



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106932570 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201710131799.1

(22)申请日 2017.03.07

(71)申请人 中国人民解放军第二军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 肖建如 李博 周娉婷 陈天睿
魏海峰 蔡维砾 由贺 李嵩

(74)专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务
所(普通合伙) 31262

代理人 周春洪

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书12页

(54)发明名称

一种检测前列腺特异性抗原PSA的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,包括如下检测试剂:(1)PSA试剂1号;(2)PSA试剂2号;(3)PSA质控品,所述PSA质控品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液;(4)PSA校准品,所述PSA校准品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液。本发明采用抗原抗体结合原理,通过胶体金颗粒与抗体结合将检测结果等比放大,应用全自动生化分析仪进行定量检测,在检测范围内,沉淀强度与样本中PSA浓度成正比,通过内插法可从拟合曲线上读取待测样本的PSA浓度。相比其它方法本发明的试剂盒灵敏度更高,稳定性更强,成本极低,完全可以超越国内外同等试剂盒的标准。

1. 一种前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括如下检测试剂:

(1) PSA试剂1号成分:

NaCl	8.0g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
KCl	0.2g
BSA	1g
NaN ₃	1g

(2) PSA试剂2号成分:

NaCl	16.77g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
KCl	0.2g
BSA	5g
NaN ₃	1g
2-吗啉乙磺酸	0.88g
3-吗啉丙磺酸	10.46g
EDC.HCl	100mg
PSA 单抗	250mg
胶体金微球	3g。

2. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括PSA质控品,所述PSA质控品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液,所述PSA抗原提取自人精液。

3. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括PSA校准品,所述PSA校准品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液,所述PSA抗原提取自人精液。

4. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述PSA胶体金的标记方法如下:

- (1) 用0.1mol/LK₂CO₃或0.1mol/LHCl调节金溶胶至pH6.8;
- (2) 于100ml金溶胶中加入滴度为10000,体积为2ml的PSA抗体溶液,搅拌2~3分钟;
- (3) 加入5ml 1%PEG20000溶液;

(4) 于10000g离心30分钟,小心吸去上清液;

(5) 将沉淀悬浮于20ml含0.2~0.5mg/ml PEG20000的缓冲液中,离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,浓度以 $A_{1\text{cm}}/540\text{nm}=1.5$,以0.5mg/ml叠氮钠防腐,置4℃保存;

(6) 包被后的金溶胶也可浓缩后于Sephadex G-200柱进行凝胶层析分离纯化,以含0.1%BSA的缓冲溶液洗脱。

5. 根据权利要求4所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述金溶胶的制备方法如下:

(1) 胶体金的烧制应在24小时内完成;

(2) 用量筒称取所需量的水,将其倒入烧杯中,在烧杯上液面处用记号笔划线,将水煮至沸腾;

(3) 将1%的氯金酸溶液按照3:100的比例迅速加入到2的液体中;

(4) 将1%柠檬酸钠溶液按4.5:100加入到沸腾的3的液体中,混合均匀,保持沸腾5分钟至液体呈稳定的酒红色;

(5) 停止加热,冷却至室温;

(6) 用水补足至划线处,将胶体金倒入广口瓶中,用封口膜密封,得到金溶胶。

6. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的最低检测限低于0.1ng/ml,重复性小于15%,批间差小于15%。

7. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,将 (80 ± 16) ng/ml的样本倍比稀释为5种浓度,将每一浓度的样本重复检测2次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,线性相关系数大于等于0.999。

8. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒测量结果的测量偏差在 $\pm 10\%$ 范围内。

9. 根据权利要求1所述前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒与癌胚抗原(CEA)和甲胎蛋白(AFP)交叉反应均小于1%。

10. 权利要求1-3任一所述试剂盒在前列腺特异性抗原定量检测中的用途,用于:

(1) 在前列腺特异性抗原定量检测中的应用;

(2) 在制备人前列腺特异性抗原定量检测产品中的应用;

(3) 待测样本中检测前列腺特异性抗原的定量检测方法:将目标浓度为0、0.5、5、15、50和100ng/ml的前列腺特异性抗原校准品加入全自动生化分析仪,以水为零点,建立工作曲线。

操作步骤:

标本量 (S)	sample volume	uL	5
试剂 1 (R1)	reagent 1	uL	225
S+R1 在 37℃ 保温 5 分钟, 记录吸光度值 A1 后, 加入 R2。			
试剂 2 (R2)	reagent 2	uL	25
S+R1+R2 在 37℃ 保温 5 分钟, 记录吸光度值 A2。			
主波长	main wavelength	nm	340
副波长	sub wavelength	nm	700
反应类型	reaction type		两点终点法
反应方向	reaction direction		升反应 (+)

计算方法:

计算校准液吸光度差值 (A2-A1), 并建立校准液吸光度—浓度工作曲线。
计算样本的吸光度差值, 在工作曲线上读取对应浓度值。

质控程序: 测量 PSA 质控品, 测试结果在质控范围内方可进行标本检测。

一种检测前列腺特异性抗原PSA的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析技术领域,具体地说,是一种检测前列腺特异性抗原PSA的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 前列腺特异性抗原PSA (Prostate) 是一种含有237个氨基酸的单肽链糖蛋白,分子量约34kDa,属于具有组织特异性的具有糜蛋白酶样作用的丝氨酸蛋白酶族。PSA主要由前列腺的线上皮细胞产生,在精液中的浓度很高。PSA的主要生理作用是分解精液中的胶状蛋白,有稀释精液,增加精子运动能力的作用。最初分泌到前列腺管的PSA是一种无活性的酶原(proPSA),酶原在氨基裂解掉7个氨基酸后具有丝氨酸蛋白酶活性。少量PSA可进入血循环,进入血循环的大部分PSA迅速与蛋白酶抑制素结合而失活,主要与 α -1抗糜蛋白酶(ACT)和 α -2巨球蛋白结合(MG),也有少部分被蛋白水解酶灭活后以游离状态存在。游离的PSA以及和ACT结合的PSA(PSA-ACT)通过现有免疫学方法可以检测到。同时检测游离PSA和PSA-ACT复合物即为目前所说的总PSA检测。与 α -2巨球蛋白结合(MG)的PSA由于蛋白的包裹、遮蔽作用使PSA特异性表位消失,因此用现有免疫学方法无法检测。血清总PSA含量和前列腺疾病密切相关,良性前列腺增生和恶性的前列腺癌都会引起总PSA升高,游离PSA则较少受前列腺癌生长的影响。PSA具有组织特异性,但并无肿瘤特异性,前列腺炎、良性前列腺增生和前列腺癌均可导致PSA升高。

[0003] 前列腺癌已超过皮肤癌成为北美男性最常见的癌症,因癌致死病例数排第二位。PSA在大多数有临床症状的前列腺癌中都会升高,因此监测PSA含量对于评估肿瘤治疗效果有重要意义。目前PSA的检测全部采用免疫学方法,胶体金试纸条法及化学发光法,免疫学方法灵敏度不高,胶体金试纸条灵敏度不高且需要借助人眼识别,化学发光法成本较高。进口单抗由于灵敏度高、精密度高、准确性好、使用灵活方便等,在市场上占据领先地位。

[0004] 中国专利201210291449.9公开了一种前列腺特异性抗原检测试剂盒,包括抗-FITC抗体包被的固相载体、FITC标记的anti-PSA抗体、酶标记的anti-fPSA抗体、上述酶所作用的化学发光底物、以及阴性和阳性对照液;制备上述试剂盒的方法包括以下步骤:1)以抗-FITC抗体包被的固相载体;2)用FITC标记anti-PSA抗体,获得FITC标记的anti-PSA抗体;3)用酶标记anti-fPSA抗体,获得酶标记的anti-fPSA抗体;4)分装和组装。中国专利201110235581.3公开了游离前列腺特异性抗原定量测定试剂盒,包含FPSA磁分离试剂,酶反应物,反应增强剂,稀释液,FPSA标准品、FPSA质控品,清洗液浓缩液以及底物溶液。然而现有技术中,关于本发明检测前列腺特异性抗原PSA的试剂盒,目前还未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术中的不足,提供一种前列腺特异性抗原定量检测试剂盒。

[0006] 本发明的另一个目的是,提供如上所述试剂盒的用途。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案是:

[0008] 一种前列腺特异性抗原定量检测试剂盒,包括如下检测试剂:

[0009] (1) PSA试剂1号成分:

NaCl 8.0g

Na₂HPO₄·12H₂O 1.44g

KH₂PO₄ 0.24g

[0010]

