



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108008132 B

(45)授权公告日 2020.05.08

(21)申请号 201711257970.X

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.12.04

G01N 33/535(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/577(2006.01)

申请公布号 CN 108008132 A

审查员 许珊萍

(43)申请公布日 2018.05.08

(73)专利权人 北京惠中医疗器械有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路37号

专利权人 刘向祎

(72)发明人 刘承举 刘向祎 路晟

(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 张淑贤

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

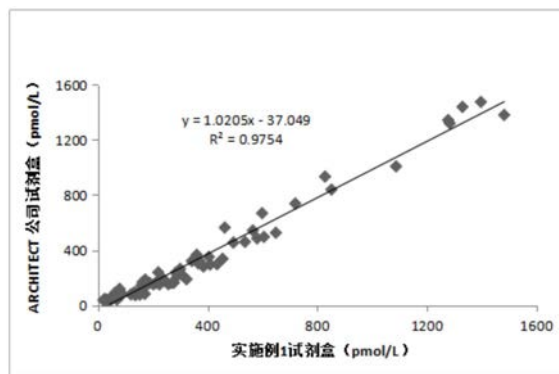
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒及其制备方法和应用。本发明试剂盒,将辣根过氧化物酶进行硅烷化处理,阻断了辣根过氧化物酶成为碱性磷酸酶催化化学发光底物发光过程中磷酸受体的可能,解决了辣根过氧化物酶的存在会干扰碱性磷酸酶催化发光的问题,使得能够首先采用化学发光底物液检测磁微粒上碱性磷酸酶引起的发光强度大小,再采用显色底物液检测磁微粒上辣根过氧化物酶引起的显色的吸光度的大小,实现对样品中HE4和CA125的同时检测。本发明试剂盒检测过程简单、反应时间短,试剂用量少,节约成本,灵敏度高、试剂重复性和稳定性好。



1. 一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,其特征在于,包括HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒、酶标记物、化学发光底物液、显色底物液;其中酶标记物由碱性磷酸酶标记的HE4抗体和硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体组成;

所述化学发光底物液为0.2mol/L pH 9.7的Tris缓冲液溶液,所述Tris缓冲液溶液中还包括2.7mol/L的氯化钠、0.08mmol/L的十六烷基三甲基氯化铵和2.6mmol/L的3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐;

显色底物液为pH 6.0±0.5醋酸钠-柠檬酸缓冲溶液,其中醋酸钠0.33mol/L,柠檬酸0.017mol/L,所述醋酸钠-柠檬酸缓冲溶液还包括10%的甘油,0.06%的30%过氧化氢和用二甲基亚砷溶解的的四甲基联苯胺,所述四甲基联苯胺在缓冲溶液的终浓度为0.15g/L。

2. 如权利要求1所述的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,其特征在于,还包括校准品和洗涤缓冲液。

3. 如权利要求1所述的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,其特征在于,硅烷化辣根过氧化物酶由以下方法制备获得,包括将辣根过氧化物酶加入叔丁基二甲基氯硅烷的N,N-二甲基甲酰胺溶液中得混合物溶液,搅拌反应得硅烷化辣根过氧化物酶。

4. 如权利要求3所述的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,其特征在于,所述叔丁基二甲基氯硅烷的N,N-二甲基甲酰胺溶液的浓度为3.02mg/ml;每1mg的辣根过氧化物酶中加入128μL叔丁基二甲基氯硅烷的N,N-二甲基甲酰胺溶液。

5. 如权利要求3所述的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,其特征在于,硅烷化辣根过氧化物酶制备过程中还包括首先对酶进行除盐和浓缩,具体方法为:取辣根过氧化物酶,加入除盐缓冲液,采用分子筛层析法进行除盐,然后对除盐后收集的辣根过氧化物酶进行离心浓缩至3~5mg/ml。

6. 如权利要求3所述的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,其特征在于,还包括对硅烷化辣根过氧化物酶进行纯化与浓缩,具体方法为:采用分子筛层析法对混合物溶液搅拌反应后的产物进行分离纯化,除去未反应的残留物,将纯化后的硅烷化辣根过氧化物酶进行离心浓缩至3~5mg/ml。

7. 一种如权利要求1所述的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下操作步骤:

1) 制备HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒:包括含有HE4抗体和CA125抗体的溶液中加入活化后的羧基磁珠,混合偶联反应后,对反应后的磁珠进行封闭,即得所述的HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒;

2) 制备酶标记物:A:制备碱性磷酸酶标记的HE4抗体:将活化除盐后的HE4抗体与活化除盐后的碱性磷酸酶混合偶联反应,即得碱性磷酸酶标记的HE4抗体;

B:制备硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体:将除盐后的辣根过氧化物酶加入叔丁基二甲基氯硅烷溶液中反应制得硅烷化辣根过氧化物酶,将硅烷化辣根过氧化物酶活化除盐后与活化除盐的CA125抗体混合偶联反应,即得硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体;

C:将步骤A制备的碱性磷酸酶标记的HE4抗体与硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体混合,即得酶标记物;

3) 制备化学发光底物液和显色底物液;

4) 取步骤1) 制备的HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒、步骤2) 制备的酶标记物、步骤3) 制备的化学发光底物液和显色底物液, 组装成试剂盒, 即完成。

一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 卵巢癌是妇科生殖系统的恶性肿瘤之一,其在妇科肿瘤中发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌位居第三位,但其致死率在妇科疾病中却占据第一位。主要是因为卵巢深藏在盆腔内,卵巢癌早期症状十分不明显,在临床上也缺乏有效的早期诊断方法,很多患者在诊断出卵巢癌时已经是癌症晚期。早期患者的五年生存率在百分之九十以上,而晚期的却达不到百分之三十。因此,如何能尽早的诊断出卵巢癌对于患者的预后及生存极其关键。近几年,学者们一直在寻找具有高特异性和准确性的肿瘤标记物,以提高卵巢癌的早期诊断率,保证患者的有效预后。

