

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510017942.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年3月7日

[11] 公开号 CN 1924581A

[22] 申请日 2005.8.30

[21] 申请号 200510017942.1

[71] 申请人 郑州安图绿科生物工程有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区
第五大街经北一路87号

[72] 发明人 付光宇 李晓霞 王睿 许远航
李彬 马建军

[74] 专利代理机构 郑州联科专利事务所

代理人 田小伍

权利要求书1页 说明书5页

[54] 发明名称

前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒

[57] 摘要

前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒，属于临床血液检测分析技术领域。主要由包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板、前列腺特异性抗原系列标准品、酶标记前列腺特异性抗原抗体、发光底物A液和发光底物B液组成，发光底物A液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸配成，发光底物B液由氨基酸氧化酶和稳定剂配成。发光底物A、B为HRP-鲁米诺发光体系。可用于临床检测人血清PSA含量的检测方法，对前列腺疾病的早期发现、病情进展监测、治疗效果监测与评估等提供良好的技术支持。

1、前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，主要由包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板、前列腺特异性抗原系列标准品、酶标记前列腺特异性抗原抗体、发光底物 A 液和发光底物 B 液组成，发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸配成，发光底物 B 液由氨基酸氧化酶和稳定剂配成。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板为包被有抗前列腺特异性抗原单克隆或多克隆抗体的不透明聚苯乙烯板；前列腺特异性抗原系列标准品以分析缓冲液为基质，加入前列腺特异性抗原纯品配制而成；酶标记前列腺特异性抗原抗体为辣根过氧化物酶标记的前列腺特异性抗原的抗体；发光底物 A、B 为 HRP-鲁米诺发光体系。

3、如权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于，辣根过氧化物酶标记前列腺特异性抗原抗体的工作浓度为 1: 5000—9000；包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板采用直接物理吸附包被法包被抗前列腺特异性抗原单克隆或多克隆抗体。

4、如权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于，发光底物 A 液由下列成分组成：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-HCl 缓冲液 0.2M；发光底物 B 液由下列成分组成：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M。

前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒

技术领域

本发明属于临床血液免疫检测技术领域，特别涉及一种用于人体血清前列腺特异性抗原（PSA）定量检测的化学发光免疫分析试剂盒，利用该试剂盒检测特异性强、灵敏度高。

背景技术

近年来，随着人口结构老龄化、饮食习惯的改变，我国前列腺疾病的发病率迅速增长，其中前列腺癌占男性发病率的第二位、死亡率的第三位，而前列腺癌的早期发现是能否根治的关键所在。前列腺特异性抗原（PSA）是前列腺癌特异性最强的肿瘤标志物，PSA 的检测有助于前列腺癌的早期发现、监视病情进展、治疗效果监测，同时 PSA 在原发性前列腺癌和继发性前列腺癌的鉴别诊断中起着决定性作用。目前在临床实验室检测 PSA 的方法，仍多来自 60 年代发展起来的放射免疫分析方法和 80 年代兴起的酶联免疫分析法。但由于放射免疫分析方法必须使用放射性标记物，检测设备复杂，必需用专门的放射性探测器对检测结果进行测定。同时，对操作人员也存在有放射性污染与伤害，特别是如常用的碘-125、碘-131 和磷-32 等半衰期短的核素，其保存时期不长，也给临床使用带来了不便。而酶免法虽然避免了放免法的污染、繁琐、保存期短等问题，但由于其检测范围窄、灵敏度低等缺点仍不能满足临床的需求。

20 世纪 70 年代中期 Arakawa 首次报道用发光信号进行分析检测，即利用发光的化学反应（chemiluminescence, CL）和生物反应（bioluminescence, BL）分析超微量物质，特别是用于临床免疫分析中检验超微量活性物质。化学发光免疫分析（chemiluminescence immunoassay, CLIA）以其灵敏度高（attomole 即 10^{-18} mol）、快速（几秒钟内产生化学发光信号，有的情况下信号可持续几小时）、简便、测试中不使用有害的试剂，因此成为非放射性免疫

分析法中最有前途的方法之一。化学发光免疫分析法因标记方法的不同而分为直接标记法和化学发光酶免疫分析法两种，直接标记法多采用的是吖啶酯直接标记在抗原或抗体上用于检测。由于其发光往往是闪烁光，不宜捕获，往往只适应全自动化学发光免疫分析仪器。

