



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102520195 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110455048.8

(22) 申请日 2011.12.30

(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 单存海

(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 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒  
及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括如下组分:1) 嗜铬粒蛋白 A 标准品;2) 辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体;3) 嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒;4) 白色不透明微孔板;5) 洗涤液;6) 化学发光底物 A 及 B 工作液。本发明将化学发光免疫分析与纳米磁颗粒技术相结合,提供一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒。本方法既克服了传统 ELISA 方法灵敏度低、准确度较差的缺点,又没有 RIA 技术的放射性污染,具有安全环保、特异性强、灵敏度及准确度高等优点。

1. 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒,其特征是包括如下组分:

- 1) 嗜铬粒蛋白 A 标准品;
- 2) 辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体;
- 3) 嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒;
- 4) 白色不透明微孔板;
- 5) 洗涤液;
- 6) 化学发光底物 A 及 B 工作液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒,其特征是所述辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体是用下述方法制成:

①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg,加入 1~2ml 浓度为 0.05mol/L, pH = 7.5 的碳酸盐缓冲液溶解,4℃ 储存备用;

②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶,加入 1.0ml 去离子水,振荡,溶解后,取出 0.14~0.28ml,加入 0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 溶液 0.2ml,室温下避光反应 1~2 小时;

③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合,室温下避光反应 4~8 小时;

④加入 200 μl 浓度为 5mg/ml 的 NaBH<sub>4</sub> 水溶液,室温下避光反应 1~2 小时;

⑤用 0.02M PBS 透析 12-24 小时,用 HPLC 二次纯化,收集蛋白峰并于 -20℃ 下冷冻保存。

3. 根据权利要求 1 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒,其特征是所述嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒是用下述方法制成:

①取 5ml 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液,用磁板分离弃上清,用去离子水洗磁颗粒;

②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗磁颗粒;

③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积为 5~10ml;

④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 10~20 分钟;

⑤加入碳二亚胺 5~10mg;室温,放在摇床上进行匀化 5~10 小时;

⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次;

⑦加入 Tris 和 EDTA,使 Tris 的含量为 0.05mol/L,使 EDTA 的含量为 0.004mol/L,调 pH = 7.5,使抗体浓度为 1.0mg/ml,2-4℃ 保存。

4. 根据权利要求 1 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒,其特征是所述洗涤液的配制:

取:三羟甲基氨基甲烷 6.05g;NaCl8.55g;Tween-20 0.5ml;加水至 1L;用 HCl 调 pH 至 7.5±0.1。

5. 根据权利要求 1 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒,其特征是所述化学发光底物 A 工作液是用下述方法制成:

(1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

(2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 3~5mmol 鲁米诺,混匀;让所述化学发光底物 B 工作液是用下述方法制成:

(1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

(2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入:0.5~1.0mmol 四苯硼

钠;1.42mmol 铁氰化钾;0.38mmol 肉桂酸;7.56mmol 过氧化氢,混匀。

6. 权利要求 1 的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征是包括如下步骤:

- 1) 准备嗜铬粒蛋白 A 标准品;
- 2) 制备辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体;
- 3) 制备嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒;
- 4) 准备白色不透明微孔板;
- 5) 制备洗涤液;
- 6) 制备化学发光底物 A 及 B 工作液。

7. 根据权利要求 6 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征是所述制备辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体的步骤是:

①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg,加入 1~2ml 浓度为 0.05mol/L, pH = 7.5 的碳酸盐缓冲液溶解,4℃ 储存备用;

②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶,加入 1.0ml 去离子水,振荡,溶解后,取出 0.14~0.28ml,加入 0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 溶液 0.2ml,室温下避光反应 1~2 小时;

③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合,室温下避光反应 4~8 小时;

④加入 200 μl 浓度为 5mg/ml 的 NaBH<sub>4</sub> 水溶液,室温下避光反应 1~2 小时;

