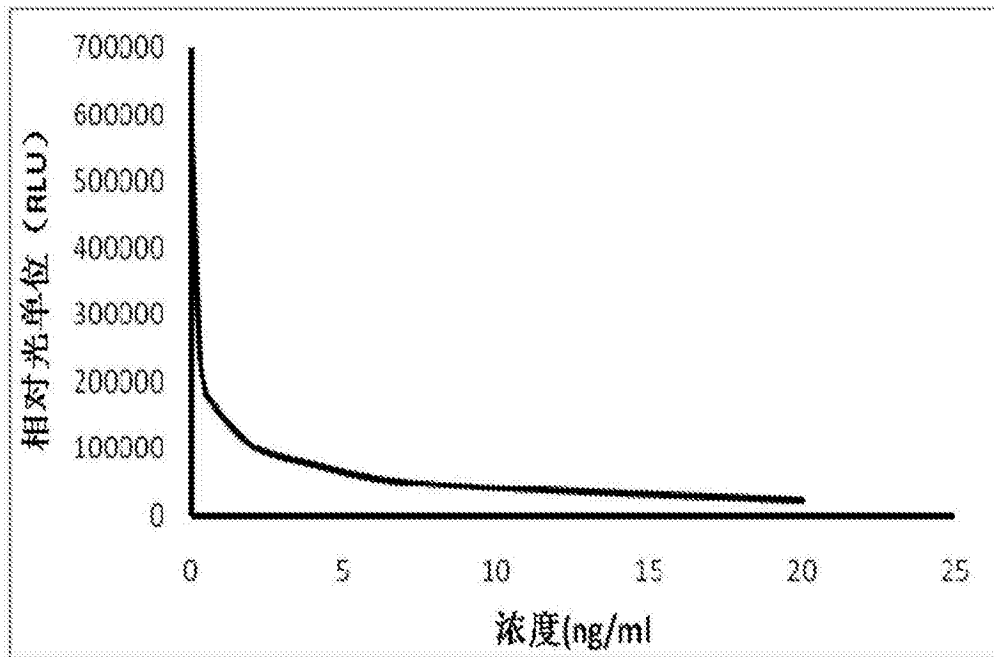


图4

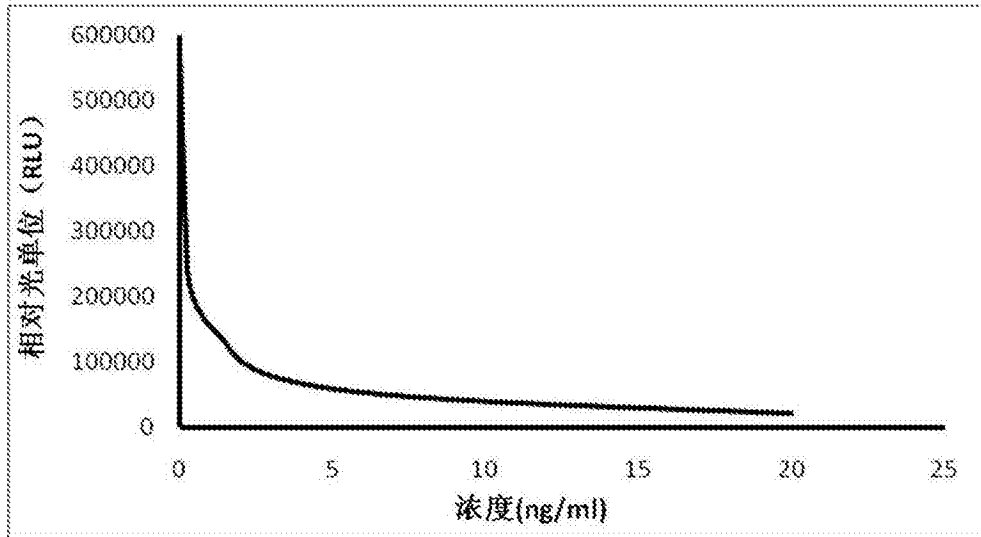


图5

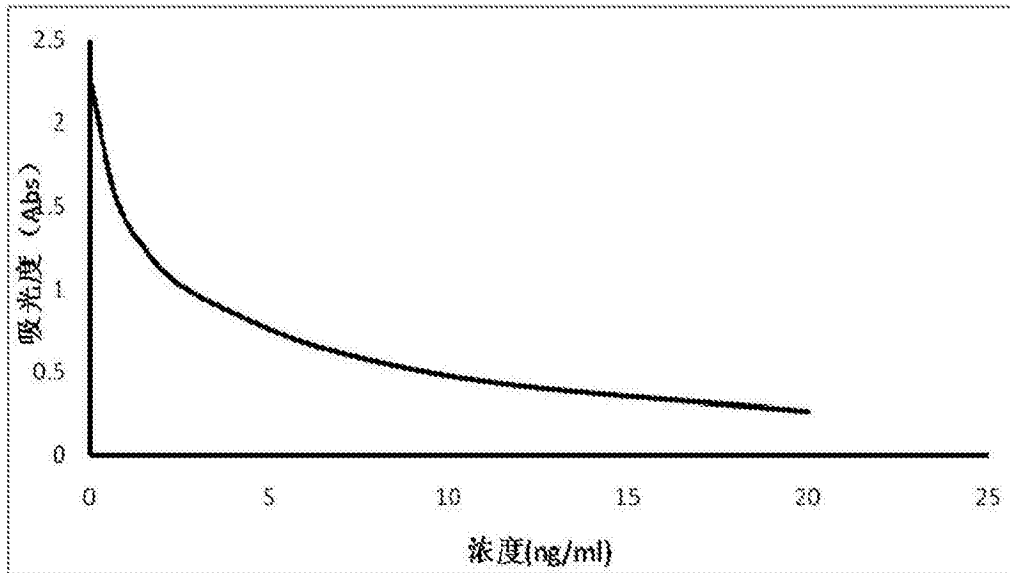


图6

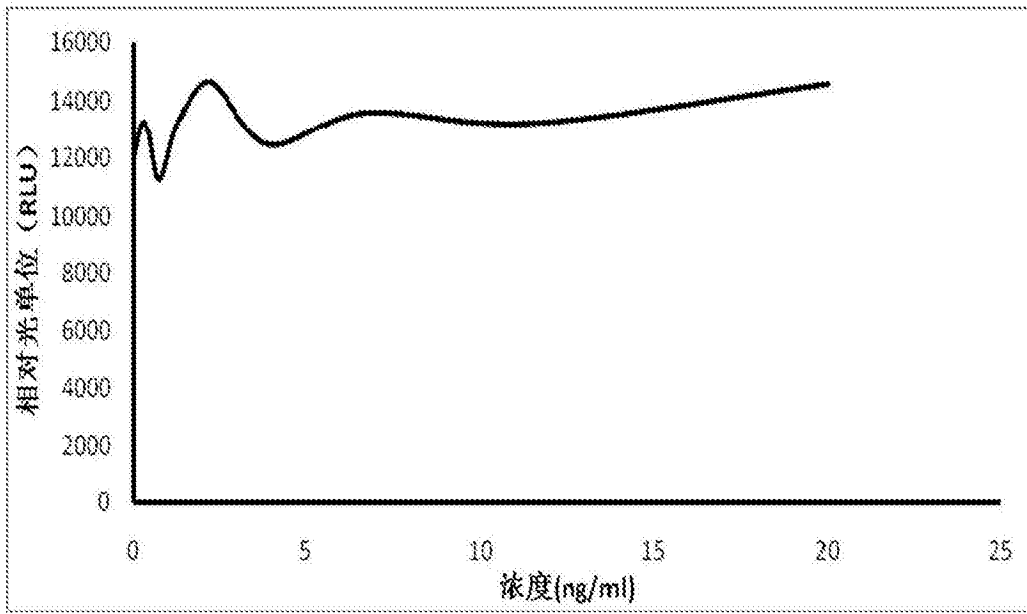


图7

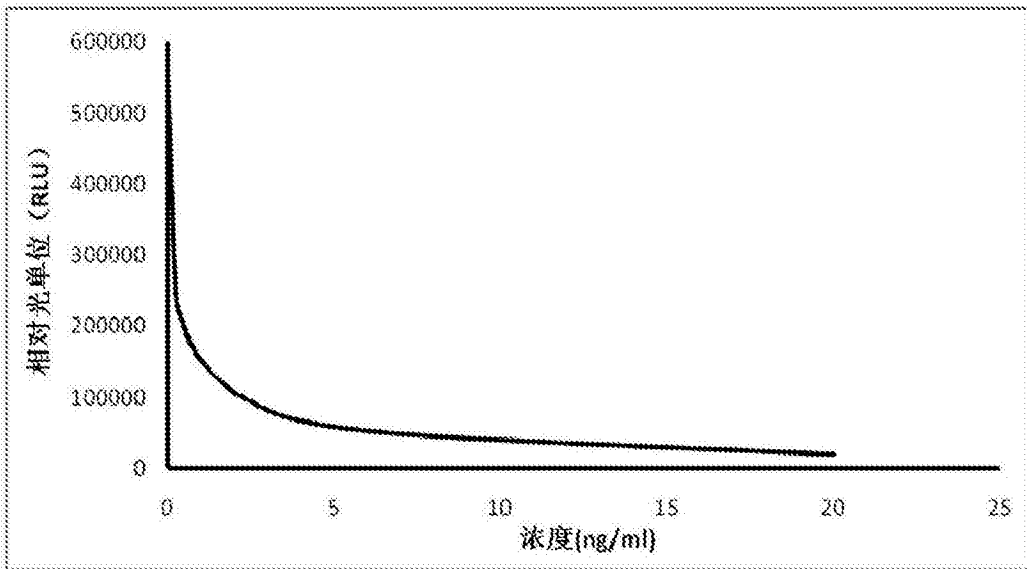


图8

专利名称(译)	一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105651990A	公开(公告)日	2016-06-08
申请号	CN201511019364.5	申请日	2015-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 余慧玲 李婷华 彭国涛 罗凯 杜凯		
发明人	饶微 余慧玲 李婷华 彭国涛 罗凯 杜凯		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N21/763 G01N33/532 G01N33/54346 G01N33/54353		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒，所述试剂盒包括组分A和组分B，所述组分A为17 α -羟孕酮抗原衍生物包被的磁球悬浮液，所述17 α -羟孕酮抗原衍生物由17 α -羟孕酮抗原与蛋白载体偶联而成，所述组分B为标记17 α -羟孕酮抗体的化学发光标记物溶液。本发明还提供了一种17 α -羟孕酮的化学发光检测试剂盒的制备和检测方法及其应用，利用本发明提供的化学发光检测试剂盒，根据竞争法原理，准确、灵敏地测定样本中的17 α -羟孕酮含量。

