



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103048473 A

(43) 申请公布日 2013.04.17

(21) 申请号 201210549841.9

(22) 申请日 2012.12.18

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街  
218号

(72) 发明人 于大为 程晓蕾

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法,试剂盒包括:第一试剂:含异硫氰酸荧光素标记的促卵泡生成激素抗体的溶液;第二试剂:含碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体的溶液;磁分离试剂:含包被着异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法和采用该试剂进行促卵泡生成激素的检测方法。相对于现有技术,本发明准确性更好、精密度更高、灵敏度更高,而且待测样本无需预稀释,操作简单省时,检测范围宽,并且成本低。

1. 一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,所述试剂盒包括用于化学发光免疫检测的免疫反应步骤的免疫反应试剂,其特征在于:所述的免疫反应试剂包括第一试剂、第二试剂和磁分离试剂,其中:

第一试剂:含荧光素标记的促卵泡生成激素抗体、pH 为 7-9 的缓冲液,所述荧光素标记的促卵泡生成激素抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ;

第二试剂:含碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体、pH 为 7-9 的缓冲液,所述碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ;

磁分离试剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于:所述的碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体由碱性磷酸酶与促卵泡生成激素抗体通过交联剂琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物和 2-亚氨基四氢噻吩连接构成。

3. 根据权利要求 1 所述的一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于:所述包被有荧光素抗体的磁微粒中,荧光素抗体与磁微粒之间相化学偶联。

4. 一种如权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述第一试剂、所述第二试剂以及所述磁分离试剂的步骤,其特征在于:所述第二试剂的制备过程如下:

(1) 使促卵泡生成激素抗体与交联剂 2-亚氨基四氢噻吩在甘氨酸溶液中,室温静置反应,生成促卵泡生成激素抗体与 2-亚氨基四氢噻吩的连接物,于  $2-8^{\circ}\text{C}$  下保存备用;

(2) 使碱性磷酸酶溶液与交联剂琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物溶液混合,室温静置反应,将反应液通过 G-25 凝胶柱除盐,将收集到的碱性磷酸酶与琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物的连接物于  $2-8^{\circ}\text{C}$  下保存备用;

(3) 将步骤(1)所得溶液与步骤(2)所得溶液按照促卵泡生成激素抗体与 2-亚氨基四氢噻吩的连接物与碱性磷酸酶与琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物的连接物的摩尔比为  $1:1 \sim 2$  混合,在  $2-8^{\circ}\text{C}$  下反应,使生成所述的碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体,反应结束,将反应液通过 Superdex200 凝胶纯化柱纯化,选择合适的 pH 缓冲液调整浓度和 pH 值即得所述的第二试剂。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述的促卵泡生成激素抗体、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于 95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过  $1000\text{u/mg}$ ,所述碱性磷酸酶的缓冲液的浓度大于等于  $5\text{mg/ml}$ 。

6. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述的第一试剂的制备方法如下:配制含有荧光素的 pH 为  $9 \sim 10$  的缓冲液,然后按照荧光素与促卵泡生成激素抗体的分子比为  $20 \sim 200:1$  的比例,将所述含有荧光素的 pH 为  $9 \sim 10$  的缓冲液与促卵泡生成激素抗体混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去游离的荧光素,得到含有荧光素标记的促卵泡生成激素抗体的溶液,接着用具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH,即得所述第一试剂。

7. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述的磁分离试剂的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体在偶联剂的存在下,室温反应  $2 \sim 18$  小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得所述磁分离试剂。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于:所述的磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于0.4毫摩尔,其直径为0.5~2微米;所述的荧光素抗体是多克隆抗体或单克隆抗体,其纯度大于等于90wt%,稀释效价大于1:100万,所述偶联剂为碳二亚胺。

9. 一种促卵泡生成激素的检测方法,该方法是基于磁微粒分离技术的化学发光免疫检测法,所述检测方法包括依次进行的免疫反应步骤、使用磁分离及洗涤设备对免疫反应的反应液进行洗涤的步骤以及向洗涤后的反应液内加入底物溶液并利用化学发光检测仪检测发光强度的步骤,其特征在于:所述的免疫反应步骤采用权利要求1~3中任一项权利要求所述的试剂盒,且具体实施如下:在检测管中加入待测样本原液,然后依次第一试剂、第二试剂,混匀,在25-40℃条件下进行第一次温育,然后加入磁分离试剂,混匀,25-40℃条件下进行第二次温育;

