



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109444421 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811385132.5

(22)申请日 2018.11.20

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

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 支开旗 李玉林 王继创
张怡青

(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 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

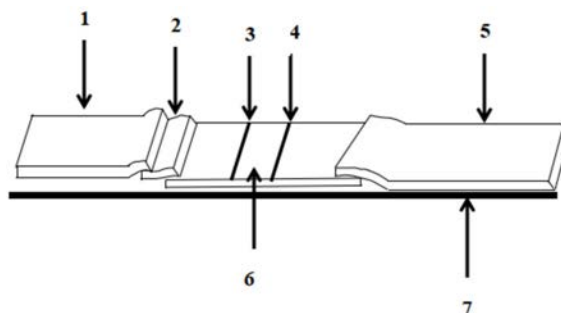
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种NSE检测试纸条的制备方法、试纸条、检测卡及NSE检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及免疫层析技术领域,具体涉及一种NSE检测试纸条的制备方法以及按照该方法制备得到的试纸条、检测卡和NSE检测试剂盒。该NSE检测试纸条的制备方法,包括如下步骤:将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接设置在所述底板上,其中,所述结合垫上固定有NSE抗体-荧光微球复合物,所述硝酸纤维素膜上设有检测线T线和质控线C线,所述C线设置在靠近所述吸水垫的一端;所述T线处包被有抗NSE单克隆抗体,所述C线处包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体。该NSE检测试纸条用于检测NSE检测速度快,无需依赖大型医疗设备。



1. 一种NSE检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接设置在所述底板上,其中,所述结合垫上固定有NSE抗体-荧光微球复合物,所述硝酸纤维素膜上设有检测线T线和质控线C线,所述C线设置在靠近所述吸水垫的一端;所述T线处包被有抗NSE单克隆抗体,所述C线处包被有羊抗鼠IGg多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的NSE检测试纸条的制备方法,其特征在于,将所述样品垫搭接在所述结合垫上靠近所述样品垫的一端的上方,所述结合垫的另一端和吸水垫上靠近所述硝酸纤维素膜的一端分别搭接在所述硝酸纤维素膜的两端的上方。

3. 根据权利要求1所述的NSE检测试纸条的制备方法,其特征在于,在所述结合垫上固定NSE抗体-荧光微球的步骤如下:(1)将玻璃纤维构件置于处理液中进行浸泡处理,干燥;制备NSE抗体-荧光微球复合物;(2)将步骤(1)制备得到的NSE抗体-荧光微球复合物喷涂于经处理液浸泡、干燥后得到的玻璃纤维件上,干燥,即得所述结合垫。

4. 根据权利要求3所述的NSE检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述处理液主要由Tris-HCl、BSA、Triton X-100和海藻糖配制而成。

5. 根据权利要求3所述的NSE检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述NSE抗体-荧光微球的制备方法如下:将Eu-羧基荧光微球加入PH=7.6的硼酸缓冲液中,混匀;加入EDC活化剂和NHS溶液,于恒温振荡器上振荡活化;离心,弃上清;加硼酸缓冲液,涡旋混匀,加入NSE抗体;涡旋混匀,放入摇床低速振荡偶联;离心,弃上清;加入复溶液复溶,再用封闭液封闭。

6. 根据权利要求5所述的NSE检测试纸条,其特征在于,所述复溶液主要由Tris-HCl、PVP K30、BSA、海藻糖、Triton X-100和 NaN_3 配制而成。

7. 试纸条,所述试纸条采用权利要求1-6中任意一项所述的NSE检测试纸条的制备方法制得。

8. 根据权利要求7所述的试纸条,其特征在于,所述样品垫采用滤血膜制成。

9. 一种检测卡,包括外壳,其特征在于,所述外壳内设有如权利要求7或8所述的试纸条,所述外壳上对应所述样品垫的位置处设有加样孔、对应所述硝酸纤维素膜的位置处设有观察窗。

10. 一种NSE检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒内设有试纸条或检测卡以及一次性采血针、消毒装置、样品收集瓶、紫外灯、荧光免疫层析读数仪和样品稀释液中的任意一种或几种。

一种NSE检测试纸条的制备方法、试纸条、检测卡及NSE检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫层析检测技术领域,具体涉及一种NSE检测试纸条的制备方法、试纸条、检测卡及NSE检测试剂盒。

背景技术

[0002] 小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是肺癌的一种特殊类型,属于恶性程度极高的神经内分泌肿瘤,小细胞肺癌具有倍增时间短、增殖指数高和早期扩散等特点。小细胞肺癌生长迅速,易出现在大气道,刺激支气管黏膜,阻塞气道,临床症状以刺激性干咳最多见,首发症状包括咳嗽、咳痰、发热、胸闷、气短、胸痛及肺外症状。中心型肺癌出现呼吸道症状和体征较周围型早且明显,周围型肺癌除累及纵隔、胸膜或胸壁时出现胸痛外,一般早期无明显临床症状。当前的检测手段有肿瘤VIP受体显像、胸部普通X线检查、核磁共振成像 (MRI)、正电子发射计算机断层扫描 (PET) 等大型且在大型医院应用的设备仪器,价格昂贵,无法下沉到基层社区进行有效的检测,而当前市场上检测试剂以胶体金和ELISA等方法为主,而成本较高,对仪器设备有特殊要求,操作繁琐,不便于床旁检测。因此,迫切需要建立一种适合基层对小细胞肺癌的快速检测试剂。

