



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102221612 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

(21) 申请号 201110154443. 2

(22) 申请日 2011. 06. 10

(71) 申请人 正元盛邦(天津)生物科技有限公司

地址 300457 天津市经济技术开发区洞庭路
220 号 S901

(72) 发明人 霍五奎 岳晓燕 马雪明 刘寅

王晶 罗云萍 张有青

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

G01N 33/52(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

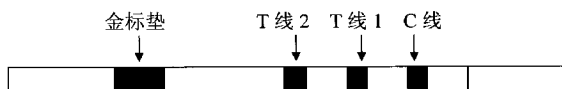
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种生物工程技术领域的检测方法,具体是一种用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法。癌胚抗原是一个广谱性肿瘤标志物,它能向人们反映出多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计,是一个较好的肿瘤标志物。临床上对 CEA 的检测常作为结肠癌、胃癌、直肠癌、食道癌等早期辅助诊断及癌症术后有无复发的检测指标。目前,临床上常用的 CEA 检测的方法为 ELISA, CLIA 等方法。上述方法费时、费力、不利于普及而且费用昂贵。免疫胶体金技术近年来发展迅速,得到了广泛应用,如传染病、早孕、癌症等的检测。本发明采用胶体金免疫层析法,建立快速检测 CEA 的方法,并且能够半定量检测 5ng/mL ~ 20ng/mL 这一 CEA 灰区范围,测定 CEA 可以作为良性与恶性肿瘤的鉴别诊断依据。



1. 一种用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法,其特征在于,采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记抗 CEA 单克隆抗体 1 并均匀涂布于胶体金垫上,作为示踪标记物。在硝酸纤维素膜上,两个不同浓度的 CEA 单克隆抗体 2 固定于两个检测线(即 T 线),羊抗鼠二抗固定于质控线(即 C 线)。依次将样本垫、胶金垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸组装,剪成胶体金试纸并装入检测卡中。金标抗体与相应的抗原、抗体发生特异性结合被截留而显色,根据 T 线、C 线显色与否来判断阴阳性结果。

2. 根据权利要求 1 所述的一种用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法,其特征在于,抗体划线浓度为:

T1 线用浓度为 0.2mg/mL 的 CEA 单克隆抗体 2 划线,用于检出 5ng/mL 的 CEA;

T2 线用浓度为 0.1mg/mL 的 CEA 单克隆抗体 2 划线,用于检出 20ng/mL 的 CEA;

C 线用 3.5mg/mL 羊抗鼠多克隆载体划线;

将硝酸纤维素膜置于 40°C 烘箱干燥 3 天。

3. 根据权利要求 1 所述的一种用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法,其特征在于,运用不同浓度的抗体溶液在相同的基质上划线,以胶体金方法检测多个不同浓度水平物质的方法。

用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物工程技术领域的检测方法,具体是一种用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤已成为危害人类健康的主要疾病,其中消化系统恶性肿瘤的发病高居首位。据国内有关临床调查显示,近年来大肠癌、结肠癌、肝癌和胰腺癌等消化系统恶性肿瘤在人群中发病率有所上升,消化系统恶性肿瘤约占所有肿瘤发病的 60 ~ 70%,位居第一,在死亡率“排行榜”上也是“名列前茅”,且呈年轻化趋势,因此开展消化系统肿瘤诊断治疗研究的重要性不言而喻。这表明,未来我国对于高质量的消化系统肿瘤诊断产品,尤其是 CEA 诊断产品的需求将越来越大。

[0003] 大肠癌组织可产生一种糖蛋白,作为抗原引起患者的免疫反应。此种抗原称为癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen CEA),可广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌。在成年人胃肠道中也有少量合成,但不进入血液系统而是通过胃肠道排出,因此,在正常成年人血清中只有微量的癌胚抗原,浓度小于 5ng/mL。在胃肠道肿瘤时,血清中的癌胚抗原会明显升高,如果血清中的癌胚抗原超过每升血 20 μ g,提示有胃肠道肿瘤。但是其他的恶性肿瘤如肺癌、胰腺癌、乳腺癌以及一些良性疾病如非特异性结肠炎、胶原性疾病、心血管疾病等也会升高。

