



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108646021 B

(45) 授权公告日 2021.08.24

(21) 申请号 201810457757.1

(22) 申请日 2018.05.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108646021 A

(43) 申请公布日 2018.10.12

(73) 专利权人 新疆医科大学第一附属医院

地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
市新市区鲤鱼山南路137号新疆医科大学第一附属医院

专利权人 新疆医科大学

(72) 发明人 巩月红 温浩 高晓黎 王建华

赵军 段新宇 孙其 何丽平

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务所 65105

代理人 汤建武 周星莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/64 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 203376329 U, 2014.01.01

WO 2017109133 A1, 2017.06.29

王英 等. 雌酮免疫分析方法的研究.《食品研究与开发》.2007,第28卷(第04期),

李元. 雌甾酮(Estrone)及其抗原衍生物的合成研究.《万方数据知识服务平台》.2018,

巩月红. 雌酮硫酸钠多克隆抗体的制备与免疫分析法的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2012,(第03期),

Pemmaraju N. Rao, et al. Synthesis of New Immunogens for Estrone and Estradiol-17 β and Antisera Evaluation.《Steroids》.1998,第13卷

审查员 许珊萍

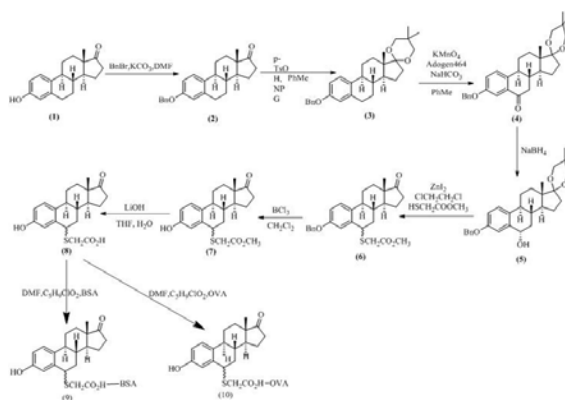
权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

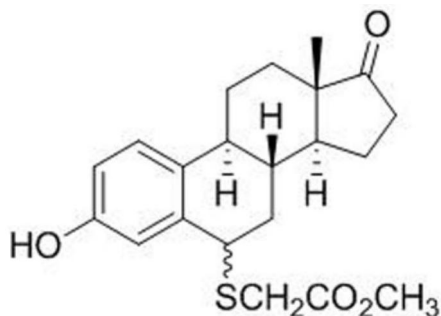
雌酮酶联免疫检测试剂盒及其检测方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及酶联免疫检测技术领域,是一种雌酮酶联免疫检测试剂盒及其检测方法和应用,该雌酮酶联免疫检测试剂盒,包括包被有雌酮单克隆抗体的多孔酶标板、酶标记物、雌酮标准品溶液、底物显色液A、底物显色液B、样本稀释液、酶标记物稀释液、第一浓缩洗涤液、第二浓缩洗涤液、终止液。本发明提供了一种雌酮酶联免疫试剂盒及其检测方法和应用,其检测方法主要包括:先进行样本前处理,再用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明雌酮酶联免疫检测试剂盒可应用于怀孕母马尿液中雌酮的检测,也可应用于临床中血液雌酮浓度的检测,本发明具有操作简便、快速、准确、灵敏度高和费用低的特点,适合大量样本的筛查和现场监控。



1. 一种雌酮酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于包括多孔酶标板、酶标记物、雌酮标准品溶液、底物显色液A、底物显色液B、样本稀释液、酶标记物稀释液、第一浓缩洗涤液、第二浓缩洗涤液、终止液, 其中, 多孔酶标板包被有雌酮单克隆抗体, 酶标记物中的酶为辣根过氧化物酶, 辣根过氧化物酶标记的抗原为雌酮抗原中的雌酮-6-SCH₂CO₂H-OVA, 雌酮抗原包括雌酮免疫原和雌酮包被原, 雌酮-6-SCH₂CO₂H-OVA为雌酮半抗原与载体蛋白中卵清蛋白的偶联物, 雌酮半抗原的分子结构式为



, 雌酮单克隆抗体为雌酮鼠源单克隆抗体、雌酮兔源单克隆抗体或雌酮羊源单克隆抗体, 是用雌酮免疫原免疫动物后, 取抗血清效价为1:2000至1:100000的动物脾脏细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合培养筛选得到的可稳定分泌阳性抗体的杂交瘤细胞株制备的。

2. 根据权利要求1所述的雌酮酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于雌酮半抗原按照下述制备步骤得到: 第一步, 室温下, 依次向含有270mg雌酮的4mL二甲基甲酰胺溶液中加入225mg至280mg碳酸钾、摩尔浓度为6.7mol/L至8.3mol/L的苄基溴, 得到第一混合液, 搅拌混合液26h至27h, 用水猝灭反应, 经乙酸乙酯萃取第一混合液, 合并萃取液中有机层, 并洗涤、干燥和过滤有机层, 收集滤渣, 用乙醚洗涤滤渣, 得到第一白色固体产物; 第二步, 将第一白色固体产物、59.1mg至70.2mg新戊二醇和0.52g至0.73g对甲苯磺酸加入到3.4mL苯中, 常温下搅拌回流90min并移走水分, 冷却至室温, 加入饱和碳酸氢钠溶液得到第二混合液, 经乙醚萃取第二混合液, 得到的萃取液经水洗后, 用无水硫酸镁干燥并过滤和浓缩, 收集残留物, 残留物经硅胶柱纯化, 得到第一无色透明固体, 其中, 硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯, 石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:60; 第三步, 第一无色透明固体与甲苯溶解后, 与215mg至248mg高锰酸钾、10mg至32mg碳酸氢钠和水混合, 氮气作为保护气体, 加入30.1mg至47.9mg甲基三烷基氯化铵, 在95℃至100℃条件下油浴加热, 搅拌17h至19h, 得到第三混合液, 第三混合液冷却至室温, 用硅藻土过滤, 得到的滤液用乙醚萃取三次, 合并萃取液中有机层, 水洗涤有机层, 洗涤后的有机层用无水硫酸镁干燥、过滤和浓缩后, 经硅胶柱纯化, 得到第二白色固体产物, 其中, 硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯, 石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:13; 第四步, 将第二白色固体产物、10mL至15mL甲醇和4mL乙醚混合并将混合液冷却至0℃, 加入43mg至65mgNaBH₄, 得到第四混合液, 第四混合液在室温下搅拌1h, 蒸发去除溶剂, 得到残留物, 残留物与水混合后, 用乙醚萃取三次, 合并萃取液中有机层, 有机层用无水硫酸镁干燥、过滤和浓缩后, 经硅胶柱纯化, 得到第二无色透明固体, 其中, 硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯, 石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:10; 第五步, 向第二无色透明固体中加入135mg至155mgZnI₂、10mL干燥后的1,2-二氯乙烷、35μL至45μL巯基乙酸甲酯, 得到第五混合液, 并以氮气或者氩气作为保护气体, 室温下搅拌1h后, 用水猝灭反应, 经二氯甲烷萃取第五混合液, 合并萃取液中有机层, 盐水洗涤有机层, 洗涤后的有机层用无水硫酸镁干

