



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109781986 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201910180925.1

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.03.11

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 复旦大学附属妇产科医院

C12P 21/06(2006.01)

地址 200000 上海市黄浦区方斜路419号、
沈阳路128号、大林路358号、方斜路
566号

C12N 11/14(2006.01)

申请人 北京润诺思医疗科技有限公司

(72)发明人 徐丛剑 王宜生 路晟 霍萌萌
胡春颖 张晓燕 顾建新 任士芳

(74)专利代理机构 北京东方汇众知识产权代理
事务所(普通合伙) 11296

代理人 张淑贤

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

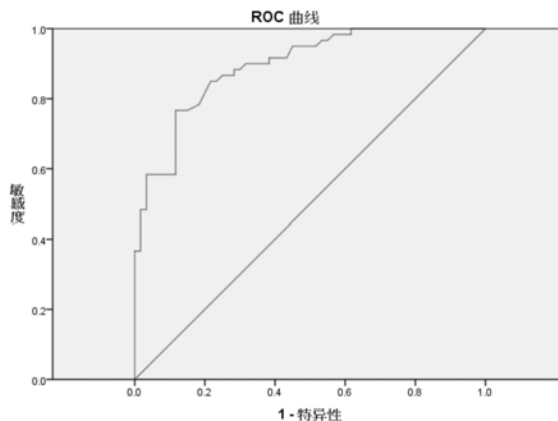
权利要求书3页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn
抗原的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一
种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的
试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括偶联有
CA125抗体Fab片段的磁分离试剂,含有唾液酸酶
的能够识别Tn抗原的生物素-凝集素试剂,链霉
亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂;磁分离试
剂特异性结合CA125抗原,生物素-凝集素可特异
性识别CA125抗原表面的Tn抗原,链霉亲和素-生
物素-碱性磷酸酶偶联试剂可特异性结合生物
素-凝集素试剂实现对检测信号的放大,唾液酸
酶水解Tn抗原表面与唾液酸相连的糖苷键,释放
唾液酸使Tn抗原暴露,提高检测的准确率、灵敏
度和线性范围。本发明试剂盒特异性高、灵敏度
好,可实现全自动化测试。



1. 一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,其特征在于,包括偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂,含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂,具备检测信号放大功能的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂。

2. 如权利要求1所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,其特征在于,还包括化学发光底物液、洗涤液和校准品工作液。

3. 如权利要求1所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,其特征在于,所述CA125抗体为0v185单克隆抗体;所述含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂为含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂。

4. 如权利要求1~3任一项所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,其特征在于,所述CA125抗体Fab片段由以磁微珠为载体的固定化木瓜蛋白酶进行酶切制备而得,具体包括以下操作步骤:

1) 准确量取一定质量固定化木瓜蛋白酶于一定体积的容器中,容器置于磁架,固定化木瓜蛋白酶沉淀后去除上清,使用0.01M的PBS缓冲溶液进行洗涤备用;

2) 准确量取0.1-0.2倍固定化木瓜蛋白酶质量的CA125抗体,使用PD-10脱盐柱和含0.02M EDTA及0.02M半胱氨酸的0.01M PBS缓冲液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将其稀释或浓缩为0.1-0.2倍固定化木瓜蛋白酶质量数的体积;

3) 将步骤1)中备用的固定化木瓜蛋白酶溶液置于磁架,留沉淀去除上清,将步骤2)中脱盐后的CA125抗体溶液加入其中,于37℃条件下酶解3-4小时;

4) 酶解结束后将步骤3)中溶液置于磁架,固定化木瓜蛋白酶沉淀后收集上清,此上清液中含CA125抗体Fab片段。

5. 如权利要求4所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,其特征在于,所述以磁微珠为载体的固定化木瓜蛋白酶由以下方法制备获得:包括以下操作步骤:

I、准确量取一定质量Fe₃O₄纳米磁颗粒于一定体积的容器中,置于磁架,沉淀后去上清,使用0.1-0.5倍磁珠质量数的纯水洗涤两次,清洗完成后加入0.1-0.5倍磁珠质量数的0.01M PBS缓冲液,后加入0.04-0.08倍磁珠质量的木瓜蛋白酶,室温混匀1-2小时;

II、混匀结束后将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,加入0.1-0.3倍磁珠质量数的0.2mM盐酸缓冲液,室温混匀10-15分钟;

III、混匀结束后加入0.002-0.006倍磁珠质量数的0.5M pH=7.4±0.1的HEPES缓冲液,调整pH至7.3±0.1,37℃混匀1-2小时;

IV、混匀结束后加入1.5-4.5倍磁珠质量的甘氨酸,37℃混匀0.5-1小时;

V、混匀结束后将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,使用0.1-0.3倍磁珠质量数的3M pH=8.6±0.1的NaHCO₃缓冲液,洗涤两次;

VI、洗涤完成后,将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,加入0.1-0.3倍磁珠质量数的磁珠保存液,于2~8℃进行保存。

6. 如权利要求3所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,其特征在于,所述偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂由以下方法制备获得:

a: 取一定量的羧基磁珠溶液于一定体积的容器中,容器置于磁架,沉淀后去上清,分别使用0.01M的NaOH溶液及预冷的纯水洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留羧基磁珠

固体；

b: 准确量取1-3倍磁珠质量的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺, 加入一定体积预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液, 使其浓度为45mg/ml;

c: 准确量取2-6倍磁珠质量的碳化二亚胺盐酸盐, 加入一定体积预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液, 使其浓度为85mg/ml;

d: 将b配制的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺溶液及c配制的碳化二亚胺盐酸盐溶液加入至a中盛有羧基磁珠固体的容器中, 将此羧基磁珠混悬液于2~8℃条件下混匀1-2小时, 完成对羧基磁珠的活化;

e: 羧基磁珠活化完成后置于磁架, 羧基磁珠沉淀后去上清, 使用预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液进行洗涤, 清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清, 仅留活化的羧基磁珠固体;

f: 准确量取0.01-0.05倍羧基磁珠质量的CA125抗体Fab片段, 使用PD-10脱盐柱和25mM pH5.0的MES缓冲溶液对其进行脱盐处理, 脱盐完成后将CA125抗体Fab片段溶液稀释或浓缩为0.04-0.2倍羧基磁珠质量数的体积;

g: 将f中的CA125抗体Fab片段溶液加入至e中盛有经活化的羧基磁珠固体的容器中, 室温混匀3-4小时, 完成羧基磁珠与CA125抗体Fab片段的偶联;

h: 羧基磁珠与CA125抗体Fab片段偶联完成后置于磁架, 羧基磁珠沉淀后去上清, 加入与f中CA125抗体Fab片段溶液等体积的100mM pH7.4的Tris-盐酸溶液, 室温混匀0.5-1小时对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭;

i: 羧基磁珠封闭完成后置于磁架, 羧基磁珠沉淀后去上清, 使用0.1% PBST缓冲液进行洗涤, 清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清, 加入与f中CA125抗体Fab片段溶液等体积的磁分离试剂保存缓冲液进行保存。

