



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103575902 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201210276519. 3

(22) 申请日 2012. 08. 03

(73) 专利权人 河南生生医疗器械有限公司

地址 450000 河南省郑州市郑东新区金水东路南、东风东路东 1 幢东 1 单元 8 层 06 号

(72) 发明人 王嘎 程自卿

(74) 专利代理机构 北京东方汇众知识产权代理
事务所(普通合伙) 11296

代理人 刘淑芬

(56) 对比文件

CN 101410715 A, 2009. 04. 15, 全文.

CN 101460630 A, 2009. 06. 17, 全文.

CN 101473041 A, 2009. 07. 01, 全文.

WO 2010/061393 A1, 2010. 06. 03, 全文.

EP 2322933 A1, 2011. 05. 18, 全文.

姚永良等. 血清 HE4、TPS 和 CA125 联检
在卵巢癌诊断中的应用价值. 《放射免疫学杂
志》. 2010, 第 23 卷(第 4 期), 第 409-411 页.

审查员 陈伟潘

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

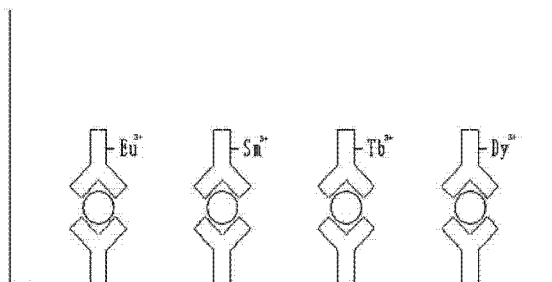
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试
剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物和医学检测技术领域,具体涉及一种在同一反应体系内同时综合检测卵巢癌肿瘤标志物四项指标 HE4、CA125、CEA、TPS 的时间分辨荧光免疫检测试剂盒,同时还涉及该试剂盒在综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 中的应用。该试剂盒包括:分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板;用 Sm^{3+} 标记的抗 HE4、 Eu^{3+} 标记的抗 CA125、 Tb^{3+} 标记的抗 CEA、 Dy^{3+} 标记的抗 TPS 第二株单克隆抗体混合抗体;分析缓冲液;共用荧光增强剂;洗涤液;质控品。本发明提供的试剂盒可用于卵巢癌的临床辅助诊断、疗效观察及预后判断,对卵巢癌肿瘤的治疗和预防具有重要意义,同时检测四个肿瘤标志物,简化了检测步骤,提高了检测数据综合分析的特异性和灵敏性。



1. 一种时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,把四种卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 综合在同一微孔的同一反应体系内,采用时间分辨荧光免疫法检测,其特征在于:该试剂盒包括:分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板;用 Sm^{3+} 标记的抗 HE4、 Eu^{3+} 标记的抗 CA125、 Tb^{3+} 标记的抗 CEA、 Dy^{3+} 标记的抗 TPS 第二株单克隆抗体混合抗体;分析缓冲液;共用荧光增强剂;洗涤液;质控品。

2. 根据权利要求 1 所述的时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,其特征在于:所述的第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板的制备方法为:把分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 第一株单克隆抗体混合抗体用包被缓冲液稀释,制得抗体包被液,然后向微孔板的每个孔中分别加入 $50\ \mu\text{L}$ 的所述抗体包被液,于 37°C 包被 2 小时,然后用生理盐水冲洗微孔板三次,然后再向微孔板的每个孔中分别加入 $100\ \mu\text{L}$ 的封板液,于室温封闭 2 小时,然后用生理盐水冲洗微孔板两次,冷冻干燥,制得混合抗体包被的微孔板。

3. 根据权利要求 2 所述的时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,其特征在于:所述抗体包被液中,分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 的第一株单克隆抗体的浓度均为 $0.01 \sim 0.016\text{g/L}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,其特征在于:所述共用荧光增强剂的制备方法为:解离部分:将 $70 \sim 200\ \mu\text{mol}$ 的 PTA、 $2 \sim 7\ \mu\text{mol}$ 的氧化钼、 0.6g 的 Triton X-100 和 300ml 的乙醇混合,用水定容至 1 升,用乙酸调 pH 值至 3.5,制得解离部分;增强部分:将 $0.1 \sim 0.4\text{mmol}$ 的邻菲罗啉和 0.2mol 的 Tris 混合,用水定容至 1L,制得增强部分。

5. 根据权利要求 1 所述的时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,其特征在于:所述洗涤液的制备方法为:在浓度为 0.01mol/L 、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入吐温-20,混匀,制得吐温-20 质量百分比浓度为 0.05% 的 PBS 溶液,然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理,制得洗涤液。

6. 根据权利要求 1 所述的时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,其特征在于:所述质控品为 HE4、CA125、CEA、TPS 标准品的混合物。

