



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102901810 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210379893. 6

(22) 申请日 2012. 10. 09

(71) 申请人 北京九强生物技术股份有限公司  
地址 100083 北京市海淀区花园东路 15 号  
旷怡大厦 5 层

(72) 发明人 高爱民 孙国敬 张小锐 徐丽  
刘希

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限  
公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 21/82 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的  
制备方法及 PSA 胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及包被有前列腺特异性抗原抗体的  
胶乳颗粒的制备方法及 PSA 胶乳增强免疫比浊法  
试剂盒。本发明通过优化的物理吸附方法将 PSA  
抗体结合至胶乳颗粒后而获得包被有 PSA 抗体的  
胶乳颗粒。本发明的试剂盒利用结合至胶乳颗粒  
表面的 PSA 抗体与人类血液样本中的 PSA 发生免  
疫反应形成浊度,通过浊度的上升程度来检测前  
列腺特异性抗原含量。

1. 一种包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其特征在于,包括步骤:

- 1) 将胶乳颗粒溶于 MES 缓冲液中;
- 2) 将前列腺特异性抗原抗体溶于 MES 缓冲液中;
- 3) 将步骤 2) 获得的混合物立即加入到步骤 1) 获得的混合物中进行反应;
- 4) 向步骤 3) 的反应体系中加入甘氨酸缓冲液终止反应;
- 5) 离心去掉上清;
- 6) 获得包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒。

2. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 1) 中所述的 MES 缓冲液还含有甘油。

3. 根据权利要求 2 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中甘油含量为 0.01% 至 0.5%。

4. 根据权利要求 3 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中甘油含量为 0.15%。

5. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 1) 和步骤 2) 中所述的 MES 缓冲液为 0.05MMES 缓冲液 pH6。

6. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 3) 所述的反应为在 25-40°C 下进行 1-3 小时。

7. 根据权利要求 6 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 3) 所述的反应为在 37°C 进行 2 小时。

8. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 4) 所述的甘氨酸缓冲液为 0.1M 甘氨酸缓冲液 pH7。

9. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 4) 所述的终止反应进行 0.5-2 小时。

10. 根据权利要求 9 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中步骤 4) 所述的终止反应在搅拌条件下进行 1 小时。

11. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中所述胶乳颗粒是聚苯乙烯胶乳颗粒。

12. 根据权利要求 11 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中所述聚苯乙烯胶乳颗粒表面修饰有选自如下化学基团中的一种:硫酸基、磺酸基、羧基、氨基、羟基、酰肼基和氯甲基。

13. 根据权利要求 11 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中所述聚苯乙烯胶乳颗粒直径范围为 50-250nm。

14. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中所述前列腺特异性抗原抗体为前列腺特异性抗原多克隆抗体或前列腺特异性抗原单克隆抗体。

15. 根据权利要求 14 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其中所述前列腺特异性抗原抗体为前列腺特异性抗原单克隆抗体。

16. 根据权利要求 1 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法,其

中在步骤 5) 和步骤 6) 之间还包括用甘氨酸缓冲液洗涤胶乳颗粒的步骤。

17. 根据权利要求 16 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法, 其中所述甘氨酸缓冲液为含有氯化钠、EDTA、BSA、吐温和叠氮化钠的 100mM 甘氨酸缓冲液 pH7。

18. 根据权利要求 17 所述的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法, 其中所述甘氨酸缓冲液为含有 0.9% 氯化钠、50mM EDTA、0.5%BSA、0.5% 吐温 20 和 0.09% 叠氮化钠的 100mM 甘氨酸缓冲液 pH7。

19. 一种测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其特征在于, 包括 R1 试剂和 R2 试剂;

所述 R1 试剂包括缓冲液、稳定剂、促凝剂和防腐剂;

所述 R2 试剂包括根据权利要求 1 至 18 任一项所述的制备方法而获得的包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒、缓冲液、稳定剂和防腐剂。

20. 根据权利要求 19 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其还包括前列腺特异性抗原校准品。

21. 根据权利要求 20 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述的前列腺特异性抗原校准品由前列腺特异性抗原、缓冲液、稳定剂和防腐剂组成。

22. 根据权利要求 19 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述胶乳颗粒是聚苯乙烯胶乳颗粒。

