



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107918013 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201710876326.4

(22)申请日 2017.09.25

(71)申请人 浙江天科高新技术发展有限公司

地址 310012 浙江省杭州市黄姑山路9号

(72)发明人 沈晓亮 赵甜甜

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公

司 33200

代理人 林松海

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

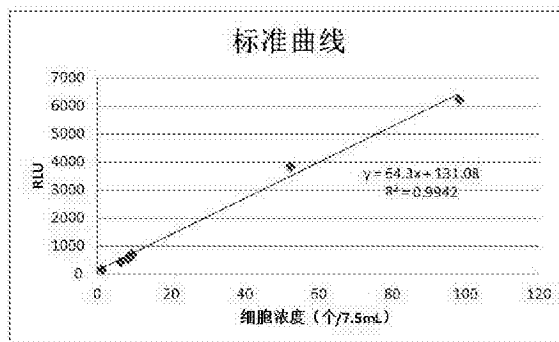
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒。将EpCAM抗体、生物素标记二抗和碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应;加入链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应;磁分离,洗涤并且去除上清;加入化学发光底物,检测读值;或者将生物素标记EpCAM抗体和碱性磷酸酶标记K-Ras抗体与待测标本,同时加入反应杯中孵育反应。本发明采用化学发光酶免疫分析技术测定结直肠癌循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的表达量,可较大提高检测的范围和灵敏度,具有良好的市场前景。



1. 一种化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法,其特征在于,

将1uL 0.04mg/mL的EpCAM抗体、1uL 0.2mg/mL的生物素标记二抗和1uL碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存在pH为7.5的PBS中的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应60min;加入2 uL 1%(w/v 固含量)链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应60min;磁分离,pH为7.5的PBS洗涤3次并且去除上清;加入100uL化学发光底物,检测读值;或者

将1uL 0.04mg/mL的生物素标记EpCAM抗体和1uL碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存在pH为7.5的PBS中的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应60min;加入2 uL 1%(w/v 固含量)链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应60min;磁分离,洗涤3次并且去除上清;加入100uL化学发光底物,检测读值。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述碱性磷酸酶标记K-Ras抗体的标记步骤如下:

将碱性磷酸酶平衡到室温,摇晃混匀,然后用100mMPBS (pH6.8)洗涤3遍;取出100ug碱性磷酸酶加入到200uL 2%的戊二醛溶液中,混匀后室温静置过夜,得到醛化碱性磷酸酶;用50mM的CB (pH9.6)洗涤3次,最后用CB定容至200uL,得到纯化的醛化AP;向醛化AP中加入27.28ugK-Ras抗体,混匀后置于4℃静置24小时,得到AP标记的K-Ras抗体;向AP标记的K-Ras抗体溶液中加入0.4uL15mg/mL的甘氨酸溶液,室温反应2小时,然后用稀释缓冲液洗涤3次,最后定容至200uL,4℃储存备用。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测标本的预处理如下:

取新鲜抗凝血7.5mL转移至50mL离心管中,4℃ 460g离心7min,去上清;加入8倍体积的红细胞裂解液,冰上裂解5min,裂解过程中摇动以促进裂解;4℃ 460g离心7min弃去红色上清;若裂解不完全则重复裂解一次;加入5mL 细胞洗涤液,重悬,4℃,460g离心7min去上清;加入5mL 4%多聚甲醛溶液,固定30min;4℃,460g离心7min去上清并用5mL 细胞洗涤液洗涤1次;再加入5mL 0.5%的TritonX-100,通透30min,460g离心7min去上清并用5mL 细胞洗涤液洗涤1次;再用反应液洗涤1次,用反应液定容至200uL;待用。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述化学发光底物采用AMPPD。

5. 一种根据权利要求1所述的方法的试剂盒,其特征在于,主要包括

- 1) 生物素标记二抗,EpCAM抗体;和/或者生物素标记EpCAM抗体;
- 2) 碱性磷酸酶标记K-Ras抗体、链霉亲和素磁珠、化学发光底物。

化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 结直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一。2008年全球新增结直肠癌病例123.3万，死亡60.87万，居男性恶性肿瘤发病率第3位，女性恶性肿瘤发病率第2位，死亡率居恶性肿瘤第4位。2011年美国新增结直肠癌病例14.12万，死亡4.94万，均居恶性肿瘤发病率和死亡率第3位，且呈逐年上升趋势，严重危害人民健康。

