

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 12 月 8 日 (08.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/192168 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/083129
- (22) 国际申请日: 2015 年 7 月 2 日 (02.07.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510292617.X 2015 年 5 月 30 日 (30.05.2015) CN
- (71) 申请人: 深圳市共创百业科技开发有限公司 (SHENZHEN GONGCHUANG SCIENCE AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 深圳市易特科信息技术有限公司 (E-TECHNO INFORMATION TECHNOLOGIES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 深圳市前海安测信息技术有限公司 (ANY-CHECK INFORMATION TECHNOLOGIES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057

(CN)。 深圳市贝沃德克生物技术有限公司 (BIO-TECH ACADEMY (CHINA) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。

(72) 发明人: 张贯京 (ZHANG, Guanjing); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 陈兴明 (CHEN, Xingming); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 葛新科 (GE, Xinke); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 张少鹏 (ZHANG, Shaopeng); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 方静芳 (FANG, Jingfang); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 普拉纽克·克里斯基涅 (PRONYUK, Khrystyna); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 古列莎·艾琳娜 (KULIESH, Olena); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。 波达别特·伊

[见续页]

(54) Title: BIOMARKER-BASED TUMOR EARLY DETECTION KIT AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒及其制备方法

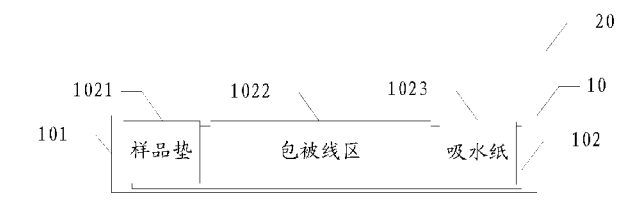


图 1

1021 SAMPLE PAD
1022 ENVELOPING LINE AREA
1023 ABSORBENT PAPER

(57) Abstract: A biomarker-based tumor early detection kit. The biomarker-based tumor early detection kit comprises a test strip and a cardboard shell. The cardboard shell is arranged at the periphery of the test strip and surrounds the test strip. The test strip comprises a substrate and an enveloping film arranged on the substrate. A sample pad, an enveloping line area, and absorbent paper are provided on the enveloping film sequentially. A marker line, a quality control line, an AFP detection line, and a CEA detection line are sequentially arranged in the enveloping line area. The biomarker-based tumor early detection kit has a synergetic and complementary effect for diagnosis of tumorigenesis by means of combined detection of AFP and CEA, and can provide, according to an actual test result, assistant diagnosis of tumor early detection, thereby shortening a detection period, improving detection sensitivity, and achieving convenient use for a user.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2016/192168 A1



万 (PODOBED, Ivan); 中国广东省深圳市南山科技园高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。

- (81) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒。基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒包括试纸条和卡壳: 卡壳设置于试纸条的外围, 包围试纸条; 试纸条包括底衬以及设置于底衬上的包被膜, 包被膜上依次设置有样品垫、包被线区和吸水纸; 包被线区依次设置为标记线、质控线、AFP 检测线和 CEA 检测线。基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒通过 AFP 与 CEA 两项联检, 对于肿瘤发生的判断起到协同互补作用, 可以根据实际检测结果, 为肿瘤早期提供辅助判断, 缩短检测周期, 增加了检测的灵敏度, 方便了用户使用。

基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒及其制备方法

[1] 技术领域

[2] 本发明涉及生命健康技术领域，具体地说，本发明涉及基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒及其制备方法。

[3] 背景技术

[4] 甲胎蛋白 (α -fetoprotein AFP) 是单一多聚体肽键糖蛋白，含590个氨基酸，分子量约为 70KD，与血清白蛋白、维生素结合蛋白属同一基因家族。AFP于胎儿6周开始合成，12-15周达到高峰。出生后1-2年降至成人水平。AFP是诊断肝癌灵敏度高和特异性好的肿瘤标志物，是临床诊断原发性肝细胞癌的主要实验室指标，常用于原发性肝癌临床检查及普查。癌胚抗原(carcino-embryonic antigen CEA)是一种分子量为180-200kDa的多糖蛋白复合物。它存在2-6月龄的胎儿胃肠道组织和直、结肠癌细胞组织中，胃癌、胰腺癌、卵巢癌、食道癌等组织中也有存在。通常 CEA被认为是一种广谱的肿瘤标志物。目前市场上的广谱的肿瘤的早期判断仅仅单独依靠单一的肿瘤标志物的检测，常常因为单一的检验周期长，灵敏度低，从而无法确保肿瘤的诊断率以及甚至会影响肿瘤患者后续的治疗和生命健康。

[5] 发明内容

[6] 本发明的主要目的在于提供一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒及其制备方法，同时检测AFP和CEA，对于肿瘤发生的判断起到协同互补作用，可以根据实际检测结果，为肿瘤早期提供辅助判断，缩短检测周期，增加了检测的灵敏度，方便了用户使用。

