



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109307759 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201811417344.7

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.11.26

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 田会会 史小芹 崔小妞 马雷
陈鹏 付光宇 吴学炜 乔晓芳
李晓霞

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

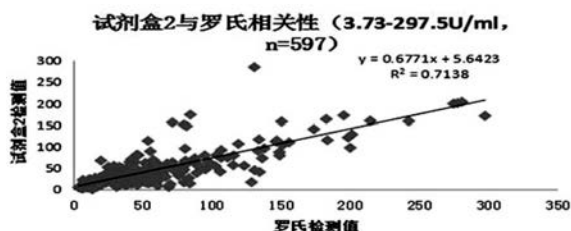
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种检测糖类抗原15-3的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测糖类抗原15-3的试剂盒,包括包被有两个CA15-3抗体的包被板,两个HRP标记的抗CA15-3抗体的酶结合物,样品稀释液和标准品。本发明试剂盒为化学发光免疫分析法,属于改良的双抗体夹心,采用双包被双酶标一主一副两对抗体,既具有放射免疫的高灵敏度,又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点,易于标准化操作。且测试中不使用有害试剂,试剂保持期长,应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作,成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。



1. 一种检测糖类抗原15-3的试剂盒,其特征在于:包括包被有两个CA15-3抗体的包被板,两个HRP标记的抗CA15-3抗体的酶结合物,样品稀释液和标准品。

2. 根据权利要求1所述的检测糖类抗原15-3的试剂盒,其特征在于:所述包被板的制备方法为:在包被缓冲液中加入CA15-3抗体1和CA15-3抗体2,混合均匀后,包被到发光Costar空白板上,2~8℃过夜;然后用封保液封保,2~8℃过夜,干燥,包装,2~8℃保存待用。

3. 根据权利要求1所述的检测糖类抗原15-3的试剂盒,其特征在于:所述酶结合物的制备方法为:将含有Tris的纯化水作为缓冲液,加入牛血清白蛋白混合均匀后加入CA15-3酶标抗体1和CA15-3酶标抗体2,2~8℃保存待用。

4. 根据权利要求1所述的检测糖类抗原15-3的试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液的制备方法为:在含有Tris的纯化水中加入牛血清白蛋白混合均匀,2~8℃保存待用。

5. 根据权利要求1所述的检测糖类抗原15-3的试剂盒,其特征在于:所述标准品选用pH 6.2的缓冲液。

一种检测糖类抗原15-3的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术,尤其是涉及一种检测糖类抗原15-3的试剂盒。

背景技术

[0002] 近半个世纪以来,肿瘤的发病率和死亡率逐年升高,成为医学界热点中的热点。20世纪70年代,美国提出的向“肿瘤进军”反映了社会对肿瘤死亡率居高不下的焦虑,同时,在过去的几十年中,肿瘤标志在技术上和定义上有了突破,这一切都促使了肿瘤标志研究的快速发展。

[0003] 目前,乳腺癌已成为威胁女性健康和生命的最常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年上升趋势。乳腺癌患者最主要的死亡原因是复发和转移,因此动态监测病情变化,早期发现复发转移,准确评价疗效,对乳腺癌患者来说就显得极为重要。

[0004] CA15-3是一种多形态上皮糖蛋白,分子量400 KD。1984年Hikens等人从乳脂肪球膜上糖蛋白MAM-6制成小鼠单克隆抗体(115-DB),1984年KuFu等自肝转移乳腺癌细胞膜制成单克隆抗体(DF-3),这两种抗体均能识别同一种抗原,这种抗原即为抗原CA15-3。血清CA15-3测定是检测乳腺癌较重要的指标,30%~50%的乳腺癌患者的CA15-3血清水平明显升高,而且CA15-3与组织学分级、肿瘤大小和腋窝淋巴结转移的出现呈正相关,对乳腺癌的动态追踪、疗效判定与判断复发转移很有价值。1997年美国FDA批准Mucin1(CA15-3)作为II/III期乳腺癌复发的检测指标。CA15-3还可与其它肿瘤标志物一起检测,用于相关肿瘤病例的辅助诊断。与CA125一起检测时,CA15-3可作为卵巢癌早期复发的指标;在肝、胃、肺、胰腺和结肠肿瘤患者中也可能升高。另外,在肝炎、肝硬化等非恶性疾病时也可见CA15-3升高的现象。