[0003] 血清肿瘤标志物的检测对于肿瘤的早期发现、病情的发展、治疗后的评价、监测复发和转移等方面都具有一定的应用价值。大多肿瘤标志物不仅仅针对一种癌症,而且很多的癌症也都有超过一种以上的肿瘤标志物。因此,每个样品只检测一种肿瘤标志物已不能满足临床诊断的需要,对于在同一样品中,两种或两种以上的肿瘤标志物联合检测是目前发展的方向。

[0004] 糖抗原125 (CA125) 是目前公认的卵巢癌术前诊断疗效观察术后复发和预后评估最具价值的观测指标,但CA125的合成受许多因素影响,如子宫内膜异位症,盆腔炎症等均可见不同程度地升高,有研究发现40%-50%的I-II期卵巢癌患者的血清CA125检测值并不升高,所以将CA125作为卵巢癌早期诊断唯一的指标仍有一定的局限性。

[0005] 人附睾蛋白4 (HE4, 又名WFDC2) 基因的cDNA最早由Kirchhoff等首先从附睾的上皮远端分离出来,是一种可能与精子成熟度有关的蛋白酶抑制剂。目前已有大量实验表明HE4在卵巢癌早期诊断中具有很高的应用价值。Drapkin等用免疫组织化学方法描述了HE4在不同组织类型卵巢癌中的表达,发现HE4在93%的卵巢浆液性癌、50%的卵巢透明细胞癌及100%卵巢子宫内膜样癌中高表达,而在卵巢黏液性癌及正常卵巢组织中不表达。Moore等研究表明,就单一标志物而言,HE4用于诊断卵巢癌的敏感性高达72.9%、特异性达95%,而CA125的敏感性为27%-66%,特异性为75.2%。就联合检测物而言,CA125联合HE4的检测敏感性达76.4%、特异性95%,明显高于单项检测HE4或CA125的敏感度。Huhtinen等研究显示联合检测HE4和CA125血清浓度可增加卵巢癌的诊断准确率,并可从卵巢子宫内膜异位囊肿中鉴别卵巢癌。Kim等研究显示联合检测附件肿块患者血清HE4和CA125水平可成功地将可能发展为卵巢癌的高风险组和低风险组患者区分开(敏感性87.5%,特异性93.8%)。因此,多数卵巢癌HE4和CA125水平会同时升高,二者的联合检测有利于提高卵巢癌的检出率,有效改善了单一肿瘤标志物阴性导致的卵巢癌漏诊,有效降低假阴性结果,大大增加了卵巢癌诊断的准确性。

[0006] 免疫分析中,抗原-抗体免疫复合物的分离往往比较繁琐、费时,常常是信噪比低的原因,引入磁性微粒子作为免疫反应与分离的固相载体,是目前策略之一。磁性微粒子主要用于与抗体相连,通过免疫反应使其能够捕获靶物质形成免疫复合物,在外加磁场的作用下,免疫复合物被滞留下来,实现了分离,从而清除了样品中基质的干扰,降低了背景值。而且,与微孔板的免疫分析相比,磁性微粒子的介入,不但使反应试剂的用量减少了约1/2,以及缩短了反应时间,更重要的是降低了背景值,提高了灵敏度。

[0007] 迄今为止,卵巢癌的临床检测中缺乏一种采用磁性微粒子免疫分析法一次实验同时出现两种肿瘤标志物浓度的检测过程简单、反应时间短,试剂用量少,具有灵敏度高、试剂重复性好以及稳定性好等诸多优良特性的检测HE4和CA125的试剂盒。

发明内容

[0008] 为了克服现有技术的缺陷,本发明的目的是提供一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,能够特异性、灵敏性、准确性的同时对人血清中的HE4和CA125进行检测。

[0009] 本发明的目的之二在于提供一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒的制备方法。

[0010] 本发明的目的之三在于提供一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒的应用。

[0011] 为了实现以上目的,本发明采用如下技术方案:

[0012] 一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒,包括HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒、酶标记物、化学发光底物液、显色底物液;其中酶标记物由碱性磷酸酶标记的HE4抗体和硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体组成。

[0013] 可选的,所述化学发光底物液为化学发光底物A溶液为0.2mol/L pH 9.7的Tris缓冲液溶液,还包括2.7mol/L的氯化钠(NaCl)、0.08mmol/L的CTAC(十六烷基三甲基氯化铵)和2.6mmol/L的AMPPD(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐),不含有叠氮钠;

[0014] 显色底物液为pH 6.0±0.5的0.33mol/L的醋酸钠和0.03mol/L的柠檬酸缓冲溶液,还包括10%的甘油,0.06%的30%过氧化氢(H₂O₂)和用二甲基亚砜(DMSO)溶解的0.5g/mL的四甲基联苯胺(TMB),不含有叠氮钠。

[0015] 可选的,上述试剂盒还包括校准品和洗涤缓冲液。

[0016] 可选的,所述洗涤液为含有吐温20和氯化钠的Tris,浓缩洗涤液的pH值为7.5~8.5,其中氯化钠的含量为20~100g/L、吐温20的含量为0.05%~5%。

[0017] 可选的,所述校准品为含有HE4和CA125的标准溶液。

[0018] 可选的,硅烷化辣根过氧化物酶由以下方法制备获得,包括将辣根过氧化物酶加入叔丁基二甲基氯硅烷的N,N-二甲基甲酰胺溶液中得混合物溶液,搅拌反应得硅烷化辣根过氧化物酶。

