



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102426245 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201110257475. 5

(22) 申请日 2011. 08. 31

(71) 申请人 内蒙古科慧生物科技有限责任公司

地址 012000 内蒙古自治区乌兰察布市察哈尔经济技术开发区赛汗工业园区平一路北

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京富天民宏济知识产权代理事务所(普通合伙) 11272

代理人 刘寿椿 龚雅民

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 11 页

### (54) 发明名称

细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 定量测定试剂盒及其检测方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种细胞角质蛋白 19 片段 CYFRA21-1 的定量测定试剂盒,其特征在於,该试剂盒包含 CYFRA21-1 磁分离试剂,酶反应物,反应增强剂,稀释液,CYFRA21-1 校准品、CYFRA21-1 质控品,清洗液浓缩液以及底物溶液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法。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,并且大大降低了产品成本。

1. 一种细胞角质蛋白 19 片段 CYFRA21-1 的定量测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒包含 CYFRA21-1 磁分离试剂,酶反应物,反应增强剂,稀释液,CYFRA21-1 校准品、CYFRA21-1 质控品,清洗液浓缩液以及底物溶液。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的 CYFRA21-1 磁分离试剂含有标记有抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的磁性微球;

所述的酶反应物是含有碱性磷酸酶标记的抗 CYFRA21-1 单克隆抗体;

所述的反应增强剂是含有 Tris 的缓冲液;

所述稀释液是含有 BSA 的溶液;

所述的校准品及质控品是含有一定量的 CYFRA21-1 抗原的 BSA 溶液;

所述清洗液浓缩液是含有 TWEEN-20 和 Proclin-300 的缓冲液;

所述的底物溶液为酶促化学发光底物溶液。

3. 如权利要求 1-2 任其一所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中各组分按照如下制备方法制得:

#### 一、磁分离试剂的制备过程

一)、磁珠缓冲液配制操作步骤,配制 1L:

1、称取 TRIS 4.58g 和 NaCl6.81g 于 1L 容器中,称取 0.96g TWEEN-20 于 20ml 容器中加适量水使其完全溶解后,倒入上述 1L 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 1L 容器中,然后在上述 1L 容器中加入 800ml 纯化水,充分搅拌;

3、调节 PH,控制 PH 在 7.95-8.05 之间;

4、称取 BSA 3g 倒入上述 1L 容器中;

5、最后定容至 1000ml,用 0.2um 滤器过滤即得;

二)、磁分离试剂的制备过程

1、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中,取 2mg 抗 CYFRA21-1 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、用移液枪吸取上述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;

4、取 0.5ml 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. 1mol/L PB,混匀 30 秒,然后加入步骤 3 获得的抗体溶液,混匀后室温反应 4 小时;

5、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37°C 15 分钟,然后加入 1.5ml PH 7.2 0.1mol/L PB 清洗已经标记的磁珠,混匀 30 秒;

6、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入玻璃瓶;

7、将步骤 6 获得的溶液与上述磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀,即得权利要求 1 或 2 所述试剂盒中的磁分离试剂;

#### 二、酶反应物的制备过程

一)、酶反应物稀释液配制操作步骤,配制 1L:

1、取 Tris 6.06g、NaCl 13.0g、ZnCl<sub>2</sub> 0.05g、Proclin-300 0.2ml 和 MgCl<sub>2</sub> 0.05g 于烧

瓶中,然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

- 2、调 PH,控制 PH 在 7.35-7.45 范围内;
- 3、称取 BSA 3g 倒入上述烧杯中;
- 4、最后定容至 1000ml,用 0.2um 滤器过滤即得;

#### 二)、碱性磷酸酶 ALP 与抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联

1、取 10mgALP 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;

2、向步骤 1 获得浓缩液中加入 0.2ml 的 0.1M  $\text{NaIO}_4$  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;

3、向步骤 2 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 CYFRA21-1 单克隆抗体,搅拌 2 小时,再加入 0.1ml 的 4mg/ml  $\text{NaBH}_4$  溶液,混匀,置 4℃下 2 小时;

4、将上述溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4PBS 透析,4℃过夜,收集保留液;

5、向步骤 4 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;

6、将步骤 5 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 : 100 的比例添加 1M  $\text{MgCl}_2$  溶液,即得碱性磷酸酶 ALP 与抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联物;将收集到的碱性磷酸酶 ALP 与抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联物用上述步骤一)获得的酶反应物稀释液以 1 : 1000 的体积比混合均匀,即得酶反应物。

