



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105445470 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201410441675. X

(22) 申请日 2014. 09. 01

(71) 申请人 江苏泽成生物技术有限公司

地址 214000 江苏省无锡市江阴市澄江中路
159 号 D405

(72) 发明人 夏振伟 杨旻 汪丹

(74) 专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 曾少丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

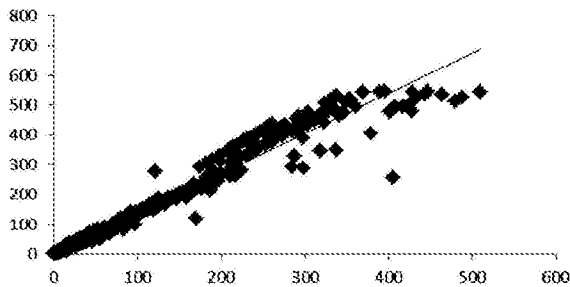
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒及其制备方法
与检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物。本发明还公开了该试剂盒的制备方法与使用该试剂盒检测糖类抗原 CA125 的方法。本发明以异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体和碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体制备抗试剂,以抗异硫氰酸荧光素抗体偶联羧基磁珠制得磁微粒试剂,使免疫反应更容易混匀和分离,而且大大提高了反应速度,以新型化学发光底物 APLS 为底物,提高了试剂盒的灵敏度和特异性性能。本发明的检测试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽,可配合半自动、全自动仪器使用。



1. 一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物;所述试剂盒中各组分按照如下方法制备:

一、校准品、质控品的配制:

用校准品缓冲液溶解糖类抗原 CA125,配置糖类抗原 CA125 校准品和糖类抗原 CA125 质控品;其中,所述校准品缓冲液是通过在 1L 新生牛血清中加入 0.01g ~ 0.05g 的四环素和 0.1g ~ 0.5g 硫酸新霉素,溶解后经过 0.22 μ m 滤膜处理制备;

二、抗试剂的配制:

(1)、抗试剂缓冲液的制备:

Tris:12.12mg ~ 60.57mg,四环素:0.01g ~ 0.05g,绵羊血清:1g ~ 5g,新生牛血清 3g ~ 10g,马血清 1g ~ 5g 加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解;

(2)、将异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体和碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体加入到所述抗试剂缓冲液中充分搅拌至完全溶解;

三、磁微粒试剂的制备:

将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制得磁微粒试剂;

四、发光底物的制备

将 ALPS 溶解于发光底物缓冲液中制得发光底物。

2. 根据权利要求 1 所述的一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,其特征在于,所述抗试剂是按照以下步骤制备:

(1)、异硫氰酸荧光素与糖类抗原 CA125 抗体的偶联,获得异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体:

首先用抗试剂缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的异硫氰酸荧光素溶液,按照糖类抗原 CA125 与异硫氰酸荧光素的质量之比为 1:1.1 的量,将二者转移到棕色玻璃瓶中,室温下搅拌 1 ~ 2 小时;充分反应后使用 pH = 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液进行平衡,然后凝胶层析分离纯化得到的异硫氰酸荧光素标记的糖类抗原 CA125 包被抗体;

(2)、碱性磷酸酶与糖类抗原 CA125 抗体的偶联,获得碱性磷酸酶标记的糖类抗原 CA125 标记抗体:

首先用抗试剂缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的碱性磷酸酶溶液,按照碱性磷酸酶与糖类抗原 CA125 的摩尔比为 1:2 ~ 1:10 的量将二者转移至棕色瓶中,室温下搅拌 4 ~ 5 小时,充分反应后使用 pH = 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到的碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体;

(3)、将步骤 (1) 中获得的异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体和步骤 (2) 中获得的碱性磷酸酶标记的糖类抗原 CA125 标记抗体,加入含有表面活性剂的 Tris 盐缓冲液,充分搅拌后获得所述抗试剂;所述表面活性剂为 Tween20、Triton X-100、Bronidox 中的一种或多种,表面活性剂的添加量为 0.01% ~ 0.5%。

3. 根据权利要求 1 所述的一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,其特征在于,所述磁微粒试剂是按照以下步骤制备的:

(1)、取一定体积的充分混匀后的羧基磁珠浓缩液至反应瓶中,将该反应瓶在磁场放置 15min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入 2 ~ 5 倍于反应瓶中羧基磁珠体积的磁微粒缓冲液,震荡清洗 20-30min;再将反应瓶置于磁场中 15min 后吸去上清;重复清

洗羧基磁珠 3 遍 ;最后将羧基磁珠溶液定容到 10-50mg/mL,混匀 ;所述磁微粒缓冲液的配置方法是 :Tris :12.12mg,氯化钠 5.82mg,甲基纤维醚 50g,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解 ;

(2)、连接反应 :按照羧基磁珠与抗异硫氰酸荧光素抗体质量比为 100:1 的比例,在羧基磁珠中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,在 2 ~ 8°C 内保持混匀状态反应 18 小时 ;

(3)、反应瓶在在磁场放置 15min,待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液洗 3 遍,随后定容至 10mg/mL,2 ~ 8°C 保存,制得所需待用磁微粒试剂。

4. 根据权利要求 1 所述的一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,其特征在于,所述发光底物是按照以下步骤制备的 :

用 4 ~ 10 倍于 ALPS 体积的发光底物缓冲液充分溶解 ALPS,所述发光底物缓冲液的配置方法是 :Tris12.12g ~ 121.14g,氯化钠 5.82g,光泽精 0.03g,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调节缓冲液的 pH 至 9.5。

5. 根据权利要求 1 所述的一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括清洗液,所述清洗液的配置方法为 :Tris12.12g,氯化钠 5.82g, Tween-20 50mL,曲拉通 -100 50mL,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解。

6. 根据权利要求 1-4 任一项所述的一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒的制备方法,该方法包括 :分别配制 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物 ;将 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物独立地置于包装容器内,得到糖类抗原 CA125 的定量测定试剂盒。

7. 利用权利要求 1 ~ 6 任一项所述的一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒定量检测糖类抗原 CA125 的方法,该方法包括以下步骤 :

(1) 取三支试管分别加 30 μ L 糖类抗原 CA125 的校准品、30 μ L 糖类抗原 CA125 的质控品、30 μ L 待测样本 ;

(2) 每一试管中加入 60 μ L 抗试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,置于 37°C 下水浴 30 分钟 ;

(3) 每一试管中加入 30 μ L 磁微粒试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,置 37°C 下水浴 5 分钟 ;

(4) 将试管在磁分离器上沉淀 2 分钟,缓慢的倒转试管和磁分离器,倒出上清液 ;把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴 ;

(5) 每支试管中加入 300 μ L 清洗液,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同磁分离器一起,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 ;

(6) 重复步骤 (5) 一次 ;

(7) 每一试管中加入 200 μ L 发光底物,振荡混匀 3s,用化学发光仪检测发光强度。

糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒及其制备方法与检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于医疗器械生物类免疫体外诊断领域,主要涉及一种基于磁微粒分离化学发光法定量检测血液中糖类抗原 CA125 的试剂盒及其制备方法,以及应用该试剂盒定量检测血液中糖类抗原 CA125 的方法。

背景技术

[0002] 卵巢恶性肿瘤是恶性程度极高的妇科肿瘤之一,其发病率仅次于乳腺癌,死亡率居妇科恶性肿瘤的首位。在卵巢原发性恶性肿瘤中,60%以上是上皮性卵巢癌(EOC),由于卵巢位于妇女盆腔深部,卵巢恶性上皮性肿瘤(EOC)患者早期一般不会表现出明显症状和体征,难以早期发现,80%患者就诊时已为晚期。目前,EOC的早期发现主要是通过筛查实现,其中糖类抗原 125(Cancer Antigen125, CA125)检测为重要手段。

