



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109085335 A

(43)申请公布日 2018.12.25

(21)申请号 201810969563.X

(22)申请日 2018.08.23

(71)申请人 宁波奥丞生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市海曙区望春工  
业园区春华路885号

(72)发明人 唐静 陈星星 田青青

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理  
有限公司 11616

代理人 李丽君

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

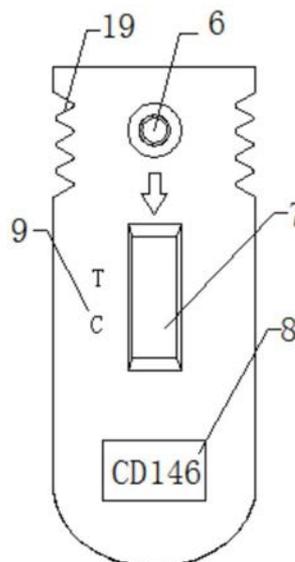
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光  
法试剂盒

(57)摘要

本发明公开了定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,包括试剂盒盒体以及设置于试剂盒盒体内的试纸条,所述试剂盒盒体包括盒体、盖体,试纸条包括底板、吸水垫、硝酸纤维素包被膜、结合垫以及样品垫,结合垫上包被量子点标记的CD146单克隆抗体I,检测线上包被有CD146单克隆抗体II,质控线上包被有兔抗鼠IgG;本发明免疫荧光试剂盒采用量子点标记技术,用巯基乙酸修饰量子点,保证了量子点标记抗体的稳定性,具有检测结果灵敏度高、检测时间短、特异性良好等优点,本发明试剂盒精巧轻便,携带方便,对操作场所和环境没有硬性要求,操作简单快捷,检测步骤简单、具备定量检测功能,适于市场进一步推广使用。



1. 定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,其特征在于,包括试剂盒盒体以及设置于试剂盒盒体内的试纸条,所述试剂盒盒体包括盒体、盖体,盒体、盖体通过卡扣相连,所述盖体内表面设有用来固定盖体与盒体的插销,插销左右对称设置,插销上下间隔设置3对,盒体内表面设有与插销相适应的插孔,所述盖体上设有加样孔、观察窗,加样孔为圆形通孔结构,观察窗为长方形通孔结构,盖体上表面设有项目标识、检测标识,盖体内表面设有用于固定试纸条的卡位凸起,所述盒体内表面设有挡板、条状凸起,挡板包括上下两端的横挡板以及与横挡板竖直连接的竖挡板,所述横挡板与竖挡板组成半封闭结构,所述试纸条位于上下两端的半封闭结构中,所述条状凸起左右对称设置,条状凸起之间的距离等于试纸条的宽度;

所述试纸条包括底板、吸水垫、硝酸纤维素包被膜、结合垫以及样品垫,所述硝酸纤维素包被膜粘覆于所述底板的中间部位,且硝酸纤维素包被膜上设置有相间隔的检测线和质控线,所述检测线靠近所述结合垫,所述质控线靠近所述吸水垫,所述结合垫上包被量子点标记的CD146单克隆抗体I,所述检测线上包被有CD146单克隆抗体II,质控线上包被有兔抗鼠IgG。

2. 如权利要求1所述的定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,其特征在于,所述试剂盒盒体的加样孔端两侧设有波浪形锯齿。

3. 如权利要求1所述的定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,其特征在于,所述量子点为硒化镉量子点或硫化镉量子点。

4. 如权利要求1所述的定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,其特征在于,所述结合垫为聚氨酯材质。

5. 如权利要求1所述的定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,其特征在于,所述样品垫是玻璃纤维素膜。

6. 如权利要求1所述的定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,其特征在于,所述吸水垫、硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠。

## 定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂领域,具体涉及定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒。

### 背景技术

[0002] 血管生成对恶性实体肿瘤的生长、转移乃至预后都有着极其重要的意义。目前国内在研究肿瘤中新生血管时,常用的血管内皮细胞标记物包括CD34、CD31、CD146、CD146和vWF等,血管生成是恶性实体肿瘤突破上皮基底膜后进一步生长所必须的,肿瘤中新形成的血管具有其自身独特的结构特点,表现为管壁不完整,无平滑肌成分,仅由有孔的内皮细胞和片状的基膜构成,多数学者认为,新生血管的结构特点使恶性肿瘤组织发生远处转移成为可能。因此,恶性实体肿瘤中新生血管的定量被认为是一种重要的独立的预后标志。