[0003] 目前许多医院检测NSE小细胞肺癌标志物主要采用大型生化仪,其优点主要是测量精确,但存在测量时间慢;用量多;操作复杂,只有受过专业培训的人才能操作;机器价格昂贵,只有部分医院才有配备,使其应用受到限制。近年来,POCT检测技术发展迅速,成为一项新型检验技术。其中荧光免疫层析技术以其独特的性能正在为临床实验室所接受,与传统方法相比,它具有操作简单、速度快、污染少、结果稳定准确;可以采用微创末梢(手指、耳垂)采血,减少抽血量;还可能缩短病人住院时间,节省住院费用等诸多优点。

[0004] 时间分辨荧光免疫分析法是一种新型的检测手段,利用稀土离子作为示踪物标记蛋白质、多肽、激素、抗体、核酸探针或生物活性细胞,与其螯合剂、增强液在待反应体系(如:抗原抗体免疫反应、生物素亲和素反应、核酸探针杂交反应、靶细胞与效应细胞的杀伤反应等)发生特异性亲和反应后,用时间分辨荧光分析仪测定最后产物中的荧光强度,根据荧光强度和相对荧光强度比值,推测反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。相较于其他免疫检测技术,可极大地提高灵敏度,并获得较为宽阔的线性范围,实现现场快速定量检测,成为目前国内外研究的新热点。而针对NSE,利用时间分辨荧光免疫分析法对其进行定量检测的相关技术和检测工具尚未见报道。

发明内容

[0005] 本发明提供一种NSE检测试纸条的制备方法、以及根据该NSE检测试纸条的制备方法制得的试纸条、检测卡和试剂盒,以更高效、便捷的实现对NSE的检测。

[0006] 本发明的NSE检测试纸条的制备方法采用如下技术方案:一种NSE检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接设

置在所述底板上,其中,所述结合垫上固定有NSE抗体-荧光微球复合物,所述硝酸纤维素膜上设有检测线T线和质控线C线,所述C线设置在靠近所述吸水垫的一端;所述T线处包被有抗NSE单克隆抗体,所述C线处包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体。为了使按照本发明的方法制备得到的试纸条的效果更好,所述抗NSE单克隆抗体的浓度大于0.5mg/ml,最优选1mg/ml;所述羊抗鼠IgG多克隆抗体的浓度为优选0.5-2mg/ml,最优选1mg/ml。

[0007] 优选的,将所述样品垫搭接在所述结合垫上靠近所述样品垫的一端的上方,所述结合垫的另一端和吸水垫上靠近所述硝酸纤维素膜的一端分别搭接在所述硝酸纤维素膜的两端的上方。样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫之间交叠位置处的上下顺序会影响免疫层析的时间,采用使结合垫的右端和吸水垫的左端分别交叠压在所述硝酸纤维素膜的两端上方,所述样品垫交叠压在所述结合垫的左端的上方的顺序,可起到在不影响检测结果的情况下,减少层析时间,即样品检测所需时间的作用。

[0008] 优选的,先将硝酸纤维素膜粘贴在底板上,再在硝酸纤维素膜上包被抗NSE单克隆抗体(T线)和羊抗鼠IgG多克隆抗体(C线),以防止在硝酸纤维素膜上包被T线和C线时造成硝酸纤维素膜的破裂。

[0009] 优选的,在所述结合垫上固定NSE抗体-荧光微球的步骤如下:(1)将玻璃纤维构件置于处理液中进行浸泡处理,干燥;制备NSE抗体-荧光微球复合物;(3)将步骤(1)制备得到的NSE抗体-荧光微球复合物喷涂于经处理液处理、干燥后得到的玻璃纤维件上,干燥,即得所述结合垫。

[0010] 优选的,所述处理液主要由Tris-HCL、BSA、Triton X-100和海藻糖配制而成,处理液可起到使NSE-荧光微球复合物更好的固定在玻璃纤维构件的作用,还可起到一定的维持NSE-荧光微球复合物的分子空间构象的作用。优选采用0.02M Tris-HCL、0.05%BSA(质量分数)、0.1%Triton X-100(质量分数)和3%海藻糖(质量分数)的混合溶液;其中,上述任一组分的浓度为混合后的终浓度。

[0011] 优选的,所述NSE抗体-荧光微球的制备方法如下:将Eu-羧基荧光微球加入缓冲液中,混匀;加入EDC活化剂和NHS溶液,于恒温振荡器上振荡活化;离心,弃上清;加缓冲液,涡旋混匀,加入NSE抗体;涡旋混匀,放入摇床低速振荡偶联;离心,弃上清;加入复溶液复溶,再用封闭液封闭。所述EDC活化剂、NHS溶液和NSE抗体的用量比为4:1:4,所述Eu-羧基荧光微球的粒径为100nm-400nm,优选200nm;所述EDC、NHS与Eu-羧基荧光微球活化的时间为20-40min,优选30min;所述Eu-羧基荧光微球与NSE抗体偶联的时间为1-3h,优选2h;所述封闭液封闭的时间为20-60min,优选30min;所述缓冲液可选自MES、PBS或硼酸缓冲液,优选pH=7.6的硼酸缓冲液。由于Eu-羧基荧光微球的粒径较大(>100nm),因此需要将微球打散,避免微球黏连在一起,无法进行偶联,造成检测结果不准确。本发明通过在恒温振荡器上对微球进行充分活化,再与NSE抗体在低速震荡的条件下偶联,有助于提高NSE抗体与荧光微球复合物偶联的效率。

