



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 201796036 U

(45) 授权公告日 2011.04.13

(21) 申请号 201020290677.0

(22) 申请日 2010.08.13

(73) 专利权人 中南大学

地址 410083 湖南省长沙市岳麓区麓山南路
932 号

(72) 发明人 陈真诚 方成 朱健铭

(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
43114

代理人 颜勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

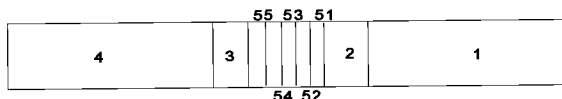
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 实用新型名称

一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测测试纸条

(57) 摘要

本实用新型公开了一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测测试纸条。包括样品垫、金标抗体结合物膜、硝酸纤维膜、吸水垫、反应支持物。所述的硝酸纤维膜以靠近样品垫一端为起始端，靠近吸水垫一端为末端，依次包被 5 条抗体条带，分别为包被鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 的 T₁、T₂、T₃、T₄ 检测条带和包被羊抗鼠 IgG 的 C 质控条带，金标抗体结合物膜为喷涂有胶体金标记的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 的膜。本实用新型实现了肿瘤标志物的快速、准确的定量检测，从而满足了应对癌症普查筛选和家庭癌症预后监测等快速检测的需要。



1. 一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测试纸条，包括样品垫、金标抗体结合物膜、硝酸纤维膜、吸水垫、反应支持物，反应支持物位于底层，硝酸纤维膜位于反应支持物上的中部，金标抗体结合物膜位于硝酸纤维膜上部的一侧并与之部分重叠；吸水垫位于硝酸纤维膜上相对于金标抗体结合物膜而言的另一侧并与硝酸纤维膜部分重叠；样品垫位于硝酸纤维膜上与吸水垫相反的一侧并与金标抗体结合物膜部分重叠；其特征在于，所述的硝酸纤维膜以靠近样品垫一端为起始端，靠近吸水垫一端为末端，依次包被 5 条抗体条带，分别为包被鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 的 T₁、T₂、T₃、T₄ 检测条带和包被羊抗鼠 IgG 单克隆抗体的 C 质控条带，金标抗体结合物膜为喷涂有胶体金标记的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 的膜。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条，其特征在于，所述的每条抗体条带之间有 3mm 的平行间隔，所述的硝酸纤维膜的宽度为 0.3cm。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试纸条，其特征在于，所述的样品垫选自聚脂膜或玻璃纤维；所述的金标抗体结合物膜选自聚脂膜或玻璃纤维或滤纸纤维；吸水垫选用滤纸；反应支持物选用 PVC 板。

一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测试纸条

技术领域

[0001] 本实用新型属于生物检测领域，具体涉及用于肿瘤检测的胶体金免疫层析定量检测试纸条。

背景技术

[0002] 肿瘤标志物 (tumor marker, TM) 是指在肿瘤的发生和增殖过程中，由肿瘤细胞本身所产生的或者是由机体对肿瘤细胞反应而产生的，反映肿瘤存在和生长的一类物质，包括蛋白质、激素、酶 (同工酶) 及癌基因产物等。这些物质有的不存在于正常人体内只见于胚胎中，有的在肿瘤病人体内含量超过正常人体内含量。肿瘤标志物在肿瘤普查、诊断、判断预后和转归、评价治疗疗效和高危人群随访观察等方面都具有较大的实用价值。通过测定其存在或含量可辅助诊断肿瘤、分析病程、指导治疗、监测复发或转移、判断预后。目前临床上检测的肿瘤标志物绝大多数不仅存在于恶性肿瘤中，也存在于良性肿瘤、胚胎组织、甚至正常组织中。因此，肿瘤标志物动态检查和多项联合检查更有价值，所以需要一种快捷易行的肿瘤标志物定量检测手段。