所述的底物溶液为碱性磷酸酶化学发光底物溶液。

10. 根据权利要求9所述的一种促卵泡生成激素的检测方法,其特征在于:所述第一次温育的时间为10-30min;第二次温育的时间为2-15min。

## 一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法。

### 背景技术

[0002] 促卵泡生成激素(Follicle Stimulating Hormone, FSH)是由垂体前叶分泌的糖蛋白激素,其分子量大约为 30,000,由两条多肽链(即  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位组成),FSH 的  $\alpha$  亚单位由 92 个氨基酸残基组成,并与 LH、TSH 和 hCG 的  $\alpha$  亚单位的结构相同, $\beta$  亚单位在上述激素之间是不同的,从而赋予各激素各自的生物及免疫学特性。其主要功能是促进卵巢的卵泡发育和成熟,主要为促进卵泡颗粒层细胞增生分化,促进整个卵巢长大。其作用于睾丸曲细精管时可促进精子形成。

[0003] FSH 与 LH 协同作用促进排卵等作用。在女性中,LH 在卵泡期与 FSH 一起促进卵泡的成熟、雌性激素的合成和分泌;促进排卵和使排卵后的卵泡转变为黄体,促进间质的生长;并促进黄体合成和孕激素与雌性激素的分泌。因此女性的 FSH 分泌具有明显的周期性,月经周期 FSH 呈有规律的升高和降低,血中 FSH 浓度及每日由尿液排泄的 FSH 的量随周期变化而变化。因此 FSH 可用于预测排卵时间、绝经期检查、不孕症诊断和内分泌治疗的监测等。

[0004] 男性体内 FSH 可刺激睾丸支持细胞发育,并促进产生一种能结合雄性激素的蛋白质,通过这种蛋白质,可使发育的生殖细胞获得稳定的高浓度的雄性激素,促进生殖细胞发育,并分化成为成熟的精子。男性体内 FSH 分泌无明显周期性,但在 50 岁以后略有升高。男性体内高水平的 FSH 会在睾丸衰退和克兰费尔特氏综合症的初期出现。此外,FSH 的浓度在饥饿、肾衰竭、甲状腺机能亢进和肝硬化时也会有所提高。

[0005] 目前用于促卵泡生成激素(FSH)的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法等。酶联免疫分析法存在灵敏度低,线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析技术因其有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0006] 然而,在实际的免疫检测中,由于待测样品中所含的杂质成分较多,一定程度上影响了检测灵敏度和准确性,所以从复杂的样品基质中快速分离、纯化出目的待测物,是临床检验工作者面临的难题之一。磁微粒免疫检测技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、可重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学性状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,使得某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。

## 发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种改进的促卵泡生成激素的定量检测方法,该方法不仅准确性好、灵敏度高,且精密度特别是分析间精密度高,此外该方法成本低。

[0008] 本发明同时还要提供一种促卵泡生成激素的定量检测所用的试剂盒,其能够以较低的成本制备得到,且能够实现促卵泡生成激素准确和高精确地定量测定。

[0009] 此外,本发明还提供一种促卵泡生成激素的定量检测所用的试剂盒的简便和低成本的制作方法。

[0010] 为解决以上技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0011] 一种促卵泡生成激素化学发光定量检测试剂盒,所述试剂盒包括用于化学发光免疫检测的免疫反应步骤的免疫反应试剂,特别是,所述的免疫反应试剂包括第一试剂、第二试剂和磁分离试剂,其中:

[0012] 第一试剂:含荧光素标记的促卵泡生成激素抗体、pH 为 7-9 的缓冲液,所述荧光素标记的促卵泡生成激素抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ;

[0013] 第二试剂:含碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体、pH 为 7-9 的缓冲液,所述碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ;

[0014] 磁分离试剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。

[0015] 根据本发明,所述的碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体由碱性磷酸酶与促卵泡生成激素抗体通过交联剂琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物和 2-亚氨基四氢噻吩连接构成。

[0016] 根据本发明,所述的第一试剂中的含有荧光素标记的促卵泡生成激素抗体是能够通过成熟和稳定的工艺容易地制备的。

[0017] 根据本发明,所述包被有荧光素抗体的磁微粒的制备也是较为容易的,且现有技术已有成熟的制备工艺可以参照。例如可以通过常规的物理吸附或化学偶联包被方式制备,没有特别限制。作为本发明的一种优选实施方案:该包被有荧光素抗体的磁微粒中,荧光素抗体与磁微粒之间相化学偶联。

