



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110045123 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201810038426.4

(22)申请日 2018.01.13

(71)申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司

地址 300300 天津市东丽区东丽开发区四
纬路10号201

(72)发明人 刘萍 田云霞 张影

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种糖类抗原242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242(CA242)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242校准品;偶联有糖类抗原242单克隆抗体的磁微粒悬浮液;糖类抗原242单克隆抗体酶结合物,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242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灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测时间短、检测自动化程度高等优点。

1. 一种糖类抗原242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242校准品,浓度为0,5,20,50,100,200U/mL;
- 2) 偶联有糖类抗原242单克隆抗体的磁微粒悬浮液;
- 3) 糖类抗原242抗体酶结合物,所用抗体为单克隆抗体,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;
- 4) 糖类抗原242质控品;质控品包括浓度12U/mL的低值质控品和150U/mL的高值质控品;
- 5) 化学发光液A液和B液;A液为5mmol/L,pH8.6的Tris-HCl缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度0.7g/L鲁米诺和终浓度0.165g/L对碘酚;B液为0.675g/L过氧化脲;
- 6) 20倍浓缩洗液;
- 7) 反应管。

2. 根据权利要求1所述的糖类抗原242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10-50nm。

3. 根据权利要求1所述的糖类抗原242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。

4. 权利要求1-3任一权利要求所述的试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 糖类抗原242校准品的配制:

将糖类抗原242纯品用校准品稀释液配稀释至工作浓度,分别为0,5,20,50,100,200U/mL;

校准品稀释液成分为牛血清,要求外观为浅黄色呈稍粘稠的液体,无溶血或异物;总蛋白含量不小于32mg/mL;球蛋白含量不大于2mg/mL;

(2) 糖类抗原242质控品的配制:

用校准品稀释液将糖类抗原242纯品稀释至12U/mL和150U/mL,12U/mL为低值质控品,150U/mL为高值质控品;

(3) 磁微粒偶联糖类抗原242单克隆抗体的制备:

A、四氧化三铁磁微粒制备

采用沉淀法制备四氧化三铁磁微粒,具体制备方法如下:1)将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以摩尔比2:1加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2)在氮气环境下加0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调pH9-10,反应温度65°C,反应时间45min;3)反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于60°C烘干,即得10-50nm的四氧化三铁磁微粒;

B、磁珠表面羧基的偶联

采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的磁微粒超声分散在10% PEG8000溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比1:10加入无水乙醇,搅拌30min后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$,恒温搅拌30min,之后依次加入磁流体体积3%的过氧化苯甲酰,搅拌速度约为500rpm,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积25%的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节pH = 1,浸泡24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下

来的产品放入真空干燥箱中50℃下干燥24h,得到表面联有羧基的磁微粒;

C、磁微粒单克隆抗体的制备,配制1L,方法如下:

取100mL0.1M MES缓冲液,加入10mg表面联有羧基的磁微粒,室温搅拌40min,之后加入3.5mg糖类抗原242单克隆抗体,然后加入5mg/mL EDC溶液,2-8℃反应1h后,用0.01M PBS缓冲液洗涤3次,最后用0.01M PBS定溶至1L即可;

(4) 糖类抗原242抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将糖类抗原242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10%酶稳定剂,储存于2~8℃;

(5) 20倍浓缩洗液的配制

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2% Proclin300;

(6) 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;

(7) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于2~8℃,每种试剂各一瓶;

(8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密性、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

一种糖类抗原242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242(CA242)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] 糖类抗原242(carbohydrate antigen 242)是存在于粘蛋白复合物中的唾液酸化鞘糖脂抗原。健康者和良性疾病患者血清CA242含量较低,但胰腺、胃肠道肿瘤患者血清含量升高,因此CA242可用于胰腺、胃肠道肿瘤的诊断和疗效判断。

