



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109444406 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811329449.7

(22)申请日 2018.11.09

(71)申请人 深圳市众循精准医学研究院
地址 518000 广东省深圳市罗湖区友谊路
47号罗湖区人民医院医技楼5楼

(72)发明人 吴松 雷崎方 孙越 赵琳琳

(74)专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理
有限公司 44217

代理人 吴静 高占元

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

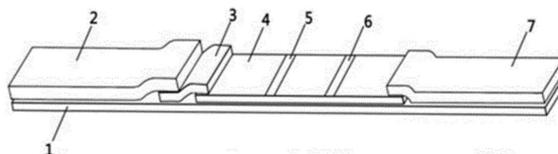
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法 and 检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法,该试纸条包括样本垫,喷涂有处理液;结合垫,喷涂有近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体;硝酸纤维素膜,设置有由抗cyfra21-1的第二抗体形成的检测带和由羊抗鼠多克隆抗体形成的质控带;以及吸水垫。本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法是针对尿液中cyfra21-1进行定量检测,灵敏度高,特异性高,可用于膀胱癌的早期检测和复发监测,直接将尿液滴至试纸条上便可以快速检测,而且该试纸条制备过程简单,可批量化生产,成本低,试纸检测手段快速,省时省力,适合临床广泛应用。



1. 一种定量检测标志物cyfra21-1的试纸条,其特征在于,包括:
样本垫,喷涂有处理液;
结合垫,喷涂有近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体;
硝酸纤维素膜,设置有由抗cyfra21-1的第二抗体形成的检测带和由羊抗鼠多克隆抗体形成的质控带;

以及吸水垫。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体通过如下方法标记:

S1、初洗:吸取近红外荧光纳米微球450-550 μ L,加初洗液并超声混匀,离心后吸弃上清,沉淀物用初洗液重悬并超声混匀,离心后吸弃上清,重复洗至少一次,最后一次洗涤后用初洗液重悬并超声混匀,确保近红外荧光纳米微呈单分散态;

S2、活化:加入现配的20mg/ml EDC 80-120 μ L、20mg/mL NHS 250-350 μ L超声混匀,从加入EDC和NHS开始计时活化至少15min,在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C条件下离心,吸弃上清,用偶联液重悬;

S3、偶联:在偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心后弃上清,超声混匀,离心后弃上清,重复洗至少一次;加入偶联液重悬,加入第一抗体,第一抗体加入的量是30 μ g第一抗体/100 μ l微球,超声混匀,并利用摇床振荡,期间每隔20min-40min超声一次;

S4、封闭:偶联完成后加入2-5 μ L的乙醇胺,再加封闭液重悬,利用摇床振荡,封闭完成后,在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C条件下离心,去掉上清;

S5、终洗:用终洗液重悬,超声混匀,在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C条件下离心,吸弃上清,重复洗至少一次;沉淀溶于400-600 μ L终洗液中。

3. 根据权利要求2所述的试纸条,其特征在于,

步骤S1具体包括:吸取荧光微球500 μ L,加1mL的初洗液并超声充分混匀,高速离心,吸弃上清,沉淀物用1mL的初洗液重悬并超声充分混匀2min,高速离心,吸弃上清,重复洗至少一次,最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并超声充分混匀,确保微球呈单分散态;

步骤S2具体包括:加入现配的20mg/ml EDC 100 μ L、20mg/mL NHS300 μ L超声混匀,从加入EDC和NHS开始计时活化15min,在4 $^{\circ}$ C条件下高速离心,吸弃上清,用1mL偶联液重悬;

步骤S3具体包括:在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,高速离心,弃上清,超声混匀,高速离心,弃上清,重复洗至少一次;加入1000 μ L偶联液重悬,加入150 μ g第一抗体超声混匀,摇床振荡3h,期间每30min超声2min;

步骤S4具体包括:偶联完成后加入3 μ L乙醇胺原液,再加800 μ L封闭液重悬,摇床振荡2.5h,封闭完成后,在4 $^{\circ}$ C条件下,高速离心,去掉上清;

步骤S5具体包括:用1mL终洗液重悬,超声混匀,在4 $^{\circ}$ C条件下高速离心,吸弃上清,重复洗至少一次;沉淀溶于500 μ L终洗液中。

4. 根据权利要求2或3所述的试纸条,其特征在于,

样本垫上喷涂的处理液是由Tris、BSA、吐温-20配制的,且Tris的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.5g/100mL;

在步骤S1中,所述初洗液是由MES配制的pH6.0的缓冲液,且MES的浓度为0.1mol/L;

在步骤S2和S3中,所述偶联液是由硼酸和四硼酸钠配制的pH6.5的缓冲液,且硼酸的浓度为0.2mol/L,四硼酸钠的浓度为0.01mol/L;

在步骤S4中,所述封闭液是由PBS、BSA、吐温-20配制的pH7.2的缓冲液,且PBS的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.4g/100mL;

在步骤S5中,所述终洗液是由PBS、BSA、吐温-20配制的pH7.2的缓冲液,且PBS的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.4g/100mL。

5. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述近红外荧光纳米微球是钨螯合物PS-COOH微球,近红外荧光纳米微球的平均粒径分布为0.18-0.22 μ m;所述样本垫和所述结合垫分别是玻璃纤维素膜;所述吸水垫是吸水纸或吸水布。

6. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫通过粘性底板固定,所述样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫粘结在所述粘性底板上。

7. 一种权利要求1-6任一项权利要求所述的试纸条的制备方法,其特征在于,包括:

A、近红外荧光纳米微球标记抗cyfra21-1的第一抗体;

B、在结合垫上喷涂近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体,烘干备用;

