



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104007256 A

(43) 申请公布日 2014.08.27

(21) 申请号 201310055076.X

(22) 申请日 2013.02.21

(71) 申请人 林斯

地址 100078 北京市房山区新镇泳池路3号
楼

(72) 发明人 林斯

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54) 发明名称

总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断
试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法,该方法用一株抗 PSA 抗体包被成固相包被板,用两种不同的酶来标记 PSA 不同位点的抗体,再用不同酶对应的不同底物来获取各自的标准曲线进而实现在一次免疫反应过程中同时检测 PSA 和 FPSA 两种物质的浓度。采用此发明前的检测总 PSA 和游离 PSA 是通过两次实验分别进行的,操作繁琐,时间周期长。采用本发明后能将两种检测试剂二合一,通过一次实验获得两种项目的结果,缩短的实验时间,减少实验步骤。

1. 一种总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括如下步骤:

步骤 1:取 0.5 ~ 1.5mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M、pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 4 ~ 6 μ g/ml,在 96 孔化学发光板上每孔加 100 ~ 120 μ l;4 $^{\circ}$ C 静置过夜,次日将板子拍杆,加入含有 1%牛血清白蛋白的溶液 150 ~ 250 μ l,37 $^{\circ}$ C 封闭反应 0.5 ~ 1.5 小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装;

步骤 2:取 0.5 ~ 1.5mg 抗 PSA 单抗和 0.5 ~ 1.5mg 辣根过氧化物酶溶解于 0.5 ~ 1.5ml、0.1M、pH8.0 的磷酸缓冲液中,加入水溶性碳二亚胺 0.05 ~ 0.15mg;室温搅拌 0.5 ~ 1.5 小时;取出反应液对 0.02M、pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 2 ~ 4 次;

步骤 3:取 0.5 ~ 1.5mg 抗 PSA 单抗和 0.5 ~ 1.5mg 碱性磷酸酶溶解于 0.5 ~ 1.5ml、0.1M、pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,加入 4%戊二醛 0.05 ~ 0.15ml,室温搅拌 0.5 ~ 1.5 小时,加入 0.05 ~ 0.15mg 赖氨酸终止反应,室温继续搅拌 10 ~ 20 分钟,取出反应液对 0.02M、pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 2 ~ 4 次;用含有 0.2%牛血清白蛋白的 0.1M、pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 900 ~ 1100 倍,10 毫升分装备用;

步骤 4:分别量取 90 ~ 110ml 已灭活过的新生牛血清 4 ~ 6 份,分别往每份血清中添加总 PSA 标准品原料和游离 PSA 标准品原料,混合均匀后将配制的血清样品用罗氏电化学发光系统分别标定总 PSA 浓度值和游离 PSA 浓度值,分装后作为试剂盒的系列校准品;

步骤 5:分别采用市售的金刚烷化学发光底物系统和鲁米诺化学发光底物系统作为发光底物;金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 6 毫升,鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分,其中 A 液为鲁米诺溶液,6 毫升;B 液为氧化剂溶液,6 毫升;

步骤 6:配制含有 0.05% TWEEN20 的 0.01M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液为洗涤液。

2. 如权利要求 1 中所述的制备方法,其特征在于,在步骤 1 中,取 1mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M、pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 5 μ g/ml,在 96 孔化学发光板上每孔加 110 μ l;4 $^{\circ}$ C 静置过夜,次日将板子拍杆,加入含有 1%牛血清白蛋白的溶液 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 封闭反应 1 小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装。

3. 如权利要求 1 中所述的制备方法,其特征在于,在步骤 2 中,取 1mg 抗 PSA 单抗和 1mg 辣根过氧化物酶溶解于 1ml、0.1M pH8.0 的磷酸缓冲液中,加入水溶性碳二亚胺 0.1mg。室温搅拌 1 小时;取出反应液对 0.02M pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 3 次。

