



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104034898 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410279286. 1

(22) 申请日 2014. 06. 21

(71) 申请人 广西博士海意信息科技有限公司

地址 530022 广西壮族自治区南宁市民族大道 38-2 号 1211 室

(72) 发明人 李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云
蓝文苑

(74) 专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司 44214

代理人 李珊

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

一种定量检测 CEA 癌胚抗原试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及测定一种定量检测 CEA 癌胚抗原的试剂盒,属于免疫检测领域。采用该试剂盒进行癌胚抗原检测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。本发明提供的试剂盒,其包含的试剂有 CEA 癌胚抗原磁分离试剂,酶标抗体,增强剂,校准品、控制品,浓缩液以及底物。本试剂盒采用免疫磁微粒分离技术与竞争酶联免疫技术结合,与现有技术的试剂盒相比,大大缩短了检测时间。

1. 一种定量检测 CEA 癌胚抗原试剂盒,其特征在于,该试剂盒包含 CEA 癌胚抗原磁分离试剂,酶标抗体,增强剂,校准品、控制品,浓缩液以及底物。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的磁分离试剂含有标记有癌胚抗原单克隆抗体的磁性微球;所述的酶标抗体是含有辣根过氧化物酶标记的癌胚抗原单克隆抗体。

所述的增强剂是含有 Tris 的缓冲液;所述的校准品及控制品是含有一定量的癌胚抗原抗原的溶液;所述浓缩液是含有 TWEEN-20 和 Proclin-300 的缓冲液;所述的底物为酶促化学发光底物。

3. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法:

第一步:CEA 癌胚抗原磁分离试剂的制备步骤:

1) 将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μ l DMSO 中,取 2mg 癌胚抗原单克隆抗体溶于 PH9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml;

2) 用移液枪吸取步骤 1 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤 1 的抗体溶液中,置室温 90min;

3) 将步骤 2 获得的溶液加入到浓缩管中然后放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml;

4) 取 0.5ml 磁珠,加入 5ml 反应杯中,放入试管架,经磁铁吸附 2 分钟后吸取上清;

5) 加入步骤 3 获得的抗体溶液,混匀后室温反应 4 小时;

6) 加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37 $^{\circ}$ C 15 分钟;

7) 加入 1.5ml PH7.20.1mol/LPB 清洗已经标记的磁珠,混匀 30 秒,上架,去上清;

8) 用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶;磁珠保存液配方为 0.1% BSA, 0.05%吐温-20,0.02% NaN₃,20%乙醇,4 $^{\circ}$ C 保存;

9) 将步骤 8 获得的溶液用磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀,即得试剂盒中磁分离试剂;所述磁珠缓冲液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液;

第二步:酶标抗体制备步骤:

1) 2.5mg 癌胚抗原单克隆抗体溶于 1.0ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中,加入 1ml 的 10mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液和 1.3mg 碳化二亚胺,1 小时后将 1.0ml 20mg/ml 的碳化二亚胺加入,混合物不断搅拌,4 $^{\circ}$ C 过夜;

2) 将步骤 1 的溶液装入透析袋中,对 0.15M 的 PH7.4PBS 透析,4 $^{\circ}$ C 过夜,收集保留液;然后加入 10ml 浓度为 15mg/ml 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 储存备用;最后将上述溶液用酶标抗体稀释液以 1 : 1000 的体积比混合均匀,即得酶标抗体;所述酶标抗体稀释液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液;

第三步:增强剂配制步骤:

1) 称取 TRIS1.56g 和 NaCl14.23g 于 1L 容器中;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 1L 容器中;

2) 用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌,直至完全溶解,调 PH 在 7.35-7.45 之间;

3) 称取 Mak330.9g 于上述 1L 容器中;最后定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤;第四步:校准品和控制品的配制:

将癌胚抗原配制浓度分别为 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 单位 ng/ml 的校准品 ; 将癌胚抗原配制成浓度分别为 0. 20、0. 80ng/ml 的控制品 ;

第五步 :

浓缩液配制步骤, 配制 1L :

- 1) 称取癌胚抗原 12. 54g 和 NaCl 325. 6g 于 1L 容器中 ;
- 2) 称取 5g Tween-20 于 100ml 容器中加 20ml 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 0. 2ml 于盛有 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后, 倒入上述 1L 容器中 ;
- 4) 用量筒量取 800ml 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 1000ml, 完全溶解后用 0. 2um 滤器过滤即得 ;