23. 根据权利要求 22 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述聚苯乙烯胶乳颗粒表面修饰有选自如下化学基团中的一种: 硫酸基、磺酸基、羧基、氨基、羟基、酰肼基和氯甲基。

24. 根据权利要求 19 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述胶乳颗粒直径范围为 50-250nm, 浓度为 0.05-0.5%。

25. 根据权利要求 19 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述前列腺特异性抗原抗体为前列腺特异性抗原多克隆抗体或前列腺特异性抗原单克隆抗体。

26. 根据权利要求 25 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述前列腺特异性抗原抗体为前列腺特异性抗原单克隆抗体。

27. 根据权利要求 19 或 21 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述缓冲液选自 3-[N, N-二(羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液和巴比妥缓冲液中的一种或两种以上, 使用浓度选自 10-200mM。

28. 根据权利要求 19 或 21 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒, 其中所述稳定剂选自 0.1-5% 浓度范围的牛血清白蛋白、0.5-1% 浓度范围的氯化钠、2-50mM 的 EDTA、0.1-1% 浓度范围的吐温-20 和 1-10% 浓度范围的丙三醇一种或两种以上。

29. 根据权利要求 19 或 21 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强

免疫比浊法试剂盒,其中所述防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞、苯酚和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或两种以上,使用浓度选自 0.02% -0.1%。

30. 根据权利要求 19 或 21 所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒,其中所述促凝剂选自 PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000、PEG-10000、葡聚糖 T-40、葡聚糖 T-70 和葡聚糖 T-500 中的一种,使用浓度范围选自 1-10%。

31. 根据权利要求 19 至 30 任一项所述的测定人血液样本前列腺特异性抗原含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒,其由如下组分组成:

R1 :0.9%氯化钠、3%PEG-6000、0.5%BSA、50mM EDTA、0.09%叠氮化钠和 50mM HEPES 缓冲液 pH7.2;

R2 :前列腺特异性抗原抗体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒 0.25%、100mM 的甘氨酸缓冲液 pH7、0.9%氯化钠、0.5%BSA、50mM EDTA、0.5%吐温 20 和 0.09%叠氮化钠,其中所述聚苯乙烯胶乳颗粒直径为 100nm;

前列腺特异性抗原校准品:浓度分别为 0、4、10、23、45、90ng/mL 的前列腺特异性抗原、0.9%氯化钠、1%BSA、50mM EDTA、0.1%叠氮化钠和 50mM HEPES 缓冲液 pH7.2。

## 包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法及其 PSA 胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种包被有前列腺特异性抗原(PSA)抗体的胶乳颗粒的制备方法,以及一种利用免疫比浊方法测定人血液样本中 PSA 含量的试剂盒。本发明的制备方法以及检测试剂盒属于临床医学体外诊断领域。

### 背景技术

[0002] 前列腺特异性抗原(Prostate specific antigen, PSA)是由前列腺上皮细胞合成分泌至精液中,是精浆的主要成分之一。在上个世纪 60 年代末,在研究免疫避孕过程中 Hare 等人发现,在前列腺液及精液中含有一种分子量大约 34000 的精液特异性蛋白质。1979 年从前列腺组织中提取并纯化了这种蛋白质。由于这种蛋白质只在前列腺组织中存在,被命名为前列腺特异性抗原。

[0003] PSA 在血清中主要有两种存在形式:一种是游离型的 PSA(f-PSA),约占血清 PSA 总浓度的 10%-30%。另一种是与  $\alpha$  1-抗糜蛋白酶(ACT)结合的 PSA (PSA-ACT)和与  $\alpha$  2-巨球蛋白(AMG)结合的 PSA (PSA-AMG),约占血清 PSA 总浓度的 70%-90%。在前列腺癌患者的血清中,t-PSA 和 f-PSA 均有升高。PSA 具有靶器官特异性,前列腺癌患者血清中 PSA 浓度明显升高,所以血清 PSA 的测定被目前公认为诊断前列腺癌的首选标志物。早期敏感性在 40-75% 之间,中后期可达 75-95%,因此它对前列腺癌的诊断和病程监测具有一定的临床价值。

