



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308682 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310190916. 3

(22) 申请日 2013. 05. 22

(71) 申请人 苏州市马尔泰新材料有限公司
地址 215434 江苏省苏州市太仓市浮桥镇港
区北环路 19 号商务中心 730 室

(72) 发明人 朱进安

(74) 专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务
所(普通合伙) 31262
代理人 金重庆

(51) Int. Cl.
G01N 33/574 (2006. 01)

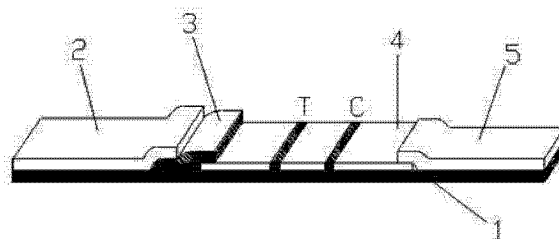
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速诊断唇癌的试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种诊断唇癌的试剂盒,包括底板、样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,所述的硝酸纤维膜层上含有牛血清白蛋白-唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 偶联物的测试线和抗鼠二抗的质控线,所述的金胶垫上含有胶体金与抗唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 抗体结合形成的金标抗唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 抗体复合物。本发明的试纸检测快速、灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便、无需任何仪器设备,而且结果判断直观可靠、易于掌握,同时也方便病人对病情自我监测。



1. 一种诊断唇癌的试剂盒,包括底板、样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,所述的底板上依次覆盖样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,其特征在于,所述的硝酸纤维膜层上含有牛血清白蛋白-唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 偶联物的测试线和抗鼠二抗的质控线,所述的金胶垫上含有胶体金与抗唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 抗体结合形成的金标抗唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 抗体复合物,所述的试剂盒的诊断样品是唾液,所述的试剂盒的检测阈值为唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 浓度 10-40ng/ml。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的金胶垫由玻璃纤维和固定其上的金标抗体组成,所述的样品垫为吸水性玻璃纤维层。

一种快速诊断唇癌的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,具体地说,是关于一种快速诊断唇癌的试剂盒。

背景技术

[0002] 唇癌是指发生于上下口唇的恶性肿瘤为口腔常见恶性肿瘤之一,在口腔癌中占第三位,占全身恶性肿瘤的 0.1%~0.5%,占口腔恶性肿瘤的 7.1%~15.0%,欧美国家唇癌患者较多,占口腔癌的 20%~30%。一般下唇比上唇易受累,约 90%~95%发生在下唇红缘部,而且以下唇的外 1/3 处为多见。男性患者居多,男女之比为 7:1。高发年龄为 50~70 岁。唇癌绝大多数为高分化之鳞状细胞癌,多在良性赘生物的病变基础上发生,其生长速度较慢,预后较好,一般 5 年生存率为 70%以上,本病的病因可能与局部长受异物刺激,强烈的紫外线照射有关。口唇上皮角化、白斑、疣赘、肉芽肿及裂口等长期不愈,亦可导致癌变。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术中的不足,提供一种诊断唇癌的试剂盒。

[0004] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案是:一种诊断唇癌的试剂盒,包括底板、样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,所述的底板上依次覆盖样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,所述的硝酸纤维膜层上含有牛血清白蛋白-唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 偶联物的测试线和抗鼠二抗的质控线,所述的金胶垫上含有胶体金与抗唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 抗体结合形成的金标抗唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 抗体复合物,所述的试剂盒的诊断样品是唾液,所述的试剂盒的检测阈值为唾液富含半胱氨酸分泌蛋白 1 浓度 10-40ng/ml。

[0005] 所述的金胶垫由玻璃纤维和固定其上的金标抗体组成,所述的样品垫为吸水性玻璃纤维层。

[0006] 本发明优点在于:提供了富含半胱氨酸分泌蛋白 1 的新用途,为唇癌的大规模人群筛查、唇癌术后病人的自我检测提供方便、可靠、无创、价廉的方法,指导唇癌的治疗;本发明的试纸检测快速、灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便、无需任何仪器设备,而且结果判断直观可靠、易于掌握,同时也方便病人对病情自我监测。

附图说明

[0007] 附图 1 是唇癌的 CRISP1 诊断试纸的结构示意图。

[0008] 附图 2 是唇癌的 CRISP1 诊断试纸的检测结果示意图。

[0009] 附图 3 是唇癌的 CRISP1 诊断试纸的检测过程示意图。

具体实施方式

[0010] 下面对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0011] 实施例 1

下面结合附图对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0012] 附图中涉及的附图标记和组成部分如下所示：

