



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106950373 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710194642.3

(22)申请日 2017.03.29

(71)申请人 杭州博拓生物科技股份有限公司
地址 311121 浙江省杭州市余杭区中泰街
道富泰路17号

(72)发明人 孙越 顾晓燕 叶春生

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350
代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

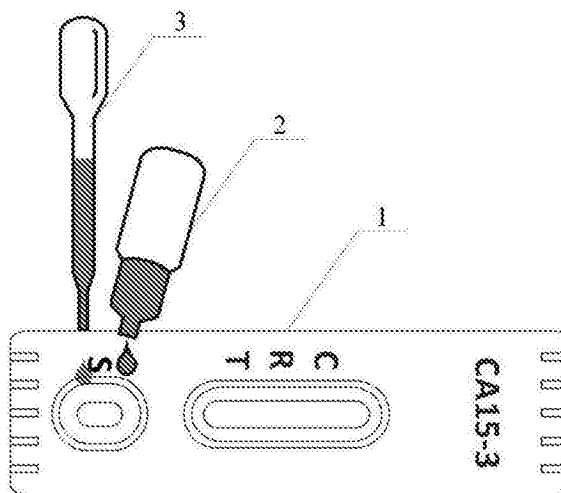
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种CA15-3半定量检测试剂盒及制备工艺

(57)摘要

本发明涉及一种CA15-3半定量检测试剂盒,其包被膜上包被有羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG和CA15-3单克隆抗体2,从靠近吸水垫的一端到靠近标记垫的一端依次为质控线、参照线和检测线,其标记垫上包被有CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG;本发明还涉及上述试剂盒制备工艺,采用双抗夹心法免疫层析诊断技术,包括包被膜的制备、标记垫的制备、样品垫的制备、试纸条的组装及切割、缓冲液的配制。本发明产品可半定量检测出全血、血清及血浆中CA15-3的含量,敏感性和特异性好,检测结果可靠稳定,适用于单人份使用,操作简单、反应快速。



1. 一种CA15-3半定量检测试剂盒,包括检测板、缓冲液和吸管三个部分,所述检测板包括试纸条和塑料模具,所述试纸条是在塑料模具底板依次粘贴包被膜、吸水垫、标记垫、样品垫组装而成,其特征在于,所述包被膜上包被有羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG和CA15-3单克隆抗体2,从靠近吸水垫的一端到靠近标记垫的一端依次为质控线、参照线和检测线;所述标记垫上包被有CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG。

2. 一种权利要求1所述的CA15-3半定量检测试剂盒的制备工艺,其特征在于,采用双抗夹心法免疫层析诊断技术,包括以下步骤:

(1) 包被膜的制备:配制0.015M, pH 7.4±0.1的磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液;用包被缓冲液将CA15-3单克隆抗体2稀释至0.5mg/ml,羊抗兔IgG稀释至0.1mg/ml,羊抗鼠IgG稀释至1.0mg/ml,使用连续点膜机以1.0μl/ml的喷量将其以5mm的间隔均匀喷印于硝酸纤维素膜上,将其烘置于37℃烘箱内烘干,然后加入干燥剂,铝箔袋内封存备用;

(2) 标记垫的制备:利用柠檬酸钠还原氯金酸分别制备粒径为20~40nm的CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG的胶体金溶液,将制备好的胶体金溶液稀释至OD=30,利用划膜喷金标机以2.0μl/ml的喷量将其以8mm的间隔均匀喷印于聚酯纤维素膜上,将其烘置于37℃烘箱内烘干,然后加入干燥剂铝箔袋封存备用;

(3) 样品垫的制备:配制含有1-1.5%三羟甲基氨基甲烷、0.05-1%聚乙烯吡咯烷酮、0.05-1%表面活性剂S9、1-5%鼠抗人红细胞单克隆抗体以及0.05-0.1%酪蛋白的pH为8.0±0.5的纯化水溶液作为样品垫处理液;将样品处理液均匀喷洒在样品垫上,取出后37℃烘箱内烘干;

(4) 试纸条的组装及切割:将塑料底板、包被膜、吸水垫、标记垫和样品垫按顺序依次粘贴后,用切条机将其切成试纸条,装入模具中;

