



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102507947 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201110356936. 4

(22) 申请日 2011. 11. 11

(73) 专利权人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区沙太南路 1023 号

(72) 发明人 吴英松

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101750502 A, 2010. 06. 23,

CN 101819206 A, 2010. 09. 01,

CN 101614747 A, 2009. 12. 30,

CN 101162231 A, 2008. 04. 16,

WO 2004086045 A1, 2004. 10. 07,

JP 4232461 A, 1992. 08. 20,

L. S. L. Yu 等. Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for the detection of Escherichia coli O157:H7 in apple cider. 《Journal of Microbiological Methods》. 2002, 第 49 卷 (第 1 期),

杭建峰等. 癌胚抗原的时间分辨免疫荧光分析及其诊断试剂的研制. 《细胞与分子免疫学杂志》. 2006, 第 22 卷 (第 1 期),

杭建峰等. 癌胚抗原的时间分辨免疫荧光分析及其诊断试剂的研制. 《细胞与分子免疫学杂志》. 2006, 第 22 卷 (第 1 期),

审查员 黄晓丽

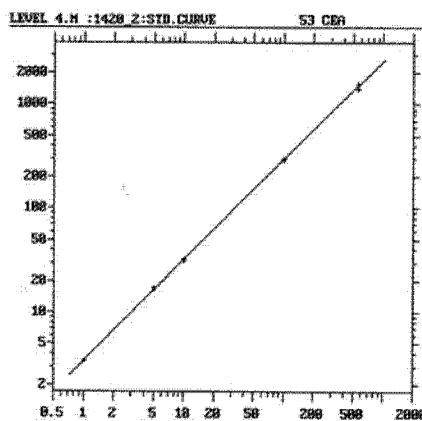
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒。该试剂盒包括校准品，连接抗 CEA 抗体的磁珠，铕标记抗 CEA 抗体，分析缓冲液，洗涤液和增强液。通过双抗体夹心的免疫反应，形成免疫磁珠-CEA-铕标记抗-CEA 单克隆抗体复合物，再通过磁性分离将吸附 CEA 的免疫磁珠与上清分离洗涤，加入增强液并通过时间分辨仪器测值。本发明除拥有 TRFIA 技术优点外，还通过免疫磁珠富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大，大大缩短反应时间，提高检测灵敏度。磁珠与抗体通过化学基团定向连接，大大减少配对抗体用量以及提高检测精密度。该技术容易实现自动化，克服了传统微孔板式 TRFIA 技术需要样本累积到一定数量才能检测，实现了样本即时检测。



CN 102507947 B

1. 一种基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征包括:校准品,连接抗 CEA 抗体的磁珠,钕标记抗 CEA 抗体,分析缓冲液,洗涤液和增强液;

所述分析缓冲液配方为:50 mmol/L Tris-HCl、1.5% PEG6000、0.2% BSA、0.1% Proclin300、0.02% 牛 IgG、0.1% Tween 20、0.84% NaCl, pH7.8 缓冲液;

所述洗涤液配方为:1.25 mmol/L Tris-HCl、2.5% Tween 20、21% NaCl, pH7.8 缓冲液;

所述增强液配方包括:由 15  $\mu$ mol/L  $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮、50  $\mu$ mol/L 三辛基氧化磷、0.1% Triton X-100、0.6% 醋酸组成,用适量邻苯二甲酸氢钾调整 pH 为 3.0-3.2;

所述连接抗 CEA 抗体的磁珠的制备步骤为:磁珠活化,与抗 CEA 单克隆抗体连接,洗涤,封闭,保存;

所述磁珠活化的步骤包括:用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠,取 1ml 或 10mg 悬浮液于离心管中,并置于磁分离器上 1min 或更长时间,小心移去上清;加入 1ml Binding Buffer,用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠,并置于磁分离器上 1min 或更长时间,小心移去上清,重复该步骤 2 次后加入 25  $\mu$ l 10mg/ml EDC 和 40  $\mu$ l 10mg/ml NHS,用样本旋转混合器,室温旋转 30min;加入 1ml Binding Buffer,用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠,并置于磁分离器上 1min 或更长时间,小心移去上清,重复该步骤 2 次;

所述钕标记抗 CEA 抗体的制备步骤为:选用抗 CEA-单克隆抗体进行  $\text{Eu}^{3+}$  标记,抗体与  $\text{Eu}^{3+}$  标记物的质量比例为 5:1。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征包括:所述校准品的制备步骤为:用含 2 g/L BSA 及 1 g/L  $\text{NaN}_3$  的 50 mmol/L pH7.8 Tris-HCl 缓冲液,将 CEA 抗原配制成 0、1、5、10、100 及 560 ng/mL 系列浓度的校准溶液。

## 一种基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物分析化学、纳米生物技术领域,具体地说,涉及一种基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

