



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802373 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810550555.1

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 湖南远璟生物技术有限公司

地址 410154 湖南省长沙市开福区沙坪街
道中青路1048号山河医药健康产业园
4栋6楼

(72)发明人 李明勇 姜雪莲 黄金浪 张玲
胡洁 黄伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书4页 说明书9页

(54)发明名称

一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括:链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物,生物素标记的孕酮抗体,测试稀释液,孕酮校准品,孕酮质控品。本发明的试剂盒与现有试剂盒相比,制备工艺更简单,成本更低,检测范围宽,稳定性好。

1. 一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:它包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物,生物素标记的孕酮抗体,测试稀释液,孕酮校准品,孕酮质控品。

2. 根据权利要求1所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为 $1\mu\text{m}\sim 1.5\mu\text{m}$ 的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为 $0.1\text{mg/mL}\sim 1.0\text{mg/mL}$;所述磁微粒包被物缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$;

所述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物为碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物稀释于酶标记物缓冲液中所形成,其中孕酮衍生物为N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,或N-磺酸化羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和孕酮的化学合成物质;

所述生物素标记的孕酮抗体为生物素和孕酮抗体的偶联物稀释于生物素标记物缓冲液中所形成,其中孕酮抗体为小鼠单克隆抗体;

所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为DANAZOL,所述缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$;

所述孕酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,所述孕酮校准品的工作浓度分别为 $0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0\text{ng/mL}$;所述校准品缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$;

所述孕酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液,所述孕酮质控品的工作浓度,分别为 $1.0, 25.0\text{ng/mL}$;所述质控品缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$ 。

3. 根据权利要求2所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为 $1\mu\text{m}\sim 1.5\mu\text{m}$ 的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为 0.5mg/mL ;所述磁微粒包被物缓冲液为 100mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH为 7.0 。

4. 根据权利要求2所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物为碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物稀释于酶标记物缓冲液中所形成,其中孕酮衍生物为N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,或N-磺酸化羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和孕酮的化学合成物质;所述碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物与酶标记物缓冲液的稀释比例为 $1:400\sim 1:2000$,优选的稀释比例为 $1:1000$;所述酶标记物缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$,优选的浓度为 20mM ,优选的PH为 7.4 。

5. 根据权利要求2所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述生物素标记的孕酮抗体为生物素和孕酮抗体的偶联物稀释于生物素标记物缓冲液中所形成,其中孕酮抗体为小鼠单克隆抗体;所述生物素和孕酮抗体的偶联物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为 $1:200\sim 1:1000$,优选的稀释比例为 $1:500$;生物素标记物缓冲液为 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ Tris缓冲液,PH范围为 $6.5\sim 8.0$,优选的浓度为 20mM ,优选的PH为 8.0 。

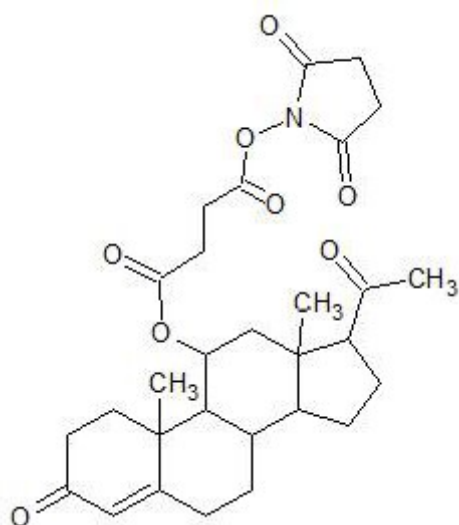
6. 根据权利要求2所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于:所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为DANAZOL,浓度范围为 $0.01\%\sim 1\%$,优

选的浓度为0.1%；所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液，PH范围为6.5~8.0，优选的浓度为20mM，优选的PH为7.4；