⑤用 0.02M PBS 透析 12-24 小时,用 HPLC 二次纯化,收集蛋白峰并于 -20℃ 下冷冻保存。

8. 根据权利要求 6 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征是所述制备嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒的步骤是:

①取 5ml 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液,用磁板分离弃上清,用去离子水洗磁颗粒;

②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗磁颗粒;

③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积为 5~10ml;

④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 10~20 分钟;

⑤加入碳二亚胺 5~10mg;室温,放在摇床上进行匀化 5~10 小时;

⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次;

⑦加入 Tris 和 EDTA,使 Tris 的含量为 0.05mol/L,使 EDTA 的含量为 0.004mol/L,调 pH = 7.5,使抗体浓度为 1.0mg/ml,2-4℃ 保存。

9. 根据权利要求 6 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征制备所述洗涤液的步骤是:

取:三羟甲基氨基甲烷 6.05g;NaCl8.55g;Tween-20 0.5ml;加水至 1L;用 HCl 调 pH 至 7.5±0.1。

10. 根据权利要求 6 所述的一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征是所述制备化学发光底物 A 工作液的步骤是:

(1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

(2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 3~5mmol 鲁米诺,混匀;所述制备化学发光底物 B 工作液的步骤是:

- (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 :0.5 ~ 1.0mmol 四苯硼钠 ;1.42mmol 铁氰化钾 ;0.38mmol 肉桂酸 ;7.56mmol 过氧化氢,混匀。

## 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学技术领域,具体地涉及一种人血清中嗜铬粒蛋白 A(CgA)化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 嗜铬粒蛋白 A(Chromogranin A,CgA)是一种由 439 个氨基酸组成的酸性可溶性蛋白,为嗜铬蛋白家族的主要成员。广泛存在于神经内分泌细胞中,血浆中 CgA 浓度的升高可提示神经内分泌来源的肿瘤。几乎所有类型的神经内分泌肿瘤的诊断中都会出现 CgA 水平的升高。因此神经内分泌肿瘤的诊断中,CgA 是极具价值的诊断标志物。若以 32.7U/L 作为临界值,CgA 对胰腺肿瘤的灵敏度和特异性分别为 82.1%和 96.2%,对嗜铬细胞瘤的灵敏度和特异性分别为 88.5%和 96.2%。因此,CgA 的定量检测对于胰腺癌及嗜铬细胞瘤的临床诊断具有十分重要的意义。

[0003] 目前对 CgA 的测定报道的方法主要有酶联免疫分析法(ELISA)、免疫放射分析法(IRMA)等。如上海研辉生物科技有限公司提供的进口试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人嗜铬蛋白 A(CgA)水平。用纯化的人嗜铬蛋白 A(CgA)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入嗜铬蛋白 A(CgA),再与 HRP 标记的羊抗人抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过洗涤后加底物 TMB 显色。用酶标仪测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中人嗜铬蛋白 A(CgA)含量。再如中国协和医科大学采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)对血清 CgA 水平进行检测。结果表明,血清 CgA 浓度与 CgA 在嗜铬细胞瘤组织中的表达强度相关,与肿瘤重量呈正相关,高水平的血清 CgA 浓度提示肿瘤很可能为恶性。ELISA 方法受影响因素较多,很容易造成结果失真,准确性较差。因此该技术在科研中应有较多,而在临床检测中应有并不多。

[0004] 法国 CIS 公司研制了一种免疫放射分析法检测 CgA 的试剂盒,用一株 CgA 单克隆抗体包被试管,另一株 CgA 单克隆用碘-125(<sup>125</sup>I)标记,通过双抗体夹心法检测血清中 CgA 的浓度。该方法操作简单,测定结果比较准确可靠。但由于碘-125 具有放射性污染,在我们对环保要求越来越高的今天,放射免疫分析技术显然不符生物医药技术的发展趋势。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种灵敏度高、准确度高、又没有放射性污染的嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒。