KCl 0.2g

BSA 1g

NaN₃ 1g

[0011] (2) PSA试剂2号成分:

NaCl 16.77g

Na₂HPO₄·12H₂O 1.44g

KH₂PO₄ 0.24g

KCl 0.2g

[0012]

BSA 5g

NaN₃ 1g

2-吗啉乙磺酸 0.88g

3-吗啉丙磺酸 10.46g

EDC.HCl 100mg

[0013] PSA 单抗 250mg

胶体金微球 3g。

[0014] 进一步,所述试剂盒还包括PSA质控品,所述PSA质控品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液,所述PSA抗原提取自人精液。

[0015] 进一步,所述试剂盒还包括PSA校准品,所述PSA校准品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液,所述PSA抗原提取自人精液。

[0016] 进一步,所述PSA胶体金的标记方法如下:

[0017] (1) 用0.1mol/LK₂CO₃或0.1mol/LHCl调节金溶胶至pH6.8;

[0018] (2) 于100ml金溶胶中加入滴度为10000,体积为2ml的PSA抗体溶液,搅拌2~3分钟;

[0019] (3) 加入5ml 1%PEG20000溶液;

[0020] (4) 于10000g离心30分钟,小心吸去上清液;

[0021] (5) 将沉淀悬浮于20ml含0.2~0.5mg/ml PEG20000的缓冲液中,离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,浓度以A1cm/540nm=1.5,以0.5mg/ml叠氮钠防腐,置4℃保存;

[0022] (6) 包被后的金溶胶也可浓缩后于Sephadex G-200柱进行凝胶层析分离纯化,以含0.1%BSA的缓冲溶液洗脱。

[0023] 进一步,所述金溶胶的制备方法如下:

[0024] (1) 胶体金的烧制应在24小时内完成;

[0025] (2) 用量筒称取所需量的水,将其倒入烧杯中,在烧杯上液面处用记号笔划线,将水煮至沸腾;

[0026] (3) 将1%的氯金酸溶液按照3:100的比例迅速加入到2的液体中;

[0027] (4) 将1%柠檬酸钠溶液按4.5:100加入到沸腾的3的液体中,混合均匀,保持沸腾5分钟至液体呈稳定的酒红色;

[0028] (5) 停止加热,冷却至室温;

[0029] (6) 用水补足至划线处,将胶体金倒入广口瓶中,用封口膜密封,得到金溶胶。

[0030] 进一步,所述试剂盒的最低检测限低于0.1ng/ml,重复性小于15%,批间差小于15%。

[0031] 进一步,将(80±16)ng/ml的样本倍比稀释为5种浓度,将每一浓度的样本重复检测2次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,线性相关系数大于等于0.999。

[0032] 进一步,所述试剂盒测量结果的测量偏差在±10%范围内。

[0033] 进一步,所述试剂盒与癌胚抗原(CEA)和甲胎蛋白(AFP)交叉反应均小于1‰。

[0034] 为实现上述第二个目的,本发明采取的技术方案是:

[0035] 如上任一所述试剂盒的用途,用于:

[0036] (1) 在前列腺特异性抗原定量检测中的应用;

[0037] (2) 在制备人前列腺特异性抗原定量检测产品中的应用;

[0038] (3) 检测人前列腺特异性抗原的定量检测方法:将目标浓度为0、0.5、5、15、50和100ng/ml的前列腺特异性抗原校准品加入全自动生化分析仪,以水为零点,建立工作曲线。

[0039] 操作步骤:

标本量 (S)	sample volume	uL	5
试剂 1 (R1)	reagent 1	uL	225
S+R1 在 37°C 保温 5 分钟, 记录吸光度值 A1 后, 加入 R2。			
试剂 2 (R2)	reagent 2	uL	25
[0040]	S+R1+R2 在 37°C 保温 5 分钟, 记录吸光度值 A2。		
主波长	main wavelength	nm	340
副波长	sub wavelength	nm	700
反应类型	reaction type		两点终点法
反应方向	reaction direction		升反应 (+)

