



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106932583 A

(43) 申请公布日 2017. 07. 07

(21) 申请号 201511008970. 7

G01N 21/76(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 29

(71) 申请人 北京大成生物工程有限公司

地址 102600 北京市大兴区科苑路 18 号留
学生人员大兴创业园

(72) 发明人 刘劲

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限
公司 11127

代理人 韩蕾

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/553(2006. 01)

权利要求书3页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

人表皮生长因子受体 Her-2/neu 定量检测试剂盒及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种人表皮生长因子受体 Her-2/neu 定量检测试剂盒及其制备方法与应用。本发明的试剂盒是基于磁微粒化学发光法制备而成,其中采用重组的 Her-2/neu 抗原作为标准品抗原,并稀释至含非离子表面活性剂的蛋白缓冲组中,增加其分散性,防止自身凝集,保持活性;另将 Her-2/neu 蛋白抗体和磁微粒偶联,采用优化的固定化方法和封闭方法,使磁分离组分稳定性良好;此外采用多组分免疫复合物和罗氏主动型干扰去除蛋白 MAK33 联用,可解决肿瘤标志物夹心法检测中异嗜性抗体干扰的问题,提高了终产品的特异性。本发明的试剂盒性能优异,成本较低,同时有效期长。

1. 一种人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,该试剂盒包括以下试剂组分:校准品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂以及化学发光底物;

其中:

所述校准品是按照以下方法配制得到的:将人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原溶解于含非离子表面活性剂的蛋白缓冲液中配制得到校准品;其中,所述非离子表面活性剂选自Tween 20、Triton X 100、Bronidox中的一种或多种,非离子表面活性剂在蛋白缓冲液中的浓度为0.01%~0.5%;

所述磁分离试剂是按照以下方法制备得到的:将链霉亲和素和磁微粒偶联制得链霉亲和素磁微粒,利用长臂生物素标记人表皮生长因子受体Her-2/neu捕获抗体制得生物素化抗体,然后将生物素化抗体与链霉亲和素磁微粒免疫固定,制得磁分离试剂;

所述酶反应物包括碱性磷酸酶标记的人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体;

所述稳定增强剂包括MAK33和抗异嗜性抗体干扰的多组分免疫复合物,所述MAK33在稳定增强剂中的终浓度为80~120 μ g/ml;所述多组分免疫复合物是按照以下方法制备得到的:新生牛血清、小鼠血清、绵羊血清按1:1.5~2.5:0.4~0.6的体积比混合,加入硫酸铵沉淀过夜,离心,去上清,将沉淀溶于含0.5%牛血清白蛋白的PBS pH7.2缓冲液中,70~75 $^{\circ}$ C放置0.5~2小时,干燥,制得抗异嗜性抗体干扰的多组分免疫复合物;

所述化学发光底物为经缓冲液稀释的APS-5化学发光底物。

2. 根据权利要求1所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,该试剂盒还包括质控品,该质控品是按照以下方法配制得到的:将人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原稀释至含非离子表面活性剂的蛋白缓冲液中配制得到质控品;其中,所述非离子表面活性剂选自Tween 20、Triton X 100、Bronidox中的一种或多种,非离子表面活性剂在蛋白缓冲液中的浓度为0.01%~0.5%。

3. 根据权利要求1或2所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,其中,所述校准品是按照以下方法配制得到的:

将人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原溶解于PBS pH7.2缓冲液中至0.5mg/ml,15分钟后,加入终浓度为1mM赖氨酸反应5~120分钟;

将上述反应物,按不同浓度用含非离子表面活性剂的PBS蛋白缓冲液稀释成不同浓度点,并定标,得到校准品;所述含非离子表面活性剂的PBS蛋白缓冲液组分为:磷酸二氢钠50mM,氯化钠75mM,Tween 20 0.02%,Triton X100 0.03%,蔗糖1%,酪蛋白0.15%,牛血清白蛋白3%,Proclin 300 0.02%,氢氧化钠pH 6.8。

4. 根据权利要求1或2所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,其中,所述磁分离试剂是按照以下方法制备得到的:

取磁微粒,加入MES缓冲液中,加入sulfo-NHS、EDC,反应,之后去上清,洗涤;

加入人表皮生长因子受体Her-2/neu包被抗体反应过夜,备用;

加入含BSA、蔗糖、聚乙二醇6000的PBS pH7.2缓冲液,将磁微粒浓缩液置于平皿中,封闭;用pH6.0缓冲液洗涤数次;

用含酪蛋白、牛血清白蛋白、Tween20、Proclin300的PBS pH7.2缓冲液复溶;制得磁分离试剂。

5. 根据权利要求1或2所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,其中,所

述酶反应物是按照以下方法配制得到的：

碱性磷酸酶标记人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体：将碱性磷酸酶透析至PBS pH7.2缓冲液中；将人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体透析至PBS pH6.8缓冲液中；在碱性磷酸酶溶液中加入预先用二甲基亚砷溶解的SMCC溶液，反应5分钟后透析至PBS pH7.2缓冲液，得活化的碱性磷酸酶溶液；在示踪抗体溶液中加入预先用的用PBS pH6.8缓冲液溶解的2-IT溶液，反应15分钟后，透析至PBS pH7.2缓冲液，得活化的示踪抗体溶液；将活化的碱性磷酸酶溶液和活化的示踪抗体溶液混合，反应过夜，得碱性磷酸酶标记的人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体；

将上述碱性磷酸酶标记的人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体稀释至如下组分的缓冲液中：磷酸二氢钠50mM、氯化钠75mM、Tween 20 0.02%、蔗糖1%、酪蛋白0.15%、牛血清白蛋白0.5%、Proclin 300 0.02%、氢氧化钠pH 6.8，制得所述酶反应物。

6. 根据权利要求1或2所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒，其中，所述稳定增强剂是按照以下方法配制得到的：

制备抗异嗜性抗体干扰的多组分免疫复合物：将新生牛血清、小鼠血清、绵羊血清按1:2:0.5的体积比混合；加入终浓度为57%的饱和硫酸铵，4摄氏度过夜；次日将处理后的混合血清离心，去上清，将沉淀溶于含0.5%牛血清白蛋白的PBS pH7.2缓冲液中，放置于温箱中，72℃放置1小时；用PBS pH7.2缓冲液稀释至50mg/ml，分装后冷冻干燥；

按如下配方配制稳定增强剂：磷酸二氢钠50mM，氯化钠75mM，三乙醇胺2%，多组分免疫复合物6μg/ml，MAK33 100μg/ml，酪蛋白0.15%，牛血清白蛋白0.5%，Proclin 300 0.02%，氢氧化钠pH 6.8。

7. 根据权利要求1或2所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒，其中，所述化学发光底物是按照以下方法配制得到的：

按1:4~10的比例将APS-5化学发光底物稀释至下列组分的缓冲液中：三乙醇胺2%，二乙醇胺0.75%，CTAB2%，N,N-二甲二吡呢硝酸盐0.3%，牛血清白蛋白0.15%，Bronidox0.5%，盐酸pH9.5。