[0003] CA125 是 Bast 等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,其分子量大于 200KD,正常人血清 CA125 中的(RIA 检测)阳性临界值为 35KU/L。CA125 常存在于病人上皮性卵巢癌组织和血清中,因其异常升高与卵巢癌等恶性肿瘤相关,故被建议用作卵巢癌的特异性标志物。CA125 在多种肿瘤与非肿瘤细胞均有表达,研究发现 CA125 在子宫、子宫颈、输卵管和肺、胸膜及腹膜等处均可生成,这些部位的组织炎症或被卵巢癌侵犯均可使 CA125 出现在血循环中。CA125 增高见于卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌等;一些非恶性肿瘤如子宫内膜异位症、平滑肌瘤、盆腔炎、卵巢囊肿、良性肝脏病和胃肠道疾病等也增高;因此,CA125 可以作为患者疾病进展、预防和检验化疗疗效的标志物。

[0004] 目前,国内糖类抗原 CA125 临床检测主要以国外进口试剂和免疫组化试剂为主,国外进口试剂价格非常昂贵,给患者带来很大的经济负担,不利于在基层普及。具有自主知识产权的国产糖类抗原 CA125 免疫化学发光检测试剂盒目前还较少,也仅停留在 96 孔微孔板式技术水平上,检测灵敏度较低、线性窄、特异性较差,也不利于高通量的全自动检测。

[0005] 因此,有待开发对糖类抗原 CA125 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

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服现有的缺陷,提供一种新的可定量检测糖类抗原 CA125 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。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0008] 一方面,本发明提供了一种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物。

[0009] 其中:

[0010] 一、糖类抗原 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 质控品的配制方法如下:

[0011] 用标准品缓冲液溶解糖类抗原 CA125,配置糖类抗原 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 校准品,其中,所述校准品缓冲液是通过在 1L 新生牛血清中加入 0.01g~0.05g 的四

环素和 0.1g ~ 0.5g 硫酸新霉素,溶解后经过 0.22 μm 滤膜处理制备;

[0012] 二、抗试剂的制备方法如下:

[0013] (1)、抗试剂缓冲液的制备:

[0014] Tris :12.12mg ~ 60.57mg,四环素 :0.01g ~ 0.05g,绵羊血清 :1g ~ 5g,新生牛血清 3g ~ 10g,马血清 1g ~ 5g 加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解;

[0015] (2)、异硫氰酸荧光素与糖类抗原 CA125 的偶联,获得异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体:

[0016] 首先用抗试剂缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的异硫氰酸荧光素溶液,使用分光光度计在 495nm 处读取吸光值,来调整浓度,然后按照糖类抗原 CA125 抗体与异硫氰酸荧光素的质量之比为 1:1.1,将二者同时转移到棕色玻璃瓶中,室温下搅拌 1 ~ 2 小时,充分反应后使用 pH = 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液进行平衡,然后凝胶层析分离纯化得到的异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体;紫外监测,记录仪记录纯化图谱,同时注意确认含有连接物的试管,注意、避光防护。

[0017] (3)、碱性磷酸酶与糖类抗原 CA125 抗体的偶联,获得碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体:

[0018] 首先用抗试剂缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的碱性磷酸酶溶液,可以根据分光光度计在 280nm 处读取吸光值,将碱性磷酸酶的吸光值应该在一定的范围内。然后按照碱性磷酸酶与糖类抗原 CA125 的摩尔比为 1:2 ~ 1:10 的量将二者转移至棕色瓶中,室温下搅拌 4 ~ 5 小时,充分反应后使用 pH = 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到的碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体;注意含有连接物的试管的避光防护。

[0019] (4)、将步骤 (2) 中获得的异硫氰酸荧光素标记的糖类抗原 CA125 包被抗体和和步骤 (3) 中获得的碱性磷酸酶标记的糖类抗原 CA125 标记抗体,加入含有表面活性剂的 Tris 盐缓冲液充,分搅拌后获得所述抗试剂;所述表面活性剂为 Tween20、Triton X-100、Bronidox 中的一种或多种,表面活性剂的添加量为 0.01% ~ 0.5%。

[0020] 三、磁微粒试剂的制备:

[0021] 将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制得磁微粒试剂。

[0022] (1)、取一定体积的充分混匀后的羧基磁珠浓缩液至反应瓶中,将该反应瓶在磁场放置 15min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入 2 ~ 5 倍于反应瓶中羧基磁珠体积的磁微粒缓冲液,混匀 20-30min。再将反应瓶置于磁场中 15min 后吸去上清。重复清洗羧基磁珠 3 遍。最后将羧基磁珠溶液定容到 10-50mg/mL,混匀;所述磁微粒缓冲液的配置方法是:Tris :12.12mg,氯化钠 5.82mg,甲基纤维醚 50g,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解;

