



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101995396 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 200910194425. X

(22) 申请日 2009. 08. 21

(73) 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 李欢 曹志娟 刘彩云 卢建忠

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101144815 A, 2008. 03. 19,

CN 101221182 A, 2008. 07. 16,

CN 101144815 A, 2008. 03. 19,

林海龙等. 肿瘤标记物蛋白芯片对肺癌的诊断价值.《第三军医大学学报》. 2005, 第 27 卷(第 15 期), 1591-1592.

孙来玉. 测定癌胚抗原免疫芯片技术的研究.《中国计量学院学报》. 2006, 第 17 卷(第 2 期), 107-110.

侯惠仁等. 癌胚抗原(CEA)酶联免疫分析试剂盒的研制.《同位素》. 2001, 第 14 卷(第 3-4 期), 227-229.

审查员 付婧

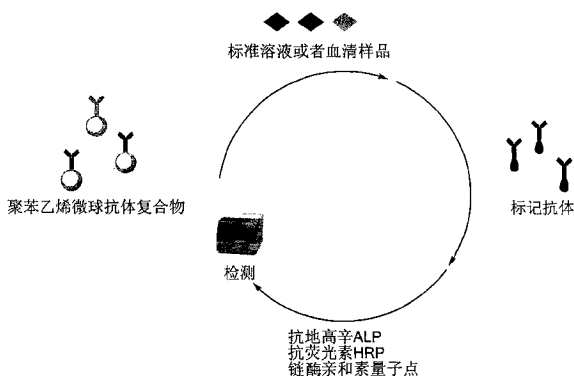
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种均相多指标荧光 / 化学发光测定方法及其用途

(57) 摘要

本发明属血液检验领域,涉及一种均相多指标荧光 / 化学发光分析方法及其用途。采用聚苯乙烯微球上固定多种特异性识别单克隆抗体,与癌胚抗原、细胞角质素片断 19、神经元特异性烯醇化酶和其它多种标志物结合后,与多种不同半抗原修饰的标记抗体夹心反应;与对应半抗原抗体修饰的辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶和量子点反应,结合化学发光和荧光等检测在同一台仪器上进行多种标志物同时测定。本方法具有血清用量小、检测时间短、诊断费用低、操作简单、适合推广的多指标同时检测的优点,能为肿瘤等重大疾病早期诊断,提供辅助判断依据。



1. 一种均相多指标荧光 / 化学发光测定方法, 其特征在于, 在同一台仪器上同时进行化学发光与荧光测定, 同时检查 3 种标志物, 包括用聚苯乙烯微球作为载体结合多种肿瘤标志物的包被抗体, 与标准溶液或者血清样品中的相应多种标志物结合后, 与分别制备的标记抗体结合, 然后与抗地高辛 ALP, 抗 FITC HRP 和链酶亲和素量子点标记物结合后, 进行化学发光测定或者直接进行荧光测定血清标志物;

所述的肿瘤标志物是癌胚抗原 CEA、细胞角质素片断 19Cyfra21-1 和神经元特异性烯醇化酶 NSE;

所述的制备的标记抗体是生物素化 NSE 标记抗体, 地高辛标记的 CEA 标记抗体和 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体。

2. 按权利要求 1 所述的均相多指标荧光 / 化学发光测定方法, 其特征在于, 其包括下述步骤:

- 1) 将包被抗体结合到聚苯乙烯微球上制备载体抗体复合物;
- 2) 制备地高辛标记的 CEA 标记抗体;
- 3) 制备 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体;
- 4) 制备生物素化的 NSE 标记抗体;
- 5) 在同一台仪器上同时进行荧光 / 化学发光测定。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 将步骤 1) 的抗体复合物混合后, 加入含有肿瘤标志物 CEA、Cyfra21-1、NSE 的标准溶液或者血清样品, 于 37°C 反应 1h;

将结合有所述肿瘤标志物的载体抗体复合物洗涤, 加入到步骤 2, 3, 4) 制成的生物素化 NSE 标记抗体, 地高辛标记的 CEA 标记抗体和 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体, 于 37°C 反应 1h;

反应后, 经洗涤, 加入 ALP 修饰抗地高辛、HRP 修饰抗 FITC 和量子点修饰链酶亲和素, 于 37°C 反应 1h;

经洗涤将反应产物平均分为 3 组, 各组加入 HRP 化学发光底物、ALP 化学发光底物进行化学发光测定或者直接进行荧光测定。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征是, 该方法同时检测 3 种标志物, 或同时检测 2 种或 3 种以上标志物。

5. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征是, 该方法使用 2 种酶标记物和 1 种荧光量子点, 或使用 2 种以上或少于 2 种酶标记物或 1 种或 1 种以上荧光量子点。

6. 一种检测肿瘤多种血清标志物的试剂盒, 其特征是, 其包括肿瘤标志物标记抗体和聚苯乙烯微球抗体复合物以及酶标记物和荧光量子点; 所述的肿瘤标志物标记抗体为生物素化 NSE 标记抗体, 地高辛标记的 CEA 标记抗体和 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体; 其中, 使用所述的试剂盒检测肿瘤多种血清标志物的测定步骤在同一台仪器上同时进行化学发光与荧光测定, 同时检查 3 种标志物。

## 一种均相多指标荧光 / 化学发光测定方法及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属血液检验领域,涉及荧光 / 化学发光同时检测新技术,具体涉及一种均相多指标荧光 / 化学发光测定方法及其用途。尤其涉及一种肿瘤等重大疾病多种血清标志物荧光 / 化学发光同时检测技术。

### 背景技术

[0002] 流行病学研究提示,我国不仅肿瘤死亡率呈明显上升趋势,而且兼有发展中国家和发达国家高发并存的特点,主要原因有四点:(1) 人口老龄化。50 年前我国人均寿命 49 岁左右,而现在为 70 多岁,非常接近发达国家水平,老龄化导致老年性疾病自然增多;(2) 工业化发展。随着工业化的进展,环境污染等影响加剧,癌症发病率增高;(3) 农村的城市化随着农村向城镇化发展,生活节奏越来越紧张,饮食结构明显改变,不健康饮食增多,导致癌症发病率增高;(4) 不良的生活习惯如吸烟和不良饮食等。统计表明:中国每年癌症新发病例约为 220 万人,因癌症死亡人数为 160 万人。近 20 年来,每 4-5 个死亡者中就有一个死于癌症,居死亡原因之首。卫生部肿瘤防治办公室提供的 2006 年我国肿瘤发病率和十大恶性肿瘤发病率排序显示:肺癌、乳腺癌分别位居男、女性恶性肿瘤发病首位,男女恶性肿瘤死亡率最高的均为肺癌。据预测,到 2020 年,中国也将有 550 万新发癌症病例,其中死亡人数将达 400 万。

[0003] 目前,肺癌等重大疾病的临床诊断方法主要有:X 线检查、活检、纤维支气管镜检查、CT、MRI 以及痰细胞学检查等。实践显示,活检,纤维支气管镜检查均为创伤性诊断方式,对患者身体及组织有一定程度的损伤,且有人群局限性。CT 和 MRI 检测费用相对昂贵,且地方性医院不具备该类设施。痰细胞学检查为非常规类检查,患者往往在出现明显的症状后才进行该类检查,容易贻误早期诊断时机。因此,发展快速、费用低、灵敏度高、特异性好的无创性早期诊断新技术,特别是血清学的诊断技术,近年来已成为临床上颇为关注的热点研究领域。

[0004] 现代医学的研究成果表明:血清中包含的多种肿瘤标志物如癌胚抗原 (CEA)、细胞角质素片断 19 (Cyfra21-1) 为早期非小细胞肺癌诊断的主要标志物,其中患者血清 Cyfra21-1 值与肺癌的进展程度和组织学分型相关,其广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌,也存在于正常胚胎的消化管组织中,在正常人血清中也可有微量存在。癌胚抗原 (CEA) 是一个广谱性肿瘤标志物,能反映出多种肿瘤的存在,实践显示,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物,但其特异性不强,灵敏度不高,对肿瘤早期诊断作用不明显。神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 为早期小细胞肺癌 (SCLC) 诊断的主要标志物,血清 NSE 是神经原和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶,神经内分泌肿瘤的特异性标志物,如神经母细胞瘤、甲状腺髓质癌和小细胞肺癌 (70% 升高),可用于鉴别诊断、病情监测、疗效评价和复发预报。上述肿瘤标志物主要存在于肺癌患者血清中,已分别应用于肺癌等重大疾病诊断。但大量的临床数据表明:单一肿瘤标志物存在着特异性不强的弊端,特别是对早期肿瘤的检测率不高,临床实践中常不得不采用多

个标志物分别检测、联合分析的方法来提高肿瘤检测的敏感性。但是,每种标志物都需要一种放射或酶联免疫试剂盒,直接导致这些多指标检测方法普遍存在所需血清用量大、检测时间长、诊断费用高、操作复杂等不足,从而限制了它们在临床上的应用。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术检测标志物单一,实验周期长,血清用量大,诊断费用高的不足,提供一种均相多指标荧光/化学发光测定方法,尤其涉及一种肿瘤等重大疾病多种血清标志物荧光/化学发光同时检测技术。