[0012] 优选的,所述复溶液主要由Tris-HCl、PVP K30、BSA、海藻糖、Triton X-100和Na₃配制而成,以主要由0.05M PH 8.0Tris-HCl(终浓度)、0.1%PVP K30(质量分数,终浓度)、0.5%BSA(质量分数,终浓度)、3%海藻糖(质量分数,终浓度)、1%Triton X-100(质量分数,终浓度)和0.05%Na₃(质量分数,终浓度)组成的复溶液效果最佳。所述复溶液可起到维持NSE抗体-Eu羧基荧光微球复合物的空间构象的作用,与试纸条的有效期有关。采用本

发明的复溶液制备得到的结合垫可更长时间的保存,保证试纸条检测结果的准确性。

[0013] 优选的,所述封闭液选自BSA溶液、酪蛋白、乙醇胺、Tris或脱脂奶粉等,所述封闭液优选10%~20%的BSA溶液,恰当浓度的BSA溶液可起到使所述NSE抗体-荧光微球复合物上仅留一个与硝酸纤维素膜上的T线或C线结合的位点,提高检测结果的准确性的作用。封闭液的浓度与样品和NSE抗体-荧光微球复合物结合率直接相关,进而影响检测效果。过大的封闭液浓度造成样品与NSE抗体-荧光微球复合物结合率降低。

[0014] 试纸条,按照本发明的任意一种NSE检测试纸条的制备方法制得。

[0015] 优选的,所述试纸条的样品垫采用滤血膜制成,滤血膜可有效分离并阻止血液中红细胞前进,在检测过程中省去血液离心的麻烦,可直接使用指尖血或新鲜血液进行检测,使本发明的试纸条在使用时更加方便简捷,节省检测时间,提高检测效率。

[0016] 一种检测卡,包括外壳和如上所述的试纸条,所述试纸条设置在所述外壳内,所述外壳上对应所述样品垫的位置处设有加样孔、对应所述硝酸纤维素膜的位置处设有观察窗。所述外壳可以为长方形塑料卡壳,包括上壳和下壳,上壳和下壳可扣合在一起,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。

[0017] 一种NSE检测试剂盒,所述试剂盒内设有试纸条或检测卡以及一次性采血针、消毒装置、样品收集瓶、紫外灯、荧光免疫层析读数仪和样品稀释液中的任意一种或几种。所述试纸条或检测卡、一次性采血针、消毒装置、样品收集瓶、紫外灯、荧光免疫层析读数仪和样品稀释液分别密封包装,所述消毒装置为碘酒和棉签,也可为医用酒精等其他常用消毒装置。优选的,还可在所述检测试剂盒内设有液体定量仪器,便于移液;所述样品稀释液可选用生理盐水或主要由PBS缓冲液、Tween-20、BSA和NaN₃或Tris-HCl配制而成的混合溶液或行业内常用的其他血液样品稀释液,当样品稀释液采用由PBS缓冲液、Tween-20、BSA和NaN₃或Tris-HCl配制而成的混合溶液时有助于提高荧光值,起到延长试剂有效期的作用。例如样品稀释液可采用主要由0.05M PBS缓冲液、0.1% Tween-20(质量分数)、0.1% BSA(质量分数)和0.05% NaN₃(质量分数)组成的混合溶液或主要由0.02M PBS缓冲液、0.1% BSA(质量分数)、20mmol Tris-HCl和0.1% Tween-20(质量分数)组成的混合溶液,上述任意一种组分的浓度均为终浓度。

[0018] 本发明的有益效果是:本发明的试纸条/检测卡/检测试剂盒在紫外灯下或免疫荧光层析读数仪中就可以直接观察到检测结果,并结合本发明提供的结果判读方法,实现对NSE的定性/定量检测,同时本发明试剂盒套装可避免杂荧光信号的干扰,提高检测的灵敏度;本发明高效集成,可统一有序地实现快速家庭小细胞肺癌标志物检验的目的,快速进行疾病的早期诊断及鉴别诊断;本发明的检测时间大为缩短,仅需5分钟即可实现采样,检测到结果判读,满足“在最短的时间内得到准确检验结果”要求,可为早期治疗提供依据;本发明应用范围广,所得试剂盒套装可应用于社区基层医院、社区保健、幼儿园、学校、厂矿、社区的小诊所或私人医师诊所、战地急救、或在救护车上以及家庭在内使用,无需特殊仪器的任何地点下检测,可以省去诸多标本预处理、样本送检、繁琐的设备检测、数据处理以及传输流程等步骤,避免长时间的等待,满足相对简陋、恶劣和应急情况下的医疗需求,直接快速的得到可靠的结果;本发明检测操作简便,所述NSE检测试剂盒对检测人员无特殊要求,非专业检验师、非医学专业人员,甚至是被检测对象本人,均可按照说明书进行操作及时检

测,减少分析前的环节,不会将标本弄错;直接面对病人,及时了解病情,有利于对检验结果做出正确的判断和解释;本发明微创检测,即采用末梢(手指、耳垂)采血,减少抽血量,仅需1滴全血样本,即可完成对血样的超敏NSE检测,最低检测限为0.125ng/mL,避免病人因抽血造成的痛苦可能。

[0019] 本发明的NSE检测试纸条/检测卡经加速破坏21天仍可保持良好的精密性,可长时间保存而不影响检测结果的准确性。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0021] 图1为本发明的NSE检测试纸条的一种具体实施方式的结构示意图;

[0022] 图2为本发明的检测卡的一种具体实施方式的结构示意图;

[0023] 图3为本发明实施例一制得的NSE检测试纸条/检测卡的标准曲线图;

[0024] 图4为实施例二制得的NSE检测试纸条/检测卡的标准曲线图;