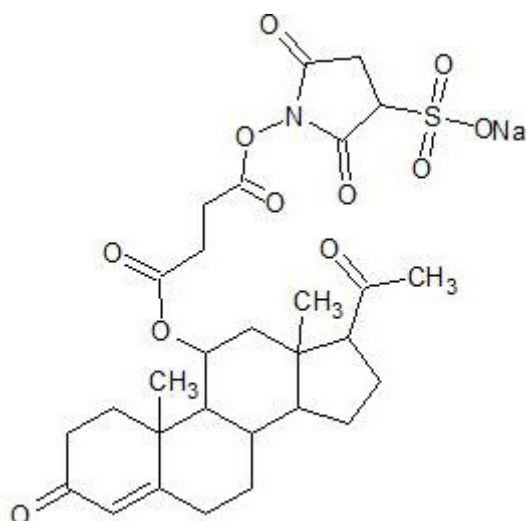
所述孕酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液，将孕酮纯品稀释至工作浓度，分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL；所述校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液，PH范围为6.5~8.0，优选的浓度为20mM，优选的PH为7.4；

所述孕酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液，将孕酮纯品稀释至工作浓度，分别为1.0, 25.0ng/mL；所述质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液，PH范围为6.5~8.0，优选的浓度为20mM，优选的PH为7.4。

7. 根据权利要求2所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于：所述孕酮衍生物为N-羧基琥珀酰亚胺(NHS) 和孕酮的化学合成物质，化学结构式如下：



或者所述孕酮衍生物为N-磺酸化羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS) 和孕酮的化学合成物质，化学结构式如下：



8. 根据权利要求2所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于：所述孕酮衍生物是采用以下工艺制备的：

S1. 孕酮琥珀酸酯的制备：取11- α -羟基孕酮加入到二氯甲烷、琥珀酸酐中，加入4-二甲氨基吡啶，在油浴中回流5小时，冷却至室温后，冰浴降温到结晶析出，用乙醇重结晶，得到

白色片状结晶孕酮琥珀酸酯；

S2.N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物的制备:取孕酮琥珀酸酯溶解于柠檬酸溶液 (PH4.0) 中,加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC),避光条件下2~8℃反应8h,过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物,即孕酮衍生物。

9. 一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括:

(1) 碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入孕酮衍生物 (P-NHS),在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化酶标抗体,得到孕酮酶结合物,将孕酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述孕酮酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;

(2) 生物素标记的孕酮抗体制备方法:将孕酮抗体 (小鼠,单克隆) 加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入生物素衍生物,在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化生物素标记抗体,得到孕酮生物素结合物,将孕酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述孕酮生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000,优选的稀释比例为1:500;

(3) 测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液 (PH7.4) 将DANAZOL稀释至工作浓度为0.1%;

(4) 孕酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL;

(5) 孕酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为1.0, 25.0ng/mL;

(6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物、生物素标记的孕酮抗体、测试稀释液、孕酮校准品、孕酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

10. 根据权利要求9所述的一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,它包括:

(1) 碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入孕酮衍生物 (P-NHS),37℃的条件下反应4小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化酶标抗体,得到孕酮酶结合物,将孕酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述孕酮酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:1000;

(2) 生物素标记的孕酮抗体制备方法:将孕酮抗体 (小鼠,单克隆) 加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入生物素衍生物,37℃的条件下反应4小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化生物素标记抗体,得到孕酮生物素结合物,将孕酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述孕酮生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:500;

(3) 测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液 (PH7.4) 将DANAZOL稀释至工作浓度为0.1%;

(4) 孕酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL;

(5) 孕酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为1.0, 25.0ng/mL;

(6) 组装:将上述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物、生物素标记的孕酮抗体、测试稀释液、孕酮校准品、孕酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及检测血清中孕酮 P 含量的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 孕酮(P)孕酮是类固醇生物合成过程中生成的第一个具有生物活性的化合物,它由肾上腺皮质、男性睾丸,女性卵巢和胎盘生成,主要代谢产物为孕二醇-3-葡糖苷酸。LH作用于黄体调节孕酮的合成和分泌。随着LH在月经周期中期达到高峰,黄体开始发育,孕酮的水平也随之增长。如果怀孕,孕酮水平则随着其主要来源胎盘的发育而持续增长,并贯穿整个妊娠期。血液循环中的孕酮结合蛋白主要有类固醇结合蛋白、白蛋白、性激素结合蛋白,其中主要与白蛋白和类固醇结合蛋白结合,具有生物活性的游离型孕酮仅占总孕酮的2.5~3%。临床上检测孕酮主要用于确认排卵、评价黄体功能缺失,检验诱导排卵过程的有效性等。目前认为,结合孕酮的检测是除了子宫内膜活检以外可以正确评价黄体功能的一种方法,甚至可以替代子宫内膜活检。正常妊娠和异位妊娠时孕酮水平都会升高。血清孕酮的测定也可用于替代疗法的疗效监测和妊娠早期自发性流产危险性的评估。

