



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101762699 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 200910087641.4

(22) 申请日 2009.06.24

(71) 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司
地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号北科园

(72) 发明人 唐宝军 应希堂 李强 胡国茂
郑金来 于尚永

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

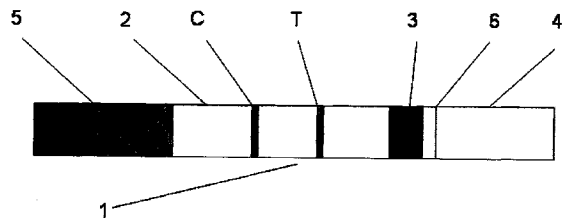
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 125 的磁性免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 125 的磁性免疫层析试纸条及其制备方法。该试纸条是在底板上依次相互交错 2mm 粘贴上包被膜、结合了肿瘤相关抗原 125 抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫,然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成的试纸条,包被膜上预包被有肿瘤相关抗原 125 抗体检测线和质控线,本发明将磁性免疫层析技术和异硫氰酸荧光素系统引入到肿瘤相关抗原 125 的定量检测中,大大提高了检测灵敏度,并且可以准确的给出定量结果,操作简便,诊断快速。



1. 一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 125 (CA125) 的磁性免疫层析试纸条,其特征在于:该试纸条是在底板上依次相互交错 2mm 地粘贴包被膜、结合了 CA125 抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫、然后在上层覆盖透明塑料密封膜而组装成的试纸条,包被膜上预包被有 CA125 抗体的检测线 T 和质控线 C。

2. 根据权利要求 1 的定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条,其特征就在于:所述的样品垫是经过样品垫处理液预处理的纤维素膜,所述的样品垫处理液是含有 1% -5% 酪蛋白和 0.1% -1% 的聚乙烯醇以及 0.01-0.2% 吐温 -20 的 0.02M, pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求 1 的定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条制备方法,其特征就在于:包括以下步骤:

A、异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗体的制备:选用 FITC 进行 CA125 抗体的标记;

B、磁颗粒的制备:选用直径为 100-300nm 的超顺磁颗粒,使用碳二亚胺共价偶联的方式将抗荧光素抗体标记到磁颗粒上,将标记好的 FITC- 抗体以 1 : 2-1 : 5 的分子比例(摩尔比)与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒混合,确保偶联抗荧光素抗体的磁颗粒过量;

C、将制备好的磁颗粒使用定量喷液装置以 25 μ l/cm-50 μ l/cm 的量喷涂于磁颗粒垫上;

D、包被膜的制备:使用 0.02mM, pH7.0-7.6 的 PBS, 分别将抗 CA125 包被抗体以及 FITC- 牛血清白蛋白稀释到 0.5-2mg/ml 浓度,使用定量喷液装置分别将二者以 0.5-1.0cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上,晾干后于封闭液中浸泡 10 分钟后于 25-35 $^{\circ}$ C 烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用;

E、样品垫的处理:将样品垫放入样品垫处理溶液中浸泡处理 1 小时后取出 25-35 $^{\circ}$ C 烘干 8 小时;

F、试纸条的组装:在透明塑料底板上依次相互交错 2mm 贴上包被膜,磁颗粒垫,样品垫,吸水垫,然后在上层覆盖透明塑料密封膜得到试纸板,根据要求宽度切割即得到试纸条。

4. 根据权利要求 3 所述的磁性免疫层析法定量检测血液中 CA125 的试纸条的制备方法,其特征就在于所述的步骤 A 如下:

将 CA125 抗体对 0.02M pH7.0-7.6 的 PBS 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,调整浓度为 2mg/ml,将 FITC 使用二甲基甲酰胺溶解,终浓度为 50mmol,以 5 : 1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的 FITC 溶液,室温反应 1 小时,对 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,加入等体积甘油后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

5. 根据权利要求 3 所述的磁性免疫层析法定量检测血液中 CA125 的试纸条的制备方法,其特征就在于所述的步骤 B 包括以下两步:

1) 偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的制备:使用含有 0.1% Tween-20 的 50mmol, pH7.0-7.6 的 PBS 洗涤磁颗粒,加入碳二亚胺和琥珀酰亚胺使二者终浓度均为 20mmol,室温反应 1 小时,充分洗涤磁颗粒后加入抗荧光素抗体使抗荧光素抗体与磁颗粒的分子比为 5 : 1(摩尔比),室温反应 3 小时,加入含有 0.5% BSA 的 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 室温封闭 30 分钟,洗涤磁颗粒,使用含有 1% PVP, 1% Casein, 0.5% Tween-20, 5% 蔗糖的 50mmol, pH8.2-9.0 的硼酸保存缓冲液,复溶磁颗粒,4 $^{\circ}$ C 保存备用;

2) FITC-抗体与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的混合,以 $0.5 \mu\text{l}/\text{mg}$ 磁颗粒的量向偶联抗荧光素抗体的磁颗粒溶液中加入 FITC-CA125 抗体,充分混匀后使用保存缓冲液以 1 : 5-1 : 20 的比例(体积比)将混合物稀释待喷涂玻璃纤维垫使用。

6. 根据权利要求 3 所述磁性免疫层析法定量检测血液中 CA125 的试纸条的制备方法,其特征在于:所述的步骤 C 中,磁颗粒的喷涂方法是:将制备好的磁颗粒使用定量喷膜装置以 $50 \mu\text{l}/\text{cm}$ 的量均匀喷涂于玻璃纤维上,冷冻干燥后加入干燥剂封存备用。

7. 根据权利要求 3 所述磁性免疫层析法定量检测血液中 CA125 的试纸条的制备方法,其特征在于:所述的步骤 D 中,包被膜的制备方法是:用包被缓冲液将 CA125 抗体稀释为 $0.5\text{mg}/\text{ml}$, FITC-BSA 稀释为 $1\text{mg}/\text{ml}$,使用定量喷膜装置以 $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ 的量将二者以 0.6cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上,室温晾干 30 分钟后于封闭液中浸泡 10 分钟后于 $25-35^{\circ}\text{C}$ 烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用。

一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 125 的磁性免疫层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,特别是涉及一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 125 的磁性免疫层析试纸条及制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤相关抗原 125 (CA125),分子量可达 220000 ~ 1000000 之间,糖基含量仅占总蛋白质量的 24%。CA125 是由鼠抗人乳头状囊性卵巢上皮细胞系 OC125 制备而成。血清 CA125 水平升高是肿瘤存在与复发的可靠指标。80 ~ 90% 的卵巢上皮癌中 CA125 可明显升高,子宫内膜癌、透明细胞癌、输卵管癌及未分化卵巢癌患者中 CA125 含量也可明显升高;粘液性卵巢癌患者的阳性率则较低,CA125 在卵巢包块良恶性的鉴别上特别有价值,敏感度为 78%、特异性 95%、阳性预测价值 82%、阴性预测价值 91%。CA125 和 CEA 联合测定,计算两者比值,可提高卵巢癌检出的敏感性和特异性。非卵巢癌类的恶性肿瘤,如胰腺、肝、胃、肠、子宫和乳腺癌症患者中 CA-125 的阳性率可分别高达 73%、70%、53%、27%、22% 和 20%。然而 CA-125 血清浓度轻微上升还可见于 1% 健康妇女,3 ~ 6% 的良性卵巢疾患或非肿瘤患者,包括孕期起始 3 个月、行经期、子宫内膜异位、子宫纤维变性、子宫肌瘤、良性卵巢瘤、急性输卵管炎、急性胰腺炎、肝病、胸腹膜和心包感染等,应注意排除。但需要指出的是以血清 CA125 水平升高来诊断复发的敏感性低于特异性,即血清 CA125 升高在很大程度上提示复发,但正常的 CA125 既不表明无肿瘤存在也不表明无肿瘤进展。

