



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104422764 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310400058. 0

(22) 申请日 2013. 09. 04

(71) 申请人 深圳市艾瑞生物科技有限公司

地址 518100 广东省深圳市宝安区西乡街道
臣田社区宝田三路宝田工业区 22 栋 5
楼西边

(72) 发明人 谢爱武

(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 黄冠华

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

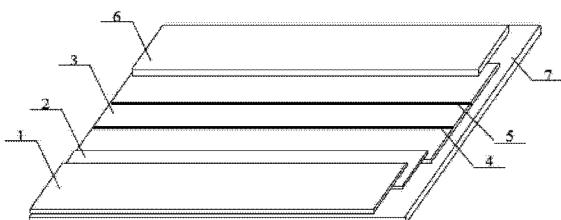
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制
备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种基于苯硼酸标记技术的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制备方法与应用，试纸条采用苯硼酸作为生物标记物，结果在激发光照射下以发射光信号的形式表现出来，并可进行仪器判读，从而实现对糖蛋白类肿瘤标志物的定量检测。试纸条包括样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫和衬垫。结合物垫固定有苯硼酸标记物，分析膜上固定有检测线和质控线。本发明还公开了该试纸条的制备方法和在糖蛋白类肿瘤标志物定量检测中的应用。



1. 一种糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条,其特征在于,包括依次相互接触的样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫,底部设有衬垫,所述分析膜上设有检测线与质控线;所述结合物垫中固定有苯硼酸标记物及荧光材料标记的用于检测抗原的抗体,检测线含有与待测样品发生反应的抗体,质控线含有与苯硼酸标记物产生反应的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条,其特征在于:所述依次相互接触的样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫相互具有 1 ~ 2mm 的重叠区域。

3. 根据权利要求 2 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条,所述分析膜设置于结合物垫及吸水垫的下方,所述样品垫设置于所述结合物垫的上方。

4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测线与质控线间隔 5mm。

5. 一种权利要求 1 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的应用,其特征在于,其可以用于检测生物样品,检测对象为全血、血清、血浆中糖蛋白类肿瘤标志物的含量检测。

6. 根据权利要求 5 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的应用,其特征在于,检测方法为将样品滴加至样品垫上,从吸水垫一侧借由虹吸作用使液体进行流动,当液体接触检测线与质控线之后,通过仪器读取荧光强度的方式得出待测样品的浓度。

7. 一种权利要求 1 所述糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 苯硼酸标记物的制备:将荧光染料化合物分别用缓冲液稀释,分别加入苯硼酸材料溶解液,搅匀,室温反应至少 1 小时,通过凝胶柱进行分离纯化,收集标记物,用缓冲液稀释混匀后保存;

(2) 样品垫的制备:用纤维素膜作为样品垫固相材料,用 0.01% ~ 0.5% 聚乙二醇、1% ~ 5% 牛血清白蛋白、0.01% ~ 0.05% 表面活性剂的 0.01 ~ 0.3M 磷酸盐缓冲液浸泡,所述缓冲液 pH 值为 7.2 ~ 7.6,浸泡处理后,将样品垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

(3) 结合物垫的制备:用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料,用含 1% ~ 5% 牛血清白蛋白、0.1 ~ 2% 聚乙二醇、0.5 ~ 2% 蔗糖、0.01% ~ 0.1% 表面活性剂的 0.01 ~ 0.1M pH 7.2 磷酸盐缓冲液稀释磷光材料标记物,制成悬液,喷涂在玻璃纤维素膜上,将结合物垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

(4) 分析膜的制备:用缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体至适合浓度,采用喷膜机分别喷涂在分析膜的检测线和质控线位置上,将喷膜后的分析膜放入真空干燥箱内,干燥后取出真空密封备用;

(5) 吸水垫的制备:选用滤纸作为吸水垫固相材料,将其在干燥环境保存备用;

以上步骤(1)至步骤(5)没有顺序限制;

(6) 成品试纸条的制备:按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠 1 ~ 2mm;在分析膜下端粘附结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠 1 ~ 2mm;再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠 1 ~ 2mm;将衬垫以及上面粘贴的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫一同裁切成型即可。

8. 根据权利要求 7 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述抗体为抗糖蛋白类肿瘤标志物单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 抗体。

9. 根据权利要求 7 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述衬垫由聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成。

10. 根据权利要求 7 所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述苯硼酸材料为苯硼酸衍生物, 所述苯硼酸衍生物有标记荧光染料的化学基团, 所述荧光染料的激发光光谱范围为 390 ~ 420nm, 发射光波长范围为 600 ~ 700nm。

糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于苯硼酸标记技术的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制备方法和应用，属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 肿瘤是严重危害人类健康的疾病，晚期治疗效果不理想。因此，早期发现、早期诊断、早期治疗是征服肿瘤的关键。肿瘤标志物检查方便、快捷，是临幊上检查肿瘤的重要手段之一。肿瘤标志物是指特征性存在于恶性肿瘤细胞或由恶性肿瘤细胞异常产生的物质或是宿主对肿瘤反应而产生的物质。这些物质存在于肿瘤细胞和组织中，也可进入血液和其他体液，当肿瘤发生、发展时，这些物质明显异常，标示肿瘤的存在。绝大部分的体液中的肿瘤标志既存在于肿瘤中，也存在于正常人群和非肿瘤病人中，只是肿瘤病人的标志物浓度高于非肿瘤病人。唯有 PSA 等几个极少数的肿瘤标志物和特定的器官相关联呈现器官特异性，大多数肿瘤标志物在某一组织类型的多种癌症上呈阳性，但阳性率不一。除少数肿瘤外，大部分肿瘤往往会有多个阳性肿瘤标志物阳性。一个特定的肿瘤，不同肿瘤阶段，不同的肿瘤细胞类型，不同的预后时，呈阳性的肿瘤标志物可能不尽相同；或相同的标志阳性率不同，增加了肿瘤标志物应用的复杂性。有的肿瘤标志可在多种肿瘤呈阳性，称为广谱肿瘤标志(nonspecific tumor marker)。

