

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810033198.8

[51] Int. Cl.
G01N 33/72 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月6日

[11] 公开号 CN 101236210A

[22] 申请日 2008.1.29

[21] 申请号 200810033198.8

[71] 申请人 王学生

地址 200050 上海市长宁区愚园路 1060 弄 9
号 401 室

共同申请人 冯 吉

[72] 发明人 王学生 冯 吉

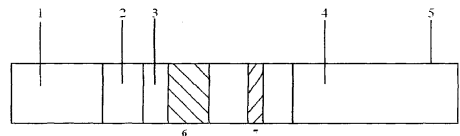
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

[54] 发明名称

快速联检血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物和大便潜血试剂

[57] 摘要

一种快速、联合检测大便中血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物和大便潜血试剂，是应用免疫学原理和胶体金免疫层析技术，主要由免疫试条和塑料件组成。本发明方法简单，操作方便，性能稳定，结果准确，在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化道出血症状的肿瘤早期诊断和鉴别有较大参考意义，由于它快速、简便、准确性高的特点适合临床医检和家庭的自检，同时为普查此类疾病提供手段，也为医疗条件落后地方诊断此类疾病提供了手段。



1. 快速联检大便中血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血诊断试剂，其特征是联合型、二合一型或血红蛋白-结合珠蛋白复合物单独型试剂，应用免疫学原理和胶体金或乳胶免疫层析技术，检测人粪便中的血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血，从而早期诊断直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤。
2. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，使用高度特异性的抗人血红蛋白单克隆抗体和抗人结合珠蛋白抗体。
3. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，试剂由样品处理垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和粘性底板组成。
4. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，样品处理垫缓冲液的组成。
5. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，胶体金结合垫附着有经过血红蛋白单克隆抗体标记的胶体金颗粒。
6. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，联合型的硝酸纤维素膜的检测线处分别包被有抗人结合珠蛋白抗体和抗人血红蛋白单克隆抗体，控制线处包被有羊抗鼠 IgG；二合一型的硝酸纤维素膜的检测线处同时包被有抗人结合珠蛋白抗体和抗人血红蛋白单克隆抗体，控制线处包被有羊抗鼠 IgG。
7. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，吸水垫吸收通过硝酸纤维素膜的样品，保证反应持续进行。
8. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，粘性底板起支撑作用，样品处理垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在粘性底板上。
9. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，联合型和血红蛋白-结合珠蛋白复合物单独型试剂，增加塑料外壳则试剂的外部形态为有加样孔方便加样，反应观察窗标有检测线（T）和控制线（C）；二合一试剂增加塑料外壳则试剂的外部形态为有加样孔，反应观察窗标有检测线 Hb、Hb-Hp 和控制线（C）。
10. 如权利要求 1 所述试剂，其特征是，试剂不加塑料外壳则试剂的外部形态为试剂条，使用时直接将样品处理垫的一端插入有样品液的容器中进行测试。

快速联检血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血试剂

所属技术领域

本发明是医用诊断试剂，应用免疫学原理，通过检测人粪便中的血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血，发现下消化道出血症状，早期诊断直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤。

背景技术

粪便中的血红蛋白(Hb, Hemoglobin)又叫大便潜血 (Fecal Occult Blood, FOB)，目前在临床被看作是直肠癌、结肠癌的肿瘤标志物之一。血红蛋白容易与结合珠蛋白 (Hp, Haptoglobin, 又译为触珠蛋白、珠球蛋白) 结合形成稳定不可逆的复合物——血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp Complex)。