[0023] (2)、连接反应:按照羧基磁珠与抗异硫氰酸荧光素抗体质量比为 100:1 的比例,在羧基磁珠中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,2 ~ 8°C 内保持混匀状态反应 18 小时;

[0024] (3)、反应瓶在在磁场放置 15min,待羧基磁珠沉降后用磷酸缓冲液清洗 3 遍,然后定容至 10mg/mL,2 ~ 8°C 保存,制得所需待用磁微粒试剂。

[0025] 四、发光底物的制备

[0026] 将 ALPS 溶解于发光底物缓冲液中制备发光底物。

[0027] 用 4 ~ 10 倍于 ALPS 体积的发光底物缓冲液充分溶解 ALPS, 所述发光底物缓冲液的配置方法是: Tris 12.12g ~ 121.14g, 氯化钠 5.82g, 光泽精 0.03g, 加入 1L 纯化水中, 充分搅拌至完全溶解, 用盐酸调节缓冲液的 pH 至 9.5。

[0028] 进一步的, 本发明的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒, 该试剂盒还包括清洗液。该清洗液主要用于在检测过程中清洗与磁微粒试剂反应后的样品, 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、Tween20 和 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。优选的清洗液的配置方法是: Tris 12.12g, 氯化钠 5.82g, Tween-20 50mL, 曲拉通-100, 50mL, 加入 1L 纯化水中, 充分搅拌至完全溶解。

[0029] 另一方面, 本发明提供了这种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒的制备方法, 包括以下步骤。

[0030] 分别配制 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物; 将 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物独立地置于包装容器内, 得到糖类抗原 CA125 的定量测定试剂盒。

[0031] 本试剂盒的异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体为能与人体内糖类抗原 CA125 抗原特异结合的单克隆抗体, 所述碱性磷酸酶标记的糖类抗原 CA125 标记抗体为能与糖类抗原 CA125 抗原特异结合的单克隆抗体。包被抗体和标记抗体除能与糖类抗原 CA125 抗原特异性结合外, 配对使用时可与抗原形成“三明治”夹心结构。

[0032] 再一方面, 本发明提供了利用这种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒检测糖类抗原 CA125 的方法, 该方法包括步骤:

[0033] (1) 取三支试管分别加 30 μ L 糖类抗原 CA125 的校准品、30 μ L 糖类抗原 CA125 的质控品、30 μ L 待测样本;

[0034] (2) 每一试管中加入 60 μ L 抗试剂, 用塑料薄膜覆盖试管, 轻轻振荡试管 30s, 置 37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 分钟;

[0035] (3) 每一试管中加入 30 μ L 磁微粒试剂, 用塑料薄膜覆盖试管, 轻轻振荡试管 30s, 置 37 $^{\circ}$ C 下水浴 5 分钟;

[0036] (4) 将三支试管在磁分离器上沉淀 2 分钟, 缓慢的倒转试管和磁分离器, 倒出上清液, 把倒转的试管连同磁分离器一起放在滤纸上, 用力拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0037] (5) 每支试管中加入 300 μ L 清洗液, 用塑料薄膜覆盖试管, 轻轻振荡试管 30s, 混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器, 倒出上清液, 把倒转的试管连同磁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;

[0038] (6) 重复步骤 (5) 一次;

[0039] (7) 每一试管中加入 200 μ L 发光底物溶液, 振荡混匀 3s, 用化学发光仪检测发光强度。

[0040] 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

仪器设备例如化学发光类测定仪的使用按照说明书操作进行；

[0041] 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；

[0042] 本发明的有益效果是：

[0043] 本发明的糖类抗原 CA125 定量检测试剂盒（磁微粒分离化学发光法）各试剂组分包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物,具有以下有益效果；