[0018] 本领域技术人员应知晓,本发明的试剂盒还可以进一步包括有其它检测所需的试剂,例如底物溶液。但是诸如底物溶液等其它试剂可以另行购买或配制,因此,虽然试剂盒中可以包括这些试剂,但它们对于本发明试剂盒来说并非必不可少。

[0019] 本发明采取的又一技术方案是:一种所述的试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述第一试剂、所述第二试剂以及所述磁分离试剂的步骤,其中,所述第二试剂的制备过程如下:

[0020] (1) 使促卵泡生成激素抗体与交联剂 2-亚氨基四氢噻吩在甘氨酸溶液中,室温静置反应,生成促卵泡生成激素抗体与 2-亚氨基四氢噻吩的连接物,于  $2-8^{\circ}\text{C}$  下保存备用;

[0021] (2) 使碱性磷酸酶溶液与交联剂琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物溶液混合,室温静置反应,将反应液通过 G-25 凝胶柱除盐,将收集到的碱性磷酸酶与琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物的连接物于  $2-8^{\circ}\text{C}$  下保存备用;

[0022] (3) 将步骤(1)所得溶液与步骤(2)所得溶液按照促卵泡生成激素抗体与 2-亚

氨基四氢噻吩的连接物与碱性磷酸酶与琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物的连接物的摩尔比为 1:1 ~ 2 混合,在 2-8℃ 下反应,使生成所述的碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体,反应结束,将反应液通过 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化,选择合适的 pH 缓冲液调整浓度和 pH 值即得所述的第二试剂。

[0023] 进一步地,所述的促卵泡生成激素抗体、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于 95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过 1000u/mg,所述碱性磷酸酶的缓冲液的浓度大于等于 5mg/ml。

[0024] 根据一个具体方面,所述的第一试剂的制备方法如下:配制含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液,然后按照荧光素与促卵泡生成激素抗体的分子比为 20~200:1 的比例,将所述含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液与促卵泡生成激素抗体混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去游离的荧光素,得到含有荧光素标记的促卵泡生成激素抗体的溶液,接着用具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH,即得所述第一试剂。

[0025] 根据又一具体方面,所述的磁分离试剂的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体在偶联剂的存在下,室温反应 2~18 小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得所述磁分离试剂。

[0026] 优选地,所述的磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于 0.4 毫摩尔,其直径为 0.5 ~ 2 微米;所述的荧光素抗体是多克隆抗体或单克隆抗体,其纯度大于等于 90wt%,稀释效价大于 1:100 万,所述偶联剂为碳二亚胺。

[0027] 本发明以上所述的缓冲液可以是本领域常用的那些,例如碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、TRIS 缓冲液。实际实施过程中,可选择最适合的缓冲液。例如,在第一试剂、第二试剂以及磁分离试剂的制备的最后阶段,通常采取含 0.5% 牛血清蛋白(BSA)、pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液。

[0028] 本发明所述的荧光素可以是已知的各种荧光素,常用的有例如异硫氰酸荧光素,四乙基罗丹明,四甲基异硫氰酸罗丹明等。

[0029] 本发明采取的又一技术方案是:一种促卵泡生成激素的检测方法,该方法是基于磁微粒分离技术的化学发光免疫检测法,所述检测方法包括依次进行的免疫反应步骤、使用磁分离及洗涤设备对免疫反应的反应液进行洗涤的步骤以及向洗涤后的反应液内加入底物溶液并利用化学发光检测仪检测发光强度的步骤,其特征在于:所述的免疫反应步骤采用权利要求 1~3 中任一项权利要求所述的试剂盒,且具体实施如下:在检测管中加入待测样本原液,然后依次第一试剂、第二试剂,混匀,在 25-40℃ 条件下进行第一次温育,然后加入磁分离试剂,混匀,25-40℃ 条件下进行第二次温育;

[0030] 所述的底物溶液为碱性磷酸酶化学发光底物溶液。

[0031] 进一步地,所述第一次温育的时间为 10-30min;第二次温育的时间为 2-15min。

[0032] 上述的使用磁分离及洗涤设备对免疫反应的反应液进行洗涤的步骤以及向洗涤后的反应液内加入底物溶液并利用化学发光检测仪检测发光强度的步骤均可参照常規方法实施,所用的设备以及装置也是常规的。其中,碱性磷酸酶化学发光底物溶液为含一定浓度二氧杂环乙烷类化合物的浓度 0.6mmol/L, pH9.35 的 Tris 缓冲液。