8. 根据权利要求1或2所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒，该试剂盒还包括清洗液。

9. 权利要求1~8任一项所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒的制备方法，该方法包括步骤：

分别配制校准品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂、以及化学发光底物；

将校准品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂、化学发光底物独立地置于包装容器内，得到人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒。

10. 利用权利要求1~8任一项所述的试剂盒定量检测人表皮生长因子受体Her-2/neu的方法，该方法包括步骤：

—分别加30μl人表皮生长因子受体Her-2/neu标准品、待测样本至对应试管底部；

—加45μl酶反应物至每一试管中；

—加45μl稳定增强剂至每一试管中；

—加30μl磁分离试剂至每一试管中；

—用塑料薄膜覆盖试管，多管混匀器轻轻振荡试管架30s后，置37℃水浴15分钟；

一试管连架放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀2分钟;缓慢的倒转分离器倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

一加清洗液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀;

一加200 μ l化学发光底物溶液至试管中混匀3秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物类免疫检测试剂领域,具体涉及一种人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒及其制备方法与应用,更具体地说,是涉及一种基于磁微粒分离化学发光法定量检测肿瘤标志物人表皮生长因子受体Her-2/neu的试剂盒及其制备方法,以及应用该试剂盒定量检测肿瘤标志物人表皮生长因子受体Her-2/neu的方法。

背景技术

[0002] 人表皮生长因子受体Her-2/neu基因是一种最初在化学物质诱发的大鼠神经母细胞瘤和胶质母细胞瘤的DNA中被发现的原癌基因,也称为c-erbB2,其由922个腺嘌呤、1,382个胞嘧啶、1,346个鸟嘌呤和880个胸腺嘧啶组成,位于人染色体17q21上,编码相对分子量为185kDa的跨膜糖蛋白(p185),由1255个氨基酸组成,720-987位属于酪氨酸激酶区。Her-2/neu蛋白是具有酪氨酸蛋白激酶活性跨膜糖蛋白,是EGFR家族成员之一。

[0003] Her-2/neu基因属于一种胞内具有酪氨酸激酶活性的细胞表面受体家族,且结构上与表皮生长因子受体相关(erbB-1)。Her-2/neu蛋白由胞外的配体结合区、单链跨膜区及胞内的蛋白酪氨酸激酶区三部分组成,由于目前尚未发现能与Her-2/neu蛋白直接结合的配体。其主要通过与家族中其他成员包括EGFR(HER1/erbB1),HER3/erbB3,HER4/erbB4形成异二聚体而与各自的配体结合。Her-2/neu蛋白常为异二聚体首选伴侣,且活性常强于其它异二聚体。当与配体结合后,主要通过引起受体二聚化及胞浆内酪氨酸激酶区的自身磷酸化。激活酪氨酸激酶的活性。

[0004] Her-2/neu蛋白介导的信号转导途径主要有Ras/Raf/分裂素活化蛋白激酶(MAPK)途径,磷脂酰肌醇3羟基激酶(P13K)/Akt途径,信号转导及转录激活(STAT)途径和PLC通路等。Her-2/neu蛋白在胃癌中的表达情况及影响因素Her-2/neu蛋白通常只在胎儿时期表达,成年以后只在极少数组织内低水平表达。然而在多种人类肿瘤中却过度表达,如乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌、原发性肾细胞癌、子宫内膜癌等,并提示预后不良。在胃癌细胞上Her-2/neu蛋白主要定位在细胞膜上,少量表达在细胞质中。在胃癌中,常见Her-2/neu基因扩增和RNA及蛋白质的过度表达,但在所有非胃癌组织中均检测不到,表明Her-2/neu蛋白在胃癌的发生、发展和侵袭性转移性上发挥着重要作用。

[0005] HER2癌基因的致癌机制是抑制凋亡,促进增殖;增加肿瘤细胞的侵袭力;促进肿瘤血管新生和淋巴管新生。HER2基因扩增是影响乳腺癌生长与转移的最重要的因素之一。在大约30%的乳腺癌中可出现HER2基因过度表达,并与患者预后较差相关。HER2过度表达的乳腺癌患者病情进展迅速,化疗缓解期短,内分泌治疗效果差,无病生存和总生存率低。HER2的含量可作为一个独立的强有力的预后指标,尤其对那些腋窝淋巴结阳性的乳腺癌患者它甚至比目前常用的一些肿瘤指标更有说服力。HER2扩增阳性的乳腺癌具有一些特殊的生物学和临床特征,例如组织学分级更差、低ER、PR水平、更多的非整倍体、更倾向于转移至中枢神经系统和内脏、内分泌治疗无效、肿瘤的增殖指数更高、对阿霉素敏感等。

[0006] 目前把HER2基因扩增状态作为乳腺癌药物治疗(环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶和赫赛汀)的主要参考指标。由于只有HER2过度表达和基因扩增的乳腺癌患者用赫赛汀治疗才有效,因此正确检测和评定乳腺癌的HER2基因扩增状态至关重要。FDA批准了赫赛汀和拉帕替尼两种针对HER2扩增的肿瘤的靶向药物。赫赛汀主要通过阻断HER2/Src相互作用、引起HER2受体下调和促进抗体介导的细胞毒作用而达到治疗肿瘤的目的。HER2基因扩增阳性的转移性乳腺癌中,25%的患者单药治疗有效,并且与其他化疗药联合应用具有协同作用,与阿霉素、环磷酰胺、紫杉醇联合应用可显著延长患者无病生存期和总生存期。在ER和HER2均阳性的患者中,赫赛汀和激素联合治疗有效。

[0007] HER2蛋白通常只在胎儿时期表达,成年以后只在极少数组织内低水平表达。然而有研究表明30%以上的人类肿瘤中存在HER2基因的扩增/过度表达(如乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、输卵管癌、胃癌和前列腺癌等);其中20%—30%的原发性浸润性乳腺癌有HER2基因的扩增/过度表达。研究证实:HER2的过度表达与肿瘤的发生和侵袭有关,可提高转移的危险;转染的细胞和动物模型证实,其可改变肿瘤对激素和化疗药物的敏感性。目前在乳腺癌中p185已经被认为是一个预后因子、预测因子和治疗的靶蛋白。

[0008] 关于HER2的血清学检测意义:细胞表面HER2蛋白胞外段会受蛋白酶裂解脱落进入血液循环,循环中有HER-2蛋白的胞外段的存在为血清学检测HER2提供了可能。目前检测血清HER2的方法有:酶联免疫分析(EIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学发光免疫分析法等。近期发现的NIDS快速反应法则有待进一步研究。近来研究表明,血清学与组织学HER2的检测结果一致性较好,约有20%—30%乳腺癌患者血清中可溶性HER2蛋白水平升高。血清HER2可作为反映肿瘤生长、复发或者转移的检测指标。高血清HER2水平提示肿瘤的高侵袭性,与临床分期、病情进展、无瘤生存期和总生存期有关,并能监测化疗药的治疗效果,是重要的预后因素。

