



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109142753 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201811118543.8

(22)申请日 2018.09.25

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 王凯 孟令敏 李磊 高威
孙成艳

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 李外

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

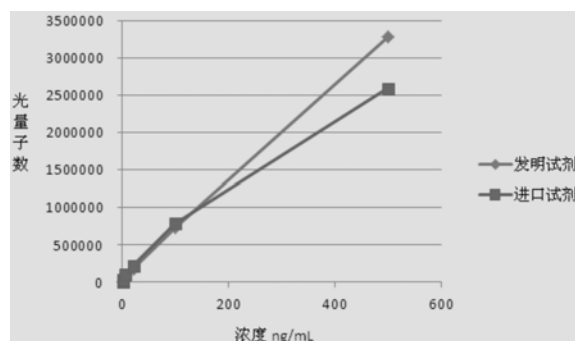
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,属于体外检测技术领域。该试剂盒包括:链霉亲和素磁颗粒悬浮液、化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体和偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体。本发明还提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒为全自动的测量样本,并直接给出数值,减少人为操作误差,并且实现无人值守,缩短了临床检测所需的时间、检测精度较高,试剂与仪器组成封闭系统,系统误差小。



1. 一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:
链霉亲和素磁颗粒悬浮液、化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体和偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体。
2. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中,链霉亲和素磁颗粒的质量分数是0.01%~1%。
3. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的链霉亲和素磁颗粒悬浮液中,链霉亲和素磁颗粒的粒径为0.05~3 μm 。
4. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体中,鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:3~20。
5. 根据权利要求4所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌。
6. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体中,鳞状上皮细胞癌抗原抗体与偶联标记物的摩尔比为1:5~20。
7. 根据权利要求6所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述偶联标记物为生物素或抗原。
8. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液,所述A液为硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。
9. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括鳞状上皮细胞癌抗原校准品,所述鳞状上皮细胞癌抗原校准品的浓度分别为0.00ng/mL、0.5ng/mL、1.00ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、250ng/mL和500ng/mL的鳞状上皮细胞癌抗原溶液。
10. 根据权利要求1所述的一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
步骤一:链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备
将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂,得到链霉亲和素磁颗粒悬浮液;
步骤二:化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体的制备
将SCC抗体放入离心管中离心,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;
步骤三:偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体的制备
将SCC抗体放入离心管中离心,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存。

鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外检测技术领域,具体涉及一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 鳞状上皮细胞癌抗原(SCC)是一种从子宫组织中提取的糖蛋白,简称SCC。SCC是一组属于丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制物家族的糖蛋白,由高度同源而生物学功能截然不同的SCC1和SCC2组成,均含有390个氨基酸,分子量约为45KDa。SCC广泛存在于正常组织(含量极微)和恶性病变的上皮细胞中。血清中的SCC浓度和鳞状细胞癌的分化程度有关,正常人血清中SCC浓度 $<1.5\text{ng/ml}$ 。少数良性疾病也能见SCC升高,如肺部感染、皮肤炎、肾衰和肝病。其对子宫颈癌有较高的诊断价值,敏感性及特异性较好,同时辅助诊断肺部、食道等鳞癌,其水平与肿瘤的发展程度相关,与CYFRA21-1联合检测可以提高准确性及灵敏性。

[0003] 目前测定鳞状上皮细胞癌抗原的方法有放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、化学发光免疫法(CLEIA)等。然而,ELISA发尤其局限性,特异性差、灵敏度低、准确性不高等。放射性免疫方法虽然被认为是准确可靠的方法,但是放射性同位素的辐射影响,废物处理需要专门的实验室,成本高和半衰期短的弊端,已经使该方法逐渐遭到淘汰。

[0004] SCC化学发光免疫测试试剂盒相比传统的检测方法,抗原、抗体的结合是在相似的液体条件下进行,反应过程更简洁、反应迅速灵敏、线性范围更宽以及特异性更好;另一方面,SCC化学发光免疫测试试剂盒与化学发光免疫检测仪器组成封闭系统,试剂、样本的添加及检测任务均由仪器自动完成,降低了人为操作的误差,提高了整个系统的灵敏度与准确度。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有的SCC测定试剂盒存在操作时间长、准确度差、线性范围窄的问题,而提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 本发明首先提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒包括:

[0007] 链霉亲和素磁颗粒悬浮液、化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体和偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体。

[0008] 优选的是,所述的试剂盒中,链霉亲和素磁颗粒的质量分数是 $0.01\%\sim 1\%$ 。

[0009] 优选的是,所述的链霉亲和素磁颗粒悬浮液中,链霉亲和素磁颗粒的粒径为 $0.05\sim 3\mu\text{m}$ 。

[0010] 优选的是,所述化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体中,鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为 $1:3\sim 20$ 。

