

[12] 实用新型专利说明书

[21] ZL 专利号 01256858.9

[45]授权公告日 2002 年 9 月 18 日

[11]授权公告号 CN 2511976Y

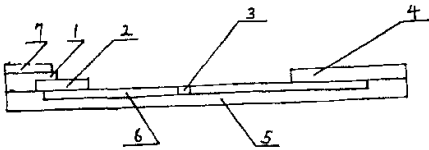
[22]申请日 2001.12.8
[73]专利权人 云南大学
地址 650091 云南省昆明市翠湖北路 52 号(云南大学生命科学院)
共同专利权人 昆明云大生物技术有限公司
马 岚
[72]设计人 马 岚

[21]申请号 01256858.9
[74]专利代理机构 昆明正原专利代理有限公司
代理人 赛晓刚

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图页数 1 页

[54]实用新型名称 一种甄别前列腺癌与前列腺增生试纸
[57]摘要

本实用新型涉及一种用单克隆抗体和胶体金免疫层析一步法检测技术 制作甄别前列腺癌与前列腺增生的试纸及使用这种试纸测定人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值的方法。该发明试纸中有一条检测线,检测线 数据设置为游离 PSA 与总 PSA 的比值为 10%,作为显色与不显色的分界值。检测线显色或不显色,作为测定人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值 标志,该试纸在使用时,除需要被测样品外,无需加入任何试剂,也不需 洗涤,不需要其它分离步骤,操作简单、快速、方便,检测结果直观,易于判断,并且能甄别前列腺癌,尤其是早期前列腺癌或前列腺增生的试纸(Ⅱ型)和使用这种试纸检测人体全血或血清中游离 PSA 数值与总 PSA 的 比值的方法。



I S S N 1 0 0 8 - - 4 2 7 4

1、一种甄别前列腺癌与前列腺增生试纸，包括有底板（5）、吸样品膜（1）、硝酸纤维素膜（6）层、胶体金膜（2）和吸水层（4），在底板（5）上固定有硝酸纤维素膜（6）层，其特征是在硝酸纤维素膜层（6）上部固定有一段吸水物，构成吸水层（4），硝酸纤维素膜（6）层中部喷有一条抗前列腺特征性抗原 PSA 单克隆抗体，构成检测线（3），在吸样品膜（1）层与硝酸纤维素膜（6）层之间夹有胶体金膜（2）层，胶体金膜中含有用另一抗 PSA 单克隆抗体制备的金标探针，在吸样品膜（1）上加入一层分血膜（7）即构成全血检测试纸。

2、根据权利要求 1 所述的甄别前列腺癌与前列腺增生试纸，其特征是试纸中有一条检测线（3），检测线（3）显色或不显色，作为测定人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值标志。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的甄别前列腺癌与前列腺增生试纸，其特征是检测线（3）数据设置为游离 PSA 与总 PSA 的比值为 10%，作为显色与不显色的分界值。

一种甄别前列腺癌与前列腺增生试纸

技术领域：本实用新型涉及一种用单克隆抗体和胶体金免疫层析一步法检测技术制作甄别前列腺癌与前列腺增生的试纸及使用这种试纸测定人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值的方法。属检测用品领域。

