



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101762698 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 200910087639.7

(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号北科技园

(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 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

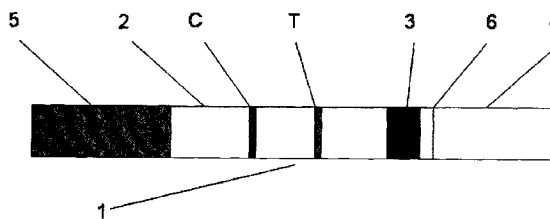
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的磁性免疫层析试纸条及其制备方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 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 CA19-9 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 CA19-9 抗体检测线和质控线,本发明将磁性免疫层析技术和生物素亲和素系统引入到血液中 CA19-9 的定量检测中,大大提高了检测灵敏度和可靠性,准确快速,无需长时间等候,成本费用低,操作方法简便,易于掌握。



1. 一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 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 CA19-9 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 CA19-9 抗体的检测线 T 和质控线 C。

2. 根据权利要求 1 的定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的磁性免疫层析试纸条,其特征在于: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 的磁性免疫层析法定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的试纸条中磁颗粒制备方法,其特征在于:选用直径为 100-300nm 的超顺磁颗粒,使用碳二亚胺和琥珀酰亚胺共价偶联的方式将链亲和素标记到磁颗粒上,选用预活化生物素进行 CA19-9 抗体的标记,将标记好的生物素化抗体以 1 : 2-1 : 10 的分子比例(摩尔比)与链亲和素磁颗粒混合,确保链亲和素磁颗粒过量;将制备好的磁颗粒使用定量喷液装置以 25  $\mu$  l/cm-50  $\mu$  l/cm 的量喷涂于磁颗粒垫上。

4. 根据权利要求 1 的磁性免疫层析法定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的试纸条中包被膜制备方法,其特征在于:使用 0.02mM, pH7.0-7.6 的 PBS,分别将抗 CA19-9 包被抗体以及生物素化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。

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肿瘤相关抗原 19-9 的试纸条中磁颗粒的制备方法,其特征在于包括以下三步:

1) 链亲和素磁颗粒的制备:使用含有 0.1% Tween-20 的 50mmol, pH9.0-9.6 的碳酸缓冲液洗涤磁颗粒,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链亲和素使链亲和素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) 生物素化 CA19-9 抗体的制备:将 CA19-9 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,将预活化生物素使用二甲基亚砷溶解,终浓度为 50mmol,以 10 : 1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的生物素溶液,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;

3) 生物素化抗体与链亲和素磁颗粒的混合,以 0.5  $\mu$  l/mg 磁颗粒的量向链亲和素磁颗粒溶液中加入生物素化 CA19-9 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。

## 一种定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 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 19-9 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 19-9 是一种与胰腺癌、胆囊癌、结肠癌和胃癌相关的肿瘤标志物,又称胰腺癌相关抗原 (Gastrointestinalcancer-associatedantigen, GICA)。1979 年 Koprowski 将人的结肠癌细胞株 sw1116 细胞表面分离出来的单唾液酸神经节糖苷脂 (monosialoganglioside) 作抗原,制成相应的单克隆抗体 1116-Ns-19-9,用此单克隆抗体识别的肿瘤相关抗原即称为 CA19-9。CA19-9 是一种黏液型糖蛋白,存在于血液中,是由胰腺细胞、胆管和胃、结肠、子宫内膜、唾液的上皮细胞组成。血清癌抗原 19-9 可作为胰腺癌、胆囊癌、胃癌、结肠癌、肝癌等恶性肿瘤的辅助诊断指标。胚胎期胎儿的胰腺、胆囊、肝、肠等组织存在这种抗原;正常人体组织中含量很低;在消化道恶性肿瘤,尤其是胰腺癌、胆囊癌病人血清中,癌抗原 19-9 含量明显增高,但早期诊断价值不大,主要作为病情监测和预示复发的指标。此外,对消化道疾病鉴别诊断,如急性胰腺炎、胆囊炎、肝炎等也有不同程度的升高。CA19-9 是胰腺癌敏感标志物,与 CA19-9、CEA 联用对胃肠道肿瘤的诊断更有价值。在卵巢癌、淋巴瘤、胃癌、肺癌、食道癌和乳腺癌阳性率约 30%。大部分胰腺癌患者血清 CA19-9 水平明显增高;肝胆系癌、胃癌、结直肠癌的 CA19-9 水平也会升高。

