



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104122394 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201310140596. 0

(22) 申请日 2013. 04. 23

(71) 申请人 北京豪迈生物工程有限公司
地址 100007 北京市东城区板桥胡同 4 号

(72) 发明人 鄢盛恺

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书4页 说明书7页

(54) 发明名称

人表皮生长因子受体 2(Her-2) 定量测定试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

一种人表皮生长因子受体 2 定量测定试剂盒及其检测方法,该试剂盒包括 HER-2 磁分离试剂,试剂 1,试剂 2,稀释液,HER-2 标准品,HER-2 质控品,清洗浓缩液以及酶促化学发光底物溶液;所述的 HER-2 磁分离试剂含有兔抗小鼠 2 抗和小鼠抗人 HER-2 的单克隆抗体复合物的纳米磁性微球;所述的试剂 1 是含有碱性磷酸酶标记的抗 HER-2 单克隆抗体;所述的试剂 2 是含有三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、MAK33 和甲基纤维素的缓冲液;所述稀释液是含有牛血清白蛋白 (BSA) 的溶液。其目的是提供一种特异性强,灵敏度高,获得检测结果的时间短,操作方式简便,检测结果准确可靠的人表皮生长因子受体 2 定量测定试剂盒及其检测方法。

1. 人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒, 其特征在于: 包括 HER-2 磁分离试剂, 试剂 1, 试剂 2, 稀释液, HER-2 标准品, HER-2 质控品, 清洗浓缩液以及酶促化学发光底物溶液; 所述的 HER-2 磁分离试剂含有兔抗小鼠 2 抗和小鼠抗人 HER-2 的单克隆抗体复合物的纳米磁性微球; 所述的试剂 1 含有碱性磷酸酶标记的抗 HER-2 单克隆抗体; 所述的试剂 2 是含有三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、MAK33 和甲基纤维素的缓冲液; 所述稀释液是含有牛血清白蛋白 (BSA) 的溶液; 所述的 HER-2 标准品和 HER-2 质控品分别是含 HER2 抗原的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液; 所述清洗浓缩液是含有吐温 -20 (TWEEN-20) 和 Proclin-300 的缓冲液。

2. 按照权利要求 1 所述的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒, 其特征在于: 所述 HER-2 磁分离试剂采用如下步骤制成:

(1)、称取 7g 三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、1g NaN_3 和 6g 甲基纤维素于容器中, 称取 4g 吐温 20 (TWEEN-20), 加适量水使吐温 20 (TWEEN-20) 完全溶解后, 倒入上述容器中;

(2)、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后, 倒入上述容器中, 然后在容器中加入 800ml 纯化水, 充分搅拌;

(3)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH, 控制 pH 在 7.95-8.05 之间;

(4)、称取牛血清白蛋白 (BSA) 3g, 四环素 0.04g, 硫酸新霉素 1g, 全部倒入上述容器中, 充分混匀;

(5)、最后用纯化水将容器中的溶液定容至 1000ml, 用 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤, 得到免疫磁珠缓冲液, 备用;

(6)、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μl 二甲基亚砜 (DMSO) 中, 备用; 取 2mg 兔抗小鼠抗体溶于 PH9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml, 获得一级抗体溶液, 用移液枪吸取溶于 50 μl 二甲基亚砜 (DMSO) 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯, 加入到所述抗体溶液中, 置室温 90min, 获得二级抗体溶液;

(7)、将步骤 6 获得的二级抗体溶液加入到浓缩管中, 然后放入到高速冷冻离心机中, 在 3000g 下离心 30min, 浓缩至 0.5ml, 获得三级抗体溶液;

(8)、取 0.5ml 免疫磁珠, 加入 5ml 反应杯中, 经磁铁吸附 2 分钟后, 吸取上清, 然后加入 1.5ml PH9.5 0.1mol/L PB, 混匀 30 秒, 然后加入步骤 7 获得的三级抗体溶液中, 保持混匀状态, 室温反应 4 小时, 获得已经标记的免疫磁珠;

(9)、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液室温反应 30 分钟, 然后加入 1.5ml PH7.2 0.1mol/L PB 清洗已经标记的免疫磁珠, 混匀 30 秒;

(10)、用 10ml PH7.2 0.1mol/L PB 将步骤 9 获得的已经标记的免疫磁珠转入玻璃瓶;

