



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596937 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201610951522.9

(22)申请日 2016.11.03

(71)申请人 重庆高圣生物医药有限责任公司
地址 400039 重庆市九龙坡区二郎创业路
101至109单号高科创业园D-2

(72)发明人 周勇 吴秀兰

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒

(57)摘要

本发明属于体外诊断领域,具体涉及一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒。该试剂盒包括试纸条、吸滴管、检测液I、检测液II、检测液III、稀释液、样本稀释杯和存贮介质。其中,试纸条制备步骤是:(1)量子点标记抗体的制备,即检测液的制备;(2)制备包被有检测指标的反应膜;(3)在荧光专用背衬上顺序粘贴样品垫、步骤(2)制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,即得量子点检测试纸条;(4)定性或定量检测。本发明公开的试剂盒采用双抗体夹心法原理,快速检测人全血或血清、血浆中的三种抗原,规避了以前单独检测方法的很多缺陷,一滴血便可以同时检测三种肿瘤标记物,操作简便、结果更加直观、价格低廉,且灵敏度和特异性均得到了显著的提高,显示出了其在临床应用中的巨大潜力。

1. 一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,包括试纸条、吸滴管、检测液I、检测液II、检测液III、稀释液、样本稀释杯和存贮介质。

2. 其特征在于:所述的试纸条自下而上依次由样品垫、反应膜和吸水垫连接在一起后固定于背衬上而组成;其中,所述的反应膜上含有由CA19-9单克隆抗体、CEA单克隆抗体、CA242单克隆抗体分别包被而成的三条T线即检测线和一条由羊抗鼠IgG包被而成的C线即质控线。

3. 根据权利要求1所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:反应膜为硝酸纤维素膜。

4. 根据权利要求1所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:所述检测液I、II、III分别为QD530 nm量子点标记的CA19-9单克隆抗体、QD610 nm量子点标记的CEA单克隆抗体、QD652 nm量子点标记的CA242单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:稀释液的组分为0.5~1.0% 吐温Tween-20、1.5~2% 牛血清白蛋白BSA、0.02~0.05% proClin300的0.01M PBS缓冲溶液。

6. 根据权利要求1所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:所述的硝酸纤维素膜上的三条检测线和一条质控线分别按照如下次序排列而成:从靠近吸水垫一端到靠近量子点样品垫一端依次为IgG质控线(C)、CA19-9单克隆抗体(T1)、CEA单克隆抗体(T2)、CA242单克隆抗体(T3)检测线。

7. 根据权利要求1所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:所述存贮介质包括RFID标签、IC芯片、磁码、或条码;所述存贮介质储存有同批次量子点免疫试纸条定量检测样品用的被检物标准曲线、试条批号、试条有效期、存贮介质密码、临床指标参考值、试条生产厂商信息,且可读入被测对象身份信息、检测者信息、样品名称、样品编号、检测日期、检测结果信息。

8. 根据权利要求1所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:上述用于激发量子点的光源范围在320 ~ 450 nm;根据双抗体夹心原理,当待测样本中含有胰腺癌的相关抗原时,复合物将同时被T线和C线捕获,激发光照射下出现2条及2条以上荧光条带,且其中一条为C线时,检测结果为阳性;反之,检测样本中不含相关抗原,则只在C线位置出现荧光条带,检测结果为阴性;如果T线和C线都不出现条带则说明检测无效,条带颜色越深说明待测样本中含有胰腺癌标记物相关抗原含量越高,反之,条带颜色越浅说明相关抗原含量越低。

9. 根据权利要求7所述的同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,其特征在于:所述试剂盒的定量检测方法是利用荧光定量分析仪分别进行免疫层析检测,将数值代入存贮介质中标准曲线得到待测抗原含量。

一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤诊断试剂盒,尤其是涉及一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,属于免疫检测领域。

背景技术

[0002] 胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,由于早期缺乏典型的临床表现,临床上90%以上的患者确诊时已经属于中晚期,失去最佳治疗时机,其5年生存率仅为5%。因此,实现对胰腺癌的早期诊断,提高胰腺癌患者的生存率是治疗该疾病的关键。