[0009] 通过检测血清中HER2的水平,有助于诊断、预测患者组织HER2的状态,在接受化疗的晚期乳腺癌患者中监测血清HER2含量有助于预测疗效、无病生存期和总生存期。在指导靶向药物应用方面,血清HER2的检测也可以作为组织学检测的一个补充,并可能使靶向治疗的适应人群得以放宽。血清HER2的检测也可以作为重要的预后因素,可在乳腺癌随访监测、疗效观察尤其是靶向治疗后的疗效观察中发挥其独到的作用。

[0010] 综上所述,HER2与乳腺癌的关系涉及到肿瘤的发生、发展、诊断与鉴别诊断、治疗和预后评价等方面,目前的研究取得一定进展,使乳腺癌的诊治上了一个新台阶。

[0011] 因此,有待开发对人表皮生长因子受体Her-2/neu检测灵敏度高与可靠性并能降低检测成本的检测技术。

发明内容

[0012] 本发明的一个目的在于针对上述现有技术检测人表皮生长因子受体Her-2/neu所存在的问题,提供一种新的可定量检测人表皮生长因子受体Her-2/neu的试剂盒,提高检测灵敏度及可靠性,并降低成本,延长有效期。

[0013] 本发明的另一目的在于提供制备人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒的方法。

[0014] 本发明的另一目的在于提供利用所述的试剂盒检测人表皮生长因子受体Her-2/

neu的方法。

[0015] 一方面,本发明提供了一种人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,该试剂盒包括以下试剂组分:

[0016] 校准品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂以及化学发光底物;

[0017] 其中:

[0018] 所述校准品是按照以下方法配制得到的:将人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原溶解于含非离子表面活性剂的蛋白缓冲液中配制得到校准品;其中,所述非离子表面活性剂选自Tween 20、Triton X 100、Bronidox中的一种或多种,非离子表面活性剂在蛋白缓冲液中的浓度为0.01%~0.5%;

[0019] 所述磁分离试剂是按照以下方法制备得到的:将链霉亲和素和磁微粒偶联制得链霉亲和素磁微粒,利用长臂生物素标记人表皮生长因子受体Her-2/neu捕获抗体制得生物素化抗体,然后将生物素化抗体与链霉亲和素磁微粒免疫固定,制得磁分离试剂;

[0020] 所述酶反应物包括碱性磷酸酶标记的人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体;

[0021] 所述稳定增强剂包括MAK33和抗异嗜性抗体干扰的多组分免疫复合物,所述MAK33在稳定增强剂中的终浓度为80~120 μ g/ml;所述多组分免疫复合物是按照以下方法制备得到的:新生牛血清、小鼠血清、绵羊血清按1:1.5~2.5:0.4~0.6的体积比混合,加入硫酸铵沉淀过夜,离心,去上清,将沉淀溶于含0.5%牛血清白蛋白的PBS pH7.2缓冲液中,70~75 $^{\circ}$ C放置0.5~2小时,干燥,制得抗异嗜性抗体干扰的多组分免疫复合物;

[0022] 所述化学发光底物为经缓冲液稀释的APS-5化学发光底物。

[0023] 根据本发明的具体实施方案,本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒还可进一步包括质控品,质控品的配制同标准品。具体地,该质控品是按照以下方法配制得到的:将人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原稀释至含非离子表面活性剂的蛋白缓冲液中配制得到质控品;其中,所述非离子表面活性剂选自Tween 20、Triton X100、Bronidox中的一种或多种,非离子表面活性剂在蛋白缓冲液中的浓度为0.01%~0.5%。

[0024] 根据本发明的具体实施方案,本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒中,所述校准品是按照以下方法配制得到的(如包含质控品,质控品的具体配制也可按照该方法进行):

[0025] 将人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原溶解于PBS pH7.2缓冲液中至0.5mg/ml,15分钟后,加入终浓度为1mM赖氨酸反应5~120分钟;

[0026] 将上述反应物,按不同浓度用含非离子表面活性剂的PBS蛋白缓冲液稀释成不同浓度点,并定标,得到校准品;所述含非离子表面活性剂的PBS蛋白缓冲液组分为:磷酸二氢钠50mM,氯化钠75mM,Tween 200.02%,Triton X1000.03%,蔗糖1%,酪蛋白0.15%,牛血清白蛋白3%,Proclin 3000.02%,氢氧化钠pH 6.8。

[0027] 根据本发明的具体实施方案,本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒中,所述磁分离试剂是按照以下方法制备得到的:

[0028] 取磁微粒,加入MES缓冲液中,加入sulfo-NHS-EDC,反应,之后去上清,洗涤;

[0029] 加入人表皮生长因子受体Her-2/neu包被抗体反应过夜,备用;

[0030] 加入含BSA、蔗糖、聚乙二醇6000的PBS pH7.2缓冲液,将磁微粒浓缩液置于平皿中,封闭;用pH6.0缓冲液洗涤数次;

[0031] 用含酪蛋白、牛血清白蛋白、Tween20、Proclin300的PBS pH7.2缓冲液复溶；制得磁分离试剂。

[0032] 根据本发明的具体实施方案，本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒中，所述酶反应物是按照以下方法配制得到的：

[0033] 碱性磷酸酶标记人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体：将碱性磷酸酶透析至PBS pH7.2缓冲液中；将人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体透析至PBS pH6.8缓冲液中；在碱性磷酸酶溶液中加入预先用二甲基亚砷溶解的SMCC溶液，反应5分钟后透析至PBS pH7.2缓冲液，得活化的碱性磷酸酶溶液；在示踪抗体溶液中加入预先用的用PBS pH6.8缓冲液溶解的2-IT溶液，反应15分钟后，透析至PBS pH7.2缓冲液，得活化的示踪抗体溶液；将活化的碱性磷酸酶溶液和活化的示踪抗体溶液混合，反应过夜，得碱性磷酸酶标记的人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体；

[0034] 将上述碱性磷酸酶标记的人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体稀释至如下组分的缓冲液中：磷酸二氢钠50mM、氯化钠75mM、Tween 200.02%、蔗糖1%、酪蛋白0.15%、牛血清白蛋白0.5%、Proclin 3000.02%、氢氧化钠pH 6.8，制得所述酶反应物。

[0035] 根据本发明的具体实施方案，本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒中，所述稳定增强剂是按照以下方法配制得到的：

[0036] 制备抗异嗜性抗体干扰的多组分免疫复合物：将新生牛血清、小鼠血清、绵羊血清按1:2:0.5的体积比混合；加入终浓度为57%的饱和硫酸铵，4摄氏度过夜；次日将处理后的混合血清离心，去上清，将沉淀溶于含0.5%牛血清白蛋白的PBS pH7.2缓冲液中，放置于温箱中，72℃放置1小时；用PBS pH7.2缓冲液稀释至50mg/ml，分装后冷冻干燥；

