



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102269763 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 07

(21) 申请号 201110118338. 3

(22) 申请日 2011. 05. 09

(71) 申请人 沈鹤柏

地址 200233 上海市徐汇区桂林路 100 号 14
号楼 202 室

(72) 发明人 沈鹤柏 赵露晶

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务
所 31233

代理人 宋纓 张文军

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

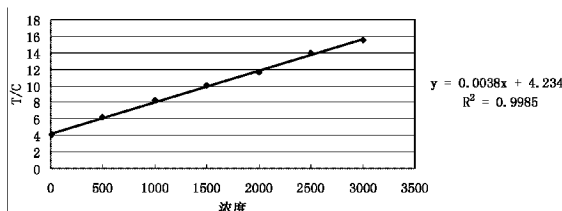
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种膀胱癌定量检测试纸

(57) 摘要

本发明涉及一种膀胱癌定量检测试纸, 由样品垫、胶金垫、硝酸纤维膜、吸水纸和底板组成, 在所述硝酸纤维膜上有固定有尿纤维连接蛋白的检测区和羊抗鼠二抗的对照区, 在所述的胶金垫上有金标抗尿纤维连接蛋白抗体, 其中, 所述的金标抗体经 pH5-10 的稀释液分散后固定于胶金垫上。定量检测灵敏度达 10ng/mL、线性范围从 10-3000ng/mL, 并且具备特异性强、精密度高、稳定性好、操作简便、费用低等优点, 适用于对膀胱癌的初步筛查和术后跟踪。



1. 一种膀胱癌定量检测试纸,由样品垫、胶金垫、硝酸纤维膜、吸水纸和底板组成,在所述的硝酸纤维膜上固定有尿纤维连接蛋白抗体的检测区和羊抗鼠二抗的对照区,在所述的胶金垫上有金标抗尿纤维连接蛋白抗体,其中,所述的金标抗体经组成为 0.1M Tris-HCL pH5-10、0.1-10% BSA、0.2-10% 蔗糖、0.01-2% Tween 20 和 0.01-0.2% NaN_3 的稀释液分散后固定于胶金垫上。

2. 根据权利要求 1 所述的膀胱癌定量检测试纸,其特征在于,所述的金标抗尿纤维连接蛋白抗体是以如下方法制备的:将 20-200mL 0.001-0.1%的 HAuCl_4 溶液加热至沸,在剧烈搅拌下迅速加入 0.5-5mL 1%的柠檬酸钠溶液,保持沸腾状态反应 5-30min 后关闭热源即得胶体金溶液,调节 pH 至 5-10,混合抗尿纤维连接蛋白单克隆抗体与胶体金溶液,包被量 10-50 $\mu\text{g/mL}$,涡旋反应 10-30 分钟,加入含 10% PEG 和 10% BSA 封闭,重悬并浓缩,得到稳定的金标抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的膀胱癌定量检测试纸,其特征在于,所述的稀释液的 pH 值为 7-9。

4. 根据权利要求 1 所述的膀胱癌定量检测试纸,其特征在于,所述的样品垫为经 0.1-10% BSA,0.05-3% Triton X-100 的 0.01-0.1mol/L PBS pH = 5-10 处理液浸泡处理的玻璃纤维膜。

5. 根据权利要求 4 所述的膀胱癌定量检测试纸,其特征在于,所述的处理液的 pH 为 7-9。

6. 根据权利要求 1 所述的膀胱癌定量检测试纸,其特征在于,所述试纸上具有至少一个质控区,其显色表示试纸有效,且其显色的吸收或反射光密度作为定量测定的参比值。

7. 一种膀胱癌定量检测试纸的制备方法,依次包括如下步骤:

1) 将 100mL 0.01%的 HAuCl_4 溶液加热至沸,在剧烈搅拌下迅速加入 0.5-5mL 1%的柠檬酸钠溶液,保持沸腾状态反应 5-30min 后关闭热源即得胶体金溶液;

