



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593922 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810418743.9

(22)申请日 2018.05.03

(71)申请人 常州领航量子生物医疗科技有限公司

地址 213000 江苏省常州市天宁区青洋北路143号

(72)发明人 高省 李小冬

(74)专利代理机构 常州智慧腾达专利代理事务所(普通合伙) 32328

代理人 杨雪

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

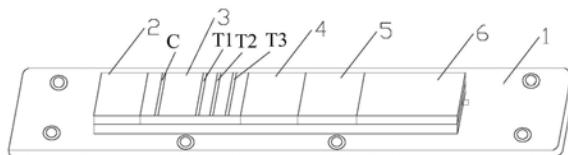
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明属于生物检测领域,具体涉及一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法,检测垫上设有检测线T1、检测线T2、检测线T3和质控线,检测线T1上包被有NMP22单克隆抗体,检测线T2上包被有UBC单克隆抗体,检测线T3上包被有BTA单克隆抗体,质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG,标记垫上包被有量子点标记的NMP22单克隆抗体、量子点标记的UBC单克隆抗体与量子点标记的BTA单克隆抗体的混合物,所述量子点为两种不同颗粒粒径的混合物。本发明的试剂盒可以同步检测NMP22、UBC和BTA,可以快速定量的判断膀胱癌病变程度,检测灵敏度高,特异性好。



1. 一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒，其特征在于：包括免疫层析试纸条，所述免疫层析试纸条包括底板(1)，底板(1)的一面上顺序搭接有吸水垫(2)、检测垫(3)、标记垫(4)、第一样品垫(5)和第二样品垫(6)，检测垫(3)上设有检测线T1、检测线T2、检测线T3和质控线，检测线T1上包被有NMP22单克隆抗体，检测线T2上包被有UBC单克隆抗体，检测线T3上包被有BTA单克隆抗体，质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG，标记垫(4)上包被有量子点标记的NMP22单克隆抗体、量子点标记的UBC单克隆抗体与量子点标记的BTA单克隆抗体的混合物，所述量子点标记的NMP22单克隆抗体为量子点荧光微球标记的NMP22单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22单克隆抗体混合而成，所述量子点标记的UBC单克隆抗体为量子点荧光微球标记的UBC单克隆抗体与量子点修饰物标记的UBC单克隆抗体混合而成，所述量子点标记的BTA单克隆抗体为量子点荧光微球标记的BTA单克隆抗体与量子点修饰物标记的BTA单克隆抗体混合而成，所述量子点荧光微球的粒径与量子点修饰物的粒径不同。

2. 根据权利要求1所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒，其特征在于：所述量子点荧光微球为量子点与微球的复合物，量子点荧光微球表面带有基团，其粒径为120-160nm，所述量子点修饰物为量子点表面经基团修饰而成，其粒径为25-60nm，所述量子点为硅、锗、硫化镉、碲化镉、硒化锌、硫化铅、硒化铅、砷化铟、硒化镉或膦化铟，所述微球为聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚乙烯甲苯微球或二氧化硅微球。

3. 根据权利要求2所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒，其特征在于：所述基团为羧基，量子点荧光微球标记的NMP22单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22单克隆抗体的混合比例为1:0.1-10。

4. 根据权利要求1所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒，其特征在于：检测垫(3)的材质为硝酸纤维素膜，标记垫(4)的材质为玻璃纤维素。

5. 根据权利要求1所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒，其特征在于：所述试剂盒对NMP22的检测灵敏度达到0.15ng/ml，对UBC的检测灵敏度达到0.1ng/ml，对BTA的检测灵敏度达到0.1ng/ml。

6. 一种权利要求1所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒的制备方法，其特征在于：包括以下步骤：

(I) 标记垫(4)的制备

取量子点荧光微球标记的NMP22单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合，形成量子点标记的NMP22单克隆抗体，取量子点荧光微球标记的UBC单克隆抗体与量子点修饰物标记的UBC单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合，形成量子点标记的UBC单克隆抗体，取量子点荧光微球标记的BTA单克隆抗体与量子点修饰物标记的BTA单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合，形成量子点标记的BTA单克隆抗体，将量子点标记的NMP22单克隆抗体、量子点标记的UBC单克隆抗体与量子点标记的BTA单克隆抗体按照1:1:1的比例混合，将混合液喷涂在玻璃纤维素垫上，干燥，备用；

