



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103018445 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201210472473. 2

(22) 申请日 2012. 11. 20

(71) 申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司  
地址 300300 天津市东丽区开发区四纬路  
10 号

(72) 发明人 刘萍 范利花

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理  
有限公司 12211

代理人 李莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

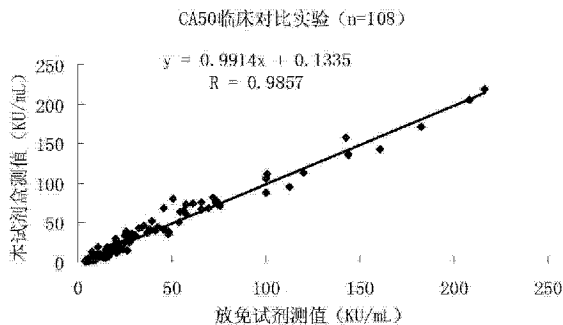
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测  
试剂盒及其制备方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种糖类抗原 50 磁微粒化学  
发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:糖  
类抗原 50 校准品;偶联有链霉亲和素的磁微粒悬  
浮液;生物素标记的糖类抗原 50 抗体;糖类抗原  
50 抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,  
辣根过氧化物酶纯度  $RZ \geq 3.0$ ,活性  $\geq 250U/mL$ ;  
糖类抗原 50 质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20  
倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发  
明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂  
盒相比操作简便,安全无环境污染。此外,本发  
明还具有检测样品的浓度范围宽、成本低、稳定性好  
等优点。



1. 糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:
  - 1)糖类抗原 50 校准品,浓度为 0、5、10、25、50、100KU/mL,校准品稀释液为 50% 牛血清;
  - 2) 偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;
  - 3) 生物素标记的糖类抗原 50 抗体;
  - 4) 糖类抗原 50 抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度  $RZ \geq 3.0$ ,活性  $\geq 250U/mL$ ;
  - 5) 糖类抗原 50 质控品;
  - 6) 化学发光液 A 液和 B 液;
  - 7) 20 倍浓缩洗液;
  - 8) 反应管。
2. 根据权利要求 1 所述的糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的发光液 A 液的主要成分为鲁米诺,B 液的主要成分是过氧化脲。
3. 根据权利要求 1 所述的糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径  $1 \sim 2\mu m$ 。
4. 根据权利要求 1 所述的糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的糖类抗原 50 质控品包括低值质控品和高值质控品。
5. 根据权利要求 1 所述的糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。
6. 一种制备所述权利要求 1 的试剂盒的方法,其特征在于包括以下步骤:
  - (1) 糖类抗原 50 校准品的配制:

将 CA50 纯品用 50% 牛血清稀释成系列梯度,浓度分别为 0、5、10、25、50、100KU/mL;
  - (2) 糖类抗原 50 质控品的配制:

将糖类抗原 50 用含有 50% 牛血清溶液稀释配制低值质控品高值质控品,浓度范围分别为  $8 \sim 12KU/mL$  和  $29.6 \sim 44.4KU/mL$ ;
  - (3) 磁性颗粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备:

取  $100mL 0.1mol/L$  2- 吗啉乙磺酸溶液,依次加入 10mg 磁性颗粒和 3mg 链霉亲和素,搅拌 30min,然后加入  $10mg/mL$  碳二亚胺盐酸盐溶液 3.5uL,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静止 10min,移去液体,加入  $10mL 0.01mol/L$  PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用  $0.01mol/L$  PBS 定溶至 1L 即可;
  - (4) 生物素标记的 CA50 抗体的制备:

取 0.5mg CA50 抗体,用硼酸盐缓冲液在  $2 \sim 8^{\circ}C$  下透析 1 ~ 3h;将透析后的抗体加入 25ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,最终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡;在上述溶液中加入  $250uL 1mol/L$  氯化铵溶液,常温避光反应 30 ~ 60min;用  $0.01mol/L$  PBS 溶液在  $2 \sim 8^{\circ}C$  下透析 2 天,期间换液 3 ~ 5 次;
  - (5) 糖类抗原 50 抗体酶结合物的制备:

采用高碘酸钠氧化法将糖类抗原 50 抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:6000,并加入 5 ~ 20% 酶稳定剂,储存于  $2 \sim 8^{\circ}C$ ;
  - (6) 20 倍浓缩洗液的配制:

20 浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/

LTween-20 和 1‰ Proclin300 ;

(7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris • HCl,避光保存 ;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制 ;A 液和 B 液在使用前 5min 混合 ;

