



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103472229 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201310428782. 4

(22) 申请日 2013. 09. 17

(73) 专利权人 武汉生之源生物科技有限公司
地址 430223 湖北省武汉市东湖开发区大学
园路武大科技园创业楼四楼

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京华沛德权律师事务所
11302

代理人 刘杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102426257 A, 2012. 04. 25,

CN 102426257 A, 2012. 04. 25,

CN 101776683 A, 2010. 07. 14,

CN 102507947 A, 2012. 06. 20,

CN 101762700 A, 2010. 06. 30,

JP 特开平 4-249770 A, 1992. 09. 04,

司梦军. 增强化学发光酶联免疫分析新体系的研究及应用. 《万方数据库 青岛科技大学硕士学位论文》. 2009,

Riko Iwata 等. Stable and general-purpose chemiluminescent detection system for horseradish peroxidase employing a thiazole compound enhancer and some additives. 《Analytical Biochemistry》. 1995, 第 231 卷 (第 1 期),

审查员 段晓露

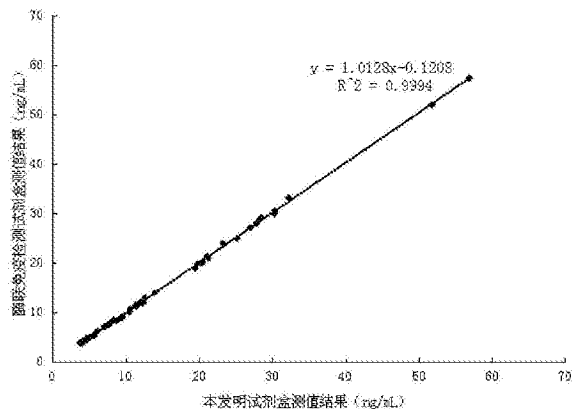
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒及其检测方法,属于试剂盒技术领域。所述癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,包括癌胚抗原校准品、抗癌胚抗原抗体包被的磁珠、酶标记的单克隆抗体、酶所作用的化学发光底物以及浓缩洗涤液。本发明检测试剂盒利用磁分离以及化学发光检测法的优势,使检测过程简单、易于操作、便于自动化;同时本发明检测试剂盒还具有灵敏度高、特异性好、检测限低以及稳定性好等特性,能满足各种癌症临床辅助诊断或检测的需要。



1. 一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于,包括癌胚抗原校准品、抗癌胚抗原抗体包被的磁珠、酶标记的单克隆抗体、酶所作用的化学发光底物以及浓缩洗涤液;所述磁珠的粒径为 $0.3 \sim 1.0 \mu\text{m}$,所述磁珠为氧化铁为内核、聚苯乙烯表面包裹带羧基活性基团的聚合物;

所述癌胚抗原校准品的制备方法包括以下步骤:

1) 制备去激素人血清;

2) 将癌胚抗原用去激素人血清配制成浓度为 80ng/mL 校准品,并将此校准品用去激素人血清稀释得到浓度分别为 40ng/mL 、 20ng/mL 、 10ng/mL 、 5ng/mL 的校准品,等量分装成浓度分别为 0ng/mL 、 5ng/mL 、 10ng/mL 、 20ng/mL 、 40ng/mL 和 80ng/mL 的癌胚抗原校准品;

所述抗癌胚抗原抗体包被磁珠的制备方法包括以下步骤:

1) 将磁珠用MES缓冲液分散,使磁珠的终浓度为 $60 \sim 90\text{mg/mL}$;

2) 用三倍磁珠溶液体积的MES缓冲液清洗磁珠两次后,再用MES缓冲液重新分散磁珠,使磁珠的终浓度为 $12 \sim 24\text{mg/mL}$;

3) 取1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺溶解于步骤2)所得的磁珠溶液中,搅拌反应后再向反应体系中加入癌胚抗原抗体溶液,搅拌混匀,室温下搅拌过夜;

4) 将磁珠与反应体系分离后用MES缓冲液洗涤磁珠两次,再用MES缓冲液重新分散磁珠,磁珠的终浓度为 $20 \sim 50\text{mg/mL}$;向重新分散后的磁珠溶液中加入1%BSA封闭液,室温封闭3~6小时,将磁珠与反应体系分离;再用 $\text{pH}7.4$ 的Tris-HCl缓冲液清洗磁珠两次后用 $\text{pH}7.4$ 的Tris-HCl缓冲液分散磁珠,使磁珠的终浓度为 $5 \sim 20\text{mg/mL}$,得到所述抗癌胚抗原抗体包被磁珠;

所述酶为辣根过氧化物酶,所述酶标记的单克隆抗体的制备方法包括步骤如下:

1) 将辣根过氧化物酶溶解于蒸馏水中;