[0004] 对于 PSA 的定量检测分析,目前包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)和化学发光免疫分析(CLIA)。ELISA 操作过程复杂,自动化程度低,检测范围窄,影响因素较多,易造成假阴性和假阳性等缺点也不能满足临床的要求。RIA 必须用  $^{125}\text{I}$  等放射性元素标记,检测设备复杂,必须用专门的仪器测定,其放射性核素的半衰期短,不能长期保存,测定结果不稳定,同时也给实验操作人员带来了放射性伤害。CLIA 虽然提高了检测的敏感度和自动化程度,但通常需要昂贵的全自动化学发光测量仪,存在检测时间长和检测成本高的缺点。

[0005] 胶乳增强透射免疫比浊检测(PETIA)技术是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫测定法,可以对各种微量的抗原物质和小分子半抗原进行精确的定量测定,目前越来越多的应用到临床实验室中。与 CLIA 技术相比, PETIA 有效的提高检测速度和降低检测成本。然而,PSA 的定量检测分析需要较高的灵敏度,一般的 PETIA 技术很难达到同 CLIA 技术相同的灵敏度,需要对 PETIA 技术的优化改进来达到提高检测 PSA 灵敏度的目的。

[0006] 在胶乳增强免疫比浊试剂中,将抗原或抗体与胶乳相结合是制备试剂中最重要的步骤,通常有物理吸附法和化学交联法。化学交联法是通过抗原或抗体与胶乳表面的化学基团反应,将抗原或抗体交联在胶乳上。由于化学交联法的反应条件较为强烈且反应时间较长,抗原或抗体的活性损失较大。所以,物理吸附法是一种反应更温和、快速的方法。物

理吸附是靠蛋白质分子结构上的疏水基团与胶乳表面的疏水基团间的相互作用,将抗原或抗体吸附到胶乳表面,由于这是一种弱作用力,蛋白质很容易从颗粒表面解吸下来,导致灵敏度下降且试剂稳定性差。吸附上的抗原(或抗体)量越多、越不易脱落,则灵敏度越高、稳定性越好。由于这种吸附力也会导致一些杂质也吸附到胶乳颗粒上,进一步影响了抗原(或抗体)对颗粒的结合。因此,仍然需要改善包被有抗原(或抗体)的胶乳颗粒的制备方法。

## 发明内容

[0007] 根据本发明的一方面,涉及一种包被有前列腺特异性抗原(PSA)抗体的胶乳颗粒的制备方法,其特征在于,包括步骤:

[0008] 1) 将胶乳颗粒溶于 MES 缓冲液中;

[0009] 2) 将 PSA 抗体溶于 MES 缓冲液中;

[0010] 3) 将步骤 2) 获得的混合物立即加入到步骤 1) 获得的混合物中进行反应;

[0011] 4) 向步骤 3) 的反应体系中加入甘氨酸缓冲液终止反应;

[0012] 5) 离心去掉上清;

[0013] 6) 获得包被有 PSA 抗体的胶乳颗粒。

[0014] 在本发明的优选实施方式中,步骤 1) 中的 MES 缓冲液还含有甘油。在本发明的一些实施方式中,步骤 1) 中的 MES 缓冲液还含有含量为 0.01% 至 0.5% 的甘油。在一个具体的实施方式中,含有 0.15% 的甘油。

[0015] 在本发明的一个具体的实施方式中,步骤 1) 和步骤 2) 中所述的 MES 缓冲液为 0.05M MES 缓冲液 pH6。

[0016] 在本发明的一些实施方式中,步骤 3) 所述的反应为在 25-40℃ 下进行 1-3 小时。在本发明的一个具体的实施方式中,步骤 3) 所述的反应是在 37℃ 下进行 2 小时。

[0017] 在本发明的一个具体的实施方式中,步骤 4) 所述的甘氨酸缓冲液为 0.1M 的甘氨酸缓冲液 pH7。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,步骤 4) 所述的终止反应进行 0.5-2 小时。终止反应的反应时间可以由技术人员来确定,可以搅拌或不搅拌,优选在搅拌条件下进行,以保证混合均匀,搅拌速度可以由技术人员根据本领域常规选择来确定。因此,在本发明的一个具体的实施方式中,步骤 4) 所述的终止反应在搅拌条件下进行 1 小时。

