



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103777019 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410035830. 8

G01N 33/535(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 01. 26

G01N 21/76(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C201418 2014. 01. 19

CCTCC NO:C201417 2014. 01. 19

(71) 申请人 东北林业大学

地址 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号

申请人 东北林业大学大庆生物技术研究院  
李玉花

(72) 发明人 蓝兴国 李玉花 魏德强 李晓屿  
冯玥

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

抗 CA50 单克隆抗体产生的杂交瘤及化学发光免疫分析试剂盒的制备

(57) 摘要

抗 CA50 单克隆抗体产生的杂交瘤及化学发光免疫分析试剂盒的制备制备, 属于免疫分析医学领域。本发明提供了一种特异性识别 CA50 的单克隆抗体, 产生该单克隆抗体的杂交瘤, 以及使用该单克隆抗体检测 CA50 的高灵敏度的方法; 还提供了 CA50 化学发光免疫分析检测试剂盒及其制备方法, 该试剂盒包括: CA50 检测反应板、酶结合物、发光底物、标准品、质控品、浓缩洗涤液。本发明用细胞融合和杂交瘤技术研发出灵敏度高、特异性好的抗体; 同时用自主研发抗体将免疫学与化学发光技术相结合, 研制出检测范围宽、灵敏度高、操作方便、生产成本低的试剂盒。CA50 主要用于胰腺癌、结直肠癌、胃癌的辅助诊断。

1. 抗 CA50 的杂交瘤细胞株, 其保藏号分别为 CCTCC NO :C201417 和 CCTCC NO :C201418。

2. 抗 CA50 的单克隆抗体, 分别由保藏号为 CCTCC NO:C201417 和 CCTCC NO:C201418 的杂交瘤细胞系所分泌, 所述单克隆抗体命名为 11-1 和 2-1。

3. 如权利要求 2 所述的抗 CA50 单克隆抗体的应用, 即利用所述的单克隆抗体的双抗体夹心法 ELISA 检测 CA50, 夹心法两两配对的抗体来源于保藏号为 CCTCC NO:C201417 杂交瘤分泌的抗体 11-1 和保藏号为 CCTCC NO:C201418 杂交瘤分泌的抗体 2-1, 其步骤包括:

- (1) 以所述的两两配对的单克隆抗体 11-1 包被;
- (2) 加入待测样品孵育;
- (3) 以所述的两两配对的 HRP 标记的另一株单克隆抗体 2-1 作为二抗, 加入反应体系;
- (4) 洗涤后加入酶反应底物, 以 450nm 读取 OD 值;
- (5) 结果表明检测的灵敏度很高。

4. 一种检测血清中 CA50 含量的试剂盒, 包括: 包被有抗 CA50 单克隆抗体 11-1 的不透明聚苯乙烯板; CA50 抗原系列标准品; 酶标记的 CA50 单克隆抗体 2-1; 上述酶所作用的化学发光底物 A 液和 B 液以及洗涤液。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒, 其特征在于: 不透明聚苯乙烯板采用直接物理吸附法包被单克隆抗体 11-1, 包被液是碳酸盐缓冲液; 另一株 CA50 单克隆抗体 2-1 和辣根过氧化酶偶联形成酶标记抗体, 采用的是改良的过碘酸钠法进行标记; CA50 抗原系列标准品以小牛血清为基质, 加入 CA50 抗原纯品配置而成; 发光底物 A、B 为 HRP-Luminol 发光体系。

6. 如权利要求 4 所述的试剂盒, 其特征在于: 标记抗体所用的标记酶是辣根过氧化酶, 用的是高碘酸钠氧化法, 所得酶标记抗体最佳的工作浓度是 1:4000; 包被有抗 CA50 抗体的不透明聚苯乙烯板采用的是直接物理吸附法包被; 发光液 A 液用硼砂 7.99g, 硼酸 3.46g, 鲁米诺 0.28g, 对碘苯酚 0.07g, 加工艺用水定容至 700mL, 避光保存; 发光底物 B 液由下列成分组成: 硼砂 7.99g, 硼酸 3.46g, 过氧化脲 0.07g 加工艺用水定容至 700mL。

7. 如权利要求 4-6 所述试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 标准品的配制和浓度的校正

将 CA50 抗原纯品, 加入标准品稀释液, 配制一高浓度标准品浓液, 采用逐低稀释的方法稀释到各浓度, 配制成 0、5、20、100、250、500U/mL 的系列标准品, 标准品用国家标准品校正。

(2) 包被

采用 0.2mol/L, pH 值为 9.5 的 0.2M 碳酸盐缓冲液与 CA50 单抗混合成抗体浓度是 2 μg/mL 包被液, 以 100 μL/ 孔包被在不透明的聚苯乙烯板上, 4°C 孵育过夜;

(3) 洗板

用 PBS-T 洗液洗板孔 2 次;

(4) 封闭

封闭液包含 NaCl 8.00g, KCl 0.20g, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O 2.90g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20g, 蔗糖 20.00g, proclin 300 1.00mL, BSA 20.00g, 封闭液的 PH 值为 7.3-7.5, 150 μL/ 孔封闭, 湿盒放置孵育 3h;