[0037] 按如下配方配制稳定增强剂：磷酸二氢钠50mM，氯化钠75mM，三乙醇胺2%，多组分免疫复合物6μg/ml，MAK33100μg/ml，酪蛋白0.15%，牛血清白蛋白0.5%，Proclin 3000.02%，氢氧化钠pH 6.8。

[0038] 根据本发明的具体实施方案，本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒中，所述化学发光底物是按照以下方法配制得到的：

[0039] 按1:4~10的比例将APS-5化学发光底物稀释至下列组分的缓冲液中：三乙醇胺2%，二乙醇胺0.75%，CTAB2%，N,N-二甲二吡啶硝酸盐0.3%，牛血清白蛋白0.15%，Bronidox0.5%，盐酸pH9.5。

[0040] 根据本发明的具体实施方案，本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒，还进一步包括清洗液。该清洗液主要是用于在检测过程中清洗与磁分离试剂反应后的样品，清洗液的具体组分可以参照所属领域的常规操作进行。通常是磷酸二氢钠、氯化钠、Tween 20、Proclin300的混合溶液，在试剂盒制品中可以浓缩清洗液的形式存在，检测时适当稀释后使用。

[0041] 另一方面，本发明还提供了所述的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒的制备方法，该方法包括步骤：

[0042] 分别配制校准品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂、以及化学发光底物；各试剂组分的配制参见前面的记载，此处不再赘述；

[0043] 将校准品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂、化学发光底物等各试剂组分独立地置于包装容器内，得到人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒。

[0044] 另一方面,本发明还提供了利用所述的试剂盒定量检测人表皮生长因子受体Her-2/neu的方法,该方法包括步骤:

[0045] 一分别加30 μ l人表皮生长因子受体Her-2/neu标准品、待测样本至对应试管底部;

[0046] 一加45 μ l酶反应物至每一试管中;

[0047] 一加45 μ l稳定增强剂至每一试管中;

[0048] 一加30 μ l磁分离试剂至每一试管中;

[0049] 一用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30s后,置37 $^{\circ}$ C水浴15分钟;

[0050] 一试管连架放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀2分钟;缓慢的倒转分离器倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0051] 一加清洗液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀;

[0052] 一加200 μ l化学发光底物溶液至试管中混匀3秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

[0053] 本发明的关键包括:

[0054] 采用重组的Her-2/neu抗原作为标准品抗原,并稀释至含非离子表面活性剂的蛋白缓冲组分中,增加其分散性,防止自身凝集,保持活性,效期至一年以上;

[0055] 将Her-2/neu蛋白抗体和磁微粒偶联,采用优化的固定化方法,和封闭方法,使磁分离组分稳定性良好,效期可至一年以上;

[0056] 采用异官能团的两步活化方法,分别活化抗体和碱性磷酸酶的氨基位点,再通过巯基的结合将活化的碱性磷酸酶和活化的抗体结合,结合效率优异,自身交联极低,提高了最终试剂盒的灵敏度和特异性性能;

[0057] 同时,采用公司自产的多组分免疫复合物和罗氏主动型干扰去除蛋白MAK33联用。

[0058] 通过含免疫复合物的特别组分体系可解决肿瘤标志物夹心法检测中异嗜性抗体干扰的问题,提高了终产品的特异性;

[0059] 在化学发光底物方面,采用灵敏度高和平台稳定期长的APS-5底物,并优化化学发光增强体系,保证了终产品的信号灵敏度高和稳定性好、变异小;

[0060] 在本产品中,上述组分经过大量实验的工艺优化,得到完善统一工艺,并严格按照的标准生产操作规程和质量控制规程进行生产。用户仅需按照操作说明进行规范操作,就可得到可靠的结果。

[0061] 本发明的试剂盒中未详细提及的试剂组分(例如清洗液、一些必要的缓冲液等)、试剂盒的外包装以及各试剂组分的独立包装容器等均可以按照所属领域的常规操作进行,符合相关行业规定即可。本发明的方法中未详细提及的操作步骤也可参照所属领域的常规操作进行,例如,在检测前,可将各试剂放至室温(18~25 $^{\circ}$ C),加样前充分混匀;所用检测设备例如化学发光类测定仪的使用按照说明书操作进行。

[0062] 本发明中,未特别注明单位的比例与含量,固体组分为质量比例与含量,液体组分为体积比例与含量。

[0063] 综上所述,本发明的人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒,具有以下有益效果:性能优异,成本较低,同时有效期长。样本和试剂一次加入,即方便手动操作也利于提高全自动操作效率。

附图说明

[0064] 图1为本发明具体实施例中两种试剂盒产品(评价试剂、对照试剂)进行线性回归分析数据图。

[0065] 图2A为本发明具体实施例中评价试剂-对照试剂散点图。

[0066] 图2B为本发明具体实施例中评价试剂测值偏倚-对照试剂散点图。

具体实施方式

[0067] 为了更清楚地理解本发明,现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中所用各试剂材料均可商购获得,所用各仪器设备也是所属领域的现有仪器设备,未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件,或按照制造商所建议的条件。

[0068] 实施例1

[0069] 本发明中,本发明所述的捕获抗体为能与人体内人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原特异结合的单克隆抗体,所述的示踪抗体为能与人表皮生长因子受体Her-2/neu特异结合的单克隆抗体。捕获抗体和示踪抗体除能与人表皮生长因子受体Her-2/neu特异性结合外,配对使用时可与抗原形成“三明治”夹心结构。

[0070] 1、本实施例所用的人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原采购自无锡傲锐东源生物科技有限公司,本实施例所用的人表皮生长因子受体Her-2/neu捕获抗体和示踪抗体采购自无锡傲锐东源生物科技有限公司。本实施例中所述的各种试剂的配方如下:

[0071] 【PBS pH7.2缓冲液】

[0072]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
氯化钠	Sigma	75mM	4.39g
4M氢氧化钠	Sigma	pH 7.2	~25ml

[0073] 【PBS pH6.8缓冲液】

[0074]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
氯化钠	Sigma	75mM	4.39g
4M氢氧化钠	Sigma	pH 6.8	~25ml

[0075] 【20mM MES pH6.0】

[0076]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
MES	Sigma	50mM	2.44g
氯化钠	Sigma	150mM	8.78g
4M氢氧化钠	Sigma	pH 6.0	~35ml

[0077] 【100mM赖氨酸溶液】

[0078]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
赖氨酸	Sigma	100mM	18.27g
4M氢氧化钠	Sigma	pH 6.8	~25ml

[0079] 【饱和硫酸铵溶液】

试剂	厂商	终浓度	1000ml 试剂用量
硫酸铵	Sigma	4M	660.65g
加热至全部溶解			
冷却后过滤			

[0081] 【校准品缓冲液】

[0082]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
氯化钠	Sigma	75mM	4.39g
Tween 20	Sigma	0.02%	0.2ml
Triton X100	Sigma	0.03%	0.3ml
蔗糖	Sigma	1%	10g
酪蛋白	Sigma	0.15%	1.5g
牛血清白蛋白	元亨圣马	3%	30g
Proclin 300	Sigma	0.02%	0.2ml
4M氢氧化钠	Sigma	pH 6.8	~25ml

