



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104267197 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201410573982. 3

(22) 申请日 2014. 10. 24

(71) 申请人 浙江东方基因生物制品有限公司
地址 313000 浙江省湖州市安吉县经济开发区健康医药产业园吉二路

(72) 发明人 张华 廖钟财

(74) 专利代理机构 湖州金卫知识产权代理事务所(普通合伙) 33232
代理人 裴金华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

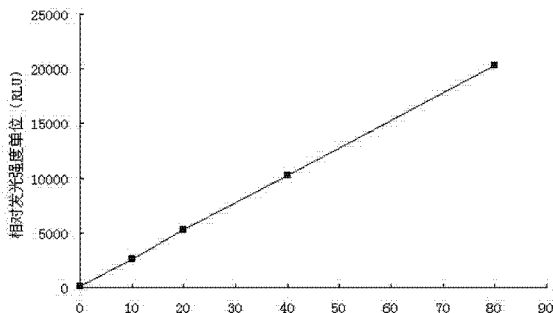
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫分析医学领域,特别涉及一种核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,可用于临床膀胱癌的早期诊断及术后疗效监测。本发明的试剂盒包括:1) NMP22 校准品;2) NMP22 单克隆抗体预包被的固相载体;3) NMP22 单克隆抗体的酶标记物;4) 与所述酶作用的发光底物液;5) 浓缩洗液。本发明的优点是简便、无创且能早期诊断膀胱癌。



1. 一种核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:1) NMP22 校准品;2) NMP22 单克隆抗体预包被的固相载体;3) NMP22 单克隆抗体的酶标记物;4) 与所述酶作用的发光底物液;5) 浓缩洗液。

2. 如权利要求 1 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。

3. 如权利要求 1 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

4. 如权利要求 1 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的发光底物液的发光底物为 1,2- 二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺。

5. 如权利要求 4 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的 1,2- 二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2- 二氧乙烷、3- (2' - 螺旋金刚烷)-4- 甲氧基-4- (3'' - 磷酸氧基) 苯基-1,2- 二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

6. 如权利要求 1 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的浓缩洗液为 Tris-HCl 或 PBST 洗涤液。

7. 如权利要求 1 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

配制核基质蛋白 22 的校准品;

以酶标记核基质蛋白 22 单克隆抗体;

以核基质蛋白 22 单克隆抗体包被固相载体;

配制上述酶所作用的发光底物液;

配制浓缩洗液;

分装所述核基质蛋白 22 的校准品、酶标记的核基质蛋白 22 单克隆抗体、酶作用的发光底物液和浓缩洗液,并将各组分装成成品。

8. 如权利要求 7 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述发光底物液包含 Tris、NaCl、KCl、HCl、3- (2' - 螺旋金刚烷)-4- 甲氧基-4- (3'' - 磷酸氧基) 苯基-1,2- 二氧乙烷、Proclin 300 和双蒸水。

9. 如权利要求 7 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述包被固相载体的步骤 3) 包括以下步骤:

1) 包被

采用柠檬酸缓冲液与核基质蛋白 22 (NMP22)单克隆抗体混合配制成包被液,并将所得包被液负载于固相载体上;

2) 用生理盐水洗涤步骤 1) 所得载体;

3) 封闭

配制封闭液, pH 值为 7-7.5,然后将所得的封闭液负载于步骤 2) 洗涤后的载体上。

10. 如权利要求 9 所述的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述封闭液为 PBS 缓冲液。