检验大便潜血大致可分为化学检测法 (Guaiac test) 及免疫检测法。化学法较烦琐且整个过程患者很受罪，目前普遍采用免疫检测法，即通过抗人血红素球蛋白特异性抗体采用免疫夹心来检测人类血红素球蛋白，此法因系针对人类血红素球蛋白反应，故特异性高。但潜血反应测的是有无潜血，而不是有无有肿瘤标志，潜血反应呈阳性必须用其它方法确认，例肠镜等，这是因为可能由其它因素引起的偶尔出血阳性，同样潜血反应阴性也有可能是假阴性，这是由于早期肿瘤少量出血和便中结合珠蛋白形成复合物，而这种复合物抗血红蛋白抗体不能对之识别，检测结果呈阴性。日本的目黑高志(Takashi Meguro, 北海道医誌69(4), 1994)对48例结肠癌或直肠癌患者的粪便，用放射免疫法检测其血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 及血红蛋白 (Hb)，结果阳性分别为44例及35例，这里至少有9例便潜血者为假阴性，也就是说测定大便潜血诊断直肠癌或结肠癌的阳性符合率仅在70%左右，而测定血红蛋白-结合珠蛋白的复合物对直肠癌或结肠癌的阳性符合率在90%以上，造成测定大便潜血对直肠癌或结肠癌20%—30%假阴性主要原因：由消化道少量出血，释出的血红蛋白 (Hb) 在经过较长的肠道时与粪便内的Hp结合成复合物引起潜血假阴性，显然检粪便中的血红蛋白来诊断是否患直肠癌或结肠癌的肿瘤标志物有严重漏检。

本发明针对这些缺陷采用免疫层析胶体金技术，快速、简便同时检测大便中的血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 和大便潜血的人血红蛋白 (Hb) 可以消除上述弊端，准确发现消化道癌变引起的少量出血，提高早期直肠癌或结肠癌诊断准确率，也为早期诊断此病提供快速、简便的手段和及时治疗。

发明内容

大便中血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血诊断试剂，主要由二种形式。一种形式是由二根试条分别检测血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 和血红蛋白 (Hb) 组成的试剂称联合型试剂，另一种形式由一根试条同时检测血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 和血红蛋白 (Hb) 组成的试剂称二合一型试剂。

试剂的检测原理是免疫学原理，即采用相应的抗原抗体反应，并通过胶体金免疫层析技术实现此反应过程，达到检测目的。

本发明的试剂结构及工作原理：联合型的二根试条组成，其中一试条包含一对抗人血红蛋白抗体 (anti-Hb)，anti-Hb1 抗体标记在胶体金上并包被在胶体金结合垫上，anti-Hb2 抗体被包被并固定在硝酸纤维素 (NC) 膜的检测区的检测线 (T 线) 上，另一根试条含抗人血红蛋白抗体 (anti-Hb) 和抗人结合珠蛋白抗体 (anti-Hp)，anti-Hb 抗体标记在胶体金上并包被在胶体金结合垫上，anti-Hp 抗体被包被并固定在硝酸纤维素 (NC) 膜的检测区的检测线 (T 线) 上，二根试条分别组成在粘性底板上，始端有供加样用的样品处理垫，末端有供助层析用的吸水垫，并镶嵌入塑卡中组成联合型试剂；二合一型试条包含一对抗人血红蛋白抗体 (anti-Hb) 和抗人结合珠蛋白抗体 (anti-Hp)，其中 anti-Hb1 抗体标记在胶体金上并包被在胶体金结合垫上，另一个 anti-Hb2 抗体和 anti-Hp 抗体分别被包被并固定在同一硝酸纤维素 (NC) 膜的检测区的检测线 (T 线) 不同位置上，试条组成在粘性底板上，始端有供加样用的样品处理垫，末端有供助层析用的吸水垫，并镶嵌入塑卡中组成二合一型试剂。当被测样品加样到加样样品处理垫上，通过层析使包被在胶体金结合垫上金标记的 Hb1 抗体复溶，同时样本中的血红蛋白 (Hb) 或血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 抗原就与金标记的 Hb1 抗体结合形成相应的复合物(anti-Hb1...Hb 或 anti-Hb1...Hb-Hp)，这种复合物通过毛细作用沿 NC 膜向前移动，再与固定在测试区的 T 线上的 Hb2 或 Hp 抗体结合形成夹心物(anti-Hb1...Hb...anti-Hb2 或 anti-Hb1...Hb-Hp...anti-Hp)，在测试区 (T) 内会出现一条紫红色条带。显而易见，色带深浅和样品中相应抗原浓度有关，抗原浓度越高，T 线显色越深。反之，如相应的抗原浓度为 0，带有金标记抗体和 T 线抗体不可能结合，此时测试区 (T) 内没有任何线出现，这种由二种抗体同时和相应抗原结合的方法称双抗体夹心法。为了证明试剂有效性和易判读，分别在质控区 (C) 包被羊抗鼠二抗 IgG 为质控线，所以不管结果怎样质控线 C 始终出现。