燥、过滤和浓缩后,经硅胶柱纯化,得到巯基乙酸甲酯取代物;第六步,向干燥后的巯基乙酸甲酯取代物中加入10mL至15mL干燥后的1,2-二氯乙烷,并以氮气或者氩气作为保护气体,降温至-5℃,再加入0.3机层,有机层用无水硫酸镁干燥、过滤和浓缩后,经硅胶柱纯化,得到雌酮半抗原,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比2mL至0.48mLBCL₃,在0℃下反应4h后,用甲醇猝灭反应,去除溶剂,与水混合,得到第六混合液,经乙酸乙酯和乙醚萃取第六混合液后,合并萃取液中有为4:1。

3.一种根据权利要求1或2所述的雌酮酶联免疫检测试剂盒在怀孕母马尿液中雌酮浓度检测或/和临床中血液雌酮浓度检测方面的应用。

雌酮酶联免疫检测试剂盒及其检测方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域，是一种雌酮酶联免疫检测试剂盒及其检测方法和应用。

背景技术

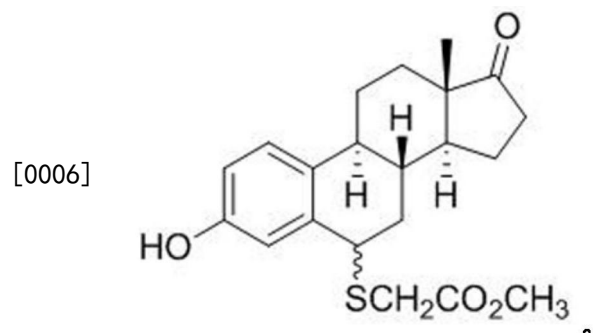
[0002] 雌酮是一种甾体激素类化合物，具有环戊烷并多氢菲母核，为天然内源性雌激素，可从孕妇或孕马的妊娠尿液中提取而得。自美国惠氏公司开创了更年期女性的激素补充疗法后，从孕马尿中提取结合态雌激素制备此类药物制剂已成为目前的一个主要方向。根据文献报道雌激素替代疗法范围越来越广泛。因而，使从孕马尿中提取雌激素的生产规模也越来越大。

[0003] 目前，雌酮检测常采用GC、HPLC、GC-MS、TLC等各种仪器分析法，孕马尿中结合态雌激素提取检测也主要借助于HPLC、GC分析方法。因随市场需求量的激增，孕马尿采集量也大幅度增加，从而导致色谱检测法作为孕马尿原料质控手段与需检测样本大幅度增加相比出现了一定的局限性。因此有必要建立一种简单快速、灵敏度高、经济、适宜于采集现场监测孕马尿原料中主要活性成分雌酮的方法。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种雌酮酶联免疫检测试剂盒及其检测方法和应用，克服了上述现有技术之不足，可应用于怀孕母马尿液中雌酮的检测，也可应用于临床中血液雌酮浓度的检测，具有操作简便、快速、准确、灵敏度高和费用低的特点，适合大量样本的筛查和现场监控。

[0005] 本发明的技术方案之一是通过以下措施来实现的：一种雌酮酶联免疫检测试剂盒，包括多孔酶标板、酶标记物、雌酮标准品溶液、底物显色液A、底物显色液B、样本稀释液、酶标记物稀释液、第一浓缩洗涤液、第二浓缩洗涤液、终止液，其中，多孔酶标板包被有雌酮单克隆抗体，酶标记物中的酶为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶标记的抗原为雌酮抗原中的雌酮-6-SCH₂CO₂H-OVA，雌酮抗原包括雌酮免疫原和雌酮包被原，雌酮-6-SCH₂CO₂H-OVA为雌酮半抗原与载体蛋白中卵清蛋白的偶联物，雌酮半抗原的分子结构式为



[0007] 下面是对上述发明技术方案之一的进一步优化或/和改进：

[0008] 上述雌酮标准品溶液的浓度范围为0μg/mL至100μg/mL；或/和，底物显色液A为含

体积百分含量0.05%至0.08%过氧化氢尿素的磷酸钠柠檬酸溶液;或/和,底物显色液B为含体积百分含量0.04%至0.05%四甲基联苯胺的酸性稳定液;或/和,样本稀释液为小牛血清和磷酸盐缓冲液的混合液,其中,样本稀释液中,小牛血清的体积百分含量为5%至15%,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4;或/和,酶标记物稀释液为磷酸盐缓冲液和小牛血清的混合液,其中,酶标记物稀释液中,小牛血清的体积百分含量为10%至20%,磷酸盐缓冲液中含有体积百分含量为1%的吐温-20,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4;或/和,第一浓缩洗涤液为含有体积百分含量为1%的吐温-20的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.2mol/L、pH值为7.2至7.4;或/和,第二浓缩洗涤液为摩尔浓度为2%的乙酸溶液;或/和,第二浓缩洗涤液为摩尔浓度为2%的乙酸溶液。

[0009] 上述在于雌酮单克隆抗体为雌酮鼠源单克隆抗体、雌酮兔源单克隆抗体、雌酮羊源单克隆抗体,是用雌酮免疫原免疫动物后,取抗血清效价为1:2000至1:100000的动物脾脏细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合培养筛选得到的可稳定分泌阳性抗体的杂交瘤细胞株。

[0010] 上述多孔酶标板按照下述步骤得到:第一步,在微孔中用包被缓冲液将雌酮单克隆抗体稀释成1.0 μ g/mL至5.0 μ g/mL的稀释液,其中,每孔雌酮单克隆抗体中加入100 μ L包被缓冲液,包被缓冲液是摩尔浓度为0.05mol/L、pH值为9.6的碳酸盐缓冲液;第二步,稀释液在37 $^{\circ}$ C环境中避光孵育2h或在4 $^{\circ}$ C环境中过夜,倾去孔中液体,用第一浓缩洗涤液稀释20倍后洗涤3次至5次,拍干后,每孔中加入180 μ L至200 μ L封闭液,在37 $^{\circ}$ C环境中避光孵育2h,倾去孔中液体,用第一浓缩洗涤液洗涤3次至5次,拍干后真空密闭,得到包被有雌酮单克隆抗体的多孔酶标板,其中,封闭液为含有体积百分含量为2%至5%鱼胶原蛋白、5%至10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液的混合液,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4。

[0011] 上述雌酮免疫原按照下述步骤得到:第一步,将20mg雌酮半抗原与1mL至5mL N,N-二甲基亚酰胺混合溶解,加入20 μ L至28 μ L三正丁胺并搅拌反应30min后,加入17 μ L至18 μ L氯甲酸已丁酯,得到第一溶液,第二步,将60mg至90mg牛血清蛋白与5mL磷酸盐缓冲液混合后,在4 $^{\circ}$ C的条件下静置30min,得到第二溶液,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol $\cdot$ L $^{-1}$,pH值为7.2至7.4,第三步,将第一溶液滴入第二溶液中并搅拌得到混合液,混合液在4 $^{\circ}$ C条件下搅拌反应18h,第四步,将混合液与磷酸盐缓冲液混合后,于4 $^{\circ}$ C下透析48h,得到雌酮免疫原,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为0.05mol $\cdot$ L $^{-1}$,pH值为7.2至7.4;或/和,雌酮包被原按照下述步骤得到:第一步,将20mg雌酮半抗原与1mL至5mL N,N-二甲基亚酰胺混合溶解,加入20 μ L至28 μ L三正丁胺并搅拌反应30min后,加入17 μ L至18 μ L氯甲酸已丁酯,得到第一溶液,第二步,将60mg至90mg卵清蛋白与5mL至10mL磷酸盐缓冲液混合后,在4 $^{\circ}$ C的条件下静置30min,得到第二溶液,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol $\cdot$ L $^{-1}$,pH值为7.2至7.4,第三步,将第一溶液滴入第二溶液中并搅拌得到混合液,混合液在4 $^{\circ}$ C条件下搅拌反应18h,第四步,将混合液与磷酸盐缓冲液混合后,于4 $^{\circ}$ C下透析48h,得到雌酮包被原,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为0.05mol $\cdot$ L $^{-1}$,pH值为7.2至7.4。

