



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103389381 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201310307333. 4

(22) 申请日 2013. 07. 19

(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 华权高 来祥兵 许可 沈鹤霄  
舒芹

(74) 专利代理机构 北京华沛德权律师事务所  
11302

代理人 刘丽君

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102890083 A, 2013. 01. 23,

CN 102890083 A, 2013. 01. 23,

CN 102735846 A, 2012. 10. 17,

CN 101949935 A, 2011. 01. 19,

CN 101949937 A, 2011. 01. 19,

CN 101949942 A, 2011. 01. 19,

CN 101949943 A, 2011. 01. 19,

CN 101949944 A, 2011. 01. 19,

CN 102103144 A, 2011. 06. 22,

CN 102914650 A, 2013. 02. 06,

唐秋艳等主编. 化学发光免疫诊断技术.《免  
疫诊断试剂实用技术》. 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

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

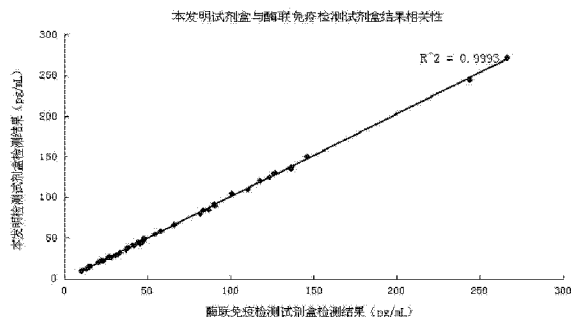
(54) 发明名称

附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括：附睾蛋白 4 系列校准品、附睾蛋白 4 抗体包被的磁珠、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液。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，能满足卵巢癌临床诊断或检测的需要。

CN 103389381 B



1. 一种附睾蛋白 4 磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在於,包括:附睾蛋白 4 校准品、附睾蛋白 4 抗体包被的磁珠、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体、辣根过氧化物酶所作用的化学发光底物和浓缩洗涤液;

所述附睾蛋白 4 校准品的制备方法包括以下步骤:

(1) 制备去激素人血清;

(2) 将附睾蛋白 4 用去激素人血清配制成浓度为 320pg/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 160pg/mL、80pg/mL、40pg/mL、20pg/mL 的校准品,等量分装成浓度分别为 0pg/mL、20pg/mL、40pg/mL、80pg/mL、160pg/mL 和 320pg/mL 的附睾蛋白 4 校准品;

所述附睾蛋白 4 抗体包被磁珠通过以下方法制备得到:

(1) 磁珠的分散:将粒径为 0.9-1.8um 的磁珠用 MES 缓冲液分散,使磁珠的终浓度为 50-100mg/mL;所述磁珠为以氧化铁为内核、聚苯乙烯表面包裹带羧基活性基团的聚合物,粒径为 0.9-1.8um;

(2) 磁珠的清洗: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 10-30mg/mL;

(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附睾蛋白 4 抗体溶液,搅拌混匀,室温下搅拌过夜;

(4) 磁珠的清洗及封闭:步骤 (4) 中将磁珠与反应体系分离后用 MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次,再用 MES 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,即得;

所述辣根过氧化物酶标记附睾蛋白 4 单克隆抗体通过以下方法制备得到:

(1) 将辣根过氧化物酶溶解于蒸馏水中;

(2) 向 (1) 步所得溶液中加入 0.1M  $\text{NaIO}_4$  溶液,室温下避光搅拌,得到混合溶液;

(3) 将步骤 (2) 所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) 向步骤 (3) 的透析液中加入碳酸盐缓冲液至 pH 值为 9.0-9.5,加入附睾蛋白 4 单克隆抗体,混匀,室温下避光搅拌反应;

(5) 向步骤 (4) 的反应产物汇总加入  $\text{NaBH}_4$  溶液,混匀,静置反应;

(6) 将步骤 (5) 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) 将步骤 (7) 所得溶液离心,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) 将步骤 (8) 所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 A 液和 B 液两种彼此独立分装的两种组分组成,使用时将两种组分按等体积比例混合,其中:A 液为 10mM pH7.0 磷酸盐缓冲溶液,含有 2mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、1g/L 脱脂奶粉、0.5g/L 卵白蛋白和 0.1% 吐温 20;B 液为 100mM pH10.0 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,所述浓缩洗涤液中氯化钠的含量为 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. 按照权利要求 1 所述的附睾蛋白 4 磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述附睾蛋白 4 是重组的附睾蛋白 4 或天然的附睾蛋白 4。