应用发明试剂能快速检测人粪便中的血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血，由于血红蛋白-结合珠蛋白复合物及大便潜血和直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤相关性大于 90%，所以

本发明为诊断早期直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤提供新的方法。

本诊断试剂的特点：快速简便、不需要任何仪器设备，又由于采用特异性抗体的免疫反应所以准确性高。检测结果大便潜血和血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp）都是阳性或血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp）阳性者，则高度怀疑是下消化道出血，很可能患直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤，建议进一步诊断加以确认，例肠镜；如果血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp）阴性而血红蛋白（Hb）阳性可能由突发性炎症引起的；大便潜血和血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp）都是阴性者，说明下消化道没有出血。

试剂灵敏度可调在临床意义范围中。例血红蛋白（Hb） 100ng/ml，血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp） 25ng/ml 是有临床意义的值。

附图说明

附图 1 是本发明二合一型试剂的结构示意图。

图中 1.样品处理垫，2.胶体金结合垫，3.硝酸纤维素膜，4.吸水垫，5.粘性底板，6.检测区（检测线 T），7.控制区（控制线 C）。

附图 2 是本发明联合型试剂的结构示意图。

图中 1.样品处理垫，2.胶体金结合垫，3.硝酸纤维素膜，4.吸水垫，5.粘性底板，6.检测区（检测线 T），7.控制区（控制线 C）。

附图 3 是本发明联合型试剂增加塑料外壳的外部形态示意图。

图中“T”是检测线的位置和“C”是控制线的位置，左边是检测大便潜血（Hb）的，右边是检测血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp）的。

附图 4 是本发明二合一试剂增加塑料外壳的外部形态示意图。

图中“C”是控制线的位置，“Hb-Hp”是血红蛋白-结合珠蛋白复合物检测线的位置，“Hb”是大便潜血检测线的位置。

附图 5 是本发明的联合型试剂的阳性结果示意图。

图中 1. 血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血均是阳性，2. 大便潜血是阴性、血红蛋白-结合珠蛋白复合物是阳性，3. 大便潜血是阳性、血红蛋白-结合珠蛋白复合物是阴性。

附图 6 是本发明的二合一型试剂的阳性结果示意图。

图中 1. 血红蛋白-结合珠蛋白复合物和大便潜血均是阳性, 2. 大便潜血是阳性、血红蛋白-结合珠蛋白复合物是阴性, 3. 大便潜血是阴性、血红蛋白-结合珠蛋白复合物是阳性。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明做进一步说明。

1. 样品垫处理：按下表配方（按百分比计算）配制，均匀铺在样品处理垫上并维持在 37℃，相对湿度小于 20%干燥。

名称	含量
胆酸钠	0.1%-0.7%
S17	0.05%-1%
硼酸钠(pH9.0)缓冲液	0.01mmol/l -0.03mmol/l

2. 包被金标记抗体胶体金结合垫：100ml 0.01% 氯金酸溶液，加热煮沸加入 3ml 1%柠檬酸三钠溶液煮沸 5min，得胶体金液。取上述冷至室温的胶体金液 100 ml，加 10ml 0.1mol/l 硼酸缓冲液，滴加完毕后搅拌下加入 1-2mg Hb1 的抗体，继续搅拌 5min，再加入 2ml 10%的牛血清蛋白（BSA），4℃离心，去上清，用 1%BSA 0.01mol/l pH7.0 的磷酸钠(PB)缓冲液稀释悬浮物并均匀包被上胶体金结合垫，包被好的胶体金结合垫在 37℃，相对湿度小于 20%干燥室干燥过夜。