(5) 缓冲液的配制:配制含有0.01-0.1M磷酸氢二钠及0.01-0.2M氯化钠,pH为7.4±0.1的纯化水溶液。

3. 根据权利要求2所述的CA15-3半定量检测试剂盒的制备工艺,其特征在于,所述制备工艺步骤(1)中的硝酸纤维素膜的尺寸为25mm×310mm。

4. 根据权利要求2所述的CA15-3半定量检测试剂盒的制备工艺,其特征在于,所述制备工艺步骤(2)中的聚酯纤维素膜的尺寸为10mm×310mm。

一种CA15-3半定量检测试剂盒及制备工艺

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,涉及一种CA15-3半定量检测试剂盒及制备工艺。

背景技术

[0002] 肿瘤相关抗原CA15-3是位于细胞膜上的一种分子量较大的粘液样糖蛋白,为MUC1基因的产物,其最初由两种单克隆抗体所识别,分别是人乳脂肪球膜上糖蛋白MAM-6制成的抗体(115-DB)和肝转移乳腺癌细胞膜制成的抗体(DF-3)。乳腺癌患者常有CA15-3升高,初期敏感性较低,但CA15-3在反映乳腺癌转移方面有较好的敏感性和特异性。除此之外,CA15-3检测比临床症状的出现及影像学检查(如B超、X线或CT等)检出复发和转移的时间要早数月。因此CA15-3可用于作为乳腺癌辅助诊断指标,也是用于术后随访,动态追踪、疗效判定、检测肿瘤复发,转移的重要指标,一般参考值范围<30IU/mL。

[0003] 临床检测CA15-3的方法有放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(ELISA)、化学发光免疫分析(CLIA)和电化学发光免疫分析(ECLA)等。放射免疫分析方法是临床比较常用的方法,但存在操作繁琐,耗时长,且容易产生环境污染,并对操作者产生危害等缺点,现已基本退出市场。目前应用较多的为酶联免疫检测技术和化学发光技术,这两种方法原理相似,且已实现自动化、大批量、定量检测,但是存在方法间结果差异大,同时,自动化检测目前由国外大厂商所垄断,仪器设备昂贵,并且不适合单人份和较小批量检测用,大大限制了其在基层医院、诊所的应用。

[0004] 免疫胶体金技术是20世纪70年代初期由Faull和Taylors始创,最初用于免疫电镜技术。胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物,应用于抗原抗体特异性反应的一种新型免疫标记技术,现已成功用于流式细胞仪、免疫印迹、体外诊断制剂的制造等领域。目前金标记技术常与膜载体配合,形成特定的免疫检测方式,免疫层析试纸条就是此技术用于体外快速诊断的一个重要发展方向,近年来该技术发展迅速,已经在临床诊断特别是床边检测(POCT)中得到了广泛应用。

[0005] 将免疫胶体金技术应用于临床检测CA15-3,与传统的ELISA技术相比,既保留了ELISA技术的敏感性和特异性,又保证了检测结果的可靠性及稳定性,适用于单人份使用,具有操作简便、反应快速、无需任何仪器设备、结果判断直观可靠、经济实用、适合现场检测等优点。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种应用免疫胶体金技术、双抗夹心法原理制备的CA15-3半定量检测试剂盒及其制备工艺,敏感性和特异性好,检测结果可靠稳定,适用于单人份使用,操作简单、反应快速。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供的一种CA15-3半定量检测试剂盒,包括检测板、缓冲液和吸管三个部分,所述检测板包括试纸条和塑料模具,所述试纸条是在塑料模具底板依次粘贴包被膜、吸水垫、标记垫、样品垫组装而成,所述包被膜上包被有羊抗鼠IgG、羊

抗兔IgG和CA15-3单克隆抗体2,从靠近吸水垫的一端到靠近标记垫的一端依次为质控线、参照线和检测线;所述标记垫上包被有CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG。

[0008] 所述的CA15-3半定量检测试剂盒的制备工艺,采用双抗夹心法免疫层析诊断技术,包括以下步骤:

[0009] (1)包被膜的制备:配制0.015M,pH 7.4±0.1的磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液;用包被缓冲液将CA15-3单克隆抗体2稀释至0.5mg/ml,羊抗兔IgG稀释至0.1mg/ml,羊抗鼠IgG稀释至1.0mg/ml,使用连续点膜机以1.0μl/ml的喷量将其以5mm的间隔均匀喷印于硝酸纤维素膜上,将其烘置于37℃烘箱内烘干,然后加入干燥剂,铝箔袋内封存备用;