第六步 : 底物配制步骤, 配制 1L :

- 1) 称取 TRIS 2. 35g、NaCl 16. 41g、Na₂S₂O₃ 0. 002g 和 Proclin-300 0. 2ml 于 1L 烧杯中 ;
- 2) 用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中, 充分搅拌, 直至完全溶解, 调 PH 在 7. 95-8. 05 之间 ;
- 3) 加入 250ml Lumi-Phos 530 后, 用 0. 2um 滤器过滤收集滤液, 用纯化水定容至 1000ml, 混匀后即得。

一种定量检测 CEA 癌胚抗原试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,具体涉及一种定量检测 CEA 癌胚抗原的试剂盒。

背景技术

[0002] 癌胚抗原是一种分子量约为 22KD 的酸性糖蛋白。CEA 的编码基因位于 19 号染色体,是胚胎性致癌抗原。CEA 主要存在于胎儿消化道上皮组织、胰脏和肝脏,在正常成人血清中含量极低,而失去极性的癌细胞分泌 CEA 进入血液和淋巴,导致血中 CEA 水平增高。CEA 主要存在于结肠癌、胰腺癌、胃癌、肝癌等组织中,但在患肺癌、乳腺癌时,也有不同程度的提高。

[0003] CEA 广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌中,如胃癌、大肠癌、肝癌、胰腺癌,也可存在于小细胞肺癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌中。因此,检测血清中 CEA 含量对上述癌症的诊断具有辅助价值。CEA 的临床意义为:

(1) 用于结肠直肠癌、胃癌、胰癌、肝细胞癌、肺癌、乳癌以及甲状腺髓质癌的临床监测。

[0004] a. 胰液和胆汁内 CEA 定量可以用于诊断胰腺或胆道癌。

[0005] b. 浆液性渗出液的 CEA 定量可以作为细胞学检查的辅助手段。

[0006] c. 尿液化的 CEA 定量可以作为诊断膀胱癌预后的参考。

[0007] d. 血清中 CEA 的定量结合甲状腺降钙素测定,有助于甲状腺髓样癌的诊断和复发的估计。

[0008] (2) 用于预测恶性肿瘤的预后:CEA 浓度越低说明病程较早,治疗效果好,存活时间长。

[0009] (3) 可以检测疗效:治疗后血清水平将下降至正常水平,如复发或治疗失败将两次上升。

[0010] (4) 可以跟踪复发:治疗后 CEA 又复升高,提示有转移可能。

发明内容

[0011] 本发明需要解决的技术问题在于提供一种定量检测 CEA 癌胚抗原试剂盒及其检测方法,

采用该试剂盒进行 CEA 癌胚抗原检测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。

[0012] 本发明提供的试剂盒,其包含的试剂有 CEA 癌胚抗原磁分离试剂,酶标抗体,增强剂,校准品、控制品,浓缩液以及底物。

[0013] 所述的磁分离试剂含有标记有癌胚抗原单克隆抗体的磁性微球。

[0014] 所述的酶标抗体是含有辣根过氧化物酶标记的癌胚抗原单克隆抗体。

[0015] 所述的增强剂是含有 Tris 的缓冲液。

[0016] 所述的校准品及控制品是含有一定量的癌胚抗原抗原的溶液。

[0017] 所述浓缩液是含有 TWEEN-20 和 Proclin-300 的缓冲液。

[0018] 所述的底物为酶促化学发光底物。

[0019] 本发明 CEA 癌胚抗原的定量检测试剂盒, 优选通过如下步骤制备而成:

第一步: 磁分离试剂的制备步骤:

1、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中, 取 2mg 癌胚抗原单克隆抗体溶于 PH 9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml;

2、用移液枪吸取步骤 1 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤 1 的抗体溶液中, 置室温 90min;

3、将步骤 2 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 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml;

4、取 0.5ml 磁珠, 加入 5ml 反应杯中, 放入专用试管架, 经磁铁吸附 2 分钟后吸取上清;

5、每次加入 1.5ml PH9.50.1mol/L PB, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次; 将步骤 3 获得的抗体溶液加入到上述磁珠中, 混匀后室温反应 4 小时;

6、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37℃ 15 分钟;

7、每次加入 1.5ml PH 7.20.1mol/L PB 清洗已经标记的磁珠, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次;

8、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶; 磁珠保存液配方为 (均为质量体积比)

