



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103033625 A

(43) 申请公布日 2013.04.10

(21) 申请号 201210555378.9

(22) 申请日 2012.12.19

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 6906 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 张倩云 李翀 杜颖

王彦英 杨昭

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所

11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种人膀胱癌细胞化学发光检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫分析医学领域,具体地提供了一种基于免疫磁颗粒的化学发光分析方法检测人膀胱癌细胞的试剂盒及其制备方法。根据本发明,本发明的试剂盒主要包括:1) 膀胱癌 EJ 细胞标准品;2) 由特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体包被的磁颗粒;3) 酶标记的特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体;4) 3) 中的酶所作用的化学发光底物;5) 反应管或微孔板;6) 与 5) 中的反应管或微孔板配套的磁分离器。

1. 一种用于检测人膀胱癌细胞的试剂盒,所述试剂盒包括两种特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,所述试剂盒包括:

1) 膀胱癌 EJ 细胞标准品;

2) 由特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体包被的磁颗粒;

3) 酶标记的特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体;

4) 3) 中的酶所作用的化学发光底物;

5) 反应管或微孔板,所述反应管或微孔板优选经过无蛋白封闭液的封闭处理,所述无蛋白封闭液为含有 1.0% 的鱼水解明胶, pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液;

6) 与 5) 中的反应管或微孔板配套的磁分离器。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中所述膀胱癌 EJ 细胞标准品为膀胱癌 EJ 细胞的逐级稀释液。

4. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中,2) 中所述的特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 6906 的杂交瘤细胞株制备的单克隆抗体 BCMab2,其与磁颗粒通过共价键结合。

5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中,2) 中所述的磁颗粒是粒径为 100nm 至 1 μ m 的氧化硅羟基磁颗粒。

6. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中,3) 中所述的酶标记的特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体是酶标记的 BCMab1 单克隆抗体,所述 BCMab1 单克隆抗体由保藏号为 CGMCC No. 3845 的杂交瘤细胞株制备。

7. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中,3) 中所述的酶是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶。

8. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中,5) 中所述的反应管是具有光学透明度的聚苯乙烯管、聚乙烯管、聚丙烯管或者玻璃管;所述微孔板是适用于化学发光反应的检测的白色微孔板。

9. 制备根据权利要求1或2所述的试剂盒的方法,所述方法包括以下步骤:

1) 配制膀胱癌 EJ 细胞标准品:对膀胱癌 EJ 细胞溶液进行逐级稀释以制成膀胱癌 EJ 细胞的逐级稀释液;

2) 制备链酶亲合素修饰的磁颗粒;

3) 分别使用保藏号为 CGMCC No. 3845 和 CGMCC No. 6906 的两株单克隆杂交瘤细胞株制备可特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体 BCMab1 和 BCMab2;

4) 制备生物素化的单克隆抗体 BCMab2:在微碱性条件下将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺与所述抗体的游离赖氨酸发生偶联反应;

5) 使用 2) 中制备的链酶亲合素修饰的磁颗粒和 4) 中制备的生物素化的单克隆抗体 BCMab2,通过链酶亲合素与生物素的特异性结合反应,制备由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒;

6) 制备酶标记的单克隆抗体 BCMab1:采用碳化二亚胺(EDC)偶联法,实现所述抗体上的氨基与所述酶分子上的羧基的结合;

7) 配制 6) 中的酶所作用的化学发光底物液;

8) 组装为成品。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,所述方法还包括以下步骤:

a) 在所述由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒的制备后,用封闭液封闭所制备的由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒以降低非特异性吸附,所述封闭液包含 0.2%~1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、0.5%~1.0%的鱼水解明胶,pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液;和

b) 用无蛋白封闭液封闭反应管和微孔板,所述无蛋白封闭液为含有 1.0%的鱼水解明胶,pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液。

一种人膀胱癌细胞化学发光检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析以及临床诊断医学领域,具体地,本发明提供一种人膀胱癌细胞的化学发光检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 膀胱癌是泌尿系统中最常见的肿瘤。血尿是膀胱癌患者临床早期症状之一,有肉眼血尿和镜检血尿。然而血尿在尿路炎症以及结石症状下也有发生,并不是膀胱癌的特异性症状。正是由于膀胱癌早期症状不明显,以至于发现有血尿,患者膀胱肿瘤一般发展为较大的肿瘤结节。寻找特异的膀胱癌诊断方法对早期膀胱癌诊断有重要的临床应用价值。

[0003] 膀胱癌的早期诊断方法有以下几种:

[0004] 1) 尿液分析:血尿出现后的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,早期膀胱癌容易被漏检;

[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,进行膀胱内可视观察,从而发现早期的肿瘤。能够检出 2)、3) 中漏检的大部分患者。

[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。但患者一般需要临床跟踪观察,从而能及早发现肿瘤发生或复发状况。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、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] 实现尿样中的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 Scimedx 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,因此在膀胱癌病人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,需要检测大量的尿脱落细胞。

[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得出:一方面,新的特异的膀胱癌标志物仍是研究的重点,制备早期诊断试剂盒,实现快速检测,在膀胱癌的诊断方面具有重要的临床价值;另一方面,进行尿样中的细胞检测,避免炎症、血尿等非特异症状的影响,准确性最高。