[0003] CA242是一种鞘糖脂抗原,不同于CA19-9、CA125、CA50等肿瘤相关性抗原,作为肿瘤标记物有更高的特异度,有利于消化系统良、恶性肿瘤的鉴别。

[0004] 目前,临床领域应用的检测血清CA242的方法主要有酶联免疫测定法和化学发光免疫测定法等。

[0005] 酶联免疫测定法具有操作简单、无污染、结果可用仪器测定等优点,但由于敏感性相对较低,所用标记酶与底物可定量测定范围窄,及仪器测定范围窄等缺点,限制了其在微量免疫定量测定中的应用。

[0006] 化学发光免疫测定经过近二十年的发展,已成为较为成熟的技术,避免了放射免疫法的污染性,及酶联免疫法的测定范围窄等缺陷,但目前医疗机构使用化学发光方法检测糖类抗原242的试剂盒还较少,尤其是利用磁微粒技术生产的试剂盒还没有使用。

[0007] 本发明试剂盒将磁性分离技术、化学发光检测技术与免疫学方法三者相结合综合了化学发光法灵敏度高、线性范围广、测定速度快以及免疫法的特异性高、准确性好等优点,还利用了磁性微粒在磁场可控运动的特点可实现待测物的快速富集及分离结合抗原-抗体与游离抗体的作用,具有更快的检测速度。(2) 使用单克隆抗体,提高了反应的特异性。(3) 在液相反应中,使用发光增强剂,将水分子从发光底物的发光位点排开,同时缩短了发光的达峰时间。

[0008] 本试剂盒用辣根过氧化物酶标记抗体,操作简便,产品易得,相比现有技术无污染、成本低、能耗少、检测范围宽、灵敏度高、试剂盒有效期长(有效期可达两年以上),同时测值重复性好,适于临床推广。

发明内容

[0009] 本发明要解决的问题是提供糖类抗原242的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了测值重复性差,酶联免疫法灵敏度低,检测范围窄等缺陷。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:糖类抗原242(CA242)磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:糖类抗原242校准品;偶联有糖类抗原242单克隆抗体的磁微粒悬浮液;糖类抗原242抗体酶结合物,所述抗体是单克隆抗体,但是与磁微粒偶联的糖类抗原242单克隆抗体不为同一株;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242质控品, 质控品包括浓度12U/mL的低值质控品和150U/mL的高值质控品; 化学发光液A液和B液, A液为5mmol/L, pH8.6的Tris-HCl缓冲液, 且该缓冲液中含有终浓度0.7g/L鲁米诺和终浓度0.165g/L对碘酚; B液为0.675g/L过氧化脲; 20倍浓缩洗液; 反应管。

[0011] 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10-50nm。

[0012] 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。

[0013] 试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 糖类抗原242校准品的配制:

将糖类抗原242纯品用校准品稀释液配稀释至工作浓度, 分别为0, 5, 20, 50, 100, 200U/mL;

校准品稀释液成分为牛血清, 要求外观为浅黄色呈稍粘稠的液体, 无溶血或异物; 总蛋白含量不小于32mg/mL; 球蛋白含量不大于2mg/mL;

(2) 糖类抗原242质控品的配制:

用校准品稀释液将糖类抗原242纯品稀释至12U/mL和150U/mL; 12U/mL为低值质控品, 150U/mL为高值质控品;

(3) 磁微粒偶联糖类抗原242单克隆抗体的制备:

配制1L, 方法如下:

取100mL 0.1M MES缓冲液, 加入10mg表面联有羧基的磁微粒, 室温搅拌40min, 之后加入3.5mg糖类抗原242单克隆抗体, 然后加入5mg/mL EDC溶液, 2-8℃反应1h后, 用0.01M PBS缓冲液洗涤3次, 最后用0.01M PBS定溶至1L即可;

(4) 糖类抗原242抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将糖类抗原242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10%酶稳定剂, 储存于2~8℃;

(5) 20倍浓缩洗液的配制

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2% Proclin300;

