



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103033623 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201210533766. 7

(22) 申请日 2012. 12. 10

(71) 申请人 天津市协和医药科技集团有限公司
地址 300192 天津市南开区白堤路 238 号

(72) 发明人 王立凯 潘学继 黄丽娟 单存海
曹青 洪宇霞

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代
理事务所 12201

代理人 陆艺

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂
盒及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人 M2 型丙酮酸激酶化学
发光免疫分析试剂盒及制备方法,所述试剂盒包
括以下组份:M2 型丙酮酸激酶标准品;包被有 M2
型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒;辣根过氧化
物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体;化学发
光底物 A 和 B;白色不透明微孔板;洗涤液;本发
明试剂盒可以准确定量检测病人血清中 M2-PK 的
含量,对于肺癌等恶性肿瘤的检测具有重要的指
导意义,与传统的 ELISA 方法相比,本发明灵敏度
高,特异性好,线性范围宽,且稳定性、可靠性和准
确度高,安全环保,操作简便。

1. 一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,其特征包括以下组份:

- ① M2 型丙酮酸激酶标准品;
- ② 包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒;
- ③ 辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体;
- ④ 化学发光底物 A 和 B;
- ⑤ 白色不透明微孔板;
- ⑥ 洗涤液;

其中,所述包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒经过以下步骤制备:

① 取 2.0ml 质量含量为 2.5% 的磁颗粒悬浮液,磁板分离弃上清,用 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液洗磁颗粒一次;所述磁颗粒悬浮液中的液体是 0.05mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;

② 将 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液与步骤①获得的磁颗粒混合使总体积为 2.0 ~ 5.0ml;

③ 加入 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,于摇床上匀化 10 ~ 20 分钟;

④ 加入 4.0 ~ 10.0mg 碳二亚胺,于摇床上匀化 16 ~ 20 小时;

⑤ 用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次;

⑥ 加入 Tris-EDTA 缓冲液,调节总体积至 2.0ml,置于 2 ~ 4℃ 保存。

2. 根据权利要求 1 所述的一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,其特征在在于所述辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体是用下述方法制备:

① 取 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,加入 0.5 ~ 1.0ml 浓度为 0.02mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,2 ~ 4℃ 保存;

② 取 10.0mg 的辣根过氧化物酶,加入 2.0ml 去离子水溶解,取出 0.5 ~ 1.0ml,加入 0.2ml 浓度为 0.1mol/L 的 NaIO_4 水溶液,室温下避光反应 0.5 ~ 1.5 小时;

③ 将步骤①与②获得的液体混合,室温下避光反应 4 ~ 6 小时;

④ 向步骤③获得的溶液中加入 0.1ml 浓度为 3mg/ml 的 NaBH_4 水溶液,室温下避光反应 1 ~ 2 小时;

⑤ 用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 16 ~ 24 小时,再用 HPLC 进行二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油后于 -20℃ 下冷冻保存。

3. 根据权利要求 1 所述的一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,其特征在在于所述化学发光底物 A 是用下述方法制成:

① 配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

② 将 5 ~ 10mmol 鲁米诺加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4℃ 避光保存。

4. 根据权利要求 1 所述的一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,其特征在在于所述化学发光底物 B 是用下述方法制成:

① 配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

② 将 0.6 ~ 1.0mmol 四苯硼钠、1.5mmol 铁氰化钾、1.0mmol 肉桂酸、10.0mmol 过氧化氢加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4℃ 保存。

5. 根据权利要求 1 所述的一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,其特征在

于所述洗涤液由下述方法制成：

取 6.05g 三羟甲基氨基甲烷、8.5g NaCl、1.0ml Tween-20，加去离子水至 1L，溶解后用 HCl 调 pH 至 7.5。

人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析及医学检验技术领域,具体的,本发明涉及一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 癌症是目前威胁人类健康的主要致死疾病之一,癌症已超过心脑血管疾病成为致死原因的第一位的疾病,严重危害着人民健康和生命安全,且有逐年上升的趋势。癌症的最佳治疗时期在癌细胞转移前,此时可通过手术或药物治疗将其彻底清除。因此早期发现早期治疗至关重要。绝大多数癌症早期患者并无任何症状,很难被发现。因此只有建立准确可靠的早期检测方法,通过体检筛查才能发现早期病变,才有可能及时采取有效的治疗措施,免疫分析技术为这种早期筛查提供了可能。近年来研究发现,M2 型丙酮酸激酶(M2Pyruvate Kinase,M2-PK)在肺癌等癌症诊断、动态监测、抗癌疗效评价及预后判断中具有广泛的应用价值。