[0006] 本发明的第二个目的是提供一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明的技术方案概述如下:

[0008] 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒,包括如下组分:

[0009] 1) 嗜铬粒蛋白 A 标准品;

[0010] 2) 辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体;

- [0011] 3) 嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒；
- [0012] 4) 白色不透明微孔板；
- [0013] 5) 洗涤液；
- [0014] 6) 化学发光底物 A 及 B 工作液。
- [0015] 所述辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体是用下述方法制成：
- [0016] ①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg, 加入 1 ~ 2ml 浓度为 0.05mol/L, pH = 7.5 的碳酸盐缓冲液溶解, 4℃ 储存备用；
- [0017] ②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶, 加入 1.0ml 去离子水, 振荡, 溶解后, 取出 0.14 ~ 0.28ml, 加入 0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 溶液 0.2ml, 室温下避光反应 1 ~ 2 小时；
- [0018] ③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合, 室温下避光反应 4 ~ 8 小时；
- [0019] ④加入 200 μl 浓度为 5mg/ml 的 NaBH<sub>4</sub> 水溶液, 室温下避光反应 1 ~ 2 小时；
- [0020] ⑤用 0.02M PBS 透析 12-24 小时, 用 HPLC 二次纯化, 收集蛋白峰并于 -20℃ 下冷冻保存。
- [0021] 所述嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒是用下述方法制成：
- [0022] ①取 5mL 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液, 用磁板分离弃上清, 用去离子水洗磁颗粒；
- [0023] ②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗磁颗粒；
- [0024] ③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积为 5 ~ 10ml；
- [0025] ④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 10 ~ 20 分钟；
- [0026] ⑤加入碳二亚胺 5 ~ 10mg；室温, 放在摇床上进行匀化 5 ~ 10 小时；
- [0027] ⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；
- [0028] ⑦加入 Tris 和 EDTA, 使 Tris 的含量为 0.05mol/L, 使 EDTA 的含量为 0.004mol/L, 调 pH = 7.5, 使抗体浓度为 1.0mg/ml, 2-4℃ 保存。
- [0029] 所述洗涤液的配制：
- [0030] 取：三羟甲基氨基甲烷 6.05g；NaCl 18.55g；Tween-20 0.5ml；加水至 1L；用 HCl 调 pH 至 7.5 ± 0.1。
- [0031] 化学发光底物 A 工作液是用下述方法制成：
- [0032] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0033] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 3 ~ 5mmol 鲁米诺, 混匀；让化学发光底物 B 工作液是用下述方法制成：
- [0034] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0035] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入：0.5 ~ 1.0mmol 四苯硼钠；1.42mmol 铁氰化钾；0.38mmol 肉桂酸；7.56mmol 过氧化氢, 混匀。
- [0036] 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法, 包括如下步骤：
- [0037] 1) 准备嗜铬粒蛋白 A 标准品；
- [0038] 2) 制备辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体；
- [0039] 3) 制备嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒；
- [0040] 4) 准备白色不透明微孔板；

