



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108828216 A

(43)申请公布日 2018.11.16

(21)申请号 201810285857.0

(22)申请日 2018.04.03

(71)申请人 江苏省肿瘤防治研究所(江苏省肿瘤医院)

地址 210000 江苏省南京市百子亭42号

(72)发明人 曲军卫 王金华 徐恒 陆上苏

(74)专利代理机构 南京禹为知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 32272

代理人 王晓东

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

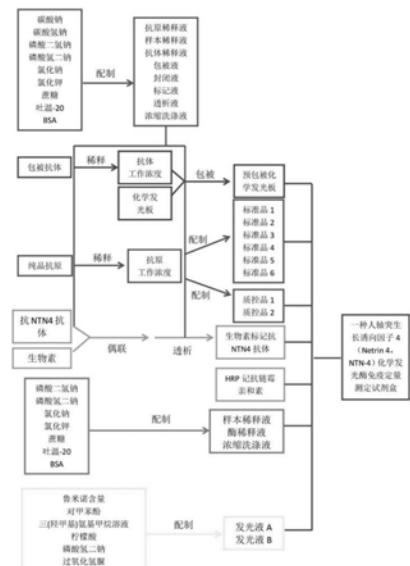
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒及应用

(57)摘要

本发明公开了一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒及应用,本发明经20%蔗糖保护剂保护的预包被抗NTN-4单克隆抗抗体的化学发光板稳定性达1年。本发明试剂盒的拟合标准曲线相关系数可达 $r=0.9987$,大于0.9900;准确性结果相对偏差为3.06%,小于10%;检测限为0.88ng/mL;线性考察,浓度值拟合直线的相关系数 $r=0.9996$,相关系数大于0.9900;重复性结果的变异系数CV均小于10%;在应用于临床样本的检测中能够明显的区分正常人和病人。该试剂盒展示了良好的准确性、线性、重复性、最低检测限,具有良好的测定血清中的NTN-4蛋白的浓度的能力,能够作为检测胃癌的辅助诊断。



1. 一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:包括,NTN-4标准品溶液、NTN-4质控品溶液、样本稀释液、生物素标记抗NTN-4单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素、抗体稀释液、化学发光溶液、浓缩洗涤液、化学发光板,所述化学发光板上包被有抗NTN-4单克隆抗体,所述抗NTN-4单克隆抗体包被浓度为2~3 μ g/mL。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述化学发光板为不透明聚苯乙烯化学发光板,所述化学发光板上包被有抗NTN-4单克隆抗体,所述抗NTN-4单克隆抗体包被浓度为2.5 μ g/mL。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒的检测样本为人血清样本。

4. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:所述NTN-4的标准品溶液浓度分别为:0、1.25、2.5、5、10、20ng/mL。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述NTN-4的质控品溶液浓度分别为:2.5±0.5、10±2ng/mL。

6. 根据权利要求1、2或5任一所述的试剂盒,其特征在于:所述生物素标记抗NTN-4单克隆抗体由NTN-4单克隆抗体与生物素偶合制成,其浓度为0.1mg/mL,用抗体稀释液稀释成1:2000的工作浓度作为检测抗体。

7. 根据权利要求1、2或5任一所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH=7.4、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求1、2或5任一所述的试剂盒,其特征在于:所述化学发光溶液包括化学发光液A、B,所述化学发光溶液A为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M、pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液,化学发光溶液B为每100mL溶液含柠檬酸2.1g、无水Na₂HP0₄2.82g、0.75wt%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液。

9. 根据权利要求1、2或5任一所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括样本稀释液,所述样本稀释液为包括20g/L BSA、50g/L蔗糖、8g/L NaCl、0.2g/L KC1、0.24g/L KH2P04、1.44g/L Na2HP04的水溶液,pH=7.4;

所述抗体稀释液,为包括50g/L蔗糖,8g/L NaCl,0.2g/L KC1,0.24g/L KH2P04,1.44g/L Na2HP04的水溶液,pH=7.4。

10. 权利要求1-9任一所述的NTN-4化学发光酶免疫检测试剂盒作为胃癌的辅助诊断、监测疾病状态、反映治疗疗效的试剂盒的应用。

一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学检测技术领域,具体涉及一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒及应用。

背景技术

[0002] 胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,据世界卫生组织/国际癌症研究中心(IARC)公布的统计数据显示,2012年全球胃癌新病例95.2万,中国胃癌新发病例40.5万,占全球胃癌发病的42.6%;2012年全球范围内胃癌死亡病例72.3万,死亡率为10.2/10万,我国胃癌死亡病例32.5万,死亡率为21.9/10万。全国死因回顾抽样调查报告数据显示,2004~2005年全国胃癌从1973~1975年和1990~1992年均稳居恶性肿瘤首位后移至肺癌和肝癌之后的第3位。可见,我国属于胃癌发病率和死亡率均较高的国家。

[0003] 神经导向因子4 (netrin-4, NTN-4) 是一种分泌蛋白,可与不同受体结合,参与神经细胞生长、迁移等生理功能。NTN-4具有诱导细胞和轴突迁移的功能,能促进神经突生长,是神经系统发展中细胞和轴突迁移必需的趋向性化学信号。体内研究表明,NTN-4具有调节血管生成和促淋巴管形成作用,从而影响肿瘤的发生、发展和转移;体外研究发现,NTN-4对肿瘤细胞的增殖、迁移等有不同的作用,可能与NTN-4和不同受体结合有关。肿瘤细胞生长与NTN-4的浓度具有相关性,NTN-4在肿瘤细胞中表达与甲基化有关。因此,NTN-4及其受体在肿瘤的生长,转移等方面发挥作用。

