



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109001471 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201810879352.7

(22)申请日 2018.08.03

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路  
3333号

(72)发明人 孙天旭 李婷 高威 孙成艳  
何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理  
有限公司 22214

代理人 张伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

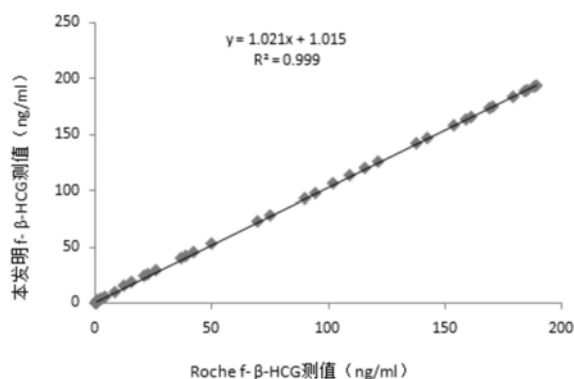
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

### (54)发明名称

游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法

### (57)摘要

本发明涉及一种游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法,涉及免疫分析医学技术领域。本发明的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒包括校准品、R1试剂、R2试剂、R3试剂和质控品。与现有酶促发光体系相比,本发明不需要酶标记,不会引入外来大分子影响抗原抗体结合;不需要发光底物,减少反应流程;对环境温度变化不敏感。本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒具有灵敏度高,线性范围宽,检测时间短,稳定性好等特点,缩短了检测时间,为急诊患者节省宝贵时间,可为临床诊断提供更为灵敏、特异、快速的体外诊断试剂。



1. 一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒,其特征在于,包括校准品、R1试剂、R2试剂、R3试剂和质控品;

所述R1试剂为包被有链霉亲和素的磁珠溶液;

所述R2试剂为用HEPES缓冲液稀释的吡啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液;

所述R3试剂为用HEPES缓冲液稀释的生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液。

2. 根据权利要求1所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

3. 根据权利要求1所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述吡啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液中的游离 $\beta$ -HCG抗体和吡啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

4. 根据权利要求1所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液中的游离 $\beta$ -HCG抗体和生物素的摩尔比1:3-1:15。

5. 一种权利要求1所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 以纯品 $\beta$ -HCG抗原配制校准品;

2) 以纯品 $\beta$ -HCG抗原配制质控品;

3) R1试剂制备:

用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释后得到包被有链霉亲和素的磁珠溶液,即为R1试剂;

4) R2试剂制备:

使用超滤离心管将游离 $\beta$ -HCG抗体缓冲液置换为PBS,加入吡啶酯,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记游离 $\beta$ -HCG抗体,将收集到的吡啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体用HEPES缓冲液稀释,即为R2试剂;

5) R3试剂:

使用超滤离心管将游离 $\beta$ -HCG抗体缓冲液置换为PBS,加入生物素,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记游离 $\beta$ -HCG抗体,将收集到的生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体用HEPES缓冲液稀释,即为R3试剂;

6) 分装上述校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂,组装为成品。

6. 根据权利要求5所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤3)中配制的包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

7. 根据权利要求5所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤4)中所述游离 $\beta$ -HCG抗体与所述吡啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

8. 根据权利要求5所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤5)中所述游离 $\beta$ -HCG抗体与所述生物素的摩尔比为1:3-1:15。

9. 根据权利要求5所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤4)和步骤5)中所述的HEPES缓冲液的pH值均为6-8,所述的R2和R3试剂的浓度均为1-3 $\mu$ g/mL。

10. 一种权利要求1-4任意一项所述的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

将待测样本与R2试剂孵育5min,加入R3及R1试剂继续孵育5min,洗涤,加入激发液记录相对发光强度。

## 游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学技术领域,具体涉及一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法。

### 背景技术

[0002] 近年来标记免疫分析技术的研究和应用发展迅速,已广泛应用于生物医学基础理论研究以及临床体外诊断等领域。主要技术有:放射免疫技术、酶免疫分析和化学发光免疫分析技术。其中放射免疫技术及酶免疫分析技术存在灵敏度低,线性范围窄,且自动化程度低等缺点。化学发光是建立在酶联免疫分析技术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、稳定性好、自动化程度高等优势。基于以上优势,化学发光免疫分析技术成为目前应用最为广泛的免疫分析技术。