背景技术：前列腺癌是中老年男性的常见病多发病。据统计，在男性癌症患者中，前列腺癌的发病率最高，是除肺癌和大肠癌外第三位的死因。前列腺特征性抗原 PSA 是分子量为 34KD 的具有高度组织特异性的糖蛋白，除了分布在正常的前列腺组织、前列腺增生组织、恶性前列腺组织、前列腺转移癌和前列腺分泌液，以及精浆中外，PSA 不存在于其它任何正常组织，也不存在于如乳腺癌、肺癌、直肠结肠癌、胃癌、胰腺癌及甲状腺癌等其它癌症中。对于正常健康和非前列腺病变的男性病人来说，其全血或血清 PSA 的含量均低于 4.0ng/ml。当病人患有前列腺癌、前列腺增生症（BPH）或其它相邻生殖尿道组织炎症时，全血或血清 PSA 浓度会发生显著升高，因此，PSA 是目前为止最有效的前列腺癌的检测标志物。检测全血或血清中的 PSA 是进行前列腺癌的诊断，监控其病症的发生、发展，评价其治疗后的效果，以及检测其化疗或放疗后的复发率的重要指标。目前可用于 PSA 血清检测的试剂盒有放射免疫（RIA）试剂盒、酶标（ELISA）免疫试剂盒、光化学免疫试剂盒及荧光标记免疫试剂盒等。使用这些试剂盒时均需配备相应的仪器，并要求有专业技术人员进行操作方能进行。测定时，测定步骤多，时间长，费用高，使这些方法的使用受到限制。目前国外也有测定血清 PSA 的试纸条出现，但其产品只能显示血清中 PSA 的增高情况，并且存在测定中的灰区现象，即当测定样品中的血清总 PSA 介于 4-10 ng/ml 之间时，将无法区分出此时的 PSA 升高是由于前列腺癌，尤其是早期前列腺癌还是其它前列腺病症如前列腺肥大等引起的。因此必须再用前列腺活检这一现行最可靠的确证标准进行进一步区分，而实际中只有约 25%的人可能是前列腺癌，这就意味着那些血清总 PSA 位于灰区的另外 75%的病人也不得不通过前列腺活检来排除，这无疑会给这些病人的身心带来不必要的痛苦和高额的费用支出。同时由于目前使用的 PSA 临床检测

方法均以血清作为样品，这样就使血清分离有困难的用户无法使用，也使这些测定方法的使用受到限制。多项研究结果证明：PSA 值在 4.0—10.0ng/ml 的灰区范围内应该作游离 PSA 与总 PSA 百分比的测定，这样可以大大提高诊断的灵敏度和特异性，较为准确地区分前列腺癌，尤其是早期前列腺癌和一般的前列腺疾病，如前列腺增生，避免不必要的活检。研究还表明：当游离 PSA 与总 PSA 的比值分别为 20-25%之间、15-20%之间、10-15%之间以及 0-10%之间时，可能患前列腺癌的比例则分别为 16%、20%、28%和 56%。为此 1997 年国际临床化学联合会确定将游离 PSA 与总 PSA 的通用比值定为 10%。

发明内容：本发明的目的在于克服现有技术的缺陷，发明一种利用胶体金免疫层析一步法原理和单克隆抗体技术制作的甄别前列腺癌与前列腺增生试纸，该试纸中有一条检测线，检测线显色数值设定为以游离 PSA 与总 PSA 的比值为 10%作为显色与不显色的分界值，及对人体全血或血清中游离 PSA 数值与总 PSA 的比值的检测方法。基检测时无需其它任何试剂，也不需要洗涤或者其它分离的步骤，即能甄别前列腺癌，尤其是早期前列腺癌与前列腺增生的试纸（Ⅱ型）和使用这种试纸检测人体全血或血清中游离 PSA 数值与总 PSA 的比值的方法，其检测准确率可达到 90%以上。本发明的另一个目的在于避免血清分离麻烦，可直接使用全血进行上述检测工作和甄别前列腺癌与前列腺增生的试纸。

本实用新型是通过下列方式完成的：甄别前列腺癌与前列腺增生试纸，包括有底板、吸样品膜、硝酸纤维素膜层、胶体金膜和吸水层，在底板上固定有硝酸纤维素膜层，其特征是在硝酸纤维素膜层上部固定有一段吸水物，构成吸水层，硝酸纤维素膜层中部喷有一条抗前列腺特征性抗原 PSA 单克隆抗体，构成检测线，在吸样品膜层与硝酸纤维素膜层之间夹有胶体金膜层，胶体金膜中含有用另一抗 PSA 单克隆抗体制备的金标探针，在吸样品膜上多加入一层分血膜构成全血检测试纸。