(II) 检测垫(3)的制备

取硝酸纤维素膜，间隔划出检测线T1、检测线T2、检测线T3和质控线，检测线T1上包被NMP22单克隆抗体，检测线T2上包被UBC单克隆抗体，检测线T3上包被BTA单克隆抗体，质控线上包被羊抗鼠或羊抗兔IgG，将包被好的硝酸纤维素膜干燥，备用；

(III) 免疫层析试纸条制备

在底板(1)上依次搭接吸水垫(2)、检测垫(3)、标记垫(4)、第一样品垫(5)和第二样品垫(6)，组装完毕后剪切成条即可；

(IV) 试剂盒组装

将试纸条装入塑料板卡上，扣上上盖，密封保存。

7. 根据权利要求6所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒的制备方法，其特征在于：步骤(I)中，量子点荧光微球标记的NMP22/UBC/BTA单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22/UBC/BTA单克隆抗体的制备方法为：取量子点荧光微球或量子点修饰物，加入标记缓冲液中，混匀后，分别使用不同的活化缓冲液活化，活化完成后，加入NMP22或UBC或BTA单克隆抗体，超声混匀并振荡反应，然后加入封闭缓冲液进行封闭反应，最后离心去上清液，对沉降的固体重悬，超声混匀即可。

8. 根据权利要求7所述的测定膀胱癌的联合检测试剂盒的制备方法，其特征在于：所述标记缓冲液为4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液，所述活化缓冲液为N-羟基琥珀酰亚胺活化缓冲液和碳二亚胺活化缓冲液，所述封闭缓冲液为甘氨酸溶液和酪蛋白钠溶液。

## 一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤,近十年来其发病率和死亡率均呈现逐年上升的趋势,膀胱癌好发于50岁以上人群,男性膀胱癌的发病率高于女性,约为女性的3-4倍。90%的膀胱癌都源自于膀胱内壁的移形上皮细胞,尽管70%以上的癌症为非肌层浸润型膀胱癌,但其复发率却很高且很多膀胱癌因此进展成为肌肉浸润型膀胱癌或其他转移性疾病。膀胱癌患者的生存率与肿瘤分期分级有着密切关系,统计数据显示:浅表性膀胱癌患者5年生存率可达到94%,若癌症侵犯肌层或转移,其5年生存率分别只有49%和6%。更为重要的是,膀胱癌是所有恶性肿瘤中复发率最高的恶性肿瘤之一,据估计70%的膀胱癌患者均会复发,而且在这些复发的病例中,30%以上病情都会出现进展。因此早期诊断并及时准确的治疗对膀胱癌患者的预后起着关键作用。

[0003] 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。根据中国医学科学院肿瘤研究所和全国肿瘤登记中心统计的我国膀胱癌发病数据显示:2008年全国肿瘤登记地区膀胱癌发病率为7.49/10万,占中国恶性肿瘤发病构成的2.50%;男性和女性膀胱癌的发病率分别为11.41/10万、3.51/10万,男性发病率明显高于女性,约为女性的3.3倍;1998年-2008年间膀胱癌发病率呈现逐年增长趋势,10年间的平均增长率为14.6%。2008年我国总人口数量为132802万人,其中男性68357万人,女性64445万人;60岁以上人口15989万人,其中男性8227万人,而60岁以上男性膀胱癌的发病率大于23%,也就是说2008年60岁以上男性膀胱癌发病人数大于1892万人,同样方法计算60岁以上女性膀胱癌发病人数大于1164万,也就是说2008年中国60岁以上膀胱癌发病人数为3056万人。随着老龄化社会的来临,未来10年内,我国膀胱癌患者数量将不断上升。

[0004] 目前临幊上在膀胱癌筛查和复发评估方面最常用的检测方法为膀胱镜和尿细胞学检查。膀胱镜检查时需要将内镜经尿道插入膀胱内,此过程无疑会给病人带来疼痛或不适,而且该方法对于小的原位肿瘤诊断的敏感性较低。尿细胞学检查作为一种无创、非侵入性的检测方法,被推荐作为膀胱镜检查的一种辅助检查手段,目前已被广泛用于膀胱癌的筛查。然而,尽管尿细胞学检查具有较高的特异性,但其在检测高分化肿瘤或低级别肿瘤方面的敏感性普遍偏低(30%-40%以下)。为了克服现有膀胱癌诊断方法存在的上述局限性,需要寻找新的尿膀胱肿瘤检测方法,尤其是需要寻找新的可以用于膀胱癌早期筛查的检测方法。