### 背景技术

[0002] 癌胚抗原 (CEA) 是 1965 年 Gold 和 Freedman 首先从胎儿及结肠癌组织中发现的。CEA 的编码基因位于 19 号染色体,是一种分子量为 22000 的多糖蛋白复合物,45% 为蛋白质。一般情况下,CEA 是由胎儿胃肠道上皮组织、胰和肝细胞所合成。通常在妊娠前 6 个月内 CEA 含量增高,出生后血清中含量已很低。正常情况下,CEA 经胃肠道代谢,而肿瘤状态时的 CEA 则进入血液和淋巴循环,引起血清 CEA 异常增高。目前认为,CEA 广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌中,如胃癌、大肠癌、肝癌、胰腺癌,也可存在于小细胞肺癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌中。因此,检测血清中 CEA 含量对上述癌症的诊断具有辅助价值。

[0003] 目前常规的癌胚抗原检测大多采用酶免疫分析 (Enzymatic immunoassay, EIA)、化学发光免疫分析 (Chemilinescent immunoassay, CLIA) 和时间分辨荧光免疫分析 (Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 等。

[0004] 酶联免疫法试剂盒为定性或半定量试剂,不能为临床医生提供精确的定量,很难有效指导临床的治疗。

[0005] CLIA 与其它标记技术相比有许多优点:①无放射性辐射的危害;②灵敏度高,检测线性范围宽;③稳定性好、自动化程度高;④应用范围宽,可检测不同分子大小的抗原、半抗原和抗体,又可以用于核酸探针的检测。缺点是发光过程短、样品不能重复检测、本底较高及易受环境物质干扰。目前国内使用大部分为 Roche、Abbott、Beckman 为代表的进口试剂。

[0006] TRFIA 技术是继放射免疫分析之后标记物发展的一个新里程碑,已成为生物医学研究和临床超微量生化检验中一项最有发展前景的分析手段。TRFIA 以稀土离子作为标记物,具有制备简便、储存时间长、无放射性污染、标准曲线范围宽、不受样品自然荧光干扰和应用范围十分广泛等优点。然而,目前国内外厂家均采用基于微孔板 TRFIA 技术,由于微孔板的固液相反应面积小,需要的免疫反应时间较长;微孔板包被抗体或抗原是通过物理吸附包被,包被抗体或抗原很难标准化,使得检测结果精密度较差;微孔板 TRFIA 技术主要为半自动检测,或前处理加上 TRFIA 检测仪的准全自动检测,使得样本需要积累到一定量后才能检测。

[0007] 免疫磁珠是免疫学和磁载体技术相结合而发展起来的一类新型材料,是一种磁珠表面包被特异性配基,可与抗体 / 抗原特异性的结合形成磁珠 - 抗体 / 抗原复合物,然后通过外加磁场的作用,使磁珠和溶液快速分离,磁珠与传统的微孔板相比具有以下的特点:①表面积更大,能结合更多的蛋白分子;②可以通过共价键与探针分子连接,比聚苯乙烯为材料的微孔板的物理吸附作用更牢固;③是一种小型的、流动的固相载体,使反应能更快的

达到动态平衡,从而加快反应速度;④表面结合的密度高,使荧光信号更集中;⑤可以和不同的探针分子结合,使检测同一样本中不同的待测物成为可能;⑥磁珠的外观和包被过程的灵活性更大,可以根据不同的实验要求进行选择。

[0008] 磁珠的上述特点与时间分辨荧光免疫分析结合后可以减少反应所需的样本量,加快反应时间,易自动化,实验样本随到随做功能。

[0009] 目前免疫磁珠在化学发光免疫分析、核酸提取等领域已有广泛的应用,但免疫磁珠结合时间分辨荧光免疫分析检测一些肿瘤相关抗原尚无文献报道。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供一种基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

[0011] 本发明检测方法的基础是双抗体夹心的免疫反应:通过磁珠与抗体连接形成复合物,即免疫磁珠,用免疫磁珠、铕标记抗体及样本中 CEA 抗原在反应管中经过震荡孵育后形成免疫磁珠-CEA 抗原-铕标抗体复合物。加入增强液震荡反应后,在紫外光的激发下发射出很强的荧光,用时间分辨仪器测定其荧光强度。荧光强度与样品中的 CEA 浓度成正比,对照标准曲线即可确定样品中抗原的量。

[0012] 本发明的基于免疫磁珠的 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒包括:

[0013] 1) 校准品

[0014] 2) 连接抗 CEA 抗体的磁珠

[0015] 3) 铕标记抗 CEA 抗体

[0016] 4) 分析缓冲液

[0017] 5) 洗涤液(25x)