[0003] 用于体内孕酮测定的主要方法有放射免疫分析法、酶联免疫吸附分析法、化学发光免疫分析法等。目前常用的放射免疫分析法(RIA)是用 I^{125} 标记孕酮半抗原来实现的,其合成工艺复杂,有效期短,对环境有一定污染,影响检测结果的因素较多。近几年来,化学发光免疫分析技术发展迅速,灵敏度、特异性以及自动化程度均达到或超过了RIA水平,特别是标记物的稳定性和不污染环境是RIA法无法比拟的。

[0004] 目前各大中型医院均进口了全自动化学发光免疫分析系统,但是仪器和试剂价格昂贵。

[0005] 目前已有多件磁微粒化学发光方法检测孕酮的专利申请,如申请号(201110257759)的专利申请是化学发光板的方法,板间差异较大;申请号(201511019364)的专利申请使用的是异鲁米诺发光标记物标记孕酮抗体,检测灵敏度较低,稳定性较差。

发明内容

[0006] 本发明要解决的问题是提供孕酮的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了放射性免疫分析的试剂有效期短、存在放射性污染、操作繁琐等缺点,且解决了灵敏度低,稳定性差,成本高的缺陷。本发明公开了一种制备工艺简单、成本低廉、稳定性好的孕酮的化学发光免疫定量检测试剂盒以及制备方法。

[0007] 本发明是通过以下技术方案予以实现的:一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物,生物素标记的孕酮抗体,测试稀释液,孕酮校准品,孕酮质控品。

[0008] 优选地,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为 $1\mu\text{m}\sim 1.5\mu\text{m}$ 的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成,所述链霉亲和素包被的

磁微粒悬浮液的浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL;所述磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH范围为6.5~8.0;

所述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物为碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物稀释于酶标记物缓冲液中所形成,其中孕酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和孕酮的化学合成物质;

所述生物素标记的孕酮抗体为生物素和孕酮抗体的偶联物稀释于生物素标记物缓冲液中所形成,其中孕酮抗体为小鼠单克隆抗体;

所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为DANAZOL,所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0;

所述孕酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,所述孕酮校准品的工作浓度分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL;所述校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0;

所述孕酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液,所述孕酮质控品的工作浓度,分别为1.0,25.0ng/mL;所述质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0。

[0009] 优选地,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的粒径为1 μ m~1.5 μ m的四氧化三铁悬浮于磁微粒包被物缓冲液中所形成,所述链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液的浓度为0.5mg/mL;所述磁微粒包被物缓冲液为100mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH为7.0。

[0010] 优选地,所述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物为碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物稀释于酶标记物缓冲液中所形成,其中孕酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和孕酮的化学合成物质;所述碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;所述酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0011] 优选地,所述生物素标记的孕酮抗体为生物素和孕酮抗体的偶联物稀释于生物素标记物缓冲液中所形成,其中孕酮抗体为小鼠单克隆抗体;所述生物素和孕酮抗体的偶联物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000,优选的稀释比例为1:500;生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为8.0。

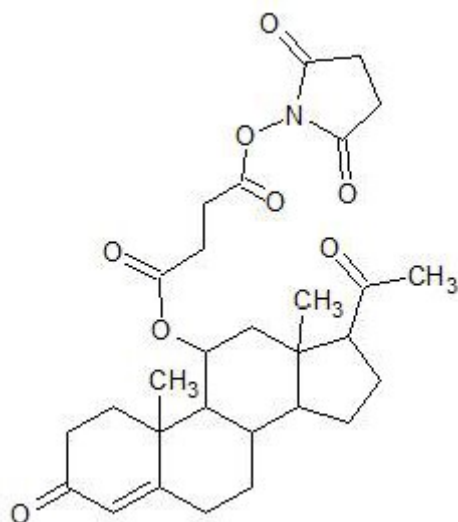
[0012] 优选地,所述测试稀释液为含有解离剂的缓冲液,其中解离剂为DANAZOL,浓度范围为0.01%~1%,优选的浓度为0.1%;所述缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;