7. 如权利要求1所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒, 其特征在于, 所述含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂由以下方法制备获得: 包括准确量取一定量生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂, 加入唾液酸酶缓冲液将其稀释至10 μ g/ml, 即得含有唾液酸酶的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂。

8. 如权利要求7所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒, 其特征在于, 所述唾液酸酶缓冲液的浓度为0.1-0.5U/ml, 并由以下方法制备获得:

准确量取BSA 10g、NaCl 8g、KCl 0.2g、12 H₂O • Na₂HPO₄ 3.6g、KH₂PO₄ 0.3g、1M CaCl₂ 0.1ml、1U/ml唾液酸酶0.1-0.5ml, 添加纯化水1L混匀30min, 调节pH=7.2 \pm 0.05, 0.22 μ m过滤后即得。

9. 如权利要求1所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒, 其特征在于, 所述具备检测信号放大功能的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂由以下方法制备获得:

A: 准确量取一定质量的碱性磷酸酶制剂, 使用PD-10柱及0.1M pH=8.4 \pm 0.05的NaHCO₃缓冲液对其进行除盐, 除盐结束后浓缩至浓度为3-4mg/ml, 备用;

B: 准确量取0.08-0.16倍碱性磷酸酶质量的生物素固体粉末, 溶解于二甲基亚砜, 终浓度为10-15mg/ml;

C: 将B配制的生物素溶液加入至A中备用的碱性磷酸酶溶液, 室温混匀4-5h进行偶联;

D: 偶联结束后使用分子筛层析法对其进行纯化, 去除未偶联的生物素, 得到生物素-碱

性磷酸酶偶联试剂；

E:准确量取7倍碱性磷酸酶质量的链霉亲和素试剂,加入D中所得的生物素-碱性磷酸酶偶联试剂,于37°C混匀20分钟,得到高浓度链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂；

F:工作液缓冲液的配制:准确量取BSA 10g、NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.6g、 KH_2PO_4 0.3g、1M CaCl_2 0.1ml,添加纯化水1L混匀30min,调节 $\text{pH}=7.2 \pm 0.05$, $0.22\mu\text{m}$ 过滤后备用；

G:取步骤D制备的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂加入步骤F制备的工作液缓冲液稀释至 $30\mu\text{g}/\text{ml}$,即得所述链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂。

10.一种如权利要求2所述的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括分别制备偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂,含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂、具备检测信号放大功能的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂、化学发光底物液、洗涤液和校准品校准品,将制备好的各试剂组装在一个试剂盒中,即完成。

一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 卵巢癌于妇科恶性肿瘤发病率位居第三,仅次于宫颈癌和子宫体癌,但病死率位居首位。近数十年来,尽管大量科研工作者致力于卵巢癌的研究,但仍未明显改善该类患者的生存率。癌抗原125(cancer antigen 125,CA125)最初于1981年由Bast等发现并命名,为单克隆抗体OC125所识别的抗原表位,且于1984年由Klug等首次使用放射免疫分析技术对其进行定量检测,并设定CA125的正常范围 $<35\text{U/ml}$ 。CA125一方面为妇科常用的血清肿瘤标志物,另一方面为卵巢癌病情监测及随访最重要的肿瘤标志物。

[0003] 研究显示,卵巢癌组织能合成并分泌大量CA125,血清中CA125水平与肿瘤大小,及肿瘤组织CA125染色程度呈正相关,因此其水平能够很好显示机体的肿瘤负荷,从而作为卵巢癌临床诊断及术后随访的重要指标。但除卵巢癌外,血清中CA125具有多源性,其在成人组织中分布包括苗勒氏管上皮(输卵管内膜、子宫内膜、宫颈内膜);结膜和角膜上皮;支气管上皮及支气管粘膜下腺;腹膜、胸膜以及心膜等间皮组织。此种现象致使除卵巢癌外的其他诸多良恶性疾病均会出现血清CA125浓度升高的现象。1997年,有学者报道了克利夫兰临床中心300余名血清CA125浓度大于 65U/ml 患者的临床病症,其中74.3%为妇科恶性肿瘤,另有10.2%为非妇科恶性肿瘤,及13.1%为良性疾病患者。较多妇科良性疾病,如子宫内膜异位症等,近年来呈现较高的发病率,其临床表现,如盆腔包块、盆腔积液等与卵巢癌的临床表现类似。此等现象均为临床诊断带来较多困难,并给良性疾病患者带来不必要的精神负担。鉴于此,若能找寻良恶性来源CA125分子间的结构差异,并对其进行准确分型,可明显提高临床诊断的准确率。

[0004] CA125序列中存在较多潜在的糖基化位点,因此它是一种高度糖基化的粘蛋白,其糖链可达整个分子质量的20%~70%,而糖基化程度也是造成CA125分子异质性的原因之一。恶性肿瘤的产生常伴随糖链合成、降解,以及连接相关分子的异常变化,从而导致其最终合成的蛋白出现异常糖基化状态。卵巢癌CA125分子可表现出O-糖基化障碍,O-糖链是以GalNAc与肽链上的丝氨酸/苏氨酸连接形成,而卵巢癌CA125常出现O-糖链合成障碍,结果形成短的O-糖链,表现为T抗原或Tn抗原。通过检测CA125表面的Tn抗原可进一步区分患者血清中CA125的良、恶性来源。

[0005] 凝集素可用于特异性糖链的分析,其所识别的糖链结构常位于分子表面,且为糖链参与免疫识别的关键位点,因此对生物学分析具有重要意义。而且凝集素本身是一类不具有催化活性、不改变糖链构型及定位的非抗体类糖结合蛋白,其与糖链的结合具有高度结构、连键方式,及空间构型的特异性。有研究者已证明卵巢癌来源的CA125抗原表面具有因糖链高度特异化而形成的Tn抗原,一种凝集素VVA与该抗原具有高度特异性识别作用,例

如专利CN201210283107.2公开了一种检测CA125表面Tn抗原的基于ELISA原理的试剂盒,该试剂盒利用了凝集素VVA识别CA125表面Tn抗原,但其本身存在诸多不足和缺陷,共表现在以下几个方面:

[0006] 1) 该专利是基于ELISA技术的微孔板的非均相反应体系相较于基于磁微粒化学发光的均相反应体系,其选择性、灵敏性,及反应速度均不及后者;

[0007] 2) 该专利对包被板进行氧化衍生化处理,拟在解决凝集素VVA与抗体的非特异性吸附现象,虽然实现了Fc段糖链的封闭,但同时无论氧化剂还是衍生化试剂,均不可避免的对Fab段产生影响,从而影响抗体的活性;

[0008] 3) 该专利通过生物素-凝集素VVA与链霉亲和素-辣根过氧化物酶的特异性结合实现信号的放大作用,该方法存在不确定性,无法保证每个链霉亲和素分子只结合1个生物素分子,从而削弱最终测试结果值;;

[0009] 4) 该专利操作步骤复杂,反应时间冗长,其测试过程经12次洗脱,由测试起始至测试结束需近4小时方能完成,且难以实现集成化及全自动化;

[0010] 5) 该专利以酶标仪测试的OD值作为最终数据进行ROC曲线分析,未涉及校准品拟合,该种处理方式具有一定局限性,受不同厂家或型号酶标仪影响,其最终结果波动较大;

