



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103123356 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201210510860. 0

(22) 申请日 2012. 12. 04

(66) 本国优先权数据

201210349597. 1 2012. 09. 20 CN

(73) 专利权人 河南生生医疗器械有限公司

地址 450000 河南省郑州市郑东新区金水东路南、东风东路东 1 幢东 1 单元 8 层 06 号

(72) 发明人 王嘎 程自卿

(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 刘淑芬

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101831490 A, 2010. 09. 15, 全文.

WO 01/42792 A2, 2001. 06. 14, 全文.

Masato Kinugasa 等. Combination Assay
of Urinary β -Core Fragment of Human

Chorionic Gonadotropin with Serum Tumor
Markers in Gynecologic Cancers. 《Jpn. J.
Cancer Res. 》. 1995, 第 86 卷摘要.

Yong-Yuan Xu 等. Simultaneous
Quadruple-Label Fluorometric Immunoassay
of Thyroid-Stimulating Hormone,
17 α -Hydroxyprogesterone, Immunoreactive
Trypsin, and Creatine Kinase MM Isoenzyme
in Dried Blood Spots. 《Clinical
Chemistry》. 1992, 第 38 卷(第 10 期), 摘要,
2039 页左栏第 3 段—2040 页左栏第 3 段.

李敏. 血清肿瘤标志物联合检测对女性恶性
肿瘤诊断价值探讨. 《中外健康文摘》. 2011, 第
8 卷(第 48 期), 摘要、表 1-2, 第 140 页右栏第 2
段.

吕秋波等. 血清 CA125、CA19-9、CEA 及 SCC
水平在子宫内膜癌患者中的诊断意义. 《中国肿
瘤临床》. 2002, 第 29 卷(第 9 期), 第 1. 1-1. 2、
2. 1-2. 2 小节, 第 640 页左栏第 4 段.

张燕. “肿瘤标志物检测在宫颈癌患者诊断与
预后分析中的应用”. 《河北医科大学学报》. 2011,
第 32 卷(第 10 期), 摘要.

审查员 周露露

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

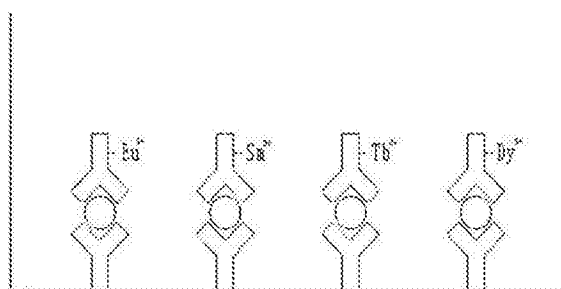
(54) 发明名称

一种时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒
及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物和医学检测技术领域, 具体
涉及一种在同一反应体系内同时综合检测子宫
癌肿瘤标志物 SCC、CEA、CA125、 β -HCG 的时间
分辨荧光免疫检测试剂盒, 同时还涉及该试剂盒
在综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CEA、CA125、
 β -HCG 中的应用. 该试剂盒包括: 分别抗 SCC、
CEA、CA125、 β -HCG 第一株单克隆抗体混合抗体
包被的微孔板; 用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC、 Sm^{3+} 标记的
抗 CEA、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG
第二株单克隆抗体混合抗体; 分析缓冲液; 共用
荧光增强剂; 洗涤液; 质控品. 本发明试剂盒可用

于子宫癌的临床辅助诊断、疗效观察及预后判断,
对子宫癌肿瘤的治疗和预防具有重要意义, 同时
检测四个肿瘤标志物, 简化了检测步骤, 提高了检
测数据综合分析的特异性和灵敏性.



1. 一种时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒,把四种子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 综合在同一微孔的同一反应体系内,采用时间分辨荧光免疫法检测,其特征在于:该试剂盒包括:分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板;用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125、 Sm^{3+} 标记的抗 CEA、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 第二株单克隆抗体混合抗体;分析缓冲液;共用荧光增强剂;洗涤液;质控品;

所述的第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板的制备方法为:把分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 第一株单克隆抗体混合抗体用包被缓冲液稀释,制得抗体包被液,然后向微孔板的每个孔中分别加入 $100\ \mu\text{L}$ 的所述抗体包被液,于 37°C 包被 2 小时,然后用生理盐水冲洗微孔板三次,然后再向微孔板的每个孔中分别加入 $200\ \mu\text{L}$ 的封板液,于室温封闭 2 小时或置于 4°C 环境中过夜,然后用生理盐水冲洗微孔板两次,冷冻干燥,制得第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板;

所述抗体包被液中,分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的第一株单克隆抗体的浓度均为 $0.009 \sim 0.018\text{g/L}$;