[0033] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0034] 1、采用本发明的试剂盒以及结合传统的化学发光免疫检测方法和设备就可以实现促卵泡生成激素准确,精密的检测;

[0035] 2、本发明的试剂盒中的第一试剂、磁分离试剂可以通过成熟、稳定的制备工艺制备得到,生产成本低,且由于制备工艺的稳定性,试剂盒分析批间差小,检测的分析间精密度提高;

[0036] 3、本发明的试剂盒中的第二试剂的制备方法,能够有效将促卵泡生成激素抗体与碱性磷酸酶偶联,偶联效率高,进一步降低试剂盒的成本低和确保试剂盒的检测效果。

[0037] 4、本发明的检测方法检测的准确度好,精密度高,灵敏度高,检测范围宽,样品无序预稀释,操作简单省时。与采用进口试剂盒进行检测的方法相比,本发明的检测方法在成本上具有显著的优势。

### 附图说明

[0038] 图 1 为采用本发明促卵泡生成激素化学发光定量检测试剂盒的测试校准品检测相对发光值的标准曲线,横坐标为浓度,单位为 ng/mL,纵坐标为发光值。

[0039] 图 2 为为本发明灵敏度测试中 A, B 点连点拟合曲线。

[0040] 图 3 为本发明的促卵泡生成激素化学发光定量检测试剂盒的血清检测结果与贝克曼公司试剂盒检测结果的相关性,横坐标 x 为实施例 1 制备得的试剂盒样本测值,浓度单位为 mIU/mL,纵坐标 y 为贝克曼公司试剂盒样本测值,浓度单位为 mIU/mL。

### 具体实施方式

[0041] 下面结合附图对本发明的具体实施方式进行详细说明。

[0042] 实施例 1 磁分离试剂的制备。

[0043] 材料与仪器

[0044] 磁微粒的悬浮液:磁微粒含量 5wt%,含羧基(COOH)活性基团,每克(g)磁微粒(干重)羧基含量不低于 0.4 毫摩尔(mmol),具有超顺磁性,直径在 0.5-2 μm 之间。

[0045] 抗 FITC 抗体:可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,纯度应超过 90%,稀释效价应超过 1:100 万。

[0046] 2-吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS 和其他试剂应达到化学纯。

[0047] 操作步骤

[0048] 1、取 100mg 磁微粒的悬浮液,磁分离去上清,用 0.05mol/L, pH4.5-5MES 缓冲液 10ml 重悬;

[0049] 2、加入 2-4mg 的抗 FITC 抗体,室温混悬 30-60min;

[0050] 3、加入 0.5-1ml,新鲜配制的 10mg/ml,EDC 水溶液,室温混悬 2-12h;

[0051] 4、磁分离,去上清,用含质量百分比为 0.5%牛血清白蛋白(BSA)pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液重悬到 1mg/ml, pH8.0,完成磁分离试剂的制备。

[0052] 实施例 2 第一试剂的制备。

[0053] 材料与仪器

[0054] 抗 FSH 单克隆抗体,纯度超过 95wt%,浓度超过 2mg/ml,以磷酸盐缓冲液保存;

