



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109270269 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201811031955.8

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2018.09.05

G01N 33/543(2006.01)

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心

G01N 33/533(2006.01)

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

G01N 33/531(2006.01)

申请人 河南省生物工程技术研究中心有限
公司

(72)发明人 王云龙 李果 李玉林 王继创
程蕾 王敏

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

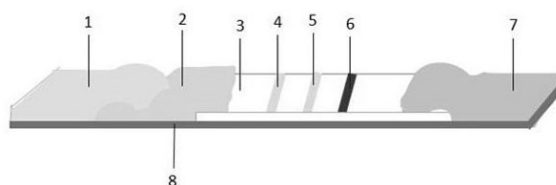
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫
层析检测卡、试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡、试剂盒,其中包括试纸条和卡壳,试纸条由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上;吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上;结合垫上喷涂羧基荧光微球标记的HE4单克隆抗体和CA153单克隆抗体,硝酸纤维素膜上包被HE4单克隆抗体、CA153单克隆抗体和羊抗鼠多克隆抗体,作为检测线T2、检测线T1和质控线C。本发明同时检测两种标志物,提高乳腺癌早期的检出诊断率,而且操作简单快速、检测成本低、对实验室实验设备及操作人员要求较低、缩短检测时间。



1. 一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡, 其特征在于, 包括试纸条和卡壳, 所述试纸条由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成, 所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上, 其中, 吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端, 并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区; 样品垫交叠压在结合垫上; 所述结合垫上喷涂羧基荧光微球标记的HE4单克隆抗体和CA153单克隆抗体, 所述检测区内的硝酸纤维素膜上包被固相的HE4单克隆抗体、CA153单克隆抗体和羊抗鼠多克隆抗体, 作为检测线T2、检测线T1和质控线C。

2. 根据权利要求1所述用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡, 其特征在于, 所述样品垫为用处理液浸泡处理后烘干的玻璃纤维棉。

3. 根据权利要求2所述用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡, 其特征在于, 所述处理液的组分包括质量浓度为0.1%T-20和0.1%BSA。

4. 根据权利要求1所述用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡, 其特征在于, 所述硝酸纤维素膜上抗体的包被量均为 $1.5 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{cm}$, 结合垫上羧基荧光微球标记的抗体的喷涂量均为 $1 \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

5. 制备权利要求1-4任意一项所述用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 制备羧基荧光微球标记的抗体

采用EDC法和Sulfo-NHS法, 分别将HE4单克隆抗体和CA153单克隆抗体与羧基荧光微球偶联, 然后依次均匀喷涂在结合垫上, 最后将结合垫置于 37°C 干燥箱, 干燥10-12h;

(2) 包被T线和C线

采用Gold Bio三维点膜喷金仪, 将HE4单克隆抗体、CA153单克隆抗体及羊抗鼠多克隆抗体依次包被在检测区内的硝酸纤维素膜上, 作为检测线T2、检测线T1和质控线C, 然后将上述硝酸纤维素膜置于 37°C 干燥箱, 干燥2h;

(3) 制备试纸条

将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上, 其中, 吸水垫和结合垫分别叠压在硝酸纤维素膜的两端, 并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区(结合垫和吸水垫均与硝酸纤维素膜重叠2mm); 样品垫交叠压在结合垫上(样品垫与结合垫重叠2mm), 组装后得到试纸大板, 切割成宽4mm, 制成试纸条;

(4) 制备检测卡

将步骤(3)所得试纸条装入卡壳内形成试纸卡, 其中, 上壳面上对应于硝酸纤维素膜的位置设有观察窗, 上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔, 加样孔位于样品垫中间。

6. 一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析试剂盒, 其特征在于, 包含权利要求5所得POCT荧光免疫层析检测卡、样品稀释液、SD卡、干燥剂。

7. 根据权利要求6所述用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析试剂盒, 其特征在于, 所述样品稀释液的制备方法为: 用0.02M PB溶液稀释NaCl、T-20、BSA使其单位体积终浓度分别为0.9%、0.1%、0.1%, 混匀, 得样品稀释液。

8. 根据权利要求6所述用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析试剂盒, 其特征在于, 所述SD卡上烧制了: 以HE4标准品溶液浓度为横坐标, 以T2线与C线的荧光强度的比值为纵坐标, 采用拟合法得到的标准曲线; 以CA153标准品溶液浓度为横坐标, 以T1线与C线的荧光

