



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105486864 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201610025127. 8

G01N 33/558(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 01. 14

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/58(2006. 01)

(71) 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区钱荣璐
20号(卫生部核医学重点实验室、江苏
省分子核医学重点实验室)

(72) 发明人 黄飏 张艺 张珏 周彬 郭明明
范俊 邓黎莉 朱岚

(74) 专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51) Int. Cl.

G01N 33/573(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

定量检测前列腺特异性抗原的试纸条及制备
方法与试纸卡

(57) 摘要

本发明公开了一种采用时间分辨荧光免疫层析方法同时定量检测总前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原含量的试纸条及其制备方法与试纸卡;试纸条包括底板和在底板顺次粘覆的吸水纸、硝酸纤维素膜、结合垫以及样品垫;首先在硝酸纤维素膜上相间隔依次平行设置 fPSA 划膜抗体的第一检测带、复合 PSA 划膜抗体的第二检测带以及兔抗鼠多克隆抗体的质控带,结合垫表面喷涂复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体,复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体均偶联有镧系稀土离子的纳米微球,可以保证同一样品液体中的 tPSA 和 fPSA 的检测检测结果精确度高、误差小,为临床使用提供了极大便利。



1. 一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,包括底板(1)和沿所述底板(1)长度方向顺次粘覆于所述底板(1)上的吸水纸(3)、硝酸纤维素膜(2)、结合垫(5)以及样品垫(4);

其特征在于,所述硝酸纤维素膜(2)粘覆于所述底板(1)长度方向的中央,两端分别与所述吸水纸(3)和所述结合垫(5)部分重叠;所述结合垫(5)的另一端与所述样品垫(4)部分重叠;

所述硝酸纤维素膜(2)上相间隔依次设置有游离前列腺特异性抗原划膜抗体涂层形成的第一检测带(7)、复合前列腺特异性抗原划膜抗体涂层形成的第二检测带(8)和兔抗鼠多克隆抗体涂层形成的质控带(6);所述结合垫(5)表面喷涂有复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体,所述复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体均偶联有镧系稀土离子的纳米微球。

2. 如权利要求1所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,其特征在于,所述质控带(6)、所述第一检测带(7)和所述第二检测带(8)平行设置;且所述第一检测带(7)与所述质控带(6)和所述第二检测带(8)分别相隔距离为0.4cm~0.5cm,且所述第二检测带(8)与所述结合垫(5)相隔距离为0.4cm~0.5cm。

3. 如权利要求2所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,其特征在于,所述第一检测带(7)与所述质控带(6)和所述第二检测带(8)分别相隔距离为0.45cm,且所述第二检测带(8)与所述结合垫(5)相隔距离为0.45cm。

4. 如权利要求1所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,其特征在于,所述镧系稀土离子为铈离子、钐离子、铽离子中的任意一种。

5. 如权利要求1所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,其特征在于,所述纳米微球的直径为10~500nm。

6. 如权利要求3所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,其特征在于,所述吸水纸(3)与所述硝酸纤维素膜(2)相重叠的部分在所述底板(1)长度方向的长度为2mm,且重叠部分中所述吸水纸(3)位于所述硝酸纤维素膜(2)的上方;所述结合垫(5)与所述硝酸纤维素膜(2)相重叠的部分在所述底板(1)长度方向的长度为2mm,且重叠部分中所述结合垫(5)位于所述硝酸纤维素膜(2)的上方。

7. 如权利要求6所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,其特征在于,所述样品垫(4)与所述结合垫(5)相重叠的部分在所述底板(1)长度方向的长度为2mm,且重叠部分中所述样品垫(4)位于所述结合垫(5)的上方,所述结合垫(5)直接与所述底板(1)相接触部分的长度大于4mm。

8. 一种如权利要求1-7任一项所述的定量检测前列腺特异性抗原的试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下几个步骤:

(1)、抗体的预处理

用0.05mol/L, pH为7.2~7.6的磷酸盐缓冲液在4℃下透析商品化的复合前列腺特异性抗原划膜抗体和游离前列腺特异性抗原划膜抗体,过夜;

(2)、结合垫的制备:

在镧系稀土离子的纳米微球溶液中加入碳二亚胺和步骤(1)预处理过的复合前列腺特异性抗原划膜抗体,碳二亚胺的终浓度为20mmol/L,镧系稀土离子的纳米微球与预处理过的抗体的质量比为50:1,室温反应2小时,离心,去除上清液后,加入含有1%质量分数的BSA

的0.05mol/L,pH为7.2的磷酸盐缓冲液至微球浓度为1.0ug/L,待用;