[0012] 上述雌酮半抗原按照下述制备步骤得到:第一步,室温下,依次向含有270mg雌酮的4mL二甲基甲酰胺溶液中加入225mg至280mg碳酸钾、摩尔浓度为6.7mol/L至8.3mol/L的苄基溴,得到第一混合液,搅拌混合液26h至27h,用水猝灭反应,经乙酸乙酯萃取第一混合

液,合并萃取液中有机层,并洗涤、干燥、过滤有机层,收集滤渣,用乙醚洗涤滤渣,得到第一白色固体产物;第二步,将第一白色固体产物、59.1mg至70.2mg新戊二醇和0.52g至0.73g对甲苯磺酸加入到3.4mL苯中,常温下搅拌回流90min并移走水分,冷却至室温,加入饱和碳酸氢钠溶液得到第二混合液,经乙醚萃取第二混合液,得到的萃取液经水洗后,用无水硫酸镁干燥并过滤、浓缩,收集残留物,残留物经硅胶柱纯化,得到第一无色透明固体,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:60;第三步,第一无色透明固体与甲苯溶解后,与215mg至248mg高锰酸钾、10mg至32mg碳酸氢钠和水混合,氮气作为保护气体,加入30.1mg至47.9mg甲基三烷基氯化铵,在95℃至100℃条件下油浴加热,搅拌17h至19h,得到第三混合液,第三混合液冷却至室温,用硅藻土过滤,得到的滤液用乙醚萃取三次,合并萃取液中有机层,水洗涤有机层,洗涤后的有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后,经硅胶柱纯化,得到第二白色固体产物,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:13;第四步,将第二白色固体产物、10mL至15mL甲醇和4mL乙醚混合并将混合液冷却至0℃,加入43mg至65mgNaBH₄,得到第四混合液,第四混合液在室温下搅拌1h,蒸发去除溶剂,得到残留物,残留物与水混合后,用乙醚萃取三次,合并萃取液中有机层,有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后,经硅胶柱纯化,得到第二无色透明固体,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:10;第五步,向第二无色透明固体中加入135mg至155mgZnI₂、10mL干燥后的1,2-二氯乙烷、35μL至45μL巯基乙酸甲酯,得到第五混合液,并以氮气或者氩气作为保护气体,室温下搅拌1h后,用水猝灭反应,经二氯甲烷萃取第五混合液,合并萃取液中有机层,盐水洗涤有机层,洗涤后的有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后,经硅胶柱纯化,得到巯基乙酸甲酯取代物;第六步,向干燥后的巯基乙酸甲酯取代物中加入10mL至15mL干燥后的1,2-二氯乙烷,并以氮气或者氩气作为保护气体,降温至-5℃,再加入0.32mL至0.48mLBCL₃,在0℃下反应4h后,用甲醇猝灭反应,去除溶剂,与水混合,得到第六混合液,经乙酸乙酯和乙醚萃取第六混合液后,合并萃取液中有机层,有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后,经硅胶柱纯化,得到雌酮半抗原,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比为4:1。

[0013] 上述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白和人血清白蛋白中的一种以上。

[0014] 上述酶标记物采用改良过碘酸钠法将辣根过氧化物酶与雌酮抗原进行偶联后经硼氢化钠还原而得到,其中,辣根过氧化物酶与雌酮抗原的摩尔浓度之比为1:1。

[0015] 本发明的技术方案之二是通过以下措施来实现的:一种雌酮酶联免疫检测试剂盒的检测方法按照下述步骤进行:第一步,取所需量样本溶液离心,得到样本上清液;第二步,加所需量雌酮标准品溶液、样本稀释液至对应的微孔中,置于37℃避光环境中反应60min;第三步,揭开包被有雌酮单克隆抗体的多孔酶标板的盖板膜,将孔内液体甩干,取250μL/孔的第二洗涤液置于室温下5min后,将孔内液体拍干,再取250μL/孔的第一洗涤液洗涤4次至5次,每次间隔1min,将孔内液体拍干,其中,第二浓缩洗涤液与纯水按照1:4的体积混合得到第二洗涤液,第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液;第四步,酶标记物稀释液与水按照1:10的体积混合得到酶标记物稀释液,酶标记物稀释液与酶标记物按照体积比为1:100至1:1000的比例混合均匀,得到酶标记物混合液;第五步,取100μL酶标记物混合液至微孔中,覆盖所有板孔,置于37℃避光环境中反应60min后,将孔内液体拍干,取

250 μ L/孔的第一洗涤液洗涤4次至5次,每次间隔1min,将孔内液体拍干,其中,第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液;第六步,将底物显色液A和底物显色液B分别以50 μ L/孔加入微孔内振荡混合均匀,盖板后置于37℃避光环境中显色15min,加入终止液50 μ L/孔,振荡混合均匀;第七步,将酶标仪设定于450nm处,用双波长450nm/630nm在5分钟内检测每孔的吸光度值并记录数据,根据样本孔的颜色或OD450nm与雌酮标准孔进行比较,从而检测出本样本中雌酮的浓度范围。

[0016] 本发明的技术方案之三是通过以下措施来实现的:一种雌酮酶联免疫检测试剂盒在怀孕母马尿液中雌酮浓度检测或/和临床中血液雌酮浓度检测方面的应用。

[0017] 本发明雌酮酶联免疫检测试剂盒可应用于怀孕母马尿液中雌酮的检测,也可应用于临床中血液雌酮浓度的检测,本发明具有操作简便、快速、准确、灵敏度高和费用低的特点,适合大量样本的筛查和现场监控。

附图说明

[0018] 附图1为本发明中雌酮免疫原和雌酮包被原的合成路线示意图。

[0019] 附图2为本发明雌酮半抗原的制备步骤中第一白色固体的化学结构式示意图。

[0020] 附图3为本发明雌酮半抗原的制备步骤中第一无色透明固体的化学结构式示意图。

[0021] 附图4为本发明雌酮半抗原的制备步骤中第二白色固体的化学结构式示意图。

[0022] 附图5为本发明雌酮半抗原的制备步骤中第二无色透明固体的化学结构式示意图。

[0023] 附图6为本发明雌酮半抗原的制备步骤中巯基乙酸甲酯取代物的化学结构式示意图。

[0024] 图7为本发明中雌酮标准品溶液浓度曲线图。

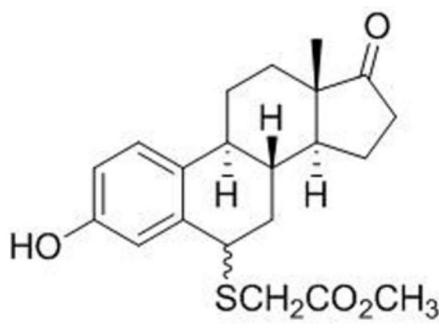
具体实施方式

[0025] 本发明不受下述实施例的限制,可根据本发明的技术方案与实际情况来确定具体的实施方式。本发明中所提到各种化学试剂和化学用品如无特殊说明,均为现有技术中公知公用的化学试剂和化学用品;本发明中的百分数如没有特殊说明,均为质量百分数;本发明中的溶液若没有特殊说明,均为溶剂为水的水溶液,例如,盐酸溶液即为盐酸水溶液;本发明中的常温、室温一般指15℃到25℃的温度,一般定义为25℃。