## 附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤标志物的检测试剂盒,尤其涉及一种附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒及其制备方法,属于卵巢癌的诊断或检测领域。

### 背景技术

[0002] 卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,其发病率在女性生殖系统肿瘤中占第 3 位,死亡率居妇科恶性肿瘤之首。2008 年美国女性生殖系统恶性肿瘤死亡 28490 例,其中 15520 例(54.5%)死于卵巢癌。全世界范围内每年约有 190000 例新增卵巢癌病例,并且每年约有 114000 例死亡。卵巢癌发病隐匿,70% 的卵巢癌患者在确诊时已属于晚期,随着肿瘤细胞减灭术及有效化疗方案的进展,其 5 年生存率约 30%,而早期卵巢癌患者 5 年生存率可达 90%。因此,早期诊断是改善卵巢癌患者预后的关键。

[0003] 肿瘤标志物的检测简便无创,在肿瘤的筛查、诊断、指导治疗和评估预后等方面有着非常广泛的应用前景。在卵巢癌的临床诊断方面,目前只有糖类抗原 125 (CA125) 的检测被广泛应用,由于 CA125 在正常卵巢表面上皮、卵巢良性肿瘤和上皮性癌组织中具有不同程度的表达,所以用 CA125 诊断卵巢癌的假阳性率较高。因此,需要一种敏感性好、特异性强的新标志物。附睾蛋白 4 (human epididymal secretory protein E4, HE4) 是一种新的肿瘤标志物,HE4 诊断卵巢癌的敏感性高达 72.9%、特异性达 95%,其在良性肿瘤及正常组织中含量极低,但在卵巢癌中含量较高。血清 HE4 的检测将有助于卵巢癌的诊断及治疗效果的监测。

[0004] 化学发光检测技术是上世纪 70 年代中期发展起来的新型分析技术。目前,这一技术已经成为临床检验医学的常规检测手段。它与酶免法不同之处就在于以发光物质作为底物,并借助其自身的发光强度直接进行测定。检测过程中发光底物在酶的作用下,底物发生化学反应并释放出大量的能量,产生激发态的中间体。这种激发态的中间体,当其回归到稳定的基态时,可同时发射出光子。利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额,该光量子产额与样本中待检测物质的含量成正比,由此可以建立标准曲线并计算样品中待检测物质的含量。

[0005] 迄今为止,卵巢癌的临床检测中缺乏一种检测过程简单、检测灵敏度高、特异性好、检测限低以及稳定性好的附睾蛋白 4 检测试剂盒。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的之一是提供一种检测过程简单、易于操作、自动化程度高、检测灵敏度高、特异性好、检测限低以及稳定性好的附睾蛋白 4 磁微粒化学发光检测试剂盒。

[0007] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0008] 一种附睾蛋白 4 磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,该检测试剂盒的成分包括:附睾蛋白 4 校准品、附睾蛋白 4 抗体包被的磁珠、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体、辣根过氧化物酶所作用的化学发光底物和浓缩洗涤液。

[0009] 本发明中所用的附睾蛋白 4 可以为样本中分离的天然蛋白,也可以为通过基因工程手段重组获得的重组蛋白,本发明通过研究发现,采用这两种蛋白作为校准品所得的检测结果基本一致。

[0010] 所述附睾蛋白 4 校准品可通过以下方法制备得到:

[0011] (1) 制备去激素人血清;

[0012] (2) 将重组或天然附睾蛋白 4 用去激素人血清配制成浓度为 320pg/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 160pg/mL、80pg/mL、40pg/mL、20pg/mL 的校准品,等量分装成浓度分别为 0pg/mL、20pg/mL、40pg/mL、80pg/mL、160pg/mL 和 320pg/mL 的附睾蛋白 4 校准品。

[0013] 本发明所制备的检测试剂盒,其所采用的磁珠粒径优选为 0.9-1.8um;所述磁珠以氧化铁为内核、聚苯乙烯表面包裹带羧基活性基团的聚合物。

[0014] 其中,所述附睾蛋白 4 抗体包被磁珠可通过以下方法制备得到:

[0015] (1) 磁珠的分散:将磁珠用 MES 缓冲液分散;

[0016] (2) 磁珠的清洗:用 MES 缓冲液清洗磁珠后再用 MES 缓冲液重新分散磁珠;

