



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113125699 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 201911411082.8

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 科美诊断技术股份有限公司
地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤
中路7号北科现代制造园孵化楼一层、
六层

(72)发明人 徐静心 李临

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限
公司 11372
代理人 刘建军 吴大建

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/76(2006.01)

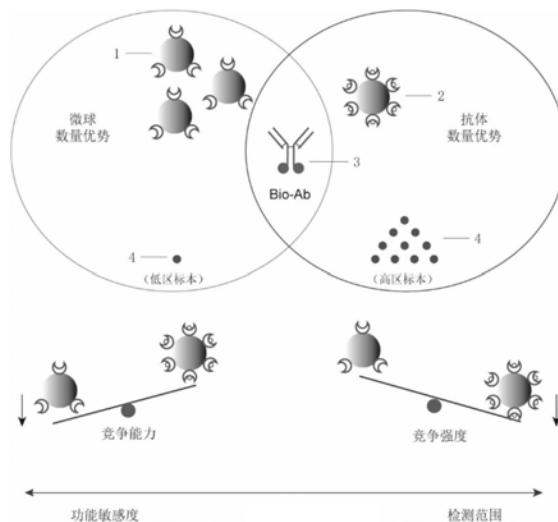
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种 β -hCG均相化学发光检测试剂盒及其
应用

(57)摘要

本发明涉及一种 β -hCG均相化学发光检测
试剂盒,其包括:第一组合物,其包含第一受体微
球以及与之结合的第一抗体或其结合片段,所述
第一抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第
一表位的检测抗体;第二组合物,其包含第二受
体微球以及与之结合的第二抗体或其结合片段,
所述第二抗体或其结合片段是特异性结合 β -
hCG第二表位的检测抗体;所述第一表位和所述
第二表位没有重叠部分;所述第一抗体或其结合
片段与 β -hCG特异性结合的亲和力高于所述第
二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲
和力;同时,所述第一抗体或其结合片段与所述
第一受体微球的质量比低于所述第二抗体或其
结合片段与第二受体微球的质量比。该试剂盒既
有较高的功能灵敏度又有较宽的检测范围。



CN 113125699 A

1. 一种 β -hCG均相化学发光检测试剂盒,其包括受体微球以及与之结合的抗 β -hCG抗体,其特征在于,所述试剂盒具体包括如下组分:

第一组合物,其包含第一受体微球以及与之结合的第一抗体或其结合片段,所述第一抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第一表位的检测抗体;

第二组合物,其包含第二受体微球以及与之结合的第二抗体或其结合片段,所述第二抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第二表位的检测抗体;

所述第一表位和所述第二表位没有重叠部分;

所述第一抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力高于所述第二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力;同时,

所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比低于所述第二抗体或其结合片段与第二受体微球的质量比。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比为1:(10~200),优选为1:(20~180),更优选为1:(40~160)。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述第一组合物在所述试剂盒中的浓度高于所述第二组合物在所述试剂盒中的浓度。

4. 根据权利要求1-3中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度与所述第二组合物在所述试剂盒中的质量浓度比为(5~100):1,优选为(10~50):1,更优选为(15~25):1。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度为5~500ug/ml,优选为10~250ug/ml,更优选为15~200ug/ml。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一组合物与所述第二组合物单独分散在同一种缓冲液中。

7. 根据权利要求1-5中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一组合物与所述第二组合物混合后分散在一种缓冲液中组装成一种试剂。

8. 根据权利要求1-7中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一受体微球的平均粒径与所述第二受体微球的平均粒径相同。

9. 根据权利要求1-7中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一受体微球的平均粒径与所述第二受体微球的平均粒径不同。

10. 根据权利要求1-9中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括第三组合物,所述第三组合物包括第三抗体或其结合片段,所述第三抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG,且其结合位点不与所述第一和第二表位重叠的捕获抗体;所述第三抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合。

11. 根据权利要求1-10中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第三抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力介于第一抗体或其结合片段和第二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力之间。

12. 根据权利要求1-11中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括已知 β -hCG浓度的列校准品溶液;优选地,所述系列校准品溶液中 β -hCG的浓度为0-10000IU/L。

13. 一种如权利要求1-12中任意一项所述的试剂盒在妊娠检测、葡萄胎检测或绒毛膜

上皮癌检测中的应用。

一种 β -hCG均相化学发光检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于均相化学发光检测技术领域,具体涉及一种 β -hCG均相化学发光检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, β -hCG) 是胎盘中最重要的激素,主要由胎盘合体滋养层细胞合成,男性和未受孕女性的垂体也分泌少量 β -hCG。 β -hCG分子量为37.9kD,是一种糖蛋白、含糖量40%,其糖链末端是唾液酸。 β -hCG是一种异二聚体结构,由 α 和 β 亚基非共价结合,其 α 亚基结构与甲状腺刺激素 (TSH)、黄体生成素 (LH)、促卵泡激素 (FSH) 具有高度同源性。 β -hCG的主要作用是在妊娠的前几周维持卵巢黄体的分泌功能,以支持早期胚胎发育的需要。 β -hCG具有TSH样活性,胎盘产生的大量 β -hCG刺激母体甲状腺产生 T_3 、 T_4 。因此, β -hCG在维持母体甲状腺激素水平方面起重要作用。