[0026] 下面结合实施例对本发明作进一步描述:

[0027] 实施例1:该雌酮酶联免疫检测试剂盒,包括多孔酶标板、酶标记物、雌酮标准品溶液、底物显色液A、底物显色液B、样本稀释液、酶标记物稀释液、第一浓缩洗涤液、第二浓缩洗涤液、终止液,其中,多孔酶标板包被有雌酮单克隆抗体,酶标记物中的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶标记的抗原为雌酮抗原中的雌酮-6-SCH₂CO₂H-OVA,雌酮抗原包括雌酮免疫原和雌酮包被原,雌酮-6-SCH₂CO₂H-OVA为雌酮半抗原与载体蛋白中卵清蛋白的偶联物,雌酮半抗原的分子结构式为

[0028]



[0029] 实施例2:作为上述实施例的优化,雌酮标准品溶液的浓度范围为 $0\mu\text{g/mL}$ 至 $100\mu\text{g/mL}$;或/和,底物显色液A为含体积百分含量 0.05% 至 0.08% 过氧化氢尿素的磷酸钠柠檬酸溶液;或/和,底物显色液B为含体积百分含量 0.04% 至 0.05% 四甲基联苯胺的酸性稳定液;或/和,样本稀释液为小牛血清和磷酸盐缓冲液的混合液,其中,样本稀释液中,小牛血清的体积百分含量为 5% 至 15% ,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为 0.01mol/L 、pH值为 7.2 至 7.4 ;或/和,酶标记物稀释液为磷酸盐缓冲液和小牛血清的混合液,其中,酶标记物稀释液中,小牛血清的体积百分含量为 10% 至 20% ,磷酸盐缓冲液中含有体积百分含量为 1% 的吐温-20,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为 0.01mol/L 、pH值为 7.2 至 7.4 ;或/和,第一浓缩洗涤液为含有体积百分含量为 1% 的吐温-20的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为 0.2mol/L 、pH值为 7.2 至 7.4 ;或/和,第二浓缩洗涤液为摩尔浓度为 2% 的乙酸溶液;或/和,第二浓缩洗涤液为摩尔浓度为 2% 的乙酸溶液。

[0030] 实施例3:作为上述实施例的优化,雌酮单克隆抗体为雌酮鼠源单克隆抗体、雌酮兔源单克隆抗体、雌酮羊源单克隆抗体,是用雌酮免疫原免疫动物后,取抗血清效价为 $1:2000$ 至 $1:100000$ 的动物脾脏细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合培养筛选得到的可稳定分泌阳性抗体的杂交瘤细胞株。

[0031] 本发明中,雌酮单克隆抗体优选雌酮鼠源单克隆抗体,雌酮鼠源单克隆抗体的制备如下

[0032] 动物免疫:雌酮半抗原与载体蛋白偶联物免疫6周龄至8周龄BALB/c小鼠,取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂pH8.0,50%聚乙二醇(PEG)1500的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0033] 细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37°C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0034] 单克隆抗体的生产与纯化:取成年BALB/c小鼠(如饲养条件允许,选用雄性BALB/c小鼠)适应性饲养一周后,腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 1×10^6 个/只至 5×10^6 个/只,7天后每日观察每只小鼠腹部是否明显膨大,如腹部明显膨大且精神萎靡进行无菌操作采集腹水。 1500rpm 离心 10min ,收集上层澄清液体,即为腹水型单克隆抗体,测定的效价, -40°C 保存。取腹水型单克隆抗体 3mL ,用3倍体积 0.01mol/L 、pH值为 7.2 至 7.4 的PBS稀释,加入终浓度为 50% 的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,混匀; 4°C 沉淀 6h , 5000rpm 离心 30min ;弃上清液体,将沉淀物溶解在 3mL 的PBS中,加入终浓度 25% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,混匀; 4°C 沉淀 6h , 5000rpm 离心 30min ;弃上清液体,将沉淀物溶解在 5mL 的PBS中,用蛋白A-琼脂糖柱进行腹水纯化。

[0035] 实施例4:作为上述实施例的优化,多孔酶标板按照下述步骤得到:第一步,在微孔中用包被缓冲液将雌酮单克隆抗体稀释成 $1.0\mu\text{g/mL}$ 至 $5.0\mu\text{g/mL}$ 的稀释液,其中,每孔雌酮单克隆抗体中加入 $100\mu\text{L}$ 包被缓冲液,包被缓冲液是摩尔浓度为 0.05mol/L 、pH值为9.6的碳酸盐缓冲液;第二步,稀释液在 37°C 环境中避光孵育2h或在 4°C 环境中过夜,倾去孔中液体,用第一浓缩洗涤液稀释20倍后洗涤3次至5次,拍干后,每孔中加入 $180\mu\text{L}$ 至 $200\mu\text{L}$ 封闭液,在 37°C 环境中避光孵育2h,倾去孔中液体,用第一浓缩洗涤液洗涤3次至5次,拍干后真空密闭,得到包被有雌酮单克隆抗体的多孔酶标板,其中,封闭液为含有体积百分含量为2%至5%鱼胶原蛋白、5%至10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液的混合液,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为 0.01mol/L 、pH值为7.2至7.4。

[0036] 实施例5:作为上述实施例的优化,雌酮免疫原按照下述步骤得到:第一步,将20mg雌酮半抗原与1mL至5mL N,N-二甲基亚酰胺混合溶解,加入 $20\mu\text{L}$ 至 $28\mu\text{L}$ 三正丁胺并搅拌反应30min后,加入 $17\mu\text{L}$ 至 $18\mu\text{L}$ 氯甲酸己丁酯,得到第一溶液,第二步,将60mg至90mg牛血清蛋白与5mL磷酸盐缓冲液混合后,在 4°C 的条件下静置30min,得到第二溶液,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为7.2至7.4,第三步,将第一溶液滴入第二溶液中并搅拌得到混合液,混合液在 4°C 条件下搅拌反应18h,第四步,将混合液与磷酸盐缓冲液混合后,于 4°C 下透析48h,得到雌酮免疫原,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为7.2至7.4;或/和,雌酮包被原按照下述步骤得到:第一步,将20mg雌酮半抗原与1mL至5mL N,N-二甲基亚酰胺混合溶解,加入 $20\mu\text{L}$ 至 $28\mu\text{L}$ 三正丁胺并搅拌反应30min后,加入 $17\mu\text{L}$ 至 $18\mu\text{L}$ 氯甲酸己丁酯,得到第一溶液,第二步,将60mg至90mg卵清蛋白与5mL至10mL磷酸盐缓冲液混合后,在 4°C 的条件下静置30min,得到第二溶液,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为7.2至7.4,第三步,将第一溶液滴入第二溶液中并搅拌得到混合液,混合液在 4°C 条件下搅拌反应18h,第四步,将混合液与磷酸盐缓冲液混合后,于 4°C 下透析48h,得到雌酮包被原,其中,磷酸盐缓冲液的浓度为 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为7.2至7.4。