在镧系稀土离子的纳米微球中加入碳二亚胺和步骤(1)预处理过的游离前列腺特异性抗原划膜抗体,碳二亚胺的终浓度为20mmol/L,镧系稀土离子的纳米微球与预处理过的抗体的质量比为50:1,室温反应2小时,离心,去除上清液后加入含有1%质量分数的BSA的0.05mol/L,pH为7.2的磷酸盐缓冲液至微球浓度为1.0ug/L,待用;

将复合前列腺特异性抗原划膜抗体标记的纳米微球与游离前列腺特异性抗原划膜抗体标记的微球混合,用定量喷膜仪以3uL/cm~5uL/cm的量将混合微球喷涂于聚酯膜形成的结合垫5上,避光的条件下于35~38°C烘干1小时,加入干燥剂封存备用;

(3)硝酸纤维素膜的制备:

使用0.02mol/L,pH为7.4的含质量分数为1%蔗糖的磷酸盐缓冲液,分别透析识别不同抗原表位的游离前列腺特异性抗原划膜抗体、识别不同抗原表位的复合前列腺特异性抗原划膜抗体和兔抗鼠多克隆抗体,各抗体的浓度最终稀释到1ug/L,使用定量喷膜仪以1uL/cm的量将三者以一定的间隔喷于硝酸纤维素膜上制得依次设置的第一检测带、第二检测带和质控带,35~38°C烘干1h,加入干燥剂封存备用;

(4)试纸条的组装:在底板中间先铺设硝酸纤维素膜,然后在与质控带相临近的一端铺吸水纸,使吸水纸与硝酸纤维素膜部分重叠;在与第二检测带相临近的一端铺结合垫,使硝酸纤维素膜与结合垫部分重叠;最后贴样品垫。

9.一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸卡,其特征在于,包括权利要求1-7任一项所述的试纸条以及包覆所述试纸条的外壳;所述外壳包括底座和卡盖(9),所述卡盖(9)上设置有用以露出所述试纸条的局部区域观察口(11)和加样口(10);其中,所述加样口(10)设于所述样品垫(4)上方,以露出部分或全部所述样品垫(4)区域,所述观察口(11)设于所述硝酸纤维素膜(2)上部,以露出所述第一检测带(7)、所述第二检测带(8)和所述质控带(6)。

10.如权利要求9所述的一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸卡,其特征在于,所述的底座和卡盖均由塑料制得。

定量检测前列腺特异性抗原的试纸条及制备方法与试纸卡

技术领域

[0001] 本发明涉及体外试纸检测技术领域,具体为一种采用时间分辨荧光免疫层析方法同时定量检测总前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原含量的试纸条及制备方法与试纸卡。

背景技术

[0002] 前列腺特异性抗原(Prostate Specific Antigen,PSA)是由前列腺上皮细胞产生的一种蛋白水解酶,正常生理情况下,PSA主要存在于精液中,其在精液中的浓度高于血清中浓度的100万倍。血循环中PSA以两种形式存在,与蛋白水解酶抑制物结合的复合PSA大约占85%以上,游离PSA(fPSA)占15%左右,总前列腺特异性抗原(tPSA)为复合PSA和游离PSA的总和。PSA在前列腺炎、前列腺增生、前列腺缺血性梗塞以及前列腺癌等前列腺疾病时均可升高。目前,国内检验学界通常把tPSA>4ug/L作为筛选前列腺癌的临界值,把tPSA结果在4~10ug/L之间称为灰色区域,前列腺癌与前列腺增生均有可能,而当tPSA>10ug/L时,前列腺癌风险极大。当血清tPSA在灰色区域时,fPSA与tPSA的比值显得非常重要,fPSA/tPSA大于临界值时,前列腺癌可能性小,当fPSA/tPSA小于临界值时,前列腺癌可能性较大。通常,采用tPSA、fPSA联合测定可使前列腺恶性疾病的检出率提高到90%以上。作为一种肿瘤标志物,PSA测定有其不可替代的优越性,定量测定准确度高、特异性性好,而且无创、无痛苦,有助于前列腺癌早期诊断,监测治疗反应及判断预后,也可用于高危人群(50岁以上男性)前列腺癌的普查。

[0003] 常规检测血清tPSA、fPSA时,均为单一检测,因每次检查的误差不可避免和误差的累加,令fPSA/tPSA结果的误差翻倍,对检测结果的准确性和临床判断影响较大。如果能够将tPSA和fPSA两个项目合并在一个试纸条上同时进行,在缩短检测时间、提高检测效率的同时,可以实现更为准确的检测。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术中用于检测前列腺特异性抗原的检测试纸盒仅能对总或游离前列腺特异性抗原进行检测,但在计算样品液体中的游离与总前列腺特异性抗原的比值时容易出现误差的技术缺陷;进而提供一种同时检测游离与总前列腺特异性抗原的试纸条及应用其的试纸卡。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0006] 一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸条,包括底板和沿所述底板长度方向顺次粘覆于所述底板上的吸水纸、硝酸纤维素膜、结合垫以及样品垫;