[0003] 免疫层析试纸条检测也称为免疫侧向层析,是一种快速、简便、灵敏、直观、价格低廉,并可进行现场检测的方法。具有放射性免疫、酶联免疫吸附法、气相色谱法、液相色谱法、毛细管电泳等仪器检测方法所不具备的优点,在检测技术中处于重要地位,是对传统和大型仪器检测方法的有力补充。随着社会的发展,人类对生活质量有了更高的要求,免疫层析检测技术在面对人类疾病、环境污染物、食品安全、动物医学等重大问题时具有重要的作用。

[0004] 当前免疫层析产品主要是基于胶体金技术而开发的,在医学检验、毒品检测、食品安全检测等领域得到了广泛的应用。但该技术由于存在颗粒粒径均一性差、免疫标记物不稳定、颜色单一、只能单指标检测、难以实现准确定量检测和灵敏度低等不足,无法满足人们的需求。因此,发明高灵敏度、多指标同时检测、简便、直观、价格低廉的免疫层析检测方法十分必要。

[0005] 量子点(QDs)是一种半导体纳米晶,其激发光谱宽,呈连续分布,而发射光谱窄,单色性好且颜色可调,并且具有持久的光化学稳定性,其独特的光学性质使其作为一种新型的荧光探针而得到广泛关注。因此,本发明用量子点取代传统的胶体金作为标记物可以弥补胶体金标记的不足,发明高灵敏度、多指标同时检测、简便、直观、价格低廉的免疫层析方法,提高胰腺癌阳性检测率。

发明内容

[0006] 为克服现有技术中的不足,本发明提供了一种利用量子点荧光免疫层析试纸条,联合检测胰腺癌标记物的试剂盒,该试剂盒具有高灵敏度、多指标同时检测、简便、直观、价格低廉等特点。通过同时检测CA19-9、CEA、CA242三种肿瘤标记物,大大提高检测胰腺癌的速度和效率,相对于单检试剂盒具有灵敏度高及特异性强等优势。同时,每种肿瘤标记物的荧光颜色不同,在紫外灯照射下,结果判断更加直观。

[0007] 本发明实现其目的采用如下技术方案:

1、一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,包括试纸条、吸滴管、检测液I、检测液II、检测液III、稀释液、样本稀释杯和存贮介质。其特征在于:所述的试纸条自下而上依次由样品垫、反应膜和吸水垫连接在一起后固定于背衬上而组成;其中,所述的硝酸纤维素膜上含有由CA19-9单克隆抗体、CEA单克隆抗体、CA242单克隆抗体分别包被而成的三条T线即检

测线和一条由羊抗鼠 IgG 包被而成的 C 线即质控线。

[0008] 其中,所述检测液 I、II、III 分别为 QD530 nm 量子点标记的 CA19-9 单克隆抗体、QD610 nm 量子点标记的 CEA 单克隆抗体、QD652 nm 量子点标记的 CA242 单克隆抗体。稀释液组分为 0.5~1.0% 吐温 Tween-20、1.5~2% 牛血清白蛋白 BSA、0.02~0.05% procIn300 的 0.01M PBS 缓冲溶液。

[0009] 优选的,所述的硝酸纤维素膜上的 3 条检测线和 1 条质控线分别按照以下次序排列而成:从靠近吸水垫一端到靠近样品垫一端依次为羊抗鼠 IgG 质控线 (C)、CA19-9 单克隆抗体 (T1) 检测线、CEA 单克隆抗体 (T2) 检测线和 CA242 单克隆抗体 (T3) 检测线。

[0010] 所述反应膜为硝酸纤维素膜。

[0011] 所述的背衬为各种硬质的支持物,仅在紫外照射下无荧光且具有负载和支持的功能均可用于本发明。

[0012] 本发明所述的量子点可为 II-IV 族元素组成的化合物,如 CdS、CdSe、CdTe、ZnS、ZnSe 等,以及它们组成的核壳式量子点 (如 CdSe@CdS、CdSe@ZnS 等) 的任意一种,且均为水溶性羧基量子点。

[0013] 本发明所述同步定量胰腺癌肿瘤标记物的量子点免疫层析试纸条的制备方法包括如下步骤:

1) 量子点标记抗体的制备;

A、取不同波长量子点分别用磷酸缓冲液调节 pH=6~8,加入 EDC 和 suIf o-NHS (QDs: EDC 的摩尔比为 1:50~1:200;EDC: suIf o-NHS 的摩尔比为 1:1~5:1),涡旋振荡均匀,室温活化 15~60 min;

