



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 107121548 A

(43) 申请公布日 2017. 09. 01

(21) 申请号 201610105566. X

(22) 申请日 2016. 02. 25

(71) 申请人 深圳市迈科龙生物技术有限公司
地址 518000 广东省深圳市高新技术产业园
高新南六道迈科龙大厦 17 楼

(72) 发明人 蒋能辉 常文伟 唐盛 尹立东

(74) 专利代理机构 深圳市康弘知识产权代理有
限公司 44247

代理人 胡朝阳 孙洁敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

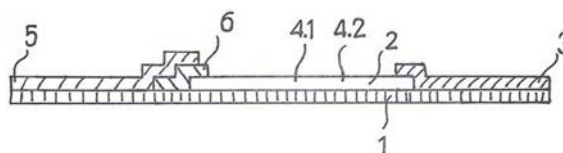
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

定量检测肿瘤标志物的试纸、制备方法及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及体外诊断检测技术领域,特别涉及一种定量检测肿瘤标志物的试纸及其制备方法和定量检测肿瘤标志物的方法。本发明提供的定量检测肿瘤标志物的试纸,包括依次连接的标记垫、层析膜及吸水纸;所述层析膜包括检测区和质控区,所述检测区与标记垫连接,所述质控区与吸水纸连接;所述检测区包被有抗特异肿瘤标志物的抗体,所述质控区包被有抗 IgG 抗体;所述标记垫包括标记区,所述标记区与检测区连接,所述标记区上负载有荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗 IgG 抗体。具有成本低廉、操作简便、灵敏度高、快速、准确的优点。



1. 一种定量检测肿瘤标志物的试纸,其特征在于,包括依次连接的标记垫、层析膜及吸水纸;

所述层析膜包括检测区和质控区,所述检测区与标记垫连接,所述质控区与吸水纸连接;所述检测区包被有抗特异肿瘤标志物的抗体,所述质控区包被有抗IgG抗体;

所述标记垫包括标记区,所述标记区与检测区连接,所述标记区上负载有荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述试纸还包括样品垫和载体,所述样品垫与标记垫连接;所述样品垫、标记垫、层析膜及吸水纸位于载体表面,所述样品垫、标记垫、层析膜及吸水纸沿载体的延伸方向依次连接。

3. 根据权利要求2所述的试纸,其特征在于,所述样品垫、标记垫、层析膜及吸水纸顺次搭接;所述标记垫形成为Z型结构,一端搭接在层析膜的一端上;所述样品垫的一端具有台阶结构,此端与标记垫的Z型结构适配,搭接在标记垫的Z型结构上;所述吸水纸形成为Z型结构,一端搭接在层析膜的另一端上。

4. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述标记垫上负载的荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,荧光乳胶为时间分辨荧光微球。

5. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述时间分辨荧光微球包括镧系元素,时间分辨荧光微球的粒径为50~300nm。

6. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述检测区包被的抗特异肿瘤标志物的抗体与标记区上负载的荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体为针对同一肿瘤标志物的不同抗体。

7. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述肿瘤标志物包括蛋白类肿瘤标志物或糖类抗原标志物中的一种或几种,所述蛋白类肿瘤标志物选自癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、游离前列腺特异抗原(f-PSA)、总前列腺特异抗原(t-PSA)中的一种或几种;所述糖类抗原标志物选自糖类抗原199(CA199)、糖类抗原125(CA125)、糖类抗原153(CA153)中的一种或几种。

8. 一种如权利要求1-7任意一项所述的试纸的制备方法,其特征在于,步骤包括将第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体用荧光乳胶标记,并将荧光乳胶标记的第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体包被至标记垫上;将包被有荧光乳胶标记的第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体的标记垫、层析膜和吸水纸依次连接。

9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤包括

A、荧光乳胶标记抗体:将时间分辨荧光微球与偶联剂混合反应后;沉淀用硼酸盐缓冲液重悬至浓度为0.1wt%-1wt%,与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体混合反应;所述时间分辨荧光微球与偶联剂混合反应起始时间分辨荧光微球的浓度为0.1wt%-1wt%;偶联剂的浓度为0.2-0.6mg/ml;与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体混合反应起始第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体的浓度为0.2-0.4mg/ml;