[0083] 【磁分离试剂缓冲液】

[0084]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
氯化钠	Sigma	75mM	4.39g
Tween 20	Sigma	0.02%	0.2ml
酪蛋白	Sigma	0.15%	1.5g
牛血清白蛋白	元亨圣马	0.5%	5g
Proclin 300	Sigma	0.02%	0.2ml
氢氧化钠	Sigma	pH 7.2	~25ml

[0085] 【酶反应物缓冲液】

[0086]

试剂	厂商	终浓度	1000ml试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
氯化钠	Sigma	75mM	4.39g
Tween 20	Sigma	0.02%	0.2ml
蔗糖	Sigma	1%	10g

酪蛋白	Sigma	0.15%	1.5g
牛血清白蛋白	元亨圣马	0.5%	5g
Proclin 300	Sigma	0.02%	0.2ml
4M氢氧化钠	Sigma	pH 6.8	~25ml

[0087] 【稳定增强剂】

[0088]

试剂	厂商	终浓度	1000ml 试剂用量
磷酸二氢钠	Sigma	50mM	6.0g
氯化钠	Sigma	75mM	4.39g
三乙醇胺	Sigma	2%	20ml
多组分免疫复合物	自产	6 μ g/ml	6mg
MAK33	Roche	100ug/ml	100mg
酪蛋白	Sigma	0.15%	1.5g
牛血清白蛋白	元亨圣马	0.5%	5g
Proclin 300	Sigma	0.02%	0.2ml
4M氢氧化钠	Sigma	pH 6.8	~25ml

[0089] 【化学发光底物增强缓冲液】

试剂	厂商	终浓度	1000ml 试剂用量
三乙醇胺	Sigma	2%	20ml
二乙醇胺	Sigma	0.75%	7.5ml
CTAB	Sigma	2%	20g
光泽精 (N, N-二甲二 叮呢硝酸盐)	Sigma	0.3%	3g
牛血清白蛋白	Sigma	0.15%	1.5g
Bronidox	Sigma	0.5%	5g
4M 盐酸	Sigma	pH9.5	~15ml

[0091] 【浓缩洗液】

[0092]

试剂	厂商	终浓度	1000ml 试剂用量
TRIS	Sigma	25mM	3.03g
NaCl	Sigma	900mM	52.65
Tween 20	Sigma	0.2%	2ml
Triton X100	Sigma	0.05%	0.5ml
pH		7.0-7.4	

[0093] 2、本实施例的人表皮生长因子受体Her-2/neu磁微粒化学发光检测试剂盒的主要试剂组分包括：

[0094] 1)用校准品缓冲液稀释的稳定化处理人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原的校准品(S0,S1,...,S5)。

[0095] 2)用校准品缓冲液稀释的稳定化处理人表皮生长因子受体Her-2/neu抗原的质控品(Q1,Q2)。质控品浓度范围每批标定。

[0096] 3)用磁分离缓冲液稀释的延臂偶联人表皮生长因子受体Her-2/neu捕获抗体的磁分离试剂,磁微粒浓度每次滴定,约为0.0015%。

[0097] 4)用酶反应物缓冲液稀释的碱性磷酸酶标记人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体的酶反应物,酶标抗体每次滴定,约为0.8 μ g/ml。

[0098] 5)含抗异嗜性抗体的多组分免疫复合物组分的稳定增强剂。

[0099] 6)浓缩洗液,15ml稀释至100ml使用。

[0100] 7)用化学发光增强缓冲液稀释的APS-5化学发光底物。

[0101] 3、本实施例的人表皮生长因子受体Her-2/neu磁微粒化学发光检测试剂盒的各试剂组分的制备过程为:

[0102] 1)校准品和质控品的制备

[0103] 一将重组人表皮生长因子受体Her-2/neu重组抗原溶解于PBS pH7.2缓冲液至0.5mg/ml,按不同浓度用多非离子表面活性剂组成的PBS蛋白缓冲体系稀释成不同浓度点,并定标。非离子表面活性剂组成的PBS蛋白缓冲体系组分为:

[0104]

试剂	厂商	终浓度
磷酸二氢钠	Sigma	50mM
氯化钠	Sigma	75mM
Tween 20	Sigma	0.02%
Triton X100	Sigma	0.03%
蔗糖	Sigma	1%
酪蛋白	Sigma	0.15%
牛血清白蛋白	元亨圣马	3%
Proclin 300	Sigma	0.02%
氢氧化钠	Sigma	pH 6.8

[0105] 一校准品和质控品的目标浓度为:

[0106]

试剂名称	目标浓度
标准品S0	0ng/ml
标准品S1	3.5ng/ml
标准品S2	10ng/ml
标准品S3	35ng/ml
标准品S4	100ng/ml
标准品S5	350ng/ml
质控品Q1	10ng/ml
质控品Q2	100ng/ml

[0107] 2)磁分离试剂的制备

[0108] 一取250 μ l 5%的磁微粒;

- [0109] 一用20mM MES pH6.0缓冲液洗涤数次；
- [0110] 一去上清后加入20mM MES pH6.0缓冲液400 μ l,80mg/ml的sulfo-NHS 50 μ l,25mg/ml EDC 50 μ l,反应30分钟；去上清；
- [0111] 一用20mM MES pH6.0缓冲液洗涤数次；
- [0112] 一加入2mg/ml人表皮生长因子受体Her-2/neu包被抗体500 μ l反应过夜,备用；
- [0113] 一加入含0.5%BSA,1%蔗糖,5%的聚乙二醇6000的PBS pH7.2缓冲液5毫升；将磁微粒浓缩液置于平皿中,封闭4小时；
- [0114] 一用20mM MES pH6.0缓冲液洗涤数次；
- [0115] 一用含0.15%酪蛋白,0.5%的牛血清白蛋白,0.2%Tween20,0.02%Proclin300的PBS pH7.2缓冲液稀释至15ml,使用时稀释至工作浓度。
- [0116] 一经过和不同浓度酶反应物做正交棋盘滴定,确定工作浓度。一般工作浓度约为0.0015%。
- [0117] 3)酶反应物的配制
- [0118] 一将碱性磷酸酶透析至PBS pH7.2缓冲液并浓缩至0.8mg/ml；
- [0119] 一将人表皮生长因子受体Her-2/neu示踪抗体透析至PBS pH6.8缓冲液并浓缩至1mg/ml；
- [0120] 一按摩尔比1:20的比例在碱性磷酸酶溶液中加入预先用二甲基亚砷溶解的SMCC溶液,反应5分钟后透析至PBS pH7.2缓冲液并计算浓度；
- [0121] 一按摩尔比1:20比例在示踪抗体溶液中加入预先用的用PBS pH6.8缓冲液溶解的2-IT溶液,反应15分钟后,透析至PBS pH7.2缓冲液；
- [0122] 一将活化的碱性磷酸酶和活化的抗体按质量比2:1的比例混合,反应过夜备用。
- [0123] 一经过和不同浓度磁分离试剂做正交棋盘滴定,确定工作浓度。一般工作浓度约为0.8ug/ml。
- [0124] 一将碱性磷酸酶标记的Her-2示踪抗体稀释至如下缓冲液至滴定完确定浓度：
- [0125]

