

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510104796.6

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 100405065C

[22] 申请日 2005.12.27

[21] 申请号 200510104796.6

[73] 专利权人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市湖滨南路 201
-209 号

[72] 发明人 张忠英 葛金梅 游攀 叶辉铭

[56] 参考文献

CN2862034Y 2007.1.24

US2003044977A1 2003.3.6

WO2005118875A2 2005.12.15

CN1458527A 2003.11.26

CN1553193A 2004.12.8

电化学发光免疫分析法检测尿细胞角蛋白
19 及其在膀胱癌诊断中的应用. 叶辉铭等. 检
验医学, 第 20 卷第 6 期. 2005

审查员 李冰

[74] 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

代理人 马应森

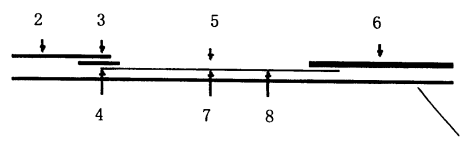
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

纳米胶体金膀胱癌免疫层析检测试剂条及其
检测方法

[57] 摘要

纳米胶体金膀胱癌免疫层析检测试剂条及其检测方法, 涉及一种尿液检测器具, 尤其是涉及一种利用免疫层析法和纳米胶体金技术检测膀胱癌的试剂条及检测方法。提供一种膀胱癌免疫层析检测试剂条与检测方法。在底板上从左到右依次设有吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、固定有金标抗 CK19 抗体或 Ks19.2 抗体的玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层和吸水滤纸层, 吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、固定有金标抗 CK19 抗体的玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层和吸水滤纸层依次重叠相连粘贴在底板上组装而成的。在硝酸纤维素膜层上有 T 测试区和 C 质控区。测试区包被金标抗 CK19 抗体或 Ks19.2 抗体, 质控区包被羊抗鼠抗体。



1、膀胱癌免疫层析检测试剂条，其特征在于设有底板，在底板上从左到右依次设有吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层和吸水滤纸层，吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层和吸水滤纸层依次重叠相连粘贴在底板上组装而成的；

在玻璃纤维层上固定有金标抗 CK19 抗体或 Ks19.2 抗体；

在硝酸纤维素膜层上有 T 测试区和 C 质控区，测试区包被金标抗 CK19 抗体或 Ks19.2 抗体，质控区包被羊抗鼠抗体；

所述的吸尿玻璃纤维层为加样区。

2、如权利要求 1 所述的膀胱癌免疫层析检测试剂条，其特征在于硝酸纤维素膜层的尺寸为长 2~4.5cm，宽 2.5~4.5mm。

3、如权利要求 2 所述的膀胱癌免疫层析检测试剂条，其特征在于硝酸纤维素膜层的尺寸为长 2.5cm，宽 3.5mm。

4、如权利要求 1 所述的膀胱癌免疫层析检测试剂条，其特征在于底板选自硬纸板或塑料板。

纳米胶体金膀胱癌免疫层析检测试剂条及其检测方法

技术领域

本发明涉及一种尿液检测器具，尤其是涉及一种利用免疫层析法 (immuno-chromatography) 和纳米胶体金技术检测膀胱癌的试剂条及其检测方法。

背景技术

免疫层析法是近年来兴起的一种快速诊断技术，其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带，当该干燥的硝酸纤维素膜一端浸入样品后，由于毛细管作用，样品将沿着该膜向前移动。当移动至固定有抗体的区域时，样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合。若用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色，从而实现特异性的免疫诊断。其优点是简化操作步骤、加快检测速度、特异性好、灵敏度高，适用于临床实验室的普查和筛选以及现场（床边）诊断。

胶体金层析技术是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新技术 (Beggs M, Novotany M, Sampedro S. A selfperforming chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin (HCG) in ureine and serum[J]. Clin Chem 1990, 36:1084-1085.) 自从它与免疫学方法相结合以来，发展迅速。其反应所需要的全部或大部分原料均已整合到试剂中。当待测样品（尿液、血清或有机溶剂提取液）加入到样品膜上后，由于微孔滤膜的毛细管作用，使抗原抗体反应在固相膜上快速进行，反应通常只需数分钟，其测试结果以肉眼可见的显色条带来判断，其显色反应是由于所标记的有颜色的颗粒在反应区域聚集而形成的。金标单抗快速诊断试剂具有特异性强、敏感性高、简易快速、试剂易保存以及成本低廉且不需要特殊设备等优点。