所述的用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125、 Sm^{3+} 标记的抗 CEA、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 第二株单克隆抗体混合抗体中,用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC 抗体、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125 抗体、 Sm^{3+} 标记的抗 CEA 抗体、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 抗体的质量配比为: Eu^{3+} 标记的抗 SCC 抗体: Tb^{3+} 标记的抗 CA125 抗体: Sm^{3+} 标记的抗 CEA 抗体: Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 抗体 = $(5 \sim 10):(6 \sim 9):(6 \sim 11):(11 \sim 15)$;

所述共用荧光增强剂的制备方法为:解离部分:将 $70 \sim 200\ \mu\text{mol}$ 的 PTA、 $2 \sim 7\ \mu\text{mol}$ 的氧化钬、 0.6g 的 Triton X-100 和 300ml 的乙醇混合,用水定容至 1 升,用乙酸调 pH 值至 3.5,制得解离部分;增强部分:将 $0.1 \sim 0.4\text{mmol}$ 的邻菲罗啉和 0.2mol 的 Tris 混合,用水定容至 1L,制得增强部分;

所述洗涤液的制备方法为:在浓度为 0.01mol/L 、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入吐温-20,混匀,制得吐温-20 质量百分比浓度为 0.05% 的 PBS 溶液,然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理,制得洗涤液。

2. 根据权利要求 1 所述的时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒,其特征在于:所述质控品为 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 标准品的混合物。

一种时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物和医学检测技术领域,具体涉及一种在同一反应体系内同时综合检测子宫癌肿瘤标志物指标 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的时间分辨荧光免疫检测试剂盒,同时还涉及该试剂盒在综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 中的应用。

背景技术

[0002] 子宫癌是发生在子宫部位的一系列的恶性肿瘤的总称,最为常见的子宫内出现的癌症是子宫内膜癌和子宫颈癌。我国每年新发现的子宫癌病例约为 13.15 万,早期发现治愈率较高。因此,在早期、更加准确的确诊子宫癌依然是治疗该疾病的关键。

[0003] 目前,诊断子宫癌的常用检测指标有 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 等几种。在实际诊断子宫癌时,一般是用 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种指标综合确诊子宫癌,因为四种综合的分析在特异性和敏感度上明显高于单一指标。常规实验室或医疗单位用于检测该四项指标通常采用单一试剂盒,即一个试剂盒针对一种肿瘤标记物的检测,此种方式存在的缺点是:1、检测步骤繁多,费时费力;2、目前四种标记物分别采用四种单指标试剂盒进行检测,然后再进行综合判断,由于不同生产厂家的试剂盒存在差异,且同一厂家的不同试剂盒由于检测的标记物不同可能会存在控制条件、参数的差异而导致检测结果存在误差,此种误差在综合分析四种标记物的特异性和敏感性上会产生较大的影响,可能导致判断结果相差甚远。因此,开发一种能够在相对同一的检测条件下同时检测该四种子宫癌肿瘤标记物的试剂盒,就能降低由于人为原因造成的检测误差,大大提高综合分析检测结果的特异性和敏感性,为下一步的研究或判断做出准确的结论提供更充分的依据。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决现有技术中存在的问题,提供一种在同一反应体系内同时综合检测子宫癌肿瘤标志物指标 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的时间分辨荧光免疫检测试剂盒。

[0005] 本发明的目的还在于提供一种该试剂盒的应用。

[0006] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:一种时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒,把四种子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 综合在同一微孔的同一反应体系内,采用时间分辨荧光免疫法检测,该试剂盒包括:分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板;用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125、 Sm^{3+} 标记的抗 CEA、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 第二株单克隆抗体混合抗体;分析缓冲液;共用荧光增强剂;洗涤液;质控品。

[0007] 其中,所述的第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板的制备方法为:把分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 第一株单克隆抗体混合抗体用包被缓冲液稀释,制得抗体包被液,然后向微孔板的每个孔中分别加入 100 μl 的所述抗体包被液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 小时,然后用生理盐水冲洗微孔板三次,然后再向微孔板的每个孔中分别加入 200 μl 的封板液,于室温

封闭 2 小时或置于 4℃ 环境中过夜,然后用生理盐水冲洗微孔板两次,冷冻干燥,制得第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板。

[0008] 所述抗体包被液中,分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的第一株单克隆抗体的浓度均为 0.009 ~ 0.018g/L。

[0009] 所述的用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125、 Sm^{3+} 标记的抗 CEA、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 第二株单克隆抗体混合抗体中,用 Eu^{3+} 标记的抗 SCC 抗体、 Tb^{3+} 标记的抗 CA125 抗体、 Sm^{3+} 标记的抗 CEA 抗体、 Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 抗体的质量配比为: Eu^{3+} 标记的抗 SCC 抗体: Tb^{3+} 标记的抗 CA125 抗体: Sm^{3+} 标记的抗 CEA 抗体: Dy^{3+} 标记的抗 β -HCG 抗体 = (5 ~ 10):(6 ~ 9):(6 ~ 11):(11 ~ 15)。