(5) 干燥

去除封闭液,过夜干燥。

(6) 组装为成品

将聚苯乙烯板子放入铝箔袋中并放入干燥剂,密封保存。

## 抗 CA50 单克隆抗体产生的杂交瘤及化学发光免疫分析试剂盒的制备

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及 CA50 单克隆抗体产生的杂交瘤及检测血清中 CA50 含量的试剂盒, 可广泛应用于医学和生物化学技术领域。

### 【背景知识】

[0002] CA50 是一种广谱的肿瘤标志物, 主要分布于糖脂及高分子蛋白中, 不同肿瘤血清 CA50 阳性率不同。胰腺、肝脏、结肠、直肠等消化道恶性肿瘤患者中 CA50 阳性率较高。CA50 在血清中的含量与肿瘤组织的大小、转移与否及病情严重程度有直接的定量关系, 是用于胰腺癌早期诊断的一个有效指标。CA50 广泛存在于上皮组织肿瘤中, CA50 在血清中的含量与肿瘤组织的大小、转移及病情的严重程度有着直接的定量关系, 是胰腺癌早期诊断的一种有效手段。有研究表明, 胰腺癌患者血清 CA50 的含量明显高于正常组, 而且其特异性较高。

[0003] CA50 与 CA199 同属糖类蛋白抗原, 与 CA199 有交叉免疫性, 胰腺癌患者 CA50 检出率约为 50%。约 10% 的胰腺癌患者不产生 CA199, 仅产生 CA50, CA50 和 CA199 联合检测可修正部分 CA199 的假阴性结果。相关研究结果显示, 联合检测的敏感性和特异性均高于单一检测。因此, CA50 和 CA199 联合检测可提高胰腺癌的检出率, 有助于胰腺癌的早期诊断、疗效观察及复发预测。此外 CA50 和 CA199 与其他肿瘤标志物 CEA 及 CA242 的联合检测对胰腺癌诊断的特异性和敏感性高, 具有较高临床价值。

### 【发明内容】

[0004] 本发明的目的在于提供一种抗 CA50 单克隆抗体产生的杂交瘤以及建立一种简单且具高灵敏度的检测 CA50 的方法, 并将该方法应用胰腺癌的早期筛查。以解决现有的单克隆抗体检测 CA50 的灵敏度不够或价格昂贵, 不适合临床大规模的应用的缺点。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一种 CA50 化学发光免疫分析测定试剂盒以及该试剂盒的制备方法。利用该试剂盒分析检测灵敏度高、特异性强。

[0006] 本发明获得了能够产生特异性识别 CA50 的单克隆抗体 (mAb) 的杂交瘤细胞株 11-1 与杂交瘤细胞株 2-1, 此 2 株细胞株分别在 2014 年 1 月 19 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏地址是, 中国. 武汉. 武汉大学, 保藏编号为 CCTCC NO:C201417 与 CCTCC NO:C201418。此外, 经过鉴定, 两株单克隆抗体分别识别 CA50 的两个不同表位, 通过 11-1 与 2-1 的结合建立了双抗体夹心酶联免疫反应方法, 其是一种高灵敏度及高通量的检测系统。

[0007] 因此, 本发明提供了下面所述的 1 至 7 的内容:

[0008] 1. 抗 CA50 的杂交瘤细胞株, 其保藏号分别为 CCTCC NO:C201417 和 CCTCC NO:C201418。

[0009] 2. 抗 CA50 的单克隆抗体, 分别由保藏号为 CCTCC NO:C201417 和 CCTCC

NO:C201418 的杂交瘤细胞系所分泌,所述单克隆抗体命名为 11-1 和 2-1。

[0010] 3. 如权利要求 2 所述的抗 CA50 单克隆抗体的应用,即利用所述的单克隆抗体的双抗体夹心法 ELISA 检测 CA50,夹心法两两配对的抗体来源于保藏号为 CCTCC NO:C201417 杂交瘤分泌的抗体 11-1 和保藏号为 CCTCC NO:C201418 杂交瘤分泌的抗体 2-1,其步骤包括:

[0011] (1) 以所述的两两配对的单克隆抗体 11-1 包被;

[0012] (2) 加入待测样品孵育;

[0013] (3) 以所述的两两配对的 HRP 标记的另一株单克隆抗体 2-1 作为二抗,加入反应体系;

[0014] (4) 洗涤后加入酶反应底物,以 450nm 读取 OD 值;

[0015] (5) 结果表明检测的灵敏度很高。

[0016] 4. 一种检测血清中 CA50 含量的试剂盒,包括:包被有抗 CA50 单克隆抗体 11-1 的不透明聚苯乙烯板;CA50 抗原系列标准品;酶标记的 CA50 单克隆抗体 2-1;上述酶所作用的化学发光底物 A 液和 B 液以及洗涤液。

[0017] 5. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于:不透明聚苯乙烯板采用直接物理吸附法包被单克隆抗体 11-1,包被液是碳酸盐缓冲液;另一株 CA50 单克隆抗体 2-1 和辣根过氧化酶偶联形成酶标记抗体,采用的是改良的过碘酸钠法进行标记;CA50 抗原系列标准品以小牛血清为基质,加入 CA50 抗原纯品配置而成;发光底物 A、B 为 HRP-Luminol 发光体系。