[0011] 6) 该专利未对CA125抗原表面的唾液酸进行处理,而抗原表面的唾液酸可掩盖凝集素VVA的识别位点,进而影响了检测灵敏度及线性范围。

[0012] 因此,为了克服现有检测技术中存在的上述缺陷,需要研究开发出一种抗体活性高、信号放大效果好、灵敏度高、线性范围宽、操作简单、测试更稳定的用于检测CA125表面Tn抗原的磁微粒化学发光免疫试剂盒。

发明内容

[0013] 为了克服现有技术的缺陷,本发明的目的是提供一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,该试剂盒特异性高、灵敏度好、反应速度快、操作简便,并可实现全自动化测试。

[0014] 同时,本发明还在于提供一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒的制备方法。

[0015] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:

[0016] 一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,包括偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂,含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂、具备检测信号放大功能的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂。

[0017] 上述试剂盒中还包括化学发光底物液、洗涤液和校准品工作液。

[0018] 可选的,所述CA125抗体为0v185单克隆抗体。

[0019] 可选的,所述含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂为含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素长柔毛野豌豆凝集素试剂。

[0020] 可选的,所述CA125抗体Fab片段由以磁微珠为载体的固定化木瓜蛋白酶进行酶切制备而得,具体包括以下操作步骤:

[0021] 1) 准确量取一定质量固定化木瓜蛋白酶于一定体积的容器中,容器置于磁架,固

定化木瓜蛋白酶沉淀后去除上清,使用0.01M的PBS缓冲溶液进行洗涤备用;

[0022] 2) 准确量取0.1~0.2倍固定化木瓜蛋白酶质量的CA125抗体,使用PD-10脱盐柱和含0.02M EDTA及0.02M半胱氨酸的0.01M PBS缓冲液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将其稀释或浓缩为0.1~0.2倍固定化木瓜蛋白酶质量数的体积;

[0023] 3) 将步骤1)中备用的固定化木瓜蛋白酶溶液置于磁架,留沉淀去除上清,将步骤2)中脱盐后的CA125抗体溶液加入其中,于37℃条件下酶解3~4小时;

[0024] 4) 酶解结束后将步骤3)中溶液置于磁架,固定化木瓜蛋白酶沉淀后收集上清,此上清液中含CA125抗体Fab片段。

[0025] 可选的,所述以磁微珠为载体的固定化木瓜蛋白酶由以下方法制备获得:包括以下操作步骤:

[0026] I、准确量取一定质量 Fe_3O_4 纳米磁颗粒(单位:毫克)于一定体积的容器中,置于磁架,沉淀后去上清,使用0.1~0.5倍磁珠质量数的纯水(单位:毫升)洗涤两次,清洗完成后加入0.1~0.5倍磁珠质量数的0.01M PBS缓冲液,后加入0.04~0.08倍磁珠质量的木瓜蛋白酶,室温混匀1~2小时;

[0027] II、混匀结束后将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,加入0.1~0.3倍磁珠质量数的0.2mM盐酸缓冲液(单位:毫升),室温混匀10分钟;

[0028] III、混匀结束后加入0.002~0.006倍磁珠质量数的0.5M $\text{pH}=7.4\pm 0.1$ 的HEPES缓冲液,调整 pH 至 7.3 ± 0.1 ,37℃混匀2.5小时;

[0029] IV、混匀结束后加入1.5~4.5倍磁珠质量的甘氨酸,37℃混匀1小时;

[0030] V、混匀结束后将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,使用0.1~0.3倍磁珠质量数的3M $\text{pH}=8.6\pm 0.1$ 的 NaHCO_3 缓冲液,洗涤两次;

[0031] VI、洗涤完成后,将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,加入0.1~0.3倍磁珠质量数的磁珠保存液,于2~8℃进行保存。

[0032] 可选的,上述步骤I中0.01M缓冲液的配方组成为:0.14M NaCl 、3mM KCl 、10mM Na_2HPO_4 、2mM KH_2PO_4 , $\text{pH}=7.2\pm 0.05$ 。

[0033] 可选的,上述步骤VI中磁珠保存液的配方组成为:0.05M Tris 、0.01M NaN_3 、0.03M 甲基纤维素, $\text{pH}=8.2\pm 0.05$ 。

[0034] 可选的,所述偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂由以下方法制备获得:

[0035] a:取一定量的羧基磁珠溶液于一定体积的容器中,容器置于磁架,沉淀后去上清,分别使用0.01M的 NaOH 溶液及预冷的纯水洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留羧基磁珠固体;

[0036] b:准确量取1~3倍磁珠质量(单位:毫克)的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺,加入一定体积预冷的25mM $\text{pH}5.0$ 的MES缓冲溶液,使其浓度为45mg/ml;

[0037] c:准确量取2~6倍磁珠质量的碳化二亚胺盐酸盐,加入一定体积预冷的25mM $\text{pH}5.0$ 的MES缓冲溶液,使其浓度为85mg/ml;

[0038] d:将b配制的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺溶液及c配制的碳化二亚胺盐酸盐溶液加入至a中盛有羧基磁珠固体的容器中,将此羧基磁珠混悬液于2~8℃条件下混匀1~2小时,完成对羧基磁珠的活化;

[0039] e:羧基磁珠活化完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用预冷的25mM

pH5.0的MES缓冲溶液进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留活化的羧基磁珠固体;

[0040] f:准确量取0.01~0.05倍羧基磁珠质量的CA125抗体Fab片段,使用PD-10脱盐柱和25mM pH5.0的MES缓冲溶液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将CA125抗体Fab片段溶液稀释或浓缩为0.04~0.2倍羧基磁珠质量数的体积(单位:毫升);

[0041] g:将f中的CA125抗体Fab片段溶液加入至e中盛有经活化的羧基磁珠固体的容器中,室温混匀3~4小时,完成羧基磁珠与CA125抗体Fab片段的偶联;

[0042] h:羧基磁珠与CA125抗体Fab片段偶联完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,加入与f中CA125抗体Fab片段溶液等体积的100mM pH7.4的Tris-HCl溶液,室温混匀0.5~1小时对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭;

[0043] i:羧基磁珠封闭完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用0.1%PBST缓冲液进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,加入与f中CA125抗体Fab片段溶液等体积的磁分离试剂保存缓冲液进行保存。

[0044] 可选的,上述步骤i中磁分离试剂保存缓冲液的组成配方为:2.6%NaH₂PO₄·H₂O、14.4%Na₂HPO₄·2H₂O、0.5%Proclin300、1.4%NaCl、5%BSA,pH=7.4±0.05。

[0045] 可选的,上述步骤i中0.1%PBST缓冲液的组成配方为:0.14M NaCl、3mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄、0.8mM吐温-20,pH=7.2±0.05。

[0046] 可选的,所述含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂由以下方法制备获得:包括准确量取一定量生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂,加入唾液酸酶缓冲液将其稀释至10μg/ml,即得含有唾液酸酶的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂。

