



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108896764 A

(43)申请公布日 2018. 11. 27

(21)申请号 201810457630.X

(22)申请日 2018.05.14

(71)申请人 苏州承美生物科技有限公司

地址 215200 江苏省苏州市吴江区吴江经
济技术开发区科技创业园

(72)发明人 孙喜元

(74)专利代理机构 北京科家知识产权代理事务
所(普通合伙) 11427

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

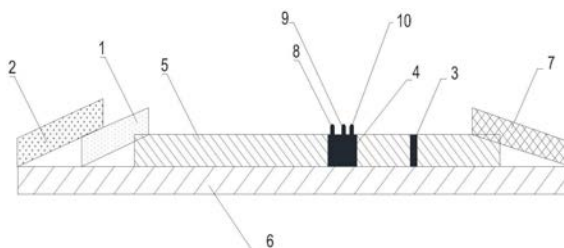
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试
剂盒及制法

(57)摘要

本发明公开了一种肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒及制法。本发明的试剂盒从提高检测灵敏度与缩短检测时间出发,将免疫层析技术与电化学分析技术优势相结合提供了,即免疫层析技术特异性强、简单快速、易于操作、结果容易判读等优点,又电化学分析法具有灵敏度较高、准确度高、测量范围宽、仪器设备较简单等特点的方便快速的肿瘤关联糖蛋白-72检测试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒操作简单方便,灵敏度大幅提高,检测时间缩短至10~20分钟。



1. 肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条,所述肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条包含亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫(1)、样品垫(2)、C线(3)和T线(4),所述C线(3)和T线(4)划线或点样于硝酸纤维素膜(5)上不同位置,所述硝酸纤维素膜(5)粘贴于底板(6)上,所述底板(6)一端粘贴加厚吸水纸(7),所述底板(6)另一端粘贴有所述亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫(1)和样品垫(2),所述肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条还包含工作电极(8)、参比电极(9)、辅助电极(10)贴片贴合于硝酸纤维素膜上T线(4)抗体区。

2. 根据权利要求1所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其特征在于,所述肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒还包括反应溶液,样本稀释溶液,清洗液。

3. 根据权利要求1所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其特征在于,所述亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫(1)由亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72抗体、抗体垫结合稀释液和玻璃纤维素膜制成。

4. 根据权利要求3所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其特征在于,所述亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72抗体中亚甲基蓝和肿瘤关联糖蛋白-72的摩尔比为5:1~50:1。

5. 根据权利要求4所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其特征在于,所述抗体垫结合稀释液包含:PBS、蔗糖、海藻糖、BSA、PVP、表面活性剂和NaN₃,所述PVP质量浓度范围:0.5%~10%,所述表面活性剂浓度范围:0.5%~5%。

6. 根据权利要求6所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其特征在于,所述反应液包含:浓度为0.1~10mM三氯化六铵合钨、浓度为0.1~20mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

7. 肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒制备方法,其特征在于,方法包括如下步骤:

亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫的制备;

层析试纸条C线与T线的制备;

层析试纸条的组装。

8. 根据权利要求8所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒制备方法,其特征在于,所述亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体垫的制备方法为:

将肿瘤关联糖蛋白-72抗体和DMSO溶解亚甲基蓝-琥珀酰亚胺酯加入3ml 0.02M MES (PH 8.0), 4℃轻轻摇晃过夜;标记抗体装入分子量10000D的透析袋, 4℃在PBS溶液中透析4h,用截留分子量30000D的超滤管离心浓缩,用保存液收集, 4℃保存;将保存的亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72抗体用垫结合稀释液按1:4稀释,铺于玻璃纤维素膜,真空干燥后密封保存。

9. 根据权利要求8所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒制备方法,其特征在于,所述层析试纸条C线与T线的制备方法为:将羊抗鼠IgG抗体稀释成1mg/ml、肿瘤关联糖蛋白-72鼠单克隆抗体稀释成1mg/ml别划线或点样于硝酸纤维素膜上不同位置,C线为羊抗鼠IgG线,T线为肿瘤关联糖蛋白-72鼠单克隆抗体线,于37度干燥2-3小时,密封保存。

10. 根据权利要求8所述的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒制备方法, 其特征在于, 所述层析试纸条的组装方法为:

将含C线、T线的硝酸纤维素膜粘贴于底板中间, 底板一端粘贴加厚吸水纸, 另一端粘贴上制作好的亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫和样品垫, 切条机切成所需大小试纸条, 将工作电极、参比电极、辅助电极贴片贴合于NC膜T线肿瘤关联糖蛋白-72抗体区, 压卡机压入塑料卡中, 加入干燥剂, 密封包装保存。

肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒及制法

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤关联糖蛋白检测技术,特别涉及肿瘤关联糖蛋白-72。

背景技术

[0002] 肿瘤相关糖蛋白-72 (TAG-72) 是一种高分子质量的类黏液糖蛋白,主要表达在人结肠癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌及肺癌中。其高表达常伴有恶性预后,几乎不表达于正常上皮及良性病变中。已有研究表明TAG-72对多种恶性肿瘤有提示诊断价值。

[0003] 现有检测肿瘤相关糖蛋白-72的手段是ELISA法。检测酶联免疫吸附实验(ELISA)即将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面,使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行的技术。常用于检测大分子抗原和特异性抗体等,具有灵敏、简便、载体易于标准化等优点。

[0004] 酶联免疫吸附试验法虽然灵敏度较好,但其对实验人员操作技术要求高,操作过程有些繁琐,检测时间长达几个小时。

发明内容

[0005] 为了解决上述现有各种方法的不足,本发明的目的是提供肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒及制法。本发明从提高检测灵敏度与缩短检测时间出发,将免疫层析技术与电化学分析技术优势相结合提供了,即免疫层析技术特异性强、简单快速、易于操作、结果容易判读等优点,又电化学分析法具有灵敏度较高、准确度高、测量范围宽、仪器设备较简单等特点的方便快速的肿瘤关联糖蛋白-72检测试剂盒及制备方法。

[0006] 根据本发明的一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,该试剂盒包括:肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条,肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条包含亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫、样品垫、C线和T线,C线和T线划线或点样于硝酸纤维素膜上不同位置,硝酸纤维素膜粘贴于底板上,底板一端粘贴加厚吸水纸,底板另一端粘贴有所述亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫和样品垫,肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条还包含工作电极、参比电极、辅助电极贴片贴合于硝酸纤维素膜上T线抗体区。其中样品垫即玻璃纤维素膜。

[0007] 根据本发明的一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其中上述亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫和样品垫是有接触的即重叠约2毫米、亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫和硝酸纤维素膜有接触的即重叠约2毫米。抗体垫、样品垫还有吸水纸为柔性材质和底板接触贴合的。

[0008] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,该肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒还包括反应溶液,样本稀释溶液,清洗液。

[0009] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,该亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫由亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72抗体、抗体垫结合稀释液和玻璃纤维素膜制成。

[0010] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其中亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72抗体中亚甲基蓝和肿瘤关联糖蛋白-72的摩尔比为5:1~50:1,最佳为30:1。

[0011] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其中抗体垫结合稀释液包含:PBS、蔗糖、海藻糖、BSA、PVP、表面活性剂和 NaN_3 ,PVP质量浓度范围:0.5%~10%,表面活性剂浓度范围:0.5%~5%。本发明的还提供了一种抗体垫结合稀释液组成为:10mM PBS (74),10%蔗糖,5%海藻糖,2%BSA,2%PVP,2%表面活性剂,0.05% NaN_3 。本发明一方案的PVP浓度范围:0.5%~10%,最佳为2%;表面活性剂浓度范围:0.5%~5%,最佳为2%。

[0012] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其中反应液包含:浓度为0.1~10mM三氯化六铵合钌($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$)和浓度为0.1~20mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)。其中三氯化六铵合钌最佳浓度1mM;三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)最佳浓度2mM。

[0013] 根据本发明的还有一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒制备方法,该方法包括如下步骤:

[0014] 亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体垫的制备;

[0015] 层析试纸条C线与T线的制备;

[0016] 层析试纸条的组装。

[0017] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,其中亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体垫的制备方法为:

[0018] 将肿瘤关联糖蛋白-72抗体和DMSO溶解亚甲基蓝-琥珀酰亚胺酯加入3ml 0.02M MES (PH 8.0),4℃轻轻摇晃过夜;标记抗体装入分子量10000D的透析袋,4℃在PBS溶液中透析4h,用截留分子量30000D的超滤管离心浓缩,用保存液收集,4℃保存;将保存的亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72抗体用垫结合稀释液按1:4稀释,铺于玻璃纤维素膜,真空干燥后密封保存。