[0003] M2 型丙酮酸激酶是一种新发现的肿瘤标志物,作为肺癌新的特异性标记物来探讨其在肺癌诊断、动态监测 / 抗肺癌疗效评价及预后评估等方面的作用,已成为国内外肺癌研究的热点。丙酮酸激酶是糖酵解途径的一个关键酶,在三磷酸核苷的合成过程中也起决定性作用。PK 有两种结构基因(L 基因、M 基因)和四种同工酶分别为 L 型、R 型、M1 型、M2 型,这 4 种同工酶的分布具有组织特异性,常以酶的活性四聚体形式存在。当肿瘤发生时往往先表现为 PK 的组织特异性同工酶(如肌肉及脑中的 M1-PK)表达减少,随之发生 M2-PK 同工酶的表达上调,酶从传统的四聚体型转变成二聚体型,在肿瘤细胞中呈过度表达。所以称这种 M2-PK 为肿瘤 M2-PK 或 TU M2-PK, M2-PK 能在体液中被大量监测到。肿瘤发生时往往伴随二聚体型 M2-PK 含量的增加,在有足够氧气供应的实体瘤(如肺癌)中,谷氨酸酵解提供大量的丙酮酸,这些谷氨酸酵解和糖酵解中产生的丙酮酸用来合成乳酸、谷氨酸和脂肪酸,从而释放出糖酵解过程中甘油醛 3-磷酸脱氢酶作用下产生的氢,以保证肿瘤细胞中能量的供给,可见在肿瘤新陈代谢中发挥着极其重要的作用。Oremek G 等用健康对照 195 例,新确诊的不同病理类型的肺癌患者 140 例为对象,检测血浆中 TU M2-PK 的水平。研究显示,肿瘤患者的 TU M2-PK 水平比对照组明显升高,且特异性为 95%,在小细胞肺癌为 78%,腺癌和非小细胞肺癌分别为 73% 和 85%。

[0004] 目前对 M2-PK 的检测方法主要有 ELISA 法和胶体金法,如德国 SCHEBO BIOTEO 公司建立了一种可以检测患者血浆中 M2-PK 的酶联免疫方法。该方法具有简便快捷和无污染等优点,但与化学发光技术相比具有灵敏度不够高、线性范围窄等缺点。

[0005] 复旦大学附属肿瘤医院公开了《一种检测肿瘤型 M2 丙酮酸激酶的试剂盒及其制备方法》,该试剂盒采用胶体金测定技术,在测定区包被抗人肿瘤型 M2 丙酮酸激酶抗体,参比区包被抗鼠 IgG 或抗原液;对肿瘤型 M2 丙酮酸激酶进行半定量分析测定,10 分钟内完成测试。胶体金试剂盒便于携带和保存,操作简便,快速,但是准确性较差,无法进行精确定量测定。深圳市安群生物工程有限公司公开了一种《人肿瘤 M2 型丙酮酸激酶抗原决定簇多

肽、抗体及其在诊断试剂盒上的应用》的发明专利,该发明主要是制备人肿瘤 M2 型丙酮酸激酶抗原决定簇多肽和多克隆抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种灵敏度高,检测时间短,特异性好,稳定可靠的人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒。

[0007] 本发明的技术方案概述如下:

[0008] 一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,包括以下组份:

[0009] ① M2 型丙酮酸激酶标准品;

[0010] ② 包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒;

[0011] ③ 辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体;

[0012] ④ 化学发光底物 A 和 B;

[0013] ⑤ 白色不透明微孔板;

[0014] ⑥ 洗涤液;

[0015] 其中,所述包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒经过以下步骤制备:

[0016] ① 取 2.0ml 质量含量为 2.5% 的磁颗粒悬浮液,磁板分离弃上清,用 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液洗磁颗粒一次;所述磁颗粒悬浮液中的液体是 0.05mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;

[0017] ② 将 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液与步骤①获得的磁颗粒混合,使总体积为 2.0 ~ 5.0ml;

[0018] ③ 加入 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,于摇床上匀化 10 ~ 20 分钟;

[0019] ④ 加入 4.0 ~ 10.0mg 碳二亚胺,于摇床上匀化 16 ~ 20 小时;

[0020] ⑤ 用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次;

[0021] ⑥ 加入 Tris-EDTA 缓冲液,调节总体积至 2.0ml,置于 2 ~ 4°C 保存。

[0022] 所述辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体是用下述方法制备:

[0023] ① 取 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,加入 0.5 ~ 1.0ml 浓度为 0.02mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,2 ~ 4°C 保存;

[0024] ② 取 10.0mg 的辣根过氧化物酶,加入 2.0ml 去离子水溶解,取出 0.5 ~ 1.0ml,加入 0.2ml 浓度为 0.1mol/L 的 NaIO_4 水溶液,室温下避光反应 0.5 ~ 1.5 小时;

[0025] ③ 将步骤①与②获得的液体混合,室温下避光反应 4 ~ 6 小时;

[0026] ④ 向步骤③获得的溶液中加入 0.1ml 浓度为 3mg/ml 的 NaBH_4 水溶液,室温下避光反应 1 ~ 2 小时;

[0027] ⑤ 用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 16 ~ 24 小时,再用 HPLC 进行二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油后于 -20°C 下冷冻保存。

[0028] 所述化学发光底物 A 是用下述方法制成:

[0029] ① 配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

[0030] ② 将 5 ~ 10mmol 鲁米诺加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4°C 避光保存。

[0031] 所述化学发光底物 B 是用下述方法制成:

- [0032] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0033] ②将 0.6 ~ 1.0mmol 四苯硼钠、1.5mmol 铁氰化钾、1.0mmol 肉桂酸、10.0mmol 过氧化氢加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中，混匀，2 ~ 4℃ 保存。
- [0034] 所述洗涤液由下述方法制成：
- [0035] 取 6.05g 三羟甲基氨基甲烷、8.5g NaCl、1.0ml Tween-20，加去离子水至 1L，溶解后用 HCl 调 pH 至 7.5。
- [0036] M2 型丙酮酸激酶标准品的配制
- [0037] 将 0.02mol/L，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液与胎牛血清按体积比 4:1 的比例混合配制成基础缓冲液，用基础缓冲液将 M2 型丙酮酸激酶抗原稀释成浓度为 0、2.5U/mL、6.4U/mL、16U/mL、40U/mL、100U/mL 的标准品。
- [0038] 本发明的优点
- [0039] 本发明试剂盒可以准确定量检测病人血清中 M2-PK 的含量，对于肺癌等恶性肿瘤的检测具有重要的指导意义，与传统的 ELISA 方法相比，本发明灵敏度高，特异性好，线性范围宽，且稳定性、可靠性和准确度高，安全环保，操作简便。

附图说明

- [0040] 图 1M2-PK 试剂盒(实施例 1) 标准曲线。

具体实施方式

- [0041] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。
- [0042] 实施例 1
- [0043] 人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒，包括以下组份：
- [0044] ① M2 型丙酮酸激酶标准品；
- [0045] ② 包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒；
- [0046] ③ 辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体；
- [0047] ④ 化学发光底物 A 和 B；
- [0048] ⑤ 白色不透明微孔板；
- [0049] ⑥ 洗涤液；
- [0050] 其中，所述包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒经过以下步骤制备：
- [0051] ① 取 2.0ml 质量含量为 2.5% 的磁颗粒悬浮液，磁板分离弃上清，用 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液洗磁颗粒一次；所述磁颗粒悬浮液中的液体是 0.05mol/L，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液；
- [0052] ② 将 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液与步骤①获得的磁颗粒混合使总体积为 2.0ml；
- [0053] ③ 加入 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体，于摇床上匀化 10 分钟；
- [0054] ④ 加入 4.0mg 碳二亚胺，于摇床上匀化 16 小时；
- [0055] ⑤ 用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；
- [0056] ⑥ 加入 Tris-EDTA 缓冲液(Tris0.05mol/L，EDTA0.005mol/L，BSA0.1%，Proclin3001.0mL/L，pH=7.5)，调节总体积至 2.0ml，置于 2 ~ 4℃ 保存。