[7] 为实现上述目的，本发明提供了一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒。

[8] 所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒包括试纸条和卡壳：

[9] 所述卡壳设置于所述试纸条的外围，包围所述试纸条；

[10] 所述试纸条包括底衬以及设置于所述底衬上的包被膜，所述包被膜上依次设置有样品垫、包被线区和吸水纸；

- [11] 所述包被线区依次设置有标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线。
- [12] 在其中一个实施例中，所述标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体。
- [13] 在其中一个实施例中，所述质控线包括羊抗兔IgG抗体。
- [14] 在其中一个实施例中，所述卡壳包括加样区和视窗区：
- [15] 所述加样区设置于所述试纸条的样品垫处，用于滴加样品；
- [16] 所述视窗区设置于所述试纸条的包被线区，用于观测实验结果。
- [17] 在其中一个实施例中，所述标记线和所述质控线之间、所述质控线和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线和所述CEA检测线之间的间隔设置为2mm-5mm。
- [18] 在其中一个实施例中，所述AFP检测线包括能与待检测抗原AFP特异性结合的第一AFP单克隆抗体；所述CEA检测线包括能与待检测抗原CEA特异性结合的第一CEA单克隆抗体。
- [19] 在其中一个实施例中，所述标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体。
- [20] 在其中一个实施例中，所述质控线包括羊抗兔IgG抗体。
- [21] 在其中一个实施例中，所述卡壳包括加样区和视窗区：
- [22] 所述加样区设置于所述试纸条的样品垫处，用于滴加样品；
- [23] 所述视窗区设置于所述试纸条的包被线区，用于观测实验结果。
- [24] 在其中一个实施例中，所述标记线和所述质控线之间、所述质控线和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线和所述CEA检测线之间的间隔设置为2mm-5mm。在其中一个实施例中，所述待检测抗原AFP为人源AFP，所述待检测抗原CEA为人源CEA。
- [25] 在其中一个实施例中，所述标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体。
- [26] 此外，为实现上述目的，本发明还提供一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法。
- [27] 所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法包含以下步骤：

- [28] 将稀释过的标记有第二AFP单克隆抗体的荧光胶乳、标记有第二CEA单克隆抗体的荧光胶乳和标记有兔IgG抗体的荧光胶乳，划线包被于包被膜上的包被线区，形成标记线；
- [29] 稀释羊抗兔IgG抗体，并将稀释过的所述羊抗兔IgG抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成质控线；
- [30] 稀释能与待检测抗原AFP特异结合的第一AFP单克隆抗体，并将稀释过的所述能与待检测抗原AFP特异结合的第一AFP单克隆抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成AFP检测线；
- [31] 稀释能与待检测抗原CEA特异结合的第一CEA单克隆抗体，并将稀释过的所述能与待检测抗原CEA特异结合的第一CEA单克隆抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成CEA检测线；
- [32] 将包被有所述标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线的包被膜置于烘箱中，进行干燥平衡；
- [33] 将样品垫和吸水纸依次搭接并粘贴于干燥平衡后的所述包被膜上，所述样品垫设置于所述标记线的一端，所述吸水纸设置于所述CEA检测线的一端；
- [34] 将所述包被膜粘贴于底衬上，形成试纸条；
- [35] 将卡壳设置于所述试纸条的外围，包围所述试纸条。
- [36] 优选地，所述待检测抗原AFP为人源AFP，所述待检测抗原CEA为人源CEA。
- [37] 优选地，所述标记线和所述质控线之间、所述质控线和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线和所述CEA检测线之间的间隔设置为2mm-5mm。
- [38] 本发明采用上述技术方案，带来的技术效果为：本发明实施例提供的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，包括试纸条和卡壳，卡壳设置于试纸条的外围，包围试纸条；试纸条包括底衬以及设置于底衬上的包被膜，包被膜上依次设置有样品垫、包被线区和吸水纸；包被线区依次设置为标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线；标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体，质控线包括羊抗兔IgG抗体；AFP检测线和CEA检测线分别包括能与待检测抗原AFP特异性结合的第一AFP单克隆抗体和能与待检测抗原CEA特异性结合的第一CEA单克隆抗体。本发明实施例提供的基于生物

标志物的肿瘤早期检测试剂盒通过AFP与CEA两项联检，对于肿瘤发生的判断起到协同互补作用，可以根据实际检测结果，为肿瘤早期提供辅助判断，缩短检测周期，增加了检测的灵敏度，方便了用户使用。

[39] 附图说明

[40] 图1为本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒较佳实施例的内部结构示意图；

[41] 图2为本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒较佳实施例的包被线区的示意图；

[42] 图3为采用本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒与德灵仪器针对相同临床样本测量出的AFP的相关性图；

[43] 图4为采用本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒与德灵仪器针对相同临床样本测量出的CEA的相关性图。

[44] 本发明目的的实现、功能特点及优点将结合实施例，参照附图做进一步说明。

[45] 具体实施方式

[46] 应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[47] 本发明的主要目的在于提供一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒及其制备方法，同时检测AFP和CEA，对于肿瘤发生的判断起到协同互补作用，可以根据实际检测结果，为肿瘤早期提供辅助判断，缩短检测周期，增加了检测的灵敏度，方便了用户使用。

[48] 为实现上述目的，本发明提供了一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒。

[49] 图1为本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒较佳实施例的内部结构示意图；图2为本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒较佳实施例的包被线区的示意图。参照图1和图2，在本实施例中，所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒包括试纸条10和卡壳20：

[50] 所述卡壳20设置于所述试纸条10的外围，包围所述试纸条10；

[51] 所述试纸条10包括底衬101以及设置于所述底衬101上的包被膜102，所述包被膜102上依次设置有样品垫1021、包被线区和吸水纸：

[52] 所述包被线区1022依次设置有标记线10221、质控线10222、AFP检测线10223和CEA检测线10224。

[53] 在本实施例中，所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒包括试纸条10和卡壳20，卡壳20设置于试纸条10的外围，卡壳20的材质可以是塑料的，卡壳20的形状可以是长方体的，也可以设计成别的形状，但是以匹配试纸条10为前提，卡壳20包围试纸条10，起到保护的作用。作为优选的实施例，卡壳20上有两处开孔的地方，一处称为加样区：对应于试纸条10上的样品垫1021处，为了方便使用者加样，卡壳20的加样区可以设置有“小雨点”的加样标识，防止初次使用者混淆加样区，导致实验检测失败；另一处称为视窗区：对应设置于试纸条10上的包被线区1022，为了清晰直观的观测到实验结果。此外，设置卡壳20方便了使用者的实验操作，减少了人为的误差，提高了检测结果的正确率。