[0010] 分析缓冲液的制备方法为:向每升浓度为 0.05mol/L、pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 9g NaCl、0.5g NaN_3 、10g BSA、0.1ml 吐温-40、5g 聚乙二醇,混合均匀,即制得分析缓冲液。

[0011] 所述共用荧光增强剂的制备方法为:解离部分:将 70 ~ 200 μmol 的 PTA、2 ~ 7 μmol 的氧化钼、0.6g 的 Triton X-100 和 300ml 的乙醇混合,用水定容至 1 升,用乙酸调 pH 值至 3.5,制得解离部分;增强部分:将 0.1 ~ 0.4mmol 的邻菲罗啉和 0.2mol 的 Tris 混合,用水定容至 1L,制得增强部分。

[0012] 所述洗涤液的制备方法为:在浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入吐温-20,混匀,制得吐温-20 质量百分比浓度为 0.05% 的 PBS 溶液,然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理,制得洗涤液。

[0013] 所述质控品为 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 标准品的混合物。

[0014] 一种时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒在综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 中的应用。

[0015] 时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒在综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 中的应用,包括以下步骤:

[0016] (1) 用分析缓冲液稀释质控品,制成具有系列浓度梯度包含有 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种标准品的混合溶液;

[0017] (2) 将待测样品与步骤(1)制备的四种标准品混合溶液分别加入抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板的不同孔中,然后再向孔中加入能分别与 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 结合的标记有稀土离子螯合物的第二株单克隆抗体混合抗体,之后加入共用荧光增强剂,进行时间分辨荧光免疫检测,得到发光值;

[0018] (3) 根据测定的具有系列浓度梯度的包含 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种标准品的混合溶液的发光值做标准曲线;

[0019] (4) 以测定的待测样品中的 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 发光值和标准品中 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 各自的标准曲线的发光值做比较,得出待测样品中 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 各自的含量。

[0020] 其中,所述待测样品为人体血清。

[0021] 进一步的,所述包被缓冲液的制备方法为:取浓度为 0.05mol/L、pH 值为 8.6 的碳酸盐缓冲液,然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理,制得包被缓冲液。

[0022] 所述封板液的制备方法为:向浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入

BSA,配制成BSA质量百分比浓度为1%的BSA的PBS缓冲液,然后用质量百分比浓度为0.2%的 NaN_3 溶液防腐处理,制得封板液。

[0023] 本发明提供的试剂盒,采用时间分辨荧光免疫检测方法,实现同时综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的目的。时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)是一种以稀土离子为标记物,根据稀土离子螯合物的发光特点,用时间分辨技术测定特异性荧光的技术方法。TRFIA利用稀土离子的激发光和发射光的波长不同,同时发射光具有长的衰减时间,这样可以有效的排除非特异性荧光的干扰,具有线性范围宽、灵敏度高和稳定性好等优点,另外,可以利用不同的稀土离子的不同的发射光波长和不同的衰减时间,实现同一反应体系内同时检测多个标志物,这样和单个指标分开检测相比可以节约时间、人员、试剂等,这些特点正好适合本发明的同时在同一反应体系内检测多指标。

[0024] 本发明提供的子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 时间分辨荧光免疫检测试剂盒,具有非常好的线性范围,检测 SCC 的线性范围为 $1\text{ng/ml} \sim 90\text{ng/ml}$,检测限为 0.5ng/ml ;检测 CA125 的线性范围为 $25\text{U/ml} \sim 500\text{U/ml}$,检测限为 9U/ml ;检测 CEA 的线性范围为 $2\text{ng/ml} \sim 400\text{ng/ml}$,检测限为 1ng/ml ;检测 β -HCG 的线性范围为 $1\text{mIU/ml} \sim 9000\text{mIU/ml}$,检测限为 0.5mIU/ml 。各检测指标的正常参考值分别为:SCC 为 $0 \sim 2.5\text{ng/ml}$;CA125 为 $0 \sim 35\text{U/ml}$;CEA 为 $0 \sim 6.5\text{ng/ml}$; β -HCG 为 $0 \sim 5\text{mIU/ml}$ 。本发明提供的子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 时间分辨荧光免疫检测试剂盒可用于子宫癌的临床辅助诊断、疗效观察及预后判断,对子宫癌肿瘤的治疗和预防具有重要意义。