[0007] 所述硝酸纤维素膜粘覆于所述底板长度方向的中央,两端分别与所述吸水纸和所述结合垫部分重叠;所述结合垫的另一端与所述样品垫部分重叠;

[0008] 所述硝酸纤维素膜上相间隔依次设置有由游离前列腺特异性抗原抗体涂层形成的第一检测带、复合前列腺特异性抗原抗体涂层形成的第二检测带和兔抗鼠多

克隆抗体涂层形成的质控带;所述结合垫表面喷涂有复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体,所述复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体均偶联有镧系稀土离子的纳米微球。

[0009] 优选的,所述质控带、第一检测带和第二检测带平行设置;且所述第一检测带与质控带和所述第二检测带分别相隔距离为0.4cm~0.5cm,且所述第二检测带与所述结合垫相隔距离为0.4cm~0.5cm。

[0010] 优选的,所述第一检测带与质控带和所述复体第二检测带分别相隔距离为0.43cm~0.47cm,且所述第二检测带与所述结合垫相隔距离为0.43cm~0.47cm。

[0011] 优选的,所述第一检测带与质控带和所述第二检测带分别相隔距离为0.45cm,且所述第二检测带与所述结合垫相隔距离为0.45cm。

[0012] 进一步的,所述镧系稀土离子为铈离子、钐离子、铽离子中的任意一种。

[0013] 进一步的,所述纳米微球的直径为10~500nm。

[0014] 进一步的,所述吸水纸与所述硝酸纤维素膜相重叠的部分在所述底板长度方向的长度为2mm,且重叠部分中所述吸水纸位于所述硝酸纤维素膜的上方;所述结合垫与所述硝酸纤维素膜相重叠的部分在所述底板长度方向的长度为2mm,且重叠部分中所述结合垫位于所述硝酸纤维素膜的上方。

[0015] 进一步的,所述样品垫与所述结合垫相重叠的部分在所述底板长度方向的长度为2mm,且重叠部分中所述样品垫位于所述结合垫的上方,所述结合垫直接与所述底板相接触部分的长度大于4mm。

[0016] 一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸条的制备方法,包括以下几个步骤:

[0017] (1)、抗体的预处理

[0018] 用0.05mol/L,pH为7.2~7.6的磷酸盐缓冲液在4℃下透析商品化的复合前列腺特异性抗原划膜抗体和游离前列腺特异性抗原划膜抗体,过夜;

[0019] (2)、结合垫的制备:

[0020] 在镧系稀土离子的纳米微球溶液中加入碳二亚胺和步骤(1)预处理过的复合前列腺特异性抗原划膜抗体,碳二亚胺的终浓度为20mmol/L,纳米微球与预处理过的抗体的质量比为50:1,室温反应2小时,离心,去除上清液后,加入含有1%质量分数的BSA的0.05mol/L,pH为7.2的磷酸盐缓冲液至微球浓度为1.0ug/L,待用;

[0021] 在镧系稀土离子的纳米微球中加入碳二亚胺和步骤(1)预处理过的游离前列腺特异性抗原划膜抗体,碳二亚胺的终浓度为20mmol/L,纳米微球与预处理过的抗体的质量比为50:1,室温反应2小时,离心,去除上清液后加入含有1%质量分数的BSA的0.05mol/L,pH为7.2的磷酸盐缓冲液至微球浓度为1.0ug/L,待用;

[0022] 将复合前列腺特异性抗原划膜抗体标记的纳米微球与游离前列腺特异性抗原划膜抗体标记的微球混合,用定量喷膜仪以3uL/cm~5uL/cm的量将混合微球喷涂于聚酯膜形成的结合垫5上,避光的条件下于35~38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用;

[0023] (3)硝酸纤维素膜的制备:

[0024] 使用0.02mol/L,pH为7.4的含质量分数为1%蔗糖的磷酸盐缓冲液,分别透析识别不同抗原表位的游离前列腺特异性抗原划膜抗体、识别不同抗原表位的复合前列腺特异性抗原划膜抗体和兔抗鼠多克隆抗体,各抗体的浓度最终稀释到1ug/L,使用定量喷膜仪以

1 μ L/cm的量将三者以一定的间隔喷于硝酸纤维素膜上制得依次设置的第一检测带、第二检测带和质控带,35~38 $^{\circ}$ C烘干1h,加入干燥剂封存备用;