[0057] 所述辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体是用下述方法制备：

[0058] ①取 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体，加入 0.5ml 浓度为 0.02mol/L，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解，2 ~ 4℃ 保存；

[0059] ②取 10.0mg 的辣根过氧化物酶，加入 2.0ml 去离子水溶解，取出 0.5ml，加入 0.2ml 浓度为 0.1mol/L 的 NaIO₄ 水溶液，室温下避光反应 0.5 小时；

[0060] ③将步骤①与②获得的液体混合，室温下避光反应 4 小时；

[0061] ④向步骤③获得的溶液中加入 0.1ml 浓度为 3mg/ml 的 NaBH₄ 水溶液，室温下避光反应 1 小时；

[0062] ⑤用 0.02mol/L，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 16 小时，再用 HPLC 进行二次纯化，收集蛋白峰，加入等体积甘油后于 -20℃ 下冷冻保存；

[0063] 所述化学发光底物 A 是用下述方法制成：

[0064] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0065] ②将 5mmol 鲁米诺加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中，混匀，2 ~ 4℃ 避光保存。

[0066] 所述化学发光底物 B 是用下述方法制成：

[0067] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0068] ②将 0.6mmol 四苯硼钠、1.5mmol 铁氰化钾、1.0mmol 肉桂酸、10.0mmol 过氧化氢加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中，混匀，2 ~ 4℃ 保存。

[0069] 所述洗涤液由下述方法制成：

[0070] 取 6.05g 三羟甲基氨基甲烷、8.5g NaCl、1.0ml Tween-20，加去离子水至 1L，溶解后用 HCl 调 pH 至 7.5。

[0071] M2 型丙酮酸激酶标准品的配制

[0072] 将 0.02mol/L，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液与胎牛血清按体积比 4:1 的比例混合配制成基础缓冲液，用基础缓冲液将 M2 型丙酮酸激酶抗原稀释成浓度为 0、2.5U/mL、6.4U/mL、16U/mL、40U/mL、100U/mL 的标准品。

[0073] 实施例 2

[0074] 人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒，包括以下组份：

[0075] ① M2 型丙酮酸激酶标准品；

[0076] ② 包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒；

[0077] ③ 辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体；

[0078] ④ 化学发光底物 A 和 B；

[0079] ⑤ 白色不透明微孔板；

[0080] ⑥ 洗涤液；

[0081] 其中，所述包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒经过以下步骤制备：

[0082] ① 取 2.0ml 质量含量为 2.5% 的磁颗粒悬浮液，磁板分离弃上清，用 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液洗磁颗粒一次；所述磁颗粒悬浮液中的液体是 0.05mol/L，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液；

[0083] ② 将 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液与步骤①获得的磁颗粒混合使总体积为 3.0ml；