[0006] 本发明采用聚苯乙烯微球上固定多种特异性识别单克隆抗体,用来与癌胚抗原 CEA、细胞角质素片断 19Cyfra21-1、神经元特异性烯醇化酶 NSE 和其它多种癌症标志物结合,然后与多种不同半抗原修饰的标记抗体进行夹心反应;随后与对应半抗原抗体修饰的辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶和量子点反应,结合化学发光和荧光等检测手段在同一台仪器上进行多种标志物同时测定。

[0007] 具体而言,本发明方法一种多种血清标志物荧光/化学发光同时检测方法,可以同时检测多种肿瘤标志物。其特征在于,使用聚苯乙烯微球作为载体结合多种肿瘤标志物的包被抗体,与标准溶液或者血清样品中的相应多种标志物结合后,与分别制备的标记抗体结合,然后与抗地高辛 ALP,抗 FITC HRP 和链酶亲和素量子点等标记物或者其他多种标记物结合,最后进行化学发光测定或者直接进行荧光测定。

[0008] 本发明方法具有血清用量小、检测时间短、诊断费用低、操作简单、适合推广的多指标同时检测的优点,尤其能为临床肿瘤等重大疾病早期诊断,提供多种血清标志物辅助判断依据。

[0009] 本发明方法包括下述步骤:

[0010] 1) 将包被抗体结合到聚苯乙烯微球上制备载体抗体复合物;

[0011] 2) 制备标记抗体;

[0012] 3) 制备 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体;

[0013] 4) 制备生物素化的 NSE 标记抗体;

[0014] 5) 在同一台仪器上同时进行荧光/化学发光测定。

[0015] 本发明中,所述的肿瘤标志物包括癌胚抗原 (CEA)、细胞角质素片断 19 (Cyfra21-1) 神经元特异性烯醇化酶 (NSE)。

[0016] 本发明中,制备的标记抗体包括生物素化 NSE 标记抗体,地高辛标记的 CEA 标记抗体和 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体或者其他标记抗体。

[0017] 本发明中,利用 EDC 反应在聚苯乙烯微球上结合肿瘤标记物抗体,其形成的聚苯乙烯微球抗体复合物作为载体用于肿瘤标志物检测;

[0018] 将上述抗体复合物混合后,加入含有肿瘤标志物的标准溶液或者血清样品,于 37°C 反应 1h;

[0019] 经洗涤将结合有肿瘤标志物的载体抗体复合物中加入到制备的标记抗体,于 37°C 反应 1h;

[0020] 经洗涤加入 ALP 修饰抗地高辛、HRP 修饰抗 FITC 和量子点修饰链酶亲和素,于 37°C 反应 1h;

[0021] 经洗涤将反应产物平均分为 3 组, 各组加入 HRP 化学发光底物、ALP 化学发光底物进行化学发光测定或者直接进行荧光测定。

[0022] 本发明中, 测定步骤在同一台仪器上进行。

[0023] 本发明中, 同时进行化学发光与荧光测定。

[0024] 本发明中, 同时检测三种标志物, 经方法的适当调整, 同样适合于同时检测 2 种甚至 3 种以上标志物。

[0025] 本发明中, 使用 2 种酶标记物和 1 种荧光量子点, 但该方法并不局限于使用 2 种以上或少于 2 种酶标记物和 1 种或 1 种以上荧光量子点, 适合于同时检测 2 种甚至 3 种以上标志物。

[0026] 本发明的另一目的是制备同时检测肿瘤等重大疾病多种血清标志物的检测试剂盒。

[0027] 所述的检测试剂盒包括肿瘤标志物标记抗体和聚苯乙烯微球抗体复合物;

[0028] 本发明优选肿瘤标志物标记抗体为生物素化 NSE 标记抗体, 地高辛标记的 CEA 标记抗体和 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体。

[0029] 为了便于理解, 以下将通过具体的附图和实施例对本发明的进行详细地描述。需要特别指出的是, 具体实例和附图仅是为了说明, 显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明, 在本发明的范围内对本发明做出各种各样的修正和改变, 这些修正和改变也纳入本发明的范围内。下面结合附图和具体实施方式对本发明进一步说明。