[0003] 在妊娠情况下,停经的第一天,约50%妊娠女性血清 β -hCG浓度达到25U/L,妊娠期前8周母体血清 β -hCG浓度呈对数上升,至妊娠8~10周,血清 β -hCG达到峰值,浓度可达100000U/L。随后,血清 β -hCG浓度缓慢下降,中期妊娠末, β -hCG浓度为峰值的10%左右。确定妊娠最重要的标志是血清或尿 β -hCG定量。当尿 β -hCG含量超过停经后第一周的含量时,即可诊断妊娠,而血清定量实验可更早预测早期妊娠。

[0004] 现有化学发光免疫分析、电化学发光免疫分析、光激化学发光免疫分析等用于检测 β -hCG时尚存在缺陷,不能有效兼顾功能灵敏度和分析范围的特殊要求。因此,亟需一种化学发光检测技术,其能兼顾功能灵敏度和分析范围的要求。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足提供了一种 β -hCG均相化学发光检测试剂盒,所述试剂盒中包括“差异性受体微球”(与不同亲合力抗体分别偶联的受体微球的混合物),进而使得所述试剂盒同时具有优异的功能灵敏度和检测范围。

[0006] 为此,本发明第一方面提供了一种 β -hCG均相化学发光检测试剂盒,其包括受体微球以及与之结合的抗 β -hCG抗体,其特征在于,所述试剂盒具体包括如下组分:

[0007] 第一组合物,其包含第一受体微球以及与之结合的第一抗体或其结合片段,所述第一抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第一表位的检测抗体;

[0008] 第二组合物,其包含第二受体微球以及与之结合的第二抗体或其结合片段,所述第二抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第二表位的检测抗体;

[0009] 所述第一表位和所述第二表位没有重叠部分;

[0010] 所述第一抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力高于所述第二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力;同时,

[0011] 所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比低于所述第二抗体或其结合片段与第二受体微球的质量比。

[0012] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比为1:(10~200),优选为1:(20~180),更优选为1:(40~160)。

[0013] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一组合物在所述试剂盒中的浓度高于所述第二组合物在所述试剂盒中的浓度。

[0014] 在本发明的一些实施方式中,所述第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度与所述第二组合物在所述试剂盒中的质量浓度比为(5~100):1,优选为(10~50):1,更优选为(15~25):1。

[0015] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度为5~500ug/ml,优选为10~250ug/ml,更优选为15~200ug/ml。

[0016] 在本发明的一些实施方式中,所述第一组合物与所述第二组合物单独分散在同一种缓冲液中。

[0017] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一组合物与所述第二组合物混合后分散在一种缓冲液中组装成一种试剂。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,所述第一受体微球的平均粒径与所述第二受体微球的平均粒径相同。

[0019] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一受体微球的平均粒径与所述第二受体微球的平均粒径不同。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒还包括第三组合物,所述第三组合物包括第三抗体或其结合片段,所述第三抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG且其结合位点不与所述第一和第二表位重叠的捕获抗体;所述第三抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述第三抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力介于第一抗体或其结合片段和第二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力之间。

[0022] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒中还包括已知 β -hCG浓度的列校准品溶液;优选地,所述系列校准品溶液中 β -hCG的浓度为0-10000IU/L。

[0023] 本发明第二方面提供了一种如本发明第一方面所述的试剂盒在妊娠检测、葡萄胎检测或绒毛膜上皮癌检测中的应用。

[0024] 本发明的有益效果为:本发明所述试剂盒选用不同亲合力的抗体分别以不同质量比偶联受体微球,再以适当比例混合两种受体微球,实现两种不同亲合力抗体视待检抗原浓度差异选择性发挥作用,在保障功能灵敏度的同时,拓宽检测范围防止钩状效应的发生,且所述试剂盒隶属均相化学发光分析,全程没有分离洗涤过程,不仅节省检测时间,而且回避洗涤所致误差,具备较高的精密度和准确度。

附图说明

[0025] 下面将结合附图对本发明作进一步说明。

[0026] 图1为本发明所述试剂盒的检测原理图;其中,附图标记的含义如下:1第一受体微球以及与之结合的第一抗体或其结合片段,第一受体微球表面包被少量高亲和力的第一抗体或其结合片段,但第一受体微球浓度较高,确保检测低浓度 β -hCG样本时,第一受体微球

优先发挥作用;2第二受体微球以及与之结合的第二抗体或其结合片段,第二受体微球表面被较多低亲和力的第二抗体或其结合片段,但第二受体微球浓度较低,确保检测高浓度 β -hCG样本时,第二受体微球优先发挥作用;3与生物素结合的第三抗体或其结合片段;4待测的 β -hCG(人绒毛膜促性腺激素)。