B、分别对应加入胰腺癌标记物的相应抗体 (CA19-9 单抗、CEA 单抗、CA242 单抗,且 QDs 和抗体的摩尔比为 1:4~1:10),室温振荡反应 1~4 h;

C、反应结束后用分子截留量 30~100 KDa 的超滤离心管浓缩至 30~100 uI,然后采用凝胶尺寸排阻法进行纯化,收集有荧光的部分,再用超滤离心管浓缩后保存于 PBS 缓冲溶液中 (含 0.05% ProcIn300),4℃ 保存备用。即得检测液 I (QD530-CA199 Ab)、检测液 II (QD610-CEA Ab)、检测液 III (QD652-CA242 Ab)。

[0014] 2) 制备包被有检测指标的反应膜:检测指标为 CA19-9 单抗、CEA 单抗、CA242 单抗。以 NC 膜为反应膜,将检测指标和羊抗鼠 IgG 用包被缓冲液调节浓度至 0.1~2.0 mg/ml,在湿度为 40~60% 的条件下,按照 1~2 uI/cm 的溶液划线液量,将检测指标和羊抗鼠 IgG 喷到反应膜上对应的检测区和质控区进行包被,各个指标间隔为 3~6 mm,放置于 20~37℃ 干燥 1~2 h,4℃ 保存备用,所用包被缓冲液为 0.01M PBS 缓冲溶液。

[0015] 3) 在干燥环境中,依次在荧光专用背衬上粘贴样品垫、步骤 2) 制得的反应膜及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,即得量子点荧光免疫层析试纸条。

[0016] 本发明试剂盒的使用方法及评测标准:

定性或定量检测:用稀释液将检测液 I、检测液 II、检测液 III (检测液 I、II、III 等比例稀释) 稀释 50~100 倍,得混合液 1。取 75~150 uI 混合液 1 与 10~40 uI 待检样本充分混匀后得混合液 2,取 50~100 uI 混合液 2 与加入到试纸卡的加样孔内,反应 3~10 min 即可读取结果。

[0017] 1) 定性检测或半定量检测:用激发量子点的光源范围在 320~450 nm 的普通激发光源照射反应膜区域,根据双抗体夹心原理,当待测样本中含有胰腺癌的相关抗原时,复合物

将同时被T线和C线捕获,激发光照射下出现2条及2条以上条带,且其中一条为C线时,检测结果为阳性;反之,检测样本中不含相关抗原,则只在C线位置出现荧光条带,检测结果为阴性;如果T线和C线都不出现条带则说明检测无效,条带颜色越深说明待测样本中含有胰腺癌标记物相关抗原含量越高,反之,条带颜色越浅说明相关抗原的含量越低。

[0018] 2) 定量检测:将加样反应后的试纸条,通过荧光定量分析仪进行免疫层析扫描,对所得检测线荧光强度/质控线荧光强度的比值代入同批次存贮介质中的标准曲线,根据公式计算待测物质含量。

[0019] 其中存贮介质中标准曲线制作:配备一系列不同浓度的待检物质标准溶液,加入试纸条检测孔,然后利用荧光定量分析仪分别进行免疫层析检测,通过检测线荧光强度/质控线荧光强度对相应浓度做标准曲线。

[0020] 本发明所述的量子点荧光免疫层析试纸条,原理为双抗体夹心法,应用范围广,可用于胰腺癌单项指标或者多指标的高灵敏度快速检测,能够检测全血、血清、血浆等样本。

[0021] 发明涉及一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,本发明标记稳定性好(生物分子与量子点共价结合)、多指标同时检测(不同粒径量子点其荧光发射波长不同,可实现多指标同时检测)、灵敏度高(量子点的荧光强度高,可实现对低丰度靶分子的检测)、操作简单快速,检测耗时短,结果判读容易,定性定量皆可等优点。特别适合家庭、社区和医院等场所对于胰腺癌的筛查、诊断、判断预告和转归,评价治疗效果和高危人群的跟踪观察。

附图说明

[0022] 图1 免疫层析试纸条示意结构图(1:样本垫;2:NC膜,检测线T1(21)、检测线T2(22)、检测线T3(23)、质控线C(20);3:吸水垫;4:荧光专用板);

图2 免疫试纸条定性或半定量检测评价标准;

图3 CA19-9抗原浓度标准曲线;

图4 CEA抗原浓度标准曲线;

图5 CA242抗原浓度标准曲线。

具体实施方式

[0023] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例用以对本发明作进一步阐述,但不用来限制本发明的范围。

