



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103018461 A

(43) 申请公布日 2013.04.03

(21) 申请号 201210540815.X

(22) 申请日 2012.12.13

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6907 2012.11.27

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 范祖森 杜颖 李翀 张倩云

王彦英 杨昭 周鹏

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种早期诊断膀胱癌的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及生物医学免疫分析领域,本发明利用微孔板化学发光免疫分析法,通过检测人尿液中的膀胱癌肿瘤标志物——异常糖基化的整合素 AG- $\alpha 3\beta 1$ 建立一种快速、灵敏、高特异性的早期诊断膀胱癌的检测试剂盒。本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、高特异、稳定等优点,可用于常规体检中膀胱癌早期筛查及膀胱癌跟踪观察和预后评价,可满足目前膀胱癌体外诊断方面缺乏特异诊断方法的需要。

1. 一种检测（人尿液中）膀胱癌肿瘤标志物（异常糖基化的整合素 AG- $\alpha 3\beta 1$ ）的（化学发光）免疫分析试剂盒，其包括：

特异性识别膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的两种单克隆抗体，优选鼠源单克隆抗体，更优选 BCMab3 和 BCMab1，最优选用作捕获抗体的 BCMab3 和酶标记的单克隆抗体 BCMab1。

2. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒，其包括：

- 1) 标准品；
- 2) 捕获抗体 BCMab3 包被的微孔板；
- 3) 酶标记的单克隆抗体 BCMab1；
- 4) 上述酶所作用的化学发光底物；
- 5) 浓缩洗涤液；
- 6) 阴性对照，为不含膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的正常人全尿样本；和
- 7) 阳性对照，为含有膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的膀胱癌患者全尿样本。

3. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒，其中所述标准品为膀胱癌患者尿液样本的逐级稀释液。

4. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒，其中所述捕获抗体 BCMab3 为特异性识别人膀胱癌 AG- $\alpha 3\beta 1$ 蛋白 C 端的单克隆抗体，该单克隆抗体由保藏号为 CGMCC No. 6907 的杂交瘤细胞株分泌，优选其中所述微孔板为适用于化学发光反应的检测的 96 孔（白色）微孔板。

5. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒，其中所述单克隆抗体 BCMab1 为抗人膀胱癌 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的单克隆抗体，由保藏号为 CGMCC No. 3845 的杂交瘤细胞株分泌。

6. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒，其中所述酶为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。

7. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒，其中所述浓缩洗涤液使用前需用去离子水稀释至原倍浓度后使用。

8. 如权利要求 1 所述的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

- 1) 配制标准品；
- 2) 将捕获抗体 BCMab3 包被固相载体，优选微孔板；
- 3) 制备酶标记的单克隆抗体 BCMab1；
- 4) 配制酶所作用的化学发光底物液；
- 5) 配制浓缩洗涤液；和
- 6) 分装上述各组分，并组装为试剂盒。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中，所述包被固相载体的步骤 2) 包括以下步骤：将纯化后的 BCMab3 抗体配制成包被缓冲液；将 BCMab3 抗体包被缓冲液过夜包被微孔板；将封闭液封闭微孔板后，用洗涤液洗涤微孔板；再干燥、封板，于 4℃ 保存。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述封闭液为复合封闭液：1000mL 磷酸缓冲液，其中含 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，加入 10g BSA、1g 水解明胶和 1mL 生物防腐剂，所述封闭液的 pH 值为 7.0 ~ 7.6，然后将所得封闭液加载于微孔板上。

一种早期诊断膀胱癌的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种膀胱癌患者尿液中的肿瘤标志物的检测方法,该方法通过定量检测存在于尿液中异常糖基化的整合素 AG- $\alpha 3\beta 1$ 含量,无创性地实现膀胱癌的早期诊断。

背景技术

[0002] 膀胱癌为泌尿系最常见的恶性肿瘤,发病率在美国被列为男性恶性肿瘤的第四位,女性为第八位,居恶性肿瘤的第七位。在我国发病率泌尿系肿瘤第一位。膀胱癌约 95% 来源于膀胱上皮,绝大多数为恶性,只有少数为良性,包括乳头状瘤、移行细胞癌、鳞状细胞癌和腺癌。其中以移行细胞癌最常见,占 80% 以上。目前手术治疗、放疗和化疗的疗效并不令人满意,患者 5 年存活率在 40% -60%。预后较差和极易复发是膀胱癌的最大特点,有效的治疗很大程度上依赖于对膀胱癌的早期发现和早期治疗。然而,膀胱癌发病隐匿,大部分患者都是因为肉眼或镜下血尿怀疑膀胱癌才会到医院就诊,而出现肉眼血尿往往已是癌症晚期。所以寻找特异的膀胱癌早期诊断方法具有重要的临床应用价值。

[0003] 目前,膀胱癌的早期诊断方法有以下几种:

[0004] 1) 尿液分析:血尿出现后首先便是进行尿液分析,以便排除是否是由于尿路炎症引起,并不能确定患者是否患膀胱癌;

[0005] 2) 尿脱落细胞分析:对尿沉渣中的尿脱落细胞进行显微镜下观察,可以鉴别并区分恶化的肿瘤细胞和正常细胞。但灵敏度不高,且差异较大,早期膀胱癌容易漏检;