4. 如权利要求 1 中所述的制备方法,其特征在于,在步骤 3 中,取 1mg 抗 PSA 单抗和 1mg 碱性磷酸酶溶解于 1ml、0.1M pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,加入 4%戊二醛 0.1ml,室温搅拌 1 小时,加入 0.1mg 赖氨酸终止反应,室温继续搅拌 15 分钟,取出反应液对 0.02M pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 3 次;用含有 0.2%牛血清白蛋白的 0.1M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 1000 倍,10 毫升分装备用。

5. 如权利要求 1 中所述的制备方法,其特征在于,在步骤 4 中,分别量取 100ml 已灭活过的新生牛血清 5 份。

6. 如权利要求 1 中所述的制备方法,其特征在于,金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 6 毫升,鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分,其中 A 液为鲁米诺溶液,6 毫升;B 液为氧化剂溶液,6 毫升。

7. 一种总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括如下步骤:

步骤 1:取 1mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 $5\mu\text{g/ml}$,在 96 孔化学发光板上每孔加 $110\mu\text{l}$; 4°C 静置过夜,次日将板子拍杆,加入含有 1% 牛血清白蛋白的溶液 $200\mu\text{l}$, 37°C 封闭反应 1 小时。将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装;

步骤 2:取 1mg 抗 PSA 单抗和 1mg 辣根过氧化物酶溶解于 1ml、0.1M pH8.0 的磷酸缓冲液中,加入水溶性碳二亚胺 0.1mg;室温搅拌 1 小时。取出反应液对 0.02M pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 3 次;

步骤 3:取 1mg 抗 PSA 单抗和 1mg 碱性磷酸酶溶解于 1ml、0.1M pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,加入 4% 戊二醛 0.1ml,室温搅拌 1 小时,加入 0.1mg 赖氨酸终止反应,室温继续搅拌 15 分钟,取出反应液对 0.02M pH7.4 的 P.B 透析过夜,中间换液 3 次;用含有 0.2% 牛血清白蛋白的 0.1M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 1000 倍,10 毫升分装备用;

步骤 4:分别量取 100ml 已灭活过的新生牛血清 5 份,分别往每份血清中添加总 PSA 标准品原料和游离 PSA 标准品原料,混合均匀后将配制的血清样品用罗氏电化学发光系统分别标定总 PSA 浓度值和游离 PSA 浓度值,分装后作为试剂盒的系列校准品;

步骤 5:分别采用市售的金刚烷化学发光底物系统和鲁米诺化学发光底物系统作为发光底物;金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 6 毫升,鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分,其中 A 液为鲁米诺溶液,6 毫升;B 液为氧化剂溶液,6 毫升;

步骤 6:配制含有 0.05% TWEEN20 的 0.01M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液为洗涤液。

8. 一种二合一化学发光免疫诊断试剂盒,其特征在于,根据权利要求 1 或 7 所述的方法制备。

总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种医疗设备及其制造方法。

背景技术

[0002] 目前国内外对于总前列腺特异性抗原 (PSA) 和游离前列腺特异性抗原 (FPSA) 的检测往往是分别进行的。PSA 在血清中主要有两种存在形式:一种是游离的 PSA (FPSA), 约占血清 PSA 总浓度的 10%~30%。另一种是与 α 1-抗糜蛋白酶 (ACT) 结合的 PSA (PSA-ACT), 约占血清 PSA 总浓度的 70%~90%。在采用化学发光免疫诊断方法检测时往往采用夹心法,用一株抗体包被,另一株抗体标记上示踪物。在具体检测 PSA 和游离 PSA 时,一般采用同一株抗体作为包被抗体,这株抗体既能够跟 PSA 结合又能够跟 FPSA 结合,当需要检测的是 PSA 时就用另一株抗体作夹心反应,这时要求这一株抗体能够与 PSA-ACT 中暴露在外的 PSA 位点结合。如果需要检测 FPSA 时则相反,这时作为夹心的这株抗体必须不能跟 PSA-ACT 暴露在外的 PSA 位点结合而应该与其内包的 PSA 位点结合。在这种情况下,由于 PSA-ACT 的内包位点的空间位阻,导致仅能跟体液中游离的 PSA 上的位点结合,这样就达到了仅检测 FPSA 的目的。