[0044] 1、本发明以碱性磷酸酶为标记酶,通过化学反应标记抗体,并使用凝胶层析分离纯化,提高了反应的灵敏度；

[0045] 2、本发明以抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制得磁微粒试剂,使免疫反应更容易混匀和分离,而且大大提高了反应速度；

[0046] 3、本发明以 APLS 为底物,该底物是辉光性底物,灵敏度高,可以快速达到平台期,平台稳定期长且信号较强,有利于信号的检测,提高了最终试剂盒的灵敏度和特异性性能；并进一步优化了化学发光增强体系,保证了终产品的信号灵敏度高和稳定性好、变异小；

[0047] 4、本试剂盒稳定性良好,有效期可至一年以上。

[0048] 5、本试剂盒在临床研究与国外进口试剂的符合相关性高达 95% 以上,且费用仅为其 1/5。

附图说明

[0049] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。

[0050] 图 1 是糖类抗原 CA125 的标准曲线；

[0051] 图 2 是糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒与进口检测试剂的检测效果相关性曲线。

具体实施方式

[0052] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说为了更清楚地理解本发明,参照下列实施例进一步描述本发明。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。

[0053] 实施例 1：

[0054] 各种缓冲液的配置,具体如下：

[0055] 1、Tris 盐 pH8.0 缓冲液

[0056] Tris :12.12mg,氯化钠 5.82mg,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调整最终 pH 为 7.5。

[0057] 2、校准品缓冲液的制备

[0058] 在 1L 新生牛血清中加入 0.01g 四环素和 0.1g 硫酸新霉素,充分溶解后经过 0.22 μ m 滤膜处理获得。

[0059] 3、抗试剂缓冲液

[0060] Tris :12.12mg ~ 60.57mg,四环素 :0.01g ~ 0.05g,绵羊血清 :1g ~ 5g,新生牛血

清 3g ~ 10g, 马血清 1g ~ 5g 加入 1L 纯化水中, 充分搅拌至完全溶解;

[0061] 4、磁微粒缓冲液

[0062] Tris :12. 12mg, 氯化钠 5. 82mg, 甲基纤维醚 50g, 加入 1L 纯化水中, 充分搅拌至完全溶解。

[0063] 5、发光底物缓冲液

[0064] Tris12. 12g ~ 121. 14g, 氯化钠 5. 82g, 光泽精 0. 03g, 加入 1L 纯化水中, 充分搅拌至完全溶解, 用盐酸调节缓冲液的 pH 至 9. 5 ;

[0065] 6、清洗液的浓缩液的配置

[0066] Tris12. 12g, 氯化钠 5. 82g, Tween-20 50mL, 曲拉通 -100, 50mL, 加入 1L 纯化水中, 充分搅拌至完全溶解。

[0067] 实施例 2 :糖类抗原 CA125 的定量测定试剂盒的制备

[0068] 1、校准品和质控品的制备

[0069] 首先 :用标准品缓冲液溶解糖类抗原 CA125, 配置成如表 1 所示的目标浓度的校准品和质控品 ;本实施例所用的糖类抗原 CA125 采购自国内外知名厂家 fitzgerald 公司。

[0070] 表 1 :校准品和质控品的制备

[0071]

试剂名称	校准品 A	校准品 B	校准品 C	校准品 D	校准品 E	校准品 F	质控品 Q1	质控品 Q2
目标浓度 U/mL	0	12	50	200	350	600	12	350

[0072] 2、抗试剂的制备方法如下 :

[0073] (1)、异硫氰酸荧光素与糖类抗原 CA125 抗体偶联, 获得异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体 :

[0074] 首先用抗试剂缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为 2. 5mg/mL 异硫氰酸荧光素溶液, 按照糖类抗原 CA125 与异硫氰酸荧光素的质量之比为 1:1. 1, 将二者同时转移到棕色玻璃瓶中, , 室温下搅拌 1 ~ 2 小时, 充分反应后使用 pH = 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液进行平衡, 然后凝胶层析分离纯化得到的异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体 ;

[0075] (2)、碱性磷酸酶与糖类抗原 CA125 抗体的偶联, 获得碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体 :