0.1% BSA, 0.05% 吐温 -20, 0.02% NaN₃, 20% 乙醇, 4℃ 保存。

[0020] 9、将步骤 8 获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀, 即得本发明试剂盒中磁分离试剂; 所述磁珠缓冲液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0021] 第二步: 酶标抗体制备步骤:

1、2.5mg 癌胚抗原单克隆抗体溶于 1.0ml 的 N, N- 二甲基甲酰胺中, 加入 1ml 的 10mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液和 1.3mg 碳化二亚胺, 1 小时后将 1.0ml 20mg/ml 的碳化二亚胺加入, 混合物不断搅拌, 4℃ 过夜;

2、将步骤 1 的溶液装入透析袋中, 对 0.15M 的 PH7.4PBS 透析, 4℃ 过夜, 收集保留液;

然后加入 10ml 浓度为 15mg/ml 的 BSA 溶液, 4℃ 储存备用; 最后将收集到的辣根过氧化物酶与癌胚抗原单克隆抗体的偶联物用酶标抗体稀释液以 1 : 1000 的体积比混合均匀, 即得酶标抗体; 所述酶标抗体稀释液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0022] 第三步: 增强剂配制步骤:

1、称取 TRIS1.56g 和 NaCl 4.23g 于 1L 容器中; 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 1L 容器中;

2、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中, 充分搅拌, 直至完全溶解调 PH, 控制 PH 在 7.35-7.45 之间;

3、称取 Mak330.9g 于上述 1L 容器中; 最后定容 1000ml, 完全溶解后, 用 0.2um 过滤器过滤。

[0023] 第四步: 校准品和控制品的配制:

校准品浓度分别为 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 单位 ng/ml; 控制品浓度分别为 0.20、0.80ng/ml。

[0024] 第五步:

浓缩液配制步骤, 配制 1L :

- 1、称取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中 ;
- 2、称取 5g Tween-20 于 100ml 容器中加 20ml 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 0.2ml 于盛有 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后, 倒入上述 1L 容器中 ;
- 4、用量筒量取 800ml 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 1000ml, 完全溶解后用 0.2um 滤器过滤即得。

[0025] 第六步 : 底物配制步骤, 配制 1L :

- 1、称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、Na₂S₂O₃ 0.002g 和 Proclin-3000.2ml 于 1L 烧杯中 ;
- 2、用量筒量取 600ml 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 ;
- 3、加入 250ml Lumi-Phos 530 后, 用 0.2um 滤器过滤收集滤液, 用纯化水定容至 1000ml, 混匀后即得。

[0026] 本发明的主要创新之处在于 :

1、本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合, 提供了一种接近均相的反应体系, 与现有技术相比, 本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和特异性, 并达到了较佳的性能参数。

[0027] 2、本发明公开了一种新的专用增强剂以及浓缩液, 使得反应过程更加稳定可靠, 实验数

据灵敏有效, 可精确到 0.01ng, 在提高产品性能的同时, 并且大大降低了产品成本 ;

3、本试剂盒中的癌胚抗原磁分离试剂, 酶标抗体, 增强剂, 校准品、控制品, 浓缩液以及底物均是该反应体系下的最优配方, 给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0028]

具体实施方式

[0029] 实施例 1、

一、癌胚抗原磁分离试剂制备步骤 :

1、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中, 取 2mg 癌胚抗原单克隆抗体 (Santa Cruz 公司产品) 溶于 PH 9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml ;

2、用移液枪吸取步骤 1 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤 1 的抗体溶液中, 置室温 90min ;

3、将步骤 2 的溶液加入到 Centricon-10 浓缩管中然后放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml ;

4、取 0.5ml 磁珠, 加入 5ml 反应杯中, 放入专用试管架, 经磁铁吸附 2 分钟后吸取上清 ; 磁珠为本领域常用磁珠, 优选浓度 25mg/mL, 直径为 800nm。

[0030] 5、每次加入 1.5ml PH 9.5 0.1mol/L PB, 混匀 30 秒, 上架, 去上清, 重复操作 3 次 ; 将步骤 4 获得的抗体溶液加入到上述磁珠中, 混匀后室温反应 4 小时 ;

6、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37℃ 15 分钟；

7、每次加入 1.5ml PH 7.20. 1mol/L PB 清洗已经标记的磁珠，混匀 30 秒，上架，去上清，重复操作 3 次；

8、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶；磁珠保存液配方为 0.1% BSA, 0.05% 吐温-20, 0.02% NaN₃, 20% 乙醇（均为质量体积比），4℃ 保存。