[0003] 糖蛋白类肿瘤标志物是由于细胞膜成分异常糖基化而形成的抗原。这类抗原标志物的命名是没有规律的，有些是肿瘤细胞株的编号，有些是抗体的物质编号，常用检测方法是单克隆抗体法，有的还同时用两种不同位点的单抗做成双位点固相酶免疫法，这些比一般化学法测定的特异性有很大的提高。而对一些糖类抗原的异质体，则通常用不同的植物凝集素来进行分离检测。

[0004] 1983 年由 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。分子量为 20 万 -100 万，加热至 100℃ 时 CA125 的活性破坏，正常人血清 CA125 中的(RIA) 阳性临界值为 35U/L。

[0005] CA125 是上皮性卵巢癌和子宫内膜癌的标志物，浆液性子宫内膜样癌、透明细胞癌、输卵管癌及未分化卵巢癌患者的 CA125 含量可明显升高。当卵巢癌复发时，在临幊确诊前几个月便可呈现 CA125 增高，尤其卵巢癌转移患者的血清 CA125 更明显高于正常参考值。CA125 测定和盆腔检查的结合可提高试验的特异性。动态观察血清 CA125 浓度有助于卵巢癌的预后评价和治疗控制，经治疗后，CA125 含量可明显下降，若不能恢复至正常范围，应考虑有残存肿瘤的可能。95% 的残存肿瘤患者的血清 CA125 浓度大于 35kU/L。然而，CA125 血清浓度轻微上升还见于 1% 健康妇女，3% -6% 良性卵巢疾患或非肿瘤患者，包括孕期起始 3 个月、行经期、子宫内膜异位、子宫纤维变性、急性输卵管炎、肝病、胸腹膜和心包感染等。

[0006] CA15-3 是 1984 年从人乳脂肪球膜上糖蛋白 MAM-6 制成的小鼠单克隆抗体(115-DB)；1984 年自肝转移乳腺癌细胞膜制成单克隆抗体(DF-3)，故被命名为 CA15-3。CA15-3 分子量为 400ku，分子结构尚未清楚。正常健康者血清 CA15-3 含量(RIA 法) 小于

28kU/L。30% -50% 是乳腺癌患者的 CA15-3 明显升高, 它也是监测乳腺癌患者术后复发的最佳指标, 当 CA15-3 大于 100U/ml 时, 可认为有转移性病变, 其含量的变化与治疗结果密切相关。肺癌、胃肠癌、卵巢癌及宫颈癌患者的血清 CA15-3 也可升高, 应予以鉴别, 特别要排除部分妊娠引起的含量升高。

[0007] CA19-9 是 1979 年用结肠癌细胞免疫小鼠, 并与骨髓瘤杂交所得 116NS19-9 单克隆抗体, 它是一种分子量为 5000ku 的低聚糖类肿瘤相关糖类抗原, 其结构为 Lea 血型抗原物质与唾液酸 Lexa 的结合物。正常人群的 CA19-9 血清含量为 (RIA 法) 2-16U/ml。CA19-9 是胰腺癌和结、直肠癌的标志物。血清 CA19-9 阳性的临界值为 37kU/L。胰腺癌患者 85%-95% 为阳性。当 CA19-9 小于 1000U/ml 时, 有一定的手术意义, 肿瘤切除后 CA19-9 浓度会下降, 如再上升, 则可表示复发。结直肠癌、胆囊癌、胆管癌、肝癌和胃癌的阳性率也会很高, 若同时检测 CEA 和 AFP 可进一步提高阳性检测率。良性疾患时如胰腺炎和黄疸, CA19-9 浓度也可增高, 但往往呈“一过性”, 而且其浓度多低于 120kU/L, 必须加以鉴别。

[0008] CA50 是 1983 年从抗人结、直肠癌 Colo-205 细胞株的一系列单克隆抗体中筛选出的一株对结、直肠癌有强烈反应, 但不与骨髓瘤细胞及血淋巴细胞反应的单克隆抗体, 所能识别的抗原称 CA50。CA50 存在于细胞膜内, 其抗原决定簇为唾液酸 Lea 血型物质与唾液酸-N-四氧神经酰胺。在正常人群, CA50 血清浓度 (RIA 法) 小于 20U/ml。一般认为, CA50 是胰腺和结、直肠癌的标志物, 因 CA50 广泛存在胰腺、胆囊、肝、胃、结直肠、膀胱、子宫, 当细胞恶变时, 由于糖基转化酶的失活或胚胎期才能活跃的某些转化酶被激活, 造成细胞表面糖类结构性质改变而形成 CA50, 因此, 它又是一种普遍的肿瘤标志相关抗原, 而不是特指某个器官的肿瘤标志物。所以在多种恶性肿瘤中可检出不同的阳性率。1983 年, 建立了放射免疫分析法, 1987 年应用 CA50 单抗, 在国内建立了 IRMA 技术用于肿瘤的早期诊断, 胰腺癌、胆囊癌的阳性检测率达 90%, 对肝癌、胃癌、结直肠癌及卵巢肿瘤诊断亦有较高价值, 在胰腺炎、结肠炎和肺炎发病时, CA50 也会升高, 但随炎症消除而下降。