[54] 所述试纸条10包括底衬101及设在底衬101上的包被膜102，包被膜102上设有样品垫1021、包被线区1022和吸水纸1023。在检测的过程中，吸水纸1023的主要成分是纤维素，用于提供检测所需的毛细作用力，吸水纸的材料可以是自由棉绒，也可以是玻璃纤维，优选自由棉绒的材料。由于纤维素是天然的大分子有机物，纸张中的纤维素交错呈网状，因此纤维素交错形成的网状中有很多空隙，这些空隙可以含住吸水纸1023上的水分，从而产生张力。此外水由于势能，从浓度高的一侧流向浓度低的一侧，因此在实验操作的过程中，如果从一侧吸水，则有利于滴加的检测样品快速的扩散从加样处到硝酸纤维素膜上，利于实验的进行。硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane，简称NC膜)，是免疫反应的发生处。当通过样品垫1021，在吸水纸1023的作用下把样品从起始上样点转移至包被线区，在检测试纸条10下游控制着样品沿着NC膜膜片流动。

[55] 所述包被线区1022包括有从靠近所述样品垫1021端至靠近所述吸水纸1023端依次平行设置、且相互间隔的包被有第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体的标记线10221、包被有羊抗兔IgG抗体的质控线10222、包被有能与待检测抗原AFP特异性结合的第一AFP单克隆抗体的AFP检测线10223、以及包被有能与待检测抗原CEA特异性结合的第一CEA单克隆抗体的CEA检测线10224。所述标记线10221上荧光胶乳标记的抗体采用荧光稀释液进行稀释，所述荧光

稀释液包括：1.0%-1.5%BSA，2.5%-5%蔗糖，0.1%-0.5%Tween-20，0.08-0.1% NaN₃，余量为0.01-0.02M、pH7.2的PBS；牛血清白蛋白（BSA），是牛血清中的一种白蛋白，能减轻有些抗体的变性，对于某些不利环境因素如加热，表面张力及化学因素引起的抗体的变性，起到稳定、减轻的效果，减少外界因素对实验的干扰。此外在本发明实施例中加入BSA，可增强产物的稳定性。Tween-20为聚氧乙烯去水山梨醇单月桂酸酯和一部分聚氧乙烯双去水山梨醇单月桂酸酯的混合物，是一种表面活性剂，在本发明实施例中促进抗体与抗体的结合的作用，磷酸盐缓冲液又称PBS，是由磷酸二氢钠和磷酸氢二钠组成的溶液，用于样品的稀释。叠氮钠又称NaN₃，在本发明实施例中起到防腐的作用；所述质控线10222、AFP检测线10223和CEA检测线10224上包被的抗体均采用包被缓冲液进行稀释，所述包被缓冲液包括：0.08-0.1% NaN₃，余量为0.01-0.02M、pH7.2的PBS。所述包被膜102为硝酸纤维素膜，所述硝酸纤维素膜的爬速为95s~135s/4cm。所述荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体和第二CEA单克隆抗体的浓度均为0.25-1.0mg/ml，在试纸条10上的用量均为0.02-0.1μg/cm²，按5%~30%的比例进行稀释；所述荧光乳胶标记的兔IgG抗体的浓度为0.25-1.0mg/ml，按5%-15%的比例进行稀释，在试纸条10上的用量为0.001-0.025μg/cm²。所述质控线10222上包被的兔IgG抗体的浓度为0.25-1.0mg/ml，用量为20μl/27-35cm；所述检测线上包被的AFP单克隆抗体和CEA单克隆抗体的浓度均为0.25-1.0mg/ml，用量均为20μl/27-35cm。

- [56] 所述待检测抗原AFP为人的血液中的甲胎蛋白AFP，所述待检测抗原CEA为人的血液中的癌胚抗原CEA，其中，人的血液中可取全血、血清或血浆。所述标记线10221和所述质控线10222之间、所述质控线10222和所述AFP检测线10223之间以及所述AFP检测线10223和所述CEA检测线10224之间的间隔设置为2mm-5mm。此处，间隔间距的设置考虑匹配荧光信号读取仪器装置在后续检测中的使用，当间隔间距过短时，仪器无法区分出AFP检测线和CEA检测线二者发出的荧光信号强度，影响实验结果，当间隔间距过长时，仪器检测不到相应的荧光信号，同样也会对实验造成干扰。基于此，针对本发明AFP检测线10223和所述CEA检测线10224之间的间隔设置为2mm-5mm为宜。匹配与后续所述荧光胶乳颗粒

的直径为0.1 μ m

-1 μ m，受激发后发射的波长为180nm-800nm。本实验中的第一AFP单克隆抗体与第二AFP单克隆抗体与待测AFP抗原结合时处于不同表位；同样，第一CEA单克隆抗体与第二CEA单克隆抗体与待测CEA抗原结合时处于不同表位。