[0018] 6) 增强液

[0019] 上述连接抗 CEA 抗体的磁珠的制备步骤为:磁珠活化→与抗 CEA 单克隆抗

[0020] 体连接→洗涤→封闭→保存等步骤制备得到偶联有高特异性的抗-CEA 单克隆抗体的免疫磁珠。

[0021] 上述铕标记抗 CEA 抗体的制备步骤为:选用抗 CEA-单克隆抗体进行  $\text{Eu}^{3+}$  标记,抗体与  $\text{Eu}^{3+}$  标记物的比例为 5:1(质量比)为最佳比例,标记率太高,影响被标记抗体的免疫活性;标记率太低,信号强度不够,降低检测灵敏度。

[0022] 上述校准品的制备步骤为:用含 2 g/L BSA 及 1 g/L  $\text{NaN}_3$  的 50 mmol/l pH7.8 Tris-HCl 缓冲液,将 CEA 抗原配制成 0、1、5、10、100 及 560 ng/mL 系列浓度的校准溶液,按每瓶 1mL 分装冻干,4℃保存备用。

[0023] 上述分析缓冲液配方为:Tris-HCl(50mmol/L,)、PEG6000(1.5%)、BSA(0.2%)、Proclin300(0.1%)、牛 IgG(0.02%)、Tween 20(0.1%) 和 NaCl(0.84%) pH7.8 缓冲液。

[0024] 上述洗涤液(25x)配方为:Tris-HCl(1.25mmol/L,)、Tween 20(2.5%) 和 NaCl(21%) pH7.8 缓冲液。

[0025] 上述增强液配方为:由  $\beta_2$ 二酮体、三辛基氧化磷(TOPO)、Triton200、醋酸和邻苯二甲酸氢钾(pH 2.0~3.2)组成。

[0026] 本发明的测定方法为:往反应管中加入用分析缓冲液以体积比为 1:25 稀释的免疫磁珠 50  $\mu\text{l}$ ,然后加入 CEA 校准品或样品 25  $\mu\text{l}$ ,再加入用分析缓冲液以体积比为 1:50

稀释的  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体  $200 \mu\text{l}$ ; 室温震荡孵育反应 30 min, 运用磁性分离技术将吸附 CEA 的免疫磁珠与上清分离洗涤, 最后每孔加入  $200 \mu\text{l}$  增强液振摇 5 min 后在时间分辨荧光检测仪上按所编程序测定。

[0027] 与现有技术相比, 本发明具有如下有益效果:

[0028] 1、本发明首先对所用的原材料进行筛选试验和质量检定, 包括免疫磁珠和铕标记抗体的活性、标记物和抗体的比例、标记物的稀释度等通过反复探索和试验比对最终找到了简便、效率高、成本低、质量可靠的连接和标记方法。

[0029] 2、本发明公开了基于上述探索试验得到的各种试剂配方, 包括: 洗涤液配方、分析缓冲液配方、增强液配方, 进一步公开了铕标记抗体及免疫磁珠的制备过程。

[0030] 3、本试剂盒采用磁分离技术并结合 TRFIA 技术, 除拥有 TRFIA 技术的灵敏度高、储存时间长、无放射性污染、标准曲线范围宽等诸多优点外, 还通过免疫磁珠的富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大, 大大缩短反应时间, 提高检测灵敏度。磁珠与抗体通过化学基团定向连接, 大大减少配对抗体用量以及提高检测的精密密度。另外该技术容易实现自动化, 克服了传统微孔板式 TRFIA 技术需要样本累积到一定数量才能检测, 实现了样本即时检测。

#### 附图说明

[0031] 图 1 为实施例 3 基于免疫磁珠 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒定标品标准曲线(双对数拟合)。

[0032] 图 2 为实施例 3 基于免疫磁珠 CEA 时间分辨荧光免疫分析试剂盒国家标准品标准曲线(双对数拟合)。

[0033] 图 3 为实施例 4 本发的试剂盒与 Roche 公司 CEA 电化学发光试剂盒检测血清 CEA 的相关性(回归分析)

[0034] 图 4 为实施例 4 本发的试剂盒与广州市达瑞抗体工程技术有限公司微孔板式 TRFIA 试剂盒检测血清 CEA 的相关性(回归分析)。

#### 具体实施方式

[0035] 实施例 1 本发明的试剂盒的制备

[0036] (1) 免疫磁珠的制备具体步骤:

[0037] 第一步, 磁珠的预处理: 用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠(Merck 公司产品, 编号: 39572001), 取 1ml (10mg) 悬浮液于离心管中, 并置于磁分离器上 1min (或更长时间), 小心移去上清。加入 1ml Binding Buffer, 用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠, 并置于磁分离器上 1min (或更长时间) 小心移去上清, 重复该步骤 2 次后加入  $25 \mu\text{l}$  EDC(10mg/ml) 和  $40 \mu\text{l}$  NHS(10mg/ml), 用样本旋转混合器, 室温旋转 30min。加入 1ml Binding Buffer, 用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠, 并置于磁分离器上 1min (或更长时间) 小心移去上清, 重复该步骤 2 次。