#### 附图说明

[0030] 图 1 是本发明的原理图。

#### 具体实施方式

[0031] (1) 聚苯乙烯微球上结合不同标志物对应的包被抗体、封闭备用; (2) 加入含有多种标志物标准品的标准溶液或血清真实样品; (3) 洗涤后加入含有生物素化 NSE 标记抗体, 地高辛标记的 CEA 标记抗体以及 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体或者多种其它半抗原标记的标记抗体混合溶液; (4) 加入 ALP 修饰抗地高辛、HRP 修饰抗 FITC 和量子点修饰链酶亲和素或其它半抗原标记的肿瘤标志物; (5) 平均分为三次后, 加入各自的化学发光底物进行化学发光测定或者直接进行荧光测定。

[0032] 实施例 1

[0033] 1) 将包被抗体结合到聚苯乙烯微球上制备载体抗体复合物

[0034] 首先将羧基聚苯乙烯微球移入一个 1.5mL 的离心管中, 利用 pH = 6.0 的咪唑溶液 (0.1M) 离心 12000rpm 洗涤三次后加入 100  $\mu$ L 溶有 1mg EDC 的咪唑溶液于 37 $^{\circ}$ C 活化 30min。随后用咪唑溶液离心洗涤活化后的聚苯乙烯微球三次, 最后分散于 100  $\mu$ L 咪唑溶液后。随后加入 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 包被抗体, 37 $^{\circ}$ C 下反应 1h。PBSTW 洗液洗涤三次后, 加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液 200  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。聚苯乙烯微球抗体复合物洗涤后, 保存在 200  $\mu$ L 含有 2% BSA 的 PBS 溶液待用。

[0035] 2) 制备地高辛抗 CEA 标记抗体

[0036] 1mg 地高辛首先分散在 400  $\mu$ L 无水乙醇中, 再加入 20  $\mu$ L 水, 缓慢加入 45  $\mu$ L 的

0. 1M 高碘酸钠溶液, 至地高辛完全溶解后反应 30min, 随后加入 35  $\mu$ L 1M 的乙二醇溶液反应 5 分钟, 保存备用。

[0037] 300  $\mu$ L 抗 CEA 标记抗体加入 200  $\mu$ L 水, 用 5% 的碳酸钾溶液调 pH 至 9.5, 加入上述氧化后的地高辛溶液 20  $\mu$ L 反应 1h, 随后加入 6mg 硼氢化钠反应 4h, 用 1M 甲酸调节 pH 至 6.5, 反应 1h 后用氨水调节 pH 至 9.5, 透析过夜后, 浓缩至 150  $\mu$ L 待用, 用紫外分光光度法测得蛋白浓度为 1.63mg/mL。

[0038] 3) 制备 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体。

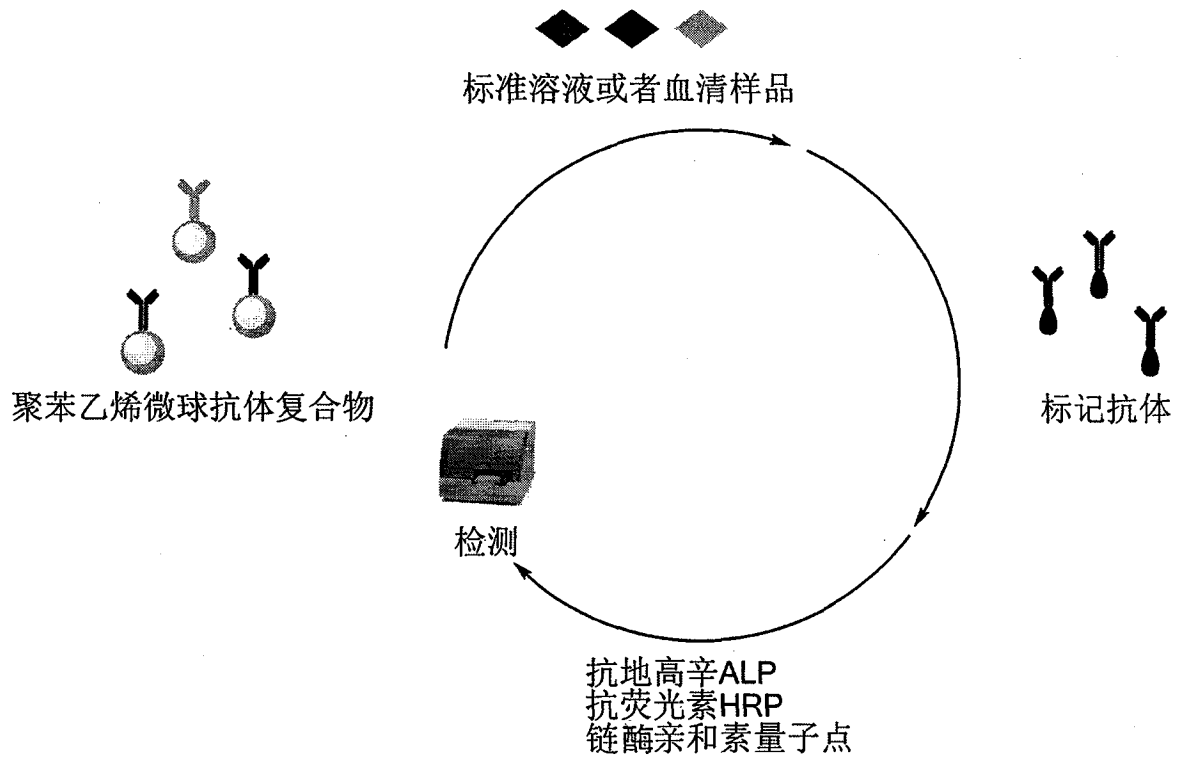
[0039] 浓缩 150  $\mu$ L Cyfra21-1 抗体至 90  $\mu$ L, pH9.2 的 0.1M 碳酸钠 / 碳酸氢钠溶液中, 随后加入 10  $\mu$ L 的异硫氰酸荧光素 (FITC) 的 0.1M 碳酸钠 / 碳酸氢钠溶液, 在 0.1M 碳酸钠 / 碳酸氢钠溶液中透析 12h, 再利用 PBS 溶液透析 12h, 随后浓缩溶液至 150  $\mu$ L 待用, 用紫外分光光度法测得蛋白浓度为 3.45mg/mL。

