



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108732358 A

(43)申请公布日 2018.11.02

(21)申请号 201810294033.X

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2018.03.30

(71)申请人 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

地址 210000 江苏省南京市建邺区创智路39号

(72)发明人 王毅谦 陈雷 龙云凤 蔡正清  
高玲 丁涛 姜珊 方云涛  
厉蓉蓉 祁专成

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林 薛海霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

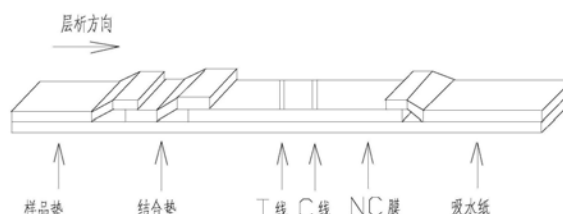
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

## (54)发明名称

一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条及其制备方法和应用

## (57)摘要

本发明公开了一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条及其制备方法和应用。本发明荧光该试剂条有三个区域,分别为:加样区、结合区、检测区。该试剂条由上而下分别为吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫;结合垫上平铺有荧光物质标记的抗NMP22抗体复合物,层析膜上T线上包被有抗核基质蛋白(NMP22)单抗可用于检测尿液中核基质蛋白(NMP22)。与荧光分析仪一起使用可以实现定量检测,操作简单方便。可用于实验室检测,也可用于现场快速检测,检测只需要约10min,操作时间大幅度减少,该试剂盒可用于膀胱癌的早期筛查和复发监测的辅助诊断。



1. 一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:免疫荧光试剂条中,吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序设置;样品垫对应于加样区,结合垫对应于结合区;层析膜对应于检测区;层析膜上设有检测线T线和质控线C线;检测线T线上包被有抗核基质蛋白(NMP22)单抗N-C2;质控线C线上包被有羊抗鼠IgG;结合垫上平铺有荧光物质标记的抗NMP22抗体复合物Cy3-N-C1。

2. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:T线、C线稀释液配方为:0.01M PBS,5%蔗糖,1%BSA;结合垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1% Tween-20,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;Cy3-N-C1稀释液配方为:0.01M PBS,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;样品垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1% Tween-20,1%BSA。

3. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫均为一个试剂条单元,相邻试剂条单元重叠区域长度为2mm,吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序紧密粘合在底板上,完成粘合后切割成3mm宽的试剂条。

4. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:吸水垫为吸水纸;层析膜为硝酸纤维素(NC)膜;结合垫和样品垫均为玻璃纤维素膜。

5. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:检测线T线和质控线C线之间的距离为10mm。

6. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:检测线T线上包被的抗NMP22单抗N-C2,浓度为0.5 mg/mL,用量为3 $\mu$ l/cm。

7. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:质控线C线上包被的羊抗鼠IgG,浓度为0.5mg/mL,用量为3 $\mu$ l/cm。

8. 根据权利要求1所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条,其特征在于:使浓度为1mg/mL的荧光物质标记的抗NMP22抗体复合物Cy3-N-C1喷膜于结合垫上,荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1用量为6 $\mu$ l/cm;荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1中,荧光物质为菁染料Cy3。

9. 权利要求1-8任意一项所述的一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条的制备方法,包括如下步骤:

样品垫处理:将20mm宽的样品垫浸泡于样品垫处理液中,4℃条件下浸泡过夜,取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥,室温干燥条件下保存;样品垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1% Tween-20,1%BSA;

结合垫处理:将10mm宽的结合垫浸泡于结合垫处理液中,4℃条件下浸泡过夜,取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥,室温干燥条件下保存;结合垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1% Tween-20,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;

荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1制备:将抗NMP22抗体N-C1用0.15M NaCl溶液室温透析4小时,而后用新鲜的0.15M NaCl溶液4℃透析过夜,将N-C1与10mg/mL Cy3按照20:1的摩尔比混合室温避光反应45分钟,而后用新鲜的0.15M NaCl溶液4℃避光透析过夜,再用0.01M PBS溶液室温避光透析4小时,再用新鲜的0.01M PBS溶液4℃避光透析过夜,收集Cy3-N-C1并保存;

荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1喷膜:用Cy3-N-C1稀释液将Cy3-N-C1稀释为浓度

为1mg/mL的Cy3-N-C1溶液并喷膜于结合垫上,1mg/mL的Cy3-N-C1溶液在结合垫上的用量为6 $\mu$ l/cm;Cy3-N-C1稀释液:0.01M PBS,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;

T线、C线划线:取30mm宽的NC膜上划T线,C线,T线和C线的距离为10mm;T线上包被有抗NMP22单抗N-C2,用T线、C线稀释液调整抗NMP22单抗N-C2浓度为0.5mg/mL,用量为3 $\mu$ l/cm;C线上包被有羊抗鼠IgG,用T线、C线稀释液调整羊抗鼠IgG浓度为0.5mg/mL,用量为3 $\mu$ l/cm;T线、C线稀释液:0.01M PBS,5%蔗糖,1%BSA;

组装:将吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序紧密粘合在底板上,样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫均为一个试剂条单元,相邻试剂条单元重叠区域长度为2mm,完成粘合后切割成3mm宽的试剂条。

10. 权利要求1-8任意一项所述的用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条作为检测人尿液中的核基质蛋白(NMP22)的浓度的试剂的应用。

## 一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条及其制备方法和应用，用于尿液中的尿核基质蛋白 (NMP22) 的浓度的定量检测。本试剂盒可用于膀胱癌的早期筛查和复发监测的辅助诊断。属于免疫学检测领域。

### 技术背景

[0002] 膀胱癌是我国泌尿系统最常见的恶性肿瘤。膀胱癌术后复发率可达70%~80%，10%~15%的患者因肿瘤进展而死亡。早期发现、术后定期随访、检测复发是膀胱肿瘤治疗的关键。

[0003] 我国膀胱癌年龄标准化发病率男性为3.8/10万，女性为1.8/10万。近年来，我国部分城市肿瘤发病率报告显示膀胱癌发病率有增高趋势。膀胱癌男性发病率为女性的3-4倍。

[0004] 核基质蛋白 (NMP22) 是细胞核基质的重要组成部分，参与构成细胞核内部框架，是参与维持细胞核功能的一种三维网状结构蛋白，并与DNA复制、RNA合成、激素合成以及基因表达的调控有关。NMP22是核有丝分裂装置蛋白 (nuclear mitotic apparatus protein), Nu-MAP) 的一个亚单位。Nu-MAP的主要动能为协调核有丝分裂期间染色体正确、均等地分配到子代细胞。当细胞发生恶变时，核内遗传物质在有丝分裂末期分配极度异常，Nu-MAP合成激增。NMP22参与了基因表达的调节和协调NMP22通过凋亡而释放到尿液中并达到可检测的水平，与尿路上皮肿瘤密切相关。在膀胱癌上皮细胞内NMP22的含量要比正常尿路上皮高数十倍。

[0005] 研究表明：NMP22联合膀胱镜检查，敏感性 (检出率) 达99%以上；NMP22检测无论在早期筛查或复发监测中，敏感性大大高于尿脱落细胞，但特异性略低于尿细胞。

[0006] 2012EAU (European Association of Urology Guidelines) 膀胱癌指南指出：NMP22比尿脱落细胞更具有敏感性，经筛选病例后特异性得以提高。其高阴性预测值，可在监测中使用以延迟膀胱镜检。2015EAU膀胱癌指南指出：NMP22可用于床边诊断，其敏感性为47~100%，特异性为55~98%，高分期癌敏感性为75~83%。2016年美国NCCN膀胱癌指南指出：对于病人的管理基于活检、病理分析等，这些信息辅以判断复发可能。可考虑用FDA批准的NMP22标志物，进行检测。