发明内容

[0011] (一) 解决的技术问题

[0012] 本发明着眼于膀胱癌的早期诊断与膀胱癌病人的跟踪观察,拟解决现行的膀胱癌诊断方面的难题,即采用特异的识别膀胱癌细胞两株单克隆抗体,实现膀胱癌细胞的双抗体识别与捕获,结合高灵敏的化学发光免疫分析方法,定量检测尿脱落膀胱癌细胞,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。

[0013] 本发明的目的是提供一种特异的膀胱癌细胞捕获、识别方法,以及高灵敏检测试剂盒。

[0014] 本发明的另一目的是提供一种用于膀胱癌早期诊断、术后监测的试剂盒。

[0015] 本发明的另一目的是提供一种制备上述试剂盒的方法。

[0016] (二) 技术方案

[0017] 本发明具体提供以下试剂盒:

[0018] [1] 一种用于检测人膀胱癌细胞的试剂盒,所述试剂盒包括两种特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体。

[0019] [2] 根据 [1] 所述的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0020] 1) 膀胱癌 EJ 细胞标准品;

[0021] 2) 由特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体包被的磁颗粒;

[0022] 3) 酶标记的特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体;

[0023] 4) 3) 中的酶所作用的化学发光底物;

[0024] 5) 反应管或微孔板,所述反应管或微孔板优选经过无蛋白封闭液的封闭处理,所述无蛋白封闭液为含有 1.0% 的鱼水解明胶, pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液;

[0025] 6) 与 5) 中的反应管或微孔板配套的磁分离器。

[0026] [3] 根据 [2] 所述的试剂盒,其中所述膀胱癌 EJ 细胞标准品为膀胱癌 EJ 细胞的逐级稀释液。

[0027] [4] 根据 [2] 所述的试剂盒,其中,2) 中所述的特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 6906 的杂交瘤细胞株制备的单克隆抗体 BCMab2,其与磁颗粒通过共价键结合。

[0028] [5] 根据 [2] 所述的试剂盒,其中,2) 中所述的磁颗粒是粒径为 100nm 至 1 μ m 的氧化硅羟基磁颗粒。

[0029] [6] 根据 [2] 所述的试剂盒,其中,3) 中所述的酶标记的特异识别膀胱癌细胞表

面抗原的单克隆抗体是酶标记的 BCMab1 单克隆抗体,所述 BCMab1 单克隆抗体由保藏号为 CGMCC No. 3845 的杂交瘤细胞株制备(关于 BCMab1 单克隆抗体的制备具体可以参见中国专利申请号:201010251384.6)。

[0030] [7] 根据 [2] 所述的试剂盒,其中,3) 中所述的酶是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶。

[0031] [8] 根据 [2] 所述的试剂盒,其中,5) 中所述的反应管是具有光学透明度的聚苯乙烯管、聚乙烯管、聚丙烯管或者玻璃管;所述微孔板是适用于化学发光反应的检测的白色微孔板。

[0032] 本发明还提供制备所述试剂盒的方法方法,所述方法包括以下步骤:

[0033] 1) 配制膀胱癌 EJ 细胞标准品:对膀胱癌 EJ 细胞溶液进行逐级稀释以制成膀胱癌 EJ 细胞的逐级稀释液;

[0034] 2) 制备链酶亲合素修饰的磁颗粒;

[0035] 3) 分别使用保藏号为 CGMCC No. 3845 和 CGMCC No. 6906 的两株单克隆杂交瘤细胞株制备可特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体 BCMab1 和 BCMab2;

[0036] 4) 制备生物素化的单克隆抗体 BCMab2:在微碱性条件下将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺与所述抗体的游离赖氨酸发生偶联反应;

[0037] 5) 使用 2) 中制备的链酶亲合素修饰的磁颗粒和 4) 中制备的生物素化的单克隆抗体 BCMab2,通过链酶亲合素与生物素的特异性结合反应,制备由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒;

[0038] 6) 制备酶标记的单克隆抗体 BCMab1:采用碳化二亚胺(EDC)偶联法,实现所述抗体上的氨基与所述酶分子上的羧基的结合;

[0039] 7) 配制 6) 中的酶所作用的化学发光底物液;

[0040] 8) 组装为成品。

[0041] 优选地,所述方法还包括以下步骤:

[0042] a) 在所述由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒的制备后,用封闭液封闭所制备的由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒以降低非特异性吸附,所述封闭液包含 0.2%~1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、0.5%~1.0%的鱼水解明胶,pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液;和

[0043] b) 用无蛋白封闭液封闭反应管和微孔板,所述无蛋白封闭液为含有 1.0%的鱼水解明胶,pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液。

[0044] 本发明的试剂盒能够灵敏、快速测定尿中脱落的膀胱癌细胞,可以及早检测早期脱落的恶性肿瘤细胞,灵敏度高于检测尿成分测定以及目前市场上的尿细胞学检测。本发明专利检测灵敏度达到每个分析实现 1 个恶性膀胱癌细胞的检测。