[0003] 化学发光免疫分析技术是用抗原抗体结合的原理、不同的发光底物进行分析的检测方法。根据发光底物的不同可分为酶促间接化学发光、电化学发光及直接化学发光。其中,酶促间接化学发光通常使用酶标记抗体,抗原抗体形成复合物后加入发光底物。该方法化学发光底物为辉光型持续发光,发光信号易受影响。用于标记的酶易受样本中重金属离子及温度影响,同时试剂稳定性受到酶的稳定性的制约。由于标记物为蛋白质大分子物质,标记物的增加提高了抗原抗体间反应的空间位阻效应。

[0004] 电化学发光免疫分析是以电化学发光剂三联吡啶钌标记抗体,以三丙胺为电子供体在电场中因电子转移而发生特异性化学发光反应。包括电化学和化学发光两个过程。该方法对环境因素和其他非特异反应过于敏感,对于血清样本中的金属离子及EDTA等抗凝剂、防腐剂的金属螯合物过于敏感。同时反应副产品的沉积也存在潜在的干扰。该方法虽然灵敏度高但对于环境及仪器的要求极高,提高了试剂检测成本。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决现有化学发光免疫分析技术所用化学发光试剂中存在的对环境敏感、易受干扰、灵敏度差、检测时间长的技术问题,提供一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法。本发明的检测试剂盒具有灵敏度高,线性范围广,稳定性好,检测时间短的优点,适于广泛的推广。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案具体如下:

[0007] 一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒,包括校准品、R1试剂、R2试剂、R3试剂和质控品;

[0008] 所述R1试剂为包被有链霉亲和素的磁珠溶液;

[0009] 所述R2试剂为用HEPES缓冲液稀释的吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液;

[0010] 所述R3试剂为用HEPES缓冲液稀释的生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液。

[0011] 在上述技术方案中,所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为 0.05%—

0.1%。

[0012] 在上述技术方案中,所述吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液中的游离 $\beta$ -HCG 抗体和吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

[0013] 在上述技术方案中,所述生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液中的游离 $\beta$ -HCG 抗体和生物素的摩尔比1:3-1:15。

[0014] 一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0015] 1) 以纯品 $\beta$ -HCG抗原配制校准品;

[0016] 2) 以纯品 $\beta$ -HCG抗原配制质控品;

[0017] 3) R1试剂制备:

[0018] 用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释后得到包被有链霉亲和素的磁珠溶液,即为R1试剂;

[0019] 4) R2试剂制备:

[0020] 使用超滤离心管将游离 $\beta$ -HCG抗体缓冲液置换为PBS,加入吖啶酯,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记游离 $\beta$ -HCG抗体,将收集到的吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体用HEPES缓冲液稀释,即为R2试剂;

[0021] 5) R3试剂:

[0022] 使用超滤离心管将游离 $\beta$ -HCG抗体缓冲液置换为PBS,加入生物素,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记游离 $\beta$ -HCG抗体,将收集到的生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体用HEPES缓冲液稀释,即为R3试剂;

[0023] 6) 分装上述校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂,组装为成品。

[0024] 在上述技术方案中,步骤3)中配制的包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。

[0025] 在上述技术方案中,步骤4)中所述游离 $\beta$ -HCG抗体与所述吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。

[0026] 在上述技术方案中,步骤5)中所述游离 $\beta$ -HCG抗体与所述生物素的摩尔比为1:3-1:15。

[0027] 在上述技术方案中,步骤4)和步骤5)中所述的HEPES缓冲液的pH值均为6-8,所述的R2和R3试剂的浓度均为1-3 $\mu$ g/mL。

[0028] 一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0029] 将待测样本与R2试剂孵育5min,加入R3及R1试剂继续孵育5min,洗涤,加入激发液记录相对发光强度。

[0030] 本发明的有益效果是:

[0031] 1、本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒为吖啶酯化学发光体系,与现有酶促发光体系相比,不需要酶标记,不会引入外来大分子影响抗原抗体结合;不需要发光底物,减少反应流程;对环境温度变化不敏感。

[0032] 2、本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒使用包被有链霉亲和素的磁珠,吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体和生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体三种试