[0024] 实施例1 一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒及其制备方法

1、试剂盒结构

1.1 试剂盒组成

一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒,包括试纸条、吸滴管、检测液I、检测液II、检测液III、稀释液、样本稀释杯和存贮介质。

[0025] 1.2 试纸条结构

图1说明试纸条结构。图1中,所述的胰腺癌量子点联检试剂条,其包括依次搭接于荧光专用底衬4上的样品垫1、反应膜2、吸水垫3。

[0026] 所述试纸条的样本垫1为可过滤红细胞的玻璃纤维膜。所述反应膜2,其上具有检

测线T1(即21)、检测线T2(即22)、检测线T3(即23)和质控线C(即20)。

[0027] 2、试纸条制备方法

1)量子点标记抗体的制备:

A、取不同波长量子点分别用磷酸缓冲液调节pH=6~8,加入EDC和suIfo-NHS(QDs: EDC的摩尔比为1:50~1:200;EDC: suIfo-NHS的摩尔比为1:1~5:1),涡旋振荡均匀,室温活化15~60 min;

B、分别对应加入胰腺癌标记物的相应抗体(CA19-9单抗、CEA单抗、CA242单抗,且QDs和抗体的摩尔比为1:4~1:10),室温振荡反应1~4 h;

C、反应结束后用分子截留量30~100 KDa的超滤离心管浓缩至30~100 uI,然后采用凝胶尺寸排阻法进行纯化,收集有荧光的部分,再用超滤离心管浓缩后保存于PBS缓冲溶液中(含0.05% ProcIin300),4℃保存备用。即得检测液I(QD530-CA199 Ab)、检测液II(QD610-CEA Ab)、检测液III(QD652-CA242 Ab)。

[0028] 2)制备包被有检测指标的反应膜:检测指标为CA19-9单抗、CEA单抗、CA242单抗。以NC膜为反应膜,将检测指标和羊抗鼠IgG用包被缓冲液调节浓度至0.1~2.0mg/ml,在湿度为40~60%的条件下,按照1~2 uI/cm的溶液划线液量,将检测指标和羊抗鼠IgG喷到反应膜上对应的检测区和质控区进行包被,各个指标间隔为3~6 mm,放置于20~37℃干燥1~2 h,4℃保存备用,所用包被缓冲液为0.01M PBS缓冲溶液。

[0029] 3)在干燥环境中,依次在荧光专用背衬上粘贴样品垫、步骤2)制得的反应膜及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,即得量子点荧光免疫层析试纸条。

[0030] 实施例2 本发明试剂盒使用方法及评价标准

用稀释液将检测液I、检测液II、检测液III(检测液I、II、III等比例稀释)稀释50~100倍,得混合液1。取75~150 uI混合液1与10~40 uI待检样本充分混匀后得混合液2,用吸滴管吸取50~100 uI混合液2滴加到试纸条的样本垫上,等候约3~10 min后,待样本沿试纸条层析后,对其进行鉴定。

[0031] 定性或半定量检测:用激发量子点的光源范围在320~450 nm的普通激发光源照射反应膜区域,根据量子点标记的对应抗体的荧光的颜色进行鉴定,自吸水垫至样品垫分别为检测CA19-9、CEA、CA242抗原的条带,相对应荧光颜色为绿色、橙色、红色,且靠近吸水垫端的质控线始终有荧光。则可以根据不同组合颜色变化对应胰腺癌的机率,如图2所示。

[0032] 定量检测:利用荧光定量分析仪进行免疫层析扫描加样反应后的试纸条,自吸水垫至样品垫分别为C、T1、T2、T3对应的荧光谱图,对所得荧光峰荧光强度进行计算,即将检测线荧光强度/质控线荧光强度的比值代入同批次存贮介质中的相对应标准曲线,根据公式计算待检抗原含量。

[0033] 实施例3 试纸标准曲线建立

(a)取CA199、CEA、CA242标准品用稀释检测液(稀释检测液I、II、III等比例混合)配制一系列浓度梯度的肿瘤标记物抗原(CA199、CEA、CA242)标准液,如表1所示,将CA199、CEA、CA242标准液的1号标准液混合均匀,标记为B1,同理,配制标号为B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11系列浓度梯度的标准使用液。

[0034]