2) 取上述制备的胶体金溶液,用 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 5-10,再加入抗尿纤维连接蛋白单克隆抗体,确保包被量为 10-50 $\mu\text{g/mL}$,涡旋反应 10-30 分钟,依次加入含 10% PEG 和 10% BSA 进行封闭,终浓度分别控制在 0.1-1%和 0.05-1%,离心重悬并浓缩,得到稳定的金标抗体;

3) 样品垫用含有 0.1-10% BSA,0.05-3% Triton X-100 的 0.01-0.1mol/LPBS pH = 5-10 处理液中浸泡,干燥;

4) 将浓缩的金标抗体重新分散在 0.1M Tris-HCL pH5-10、0.1-10% BSA、0.2-10% 蔗糖、0.01-2% Tween 20 和 0.01-0.2% NaN_3 的稀释液中,并将其固定在玻璃纤维上,制成胶金垫;

5) 将样品垫、胶金垫、硝酸纤维层和吸水纸,依次重叠相连粘贴在底板上,组装成检测试纸。

8. 一种膀胱癌标志物定量检测方法,包括将液体样品滴于权利要求 1 所述的膀胱癌定量检测试纸的样品垫一侧,通过抗原与抗体特异性结合反应,使胶体金聚集而显色;测量免疫层析试纸检测区和质控区胶体金颗粒的漫反射光,分别计算出所述的检测区的光密度 (T_{OD}) 和质控区的光密度 (C_{OD}),制作标准工作曲线,获得被检样品中所述标志物的浓度。

9. 根据权利要求 8 所述的定量检测方法,其特征在于,所述试纸的检测限低于 10ng/mL 尿纤维连接蛋白。

10. 根据权利要求 8 所述的定量检测方法,其特征在于,所述试纸上具有至少一个质控区,其显色表示试纸有效,且其显色的吸收光密度作为定量测定的参比值。

一种膀胱癌定量检测试纸

技术领域

[0001] 本发明属生物技术领域,特别是涉及一种膀胱癌的定量检测试纸。

背景技术

[0002] 膀胱移行细胞癌 (Bladder transitional cell carcinoma, BTCC) 是泌尿生殖系肿瘤中最常见的恶性肿瘤,虽然手术治疗可获得较好疗效,但其治疗费用昂贵,术后复发率高。一直以来,膀胱镜病理活检被作为膀胱癌临床诊断的金标准,但它属于侵入性操作,诊疗过程复杂、费时费力,且病人难以忍受其痛苦。因此寻找敏感、特异的膀胱肿瘤标志物并建立一种无创、简便、快速、廉价的检测方法成为膀胱癌诊断及术后复查的研究热点。

[0003] 纤维连接蛋白 (Fibronectin, FN) 是一种大分子非胶原糖蛋白,其在尿液中的含量与 BTCC 的浸润程度有关,是评价膀胱癌恶性程度、进展以及估测预后的敏感指标。作为一种新型肿瘤标志物, FN 现已引起国内外学者的广泛关注,但是将其作为指标应用于临床诊断的仍然甚少。目前,尿 FN 临床主要采用 E LISA 方法进行检测,但是该方法操作复杂,反应时间较长,且对操作人员和环境也有一定的要求,普遍应用受限。免疫层析方法是 20 世纪 90 年代兴起的一种将免疫技术和色谱层析技术相结合的固相膜免疫分析方法,但是,尚缺乏对纤维连接蛋白的定量检测方法,不能满足临床对指标量化的要求。

发明内容

[0004] 所要解决的技术问题

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种膀胱癌标志物的定量检测试纸,以克服现有的膀胱癌检测中只能定性而不能定量的缺陷。

[0006] 技术方案

[0007] 本发明的技术方案之一是提供一种膀胱癌定量检测试纸,由样品垫、胶金垫、硝酸纤维膜、吸水纸和底板组成,在所述的硝酸纤维膜上固定有尿纤维连接蛋白抗体的检测区和羊抗鼠二抗的对照区,在所述的胶金垫上有金标抗尿纤维连接蛋白抗体,其中,所述的金标抗体经组成为 0.1M Tris-HCl pH5-10、0.1-10% BSA、0.2-10% 蔗糖、0.01-2% Tween 20 和 0.01-0.2% NaN_3 的稀释液分散后固定于胶金垫上。