[0005] 临床检测CA15-3的方法有放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫分析法(ELISA)、化学发光免疫分析法(CLIA)和电化学发光免疫分析(ELLA)等。目前采用化学发光免疫分析法检测CA15-3的试剂盒为郑州安图生物工程股份有限公司的产品,临床使用时存在与罗氏(标杆产品)的相关性差、检测准确度低、特异性弱等问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测糖类抗原15-3的试剂盒,该试剂盒与罗氏相关性更好,检测准确度更好、特异性更强。

[0007] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的检测糖类抗原15-3的试剂盒,包括包被有两个CA15-3抗体的包被板,两个HRP标记的抗CA15-3抗体的酶结合物,样品稀释液和标准品。

[0008] 本发明试剂盒所用包被板的制备方法为:在碳酸盐(CB)包被缓冲液中加入CA15-3抗体1和CA15-3抗体2,混合均匀后,包被到发光Costar空白板上,2~8℃过夜;然后用封保液封保,2~8℃过夜,干燥,包装,2~8℃保存待用。

[0009] 本发明试剂盒所用酶结合物的制备方法为:将含有Tris的纯化水作为缓冲液,加

入牛血清白蛋白混合均匀后加入CA15-3酶标抗体1和CA15-3酶标抗体2,2~8℃保存待用。

[0010] 本发明试剂盒所用样品稀释液的制备方法为:在含有Tris的纯化水中加入牛血清白蛋白混合均匀,2~8℃保存待用。

[0011] 本发明试剂盒所用标准品选用pH 6.2的缓冲液。

[0012] 本发明试剂盒为化学发光免疫分析法,属于改良的双抗体夹心,采用双包被双酶标一主一副两对抗体,既具有放射免疫的高灵敏度,又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点,易于标准化操作。且测试中不使用有害试剂,试剂保持期长,应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作,成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。

附图说明

[0013] 图1是本发明试剂盒与罗氏的临床相关性验证。

[0014] 图2是现有试剂盒与罗氏的临床相关性验证。

具体实施方式

[0015] 下面通过具体实施例对本发明做更加详细的说明,以利于本领域技术人员的理解。如无特殊说明,本发明所用的检测试剂和检测仪器均为本领域常规使用产品,本发明所用的检测方法为本领域常规使用的方法。

[0016] 实施例1 制备糖类抗原15-3检测试剂盒

1、制备包被板:配制CB包被缓冲液(在纯化水中加入0.2%的碳酸钠和0.4%的碳酸氢钠),加入8 μg/ml的发光CA15-3包被抗体1和8 μg/ml的发光CA15-3包被抗体2,混合均匀后,将其包被在发光Costar空白板上,2~8℃放置过夜;采用固体洗液(磷酸盐缓冲液/常规产品)洗板两次后,加入封保液200 μl,2~8℃放置过夜;拍干、干燥、包装;2~8℃保存待用;其中封保液为PBS缓冲液(在纯化水中加入0.8%的氯化钠、0.02%的氯化钾、0.02%的磷酸二氢钾和0.3%的磷酸氢二钠)+2%牛血清白蛋白制得;

2、制备酶结合物:配制Tris缓冲液(在纯化水中加入0.6%的Tris,并用盐酸调至pH 7.4),加入2%牛血清白蛋白,混合均匀后加入1/1000的发光CA15-3酶标抗体1和1/1000的发光CA15-3酶标抗体2,混合均匀,2~8℃保存待用;