[0005] 细胞核基质蛋白(nuclear matrix protein,NMP22)为核有丝分裂装置蛋白的一个亚单位,其主要功能是在细胞有丝分裂末期使染色体正确、均等地分配到子代细胞。当细胞恶变时,核内遗传物质在分裂末期分配极度异常,NMP22合成激增,可视其为尿路上皮特异性肿瘤标志物。Carpinito等测定了包括膀胱癌患者、良性膀胱疾病和正常人在内的667

例尿NMP22浓度，膀胱癌患者的NMP22浓度的中位数明显高于非膀胱癌患者。

[0006] 尿膀胱癌抗原(UBC)的实质为膀胱肿瘤来源的细胞角蛋白(CKs)片段8和18。细胞角蛋白(CKs)是一类蛋白质的多基因家族，在体内形成不溶于水的中间片段，该片段具有上皮来源的细胞特异性。不同的上皮组织，存在20种不同的，进一步可分为1型(CK9-20)和2型(CK1-8)。在中间片段的正常形成中，需要不同的CKs类型，两种不同的CKs形成一对。在单层上皮、管状上皮、腺状上皮、假覆层上皮、移行上皮和肿瘤来源的上皮细胞里，存在CKs对8和18。片段以各种结合形式表达，其表达水平依赖于上皮类型、分化程度和恶性程度。恶性细胞通常保留其前体细胞的中间片段，而且几乎所有上皮细胞恶性变阶段，CKs维持其表达量，因此CKs的变化被认为是上皮来源的肿瘤细胞的一种特征性变化，因而，认为CKs被认为是上皮分化的标志，而且通过一种特异的CKs的表达，可确定一种细胞类型。在尿液中存在正常尿路上皮来源的和尿路上皮肿瘤来源的特异的CKs片段，因此可作为膀胱肿瘤的潜在瘤标。

[0007] 膀胱肿瘤相关抗原(Biadder tumor antigen,BTA)又称为膀胱肿瘤抗原或称为补体因子H相关蛋白。膀胱肿瘤与基底膜接触，肿瘤细胞分泌内源性基底蛋白与基底膜表面蛋白受体相结合，释放蛋白水解酶破坏基底膜，含基本组分的基底膜碎片进入膀胱内聚成高分子复合物即BTA，由16-165kd的特异多肽组成。最初的BTA试验是一种乳胶凝集试验，敏感性优于尿细胞学检测，但当有泌尿性结石和感染时，其特异性较低。九十年代后期，经过了BTA的筛选阶段，证明其为一种补体因子H相关蛋白(complement factor H related protein,cFhrp)。FH上有一个补体因子C3b结合位点，能与C3b结合并加速C3b的降解，具有FH活性的蛋白表达，使膀胱癌细胞具有逃脱免疫监视的能力，促进肿瘤的发展。而正常人的上皮角质细胞不产生cFhrp，因此cFhrp就成为检测膀胱肿瘤细胞的一种特有的标志物。

## 发明内容

[0008] 本发明主要提供了一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒可以同步检测NMP22、UBC和BTA，可以快速定量的判断膀胱癌病变程度，检测灵敏度高，特异性好。

[0009] 一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒，包括免疫层析试纸条，所述免疫层析试纸条包括底板，底板的一面上顺序搭接有吸水垫、检测垫、标记垫、第一样品垫和第二样品垫，检测垫上设有检测线T1、检测线T2、检测线T3和质控线，检测线T1上包被有NMP22单克隆抗体，检测线T2上包被有UBC单克隆抗体，检测线T3上包被有BTA单克隆抗体，质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG，标记垫上包被有量子点标记的NMP22单克隆抗体、量子点标记的UBC单克隆抗体与量子点标记的BTA单克隆抗体的混合物，所述量子点标记的NMP22单克隆抗体为量子点荧光微球标记的NMP22单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22单克隆抗体混合而成，所述量子点标记的UBC单克隆抗体为量子点荧光微球标记的UBC单克隆抗体与量子点修饰物标记的UBC单克隆抗体混合而成，所述量子点标记的BTA单克隆抗体为量子点荧光微球标记的BTA单克隆抗体与量子点修饰物标记的BTA单克隆抗体混合而成，所述量子点荧光微球的粒径与量子点修饰物的粒径不同。