[0027] 图2为实施例6中3个批次的样本测值与贝克曼测值相关性图。

具体实施方式

[0028] 为使本发明容易理解,下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前,应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式,而并不表示限制性的。

[0029] 在提供了数值范围的情况下,应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中,并且也涵盖在本发明内,服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下,排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0030] 除非另有定义,本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用,但是现在描述了优选的方法和材料。

[0031] I. 术语

[0032] 本发明所述用语“均相”所对应的英文定义为“homogeneous”,其是指无须对结合的抗原抗体复合物和剩余的游离抗原或抗体进行分离既可进行检测。

[0033] 本发明所述用语“特异性结合”,是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应,从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0034] 本发明所述用语“受体微球”是指能够与单线态氧反应可以产生可检测信号的化合物。供体微球被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的单线态氧,该高能态的单线态氧被近距离的受体微球俘获,从而传递能量以激活所述受体微球。在本发明的一些具体实施方式中,所述受体微球包含发光组合物和基质,所述发光组合物填充于基质中和/或被于基质表面。本发明所述“基体”是本领域技术人员所公知的微球或微粒,其可以是任何尺寸的,其可以是有机或是无机的,其可以是可膨胀或不可膨胀的,其可以是多孔的或非多孔的,其具有任何密度,但优选具有和水接近的密度,优选能漂浮于水中,且由透明、部分透明或不透明的材料构成。所述基体可以有或没有电荷,当带有电荷时,优选是负电荷。所述基体可以是乳胶颗粒或是含有有机或无机聚合物的其他颗粒、脂双层如脂质体、磷脂囊泡、小油滴、硅颗粒、金属溶胶、细胞和微晶染料。

[0035] 本发明所述用语“供体微球”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体微球反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体微球可以是光活化的(如染料和芳香化合物)或者化学活化的(如酶、金属盐等)。在本发明一些具体实施例中,所述供体微球为填充有光敏剂的高分子微球,所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂,优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物,其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994(该专利文献在此全文引为参考)公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物,

以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物,所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对成员的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用,例如美国专利US6406913中记载的内容,该专利文献并入本文以供参考。

[0036] 本发明所述用语“生物素”广泛存在于动植物组织中,其分子上有两个环状结构,分别为咪唑酮环和噻吩环,其中咪唑酮环是与链霉亲和素结合的主要部位。活化的生物素可以在蛋白质交联剂的介导下,与已知的几乎所有生物大分子偶联,包括蛋白质、核酸、多糖和脂类等。“亲和素”分子由4条相同的肽链组成,其中每条肽链都能结合一个生物素。因此每个抗原或抗体可同时偶联多个生物素分子,从而产生“触手效应”提高分析灵敏度。

[0037] 本发明所述用语“表位”是指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团。针对蛋白质而言,抗原表位是一段特定氨基酸序列(线性表位),也可以是几段特定氨基酸序列构成的空间构象(构象表位)。抗原表位不仅是抗体结合最小结构和功能单位,同时也是淋巴细胞(B细胞)抗原受体识别的基本单位。

[0038] 本发明所述用语“单克隆抗体”是指采用杂交瘤融合技术制备的、针对单一抗原表位、具备单一特异性、结构和功能完全均一的抗体。首先,单克隆抗体具备单一特异性,杜绝交叉反应,提高标记免疫分析特异性。其次,单克隆抗体确保持续供应,且较小批间差异,有效降低免疫诊断试剂盒的批间差异。再次,不同单克隆抗体识别抗原位点不同,显示不同亲合力特征。

[0039] 本发明所述“差异性受体微球”特指与不同亲合力抗体偶联的受体微球(FG)。

[0040] 本发明所述“功能灵敏度”指最低检测线,即将已知浓度标本倍比稀释后,分析方法所能检测到的最低含量,且批内精密度不能大于20%。分析灵敏度是真实测定获得,也称为“功能灵敏度”。

[0041] 本发明所述“检测范围”,是指剂量函数的有效范围,如将高浓度标本倍比稀释,用稀释标本测定结果做线性回归分析,相关系数(r)大于0.990。

[0042] II.具体实施方案

[0043] 下面将详细说明本发明。

[0044] 本申请的发明人通过将 β -hCG特异性结合亲合力不同的两种或多种抗体,分别以不同的“质量比”偶联受体微球,制备差异性受体微球,通过质量比控制微球表面、局部环境的抗体分子数。同时,偶联不同亲和力抗体的受体微球以“适当比例”混合作为单一溶液(试剂1),通过控制单位体积溶液微球数量(微球浓度)来可控制与待检 β -hCG相互碰撞几率,从而实现不同亲合力抗体看待检抗原浓度差异选择性发挥作用,在保障功能灵敏度的同时,拓宽检测范围防止钩状效应的发生。

[0045] 因此,本发明第一方面所涉及的 β -hCG均相化学发光检测试剂盒,其包括受体微球以及与之结合的抗 β -hCG抗体,其特征在于,所述试剂盒具体包括如下组分:

[0046] 第一组合物,其包含第一受体微球以及与之结合的第一抗体或其结合片段,所述第一抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第一表位的检测抗体;

[0047] 第二组合物,其包含第二受体微球以及与之结合的第二抗体或其结合片段,所述第二抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG第二表位的检测抗体;

[0048] 所述第一表位和所述第二表位没有重叠部分;

[0049] 所述第一抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力高于所述第二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力;同时,

[0050] 所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比低于所述第二抗体或其结合片段与第二受体微球的质量比。也即所述第一抗体或其结合片段在所述第一受体微球上的偶联量低于所述第二抗体或其结合片段在所述第二受体微球上的偶联量。

[0051] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一抗体和第二抗体均为与 β -hCG特异性结合的单克隆抗体。

[0052] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比为1:(10~200),优选为1:(20~180),更优选为1:(40~160)。在本发明的一些具体实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与所述第一受体微球的质量比为1:10、1:20、1:30、1:40、1:80、1:120、1:160、1:180或1:200等。

[0053] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一组合物在所述试剂盒中的浓度高于所述第二组合物在所述试剂盒中的浓度。本发明中,所述浓度既可以是质量浓度也可以是摩尔浓度。

[0054] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度与所述第二组合物在所述试剂盒中的质量浓度比为(5~100):1,优选为(10~50):1,更优选为(15~25):1。在本发明的一些具体实施方式中,第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度与所述第二组合物在所述试剂盒中的质量浓度比为5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、50:1、80:1或100:1等。

[0055] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一组合物在所述试剂盒中的质量浓度为5~500ug/ml,优选为10~250ug/ml,更优选为15~200ug/ml。

[0056] 在本发明的一些实施方式中,所述第一组合物与所述第二组合物单独分散在同一种缓冲液中。

[0057] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一组合物与所述第二组合物混合后分散在同一种缓冲液中组装成一种试剂(即试剂1)。

[0058] 针对两种极端样本,第一抗体偶联的受体微球和第二抗体偶联的受体微球发挥作用方式不同:针对低浓度待测样本,待检抗原结合微球表面的抗体依赖于受体微球的浓度,即第一抗体偶联的受体微球浓度高,此种微球占优势;针对高浓度待测样本,待检抗原结合微球表面的抗体不再依赖于微球的浓度,而是依赖于微球表面抗体的分子数量,虽然第二抗体包被的受体微球浓度低,但是微球表面抗体分子数量多,高浓度待检抗原需要更多抗体分子,此时第二抗体包被的受体微球起决定作用。

[0059] 基于上述分析,本发明采用不同亲和力抗体(例如,单克隆抗体),分别以不同方式(包被量和/或偶联方式)制备差异性受体微球。将差异性受体微球按一定比例混合作为单一溶液(试剂1),此种溶液中的两种性质不同的受体微球,利用微球液相扩散原理和抗体亲和力差异,可以实现根据样本中待检抗原的浓度差异选择性发挥作用,满足临床 β -hCG对功能灵敏度和检测范围的特殊要求。

[0060] 在本发明的一些实施方式中,所述第一受体微球的平均粒径与所述第二受体微球的平均粒径相同。

[0061] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一受体微球的平均粒径与所述第二受体微

球的平均粒径不同。

[0062] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒还包括第三组合物,所述第三组合物包括第三抗体或其结合片段,所述第三抗体或其结合片段是特异性结合 β -hCG且其结合位点不与所述第一和第二表位重叠的捕获抗体;所述第三抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员(例如生物素)结合。所述第三组合物即为试剂2。

[0063] 在本发明的一些实施方式中,所述第三抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力介于第一抗体或其结合片段和第二抗体或其结合片段与 β -hCG特异性结合的亲和力之间。

[0064] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第三抗体为与 β -hCG特异性结合的单克隆抗体。

[0065] 在本发明的另一些实施方式中,所述试剂盒中还包括已知 β -hCG浓度的列校准品溶液;优选地,所述系列校准品溶液中 β -hCG的浓度为0-10000IU/L。

[0066] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒还包括与特异性结合配对成员中的另一员(例如亲和素)结合的供体微球溶液,所述供体微球能够在激发状态下生成活性氧。

[0067] 在本发明的一些实施方式中,所述受体微球包含发光组合物和基质,所述发光组合物填充于基质中和/或包被于基质表面。

[0068] 在本发明的另一些实施方式中,所述发光组合物能够与活性氧反应产生可检测的化学发光信号,其包含化学发光化合物和金属螯合物。

[0069] 在本发明的一些实施方式中,所述化学发光化合物选自烯烃化合物,优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物,更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