[0007] 鉴于此，建立一种有效、快速、简单、灵敏的定量检测NMP22的方法具有重要意义。

### 发明内容

[0008] 本发明提供了一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条及其制备方法和应用。该试剂盒与荧光分析仪一起使用可以实现定量检测，操作简单方便。可用于实验室检测，也可用于现场快速检测，检测只需要约10min，操作时间大幅度减少，用于尿液中的NMP22蛋白的浓度的定量检测。本试剂盒可用于膀胱癌的早期筛查和复发监测的辅助诊断。

[0009] 本发明采用了免疫荧光层析原理制备了尿核基质蛋白免疫荧光试剂条。该试剂条

有三个区域,分别为:加样区、结合区、检测区。该试剂条的构建是将吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫由上而下的顺序紧密粘合在底板上。荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1平铺于结合垫上,层析膜上划有检测线(T线)和质控线(C线),T线上包被有抗NMP22单抗N-C2,C线上包被有羊抗鼠IgG。滴于样品垫上的待检样品液在毛细层析的作用下流动至结合垫上,待检样品中的NMP22蛋白与结合垫上的荧光抗体(Cy3-N-C1)发生免疫反应后形成复合物,随后一起迁移到NC膜上,到达T线时与T线包被的NMP22单抗N-C2结合并富集截留于T线处,剩余的未反应的荧光抗体与C线包被的羊抗鼠IgG结合并富集截留于C线处,在免疫荧光分析仪中检测获得检测结果。T线检测病人NMP22蛋白浓度;C线是未反应的荧光抗体与羊抗鼠IgG结合,作为本次监测的质控。

[0010] 一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条,其特征在于:免疫荧光试剂条中,吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序设置;样品垫对应于加样区,结合垫对应于结合区;层析膜对应于检测区;层析膜上设有检测线T线和质控线C线;检测线T线上包被有NMP22单抗N-C2;质控线C线上包被有羊抗鼠IgG;结合垫上平铺有荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1。

[0011] T线、C线稀释液配方为:0.01M PBS,5%蔗糖,1%BSA;结合垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;Cy3-N-C1稀释液配方为:0.01M PBS,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;样品垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,1%BSA。

[0012] 样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫均为一个试剂条单元,相邻试剂条单元重叠区域长度为2mm,吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序紧密粘合在底板上,完成粘合后切割成3mm宽的试剂条。

[0013] 吸水垫为吸水纸;层析膜为硝酸纤维素(NC)膜;结合垫和样品垫均为玻璃纤维素膜。

[0014] 检测线T线和质控线C线之间的距离为10mm。检测线T线上包被的NMP22单抗N-C2,浓度为0.5mg/mL,用量为3 $\mu$ l/cm。质控线C线上包被的羊抗鼠IgG,浓度为0.5mg/mL,用量为3 $\mu$ l/cm。

[0015] 采用浓度为1mg/mL的荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1平铺(喷膜)于结合垫上,荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1用量为6 $\mu$ l/cm;荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1中,荧光物质为菁染料Cy3。

[0016] 一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条的制备方法,包括如下步骤:

[0017] 1) 样品垫处理:将20mm宽的样品垫浸泡于样品垫处理液中,4℃条件下浸泡过夜,取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥,室温干燥条件下保存;样品垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,1%BSA;

[0018] 2) 结合垫处理:将10mm宽的结合垫浸泡于结合垫处理液中,4℃条件下浸泡过夜,取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥,室温干燥条件下保存;结合垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;

[0019] 3) 荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1制备:将抗NMP22抗体N-C1用0.15M NaCl溶液室温透析4小时,而后用新鲜的0.15M NaCl溶液4℃透析过夜,将N-C1与10mg/mL Cy3按照20:1的摩尔比混合室温避光反应45分钟,而后用新鲜的0.15M NaCl溶液4℃避光透析过夜,再用0.01M PBS溶液室温避光透析4小时,再用新鲜的0.01M PBS溶液4℃避光透析过夜,