[0025] 图5为本发明实施例一制得的NSE检测试纸条/检测卡在紫外灯照射下的检测效果图;

[0026] 图6为本发明实施例一制得的NSE检测试纸条/检测卡的有效期验证标准曲线图;

[0027] 图中:1.样品垫,2.结合垫,3.T线,4.C线,5.吸水垫,6.硝酸纤维素膜,7.底板,8.外壳,9.加样孔,10.观察窗。

具体实施方式

[0028] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例一:制备NSE检测试纸条、检测卡和试剂盒套装

[0030] 1.1制备结合垫:(1)制备NSE抗体-荧光微球复合物:取10 μ L Eu-羧基荧光微球(悬浊液、粒径200nm,浓度112 μ eq/g)加入400 μ L 0.05M PH=7.6的硼酸缓冲液,混匀;加入40 μ L 1mg/ml的EDC活化剂及10 μ L 1mg/ml NHS溶液,于恒温振荡器上振荡活化20min;然后于5000rpm下离心20min,弃上清,加入500 μ L 0.05M pH=7.6硼酸缓冲液复溶沉淀,漩涡混匀,加入40 μ gNSE抗体,漩涡混匀,放入摇床低速振荡偶联2h;于15000rpm下离心15min,弃上清,加入1500 μ L复溶液复溶,再用10 μ L封闭液(20%BSA)封闭30min,所述复溶液为主要由0.05M pH 8.0Tris-HCl、0.1%PVP K30(质量分数)、0.5%BSA(质量分数)、3%海藻糖(质量分数)、1%Triton X-100(质量分数)、0.05%NaN₃(质量分数,上述任一组分的浓度均为终浓度)组成的混合物。

[0031] (2)玻璃纤维构件预处理:将玻璃纤维构件裁成30mm*7mm宽大小,按照每4cm加150 μ L处理液进行浸泡处理,捞出后置于电热鼓风干燥箱中干燥2h。其中处理液为主要由0.02M

Tris-HCL、0.05%BSA(质量分数)、0.1%Triton X-100(质量分数)和3%海藻糖(质量分数)组成的混合溶液(上述任一组分的浓度均为终浓度)。

[0032] (3) 将NSE抗体-荧光微球复合物固定在经预处理的玻璃纤维构件上:采用三维点膜喷金仪将制备的NSE抗体-荧光微球复合物,按照每4cm加150 μ L的比例均匀喷涂于处理好的玻璃纤维构件上,置于干燥间,于温度37 $^{\circ}$ C、湿度10%下干燥2h,制备成结合垫。

[0033] 1.2对硝酸纤维素膜的处理:

[0034] (1) 在硝酸纤维素薄膜上包被抗NSE单克隆抗体:采用0.05M PBS将抗NSE单克隆抗体稀释至1mg/ml标记;将硝酸纤维素膜粘贴在底板(PVC板)的中间位置,设置三维点膜喷金仪在硝酸纤维素膜上从靠近结合垫2的一侧起以1 μ l/cm速度包被1mg/ml抗NSE单克隆抗体,作为检测线T线。

[0035] (2) 在硝酸纤维素膜上包被羊抗鼠IgG多克隆抗体:设置三维点膜喷金仪在硝酸纤维素膜上C线与硝酸纤维素膜右端之间的位置处以1 μ l/cm速度包被1mg/ml羊抗鼠IgG多克隆抗体,作为质控线C线。

[0036] (3) 将硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C的环境中干燥2h。

[0037] 1.3将样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜6和吸水垫5依次搭接组装在底板(PVC板)7上,其中,吸水垫5和结合垫2分别交叠压在硝酸纤维素膜6的两端,并在硝酸纤维素膜6的表面形成检测区;样品垫1交叠压在结合垫2上,组装后得到试纸大板,切割成宽3.9mm的条状,制成NSE检测试纸条。

[0038] 2.检测卡的制备:将制备好的试纸条装入外壳8中,外壳8为具有塑料上壳和塑料下壳的长方形卡壳,放入加有干燥剂的铝箔袋中,制备成检测小细胞肺癌标志物NSE的检测卡;其中,上壳面上对应于硝酸纤维素膜6的位置设有观察窗10,上壳面上对应于样品垫1的位置设有加样孔9,加样孔9位于样品垫1中间。

[0039] 3.制备检测试剂盒:将检测卡或试纸条(密封包装)、单独包装的样品稀释液(生理盐水或主要由去离子水、0.05M PBS缓冲液、0.1%Tween-20(质量分数)、0.1%BSA(质量分数)和0.05%NaN₃(质量分数)组成的混合溶液,上述组分的浓度均为终浓度)、分别无菌包装的一次性采血针、样品收集瓶、消毒装置、荧光免疫层析读数仪或紫外灯中的任意一种或多种放置于同一容器内,制成检测试剂盒。消毒装置可以为碘伏、棉签,也可采用本领域常用的其他消毒方法:如酒精消毒等。

[0040] 4.检测方法:对采血处用棉签蘸取碘伏消毒后,用一次性采血针采血得到检测样品(一滴),向样品中加入3ml样品稀释液稀释,混匀,取65 μ L加到样品垫上即可。采血时优选从手指无名指处采集。

[0041] 5.检测结果判读:

[0042] (1) 定量检测:向样品垫加样5min后,将检测卡或者试纸条置于荧光免疫层析读数仪的反应区,从读数窗T线的数值,即可得出样品中NSE的浓度(预先对免疫荧光层析读数仪进行设置,将本试纸条检测的标准曲线和换算公式输入荧光免疫层析读数仪)。