[0004] 现有NTN-4化学发光酶免疫定量测试试剂盒检测的准确度、灵敏度仍然不足,鉴于此,建立一种有效、快速、简单、灵敏的检测NTN-4的方法,应用于肿瘤的辅助诊断或疗效监测与预后具有重要意义。

发明内容

[0005] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊,而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

[0006] 鉴于上述的技术缺陷,提出了本发明。

[0007] 因此,作为本发明其中一个方面,本发明克服现有技术中存在的不足,提供一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供了如下技术方案:一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其包括,NTN-4标准品溶液、NTN-4质控品溶液、样本稀释液、生物素标记抗NTN-4单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素、抗体稀释液、化学发光溶液、浓缩洗涤液、化学发光板,所述化学发光板上包被有抗NTN-4单克隆抗体,所述抗NTN-4单克隆抗体包被浓度为2~3 μ g/mL。

[0009] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述化学发光板为不透明聚苯乙烯化学发光板,所述化学发光板上包被有抗NTN-4单克隆抗

体,所述抗NTN-4单克隆抗体包被浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0010] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述试剂盒的检测样本为人血清样本。

[0011] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述NTN-4的标准品溶液浓度分别为:0、1.25、2.5、5、10、20 ng/mL 。

[0012] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述NTN-4的质控品溶液浓度分别为: 2.5 ± 0.5 、 $10\pm2\text{ng}/\text{mL}$ 。

[0013] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述生物素标记抗NTN-4单克隆抗体由NTN-4单克隆抗体与生物素偶合制成,其浓度为 $0.1\text{mg}/\text{mL}$,用抗体稀释液稀释成1:2000的工作浓度作为检测抗体。

[0014] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述浓缩洗涤液是含有体积分数0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ 、 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的磷酸盐缓冲液。

[0015] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述化学发光溶液包括化学发光液A、B,所述化学发光溶液A为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M、 $\text{pH}=8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液,化学发光溶液B为每100mL溶液含柠檬酸2.1g、无水 Na_2HPo_4 2.82g、0.75wt%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液。

[0016] 作为本发明所述NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒的一种优选方案,其中:所述试剂盒还包括样本稀释液,所述样本稀释液为包括20g/L BSA、50g/L蔗糖、8g/L NaCl、0.2g/L KCl、0.24g/L KH₂PO₄、1.44g/L Na₂HP₄的水溶液, $\text{pH}=7.4$;

[0017] 所述抗体稀释液,为包括50g/L蔗糖,8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HP₄的水溶液, $\text{pH}=7.4$ 。

[0018] 作为本发明的另一个方面,本发明克服现有技术中存在的不足,提供NTN-4化学发光酶免疫检测试剂盒作为胃癌的辅助诊断、监测疾病状态、反映治疗疗效的试剂盒的应用。

[0019] 本发明的有益效果:本发明公开了NTN-4 (NTN-4) 的化学发光酶免疫 (CLEIA) 定量测定试剂盒,试剂盒用于检测胃癌病人血清中的NTN-4蛋白的浓度,适用于胃癌的辅助诊断,对于监测疾病状态、反映治疗疗效、早期发现、癌症复发检查有所裨益。本发明经20%蔗糖保护剂保护的预包被抗NTN-4单克隆抗抗体的化学发光板稳定性达1年。本发明试剂盒的拟合标准曲线相关系数可达 $r=0.9987$,大于0.9900;准确性结果相对偏差为3.06%,小于10%;检测限为 $0.88\text{ng}/\text{mL}$;线性考察,浓度值拟合直线的相关系数 $r=0.9996$,相关系数大于0.9900;重复性结果的变异系数CV均小于10%;在应用于临床样本的检测中能够明显的区分正常人和病人。该试剂盒展示了良好的准确性、线性、重复性、最低检测限,具有良好的测定血清中的NTN-4蛋白的能力,能够作为检测胃癌的辅助诊断。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。其中:

[0021] 图1为NTN-4化学发光酶免疫 (CLEIA) 检测试剂盒的原理概述图。

- [0022] 图2为NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的制备流程图。
- [0023] 图3为NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的标准曲线图。
- [0024] 图4为NTN-4的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的线性考察结果图。
- [0025] 图5为NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒测定病人血清与正常人的血清中NTN-4含量的散点图。
- [0026] 图6为本发明生物素标记抗NTN-4抗体浓度确定示意图。
- [0027] 图7为本发明抗体包被浓度的确定结果示意图。
- [0028] 图8为本发明抗体包被浓度的数据分析示意图。

具体实施方式

[0029] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0030] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0031] 其次,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

[0032] 本发明提供了NTN-4的化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法及其检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,包括:

[0033] 1、化学发光板。为白色不透明96孔可拆卸或不可拆卸的聚苯乙烯化学发光板,各孔包被有抗NTN-4的抗体,抗体包被浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0034] 2、NTN-4系列标准品溶液。浓度分别为:0、1.25、2.5、5、10、20 ng/mL 。

[0035] 3、NTN-4系列质控品溶液。浓度分别为: 2.5 ± 0.5 、 $10\pm 2\text{ng}/\text{mL}$ 。

[0036] 4、样本稀释液。

[0037] 5、生物素标记抗NTN-4抗体,其浓度为 $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 。由抗NTN-4抗体与生物素偶合制成的偶联物作为检测抗体。

[0038] 6、辣根过氧化物酶(HRP)标记的链酶亲和素。

[0039] 7、化学发光溶液A、B液。A液为鲁米诺含量为 0.01M 、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH}=8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B液为每 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g ,无水 Na_2HPo_4 2.82g , 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液,所述百分比为质量百分比。