B、标记垫的制备:将步骤A制得的沉淀用三羟甲基氨基甲烷缓冲液重悬至浓度为0.01-0.1 mg/ml,按2-10ul/cm的用量包被至标记垫上;

C、层析膜的制备:分别用磷酸缓冲盐溶液将第二抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗

体调节至浓度为0.25-2mg/ml,将第二抗特异肿瘤标志物的抗体包被至硝酸纤维素膜的检测区,将抗IgG抗体包被至硝酸纤维素膜的质控区;

D、组装:在载体上顺次相互搭接粘贴样品垫、标记垫、层析膜和吸水纸。

10.一种定量检测肿瘤标志物的方法,其特征在于,包括将待测样本附着于权利要求1-7任意一项所述的试纸上,后在荧光免疫分析仪下分析。

定量检测肿瘤标志物的试纸、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断检测技术领域,特别涉及一种定量检测肿瘤标志物的试纸及其制备方法和定量检测肿瘤标志物的方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤严重威胁着人类生命安全及身心健康,早期诊断是治愈肿瘤的关键。临床上应用的X线检查、超声检查、CT检查、核磁共振检查、内窥镜检查等手段都能从不同角度对肿瘤进行明确诊断,提高了肿瘤的诊断确诊性,而其局限性也明显,只有在肿瘤发展到一定阶段形成明显肿瘤灶才能被检查到。临床需要一种能够在肿瘤还未发生而只是有发展趋势的早期既可给予预警的方法,或者在肿瘤治疗过程中对治疗效果和发展趋势给予指导的方法。肿瘤标志物是指在肿瘤的发生和增值过程中,因肿瘤细胞的相关基因表达或机体对肿瘤产生反应而异常变化而一类物质,这些物质不存在于正常人体内或含量极低。人们通过检测其含量,协助临床对肿瘤的诊断、分析病情、指导治疗、监测复发或转移、及判断预后有知道意义。临床常用的肿瘤标志物及其临床意义见表:

[0003]

肿瘤标志物 名称	英文简写	主诊 部位	所预示的肿瘤	健康人血清中 浓度
-------------	------	----------	--------	--------------

[0004]

甲胎蛋白	AFP	肝脏	肝细胞癌、睾丸癌	<20ug/L
癌胚抗原	CEA	广谱	结直肠癌、乳腺癌	<5ug/L
癌抗原 125	CA125	卵巢	卵巢癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌	<35000U/L
癌抗原 199	CA199	消化道	胰腺癌、胆管癌、胃癌、肠癌	<35000U/L
癌抗原 724	CA724	胃	胃癌、卵巢癌	<6.7ug/L
癌抗原 153	CA153	乳腺	乳腺癌	<35000U/L
癌抗原 50	CA50	广谱	胰腺癌、肝癌、卵巢癌、肠癌、胃癌、肺癌	<20000U/L
前列腺特异性抗原	PSA	前列腺	前列腺癌	<5ug/L
人绒毛膜促性腺激素	HCG	子宫	胚胎细胞癌、滋养层肿瘤	<5ug/L
神经元特异性烯醇化酶	NSE	肺	小细胞肺癌、神经内分泌系统肿瘤	<13ug/L
鳞状上皮细胞癌抗原	SCC	鳞癌	鳞状细胞癌	<5ug/L
细胞角蛋白 19 的可溶性片段	CYFRA21-1	肺	非小细胞肺癌	0.1-4 ug/L

[0005] 理想的肿瘤标志物应当是指在一种特异性的肿瘤中出现,但是实际上这些肿瘤标

志物特异性均有局限性,单一肿瘤标志物监测诊断某一种恶性肿瘤的准确率不是很高,一般不会超过60%。不同类型的肿瘤释放标志物浓度不同,且在肿瘤发展的不同时期其释放标志物浓度也不一样,因此在临床上多采用多种肿瘤标志物联合诊断和动态观察的方法,以达到提高肿瘤诊断阳性率的目的。目前临床联合诊断的肿瘤标志物及诊断的肿瘤类型见表,并可根据临床情况增加相应项目。