[0018] 6. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于:标记抗体所用的标记酶是辣根过氧化酶,用的是高碘酸钠氧化法,所得酶标记抗体最佳的工作浓度是 1:4000;包被有抗 CA50 抗体的不透明聚苯乙烯板采用的是直接物理吸附法包被;发光液 A 液用硼砂 7.99g,硼酸 3.46g,鲁米诺 0.28g,对碘苯酚 0.07g,加工艺用水定容至 700mL,避光保存;发光底物 B 液由下列成分组成:硼砂 7.99g,硼酸 3.46g,过氧化脲 0.07g 加工艺用水定容至 700mL。

[0019] 7. 如权利要求 4-6 所述试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0020] (1) 标准品的配制和浓度的校正

[0021] 将 CA50 抗原纯品,加入标准品稀释液,配制一高浓度标准品浓液,采用逐低稀释的方法稀释到各浓度,配制成 0、5、20、100、250、500U/mL 的系列标准品,标准品用国家标准品校正。

[0022] (2) 包被

[0023] 采用 0.2mol/L, pH 值为 9.5 的碳酸盐缓冲液与 CA50 单抗混合成抗体浓度是 2 μg/mL 包被液,以 100 μL/孔包被在不透明的聚苯乙烯板上,4°C 孵育过夜;

[0024] (3) 洗板

[0025] 用 PBS-T 洗液洗板孔 2 次;

[0026] (4) 封闭

[0027] 封闭液包含 NaCl 8.00g, KC10.20g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.90g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20g, 蔗糖 20.00g, proclin300 1.00mL, BSA 20.00g, 封闭液的 PH 值为 7.3-7.5, 150 μL/孔封闭, 湿盒放置孵育 3h;

[0028] (5) 干燥

[0029] 去除封闭液,过夜干燥。

[0030] (6) 组装为成品

- [0031] 将聚苯乙烯板子放入铝箔袋中并放入干燥剂,密封保存。
- [0032] 上述的抗 CA50 的单克隆抗体,是由下列的方法所制备,步骤包括:
- [0033] (1)用蛋白量为 5KU/ 只的 CA50 抗原与弗氏完全佐剂混合免疫小鼠;经 15 天后进行第二次相同剂量与弗氏不完全佐剂混合免疫;再 15 天后进行第三次相同剂量与弗氏完全佐剂混合免疫;10 天后尾部取血用间接 ELISA 方法测血清滴度,用相同剂量的纯抗原不加佐剂加强免疫;3 天后取脾细胞进行融合;
- [0034] (2)将免疫小白鼠脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 5:1-10:1 的比例,用 50%PEG 作为融合剂融合;
- [0035] (3)用含 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶) 的无血清培养基,在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 10 天,常规间接 ELISA 方法筛选阳性孔;
- [0036] (4)筛选出的特异性强阳性孔用有限稀释法克隆,获得单抗细胞株进一步扩大培养;
- [0037] (5)收集培养上清液,亲和层析法纯化单克隆抗体,即为抗 CA50 单克隆抗体;
- [0038] (6)检测单克隆抗体的效价,选取效价高的一株进行 HRP 标记,并对标记好的单克隆抗体进行滴度测定;
- [0039] (7)标记好的单克隆抗体与其他未标记的单克隆抗体进行竞争 ELISA 反应,选取没有竞争的一株进行夹心 ELISA 反应,确定最佳条件。
- [0040] 本发明的单克隆抗体可直接用于检测样品中的 CA50 含量,通过大量培养单抗细胞株,即可获得大量的单克隆抗体,与多克隆抗体相比,具有纯度高,专一性强、重复性好等优点。
- [0041] 本发明针对临床实验室建立了一种既可以手工操作,又可以用于标准全自动检测仪器的检测手段,建立了检测人血清 CA50 的定量检测方法。本发明的 CA50 定量检测试剂盒(化学发光法)可以专一的检测出人血清中的 CA50 的含量,主要用于用于相关恶性肿瘤的辅助诊断、对已确诊的恶性肿瘤患者进行动态监测以辅助判断疾病的进程或治疗效果等。它具有简便、快速、灵敏、稳定的优点,本发明的试剂盒,包被的抗体 11-1 与酶标记的抗体 2-1 及被测样品中的 CA50 形成“包被抗体-抗原-抗体-酶”的夹心复合物结构,所以本发明采用的是“双抗夹心一步法”的反应模式。利用辣根过氧化酶催化发光底物,发光底物发生化学反应释放大量的能量,产生激发态的中间体,当其回到稳定的基态时,可以发射出光子,利用发光仪器测量光量子的产额,该光量子的产额和样品中的检测物质的量成正比,由此建立标准曲线并计算出样品中待测物质的含量。试剂盒检测方法具有灵敏度高,检测范围宽,操作方便、对实验人员无伤害,同时生产成本低,减轻了医患双方的负担,因此更有利与临床胰腺癌的早期筛查。

### 【附图说明】

- [0042] 图 1 显示的是本发明中的杂交瘤所产生的抗 CA50 单克隆抗体在 ELISA 方法中效价测定结果;
- [0043] 图 2 显示的是标记 HRP 的抗 CA50 单克隆抗体滴度测量结果;
- [0044] 图 3 显示的是夹心法 ELISA 系统的检测灵敏度;
- [0045] 图 4 显示的是所制备的试剂盒的标准品线形图。

**【具体实施方式】**

[0046] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。此外,应理解,在阐述了本发明的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动和修改,这些等价形式同样是本申请中权利要求书中所限定的范围。