- [0041] 计算方法：
- [0042] 计算校准液吸光度差值 (A2-A1)，并建立校准液吸光度—浓度工作曲线。
- [0043] 计算样本的吸光度差值，在工作曲线上读取对应浓度值。
- [0044] 质控程序：测量PSA质控品，测试结果在质控范围内方可进行标本检测。
- [0045] 本发明优点在于：
- [0046] 1、本发明采用匀相溶胶颗粒免疫测定法(胶体金溶液法)将抗体标记到胶体金溶液中，通过全自动生化分析仪检测病人血样，相比其它方法灵敏度更高，稳定性更强，成本极低，完全可以超越国内外同等试剂盒的标准。
- [0047] 2、本发明的试剂盒采用抗原抗体结合原理，通过胶体金颗粒与抗体结合将检测结果等比放大，应用全自动生化分析仪进行定量检测。在检测范围内，沉淀强度与样本中PSA浓度成正比，因此通过内插法就可以从拟合曲线上读取待测样本的PSA浓度。
- [0048] 3、本发明的试剂盒在效期内性能稳定，最低检测限、重复性、线性、准确性、批间差、分析特异性符合要求。

具体实施方式

[0049] 下面结合具体实施方式，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明记载的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0050] 实施例

[0051] 一、本发明试剂盒组分

[0052] 前列腺特异性抗原 (PSA) 定量检测试剂盒(胶体金法)由以下四种组分构成，各组分生产工艺概括如下：

[0053] (1) PSA试剂1号 (PSA-R1) 成分：

NaCl	8.0g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
[0054] KCl	0.2g
BSA	1g
NaN ₃	1g

[0055] (2) PSA试剂2号 (PSA-R2) 成分：

NaCl	16.77g
[0056] Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
KCl	0.2g

	BSA	5g
	NaN	1g
	2-吗啉乙磺酸	0.88g
[0057]	3-吗啉丙磺酸	10.46g
	EDC.HCl	100mg
	PSA 单抗	250mg
	胶体金微球	3g

[0058] 抗PSA抗体提取自PSA杂交瘤细胞培养上清液或感染的小鼠腹水。

[0059] (3) PSA质控品 (PSA-QC) : 内容物为含一定浓度PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液 (浓度0.02mol/L, PH=7.4), PSA抗原提取自人精液。质控的标称浓度为4ng/ml和30ng/ml, 每批的浓度范围稍有不同。

[0060] (4) PSA校准品 (PSA-STD) : 含一定浓度PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液 (浓度0.02mol/L, PH=7.4) 配制而成, PSA抗原提取自人精液。目标浓度分别为0、0.5、5、15、50和100ng/ml。本试剂盒校准品浓度可溯源至the Stanford Reference standard/WH096/670 (90%PSA-ACT+10%free PSA)。用于建立标准曲线。

[0061] 二、具体使用方法如下:

[0062] **【适用仪器】**

[0063] 本试剂盒已在日立7060、Olympus400、西门子Dimension xpand全自动生化分析仪上验证合格。

[0064] **【检验方法】**

[0065] 校准程序: 可选择单点或多点定标方式建立工作曲线。

[0066] 单点定标: 液体校准液, 直接使用。

[0067] 多点定标: (对于自动生化仪, 定标方式选择Nonlinear或log-logit 4P法), 将目标浓度为0、0.5、5、15、50和100ng/ml的前列腺特异性抗原校准品加入全自动生化分析仪, 以水为零点, 建立工作曲线。

[0068] 操作步骤:

[0069]	标本量 (S)	sample volume	uL	5
	试剂 1 (R1)	reagent 1	uL	225

S+R1 在 37℃保温 5 分钟, 记录吸光度值 A1 后, 加入 R2。			
试剂 2 (R2)	reagent 2	uL	25
S+R1+R2 在 37℃保温 5 分钟, 记录吸光度值 A2。			
[0070] 主波长	main wavelength	nm	340
副波长	sub wavelength	nm	700
反应类型	reaction type		两点终点法
反应方向	reaction direction		升反应 (+)

[0071] 计算方法:

[0072] 计算校准液吸光度差值(A2-A1), 并建立校准液吸光度—浓度工作曲线。

[0073] 计算样本的吸光度差值, 在工作曲线上读取对应浓度值。

[0074] 质控程序: 测量PSA质控品, 测试结果在质控范围内方可进行标本检测。

[0075] **【检验结果的解释】**

[0076] 结果如超过线性范围, 请用生理盐水将标本按1:1稀释, 测定结果乘2。

[0077] 试剂储存:

[0078] 各组分均应避免阳光直射。磁分离试剂应保持直立, 防止磁微粒长时间干燥而失活。磁分离试剂、试剂2号如出现冻结不可继续使用。试剂使用后应及时恢复到2-8℃, 避免长时间室温放置。试剂有效期: 未开封试剂盒及各组分于2-8℃保存, 有效期为12个月。

[0079] **【样本要求】**

[0080] 以下样本经验证符合本试剂盒要求: • 血清: 取5.0ml静脉血至玻璃试管中, 不加抗凝剂, 在室温中静置, 然后通过离心(3000rpm×5min)分离血清部分。标本贮存和处理 • 血清标本于室温(22℃)条件下放置不应超过8h。• 血清标本于2℃-8℃保存不应超过48h, 否则应-20℃保存。• -20℃保存血清标本储存期小于3个月, 冻融次数小于3次不影响检测结果应避免样本反复冻融。

[0081] 已知的干扰物

[0082] • 若样本中含有下述浓度干扰物质时, 不影响检测结果: 血红蛋白<5mg/ml; 总胆红素<0.5umol/ml; 脂肪乳<10mg/ml; 肝素钠<100IU/ml。• 碱性磷酸酶活性高的标本(Paget病、胆汁阻塞等)检测结果可能不准确, 应避免使用。• 标本如果出现明显微生物污染不能用于检测。• 密切接触啮齿类动物或接受过鼠源单克隆抗体药物治疗的患者, 其样本中可能含有人抗鼠抗体, 所得结果有出现异常的可能性; 样本中含有其它各种异嗜性抗体, 也可能导致结果异常。

[0083] 校准方法: 将PSA校准品A-F作为样本进行检测, 至少设两个重复管, 同时至少做单管的PSA质控。如果拟合相关系数>0.9900, 同时PSA质控测值在预定范围内, 则认为定标正确, 该标准曲线可以储存使用。

[0084] 质量控制: 每个工作日都需要进行质量控制, 每个质控点必须至少做1管。如果发现质控测量值不在预定范围(参见质控单)内, 则不能进行样本的检测。

[0085] 测定结果的计算:推荐利用四参数逻辑拟合得到校准品剂量-反应曲线的回归方程,再根据待测样本的相对发光强度可以从回归曲线上返算出样本中待测物的浓度。测量范围:测量范围为(0.1-100)ng/ml。样本浓度低于0.1ng/ml时,报告为<0.1ng/ml。样本浓度高于100ng/ml时报告为>100ng/ml,若想要了解样本确切的浓度,可用生理盐水稀释样本(建议稀释20倍)后再测定。

[0086] 【参考范围】95%的正常男性血清中PSA含量不大于4ng/ml。由于地理、人种及年龄等差异,建议各实验室建立自己的参考值(范围)。在参考值研究中,由于检测结果不属于正态分布,所以用百分位法表示参考值范围。PSA参考值的百分位值为95%。【检验结果的解释】• 本产品的检测结果不是临床适应症的唯一确认指标,其临床意义需结合其它检测指标及临床表现具体分析。• 有些前列腺良性病变,血中PSA水平也会升高。

[0087] 【检验方法的局限性】

[0088] • 在临床诊断时要把本试剂盒的检测结果作为对其它临床信息的一种补充。检测时要严格遵守操作程序,对步骤的任何改动都有可能影响结果。• PSA浓度超过1000ng/ml时有可能出现HOOK(钩状)效应。• 若样本中含有下述浓度干扰物质时,不影响检测结果:血红蛋白<5mg/ml;总胆红素<0.5umol/ml;脂肪乳<10mg/ml;肝素钠<100IU/ml。• 碱性磷酸酶活性高的标本(Paget病、胆汁阻塞等)检测结果可能不准确,应避免使用。• EDTA或柠檬酸钠抗凝血浆标本检测结果可能不准确,应避免使用。

