



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108414743 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810186996.8

(22)申请日 2018.03.07

(71)申请人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾
大道2076号中国高科大厦六楼A2

(72)发明人 张大准 张永顶 马伟民 王洪涛
马新民

(74)专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事
务所(普通合伙) 44285

代理人 王仲凯

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

(54)发明名称

一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿
瘤标志物检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及酶联免疫技术领域,公开了一种
用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物
检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包
括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有胎牛血
清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠;所述酶
标稀释液含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲
酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300。本发明从
酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通
过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长
时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制
备的肿瘤标志物检测试剂盒在具有较佳稳定性
的基础上,还具备较高的灵敏度、准确度和精密
度。

1. 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,其特征在于,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠;所述酶标稀释液含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300。

2. 根据权利要求1所述组合物,其特征在于,所述封闭液含有20%-25%胎牛血清,2%-5%海藻糖,0.01M PBS、0.02%-0.05%Tween20、1%-3%PVA,0.05%叠氮钠,pH值为7.4,余量为水。

3. 根据权利要求1所述组合物,其特征在于,所述酶标稀释液含有0.1M Tris、2.5%-5%酪蛋白、2%-5%海藻糖、0.2%-0.5%对羟基苯甲酸钠、0.01%-0.05%阿拉伯树胶、1%-5%PEG,0.05%proclin300,余量为水。

4. 权利要求1-3任意一项所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用。

5. 根据权利要求4所述应用,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒为肿瘤标志物免疫检测试剂盒。

6. 一种肿瘤标志物检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:

包被有肿瘤标志物抗体的蛋白芯片、生物素化的肿瘤标志物抗体、用酶标稀释液稀释包含酶标亲和素的酶标记物、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被肿瘤标志物后采用封闭液封闭,所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠,所述酶标稀释液含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300。

7. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述封闭液含有20%-25%胎牛血清,2%-5%海藻糖,0.01M PBS、0.02%-0.05%Tween20、1%-3%PVA,0.05%叠氮钠,pH值为7.4,余量为水。

8. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述酶标稀释液含有0.1M Tris、2.5%-5%酪蛋白、2%-5%海藻糖、0.2%-0.5%对羟基苯甲酸钠、0.01%-0.05%阿拉伯树胶、1%-5%PEG,0.05%proclin300,余量为水。

9. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述肿瘤标志物选自AFP、CEA、CA19-9、CA242、CA125、CA15-3、CA72-4、CA50、SF、HGH、 β -HCG、TPSA、FPSA、CT、SCC、NSE、CYFRA21-1、Pro-GRP、TSGF、POA、PGI、PGII中的一种或两种以上。

10. 根据权利要求6或9所述试剂盒,其特征在于,所述肿瘤标志物采用CB缓冲液、PBS缓冲液或Tris缓冲液为肿瘤标志物稀释缓冲液进行包被。

11. 根据权利要求6-10任意一项所述试剂盒,其特征在于,所述蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、样品质控点、酶标质控点、标准曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上。

12. 权利要求6所述试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

将肿瘤标志物抗体在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有肿瘤标志物抗体的蛋白芯片,所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠;

配制含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300的酶标稀释液并稀释包含酶标亲和素的酶标记物,获得用酶标稀释液稀释的酶标记亲和素,然后制备生物素化的肿瘤标志物抗体以及配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得肿瘤标志

物检测试剂盒。

一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫技术领域,具体涉及一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤,尤其是恶性肿瘤(癌症)是一类严重威胁人类健康的多发病和常见病。近年来,癌症的发病率和死亡率一直呈上升的趋势,而且存在发现晚、治疗不及时,导致死亡率较高的难题。虽随着科学和经济的发展,对肿瘤的治疗发展出了一些新的方法和药物,但及早发现和预防仍然是对癌症的有效防治方法。

[0003] 肿瘤标志物是指在肿瘤的发生和增殖过程中,由肿瘤细胞本身所产生的或者是由机体对肿瘤细胞反应而产生的,反应肿瘤存在和生长的一类物质,包括蛋白质、激素、酶、多胺及癌基因等。如甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原19-9(CA19-9)、癌抗原242(CA242)、癌抗原125(CA125)、癌抗原15-3(CA15-3)、癌抗原72-4(CA72-4)、癌抗原50(CA50)、铁蛋白(SF)、生长激素(HGH)、绒毛膜促性腺激素 β 亚基(β -HCG)、总前列腺特异性抗原(TPSA)、游离前列腺特异性抗原(FPSA)、降钙素(CT)、鳞状细胞癌抗原(SCC)、神经元烯醇化酶(NSE)、非小细胞肺癌相关抗原(CYFRA21-1)、胃泌素释放肽前体(Pro-GRP)、肿瘤相关物质(TSGF)、胰胚胎抗原(POA)、胃蛋白酶I(PGI)、胃蛋白酶II(PGII)。这些肿瘤标志物的检测对肿瘤早期筛查,疗效观察,追踪复发等都具有重要意义。

[0004] 肿瘤标志物大多无器官特异性,为广谱标志物。例如:正常成人的血液中CEA很难测出,70-90%的结肠腺癌患者CEA高度阳性,在其他恶性肿瘤中的阳性率顺序为胃癌(60-90%)、胰腺癌(70-80%)、小肠腺癌(60-83%)、肺癌(56-80%)、肝癌(62-75%)、乳腺癌(40-68%)、泌尿系癌肿(31-46%)。同时,一种癌症患者往往存在多种肿瘤标志物的异常或是明显升高,因此单项指标检测一般都存在特异性不强、阳性率偏低、特别是对早期肿瘤的检出率不高等难题。同时检测多种肿瘤标志物能显著提高相关肿瘤的检出率,也能更有效的帮助判断肿瘤的类型,以便协助进一步的确诊及诊疗方案的确定。例如:联合测定CEA、PGI、PGII、CA19-9、CA72-4能大大的提高胃癌的检出率;同时检测AFP、SF、CA125有利于肝癌的判断;还有CEA、SCC、ProGRP、CYFRA21-1、NSE、CA125等是肺癌的标志物;等等。鉴于此,对肿瘤标志物多项指标的联合检测逐渐受到多数学者的关注,同时也将受到临床越来越高的重视。多项肿瘤标志物的联合检测尤其适用于健康或亚健康人群的防癌普查,有利于肿瘤的早期发现,为临床诊断、治疗提供检测手段。

