



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107462721 B

(45)授权公告日 2019.10.25

(21)申请号 201710557419.0

G01N 33/96(2006.01)

(22)申请日 2017.07.10

G01N 33/535(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 21/76(2006.01)

申请公布号 CN 107462721 A

审查员 刘迎鸣

(43)申请公布日 2017.12.12

(73)专利权人 江苏福隆生物技术有限公司

地址 214434 江苏省无锡市江阴市城东街
道东盛西路78号

(72)发明人 戴宝平 彭会军 钱晓锦 张伟

(74)专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限公司 11429

代理人 赵海波

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页

(54)发明名称

细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,包括的试剂:生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液、CYFRA21-1校准品A-F、浓缩洗液、底物液A、底物液B。本发明的主要设计思路是在化学发光免疫分析基础上,通过引入具有抗生物素抗体-生物素体系,稳定试剂盒检测特异性的同时,大幅增加了检测灵敏度以及检测时间。改进了高温振荡式抗生物素抗体包被工艺,从而降低抗体/抗原使用量的同时,简化了试剂生产流程,缩短了生产周期。

1. 一种细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,其特征在於:包括的试剂:生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液、CYFRA21-1校准品A-F、浓缩洗液、底物液A、底物液B;

试剂盒的制备方法,包括如下步骤

一、浓缩洗液的配制,步骤如下:

- 1、称取KCl 60g、NaCl 300g于1L 容器中;
- 2、称取20.0g Tween-20 于100ml 容器中加50ml 水使其完全溶解后,倒入上述1L 容器中;
- 3、用移液器将Proclin-300 量取2ml,倒入上述1L 容器中;
- 4、用量筒量取适量纯化水于上述1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;
- 5、调pH,控制其范围在7.35~7.45 之间;
- 6、最后定容至1000ml,完全溶解后用0.2 μ m 滤器过滤即得;

二、底物液的配制

(一)底物液A 的配制步骤

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、鲁米诺2.0g 和对碘苯酚0.2mg 于1L 烧杯中;
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调pH,控制其范围在7.95-8.05 之间;
- 3、用0.2 μ m 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

(二)底物液B 的配制

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、过氧化脲0.2g 和PC300 500 μ l 于1L 烧杯中;
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 pH 控制其范围在7.95-8.05 之间;
- 3、用0.2 μ m 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

三、校准品稀释液的配制方法,步骤如下:

- 1、称取Tris 12.11g 和HCl 7 ml 于1L 的容器中,调节溶液pH, 控制其范围在7.35-7.45 之间, 定容至1000ml ;

- 2、用量筒量取小牛血清300ml,加入上述溶液中,作为校准品稀释液备用;

四、校准品的配制方法,步骤如下:

- 1、校准品A的配制:取校准品稀释液,分装到适宜规格;
- 2、校准品B的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为1 ng/mL,分装到适宜规格;
- 3、校准品C的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为5 ng/mL,分装到适宜规格;
- 4、校准品D的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为20 ng/mL,分装到适宜规格;
- 5、校准品E的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度60 ng/mL,分装到适宜规格;
- 6、校准品F的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为120 ng/mL,分装到适宜规格;

五、抗生物素抗体包被的酶标板

1、配制0.01M的碳酸缓冲液,调节pH至 $pH9.6 \pm 0.1$,备用;

2、在上述0.01M的碳酸缓冲液中加入抗生物素抗体溶液至终浓度为 $0.2 \sim 8 \mu\text{g/ml}$,搅拌30分钟至混合均匀;

3、将上述混匀后的溶液按包被量为 $100 \mu\text{L}$ 每孔加入酶标板中,采用高温振荡式包被,包被温度为 $37 \pm 1^\circ\text{C}$,包被时间为 $1 \sim 3$ 小时,采用低速振荡包被形式,振荡幅度与方式: 3mm ,采用水平回转,转速为 $200 \sim 500\text{rpm}$;

4、配制 0.1M , $pH7.4$ TBS缓冲液,含 0.3% BSA, 1% 羊血清, 0.1% Proclin300 (v/v), 1% 鱼皮明胶, 2% 海藻糖和 10% 蔗糖,作为封闭液加入到清洗后的包被板中,封闭量为 $150\mu\text{L}$ 每孔,封闭温度为 $37 \pm 1^\circ\text{C}$,封闭时间为 $2 \sim 5$ 小时;