[0040] 8、浓缩洗涤液。浓缩洗涤溶液具体为含有吐温-20(Tween-20)缓冲液的20倍浓缩磷酸盐缓冲液,使用前用双蒸水稀释至工作浓度后使用,用于实验过程中洗涤化学发光板。

[0041] 本发明提供的NTN-4的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的制备过程对本发明试剂盒检测的灵敏度以及相关性能影响很大,其制备关键步骤如下:

[0042] 1、预包被化学发光板的制备:采用将抗NTN-4抗体置于设定的包被溶液中,以设定的浓度,在 37°C 恒温箱中反应2小时包被。采用的抗体包被浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$,采用的是 $\text{pH}=9.5$ 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。微孔板中所包被的抗NTN-4抗体在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上,可以经受多次洗板。包被好的微孔板可以用封闭溶液封闭,在

37℃恒温箱中反应2小时封闭。在进行化学发光板封闭处理过程结束后,用稳定剂进行了处理。稳定剂配方:20%蔗糖溶液,pH 7.0-7.4,在37℃恒温箱中反应1小时。本发明经20%蔗糖保护剂保护的预包被抗NTN-4单克隆抗抗体的化学发光板稳定性达1年。

[0043] 2、NTN-4系列标准品溶液的制备:NTN-4抗原溶液浓度是决定本发明中NTN-4酶联免疫检测试剂盒测定范围及灵敏度的重要因素。将NTN-4抗原溶液可以用抗原稀释液稀释成1:1000的工作浓度,而后按照倍比稀释的方法稀释抗原至终浓度为0、1.25、2.5、5、10、20ng/mL的系列标准品溶液。

[0044] 3、NTN-4系列质控溶液的制备:NTN-4质控溶液浓度是本发明中NTN-4酶联免疫检测试剂盒实验操作质控的重要因素。将NTN-4抗原纯品溶液用抗原稀释液稀释成1:1000的工作浓度,而后稀释至终浓度为2.5±0.5、10±2ng/mL的质控溶液。

[0045] 4、生物素标记抗NTN-4抗体的制备:10μl标记抗体加1μl溶解后的生物素,用标记液稀释至100μl,37℃水浴锅中反应1小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需4~6h更换一次,更换5次后即可收抗体,浓度为0.1mg/mL。

[0046] 本发明提供的NTN-4的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的内设以及制备过程中的试剂溶液对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大,所涉及相关溶液的配制方法如下:

[0047] 1、NTN-4标准品溶液:以既定方法将NTN-4抗原纯品用抗原稀释液配制成浓度分别为0、1.25、2.5、5、10、20ng/mL的NTN-4系列标准溶液。

[0048] 2、NTN-4质控品溶液:以既定方法将NTN-4抗原纯品用抗原稀释液配制成浓度分别为2.5±0.5、10±2ng/mL的质控品溶液。

[0049] 3、生物素标记抗NTN-4抗体:按照既定方法将生物素与抗体进行偶联透析后获得的生物素标记抗NTN-4抗体(浓度为0.1mg/mL),用抗体稀释液稀释成1:2000的工作浓度作为检测抗体。

[0050] 生物素标记抗NTN-4抗体浓度确定实验如下:

[0051] 包被抗体按照2.5μg/mL的浓度包被化学发光板,100μl/孔,置于37℃恒温箱2小时后,拍干;以150μl/孔封闭溶液封闭,37℃恒温箱放置2小时,洗板一次,拍干。以多个浓度梯度抗原样本为实验样本加入微孔中,再分别加入不同稀释度的生物素标记抗NTN-4抗体,再加入链酶亲和素-HRP,37℃水浴10分钟,洗板、拍干;分别加入100μl发光液A发光液B混合液(比例为1:1)测定发光强度值RLU值。实验结果如图6所示。

[0052] 考察最高浓度值点(20ng/mL)的发光值RLU₁和信噪比RLU₁/RLU₀(最高浓度值点(20ng/mL)发光值与0浓度点发光值的比值)。选择RLU₁最高、信噪比最低时对应的生物素标记抗NTN-4抗体浓度为最佳抗生物素标记抗NTN-4抗体浓度为1:2000。

[0053] 4、抗原稀释液/样本稀释液:为含有BSA,蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20g BSA,50g蔗糖,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,1.44g Na₂HP0₄的水溶液。

[0054] 5、抗体稀释液:为含有蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有50g蔗糖,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,1.44g Na₂HP0₄的水溶液。

[0055] 6、化学发光溶液:A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M,pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液,B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g,无水Na₂HP0₄ 2.82g,0.75%的

过氧化氢脲0.64mL的水溶液。

[0056] 7、浓缩洗涤液:按体积分数0.05%将吐温-20添加至pH=7.4,0.1mol/L磷酸盐缓冲液中。

[0057] 8、包被溶液:1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中,调节pH=9.5。

[0058] 9、封闭溶液:10g BSA溶于1L洗涤溶液中,再加入重量比为5%的P300。

[0059] 10、标记液:1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中,调节pH=9.5。

[0060] 11、透析液:0.24g磷酸二氢钠、1.44g磷酸氢二钠、8g氯化钠、0.2g氯化钾溶于1L水中,调节PH=7.4。

[0061] 本发明提供了NTN-4的化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法的检测步骤如下:

[0062] 1、使用前,将试剂盒所有组分于室温下放置20分钟,清洗液(20×)在使用前必须用纯化水稀释20倍,链霉亲和素-HRP用酶稀释液稀释1000倍后使用,避光存放。

