



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061165 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810982140.1

(22)申请日 2018.08.27

(71)申请人 深圳市第二人民医院

地址 518037 广东省深圳市福田区华富街
道笋岗西路3002号

(72)发明人 谢妮 阎锡蕴 张德玺 杨东玲
何盛南

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 李小焦 彭家恩

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

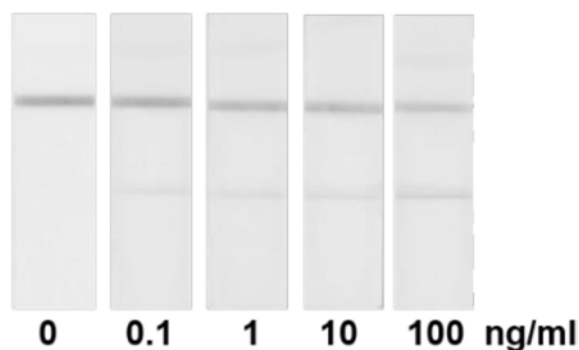
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸、检测方法
和应用

(57)摘要

本申请公开一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸、检测方法和应用。本申请的乳头溢液CEA检测免疫层析试纸包括搭接在支撑材料上的样品垫和层析条；样品垫上附着有胶体金或磁性纳米颗粒标记的乳头溢液CEA第一单克隆抗体；层析条上设检测线和质控线，检测线上固定抗乳头溢液CEA第二单克隆抗体或多克隆抗体，质控线上固定第一单克隆抗体的二抗；第一单克隆抗体和第二单克隆抗体分别识别不同抗原决定簇。本申请的免疫层析试纸，为乳头溢液中的CEA检测提供了一种新方案和途径，并且，使用简单方便，具有灵敏度高、特异性好、检测周期短等优势，适用于临床检测，为乳腺癌前病变风险评估、乳腺癌早期诊断与筛查提供了有效的检测工具。



1. 一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸,其特征在于:包括搭接在支撑材料上的样品垫和层析条;

所述样品垫上附着有胶体金或磁性纳米颗粒标记的乳头溢液CEA第一单克隆抗体;

所述层析条上设置有检测线和质控线,所述检测线上固定有抗乳头溢液CEA第二单克隆抗体或多克隆抗体,所述质控线上固定有所述第一单克隆抗体的二抗;

所述第一单克隆抗体和第二单克隆抗体分别识别乳头溢液CEA的不同抗原决定簇。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述第一单克隆抗体为CEA2,所述第二单克隆抗体为CC4。

3. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述第一单克隆抗体的二抗为羊抗鼠多克隆抗体。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述层析条为硝酸纤维素膜,所述样品垫为玻璃纤维垫。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述磁性纳米颗粒为四氧化三铁磁性纳米颗粒;优选的,所述磁性纳米颗粒的粒径为90~130纳米,所述胶体金的粒径为10~30纳米。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的免疫层析试纸在制备乳头溢液CEA检测试剂盒或装置中的应用。

7. 一种乳头溢液CEA检测的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中包括权利要求1-5任一项所述的免疫层析试纸。

8. 一种乳头溢液CEA的检测方法,其特征在于:包括采用权利要求1-5任一项所述的免疫层析试纸对乳头溢液样品进行检测。

一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸、检测方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及乳头溢液CEA的检测技术领域,具体涉及一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸、检测方法和应用。

背景技术

[0002] 触诊是乳腺肿瘤诊断的重要手段,但是触诊对于较小肿瘤不能发现,同时不能对肿块的性质做出判断。对于有乳头溢液的患者,可以通过乳头溢液进行初步检查。但是,目前国内的临床上,对于乳头溢液的初步检查局限于形态学的定性检查。形态学定性检查主要包括,根据乳头溢液性状将其分为乳白色溢液、浆液透明、浆液黄色、脓性、浆液血性等类型;根据分泌位置数量分为左右单侧或双侧的多导管或单导管分泌。一般病理性如乳腺癌患者乳头溢液呈浆液性或血性,多为单侧单导管分泌。由此首先鉴别生理或病理性乳头溢液,然后再进一步采用乳腺钼靶、超声、乳腺导管造影或穿刺活检,必要时采用核磁共振(缩写MRI)进行精细检查,最终确诊是否罹患乳腺癌,进而实施手术或保守治疗。然而常规钼靶、超声、导管造影等单一检测手段灵敏度及准确性较低,操作复杂耗时。导管造影、手术活检、MRI等方法为侵入型或具有放射性,不可避免会给患者带来一定的创伤和精神压力。并且,MRI等手段由于仪器费用昂贵,不利于临床推广,多数患者无法获益。因此,以上方法,一方面,只能定性检查,不能定量检测;另一方面,单一手段很难准确鉴别良性乳腺疾病、癌前病变和乳腺癌,极易出现漏诊,需要同时结合其他检查指标进行综合评判。