[0005] 目前较常用的肿瘤标志物的检测方法主要有:放射免疫分析法,酶联免疫分析法,化学发光免疫分析法,免疫印迹法等,普遍采用的酶联免疫吸附法虽然灵敏度高、特异性也较好,但检测指标单一,无法达到普查的目的;放免法有污染的危险;化学发光免疫分析法存在发光时间短,需要严格掌握测量时间的缺陷;免疫印迹灵敏度低、操作繁琐,且无法定量测定。随着科技手段的发展和成熟,近来也发展出了部分高通量、高灵敏度的肿瘤标志物

抗体芯片试剂盒:CN103869068,其虽然具有廉价、灵敏、准确、高通量、标本使用量少、且能在普通实验室推广和规模化等优点,但该试剂盒需要通过配备标准品、并通过将标准品稀释不同倍数然后测定信号值,来制定标准曲线,用于待测样品的定量,仍然较为繁琐。

[0006] 我们知道蛋白质芯片是一种高通量的蛋白功能分析技术,是近年来发展起来的一项生物检测技术,这项技术是将蛋白质的分析微缩到小型芯片上,利用荧光或酶显色进行探测,最后用特定的计算机软件加以分析。如专利CN103869068公开了一种高通量、高灵敏度的肿瘤标志物抗体芯片试剂盒,其虽然具有廉价、灵敏、准确、高通量、标本使用量少、且能在普通实验室推广和规模化等优点,但该试剂盒需要通过配备标准品、并通过将标准品稀释不同倍数然后测定信号值,来制定标准曲线,用于待测样品的定量,仍然较为繁琐。更为值得关注的是,目前该类试剂盒的稳定性并不好。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,使得所述组合物用于制备酶联免疫试剂盒时能够显著提高试剂盒在低温和室温下的稳定性,保存时间延长;

[0008] 本发明的另外一个目的在于提供上述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是用于检测肿瘤标志物的相关试剂盒;

[0009] 本发明的另外一个目的在于提供一种包含上述组合物的肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法,使得所述试剂盒在低温和室温下具有较长时间的稳定性,同时检测结果具有较高的特异性和敏感性。

[0010] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0011] 一种用于酶联免疫试剂盒的组合物,包括封闭液和酶标稀释液;所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠;所述酶标稀释液含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300。

[0012] 针对现有酶联免疫试剂盒稳定较差、保存时间较短的缺陷,本发明意外发现了从制备试剂盒的封闭液和酶标稀释液(用于稀释酶标记物用)入手,通过选择合适的组分完善两者的组成,能够显著提高酶联免疫试剂盒的稳定性和保存时间。

[0013] 作为优选,所述封闭液含有20%-25%胎牛血清,2%-5%海藻糖,0.01M PBS、0.02%-0.05%Tween20、1%-3%PVA,0.05%叠氮钠,pH值为7.4,余量为水,所述百分比为质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,20%胎牛血清、4%的海藻糖、0.01M PBS、0.05%Tween20、1%PVA和0.05%叠氮钠,pH值为7.4,余量为超纯水。其中,聚乙烯醇PVA优选为聚乙烯醇2W。

[0014] 作为优选,所述酶标稀释液含有0.1M Tris、2.5%-5%酪蛋白、2%-5%海藻糖、0.2%-0.5%对羟基苯甲酸钠、0.01%-0.05%阿拉伯树胶、1%-5%PEG,0.05%proclin300,余量为水。所述百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v);在本发明具体实施方式中,所述酶标稀释液含有0.1M Tris、2.5%酪蛋白、2%海藻糖、0.2%对羟基苯甲酸钠、0.01%阿拉伯树胶、1%PEG和0.05%Proclin300,余量为水。其中,聚乙二醇优选为聚乙二醇1W。

[0015] 本发明利用上述组合物进行肿瘤标志物抗体酶联免疫试剂盒的制备,与采用常规

的封闭液和酶标稀释液肿瘤标志物抗体酶联免疫试剂盒相比,在低温(2-8℃)下,本发明试剂盒在放置24个月后仍然能够保持较高稳定性,而对照的试剂盒在放置18个月后就出现很大程度的不稳定性;在室温(18-28℃)下,本发明试剂盒在放置6个月后仍然能够保持制备完成时的稳定性,在放置9个月后仍然能够保持较高的稳定性,而对照的试剂盒在放置6个月后就出现很大程度的不稳定性,在放置9个月已经无法保证检测的稳定性了。

[0016] 基于上述优异的技术效果,本发明提出了所述组合物在制备酶联免疫试剂盒中的应用,特别是在制备肿瘤标志物酶联免疫检测试剂盒中的应用。

[0017] 同时,本发明还提供一种肿瘤标志物检测试剂盒,包括以下组分:

[0018] 包被有肿瘤标志物抗体的蛋白芯片、生物素化的肿瘤标志物抗体、用酶标稀释液稀释包含酶标亲和素的酶标记物、样品稀释液、洗涤液和显色液;其中,所述蛋白芯片包被肿瘤标志物后采用封闭液封闭,所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠,所述酶标稀释液含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300,所述封闭液和酶标稀释液与前述组合物方案相同。

[0019] 作为优选,酶标记物中,酶标亲和素为辣根过氧化物酶标记的亲和素。其中,亲和素优选为链霉亲和素。作为进一步优选,所述酶标物中还包括抗人Ig-HRP,可用于有样品质控点的蛋白芯片使用。

[0020] 作为优选,所述肿瘤标志物选自AFP、CEA、CA19-9、CA242、CA125、CA15-3、CA72-4、CA50、SF、HGH、 β -HCG、TPSA、FPSA、CT、SCC、NSE、CYFRA21-1、Pro-GRP、TSGF、POA、PGI、PGII中的一种或两种以上。在本发明具体实施方式中,本发明选择上述22种肿瘤标志物。