2) 向所述步骤1)得到的溶液中加入 0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌,得到混合溶液;

3) 将所述步骤2)得到的混合溶液装入透析袋中用醋酸钠缓冲液透析过夜;

4) 向所述步骤3)得到的透析液中加入碳酸盐缓冲液至 pH 值为 $9.0 \sim 9.5$,加入癌胚抗原单克隆抗体,混匀,室温下避光搅拌反应;

5) 向所述步骤4)得到的反应产物中加入 NaBH_4 溶液,混匀,静置反应;

6) 将所述步骤5)得到的反应产物装入透析袋中于PBS缓冲液中搅拌过夜;

7) 取出透析袋中的液体,在搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液,静置;

8) 将所述步骤7)得到的溶液离心,弃上清;将沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤后,将沉淀物溶于PBS缓冲液中;

9) 将所述步骤8)得到的溶液装入透析袋中透析去除铵离子后,将溶液离心,去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入等体积甘油后混匀分装,冰冻保存;

所述的化学发光底物由两种彼此独立分装的A液和B液组成;所述A液为 $10\text{mM pH}7.0$ 磷酸盐缓冲溶液,含有 $2\text{mM H}_2\text{O}_2$ 、 1g/L 脱脂奶粉、 0.5g/L 卵白蛋白和 0.1% 吐温20;B液为 $100\text{mM pH}10.0$ 硼酸-硼砂缓冲液,含有 10mM 鲁米诺、 0.3mM 4-羟基联苯;

所述浓缩洗涤液为含有吐温20和氯化钠的磷酸盐缓冲溶液,该溶液中的氯化钠的含

量为 1 ~ 5g/L、吐温 20 的含量为 0.5% -3%，浓缩洗涤液的 pH 值为 7.0 ~ 8.0。

2. 根据权利要求 1 所述的癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒，其特征在于，所述癌胚抗原是重组的癌胚抗原或天然的癌胚抗原。

一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于试剂盒技术领域,特别涉及一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 癌胚抗原(CEA)是在1965年由Gold和Freedman首先从胎儿及结肠癌组织中发现的,是一种分子量为22ku的多糖蛋白复合物,45%为蛋白质。一般情况下,CEA是由胎儿胃肠道上皮组织、胰和肝细胞所合成,通常在妊娠6个月内CEA含量增高,出生后血清中含量已经很低,健康成年人血清中CEA浓度小于 $5\mu\text{IU/mL}$ 。

[0003] CEA属于非器官特异性肿瘤相关抗原,分泌CEA的肿瘤大多位于空腔脏器,如胃肠道、呼吸道、泌尿道等。正常情况下,CEA经胃肠道代谢,而肿瘤状态时的CEA则进入血和淋巴循环,引起血清CEA异常增高,使上述各种肿瘤患者的血清CEA均有增高。

[0004] 癌胚抗原(CEA)广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌症中,如:胃癌、肝癌、胰腺癌以及大肠癌等癌症中,同时在小细胞肺癌、乳腺癌等癌症中也有明确的升高,因此,检测血清中CEA含量对各种癌症的辅助诊断具有明确的意义。

[0005] 目前样本中癌胚抗原的检测方法主要包括:酶联免疫法(ELISA)、放射免疫法(RIA)、时间分辨免疫荧光法、胶体金免疫层析法以及化学发光法等多种方法。这些方法的检测试剂盒都有各自的优缺点如:酶联免疫法检测限低,线性范围较宽,但该检测试剂盒操作繁琐,检测时间长,自动化程度低,受人为因素影响较大;放射免疫法也有检测限低的优势,但是由于其检测过程中需要用到放射性标记物,对操作人员的身体健康存在不良影响,同时对环境也有一定程度的污染,该检测方法目前已经逐步被其他的技术所替代;胶体金免疫层析法具有检测迅速,操作方便等优势,利于病人自行对样本进行检测,适用于居家检测,但该检测方法不能定量检测,判读结果有一定的误差;化学发光免疫分析技术是近几年新兴的检测技术,具有操作简便,自动化程度高,检测线性范围宽,检测限低等诸多优良的特性,是未来生化检测领域里面技术发展的大趋势。由于化学发光技术是新兴技术,现有的化学发光检测试剂盒在技术上面存在一些明显的缺陷和不足:该试剂盒在癌胚抗原检测过程中检测的线性范围很窄、准确性很低、重现性较差,从而对其应用以及检测带来不良影响,限制了该技术的推广应用。

发明内容

[0006] 本发明的目的是为解决上述问题而提供了一种检测过程简单、易于操作、自动化程度高、检测线性范围广、准确性好、重现性好的癌胚抗原磁微粒化学发光检测试剂盒及其检测方法。

[0007] 本发明所采用的技术方案是:

[0008] 一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,包括癌胚抗原校准品、抗癌胚抗原抗体包被的磁珠、酶标记的单克隆抗体、酶所作用的化学发光底物以及浓缩洗涤液。

[0009] 优选地,所述癌胚抗原是重组的癌胚抗原或天然的癌胚抗原。

[0010] 进一步地,所述癌胚抗原校准品的制备方法包括以下步骤:

[0011] (1) 制备去激素人血清;

[0012] (2) 将癌胚抗原用去激素人血清配制成浓度为 80ng/mL 校准品,并将此校准品用去激素人血清稀释得到浓度分别为 40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL 的校准品,等量分装成浓度分别为 0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL 和 80ng/mL 的癌胚抗原校准品。

[0013] 进一步地,所述抗癌胚抗原抗体包被磁微粒的制备方法包括以下步骤:

[0014] (1) 磁珠的分散:将磁珠用缓冲液分散;

[0015] (2) 磁珠的清洗:用缓冲液清洗磁珠后,再用缓冲液重新分散磁珠;

[0016] (3) 磁珠的活化与连接:取 EDC 和 NHS 溶解于步骤(2) 所得的磁珠溶液中,搅拌反应后再向反应体系中加入癌胚抗原抗体溶液,搅拌均匀,室温下搅拌过夜;

[0017] (4) 磁珠的清洗及封闭:将磁珠与反应体系分离后,用缓冲液洗涤磁珠再用缓冲液重新分散磁珠;向重新分散后的磁珠溶液中加入封闭液封闭,将磁珠与反应体系分离;用缓冲液清洗磁珠后再用缓冲液分散磁珠,得到所述抗癌胚抗原抗体包被磁微。

[0018] 进一步地,所述步骤(1) 中的磁珠用缓冲液分散,使磁珠的终浓度为 60 ~ 90mg/mL;所述步骤(2) 中用三倍磁珠溶液体积的缓冲液清洗磁珠两次后,再用缓冲液重新分散磁珠,使磁珠的终浓度为 12 ~ 24mg/mL;所述步骤(4) 中将磁珠与反应体系分离后用缓冲液洗涤磁珠两次,再用缓冲液重新分散磁珠,磁珠的终浓度为 20 ~ 50mg/mL;向重新分散后的磁珠溶液中加入 1%BSA 封闭液,室温封闭 3 ~ 6 小时,将磁珠与反应体系分离;再用 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液清洗磁珠两次后用 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液分散磁珠,使磁珠的终浓度为 5 ~ 20mg/mL。

[0019] 优选地,所述磁珠的粒径为 0.3 ~ 1.0 μm ,所述磁珠为氧化铁为内核、聚苯乙烯表面包裹带羧基活性基团的聚合物,所述缓冲液选自适合生化试验的多种缓冲液,优选为 MES 缓冲液。

[0020] 进一步地,所述酶为辣根过氧化物酶,因为辣根过氧化物酶性质稳定且适用于多种生化检测试验,所述酶标记的单克隆抗体的制备方法包括步骤如下:

[0021] (1) 将辣根过氧化物酶溶解于蒸馏水中;

[0022] (2) 向所述步骤(1) 得到的溶液中加入 0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌,得到混合溶液;

[0023] (3) 将所述步骤(2) 得到的混合溶液装入透析袋中用醋酸钠缓冲液透析过夜;

[0024] (4) 向所述步骤(3) 得到的透析液中加入碳酸盐缓冲液至 pH 值为 9.0 ~ 9.5,加入癌胚抗原单克隆抗体,混匀,室温下避光搅拌反应;

[0025] (5) 向所述步骤(4) 得到的反应产物中加入 NaBH_4 溶液,混匀,静置反应;

[0026] (6) 将所述步骤(5) 得到的反应产物装入透析袋中于 PBS 缓冲液中搅拌过夜;

[0027] (7) 取出透析袋中的液体,在搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液,静置;

[0028] (8) 将所述步骤(7) 得到的溶液离心,弃上清;将沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤后,将沉淀物溶于 PBS 缓冲液中;

[0029] (9) 将所述步骤(8) 得到的溶液装入透析袋中透析去除铵离子后,将溶液离心,去

除沉淀,上清液即为酶结合物,加入等体积甘油后混匀分装,冰冻保存。

[0030] 进一步地,所述的化学发光底物由两种彼此独立分装的 A 液和 B 液组成;所述 A 液为 10mM pH7.0 磷酸盐缓冲溶液,含有 2mM H_2O_2 、1g/L 脱脂奶粉、0.5g/L 卵白蛋白和 0.1% 吐温 20;B 液为 100mM pH10.0 硼酸-硼砂缓冲液,含有 10mM 鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯。