3. 联合型试条 T 线和 C 线：在硝酸纤维素膜上检测线处分别包被 1.0mg/ml 的 Hp 抗体或包被 1.0mg/ml 的 Hb2 单克隆抗体，控制线处包被 1.0mg/ml 的羊抗鼠 IgG。二合一型试条同时在硝酸纤维素膜上检测线处包被 1.0mg/ml 的 Hp 抗体和包被 1.0mg/ml 的 Hb2 单克隆抗体，以及控制线处包被 1.0mg/ml 的羊抗鼠 IgG。包被好的膜在 37℃，相对湿度小于 20%干燥室干燥过夜。

4. 粘性底板依次粘贴包被好的硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品处理垫和吸水垫。

5. 联合型试剂：将粘贴好相应的试条镶嵌入塑卡中，试条的样品处理垫对着加样孔，塑料外壳则试剂的外部形态为有加样孔方便加样，反应观察窗标有检测线（T）和控制线（C）位置，和相应试条名称。二合一试剂：试条镶嵌入要求和联合型一样，塑料外壳有试剂的外部形态有加样孔，反应观察窗标有检测血红蛋白（Hb）和血红蛋白-结合珠蛋白复合物（Hb-Hp）线以及控制线（C）的位置。

6. 结果判断

6.1 联合型试剂

6.1.1 大便潜血 (Hb) 试条窗口 T 和 C 处都出线, 即出现二条线, 说明样本中血红蛋白 (Hb) 浓度 100ng/ml 以上; 血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 试条窗口也出现二条线, 说明样本中血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 浓度 25ng/ml 以上, 此时两者都是阳性;

6.1.2 大便潜血 (Hb) 试条窗口 T 和 C 处出现二条线, 说明样本中血红蛋白 (Hb) 浓度 100ng/ml 以上; 血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 试条窗口仅在 C 处出现一条线, 说明样本中血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 浓度 25ng/ml 以下, 此时样本血红蛋白 (Hb) 为阳性, 血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 为阴性;

6.1.3 大便潜血 (Hb) 试条窗口仅在 C 处出现一条线, 说明样本中血红蛋白 (Hb) 浓度 100ng/ml 以下; 血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 试条窗口 T 和 C 处出现二条线, 说明样本中血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 浓度 25ng/ml 以上, 此时样本血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 为阳性, 血红蛋白 (Hb) 为阴性;

6.1.4 大便潜血 (Hb) 试条窗口仅在 C 处出现一条线, 血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 试条窗口也仅在 C 处出现一条线, 说明样本中血红蛋白 (Hb) 和血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 浓度都低于规定值, 此时样本中血红蛋白 (Hb) 和血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 都为阴性。

6.2 二合一型试剂

判断和联合型一样, 结果从名称位置判读得出。

7. 此试剂的特点: 快速准确, 操作方便, 性能稳定, 不需任何专业仪器设备, 适合医院的临检也适合家庭的自检。由于此试剂在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化肿瘤的早期诊断和鉴别有较大参考意义, 加上它快速、简便、准确性高的特点为普查此类疾病和为医疗条件落后地方诊断此类疾病提供手段。