(8) 组装 :将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃ ;

(9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查,准确度、剂量 - 反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

## 糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体的,本发明提供了一种糖类抗原 50 (CA50)磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 癌症亦称恶性肿瘤,是严重威胁人类健康的一种疾病,据统计,我国每年新患癌症的病人约 160 万人,每年因癌症死亡的人数约 130 万人,按目前的医疗水平,早期癌症病人约有 80% ~ 90% 可以治愈,大大降低了癌症病人的死亡率,可见癌症病人的早期发现、早期诊断和早期治疗尤为重要。

[0003] 糖类抗原 50 (CA50)是一种非特异性的广谱肿瘤标志物,以唾液蛋白和唾液酸糖脂为主要成分的一种神经节苷脂抗原,1983 年 Lindholm 等应用结肠癌细胞为免疫原首次制备出 CA50 单克隆抗体。CA50 以脂或脂蛋白结合的形式存在于细胞膜,在正常组织中一般不存在,当细胞恶变时,糖基化酶被激活,造成细胞表面糖基结构改变而成为 CA50 标志物。CA50 对多种上皮类恶性肿瘤有较高的阳性检出率,一般在消化道肿瘤的病人中可以观察到血清中 CA50 含量升高,与 CEA、CA125、CA199 等标志物联检,可为疾病的前期筛查、辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察、癌细胞转移以及预后提供有参考价值的依据。

[0004] 在临床上,正常人的血中 CA50 含量 < 20  $\mu$ g/L,许多恶性肿瘤患者血中皆可升高,如 66.6% 的肺癌、88.2% 的肝癌、68.9% 的胃癌、88.5% 的卵巢或子宫颈癌、94.4% 胰或胆管癌,其他如直肠癌、膀胱癌等皆有 70% 以上是升高的,另外,溃疡性结肠炎、肝硬化、黑色素瘤、淋巴瘤,自身免疫性疾病等也有 CA50 升高现象。

[0005] 目前常用的检测 CA50 的方法有放射免疫分析技术(RIA)和酶联免疫分析法(ELISA),但是这两种方法存在诸多不足,例如 RIA 存在放射性污染、标记物半衰期短、对操作者具有放射性损伤,且操作繁琐,时间长等缺点;而 ELISA 灵敏度低,检测范围窄;随着标记免疫技术的迅速发展,各种新的检测方法层出不穷,其中化学发光免疫分析(CLIA)是将化学发光和酶免疫分析结合在此技术上发展起来的,是当今最为敏感的微量免疫测定法。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的问题是提供 CA50 的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了放射性免疫分析的试剂有效期短、存在放射性污染、操作繁琐等缺点,且解决了灵敏度低,检测范围窄,成本高的缺陷。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:糖类抗原 50 磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:糖类抗原 50 校准品,浓度为 0、5、10、25、50、100KU/mL,校准品稀释液为 50% 牛血清;偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;生物素标记的糖类抗原 50 抗体;糖类抗原 50 抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 RZ  $\geq$  3.0,活性  $\geq$  250U/mL;糖类抗原 50 质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20 倍浓缩洗液;反应管。

[0008] 进一步,所述的发光液 A 液的主要成分为鲁米诺, B 液的主要成分是过氧化脲。A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris·HCl,避光保存; B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制。

[0009] 进一步,所述的磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 1 ~ 2 $\mu$ m。

[0010] 进一步,所述的糖类抗原 50 质控品包括低值质控品和高值质控品。

[0011] 进一步,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

[0012] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 糖类抗原 50 校准品的配制:

[0014] 将 CA50 纯品用 50% 牛血清溶液稀释成系列梯度,浓度分别为 0、5、10、25、50、100KU/mL。

[0015] (2) 糖类抗原 50 质控品的配制:

[0016] 将糖类抗原 50 用含有 50% 牛血清溶液稀释配制低值质控品高值质控品,低值质控品(QcL)和高质质控品(QcH)的允许范围分别为 8 ~ 12KU/mL 和 29.6 ~ 44.4KU/mL。

[0017] (3) 磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

[0018] 取 100mL0.1mol/L 2-吗啉乙磺酸溶液(MES 溶液),依次加入 10mg 磁性颗粒和 3mg 链霉亲和素(SA),搅拌 30min,然后加入 10mg/mL 碳二亚胺盐酸盐溶液(1-乙基-(3-二甲氨基丙基,EDC)3.5uL,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静止 10min,移去液体,加入 10mL 0.01mol/L PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用 0.01mol/L PBS 定溶至 1L 即可。