[0008] 上述的膀胱癌定量检测试纸的优选方案之一为,所述的金标抗尿纤维连接蛋白抗体是以如下方法制备的:将 20-200mL 0.001-0.1% 的 HAuCl_4 溶液加热至沸,在剧烈搅拌下迅速加入 0.5-5mL 的柠檬酸钠溶液,保持沸腾状态反应 5-30min 后关闭热源即得胶体金溶液,调节 pH 至 5-10,优选将所述的胶体金溶液的 pH 调节至 7-9,混合抗尿纤维连接蛋白单克隆抗体与胶体金溶液,包被量 10-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,涡旋反应 10-30 分钟,加入含 10% PEG 和 10% BSA 封闭,得到稳定的金标抗体。

[0009] 上述的膀胱癌定量检测试纸的优选方案之二为,所述的胶金垫由玻璃纤维和固定其上的金标抗体组成。金标抗体需重新分散在 0.1M Tris-HCl (pH5-10 优选 pH7-9) 体系中 (含有 0.1-10% BSA、0.2-10% 蔗糖、0.01-2% Tween 20 和 0.01-0.2% NaN_3),才能确保层

析过程金标抗体的顺利释放和该试纸长期存放的稳定性。

[0010] 上述的膀胱癌定量检测试纸的优选方案之三为,所述的样品垫为吸水性玻璃纤维层。该样品垫用含有 0.1-10% BSA,0.05-3% Triton X-100 的 0.01-0.1mol/L PBS pH = 5-10,优选 pH7-9 事先处理,不仅能平衡样品间的个体差异,还能在层析的过程中对硝酸纤维素膜进行适当的封闭。

[0011] 上述的膀胱癌定量检测试纸的优选方案之四为,所述试纸上具有至少一条质控区,其显色表示试纸有效,且其显色的吸收光密度作为定量测定的参比值。

[0012] 本发明的技术方案之二是提供一种膀胱癌定量检测试纸的制备方法,依次包括如下步骤:

[0013] 1) 将 100mL 0.01% 的 HAuCl_4 溶液加热至沸,在剧烈搅拌下迅速加入 0.5-5mL 1% 的柠檬酸钠溶液,保持沸腾状态反应 5-30min 后关闭热源即得胶体金溶液;

[0014] 2) 取上述制备的胶体金溶液,用 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 5-10,优选 pH7-9,再加入抗尿纤维连接蛋白单克隆抗体,确保包被量为 10-50 $\mu\text{g/mL}$,涡旋反应 10-30 分钟,依次加入含 10% PEG 和 10% BSA 进行封闭,终浓度分别控制在 0.1-1% 和 0.05-1%,离心重悬并浓缩,得到稳定的金标抗体;

[0015] 3) 样品垫用含有 0.1-10% BSA,0.05-3% Triton X-100 的 0.001-0.1mol/L PBS pH = 5-10,优选 pH7-9 的处理液中浸泡,干燥;

[0016] 4) 将浓缩的金标抗体重新分散在 0.1M Tris-HCL (pH5-10,优选 pH7-9) 体系中,含有 0.1-10% BSA、0.2-10% 蔗糖、0.01-2% Tween 20 和 0.01-0.2% NaN_3 ,并将其固定在玻璃纤维上,制成胶金垫;

[0017] 5) 将样品垫、胶金垫、硝酸纤维素层和吸水纸,依次重叠相连粘贴在底板上,组装成检测试纸。

[0018] 本发明的技术方案之三是提供一种膀胱癌标志物定量检测方法,包括将液体样品滴于上述的膀胱癌定量检测试纸的样品垫一侧,通过抗原与抗体特异性结合反应,使胶体金聚集而显色;测量免疫层析试纸检测区和质控区胶体金颗粒的漫反射光,分别计算出所述的检测区的光密度 (T_{OD}) 和质控区的光密度 (C_{OD}),制作标准工作曲线,获得被检样品中所述标志物的浓度。