[0011] 优选的是,所述的化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌。

[0012] 优选的是,所述偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体中,鳞状上皮细胞癌抗原抗体与偶联标记物的摩尔比为 $1:5\sim 20$ 。

[0013] 优选的是,所述偶联标记物为生物素或抗原。

[0014] 优选的是,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液,所述A液为硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0015] 优选的是,所述的试剂盒还包括鳞状上皮细胞癌抗原校准品,所述鳞状上皮细胞癌抗原校准品的浓度分别为0.00ng/mL、0.5ng/mL、1.00ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、250ng/mL和500ng/mL的鳞状上皮细胞癌抗原溶液。

[0016] 本发明还提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0017] 步骤一:链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0018] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂,得到链霉亲和素磁颗粒悬浮液;

[0019] 步骤二:化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体的制备

[0020] 将SCC抗体放入离心管中离心,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0021] 步骤三:偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体的制备

[0022] 将SCC抗体放入离心管中离心,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存。

[0023] 本发明的有益效果

[0024] 1、本发明选择吖啶酯等为化学发光免疫分析系统的标记材料,该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光,不需要酶的参与,节约时间及成本。

[0025] 2、本发明采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起,减少非特异性吸附,提高测试样本的准确度,抗干扰能力强。

[0026] 3、本发明的鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒为全自动的测量样本,并直接给出数值,减少人为操作误差,并且实现无人值守。

[0027] 4、本发明的化学发光免疫分析试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成对鳞状上皮细胞癌抗原的检测,这种化学发光免疫分析试剂盒与仪器配套,缩短了临床检测所需的时间、检测精度较高,试剂与仪器组成封闭系统,系统误差小。

[0028] 5、本发明的化学发光免疫检测试剂盒在准确度方面可以替代市面传统试剂盒,为客户提供更加准确的测量数据及低廉的测试成本。

附图说明

[0029] 图1为本发明的鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法的制备流程设计图;

[0030] 图2为本发明的试剂盒和现有试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0031] 为了使本发明的优点、目的和方法更加详实易懂,下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了诸多细节以便于理解,但本发明可以以不同与描述的其他方式来实施。

[0032] 本发明首先提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒包括:

[0033] 链霉亲和素磁颗粒悬浮液、化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体和偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体。

[0034] 按照本发明,所述的试剂盒中,链霉亲和素磁颗粒的质量分数优选是0.01%~1%,更优选为0.072%。

[0035] 按照本发明,所述的链霉亲和素磁颗粒悬浮液中,链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为0.05~3 μm ,更优选为3 μm ,当链霉亲和素磁颗粒的粒径低于0.05 μm 时,抗原或者抗体与磁珠结合率低,可能导致整体光量子数偏低;当链霉亲和素磁颗粒的粒径高于1 μm 时,非特异性结合效果明显,可能导致试剂盒灵敏度差等。

[0036] 按照本发明,所述化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体中,鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:3~20,更优选为1:3。所述的化学发光标记物优选为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌,更优选为吖啶酯。

[0037] 按照本发明,所述偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体中,鳞状上皮细胞癌抗原抗体与偶联标记物的摩尔比优选为1:5~20,更优选为1:5;所述偶联标记物优选为生物素或抗原,更优选为生物素。

[0038] 按照本发明,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液,所述A液优选为硝酸溶液,B液优选为氢氧化钠溶液。

[0039] 按照本发明,所述的试剂盒还包括鳞状上皮细胞癌抗原校准品,所述鳞状上皮细胞癌抗原校准品的浓度优选分别为0.00ng/mL、0.5ng/mL、1.00ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、250ng/mL和500ng/mL的鳞状上皮细胞癌抗原溶液。

[0040] 本发明还提供一种鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,制备流程如图1所示,包括如下步骤:

[0041] 步骤一:链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0042] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂,得到链霉亲和素磁颗粒悬浮液;

[0043] 所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度优选为50~100mg/ml;链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为(0.5~1):(5~10);所述的混匀时间优选为10~15分钟,所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5;所述的固相试剂的浓度优选为0.01%~1%;所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的来源为商购。

[0044] 步骤二:化学发光标记物标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体的制备

[0045] 将SCC抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心10s~30s,保证抗体位于离心管底部位置,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,所述的离心温度优选为室温,离心时间优选为0.5min~3min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放