[0010] 优选的，所述量子点荧光微球为量子点与微球的复合物，量子点荧光微球表面带有基团，其粒径为120-160nm，所述量子点修饰物为量子点表面经基团修饰而成，其粒径为

25-60nm，所述量子点为硅、锗、硫化镉、碲化镉、硒化锌、硫化铅、硒化铅、砷化铟、硒化镓或磷化铟，所述微球为聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚乙烯甲苯微球或二氧化硅微球。

[0011] 优选的，所述基团为羧基，量子点荧光微球标记的NMP22单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22单克隆抗体的混合比例为1:0.1-10。

[0012] 优选的，检测垫的材质为硝酸纤维素膜，标记垫的材质为玻璃纤维素。

[0013] 优选的，所述试剂盒对NMP22的检测灵敏度达到0.15ng/ml，对UBC的检测灵敏度达到0.1ng/ml，对BTA的检测灵敏度达到0.1ng/ml。

[0014] 一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0015] (I) 标记垫的制备

[0016] 取量子点荧光微球标记的NMP22单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合，形成量子点标记的NMP22单克隆抗体，取量子点荧光微球标记的UBC单克隆抗体与量子点修饰物标记的UBC单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合，形成量子点标记的UBC单克隆抗体，取量子点荧光微球标记的BTA单克隆抗体与量子点修饰物标记的BTA单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合，形成量子点标记的BTA单克隆抗体，将量子点标记的NMP22单克隆抗体、量子点标记的UBC单克隆抗体与量子点标记的BTA单克隆抗体按照1:1:1的比例混合，将混合液喷涂在玻璃纤维素垫上，干燥，备用；

[0017] (II) 检测垫的制备

[0018] 取硝酸纤维素膜，间隔划出检测线T1、检测线T2、检测线T3和质控线，检测线T1上包被NMP22单克隆抗体，检测线T2上包被UBC单克隆抗体，检测线T3上包被BTA单克隆抗体，质控线上包被羊抗鼠或羊抗兔IgG，将包被好的硝酸纤维素膜干燥，备用；

[0019] (III) 免疫层析试纸条制备

[0020] 在底板上依次搭接吸水垫、检测垫、标记垫、第一样品垫和第二样品垫，组装完毕后剪切成条即可；

[0021] (IV) 试剂盒组装

[0022] 将试纸条装入塑料板卡上，扣上上盖，密封保存。

[0023] 优选的，步骤(I)中，量子点荧光微球标记的NMP22/UBC/BTA单克隆抗体与量子点修饰物标记的NMP22/UBC/BTA单克隆抗体的制备方法为：取量子点荧光微球或量子点修饰物，加入标记缓冲液中，混匀后，分别使用不同的活化缓冲液活化，活化完成后，加入NMP22或UBC或BTA单克隆抗体，超声混匀并振荡反应，然后加入封闭缓冲液进行封闭反应，最后离心去上清液，对沉降的固体重悬，超声混匀即可。

[0024] 优选的，所述标记缓冲液为4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液，所述活化缓冲液为N-羟基琥珀酰亚胺活化缓冲液和碳二亚胺活化缓冲液，所述封闭缓冲液为甘氨酸溶液和酪蛋白钠溶液。

[0025] 采用上述方案，本发明具有以下优点：

[0026] (1) 本发明通过实现联检，使用通用的样本缓冲液，一次加样，可以同时获得三个结果，联合检测可以提高检测的灵敏度和特异性。不仅如此，对于单克隆抗体，采用不同粒径混合的量子点标记，既能提高检测灵敏度，又提高了检测的线性范围；

[0027] (2) 本案对NMP22、UBC和BTA的检测下限分别可以达到0.15ng/ml、0.1ng/ml和

0.12ng/ml,线性范围在0.1ng–1000ng/ml之间,检测线性范围广,灵敏度高;

[0028] (3)量子点产品具有发光信号持久、稳定和抗光漂白的特性,因此检测的重复性大幅提升,变异值在2.5%以内,产品的稳定性好,同时,批内和批间变异系数(CV值)分别可以达到6%和9%以内,检测的精密度高。