[0006] 3) 超声、CT 或者 MRI 成像观察:对肿瘤的大小和恶化程度可以直接进行图像观察,准确度较前面方法大大提高。尽管近年来成像技术的不断进步,灵敏度不断提高,但对较小的肿瘤观察仍然不够,易漏检;

[0007] 4) 膀胱镜观察:膀胱镜通过尿路进入膀胱,进行可视化的观察,从而发现早期的肿瘤并取活检。但该方法是一种有创性检查,不能用于膀胱癌早期筛查环节。

[0008] 目前早期诊断膀胱癌细胞特异性最高的是通过膀胱镜的观察,荧光膀胱镜的应用提高了检测灵敏度。但患者一般需要经常性的跟踪观察,从而能及早发现肿瘤,或者跟踪治疗中的疗效及复发状况的观察。然而,膀胱镜观察会对患者造成身体不适。另外,目前荧光膀胱镜检测所需荧光染料特异性不高,且对人体有一定的负面影响。因此,在膀胱癌的早期诊断方面,人们一直在探索更特异和更灵敏的检测方法,尽可能的利用特异的肿瘤标志物实现方便、快速的检测。

[0009] 实现尿液中膀胱癌标志物或者细胞的检测,进行实时检测在临床诊断方面具有重要的应用价值。目前商业化的可用的膀胱癌的标志物有:人补体因子 H 相关蛋白(膀胱肿瘤抗原, BTA 试剂盒)、高分子量的癌胚抗原和两个膀胱癌细胞相关的粘附分子(美国 Scimedex Corp 公司的 Immunocyt 试剂盒)、核基质蛋白 22 (NMP22)、3、7 和 17 号染色体的异倍体以及 P16 肿瘤抑制因子 9p21 位点的缺失 (UroVysion 试剂盒)。BTA 是指人补充因子 H 相关蛋白, BTA 检测需要专业操作人员在标准实验室进行。灵敏度达到 57-83%, 特异性 60-92%, 血尿患者的特异性只能达到 46%, 另外良性前列腺增生、肾结石以及尿路感染等情况均影

响 BTA 检测的特异性 ; Immunocyt 试剂盒通过免疫荧光检测尿脱落细胞, 尽管灵敏度以及特异性很高, 但为了达到较高的准确性需要进行大量的尿脱落细胞检测, 因此在膀胱癌患者的治疗以及预后观测方面具有很高的应用价值, 但应用在早期诊断方面差强人意 ; 其中 NMP22 是目前应用最广的膀胱癌标志物, ELISA 试剂盒的市场化实现了膀胱癌早期诊断的方便、快捷检测, 检测灵敏度和特异性也很高, 但是在有病毒感染、肾 / 膀胱结石等情况下, 仍会出现假阳性 ; UroVysion 试剂盒采用的是多靶标的荧光原位杂交 (FISH) 技术, 尽管灵敏度与特异性得到极大提高, 美国 FDA 批准, 但与 Immunocyt 试剂盒类似, 需要进行大量的尿脱落细胞检测。

[0010] 结合目前的膀胱癌标志物的应用以及膀胱癌的诊断现状, 我们得出 : 一方面, 新的特异的膀胱癌仍是研究的重点 ; 制备早期诊断试剂盒, 实现快速、高通量检测, 在膀胱癌的早期筛查及预后方面具有重要的临床价值。

[0011] 因此, 选用高特异性、高灵敏性且无创伤性的检测方法对膀胱癌的早诊、早治有重要意义。

发明内容

[0012] 根据本发明人之前的研究 (参见中国专利申请号 : 201010251384.6), 发现了一种人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$, 其为异常糖基化的整合素 $\alpha 3\beta 1$, 其特征在于带有作为抗原表位的糖结构 [3OS03]Galb1-4(Fuca1-3)[6OS03]GlcNAc。在上述中国专利申请号 : 201010251384.6 中, 公开了所述整合素 $\alpha 3\beta 1$ 的 $\alpha 3$ 亚单位的氨基酸序列如 SEQ ID No : 1 所示, 所述整合素 $\alpha 3\beta 1$ 的 $\beta 1$ 亚单位的氨基酸序列如 SEQ ID No : 2 所示, 优选所述异常糖基化是处在 $\alpha 3$ 亚单位的第 740 位的氨基酸 T (苏氨酸) 上。

[0013] 在中国专利申请号 : 201010251384.6 中, 本发明人通过以人膀胱癌细胞系 T24 (ATCC : HTB-4) 免疫 Balb/C 小鼠 (商购自北京维通利华实验动物技术有限公司), 将致敏的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 用 ELISA 方法筛选出针对人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的一株杂交瘤细胞株, 该杂交瘤细胞株于 2010 年 5 月 21 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC, 中国, 北京), 保藏号为 CGMCC No. 3845。

[0014] 通过同样的方法, 本发明人还获得了单抗 BCMab3, 其为特异性识别人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 蛋白 C 端的单克隆抗体, 分泌单抗的杂交瘤细胞株于 2012 年 11 月 27 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC, 中国, 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 100101), 保藏号为 CGMCC No. 6907。