[0017] (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附睾蛋白 4 抗体溶液,搅拌混匀,室温下搅拌过夜;

[0018] (4) 磁珠的清洗及封闭:将磁珠与反应体系分离后,用 MES 缓冲液洗涤磁珠再用 MES 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,即得。

[0019] 步骤(1)中所述的磁珠的分散优选为将粒径为 0.9-1.8um 的磁珠用 MES 缓冲液分散,使磁珠的终浓度为 50-100mg/mL;

[0020] 步骤(2)中所述磁珠的清洗优选为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 10-30mg/mL;

[0021] 步骤(4)中所述的磁珠的清洗及封闭优选为:将磁珠与反应体系分离后用 MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次,再用 MES 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,即得。

[0022] 所述辣根过氧化物酶标记附睾蛋白 4 单克隆抗体可通过以下方法制备得到:

[0023] (1) 将辣根过氧化物酶溶解于蒸馏水中;

[0024] (2) 向步骤(1)所得溶液中加入 0.1M  $\text{NaIO}_4$  溶液,室温下避光搅拌,得到混合溶液;

[0025] (3) 将步骤(2)所得到的混合溶液装入透析袋中用醋酸钠缓冲液透析过夜;

[0026] (4) 向步骤(3)的透析液中加入碳酸盐缓冲液至 pH 值为 9.0-9.5,加入附睾蛋白 4 单克隆抗体,混匀,室温下避光搅拌反应;

[0027] (5) 向步骤(4)的反应产物汇总加入  $\text{NaBH}_4$  溶液,混匀,静置反应;

[0028] (6) 将步骤(5)的反应产物装入透析袋中于 PBS 缓冲液中搅拌过夜;

[0029] (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;

[0030] (8) 将步骤(7)所得溶液离心,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；

[0031] (9) 将步骤(8)所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。

[0032] 本发明通过研究发现,检测用的化学发光底物溶液将其中所需要的组分配制成 A 液和 B 液两种组分,使用时将两种组分按等体积比例混合,制备出来的试剂盒的稳定性更好。其中, A 液为 10mM pH7.0 磷酸盐缓冲溶液,还包括 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、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,还包括 10mM 鲁米诺、0.3mM 4- 羟基联苯。

[0033] 本发明检测试剂盒中提供的洗涤液为浓缩洗涤液,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,所述的浓缩洗涤液为含有吐温 20 和氯化钠的磷酸盐缓冲溶液,浓缩洗涤液的 pH 值为 7.0-8.0,其中氯化钠的含量为 1-5g/L、吐温 20 的含量为 0.5%-3%。

[0034] 本发明检测试剂盒中的所有组分均能通过商业途径从生物试剂或化学试剂公司购买得到。

[0035] 本发明的又一目的是提供所述附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒检测样本中附睾蛋白 4 含量的检测方法,包括以下步骤:取 20 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,校准品购自美国 novoprotein 公司)于反应杯中,后加入 140 μL 辣根过氧化物酶标记附睾蛋白 4 单克隆抗体,充分混匀,并与 37°C 温育 10min ;向反应体系中加入 40 μL 磁微粒试剂,充分混匀,并与 37°C 温育 10min,后清洗分离磁珠 ;向磁珠中加入 100 μL 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。

[0036] 采用本发明制备的附睾蛋白 4 磁微粒化学发光免疫分析检测试剂盒,可以非常有效的检测出人体中的附睾蛋白 4 含量,有利于医生根据附睾蛋白 4 的含量对是否为卵巢癌进行辅助判断。本发明所制备的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,同时该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诸多优良特性,为临床诊断和科研工作提供一种非常有效的检测手段。

## 附图说明

[0037] 图 1 为本发明检测试剂盒与市售酶联免疫检测试剂盒测定人血清中附睾蛋白 4 含量结果的相关性。

[0038] 图 2 为各附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒标准工作曲线。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0040] 实施例 1 本发明检测试剂盒的制备

[0041] 1、附睾蛋白 4 校准品的配制

[0042] ①去激素人血清的制备:取 15mL 的正常人血清与离心管中,再向血清中加入 6.0g 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 Proclin-300,混匀之后冷冻保存。