1. 底板
2. 样品垫
3. 金胶垫
4. 硝酸纤维膜层
5. 吸水纸层
6. 唾液
7. 层析方向

实施例 1 免疫组化

实验材料：正常唇组织、唇癌组织；一抗为羊抗人 CRISP1 抗体，二抗驴抗羊 DyLight594 抗体。

[0013] 实验方法：

组织芯片就是将大量组织样品有序地组合在一个微小基片表面，借助免疫组织化学的方法进行检测。

[0014] 1、将组织用 PFA 固定液固定 5 分钟，PBS 洗 10 分钟

2、抗原修复：用 0.01M 柠檬酸盐溶液暴露抗原决定簇。微波炉高火 3 分钟加热修复液至沸腾（4 分钟），再连续低火微波 1 分钟、两次。冷却至室温，PBS 洗 10 分钟。用 0.5% 的 Triton 破膜 10 分钟。

[0015] 3、封闭非特异性蛋白

- 1) PBS 浸泡 3 分钟 × 3 次
- 2) 3% H₂O₂- 甲醇（30% H₂O₂10ml+ 甲醇 90ml）室温浸泡 30 分钟
- 3) 自来水冲洗 10 分钟，PBS 浸泡 3 分钟 × 3 次，甩干或纸巾吸去多余液体（勿碰到组织），用组化笔在组织周围画上圈（蒸馏水冲洗时间内配好 10% 封闭血清）
- 4) 在圆圈内组织内迅速滴入 5% BSA（用 PBS 配制），封闭非特异性抗原（勿让组织干燥，应在纸巾吸掉水后立即加入），室温 30 分钟（配好一抗），扣掉封闭液，不洗。

[0016] 4、一抗孵育

甩去切片上的 BSA，用滤纸擦干组织周围残留 BSA，直接加入已稀释的羊抗人 CRISP1 抗体（约 60 μl），放入湿盒中 4℃ 过夜。第二天从冰箱中取出需 37℃ 复温 30 min。

[0017] 5、二抗孵育

1) 将一抗洗掉，将玻片插入塑料玻片架，然后整个放入塑料盒中，加 PBS 浸泡放于微型振荡器上洗 10 分钟。

[0018] 2) 用滤纸将圆圈周围的水吸去，加入二抗驴抗羊 DyLight594 抗体，室温 30 分钟。

[0019] 3) 加 PBS 浸泡放于微型振荡器上洗 10 分钟。

[0020] 6、封片

纸巾吸除多余液体，在玻片上滴管滴加 DAPI 封片液一滴，然后盖上盖玻片，用镊子轻轻挤压，并赶走气泡，室温放置 1 小时。观察。

[0021] 实验结果，组织芯片免疫组化染色显示 CRISP1 分泌蛋白在 30 个唇癌组织的 23 个中呈明显阳性，而在正常组织中为阴性。

[0022] 实施例 2 酶联免疫吸附实验 (Elisa)

总体共 90 例，其中唇癌（鳞状细胞癌）病例组 30 例；口腔其他疾病（牙周病，牙髓病，口

腔念珠菌病)组 30 例;健康对照人群 30 例。采用富含半胱氨酸分泌蛋白检测试剂盒检测,检测步骤参照富含半胱氨酸分泌蛋白定量酶联检测试剂盒使用说明书。

[0023] CRISP1 的 ELISA 检测结果:

1. 唇癌组高于其它两组,而其他疾病组与健康人群组无差异(P=0.802)。

[0024] 表 1 唾液 CRISP1 诊断唇癌的诊断价值

诊断指标	AUC	灵敏度	特异度	假阳性率	假阴性率	Youden 指数
UrineCRISP110ng/ml	0.825	86.2%	37.4%	58.7%	13.9%	0.236
UrineCRISP140ng/ml	0.825	72.7%	85.2%	12.7%	27.6%	0.579

(说明:AUC:ROC 曲线(受试者工作特征曲线,)下面积;AUC 越接近于 1,说明诊断效果越好;AUC 在 0.5~0.7 时有较低准确性,AUC 在 0.7~0.9 时有一定准确性,AUC 在 0.9 以上时有较高准确性。Youden 指数:约登指数=灵敏度+特异度-1;Youden 指数达到最大所对应的值为最佳诊断界值。)

唾液 CRISP1 对唇癌的诊断价值高,其 AUC 达 0.825。以 CRISP1 10ng/ml 为诊断阈值,其对唇癌的诊断灵敏度为 86.2%,特异度为 37.4%,假阳性率为 58.7%,假阴性率为 13.9%;以 CRISP1 40 ng/ml 为诊断阈值,其灵敏度为 72.7%,特异度为 85.2%,假阳性率为 12.7%,假阴性率为 27.6%。唾液 CRISP1 浓度 40 ng/ml 为最佳诊断界值;唾液 CRISP1 浓度 10 ng/ml 可用于筛检目的。