[0003] 这就为本发明提供了一种可能性,即通过采用两株针对不同反应位点的抗体作为示踪抗体,其中一株是仅能够与 PSA-ACT 的内包位点结合,另一株仅能够与 PSA-ACT 的外露位点结合,而这两株抗体分别采用不同的示踪剂,就可以区分出 PSA 与 FPSA 的量的多少了。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的缺陷,本发明提供了一种总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法。本发明的方法用一株抗 PSA 抗体包被成固相包被板,用两种不同的酶来标记 PSA 不同位点的抗体,再用不同酶对应的不同底物来获取各自的标准曲线进而实现在一次免疫反应过程中同时检测 PSA 和 FPSA 两种物质的浓度。采用此发明前的检测总 PSA 和游离 PSA 是通过两次实验分别进行的,操作繁琐,时间周期长。采用本发明后能将两种检测试剂二合一,通过一次实验获得两种项目的结果,缩短的实验时间,减少实验步骤。

[0005] 本发明的总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法包括如下步骤:

[0006] 步骤 1:取 0.5~1.5mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M、pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 4~6 μ g/ml,在 96 孔化学发光板上每孔加 100~120 μ l;4 $^{\circ}$ C 静置过夜,次日将板子拍杆,加入含有 1% 牛血清白蛋白的溶液 150~250 μ l,37 $^{\circ}$ C 封闭反应 0.5~1.5 小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装;

[0007] 优选地,在步骤 1 中,取 1mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M、pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 5 μ g/ml,在 96 孔化学发光板上每孔加 110 μ l;4 $^{\circ}$ C 静置过夜,次日将板子拍杆,加入含有

1%牛血清白蛋白的溶液 200 μ l, 37°C 封闭反应 1 小时;将板子再次拍干,置于烘干间抽湿烘干后真空包装;

[0008] 步骤 2:取 0.5 ~ 1.5mg 抗 PSA 单抗和 0.5 ~ 1.5mg 辣根过氧化物酶溶解于 0.5 ~ 1.5ml、0.1M、pH8.0 的磷酸缓冲液中,加入水溶性碳二亚胺 0.05 ~ 0.15mg;室温搅拌 0.5 ~ 1.5 小时;取出反应液对 0.02M、pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 2 ~ 4 次;

[0009] 优选地,在步骤 2 中,取 1mg 抗 PSA 单抗和 1mg 辣根过氧化物酶溶解于 1ml、0.1M pH8.0 的磷酸缓冲液中,加入水溶性碳二亚胺 0.1mg。室温搅拌 1 小时;取出反应液对 0.02M pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 3 次;

[0010] 步骤 3:取 0.5 ~ 1.5mg 抗 PSA 单抗和 0.5 ~ 1.5mg 碱性磷酸酶溶解于 0.5 ~ 1.5ml、0.1M、pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,加入 4% 戊二醛 0.05 ~ 0.15ml,室温搅拌 0.5 ~ 1.5 小时,加入 0.05 ~ 0.15mg 赖氨酸终止反应,室温继续搅拌 10 ~ 20 分钟,取出反应液对 0.02M、pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 2 ~ 4 次;用含有 0.2% 牛血清白蛋白的 0.1M、pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 900 ~ 1100 倍,10 毫升分装备用;

[0011] 优选地,在步骤 3 中,取 1mg 抗 PSA 单抗和 1mg 碱性磷酸酶溶解于 1ml、0.1M pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,加入 4% 戊二醛 0.1ml,室温搅拌 1 小时,加入 0.1mg 赖氨酸终止反应,室温继续搅拌 15 分钟,取出反应液对 0.02M pH7.4 的磷酸缓冲液透析过夜,中间换液 3 次;用含有 0.2% 牛血清白蛋白的 0.1M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 1000 倍,10 毫升分装备用;

[0012] 步骤 4:分别量取 90 ~ 110ml 已灭活过的新生牛血清 4 ~ 6 份,分别往每份血清中添加总 PSA 标准品原料和游离 PSA 标准品原料,混合均匀后将配制的血清样品用罗氏电化学发光系统分别标定总 PSA 浓度值和游离 PSA 浓度值,分装后作为试剂盒的系列校准品;