[0063] 2、化学发光板使用前每孔加200μl清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,并去除水滴(在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作2次。

[0064] 3、将校准品、质控品或血清样本各10~20μl分别加入化学发光板微孔中,再加80~90μl样本稀释液,用封板膜封板,37℃水浴20分钟。

[0065] 4、甩去化学发光板孔内液体,每孔加200μl清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,并去除水滴(在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作5次。

[0066] 5、再加入生物素标记的抗NTN-4抗体50μl,再加HRP标记的抗NTN-4抗体50μl,震荡混匀后,用封板膜封板,37℃水浴,20分钟。

[0067] 6、甩去化学发光板孔内液体,每孔加200μl清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,并去除水滴(在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作5次。

[0068] 7、加入100μl发光液A发光液B混合液(A、B液体积比例为1:1)立刻置于化学发光仪上读数,获得RLU值。

[0069] 8、根据标准品的RLU值和浓度为坐标轴,选择合适的数学模型建立标准曲线。将样本的RLU值,代入上述的标准曲线中,得出样本浓度。

[0070] 实施例1:用于包被及生物素标记的NTN-4单克隆抗体的研制与选择

[0071] 本发明抗NTN-4单克隆抗体的研制过程如下:1.将50μg NTN-4蛋白与佐剂混合腹腔注射BALB/C小鼠三次,每次间隔3周,取小鼠内眦静脉血测免疫效价;2.取效价高的小鼠尾静脉注射加强免疫一次,三天后取小鼠脾细胞,与骨髓瘤细胞在PEG4000(聚乙二醇4000)作用下进行细胞融合。一周后取细胞生长孔上清经ELISA测抗体分泌情况,将阳性分泌孔扩大培养并进行亚克隆。三次亚克隆后,将单克隆孔细胞扩大培养,进行杂交瘤细胞及单克隆抗体的鉴定;3.采用动物体内诱生的方法大量制备单克隆抗体,最后用Protein G纯化腹水得到抗NTN-4的单克隆抗体。

[0072] 所述抗NTN-4单克隆抗体的选择过程如下:采用夹心ELISA的方法进行配对组合,选择最佳组合配对的将研制出的抗NTN-4单克隆抗体进行标号,如抗体1、抗体2。如:分别将抗体1或抗体2包被于ELISA板中(包被抗体浓度5μg/mL,100μL/孔),选择10个胃癌病人血清制成混合悬液作为筛选用的抗原(50μL/孔),在分别用经HRP标记过的抗体2或抗体1作为检测抗体(0.5μg/mL,100μL/孔),再加入链霉亲和素-HRP,用TMB显色,选取能够产生反应的配对抗体组合,作为所述试剂盒的抗NTN-4单克隆抗体的原料。

[0073] 实施例2:抗原与包被抗体浓度的优选

[0074] 纵向用每种包被抗体按20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 μ g/mL的系列稀释度包被化学发光板,100 μ l/孔,置于37℃恒温箱2小时后,拍干;以150 μ l/孔封闭溶液封闭,37℃恒温箱放置2小时,洗板一次,拍干;加入50 μ l/孔一系列稀释的NTN-4抗原(1:1000至1:512000),再加生物素标记抗NTN-4单克隆抗体,再加入链酶亲和素-HRP,37℃水浴10分钟,洗板五次,最后一次拍干;分别加入100 μ l发光液A发光液B混合液(比例为1:1)测定发光强度值RLU值。以发光强度值随包被抗原的浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释度为最佳浓度进行特异性测定。

[0075] 抗体包被浓度确定结果图如7所示。根据上述对包被抗体及抗原浓度的优选实验中确定：包被抗体浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ，抗原标准品的最高点工作浓度为 $20\text{ng}/\text{mL}$ 。

[0076] 从图7可知,抗原浓度低于20ng/mL时,出现线性段,对此段数据进行作图分析如图8所示,当包被浓度为2.5 μ g/mL时线性段直线拟合程度最佳,且发光值分布较为适中,因此包被浓度最佳方案为2.5 μ g/mL。

[0077] 实施例3:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的标准曲线

[0078] 根据NTN-4化学发光酶免疫 (CLEIA) 测定方法的检测步骤, 获得NTN-4系列标准品的发光值RLU。根据标准品的RLU值和浓度为坐标轴, 选择合适的数学模型建立标准曲线,

[0079] 标准曲线如图3所示,其相关系数 $r=0.9987$ 。

〔0080〕 实施例4:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的准确度

[0081] 根据NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法的检测步骤,取定值样本进行检测。重复测量3次后,其平均结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差。

〔0083〕 式中：

〔0084〕 β —相对偏差：

〔0085〕 M—测量浓度3次结果的平均值：

[0086] T—半值样本的浓度

[0087] 准确度结果如表1所示,其相对偏差为3.06%,小于10%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的准确度。

【0088】 麦1-NTN-1化学发光酶免疫(CEIA)检测试剂盒的准确度

〔0089〕

样本定值浓度 T (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	平均值 M	相对偏差 B
	10.98		
10.00	10.22	10.69	3.06%
	10.87		

[0090] 实施例5:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的最低检测限

[0091] 用零浓度样本作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的发光值值

(RLU值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD所对应的RLU值,根据试剂盒所用校准品的定标曲线方程,将M+2SD所对应的RLU值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为检测限。

[0092] 检测限结果如表2所示,本发明CLEIA法检测限为0.88ng/mL,远低于现有技术ELISA法,检测时间仅为20min。

[0093]

方法学	检测限	相对偏差	检测时间
ELISA 法	8.69 ng/mL	14.68%	3 h
CLEIA 法	0.88 ng/mL	3.06%	20 min

[0094] 表2:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的最低检测限

[0095]

