(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107167590 B
(45)授权公告日 2019.03.08

(21)申请号 201710243922.9

(22)申请日 2017.04.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107167590 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(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 彭会军 戴宝平 丁晓蔚

(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 33/543(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

(56)对比文件
CN 102095846 A,2011.06.15,
CN 103163294 A,2013.06.19,
CN 103383394 A,2013.11.06,
CN 103298834 A,2013.09.11,

审查员 赵晓明

权利要求书3页 说明书10页

(54)发明名称

糖类抗原242的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种糖类抗原242的板式化学发光法检测试剂盒，包括的试剂有生物素标记的CA242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CA242抗体溶液、CA242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。

CN 107167590 B

1.一种糖类抗原242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CA242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CA242抗体溶液、CA242校准品A-F、浓缩洗液、底物液A、底物液B；该试剂盒各试剂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0.2μm 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 烧瓶中；

2、用量筒量取纯化水于1L 烧瓶中，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0.2μm 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 500μl 于1L 烧瓶中；

2、用量筒量取纯化水于1L 烧瓶中，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0.2μm 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，加入上述步骤1的溶液中，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CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为4U/mL，分装到适宜规格；

3、校准品C的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为16U/mL，分装到适宜规格；

4、校准品D的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为48U/mL，分装到适宜规格；

5、校准品E的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为144U/mL，分装到适宜规格；

6、校准品F的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为288U/mL，分装到适宜规格；

五、抗生物素抗体包被的酶标板

配制0.01M的碳酸缓冲液，调节pH至9.6，备用；

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0.1～5μg/ml，搅拌30分钟至混合均匀；

将上述混合均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℃，包被时间为1～3小时，采用低速振荡包被形式；

配制0.1M ，pH7.4TBS缓冲液，含0.3wt%BSA，1 wt %羊血清，0.1 % Proclin300(v/v)，1 wt %鱼皮明胶，2 wt %海藻糖和10 wt %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℃，封闭时间为2～5小时；

吸掉封闭液，放置在干燥箱中，干燥温度控制在37℃，干燥时间为2～4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CA242抗体溶液的制备

(一)酶反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g、HCl 2900μl 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；

2、调pH，控制 pH 在 7.35-7.45 ；

3、称取BSA 4g 倒入上述烧瓶中；

4、最后烧瓶定容至400ml，用0.2μm 滤器过滤即得；

(二)辣根过氧化物酶 (HRP)与CA242抗体的偶联

1、取抗CA242抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中；

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；

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℃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℃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 的体积添加自制的酶反应物稀释液，控制最终使用浓度在0.03-5.0μg/ml，混合均匀即得酶反应物；

七:生物素标记的CA242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 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；

2、调pH，控制 pH 在 7.35-7.45 ；

3、称取BSA 4g 倒入上述烧瓶中；

4、最后烧瓶定容至400ml，用0.2μm 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0.01～5.0μg/ml，混匀，即可得到生物素结合物。

2.根据权利要求1所述的糖类抗原242的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述辣根过氧化物酶标记的CA242抗体溶液的浓度为0.03～5.0μg/ml，阳性对照稀释比为1：500～1:10000。

3.根据权利要求1所述的糖类抗原242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℃，包被时间为1～3小时，采用低速振荡包被形式，振荡幅度：3mm，采用水平回转，转速为200～500rpm，封闭和干燥温度为37℃，封闭时间为2～3小时，干燥时间为2～4小时；采用高温振荡式包被工艺，包被板制备时间能够控制在5～7小时。

糖类抗原242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，具体涉及一种用于糖类抗原242的定量检测试剂盒及检测方法，可快速、简便、高效、灵敏地对人血清样本中糖类抗原242的定性定量检测。