[0037] 在实施例5的混合液中,混合液的pH值为8.0以上。

[0038] 实施例6:作为上述实施例的优化,雌酮半抗原按照下述制备步骤得到:第一步,室温下,依次向含有270mg雌酮的4mL二甲基甲酰胺溶液中加入225mg至280mg碳酸钾、摩尔浓度为 6.7mol/L 至 8.3mol/L 的苄基溴,得到第一混合液,搅拌混合液26h至27h,用水猝灭反应,经乙酸乙酯萃取第一混合液,合并萃取液中有机层,并洗涤、干燥、过滤有机层,收集滤渣,用乙醚洗涤滤渣,得到第一白色固体产物;第二步,将第一白色固体产物、59.1mg至70.2mg新戊二醇和0.52g至0.73g对甲苯磺酸加入到3.4mL苯中,常温下搅拌回流90min并移走水分,冷却至室温,加入饱和碳酸氢钠溶液得到第二混合液,经乙醚萃取第二混合液,得到的萃取液经水洗后,用无水硫酸镁干燥并过滤、浓缩,收集残留物,残留物经硅胶柱纯化,得到第一无色透明固体,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:60;第三步,第一无色透明固体与甲苯溶解后,与215mg至248mg高锰酸钾、10mg至32mg碳酸氢钠和水混合,氮气作为保护气体,加入30.1mg至47.9mg甲基三烷基氯化铵,在 95°C 至 100°C 条件下油浴加热,搅拌17h至19h,得到第三混合液,第三混合液冷却至室温,用硅藻土过滤,得到的滤液用乙醚萃取三次,合并萃取液中有机层,水洗涤有机层,洗涤后的有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后,经硅胶柱纯化,得到第二白色固体产物,其中,硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯,石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:13;第四步,将第二白

色固体产物、10mL至15mL甲醇和4mL乙醚混合并将混合液冷却至0℃，加入43mg至65mgNaBH₄，得到第四混合液，第四混合液在室温下搅拌1h，蒸发去除溶剂，得到残留物，残留物与水混合后，用乙醚萃取三次，合并萃取液中有机层，有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后，经硅胶柱纯化，得到第二无色透明固体，其中，硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯，石油醚和乙酸乙酯的体积比为1:10；第五步，向第二无色透明固体中加入135mg至155mgZnI₂、10mL干燥后的1,2-二氯乙烷、35μL至45μL巯基乙酸甲酯，得到第五混合液，并以氮气或者氩气作为保护气体，室温下搅拌1h后，用水猝灭反应，经二氯甲烷萃取第五混合液，合并萃取液中有机层，盐水洗涤有机层，洗涤后的有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后，经硅胶柱纯化，得到巯基乙酸甲酯取代物；第六步，向干燥后的巯基乙酸甲酯取代物中加入10mL至15mL干燥后的1,2-二氯乙烷，并以氮气或者氩气作为保护气体，降温至-5℃，再加入0.32mL至0.48mLBCL₃，在0℃下反应4h后，用甲醇猝灭反应，去除溶剂，与水混合，得到第六混合液，经乙酸乙酯和乙醚萃取第六混合液后，合并萃取液中有机层，有机层用无水硫酸镁干燥、过滤、浓缩后，经硅胶柱纯化，得到雌酮半抗原，其中，硅胶柱中洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯，石油醚和乙酸乙酯的体积比为4:1。

[0039] 本发明实施例6中，第一白色固体的化学结构式如附图2所示，第一无色透明固体的化学结构式如附图3所示，第二白色固体的化学结构式如附图4所示，第二无色透明固体的化学结构式如附图5所示，巯基乙酸甲酯取代物的化学结构式如附图6所示。

[0040] 实施例7：作为上述实施例的优化，载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白和人血清白蛋白中的一种以上。

[0041] 实施例8：作为上述实施例的优化，酶标记物采用改良过碘酸钠法将辣根过氧化物酶与雌酮抗原进行偶联后经硼氢化钠还原而得到，其中，辣根过氧化物酶与雌酮抗原的摩尔浓度之比为1:1。

[0042] 实施例9：该雌酮酶联免疫检测试剂盒的检测方法按照下述步骤进行：第一步，取所需量样本溶液离心，得到样本上清液；第二步，加所需量雌酮标准品溶液、样本稀释液至对应的微孔中，置于37℃避光环境中反应60min；第三步，揭开包被有雌酮单克隆抗体的多孔酶标板的盖板膜，将孔内液体甩干，取250μL/孔的第二洗涤液置于室温下5min后，将孔内液体拍干，再取250μL/孔的第一洗涤液洗涤4次至5次，每次间隔1min，将孔内液体拍干，其中，第二浓缩洗涤液与纯水按照1:4的体积混合得到第二洗涤液，第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液；第四步，酶标记物稀释液与水按照1:10的体积混合得到酶标记物稀释液，酶标记物稀释液与酶标记物按照体积比为1:100至1:1000的比例混合均匀，得到酶标记物混合液；第五步，取100μL酶标记物混合液至微孔中，覆盖所有板孔，置于37℃避光环境中反应60min后，将孔内液体拍干，取250μL/孔的第一洗涤液洗涤4次至5次，每次间隔1min，将孔内液体拍干，其中，第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液；第六步，将底物显色液A和底物显色液B分别以50μL/孔加入微孔内振荡混合均匀，盖板后置于37℃避光环境中显色15min，加入终止液50μL/孔，振荡混合均匀；第七步，将酶标仪设定于450nm处，用双波长450nm/630nm在5分钟内检测每孔的吸光度值并记录数据，根据样本孔的颜色或OD450nm与雌酮标准孔进行比较，从而检测出本样本中雌酮的浓度范围。

[0043] 实施例10：该雌酮酶联免疫检测试剂盒在怀孕母马尿液中雌酮浓度检测或/和临

床中血液雌酮浓度检测方面的应用。

[0044] 实施例11:该雌酮酶联免疫检测试剂盒的检测方法按照下述步骤进行:第一步,取马尿样本30mL,5000rpm离心10min,取上清液1mL,再12000rpm离心20min,得到马尿上清液样本;第二步,加100μL雌酮标准品溶液、100μL马尿上清液样本至对应的微孔中,置于37℃避光环境中反应60min;第三步,将孔内液体甩干,取250μL/孔的第二洗涤液置于室温下5min后,将孔内液体拍干,再取250μL/孔的第一洗涤液洗涤4次或5次,每次间隔1min,将孔内液体拍干,其中,第二浓缩洗涤液与纯水按照1:4的体积混合得到第二洗涤液,第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液;第四步,酶标记物稀释液与水按照1:10的体积混合得到酶标记物稀释液,酶标记物稀释液与雌酮抗原按照体积比为1:1000的比例混合均匀,得到酶标记物混合液;第五步,取所需量酶标记物混合液至微孔中,覆盖所有板孔,置于37℃避光环境中反应60min后,将孔内液体拍干,取250μL/孔的第一洗涤液洗涤5次,每次间隔1min,将孔内液体拍干,其中,第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液;第六步,将底物显色液A和底物显色液B分别以50μL/孔加入微孔内振荡混合均匀,盖板后置于37℃避光环境中显色15min,加入终止液50μL/孔,振荡混合均匀;第七步,将酶标仪设定于450nm处,用双波长450nm/630nm在5分钟内检测每孔的吸光度值并记录数据,根据样本孔的颜色或OD450nm与雌酮标准孔进行比较,从而检测出本样本中雌酮的浓度范围。