人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值的检测的：试纸中有一条检测线，检测线显色或不显色，作为测定人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值标志，测定时包括以下步骤：A、将试纸吸样品膜端部插入被检样品中 0.5—1.0cm 深，保持 10—30 秒，取出试纸后平放，或者将被测样品直

接滴在试纸吸样品膜端部，5—30 分钟后观察检测线处是否显色；B、当检测线不显色时，表明样品中游离 PSA 的含量超过 10%，患有前列腺癌的可能性较小，可以不必作前列腺活检、病理切片等进一步检查；C、当检测线显色时，表明样品中游离 PSA 的含量低于或等于 10%，患前列腺癌的可能性较大，应做前列腺活检、病理切片等进一步检查；检测线数据设置为游离 PSA 与总 PSA 的比值为 10%，作为显色与不显色的分界值。

使用本发明甄别前列腺癌与前列腺增生试纸检测人体全血或血清中总 PSA 与游离 PSA 比值的方法是：将试纸吸样品膜端部插入被检样品中 10—30 秒，或者直接将待测样品滴在吸样品膜一端，则吸样品膜（1）可使试纸保有一定数量的样品液，样品液通过硝酸纤维素膜的毛细血管作用，可将样品液从试纸一端向另一端输送，输送过程中样品液中的 PSA 首先与胶体金膜层（2）中的抗 PSA 金标探针发生特异性结合，继续输送到达检测线（3）时，再与检测线中的另一个抗 PSA 单克隆抗体形成三明治式的特异性结合而停留下来，于是检测线显色，检测全过程需用 5—30 分钟。测定全血样品时，位于吸样品膜（1）上的分血膜（7）可自动将血液中的血细胞和血清分离，以避免血细胞对试纸测定的影响。

当检测全血或血清中总 PSA 数值被确定为 4—10ng/ml 时，才需用本发明所示的甄别前列腺癌与前列腺增生试纸检测人体全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值，以确定是前列腺癌还是前列腺肥大等其它前列腺疾病，或者确定受试者是否需要做活检或者其它进一步检查。

当本发明甄别前列腺癌与前列腺增生试纸的检测线（3）显色时，说明样品中游离 PSA 的含量低于或等于 10%，表明患者患有前列腺癌的可能性较大，应做进一步的前列腺活检或病理切片检查等进行进一步检查。

本实用新型前列腺癌与前列腺增生甄别试纸显色原理是：利用胶体金免疫层析一步法原理和单克隆抗体技术，预先将一定数值的抗 PSA 单克隆抗体固定在硝酸纤维素膜的某一区域构成为检测线，而将与胶体金结合的另一抗 PSA 单克隆抗体，即抗 PSA 金标探针固定在胶体金膜层的另一区域，测定时将试纸吸样品膜一端插入被检全血或血清样品中 10—30 秒，或者直接将待测样品滴在吸样品膜一端，则吸样品膜（1）可使试纸保持有一定数量的样品液，样品液可通过硝酸纤维素膜的毛细血管作用，从试纸

一端向另一端输送，在输送过程中样品液中的 PSA 首先与胶体金膜层中的抗 PSA 金标探针发生特异结合，继续输送到硝酸纤维素膜上的检测线位置时，再与检测线中的另一个抗 PSA 单克隆抗体形成三明治式的特异性结合，于是停留下来，当全血或血清样品中所含游离 PSA 与总 PSA 的比值低于或等于所设定的显色数值时，检测线显色，通过设定一条检测数值的检测线，判别该全血或血清样品中所含游离 PSA 与总 PSA 的比值，进一步说明被检人患前列腺癌的可能性，全血测定时预先设置的分血膜可将血液中的血细胞和血清分开，避免血细胞对测定的影响。整个测定需要 5—30 分钟。

本实用新型试纸在使用时，除需要被测样品外，无需加入任何试剂，也不需洗涤，不需要其它分离步骤，操作简单、快速、方便，检测结果直观，易于判断，并且能甄别前列腺癌，尤其是早期前列腺癌或前列腺增生的试纸（II 型）和使用这种试纸检测人体全血或血清中游离 PSA 数值与总 PSA 的比值的方法。