[0006]

肿瘤类型	联合检测标志物项目
小细胞肺癌	NSE、CEA、CA125
非小细胞肺癌	CEA、SCC、CA125
肝癌	AFP、CEA、CA199、 β HCG
胆管/胆囊癌	CEA、CA199、CA242
胰腺癌	CA199、CEA、CE242
食管癌	CA199、SCC、CEA
胃癌	CEA、CA242、CA199
结直肠癌	CEA、CA242、CA199
乳腺癌	CA153、CEA、CA125
卵巢癌	CA125、CEA、AFP
子宫癌	SCC、CA125、CEA
睾丸癌	AFP、SCC、 β HCG
前列腺癌	tPSA、fPSA
膀胱癌	TPA、CEA、CA199

[0007]

鼻咽癌	CEA、SCC、EBV-IgA
-----	-----------------

[0008] 目前临床上检测肿瘤标志物主要采用酶联免疫分析(ELISA)和化学发光免疫分析(CLIA)方法,其它如蛋白芯片和放射免疫方法等产品使用量较少。酶联免疫分析(ELISA)不

需要特殊仪器装置,简便、容易掌握,一般检测实验室即可操作,但操作步骤和影响因素较多,容易造成假阴性和假阳性。化学发光免疫分析(CLIA)检测灵敏度可达Pg/ml,特异性高,可进行自动化分析,被广泛用于肿瘤标志物检测,但该技术存在发光反应短,影响因素多,稳定性及重复性欠佳的问题,且检测成本高,不适用于快速现场检测。时间分辨免疫层析技术是最近几年研究的新热点技术,一般用镧系稀土元素离子作为标记物,其荧光光谱发射光谱窄,特异性强,荧光光谱的Stokes位移较大,发射寿命长,可采用延缓测量时间的方式来降低样品和试剂的本地荧光干扰。现有有针对AFP、CEA等蛋白肿瘤标志物的胶体金或荧光微球免疫层析技术,其中胶体金技术(Immune colloidal gold technique)是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术,英文缩写为:GICT。胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,称为胶体金。荧光微球免疫层析技术是以功能化纳米微球载体技术,结合荧光标记物探针,仪器直接检测激发荧光信号而非传统金标定量所采用的CCD表层光密度扫描技术,检测信号具有较高的信噪比、更高的信号检测和检测灵敏度,检测范围更宽:与传统光度百分率分析及光密度扫描分析技术不同,荧光免疫层析技术采用荧光直接激发发光检测手段,荧光信号强度与荧光微球数量呈直线相关,同时避免了酶催化发光技术存在的催化效率及底物量限制等问题,定量范围与反应体系内参与反应的特异性蛋白量直接相关,根据目前已经在临床应用的全自动化学发光检测技术相比,现有荧光免疫层析技术灵敏度可达到0.05pg,线性范围可达到200-1000倍,产品变异系数(CV%)低于10%,性能指标远远高于其它快速检测技术,接近全自动化学发光检测技术水平。但现有普通的荧光免疫层析技术,激发光与接收光波长相近,且所用的大部分材料本身具有荧光性质,导致背景干扰,灵敏度不理想,且应用范围窄,还不能应用于糖类抗原的检测。

发明内容

[0009] 本发明旨在克服现有技术中的定量检测肿瘤标志物的产品成本高、灵敏度不理想且应用范围窄的问题,提供一种成本低廉、操作简便、灵敏度高、能快速准确的定量检测肿瘤标志物的试纸及其制备方法和定量检测肿瘤标志物的方法。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0011] 本发明提供了一种定量检测肿瘤标志物的试纸,包括依次连接的标记垫、层析膜及吸水纸;所述层析膜包括检测区和质控区,所述检测区与标记垫连接,所述质控区与吸水纸连接;所述检测区包被有抗特异肿瘤标志物的抗体,所述质控区包被有抗IgG抗体;所述标记垫包括标记区,所述标记区与检测区连接,所述标记区上负载有荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体。