(11)、将 1.5mg 小鼠抗人 HER-2 抗体溶于 5ml 步骤 9 获得的已经标记的免疫磁珠的保存液中, 加入到步骤 10 中的玻璃瓶中, 混匀反应 2 小时, 再加入 5ml PH7.2 0.1mol/L PB 清洗已经标记的免疫磁珠, 并混匀 30 秒;

(12)、用 50ml 免疫磁珠保存液将免疫磁珠转入玻璃瓶, 配制得免疫磁珠浓度为 0.05% 的标准浓度磁珠使用液;

(13)、将步骤 12 获得的溶液与步骤 5 获得的免疫磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀, 即得所述 HER-2 磁分离试剂 (其使用浓度为 0.025%);

所述试剂 1 采用如下步骤制成:

(1)、取 Tris6.06g、NaCl13.0g、ZnCl₂、0.05g、Proclin-300 0.2ml 和 MgCl₂ 0.05g 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌,使其中的固体完全溶解;

(2)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调 pH,控制 pH 在 7.35-7.45 范围内;

(3)、称取牛血清白蛋白 (BSA)3g 倒入上述烧杯中;

(4)、最后用纯化水定容至 1000ml,用 0.2 μ m 滤器过滤,得试剂 1 稀释液,备用;

(5)、取 10mg 碱性磷酸酶 (ALP),加入 5ml 生理盐水中,加入到浓缩管中,3000RPM 离心 20 分钟,浓缩至 1 毫升,获得浓缩液;

(6)、向步骤 5 获得浓缩液中加入 0.2ml 的 0.1M NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟,然后装入透析袋中,用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,收集保留液;

(7)、向步骤 6 获得保留液中加入 0.2M PH9.5 碳酸盐缓冲液,使 PH 升高到 9.0,然后立即加入 2.5mg 抗 HER-2 单克隆抗体,搅拌 2 小时,再加入 0.1ml 的 4mg/ml NaBH₄ 溶液,混匀,置 4℃下 2 小时;

(8)、将步骤 7 获得溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4PBS 透析,4℃过夜,收集保留液;

(9)、向步骤 8 获得保留液中逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4℃ 1 小时,然后 3000rpm 离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于 20ml 的 0.15M PH7.4 的 PBS 中,获得溶液;

(10)、将步骤 9 获得的溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4 的 PB 缓冲液透析 5 个小时,去除铵离子,收集保留液后 10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,收集上清液,按照体积比为 1 体积的上清液 :100 体积的 MgCl₂ 的比例,添加 1M MgCl₂ 溶液,即得碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 HER-2 单克隆抗体的偶联物,将收集到的碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 HER-2 单克隆抗体的偶联物,用上述步骤 4 获得的试剂 1 稀释液,以 1 体积的偶联物 :1000 体积的试剂 1 稀释液的体积比混合均匀,即得试剂 1。

所述试剂 2 采用如下步骤制成:

(1)、取 TRIS1.56g、NaCl4.23g 和 0.5g 甲基纤维素,全部加入容器中,取 0.2ml Proclin-300 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入容器中;

(2)、取 800ml 纯化水加入步骤 1 容器中,充分搅拌直至其中的固体物完全溶解,调 PH 在 7.35-7.45 之间;

(3)、根据 Mak33 的浓度量取最终量为 0.9g 的 Mak33,称取牛 γ -球蛋白 (IgG)20g,羊血清 4ml,马血清 5ml 加入步骤 2 容器中;最后用纯化水定容至 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得试剂 2;

所述稀释液采用如下步骤制成:

(1)、称取 NaCl9.0g 和 BSA60g,加入容器中;

(2)、取 0.5ml Proclin-300 加 10ml 纯化水溶解,加入步骤 1 容器中;

(3)、最后加纯化水定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得稀释液;

所述清洗浓缩液采用如下步骤制成:

(1)、取 TRIS12.54g 和 NaCl325.6g,加入容器中;

(2)、取 5gTween-20,加 20ml 水使其完全溶解后,加入步骤 1 容器中;

(3)、取 0.2ml Proclin-300,用 10ml 纯化水完全溶解后,加入步骤 2 容器中;

(4)、取 800ml 纯化水加入步骤 3 容器中,充分搅拌,直至其中的固体物完全溶解;

(5)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调 PH,控制其范围在 7.35-7.45 之间;

(6)、最后用纯化水定容 1000ml,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得清洗浓缩液;

所述酶促化学发光底物溶液采用如下步骤制成:

(1)、取 TRIS2.35g、NaCl6.41g、Na₂SO₃0.002g、光泽精 0.002g 和 Proclin-300 0.2ml,加入烧杯中;

(2)、加入 600ml 纯化水于烧杯中,充分搅拌直至其中的固体物完全溶解,调 PH 在 7.95-8.05 之间;

(3)、向烧杯中加入 250ml Lumi-PHos480,用纯化水定容至 1000ml,混匀后用 0.2 μ m 滤器过滤,即得酶促化学发光底物溶液。

3. 按照权利要求 2 所述的人表皮生长因子受体 2(Her-2) 的定量测定试剂盒,其特征在于:所述 HER-2 校准品中 HER-2 抗原的浓度分别为 0、15、45、90、180、350ng/ml;所述 HER-2 质控品中 HER-2 抗原的浓度分别为 15、180ng/ml。

4. 按照权利要求 3 所述的人表皮生长因子受体 2(Her-2) 的定量测定试剂盒,其特征在于:所述室温反应的温度为 20 $^{\circ}$ C -24 $^{\circ}$ C。

5. 人表皮生长因子受体 2(Her-2) 的定量测定试剂盒的检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

1)、向试管架上的每一试管中分别加入 30 μ l HER-2 标准品、质控品和待测标本;

2)、向每一试管中加入 45 μ l 试剂 1;

3)、向每一试管中加入 45 μ l 试剂 2;

4)、向每一试管中加入 30 μ l HER-2 磁分离试剂;

5)、用多管混匀器轻轻振荡试管架 30 秒后,将试管架连同全部试管置于水浴箱中,温浴 45 分钟;

6)、将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;

7)、将清洗浓缩液按照 1 体积的清洗浓缩液:7 体积纯化水的比例添加纯化水,得到清洗液,向每一试管中加 200 μ l 清洗液,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30 秒;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;

8)、再次将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;

9)、再次向每一试管中加 200 μ l 清洗浓缩液,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30 秒;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;

10)、第 3 次将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;

11)、加 200 μ l 酶促化学发光底物溶液至试管中,混匀 5 秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测,即可得到相关数据。

6. 按照权利要求 5 所述的人表皮生长因子受体 2(Her-2) 的定量测定试剂盒的检测方

法,其特征在于:所述待测标本为高值 HOOK 样本时,使用稀释液对标本进行稀释。

人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 定量测定试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定血清的试剂盒及其测试方法,尤其是人表皮生长因子受体 2 (HER-2) 定量测定试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体 (epidermal growth Tactor receptor,缩写 EGFR) 是 ErbB 家族成员之一,具有酪氨酸激酶活性,是一种重要的跨膜受体。EGFR 被配体激活后,启动胞内信号传导,经过细胞质中衔接蛋白、酶的级联反应,调节转录因子激活基因的转录,指导细胞迁移、黏附、增殖、分化、凋亡,且与肿瘤的形成和恶化密切相关。

[0003] 目前乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤,也是常见的女性肿瘤死亡原因之一。大约有 20%~30% 的乳腺癌患者 HER-2/neu 高表达,HER-2/neu 高表达与患者的不良预后密切相关。HER-2/neu 基因是人表皮生长因子家族的第 2 位成员。定位于染色体 17q21,其编码一种分子量为 185ku 的跨膜糖蛋白,具有酪氨酸激酶活性,结构上分为膜外配体结合域、跨膜区和膜内酪氨酸激酶的活性域。HER-2/neu 蛋白的胞外部分可以从细胞的表面脱落至血液中,形成分子量大约为 105ku 的可溶性蛋白 HER-ZECD。HER-ZECD 的裂解启动了细胞膜上的受体磷酸化,从而激活了细胞核内 her-2 并导致基因转录、细胞增殖;或 ECD 裂解后,截短的细胞内酪氨酸激酶保持信号传导能力,相应的实验结果认为 ECD 的裂解会使细胞膜上的 p95 发生磷酸化,从而导致肿瘤细胞的增殖。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种特异性强,灵敏度高,获得检测结果的时间短,操作方式简便,检测结果准确可靠的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 定量测定试剂盒及其检测方法。