[0045] 本发明的试剂盒也适用于膀胱癌组织消化细胞的肿瘤细胞检测,也适用于血液中循环的膀胱癌细胞的检测。

[0046] 本发明的试剂盒采用免疫磁颗粒特异捕获、酶标记单克隆抗体特异识别的双抗体夹心方法,实现了膀胱癌细胞的特异性检测。本试剂盒可以排除正常、炎症上皮细胞,以及其它血细胞的干扰,只特异识别膀胱癌细胞。

[0047] 本发明专利采用免疫磁颗粒方法捕获尿液中脱落的膀胱癌细胞,操作简便、检测

时间短,利于临床大规模的应用。

[0048] 本发明中使用到两种特异识别膀胱癌细胞表面抗原的单克隆抗体:

[0049] 1)BCMab1:由保藏号为 CGMCC No. 3845 的杂交瘤细胞株制备,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),该抗体及其制备具体描述于中国专利申请号:201010251384.6;以及

[0050] 2)BCMab2:由保藏号为 CGMCC No. 6906 的杂交瘤细胞株制备,该杂交瘤细胞株于 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)。

附图说明

[0051] 图 1. 所制备的试剂盒以 EJ 细胞为模型所得线性标准曲线。

[0052] 图 2. EJ、Lovo、HCV29 细胞系和 PBS 通过本方法检测所得的发光值对比。EJ:膀胱癌细胞系;Lovo:直肠癌细胞系;HCV29:正常上皮细胞系。

[0053] 图 3. 试剂盒检测灵敏度。膀胱癌细胞系:EJ、T24、5637、BIU-87;BCU-Ta:Ta 期膀胱癌患者尿液样本;BCU-T1:T1 期膀胱癌患者尿液样本。

[0054] 图 4. 本发明试剂盒应用于膀胱癌与正常样本检测。

[0055] 图 5. 本发明试剂盒临床测定结果的 ROC 曲线。

具体实施方式

[0056] 实施例 1 制备本发明的一种新的膀胱癌细胞化学发光检测试剂盒

[0057] 一、标准化的膀胱癌细胞的制备

[0058] 膀胱癌 EJ 细胞系 (CRL-2888TM) 购自美国模式培养物保存所 (ATCC),以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco, 12100-046) 培养。将培养的贴壁状态良好的细胞加入 1-2mL 胰酶 (Invitrogen, R-001-100), 37°C 消化 2 分钟,加入适量培养基,将消化下来的细胞离心弃上清后,重悬于胎牛血清加 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 配制而成的冻存液中,以 10^6 个 /mL 细胞浓度 -80°C 冻存,每支冻存 500 μ L。试剂盒运输过程,此成分需要单独采用干冰冻存运输。

[0059] 二、单克隆抗体 BCMab2 杂交瘤细胞的制备

[0060] 取冻存 EJ 细胞,培养于 DMEM 培养基,状态良好培养 3 周后,取处于生长对数期的 EJ 细胞 1×10^7 个,免疫 6 周大小的 BALB/c 小鼠 (商购自北京维通利华实验动物技术有限公司),每周免疫 4 次,免疫 1 个月后,取小鼠脾脏细胞。并准备小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 (CRL-1772, ATCC) 与小鼠脾脏细胞融合,按照参考文献 (Kirk, A. D., et al. Nat Med 1999, 5, 686-693) 所述进行杂交瘤筛选 EJ 细胞的单克隆株细胞。

[0061] 然后,将选出的阳性杂交瘤细胞克隆化培养 (有限稀释法,以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞)。经过 2-3 轮克隆化培养,获得稳定的能够产生高效价单抗的杂交瘤细胞克隆株。将杂交瘤细胞克隆株扩大培养,并冻存保种。筛选所得杂交瘤细胞株可分泌单克隆抗体 BCMab2,特异识别 EJ 细胞以及其它膀胱癌细胞。

[0062] 三、单克隆抗体 BCMab1 和 BCMab2 的制备

[0063] 已具备两株单克隆杂交瘤细胞株:保藏号为 CGMCC No. 3845 的杂交瘤细胞株可获

得 BCMab1 抗体 (具体参见,中国专利申请号:201010251384.6);保藏号为 CGMCC No. 6906 的杂交瘤细胞株可获得 BCMab2 抗体。取 5×10^6 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:

[0064] 1. 收集所得的腹水以 2500r/min 离心,取上清,以 0.01M pH7.4 PBS 对倍稀释腹水上清。

[0065] 2. 向上述腹水中加入等体积的饱和硫酸铵,室温搅拌 1 小时;

[0066] 3. 以 11000r/min,4℃ 离心 20 分钟,弃上清。重悬于适量 0.01M pH7.4PBS 中,并加入一半腹水体积的饱和硫酸铵,4℃ 搅拌过夜。

[0067] 4. 上述腹水以 11000r/min,4℃ 离心 20 分钟,弃上清。将沉淀溶于 0.01M pH7.4 PBS 中,再用 0.01M pH7.4 PBS 透析,即得抗体粗球。

[0068] 5. Protein-G 凝胶柱安装到 AKTA 蛋白纯化仪;

[0069] 6. 将抗体粗球 11000r/min,4℃ 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;

[0070] 7. 0.02M pH7.0 含 0.15M 的 NaCl 的 PBS 洗脱杂蛋白;

[0071] 8. 0.2M pH2.8 甘氨酸缓冲液洗脱抗体峰;