[0003] CD146是一种钙非依赖性细胞黏附分子的膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族的成员,介导细胞与细胞之间或细胞与细胞外基质之间的相互作用,CD146在新生血管中选择性高表达,参与新生血管的生成,为肿瘤的生长和转移提供必要的营养,CD146能促进肿瘤生长、血行转移,与肿瘤侵袭和转移密切相关,可作为肿瘤侵袭和转移的相关标志物,CD146在肿瘤血管生成、发生、发展和转移中起重要作用,并可能成为肿瘤预后判断的参考指标。

[0004] 目前,检测血管内皮细胞标记物CD146的方法目前主要是免疫组化法,免疫组化法主要用于定性分析,灵敏度较低,干扰因素较多,重复性不好,检测时间长。因此免疫组化法不适合临床快速诊断,如何能够制作出快速的定量检测设备成为需要迫切解决的问题。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,具有发射光谱范围窄且对称、Stocks位移大、背景噪声小、灵敏度高、检测时间短、特异性良好等优点。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒,包括试剂盒盒体以及设置于试剂盒盒体内的试纸条,所述试剂盒盒体包括盒体、盖体,盒体、盖体通过卡扣相连,所述盖体内表面设有用来固定盖体与盒体的插销,插销左右对称设置,插销上下间隔设置3对,盒体内表面设有与插销相适应的插孔,所述盖体上设有加样孔、观察窗,加样孔为圆形通孔结构,观察窗为长方形通孔结构,盖体上表面设有项目标识、检测标识,盖体内表面设有用于固定试纸条的卡位凸起,所述盒体内表面设有挡板、条状凸起,挡板包括上下两端的横挡板以及与横挡板竖直连接的竖挡板,所述横挡板与竖挡板组成半封闭结构,所述试纸条位于上下两端的半封闭结构中,所述条状凸起左右对称设置,条状凸起之间的距离等于试纸条的宽度;

[0007] 所述试纸条包括底板、吸水垫、硝酸纤维素包被膜、结合垫以及样品垫,所述硝酸纤维素包被膜粘覆于所述底板的中间部位,且硝酸纤维素包被膜上设置有相间隔的检测线和质控线,所述检测线靠近所述结合垫,所述质控线靠近所述吸水垫,所述结合垫上包被量

子点标记的CD146单克隆抗体I,所述检测线上包被有CD146单克隆抗体II,质控线上包被有兔抗鼠IgG。

[0008] 优选的,所述试剂盒盒体的加样孔端两侧设有波浪形锯齿。

[0009] 优选的,所述量子点为硒化镉量子点或硫化镉量子点。

[0010] 优选的,所述结合垫为聚氨酯材质。

[0011] 优选的,所述样品垫是玻璃纤维素膜。

[0012] 优选的,所述CD146单克隆抗体I与CD146单克隆抗体II的区别在于结合CD146抗原的位点不同。

[0013] 优选的,所述吸水垫、硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠。

[0014] 上述定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒包括如下制备步骤:

[0015] (1) 制备量子点标记的CD146单克隆抗体I:取胶乳颗粒加入PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)中,离心机离心;去掉上清液,用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀颗粒物,得到胶乳颗粒溶液,4℃保存待用;将胶乳颗粒溶液用MES缓冲液(0.01M, pH=6.1)将胶乳颗粒稀释至10mg/ml,然后将稀释后的胶乳颗粒溶液加入巯基乙酸,混匀后,离心机离心,弃去上清,并用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀颗粒物,之后再次离心机离心,弃去上清,沉淀颗粒物复溶于0.02M, pH7.4的PBS缓冲液中,得巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液;将巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液,用MES缓冲液(0.01M, pH=6.1)稀释至10mg/ml,然后将稀释后的巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液,加入硒化镉量子点,超声混匀,离心机离心,弃去上清,并用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀颗粒物,之后再次离心机离心,弃去上清,沉淀颗粒物复溶的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)中,得量子点-巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液;将量子点-巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液,用MES缓冲液(0.01M, pH=6.1)稀释至10mg/ml,然后在量子点-巯基乙酸-胶乳复合物加入碳二亚胺,搅拌混匀,离心机离心,弃去上清,并用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀物颗粒,之后按照CD146单克隆抗体I与量子点-巯基乙酸-胶乳复合物的质量比1:10的比例加入CD146单克隆抗体I,搅拌混匀,离心机离心,去除上清,将沉淀物复溶于含有5wt%BSA的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2),即得量子点标记的CD146单克隆抗体I;