[0045] 实施例12:该雌酮酶联免疫检测试剂盒的检测方法按照下述步骤进行:第一步,取血样样本30mL,3000rpm离心10min,取上清液100μL,加入50μL样本稀释液,混合均匀得到血液上清液样本;第二步,加100μL雌酮标准品溶液、50μL血液上清液样本至对应的微孔中,置于37℃避光环境中反应60min;第三步,将孔内液体甩干,取250μL/孔的第二洗涤液置于室温下5min后,将孔内液体拍干,再取250μL/孔的第一洗涤液洗涤4次或5次,每次间隔1min,将孔内液体拍干,其中,第二浓缩洗涤液与纯水按照1:4的体积混合得到第二洗涤液,第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液;第四步,酶标记物稀释液与水按照1:10的体积混合得到酶标记物稀释液,酶标记物稀释液与雌酮抗原按照体积比为1:1000的比例混合均匀,得到酶标记物混合液;第五步,取所需量酶标记物混合液至微孔中,覆盖所有板孔,置于37℃避光环境中反应60min后,将孔内液体拍干,取250μL/孔的第一洗涤液洗涤4次,每次间隔1min,将孔内液体拍干,其中,第一浓缩洗涤液与纯水按照1:19的体积混合得到第一洗涤液;第六步,将底物显色液A和底物显色液B分别以50μL/孔加入微孔内振荡混合均匀,盖板后置于37℃避光环境中显色15min,加入终止液50μL/孔,振荡混合均匀;第七步,将酶标仪设定于450nm处,用双波长450nm/630nm在5分钟内检测每孔的吸光度值并记录数据,根据样本孔的颜色或OD450nm与雌酮标准孔进行比较,从而检测出本样本中雌酮的浓度范围。

[0046] 根据本发明实施例11、实施例12雌酮酶联免疫检测试剂盒的检测方法得到每孔的吸光度值进行检测结果分析分为半定量判定方法和定量分析。半定量判定方法中,由于样本颜色或吸光值与雌酮含量负相关,所以可以用样本孔的颜色或OD450nm与雌酮标准孔进行比较,从而判断出本样本中雌酮的浓度范围;定量分析中,根据标准品或样本的百分吸光率公式: $B/B_0 \times 100\%$ (B-标准品或样本的吸光度值的平均值, B_0 -第一个标准(0标准)的平均吸光度值。以雌酮标准品百分吸光率为纵坐标,以雌酮标准品浓度(μg/mL)的对数为横坐

标,绘制标准曲线图,如图7所示。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中雌酮实际浓度。

[0047] 本发明雌酮酶联免疫检测试剂盒的灵敏度、特异性、精密度和准确度、保存期实验

[0048] 1. 试剂盒灵敏度测定

[0049] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验,试剂盒标准曲线最低点为 $3\mu\text{g/mL}$,标准曲线的范围为 $3\mu\text{g/mL}$ 至 $100\mu\text{g/mL}$ 。

[0050] 2. 试剂盒准确度和精密度

[0051] 准确度是指测定值与真值间的符合程度,试剂盒的准确度常用回收率表示;精密度是反应测定方法对某一特定样本多次测定所得结果的重复程度,常用变异系数表示。分别向空白马尿和正常人血清中添加雌酮至终浓度为 $12.5\mu\text{g/mL}$,重复5次,分别取三个批次的试剂盒计算变异系数,结果如表1。

[0052] 由表1可得,向空白马尿中添加至终浓度为 $3\mu\text{g/mL}$,回收率范围为77.5%至109.5%,向正常人血清中添加至终浓度为 $3\mu\text{g/mL}$,回收率范围为73.0%至115.0%,因此,本发明雌酮酶联免疫检测试剂盒的准确度较好;由表1可知,批内、批间变异系数小于20%,因此,本发明雌酮酶联免疫检测试剂盒的精密度较好。

[0053] 3. 交叉反应率试验

[0054] 选择如下所示的己烯雌酚、孕酮、睾酮3种药物按照常规方法分别测定交叉反应率,结果如表2所示。

[0055] 交叉反应率(%) = (引起50%抑制的雌酮浓度/引起50%抑制的雌酮类似物浓度) $\times 100\%$

[0056] 由表2可知,各类似药物的交叉反应率中,雌酮100%,其余为0,因此,本发明抗体对己烯雌酚、孕酮、睾酮三种药物均无交叉反应,只对雌酮有特异性结合。

[0057] 4. 保存期实验

[0058] 试剂盒保存条件为 2°C 至 8°C ,经过12个月测定,试剂盒的最大吸光度值、 IC_{50} 值、雌酮添加实际测定值均在正常范围之内。同时做加速老化和冷冻试验,将试剂盒放在 37°C 、 -20°C 中7天,测定结果也表明试剂盒的各项指标正常。从以上结果得到雌酮试剂盒可以在 2°C 至 8°C 保存12个月。

[0059] 5. 酶联免疫吸附法与高效液相色谱仪法对比

[0060] 试剂盒检测与高效液相色谱法从灵敏度、样品处理、时间、费用等方面进行比较,结果如表3所示。

[0061] 由表3可知,酶联免疫吸附法灵敏性更高、样品处理更简单、检测时间更短、所消耗费用更低。

[0062] 综上所述,本发明提供了一种雌酮酶联免疫试剂盒及其检测方法和应用,其检测方法主要包括:先进行样本前处理,再用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明雌酮酶联免疫检测试剂盒可应用于怀孕母马尿液中雌酮浓度的检测,也可应用于临床中血液雌酮定性的检测,本发明具有操作简便、快速、准确、灵敏度高和费用低的特点,适合大量样本的筛查和现场监控。

[0063] 以上技术特征构成了本发明的实施例,其具有较强的适应性和实施效果,可根据实际需要增减非必要的技术特征,来满足不同情况的需求。

[0064] 表1

样本 批次	马尿			正常人血清		
	01	02	03	01	02	03
测定结果	1.204	1.151	1.295	1.414	1.501	1.529
	1.081	1.029	1.469	1.182	1.239	1.041
	1.271	1.337	0.976	1.572	1.016	1.114
	1.346	1.401	1.532	1.332	0.891	1.243
	1.066	1.361	1.226	1.255	1.067	1.537
变异系数 (CV%)	10.1	12.7	16.9	11.2	17.8	17.9

[0066] 表2

药物名称	交叉反应率 (%)
雌酮	100%
己烯雌酚	0
孕酮	0
睾酮	0

[0068] 表3

指标	酶联免疫吸附法	高效液相色谱法
灵敏性	30ng/ml	3μg/ml
样品处理	简单	复杂
所用时间	2min/样	35min/样
所用费用	2元/样	4.75元/样