[0003] 目前的血液中 CA19-9 的诊断技术主要包括:放射免疫法 (RIA),酶联免疫试验 (ELISA)、化学发光 (CLIA)、时间分辨荧光等方法,但这些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。

[0004] 免疫层析技术是上世纪 90 年代初出现的一种操作简便、检测快速成本低廉而使用范围广泛的免疫检测方法。目前免疫层析已经能够很方便地应用于诸如:医学、毒品、药物残留、海关检查、环境检测等各种检测领域。它的出现大大地简便了人们的检测行为,但是,由于各种因素的影响,免疫层析技术只能实现定性检测和半定量或不准确的定量检测;免疫层析的检测灵敏度也有待提高,尤其是广泛使用的免疫胶体金层析试纸条,只能靠目测来判断检测结果,主观性很大,不同的人可能读出的结果偏差不小;基于光电效应的定量免疫检测技术,由于只能检测硝化纤维膜表面的免疫颗粒的光线,所以很难真实反映检测线上免疫颗粒的总量;另外,可以考虑在硝化纤维膜上同时设置多条不同检测线,以同时检测多个联检指标;还有,由于硝化纤维膜的不均一性,划检测线或控制线时,抗体在膜上的

分布也不均匀,导致检测时免疫颗粒在膜上的分布亦不均匀,从而影响检测结果。

[0005] 磁性免疫层析 (Magnetic ImmunoChromatographic Test, MICT) 是近年来出现的一种新一代单人份快速定量检测技术。通过用免疫纳米磁珠代替免疫胶体金,构建新型的免疫层析试纸条;并借助于相关弱磁信号阅读仪,实现对样品的定量快速检测。本发明以制备的高磁性物质含量的纳米磁性微球为标记物质,不仅提高检测的灵敏度与准确度,一方面解决目前免疫层析不能定量的问题,另一方面而且由于采用的是纳米尺度的微球,检测时间较目前亚微米尺度的乳胶颗粒或磁微球大为缩短,因此具有较好的临床检测意义。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。

[0006] 我们将生物素亲和素系统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,增加了工艺的通用性,减少了可变因素。

#### 发明内容

[0007] 本发明的目的即是 将磁性免疫层析技术和生物素亲和素系统联合应用在 CA19-9 定量检测试纸条中,将链亲和素共价偶联于超顺磁颗粒上,将生物素化 CA19-9 抗体与之混合之后作为检测流动相,将另一株配对的 CA19-9 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又能大大缩短检测的窗口期,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。

[0008] 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肿瘤相关抗原 19-9 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 CA19-9 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 CA19-9 抗体检测线 T 和质控线 C。

[0009] 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)。

[0010] 上述定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的磁性免疫层析试纸条制备方法包括以下步骤:

[0011] A、抗体的处理:选用单克隆抗体技术制备的商品化高效价抗 CA19-9 配对抗体,对 20mM, pH7.0-7.6 的 PBS 4℃ 透析过夜;

[0012] 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) 和琥珀酰亚胺 (NHS) 共价偶联的方式将链亲和素标记到磁颗粒上,选用预活化生物素进行 CA19-9 抗体的标记,将标记好的生物素化抗体以 1 : 2-1 : 10 的分子比例 (摩尔比) 与链亲和素化磁颗粒混合,确保链亲和素化磁颗粒过量;

[0013] C、将制备好的磁颗粒使用定量喷液装置以 25  $\mu$  l/cm-50  $\mu$  l/cm 的量喷涂于磁颗

粒垫上；

[0014] D、包被膜的制备：使用包被缓冲液分别将抗 CA19-9 包被抗体以及生物素化 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；

[0015] 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；

[0016] 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。

[0017] 进一步，上述的步骤 B 包括以下三步：

[0018] 1) 链亲和素化磁颗粒的制备：使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH9.0-9.6 的碳酸缓冲液洗涤磁颗粒，加入 EDC 和 NHS 使二者终浓度均为 20mM，室温反应 1 小时，使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH9.0-9.6 的碳酸缓冲液充分洗涤磁颗粒后，加入链亲和素使链亲和素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，用上述醋酸钠缓冲液洗涤磁颗粒，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；