[57] 本发明采用上述技术方案，带来的技术效果为：基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，包括试纸条和卡壳，卡壳设置于试纸条的外围，包围试纸条；试纸条包括底衬以及设置于底衬上的包被膜，包被膜上依次设置有样品垫、包被线区和吸水纸；包被线区依次设置为标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线；标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体，质控线包括羊抗兔IgG抗体；AFP检测线和CEA检测线分别包括能与待检测抗原AFP特异性结合的第一AFP单克隆抗体和能与待检测抗原CEA特异性结合的第一CEA单克隆抗体。通过AFP与CEA两项联检，对于肿瘤发生的判断起到协同互补作用，可以根据实际检测结果，为肿瘤早期提供辅助判断，缩短检测周期，方便了用户使用。

[58] 此外，为实现上述目的，本发明还提供一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法。

[59] 所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法包含以下步骤：

[60] 将稀释过的标记有第二AFP单克隆抗体的荧光胶乳、标记有第二CEA单克隆抗体的荧光胶乳和标记有兔IgG抗体的荧光胶乳，划线包被于包被膜上的包被线区，形成标记线；

[61] 稀释羊抗兔IgG抗体，并将稀释过的所述兔IgG抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成质控线；

[62] 稀释能与待检测抗原AFP特异结合的第一AFP单克隆抗体，并将稀释过的所述能与待检测抗原AFP特异结合的第一AFP单克隆抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成AFP检测线；

[63] 稀释能与待检测抗原CEA特异结合的第一CEA单克隆抗体，并将稀释过的所述能与待检测抗原CEA特异结合的第一CEA单克隆抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成CEA检测线；

- [64] 将包被有所述标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线的包被膜置于烘箱中，进行干燥平衡；
- [65] 将样品垫和吸水纸依次搭接并粘贴于干燥平衡后的所述包被膜上，所述样品垫设置于所述标记线的一端，所述吸水纸设置于所述CEA检测线的一端；
- [66] 将所述包被膜粘贴于底衬上，形成试纸条；
- [67] 将卡壳设置于所述试纸条的外围，包围所述试纸条。
- [68] 在本实施例中，参照图1和图2，在标记线10221的制备过程中，用荧光稀释液稀释标记有第二AFP单克隆抗体的荧光胶乳、标记有第二CEA单克隆抗体的荧光胶乳和标记有兔IgG抗体的荧光胶乳，划线于包被膜上形成标记线10221；其中荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体和荧光胶乳标记的第二CEA单克隆抗体的浓度均为0.25-1.0mg/ml，用量均为0.02-0.1 μ g/cm²；荧光胶乳标记的兔IgG抗体的浓度为0.25-1.0mg/ml，用量为0.001-0.025 μ g/cm²；所述荧光稀释液中含有1.0%-1.5%BSA，2.5%-5%蔗糖，0.1%-0.5%Tween-20，0.08-0.1%NaN₃，余量为0.01-0.02M、pH7.2的PBS；质控线10222和检测线的制备过程中，用包被缓冲液稀释兔IgG抗体（购自Hytest公司）、能与待检测抗原AFP特异结合的检测线上的第一AFP单克隆抗体（购自杭州启泰生物技术有限公司）、以及能与待检测抗原CEA特异结合的检测线上的第一CEA单克隆抗体（购自Hytest公司），并将稀释后的三种抗体分别依次平行地划线于包被膜上形成质控线10222、AFP检测线10223和CEA检测线10224；其中，质控线10222包被的羊抗兔IgG抗体的浓度为0.25-1.0mg/ml，用量为20 μ l/27-35cm；AFP检测线10223包被的第一AFP单克隆抗体的浓度为0.25-1.0mg/ml，用量为20 μ l/27-35cm；CEA检测线10224包被的第一CEA单克隆抗体的浓度为0.25-1.0mg/ml，用量为20 μ l/27-35cm；所述包被缓冲液中含有0.08-0.1%NaN₃，余量为0.01-0.02M、pH7.2的PBS；所述标记线10221和所述质控线10222之间、所述质控线10222和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线10223和所述CEA检测线10224之间的间隔设置为2mm-5mm标记线10221、质控线10222、AFP检测线10223、CEA检测线10224在包被膜的制备过程中，将包被好标记线10221、质控线10222、AFP检测线10223、CEA检测线10224的包被膜置于湿度<30%的烘箱，且烘箱的温度设定在35-45

°C，干燥 24-36h 后，于 2°C-30°C 密封干燥平衡 7 天以上。在试纸条的制备过程中，将样品垫 1021 和吸水纸 1023 依次搭接并粘贴于干燥平衡后的包被膜 102 上，在包被膜 102 靠近 CEA 检测线 10224 的一端搭接粘贴吸水纸 1023，即可制成试纸条 10。将得到的试纸条 10 与预制成的卡壳 20 相匹配，即可得到试剂盒。