[0025] 采用本发明提供的试剂盒可实现在同一反应体系内同时综合检测子宫癌肿瘤标志物四项指标 SCC、CA125、CEA、 β -HCG,检测操作简单,步骤少,所需时间短,方便快捷;检测结果准确,避免了现有的采用四种单项试剂盒分别检测四项指标 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 再进行综合判断而引起的判断误差,大大提高了检测结果的特异性和敏感性,为下一步的研究或判断做出准确的结论提供了可靠依据。

附图说明

[0026] 图1为本发明实施例1提供的试剂盒同一微孔内同一反应体系反应原理示意图;

[0027] 图2为本发明实施例1提供的试剂盒与 Abbott 公司的单指标试剂盒测试 SCC 相关回归分析图;

[0028] 图3为本发明实施例1提供的试剂盒与罗氏公司的单指标试剂盒测试 CA125 相关回归分析图;

[0029] 图4为本发明实施例1提供的试剂盒与 Abbott 公司的单指标试剂盒测试 CEA 相关回归分析图;

[0030] 图5为本发明实施例1提供的试剂盒与 Siemens 公司的单指标试剂盒测试 β -HCG 相关回归分析图。

具体实施方式

[0031] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0032] 实施例1

[0033] 本实施例提供的时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒,包括:抗 SCC 的抗体

H00006317-M01、抗 CA125 的抗体 M32112M、抗 CEA 的抗体 MAM02-008、抗 β -HCG 的抗体 10R-7515 四种单克隆抗体组成的混合抗体包被的微孔板；用 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体（抗 SCC 的抗体）、用 Tb^{3+} 标记的 M86306M 抗体（抗 CA125 的抗体）、用 Sm^{3+} 标记的 MAM02-881 抗体（抗 CEA 的抗体）、用 Dy^{3+} 标记的 10R-7751 抗体（抗 β -HCG 的抗体）四种单克隆抗体组成的混合抗体；分析缓冲液；共用荧光增强剂；洗涤液；SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种标准品混合组成的质控品。该试剂盒还包括阴性对照、阳性对照、底物等其它相关试剂。

[0034] 本实施例提供的试剂盒中，抗 SCC 抗体 H00006317-M01、H00025816-A01 购自 Abnova 公司；抗 β -HCG 抗体 10R-7515、10R-7751 购自 Fitzgerald 公司；抗 CA125 的抗体 M32112M、M86306M 抗体和抗 CEA 的单克隆抗体 MAM02-008、MAM02-881 抗体均购自 Meridian 公司。

[0035] H00006317-M01、M32112M、MAM02-008、10R-7515 四种单克隆抗体组成的混合抗体包被的微孔板的制备方法为：把混合抗体用包被缓冲液稀释，制得混合抗体包被液，混合抗体包被液中，分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的第一株单克隆抗体的浓度均为 0.012g/L，即混合抗体包被液中，抗体 H00006317-M01、M32112M、MAM02-008、10R-7515 的浓度均为 0.012g/L，然后向微孔板的每个孔中分别加入 100 μ l 的混合抗体包被液，于 37℃ 包被 2 小时，然后用生理盐水冲洗微孔板三次，然后再向微孔板的每个孔中分别加入 200 μ l 的封板液，于室温封闭 2 小时，然后用生理盐水冲洗微孔板两次，冷冻干燥，制得混合抗体包被的微孔板，密封于铝箔袋中，4℃ 保存备用。

[0036] 其中，包被缓冲液的制备方法为：取浓度为 0.05mol/L、pH 值为 8.6 的碳酸盐缓冲液，然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理，制得包被缓冲液。封板液的制备方法为：向浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入 BSA，配制成 BSA 质量百分比浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液，然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理，制得封板液。

[0037] 用 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体、用 Tb^{3+} 标记的 M86306M 抗体、用 Sm^{3+} 标记的 MAM02-881 抗体、用 Dy^{3+} 标记的 10R-7751 抗体四种单克隆抗体组成的混合抗体的制备方法为：将 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体、 Tb^{3+} 标记的 M86306M 抗体、 Sm^{3+} 标记的 MAM02-881 抗体、 Dy^{3+} 标记的 10R-7751 抗体以质量比： Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体： Tb^{3+} 标记的 M86306M 抗体： Sm^{3+} 标记的 MAM02-881 抗体： Dy^{3+} 标记的 10R-7751 抗体 = 7:6:11:13 混合，制得混合抗体。

[0038] 其中用 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体、用 Tb^{3+} 标记的 M86306M 抗体、用 Sm^{3+} 标记的 MAM02-881 抗体、用 Dy^{3+} 标记的 10R-7751 抗体的制备方法为：每种抗体的标记流程步骤相同，只是分别抗 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 的抗体分别对应的稀土离子螯合物标记物为 N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Eu、N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Tb、N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Sm、N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Dy。下面以 N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Eu 标记抗 SCC 抗体 H00025816-A01 为例，其具体制备方法和步骤为：