一种时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物和医学检测技术领域,具体涉及一种在同一反应体系内同时综合检测卵巢癌肿瘤标志物四项指标 HE4、CA125、CEA、TPS 的时间分辨荧光免疫检测试剂盒,同时还涉及该试剂盒在综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 中的应用。

背景技术

[0002] 卵巢癌发病隐匿,预后差,被形容为最为致命的癌症之一。卵巢癌的早期症状很不明显,初期症状是腹部疼痛或膨胀、肠胃消化不良,不易引起足够重视,一般卵巢癌患者发现时都到了晚期,因此治愈率极低。如果能在早期发现卵巢癌就可大大提高卵巢癌的治愈率,为了达到这一目的,人们进行了大量的研究工作。

[0003] CA125 是 1983 年由 Bast 等人从上皮性卵巢癌抗原检测出可被单克隆抗体 OC125 结合的一种糖蛋白,存在于上皮性卵巢癌组织和病人的血清中,主要用于辅助诊断恶性浆液性卵巢癌,上皮性卵巢癌,同时也是卵巢癌术后、化疗后疗效观察的指标。CA125 是一种诊断卵巢癌和监测其复发最敏感的指标之一,但 CA125 在患者发病早期往往检测不到,其临床应用有一定的局限性。鉴于此,国内外的专家学者都致力于寻找更为有效的标志物,以便能在早期、更加准确的确诊卵巢癌。

[0004] 目前,国内外很多的专家、学者纷纷以 HE4、CA125、CEA、TPS 四种指标综合确诊卵巢癌,四种综合的分析在特异性和敏感度上明显高于单一指标。常规实验室或医疗单位用于检测该四项指标通常采用单一试剂盒,即一个试剂盒针对一种肿瘤标记物的检测,此种方式存在的缺点是:1、检测步骤繁多,费时费力;2、四种标记物分别采用 4 种试剂盒检测,由于不同生产厂家的试剂盒存在差异,且同一厂家的不同试剂盒由于检测的标记物不同可能会存在控制条件、参数的差异而导致检测结果存在误差,此种误差在综合分析四种标记物的特异性和敏感性上会产生较大的影响,可能导致判断结果相差甚远。因此,开发一种能够在相对同一的检测条件下同时能够检测该四种肿瘤标记物的试剂盒,就能降低由于人为原因造成的检测误差,大大提高综合分析检测结果的特异性和敏感性,对下一步的研究或判断做出准确的结论提供更充分的依据。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有技术中存在的问题,提供一种在同一反应体系内同时综合检测卵巢癌肿瘤标志物四项指标 HE4、CA125、CEA、TPS 的时间分辨荧光免疫检测试剂盒。

[0006] 本发明的目的还在于提供一种该试剂盒的应用。

[0007] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:一种时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒,把四种卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 综合在同一微孔的同一反应体系内,采用时间分辨荧光免疫法检测,该试剂盒包括:分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板;用 Sm^{3+} 标记的抗 HE4、 Eu^{3+} 标记的抗 CA125、 Tb^{3+} 标

记的抗 CEA、Dy³⁺ 标记的抗 TPS 第二株单克隆抗体混合抗体 ; 分析缓冲液 ; 共用荧光增强剂 ; 洗涤液 ; 质控品。

[0008] 其中, 所述的第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板的制备方法为 : 把分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 的第一株单克隆抗体组成的混合抗体用包被缓冲液稀释, 制得抗体包被液, 然后向微孔板的每个孔中分别加入 50 μ l 的抗体包被液, 于 37℃ 包被 2 小时, 然后用生理盐水冲洗微孔板三次, 然后再向微孔板的每个孔中分别加入 100 μ l 的封板液, 于室温封闭 2 小时, 然后用生理盐水冲洗微孔板两次, 冷冻干燥, 制得混合抗体包被的微孔板。该微孔板密封于铝箔袋中, 4℃ 保存备用。

[0009] 所述抗体包被液中, 分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 的第一株单克隆抗体的浓度均为 0.01 ~ 0.016g/L。

[0010] 进一步的, 所述包被缓冲液的制备方法为 : 取浓度为 0.05mol/L、pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液, 然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN₃ 溶液防腐处理, 制得包被缓冲液。

[0011] 所述封板液的制备方法为 : 向浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入 BSA, 配制成 BSA 质量百分比浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液, 然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN₃ 溶液防腐处理, 制得封板液。

[0012] 用 Sm³⁺ 标记的抗 HE4、Eu³⁺ 标记的抗 CA125、Tb³⁺ 标记的抗 CEA、Dy³⁺ 标记的抗 TPS 第二株单克隆抗体混合抗体的制备方法, 其中每种抗体的标记流程步骤相同, 只是分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 的抗体分别对应的稀土离子螯合物标记物为 N1- 对异硫氰酸苄基 -DTTA-Sm、N1- 对异硫氰酸苄基 -DTTA-Eu、N1- 对异硫氰酸苄基 -DTTA-Tb、N1- 对异硫氰酸苄基 -DTTA-Dy, 下面把各自的抗体统称为标记抗体, 把各自对应的标记物统称为稀土离子螯合物, 具体制备方法为 :