[0012] 本发明同时提供了上述试纸的制备方法,其步骤包括将第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体用荧光乳胶标记,并将荧光乳胶标记的第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体包被至标记垫上;将包被有荧光乳胶标记的第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体的标记垫、层析膜和吸水纸依次连接。

[0013] 本发明同时提供了一种定量检测肿瘤标志物的方法,其包括将待测样本附着于上述试纸上,后在荧光免疫分析仪下分析。

[0014] 本发明的有益效果在于：

[0015] 应用本发明的试纸检测的原理为待测样本中的肿瘤标志物抗原与标记垫上的抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体标记用荧光乳胶特异性结合成复合物,该荧光乳胶复合物通过层析作用在层析膜上与检测区的抗特异肿瘤标志物的抗体特异性结合而使荧光大量聚集。在荧光免疫分析仪下,由光源激发的检测区荧光信号,经过时间分辨控制和光电接受转化为电信号,并由分析仪进行数据分析输出最终定量结果。采用本发明的试纸来联合检测肿瘤标志物,具有成本低廉、操作简便、灵敏度高、快速、准确的优点,同时本发明建立针对多种不同肿瘤标志物的试纸产品,可根据临床联合检测需求灵活组合。

[0016] (1)本发明的试纸配合荧光定量检测仪即可实现准确检测,可实现手动、半自动或全自动的检测,与酶联免疫法和化学发光法相比,具有操作简便快速、即可单项目检测也可多项目随机组合、检测成本低、不需要大型仪器的优点,在基层社区医院即可开展。

[0017] (2)本发明的试纸是一种基于时间分辨荧光免疫层析技术,在免疫层析法的基础上,采用时间分辨技术,克服了胶体金试纸和普通荧光试纸的背景干扰,且敏感度显著提高(可达pg/l级别)。

[0018] (3)本发明试纸对待测样品无要求,即可用于血清、血浆检测,亦可用于全血样本检测。

附图说明

[0019] 图1为本发明的实施例1的试纸结构示意图；

[0020] 图2为本发明的实施例1的CA199标准曲线图；

[0021] 图3为本发明的实施例1的相关性分析图；

[0022] 附图标记:1、底板;2、硝酸纤维素包被膜;3、吸水纸;4.1、检测区;4.2、质控区;5、样品垫;6、标记垫。

具体实施方式

[0023] 下面详细描述本发明的实施例,下面描述的具体实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0024] 本发明提供了一种定量检测肿瘤标志物的试纸,包括依次连接的标记垫、层析膜及吸水纸;所述层析膜包括检测区和质控区,所述检测区与标记垫连接,所述质控区与吸水纸连接;所述检测区包被有抗特异肿瘤标志物的抗体,所述质控区包被有抗IgG抗体;所述标记垫包括标记区,所述标记区与检测区连接,所述标记区上负载有荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体。采用本发明的试纸来联合检测肿瘤标志物,具有成本低廉、操作简便、灵敏度高、快速、准确的优点,同时本发明建立针对多种不同肿瘤标志物的试纸产品,可根据临床联合检测需求灵活组合。

[0025] 其中,质控区是检验该试纸是否正常,只要质控区的线出现了,则表示检测区的结果是大致正常的,检测区是反应试剂是否有反应。

[0026] 其中,试纸一般还包括用于负载待测样品的样品区,样品区可以位于标记垫的非标记区,也可以在标记垫上连接样品垫,样品垫与标记垫连接专门用于负载待测样品。

[0027] 一般试纸还可包括用于支撑上述标记垫、层析膜及吸水纸等的载体,上述样品垫、

标记垫、层析膜及吸水纸均位于载体表面,一般采用黏贴的方式附着在载体上,样品垫、标记垫、层析膜及吸水纸沿载体的延伸方向依次连接。

[0028] 一些实施例中,样品垫、标记垫、层析膜及吸水纸顺次搭接;优先,标记垫形成为Z型结构,一端搭接在层析膜的一端上;所述样品垫的一端具有台阶结构,此端与标记垫的Z型结构适配,搭接在标记垫的Z型结构上;所述吸水纸形成为Z型结构,一端搭接在层析膜的另一端上。能够更好的层析,便于高效准确的检测。其中,搭接在标记垫的Z型结构上可以全部或部分覆盖标记垫的Z型结构。