[0047] 实施例 1 :动物免疫

[0048] 选择与所用的骨髓瘤细胞同源的 8 周龄左右的雄性 Balb/C 健康小鼠,抗原是蛋白量为 5KU/ 只的 CA50 抗原与弗氏完全佐剂、PBS 混合,完全乳化后,采取背部多点,及腋下、腹股沟免疫。免疫程序:经 15 天后进行第二次相同剂量与弗氏不完全佐剂混合免疫;再 15 天后进行第三次相同剂量与弗氏完全佐剂混合免疫;10 天后尾部取血用间接 ELISA 方法测血清滴 度,用相同剂量的纯抗原不加佐剂加强免疫;3 天后取脾细胞进行融合。

[0049] 实施例 2 :杂交瘤的构建

[0050] 1、骨髓瘤细胞株的培养及制备

[0051] (1) 本发明采用的是 SP2/0 骨髓瘤细胞,该细胞株生长及融合效率均佳,倍增时间为 10-12h。融合时选择处于对数生长期、细胞形态和活性佳的细胞。骨髓瘤细胞在融合前应先在培养基上作适应培养,使细胞生长到最佳的状态(即对数生长期);

[0052] (2) 将培养的 SP2/0 吸至 50mL 的管中,离心,弃上清,悬起,加 10mL 的培养基,吸取少量 10 倍稀释后,计数。

[0053] 2、脾细胞的制备

[0054] (1) 将小鼠放在密封袋中,充 CO<sub>2</sub> 使其窒息死亡;

[0055] (2) 将小鼠消毒固定在解剖板上,在超净工作台中取脾,放在 12mL 培养基的培养皿中,剥掉粘连组织,研磨脾脏,直至剩白色组织为止,吸管全部吸起,再缓慢打出使组织块粘连的管壁上,离心,弃上清,加 10mL 的红细胞裂解液裂解 10min,再加 20-25mL 的培养基终止其反应,离心后,弃上清,加 10mL 的培养基,吸取少量 10 倍稀释后,计数。

[0056] 3、细胞融合

[0057] 细胞融合是杂交瘤技术的中心环节,基本步骤是取处于对数生长期的 Sp2/0 细胞与脾细胞 1:10 混和,通过聚乙二醇(PEG)法以获得杂交瘤细胞,命名为 11-1 和 2-1。所获得的杂交瘤细胞悬浮在含有饲养细胞的 HAT 培养基中,然后加入到 96 孔板中,在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中封闭培养 12 天。

[0058] 实施例 3 :单克隆抗体的制备及筛选

[0059] 1、单克隆抗体的制备

[0060] 从实施例 2 中所获得的杂交瘤细胞的孔格中回收培养基的上清液,选取在 ELISA 方法中与抗原多肽反应的单克隆抗体。

[0061] 2、单克隆抗体的筛选

[0062] (1) 将 100uL 浓度为 10U/ml 的 CA50 到 96 孔板的每个孔格中,于 4℃过夜后使其固定于固相;

[0063] (2) 用 150uL 浓度为 1% 的牛血清白蛋白进行封闭 2h;

[0064] (3) 将 100uL 杂交瘤细胞的培养基上清液加入到每个孔格中,于 37℃反应 2h,然后

加入稀释 10000 倍的辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠抗体于 37℃ 反应 1h；

[0065] (4) 使用四甲基联苯胺微孔过氧化物酶底物 (TMB) 作为底物进行显色 20min；

[0066] (5) 添加 50uL 浓度为 0.2N 的硫酸终止反应后, 测量 450nm 的吸光度；

[0067] (6) 选出吸光度大约为 3 的 11-1 和 2-1, 并通过有限稀释法进行亚克隆。

[0068] 3、单克隆抗体的大量制备及和纯化

[0069] 将亚克隆后的细胞用细胞培养转瓶进行扩大培养, 约 20 天后, 收集上清, 用葡萄球菌 A 蛋白 (Protein A) 进行亲和层析纯化。得到的单克隆抗体分别命名为 11-1 与 2-1。

[0070] 4、单克隆抗体效价的测定

[0071] 所筛选出的 2 株单克隆抗体的效价通过 ELISA 方法来测定。分别加入 11-1、2-1 (10ug/mL), 在反应后, 使用辣根过氧化物酶偶联的抗 - 小鼠抗体与 TMB 进行显色, 结果如图 1 所示两株单克隆抗体的效价达到  $10^{-9}$  以上。

[0072] 实施例 4 :单克隆抗体的标记及滴度的测定

[0073] 将纯化出的抗体按常规方法进行 HRP 标记, 标记好的单克隆抗体的滴度通过下面的方法测定, 将浓度为 10U/mL 的 CA50 固定在 96 孔微板上 (100uL/ 孔)。使用 1% 的牛血清白蛋白进行封闭 2h, 加标记的单克隆抗体 (第一孔 100 倍稀释), 从第二孔开始 4 倍稀释, 于室温下反应 1h。添加 TMB 后, 反应在室温下进行 20min, 用 0.2N 的硫酸中止反应。测量在 450nm 的吸光度, HRP 标记的单克隆抗体的滴度结果如图 2 所示。

[0074] 实施例 5 :双抗体夹心 ELISA 检测 CA50 方法的建立

[0075] (1) 以所述的两两配对的单克隆抗体 11-1 包被, 2ug/ml 的单克隆抗体以 100uL/ 孔加到微孔板上, 于 4℃ 孵育 24h 固定于固相；