#### 三、反应增强剂的制备过程,配制 1L:

1、取 TRIS1.56g 和 NaCl 4.23g 于 1L 容器中,取 0.2ml Proclin-300 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;

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

#### 四、稀释液的制备过程,配制 1L:

- 1、称取 NaCl9.0g 和 BSA 60g 于 1L 的容器中;
- 2、取 0.5ml Proclin-300 加 10ml 纯化水溶解,倒入上述 1L 的容器中;
- 3、最后定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2um 滤器过滤即得;

#### 五、CYFRA21-1 校准品和 CYFRA21-1 质控品的配制:

CYFRA21-1 校准品中 CYFRA21-1 抗原的浓度分别为 5、15、30、80、160ng/ml ;CYFRA21-1 质控品中 CYFRA21-1 抗原的浓度分别为 15、80ng/ml ;

#### 六、清洗液浓缩液的制备过程,配制 1L:

- 1、取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中;
- 2、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、取 0.2ml Proclin-300 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、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；

七、底物溶液的制备过程，配制 1L：

1、取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.002g 和 Proclin-300 0.2ml 于 1L 烧杯中；

2、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 480，用 0.2um 滤器过滤收集滤液，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

4. 如权利要求 1-3 任其一所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒的使用方法如下：

1)、加 15  $\mu$ l CYFRA21-1 校准品、CYFRA21-1 质控品、待测标本至对应试管底部；

2)、加 30  $\mu$ l 酶反应物至每一试管中；

3)、加 30  $\mu$ l 反应增强剂至每一试管中；

4)、加 30  $\mu$ l 磁分离试剂至每一试管中；

5)、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°C 水浴 30 分钟；

6)、然后放至磁分离器上，确保每支试管都与分离器表面接触，沉淀 2 分钟，倒转分离器倒出上清液；

7)、清洗液浓缩液用纯化水稀释 20 倍后，加 200  $\mu$ 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；

8)、加 200  $\mu$ l 底物溶液至试管中混匀 3 秒，发光检测仪检测。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于，所述待测标本为高值 HOOK 样本时，根据需要使用稀释液对标本进行稀释。

## 细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 定量测定试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及测定血清的试剂盒及其测试方法,尤其是涉及测定血清中细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 含量的试剂盒及其测试方法。

### 背景技术

[0002] 细胞角蛋白 19 (CYK-19) 是一分子量约 40,000Da 的 I 类角蛋白 (酸性蛋白),是角蛋白家族中最小的成员。CYK-19 广泛分布在正常组织表面,如层状或鳞状上皮中。在恶性上皮细胞中,激活的蛋白酶加速了细胞的降解,使得大量细胞角蛋白片段释放入血,其可溶性片段可与两株单克隆抗体 KS19.1 和 BM19.21 特异性结合,故称为 CYFRA21-1。CYFRA21-1 分子量约 30,000Da。在恶性肺癌组织中,CYFRA21-1 含量丰富,尤其是在肺鳞癌中有高表达。CYFRA21-1 对各型肺癌诊断的敏感性依次为:鳞癌>腺癌>大细胞癌>小细胞癌。从检测角度上来说,目前临床上用于测定 CYFRA21-1 的方法主要有放免法、ELISA 法、化学发光法等。

[0003] 过去以放免为代表的细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 测定试剂盒受方法学的限制,其灵敏度和抗干扰能力严重不足,存在很大的弊端,已基本上退出市场,目前应用较多的为酶联免疫检测技术和化学发光技术。化学发光技术兴起于上个世纪 80 年代是继酶联免疫技术和放免技术之后发展起来的新兴技术,由于其高灵敏度、高特异性,同时方法简便、快速,标记结合物稳定,无放射性同位素损伤和污染等特点,在近些年得到了飞速发展。

[0004] 磁微粒分离酶联免疫检测技术是一种以磁性微粒为固相分离载体,将免疫磁微粒分离技术与酶联免疫检测技术相结合而建立的一种新型免疫检测方法。传统 ELISA 方法,抗原、抗体的结合反应是在固相 (ELISA 板反应孔) 表面进行的,而磁微粒分离酶联免疫检测方法,抗原、抗体的结合反应也在近似液相的条件下进行,因而反应快速、彻底。与传统 ELISA 相比具有灵敏度高,检测用时少的优点。