[0029] 一些实施例中,标记垫上负载的荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,荧光乳胶为时间分辨荧光微球。优先,时间分辨荧光微球包括镧系元素,即镧系荧光微球;优先,时间分辨荧光微球的粒径为50~300nm。

[0030] 优先,检测区包被的抗特异肿瘤标志物的抗体与标记区上负载的荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体为针对同一肿瘤标志物的不同抗体,即一般采用能抗同一特异肿瘤标志物的不同抗体。

[0031] 本发明试纸应用广泛,可以应用于各种肿瘤标志物的检测,例如肿瘤标志物包括蛋白类肿瘤标志物或糖类抗原标志物中的一种或几种,所述蛋白类肿瘤标志物选自癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、游离前列腺特异抗原(f-PSA)、总前列腺特异抗原(t-PSA)中的一种或几种;所述糖类抗原标志物选自糖类抗原199(CA199)、糖类抗原125(CA125)、糖类抗原153(CA153)中的一种或几种。可根据检测的肿瘤标志物的不同选择标记区和层析膜上的抗特异肿瘤标志物的抗体来制备针对不同肿瘤标志物检测的试纸产品,均可以实现准确快速的定量检测。

[0032] 本发明同时提供了上述试纸的制备方法,其步骤包括将第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体用荧光乳胶标记,并将荧光乳胶标记的第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体包被至标记垫上;将包被有荧光乳胶标记的第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体的标记垫、层析膜和吸水纸依次连接。其中,包被、连接的技术本发明没有限制,可以采用常规技术。

[0033] 一些实施例中,步骤包括

[0034] A、荧光乳胶标记抗体:将时间分辨荧光微球与偶联剂例如碳二亚胺混合反应后;沉淀用硼酸盐缓冲液重悬至浓度为0.1wt%-1wt%,与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体混合反应;所述时间分辨荧光微球与偶联剂混合反应起始时间分辨荧光微球的浓度为0.1wt%-1wt%;偶联剂的浓度为0.2-0.6mg/ml;与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体混合反应起始第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体的浓度为0.2-0.4mg/ml。一般先将时间分辨荧光微球分散后再与碳二亚胺混合反应,分散的方法本发明没有限制,可以采用本领域技术人员公知的各种分散技术,例如超声分散。优选,硼酸盐缓冲液的浓度为10-50mM,pH为7.0-8.0。时间分辨荧光微球与偶联剂反应的时间没有特别限定。与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体反应的时间也没有特别限定。其中,与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体混合反应是指沉淀的重悬液可以分别与第一抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体混合反应,最后再混合,也可以一起混合反应。一般可以将制得的沉淀用10-50mM Tris缓冲液(三羟甲基氨基甲烷缓冲液)(pH8.0-9.0)重悬至0.1mg/ml,超声波处理分散后放置在2-8℃条件下保存备用。其中,偶联剂本发

明没有特别限定,可以为本领域技术人员公知的各种偶联剂,例如碳二亚胺。

[0035] B、标记垫的制备:将步骤A制得的沉淀用三羟甲基氨基甲烷缓冲液重悬至浓度为0.01-0.1mg/ml,按2-10 μ l/cm的用量包被至标记垫上。优选,三羟甲基氨基甲烷缓冲液的浓度可以为10-50mM,pH8.0-9.0。一般可采用真空冷冻或37℃干燥。

[0036] C、层析膜的制备:分别用磷酸缓冲盐溶液将第二抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体调节至浓度为0.25-2mg/ml,将第二抗特异肿瘤标志物的抗体包被至硝酸纤维素膜的检测区,将抗IgG抗体包被至硝酸纤维素膜的质控区制得硝酸纤维素包被膜。其中,优选,磷酸缓冲盐溶液的浓度为10-50mM,pH7.4。其中,第二抗特异肿瘤标志物的抗体可以为不同于第一抗特异肿瘤标志物的抗体的另一种抗同一特异肿瘤标志物的抗体。层析膜为免疫反应的发生处。