一种核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 发明涉及免疫分析医学领域,具体地,本发明提供了一种核基质蛋白 22 (NMP22) 化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 膀胱肿瘤是泌尿系统最常见的肿瘤,90% 以上为移行细胞癌,其中 80 % 以上是无浸润的浅表性癌,10%-20% 发展为浸润性膀胱癌。膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,多发生于 50-70 岁之间。这种疾病死亡率高,及早地发现、诊断对治疗和预后有重要作用。有资料表明在疾病早期诊断出的患者的 5 年存活率大于 90%,而在晚期诊断出的患者其 5 年存活率仅约为 15%-30%。目前对膀胱癌诊断和术后复查主要靠膀胱镜和尿细胞学检查,前者虽准确,但是一种侵入性检查,操作复杂、费时费力、费用高额,且给病人带来很大痛苦,使得很多病人对此方法有抵触情绪,同时难以发现原位癌或扁平癌;尿细胞学检查虽无创,且特异性较好,但敏感性低,对于分期较低、分化较好的肿瘤,其敏感性仅为 30% 或更低,而且受诊断医师主观因素的影响较大。膀胱镜和尿细胞学检查的局限性限制了对膀胱癌诊断的应用,故寻找一种简便、无创且能早期诊断膀胱癌的检测方法及设备具有很大意义。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种简便、无创且能早期诊断膀胱癌的使用化学发光免疫检测核基质蛋白 22 (NMP22) 试剂盒及其制备方法。

[0004] 本发明的目的之一是提供一种使用化学发光免疫检测核基质蛋白 22 试剂盒。

[0005] 核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒包括 NMP22 校准品、NMP22 单克隆抗体预包被的固相载体、NMP22 单克隆抗体的酶标记物、与所述酶作用的化学发光底物液、以及浓缩洗液。

[0006] 优选,所述的固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。

[0007] 优选,所述的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0008] 优选,所述的发光底物为 1,2- 二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺。

[0009] 优选,所述的 1,2- 二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2- 二氧乙烷、3- (2' - 螺旋金刚烷) -4- 甲氧基 -4- (3'' - 磷酸氧基) 苯基 -1,2- 二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

[0010] 优选,所述的浓缩洗液为 Tris-HCl 或 PBST 洗涤液。

[0011] 本发明还提供一种制备上述试剂盒的方法,包括以下步骤:

- 1) 配制核基质蛋白 22 的校准品;
- 2) 以酶标记核基质蛋白 22 单克隆抗体;
- 3) 以核基质蛋白 22 单克隆抗体包被固相载体;
- 4) 配制上述酶所作用的发光底物液;
- 5) 配制浓缩洗液;

6) 分装所述核基质蛋白 22 的校准品、酶标记的核基质蛋白 22 单克隆抗体、酶作用的发光底物液和浓缩洗液,并将各组分装成成品。

[0012] 优选,所述步骤 3) 包被固相载体包括以下步骤:

1) 包被

采用柠檬酸缓冲液与核基质蛋白 22 (NMP22)单克隆抗体混合配制成包被液,并将所得混合液负载于固相载体上;

2) 用生理盐水洗涤步骤 1) 所得载体;

3) 封闭

配制封闭液, pH 为 7.0-7.5,然后将所得的封闭液负载于步骤 2) 洗涤后的载体上。

[0013] 更优选,所述封闭液选用 PBS 缓冲液。

[0014] 或更优选,所述发光底物液包含 24g Tris、160g NaCl、4g KCl、15ml HCl、200ml 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷、1ml Proclin 300、1000ml 双蒸水。

[0015] 优选,所述的固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。

[0016] 优选,所述的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0017] 优选,所述的发光底物为 1,2-二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺。

[0018] 更优选,所述的 1,2-二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

[0019] 优选,所述的浓缩洗液为 Tris-HCl 或 PBST 洗涤液。

[0020] 综上所述,本发明的有益效果为:

1、本发明所提供的使用化学发光免疫检测核基质蛋白 22 试剂盒,核基质蛋白 22 (NMP22) 是一种新的膀胱癌肿瘤标志物,能通过检测其在人体尿液或血液中的含量来进行膀胱癌的早期诊断及术后复发情况,研究表明尿液或血液中 NMP22 诊断的灵敏度、特异度和准确度均比较高,所以本发明可用于早期诊断膀胱癌及术后疗效监测。本发明所述试剂盒,利用化学发光法检测 NMP22,只需提供检测样品(尿液或血液)而不使用任何设备,具有操作方便,而且患者无痛苦的优点。