[0009] CA242 是一种唾液酸化的鞘糖脂类抗原, 几乎总是和 CA50 一起表达, 但两者受不同的单克隆抗体识别。在临幊上均被用于消化道恶性肿瘤尤其是胰腺癌、结直肠癌的诊断, 与 CA19-9、CA50 相比, 新一代的 CA242 在胰腺癌、胆囊癌和消化道癌中的灵敏度、特异性更高 (CA50、CA19-9 易受肝功能以及胆汁郁积的影响, 在良性阻塞性黄疸以及肝实质性损害记疾病时常出现假阳性)。CA242 升高见于胰腺癌患者阳性率约为 72.4%, 但目前认为胰腺癌首要的肿瘤标志物仍是 CA19-9; 大肠癌患者 CA242 阳性率为 63.7%, CA242 结合 CEA、CA19-9 同时检测是大肠癌最敏感的标志物; 胃癌、肝癌、食道癌 CA242 阳性率分别为 40.9%、37.6% 及 30%; 非肿瘤性疾病如胰腺炎、溃疡性结肠炎、肝硬化等可有 CA242 轻度升高。

[0010] CA72-4 是一种高分子量糖蛋白, 正常人血清中含量 < 6U/ml, 异常升高在各种消化道肿瘤、卵巢癌均可产生。对于胃癌的检测特异性较高, 以 > 6U/ml 为临界值。良性胃病仅 < 1% 者升高, 而胃癌升高者比例可达 42.6%, 如与 CA19-9 同时检测, 阳性率可达 56%。CA72-4 的敏感性不高, 但它和 CEA 在诊断肿瘤时有互补作用, 两者同时使用可提高诊断胃癌的敏感性和特异性。

[0011] CA549 也是乳腺癌的标志物, 它是一种酸性糖蛋白, 大部分健康女性 < 11U/ml, 异常升高者比例并不高, 可见于 50% 乳腺癌、卵巢癌、40% 前列腺癌、33% 肺癌患者。由此, 作为乳腺癌的早期诊断, CA 则还较欠缺, 应联合应用其它 TM。

[0012] 鳞状细胞相关抗原 (SCC) 是由宫颈癌细胞中提纯的,是宫颈癌较好的肿瘤标志物。SCC在正常鳞状上皮细胞内也存在,随着鳞状上皮细胞的增殖(恶性)而释放入血。正常人血清水平<2 μg/L。异常升高可见于宫颈鳞癌,21%宫颈腺癌也有升高。肺鳞癌有较高的阳性率,各家报告从40%~100%不等,而小细胞肺癌阳性率则较低(3.7%)。食道鳞状上皮癌、口腔鳞状上皮癌皆有较高的阳性率,且随肿瘤的分期呈现不同变化(20%~80%)。可见 SCC 是鳞状上皮癌的重要标志物。

[0013] 核基质蛋白 22(nuclear matrix protein—22, NMP22) 为核有丝分裂装置蛋白(NuMAP 238KD) 的一个亚单位。NMP22 是核基质的重要组成部分,与 DNA 的复制、转录、RNA 合成,基因表达的调控有关。细胞发生恶变时,核内遗传物质在有丝分裂末期分配极度异常,NuMAP 合成激增。尿路上皮肿瘤细胞因凋亡或其他的机制死亡进入尿液释放出 NMP22,作为膀胱癌的生物学标志物。1996 年,美国食品药物监督局(FDA) 批准了 NMP22 试剂盒的临床应用, NMP22 的检测现已常见用于膀胱癌的检测,。是膀胱癌的一种新的标志物,检测尿 NMP22 可鉴别良恶性膀胱疾病。

[0014] 公开号为 CN101324579、公开日为 2008 年 12 月 17 日,名称为“一种检测糖类抗原的磁性微粒子化学发光酶免疫分析试剂盒及其使用方法”的专利申请公开了一种化学发光测定技术。该技术采用虽然灵敏度高,但操作步骤繁杂,且需要昂贵的专用设备来完成检测,限制了其在临床的应用。

[0015] 公开号为 CN101526535、公开日为 2009 年 9 月 9 日,名称为“多肿瘤标志物联合检测液相芯片及其制备方法”的专利申请公开了一种蛋白芯片测定技术。该技术采用虽然多项目联合检测,但操作过程同样需要昂贵的专用设备来完成检测,限制了其在临床的应用。

[0016] 综上所述的几种方法,在一定程度上均存在着不少问题,亟待提出一种新方法来解决这些问题。

发明内容

[0017] 本发明的目的是为了解决上述背景技术提出的现有技术存在的问题,进而提供一种基于苯硼酸标记技术的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制备方法和应用,其中苯硼酸标记物可采用 4-NCS(二酰亚胺)-苯硼酸或 4-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)-苯硼酸作为苯硼酸材料制成。使用这种试纸条时,只需要微量的全血样本,即可在 3~5 分钟内实现定量检测糖蛋白类肿瘤标志物的含量,大大提高了筛查的速度,且灵敏度高、特异性好,试纸条结构简单,易于大规模生产。

[0018] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0019] 本发明的原理请参考附图 1。

[0020] 本发明所述的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条包括依次相互接触的样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫,底部设有衬垫,所述分析膜上设有检测线与质控线;所述结合物垫中固定有苯硼酸标记物及荧光材料标记的用于检测抗原的抗体,检测线含有与待测样品发生反应的抗体,质控线含有与苯硼酸标记物产生反应的抗体。