[0003] 目前的血液中 CA125 的诊断技术主要包括:放射免疫分析 (RIA),酶联免疫分析 (ELISA)、化学发光免疫分析 (CLIA)、时间分辨荧光免疫分析、胶体金免疫层析等方法,但 these 方法都有各自的特点及不足:放射免疫是临床比较常用的方法,优点是结果比较准确,线性范围较宽,缺点是操作繁琐,耗时长,且放射性标记物会对操作者产生危害,并且会产生环境污染,目前已经逐渐被其他方法所替代。ELISA 和化学发光以及时间分辨荧光法原理类似,只是因为最终的检测系统有所区别而在灵敏度方面有差异,目前已经实现自动化、大批量、定量检测,但是存在方法间结果差异大,线性范围较窄等缺点,同时,自动化检测目前由国外大厂商所垄断,仪器设备昂贵,并且不适合单人份和较小批量检测用,大大限制了它们在基层医院、诊所的应用。近年来出现了胶体金免疫层析法来检测 CA125,快速,便捷,单人份操作,但是缺点是只能实现半定量,只能指示一个大概范围,无法实现精确定量,异常标本需要使用其他方法复核检测,增加了被测试者的就医成本,在市场推广方面有较大难度,很难广泛使用。

[0004] 磁性免疫层析 (Magnetic ImmunoChromatographic Test, MICT) 是近年来出现的一种单人份快速定量检测技术。是以超顺磁性颗粒 (superPMPs) 代替传统的标记物 (胶体金,乳胶颗粒等) 来进行免疫层析,通过检测结合在超顺磁性纳米微粒上的生化物质来提供对生物样品的定量检测数据。通过检测测量磁场强度来表达标记在样品区域的量,采用标记的免疫复合物 - 磁场强度的标准曲线,从而达到定量的目的。该技术与传统技术相比具有

下述优势:1) 分析灵敏度:比各类目测快速诊断法灵敏 10-100 倍;2) 分析速度:可在 15 秒内测量到多达 6 个分析位点的数据;3) 线性范围:在 4 个数量级浓度范围内呈线性;4) 所用磁性检测仪器采用固相元件,微型化设计自成一体,独立运行,体积小,操作简便;5) 超顺磁性纳米微粒由聚合物包被,不会随时间而衰变;独立的快速诊断色谱卡 (MAR Cassette) 可直接插入 MAR 检测仪,为目前许多快速临床诊断试剂的整合提供了广泛的开发空间;而且还避免了操作过程中人员或仪器可能发生的交叉污染,提高了分析和过程的安全性。该技术继承了传统免疫层析法(胶体金,乳胶颗粒等)简便快速,单人份操作的优点,又弥补了传统免疫层析技术灵敏度低,只能定性,不能定量的缺点,代表了当今即时检验 (Point of Care Test, POCT) 技术发展的方向和潮流,一经问世,发展迅速,目前已经成为替代传统免疫层析技术的首选。

[0005] 将异硫氰酸荧光素 (FITC) 引入磁性免疫层析中,在极大地提高了检测方法的灵敏度的同时,又提供了一种极好的通用技术平台,在规模化生产中减少了标记步骤,减少了可变因素。

发明内容

[0006] 本发明的目的即是将磁性免疫层析技术和异硫氰酸荧光素 (FITC) 系统联合应用在 CA125 定量检测试纸条中,将抗荧光素抗体共价偶联于超顺磁颗粒上,将 FITC-CA125 抗体与之混合之后作为检测流动相,将另一株配对的 CA125 抗体包被于硝酸纤维素膜上作为捕获固相,按照常规免疫层析法的原理进行标本的检测,结合简便易行的磁性检测仪进行检测,在实现高灵敏度检测的同时既可以避免前述几种检测方法的种种弊端,又综合了前述几种方法的优势:可以单人份检测,也可以批量检测,并且可以即时给出定量结果,测量仪器简单可靠,操作简便,方便实用。