[0021] 在包被中,所述肿瘤标志物采用CB缓冲液、PBS缓冲液或Tris缓冲液为肿瘤标志物稀释缓冲液进行包被;作为优选,所述缓冲液选自pH9.6的CB缓冲液、pH7.4的PBS缓冲液(优选0.01M)或pH8.5的Tris缓冲液(优选20mM),更优选地,在缓冲液中添加PEG或PVP,甘油和Proclin300,同时添加了水溶性的环糊精,可使包被更稳定、肿瘤标志物包被点更规则、更圆,CV更小。

[0022] 其中,水溶性环糊精可以是Captisol、2-羟基- β -环糊精或羧甲基- β -环糊精等,浓度为0.02%;PEG的浓度为5%,PVP的浓度为0.5-0.6%,甘油的浓度为15%,Proclin300浓度为0.05%,所述百分比中除Proclin300是体积百分比之外,其余都是质量百分比(w/v)。

[0023] 在本发明具体实施方式中,CT抗体、SCC抗体、CYFRA21-1抗体、TSGF抗体的稀释缓冲液为pH8.5的20mM Tris缓冲液(含0.5%的PVP、0.05%的Proclin300,0.02%Captisol,以及15%的甘油),终浓度分别为6ug/ml、10ug/ml、12ug/ml、10ug/ml。

[0024] AFP抗体、CEA抗体、CA19-9抗体、CA242抗体、CA125抗体、CA15-3抗体、CA72-4抗体、CA50抗体、SF抗体、POA抗体的稀释缓冲液为pH9.6的CB缓冲液,终浓度分别为5ug/ml、6ug/ml、8ug/ml、8ug/ml、6ug/ml、6ug/ml、5ug/ml、6ug/ml、10ug/ml、10ug/ml。

[0025] HGH抗体、 β -HCG抗体、TPSA抗体、FPSA抗体、NSE抗体、Pro-GRP抗体、PGI抗体、PGII抗体的稀释缓冲液为pH7.4的0.01M的PBS缓冲液(含有0.6%的PVP、0.05%的Proclin300、0.02%Captisol,以及15%的甘油),终浓度分别为6ug/ml、6ug/ml、8ug/ml、8ug/ml、10ug/ml、7ug/ml、6ug/ml、6ug/ml。

[0026] 上述各肿瘤标志物抗体优选为单克隆抗体。

[0027] 此外,本发明试剂盒中的蛋白芯片还包括阴性质控点、阳性质控点、参考临界值

点、酶标质控点、标准曲线点以及位置参考点中的一个或两个以上。更为具体地,至少一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC);至少一个样品点质控点(SC)和一个酶标质控点(EC);至少3个标准曲线点(S1-S3)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0028] 在具体实施方式中,本发明蛋白芯片上还包含一个阴性质控点(NC)和一个阳性质控点(PC);一个样品点质控点(SC)和一个酶标质控点(EC);3个参考曲线点(S1-S3)以及一个芯片本身包被的位置参考点(Loc)。

[0029] 其中,阳性质控点可以是一定浓度的生物素化的BSA,而阴性质控点可以是低于反映信号值的微量浓度的生物素化的BSA,或采用其他的无关蛋白来替代;酶标质控点可以是生物素化的BSA,或生物素化的其他无关蛋白;样品点质控点(SC)和标准曲线点分别是不同浓度的生物素化的BSA。芯片本身的位置参考点(Loc)是生物素化的BSA,主要是对阵列的定位作用。

[0030] 本发明所述酶标记亲和素中的酶可选择常规的酶以及对应的显色液,如辣根过氧化物酶。

[0031] 本发明使用的显色液是增强型化学发光底物(ECL),通过荧光检测装置或仪器进行反应结果的读取。在其他实施例中也可以使用其他的显色底物,如p-NPP,TMB等。

[0032] 本发明还对应提供了所述试剂盒的制备方法,包括:

[0033] 将肿瘤标志物抗体在蛋白芯片上进行包被,包被后洗涤,然后加入封闭液封闭,获得包被有肿瘤标志物抗体的蛋白芯片,所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠;

[0034] 配制含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300的酶标稀释液并稀释包含酶标亲和素的酶标记物,获得用酶标稀释液稀释的酶标记亲和素,然后制备生物素化的肿瘤标志物抗体以及配制样品稀释液、洗涤液和显色液,获得肿瘤标志物检测试剂盒。

[0035] 采用本发明肿瘤标志物检测试剂盒检测血清样本,对CEA和FPSA的处于参考范围下限(cutoff值)的临床样本的检出率都能达到100%(与现有市售试剂盒比较),且与市售试剂盒比较两者的相关性均能达到 $R^2 > 0.98$ ($R > 0.99$),可以说明本发明试剂盒的准确度和灵敏度均达到预期要求。

[0036] 此外,不管是CEA还是AFP在批内还是批间的检测结果,其CV值都低于10%,表明本发明试剂盒精密度高。

[0037] 由以上技术方案可知,本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手,通过选择适宜成分,使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时,以所述组合物制备的肿瘤标志物检测试剂盒在具有较佳稳定性的基础上,还具备较高的灵敏度、准确度和精密度。

具体实施方式

[0038] 本发明公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述组合物、试剂盒和应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能

在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的组合物、试剂盒和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0039] 以下就本发明所提供的一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法做进一步说明。

[0040] 实施例1:本发明所述肿瘤标志物检测试剂盒的制备

[0041] 1、抗肿瘤标志物抗体和相关蛋白的包被

[0042] 蛋白芯片阵列中的Loc、EC、PC、NC、S1、S2、S3、分别包被的是2ug/ml、2ug/ml、2ug/ml、0.01ug/ml、0.5ug/ml、2ug/ml、4ug/ml的生物素化(Thermo的EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin生物素化试剂盒)的BSA,可用PH9.6的CB缓冲液(含5%的PEG400、0.05%的Proclin300,以及0.02%的Captisol)进行稀释。