收集Cy3-N-C1并保存；

[0020] 4) 荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1喷膜：用Cy3-N-C1稀释液将Cy3-N-C1稀释为浓度为1mg/mL的Cy3-N-C1溶液并喷膜于结合垫上，1mg/mL的Cy3-N-C1溶液在结合垫上的用量为6 $\mu$ l/cm；Cy3-N-C1稀释液：0.01M PBS，0.5%PVA，5%蔗糖，1%BSA；

[0021] 5) T线、C线划线：取30mm宽的NC膜上划T线，C线，T线和C线的距离为10mm；T线上包被有抗NMP22单抗N-C2，用T线、C线稀释液调整抗NMP22单抗N-C2浓度为0.5mg/mL，用量为3 $\mu$ l/cm；C线上包被有羊抗鼠IgG，用T线、C线稀释液调整羊抗鼠IgG浓度为0.5mg/mL，用量为3 $\mu$ l/cm；T线、C线稀释液：0.01M PBS，5%蔗糖，1%BSA；

[0022] 6) 组装：将吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序紧密粘合在底板上，样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫均为一个试剂条单元，相邻试剂条单元重叠区域长度为2mm，完成粘合后切割成3mm宽的试剂条。

[0023] 本发明还提供用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条作为检测人尿液中的核基质蛋白的浓度的试剂的应用。

[0024] 相对于现有技术，本发明的有益效果为：

[0025] 1) 用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条与荧光分析仪一起使用可以实现定量检测，操作简单方便，不需要专业技术人员参与。可用于实验室检测，也可用于现场快速检测，检测只需要约10min。

[0026] 2) 本发明自主构建了抗NMP22单抗N-C1和N-C2作为用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条构建的核心部分，决定了试纸条的准确度和灵敏度。

#### 附图说明：

[0027] 图1：一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条结构示意图；

[0028] 图2：一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条的标准曲线图；

[0029] 图3：一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条测定病人尿液与正常人的尿液中NMP22含量对比散点图。

#### 具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

[0031] 实施例一：抗核基质蛋白(NMP22)的特异性单抗的制备

[0032] 1. 动物免疫：

[0033] 选取6-8周龄的雌性Balb/c小鼠为免疫对象，初次免疫前每只小鼠尾静脉采血，初次免疫时腹腔注射乳化后免疫原200 $\mu$ l（抗原加完全佐剂）；在初免后第14天、第28天以相同方法进行第二次和第三次免疫（抗原加不完全佐剂），在第三次免疫后第5天对每只小鼠进行眼眶采血取血清评估抗体效价，在第三次免疫后第七天进行加强免疫，尾静脉注射免疫原100 $\mu$ l，加强免疫后第3天取脾淋巴细胞和SP2/0（5:1的混合比例）进行细胞融合，融合采用PEG法。融合完成后用HAT培养基选择性培养。

[0034] 2. 亚克隆：

[0035] 采用有限稀释法进行亚克隆。饲养细胞铺于96孔板中，将阳性孔中的杂交瘤细胞，计数，用HT培养基稀释成3个浓度，铺96孔板，每个浓度2列，使得每孔中细胞为1个/孔、3个/

孔、10个/孔,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养7—10天,选择阳性最强的孔连续进行2—3次亚克隆,阳性株抗NMP22单抗N-C1和N-C2,进行转孔扩大培养。

### [0036] 3. 单抗制备

[0037] 单抗制备采用了体内法即小鼠腹腔接种法,采取小鼠腹腔的腹水,获得的抗体浓度高。取10周龄的Balb/c雌性小鼠,小鼠腹腔注射500μl已灭菌的液体石蜡。杂交瘤细胞经过收集离心,腹腔注射 $2 \times 10^6$ 个细胞/只小鼠。约1周左右小鼠腹部明显隆起,用注射器针头从腹腔采腹水。