3、制备样品稀释液:配制Tris缓冲液,加入2%牛血清白蛋白,混合均匀后,2~8℃保存待用;

4、标准品选用pH 6.2的缓冲液,添加2%牛血清白蛋白,混合均匀。

[0017] 5、发光底物为鲁米诺试剂。

[0018] 实施例2 本发明试剂盒的检测方法

使用时,首先将所有待测血清用样品稀释液稀释51倍(注意:CA15-3标准品已经预先稀释,可直接使用,切勿再做稀释)。

[0019] 分别吸取50 μl CA15-3标准品或稀释后的血清样本,加入相应的微孔中,轻轻摇动,混合10 s后37℃孵育60分钟,固体洗液洗板5次后,分别吸取100 μl 酶结合物加入相应的微孔中,轻轻混合10 s后37℃孵育60分钟,固体洗液洗板5次后,加入100 μl 发光底物,室温避光5分钟后检测发光值,通过发光值计算出CA15-3的浓度。

[0020] CA15-3浓度的计算方法:

本试剂盒采用点到点拟合方式,即以标准品浓度值为横坐标(X轴),以标准品发光强度值为纵坐标(Y轴),建立标准曲线,进行计算。注意,所求浓度即是真实浓度,不需要再乘以稀释倍数。

[0021] 实施例3 本发明试剂盒的性能检测

1、灵敏度检测

LoB(配方为纯化水1000 ml、 NaH_2PO_4 0.8 g、 Na_2HPO_4 4.0 g、BSA20 g、10% NaN_3 2 ml),准备5份接近0值的临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据;LoD(标准品S2以LoB为稀释液稀释),准备5份浓度范围为1-4倍LOB的系列临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据;FS:采用LoD实验中的数据,5个浓度样本每天测3次,总共测4天,每个样本得到12个结果,计算每个样本的均值、SD和CV%,最接近20%的浓度为功能灵敏度;灵敏度检测结果见下表1。

[0022] 表1

灵敏度 [□]	批次 [□]	
	第1批/(U/ml)	第2批/(U/ml)
LoB [□]	0.08 [□]	0.08 [□]
LoD [□]	0.29 [□]	0.30 [□]
FS [□]	0.40 [□]	0.30 [□]

从表1检测结果可以看出:中试第1批试剂盒能够准确检测出CA15-3的最低浓度为0.40 U/ml;中试第2批试剂盒能够准确检测出CA15-3的最低浓度为0.30 U/ml;可以看出本试剂盒的灵敏度能够满足临床检测需求。

[0023] 2、特异性检测

2.1 血红蛋白、胆红素、甘油三酯干扰

准备高中低值样本各一份,高值浓度为80 U/ml,中值浓度为40 U/ml,低值浓度为20 U/ml。血红蛋白分别用高中低值样本配制500 mg/dl的浓度;胆红素分别用高中低值样本配制20 mg/dl的浓度,甘油三酯分别用高中低值样本配制3000 mg/dl的浓度,分别重复三次一天内完成考核2批;自身抗体(类风湿因子、RF、ANA)干扰重复两次考核1批。结果见下表2、表3、表4。