剂与磁珠直接偶联抗体；与吖啶酯标记抗体的两试剂相比，抗体与磁珠直接偶联，二者为大分子物质，进行偶联时大分子间的空间位阻效应可能导致抗体与磁珠表面偶联不均匀，无法控制磁珠与抗体偶联的均一性，导致试剂批间差控制难。而本发明所用的链霉亲和素为小分子物质，偶联时不存在位阻效应，可均匀连接至磁珠表面，同时链霉亲和素与生物素结合，消除抗体与磁珠的位阻效应，使得抗体可均匀连接至磁珠表面，易于控制试剂批间差。链霉亲和素与生物素结合比例1:4，1分子链霉亲和素可结合4分子生物素，即磁珠上一分子的链霉亲和素可结合4分子的生物标记抗体，可有效放大反应信号，提高试剂灵敏度。

[0033] 3、本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒具有灵敏度高，线性范围宽，检测时间短，稳定性好等特点，缩短了检测时间，为急诊患者节省宝贵时间，可为临床诊断提供更为灵敏、特异、快速的体外诊断试剂。

[0034] 4、本发明对游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的反应模式及条件进行了探索。通过不同的反应模式及反应时间对比实验，最终确定了本发明的试剂盒采用双抗体夹心一步法两步孵育反应模式，并最终确定了试剂孵育时间为10min，缩短了检测时间，提高了检测效率。

## 附图说明

[0035] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0036] 图1为采用本发明游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光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。

[0037] 图2为本发明游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的血清检测结果与Roche公司试剂盒检测结果的相关性，横坐标X为实施例1制备的试剂盒样本值，浓度为ng/mL，纵坐标y为Roche公司试剂盒样本测值，浓度单位为 ng/mL。

## 具体实施方式

[0038] 本发明的发明思想为：基于吖啶酯的化学发光体系是直接化学发光最常见的体系。吖啶酯化学发光体系不需要催化剂，物质稳定性高；闪光型发光，发光用时短，能完全捕捉反应产生的光量子数，检测重复性好。吖啶酯为人工合成物质，带有甲基，增加的试剂的稳定性和有效期同时对样本中干扰物质的抗干扰能力强，并且对试剂pH及环境温度变化不敏感。吖啶酯发光仅需碱性条件下的过氧化氢反应即可产生光量子数。综合化学发光各发光体系的对比，吖啶酯化学发光体系具有稳定性好，灵敏度高，抗干扰能力强、成本低等优点，更易推广应用。本发明使用吖啶酯化学发光体系，提供了一种包括校准品、吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体、包被有链霉亲和素的磁珠、生物素标记的游离 $\beta$ -HCG 抗体和质控品的试剂盒；该试剂盒具有灵敏度高，线性范围广，稳定性好，检测时间短的优点。本发明的试剂盒测定原理是双抗体夹心法。样本与吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体R2溶液共同孵育5min，加入生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体R3溶液与包被有链霉亲和素的磁珠R1共同孵育5min，样本与吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体及生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体形成免疫复合物，通过生物素与链霉亲和素结合到磁珠。通过磁分离器分离免疫复合物，清洗液洗去未结合抗体。通过酸碱激发液激发吖啶酯发光，记录相对发光强度 (RLU)，在线性范围内，样本中f- $\beta$ -HCG的含量与相对发光强度成正比。

[0039] 本发明提供一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒,包括校准品、R1试剂、R2试剂、R3试剂和质控品;所述R1试剂为包被有链霉亲和素的磁珠溶液;所述R2试剂为用HEPES缓冲液稀释后的吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液;所述R3试剂为用HEPES缓冲液稀释后的生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液。优选所述包被有链霉亲和素的磁珠溶液的磁珠浓度为0.05%-0.1%。优选所述吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液中的游离 $\beta$ -HCG抗体和吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15。优选所述生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体溶液中的游离 $\beta$ -HCG抗体和生物素的摩尔比1:3-1:15。

[0040] 本发明提供一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0041] 1) 以纯品 $\beta$ -HCG抗原配制校准品;

[0042] 2) 以纯品 $\beta$ -HCG抗原配制质控品;

[0043] 3) R1试剂制备:

[0044] 用磁珠稀释缓冲液将链霉亲和素磁珠稀释后得到磁珠浓度为0.05%-0.1%的包被有链霉亲和素的磁珠溶液,即为R1试剂;