### [0038] 4. 抗体纯化

[0039] 采用了Protein G亲和层析柱进行抗体的纯化。用等体积的结合缓冲液稀释腹水,开始过柱,待样本完全流出,用适量结合缓冲液过柱,待液体完全流出用适量洗脱液过柱,同时用装有适量体积中和液的小离心管中和所接收的洗脱液,用考马斯亮蓝检测,收集蓝色较深的离心管抗体,装于透析袋中,透析3天,透析结束后检测蛋白浓度,置于-20℃保存。

### [0040] 实施例二

[0041] 一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条,其特征在于:免疫荧光试剂条中,吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序设置;样品垫对应于加样区,结合垫对应于结合区;层析膜对应于检测区;层析膜上设有检测线T线和质控线C线;检测线T线上包被有NMP22单抗N-C2;质控线C线上包被有羊抗鼠IgG;结合垫上平铺有荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1。

[0042] T线、C线稀释液配方为:0.01M PBS,5%蔗糖,1%BSA;结合垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;Cy3-N-C1稀释液配方为:0.01M PBS,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;样品垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,1%BSA。

[0043] 样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫均为一个试剂条单元,相邻试剂条单元重叠区域长度为2mm,吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序紧密粘合在底板上,完成粘合后切割成3mm宽的试剂条。

[0044] 吸水垫为吸水纸;层析膜为硝酸纤维素(NC)膜;结合垫和样品垫均为玻璃纤维素膜。

[0045] 检测线T线和质控线C线之间的距离为10mm。检测线T线上包被的NMP22单抗N-C2,浓度为0.5mg/mL,用量为3μl/cm。质控线C线上包被的羊抗鼠IgG,浓度为0.5mg/mL,用量为3μl/cm。

[0046] 采用浓度为1mg/mL的荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1平铺(喷膜)于结合垫上,荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1用量为6μl/cm;荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1中,荧光物质为菁染料Cy3。

[0047] 一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条的制备方法,包括如下步骤:

[0048] 1) 样品垫处理:将20mm宽的样品垫浸泡于样品垫处理液中,4℃条件下浸泡过夜,取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥,室温干燥条件下保存;样品垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,1%BSA;

[0049] 2) 结合垫处理:将10mm宽的结合垫浸泡于结合垫处理液中,4℃条件下浸泡过夜,取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥,室温干燥条件下保存;结合垫处理液配方为:0.1M Tris-HCl,0.1%Tween-20,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;

[0050] 3) 荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1制备:将抗NMP22抗体N-C1用0.15M NaCl溶液室温透析4小时,而后用新鲜的0.15M NaCl溶液4℃透析过夜,将N-C1与10mg/mL Cy3按照20:1的摩尔比混合室温避光反应45分钟,而后用新鲜的0.15M NaCl溶液4℃避光透析过夜,再用0.01M PBS溶液室温避光透析4小时,再用新鲜的0.01M PBS溶液4℃避光透析过夜,收集Cy3-N-C1并保存;

[0051] 4) 荧光物质标记的抗体复合物Cy3-N-C1喷膜:用Cy3-N-C1稀释液将Cy3-N-C1稀释为浓度为1mg/mL的Cy3-N-C1溶液并喷膜于结合垫上,1mg/mL的Cy3-N-C1溶液在结合垫上的用量为6μl/cm;Cy3-N-C1稀释液:0.01M PBS,0.5%PVA,5%蔗糖,1%BSA;

[0052] 5) T线、C线划线:取30mm宽的NC膜上划T线,C线,T线和C线的距离为10mm;T线上包被有抗NMP22单抗N-C2,用T线、C线稀释液调整抗NMP22单抗N-C2浓度为0.5mg/mL,用量为3μl/cm;C线上包被有羊抗鼠IgG,用T线、C线稀释液调整羊抗鼠IgG浓度为0.5mg/mL,用量为3μl/cm;T线、C线稀释液:0.01M PBS,5%蔗糖,1%BSA;

[0053] 6) 组装:将吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫依序紧密粘合在底板上,样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫均为一个试剂条单元,相邻试剂条单元重叠区域长度为2mm,完成粘合后切割成3mm宽的试剂条。