[0003] 癌胚抗原(CarcinoembryonicAntigen,缩写CEA)是一类具有人类胚胎抗原决定簇的酸性糖蛋白,最初发现于胎儿肠组织和结肠癌组织。当快速增生的细胞发生恶性转化时,基因组不稳定性致使CEA基因转录激活,肿瘤细胞上癌胎抗原上调表达,导致血清等体液中CEA水平上调,因而被鉴定为多种恶性肿瘤的标志物。有研究表明,CEA是乳腺癌较为敏感的肿瘤标志物及预后指标之一。据文献报道,Her2阳性乳腺癌患者血清CEA水平低于患者癌乳房血流量中的CEA含量。临床实验室数据显示,血清CEA截止值为3.4ng/mL,乳头溢液中为9.8ng/mL,乳头溢液CEA检测灵敏度高于血清CEA检测。对乳腺癌早期患者或局灶性乳腺癌,由增生上皮细胞产生的CEA首先分泌到乳腺导管中,乳头溢液CEA水平显著上调,而肿瘤未突破基底膜,血清中CEA水平变化不大,检出率低,易出现漏诊,因此血清学检测很难为乳腺癌早期诊断提供有效的信息。且有研究表明,乳头溢液中的肿瘤标志物CEA与乳腺疾病的发生及恶性进展程度相关性更高,乳腺癌患者的乳头溢液CEA显著高于良性病变患者及正常人群。相对于病人血清而言,病变组织的乳头溢液CEA水平变化与乳腺组织早期癌变关系更为密切。因此,乳头溢液中CEA的检测对乳腺癌前病变风险评估具有重要意义,可替代乳腺疾病血清学CEA的检测,来辅助乳腺癌的早期诊断。然而,目前临床上通过乳头溢液肿瘤标志物的定量检测来辅助乳腺癌早期诊断的应用很少。

[0004] 目前,仅日本临床上采用免疫色谱分析(ICGA)试剂盒对乳头溢液CEA进行半定量检测,通过标准比色板目测判定乳头溢液中CEA水平,并判定:100ng/mL为阳性临界值,CEA含量在400ng/mL~1000ng/mL时指示乳腺上皮增生,1000ng/mL及以上水平时为高度疑是乳

腺癌病例。另有实验室研究团队尝试采用蛋白芯片联合检测乳头溢液中的肿瘤标志物 CA153、CEA；或以硝酸纤维素膜为载体，通过免疫组化法定性鉴定乳头溢液中CEA的阳性表达情况。此外，采用全自动电化学发光免疫分析仪进行乳头溢液CEA的实验室检测也有所报道，但检测限仅达20 μ g/mL。上述实验方法学的尝试，存在着灵敏度低、技术要求高、操作繁琐等不足，严重制约了乳头溢液CEA检测在乳腺癌早期诊断中的应用推广，因而至今未被临床采纳。

[0005] 因此，亟需研发一种适用于临床使用的灵敏度高、技术要求低、操作简单的乳头溢液CEA检测。

发明内容

[0006] 本申请的目的提供一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸，基于该乳头溢液CEA检测免疫层析试纸的检测方法及应用。

[0007] 为了实现上述目的，本申请采用了一下技术方案：

[0008] 本申请的一方面公开了一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸，包括搭接在支撑材料上的样品垫和层析条；样品垫上附着有胶体金或磁性纳米颗粒标记的乳头溢液CEA第一单克隆抗体；层析条上设置有检测线和质控线，检测线上固定有乳头溢液CEA第二单克隆抗体或多克隆抗体，质控线上固定有第一单克隆抗体的二抗；第一单克隆抗体和第二单克隆抗体分别识别乳头溢液CEA的不同抗原决定簇。