[0019] 可选的,所述叔丁基二甲基氯硅烷的N,N-二甲基甲酰胺溶液的浓度为3.02mg/ml;每1mg的辣根过氧化物酶中加入128μL叔丁基二甲基氯硅烷的N,N-二甲基甲酰胺溶液。

[0020] 可选的,搅拌反应的反应温度为2~8℃,反应时间为1小时。

[0021] 可选的,硅烷化辣根过氧化物酶制备过程中还包括首先对酶进行除盐和浓缩,具体方法为:取辣根过氧化物酶,加入除盐缓冲液,采用分子筛层析法进行除盐,然后对除盐后收集的辣根过氧化物酶进行离心浓缩至3~5mg/ml。

[0022] 其中除盐缓冲液的配制方法为:准确称取咪唑10.2g,氯化钠(NaCl)5.84g,溶解于1000g纯化水中,调整pH=8.2~8.5。

[0023] 可选的,还包括对硅烷化辣根过氧化物酶进行纯化与浓缩,具体方法为:采用分子筛层析法对混合物溶液搅拌反应后的产物进行分离纯化,除去未反应的残留物,将纯化后的硅烷化辣根过氧化物酶进行离心浓缩至3~5mg/ml。

[0024] 上述联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒的制备方法,包括以下操作步骤:

[0025] 1) 制备HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒:包括含有HE4抗体和CA125抗体的溶液中加入活化后的羧基磁珠,混合偶联反应后,对反应后的磁珠进行封闭,即得所述的HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒;

[0026] 2) 制备酶标记物:A:制备碱性磷酸酶标记的HE4抗体:将活化除盐后的HE4抗体与活化除盐后的碱性磷酸酶混合偶联反应,即得碱性磷酸酶标记的HE4抗体;

[0027] B:制备硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体:将除盐后的辣根过氧化物酶加入叔丁基二甲基氯硅烷溶液中反应制得硅烷化辣根过氧化物酶,将硅烷化辣根过氧化物酶活化除盐后与活化除盐的CA125抗体混合偶联反应,即得硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体;

[0028] C:将步骤A制备的碱性磷酸酶标记的HE4抗体与硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体混合,即得酶标记物;

[0029] 3) 制备化学发光底物液和显色底物液;

[0030] 4) 取步骤1) 制备的HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒、步骤2) 制备的酶标记物、步骤3) 制备的化学发光底物液和显色底物液,组装成试剂盒,即完成。

[0031] 步骤1) 中HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒的具体制备方法为:

[0032] ①磁珠的清洗:用NaOH溶液及纯水清洗羧基磁珠后沉淀羧基磁珠去上清;

[0033] ②磁珠的活化:分别取EDC和Sulfo-NHS分别溶解于MES缓冲溶液中,配制Sulfo-NHS溶液及EDC溶液,将Sulfo-NHS溶液及EDC溶液加入至盛有步骤①清洗后的羧基磁珠的容器中,在2~8℃条件下混匀30分钟;

[0034] ③磁珠的清洗:用MES缓冲溶液清洗活化后的羧基磁珠;

[0035] ④抗体的脱盐:分别量取HE4抗体溶液和CA125抗体溶液,使用GEPD10脱盐柱和MES缓冲溶液对其进行脱盐后,将其稀释或浓缩为0.04倍活化后羧基磁珠质量数的体积(单位:毫升);

[0036] ⑤磁珠的连接:将④中的抗体溶液加入至盛有③中经活化的羧基磁珠的容器中,室温混匀偶联反应2小时;

[0037] ⑥磁珠的清洗及封闭:将步骤⑤偶联后的羧基磁珠沉淀后去上清,加入与步骤④中的抗体溶液等体积的Tris-HCl溶液,室温混匀30分钟对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭;

[0038] ⑦磁珠的保存:将步骤⑥封闭后的羧基磁珠沉淀后去上清,使用PBST溶液进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,加入与步骤④中的抗体溶液等体积的磁珠保存缓冲

液进行保存。

[0039] 步骤2) 中碱性磷酸酶标记的HE4抗体的具体制备方法为:

[0040] ①抗体的脱盐与浓缩:取抗HE4单克隆抗体利用分子筛层析法对抗体进行脱盐和浓缩处理,终浓度为3~5mg/ml;

[0041] ②抗体的活化与除盐:取2-亚氨基硫烷(2-Iminothiolane hydrochloride)溶解于2-IT稀释液中,终浓度为13.76mg/ml;每1mg步骤①处理后的抗体中加入10 μ l溶解有2-亚氨基硫烷的2-IT稀释液,室温下混匀搅拌反应后,利用分子筛层析法对其进行除盐处理,收集后备用;

[0042] ③酶的活化与除盐:取4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)溶解于纯化水中,终浓度为4.36mg/ml;按照每1mg的碱性磷酸酶中加入50 μ l Sulfo-SMCC溶液的添加比例,在碱性磷酸酶中加入Sulfo-SMCC溶液,室温下混匀搅拌反应后,利用分子筛层析法对其进行除盐处理,收集后备用;

[0043] ④抗体和酶的偶联与纯化:将②和③中得到的活化后的HE4抗体和活化后的碱性磷酸酶,按照质量比1:1进行混合,置于2~8 $^{\circ}$ C下反应4小时;利用分子筛层析法对其偶联产物进行分离纯化,得到碱性磷酸酶标记的HE4抗体。

[0044] 步骤2) 中硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体的具体制备方法:

[0045] ①抗体的脱盐与浓缩:取抗CA125单克隆抗体利用分子筛层析法对抗体进行脱盐和浓缩处理,终浓度为3~5mg/ml。

[0046] ②抗体的活化与除盐:取2-亚氨基硫烷(2-Iminothiolane hydrochloride)溶解于2-IT稀释液中,终浓度为13.76mg/ml;每1mg步骤①处理后的抗体中加入10 μ l溶解有2-亚氨基硫烷的2-IT稀释液,室温下混匀搅拌反应后,利用分子筛层析法对其进行除盐处理,收集后备用;