### 发明内容

[0005] 本发明需要解决的技术问题在于提供一种细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 定量测定试剂盒及其检测方法,采用该试剂盒进行 CYFRA21-1 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。

[0006] 本发明提供了一种细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 的定量测定试剂盒,其包含的试剂有 CYFRA21-1 磁分离试剂,酶反应物,反应增强剂,稀释液,校准品、质控品,清洗液浓缩液以及底物溶液。

[0007] 所述的磁分离试剂含有标记有抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的磁性微球。

[0008] 所述的酶反应物是含有碱性磷酸酶标记的抗 CYFRA21-1 单克隆抗体。

[0009] 所述的反应增强剂是含有 Tris 的缓冲液。

[0010] 所述稀释液是含有 BSA 溶液。

[0011] 所述的校准品及质控品是含有一定量的 CYFRA21-1 抗原的 BSA 蛋白溶液。

[0012] 所述清洗液浓缩液是含有 TWEEN-20 和 Proclin-300 的缓冲液。

[0013] 所述的底物溶液为酶促化学发光底物溶液。

[0014] 本发明细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 的定量测定试剂盒的制备方法,包括下述步骤:

[0015] 第一步:磁分离试剂的制备过程

[0016] 一、磁珠缓冲液配制操作步骤,配制 1L:

[0017] 1、称取 TRIS 4.58g 和 NaCl6.81g 于 1L 容器中,称取 0.96g TWEEN-20 于 20ml 容器中加适量水使其完全溶解后,倒入上述容器中;

[0018] 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 1L 容器中,然后在上述 1L 容器中加入 800ml 纯化水,充分搅拌;

[0019] 3、调节 PH 计测量其 PH 值,调 PH,控制 PH 在 7.95-8.05 之间;

[0020] 4、称取 BSA 3g 倒入上述 1L 容器中;

[0021] 5、最后定容至 1000ml,用 0.2um 滤器过滤;过滤完后贴好标签于 2-8℃冷库贮存。

[0022] 二、磁分离试剂的制备过程

[0023] 1、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50ul DMSO 中,取 2mg 抗 CYFRA21-1 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;

[0024] 2、确定辛二酸二琥珀酰亚胺酯的投入量,用移液枪吸取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;

[0025] 3、将步骤 2 抗体溶液加入到 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;

[0026] 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;

[0027] 5、每次加入 1.5ml PH9.5 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;

[0028] 6、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37℃ 15 分钟;

[0029] 7、每次加入 1.5ml PH 7.2 0.1mol/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;

[0030] 8、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶,即为 0.05%的 CYFRA21-1 磁分离试剂;磁珠保存液配方为 0.1% BSA,0.05%吐温-20,0.02% NaN<sub>3</sub>,20%乙醇,4℃保存。

[0031] 9、将步骤 9 获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1:1 的比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂。

[0032] 第二步:酶反应物制备过程

[0033] 一、酶反应物稀释液配制操作步骤,配制 1L:

[0034] 1、取 Tris 6.06g、NaCl 13.0g、ZnCl<sub>2</sub> 0.05g、Proclin-300 0.2ml 和 MgCl<sub>2</sub> 0.05g 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0035] 2、调 PH,控制 PH 在 7.35-7.45 范围内;

[0036] 3、称取 BSA 3g 倒入上述烧杯中;

[0037] 4、最后定容至 1000ml,用 0.2um 滤器过滤即得。

[0038] 二、碱性磷酸酶 ALP 与抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联

[0039] 1、取 10mgALP 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;

[0040] 2、向步骤 1 获得浓缩液中加入 0.2ml 的 0.1M  $\text{NaIO}_4$  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;

[0041] 3、向步骤 3 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 CYFRA21-1 单克隆抗体,室温避光轻轻搅拌 2 小时,再加入 0.1ml 的 4mg/ml  $\text{NaBH}_4$  溶液,混匀,置 4℃下 2 小时;

[0042] 4、将上述液装入透析袋中,对 0.15M PH7.4PBS 透析,4℃过夜,收集保留液;

[0043] 5、向步骤 4 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;

[0044] 6、将步骤 5 获得的溶液装入透析袋中,用 0.15M PH7.4 的 PB 缓冲盐水透析 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 : 100 的比例添加 1M  $\text{MgCl}_2$  溶液,即得碱性磷酸酶 (ALP) 与 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联物,最后将收集到的碱性磷酸酶 (ALP) 与 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以 1 : 1000 的体积比混合均匀,即得酶反应物。