强度的比值为纵坐标,采用拟合法得到的标准曲线。

一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡、试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于POCT免疫层析检测技术领域,具体涉及一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡、试剂盒。

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,通常绝经期前后妇女的发病率较高,一般是在乳房腺上皮组织的发生恶性肿瘤。乳腺癌的病因尚未完全清楚,乳腺癌的早期发现、早期诊断,是提高疗效的关键。

[0003] 目前乳腺癌的常用检测方法:

1. 询问病史:多数病人表现为乳房内无痛性肿块,质地较硬,边界不清。

[0004] 2. 乳房临床检查:能了解一个肿块的大小、硬度、活动度和与周围组织的关系,良性肿块和癌肿是不同的。

[0005] 3. 影像学检查(包括:1)乳腺钼靶照相:各年龄组的敏感性不同,50岁以上妇女敏感性最高达94%,40—49岁为87%,30—39岁为77%。所以,50岁以下妇女配合乳腺B超扫描才能提高敏感性。40岁以上的妇女乳腺对射线不敏感,受到的放射损伤有限,且乳腺密度相对较低,乳腺X线片容易发现异常征象;2)乳腺彩超:超声检查有时会出现假阳性,在X线穿过被挤压的乳腺组织投影所得的图像上,正常乳腺组织互相重叠使得某些征象不易观察清楚,进而影响到最终诊断。对小于1厘米的肿块确诊困难;3)乳腺磁共振检查:缺乏设计良好的临床试验,术前进行乳腺磁共振检查的长期临床效果还不十分清楚,目前还没有确切数据支持乳腺磁共振检查能减少乳腺癌手术的数量或改变手术方式,其术后生存情况及肿瘤复发情况等也尚不清楚。)

[0006] 4. 病理学检查:

穿刺活检可以发现癌细胞,是临床诊断金标准,有一定的创伤。

[0007] 5. 乳管镜检查:

该方法确诊率高、痛苦小,但在检查前需检查乙型肝炎表面抗原,必要时还应检测艾滋病病毒,以防止交叉感染发生。

[0008] 6. 数字乳腺断层合成技术:

数字乳腺断层合成技术是一项基于平板探测器技术的高级应用,是在传统体层摄影原理的基础上结合数字影像处理技术开发的新型体层成像技术。可获得任意层面影像,可进一步处理显示三维信息,有更高的敏感度和特异度,可降低复检率,但DBT目前临床经验尚不足。

[0009] 医院中这些乳腺癌的检查方法大多需要昂贵的设备,并且无法迅速大量的对健康人群进行普筛,不利于早期发现和诊断乳腺肿瘤。因血清肿瘤标志物检测具有简便、快速等优点,普遍用于肿瘤的筛查、诊断、疗效评价及复发监测等方面。血清糖蛋白抗原CA153(Breast Cancer Antigen ,CA153)是位于肿瘤细胞表面的糖蛋白抗原,由124个氨基酸组

成,其NH₂-端包含有30个氨基酸的信号肽序列,蛋白分子量为11 kD,被糖基化修饰成一个约25KD的分泌性糖蛋白,是临床上用于乳腺癌检测的重要肿瘤标志物。

[0010] 2007年全国临床肿瘤学会将CA153推荐为乳腺癌预防、诊断及随访的一种重要肿瘤标志物,FDA也将CA153批准为乳腺癌的诊断指标之一。患者血清CA153水平的消长与乳腺癌病情变化相平行,是复发和转移的重要信号,当CA153 大于100U/ml 时,可认为有转移性病变。而且这种信号的发出要比临床症状的出现和用诸如B超、X线或CT等检出复发和转移的时间要早。

[0011] 临床上CA153检测方法主要为酶联免疫法和化学发光法。酶联免疫法,检测时间较长,需要专业人员在实验室操作;化学发光法所需专业仪器昂贵,不利于在基层和社区医院广泛推广使用。而且CA153对乳腺癌患者的检出率是67.5%。其特异性及敏感性均不甚理想,不适合用于早期筛查。