[0025] 实施例 3 制备试纸的金标抗体复合物

一、胶体金制备

将 100ml 0.005%-0.02% 的氯金酸溶液加入圆底烧瓶中加热至沸腾,沸腾后在剧烈搅拌下迅速准确地加入新鲜配制的 0.4%-2% 的柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)水溶液 1-2.2ml,煮沸 10-25 分钟后,继续搅拌冷却至室温。此过程中可以看到溶液的颜色变化是:金黄色→黑色→紫色→深蓝→鲜红色,当溶液的颜色完全变为透明的鲜红色时,即制得所需的胶体金。冷却后装入透析袋中对超纯水(1:5000)透析三次,最后将透析好的胶体金转移到干净的带旋盖的玻璃瓶中,在 4℃ 避光的环境下保存。

[0026] 二、金胶体与蛋白的连接

1、胶体金对蛋白的吸附主要取决于 pH 值,在接近蛋白质的等电点或偏碱的条件下,二者容易形成牢固的结合物。如果胶体金的 pH 值低于蛋白质的等电点时,则会聚集而失去结合能力。

[0027] 2、待标记蛋白溶液的制备:将待标记蛋白预先在 0.003 mol/l-0.01 mol/l pH5.5-7.8 NaCl 溶液中 4℃ 透析过夜,以除去多余的盐离子。然后 100000 转 4℃ 离心 1h,去除聚合物。

[0028] 3、待标胶体金溶液的准备:以 0.05 mol/l-0.3 mol/l K_2CO_3 调胶体金液的 pH 值为 7.5-10.0。由于胶体金溶液可能损坏 pH 计的电板,因此,在调节 pH 时,采用精密 pH 试纸测定为宜。

[0029] 4、胶体金与标记蛋白用量之比的确定:根据待标记蛋白的要求,将胶体金调好 pH 之后,分装 10 管,每管 1ml。将标记蛋白以 0.005mol/l pH9.0 硼酸盐缓冲液做系列稀释为 5μg/ml ~ 50μg/ml,分别取 1ml,加入上述金胶溶液中,混匀。对照管只加 1ml 稀释液。

5min后,在上述各管中加入0.1ml 10% NaCl溶液,混匀后静置2h,观察结果。对照管(未加蛋白质)和加入蛋白质的量不足以稳定胶体金的各管,均呈现出由红变蓝的聚沉现象;而加入蛋白量达到或超过最低稳定量的各管仍保持红色不变。稳定1ml胶体金溶液红色不变的最低蛋白质用量,即为标记该蛋白质的最低用量,在实际工作中,可适当增加10%~20%。

[0030] 5、胶体金与抗CRISP1单抗的结合:将胶体金溶液以0.05 mol/l-0.3 mol/l K_2CO_3 调pH至7.5-10.0,加入透析好的抗CRISP1单抗溶液,漩涡混合器混匀,反应10min后,加入稳定剂以防止胶体金聚合发生沉淀。常用稳定剂是5%胎牛血清(BSA)和1%聚乙二醇(分子量20KD)。加入的量:5% BSA使溶液终浓度为1%;1%聚乙二醇加至总溶液的1/10。

[0031] 6、胶体金标记蛋白的纯化:制备好的胶体金标记抗体复合物在900rpm/min离心15min,仔细吸出上清,沉淀物用含5%的蔗糖和0.05% Tween-20的0.002M硼酸盐缓冲溶液复溶。离心洗涤两次,最后将复合物浓缩至原体积的1/10,4℃保存。

[0032] 实施例4 制备快速诊断唇癌的CRISP1试纸

请参照附图1,附图1是唇癌的CRISP1诊断试纸的结构示意图。该试纸设有底板1,底板上依次覆盖样品垫2、金胶垫3、硝酸纤维膜层4和吸水纸层5。所述底板1是PVC底板,样品垫2的材料是吸唾液玻璃纤维。金胶垫3的制作:将实施例3所制备得到的金标抗体溶液喷点在1cm宽的玻璃纤维膜上,点样量约为2ul/cm,37℃干燥。硝酸纤维膜层4的制作:将二抗喷点在硝酸纤维膜(NC膜)上,作为质控线(C线)。将抗CRISP1多克隆抗体喷点在距离质控线1cm处作为测试线(T线),点样量约为1ul/cm。所述的测试线(T线)的检测阈值为10-40 ng/ml。37℃干燥。将上述的样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层、吸水纸层依次组装在底板上,切成4mm宽的试纸条,装入检测卡中。