[0024] 表2 血红蛋白干扰

血红蛋白干扰考核 [□]														
项目名称 [□]	糖类抗原 15-3 检测试剂盒（化学发光法）				仪器机型 [□]	/□		仪器编号 [□]	/□					
基本信息 [□]	参考值范围	<35 U/ml [□]			医学决定水平 [□]		35 U/ml	线性范围 [□]	15-240 U/ml [□]					
批次/批号 [□]	添加浓度 [□]	重复次数 [□]	高值样本，80 U/ml [□]				低值样本，20 U/ml [□]				中值样本，40 U/ml [□]			
			对照样本 [□]	干扰样本 [□]	仅添加溶剂 [□]	干扰率 [□]	对照样本 [□]	干扰样本 [□]	仅添加溶剂 [□]	干扰率 [□]	对照样本 [□]	干扰样本 [□]	仅添加溶剂 [□]	干扰率 [□]
第 1 批，试剂批号 2017030201 [□]	500 mg/dl [□]	复孔 1	69.13	73.56	/□	0.10%	19.25	20.55	/□	1.82%	35.53	36.75	/□	-1.30%
		复孔 2	74.14	74.20	/□		20.66	20.88	/□		37.66	36.60	/□	
		复孔 3	79.50	75.23	/□		21.21	20.80	/□		39.56	37.94	/□	
第 2 批，试剂批号 2017062002 [□]	500 mg/dl [□]	复孔 1	75.57 [□]	82.53 [□]	/□	5.43%	19.92 [□]	22.18 [□]	/□	6.89%	36.49 [□]	40.56 [□]	/□	6.25%
		复孔 2	78.07 [□]	82.38 [□]	/□		20.41 [□]	21.43 [□]	/□		38.21 [□]	39.79 [□]	/□	
		复孔 3	78.21 [□]	79.54 [□]	/□		20.35 [□]	21.25 [□]	/□		37.76 [□]	39.14 [□]	/□	

由表2血红蛋白干扰检测结果可以看出,血红蛋白浓度500 mg/dl以下,干扰<10%。

[0025] 表3胆红素干扰

胆红素干扰考核 ^o														
项目名称 ^o	糖类抗原 15-3 检测试剂盒（化学发光法） ^o				仪器机型 ^o	/ ^o		仪器编号 ^o	/ ^o					
基本信息 ^o	参考值范围	<35 U/ml ^o		医学决定水平 ^o		35 U/ml ^o		线性范围 ^o	15-240 U/ml ^o					
批次/批号 ^o	添加浓度 ^o	重复次数 ^o	高值样本，80 U/ml ^o				低值样本，20 U/ml ^o				中值样本，40 U/ml ^o			
			对照样本 ^o	干扰样本 ^o	仅添加溶剂 ^o	干扰率 ^o	对照样本 ^o	干扰样本 ^o	仅添加溶剂 ^o	干扰率 ^o	对照样本 ^o	干扰样本 ^o	仅添加溶剂 ^o	干扰率 ^o
第 1 批，试剂批号 2017030201 ^o	20 mg/dl ^o	复孔 1 ^o	69.13	66.22	/ ^o	-8.85%	19.25	18.59	/ ^o	-8.65%	35.53	34.13	/ ^o	-7.90%
		复孔 2 ^o	74.14	67.03	/ ^o		20.66	18.39	/ ^o		37.66	34.81	/ ^o	
		复孔 3 ^o	79.50	69.80	/ ^o		21.21	18.85	/ ^o		39.56	34.90	/ ^o	
第 2 批，试剂批号 2017062002 ^o	20 mg/dl ^o	复孔 1 ^o	75.57 ^o	75.08 ^o	/ ^o	-1.58%	19.92 ^o	19.33 ^o	/ ^o	-4.45%	36.49 ^o	37.71 ^o	/ ^o	0.42%
		复孔 2 ^o	78.07 ^o	76.59 ^o	/ ^o		20.41 ^o	19.37 ^o	/ ^o		38.21 ^o	38.42 ^o	/ ^o	
		复孔 3 ^o	78.21 ^o	76.51 ^o	/ ^o		20.35 ^o	19.28 ^o	/ ^o		37.76 ^o	36.8 ^o	/ ^o	