[0021] 2、本发明采用了辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(ALP)两个系统进行实验研究,用 HRP 或 ALP 对抗体进行标记,然后加入待测抗原使之结合,HRP 或 ALP 催化发光底物液使之分解而产生发光信号。HRP 作用的底物为 1,2-二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺,此类物质价格便宜,基本实现了国产化,是当前在临床应用最广的一类发光剂。ALP 作用的底物为 1,2-二氧乙烷类衍生物(AMPPD),它是一种新型的化学发光剂,属于二氧杂环丁烷类,性能十分稳定,5℃下保存的固体 AMPPD 几乎不分解。本发明通过使用化学发光增强剂 AMPPD,增强了化学发光强度,延长了发光时间。

附图说明

[0022] 图 1 为实施例 1 所制备的试剂盒中的校准品线性图。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做进一步的描述,并不因此将本发明限制

在所述的实施例范围之内。

[0024] 实施例 1-6 为核基质蛋白 22 (NMP22) 化学发光免疫检测试剂盒的制备

实施例 1

一、酶标抗体制备

辣根过氧化物酶标记核基质蛋白 22 (NMP22) 单克隆抗体采用改良过碘酸钠法制备, 用酶标记抗体稀释液以 1:6000 工作浓度稀释酶标抗体;

1. 辣根过氧化物酶标记核基质蛋白 22 (NMP22) 单克隆抗体的制备

将标记用的核基质蛋白 22 (NMP22) 单克隆抗体和辣根过氧化物酶用改良过碘酸钠法结合在一起, 完成用辣根过氧化物酶标记的酶标结合物。

[0025] 以标记 10mg 核基质蛋白 22 (NMP22) 单克隆抗体为例, 其具体步骤如下:

- (1) 称取 5mgHRP 加 1ml 0.1mol/L 醋酸钠或水溶解, 充分混匀;
- (2) 于上液中加入 0.2ml 新配的 0.1mol/L NaIO₄ 溶液, 室温下避光搅拌 30min;
- (3) 将上述溶液装入透析袋中, 对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析, 4℃ 过夜。

[0026] (4) 加 20ul 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液, 使以上醛化 HRP 的 pH 升高到 9.0-9.5, 然后立即加入 10mg 核基质蛋白 22 (NMP22) 单克隆抗体在 1ml 0.01M 碳酸盐缓冲液中, 室温避光轻轻搅拌 2h;

(5) 加 0.1ml 新配的 4mg/mlNaBH₄ 液, 混匀, 再置 4℃, 2h;

(6) 将上述液装入透析袋中, 用 0.15M pH7.4 的 PB 缓冲液中透析, 去除铵离子后, 10,000rpm 离心 30min 去除沉淀, 上清液即为所需的酶结合物, 加入等量优质丙三醇, 分装后, -20℃ 保存。

[0027] 2. 酶标抗体稀释液配方:

磷酸二氢钠	0.2g
磷酸氢二钠	2.9g
氯化钠	8.8g
BSA	5g
Proclin300	1.0ml
食品红	1.0ml
蒸馏水	1000ml

二、核基质蛋白 22 (NMP22) 校准品的配制

以动物血清或蛋白缓冲液为基质, 加入核基质蛋白 22 (NMP22) 纯品配制而成。制备的最终浓度为: 0IU/ml、5IU/ml、10IU/ml、20IU/ml、40IU/ml、80IU/ml。

[0028] 三、固相包被板的制备

(1) 包被

采用 0.046M pH4.6 的 CT 缓冲液与适当浓度的核基质蛋白 22 (NMP22) 单克隆抗体混合制成包被液, 并将其负载于固相载体上;

具体地, 所述包被方法为:

柠檬酸三钠	7.3g
柠檬酸	4.44g
蒸馏水	1000ml

溶解混匀后,调整 pH 值至 4.6,加入 5.0mg 核基质蛋白 22 (NMP22)单克隆抗体混匀,然后加入微孔板各孔中,每孔 110 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0029] (2) 洗涤 :用生理盐水洗三次。