[0039] (1) 标记前应用截留分子量为 50kDa 的离心柱对 H00025816-A01 抗体进行标记前纯化处理，具体步骤如下：悬空加入 1mg H00025816-A01 抗体于 50kDa 的离心柱中，9000rpm 离心 8 分钟，弃掉滤液；往离心柱中加入 200 μ l 标记缓冲液，9000rpm 离心 8 分钟，弃掉滤液，该步骤重复四次，最后一次将离心管取出，弃掉滤液；往离心柱中加入 50 μ l 标记缓冲

液,让其静置 1 分钟,然后将离心柱的滤膜反转装入离心管中,8000rpm 离心 6 分钟,收集滤液,即得到待标记的抗体 H00025816-A01;其中,标记缓冲液为 50mmol/L、pH 值为 9.0 的碳酸盐缓冲液;

[0040] (2) 称取稀土离子螯合物标记物 N 1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Eu 0.2mg,加入 80 μ l 超纯水进行溶解,制成螯合试剂;将螯合试剂加入到盛有待标记抗体 H00025816-A01 的 EP 管中,混合均匀;置于摇床上 4℃ 过夜,制得标记好的抗体 H00025816-A01,即用 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体;

[0041] 用三倍柱体积的 PBS 缓冲液作为柱平衡液平衡 Superdex 2001 $\times$ 30cm 柱,用移液器吸取用 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体缓慢上样,用洗脱液进行洗脱,流速控制在 1ml/min,蛋白检测仪检测到蛋白峰收集样品,将收集的目的产物经过 0.22 μ m 滤膜除菌;用比活度测定方法对标记抗体进行标记率的计算与分析。长期储存标记抗体可以将高纯度的 BSA 加入到标记抗体溶液中,BSA 的终浓度为 0.1%,可置于 4℃ 或 -20℃ 进行保存。

[0042] 分析缓冲液的制备方法为:向每升浓度为 0.05mol/L、pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 9g NaCl、0.5g NaN_3 、10g BSA、0.1ml 吐温 -40、5g 聚乙二醇,混合均匀,即制得分析缓冲液。

[0043] 共用荧光增强剂的制备方法为:解离部分:将 100 μ mol 的 PTA、5 μ mol 的氧化钬、0.6g 的 Triton X-100 和 300ml 的乙醇混合,用水定容至 1 升,用乙酸调 pH 值至 3.5,制得解离部分;增强部分:将 0.3mmol 的邻菲罗啉和 0.2mol 的 Tris 混合,用水定容至 1 升,制得增强部分。

[0044] 洗涤液的制备方法为:在浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入吐温 -20,混匀,制得吐温 -20 质量百分比浓度为 0.05% 的 PBS 溶液,然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理,制得洗涤液。

[0045] 质控品为 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 标准品的混合物。SCC、CA125、CEA、 β -HCG 标准品均购自 Abnova 公司。

[0046] 实施例 2

[0047] 本发明实施例 1 提供的试剂盒在综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 中的应用,即采用本发明实施例 1 提供的试剂盒,同时综合检测子宫癌肿瘤标志物 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 时间分辨荧光免疫检测方法,其反应原理如图 1 所示,采用双抗体夹心法,包括以下步骤:

[0048] (1) 用分析缓冲液稀释 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种蛋白标准品混合物,即质控品,制成具有系列浓度梯度包含有 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种蛋白标准品的混合溶液;

[0049] (2) 分别取 100 μ l 待测样品人体血清和步骤(1)制备的四种蛋白标准品混合溶液,加入 H00006317-M01、M32112M、MAM02-008、10R-7515 四种单克隆抗体组成的混合抗体包被的微孔板的不同孔中,37℃ 温育 1 小时,三次洗涤(洗涤时所用洗涤液的配制方法为:每升 PBS 缓冲液中加入 9g 氯化钠、0.5ml 吐温 -20,摇匀,即可),之后加入 100 μ l 混合标记抗体工作液(用分析缓冲液以体积比 1:3000 稀释混合标记抗体储存液,制得混合标记抗体工作液,每 100 μ l 该混合标记抗体工作液中含有用 Eu^{3+} 标记的 H00025816-A01 抗体 70ng,用 Tb^{3+} 标记的 M86306M 抗体 60ng,用 Sm^{3+} 标记的 MAM02-881 抗体 110ng,用 Dy^{3+} 标记的 10R-7751 抗体 130ng,其余为分析缓冲液),震荡均匀,37℃ 温育 1 小时,用洗涤液洗 5 次,在