[0076] 首先用抗试剂缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为 2. 5mg/mL 的碱性磷酸酶溶液, 按照碱性磷酸酶与糖类抗原 CA125 的摩尔比为 1:2 的量将二者转移至棕色瓶中, 室温下搅拌 4 ~ 5 小时, 充分反应后使用 pH = 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液平衡, 然后使用凝胶层析分离纯化得到的碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体 ;紫外监测, 记录仪记录纯化图谱, 注意、避光防护。

[0077] (3)、将步骤 (1) 中获得的异硫氰酸荧光素标记的 CA125 包被抗体和和步骤 (2) 中获得的碱性磷酸酶标记的 CA125 标记抗体, 加入含有 0. 1% Tween 20 的 Tris 盐缓冲液中, 充分搅拌后获得所述抗试剂 ;

[0078] 3、磁微粒试剂的制备：

[0079] 将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基偶联制得磁微粒试剂。

[0080] (1)、取 10mL 的充分混匀后的羧基磁珠浓缩液至反应瓶中，将该反应瓶在磁场放置 15min，待羧基磁珠全部沉降后吸去上清，向反应瓶中加入 5 倍于反应瓶中羧基磁珠体积的磁微粒缓冲液，震荡清洗 20 ~ 30min；再将反应瓶置于磁场中 15min 后吸去上清。重复清洗羧基磁珠 3 遍。最后将羧基磁珠溶液定容到 10-50mg/mL，混匀；

[0081] (2)、连接反应：按照羧基磁珠与抗异硫氰酸荧光素抗体质量比为 100:1 的比例，在羧基磁珠中加入抗异硫氰酸荧光素抗体，在 2 ~ 8℃ 内保持混匀状态反应 18 小时；

[0082] (3)、反应瓶在在磁场放置 15min，待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液清洗 3 遍，随后定容至 10mg/mL，2 ~ 8℃ 保存，制得所需待用磁微粒试剂。

[0083] 4、发光底物的制备

[0084] 用 7 倍于 ALPS 体积的发光底物缓冲液充分溶解 ALPS。

[0085] 5、将糖类抗原 CA125 校准品、糖类抗原 CA125 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物独立地置于包装容器内，得到糖类抗原 CA125 的定量测定试剂盒。

[0086] 实施例 3：用糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒检测糖类抗原 CA125 的步骤

[0087] 利用这种糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒检测糖类抗原 CA125 的方法，该方法包括步骤：

[0088] (1) 取三支试管分别加 30 μ L 糖类抗原 CA125 的校准品、30 μ L 糖类抗原 CA125 的质控品、30 μ L 待测样本；

[0089] (2) 每一试管中加入 60 μ L 抗试剂，用塑料薄膜覆盖试管，轻轻振荡试管 30s，置 37℃ 下水浴 30 分钟；

[0090] (3) 每一试管中加入 30 μ L 磁微粒试剂，用塑料薄膜覆盖试管，轻轻振荡试管 30s，置 37℃ 下水浴 5 分钟；

[0091] (4) 将试管在磁分离器上沉淀 2 分钟，缓慢的倒转试管和磁分离器，倒出上清液，把倒转的试管连同磁分离器一起放在滤纸上，用力拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴；

[0092] (5) 每支试管中加入 300 μ L 清洗液，用塑料薄膜覆盖试管，轻轻振荡试管 30s，混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器，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；

[0093] (6) 重复步骤 (5) 一次；

[0094] (7) 每一试管中加入 200 μ L 发光底物溶液，振荡混匀 3s，用化学发光仪检测发光强度；

[0095] (8) 数据的处理：

[0096] 通过四参数非线性拟合校准品的浓度值和发光值获得标准曲线的四参数 Logistic 方程： $Y = 6120.937 + (1714028.6678 - 6120.9357) / (1 + (X/881.5977)^{-1.2987})$ ($R = 0.999865$)，标准曲线如图 1 所示，其中，横轴代表校准品的浓度值，纵轴代表发光值。

[0097] 临床数据：

[0098] 1、为了评价本发明的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒的稳定性和准确性，每隔一

段时间对本实施例的试剂盒性能进行测定。测试结果如表 2 所示,由表 2 可以看出:糖类抗原 CA125 与发光值的相关性连续 15 个月保持在 0.99 以上,本发明的试剂盒的最低检测限和准确度的相对偏差以及每批次的质控品的变异系数也符合国家标准。