[0019] (4) 生物素标记的 CA50 抗体的制备

[0020] 取 0.5mg CA50 抗体,用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下透析 1 ~ 3h;将透析后的抗体加入 25ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,最终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡;在上述溶液中加入 250uL1mol/L 氯化铵溶液,常温避光反应 30 ~ 60min;用 0.01mol/L PBS 溶液在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下透析 2 天,期间换液 3 ~ 5 次;

[0021] (5) 糖类抗原 50 抗体酶结合物的制备

[0022] 采用高碘酸钠氧化法将 CA50 抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:6000,并加入 5 ~ 20% 酶稳定剂,储存于 2~8 $^{\circ}$ C;酶稳定剂是一种可以保持蛋白质在冻干或溶液下保持天然折叠构想的试剂,有利于抗原或抗体的保存,避免外界因素如温度、pH、盐、金属离子及其他污染物影响其稳定性。

[0023] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0024] 20 浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/LTween-20 和 1% Proclin300;

[0025] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0026] A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris·HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0027] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8 $^{\circ}$ C;

[0028] (9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查,准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0029] 本发明的原理是,本发明采用夹心法原理测定血清或血浆中的 CA50,在亲和

素-磁微粒悬浮液中加入生物素-CA50 抗体结合物,通过亲和素和生物素的亲和反应,形成磁微粒-亲和素-生物素-CA50 抗体复合物,加入样本和酶后,会通过抗原抗体反应,形成了磁微粒-亲和素-生物素-CA50 抗体-CA50-CA50 抗体-HRP 复合物,用磁场将复合物吸附在试管底部,清洗掉游离的成分,加入底物工作液,在氧化剂作用下,HRP 催化鲁米诺生成处于激发态的氨基邻苯二甲酸离子,其恢复到基态时,释放出 425nm 的光子,于第 5 分钟测定各加样孔的发光值(RLU)。样本的发光值与样本中 CA50 浓度呈正相关。样本中的 CA50 浓度依据由校准品 CA50 浓度和对应的 RLU 建立的  $\text{Log}(X)-\text{Log}(Y)$  数学模型进行定量,从而检测人血清、血浆中的 CA50 含量。

[0030] 发明制备的试剂盒将化学发光免疫分析和磁微粒技术结合,大大提高了检测的灵敏度和准确性,另外,在检测过程中引入的生物素-亲和素系统(biotin-avidin system, BAS)具有多级的信号放大作用,且不增加非特异性干扰,具有灵敏度高、特异性好、稳定性高、适用性强和实验成本低等特点,本技术具有以下优点:(1)以磁微粒为固相载体,大大增加了抗体的有效包被量,节约了抗体的用量;(2)以磁微粒为固相载体包被抗体,增加了抗原-抗体的接触面积,及发光面积,提高了反应的灵敏度;(3)反应在液相中进行,且利用旋转磁场使磁微粒其搅拌作用,大大缩短了反应时间。

#### 附图说明

[0031] 图 1 是本发明的博奥赛斯化学发光试剂盒测定糖类抗原 50 与放免试剂盒测定糖类抗原 50 的测定结果比较图,其中纵坐标为博奥赛斯测得的糖类抗原 50 值,横坐标为放免试剂盒测定糖类抗原 50 值,两种方法相关系数( $r$ )=0.9928,直线方程  $y=0.9914x+0.1335$ 。

[0032] 图 2 是 CA50 标准曲线。

#### 具体实施方式

[0033] 实施例 1:制备糖类抗原 50 (CA50)磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒 I

[0034] (1)糖类抗原 50 校准品的配制:

[0035] 将 CA50 纯品用 50%牛血清溶液稀释成系列梯度,浓度分别为 0、5、10、25、50、100KU/mL。

[0036] (2)糖类抗原 50 质控品的配制:

[0037] 将糖类抗原 50 用含有 50%牛血清溶液稀释配制低值质控品高值质控品,低值质控品(QcL)浓度为 8KU/mL,高质质控品(QcH)的浓度为 38.2KU/mL。

[0038] (3)磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

[0039] 取 100mL 0.1mol/L 2-吗啉乙磺酸溶液(MES 溶液),依次加入 10mg 磁性颗粒和 3mg 链霉亲和素(SA),搅拌 30min,然后加入 10mg/mL 碳二亚胺盐酸盐溶液(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基,EDC)3.5uL,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静止 10min,移去液体,加入 10mL 0.01mol/L PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用 0.01mol/L PBS 定溶至 1L 即可。