- [69] 在其中一个实施例中，所述荧光胶乳标记抗体的制备步骤为：将常规方法共价活化后的荧光胶乳超声波 200W-400W 处理 20-30 秒后，按照 50-200 μ g 标记抗体/100 μ l 荧光胶乳的比例加入第二 AFP 单克隆抗体（购自杭州启泰生物技术有限公司）、第二 CEA 单克隆抗体（购自 Hytest 公司）和兔 IgG 抗体（购自 Hytest 公司），混匀后室温搅拌反应 2 h，离心洗涤 3 次，每次 10000-15000xg、离心 10 min，沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 s，用 PBS-TBN 恢复离心前体积，4°C 保存，备用。
- [70] 本发明所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒原理是双抗夹心法；首先将直径范围 0.01 μ m-1.5 μ m 的胶乳与 AFP 抗体以及各类不同的荧光素共价结合形成物质 A，然后将直径范围 0.01 μ m-1.5 μ m 的胶乳与 CEA 抗体以及各类不同的荧光素共价结合形成物质 B，由于胶乳本身具有羧基、氨基等基团，当物质 A 再与相应的 AFP 抗原结合，利用荧光素在激发光下发射荧光；同样，当物质 B 再与相应的 CEA 抗原结合，利用荧光素在激发光下也可以发射荧光。
- [71] 当荧光胶乳标记的第二 AFP 抗体与检测样品（例如：血液中的全血、血清或血浆）中的足够的 AFP 抗原结合形成复合物 A1，该复合物 A1 在层析的作用下转移至 AFP 检测线处，与第一 AFP 抗体（该抗体会结合在 AFP 抗原的另一表位上）结合，从而形成双抗体夹心的复合物 A2，该复合物 A2 聚集在此处后，受到光源激发释放出相应波长的发射光，将该试纸条放于专门的荧光信号读取仪器中，即可读取荧光信号的大小，从而进行定量测定。同样的当荧光胶乳标记的第二 CEA 抗体与检测样品（例如：血液中的全血、血清或血浆）中的足够的 CEA 抗原结合形成复合物 B1，该复合物 B1 在层析的作用下转移至 CEA 检测线处，与第一 CEA 抗体（该抗体会结合在 CEA 抗原的另一表位上）结合，从而形成双抗体夹心的复合物 B2，该复合物 B2 聚集在此处后，受到光源激发释放出相应波长的发射光，将该试纸条放于专门的荧光信号读取仪器中，即可读取荧光信号的大小，从

而进行定量测定。

[72] 荧光信号读取仪器的主要工作原理是该仪器的荧光光源系统能够发出单色激发光，照射在待检测的试纸条AFP检测线和CEA检测线处，此时检测线AFP和CEA通过反应凝集的荧光乳胶在单色激发光的作用下，发出荧光信号，该荧光信号被该仪器的检测系统捕获，检测系统接收荧光信号后，由检测系统中的光电倍增管实现光信号的放大，然后由该仪器的固态检测器进行光电信号的转化，由电信号读出电路将电信号输出，再有自动软件分析控制系统处理，在显示屏处显示结果，从而实现对样品的精确定量。

[73] 1、用德灵DN-100特种蛋白测定仪对134例临床AFP和CEA样本（例如：血液中的全血、血清或血浆）作为检测标准，表1采用本发明较佳实施例的试剂盒对10个样本的AFP定量测定结果；表2采用本发明较佳实施例的试剂盒对10个样本的CEA定量测定结果。

[74] 表1 采用本发明较佳实施例的试剂盒对10个样本的AFP定量测定结果

[Table 1]

	AFP ug/ml 样本 1	AFP ug/ml 样本 2	AFP ug/ml 样本 3	AFP ug/ml 样本 4	AFP ug/ml 样本 5	AFP ug/ml 样本 6	AFP ug/ml 样本 7	AFP ug/ml 样本 8	AFP ug/ml 样本 9	AFP ug/ml 样本 10
德灵	93.24	15.9	72.03	21.48	114.39	4.96	65.47	17.17	135.98	7.19
本发明较佳实施例的试剂盒	92.71	16.14	72.01	21.86	115.01	4.89	65.61	17.03	142.57	7.34

[75]

[76] 表2 采用本发明较佳实施例的试剂盒对10个样本的CEA定量测定结果

[Table 2]

	CEA ug/ml 样本 1	CEA ug/ml 样本 2	CEA ug/ml 样本 3	CEA ug/ml 样本 4	CEA ug/ml 样本 5	CEA ug/ml 样本 6	CEA ug/ml 样本 7	CEA ug/ml 样本 8	CEA ug/ml 样本 9	CEA ug/ml 样本 10
德灵	27.53	4.91	42.59	5.87	35.46	8.19	23.94	1.03	57.24	10.05
本发明较佳实施例的试剂盒	27.06	5.04	42.51	5.65	34.32	8.35	24.17	1.15	58.64	10.17

[77] 从表1和表2可知，采用较佳实施例的试剂盒对样本进行测定时，可以得到与检测标准相当的结果，说明本发明的试剂盒可以实现准确定量测量。

[78] 2、对试剂盒进行性能方面的测定---最低检测限度

[79] 图3 为采用本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒与德灵仪器针对相同临床样本测量出的AFP的相关性图；图4 为采用本发明基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒与德灵仪器针对相同临床样本测量出的CEA的相关性图。参照图3和图4，在本实施例中，AFP以德灵公司的特种蛋白分析仪测试60份临床样本（例如：血液中的全血、血清或血浆），这两种产品的结果相关系数为 $R^2 > 0.996$ ，且 $Y = 0.05 + 0.984X$ ；CEA以德灵公司的特种蛋白分析仪测试60份临床样本（例如：血液中的全血、血清或血浆），这两种产品的结果相关系数为 $R^2 > 0.994$ ，且 $Y = 0.263 + 0.983X$ ；因此，该实施例的试剂盒跟对照试剂的相关性好，AFP的最低检测限度为0.05mg/l，CEA的最低检测限度为0.1ng/l。