[0025] (4)试纸条的组装:在底板中间先铺设硝酸纤维素膜,然后在与质控带相临近的一端铺吸水纸,使吸水纸与硝酸纤维素膜部分重叠;在与复合前列腺特异性抗原划膜抗体第二检测带相临近的一端铺结合垫,使硝酸纤维素膜与结合垫部分重叠;最后贴样品垫。

[0026] 鉴于上述试纸条结构不牢固,不利于直接进行定量检测操作、且存放携带不方便的问题,将上述结构的试纸条装入塑料外壳内部以利于各组成结构的固定,从而便于存放和检测,因此,本发明还公开了一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸卡。

[0027] 一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸卡,包括定量检测前列腺特异性抗原的试纸条以及包覆所述试纸条的外壳;所述外壳包括底座和卡盖,所述卡盖上设置有用于露出所述试纸条的局部区域观察口和加样口;其中,所述加样口设于所述样品垫上方,以露出部分或全部所述样品垫区域,所述观察口设于所述硝酸纤维素膜上部,以露出所述第一检测带、所述第二检测带和所述质控带。

[0028] 进一步的,所述底座为塑料底座,所述卡盖为塑料卡盖。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0030] 一、本发明中所述硝酸纤维素膜上相间隔依次设置fPSA划膜抗体的第一检测带、复合PSA划膜抗体的第二检测带以及兔抗鼠多克隆抗体的质控带;该试纸条将时间分辨荧光免疫技术、双抗体夹心测抗原与具体试纸结构相结合,形成了一种可同时检测tPSA和fPSA含量的试纸条,解决了现有技术中PSA试纸盒无法同时检测tPSA和fPSA的问题,采用该种试纸条对tPSA和fPSA检测,可以保证同一样品液体中的tPSA和fPSA的检测检测结果精确度高、误差小,为临床使用提供了极大便利;

[0031] 二、本发明将第一检测带和第二检测带设置于同一检测试纸上,两条检测带平行设置,避免了两种单克隆抗体之间存在协同影响,在检测过程中只会出现相同的误差,比如同时出现正的误差或同时出现负的误差,在计算比值的时候,该误差就基本可以相抵,从而计算fPSA/tPSA比值结果更准确;

[0032] 三、本发明在结合垫表面喷涂有抗复合前列腺特异性抗原抗体和抗游离前列腺特异性抗原抗体,抗复合前列腺特异性抗原抗体和抗游离前列腺特异性抗原抗体偶联有镧系稀土离子的纳米微球,减少了稀土离子在样品溶液的猝灭,提高了稀土离子发出的荧光强度,因此不仅提高了检测的精确度,而且便于检测结果的显示和操作者的观察;

[0033] 四、本发明采用直径为10~500nm的镧离子纳米微球,提高了检测的精确度,减少了误差;

[0034] 五、在本发明在试纸条外设置包覆塑料外壳,重量轻,且制作成本低,使得试纸卡不仅便于存放和携带,还便于操作过程中的检测操作。

附图说明

[0035] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0036] 图1是实施例1中试纸条沿长度方向的剖面结构示意图;

[0037] 图2是实施例3中试纸卡平面结构示意图

[0038] 图3;是实施例4中tPSA的标准曲线;

[0039] 图4是实施例4中fPSA的标准曲线;

[0040] 其中,1-底板,2-硝酸纤维素膜,3-吸水纸,4-样品垫,5-结合垫,6-质控带,7-第一检测带,8-第二检测带,9-卡盖,10-加样口,11-观察口。

具体实施方式

[0041] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0042] 实施例1

[0043] 如图1所示,一种同时检测游离和总前列腺特异性抗原的试纸条,包括底板1和沿底板1长度方向顺次粘覆于底板1上的吸水纸3、硝酸纤维素膜2、结合垫5以及样品垫4;

[0044] 硝酸纤维素膜2粘覆于所述底板1的中间部位,两端分别与所述吸水纸3和结合垫5部分重叠;结合垫5的另一端与所述样品垫4部分重叠;

[0045] 硝酸纤维素膜2上相间隔依次设置有第一检测带7、第二检测带8和质控带6;

[0046] 结合垫5表面喷涂有抗复合前列腺特异性抗原抗体和抗游离前列腺特异性抗原抗体,抗复合前列腺特异性抗原抗体和抗游离前列腺特异性抗原抗体均偶联有镧系稀土离子的纳米微球;

[0047] 质控带6、第一检测带7和复第二检测带8平行设置;且第一检测带7与质控带6和第二检测带8分别相隔距离为0.45cm,且第二检测带8与所述结合垫5相隔距离为0.4cm;