[0045] 第三步:

[0046] 反应增强剂配制步骤,配制 1L:

[0047] 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;

[0048] 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;

[0049] 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。

[0050] 第四步:

[0051] 稀释液配制步骤,配制 1L:

[0052] 1、称取 NaCl9.0g 和 BSA 60g 于 1L 的容器中;

[0053] 2、用移液器将 Proclin-300 量取 0.5ml 加 10ml 纯化水溶解,倒入上述 1L 的容器中;

[0054] 3、最后定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2um 滤器过滤,贴好标签于 2-8℃冷库贮存,有效期为 12 个月。

[0055] 第五步:

[0056] 校准品和质控品的配制:

[0057] 校准品浓度分别为 5、15、30、80、160ng/ml;质控品浓度分别为 15、80ng/ml。

[0058] 第六步:

[0059] 清洗浓缩液配制步骤,配制 1L:

[0060] 1、称取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中;

[0061] 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；

[0062] 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；

[0063] 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；

[0064] 5、调 PH，控制其范围在 7.35-7.45 之间；

[0065] 6、最后定容 1000ml，完全溶解后用 0.2um 滤器过滤即得。

[0066] 第七步：

[0067] 底物溶液配制步骤，配制 1L：

[0068] 1、称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.002g 和 Proclin-300 0.2ml 于 1L 烧杯中；

[0069] 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；

[0070] 3、加入 250ml Lumi-Phos 480 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。

[0071] 本发明工作原理：本品为夹心法化学发光免疫分析法与磁性微粒分离技术相结合的一种检测方法。在标本、校准品和质控品中加入定量的酶标 CYFRA21-1 单抗、结合着磁性微粒的 CYFRA21-1 单克隆抗体及稳定增强剂。37℃ 孵育后，磁性微粒上结合的 CYFRA21-1 单克隆抗体与酶标单克隆抗体分别与 CYFRA21-1 分子的不同表位结合，形成“三明治”结构。在外加磁场中直接沉淀，不需离心即可分离。倒去上清液，清洗沉淀的复合物，然后加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解，形成不稳定的激发态中间体，当激发态中间体回到基态时便发出光子，形成发光反应，即可使用发光仪检测反应的发光强度，根据标准曲线即可算出样品中的 CYFRA21-1 含量。在检测范围内，发光强度与样本中的 CYFRA21-1 浓度成正比。

[0072] 本发明的主要创新之处在于：

[0073] 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，同时在出结果时间上相对现有技术缩短了至少 10 分钟，并达到了较佳的性能参数。

[0074] 2、本发明公开了一种新的专用稳定增强剂以及清洗液浓缩液，使得反应过程更加稳定可靠，实验数据灵敏有效，在提高产品性能的同时，并且大大降低了产品成本；

[0075] 3、试剂盒中的磁分离试剂，酶反应物，稳定增强剂，校准品、质控品，清洗液浓缩液、稀释液以及底物溶液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。

## 具体实施方式

[0076] 实施例 1、

[0077] 一、磁珠缓冲液配制操作规程：配方见表 1，以配制 1L 为例：

[0078] 1、称取 TRIS 4.58g 和 NaCl 6.81g 于 1L 容器中，称取 0.96g TWEEN-20 于 20ml 容器中加适量水使其完全溶解后，倒入上述容器中；

[0079] 2、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于少量纯化水的烧杯中完全溶解后，倒入

上述 1L 容器中；然后在 1L 容器中加入 800ml 纯化水，充分搅拌，使试剂完全溶解；

[0080] 3、调节 PH 计测量其 PH 值；用 HCl 或 NaOH 调 PH，测量其 PH 在 7.95-8.05 之间即符合要求；

[0081] 4、称取 BSA（牛血清白蛋白）3g 倒入上述容器中；

[0082] 5、最后定容至 1000ml，测 PH 值，范围在 7.95-8.05 之间即符合要求，用 0.2um 滤器过滤；

[0083] 过滤完后贴好标签于 2-8℃ 冷库贮存，磁珠缓冲液有效期为 12 个月；

[0084] 磁珠缓冲液表 1

[0085]