[0076] (2) 微孔板使用含有 0.1%Tween-20 的 pH 值为 7.4 的 20mM PBS 以 200uL/ 孔的量洗 2 次。以 150uL/ 孔的量加入 1% 牛血清白蛋白进行封闭 2h。

[0077] (3) 微孔板用 PBST 以 200uL/ 孔的量洗 4 次, 加入由起始浓度 10ug/ml 连续 4 倍稀释 CA50, 于室温温育 2h, 然后加入标记 HRP 的另一株抗体 2-1 (1:4000 ;100uL/ 孔) 并于室温温育 2h。

[0078] (4) 添加 TMB 后, 反应在室温下进行 20min, 加入 0.2N 的硫酸中止反应并测量 450nm 的吸光度。

[0079] (5) 检测结果见附图 3 所示。

[0080] 实施例 6 :制备本发明的 CA50 定量测定试剂盒(化学发光法)

[0081] (一) 高碘酸钠氧化法标记辣根过氧化酶

[0082] (1) 酶的氧化(全过程避光)

[0083] a、称取 3-5mg HRP 溶解于 600  $\mu$  L ddH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中；

[0084] b、加入新鲜配制的 150uL 0.1M 高碘酸钠 (NaIO<sub>4</sub>) (MW :213.89g/mol, 取 0.22g 溶解于 10mL 10mM pH7.0 磷酸钠缓冲液中)；

[0085] c、混匀, 室温, 避光孵育 20min；

[0086] d、将溶液用透析管透析, 3000rpm/min, 4℃, 20min, 溶液为 1.0mM pH4.0 醋酸钠缓冲液, 换 3-4 次；

[0087] e、最后透析至 800  $\mu$  L, 至 EP 管中；

[0088] (2) 抗体的准备和标记(避光)

[0089] a、取准备好的 3mg 单抗,用离心管浓缩成 500  $\mu$  L-1000  $\mu$  L 体积,吸出于新的 15mL 离心管中;

[0090] b、加入 500  $\mu$  L 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液,混匀,检测 pH 值在 9.0 ~ 9.5;

[0091] c、立即将透析好的 HRP 溶液与单抗溶液混合,室温摇晃 2h,避光;

[0092] d、加入 80  $\mu$  L 新鲜配制的 NaBH4 (4.0mg/mL, 取 40mg 溶解于 10mL ddH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中);

[0093] e、混匀(避光),4℃孵育 1.5h;

[0094] f、用 PBS 透析至体积为 2mL;

[0095] g、加入等体积甘油,1mL/管, -20℃保存

[0096] (二) 酶标抗体工作液的配制

[0097] (1) 酶标稀释液的配制

[0098]

三羟甲基氨基甲烷	7.27 g
----------	--------

浓盐酸	适量
-----	----

BSA	12.0 g
-----	--------

氯化钠	1.2 g
-----	-------

Proclin300	1.2 mL
------------	--------

胭脂红	0.012 g
-----	---------

工艺用水	800.0 mL
------	----------

工艺用水定容至 1200.0 mL

[0099] 按照标准配方准确称取三羟甲基氨基甲烷 7.27g, 加工艺用水 800.0mL, 搅拌使充分溶解后, 加入浓盐酸适量, 搅拌均匀, 使用数显酸度计测量液体的 pH 值为 7.1 ~ 7.3, 再将称量好的其他配方组分依次加入上述溶液中, 充分搅拌溶解后, 使用工艺用水定容至 1200.0mL, 按《316L SGP150K 型不锈钢膜式液体精密过滤器标准操作规程》进行除菌过滤, 过滤后液体 2 ~ 8℃保存备用。

[0100] (2) 酶标抗体工作液的配制

[0101] 经试验证明, 酶标抗体的最佳工作浓度是 1:4000, 用(1)所述的稀释液将酶标抗体稀释到所需要的工作浓度。

[0102] 检验合格的酶结合物缓冲液按照所用抗体的稀释比例添加 CA50-HRP, 顺时钟方向搅拌 30min 充分混合均匀后 2 ~ 8℃保存备用, 分装时按 96 人份:11.0mL/瓶, 有效期 18 个月。

[0103] (三) CA50 标准品的配制

[0104]

三羟甲基氨基甲烷	6.0 g
浓盐酸	适量
氯化钠	9.0 g
牛血清白蛋白	20.0 g
工艺用水	800.0 mL

工艺用水定容至 1000.0 mL

[0105] 按照标准配方内容准确称取上述各组分,加入工艺用水 800.0mL 搅拌充分溶解后,使用数显酸度计测量液体的 pH 值应为 7.1 ~ 7.3,用工艺用水定容至 1000.0mL,混合均匀,将 CA50 抗原纯品,加入标准品稀释液,配制一高浓度标准品浓液,采用逐低稀释的方法稀释到各浓度,配制成 0、5、20、100、250、500U/mL 的系列标准品,2 ~ 8℃保存备用。

[0106] 检验合格的 CA50 标准品分装时,0.3mL/ 瓶,有效期 18 个月。

[0107] (四) CA50 单克隆抗体包被聚苯乙烯板

[0108] (1) 将 0.05mol/L, pH9.6 的磷酸氢二钾溶液和 CA50 单克隆抗体 11-1 混合制成包被液,将其包被于聚苯乙烯板上,放置湿盒中,过夜包被;