[0070] 在本发明的另一些实施方式中,所述金属螯合物的金属为稀土金属或VIII族金属,优选选自铈、铽、镝、钆、铕和钇,更优选选自铈。

[0071] 在本发明的一些实施方式中,所述金属螯合物包含选自下列的螯合剂:4'-(10-甲基-9-蒎基)-2,2':6'2"-联三吡啶-6,6"-二甲胺]四乙酸(MTTA)、2-(1',1',2',2',3',3'-七氟-4',6'-己二酮-6"-基)-萘(NHA)、4,4'-二(2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-邻-三联苯(BHHT)、4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-氯代磺基-邻-三联苯(BHHCT)、4,7-联苯-1,10-菲咯啉(DPP)、1,1,1-三氟丙酮(TTA)、3-萘酰-1,1,1-三氟丙酮(NPPTA)、萘基三氟丁二酮(NTA)、三辛基氧化膦(TOPO)、三苯基氧化膦(TPPO)、3-苯甲酰-1,1,1-三氟丙酮(BFTA)、2,2-二甲基-4-全氟丁酰-3-丁酮(fod)、2,2'-联吡啶(bpy)、联吡啶基羧酸、氮杂冠醚、氮杂穴状配体和三辛基氧化膦以及它们的衍生物。。

[0072] 在本发明的一些实施方式中,所述化学发光化合物是二甲基噻吩的衍生物,所述金属螯合物是铈螯合物。

[0073] 在本发明的另一些实施方式中,所述基质选自高分子微球,优选为乳胶微球,更优选为聚苯乙烯微球。

[0074] 在本发明的一些实施方式中,所述受体微球的粒径为100-500nm,优选为150-400nm,更优选为200-300nm。在本发明的一些具体实施方式中,所述受体微球的粒径为100nm、150nm、200nm、250nm、300nm。

[0075] 在本发明的一些具体实施方式中,所述试剂盒的使用方法,其包括:

[0076] 步骤N1,将待测样本、试剂1和试剂2混合后,获得第一混合物;

[0077] 步骤N2,将与亲和素结合的供体微球溶液与第一混合物混合后,获得第二混合物;

[0078] 步骤N3,利用能量或活性化合物激发第二混合物中的供体微球生成活性氧,然后受体微球与其接触到的活性氧反应生产化学发光信号;

[0079] 步骤N4,检测步骤N3中所述化学发光信号的强度,分析待测样本中是否存在 β -hCG和/或 β -hCG的浓度。

[0080] 上述方法中,所述试剂混合后均可以根据需要进行温育。具体地,所述温育的温度可以是35-45℃,时间可以是10-50min;优选地,所述温育的温度可以选自36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃或44℃;温育的时间可以选自10min、20min、30min、35min、40min、45min或50min。

[0081] 本发明第二方面涉及一种如本发明第一方面所述的试剂盒在妊娠检测、葡萄胎检测或绒毛膜上皮癌检测中的应用。

[0082] 实施例

[0083] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0084] 实施例1:本发明所述试剂盒的制备

[0085] (1) 单克隆抗体偶联的受体微球溶液(试剂1)的制备过程

[0086] 受体微球(FG):微球表面含有醛基(-CHO),通过醛基与抗体分子连接。内含有发光化合物(二甲基噻吩的衍生物)及镧系元素(Eu)化合物的螯合物。

[0087] 生物原料:与 β -hCG特异性结合的亲和力高的单克隆抗体(即,hCG(A))和与 β -hCG特异性结合的亲和力低的单克隆抗体(即,hCG(a))。

[0088] 制备过程:

[0089] 1) 用包被缓冲液(PH 7.2~8.0磷酸盐缓冲液)清洗受体微球;

[0090] 2) 用hCG(A),按与受体微球的质量比为1:200的比例偶联受体微球,37℃过夜,获得FG-An;用hCG(a),Ab按与受体微球的质量比为1:20的比例偶联受体微球,37℃过夜,获得FG-aN;

[0091] 3) 用封闭剂封闭FG-An和FG-aN,37℃保持2h;

[0092] 4) 清洗液清洗FG-An和FG-aN;

[0093] 5) 将FG-An和FG-aN保存在hepes缓冲液系统中;

[0094] 6) 用试剂1的缓冲液将FG-An和FG-aN分别按1:200、1:3000稀释,配制成试剂1,备用。获得的试剂1中FG-An和FG-aN的浓度比为15:1。

[0095] (2) 与生物素结合的抗 β -hCG抗体的溶液(试剂2)的制备过程

[0096] 生物原料:活化的生物素以及与 β -hCG特异性结合的亲和力中等的单克隆抗体。

[0097] 制备过程:取抗体0.5mg转移至14KD透析袋内,用标记缓冲液(0.1M NaHCO₃)透析,2h/次,换液1次;加入5mg/ml的生物素溶液10 μ l,迅速混匀,补充标记缓冲液至500 μ l,2-8℃混匀过夜,标记比例为1:30(抗体:生物素-摩尔比);将标记完成的Bio-Ab试剂取至14KD透析袋,用透析缓冲液(0.1M Tris-HCl)透析,2h/次,换液1次;用pH 8.0,0.1M Tris-HCl溶液