[0043] ②取一定量的重组附睾蛋白 4 蛋白(购自美国 novoprotein 公司)用①步所得去激素人血清配制成浓度为 320pg/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 160pg/mL、80pg/mL、40pg/mL、20pg/mL 的校准品,等量分装成浓度分别为 0pg/mL、20pg/mL、40pg/mL、80pg/mL、160pg/mL 和 320pg/mL 的 6 瓶附睾蛋白 4 校准品。

[0044] 2、附睾蛋白 4 抗体包被磁珠的制备

[0045] ①磁珠的分散:取 100mg 粒径为 0.9  $\mu\text{m}$  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 100mg/mL;

[0046] ②磁珠的清洗:用 3mL 的 MES 缓冲液清洗磁珠两次,后用 10mL 的 MES 缓冲液重新分散磁珠,使磁珠的终浓度为 10mg/mL;

[0047] ③磁珠的活化与连接:取 0.1mg 的 EDC 和 0.3mg 的 NHS 溶解于②步所得的磁珠溶液中,搅拌充分溶解,室温下搅拌反应 30 分钟,向反应体系中加入 400  $\mu\text{L}$  1mg/mL 附睾蛋白 4 抗体溶液,搅拌混匀,室温下搅拌过夜;

[0048] ④磁珠的清洗及封闭:将磁珠与反应体系分离后,用 10mL MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次,后用 1mL MES 缓冲液重新分散磁珠,磁珠的终浓度为 100mg/mL,向磁珠溶液中加入 1mL 1% 的 BSA 封闭液,室温封闭 4 小时,将磁珠与反应体系分离,并用 10mL pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液清洗磁珠两次,并用 10mL pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液分散磁珠,磁珠的终浓度为 10mg/mL。

[0049] 3、辣根过氧化物酶标记附睾蛋白 4 单克隆抗体

[0050] ①称取 5mg 的辣根过氧化物酶溶解于 1mL 蒸馏水中,其终浓度为 5mg/mL;

[0051] ②向①步所得溶液中加入 0.2mL 新配置的 0.1M  $\text{NaIO}_4$  溶液,搅拌混匀,于室温下避光搅拌 20 分钟;

[0052] ③将上述溶液装入透析袋中,并用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液于 4 $^{\circ}\text{C}$  透析过夜;

[0053] ④向③步的溶液中加入 20  $\mu\text{L}$  pH9.5 的碳酸盐缓冲液,使以上溶液的 pH 升高至 9.0-9.5,然后立即向反应体系中加入 10mg 附睾蛋白 4 单克隆抗体,混匀,并于室温下避光轻轻搅拌反应 2 小时;

[0054] ⑤加入 0.1mL 新配的 4mg/mL  $\text{NaBH}_4$  液,混匀,置于 4 $^{\circ}\text{C}$  静置反应 2 小时;

[0055] ⑥将上述反应液装入透析袋中,于 0.15M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$  条件下搅拌过夜;

[0056] 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,后置于 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 1 小时;

[0057] ⑧将⑦步所得溶液于 3000 离心 30min,弃上清。将沉淀物用半饱和硫酸铵洗两次,后将沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 中。

[0058] ⑨将上述溶液装入透析袋中,对 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。

[0059] 4、配制化学发光底物 A 液和 B 液

[0060] A 液为 10mM pH7.0 磷酸盐缓冲溶液,其中包括 2mM  $H_2O_2$ 、1g/L 脱脂奶粉、0.5g/L 卵白蛋白和 0.1% 吐温 20 ;

[0061] 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。

[0062] 5、配制浓缩洗涤液

[0063] 准确称取 232g 十二水和磷酸氢二钠、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。

[0064] 6、将上述校准品、附睾蛋白 4 抗体包被的磁珠、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液分装并密封保存,即得本发明检测试剂盒。

[0065] 实施例 2

[0066] 除“附睾蛋白 4 抗体包被磁珠的制备”过程中采用的磁珠粒径为 1.8  $\mu m$  外(购自德国 merck 公司),其余均与实施例 1 相同。

[0067] 实施例 3

[0068] 除“附睾蛋白 4 抗体包被磁珠的制备”过程中采用的磁珠粒径为 1.5  $\mu m$  外(购自德国 merck 公司),其余均与实施例 1 相同。

[0069] 实施例 4

[0070] 1、附睾蛋白 4 校准品的配制

[0071] 同实施例 1

[0072] 2、附睾蛋白 4 抗体包被磁珠的制备

[0073] ①磁珠的分散:取 80mg 粒径为 1.2  $\mu m$  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 80mg/mL ;

