

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03136488.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年7月26日

[11] 授权公告号 CN 1266475C

[22] 申请日 2003.6.5 [21] 申请号 03136488.8

[71] 专利权人 马旭

地址 100081 北京市海淀区大慧寺12号
国家计划生育委员会出生缺陷干预
工程技术中心

[72] 发明人 马旭 吴尔若

审查员 姜涛

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

一种用于诊断早期卵巢癌的四粘蛋白酶联免疫检测试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种用于诊断早期卵巢癌的四粘蛋白酶联免疫检测试剂盒，该试剂盒使用了卵巢癌蛋白标志物四粘蛋白，本发明试剂盒由标准品、多克隆抗体包被板、酶标单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成，本发明还涉及试剂盒的制作及检测方法。本发明试剂盒可用于卵巢肿瘤的良、恶性的诊断，特别是早期卵巢癌的检测以及粘液性卵巢癌的检测，也可用于卵巢癌术后化疗的监测及预后评估。

1. 一种用于诊断早期卵巢癌的酶联免疫检测试剂盒，其特征在于它由一种卵巢癌蛋白标志物四粘蛋白标准品、多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶标记的四粘蛋白多克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。
5
2. 根据权利要求1的试剂盒，其中所述四粘蛋白标准品是用入血浆经饱和硫酸铵沉淀、离子交换层析、赖氨酸亲和层析分离纯化而获得的四粘蛋白纯品制备的。
3. 根据权利要求2的试剂盒，其中所述多克隆抗体包被板是用四粘蛋白纯品免疫动物而获得的四粘蛋白多克隆抗体包被酶标板而制作的。
- 10 4. 根据权利要求3的试剂盒，其中所述四粘蛋白多克隆抗体是从四粘蛋白纯品免疫小鼠而获得的腹水中纯化而得到的。
5. 根据权利要求4的试剂盒，其中所述多克隆抗体包被板的制作是将四粘蛋白多克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释后滴入酶标板各孔内，经吸附、洗板、封闭、吹干步骤处理后而制作的。
- 15 6. 根据权利要求5的试剂盒，其中所述辣根过氧化物酶标记的四粘蛋白多克隆抗体是用四粘蛋白多克隆抗体，经辣根过氧化物酶标记而制备的。
7. 根据权利要求1-6之一的试剂盒，其中所述质控品是用混合人血清经稀释调配而获得的。
8. 根据权利要求7的试剂盒，其中所述辅助试剂包括：酶联反应底物溶液、显色
20 液、反应终止液及清洗缓冲液。
9. 根据权利要求1-8之一的试剂盒用于检测和/或诊断早期卵巢癌用途。

一种用于诊断早期卵巢癌的四粘蛋白酶联免疫检测试剂盒

技术领域

- 5 本本发明属于医学和生物学检测领域，具体而言，本发明涉及一种用于诊断早期卵巢癌的酶联免疫检测试剂盒，即本发明提供了一种卵巢癌蛋白标志物四粘蛋白（即 Tetranectin，简称 TN）检测试剂盒，可用于卵巢肿瘤的良好、恶性诊断，特别是早期卵巢癌的检测，以及粘液性卵巢上皮癌的检测；也可用于卵巢癌术后化疗效果的监测及预后评估。

10 背景技术

- 卵巢癌在全世界范围一直是妇科肿瘤中治愈率最低、死亡率最高的恶性肿瘤。目前卵巢癌在我国妇科癌症中的发病率已由八十年代占第三位而上升为第一位。约有 80% 以上的卵巢癌初诊患者到晚期（III 期或 IV 期），即使立刻手术，术后五年生存率也仅仅不到 15%，卵巢癌手术预后的不良结局近五十年以来几乎没有改善。由于卵巢癌的发病机理至今仍不清楚，因此很难采取有效的预防措施。为了降低卵巢癌的危害，关键仍在早期发现、早期治疗。虽然基础和临床研究已经发现了一些卵巢癌的肿瘤标志物，如糖链抗原 125 (CA125)、癌胚抗原 (CEA)、组织多肽抗原 (TPA)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSA) 和抑制素等，但真正提供给临床使用的并不多。近年来即使在有条件的医院里仍然多以 CA125 单项指标作为卵巢癌
- 15 诊断、术后化疗监测及预后评估的参考依据。由于 CA125 也用于其他恶性肿瘤的检测，因此对卵巢癌并不是特异性指标。而且 CA125 只在浆液性卵巢癌患者血清中有升高，对非浆液性卵巢癌、尤其是粘液性卵巢癌则没有反应。CA125 对早期卵巢癌也不敏感。CA125 作为检测卵巢癌的唯一指标显然是不能满足临床需要的。本发明的目的正是为了解决目前临床上使用单项 CA125 作为卵巢癌诊断指标的不足，
- 20 将 TN 作为一种新的蛋白标志物用于卵巢癌的早期诊断和粘液性卵巢上皮癌的
- 25 诊断，并且提供了操作简便、准确灵敏的检测试剂盒和测定方法，从而可以提高卵巢癌的检出率，以便临床上能尽早采取有效的综合治疗方案，达到提高存活率、降低死亡率的目的。