[0021] 进一步地,所述依次相互接触的样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫相互具有 1~2mm 的重叠区域。

[0022] 进一步地,所述分析膜设置于结合物垫及吸水垫的下方,所述样品垫设置于所述

结合物垫的上方。

[0023] 进一步地,所述检测线与质控线间隔 5mm。

[0024] 本发明还公开了一种糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的应用,其可以用于检测生物样品,检测对象为全血、血清、血浆中糖蛋白类肿瘤标志物的含量检测。

[0025] 具体地,检测方法为将样品滴加至样品垫上,从吸水垫一侧借由虹吸作用使液体进行流动,当液体接触检测线与质控线之后,通过仪器读取荧光强度的方式得出待测样品的浓度。

[0026] 本发明还公开了一种糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0027] (1)苯硼酸标记物的制备:将荧光染料化合物分别用缓冲液稀释,分别加入苯硼酸材料溶解液,搅匀,室温反应至少 1 小时,通过凝胶柱进行分离纯化,收集标记物,用缓冲液稀释混匀后保存;

[0028] (2)样品垫的制备:用纤维素膜作为样品垫固相材料,用 0.01% ~ 0.5% 聚乙二醇、1% ~ 5% 牛血清白蛋白、0.01% ~ 0.05% 表面活性剂的 0.01 ~ 0.3M 磷酸盐缓冲液浸泡,所述缓冲液 PH 值为 7.2 ~ 7.6,浸泡处理后,将样品垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

[0029] (3)结合物垫的制备:用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料,用含 1% ~ 5% 牛血清白蛋白、0.1 ~ 2% 聚乙二醇、0.5 ~ 2% 蔗糖、0.01% ~ 0.1% 表面活性剂的 0.01 ~ 0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释磷光材料标记物,制成悬液,喷涂在玻璃纤维素膜上,将结合物垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

[0030] (4)分析膜的制备:用缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体至适合浓度,采用喷膜机分别喷涂在分析膜的检测线和质控线位置上,将喷膜后的分析膜放入真空干燥箱内,干燥后取出真空密封备用;

[0031] (5)吸水垫的制备:选用滤纸作为吸水垫固相材料,将其在干燥环境保存备用;

[0032] 以上步骤(1)至步骤(5)没有顺序限制。

[0033] (6)成品试纸条的制备:按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠 1 ~ 2mm;在分析膜下端粘附结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠 1 ~ 2mm;再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠 1 ~ 2mm;将衬垫以及上面粘贴的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫一同裁切成型即可。

[0034] 进一步地,所述抗体为抗糖蛋白类肿瘤标志物单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 抗体。

[0035] 进一步地,所述衬垫由聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成。

[0036] 进一步地,所述苯硼酸材料为苯硼酸衍生物,所述苯硼酸衍生物有标记荧光染料的化学基团,所述荧光染料的激发光光谱范围为 390 ~ 420nm,发射光波长范围为 600 ~ 700nm。

[0037] 本发明中,对于定量检测项目,通过建立糖蛋白类肿瘤标志物标准品与荧光信号强度标准曲线,来实现定量检测。

[0038] 本发明具有以下有益效果:本发明采用苯硼酸衍生物作为生物标记物,结果在激发光照射下以发射光光信号的形式表现出来,并可进行仪器判读,从而实现对目标被检测

物的定量检测。

附图说明

- [0039] 图 1 为本发明的原理示意图；
- [0040] 图 2 为本发明制得的试纸条的优选结构示意图；
- [0041] 图 3 为试验例 1 针对实施例 1 做出的定量分析工作曲线图；
- [0042] 图 4 为试验例 5 针对实施例 1 做出的对比检测回归曲线图；
- [0043] 附图标记：1、样品垫；2、结合物垫；3、分析膜；4、糖蛋白类肿瘤标志物检测线；5、质控线；6、吸水垫；7、衬垫。

具体实施方式

[0044] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0045] 如图 2 所示，本发明产品的结构包括衬垫 7、设置于衬垫中部的分析膜 3、设置于分析膜上部一端的吸水垫 6、设置于分析膜上部另一端的结合物垫 2 以及设置于结合物垫上部一端的样品垫 1，分析膜上设置有检测线 4 和质控线 5。吸水垫与分析膜重叠 1～2mm，结合物垫与分析膜重叠 1～2mm，样品垫与结合物垫重叠 1～2mm。检测线包括糖蛋白类肿瘤标志物检测线 4 和质控线 5。糖蛋白类肿瘤标志物检测线、质控线依次间隔 5mm。

[0046] 在本发明中，样品垫是检测糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条在使用过程中滴加待测样品的部位。结合物垫中固定有苯硼酸材料标记荧光材料和荧光材料标记抗体等活性分子结合物，在加入待测样品后，在此开始发生抗原-抗体免疫反应。分析膜是层析试纸的核心部分，在其表面上分别固定有糖蛋白类肿瘤标志物检测线和质控线；检测线含有与待测样品中糖蛋白类肿瘤标志物发生免疫反应的抗体，质控线含有与荧光材料标记物产生免疫反应的抗体。吸水垫在整个检测过程中，通过虹吸作用提供液体流过整个试纸条的动力。各部分之间有重叠区域，有助于液体在试纸条上流动的连续性。

[0047] 本发明提出的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的原理在于，当进行检测时，样品滴加在样品垫上，样品通过渗透和虹吸作用进入结合物垫，使其中的荧光材料标记物溶解释放，在吸水垫的虹吸作用下，液体进入分析膜，依次流经糖蛋白类肿瘤标志物检测线和质控线，并发生特异性免疫反应，产生具有指示性的荧光信号。