[0005] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒,包括 HER-2 磁分离试剂,试剂 1,试剂 2,稀释液,HER-2 标准品,HER-2 质控品,清洗浓缩液以及酶促化学发光底物溶液;所述的 HER-2 磁分离试剂含有兔抗小鼠 2 抗和小鼠抗人 HER-2 的单克隆抗体复合物的纳米磁性微球;所述的试剂 1 是含有碱性磷酸酶标记的抗 HER-2 单克隆抗体;所述的试剂 2 是含有三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、MAK33 和甲基纤维素的缓冲液;所述稀释液是含有牛血清白蛋白 (BSA) 的溶液;所述的 HER-2 标准品和 HER-2 质控品分别是含 HER-2 抗原的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液;所述清洗浓缩液是含有吐温 -20 (TWEEN-20) 和 Proclin-300 的缓冲液。

[0006] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒,其中所述 HER-2 磁分离试剂采用如下步骤制成:

[0007] (1)、称取 7g 三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、1g NaN_3 和 6g 甲基纤维素于容器中,称取 4g 吐温 20 (TWEEN-20),加适量水使吐温 20 (TWEEN-20) 完全溶解后,倒入上述容器中;

[0008] (2)、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒

入上述容器中,然后在容器中加入 800ml 纯化水,充分搅拌;

[0009] (3)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH,控制 pH 在 7.95-8.05 之间;

[0010] (4)、称取牛血清白蛋白 (BSA) 3g,四环素 0.04g,硫酸新霉素 1g,全部倒入上述容器中,充分混匀;

[0011] (5)、最后用纯化水将容器中的溶液定容至 1000ml,用 0.2 μ m 滤器过滤,得到免疫磁珠缓冲液,备用;

[0012] (6)、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μ l 二甲基亚砜 (DMSO) 中,备用;取 2mg 兔抗小鼠抗体溶于 PH9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml,获得一级抗体溶液,用移液枪吸取溶于 50 μ l 二甲基亚砜 (DMSO) 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯,加入到所述抗体溶液中,置室温 90min,获得二级抗体溶液;

[0013] (7)、将步骤 6 获得的二级抗体溶液加入到浓缩管中,然后放入到高速冷冻离心机中,在 3000g 下离心 30min,浓缩至 0.5ml,获得三级抗体溶液;

[0014] (8)、取 0.5ml 免疫磁珠,加入 5ml 反应杯中,经磁铁吸附 2 分钟后,吸取上清,然后加入 1.5ml PH9.5 0.1mol/L PB,混匀 30 秒,然后加入步骤 7 获得的三级抗体溶液中,保持混匀状态,室温反应 4 小时,获得已经标记的免疫磁珠;

[0015] (9)、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液室温反应 30 分钟,然后加入 1.5ml PH7.2 0.1mol/LPB 清洗已经标记的免疫磁珠,混匀 30 秒;

[0016] (10)、用 10ml PH7.2 0.1mol/L PB 将步骤 9 获得的已经标记的免疫磁珠转入玻璃瓶;

[0017] (11)、将 1.5mg 小鼠抗人 HER-2 抗体溶于 5ml 步骤 9 获得的已经标记的免疫磁珠的保存液中,加入到步骤 10 中的玻璃瓶中,混匀反应 2 小时,再加入 5ml PH7.2 0.1mol/L PB 清洗已经标记的免疫磁珠,并混匀 30 秒;

[0018] (12)、用 50ml 免疫磁珠保存液将免疫磁珠转入玻璃瓶,配制得免疫磁珠浓度为 0.05% 的标准浓度磁珠使用液;

[0019] (13)、将步骤 12 获得的溶液与步骤 5 获得的免疫磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀,即得所述 HER-2 磁分离试剂 (其使用浓度为 0.025%);

[0020] 所述试剂 1 采用如下步骤制成:

[0021] (1)、取 Tris6.06g、NaCl13.0g、ZnCl₂0.05g、Proclin-300 0.2ml 和 MgCl₂0.05g 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌,使其中的固体完全溶解;

[0022] (2)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调 pH,控制 pH 在 7.35-7.45 范围内;

[0023] (3)、称取牛血清白蛋白 (BSA) 3g 倒入上述烧杯中;

[0024] (4)、最后用纯化水定容至 1000ml,用 0.2 μ m 滤器过滤,得试剂 1 稀释液,备用;

[0025] (5)、取 10mg 碱性磷酸酶 (ALP),加入 5ml 生理盐水中,加入到浓缩管中,3000RPM 离心 20 分钟,浓缩至 1 毫升,获得浓缩液;