[0074] ②磁珠的清洗:用 4mL 的 MES 缓冲液清洗磁珠两次,后用 10mL 的 MES 缓冲液重新分散磁珠,使磁珠的终浓度为 8mg/mL ;

[0075] ③磁珠的活化与连接:取 0.2mg 的 EDC 和 0.2mg 的 NHS 溶解于②步所得的磁珠溶液中,搅拌充分溶解,室温下搅拌反应 30 分钟,向反应体系中加入 300  $\mu L$  1mg/mL 附睾蛋白 4 抗体溶液,搅拌混匀,室温下搅拌过夜 ;

[0076] ④磁珠的清洗及封闭:将磁珠与反应体系分离后,用 8mL MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次,后用 1mL MES 缓冲液重新分散磁珠,磁珠的终浓度为 80mg/mL,向磁珠溶液中加入 1mL 1% 的 BSA 封闭液,室温封闭 4 小时,将磁珠与反应体系分离,并用 10mL pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液清洗磁珠两次,并用 10mL pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液分散磁珠,磁珠的终浓度为 8mg/mL。

[0077] 3、辣根过氧化物酶标记附睾蛋白 4 单克隆抗体

[0078] ①称取 6mg 的辣根过氧化物酶溶解于 1mL 蒸馏水中,其终浓度为 6mg/mL ;

[0079] ②向①步所得溶液中加入 0.3mL 新配置的 0.1M  $NaIO_4$  溶液,搅拌混匀,于室温下避光搅拌 20 分钟 ;

[0080] ③将上述溶液装入透析袋中,并用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液于 4 $^{\circ}C$  透析过夜 ;

[0081] ④向③步的溶液中加入 30  $\mu L$  pH9.5 的碳酸盐缓冲液,使以上溶液的 pH 升高至

9.0-9.5, 然后立即向反应体系中加入 12mg 附睾蛋白 4 单克隆抗体, 混匀, 并于室温下避光轻轻搅拌反应 2 小时;

[0082] ⑤加入 0.2mL 新配的 4mg/mL  $\text{NaBH}_4$  液, 混匀, 置于 4℃ 静置反应 2 小时;

[0083] ⑥将上述反应液装入透析袋中, 于 0.15M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液中, 4℃ 条件下搅拌过夜;

[0084] 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, 后置于 4℃ 静置 1 小时;

[0085] ⑧将⑦步所得溶液于 5000 离心 30min, 弃上清。将沉淀物用半饱和硫酸铵洗两次, 后将沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 缓冲液中。

[0086] ⑨将上述溶液装入透析袋中, 对 0.15M pH7.4 的 PBS 缓冲液中透析, 以去除铵离子, 后将溶液置于 8000rpm 离心 30min, 去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 加入等体积的甘油混匀后分装, 冰冻保存。

[0087] 4、配制化学发光底物 A 液和 B 液

[0088] 同实施例 1。

[0089] 5、配制浓缩洗涤液

[0090] 同实施例 1。

[0091] 6、将上述校准品、附睾蛋白 4 抗体包被的磁珠、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液分装并密封保存, 既得本发明检测试剂盒的各种组分。

[0092] 对比实施例 1

[0093] 除“附睾蛋白 4 抗体包被磁珠的制备”过程中采用的磁珠粒径为 0.7  $\mu\text{m}$  外(购自德国 merck 公司), 其余均与实施例 1 相同。

[0094] 对比实施例 2

[0095] 除“附睾蛋白 4 抗体包被磁珠的制备”过程中采用的磁珠粒径为 0.7  $\mu\text{m}$  外(购自德国 merck 公司), 其余均与实施例 4 相同。

[0096] 试验例 1 本发明所制备的检测试剂盒方法学鉴定

[0097] 按照本领域中常规的检定规程对实施例 1-4 所制备的附睾蛋白 4 磁珠化学发光检测试剂盒进行检定, 检定结果见表 1。

[0098] 表 1

[0099]

| 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 (%) | $\leq 15\%$ (n=10)        | 符合标准 |
| 灵敏度        | $\leq 1.00\text{pg/mL}$   | 符合标准 |
| 稳定性        | 各试剂组分置 37℃ 至少 3 天         | 符合标准 |

[0100] 由表 1 的检测结果显示可知,本发明所制备的附睾蛋白 4 磁珠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。