[0031] 进一步地,所述浓缩洗涤液为含有吐温 20 和氯化钠的磷酸盐缓冲溶液,该溶液中的氯化钠的含量为 1~5g/L、吐温 20 的含量为 0.5%-3%,浓缩洗涤液的 pH 值为 7.0~8.0。该浓缩洗涤液可有效缩小整个试剂盒的体积,便于存储和运输,同时也可以适当的节约生产成本。

[0032] 一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0033] (1) 取 10 μ L 待检测样本于反应杯中,后加入 140 μ L 辣根过氧化物酶标记癌胚抗原单克隆抗体,充分混匀,并于 37°C 温育 10min,同时准备校准样板和空白样本;

[0034] (2) 向反应体系中加入 50 μ L 磁微粒试剂,充分混匀,并于 37°C 温育 10min,后清洗分离磁珠;向磁珠中加入 100 μ L 发光底物 A 液和 B 液的混合溶液,反应并测定各管的光强度;

[0035] (3) 根据校准品的浓度与光强度的关系绘制标准工作曲线,样本光强度在标准工作曲线上相对应的浓度值即为待测样品的测定浓度。

[0036] 本发明具有以下优点:

[0037] 利用发明得到的癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,可以克服现有的酶联免疫法以及放射免疫法的技术缺陷;同时采用本发明所得到的检测试剂盒能克服现有的癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒在检测线性范围、准确性或重现性等方面的技术缺陷,保证检测结果的有效性及准确性,为癌胚抗原含量检测提供一种非常好的检测工具。

附图说明

[0038] 图 1 为本发明实施例 2 与酶联免疫检测试剂盒测值相关性结果的曲线图;

[0039] 图 2 为本发明实施 1 与对比实施例 1 和对比实施例 2 比较的工作曲线图。

具体实施方式

[0040] 下面结合附图和实施方式对本发明做进一步详细的说明。

[0041] 实施例 1

[0042] 本实施例中检测试剂盒的制备:

[0043] 1. 癌胚抗原校准品的配制

[0044] ①去激素人血清的制备:取 20mL 的正常人血清与离心管中,再向血清中加入 8.0g 活性炭,将离心管置于漩涡混合器上混合均匀,振荡 5 小时,以 8000rpm 离心 30 分钟,将上清液过滤,向滤液中加入体积百分比浓度为千分之一的叠氮化钠,混匀之后冷冻保存。

[0045] ②取一定量的癌胚抗原蛋白(购自美国 Bioss 公司)并用上述的去激素人血清配制成浓度为 80ng/mL 的校准品溶液,并将此校准品用去激素人血清稀释得到浓度分别为 40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL 的校准品,等量分装成浓度分别为 0ng/mL、5ng/mL、

10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL 和 80ng/mL 的癌胚抗原校准品。

[0046] 2. 抗癌胚抗原单克隆抗体包被磁珠的制备

[0047] ①磁珠的分散:取 80mg 粒径为 0.3 μm 的磁珠(购自德国 merck 公司),用 1mL 的 MES 缓冲液分散磁珠,使磁珠的终浓度为 80mg/mL;

[0048] ②磁珠的清洗:用 3mL 的 MES 缓冲液清洗磁珠两次,后用 5mL 的 MES 缓冲液重新分散磁珠,使磁珠的终浓度为 16mg/mL;

[0049] ③磁珠的活化:取 0.1mg 的 EDC 和 0.3mg 的 NHS 溶解于 1mL 的 MES 缓冲液中,后将该缓冲液逐滴缓慢加入②步所得的磁珠溶液中,搅拌混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 1 小时。

[0050] ④抗体溶液的配制及与磁珠的链接:取 1mg 抗癌胚抗原单克隆抗体(购自武汉华美生物工程有限公司)并用去 1mL 离子水配制成浓度为 1mg/mL 的抗癌胚抗原抗体溶液,后取 500 μL 1mg/mL 抗体溶液,加入③步反应终止的磁珠溶液中,30 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜;

[0051] ⑤磁珠的清洗及封闭:利用磁场将磁珠与反应体系分离,用 15mL MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次,后用 2mL MES 缓冲液分散磁珠,使磁珠的终浓度为 40mg/mL,再向磁珠溶液中加入 2mL 1% 浓度的 BSA 溶液,搅拌混匀,30 摄氏度下静置 4 小时,然后利用磁场将磁珠与反应体系分离,并用 15mL pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液清洗磁珠两次,最后用 5mL pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液分散磁珠,磁珠的终浓度为 16mg/mL。

[0052] 3. 辣根过氧化物酶标记的抗癌胚抗原单克隆抗体的制备

[0053] ①称取 10mg 的辣根过氧化物酶溶解于 2mL 蒸馏水中,其终浓度为 5mg/mL;