[0030] (3) 封闭

封闭液配方为 :

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9g
NaCl	9g
脱脂奶粉	10g
Proclin300	10g
双蒸水	1000ml

将上述试剂称量好放入洁净容器中,加双蒸水定容,溶解混匀,测定 pH 值为 7.0,甩掉包被液后,每孔分别加入封闭液 300 μ l,室温放置 3 小时。甩掉封闭液,室温除湿干燥 24 小时。立即进行封袋,后置 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

[0031] 四、化学发光底物液

本发明所使用的辣根过氧化物酶 (HRP) 的化学发光底物液的配制方法 :

化学发光底物液 A :

鲁米诺	10mM	1.7716g
4-羟基联苯	0.3mM	0.051g
4-碘苯硼酸	0.05mM	0.012g
硼酸		11.4g
硼砂		4.9g
双蒸水		1000ml

pH 值为 8.0-10.0

化学发光底物液 B :

过氧化脲	3.5mM	0.329g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O		51.58g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		8.74g
Tween-20	0.1%	1ml
双蒸水		1000ml

pH 值为 7.0—7.6

使用方法：使用前将 A 液与 B 液按 1 :1 比例混合后使用。

[0032] 五、浓缩洗液

辣根过氧化物酶所使用的浓缩洗液 (PBST 洗涤液)

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	58g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2g
NaCl	160g
Tween-20	1ml
Proclin300	1ml
双蒸水	1000ml

调整 pH 至 7.2—7.4

使用前用双蒸水稀释 20 倍使用。

[0033] 六、半成品及成品组成

将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、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成 NMP22 化学发光免疫检测试剂盒。

[0034] 实施例 3

与实施例 1 的不同之处在于:以戊二醛法将碱性磷酸酶与核基质蛋白 22 单克隆抗体连接;用酶标抗体稀释液以 1 :3000 稀释酶标记物;采用成分为 Tris(24g)、HCl(15ml)、NaCl(160g)、KCl(4g)、双蒸水(1000ml)、pH 值为 7.4 的 Tris-HCl 浓缩洗涤液和以 CSPD 为发光底物液。

[0035] 实施例 4

与实施例 1 的不同之处在于:包被步骤中所用微孔板以塑料珠作为固相载体。

[0036] 实施例 5

与实施例 1 的不同之处在于:包被步骤中所用微孔板以塑料管作为固相载体。

[0037] 实施例 6

与实施例 1 的不同之处在于:以磁性颗粒作为载体;以经典戊二醛法将核基质蛋白 22 单克隆抗体连接于磁性颗粒表面。

[0038] 综合实施例 1—6 所制得的核基质蛋白 22 化学发光免疫检测试剂盒包括:1)NMP22 校准品;2)NMP22 单克隆抗体预包被的固相载体;3)NMP22 单克隆抗体的酶标记物;4)与上述酶作用的发光底物液;5)浓缩洗液。

[0039] 实施例 7

本发明试剂盒的检测方法

结合附图 1：

使用本试剂盒进行实验前，需先取出固相抗体、校准品、待检样品、标记抗体溶液在室温放置 15-30min，使他们平衡到室温；之后，将恒温温箱或者水浴锅调至 37℃；再后，准备好合适的微量加样器及对应吸头并且检查化学发光仪以及辅助仪器，如洗板机等，是否正常工作。