[0099] 表 2:本实施例的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒分析性能和稳定性表。

[0100]

测试参数	测试值							
	0月	3月	6月	9月	12月	13月	14月	15月
外观	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
曲线相关系数	0.9934	0.9951	0.9992	0.9917	0.9977	0.9995	0.9973	0.9942
最低检测限 U/mL	0.12	0.18	0.09	0.28	0.22	0.18	0.20	0.13

[0101]

准确度 (%)	96.1	98.3	102.5	104.2	96.4	98.4	102.1	103.1	
重复性	Q1%	2.8	4.7	5.1	4.4	4.2	3.4	2.1	3.2
	Q2%	3.5	1.8	4.6	6.1	3.2	4.3	4.0	5.4

[0102] 2、糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒与进口检测试剂的检测效果的比较

[0103] 选取 240 份标本,将标本中的低中高值分离后,对低中高值样本进行单独的线性回归分析,得到了线性回归方程 $y = 1.3481x + 1.1556$, $R^2 = 0.9712$ 。该回归曲线方程如图 2 所示,其中,横轴代表对照测值,纵轴代表参考测值。表 2 的数据表明本发明的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒的有较好的稳定性和准确性。

[0104] 3、采用本实施例的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒,对 400 份正常人样本进行检验;用 SPSS19.0for windows 软件对正常人样本的测定结果进行正态性检验,数据整体分布基本属于非正态分布。

[0105] 表 3:本实施例的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒正态性检验表

[0106]

自由度	p 值
400	0.00

[0107] 4、本实施例的糖类抗原 125 定量测定试剂盒临床参考值范围;以正常人样本检测值的双侧 95 百分位数作为参考值。

[0108] 表 4:本实施例的糖类抗原 CA125 定量测定试剂盒临床参考值范围表

[0109]