[0019] 在本发明的一些实施方式中,所述胶乳颗粒是聚苯乙烯胶乳颗粒。优选地,所述聚苯乙烯胶乳颗粒表面修饰有选自如下化学基团中的一种:硫酸基、磺酸基、羧基、氨基、羟基、酰肼基、氯甲基。在本发明的一个具体的实施方式中,所述胶乳颗粒是磺酸基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。优选地,聚苯乙烯胶乳颗粒直径范围为 50-250nm。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述 PSA 抗体为 PSA 多克隆抗体或 PSA 单克隆抗体,优选地,所述 PSA 抗体为 PSA 单克隆抗体。优选地,所述 PSA 单克隆抗体可以通过常见文献报道的方法,包括但不限于杂交瘤技术,而获得;或者也可以购买商品化的产品,例如 Hytest、Fitzgerald 等。在本发明的一个具体的实施方式中,所述 PSA 单克隆抗体是通过杂交瘤细胞技术制备的。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,在步骤 5) 和步骤 6) 之间还可以包括用甘氨酸缓冲液洗涤胶乳颗粒的步骤。优选地,所述甘氨酸缓冲液为含有 0.9% 氯化钠、50mM EDTA、

0.5%BSA、0.5%吐温 20、0.09%叠氮化钠的 100mM 甘氨酸缓冲液 pH7。

[0022] 根据本发明的另一方面,本发明还提供一种用于测定人血液样本 PSA 含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒,其特征在于,包括 R1 试剂和 R2 试剂;所述 R1 试剂包括缓冲液、稳定剂、促凝剂和防腐剂;所述 R2 试剂包括根据上述制备方法而获得的包被有 PSA 抗体的胶乳颗粒、缓冲液、稳定剂和防腐剂。

[0023] 在本发明的优选实施方式中,试剂盒还可以包括校准品。优选地,校准品由 PSA、缓冲液、稳定剂和防腐剂组成。

[0024] 在本发明的一些实施方式中,胶乳颗粒是聚苯乙烯胶乳颗粒。优选地,所述聚苯乙烯胶乳颗粒表面修饰有选自如下化学基团中的一种:硫酸基、磺酸基、羧基、氨基、羟基、酰肼基、氯甲基。

[0025] 在本发明的一些实施方式中,胶乳颗粒直径范围为 50-250nm,浓度为 0.05-0.5%。在本发明的一个具体实施方式中,胶乳颗粒直径为 100nm,最终 R2 试剂中 PSA 单克隆抗体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒浓度为 0.25%。

[0026] 在本发明的一些实施方式中,所述 PSA 抗体为 PSA 多克隆抗体或 PSA 单克隆抗体。

[0027] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述 PSA 抗体为 PSA 单克隆抗体。优选地,所述 PSA 单克隆抗体可以通过常见文献报道的方法而获得;或者也可以购买商品化的产品,例如 Hytest、Fitzgerald 等。在本发明的一个具体的实施方式中,所述 PSA 单克隆抗体是通过杂交瘤细胞技术制备的。所选择的 PSA 单克隆抗体首先要通过表位分析,确认与游离型和结合型的 PSA 均能反应。

[0028] 通过在特定缓冲液中添加无机盐、促凝剂、蛋白质和防腐剂来制作 R1 试剂。其中要求缓冲液的缓冲能力为调节 pH 范围在 7-9 之间,可以选择各种缓冲液,优选 HEPES、甘氨酸、Tris 等,与其他缓冲液相比,具有缓冲能力强、溶解度高、很好的生物适应性和反应惰性。

[0029] 因此,在本发明的一些实施方式中,所述缓冲液选自 3-[N,N-二(羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液和巴比妥缓冲液中的一种或两种以上,使用浓度选自 10-200mM。其中 HEPES 在特定的 pH 范围内缓冲能力强,因此更优选 HEPES,其浓度范围为 10-100mM, pH 范围为 7-8。

[0030] 在本发明的一些实施方式中,所述稳定剂选自 0.1-5% 浓度范围的牛血清白蛋白、0.5-1% 浓度范围的氯化钠、2-50mM 的 EDTA、0.1-1% 浓度范围的吐温-20、1-10% 浓度范围的丙三醇一种或两种以上。优选地,稳定剂选择牛血清白蛋白,终浓度为 0.1-1%。氯化钠浓度为 0.7-0.9%,叠氮钠浓度为 0.05-0.1%。