[0109] (2) 洗涤:用 PBS-Tween 洗液洗板孔 2 次;

[0110] (3) 封闭:

[0111] 封闭液的配制:

[0112]

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.90g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
蔗糖	20.00 g
proclin300	1.00 mL
BSA	20.00 g
工艺用水	800.00mL

工艺用水定容至 1000.00mL

[0113] 准确称量 NaCl8.00g, KCl0.20g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O2.90g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.20g, 搅拌均匀, 使用数显酸度计测量液体的 pH 值为 7.3 ~ 7.5,再将称量好的其他配方组分依次加入上述溶液中,充分搅拌溶解后,使用工艺用水定容至 1000.00mL,2 ~ 8℃保存备用,有效期 15 天。使用时 150 μ L/ 孔,湿盒孵育 2h,甩掉封闭液,在干净的吸水纸上拍干;

[0114] (4) 干燥:将聚苯乙烯板放置在冻干机上冻干 2h,真空封袋,贴签后置 2-8℃保存。

[0115] (五) 化学发光底物液

[0116] 本发明所使用的辣根过氧化酶(HRP)的化学发光底物液的配制方法是:

[0117] 化学发光底物 A 的配制方法:

[0118]

硼砂	7.99 g
硼酸	3.46 g
鲁米诺	0.28 g
对碘苯酚	0.07 g
工艺用水	600.0mL

工艺用水 定容至 700.0mL

[0119] 准确称取上述各组分,加入纯化水 600. 0mL,搅拌充分溶解后定容至 700. 0mL,测定溶液的 pH 应为 9. 1 ~ 9. 4, 2 ~ 8℃避光保存备用。

[0120] 按检验合格后按 96 人份 :6. 0mL/ 瓶分装, 有效期 18 个月。

[0121] 化学发光底物 B 的配制方法 :

[0122]

硼砂	7.99 g
硼酸	3.46 g
过氧化脲	0.07 g
工艺用水	600.0 mL

工艺用水定容至 700.0 mL

[0123] 准确称取上述各组分,加入纯化水 600. 00mL,搅拌充分溶解后定容至 700. 00mL,测定溶液的 pH 应为 9. 1 ~ 9. 4, 2 ~ 8℃保存备用。

[0124] 检验合格后按 96 人份 :6. 0mL/ 瓶分装, 有效期 18 个月。

[0125] 使用方法 :使用前将 A 液和 B 液按 1:1 比例混合使用。

[0126] (六) 10× 洗涤液

[0127]

NaCl	80.00 g
KCl	2.00g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29.00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.00 g
Tween-20	5.00 mL
工艺用水	800.00 mL

工艺用水定容至 1000.00mL

[0128] 准确称取上述各组分,加入工艺用水定容至 800. 00mL,搅拌充分溶解后,加工艺用水定容至 1000. 00mL,测定溶液的 pH 应为 7. 1 ~ 7. 4, 室温保存备用。

[0129] 检验合格后按照 96 人份,30. 00mL/ 瓶分装, 有效期 18 个月。

[0130] (七) 半成品及成品的组成

[0131] 上述步骤所得的各种半成品组成及产品说明书等各种附件组装成 CA50 定量测定试剂盒(化学发光法)。

[0132] 试剂盒中的固相抗体是提前包被好的,不需要现场包被,使用方便且节时;校准品是液体;酶标记物是已经稀释到工作浓度的液体,也可以直接使用。

[0133] 实施例 7 :本发明 CA50 定量测定试剂盒(化学发光法)操作方法如下 :

[0134] (一) 准备

[0135] 将要待检血清样品和检测试剂盒恢复至室温(18-25℃) (大约 15min), 本发明的试剂盒中的不透明的聚苯乙烯板已经将 CA50 抗体固定在板孔中, 可直接使用, 不用现时包被, 使用非常方便。

[0136] (二) 操作方法 :

[0137] 1、将所需要量的已包被的板条放置在支架上 ;

[0138] 2、在包被孔中分别加入 10 μ L 的标准品和血样 ;

[0139] 3、每孔加入 100 μ L 的酶标记物, 稍微振荡使其混合均匀 ; 置湿盒中孵育 1h ;

[0140] 4、弃去孔内液体, 用稀释后的洗涤液, 自动洗板机或者手工洗板 4 次, 最后在干净的吸水纸上扣干 ;

[0141] 5、将发光底物 A、B 等比例混合至本次所用的体积, 每孔加入混合后的发光底物 100 μ L, 稍微振荡使其混合均匀, 避光室温反应 3min ;

[0142] 6、化学发光仪检测相对发光值(RLU), 测量时间是 0.1-1 秒 / 孔 ;

[0143] 7、分别对标准品浓度和相对发光值(RLU) 取对数值, 建立标准曲线(见附图 4), 以待测血清 RLU 的值在标准曲线查出血清中 CA50 的浓度值, 计算检测结果 ;

[0144] 8、统计分析检测结果。

[0145] 以本发明的上述试剂盒按照上述步骤进行测定所用的时间短、仅需要一个多小时就可全

[0146] 部完成, 方便快速。

[0147] 实施例八本发明的试剂盒测定时的方法学指标如下 :

[0148] 1、检测范围 : 0-500U/mL ;

[0149] 2、灵敏度 : 最小检出限是 1U/mL ;