[0043] 样品质控点使用是1.5ug/ml抗人IgG,稀释缓冲液为PH9.6的CB缓冲液。

[0044] AFP抗体、CEA抗体、CA19-9抗体、CA242抗体、CA125抗体、CA15-3抗体、CA72-4抗体、CA50抗体、SF抗体、POA抗体,分别用CB缓冲液稀释至浓度:5ug/ml、6ug/ml、8ug/ml、8ug/ml、6ug/ml、6ug/ml、5ug/ml、6ug/ml、10ug/ml、10ug/ml。

[0045] HGH抗体、 β -HCG抗体、TPSA抗体、FPSA抗体、NSE抗体、Pro-GRP抗体、PGI抗体、PGII抗体,分别用PH7.4的0.01M的PBS缓冲液(含有0.6%的PVP、0.05%的Proclin300、0.02% Captisol,以及15%的甘油)稀释至浓度:6ug/ml、6ug/ml、8ug/ml、8ug/ml、10ug/ml、7ug/ml、6ug/ml、6ug/ml。

[0046] CT抗体、SCC抗体、CYFRA21-1抗体、TSGF抗体,分别用PH8.5的20mM Tris缓冲液(含0.5%的PVP、0.05%的Proclin300,0.02% Captisol,以及15%的甘油),终浓度分别为6ug/ml、10ug/ml、12ug/ml、10ug/ml。

[0047] 所有稀释好的蛋白分别用0.22um的滤膜过滤,然后利用BioDot精密点样仪按要求进行阵列的包被,全部阵列完成点样之后,将芯片置于2-8℃,过夜包被24-30h。蛋白芯片阵列可参照如下表呈现的阵列,也可根据实际需要调整,不做限制:

[0048] 表1蛋白芯片阵列

[0049]

PC	S1	Anti-C A19-9	Anti-C A50	Anti-TP SA	Anti-P GII
NC	S2	Anti-C A242	Anti-SF	Anti-FP SA	Anti-C T
SC	S3	Anti-C A125	Anti-P OA	Anti-N SE	Anti-S CC
EC	Anti-AFP	Anti-C A15-3	Anti-H GH	Anti-Pr o-GRP	Anti-C YFRA2 1-1
Loc	Anti-CEA	Anti-C A72-4	Anti- β - HCG	Anti-P GI	Anti-TS GF

[0050] 2、封闭

[0051] 取出包被的芯片,用PH7.4的PBST洗涤液清洗3次,然后每孔加入150ul的封闭液(pH7.4,含20%胎牛血清、4%的海藻糖、0.01M PBS、0.05% Tween20、1% PVA和0.05% 叠氮钠,余量超纯水),室温封闭1h,然后拍干,于湿度15%以下,室温放置,干燥4h,后密封、2-8

℃保存。

[0052] 3、配制生物素化的肿瘤标志物抗体、酶标稀释液、酶标记链霉亲和素、显色液、样品稀释液和浓缩洗涤液

[0053] 生物素化的肿瘤标志物抗体：用前述生物素化试剂盒分别对以上22种肿瘤标志物抗体进行生物素化；

[0054] 酶标稀释液：含有0.1M Tris、2.5%酪蛋白、2%海藻糖、0.2%对羟基苯甲酸钠、0.01%阿拉伯树胶、1%PEG和0.05%Proclin300，余量为水；

[0055] 酶标记链霉亲和素：辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素；

[0056] 使用时，用酶标稀释液将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与抗人Ig-HRP（辣根过氧化物酶标记的抗人IgG）稀释至6K倍混合（6K指辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素浓度以及抗人Ig-HRP浓度）。

[0057] 显色液：ECL。

[0058] 样品稀释液：0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20, 0.01%酪蛋白, pH7.4。

[0059] 10倍浓缩洗涤液：0.2M Tris, 1.5M NaCl, 0.5% Tween20, pH7.4。

[0060] 上述包被有肿瘤标志物抗体的蛋白芯片、生物素化的肿瘤标志物抗体、酶标稀释液稀释的酶标记链霉亲和素、显色液、以及样品稀释液和洗涤液组成本发明肿瘤标志物检测试剂盒。

[0061] 4、检测方法

[0062] (1) 取出芯片和相关试剂，平衡至室温；

[0063] (2) 加样：将阴性和阳性对照血清、以及用样品稀释液稀释了101倍的待测样品，每孔100uL加入待测芯片孔中反应。

[0064] (3) 温育：室温静置反应30min。加300uL洗涤液（用超纯水稀释10倍后使用），洗涤3次，每次静置1min。

[0065] (4) 加检测抗体：每孔加入100uL生物素化的肿瘤标志物抗体。

[0066] (5) 温育：室温静置反应30min。加300uL洗涤液，洗涤3次，每次静置1min。

[0067] (6) 加酶标记物（酶标记链霉亲和素和酶标抗人IgG混合液）：每孔加入100uL酶标记物。

[0068] (7) 温育：室温静置反应30min。加300uL洗涤液，洗涤3次，每次静置1min。

[0069] (8) 显色：每孔加入ECL显色剂50uL，室温静置，避光反应30min。

[0070] (9) 测定：30min内，用化学发光芯片分析仪读取并分析每个反应孔对应检测指标的信号值，通过NC、CO、以及S1-S3五点校准的标准曲线，来计算并判断结果的阴阳性及强度。

[0071] 实施例2：临床样本的检测

[0072] 1、灵敏度和准确度

[0073] 以检测CEA和FPSA为例，选取7个临床样本，以湖州数康生物科技有限公司的蛋白芯片试剂盒作为对照，与实施例1试剂盒同时检测临床样本，具体的实验结果和数据如下表：

[0074] 表2

[0075]

CEA			FPSA		
样本	对照试剂盒 (ng/ml)	本发明试剂盒 (ng/ml)	样本	对照试剂盒 (ng/ml)	本发明试剂盒 (ng/ml)
参考范围	<5ng/ml	<5ng/ml	参考范围	<1ng/ml	<1ng/ml
1	5.89	5.81	1	0.99	1.01
2	6.2	6.31	2	1.15	1.24
3	6.88	7.03	3	1.2	1.13
4	7.67	7.26	4	1.41	1.23
5	7.81	7.67	5	2.5	2.35
6	8.65	8.66	6	2.62	2.71
7	10.11	9.81	7	3.33	3.21