[0019] 2) 生物素化 CA19-9 抗体的制备：将 CA19-9 抗体对 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 4℃ 透析过夜，调整浓度为 2mg/ml，将预活化生物素使用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解，终浓度为 50mM，以 10 : 1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的生物素溶液，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；

[0020] 3) 生物素化抗体与链亲和素化磁颗粒的混合，以 0.5 μl/mg 磁颗粒的量向链亲和素化磁颗粒溶液中加入生物素化 CA19-9 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。

[0021] 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。

[0022] 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 CA19-9 抗体稀释为 1.0mg/ml，生物素化 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。

[0023] 与现有快速检测试纸条相比较，本发明具有以下优点：

[0024] 1) 通过对试纸条的改进，首次将磁性免疫层析技术引入 CA19-9 的检测中，结合磁性检测仪，实现了 CA19-9 的单人份宽范围定量检测，为临床使用提供了极大便利。

[0025] 2) 通过引入生物素亲和素系统，使得试纸条的制备过程大大简化，适合大规模生产。

[0026] 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。

## 附图说明

[0027] 图 1 为本发明磁性免疫层析法定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的试纸条结构示意图

[0028] 为进一步说明本发明磁性免疫层析法定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 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

[0029] 本发明所述的定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 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 CA19-9 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 CA19-9 抗体检测线 T 和质控线 C。

[0030] 在具体实施例中,所采用 CA19-9 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 CA19-9 抗原的原理检测标本,当待测标本中含有 CA19-9 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 CA19-9 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,未结合生物素化抗体的链亲和素标记磁颗粒会继续前行,到达指控线 C 时,生物素化 BSA 会与链亲和素结合从而在 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。

[0031] 本发明所述的定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的磁性免疫层析试纸条的制备方法见以下实例:

[0032] 实施例 1

[0033] 定量检测血液中肿瘤相关抗原 19-9 的磁性免疫层析试纸条及试纸盒的制备方法

[0034] 本实施例的试纸条及试纸盒的制备方法包括以下步骤:

[0035] A、抗体制备:选用商品化的 CA19-9 配对抗体,对 20mM, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS 4℃透析过夜备用。

[0036] B、包被膜的制备:

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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 CA19-9 抗体稀释为 1.0mg/ml,生物素化 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。

[0040] C、磁颗粒的制备:

[0041] 碳酸缓冲液的配制:用双蒸水和碳酸钠及碳酸氢钠配制 pH 值为 9.5 (pH9.0-9.6 均适用),浓度为 50mM 的碳酸缓冲液,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。

[0042] 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 μm 微孔滤膜过滤除菌后 4℃ 保存备用,有效期一周。

[0043] 链亲和素化磁颗粒的制备:使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH9.5 (pH9.0-9.6 均适用) 碳酸缓冲液洗涤磁颗粒,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,加入链亲和素使链亲和素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, pH9.5 (pH9.0-9.6 均适用) 的碳酸缓冲液洗涤磁颗粒,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。

[0044] 生物素化 CA19-9 抗体的制备方法是:将 CA19-9 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,将预活化生物素使用 DMSO 溶解,终浓度为 50mM,以 10 : 1 的分子比例向抗体溶液中加入所需量的生物素溶液,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。

[0045] 生物素化抗体与链亲和素化磁颗粒的混合,以 0.5 μl/mg 的量向链亲和素化磁颗粒溶液中加入生物素化 CA19-9 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。

[0046] D、磁颗粒的喷涂与冻干

[0047] 使用 BioDot 喷膜仪的专用喷头将处理好的磁颗粒以 50 μl/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,

[0048] E、样品垫的处理

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] F、试纸条的组装及切割

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] G、试纸卡的组装

[0056] 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。

[0057] H、确定该批次的二维码信息

[0058] 品名 :CA19-9 定量磁性检测卡

[0059] 批次 :试纸卡的组装日期, 格式为 :年 / 月 / 日, XXXX/XX/XX

[0060] 判读标准的确定 :取 CA19-9 标准抗原原料, 用标准品稀释液稀释成 200U/mL, 60U/mL, 20U/mL, 6U/mL, 2U/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。

[0061] 标准品稀释液配方 :20mmol PBS, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用), 0.5% casein, 0.01%  $\text{NaN}_3$ 。

[0062] I、二维码的打印粘贴

[0063] 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。

[0064] J、成品包装

[0065] 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。

[0066] 层析缓冲液配方为 :1% Tween-20, 0.5% Triton X-100, 1% NP-40, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 20mmol PBS, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用)。