[0026] (6)、向步骤 5 获得浓缩液中加入 0.2ml 的 0.1M NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟,然后装入透析袋中,用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C 过夜,收集保留液;

[0027] (7)、向步骤 6 获得保留液中加入 0.2M PH9.5 碳酸盐缓冲液,使 PH 升高到 9.0,然后立即加入 2.5mg 抗 HER-2 单克隆抗体,搅拌 2 小时,再加入 0.1ml 的 4mg/ml NaBH₄ 溶液,

混匀,置 4℃下 2 小时;

[0028] (8)、将步骤 7 获得溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4PBS 透析,4℃过夜,收集保留液;

[0029] (9)、向步骤 8 获得保留液中逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4℃ 1 小时,然后 3000rpm 离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于 20ml 的 0.15M PH7.4 的 PBS 中,获得溶液;

[0030] (10)、将步骤 9 获得的溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4 的 PB 缓冲液透析 5 个小时,去除铵离子,收集保留液后 10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,收集上清液,按照体积比为 1 体积的上清液 :100 体积的 $MgCl_2$ 的比例,添加 1M $MgCl_2$ 溶液,即得碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 HER-2 单克隆抗体的偶联物,将收集到的碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 HER-2 单克隆抗体的偶联物,用上述步骤 4 获得的试剂 1 稀释液,以 1 体积的偶联物 :1000 体积的试剂 1 稀释液的体积比混合均匀,即得试剂 1。

[0031] 所述试剂 2 采用如下步骤制成:

[0032] (1)、取 TRIS1.56g、NaCl4.23g 和 0.5g 甲基纤维素,全部加入容器中,取 0.2ml Proclin-300 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入容器中;

[0033] (2)、取 800ml 纯化水加入步骤 1 容器中,充分搅拌直至其中的固体物完全溶解,调 PH 在 7.35-7.45 之间;

[0034] (3)、根据 Mak33 的浓度量取最终量为 0.9g 的 Mak33,称取牛 γ 球蛋白 (1gG) 20g,羊血清 4ml,马血清 5ml 加入步骤 2 容器中;最后用纯化水定容至 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得试剂 2;

[0035] 所述稀释液采用如下步骤制成:

[0036] (1)、称取 NaCl9.0g 和 BSA60g,加入容器中;

[0037] (2)、取 0.5ml Proclin-300 加 10ml 纯化水溶解,加入步骤 1 容器中;

[0038] (3)、最后加纯化水定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得稀释液;所述清洗浓缩液采用如下步骤制成:

[0039] (1)、取 TRIS12.54g 和 NaCl325.6g,加入容器中;

[0040] (2)、取 5g Tween-20,加 20ml 水使其完全溶解后,加入步骤 1 容器中;

[0041] (3)、取 0.2ml Proclin-300,用 10ml 纯化水完全溶解后,加入步骤 2 容器中;

[0042] (4)、取 800ml 纯化水加入步骤 3 容器中,充分搅拌,直至其中的固体物完全溶解;

[0043] (5)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调 PH,控制其范围在 7.35-7.45 之间;

[0044] (6)、最后用纯化水定容 1000ml,用 0.2 μ μ m 滤器过滤,即得清洗浓缩液;

[0045] 所述酶促化学发光底物溶液采用如下步骤制成:

[0046] (1)、取 TRIS2.35g、NaCl6.41g、 Na_2SO_3 0.002g、光泽精 0.002g 和 Proclin-300 0.2ml,加入烧杯中;

[0047] (2)、加入 600ml 纯化水于烧杯中,充分搅拌直至其中的固体物完全溶解,调 PH 在 7.95-8.05 之间;

[0048] (3)、向烧杯中加入 250ml Lumi-PHos480,用纯化水定容至 1000ml,混匀后用 0.2 μ m 滤器过滤,即得酶促化学发光底物溶液。

[0049] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒,其中所述 HER-2 校准

品中 HER-2 抗原的浓度分别为 0、15、45、90、180、350ng/ml ;所述 HER-2 质控品中 HER-2 抗原的浓度分别为 15、180ng/ml。

[0050] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒,其中所述室温反应的温度为 20℃ -24℃。

[0051] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0052] 1)、向试管架上的每一试管中分别加入 30 μ l HER-2 标准品、质控品和待测标本;

[0053] 2)、向每一试管中加入 45 μ l 试剂 1;

[0054] 3)、向每一试管中加入 45 μ l 试剂 2;