- [0041] 5) 制备洗涤液；
- [0042] 6) 制备化学发光底物 A 及 B 工作液。
- [0043] 制备辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体的步骤是：
- [0044] ①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg，加入 1 ~ 2ml 浓度为 0.05mol/L, pH = 7.5 的碳酸盐缓冲液溶解，4℃ 储存备用；
- [0045] ②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶，加入 1.0ml 去离子水，振荡，溶解后，取出 0.14 ~ 0.28ml，加入 0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 溶液 0.2ml，室温下避光反应 1 ~ 2 小时；
- [0046] ③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合，室温下避光反应 4 ~ 8 小时；
- [0047] ④加入 200 μ l 浓度为 5mg/ml 的 NaBH<sub>4</sub> 水溶液，室温下避光反应 1 ~ 2 小时；
- [0048] ⑤用 0.02M PBS 透析 12-24 小时，用 HPLC 二次纯化，收集蛋白峰并于 -20℃ 下冷冻保存。
- [0049] 制备嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒的步骤是：
- [0050] ①取 5mL 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液，用磁板分离弃上清，用去离子水洗磁颗粒；
- [0051] ②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗磁颗粒；
- [0052] ③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积为 5 ~ 10ml；
- [0053] ④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 10 ~ 20 分钟；
- [0054] ⑤加入碳二亚胺 5 ~ 10mg；室温，放在摇床上进行匀化 5 ~ 10 小时；
- [0055] ⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；
- [0056] ⑦加入 Tris 和 EDTA，使 Tris 的含量为 0.05mol/L，使 EDTA 的含量为 0.004mol/L，调 pH = 7.5，使抗体浓度为 1.0mg/ml，2-4℃ 保存。
- [0057] 制备所述洗涤液的步骤是：
- [0058] 取：三羟甲基氨基甲烷 6.05g；NaCl 8.55g；Tween-20 0.5ml；加水至 1L；用 HCl 调 pH 至 7.5 ± 0.1。
- [0059] 制备化学发光底物 A 工作液的步骤是：
- [0060] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0061] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 3 ~ 5mmol 鲁米诺，混匀；所述制备化学发光底物 B 工作液的步骤是：
- [0062] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0063] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入：0.5 ~ 1.0mmol 四苯硼钠；1.42mmol 铁氰化钾；0.38mmol 肉桂酸；7.56mmol 过氧化氢，混匀。
- [0064] 本发明将化学发光免疫分析与纳米磁颗粒技术相结合，提供一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒。本方法既克服了传统 ELISA 方法灵敏度低、准确度较差的缺点，又没有 RIA 技术的放射性污染，具有安全环保、特异性强、灵敏度及准确度高等优点。

#### 附图说明

- [0065] 图 1 CgA 化学发光免疫分析原理示意图。

## 具体实施方式

[0066] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明：

[0067] 实施例 1

[0068] 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法及实验操作程序：

[0069] 1. 辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体（简称酶标抗体）制备：

[0070] ①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg 放入 5ml 玻璃瓶内，加入 1.0ml 0.05mol/L, pH = 7.5 的碳酸钠缓冲液溶解，4℃ 储存备用；

[0071] ②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶放入一只 16×100mm 玻璃试管内，加入 1.0ml 去离子水，振荡，待其完全溶解后，取出 0.14ml 放入另一只 16×100mm 玻璃试管内，加入 0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 溶液 0.2ml (NaIO<sub>4</sub> 溶液必须新鲜配制)，用胶塞将玻璃试管口塞紧，室温下避光反应 1 小时；

[0072] ③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合，室温下避光反应 4 小时；

[0073] ④加入 200 μl 浓度为 5mg/ml 的 NaBH<sub>4</sub> 水溶液，室温下避光反应 1 小时；

[0074] ⑤用 0.02M PBS 透析 18 小时，用 HPLC 二次纯化，收集蛋白峰并于 -20℃ 下冷冻保存；

[0075] 2、嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒的制备；

[0076] ①取 5mL 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液中，用磁板分离弃上清，用去离子水洗磁颗粒 1 次；

[0077] ②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗 1 次；

[0078] ③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积约为 5ml；

[0079] ④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 10 分钟；

[0080] ⑤加入碳二亚胺 (EDAC) 5mg；室温，放在摇床上进行匀化 5 小时；

[0081] ⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；

[0082] ⑦加入 Tris 和 EDTA，使 Tris 的含量为 0.05mol/L，使 EDTA 的含量为 0.004mol/L，调 pH = 7.5，使抗体浓度为 1.0mg/ml，4℃ 保存。

[0083] 3、洗涤液的配制：

[0084] 取三羟甲基氨基甲烷 (TrisBase) 6.05g；NaCl 8.55g；Tween-20 0.5ml；加水至 1L；用 HCl 调 pH 至 7.5±0.1，混匀；