稀释至5 μ g/ml。

[0098] (3) 已知浓度 β -hCG系列校准品的制备过程

[0099] 取 β -hCG纯品,用含20%灭活小牛血清的0.1M pH 7.4磷酸盐缓冲盐水溶液配制成0、5、50、500、5000、10000IU/L系列校准品溶液各0.5ml。

[0100] 实施例2:本发明所述试剂盒线性范围的检测

[0101] 线性范围意义:分析方法的线性是在给定范围内获取与样品中供试物浓度成正比的试验结果的能力。

[0102] 线性范围评估方法:将接近线性范围上限(10000IU/L)的高值血清按一定比例稀释6种浓度,其中低值浓度的样本必须接近线性范围下限(0.5IU/L)。按下述试剂盒使用方法,每一浓度样本均重复检测3次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算相关系数 r , r 应大于等于0.9900。检测如果如表1和表2所示。

[0103] 使用实施例1制备的试剂盒进行检测的过程由LiCA500自动光激化学发光分析系统全自动完成并输出检测结果。具体步骤为:

[0104] a. 在反应孔中分别加入10 μ l样品或校准品、质控品;

[0105] b. 在反应孔中依次加入25 μ l试剂1和25 μ l试剂2;

[0106] c. 37 $^{\circ}$ C温育15分钟;

[0107] d. 加入LiCA通用液(与亲和素结合的供体微球溶液)175 μ l;

[0108] e. 37 $^{\circ}$ C温育15分钟;

[0109] e. 激光照射微孔并计算每孔发光光子量;

[0110] f. 根据校准曲线,计算样品浓度。

[0111] 表1:本发明所述试剂盒线性检测的原始数据

		标示浓度	发光值	浓度
		0	236	
		5	1343	
[0112]	校准品	50	12168	
		500	123791	
		5000	1192703	
		10000	2497549	
			2456711	9848.25
			281527	1165.8
[0113]	线性样本		24857	101.77
			2579	10
			485	1.12
			294	0.26

[0114] 表2:本发明所述试剂盒对血清 β -hCG定量检测的线性范围

	稀释比例	浓度值 (IU/L)
	1	9848.25
	0.1	1165.8
	0.01	101.77
[0115]	0.001	10.00
	0.0001	1.12
	0.00002	0.26
	r	0.9998

[0116] 由表2可知,本发明所述试剂盒对血清 β -hCG定量检测的线性范围宽,且线性相关系数较高。

[0117] 实施例3:本发明所述试剂盒精密度的检测

[0118] 精密度意义:精密度是衡量试剂盒批内和批间变异的重要指标,是评价拟上市产品有效性的重要依据,通常包括批内精密度和批间精密度。

[0119] 批内精密度评估方法:用低(L)、中(M)、高(H)值样本对1个批次的产品进行独立分析,利用实施例2所述的方法对每个批次重复测定10次,计算10次测量结果的平均值(\bar{x})和标准差(SD),根据公式 $CV=SD/\bar{x}\times 100\%$,计算变异系数(CV),结果如表3和4所示。

[0120] 批间精密度评估方法:用低(L)、中(M)、高(H)值样本,对3个批次的产品进行独立分析,利用实施例2所述的方法对每个批次重复测定10次,计算30次测量结果的平均值(\bar{x})和标准差(SD),根据公式 $CV=SD/\bar{x}\times 100\%$,计算变异系数(CV),结果如表3和5所示。

[0121] 表3:本发明所述试剂盒精密度检测原始数据

	标示浓度 (IU/L)	第一批		第二批		第三批	
		发光值	浓度	发光值	浓度	发光值	浓度
[0122]	校准品	0	231		239		239
		5	1272		1307		1328
		50	12787		12518		12680
		500	129721		129378		118539
		5000	1283918		1263837		1209551
		10000	2445157		2441004		2519937
精密度 样本	L	1387	5.45	1390	5.33	1412	5.32
	M	392263	1490.35	389410	1497.78	376316	1602.93
	H	2028325	8165.05	2036113	8255.25	2031436	8165.94

[0123] 表4:本发明所述试剂盒对血清 β -hCG检测的批内精密度

	批次	样本	X (IU/L)	SD	CV (%)
[0124]	第一批	L	5.45	0.11	1.93
		M	1490.36	40.79	2.74
		H	8165.30	236.55	2.90
	第二批	L	5.33	0.14	2.57
		M	1497.80	39.21	2.62
		H	8255.45	236.55	2.87
	第三批	L	5.32	0.10	1.90
		M	1602.89	63.45	3.96
		H	8165.83	167.81	2.06

[0125] 表5: 本发明所述试剂盒对血清 β -hCG检测的批间精密度

	样本	X (IU/L)	SD	CV (%)
[0126]	L	5.37	0.13	2.37
	M	1530.35	70.53	4.61
	H	8195.52	205.78	2.51

[0127] 从表4和5可知, 三批试剂批内和批间精密度均 $<5\%$, 说明本发明所述试剂盒的测值重复性好, 随机误差小。

[0128] 实施例4: 本发明所述试剂盒准确度的检测

[0129] 准确度意义: 实测值与真实值的相符程度, 反应系统误差的大小。

[0130] 准确度评估方法: 将含不同 β -hCG水平的2个样本, 用校准品基质液进行多点稀释, 利用实施例2所述的方法对稀释后样本进行浓度测定, 结果如表6所示。然后再根据稀释比例分别计算2个样本的回收率, 结果分别如表7和8所示。