[0089] 【注意事项】• 本试剂仅用于体外诊断。请严格按照说明书指示合理储存和使用试剂,对步骤的任何改动都可能影响结果。试剂超过效期时,请停止使用。• 不同批号试剂盒组分不应交叉使用。• 本试剂盒的检测结果仅供临床参考,对疾病的临床诊断应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。• 由于方法学或抗体特异性等原因,使用不同生产商的试剂对同一份样本进行肿瘤标记物检测可能会得到不同的检测结果,因此,在肿瘤诊断和监测过程中,用不同试剂检测所得结果不应直接相互比较,以免造成错误的医学解释;建议实验室在发给临床医生的检测报告中注明所用试剂特征。疾病监测中如果改变试剂类型,则应进行额外的连续性检测并与原有试剂结果进行平行比较以重新确定基线值。• 该试剂盒在制备过程中所用的血清或血浆原料,虽已经通过了HBsAg、HIV1/2-Ab、HCV-Ab等项目的检测均为阴性,但截至目前,没有任何一项检测可以确保绝对安全,故仍应将这些组份作为潜在传染源对待。应根据《实验室—生物安全通用要求》所规定的处理方法实施。操作时应确保切口、或其皮肤损伤处得到充分的保护。

[0090] 三、烧制胶体金的操作标准

[0091] 1.操作前确认:

[0092] 1.1操作前确认所需玻璃仪器内表面均不存在任何污点以及瑕疵。

[0093] 1.2生产前确认所用水电阻不小于18MΩ,且存放时间不超过24小时。

[0094] 2.生产操作:

[0095] 2.1胶体金的烧制应在24小时内完成。

[0096] 2.2用量筒称取所需量的水,将其倒入烧杯中,在烧杯上液面处用记号笔划线,将水煮至沸腾。

[0097] 2.3将1%的氯金酸溶液按照3:100的比例迅速加入到2.2液体中。

[0098] 2.4将1%柠檬酸钠溶液按4.5:100加入到沸腾的2.3液体中,混合均匀,保持沸腾5

分钟至液体呈稳定的酒红色。

[0099] 2.5停止加热,冷却至室温。

[0100] 2.6用水补足至划线处。将胶体金倒入广口瓶中,用封口膜密封,得到金溶胶。

[0101] 四、PSA胶体金的标记方法:

[0102] (1)用0.1mol/LK₂CO₃或0.1mol/LHCl调节金溶胶至pH6.8。

[0103] (2)于100ml金溶胶中加入滴度为10000,体积为2ml的PSA抗体溶液,搅拌2~3分钟。

[0104] (3)加入5ml 1%PEG20000溶液。

[0105] (4)于10000g离心30分钟,小心吸去上清液(切忌倾倒)。

[0106] (5)将沉淀悬浮于20ml含0.2~0.5mg/ml PEG20000的缓冲液中,离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,浓度以A1cm/540nm=1.5,以0.5mg/ml叠氮钠防腐,置4℃保存。

[0107] (6)包被后的金溶胶也可浓缩后于Sephadex G-200柱进行凝胶层析分离纯化,以含0.1%BSA的缓冲溶液洗脱。通常用金溶胶洗脱液pH为8.2。

[0108] 以上操作中应注意,一切溶液中不应含杂质微粒,可用高速离心或微孔滤膜预处理。

[0109] 五、胶体金PSA抗体结合物的质量鉴定

[0110] (1)胶体金颗粒平均直径的测量:用支持膜的镍网(铜网也可)蘸取金标蛋白试剂,自然干燥后直接在透射电镜下观察。或用醋酸铀复染后观察。计算100个金颗粒的平均直径。

[0111] (2)胶体金溶液的OD_{520nm}测定:胶体金颗粒在波长510nm~550nm之间出现最大吸收值峰。用0.02mol/L pH8.2 PBS液(含1%BSA,0.02%NaN₃)将胶体金蛋白试剂作1:20稀释,OD₅₂₀=0.25左右。一般应用液的OD₅₂₀应为0.2~0.4。

[0112] (3)金标记PSA溶液的特异性与敏感性测定:采用微孔滤膜免疫金银染色法(MF-1GSSA)。将可溶性PSA抗原吸附于载体上(滤纸、硝酸纤维膜、微孔滤膜),用胶体金标记的PSA溶液以直接或间接染色法并经银显影来检测相应的PSA抗原,或直接通过全自动生化分析仪检测血液中的PSA抗原,对金标记PSA溶液的特异性和敏感性进行鉴定。

[0113] 本试剂盒采用抗原抗体结合原理,通过胶体金颗粒与抗体结合将检测结果等比放大,应用全自动生化分析仪进行定量检测。在检测范围内,沉淀强度与样本中PSA浓度成正比,因此通过内插法就可以从拟合曲线上读取待测样本的PSA浓度。

[0114] 六、质量控制及技术参数

[0115] 1质量控制

[0116] 1.1使用待测PSA试剂进行以下实验,用校准品做标准曲线,检测以下各点:

国标或工作参考标准品(WRS) 30 (±10%) ng/ml 4 管

校准品 A 点 20 管

[0117] 样本 (30±6) ng/ml 倍比稀释 5 个浓度 各 2 管

样本 ((3±0.6) ng/ml 和 (30±6) ng/ml 各 10 管

质控品及内部质控 2 管

- [0118] 1.2依次计算准确性、最低检测限、线性和重复性。
- [0119] 2技术参数
- [0120] 2.1准确性
- [0121] 测量浓度与瓶标浓度偏差在 $\pm 10\%$ 内；
- [0122] 2.2最低检测限
- [0123] $\leq 0.1\text{ng/ml}$ ；
- [0124] 2.3线性
- [0125] 相关系数 $r \geq 0.99$
- [0126] 2.4重复性
- [0127] 两样本CV均 $< 15\%$ ；
- [0128] 2.5质控品
- [0129] 各质控品测值均在范围内。
- [0130] 七、被测样本
- [0131] 1.适用样本
- [0132] 适用于血清和肝素抗凝血浆。
- [0133] 2.样本的处理
- [0134] 2.1血清
- [0135] 取5.0ml静脉血至玻璃试管中，不加添加剂，在室温（18-25℃）中静置，通过离心分离血清部分，贮存。
- [0136] 2.2血浆
- [0137] 取5.0ml静脉血至玻璃或塑料试管中，以肝素为抗凝剂，通过离心分离血浆部分，贮存。
- [0138] 2.3高浓度样本
- [0139] 若估计标本浓度超出100ng/ml，测定前需用样品稀释液稀释。
- [0140] 3.样本的储存
- [0141] 血清和血浆样本2~8℃稳定24小时。若需较长时间保存，分装密封，于-20℃可保存30天，避免反复冻融。
- [0142] 4.已知干扰因素
- [0143] 避免使用以下几种血清或肝素抗凝血浆：严重溶血的样本、严重高脂血症样本、碱性磷酸酶活性高的样本（Paget病，胆汁阻塞等）、严重黄疸症的样本。不可使用EDTA和柠檬酸钠为抗凝剂的血浆样本。
- [0144] 八、结果
- [0145] 在HITACHI 7180全自动生化分析仪上检测
- [0146] 性能评估资料
- [0147] 1最低检测限
- [0148] 1.1实验要求
- [0149] 应不大于0.1ng/ml。
- [0150] 1.2实验方法
- [0151] 用零浓度校准品作为样本进行检测，重复测定20次，得出20次测量结果，计算其平

均值(M)和标准差(SD),得出 $M+2SD$,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度和检测值进行两点回归拟合得出一次方程,将 $M+2SD$ 的RLU值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。

[0152] 1.3实验数据

[0153]

最低检测限	第一批	第二批	第三批
	0.012	0.015	0.013

[0154] 1.4结论

[0155] 由三批试剂检测结果可见,最低检测限实验结果均不高于0.1ng/ml。

[0156] 2重复性

[0157] 2.1实验要求

[0158] 应不大于15%

[0159] 2.2实验方法

[0160] 用 (4 ± 0.8) ng/ml和 (30 ± 6) ng/ml的样本各重复检测10次,计算10次测量结果的平均值M和标准差SD,根据公式 $CV=SD/M\times 100\%$ 得出变异系数CV。

[0161] 2.3实验数据

[0162]

重复性	样本浓度	第一批	第二批	第三批
	4ng/ml	6.24%	7.21%	5.03%
	30ng/ml	3.36%	4.90%	5.48%

[0163] 2.4结论

[0164] 由三批试剂检测结果可见,重复性实验结果均不高于15%。

[0165] 3批间差

[0166] 3.1实验要求

[0167] 应不大于15.0%

[0168] 3.2实验方法

[0169] 用三个批号的试剂盒分别检测一份浓度在 (4 ± 0.8) ng/ml和 (30 ± 6) ng/ml范围内的样本,各重复10次,计算30次测量结果的平均值M和标准差SD,根据公式 $CV=SD/M\times 100\%$ 得出变异系数CV。

[0170] 3.3实验数据

[0171]