[0047] 可选的,所述唾液酸酶缓冲液的浓度为0.1-0.5U/ml,并由以下方法制备获得:准确量取BSA 10g、NaCl 8g、KCl 0.2g、12H₂O·Na₂HPO₄ 3.6g、KH₂PO₄ 0.3g、1M CaCl₂ 0.1ml、1U/ml唾液酸酶0.1-0.5ml,添加纯化水1L混匀30min,调节pH=7.2±0.05,0.22μm过滤后即得。

[0048] 可选的,所述具备检测信号放大功能的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂由以下方法制备获得:包括以下操作步骤:

[0049] A:准确量取一定质量的碱性磷酸酶制剂(单位:毫克),使用PD-10柱及0.1M pH=8.4±0.05的NaHCO₃缓冲液对其进行除盐,除盐结束后浓缩至浓度为3~4mg/ml,备用;

[0050] B:准确量取生物素固体粉末3~4mg,溶解于二甲基亚砜,终浓度为10~15mg/ml;

[0051] C:取B中0.08倍碱性磷酸酶质量的生物素加入至A中备用的碱性磷酸酶溶液,室温混匀4~5h进行偶联;

[0052] D:偶联结束后使用分子筛层析法对其进行纯化,去除未偶联的生物素,得到生物素-碱性磷酸酶偶联试剂;

[0053] E:准确量取7倍碱性磷酸酶质量的链霉亲和素试剂,加入D中所得的生物素-碱性磷酸酶偶联试剂,于37℃混匀20分钟,得到高浓度链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂;

[0054] F:工作液缓冲液的配制:准确量取BSA 10g、NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 3.6g、KH₂PO₄ 0.3g、1M CaCl₂ 0.1ml,添加纯化水1L混匀30min,调节pH=7.2±0.05,0.22μm过滤后备用;

[0055] G:取步骤D制备的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂加入步骤F制备的工作液缓冲液稀释至30ug/ml,即得所述链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂工作液;

[0056] 可选的,上述脱盐操作过程中使用的PD-10脱盐柱为美国GE PD-10。

[0057] 可选的,所述化学发光底物液由以下方法制备获得:准确量取Tris24g,3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐1g,氯化钠160g,纯化水定容至1000ml,混匀30min调整pH值为 9.0 ± 0.1 ,即得化学发光底物液。

[0058] 可选的,所述洗涤液由以下方法制备获得:准确量取Tris1.2g,NaCl 9g,吐温-20 1g,纯化水定容至1000ml,混匀30min调pH为 8.0 ± 0.5 ,0.22 μ m过滤即得所述的洗涤液。

[0059] 可选的,所述校准品工作液由以下方法制备获得:

[0060] i、校准品缓冲液制备:准确称取Tris碱1.2g、NaCl1.8g、MIT 0.3g,添加纯化水160g混匀30min,使用5M的浓盐酸和5M的NaOH溶液调PH值至 7.5 ± 1 ,继续添加Proclin300 0.1g、BSA 6g,搅拌30min后添加纯化水定重至200g,复测pH值后,0.22 μ m过滤备用;

[0061] ii、校准品的配制:将高浓度的含Tn抗原的CA125抗原加入1中所述缓冲液,配制成具备一定浓度梯度的校准品。

[0062] 上述磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括分别制备偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂,含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂、具备检测信号放大功能的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂、化学发光底物液、洗涤液和校准品工作液,将制备好的各试剂分别储存放置,完后组装在一个试剂盒中,即完成。

[0063] 本发明磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒的反应原理为夹心法,具体为:先加入待测样本或校准品,然后连续加入一定量的偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂和含有唾液酸酶的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂,反应过程中一方面磁分离试剂上的CA125抗体与样本或校准品中的CA125抗原特异性结合,另一方面唾液酸酶分解唾液酸,从而使Tn抗原充分暴露,之后生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂中的凝集素与CA125抗原上的Tn抗原特异性结合,反应结束后在磁场作用下进行固液分离,去除未参与反应的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂,得到富集的生物素-长柔毛野豌豆凝集素-抗原-磁珠结合物,后加入一定量的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂,该试剂中的链霉亲和素与结合物中的生物素特异性结合,反应结束后在磁场作用下进行固液分离,去除未参与反应的链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂,最终得到富集的磁珠-抗原-凝集素-生物素-链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶结合物,进而加入化学发光底物液进行测试,样本中Tn抗原浓度越高,所测得发光值也就越高,通过发光值确定Tn抗原的浓度。

[0064] 本发明试剂盒的有益效果:

[0065] 1) 相较于专利CN201210283107.2,本发明试剂盒的生物素-长柔毛野豌豆凝集素试剂中添加唾液酸酶,唾液酸通常以短链残基的形式连接于糖蛋白、糖脂等糖缀合物的末端,如以 $\alpha 2-3$, $\alpha 2-6$, $\alpha 2-8$ 糖苷键连接到糖蛋白上,从而封闭和掩盖具有信号识别作用的糖蛋白等。Tn抗原为一种高度特异化的糖蛋白,其末端具备唾液酸,而唾液酸酶具有显著的底物专一性,可以断裂Tn抗原末端与唾液酸残基相连接的糖苷键从而水解唾液酸缀合物,进而使Tn抗原暴露,且不影响Tn抗原的免疫原性,以利于凝集素对Tn抗原的识别,进而提高测试的灵敏度和线性范围;

[0066] 2) 本发明采用偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂,是由于凝集素与抗体Fc段糖链具有非特异性结合作用,本发明将抗体的Fc段切除,只选用Fab段,一方面避免了凝集素与Fc段糖链的非特异性吸附现象,另一方面避免了Fc片段与样本中类风湿因子等结合而造成的假阳性现象,此外,本发明采用磁微粒固定化木瓜蛋白酶对抗体的Fc段进行切除,其剩余的Fab片段不但能保持完整抗体的免疫活性,而且能够促使抗体活性片段有效富集,从而达到了节约生产成本及提高试剂盒性能的双重功效;

[0067] 3) 本发明通过制备链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂的方法实现发光信号的放大作用,该工艺首先实现生物素与碱性磷酸酶的偶联,本专利采用的偶联方法简单,且不影响酶的活性,其次实现链霉亲和素与生物素-碱性磷酸酶的偶联,通过投入定量的链霉亲和素,保证每个链霉亲和素分子与3个生物素分子结合,从而剩余一个位点与生物素-长柔毛野豌豆凝集素结合,该方法相较于专利CN201210283107.2标记亲和素的方法而言,具有信号放大倍数高,测试更稳定的特点。此外如专利CN 102359958 A、CN 103969438 A、CN101398431A均使用标记亲和素的方法,该方法中生物素标记第二抗体,酶标记链霉亲和素,通过生物素与链霉亲和素的特异性结合完成检测信号的放大,该法虽然具备一定的信号放大作用,但是该方法一方面无法保证每个与碱性磷酸酶偶联的链霉亲和素分子只结合1个生物素分子,从而削弱最终测试结果值,另一方面链霉亲和素相较于普通IgG分子,其分子量较小,为66KDa,其所能连接的酶数量有限,从而导致放大信号低,此外该偶联方法复杂,偶联过程中使用的部分化学试剂对酶的活性具有一定负面影响;