[80] 3、对试剂盒进行性能方面的测定---精密度

[81] 采用较佳实施例的试剂盒对含量分别是高值、低值和中值的样本，连续至少检

测10次，计算变异系数（CV）。

- [82] 对于AFP含量的较高值选择为（115.01 mg/l）、中值选择为（16.14 mg/l）、低值选择为（0.41 mg/l），将上述3个血液样本分别测定10次，根据其测定数据，利用SPSS软件统计得出高值（115.54 + 9.13mg/l），CV 2.41%；同样的利用SPSS软件统计得出中值（16.2 + 0.82 mg/l），CV 3.06%；同样的利用SPSS软件统计得出低值选择为（0.41+ 0.03 mg/l），CV 2.1%；；检测结果CV值均小于12%。
- [83] 对于CEA含量的较高值选择为（42.51 mg/l）、中值选择为（5.4 mg/l）、低值选择为（0.40 mg/l），将上述3个血液样本分别测定10次，根据其测定数据，利用SPSS软件统计得出高值（42.51 + 4.74mg/l），CV 3.21%；同样的利用SPSS软件统计得出中值（5.4 + 0.51 mg/l），CV 3.3%；同样的利用SPSS软件统计得出低值选择为（0.40+ 0.05 mg/l），CV 2.40%；；检测结果CV值均小于12%。以上结果说明较佳实施例的试剂盒的精密度良好。
- [84] 本发明实施例基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，包括试纸条和卡壳，卡壳设置于试纸条的外围，包围试纸条；试纸条包括底衬以及设置于底衬上的包被膜，包被膜上依次设置有样品垫、包被线区和吸水纸；包被线区依次设置为标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线；标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体，质控线包括羊抗兔IgG抗体；AFP检测线和CEA检测线分别包括能与待检测抗原AFP特异性结合的第一AFP单克隆抗体和能与待检测抗原CEA特异性结合的第一CEA单克隆抗体。通过AFP与CEA两项联检，对于肿瘤发生的判断起到协同互补作用，可以根据实际检测结果，为肿瘤早期提供辅助判断，缩短检测周期，增加了检测的灵敏度，方便了用户使用。
- [85] 以上仅为本发明的优选实施例，并非因此限制本发明的专利范围，凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换，或直接或间接运用在其他相关的技术领域，均同理包括在本发明的专利保护范围内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒包括试纸条和卡壳：
所述卡壳设置于所述试纸条的外围，包围所述试纸条；
所述试纸条包括底衬以及设置于所述底衬上的包被膜，所述包被膜上依次设置有样品垫、包被线区和吸水纸；
所述包被线区依次设置有标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体。
- [权利要求 3] 如权利要求1所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述质控线包括羊抗兔IgG抗体。
- [权利要求 4] 如权利要求1所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述卡壳包括加样区和视窗区：
所述加样区设置于所述试纸条的样品垫处，用于滴加样品；
所述视窗区设置于所述试纸条的包被线区，用于观测实验结果。
- [权利要求 5] 如权利要求1所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述标记线和所述质控线之间、所述质控线和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线和所述CEA检测线之间的间隔设置为2mm-5mm。
- [权利要求 6] 如权利要求1所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述AFP检测线包括能与待检测抗原AFP特异性结合的第一AFP单克隆抗体；所述CEA检测线包括能与待检测抗原CEA特异性结合的第一CEA单克隆抗体。
- [权利要求 7] 如权利要求6所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体。

- [权利要求 8] 如权利要求6所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述质控线包括羊抗兔IgG抗体。
- [权利要求 9] 如权利要求6所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述卡壳包括加样区和视窗区：
所述加样区设置于所述试纸条的样品垫处，用于滴加样品；
所述视窗区设置于所述试纸条的包被线区，用于观测实验结果。
- [权利要求 10] 如权利要求6所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述标记线和所述质控线之间、所述质控线和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线和所述CEA检测线之间的间隔设置为2mm-5mm。
- [权利要求 11] 如权利要求6所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述待检测抗原AFP为人源AFP，所述待检测抗原CEA为人源CEA。
- [权利要求 12] 如权利要求11所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒，其特征在于，所述标记线包括被荧光胶乳标记的第二AFP单克隆抗体、第二CEA单克隆抗体和兔IgG抗体。
- [权利要求 13] 一种基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述肿瘤早期检测试剂盒的制备方法包括以下步骤：
将稀释过的标记有第二AFP单克隆抗体的荧光胶乳、标记有第二CEA单克隆抗体的荧光胶乳和标记有兔IgG抗体的荧光胶乳，划线包被于包被膜上的包被线区，形成标记线；
稀释羊抗兔IgG抗体，并将稀释过的所述羊抗兔IgG抗体划线包被于包被膜上的包被线区，形成质控线；
稀释能与待检测抗原AFP特异结合的第一AFP单克隆抗体，并将稀释过的所述能与待检测抗原AFP特异结合的第一AFP单克隆抗体包被于包被膜上的包被线区，形成AFP检测线；
稀释能与待检测抗原CEA特异结合的第一CEA单克隆抗体，并将稀释过的所述能与待检测抗原CEA特异结合的第一CEA单克隆抗

体划线包被于包被膜上的包被线区，形成CEA检测线；
将包被有所述标记线、质控线、AFP检测线和CEA检测线的包被膜置于烘箱中，进行干燥平衡；
将样品垫和吸水纸依次搭接并粘贴于干燥平衡后的所述包被膜上，所述样品垫设置于所述标记线的一端，所述吸水纸设置于所述CEA检测线的一端；
将所述包被膜粘贴于底衬上，形成试纸条；
将卡壳设置于所述试纸条的外围，包围所述试纸条。

[权利要求 14] 如权利要求13所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述待检测抗原AFP为人源AFP，所述待检测抗原CEA为人源CEA。

[权利要求 15] 如权利要求13所述的基于生物标志物的肿瘤早期检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述标记线和所述质控线之间、所述质控线和所述AFP检测线之间以及所述AFP检测线和所述CEA检测线之间的间隔设置为2mm-5mm。