[0012] 人附睾蛋白4 (human epididymis protein 4 , HE4)是WFDC2 (WAP four-disulfide core domain protein 2)基因编码的产物,WFDC2基因位于染色体20q ,由5个外显子和4个内含子组成,基因全长约12Kb,是一种富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白,HE4是新发现的肿瘤标志物,主要在附睾和女性生殖道包括卵巢、输卵管、子宫内膜和宫颈中呈高表达,因其分子量小,乳腺癌又易引起激素分泌失调,因此HE4很容易分泌到血中,引起HE4水平的升高。HE4蛋白在体内的量值对妇科恶性肿瘤有较高的诊断价值。研究表明,在乳腺癌细胞及乳腺癌组织细胞浆中HE4均有高表达,同时其与乳腺癌的淋巴结转移密切相关。周岩的研究结果显示HE4在正常细胞中低表达,在乳腺癌细胞系中呈高表达。

[0013] 申请号为201310375818.7的中国专利“基于上转换发光的妇科肿瘤标志物CA125、CA153、SCCA、HE4芯片检测系统及试剂”中提到利用上转换发光颗粒UCP联合检测4种妇科肿瘤标志物,该方法虽然测量便捷、操作简单,但检测的肿瘤标记物多,导致检测结果导向不明确,涉及的疾病范围较广,没有针对性,检测后仍然需进一步深入检查才能确定。另外,肿瘤标记物多,增加了成本,不利于产品在基层医院或社区医院的推广应用。

发明内容

[0014] 本发明的目的在于克服上述问题,提供一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡、试剂盒,能够同时快速联合检测HE4和CA153,简化检测过程,提高乳腺癌的检出率。本发明乳腺癌两项联检的普筛试剂盒可以同时检测乳腺癌的两个标志物进行测试,使乳腺癌的早期诊断率高达92.5%,更好地指示乳腺癌的发生,具有快速、高效、灵敏、准确、经济的优势。

[0015] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案具体如下:

一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析检测卡,包括试纸条和卡壳,所述试纸条由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上;所述结合垫上喷涂羧基荧光微球标记的HE4单克隆抗体和CA153单克隆抗体,所述检测区内的硝酸纤维素膜上包被固相的HE4单克隆抗体、CA153单克隆抗体和羊抗鼠多克隆抗体,作为检测线T₂、检测线T₁和质控线C。

[0016] 优选的,所述样品垫为用处理液浸泡处理后烘干的玻璃纤维棉。

[0017] 优选的,所述处理液的组分包括质量浓度为0.1%T-20和0.1%BSA。

[0018] 优选的,所述硝酸纤维素膜上抗体的包被量均为1.5~2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}$,结合垫上羧基荧光微球标记的抗体的喷涂量均为1~1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

所述POCT荧光免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

(1) 制备羧基荧光微球标记的抗体

采用EDC法和Sulfo-NHS法,分别将HE4单克隆抗体和CA153单克隆抗体与羧基荧光微球偶联,然后混匀均匀喷涂在结合垫上,最后将结合垫置于37℃干燥箱,干燥10-12h;

(2) 包被T线和C线

采用Gold Bio三维点膜喷金仪,将HE4单克隆抗体、CA153单克隆抗体及羊抗鼠多克隆抗体依次包被在检测区内的硝酸纤维素膜上,作为检测线T2、检测线T1和质控线C,然后将上述硝酸纤维素膜置于37℃干燥箱,干燥2h;

(3) 制备试纸条

将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区(结合垫和吸水垫均与硝酸纤维素膜重叠2mm);样品垫交叠压在结合垫上(样品垫与结合垫重叠2mm),组装后得到试纸大板,切割成宽4mm,制成试纸条;

(4) 制备检测卡

将步骤(3)所得试纸条装入卡壳内形成试纸卡,其中,上壳面上对应于硝酸纤维素膜的位置设有观察窗,上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔,加样孔位于样品垫中间。

[0019] 本发明还提供了一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析试剂盒,包含上述所得POCT荧光免疫层析检测卡、样品稀释液、SD卡、干燥剂。

[0020] 优选的,所述样品稀释液的制备方法为:用0.02M PB溶液稀释NaCl、T-20、BSA使其单位体积终浓度分别为0.9%、0.1%、0.1%,混匀,得样品稀释液。

[0021] 优选的,所述SD卡上烧制了:以HE4标准品溶液浓度为横坐标,以T2线与C线的荧光强度的比值为纵坐标,采用拟合法得到标准曲线(图4);以CA153标准品溶液浓度为横坐标,以T1线与C线的荧光强度的比值为纵坐标,采用拟合法得到标准曲线(图3)。

[0022] 本发明的有益效果是:

1. 诊断率高,本发明在常规荧光免疫层析单检试纸条的基础上增加了一条检测线,一次点样即可同时完成2种标志物的检测,弥补CA153的敏感度,提高乳腺癌早期的检出诊断率。