[0054] 实施例三:用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条的标准曲线

[0055] 将NMP22抗原溶液可以用抗原稀释液稀释抗原至终浓度为0ng/mL,4ng/mL,8ng/mL,16ng/mL,32ng/mL,64ng/mL的系列标准品溶液。

[0056] 抗原稀释液为含有BSA,蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20g BSA,50g蔗糖,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的水溶液。

[0057] 根据尿核基质蛋白NMP22免疫荧光试剂条测定方法的检测步骤,获得NMP22系列标准品的荧光检测强度。根据标准品的荧光强度值和浓度为坐标轴,选择合适的数学模型建立标准曲线,标准曲线如图2所示,采用四参数法拟合其相关系数 $r=0.9982$ 。

[0058] 实施例四:用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条的样本的重复性

[0059] 根据尿核基质蛋白NMP22免疫荧光试剂条测定方法的检测步骤,用两个浓度水平的样本各重复检测10次,计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出变异系数CV。

[0060]  $CV=SD/M \times 100\%$  ..... 公式(2)

[0061] 式中:

[0062] CV—变异系数;

[0063] SD—10次测量结果的标准差;

[0064] M—10次测量结果的平均值。

[0065] 重复性结果如表1所示,变异系数CV均小于10%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的重复性:

[0066] 表1:试剂盒重复性测定

[0067]

| 样本定值浓度 T<br>(ng/mL) | 平均值 M<br>(ng/mL) | 标准差 SD | 变异系数 CV |
|---------------------|------------------|--------|---------|
| 8.0                 | 8.2              | 0.56   | 6.8%    |
| 16.0                | 16.1             | 0.7    | 4.5%    |

[0068] 实施例五：用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条的样本检测临床应用情况

[0069] 根据尿核基质蛋白NMP22免疫荧光试剂条测定方法的检测步骤，选择了30例膀胱癌病人，20例体检人的尿液样本，进行检测，获得了尿液中NMP22的浓度值，绘制散点图。测定结果图3所示，该试剂盒测定的病人和正常人的血清中NMP22的浓度值，具有明显差异性。

[0070] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出：对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