[0048] 在本发明的产品的制造过程中，各组缓冲液的物质的量、浓度、pH 值及组分可以相同，可以不同，其均在本发明的保护范围之内，对于具体实施例中所列举出来的不同组分只是本发明人所做试验中的其中一些优选实施例。

[0049] 本发明的应用原理在于通过建立待测物标准品与荧光信号强度标准曲线，来实现定量检测。当进行样品检测时，将样品滴加在样品垫上，样品通过渗透和虹吸作用进入结合物垫，使其中的磷光材料标记的结合物重新溶解，并在吸水垫的虹吸作用下，从结合物垫释放并进入分析膜，向吸水垫方向流动。在分析膜中移动过程中，荧光标记物、目标待测物、检测线、质控线之间将发生特异性的免疫反应，并在检测线和质控线产生具有指示性的光信

号。

[0050] 实施例 1

[0051] 本发明产品制备方法如下：

[0052] 1、荧光发光材料标记单克隆抗体的制备：将抗 CA125 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体，分别用物质的量浓度为 0.1mol/L、pH 为 9.6 的碳酸氢钠 - 碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml，各取 5ml 抗体溶液，分别加入 25mg 荧光发光材料金属卟啉溶解液，搅匀，室温孵育 2 小时，每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G50 的凝胶柱过柱分离纯化，收集标记好的金属卟啉标记抗 CA125 抗体和羊抗鼠 IgG 抗体，用物质的量浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.2 的第一磷酸盐缓冲液稀释，其中第一磷酸盐缓冲液包括含质量百分数为 0.15% 的聚乙二醇、2.5% 的牛血清白蛋白、0.03% 的第一表面活性剂，用试剂瓶密封包装，于 2 ~ 8℃ 条件下保存。

[0053] 2、样品垫的制备：选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料，将其裁切成 5×300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容器内，用物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的第一磷酸盐缓冲液稀释浸泡 30min，其中第一磷酸盐缓冲液包括含质量百分数为 0.2% 的聚乙二醇、2.5% 的牛血清白蛋白、0.03% 的第一表面活性剂。浸泡处理后，将样品垫取出，置于洁净的网状支架上，放入 60℃ 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封备用。

[0054] 3、结合物垫的制备：选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体，将其裁切成 5×300mm 规格的条带。将 2 ~ 8℃ 保存备用的苯硼酸材料标记荧光材料、荧光标记抗白蛋白抗体和羊抗鼠 IgG 抗体，用物质的量浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的第二磷酸盐缓冲液稀释制成悬液，其中第二磷酸盐缓冲液包括含质量百分数为 0.35% 的聚乙二醇、2.8% 的牛血清白蛋白、2.5% 的蔗糖和 0.05% 的第二表面活性剂。用喷膜机喷膜划线，膜液量为 10ul/mm，然后置于洁净的网状支架上，放入 45℃ 的干燥箱内干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0055] 4、分析膜的制备：(1) 糖蛋白类肿瘤标志物 CA125 检测线包被液的制备：用 50ml 物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，其中，以质量百分数计，该磷酸盐缓冲液内含甲醇 0.5%、海藻糖 1.0%、牛血清白蛋白 1.5%，稀释抗 CA125 抗体至终浓度 1.6mg/ml。(2) 质控线包被液的制备：用 50ml 物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，其中，以质量百分数计，该磷酸盐缓冲液内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%，稀释鼠 IgG 抗体至终浓度 0.5mg/ml。(3) 选用硝酸纤维素膜作为固相载体，即为分析膜，将其裁切成 25×300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上依次划线，从下往上 10mm 处喷膜划线，膜液量为 2ul/mm，作为 CA125 检测线检测线；再间隔 5mm 处，从下往上 15mm 处喷膜划线，膜液量为 1.5ul/mm，作为质控线。CA125 检测线检测线与质控线依次间隔 5mm，划线细致均匀，将分析膜放置 37℃ 干燥箱处理 50 分钟，取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0056] 5、吸水垫的制备：选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料，将其裁切成 25mm×300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0057] 6、制备检测糖蛋白类肿瘤标志物的免疫层析试纸条：首先将分析膜粘附在聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成的衬垫中间位置上，在分析膜上端粘附吸水垫和结合物垫，再在结合物垫上端粘贴样品垫，将衬垫以及设置于衬垫上部的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水

垫一同裁切成条状，即为检测糖化白蛋白免疫层析试纸条。第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Tween20、TritonX-100 和 tetronic1307 中的一种，在本实施例中优选第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Tween20。

[0058] 实施例 2

[0059] 在实施例 1 的基础上，不同之处在于：步骤 1 和步骤 2 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA15-3 单克隆抗体；缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同，其物质的量浓度为 0.05mol/L，pH 值为 7.4，其包括：以质量百分数计，0.01% 的聚乙二醇、1% 的牛血清白蛋白和 0.01% 的第一表面活性剂。步骤 3 中，第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为 0.5mol/L，pH 值为 7.2，其包括：以质量百分数计，1% 的牛血清白蛋白、0.1% 的聚乙二醇、0.5% 的蔗糖和 0.01% 的第二表面活性剂。步骤 4 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA15-3 单克隆抗体；缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为 TritonX-100。