[0023] 2. 检测时间短,与其他检测方法相比,该方法操作简单快速,检测成本低,对实验室实验设备及操作人员要求较低,大大缩短检测时间,而且需要检测多个血清样本时,只需将待测样品直接点入加样孔计时15min即可用荧光判读仪进行定量结果读数判定。

[0024] 3. 本发明的POCT荧光免疫层析试剂盒可用于乳腺癌普筛查和预后诊断,直接明确定量检测者 CA153和HE4蛋白浓度,而且与乳腺癌普筛查和预后诊断,结合起来,市场定位于乳腺癌普筛查和预后诊断的空白市场。

附图说明

[0025] 图1为本发明试纸条的结构示意图；

其中,1-样品垫;2-结合垫;3-硝酸纤维素膜;4-检测线T1;5-检测线T2;6-质控线C;7-吸水垫;8-底板。

[0026] 图2为本发明检测卡的示意图；

图3为以CA153校准品溶液浓度为横坐标,T1线和C线的荧光强度比值为纵坐标,采用拟合法得到的标准曲线；

图4为以HE4校准品溶液浓度为横坐标,T2线和C线的荧光强度比值为纵坐标,采用拟合法得到的标准曲线。

具体实施方式

[0027] 下面通过具体实施例对本发明作进一步说明。

[0028] 实施例1 荧光免疫层析多联检测卡的制备

(1) 制备羧基荧光微球标记的抗体

每管分别取荧光微球20 μ L,用硼酸盐缓冲液活化后,离心15min,弃上清,加入硼酸盐缓冲液使荧光微球悬浮;每管分别加入HE4标记的单克隆抗体和CA153标记的单克隆抗体,混匀,振荡2h,离心,弃上清,用复溶液(复溶液的组分包括质量浓度为0.1%T-20、1%BSA、3%海藻糖和0.5%PVP)复溶;加入终浓度0.1%BSA进行封闭,振荡0.5h,制成相应的羧基荧光微球标记的抗体的浓缩液,将上述两种浓缩液都稀释到250倍,混匀,以1~1.5 μ g/cm²的量依次喷涂在结合垫上,然后将结合垫置于37℃干燥箱,干燥10-12h;

(2) 包被T线和C线

用 PBS将HE4包被单克隆抗体、CA153包被单克隆抗体、羊抗鼠包被多克隆抗体分别稀释到所需包被抗体浓度(2.0mg/ml),采用Gold Bio三维点膜喷金仪,将HE4包被单克隆抗体、CA153包被单克隆抗体及羊抗鼠包被多克隆抗体以1.5~2.0 μ g/cm依次包被在检测区内的硝酸纤维素膜上,作为检测线T2、检测线T1和质控线C,然后将上述硝酸纤维素膜置于37℃干燥箱,干燥2h;

(3) 制备试纸条

将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区(结合垫和吸水垫均与硝酸纤维素膜重叠2mm);样品垫交叠压在结合垫上(样品垫与结合垫重叠2mm),组装后得到试纸大板,切割成宽4mm,制成试纸条,所述样品垫为用处理液(处理液的组分包括质量浓度为0.1%T-20和0.1%BSA)浸泡处理后烘干的玻璃纤维棉;

(4) 制备检测卡

将步骤(3)所得试纸条装入卡壳内形成试纸卡,加干燥剂,于2-8℃密封保存,其中,上壳面上对应于硝酸纤维素膜的位置设有观察窗,上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔,加样孔位于样品垫中间。

[0029] 实施例2 SD卡的烧制

1. 标准曲线绘制:

首先用HE4、CA153标准品配制一系列线性浓度的标准品溶液,使用实施例1所得检测卡

进行检测,采用自动监测仪读取荧光强度,结果如表1-2所示:

表1 CA153浓度及对应的荧光强度值

CA153浓度(U/mL)	0	15	30	60	100	150	200	250	300
T1线荧光强度	119	1965	3323	5031	6838	7978	8810	8914	9100
C线荧光强度	6087	4847	4773	4154	2662	2105	1874	1367	925

表2 HE4浓度及对应的荧光强度值

HE4浓度(pmol/L)	0	3.9	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000	1500
T2线荧光强度	630	1410	3282	4255	6008	8263	9045	11411	15163	13284
C线荧光强度	5527	5743	5190	4114	3072	2170	1481	1009	859	510