[0048] 吸水纸3与硝酸纤维素膜2相重叠的部分在底板1长度方向的长度为2mm,且重叠部分中吸水纸3位于硝酸纤维素膜2的上方;结合垫5与硝酸纤维素膜2相重叠的部分在底板1长度方向的长度为2mm,且重叠部分中结合垫5位于所述硝酸纤维素膜2的上方;

[0049] 样品垫4与所述结合垫5相重叠的部分在底板1长度方向的长度为2mm,且重叠部分中样品垫4位于结合垫5的上方,结合垫5直接与底板1相接触部分的长度大于4mm。

[0050] 实施例2

[0051] 一种同时检测游离和总前列腺特异性抗原的试纸条的制备方法,包括以下几个步骤:

[0052] (1)、抗体的预处理:

[0053] 用0.05mol/L,pH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液在4℃下透析过夜商品化的复合前列腺特异性抗原划膜抗体和游离前列腺特异性抗原划膜抗体;

[0054] (2)、结合垫5的制备:

[0055] 在镧系稀土离子的纳米微球溶液中加入碳二亚胺(EDC)(EDC的终浓度为20mmol/L)和步骤(1)预处理过的复合前列腺特异性抗原划膜抗体,纳米微球与预处理过的抗体的质量比为50:1,室温反应2小时,离心,去除上清液后,加入样品稀释液(含有1%质量分数的BSA的0.05mol/L,pH为7.2的磷酸盐缓冲液)至微球浓度为1.0ug/L,待用;

[0056] 在镧系稀土离子的纳米微球溶液中加入碳二亚胺(EDC)(EDC的终浓度为20mmol/L)和步骤(1)预处理过的游离前列腺特异性抗原划膜抗体,纳米微球与预处理过的抗体的质量比为50:1,室温反应2小时,离心,去除上清液后,加入样品稀释液(含有1%质量分数的BSA的0.05mol/L,pH为7.2的磷酸盐缓冲液)至微球浓度为1.0ug/L,待用;

[0057] 将复合前列腺特异性抗原划膜抗体标记的纳米微球与游离前列腺特异性抗原划膜抗体标记的微球混合,用定量喷膜仪以 $3\mu\text{L}/\text{cm}\sim 5\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量将混合微球喷涂于聚酯膜形成的结合垫5上,避光的条件下于 $35\sim 38^{\circ}\text{C}$ 烘干1小时,加入干燥剂封存备用;

[0058] (3)硝酸纤维素膜2的制备:

[0059] 使用 $0.02\text{mol}/\text{L}$,pH为7.4的含质量分数为1%蔗糖的磷酸盐缓冲液,分别透析识别不同抗原表位的游离前列腺特异性抗原划膜抗体、识别不同抗原表位的复合前列腺特异性抗原划膜抗体和兔抗鼠多克隆抗体,各抗体的浓度最终稀释到 $1\mu\text{g}/\text{L}$,使用定量喷膜仪以 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量将三者以一定的间隔喷于硝酸纤维素膜上即为依次设置的第一检测带7、第二检测带8和质控带6, $35\sim 38^{\circ}\text{C}$ 烘干1h,加入干燥剂封存备用;

[0060] (4)试纸条的组装:在底板中间先铺设硝酸纤维素膜2,然后在与兔抗鼠多克隆抗体的质控带6相临近的一端铺吸水纸3,使吸水纸3与硝酸纤维素膜2部分重叠;在第二检测带8相临近的一端铺结合垫5,使硝酸纤维素膜2与结合垫5部分重叠;最后贴样品垫4;用斩切机切按 0.4cm 宽度斩切;即得实施例1的同时检测游离和总前列腺特异性抗原的试纸条。

[0061] 实施例3

[0062] 如图2所示,一种定量检测前列腺特异性抗原的试纸卡,包括定量检测前列腺特异性抗原的试纸条以及包覆试纸条的外壳;外壳包括底座和卡盖9,卡盖9上设置有用于露出所述试纸条的局部区域观察口11和加样口10;其中,加样口10设于样品垫4上方,以露出部分或全部所述样品垫4区域,观察口11设于硝酸纤维素膜2上部,以露出第一检测带7、第二检测带8和质控带6。底座和卡盖9均为塑料材质。

[0063] 实施例4

[0064] 使用实施例3的试剂卡对检测游离和总前列腺特异性抗原的定量检测方法,包括如下步骤:

[0065] (1)绘制标准曲线:

[0066] 以总前列腺特异性抗原标准品作为样品,进行检测,检测结果如表1所示。将检测结果以荧光信号值为纵坐标,标准品浓度为横坐标,建立方程并拟合标准曲线(详见图3)。总前列腺特异性抗原标准品(取6个不同的浓度,分别为 $0\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $4\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{L}$,每个浓度做5个平行样)。

