



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101609096 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200910055141. 2

(22) 申请日 2009. 07. 21

(73) 专利权人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 沈鹤柏 孙红英 方菲 赵露晶

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 季申清

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1492229 A, 2004. 04. 28, 全文.

CN 201196651 Y, 2009. 02. 18, 全文.

CN 101256190 A, 2008. 09. 03, 全文.

CN 1451964 A, 2003. 10. 29, 全文.

CN 101221180 A, 2008. 07. 16, 全文.

EP 1772465 A1, 2007. 04. 11, 全文.

CA 2568252 A1, 2005. 12. 15, 全文.

审查员 杨冀川

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

肺癌标志物检测免疫层析试纸的制备方法

(57) 摘要

本发明属于癌症检测技术,肺癌标志物检测免疫层析试纸及应用。现有技术单一肿瘤标志物的检测无法满足临床早期诊断、鉴别诊断的要求。本发明通过双抗夹心免疫层析技术对血清中的NSE、CEA 进行联合检测,实现肺癌的早期诊断。本发明的制备步骤是:制备胶体金-神经元NSE 和胶体金-癌胚抗原 CEA 抗体复合物;制备双抗体夹心 NSE、CEA 检测试纸条。本发明在肺癌检测中的步骤为:配置系列浓度 CEA 和 NSE 标准品;用正常人血清配制 NSE、CEA 混合抗原溶液;将试纸条的样品垫端分别插入上述浓度系列标准品中观察 NC 膜上 T、C 线颜色的变化。本发明优点是:测试操作简便;灵敏性高;结果准确;提早 4~12 周确定肺癌复发。

CN 101609096 B

1. 一种肺癌标志物检测免疫层析试纸的制备,包括如下步骤:

(1) 制备胶体金—神经元特异性烯醇化酶 NSE 抗体复合物:

a. 将胶体金与 0.1M  $K_2CO_3$  溶液按体积比为 100:1 ~ 3 的比例混合,调节 pH 至 7.0 ~ 10.0,混合均匀;

b. 将 NSE 单克隆抗体按胶体金溶液体积的 1/125 ~ 1/100 加入胶体金溶液中,充分混合,静置 10min;

c. 加入 10% 牛血清白蛋白溶液,使终浓度为 1 ~ 3%,充分混合,静置 10min;

d. 将上述所得的胶体金溶液 8000 ~ 10000rpm 离心 15min;

e. 制备硼酸盐缓冲液:硼酸 0.01M、蔗糖 0.5 ~ 1.0%、牛血清白蛋白 2 ~ 5%、余量为蒸馏水;

f. 吸出上清,沉淀物用硼酸盐缓冲液重新分散至原体积,高速离心分离;

g. 吸出上清,浓缩至原体积的 1/10,4℃ 保存备用;

(2) 制备胶体金—癌胚抗原 CEA 抗体复合物:

a. 将胶体金用 0.1M  $K_2CO_3$  溶液按体积比为 100:1 ~ 3 的比例调节 pH 至 9.0,混合均匀;

b. 将 CEA 单克隆抗体按胶体金溶液体积的 1/100 ~ 1/80 加入胶体金溶液中,充分混合,静置 10min;

c. 加入 10% 牛血清白蛋白溶液,使终浓度为 1 ~ 3%,充分混合,静置 10min;

d. 将上述所得的胶体金溶液于 8000 ~ 10000rpm 下离心 15min;

e. 吸出上清,沉淀物用硼酸盐缓冲液重新分散至原体积,高速离心分离;

f. 吸出上清,浓缩至原体积的 1/10,4℃ 保存备用;

(3) 制备双抗体夹心 NSE、CEA 检测试纸条:

a. 制备样品垫:玻璃纤维素膜剪成 5.0×30.0cm 规格的条带,放入样品垫封闭液中浸泡 30min,37℃ 烘干备用;所述样品垫封闭液的组成为:0.01mol/LPBS, PH=7.4, 1.0 ~ 2.0%BSA, 1.0 ~ 2.0% 蔗糖,0.1 ~ 0.5% 吐温,0.1 ~ 1.0% 聚乙烯基吡咯烷酮;

b. 结合垫的制备:选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料,将其剪成 1.0×30.0cm 规格的条带备用;

c. 硝酸纤维膜的制备:将硝酸纤维膜贴在底板上,用划膜仪在硝酸纤维膜上不同位置分别划上 CEA、NSE 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体,作为检测带和质控带;

d. 免疫层析试纸条的组装:将吸水纸、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上,37℃ 下干燥 1h 后用自动斩切机切成 3cm 宽的试纸条。