试剂	厂商	终浓度
磷酸二氢钠	Sigma	50mM
氯化钠	Sigma	75mM
Tween 20	Sigma	0.02%
蔗糖	Sigma	1%
酪蛋白	Sigma	0.15%
牛血清白蛋白	元亨圣马	0.5%
Proclin 300	Sigma	0.02%
氢氧化钠	Sigma	pH 6.8

- [0126] 4)稳定增强剂的配制
- [0127] 一按如下方法制备多组分免疫复合物：
- [0128] 一将新生牛血清,小鼠血清,绵羊血清按1:2:0.5的体积比混合；
- [0129] 一加入终浓度为57%的饱和硫酸铵,4摄氏度过夜；
- [0130] 一次日将处理后的混合血清以10,000g冷冻离心,去上清,将沉淀溶于含0.5%牛

血清白蛋白的PBS pH7.2缓冲液中,测定浓度;

[0131] 一将上述溶液放置于温箱中,72℃放置1小时;

[0132] 一测定浓度,用PBS pH7.2缓冲液稀释至50mg/ml,1ml每瓶分装后冷冻干燥,制备得到多组分免疫复合物。

[0133] 一按如下配方配制稳定增强剂:

[0134]

试剂	厂商	终浓度
磷酸二氢钠	Sigma	50mM
氯化钠	Sigma	75mM
三乙醇胺	Sigma	2%
多组分免疫复合物	自产	6μg/ml
MAK33	Roche	100μg/ml
酪蛋白	Sigma	0.15%
牛血清白蛋白	元亨圣马	0.5%
Proclin 300	Sigma	0.02%
氢氧化钠	Sigma	pH 6.8

[0135] 5)化学发光底物的配制

[0136] 一按1:10的比例将APS-5化学发光底物稀释至下列组分的缓冲液中:

[0137]

试剂	厂商	终浓度
三乙醇胺	Sigma	2%
二乙醇胺	Sigma	0.75%
CTAB	Sigma	2%
光泽精	Sigma	0.3%
牛血清白蛋白	Sigma	0.15%
Bronidox	Sigma	0.5%
盐酸	Sigma	pH9.5

[0138] 上述校准品、质控品、磁分离试剂、酶反应物、稳定增强剂、化学发光底物各试剂组分配制好后,独立地置于一个包装容器内(该包装容器内还可进一步包括独立包装的浓缩洗液),以组成本实施例的人表皮生长因子受体Her-2/neu磁微粒化学发光检测试剂盒套组。

[0139] 4、利用本实施例的磁微粒化学发光检测试剂盒检测人表皮生长因子受体Her-2/neu时的具体操作方法为:

[0140] 一每次测定前准备下列试管,做好标记并放置在试管架上;

[0141] 一各浓度校准品用试管各2支;

[0142] 一待测样本(非抗凝型采血管采取全血,离心取上部血清。避免溶血)、质控品用试管各1支;

[0143] 一测定前将各试剂放至室温(18~25℃),加样前充分混匀;

[0144] 一设定好37℃水浴锅;

- [0145] 一准备好化学发光类测定仪(请参阅仪器使用说明书);
- [0146] 一加30 μ l Her-2/neu标准品、质控品、待测标本至对应试管底部。
- [0147] 一加45 μ l酶反应物至每一试管中。
- [0148] 一加45 μ l稳定增强剂至每一试管中。
- [0149] 一加30 μ l分离试剂至每一试管中。
- [0150] 一用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架30s后,置37 $^{\circ}$ C水浴15分钟。
- [0151] 一试管连架放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀2分钟。缓慢的倒转分离器倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴。
- [0152] 一加200 μ l稀释后的清洗液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀30s。加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出。混匀要彻底。
- [0153] 一重复上述洗涤步骤
- [0154] 一加200 μ l底物溶液至试管中混匀3秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测。结果计算参阅仪器的相关说明。
- [0155] 一如使用全自动检测仪器,则上述手动操作步骤将由仪器自动操作所代替,请严格按照仪器使用说明书进行检测。
- [0156] 一临床的临界值为15ng/ml。
- [0157] 5、本实施例试剂盒的分析性能
- [0158] 5.1灵敏度和重复性

[0159]

标记	计算浓度	理论浓度	偏差(%)	RLU	标准偏差	变异系数(%)	稀释倍数
S0	0	0		3683	0	0	
S1	3.49	3.5	-0.3	16493	0	0	
S2	9.59	10	-4.1	43781	0	0	
S3	36.96	35	5.6	160992	0	0	
S4	103.27	100	3.3	433984	0	0	
S5	335.91	350	-4	1354826	0	0	
QC1	9.22	8.00 - 12.00		42156	0	0	
QC2	104.69	80.00 - 120.00		439754	0	0	
U1	< 0.50			3143	0	0	1
U1	0.75			3751	0	0	1
U1	0.88			4363	0	0	1
U1	0.82			4098	0	0	1
U1	< 0.50			3238	0	0	1
U1	0.87			4302	0	0	1
U1	0.77			3852	0	0	1
U1	0.84			4176	0	0	1
U1	0.87			4300	0	0	1
U1	< 0.50			3461	0	0	1
U1	< 0.50			3423	0	0	1
U1	< 0.50			3192	0	0	1
U1	0.77			3840	0	0	1
U1	< 0.50			3313	0	0	1
U1	0.83			4128	0	0	1
U1	< 0.50			3298	0	0	1
U1	< 0.50			3206	0	0	1
U1	0.82			4087	0	0	1
U1	0.75			3741	0	0	1
U1	0.79			3920	0	0	1
QC1	10.36			47168	0	0	1
QC1	8.75			40058	0	0	1
QC1	9.59			43787	0	0	1
QC1	8.78			40201	0	0	1
QC1	9.1			41634	0	0	1
QC1	10.3			46910	0	0	1
QC1	9.87			45020	0	0	1
QC1	9.54			43573	0	0	1
QC1	8.74			40034	0	0	1
QC1	10.11			46082	0	0	1
QC2	106.68			447839	0	0	1
QC2	100.32			422009	0	0	1
QC2	96.92			408216	0	0	1
QC2	102.88			432401	0	0	1
QC2	118.29			494764	0	0	1
QC2	101.68			427528	0	0	1
QC2	117.44			491348	0	0	1
QC2	100.2			421558	0	0	1
QC2	105.09			441368	0	0	1
QC2	105.25			442011	0	0	1
Blank				515	0	0	
SEN	0.2316	CV1	6.75%	CV2	6.76%		