[0150] 3、精密度 : 分析内精密度(检测低、中、高三组样品 (n=10) 均小于 15%, 分析间的精密度(检测低、中、高三组样品 (n=10) 均小于 15%, 高于国家标准, 说明本发明的试剂盒在检测试验中具有良好的重复性 ;

[0151] 4、线性 :  $r \geq 0.99$  ;

[0152] 5、特异性 : 和 CA153、CA125、CA724、CA199 等常见肿瘤标志物无交叉反应。

[0153] 本发明的试剂盒所用的血清量少, 只需要 10 μ L, 体外检测对患者没有任何的副作用 ; 同时本发明用的是化学发光免疫分析方法, 各项指标也优于酶联免疫吸附分析方法(ELISA), 因此本发明为临床检测 CA50 提供了一种更简便、快速、准确的方法, 更能满足临床上的需求。

[0154] 实施例九本发明的试剂盒临床血样测值

[0155] 取用医院临床收集病人血清标本 60 份, 用本发明的试剂盒进行临床检测, 其测值如下 :

[0156]

标记	计算浓度	理论浓度	发光值
S0	0.00	0.00	7916
S1	5.21	5.00	210657
S2	18.21	20.00	599623
S3	105.87	100.00	2612407

S4	256.35	250.00	5472271
S5	485.09	500.00	9327738

[0157]

编号	血样值	发光值	编号	血样值	发光值
U1	4.2840	178783	U31	10.4540	376936
U2	2.9530	130974	U32	24.3570	764587
U3	0.9560	50990	U33	19.8350	643940
U4	1.5790	77589	U34	73.5470	1926377
U5	3.4880	150539	U35	12.8610	448237
U6	3.3020	143796	U36	57.1430	1559899
U7	3.9420	166754	U37	51.4930	1429831
U8	5.7970	230230	U38	36.2130	1065257
U9	1.9740	93536	U39	103.5050	2563443
U10	3.5800	153843	U40	224.5220	4898073
U11	0.2950	19103	U41	170.7290	3895491
U12	3.4430	148909	U42	68.4620	1814349
U13	2.8590	127496	U43	101.3540	2518823
U14	6.2310	244544	U44	64.9210	1735549
U15	4.2850	178824	U45	92.2400	2327983
U16	4.8270	197544	U46	91.3860	2309944
U17	2.1240	99450	U47	91.8800	2320387
U18	8.9550	331169	U48	123.7030	2975496
U19	2.6280	118803	U49	78.6040	2036516
U20	5.7580	228931	U50	96.9380	2426733
U21	0.4790	28640	U51	10.4540	376936
U22	3.8690	164177	U52	24.3570	764587
U23	4.8600	198653	U53	19.8350	643940
U24	5.5720	222727	U54	73.5470	1926377
U25	27.3790	843156	U55	12.8610	448237
U26	19.5640	636589	U56	57.1430	1559899
U27	14.8360	505119	U57	51.4930	1429831
U28	46.4640	1312110	U58	36.2130	1065257
U29	11.1990	399280	U59	103.5050	2563443
U30	10.2460	370664	U60	224.5220	4898073

[0158] 首先对上表中的标准品浓度和相对发光值(RLU)取对数值,建立标准曲线,标准曲线相关系数R值是0.99,并以待测血清RLU的值在标准曲线中查出血清中CA50的浓度值,统计分析检测结果,与临床检测值比较,符合率达到99%。