[0060] 实施例 3

[0061] 在实施例 1 的基础上，不同之处在于：步骤 1 和步骤 2 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA19-9 单克隆抗体；缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同，其物质的量浓度为 0.3mol/L，pH 值为 7.6，其包括：以质量百分数计，0.5% 的聚乙二醇、5% 的牛血清白蛋白和 0.03% 的第一表面活性剂。步骤 3 中，第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为 0.1mol/L，pH 值为 7.2，其包括：以质量百分数计，5% 的牛血清白蛋白、2% 的聚乙二醇、1% 的蔗糖和 0.1% 的第二表面活性剂。步骤 4 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA19-9 单克隆抗体；缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为 tetronic1307。

[0062] 实施例 4

[0063] 在实施例 1 的基础上，不同之处在于：步骤 1 和步骤 2 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA50 单克隆抗体；缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同，其物质的量浓度为 0.25mol/L，pH 值为 7.4，其包括：以质量百分数计，0.8% 的聚乙二醇、5% 的牛血清白蛋白和 0.05% 的第一表面活性剂。步骤 3 中，第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为 0.05mol/L，pH 值为 7.2，其包括：以质量百分数计，4% 的牛血清白蛋白、1.5% 的聚乙二醇、1% 的蔗糖和 0.05% 的第二表面活性剂。步骤 4 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA50 单克隆抗体；缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为 tetronic1307。

[0064] 实施例 5

[0065] 在实施例 1 的基础上，不同之处在于：步骤 1 和步骤 2 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA242 单克隆抗体；缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同，其物质的量浓度为 0.3mol/L，pH 值为 7.6，其包括：以质量百分数计，0.5% 的聚乙二醇、5% 的牛血清白蛋白和 0.03% 的第一表面活性剂。步骤 3 中，第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为 0.1mol/L，pH 值为 7.2，其包括：以质量百分数计，5% 的牛血清白蛋白、2% 的聚乙二醇、1% 的蔗糖和 0.1% 的第二表面活性剂。步骤 4 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA242 单克隆抗体；缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为吐温 -20。

[0066] 实施例 6

[0067] 在实施例 1 的基础上，不同之处在于：步骤 1 和步骤 2 中，将抗 CA125 单克隆抗体换成抗 CA72-4 单克隆抗体；缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同，其物质的量浓度为 0.3mol/L，pH 值为 7.6，其包括：以质量百分数计，0.5% 的聚乙二醇、2.5% 的牛血清白蛋白和

0.05%的第一表面活性剂。步骤3中,第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为0.01mol/L, pH值为7.2,其包括:以质量百分数计,3.5%的牛血清白蛋白、2.4%的聚乙二醇、1.5%的蔗糖和0.1%的第二表面活性剂。步骤4中,将抗CA125单克隆抗体换成抗CA72-4单克隆抗体;缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为吐温-20。

[0068] 实施例7

[0069] 在实施例1的基础上,不同之处在于:步骤1和步骤2中,将抗CA125单克隆抗体换成抗CA549单克隆抗体;缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同,其物质的量浓度为0.03mol/L, pH值为7.4,其包括:以质量百分数计,0.25%的聚乙二醇、5%的牛血清白蛋白和0.04%的第一表面活性剂。步骤3中,第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为0.03mol/L, pH值为7.2,其包括:以质量百分数计,2.5%的牛血清白蛋白、2%的聚乙二醇、1%的蔗糖和0.05%的第二表面活性剂。步骤4中,将抗CA125单克隆抗体换成抗CA549单克隆抗体;缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为tетronic1307。

[0070] 实施例8

[0071] 在实施例1的基础上,不同之处在于:步骤1和步骤2中,将抗CA125单克隆抗体换成抗SCC单克隆抗体;缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同,其物质的量浓度为0.02mol/L, pH值为7.5,其包括:以质量百分数计,0.35%的聚乙二醇、1.5%的牛血清白蛋白和0.02%的第一表面活性剂。步骤3中,第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为0.03mol/L, pH值为7.4,其包括:以质量百分数计,1.5%的牛血清白蛋白、2%的聚乙二醇、1%的海藻糖和0.05%的第二表面活性剂。步骤4中,将抗CA125单克隆抗体换成抗SCC单克隆抗体;缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为tетronic1307。

[0072] 实施例9

[0073] 在实施例1的基础上,不同之处在于:步骤1和步骤2中,将抗CA125单克隆抗体换成抗NMP22单克隆抗体;缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同,其物质的量浓度为0.02mol/L, pH值为7.4,其包括:以质量百分数计,0.5%的聚乙二醇、3.5%的牛血清白蛋白和0.01%的第一表面活性剂。步骤3中,第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为0.05mol/L, pH值为7.3,其包括:以质量百分数计,1.5%的牛血清白蛋白、2%的聚乙二醇、1%的海藻糖和0.05%的第二表面活性剂。步骤4中,将抗CA125单克隆抗体换成抗NMP22单克隆抗体;缓冲液相同。第一表面活性剂和第二表面活性剂为TrtonX-100。

[0074] 经过测试,实施例1制备出的糖蛋白类肿瘤标志物CA125免疫层析试纸条其性能最佳,其灵敏度高,测试糖蛋白类肿瘤标志物CA125免疫层析试纸条的性能的方法为本领域技术人员普遍应用的方法,在此不做赘述。

[0075] 下面对实施例1制备出的糖蛋白类肿瘤标志物CA125免疫层析试纸条进一步通过试验例来对本发明提出的糖蛋白类肿瘤标志物CA125免疫层析试纸条的性能进行阐述。