表1

标准液类别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CA199 (U/mL)	0.2176	1.088	5.44	10.88	27.2	54.4	136	272	680	1360	3400
CEA (ng/mL)	0.00128	0.0064	0.032	0.16	0.8	4	20	40	60	80	100
CA242 (U/mL)	1	5	10	50	100	250	500	750	1000	1500	2000

(b) 将1~11标准品浓度分别滴加在 11条量子点免疫层析试条上在相同条件下用检测仪进行检测(即 :每一标准品浓度分别用 10 条量子点免疫层析试条在相同条件下用检测仪检测 10 次),分别读得其T1、T2、T3带荧光强度(FL1、FL2、FL3)与 C 带荧光强度(FLc),得到平均值和FL1/FLc、FL2/FLc、FL3/FLc比值。

[0035] (c)以标准品系列浓度作 X 轴,分别以FL1/FLc、FL2/FLc、FL3/FLc比值作 Y 轴,得到同批次量子点检测CA19-9、CEA、CA242抗原试纸条的标准曲线,如图 3、图4、图5。

[0036] (d)将(c)所得标准曲线采用二维码、条码、或 IC 卡芯片等存贮介质进行储存,用于同批次试纸条的参照标准曲线。

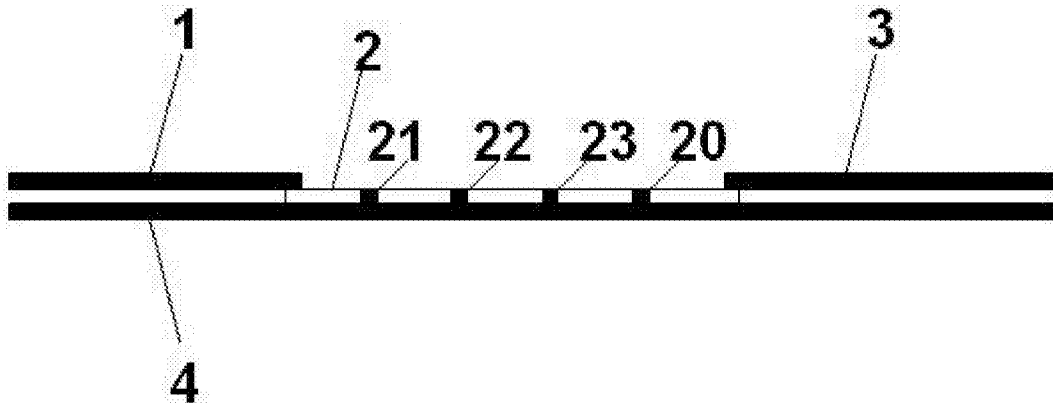


图1

显色组合	胰腺癌几率	说明
无	-	健康
CEA	+	有患胰腺癌风险，需进行再次检查
CA199	++	
CA242	+++	
CEA+CA242	++++	患胰腺癌几率较大，需到医院辅以影像学检查
CEA+CA199	++++	
CA199+CA242	+++++	
CA199+CEA+CA242	+++++	患有胰腺癌几率大，需就医检查