5、吸掉封闭液,放置在干燥箱中,干燥温度控制在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$,干燥时间为 $2 \sim 4$ 小时,再以铝箔袋真空包装,贴签备用;

六、辣根过氧化物酶标记CYFRA21-1抗体溶液的制备

(一) 酶反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g 、HCl $2900\mu\text{l}$ 于烧杯中,然后在烧杯中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

2、调pH,控制 pH 在 $7.35 \sim 7.45$;

3、称取BSA 1g 倒入上述烧杯中;

4、最后烧杯定容至 400ml ,用 $0.2\mu\text{m}$ 滤器过滤即得;

(二) 辣根过氧化物酶 (HRP) 与CYFRA21-1抗体的偶联

1、取抗CYFRA21-1抗体 1mg 放置于 1ml 玻璃管中;

2、取 $200\mu\text{l}$ DMSO 溶解抗体使抗体的终浓度到达 5mg/ml ,然后充分混匀;

3、按照 1mol 抗体加入 10mol 的辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比例加辛二酸二琥珀酰亚胺酯到上述步骤2得到的溶液中, 37°C 恒温箱中反应 1.5 小时;

4、按照 3mol 抗体加入 1mol HRP的摩尔比往上述步骤3得到的溶液中添加HRP,然后加入 1ml 的pH 为 7.4 浓度为 0.1M 的PB 缓冲液,置于 37°C 恒温箱中反应 3 小时;

5、将上述步骤4 配制的溶液用PD-10 柱纯化,收集纯化液,按照 $1:3000$ 的体积添加酶反应物稀释液,控制最终使用浓度在 $0.02 \sim 3.0 \mu\text{g/ml}$,混合均匀即得酶反应物;

七:生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液的制备

(一) 生物素反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g 、HCl $2847\mu\text{l}$ 于烧杯中,然后在烧杯中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

2、调pH,控制 pH 在 $7.35 \sim 7.45$;

3、称取BSA 1g 倒入上述烧杯中;

4、最后烧杯定容至 400ml ,用 $0.2\mu\text{m}$ 滤器过滤即得;

(二) 取生物素化抗体,以生物素反应物稀释液稀释,控制最终使用浓度在 $0.01 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$,混匀,即可得到生物素结合物。

2. 根据权利要求1所述的细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,其特征在于:所述生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液的浓度为 $0.01 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$,所述抗生物素抗体包

被的酶标板的抗生物素抗体的包被浓度为0.2~8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,所述辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液的浓度为0.02~3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 根据权利要求1所述的细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,其特征在于:所述CYFRA21-1校准品A-F点是CYFRA21-1以pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液配制得到的,浓度分别为0,1,5,20,60,120ng/mL。

4. 根据权利要求1所述的细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,其特征在于:所述抗生物素抗体包被的酶标板所用包被液为0.01M的碳酸缓冲液,pH 9.6 ± 0.1 ,所用封闭液含0.3wt%BSA、0.1% Proclin300(v/v)、1 wt %羊血清、1 wt %鱼皮明胶、2 wt %海藻糖和10 wt %蔗糖的0.1M pH7.4 TBS缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,其特征在于:所述抗生物素抗体包被的酶标板采用高温振荡式包被,包被温度为 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被形式,振荡幅度与方式:3mm水平回转,转速为200~500rpm,封闭和干燥温度为 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$,封闭时间为1.5~3小时,干燥时间为2~4小时;采用高温振荡式包被工艺,包被板制备时间可控制在5~7小时。

细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物试剂盒材料领域,具体涉及一种用于细胞角蛋白19片段的定量检测试剂盒及制备方法,可快速、简便、高效、灵敏地对人血清样本中细胞角蛋白19片段的定量检测。

背景技术

[0002] 细胞角蛋白19片段(Cytokeratin-19-fragment CYFRA21-1)是肺泡上皮细胞凋亡时,其细胞中含有的角蛋白的碎片降解后变成可溶性物质而进入血液,使血中含量增高。

[0003] CYFRA21-1是非小细胞肺癌的首选标志物,特别是鳞状上皮细胞癌目前首选的肿瘤标志物,灵敏度可达60%,特异性可达95%。它对非小细胞肺癌(NSCLC)的早期诊断、疗效监测和预后判断均有重要意义。CYFRA21-1常用来监测非小细胞肺癌的病程和预后,在非小细胞肺癌病人体内,血中CYFRA21-1水平显著升高。