[0076] 由以上结果分析可知,本发明的试剂盒对CEA和FPSA的处于参考范围下限(cutoff值)的临床样本的检出率都能达到100%(与对照试剂盒比较),且与对照试剂盒比较两者的相关性均能达到 $R^2 > 0.98$ ($R > 0.99$),可以说明试剂盒的灵敏性和准确度均能达到要求。

[0077] 2、精密度

[0078] 以检测CEA和AFP为例,选取2个临床样本,进行批内精密度检测;同时选取3个样本,进行批间精密度检测,结果见表3和表4。

[0079] 表3

[0080]

	CEA		AFP	
重复次数	样本 1 (ng/ml)	样本 2 (ng/ml)	样本 1 (ng/ml)	样本 2 (ng/ml)
测试 1	8.66	242.21	25.51	149.65
测试 2	8.53	238.56	22.36	150.8
测试 3	8.98	249.63	24.41	146.73
测试 4	8.05	250.1	28.89	151.25
测试 5	7.98	252.32	26.63	156.44
测试 6	8.44	241.41	26.56	158.85
测试 7	9.22	239.6	26.74	148.78
测试 8	9.05	226.48	25.48	152.36
测试 9	8.92	235.72	26.76	143.35
测试 10	8.55	239.6	22.15	155.76
AVE	8.638	241.563	25.549	151.397
STD	0.414026301	7.691800902	2.088712788	4.687524933
CV	4.79%	3.18%	8.18%	3.10%

[0081] 表4

[0082]

	重复次数	CEA (ng/ml)	AFP (ng/ml)
第一批	测试 1	8.66	25.51
	测试 2	8.53	22.36
	测试 3	8.98	24.41
	测试 4	8.05	28.89
	测试 5	7.98	26.63
	测试 6	8.44	26.56
	测试 7	9.22	26.74
	测试 8	9.05	25.48
	测试 9	8.92	26.76
	测试 10	8.55	22.15
第二批	测试 1	8.25	25.5

[0083]

	测试 2	8.88	27.85
	测试 3	8.56	24.48
	测试 4	9.12	26.65
	测试 5	8.35	25.56
	测试 6	8.54	23.81
	测试 7	8.56	26.63
	测试 8	8.98	26.85
	测试 9	9.21	24.15
	测试 10	8.36	29.05
第三批	测试 1	8.65	25.58
	测试 2	9.06	26.61
	测试 3	8.47	25.05
	测试 4	8.88	24.47
	测试 5	8.91	28.86
	测试 6	8.04	27.31
	测试 7	7.99	22.89
	测试 8	8.06	24.45
	测试 9	8.52	25.51
	测试 10	8.45	24.82
AVE		8.607333333	25.719
STD		0.375177506	1.776900343
CV		4.36%	6.91%

[0084] 由以上精密度测试结果可以看出,不管是CEA还是AFP在批内还是批间的检测结果,其CV值都低于10%,精密度高。

[0085] 实施例3:本发明所述试剂盒稳定性检测

[0086] 对照试剂盒:按照实施例1的方法进行制备,区别在于封闭液采用3%的BSA溶液,

酶标稀释液采用含3%的BSA、0.05%Proclin300的PBS缓冲液,PH7.4(参考现有专利CN10160396A);

[0087] 试验试剂盒:实施例1试剂盒;

[0088] 检测方法:将两种试剂盒分别置于室温(18-28℃)和低温(2-8℃)下放置一段时间,然后采用相同血清按照实施例1检测方法检测,统计仪器信号值,结果见表5-8。

[0089] 1、实施例1试剂盒低温下的稳定性数据表5

[0090]

肿瘤标志物	0 个月	6 个月	6 个月/0 个月	12 个月	12 个月/0 个月
AFP	25.5	25.01	98.08%	25.35	99.41%
CEA	151.4	150.59	99.46%	148.85	98.32%
CA19-9	241.56	240.05	99.37%	238.38	98.68%
CA242	144.21	142.81	99.03%	136.68	94.78%
CA125	221.2	222.1	100.41%	218.41	98.74%
CA15-3	135.94	133.65	98.32%	131.88	97.01%
CA72-4	25.51	24.7	96.82%	23.36	91.57%
CA50	46.65	45.71	97.98%	45.05	96.57%
SF	421.83	420.36	99.65%	415.57	98.52%
HGH	36.74	36.15	98.39%	35.59	96.87%
β -HCG	25.83	25.31	97.99%	25.1	97.17%
TPSA	15.52	15.33	98.78%	15.02	96.78%
FPSA	8.64	8.66	100.23%	8.59	99.42%
CT	6.21	6.03	97.10%	6.01	96.78%
SCC	11.21	11.23	100.18%	10.65	95.00%
NSE	26.71	25.35	94.91%	25.12	94.05%
CYFRA21-1	66.87	65.25	97.58%	63.32	94.69%
Pro-GRP	262.1	260.31	99.32%	255.83	97.61%
TSGF	228.27	226.62	99.28%	218.98	95.93%
POA	55.68	55.03	98.83%	52.47	94.23%
PGI	46.83	45.55	97.27%	42.31	90.35%
PGII	51.96	50.26	96.73%	50.1	96.42%
肿瘤标志物	12 个月/6 个月	18 个月	18 个月/0 个月	18 个月/6 个月	18 个月/12 个月
AFP	101.36%	23.91	93.76%	95.60%	94.32%
CEA	98.84%	142.66	94.23%	94.73%	95.84%
CA19-9	99.30%	228.96	94.78%	95.38%	96.05%
CA242	95.71%	132.33	91.76%	92.66%	96.82%
CA125	98.34%	211.35	95.55%	95.16%	96.77%
CA15-3	98.68%	125.93	92.64%	94.22%	95.49%
CA72-4	94.57%	23.55	92.32%	95.34%	100.81%
CA50	98.56%	43.96	94.23%	96.17%	97.58%
SF	98.86%	412.65	97.82%	98.17%	99.30%
HGH	98.45%	34.64	94.28%	95.82%	97.33%
β -HCG	99.17%	24.16	93.53%	95.46%	96.25%
TPSA	97.98%	14.61	94.14%	95.30%	97.27%
FPSA	99.19%	8.38	96.99%	96.77%	97.56%
CT	99.67%	5.89	94.85%	97.68%	98.00%
SCC	94.84%	10.51	93.76%	93.59%	98.69%