分别以相应的标准品溶液浓度作为横坐标,以T1线或T2线与C线的荧光强度的比值作为纵坐标,采用最小二乘拟合法得到标准曲线,分别如图3、4所示,输入检测设备,烧制到SD卡上。

[0030] 实施例3 荧光免疫层析多联检测试剂盒

本发明还提供了一种用于早期乳腺癌多联检测的荧光免疫层析试剂盒,包含样品稀释液、干燥剂、实施例1所得POCT荧光免疫层析检测卡、实施例2所得SD卡,其中,所述样品稀释液的制备方法为:用0.02M PB溶液稀释NaCl、T-20、BSA使其单位体积终浓度分别为0.9%、0.1%、0.1%,混匀,得样品稀释液。

[0031] 实施例4 样本检测

(1) 样本处理:取静脉血3-4mL,标识,离心得到血清,作为检测人的血清样本,若样本不能及时检测或需保留以复查时,一般应存放于4~6℃冰箱;

(2) 稀释样本:用移液器吸取50μL血清或血浆样本至450μL样品稀释液中,震荡3min充分混匀,恢复至室温(温度建议20~25℃为宜)并编号;

(3) 检测卡的准备:取出实施例3所得试剂盒中的检测卡,室温放置15min恢复温度;

(4) 检测:吸取步骤(2)所得稀释样本75μL垂直滴加在步骤(3)所得检测卡的加样孔处,置于已插入SD卡的荧光检测仪孵育仓,15min后,仪器自动检测并读取C线、T1线与T2线、的荧光强度;

(5) 计算:根据实际测得的T1/C值与CA153标准曲线,得到CA153浓度,再通过T2/C值与HE4标准曲线得到HE4蛋白的实际浓度。

[0032] 采用经临床病理确诊的乳腺癌样本50份及健康样本35份,对本发明所得的联合检测HE4和CA153荧光免疫层析试剂盒的检测结果进行验证,结果显示,本发明的联合检测HE4和CA153荧光免疫层析定量试剂盒检测乳腺癌的敏感性为73%,特异性达到92%。

[0033] 需要说明的是在其他实施例中样品垫处理液的组分还可以是质量浓度为0.1%T-20、0.1%BSA和0.5%蔗糖。

[0034] 以上仅描述了本发明的较佳实施方式,但本发明并不限于上述实施例。本领域技术人员可以理解的是,能够实现本发明技术效果的任何相同或相似手段,均应落入本发明的保护范围内。