[0003] 临床上肿瘤标志物的检测一般采用酶联免疫吸附法分析 (ELISA)，由于 ELISA 需要多次孵育，检测时间较长，不适宜快速检测。胶体金免疫层析技术具有简单、快速、灵敏、可现场操作等优点，已被广泛应用于鼠疫、禽流感、嗜肺军团等的检测，国内尚无成功研制出肿瘤标志物定量检测试纸条的报道。本实用新型利用双抗体夹心法，发明了肿瘤标志物的快速定量检测试纸条，从而满足了应对癌症普查筛选和家庭癌症预后监测等快速检测的需要。

实用新型内容

[0004] 本实用新型的目的是提供一种快速、准确的检测肿瘤标志物的胶体金免疫层析定量检测试纸条。

[0005] 本实用新型的一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测试纸条，包括样品垫、金标抗体结合物膜、硝酸纤维膜、吸水垫、反应支持物，反应支持物位于底层，硝酸纤维膜位于反应支持物上的中部，金标抗体结合物膜位于硝酸纤维膜上部的一侧并与之部分重叠；吸水垫位于硝酸纤维膜上相对于金标抗体结合物膜而言的另一侧并与硝酸纤维膜部分重叠；样品垫位于硝酸纤维膜上与吸水垫相反的一侧并与金标抗体结合物膜部分重叠；所述的硝酸纤维膜以靠近样品垫一端为起始端，靠近吸水垫一端为末端，依次包被 5 条抗体条带，分别为包被鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 的 T₁、T₂、T₃、T₄ 检测条带和包被羊抗鼠 IgG 单克隆抗体的 C 质控条带，金标抗体结合物膜为喷涂有胶体金标记的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 的膜。

[0006] 所述的每条抗体条带上鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 的包被量为 0.3-1.5ug，羊抗鼠 IgG 纯化抗体的包被量为 0.15-0.75ug。

[0007] 所述的每条抗体条带之间有 3mm 的平行间隔，所述的硝酸纤维膜的宽度为

0.3cm。

[0008] 每 8-15 μ g 鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 采用 1ml OD_{520nm} 值为 1.5 ~ 2.0 的胶体金溶液标记，胶体金颗粒直径为 40nm。

[0009] 所述的金标抗体结合物膜上胶体金标记的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 的用量为 5-10 μ l。

[0010] 所述的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 包括游离态前列腺特异抗原 fPSA、复合态前列腺特异抗原 cPSA、前列腺酸性磷酸酶 PAP、核基质蛋白 22NMP-22、膀胱癌抗原 UBC 或膀胱肿瘤抗原 BTA 的单克隆抗体；所述的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 包括与鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 所述的各种抗体表位不同的单克隆抗体中的一种。

[0011] 所述的样品垫选自聚脂膜或玻璃纤维；所述的金标抗体结合物膜选自聚脂膜或玻璃纤维或滤纸纤维；吸水垫选用滤纸；反应支持物选用 PVC 板。

[0012] 利用本实用新型的前列腺癌和膀胱癌检测试纸，利用目视或配备手持式金标试纸分析仪，可实现多种肿瘤标志物的定量检测。检测操作十分简便，普通人也可以熟练操作。同时其检测灵敏度高，特异性好，检测周期短，适合基层医疗单位，家庭用户使用。可用于前列腺癌和膀胱癌的筛查和监测。

附图说明

[0013] 图 1 为肿瘤标志物定量检测试纸平面结构区域图；

[0014] 图 2 为肿瘤标志物定量检测试纸纵切面结构图；

[0015] 其中：1- 样品垫，2- 金标抗体结合物膜，3- 硝酸纤维素膜，4- 吸水垫，51-T₁ 检测条带，52-T₂ 检测条带，53-T₃ 检测条带，54-T₄ 检测条带，55-C 质控条带，6- 下聚酯膜，7- 上聚酯膜，8-max 线，9- 色皮，10- 反应支持物；