发明内容

- 30 因此，本发明的目的是提供了一种用于诊断早期卵巢癌的酶联免疫检测试剂盒。

本发明的上述目的是通过下列技术方案实施的：

一种卵巢癌蛋白标志物四粘蛋白（即 Tetranectin，简称 TN）酶联免疫检测试剂盒，其特征在于它由 TN 标准品、多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶 (HRP)

标记多克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。

本发明试剂盒的制作方法包括标准品的制备、多克隆抗体包被板的制作、酶标多克隆抗体的制备、质控品的制备以及辅助试剂的配制。

本发明试剂盒中的 TN 标准品是从人血浆中提取制备的。一种制备步骤包括：

- 5 收集正常血浆（经 HIV、肝炎病毒、梅毒、AIDS 等测定均为阴性者），低温贮存备用；上述血浆经饱和硫酸铵沉淀、离子交换层析和亲和层析三个步骤进行 TN 的分离纯化，后两步层析的顺序可以变换，本发明试剂盒使用的一种 TN 纯化顺序依次为饱和硫酸铵沉淀、离子交换层析和亲和层析；将获得的 TN 纯品按试剂盒的标准曲线最高点浓度进行稀释，然后进行分装、冷冻干燥，即获得 TN 标准品。

- 10 本发明试剂盒中的多克隆抗体包被板可用 TN 纯品对兔或鼠免疫而获得的多克隆抗体包被酶标板而制作。本发明试剂盒中的多克隆抗体包被板是用 TN 纯品对小鼠免疫而获得的鼠抗人多克隆抗体包被酶标板而制作的。酶标板可选用国产板或进口板；规格可以是 96 孔平板或 12 x 8、6 x 8 可拆条板。本发明试剂盒采用一种进口酶标板（Costar 公司产品）。一种多克隆抗体包被酶标板的制作步骤如下：
- 15 下：

- a) 制备多克隆抗体：用 TN 纯品按常规对 Balb/c 小鼠进行免疫后，再在腹腔内注射小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0；收集腹水经重组 Protein G 预装层析柱纯化后即获得 TN 多克隆抗体；
- b) 包被：将上述多克隆抗体用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释后加入酶标板各孔，
- 20 每孔 100ul，吸附过夜，用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干，即获得多克隆抗体包被酶标板。

本发明试剂盒中的酶标多克隆抗体是用辣根过氧化物酶（HRP）标记 TN 多克隆抗体而制备的。一种酶标多克隆抗体的制备步骤如下：

- a) 在纯化好的 TN 抗体溶液中加入 SATA 溶液，在室温反应 0.5 小时；
- 25 b) 加入去乙酰化溶液，室温孵育 2 小时；
- c) 用脱盐柱分离出去乙酰化 SATA 衍生物（即多抗）和副产品（盐酸羟胺）；
- d) 将上述多抗溶液与用马来酰胺（Maleimide）活化的 HRP 在室温反应 1 小时，即获得 HRP 酶标多克隆抗体。

- 30 本发明试剂盒中的质控品是用混合人血清，按照本试剂盒的标准曲线范围要求进行稀释而调配制备的。本发明试剂盒采用的一种质控品制备方法包括如下步骤：

- a) 收集正常人血清（经 HIV、肝类病毒、AIDS、梅毒等测定均为阴性者），于

-20℃保存;

- b) 将积累的各个血清混合, 用 ELISA 方法测定 TN 浓度, 并按标准曲线要求, 将两份混合血清的浓度分别调至 10 ± 2 ng/ml、 50 ± 10 ng/ml 范围;
- c) 将步骤 b) 所获得的两份血清按每个试剂盒的需要量分装, 冷冻干燥, 即制备成低、高值质控品。