[0091]

NSE	99.09%	24.31	91.01%	95.90%	96.78%
CYFRA21-1	97.04%	62.23	93.06%	95.37%	98.28%
Pro-GRP	98.28%	252.36	96.28%	96.95%	98.64%
TSGF	96.63%	218.6	95.76%	96.46%	99.83%
POA	95.35%	51.6	92.67%	93.77%	98.34%
PGI	92.89%	43.12	92.08%	94.67%	101.91%
PGII	99.68%	48.88	94.07%	97.25%	97.56%
肿瘤标志物	24 个月	24 个月/0 个月	24 个月/6 个月	24 个月/12 个月	24 个月/18 个月
AFP	23.08	90.51%	92.28%	91.05%	96.53%
CEA	140.35	92.70%	93.20%	94.29%	98.38%
CA19-9	221.72	91.79%	92.36%	93.01%	96.84%
CA242	129.94	90.10%	90.99%	95.07%	98.19%
CA125	202.6	91.59%	91.22%	92.76%	95.86%
CA15-3	121.41	89.31%	90.84%	92.06%	96.41%
CA72-4	22.98	90.08%	93.04%	98.37%	97.58%
CA50	43.21	92.63%	94.53%	95.92%	98.29%
SF	406.18	96.29%	96.63%	97.74%	98.43%
HGH	33.96	92.43%	93.94%	95.42%	98.04%
β -HCG	23.67	91.64%	93.52%	94.30%	97.97%
TPSA	14.01	90.27%	91.39%	93.28%	95.89%
FPSA	8.05	93.17%	92.96%	93.71%	96.06%
CT	5.66	91.14%	93.86%	94.18%	96.10%
SCC	10.16	90.63%	90.47%	95.40%	96.67%
NSE	24.3	90.98%	95.86%	96.74%	99.96%
CYFRA21-1	60.2	90.03%	92.26%	95.07%	96.74%
Pro-GRP	250.15	95.44%	96.10%	97.78%	99.12%
TSGF	212.33	93.02%	93.69%	96.96%	97.13%
POA	50.15	90.07%	91.13%	95.58%	97.19%
PGI	42.28	90.28%	92.82%	99.93%	98.05%
PGII	47.61	91.63%	94.73%	95.03%	97.40%

[0092] 由表5可以看出,本发明试剂盒分别检测了在低温下放置0、6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了24个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、6、12、18个月的检测信号值相比,几乎均处于90%以上,证明本发明所述试剂盒在低温条件下放置24个月仍然具备较高的检测稳定性。

[0093] 2、实施例1试剂盒室温下的稳定性数据

[0094] 表6

[0095]

肿瘤标志物	0 个月	3 个月	3 个月/0 个月	6 个月	6 个月/0 个月
AFP	26.91	25.33	94%	25.06	93%
CEA	147.22	145.64	99%	140.31	95%
CA19-9	238.91	236.25	99%	229.62	96%
CA242	138.12	135.53	98%	133.15	96%
CA125	212.21	210.34	99%	208.64	98%
CA15-3	127.22	126.67	100%	122.42	96%
CA72-4	22.53	22.55	100%	21.38	95%
CA50	45.81	45.12	98%	44.15	96%
SF	412.25	410.56	100%	402.68	98%
HGH	37.6	35.5	94%	34.95	93%
β-HCG	26.17	25.31	97%	25.05	96%
TPSA	15.11	15.12	100%	15.06	100%
FPSA	8.98	8.88	99%	8.64	96%
CT	6.58	6.31	96%	6.35	97%
SCC	10.64	10.34	97%	10.03	94%
NSE	26.45	26.32	100%	25.65	97%
CYFRA21-1	66.7	65.8	99%	64.41	97%
Pro-GRP	257.26	256.71	100%	249.91	97%
TSGF	221.32	220.58	100%	218.64	99%
POA	56.14	55.34	99%	54.94	98%
PGI	45.42	44.68	98%	43.93	97%
PGII	52.21	51.31	98%	50.37	96%
肿瘤标志物	6 个月/3 个月	9 个月	9 个月/0 个月	9 个月/3 个月	9 个月/6 个月
AFP	98.93%	23.94	89%	94.51%	95.53%
CEA	96.34%	138.82	94%	95.32%	98.94%
CA19-9	97.19%	228.35	96%	96.66%	99.45%
CA242	98.24%	129.6	94%	95.62%	97.33%
CA125	99.19%	201.22	95%	95.66%	96.44%
CA15-3	96.64%	121.63	96%	96.02%	99.35%
CA72-4	94.81%	20.72	92%	91.88%	96.91%
CA50	97.85%	42.8	93%	94.86%	96.94%
SF	98.08%	396.81	96%	96.65%	98.54%
HGH	98.45%	33.21	88%	93.55%	95.02%
β-HCG	98.97%	23.96	92%	94.67%	95.65%
TPSA	99.60%	13.68	91%	90.48%	90.84%
FPSA	97.30%	8.09	90%	91.10%	93.63%
CT	100.63%	5.89	90%	93.34%	92.76%
SCC	97.00%	9.64	91%	93.23%	96.11%

[0096]