[0016] 图 3 为本实用新型试纸条检测显色示意图。

具体实施方式

[0017] 下面结合具体实施方式进一步阐述本实用新型，而不会限制本实用新型。

[0018] 本实用新型的肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测试纸条，包括样品垫 1、金标抗体结合物膜 2、硝酸纤维膜 3、吸水垫 4、反应支持物 10。反应支持物 10 位于底层，硝酸纤维膜 3 位于反应支持物 10 上的中部，金标抗体结合物膜 2 位于硝酸纤维膜 3 上部的一侧并与之部分重叠；吸水垫 4 位于硝酸纤维膜 3 上相对于金标抗体结合物膜 2 而言的另一侧并与硝酸纤维膜 3 部分重叠；样品垫 1 位于硝酸纤维膜 3 上与吸水垫 4 相反的一侧并与金标抗体结合物膜 2 部分重叠。所述的硝酸纤维膜 3 以靠近样品垫 1 一端为起始端，靠近吸水垫 4 一端为末端，依次包被 5 条抗体条带，分别为包被鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 I 的 T₁、T₂、T₃、T₄ 检测条带和包被羊抗鼠 IgG 的 C 质控条带，金标抗体结合物膜 2 为喷涂有胶体金标记的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体 II 的膜。

[0019] 实施例 1

[0020] 本实用新型的试纸条的制备方法包括以下步骤：

[0021] 1、抗体制备

[0022] 选用商品化的配对好的鼠抗人游离态前列腺特异抗原 (fPSA) 单克隆抗体 I 和

II(产品型号:A8014-1, A8014-2 北京博迈世纪生物技术有限公司),对 20mM, pH7.4 的 PBS 4℃透析过夜备用。

[0023] 2、硝酸纤维膜的包被

[0024] 包被缓冲液的配制:0.02M pH 7.4 的磷酸缓冲液(PBS)为包被缓冲液,0.22um 微孔滤膜过滤除菌后置 4℃保存备用,有效期两周。

[0025] 封闭液的配制:含 0.5% BSA 的 0.02M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS),0.22um 微孔滤膜过滤除菌后置 4℃保存备用,有效期一周。

[0026] 用包被缓冲液将鼠抗人游离态前列腺特异抗原单克隆抗体 I 稀释为 1mg/ml,羊抗鼠 IgG 单克隆抗体稀释为 1mg/ml,使用定量喷膜装置 BioDot 以 1ul/cm 的量将二者以 3mm 的间隔均匀喷印于 2.5cm 宽度硝酸纤维素膜上。室温晾干 30 分钟后,于封闭液中浸泡 30 分钟后,于 37℃烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用。

[0027] 3、胶体金标记鼠抗游离态前列腺特异抗原单克隆抗体 II 的制备

[0028] 分别取直径为 40nm 的胶体金 20ml 及鼠抗人游离态前列腺特异抗原单克隆抗体 II 200ug,在 pH9.0 的条件下通过磁力搅拌振荡使其结合,加牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂,且使得 BSA 最终浓度为 1%,采用高速离心法(10000r/min, 30min, 4℃)除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物,在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-抗体复合物。

[0029] 4、金标抗体结合物膜制备

[0030] 用 20ml 0.2% 聚乙二醇缓冲液洗涤胶体金-抗体复合物,离心除去上清液,得到深红色沉淀,纯化后的沉淀用 2ml 浓度为 20mmol/L, PH 8 的硼酸缓冲液溶解,用 BioDot 喷膜仪以 0.1ml/cm 的量均匀喷涂于 0.8cm 宽度玻璃纤维膜上,37℃真空干燥 3 小时,即得到金标抗体结合物膜。

[0031] 5、样品垫的处理

[0032] 将 2.5cm 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 37℃烘干 3 小时。样品垫处理液是含有 1% Casein 和 1.0% 的 PVA 以及 0.2% Tween-20 的 0.02M, pH7.4 的 PBS 溶液。