膀胱肿瘤在工业化国家的发病率高于工业不发达国家，在城市中的发病率高于农村，环境污染和生态环境的破坏，致癌物质的接触是膀胱癌发病率增高的主要原因。

膀胱癌的诊断以尿液脱落细胞检查和膀胱镜活检为金标准。但尿样细胞学检查，影响因素较多，阳性率低，对于 I、II 期病人阳性率不足 50%。

临床早期诊断多指肿瘤出现于形态学变化之后，通常应用 CT、B 超进行早期诊断，但肿瘤较小时易漏诊，且肿瘤的性质不易判断。膀胱镜比 CT、B 超诊断率高，但对原位癌难

以诊断。在不做病理切片的情况下，膀胱镜认为是最可靠的诊断方法，但这种方法为侵入性创伤性检查，给病人带来痛苦，且收费高，患者不易接受，并只限于可见性肿瘤的诊断，且有增加泌尿系统感染的机会。

应用电化学发光免疫测定技术检测尿 CYFRA211 对膀胱癌的诊断有较好的敏感性和阴性预测值，有快速和无创伤的优势，可作为膀胱癌的辅助诊断指标和术后监测指标。但是成本过高，不能用于床边检查，且需要贵重的电化学发光仪，不适应基层医院和落后地区的医疗条件。

细胞角蛋白(cytokeratin, CKs)是上皮细胞的结构蛋白，目前已发现 20 种不同的细胞角蛋白。细胞角蛋白 19 片段(cytokeratin 19 fragment, cytokeratin 211)是细胞角蛋白成分之一，分子量 43kD，是可溶性酸性多肽，正常状态下 CK19 含量很低，当细胞癌变时，含量升高，因细胞通透性改变或溶解而被释放，使组织液、体液中浓度升高。尿 CK19 水平对膀胱癌的诊断和术后复发的监测有意义。膀胱癌上皮细胞癌变时，由于肿瘤细胞增生、脱落、溶解，细胞角蛋白成分从细胞内逸出并降解，使尿中 CK19 水平升高。有研究(张忠英，林永志，黄松洁，等. 电化学发光技术检测尿中角蛋白 19 片段的意义[J]. 中华检验医学杂志，2003，26(2): 104-106.)表明尿 CK19 对膀胱癌有较高的敏感性(93.3%)和特异性(82.7%)。

发明内容

本发明的目的在于提供金标抗 CK19 抗体(胶体金标记抗 CK19 片段的抗体，英文名为 Monoclonal Antibody to Cytokeratin 19)在制备一种膀胱癌免疫层析检测试剂条中的应用。

本发明的另一目的在于提供一种膀胱癌免疫层析检测试剂条及其检测方法。

金标抗 CK19 抗体(Monoclonal Antibody to Cytokeratin 19)可用于制备一种膀胱癌免疫层析检测试剂条，并用于膀胱癌的检测。

本发明所述的膀胱癌免疫层析检测试剂条设有底板，在底板上从左到右依次设有吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、固定有金标抗 CK19 抗体(Monoclonal Antibody to Cytokeratin 19)或 Ks19.2 抗体(Clone Determination Ks 19.2(Z105.6), also published as BM 19.21, MAK 19.21)的玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层(NC膜)和吸水滤纸层，吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、固定有金标抗 CK19 抗体的玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层(NC膜)和吸水滤纸层依次重叠相连粘贴在底板上组装而成的。

在硝酸纤维素膜层上有 T 测试区和 C 质控区。测试区是包被金标抗 CK19 抗体(Monoclonal Antibody to Cytokeratin 19)或 Ks19.2 抗体(Clone Determination Ks

19.2(Z105.6), also published as BM 19.21, MAK 19.21), 质控区是包被羊抗鼠抗体。其中吸尿玻璃纤维层为加样区。

硝酸纤维素膜层的尺寸为：长 2~4.5cm，宽 2.5~4.5mm，最好为长 2.5cm，宽 3.5mm，底板可选用硬纸板、塑料板等。

本发明所述的膀胱癌免疫层析检测方法的具体步骤如下：

- 1) 取 30~150 μL ，最好 50 μL 待检样本加在试剂条的加样区。
- 2) 在 2~30min，最好 5min 内观察并记录试验结果。

本发明采用胶体金免疫层析技术双抗体夹心法原理检测样品中的 CK19 片段，从尿液中检测出是否存在 CK19 抗原片断，以便作为诊断膀胱癌的辅助参考参数。在加样区滴加尿液，因层析作用，液体流向吸水滤纸方向，当流至金标记物处时，金标抗体溶解，并与尿液中的 CK19 片段抗原结合形成复合物。当金标抗 CK19 抗体-CK19 片段抗原复合物继续前移时，在测试线与包被抗体结合，形成“金标抗 CK19 抗体-抗原-包被 Ks19.2 抗体”复合物而凝聚显色，在质控线处形成金标抗 CK19 抗体-包被羊抗鼠抗体复合物而显色，如质控线未显色则表明该试剂无效。