[0009] 需要说明的是，本申请的关键在于研制了用于乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸；使用时，待检样品或样品稀释液中的癌胚抗原，与胶体金或磁性纳米颗粒标记的乳头溢液CEA第一单克隆抗体结合，形成抗原-胶体金或磁颗粒第一单克隆抗体复合物，并在毛细管作用下沿着试纸条进行层析，当移动至检测线（即T线）时，复合物中的抗原就会与T线区域的第二单克隆抗体或多克隆抗体（简称，捕获抗体）结合，形成捕获抗体-抗原-胶体金或磁颗粒第一单克隆抗体复合物；而没有结合抗原的胶体金或磁颗粒探针将继续层析，至质控线（即C线）处与二抗结合形成二抗-胶体金或磁颗粒第一单克隆抗体复合物；聚集在C线和T线的胶体金或磁颗粒探针显示出颜色，且颜色深浅与结合待测乳头溢液中CEA的浓度呈正相关；因此，可以通过读取T线的颜色进行定量，也可以将试纸条插入免疫定量分析仪（HR201）进行定量分析，并对不同浓度CEA标准品蛋白层析结果读值，绘制CEA检测标准曲线，由此计算得出乳头溢液中CEA含量。可以理解，本申请的关键在于通过乳头溢液CEA的单克隆抗体或多克隆抗体实现其免疫层析试纸条检测，至于支撑材料、样品垫、层析条等材料可以参考现有的免疫层析试纸，在此不做具体限定；抗体包被方法、抗体与胶体金或磁性纳米颗粒的结合方法、样品垫喷涂等都可以参考现有技术，在此不作具体限定。

[0010] 优选的，第一单克隆抗体为CEA2，第二单克隆抗体为CC4。

[0011] 优选的，第一单克隆抗体的二抗为羊抗鼠多克隆抗体。

[0012] 优选的，层析条为硝酸纤维素膜，样品垫为玻璃纤维垫。

[0013] 优选的，将癌胚抗原与磁性纳米颗粒标记的乳头溢液CEA第一单克隆抗体结合，形成抗原-磁颗粒第一单克隆抗体复合物，其中，磁性纳米颗粒优选为四氧化三铁磁性纳米颗粒。

[0014] 优选的，磁性纳米颗粒的粒径为90~130纳米，胶体金的粒径为10~30纳米。

[0015] 本申请的另一面公开了本申请的免疫层析试纸在制备乳头溢液CEA检测试剂盒或装置中的应用。

[0016] 本申请的再一面公开了一种乳头溢液CEA检测的试剂盒,该试剂盒中包括本申请的免疫层析试纸。

[0017] 需要说明的是,为了使用方便,可以将本申请的乳头溢液CEA检测免疫层析试纸置于试剂盒中方便取用,并且,试剂盒中还可以根据情况加入相应的检测或显色试剂、阳性标准品或由阳性标准品制备的比色卡等,在此不作具体限定。

[0018] 本申请的再一面还公开了一种乳头溢液CEA的检测方法,包括采用本申请的免疫层析试纸对乳头溢液样品进行检测。

[0019] 需要说明的是,本申请的检测方法操作简单方便、灵敏度高、技术要求低,特别适于临床使用。本申请的一种实现方式中,只需要至少5 μ L/人份的乳头溢液样品就可以进行检测,将乳头溢液样品滴加到样品垫上后,15分钟内即可完成批量平行检测,可以通过颜色判读或者免疫定量分析仪读取检测结果。

[0020] 由于采用以上技术方案,本申请的有益效果在于:

[0021] 本申请的乳头溢液CEA检测免疫层析试纸,为乳头溢液中的CEA检测提供了一种新的方案和途径,并且,使用简单方便,具有灵敏度高、特异性好、检测周期短等优势,特别适用于临床检测,为乳腺癌前病变风险评估、乳腺癌早期诊断与筛查提供了有效的检测工具。