[0038] 第二步, 磁珠偶联: 在第一步去除上清的磁珠中加入 100 mg 抗体(芬兰 Medix 公司产品, 编号: 5910), 用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠, 用样本旋转混合器, 室温旋转 3h。

[0039] 第三步, 洗涤: 将第二步中的离心管置于磁分离器上 1min(或更长时间), 小心移去

上清,加入 1ml 洗涤液,用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠,并置于磁分离器上 1min (或更长时间)小心移去上清,重复该步骤 2 次。

[0040] 第四步,封闭:在清洗后的磁珠中加入 3ml 封闭液,用样本旋转混合器,室温旋转 3h 离心管置于磁分离器上 1min (或更长时间),小心移去上清,加入 1ml Binding Buffer,用涡旋混合器充分混匀悬浮磁珠,并置于磁分离器上 1min (或更长时间)小心移去上清。

[0041] 第五步,保存:在磁珠中加入 1ml 保存液 TBST,2-8℃保存。

[0042] 第一步中所述 Binding Buffer 为含有 MES(0.1M)、pH 5.0 的缓冲液。

[0043] 第一步中所述 EDC 为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,NHS 为 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0044] 第三步中所述洗涤液为 Tris-HCl (25mM)、NaCl (0.15M)、Tween20 (0.05%)、pH7.2 的缓冲液。

[0045] 第四步中所述封闭液为蔗糖 (15%)、小牛血清 (10%)、pH7.0 的缓冲液。

[0046] 第五步中所述保存液为 Tris-HCl (25mM)、NaCl (0.15M)、Tween20 (0.05%)、pH7.2 的缓冲液。

[0047] (2) 铕标记抗 CEA 抗体制备步骤为:

[0048] 抗体纯化和浓缩:将 1mg 抗 CEA 单克隆抗体(芬兰 Medix 公司产品,编号:5909)加入 0.5ml 标记缓冲液(50mmol/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.0),混匀后,用 Millipore 公司带有滤膜的 G-50 离心管 10000rpm 离心 5min,再重复洗涤 6 次,倒转离心收集抗体,体积控制在 200μl 左右。

[0049] 抗体标记:将纯化的 CEA 抗体加入 0.2mg Eu<sup>3+</sup>标记试剂(PerKin Elmer 公司产品,编号:1244-302),充分混匀,25℃振荡过夜。

[0050] 上样与洗脱:用 Sephadex G-50 层析柱(1x30cm)分离纯化,洗脱液(含 0.9% NaCl 的 50mmol/l Tris-HCl)洗脱,同时收集流出液(1ml/管),逐管测量吸光度(A<sub>280nm</sub>),合并峰管,测蛋白含量并计算标记率。

[0051] 确定稀释度:并管后的铕标记物,进行稀释度摸索,选择线性较好,灵敏度较低的稀释度;分装铕标记物:用连续加样枪分装,体积为 1.0 ml/瓶,真空冷冻干燥。

[0052] 保存:冻干后 2℃ - 8℃。

[0053] (3) 校准品制备步骤为:用含 2 g/L BSA 及 1 g/L NaN<sub>3</sub>的 50 mmol/lpH7.8 Tris-HCl 缓冲液,将 CEA 抗原(美国 Biodesign 公司产品,编号:A41107H)配制成 1、5、10、100 及 560 ng/mL 系列浓度的校准溶液,按每瓶 1mL 分装冻干,4℃保存备用。

[0054] (4) 分析缓冲液配方为:Tris-HCl (50mmol/L)、PEG6000 (1.5%)、BSA (0.2%)、Proclin300 (0.1%)、牛 IgG (0.02%)、Tween 20 (0.1%) 和 NaCl (0.84%) pH7.8 缓冲液。

[0055] (5)洗涤液 (25x) 配方为:Tris-HCl (1.25mmol/L)、Tween 20 (2.5%) 和 NaCl (21%) pH7.8 缓冲液。

[0056] (6)增强液配方为:由 β-萘甲酰三氟丙酮 (β-NTA) (15 μmol/L)、三辛基氧化磷 (TOPO) (50 μmol/L)、Triton X-100 (0.1%)、醋酸 (0.6%) 组成,用适量邻苯二甲酸氢钾调整 pH 为 3.0-3.2。

[0057] 实施例 2 本发明的试剂盒的使用方法

[0058] (1) 样本收集

[0059] 采静脉血 1-2ml 于凝血管中,4℃放置 2 小时以上,待血清析出后取 25ml 血清即可。血清样品在 2-8℃可以保存 7 天,如果需要长期保存,请在 -20℃保存,避免反复冻融。样品需要在含干冰的保温瓶或其它装置条件下运输。