[0004] 癌胚抗原是一个广谱性肿瘤标志物,它能向人们反映出多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计,是一个较好的肿瘤标志物。临床上对 CEA 的检测常作为结肠癌、胃癌、直肠癌、食道癌等早期辅助诊断及癌症术后有无复发的检测指标。良性肿瘤,炎症和退行性疾病,如结肠息肉,溃疡性结肠炎,胰腺炎和酒精性肝硬变病人 CEA 也有部分升高,但远远低于恶性肿瘤,一般小于 20ng/mL,CEA 超过 20ng/mL 时往往提示有消化道肿瘤。所以测定 CEA 可以作为良性与恶性肿瘤的鉴别诊断依据。

[0005] 一些肿瘤如早期胃癌 70% 以上无明显症状,给早期诊断带来了困难,一旦临床上出现了明显症状,往往已属于病变的晚期。因此,早期发现并及时就诊成为提高治愈率的焦点问题,而目前,对于消化系统肿瘤的早期检测集中于癌胚抗原 CEA 这一特异性蛋白。较高的 CEA 水平意味着癌症也许会存在,这时就需要进行活检来确认诊断。目前,临床上常用的 CEA 检测的方法为 ELISA,CLIA 等方法。上述方法费时、费力、不利于普及而且费用昂贵。开发简单、快速的癌胚抗原诊断方法具有十分重要的经济价值和社会意义。

[0006] 免疫胶体金技术是 20 世纪 70 年代初期由 Faulk 和 Taylor 始创,最初用于免疫电镜技术。胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术,现在已成功用于电镜、流式细胞仪、免疫印迹、蛋白染色、体外诊断制剂的制造等领域。目前金标记技术常与膜载体配合,形成特定的免疫检测方式,如免疫渗滤试验和免疫层析试验等。免疫层析试纸条就是此技术用于体外快速诊断的一个重要发展方向,是在现代单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的新型检测

技术。近年来该技术发展迅速,已经在临床诊断特别是床边检测(POCT)中得到了广泛应用,如传染病、早孕、癌症等的检测。

[0007] 利用胶体金的检测方法测定血清中 CEA 作为结肠癌、胃癌、直肠癌、食道癌等早期辅助诊断及癌症术后有无复发的检测指标,已被开发,其检测下限为 5ng/mL。但是对于临床上单独使用 5ng/mL 这一标准不能直接、快速区分良性与恶性肿瘤,所以开发能够检测 CEA 5~20ng/mL 这一 CEA 诊断灰区的半定量胶体金试纸也是十分必要的。目前国内外均无相关的试纸条出售。

发明内容

[0008] 本发明的目的:开发简单、快速的癌胚抗原诊断方法具有十分重要的经济价值和社会价值。本实验采用胶体金免疫层析法,建立快速检测 CEA 的方法。并且能够半定量检测 5ng/mL~20ng/mL 这一 CEA 灰区范围。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记抗 CEA 单克隆抗体 1 并均匀涂布于胶金垫上,作为示踪标记物。在硝酸纤维素膜上,两个不同浓度的 CEA 单克隆抗体 2 固定于两个检测线(即 T 线),羊抗鼠二抗固定于质控线(即 C 线)。依次将样本垫、胶金垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸组装,剪成胶体金试纸并装入检测卡中。金标抗体与相应的抗原、抗体发生特异性结合被截留而显色,根据 T 线、C 线显色与否来判断阴阳性结果。

[0010] 本发明方法包括如下步骤:

[0011] 一、胶体金溶液配制

[0012] 1. 配制 1% 氯金酸溶液;

[0013] 2. 配制 2% 柠檬酸三钠溶液;

[0014] 3. 将 0.02% 的氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 2% 的柠檬酸三钠 2mL;

[0015] 4. 溶液由浅蓝色,深蓝,再加热出现酒红色,继续煮沸 10min;

[0016] 停止加热,继续搅拌至室温。

[0017] 二、胶体金标记物的制备

[0018] 1. 取两个 1.5mL 试管,分别加入 1mL 胶体金溶液;

[0019] 2. 加入适量硼砂缓冲液把 pH 调整为 8.8;

[0020] 3. 加入 20 μ g/mL CEA 单克隆抗体 1,使其达到最小蛋白浓度,混匀,振荡 30min;

[0021] 4. 加入 20 μ L 的 10% BSA,混匀,振荡 30min;

[0022] 5. 12000rpm 离心 5min,轻轻吸除上清;

[0023] 6. 用 1mL wash buffer 溶液重悬浮松散的胶体金沉淀;

[0024] 7. 重复 5. 步操作;

[0025] 8. 重复 6. 步操作;

[0026] 9. 重复 5. 步操作;