[0015] (一) 本发明解决的技术问题

[0016] 本发明着眼于膀胱癌的早期诊断与膀胱癌患者的跟踪观察, 拟解决现行的膀胱癌早期诊断方面的难题, 即采用特异性识别膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的两株单克隆抗体, 利用双抗体夹心法实现对 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的识别与捕获, 结合高灵敏的化学发光免疫分析方法, 提供了一种高灵敏、高特异、操作简便、价格适宜的定量检测 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的化学发光免疫试剂盒。该试剂盒不需要昂贵的检测仪器, 便于临床推广, 具有良好的市场应用价值, 将会弥补市场现有试剂盒的不足。

[0017] 本发明的目的是提供一种定量检测 AG- $\alpha 3\beta 1$ 化学发光免疫分析试剂盒, 很好的解决了检测灵敏度和特异性低而影响膀胱癌早期诊断的问题。

[0018] 本发明的另一目的是提供一种制备上述试剂盒的方法。

[0019] (二) 技术方案

[0020] 1. 本发明试剂盒组分

[0021] 本发明定量检测 AG- α 3 β 1 化学发光免疫分析试剂盒,其组分包括如下:

[0022] A. 标准品。其是化学发光值很高的膀胱癌患者尿液样本的逐级稀释物。冻存备用。

[0023] B. 捕获抗体 BCMab3 包被的微孔板。BCMab3 为单克隆抗体,能特异地识别尿液中的 AG- α 3 β 1,将该抗体包被在微孔板上,用于特异性捕获尿液中的 AG- α 3 β 1。

[0024] C. 用于检测的标记抗体。该抗体为酶标记的针对 AG- α 3 β 1 的单克隆抗体 BCMab1,能特异地识别尿液中的 AG- α 3 β 1。此单抗可用碱性磷酸酶或者辣根过氧化物酶偶联形成酶联单抗结合物。用其识别样品中的 AG- α 3 β 1,释放信号。其释放信号能被转换成 AG- α 3 β 1 的浓度,用于定量分析。

[0025] D. 配置碱性磷酸酶或者辣根过氧化物酶所作用的化学发光底物液。

[0026] E. 10 \times 浓缩洗涤液。本发明所述试剂盒为了便于用户使用,配制了浓缩洗涤液。使用时,用去离子水稀释 10 倍至 1x 使用。该浓缩洗液为含有 2% Tween-20 的磷酸盐缓冲洗涤液。

[0027] F. 阴性对照,为正常男性尿液,不含有 AG- α 3 β 1。

[0028] G. 阳性对照,为膀胱癌患者尿液,含有一定量的 AG- α 3 β 1。

[0029] 2. 本发明试剂盒的制备方法

[0030] 制备上述定量检测 AG- α 3 β 1 化学发光免疫分析试剂盒的方法包括以下步骤:

[0031] 1) 配制标准品。选取化学发光值很高的膀胱癌患者尿液样本,逐级稀释,冻存备用,用作制备定量分析的标准曲线。本方法中将化学发光值为 6685 的样本(即本方法选取的 Cut off 值)中包含 AG- α 3 β 1 的量定义为 1U/mL。标准品的浓度梯度为 0、1、2、4、8、16、32、64、128U/mL,用其标准曲线计算出样本中 AG- α 3 β 1 浓度。

[0032] 2) 配制含单克隆抗体 BCMab3 的包被液,将其包被于 96 孔微孔板上。包被微孔板的步骤为:a) 包被:采用 0.05M、pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液或 0.046M、pH 值为 4.6 的柠檬酸缓冲液与适当浓度的 BCMab3 抗体混合制成包被液,并将其加载于微孔板上,室温过夜;b) 封闭:配制复合封闭液:1000mL 磷酸缓冲液,包含 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10g BSA、1g 水解明胶和 1mL 生物防腐剂(例如 Proclin300),调 pH 值为 7.0 ~ 7.6,然后将该封闭液加载于包被好抗体的微孔板上,室温过夜;c) 洗板:稀释 10 \times 浓缩洗液至原倍(1x),用原倍洗涤液洗板,干燥、封板后,于 4 $^\circ\text{C}$ 封存备用。

[0033] 3) 制备辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体 BCMab1。采用碳二亚胺(EDC)偶联法,即采用碳二亚胺基团可以与酶分子上的羧基反应,洗去多余的 EDC 后,再加入抗体,实现抗体上的氨基与酶分子上的羧基结合,形成酶标记抗体。选取合适的酶浓度溶解于新配置的酶稀释液中,冻存备用。

[0034] 4) 配制辣根过氧化物酶作用的化学发光底物液,化学发光底物液包含 A 液和 B 液,其中,基于 1000mL 所述化学发光底物 A 液,包括 1.7716g 鲁米诺、0.051g 4-羟基联苯、0.012g 4-碘苯硼酸、11.4g 硼酸、4.9g 硼砂,其 pH 值为 8.0 ~ 10.0;基于 1000mL 所述化学发光底物 B 液,包括 0.329g 过氧化脲、1ml Tween20、51.58g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.74g

NaH₂PO₄ · 2H₂O, 其 pH 值为 7.0 ~ 7.6。

[0035] 5) 配制浓缩洗涤液:1000mL 10× 浓缩洗涤液, 包含 5.93g NaH₂PO₄ · 12H₂O、58gNaH₂PO₄ · 2H₂O、9g NaCl、10mL Tween-20 和 10mL 生物防腐剂(例如 Proclin300)。