入气浴恒温振荡器(25℃)中混匀,所述的混匀时间优选为2-4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀封闭,所述的封闭时间优选为1-2h,将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化、用缓冲液洗脱,收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0046] 所述的SCC抗体的质量(μg):化学发光标记物溶液的体积(μl)优选为500:5;所述的化学发光标记物溶液的浓度优选为2mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数优选为20%;所述的缓冲液为100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0;

[0047] 步骤三:偶联标记的鳞状上皮细胞癌抗原抗体的制备

[0048] 将SCC抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心10s~30s,保证抗体位于离心管底部位置,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,所述的离心温度优选为室温,离心时间优选为0.5min~3min;然后混匀,所述的混匀温度优选为2-8℃,混匀时间优选为2-4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀封闭,所述的封闭时间优选为1-2h,将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化、用缓冲液洗脱,收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0049] 所述的SCC抗体的质量(μg):偶联标记物溶液的体积(μl)优选为500:2;所述的偶联标记物溶液的浓度优选为2mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数优选为20%;所述的缓冲液为100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0;

[0050] 本发明的鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒用于检测鳞状上皮细胞癌抗原时,利用全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对鳞状上皮细胞癌抗原校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求测试临床样本,根据样本的光量子数计算鳞状上皮细胞癌抗原的浓度;最后对鳞状上皮细胞癌抗原全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。

[0051] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0052] 实施例1:鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备:

[0053] (1)链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0054] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72毫升(72mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后在50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH7.4的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存。

[0055] (2)吡啶酯标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体的制备

[0056] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入磷酸缓冲液,充分混匀,混匀后加入5 μl 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5分钟。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,流速为3ml/min,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的鳞状上皮细胞癌抗原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,2~8℃保存。

[0057] (3)生物素偶联标记鳞状上皮细胞癌抗原抗体的制备

[0058] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)

后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2ml 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5分钟。2-8℃混匀4小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,流速为3ml/min,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的鳞状上皮细胞癌抗原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.7μg/ml,2~8℃保存。

[0059] 实施例2鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0060] (1) 链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0061] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72毫升(72mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀12分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后在50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH7.4的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存。

[0062] (2) 吡啶酯标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体的制备

[0063] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心3分钟。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀2小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,流速为3ml/min,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的鳞状上皮细胞癌抗原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2μg/ml,2~8℃保存。

[0064] (3) 生物素偶联标记鳞状上皮细胞癌抗原抗体的制备

[0065] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2ml 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心3分钟。2-8℃混匀2小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体上AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,流速为3ml/min,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的鳞状上皮细胞癌抗原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.7μg/ml,2~8℃保存。

[0066] 实施例3鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0067] (1) 链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0068] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72毫升(72mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀12分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后在50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH7.4的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存。

[0069] (2) 吡啶酯标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体的制备

[0070] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心2分钟。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振

荡器 (25℃), 混匀3小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液, 放入气浴恒温振荡器 (25℃), 中速混匀, 封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化, 流速为3ml/min, 用PB缓冲液洗脱, 分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的鳞状上皮细胞癌抗原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300, pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2μg/ml, 2~8℃保存。

[0071] (3) 生物素偶联标记鳞状上皮细胞癌抗原抗体的制备

[0072] 将500ug抗体放入离心管中, 保证抗体位于离心管底部位置 (离心机室温离心20s) 后加入磷酸缓冲溶液, 充分混匀, 混匀后加入2ml 2mg/mL生物素的DMF溶液, 用离心机室温条件下离心2分钟。2-8℃混匀3小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液, 放入气浴恒温振荡器 (25℃), 中速混匀, 封闭时间为1h。将封闭好的抗体上AKTA纯化仪 (葡聚糖凝胶G250柱) 纯化, 流速为3ml/min, 用PB缓冲液洗脱, 分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的鳞状上皮细胞癌抗原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05% Proclin300, pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.7μg/ml, 2~8℃保存。

[0073] 实施例4鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒检测方法:

[0074] 以全自动化学发光免疫分析仪 (CM180) 为检测工具, 方法学模式为夹心法, 即仪器依次加入25μL的样本, 50μL吡啶酯标记的鳞状上皮细胞癌抗原单克隆抗体, 50μL生物素标记的鳞状上皮细胞癌抗原类似物及40μL链霉亲和素磁颗粒。反应20分钟后, 进行磁分离。仪器将反应物送入暗室, 一次加入发光底物液A液 (HNO₃溶液) 和B液 (NaOH溶液) 进行反应, 最后记录光量子数。

[0075] 实施例5鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0076] (1) 线性的检测: 将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为7种浓度, 对每一浓度的样本均重复检测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, 计算线性相关系数r, 得到线性相关系数r=0.9999, 线性范围为0.01-500.00ng/mL。结果如图2和表1所示:

[0077] 表1

[0078]

理论值n g/mL)	L7	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关 系数 (r)
	0.032	0.16	0.8	4	20	100	500	
测定值(ng/mL)	0.03	0.16	0.82	4.09	20.83	102.56	502.32	1.000
	0.031	0.15	0.83	4.23	20.36	103.26	495.54	
测定均 值 (ng/m L)	0.031	0.155	0.825	4.16	20.595	102.91	498.93	
发明试 剂光量 子数	636	1652	8286	35434	177170	735856	3279282	1.000

[0079]

进口试剂光量子数	4543	25954	35408	106473	218588	788595	2589641	0.995
----------	------	-------	-------	--------	--------	--------	---------	-------

[0080] (2) 最低检测线:最低检测线的定义为对零值校准品进行20次测定光量子数,取其平均值减去两倍的标准差,带入标准曲线所得即为灵敏度;计算鳞状上皮细胞癌抗原化学发光免疫检测试剂盒的最低检测线 $<0.01\text{ng/mL}$,结果如表2所示:

[0081] 表2

[0082]

测试次数	光量子数	测试次数	光量子数
1	606	11	585
2	576	12	543
3	587	13	578
4	528	14	583
5	572	15	556
6	590	16	567
7	576	17	588
8	582	18	559
9	610	19	560
10	575	20	650
平均值		579	
标准差		26	
灵敏度 (ng/mL)		0.01	

[0083] (3) 准确度:将浓度约为 50ng/mL (允许其浓度偏差为 $\pm 20\%$)的鳞状上皮细胞癌抗原样品(A)加入到相应基质的样品(B)中,所加入(A)/(B)的体积比为1:9,计算回收率为97.80%,如表3所示:

[0084] 表3

[0085]

A 液样本浓度	B 液样本浓度	A+B 液混合浓度	回收率 (R)
Cs (pmol/L)	C0 (pmol/L)	C (pmol/L)	
50.00	0.00	4.89	97.80%
50.00	0.00	4.90	
50.00	0.00	4.88	
V (mL)	V0 (mL)	V0+V (mL)	
0.300	2.700	3.000	

[0086] (4) 重复性:分别用浓度为 $5\pm 2\text{ng/mL}$ 和 $50\pm 10\text{ng/mL}$ 的样本各重复检测10次,两个样本重复性变异系数(CV)分别为1.78%和1.33%,结果如表4所示:

[0087] 表4

[0088]

测定次数	重复性样本 1	重复性样本 2
Rep1	4.98	52.71
Rep2	4.89	51.61
Rep3	5.10	51.75
Rep4	4.98	51.27
Rep5	5.02	50.05
Rep6	5.03	51.65
Rep7	5.20	51.43
Rep8	5.15	51.76
Rep9	5.01	52.22
Rep10	5.03	51.77
M (ng/mL, 测定均值)	5.04	51.62
SD	0.09	0.69
CV	1.78%	1.33%

[0089] (5) 抗干扰特异性实验:对于1000ng/mL的丝裂霉素C、阿霉素和氟尿嘧啶测试结果小于0.5ng/mL;20mg/dL胆红素、500mg/dL血红蛋白、3000mg/dL甘油三酯、12g/dL总蛋白、RF样本的样本,不会显著影响鳞状上皮细胞癌抗原的测定($\pm 10\%$)。

[0090] (6) 稳定性:试剂置于37℃烘箱7天和14天,使用校准品及临床样本检测7天和14天高温试剂与零时间试剂光子数衰减率,衰减率 $<15\%$,结果如表5所示:

[0091] 表5

[0092]

测试样本说明	理论浓度 (ng/mL)	SCC高温稳定性数据							
		零时间2-8℃		14天2-8℃			14天37℃		
		平均光子数	CV	平均光子数	CV	与零时间比光子数衰减	平均光子数	CV	与零时间光子数衰减
									与2-8℃14天光子数

[0093]