由表3胆红素干扰检测结果可以看出,本发明试剂盒检测胆红素浓度20 mg/dl以下,干扰<10%。

[0026] 表4甘油三酯干扰

甘油三酯干扰考核（实际添加物为脂肪乳剂，Intralipid） ^o														
项目名称 ^o	糖类抗原 15-3 检测试剂盒（化学发光法） ^o				仪器机型 ^o	/ ^o		仪器编号 ^o		/ ^o				
基本信息 ^o	参考值范围 ^o	<35 U/ml ^o		医学决定水平 ^o		35 U/ml ^o		线性范围 ^o		15-240 U/ml ^o				
批次/批号 ^o	添加浓度 ^o	重复次数 ^o	高值样本，80 U/ml ^o				低值样本，20 U/ml ^o				中值样本，40 U/ml ^o			
			对照样本 ^o	干扰样本 ^o	仅添加溶剂 ^o	干扰率 ^o	对照样本 ^o	干扰样本 ^o	仅添加溶剂 ^o	干扰率 ^o	对照样本 ^o	干扰样本 ^o	仅添加溶剂 ^o	干扰率 ^o
第 1 批，试剂批号 2017030201 ^o	3000 mg/dl ^o	复孔 1 ^o	69.13	69.72	67.28	-1.26%	19.25	18.68	19.63	-9.53%	35.53	34.18	35.35	-7.02%
		复孔 2 ^o	74.14	74.05	74.64		20.66	18.00	20.26		37.66	34.58	37.41	
		复孔 3 ^o	79.50	77.00	81.66		21.21	19.10	21.72		39.56	35.27	39.18	
第 2 批，试剂批号 2017062002 ^o	3000 mg/dl ^o	复孔 1 ^o	75.57 ^o	75.69 ^o	76.00	1.18%	19.92 ^o	18.84	19.39	-7.10%	36.49 ^o	37.2 ^o	35.76	-1.94%
		复孔 2 ^o	78.07 ^o	78.33 ^o	76.09		20.41 ^o	18.99	20.77		38.21 ^o	36.5 ^o	39.33	
		复孔 3 ^o	78.21 ^o	79.38 ^o	78.58		20.35 ^o	18.93	20.92		37.76 ^o	37.46 ^o	38.25	

由表4甘油三酯干扰检测结果可以看出,本发明试剂盒检测甘油三酯浓度3000 mg/dl以下,干扰<10%。

[0027] 2.2 自身抗体的干扰

考核类风湿因子、ANA、HAMA等自身抗体对本发明试剂盒的干扰,结果见下表5、表6、表7。

[0028] 表5类风湿性因子干扰

样本序号 ^o	RF 含量 (单位 IU/ml) ^o	测定结果 ^o
1 ^o	31 ^o	28.73 ^o
2 ^o	32 ^o	9.91 ^o
3 ^o	41 ^o	25.45 ^o
4 ^o	34 ^o	33.56 ^o
5 ^o	28 ^o	32.23 ^o
6 ^o	24 ^o	22.84 ^o
7 ^o	19 ^o	11.91 ^o
8 ^o	19 ^o	13.42 ^o
9 ^o	54 ^o	32.45 ^o
10 ^o	41 ^o	24.67 ^o

表6 ANA干扰

样本序号 ^o	ANA 滴度(单位 IU/ml) ^o	测定结果 ^o
1 ^o	12.65 ^o	31.50 ^o
2 ^o	213.07 ^o	21.96 ^o
3 ^o	611.68 ^o	16.52 ^o
4 ^o	606.32 ^o	31.00 ^o
5 ^o	170.46 ^o	28.76 ^o
6 ^o	349.02 ^o	17.00 ^o
7 ^o	434.9 ^o	30.06 ^o
8 ^o	191.86 ^o	20.52 ^o
9 ^o	80.51 ^o	25.13 ^o
10 ^o	709.47 ^o	11.87 ^o
11 ^o	610.86 ^o	20.15 ^o
12 ^o	795.09 ^o	16.47 ^o

表7 HAMA干扰

样本序号	HAMA 含量 (单位 ng/ml)	测定结果
1	1	10.31
2	1	5.83
3	1	22.43
4	1	9.07
5	1	10.72
6	1	11.59
7	1	7.17
8	1	10.84
9	1	8.72
10	1	8.52