[0016] (2) 制备结合垫:使用含有1wt%蔗糖的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)将量子点标记的CD146单克隆抗体I稀释至2mg/ml的浓度,再使用定量喷膜仪以2 $\mu$ l/cm的量将量子点标记的CD146单克隆抗体I喷涂于结合垫上,避光条件下37℃烘干1h,制得单克隆抗体结合垫;

[0017] (3) 制备硝酸纤维素包被膜:使用含有1wt%蔗糖的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)分别将CD146单克隆抗体II、兔抗鼠IgG抗体稀释至2mg/ml的浓度,再使用定量喷膜仪以1 $\mu$ l/cm的量将二者间隔0.8cm喷涂在硝酸纤维素膜上,37℃烘干1h,加入干燥剂置于4℃封存备用;

[0018] (4) 制备样品垫:用含有1wt%BSA、0.1wt%tritonx-100的PBS缓冲液(0.01M、pH=7.2)浸泡样品垫1.5h,37℃烘干备用;

[0019] (5) 装配试剂盒:将标记有抗体的硝酸纤维素包被膜粘贴于底板的中间位置,在硝酸纤维素包被膜的一端搭接吸水垫,另一端搭接结合垫,结合垫上搭接样品垫,将试纸条置于盒体的指定位置,盖上盖体,置于湿度低于15%的密封空间内保存。

[0020] 本发明具有有益效果：本发明免疫荧光试剂盒，采用量子点标记技术，用巯基乙酸修饰量子点，保证了量子点标记抗体的稳定性，具有检测结果灵敏度高、背景噪声小、检测时间短、特异性良好等优点，且盒体与盖体易于组装，设有波浪形锯齿，便于抓握且不易滑落，保证试剂盒检测的稳定性，本发明试剂盒精巧轻便，携带方便，对操作场所和环境没有硬性要求，操作简单快捷，检测步骤简单、检测结果稳定、具备定量检测功能，适于市场进一步推广使用。

### 附图说明

[0021] 图1为本发明结构示意图；

[0022] 图2为盖体内表面示意图；

[0023] 图3为盒体内表面示意图；

[0024] 图4为试纸条结构示意图；

[0025] 图中：1-试纸条，2-盒体，3-盖体，4-插销，5-插孔，6-加样孔，7-观察窗，8-项目标识，9-检测标识，10-卡位凸起，11-横挡板，12-竖挡板，13-条状凸起，14-底板，15-吸水垫，16-硝酸纤维素包被膜，17-结合垫，18-样品垫，19-波浪形锯齿，20-检测线，21-质控线。

### 具体实施方式

[0026] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0027] 实施例1

[0028] 如图1-4所示，定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒，包括试剂盒盒体以及设置于试剂盒盒体内的试纸条1，所述试剂盒盒体包括盒体2、盖体3，盒体2、盖体3通过卡扣相连，所述盖体3内表面设有用来固定盖体3与盒体2的插销4，插销4左右对称设置，插销4上下间隔设置3对，盒体2内表面设有与插销4相适应的插孔5，所述盖体3上设有加样孔6、观察窗7，加样孔6为圆形通孔结构，观察窗7为长方形通孔结构，盖体上表面设有项目标识8、检测标识9，盖体3内表面设有用于固定试纸条1的卡位凸起10，卡位凸起10的宽度与试纸条1的宽度一致，所述盒体2内表面设有挡板、条状凸起13，挡板包括上下两端的横挡板11以及与横挡板11竖直连接的竖挡板12，所述横挡板11与竖挡板12组成半封闭结构，所述试纸条1位于上下两端的半封闭结构中，所述条状凸起13左右对称设置，条状凸起13之间的距离等于试纸条1的宽度；

[0029] 所述试纸条包括底板14、吸水垫15、硝酸纤维素包被膜16、结合垫17以及样品垫18，所述硝酸纤维素包被膜16粘覆于所述底板14的中间部位，且硝酸纤维素包被膜16上设置有相间隔的检测线20和质控线21，所述检测线20靠近所述结合垫17，所述质控线21靠近所述吸水垫15，所述结合垫17上包被量子点标记的CD146单克隆抗体I，所述检测线20上包被有CD146单克隆抗体II，质控线21上包被有兔抗鼠IgG。