[0010] (2)标记垫的制备:利用柠檬酸钠还原氯金酸分别制备粒径为20~40nm的CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG的胶体金溶液,将制备好的胶体金溶液稀释至OD=30,利用划膜喷金标机以2.0μl/ml的喷量将其以8mm的间隔均匀喷印于聚酯纤维素膜上,将其烘置于37℃烘箱内烘干,然后加入干燥剂铝箔袋封存备用;

[0011] (3)样品垫的制备:配制含有1-1.5%三羟甲基氨基甲烷、0.05-1%聚乙烯吡咯烷酮、0.05-1%表面活性剂S9、1-5%鼠抗人红细胞单克隆抗体以及0.05-0.1%酪蛋白的pH为8.0±0.5的纯化水溶液作为样品垫处理液;将样品处理液均匀喷洒在样品垫上,取出后37℃烘箱内烘干;

[0012] (4)试纸条的组装及切割:将塑料底板、包被膜、吸水垫、标记垫和样品垫按顺序依次粘贴后,用切条机将其切成试纸条,装入模具中;

[0013] (5)缓冲液的配制:配制含有0.01-0.1M磷酸氢二钠及0.01-0.2M氯化钠,pH为7.4±0.1的纯化水溶液。

[0014] 优选地,所述制备工艺步骤(1)中的硝酸纤维素膜的尺寸为25mm×310mm。

[0015] 优选地,所述制备工艺步骤(2)中的聚酯纤维素膜的尺寸为10mm×310mm。

[0016] 本发明可半定量检测出全血、血清及血浆中CA15-3的含量,对于已确诊乳腺癌患者进行疾病动态检测,以辅助判断疾病进程或治疗效果有着积极的意义。与传统的ELISA技术相比,本发明操作更加简单,同时保留了ELISA技术的敏感性和特异性,检测结果的可靠性及稳定性。除此之外,本发明容易被基层掌握并大面积推广,能广泛应用于医院、诊所、防疫站等大批量使用单位或单人份使用,具有操作简便、反应快速、无需任何仪器设备、结果判断直观可靠、经济实用、适合现场检测等优点。

附图说明

[0017] 下面结合附图和实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0018] 图1为CA15-3半定量检测试剂盒的结构示意图。

[0019] 图2为CA15-3半定量检测试剂盒的检测板的结构示意图。

[0020] 图3为CA15-3半定量检测试剂盒检测时加样及检测结果示意图。

具体实施方式

[0021] 如图1所示,CA15-3半定量检测试剂盒,包括检测板1、缓冲液2和吸管3三个部分;如图2所示,所述检测板1包括试纸条和塑料模具4,所述试纸条是在塑料模具底板依次粘贴包被膜5、吸水垫6、标记垫7、样品垫8组装而成,所述包被膜5上包被有羊抗鼠IgG、羊抗兔

IgG和CA15-3单克隆抗体2,从靠近吸水垫6的一端到靠近标记垫的一端依次为质控线(C)9、参照线(R)10和检测线(T)11;所述标记垫7上包被有CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG。

[0022] 实施例1

[0023] 一、CA15-3半定量检测试剂盒的制备工艺步骤:

[0024] (1) 包被膜5的制备:配制0.015M,pH 7.3的磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液;用包被缓冲液将CA15-3单克隆抗体2稀释至0.5mg/ml,羊抗兔IgG稀释至0.1mg/ml,羊抗鼠IgG稀释至1.0mg/ml,使用连续点膜机以1.0 μ l/ml的喷量将其以5mm的间隔均匀喷印于硝酸纤维素膜上(膜尺寸为25mm \times 310mm),将其烘置于37 $^{\circ}$ C烘箱内烘干14小时,然后加入干燥剂,铝箔袋内封存备用;

[0025] (2) 标记垫7的制备:利用柠檬酸钠还原氯金酸分别制备粒径为20nm的CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG的胶体金溶液,将制备好的胶体金溶液稀释至OD=30,利用划膜喷金标机以2.0 μ l/ml的喷量将其以8mm的间隔均匀喷印于聚酯纤维素膜上(膜尺寸为25mm \times 310mm),将其烘置于37 $^{\circ}$ C烘箱内烘干14小时,然后加入干燥剂铝箔袋封存备用;