NSE	97.45%	24.1	91%	91.57%	93.96%
CYFRA21-1	97.89%	63.12	95%	95.93%	98.00%
Pro-GRP	97.35%	245.36	95%	95.58%	98.18%
TSGF	99.12%	215.4	97%	97.65%	98.52%
POA	99.28%	52.68	94%	95.19%	95.89%
PGI	98.32%	42.17	93%	94.38%	95.99%
PGII	98.17%	48.61	93%	94.74%	96.51%
肿瘤标志物	12 个月	12 个月/0 个月	12 个月/3 个月	12 个月/6 个月	12 个月/9 个月
AFP	22.61	84%	89.26%	90.22%	94.44%
CEA	135.02	92%	92.71%	96.23%	97.26%
CA19-9	224.1	94%	94.86%	97.60%	98.14%
CA242	124.57	90%	91.91%	93.56%	96.12%
CA125	196.36	93%	93.35%	94.11%	97.58%
CA15-3	115.82	91%	91.43%	94.61%	95.22%
CA72-4	18.8	83%	83.37%	87.93%	90.73%
CA50	40.53	88%	89.83%	91.80%	94.70%
SF	381.6	93%	92.95%	94.77%	96.17%
HGH	30.3	81%	85.35%	86.70%	91.24%
β -HCG	20.52	78%	81.07%	81.92%	85.64%
TPSA	12.11	80%	80.09%	80.41%	88.52%
FPSA	6.48	72%	72.97%	75.00%	80.10%
CT	5.01	76%	79.40%	78.90%	85.06%
SCC	8.55	80%	82.69%	85.24%	88.69%
NSE	22.06	83%	83.81%	86.00%	91.54%
CYFRA21-1	61.15	92%	92.93%	94.94%	96.88%
Pro-GRP	241.08	94%	93.91%	96.47%	98.26%
TSGF	208.31	94%	94.44%	95.28%	96.71%
POA	50.42	90%	91.11%	91.77%	95.71%
PGI	40.65	89%	90.98%	92.53%	96.40%
PGII	44.86	86%	87.43%	89.06%	92.29%

[0097] 由表6可以看出,本发明试剂盒分别检测了在常温下放置0、3、6、9、12个月的检测信号值,同时统计了各个信号值的比值,结果显示,放置了6个月的试剂盒,其检测信号值与放置0、3个月的检测信号值相比,仍接近100%能够保持制备完成时的稳定性;与0、3、6个月的检测信号值相比,在放置9个月后仍然处于90%以上,能够保持较高的稳定性。

[0098] 3、实施例1试剂盒和对照试剂盒低温下的稳定性数据对比

[0099] 表7

[0100]

	肿瘤标志物	实 施 例 1	对照	对照/实 施例 1		抗原对应的 抗体	实 施 例 1	对照	对 照 / 实施例 1
6 个 月	AFP	25.01	24.94	99.72%	12 个 月	AFP	25.35	23.3	91.91%
	CEA	150.59	150.12	99.69%		CEA	148.85	140.66	94.50%
	CA19-9	240.05	238.64	99.41%		CA19-9	238.38	226.86	95.17%
	CA242	142.81	140.28	98.23%		CA242	136.68	128.62	94.10%
	CA125	222.1	221.38	99.68%		CA125	218.41	210.17	96.23%
	CA15-3	133.65	130.63	97.74%		CA15-3	131.88	120.6	91.45%
	CA72-4	24.7	24.05	97.37%		CA72-4	23.36	21.4	91.61%
	CA50	45.71	44.35	97.02%		CA50	45.05	42.96	95.36%
	SF	420.36	415.63	98.87%		SF	415.57	401.5	96.61%
	HGH	36.15	35.53	98.28%		HGH	35.59	33.61	94.44%
	β -HCG	25.31	25.1	99.17%		β -HCG	25.1	23.52	93.71%
	TPSA	15.33	15.06	98.24%		TPSA	15.02	12.68	84.42%
	FPSA	8.66	80.54	930.02%		FPSA	8.59	7.96	92.67%
	CT	6.03	5.98	99.17%		CT	6.01	5.28	87.85%
	SCC	11.23	11.12	99.02%		SCC	10.65	9.86	92.58%
	NSE	25.35	25.05	98.82%		NSE	25.12	20.3	80.81%
	CYFRA21-1	65.25	64.35	98.62%		CYFRA21-1	63.32	60.34	95.29%
	Pro-GRP	260.31	261.25	100.36%		Pro-GRP	255.83	246.6	96.39%
	TSGF	226.62	225.57	99.54%		TSGF	218.98	208.31	95.13%
	POA	55.03	55.1	100.13%		POA	52.47	49.65	94.63%
18 个 月	PGI	45.55	45.32	99.50%	24 个 月	PGI	42.31	40.5	95.72%
	PGII	50.26	48.67	96.84%		PGII	50.1	46.36	92.53%
	AFP	23.91	18.38	76.87%		AFP	23.08	5.6	24.26%
	CEA	142.66	116.25	81.49%		CEA	140.35	2.3	1.64%
	CA19-9	228.96	180.63	78.89%		CA19-9	221.72	14.71	6.63%
	CA242	132.33	105.31	79.58%		CA242	129.94	15.14	11.65%
	CA125	211.35	186.34	88.17%		CA125	202.6	12.35	6.10%
	CA15-3	125.93	101.92	80.93%		CA15-3	121.41	14.3	11.78%
	CA72-4	23.55	18.36	77.96%		CA72-4	22.98	3.1	13.49%
	CA50	43.96	26.95	61.31%		CA50	43.21	10.35	23.95%
	SF	412.65	316.48	76.69%		SF	406.18	36.48	8.98%
	HGH	34.64	23.61	68.16%		HGH	33.96	6.31	18.58%
	β -HCG	24.16	15.24	63.08%		β -HCG	23.67	2.6	10.98%
	TPSA	14.61	10.3	70.50%		TPSA	14.01	2.05	14.63%
	FPSA	8.38	5.4	64.44%		FPSA	8.05	0.36	4.47%
	CT	5.89	4.02	68.25%		CT	5.66	0.03	0.53%
	SCC	10.51	6.36	60.51%		SCC	10.16	1.21	11.91%
	NSE	24.31	16.65	68.49%		NSE	24.3	6.52	26.83%

[0101]