[0055] 异硫氰酸荧光素(FITC),碳酸钠等试剂应达到化学纯,

- [0056] G-25 凝胶纯化柱采购自 GE 公司。
- [0057] 操作步骤
- [0058] 1、用 0.1-0.2mol/L pH9.0-10.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/ml 的 FITC 溶液；
- [0059] 2、按照抗 FSH 抗体与 FITC 分子摩尔数比 1:20 比例在抗体溶液中加入 FITC 溶液，混合均匀，室温静置超过 12h；
- [0060] 3、用 G-25 凝胶柱将抗体 FITC 连接物与游离 FITC 分离，获得偶联有 FITC 分子的抗体浓溶液，将该溶液用含质量百分比为 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5-1 μg/ml, pH 为 7-9, 即为第一试剂。
- [0061] 实施例 3 第二试剂的制备。
- [0062] 材料与仪器
- [0063] 抗 FSH 单克隆抗体, 纯度超过 95%, 浓度超过 1mg/ml, 以磷酸盐缓冲液保存；
- [0064] 碱性磷酸酶纯度约为 99%, 比活性约为 1500U/mg, 浓度为 10mg/ml；
- [0065] 偶联剂琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物(SMCC), 2-亚氨基四氢噻吩(2-IT) 购自 THERMO 公司, TRIS 等化学试剂应达到化学纯；
- [0066] AKTA-purifier 蛋白纯化仪和 Superdex200 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。
- [0067] 操作步骤
- [0068] 1、取 1mg 抗 FSH 抗体, 加入 10mg/ml 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μl, 室温静置 20min, 加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μl, 室温静置 5min, 用 G-25 凝胶柱除盐, 收集活化后抗体, 2-8℃ 保存备用；
- [0069] 2、取 1.5mg 的 ALP 溶液, 加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 10-20 μl, 室温静置 30min, 用 G-25 凝胶柱除盐, 收集活化后抗体, 2-8℃ 保存备用；
- [0070] 3、将上述活化的抗 FSH 抗体与活化的 ALP 混合, 2-8℃ 条件下静置 12-24h, 用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物, 获得连接物浓溶液, 2-8℃ 保存备用。
- [0071] 4、将抗体-ALP 连接物浓溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5-1 μg/ml, pH7-9, 即为第二试剂。
- [0072] 实施例 4 用于促卵泡生成激素定量检测的试剂盒
- [0073] 该试剂盒包括：
- [0074] 按照实施例 1 方法制备的磁力分离试剂 50ml；
- [0075] 按照实施例 2 方法制备的第一试剂(浓度为 0.75 μg/ml), 50ml；
- [0076] 按照实施例 3 方法制备的第二试剂(浓度为 0.75 μg/ml), 50ml。
- [0077] 实施例 5 用于促卵泡生成激素定量检测的试剂盒
- [0078] 该试剂盒包括：
- [0079] 按照实施例 1 方法制备的磁力分离试剂 50ml；
- [0080] 按照实施例 2 方法制备的第一试剂(浓度为 0.5 μg/ml), 50ml；
- [0081] 按照实施例 3 方法制备的第二试剂(浓度为 0.5 μg/ml), 50ml。
- [0082] 实施例 6 采取实施例 4 的试剂盒进行促卵泡生成激素的定量检测
- [0083] (一) 检测实施
- [0084] 下述检测步骤由全自动化学发光分析仪自动完成, 也可手工操作完成。
- [0085] 1、在检测管中加入 20 μl 待测样本(血清)原液, 然后加入 50 μl 第一试剂和 50 μl

第二试剂混匀,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下温育 15min ;

[0086] 2、加入  $50 \mu\text{l}$  磁分离试剂, 混匀,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下温育 5min ;

[0087] 3、使磁微粒在磁场中沉降, 去除上清, 加入  $300 \mu\text{l}$  的清洗液, 去除磁场, 震荡使磁微粒充分混悬。重复此操作, 共操作 3 次。

[0088] 4、将磁微粒在磁场中沉降, 去除上清, 加入  $100 \mu\text{l}$  的碱性磷酸酶化学发光底物溶液(北京阿匹斯生物技术有限公司 APCL- I), 去除磁场, 在 5 分钟内用发光检测仪进行检测。

[0089] (二) 绘制校准品标准曲线

[0090] 校准品标准曲线参见图 1。

[0091] (三) 灵敏度评价

[0092] 检测“0”浓度样本, 重复检测 20 次, 计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD), 并计算  $M+2SD$  值, 根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程, 将  $M+2SD$  值带入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为最低检测限。本方法的灵敏度不大于  $0.3\text{mIU/mL}$ 。其中:A 点的发光值参见表 1 :

[0093] 表 1

[0094]

FSH-STD-A (RLU)			
1066	1069	1012	1005
935	938	984	910
1090	930	1022	1082
1013	991	978	969
996	1049	926	1063

[0095] A 点发光均值  $X=1001$

[0096]  $SD=55.9$

[0097]  $X+2SD=1112.8$

[0098] (2) B 点发光值

[0099] 表 2

[0100]

FSH-STD-B (RLU)
8856
8872

[0101] B 点发光均值  $X=8864$

[0102] A, B 点连点拟合曲线参见图 2。灵敏度  $=0.014\text{mIU/mL}$

[0103] (四) 精密度评价

[0104] (1) 分析内精密度

[0105] 将实施例 4 中制备的试剂盒一批, 分别测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔

平行测定,得出批内变异系数为 3.83% ~ 6.75%。

[0106] 表 3 分析内精密度测试

[0107]

测定血清浓度(mI U/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
5	10	6.75
20	10	3.83
80	10	3.95

[0108]

[0109] (2) 分析间精密度

[0110] 将实施例 4 中制备的试剂盒取三批,每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清,10 孔平行测定。每份血清得到 30 个浓度测值,统计分析间变异系数为 5.35% ~ 7.82%。

[0111] 表 4 分析间精密度测试

[0112]

测定血清浓度(mI U/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
5	30	7.82
20	30	5.35
80	30	5.75

[0113] (五) 准确度评价

[0114] 在 2 例混合血清样本中添加不同量人 FSH 标准品,形成 3 个浓度水平的血清添加样本,添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度,按下述公式计算回收率。本方法血清基质回收率在 90-110% 之间。数据参见表 5。

[0115] 
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0116] R :回收率 ;

[0117] V :加入标准溶液的体积 ;

[0118] V0 :人源样品的体积 ;

[0119] C :人源样品加入标准溶液后的检测浓度 ;

[0120] C0 :人源样品的检测浓度 ;

[0121] Cs :标准溶液的浓度。

[0122] 表 5. 准确度评价——添加回收实验数据

[0123]

样品值	添加浓度 (mIU /mL L)	添加后终浓 (mIU /mL)	测定平均值 (mIU /mL L)	回收率 (%)
7.69	10	17.69	17.98	102.9%
	40	47.69	46.66	97.4%
	120	127.69	125.14	97.9%
12.36	10	22.36	22.20	98.4%
	40	52.36	51.20	97.1%
	120	132.36	132.95	100.5%

[0124]

[0125] (六) 试剂盒特异性评价

[0126] 对实施例 4 的试剂盒特异性检验是选取与 FSH 有类似结构的促黄体生成激素 (LH)、促甲状腺激素 (TSH)、绒毛膜促性腺激素 (HCG), 配制成大于生理浓度的样本, 以本方法进行测定。结果见表 6, 本法与 LH、TSH、HCG 无交叉反应。

[0127] 表 6 特异性实验

[0128]

交叉反应物	实验浓度 (mIU/ml)	FSH测定浓度 (mIU /mL)
促黄体生成激素 (LH)	500	< 0.3
促甲状腺激素 (TSH)	400	< 0.3
绒毛膜促性腺激素 (HCG)	400	< 0.3

[0129] (七) 相关性评价

[0130] 用实施例 4 制备得的试剂盒和贝克曼公司的化学发光法试剂盒对 100 份人血清样品同时进行检测。其检测见过附图 3, 以本发明方法的测的血清 FSH 浓度为横坐标, 以贝克曼试剂盒测定的结果为纵坐标作回归分析, 相关方程为:  $y = -0.1215 + 1.0354x$ , 相关系数为: 0.9850。经统计学处理结果表明, 本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0131] (八) 热稳定性评价

[0132] 对实施例 4 的试剂盒分别进行 4℃ 12 个月和 37℃ 7 天的稳定性实验, 结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内, 试剂盒有效期可达 12 个月。

[0133] 实施例 7 采取实施例 5 的试剂盒进行游离甲状腺素的定量检测

[0134] (1) 检测步骤: 同实施例 6。

[0135] (2) 灵敏度评价: 该实施例中的试剂盒灵敏度为 0.014mIU/mL, 达到国内外同类试剂领先水平, 较好的满足临床应用。

[0136] (3) 精密度评价: 该实施例中的试剂盒分析内和分析见精密度均小于 10%, 批间差

小。

[0137] (4)准确性评价：该实施例中的试剂盒血清添加回收率在 90-110% 之间，临床应用测值准确性可靠。

[0138] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围，凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