[0004] 提示肿瘤的晚期或预后差;如果对非小细胞肺癌的治疗效果好,其水平会很快下降或恢复到正常水平,如值不变或轻度减低提示肿瘤未完全去除或有多发性肿块存在。

[0005] 为了提高肿瘤诊断水平和改善治疗效果,从检测角度上来说,目前临床上用于测定CYFRA21-1的方法较少,主要有酶联免疫技术和化学发光技术等。其中,化学发光技术兴起于上个世纪 80 年代,是继酶联免疫技术和放射性免疫技术之后发展起来的新兴技术,由于其高灵敏度、高特异性,同时方法简便、快速,标记结合物稳定,相对时间分辨荧光免疫法分析成本低廉、操作简便,无放射性同位素损伤和污染等特点,得到了飞速发展。

[0006] 本试剂盒主要用于对相关恶性肿瘤患者进行动态监测以辅助判断疾病进程或治疗效果,不能作为相关恶性肿瘤早期诊断或确诊的依据,不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是针对上述现有技术提供一种板式化学发光法检测人血清CYFRA21-1的试剂盒及其制备方法,研发和优化了与血清学免疫反应原理相关的各种关键技术,从而提高针对临床患者体内的CYFRA21-1检测灵敏度和准确性,开发出灵敏度高、稳定性好、生产便捷、操作方便的板式化学发光诊断试剂。

[0008] 本发明的主要设计思路是在化学发光免疫分析基础上,通过引入具有抗生物素抗体-生物素体系,稳定试剂盒检测特异性的同时,大幅增加检测灵敏度。

[0009] 本发明实现上述技术目的所采用的技术方案为:

[0010] 一种细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒,其特征在于:包括的试剂有生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液、CYFRA21-1校准品A-F、浓缩洗液、底物液A、底物液B。

[0011] 上述生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液的浓度为0.01~1.0 μ g/ml,所述抗生物素抗体包被的酶标板的抗生物素抗体的包被浓度为0.2~8.0 μ g/ml,所述辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液的浓度为0.02~3.0 μ g/ml。

[0012] 上述CYFRA21-1校准品A - F点是CYFRA21-1(北京华信行)以pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液配制得到的,浓度分别为0,1,5,20,60,120ng/mL。

[0013] 上述生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液的制备过程:生物素标记的CYFRA21-1抗体加入到pH值为7.4的缓冲液中,调节到适宜倍数,混匀得到。

[0014] 上述辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液的制备过程:辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液加入到pH值为7.4的缓冲液中,调节到适宜倍数,混匀得到。

[0015] 上述抗生物素抗体包被的酶标板所用包被液为0.01M的碳酸缓冲液, pH9.6±0.1。所用封闭液是含0.1wt%BSA、0.1 % Proclin300(v/v)、1 wt %羊血清、1 wt %鱼皮明胶、2 wt %海藻糖和10 wt %蔗糖的0.1M pH7.4 TBS缓冲液。针对本发明的抗生物素抗体包被体系,采用0.01M的碳酸缓冲液,并在封闭液中以少量BSA,屏蔽了酶标板大部分未结合位点,在缓冲体系的协同作用下,以动物血清消除非特异性结合位点,保证了包被板的精密度和低本底,以蔗糖、海藻糖和鱼皮明胶作为稳定体系,强化了包被板对高温、干燥的抗性,保证了抗生物素抗体包被板的有效活性。

[0016] 抗生物素抗体包被的酶标板的制备过程为:酶标板采用高温振荡式包被,包被温度为37±1℃,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被形式,选用的振荡仪为艾本森科学仪器有限公司微孔板振荡器,振荡幅度与方式:3mm(水平回转),速度低速(200~500rpm),封闭和干燥温度为37±1℃,封闭时间为1.5~3小时,干燥时间为2~4小时;采用高温振荡式包被工艺,包被板制备时间可控制在5~7小时,跟室温包被普遍的3~4天制备时间相比,具备明显的效率优势,同时提高了反应的灵敏度,降低抗体/抗原使用量的同时,简化了试剂生产流程,缩短了生产时间。国内包被板技术采用链霉亲和素包被较多,采用抗生物素抗体未见专利文献报告。另外,低速振荡包被法相比常规的室温包被法明显缩短了包被板的生产时间,提高了试剂生产效率。

[0017] 本发明CYFRA21-1的板式化学发光法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤

[0018] 一、浓缩洗液的配制,步骤如下:

[0019] 1、称取KCl 60g、NaCl 300g于1L 容器中;

[0020] 2、称取20.0g Tween-20 于100ml 容器中加50ml 水使其完全溶解后,倒入上述1L 容器中;

[0021] 3、用移液器将Proclin-300 量取2ml,倒入上述1L 容器中;

[0022] 4、用量筒量取适量纯化水于上述1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;

[0023] 5、调pH,控制其范围在7.35~7.45 之间;

[0024] 6、最后定容至1000ml,完全溶解后用0.2μm 滤器过滤即得;

[0025] 二、底物液的配制

[0026] (一)底物液A 的配制

[0027] 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、鲁米诺2.0g 和对碘苯酚0.2mg 于1L 烧杯中;

[0028] 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调pH,控制其范围在7.95-8.05 之间;

[0029] 3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

[0030] (二)底物溶液B 的配制

[0031] 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、过氧化脲0.2g 和PC300 500μl 于1L 烧杯中;

[0032] 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 pH 控制其范围在 7.95-8.05 之间;

[0033] 3、用0.2 μ m 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

[0034] 三、校准品稀释液的配制方法,步骤如下:

[0035] 1、称取Tris 12.11g 和HCl 7 ml 于1L 的容器中,调节溶液pH, 控制其范围在 7.35-7.45 之间, 定容至1000ml ;

[0036] 2、用量筒量取小牛血清300ml,加入上述溶液中,作为校准品稀释液备用

[0037] 四、校准品的配制方法,步骤如下:

[0038] 1、校准品A点的配制:取校准品稀释液,分装到适宜规格;

[0039] 2、校准品B点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为1 ng/mL,分装到适宜规格;

[0040] 3、校准品C点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为5 ng/mL,分装到适宜规格;

[0041] 4、校准品D点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为20 ng/mL,分装到适宜规格;

[0042] 5、校准品E点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度 60 ng/mL,分装到适宜规格;

[0043] 6、校准品F点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为120 ng/mL,分装到适宜规格

[0044] 五、抗生物素抗体包被的酶标板

[0045] 1、配制0.01M的碳酸缓冲液,调节pH至pH9.6 \pm 0.1,备用;

[0046] 2、在上述0.01M的碳酸缓冲液中加入抗生物素抗体溶液至终浓度为0.1~5 μ g/ml 搅拌30分钟至混合均匀;

[0047] 3、将上述混匀后的溶液按包被量为100 μ L每孔加入酶标板中,采用高温振荡式包被,包被温度为37 \pm 1 $^{\circ}$ C,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被方式;

[0048] 4、配制0.1M pH7.4TBS缓冲液,含0.3%BSA,1%羊血清,0.1% Proclin300 (v/v),1% 鱼皮明胶,2%海藻糖和10%蔗糖,作为封闭液加入到清洗后的包被板中,封闭量为150 μ L每孔,封闭为37 \pm 1 $^{\circ}$ C,封闭时间为2~5小时;

[0049] 5、吸掉封闭液,放置在干燥箱中,干燥温度控制在37 \pm 1 $^{\circ}$ C,干燥时间为2~4小时,再以铝箔袋真空包装,贴签备用;

[0050] 六、辣根过氧化物酶标记CYFRA21-1抗体溶液的制备

[0051] (一)酶反应物稀释液的配制

[0052] 1、取Tris 4.846g、HCl 2900 μ l 于烧杯中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

[0053] 2、调pH,控制 pH 在 7.35-7.45 ;

[0054] 3、称取BSA 1g 倒入上述烧杯中;

[0055] 4、最后烧杯定容至400ml,用0.2 μ m 滤器过滤即得;

[0056] (二)辣根过氧化物酶(HRP)与CYFRA21-1抗体的偶联

[0057] 1、取抗CYFRA21-1抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中;