[0067] 表1总前列腺特异性抗原标准品的检测结果

[0068]

总前列腺特异性抗原 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	0	2	4	10	50	100	
样品荧光 信号值	1	4554	15876	24920	53118	252786	427444
	2	4576	16444	25564	48710	255552	413064
	3	4433	15392	24050	45440	227778	386490
	4	4652	17022	23754	51746	277496	456040
	5	4525	16134	25046	56000	233090	435124
	均值	4548	16174	24667	51003	249340	423632
	CV	2.00%	4.36%	3.35%	6.70%	8.16%	6.85%

[0069] 以游离前列腺特异性抗原标准品作为样品,进行检测,检测结果如表2所示。检测结果以荧光信号值为纵坐标,标准品浓度为横坐标,建立方程并拟合标准曲线(详见图4)。

游离前列腺特异性抗原标准品(取6个不同的浓度,分别为0ug/L、0.5ug/L、2.5ug/L、5ug/L、12ug/L、60ug/L,每个浓度做5个平行样),如表2所示。

[0070] 表2游离前列腺特异性抗原标准品的检测结果

[0071]

游离前列腺特异性抗原标准品 (ug/L)		0	0.5	2.5	5	12	60
样品荧光信号值	1	1641	3526	9174	16887	39161	144639
	2	1724	3867	9730	15778	44406	145855
	3	1504	3635	8749	17035	36424	148010
	4	1761	3965	9280	17545	37582	138555
	5	1565	3613	7733	16603	40969	133232
	均值	1639	3721	8933	16769	39708	142058
	CV	6.55%	4.99%	8.47%	3.88%	7.89%	4.26%

[0072] (2)样品检测:

[0073] <1>准备

[0074] a)打开仪器电源开关,预热30分钟;

[0075] b)试纸、样品稀释液、样品室温平衡;

[0076] <2>检测

[0077] a)取20uL样品滴加在试纸卡的加样孔中,再加入50uL样品稀释液,等待15min后立即检测;

[0078] b)荧光扫描所述质控线6,分别测定所述质控线6区域的荧光强度,若所述质控线6区域出现荧光发射峰,则表明该试纸条有效,反之则无效。

[0079] <3>数值分析与整理;

[0080] (3)与市售前列腺特异性抗原检测试剂盒的比较

[0081] 用市售的列腺特异性抗原时间分辨免疫荧光试剂盒(TRF),测试同一样品,重复三次,验证试纸的检测结果正确性。结果如表3所示,用该试纸和市售试剂盒检测的误差均小于10%,该试剂的检测结果准确可靠。

[0082] 表3实施例3的试剂卡与市售的TRF测试结果的对比

tPSA	高值样本		中值样本		低值样本	
	TRF	试纸	TRF	试纸	TRF	试纸
1	52	55	11.5	10.9	4.2	4.5
2	56	59	12.4	11.2	3.8	4.3
3	49	51	11.9	10.8	4.3	3.9
均值	52.3	55.0	11.9	11.0	4.1	4.2
误差		5.10%		-8.10%		3.25%
fPSA	高值样本		中值样本		低值样本	
	TRF	试纸	TRF	试纸	TRF	试纸
1	28.3	27.9	6.1	6.5	1.72	1.97
2	27.3	26.5	6.2	5.6	1.29	1.34
3	28.9	27.6	5.9	5.3	1.45	1.42
均值	28.17	27.33	6.07	5.80	1.49	1.58
误差		-2.96%		-4%		6.05%

[0083] 为了验证单独进行总前列腺特异性抗原检测的试纸条和游离前列腺特异性抗原检测的试纸条与同时检测的差别,采用实验例3的试纸条与市售单独测试试剂盒分别进行检测,结果如表4所示:

[0084] 表4单独检测与同时检测的误差对比表格

[0085]

	实验组 1	实验组 2
--	-------	-------

[0086]

	理论值	单独 tPSA 组	单独 fPSA 组	同时检测组	理论值	单独 tPSA 组	单独 fPSA 组	同时检测组
tPSA 值 (ng/ml)	4.3	4.7	/	4.5	17.5	16.2	/	16
fPSA 值 (ng/ml)	1.57	/	1.47	1.63	2.32	/	2.54	2.19
fPSA/tPSA	0.37	0.31		0.36	0.13	0.16		0.14
tPSA 误差	/	9.30%	/	4.65%	/	-7.40%	/	-8.57%
fPSA 误差	/	/	-6.37%	3.82%	/	/	9.48%	-5.60%
fPSA/tPSA 误差	/	-16.20%		-0.79%	/	15.79%		7.69%