附图说明：下面结合附图进行说明。

图 1 为本实用新型甄别前列腺癌与前列腺增生试纸纵向剖视图。

图 2 为使用图 1 所示试纸检测全血或血清样品后，检测线不显色，说明全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 比值大于 10% 的使用状态图。

图 3 为使用图 1 所示试纸检测全血或血清样品后，检测线显色，说明全血或血清中游离 PSA 与总 PSA 与比值小于或等于 10% 的使用状态图。

具体实施方式（试纸制造）：制备本实用新型甄别前列腺癌与前列腺增生试纸。选用自产（昆明云大生物技术公司）或购买（如美国 Sigma 公司等）的两种不同检测位点的抗 PSA 单克隆抗体，使用其中一种抗体制备金标探针，并预先将一定量的另一种抗 PSA 抗体喷在硝酸纤维素膜的一定区域，形成一条检测线，选取长 100 毫米、宽为 80 毫米、厚为 1 毫米的白色 PVC 塑料为底板，通过双面胶先在中间贴长为 100 毫米、宽为 30 毫米的已喷有一条检测线的硝酸纤维素膜；再在硝酸纤维素膜的上部贴长为 100 毫米、宽为 30 毫米的吸水物（如滤纸等），构成吸水层；在硝酸纤维素膜的另一端粘贴胶体金膜层，其有含有用上述抗 PSA 单克隆抗体制备的金标探针，在胶体金膜层上粘贴吸样品膜，粘贴完毕后，将其切成 80 毫

米长，2.5 毫米宽的试纸条，包装即可。如果制备可直接测定全血样品的全血检测试纸，需在吸样品膜层上多粘贴一层分血膜。

甄别实施例：

1、配制 PSA 标准液，其中游离 PSA 与总 PSA 的比值为 25%，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入样品液，深度为 0.5cm，保持 10 秒钟后取出，平放 10 分钟后观察，试纸上无任何色带显现。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 10 分钟后观察，试纸上无任何色带显现。

2、配制 PSA 标准液，其中游离 PSA 与总 PSA 的比值为 10%，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入样品液，深度为 0.8cm，保持 25 秒钟后取出，平放 10 分钟后观察，试纸上有色带显现。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 10 分钟后观察，试纸上有色带显现。

3、配制 PSA 标准液，其中游离 PSA 与总 PSA 的比值为 5%，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入样品液，深度为 0.6cm，保持 20 秒钟后取出，平放 15 分钟后观察，试纸上有色带显现。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 15 分钟后观察，试纸上有色带显现。

4、取经过总 PSA 测定，其值为 4.2ng/ml 病人全血或血清 0.5ml 置于测定试管中，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入全血或血清中，深度为 0.5cm，保持 15 秒钟后取出，平放 10 分钟后观察，无色带显现，说明该血清样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值大于 10%。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 10 分钟后观察，无色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值大于 10%。

5、取经过总 PSA 测定，其值为 5.5ng/ml 病人全血或血清 0.5ml 置于测定试管中，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入全血或血清中，

深度为 0.5cm，保持 30 秒钟后取出，平放 8 分钟后观察，有色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值小于 10%。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 8 分钟后观察，有色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值小于 10%。

6、取经过总 PSA 测定，其值为 6.1ng/ml 病人全血或血清 0.5ml 置于测定试管中，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入全血或血清中，深度为 0.6cm，保持 20 秒钟后取出，平放 5 分钟后观察，无色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值大于 10%。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 5 分钟后观察，无色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值大于 10%。

7、取经过总 PSA 测定，其值为 9.1ng/ml 病人全血或血清 0.5ml 置于测定试管中，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入全血或血清中，深度为 0.5cm，保持 10 秒钟后取出，平放 10 分钟后观察，有色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值小于 10%。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 10 分钟后观察，有色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值小于 10%。