图 1

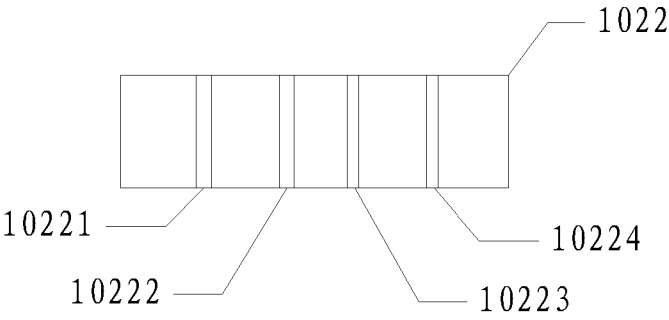


图 2

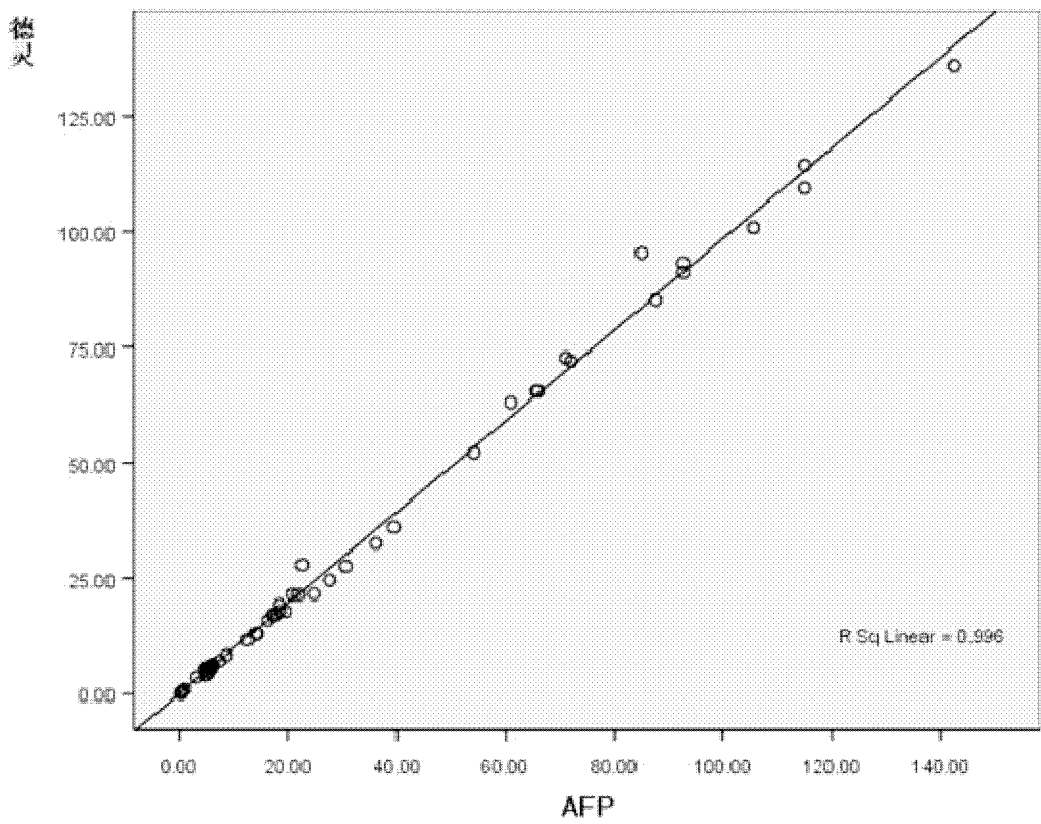


图 3

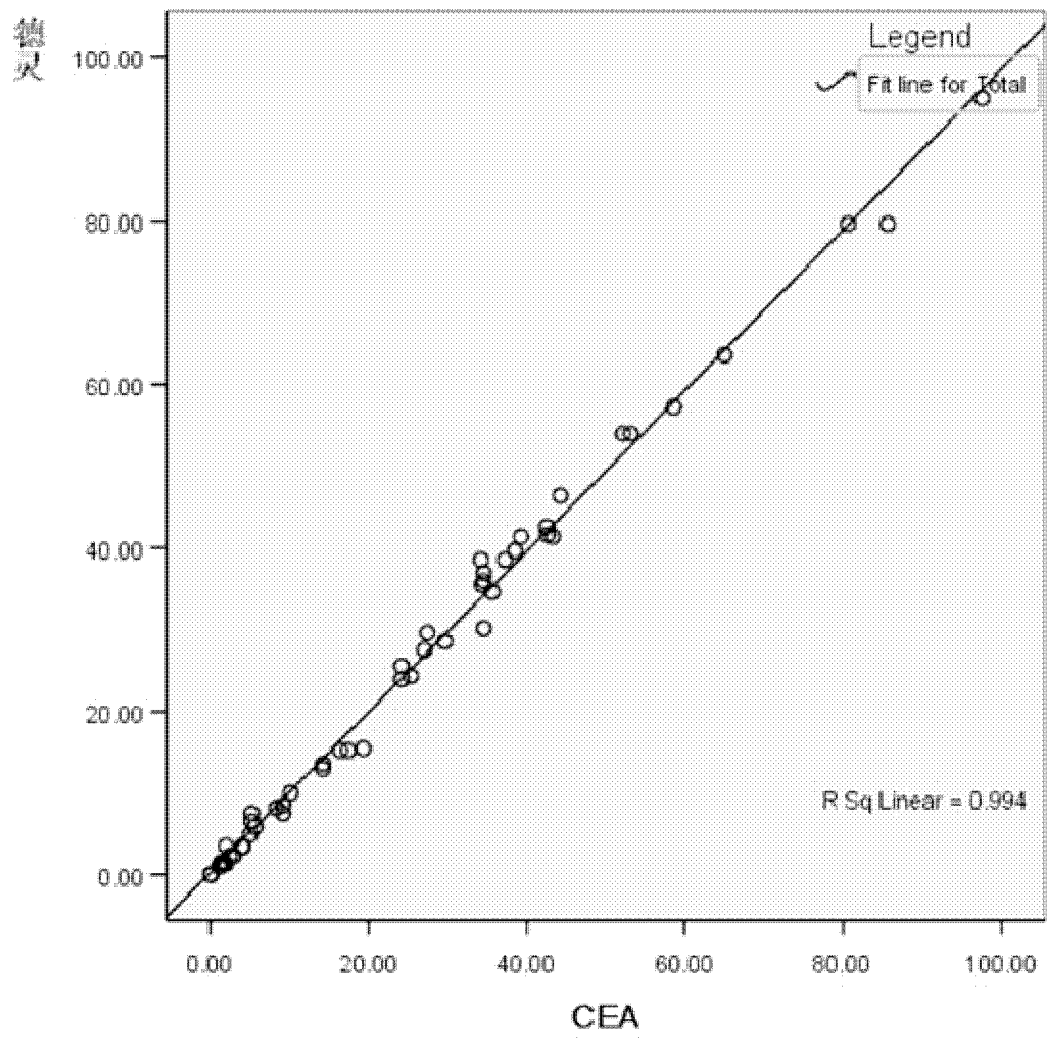


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/083129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574 (2006.01) i; G01N 33/558 (2006.01) i; G01N 33/543 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPODOC, WPI, CNKI, WANFANGDATA, DUXIU, PubMed, ISI Web of Knowledge, Google Scholar: BEIWODEKE, QIANHAI ANYCHECK, E-TECHCO GROUP, fluorescent latex, double antibody sandwich, mark line, detection line?, control line, co-detection, AFP, CEA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 204758606 U (SHENZHEN BEIWODEKE BIOTECHNOLOGY RES INST CO., LTD.) 11 November 2015 (11.11.2015) claims 1-6, description, paragraphs [0026]-[0037]	1-15
Y	CN 104316702 A (WANDFO BIOTECH CO., LTD.) 28 January 2015 (28.01.2015) claims 1-10, description, embodiments 1-4	1-15
Y	CN 101017168 A (WANG, Jihua et al.) 15 August 2007 (15.08.2007) description, embodiment 1	1-15
Y	CN 204142734 U (WANDFO BIOTECH CO., LTD.) 04 February 2015 (04.02.2015) claims 1, 3-6, description, embodiments 3, 4, 6, and 7	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 26 January 2016	Date of mailing of the international search report 18 February 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YANG, Jiaqian Telephone No. (86-10) 82245626

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2015/083129

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104502591 A (JIANGSU HONGTAIGEER BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD.) 08 April 2015 (08.04.2015) the whole document	1-15
A	CN 102692504 A (NANJING GETEIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 26 September 2012 (26.09.2012) the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/083129