[0131] 表6: 本发明所述试剂盒准确度检测的原始数据

	标示浓度	发光值	浓度
	0	236	
	5	1293	
校准品	50	12571	
	500	127959	
	5000	1277686	
	10000	2503245	
		2285992	9103.88
[0132] 准确性样本		1223321	4782.46
		604264	2340.65
		302732	1173.44
		153427	598.29
		68451	269.41
		11831	47.05
		6087	24.10
		2886	11.31
		1642	6.38
		890	3.09
	521	1.44	

[0133] 表7:本发明所述试剂盒对样本1中 β -hCG检测的准确度

样本 1	预期浓度 (IU/L)	测定浓度 (IU/L)	回收率 (%)	
原样本	N/A	9103.88	N/A	
[0134] 1/2	4551.94	4782.46	105.06	
	1/4	2275.97	2340.65	102.84
	1/8	1137.99	1173.44	103.12
	1/16	568.99	598.29	105.15
	1/32	284.50	269.41	94.70

[0135] 表8:本发明所述试剂盒对样本2中 β -hCG检测的准确度

样本 2	预期浓度 (IU/L)	测定浓度 (IU/L)	回收率 (%)	
原样本	N/A	47.05	N/A	
[0136] 1/2	23.53	24.10	102.44	
	1/4	11.76	11.31	96.15
	1/8	5.88	6.38	108.48
	1/16	2.94	3.09	105.08
	1/32	1.47	1.44	97.94

[0137] 从表7和表8可知,用不同水平的2例 β -hCG样本进行多点稀释后,回收率均在90%~110%范围内,说明实测值与真实值接近,本发明所述试剂盒的检测误差小。

[0138] 实施例5:本发明所述试剂盒的功能灵敏度和线性范围的检测

[0139] 对比试剂盒1:与本发明所述试剂盒不同之处在于试剂1为与 β -hCG特异性结合的亲和力低的单克隆抗体偶联的受体微球溶液;其中抗体与受体微球的质量比分别为1:20、1:40、1:80、1:160。

[0140] 对比试剂盒2:与本发明所述试剂盒不同之处在于试剂1为与 β -hCG特异性结合的亲和力高的单克隆抗体偶联的受体微球溶液;其中抗体与受体微球的质量比分别为1:20、1:40、1:80、1:160。

[0141] 本发明所述试剂盒:实施例1制备的试剂盒,其中试剂1中FG-An和FG-aN的浓度比分别为5:1、10:1、15:1、20:1、25:1。

[0142] 采用上述试剂盒按照实施例2中所述方法进行检测,结果如表9所示。

[0143] 表9

	抗体类型	质量比或浓度比	线性范围 (IU/L)	检出限 (IU/L)
[0144]	对比试剂盒 1	1:20	10000	2
		1:40	8000	2
		1:80	5000	4
		1:160	2000	5
[0145]	对比试剂盒 2	1:20	1000	0.3
		1:40	1000	0.3
		1:80	2000	0.4
		1:160	3000	0.5
[0145]	本发明所述试剂 盒	5:1	10000	1
		10:1	10000	1
		15:1	10000	0.5
		20:1	5000	0.5
		25:1	2000	0.4

[0146] 从上述结果可知,含与 β -hCG特异性结合的亲和力低的单克隆抗体偶联的受体微球溶液的试剂盒,拥有更宽的检测范围但功能灵敏度相对较低;而含与 β -hCG特异性结合的亲和力高的单克隆抗体偶联的受体微球溶液的试剂盒,有较高的功能灵敏度但检测范围较窄。当将上述两种受体微球溶液以不同的比例混合制备成差异性受体微球溶液时,含有上述差异性受体微球溶液的试剂盒既有较宽的检测范围又具有较高的功能灵敏度。

[0147] 实施例6:本发明所述试剂盒的样本测值与贝克曼测值的比较

[0148] 利用实施例2所述方法对3个批次的样本进行检测,检测结果与贝克曼测值进行比较,结果分别如表10-12所示。3个批次的样本测值与贝克曼测值相关性如图2所示。