[0055] 4)、向每一试管中加入 30 μ l HER-2 磁分离试剂;

[0056] 5)、用多管混匀器轻轻振荡试管架 30 秒后,将试管架连同全部试管置于水浴箱中,温浴 45 分钟;

[0057] 6)、将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;

[0058] 7)、将清洗浓缩液按照 1 体积的清洗浓缩液 :7 体积纯化水的比例添加纯化水,得到清洗液,向每一试管中加 200 μ l 清洗液,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30 秒;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;

[0059] 8)、再次将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;

[0060] 9)、再次向每一试管中加 200 μ l 清洗浓缩液,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30 秒;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;

[0061] 10)、第 3 次将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;

[0062] 11)、加 200 μ l 酶促化学发光底物溶液至试管中,混匀 5 秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测,即可得到相关数据。

[0063] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒的检测方法,其中所述待测标本为高值 HOOK 样本时,使用稀释液对标本进行稀释。

[0064] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 定量测定试剂盒及其检测方法,其试剂盒包括 HER-2 磁分离试剂,试剂 1,试剂 2,稀释液,HER-2 标准品,HER-2 质控品,清洗浓缩液以及酶促化学发光底物溶液;实验表明,本发明的人表皮生长因子受体 2 也即癌胚抗原 (HER-2) 定量测定试剂盒及其检测方法,具有较高的灵敏度和特异性,和更短的获得检测结果的时间和更简便的操作方式。

[0065] 下面对本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 定量测定试剂盒及其检测方法作进一步详细说明。

具体实施方式

[0066] 本发明的人表皮生长因子受体 2 (Her-2) 的定量测定试剂盒, 包括 HER-2 磁分离试剂, 试剂 1, 试剂 2, 稀释液, HER-2 标准品, HER-2 质控品, 清洗浓缩液以及酶促化学发光底物溶液; 所述的 HER-2 磁分离试剂含有兔抗小鼠 2 抗和小鼠抗人 HER-2 的单克隆抗体复合物的纳米磁性微球; 所述的试剂 1 是含有碱性磷酸酶标记的抗 HER-2 单克隆抗体; 所述的试剂 2 是含有三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、MAK33 和甲基纤维素的缓冲液; 所述稀释液是含有牛血清白蛋白 (BSA) 的溶液; 所述的 HER-2 标准品和 HER-2 质控品分别是含 HER-2 抗原的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液; 所述清洗浓缩液是含有吐温 -20 (TWEEN-20) 和 Proclin-300 的缓冲液。

[0067] 上述 HER-2 磁分离试剂采用如下步骤制成:

[0068] (1)、称取 7g 三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、1g NaN_3 和 6g 甲基纤维素于容器中, 称取 4g 吐温 20 (TWEEN-20), 加适量水使吐温 20 (TWEEN-20) 完全溶解后, 倒入上述容器中;

[0069] (2)、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后, 倒入上述容器中, 然后在容器中加入 800ml 纯化水, 充分搅拌;

[0070] (3)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH, 控制 pH 在 7.95-8.05 之间;

[0071] (4)、称取牛血清白蛋白 (BSA) 3g, 四环素 0.04g, 硫酸新霉素 1g, 全部倒入上述容器中, 充分混匀;

[0072] (5)、最后用纯化水将容器中的溶液定容至 1000ml, 用 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤器过滤, 得到免疫磁珠缓冲液, 备用;

[0073] (6)、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μl 二甲基亚砜 (DMSO) 中, 备用; 取 2mg 兔抗小鼠抗体溶于 PH9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml, 获得一级抗体溶液, 用移液枪吸取溶于 50 μl 二甲基亚砜 (DMSO) 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯, 加入到所述抗体溶液中, 置室温 90min, 获得二级抗体溶液;

[0074] (7)、将步骤 6 获得的二级抗体溶液加入到浓缩管中, 然后放入到高速冷冻离心机中, 在 3000g 下离心 30min, 浓缩至 0.5ml, 获得三级抗体溶液;

[0075] (8)、取 0.5ml 免疫磁珠, 加入 5ml 反应杯中, 经磁铁吸附 2 分钟后, 吸取上清, 然后加入 1.5ml PH9.5 0.1mol/L PB, 混匀 30 秒, 然后加入步骤 7 获得的三级抗体溶液中, 保持混匀状态, 室温反应 4 小时, 获得已经标记的免疫磁珠;