[0031] 在本发明的一些实施方式中,所述防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞、苯酚和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或两种以上,使用浓度选自 0.02%-0.1%。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述促凝剂选自 PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000、PEG-10000、葡聚糖 T-40、葡聚糖 T-70、葡聚糖 T-500 中的一种,使用浓度范围选自 1-10%。优选地,促凝剂选择 PEG-6000,可以加快免疫反应速度,缩短检测时间,其终浓度为 2-6%。

[0033] 通过在特定缓冲液中添加 PSA 浓度分别为 0、4、10、23、45、90ng/mL 制作多点校准品,其中要求缓冲液的缓冲能力为调节 pH 范围在 7-9 之间,可以选择各种缓冲液,优选

HEPES、甘氨酸、Tris 等,与其他缓冲液相比,具有缓冲能力强、溶解度高、很好的生物适应性和反应惰性。其中 HEPES 在特定的 pH 范围内缓冲能力强,因此更优选 HEPES,其浓度范围为 10-200mM, pH 范围为 7-8。其中含有特定的蛋白稳定剂如牛血清白蛋白浓度为 0.1-1%,含有特定的防腐剂如叠氮钠浓度为 0.05-0.1%,含有特定的抗氧化剂如乙二胺四乙酸浓度为 5-50mM。

[0034] 因此,在本发明的一个具体的实施方式中,测定人血液样本 PSA 含量的胶乳增强免疫比浊法试剂盒,其由如下组分组成:

[0035] R1 :0.9% 氯化钠、3%PEG-6000、0.5%BSA、50mM EDTA、0.09% 叠氮化钠、50mM HEPES 缓冲液 pH7.2 ;

[0036] R2 :PSA 抗体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒 0.25%、100mM 的甘氨酸缓冲液 pH7、0.9% 氯化钠、0.5%BSA、50mM EDTA、0.5% 吐温 20、0.09% 叠氮化钠,其中所述聚苯乙烯胶乳颗粒直径为 100nm ;

[0037] 校准品 :浓度分别为 0、4、10、23、45、90ng/mL 的 PSA、0.9% 氯化钠、1%BSA、50mM EDTA、0.1% 叠氮化钠、50mM HEPES 缓冲液 pH7.2。

[0038] 本发明基于优化的包被有 PSA 抗体的胶乳颗粒的制备方法所获得胶乳颗粒,在特定的反应体系中发生抗原抗体反应形成一定的浊度,能够被基于分光光度计的生化分析仪检测到,通过测定反应后体系浊度的上升程度来进行 PSA 定量分析。本发明同时解决了 PSA 检测的灵敏度和自动化程度低的问题,可以广泛应用。

[0039] 具体而言,为了实现上述目的,本发明采取的技术方案是:通过优化的方法,加入特定浓度的有机溶剂,更具体而言,有机溶剂为甘油,由此而制作的 R2 试剂反应特异性和灵敏度也相应得以提高,稳定性随之增加。虽然不限于具体理论,可以认为本发明的方法改善了 PSA 抗体与胶乳颗粒表面的亲和性、结合效率,从而提高了反应特异性和灵敏度,于此同时还提高了抗体的利用率,降低试剂成本。

[0040] 本发明的技术方案与现有技术相比,具有如下特点:

[0041] 1) 能够应用在自动生化分析仪器上,检测速度快;

[0042] 2) 检测特异性强,能够同时检测游离型和结合型的前列腺特异性抗原,与化学发光方法具有很高的相关性;