计算基本范围 (U/mL)	
95%	0-20.1120
修正参考值范围 (U/mL)	
95%	0-20

[0110] 可以看出,本发明的试剂盒性能可靠,灵敏度高,线性范围宽,可配合全自动仪器使用。

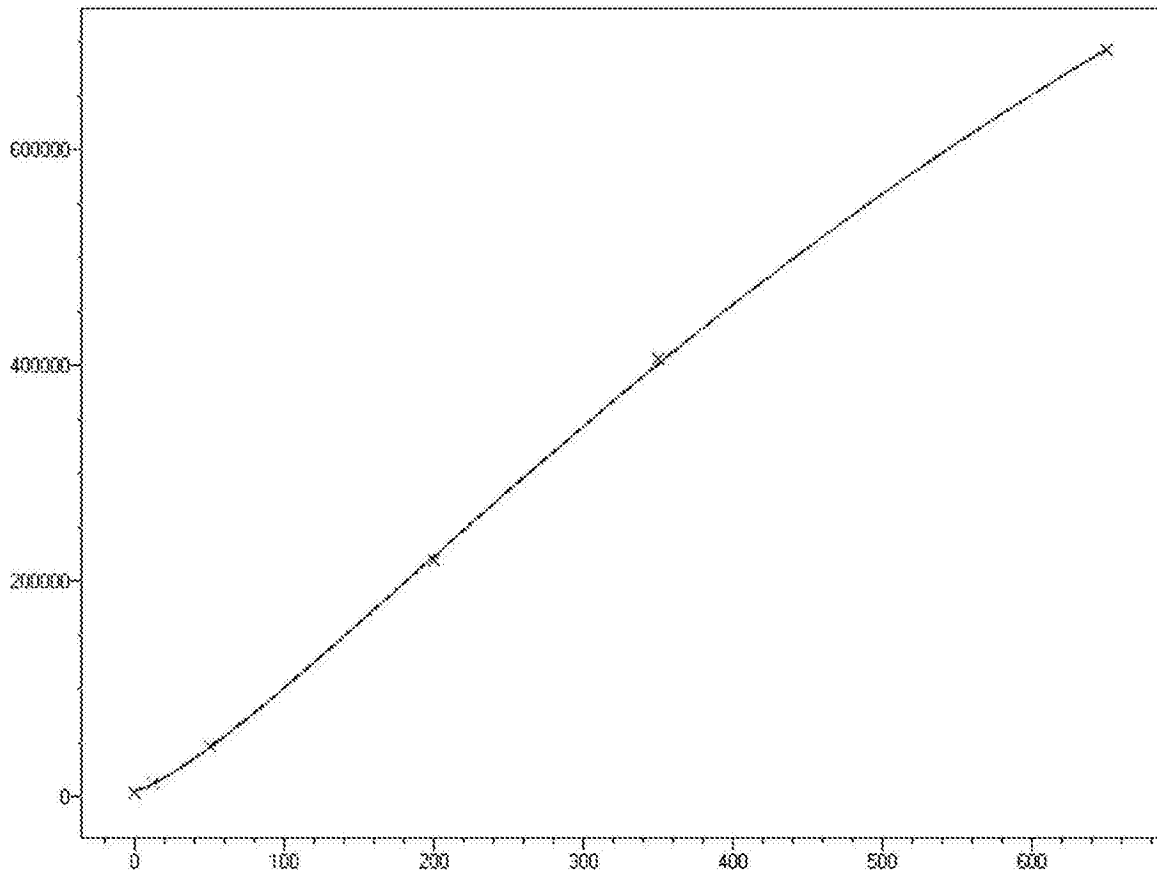


图 1

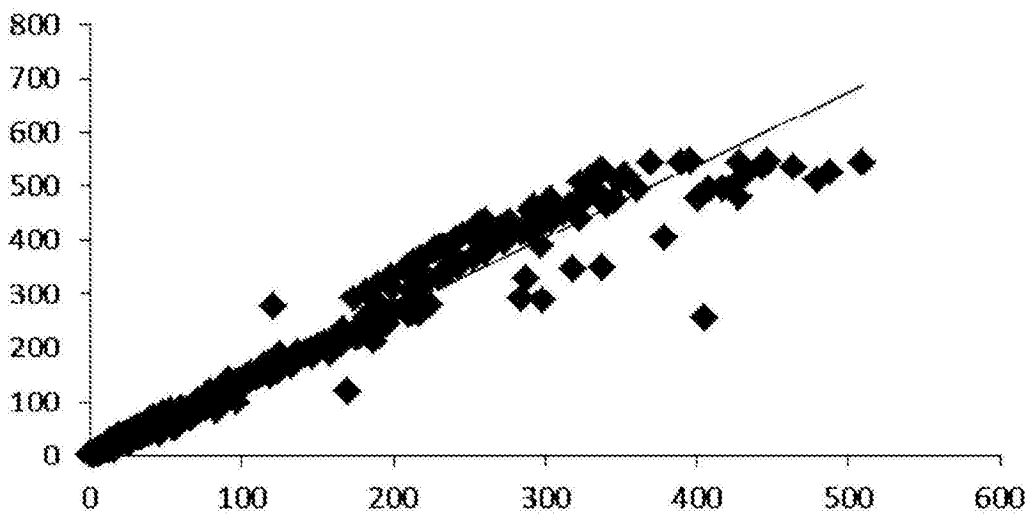


图 2

专利名称(译)	糖类抗原CA125定量测定试剂盒及其制备方法与检测方法		
公开(公告)号	CN105445470A	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201410441675.X	申请日	2014-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	夏振伟 杨旻 汪丹		
发明人	夏振伟 杨旻 汪丹		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/533 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种糖类抗原CA125定量测定试剂盒，该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物。本发明还公开了该试剂盒的制备方法与使用该试剂盒检测糖类抗原CA125的方法。本发明以异硫氰酸荧光素标记的CA125包被抗体和碱性磷酸酶标记的CA125标记抗体制备抗试剂，以抗异硫氰酸荧光素抗体偶联羧基磁珠制得磁微粒试剂，使免疫反应更容易混匀和分离，而且大大提高了反应速度，以新型化学发光底物APLS为底物，提高了试剂盒的灵敏度和特异性性能。本发明的检测试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽，可配合半自动、全自动仪器使用。