[0085] 4、化学发光底物 A 工作液的配制：

[0086] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0087] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 3mmol 鲁米诺，混匀。

[0088] 5. 化学发光底物 B 工作液的配制：

[0089] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0090] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入：0.5mmol 四苯硼钠；1.42mmol 铁氰化钾；0.38mmol 肉桂酸；7.56mmol 过氧化氢，混匀。

[0091] 6、标准品的配制：

[0092] 0.01M PBS 配制：

[0093] ① Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.104g/L；

[0094] ② NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25g/L；

[0095] ③ NaCl 8.55/L ;

[0096] ④ ProClin300 1.0ml/L,用 HCl 调 PH 至  $7.4 \pm 0.1$ 。

[0097] 将上述 0.01M PBS 与牛血清按体积比 4 : 1 的比例混合配制成基础缓冲液,再用 CgA 抗原配制成不同浓度的标准品。

[0098] 7、人血清中嗜铬粒蛋白 A (CgA) 的化学发光免疫分析 (CLIA) 方法实验操作程序如下 :

[0099] (1) 将实验所需试剂及样本放置室温,平衡至少 30 分钟以上才可进行操作 ;

[0100] (2) 取一块 96 孔微孔板进行编号,所有实验均做双孔重复 ;

[0101] (3) 取各个浓度的标准品和样品  $50 \mu\text{l}$  加入相应编号的孔中 ;

[0102] (4) 每孔均各加入  $50 \mu\text{l}$  酶标记抗体 ;

[0103] (5) 充分混匀嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒,每孔均各加入  $50 \mu\text{l}$  磁颗粒 ;

[0104] (6) 充分混匀,室温振荡 0.5 小时 ;

[0105] (7) 将其放在磁板上吸附磁颗粒,吸去上清液 ;

[0106] (8) 去除磁板,每孔均各加入  $250 \mu\text{l}$  洗涤液 ;

[0107] (9) 振荡 5 秒后,将其放在磁板上吸附磁颗粒,吸去上清液 ;

[0108] (10) 重复一遍步骤 (8)、(9) ;

[0109] (11) 每孔各加入化学发光底物 A 工作液  $50 \mu\text{l}$  ;

[0110] (12) 每孔加各入化学发光底物 B 工作液  $50 \mu\text{l}$  ;

[0111] (13) 用化学发光仪测定每孔的发光强度 ;

[0112] (14) 从标准曲线上读取样品的浓度。

[0113] 实施例 2

[0114] 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法及实验操作程序 :

[0115] 1. 辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体 (简称酶标抗体) 制备 :

[0116] ①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg 放入 5ml 玻璃瓶内,加入 1.5ml 0.05mol/L, pH = 7.5 的碳酸钠缓冲液溶解,4℃ 储存备用 ;

[0117] ②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶放入一只  $16 \times 100\text{mm}$  玻璃试管内,加入 1.0ml 去离子水,振荡,待其完全溶解后,取出 0.21ml 放入另一只  $16 \times 100\text{mm}$  玻璃试管内,加入 0.1mol/L 的  $\text{NaIO}_4$  溶液 0.2ml ( $\text{NaIO}_4$  溶液必须新鲜配制),用胶塞将玻璃试管口塞紧,室温下避光反应 1.5 小时 ;

[0118] ③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合,室温下避光反应 6 小时 ;

[0119] ④加入  $200 \mu\text{l}$  浓度为 5mg/ml 的  $\text{NaBH}_4$  水溶液,室温下避光反应 1.5 小时 ;

[0120] ⑤用 0.02M PBS 透析 24 小时,用 HPLC 二次纯化,收集蛋白峰并于  $-20^\circ\text{C}$  下冷冻保存 ;

[0121] 2、嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒的制备 ;