[0030] 优选的，所述试剂盒盒体的加样孔端两侧设有波浪形锯齿19；便于抓握，避免滑落。

[0031] 优选的，所述量子点为硒化镉量子点或硫化镉量子点。

[0032] 优选的，所述结合垫17为聚氨酯材质。

[0033] 优选的,所述样品垫18是玻璃纤维素膜。

[0034] 优选的,所述CD146单克隆抗体I与CD146单克隆抗体II的区别在于结合CD146抗原的位点不同。

[0035] 优选的,所述吸水垫15、硝酸纤维素包被膜16、结合垫17、样品垫18之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠。

[0036] 上述试剂盒盒体结构合理,精巧轻便,携带方便,对操作场所和环境没有硬性要求,操作简单快捷,检测步骤简单、检测结果稳定、具备定量检测功能。

[0037] 实施例2

[0038] 上述定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒的制备步骤如下:

[0039] (1) 制备量子点标记的CD146单克隆抗体I:取1ml胶乳颗粒加入10ml的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)中,离心机8000rpm离心5min;去掉上清液,用5ml的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀颗粒物,得到胶乳颗粒溶液,4℃保存待用;将胶乳颗粒溶液用MES缓冲液(0.01M, pH=6.1)将胶乳颗粒稀释至10mg/ml,然后取5ml稀释后的胶乳颗粒溶液加入3ml巯基乙酸,混匀24小时后,离心机8000rpm离心,弃去上清,并用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀颗粒物,之后再次离心机5000rpm离心,弃去上清,沉淀颗粒物复溶于0.02M, pH7.4的PBS缓冲液中,得巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液;将巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液,用MES缓冲液(0.01M, pH=6.1)稀释至10mg/ml,然后取20ml稀释后的巯基乙酸-胶乳复合悬浊液,加入20mg硒化镉量子点,超声混匀8h,离心机5000rpm离心,弃去上清,并用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀颗粒物,之后再次离心机5000rpm离心,弃去上清,沉淀颗粒物复溶于0.02M, pH7.4的PBS缓冲液中,得量子点-巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液;将量子点-巯基乙酸-胶乳复合物悬浊液,用MES缓冲液(0.01M, pH=6.1)稀释至10mg/ml,然后按照量子点-巯基乙酸-胶乳复合物与碳二亚胺的质量比为1:8,加入碳二亚胺,搅拌混匀10min,5000rpm离心,弃去上清,并用PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)重悬沉淀物颗粒,之后按照CD146单克隆抗体I与量子点-巯基乙酸-胶乳复合物的质量比1:10的比例加入CD146单克隆抗体I,搅拌混匀3小时后,5000rpm离心5min,去除上清,将沉淀物复溶于含有5wt% BSA的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2),即得量子点标记的CD146单克隆抗体I;

[0040] (2) 制备结合垫:使用含有1wt%蔗糖的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)将量子点标记的CD146单克隆抗体I稀释至2mg/ml的浓度,再使用定量喷膜仪以2ul/cm的量将量子点标记的CD146单克隆抗体I喷涂于结合垫上,避光条件下37℃烘干1h,制得单克隆抗体结合垫;

[0041] (3) 制备硝酸纤维素包被膜:使用含有1wt%蔗糖的PBS缓冲液(0.02M、pH=7.2)分别将CD146单克隆抗体II、兔抗鼠IgG抗体稀释至2mg/ml的浓度,再使用定量喷膜仪以1ul/cm的量将二者间隔0.8cm喷涂在硝酸纤维素膜上,37℃烘干1h,加入干燥剂置于4℃封存备用;

[0042] (4) 制备样品垫:用含有1wt%BSA、0.1wt% tritonx-100的PBS缓冲液(0.01M、pH=7.2)浸泡样品垫1.5h,37℃烘干备用;

[0043] (5) 装配试剂盒:将标记有抗体的硝酸纤维素包被膜粘贴于底板的中间位置,在硝酸纤维素包被膜的一端搭接吸水垫,另一端搭接结合垫,结合垫上搭接样品垫,将试纸条置于盒体的指定位置,盖上盖体,置于湿度低于15%的密封空间内保存。

[0044] 实施例3

[0045] 本实施例与实施例2基本相同,不同的地方在于,采用的量子点为硫化镉量子点,在活化的量子点-巯基乙酸-胶乳悬浊液中加入抗体超声混匀时间为5小时。

[0046] 实施例4

[0047] 临床样本检测方法:将100u1待测样品加入实施例2制备的样本垫上,10min后待测样品的试纸条放入荧光免疫层析检测仪中,读取T/C线的发光值,并记录,将待测样品T/C值带入标准曲线中,得到CD146的浓度;本发明可以直接定量检测CD146的浓度,操作方便,结果可靠。