[0101] 试验例 2 本发明试剂盒与酶联免疫分析检测试剂盒测值相关性试验

[0102] 1、供试试剂盒

[0103] 实施例 2 所制备的试剂盒和酶联免疫检测试剂盒(购自北京热景生物技术有限公司)

[0104] 2、试验方法及结果

[0105] 通过用本发明实施例 2 所制备的试剂盒与购自北京热景生物技术有限公司的酶联免疫检测试剂盒测定血清样本中附睾蛋白 4 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 中可以看出本发明试剂盒与酶联试剂盒在血清中附睾蛋白 4 测值上具有良好的相关性。

[0106] 试验例 3 附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒的线性范围比较试验

[0107] 取 20  $\mu\text{L}$  附睾蛋白 4 系列浓度的校准品溶液于反应杯中(每个浓度三次重复),后加入 140  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记附睾蛋白 4 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 40  $\mu\text{L}$  磁微粒试剂,充分混匀,并于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 10min,后清洗分离磁珠;向磁珠中加入 100  $\mu\text{L}$  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。

[0108] 本发明实施例 1 与对比实施例 1 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 10-320pg/mL 内具有良好的线性关系,如果被检测样本中 HE4 的含量低于 10pg/mL 则认为是正常样本,如果样本中 HE4 含量高于 320pg/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 制备的检测试剂盒在 10-320pg/mL 检测区间其标准曲线线性关系明显较实施例 1 差。

[0109] 试验例 4 本发明检测试剂盒的稳定性试验

[0110] 将实施例 1 制备的检测试剂盒于 37 $^{\circ}\text{C}$  放置 3 天、6 天和 10 天后,检测样本中附睾蛋白 4 的含量,结果表明本发明实施例 1 制备的检测试剂盒其各项指标均可以达到国家标准。据此可以说明本发明制备的“附睾蛋白 4 磁微粒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。

[0111] 试验例 5 附睾蛋白 4 化学发光检测试剂盒的重复性和准确度试验

[0112] 用购自美国 novoprotein 公司的重组附睾蛋白 4 蛋白粉末配制 50pg/mL 的校准品作为样本,用本发明实施例 2 与对比实施例 2 制备的检测试剂盒测定校准品溶液,每个试剂盒重复测定 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 2 所制备的检测试剂盒其准确度及精密度均优于对比实施例 2 制备的检测试剂盒。

[0113] 表 2 各检测试剂盒的重复性及准确度结果

[0114]

| 测试序号         | 实施例 2 | 对比实施例 2 |
|--------------|-------|---------|
| 1            | 51.35 | 50.25   |
| 2            | 49.78 | 48.23   |
| 3            | 52.03 | 47.63   |
| 4            | 53.21 | 49.85   |
| 5            | 48.72 | 50.23   |
| 6            | 50.65 | 54.32   |
| 7            | 49.88 | 46.78   |
| 8            | 50.23 | 52.31   |
| 9            | 49.78 | 46.32   |
| 10           | 49.48 | 51.78   |
| 平均值 (M)      | 50.51 | 49.37   |
| 标准差 (S)      | 1.34  | 2.85    |
| 变异系数 (CV%)   | 2.65% | 5.77%   |
| 相对偏差 (Bias%) | 1.02% | 2.50%   |