样本浓度值 (ng/mL)	平均值 M RLU	标准差 (SD) RLU	M+2SD	检测限 ng/mL
0	808.5	72.34	985.17	0.88

[0096] 本发明抗体检测范围为:0.88ng/mL~100ng/mL。

[0097] 实施例6:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的线性

[0098] 用样本稀释液将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为至少5种浓度，其中低值浓度样本须接近线性范围的下限。将每一浓度样本重复检测2次，计算其浓度的平均值，将结果平均值和稀释后的样本浓度用最小二乘法进行直线拟合，并计算线性相关系数r。

[0099] 线性考察图如图4所示,其 $r=0.9996$,相关系数大于0.9900,试剂盒线性相关性较好。

[0100] 实施例7:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的重复性

[0101] 用两个浓度水平的样本各重复检测10次,计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出变异系数CV。

〔0103〕 式申・

[0104] CV—变异系数:

[0105] SD=10次测量结果的标准差:

[0106] M=10次测量结果的平均值.

[0107] 重复性结果如表3所示,变异系数CV均小于15%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的重复性。

[0108] 表3:NTN-4化学发光酶免疫(CLIA)检测试剂盒的重复性

[0109]

样本定值浓度 T (ng/mL)	平均值 M (ng/mL)	标准差 SD	变异系数 CV
10	10.33	0.73	7.11%
2.5	2.52	0.10	4.06%

[0110] 实施例:8:NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的临床样本检测情况

[0111] 根据NTN-4化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法的检测步骤,选择了30例病人(临床诊断为胃癌),30例正常人(临床诊断为健康人群)的血清样本,进行检测,获得了血清中NTN-4的浓度值,绘制散点图。

[0112] 测定结果图5所示,该试剂盒测定的胃癌病人和正常人的血清中NTN-4的浓度值,具有明显差异性,胃癌病人血清中NTN-4的浓度均值明显高于血清中NTN-4的浓度均值。该试剂盒是一种较好的NTN-4浓度测定试剂盒。

[0113] 本发明公开了NTN-4(NTN-4)的化学发光酶免疫(CLEIA)定量测定试剂盒,试剂盒用于检测胃癌病人血清中的NTN-4蛋白的浓度,适用于胃癌的辅助诊断,对于监测疾病状态、反映治疗疗效、早期发现、癌症复发检查有所裨益。本发明经20%蔗糖保护剂保护的预包被抗NTN-4单克隆抗抗体的化学发光板稳定性达1年。本发明试剂盒的拟合标准曲线相关系数可达 $r=0.9987$,大于0.9900;准确性结果相对偏差为3.06%,小于10%;检测限为0.88ng/mL~100ng/mL;线性考察,浓度值拟合直线的相关系数 $r=0.9996$,相关系数大于0.9900;重复性结果的变异系数CV均小于10%;在应用于临床样本的检测中能够明显的区分正常人和病人。该试剂盒展示了良好的准确性、线性、重复性、最低检测限,具有良好的测定血清中的NTN-4蛋白的浓度的能力,能够作为检测胃癌的辅助诊断。

[0114] 由于肿瘤患者NTN-4过表达,因此肿瘤患者血清中NTN-4浓度显著高于健康人,现有技术的NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒由于检测上限较低,难以提供对于肿瘤患者NTN-4高表达状态时血清NTN-4的准确测定,本发明检测范围为0.88ng/ml~100ng/ml,本发明检测上限为100ng/ml,因此可以满足肿瘤患者样本NTN-4的准确测定。使用本发明的试剂盒,样品上样量仅需10~20uL,远小于现有技术常用的上样量100uL,节约样本;同时,针对试剂盒中价格最为昂贵并且作为产业化应用限速环节的抗体,由于本发明自主研发的单克隆抗体特异性高、效价高,因此本发明包被抗体浓度仅需2.5ug/ml,抗体工作浓度仅为1~1.5pg/ml,从而使得抗体用量大大降低,节约了成本消耗,也同时节省了生产时间。