[0036] 6) 分装上述各组分, 并组装为成品。

[0037] (三) 技术效果

[0038] 本发明采用“双抗体夹心一步法”反应模式, 即载体上包被的抗体与酶标记的抗体和被测样品的 AG-α 3β 1 形成“包被抗体-抗原-抗体-酶”的夹心复合物结构。另外, 本发明有效地利用了化学发光技术原理, 实现了检测的高灵敏度。

[0039] 本发明一方面可以灵敏、快速测定尿液中膀胱癌肿瘤标志物 AG-α 3β 1 的含量, 对于膀胱癌患者早期诊断、早期治疗提供可靠的临床参考价值, 能够实现无创性地早期筛查膀胱癌的目标; 另一方面由于使用特异性提高的单克隆抗体作为包被固相, 大大提高了 AG-α 3β 1 检测的线性范围, 可以根据 AG-α 3β 1 含量的变化情况判断膀胱癌治疗效果及其病情的变化。本方法可以排除正常、炎症上皮细胞, 以及其它血细胞的干扰, 特异性的识别膀胱癌肿瘤标志物。

[0040] 本发明具有使用简便、检测快速、灵敏、稳定、可使用范围宽等优点。操作简便适用性广, 既可应用于开放式的半自动化学发光测量仪, 也可用于全自动的测量系统, 可实现大批量快检测, 使用成本低, 更易推广应用, 特别适合广大中、小医院推广使用。

附图说明

[0041] 图 1. 本发明所制备的试剂盒中标准品的线性标准曲线(实施例 1 制备的试剂盒的标准曲线)。

[0042] 图 2. 为实施例 1 制备的试剂盒特异性试验。

[0043] 图 3. 采用实施例 2 所述的方法对早期膀胱癌患者及正常人尿液检测的散点图。

[0044] 图 4. 膀胱癌及正常人样本尿液检测的接收者操作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)。

具体实施方式

[0045] 实施例 1 制备本发明的人尿液膀胱癌肿瘤标志物 AG-α 3β 1 的化学发光免疫分析试剂盒

[0046] 一、标准品的配制

[0047] 本方法采用辣根过氧化物酶催化鲁米诺和过氧化氢化学发光体系, 用化学发光仪检测发光值为 6685 的样本(即本方法选取的 Cut off 值)中包含 AG-α 3β 1 的量定义为 1U/mL。该发光值也与浓度为 1000cell/mL 的人膀胱癌细胞系(EJ 细胞)的化学发光值相等。

[0048] 收集大量的化学发光值很高的膀胱癌患者尿液样本以及正常人尿液样本(正常人尿液中不含 AG-α 3β 1), 用正常人尿液样本逐级稀释膀胱癌患者尿液样本, 标准品的浓度梯度为 0、1、2、4、8、16、32、64、128U/mL, 冻存备用, 用作制备定量分析的标准曲线, 用其标准曲线计算出样本中 AG-α 3β 1 浓度。

[0049] 二、单克隆抗体 BCMab1 和 BCMab3 的制备

[0050] 已具备两株单克隆抗体杂交瘤细胞株：保藏号为 CGMCC No. 3845 的杂交瘤细胞株分泌 BCMab1 抗体（中国专利申请号：201010251384.6）；保藏号为 CGMCCNo. 6907 的杂交瘤细胞株分泌 BCMab3 抗体。对于 BCMab1 和 BCMab3 各自的制备，取 5×10^7 个正处于对数生长期的杂交瘤细胞，以 1×10^7 的细胞浓度注射于 BALB/c 小鼠（购自北京维通利华实验动物公司）腹腔，10 天后收集腹水。通过以下步骤纯化腹水中的单克隆抗体：

[0051] a) 收集所得的腹水以 2500r/min 离心，取上清，以 0.01M pH7.4PBS 对倍稀释腹水上清。

[0052] b) 向上述腹水中加入等体积的饱和硫酸铵，室温搅拌 1 小时；

[0053] c) 以 11000rrmin, 4°C 离心 20 分钟，弃上清。重悬于适量 0.01M pH7.4PBS 中，并加入 1/2 体积的饱和硫酸铵，4°C 搅拌过夜。

[0054] d) 上述腹水以 11000r/min, 4°C 离心 20 分钟，弃上清。将沉淀溶于 0.01M pH7.4PBS 中，再用 0.01M pH7.4PBS 透析，即得抗体粗球。

[0055] e) Protein-G 凝胶柱安装到 AKTA 蛋白纯化仪 (GE Healthcare 公司)；

[0056] f) 将抗体粗球 11000r/min, 4°C 离心 20 分钟，取上清。上清以 0.5mL/min 流速通过预先以 0.02M pH7.0 含 0.15M 的 NaCl 的 PBS 平衡过的 Protein-G 凝胶柱，上样完毕后孵育 1 小时；

[0057] g) 0.02M pH7.0 含 0.15M 的 NaCl 的 PBS 洗脱杂蛋白；

[0058] h) 0.2M pH2.8 甘氨酸缓冲液，并收集洗脱液；

[0059] i) 清洗 Protein-G 凝胶柱，并将柱子保存在 20% 的乙醇中；

[0060] j) 洗脱的抗体溶液经超滤浓缩，测抗体浓度，即完成抗体的纯化。

[0061] 三、制备单克隆抗体 BCMab3 包被的微孔板

[0062] 采用 0.05M pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液与适当浓度的单克隆抗体 BCMab3 混合制成包被液，并将其加载于固相载体上；