[0040] 4) 制备生物素化的 NSE 标记抗体

[0041] 将 100  $\mu$ L NSE 标记抗体去除杂质后, 溶于 100  $\mu$ L PBS 中, 加入 5  $\mu$ L 0.1M 溶于 DMF 的 NHS 化生物素 (N-羟基琥珀酰亚胺生物素) 于 4 $^{\circ}$ C 反应 2.5h, 然后利用 PBS 透析过夜, 浓缩至 100  $\mu$ L 待用, 用紫外分光光度法测得蛋白浓度为 1.39mg/mL。

[0042] 5) 化学发光和荧光检测步骤

[0043] 50  $\mu$ L 封闭好并结合有 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 包被抗体的聚苯乙烯微球混合后, 离心或过膜去除上清液。随后加入 100  $\mu$ L 含有 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 的标准品溶液或真实血清样品, 37 $^{\circ}$ C 下反应 1h。200  $\mu$ L PBSTW 溶液洗涤三次后, 加入 100  $\mu$ L 含有生物素化 NSE 标记抗体 (0.5ug/孔)、地高辛标记的 CEA 标记抗体 (0.815ug/孔) 和 FITC 标记的 Cyfra21-1 标记抗体 (3.45ug/孔) 的 2% BSA-PBS 溶液, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。洗涤三次后, 加入 100  $\mu$ L 含有抗地高辛修饰 ALP (1 : 1000)、抗 FITC 修饰 HRP (1 : 1000) 和链霉亲和素修饰量子点 (1 : 200), 于 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。洗涤后, 均分为三份, 加入 50  $\mu$ L PBS 荧光测定, 或 100  $\mu$ L HRP 化学发光底物或 ALP 化学发光底物, 在同一台仪器上同时进行荧光 / 化学发光测定。



专利名称(译)	一种均相多指标荧光/化学发光测定方法及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101995396B</a>	公开(公告)日	2012-12-12
申请号	CN200910194425.X	申请日	2009-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	李欢 曹志娟 刘彩云 卢建忠		
发明人	李欢 曹志娟 刘彩云 卢建忠		
IPC分类号	G01N21/64 G01N21/76 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	吴桂琴		
其他公开文献	CN101995396A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属血液检验领域，涉及一种均相多指标荧光/化学发光分析方法及其用途。采用聚苯乙烯微球上固定多种特异性识别单克隆抗体，与癌胚抗原、细胞角质素片断19、神经元特异性烯醇化酶和其它多种标志物结合后，与多种不同半抗原修饰的标记抗体夹心反应；与对应半抗原抗体修饰的辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶和量子点反应，结合化学发光和荧光等检测在同一台仪器上进行多种标志物同时测定。本方法具有血清用量小、检测时间短、诊断费用低、操作简单、适合推广的多指标同时检测的优点，能为肿瘤等重大疾病早期诊断，提供辅助判断依据。