[0003] 结直肠癌是一种全身性疾病，不同的患者生物学特性的不同，也导致预后和治疗方案的个体化差异。临床上K-Ras、BRAF等分子生物学标记的检测和分型是结直肠癌个体化治疗的重要依据。K-Ras是一种原癌基因，长约35kb，位于12号染色体，是Ras基因家族成员之一，编码K-Ras蛋白。K-Ras蛋白具有GTPase活性，结合GTP时为活化态，结合GDP时为失活态。K-Ras蛋白定位于细胞膜上，参与多种信号通路，促进结直肠癌的发生、发展和转移。K-Ras基因分为突变型和野生型，常见突变位点为K-Ras基因2号外显子的12和13号密码子，3号外显子的61号密码子。在所有结直肠癌患者中，属于K-Ras基因野生型者占50%-60%。NCCN指南推荐晚期和转移性结直肠癌患者，常规进行K-Ras基因检测。若K-Ras基因为野生型，在一线和二线化疗中均推荐联合西妥昔单抗(Cetuximab，商品名：爱必妥Erbix)分子靶向治疗，可进一步临床生存获益。但目前临床上检测K-Ras基因状态都是基于患者原发灶或者转移灶组织的检测，这些检测不仅会受到肿瘤组织(取材、固定和保存等操作不当)、检测方法、肿瘤异质性或变异等影响，造成患者的K-Ras状态无法确定，术后更无法在辅助治疗过程中对患者进行动态的观察和疗效监测。NCCN指南推荐对于K-Ras基因野生型晚期或转移性结直肠癌患者，西妥昔单抗(爱必妥)辅助靶向治疗半年为标准治疗，并推荐直至进展，甚至进展后仍可继续爱必妥靶向治疗，目前对于K-Ras基因野生型结直肠癌疗效和复发的评估往往局限于血清肿瘤标记物和CT、MRI等影像学评估，相对滞后，缺乏更好的监测手段。

[0004] 1896年，澳大利亚学者Ashworth在一例转移性肿瘤患者血液中首次观察到从实体肿瘤中脱离并进入血液循环的肿瘤细胞，并率先提出了循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell, CTC)的概念。进入外周血循环是肿瘤发生远处转移的先决条件，外周血CTC检测作为一种具有高度可行性和可重复性的非侵入性新型诊断工具，在对实体肿瘤转移治疗疗效及预后评估中的作用已得到公认。CTC检测比传统的影像学手段(如CT、MRI)能更早发现问题，而且比其他的血液检测(如血清肿瘤标记物)有更好的一致性和特异性。

[0005] 免疫学检测主要是利用抗原和抗体的特异性反应进行检测的一种手段，由于其可以利用同位素、酶、化学发光物质等对检测信号进行放大和显示，因此常被用于检测蛋白质、激素等微量物质。

[0006] 本世纪70年代中期Arakawa首次报道用发光信号进行酶免疫分析，利用发光的化学反应分析超微量物质，特别是用于临床免疫分析中检验超微量活性物质。目前，这一技术

已从实验室的稀有技术过渡到临床医学的常规检测手段。化学发光免疫分析 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA) 是将化学发光或生物发光体系与免疫反应相结合, 用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术。其检测原理与放射免疫 (RIA) 和酶免疫 (EIA) 相似, 不同之处是以发光物质代替放射性核素或酶作为标记物, 并借助其自身的发光强度直接进行测定。