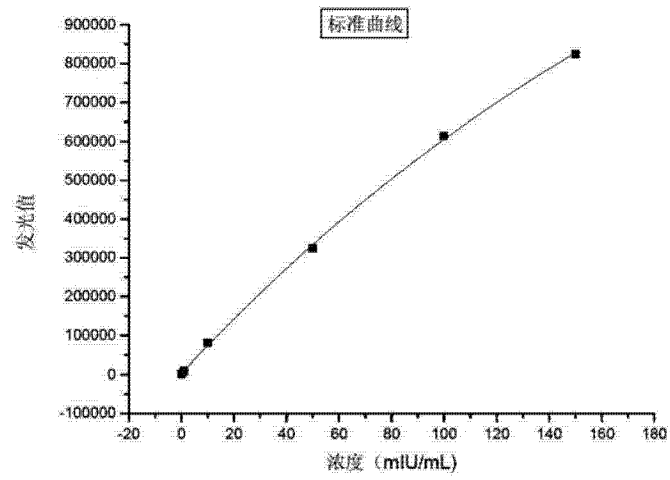


图 1

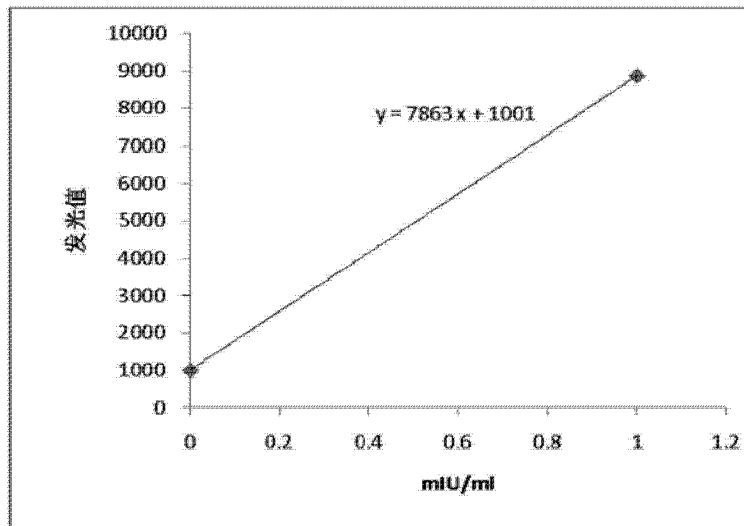


图 2

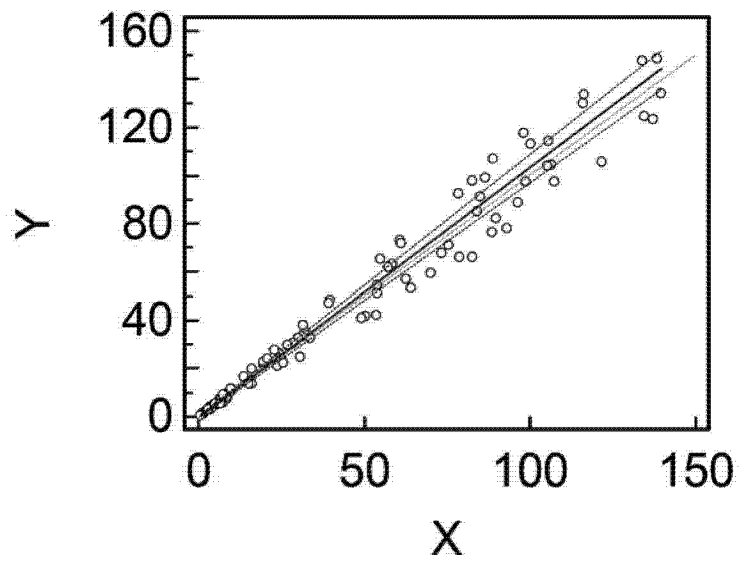


图 3

专利名称(译)	一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103048473A</a>	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210549841.9	申请日	2012-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	于大为 程晓蕾		
发明人	于大为 程晓蕾		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/533		
代理人(译)	汪青		
其他公开文献	CN103048473B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种促卵泡生成激素的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法，试剂盒包括：第一试剂：含异硫氰酸荧光素标记的促卵泡生成激素抗体的溶液；第二试剂：含碱性磷酸酶标记的促卵泡生成激素抗体的溶液；磁分离试剂：含包被着异硫氰酸荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法和采用该试剂进行促卵泡生成激素的检测方法。相对于现有技术，本发明准确性更好、精密度更高、灵敏度更高，而且待测样本无需预稀释，操作简单省时，检测范围宽，并且成本低。

FSH-STD-A (RLU)			
1066	1069	1012	1005
935	938	984	910
1090	930	1022	1082
1013	991	978	969
996	1049	926	1063