[0043] 3) 检测灵敏度能达到其他正在临床应用的化学发光检测试剂盒同等水平,能够满足临床应用需要。

## 附图说明

[0044] 图 1. 本发明所制备的试剂盒与化学发光方法试剂盒检测临床样本的相关性。

## 具体实施方式

[0045] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。

[0046] 下述实验方法所使用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。

[0047] 如无特别说明,贯穿说明书中,“%”表示重量 / 体积百分比。

[0048] 实施例

[0049] 实施例 1 :制备 PSA 单克隆抗体

[0050] 按照 Sensabaugh 等,1990, J. Urology 144, 1523 所述,从人精液血浆中分离人 PSA。在一定的时间间隔,将小鼠用在 RAS(RIBI 佐剂系统)中的 25  $\mu$ g 人 PSA 进行 4 次注射免疫。在最后一次注射后 4 个月,将从免疫的小鼠的脾脏分离的淋巴细胞与骨髓瘤细胞系 SP2/O-Ag14 融合。分泌针对 PSA 的抗体的杂交瘤细胞通过 ELISA 方法进行鉴定。可以分离多种针对 PSA 不同表位的抗体的杂交瘤。然后,亲和纯化相对应的单克隆抗体,再进行表位分析。表位分析时,使用基于表面等离子共振技术(SPR)的生物传感器 BIAcore。检测细胞培养物的上清,单克隆抗体通过多克隆羊抗-小鼠 -Fc- 抗体而结合到生物传感器的表面,监测 PSA 抗原与被检测单克隆抗体的结合和解离。数据可以使用内在的 BIA 评估软件,基于简单的 A+B=AB 平衡模型进行分析,得到的抗体可以根据各自的表观解离常数进行比较。然后,选择适当的抗体组合可以用于制备本发明的 R2 试剂。

[0051] 实施例 2 :制备 R1 试剂

[0052] 在 50mM pH7.2 的 HEPES 缓冲液中,添加氯化钠 0.9%、PEG-60003%、BSA0.5%、EDTA50mM、叠氮化钠 0.09%,搅拌均匀为 R1 试剂。

[0053] 实施例 3 :制备 PSA 校准品

[0054] 在 50mM pH7.2 的 HEPES 缓冲液中,加入浓度分别为 0、4、10、23、45、90ng/mL 的 PSA,另外添加氯化钠 0.9%、BSA1%、EDTA50mM、叠氮化钠 0.1%,搅拌均匀为 PSA 多点校准品。

[0055] 实施例 4 :制备 R2 试剂

[0056] 1. 采用普通的物理交联方式获得 R2 试剂

[0057] 直径 100nm 的聚苯乙烯胶乳溶液(浓度 10%) (表面为磺酸基修饰,购自 Merck) 0.5mL,加入 4.5mL 的 0.05M MES 缓冲液(pH6.0),将 0.5mg PSA 单克隆抗体用 5mL0.05M MES 缓冲液(pH6.0)稀释后,立即加入到上述胶乳溶液中,在 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。最后加入 1mL0.1M 的甘氨酸缓冲液(pH7.0)搅拌 1h 来终止反应,离心去掉上清,用 20mL100mM 的甘氨酸缓冲液(pH7.0)洗涤 3 次,100mM 的甘氨酸缓冲液中含有 0.9% 氯化钠、50mM EDTA、0.5%BSA、0.5% 吐温 20、0.09% 叠氮化钠,最后再以同样 20mL 的甘氨酸缓冲液分散成乳白色胶乳悬浮液,为 R2 试剂,最终 R2 试剂中 PSA 单克隆抗体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒浓度为 0.25%。

[0058] 2. 采用优化后的物理交联方式获得 R2 试剂

[0059] 直径 100nm 的聚苯乙烯胶乳溶液(浓度 10%) (表面为磺酸基修饰,购自 Merck) 0.5mL,加入 4.5mL 的 0.05M MES 缓冲液(pH6.0),含有 0.15% 甘油,将 0.5mg PSA 单克隆抗体用 5mL0.05M MES 缓冲液(pH6.0)稀释后,立即加入到上述胶乳溶液中,在 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。最后加入 1mL0.1M 的甘氨酸缓冲液(pH7.0)搅拌 1h 来终止反应,离心去掉上清,用 20mL100mM 的甘氨酸缓冲液(pH7.0)洗涤 3 次,100mM 的甘氨酸缓冲液中含有 0.9% 氯化钠、50mM EDTA、0.5%BSA、0.5% 吐温 20、0.09% 叠氮化钠,最后再以同样 20mL 的甘氨酸缓冲液分散成乳白色胶乳悬浮液,为 R2 试剂,最终 R2 试剂中 PSA 单克隆抗体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒浓度为 0.25%。

[0060] 实施例 5 :PSA 试剂盒的性能检测

[0061] 1. 检测试剂盒的用法 :

[0062] 以日立 7180 生化分析仪为例 :测定波长 570nm,首先加入 R1 试剂 150  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 反应 30 秒后加入 PSA 校准品 3  $\mu$ L,再反应 60 秒后加入 R2 试剂 50  $\mu$ L,测定反应第 10 秒、70 秒