5 本发明试剂盒中的辅助试剂包括酶联反应底物溶液, 显色液, 反应终止液和清洗缓冲液。一种配制辅助试剂的方法如下:

- a) 底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%过氧化氢溶液;
- b) 显色液: 四甲基联苯胺 (TMB) 甲醇溶液, 浓度为 0.1 mg/ml;
- c) 反应终止液: 2M 硫酸
- d) 清洗缓冲液 (20 倍浓缩液, 20X): PBS (pH7.4) 配制的 0.05% 吐温 20 溶液。

本发明试剂盒的测定方法, 其特征在于它依次按下述步骤进行:

- a) 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 100 μ l 已稀释好的不同浓度的标准品、质控品, 或待测血清样品, 37℃水浴保温 60 分钟, 然后用清洗缓冲液 (1X) 重复洗板 4 次。
- b) 酶联反应: 将 HRP-多克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 100 μ l, 37℃水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次。
- c) 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、显色液各 50 μ l, 37℃水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。
- d) 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 值并记录。
- e) 结果计算:
 - A. 制作标准曲线: 以标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 OD 值为纵坐标, 作出标准曲线; 计算标准曲线回归系数 R^2 , 当 $R^2 > 0.98$ 时本次测定有效;
 - B. 评判质控品浓度: 根据质控品的 OD 值, 从标准曲线上读取相应的浓度值; 当低值质控品、高值质控品的浓度均在给定范围内时, 本次测定判为有效;
 - C. 计算待测血清样品浓度: 当标准曲线和质控品均被判定有效时, 根据待测样本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品的 TN 浓度。

30 与已有的卵巢癌检测指标 CA125 相比较, 本发明试剂盒具有以下优点:

- a) 本发明试剂盒以 TN 作为早期卵巢癌的诊断指标, 克服了 CA125 对早期卵巢癌的不敏感性, 在 I 期卵巢癌患者中仅有 50% 患者的血清 CA125 水平异常升高;

而TN在I期~IV期卵巢癌患者中都呈现异常下降。

- b) CA125对浆液性卵巢上皮癌的阳性检出率可达80%以上,然而对粘液性卵巢上皮癌没有反应;本发明试剂盒克服了单项CA125检测卵巢癌存在较高假阴性的不足, TN不但可以检出浆液性卵巢上皮癌,而且对粘液性卵巢上皮癌同样有效。TN单独使用或与CA125联合使用,能够有效地提高早期卵巢癌的检出率,尤其可提高粘液性卵巢上皮癌的检出率。

下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是,本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范畴。除非另有说明,本发明中的百分数是重量百分数。

10 具体实施方式

实施例一: TN定量酶免检测试剂盒制作方法的应用实例

一种卵巢癌蛋白标志物四粘蛋白定量酶免检测试剂盒(48人份),其组成包括:

- TN冻干标准品1瓶;
- TN多克隆抗体包被板(48孔)1块;
- 15 辣根过氧化物酶(HRP)标记的TN多克隆抗体1瓶,6ml/瓶;
- 冻干低值质控品1瓶;
- 冻干高值质控品1瓶;
- 底物溶液1瓶,3ml/瓶;
- 显色液(TMB)1瓶,3ml/瓶;
- 20 反应终止液1瓶,3ml/瓶;
- 清洗缓冲液(20X浓缩)1瓶,15ml/瓶。

具体操作如下:

1. 制备TN标准品:

- 1) 收集血浆: 从医院或血站获得健康正常人血浆,于-70℃保存备用;
- 25 2) 分离纯化: 使用AKTA蛋白纯化仪(Pharmacia公司产品,型号Purifier 100)从上述血浆中分离纯化TN。选用的操作步骤依次为: a) 饱和硫酸铵沉淀: 在血浆中加等量PBS溶液后先按比例加入固体硫酸铵至50%饱和度,再将pH调至5.8,离心收集此时的蛋白沉淀; b) DEAE离子交换层析,缓冲液为0.02M Tris-HCl, pH7.2, 1M NaCl, 流速3ml/min; c) Lysine亲和层析,缓冲液为0.02M Tris-HCl, pH7.2, 1M NaCl, 流速1.0ml/min。层析过程中用UNICRN V400软件控制缓冲液的浓度梯度及蛋白峰的紫外吸收监测。每一步层析所获蛋白峰的活性检测采用ELISA法。最后将NaCl浓度为20%时的活性蛋白洗脱峰合并,装透析袋透析除盐后浓缩,
- 30