背景技术

[0002]　糖类抗原242(Carbohydrate Antigen 242,CA242)是一种唾液酸化的粘蛋白型糖类抗原，在健康人群和良性疾病患者的血清中含量很低，消化道等发生恶性肿瘤(如胰腺癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌、子宫癌、肺癌等)时其含量明显上升，胰腺癌和结直肠癌时尤为明显。作为一种肿瘤标志物，糖类抗原242的优点主要在于恶性肿瘤时升高明显，而良性疾病时一般不升高。糖类抗原242与癌胚抗原(CEA)联合检测，可增加对结、直肠癌的早期诊断敏感性，对监测术后复发亦是一个很好的诊断指标。糖类抗原242是胰腺癌病人中首先出现的一种与肿瘤相关的抗原。在诊断胰腺癌时，比糖类抗原19-9、糖类抗原50更为特异。

[0003]　CA242是一种唾液酸化的糖类抗原，能被结肠癌细胞株经杂交瘤技术得到的一系列单克隆抗体之一Ca242所识别，它是一种存在于多器官恶性肿瘤中呈粘蛋白类型的糖蛋白叫CanAg，即不能与LewisA型抗原反应，也不能与唾液酸化的半乳糖苷反应。免疫化学研究已表明它不同于其他已知的肿瘤相关粘蛋白如:Ca199、Ca50、Ca125、Ca153等，健康人和良性疾病血清中含量较低。Ca242是近年来应用于临床较新的一种肿瘤标志物，胰腺癌和结肠癌较好的肿瘤标志物。

[0004]　CA242是一种唾液酸化的鞘糖脂类抗原，几乎总是和CA50一起表达，但两者受不同的单克隆抗体识别。在临床上均被用于消化道恶性肿瘤尤其是胰腺癌、结直肠癌的诊断，与CA19-9、CA50相比，新一代的CA242在胰腺癌、胆囊癌和消化道癌中的灵敏度、特异性更高(CA50、CA19-9易受肝功能以及胆汁郁积的影响，在良性阻塞性黄疸以及肝实质性损害记疾病时常出现假阳性)。

[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CA242抗原的方法主要有放射性免疫技术、酶联免疫技术、时间分辨荧光免疫分析方法和化学发光技术等。过去以放射性免疫技术为代表的人CA242抗原测定试剂盒由于方法学的限制，其灵敏度和抗干扰能力严重不足，存在很大的弊端，已基本上退出市场;目前应用较多的为酶联免疫技术、时间分辨荧光免疫分析和化学发光技术，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CA242抗原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，从而提高了针对临床患者体内的CA242抗原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，从而，稳定性试剂盒检测特异性的同时，大幅增加了检测灵敏度。

[0009] 本发明解决上述问题所采用的技术方案为：

[0010] 一种糖类抗原242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CA242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CA242抗体溶液、CA242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CA242抗体溶液的浓度为0.02～8.0μg/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0.2～8.0μg/ml，所述辣根过氧化物酶标记的CA242抗体溶液的浓度为0.03～5.0μg/ml，阳性对照稀释比为1:500～1:10000。

[0012] 上述CA242校准品A - F点是CA242抗原(北京玖峰润达)以pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液配制得到的，浓度分别为0,4,16,48,144,288U/mL。

[0013] 上述生物素标记的CA242抗体溶液的制备过程：生物素标记的CA242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] 上述述辣根过氧化物酶标记的CA242抗体溶液的制备过程：辣根过氧化物酶标记的CA242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，所用封闭液的含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。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性能。

[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：3mm，采用水平回转，转速为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，采用抗生物素抗体尚未见专利文献报告。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] 本发明糖类抗原242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0.2μm 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CA242抗原溶液稀释适宜倍数,控制浓度为4U/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CA242抗原溶液稀释适宜倍数,控制浓度为16U/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CA242抗原溶液稀释适宜倍数,控制浓度为48U/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CA242抗原溶液稀释适宜倍数,控制浓度为144U/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CA242抗原溶液稀释适宜倍数,控制浓度为288U/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±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0.1～5μg/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 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,采用低速振荡包被方式,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：3mm，采用水平回转，转速为200~500rpm；

[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150μL每孔，封闭为37±1℃，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±1℃，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CA242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 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；