[0043] (2) 定性检测:向样品垫加样5min后,将检测卡或者试纸条置于紫外灯下,若C线和T线处荧光亮度相当,表示测定样品中NSE含量高于16ng/mL,提示阳性(+),可能存在患病风险;若C线有荧光而T线无荧光,判定结果为阴性或低于检测限;若C线无荧光亮度出现,T线有或无荧光亮度,判定试纸条或检测卡结果无效。

[0044] 6. 本发明的试纸条/检测卡的标准曲线:

[0045] (1) 样品的获得: 血液样品由医院提供并进行质控定值, 在此基础上, 由生理盐水进行梯度稀释, 设置赋值单位为: 0, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500; 0.39赋值单位对应的NSE浓度真实值是0.125ng/ml, 其余赋值单位以此类推)。

[0046] (2) 采用本发明的试纸条/检测卡对样品进行检测, 并根据检测结果绘制标准曲线:

[0047] 对血清样品设置的每个赋值单位均检测10次, 得出平均值, 以赋值单位(血清浓度)为横坐标, 以T/C为纵坐标, 绘制标准曲线。数据如下表1:

[0048] 表1

[0049]

赋值单位(血清浓度)	C	T	T/C
0	13445	0	0
0.39	11161	64	0.005734
0.78	12406	110	0.008867
1.56	12206	237	0.019417
3.125	11416	455	0.039856
6.25	11014	872	0.079172
12.5	11671	2265	0.194071
25	10807	6162	0.570186
50	5798	4357	0.751466
100	4398	5486	1.247385
200	1628	4796	2.945946
300	2400	9700	4.041667
400	1732	5285	3.051386
500	2185	14790	6.768879

[0050] 绘制标准曲线(如图3所示), 得到标准曲线方程 $y=0.0135x+0.0369$, $R^2=0.9978$ 。本发明的检测NSE的试纸条/检测卡的线性范围为0.39-500(0.125-320ng/mL), $R>0.99$, 线性范围宽。

[0051] 实施例二、对照实验

[0052] 1. 其余条件不变, 将复溶液替换为0.01M Tris-HCl PH=8.0、0.1% Tween-20、1% BSA、0.1% PVP、0.05% PEG-200、0.5% 甘氨酸和3% 海藻糖溶液(上述各组分的浓度均为终浓度);

[0053] 处理液替换为: 0.01M Tris-HCl PH=8.0、0.1% T-20、0.1% BSA和5% 蔗糖(上述各组分的浓度均为终浓度);

[0054] 其他均按照实施例一的方法制备试纸条、并进一步制成检测卡, 并进行样品测定。

[0055] 2. 绘制标准曲线: (1) 样品的获得: 血液样品由医院提供并进行质控定值, 在此基础上, 由生理盐水进行梯度稀释, 是设置赋值单位为: 0, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500; 0.39赋值单位对应的NSE浓度真实值是0.125ng/ml, 其

余赋值单位依次类推)。

[0056] (2) 采用按照本实施例的方法制成的试纸条/检测卡对样品进行检测,并根据检测结果绘制标准曲线:

[0057] 对血清样品设置的每个赋值单位均检测10次,得出平均值,以赋值单位(血清浓度)为横坐标,以T/C为纵坐标,绘制标准曲线。数据如下表2:

[0058] 表2

赋值单位 (血清浓度)	C	T	T/C
0	13445	0	0
0.39	11161	64	0.005734
0.78	12406	110	0.008867
1.56	12206	237	0.019417
3.125	11416	455	0.039856
6.25	11014	872	0.079172
12.5	11671	2265	0.194071
25	10807	6162	0.570186
50	5798	4357	0.751466
100	4398	5486	1.247385
200	1628	4796	2.945946
300	2400	9700	4.041667
400	1732	5285	3.051386
500	2185	14790	6.768879

[0060] 绘制标准曲线(如图4所示),得到标准曲线方程 $y=0.096x-1.7538$, $R^2=0.9095$ 。从图4可以看出,实施例二制备得到的NSE检测试纸条不能满足需求。

[0061] 实施例三、对实施例一制得的试纸条/检测卡的检测效果验证:

[0062] 1. 对本发明(实施例一)制得的检测卡/试纸条定性检测的检测限进行测定

[0063] (1) 样本处理:采用本试剂盒套装提供的样品收集装置采集血液。

[0064] (2) 检测卡或试纸条的准备:将制备的检测卡/试纸条放置在室温下15min后备用。

[0065] 将NSE标准品分别稀释为2ng/mL、4ng/mL、8ng/mL、16ng/mL、32ng/mL、64ng/mL、128ng/mL,再向标准品中加入样品生理盐水进行稀释(每滴样品加入3mL,以模拟实际检测的情况),稀释后,每次检测取65μL加到样品垫上进行检测。

[0066] 加样5min后,在紫外灯下读数。结果如表3:

[0067] 表3 NSE定性检测检测限测定结果

[0068]

	2ng/mL	4ng/mL	8ng/mL	16ng/mL	32ng/mL	64ng/mL	128ng/mL
--	--------	--------	--------	---------	---------	---------	----------

NSE	-	-	±	+	+	+	+
-----	---	---	---	---	---	---	---

[0069] 如图5所示,2ng/mL和4ng/mL的样品的检测结果如图5中左侧的试纸条所示,仅C线处可检测到荧光;8ng/mL和16ng/mL的样品的检测结果如图3中中间位置处的试纸条所示,T线处的荧光亮度较弱,T线处荧光强度弱于C线处荧光强度;32ng/mL、64ng/mL和128ng/mL的样品检测结果如图3中右侧的试纸条所示,T线处荧光强度与C线处荧光强度无明显差别。