C、在样品垫上喷涂处理液,烘干备用;

D、选取硝酸纤维素膜,将抗cyfra21-1的第二抗体及羊抗鼠多克隆抗体用划线机在硝酸纤维素膜上制成检测带及质控带,烘干备用。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,在步骤D之后还包括步骤E:将硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫以及吸水垫依次粘结在粘性底板上,然后用切割机切成试纸条,放入塑料卡槽中,组装得到成品。

9. 一种权利要求1-6任一项权利要求所述的试纸条的检测cyfra21-1方法,其特征在于,包括:

S10、将cyfra21-1标准品进行成倍稀释,得到不同浓度的多个标准样品,用微量加样器分别吸取多个标准样品并分别滴加至与每一标准样品相互对应的权利要求1-6任一项权利要求所述的试纸条上,室温静置,将每一试纸条放入近红外荧光扫描仪中读数,记录Dr值,每个浓度的标准样品测量至少两次,取平均值后,以Dr值对样品浓度做标准曲线图;其中,Dr值是检测线荧光值除以质控线荧光值的比值;

S20、吸取待测尿液样本至权利要求1-6任一项权利要求所述的试纸条,室温静置后将试纸条送入近红外荧光扫描仪中读数,得到cyfra21-1浓度。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,在步骤S10中,每一标准样品的吸取量为80 μ l-120 μ l,将标准样品滴加至试纸条上后室温静置12min-20min;

在步骤S20中,将待测尿液样本滴加至试纸条上后室温静置12min-20min;其中,待测尿液样本是收集患者尿液并于2-8 $^{\circ}$ C保存,待测尿液样本的吸取量为80 μ l-120 μ l,且检测要求在4h内完成。

定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测分析技术领域,具体涉及一种定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,我国男性膀胱癌的发病率有逐年上升且年轻化的趋势。虽然近年来膀胱癌的诊断和治疗技术有很大的进步,但是膀胱癌的死亡率仍居高不下。膀胱癌目前缺乏有效的治疗靶点和手术后评估指标,约5%~50%患者术后发生复发或转移。

[0003] 目前膀胱癌诊断,尤其是术后复发的监测,主要以尿脱落细胞学检查与尿道膀胱镜检查为主。然而,膀胱镜检查具有侵入性,操作不便,患者较痛苦,还有感染、出血等风险,而且检测费用昂贵。尿脱落细胞学检查特异性好但敏感性低,容易受到尿路感染等因素的干扰。因此这两种检查方法在临床应用上都受到一定限制。

[0004] 近年来,国内外学者开始致力于从尿液中寻找敏感、特异、可靠、有效的膀胱癌生物标记物并建立无创伤性检查方法来提高膀胱癌早期诊断率。

[0005] cyfra21-1是细胞角蛋白19的可溶性片段,分子量约30000Da。在恶性肺癌组织中,cyfra21-1含量丰富,尤其是在肺鳞癌中有高表达。目前主要用做肿瘤标志物,对肺癌的诊断有较大意义,并且有助于医生预测治疗效果及预后。对口咽鳞状细胞癌、食管癌、结直肠癌具有一定早期诊断价值。cyfra21-1对膀胱癌的诊断也具有一定价值,其对低等级和高等级的膀胱癌诊断灵敏度分别为69.6%和91.9%。另一项研究表明cyfra21-1检测原发性膀胱肿瘤的尿液最佳截止浓度为4.9 μ g/L,敏感性为79.3%,特异性为88.6%;检测复发性膀胱肿瘤的最佳检测阈值为4.04 μ g/L,敏感性为76.2%,特异性为84.2%。2014年的一项META分析显示cyfra21-1对膀胱癌诊断的汇总敏感度为71%,汇总特异度为75%。

[0006] 以往对尿液中cyfra21-1的检测,一般采用ELISA、胶体金免疫层析等方法。ELISA法需要对尿液进行预处理来提取蛋白质,不适用于快速检测,胶体金免疫层析法虽然快速,但是假阴性的比例大,只能定性或半定量,其特异性和灵敏度有待提升。因此,需要结合新方法新技术新材料开发新型膀胱癌尿液早期检测的手段,提高对膀胱癌诊断的特异性和敏感性。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法,解决现有技术中对尿液中cyfra21-1的检测方法无法同时达到快速、高特异性、高敏感性检测的问题。

[0008] 本发明解决技术问题所采用的技术方案是:一种定量检测标志物cyfra21-1的试纸条,包括:

- [0009] 样本垫,喷涂有处理液;
- [0010] 结合垫,喷涂有近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体;
- [0011] 硝酸纤维素膜,设置有由抗cyfra21-1的第二抗体形成的检测带和由羊抗鼠多克隆抗体形成的质控带;
- [0012] 以及吸水垫。
- [0013] 在本发明的试纸条中,所述近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体通过如下方法标记:
- [0014] S1、初洗:吸取近红外荧光纳米微球450-550 μ L,加初洗液并超声混匀,离心后吸弃上清,沉淀物用初洗液重悬并超声混匀,离心后吸弃上清,重复洗至少一次,最后一次洗涤后用初洗液重悬并超声混匀,确保近红外荧光纳米微呈单分散态;
- [0015] S2、活化:加入现配的20mg/ml EDC 80-120 μ L、20mg/mL NHS 250-350 μ L超声混匀,从加入EDC和NHS开始计时活化至少15min,在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C条件下离心,吸弃上清,用偶联液重悬;
- [0016] S3、偶联:在偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心后弃上清,超声混匀,离心后弃上清,重复洗至少一次;加入偶联液重悬,加入第一抗体,第一抗体加入的量是30 μ g第一抗体/100 μ l微球,超声混匀,并利用摇床振荡,期间每隔20min-40min超声一次;
- [0017] S4、封闭:偶联完成后加入2-5 μ L的乙醇胺,再加封闭液重悬,利用摇床振荡,封闭完成后,在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C条件下离心,去掉上清;
- [0018] S5、终洗:用终洗液重悬,超声混匀,在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C条件下离心,吸弃上清,重复洗至少一次;沉淀溶于400-600 μ L终洗液中。
- [0019] 在本发明的试纸条中,步骤S1具体包括:吸取荧光微球500 μ L,加1mL的初洗液并超声充分混匀,高速离心,吸弃上清,沉淀物用1mL的初洗液重悬并超声充分混匀2min,高速离心,吸弃上清,重复洗至少一次,最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并超声充分混匀,确保微球呈单分散态;
- [0020] 步骤S2具体包括:加入现配的20mg/ml EDC 100 μ L、20mg/mL NHS300 μ L超声混匀,从加入EDC和NHS开始计时活化15min,在4 $^{\circ}$ C条件下高速离心,吸弃上清,用1mL偶联液重悬;
- [0021] 步骤S3具体包括:在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,高速离心,弃上清,超声混匀,高速离心,弃上清,重复洗至少一次;加入1000 μ L偶联液重悬,加入150 μ g第一抗体超声混匀,摇床振荡3h,期间每30min超声2min;
- [0022] 步骤S4具体包括:偶联完成后加入3 μ L乙醇胺原液,再加800 μ L封闭液重悬,摇床振荡2.5h,封闭完成后,在4 $^{\circ}$ C条件下,高速离心,去掉上清;
- [0023] 步骤S5具体包括:用1mL终洗液重悬,超声混匀,在4 $^{\circ}$ C条件下高速离心,吸弃上清,重复洗至少一次;沉淀溶于500 μ L终洗液中。
- [0024] 在本发明的试纸条中,样本垫上喷涂的处理液是由Tris、BSA、吐温-20配制的,且Tris的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.5g/100mL;
- [0025] 在步骤S1中,所述初洗液是由MES配制的pH6.0的缓冲液,且MES的浓度为0.1mol/L;
- [0026] 在步骤S2和S3中,所述偶联液是由硼酸和四硼酸钠配制的pH6.5的缓冲液,且硼酸的浓度为0.2mol/L,四硼酸钠的浓度为0.01mol/L;

[0027] 在步骤S4中,所述封闭液是由PBS、BSA、吐温-20配制的pH7.2的缓冲液,且PBS的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.4g/100mL;

[0028] 在步骤S5中,所述终洗液是由PBS、BSA、吐温-20配制的pH7.2的缓冲液,且PBS的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.4g/100mL。

[0029] 在本发明的试纸条中,所述近红外荧光纳米微球是钨螯合物PS-COOH微球,近红外荧光纳米微球的平均粒径分布为0.18-0.22 μ m;所述样本垫和所述结合垫分别是玻璃纤维素膜;所述吸水垫是吸水纸或吸水布。

[0030] 在本发明的试纸条中,所述样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫通过粘性底板固定,所述样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫粘结在所述粘性底板上。

[0031] 本发明还提供了上述的试纸条的制备方法,包括:

[0032] A、近红外荧光纳米微球标记抗cyfra21-1的第一抗体;

[0033] B、在结合垫上喷涂近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体,烘干备用;

[0034] C、在样品垫上喷涂处理液,烘干备用;

[0035] D、选取硝酸纤维素膜,将抗cyfra21-1的第二抗体及羊抗鼠多克隆抗体用划线机在硝酸纤维素膜上制成检测带及质控带,烘干备用。

[0036] 在本发明的制备方法中,在步骤D之后还包括步骤E:将硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫以及吸水垫依次粘结在粘性底板上,然后用切割机切成试纸条,放入塑料卡槽中,组装得到成品。

[0037] 本发明还提供了上述的试纸条的检测cyfra21-1方法,包括:

[0038] S10、将cyfra21-1标准品进行成倍稀释,得到不同浓度的多个标准样品,用微量加样器分别吸取多个标准样品并分别滴加至与每一标准样品相互对应的上述的试纸条上,室温静置,将每一试纸条放入近红外荧光扫描仪中读数,记录Dr值,每个浓度的标准样品测量至少两次,取平均值后,以Dr值对样品浓度做标准曲线图;其中,Dr值是检测线荧光值除以质控线荧光值的比值;

[0039] S20、吸取待测尿液样本至上述的试纸条,室温静置后将试纸条送入近红外荧光扫描仪中读数,得到cyfra21-1浓度。

[0040] 在本发明的检测方法中,在步骤S10中,每一标准样品的吸取量为80 μ l-120 μ l,将标准样品滴加至试纸条上后室温静置12min-20min;

[0041] 在步骤S20中,将待测尿液样本滴加至试纸条上后室温静置12min-20min;其中,待测尿液样本是收集患者尿液并于2-8 $^{\circ}$ C保存,待测尿液样本的吸取量为80 μ l-120 μ l,且检测要求在4h内完成。

[0042] 实施本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法,具有以下有益效果:本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法是针对尿液中cyfra21-1进行定量检测,灵敏度高,特异性高,可用于膀胱癌的早期检测和复发监测,直接将尿液滴至试纸条上便可以快速检测,而且该试纸条制备过程简单,可批量化生产,成本低,试纸检测手段快速,省时省力,适合临床广泛应用。

附图说明

[0043] 图1是定量检测标志物cyfra21-1的试纸条的结构示意图；

[0044] 图2是cyfra21-1检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0045] 下面结合附图和实施例,对本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法作进一步说明:

[0046] 如图1所示,本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条包括样本垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫7,其中硝酸纤维素膜4上固定有检测带5和质控带6。

[0047] 本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条利用荧光免疫层析技术。荧光免疫层析技术是基于抗原抗体特异性免疫反应的新型膜检测技术。该技术以固定有检测带5(包被抗体)和质控带6(抗体)的条状纤维层析材料为固定相,测试液为流动相,荧光标记抗体固定于结合垫3,通过毛细管作用使待分析物在层析条上移动。通常采用“三明治”型双抗夹心免疫层析方法,即待测物在流动相作用下先与荧光标记抗体结合,当到达检测带5时再与包被抗体结合形成双抗夹心的“三明治”型。

[0048] 发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条及其制备方法和检测方法利用荧光定量免疫层析技术,操作简便、检测快速、便携性强,通过荧光示踪增强技术实现了检测结果的精确定量。本技术与传统快速检测技术性能比较,具有如下优势:(1)灵敏度更高:荧光定量免疫层析产品以功能化纳米微球载体技术,结合荧光标记物探针,仪器直接检测激发荧光信号。检测信号具有较高的信噪比、更高的信号检测量和检测灵敏度,同时纳米荧光微球表面修饰有合适密度的羧基,用于与抗体的共价偶联,提高标记物的稳定性;(2)检测范围更宽:与传统光度百分率分析及光密度扫描分析技术不同,荧光免疫层析技术采用荧光直接激发发光检测手段,荧光信号强度与荧光微球数量呈直线相关,同时避免了酶催化发光技术存在的催化效率及底物量限制等问题,定量范围与反应体系内参与反应的特异性蛋白量直接相关,通过本发明的试纸条检测cyfra21-1的技术灵敏度可达到1.2ng/ml以上,性能指标远远高于其它快速检测技术;(3)价格低廉:与传统定量检测技术相比,该技术具有快速、价格低廉等优点。

[0049] 如图1所示,本发明的定量检测标志物cyfra21-1的试纸条包括样本垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4、吸水垫7。其中,在样本垫2上喷涂有处理液;在结合垫3上喷涂有近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体;在硝酸纤维素膜4上设置有由抗cyfra21-1的第二抗体形成的检测带5和由羊抗鼠多克隆抗体形成的质控带6。

[0050] 其中,样本垫2上喷涂的处理液是由Tris、BSA、吐温-20配制的,且Tris的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.5g/100mL。

[0051] 近红外荧光纳米微球是钨螯合物PS-COOH微球,其制造商是Bangs Laboratories, Inc,近红外荧光纳米微球的平均粒径分布为0.18-0.22 μm ,近红外荧光纳米微球的平均粒径优选为0.196 μm 。抗cyfra21-1的第一抗体是Fitzgerald品牌的货号10-2689的,浓度是4mg/mL。抗cyfra21-1的第二抗体是Fitzgerald品牌的货号10-2732的,浓度是4mg/mL。羊抗鼠多克隆抗体是Arista Biologicals inc品牌的货号ABGAM-0500的。

[0052] 样本垫2和结合垫3分别是玻璃纤维素膜;吸水垫7是吸水纸或吸水布。

[0053] 样本垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫7通过粘性底板1固定,样本垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫7粘结在粘性底板1上。

[0054] 上述定量检测标志物cyfra21-1的试纸条的制备方法包括:

[0055] A、近红外荧光纳米微球标记抗cyfra21-1的第一抗体;

[0056] B、在结合垫3上喷涂近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体,烘干备用;烘干的温度为35℃-40℃,烘干时间是8-15h;优选是在37℃强对流空气烘箱中烘干10小时;

[0057] C、在样品垫2上喷涂处理液,烘干备用;烘干的温度为35℃-40℃,烘干时间是8-15h;优选是在37℃强对流空气烘箱中烘干10小时;处理液是由Tris、BSA、吐温-20配制的,且Tris的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.5g/100mL;

[0058] D、选取硝酸纤维素膜4,将抗cyfra21-1的第二抗体及羊抗鼠多克隆抗体用划线机在硝酸纤维素膜4上制成检测带5及质控带6,烘干备用;烘干的温度为35℃-40℃,烘干时间是8-15h;优选是在37℃强对流空气烘箱中烘干10小时。

[0059] E、将硝酸纤维素膜4、结合垫3、样品垫2以及吸水垫7依次粘结在粘性底板1上,然后用切割机切成试纸条,放入塑料卡槽中,组装得到成品。

[0060] 在步骤A中,近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体通过如下方法标记:

[0061] S1、初洗:吸取近红外荧光纳米微球450-550μL,加初洗液并超声混匀,离心后吸弃上清,沉淀物用初洗液重悬并超声混匀,离心后吸弃上清,重复洗至少一次,最后一次洗涤后用初洗液重悬并超声混匀,确保近红外荧光纳米微呈单分散态;其中,初洗液是由MES配制的pH6.0的缓冲液,且MES的浓度为0.1mol/L,MES是指2-(N-吗啡啉)乙磺酸;每次初洗液的用量优选为0.8-1.5ml;

[0062] S2、活化:加入现配的20mg/ml EDC 80-120μL、20mg/mL NHS 250-350μL,超声混匀,从加入EDC和NHS开始计时活化至少15min,在2℃-8℃条件下离心,吸弃上清,用偶联液重悬;其中,偶联液是由硼酸和四硼酸钠配制的pH6.5的缓冲液,且硼酸的浓度为0.2mol/L,四硼酸钠的浓度为0.01mol/L;EDC是1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的药用化学试剂;NHS是N-羟基丁二酰亚胺的药用化学试剂;每次偶联液的用量优选为0.8-1.5ml;