[0040] (4)生物素标记的 CA50 抗体的制备

[0041] 取 0.5mg CA50 抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8℃下透析 3h;将透析后的抗体加入 25ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,最终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡;在上述溶液中加入 250uL 1mol/L 氯化铵溶液,常温避光反应 30min;用 0.01mol/L PBS 溶液在 2~8℃下

透析 2 天,期间换液 3 次;

[0042] (5) 糖类抗原 50 抗体酶结合物的制备

[0043] 采用高碘酸钠氧化法将 CA50 抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:6000,并加入 20% 酶稳定剂,储存于 2~8℃;酶稳定剂使用 SurModics In Vitro Technologies 的蛋白稳定剂产品。

[0044] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0045] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 1‰ Proclin300;

[0046] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0047] A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris·HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0048] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃;

[0049] (9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查,准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0050] 说明:

[0051] 1. 物理检查:液体组分应澄清,无沉淀或絮状物;其他组分应无包装破损。

[0052] 2. 准确性:试剂盒校准品与企业标准品系列同时进行分析测定,用双对数数学模型拟合,要求两条剂量-反应曲线不明显偏离平行(t 检验,  $|t| < 2.447$ );以 CA50 企业标准品为对照品,用双对数数学模型拟合,试剂盒校准品的实测值与标示值比值的平均值应在 0.90~1.10 范围内。

[0053] 3. 剂量-反应曲线的线性:用双读数数学模型拟合,剂量-反应曲线在 0~100KU/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0054] 4. 分析灵敏度:试剂盒分析灵敏度不高于 1.0KU/L。

[0055] 5. 精密度:批内和批间不精密度(CV%)应不高于 10%。

[0056] 6. 质控品的测定值:平行测定 10 孔高值和低值的质控品,用  $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$  数学模型拟合,质控品测值应在允许范围内,QcL 和 QcH 的允许范围分别为 8~12KU/mL 和 29.6~44.4KU/mL。

[0057] 7. 特异性:

[0058] 交叉反应符合下表要求:

	交叉反应因子	浓度	测定值
[0059]	糖类抗原 125 (CA125)	1000KU/L	<2KU/L
	糖类抗原 15-3 (CA15-3)	5000KU/L	<5KU/L
	癌胚抗原 (CEA)	1000KU/mL	<2KU/L

[0060] 8. 稳定性:37℃放置 7 天,测定值应符合上述各项要求。

[0061] 实施例 2:制备糖类抗原 50 (CA50) 磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒 II

[0062] (1) 糖类抗原 50 校准品的配制:

[0063] 将 CA50 纯品用 50% 牛血清溶液稀释成系列梯度,浓度分别为 0、5、10、25、50、

100KU/mL。

[0064] (2) 糖类抗原 50 质控品的配制：

[0065] 将糖类抗原 50 用含有 50% 牛血清溶液稀释配制低值质控品、高值质控品，低值质控品(QcL)浓度为 12KU/mL，高质质控品(QcH)浓度为 29.6KU/mL。

[0066] (3) 磁性颗粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备：

[0067] 同实施例 1 磁性颗粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备。

[0068] (4) 生物素标记的 CA50 抗体的制备

[0069] 取 0.5mg CA50 抗体，用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8℃下透析 1h；将透析后的抗体加入 25ug 生物素，同时加入二甲基亚砷，最终浓度为 10%，避光反应 3h，缓慢振荡；在上述溶液中加入 250uL1mol/L 氯化铵溶液，常温避光反应 360min；用 0.01mol/L PBS 溶液在 2 ~ 8℃下透析 2 天，期间换液 4 次；

[0070] (5) 糖类抗原 50 抗体酶结合物的制备

[0071] 采用高碘酸钠氧化法将 CA50 抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后，用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:6000，并加入 5% 酶稳定剂，储存于 2~8℃；酶稳定剂使用 SurModics In Vitro Technologies 的蛋白稳定剂产品。

[0072] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0073] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠，5.92g/L 磷酸二氢钠，180g/L NaCl，10mL/L Tween-20 和 1‰ Proclin300；

[0074] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0075] A 液为 0.7g/L 鲁米诺，0.165g/L 对碘酚，缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris · HCl，避光保存；B 液为 0.675g/L 过氧化脲，用工艺用水配制；A 液和 B 液在使用前 5min 混合；