[0037] D、组装:在载体上顺次相互搭接粘贴样品垫、标记垫、层析膜和吸水纸。

[0038] 本发明的试纸的制备方法步骤具体可以为:A、荧光乳胶标记抗体:时间分辨荧光微球超声波处理分散1min,调节时间分辨荧光微球浓度为0.1mg/ml,加入终浓度为0.2-0.6mg/ml的碳二亚胺,混匀,室温反应15min后10000-15000g、离心5-15min,沉淀用10-50mM硼酸盐缓冲液(pH7.0-8.0)重悬至0.1mg/ml,超声波处理分散1min;加入终浓度为0.2-0.4mg/ml抗特异肿瘤标志物的抗体或抗IgG抗体,混匀,室温反应3h后10000-15000g、离心5-15min,,沉淀用10-50mM Tris缓冲液(三羟甲基氨基甲烷缓冲液)(pH8.0-9.0)重悬至0.1mg/ml,超声波处理分散1min,放置在2-8℃条件下备用。

[0039] B、标记垫的制备:将上述制备的荧光乳胶标记抗体用10-50mM Tris缓冲液(pH8.0-9.0,含1wt%BSA(牛血清白蛋白)和0.5wt%Tweenn20(吐温-20))调节至浓度为0.01-0.1mg/ml,按2-10 μ l/cm的用量包被至标记垫上,真空冷冻或37℃干燥。

[0040] C、层析膜的制备:分别用10-50mM PBS缓冲液(磷酸缓冲盐溶液)(pH7.4)将另一抗同一特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体调节至浓度为0.25-2mg/ml,将此抗特异肿瘤标志物抗体包被至硝酸纤维素膜的检测区,将抗IgG抗体包被至硝酸纤维素膜的质控区,37℃干燥。

[0041] D、组装:在底板上顺次相互搭接粘贴样品垫、标记物垫、层析膜和吸水纸制得试纸,最后可以根据需要裁切成适当宽度的试纸条。

[0042] 本发明同时还提供了一种定量检测肿瘤标志物的方法,其包括将待测样本附着于上述试纸上,后在荧光免疫分析仪下分析。待测样本中的肿瘤标志物抗原与标记垫上的抗特异肿瘤标志物的抗体和/或抗IgG抗体标记用荧光乳胶特异性结合成复合物,该荧光乳胶复合物通过层析作用在层析膜上与检测区的抗特异肿瘤标志物的抗体特异性结合而使荧光大量聚集。在荧光免疫分析仪下,由光源激发的检测区荧光信号,经过时间分辨控制和光电接受转化为电信号,并由分析仪进行数据分析输出最终定量结果。

[0043] 以下是本发明提供的具体实施例,用以说明上述方案及其各种条件的选取。本发明实施例中所用试剂均采用市购分析纯。

[0044] 实施例1

[0045] 以下结合实施例和附图,以糖类抗原CA199为例,对本发明做进一步的说明,但并不对本发明造成任何限制。

[0046] 以下实施例中:

[0047] CA199抗体1和CA199抗体2来源于美国meridian公司。

[0048] 抗IgG抗体来源于中国Boson公司。

[0049] 时间分辨荧光微球来源于bangslab公司

[0050] 本实施例的CA199时间分辨免疫层析定量检测试纸可通过如下方法制备：

[0051] A、抗体的预处理：将CA199抗体1用0.05mol/L、pH7.5~8.5的硼酸盐缓冲液4℃透析过夜。

[0052] B、荧光微球标记：选用直径为100~200nm镧系荧光微球，用0.05mol/L pH6.0的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液)洗涤调节微球浓度为0.1mg/ml，超声分散(200w处理，3/3s,1min)；加入碳化二亚胺(EDC)终浓度为0.5mg/ml，室温反应10~15min，12000g、离心15min；用0.05mol/L、pH7.5的硼酸盐缓冲液复溶至浓度为0.1mg/ml，加入CA199抗体1，使CA199抗体1的终浓度为0.2mg/ml，室温反应3小时；加入终止液(含有1~2wt%BSA的0.05mol/L、pH7.5的硼酸盐缓冲液，室温反应30min)；离心洗涤微球，加入复溶液(含有0.2~1wt%BSA、0.05~0.1wt%Tween-20的0.05mol/L、pH8.5的Tris缓冲液)至原体积，超声分散。