[0070] 结合表1和图5可知:该检测卡检测血清NSE稀释的系列样品,由检测结果知检测卡上NSE抗体定性检测的检测限为8ng/mL。

[0071] 2.对本发明(实施例一)制得的NSE试纸条/试纸卡的定性检测的准确性进行测定:

[0072] 取NSE阳性标本各10份,正常人标本10份,使用本发明建立的检测NSE荧光免疫层析试剂盒套装进行检测,加样5min后,置于紫外灯下判读结果。结果如表4:

[0073] 表4准确性的测定结果

NSE 阳性 标本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NSE 检 测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
[0074]										
正常人 标本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NSE 检 测结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0075] 由表4可知,NSE阳性标本检测结果均为阳性,正常人标本(阴性标本)检测结果均为阴性。该结果与预期完全相符,说明本发明提供的试纸条定性检测的准确率高,符合要求。

[0076] 3.对本发明(实施例一)建立的检测NSE荧光免疫层析试剂盒套装的定量检测的精密性进行测定:

[0077] 将制备好的NSE精密性质控品(NSE赋值单位为50,赋值规则同实施例一)从检测卡的加样孔加样,置于检测装置中,5min后检测并读取T线的荧光强度,重复检测十次,分别计算十次检测结果,检测线荧光强度的变异系数($CV=SD/\bar{x}$)。具体数据如下表5所示

[0078] 表5

	C	T	T/C	SD	平均数	CV
[0079]	6147	6450	1.049292	0.097341	1.059109	9.19%
	5294	5274	0.996222			
	7119	6447	0.909819			
	6601	6833	1.035146			
	5024	5721	1.138734			
	5865	6171	1.052174			
	4709	4979	1.057337			
	5413	5262	0.972104			
	4194	5289	1.261087			
	3667	4104	1.119171			

[0080] 由上表5可知, CV值小于15%, 符合精密性要求。

[0081] 4. 本发明(实施例一)制得的NSE试纸条/试纸卡的敏感性和特异性: 采用经检测确诊的小细胞肺癌患者的血液样品50份及健康体检血液样本52份, 使用本发明建立的检测NSE荧光免疫层析试剂盒套装进行检测, 加样5min后, 置于免疫荧光层析读数仪中判读结果。结果显示, 本发明的检测NSE荧光免疫层析定量试剂盒套装检测小细胞肺癌感染的敏感性(敏感性=真阳性人数/(真阳性人数+假阴性人数)*100%)可达94.2%, 特异性(特异性=真阴性人数/(真阴性人数+假阳性人数)*100%)达到100%。

[0082] 5. 对本发明(实施例一)制得的试纸条/检测卡的有效期进行验证:

[0083] 采用“加速破坏法”进行模拟, 采用将制备好的试纸条在除湿机作用下, 将空间湿度降到30%以下处理4小时, 后将试剂条和干燥剂放入铝箔袋, 封口, 然后放置于电热鼓风干燥箱中(37℃), 分别在此条件下加速第1天, 第3天, 第7天, 第21天进行精密性和线性范围的检测。(加速破坏144小时(6天)=1年)

[0084] 加速破坏21天精密性数据(赋值单位50, 赋值规则同实施例一)如下表表6所示:

[0085] 表6

[0086]

第21天	C	T	T/C	SD	均	CV
	2975	3142	1.056134454	0.155697481	1.348968927	11.54%
	2914	4330	1.485929993			
	3837	5617	1.463904092			
	2805	3931	1.401426025			
	2708	3183	1.175406204			
	2870	3692	1.28641115			
	2786	4019	1.442569993			
	3250	3998	1.230153846			
	2542	4053	1.594413847			
	2703	4026	1.48945616			
	2613	3091	1.182931496			
	2821	3730	1.322226161			
	1569	2190	1.395793499			
	2475	3748	1.514343434			
	2528	3017	1.193433544			

[0087] 加速破坏21天线性范围数据(如下表表7所示),并绘制标准曲线:

[0088] 表7

	C	T	T/C
0	4118	0	0
0.39	3970	24	0.00604534
0.78	3346	54	0.016138673
1.56	3845	120	0.031209363
3.125	3774	245	0.064917859
6.25	3796	612	0.161222339
12.5	2914	1701	0.583733699
25	2269	2546	1.122080212
50	1822	3639	1.997255763
100	1458	4320	2.962962963
200	902	5014	5.558758315
300	631	5225	8.280507132
400	488	5510	11.29098361
500	551	5719	10.37931034

[0089] 绘制标准曲线(如图6所示),本发明的试纸条/检测卡加速破坏21天仍可满足精密性要求(CV<15%),线性范围0.39-400(0.125-160ng/mL),R>0.99,可以满足实际检测的需求。