[0063] S3、偶联:在偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,离心后弃上清,超声混匀,离心后弃上清,重复洗至少一次;加入偶联液重悬,加入第一抗体,第一抗体加入的量是30μg第一抗体/100μl微球,超声混匀,并利用摇床振荡,摇床振荡优选是用100转-200转的摇床,振荡时间优选是2-4h,期间每隔20min-40min超声一次;需要说明的是,第一抗体加入的量是30μg第一抗体/100μl微球是指初洗时吸取近红外荧光纳米微球的每100μl微球加入30μg的第一抗体;

[0064] S4、封闭:偶联完成后加入2-5μL的乙醇胺,乙醇胺为100%原液,再加封闭液重悬,封闭液优选为600-1000μL,利用摇床振荡,摇床振荡优选是用100转-200转的摇床,振荡时间优选是2-3.5h,封闭完成后,在2℃-8℃条件下离心,去掉上清;其中,封闭液是由PBS、BSA、吐温-20配制的pH7.2的缓冲液,且PBS的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.4g/100mL;

[0065] S5、终洗:用终洗液重悬,终洗液用量优选为0.8-1.5ml,超声混匀,在2℃-8℃条件

下离心,吸弃上清,重复洗至少一次;沉淀溶于400-600 μ L终洗液中;其中,终洗液是由PBS、BSA、吐温-20配制的pH7.2的缓冲液,且PBS的浓度是0.01mol/L,BSA的浓度是0.5g/100mL,吐温-20的浓度是0.4g/100mL。

[0066] 优选地,步骤S1具体包括:吸取荧光微球500 μ L,加1mL的初洗液并超声充分混匀,高速离心,吸弃上清,沉淀物用1mL的初洗液重悬并超声充分混匀2min,高速离心,吸弃上清,重复洗至少一次,最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并超声充分混匀,确保微球呈单分散态;

[0067] 步骤S2具体包括:加入现配的20mg/ml EDC 100 μ L、20mg/mL NHS 300 μ L超声混匀,从加入EDC和NHS开始计时活化15min,在4 $^{\circ}$ C条件下高速离心,吸弃上清,用1mL偶联液重悬;

[0068] 步骤S3具体包括:在1mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,高速离心,弃上清,超声混匀,高速离心,弃上清,重复洗至少一次;加入1mL偶联液重悬,加入150 μ g第一抗体超声混匀,摇床振荡3h,期间每30min超声2min;

[0069] 步骤S4具体包括:偶联完成后加入3 μ L乙醇胺原液,再加800 μ L封闭液重悬,摇床振荡2.5h,封闭完成后,在4 $^{\circ}$ C条件下,高速离心,去掉上清;

[0070] 步骤S5具体包括:用1mL终洗液重悬,超声混匀,在4 $^{\circ}$ C条件下高速离心,吸弃上清,重复洗至少一次;沉淀溶于500 μ L终洗液中。

[0071] 需要说明的是,上述每次离心的转速优选为10000-15000rpm,离心时间优选为10-20min。

[0072] 上述的试纸条的检测cyfra21-1方法包括:

[0073] S10、将cyfra21-1标准品进行成倍稀释,得到不同浓度的多个标准样品,用微量加样器分别吸取多个标准样品并分别滴加至与每一标准样品相互对应的上述的试纸条上,室温静置12min-20min,将每一个试纸条放入近红外荧光扫描仪中读数,记录Dr值,每个浓度的标准样品测量至少两次,取平均值后,以Dr值对样品浓度做标准曲线图,如图2所示;其中,Dr值是检测线荧光值除以质控线荧光值的比值;每一个标准样品的吸取量为80 μ l-120 μ l;

[0074] S20、吸取待测尿液样本至上述的试纸条,室温静置12min-20min后将

[0075] 试纸条送入近红外荧光扫描仪中读数,得到cyfra21-1浓度。其中,

[0076] 待测尿液样本是收集患者尿液并于2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C保存,待测尿液样本的吸取量为80 μ l-120 μ l,且检测要求在4h内完成。

[0077] 本发明所制备试纸条适用于尿液中cyfra21-1含量的检测。收集膀胱癌患者晨起中段尿,立即转送至实验室,低温保存备用,于4h内完成检测。

[0078] 下面通过具体实施例进行详细说明。

[0079] 实施例1

[0080] 选取玻璃纤维素膜作为结合垫3的固相材料,在结合垫3上喷涂近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体,在37 $^{\circ}$ C强对流空气烘箱中烘干10小时备用。选取玻璃纤维素膜作为样品垫2,在样品垫2上喷涂处理液,在37 $^{\circ}$ C强对流空气烘箱中烘干10小时备用。选取硝酸纤维素膜4,将抗cyfra21-1的第二抗体及羊抗鼠多克隆抗体用划线机在硝酸纤维素膜4上制成检测带5及质控带6,在37 $^{\circ}$ C强对流空气烘箱中烘干10小时备用。将硝酸纤维素膜4、结合垫3、样品垫2以及吸水垫7依次粘结在粘性底板1上,然后用切割机切成试纸条,放