[0013] (1) 抗体标记前处理

[0014] 用截留分子量为 50kDa 的离心柱对抗体进行标记前纯化处理, 具体步骤如下 : 悬空加入 1mg 抗体于 50kDa 的离心柱中, 9000rpm 离心 8 分钟, 弃掉滤液 ; 往离心柱中加入 200 μ l 标记缓冲液, 9000rpm 离心 8 分钟, 弃掉滤液, 该步骤重复四次, 最后一次将离心管取出, 弃掉滤液 ; 往离心柱中加入 50 μ l 标记缓冲液, 让其静置 1 分钟, 然后将离心柱的滤膜反转装入离心管中, 8000rpm 离心 6 分钟, 收集滤液, 即得到待标记的抗体 ;

[0015] (2) 抗体标记处理

[0016] 称取稀土离子螯合物 0.1 ~ 0.4mg, 加入 50 ~ 100 μ l 超纯水进行溶解 ; 将螯合试剂加入到盛有待标记抗体的 EP 管中, 混合均匀 ; 置于摇床上 4℃ 过夜, 制得标记好的抗体 ;

[0017] 用三倍柱体积的 PBS 缓冲液作为柱平衡液平衡 Superdex 200 1X 30cm 柱, 用移液器吸取已标记好的抗体缓慢上样, 用洗脱液进行洗脱, 流速控制在 1ml/min, 蛋白检测仪检测到蛋白峰收集样品, 将收集的产物经过 0.22 微米滤膜除菌 ; 用比活度测定方法对标记抗体进行标记率的计算与分析。长期储存标记抗体可以将高纯度的 BSA 加入到标记抗体溶液中, BSA 的终浓度为 0.1%, 可置于 4℃ 或 -20℃ 进行保存。

[0018] 所述共用荧光增强剂的制备方法为 : 解离部分 : 将 70 ~ 200 μ mol 的 PTA、2 ~ 7 μ mol 的氧化钬、0.6g 的 Triton X-100 和 300ml 的乙醇混合, 用水定容至 1 升, 用乙酸调 pH 值至 3.5, 制得解离部分 ; 增强部分 : 将 0.1 ~ 0.4mmol 的邻菲罗啉和 0.2mol 的 Tris 混合, 用水定容至 1 升, 制得增强部分。

[0019] 所述洗涤液的制备方法为：在浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入吐温 -20，混匀，制得吐温 -20 质量百分比浓度为 0.05% 的 PBS 溶液，然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理，制得洗涤液。

[0020] 所述质控品为 HE4、CA125、CEA、TPS 标准品的混合物。

[0021] 一种所述的试剂盒在综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 中的应用。

[0022] 试剂盒在综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 中的应用，具体包括以下步骤：

[0023] (1) 用分析缓冲液稀释质控品，制成具有系列浓度梯度包含有 HE4、CA125、CEA、TPS 四种标准品的混合溶液；

[0024] (2) 将待测样品与步骤(1)制备的四种标准品混合溶液分别加入抗 HE4、CA125、CEA、TPS 第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板的不同孔中，然后再向孔中加入能分别与 HE4、CA125、CEA、TPS 结合的标记有稀土离子螯合物的第二株单克隆抗体混合抗体，之后加入共用荧光增强剂，进行时间分辨荧光免疫检测，得到发光值；

[0025] (3) 根据测定的具有系列浓度梯度的包含 HE4、CA125、CEA、TPS 四种标准品的混合溶液的发光值做标准曲线；

[0026] (4) 以测定的待测样品中的 HE4、CA125、CEA、TPS 发光值和标准品中 HE4、CA125、CEA、TPS 各自的标准曲线的发光值做比较，得出待测样品中 HE4、CA125、CEA、TPS 各自的含量。

[0027] 其中，所述待测样品为人体血清。

[0028] 本发明提供的试剂盒，采用时间分辨荧光免疫检测方法，实现同时综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 的目的。时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 是一种以稀土离子为标记物，根据稀土离子螯合物的发光特点，用时间分辨技术测定特异性荧光的技术方法。TRFIA 利用稀土离子的激发光和发射光的波长不同，同时发射光具有长的衰减时间，这样可以有效的排除非特异性荧光的干扰，具有线性范围宽、灵敏度高和稳定性好等优点，另外，可以利用不同的稀土离子的不同的发射光波长和不同的衰减时间，实现同一反应体系内同时检测多个标志物，这样和单个指标分开检测相比可以节约时间、人员、试剂等，这些特点正好适合本发明的同时在同一反应体系内检测多指标。