由表5、表6、表7考核结果可以看出,类风湿因子、ANA和HAMA对本发明试剂盒检测无干扰现象。

[0029] 3、准确度检测

选择高值样本3份,按照1:9的比例分别加入到3份低值样本/基质样本中,制成回收样本,加入高值样本的体积不得超过总体积的10%。每个回收样本重复检测3次求均值,计算回收率。比较回收率偏差与试剂盒允许偏倚(行标正确度的允许偏倚,无行标的项目一般设定为10%)的大小,若回收率偏差小于等于试剂盒允许偏倚,则回收准确性符合要求,否则不符合要求。

[0030] 回收率 $R = [C \times (V_0 + V_S) - C_0 \times V_0] / (C_S \times V_S) \times 100\%$

式中: R—回收率;

V_0 —低值样本/基质样本的体积;

V_S —加入的高值样本的体积;

C —回收样本的检测浓度;

C_0 —低值样本/基质样本的检测浓度;

C_S —高值样本的浓度。

[0031] 表8. 回收率样本制备表

条目	符号	回收样本 1	回收样本 2	回收样本 3
高值样本浓度	C _s	182 U/ml	215.86 U/ml	227.86 U/ml
加入高值样本的体积	V _s	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
低值样本/基质样本的浓度	C ₀	12.60 U/ml	13.69 U/ml	13.09 U/ml
低值样本/基质样本的体积	V ₀	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
回收样本检测浓度	C	31.46 U/ml	34.10 U/ml	36.97 U/ml

表9. 回收样本检测表

准确度—回收率						
项目名称	糖类抗原 15-3 检测试剂盒（化学发光法）		仪器机型	/	仪器编号	/
项目信息	医学决定水平	35 U/ml	参考值范围	<35 U/ml	线性范围	15-240 U/ml
试剂批次及批号	回收样本 1 检测结果		回收样本 2 检测结果		回收样本 3 检测结果	
第 1 批, 试剂批号: 2017030201	重复 1	108%	重复 1	101%	重复 1	107%
	重复 2	104%	重复 2	100%	重复 2	108%
	重复 3	108%	重复 3	101%	重复 3	105%
第 2 批, 试剂批号: 2017062002	重复 1	101%	重复 1	96%	重复 1	100%
	重复 2	106%	重复 2	98%	重复 2	94%
	重复 3	100%	重复 3	95%	重复 3	92%

计算可知,第1批3个回收样本的回收率分别为106.5%,100.6%,107.0%,第2批3个回收样本的回收率分别为102.5%,96.1%,95.4%,其偏差均小于试剂盒允许偏倚10%,回收准确性符合要求。

[0032] 实施例4 本发明试剂盒与罗氏的临床相关性验证

为了判断本发明试剂盒检测浓度与罗氏的相关性,取来自D15医院血清样本597例,血清浓度跨度整个线性范围(3.73-297.5 U/ml),分别用本发明试剂盒(试剂盒2)与郑州安图生物工程股份有限公司生产的现有CA15-3检测试剂盒(试剂盒1)进行检测,检测结果表明,本发明试剂盒(试剂盒2)与标杆罗氏的相关性为 $R^2=0.7138$,如图1所示,而试剂盒1与标杆罗氏的相关性为 $R^2=0.5202$,如图2所示,说明本发明试剂盒与罗氏的相关性更好,准确度更高。