(6) 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;

(7) 组装: 将上述试剂组装成盒, 储存于2~8℃, 每种试剂各一瓶;

(8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查, 对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密性、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0014] 本发明的原理是, 采用双抗体夹心法测定血清或血浆中的CA242, 在CA242-磁微粒悬浮液中加入样本/校准品, 再加入酶标单克隆抗体, 通过抗原抗体反应, 形成磁微粒-CA242-Ab-CA242抗原-CA242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RLU与样本CA242浓度呈正相关。样本中的CA242浓度依据由校准品CA242浓度和对应

的RLU建立的Log(X)-Log(Y)数学模型进行定量,从而检测人血清、血浆中的CA242含量。

[0015] 本专利发明的糖类抗原242磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,具有以下优点:

- (1)灵敏度高,本试剂盒的分析灵敏度不高于3U/mL;
- (2)精密性良好,批内不精密度不高于5%,批间不精密度不高于10%;
- (3)成本低,与市场上同类产品比较,本试剂盒性能良好,成本低,具有临床应用价值;
- (4)稳定性良好,本产品可在37°C可存放7天以上,在2~8°C可存放1年。

附图说明

[0016] 图1是本发明的试剂盒测定糖类抗原242与医院测定糖类抗原242的测定结果比较图,其中纵坐标为本试剂盒测得的糖类抗原242值,横坐标为医院测定糖类抗原242值,两种方法相关系数 $r=0.9668$,直线方程 $y=0.9239x+7.9803$ 。

具体实施方式

[0017] 实施例1:制备糖类抗原242磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

- (1)糖类抗原242校准品的配制:

将糖类抗原242纯品用校准品稀释液配稀释至工作浓度,分别为0,5,20,50,100,200U/mL;

校准品稀释液成分为牛血清,要求外观为浅黄色呈稍粘稠的液体,无溶血或异物;总蛋白含量不小于32mg/mL;球蛋白含量不大于2mg/mL;

- (2)糖类抗原242质控品的配制:

用校准品稀释液将糖类抗原242纯品稀释至12U/mL和150U/mL;12U/mL为低值质控品,150U/mL为高值质控品;

- (3)磁微粒偶联糖类抗原242单克隆抗体的制备:

配制1L,方法如下:

取100mL0.1M MES缓冲液,加入10mg表面联有羧基的磁微粒,室温搅拌40min,之后加入3.5mg糖类抗原242单克隆抗体,然后加入5mg/mL EDC溶液,2~8°C反应1h后,用0.01M PBS缓冲液洗涤3次,最后用0.01M PBS定溶至1L即可;

- (4)糖类抗原242抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将糖类抗原242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10%酶稳定剂,储存于2~8°C;

- (5)20倍浓缩洗液的配制

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2% Proclin300;

- (6)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;

- (7)组装:将上述试剂组装成盒,储存于2~8°C,每种试剂各一瓶;

(8)对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密性、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0018] 实施例2:本发明试剂盒的检查

(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;

(2) 准确性:试剂盒校准品与国家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, $|t| < 2.447$);以糖类抗原242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;

(3) 剂量-反应曲线的线性:用双对数数学模型拟合,剂量-反应曲线在0-800ng/mL浓度范围内相关系数r绝对值不低于0.9900;

(4) 分析灵敏度:试剂盒分析灵敏度不高于3U/mL;

(5) 精密度:10孔平行测定高值和低值质控品,计算测定结果的平均浓度与标准差(SD),批内不精密度(CV%) = $SD/平均浓度 \times 100\%$;使用3批产品进行3次试验,计算测定结果的平均浓度与标准差(SD),批间不精密度(CV%) = $SD/平均浓度 \times 100\%$,结果应符合批内不精密度(CV%)应不高于5%;批间不精密度(CV%)应不高于10%;