[0029] 本发明提供的卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 时间分辨荧光免疫检测试剂盒，具有非常好的线性范围，检测 HE4 的线性范围为 35pmol/L ~ 1000pmol/L，检测限为 25pmol/L；检测 CA125 的线性范围为 20U/ml ~ 560U/ml，检测限为 6U/ml；检测 CEA 的线性范围为 2ng/ml ~ 500ng/ml，检测限为 0.5ng/ml；检测 TPS 的线性范围为 45U/L ~ 520U/L，检测限为 15U/L。各检测指标的正常参考值分别为：HE4 为 0 ~ 120pmol/L；CA125 为 0 ~ 35U/ml；CEA 为 0 ~ 6.5ng/ml；TPS 为 0 ~ 80U/L。本发明提供的卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 时间分辨荧光免疫检测试剂盒可用于卵巢癌的临床辅助诊断、疗效观察及预后判断，对卵巢癌肿瘤的治疗和预防具有重要意义。

[0030] 采用本发明提供的试剂盒可实现在同一反应体系内同时综合检测卵巢癌肿瘤标志物四项指标 HE4、CA125、CEA、TPS，检测操作简单，步骤少，所需时间短，方便快捷；检测结果准确，避免了现有的采用四种单项试剂盒分别检测四项指标 HE4、CA125、CEA、TPS 再进行

综合判断而引起的判断误差,大大提高了检测结果的特异性和敏感性,对下一步的研究或判断做出准确的结论提供了可靠依据。

附图说明

[0031] 图1为本发明实施例1提供的试剂盒同一微孔内同一反应体系反应原理示意图;

[0032] 图2为本发明实施例1提供的试剂盒与CanAg公司的试剂盒测试HE4相关回归分析图($r=0.978$, $p < 0.05$);

[0033] 图3为本发明实施例1提供的试剂盒与罗氏公司的试剂盒测试CA125相关回归分析图($r=0.985$, $p < 0.05$);

[0034] 图4为本发明实施例1提供的试剂盒与Abbott公司的试剂盒测试CEA相关回归分析图($r=0.948$, $p < 0.05$);

[0035] 图5为本发明实施例1提供的试剂盒与ID BiotechAB公司的试剂盒测试TPS相关回归分析图($r=0.969$, $p < 0.05$)。

具体实施方式

[0036] 下面结合附图和具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0037] 实施例1

[0038] 本实施例提供的试剂盒,包括:抗HE4的抗体9F3、抗CA125的抗体M32112M、抗CEA的抗体MAM02-008、抗TPS的抗体3A6四种单克隆抗体组成的混合抗体包被的微孔板;用 Sm^{3+} 标记的10E1抗体(抗HE4的抗体)、用 Eu^{3+} 标记的M86306M抗体(抗CA125的抗体)、用 Tb^{3+} 标记的MAM02-881抗体(抗CEA的抗体)、用 Dy^{3+} 标记的4B9抗体(抗TPS的抗体)四种单克隆抗体组成的混合抗体;分析缓冲液;共用荧光增强剂;洗涤液;HE4、CA125、CEA、TPS四种标准品混合组成的质控品。

[0039] 所述试剂盒中:抗HE4的单克隆抗体9F3、10E1抗体和抗TPS的单克隆抗体3A6、4B9抗体为发明人自制;抗CA125的单克隆抗体M32112M、M86306M抗体和抗CEA的单克隆抗体MAM02-008、MAM02-881抗体购自Meridian公司。

[0040] 包被缓冲液的制备方法为:取浓度为 0.05mol/L 、 pH 值为9.6的碳酸盐缓冲液,然后用质量百分比浓度为0.2%的 NaN_3 溶液防腐处理,制得包被缓冲液。

[0041] 封板液的制备方法为:向浓度为 0.01mol/L 、 pH 值为7.4的PBS缓冲液中加入BSA,配制成BSA质量百分比浓度为1%的BSA的PBS缓冲液,然后用质量百分比浓度为0.2%的 NaN_3 溶液防腐处理,制得封板液。

[0042] 9F3、M32112M、MAM02-008、3A6混合抗体包被的微孔板的制备方法为:把混合抗体用包被缓冲液稀释,制得混合抗体包被液,混合抗体包被液中,分别抗HE4、CA125、CEA、TPS的第一株单克隆抗体的浓度均为 $0.01 \sim 0.016\text{g/L}$,然后向微孔板的每个孔中分别加入 $50\mu\text{l}$ 的混合抗体包被液,使每孔中均含有 $0.5 \sim 0.8\mu\text{g}$ 的9F3、M32112M、MAM02-008、3A6抗体,即每孔中均含有 $0.5 \sim 0.8\mu\text{g}$ 的9F3抗体、 $0.5 \sim 0.8\mu\text{g}$ 的M32112M抗体、 $0.5 \sim 0.8\mu\text{g}$ 的MAM02-008抗体、 $0.5 \sim 0.8\mu\text{g}$ 的3A6抗体,于 37°C 包被2小时,然后用生理盐水冲洗微孔板三次,然后再向微孔板的每个孔中分别加入 $100\mu\text{l}$ 的封板液,于室温封闭2小时,然后用生理盐水冲洗微孔板两次,冷冻干燥,制得混合抗体包被的微孔板,密封于铝箔