[0068] 4) 本发明试剂盒测试所需反应时间短,如专利CN201210283107.2中抗原与抗体结合需90min,整个测试完成约需4h,而本发明试剂盒抗原与抗体的结合仅需10.5min,整个测试过程更是缩减至1h以内;

[0069] 5) 本发明试剂盒测试步骤简单,更易操作,如专利CN201210283107.2中整个测试需4次加样,共9次洗涤,而本试剂盒仅需2次加样,2次洗涤即可完成,并且本试剂盒可实现全自动化测试;

[0070] 6) 进一步的,本发明试剂盒在固定化酶的过程中使用 Fe_3O_4 纳米磁颗粒以物理吸附方式对木瓜蛋白酶进行固定化处理,最终制备得到固定化木瓜蛋白酶,该方法无需对 Fe_3O_4 纳米磁颗粒进行预处理,操作步骤简单,所用试剂成本较低,且所制备的固定化木瓜蛋白酶具有较高的固载率和活性。相较于现有的固定化酶技术而言,如专利CN102181422A、CN103131689A、CN104031903A均使用高分子有机或无机材料作为载体,此类方法对酶切产物的分离效果较差,不及具备超顺磁性的 Fe_3O_4 纳米磁颗粒。此外亦有部分专利使用 Fe_3O_4 纳米磁颗粒作为固定化酶的载体,如专利CN102286452A、CN102649954A、CN104560940A,但该类专利所述方法中,在对酶进行固定化之前需对 Fe_3O_4 纳米颗粒进行复杂的包被、活化等处理,该过程耗时费力,且成本较高,此外该类固定化酶的方法多采用化学共价偶联法,共价偶联法的结合位点有限,导致酶的固载率较低,且部分偶联试剂对酶的活性具有一定负面影响,而本专利所述方法无需对 Fe_3O_4 纳米颗粒进行预处理,且使用物理吸附的方法对酶进行固定,一方面具备更高的固载率,另一方面不影响酶的活性,且所述方法中试剂成本低,操作简单。

附图说明

[0071] 图1为采用实施例1试剂盒进行临床血清样本测试时诊断CA125水平升高为恶性疾病的敏感度和特异度曲线图。

具体实施方式

[0072] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0073] 下述凝集素为VVA、生物素为Biotin、链霉亲和素为SA、碱性磷酸酶为ALP；

[0074] 下述实施例采用的脱盐柱PD-10为美国GE PD-10。

[0075] 实施例1

[0076] 本实施例磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒,包括偶联有0v185单克隆抗体Fab片段的磁分离试剂,含有唾液酸酶的Biotin-VVA试剂,SA-Biotin-ALP试剂,化学发光底物液,洗涤液和校准品工作液。

[0077] 本实施例磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒的制备方法,包括以下操作步骤:

[0078] 一、制备偶联有0v185单克隆抗体Fab片段的磁分离试剂:

[0079] 1、制备固定化木瓜蛋白酶:

[0080] I、准确量取50mg Fe_3O_4 纳米磁颗粒于10ml的聚苯乙烯塑料试管中,置于磁架,沉淀后去上清,使用5ml纯水洗涤两次,清洗完成后加入5ml 0.01M PBS缓冲液(0.14M NaCl、3mM KCl、10mM Na_2HPO_4 、2mM KH_2PO_4 , pH=7.2±0.05),后加入0.08倍磁珠质量的木瓜蛋白酶,室温混匀2小时;

[0081] II、混匀结束后将磁珠置于磁架,沉淀后去上清,加入5ml 0.2mM盐酸缓冲液,室温混匀10分钟;

[0082] III、混匀结束后加入0.1mg 0.5M HEPES缓冲液(PH=7.4±0.1),调整pH至7.3±0.1,37°C混匀2.5小时;

[0083] IV、混匀结束后加入100mg甘氨酸,37°C混匀1小时;

[0084] V、混匀结束后将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,使用5mg 3M $NaHCO_3$ 缓冲液(pH=8.6±0.1)洗涤两次;

[0085] VI、洗涤完成后,将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,加入5mg磁珠保存液(0.05M Tris、0.01M NaN_3 、0.03M甲基纤维素,PH=8.2±0.05),于2~8°C进行保存;

[0086] 2、固定化木瓜蛋白酶水解0v185单克隆抗体制备Fab片段:

[0087] 1)准确量取50mg步骤1中制备保存的固定化木瓜蛋白酶于10ml的聚苯乙烯塑料试管中,容器置于磁架,固定化木瓜蛋白酶沉淀后去除上清,使用5ml 0.01M的PBS缓冲溶液进行洗涤备用;

[0088] 2)准确量取5mg 0v185单克隆抗体,使用GE PD-10脱盐柱和含0.02M EDTA及0.02M半胱氨酸的0.01M PBS缓冲液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将其稀释为5ml;

[0089] 3)将1)中固定化木瓜蛋白酶溶液置于磁架,留沉淀去除上清,将2)中0v185单克隆抗体溶液加入其中,于37°C条件下酶解4小时;

[0090] 4)酶解结束后将3)中溶液置于磁架,固定化木瓜蛋白酶沉淀后收集上清,此上清液中含0v185单克隆抗体Fab片段;

[0091] 5) 将4)中收集的上清液过蛋白A柱去除上清液中的Fc片段,收集液即为仅含Ov185单克隆抗体Fab片段的抗体溶液,BCA法测定其蛋白浓度为0.64mg/ml;

[0092] 6) ELISA法鉴定5)中溶液是否含未去除的Fc片段:以10ug/ml浓度包被未经酶切的Ov185单克隆抗体及经酶切的Ov185单克隆抗体Fab片段,用0.1%PBST梯度稀释HRP标记的山羊抗鼠Fc片段抗体进行测试,发现未经酶切的Ov185单克隆抗体显色,而经酶切的Ov185单克隆抗体Fab片段不显色,证明经酶切后的CA125抗体Fab溶液不含Fc片段;

[0093] 7) 鉴定5)中溶液的Ov185单克隆抗体Fab片段活性:使用具备系列浓度的含Tn抗原的CA125抗原及Biotin-VVA、SA-HRP对6)中所述包被板进行测试,发现未经酶切的Ov185单克隆抗体与经酶切的Ov185单克隆抗体Fab片段显色一致,且经酶标仪测试,其OD间偏差仅为2.5%,表明经酶切后的CA125抗体Fab片段与完整的CA125抗体的活性保持一致;

[0094] 3、制备偶联有Ov185单克隆抗体Fab片段的磁分离试剂:

[0095] a:准确量取羧基磁珠50mg于10ml的聚苯乙烯塑料试管中,试管置于磁架,沉淀后去上清,分别使用2ml 0.01M的NaOH溶液及预冷的纯水洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留羧基磁珠固体;

[0096] b:准确量取75mg硫化的氮羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),加入1ml 25mM pH5.0的MES缓冲溶液,使其浓度为45mg/ml;

[0097] c:准确量取100mg碳化二亚胺盐酸盐(EDC),加入1ml预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液,使其浓度为85mg/ml;