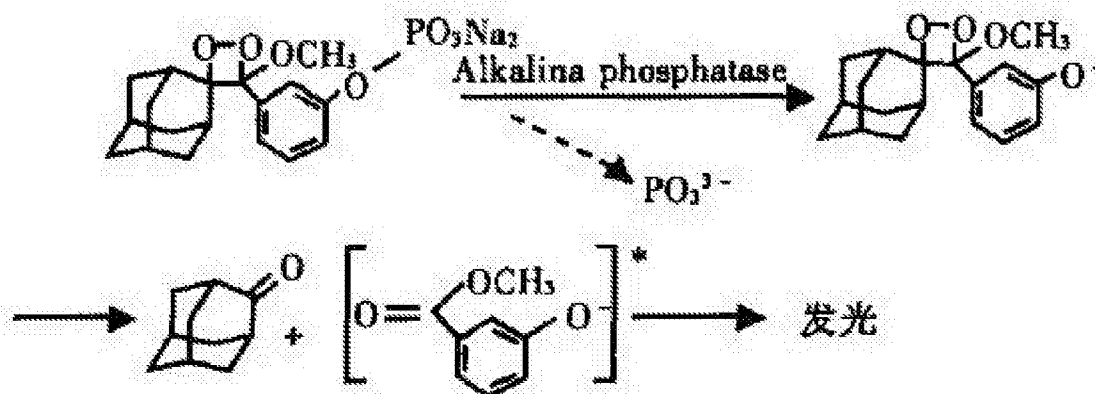
[0007] 化学发光免疫分析既具有放射免疫的高灵敏度, 又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点, 易于标准化操作, 且测试中不使用有害的试剂, 试剂保持期长, 应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作, 成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。

[0008] 常用的酶标记物有辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (ALP), 它们有各自的发光底物。

[0009] 碱性磷酸酶 (ALP) 分子量小, 稳定性好、活性高, 易分离提纯, 已广泛用于酶联免疫分析和核酸杂交分析的标记物。

[0010] 碱性磷酸酶和 1, 2-二氧环乙烷构成的发光体系是目前较为重要、灵敏的一类化学发光体系。这类体系中具有代表性的是 Bronstein 等提出的 ALP-AMPPD 发光体系。AMPPD 是一种超灵敏的 ALP 底物, 性质十分稳定, 热分解活化能 $E_a = 136 \text{ kJ/mol}$, 5°C 下保存的固态的 AMPPD 几乎不分解。在溶液中 AMPPD 的磷酸酯键很稳定, 非酶催化的水解非常慢, 在 $\text{pH} = 12$, 0.05 mol/L 碳酸钠缓冲溶液中, 分解半衰期可达 74 年, 几乎没有试剂本身的发光背景。

[0011] AMPPD 的发光机制如下式所示:



AMPPD 在 ALP 作用下, 磷酸酯基发生水解而脱去一个磷酸基, 得到一个中等稳定的中间体 AMPD^- , 此中间体经分子内电子转移裂解为一分子的金刚烷酮和一分子处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子, 当其回到基态时产生 470 nm 的光, 可持续几十分钟。AMPPD 为磷酸酯酶的直接发光底物, 可用来检测碱性磷酸酶或抗体、核酸探针及其其它配基的结合物。ALP-AMPPD 发光体系具有非常高的灵敏度, 无论是固相还是液相检测, 对标记物 ALP 的检测限可达 10^{-21} mol/L , 是最灵敏的免疫测定方法之一。在 AMPPD 基础上加以改进并具有更好反应动力学和更高灵敏度的新一代产物 CSPD、CDP-Star 也已出现。这些体系已广泛用于各种基因、病原体 DNA 的鉴定。

[0012] AMPPD-ALP 化学发光体系具有参与化学反应的组份少, 底物可直接产生信号, 从而减少了体系的复杂性和背景干扰; 由于酶的参与使其分解具有较高的转换率, 光辐射量子产率高且光信号可持续几小时到几天, 提高了发光检测的灵敏度和稳定性。

[0013] CN105891492 公开了微球富集增强技术检测循环肿瘤细胞抗原的方法及试剂盒。

方法步骤如下:1)取乳胶微球加入MES缓冲溶液HER2兔单抗抗体,BSA,HRP,EDC混合吹打均匀;在45℃振荡反应1h;离心并用洗涤液洗涤,去上清;用封闭液定容,45℃振荡封闭30min,离心洗涤一次;最后定容储存备用;2)取细胞悬液于微孔反应条板中,用PBS定容,加入生物素标记EpCAM抗体和抗体标记的乳胶微球,室温振荡反应1h;加入链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应1h;磁分离,洗涤并且去除上清;然后进行显色反应。