[0063] 具体地，所述包被方法为：

[0064] a) 包被：采用 0.05M pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液与适当浓度的单克隆抗体 BCMab3 混合配制成包被液。1000mL 的碳酸盐缓冲液包含 2.93g 的 NaHCO_3 、1.59g 的 Na_2CO_3 、和 9g NaCl，与适当浓度的单克隆抗体 BCMab3 混合制成包被液。

[0065] 具体的碳酸盐缓冲液见下：

[0066]

试剂	分子式	终浓度	分子量	1000mL 用量
----	-----	-----	-----	-----------

[0067]

碳酸氢钠	NaHCO_3	35mM	84.01	2.94g
碳酸钠	Na_2CO_3	15mM	105.99	1.59g
氯化钠	NaCl	0.15M	58.44	9.0g
水	H_2O		18.02	加至 1000mL

[0068] 上述物质溶解混匀后，加双蒸水定容，调整 pH 至 9.6，加入适量单克隆抗体 BCMab3

混匀,然后加入微孔板各孔中,每孔 120 μ L,室温过夜。

[0069] b) 封闭液配制及封闭:

[0070]

试剂	分子式	终浓度	分子量	1000mL 用量
磷酸二氢钠	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.28mM	156.01	0.2g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	8.10mM	358.14	2.9g
牛血清白蛋白	BSA	1.0%	66.430kDa	10.0g
水解明胶		1.0%		10.0g
生物防腐剂	Proclin300	0.1%		1.0ml
水	H_2O			加至 1000mL

[0071] Proclin300(商购自美国 SUPELCO 公司)

[0072] 将上述试剂称量好放入洁净容器中,加双蒸水定容,溶解混匀,调 pH 值为 7.0,即得本发明所述的复合封闭液。每孔分别加入封闭液 250 μ L,室温过夜。

[0073] c) 洗板:稀释 10 \times 浓缩洗液至原倍浓度,用原倍洗涤液洗板四次,干燥、封板用铅箔袋包装,进行真空封袋,贴签后置 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0074] 10 \times 浓缩洗液配方见下:

[0075]

试剂	分子式	终浓度	分子量	1000mL 用量
磷酸二氢钠	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.28mM	156.01	5.93g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	8.10mM	358.14	58g
氯化钠	NaCl	0.15M	58.44	9.0g
吐温 20	Tween-20	1.0%		10.0ml
生物防腐剂	Proclin300	1.0%		10.0ml
水	H_2O			加至 1000mL

[0076] 调整 pH 至 7.2-7.4,使用时稀释 10 倍使用。

[0077] 四、酶标记单克隆抗体 BCMab1 的制备、酶稀释液及酶浓度的确定

[0078] 1、碳二亚胺 (EDC) 偶联法标记辣根过氧化物酶 (HRP)

[0079] 酶标记抗体采用常规的碳二亚胺 (EDC) 偶联法,具体流程如下:10mg HRP (Sigma) 溶解于柠檬酸盐缓冲溶液中,加入 EDC (溶解于吗啉基乙磺酸, MES) 与酶分子上的羧基反应;10min 后加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),将取代 EDC 分子,酶分子与 NHS 分子间形成

活化的羧基基团；1mg 单克隆抗体与活化的酶分子反应，实现抗体上的氨基与酶分子活化羧基反应，室温 2 小时，即得 HRP 标记单克隆抗体；完成标记的抗体溶液中逐滴加入饱和硫酸铵溶液，边加边搅拌，直至饱和硫酸铵浓度降低至原始浓度的 1/3；4℃ 静置 1h，8000rpm 离心 10min，将上清液移至新管，沉淀用等体积 PBS 重新悬浮；重复上述操作 3 次，收集上清即得提纯的酶标记抗体，加入等体积甘油，-20℃ 保存备用。

[0080] 2、酶标抗体浓度选定

[0081] 采用方阵法选择酶标抗体的工作浓度为 1 : 5000。

[0082] 3、酶标记抗体稀释液的配方如下：

[0083]

试剂	分子式	终浓度	分子量	1000mL 用量
磷酸二氢钠	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1mM	156.01	0.156g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.9mM	358.14	6.783g
明胶		1‰		1g
Tween-20		0.5‰		0.5ml
牛血清白蛋白	BSA	1.0%		10g
生物防腐剂	Proclin300	1.0%		10.0ml
食品红		0.005‰		0.1ml

[0084] 六、分装半成品并组装成品试剂盒

[0085] 上述四步即完成本发明试剂盒的制备，成为半成品。分装半成品组装成试剂盒。作为成品试剂盒需满足临床检验的标准要求，即精密度、灵敏度、特异性及稳定性。对半成品抽查检验，检验合格，贴签后置 4℃ 保存。

[0086] 实施例 2 本发明的膀胱癌肿瘤标志物 AG- α 3 β 1 化学法光免疫分析测定试剂盒的使用方法

[0087] 一、样品前处理

[0088] 留取人的尿液，无需其它特殊处理，直接进行分析。

[0089] 二、检测步骤

[0090] 使用本试剂盒进行检测前，需先取出本实施例 1 中所制备的标准品、包被微孔板、酶标记单克隆抗体溶液以及各缓冲溶液，室温静置，平衡至室温后即可使用；将恒温箱或者水浴锅调至 37℃；准备好合适的微量加样器及对应吸头并且检查化学发光仪是否正常工作。