[0098] d:将b中配制的Sulfo-NHS溶液及c中配制的EDC溶液加入至a中盛有羧基磁珠固体的试管中,将此羧基磁珠混悬液于2~8℃条件下混匀2小时,完成对羧基磁珠的活化;

[0099] e:羧基磁珠活化完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用2ml预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留活化的羧基磁珠固体;

[0100] f:准确量取0.78ml(步骤5)中制备的含Ov185单克隆抗体Fab片段的抗体溶液,使用GE PD-10脱盐柱和25mM pH5.0的MES缓冲溶液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将抗体溶液浓缩为2ml;

[0101] g:将f中的抗体溶液加入至e中盛有经活化的羧基磁珠固体的容器中,室温混匀4h,完成羧基磁珠与Ov185单克隆抗体Fab片段的偶联;

[0102] h:偶联完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,加入2ml 100mM pH7.4的Tris-HCl溶液,室温混匀1小时对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭;

[0103] i:羧基磁珠封闭完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用0.1%PBST(0.14M NaCl、3mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mMKH₂PO₄、0.8mM吐温-20,pH=7.2±0.05)进行洗涤,清洗体积为2ml,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,加入2ml磁分离试剂保存缓冲液(2.6% NaH₂PO₄·H₂O、14.4%Na₂HPO₄·2H₂O、0.5%Proclin300、1.4%NaCl、5%BSA,pH=7.4±0.05)进行保存;

[0104] 二、制备含有唾液酸酶的Biotin-VVA偶联试剂:

[0105] 准确量取BSA 10g、NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O3.6g、KH₂PO₄ 0.3g、1M CaCl₂ 0.1ml、1U/ml唾液酸酶0.1~0.5ml,添加纯化水1L混匀30min,调节pH=7.2±0.05,0.22μm过滤后得唾液酸酶缓冲液;准确量取50ul浓度为2mg/ml的VVA-Bio高浓度试剂,使用

9.95ml唾液酸酶缓冲液将其稀释为10ug/ml,即得含有唾液酸酶的Biotin-VVA偶联试剂;

[0106] 三、制备SA-Biotin-ALP偶联试剂:

[0107] A:准确量取0.5mg ALP试剂,使用GE PD-10柱及0.1M pH=8.4±0.05的NaHCO₃缓冲液对其进行除盐,除盐结束后浓缩至4mg/ml;

[0108] B:准确量取生物素固体粉末0.05mg,溶解于二甲基亚砜(DMSO),终浓度为10mg/ml;

[0109] C:取B制备的生物素溶液加入至A中溶液,室温混匀4h进行偶联;

[0110] D:偶联结束后使用分子筛层析法对其进行纯化,去除未偶联的生物素,得到Bio-ALP偶联试剂;

[0111] E:准确量取3.5mg SA试剂,加入D中所得的Biotin-ALP偶联试剂,于37℃混匀20分钟,得到SA-Biotin-ALP偶联试剂;

[0112] F:工作液缓冲液的配制:准确量取BSA 10g、NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 3.6g、KH₂PO₄ 0.3g、1M CaCl₂ 0.1ml,添加纯化水1L混匀30min,调节pH=7.2±0.05,0.22μm过滤后备用;

[0113] G:使用F中缓冲液将E中得到的SA-Biotin-ALP偶联试剂稀释至30ug/ml,保存;

[0114] 四:制备化学发光底物液:

[0115] 准确量取Tris24g、AMPPD(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐)1g,氯化钠(NaCl)160g,纯化水定容至1000ml,混匀30min调整pH值为9.0±0.1,即得化学发光底物液;

[0116] 五、制备洗涤液:

[0117] 准确量取Tris1.2g,NaCl 9g,吐温-20 1g,纯化水定容至1000ml,混匀30min调pH为8.0±0.5,0.22μm过滤即得洗涤液;

[0118] 六、制备校准品工作液:

[0119] i、校准品缓冲液制备:准确称取Tris碱1.2g、NaCl 1.8g、MITO.3g,添加纯化水160g混匀30min,使用5M的浓盐酸和5M的NaOH溶液调pH值至7.5±1,继续添加Proclin300 0.1g、BSA6g,搅拌30min后添加纯化水定重至200g,复测pH值后0.22μm过滤备用;

[0120] ii、校准品的配制:将浓度为342KU/ml的含Tn抗原的CA125抗原加入i中所述缓冲液,配制成400U/ml的溶液,随后依次稀释为25、50、100、200U/ml,加上400U/ml浓度点和0U/ml浓度点(缓冲液),共得到A:0U/ml、B:25U/ml、C:50U/ml、D:100U/ml、E:200U/ml、F:400U/ml,合计共6个浓度梯度的校准品;

[0121] 七:组装:

[0122] 将上述制备的偶联有Ov185单克隆抗体Fab片段的磁分离试剂、含有唾液酸酶的Biotin-VVA偶联试剂、SA-Biotin-ALP偶联试剂、化学发光底物液、洗涤液、校准品工作液组装成试剂盒。

[0123] 试验例

[0124] 1、应用试验例

[0125] 实施例1提供的磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原试剂盒于全自动化学发光免疫分析仪IMS1200(上海惠中制造)上的检测步骤:

[0126] 1) 样本加样针向反应杯中加入30ul样本或校准品;

- [0127] 2) 试剂加样针向反应杯中加入30ul偶联有Ov185单克隆抗体Fab片段的磁分离试剂;
- [0128] 3) 试剂加样针向反应杯中加入60ul含有唾液酸酶的Biotin-VVA偶联试剂;
- [0129] 4) 混匀20秒后37℃孵育10.5min;
- [0130] 5) 反应杯移至磁铁位静置10秒,去除未结合的试剂;
- [0131] 6) 试剂加样针向反应杯加入300ul洗涤液,混匀20秒后,反应杯移至磁铁位静置10秒,去除洗涤液;
- [0132] 7) 试剂加样针向反应杯中加入60ul SA-Biotin-ALP偶联试剂;
- [0133] 8) 重复步骤4)~6);
- [0134] 9) 试剂加样针向反应杯中加入化学发光底物液后读光测试;
- [0135] 10) 按照上述步骤1)~9)分别测试不同浓度校准品的发光值,按照五参数拟合方法绘制标准曲线,得出发光值与CA125表面Tn抗原浓度之间的关系式;再按照步骤1)~9)分别测试待测样品的发光值,由上述关系式计算得出待测样品中CA125表面Tn抗原浓度。
- [0136] 2、按照上述应用试验例所述的检测步骤,测试上述实施例1制备的试剂盒的各项性能,结果如下表1所示:
- [0137] 表1

[0138]