[0054] ②向①步所得溶液中加入 0.5mL 新配置的 0.1M NaIO₄ 溶液,搅拌混匀,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下避光搅拌 30 分钟;

[0055] ③将上述溶液于 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜;

[0056] ④向上述溶液中加入 50 μL pH9.5 的碳酸钠缓冲液,后向反应体系中加入,25mg 抗癌胚抗原单克隆抗体,混匀,并于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下避光轻轻搅拌反应 2 小时,后加入 0.2mL 新配的 4mg/mL NaBH₄ 液,混匀,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置反应 2 小时;

[0057] ⑤将上述反应体系于 0.15M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌过夜;

[0058] ⑥取出透析袋中的液体,在搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液,后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 小时;后于 3000 离心 30min,弃上清;用饱和硫酸铵溶液洗涤沉淀两次,后将沉淀物用 0.5mL 0.15M pH7.4 的 PBS 溶液溶解;

[0059] ⑦将上述溶液装入透析袋中,于 0.15M pH7.4 的 PBS 缓冲液中透析,以去除铵离子,后将溶液置于 10000rpm 离心 30min,去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入等体积甘油混匀后分装,冰冻保存。

[0060] 4. 化学发光底物 A 液和 B 液的配制

[0061] A 液为 10mM pH7.0 磷酸盐缓冲溶液,其中包括 2mM H₂O₂、1g/L 脱脂奶粉、0.5g/L 卵白蛋白和 0.1% 吐温 20;

[0062] B 液为 100mM pH10.0 硼酸-硼砂缓冲液,其中包括 10mM 鲁米诺、0.3mM 4-羟基联苯。

[0063] 5. 浓缩洗涤液的配制

[0064] 准确称取 232g 十二水合磷酸氢二钠、23.8g 二水合磷酸二氢钠、6.8g 氯化钠,并加入 3L 的去离子水搅拌使各组分充分溶解后向溶液中加入 40mL 的吐温 20,搅拌混匀,然后用

去离子水将反应体系定容至 4L, 即得 20 倍浓缩洗涤液。

[0065] 6. 将上述校准品、抗癌胚抗原单克隆抗体包被的磁珠、酶标记抗癌胚抗原单克隆抗体、化学发光底物和浓缩洗涤液分装并密封保存, 即得癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒。

[0066] 实施例 2

[0067] 本实施例与实施例 1 不同的是, 抗癌胚抗原单克隆抗体包被磁珠的制备过程中采用的磁珠粒径为 $1.0 \mu\text{m}$ (购自德国 merck 公司)。

[0068] 实施例 3

[0069] 本实施例与实施例 1 不同的是, 抗癌胚抗原单克隆抗体包被磁珠的制备过程中采用的磁珠粒径为 $0.6 \mu\text{m}$ (购自德国 merck 公司)。

[0070] 实施例 4

[0071] 1. 癌胚抗原校准品的配制与实施例 1 相同。

[0072] 2. 抗癌胚抗原单克隆抗体包被磁珠的制备

[0073] ①磁珠的分散: 取 70mg 粒径为 $0.8 \mu\text{m}$ 的磁珠 (购自德国 merck 公司), 用 1mL 的 MES 缓冲液分散磁珠, 使磁珠的终浓度为 70mg/mL ;

[0074] ②磁珠的清洗: 用 3mL 的 MES 缓冲液清洗磁珠两次, 后用 5mL 的 MES 缓冲液重新分散磁珠, 使磁珠的终浓度为 14mg/mL ;

[0075] ③磁珠的活化: 取 0.2mg 的 EDC 和 0.4mg 的 NHS 溶解于 1mL 的 MES 缓冲液中, 后将该缓冲液逐滴缓慢加入②步所得的磁珠溶液中, 搅拌混匀, 30°C 下搅拌反应 1 小时。

[0076] ④抗体溶液的配制及与磁珠的链接: 取 1mg 抗癌胚抗原单克隆抗体 (购自武汉华美生物工程有限公司) 并用去 1mL 离子水配制成浓度为 1mg/mL 的抗癌胚抗原抗体溶液, 后取 $400 \mu\text{L}$ 1mg/mL 抗体溶液, 加入③步反应终止的磁珠溶液中, 30°C 下搅拌过夜;

[0077] ⑤磁珠的清洗及封闭: 利用磁场将磁珠与反应体系分离, 用 10mL MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次, 后用 2mL MES 缓冲液分散磁珠, 使磁珠的终浓度为 35mg/mL , 再向磁珠溶液中加入 1.5mL 1% 浓度的 BSA 溶液, 搅拌混匀, 30°C 下静置 4 小时, 然后利用磁场将磁珠与反应体系分离, 并用 10mL $\text{pH}7.4$ 的 Tris-HCl 缓冲液清洗磁珠两次, 最后用 5mL $\text{pH}7.4$ 的 Tris-HCl 缓冲液分散磁珠, 磁珠的终浓度为 14mg/mL 。