- [0058] 2、取200 μ l DMSO 溶解抗体使抗体的终浓度到达5mg/ml,然后充分混匀;
- [0059] 3、按照1mol 抗体加入10mol 的辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比例加辛二酸二琥珀酰亚胺酯到上述2 溶液中,37 $^{\circ}$ C恒温箱中反应 1.5 小时;
- [0060] 4、按照3mol 抗体加入1mol HRP的摩尔比往上述3 的溶液中添加HRP,然后加入1ml 的pH 为7.4 浓度为0.1M 的PB 缓冲液,置于 37 $^{\circ}$ C恒温箱中反应 3小时;
- [0061] 5、将上述4 配制的溶液用PD-10 柱纯化,收集纯化液,按照1:3000 的体积添加自制的酶反应物稀释液,控制最终使用浓度在0.02-3.0 μ g/ml,混合均匀即得酶反应物;
- [0062] 七:生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液的制备
- [0063] (一)生物素反应物稀释液的配制
- [0064] 1、取Tris 4.846g、HCl 2847 μ l 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;
- [0065] 2、调pH,控制 pH 在 7.35-7.45 ;
- [0066] 3、称取BSA 1g 倒入上述烧杯中;
- [0067] 4、最后烧杯定容至400ml,用0.2 μ m 滤器过滤即得;
- [0068] (二)取生物素化抗体,以生物素反应物稀释液稀释,控制最终使用浓度在0.3 μ g/ml左右(0.01~1.0 μ g/ml),混匀,即可得到生物素结合物。

[0069] 本发明试剂盒的检测方法是,将样品和生物素标记的CYFRA21-1抗体加入到抗生物素抗体包被的酶标板中,样品中的CYFRA21-1和该抗体结合形成免疫复合物,同时,该免疫复合物通过抗生物素抗体和生物素之间的结合作用被固定到酶标板上。使用洗液清洗酶标板,去除未结合的游离成分。加入辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液,该酶标抗体通过免疫反应与被固定的免疫复合物结合。再次清洗酶标板后,加入底物液激发化学发光,测定相对光强度RLU,在一定浓度范围内,RLU值与样品中CYFRA21-1含量呈线性正比关系。通过校准品测值,拟合校准曲线,根据曲线计算样品中CYFRA21-1浓度,从而评估人血清中是否含有CYFRA21-1以及CYFRA21-1的含量。

[0070] 与现有技术相比,本发明的板式化学发光法检测血清CYFRA21-1的试剂盒及其制备方法,在化学发光免疫分析基础上,通过引入具有抗生物素抗体包被的酶标板,并改进了高温振荡式抗生物素抗体包被工艺,通过抗生物素抗体-生物素方法体系,提高反应的灵敏度,节省生产成本,从而降低抗体/抗原使用量的同时,简化了试剂生产流程,缩短了生产时间,简化了检测步骤,可为市场提供质优价廉、稳定可靠、重复性好、批间差小、准确度高的新一代检测试剂盒。

具体实施方式

[0071] 以下结合具体实施例对本发明进行说明,所举的实施例仅是对本发明产品或方法作概括性例示,有助于更好地理解本发明,但并不会限制本发明范围。下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0072] 本实施例的CYFRA21-1的板式化学发光法检测试剂盒主要试剂包括:包括的试剂有生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液、CYFRA21-1校准品A-F、浓缩洗液、底物液A、底物液B。

[0073] 试剂盒的制备方法

[0074] 一、浓缩洗液的配制,步骤如下:

[0075] 1、称取KCl 60g、NaCl 300g于1L 容器中;

[0076] 2、称取20.0g Tween-20 于100ml 容器中加50ml 水使其完全溶解后,倒入上述1L 容器中;

[0077] 3、用移液器将Proclin-300 量取2ml,倒入上述1L 容器中;

[0078] 4、用量筒量取适量纯化水于上述1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;

[0079] 5、调pH,控制其范围在7.35~7.45 之间;

[0080] 6、最后定容至1000ml,完全溶解后用0.2 μ m 滤器过滤即得。

[0081] 二、底物液的配制

[0082] (一)底物液A 的配制步骤

[0083] 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、鲁米诺2.0g 和对碘苯酚0.2mg 于1L 烧杯中;

[0084] 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调pH,控制其范围在8 \pm 0.05 之间;

[0085] 3、用0.2 μ m 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得。

[0086] (二)底物溶液B 的配制

[0087] 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、过氧化脲0.2g 和PC300 500 μ l 于1L 烧杯中;

[0088] 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 pH 控制其范围在8 \pm 0.05之间;

[0089] 3、用0.2 μ m 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得。

[0090] 三、校准品稀释液的配制方法,步骤如下:

[0091] 1、称取Tris 12.11g 和HCl 7 ml 于1L 的容器中,调节溶液pH, 控制其范围在7.35-7.45 之间, 定容至1000ml;