袋中,4℃保存备用。

[0043] Sm^{3+} 标记 10E1、 Eu^{3+} 标记 M86306M、 Tb^{3+} 标记 MAM02-881、 Dy^{3+} 标记 4B9 的制备方法为:每种抗体的标记流程步骤相同,只是分别抗 HE4、CA125、CEA、TPS 的抗体分别对应的稀土离子螯合物标记物为 N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Sm、N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Eu、N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Tb、N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Dy。

[0044] 以 N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Sm 标记 HE4 的抗体 10E1 为例,标记的具体制备方法和步骤为:

[0045] (1) 标记前应用截留分子量为 50kDa 的离心柱对 10E1 进行标记前纯化处理,具体步骤如下:悬空加入 1mg 10E1 抗体于 50kDa 的离心柱中,9000rpm 离心 8 分钟,弃掉滤液;往离心柱中加入 200 μl 标记缓冲液,9000rpm 离心 8 分钟,弃掉滤液,该步骤重复四次,最后一次将离心管取出,弃掉滤液;往离心柱中加入 50 μl 标记缓冲液,让其静置 1 分钟,然后将离心柱的滤膜反转装入离心管中,8000rpm 离心 6 分钟,收集滤液,即得到待标记的抗体 10E1;其中,标记缓冲液为 50mmol/L、pH 值为 9.0 的碳酸盐缓冲液;

[0046] (2) 称取稀土离子螯合物标记物 N1-对异硫氰酸苄基-DTTA-Sm 0.2mg,加入 80 μl 超纯水进行溶解,制成螯合试剂;将螯合试剂加入到盛有待标记抗体 10E1 的 EP 管中,混合均匀;置于摇床上 4℃ 过夜,制得标记好的抗体 10E1,即用 Sm^{3+} 标记的 10E1 抗体;

[0047] 用三倍柱体积的 PBS 缓冲液作为柱平衡液平衡 Superdex 200 1X 30cm 柱,用移液器吸取用 Sm^{3+} 标记的 10E1 抗体缓慢上样,用洗脱液进行洗脱,流速控制在 1ml/min,蛋白检测仪检测到蛋白峰收集样品,将收集的产物经过 0.22 微米滤膜除菌;用比活度测定方法对标记抗体进行标记率的计算与分析。长期储存标记抗体可以将高纯度的 BSA 加入到标记抗体溶液中,BSA 的终浓度为 0.1%,可置于 4℃ 或 -20℃ 进行保存。

[0048] 分析缓冲液的制备方法为:向每升浓度为 0.05mol/L、pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 9g NaCl、0.5g NaN_3 、10g BSA、0.1ml 吐温 -40、5g 聚乙二醇,混合均匀,即制得分析缓冲液。

[0049] 共用荧光增强剂的制备方法为:解离部分:将 70 ~ 200 μmol 的 PTA、2 ~ 7 μmol 的氧化钪、0.6g 的 Triton X-100 和 300ml 的乙醇混合,用水定容至 1 升,用乙酸调 pH 值至 3.5,制得解离部分;增强部分:将 0.1 ~ 0.4mmol 的邻菲罗啉和 0.2mol 的 Tris 混合,用水定容至 1 升,制得增强部分。

[0050] 洗涤液的制备方法为:在浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入吐温 -20,混匀,制得吐温 -20 质量百分比浓度为 0.05% 的 PBS 溶液,然后用质量百分比浓度为 0.2% 的 NaN_3 溶液防腐处理,制得洗涤液。

[0051] 质控品为 HE4、CA125、CEA、TPS 标准品的混合物。HE4、CA125、CEA、TPS 标准品均购自 Abnova 公司。

[0052] 实施例 2

[0053] 本发明实施例 1 提供的试剂盒在综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 中的应用,即采用本发明实施例 1 提供的试剂盒,同时综合检测卵巢癌肿瘤标志物 HE4、CA125、CEA、TPS 时间分辨荧光免疫检测方法,其反应原理如图 1 所示,采用双抗体夹心法,包括以下步骤:

[0054] (1) 用分析缓冲液稀释 HE4、CA125、CEA、TPS 四种蛋白标准品混合物,即质控品,制

成具有系列浓度梯度包含有 HE4、CA125、CEA、TPS 四种蛋白标准品的混合溶液；

[0055] (2) 分别取 50 μ l 待测样品人体血清和步骤(1)制备的四种蛋白标准品混合溶液,加入 9F3、M32112M、MAM02-008、3A6 混合抗体包被的微孔板的不同孔中,37℃温育 1 小时,三次洗涤(洗涤时所用洗涤液的配制方法为:每升 PBS 缓冲液中加入 9g 氯化钠、0.5ml 吐温-20,摇匀,即可),之后加入 50 μ l 混合抗体工作液(用分析缓冲液以体积比 1:2000 稀释混合标记抗体储存液,制得混合抗体工作液,该混合抗体工作液的组成为:其中含有 30ng ~ 60ng Sm^{3+} 标记的 10E1、50ng ~ 90ng Eu^{3+} 标记的 M86306M、40ng ~ 100ng Tb^{3+} 标记的 MAM02-881、130ng ~ 200ng Dy^{3+} 标记的 4B9,其余为分析缓冲液),震荡均匀,37℃温育 1 小时,用洗涤液洗 5 次,在吸水纸上控干,加入 200 μ l 共用荧光增强剂的解离部分,震荡 5 分钟,加入 20 μ l 共用荧光增强剂的增强部分,震荡 8 分钟,在时间分辨荧光仪上测量荧光强度,激发光波长为 315nm、647nm、612nm、544nm、575nm 分别为 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 的最强的发射光峰;500 微秒、200 微秒、50 微秒、20 微秒分别为 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Dy^{3+} 的延迟时间;分别测量各自的发光值。把不同浓度的 HE4、CA125、CEA、TPS 四种蛋白混合标准品中各指标分别和各自的发光值做标准曲线,得到不同指标的各自标准曲线,待测样品人体血清的浓度按标准曲线计算得出。得到试剂盒的精密度:HE4 分析内和分析间的变异系数分别为 3.1% ~ 5.3%、3.9% ~ 7.6%;CA125 分析内和分析间的变异系数分别为 2.9% ~ 4.8%、4.1% ~ 7.0%;CEA 分析内和分析间的变异系数分别为 3.9% ~ 5.9%、4.7% ~ 8.3%;TPS 分析内和分析间的变异系数分别为 3.4% ~ 5.9%、4.0% ~ 7.9%。

[0056] 实施例 3

[0057] 用本发明的试剂盒检测 40 份血清样本得到的 HE4、CA125、CEA、TPS 四个指标的数值和用同样的 40 份血清样本分别用 CanAg 公司的试剂盒测试 HE4、罗氏公司的试剂盒测试 CA125、Abbott 公司的试剂盒测试 CEA、ID Biotech AB 公司的试剂盒测试 TPS 所得到的数据分别做回归相关性分析,分别对应附图 2、3、4、5,从附图可以看出,本发明试剂盒测试得到的各指标数据和分别用单指标试剂盒测试得到的数据具有很好的相关性。