8、取经过总 PSA 测定，其值为 9.6ng/ml 病人全血或血清 1.5ml 置于测定试管中，使用采取上述方法制备的试纸条测定样品中游离 PSA 与总 PSA 的比值，测定方法是：（1）、将试纸条吸样品膜一端插入全血或血清中，深度为 0.5cm，保持 15 秒钟后取出，平放 12 分钟后观察，无色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值大于 10%。（2）、将上述样品液直接滴在试纸吸样品膜一端，平放 12 分钟后观察，无色带显现，说明该样品中的游离 PSA 与总 PSA 的比值大于 10%。

一、灵敏性测定：

1、采用 PH7.4 的磷酸缓冲液配制含游离 PSA 与总 PSA 比值分别为 1%、2.5%、5%、7.5%、10% 的系列标准液和空白对照，随机抽取采用上述方法制备的试纸条对以上标准液和空白对照平行测定三次，测定游离 PSA 与总 PSA 比值分别为 1%、2.5%、5%、7.5%、10% 的标准液时，试纸检测线（3）

均应显色，在以上测定中空白对照均不显色。

2、采用 PH7.4 的磷酸缓冲液配制含游离 PSA 与总 PSA 比值分别为 12.5%、15%、17.5%、20%、30% 的系列标准液和空白对照，随机抽取采用上述方法制备的试纸条对以上标准液和空白对照平行测定三次，测定含游离 PSA 与总 PSA 比值为 12.5%、15%、17.5%、20%、30% 的系列标准液时，试纸检测线（3）均不显色，在以上测定中空白对照均不显色。

二、特异性测定：将（PAP）、白蛋白（Albumin）、甲胎蛋白（AFP）、癌胚抗原（CEA）、糖蛋白（Glycoprotein）、人 IgG、胆红素（Bilirubin）、CA19-9、CA125 加至不含 PSA 的血清中，使其浓度分别达到 0、10、50、100、200ng/ml，用试纸条进行检测，其结果均为阴性，说明上述在癌症病人中可能存在的物质与该试纸均无交叉反应。

三、干扰性测定：将下列物质加至不含有 PSA 的血清或含游离 PSA 与总 PSA 比值为 10% 的血清中进行试验。干扰物质包括：乙酰氨基苯酚 20mg/dl、乙酰乙酸 1500 mg/dl、丙酮 1250 mg/dl、乙酰水杨酸 20 mg/dl、白蛋白 1.4g/dl、氨苄青霉素 40 mg/dl、维生素 C 40 mg/dl、生物素 30 µg/dl、咖啡因 40 mg/dl、可待因 5 µg/ml、cortisol 150 ng/ml、creatinine 200 mg/dl、DHEAS 10000 ng/ml、雌激素酮 25 ng/ml、雌二醇 25 ng/ml、雌三醇 25 ng/ml、乙醇 4000 mg/dl、血红素 30 g/l、hydroxybutyric acid 100 mg/dl、葡萄糖 20 g/l、草酸 5000 mg/dl、孕酮 50 ng/ml、苯巴比妥 10µg/ml、salicylic acid 1500 mg/dl、司可巴比妥 10µg/ml、碳酸钠 1500 mg/dl、氯化钠 5000 mg/dl、四环素 40 mg/dl、尿素 3500 mg/dl、尿酸 10 mg/dl。每组试验各做三份。所得结果为：凡不含 PSA 的样品，不管是否含干扰物质，均为阴性结果；凡含游离 PSA 与总 PSA 比值为 10% 的血清样品，不管是否含干扰物质，均为阳性结果，说明它们对 PSA 的测定均无明显干扰。

本专利甄别前列腺癌与前列腺增生试纸具有检测速度快、准确性高、安全简便、易于使用。该试纸检测时，除需加入被测样品外，无需加入任何试剂，也不需洗涤，不需要分离的步骤，操作简单方便，检测结果易于判断，并且其检测结果准确率高，是一种适合医疗机构、保健部门和家庭及个人使用的前列腺癌早期诊断和与前列腺肥大鉴别和普查用的新一代生