[0091] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

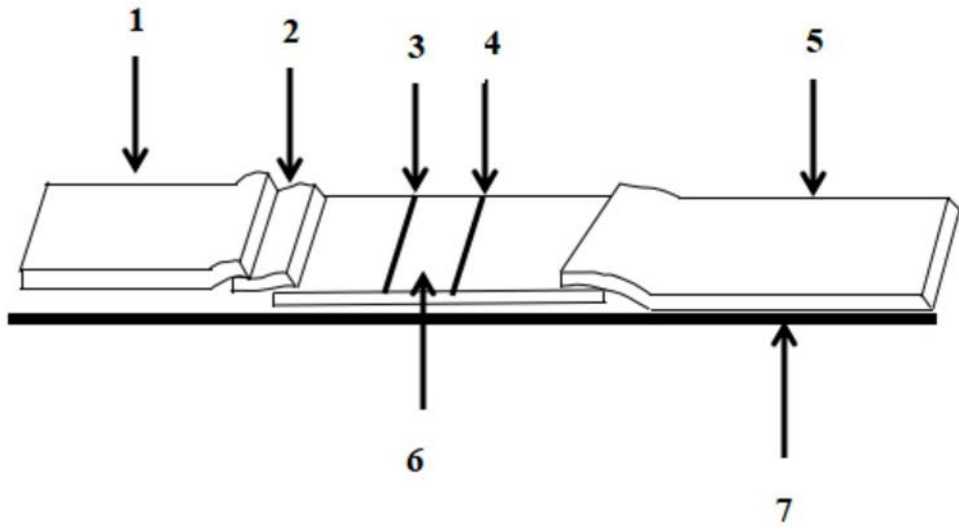


图1

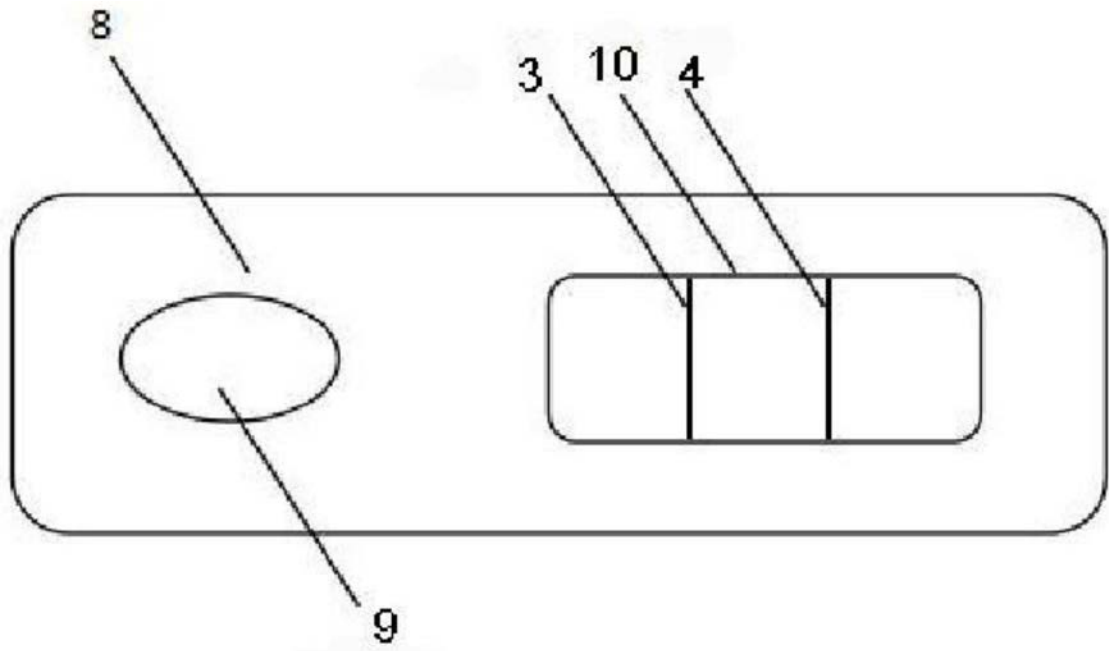