[0086]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	4.58g	分析纯
NaCl	6.81g	分析纯
TWEEN-20	0.96g	分析纯
Proclin-300	0.2ml	/
加水至	加至 800ml，溶解混匀	
PH	8.0±0.05	
加水至	加至 1000ml	
BSA	3.0g	
验证 PH	8.0±0.05	
0.2um 滤器过滤		

[0087] 二、磁分离试剂的制备过程

[0088] 1、将 1.0mg DSS（辛二酸二琥珀酰亚胺酯）溶于 50ul DMSO 中，即浓度为 20mg/ml；取 2mg 抗 CYFRA21-1 单克隆抗体（天健生物制药（天津）有限公司，浓度为 2.14mg/ml）溶于 PH 9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml；

[0089] 2、计算 DSS 的投入量，按照以下公式计算： $(\text{抗体质量} / 16000) \times 10 \times 368 / C_{\text{DSS}}$ ，其中  $C_{\text{DSS}}$  指代 DSS 的物质的量浓度 mol/L；

[0090] 3、用移液枪吸取相应体积的 DSS 加入到步骤 1 的抗体溶液中，置室温 90min；

[0091] 4、将步骤 3 抗体溶液加入到 Centricon-10 浓缩管中然后放入到 sigma2-16k 高速冷冻离心机中在 3000g 的离心力下浓缩约 30min 至体积为 0.5ml；

[0092] 5、取 0.5ml 磁珠，磁珠浓度为 0.5g/ml，所述的磁珠直径在 0.9 μm 之间，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；

[0093] 6、每次加入 1.5ml PH9.5 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磁珠中，混匀后室温反应 4 小时，保持混匀状态；

[0094] 7、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37 度 15 分钟,其中 TRIS 的加样量为 1mg 抗体加 0.15ml TRIS ;

[0095] 8、每次加入 1.5ml PH 7.2 0.1mol/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 ;

[0096] 9、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶,即为 0.05% 的 CYFRA21-1 磁分离试剂 ;磁珠保存液配方为 0.1% BSA,0.05% 吐温 -20,0.02% Na<sub>3</sub>,20% 乙醇,4℃ 保存。

[0097] 10、将步骤 9 获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1 : 1 的比例混匀 ;

[0098] 11、贴好标签于 2-8℃ 冷库贮存,磁分离试剂有效期为 12 个月 ;

[0099] 实施例 2

[0100] 一、酶反应物稀释液配制操作规程 ;配方见表 2,以配制 1L 为例 :

[0101] 1、取 Tris 6.06g、NaCl 13.0g、ZnCl<sub>2</sub> 0.05g、Proclin-300 0.2ml 和 MgCl<sub>2</sub> 0.05g 于烧瓶中 ;然后在烧瓶中加入 800ml 纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解 ;

[0102] 2、用 HCl 或 NaOH 调 PH,测量使 PH 在 7.35-7.45 范围内 ;

[0103] 3、称取 BSA 3g 倒入上述容器中 ;

[0104] 4、最后定容至 1000ml,测 PH 值,范围在 7.35-7.45 之间即符合要求,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 ;

[0105] 酶反应物稀释液表 2

[0106]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	6.06g	分析纯
NaCl	13.0g	分析纯
Proclin-300	0.2ml	/
MgCl <sub>2</sub>	0.05g	分析纯
Zncl <sub>2</sub>	0.05g	分析纯
纯化水	加至 800ml, 溶解混匀	
HCL 或者 NaOH	调节 PH 到 7.4±0.05	
BSA	3.0g	/
纯化水	加至 1000ml, 充分混匀	
验证 PH	7.4±0.05	
0.2um 滤器过滤		

[0107] 二、碱性磷酸酶 (ALP) 与抗 CYFRA21-1 单克隆抗体的偶联

[0108] 1、取 10mgALP 加入 5ml 生理盐水中,加入到 Centriprep YM10 浓缩管中,3000RPM 离心大约 20 分钟,浓缩至 1 毫升。

[0109] 2、向步骤 1 获得浓缩液中加入 0.2ml 的 0.1M NaIO<sub>4</sub> 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 ;

[0110] 3、向步骤2获得保留液中加入0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使PH升高到9.0~9.5,然后立即加入2.5mg抗CYFRA21-1单克隆抗体(天健生物制药(天津)有限公司,浓度为2.14mg/ml),室温避光轻轻搅拌2小时,再加入0.1ml的4mg/ml NaBH<sub>4</sub>(硼氢化钠)溶液,混匀,再置4℃下2小时;