[0149] 表10

		标示浓度 (IU/L)	发光值	浓度值
[0150]	定标	0	223	
		5	1255	
		50	12476	
		500	122288	
		5000	1240010	
		10000	2459638	
[0151]	贝克曼定 值样本	0.91	413	0.92
		318.83	94759	387.41
		10.05	2962	11.8
		5554.29	1288027	5194.93
		9163.03	2580496	10498.91
		246.59	60630	247.28
		1298.37	307232	1247.68
	84.63	24184	97.64	
[0152]	表11			
		标示浓度 (IU/L)	发光值	浓度值
[0153]	定标	0	225	
		5	1314	
		50	12283	
		500	129682	
		5000	1225176	
		10000	2503037	
		8727.99	2235400	8969.41
		119.48	34309	136.02
[0154]	贝克曼定 值样本	10.12	3005	11.9
		2054.46	507083	2041.25
		5000.86	1209923	4938.47
		40.16	11926	48.56
		114.87	28325	113.02
		4.91	1251	4.71
		313.85	98022	378.15
[0154]	表12			

		标示浓度 (IU/L)	发光值	浓度值
[0155]	定标	0	237	
		5	1252	
		50	12013	
		500	117679	
		5000	1209614	
		10000	2411229	
[0156]	贝克曼定 值样本	913.47	185693	785.4
		648.29	122096	518.64
		1.18	438	0.99
		8752.48	1824285	7550.68
		0.94	452	1.06
		3.98	1193	4.71
		98.94	21106	88.68
		1895.27	386734	1617.56

[0157] 从表10-12及图2可知,本发明所述试剂盒对3个批次的样本测值与贝克曼测值相关性 $r=0.9920$,相关性良好。说明采用本发明所述试剂盒能准确检测出样本中人绒毛膜促性腺激素的含量。

[0158] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

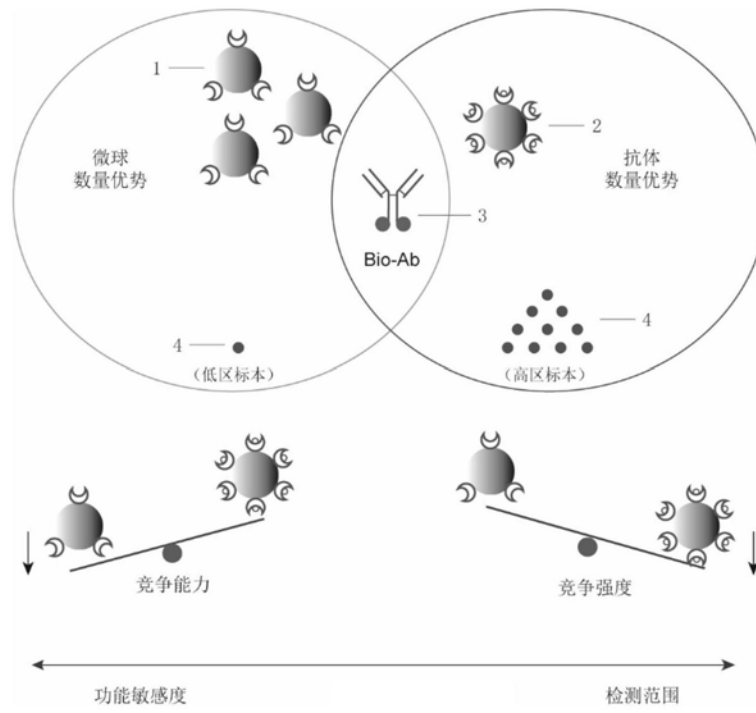


图1

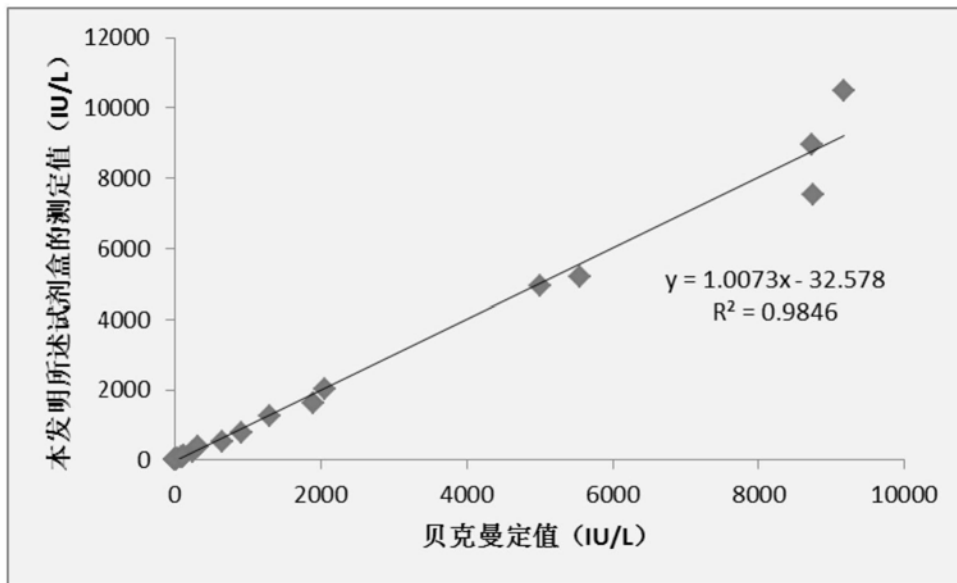


图2