## 肺癌标志物检测免疫层析试纸的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于癌症检测技术,具体地说是一种肺癌标志物检测免疫层析试纸及应用。

### 背景技术

[0002] 肺癌是人类最常见、发病率最高、死亡率最高、治疗效果差的恶性肿瘤。因其发病早期无特异性临床症状和表现,待患者有临床表现后再就诊时,大多已属于晚期,临床治疗效果和中位生存期都不令人满意。因此早期发现和诊断肺癌,对肺癌的治疗和预后有着重要的意义。

[0003] 神经元特异性烯醇化酶(NSE)是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶,在肺癌组织中的含量是正常肺组织中的3~35倍;是小细胞肺癌(SCLC)最敏感最特异的肿瘤标志物;同时又是神经母细胞瘤的肿瘤标志物。神经元特异性烯醇化酶(NSE)不仅存在于中枢神经内,还存在于各种末梢神经内分泌细胞和肿瘤细胞内,可用于鉴别诊断、病情监测、疗效评价和复发预报。检测神经元特异性烯醇化酶在肺组织中的含量,监测小细胞肺癌的复发,可以比临床其它方法提早4~12周确定肺癌复发。

[0004] 人类胚胎抗原决定簇的酸性糖蛋白(CEA)是一种非特异性肿瘤标记物,大部分肺癌(CEA)水平升高,(CEA)的水平与疾病预后及治疗效果密切相关。

[0005] 但是单一肿瘤标志物的检测其灵敏度及特异性难以满足临床对早期诊断、鉴别诊断、疗效及预后评估要求。采用联合检测的方法,可以提早4~12周确定肺癌复发。本发明通过双抗夹心免疫层析技术对血清中的(NSE)、(CEA)进行联合检测,从而实现肺癌的早期诊断,具有灵敏性高,特异性强,操作简便等优点,并且进一步拓展了(NSE)、(CEA)联合免疫层析技术在生物医学领域中的应用。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是:提供一种灵敏性高,特异性强,操作简便的肺癌标志物检测免疫层析试纸的制备方法;

[0007] 本发明的另一目的是:提供该肺癌标志物检测免疫层析试纸的使用方法。

[0008] 本发明的目的是这样实现的:

[0009] 肺癌标志物检测免疫层析试纸的制备,包括如下步骤:

[0010] (1) 制备胶体金—神经元特异性烯醇化酶NSE抗体复合物:

[0011] a. 将胶体金与0.1M  $K_2CO_3$ 溶液按体积比为100:1~3的比例混合,调节pH至7.0~10.0,混合均匀;

[0012] b. 将NSE单克隆抗体按胶体金溶液体积的1/125~1/100加入胶体金溶液中,充分混合,静置10min;

[0013] c. 加入10%BSA(牛血清白蛋白)溶液,使终浓度为1~3%,充分混合,静置10min;