[0031] 9、将步骤 8 获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀，即得本发明试剂盒中磁分离试剂；所述磁珠缓冲液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0032] 实施例 2

一、酶标抗体的制备步骤：

1、2.5mg 癌胚抗原单克隆抗体溶于 1.0ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中，加入 1ml 的 10mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液和 1.3mg 碳化二亚胺，1 小时后将 1.0ml 20mg/ml 的碳化二亚胺加入，混合物不断搅拌，4℃ 过夜；

2、将步骤 1 的溶液装入透析袋中，对 0.15M 的 PH7.4PBS 透析，4℃ 过夜，收集保留液；

然后加入 10ml 浓度为 15mg/ml 的 BSA 溶液，4℃ 储存备用；最后将收集到的辣根过氧化物酶与癌胚抗原单克隆抗体的偶联物用酶标抗体稀释液以 1 : 1000 的体积比混合均匀，即得酶标抗体；所述酶标抗体稀释液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0033] 实施例 3

增强剂配制步骤：

1、称取 TRIS 1.56g 和 NaCl 4.23g 于 1L 容器中；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 1L 容器中；

2、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中，充分搅拌，直至完全溶解调 PH，控制 PH 在 7.35-7.45 之间；

3、称取 Mak33 0.9g 于上述 1L 容器中；最后定容 1000ml，完全溶解后，用 0.2um 滤器过滤。

[0034] Mak33 是罗氏公司的商品化的试剂。

[0035] 实施例 4

校准品和控制品的配制步骤：

1、癌胚抗原定量检测试剂盒癌胚抗原校准品原料（购于 Santa Cruz 公司）用纯化水配制成浓度点为 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 单位 ng/ml；控制品用纯化水配制的浓度点为 0.20、0.80ng/ml。

[0036] 2、完全溶解后，贴好标签于 2-8℃ 冷库贮存，有效期为 12 个月。

[0037] 实施例 5：

浓缩液配制步骤：

1、称取癌胚抗原 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中；

2、称取 5g Tween-20 于 100ml 容器中加适量水使其完全溶解后，倒入上述容器中；

3、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于盛有 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后，倒入上述 1L 容器中；

4、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中，充分搅拌，直至完全溶解；

5、用 HCL 或 NaOH 调 PH，测量其范围在 7.35-7.45 之间；

6、最后定容 1000ml,测 PH 值,范围在 7.35-7.45 之间即符合要求,完全溶解后用 0.2um 滤器过滤;过滤完后,贴好标签于 2-8℃冷库贮存,有效期为 12 个月;

实施例 6

底物配制操作步骤:

1、称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、Na₂SO₃ 0.002g 和 Proclin-300 0.2ml 于 1L 烧杯中;

2、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解;用 HCl 或 NaOH 调 PH,测量其范围在 7.95-8.05 之间;

3、加入 250ml Lumi-Phos 530 后,用 0.2um 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至 1000ml,混匀后,贴好标签于 2-8℃冷库贮存,有效期为 12 个月。

[0038] 本发明试剂盒的使用方法如下:

1、加 15 μl 癌胚抗原校准品、质控品、待测标本至对应试管底部。

[0039] 2、加 25 μl 酶标抗体至每一试管中。

[0040] 3、加 25 μl 增强剂至每一试管中。

[0041] 4、加 25 μl 磁分离试剂至每一试管中。

[0042] 5、多管混匀器轻轻振荡放有试管的试管架 30s 后,置 37℃水浴 30 分钟。

[0043] 6、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,然后缓慢的倒转分离器倒出上清液。

[0044] 7、浓缩液用纯化水稀释 10 倍后,加 100 μl 稀释后的浓缩液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30s。

[0045] 8、加 100 μl 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。

专利名称(译)	一种定量检测CEA癌胚抗原试剂盒		
公开(公告)号	CN104034898A	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201410279286.1	申请日	2014-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
[标]发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57473 G01N33/535		
代理人(译)	李珊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及测定一种定量检测CEA癌胚抗原的试剂盒，属于免疫检测领域。采用该试剂盒进行癌胚抗原检测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。本发明提供的试剂盒，其包含的试剂有CEA癌胚抗原磁分离试剂，酶标抗体，增强剂，校准品、控制品，浓缩液以及底物。本试剂盒采用免疫磁微粒分离技术与竞争酶联免疫技术结合，与现有技术的试剂盒相比，大大缩短了检测时间。