[0072] 9. 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。

[0073] 四、免疫磁颗粒的制备

[0074] 1. 单克隆抗体 BCMab2 的生物素化

[0075] 取 10mg 已纯化好的单克隆抗体 BCMab2(2mg/mL),用 0.1M, pH9.5 的碳酸盐缓冲液进行透析,即得处于碳酸盐缓冲体系的抗体溶液。生物素-N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS-Biotin,货号 H1759) 购自 Sigma-Aldrich,以 1mg/mL 浓度溶解于二甲基亚砜 (DMSO)。然后在抗体溶液中加入 200uL 生物素溶液,4℃ 搅拌反应 6 小时,加入 20uL 1M 的 NH_4Cl 溶液终止反应。反应物在 0.05M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液进行透析,即得处于磷酸盐缓冲体系的生物素化抗体 BCMab2。

[0076] 2. 磁颗粒的链酶亲合素修饰

[0077] 取 20mg 氧化硅羟基磁颗粒 (上海奥润微纳有限公司, SM1-015A, SM1-035, SM1-050, SM1-100), 在外磁场作用下除去储存缓冲液,加入 2mL 1.25% 戊二醛活化,室温搅拌 2 小时后,在外加磁场下,静置 5min,弃上清,用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液清洗三次,并重悬于 0.05M, pH9.5 碳酸缓冲溶液。之后,加入 1mg 链酶亲合素 (购自 Sigma-Aldrich, S4762),室温搅拌 2 小时,用 pH7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液清洗三次,并重悬于磷酸缓冲溶液,定浓度为 4mg/mL,即得链酶亲合素修饰的磁颗粒。

[0078] 3. 免疫磁颗粒的制备

[0079] 20mg 链酶亲合素修饰的磁颗粒 (4mg/mL) 置于磁场中,待磁颗粒完全沉降后,去除上清液,加入 10mg 生物素化的抗体 BCMab2(2mg/mL),4℃ 搅拌 4 小时。之后用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液清洗四次,最后重悬于抗体缓冲溶液中 (0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液,2% 牛血清白蛋白,0.05% Tween-20,0.05% proclin-300),即得免疫磁颗粒。优选地,用封闭液封闭所制备的由生物素化的单克隆抗体 BCMab2 包被的磁颗粒以降低非特异性吸附,所述封

闭液包含 0.2%~1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、0.5%~1.0%的鱼水解明胶, pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液。所制备的免疫磁颗粒以 4mg/mL 浓度于 4℃ 保存。

[0080] 五、磁颗粒粒径的选择

[0081] 磁颗粒粒径越小, 在溶液中分散越均匀, 但小于 100nm 时, 在外磁场作用下沉降速度减慢, 会增加试剂盒应用过程中的洗涤时间, 因此本试剂盒选定大于 100nm 以上的磁颗粒。磁颗粒在免疫反应过程中分散于反应体系, 可以在一定程度上加快反应速度。鲁米诺-H₂O₂ 发光体系中, 具有一定的催化作用, 当粒径在 100nm 至 1 μm 时, 鲁米诺-H₂O₂ 体系的发光动力学曲线发光平台可持续时间在 30min 到 2h 之间。增大到 1 μm 以上, 这种催化能力下降, 鲁米诺-H₂O₂ 体系的发光动力学曲线发光平台持续时间减少 (低于 15min)。

[0082] 六、酶标记单克隆抗体 BCMab1 的制备

[0083] 以辣根过氧化物酶 (HR, 购自 Sigma, P6782) 标记抗体为例, 采用碳化二亚胺 (EDC) 偶联法, 具体流程如下: 10mg HRP 溶解于 pH6.0 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲溶液中 (1L 去离子水中加入 78.84mg 柠檬酸, 476.44mg 柠檬酸钠), 加入碳化二亚胺 (EDC, 溶解于玛琳基乙磺酸) 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 BCMab1 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 BCMab1; 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 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辣根过氧化物酶标记抗体 BCMab1, 加入等体积甘油, -20℃ 保存备用。

[0084] 碱性磷酸酶或荧光素酶与 BCMab1 的偶联, 与上述步骤类似, 试剂的具体用量可以适当进行调节优化。

[0085] 七、样本稀释液的配制

[0086] 配制样品稀释液, 具体配制为: 在 1L 去离子水中, 加入 3.628g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.272g KH₂PO₄, 0.2g KCl, 8g NaCl, 18g 尿素, 0.05g 尿酸, 1mL 胎牛血, 1mL proclin-300 振荡混合均匀, 调节 pH 至 7.4, 溶液于 4℃ 保存, 用于尿沉渣样本和冻存细胞的稀释缓冲溶液。

[0087] 八、化学发光底物液

[0088] 本发明所使用的辣根过氧化物酶 (HR) 的化学发光底物液的配制方法:

[0089] 基于 1000mL 所述化学发光底物 A 液, 包括 1.7716g 鲁米诺、0.05g 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;

[0090] 基于 1000mL 所述化学发光底物 B 液, 包括 0.329g 过氧化脲、1mL Tween-20、51.58g Na₂HPO₄ · 12H₂O、8.74g NaH₂PO₄ · 2H₂O, 其 pH 值为 7.0~7.6。