[0045] 4) R2试剂制备:

[0046] 使用超滤离心管将游离 $\beta$ -HCG抗体缓冲液置换为PBS,加入吖啶酯,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记游离 $\beta$ -HCG抗体,将收集到的吖啶酯标记的游离 $\beta$ -HCG抗体用pH值为6-8的HEPES缓冲液稀释至浓度为1-3 $\mu$ g/mL,即为R2试剂;所述游离 $\beta$ -HCG抗体与所述吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15;

[0047] 5) R3试剂:

[0048] 使用超滤离心管将游离 $\beta$ -HCG抗体缓冲液置换为PBS,加入生物素,充分混匀,室温放置2-4小时后,AKTA蛋白纯化仪纯化标记游离 $\beta$ -HCG抗体,将收集到的生物素标记的游离 $\beta$ -HCG抗体用pH值为6-8的HEPES缓冲液稀释至浓度为1-3 $\mu$ g/mL,即为R3试剂;所述游离 $\beta$ -HCG抗体与所述生物素的摩尔比为1:3-1:15;

[0049] 6) 分装上述校准品、质控品、R1试剂、R2试剂和R3试剂,组装为成品。

[0050] 本发明还提供一种游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0051] 将待测样本与R2试剂孵育5min,加入R3及R1试剂继续孵育5min,洗涤,加入激发液记录相对发光强度,在一定范围内,游离 $\beta$ -HCG抗体的含量与相对发光强度成正比。

[0052] 本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒采用一步法双抗体夹心的反应模式,定量测定人体血清中游离 $\beta$ -HCG的含量,确保的检测的灵敏度。本发明的各项检测指标均达到同类进口试剂盒的分析水平。

[0053] 本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚单位化学发光检测试剂盒使用吖啶酯化学发光体系,稳定性好,特异性强,灵敏度高,线性范围广,检测时间短为临床诊断提供更为特异、稳定、快速、可靠的检测手段。

[0054] 实施例1制备本发明的f- $\beta$ -HCG化学发光检测试剂盒

[0055] 一、校准品的制备

[0056] 用含有20%酪蛋白的100mM Mopso缓冲液将f- $\beta$ -HCG稀释成校准品,分装成0ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、110ng/mL、220ng/mL。

[0057] 二、质控品的制备。

[0058] 用含有20%酪蛋白的100mM Mopso缓冲液将f-β-HCG稀释成质控品,分装成浓度为0.1ng/mL、100ng/mL。

[0059] 三、包被链霉亲和素磁珠的R1溶液配制

[0060] 用磁珠稀释缓冲液将亲和素磁珠稀释至磁珠浓度为0.1%,4℃保存。

[0061] 四、吖啶酯标记的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体R2溶液的制备

[0062] 将游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内,加入500μL的100mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为吖啶酯标记缓冲液。收取置换后溶液,按抗体:吖啶酯=1:3摩尔比加入吖啶酯,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对吖啶酯标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%酪蛋白,pH为7.0的100mM HEPES缓冲液,将纯化后抗体配制为1μg/mL的R2溶液,4℃保存。

[0063] 五、生物素标记的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体R3溶液的制备

[0064] 将游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内,加入500μL的100mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液,按抗体:生物素=1:3摩尔比加入生物素,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%酪蛋白,pH为7.0的100mM HEPES缓冲液缓冲液将纯化后抗体配制为1μg/mL的R3溶液,4℃保存。

[0065] 六、半成品及成品组成

[0066] 上述步骤所得产品分装即为半成品。抽出三份经过特异性、精密性、灵敏度、稳定性检定合格后,组装成为游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光试剂盒。

[0067] 七、按照本领域常规的制造及检定规程对制备试剂盒进行检定,结果见下

[0068] 表1

[0069]

检验项目	检验标准	检验结果
灵敏度	≤0.5ng/mL	0.2ng/mL
特异性	与其类似激素的交叉反应率≤0.01%	<0.002%
精密度	≤15%	8%
准确性	相对偏差<±10%	5.2%
稳定性	各试剂组分置 37℃放置 14 天	符合标准

[0070] 综上,在本发明的研究过程中,本发明首先对所用的原材料进行了筛选及质量控制,包括抗体的浓度、纯度、亲和力的研究,吖啶酯及生物素标记后抗体活性。然后对吖啶酯及生物素标记体系进行了研究,使用不同标记比例及标记缓冲液进行实验,通过反复实验及对比实验,最终找到了方法简便、产率高、成本低、质量可靠的标记方法。