发明内容

本发明目的在于提供一种用于人体血清前列腺特异性抗原（PSA）定量检测的化学发光酶免疫分析试剂盒，利用该试剂盒进行分析检测特异性强、灵敏度高。

为达上述目的，本发明采用如下技术方案：前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒，主要由包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板、前列腺特异性抗原系列标准品、酶标记前列腺特异性抗原抗体、发光底物 A 液和发光底物 B 液组成，发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸配成，发光底物 B 液由氨基酸氧化酶和稳定剂配成。

包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板为包被有抗前列腺特异性抗原单克隆或多克隆抗体的不透明聚苯乙烯板；前列腺特异性抗原系列标准品以分析缓冲液为基质，加入前列腺特异性抗原纯品配制而成；酶标记前列腺特异性抗原抗体为辣根过氧化物酶标记的前列腺特异性抗原的抗体；发光底物 A、B 为 HRP-鲁米诺发光体系。

辣根过氧化物酶标记前列腺特异性抗原抗体的工作浓度为 1：5000—9000；包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板采用直接物理吸附法包被。

发光底物 A 液由下列成分组成：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-HCl 缓冲液 0.2M；发光底物 B 液由下列成分组成：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8%, V/V、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M。

本发明试剂盒中，分析缓冲液由 0.05M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.01M 的氯化钠和 1%牛血清白蛋白（BSA）组成，Ph7.2；所用抗体采用常规的细胞杂交瘤技术制备得到的 PSA 单克隆抗体，采用辛酸-硫酸铵盐析法对制备的抗

体进行纯化后，再进行筛选鉴定，选出配对较好的一对单抗用于检测，于-20℃保存备用；不透明聚苯乙烯板采用直接物理吸附法包被单克隆抗体，包被液为 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液，包被浓度为 2-5ug/ml，包被量 100ul/孔，0℃-4℃孵育过夜；弃去孔内液体，用 PBS-Tween 洗液洗板孔两次；用 pH7.4PBS-1%BSA，150ul/孔封闭，室温孵育 3 小时；弃去孔内液体，用 pH7.4PBS-2.5%蔗糖，150ul/孔保护；弃去孔内液体，经干燥后装入隔潮的铝箔袋中密封保存。

本发明试剂盒中所用的 PSA 系列标准品，以分析缓冲液为基质，采用浓缩精浆以国家标准品为准稀释而成，为系列冻干品，使用前用蒸馏水复溶；所用的酶标记前列腺特异性抗原的抗体，采用改良的过碘酸钠法进行标记。其原理为：辣根过氧化物酶是一种糖蛋白，含约 18%的糖，是与酶活性无关的。与酶活性无关的糖基被过碘酸钠 (NaIO₄) 氧化为醛基，再与抗体蛋白的氨基与醛基形成 Schiff' s 碱。为了防止酶蛋白的氨基与醛基反应发生自身偶联，在标记前先用 2, 4-二硝基氟苯 (DNFB) 封闭酶蛋白中残存的 α-和 ε-氨基。酶与抗体的结合反应后，再加入硼氢化钠 (NaBH₄) 还原成稳定的结合物。在标记好的抗体溶液中等比加入甘油于-20℃包存备用。试验表明，所用的酶标抗体使用的工作浓度为 1: 8000 最好。所用发光底物系统采用高效稳定酶促化学发光底物系统，A 液为：luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M、pH 9.4；B 液为：氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M, pH 6.5。

本发明针对临床检验实验室提供了一种既可手工操作，又可适用于某些标准全自动检测仪器的检测手段，建立了检测人血清 PSA 的定量检测方法。其采用标准 96 孔微孔板为固相载体，以辣根过氧化物酶标记抗体，催化发光底物发光作为示踪信号用以检测。利用辣根过氧化物酶催化发光底物，发光底物发生化学反应并释放出大量的能量，产生激发态中间体。这种激发态中间体，当其回到稳定的基态时，可同时发射出光子，利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额，该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比。由此

可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。

利用本发明进行检测，灵敏度高、检测范围宽、操作简便、无放射性污染；试剂盒生产成本低，大大减轻了医患双方负担。因此本发明更适合我国临床实验室的使用。

本发明检测试剂盒的使用操作程序如下：

（一）实验前准备

- 1、将所有检测试剂及血清标本恢复至室温 18-25℃（约需 30 分钟）；
- 2、将恒温箱或水浴锅调至反应温度；
- 3、将发光底物 A、B 液等比例混合至本次试验所需体积（每孔需 100 μ l，可按照每条包被板（8 孔）需混合后的发光底物 1ml 混合，依此类推）。