[0047] ③酶的活化与除盐:取4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)溶解于纯化水中,终浓度为4.36mg/ml;按照每1mg的硅烷化辣根过氧化物酶中加入50 μ l Sulfo-SMCC溶液,室温下混匀搅拌反应后,利用分子筛层析法对其进行除盐处理,收集后备用;

[0048] ④抗体和酶的偶联与纯化:将②和③中得到的活化后的CA125抗体和活化后的硅烷化辣根过氧化物酶,按照质量比1:1进行混合,置于2~8 $^{\circ}$ C下反应4小时;利用分子筛层析法对其偶联产物进行分离纯化,得到硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体。

[0049] 上述2-IT稀释液的制备方法为:准确称取三乙醇胺14.92g、氢氧化钠4.0g,溶解于1000g纯化水中,调整pH=8.5~9.0。

[0050] 优选的,步骤C中将制备的碱性磷酸酶标记的HE4抗体与硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体等比例混合均匀,置于2~8 $^{\circ}$ C下备用,即为酶标记物。

[0051] 上述联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒在同时检测人血清中HE4和CA125浓度方面的应用。

[0052] 检测人血清中HE4和CA125浓度方面的具体检测方法包括以下操作步骤:

[0053] I:取待检测样本于反应杯中,加入HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒,再加入酶标记物,充分混匀,并在37 $^{\circ}$ C温育16min;清洗分离磁微粒;向磁微粒中加入化学发光底物A溶液,反应并测定光强度;再向磁微粒中加入100 μ L显色底物B溶液,反应5min并在620nm

下测定吸光度；

[0054] II：取已知浓度的校准品按照步骤I的方法测定光强度和吸光度，绘制光强度与HE4浓度的标准工作曲线，得光强度与HE4浓度的对应关系式；绘制吸光度与CA125浓度的标准工作曲线，得吸光度与CA125浓度的对应关系式；然后按照步骤I的方法测定待测血清样本的光强度和吸光度，将血清样本的光强度和吸光度分别带入对应的关系式中，计算血清样本中的HE4和CA125的浓度。

[0055] 本发明试剂盒，采用HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒同时捕获样品中的HE4和CA125，然后再采用由HE4抗体标记的碱性磷酸酶和CA125抗体标记的硅烷化辣根过氧化物酶组成的酶标记物与捕获样品中HE4和CA125的磁微粒结合，由于本发明将辣根过氧化物酶进行硅烷化处理，阻断了辣根过氧化物酶成为碱性磷酸酶催化化学发光底物发光过程中磷酸受体的可能，解决了辣根过氧化物酶的存在会干扰碱性磷酸酶催化发光的问题，使得能够首先采用化学发光底物液检测磁微粒上碱性磷酸酶引起的发光强度大小，再采用显色底物液检测磁微粒上辣根过氧化物酶引起的显色的吸光度的大小，实现对样品中HE4和CA125的同时检测。

[0056] 采用本发明试剂盒，可以非常有效的检测出人血清中HE4和CA125的含量，本发明利用磁分离、化学发光以及显色检测法的优势，使检测过程简单、反应时间短，试剂用量少，节约成本，同时该检测试剂盒还具有灵敏度高、试剂重复性好以及稳定性好等诸多优良特性，为临床诊断和科研工作提供一种非常有效的检测手段，为医生评定是否为卵巢癌提供了一个很好的辅助作用。

附图说明

[0057] 图1为实施例1试剂盒与市售试剂盒测定人血清中人附睾蛋白4含量结果的相关性；

[0058] 图2为实施例1试剂盒与市售试剂盒测定人血清中糖抗原125含量结果的相关性；

[0059] 图3为采用对比例试剂盒联合测试HE4的标准曲线线性拟合信息；

[0060] 图4采用实施例1试剂盒联合测试HE4的标准曲线线性拟合信息。

具体实施方式

[0061] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0062] 实施例1

[0063] 本实施例提供一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒，包括校准品、HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒、酶标记物、化学发光底物液、显色底物液、洗涤液；其中酶标记物由碱性磷酸酶标记的HE4抗体和硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体组成；

[0064] 化学发光底物液为化学发光底物A溶液为0.2mol/L pH 9.7的Tris缓冲液溶液，还包括2.7mol/L的氯化钠(NaCl)、0.08mmol/L的CTAC(十六烷基三甲基氯化铵)和2.6mmol/L的AMPPD(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐)，不含有叠氮钠；

[0065] 显色底物液为pH 6.0±0.5的0.33mol/L的醋酸钠和0.03mol/L的柠檬酸缓冲溶液，还包括10%的甘油，0.06%的30%过氧化氢(H₂O₂)和用二甲基亚砜(DMSO)溶解的0.5g/

mL的四甲基联苯胺(TMB),不含有叠氮钠;

[0066] 校准品为含有HE4和CA125的标准溶液;洗涤液为含有吐温20和氯化钠的Tris,浓缩洗涤液的pH值为7.5-8.5,其中氯化钠的含量为20-100g/L、吐温20的含量为0.05%-5%。

[0067] 本实施例试剂盒由以下方法制备而成:

[0068] 1、校准品的配制

[0069] ①校准品缓冲液的组成:由0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的吐温20组成,pH值7.4,2-8℃存放备用;