[0091] 使用本试剂盒的具体操作步骤如下：

[0092] 1) 取出试剂盒内各组分平衡至室温；

[0093] 2) 将实验需要的板条放置在空板架上；

[0094] 3) 反应孔中加入 50 μ L 尿液样品、阴性对照、阳性对照和标准品溶液，每次试验设

空白对照孔,然后除空白孔外,每孔加酶标抗体(工作浓度为 1 : 5000)50 μ l ;

[0095] 4) 微量振荡器上振荡 30 秒混匀 ;

[0096] 5) 37 $^{\circ}$ C 恒温温育 60 分钟 ;

[0097] 6) 弃去孔中溶液,用原倍洗液经自动洗板机或者手工洗板 5 次,在吸水纸上拍干 ;

[0098] 7) 每孔加发光底物 100 μ l,振荡混匀 ;

[0099] 8) 用化学发光仪(北京滨松光子有限公司, BHP9504) 测相对发光值 (RLU),测量时间 1 秒 / 孔 ;

[0100] 9) 分别对校准品浓度和对应 RLU 取对数,在建立的双对数曲线上建立标准曲线,以各待测尿液 RLU 值在标准曲线上查出该尿液的 AG- α 3 β 1 的浓度,计算检测结果 ;

[0101] 10) 打印检测结果报告。

[0102] 实施例 3 本发明的试剂盒的方法学指标

[0103] 按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定,结果如下 :

[0104] 1. 本试剂盒的标准曲线

[0105] 本试剂盒采用辣根过氧化物酶催化鲁米诺和过氧化氢化学发光体系,用化学发光仪检测发光值并绘制标准曲线见附图 1,其中, I 为发光强度, C 为标准品细胞裂解液浓度(单位为 U/mL),相关系数 $R^2 = 1$, $Y = 1240.5 + 5439.54X$ 。

[0106] 2. 试剂盒灵敏度实验

[0107] 灵敏度是可以与零剂量点可区分的浓度。同时测定 10 个零标准点,得 RLU 的平均值与标准偏差。计算 RLU 平均值与两倍标准偏差的差值,由内插法,从工作曲线中得出其对应浓度值。实验中测定的灵敏度为 0.0315U/mL。

[0108] 3. 试剂盒精密度检测

[0109] 精密度是分析结果的重现性。选取高、中、低值三种膀胱癌患者尿液样本,分为 10 份,在同一次分析中同时检测每份样本,每种样本的标准偏差与平均值的比值,为批内变异系数 ;高中低三种样本在三批次不同分析中,测定值的标准偏差与平均值的比值,为批间变异系数,结果表明批内和批间变异系数在 1.58%~3.59%之间。

[0110] 表 1 试剂盒精密度测定(批内、批间变异)

样本	测定值 U/mL	平均值 U/mL	标准偏差 U/mL	CV%
[0111] 批内 变异	5.21,5.27,5.42,5.59,5.27, 5.32,5.12,5.25,5.14,5.46	5.305	0.147	2.77
	20.54,21.32,20.15,20.73,21.14, 20.77,22.49,22.41,20.85,21.17,	21.157	0.760	3.59
	90.54,93.21,90.47,89.24,91.56, 90.85,92.45,93.64,92.47,93.36	91.779	1.474	1.60
批间 变异	5.296,5.341,5.494	5.377	0.085	1.58
	21.157,20.542,22.143	21.281	0.659	3.10
	91.779,90.017,93.989	91.928	1.625	1.77

[0112] 4. 试剂盒准确度测定

[0113] 取两例膀胱癌患者尿液样本,分别加入等体积的标准品溶液 20U/mL 和 50U/mL,按照实施例 2 的方法对每个浓度做 3 个平行检测。再根据工作曲线,实际检测该溶液中 AG- α 3 β 1 含量,则样品的测定值减去尿液样本发光值,再除以 AG- α 3 β 1 标准品浓度值,得到回收率。回收率在某种程度上,反应方法的准确性和分析灵敏度。回收率如表 2 所示,回收率在 95.5-107%之间。

[0114] 表 2 实际样本准确度测定

样本	加入值 U/mL	理论值 U/mL	实测值及平均值 U/mL		回收率及平均值	
[0115]	1	20	55.0		100	
			54.5	54.53	97.5	97.67
			54.1		95.5	
	2	50	86.2		102.4	
			85.7	85.3	98.6	98.07
			84.0		98.0	
1	20	96.4		107.0		
		95.2	95.37	101	101.83	
		94.5		97.5		
2	50	124.1		98.2		
		125.5	124.63	101.0	99.27	
		124.3		98.6		

[0116] 5. 试剂盒稳定性实验

[0117] 对实施例 1 的试剂盒中的试剂进行 37℃、7 天加速实验后,测定试剂盒的最大、最低发光强度、待测物的加标回收率等。结果表明实施例 1 的试剂盒指标均在正常范围之内。