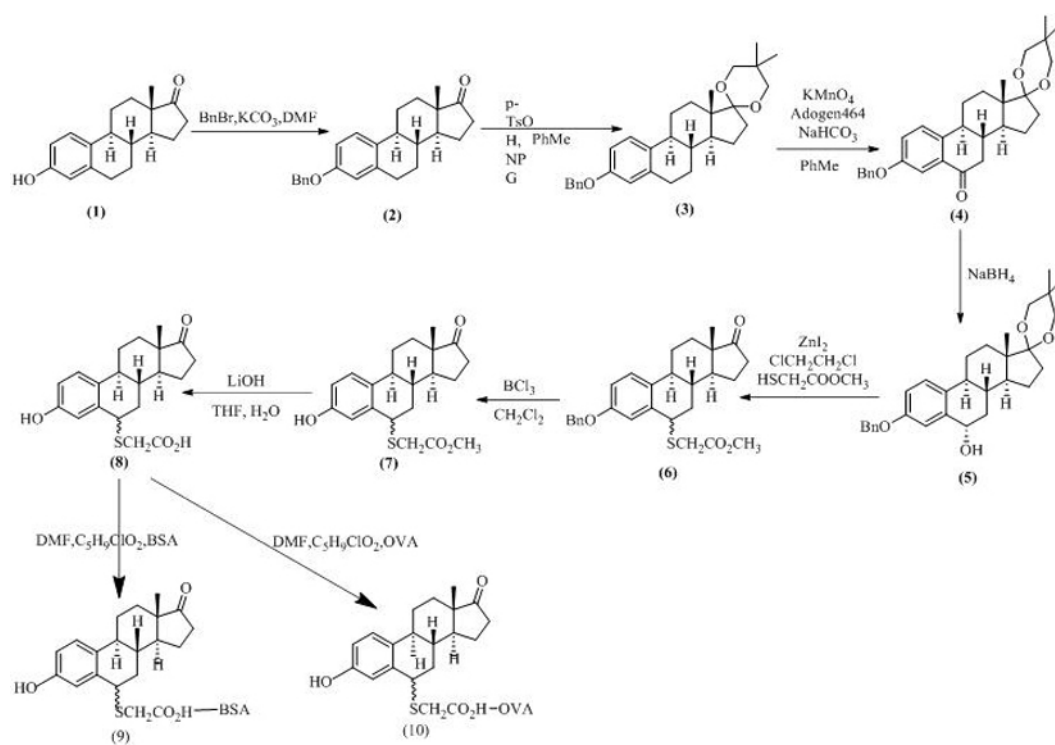


图1

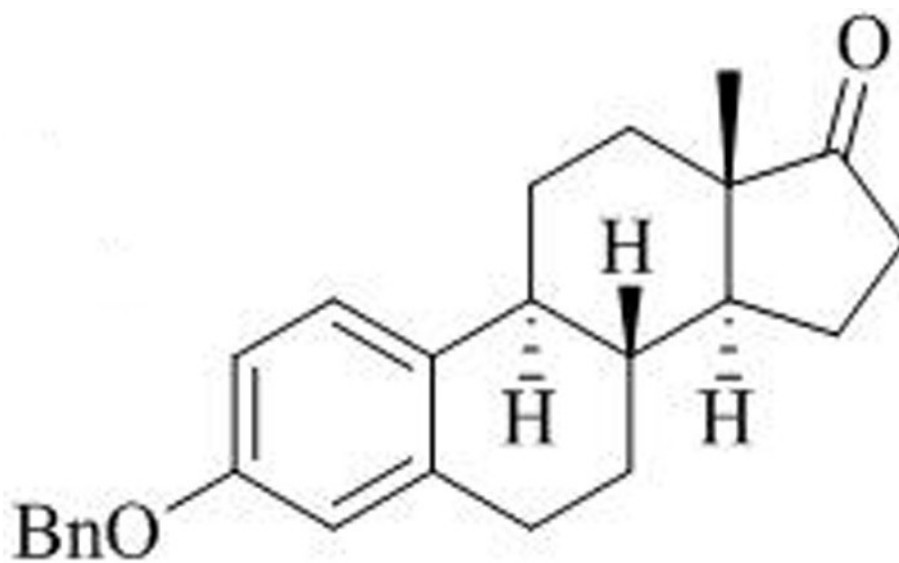


图2

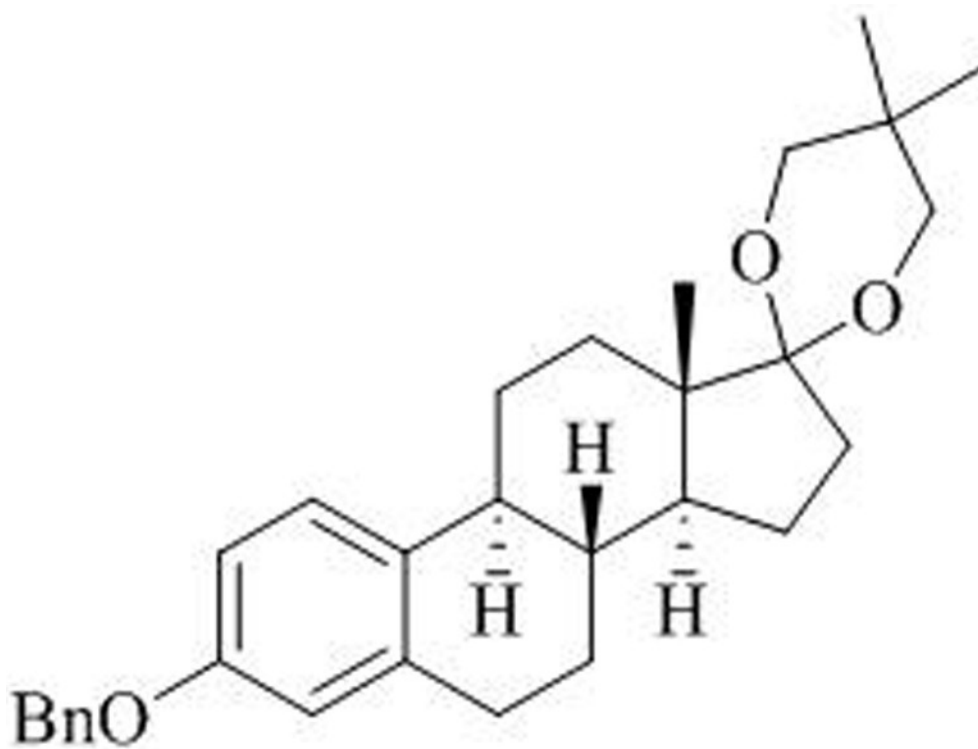


图3

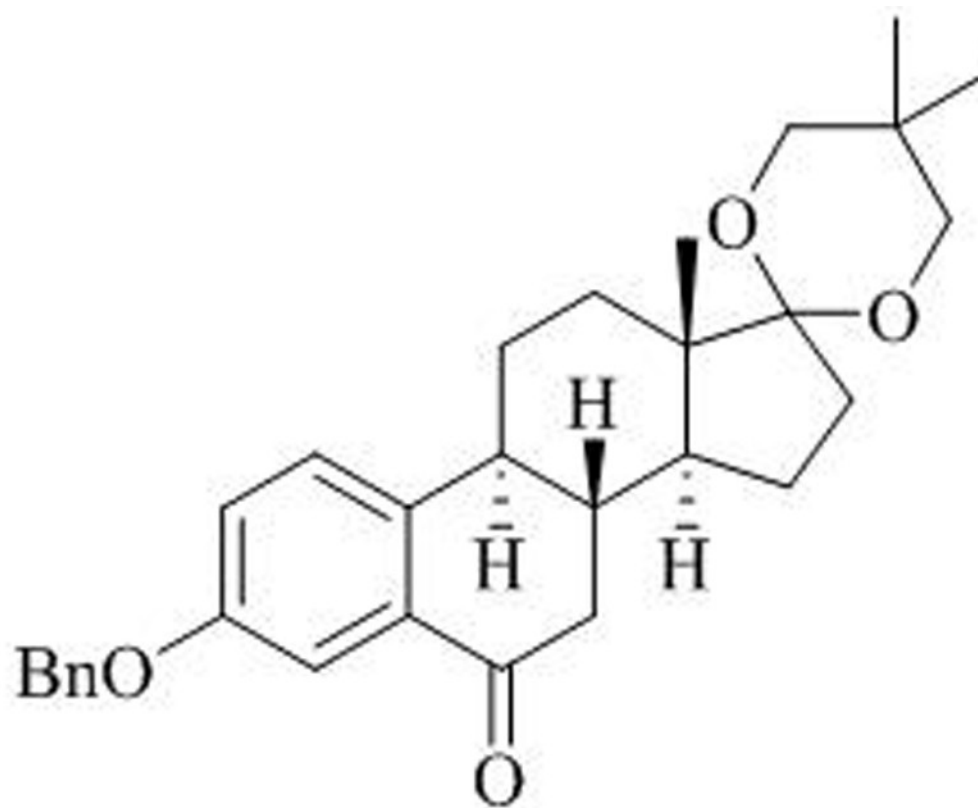