[0070] ②用①中所得校准品缓冲液,将一定量的重组人附睾蛋白4蛋白(购自美国Meridian公司)和糖抗原125(购自美国Meridian公司)在同一校准品缓冲溶液中,分别配制成终浓度为0pmol/L和0IU/mL、30pmol/L和10IU/mL、100pmol/L和40IU/mL、250pmol/L和100IU/mL、750pmol/L和300IU/mL、1500pmol/L和600IU/mL的校准品;

[0071] 2、HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒的制备

[0072] 1)磁珠的清洗:取一定量的羧基磁珠溶液于一定体积的容器中,容器置于磁架,沉淀后去上清,分别使用0.01M的NaOH溶液及预冷的纯水洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留羧基磁珠固体;

[0073] 2)磁珠的活化:准确量取0.1倍磁珠质量(单位:毫克)的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),加入一定体积预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液,使其浓度为5mg/ml;准确量取0.1倍磁珠质量的碳化二亚胺盐酸盐(EDC),加入一定体积预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液,使其浓度为5mg/ml;将配制的Sulfo-NHS溶液及配制的EDC溶液加入至1)中盛有羧基磁珠固体的容器中,将此羧基磁珠混悬液于2~8℃条件下混匀30分钟,完成对羧基磁珠的活化;

[0074] 3)磁珠的清洗:羧基磁珠活化完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用预冷的25mM pH5.0的MES缓冲溶液进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,仅留活化的羧基磁珠固体;

[0075] 4)抗体的脱盐:准确量取0.01倍磁珠质量的人附睾蛋白4抗体溶液和糖抗原125抗体溶液,使用GE PD10脱盐柱和25mM pH5.0的MES缓冲溶液对其进行脱盐处理,脱盐完成后将人附睾蛋白4抗体溶液和糖抗原125抗体溶液稀释或浓缩为0.04倍磁珠质量数的体积(单位:毫升);

[0076] 5)磁珠的连接:将4)中的抗体溶液加入至3)中盛有经活化的羧基磁珠固体的容器中,室温混匀2小时,完成羧基磁珠与人附睾蛋白4抗体和糖抗原125抗体的偶联;

[0077] 6)磁珠的清洗及封闭:羧基磁珠与人附睾蛋白4抗体和糖抗原125抗体偶联完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,加入与4)等体积的100mM pH7.4的Tris-HCl溶液,室温混匀30分钟对羧基磁珠剩余活化位点进行封闭;

[0078] 7)磁珠的保存:羧基磁珠封闭完成后置于磁架,羧基磁珠沉淀后去上清,使用0.1%PBST(0.14M NaCl、3mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄、0.8mM吐温-20,pH=7.2±0.05)进行洗涤,清洗完成后沉淀羧基磁珠去上清,加入与4)和6)等体积的磁珠保存缓冲液(2.6% H₂O • NaH₂PO₄、14.4% 2H₂O • Na₂HPO₄、0.5% Proclin300、1.4% NaCl、5% BSA,pH=7.4±0.05)进行保存。

[0079] 3、酶标记物的制备

[0080] 1) 碱性磷酸酶标记的HE4抗体

[0081] ①抗体的脱盐与浓缩:准确称取抗HE4单克隆抗体0.5mg,利用分子筛层析法对抗体进行脱盐和浓缩处理,终浓度为3~5mg/ml;

[0082] ②抗体的活化与除盐:准确称取2-亚氨基硫烷(2-Iminoethanol hydrochloride)2~6mg,溶解于2-IT稀释液(14.92g三乙醇胺,4.0g氢氧化钠,溶解于1000g纯化水中,调整pH=8.5~9.0)中,终浓度为13.76mg/ml;每1mg步骤①处理后的抗体中加入10 μ L溶解有2-亚氨基硫烷的2-IT稀释液,室温(17~23 $^{\circ}$ C)下混匀搅拌反应20分钟,完成HE4抗体表面游离伯氨基的活化,产生游离巯基;利用分子筛层析法对活化后的HE4抗体进行除盐处理,收集后备用;

[0083] ③酶的活化与除盐:准确称取4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)2~4mg,溶解于纯化水中,终浓度为4.36mg/ml;准确称取碱性磷酸酶ALP 0.75mg,按照每1mg的碱性磷酸酶中加入50 μ L Sulfo-SMCC溶液的比例,将上述Sulfo-SMCC溶液加入碱性磷酸酶中,室温(17~23 $^{\circ}$ C)下混匀搅拌反应15分钟,完成酶的活化;利用分子筛层析法对活化后的ALP进行除盐处理,收集后备用;

[0084] ④抗体和酶的偶联与纯化:将②和③中得到的活化后的HE4抗体和活化后的ALP按照质量比1:1进行混合,置于2~8 $^{\circ}$ C下反应4小时;利用分子筛层析法对其偶联产物进行分离纯化,得到碱性磷酸酶标记的HE4抗体。

[0085] 2) 硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体

[0086] 1、硅烷化辣根过氧化物酶的制备:

[0087] ①酶的除盐与浓缩:准确称取辣根过氧化物酶(HRP)0.75mg,用分子筛层析法对其进行除盐,用紫外可见分光光度计在280nm处确定HRP的收集浓度;用离心超滤管和离心设备对HRP进行浓缩处理,浓缩至3~5mg/ml;采用的除盐缓冲液的配制方法为:准确称取咪唑10.2g,氯化钠(NaCl)5.84g,溶解于1000g纯化水中,调整pH=8.2~8.5;

[0088] ②酶的硅烷化:准确称取叔丁基二甲基氯硅烷(TBDMSCL)2~5mg,用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解至3.02mg/ml;按照每1mg辣根过氧化物酶中加入的128 μ L TBDMSCL的DMF溶液的比例,在①中浓缩的辣根过氧化物酶中加入TBDMSCL的DMF溶液,置于2~8 $^{\circ}$ C下混匀搅拌反应1小时,完成HRP的硅烷化;