[0019] 上述的膀胱癌标志物定量检测方法的优选方案之一为,所述试纸的检测限低于 10ng/mL 尿纤维连接蛋白。

[0020] 上述的膀胱癌标志物定量检测方法的优选方案之二为,所述试纸上具有至少一条质控区,其显色表示试纸有效,且其显色的吸收或反射光密度作为定量测定的参比值。

[0021] 上述的膀胱癌标志物定量检测方法的优选方案之三为,所述液体样品为尿液。

[0022] 本发明可以通过如下方式实现,也可以使用同样效果的类似方式:

[0023] 所述的试纸由吸尿玻璃纤维层(样品垫)、固定有金标抗体的玻璃纤维层(胶金垫)、硝酸纤维素膜层(NC膜)和吸水纸层,按从左到右的顺序依次重叠相连粘贴在底板上组装而成(如图2所示)。金标抗体为胶体金颗粒与抗FN抗体结合的复合物;硝酸纤维素膜上标记有T区(检测区)和C区(质控区),T区为FN抗体,C区为包被的抗鼠的二抗。待病人的尿样滴加后,若T区显色,C区也显色,得到的结果为阳性。若T区不显色,C区显色,得到的结果为阴性。若质控区(C区)不显色,表示试纸失效(如图3所示)。金在尺寸减

小到纳米量级时表现出强烈的吸收特性。实验和理论均证明,胶体金颗粒对绿光具有较强的吸收特性。本发明通过测量免疫层析试纸检测区胶体金颗粒的漫反射光,分别计算出其上检测区吸收光密度(T_OD)和质控区吸收光密度(C_OD),制作标准工作曲线(如图1所示),计算出被检样品中目标被检物的浓度。

[0024] 发明人惊奇地发现,胶金垫上固定的金标抗体复合物,在加样释放的过程中会受到各种因素的影响(包括温湿度以及其中所含的生物、化学成分),造成长期存放后失效,所以需要对其进行适当的处理,实验中采用蛋白BSA、蔗糖、表面活性剂、防腐剂等,保证了复合物的生物活性以及长期存放的稳定性,实验表明该检测试纸在常温(2-30℃)密封条件下可有效保存两年。类似地,样品垫是试纸条与被检测样品接触的第一个部分,其除了具有调节加样速度使样品均匀进入试纸条反应区的作用外,更为重要的是样品垫中如果加入合适的化学试剂,例如,用处理液(比如,含有0.1-10% BSA,0.05-3% TritonX-100的0.001-0.1mol/L PBS pH = 5-10;或者含有0.5-5% BSA,0.1-2% Triton X-100的0.008-0.08mol/L PBS pH = 7-9;或者含有1% BSA,0.5% Triton X-100的0.01mol/L PBS pH = 7.4)中浸泡,可以平衡样品在物理和化学性质上的诸多差异,帮助胶金垫上的金标抗体解离,并在层析的过程中对硝酸纤维素膜进行封闭。在本发明中使用的样品垫处理液,对于实现定量检测灵敏度的提高和检测线性范围的扩大,具有关键的意义。

[0025] 有益效果

[0026] 本发明采用胶体金免疫层析技术的原理,提供一种FN快速定量检测试纸。利用以特定波长的激光器为光源的金标免疫层析分析仪器,通过测量试纸条检测带和质控带对特定波长光线的光密度,实现了对被检物的快速定量检测。本发明的FN胶体金定量检测试纸灵敏度高达10ng/mL,线性范围从10-3000ng/mL,具有准确性高,特异性好,可实现定量分析等优势,不仅能用于膀胱癌的初步筛查及术后跟踪,同时通过量化还能为肌层浸润提供可靠地信息,反映肿瘤进展的风险程度,对临床决策具有指导意义。

附图说明

[0027] 图1为标准曲线

[0028] 图2为定量检测试纸结构示意图

[0029] 图3为定性定量检测试纸检测结果示意图

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0031] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如:分子标记操作手册或临床检测操作手册,或按照制造厂商所建议的条件。

[0032] 实施例1

[0033] 1、采用经典的Frens法制备粒径为5-40nm的胶体金溶液:将100mL 0.01%的HAuCl₄溶液加热至沸,在剧烈搅拌下迅速加入0.5-5mL的柠檬酸钠溶液,保持沸腾状态反应