[0060] (2) 试剂的准备

[0061] 1) 洗涤液:将 50 mL 浓缩洗液和 1200 mL 去离子水混合,作为工作洗涤液。

[0062] 2) 标记物工作液:使用前一小时将每瓶标记物用 1 mL 去离子水溶解,用分析缓冲液以 1:50 倍稀释作为钨标抗体工作液。

[0063] 3) 免疫磁珠:使用前需震荡悬浮。

[0064] (3) 操作步骤

[0065] 1) 每管加入 50  $\mu$ l 免疫磁珠,然后加入 25  $\mu$ l 校准品或样品,再加入 200  $\mu$ l 钨标抗体工作液,室温震荡孵育 30min。

[0066] 2) 将反应管置于磁力分离架上 2 分钟,使磁珠凝集。

[0067] 3) 吸弃上清,用洗涤液冲洗 4 次,洗涤液加入量为 300  $\mu$ l,每次加入洗涤液后需静置 30 秒,使磁珠重新凝集。

[0068] 4) 吸弃洗液,每孔加增强液 200  $\mu$ l,震荡孵育 5 分钟。

[0069] 5) 测定。

[0070] 实施例 3 本发明的试剂盒的方法学检定

[0071] 按照本领域中常规的制造和检定规程对通过实施例 1 中制备成的试剂盒进行检定,结果如下:

[0072] 1) 准确度

[0073] 对校准品与相应浓度的国家标准品同时进行分析测定后,用双对数数学模型(log-log)拟合,两条剂量-反应曲线基本平行(图 1:为国家标准品的剂量-反应曲线;图 2:为校准品的剂量-反应曲线;Cps 为每秒钟荧光计数),两条曲线的斜率分别为 0.461 和 0.458 ( $t$ 检验  $P>0.05$ )。以 CEA 国家标准品为对照品,校准品的实测效价与标示效价的比值在 0.9~1.1 之间。剂量-反应曲线的线性相关系数( $r$ )=0.998。

[0074] 2) 分析灵敏度和线性范围

[0075] 以零参考标准品当作样品测量 8 次,计算其荧光值及标准差。以该点荧光测定平均值加 2 倍标准差所得的荧光值代入标准曲线方程计算得出的浓度值为其灵敏度,经测定本试剂分析灵敏度为 0.15ng/ml。将抗原稀释成不同浓度进行测定,测得标准曲线线性范围为 0.15 ~ 1000ng/ml。

[0076] 3) 精密度(CV%)

[0077] 用本发明试剂盒对自制的 CEA 质控品(质控品 I、II、III,预期浓度分别为 8.76、25.8、84.9ng/ml)进行测定,各设 10 个复孔。结果本发明试剂盒的批内变异系数(CV%)为 3.3%-6.8%和批间变异系数(CV%)为 5.5%-8.5%。较杭建锋等报道的微孔板 CEA TRFIA 批内和批间的变异系数(CV%)为 7.2%-8.6%和 8.9%-13.2%要好。

[0078] 表 1 批内精密度测试结果( $n=10$ )

[0079]

批号	100607		100924		101025	
测定值	CEA(ng/mL)	CV %	CEA(ng/mL)	CV %	CEA(ng/mL)	CV %
质控品I	9.18 ± 0.58	6.2	8.42 ± 0.54	6.5	9.34 ± 0.74	6.8
质控品II	26.4 ± 1.72	5.6	27.6 ± 1.41	4.5	25.1 ± 1.46	5.8
质控品III	83.2 ± 4.80	4.2	85.9 ± 4.27	5.3	84.6 ± 3.19	3.3

[0080] 表 2 批间精密度测试结果(三批,  $n=3*10$ )

[0081]

测定值	CEA(ng/mL)	CV%
质控品I	8.76 ± 0.78	8.5
质控品II	27.4 ± 1.94	6.8
质控品III	86.7 ± 4.21	5.5

[0082] 4) 特异性

[0083] 将高浓度的 AFP、CA125、CA19-9 及人白蛋白当作样品用本试剂盒测定, 结果表明无明显交叉反应, 见表 3。

[0084] 表 3CEA 特异性检测结果

[0085]

检测项目	AFP	CA125	CA19-9	白蛋白
样品浓度	1000IU/ml	600U/ml	500U/ml	1000ng/ml
测定浓度 (ng/ml)	0.1	0.09	0.05	0.155