						减率			率	衰减率
生理盐水	0	556	15.34 %	543	15.17 %	-2.34 %	509	6.77 %	-8.45 %	-6.26 %
SCC校准-1	0	507	9.27 %	525	10.21 %	3.55 %	483	1.62 %	-4.73 %	-8.00 %
SCC校准-2	0.5	4885	1.46 %	4626	6.36 %	-5.30 %	4608	7.28 %	-5.67 %	-0.39 %
SCC校准-3	1	9331	0.38 %	9545	2.60 %	2.29 %	9300	1.28 %	-0.33 %	-2.57 %
SCC校准-4	10	85992	2.34 %	83706	0.65 %	-2.66 %	84679	1.57 %	-1.53 %	1.16 %
SCC校准-5	50	407041	1.09 %	415329	0.03 %	2.04 %	402676	0.20 %	-1.07 %	-3.05 %
SCC校准-6	250	1804413	0.85 %	1806710	0.26 %	0.13 %	1731320	1.60 %	-4.05 %	-4.17 %
SCC校准-7	500	3229239	0.85 %	3256710	0.26 %	0.85 %	3131320	1.60 %	-3.03 %	-3.85 %
平均衰减率				校准平均衰减		-0.18 %	校准平均衰减		-3.61 %	-3.39 %
SCC临床-1	0.32	3349	1.13 %	3235	0.53 %	-3.40 %	3159	0.70 %	-5.67 %	-2.35 %
SCC临床-2	1.9	17029	0.44 %	16092	2.83 %	-5.50 %	15977	4.56 %	-6.18 %	-0.71 %
SCC临床-3	28.01	233237	0.41 %	219598	2.72 %	-5.85 %	210014	0.06 %	-9.96 %	-4.36 %
SCC临床-4	152.53	1165488	0.01 %	1157836	0.28 %	-0.66 %	1105111	0.22 %	-5.18 %	-4.55 %
SCC临床-5	334.22	2322077	0.85 %	2275736	1.21 %	-2.00 %	2194925	1.42 %	-5.48 %	-3.55 %
平均衰减率				临床平均衰减		-3.48 %	临床平均衰减		-6.49 %	-3.11 %

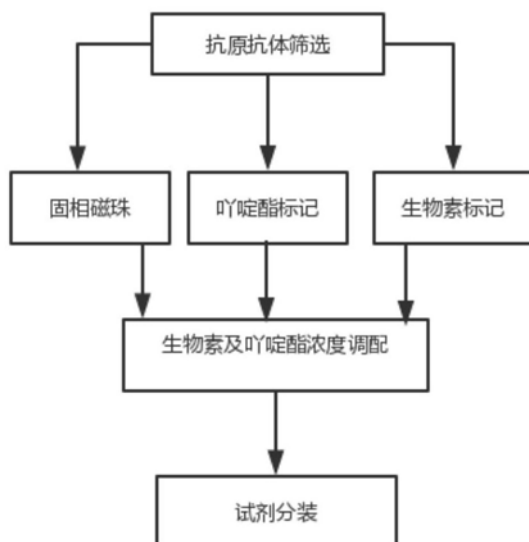


图1

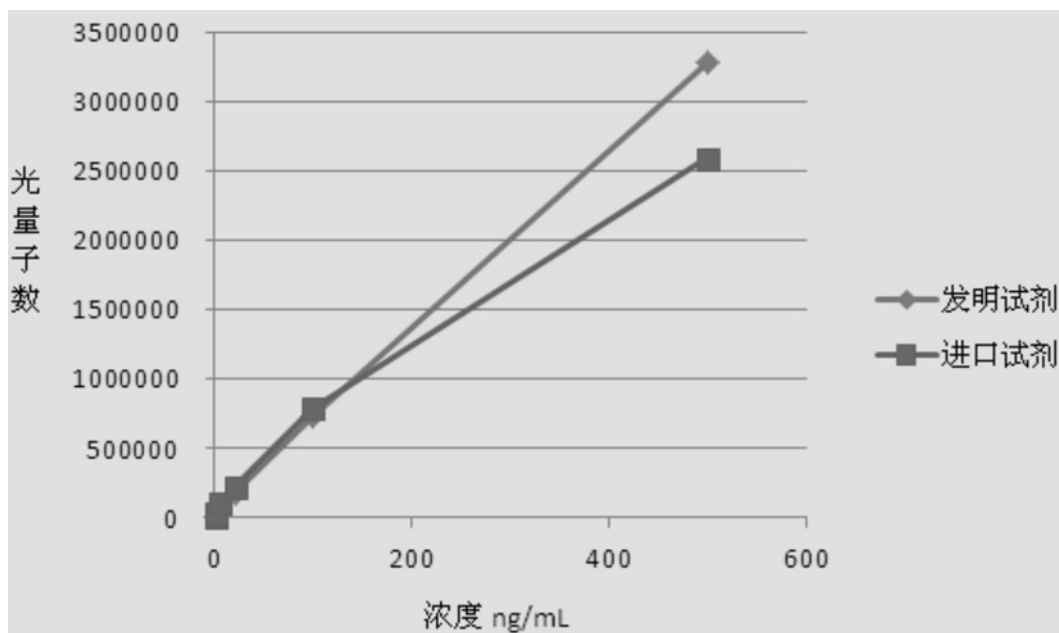


图2