### 附图说明

[0029] 图1为本发明的测定膀胱癌的联合检测试剂盒的内部结构示意图;

[0030] 图2为图1所示测定膀胱癌的联合检测试剂盒的外部结构示意图。

[0031] 其中:1、底板,2、吸水垫,3、检测垫,4、标记垫,5、第一样品垫,6、第二样品垫。

### 具体实施方式

[0032] 实施例1

[0033] 1、制备量子点标记的NMP22抗体1的混合物

[0034] (1)取量子点荧光微球1ml(浓度为10mg/ml,粒径为180nm,CdSe/ZnS,表面基团为羧基,激发波长410,发射波长615,采购自:苏州为度生物技术有限公司),加入28ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0035] 标记缓冲液

[0036]

名称	每升液体用量
Hepes(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)	0.476 g
纯化水	调整PH值至7.40±0.05并定容至1000ml
储存条件: 2–8°C冷藏保存10天	

[0037] (2)分别加入活化缓冲液1和活化剂缓冲液2各1ml,37°C振荡反应25分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0038] 活化缓冲液1

[0039]

名称	每升液体用量
NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)	120g
纯化水	1000ml
现用现配,有效期30分钟	

[0040] 活化缓冲液2

[0041]

名称	每升液体用量
EDC (碳二亚胺)	45g
纯化水	1000ml
现用现配，有效期30分钟	

[0042] (3) 加入3mg NMP22抗体1(采购自:联世生物科技(上海)有限公司),超声混匀,37℃振荡反应1小时20分钟,期间每隔10分钟超声分散25秒;

[0043] (4) 加入3ml封闭缓冲液1,37℃混匀5分钟;

[0044] 封闭缓冲液1

[0045]

名称	每升液体用量
甘氨酸	15g
纯化水	1000ml
现用现配	

[0046] (5) 加入15ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应1小时;

[0047] 封闭缓冲液2

[0048]

名称	每升液体用量
CASEIN(酪蛋白钠)	120g
纯化水	1000ml
现用现配	

[0049] (6) 低温离心机4000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液30ml重悬并超声分散,超声3次,每次30秒,直至混匀。

[0050] 重悬缓冲液

[0051]

试剂	每升液体用量
HEPES	0.536g
BSA	30g
CASEIN	12g
甘氨酸	8g
蔗糖	100g
吐温-20	30mL
加纯化水至	1000 ml
现用现配	

[0052] (7) 取量子点修饰物2ml(浓度为10mg/ml,粒径为30nm,CdSe/ZnS,表面基团位羧基,激发波长410,发射波长615),加入33ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0053] (8) 分别加入2ml活化缓冲液1和2ml活化剂缓冲液2,37℃振荡反应30分钟,期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0054] (9) 加入3.8mg NMP22抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0055] (10) 加入5ml封闭缓冲液1,37℃混匀10分钟;

[0056] (11) 加入15ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应2小时;

[0057] (12) 低温离心机12000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液30ml重悬并超声分散,超声5次,每次30秒,直至混匀。

[0058] (3) 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比1:1的比例进行混合,混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0059] 2、制备量子点标记的UBC抗体1的混合物

[0060] (1) 取量子点荧光微球2ml(浓度为10mg/ml,粒径为180nm,CdSe/ZnS,表面基团为羧基,激发波长410,发射波长615),加入28ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0061] (2) 分别加入活化缓冲液1和活化剂缓冲液2各1ml,37℃振荡反应25分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0062] (3) 加入3.2mg UBC抗体1(采购自:联世生物科技(上海)有限公司),超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔6分钟超声分散25秒;

[0063] (4) 加入4ml封闭缓冲液1,37℃混匀8分钟;

[0064] (5) 加入14ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应1.5小时;

[0065] (6) 低温离心机3500g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液30ml重悬并超声分散,超声3次,每次30秒,直至混匀;

[0066] (7) 取量子点修饰物2ml(浓度为10mg/ml,粒径为30nm,CdSe/ZnS,表面基团位羧

基,激发波长410,发射波长615),加入32ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0067] (8) 分别加入1.8ml活化缓冲液1和0.8ml活化剂缓冲液2,37℃振荡反应30分钟,期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0068] (9) 加入3.5mgUBC抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0069] (10) 加入5ml封闭缓冲液1,37℃混匀10分钟;

[0070] (11) 加入20ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应2小时;