[0089] ③硅烷化酶的纯化与浓缩:用分子筛层析法对②中硅烷化的HRP进行分离纯化,除去反应残留物;将纯化后的硅烷化HRP用紫外可见分光光度计在280nm处确定收集浓度,用离心超滤管和离心设备对其进行浓缩处理,浓缩至3~5mg/ml,并置于2~8 $^{\circ}$ C下保存;

[0090] 2、硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体:

[0091] ①抗体的脱盐与浓缩:准确称取抗CA125单克隆抗体0.5mg,利用分子筛层析法对抗体进行脱盐和浓缩处理,终浓度为3~5mg/ml;

[0092] ②抗体的活化与除盐:准确称取2-亚氨基硫烷(2-Iminoethanol hydrochloride)2~6mg,溶解于2-IT稀释液(14.92g三乙醇胺,4.0g氢氧化钠,溶解于1000g纯化水中,调整pH=8.5~9.0)中,终浓度为13.76mg/ml;按照每1mg抗体中加入10 μ L溶解有2-亚氨基硫烷的2-IT稀释液的比例,将溶解于2-IT稀释液的2-亚氨基硫烷加入到①制备的抗体中,室温(17~23 $^{\circ}$ C)下混匀搅拌反应20分钟,完成CA125抗体表面游离伯氨基的活化,产生游离巯基;利用分子筛层析法对活化后的CA125抗体进行除盐处理,收集后备用。

[0093] ③酶的活化与除盐:准确称取4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC) 2~4mg,溶解于纯化水中,终浓度为4.36mg/ml;准确称取硅烷化的HRP 0.75mg,按照每1mg硅烷化HRP加入50 μ L Sulfo-SMCC溶液的比例,将Sulfo-SMCC溶液加入硅烷化HRP中,室温(17-23 $^{\circ}$ C)下混匀搅拌反应后15分钟,完成硅烷化HRP的表面游离伯氨基的活化;利用分子筛层析法对活化后的硅烷化HRP进行除盐处理,收集后备用;

[0094] ④抗体和酶的偶联与纯化:将②和③中得到的活化后的CA125抗体和活化后的硅烷化HRP按照质量比1:1进行混合,置于2~8 $^{\circ}$ C下反应4小时;利用分子筛层析法对其偶联产物进行分离纯化,得到硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体。

[0095] 3) 酶标记物的制备:将1)-④中所得到的碱性磷酸酶标记的HE4抗体与2)-2-④中得到的硅烷化辣根过氧化物酶标记的CA125抗体等比例混合均匀,置于2-8 $^{\circ}$ C下备用,即为酶标记物。

[0096] 4、配制化学发光底物液

[0097] 准确量取Tris 24g,CTAC(十六烷基三甲基氯化铵) 25.5mg、AMPPD(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐) 1g,氯化钠(NaCl) 160g,纯化水定溶至1000ml,混匀30min调整pH值为9.7 \pm 0.05,即得到本试剂盒化学发光底物液;

[0098] 5、配制显色底物液

[0099] 准确量取四甲基联苯胺(TMB) 0.15g,溶于3mL二甲基亚砜(DMSO)中;将该溶液与27.2g的醋酸钠,3.2g的柠檬酸、0.6mL的30% H_2O_2 和100mL的甘油用纯化水定溶至1000ml,混匀30min调整pH值为6.0 \pm 0.5,即得到本试剂盒显色底物液;

[0100] 6、配制洗涤液

[0101] 准确量取Tris 8.4g,NaCl163g,吐温-20 7g,纯化水定容至1000ml,混匀30min调pH为8.0 \pm 0.5,0.22 μ m过滤即得7倍浓缩的洗涤液。

[0102] 7、将上述校准品、HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒、酶标记物、化学发光底物液、显色底物液和洗涤液分装并密封保存,即得所述试剂盒。

[0103] 实施例2

[0104] 本实施例将实施例1提供的试剂盒应用于同时检测样品中的HE4和CA125,具体检测方法为:

[0105] I:取待检测样本于反应杯中,加入HE4抗体和CA125抗体联合标记的磁微粒,再加入酶标记物,充分混匀,并在37 $^{\circ}$ C温育16min;清洗分离磁微粒;向磁微粒中加入化学发光底物A溶液,反应并测定光强度;再向磁微粒中加入100 μ L显色底物B溶液,反应5min并在620nm下测定吸光度;

[0106] II:取已知浓度的校准品按照步骤I的方法测定光强度和吸光度,绘制光强度与HE4浓度的标准工作曲线,得光强度与HE4浓度的对应关系式;绘制吸光度与CA125浓度的标准工作曲线,得吸光度与CA125浓度的对应关系式;然后按照步骤I的方法测定待测血清样本的光强度和吸光度,将血清样本的光强度和吸光度分别带入对应的关系式中,计算血清样本中的HE4和CA125的浓度。

[0107] 对比例

[0108] 本对比例试剂盒与实施例1试剂盒的不同之处在于不对辣根过氧化物酶进行硅烷化,酶标记物由碱性磷酸酶标记的HE4抗体与辣根过氧化物酶标记的CA125抗体组成。

[0109] 试验例1本发明实施例1提供的试剂盒的性能评价

[0110] 1、对本发明实施例1提供的试剂盒按照实施例2提供的检测方法对人血清样品中的卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125进行联合检测,对其线性、准确度、灵敏度、精密度和稳定性进行评价,结果如下表1和表2所示:

[0111] 表1 HE4检验结果

[0112]	性能指标	检测方法	检测标准	检测结果
	线性	将接近线性范围上限浓度的高值样本按一定比例稀释为至少 5 种浓度,其中低值浓度的样本须接近线性范围下限的浓度。将每一浓度的样本重复检测 2 次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 r 。	$r \geq 0.99$	符合标准
	准确度	将浓度为 240-360 pmol/L 的抗原加入至浓度约为 30-50pmol/L 的阴性血清或其他相应基质的样品中,所加入的体积不超过总体积的 10%,检测样本添加抗原前后的浓度,计算回收率。	85%-115%	符合标准
[0113]	灵敏度	用零浓度校准品 (A 点) 作为样本进行检测,重复测定 20 次,计算其发光值平均值 (M) 和标准差 (SD),得出 $M+2SD$; 将零浓度校准品 (A 点) 和相邻校准品 (B 点) 各测量两次,得出两次测量结果的发光值的平均值 (RLU),将其浓度 (用 y 表示) -RLU 值 (用 x 表示) 进行两点回归拟合得出一次方程 $y=ax+b$,将 $M+2SD$ 的 RLU 值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检出限。	$\leq 5\text{pmol/L}$	符合标准
	精密度	分析内精密度: 在同一次分析内,质控品各重复检测 10 次,计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD ,根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV 。	$\leq 8\%$	符合标准
		分析间精密度: 在不少于 3 次的独立分析之间,质控品各重复检测 10 次,计算 3 次测量结果的平均值 M	$\leq 15\%$	符合标准

	和标准差 SD，根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV。		
[0114]	稳定性 将实施例 1 得到的试剂盒置于 2-8℃，每间隔 3 个月 后测定试剂盒的线性、准确度、灵敏度、精密度，若 所有指标能够满足检测标准，则认为试剂盒在 2-8℃ 此段时间内是稳定的。	2-8℃保存不 低于 12 个月	符合标准

[0115] 表2 CA125检验结果

性能指标	检测方法	检测标准	检测结果
线性	将接近线性范围上限浓度的高值样本按一定比例稀释为至少 5 种浓度，其中低值浓度的样本须接近线性范围下限的浓度。将每一浓度的样本重复检测 2 次，计算平均值，将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合，并计算线性相关系数 r。	$r \geq 0.99$	符合标准
[0116] 准确度	将浓度为 240-360IU/ml 的抗原加入至浓度约为 6-10 IU/ml 的阴性血清或其他相应基质的样品中，所加入的体积不超过总体积的 10%，检测样本添加抗原前后的浓度，计算回收率。	85%-115%	符合标准
灵敏度	用零浓度校准品（A 点）作为样本进行检测，重复测定 20 次，计算其发光值平均值（M）和标准差（SD），得出 $M+2SD$ ；将零浓度校准品（A 点）和相邻校准品（B 点）各测量两次，得出两次测量结果的发光值的平均值（RLU），将其浓度（用 y 表示）-RLU 值（用	$\leq 1.0IU/ml$	符合标准

	x 表示) 进行两点回归拟合得出一次方程 $y=ax+b$, 将 $M+2SD$ 的 RLU 值带入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为最低检出限。		
[0117]	精密度 分析内精密度: 在同一次分析内, 质控品各重复检测 10 次, 计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD , 根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV 。	$\leq 10\%$	符合标准
	分析间精密度: 在不少于 3 次的独立分析之间, 质控品各重复检测 10 次, 计算 3 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD , 根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV 。	$\leq 15\%$	符合标准
	稳定性 将实施例 1 得到的试剂盒置于 $2-8^{\circ}\text{C}$, 每间隔 3 个月后测定试剂盒的线性、准确度、灵敏度、精密度, 若所有指标能够满足检测标准, 则认为试剂盒在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 此段时间内是稳定的。	$2-8^{\circ}\text{C}$ 保存不低于 12 个月	符合标准

[0118] 由表1和表2的检测结果显示可知, 本发明所制备的联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒, 其各项指标符合相关的标准, 制备的试剂盒性质优良。

[0119] 试验例2本发明试剂盒与市售试剂盒测值相关性试验

[0120] 1、供试试剂盒

[0121] 实施例1所制备的试剂盒、HE4项目试剂盒为ARCHITECT HE4 Reagent Kit、CA125项目试剂盒为CanAg CA125 EIA

[0122] 2、试验方法及结果

[0123] 通过用本发明实施例1所制备的试剂盒与购自雅培的化学发光微粒子免疫检测试剂盒ARCHITECT HE4 Reagent Kit测定血清样本中人附睾蛋白4的含量, 将其各自的人附睾蛋白4测定值进行比较, 试验结果为图1所示; 用本发明实施例1所制备的试剂盒与购自康乃格的酶联免疫检测试剂盒CanAg CA125 EIA测定血清样本中糖抗原125的含量, 将其各自的糖抗原125测定值进行比较, 试验结果为图2所示, 并进行回归分析。从图1和图2中可以看出本发明试剂盒与市售试剂盒在血清中人附睾蛋白4和糖抗原125测值上都具有良好的相关性, 表明本发明试剂盒能够特异、灵敏、准确地实现对人血清中的HE4和CA125的含量进行联合检测, 利用磁分离、化学发光以及显色检测法的优势, 使检测过程简单、反应时间短, 试剂用量少, 节约成本。

[0124] 试验例3不同的酶标记物对试剂盒性能的影响

[0125] 1、供试试剂盒

[0126] 实施例1所制备的试剂盒、对比例所制备的试剂盒

[0127] 2、试验方法及结果

[0128] 将本发明实施例1所制备的试剂盒与对比例试剂盒按照实施例2所述方法分别测定HE4标准曲线,使用软件进行拟合,将各自的曲线信息进行比较,试验结果为图3、4所示;从图3和图4中可以看出对比例试剂盒会使HE4项目检测信号值下降且影响其平行性导致曲线无法拟合通过,而本发明实施例1试剂盒对HE4项目无明显干扰,其曲线拟合通过且信号值较稳定。