[0019] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,层析试纸条C线与T线的制备方法为:将羊抗鼠IgG抗体稀释成1mg/ml、肿瘤关联糖蛋白-72鼠单克隆抗体稀释成1mg/ml别划线或点样于硝酸纤维素膜上不同位置,C线为羊抗鼠IgG线,T线为肿瘤关联糖蛋白-72鼠单克隆抗体线,于37度干燥2-3小时,密封保存。

[0020] 根据本发明的另一方面提供了肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒,层析试纸条的组装方法为:

[0021] 将含C线、T线的硝酸纤维素膜粘贴于底板中间,PVC板一端粘贴加厚吸水纸,另一端粘贴上制作好的亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72抗体垫和样品垫,切条机切成所需大小试纸条,将工作电极、参比电极、辅助电极贴片贴合于NC膜T线肿瘤关联糖蛋白-72抗体区,压卡机压入塑料卡中,加入干燥剂,密封包装保存。

[0022] 本发明从提高检测灵敏度与缩短检测时间出发,将免疫层析技术与电化学分析技术优势相结合,提供一种方便快捷的肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒。

[0023] 本发明结合免疫层析和底物循环电化学法检测样本中肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72)。试纸条中检测线包被有肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 鼠单克隆抗体,质控线包被有羊

抗鼠 IgG 抗体；在检测卡加样端的抗体垫有另一亚甲基蓝标记的肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 鼠单克隆抗体。当样本中存在肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗原时，其先与亚甲基蓝标记抗体反应，形成肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) ~ 亚甲基蓝标抗肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体复合物，依靠毛细作用在纤维膜上层析，运行至检测线时，遇到包被抗体形成肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体 ~ 肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗原 ~ 亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体复合物。滴加反应溶液后放入检测仪。反应液在试纸条检测区与抗体复合物中的亚甲基蓝形成氧化还原反应，循环产生电流，电流大小与抗体复合物中亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体量成正比。依据检测仪内置标准曲线计算出样本中肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 浓度或含量。

[0024] 本发明的其中一种方案试剂盒组成为：

[0025]

	试剂盒组成	包装	保存条件
1	肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条	10条	4℃
2	反应溶液	2ml	4℃
3	样本稀释溶液	4ml	4℃
4	清洗液	2ml	4℃

[0026] 用本发明试剂盒检测肿瘤关联糖蛋白-72的步骤：

[0027] 1. 处理待测样本，制备待测样本溶液；

[0028] 2. 将室温平衡肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条从密封包装取出；

[0029] 3. 取待80ul样本溶液加入试纸条样本孔，样本孔无明显液体后滴加80ul清洗液；

[0030] 4. 待清洗液流尽，加入80ul反应溶液；

[0031] 5. 将试纸条放入内置标准曲线检测仪，检测试纸条检测区产生的电流大小。

[0032] 6. 依据检测仪内置标准曲线计算出样本中肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 浓度或含量。

[0033] 注意：先将试剂盒中的肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条、反应溶液、样本稀释溶液、清洗液在室温放置20~30分钟进行室温平衡。

附图说明

[0034] 图1是本发明的一实施例中肿瘤关联糖蛋白-72检测试盒中试剂纸条结构示意图；

[0035] 图2是本发明的一实施例中标准曲线图。

具体实施方式

[0036] 实施例1试剂盒制备

[0037] 肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条制备：

[0038] 1. 亚甲基蓝标肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体垫制备

[0039] 1.1 亚甲基蓝偶联肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体

[0040] 将1mg肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体、300ul DMSO溶解亚甲基蓝-琥珀酰亚胺酯(1mg/ml)加入3ml 0.02M MES (PH 8.0)，4℃轻轻摇晃过夜。标记抗体装入透析袋(分子量：10000D)，4℃在PBS溶液中透析4h，用截留分子量30000D的超滤管离心浓缩，用保存液收

集,4℃保存。

[0041] 1.2制作亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体垫

[0042] 垫结合稀释液:10mM PBS (74),10%蔗糖,5%海藻糖,2%BSA,2%PVP,2%表面活性剂,0.05%NaN₃。

[0043] 将保存的亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体用垫结合稀释液按1:4稀释,铺于玻璃纤维素膜(Ahlstrom 8964),真空干燥后密封保存。