	CYFRA21-1	62.23	46.33	74.45%		CYFRA21-1	60.2	1.68	2.79%
	Pro-GRP	252.36	206.4	81.79%		Pro-GRP	250.15	0.05	0.02%
	TSGF	218.6	165.38	75.65%		TSGF	212.33	31.1	14.65%
	POA	51.6	39.66	76.86%		POA	50.15	2.44	4.87%
	PGI	43.12	29.68	68.83%		PGI	42.28	1.22	2.89%
	PGII	48.88	31.15	63.73%		PGII	47.61	2.53	5.31%

[0102] 由表7可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在低温下放置6、12、18、24个月的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了18个月的对照试剂盒,其检测信号值开始出现显著的下降,结合表5数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0103] 4、实施例1试剂盒和对照试剂盒常温下的稳定性数据对比

[0104] 表8

[0105]

	肿瘤标志物	实施例 1	对照	对照/实施例 1
3 个月	AFP	25.33	24.61	97.16%
	CEA	145.64	143.82	98.75%
	CA19-9	236.25	231.65	98.05%
	CA242	135.53	130.5	96.29%
	CA125	210.34	205.74	97.81%
	CA15-3	126.67	122.22	96.49%
	CA72-4	22.55	21.68	96.14%
	CA50	45.12	44.46	98.54%
	SF	410.56	408.76	99.56%
	HGH	35.5	33.35	93.94%
	β -HCG	25.31	25.23	99.68%
	TPSA	15.12	14.81	97.95%
	FPSA	8.88	8.69	97.86%
	CT	6.31	6.05	95.88%
	SCC	10.34	9.11	88.10%
	NSE	26.32	25.63	97.38%
	CYFRA21-1	65.8	62.15	94.45%
	Pro-GRP	256.71	253.87	98.89%
	TSGF	220.58	216.39	98.10%
	POA	55.34	55.02	99.42%
	PGI	44.68	43.28	96.87%
	PGII	51.31	50.65	98.71%
6 个月	AFP	25.06	22.1	88.19%
	CEA	140.31	116.2	82.82%
	CA19-9	229.62	201.34	87.68%

[0106]

	CA242	133.15	105.85	79.50%
	CA125	208.64	184.64	88.50%
	CA15-3	122.42	101.91	83.25%
	CA72-4	21.38	15.62	73.06%
	CA50	44.15	35.81	81.11%
	SF	402.68	339.42	84.29%
	HGH	34.95	26.15	74.82%
	β -HCG	25.05	18.36	73.29%
	TPSA	15.06	10.25	68.06%
	FPSA	8.64	6.6	76.39%
	CT	6.35	5.14	80.94%
	SCC	10.03	8.2	81.75%
	NSE	25.65	15.35	59.84%
	CYFRA21-1	64.41	46.26	71.82%
	Pro-GRP	249.91	202.32	80.96%
	TSGF	218.64	165.92	75.89%
	POA	54.94	40.38	73.50%
	PGI	43.93	29.56	67.29%
	PGII	50.37	37.76	74.97%
9 个月	AFP	23.94	9.48	39.60%
	CEA	138.82	58.52	42.16%
	CA19-9	228.35	84.26	36.90%
	CA242	129.6	26.35	20.33%
	CA125	201.22	96.23	47.82%
	CA15-3	121.63	45.15	37.12%
	CA72-4	20.72	6.22	30.02%
	CA50	42.8	13.5	31.54%
	SF	396.81	88.31	22.25%
	HGH	33.21	11.13	33.51%
	β -HCG	23.96	8.64	36.06%
	TPSA	13.68	5.5	40.20%
	FPSA	8.09	2.1	25.96%
	CT	5.89	1.33	22.58%
	SCC	9.64	2.06	21.37%
	NSE	24.1	4.47	18.55%
	CYFRA21-1	63.12	10.39	16.46%
	Pro-GRP	245.36	26.35	10.74%
	TSGF	215.4	41.12	19.09%
	POA	52.68	5.31	10.08%
	PGI	42.17	6.22	14.75%
	PGII	48.61	3.76	7.74%

[0107] 由表8可以看出,本发明试剂盒和对照试剂盒分别检测了在常温下放置3、6、9个月

的检测信号值,同时统计了相同时间下,两个试剂盒的信号值的比值,结果显示,放置了6个月的对照试剂盒,其某些指标的检测信号值开始出现显著的下降,而放置了9个月的对照试剂盒,其已经无法保证检测的稳定性了,结合表6数据可以明显得出对照试剂盒的稳定性不如本发明试剂盒的结论,而两者的差别仅在于封闭液和酶标稀释液。

[0108] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108414743A	公开(公告)日	2018-08-17
申请号	CN201810186996.8	申请日	2018-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
[标]发明人	张大准 张永顶 马伟民 王洪涛 马新民		
发明人	张大准 张永顶 马伟民 王洪涛 马新民		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6893 G01N33/5306 G01N33/574		
代理人(译)	王仲凯		
其他公开文献	CN108414743B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及酶联免疫技术领域，公开了一种用于酶联免疫试剂盒的组合物以及肿瘤标志物检测试剂盒及其制备方法。本发明所述组合物包括封闭液和酶标稀释液；所述封闭液含有胎牛血清、海藻糖、PBS、Tween20、PVA和叠氮钠；所述酶标稀释液含有Tris、酪蛋白、海藻糖、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、PEG和Proclin300。本发明从酶联免疫试剂盒的封闭液和酶标稀释液入手，通过选择适宜成分，使得酶联免疫试剂盒能够较长时间保持检测的稳定性。同时，以所述组合物制备的肿瘤标志物检测试剂盒在具有较佳稳定性的基础上，还具备较高的灵敏度、准确度和精密度。

PC	S1	Anti-C A19-9	Anti-C A50	Anti-TP SA	Anti-P GII
NC	S2	Anti-C A242	Anti-SF	Anti-FP SA	Anti-C T
SC	S3	Anti-C A125	Anti-P OA	Anti-N SE	Anti-S CC
EC	Anti-AFP	Anti-C A15-3	Anti-H GH	Anti-Pr o-GRP	Anti-C YFRA2 1-1
Loc	Anti-CEA	Anti-C A72-4	Anti-β- HCG	Anti-P GI	Anti-TS GF