[0053] 2、调pH，控制 pH 在 7.35-7.45 ；

[0054] 3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中；

[0055] 4、最后烧杯定容至400ml，用0.2um 滤器过滤即得；

[0056] (二)辣根过氧化物酶 (HRP)与CA242抗体的偶联

[0057] 1、取抗CA242抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中；

[0058] 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；

[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℃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℃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0.03-5.0μg/ml，混合均匀即得酶反应物；

[0062] 七:生物素标记的CA242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 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；

[0065] 2、调pH，控制 pH 在 7.35-7.45 ；

[0066] 3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中；

[0067] 4、最后烧杯定容至400ml，用0.2μm 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0.5μg/ml左右(0.01～5.0μg/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CA242抗体加入到抗生物素抗体包被的酶标板中，样品中的CA242抗原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CA242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CA242抗原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CA242抗原浓度，从而评估人血清中是否

含有CA242抗原以及CA242抗原的含量。

[0070] 与现有技术相比，本发明的板式化学发光法检测血清CA242抗原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] 本实施例的糖类抗原242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CA242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CA242抗体溶液、CA242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0.2μm 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±0.05 之间；

[0085] 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。

[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 500μl 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±0.05之间；

[0089] 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。

[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] 四、校准品的配制方法，步骤如下：

[0094] 1、校准品A点的配制：取校准品稀释液，分装到适宜规格；

[0095] 2、校准品B点的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原(北京玖峰润达)溶液稀释适宜倍数，控制浓度为4U/mL，分装到适宜规格；

[0096] 3、校准品C点的配制：取；校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为16U/mL，分装到适宜规格；

[0097] 4、校准品D点的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为48U/mL，分装到适宜规格；

[0098] 5、校准品E点的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为144U/mL，分装到适宜规格；

[0099] 6、校准品F点的配制：取校准品稀释液，将CA242抗原溶液稀释适宜倍数，控制浓度为288U/mL，分装到适宜规格。

[0100] 五、抗生物素抗体包被的酶标板

[0101] 6、配制0.01M的碳酸缓冲液，调节pH至pH9.6±0.1，备用；

[0102] 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；

[0103] 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；

[0104] 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；

[0105] 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；

[0106] 六、辣根过氧化物酶标记CA242抗体溶液的制备

[0107] (一)酶反应物稀释液的配制

[0108] 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；

[0109] 2、调pH，控制 pH 在 7.4±0.05 ；

[0110] 3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中；

[0111] 4、最后烧杯定容至400ml，用0.2um 滤器过滤即得；

[0112] (二)辣根过氧化物酶 (HRP)与CA242抗体的偶联

[0113] 1、取抗CA242抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中；

[0114] 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；

[0115] 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；

[0116] 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；

[0117] 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；

[0118] 七:生物素标记的CA242抗体溶液的制备

[0119] (一)生物素反应物稀释液的配制

[0120] 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;

[0121] 2、调pH,控制 pH 在 7.35-7.45;

[0122] 3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中;

[0123] 4、最后烧杯定容至400ml,用0.2μm 滤器过滤即得。

[0124] (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。

[0125] 八、优化与验证

[0126] 主要性能指标均符合发光检测试剂技术评审规范。

[0127] 1、阴性符合率

[0128] 检测130例贝克曼化学发光试剂检测的临床血样,阴性符合率(-/-)为130/130,符合率100%。

[0129] 2、阳性符合率

[0130] 检测204份贝克曼化学发光试剂检测的临床血样,阳性符合率(+/+)为201/204,符合率为98.53%, 见下表。

[0131]

		阴性	阳性	符合率%
贝克曼	阴性	130	0	100%
	阳性	3	201	98.53%

[0132] 3、重复性

[0133] 用经国家参考品标化的企业精密度参考品重复检测10 次,其变异系数CV在3.23-3.66%之间,符合不大于10.0%的行业规范(全自动仪器操作)。

[0134]