[0007] 为达到上述的目的,本发明的技术方案如下:一种定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条,该试纸条是在底板上依次相互交错 2mm 地粘贴上包被膜、结合了 CA125 抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫、然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成的试纸条,包被膜上预包被有 CA125 抗体检测线 T 和质控线 C。

[0008] 其中所述的样品垫是经过样品垫处理液预处理的纤维素膜,所述的样品垫处理液是含有 1% -5% 酪蛋白 (Casein) 和 0.1% -1% 的聚乙烯醇 (PVA) 以及 0.01-0.2% 吐温 20 (Tween-20) 的 0.02M pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液 (PBS)。

[0009] 上述定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条制备方法包括以下步骤:

[0010] A、FITC-抗体的制备:将 CA125 抗体对 0.02M pH7.0-7.6 的 PBS 4℃ 透析过夜,调整浓度为 2mg/ml,将 FITC 使用二甲基甲酰胺溶解,终浓度为 50mmol,以 5:1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的 FITC 溶液,室温反应 1 小时,对 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 4℃ 透析过夜,加入等体积甘油后 -20℃ 保存备用。

[0011] B、磁颗粒的制备:选用直径为 100-300nm 的超顺磁颗粒,使用碳二亚胺 (EDC) 共价偶联的方式将抗荧光素抗体标记到磁颗粒上,将标记好的 FITC-抗体以 1:2-1:5 的分子比例(摩尔比)与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒混合,确保偶联抗荧光素抗体的磁颗粒过量;

[0012] C、将制备好的磁颗粒使用定量喷液装置以 25 μl/cm-50 μl/cm 的量喷涂于磁颗

粒垫上；

[0013] D、包被膜的制备：使用包被缓冲液分别将抗 CA125 包被抗体以及 FITC-BSA 稀释到 0.5-2mg/ml 浓度，使用定量喷液装置分别将二者以 0.5-1.0cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上，晾干后于封闭液中浸泡 10 分钟后于 25-35 度烘干 8 小时，加入干燥剂封存备用；

[0014] E、样品垫的处理：将样品垫放入样品垫处理溶液中浸泡处理 1 小时后取出 25-35℃ 烘干 8 小时；

[0015] F、试纸条的组装：在透明塑料底板上依次相互交错 2mm 地贴上包被膜、磁颗粒垫、样品垫、吸水垫，然后在上层覆盖透明塑料密封膜得到试纸板，根据要求宽度切割即得到试纸条。

[0016] 进一步，上述的步骤 B 包括以下三步：

[0017] 1) 偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的制备：使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH7.0-7.6 的 PBS 洗涤磁颗粒，加入 EDC 和抗荧光素抗体使抗荧光素抗体与磁颗粒的分子比例为 5 : 1 (摩尔比)，室温反应 3 小时，加入含有 0.5% BSA 的 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 室温封闭 30 分钟，用上述 PBS 洗涤磁颗粒，使用含有 1% PVP, 1% Casein, 0.5% Tween-20, 5% 蔗糖的 50mM (pH8.2-9.0) 硼酸保存缓冲液复溶磁颗粒，4℃ 保存备用；

[0018] 2) FITC-CA125 抗体的制备：将 CA125 抗体对 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 4℃ 透析过夜，调整浓度为 2mg/ml，将 FITC 使用二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解，终浓度为 50mM，以 5 : 1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的 FITC 溶液，室温反应 1 小时，对 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 4℃ 透析过夜，加入等体积甘油后 -20℃ 保存备用；

[0019] 3) FITC-抗体与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的混合，以 0.5 μl/mg 磁颗粒的量向偶联抗荧光素抗体的磁颗粒溶液中加入 FITC-CA125 抗体，充分混匀后使用保存缓冲液以 1 : 5-1 : 20 的比例 (体积比) 将混合物稀释待喷涂玻璃纤维垫使用。