[0092] 2、用量筒量取小牛血清300ml,加入上述溶液中,作为校准品稀释液备用;

[0093] 1、称取Tris 12.11g 和HCl 7 ml 于1L 的容器中,调节溶液pH, 控制其范围在7.35-7.45 之间, 定容至1000ml ;

[0094] 2、用量筒量取小牛血清300ml,加入上述溶液中,作为校准品稀释液备用;

[0095] 四、校准品的配制方法,步骤如下:

[0096] 1、校准品A点的配制:取校准品稀释液,分装到适宜规格;

[0097] 2、校准品B点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为1 ng/mL,分装到适宜规格;

[0098] 3、校准品C点的配制:取;校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为5 ng/mL,分装到适宜规格;

[0099] 4、校准品D点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为20 ng/mL,分装到适宜规格;

[0100] 5、校准品E点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为60 ng/mL,分装到适宜规格;

[0101] 6、校准品F点的配制:取校准品稀释液,将CYFRA21-1溶液稀释适宜倍数,控制浓度为120 ng/mL,分装到适宜规格

[0102] 五、抗生物素抗体包被的酶标板

- [0103] 6、配制0.01M的碳酸缓冲液,调节pH至pH9.6±0.1,备用;
- [0104] 7、在上述0.01M的碳酸缓冲液中加入抗生物素抗体溶液至终浓度为0.3 μg/ml搅拌30分钟至混合均匀;
- [0105] 8、将上述混匀后的溶液按包被量为100 μL每孔加入酶标板中,采用高温振荡式包被,包被温度为37±1℃,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被形式,振荡幅度与方式:3mm水平回转,转速为200~500rpm;
- [0106] 9、配制0.1M pH7.4 TBS缓冲液,含0.3%BSA,1%羊血清,0.1% Proclin300(v/v),1%鱼皮明胶,2%海藻糖和10%蔗糖,作为封闭液加入到清洗后的包被板中,封闭量为150μL每孔,封闭温度为37±1℃,封闭时间为2~5小时;
- [0107] 10、吸掉封闭液,放置在干燥箱中,干燥温度控制在37±1℃,干燥时间为2~4小时,再以铝箔袋真空包装,贴签备用;
- [0108] 六、辣根过氧化物酶标记CYFRA21-1抗体溶液的制备
- [0109] (一)酶反应物稀释液的配制
- [0110] 1、取Tris 4.846g、HCl 2900μl 于烧杯中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;
- [0111] 2、调pH,控制 pH 在 7.4±0.05 ;
- [0112] 3、称取BSA 1g 倒入上述烧杯中;
- [0113] 4、最后烧杯定容至400ml,用0.2um 滤器过滤即得;
- [0114] (二)辣根过氧化物酶(HRP)与CYFRA21-1抗体的偶联
- [0115] 1、取抗CYFRA21-1抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中;
- [0116] 2、取200μl DMSO 溶解抗体使抗体的终浓度到达5mg/ml,然后充分混匀;
- [0117] 3、按照1mol 抗体加入10mol 的辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比例加辛二酸二琥珀酰亚胺酯到上述2 溶液中,37℃恒温箱中反应 1.5 小时;
- [0118] 4、按照3mol 抗体加入1mol HRP的摩尔比往上述3 的溶液中添加HRP,然后加入1ml 的pH 为7.4 浓度为0.1M 的PB 缓冲液,置于 37℃恒温箱中反应 3小时;
- [0119] 5、将上述4 配制的溶液用PD-10 柱纯化,收集纯化液,按照1:3000 的体积添加自制的酶反应物稀释液,控制最终使用浓度在0.5μg/ml,混合均匀即得酶反应物;
- [0120] 七:生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液的制备
- [0121] (一)生物素反应物稀释液的配制
- [0122] 1、取Tris 4.846g、HCl 2847μl 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;
- [0123] 2、调pH,控制 pH 在 7.35-7.45;
- [0124] 3、称取BSA 1g 倒入上述烧杯中;
- [0125] 4、最后烧杯定容至400ml,用0.2μm 滤器过滤即得。
- [0126] (二)取生物素化抗体,以生物素反应物稀释液稀释,控制最终使用浓度在0.5μg/ml,混匀,即可得到生物素结合物。
- [0127] 八、优化与验证
- [0128] 主要性能指标均符合发光检测试剂技术评审规范。
- [0129] 1、阴性符合率