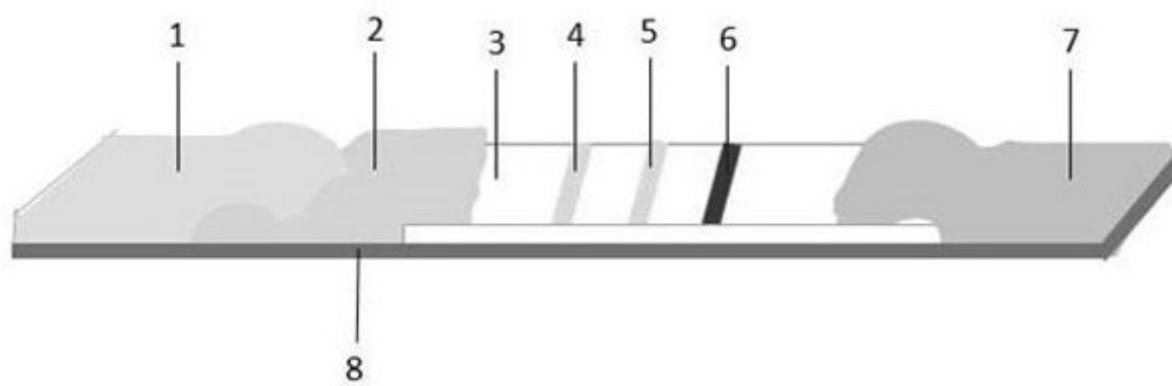


图1

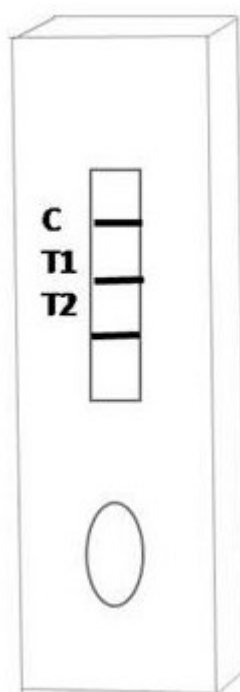


图2

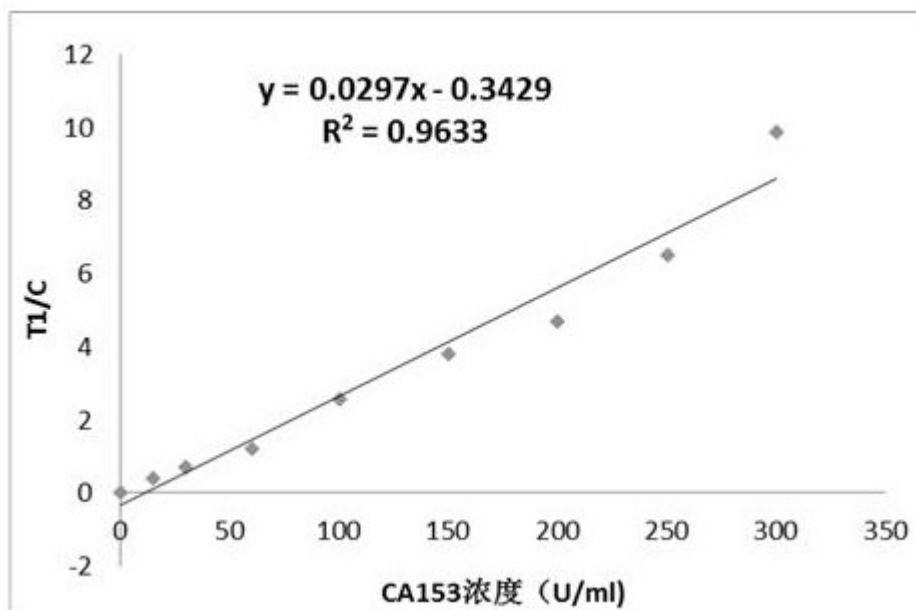


图3

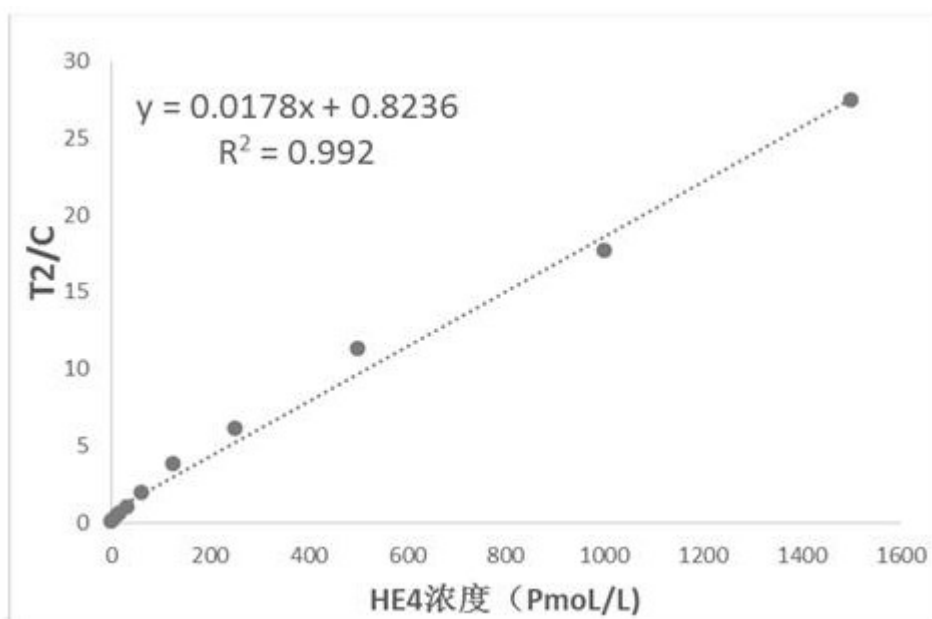


图4

A diagram of a simple machine, possibly a screwdriver or a similar tool, with numbered parts. The parts are labeled as follows:

- 1: The handle of the machine.
- 2: The shaft or rod of the machine.
- 3: The tip or point of the machine.
- 4: The base or support of the machine.
- 5: The main body or frame of the machine.
- 6: The top or head of the machine.
- 7: The side or wing of the machine.
- 8: The bottom or base of the machine.