对实施例 1 的试剂盒主要组分进行 2 ~ 8℃、8 个月跟踪实验,结果表明各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况的发生,将实施例 1 的试剂盒放入 -20℃冷冻 7 天,测定结果也表明试剂盒的各项指标完全正常。从以上结果可以看出试剂盒可以在 2 ~ 8℃至少可以保存 6 个月以上。

[0118] 6. 试剂盒特异性试验

[0119] 取正常尿路上皮细胞系 HCV29⁽¹⁾ 和人膀胱癌细胞系 T24(ATCC:HTB-4)、5637(ATCC:HTB-9)、EJ⁽²⁾、BIU-87⁽³⁾ 培养上清进行特异性试验。试验结果如图 2 所示,HCV29 的检测值与阴性对照 PBS 缓冲液的化学发光值都很低;而四种人膀胱癌细胞系 T24、5637、EJ、BIU-87 的化学发光值显著高于对照样本检测值;且四种人膀胱癌细胞 T24、5637、EJ、BIU-87 的检测值高出阴性对照 HCV29 和 PBS 缓冲液的检测值的 13 倍以上,可得本方法的灵敏度很高。

[0120] 经过上面所述大量实验,得出本发明试剂盒的方法学指标如下:

[0121] 检测范围:0U/mL ~ 140U/mL;

[0122] 灵敏度:最小检出限为 0.0315U/mL;

[0123] 精密度:分析内精密度(高、中、低三个质量控制范围)均小于 3.59% (n = 10),

[0124] 分析间精密度(高、中、低三个质量控制范围)均小于 3.1% (n = 10);

[0125] 准确性:加标回收率在 95.5-107%之间;

[0126] 利用本发明方法进行检测,灵敏度级高,特异性强,检测范围宽,操作简单,无放射性污染,试剂盒成本低,临床适用性强,更适用于临床体检筛查实验。因此本发明为临床检测膀胱癌肿瘤标志物 AG- α 3 β 1,诊断早期膀胱癌以及对膀胱癌的早期预警和动态监测,提供了一种灵敏、准确、快捷、特异的方法。

[0127] 实施例 4 本发明试剂盒在早期膀胱癌患者(病理分期为 T1a 期)临床样本测定方面的应用

[0128] 应用本发明试剂盒进行早期膀胱癌患者尿液样本的检测。尿液样本(健康志愿者和膀胱癌患者的尿液均来自北京大学第三医院)不需要进行任何处理可直接进行检测,检测结果如图 3,4 所示。根据对 103 例早期膀胱癌样本和 112 例正常人对照样本的统计学分析,本发明试剂盒的灵敏度为 95.15%,特异性为 95.54%,ROC 曲线下面积达到 0.9872。

[0129] 参考文献

[0130] (1)Lekka M, Gil D, Dąbrosz W, Jaczewska J, Kulik AJ, Lekki J, Stachura Z, Stachura J, Laidler P. Characterization of N-cadherin unbinding properties in non-malignant(HCV29)and malignant(T24)bladder cells. J Mol Recognit. 2011;24(5):833-42.

[0131] (2)Yang J, Wang J, Zuo Y, Zhan H. Molecularly modified VP3(30-121) induces apoptosis in human bladder cancer (EJ) cells but not in normal(3T3) cells. Cell Biol Int. 2012;36(11):1037-42.

[0132] (3)Xu B, He Y, Wu X, Luo C, Liu A, Zhang J. Exploration of the correlations between interferon- γ in patient serum and HEPACAM in bladder transitional cell carcinoma, and the interferon- γ mechanism inhibiting BIU-87 proliferation. JUrol. 2012;188(4):1346-53.