根据本发明的公开内容, 本领域的熟练技术人员无须过多实验即可对本发明所要求保护的进行实施, 并达到预期效果。本发明公开的实施例仅是对本发明进行详细描述, 但并不是构成对本发明的限制。本领域的熟练技术人员用相似替代物或改造, 例用乳胶标记抗体代替胶体金标记抗体, 或用某些在理化上相似的试剂替代在此描述的试剂, 对本发明的有关内容进行变动, 但不超出本发明的精神、范围和思想, 均落入本发明要求保护的范围内。

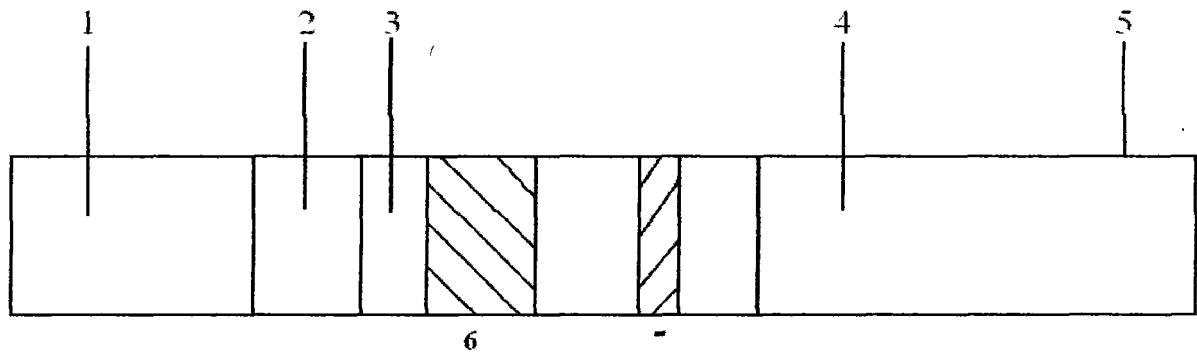


图1

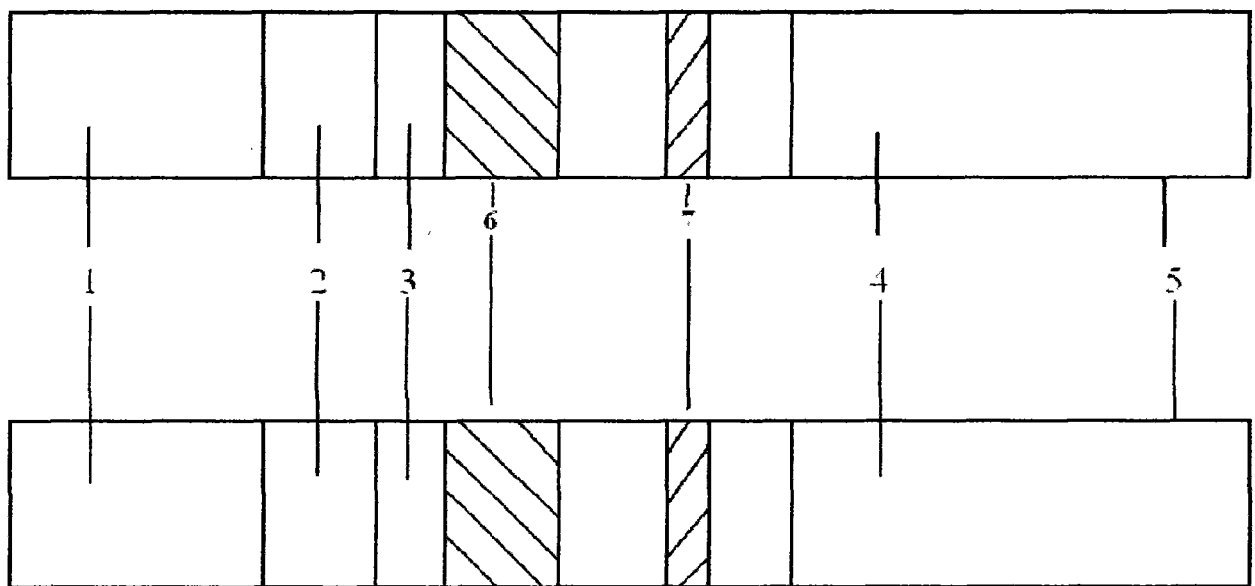


图2

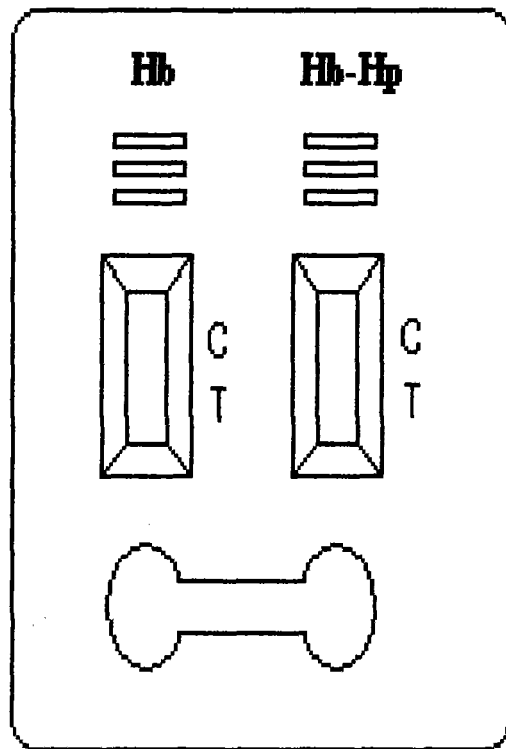


图 3

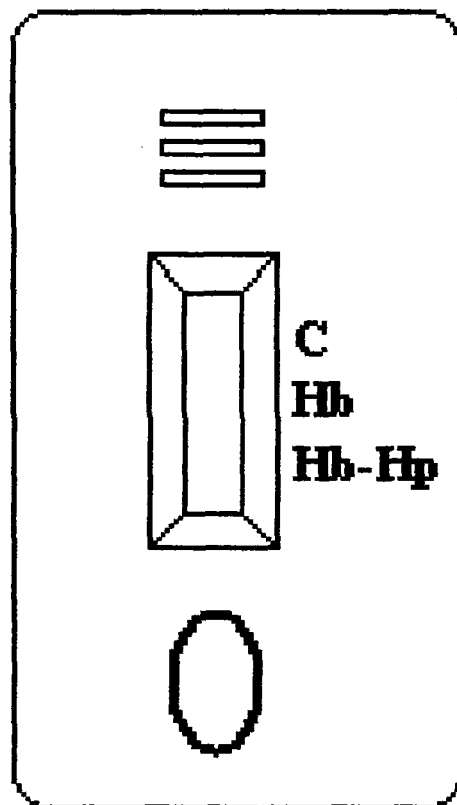