[0160] U1为零值标准品。

[0161] 以上结果计算灵敏度为:0.2316ng/ml,低值重复性为6.75%,高值重复性为6.76%。

[0162] 5.2回收率和线性

标记	计算浓度	理论浓度	偏差(%)	RLU	标准偏差	变异系数(%)	稀释倍数
S0	0	0		3944	0	0	
S1	3.5	3.5	0	16702	0	0	
S2	9.46	10	-5.4	44009	0	0	
S3	36.48	35	4.2	164134	0	0	
S4	107.92	100	7.9	472847	0	0	
S5	328.46	350	-6.2	1400426	0	0	
QC1	9.2	8.00 - 12.00		42834	0	0	
QC2	101.41	80.00 - 120.00		445010	0	0	
U1	324.59			1384327	0	0	1
U2	343.76			1464037	0	0	1
U3	336.71			1434717	0	0	1
U4	161.57			700969	0	0	1
U5	163.99			711214	0	0	1
U6	167.61			726518	0	0	1
U7	72.49			320715	0	0	1
U8	71.47			316323	0	0	1
U9	77.89			344004	0	0	1
[0163] U10	29.21			132143	0	0	1
U11	28.17			127572	0	0	1
U12	27.31			123774	0	0	1
U13	13.78			63522	0	0	1
U14	14.2			65383	0	0	1
U15	13.12			60513	0	0	1
U16	1.15			5626	0	0	1
U17	1.16			5678	0	0	1
U18	1.25			6127	0	0	1
U19	3.42			16299	0	0	1
U20	3.58			17044	0	0	1
U21	3.47			16541	0	0	1
U22	96.83			425396	0	0	1
U23	98.52			432640	0	0	1
U24	99.36			436218	0	0	1
U25	11.9			55026	0	0	1
U26	12.2			56372	0	0	1
U27	11.72			54209	0	0	1
Blank				511	0	0	

[0164] 以上结果计算线性为0.9996,回收率为92.10%。

[0165] 5.3交叉和干扰

[0166] 分别将AFP、CEA、CA125添加至零值标准品中至500ng/ml、200ng/ml、400U/ml。检测结果如下表。检测结果均小于0.5ng/ml。

[0167]	潜在交叉反应物	AFP 500 ng/ml	CEA 200ng/ml	CA125 400U/ml
	测值	≤0.5ng/ml	≤0.5ng/ml	≤0.5ng/ml

[0168] 分别将环磷酰胺、顺铂、长春新碱、博来霉素添加至零值标准品中至250mg/l、60mg/l、5mg/l、10mg/l,检测结果如下表。检测结果均为无交叉。

[0169]

药物名称	环磷酰胺 250mg/l	顺铂 60mg/l	长春新碱 5mg/l	博来霉素 10mg/l
干扰有无	无交叉	无交叉	无交叉	无交叉

[0170] 6、本实施例试剂盒的临床性能

[0171] 按《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》的要求进行临床验证。评价该试剂盒的临床应用性、有效性及适用性。

[0172] 在本次临床研究中,共收集血清1050份,使用本实施例的原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)和Siemens Healthcare Diagnostics Inc.生产的HER-2/neu蛋白测定试剂盒(化学发光法),分别测定血清样本中原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)的含量,通过比较两种检测系统的测定结果,验证北京大成生物工程有限公司所生产的原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)与Siemens Healthcare Diagnostics Inc.生产的HER-2/neu蛋白测定试剂盒(化学发光法)的等效性。

[0173] (1)一般分析:

1050 例样本检测结果:			
评价试剂	对比试剂		合计
	阳性 (+)	阴性 (-)	
阳性 (+)	432	0	432
阴性 (-)	0	618	618
合计	432	618	1050

[0175] ①阳性符合率: $A/(A+C) \times 100\% = 100\%$

[0176] 阴性符合率: $D/(B+D) \times 100\% = 100\%$

[0177] 总体符合率: $(A+D)/(A+B+C+D) \times 100\% = 100\%$

[0178] 95%可信区间: $95\%CI: p \pm 1.96 \times [p(1-p)/n]^{1/2} = [99.93\%, 1\%]$

[0179] ②一致性系数Kappa值(K):

[0180] 对称度量

		值	渐进标准误差 ^a	近似值 T ^b	近似值 Sig.	
	一致性度量	Kappa	1.000	.000	32.404	.000
[0181]	有效案例中的 N		1050			
	a. 不假定零假设。					
	b. 使用渐进标准误差假定零假设。					

[0182] Kappa=1(K>0.80)

[0183] 评价试剂和对比试剂检测结果完全一致。(K=1>0.80)

[0184] 评价试剂与对比试剂的检测结果不存在统计学意义上的差异,一致性分析Kappa=1,两种试剂的检测结果具有高度一致性。可以认为本发明实施例的原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)和Siemens Healthcare Diagnostics Inc.生产的HER-2/neu蛋白测定试剂盒(化学发光法)检测结果一致性好(K=1>0.80)。

[0185] 数据显示本发明生产的原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)在临床检测上有效性、适应性很好。

[0186] (2)回归分析、相关性分析:

[0187] 两种产品线性回归分析结果参见图1。

[0188] 结果显示:试验试剂盒剂量-反应曲线的回归方程 $y=0.9965x+0.114$ 、线性 $r^2=0.9916$ ($r^2>0.95$)。经统计学分析,两种试剂盒相关性良好。

[0189] 目测血清分布均匀,相关系数 $r^2>0.95$,血清满足试验要求。

[0190] (3)、偏倚数据分析

[0191] 评价试剂-对照试剂散点分析结果参见图2A。

[0192] 评价试剂测值偏倚-对照试剂散点分析结果参见图2B。

[0193] 对比试剂-评价试剂血清测值偏倚数据分析数据如下表:

X _(c) (15ng/ml)偏倚		95%Bc	1/2 CLIA88	SD
B	Bc			
-0.12	0.061	[-0.46,0.58]	[-1.5,1.5]	8.37

[0195] 注:X(c)为医学决定水平:

[0196] B为适当浓度范围内的平均偏倚;

[0197] Bc为适当浓度范围内的估计的预期(平均)偏倚;

[0198] 95%Bc为Bc95%置信区间的上下限;

[0199] SD为两系统测定值差值的标准差。

[0200] 从以上表格分析可以得知:评价试剂与对比试剂的偏倚值的中心线与 $y=0$ 十分接近(B=-0.12);95%Bc的数值区间在1/2CLIA88区间之内,评价试剂与对比试剂预期平均偏倚Bc、方差SD都在可接受的范围之内。

[0201] (4)统计分析

[0202] 采用spss软件对试验系统测试值与对比系统测试值做配对t检验,结果记录于下表:

[0203]

	成对差分					t	df	Sig. (双侧)
	均值	标准差	均值的 标准误	差分的 95% 置信区间				
				下限	上限			
评价试剂-对比试剂	-.12228	8.37234	.25838	-.62927	.38472	-.473	1049	.636