[0111] 4、将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4℃过夜,收集保留液;

[0112] 5、向步骤4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,最后沉淀物溶于少量0.15M PH7.4的PBS中;

[0113] 6、将步骤5获得的溶液装入透析袋中,用0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析约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1:100的比例添加1M MgCl<sub>2</sub>溶液,即得碱性磷酸酶(ALP)与CYFRA21-1单克隆抗体的偶联物,最后将收集到的碱性磷酸酶(ALP)与CYFRA21-1单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以1:1000的体积比混合均匀,即得酶反应物。

[0114] 实施例3

[0115] 反应增强剂配制操作规程:配方见(表3),以配制1L为例:

[0116] 1、称取TRIS(三羟甲基氨基甲烷,分子式:(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)1.56g和NaCl4.23g于1L容器中;用移液器将Proclin-300量取0.2ml于少量纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

[0117] 2、用量筒量取800ml纯化水于1L容器中,充分搅拌,直至完全溶解;用HCL或NaOH调PH,测量其范围在7.35-7.45之间;

[0118] 3、称取Mak330.9g于上述1L容器中;

[0119] 4、最后定容1000ml,完全溶解后,测PH值,范围在7.35-7.45之间即符合要求,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;

[0120] 反应增强剂的配制(表3)

[0121]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	1.56g	分析纯
NaCl	4.23g	分析纯
Proclin-300	0.2ml	/
纯化水	加至800ml,混匀溶解	
PH	7.4±0.05	
Mak33	加Mak330.9g于800ml纯化水中	
纯化水	加至1000ml,充分混匀	
验证 PH	7.4±0.05	
0.2um 滤器过滤		

[0122] 实施例 4

[0123] 稀释液配方见（表 4），以配制 1L 为例：

[0124] 1、称取 NaCl 9.0g 和 BSA 60g 于 1L 的容器中；

[0125] 2、用移液器将 Proclin-300 量取 0.5ml 加 10ml 纯化水溶解，倒入上述 1L 的容器中；3、最后定容 1000ml，完全溶解后，用 0.2um 滤器过滤，贴好标签于 2-8℃冷库贮存，有效期为 12 个月。

[0126] 稀释液的配制（表 4）

[0127]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
NaCl	9g	分析纯
Proclin-300	0.5ml	/
BSA	60g	/
0.2um 滤器过滤		

[0128] 实施例 5

[0129] 校准品和质控品的配制：

[0130] 1、最高点：最高浓度点为 X，目标点浓度为 A, B, C, D, E, F，配制 V 体积的溶液时，需加入原料的体积为分别为：表 5

[0131]

浓度	加入校准品稀释液体积	加入 X 体积
A	$V-A*V/X$	$A*V/X$
B	$V-B*V/X$	$B*V/X$
C	$V-C*V/X$	$C*V/X$
D	$V-D*V/X$	$D*V/X$
E	$V-E*V/X$	$E*V/X$
OF	$V-F*V/X$	$F*V/X$

[0132] 2、细胞角质蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 定量测定试剂盒 CYFRA21-1 校准品原料（购于 PPS 公司，浓度为 5.7mg/ml）用稀释液（具体配方见实施例 4）配制成浓度点为 5、15、30、80、160ng/ml；质控品用稀释液配制的浓度点为 15、80ng/ml。

[0133] 3、完全溶解后，贴好标签于 2-8℃冷库贮存，有效期为 12 个月。

[0134] 实施例 6：

[0135] 清洗浓缩液配制操作规程：配方见（表 6），以配制 1L 为例：

[0136] 1、称取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中；

[0137] 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；

[0138] 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；

[0139] 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；

[0140] 5、用 HCl 或 NaOH 调 PH，测量其范围在 7.35-7.45 之间；

[0141] 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；

[0142] 清洗浓缩液的配制（表 6）

	试剂	1000ml 用量	试剂级别
	TRIS	12.54g	分析纯
	NaCl	325.6g	分析纯
	Tween-20	5g	分析纯
	Proclin-300	0.2ml	/
[0143]	纯化水	加至 800ml，混匀溶解	
	PH	7.4±0.05	
	纯化水	加至 1000ml，混匀溶解	
	验证 PH	7.4±0.05	
	0.2um 滤器过滤		

[0144] 实施例 7

[0145] 底物溶液配制操作规程：配方见（表 7），以配制 1L 为例：

[0146] 1、称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.002g 和 Proclin-300 0.2ml 于 1L 烧杯中；