[0053] C、标记垫6的制备：荧光微球标记物用稀释液稀释至浓度为0.02mg/ml，使用定量喷膜仪器以8ul/cm的量将制备好的荧光微球标记物喷涂在聚酯纤维或玻璃纤维膜上形成标记垫6，避光37℃干燥。

[0054] D、硝酸纤维素包被膜2的制备：使用0.01mol pH7.4的磷酸盐缓冲液分别稀释CA199抗体2和兔IgG抗体至0.75mg/ml和1.5mg/ml，使用定量喷膜仪器，以1.0ul/cm的浓度，间距0.5cm的间隔包被检测区4.1和质控区4.2，37℃干燥。

[0055] D、组装：组装操作在湿度低于35%的房间进行，在底板1中间先粘贴硝酸纤维素包被膜2，然后在硝酸纤维素包被膜2与质控区4.2接近的一端粘贴吸水纸3，吸水纸3与硝酸纤维素包被膜2重叠接触1-2mm，另一端粘帖标记垫6，同样与硝酸纤维素包被膜2重叠接触1-2mm，在标记垫6上部分覆盖样品垫5，样品垫5的另一端粘帖在底板1上。最后切割成4mm宽的试纸条，装入壳体中。

[0056] CA199的定量检测

[0057] 1. 绘制标准曲线

[0058] 在制备好的CA199的时间分辨免疫层析试纸的样品垫的加样区加入不同浓度的CA199校准品(浓度为0IU/ml、5IU/ml、20IU/ml、50IU/ml、200IU/ml、500IU/ml)20ul，并加入80ul稀释液。膜层析反应15min后，仪器读取检测区和质控区信号，以检测区对应的浓度值回执标准曲线，得到拟合方程，方程参数输入读数仪的ID卡中。

[0059] 2. 样品检测

[0060] 以制备的CA199的时间分辨免疫层析试纸与贝克曼的CA199化学发光检测试剂同时检测临床样本，以两种试纸的检测结果绘制相关曲线，回归方程为： $y=1.044x-2.9611$ ， $R^2=0.9862$ ，相关系数 $R=0.993$ ， $P<0.001$ ，两者具有良好的相关性。

[0061] 本发明的试纸具有成本低廉、操作简便、灵敏度高、快速、准确的优点，同时本发明建立针对多种不同肿瘤标志物的试纸产品，可根据临床联合检测需求灵活组合。

[0062] 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特

点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0063] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