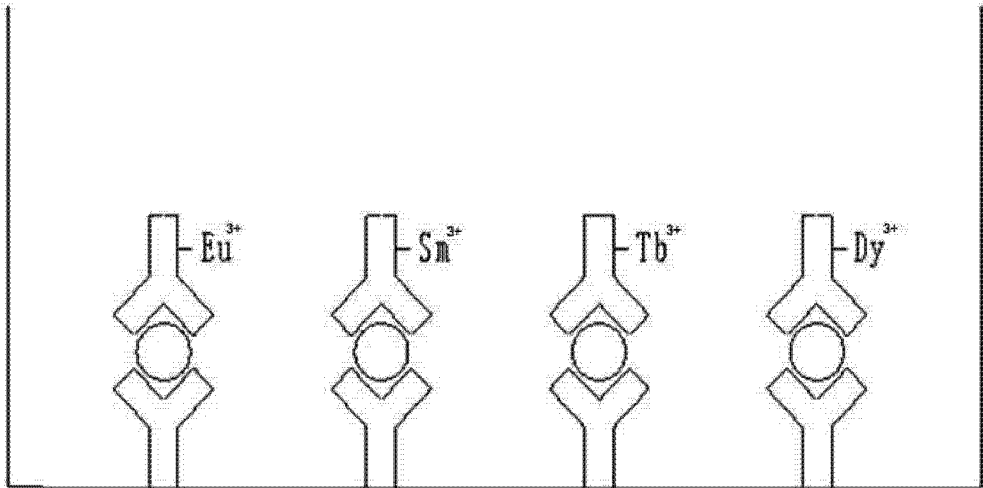


图 1

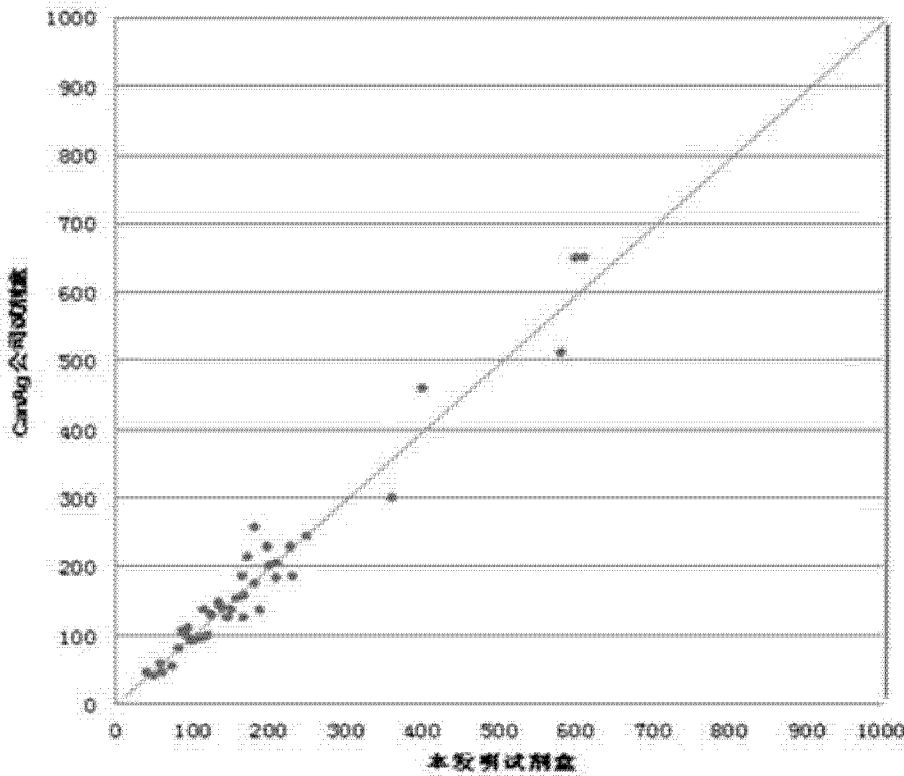


图 2

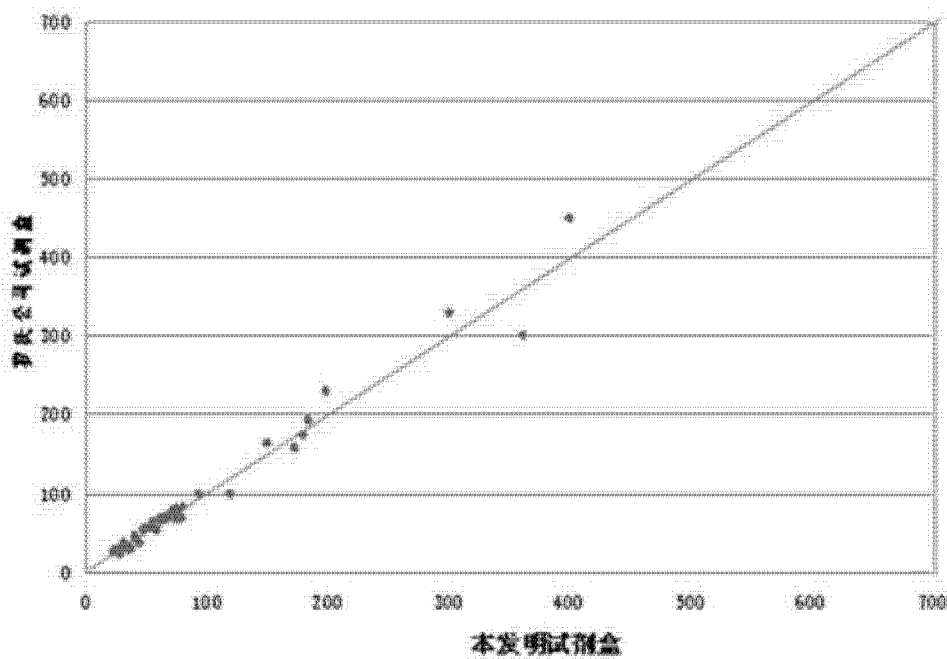


图 3

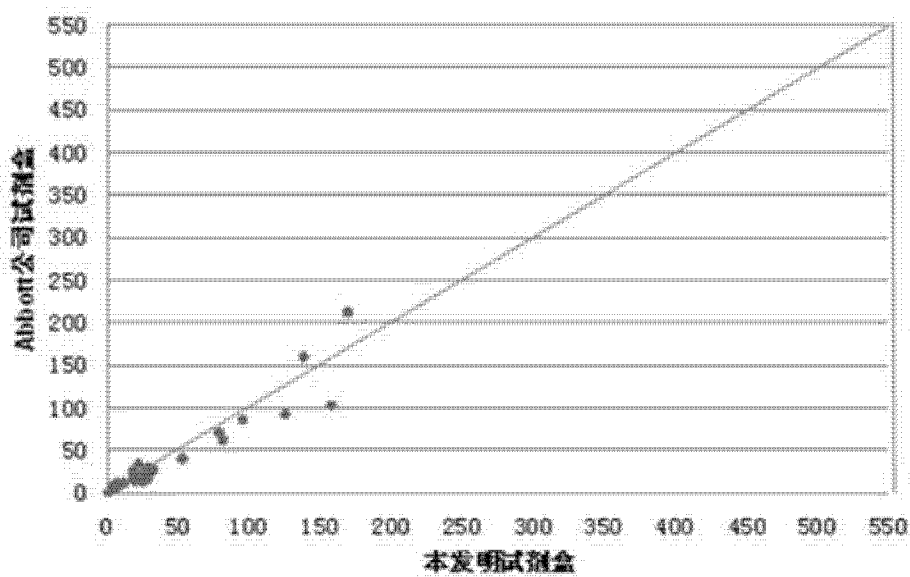


图 4

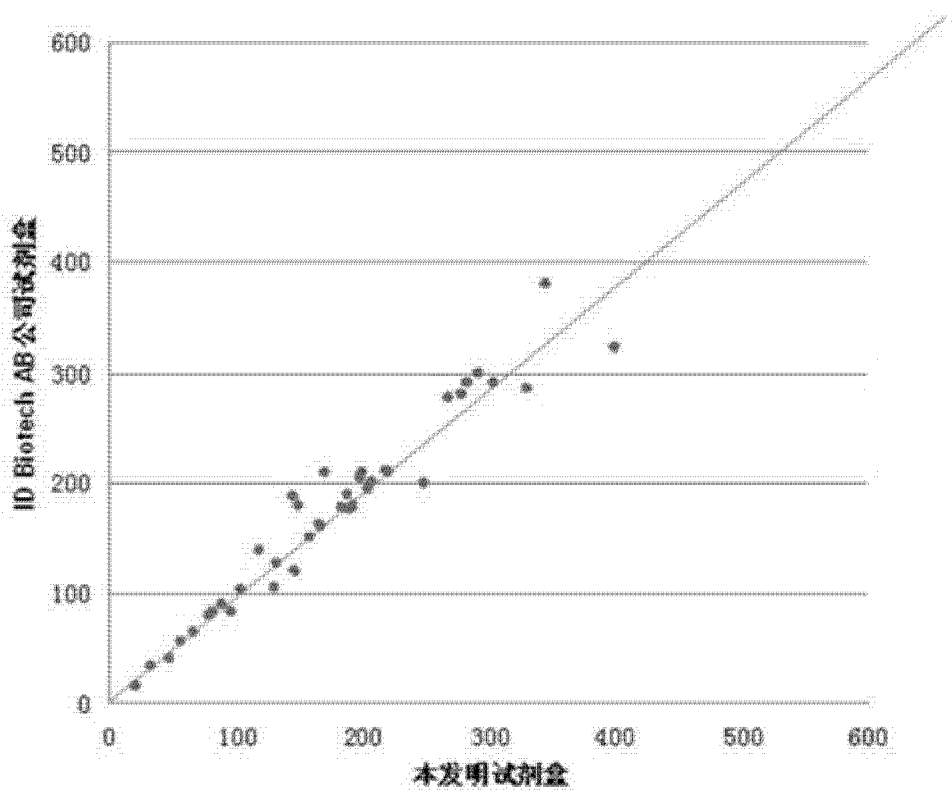


图 5

专利名称(译)	一种时间分辨荧光法四项综合检测卵巢癌试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN103575902B	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201210276519.3	申请日	2012-08-03
[标]发明人	王嘎 程自卿		
发明人	王嘎 程自卿		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57449 G01N2800/36 G01N2800/7028		
代理人(译)	刘淑芬		
其他公开文献	CN103575902A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物和医学检测技术领域，具体涉及一种在同一反应体系内同时综合检测卵巢癌肿瘤标志物四项指标HE4、CA125、CEA、TPS的时间分辨荧光免疫检测试剂盒，同时还涉及该试剂盒在综合检测四项卵巢癌肿瘤标志物HE4、CA125、CEA、TPS中的应用。该试剂盒包括：分别抗HE4、CA125、CEA、TPS第一株单克隆抗体混合抗体包被的微孔板；用Sm³⁺标记的抗HE4、Eu³⁺标记的抗CA125、Tb³⁺标记的抗CEA、Dy³⁺标记的抗TPS第二株单克隆抗体混合抗体；分析缓冲液；共用荧光增强剂；洗涤液；质控品。本发明提供的试剂盒可用于卵巢癌的临床辅助诊断、疗效观察及预后判断，对卵巢癌肿瘤的治疗和预防具有重要意义，同时检测四个肿瘤标志物，简化了检测步骤，提高了检测数据综合分析的特异性和灵敏性。