- [0014] d. 将上述所得的胶体金溶液 8000 ~ 10000rpm(转/分钟)离心 15min;
- [0015] e. 制备硼酸盐缓冲液:硼酸 0.01M、蔗糖 0.5 ~ 1.0%、BSA(牛血清白蛋白)2 ~ 5%、余量为蒸馏水;
- [0016] f. 吸出上清,沉淀物用硼酸盐缓冲液重新分散至原体积,高速离心分离;
- [0017] G. 吸出上清,浓缩至原体积的 1/10,4℃保存备用;
- [0018] (2) 制备胶体金—癌胚抗原 CEA 抗体复合物:
- [0019] a. 将胶体金用 0.1M  $K_2CO_3$  溶液按体积比为 100 : 1 ~ 3 的比例调节 pH 至 9.0,混合均匀;
- [0020] b. 将 CEA 单克隆抗体按胶体金溶液体积的 1/100 ~ 1/80 加入胶体金溶液中,充分混合,静置 10min;
- [0021] c. 加入 10% BSA(牛血清白蛋白)溶液,使终浓度为 1 ~ 3%,充分混合,静置 10min;
- [0022] d. 将上述所得的胶体金溶液于 8000 ~ 10000rpm(转/分钟)下离心 15min;
- [0023] e. 吸出上清,沉淀物用硼酸盐缓冲液重新分散至原体积,高速离心分离;
- [0024] f. 吸出上清,浓缩至原体积的 1/10,4℃保存备用;
- [0025] (3) 制备双抗体夹心 NSE、CEA 检测试纸条:
- [0026] a. 制备样品垫:玻璃纤维素膜剪成 5.0×30.0cm 规格的条带,放入样品垫封闭液(0.01mol/L PBS(PH = 7.4),1.0 ~ 2.0% BSA,1.0 ~ 2.0%蔗糖,0.1 ~ 0.5%吐温,0.1 ~ 1.0% PVP 聚乙烯基吡咯烷酮)中浸泡 30min,37℃烘干备用;
- [0027] b. 结合垫的制备:选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料,将其剪成 1.0×30.0cm 规格的条带备用;
- [0028] c. NC(硝酸纤维膜)的制备:将 NC 膜贴在底板上,用划膜仪在 NC 膜上不同位置分别划上 CEA、NSE 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体,作为检测带和质控带;
- [0029] d. 免疫层析试纸条的组装:将吸水纸、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上,37℃下干燥 1h 后用自动斩切机切成 3cm 宽的试纸条。
- [0030] 肺癌标志物检测免疫层析试纸在肺癌检测中的应用,包括以下步骤:
- [0031] (1) 将 2.4mg/mL 的 CEA 抗原标准品用正常人血清作为稀释液配置系列浓度标准品:0ng/ml,20ng/ml,50ng/ml,100ng/ml,200ng/ml,300ng/ml,400ng/ml,500ng/ml;
- [0032] (2) 将 0.5mg/mL 的 NSE 抗原标准品用正常人血清作为稀释液配置系列浓度标准品:0ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,15ng/ml,30ng/ml,50ng/ml,100ng/ml,500ng/ml;
- [0033] (3) 用正常人血清配制 NSE、CEA 浓度分别为 0ng/ml、0ng/ml,5ng/ml、20ng/ml,10ng/ml、50ng/ml,15ng/ml、100ng/ml,30ng/ml、200ng/ml,50ng/ml、300ng/ml,100ng/ml、400ng/ml,500ng/ml、500ng/ml 的混合抗原溶液。
- [0034] (4) 将试纸条的样品垫端分别插入上述浓度系列标准品中,观察 NC 膜上 T、C 线颜色的变化。
- [0035] 本发明的要点是:
- [0036] 将肿瘤标志物神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体和非特异性肿瘤标记物酸性糖蛋白(CEA)单克隆抗体加入胶体金溶液,混合、离心分离、吸出上清、浓缩,分别制得胶体金—神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体复合物和胶体金—癌胚抗原(CEA)抗体复合

物;然后将吸水纸、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上,组装免疫层析试纸条。

[0037] 本发明免疫层析试纸条使用方法简单,将样品垫端插入待测样品液 10 分钟内观察结果。如果  $T_1$ (检测带 1) 出现红色条带,说明 (CEA) 呈阳性,如果  $T_2$ (检测带 2) 出现红色条带,说明 (NSE) 呈阳性,如果不显色则呈阴性。

[0038] 本发明可以实现对肺癌的早期诊断,具有灵敏性高,特异性强,操作简便的优点。

[0039] 为了保证本发明免疫层析试纸条的最佳检测效果,在制备抗体前,还需进行以下工作:

[0040] (1) 确定最适标记 pH:

[0041] 用 0.1mol/L 的碳酸钾溶液将胶体金溶液的 pH 值分别调节到 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 各取 200 $\mu$ L 分别加入 4 $\mu$ g(NSE) 单克隆抗体 (L1C00501) 或 (CEA) 单克隆抗体 (L1C00202),混合均匀,室温反应 10 分钟,各管加入 10%氯化钠溶液 40 $\mu$ L,静置 2 小时,观察各管颜色变化。

[0042] (2) 确定最适标记抗体量:

[0043] 将胶体金溶液的 pH 调节到最佳值,在 10 支试管中各加入 200 $\mu$ L 胶体金溶液,分别加入 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、3.4、5、6 $\mu$ g(NSE) 单克隆抗体 (L1C00501) 或 (CEA) 单克隆抗体 (L1C00202),反应 10 分钟后,各管加入 10%氯化钠溶液 40 $\mu$ L,静置 2 小时,观察各管颜色变化。