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 204758606 U	11 November 2015	None	
CN 104316702 A	28 January 2015	None	
CN 101017168 A	15 August 2007	HK 1110114 A1	14 December 2012
		CN 101017168 B	29 August 2012
CN 204142734 U	04 February 2015	None	
CN 104502591 A	08 April 2015	None	
CN 102692504 A	26 September 2012	None	

A. 主题的分类 G01N 33/574(2006.01)i; G01N 33/558(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, EPODOC, WPI, CNKI, 万方数据资源系统, 读秀学术, PubMed, ISI Web of Knowledge, Google Scholar; 荧光胶乳, 双抗夹心, 标记线, 检测线, 质控线, 联检, 甲胎蛋白, 癌胚抗原, 贝沃德克, 前海安测, 易特科, fluorescent latex, double antibody sandwich, mark line, detection line?, control line, co-detection, AFP, CEA		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
E	CN 204758606 U (深圳市贝沃德克生物技术研究有限公司) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1-6, 说明书第26-37段	1-15
Y	CN 104316702 A (广州万孚生物技术股份有限公司) 2015年 1月 28日 (2015 - 01 - 28) 权利要求1-10, 说明书实施例1-4	1-15
Y	CN 101017168 A (王继华 等) 2007年 8月 15日 (2007 - 08 - 15) 说明书实施例1	1-15
Y	CN 204142734 U (广州万孚生物技术股份有限公司) 2015年 2月 4日 (2015 - 02 - 04) 权利要求1、3-6, 说明书实施例3、4、6、7	1-15
A	CN 104502591 A (江苏宏泰格尔生物医学工程有限公司) 2015年 4月 8日 (2015 - 04 - 08) 全文	1-15
A	CN 102692504 A (南京基蛋生物科技有限公司) 2012年 9月 26日 (2012 - 09 - 26) 全文	1-15
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2016年 1月 26日		国际检索报告邮寄日期 2016年 2月 18日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 杨佳倩 电话号码 (86-10)82245626

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/083129

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	204758606	U	2015年 11月 11日	无	
CN	104316702	A	2015年 1月 28日	无	
CN	101017168	A	2007年 8月 15日	HK 1110114 A1	2012年 12月 14日
				CN 101017168 B	2012年 8月 29日
CN	204142734	U	2015年 2月 4日	无	
CN	104502591	A	2015年 4月 8日	无	
CN	102692504	A	2012年 9月 26日	无	