入塑料卡槽中, 组装得到成品。

[0081] 其中, 近红外荧光纳米微球标记抗cyfra21-1的第一抗体的方法包括: 初洗: 吸取近红外荧光纳米微球500 μ L, 加1mL的初洗液并用超声清洗仪充分混匀, 13000rpm离心15min, 吸弃上清, 沉淀物用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀2min, 13000rpm离心15min, 吸弃上清, 重复洗3次, 最后一次洗涤后用1mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀, 确保近红外荧光纳米微球呈单分散态; 活化: 加入20mg/ml EDC 100 μ L、20mg/mL NHS 300 μ L (现配现用) 超声混匀, 活化15min (加入活化剂开始计时), 在4 $^{\circ}$ C, 13000rpm离心15min, 吸弃上清, 用1mL偶联液重悬; 偶联: 在1mL偶联液重悬好的微球溶液中, 超声混匀, 13000rpm离心15min, 弃上清, 超声混匀, 13000rpm离心15min, 重复洗3次; 加入1ml偶联液重悬, 加入150 μ g的第一抗体超声混匀, 140转摇床3h, 期间每30min超声2min; 封闭: 偶联完成后加入3 μ L的乙醇胺, 再加800 μ L封闭液重悬, 140转摇床封闭2.5h, 封闭完成后, 在4 $^{\circ}$ C, 13000rpm离心15min, 去掉上清; 终洗: 用1mL终洗液重悬, 超声混匀, 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm离心15min, 吸弃上清, 重复洗3次; 沉淀溶于500 μ L终洗液中。

[0082] 将cyfra21-1标准品进行成倍稀释, 用微量加样器吸取100 μ L标准品滴加至试纸条的样品口, 室温静置15分钟, 将试纸条放入近红外荧光扫描仪中读数, 记录测量值 (检测线荧光值除以质控线荧光值), 每个样品浓度测量三次, 取平均值后, 以测量值对样品浓度作图。收集膀胱癌患者晨起中段尿, 立即转送至实验室, 低温保存备用, 于4h内完成检测。吸取待测尿液样本100 μ L至试纸条的样品口, 室温静置15分钟后将试纸送入近红外荧光扫描仪中读数, 仪器将直接给出cyfra21-1浓度。

[0083] 利用本实施例中的试纸条进行检测实验, 结果参见表1, 以40ng/ml作为cutoff值, 计算得检测膀胱癌初发及复发的敏感性为100%, 特异性100%, 假阳性率0%, 假阴性率0%。

[0084] 表1:

[0085]

序号	健康人群检测值	疑似膀胱癌患者检测值	疑似膀胱癌患者检测值的平均值	疑似膀胱癌患者检测结果	疑似膀胱癌患者复查镜检结果
1	1.3	4.73	14.41 \pm 9.2	阴性	未见异常
2	2.1	5.91			未见异常
3	3.6	22.63			未见异常

[0086]

4	3.6	2.16			未见异常
5	4.46	22.53			未见异常
6	5.19	21.25			未见异常
7	6.02	5.22			未见异常
8	6.733	7.85			未见异常
9	7.92	32.82			未见异常
10	10.62	15.11			未见异常
11	1.63	15.81			未见异常
12	0.22	18.48			未见异常
13	5.1	16.79			未见异常
14	5.2	7.79			未见异常
15	1.62	5.72			未见异常
16	1.12	8.88			未见异常
17	1.68	28.76			未见异常
18	4.38	5.83			未见异常
19	8.83	10.56			未见异常
20	3.09	32.42			未见异常
21	12.09	15.77			未见异常
22	9.45	9.97			未见异常
23	1.07	237.76			膀胱肿瘤
24	1.06	146.96			膀胱癌术后复发
25	1.12	140.83			膀胱癌术后复发
26	0.74	102.75			膀胱癌
27	3.34	118.67			膀胱癌
28	4.23	251.51			膀胱肿瘤
29	12.88	113.64			膀胱癌
30	1.41	187.02			膀胱癌
31		138.95			膀胱尿路上皮癌
32	平均值:	397.6			膀胱肿瘤
33	4.39±3.54	313.38			膀胱癌
34		317.02			膀胱多发占位
			205.51±96.79	阳性	

[0087] 实施例2

[0088] 选取玻璃纤维素膜作为结合垫3的固相材料,在结合垫3上喷涂近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体,在40℃强对流空气烘箱中烘干8小时备用。选取玻璃纤维素膜作为样品垫2,在样品垫2上喷涂处理液,在40℃强对流空气烘箱中烘干8小时备用。选取硝酸纤维素膜4,将抗cyfra21-1的第二抗体及羊抗鼠多克隆抗体用划线机在硝酸纤维素膜4上制成检测带5及质控带6,在40℃强对流空气烘箱中烘干8小时备用。将硝酸纤维素

膜4、结合垫3、样品垫2以及吸水垫7依次粘结在粘性底板1上,然后用切割机切成试纸条,放入塑料卡槽中,组装得到成品。

[0089] 其中,近红外荧光纳米微球标记抗cyfra21-1的第一抗体的方法包括:初洗:吸取近红外荧光纳米微球550 μ L,加1.5mL的初洗液并用超声清洗仪充分混匀,15000rpm离心10min,吸弃上清,沉淀物用1.5mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀3min,15000rpm离心10min,吸弃上清,重复洗2次,最后一次洗涤后用1.5mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,确保近红外荧光纳米微球呈单分散态;活化:加入20mg/ml EDC 120 μ L、20mg/mL NHS 350 μ L(现配现用)超声混匀,活化20min(加入活化剂开始计时),在2 $^{\circ}$ C,15000rpm离心20min,吸弃上清,用1.5mL偶联液重悬;偶联:在1.5mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,15000rpm离心10min,弃上清,超声混匀,15000rpm离心10min,重复洗2次;加入1.5ml偶联液重悬,加入165 μ g的第一抗体超声混匀,200转摇床2h,期间每20min超声2min;封闭:偶联完成后加入5 μ L的乙醇胺,再加1000 μ L封闭液重悬,200转摇床封闭2h,封闭完成后,在2 $^{\circ}$ C,15000rpm离心10min,去掉上清;终洗:用1.5mL终洗液重悬,超声混匀,2 $^{\circ}$ C,15000rpm离心10min,吸弃上清,重复洗2次;沉淀溶于600 μ L终洗液中。