[0044] 进行胶体金标记抗体和胶体金免疫层析试纸条的组装。

[0045] 将制备好的胶体金溶液用  $K_2CO_3$  溶液调 pH 至最佳值,加入 (NSE) 单抗 (L1C00501) 或 (CEA) 单克隆抗体 (L1C00202),漩涡混合器混匀,反应 10min 后,加入一定量的 BSA(牛血清白蛋白)溶液。将金标复合物进行离心,吸出上清,沉淀物用硼酸盐缓冲液(含 0.5%蔗糖,2% BSA,0.01M 硼酸)重悬至原体积,再高速离心一次,然后浓缩至原体积的 1/10,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0046] 在玻璃纤维膜上分别喷上制备好的两种金标抗体,室温干燥 2h,另外一种与 (NSE) 相配对的鼠抗单克隆抗体 L1C00502 用 0.01M 的 PBS(硫酸缓冲溶液)(pH7.4)稀释至 0.5mg. mL<sup>-1</sup>;与 (CEA) 相配对的另一种鼠抗单克隆抗体 (L1C00201) 用 0.01M 的 PBS(磷酸缓冲溶液)(pH7.4)稀释至 0.2mg. mL<sup>-1</sup>。将两者分别喷于 NC(硝酸纤维)膜上,(CEA) 抗体在下端为  $T_1$ ,NSE(神经元特异性烯醇化酶)抗体在上面为  $T_2$ ,间隔 3mm,室温干燥 2h,在离检测线  $T_2$  3mm 处喷上兔抗鼠二抗为质控线。将 NC 膜、胶金垫、样品垫和吸水纸依次组装在塑料底板上,用切刀切割成 3mm 宽的试纸条。

[0047] 使用本发明肺癌标志物检测免疫层析试纸对样品的检测方法为:

[0048] 将试纸条的样品垫端插入待测样品液 10min 内观察结果。如果  $T_1$  出现红色条带,说明 (CEA) 呈阳性,如果  $T_2$  出现红色条带,说明 (NSE) 呈阳性,如果不显色则呈阴性,如果质控线无条带,说明试纸条无效。

[0049] 当要检测的样品中不含待测物时,样品与金标复合物不反应,层析到 T 线位置时,无法形成夹心,所以 T 线不显色,层析到 C 线时,金标复合物与二抗结合,故 C 线显色,得到阴性结果。

[0050] 当要检测的样品中含一定量以上的待测物时,样品到达金标位置,和金标复合物发生免疫反应,再层析到 T 线位置时,金标复合物上的待测物又会和 T 线上的抗体发生结

合,故 T 线显色, C 线也显色,这样得到阳性结果。

[0051] 本发明的优点是:

[0052] 1、用于鉴别诊断、病情监测、疗效评价和复发预报,测试操作简便;

[0053] 2、灵敏性高,测试结果准确;

[0054] 3、比临床其它方法提早 4 ~ 12 周确定肺癌复发。

[0055] 肺癌是人类发病率高、死亡率高、治疗效果差的恶性肿瘤,早期发现和诊断肺癌,是人们长期努力解决的技术难题,它对于肺癌的治疗和预后有着重要的意义。本发明制备和使用肺癌标志物检测免疫层析试纸,通过双抗夹心免疫层析技术对血清中的 (NSE)、(CEA) 进行联合检测,解决了人们长期渴望解决的单一肿瘤标志物检测灵敏度及特异性无法满足临床早期诊断、鉴别诊断、疗效及预后评估要求的技术难题,因此本发明具有新颖性、创造性和广泛的实用性。

### 具体实施方式

[0056] 下面通过具体实施方式对本发明做进一步说明。

[0057] 实施例 1:

[0058] 制备胶体金—神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 抗体复合物:

[0059] 利用新制备的 40nm 的胶体金与 (NSE) 抗体进行连接,具体实施步骤如下:

[0060] 1. 取 1mL 胶体金溶液,加 10uL 0.1M  $K_2CO_3$  溶液调节 pH 至 9.0,混合均匀。

[0061] 2. 将 8uL (NSE) 单克隆抗体 (L1C00501) 加入胶体金溶液中,在涡旋作用下充分混合,静置 10min。

[0062] 3. 加入 200uL 10% BSA 溶液,充分混合,静置 10min。

[0063] 4. 将上述所得的胶体金溶液在制冷条件下于 10000rpm 下离心 15min。

[0064] 5. 吸出上清,沉淀物用 1mL 硼酸盐缓冲液 (含 0.5 ~ 1.0% 蔗糖,2 ~ 5% BSA, 0.01M 硼酸) 重新分散,再高速离心一次。

[0065] 6. 吸出上清,浓缩至原体积的 1/10,4℃ 保存。

[0066] 实施例 2:

[0067] 制备胶体金—癌胚抗原 (CEA) 抗体复合物:

[0068] 利用新制备的 40nm 的胶体金与 (CEA) 抗体进行连接,具体实施步骤如下:

[0069] 1. 取 1mL 胶体金溶液,加 10uL 0.1M  $K_2CO_3$  溶液调节 pH 至 9.0,混合均匀;

[0070] 2. 将 10uL (CEA) 单克隆抗体 (L1C00202) 加入胶体金溶液中,在涡旋作用下充分混合,静置 10min;

[0071] 3. 加入 200uL 10% BSA (牛血清白蛋白) 溶液,充分混合,静置 10min;

[0072] 4. 将上述所得的胶体金溶液在制冷条件下于 10000rpm 下离心 15min;

[0073] 5. 吸出上清,沉淀物用 1mL 硼酸盐缓冲液 (含 0.5 ~ 1.0% 蔗糖,2 ~ 5% BSA, 0.01M 硼酸) 重新分散,再高速离心一次;

[0074] 6. 吸出上清,浓缩至原体积的 1/10,4℃ 保存。

[0075] 实施例 3:

[0076] 制备双抗体夹心 (NSE)、(CEA) 检测试纸条:

[0077] 1. 样品垫的制备:选用玻璃纤维素膜作为样品垫材料,剪成 5.0×30.0cm 规格的

条带,将其放入样品垫封闭液 0.01mol/L PBS(磷酸缓冲溶液)(PH = 7.4), 1.0 ~ 2.0% BSA(牛血清白蛋白);2.0 ~ 2.0%蔗糖,0.1 ~ 0.5%吐温,0.1 ~ 1.0% PVP(聚乙烯基吡咯烷酮)中浸泡 30min,37℃烘干备用。

[0078] 2. 结合垫的制备:选用玻璃纤维素膜作为结合垫,将其剪成 1.0×30.0 厘米规格的条带备用。

[0079] 3. NC(硝酸纤维膜)的制备:将 NC 膜贴在底板上,用划膜仪在 NC 膜上不同位置分别划上(CEA)、(NSE)单抗和羊抗鼠 IgG 抗体,作为检测带和质控带。

[0080] 4. 免疫层析试纸条的组装:将吸水纸、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上,37℃下干燥 1h 后用自动斩切机切成 3cm 宽的试纸条。

[0081] 实施例 4:

[0082] 联合检测(CEA)、(NSE)抗原:

[0083] 1. 将 2.4mg/mL 的(CEA)抗原标准品用正常人血清作为稀释液配置系列浓度标准品:0ng/ml,20ng/ml,50ng/ml,100ng/ml,200ng/ml,300ng/ml,400ng/ml,500ng/ml。

[0084] 2. 将 0.5mg/mL 的(NSE)抗原标准品用正常人血清作为稀释液配置系列浓度标准品:0ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,15ng/ml,30ng/ml,50ng/ml,100ng/ml,500ng/ml。

[0085] 3. 用正常人血清配制(NSE)、(CEA)浓度分别为 0ng/ml、0ng/ml,5ng/ml、20ng/ml,10ng/ml、50ng/ml,15ng/ml、100ng/ml,30ng/ml、200ng/ml,50ng/ml、300ng/ml,100ng/ml、400ng/ml,500ng/ml、500ng/ml 的混合抗原溶液。

[0086] 4. 将试纸条的样品垫端分别插入上述浓度系列标准品中,观察 NC 膜上 T、C 线颜色的变化。

[0087] 以上所述仅本发明的实施例,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、改进等,均应包括在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	肺癌标志物检测免疫层析试纸的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101609096B</a>	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	CN200910055141.2	申请日	2009-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	沈鹤柏 孙红英 方菲 赵露晶		
发明人	沈鹤柏 孙红英 方菲 赵露晶		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/532		
其他公开文献	CN101609096A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于癌症检测技术，肺癌标志物检测免疫层析试纸及应用。现有技术单一肿瘤标志物的检测无法满足临床早期诊断、鉴别诊断的要求。本发明通过双抗夹心免疫层析技术对血清中的NSE、CEA进行联合检测，实现肺癌的早期诊断。本发明的制备步骤是：制备胶体金—神经元NSE和胶体金—癌胚抗原CEA抗体复合物；制备双抗体夹心NSE、CEA检测试纸条。本发明在肺癌检测中的步骤为：配置系列浓度CEA和NSE标准品；用正常人血清配制NSE、CEA混合抗原溶液；将试纸条的样品垫端分别插入上述浓度系列标准品中观察NC膜上T、C线颜色的变化。本发明优点是：测试操作简便；灵敏性高；结果准确；提早4~12周确定肺癌复发。