[0014] CN104568923公开了电化学发光检测外周血循环肿瘤细胞抗原的方法,用富集缓冲液将血液样本移至离心管中,并定容,混匀;离心,弃上清,裂解红细胞并重选细胞;加富集缓冲液,重悬细胞;离心,弃上清,加入富集缓冲溶液和EpCAM抗体磁珠,混匀,孵育;将离心管静置于磁性底座后除去上清液;加入清洗缓冲液,洗涤后得磁性微球体系;之后将Ru(bpy)₃ 2(dcbpy)NHS一肿瘤细胞抗体加到磁性微球体系中,混匀,孵育;将离心管静置于磁性底座上,除去上清液;加入清洗缓冲液,洗涤;置于电致化学发光检测仪中,测出肿瘤细胞表面抗原的含量。

发明内容

[0015] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒。

[0016] 一种化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法,

将1μL 0.04mg/mL的EpCAM抗体、1μL 0.2mg/mL的生物素标记二抗和1μL碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存在pH为7.5的PBS中的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应60min;加入2 μL 1%(w/v 固含量)链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应60min;磁分离,pH为7.5的PBS洗涤3次并且去除上清;加入100μL化学发光底物,检测读值;或者

将1μL 0.04mg/mL的生物素标记EpCAM抗体和1μL碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存在pH为7.5的PBS中的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应60min;加入2 μL 1%(w/v 固含量)链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应60min;磁分离,洗涤3次并且去除上清;加入100μL化学发光底物,检测读值。

[0017] 所述碱性磷酸酶标记K-Ras抗体的标记步骤如下:

将碱性磷酸酶平衡到室温,摇晃混匀,然后用100mMPBS(pH6.8)洗涤3遍;取出100ug碱性磷酸酶加入到200μL 2%的戊二醛溶液中,混匀后室温静置过夜,得到醛化碱性磷酸酶;用50mM的CB(PH9.6)洗涤3次,最后用CB定容至200μL,得到纯化的醛化AP;向醛化AP中加入27.28ugK-Ras抗体,混匀后置于4℃静置24小时,得到AP标记的K-Ras抗体;向AP标记的K-Ras抗体溶液中加入0.4μL15mg/mL的甘氨酸溶液,室温反应2小时,然后用稀释缓冲液洗涤3次,最后定容至200μL,4℃储存备用。

[0018] 所述待测标本的预处理如下:

取新鲜抗凝血7.5mL转移至50mL离心管中,4℃ 460g离心7min,去上清;加入8倍体积的红细胞裂解液,冰上裂解5min,裂解过程中摇动以促进裂解;4℃ 460g离心7min弃去红色上清;若裂解不完全则重复裂解一次;加入5mL 细胞洗涤液,重悬,4℃,460g离心7min去上清;加入5mL 4%多聚甲醛溶液,固定30min;4℃,460g离心7min去上清并用5mL 细胞洗涤液洗涤1次;再加入5mL 0.5%的TritonX-100,通透30min,460g离心7min去上清并用5mL 细胞洗涤

液洗涤1次;再用反应液洗涤1次,用反应液定容至200uL;待用。

[0019] 所述化学发光底物采用AMPPD。

[0020] 一种所述的方法的试剂盒,主要包括

- 1) 生物素标记二抗,EpCAM抗体;和/或者生物素标记EpCAM抗体;
- 2) 碱性磷酸酶标记K-Ras抗体、链霉亲和素磁珠、化学发光底物。

[0021] 本发明采用化学发光酶免疫分析技术测定结直肠癌循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的表达量,可较大提高检测的范围和灵敏度,并开发出相关试剂盒,它具有准确、安全、高灵敏、经济等特点。

附图说明

[0022] 图1为标准曲线;