图4

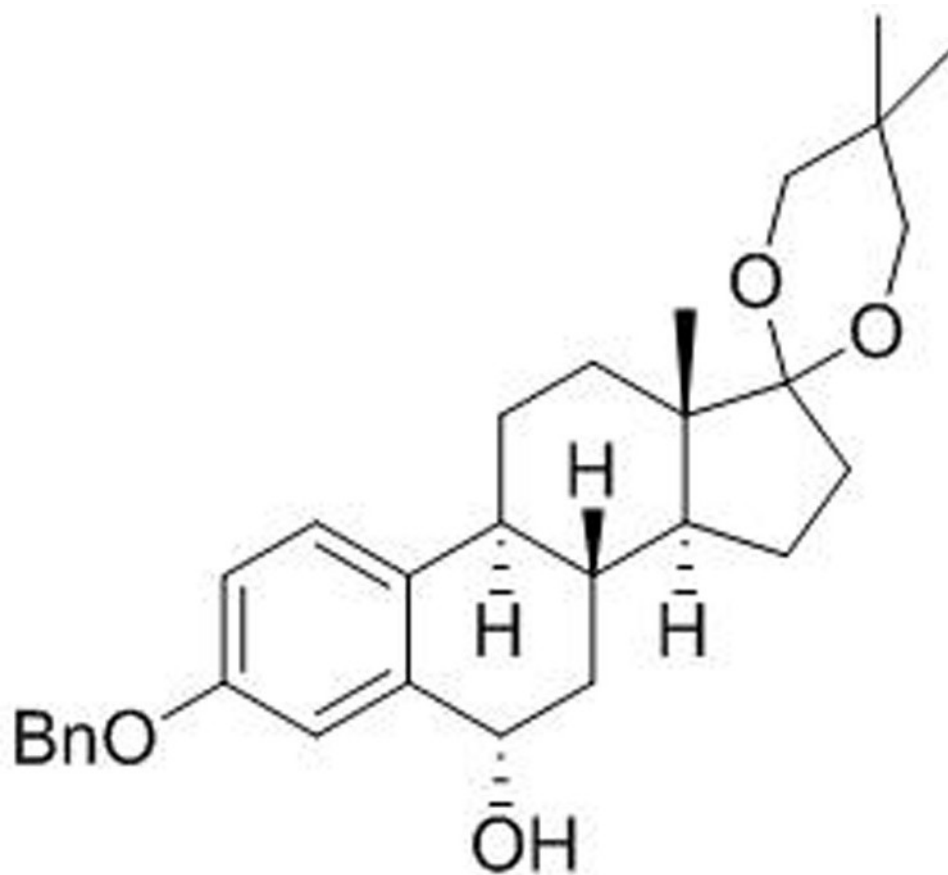


图5

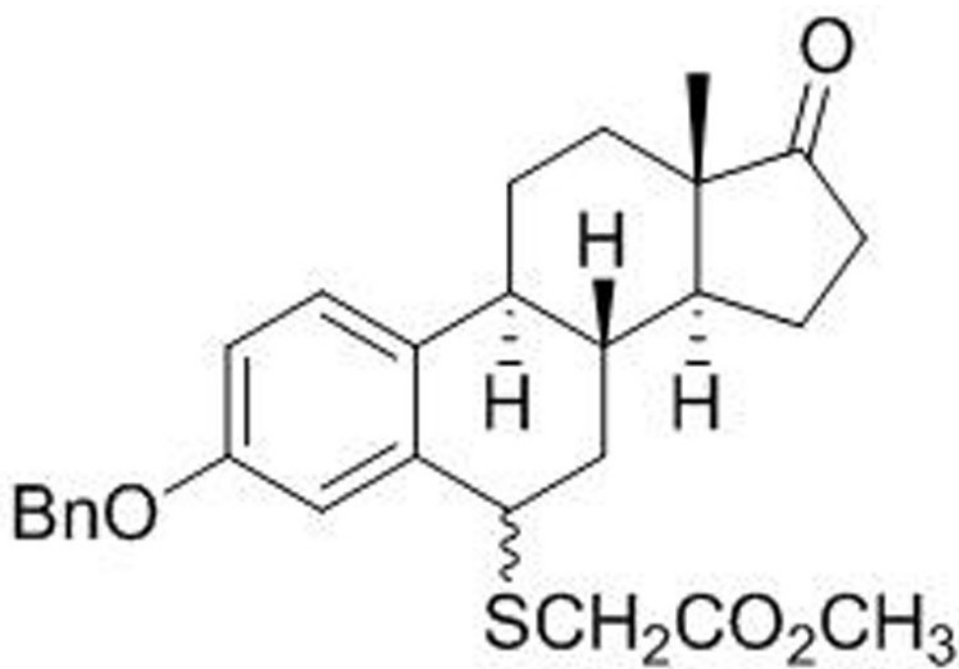


图6

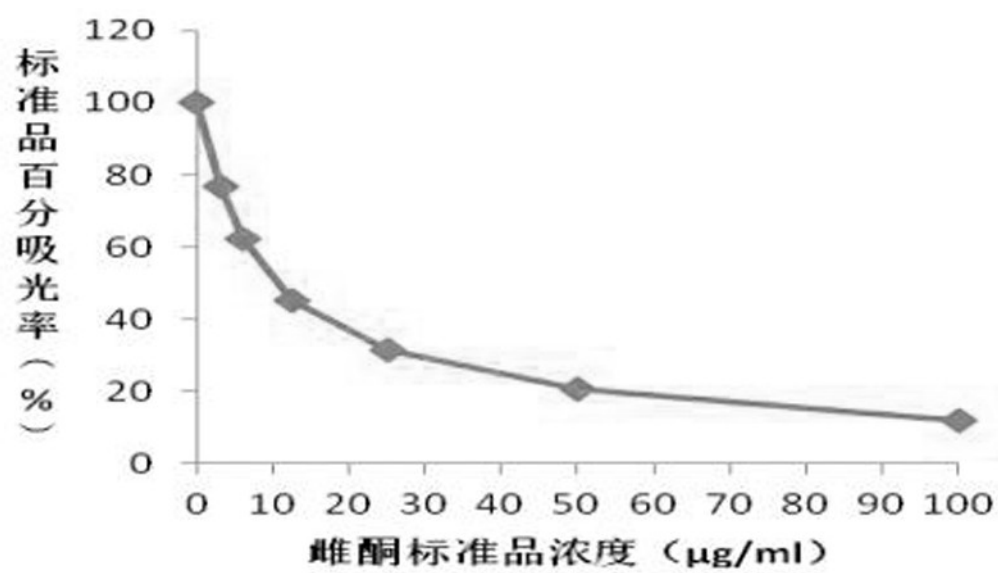


图7