[0027] 10. 用 fix buffer 配制在 540nm 处 OD(光密度)值为 0.5~1.0 的胶体金免疫复合物;

[0028] 11. 玻璃纤维素膜点样,形成胶金垫,真空冻干 3 小时。

[0029] 三、在硝酸纤维素膜上划线

- [0030] 1. T1 线用浓度为 0.2mg/mL 的 CEA 单克隆抗体 2 划线,用于检出 5ng/mL 的 CEA ;
- [0031] 2. T2 线用浓度为 0.1mg/mL 的 CEA 单克隆抗体 2 划线,用于检出 20ng/mL 的 CEA ;
- [0032] 3. C 线用 3.5mg/mL 羊抗鼠多克隆抗体划线 ;
- [0033] 4. 将硝酸纤维素膜置于 40℃烘箱干燥 3 天。
- [0034] 四、胶体金试纸条的组装
- [0035] 1. 将样品垫、胶金垫、NC 膜和吸收垫 4 部分按顺序组装 (见附图 1) ;
- [0036] 2. 将其组装好后用剪刀剪成 4mm/ 条后进行检测。
- [0037] 五、检测
- [0038] 试纸平放,将样品加到检测条的样本垫上,由于毛细效应,液体的层析方向向前,与固定在 T 线、C 线上的物质发生结合被截留而显色。5min 后,根据 T 线、C 线的显色情况判定阴阳性结果。C 线与靠近 C 线的检测带出现红色为样本中 CEA 水平大于 5ng/mL (见附图 2),C 线与两条检测带都出现红色为样本中 CEA 水平大于 20ng/mL (见附图 3),只有 C 线出现红色的为阴性 (见附图 4),T 线和 C 线均不显色则试纸条无效。
- [0039] 本发明检测对象单一且针对性强,准确率高。检测速度快,所需时间短,只需 5min,不需经培训的专业人员就可使用本发明方法来检测,满足医院、门诊等部门快速、准确地诊断消化系统肿瘤的要求,并且便于基层推广和运用。

附图说明

- [0040] 图 1 为本发明实施例试纸条的图示
- [0041] 图 2 为本发明实施例试纸条的阳性结果 (CEA 水平大于 5ng/mL)
- [0042] 图 3 为本发明实施例试纸条的阳性结果 (CEA 水平大于 20ng/mL)
- [0043] 图 4 为本发明实施例试纸条的阴性结果

具体实施方式

[0044] 下面结合附图对本发明的实施例作详细说明:本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0045] 下面实施例中,未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0046] 本实例先用 2% 的柠檬酸三钠溶液制备 20nm 的金水,并标记 CEA 单克隆抗体 1,按金标单克隆抗体、CEA 单克隆抗体 2、羊抗鼠多克隆抗体喷金标垫、检测线 (T 线)、质控线 (C 线),然后组装成试纸条,置 37℃烘箱烘干并裁成 4mm/ 条,室温干燥保存备用。

[0047] 实施例

[0048] 1. 准备 CEA 单克隆抗体 1 和 2。并清洗实验所需的玻璃器皿。

[0049] 2. 胶体金的制备

[0050] 先将 0.02% 氯金酸溶液溶液加热煮沸,迅速加入 2% 的柠檬酸三钠 2mL ;

[0051] 溶液颜色由浅蓝色变为深蓝,继续加热出现酒红色,继续煮沸 10min ;出现透明的酒红色,停止加热,继续搅拌至室温。这样就制备了 20nm 的胶体金溶液。然后用电镜镜检,确保制备的金颗粒尽量使其大小一致、均匀,颗粒直径在 20nm 左右,否则重新制作。

[0052] 3. 胶体金标记物的制备

[0053] 取两个 1.5mL 试管,分别加入 1mL 胶体金溶液;向其中加入适量硼砂缓冲液把 pH 调整为 8.8;加入 20 μ g/mL CEA 单克隆抗体 1,使其达到最小蛋白浓度,混匀,于振荡仪上快速振荡 30min;加入 20 μ L 的 10% BSA,混匀,振荡 30min;于离心机中 12000rpm,离心 5min,轻轻吸除上清;用 1mL wash buffer 溶液重悬浮松散的胶体金沉淀;于离心机中 12000rpm,离心 5min,轻轻吸除上清;用 1mL wash buffer 溶液重悬浮松散的胶体金沉淀;于离心机中 12000rpm,离心 5min,轻轻吸除上清;用 fix buffer 配制在 540nm 处 OD(光密度)值为 0.5 ~ 1.0 的胶体金免疫复合物;在玻璃纤维素膜上点样,形成胶金垫,真空冻干 3 小时。