[0033] 实施例5 快速诊断唇癌的CRISP1试纸的检测

请参照附图2,附图2是唇癌的CRISP1诊断试纸的检测结果示意图。

[0034] 一、试纸检测方法:

- 1、取50ul的待测样本(唾液)加在试纸条的加样区S处;
- 2、在10min后记观察记录检测结果。20min后观察的结果无效。

[0035] 二、检测结果的判断:

1、阳性结果:请参照附图2A,在试纸条的测试线T线和质控线C线位置上各出现一条紫红色条带。

[0036] 2、阴性结果:请参照附图2B,仅在试纸条的质控线C线上出现一条紫红色条带。

[0037] 3、无效结果:请参照附图2C,在试纸条的质控线C线上未出现紫红色条带。

[0038] 三、检测原理

请参照附图3,附图3是唇癌的CRISP1诊断试纸的检测过程示意图。如图所示,几滴唾液6滴在样品垫2上,因层析作用,液体沿层析方向7向吸水纸层5方向流动,当流经金胶垫3时,金标抗体便会被溶解,并与唾液中的CRISP1结合,形成金标复合物,随液体继续前移,在流经T线(检测线)时,复合物与T线上的抗CRISP1多克隆抗体结合而凝聚显色,流经C线(质控线)时,复合物与二抗结合而凝聚显色,如C线不显色则表明检测无效。若T线显色则表明病人唾液中CRISP1含量大于或等于10-40ng/ml,为阳性,表示有患唇癌的可能,若T线不显色则表明病人唾液中CRISP1含量正常。