- [0084] ③加入 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,于摇床上匀化 15 分钟;
- [0085] ④加入 7.0mg 碳二亚胺,于摇床上匀化 18 小时;
- [0086] ⑤用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次;
- [0087] ⑥ 加入 Tris-EDTA 缓冲液(Tris0.05mol/L, EDTA0.005mol/L, BSA0.1%, Proclin3001.0mL/L, pH=7.5),调节总体积至 2.0ml,置于 2 ~ 4℃ 保存;
- [0088] 所述辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体是用下述方法制备:
- [0089] ①取 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,加入 0.8ml 浓度为 0.02mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,2 ~ 4℃ 保存;
- [0090] ②取 10.0mg 的辣根过氧化物酶,加入 2.0ml 去离子水,溶解后取出 0.8ml,加入 0.2ml 浓度为 0.1mol/L 的 NaIO₄ 溶液,密封后于室温下避光反应 1.0 小时;
- [0091] ③将步骤①与②获得的液体混合,室温下避光反应 5 小时;
- [0092] ④向步骤③获得的溶液中加入 0.1ml 浓度为 3mg/ml 的 NaBH₄ 溶液,室温下避光反应 1.5 小时;
- [0093] ⑤用 0.02mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 20 小时,再用 HPLC 进行二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油后于 -20℃ 下冷冻保存;
- [0094] 所述化学发光底物 A 是用下述方法制成:
- [0095] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;
- [0096] ②将 8mmol 鲁米诺加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4℃ 避光保存;化学发光底物 B 工作液的配制:
- [0097] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;
- [0098] ②将 0.8mmol 四苯硼钠、1.50mmol 铁氰化钾、1.0mmol 肉桂酸、10.0mmol 过氧化氢加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4℃ 保存。
- [0099] 洗涤液和 M2 型丙酮酸激酶标准品的配制同实施例 1。
- [0100] 实施例 3:
- [0101] 人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒,包括以下组份:
- [0102] ① M2 型丙酮酸激酶标准品;
- [0103] ② 包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒;
- [0104] ③ 辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体;
- [0105] ④ 化学发光底物 A 和 B;
- [0106] ⑤ 白色不透明微孔板;
- [0107] ⑥ 洗涤液;
- [0108] 其中,所述包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒经过以下步骤制备:
- [0109] ①取 2.0ml 质量含量为 2.5% 的磁颗粒悬浮液,磁板分离弃上清,用 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液洗磁颗粒一次;所述磁颗粒悬浮液中的液体是 0.05mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液;
- [0110] ②用 0.02mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液与步骤①获得的磁颗粒混合使总体积为 5.0ml;
- [0111] ③加入 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,于摇床上匀化 20 分钟;
- [0112] ④加入 10.0mg 碳二亚胺,于摇床上匀化 20 小时;

- [0113] ⑤用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；
- [0114] ⑥ 加入 Tris-EDTA 缓冲液(Tris0.05mol/L, EDTA0.005mol/L, BSA0.1%, Proclin3001.0mL/L, pH=7.5),调节总体积至 2.0ml,置于 2 ~ 4℃保存待用。
- [0115] 所述辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体是用下述方法制备：
- [0116] ①取 2.0mg M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体,加入 1.0ml 浓度为 0.02mol/L, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,2 ~ 4℃保存；
- [0117] ②取 10.0mg 的辣根过氧化物酶,加入 2.0ml 去离子水,溶解后取出 1.0ml,加入 0.2ml 浓度为 0.1mol/L 的 NaIO₄ 溶液,密封后于室温下避光反应 1.5 小时；
- [0118] ③将步骤①与②获得的液体混合,室温下避光反应 6 小时；
- [0119] ④向步骤③获得的溶液中加入 0.1ml 浓度为 3mg/ml 的 NaBH₄ 水溶液,室温下避光反应 2 小时；
- [0120] ⑤用 0.02mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 24 小时,再用 HPLC 进行二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油后于 -20℃下冷冻保存；
- [0121] 化学发光底物 A 工作液的配制：
- [0122] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0123] ②将 10mmol 鲁米诺加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4℃避光保存；
- [0124] 化学发光底物 B 工作液的配制：
- [0125] ①配制 0.02mol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0126] ②将 1.0mmol 四苯硼钠、1.50mmol 铁氰化钾、1.0mmol 肉桂酸、10.0mmol 过氧化氢加入到 1000ml 步骤①所述的缓冲液中,混匀,2 ~ 4℃保存。
- [0127] 洗涤液和 M2 型丙酮酸激酶标准品的配制同实施例 1。
- [0128] 实施例 4
- [0129] 一种人 M2 型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒实验操作程序(以实施例 1 试剂盒为例)如下：
- [0130] ①将实验所需试剂及人血清样品放置室温,平衡 20 分钟以上才可进行实验操作；
- [0131] ②取白色不透明微孔板(96 孔)进行编号,所有 M2 型丙酮酸激酶标准品及人血清样品均做双孔重复；
- [0132] ③取各个浓度的标准品和样品 50 μl 分别加入相应编号的孔中；
- [0133] ④将辣根过氧化物酶标记的 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体用标记物缓冲液(0.05mol/L 磷酸盐缓冲液, pH=7.4, NaCl8.5g/L, BSA0.5%, Proclin3001.0mL/L, Tween-200.5mL/L)按 1:5000 稀释,再将其取 50 μl 分别加入到各孔；
- [0134] ⑤将包被有 M2 型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒用磷酸盐-BSA 缓冲液(0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, pH=7.4, BSA0.2%, Proclin3001.0mL/L)按 1:150 稀释得磁颗粒悬浮液；每孔各加入 50 μl 磁颗粒悬浮液,充分混匀,室温振荡 40 分钟；
- [0135] ⑥将其放在磁板上吸附磁颗粒,吸去上清液；
- [0136] ⑦去除磁板,每孔均各加入 300 μl 洗涤液；
- [0137] ⑧振荡 10 秒后,将其放在磁板上吸附磁颗粒,吸去上清液；
- [0138] ⑨重复一遍步骤⑦、⑧；