精密性质控品	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU
L	5.01	4.83	4.73	5.02	4.97	4.60	4.76	4.97	4.61	5.06
M	71.21	69.95	65.76	71.61	70.99	68.02	71.38	64.99	69.34	66.24
H	233.75	234.23	223.83	227.74	217.61	226.59	234.00	221.35	234.81	214.91

[0135]

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
L	4.85	0.2	3.58%
M	68.95	2.5	3.66%
H	226.88	7.3	3.23%

[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2.50～4.24%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	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU
Lot 1	4.77	4.89	4.82	4.91	4.78	4.81	4.89	4.66	4.77	4.82
Lot 2	4.63	4.87	5.02	4.73	4.63	4.97	4.71	4.85	4.86	4.76
Lot 3	4.67	4.95	4.60	4.73	4.74	4.95	4.60	4.87	4.82	4.67
中浓度精密性质控品										
批次	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU
Lot 1	63.70	67.22	65.21	65.27	64.43	65.77	68.30	71.45	70.80	71.18
Lot 2	63.99	68.63	67.00	72.33	66.25	68.51	70.29	71.37	72.05	72.17
Lot 3	72.04	66.81	70.03	71.38	71.20	68.83	72.56	65.56	68.37	65.60
高浓度精密性质控品										
批次	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU
Lot 1	207.17	237.43	222.16	231.75	212.97	230.68	206.41	231.07	228.25	232.37
Lot 2	225.96	215.39	215.29	213.54	223.27	229.72	213.20	233.31	209.42	216.24
Lot 3	231.52	206.33	218.16	228.33	211.75	230.20	207.85	206.87	216.74	235.40

[0139]　分析结果如下：

[0140]

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
L	4.79	0.1	2.39%
M	68.61	2.9	4.17%
H	220.96	10.1	4.59%

[0141]　5、稳定性

[0142]　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%。

[0143]

质控品	RLU（37℃烘烤 7 天）			RLU（未烘烤对照）			烘烤前后对比%
L	9261	9426	9693	9818	9262	9353	99.81%
M	106859	106100	103075	107960	114657	114793	93.66%
H	308564	323003	301002	329618	318642	335136	94.83%

[0144]　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

[0145]　(1)取出试剂盒置于室温，使试剂盒的温度平衡至室温(18～25℃)。

[0146]　(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。

[0147]　(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。

[0148]　(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。

[0149]　(5)按表1顺序，进行半自动加样与反应操作。

[0150]　表1加样和操作对照表

[0151]

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 242 酶	75	75
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	

[0152]　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。

[0153]　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

[0154]　(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。

[0155]　(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。

[0156]　(3)按照表2全自动仪器参数设置表，进行参数设置与数据

[0157]　表2 全自动化学发光免疫分析仪参数表

[0158]

配置项	配置参数		
样品/校准品加入量	25μL；		
检测糖类抗原 242 酶加入量	75μL；		
温育设置	加盖；	温度：37℃；	温育时间：60min；
清洗设置	洗液量：350μL /次/孔；	清洗次数：5 次；	
底物液 A 加入量	50μL；		
底物液 B 加入量	50μL；		
读数前温育设置	加盖；	温度：20℃；	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)；		

[0159]　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)	糖类抗原242的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN107167590B	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201710243922.9	申请日	2017-04-14
[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	彭会军 戴宝平 丁晓蔚		
发明人	彭会军 戴宝平 丁晓蔚		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/543		
代理人(译)	赵海波		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN107167590A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种糖类抗原242的板式化学发光法检测试剂盒，包括的试剂有生物素标记的CA242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CA242抗体溶液、CA242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。

精密性质控品	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU	RLU
L	5.01	4.83	4.73	5.02	4.97	4.60	4.76	4.97	4.61	5.06
M	71.21	69.95	65.76	71.61	70.99	68.02	71.38	64.99	69.34	66.24
H	233.75	234.23	223.83	227.74	217.61	226.59	234.00	221.35	234.81	214.91