[0130] 检测103例罗氏化学发光试剂检测的临床血样,阴性符合率(-/-)为103/103,符合率100%。

[0131] 2、阳性符合率

[0132] 检测190份罗氏化学发光试剂检测的临床血样,阳性符合率(+/)为189/190,符合率为99.47%, 见下表。

		福隆阴性	福隆阳性	符合率%
[0133] 罗氏	阴性	103	0	100%
	阳性	1	189	99.47%

[0134] 用经标化的企业精密度参考品重复检测10次,其变异系数CV在2.64-6.92%之间,符合不大于10.0%的行业规范(全自动仪器操作)。

精密性质控品	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
L	1.9	1.9	2.2	2	2.2	1.9	2.2	2.1	1.9	1.9
M	20.2	20.7	19.5	20.3	21.2	21.2	19.5	21.1	20.6	19.2
H	41.7	43.5	42.7	41.1	40.9	40.2	41	41.2	43.3	41.4

[0135]

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
L	2.02	0.1	6.92%
M	20.35	0.7	3.66%
H	41.7	1.1	2.64%

[0136] 4、批间差

[0137] 用经国家参考品标化的企业精密度质控品检测三个批号试剂盒,其批间变异系数(CV)在1.95~5.83%之间,符合行标小于15%的要求(全自动仪器操作)。

[0138]

低浓度精密性质控品										
批次	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
Lot 1	2.2	2.1	2	2.1	2.1	2.2	2.2	1.9	2.2	1.9
Lot 2	19.9	19.6	20.5	20.3	20.2	21.1	19.9	20	20.3	19.5
Lot 3	40.1	41.3	41.8	41.7	42.4	40.9	43.1	40.7	41.6	40.3
中浓度精密性质控品										
批次	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
Lot 1	2.1	2.2	1.9	2.1	1.9	2	1.9	2.2	2	2.2
Lot 2	19.8	20.4	20.9	19.4	19.9	19.8	21.3	20.1	20.5	19.2
Lot 3	41.3	42.3	40.8	40.5	43.1	40.6	41.6	41.6	41.4	41.3
高浓度精密性质控品										
批次	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
Lot 1	1.9	2.1	2.1	1.9	2.2	2.1	2	1.9	1.9	2.2
Lot 2	20.3	20	19.7	21.3	21	19.9	20.6	19.6	19.9	20.9
Lot 3	42	40.9	40.8	41.9	41.5	42.2	42.3	41.1	41.6	40.1

[0139] 分析结果如下:

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
--------	-----	-----	-----

L	2.06	0.1	5.83%
M	20.17	0.5	2.70%
H	41.36	0.8	1.95%

[0140] 5、稳定性

[0141] 热稳定性：试剂盒在37℃放置7天后进行检测，检测信号与对照相比，变化幅度不超过15%。

质控品	RLU (37℃烘烤 7 天)			RLU (未烘烤对照)			烘烤前后对比%
	L	M	H	L	M	H	
[0142] L	14195	14709	14266	15290	17013	15056	91.15%
M	162651	161458	155110	160321	164788	171471	96.50%
H	316625	322170	306071	306464	315663	318942	100.40%

[0143] 实施例中试剂盒的一种半自动仪器检测方法，采用北京滨松光子技术股份有限公司微孔板发光分析仪 BHP9504进行检测，检测步骤包括

[0144] (1) 取出试剂盒置于室温，使试剂盒的温度平衡至室温 (18~25℃)。

[0145] (2) 样本应混合均匀，若样本为冻融样本，平衡至室温 (18~25℃) 后再进行检测。

[0146] (3) 按照浓缩洗液：蒸馏水=1:39的比例配制洗液，混合均匀后，转入洗液瓶中。

[0147] (4) 取出检测酶标板板条，设好校准品孔、待检样品孔。将其余板条放回铝箔袋中，封存。

[0148] (5) 按表1顺序，进行半自动加样与反应操作。

[0149] 表1加样和操作对照表

步骤	加样物	校准孔 (μL)	样品孔 (μL)
1	校准品	25	
	样品		25
2	检测糖类抗原 CYFRA21-1 酶	75	75
[0150] 3	/	用膜封好孔口，混匀，37℃温育 60 分钟，用洗液洗孔，每次每孔 350μL，清洗 5 次后，拍干孔中残留液体	
4	底物液 A	50	50
5	底物液 B	50	50
6	/	混匀，室温 (18~25℃) 避光放置 10 分钟，及时测量 RLU	