[0076] (8) 组装：将上述试剂组装成盒，储存于 2~8℃；

[0077] (9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查，准确度、剂量 - 反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0078] 实施例 3：制备糖类抗原 50 (CA50) 磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒 III

[0079] (1) 糖类抗原 50 校准品的配制：

[0080] 将 CA50 纯品用 50% 牛血清溶液稀释成系列梯度，浓度分别为 0、5、10、25、50、100KU/mL。

[0081] (2) 糖类抗原 50 质控品的配制：

[0082] 将糖类抗原 50 用含有 50% 牛血清溶液稀释配制低值质控品高值质控品，低值质控品(QcL)浓度为 10KU/mL，高质质控品(QcH)浓度为 44.4KU/mL。

[0083] (3) 磁性颗粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备：

[0084] 同实施例 1 磁性颗粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备

[0085] (4) 生物素标记的 CA50 抗体的制备

[0086] 取 0.5mg CA50 抗体，用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8℃下透析 2h；将透析后的抗体加入 25ug 生物素，同时加入二甲基亚砷，最终浓度为 10%，避光反应 3h，缓慢振荡；在上述溶液中加入 250uL1mol/L 氯化铵溶液，常温避光反应 50min；用 0.01mol/L PBS 溶液在 2 ~ 8℃下透析 2 天，期间换液 5 次；

[0087] (5) 糖类抗原 50 抗体酶结合物的制备

[0088] 采用高碘酸钠氧化法将 CA50 抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:6000,并加入 15% 酶稳定剂,储存于 2~8℃;酶稳定剂使用 SurModics In Vitro Technologies 的蛋白稳定剂产品。

[0089] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0090] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 1‰ Proclin300;

[0091] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0092] A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris·HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0093] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃;

[0094] (9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查,准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0095] 实施例 4:本发明试剂盒的使用方法

[0096] 1 将待检试剂盒在室温(18~25℃)下平衡 30 分钟。

[0097] 2 配制洗液:用蒸馏水将浓缩洗液按 1:20 稀释(1mL 洗液加 19mL 蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶,可将浓缩洗液置于室温或 37℃ 待结晶溶解后再进行稀释。

[0098] 3 配制发光液:使用前 5 分钟取适量发光液 A 与发光液 B 等体积混合。

[0099] 4 将反应管编号,向试管中依次加入 10-50uL 校准品或血清标本、100uL 磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液、100uL 生物素-CA50 抗体结合物、100uL CA50 酶结合物,37℃ 下振荡反应 10-30min,将试管架置于磁分离器上分离 5min,然后倒出上清液,加入 500uL 洗液,充分混匀后,于磁分离器上分离,倒出洗液,重复 3 次,在各管中加入化学发光底物液 200-400uL,充分混匀,暗置 5min,在管式化学发光仪上测定各管的发光值(RLU),以校准品浓度的 Log 值为横坐标,以发光值的 Log 为纵坐标,绘制标准曲线,根据血清标本的发光值即可计算出 CA50 的浓度,得如图 2 的线性回归方程为  $Y=1.1667X+4.623$ ,相关性系数为 0.9981。

[0100] 实施例 5:本试剂盒的方法学评价结果

[0101]

项目		质检标准	结果
			合格/不合格
物理检查		液体组分澄清,无沉淀或絮状物	合格
精密度	QcL	浓度值	8~12mIU/mL
		精密度	CV<10%
	QcH	浓度值	29.6~44.4KU/mL
		精密度	CV<10%
特异性		C1 (CA125 1000KU/L)	<2KU/L
		C2 (CA15-3 5000KU/L)	<5KU/L
		C3 (CEA 1000KU/L)	<2KU/L
分析灵敏度		<2mIU/mL	合格

[0102]

		校准品线性	$r > 0.99$	合格	
准确性	定值结果		实测值/理论值平均值在 0.9-1.1 之间	合格	
	平行判定		$ t  < 2.447$ , 两条直线不偏离 平行	合格	
稳定性	物理检查		液体组分澄清, 无沉淀或絮 状物	合格	
	精密度	QcL	浓度值	8~12mIU/mL	合格
			精密度	CV<10%	合格
	QcH	浓度值	29.6~44.4KU/mL	合格	
		精密度	CV<10%	合格	
	特异性	C1 (CA125 1000KU/L)		<2KU/L	合格
		C2 (CA15-3 5000KU/L)		<5KU/L	合格
		C3 (CEA 1000KU/L)		<2KU/L	合格
	分析灵敏度		<1KU/mL	合格	
	校准品线性		$r > 0.99$	合格	
准确性	定值结果		实测值/理论值平均值在 0.9-1.1 之间	合格	
	平行判定		$ t  < 2.447$ , 两条直线不偏离 平行	合格	