[0078] 3. 辣根过氧化物酶标记的抗癌胚抗原单克隆抗体的制备

[0079] ①称取 8mg 的辣根过氧化物酶溶解于 2mL 蒸馏水中, 其终浓度为 4mg/mL ;

[0080] ②向①步所得溶液中加入 0.5mL 新配置的 0.1M NaIO_4 溶液, 搅拌混匀, 于 30°C 下避光搅拌 30 分钟;

[0081] ③将上述溶液于 1mM $\text{pH}4.4$ 的醋酸钠缓冲液中 4°C 透析过夜;

[0082] ④向上述溶液中加入 $30 \mu\text{L}$ $\text{pH}9.5$ 的碳酸钠缓冲液, 后向反应体系中加入, 15mg 抗癌胚抗原单克隆抗体, 混匀, 并于 30°C 下避光轻轻搅拌反应 2 小时, 后加入 0.1mL 新配的 4mg/mL NaBH_4 液, 混匀, 置于 4°C 静置反应 2 小时;

[0083] ⑤将上述反应体系于 0.15M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液中, 4°C 条件下搅拌过夜;

[0084] ⑥取出透析袋中的液体, 在搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 后置于 4°C 静置 1 小时; 后于 3000 离心 30min , 弃上清; 用饱和硫酸铵溶液洗涤沉淀两次, 后将沉淀物用 0.5mL 0.15M $\text{pH}7.4$ 的 PBS 溶液溶解;

[0085] ⑦将上述溶液装入透析袋中,于 0.15M pH7.4 的 PBS 缓冲液中透析,以去除铵离子,后将溶液置于 10000rpm 离心 30min,去除沉淀,上清液即为酶结合物,加入等体积甘油混匀后分装,冰冻保存。

[0086] 4. 化学发光底物 A 液和 B 液的配制与实施例 1 相同。

[0087] 5. 浓缩洗涤液的配制与实施例 1 相同。

[0088] 6. 将上述校准品、抗癌胚抗原单克隆抗体包被的磁珠、酶标记抗癌胚抗原单克隆抗体、化学发光底物和浓缩洗涤液分装并密封保存,即得癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒。

[0089] 为了方便对实施例进行分析和观察,提供了对比实施例 1 和对比实施例 2。对比实施例 1 与实施例 1 不同的是,抗癌胚抗原单克隆抗体包被磁珠的制备过程中采用的磁珠粒径为 0.2 μm (购自德国 merck 公司)。对比实施例 2 与实施例 1 不同的是,抗癌胚抗原单克隆抗体包被磁珠的制备过程中采用的磁珠粒径为 1.1 μm (购自德国 merck 公司)。

[0090] A. 实施例试剂盒的方法学鉴定

[0091] 按照本领域中常规的检定规程对实施例 1 至 4 所制备的癌胚抗原磁微粒化学发光检测试剂盒进行检定,检定结果见表 1。

[0092] 表 1 实施例 1 至 4 所制备的癌胚抗原磁微粒化学发光检测试剂盒检定结果对比

[0093]

检验项目	检验标准	检验结果
准确性	平均回收率在 90.0-110.0%	符合标准
特异性	与其类似物的交叉反应率 \leq 0.01%	符合标准
精密度 CV (%)	\leq 10% (n=10)	符合标准
灵敏度	\leq 1.00pg/mL	符合标准
稳定性	各试剂组分置 37 $^{\circ}\text{C}$ 至少 3 天	符合标准

[0094] 由表 1 的检测结果可知,实施例 1 至 4 所制备的癌胚抗原磁微粒化学发光检测试剂盒,其各项指标符合相关的标准,制备的试剂盒性质优良。

[0095] B. 实施例试剂盒与酶联免疫分析检测试剂盒测值相关性试验

[0096] 1. 供试试剂盒

[0097] 实施例 2 所制备的试剂盒和酶联免疫检测试剂盒(购自北京北方生物技术研究所)

[0098] 2. 试验方法及结果

[0099] 通过实施例 2 所制备的试剂盒与购自北京北方生物技术研究所的酶联免疫检测试剂盒测定血清样本中癌胚抗原的含量的测定值进行比较,试验结果为图 1 所示,并进行回归分析。从图 1 中可以看出实施例 2 制备得到的试剂盒与酶联试剂盒在血清中癌胚抗原测值上具有良好的相关性。

[0100] C. 实施例试剂盒与进口癌胚抗原化学发光检测试剂盒性能比对

[0101] 1、供试试剂盒

[0102] 实施例 3 所制备的试剂盒和进口癌胚抗原化学发光检测试剂盒(购自美国贝克曼公司)