[0071] 此外,本发明还对试剂盒的反应模式及条件进行了探索。通过不同的反应模式及反应时间对比实验,最终确定了本试剂盒采用双抗体夹心一步法两步孵育反应模式,并最终确定了试剂孵育时间为10min,缩短了检测时间,提高了检测效率。

[0072] 实施例2本发明的f-β-HCG化学发光检测试剂盒的方法学检定

[0073] 按照本领域中行业标准及检定规程对实施例1中制备的试剂盒进行检定,结果如下:

[0074] 1. 试剂盒线性范围测定

[0075] 将实施例1中制备的试剂盒其中1批,测定线性范围样本0ng/mL、0.2ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、110ng/mL、220ng/mL,得出线性范围为0.2-200ng/mL,相关系数 $R^2=0.9999$ ,参见图1和表2。

[0076] 表2试剂盒线性范围测定

[0077]

测定校准品浓度 (ng/mL)	相对光强度 (RLU)
0	328
0.2	899
5	22475
20	91324
110	567282
220	1162946

[0078] 2. 试剂盒灵敏度的测定

[0079] 将实施例1中制备的试剂盒其中1批,测定20次零浓度样本,计算平均值 (M) 及标准差 (SD),得出 $M+2SD$ ,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 $M+2SD$ 的RLU带入方程,得出相应浓度值即为试剂盒灵敏度0.012ng/mL。

[0080] 表3第一点发光值

[0081]

空白样本发光值				
338	368	366	342	347
331	357	354	364	358
354	372	338	384	344

[0082]

349	352	368	356	331
-----	-----	-----	-----	-----

[0083] 第一点发光均值 $M=354$ , $SD=14.10$ , $M+2SD=382$

[0084] 表4第二点发光值

[0085]

第二点校准发光值		
22587	22381	22457

[0086] 第一点与第二点连线拟合曲线,计算的灵敏度=0.012ng/mL。

[0087] 3. 试剂盒精密度测试

[0088] (1) 分析内精密度

[0089] 将实施例1中制备的试剂盒其中1批,分别测定低值及高值国家标准物质,10孔平行测试,得出批内变异系数为3.52%-4.35%。

[0090] 表5

[0091]

测定标准物质浓度 (ng/mL)	测定次数	变异系数 CV%
9.69	10	4.35
100.24	10	3.52

[0092] (1) 分析间精密度

[0093] 将实施例1中制备的试剂盒其中3批,分别测定低值及高值国家标准物质,10孔平行测试,得出批内变异系数为5.29%-7.68%。

[0094] 表6

[0095]

测定标准物质浓度 (ng/mL)	测定次数	变异系数 CV%
9.69	30	7.68
100.24	30	5.29

[0096] 4. 试剂盒准确度测定

[0097] 将实施例1中制备的试剂盒其中1批,测定浓度为9.69ng/mL及100.24ng/mL 的标准物质,相对偏差<10%,测试结果如表7。

[0098] 表7

[0099]

测定标准物质浓度	测定结果	相对偏差%
----------	------	-------

[0100]

(ng/mL)		
9.69	10.16	4.85
100.24	96.13	4.10

[0101] 5. 试剂盒特异性实验

[0102] 表8

[0103]

交叉反应物	实验浓度 (mIU/mL)	f-β-HCG 测定浓度 (ng/mL)	交叉反应率 (%)
促甲状腺素(TSH)	600	<0.012	<0.002%
促卵泡生成素(FSH)	600	<0.012	<0.002%
黄体生成素(LH)	600	<0.012	<0.002%
人绒毛促性腺激素(HCG)	1000	<0.012	<0.001%

[0104] 6. 试剂盒稳定性实验

[0105] 将实施例1中制备的试剂盒分别进行4℃及37℃14天稳定性实验,结果表明试剂盒

标准品发光强度的变化、精密度、准确性等指标均在正常范围内,试剂盒有效期可达24个月。

[0106] 经过大量重复性实验,本发明的试剂盒指标如下:

[0107] 检测范围:0-220ng/mL;

[0108] 灵敏度:最低检测限不高于0.012ng/mL;