(6) 质控品的测定值:平行测定10孔高值和低值的质控品,用Log(X)-Log(Y)数学模型拟合,质控品测值应在允许范围内,低值质控品测值在12U/mL,高值质控品测值在150U/mL;

(7) 稳定性:37°C放置7天,测定值应符合上述各项要求。

[0019] 实施例3:本发明试剂盒的使用方法

(1) 将待检试剂盒在室温(18~25°C)下平衡30分钟;

(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°C,待结晶溶解后再进行稀释;

(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;

(4) 将反应管编号,向试管中依次加入20uL校准品或血清标本、50uL磁性颗粒-糖类抗原242抗体悬浮液、75uL糖类抗原242抗体酶结合物,37°C下振荡反应45min,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100uL,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糖类抗原242的浓度。

[0020] 实施例4:本试剂盒的方法学评价结果

检测范围:范围为0-200U/mL,对于浓度大于200U/mL的标本应先进行稀释后再进行测定;

灵敏度:<3U/mL;

精密度:小于5%;

准确性:回收率的平均值在0.90~1.10范围内;

质控品测值:QcL和QcH的测值均在允许范围内,低值质控品测值在12U/mL,高值质控品测值在150U/mL;

稳定性:将试剂盒中各试剂组分于37°C下放置7d,稳定性良好。

[0021] 实施例5:本试剂盒的临床对比实验

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112例,先经医院测试后,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 $y = 0.9239x +$

7.9803, 相关系数 $r = 0.9668$ 。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 $\alpha=0.05$)， $P < 0.001$ ，两种方法测定的糖类抗原 242 值的相关密切程度是显著性的，可见两种方法测定的糖类抗原 242 值密切相关，说明试剂盒的诊断能力较强，可推广临床应用。

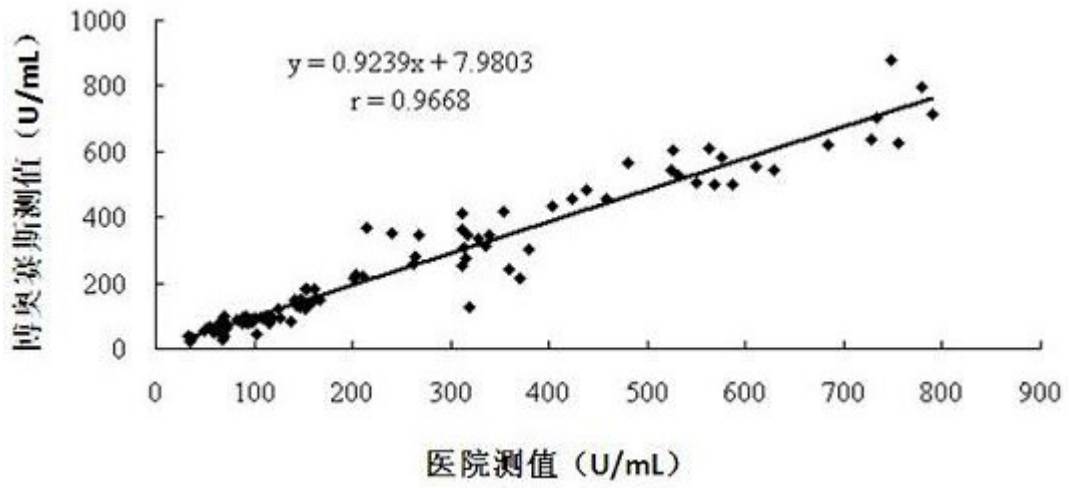


图1

专利名称(译)	一种糖类抗原242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	CN110045123A	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201810038426.4	申请日	2018-01-13
[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 田云霞 张影		
发明人	刘萍 田云霞 张影		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/57488 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种糖类抗原242 (CA242) 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242校准品; 偶联有糖类抗原242单克隆抗体的磁微粒悬浮液; 糖类抗原242单克隆抗体酶结合物, 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242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灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测时间短、检测自动化程度高等优点。