[0020] 进一步，上述的步骤 C 中，磁颗粒的喷涂方法是：将制备好的磁颗粒使用定量喷膜装置以 50 μl/cm 的量均匀喷涂于玻璃纤维上，冷冻干燥后加入干燥剂封存备用。

[0021] 进一步，上述的步骤 D 中，包被膜的制备方法是：用包被缓冲液 (0.02M pH 7.2 的磷酸缓冲液) 将 CA125 抗体稀释为 0.5mg/ml，FITC-BSA 稀释为 1mg/ml，使用定量喷膜装置以 1 μl/cm 的量将二者以 0.6cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上，室温晾干 30 分钟后于封闭液 (含有 0.5% BSA 的 0.02M PBS, pH7.0-7.6) 中浸泡 10 分钟后于 25-35℃ 烘干 8 小时，加入干燥剂封存备用。

[0022] 与现有快速检测试纸条相比较，本发明具有以下优点：

[0023] 1) 通过对试纸条的改进，首次将磁性免疫层析技术引入 CA125 的检测中，结合磁性检测仪，实现了 CA125 的单人份宽范围定量检测，为临床使用提供了极大便利。

[0024] 2) 通过引入异硫氰酸荧光素系统，使得试纸条的制备过程大大简化，适合大规模生产。

[0025] 本发明操作简便，适合大规模生产，检测所需的便携式设备也已经上市，因此能广泛用于医院、血站、防疫站、体检等大批量使用单位以及一些采血现场、农村和基层诊所等小批量或单人份使用的单位使用。对于卵巢癌的定量诊断有着积极的意义。

附图说明

[0026] 图 1 为本发明磁性免疫层析法定量检测血液中 CA125 的试纸条结构示意图

[0027] 为进一步说明本发明磁性免疫层析法定量检测血液中 CA125 的试纸条及制备方法,特举以下的实施例进行说明,该实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明。

具体实施方式

[0028] 本发明所述的定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条如图 1 所示,该试纸条是在底板 1) 上依次相互交错 2mm 地粘贴上包被膜 2)、结合了 CA125 抗体的磁颗粒垫 3)、样品垫 4)、吸水垫 5),然后在上层覆盖透明塑料密封膜 6) 组装而成的试纸条,包被膜 2) 上预包被有 CA125 抗体检测线 T 和质控线 C。

[0029] 在具体实施例中,所采用 CA125 配对抗体为单克隆抗体技术制备的单抗。利用双抗体夹心检测 CA125 抗原的原理检测标本,当待测标本中含有 CA125 抗原时,抗原会先和磁颗粒上偶联的抗体结合,随着层析作用的进行,结合物向前移动到达 CA125 抗体包被线 T 处,抗原会再次和包被抗体结合形成双抗体夹心复合物而聚集在 T 线处,另外,未结合 FITC- 抗体的抗荧光素抗体标记磁颗粒会继续前行,到达指控线 C 时, FITC-BSA 会与抗荧光素抗体结合从而在 C 线处同样出现磁颗粒聚集。整个反应在 30 分钟内进行完全,一般反应十五分钟后即可进行上机读卡, T 线以及 C 线都会产生相应的磁性信号值,磁性免疫层析检测仪会根据检测卡上的二维码信息将实际测值代入预设的标准曲线即可得出确定量的结果。整个读卡、识别二维码、将实测值代入预设标准曲线得出定量值的过程已经完全程序化,磁性检测仪会直接给出定量结果。

[0030] 本发明所述的定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条的制备方法见以下实例:

[0031] 实施例 1

[0032] 定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条及试纸盒的制备方法

[0033] 本实施例的试纸条及试纸盒的制备方法包括以下步骤:

[0034] A、抗体制备:选用商品化的 CA125 配对抗体,对 20mM, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 4℃ 透析过夜备用。

[0035] B、包被膜的制备:

[0036] 包被缓冲液的配制:0.02M pH 7.2 的磷酸缓冲液 (PB) 为包被缓冲液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置 4℃ 保存备用,有效期两周。

[0037] 封闭液的配制:含 0.5% BSA 的 0.02M, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的磷酸盐缓冲液 (PBS),0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置 4℃ 保存备用,有效期一周。

[0038] 包被膜的制备:用包被缓冲液 (0.02M PB, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用)) 将 CA125 抗体稀释为 0.5mg/ml, FITC-BSA 稀释为 1mg/ml, 使用定量喷膜装置以 1 μl/cm 的量将二者以 0.6cm 的间隔均匀喷印于 3.5cm 宽度硝酸纤维素膜上,室温晾干 30 分钟后于封闭液 (含有 0.5% BSA 的 0.02M PBS, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用)) 中浸泡 10 分钟后于 25-35 度烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用。

[0039] C、磁颗粒的制备:

[0040] PBS 缓冲液的配制:用双蒸水和磷酸二氢钠及磷酸氢二钠配制 pH 值为 7.4 (pH7.0-7.6 均适用),浓度为 50mM 的 PBS,加入 Tween-20 至终浓度为 0.1%,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后 4℃ 保存备用,有效期两周。

[0041] 硼酸保存缓冲液的配制:用双蒸水,硼酸和硼砂配制 pH 为 8.5 (pH8.2-9.0 均适用),终浓度为 50mM 的硼酸缓冲液,加入 PVP, Casine, Tween-20,蔗糖,终浓度分别为 1%, 1%, 0.5%, 5%, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后 4℃ 保存备用,有效期一周。

[0042] 偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的制备:使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH7.4 (pH7.0-7.6 均适用) PBS 洗涤磁颗粒,加入 EDC 和 NHS 使二者终浓度均为 20mmol, 室温反应 1 小时,充分洗涤磁颗粒后,加入抗荧光素抗体使抗荧光素抗体与磁颗粒的分子比例为 5 : 1 (摩尔比),室温反应 3 小时,加入含有 0.5% BSA 的 0.02M, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 室温封闭 30 分钟,使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH7.4 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 洗涤磁颗粒,使用含有 1% PVP, 1% Casein, 0.5% Tween-20, 5% 蔗糖的 50mM pH 8.5 (pH8.2-9.0 均适用) 硼酸保存缓冲液,复溶磁颗粒,4℃ 保存备用。

[0043] FITC-CA125 抗体的制备方法是:将 CA125 抗体对 0.02M, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 4℃ 透析过夜,调整浓度为 2mg/ml,将 FITC 使用 DMF 溶解,终浓度为 50mM,以 5 : 1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的 FITC 溶液,室温反应 1 小时,对 0.02M, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 4℃ 透析过夜,加入等体积甘油后 -20℃ 保存备用。

[0044] FITC- 抗体与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的混合,以 0.5 μ l/mg 的量向偶联抗荧光素抗体的磁颗粒溶液中加入 FITC-CA125 抗体,充分混匀后使用保存缓冲液以 1 : 5 的比例将混合物稀释待喷涂玻璃纤维垫使用。

[0045] D、磁颗粒的喷涂与冻干

[0046] 使用 BioDot 喷膜仪的专用喷头将处理好的磁颗粒以 50 μ l/cm 的量均匀喷涂于 0.8cm 宽度玻璃纤维垫上,过夜冷冻干燥,加入干燥剂封存备用,

[0047] E、样品垫的处理

[0048] 将 1.8cm 宽度样品垫放入样品垫处理溶液中浸泡处理 1 小时后取出 25-35℃ 烘干 8 小时。

[0049] 样品垫处理液是含有 1% -5% Casein 和 0.1% -1% 的 PVA 以及 0.01-0.2% Tween-20 的 0.02M, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 溶液。