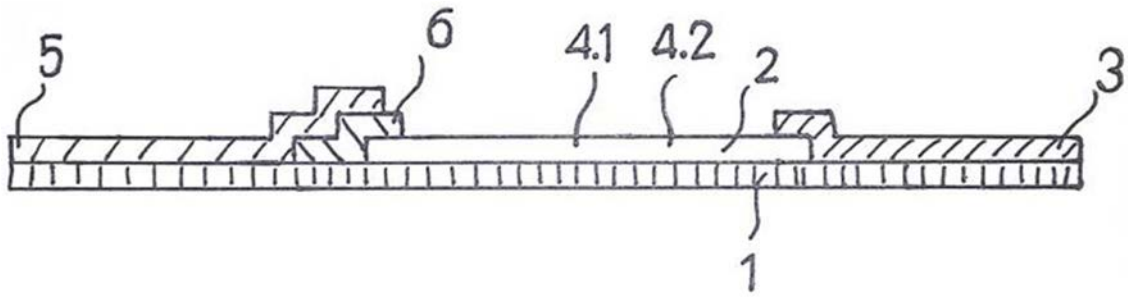


图1

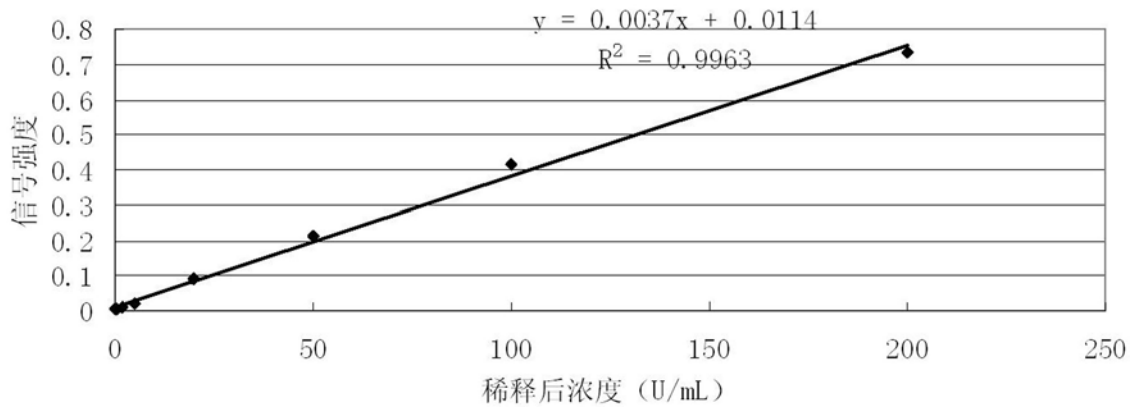


图2

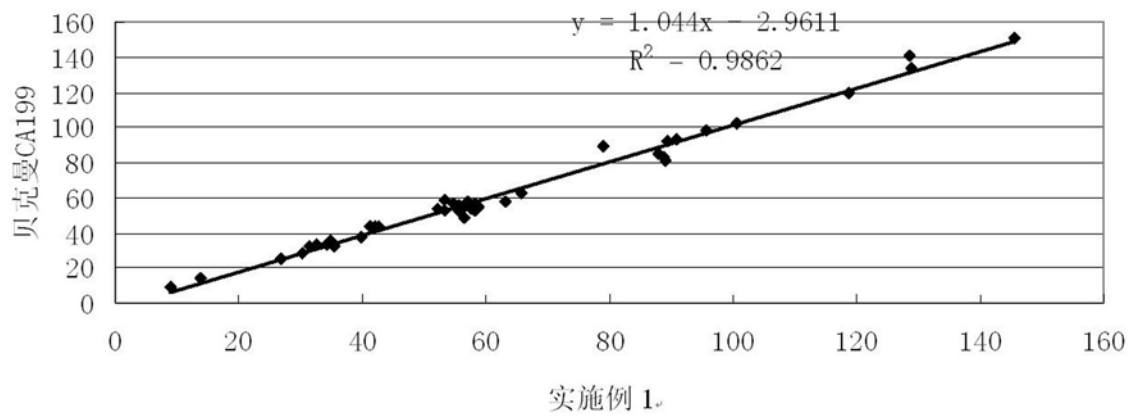


图3

专利名称(译)	定量检测肿瘤标志物的试纸、制备方法及其检测方法		
公开(公告)号	CN107121548A	公开(公告)日	2017-09-01
申请号	CN201610105566.X	申请日	2016-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市迈科龙生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市迈科龙生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市迈科龙生物技术有限公司		
[标]发明人	蒋能辉 常文伟 唐盛 尹立东		
发明人	蒋能辉 常文伟 唐盛 尹立东		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	胡朝阳 孙洁敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外诊断检测技术领域，特别涉及一种定量检测肿瘤标志物的试纸及其制备方法和定量检测肿瘤标志物的方法。本发明提供的定量检测肿瘤标志物的试纸，包括依次连接的标记垫、层析膜及吸水纸；所述层析膜包括检测区和质控区，所述检测区与标记垫连接，所述质控区与吸水纸连接；所述检测区包被有抗特异肿瘤标志物的抗体，所述质控区包被有抗IgG抗体；所述标记垫包括标记区，所述标记区与检测区连接，所述标记区上负载有荧光乳胶标记的抗特异肿瘤标志物的抗体和抗IgG抗体。具有成本低廉、操作简便、灵敏度高、快速、准确的优点。