本发明与美国采用的尿液检查膀胱癌的胶体金诊断试剂盒相比，两者的原理不同，BTA stat 是检测人补体因子 H 相关蛋白(hCFHrp)，它的结构和功能与人补体因子 H(hCFH) 相似。hCFH 抑制补体旁路途径和外源细胞裂解。与 hCFH 相似，BTA 阻断补体级联反应，使癌细胞逃脱宿主免疫系统的监视。而本发明采用胶体金免疫层析技术双抗体夹心法原理检测样品中的 CK19 片段，从尿液中检测出是否存在 CK19 抗原片断，以便作为诊断膀胱癌的辅助参考参数。在加样区滴加尿液，因层析作用，液体流向吸水滤纸方向，当流至金标记物处时，金标抗体溶解，并与尿液中的 CK19 片段抗原结合形成复合物。当金标抗 CK19 片段抗体-CK19 片段抗原复合物继续前移时，在测试线与包被抗体结合，形成“金标抗 CK19 抗体-抗原-包被 Ks19.2 抗体”复合物而凝聚显色，在质控线处形成金标抗 CK19 抗体-包被羊抗鼠抗体复合物而显色，如质控线未显色则表明该试剂无效。

与膀胱癌的其他检测方法相比，本发明具有如下突出优点：

1) 敏感性好、特异性与准确性高而又无创伤性，可检测尿液中的 CK19 片段，标本用量仅需 50 μL ，可以检测到纳克级 CK19 片段，适用于多种场合检测。其灵敏度可达到 5~10ng/mL，膀胱移行性细胞癌患者的检出率可达到 85%以上。

2) 检测速度快，成本低，可在 5min 内出结果，操作简便快捷，适用于膀胱肿瘤的流行病学调查辅助检测或治疗后的动态监测和临床医生筛选膀胱镜检查适应人群（即用该诊

断试剂盒找出高度可疑的膀胱癌患者)。

附图说明

图 1 为本发明所述的膀胱癌免疫层析检测试剂条的结构示意图。

具体实施方式

以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

实施例 1

参见图 1, 膀胱癌免疫层析检测试剂条设有硬纸底板 1, 在底板 1 上从左到右依次设有吸尿玻璃纤维层 2、聚酯膜层 3、固定有金标抗 CK19 抗体 (Monoclonal Antibody to Cytokeratin 19, clone: A53-B/A2) 的玻璃纤维层 4、硝酸纤维素膜层 5 (NC 膜) 和吸水滤纸层 6。各层被依次交错粘接在硬纸底板 1 上组装而成的。在硝酸纤维素膜层 5 上有 T 测试区 7 和 C 质控区 8。测试区 7 是标有 Ks19.2 抗体 (Clone Determination Ks 19.2(Z105.6), also published as BM 19.21, MAK 19.21) 的区带, 质控区 8 是标有抗鼠二抗的区带。其中吸尿玻璃纤维层 2 (区) 作为加样区。硝酸纤维素膜层 5 的尺寸为: 长 2.5cm, 宽 3mm, 底板也可选用塑料板等。在进行膀胱癌免疫层析检测时, 先取 50 μ L 待检样本加在试剂条的加样区即吸尿玻璃纤维层 2 上, 在 5min 内观察并记录试验结果。

检测结果的判断如下:

阳性结果: 在试剂条的测试线和质控线位置上各出现一条紫红色条带。

阴性结果: 仅试剂条的质控线位置上出现一条紫红色条带。

无效结果: 在试剂条的测试线和质控线位置上均未出现紫红色条带。

在检测时应注意以下事项:

1) 被检样品在室温 (20 $^{\circ}$ C 左右) 平衡并在该条件下检测。要求被检样品为新鲜样品。收集标本前, 病人应控制水量摄入, 留取晨尿、中段尿, 及时离心, 及时测定等方法以保证结果的可靠性。

2) 当样品中抗体含量极高时, 质控线条带有所减弱, 此结果仍视为有效结果 (若需进一步确证, 可将样本适量稀释后再作测试)。

3) 本试剂条仅供体外检测初筛, 勿作为确认试剂, 阳性结果须进行确证试验确证。

4) 30min 后观察结果无效。

5) 4~30 $^{\circ}$ C 避光干燥保存。

实施例 2

参见图 1, 与实施例 1 类似, 其区别在于玻璃纤维层 4 上固定有 Ks19.2 抗体 (Clone

Determination Ks 19.2(Z105.6), also published as BM 19.21, MAK 19.21)、在硝酸纤维素膜层 5 上的测试区标有金标抗 CK19 抗体 (Monoclonal Antibody to Cytokeratin 19, clone: A53-B/A2) 的区带。硝酸纤维素膜层 5 的尺寸为: 长 2cm, 宽 3.5mm。