[0033] 6、试纸条的组装及切割

[0034] 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。试纸条的组装:使用 BioDot LMS000 型组装仪按照图 2 要求将 2.5cm 宽的包被鼠抗人游离态前列腺特异抗原单克隆抗体 I 和羊抗鼠 IgG 单克隆抗体的硝酸纤维膜,2.5cm 宽的吸水垫,0.8cm 宽的金标抗体结合物膜,2.5cm 宽的样品垫组装于 8cm 宽度透明塑料底板上,覆盖上 max 线和色皮,组装成试纸条。使用 BioDot CM4000 型切条机将组装好的试纸板切成 0.3cm 宽的成品试纸条。下聚酯膜 6,上聚酯膜 7 能将金标抗体结合物膜与反应支持物和 max 线 8 隔离开,防止金标抗体结合物膜直接与反应支持物和 max 线 8 上的不干胶接触,从而避免金标抗体结合物释放不完全。max 线 8 能指示测试试纸可插入样品的深度,并且增强金标抗体结合物膜与硝酸纤维素膜的结合紧密性。色皮 9 能指示试纸的手持端,并且增强吸水垫与硝酸纤维素膜的结合紧密性。

[0035] 用上述 1-6 步骤的方法同样制备出了复合态前列腺特异抗原(cPSA),前列腺酸性磷酸酶(PAP),核基质蛋白-22(NMP-22),膀胱癌抗原(UBC),膀胱肿瘤抗原 BTA 等

肿瘤标志物的胶体金免疫层析快速定量检测试纸。以上所需抗体均来源于北京博迈世纪生物技术有限公司。

[0036] 实施例 2

[0037] 本实用新型的肿瘤标志物快速定量检测试纸的使用方法：

[0038] 将待测标本与样品稀释液混匀，再将试纸插入样品混合液中，样品中的液体依靠虹吸作用上行，10-15 分钟判读结果。可依据以下两种方法进行肿瘤标志物的定量：

[0039] 1、直观检测：计数显色 T 线的条数和观察颜色深浅，比对标准液显色情况表，从表中读取游离态前列腺特异抗原浓度。

[0040] 按确定的最佳条件制备游离态前列腺特异抗原胶体金免疫层析试纸条，检测不同浓度的游离态前列腺特异抗原。将游离态前列腺特异抗原用样品处理液配制成 1ng/ml、3ng/ml、5ng/ml、7ng/ml。三次重复测定，如图 3, 4 所示，< 1ng/ml 时无检测线显色，1ng/ml 时只一条检测线显色、3ng/ml 时有两条检测线显色；5ng/ml 时有三条检测线显色、7ng/ml 时有四条检测线显色性反应；即肉眼可观察到的最低浓度 < 1ng/ml；C 线不显色说明试纸已失效。

[0041] 2、定量检测：

[0042] 将空白样品用试纸检测 20 次，然后用金标试纸分析仪扫描读取信号 T/C 比值。20 个样品 T/C 比值的平均值 (AVERAGE) 与 3 倍标准差 (STDEVA) 之和为 CUT-OFF 值。将显色后的金标条放入金标试纸分析仪扫描，读取各条测试线的信号 T/C 比值，可得到游离态前列腺特异抗原浓度。

[0043] 实施例 3

[0044] 稳定性试验将新制备的胶体金免疫层析试纸条于 37℃ 存放 8 天，分别用 1ng/ml、3ng/ml、5ng/ml、7ng/ml 肿瘤标志物游离态前列腺特异抗原进行检测，结果显示和新制备的检测试纸条相比，灵敏度没有明显下降，且特异性良好。