分装后贮存于-70℃待鉴定。

3) TN 纯品按试剂盒说明书中标准曲线第一点所需要浓度分装 (75 ng/ml)、冷冻干燥、贮存于4℃。

2. 制作 TN 多克隆抗体包被板:

5 1) TN 多克隆抗体制备:

a) 小鼠免疫: 选用体重为 20-22g 的 Balb/c 雄性小鼠 10 只 (购自北京实验动物中心), 每只用含 50 μ g TN 纯品的生理盐水与 2 倍体积的弗氏完全佐剂制成 0.5ml 乳剂, 注射于小鼠腹腔内。两周后用含 50 μ g TN 纯品的生理盐水与 2 倍体积的弗氏不完全佐剂制成 0.5ml 乳剂作加强注射, 再过 2 周重复加强注射一次。重复加强注射后的次日, 每只小鼠腹腔内注射小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 2×10^6 /0.5ml。一周后小鼠产生腹水;

10 b) 腹水收集: 用 9 号针头从小鼠腹腔腹水收集。数日内连续收集腹水 2-3 次, 直至小鼠死亡。将所有收集的腹水合并后, 分装成 15ml/支贮存于-20℃备用。

15 c) 腹水纯化: 小鼠腹水经重组 Protein G 亲和层析柱 (Pharmacia 公司) 纯化后获得鼠抗人多克隆抗体。亲和层析时缓冲液为 0.02M 磷酸缓冲液, pH7.0; 洗脱液为 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH 2.7。

2) 包被:

20 酶标板采用 Costar 公司生产的 6 X 8 可拆条板。将步骤 1) 所获多克隆抗体用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释为 20 μ g/ml 后加入酶标板各孔, 每孔 100 μ l, 吸附过夜, 用清洗缓冲液洗板, 再用该缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得多克隆抗体包被酶标板。按 48 孔/块用锡箔纸包装、真空封闭。

3. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 TN 多克隆抗体

25 1) 在一支 5mg/ml 纯化好的 TN 多抗隆抗体溶液中加入稀释好的 SATA (N-羧基琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酯) 溶液 20 μ l, 室温孵育 30 分钟;

2) 加入 100 μ l 去乙酰化溶液 (即用马来酰胺醋酸缓冲液溶解的盐酸羟胺溶液), 室温孵育 2 小时;

3) 用脱盐柱分离去乙酰化 SATA 衍生物 (即多抗) 和盐酸羟胺;

30 4) 将上述多抗溶液 2ml 与 5mg 用马来酰胺活化的 HRP 在室温反应 1 小时, 即获得 HRP 酶标记多克隆抗体。

5) 纯化 HRP 酶标多克隆抗体: 用聚丙烯酰胺预装柱去除游离的 HRP, 获得克分子比接近 1: 8 的酶标 TN 多克隆抗体。

6) 组装: 用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 5) 获得的酶标 TN 多克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4℃。

4. 制备质控品:

- 5 收集健康正常人血清 (经 HIV、肝类病毒、AIDS、梅毒等测定均为阴性者), 于-20℃保存。将积累的各个血清混合, 用 ELISA 方法测定 TN 浓度, 并用含 3% BSA 的 PBS 缓冲液将两份混合血清的浓度调至 10 ± 2 ng/ml、 50 ± 10 ng/Lml 范围, 制备成低、高质控品。按每个试剂盒的需要量分装, 冷冻干燥后贮存于 4℃。每个试剂盒中含低浓度质控品和高浓度质控品各一瓶。
- 10 5. 配制底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%过氧化氢溶液, 按 3ml/瓶分装。
6. 配制显色液: TMB (0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 3ml/瓶分装。
7. 配制反应终止液: 2M H₂SO₄, 按 3ml/瓶分装。
8. 配制清洗缓冲液 (20 倍浓缩液): PBS (pH7.4) 配制的 1% 吐温 20 溶液, 按 15ml/瓶分装。
- 15

应用本发明技术制备 TN 定量酶免检测试剂盒的质量检测:

- 1) 准确性: 取三份待测样品混合后分为三份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 0、20、100 ng 的 TN 纯品, 制成回收试验血清标本#1、#2、#3。按说明书操作
- 20 步骤进行测定并计算结果。然后按回收率计算公式计算回收率。标本#2、#3 的回收率分别为 96.4%和 98.7%, 平均回收率为 97.5%, 即试剂盒的比例偏差为 2.5%, 准确性为 97.5%。
- 2) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份待测样本按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果, 求出均值、SD 和变异系数 CV。精
- 25 密度试验结果显示批间 CV ≤ 15%
- 3) 线性范围: 用 TN 纯品稀释成一系列不同浓度的纯品溶液: 300 ng、150 ng、75 ng、37.5 ng、18.8 ng、9.5 ng、4.8 ng、2.4ng、1.2 ng。按照说明书操作
- 30 步骤进行测定。以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制曲线。线性范围内最高检测上限值为 150 ng/ml, 最低检测下限值为 2.4 ng/ml。试剂盒的线性范围为 2.4 ~ 75 ng/ml。
- 4) 检测灵敏度: 根据上述线性范围测定结果, 本试剂盒的检测灵敏度为 2.4 ng/ml。

- 5) 特异性: 取四份待测样品混合后分为四份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 50ng 剂量的组织型纤溶酶原激活剂 (tPA)、血纤维蛋白溶酶 (Plasmin)、或纤粘连蛋白 (FN) 后制成干扰试验血清标本#1、#2、#3, 未加任何干扰物的#4 混合血清标本作为基础样品。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按干扰试验计算公式计算干扰率。标本#1、#2、#3 的干扰误差均小于 1.5%。

实施例二: TN 定量酶免检测试剂盒的使用实例

1. 清洗缓冲液配制: 将试剂盒提供的浓缩清洗缓冲液加蒸馏水 20 倍稀释。
2. 将试剂盒提供的标准品第一点冻干粉 (浓度 75 ng/ml) 用 500 μ l 清洗缓冲液溶解, 然后进行倍比稀释 5 次。试剂盒中的标准曲线由 6 个不同浓度的 TN 标准品组成, 标准曲线各点浓度分别为 75 ng/ml、37.5 ng/ml、18.8 ng/ml、9.5 ng/ml、4.8 ng/ml、2.4 ng/ml。
3. 质控品的稀释: 将试剂盒提供的低、高质控品冻干粉分别用 110 μ l 清洗缓冲液溶解。
4. 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 100 μ l 已稀释好的不同浓度的标准品、质控品, 或待测血清样品, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。然后用清洗缓冲液重复洗板 4 次, 每次 3min。
5. 酶联反应: 将 HRP-多克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次, 每次 3min。
6. 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、TMB 显色液各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。
7. 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 平均值; 记录各孔吸光值; 计算双孔标准品 OD 值的平均值。
8. 结果计算:
 - 1) 标准曲线的绘制: 以标准品浓度为横坐标、标准品测定的平均 OD 值为纵坐标, 绘制本次测定的标准曲线; 计算标准曲线回归系数 R^2 , 当 $R^2 > 0.98$ 时本次实验有效。
 - 2) 质控品浓度的评判: 根据质控品的 OD 值, 从标准曲线上读取相应的质控品浓度值。当低值质控品浓度在 10 ± 2 ng/ml、高值质控品浓度在 50 ± 10 ng/ml 范围内时, 本次测定判为有效;
 - 3) 计算待测血清样品浓度: 当标准曲线和质控品均被判定有效时, 根据待测样本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品中的 TN 浓度。

专利名称(译)	一种用于诊断早期卵巢癌的四粘蛋白酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1266475C	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	CN03136488.8	申请日	2003-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	马旭		
申请(专利权)人(译)	马旭		
当前申请(专利权)人(译)	马旭		
[标]发明人	马旭 吴尔若		
发明人	马旭 吴尔若		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/577		
其他公开文献	CN1553190A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于诊断早期卵巢癌的四粘蛋白酶联免疫检测试剂盒，该试剂盒使用了卵巢癌蛋白标志物四粘蛋白，本发明试剂盒由标准品、多克隆抗体包被板、酶标单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成，本发明还涉及试剂盒的制作及检测方法。本发明试剂盒可用于卵巢肿瘤的良好、恶性的诊断，特别是早期卵巢癌的检测以及粘液性卵巢癌的检测，也可用于卵巢癌术后化疗的监测及预后评估。