[0091] 使用方法: A、B 液双组分试剂, 在使用前根据使用量等体积混合。

[0092] 九、反应管和微孔板的封闭处理

[0093] 优选地, 用无蛋白封闭液封闭反应管和微孔板, 所述无蛋白封闭液为含有 1.0% 的鱼水解明胶, pH7.2 的 0.02M 磷酸盐缓冲液。

[0094] 实施例 2 本发明的膀胱癌尿脱落细胞化学法光免疫分析测定试剂盒使用方法

[0095] 一、样品前处理

[0096] 取人晨尿或晨二次尿样, 如即时检测, 样本无需处理, 直接检测。如无法当天检测,

样本需冻存：取尿液 10mL，3000rpm 离心 5min，将尿沉渣悬于 500 μ L 细胞冻存液（含 10% DMSO 的胎牛血清）中，先置于 4 $^{\circ}$ C 2 小时，再置于 -80 $^{\circ}$ C 保存，备用。

[0097] 二、检测方法

[0098] 使用本试剂盒进行实验前，先将恒温箱或者水浴锅调至 37 $^{\circ}$ C；之后需先取出本实施例 1 中所制备的磁颗粒溶液、HRP 标记抗体以及各缓冲溶液，在室温放置以平衡到室温；再将冻存样本和膀胱癌 EJ 细胞标准品取出置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱迅速复融，离心去上清，复悬于 1mL 细胞稀释液。EJ 细胞初浓度 5×10^5 个/mL，然后继续以细胞稀释液进行系列稀释，得一系列细胞标准品，即 5×10^5 个/mL、 1×10^5 个/mL、 5×10^4 个/mL、 1×10^4 个/mL、 5×10^3 个/mL、 5×10^2 个/mL、20 个/mL。再后，准备 200-1000 μ L、20-200 μ L、1-10 μ L 量程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。

[0099] 使用本发明的试剂盒进行检测的具体操作步骤如下：

[0100] （一）微孔板式化学发光检测试剂盒

[0101] 取白色 96 微孔板，每孔加入 50 μ L 尿液样本或系列校准细胞溶液（ 5×10^5 个/mL、 1×10^5 个/mL、 5×10^4 个/mL、 1×10^4 个/mL、 5×10^3 个/mL、 5×10^2 个/mL、20 个/mL）。再先后加入辣根过氧化物酶标记抗体溶液和免疫磁微粒溶液各 5 μ L，37 $^{\circ}$ C 振荡反应 60min。每孔加入洗涤液 150 μ L，在微孔板振荡器上（MH-1, Kylin-Bell Instruments）震荡 10s 混匀，然后置于 96 微孔板配套的磁分离器（购自 NEB 公司，S1511S）上，去除上清。重复上面洗涤步骤，洗涤 4 次。每孔加入化学发光底物液 100 μ L，充分混匀，而后在板式化学发光仪（北京滨松光子有限公司，BHP9504）上依序测量发光强度（RLU）。理论上每孔内标准品细胞数目分别为 25000 个/分析、5000 个/分析、2500 个/分析、500 个/分析、250 个/分析、25 个/分析、1 个/分析。以细胞数量与发光值的线性关系见附图 1，其中，纵坐标 RLU 为相对发光强度，横坐标为细胞检测数目（单位为细胞/分析）。在 1 ~ 25000 细胞/分析范围内，相关系数 $R^2 = 0.9984$ ， $Y = 12511 + 33.651X$ ；在 1 ~ 500 细胞/分析范围内，相关系数 $R^2 = 0.9968$ ， $Y = 1037 + 92.21X$ 。

[0102] 根据 RLU 大小，选择合适的标准曲线范围，将各待测样本的 RLU 代入标准曲线方程，即得待测尿样中肿瘤细胞的数目。

[0103] （二）管式化学发光检测试剂盒

[0104] 将反应管编号后，向其中加入 200 μ L 尿液样本或系列校准细胞溶液，与磁颗粒溶液和 HRP 标记 BcMab1 抗体溶液各 20 μ L 混合，37 $^{\circ}$ C 振荡反应 60min。之后置于多功能磁分离器（上海奥润微纳新材料科技有限公司，MS-12）上，3min 后弃去上清，每管加入洗涤液 300 μ L，充分混匀，置于磁分离器上静置 3min，弃去上清液，重复 4 次，最后弃去洗涤液，各管加入化学发光底物液 200 μ L，充分混匀，而后在管式化学发光测量仪（德国 Berthold Technologies GmbH & Co. KG）上依序测量各管的发光强度（RLU）。以与上述（一）中相似的方式确定待测尿样中肿瘤细胞的数目。

[0105] 实施例 3 本发明的试剂盒的方法学指标

[0106] 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：

[0107] 1、试剂盒精密度测定

[0108] (1)EJ 细胞标准品精密度实验

[0109] 将实施例 1 中制备的试剂盒抽取 10 个试剂盒,按照实施例 2 所述操作测定 1×10^3 个 /mL 的 EJ 细胞标准品 5 次。计算测定结果变异系数,测定结果如表 1 所示,结果显示变异系数在 3.5%~10%之间。