[0033] 注:本申请中所用的化学发光仪(Lumo)由郑州安图生物工程股份有限公司提供。

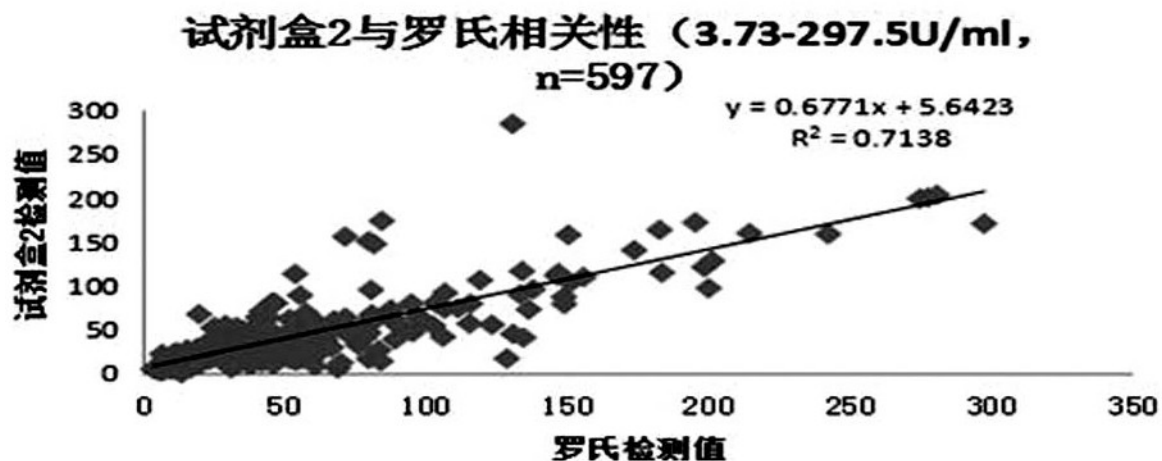


图1

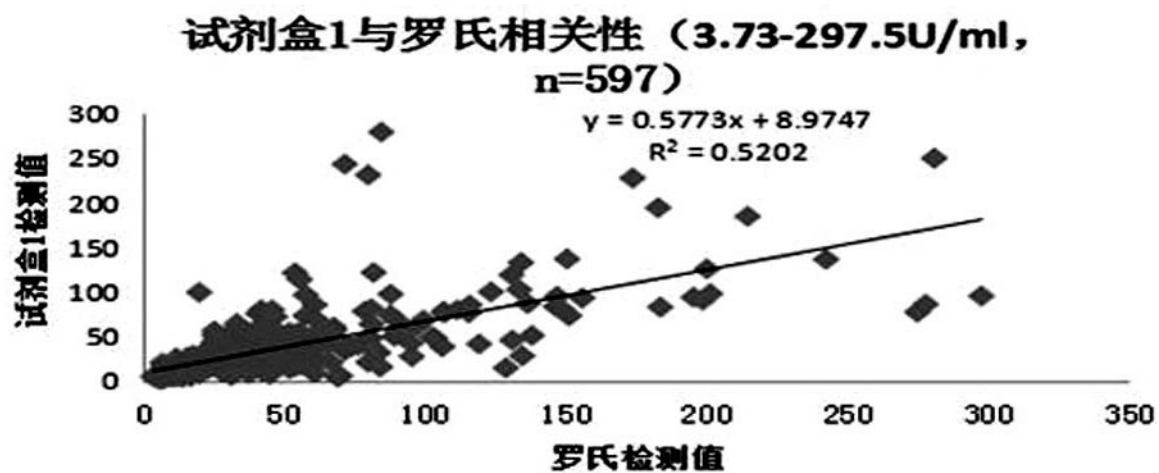


图2

专利名称(译)	一种检测糖类抗原15-3的试剂盒		
公开(公告)号	CN109307759A	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201811417344.7	申请日	2018-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	田会会 史小芹 崔小妞 马雷 陈鹏 付光宇 吴学炜 乔晓芳 李晓霞		
发明人	田会会 史小芹 崔小妞 马雷 陈鹏 付光宇 吴学炜 乔晓芳 李晓霞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/68 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测糖类抗原15-3的试剂盒，包括包被有两个CA15-3抗体的包被板，两个HRP标记的抗CA15-3抗体的酶结合物，样品稀释液和标准品。本发明试剂盒为化学发光免疫分析法，属于改良的双抗体夹心，采用双包被双酶标一主一副两对抗体，既具有放射免疫的高灵敏度，又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点，易于标准化操作。且测试中不使用有害试剂，试剂保持期长，应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作，成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。