吸水纸上控干,加入 200 μ l 共用荧光增强剂的解离部分,震荡 5 分钟,加入 20 μ l 共用荧光增强剂的增强部分,震荡 8 分钟,在时间分辨荧光仪上测量荧光强度,激发光波长为 315nm; 647nm、612nm、544nm、575nm 分别为 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 的最强的发射光峰;500 微秒、200 微秒、50 微秒、20 微秒分别为 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Dy^{3+} 的延迟时间;分别测量各自的发光值。把不同浓度的 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四种蛋白混合标准品中各指标分别和各自的发光值做标准曲线,得到不同指标的各自标准曲线,待测样品人体血清的浓度按标准曲线计算得出。得到试剂盒的精密密度:SCC 分析内和分析间的变异系数分别为 4.5%~6.3%、4.9%~8.5%;CA125 分析内和分析间的变异系数分别为 3.3%~5.4%、4.7%~7.0%;CEA 分析内和分析间的变异系数分别为 4.6%~6.7%、4.9%~8.5%; β -HCG 分析内和分析间的变异系数分别为 3.2%~5.5%、4.2%~7.7%。

[0050] 实施例 3

[0051] 用本发明的试剂盒检测 35 份血清样本得到的 SCC、CA125、CEA、 β -HCG 四个指标的数值和用同样的 35 份血清样本分别用 Abbott 公司的单指标试剂盒测试 SCC、罗氏公司的单指标试剂盒测试 CA125、Abbott 公司的单指标试剂盒测试 CEA、Siemens 公司的单指标试剂盒测试 β -HCG 所得到的数据分别做回归相关性分析,分别对应附图 2、3、4、5,从附图可以看出,本发明试剂盒测试得到的各指标数据和分别用单指标试剂盒测试得到的数据具有很好的相关性。

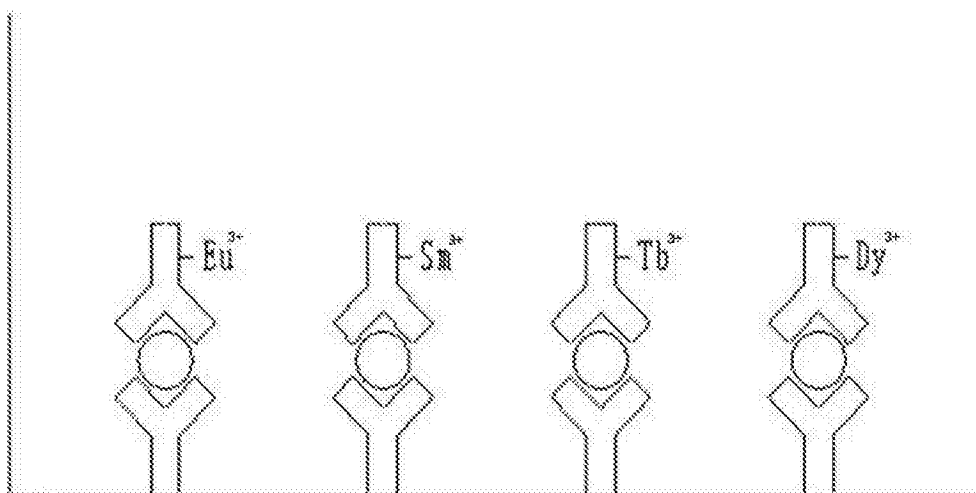
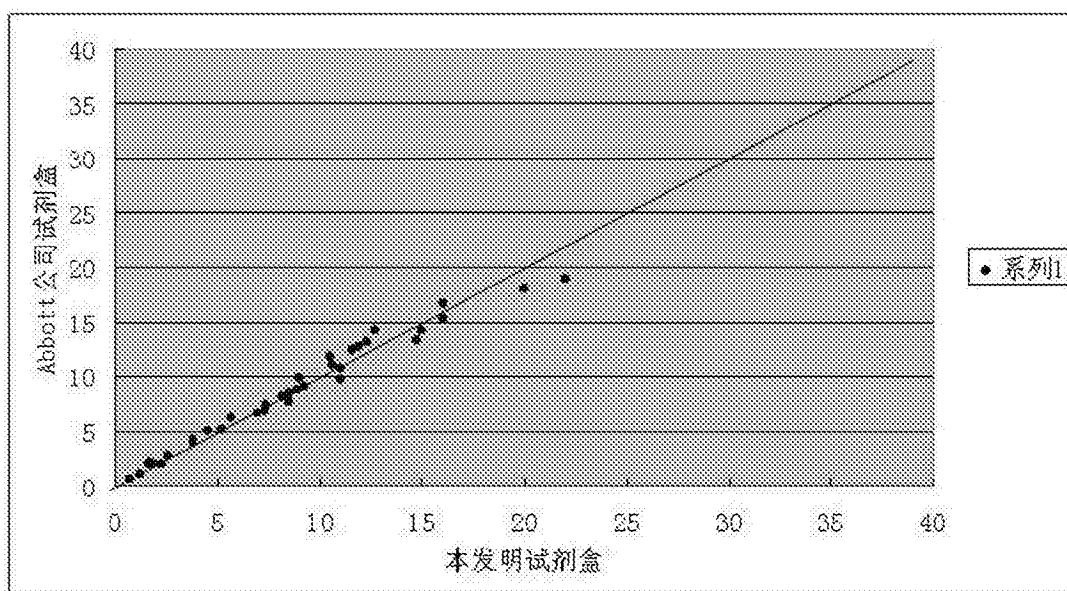