[0090] 将cyfra21-1标准品进行成倍稀释,用微量加样器吸取120 μ L标准品滴加至试纸条的样品口,室温静置20分钟,将试纸条放入近红外荧光扫描仪中读数,记录测量值(检测线荧光值除以质控线荧光值),每个样品浓度测量三次,取平均值后,以测量值对样品浓度作图。收集膀胱癌患者晨起中段尿,立即转送至实验室,低温保存备用,于4h内完成检测。吸取待测尿液样本120 μ L至试纸条的样品口,室温静置20分钟后将试纸送入近红外荧光扫描仪中读数,仪器将直接给出cyfra21-1浓度。

[0091] 利用本实施例中的试纸条进行检测实验,结果参见表2,以40ng/ml作为cutoff值,计算得检测膀胱癌初发及复发的敏感性为91.67,特异性100%,假阳性率0%,假阴性率8.33%。

[0092] 表2:

[0093]

序号	健康人群检测值	疑似膀胱癌患者检测值	疑似膀胱癌患者检测值的平均值	疑似膀胱癌患者检测结果	疑似膀胱癌患者复查镜检结果
1	1.56	9.65	14.41±9.2	阴性	未见异常
2	2.9	7.47			未见异常
3	1.8	13.21			未见异常
4	4.9	4.32			未见异常
5	2.8	17.56			未见异常
6	5.98	11.83			未见异常
7	5.45	2.52			未见异常
8	7.02	22.73			未见异常
9	4.23	6.81			未见异常
10	9.8	12.44			未见异常
11	11.23	3.57			未见异常
12	6.09	29.36			未见异常
13	7.9	14.69			未见异常
14	3.91	3.94			未见异常
15	0.45	10.79			未见异常
16	1.88	5.26			未见异常
17	4.25	4.66			未见异常
18	6.77	8.45			未见异常
19	3.6	13.77			未见异常
20	10.4	6.55			未见异常
21	2.46	18.66			未见异常
22	3.87	18.26		假阴性	膀胱癌
23	15.37	256.32	186.65±77.02	阳性	膀胱癌
24	1.1	222.53			膀胱肿瘤
25	1.39	98.45			膀胱癌术后复发
26	14.36	113.23			膀胱癌
27	1.48	103.28			膀胱癌
28	5.69	158.34			膀胱癌
29	8.44	249.35			膀胱癌
30	0.56	227.56			膀胱肿瘤

[0094]

31	平均值: 5.25±3.93	112.49			膀胱癌
32		116.47			膀胱肿瘤
33		305.38			膀胱癌
34		276.45			膀胱癌术后复发

[0095] 实施例3

[0096] 选取玻璃纤维素膜作为结合垫3的固相材料,在结合垫3上喷涂近红外荧光纳米微球标记的抗cyfra21-1的第一抗体,在35℃强对流空气烘箱中烘干15小时备用。选取玻璃纤维素膜作为样品垫2,在样品垫2上喷涂处理液,在35℃强对流空气烘箱中烘干15小时备用。选取硝酸纤维素膜4,将抗cyfra21-1的第二抗体及羊抗鼠多克隆抗体用划线机在硝酸纤维素膜4上制成检测带5及质控带6,在35℃强对流空气烘箱中烘干15小时备用。将硝酸纤维素膜4、结合垫3、样品垫2以及吸水垫7依次粘结在粘性底板1上,然后用切割机切成试纸条,放入塑料卡槽中,组装得到成品。

[0097] 其中,近红外荧光纳米微球标记抗cyfra21-1的第一抗体的方法包括:初洗:吸取近红外荧光纳米微球450 μ L,加0.8mL的初洗液并用超声清洗仪充分混匀,10000rpm离心20min,吸弃上清,沉淀物用0.8mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀1.5min,10000rpm离心20min,吸弃上清,重复洗1次,最后一次洗涤后用0.8mL的初洗液重悬并用超声清洗仪充分混匀,确保近红外荧光纳米微球呈单分散态;活化:加入20mg/ml EDC 80 μ L、20mg/ml NHS 250 μ L(现配现用)超声混匀,活化15min(加入活化剂开始计时),在8℃,10000rpm离心20min,吸弃上清,用0.8mL偶联液重悬;偶联:在0.8mL偶联液重悬好的微球溶液中,超声混匀,10000rpm离心20min,弃上清,超声混匀,10000rpm离心20min,重复洗1次;加入0.8ml偶联液重悬,加入135 μ g的第一抗体超声混匀,100转摇床4h,期间每40min超声2min;封闭:偶联完成后加入2 μ L的乙醇胺,再加600 μ L封闭液重悬,100转摇床封闭3.5h,封闭完成后,在8℃,10000rpm离心20min,去掉上清;终洗:用0.8mL终洗液重悬,超声混匀,8℃,10000rpm离心20min,吸弃上清,重复洗1次;沉淀溶于400 μ L终洗液中。

[0098] 将cyfra21-1标准品进行成倍稀释,用微量加样器吸取80 μ L标准品滴加至试纸条的样品口,室温静置12分钟,将试纸条放入近红外荧光扫描仪中读数,记录测量值(检测线荧光值除以质控线荧光值),每个样品浓度测量两次,取平均值后,以测量值对样品浓度作图。收集膀胱癌患者晨起中段尿,立即转送至实验室,低温保存备用,于4h内完成检测。吸取待测尿液样本80 μ L至试纸条的样品口,室温静置12分钟后将试纸送入近红外荧光扫描仪中读数,仪器将直接给出cyfra21-1浓度。