5-30min 后关闭热源,即得亮红色透明胶体。

[0034] 2、选择适当的 pH 值 (5-10, 优选 7-9, 具体值比如 :5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10), 混合抗尿纤维连接蛋白单克隆抗体与胶体金溶液, 包被量 10-50 $\mu\text{g/mL}$, 并涡旋反应 10-30 分钟, 依次加入含 10% PEG 和 10% BSA 封闭, 离心重悬并浓缩至原体积的 1/100-1/10, 得到稳定的金标抗体。

[0035] 3、胶金垫的制备 : 选用玻璃纤维素膜作为胶金垫材料, 将上述制备的胶体金 -FN 抗体复合物重新分散于 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 5-10, 优选 pH7-9 的含 0.1-10% BSA、0.2-10% 蔗糖、0.01-2% Tween 20 和 0.01-0.2% NaN_3) 的溶液中, 并喷于玻璃纤维上, 37°C 烘干。

[0036] 4、然后在硝酸纤维膜 (NC 膜) 的一侧喷点 FN 抗体和羊抗鼠 IgG 抗体, 分别作为 T 区和 C 区。

[0037] 5、将样品垫 (规格为 300 * 18mm)、胶金垫 (规格为 300 * 5mm)、NC 膜 (规格为 300 * 25mm) 和吸水纸 (规格为 300 * 18mm) 按照从左到右的顺序组装在底板上, 并用切刀切割成宽为 4mm 的试纸条。

[0038] 试纸定性检测方法 :

[0039] 1、取 50 μL 的待测样本加在试纸条的加样区 ;

[0040] 2、在 10min 后记观察记录检测结果。20min 后观察的结果无效。

[0041] 检测结果的判断 :

[0042] 1、阳性结果 : 在试纸条的检测区和质控区位置上各出现一条紫红色条带。

[0043] 2、阴性结果 : 仅在试纸条的质控区上出现一条紫红色条带。

[0044] 3、无效结果 : 在试纸条的质控区上未出现紫红色条带。

[0045] 试纸定量检测方法 :

[0046] 1、取阳性结果的试纸条, 利用金标免疫层析分析仪器 (上海柏纳生物技术有限公司生产), 测量免疫层析试纸检测区和质控区胶体金颗粒的漫反射光, 分别计算出所述的检测区的光密度 (T_OD) 和质控区的光密度 (C_OD) ;

[0047] 2、计算出检测区与质控区吸收光密度的比值 ; 每个样品分别用 3 个检测试纸测定 3 次, 取平均值 ;

[0048] 3、绘制相应的标准曲线, 利用所述标准曲线, 即可求得实际样品中标志物的浓度或含量。

[0049] 实施例 2

[0050] 1、将 FN 抗原标准品用正常人尿液作为稀释液配置系列浓度标准品 : 10ng/mL, 500ng/mL, 800ng/mL, 1000ng/mL, 2000ng/mL, 3000ng/mL。

[0051] 2、将系列浓度标准品滴加到检测试纸的加样孔中, 反应 10min 后通过金标免疫层析分析仪读出检测区与质控区吸收光密度的比值, 每个浓度标准品分别用 3 个检测试纸测定 3 次, 取平均值, 结果如表 1 所示, 并绘制相应的标准曲线 (见图 2)。

[0052] 3、利用上述标准曲线检测临床样品, 计算出本发明的定量检测试纸灵敏度为 10ng/mL 或以下, 线性范围下限低于 10ng/mL 上限高于 3000ng/mL。

[0053] 表 1. 系列浓度标准品的检测区与质控区吸收光密度的比值结果

[0054]

浓度	T/C(1)	T/C(2)	T/C(3)	平均值
10	4.053	4.121	4.097	4.090333
500	6.21	6.198	6.235	6.214333
1000	8.234	8.292	8.275	8.267000
1500	10.012	9.987	10.125	10.04133
2000	11.702	11.673	11.695	11.69000
2500	13.897	14.005	13.958	13.95333
3000	15.609	15.624	15.611	15.61467