[0067] 实施例 2

[0068] 除了链亲和素化磁颗粒的制备的步骤中 :链亲和素使链亲和素与磁颗粒的比例为 1 : 2, 其它步骤同实施例 1,

[0069] 实施例 3

[0070] 除了链亲和素化磁颗粒的制备的步骤中 :链亲和素使链亲和素与磁颗粒的比例为 1 : 10, 其它步骤同实施例 1。

[0071] 实施例 4

[0072] 除了生物素化抗原 \ 抗体与链亲和素化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。

[0073] 实施例 5

[0074] 除了生物素化抗原 \ 抗体与链亲和素化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。

[0075] 实施例 6

[0076] 本发明的检测卡的使用方法

[0077] 1、加样

[0078] 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  $\mu$ l 样本血清加入卡上的加样孔内, 再加入 50  $\mu$ l 层析缓冲液, 等待反应进行 15 分钟。

## [0079] 2、测量及结果输出

[0080] 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。

## [0081] 实施例 7

## [0082] 本发明的试纸条的方法学鉴定

## [0083] (1) 试纸条灵敏度实验

[0084] 以 S0 校准品进行 10 条重复测定,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 1.25U/mL。

## [0085] (2) 试纸条特异性实验

[0086] 与其类似物作交叉反应实验,其结果见表 1

[0087] 表 1 试纸条特异性实验结果

[0088]

交叉反应原	CEA	CA50	CA242	CA125
反应原浓度	162ng/mL	140U/mL	200U/mL	500U/mL
实测值 (U/mL)	0.12	2.30	3.26	0.02

## [0089] (3) 试纸条精密性实验

## [0090] 批内变异

[0091] 取低、中、高三份质控血清样品分别进行 10 条平行实验,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 5.6%, 6.2%, 4.5%。

## [0092] 批间变异

[0093] 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 4.5 ~ 9.6%之间。

## [0094] (4) 试纸条准确性实验

[0095] 将高浓度的校准品原料,用正常人血清稀释成四个不同浓度值,每个浓度做 5 孔平行实验,分别计算回收率在 92-106%范围内。

## [0096] (5) 试纸条稳定性实验

[0097] 试纸条保存温度为 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℃ 30 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。

[0098] 说明“肿瘤相关抗原 19-9 的磁性免疫层析试纸条”的灵敏度、特异性、精密性、准确性和稳定性是完全合格的。

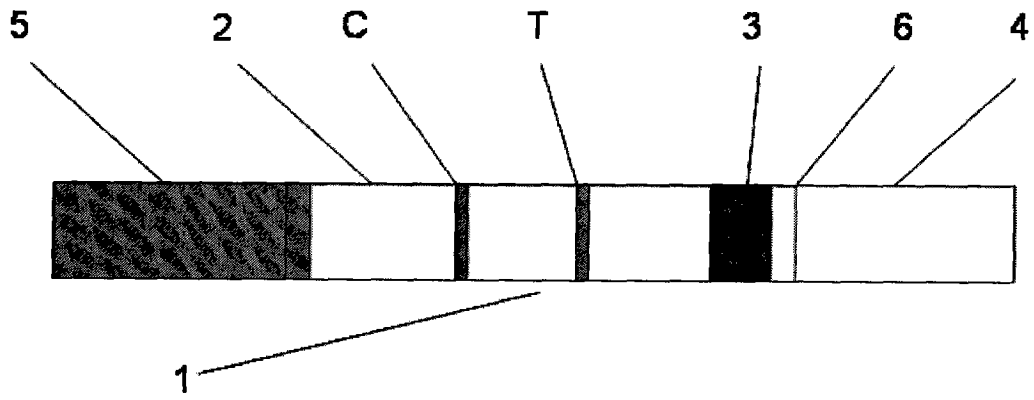


图 1

专利名称(译)	一种定量检测血液中肿瘤相关抗原19-9的磁性免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101762698A</a>	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	CN200910087639.7	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 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/552		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种定量检测血液中肿瘤相关抗原19-9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CA19-9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CA19-9抗体检测线和质控线，本发明将磁性免疫层析技术和生物素亲和素系统引入到血液中CA19-9的定量检测中，大大提高了检测灵敏度和可靠性，准确快速，无需长时间等候，成本费用低，操作方法简便，易于掌握。