[0087] 从表4的数据可以看到,当tPSA和fPSA检测的误差都在10%以内时,由于单独检测的tPSA和fPSA的误差可以是正误差,也有可能是负误差,两者是随机的,tPSA和fPSA结果有可能都是同方向的误差,也有可能是不同方向的误差,当tPSA和fPSA结果产生不同方向的误差时,其比值的误差就会放大。但同时检测的试剂条只会同时是正误差或负误差,这样单独检测后得到tPSA/fPSA的误差有可能大于10%,而同时检测后的tPSA/fPSA误差还是在10%以内,而且抵消了一些tPSA和fPSA的误差,结果更为准确。

[0088] 表5复合前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原检测带的间距对检测结果的影响

[0090]

	标准值	复合前列腺特异性抗原检测带靠近结合垫，游离前列腺特异性抗原检测带靠近质控带	游离前列腺特异性抗原检测带靠近质控带，复合前列腺特异性抗原检测带靠近结合垫
tPSA 值	3.93	3.69	4.37
fPSA 值	1.77	1.62	1.61
tPSA/fPSA	0.45	0.43902	0.36842
tPSA 误差	/	-6.11%	11.20%
fPSA 误差	/	-8.47%	-9.04%
tPSA/fPSA 误差	/	-2.44%	-18.13%

[0091] 表5显示了复合前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原检测带的间距对检测结果的影响,由表4可知,当复合前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原检测带之间的间距在0.4~0.5cm之间的时候,误差小于10%;如果间距过大或过小时,tPSA或fPSA或tPSA/fPSA会有较大的误差。

[0092] 表6复合前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原检测带先后顺序对检测结果的影响

[0093]

	标准值	复合前列腺特异性抗原检测带靠近结合垫，游离前列腺特异性抗原检测带靠近质控带	游离前列腺特异性抗原检测带靠近质控带，复合前列腺特异性抗原检测带靠近结合垫
tPSA 值	3.93	3.69	4.37
fPSA 值	1.77	1.62	1.61
tPSA/fPSA	0.45	0.43902	0.36842
tPSA 误差	/	-6.11%	11.20%
fPSA 误差	/	-8.47%	-9.04%
tPSA/fPSA 误差	/	-2.44%	-18.13%

[0094] 由表6可知,复合前列腺特异性抗原在前,游离前列腺特异性抗原在后模式的检测误差均小于10%,比复合前列腺特异性抗原在后,游离前列腺特异性抗原在前模式好。

[0095] 表7显示了高分子纳米微球涂层上喷涂的微球浓度的不同对检测结果的影响

[0096] 表7微球浓度的不同对检测结果的影响

[0097]

	标准值	0.12ug/L	0.25ug/L	0.5ug/L	1.0ug/L

tPSA值	3.68	2.82	3.14	3.52	3.76
fPSA值	1.72	1.34	1.53	1.61	1.65
tPSA/fPSA	0.47	0.48	0.49	0.46	0.44
tPSA误差	/	-23.37%	-14.67%	-4.35%	2.17%
fPSA误差	/	-22.09%	-11.05%	-6.40%	-4.07%
tPSA/fPSA误差	/	1.67%	4.25%	-2.14%	-6.11%

[0098] 如表7可知,不同的微球浓度造成的检测结果误差不同。当微球浓度较低时,标记抗体量不足,导致检测结果偏低,误差过大。当喷涂浓度为0.5ug/L或以上时,误差降低,可控制在10%以内,从生产成本角度考虑,0.5ug/L的浓度最为合适。