[0139] ⑩将化学发光底物 A 与 B 工作液等体积混合后,每孔各加入 100 μ l 混合液;

[0140] ⑪用化学发光仪测定每孔的相对发光值(RLU),检测时间 0.2 秒/孔;

[0141] ⑫利用双对数数学模型,根据标准品浓度以及其对应的 RLU 建立标准曲线(见附图 1),根据标准曲线计算样品的浓度;

[0142] ⑬打印检测结果报告。

[0143] 实施例 5

[0144] 本发明试剂盒的方法学鉴定

[0145] 根据本领域中常规的检定程序对实施例 1~3 中的三种试剂盒进行鉴定,经过多次实验证明,本发明的试剂盒在 M2-PK 浓度的测定中,检测的方法学指标如下:

[0146] ①检测范围:0~100U/ml;

[0147] ②灵敏度:最小检出限为 0.15U/ml;

[0148] ③精密度:批内变异系数小于 10%,批间变异系数小于 15%;

[0149] ④准确性:回收率测定在 90~110% 之间;

[0150] ⑤特异性:与类似物 M1-PK 的交叉反应率小于 1.0%;

[0151] ⑥稳定性:各试剂组分于 37 $^{\circ}$ C 放置 6 天后,各组分仍稳定。

[0152] 实施例 6

[0153] 使用本发明的试剂盒对人血清样本进行检测的实验数据

[0154] 按照实施例 4 的操作步骤,使用实施例 1 的试剂盒,对 83 例人血样进行测定,由 24 例非小细胞肺癌样本,以及 59 例健康人样本组成,测定结果如下表所示:

[0155] 表 1. 对 83 例血液样本的检测结果

	检测样本	非小细胞肺癌样本	健康人样本
[0156]	结果	24 例	59 例
	阳性例数	21 例	0
	阳性率	87.5%	0

[0157] 使用本发明试剂盒对 83 例人血清样本进行检测,结果显示,24 例非小细胞肺癌病人血液样本中,有 21 例 M2-PK 浓度值大于临界值 15U/mL;59 例健康人血清样本中, M2-PK 浓度值均在 15U/mL 以下,说明本试剂盒的测定特异性良好。