所述孕酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液,将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL;所述校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4;

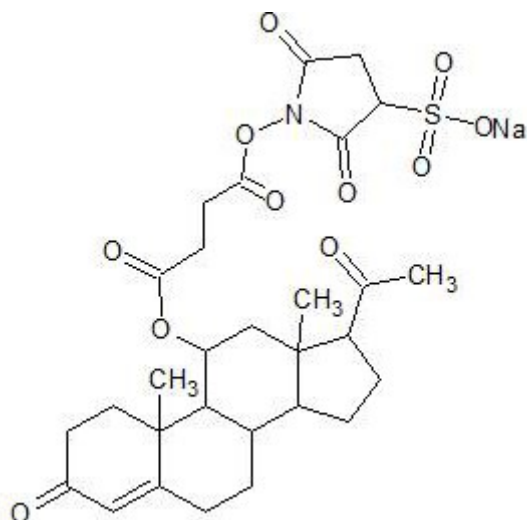
所述孕酮质控品为含20%胎牛血清的质控品缓冲液,将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为1.0,25.0ng/mL;所述质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0013] 优选地,所述孕酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,化

学结构式如下：



或者所述孕酮衍生物为N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 和孕酮的化学合成物质,化学结构式如下：



优选地,所述孕酮衍生物是采用以下工艺制备的：

S1. 孕酮琥珀酸酯的制备:取11- α -羟基孕酮加入到二氯甲烷、琥珀酸酐中,加入4-二甲氨基吡啶,在油浴中回流5小时,冷却至室温后,冰浴降温到结晶析出,用乙醇重结晶,得到白色片状结晶孕酮琥珀酸酯。

[0014] S2.N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物的制备:取孕酮琥珀酸酯溶解于柠檬酸溶液 (PH4.0) 中,加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC),避光条件下2~8℃反应8h,过色谱柱收集N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物的洗脱液,浓缩后,用无水乙醇重结晶,得到白色针状结晶N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物,即孕酮衍生物。

[0015] 一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,包括：

(1) 碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液 (pH8.0) 中,加入孕酮衍生物 (P-NHS),在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱 (GE公司) 纯化酶标抗体,得到孕酮酶结合物,将孕酮酶结合物稀释于酶标

记物缓冲液中,所述孕酮酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;

(2)生物素标记的孕酮抗体制备方法:将孕酮抗体(小鼠,单克隆)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,在温度为4℃~37℃的条件下反应0.5~24小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到孕酮生物素结合物,将孕酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述孕酮生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:200~1:1000,优选的稀释比例为1:500;

(3)测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液(PH7.4)将DANAZOL稀释至工作浓度为0.1%;

(4)孕酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL;

(5)孕酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为1.0, 25.0ng/mL;

(6)组装:将上述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物、生物素标记的孕酮抗体、测试稀释液、孕酮校准品、孕酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0016] 优选地,一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,包括:

(1)碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物制备方法:将碱性磷酸酶加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入孕酮衍生物(P-NHS),37℃的条件下反应4小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化酶标抗体,得到孕酮酶结合物,将孕酮酶结合物稀释于酶标记物缓冲液中,所述孕酮酶结合物与酶标记物缓冲液的稀释比例为1:1000;

(2)生物素标记的孕酮抗体制备方法:将孕酮抗体(小鼠,单克隆)加入碳酸钠缓冲液(pH8.0)中,加入生物素衍生物,37℃的条件下反应4小时,然后用ProteinG亲和柱(GE公司)纯化生物素标记抗体,得到孕酮生物素结合物,将孕酮生物素结合物稀释于生物素标记物缓冲液中,所述孕酮生物素结合物与生物素标记物缓冲液的稀释比例为1:500;

(3)测试稀释液的制备方法:用20mM Tris缓冲液(PH7.4)将DANAZOL稀释至工作浓度为0.1%;

(4)孕酮校准品的制备方法:用校准品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL;

(5)孕酮质控品的制备方法:用质控品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为1.0, 25.0ng/mL;

(6)组装:将上述碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物、生物素标记的孕酮抗体、测试稀释液、孕酮校准品、孕酮质控品组装成盒,于2~8℃条件下保存。