[0013] 优选地,在步骤 4 中,分别量取 100ml 已灭活过的新生牛血清 5 份;

[0014] 步骤 5:分别采用市售的金刚烷化学发光底物系统和鲁米诺化学发光底物系统作为发光底物;金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 4 ~ 8 毫升,鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分,其中 A 液为鲁米诺溶液,4 ~ 8 毫升;B 液为氧化剂溶液,4 ~ 8 毫升;

[0015] 优选地,金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 6 毫升,鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分,其中 A 液为鲁米诺溶液,6 毫升;B 液为氧化剂溶液,6 毫升;

[0016] 步骤 6:配制含有 0.05% TWEEN20 的 0.01M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液为洗涤液。

[0017] 通过使用本发明,可以使得医疗检验机构的可以使用一个试剂盒同时检测两种指标,操作时间缩短一半,操作步骤减少一半。患者可以更快获得检验结果。

具体实施方式

[0018] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过具体实施例对本发明的制备方法进一步详细说明。

[0019] 实施例 1:

[0020] 取 1mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 5 μ g/ml,在 96 孔化学发光板上每孔加 110 μ l。4°C 静置过夜,次日将板子拍杆,加入含有 1% 牛血清白蛋白的

溶液 200 μ l, 37°C 封闭反应 1 小时。将板子再次拍干, 置于烘干间抽湿烘干后真空包装。

[0021] 取 1mg 抗 PSA (PSA-ACT 内包位点) 单抗和 1mg 辣根过氧化物酶溶解于 1ml、0.1M pH8.0 的磷酸缓冲液 (P.B) 中, 加入水溶性碳二亚胺 (EDC) 0.1mg。室温搅拌 1 小时。取出反应液对 0.02M pH7.4 的 P.B 透析过夜, 中间换液 3 次。

[0022] 取 1mg 抗 PSA (PSA-ACT 外露位点) 单抗和 1mg 碱性磷酸酶溶解于 1ml、0.1M pH6.0 的柠檬酸缓冲液中, 加入 4% 戊二醛 0.1ml, 室温搅拌 1 小时, 加入 0.1mg 赖氨酸终止反应, 室温继续搅拌 15 分钟, 取出反应液对 0.02M pH7.4 的 P.B 透析过夜, 中间换液 3 次。取出反应液并与前一步制备的辣根酶标记物反应液混合并用含有 0.2% 牛血清白蛋白的 0.1M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 1000 倍, 10 毫升分装后作为标记物工作液备用。

[0023] 分别量取 100ml 已灭活过的新生牛血清 5 份, 分别往每份血清中添加一定量的总 PSA 标准品原料和游离 PSA 标准品原料, 混合均匀后将配制的血清样品用罗氏电化学发光系统分别标定总 PSA 浓度值和游离 PSA 浓度值, 0.5 毫升分装后作为试剂盒的系列校准品。

[0024] 分别采用市售的金刚烷化学发光底物系统和鲁米诺化学发光底物系统作为发光底物。金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 6 毫升, 鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分, 其中 A 液为鲁米诺溶液, 6 毫升; B 液为氧化剂溶液, 6 毫升。

[0025] 配制含有 0.05% TWEEN20 的 0.01M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液为洗涤液。

[0026] 使用时往 96 孔化学发光板中分别加入已经标定过总 PSA 和游离 PSA 浓度的系列校准品, 以及待测血清样本各 25 微升; 每孔加入混合标记物工作液 100 微升, 37 摄氏度温育 1 小时后取出。用洗涤液洗涤 5 次后, 每孔加入 50 微升金刚烷化学发光底物, 37 摄氏度放置 30 分钟后置于化学发光分析仪上检测发光信号。

[0027] 将总 PSA 系列校准品浓度对其发光信号建立总 PSA 标准曲线, 待测样本的发光信号通过总 PSA 标准曲线反求出所对应的浓度。

[0028] 检测完毕用洗涤液洗涤发光板 5 次, 分别加入鲁米诺化学发光底物 A 液 50 微升和 B 液 50 微升, 1 分钟后置于化学发光分析仪上检测发光信号。将游离 PSA 系列校准品浓度对其发光信号建立游离 PSA 标准曲线, 待测样本的发光信号通过游离 PSA 标准曲线反求出所对应的浓度。