[0110] 表 1EJ 细胞标准品可重复性实验

试剂盒编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0111] 变异系数(CV)%	01批	3.5	4.1	3.8	6.0	3.9	4.3	4.2	6.0	4.8	6.0
	04批	4.0	5.9	4.8	6.5	5.3	4.9	6.6	7.0	6.5	6.2
	07批	4.0	6.9	7.0	4.9	6.4	6.2	5.7	7.3	7.0	6.6

[0112] (2) 样本精密度实验

[0113] 将实施例 1 中制备的试剂盒抽取 10 个试剂盒,按照实施例 2 所述操作测定两个膀胱癌患者尿脱落细胞。计算测定浓度的变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 2、表 3 所示,结果表明变异系数小于 9.0%。

[0114] 表 2. 患者 1 的尿脱落细胞样品精密度测定

试剂编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0115] CV%	01批	5.2	5.2	7.4	8.1	5.4	6.2	5.2	7.7	7.2	8.1
	04批	5.0	7.2	8.6	7.5	9.0	6.1	7.1	7.2	6.3	6.2
	07批	3.4	6.9	7.2	7.0	6.0	5.2	6.1	7.2	7.1	6.1

[0116] 表 3. 患者 2 的尿脱落细胞样品精密度测定

试剂编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0117] CV%	01批	6.6	7.6	7.4	5.1	4.8	5.7	6.8	6.7	7.0	5.2
	04批	4.0	4.2	7.6	5.5	5.6	6.8	8.0	8.4	7.3	6.0
	07批	4.8	5.9	6.4	6.0	5.7	5.9	6.3	6.7	6.1	5.6

[0118] 2、试剂盒准确度测定

[0119] 取两例膀胱癌患者尿脱落细胞样本,经实施例 1 中制备的试剂盒测定两例样本的肿瘤细胞浓度分别为 4×10^3 、 2×10^3 个 /mL。向其中加入等体积的 EJ 细胞标准品溶液 4×10^3 个 /mL 和 2×10^3 个 /mL,按按照实施例 2 所述操作,每个浓度测定三次,计算回收率。结果如表 4 所示,表明回收率在 93.0%~102.0%之间。

[0120] 表 4. 准确度测定

样本细胞/mL	加入值细胞/mL	理论值(细胞/分析)	实测值及平均值(细胞/分析)		回收率及平均值(%)	
[0121]	4×10^3	200	200		100	
			200	200	100	100
			148		98.7	
	2×10^3	150	149	149	99.3	99.3
			150		100	
			124		99.2	
4×10^3	125	123	125	98.4	100	
		128		102.4		
		75		100		
2×10^3	75	76	75	101.3	100	
		74		98.7		

[0122] 3、试剂盒稳定性实验

[0123] 对实施例 1 的试剂盒,除冻存的 EJ 细胞标准品以外的其它试剂进行 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。-80℃ 冻存的膀胱癌 EJ 细胞,8 个月后复苏培养,通过 Trypan Blue 染色(碧云天, C0011),进行活细胞技术,95% 以上细胞活性保持良好。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。

[0124] 4、试剂盒特异性试验

[0125] 在健康人尿液中加入正常尿路上皮细胞系 HCV29 或者其它肿瘤细胞系如 HeLa(乳腺癌, CCL-2™)、Jurkat(白血病, CRL-1990™)、Iovo(直肠癌, CCL-219™)、K562(慢性髓系白血病, CTL-243™)、HepG2(肝癌, CRL-10741™),加入的细胞浓度达到 10^5 个 /mL,进行特异性试验。以上细胞系均购于美国模式培养物保存所(ATCC)。通过检测发光值,比较非膀胱癌细胞的加入对反应体系的影响。结果如附图 2 所示,在健康人尿液中加入正常尿路上皮细胞或者其它肿瘤细胞,均产生较低的背景值。另外 PBS 缓冲液模拟空白缓冲液,与膀胱癌 EJ 细胞和 T24 细胞溶液(10^3 个 /mL)的发光值比较,亦只产生低背景值,可得本方法特异性和灵敏度均较高。

[0126] 在 1mL 健康质控尿样中加入人外周血(取自健康人静脉血)10 μ L,得到肉眼可见血尿样本;另外,在高倍显微镜一个视野下加入人外周血红细胞数目达到 50 个,得到镜检血尿样本,考察血尿对本试剂盒的影响。测定结果显示,磁颗粒对红细胞并没有非特异捕获,BCMab1-HRP 抗体也没有非特异结合,最后结果并不受红细胞的影响。

[0127] 5. 试剂盒灵敏度

[0128] 试剂盒灵敏度以能够检测到的最少肿瘤细胞数目作为标准。四种膀胱癌细胞系 EJ、T24(HTB-4™, ATCC)、5637(HTB-9™, ATCC)、BIU-87(中国科学院上海生化细胞研究所惠赠),分别通过颗粒计数器(美国贝克曼, Z1)进行精确计数,然后进行有限稀释。每个样本取 50 μ L 反应,经有限稀释得 1、2、5 细胞 / 分析,然后通过本研究方法试剂盒进行测定。所测发光值如附图 4 所示。另外有 Tis、Ta、T1b、T2a、T2b 分期的膀胱癌尿脱落细胞样本,首先进行瑞士-吉姆萨染色试剂盒进行染色(南京建成科技有限公司, D010),确定尿脱落肿瘤细胞浓度,然后进行有限稀释。每个样本取 50 μ L 反应,经有限稀释得 1、2、5 细胞 / 分析(cell/assay),然后通过本研究方法试剂盒进行测定。所测发光值如附图 3 所示。由图可得,单个细胞的发光值显著高于空白值(PBS 做空白对照),即可以检测到单个膀胱癌细胞。