物高科技产品。

本发明甄别前列腺癌与前列腺增生试纸由于能检测人体全血或血清中总 PSA 与游离 PSA 的比值，可将在检测总 PSA 时其值位于灰区的病人作进一步区分，可有效地将前列腺肥大病人与前列腺癌，尤其是前列腺癌早期病人分开，有效率可达到 90%以上。通过该试纸的发明，可提高了前列腺癌，尤其是早期前列腺检测的准确性和检出率，由此可对病人进行及时和有针对性的治疗，提高前列腺癌的治愈率，降低中老年男性前列腺癌的死亡率，并可免除部分不必要的活检或其它检测，减少病人痛苦，降低检测费用，节约检测时间，利于推广使用，特别是全血检测试纸可更方便地用于健康普查、家庭自测和自我检查。

1—吸样品膜；2—胶体金膜；3—检测线；4—吸水层；5—底板；6—硝酸纤维素膜；7 分血膜。

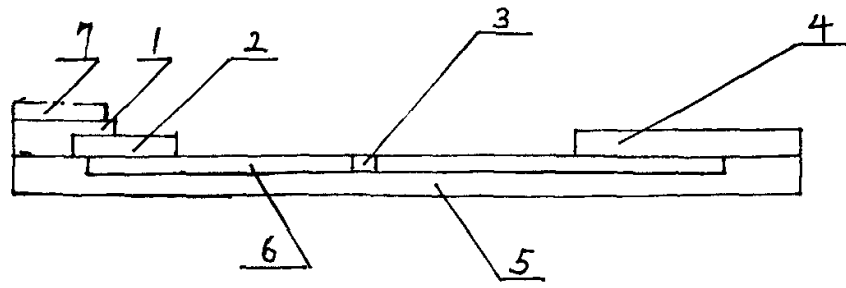


图 1

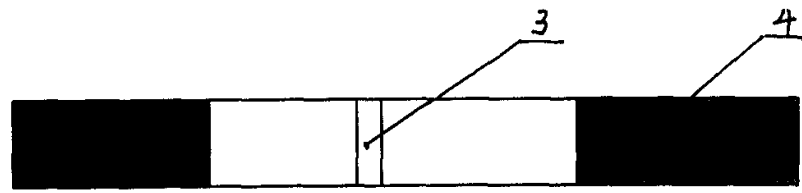


图 2

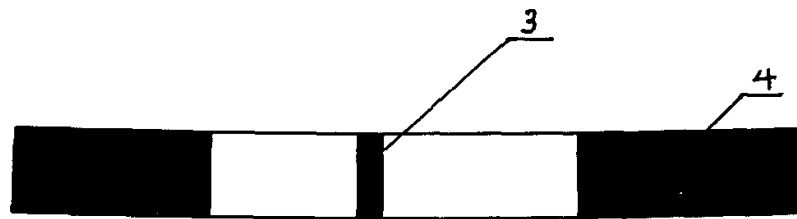


图 3

专利名称(译)	一种甄别前列腺癌与前列腺增生试纸		
公开(公告)号	CN2511976Y	公开(公告)日	2002-09-18
申请号	CN01256858.9	申请日	2001-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	云南大学 昆明云大生物技术有限公司 马岚		
申请(专利权)人(译)	云南大学 昆明云大生物技术有限公司 马岚		
[标]发明人	马岚		
发明人	马岚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种用单克隆抗体和胶体金免疫层析一步法检测技术制作甄别前列腺癌与前列腺增生的试纸及使用这种试纸测定人体全血或血清中游离PSA与总PSA比值的方法。该发明试纸中有一条检测线,检测线数据设置为游离PSA与总PSA的比值为10%,作为显色与不显色的分界值。检测线显色或不显色,作为测定人体全血或血清中游离PSA与总PSA比值标志,该试纸在使用时,除需要被测样品外,无需加入任何试剂,也不需洗涤,不需要其它分离步骤,操作简单、快速、方便,检测结果直观,易于判断,并且能甄别前列腺癌,尤其是早期前列腺癌或前列腺增生的试纸(II型)和使用这种试纸检测人体全血或血清中游离PSA数值与总PSA的比值的方法。