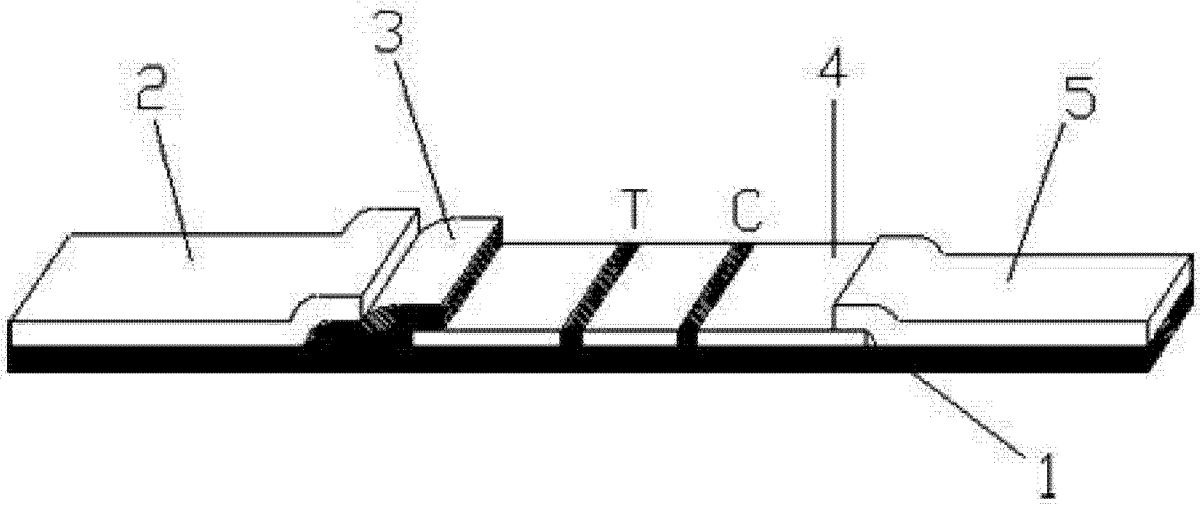


图 1

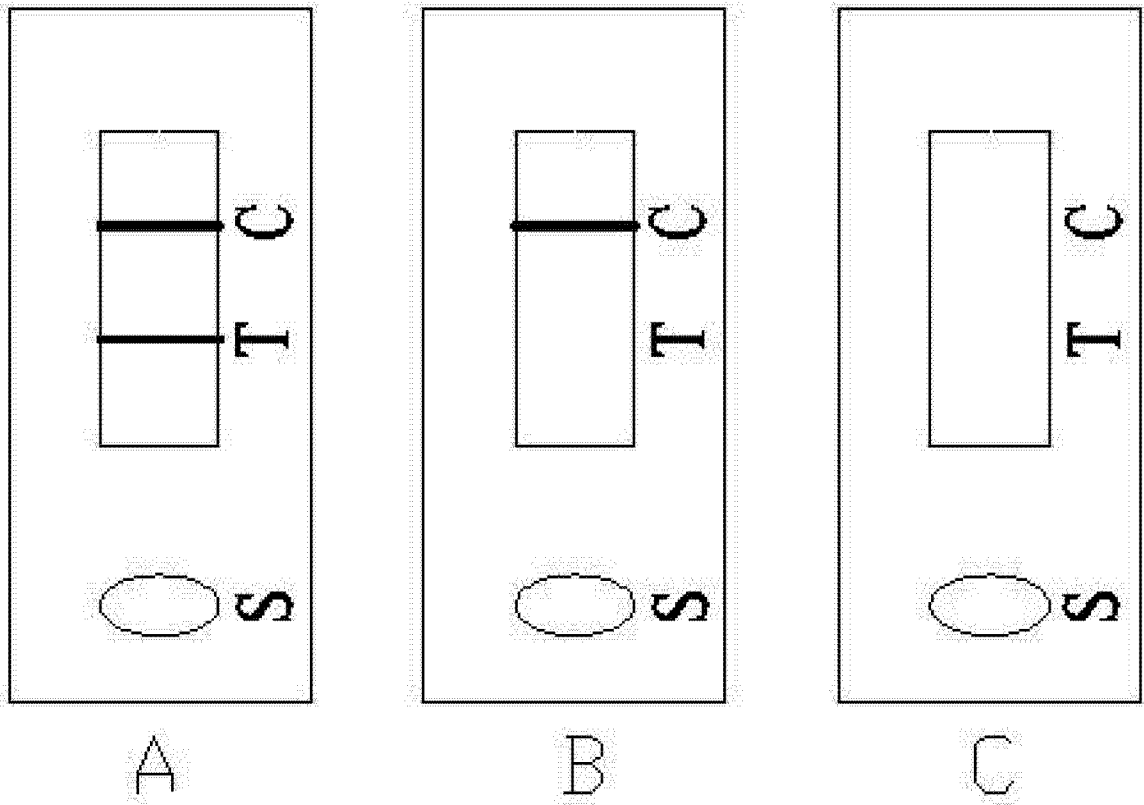


图 2

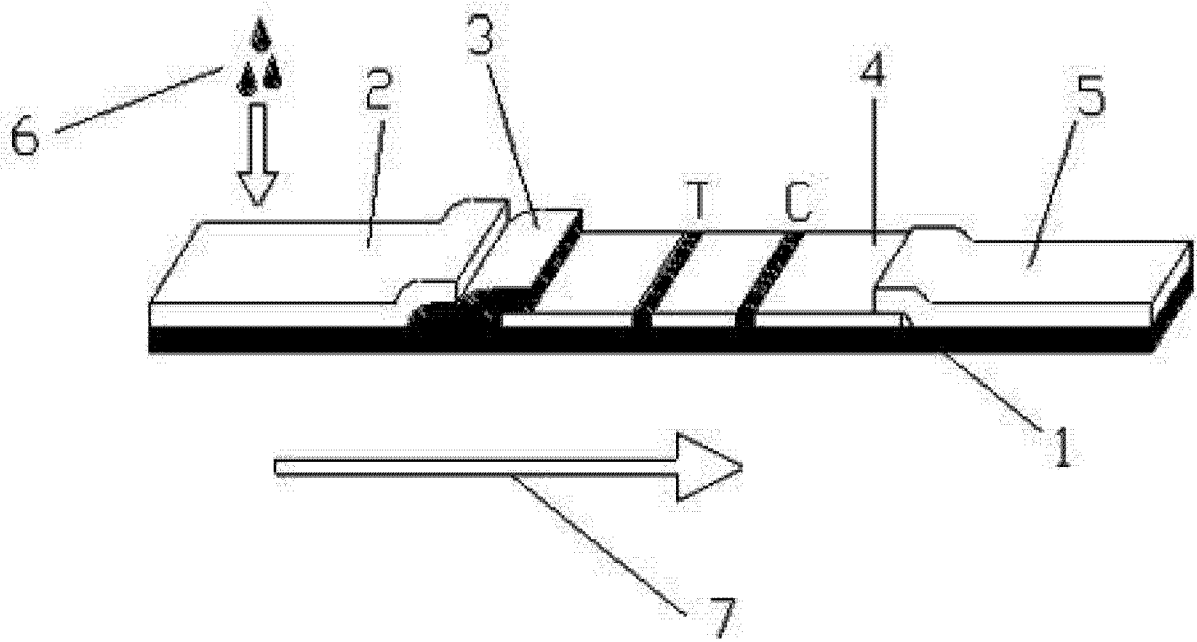


图 3