[0115] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

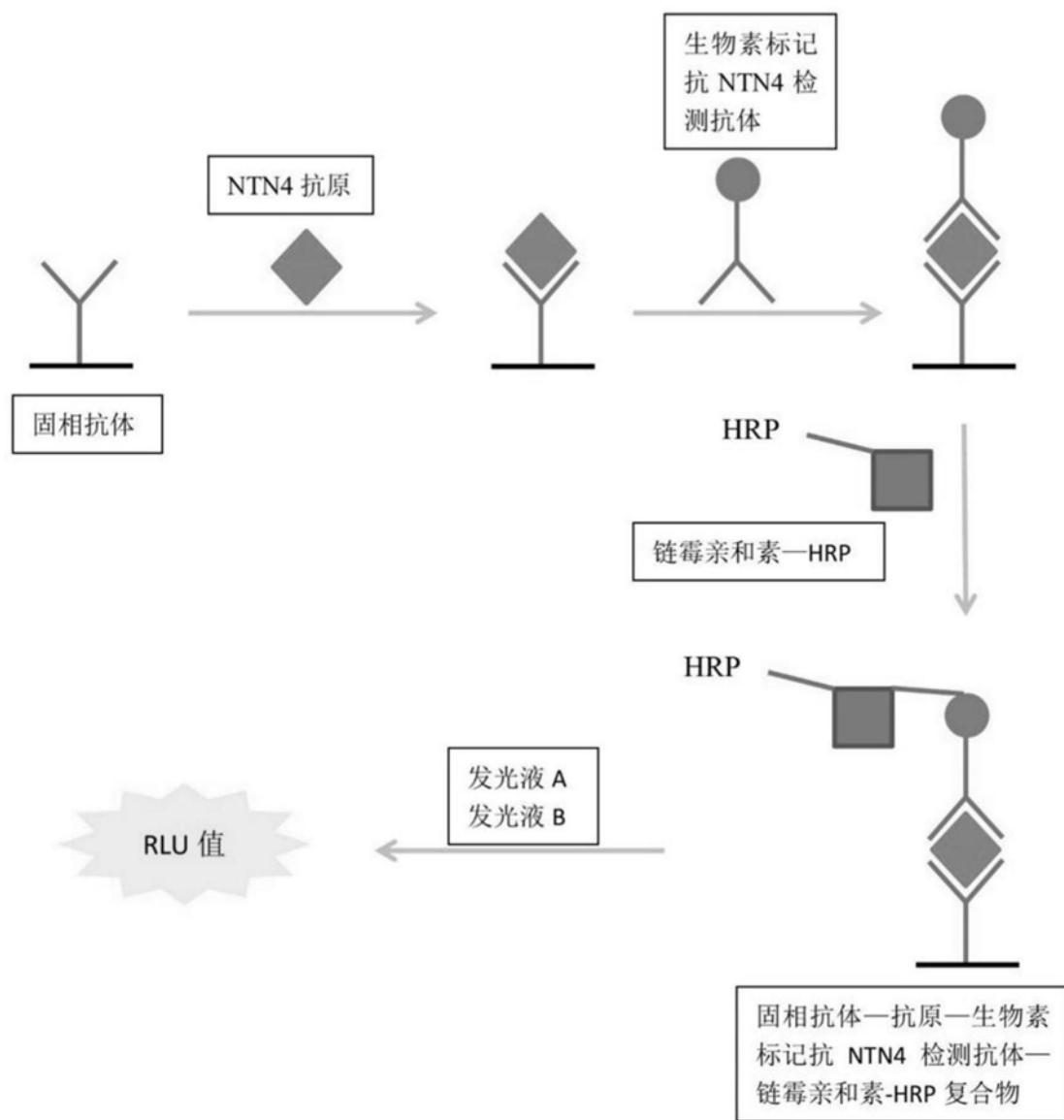


图1

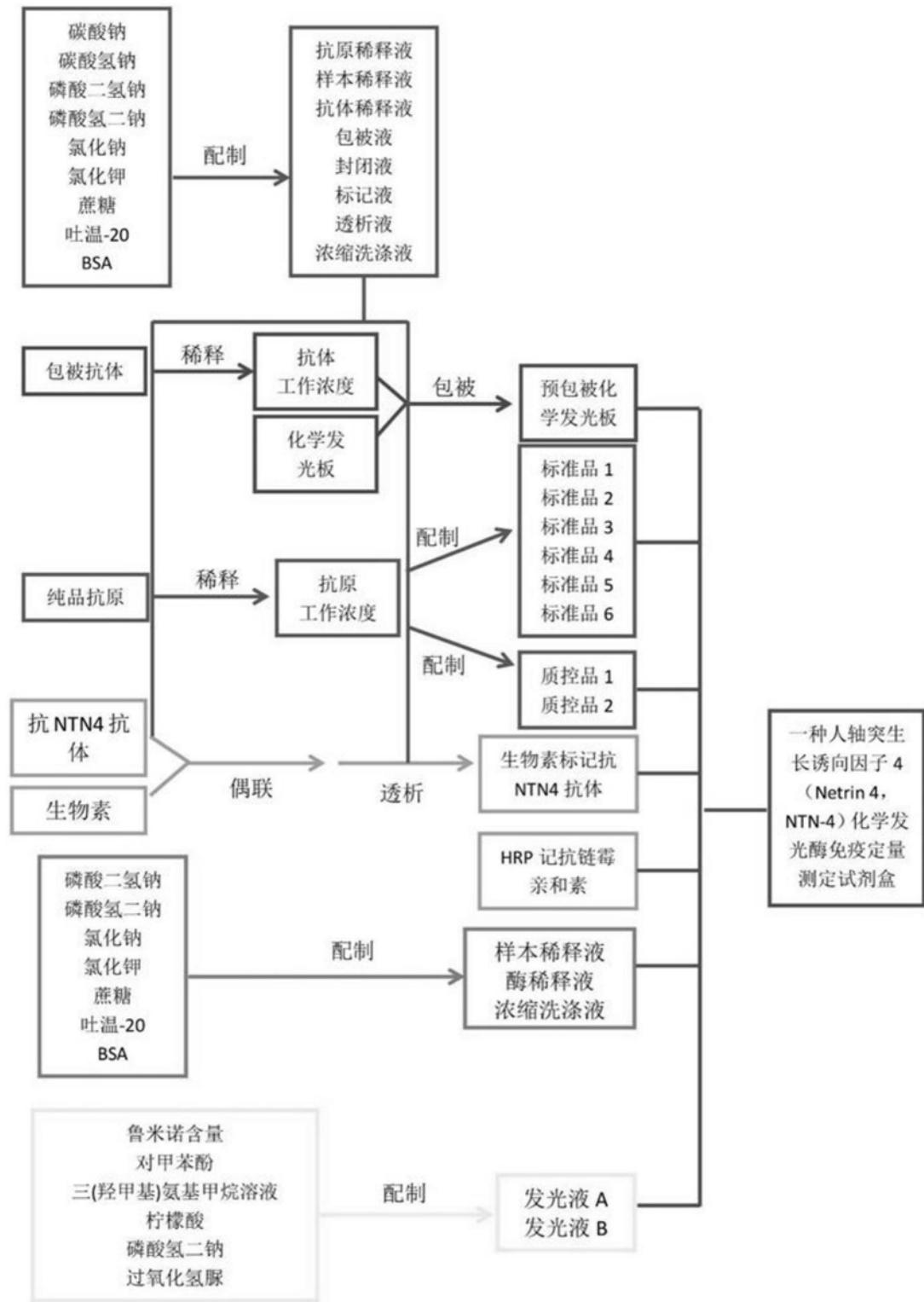


图2

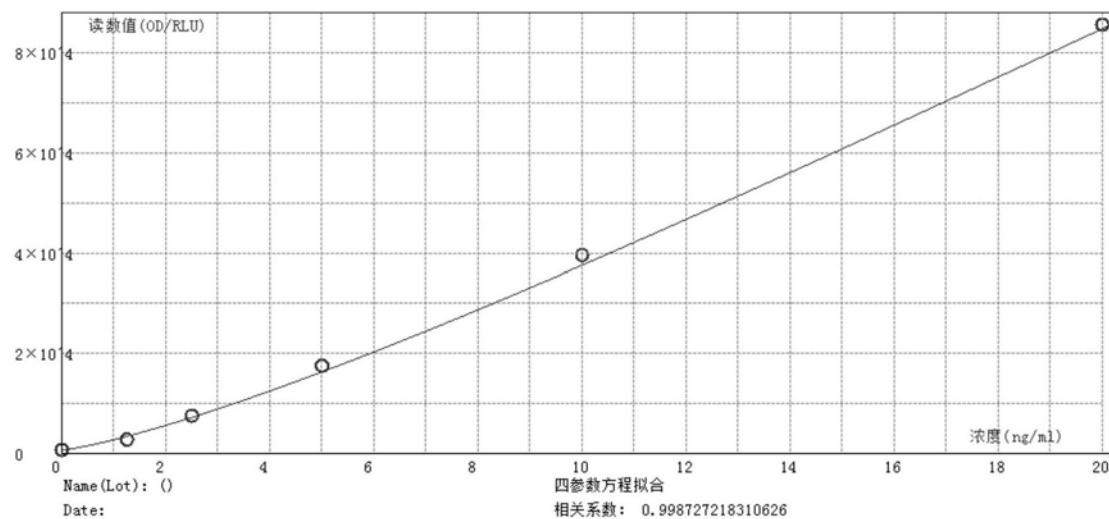


图3

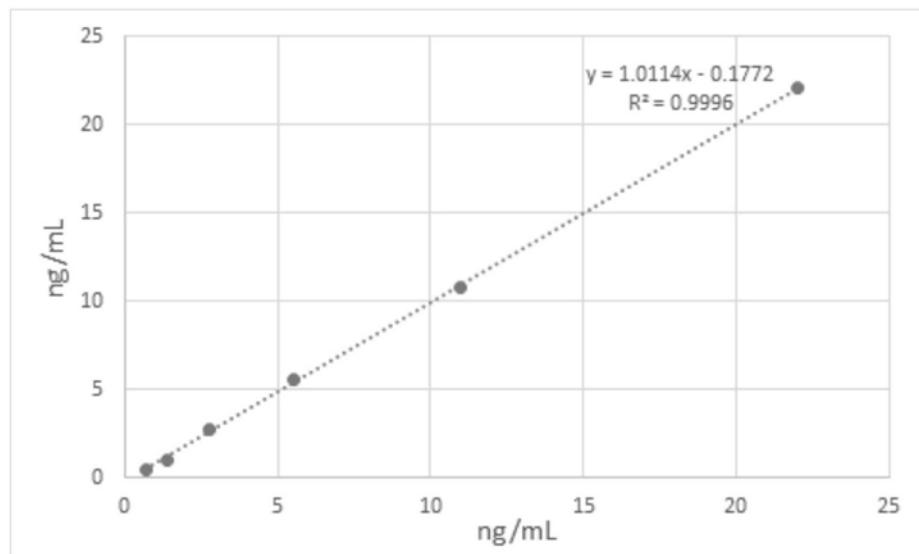


图4

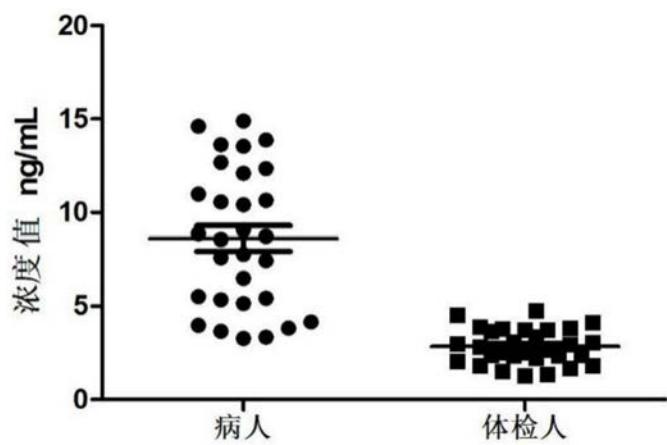


图5

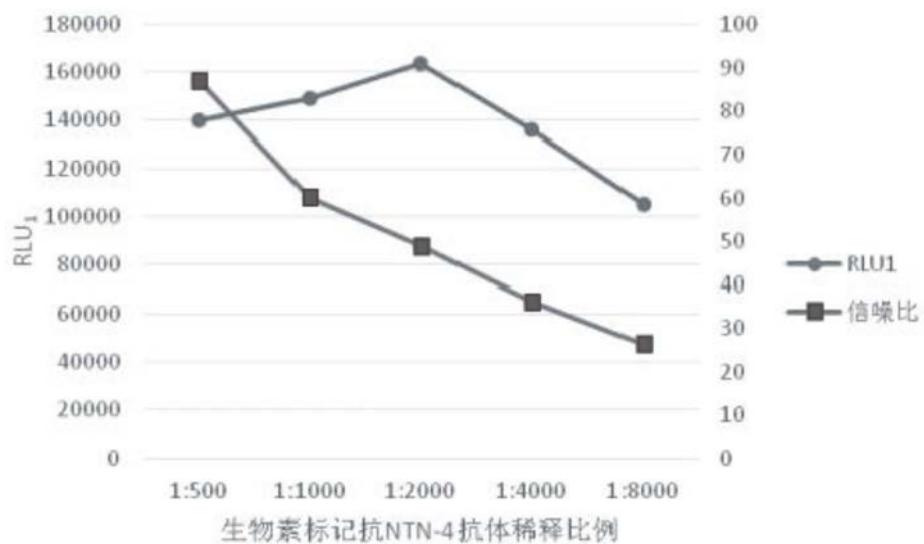


图6