[0129] 经过大量的实验证明,本发明的试剂盒方法学指标如下:

[0130] 检测范围:膀胱癌细胞检测浓度 20 个 /mL ~ 5×10^6 个 /mL,即 1 细胞 / 分析 ~ 25000 细胞 / 分析;

[0131] 灵敏度:最小检出限为 1 细胞 / 分析;

[0132] 精密度:小于 9% (n = 5)

[0133] 利用本发明方法进行检测,灵敏度高,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,更适用于我国临床检测筛查实验室。因此本发明为临床检测膀胱癌尿脱落肿瘤细胞,早期诊断膀胱癌和动态监测,提供了一种灵敏、准确、快捷、

特异的方法。

[0134] 实施例 4 本发明试剂盒在膀胱癌患者临床样本测定方面的应用

[0135] 收集膀胱癌患者尿液样本 205 例,以及正常人(包括健康人群、炎症、结石等良性泌尿系统疾病患者)尿液样本 389 例,应用本发明试剂盒进行检测,发光值(RLU)的比较如图 4 所示。可见,膀胱癌与正常人比较,所测发光值有显著差异。因此通过尿脱落细胞的检测,可以很好区分膀胱癌患者与正常人群。根据 ROC 曲线分析(如图 5 所示),分别取三个不同的临界值:(1)3126(RLU),灵敏度(sensitivity)最高,特异性(specificity)可接受,得灵敏度、特异性分别为 100%和 72%;(2)20699(RLU),灵敏度和特异性均同时最优,得灵敏度、特异性分别为 93%和 89%。56875(RLU),特异性最高,灵敏度可接受,得灵敏度、特异性分别为 72%和 99%。

[0136] 表 5. 本发明试剂盒的在不同临界值的灵敏度与特异性。

	临界值	% 灵敏度(95%置信区间)	% 特异性(95%置信区间)
[0137]	≥ 3126	100 (93 至 100)	72 (61 至 80)
	≥ 20699	93 (89 至 100)	89 (95 至 100)
	≥ 56875	72 (65 至 79)	99 (98 至 99)

[0138] 以 EJ 细胞为标准品,进行定量检测得标准测定曲线(如附图 1 所示)。采用本发明试剂盒检测膀胱癌患者尿液样本,然后根据样本检测结果和标准曲线,可计算实际样本中肿瘤细胞数目。同时制备膀胱癌患者尿液样本的脱落细胞涂片,通过快速瑞姬氏染色试剂盒(南京建成科技有限公司,D010)进行尿脱落细胞染色,统计肿瘤细胞数目。细胞涂片方法与本发明试剂盒检测结果进行比对,结果如表 6 所示,可见本方法灵敏度明显高于传统的细胞涂片方法。

[0139] 表 6. 细胞涂片与本发明试剂盒的尿脱落肿瘤细胞数目检测结果

	样本	尿脱落细胞涂片	本发明试剂盒
	样本 1	148	3×10^3
	样本 2	1.5×10^3	3×10^4
	样本 3	10	200
	样本 4	2×10^3	4×10^4
	样本 5	4.5×10^3	2.3×10^4
	样本 6	4×10^3	6×10^4
[0140]	样本 7	2.5×10^3	5×10^4
	样本 8	1×10^3	2×10^3
	样本 9	0	40
	样本 10	2	145
	样本 11	0	60
	样本 12	0	80
	样本 13	1	100
	样本 14	8	260
	样本 15	54	7×10^3