[0076] (9)、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液室温反应 30 分钟, 然后加入 1.5ml PH7.2 0.1mol/LPB 清洗已经标记的免疫磁珠, 混匀 30 秒;

[0077] (10)、用 10ml PH7.2 0.1mol/L PB 将步骤 9 获得的已经标记的免疫磁珠转入玻璃瓶;

[0078] (11)、将 1.5mg 小鼠抗人 HER-2 抗体溶于 5ml 步骤 9 获得的已经标记的免疫磁珠的保存液中, 加入到步骤 10 中的玻璃瓶中, 混匀反应 2 小时, 再加入 5ml PH7.2 0.1mol/L PB 清洗已经标记的免疫磁珠, 并混匀 30 秒;

[0079] (12)、用 50ml 免疫磁珠保存液将免疫磁珠转入玻璃瓶, 配制得免疫磁珠浓度为 0.05% 的标准浓度磁珠使用液;

[0080] (13)、将步骤 12 获得的溶液与步骤 5 获得的免疫磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀, 即得所述 HER-2 磁分离试剂 (其使用浓度为 0.025%);

[0081] 所述试剂 1 采用如下步骤制成:

[0082] (1)、取 Tris6.06g、NaCl13.0g、ZnCl₂0.05g、Proclin-300 0.2ml 和 MgCl₂ 0.05g 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌,使其中的固体完全溶解;

[0083] (2)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调 pH,控制 pH 在 7.35-7.45 范围内;

[0084] (3)、称取牛血清白蛋白 (BSA)3g 倒入上述烧杯中;

[0085] (4)、最后用纯化水定容至 1000ml,用 0.2 μ m 滤器过滤,得试剂 1 稀释液,备用;

[0086] (5)、取 10mg 碱性磷酸酶 (ALP),加入 5ml 生理盐水中,加入到浓缩管中,3000RPM 离心 20 分钟,浓缩至 1 毫升,获得浓缩液;

[0087] (6)、向步骤 5 获得浓缩液中加入 0.2ml 的 0.1M NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟,然后装入透析袋中,用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4℃ 过夜,收集保留液;

[0088] (7)、向步骤 6 获得保留液中加入 0.2M PH9.5 碳酸盐缓冲液,使 PH 升高到 9.0,然后立即加入 2.5mg 抗 HER-2 单克隆抗体,搅拌 2 小时,再加入 0.1ml 的 4mg/mlNaBH₄ 溶液,混匀,置 4℃ 下 2 小时;

[0089] (8)、将步骤 7 获得溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4PBS 透析,4℃ 过夜,收集保留液;

[0090] (9)、向步骤 8 获得保留液中逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4℃ 1 小时,然后 3000rpm 离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于 20ml 的 0.15M PH7.4 的 PBS 中,获得溶液;

[0091] (10)、将步骤 9 获得的溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4 的 PB 缓冲液透析 5 个小时,去除铵离子,收集保留液后 10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,收集上清液,按照体积比为 1 体积的上清液 :100 体积的 MgCl₂ 的比例,添加 1M MgCl₂ 溶液,即的碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 HER-2 单克隆抗体的偶联物,将收集到的碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 HER-2 单克隆抗体的偶联物,用上述步骤 4 获得的试剂 1 稀释液,以 1 体积的偶联物 :1000 体积的试剂 1 稀释液的体积比混合均匀,即得试剂 1。

[0092] 所述试剂 2 采用如下步骤制成:

[0093] (1)、取 TRIS1.56g、NaCl 4.23g 和 0.5g 甲基纤维素,全部加入容器中,取 0.2mlProclin-300 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入容器中;

[0094] (2)、取 800ml 纯化水加入步骤 1 容器中,充分搅拌直至其中的固体物完全溶解,调 PH 在 7.35-7.45 之间;

[0095] (3)、根据 Mak33 的浓度量取最终量为 0.9g 的 Mak33,称取牛 γ-球蛋白 (1gG) 20g,羊血清 4ml,马血清 5ml 加入步骤 2 容器中;最后用纯化水定容至 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得试剂 2;

[0096] 所述稀释液采用如下步骤制成:

[0097] (1)、称取 NaCl9.0g 和 BSA60g,加入容器中;

[0098] (2)、取 0.5ml Proclin-300 加 10ml 纯化水溶解,加入步骤 1 容器中;

[0099] (3)、最后加纯化水定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得稀释液;

[0100] 所述清洗浓缩液采用如下步骤制成:

[0101] (1)、取 TRIS12.54g 和 NaCl325.6g,加入容器中;

[0102] (2)、取 5gTween-20,加 20ml 水使其完全溶解后,加入步骤 1 容器中;

- [0103] (3)、取 0.2ml Proclin-300,用 10ml 纯化水完全溶解后,加入步骤 2 容器中;
- [0104] (4)、取 800ml 纯化水加入步骤 3 容器中,充分搅拌,直至其中的固体物完全溶解;
- [0105] (5)、加入盐酸或氢氧化钠溶液调 PH,控制其范围在 7.35-7.45 之间;
- [0106] (6)、最后用纯化水定容 1000ml,用 0.2 μ m 滤器过滤,即得清洗浓缩液;
- [0107] 所述酶促化学发光底物溶液采用如下步骤制成:
- [0108] (1)、取 TRIS2.35g、NaCl6.41g、Na₂SO₃0.002g、光泽精 0.002g 和 Proclin-300 0.2ml,加入烧杯中;
- [0109] (2)、加入 600ml 纯化水于烧杯中,充分搅拌直至其中的固体物完全溶解,调 PH 在 7.95-8.05 之间;
- [0110] (3)、向烧杯中加入 250ml Lumi-PHos480,用纯化水定容至 1000ml,混匀后用 0.2 μ m 滤器过滤,即得酶促化学发光底物溶液。
- [0111] 上述 HER-2 校准品中 HER-2 抗原的浓度分别为 0、15、45、90、180、350ng/ml;所述 HER-2 质控品中 HER-2 抗原的浓度分别为 15、180ng/ml。
- [0112] 上述室温反应的温度为 20℃ -24℃。
- [0113] 本发明的人表皮生长因子受体 2(Her-2) 的定量测定试剂盒的检测方法,其包括如下步骤:
- [0114] 1)、向试管架上的每一试管中分别加入 30 μ l HER-2 标准品、质控品和待测标本;
- [0115] 2)、向每一试管中加入 45 μ l 试剂 1;
- [0116] 3)、向每一试管中加入 45 μ l 试剂 2;
- [0117] 4)、向每一试管中加入 30 μ l HER-2 磁分离试剂;
- [0118] 5)、用多管混匀器轻轻振荡试管架 30 秒后,将试管架连同全部试管置于水浴箱中,温浴 45 分钟;
- [0119] 6)、将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;
- [0120] 7)、将清洗浓缩液按照 1 体积的清洗浓缩液:7 体积纯化水的比例添加纯化水,得到清洗液,向每一试管中加 200 μ l 清洗液,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30 秒;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;
- [0121] 8)、再次将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;
- [0122] 9)、再次向每一试管中加 200 μ l 清洗浓缩液,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30 秒;加样时应避免加样力度过大而导致磁珠溅出;
- [0123] 10)、第 3 次将试管架连同全部试管放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 1 分钟,然后快速倒转分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同分离器一起放在吸水纸上,用力拍击分离器底部,以除去粘在试管内壁上的所有液滴;
- [0124] 11)、加 200 μ l 酶促化学发光底物溶液至试管中,混匀 5 秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测,即可得到相关数据。
- [0125] 上述待测标本为高值 HOOK 样本时,使用稀释液对标本进行稀释。

专利名称(译)	人表皮生长因子受体2(Her-2)定量测定试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN104122394A	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN201310140596.0	申请日	2013-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京豪迈生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京豪迈生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京豪迈生物工程有限公司		
[标]发明人	鄢盛恺		
发明人	鄢盛恺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/57473 G01N21/76 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种人表皮生长因子受体2定量测定试剂盒及其检测方法，该试剂盒包括HER-2磁分离试剂，试剂1，试剂2，稀释液，HER-2标准品，HER-2质控品，清洗浓缩液以及酶促化学发光底物溶液；所述的HER-2磁分离试剂含有兔抗小鼠2抗和小鼠抗人HER-2的单克隆抗体复合物的纳米磁性微球；所述的试剂1是含有碱性磷酸酶标记的抗HER-2单克隆抗体；所述的试剂2是含有三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、MAK33和甲基纤维素的缓冲液；所述稀释液是含有牛血清白蛋白(BSA)的溶液。其目的是提供一种特异性强，灵敏度高，获得检测结果的时间短，操作方式简便，检测结果准确可靠的人表皮生长因子受体2定量测定试剂盒及其检测方法。