[0050] F、试纸条的组装及切割

[0051] 下述所有操作都必须在湿度小于 20%, 温度 20-25℃ 的房间内进行。

[0052] 试纸板的组装:使用 BioDot LM5000 型组装仪按照要求将 3.5cm 包被膜, 2.5cm 吸水纸, 0.8cm 磁颗粒垫, 1.8cm 样品垫组装于 9.8cm 宽度透明塑料底板上,覆盖上层透明塑料盖板,组装成试纸板。

[0053] 试纸条的裁切:使用 BioDot CM4000 型切条机将组装好的试纸板切成 0.5cm 宽的成品试纸条。

[0054] G、试纸卡的组装

[0055] 将本发明所述的切割好的单人份试纸条置于塑料底卡上的卡槽内,盖上上盖,使用压卡机将上下两片塑料卡压紧,确保整个试纸条处于绷紧状态。加入干燥剂室温封存备用。

[0056] H、确定该批次的二维码信息

[0057] 品名:CA125 定量磁性检测卡

[0058] 批次:试纸卡的组装日期,格式为:年/月/日,XXXX/XX/XX

[0059] 判读标准的确定 :取 CA125 标准抗原原料,以国家标准品为参照标准进行标定,用标准品稀释液稀释成 400U/mL,200U/mL,100U/mL,50U/mL,15U/ml,每个标准点作 10 个测试,按照统计学方法确定每个标准点与磁性测量值的关系并建立方程使之拟合成线性,此方程和标准曲线即可使磁性检测仪得以确定标本测量值。

[0060] 标准品稀释液配方 :20mmol PBS, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用),0.5% BSA,0.01% NaN_3 。

[0061] I、二维码的打印粘贴

[0062] 将上述二维码信息输入二维码打印机内并打印,将二维码粘贴于试纸卡的特定位置,使用二维码粘贴位置检测器随机抽检 2% 确保二维码粘贴无误。

[0063] J、成品包装

[0064] 将贴好二维码的单人份试纸卡与一包干燥剂密封于铝箔袋内,100 人份为一个包装置于一个包装盒内,一盒一份说明书和 1 瓶 10ml 装层析缓冲液即制成试纸盒,该试纸盒于室温避光保存,保质期为 18 个月。

[0065] 层析缓冲液配方为 :1% Tween-20,0.5% Triton X-100,1% NP-40,0.05% NaN_3 ,20mmol PBS, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用)。

[0066] 实施例 2

[0067] 除了偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的制备的步骤中 :抗荧光素抗体使抗荧光素抗体与磁颗粒的比例为 1 : 2,其它步骤同实施例 1,

[0068] 实施例 3

[0069] 除了偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的制备的步骤中 :抗荧光素抗体使抗荧光素抗体与磁颗粒的比例为 1 : 10,其它步骤同实施例 1。

[0070] 实施例 4

[0071] 除了 FITC- 抗体与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的混合步骤中 :充分混匀后使用保存缓冲液以 1 : 5 的比例将混合物稀释待喷涂玻璃纤维垫使用,其它步骤同实施例 1。

[0072] 实施例 5

[0073] 除了 FITC- 抗体与偶联抗荧光素抗体的磁颗粒的混合步骤中 :充分混匀后使用保存缓冲液以 1 : 20 的比例将混合物稀释待喷涂玻璃纤维垫使用,其它步骤同实施例 1。

[0074] 实施例 6

[0075] 本发明的检测卡的使用方法

[0076] 1、加样

[0077] 从包装盒中取出单人份的检测卡,撕开铝箔带包装,将试纸卡置于平整桌面上,用微量移液器取 50 μ l 样本血清加入卡上的加样孔内,再加入 50 μ l 层析缓冲液,等待反应进行 15 分钟。