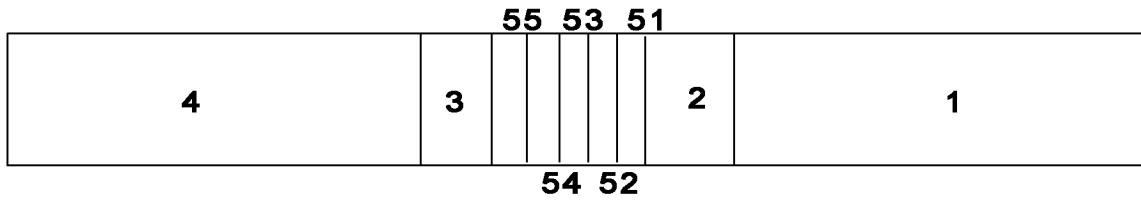


图 1

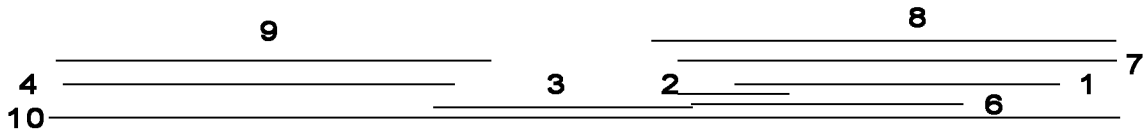


图 2

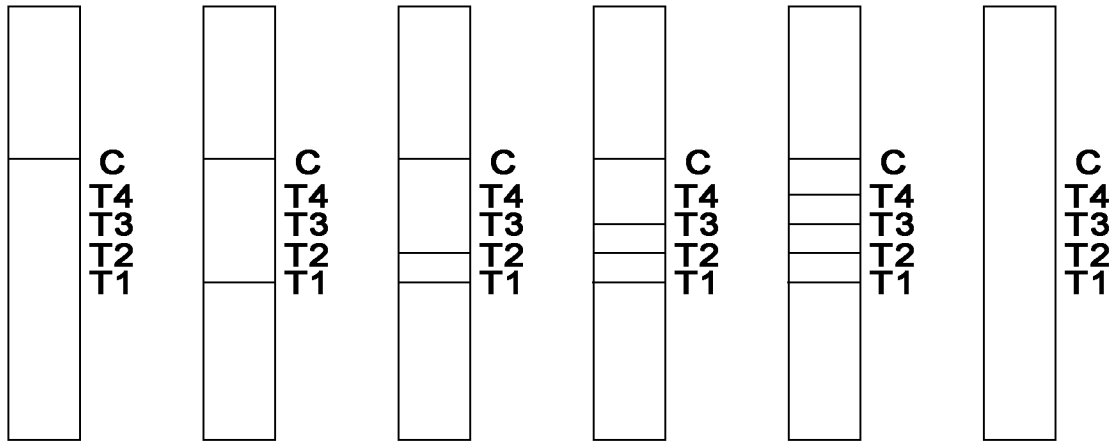


图 3

专利名称(译)	一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测试纸条		
公开(公告)号	CN201796036U	公开(公告)日	2011-04-13
申请号	CN201020290677.0	申请日	2010-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	中南大学		
申请(专利权)人(译)	中南大学		
当前申请(专利权)人(译)	中南大学		
[标]发明人	陈真诚 方成 朱健铭		
发明人	陈真诚 方成 朱健铭		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	颜勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种肿瘤标志物胶体金免疫层析定量检测试纸条。包括样品垫、金标抗体结合物膜、硝酸纤维膜、吸水垫、反应支持物。所述的硝酸纤维膜以靠近样品垫一端为起始端，靠近吸水垫一端为末端，依次包被5条抗体条带，分别为包被鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体I的T1、T2、T3、T4检测条带和包被羊抗鼠IgG的C质控条带，金标抗体结合物膜为喷涂有胶体金标记的鼠抗人肿瘤标志物单克隆抗体II的膜。本实用新型实现了肿瘤标志物的快速、准确的定量检测，从而满足了应对癌症普查筛选和家庭癌症预后监测等快速检测的需要。