[0099] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

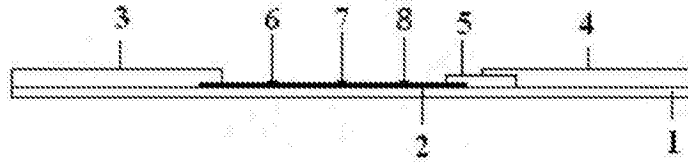


图1

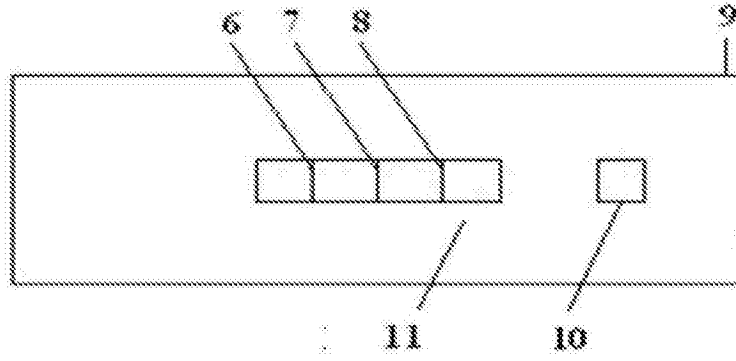


图2

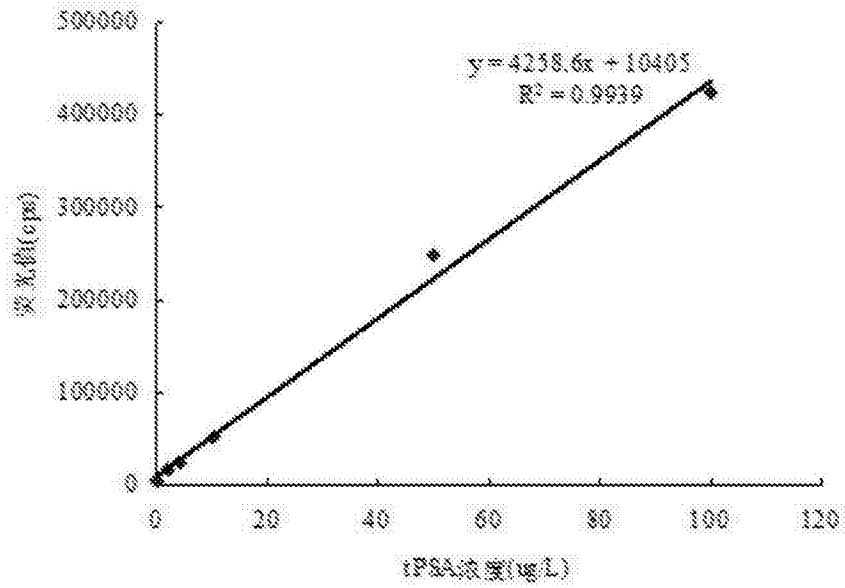


图3

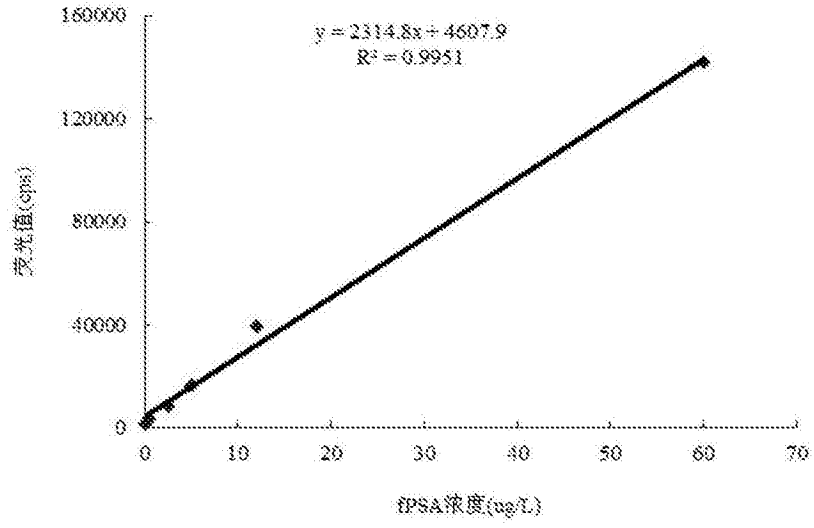


图4

专利名称(译)	定量检测前列腺特异性抗原的试纸条及制备方法与试纸卡		
公开(公告)号	CN105486864A	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	CN201610025127.8	申请日	2016-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	黄飏 张艺 张珏 周彬 郭明明 范俊 邓黎莉 朱岚		
发明人	黄飏 张艺 张珏 周彬 郭明明 范俊 邓黎莉 朱岚		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/574 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/57434 G01N33/57488 G01N33/582 G01N2333/914		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种采用时间分辨荧光免疫层析方法同时定量检测总前列腺特异性抗原和游离前列腺特异性抗原含量的试纸条及其制备方法与试纸卡；试纸条包括底板和在底板顺次粘覆的吸水纸、硝酸纤维素膜、结合垫以及样品垫；首先在硝酸纤维素膜上相间隔依次平行设置fPSA划膜抗体的第一检测带、复合PSA划膜抗体的第二检测带以及免抗鼠多克隆抗体的质控带，结合垫表面喷涂复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体，复合前列腺特异性抗原抗体和游离前列腺特异性抗原抗体均偶联有镧系稀土离子的纳米微球，可以保证同一样品液体中的tPSA和fPSA的检测检测结果精确度高、误差小，为临床使用提供了极大便利。