附图说明

[0022] 图1为本申请实施例中乳头溢液CEA检测免疫层析试纸的灵敏度检测结果图。

具体实施方式

[0023] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明,不应理解为对本申请的限制。

[0024] 实施例

[0025] 一、材料和设备

[0026] (1) 抗体

[0027] 第一单克隆抗体为CEA2,第二单克隆抗体为CC4,两种抗体由中国科学院生物物理研究所提供,羊抗鼠Anti-Mouse IgG为Sigma公司产品。

[0028] CEA标准品由中国食品药品鉴定研究院标准物质与标准化研究所提供。

[0029] (3) 主要仪器设备

[0030] 纳米酶免疫层析仪采用中国科学院生物物理研究所研制JS-II型。

[0031] 本例中未提及的试剂和设备都是实验室的常规试剂和设备,在此不累述。

[0032] 二、试验方法

[0033] 1. 乳头溢液CEA检测免疫层析试纸制备

[0034] 1) 纳米磁性颗粒制备:本例可以采用10~30纳米的胶体金颗粒,或者90~130纳米的Fe₃O₄纳米颗粒,本例具体采用了90~130纳米的Fe₃O₄纳米颗粒。Fe₃O₄纳米颗粒采用Liang et al, 2013发表的水热法合成,即取0.6g FeCl₃·6H₂O溶于20mL乙二醇,再加入1.5g醋酸钠,混合物搅拌30分钟,然后密封于高压釜中,200℃加热16小时;产物用乙醇清洗多遍,本

例具体清洗了三遍,最后60℃烘干,即获得本例的Fe₃O₄纳米磁性颗粒。其中,原材料FeCl₃·6H₂O、乙二醇和醋酸钠都购自北京化学试剂。

[0035] 采用透射电子显微镜(TEM)拍摄(JEEOL 200FX200KV),对本例制备的Fe₃O₄纳米磁性颗粒的形态和结构进行观察,结构显示,本例成功的制备了粒径90~130纳米的Fe₃O₄纳米磁性颗粒,结果符合预期,能够用于后续试验。

[0036] 2) 采用静电吸附法或经EDC/NHS活化氨基,将特异性结合CEA的抗体分子偶联于Fe₃O₄纳米颗粒表面,制备特异性检测探针,本例的具体制备方法如下:取5mg购自Sigma-Aldrich的EDC和5mg购自Sigma-Aldrich的NHS溶于1mL去离子水中,再加入5mg制备的Fe₃O₄纳米磁性颗粒到混合液中,室温孵育半小时;用磁铁收集官能化的磁纳米颗粒,并用超纯水清洗两遍;将溶有100μg/mL检测抗体4G7的50mM、pH 6.0醋酸钠缓冲液加入磁纳米颗粒中;涡旋混合物并4℃过夜孵育;用50mM、pH 7.2的Tris缓冲液室温孵育半小时以终止反应;再用pH 7.0的PBS洗多遍以获得纳米酶探针,本例具体清洗了三遍;最后重悬于1mL 5%BSA-PBS中即可。

[0037] 3) 组装和制备膜免疫层析试纸条

[0038] 采用划膜仪将捕获抗体及第二抗体羊抗小鼠IgG固定于检测线及质控线处,并与样品垫、吸水垫、背衬底板一起组装成试纸板,进一步使用切条机切割成400mm宽度的成品试纸条。

[0039] 将第二单克隆抗体CC4溶于5mM、pH 8.8的硼酸盐缓冲液中至终浓度为1.0mg/mL,用IsoFlow™ Dispenser喷膜仪(Image Technology, New Hampshire, USA)以0.1μL每毫米线固定硝酸纤维膜片(Millipore)上制成检测线。

[0040] 将羊抗鼠Anti-Mouse IgG溶于5mM、pH 8.8的硼酸盐缓冲液中至终浓度为1.0mg/mL,用IsoFlow™ Dispenser喷膜仪(Image Technology, New Hampshire, USA)以0.1μL每毫米线固定硝酸纤维膜片(Millipore)上制成控制线。

[0041] 2. 样品检测

[0042] 将5μL的乳头溢液或标准品样品滴加到本例制备的免疫层析试纸条的加样端。样品中存在CEA时,CEA与样品垫中的磁性纳米颗粒标记的第一单克隆抗体结合,在层析到检测线时,会被第二单克隆抗体捕获,从而在检测线位置聚集,因此检测线会呈氧化铁纳米酶磁颗粒的黄褐色。没有被捕获的磁性纳米颗粒标记的第一单克隆抗体层析到质控线位置时会被羊抗鼠IgG捕获,从而在质控线位置聚集,因此质控线显示黄褐色。将这种T线和C线同为黄褐色的结果判定为阳性。同理,如果样品中不存在CEA或其含量极少,那么T线就不会发生或者发生极弱的免疫识别反应,因此不会显色或者显色很浅。而纳米酶磁颗粒继续层析被C线二抗捕获而显黄褐色条带,这种T线无色或显色很浅,而C线显色的结果判定为阴性或者弱阳性。若C线不显色的话,判定为该试纸条无效。