性能指标	检测方法	检测标准	检测结果
线性	用超出或等于线性范围上限浓度的样品和超出或等于线性范围下限浓度的样品，混合成至少 5 个浓度。每个稀释浓度测试 2 次，分别求出测定结果的均值。将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合，并计算线性相关系数 r 。	$r \geq 0.99$	符合标准
准确度	将浓度为 240-360U/ml 的抗原加入至阴性血清或其他相应基质的样品中，所加入的体积不超过总体积的 10%，检测样本添加抗原前后的浓度，计算回收率。	85%~115%	符合标准
灵敏度	用零浓度校准品（A 点）作为样本进行检测，重复测定 20 次，计算其发光值平均值（M）和标准差（SD），得出 $M+2SD$ ；将零浓度校准品（A 点）和相邻校准品（B 点）各测量两次，得出两次测量结果的发光值的平均值（RLU），将其浓度（用 y 表示）-RLU 值（用 x 表示）进行两点回归拟合得出一次方程 $y=ax+b$ ，将 $M+2SD$ 的 RLU 值带入上述方程中，求出对应的浓度值，即为最低检出限。	$\leq 1.0U/ml$	符合标准
精密性	分析内精密性：在同一分析内，质控品各重复检测 10 次，计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD ，根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV 。	$\leq 10\%$	符合标准
	分析间精密性：在不少于 3 次的独立分析之间，质控品各重复检测 10 次，计算 3 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD ，根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV 。	$\leq 15\%$	符合标准
稳定性	将实施例 1 得到的试剂盒置于 2-8℃，每间隔 3 个月测定试剂盒的线性、准确度、灵敏度、精密性，若所有指标能够满足检测标准，则认为试剂盒在 2-8℃ 此段时间内是稳定的。	2~8℃ 保存 不低于 12 个月	符合标准

[0139] 3、临床血清样本测试

[0140] 血清收集：于上海红房子妇产科医院及山西妇幼保健院收集临床血清 CA125 水平升高的妇科病例共 300 例，其中包括 130 例恶性妇科肿瘤患者，170 例妇科良性疾病患者。

[0141] 血清测试：以 104U/ml 为临界值，本实施例 1 试剂盒诊断 CA125 水平升高为恶性疾病的敏感度和特异度分别为 76.70%、88.33%，如图 1 所示：

[0142] 对于所有的血清 CA125 浓度升高的患者，计算取临界值为 104U/ml 时，其用于良、恶性疾病诊断的真阴性率为 78.7%，真阳性率为 81.3%，总准确率为 80%，如表 2 所示：

[0143] 表 2

[0144]

样品总数	M (%)	TnN	Neg (%)	TnP	Pos (%)	Accuracy
300	150 (50%)	155	122 (78.7%)	145	118 (81.3%)	80%

[0145] 实施例 2

[0146] 与实施例 1 不同的是，

[0147] 步骤I为准确量取50mg Fe_3O_4 纳米磁颗粒于10ml的聚苯乙烯塑料试管中,置于磁架,沉淀后去上清,使用10ml纯水洗涤两次,清洗完成后加入10ml 0.01M PBS缓冲液(0.14M NaCl、3mM KCl、10mM Na_2HPO_4 、2mM KH_2PO_4 , $\text{pH}=7.2\pm 0.05$),后加入0.05倍磁珠质量的木瓜蛋白酶,室温混匀1.5小时;

[0148] 步骤II为混匀结束后将磁珠置于磁架,沉淀后去上清,加入7.5ml 0.2mM盐酸缓冲液,室温混匀10分钟;

[0149] 步骤III为混匀结束后加入0.3mg 0.5M HEPES缓冲液($\text{pH}=7.4\pm 0.1$),调整 pH 至 7.3 ± 0.1 , 37°C 混匀2.5小时;

[0150] 步骤IV为混匀结束后加入225mg甘氨酸, 37°C 混匀1小时;

[0151] 步骤V为混匀结束后将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,使用7.5mg 3M NaHCO_3 缓冲液($\text{pH}=8.6\pm 0.1$)洗涤两次;

[0152] 步骤VI为洗涤完成后,将磁珠溶液置于磁架,沉淀后去上清,加入7.5mg磁珠保存液(0.05M Tris、0.01M NaN_3 、0.03M甲基纤维素, $\text{pH}=8.2\pm 0.05$),于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 进行保存;

[0153] 步骤2)为准确量取6mg 0v185单克隆抗体,使用GE PD-10脱盐柱和含0.02M EDTA及0.02M半胱氨酸的0.01M PBS缓冲液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将其稀释为5ml;

[0154] 步骤3)为将1)中固定化木瓜蛋白酶溶液置于磁架,留沉淀去除上清,将2)中0v185单克隆抗体溶液加入其中,于 37°C 条件下酶解3.5小时;

[0155] 步骤b为准确量取150mg硫化的氮羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),加入1ml 25mM $\text{pH}5.0$ 的MES缓冲溶液,使其浓度为45mg/ml;

[0156] 步骤c为准确量取300mg碳化二亚胺盐酸盐(EDC),加入1ml预冷的25mM $\text{pH}5.0$ 的MES缓冲溶液,使其浓度为85mg/ml;

[0157] 步骤d为将b中配制的Sulfo-NHS溶液及c中配制的EDC溶液加入至a中盛有羧基磁珠固体的试管中,将此羧基磁珠混悬液于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 条件下混匀1.5小时,完成对羧基磁珠的活化;

[0158] 步骤e为羧基磁珠活化完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用2ml预冷的25mM $\text{pH}5.0$ 的MES缓冲溶液进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留活化的羧基磁珠固体;

[0159] 步骤f为准确量取0.85ml步骤5)中制备的含0v185单克隆抗体Fab片段的抗体溶液,使用GE PD-10脱盐柱和25mM $\text{pH}5.0$ 的MES缓冲溶液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将抗体溶液浓缩为3ml;

[0160] 步骤g为将f中的抗体溶液加入至e中盛有经活化的羧基磁珠固体的容器中,室温混匀3.5h,完成羧基磁珠与0v185单克隆抗体Fab片段的偶联;

[0161] 步骤h为偶联完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,加入2ml 100mM $\text{pH}7.4$ 的Tris-HCl溶液,室温混匀0.8小时对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭;

[0162] 步骤A为准确量取0.5mg ALP试剂,使用GE PD-10柱及0.1M $\text{pH}=8.4\pm 0.05$ 的 NaHCO_3 缓冲液对其进行除盐,除盐结束后浓缩至3mg/ml;

[0163] 步骤B为准确量取生物素固体粉末0.08mg,溶解于二甲基亚砜(DMSO),终浓度为15mg/ml;

[0164] 步骤C为取B制备的生物素溶液加入至A中溶液,室温混匀5h进行偶联。

[0165] 其他同实施例1。

[0166] 实施例3

[0167] 与实施例1不同的是，

[0168] 步骤I为准确量取50mg Fe_3O_4 纳米磁颗粒于10ml的聚苯乙烯塑料试管中，置于磁架，沉淀后去上清，使用25ml纯水洗涤两次，清洗完成后加入25ml 0.01M PBS缓冲液(0.14M NaCl、3mM KCl、10mM Na_2HPO_4 、2mM KH_2PO_4 , pH=7.2±0.05)，后加入0.04倍磁珠质量的木瓜蛋白酶，室温混匀1小时；