[0054] 4. 胶体金试纸条的组装

[0055] 分别将 0.2mg/mL 和 0.1mg/mL 的 CEA 单克隆抗体 2 划在硝酸纤维素膜的检测线(T 线)上,将 3.5mg/mL 羊抗鼠多克隆抗体划在质控线(C 线)上。然后将硝酸纤维素膜置于烘箱中 40°C 干燥 3 天。然后将各个部分按附图 1 组装成试纸条。

[0056] 5. 胶体金试纸条的使用及结果判读

[0057] 检测前,先提取被检者的血清样本。

[0058] 然后把试纸条试纸平放,将样品加到检测条的样本垫上,由于毛细效应,液体的层析方向向前,与固定在 T 线、C 线上的物质发生结合被截留而显色。5min 后,根据 T 线、C 线的显色情况判定阴阳性结果。C 线与靠近 C 线的检测带出现红色为样本中 CEA 水平大于 5ng/mL(见附图 2),C 线与两条检测带都出现红色为样本中 CEA 水平大于 20ng/mL(见附图 3),只有 C 线出现红色的为阴性(见附图 4),T 线和 C 线均不显色则试纸条无效。

[0059] 实施例可直接检测样品中的 CEA,使用方法不需要专业培训,操作方便、快速,5min 即可获得结果,可达到快速、简便、及时地检测 CEA 的目的。

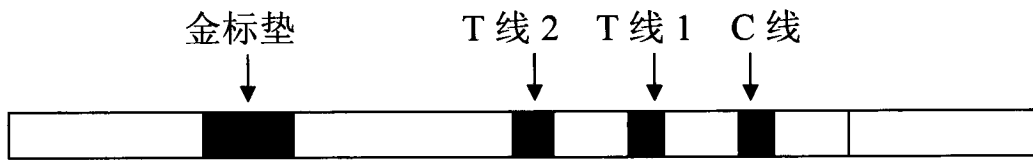


图1

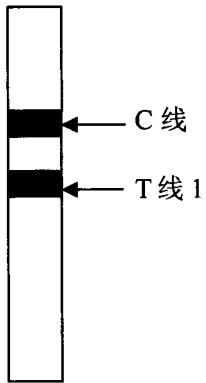


图2

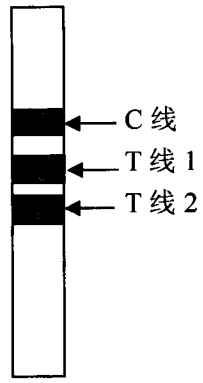


图3

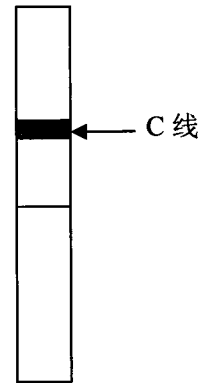


图4

专利名称(译)	用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法		
公开(公告)号	CN102221612A	公开(公告)日	2011-10-19
申请号	CN201110154443.2	申请日	2011-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	正元盛邦(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	正元盛邦(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	霍五奎 岳晓燕 马雪明 刘寅 王晶 罗云萍 张有青		
发明人	霍五奎 岳晓燕 马雪明 刘寅 王晶 罗云萍 张有青		
IPC分类号	G01N33/577 G01N21/78 G01N33/52 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种生物工程技术领域的检测方法，具体是一种用双指示线免疫层析半定量诊断癌胚抗原的方法。癌胚抗原是一个广谱性肿瘤标志物，它能向人们反映出多种肿瘤的存在，对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计，是一个较好的肿瘤标志物。临床上对CEA的检测常作为结肠癌、胃癌、直肠癌、食道癌等早期辅助诊断及癌症术后有无复发的检测指标。目前，临床上常用的CEA检测的方法为ELISA，CLIA等方法。上述方法费时、费力、不利于普及而且费用昂贵。免疫胶体金技术近年来发展迅速，得到了广泛应用，如传染病、早孕、癌症等的检测。本发明采用胶体金免疫层析法，建立快速检测CEA的方法，并且能够半定量检测5ng/mL~20ng/mL这一CEA灰区范围，测定CEA可以作为良性与恶性肿瘤的鉴别诊断依据。