图2为浓度—检测值两点回归拟合方程。

具体实施方式

[0023] 实施例1

将1uL 0.04mg/mL的EpCAM抗体、1uL 0.2mg/mL的生物素标记二抗和1uL碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存在pH为7.5的PBS中的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应60min;加入2 uL 1%(w/v 固含量)链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应60min;磁分离,pH为7.5的PBS洗涤3次并且去除上清;加入100uL化学发光底物,立即使用仪器检测,读值。

[0024] 反应机理如下所述:

首先是待测样本和EpCAM抗体和碱性磷酸酶标记K-RAS抗体特异性结合;之后生物素标记二抗与EpCAM抗体结合,最后加入链霉亲和素磁珠,将之与生物素结合形成链霉亲和素磁珠—生物素标记二抗—EpCAM抗体—待测样本—碱性磷酸酶标记K—Ras抗体复合物,此复合物可以与发光底物反应,产生信号,此信号的产生和待测物质的量呈线性关系。

[0025] 待测标本的预处理如下所述:

取新鲜抗凝血7.5mL转移至50mL离心管中,4℃ 460g离心7min,去上清;加入约8倍体积的红细胞裂解液,冰上裂解5min,裂解过程中适当摇动以促进裂解;4℃ 460g离心7min弃去红色上清;若裂解不完全则重复裂解一次;加入约5mL 细胞洗涤液,重悬,4℃,460g离心7min去上清;加入5mL 4%多聚甲醛溶液,固定30min;4℃,460g离心7min去上清并用5mL 细胞洗涤液洗涤1次;再加入5mL 0.5%的TritonX-100,通透30min,460g离心7min去上清并用5mL 细胞洗涤液洗涤1次;再用反应液洗涤1次,用反应液定容至200uL;待用。

[0026] 化学发光底物采用AMPPD。碱性磷酸酶和1, 2-二氧环乙烷构成的发光体系是目前常用的一类化学发光体系。

[0027] 实施例2 优选的实施方式

将1uL 0.04mg/mL的生物素标记EpCAM抗体和1uL碱性磷酸酶标记K-Ras抗体,与事先固定好并经通透处理以及储存在pH为7.5的PBS中的待测标本,同时加入反应杯中孵育反应60min;加入2 uL 1%(w/v 固含量)链霉亲和素磁珠,室温下振荡反应60min;磁分离,洗涤3次并且去除上清;加入100uL化学发光底物,立即使用仪器检测,读值。

[0028] 实施例3 碱性磷酸酶标记K-Ras抗体

将碱性磷酸酶平衡到室温,摇晃混匀,然后用100mMPBS (pH6.8)洗涤3遍;取出100ug (7.52uL)碱性磷酸酶加入到200uL2%的戊二醛溶液中,混匀后室温静置过夜,得到醛化碱性磷酸酶;用50mM的CB (PH9.6)洗涤3次,最后用CB定容至200uL,得到纯化的醛化AP;向醛化AP中加入27.28ugK-Ras抗体,混匀后置于4℃静置24小时,得到AP标记的K-Ras抗体;向AP标记的K-Ras抗体溶液中加入0.4uL15mg/mL的甘氨酸溶液,室温反应2小时,然后用稀释缓冲液洗涤3次,最后定容至200uL,4℃储存备用。

[0029] 实施例1、2两种实施方式的比较

实施例1和实施例2的区别为生物素标记二抗和EpCAM抗体结合系统替换为生物素标记Epcam抗体,从理论上来说增加了二抗会增加系统的空间臂,提高富集的效率、灵敏度和特异性。二抗具有一定的放大作用。但是出乎我们预料的是此方案中采用二抗的系统其实实验结果都不如直接采用生物素标记EpCAM抗体的好。因此,我们优选生物素标记EpCAM抗体系统的实施例2。

[0030] 优选实施方式的评估**1 线性范围**

线性范围评估资料是评价拟上市产品有效性的的重要依据,也是产品注册所需的重要申报资料之一。

[0031] 采用细胞浓度和发光信号强度之间建立标准曲线的方法测定,若证明这种标准曲线是否存在线性关系,做法是根据WS/T124《临床化学体外诊断试剂盒质量检验总则》关于线性范围的规定,把选取的细胞浓度范围取6点,包括浓度的下限(或0)、中间值及上限,每点重复测定3次吸光度。根据公式计算出直线方程 $y=a+bx$ 和回归系数。