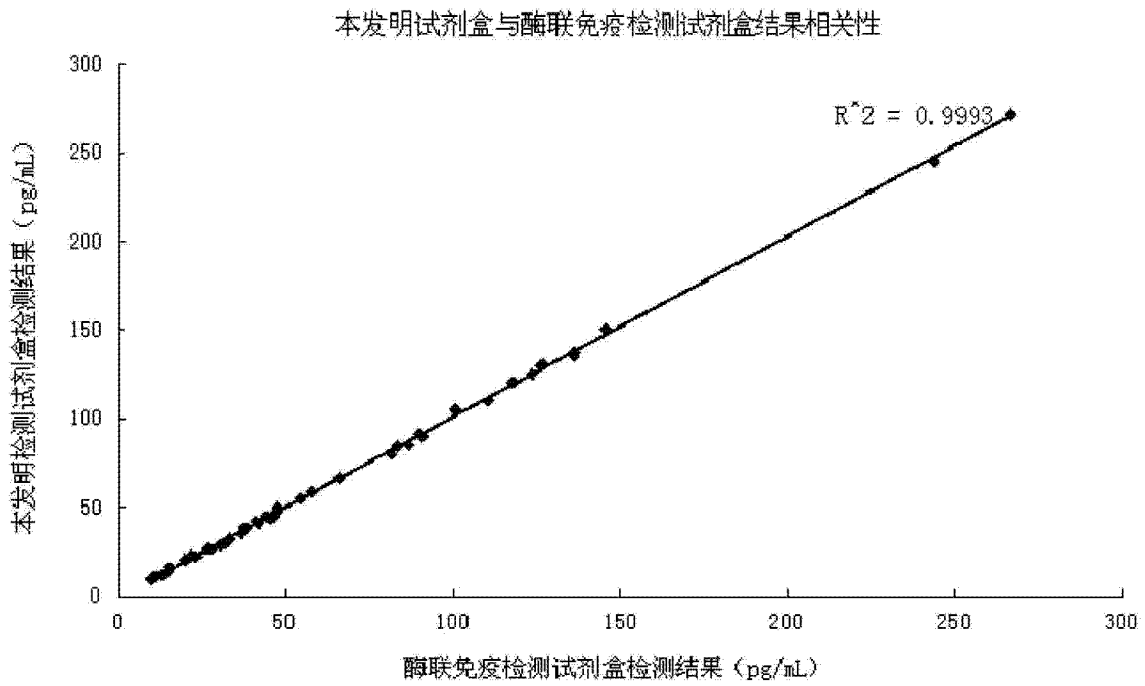


图 1

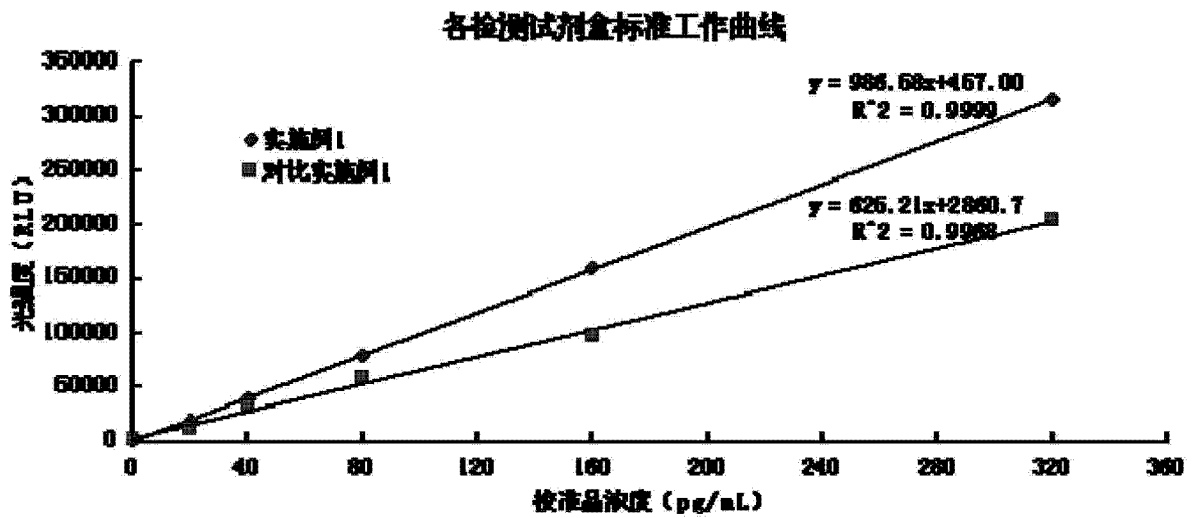


图 2

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 附睾蛋白4化学发光检测试剂盒及其制备方法                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN103389381B</a>                   | 公开(公告)日 | 2015-07-15 |
| 申请号            | CN201310307333.4                               | 申请日     | 2013-07-19 |
| [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         | 华权高<br>来祥兵<br>许可<br>沈鹤霄<br>舒芹                  |         |            |
| 发明人            | 华权高<br>来祥兵<br>许可<br>沈鹤霄<br>舒芹                  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/531 G01N21/76                 |         |            |
| 代理人(译)         | 刘丽君  |         |            |
| 其他公开文献         | CN103389381A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了附睾蛋白4化学发光检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括：附睾蛋白4系列校准品、附睾蛋白4抗体包被的磁珠、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液。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，能满足卵巢癌临床诊断或检测的需要。