[0055] 实施例 3

[0056] 膀胱癌定量检测试纸稳定性测试：将制备好的检测试纸密封包装，分别放在常温（2-30℃）条件下和 37℃环境中进行常温和加速试验。

[0057] 加速试验 30 天后取出检测试纸，测定 1000ng/ml 的 FN 标准品，重复检测 20 次， $CV \leq 5\%$ ，均值在 990-1010ng/ml 之间。

[0058] 按照同样的方法测试常温（2-30℃）条件下放置的的检测试纸，考察至第 26 个月，测定 1000ng/ml 的 FN 标准品，重复检测 20 次， $CV \leq 5\%$ ，均值同样控制在 990-1010ng/ml 之间。表明试纸可有效保存两年。

[0059] 实施例 4

[0060] 临床病人尿液样品的定量检测

[0061] 1、定量标准曲线的准备：如实施例 2。

[0062] 2、利用标准曲线对临床病人尿液样品进行定量检测：取 150 份临床病人尿液样品，无需调节样品浓度，直接利用本发明的膀胱癌定量检测试纸进行检测。记录金标免疫层析分析仪给出的检测区与质控区吸收光密度的比值。将上述的比值与标准曲线的浓度值进行比对，获得尿液中的标志物浓度数值。

[0063] 3、利用现有的 ELISA 方法（两种试剂盒，购自 InVitrogen 和上海亚培生物科技有限公司）对上述 150 份临床病人尿液样品进行平行测定。用 SPSS13.0 对两种 ELISA 试剂盒的测定数值进行相关性分析，结果为两组数值无明显差异。对本发明的膀胱癌定量检测试纸与两种 ELISA 试剂盒的测定数值分别进行相关性分析，结果为各两组数值均无明显差异。将本发明的膀胱癌定量检测试纸与购自上海亚培生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒所获得的两组浓度数值进行误差分析，获得了实测浓度和标准浓度的误差均在 5% 以内的结果。