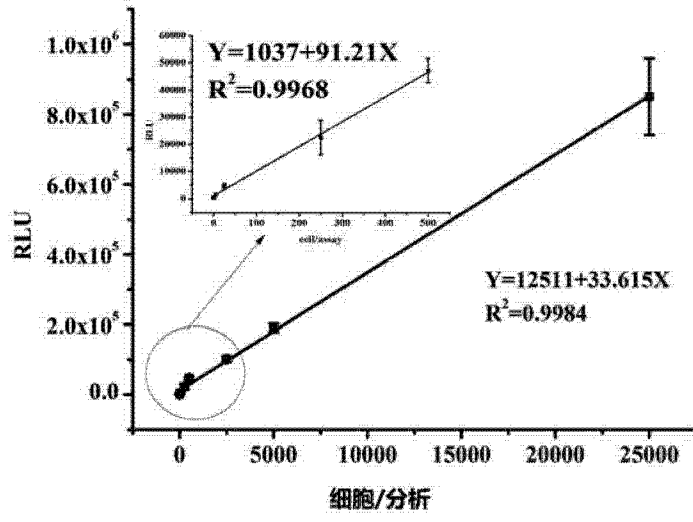


图 1

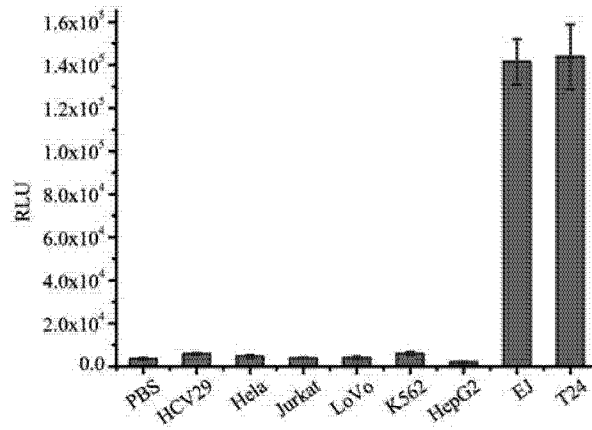


图 2

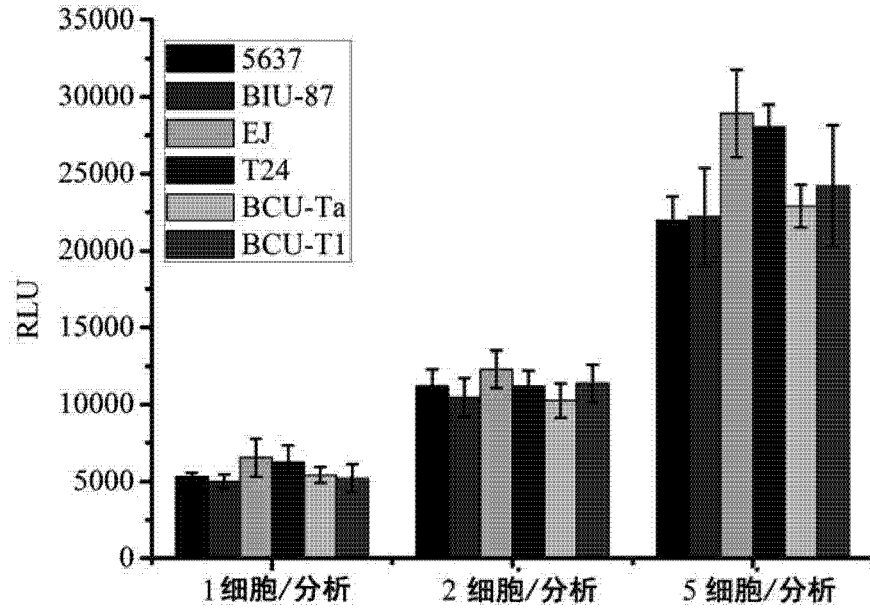


图 3

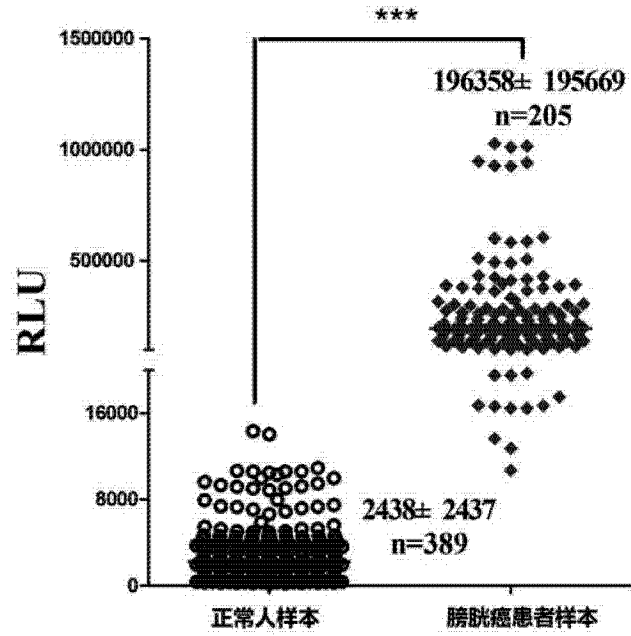


图 4

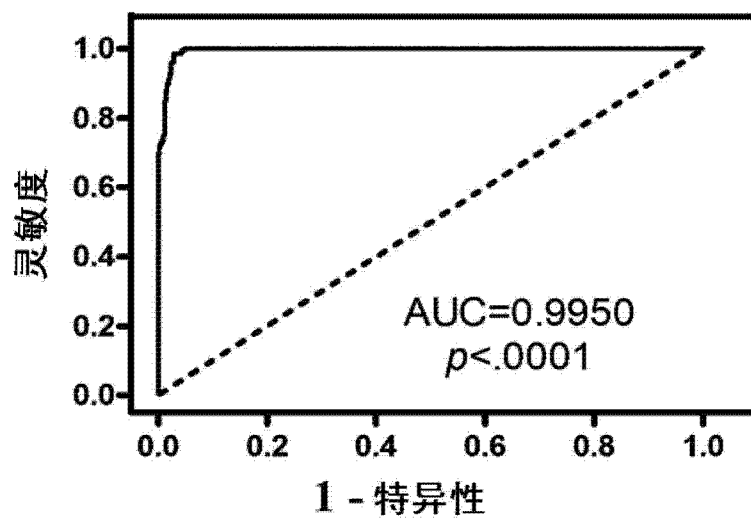


图 5