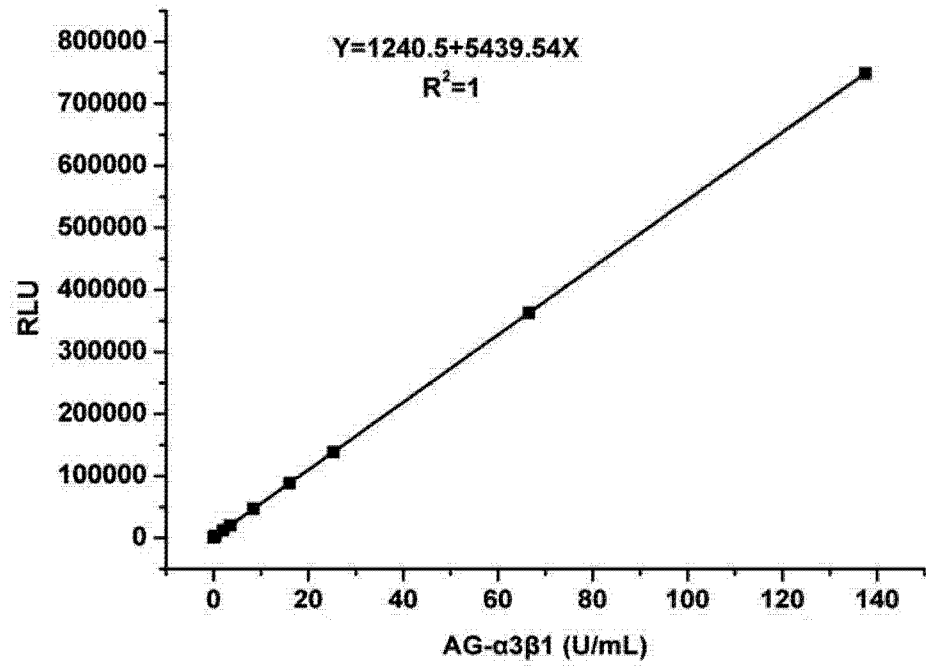


图 1

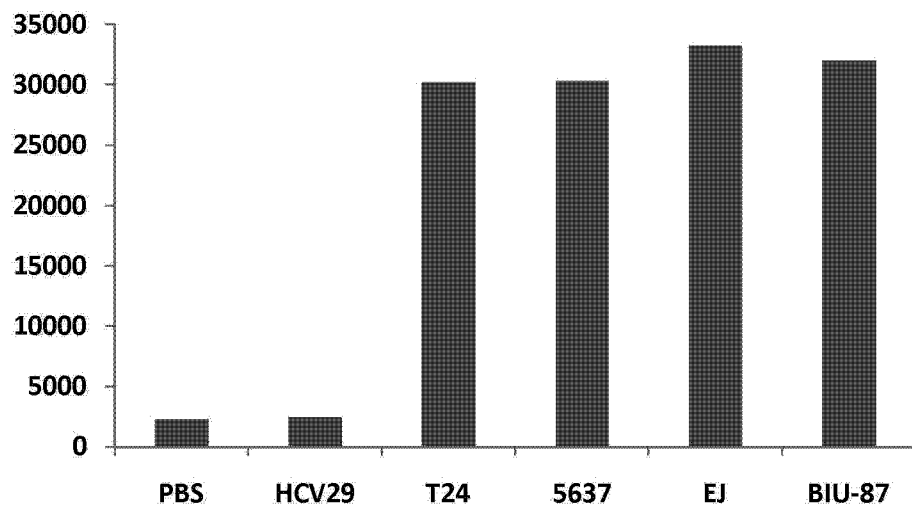


图 2

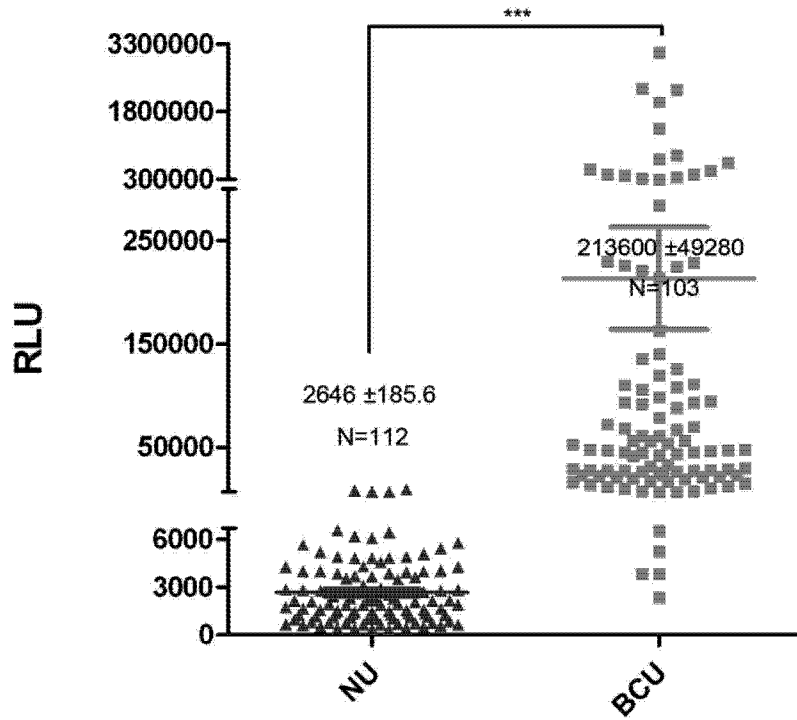


图 3

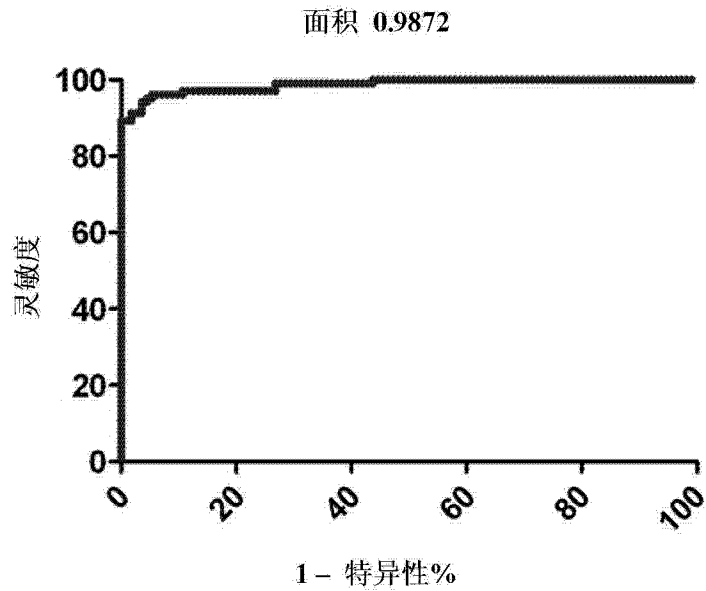


图 4