本发明的免疫反应微孔板已将 PSA 抗体固定在板孔，可直接使用，不必使用前现场包被，非常方便。

（二）实验操作步骤

- 1、将所需用量的已包被板条放置在支架上；
- 2、在包被孔中分别加入 50 μ l 标准品、血清样品；
- 3、每孔再分别加入酶标记抗体溶液 100 μ l。微量振荡器上振荡 30 秒使其混合均匀；
- 4、置 37℃温育 60 分钟；
- 5、甩去孔内混合物，用蒸馏水注满各孔，甩去，重复 5 次，最后在吸水纸上拍干；
- 6、每孔加入混合后的发光底物 100 μ l，室温（18-25℃）反应 5 分钟；
- 7、化学发光检测仪检测发光强度值；
- 8、以标准品浓度值为横坐标（X 轴），以标准品发光强度值为纵坐标（Y 轴），建立标准曲线，计算测定结果。

以本发明上述检测试剂盒按上述程序进行测定所用时间较短，一批测定一般仅需一个多小时即可完成，方便快捷。

经大量实验证明，本发明上述检测试剂在用于前列腺特异性抗原含量测定时的方法学鉴定数据可达到如下指标：

灵敏度—最小检出量为 0.3ng/ml;

标准曲线范围为 0—100ng/ml;

精密度—分析内精密度平均 4.5% (n=10), 分析间精密度平均为 9.6% (n=10), 远高于国家标准, 说明本发明试剂盒在检测实验中具有很好的重复性;

准确性——向血清中添加已知 PSA 标准品后的回收率为 98%—109%。

实验表明, 应用本发明对人血清中的前列腺特异性抗原进行测定, 只需取少量样品即可进行, 对被检测者没有任何伤害。同时由于本发明采用了化学发光酶免疫分析检测方法, 在上述指标中都优于目前广泛使用的酶联免疫检测方法, 同时也不存在放射免疫法的放射性污染、有效期短、操作复杂等缺点。因此, 本发明为临床提供了一种检测前列腺特异性抗原的更准确、方便、快捷的方法, 能够更好地满足临床的需要。

具体实施方式

前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒, 由 (1) 包被有抗前列腺特异性抗原单克隆抗体的 96 孔不透明聚苯乙烯板, (2) 以分析缓冲液为基质, 加入前列腺特异性抗原纯品配制而成的前列腺特异性抗原系列标准品, (3) 辣根过氧化物酶标记的前列腺特异性抗原的抗体, 其工作浓度为 1: 8000, (4) 发光底物 A 液, (5) 发光底物 B 液组成。发光底物 A 液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸配成, 发光底物 B 液由氨基酸氧化酶和稳定剂配成。

包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板采用直接物理吸附法包被。

发光底物 A 液由下列成分组成: luminol 0.15mM、羟基香豆素 0.59mM、没食子酸 0.35mM、Tris-Hcl 缓冲液 0.2M; 发光底物 B 液由下列成分组成: 氨基酸氧化酶 0.85mM、吐温-20 0.8% (V/V)、DTPA 0.5mM、维生素 C 0.12mM、乙酸-乙酸盐缓冲液 0.2M。

专利名称(译)	前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1924581A	公开(公告)日	2007-03-07
申请号	CN200510017942.1	申请日	2005-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
[标]发明人	付光宇 李晓霞 王睿 许远航 李彬 马建军		
发明人	付光宇 李晓霞 王睿 许远航 李彬 马建军		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/52 G01N21/64 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

前列腺特异性抗原化学发光定量检测试剂盒，属于临床血液检测分析技术领域。主要由包被有抗前列腺特异性抗原抗体的不透明聚苯乙烯板、前列腺特异性抗原系列标准品、酶标记前列腺特异性抗原抗体、发光底物A液和发光底物B液组成，发光底物A液由高效发光剂、复合增强剂、氨基酸配成，发光底物B液由氨基酸氧化酶和稳定剂配成。发光底物A、B为HRP - 鲁米诺发光体系。可用于临床检测人血清PSA含量的检测方法，对前列腺疾病的早期发现、病情进展监测、治疗效果监测与评估等提供良好的技术支持。