[0151] 底物液A和B也可在用前等体积混匀后每孔加100μL，如果底物液A和B混匀使用，则混合液应在30分钟内被使用。

[0152] 实施例中试剂盒的一种半全自动仪器检测方法，采用全自动化学发光免疫分析仪 ADC CLIA 200/300/400/500/600以及Smart3000/Smart300/ Smart3000S进行检测，检测步骤包括：

[0153] (1) 在使用全自动化学发光免疫分析仪 (以下简称“仪器”) 时，请务必仔细阅读仪器的操作手册，务必按照相应的操作说明对仪器进行设置、检查和维护，以实现最佳检测性能。

[0154] (2) 按照仪器的操作手册说明配置试剂信息，并在“微板布局设置”中设置对照品孔和样本孔的位置。特别地，请在仪器的“方法编辑”界面按照表2所示参数进行检测方法配

置。

[0155] (3) 按照表2全自动仪器参数设置表,进行参数设置与数据

[0156] 表2 全自动化学发光免疫分析仪参数表

[0157]

配置项	配置参数		
样品/校准品加入量	25 μ L;		
检测糖类抗原 CYFRA21-1 酶加入量	75 μ L;		
温育设置	加盖;	温度: 37 $^{\circ}$ C;	温育时间: 60min;
清洗设置	洗液量: 350 μ L/次/孔;	清洗次数: 5 次;	
底物液 A 加入量	50 μ L;		
底物液 B 加入量	50 μ L;		
读数前温育设置	加盖;	温度: 20 $^{\circ}$ C;	温育时间: 10min;
读数设置	静置时间: 0s;	读数后动作: 回原板位;	读数仪: PETECK96;
定标设置	定量实验: 勾选;	校准品浓度: 见校准品;	
	曲线类型: log(X)-log(Y);		

[0158] 除上述实施例外,本发明还包括有其他实施方式,凡采用等同变换或者等效替换方式形成的技术方案,均应落入本发明权利要求的保护范围之内。

专利名称(译)	细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN107462721B	公开(公告)日	2019-10-25
申请号	CN2017110557419.0	申请日	2017-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	江苏福隆生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏福隆生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏福隆生物技术有限公司		
[标]发明人	戴宝平 彭会军 钱晓锦 张伟		
发明人	戴宝平 彭会军 钱晓锦 张伟		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/96 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N21/763 G01N33/535 G01N33/574 G01N33/57423 G01N33/6884 G01N33/96 G01N2800/12		
代理人(译)	赵海波		
其他公开文献	CN107462721A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种细胞角蛋白19片段的板式化学发光法检测试剂盒，包括的试剂：生物素标记的CYFRA21-1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的CYFRA21-1抗体溶液、CYFRA21-1校准品A-F、浓缩洗液、底物液A、底物液B。本发明的主要设计思路是在化学发光免疫分析基础上，通过引入具有抗生物素抗体-生物素体系，稳定试剂盒检测特异性的同时，大幅增加了检测灵敏度以及检测时间。改进了高温振荡式抗生物素抗体包被工艺，从而降低抗体/抗原使用量的同时，简化了试剂生产流程，缩短了生产周期。

低浓度精密性质控品										
批次	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
Lot 1	2.2	2.1	2	2.1	2.1	2.2	2.2	1.9	2.2	1.9
Lot 2	19.9	19.6	20.5	20.3	20.2	21.1	19.9	20	20.3	19.5
Lot 3	40.1	41.3	41.8	41.7	42.4	40.9	43.1	40.7	41.6	40.3
中浓度精密性质控品										
批次	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
Lot 1	2.1	2.2	1.9	2.1	1.9	2	1.9	2.2	2	2.2
Lot 2	19.8	20.4	20.9	19.4	19.9	19.8	21.3	20.1	20.5	19.2
Lot 3	41.3	42.3	40.8	40.5	43.1	40.6	41.6	41.6	41.4	41.3
高浓度精密性质控品										
批次	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC	CONC
Lot 1	1.9	2.1	2.1	1.9	2.2	2.1	2	1.9	1.9	2.2
Lot 2	20.3	20	19.7	21.3	21	19.9	20.6	19.6	19.9	20.9
Lot 3	42	40.9	40.8	41.9	41.5	42.2	42.3	41.1	41.6	40.1