[0129] 由该结果可知,本发明通过对辣根过氧化物进行硅烷化改性后再标记CA125抗体,阻断辣根过氧化物酶成为碱性磷酸酶催化化学发光底物液发光过程中磷酸受体的可能,解决了辣根过氧化物酶的存在干扰碱性磷酸酶发光的问题,实现对人血清中HE4和CA125的联合检测。

[0130] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

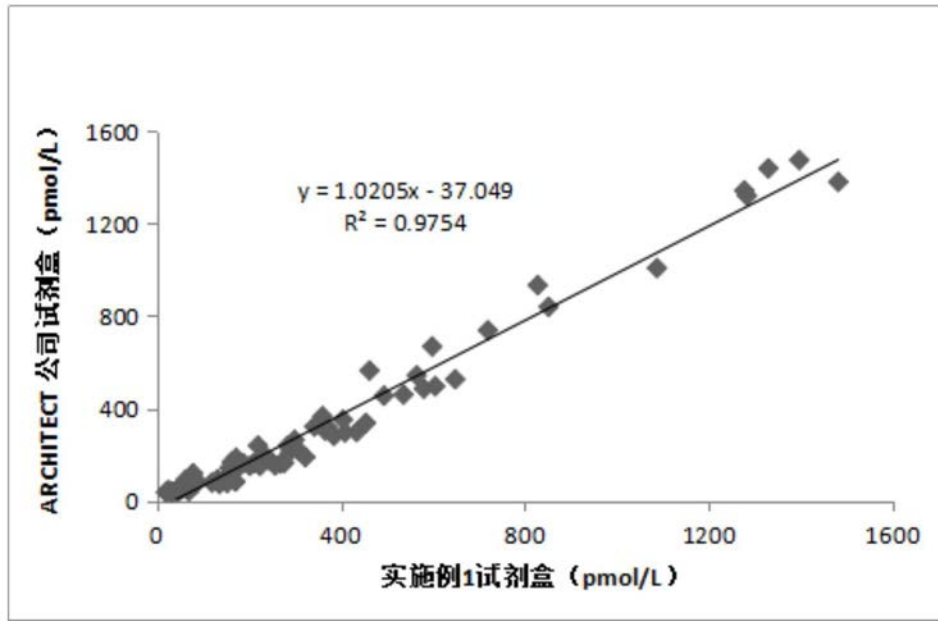


图1

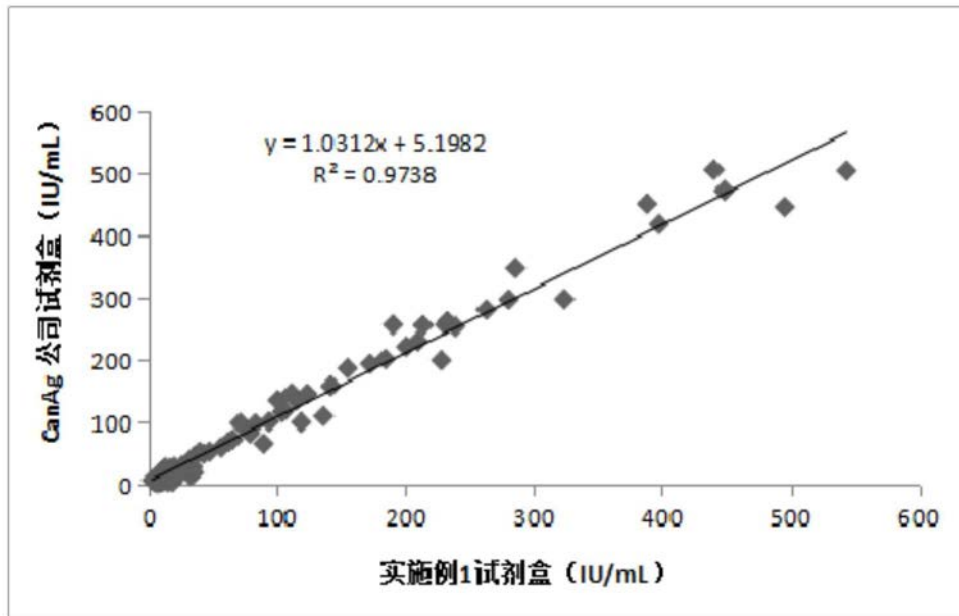


图2



图3



图4

专利名称(译)	一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108008132B	公开(公告)日	2020-05-08
申请号	CN201711257970.X	申请日	2017-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京润诺思医疗科技有限公司 刘向祎		
申请(专利权)人(译)	北京润诺思医疗科技有限公司 刘向祎		
当前申请(专利权)人(译)	刘向祎		
[标]发明人	刘承举 刘向祎 路晟		
发明人	刘承举 刘向祎 路晟		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/57449 G01N33/57484 G01N33/577 G01N2446/90 G01N2800/36		
代理人(译)	张淑贤		
其他公开文献	CN108008132A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测技术领域，具体涉及一种联合检测卵巢癌肿瘤标志物HE4和CA125的试剂盒及其制备方法和应用。本发明试剂盒，将辣根过氧化物酶进行硅烷化处理，阻断了辣根过氧化物酶成为碱性磷酸酶催化化学发光底物发光过程中磷酸受体的可能，解决了辣根过氧化物酶的存在会干扰碱性磷酸酶催化发光的问题，使得能够首先采用化学发光底物液检测磁微粒上碱性磷酸酶引起的发光强度大小，再采用显色底物液检测磁微粒上辣根过氧化物酶引起的显色的吸光度的大小，实现对样品中HE4和CA125的同时检测。本发明试剂盒检测过程简单、反应时间短，试剂用量少，节约成本，灵敏度高、试剂重复性和稳定性好。