[0026] (3) 样品垫8的制备:配制含有1%三羟甲基氨基甲烷、0.05%聚乙烯吡咯烷酮、0.05%表面活性剂S9、1%鼠抗人红细胞单克隆抗体以及0.05%酪蛋白的pH为7.5的纯化水溶液作为样品垫处理液;用注射器将样品处理液均匀喷洒在1.7cm宽度的样品垫上,取出后将其烘置于37 $^{\circ}$ C烘箱内烘干8小时;

[0027] (4) 试纸条的组装及切割:将塑料底板、包被膜、吸水垫、标记垫和样品垫按顺序依次粘贴后,用切条机将其切成试纸条,装入模具中;上述操作在湿度小于40%,温度12-26 $^{\circ}$ C的环境下进行。

[0028] (5) 缓冲液2的配制:配制含有0.01M磷酸氢二钠及0.01M氯化钠,pH为7.3的纯化水溶液。

[0029] 二、试剂盒加样方式:

[0030] 使用前将检测试剂、样本恢复至室温(20-30 $^{\circ}$ C)。从铝箔袋中取出检测试剂,将检测试剂放置在干净的水平台面上。

[0031] 血清/血浆:用吸管3垂直滴入1滴样本(约40 μ l)于加样孔(S)中,滴加一滴缓冲液2,同时开始计时。

[0032] 静脉血:用吸管3垂直滴入2滴样本(约80 μ l)于试剂加样孔(S)中,滴加一滴缓冲液2,同时开始计时。

[0033] 指尖血:用吸管3滴加2滴指尖血(约80 μ l)于试剂加样孔(S)中,滴加一滴缓冲液2,同时开始计时。

[0034] 滴加完后等待紫红色条带出现,测试结果应在10-20分钟读取,20分钟后读取的结果无效。

[0035] 三、试剂盒检测结果判定

[0036] 阳性(+):检测线位置(T)有一条与参考线(R)强度相等或相近的条带出现,表明样品中含有CA15-3的浓度约为30IU/ml。检测线位置(T)有一条比参考线(R)强的条带出现,表明样品中含有CA15-3的浓度高于30IU/ml。

[0037] 阴性(-):质控区(C)和参考区(R)均有一条紫色条带出现。检测区(T)有一条比参考线(R)弱的条带出现,表明样品中含有CA15-3的浓度在5~30IU/ml之间。检测区(T)没有

紫色条带出现,表明样品中含有CA15-3的浓度在5IU/ml以下。

[0038] 无效:若质控区(C)或参考区(R)有一个区域或两个区域均没有紫色条带出现,表明不正确的操作过程或试剂已变质损坏。

[0039] 四、试剂盒灵敏度试验

[0040] 采用CA15-3标准品配制不同浓度的溶液,具体如下:

品名	标准品浓度				
	CA15-3	1 IU/ml	5 IU/ml	30 IU/ml	100 IU/ml

[0042] 采用实施例1制备的试剂盒测试标准品浓度进行测定,通过颜色卡判读浓度结果,每个浓度测定3次。结果表明,实施例1制备的试剂盒的灵敏度为5IU/ml。五、试剂盒特异性试验

[0043] 与其类似物作交叉反应实验,交叉反应率<0.01%。

[0044] 六、试剂盒精密度试验

[0045] (1) 批内变异:取低、中、高三份质控血清样品分别进行10个平行实验,计算期批内变异系数(CV%),得出批内差异CV在3.2-5.0之间。

[0046] (2) 批间变异:选择5份不同浓度的血清样本对每份血清进行3次重复测定,计算其批间变异系数(CV%),得出批间变异CV在8.95~10之间。

[0047] 七、试剂盒稳定性试验

[0048] 考虑到运输和使用过程对试剂盒的影响,本实施例对试剂盒进行55℃下35天的加速试验,实验结果表明试剂盒的各项指标完全符合要求。

[0049] 以上实验说明本实施例的试剂盒可半定量检测全血、血清、血浆中CA15-3。

[0050] 实施例2

[0051] 制备工艺步骤同实施例1,配方调整如下:

[0052] 步骤(1),配制0.015M,pH 7.4的磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液;

[0053] 步骤(2),利用柠檬酸钠还原氯金酸分别制备粒径为30nm的CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG的胶体金溶液;

[0054] 步骤(3),配制含有1.2%三羟甲基氨基甲烷、0.5%聚乙烯吡咯烷酮、0.5%表面活性剂S9、3%鼠抗人红细胞单克隆抗体以及0.07%酪蛋白的pH为8.0的纯化水溶液作为样品垫处理液;

[0055] 步骤(5),配制含有0.05M磷酸氢二钠及0.1M氯化钠,pH为7.4的纯化水溶液。

[0056] 采用同实施例1的方法进行试剂盒灵敏度试验、试剂盒特异性试验、试剂盒精密度试验、试剂盒稳定性试验,得出本实施例的试剂盒的灵敏度为5IU/ml,交叉反应率<0.01%,批内差异CV为3.2-5.0,批间变异CV为8.95~10,各项指标完全符合要求,可半定量检测全血、血清、血浆中CA15-3。

[0057] 实施例3

[0058] 制备工艺步骤同实施例1,配方调整如下:

[0059] 步骤(1),配制0.015M,pH 7.5的磷酸盐缓冲液作为包被缓冲液;

[0060] 步骤(2),利用柠檬酸钠还原氯金酸分别制备粒径为40nm的CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG的胶体金溶液;

[0061] 步骤(3),配制含有1.5%三羟甲基氨基甲烷、1%聚乙烯吡咯烷酮、1%表面活性剂S9、5%鼠抗人红细胞单克隆抗体以及0.1%酪蛋白的pH为8.5的纯化水溶液作为样品垫处理液;

[0062] 步骤(5),配制含有0.1M磷酸氢二钠及0.2M氯化钠,pH为7.5的纯化水溶液。

[0063] 采用同实施例1的方法进行试剂盒灵敏度试验、试剂盒特异性试验、试剂盒精密度试验、试剂盒稳定性试验,得出本实施例的试剂盒的灵敏度为5IU/mI,交叉反应率<0.01%,批内差异CV为3.2-5.0,批间变异CV为8.95~10,各项指标完全符合要求,可半定量检测全血、血清、血浆中CA15-3。