[0076] 试验例1

[0077] 对实施例1制备出的糖蛋白类肿瘤标志物CA125免疫层析试纸条进行检测,其具体检测方法是:将待检测血清样品20ul加入500ul的pH值为7.2、物质的量浓度为0.05mol/L的磷酸盐缓冲液,再加入检测卡加样孔中,待反应3min后,用荧光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线,以得出结果。

[0078] 标准工作曲线的绘制:取人工制备的血清标本配成GA为1000.0、500.0、200.0、

100.0、50.0、20.0、10.0、0.0U/ml 的血清标本,再分别测定其 CA125,以配成值为 X, 实测荧光值为 Y 绘制标准工作曲线,经统计拟合标准工作曲线的表达式列出回归方程为: $Y=2.032X-0.973$, 拟合系数的平方为 $R^2=0.997$ 。结果见附图 3, 图 3 为线性检测标准工作曲线, CA125 测定线性范围为 10 ~ 600U/ml。

[0079] 试验例 2

[0080] 重复性试验:批内重复性试验:取同一患者血清标本,同时连续重复检测 20 次,计算出 CV 值(变异系数值)。批间重复性试验:将同一患者血清标本分装成 20 份,贮存于冰箱,每天取 1 份检测,共 20 天,计算出 CV 值。批内 CV 值为 3.9%。批间(日间)CV 值为 4.3%。按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件要求的批内、批间不精密度水平应小于 5%,该方法符合要求。

[0081] 试验例 3

[0082] 回收试验:按照内加入法,将 100 μl 不同浓度的 CA125 标准物分别加入 1000 μl 患者血清标本中,进行高、中、低不同浓度的回收试验检测。高、中、低不同浓度的回收试验结果如表 1 所示,平均回收率为 97.0%,基本符合临床实验要求。

[0083] 表 1

[0084]

测得浓度 (U/ml)	加入浓度 (U/ml)	回收浓度 (U/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)
18.0	-	-	-	97.0
27.6	9.6	9.1	94.8	
54.3	36.3	35.4	97.5	
116.7	98.7	97.5	98.8	

[0085] 试验例 4

[0086] 干扰试验:用本发明试纸测定 CEA(560ng/ml)、CA19-9(400U/ml)、CA15-3(300U/ml) 和 CA50(300U/ml), CA125 测定值分别为 0.06U/ml、0.28U/ml、0.15U/ml、0.24U/ml。以上各数值均低于人体 CA125 的正常含量 35U/ml,从而表明,在医学测定应用中,上述干扰物质对本发明方法测定 CA125 无明显干扰。

[0087] 试验例 5

[0088] 实际检测对比试验:对实施例 1 的试纸条进行性能方面的测定,取 178 例患者的新鲜血清标本,每份分别用 Roche 公司 CA125 电化学发光定量检测试剂与本发明方法进行双盲法检测。将结果应用相关回归和配对 t 检验分析方法进行比较。结果显示,两方法相关性良好,差异无统计学意义 ($n=178$, $Y=1.013X+0.766$, $r=0.973$, $t=0.0736$, $P>0.05$)。回归曲线图见附图 4。

[0089] 由上述检测可见,本发明检测方法具有更高的灵敏度,且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0090] 本发明提出的检测糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条,其只需要微量的全血、血清、血浆样本,即可在 3 ~ 5 分钟内实现定量检测糖蛋白类肿瘤标志物的含量,大大提高了筛查的速度,具有灵敏度高、特异性好和结构简单的优点,且其制备方法简单,易于大规模生产。