[0122] ①取 5mL 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液中,用磁板分离弃上清,用去离子水洗磁颗粒 1 次 ;

[0123] ②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗 1 次 ;

[0124] ③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积为 8ml ;

- [0125] ④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 15 分钟；
- [0126] ⑤加入碳二亚胺 (EDAC) 8mg；室温，放在摇床上进行匀化 8 小时；
- [0127] ⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；
- [0128] ⑦加入 Tris 和 EDTA，使 Tris 的含量为 0.05mol/L，使 EDTA 的含量为 0.004mol/L，调 pH = 7.5，使抗体浓度为 1.0mg/ml，2℃ 保存。
- [0129] 3、洗涤液的配制（同实施例 1）
- [0130] 4、化学发光底物 A 工作液的配制：
- [0131] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0132] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 3mmol 鲁米诺，混匀。
- [0133] 5. 化学发光底物 B 工作液的配制：
- [0134] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；
- [0135] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入：0.5mmol 四苯硼钠；1.42mmol 铁氰化钾；0.38mmol 肉桂酸；7.56mmol 过氧化氢，混匀。
- [0136] 6、标准品的配制（同实施例 1）
- [0137] 7、人血清中嗜铬粒蛋白 A (CgA) 的化学发光免疫分析 (CLIA) 方法的实验操作步骤：
- [0138] (1) 将实验所需试剂及样本放置室温，平衡至少 30 分钟以上才可进行操作；
- [0139] (2) 取一块 48 孔微孔板进行编号，所有实验均做双孔重复；
- [0140] (3) 取各个浓度的标准品和样品 50  $\mu$  l 加入相应编号的孔中；
- [0141] (4) 每孔均各加入 50  $\mu$  l 酶标记抗体；
- [0142] (5) 充分混匀嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒，每孔均各加入 50  $\mu$  l 磁颗粒；
- [0143] (6) 充分混匀，室温振荡 45 分钟；
- [0144] (7) 将其放在磁板上吸附磁颗粒，吸去上清液；
- [0145] (8) 去除磁板，每孔均各加入 250  $\mu$  l 洗涤液；
- [0146] (9) 振荡 8 秒后，将其放在磁板上吸附磁颗粒，吸去上清液；
- [0147] (10) 重复一遍步骤 (8)、(9)；
- [0148] (11) 每孔各加入化学发光底物 A 工作液 50  $\mu$  l；
- [0149] (12) 每孔加各入化学发光底物 B 工作液 50  $\mu$  l；
- [0150] (13) 用化学发光仪测定每孔的发光强度；
- [0151] (14) 从标准曲线上读取样品的浓度。
- [0152] 实施例 3
- [0153] 一种嗜铬粒蛋白 A 化学发光免疫分析试剂盒的制备方法及实验操作程序：
- [0154] 1. 辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体（简称酶标抗体）制备：
- [0155] ①称取 CgA 单克隆抗体 2.0mg 放入 5ml 玻璃瓶内，加入 2.0ml 0.05mol/L，pH = 7.5 的碳酸钠缓冲液溶解，4℃ 储存备用；
- [0156] ②称取 10.0mg 的辣根过氧化物酶放入一只 16×100mm 玻璃试管内，加入 1.0ml 去离子水，振荡，待其完全溶解后，取出 0.28ml 放入另一只 16×100mm 玻璃试管内，加入 0.1mol/L 的 NaIO<sub>4</sub> 溶液 0.2ml (NaIO<sub>4</sub> 溶液必须新鲜配制)，用胶塞将玻璃试管口塞紧，室温