[0103] 实施例 6 本试剂盒的临床对比实验

[0104] 本专利发明的试剂盒已进行了临床考核, 本次临床试验的样本总数 108 例, 先以 CA50 放射性免疫试剂盒测试后, 再用本专利发明的试剂盒(化学发光)进行测定, 结果表明, 直线方程为  $y = 0.9914x + 0.1335$ , 相关系数为  $R = 0.9857$ 。可见本方法制备的试剂盒与医院测值有较好的一致性。以 SPSS13.0 统计分析软件对相关系数进行 t 检验(检验水准  $\alpha = 0.05$ ),  $P < 0.001$ , 两种方法测定的 CA50 值的相关密切程度是显著性的, 可见两种方法测定的 CA50 值密切相关。灵敏度(真阳性率)为 96.12%、特异性(真阴性率)为 96.10%, 都较高; 而假阳性率(误诊率)为 1.90%、假阴性率(漏诊率)为 3.88%, 都较低, 可见本试剂盒的测量值与实际值(原测值)的符合程度良好。粗一致性反映试剂盒诊断病人与非病人的能力, 本试剂盒的粗一致性为 97.36%, 接近于 1, 说明试剂盒的诊断能力较强。

[0105] 为了确定本试剂盒的临床参考值, 对 574 份正常人血清、血浆样本采用本试剂盒进行了检测, 结果表明本试剂盒的参考值(参考范围)为 0~30KU/L。

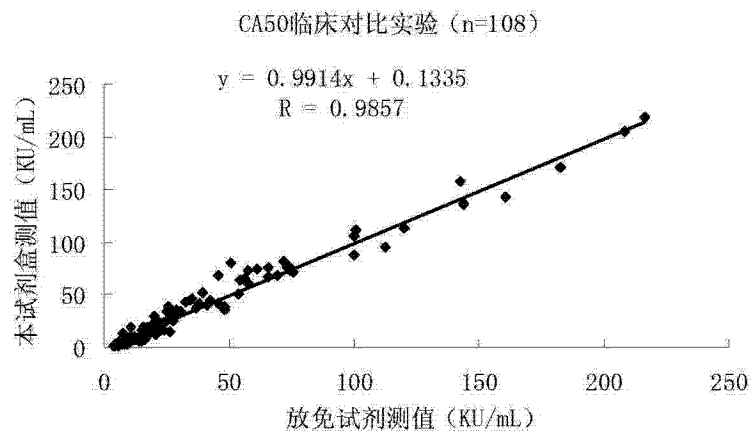


图 1

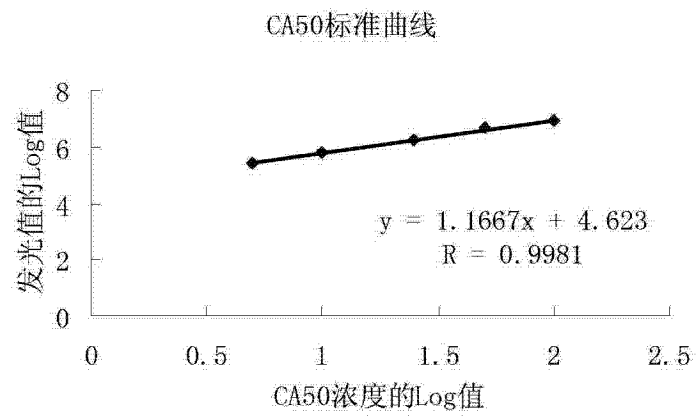


图 2

专利名称(译)	糖类抗原50磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103018445A</a>	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210472473.2	申请日	2012-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	刘萍 范利花		
发明人	刘萍 范利花		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
代理人(译)	李莉华		
其他公开文献	CN103018445B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种糖类抗原50磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒，所述试剂盒包括：糖类抗原50校准品；偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液；生物素标记的糖类抗原50抗体；糖类抗原50抗体酶结合物，所用的酶为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶纯度RZ≥3.0，活性≥250U/mL；糖类抗原50质控品；化学发光液A液和B液；20倍浓缩洗液；反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比操作简便，安全无环境污染。此外，本发明还具有检测样品的浓度范围宽、成本低、稳定性好等优点。