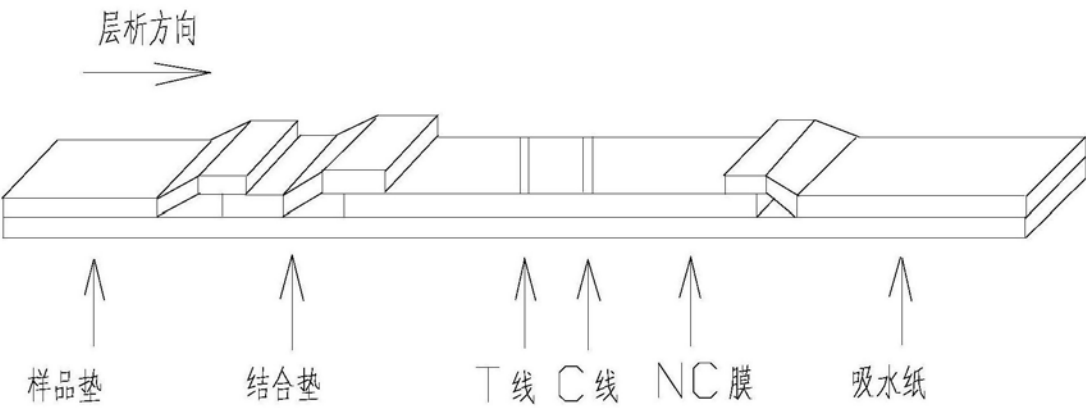


图1

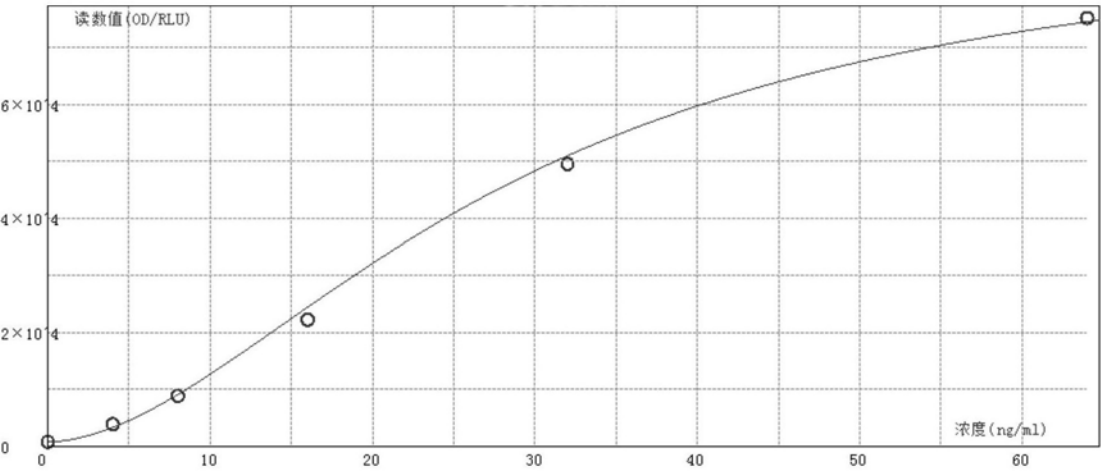


图2

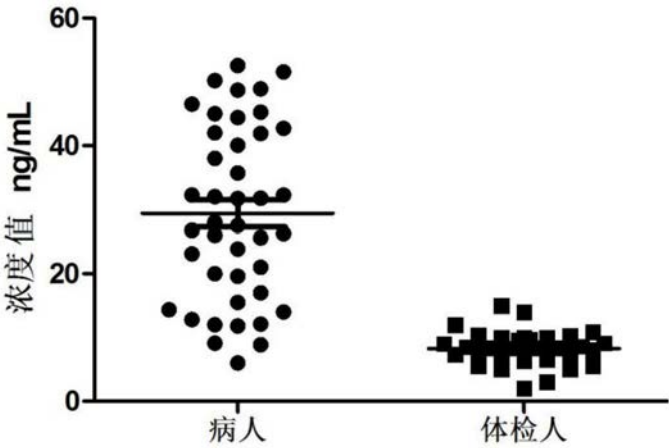


图3

|                |                                                                |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种用于测定尿核基质蛋白免疫荧光试剂条及其制备方法和应用                                   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108732358A</a>                                   | 公开(公告)日 | 2018-11-02 |
| 申请号            | CN201810294033.X                                               | 申请日     | 2018-03-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心                                           |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心                                           |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心                                           |         |            |
| [标]发明人         | 王毅谦<br>陈雷<br>龙云凤<br>蔡正清<br>高玲<br>丁涛<br>姜珊<br>方云涛<br>厉蓉蓉<br>祁专成 |         |            |
| 发明人            | 王毅谦<br>陈雷<br>龙云凤<br>蔡正清<br>高玲<br>丁涛<br>姜珊<br>方云涛<br>厉蓉蓉<br>祁专成 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531                                |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6803 G01N33/531 G01N33/54306                            |         |            |
| 代理人(译)         | 董建林<br>薛海霞                                                     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                 |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种用于测定尿核基质蛋白的免疫荧光试剂条及其制备方法和应用。本发明荧光该试剂条有三个区域，分别为：加样区、结合区、检测区。该试剂条由上而下分别为吸水垫、层析膜、结合垫、样品垫；结合垫上平铺有荧光物质标记的抗NMP22抗体复合物，层析膜上T线上包被有抗核基质蛋白（NMP22）单抗可用于检测尿液中核基质蛋白（NMP22）。与荧光分析仪一起使用可以实现定量检测，操作简单方便。可用于实验室检测，也可用于现场快速检测，检测只需要约10min，操作时间大幅度减少，该试剂盒可用于膀胱癌的早期筛查和复发监测的辅助诊断。