下避光反应 2 小时；

[0157] ③将步骤①获得的液体与步骤②的获得的液体混合，室温下避光反应 8 小时；

[0158] ④加入 200  $\mu$ l 浓度为 5mg/ml 的  $\text{NaBH}_4$  水溶液，室温下避光反应 2 小时；

[0159] ⑤用 0.02M PBS 透析 12 小时，用 HPLC 二次纯化，收集蛋白峰并于  $-20^\circ\text{C}$  下冷冻保存；

[0160] 2、嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒的制备；

[0161] ①取 5mL 磁颗粒质量含量为 2.5% 的 PBS 溶液中，用磁板分离弃上清，用去离子水洗磁颗粒 1 次；

[0162] ②用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 洗 1 次；

[0163] ③用 0.02mol/L pH = 6.2 的 PBS 调整总体积为 10ml；

[0164] ④加 CgA 单抗 5mg 放在摇床上进行匀化 20 分钟；

[0165] ⑤加入碳二亚胺 (EDAC) 10mg；室温，放在摇床上进行匀化 10 小时；

[0166] ⑥用 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次；

[0167] ⑦加入 Tris 和 EDTA，使 Tris 的含量为 0.05mol/L，使 EDTA 的含量为 0.004mol/L，调 pH = 7.5，使抗体浓度为 1.0mg/ml， $3^\circ\text{C}$  保存。

[0168] 3、洗涤液的配制（同实施例 1）

[0169] 4. 化学发光底物 A 工作液的配制：

[0170] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0171] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入 5mmol 鲁米诺，混匀。

[0172] 5. 化学发光底物 B 工作液的配制：

[0173] (1) 配制 0.05mol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0174] (2) 向 1000ml 所述步骤 (1) 配制的 Tris-HCl 缓冲液中加入：1.0mmol 四苯硼钠；1.42mmol 铁氰化钾；0.38mmol 肉桂酸；7.56mmol 过氧化氢，混匀。

[0175] 6、标准品的配制（同实施例 1）

[0176] 7、人血清中嗜铬粒蛋白 A (CgA) 的化学发光免疫分析试剂盒的实验操作步骤：

[0177] (1) 将实验所需试剂及样本放置室温，平衡至少 30 分钟以上才可进行操作；

[0178] (2) 取一块 384 孔微孔板进行编号，所有实验均做双孔重复；

[0179] (3) 取各个浓度的标准品和样品 100  $\mu$ l 加入相应编号的孔中；

[0180] (4) 每孔均各加入 50  $\mu$ l 酶标记抗体；

[0181] (5) 充分混匀嗜铬粒蛋白 A 单克隆抗体包被的磁颗粒，每孔均各加入 50  $\mu$ l 磁颗粒；

[0182] (6) 充分混匀，室温振荡 1 小时；

[0183] (7) 将其放在磁板上吸附磁颗粒，吸去上清液；

[0184] (8) 去除磁板，每孔均各加入 250  $\mu$ l 洗涤液；

[0185] (9) 振荡 10 秒后，将其放在磁板上吸附磁颗粒，吸去上清液；

[0186] (10) 重复一遍步骤 (8)、(9)；

[0187] (11) 每孔各加入化学发光底物 A 工作液 50  $\mu$ l；

[0188] (12) 每孔加各入化学发光底物 B 工作液 50  $\mu$ l；

[0189] (13) 用化学发光仪测定每孔的发光强度；

[0190] (14) 从标准曲线上读取样品的浓度。

[0191] 本方法检测灵敏度可达 0.8U/mL, 无明显交叉反应, 准确度 95-105%, 标准曲线满足临床标本所需的测量范围为 0.8 ~ 800U/mL。

[0192] 本试剂盒各项技术指标分析:

[0193] 本试剂盒检测灵敏度可达 0.8U/mL, 与类似物无明显交叉反应, 准确度可达 95-105%, 标准曲线满足临床标本所需的测量范围为 0.8 ~ 800U/mL。

[0194] 我们用本试剂盒分别对一批经医院确诊的胰腺癌、嗜铬细胞癌病人血清标本及正常人血清标本进行了测定试验, 结果如下:

[0195]