[0071] (12) 低温离心机11000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液30ml重悬并超声分散,超声5次,每次30秒,直至混匀。

[0072] (13) 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比1:1的比例进行混合,混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0073] 3、制备量子点标记的BTA抗体1的混合物

[0074] (1) 取量子点微球2ml(浓度为10mg/ml,CdSe/ZnS,表面基团位羧基,激发波长410,发射波长615),加入30ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0075] (2) 分别加入活化缓冲液1和活化剂缓冲液2各1ml,37℃振荡反应25分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0076] (3) 加入3mg BTA抗体1(Abcam公司),超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0077] (4) 加入4ml封闭缓冲液1,37℃混匀8分钟;

[0078] (5) 加入15ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应1.5小时;

[0079] (6) 低温离心机3500g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液30ml重悬并超声分散,超声3次,每次30秒,直至混匀;

[0080] (7) 取量子点修饰物2ml(浓度为10mg/ml,CdSe/ZnS,表面基团位羧基,激发波长410,发射波长615),加入32ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0081] (8) 分别加入1.8ml活化缓冲液1和1.8ml活化剂缓冲液2,37℃振荡反应30分钟,期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0082] (9) 加入3.5mg BTA抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0083] (10) 加入5ml封闭缓冲液1,37℃混匀10分钟;

[0084] (11) 加入20ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应2小时;

[0085] (12) 低温离心机11000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液30ml重悬并超声分散,超声5次,每次30秒,直至混匀;

[0086] (13) 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比1:1的比例进行混合,混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0087] 4、制备玻璃纤维素垫(标记垫)

[0088] 将上述的量子点标记的NMP22抗体1(混合物)、量子点标记的UBC抗体1(混合物)和量子点标记的BTA抗体1(混合物)按照体积比1:1:1混合后,用喷膜仪按20μL/cm的量喷涂在玻璃纤维素垫上(8975),37℃干燥5小时,备用。

[0089] 5、制备硝酸纤维素膜(检测垫)

[0090] (1)包被液的配置

[0091] T1检测线:取2.5mg NMP22抗体2(采购自:联世生物科技(上海)有限公司),使用包被缓冲液定容至5ml;

[0092] T2检测线:取3mgUBC抗体2(采购自:联世生物科技(上海)有限公司),使用包被缓冲液定容至5ml;

[0093] T3检测线:取3mg BTA抗体2(采购自:Abcam公司),使用包被缓冲液定容至5ml;

[0094] 质控线(C线):取羊抗鼠IgG1.4mg,使用包被缓冲液定容至5ml。

[0095] 包被缓冲液

包被缓冲液	
名 称	每升液体用量
磷酸氢二钠	14.5g
磷酸二氢钠	1.48g
氯化钠	9g
纯化水	1000ml

储存条件: 2-8°C 14 天

[0096] [0097] (2)包被:取硝酸纤维素膜(赛多利斯CN 95 25mm),使用划膜仪按照30μL/板的用量喷涂,T1检测线、T2检测线、T3检测线和控制线之间的间隔为5mm,之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭,37°C干燥5小时,备用。

[0098] 6、制备检测试纸条

[0099] 将检测垫3(硝酸纤维素(NC)膜)、标记垫4(玻璃纤维素垫)、吸水垫2、第一样品垫5、第二样品垫6和底板1(带背衬),按照图1-2所示情况进行组合粘贴,成品组装顺序为:靠近NC膜上方贴吸水纸,覆盖NC膜约2.5mm;NC膜下方依次贴量子点标记垫4、第一样品垫5、第二样品垫6;第二样品垫6覆盖第一样品垫5约2.5mm,第一样品垫5覆盖标记垫4约3mm,标记垫4覆盖NC膜下端约2.5mm。组装时的环境温度为22°C,湿度为25%。

[0100] 7、组装

[0101] 将上述步骤5中组装的大板使用裁切机裁切成宽度4mm的试纸条,在塑料板卡(底盖)上放置试纸条,扣上塑料板卡上盖,用力按压扣紧,装入铝箔袋中,放入干燥剂后用封口机封口即完成组装。

[0102] 8、对试剂进行检测

[0103] (1)使用配套的量子点荧光定量分析仪进行检测,先用六个由低到高的标准品进行曲线标定,保存标定好的曲线待用;