[0086] 5) 正常值范围值

[0087] 用自制试剂对 400 例健康查体者(男 200 例, 年龄 3 ~ 65 岁; 女 200 例, 年龄 8 ~ 80 岁) 血清 CEA 的水平检测表明, 最低值为 0  $\mu$ g/L, 最高值为 10.8  $\mu$ g/L, 平均浓度( $\bar{x}$ ) 为 3.14  $\mu$ g/L, 标准差( $SD$ )为 1.66  $\mu$ g/L。从表 4 的结果可以看出, 大多数样本(96.0%) 中的 CEA 浓度值在 6.0  $\mu$ g/L 以下, 均值加 2 个  $SD$  等于 6.46  $\mu$ g/L; 96.75% 的标本 CEA 的浓度值在 6.5  $\mu$ g/L 以下。综合其他人的研究及临床参考值, 我们建议采用本试剂检测时, 血清 CEA 水平的正常参考值范围应定为 0 ~ 6.5  $\mu$ g/L。各医院使用本试剂检测时, 根据各地区样本的差异, 建议设立自己的参考值范围。

[0088] 表 4 正常人血清 CEA 水平检测结果的统计学分析 ( $n=400$ )

[0089]

	CEA 浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )					
	0~6.0	6.01~7.0	7.01~8.0	8.01~10.0	10.01~12.0	>12.0
样本数	384	6	4	5	1	0
百分比 (%)	96.0	1.50	1.00	1.25	0.25	0

[0090] 实施例 4 本发明的试剂盒与国内外相关试剂盒临床血样测值比较

[0091] 用本发明的试剂盒和罗氏公司的电化学发光 CEA 试剂盒以及广州市达瑞抗体工程技术有限公司微孔板式 TRFIA CEA 试剂盒同时对 239 份血清样本进行检测。以本发明方法测定血样的 CEA 浓度结果为横坐标,以罗氏公司电化学发光法测定的 CEA 浓度结果为纵坐标做回归分析,相关方程为:  $Y = 0.873X - 3.802$ , 相关系数  $r = 0.976$  (图 3); 以本发明方法测定血样的 CEA 浓度结果为横坐标,以广州市达瑞抗体工程技术有限公司微孔板式 TRFIA 法测定的浓度结果为纵坐标做回归分析,相关方程为:  $Y = 1.049X + 1.696$ , 相关系数  $r = 0.985$  (图 4)。经统计学处理结果表明,本发明方法与罗氏电化学发光试剂和广州市达瑞抗体工程技术有限公司微孔板式 TRFIA 试剂临床血样测值均具有显著相关性。