[0099] 利用本实施例中的试纸条进行检测实验,结果参见表3,以40ng/ml作为cutoff值,计算得检测膀胱癌初发及复发的敏感性为91.67,特异性100%,假阳性率0%,假阴性率8.33%。

[0100] 表3:

[0101]

序号	健康人群检测值	疑似膀胱癌患者检测值	疑似膀胱癌患者检测值的平均值	疑似膀胱癌患者检测结果	疑似膀胱癌患者复查镜检结果
1	1.4	4.34	14.37±9.15	阴性	未见异常
2	2.3	5.69			未见异常
3	3.5	23.12			未见异常
4	3.3	2.86			未见异常
5	4.6	23.14			未见异常
6	5.9	20.11			未见异常
7	5.8	6.35			未见异常
8	6.5	7.24			未见异常
9	8.4	30.37			未见异常
10	10.1	14.48			未见异常
11	1.3	16.36			未见异常
12	0.4	19.25			未见异常
13	5.2	15.49			未见异常
14	5.5	7.12			未见异常
15	2.1	5.88			未见异常
16	1.3	9.38			未见异常
17	1.9	26.27			未见异常
18	4.2	5.12			未见异常
19	8.5	11.33			未见异常
20	3.8	35.44			未见异常
21	12.6	17.37			未见异常

[0102]

22	9.2	14.33	204.78±92.87	假阴性	膀胱癌
23	1.3	228.4		膀胱肿瘤	
24	1.1	150.7		膀胱癌术后复发	
25	1.3	148.2		膀胱癌术后复发	
26	0.5	111.3		膀胱癌	
27	3.8	118.3		膀胱癌	
28	4.1	247.3		膀胱肿瘤	
29	10.5	115.2		膀胱癌	
30	1.8	176.4		膀胱癌	
31	平均值: 5.41±3.31	144.5		膀胱尿路上皮癌	
32		386.3		膀胱肿瘤	
33		327.4		膀胱癌	
34		303.3		膀胱多发占位	

[0103] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进或变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围之内。

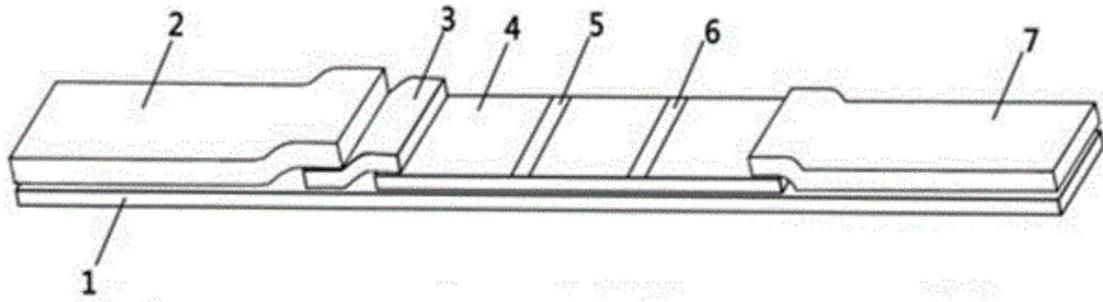


图1

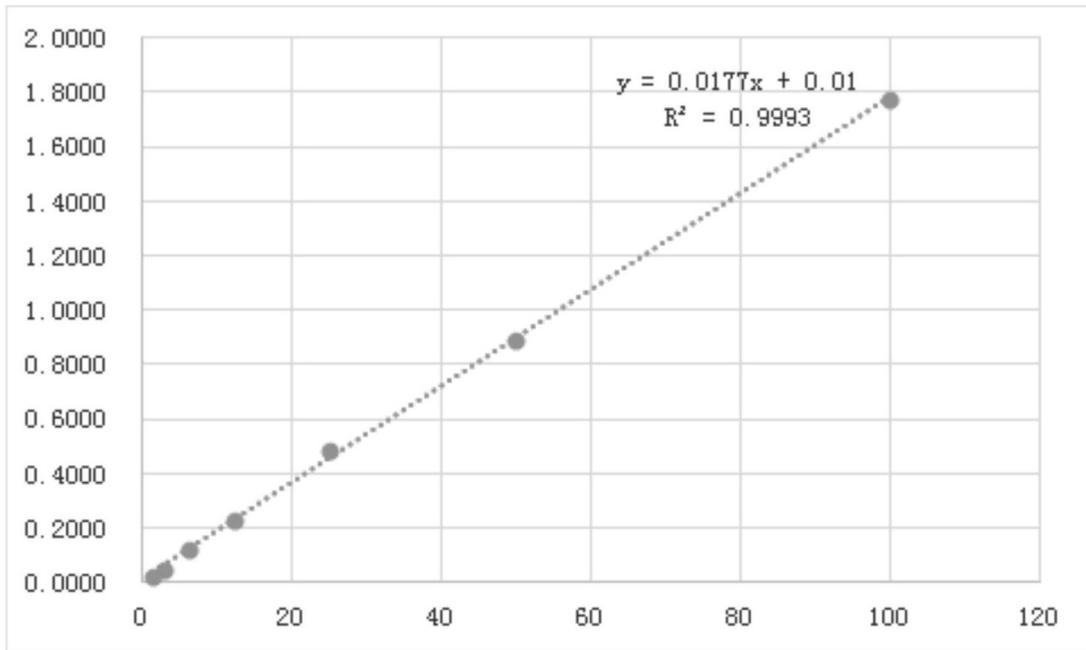


图2