[0158] 本发明试剂盒具有操作方法快速简便、灵敏度及稳定性高、检测范围广等优点。

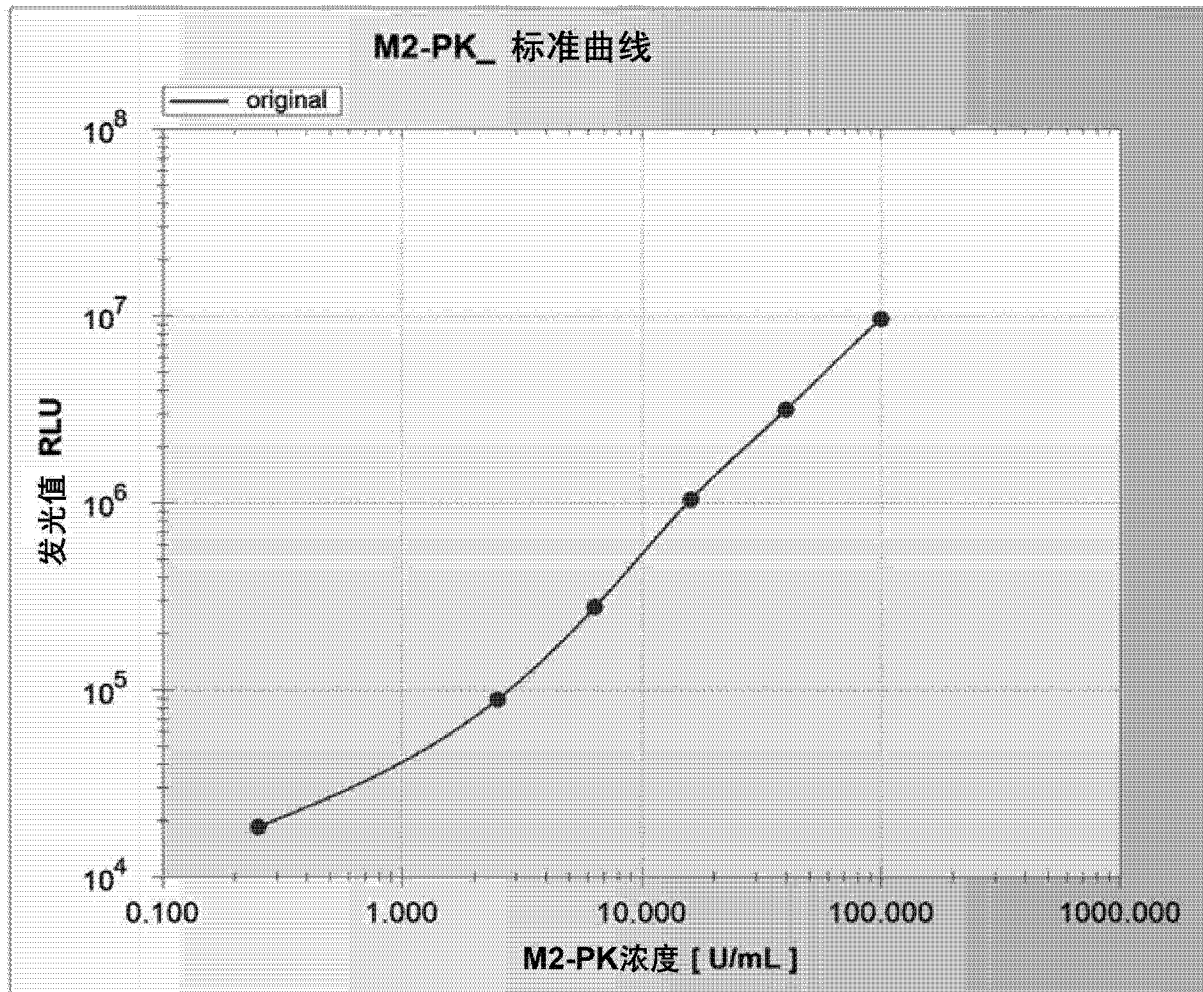


图 1

专利名称(译)	人M2型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN103033623A	公开(公告)日	2013-04-10
申请号	CN201210533766.7	申请日	2012-12-10
[标]发明人	王立凯 潘学继 黄丽娟 单存海 曹青 洪宇霞		
发明人	王立凯 潘学继 黄丽娟 单存海 曹青 洪宇霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	陆艺		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人M2型丙酮酸激酶化学发光免疫分析试剂盒及制备方法，所述试剂盒包括以下组份：M2型丙酮酸激酶标准品；包被有M2型丙酮酸激酶单克隆抗体的磁颗粒；辣根过氧化物酶标记的M2型丙酮酸激酶单克隆抗体；化学发光底物A和B；白色不透明微孔板；洗涤液；本发明试剂盒可以准确定量检测病人血清中M2-PK的含量，对于肺癌等恶性肿瘤的检测具有重要的指导意义，与传统的ELISA方法相比，本发明灵敏度高，特异性好，线性范围宽，且稳定性、可靠性和准确度高，安全环保，操作简便。

	检测样本	非小细胞肺癌样本	健康人样本
结果		24例	59例
阳性例数		21例	0
阳性率		87.5%	0