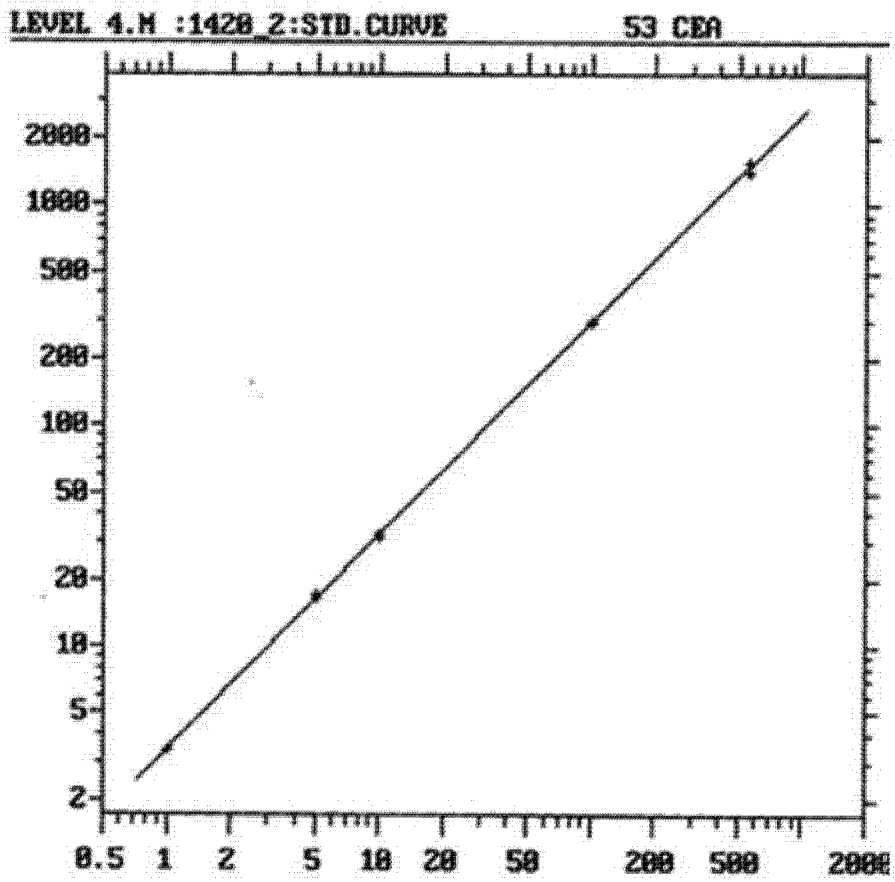


图 1

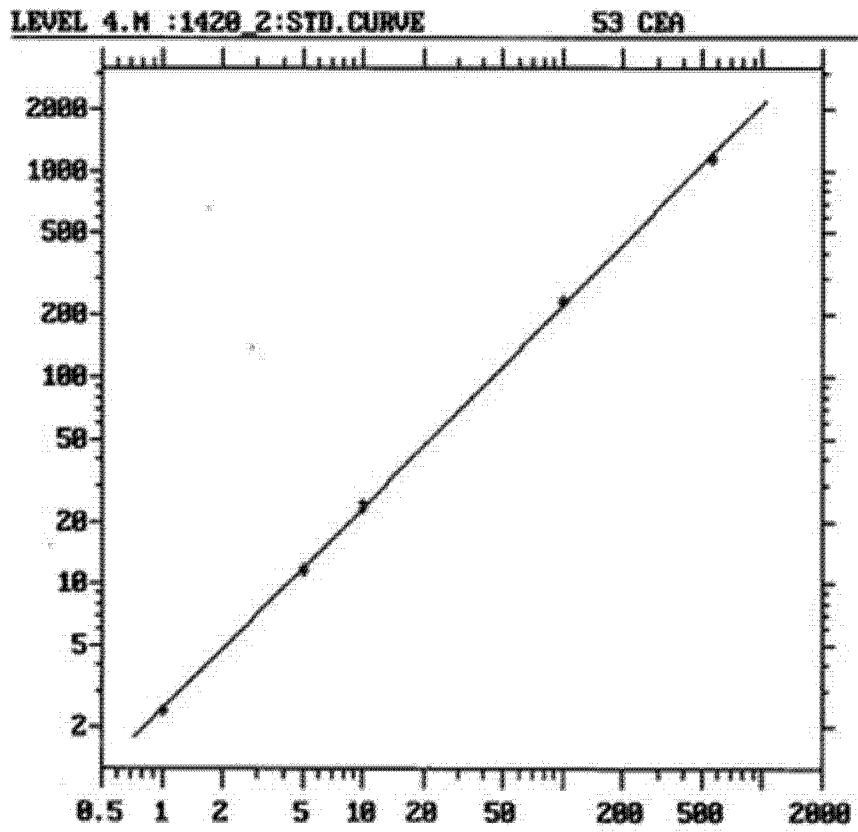


图 2

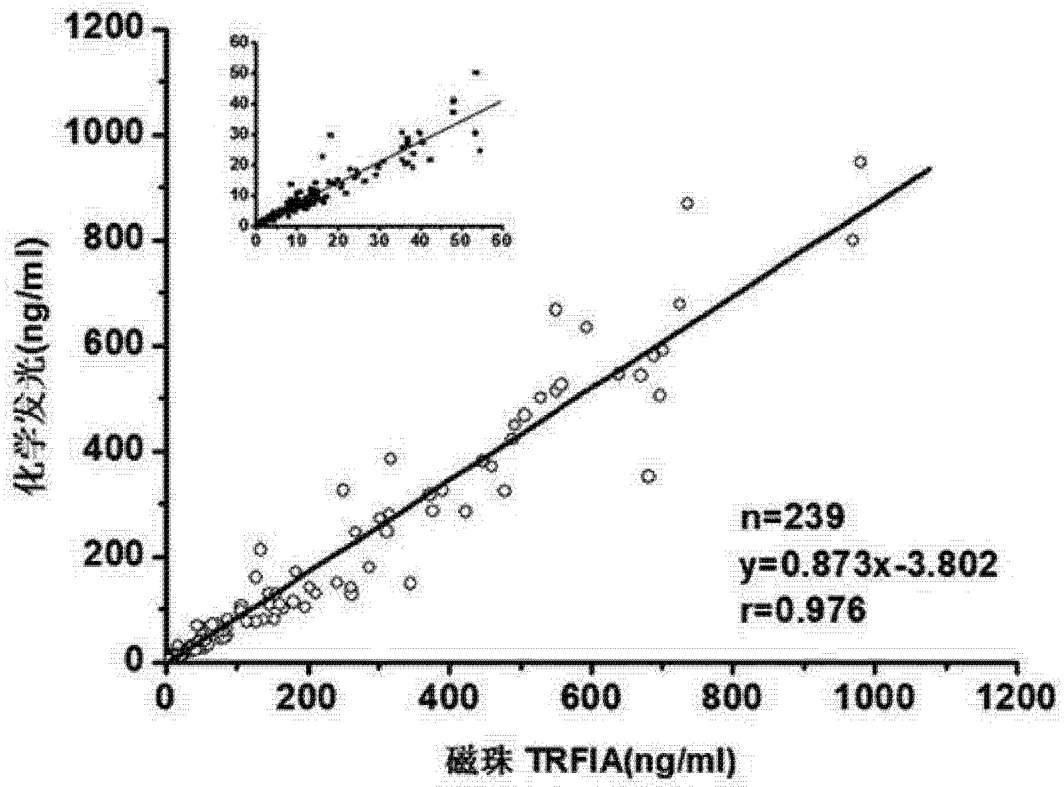


图 3

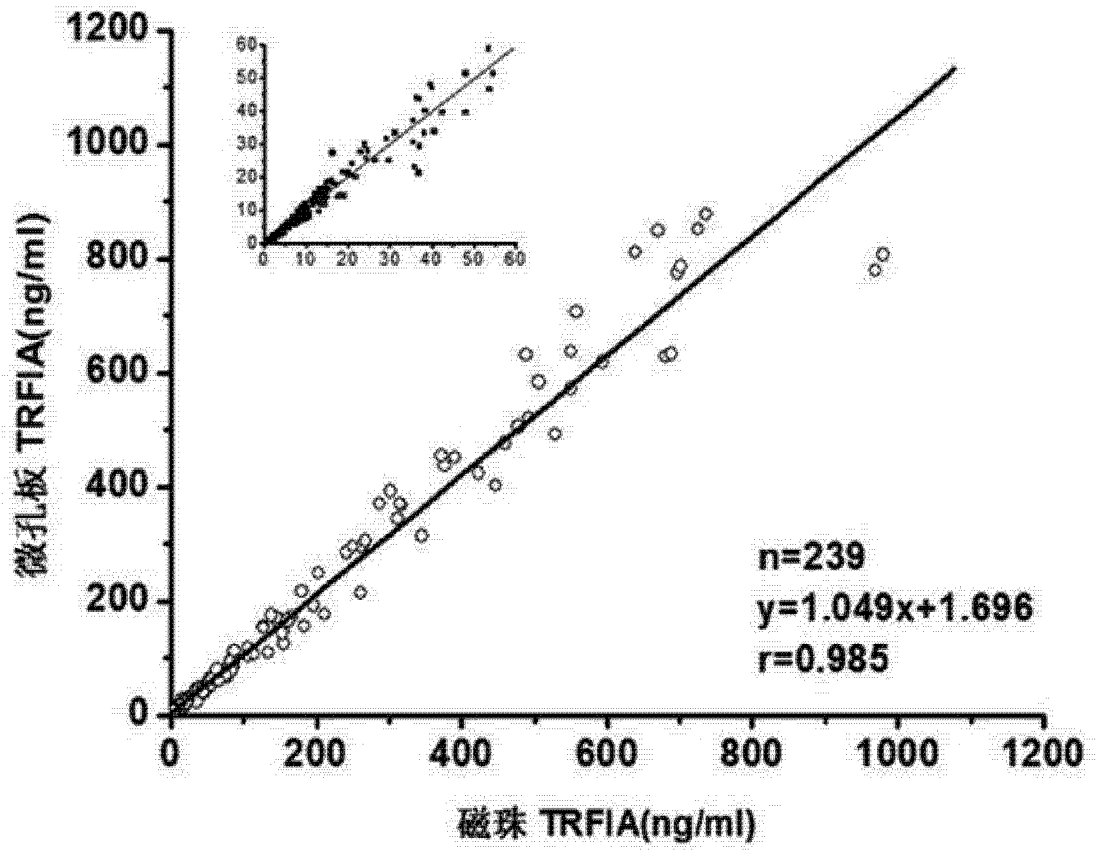


图 4

专利名称(译)	一种基于免疫磁珠的CEA时间分辨荧光免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102507947B</a>	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201110356936.4	申请日	2011-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	吴英松		
发明人	吴英松		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/64		
代理人(译)	陈卫		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102507947A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于免疫磁珠的CEA时间分辨荧光免疫分析试剂盒。该试剂盒包括校准品，连接抗CEA抗体的磁珠，标记抗CEA抗体，分析缓冲液，洗涤液和增强液。通过双抗体夹心的免疫反应，形成免疫磁珠-CEA-标记抗-CEA单克隆抗体复合物，再通过磁性分离将吸附CEA的免疫磁珠与上清分离洗涤，加入增强液并通过时间分辨仪器测值。本发明除拥有TRFIA技术优点外，还通过免疫磁珠富集作用以及磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大，大大缩短反应时间，提高检测灵敏度。磁珠与抗体通过化学基团定向连接，大大减少对抗体用量以及提高检测精密密度。该技术容易实现自动化，克服了传统微孔板式TRFIA技术需要样本累积到一定数量才能检测，实现了样本即时检测。