图 4

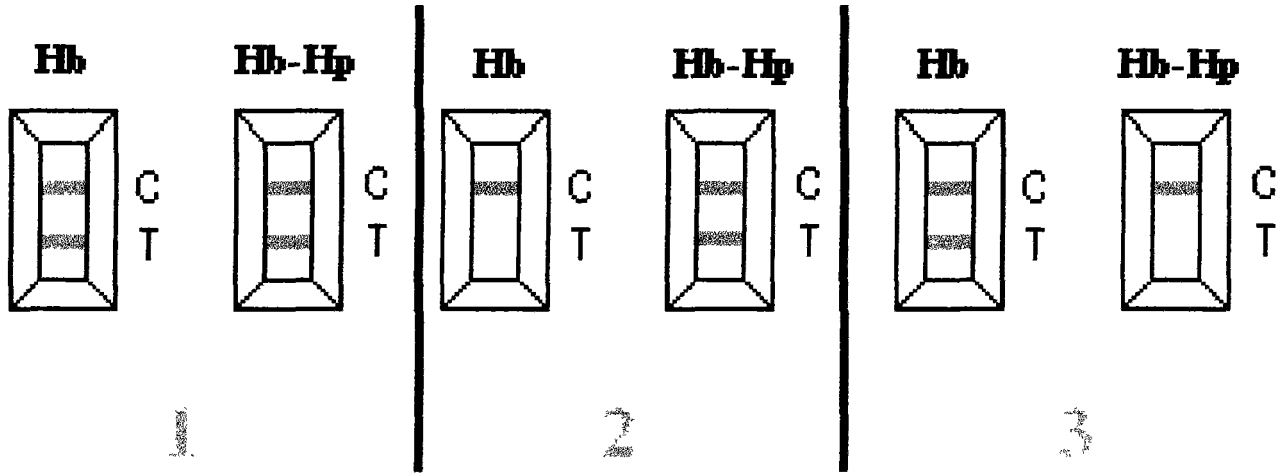


图 5

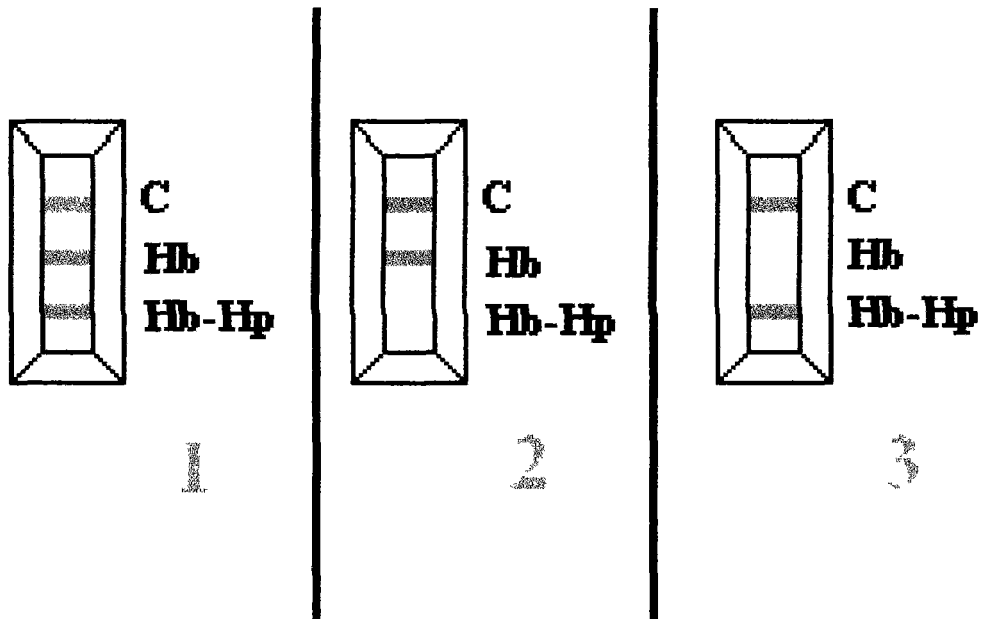


图 6

专利名称(译)	快速联检血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物和大便潜血试剂		
公开(公告)号	CN101236210A	公开(公告)日	2008-08-06
申请号	CN200810033198.8	申请日	2008-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	王学生 冯吉		
申请(专利权)人(译)	王学生 冯吉		
当前申请(专利权)人(译)	王学生 冯吉		
[标]发明人	王学生 冯吉		
发明人	王学生 冯吉		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/53 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速、联合检测大便中血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物和大便潜血试剂，是应用免疫学原理和胶体金免疫层析技术，主要由免疫试条和塑料件组成。本发明方法简单，操作方便，性能稳定，结果准确，在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化道出血症状的肿瘤早期诊断和鉴别有较大参考意义，由于它快速、简便、准确性高的特点适合临床医检和家庭的自检，同时为普查此类疾病提供手段，也为医疗条件落后地方诊断此类疾病提供了手段。