[0044] 2.层析试纸条C线与T线制备

[0045] 将羊抗鼠IgG抗体稀释成1mg/ml、肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 鼠单克隆抗体稀释成1mg/ml划线条或点样于硝酸纤维素膜(NC膜)上不同位置,于37度干燥2~3小时,密封保存。

[0046] 3.层析试纸条的组装

[0047] 将含C线、T线的硝酸纤维素膜(NC膜)粘贴于PVC底板(DB-6)中间,PVC板一端粘贴加厚吸水纸,另一端粘贴上制作好的亚甲基蓝标记肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体垫和样品垫,切条机切成所需大小试纸条,将工作电极、参比电极、辅助电极贴片贴合于NC膜T线肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 抗体区,压卡机压入塑料卡中,加入干燥剂,密封包装保存。反应溶液:

[0048] PBS中含有1mM三氯化六铵合钌(Ru(NH₃)₆³⁺);2mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)。

[0049] 样本稀释溶液:

[0050] PBS中含0.2%Tween 20。

[0051] 清洗液:

[0052] PBS中含0.2%Tween 20;0.5%BSA。

[0053] 实施例2检测血液样本中肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 含量。

[0054] 1.将肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸盒于室温平衡。

[0055] 2.处理样本1~8,制备样本1~8溶液;

[0056] 3.将室温平衡肿瘤关联糖蛋白-72检测试纸条从密封包装取出;

[0057] 3.取待80ul样本溶液加入试纸条样本孔,样本孔无明显液体后滴加80ul清洗液;

[0058] 4.待清洗液流尽,加入80ul反应溶液;

[0059] 5.将试纸条放入内置标准曲线检测仪,检测试纸条检测区产生的电流大小。试纸条放入仪器内后,仪器开始连续监测检测区电流并记录,当电流低于背景值后不再记录电流。仪器根据峰值电流数值代入标准曲线回归方程中得出所测样本中肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 浓度或含量。

[0060] 放入仪器中,检测时间5分钟之内。

[0061] 每批次样品制备工艺参数会波动,标准曲线(计算公式,标准曲线公式: $Y=aX+b$,a、b为常数,Y为样品所测浓度,X为样品所测电流值。)会参考标准品而校准以便得出更准确数值。

[0062] 6.依据检测仪内置标准曲线计算出样本中肿瘤关联糖蛋白-72 (TAG-72) 浓度或含量。

[0063] 每个样品检测3次,实验结果如下:

[0064]

	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8
已知浓度 (pg/ml)	320	160	80	40	20	10	5	0
试纸条检测浓度 (pg/ml)	319±0.5	161±0.2	80.5±0.3	39.6±0.2	20.3±0.4	9.8±0.3	5±0.4	0

[0065] 本发明操作简单方便,灵敏度大幅提高,检测时间缩短至10~20分钟。

[0066] 上述的实施例是为了进一步说明本发明的一些优选实施例,并非全部实施例。本领域专业人员在没有进行创造性劳动的前提下做出的基于本发明的其他实施例,都属于本发明的权利保护范围。