[0169] 步骤II为混匀结束后将磁珠置于磁架，沉淀后去上清，加入15ml 0.2mM盐酸缓冲液，室温混匀10分钟；

[0170] 步骤III为混匀结束后加入0.125mg 0.5M HEPES缓冲液(PH=7.4±0.1)，调整pH至7.3±0.1, 37℃混匀2.5小时；

[0171] 步骤IV为混匀结束后加入75mg甘氨酸, 37℃混匀1小时；

[0172] 步骤V为混匀结束后将磁珠溶液置于磁架，沉淀后去上清，使用15mg 3M NaHCO_3 缓冲液(pH=8.6±0.1)洗涤两次；

[0173] 步骤VI为洗涤完成后，将磁珠溶液置于磁架，沉淀后去上清，加入15mg磁珠保存液(0.05M Tris、0.01M NaN_3 、0.03M甲基纤维素, pH=8.2±0.05)，于2~8℃进行保存；

[0174] 步骤2)为准确量取10mg 0v185单克隆抗体，使用GE PD-10脱盐柱和含0.02M EDTA及0.02M半胱氨酸的0.01M PBS缓冲液对其进行脱盐处理，脱盐完成后将其稀释为10ml；

[0175] 步骤3)为将1)中固定化木瓜蛋白酶溶液置于磁架，留沉淀去除上清，将2)中0v185单克隆抗体溶液加入其中，于37℃条件下酶解3小时；

[0176] 步骤b为准确量取50mg硫化的氮羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)，加入1ml 25mM pH5.0的MES缓冲溶液，使其浓度为45mg/ml；

[0177] 步骤c为准确量取125mg碳化二亚胺盐酸盐(EDC)，加入1ml预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液，使其浓度为85mg/ml；

[0178] 步骤d为将b中配制的Sulfo-NHS溶液及c中配制的EDC溶液加入至a中盛有羧基磁珠固体的试管中，将此羧基磁珠混悬液于2~8℃条件下混匀1小时，完成对羧基磁珠的活化；

[0179] 步骤e为羧基磁珠活化完成后置于磁架，羧基磁珠沉淀后去上清，使用2ml预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液进行洗涤，清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清，仅留活化的羧基磁珠固体；

[0180] 步骤f为准确量取0.70ml骤5)中制备的含0v185单克隆抗体Fab片段的抗体溶液，使用GE PD-10脱盐柱和25mM pH5.0的MES缓冲溶液对其进行脱盐处理，脱盐完成后将抗体溶液浓缩为2.5ml；

[0181] 步骤g为将f中的抗体溶液加入至e中盛有经活化的羧基磁珠固体的容器中，室温混匀3h，完成羧基磁珠与0v185单克隆抗体Fab片段的偶联；

[0182] 步骤h为偶联完成后置于磁架，羧基磁珠沉淀后去上清，加入2ml 100mM pH7.4的Tris-HCl溶液，室温混匀0.5小时对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭；

[0183] 步骤A为准确量取0.5mg ALP试剂，使用GE PD-10柱及0.1M pH=8.4±0.05的 NaHCO_3 缓冲液对其进行除盐，除盐结束后浓缩至3.5mg/ml；

[0184] 步骤B为准确量取生物素固体粉末0.04mg,溶解于二甲基亚砷(DMSO),终浓度为12mg/ml;

[0185] 步骤C为取B制备的生物素溶液加入至A中溶液,室温混匀4.5h进行偶联。

[0186] 其他同实施例1。

[0187] 经验证,实施例2和实施例3制备的试剂盒的临床应用效果与实施例1制备的试剂盒处于同一水平。

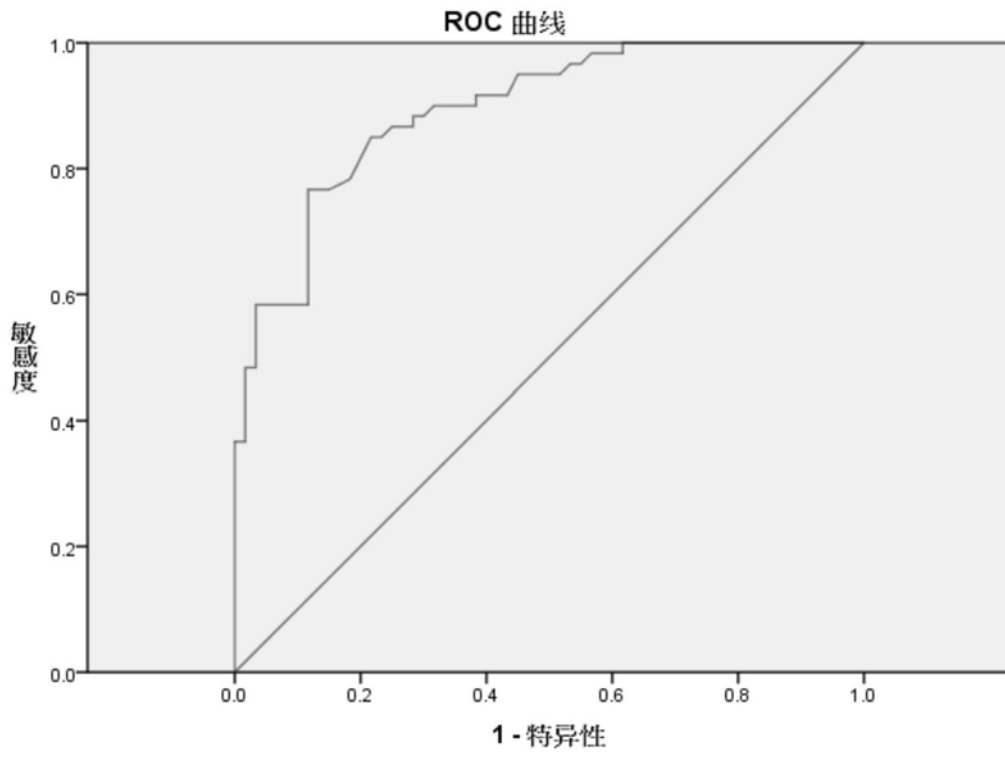


图1

专利名称(译)	一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109781986A	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201910180925.1	申请日	2019-03-11
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属妇产科医院 北京润诺思医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属妇产科医院 北京润诺思医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属妇产科医院 北京润诺思医疗科技有限公司		
[标]发明人	徐丛剑 王宜生 路晟 霍萌萌 胡春颖 张晓燕 顾建新 任士芳		
发明人	徐丛剑 王宜生 路晟 霍萌萌 胡春颖 张晓燕 顾建新 任士芳		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76 C12P21/06 C12N11/14		
代理人(译)	张淑贤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测技术领域，具体涉及一种磁微粒化学发光免疫检测CA125表面Tn抗原的试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括偶联有CA125抗体Fab片段的磁分离试剂，含有唾液酸酶的能够识别Tn抗原的生物素-凝集素试剂，链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂；磁分离试剂特异性结合CA125抗原，生物素-凝集素可特异性识别CA125抗原表面的Tn抗原，链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶偶联试剂可特异性结合生物素-凝集素试剂实现对检测信号的放大，唾液酸酶水解Tn抗原表面与唾液酸相连的糖苷键，释放唾液酸使Tn抗原暴露，提高检测的准确率、灵敏度和线性范围。本发明试剂盒特异性高、灵敏度好，可实现全自动化测试。