[0147] 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；

[0148] 3、加入 250ml Lumi-Phos 480 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。

[0149] 化学发光底物的配制（表 7）

	试剂	1000ml 用量	试剂级别
	TRIS	2.35g	分析纯
	NaCL	6.41g	分析纯
	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0.002g	分析纯
	Proclin-300	0.2ml	/
[0150]	纯化水	加至 600ml, 混匀溶解	
	PH	8.0±0.05	
	Lumi-Phos 480	250ml, 混匀	
	验证 PH	8.0±0.05	
	0.2um 滤器过滤		
	纯化水	加至 1000ml, 充分混匀	

[0151] 本发明的测试方法如下

[0152] 1、加 15 μl CYFRA21-1 校准品、质控品、待测标本至对应试管底部。

[0153] 2、加 30 μl 酶反应物至每一试管中。

[0154] 3、加 30 μl 反应增强剂至每一试管中。

[0155] 4、加 30 μl 磁分离试剂至每一试管中。

[0156] 5、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 30 分钟。

[0157] 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。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。

[0158] 7、清洗液浓缩液用纯化水稀释 20 倍后，加 200 μl 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。

[0159] 8、重复步骤 6、7、6 一遍。

[0160] 9、加 200 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。

[0161] 10、如遇到高值 HOOK 样本，为了避免出现高值 HOOK 效应，建议临床医师根据其余测试指标选择合适的稀释倍数对样品进行稀释。

[0162] 临床试验：

[0163] 1、检测数据

[0164] 测定了 1200 份正常人血清样本。血清样本体检结果均无肝、脑、肾、消化道疾病，半年内无输血和大手术史，妇女不在妊娠期和哺乳期。将测值进行统计学分析，得出正常血清参考范围： $< 3.30\text{ng/ml}$ 。与国外知名公司生产的试剂盒的检测结果相比，本发明试剂盒更加精确，精确到小数点后两位。

[0165] 本数据仅供参考，不同地区、不同个体以及采用不同方法进行检测，所测得的 CYFRA21-1 水平也会有所不同，建议各实验室建立自己的正常值范围。不可仅凭本方法得出

的 CYFRA21-1 值作出诊断,应结合临床其他资料分析结果,包括病人的具体情况和治疗状况。通过其他方法得到的样品中的 CYFRA21-1 浓度值与本试剂盒测定结果不具有直接的可比性。超出试剂盒测定范围的样本,系统将无法给出确切的数值。如欲测定其确切的结果,建议稀释后再进行测定。本试剂盒的检测结果仅供临床参考,不能单独作为确诊或排除病例的依据,为达到诊断目的,此检测结果要与临床检查、病史和别的检查结合使用。本品可用于血清样本的测定,用于其他体液样本中 CYFRA21-1 浓度测定的可靠性未得到充分确认。

[0166] 2、本发明试剂盒性能指标

[0167] 分析灵敏度定义为:对 20 次零校准品的测定,取其 2 倍的平均偏差,其在标准曲线上所对应的浓度即为分析灵敏度;

[0168] 分析灵敏度:0.40ng/ml

[0169] 精密性:批内变异 CV% $\leq$  10.0%;批间变异 CV% $\leq$  15.0%

[0170] 线性系数: $r \geq 0.9900$

[0171] 线性范围:0.40-500ng/ml

[0172] 特异性:测定 100  $\mu$ g/L 的 CK-19,干扰度 $<$  0.05%

[0173] 测定 50  $\mu$ g/L 的 CK-18,干扰度 $<$  0.03%。

专利名称(译)	细胞角质蛋白19片段(CYFRA21-1)定量测定试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102426245A</a>	公开(公告)日	2012-04-25
申请号	CN201110257475.5	申请日	2011-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古科慧生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	内蒙古科慧生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	内蒙古科慧生物科技有限责任公司		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	刘寿椿		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种细胞角质蛋白19片段CYFRA21-1的定量测定试剂盒，其特征在于，该试剂盒包含CYFRA21-1磁分离试剂，酶反应物，反应增强剂，稀释液，CYFRA21-1校准品、CYFRA21-1质控品，清洗液浓缩液以及底物溶液。本发明还公开了该试剂盒的制备方法。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，并且大大降低了产品成本。

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	4.58g	分析纯
NaCl	6.81g	分析纯