[0104] (2)使用加样器吸取80微升尿液样本加入测试卡的加样孔内,室温下层析10分钟。

[0105] (3)将板卡放入分析仪中,分析仪自动读取试剂条上荧光信号,通过标定曲线直接计算处样本浓度。

[0106] 检测时,分别配制低、中、高三种不同浓度的NMP22、UBC和BTA的混合品,NMP 22

3.3%, 2.5%, 1.9%; UBC 3.6%, 2.8%, 2.2%; BTA 4.1%, 3.4%, 2.5%。批间精密度分别为:NMP22 8.4%, 6.5%, 5.2%; UBC 7.4%, 5.5%, 4.3%; BTA 7.8%, 5.2%, 4.1%。说明检测的精密度高。

[0107] 使用中浓度值的NMP22、UBC和BTA的混合品检测,NMP22的重复性为1.8%,UBC的重复性为1.7%,BTA的重复性为2.1%。说明产品检测的重复性好。

[0108] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

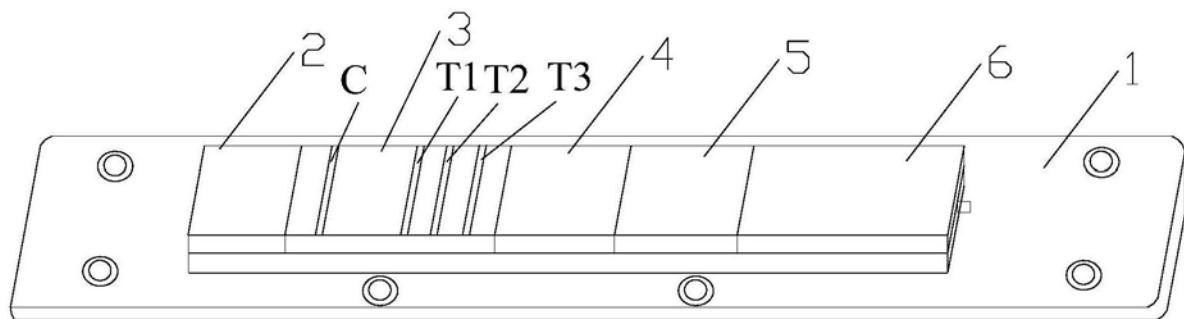


图1

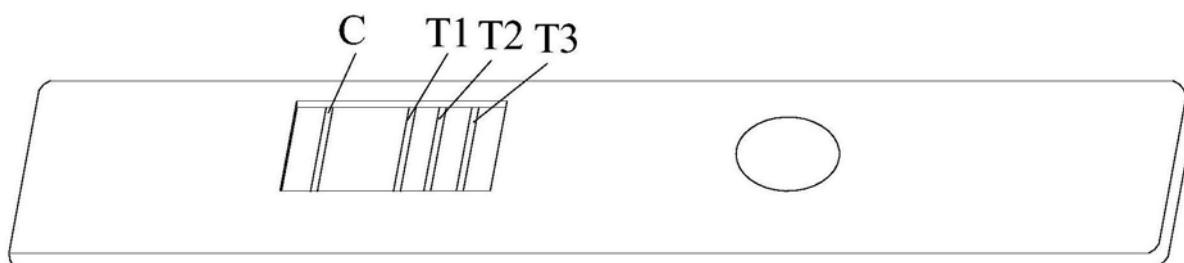


图2

专利名称(译)	一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108593922A</a>	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201810418743.9	申请日	2018-05-03
[标]发明人	高省 李小冬		
发明人	高省 李小冬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/57407 G01N33/57484 G01N33/577		
代理人(译)	杨雪		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明属于生物检测领域，具体涉及一种测定膀胱癌的联合检测试剂盒及其制备方法，检测垫上设有检测线T1、检测线T2、检测线T3和质控线，检测线T1上包被有NMP22单克隆抗体，检测线T2上包被有UBC单克隆抗体，检测线T2上包被有BTA单克隆抗体，质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG，标记垫上包被有量子点标记的NMP22单克隆抗体、量子点标记的UBC单克隆抗体与量子点标记的BTA单克隆抗体的混合物，所述量子点为两种不同颗粒粒径的混合物。本发明的试剂盒可以同步检测NMP22、UBC和BTA，可以快速定量的判断膀胱癌病变程度，检测灵敏度高，特异性好。