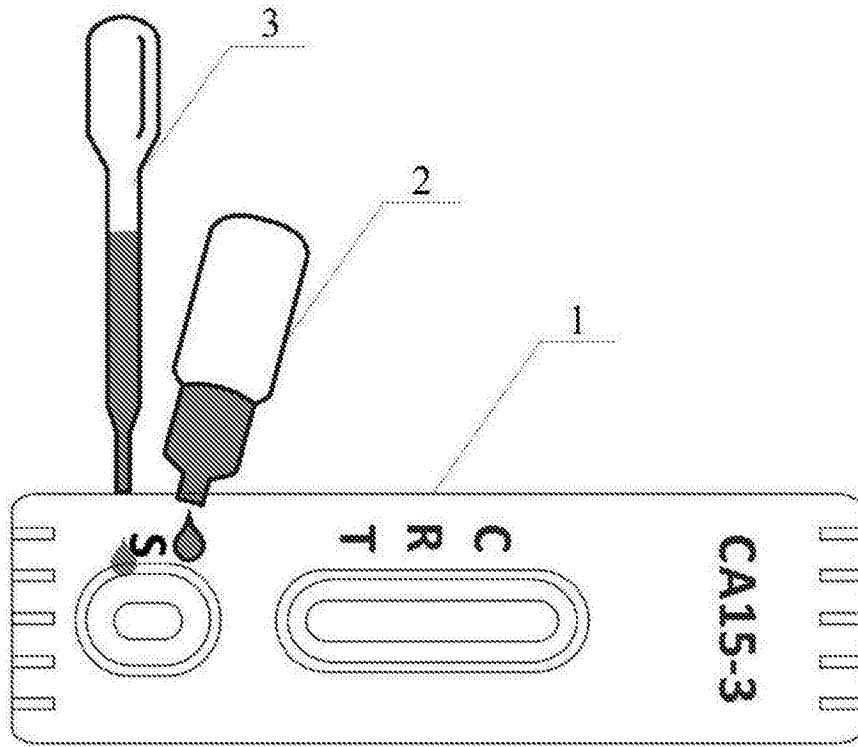


图1

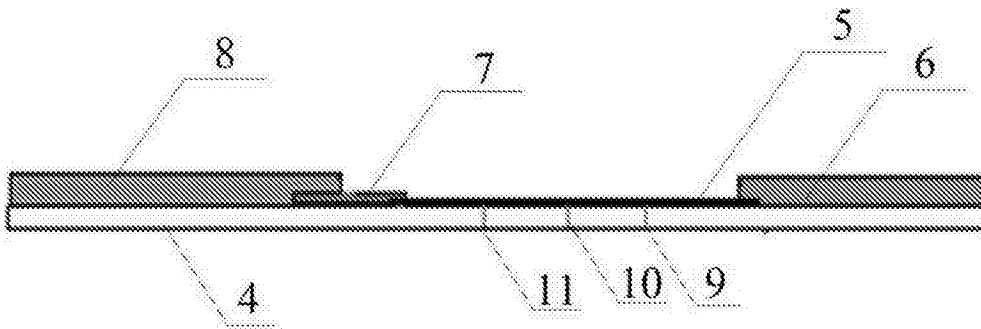


图2

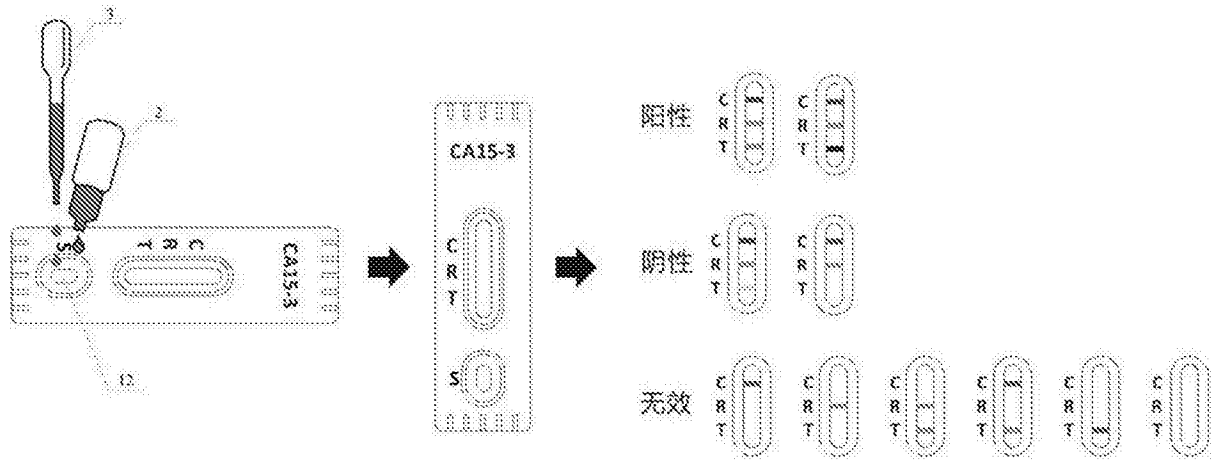


图3

专利名称(译)	一种CA15-3半定量检测试剂盒及制备工艺		
公开(公告)号	CN106950373A	公开(公告)日	2017-07-14
申请号	CN201710194642.3	申请日	2017-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	杭州博拓生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州博拓生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州博拓生物科技股份有限公司		
[标]发明人	孙越 顾晓燕 叶春生		
发明人	孙越 顾晓燕 叶春生		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/532 G01N33/57492 G01N33/6893		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种CA15-3半定量检测试剂盒，其包被膜上包被有羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG和CA15-3单克隆抗体2，从靠近吸水垫的一端到靠近标记垫的一端依次为质控线、参照线和检测线，其标记垫上包被有CA15-3单克隆抗体1、兔IgG和鼠IgG；本发明还涉及上述试剂盒制备工艺，采用双抗夹心法免疫层析诊断技术，包括包被膜的制备、标记垫的制备、样品垫的制备、试纸条的组装及切割、缓冲液的配制。本发明产品可半定量检测出全血、血清及血浆中CA15-3的含量，敏感性和特异性好，检测结果可靠稳定，适用于单人份使用，操作简单、反应快速。