[0043] 另外,层析结束后,还可以利用磁颗粒纳米酶活性,加入DAB底物进行显色,能够将聚集在检测线和质控线位置的磁颗粒显现出棕色带,进一步提高检测灵敏度,因此,本例的试纸条可以检测出样品中较低浓度的CEA。

[0044] 3. 免疫层析试纸的灵敏度测试

[0045] 将CEA标准品用0.01M、pH7.2的磷酸盐缓冲液稀释,分别获得CEA浓度为0ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、400ng/mL的标准品样品,其中CEA浓度为0ng/mL即阴

性对照样品,用本例制备的免疫层析试纸检测,每个样品平行测试3次,确定免疫层析试纸的灵敏度。具体的,用微量移液器取5 μ L标准品样品或阴性对照样品加入试纸条的样品垫上,再加入70 μ L层析缓冲液,层析进行10分钟。其中,层析缓冲液由1%Tween20、0.5% TritonX-100、1%NP-40组成,pH7.2。

[0046] 4.免疫层析试纸的特异性测试

[0047] 用本例制备的免疫层析试纸条,对5份人血清标本和5份人奶标本,总计10份干扰标本进行检测。人血清标本和人奶标本来源于深圳市第二人民医院。

[0048] 具体的,对人血清标本或人奶标本进行5000RPM离心5分钟后,用微量移液器取5 μ L样本加入试纸条的样品垫上,再加入70 μ L层析缓冲液,层析进行10分钟。其中,层析缓冲液同“3.免疫层析试纸的灵敏度测试”。

[0049] 5.免疫层析试纸的重复性测试

[0050] 为检测免疫层析试纸的重复性,本例将浓度10ng/mL的CEA标准品,用免疫层析试纸检测,平行测试20次。

[0051] 6.免疫层析试纸的老化实验

[0052] 将制备的免疫层析试纸,放置于37℃恒温干燥箱中,分别于0、7、14、21、28天取出,对浓度1ng/mL的CEA标准品进行检测,以评估免疫层析试纸的保质期。

[0053] 7.临床样品检测

[0054] 采用在深圳市第二人民医院乳腺科采集的临床乳头溢液样本60例进行试验,所有样本5000RPM离心5分钟后,用微量移液器取5 μ L乳头溢液临床样本加入试纸条的样品垫上,再加入70 μ L层析缓冲液,层析进行10分钟。其中,层析缓冲液由1%Tween20、0.5% TritonX-100、1%NP-40组成,pH7.2。

[0055] 本例使用的60例样本均为临床疑似患者的样本,其中,经B超和钼靶检测提示高风险患者27例,经B超和钼靶检测提示低风险患者33例。

[0056] 三、试验结果

[0057] 1.免疫层析试纸的灵敏度测试

[0058] 对不同浓度的CEA标准品检测结果如图1所示,图1的结果显示,本例的免疫层析试纸其最低检测下限为0.1ng/mL,而乳头溢液CEA的截止值为10ng/mL,因此,能够满足临床检测使用需求。

[0059] 本例的免疫层析试纸最低检测下限可以达到0.1ng/mL,而现有的常规检测方法灵敏度通常只有约10ng/mL,本例的免疫层析试纸灵敏度是现有检测方法的100倍左右,大大提高了检测灵敏度。

[0060] 2.免疫层析试纸的特异性测试

[0061] 对5份人血清标本和5份人奶标本进行检测,检测结果全部显示阴性,符合要求,说明本例的免疫层析试纸具有较好的特异性。

[0062] 4.免疫层析试纸的重复性测试结果

[0063] 检测10ng/mL的CEA标准品,重复20次。所完成的二十次试验检测结果全部为阳性,显色均一,说明本例的免疫层析试纸重复性好,满足设计要求。

[0064] 5.免疫层析试纸老化试验结果

[0065] 将制备的免疫层析试纸,放置于37℃恒温干燥箱中进行老化实验,于不同时间取

出试纸,对浓度1ng/mL的CEA标准品进行检测,检测结果显示,在第0、7、14、21、28时检测结果都呈阳性结果。

[0066] 6. 临床样品检测结果

[0067] 采用本例的免疫层析试纸对60例临床疑似患者乳头溢液中癌胚抗原进行检测,结果显示,经B超和钼靶检测提示高风险患者的27例中,本例免疫层析试纸检测乳腺癌患者乳头溢液中CEA含量高于100ng/mL的患者21例,即本例的免疫层析试纸检测发现高风险患者比例为77.8%;经B超和钼靶检测提示低风险患者的33例中,本例免疫层析试纸检测乳腺癌患者乳头溢液中CEA含量低于100ng/mL的患者25例,即本例的免疫层析试纸检测发现低风险患者比例为75.8%。