[0103] 2、实验结果及方法

[0104] 实施例 3 所制备的检测试剂盒其检测样本采用如下操作步骤:取 10 μL 待检测样本(校准管以校准品作为样本,空白以蒸馏水作为样本)于反应杯中,后加入 140 μL 辣根过氧化物酶标记癌胚抗原单克隆抗体,充分混匀,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10min;向反应体系中加入

50 μ L 磁微粒试剂,充分混匀,并于 37°C 温育 10min,后清洗分离磁珠;向磁珠中加入 100 μ L 发光底物 A 液和 B 液的混合溶液,反应并测定各管的光强度。绘制标准工作曲线,并根据标准工作曲线计算样本中癌胚抗原含量。

[0105] 美国贝克曼公司癌胚抗原化学发光检测试剂盒,检测样本的操作过程参考其产品说明书进行。

[0106] 实施例 3 制备的癌胚抗原化学发光检测试剂盒与美国贝克曼公司生产的癌胚抗原化学发光检测试剂盒对浓度为 20ng/mL 的癌胚抗原校准品进行检测,并通过分析检测结果对这两种检测试剂盒的重复性和准确度进行分析 and 比较。在实验过程中,每个试剂盒对校准品重复测定 10 次,分别计算测定均值(M)和标准差(S),以 $S/M \times 100\%$ 计算变异系数进行重复性考察,以 $(1-M/\text{样本浓度}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,实验结果见下表 2,由表 2 的结果可知本发明实施例 3 所制备的检测试剂盒其重复性和准确度性能优良,不亚于国际知名大公司生产的同类检测试剂盒。

[0107] 表 2 实施例 3 制备得到的试剂盒与贝克曼检测试剂盒参数对比

[0108]

测试序号	实施例 3	贝克曼检测试剂盒
1	19.98	19.56
2	20.56	19.78
3	20.13	20.65
4	19.56	20.13
5	19.96	19.84
6	20.06	20.45
7	19.87	20.32
8	20.25	20.45
9	19.95	19.68
10	20.12	20.13
平均值 (M)	20.044	20.099
标准差 (S)	0.2596	0.3705
变异系数 (CV%)	1.295%	1.843%
相对偏差 (Bias%)	0.22%	0.495%

[0109] D. 实施例试剂盒标准工作曲线比较

[0110] 取 10 μ L 待检测样本(校准管以校准品作为样本,空白以蒸馏水作为样本)于反应杯中,后加入 140 μ L 辣根过氧化物酶标记癌胚抗原单克隆抗体,充分混匀,并于 37 $^{\circ}$ C 温育 10min;向反应体系中加入 50 μ L 磁微粒试剂,充分混匀,并于 37 $^{\circ}$ C 温育 10min,后清洗分离磁珠;向磁珠中加入 100 μ L 发光底物 A 液和 B 液的混合溶液,反应并测定各管的光强度。根据校准品的浓度与光强度的关系绘制标准工作曲线,样本光强度在标准工作曲线上相对应的浓度值即为测定浓度。

[0111] 实施例 1 与对比实施例 1 和对比实施例 2 标准工作曲线见图 2。从图 2 结果可知,本发明检测试剂盒检测区间 5 ~ 80ng/mL 内具有良好的线性关系,如果被检测样本中 CEA 含量低于 5ng/mL 则认为是正常样本,如果样本中 CEA 含量高于 80ng/mL 则应使用样本稀释液稀释样本后进行检测;对比实施例 1 和对比实施例 2 制备的检测试剂盒在 5 ~ 80ng/mL 检测区间其标准曲线线性关系明显较实施例 1 差。

[0112] E. 实施例试剂盒的稳定性试验

[0113] 将实施例 1 制备的检测试剂盒于 37 $^{\circ}$ C 放置 3 天、6 天和 10 天后,检测样本中癌胚抗原的含量,结果表明实施例 1 制备的检测试剂盒于 37 $^{\circ}$ C 放置 3 天、6 天和 10 天之后,其对同一样本的测值结果完全一致。据此可以说明利用本发明得到的癌胚抗原化学发光检测试剂盒”具有良好的稳定性,能满足临床诊断在稳定性方面的需求。