[0204] $t=0.636(t>0.05)$ 说明两系统无统计学差异。

[0205] 7、关于多组分免疫复合物和MAK33联用的对比。

[0206] 下表列出了稳定增强剂中不添加多组分免疫复合物也不添加MAK33、单独添加多组分免疫复合物、单独添加MAK33与本实施例中同时添加多组分免疫复合物和MAK33的检测结果对比。其中，HAMA1~HAMA5是购自serecare的5支存在异常HAMA反应的人血清标本。HAMA5后三组数据都测出了阴性值，其数值大小主要由于实验变异带来。

[0207]

	不添加任何组分	单独添加多组分免疫复合物 (6 μ g/ml)	单独添加 MAK33 (100 μ g/ml)	多组分免疫复合物、MAK33 联用
HAMA 1	230.56	19.83	12.16	1.57
HAMA 2	37.85	0.58	9.48	1.43
HAMA 3	110.38	11.34	8.19	3.83
HAMA 4	17.23	0.97	2.75	0.29
HAMA 5	86.36	2.89	4.89	3.64

[0208] 可以看出，本发明中将多组分免疫复合物和MAK33联用，具有协同作用。

[0209] 结论：

[0210] 在本次临床试验中要验证本实施例所生产的原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)与Siemens Healthcare Diagnostics Inc.生产的HER-2/neu蛋白测定试剂盒(化学发光法)的等效性。试验结果显示本实施例所生产的原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER-2)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)与Siemens Healthcare Diagnostics Inc.生产的HER-2/neu蛋白测定试剂盒(化学发光法)的检测结果不存在统计学意义上的差异，并且具有高度一致性，即两试剂的临床应用性能等效。

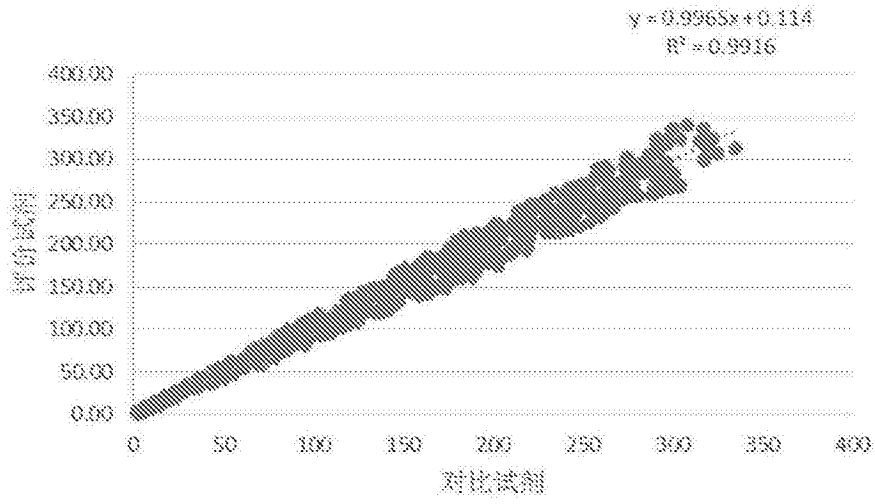


图1

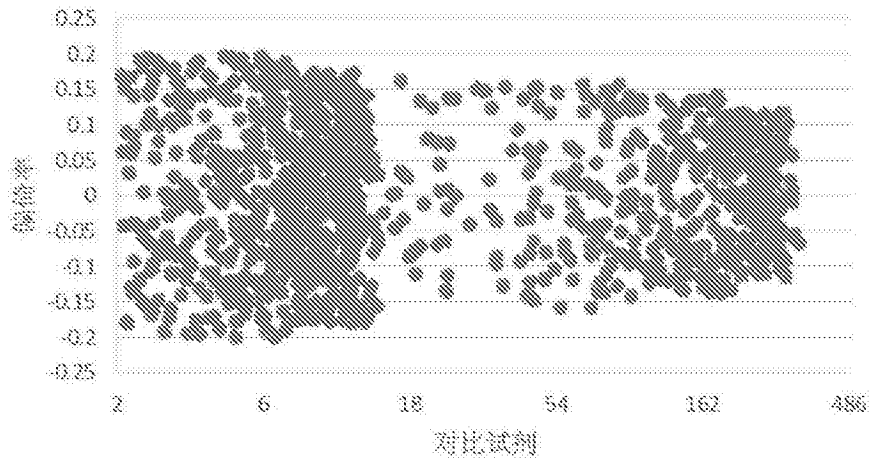


图2A

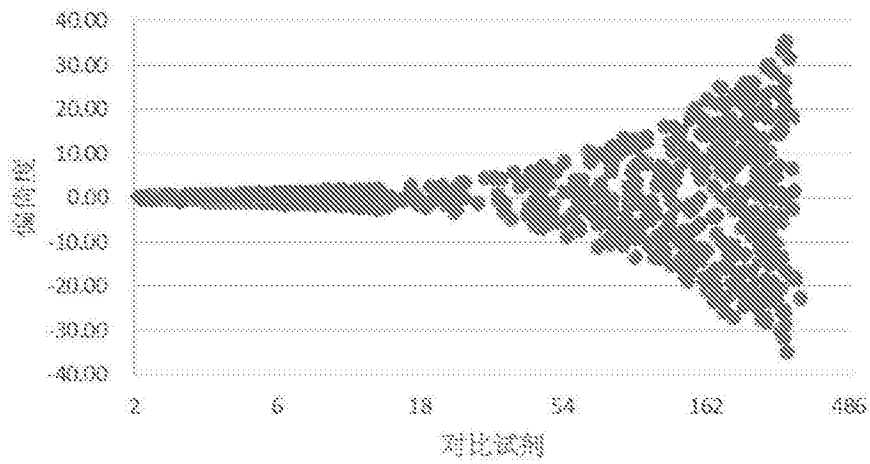


图2B

专利名称(译)	人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN106932583A	公开(公告)日	2017-07-07
申请号	CN201511008970.7	申请日	2015-12-29
[标]发明人	刘劲		
发明人	刘劲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/553 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/553 G01N33/577		
代理人(译)	韩蕾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人表皮生长因子受体Her-2/neu定量检测试剂盒及其制备方法与应用。本发明的试剂盒是基于磁微粒化学发光法制备而成，其中采用重组的Her-2/neu抗原作为标准品抗原，并稀释至含非离子表面活性剂的蛋白缓冲组分中，增加其分散性，防止自身凝集，保持活性；另将Her-2/neu蛋白抗体和磁微粒偶联，采用优化的固定化方法和封闭方法，使磁分离组分稳定性良好；此外采用多组分免疫复合物和罗氏主动型干扰去除蛋白MAK33联用，可解决肿瘤标志物夹心法检测中异嗜性抗体干扰的问题，提高了终产品的特异性。本发明的试剂盒性能优异，成本较低，同时有效期长。

试剂	厂商	终浓度	1000ml 试剂用量
硫酸胺	Sigma	4M	660.65g
加热至全部溶解			
冷却后过滤			