[0017] 本发明涉及的试剂盒性能评价指标:对采用该方法制备的试剂盒进行准确度、线性、精密度、特异性和稳定性进行测定。

[0018] 本发明涉及的试剂盒反应原理:以磁微粒子作为免疫反应的固相,利用化学发光免疫分析方法与化学发光类测定仪配合,用于测定人体血清/血浆中的孕酮含量。反应的技术原理为:待测样本、校准品或质控品中的孕酮与碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物竞争结合生物素标记的孕酮单克隆抗体,随后加入包被链霉亲和素的磁微粒,通过链霉亲和素与生物素结合使抗原抗体复合物连接在磁微粒上,在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的

复合物与未结合的其它物质分离。清洗沉淀的复合物,加入酶促化学发光底物,底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,利用发光仪测定反应的发光强度。在测定范围内,发光强度与样本中的孕酮浓度成反比,使用改良的四参数Logistic方程拟合可定量测算出待测样本中孕酮浓度。

[0019] 本发明的孕酮磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,制备工艺简单、成本低廉、稳定性好,性能达到国外知名品牌试剂的同等水平。

[0020] 本发明的技术效果在于:

(1)碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物制备方法采用的是孕酮衍生物(P-NHS)直接偶联进行磷酸酶,相比较其他专利或厂家用的是孕酮-BSA衍生物(P-6-CMO-BSA)或孕酮-OVA衍生物(P-6-CMO-OVA),该方法成本更低,工艺更简单,更可控。孕酮的大分子蛋白衍生物可能存在一定的位阻干扰,影响测试结果的准确性,而本发明涉及的孕酮衍生物(P-NHS)是与孕酮结构类似的小分子物质,有效避免的位阻干扰的问题。

[0021] (2)生物素标记抗体的制备方法采用经过活化的生物素直接与抗体进行偶联,无需添加EDC\NHS等偶联剂,工艺更简单,成本更低。

具体实施方式

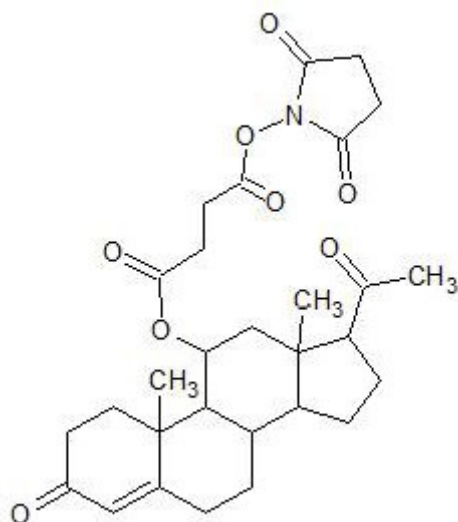
[0022] 下面结合实例进一步说明本发明,本发明的优点和特点将被描述的更清楚。但是,应该可以理解,本实例仅仅是本发明的一种范例,并不会对本发明的范围做任何限制。

[0023] 本发明采用的技术方案为:孕酮的化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液,碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物,生物素标记的孕酮抗体,测试稀释液,孕酮校准品,孕酮质控品。

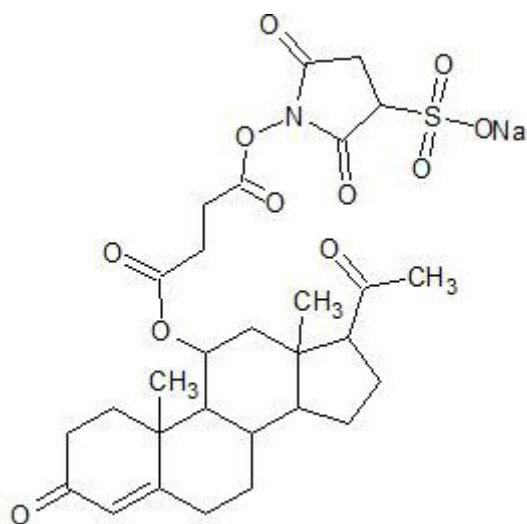
[0024] 本发明涉及的链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液为表面包裹带有链霉亲和素的四氧化三铁,粒径为1 μ m~1.5 μ m,悬浮于磁微粒包被物缓冲液中,浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL,优选的浓度为0.5mg/mL;磁微粒包被物缓冲液为20mM~200mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为100mM,优选的PH为7.0。