[0048] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

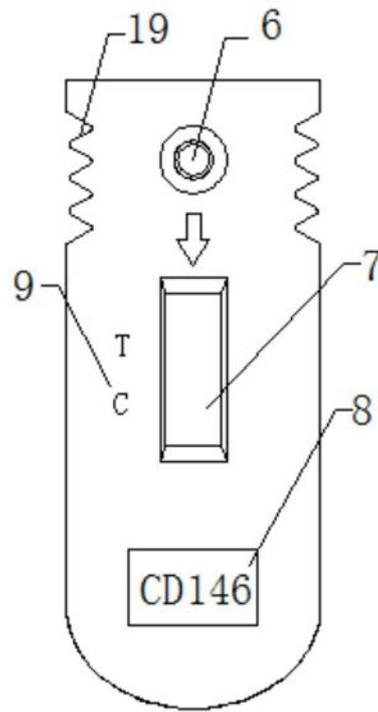


图1

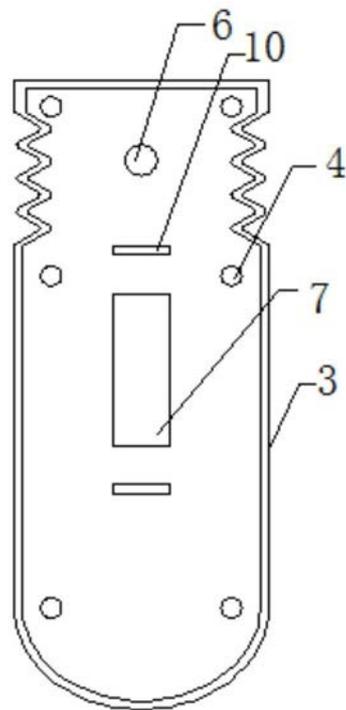


图2

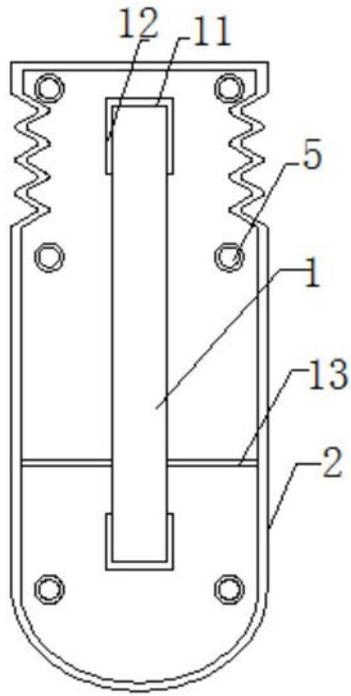


图3

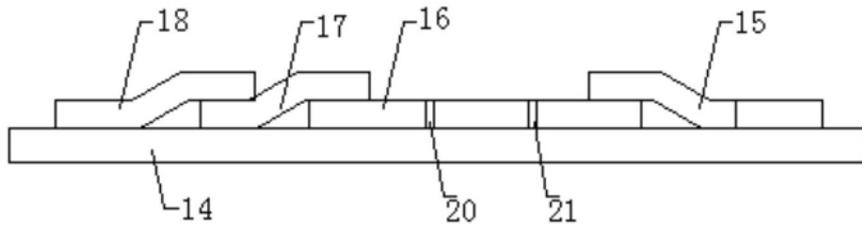


图4

专利名称(译)	定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109085335A</a>	公开(公告)日	2018-12-25
申请号	CN201810969563.X	申请日	2018-08-23
[标]发明人	唐静 陈星星 田青青		
发明人	唐静 陈星星 田青青		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54346		
代理人(译)	李丽君		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了定量检测血管内皮标志物CD146的免疫荧光法试剂盒，包括试剂盒盒体以及设置于试剂盒盒体内的试纸条，所述试剂盒盒体包括盒体、盖体，试纸条包括底板、吸水垫、硝酸纤维素包被膜、结合垫以及样品垫，结合垫上包被量子点标记的CD146单克隆抗体I，检测线上包被有CD146单克隆抗体II，质控线上包被有兔抗鼠IgG；本发明免疫荧光试剂盒采用量子点标记技术，用巯基乙酸修饰量子点，保证了量子点标记抗体的稳定性，具有检测结果灵敏度高、检测时间短、特异性良好等优点，本发明试剂盒精巧轻便，携带方便，对操作场所和环境没有硬性要求，操作简单快捷，检测步骤简单、具备定量检测功能，适于市场进一步推广使用。