[0032] 当细胞浓度和发光信号强度之间有了直线方程 $y=a+bx$ 的关系,就可以快捷的通过发光信号强度值计算出对应的细胞浓度。利用线性范围公式的计算,推证出完善的校准曲线,从而为检测试剂的检测限、准确度、精密度打好基础。

[0033] 按上述检测方法(所获得试剂盒),取6种已知浓度的样本,每个样本测定3次,取平均值,结果如图1所示。

[0034] 精密度

精密度是考察试剂盒对同一样本重复测定时能否得到相同实验结果的能力的指标,通常用重复多次样本测量结果的变异系数(CV%)表示,精密度评价是质量控制的重要内容。精密度评估资料是评价拟上市产品有效性的的重要依据,也是产品注册所需的重要申报资料之一。

[0035] 批内精密度是众多种类精密度中最基本的一个,它是在严格的相似条件下,所得到的最佳的精密度。

[0036] 按上述检测方法,在检测范围内取两个不同细胞数的样本进行测定,每个样本测定20次,将20次检测结果计算平均值,标准差和变异系数,结果如下表1所示。

[0037]

表1 精密度测试

	样品1	样品2
测定次数	20	20

平均值	1095	3346
最大值	1228	3479
最小值	982	3215
标准差	78.6	90.6
变异系数(%)	7.172	2.707

3 准确度

准确度评估资料是评价拟上市产品有效性的的重要依据,也是产品注册所需的重要申报资料之一。

[0038] 按上述检测方法,取含5个循环肿瘤细胞的细胞悬液,用试剂进行检测,检测3次,计算平均值与由标准曲线计算得到的理论值为靶值进行对照,结果如下表2所示。

[0039]

表2 准确度测试

测定次数	3
最大值	498
最小值	412
平均值	452
靶值	453

4 检测限

用样本稀释液作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次检测结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,根据样本稀释液和相邻样本之间的浓度—RLU值结果进行两点回归拟合得出一次方程,如图2所示,将M+2SD的RLU值代入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。结果如下表3所示。

[0040]

表3 最低检测限

	样本稀释液
测定次数	20
平均值(M)	151
最大值	188
最小值	114
标准差(SD)	19.6
M+2SD	190.2
最低检测限	1个/7.5mL

可知,本发明的最低检测限为1个/7.5mL。

[0041] 稳定性试验

在2~8℃贮存条件下,分别在0月,4月,8月,12月和14月对同一浓度的细胞进行测定,每个样本测3次,取均值。结果表明,4月,8月,12月,14月与0月相比,测得的差异很小,说明本发明的检测试剂盒在2~8℃贮存条件下可稳定一年,结果如下表4所示。

[0042]

表4 试剂稳定性试验

项目	0月	4月	8月	12月	14月
试剂空白值	146	129	153	148	161
样本测定值	3348	3324	3334	3272	3198
批内CV (%)	2.8	2.9	2.5	2.7	2.9

试剂开封后,在30天内,30次测定同一浓度细胞样本的均值、最大值、最小值、标准差和变异系数,可见本试剂盒试剂在开封后,可稳定一个月以上,结果如表5所示。

[0043]