样本	变异系数
4ng/ml	6.22%
30ng/ml	7.49%

[0172] 3.4结论

[0173] 由检测结果可见,批间差实验结果均不高于15%。

[0174] 4线性

[0175] 4.1实验要求

[0176] 线性范围:0.1~100ng/ml,在本线性范围内,试剂盒的相关系数 r 应 ≥ 0.99

[0177] 4.2实验方法

[0178] 将(80±16) ng/ml的样本倍比稀释为5种浓度,将每一浓度的样本重复检测2次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 r 。

[0179] 4.3实验数据

[0180]

线性	第一批	第二批	第三批
	0.9990	0.9993	0.9997

[0181] 4.4结论

[0182] 由三批试剂检测结果可见,线性相关系数(r)实验结果均不低于0.99。

[0183] 5准确性

[0184] 5.1实验要求

[0185] 用国际标准品或经过国际标准品标化的企业校准品(QB)作为样本进行检测,其测量结果的相对偏差应在±10%范围内。

[0186] 5.2实验方法

[0187] 配制浓度约为30ng/ml(允许偏差为±10%)的国际标准品或企业校准品(QB),将其作为样本按照说明书的步骤进行检测,测量3次后,取结果平均值记为 M ,根据公式:测量偏差=(M -理论值)/理论值×100%。

[0188] 5.3实验数据

[0189]

准确性	第一批	第二批	第三批
	-1.94%	-2.52%	5.94%

[0190] 5.4结论

[0191] 由三批试剂检测结果可见,用国际标准品或经过国际标准品系列标化的企业校准品(QB)作为样本进行检测,其测量结果的相对偏差在±10%范围内。

[0192] 6特异性

[0193] 6.1实验要求

[0194] 试剂盒与下表中有关潜在交叉反应物应无显著的交叉反应。

[0195]

反应因子	浓度($\mu\text{g/L}$)	测定结果($\mu\text{g/L}$)	干扰度
CEA	1,000	小于 1.0	小于 1‰
AFP	1,000	小于 1.0	小于 1‰

[0196] 6.2实验方法

[0197] 将CEA、AFP用校准品稀释液稀释到如下表所列浓度作为样品用试剂盒检测该样品得到检测浓度,以测量浓度与加入浓度的比值表示交叉反应的程度。

[0198]

反应因子	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	测定结果 ($\mu\text{g/L}$)	干扰度
CEA	1,000	小于 1.0	小于 1‰
AFP	1,000	小于 1.0	小于 1‰

[0199] 6.3实验数据

[0200]

	第一批数据	第二批数据	第三批数据
CEA干扰度	小于1‰	小于1‰	小于1‰
AFP干扰度	小于1‰	小于1‰	小于1‰

[0201] 6.4结论

[0202] 由三批试剂检测结果可见,试剂盒与癌胚抗原 (CEA) 和甲胎蛋白 (AFP) 交叉反应均小于1‰

[0203] 7结论

[0204] 由三批试剂检测结果可见,试剂盒在效期内性能稳定,最低检测限、重复性、线性、准确性、批间差、分析特异性符合要求。

[0205] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种检测前列腺特异性抗原PSA的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106932570A	公开(公告)日	2017-07-07
申请号	CN201710131799.1	申请日	2017-03-07
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	肖建如 李博 周娉婷 陈天睿 魏海峰 蔡维砾 由贺 李嵩		
发明人	肖建如 李博 周娉婷 陈天睿 魏海峰 蔡维砾 由贺 李嵩		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N35/00		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N35/00 G01N2800/342		
代理人(译)	周春洪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	NaCl	8.0g
<p>本发明涉及一种前列腺特异性抗原定量检测试剂盒，包括如下检测试剂：(1)PSA试剂1号；(2)PSA试剂2号；(3)PSA质控品，所述PSA质控品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液；(4)PSA校准品，所述PSA校准品为含PSA抗原和小牛血清的磷酸盐缓冲液。本发明采用抗原抗体结合原理，通过胶体金颗粒与抗体结合将检测结果等比放大，应用全自动生化分析仪进行定量检测，在检测范围内，沉淀强度与样本中PSA浓度成正比，通过内插法可从拟合曲线上读取待测样本的PSA浓度。相比其它方法本发明的试剂盒灵敏度更高，稳定性更强，成本极低，完全可以超越国内外同等试剂盒的标准。</p>	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.44g
	KH ₂ PO ₄	0.24g
	KCl	0.2g
	BSA	1g
	NaN ₃	1g