[0091] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

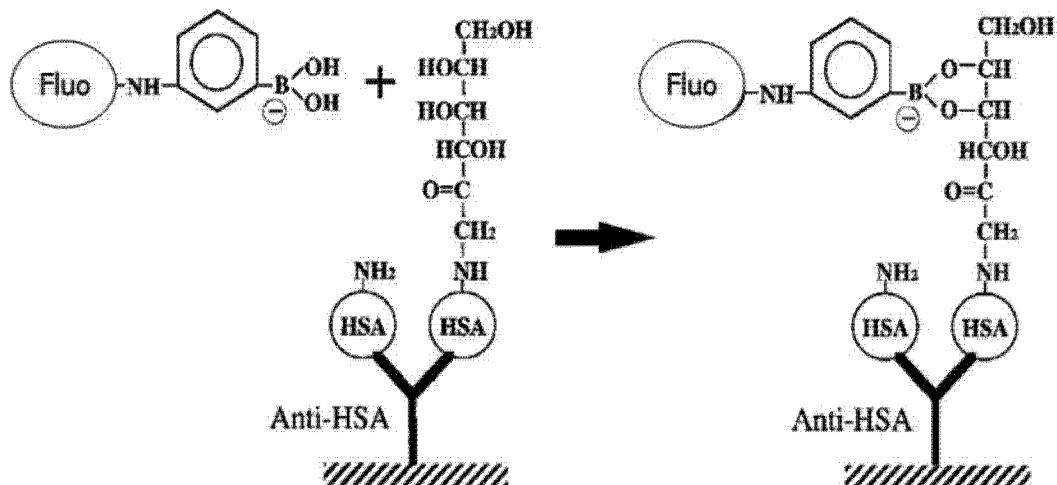


图 1

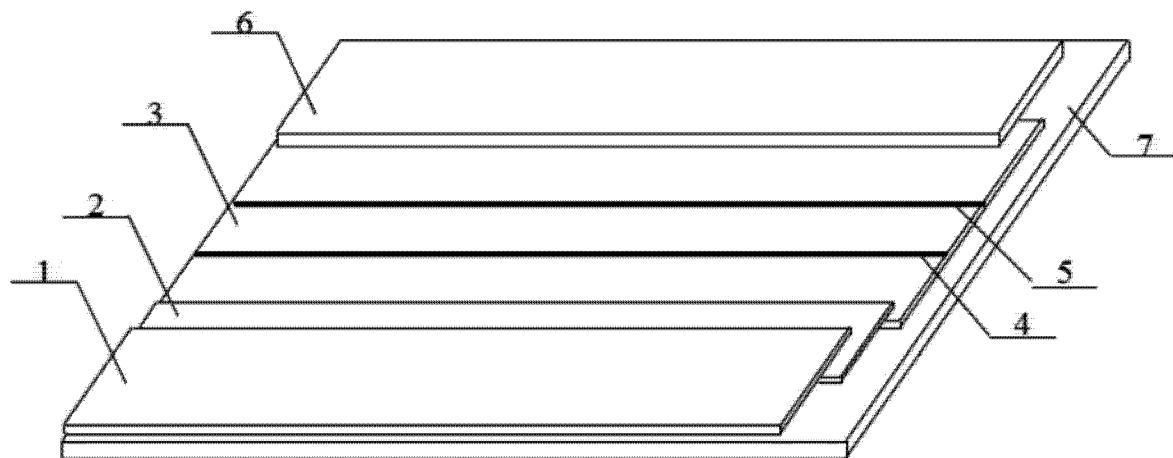


图 2

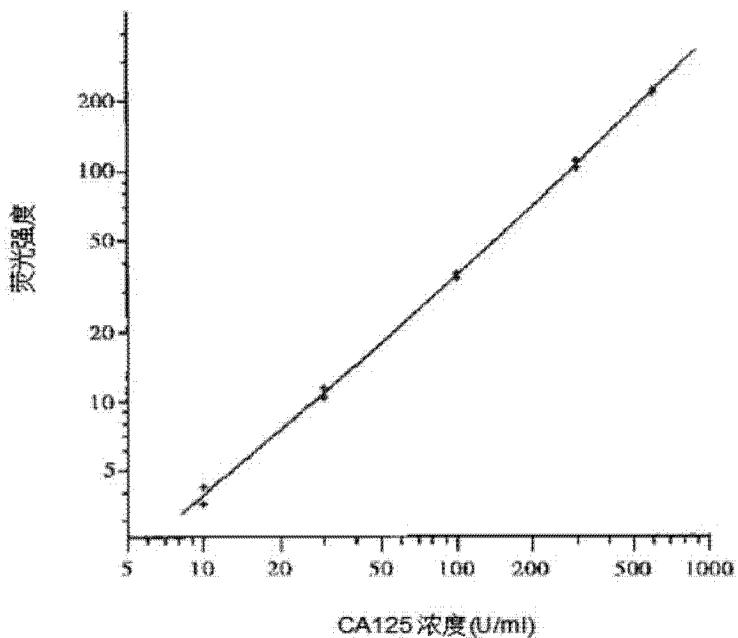


图 3

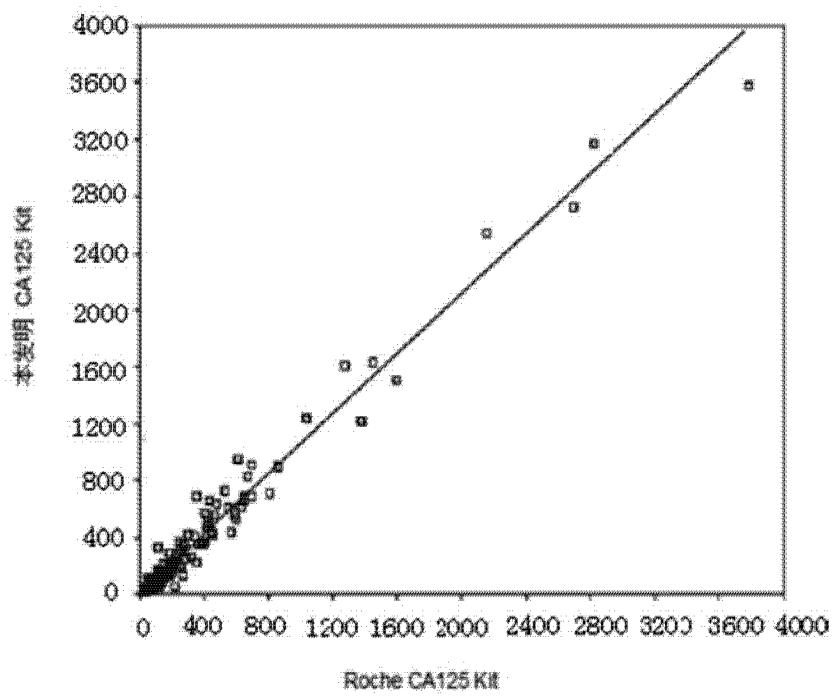


图 4

专利名称(译)	糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104422764A	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	CN201310400058.0	申请日	2013-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
[标]发明人	谢爱武		
发明人	谢爱武		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/558 G01N33/6803		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明提供了一种基于苯硼酸标记技术的糖蛋白类肿瘤标志物免疫层析试纸条及其制备方法与应用，试纸条采用苯硼酸作为生物标记物，结果在激发光照射下以发射光信号的形式表现出来，并可进行仪器判读，从而实现对糖蛋白类肿瘤标志物的定量检测。试纸条包括样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫和衬垫。结合物垫固定有苯硼酸标记物，分析膜上固定有检测线和质控线。本发明还公开了该试纸条的制备方法和在糖蛋白类肿瘤标志物定量检测中的应用。