[0078] 2、测量及结果输出

[0079] 将检测卡插入磁性免疫层析检测仪的插卡口,运行仪器,仪器会自行读取卡的二维码信息,进行测量并即时打印测量结果,阴阳性结果会在打印结果中显示。

[0080] 实施例 7 本发明的试纸条的方法学鉴定

[0081] 按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制备的试纸条进行检定,

[0082] (1) 试纸条灵敏度实验

[0083] 以 S0 校准品进行 10 次重复测定,其平均值加上两倍标准差带入曲线方程所得的浓度值为试纸条的灵敏度,其灵敏度为 2.6U/mL。

[0084] (2) 试纸条特异性实验

[0085] 与其类似物作交叉反应实验,交叉反应率 < 0.01%。

[0086] (3) 试纸条精密性实验

[0087] 批内变异

[0088] 取低、中、高三份质控血清样品分别进行 10 孔平行实验,计算测定值的平均值(\bar{x})和标准差(s)。按公式 $CV=s/\bar{x} \times 100\%$ 计算变异系数,批内变异系数 CV 分别为 6.3%, 4.9%, 4.1%。

[0089] 批间变异

[0090] 选择 5 份不同浓度的血清样品对每份血清进行 3 次重复测定,计算其批间变异系数(CV%),批间变异 CV 在 7.21 ~ 9.5%之间。

[0091] (4) 试纸条稳定性实验

[0092] 试纸条保存条件为 18-26℃,经过 18 个月的测定试纸条的各项指标均满足要求,考虑到运输和使用过程中对试纸条的影响,我们进行 37℃ 7 天的加速实验,实验结果表明试纸条的各项指标完全符合要求。

[0093] 说明“定量检测血液中 CA125 的磁性免疫层析试纸条及试剂盒”的灵敏度、特异性、精密性和稳定性是完全合格的。

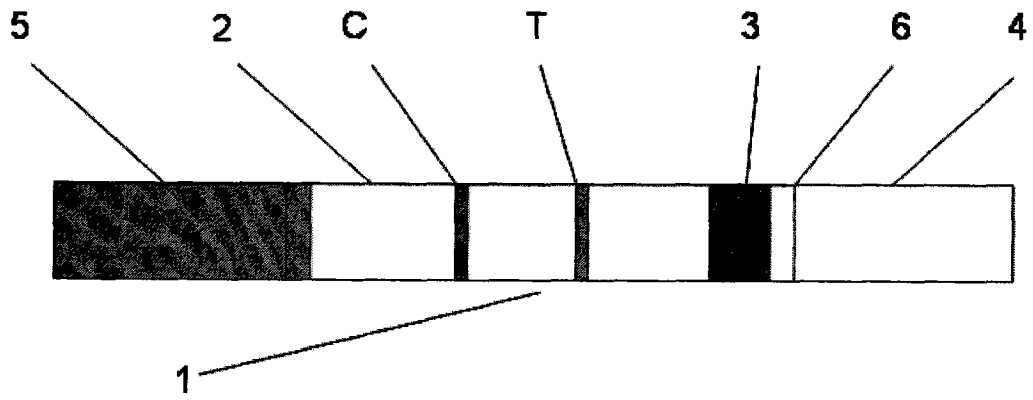


图 1

专利名称(译)	一种定量检测血液中肿瘤相关抗原125的磁性免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN101762699A	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	CN200910087641.4	申请日	2009-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	唐宝军 应希堂 李强 胡国茂 郑金来 于尚永		
发明人	唐宝军 应希堂 李强 胡国茂 郑金来 于尚永		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533 G01N33/532 G01N33/552 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种定量检测血液中肿瘤相关抗原125的磁性免疫层析试纸条及其制备方法。该试纸条是在底板上依次相互交错2mm粘贴上包被膜、结合了肿瘤相关抗原125抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫，然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成的试纸条，包被膜上预包被有肿瘤相关抗原125抗体检测线和质控线，本发明将磁性免疫层析技术和异硫氰酸荧光素系统引入到肿瘤相关抗原125的定量检测中，大大提高了检测灵敏度，并且可以准确的给出定量结果，操作简便，诊断快速。