[0025] 本发明涉及的碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物为碱性磷酸酶和孕酮衍生物的偶联物,其中孕酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,或N-磺酸化羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和孕酮的化学合成物质。稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:400~1:2000,优选的稀释比例为1:1000;酶标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液,PH范围为6.5~8.0,优选的浓度为20mM,优选的PH为7.4。

[0026] 本发明涉及的孕酮衍生物为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和孕酮的化学合成物质,结构式如下:



或者所述孕酮衍生物为N-磺酸化羧基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 和孕酮的化学合成物质, 结构式如下:



本发明涉及的孕酮衍生物的制备工艺:

(1) 孕酮琥珀酸酯的制备: 取11- α -羟基孕酮(采购自Sigma公司)3.5g于200mL二氯甲烷、50mL琥珀酸酐中, 加入4-二甲氨基吡啶500mg, 在油浴中回流5小时, 冷却至室温后, 冰浴降温2小时有结晶析出, 用乙醇重结晶, 得到白色片状结晶孕酮琥珀酸酯4.2g。

[0027] (2) N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物的制备: 取3.2g的孕酮琥珀酸酯溶解于50mM 柠檬酸溶液 (PH4.0) 中, 加入N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 300mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 100mg, 避光条件下2~8℃反应8h, 过色谱柱收集N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物的洗脱液, 浓缩后, 用无水乙醇重结晶, 得到白色针状结晶N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 与孕酮合成物460mg, 即得P-NHS。

[0028] 本发明涉及生物素标记的孕酮抗体为生物素和孕酮抗体的偶联物, 其中孕酮抗体为小鼠单克隆抗体。稀释于生物素标记物缓冲液中, 稀释比例为1:200~1:1000, 优选的稀释比例为1:500; 生物素标记物缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为8.0。

[0029] 本发明涉及的测试稀释液为含有解离剂的缓冲液, 其中解离剂主要成分为

DANAZOL, 浓度范围为0.01%~1%, 优选的浓度为0.1%; 缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为7.4。

[0030] 本发明涉及的孕酮校准品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液, 将孕酮纯品稀释至工作浓度, 分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL; 校准品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为7.4。

[0031] 本发明涉及的孕酮质控品为含20%胎牛血清的校准品缓冲液, 将孕酮纯品稀释至工作浓度, 分别为1.0, 25.0ng/mL; 质控品缓冲液为20mM~200mM Tris缓冲液, PH范围为6.5~8.0, 优选的浓度为20mM, 优选的PH为7.4。

[0032] 一、试剂盒的制备:

(1) 磁微粒包被物缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	0.50g
牛血清白蛋白	20.00g
Proclin300	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中, 充分搅拌溶解, 调节PH至7.00±0.10。

[0033] (2) 酶标记物缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	1.00g
牛血清白蛋白	50.00g
Proclin300	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中, 充分搅拌溶解, 调节PH至7.40±0.10。

[0034] (3) 生物素标记物缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	4.50g
Tween-20	1.00g
牛血清白蛋白	10.00g
Proclin300	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中, 充分搅拌溶解, 调节PH至8.00±0.10。

[0035] (4) 测试稀释液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	4.50g
Tween-20	1.00g
牛血清白蛋白	10.00g

Proclin300	1.00g
DANAZOL	1.00g

将上述物料加入1000mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 7.40 ± 0.10 。

[0036] (5) 校准品缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	1.00g
胎牛血清	200mL
Proclin300	1.00g

将上述物料加入800mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 7.40 ± 0.10 。

[0037] (6) 质控品缓冲液制备:

物料	用量
三羟甲基氨基甲烷	2.42g
氯化钠	18.00g
Tween-20	2.00g
胎牛血清	200mL
Proclin300	1.00g

将上述物料加入800mL去离子水中,充分搅拌溶解,调节PH至 7.40 ± 0.10 。

[0038] (1) 链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液制备方法:

将商品化的链霉亲和素包被的磁微粒母液(采购于南京盘古基因纳米科技有限公司)用磁珠包被物缓冲液稀释浓度为0.5mg/mL。

[0039] (2) 碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物制备方法:

将100ug碱性磷酸酶加入1mL10mM 碳酸钠缓冲液(pH8.0) 中,加入1ug孕酮衍生物(P-NHS,采购于深圳雅为公司),在温度为 $4^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 反应0.5~24小时后,然后用ProteinG亲和柱(GE公司) 纯化酶标抗体,得到孕酮酶结合物。稀释于酶标记物缓冲液中,稀释比例为1:1000。

[0040] (3) 生物素标记的孕酮抗体制备方法:

将20ug孕酮抗体(小鼠,单克隆,采购于美国Meridian公司)加入1mL10mM 碳酸钠缓冲液(pH8.0) 中,加入50ug生物素衍生物,在温度为 $4^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 反应0.5~24小时后,然后用ProteinG亲和柱(GE公司) 纯化生物素标记抗体,得到孕酮生物素结合物。稀释于生物素标记物缓冲液中,稀释比例为1:500。

[0041] (4) 孕酮校准品的制备方法:

用校准品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为0, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0ng/mL。

[0042] (5) 孕酮质控品的制备方法:

用质控品缓冲液将孕酮纯品稀释至工作浓度,分别为1.0, 25.0ng/mL。

[0043] (6) 组装:将上述试剂组分组装成盒,于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

[0044] 二、试剂盒的测试方法:

(1) 加样和孵育过程:吸取孕酮校准品、质控品或新鲜病人样本50uL加入反应管中,然后加入碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物50uL和生物素标记的孕酮抗体50uL,37℃孵育反应10分钟;然后加入链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液50uL,37℃孵育反应10分钟;

(2) 磁分离清洗过程:将孵育反应完成后的反应管放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第一次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第二次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;第三次加入磁珠包被物缓冲液300uL,放在磁分离架上静置1分钟,除去上清液;

(3) 发光过程:加入Lumi-Phos 530底物液(采购于美国Lumigen公司)200uL,37℃避光孵育5分钟后,用滨松9507半自动化学发光仪测量发光值。

[0045] 三、试剂盒的性能测试结果:

(1) 线性范围为0~50ng/mL,线性系数: $r \geq 0.9900$;

(2) 批内不精密度为不大于6%;

(3) 准确度:回收率在90%~110%之间;

(4) 最低检出限:测试结果不高于0.15ng/mL;

(5) 特异性:1000ng/mL的脱氧皮质酮、10ng/mL的雌酮,测试结果不高于0.15ng/mL:

干扰物	浓度	测试结果	结论
脱氧皮质酮	1000ng/mL	0.12ng/mL	<0.15ng/mL
雌酮	10ng/mL	0.08ng/mL	<0.15ng/mL

(6) 稳定性:37℃加速7天与2~8℃试剂测试结果偏差 $\pm 10\%$ 范围内;

样本	浓度	37℃加速7天相对偏差
低值质控	1.0ng/mL	-2.36%
高值质控	25.0ng/mL	-3.71%

由以上的结果可以看出:本发明涉及的试剂盒与国外同类型试剂盒相比,性能测试结果很接近,达到优良结果,本发明的孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒具有很好的适用性和先进性。

[0046] 以上所述实施例仅是本发明的优选实施方式。应当指出,本发明所述的稀释比例是指按质量比稀释的比例,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术方案的前提下,还可以做出若干改进和修饰,这些改进和修饰也应视为本发明的保护范围,本实施例中未明确的各组成部分均可用现有技术加以实现。

专利名称(译)	一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108802373A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810550555.1	申请日	2018-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	湖南远璟生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖南远璟生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖南远璟生物技术有限公司		
[标]发明人	李明勇 姜雪莲 黄金浪 张玲 胡洁 黄伟		
发明人	李明勇 姜雪莲 黄金浪 张玲 胡洁 黄伟		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/535 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种孕酮磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法，所述试剂盒包括：链霉亲和素包被的磁微粒悬浮液，碱性磷酸酶标记的孕酮衍生物，生物素标记的孕酮抗体，测试稀释液，孕酮校准品，孕酮质控品。本发明的试剂盒与现有试剂盒相比，制备工艺更简单，成本更低，检测范围宽，稳定性好。