[0109] 精密度:小于8%;

[0110] 准确度:测值标准物质偏差小于10%。

[0111] 特异性:与促甲状腺素(TSH)、促卵泡生成素(FSH)、黄体生成素(LH)、人绒毛促性腺激素(HCG),交叉反应小于0.002%。

[0112] 实施例3本发明的试剂盒与国外试剂盒临床样本测值比对

[0113] 用实施例1中制备的试剂盒与Roche公司试剂盒同时检测临床血清。其检测结果见图2。以Roche试剂盒测得的结果作为横坐标X,浓度为ng/mL,以本发明测定的结果作为纵坐标y,浓度单位为ng/mL,作回归方程,相关方程为:  $y=1.021x+1.015$ ,相关系数为0.999。经统计学处理结果表明,本方法与国外试剂盒临床相关性良好。

[0114] 实施例4本发明试剂盒在不同检测温度下试剂稳定性

[0115] 用实施例1中制备的试剂盒测定0ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、110ng/mL、220ng/mL校准品在20℃、25℃、30℃、35℃、40℃条件下发光强度,验证吡啶酯发光体系对环境温度适应性。检测结果如下:

[0116] 表9

[0117]

	检测校准品浓度 (ng/mL)					
检测温度	0	5	20	50	110	220
20℃	328	22475	91324	248310	567282	1162946
25℃	308	20941	83841	238412	519871	1085321
30℃	311	21875	85946	241354	558462	1158932
35℃	352	22621	96752	221485	587921	1102365
40℃	344	24754	94128	229874	599987	1258132
45℃	324	21420	90384	235187	562015	1099874
相对偏差 (CV%)	5.35%	5.98%	5.37%	3.95%	4.90%	5.63%

[0118] 在不同检测环境条件下,吡啶酯发光强度偏差5%,表明吡啶酯发光体系对于环境温度要求低,能够适应广泛的检测温度。

[0119] 实施例5制备本发明的f-β-HCG化学发光检测试剂盒

[0120] 一、校准品的制备

[0121] 用含有20%酪蛋白的100mM Mopso缓冲液将f-β-HCG稀释成校准品,分装成0ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、110ng/mL、220ng/mL。

[0122] 二、质控品的制备。

[0123] 用含有20%酪蛋白的100mM Mopso缓冲液将f-β-HCG稀释成质控品,分装成浓度为0.1ng/mL、100ng/mL。

[0124] 三、包被链霉亲和素磁珠的R1溶液配制

[0125] 用磁珠稀释缓冲液将亲和素磁珠稀释至磁珠浓度为0.05%，4℃保存。

[0126] 四、吖啶酯标记的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体R2溶液的制备

[0127] 将游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内，加入500μL的100mM PBS缓冲液，10000rpm离心10min，重复3次，将抗体内缓冲液置换为吖啶酯标记缓冲液。收取置换后溶液，按抗体：吖啶酯=1:15摩尔比加入吖啶酯，静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对吖啶酯标记抗体溶液进行纯化，收取纯化后溶液，用含有1%酪蛋白，pH为7.0的100mM HEPES缓冲液，将纯化后抗体配制为3μg/mL的R2溶液，4℃保存。

[0128] 五、生物素标记的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体R3溶液的制备

[0129] 将游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内，加入500μL的100mM PBS缓冲液，10000rpm离心10min，重复3次，将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液，按抗体：生物素=1:15摩尔比加入生物素，静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化，收取纯化后溶液，用含有1%酪蛋白，pH为7.0的100mM HEPES缓冲液缓冲液将纯化后抗体配制为3μg/mL的R3溶液，4℃保存。

[0130] 六、半成品及成品组成

[0131] 上述步骤所得产品分装即为半成品。抽出三份经过特异性、精密性、灵敏度、稳定性检定合格后，组装成为游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光试剂盒。

[0132] 本实施例制备的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒具有灵敏度高，线性范围宽，检测时间短，稳定性好等特点，缩短了检测时间，为急诊患者节省宝贵时间，可为临床诊断提供更为灵敏、特异、快速的体外诊断试剂。