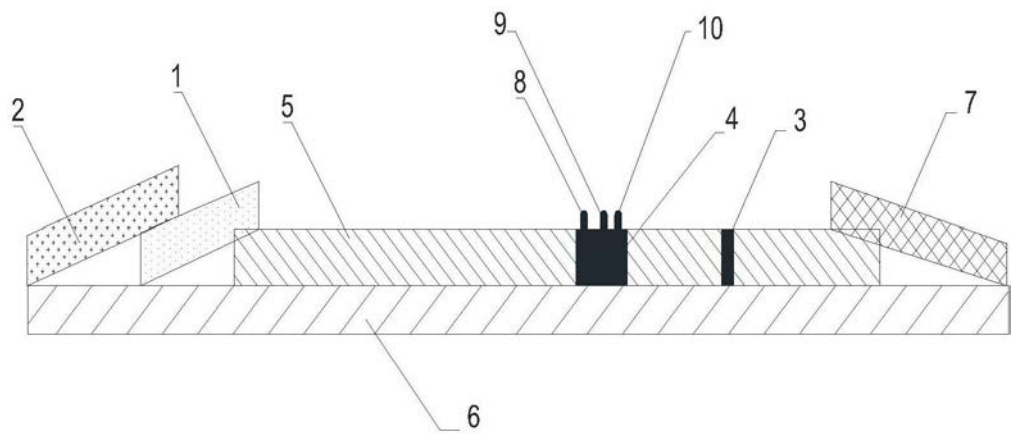


图1

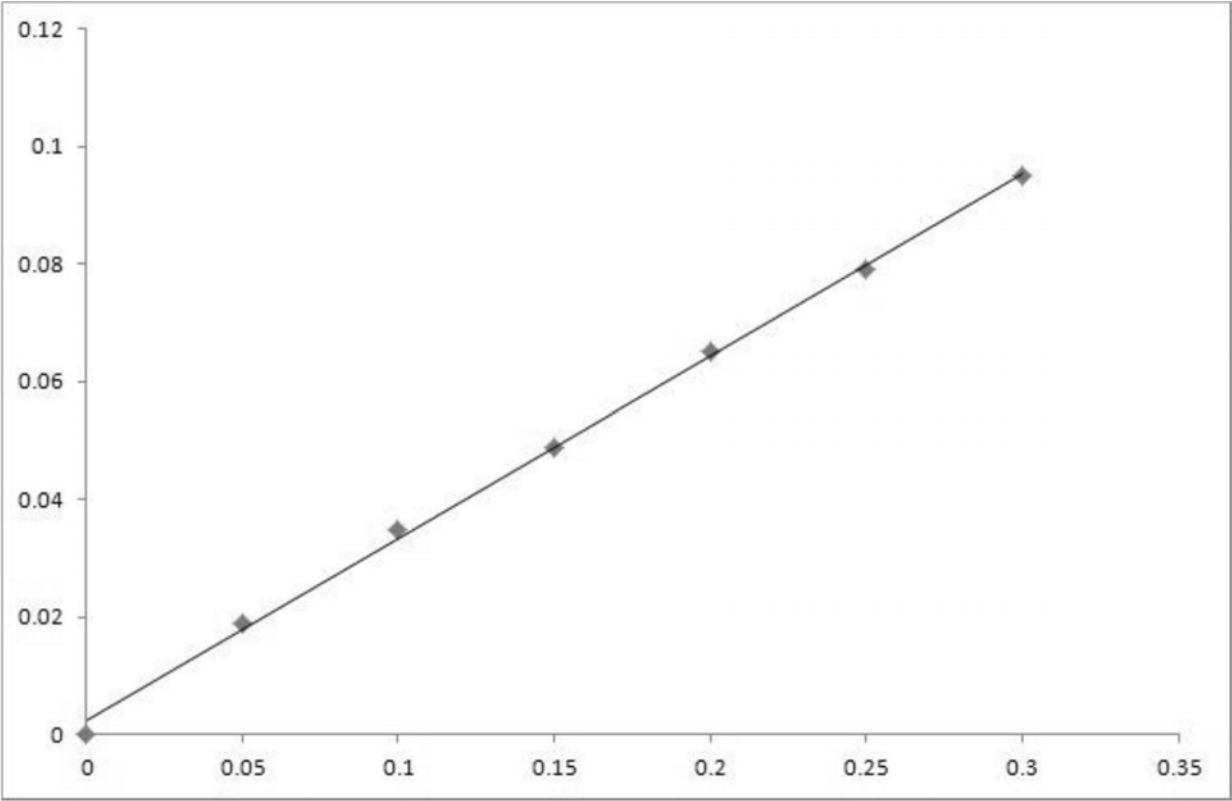


图2

专利名称(译)	肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒及制法		
公开(公告)号	CN108896764A	公开(公告)日	2018-11-27
申请号	CN201810457630.X	申请日	2018-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	苏州承美生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州承美生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州承美生物科技有限公司		
[标]发明人	孙喜元		
发明人	孙喜元		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N33/54306		
代理人(译)	陈娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肿瘤关联糖蛋白-72免疫层析电化学检测试剂盒及制法。本发明的试剂盒本发明从提高检测灵敏度与缩短检测时间出发，将免疫层析技术与电化学分析技术优势相结合提供了，即免疫层析技术特异性强、简单快速、易于操作、结果容易判读等优点，又电化学分析法具有灵敏度较高、准确度高、测量范围宽、仪器设备较简单等特点的方便快速的肿瘤关联糖蛋白-72检测试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒操作简单方便，灵敏度大幅提高，检测时间缩短至10~20分钟。