组别	标本例数	检出阳性例数	阳性检出率
胰腺癌组	52	45	86.54%
嗜铬细胞癌组	63	57	90.47%
正常人组	80	0	0

[0196] 从以上结果可以看出, 本试剂盒对胰腺癌和嗜铬细胞癌的阳性检出率分别可达 86.54% 和 90.47%, 而对正常人检测的假阳性率为 0, 因此本试剂盒对胰腺癌和嗜铬细胞癌的临床辅助诊断具有十分重要的参考价值。

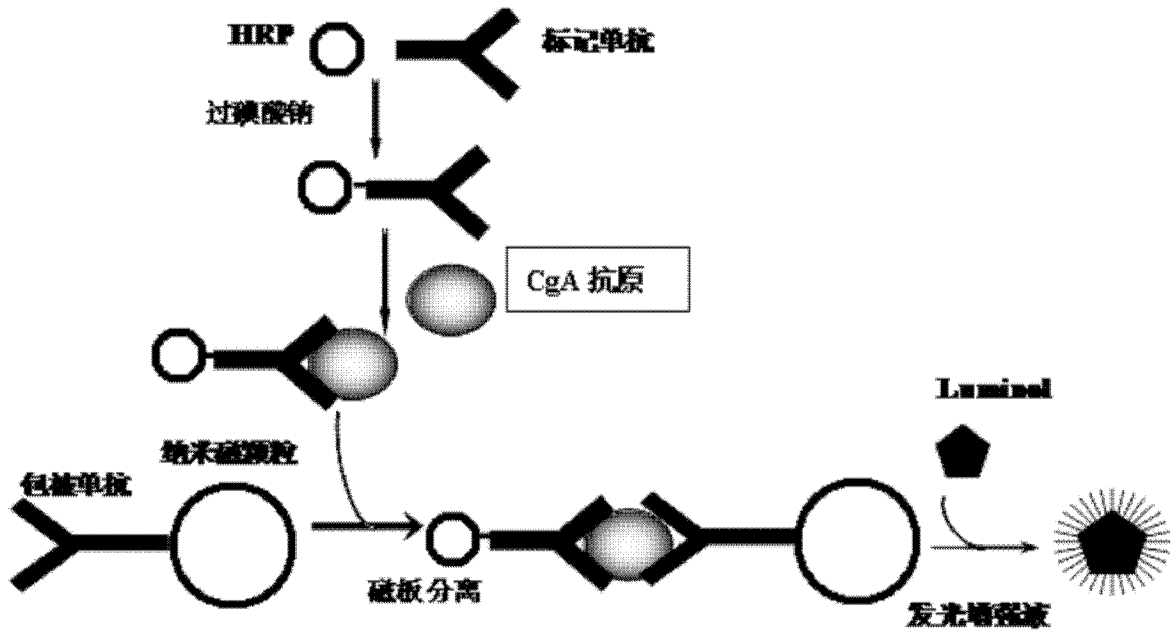


图 1

专利名称(译)	一种嗜铬粒蛋白A化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102520195A</a>	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110455048.8	申请日	2011-12-30
[标]发明人	王立凯 潘学继 单存海		
发明人	王立凯 潘学继 单存海		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	陆艺		
其他公开文献	CN102520195B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种嗜铬粒蛋白A化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法，所述试剂盒包括如下组分：1)嗜铬粒蛋白A标准品；2)辣根过氧化物酶标记的嗜铬粒蛋白A单克隆抗体；3)嗜铬粒蛋白A单克隆抗体包被的磁颗粒；4)白色不透明微孔板；5)洗涤液；6)化学发光底物A及B工作液。本发明将化学发光免疫分析与纳米磁颗粒技术相结合，提供一种嗜铬粒蛋白A化学发光免疫分析试剂盒。本方法既克服了传统ELISA方法灵敏度低、准确度较差的缺点，又没有RIA技术的放射性污染，具有安全环保、特异性强、灵敏度及准确度高等优点。