[0114] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

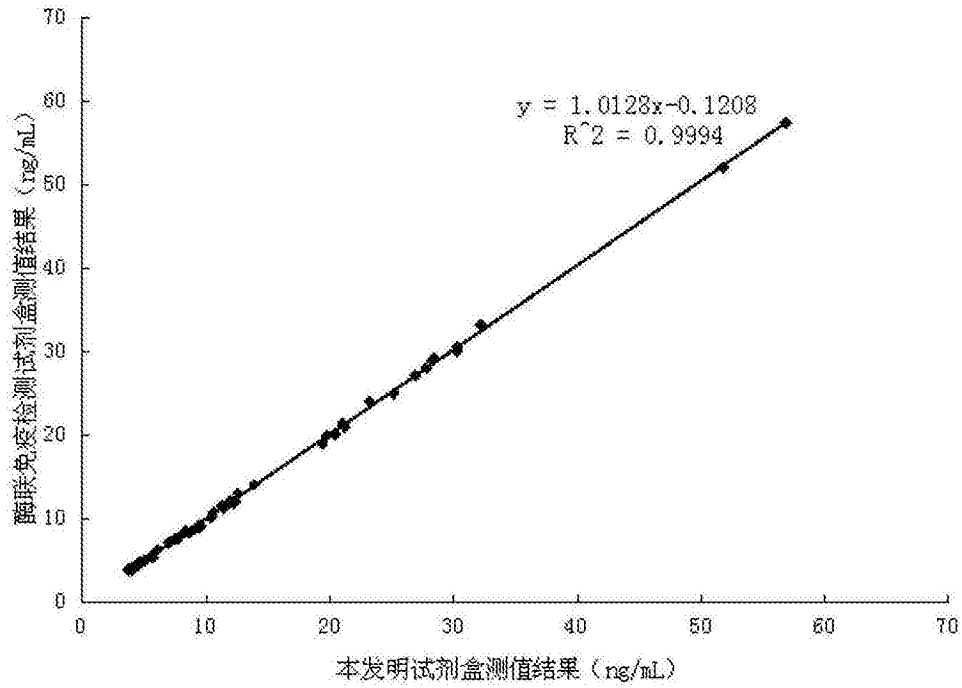


图 1

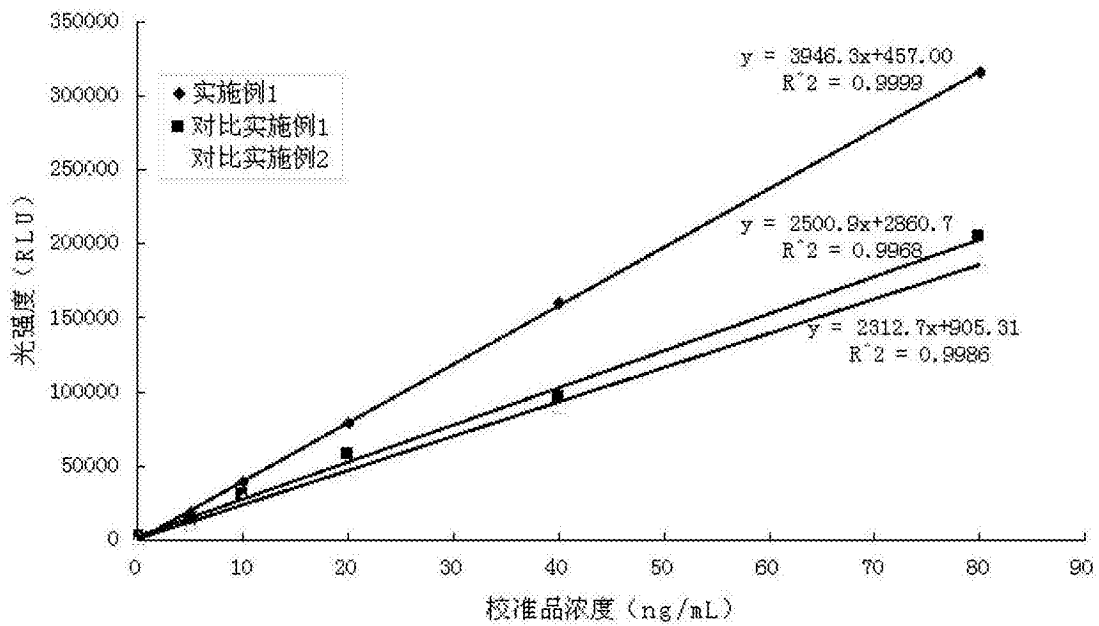


图 2

专利名称(译)	一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103472229B	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201310428782.4	申请日	2013-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	刘杰		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN103472229A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒及其检测方法，属于试剂盒技术领域。所述癌胚抗原磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒，包括癌胚抗原校准品、抗癌胚抗原抗体包被的磁珠、酶标记的单克隆抗体、酶所作用的化学发光底物以及浓缩洗涤液。本发明检测试剂盒利用磁分离以及化学发光检测法的优势，使检测过程简单、易于操作、便于自动化；同时本发明检测试剂盒还具有灵敏度高、特异性好、检测限低以及稳定性好等特性，能满足各种癌症临床辅助诊断或检测的需要。