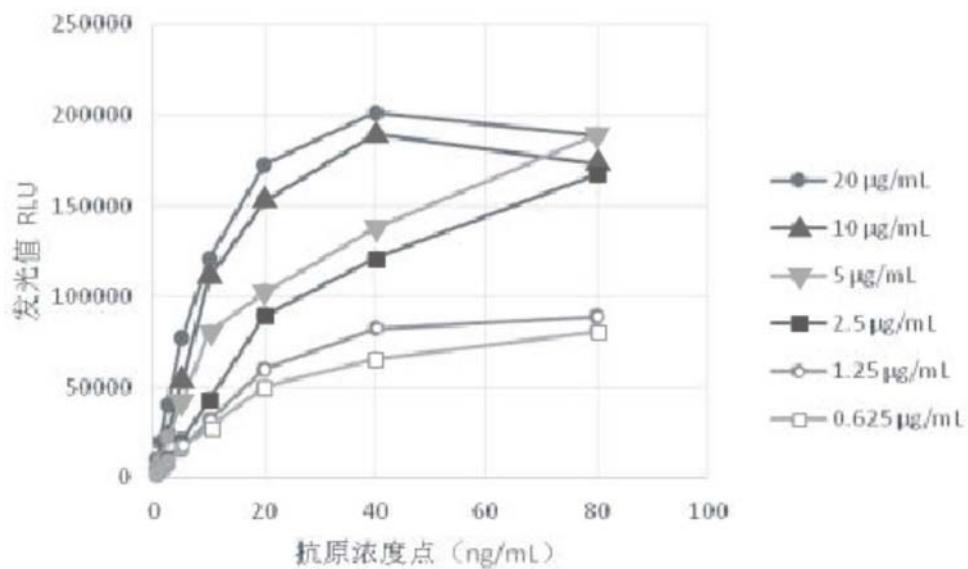


图7

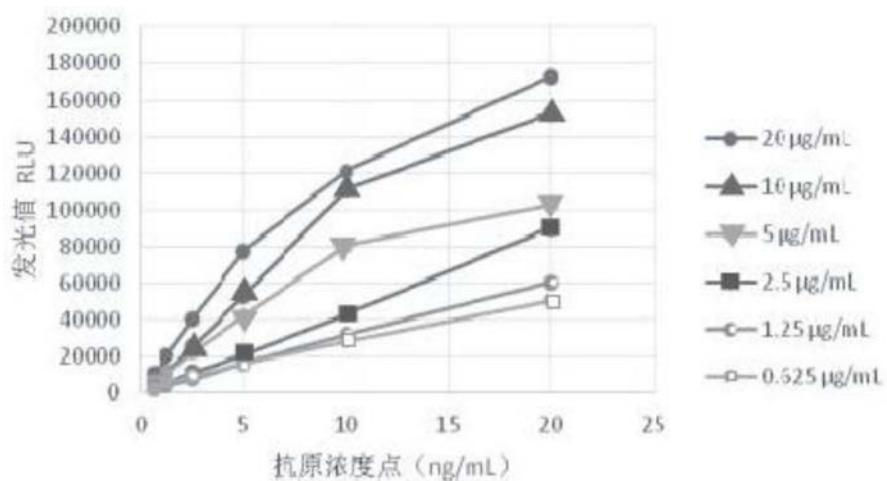


图8

专利名称(译)	一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN108828216A	公开(公告)日	2018-11-16
申请号	CN201810285857.0	申请日	2018-04-03
[标]发明人	王金华 徐恒 陆上苏		
发明人	曲军卫 王金华 徐恒 陆上苏		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/57446 G01N33/532 G01N33/54306		
代理人(译)	王晓东		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种NTN-4化学发光酶免疫定量测定试剂盒及应用，本发明经20%蔗糖保护剂保护的预包被抗NTN-4单克隆抗体的化学发光板稳定性达1年。本发明试剂盒的拟合标准曲线相关系数可达 $r = 0.9987$ ，大于0.9900；准确性结果相对偏差为3.06%，小于10%；检测限为0.88 ng/mL；线性考察，浓度值拟合直线的相关系数 $r = 0.9996$ ，相关系数大于0.9900；重复性结果的变异系数CV均小于10%；在应用于临床样本的检测中能够明显的区分正常人和病人。该试剂盒展示了良好的准确性、线性、重复性、最低检测限，具有良好的测定血清中的NTN-4蛋白的浓度的能力，能够作为检测胃癌的辅助诊断。