表5 试剂开瓶稳定性试验

均值	最小值	最大值	标准差	变异系数CV (%)
3205	2934	3468	154	4.805

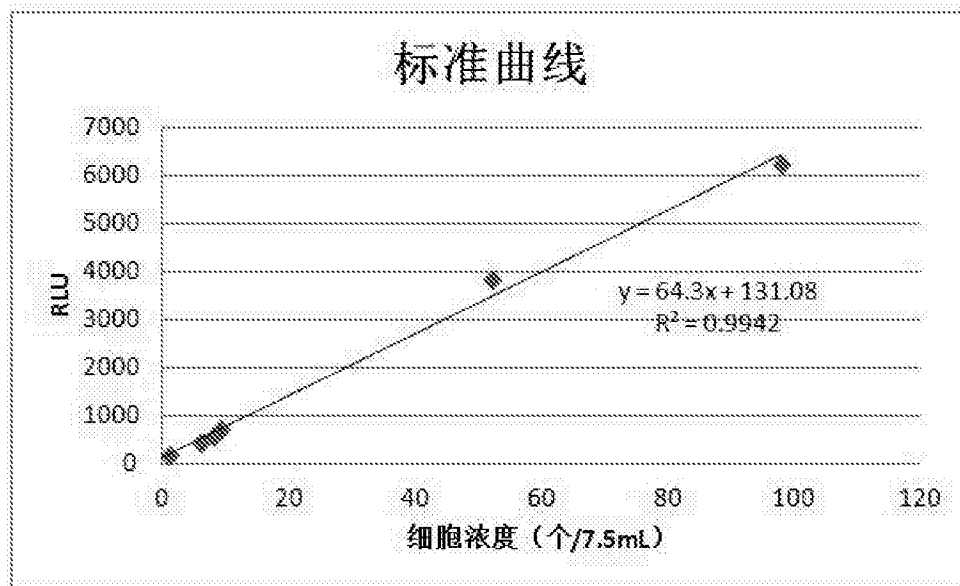


图1

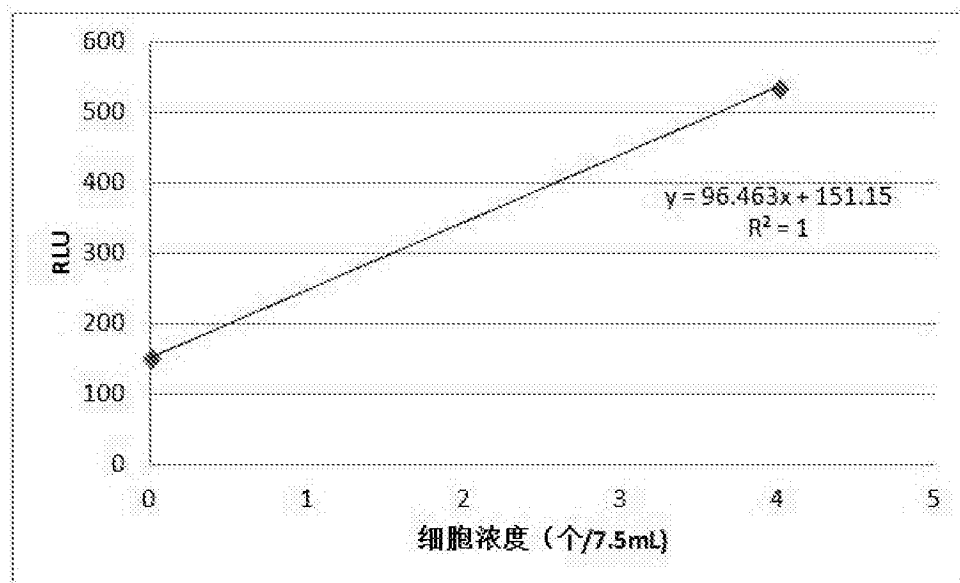


图2

专利名称(译)	化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN107918013A	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN2017110876326.4	申请日	2017-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	浙江天科高新技术发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江天科高新技术发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江天科高新技术发展有限公司		
[标]发明人	沈晓亮 赵甜甜		
发明人	沈晓亮 赵甜甜		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/57484		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种化学发光酶免测定循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的方法及试剂盒。将EpCAM抗体、生物素标记二抗和碱性磷酸酶标记K-Ras抗体，与事先固定好并经通透处理以及储存的待测标本，同时加入反应杯中孵育反应；加入链霉亲和素磁珠，室温下振荡反应；磁分离，洗涤并且去除上清；加入化学发光底物，检测读值；或者将生物素标记EpCAM抗体和碱性磷酸酶标记K-Ras抗体与待测标本，同时加入反应杯中孵育反应。本发明采用化学发光酶免疫分析技术测定结直肠癌循环肿瘤细胞中K-Ras蛋白的表达量，可较大提高检测的范围和灵敏度，具有良好的市场前景。