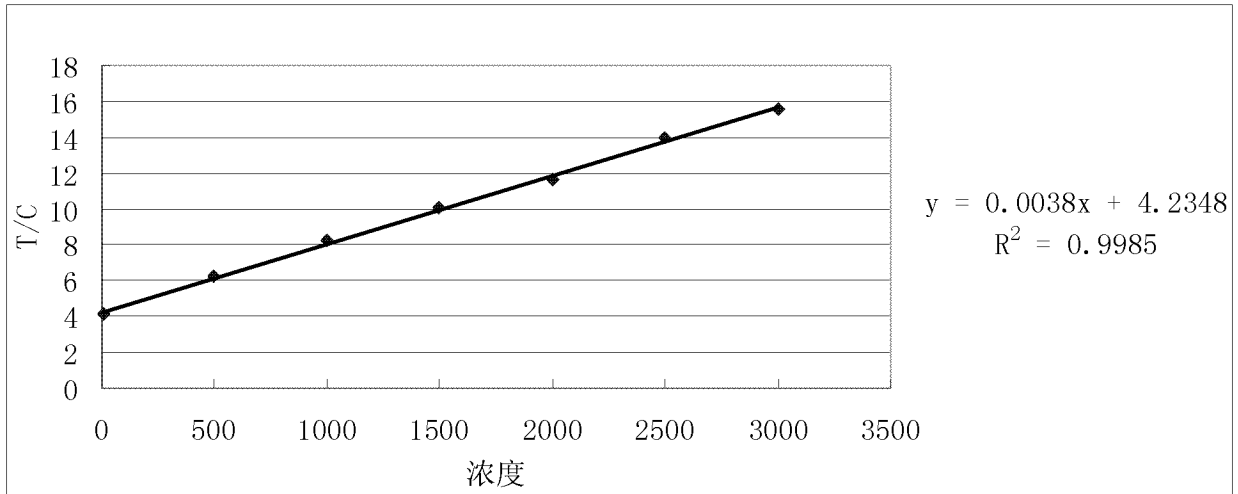


图 1

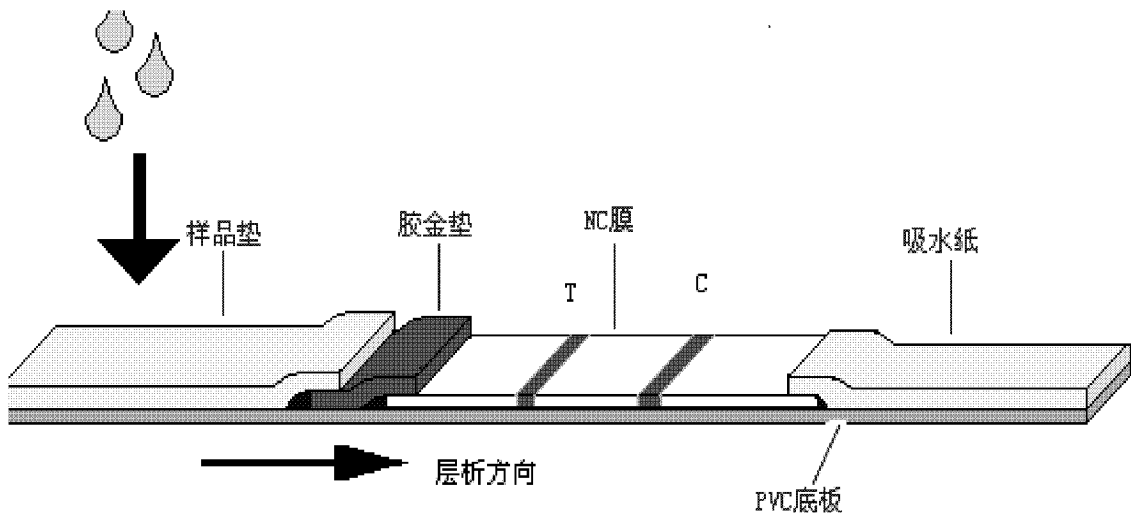


图 2

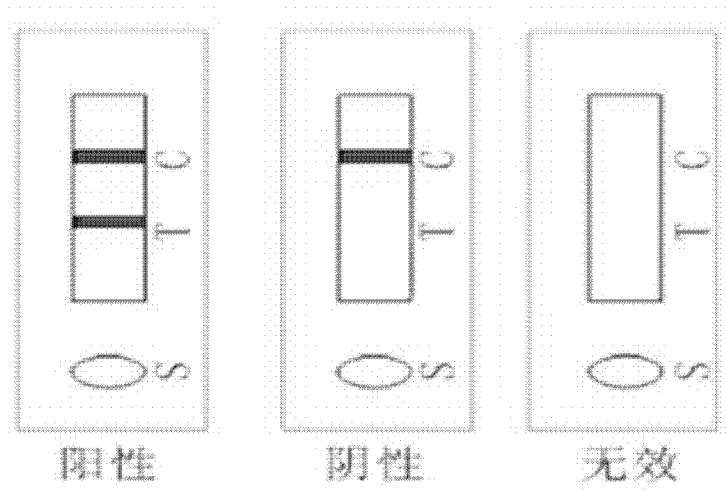


图 3

专利名称(译)	一种膀胱癌定量检测试纸		
公开(公告)号	CN102269763A	公开(公告)日	2011-12-07
申请号	CN201110118338.3	申请日	2011-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	沉鹤柏		
申请(专利权)人(译)	沉鹤柏		
当前申请(专利权)人(译)	沉鹤柏		
[标]发明人	沈鹤柏 赵露晶		
发明人	沈鹤柏 赵露晶		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	张文军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种膀胱癌定量检测试纸，由样品垫、胶金垫、硝酸纤维膜、吸水纸和底板组成，在所述的硝酸纤维膜上有固定有尿纤维连接蛋白的检测区和羊抗鼠二抗的对照区，在所述的胶金垫上有金标抗尿纤维连接蛋白抗体，其中，所述的金标抗体经pH5-10的稀释液分散后固定于胶金垫上。定量检测灵敏度达10ng/mL、线性范围从10-3000ng/mL，并且具备特异性强、精密度高、稳定性好、操作简便、费用低等优点，适用于对膀胱癌的初步筛查和术后跟踪。