[0133] 显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

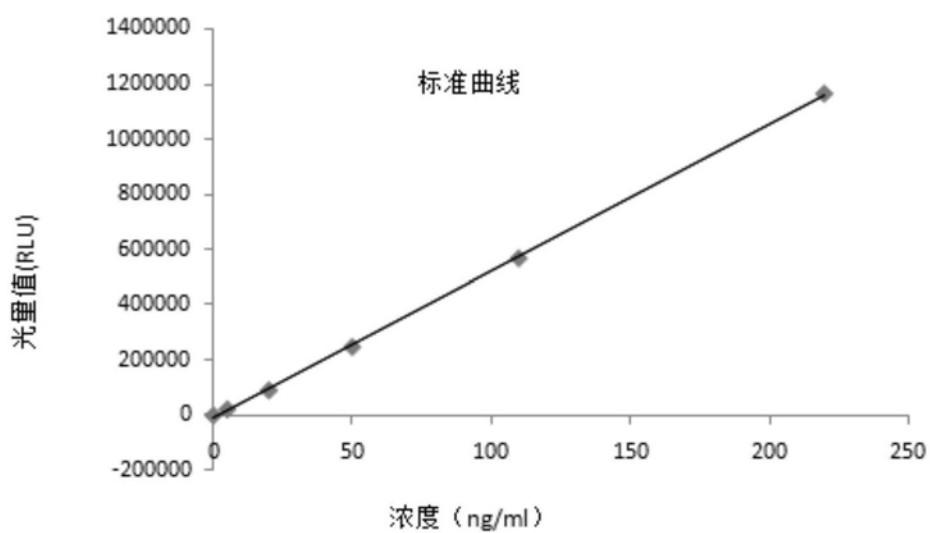


图1

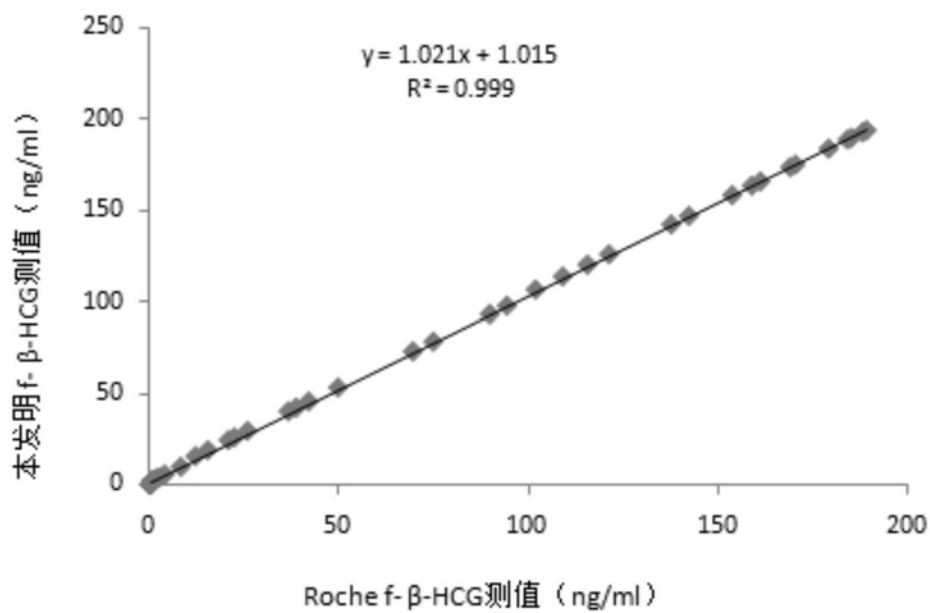


图2

专利名称(译)	游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109001471A</a>	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201810879352.7	申请日	2018-08-03
[标]发明人	孙天旭 李婷 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	孙天旭 李婷 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/58 G01N33/532		
代理人(译)	张伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒及其制备方法和使用方法，涉及免疫分析医学技术领域。本发明的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒包括校准品、R1试剂、R2试剂、R3试剂和质控品。与现有酶促发光体系相比，本发明不需要酶标记，不会引入外来大分子影响抗原抗体结合；不需要发光底物，减少反应流程；对环境温度变化不敏感。本发明提供的游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位化学发光检测试剂盒具有灵敏度高，线性范围宽，检测时间短，稳定性好等特点，缩短了检测时间，为急诊患者节省宝贵时间，可为临床诊断提供更为灵敏、特异、快速的体外诊断试剂。