[0029] 实施例 2:

[0030] 本发明的总 PSA 和游离 PSA 二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法包括如下步骤:

[0031] 步骤 1: 取 1mg 抗 PSA 包被抗体用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液稀释成 5 μ g/ml, 在 96 孔化学发光板上每孔加 110 μ l。4°C 静置过夜, 次日将板子拍干, 加入含有 1% 牛血清白蛋白的溶液 200 μ l, 37°C 封闭反应 1 小时。将板子再次拍干, 置于烘干间抽湿烘干后真空包装。

[0032] 步骤 2: 取 1mg 抗 PSA (PSA-ACT 内包位点) 单抗和 1mg 辣根过氧化物酶溶解于 1ml、0.1M pH8.0 的磷酸缓冲液 (P.B) 中, 加入水溶性碳二亚胺 (EDC) 0.1mg。室温搅拌 1 小时。取出反应液对 0.02M pH7.4 的 P.B 透析过夜, 中间换液 3 次。

[0033] 步骤 3: 取 1mg 抗 PSA (PSA-ACT 外露位点) 单抗和 1mg 碱性磷酸酶溶解于 1ml、0.1M pH6.0 的柠檬酸缓冲液中, 加入 4% 戊二醛 0.1ml, 室温搅拌 1 小时, 加入 0.1mg 赖氨酸终止

反应,室温继续搅拌 15 分钟,取出反应液对 0.02M pH7.4 的 P.B 透析过夜,中间换液 3 次。用含有 0.2% 牛血清白蛋白的 0.1M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液将步骤 2 和步骤 3 反应液混合稀释 1000 倍,10 毫升分装备用。

[0034] 步骤 4:分别量取 100ml 已灭活过的新生牛血清 5 份,分别往每份血清中添加总 PSA 标准品原料和游离 PSA 标准品原料,混合均匀后将配制的血清样品用罗氏电化学发光系统分别标定总 PSA 浓度值和游离 PSA 浓度值,分装后作为试剂盒的系列校准品。

[0035] 步骤 5:分别采用市售的金刚烷化学发光底物系统和鲁米诺化学发光底物系统作为发光底物。金刚烷系统化学发光底物每个试剂盒 6 毫升,鲁米诺化学发光底物系统又分为 A 液、B 液两个组分,其中 A 液为鲁米诺溶液,6 毫升;B 液为氧化剂溶液,6 毫升。

[0036] 步骤 6:配制含有 0.05% TWEEN20 的 0.01M pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液为洗涤液。

[0037] 本发明的特点是通过目前化学发光免疫诊断领域比较常用的两种标记物——碱性磷酸酶 (AP) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记针对 PSA 不同位点的两株抗体。通过一次免疫反应,采用两种酶分别对应的底物进行信号检测,求的各自的标准曲线进而分别计算出所对应的 PSA 和 FPSA 浓度来。通过这种办法制备得试剂盒就成为二合一的试剂盒。

[0038] 以上描述了本发明的优选实施例,但本领域技术人员可以理解,在不脱离本发明设计思想的前提下,其各种变型或组合均纳入本发明的权利要求的保护范围中。

专利名称(译)	总PSA和游离PSA二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN104007256A	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201310055076.X	申请日	2013-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	林斯		
申请(专利权)人(译)	林斯		
当前申请(专利权)人(译)	林斯		
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N33/5308 G01N2800/342		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种总PSA和游离PSA二合一化学发光免疫诊断试剂盒的制备方法，该方法用一株抗PSA抗体包被成固相包被板，用两种不同的酶来标记PSA不同位点的抗体，再用不同酶对应的不同底物来获取各自的标准曲线进而实现在一次免疫反应过程中同时检测PSA和FPSA两种物质的浓度。采用此发明前的检测总PSA和游离PSA是通过两次实验分别进行的，操作繁琐，时间周期长。采用本发明后能将两种检测试剂二合一，通过一次实验获得两种项目的结果，缩短的实验时间，减少实验步骤。