图2

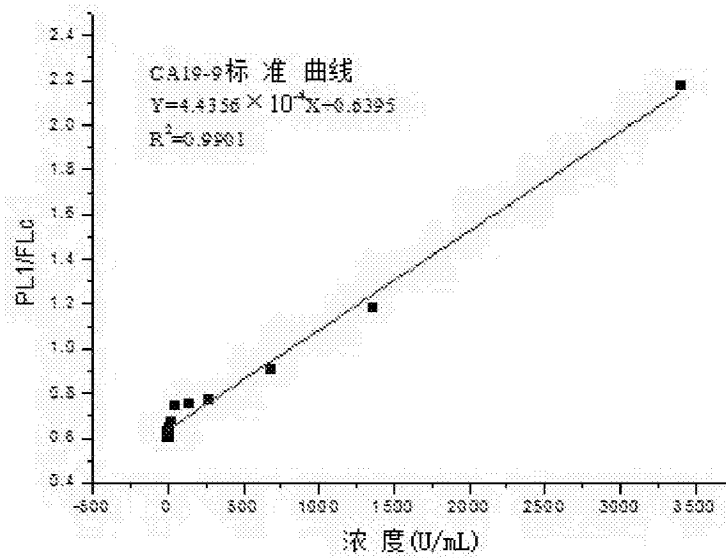


图3

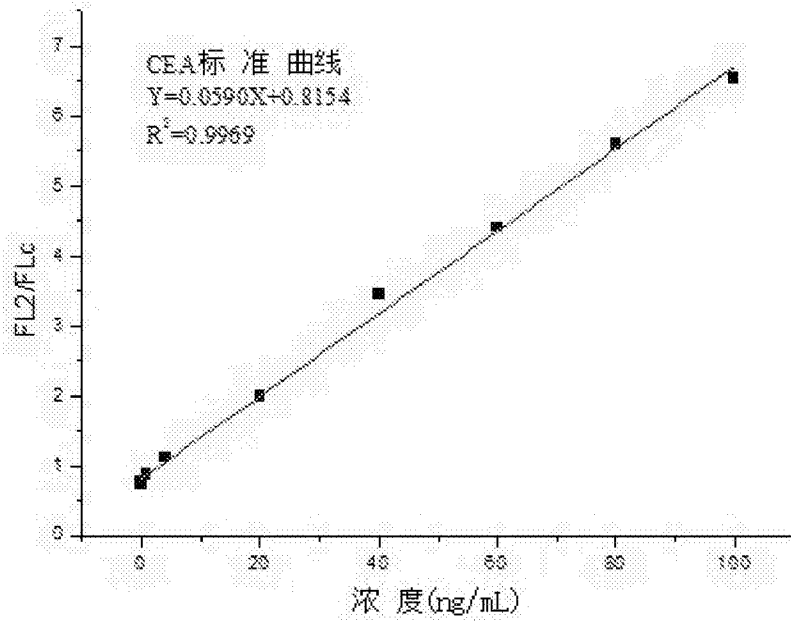


图4

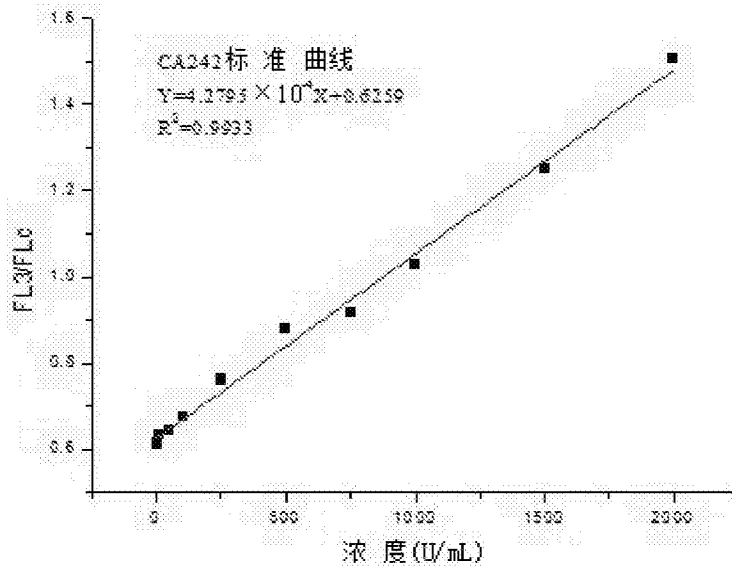


图5

专利名称(译)	一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒		
公开(公告)号	CN106596937A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201610951522.9	申请日	2016-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	重庆高圣生物医药有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	重庆高圣生物医药有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆高圣生物医药有限责任公司		
[标]发明人	周勇 吴秀兰		
发明人	周勇 吴秀兰		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N33/533 G01N33/588		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于体外诊断领域，具体涉及一种同步检测胰腺癌标记物的量子点试剂盒。该试剂盒包括试纸条、吸滴管、检测液I、检测液II、检测液III、稀释液、样本稀释杯和存贮介质。其中，试纸条制备步骤是：(1)量子点标记抗体的制备，即检测液的制备；(2)制备包被有检测指标的反应膜；(3)在荧光专用背衬上顺序粘贴样品垫、步骤(2)制得的反应膜以及吸水垫，得到试纸板，将试纸板切割成试纸条，即得量子点检测试纸条；(4)定性或定量检测。本发明公开的试剂盒采用双抗体夹心法原理，快速检测人全血或血清、血浆中的三种抗原，规避了以前单独检测方法的很多缺陷，一滴血便可以同时检测三种肿瘤标记物，操作简便、结果更加直观、价格低廉，且灵敏度和特异性均得到了显著提高，显示出了其在临床应用中的巨大潜力。