[0068] 根据乳腺溢液CEA水平判断乳腺疾病良性或恶性程度,以及评估乳腺溢液患者患乳腺癌或癌前病变的风险。结合实践情况获得本例免疫层析试纸检测的判定标准为:CEA含量在100ng/mL以下时为良性乳腺疾病,乳腺癌发生风险低;含量100ng/mL及以上为乳腺癌高发风险。乳头溢液中CEA含量100ng/mL可以用于辅助判断患乳腺癌的风险。

[0069] 以上应用了具体个例对本发明进行阐述,只是用于帮助理解本发明,并不用以限制本发明。对于本发明所属技术领域的技术人员,依据本发明的思想,还可以做出若干简单推演、变形或替换。

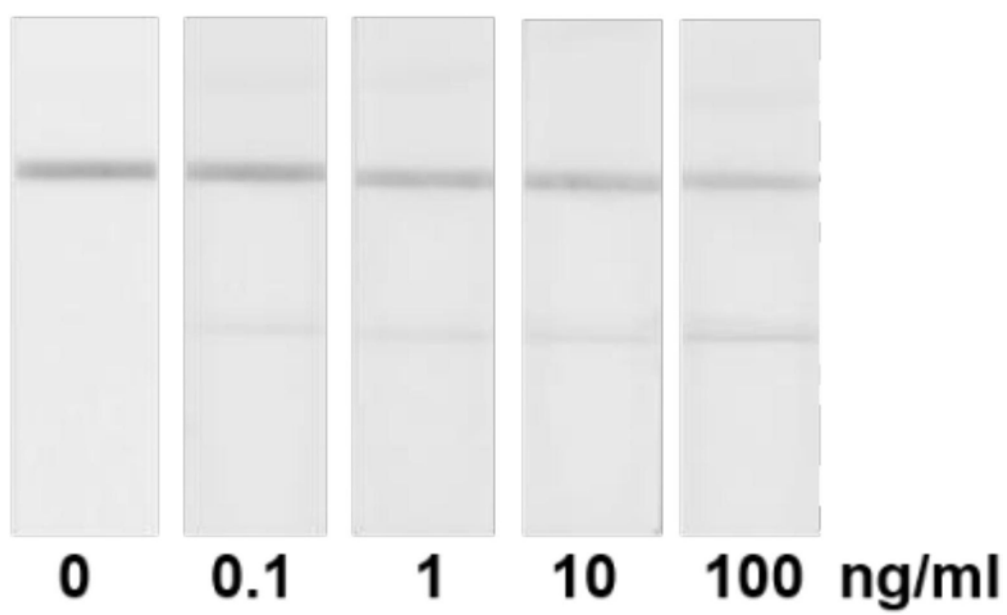


图1

专利名称(译)	一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸、检测方法和应用		
公开(公告)号	CN109061165A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810982140.1	申请日	2018-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市第二人民医院		
申请(专利权)人(译)	深圳市第二人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市第二人民医院		
[标]发明人	阎锡蕴 张德玺 何盛南		
发明人	谢妮 阎锡蕴 张德玺 杨东玲 何盛南		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/587 G01N2800/365		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请公开一种乳头溢液CEA检测的免疫层析试纸、检测方法和应用。本申请的乳头溢液CEA检测免疫层析试纸包括搭接在支撑材料上的样品垫和层析条；样品垫上附着有胶体金或磁性纳米颗粒标记的乳头溢液CEA第一单克隆抗体；层析条上设检测线和质控线，检测线上固定抗乳头溢液CEA第二单克隆抗体或多克隆抗体，质控线上固定第一单克隆抗体的二抗；第一单克隆抗体和第二单克隆抗体分别识别不同抗原决定簇。本申请的免疫层析试纸，为乳头溢液中的CEA检测提供了一种新方案和途径，并且，使用简单方便，具有灵敏度高、特异性好、检测周期短等优势，适用于临床检测，为乳腺癌前病变风险评估、乳腺癌早期诊断与筛查提供了有效的检测工具。