图2

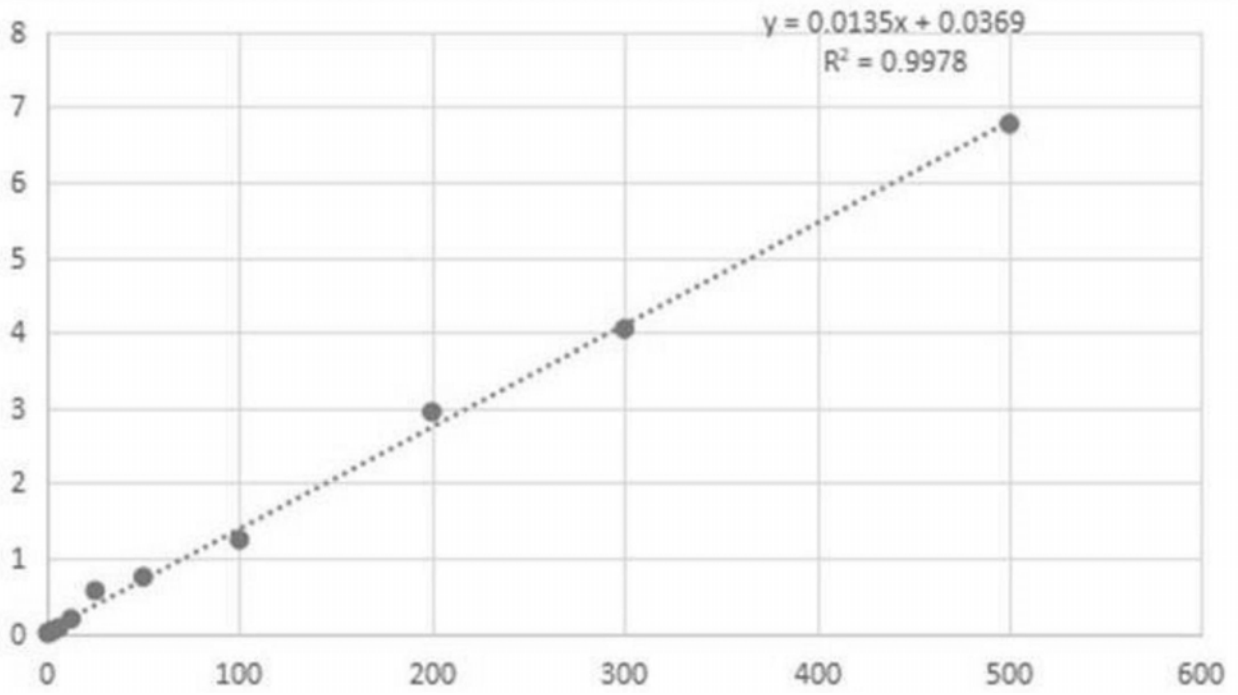


图3

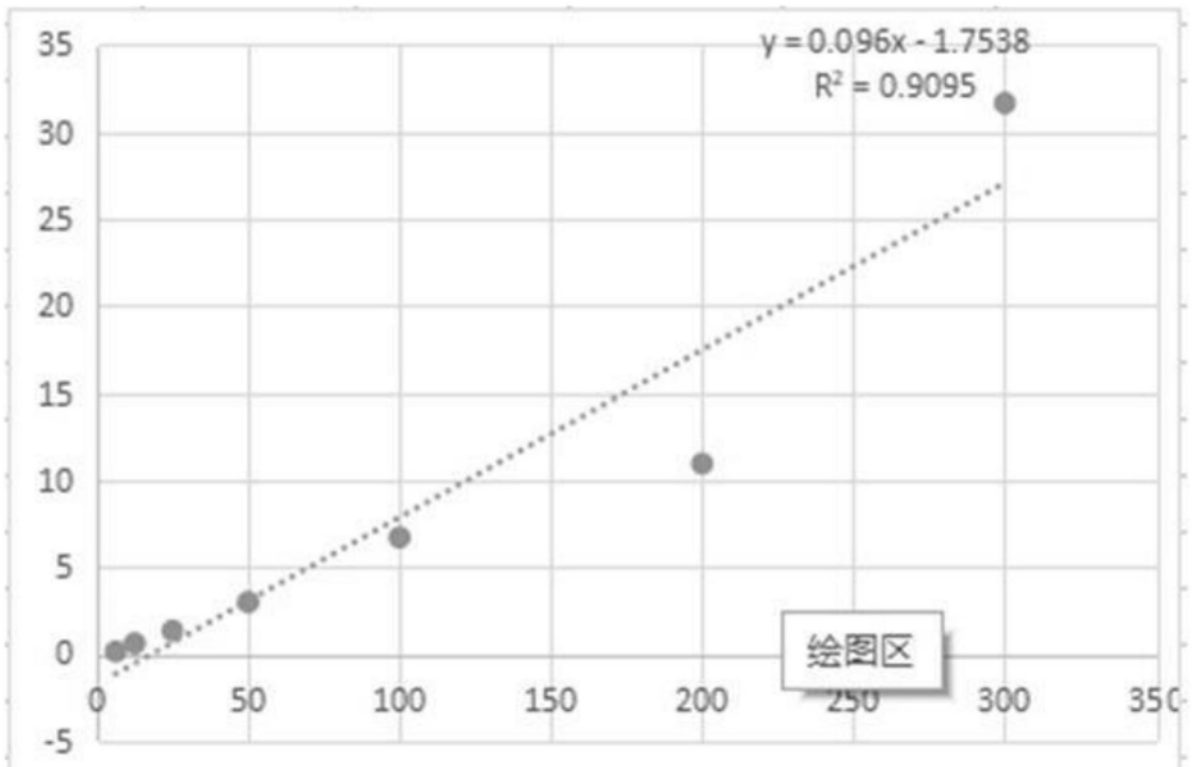


图4



图5

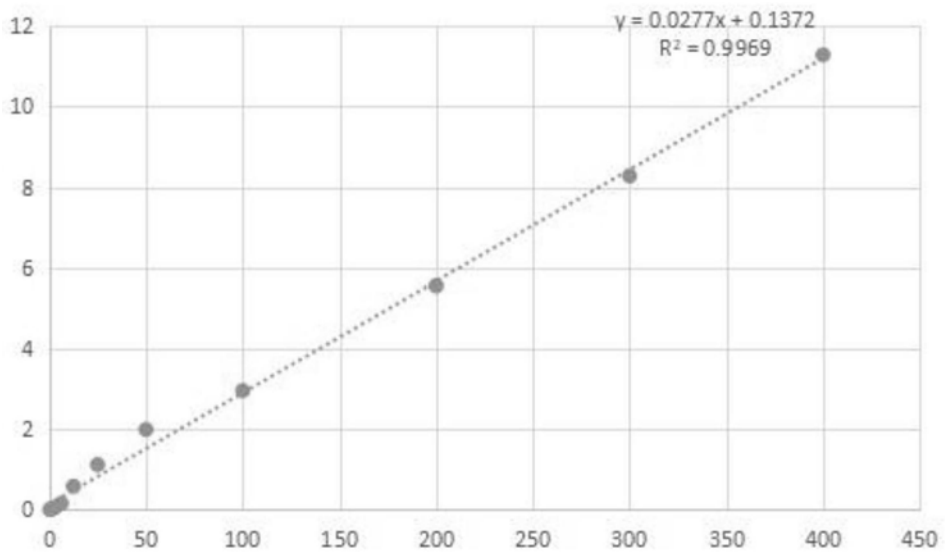


图6