的吸光度值(A1、A2),计算吸光度差值 $\Delta A=A2-A1$ ,每管重复测定 2 次,将各校准品管 2 次测得的吸光度差值 $\Delta A$ 为纵坐标,对应的浓度为横坐标,制作“浓度-吸光度差值”校准曲线,取待测样本,同法测定样本的吸光度差值,代入校准曲线,即可计算出待测样本中 PSA 的含量。

[0063] 2. 不同的物理交联方式获得的 R2 试剂差异比较:

[0064] 按照 5.1 的检测方式,比较优化后的物理交联方式和普通的物理交联方式获得的 R2 试剂检测标准品各点吸光度的差异,吸光度变化大表明所获得的 R2 试剂能够得到较高的灵敏度检测性能。如下表 1 所示:

[0065] 表 1 不同物理交联方式获得的 R2 试剂吸光度差异

PSA 浓度	优化的物理交联获得的 R2 吸光度	普通的物理交联获得的 R2 吸光度
0ng/mL	12	13
4ng/mL	208	87
10ng/mL	412	154
23ng/mL	854	357
45ng/mL	1688	668
90ng/mL	3645	1353

[0067] 3. 低值样本重复性检测:

[0068] 以生理盐水稀释人血清样本,配制浓度分别为 1、2、4、8ng/mL 的样本,用上述 PSA R1、PSA R2 和 PSA 校准品组成的试剂盒,与 A 公司的化学发光试剂盒比较重复性能。A 公司的试剂基本分析原理是,采用双抗体夹心法测定血清中 PSA 水平。用一株 PSA 单抗包被磁性粒子制成固相抗体,用另一株 PSA 单抗标记吡啶酯制成标记物。在反应杯中加入含有 PSA 的标准品或待测血清及标记物,温育后即形成固相包被抗体-PSA 抗原-吡啶酯标记抗体的复合物,充分洗涤后加入氧化剂( $H_2O_2$ )和 NaOH 使成碱性环境,于 3-10 分钟内测定其发光强度,根据标准曲线即可算出样品中 PSA 的含量,样品的发光强度值随 PSA 浓度的增加而升高。本发明试剂盒按照 1 所述的方法测定 10 次,计算不同 PSA 含量样本检测的变异系数,与 A 公司化学发光检测试剂盒比较结果如下表 2 和 3 所示:

[0069] 表 2 本发明试剂盒的低值样本重复性

	1ng/mL	2ng/mL	4ng/mL	8ng/mL
1	1.02	2.14	4.01	8.12
2	1.08	2.18	4.02	8.18
3	1.04	2.14	4.11	8.07
4	1.14	2.09	4.07	8.09
5	1.05	2.04	4.08	8.08
6	1.02	2.16	4.04	8.10
7	1.17	2.05	3.98	8.12
8	1.09	2.25	4.05	8.04

[0071]

9	1.12	2.18	4.02	8.08
10	1.07	2.12	4.07	8.09
平均值	1.08	2.14	4.05	8.10
SD	0.05077	0.06364	0.03866	0.03743
CV	4.7%	3.0%	1.0%	0.5%

[0072] 表 3A 公司的化学发光试剂盒的低值样本重复性

[0073]

	1ng/mL	2ng/mL	4ng/mL	8ng/mL
1	1.18	2.12	4.03	8.08
2	1.09	2.09	4.01	8.07
3	1.02	2.13	4.07	8.12
4	1.15	2.08	4.12	8.04
5	1.07	2.01	4.08	8.07
6	1.01	2.07	4.01	8.05
7	1.08	2.14	4.03	8.02
8	1.14	2.21	4.08	8.03
9	1.15	2.17	4.09	8.05
10	1.08	2.03	4.11	8.11
平均值	1.10	2.11	4.12	8.04
SD	0.05697	0.06151	0.04029	0.03273
CV	5.2%	2.9%	1.0%	0.4%

[0074] 从上表 2 和 3 可以看出,本发明试剂盒的在检测低值样本时重复性与 A 公司的化学发光检测试剂盒相当,达到了同 CLIA 技术相同的灵敏度,能满足临床诊断的应用。

[0075] 4. 本发明试剂盒的特异性检测:

[0076] 用生理盐水配制一定浓度的结合型 PSA 样本(ACT-PSA 和 AMG-PSA)和游离型 PSA 样本,以及可能与 PSA 检测有干扰的目标物质的浓度,主要包括 ACT、AMG,检测结果表明本发明试剂盒能够准确的检测到结合 PSA 和游离型 PSA,并且不会受到 ACT 和 AMG 的干扰。见表 4 所示:

[0077] 表 4 本发明试剂盒的检测特异性

[0078]

配制的目标物	本发明检测到的浓度 (ng/mL)
游离 PSA 浓度 (4ng/mL)	4.08
游离 PSA 浓度 (10ng/mL)	10.12
游离 PSA 浓度 (40ng/mL)	40.05
PSA-ACT 浓度 (4ng/mL)	4.03
PSA-ACT 浓度 (10ng/mL)	10.08
PSA-ACT 浓度 (40ng/mL)	40.17
PSA-AMG 浓度 (4ng/mL)	4.11
PSA-AMG 浓度 (10ng/mL)	10.33
PSA-AMG 浓度 (40ng/mL)	40.22
ACT 浓度 (4ng/mL)	0.05
ACT 浓度 (10ng/mL)	0.00
ACT 浓度 (40ng/mL)	0.04
AMG 浓度 (4ng/mL)	0.09
AMG 浓度 (10ng/mL)	0.12
AMG 浓度 (40ng/mL)	0.13

[0079] 5. 本发明试剂盒与化学发光方法检测临床样本的相关性比较

[0080] 用本发明的试剂盒与 A 公司的化学发光检测试剂盒对 56 例样本同时进行检测, 检测结果见图 1, 以化学发光检测试剂盒检测的样本 PSA 结果为横坐标, 以本发明试剂盒检测的结果为纵坐标作回归分析, 相关方程为  $Y=0.997X-0.0128$ , 相关系数  $r=0.9903$ , 经过统计学处理结果表明, 本发明方法同化学发光方法检测临床样本测值相关性良好, 能满足临床应用。

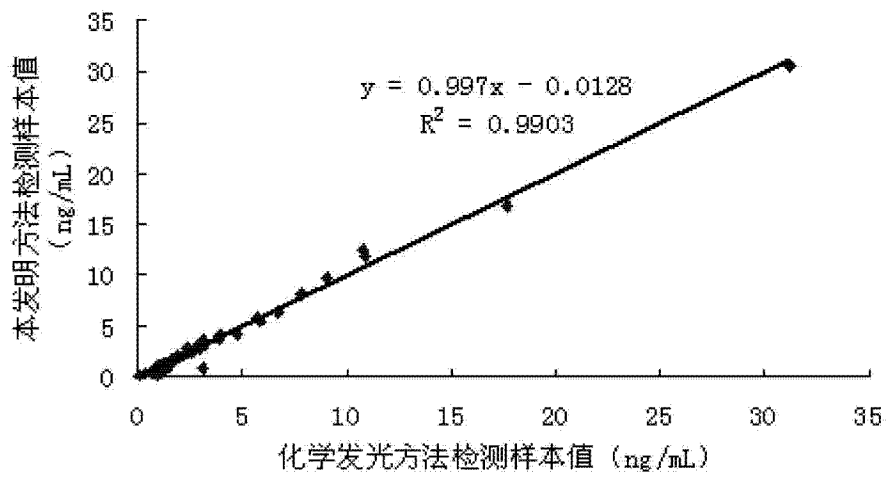


图 1

专利名称(译)	包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法及PSA胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102901810A</a>	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN201210379893.6	申请日	2012-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
[标]发明人	高爱民 孙国敬 张小锐 徐丽 刘希		
发明人	高爱民 孙国敬 张小锐 徐丽 刘希		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N21/82		
代理人(译)	程伟		
其他公开文献	CN102901810B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及包被有前列腺特异性抗原抗体的胶乳颗粒的制备方法及PSA胶乳增强免疫比浊法试剂盒。本发明通过优化的物理吸附方法将PSA抗体结合至胶乳颗粒后而获得包被有PSA抗体的胶乳颗粒。本发明的试剂盒利用结合至胶乳颗粒表面的PSA抗体与人类血液样本中的PSA发生免疫反应形成浊度，通过浊度的上升程度来检测前列腺特异性抗原含量。

PSA 浓度	优化的物理交联获得的R2吸光度	普通的物理交联获得的R2吸光度
0ng/mL	12	13
4ng/mL	208	87
10ng/mL	412	154
23ng/mL	854	357
45ng/mL	1688	668
90ng/mL	3645	1353