图 1



$R=0.987$ $P<0.05$

图 2

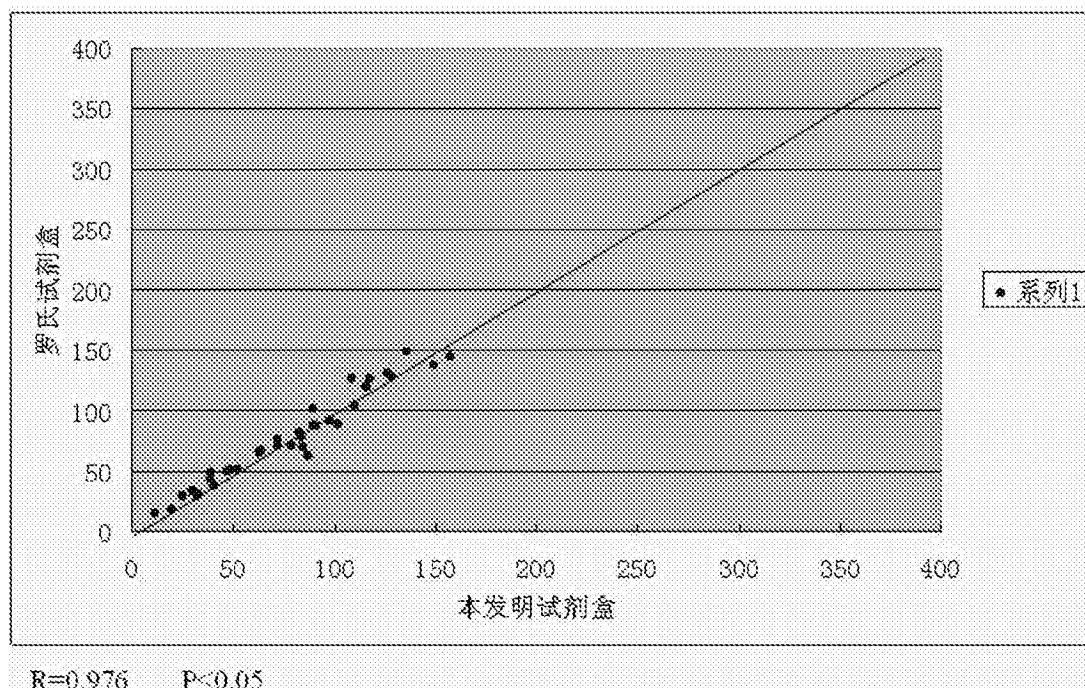


图 3

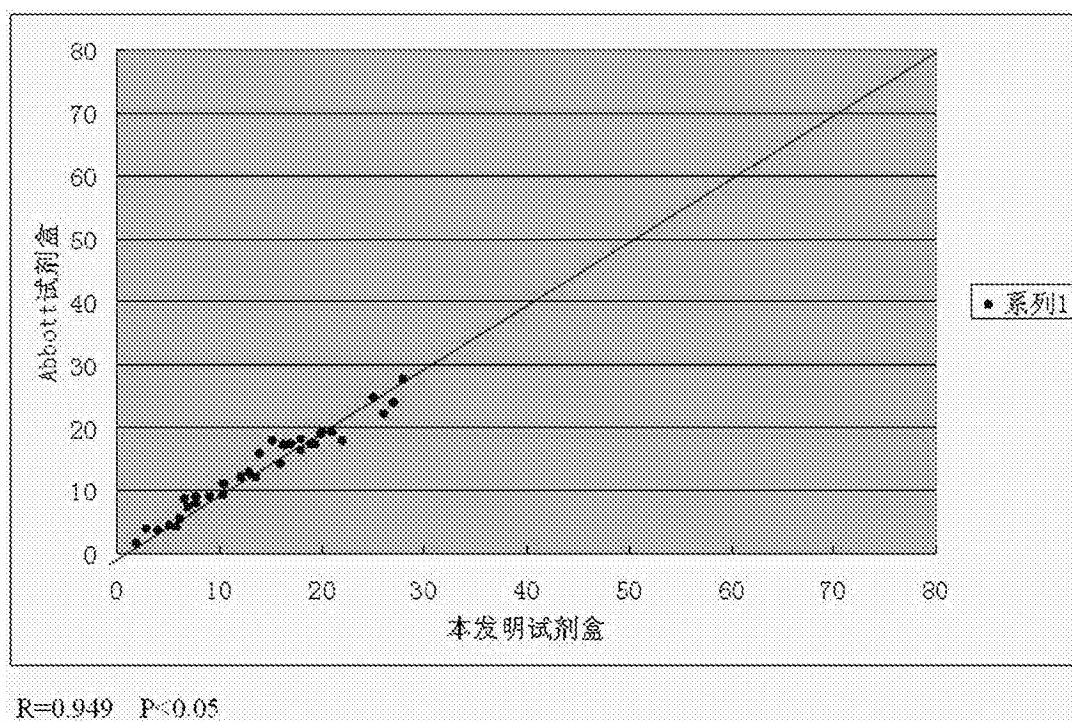


图 4

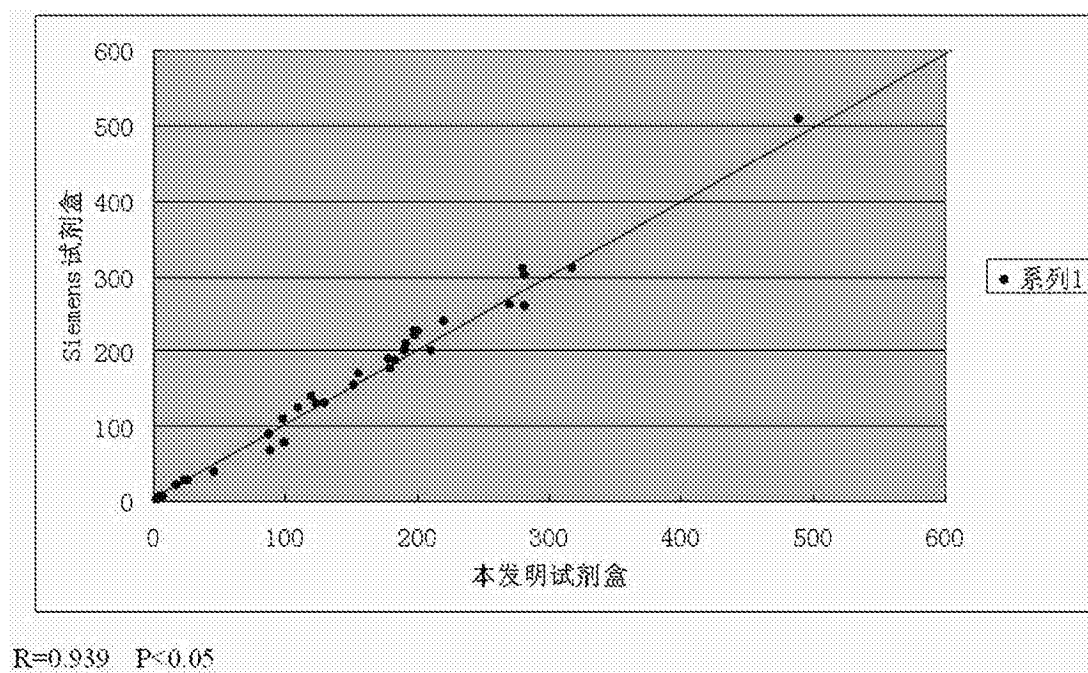


图 5

专利名称(译)	一种时间分辨荧光法综合检测子宫癌试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN103123356B	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201210510860.0	申请日	2012-12-04
[标]发明人	王嘎 程自卿		
发明人	王嘎 程自卿		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	刘淑芬		
审查员(译)	周露露		
优先权	201210349597.1 2012-09-20 CN		
其他公开文献	CN103123356A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物和医学检测技术领域，具体涉及一种在同一反应体系内同时综合检测子宫癌肿瘤标志物SCC、CEA、CA125、 β -HCG的时间分辨荧光免疫检测试剂盒，同时还涉及该试剂盒在综合检测子宫癌肿瘤标志物SCC、CEA、CA125、 β -HCG中的应用。该试剂盒包括：分别抗SCC、CEA、CA125、 β -HCG第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板；用Eu³⁺标记的抗SCC、Sm³⁺标记的抗CEA、Tb³⁺标记的抗CA125、Dy³⁺标记的抗 β -HCG第二株单克隆抗体混合抗体；分析缓冲液；共用荧光增强剂；洗涤液；质控品。本发明试剂盒可用于子宫癌的临床辅助诊断、疗效观察及预后判断，对子宫癌肿瘤的治疗和预防具有重要意义，同时检测四个肿瘤标志物，简化了检测步骤，提高了检测数据综合分析的特异性和灵敏性。