[0159] 综上所述,本发明的试剂盒操作简单、价格便宜、对患者无副作用、快速、准确率高等优点,更适于推广使用。

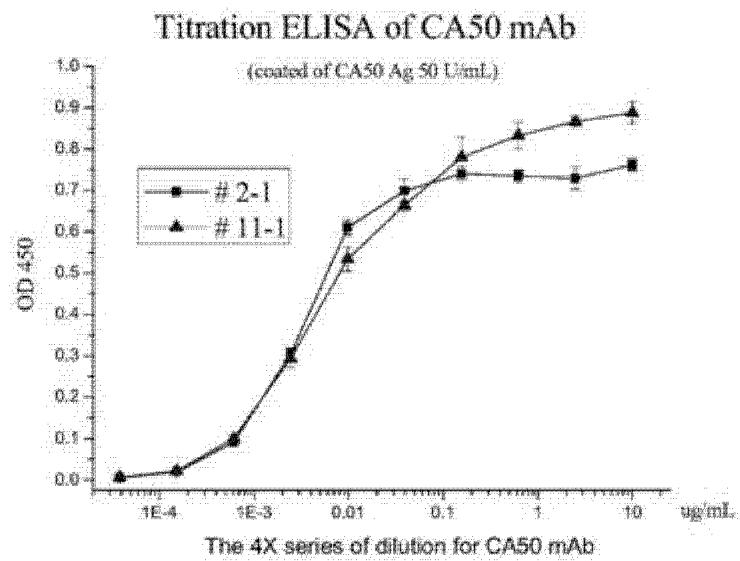


图 1

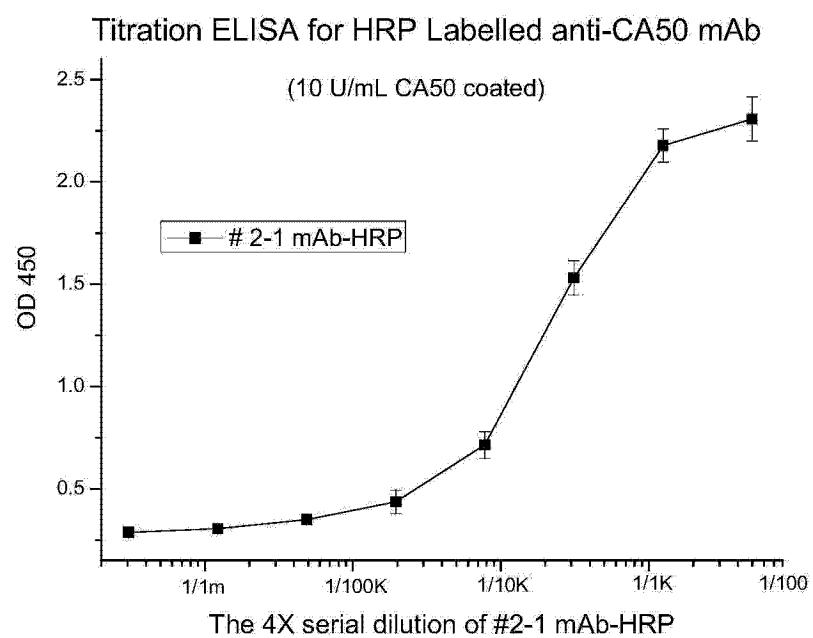


图 2

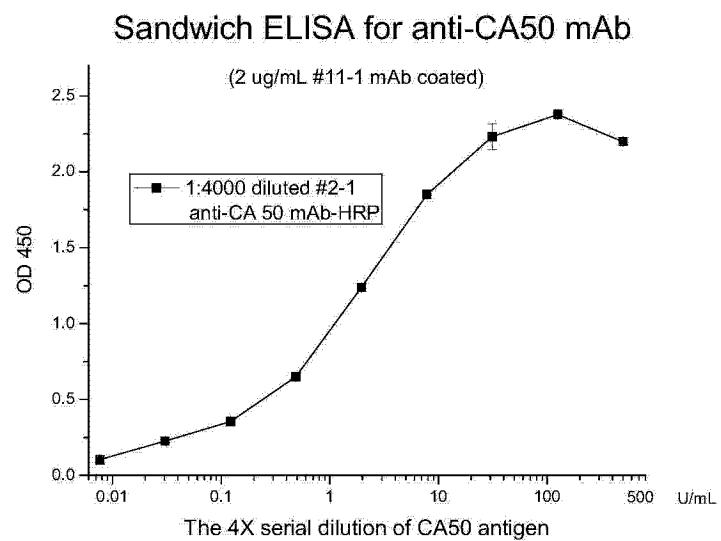


图 3

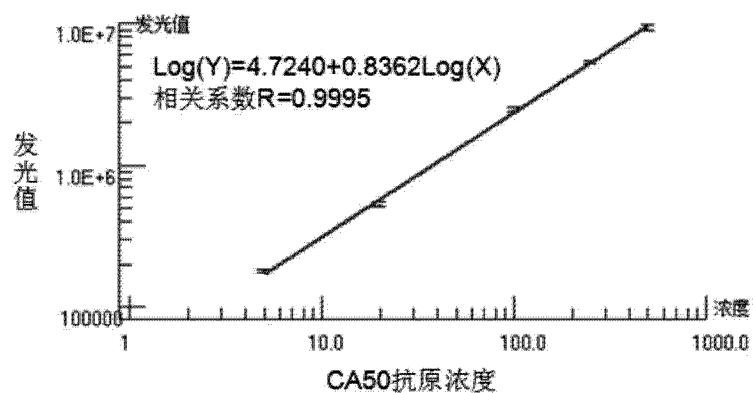


图 4

专利名称(译)	抗CA50单克隆抗体产生的杂交瘤及化学发光免疫分析试剂盒的制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN103777019A</a>	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201410035830.8	申请日	2014-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	东北林业大学 东北林业大学大庆生物技术研究院 李玉花		
申请(专利权)人(译)	东北林业大学 东北林业大学大庆生物技术研究院 李玉花		
当前申请(专利权)人(译)	东北林业大学 东北林业大学大庆生物技术研究院 李玉花		
[标]发明人	蓝兴国 李玉花 魏德强 李晓屿 冯玥		
发明人	蓝兴国 李玉花 魏德强 李晓屿 冯玥		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

抗CA50单克隆抗体产生的杂交瘤及化学发光免疫分析试剂盒的制备制备，属于免疫分析医学领域。本发明提供了一种特异性识别CA50的单克隆抗体，产生该单克隆抗体的杂交瘤，以及使用该单克隆抗体检测CA50的高灵敏度的方法；还提供了CA50化学发光免疫分析检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒包括：CA50检测反应板、酶结合物、发光底物、标准品、质控品、浓缩洗涤液。本发明用细胞融合和杂交瘤技术研发出灵敏度高、特异性好的抗体；同时用自主研发抗体将免疫学与化学发光技术相结合，研制出检测范围宽、灵敏度高、操作方便、生产成本低的试剂盒。CA50主要用于胰腺癌、结直肠癌、胃癌的辅助诊断。

三羟甲基氨基甲烷	6.0 g
浓盐酸	适量
氯化钠	9.0 g
牛血清白蛋白	20.0 g
工艺用水	800.0 mL

工艺用水定容至1000.0 mL