在进行膀胱癌免疫层析检测时, 先取 100 μ L 待检样本加在试剂条的加样区即吸尿玻璃纤维层 2 上, 在 2min 内观察并记录试验结果。检测结果的判断与实施例 1 相同。

实施例 3

参见图 1, 与实施例 2 类似, 其区别在于硝酸纤维素膜层 5 的尺寸为: 长 4.5cm, 宽 4.5mm。

在进行膀胱癌免疫层析检测时, 先取 30 μ L 待检样本加在试剂条的加样区即吸尿玻璃纤维层 2 上, 在 15min 内观察并记录试验结果。检测结果的判断与实施例 1 相同。

实施例 4

参见图 1, 与实施例 1 类似, 其区别在于硝酸纤维素膜层 5 的尺寸为: 长 3cm, 宽 2.5mm。

在进行膀胱癌免疫层析检测时, 先取 150 μ L 待检样本加在试剂条的加样区即吸尿玻璃纤维层 2 上, 在 30min 内观察并记录试验结果。检测结果的判断与实施例 1 相同。

实施例 5

患者徐××, 男, 32 岁, 在本院确诊膀胱癌。其尿标本用电化学发光免疫分析技术和本发明的检测试剂条分别检测。

1 标本采集: 收集尿标本, 收集标本前晚 9 点起禁食禁水, 留清晨第 1 次中段尿约 5mL, 置于专用管中, 颠倒混匀于 4 $^{\circ}$ C 保存, 3h 内送检。

2 标本处理: 将标本离心, 1000~3500r/min 离心 5min, 最好 1500r/min 离心 5min, 取上清液上机检测(或-75 $^{\circ}$ C 保存)。

3 方法:

1) 采用电化学发光免疫分析技术(ECLIA)。电化学发光免疫分析仪(Elecsys1010 型, Roche 公司产品), CYFRA21-1 ECLIA 试剂盒由 Roche 公司提供, 严格按操作说明书进行操作。

2) 取 50 μ L 待检尿标本加在本发明的试剂条的加样区即吸尿玻璃纤维层上, 在 5min 内观察并记录试验结果。

结果: 电化学发光免疫分析技术(ECLIA)测出的 CK19 (CYFRA21-1)为 5.16 μ g/L; 试剂条显示结果为阳性, 即在试剂条的测试线和质控线位置上各出现一条紫红色条带。

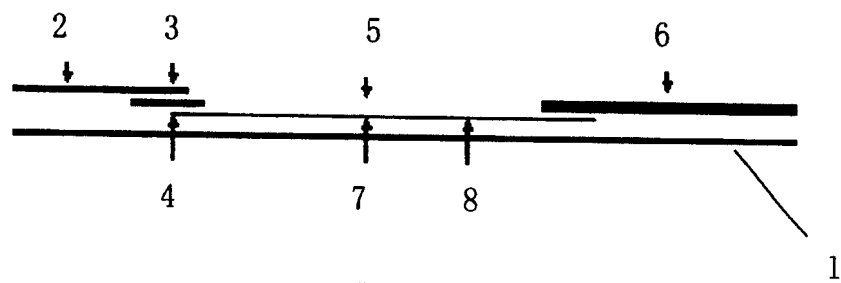


图 1

专利名称(译)	纳米胶体金膀胱癌免疫层析检测试剂条及其检测方法		
公开(公告)号	CN100405065C	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	CN200510104796.6	申请日	2005-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
[标]发明人	张忠英 葛金梅 游攀 叶辉铭		
发明人	张忠英 葛金梅 游攀 叶辉铭		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/52		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1800855A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

纳米胶体金膀胱癌免疫层析检测试剂条及其检测方法，涉及一种尿液检测器具，尤其是涉及一种利用免疫层析法和纳米胶体金技术检测膀胱癌的试剂条及检测方法。提供一种膀胱癌免疫层析检测试剂条与检测方法。在底板上从左到右依次设有吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、固定有金标抗CK19抗体或Ks19.2抗体的玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层和吸水滤纸层，吸尿玻璃纤维层、聚酯膜层、固定有金标抗CK19抗体的玻璃纤维层、硝酸纤维素膜层和吸水滤纸层依次重叠相连粘贴在底板上组装而成的。在硝酸纤维素膜层上有T测试区和C质控区。测试区包被金标抗CK19抗体或Ks19.2抗体，质控区包被羊抗鼠抗体。