[0040] 使用本试剂盒按照实施例 1 的方法进行实验的具体操作步骤如下：

- 1) 将实验所需要的板条(已包被好抗体,96/48 孔可拆为 12/6*8*1 孔) 放置在板架上；
- 2) 反应孔中分别加待测样品和各浓度校准品,校准品每孔加 0、5、10、20、40、80IU/ml 各 25ul,每次试验设空白 1 孔,其余孔加待检样品 25ul；
- 3) 每孔、管依次加入酶标记物 100ul,于微量振荡器上震荡 30 秒混匀；
- 4) 37℃恒温温育 60min；
- 5) 弃去孔中溶液,用稀释后的浓缩洗液,自动洗板机或者手工洗板 5 次,在吸水纸上拍干；
- 6) 每孔加发光底物液 100ul,震荡混匀,室温避光反应 5min；
- 7) 在 5-15min 内,用化学发光仪测相对发光值(RLU),测量时间 1 秒 / 孔；
- 8) 分别对校准品浓度和对应 RLU 取对数,在建立的对数曲线上建立标准曲线,以各待测血清 RLU 值在标准曲线上查出该血清的 NMP22 的浓度,计算检测结果；
- 9) 打印检测结果报告。

[0041] 从附图 1 的检测结果来看,呈现很好的线性关系。

[0042] 本发明试剂盒中的固相抗体为提前包被好的,不需要现场包被;校准品为液体;标记抗体也是已经稀释到工作浓度的工作溶液,均可以直接使用。校准品、待测样本、酶标记抗体溶液以及发光底物液加样体积均为 50ul,实验过程中,不需要调节加样体积,最大程度的方便使用。利用本发明的试剂盒进行检验,灵敏度高,特异性强,检测范围宽,操作简单,无放射性污染,试剂盒成本低,临床使用性强,为临床膀胱癌的检测提供了有力依据。

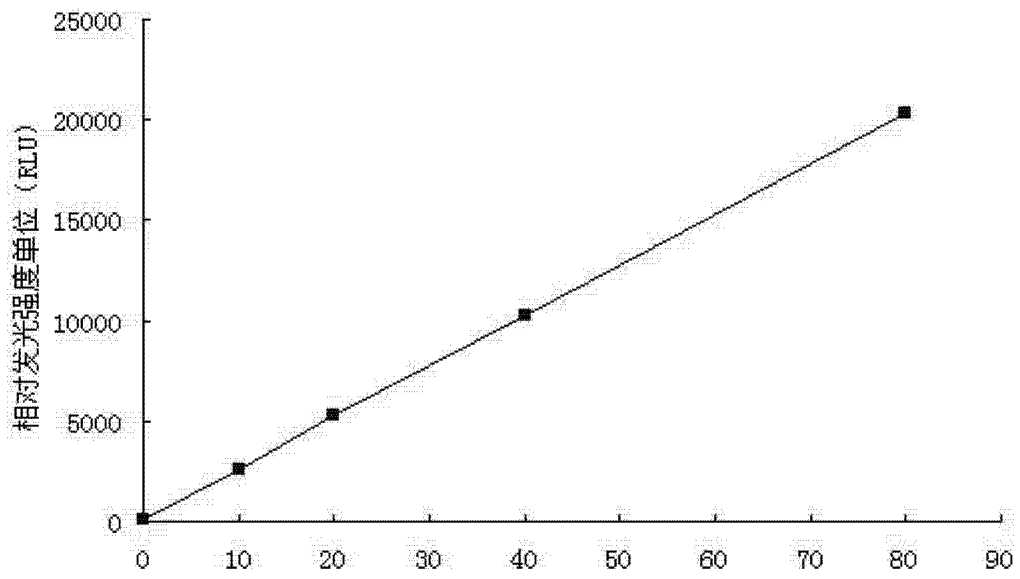


图 1

专利名称(译)	一种核基质蛋白22化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104267197A	公开(公告)日	2015-01-07
申请号	CN201410573982.3	申请日	2014-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	浙江东方基因生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江东方基因生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江东方基因生物制品有限公司		
[标]发明人	张华 廖钟财		
发明人	张华 廖钟财		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫分析医学领域，特别涉及一种核基质蛋白22化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，可用于临床膀胱癌的早期诊断及术后疗效监测。本发明的试剂盒包括：1) NMP22校准品；2) NMP22单克隆抗体预包被的固相载体；3) NMP22单克隆抗体的酶标记物；4) 与所述酶作用的发光底物液；5) 浓缩洗液。本发明的优点是简便、无创且能早期诊断膀胱癌。

