



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104764884 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201410412018. 2

(22) 申请日 2014. 08. 20

(71) 申请人 苏州和锐医药科技有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号 B2 栋 313 室

(72) 发明人 陈菲 李振军 霍如松 周阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

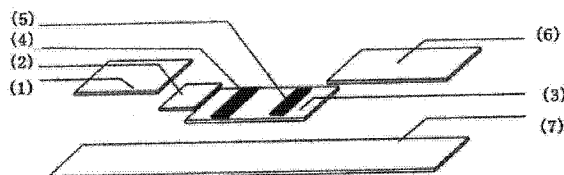
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种抗 α - 烯醇化酶抗体层析试纸条及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种抗 α - 烯醇化酶抗体层析试纸条、制备方法及应用。该试纸条包括样品垫 (1)、结合垫 (2)、分析膜 (3)、吸水垫 (6)、底板 (7)、检测带 T 线 (4) 和质控带 C 线 (5), 所述底板 (7) 的上部贴合有分析膜 (3), 所述分析膜 (3) 上部的两端分别贴合有结合垫 (2) 和吸水垫 (6), 结合垫 (2) 上部的一端贴合有样品垫 (1), 检测带 T 线 (4) 和质控带 C 线 (5) 设置在分析膜 (3) 上。本发明采用间接免疫检测法, 用 α - 烯醇化酶抗原蛋白, 实现对样本中抗 α - 烯醇化酶抗体的高灵敏度、高特异性快速检测, 为临床炎症性肠病等自体免疫性疾病的辅助诊断提供依据。



1. 一种抗 α - 烯醇化酶抗体免疫层析试纸条, 包括样品垫 (1)、结合垫 (2)、分析膜 (3)、吸水垫 (6)、底板 (7)、检测带 T 线 (4) 和质控带 C 线 (5), 所述底板 (7) 的上部贴合有分析膜 (3), 所述分析膜 (3) 上部的两端分别贴合有结合垫 (2) 和吸水垫 (6), 所述结合垫 (2) 上部的一端贴合有样品垫 (1), 所述检测带 T 线 (4) 和质控带 C 线 (5) 设置在分析膜 (3) 上, 其特征在于, α - 烯醇化酶抗原蛋白结合在结合垫 (2) 上或包被在检测带 T 线 (4) 上。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述的结合垫 (2) 包被胶体金标记物或胶乳 (乳胶) 标记物。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述的结合垫为 1 层 (图 1), 或者分上 (2a)、下 (2b) 两层与分析膜错落搭接 (图 2)。

4. 一种抗 α - 烯醇化酶抗体免疫层析试纸条的制备方法, 包括如下步骤:

步骤 1. α - 烯醇化酶抗原蛋白的制备

步骤 2. 结合垫 (2) 制备

(1) 胶体金标记物的制备: 用纳米金溶液标记 α - 烯醇化酶抗原蛋白、抗人 IgG 抗体、葡萄球菌 A 蛋白 (SPA)、链球菌 G 蛋白 (Protein G), 以及其他与检测带 T 线和质控带 C 线能形成免疫复合物的蛋白。

(2) 胶乳标记物的制备: 用带活性基团的胶乳微球标记 α - 烯醇化酶抗原蛋白、抗人 IgG 抗体、葡萄球菌 A 蛋白 (SPA)、链球菌 G 蛋白 (Protein G), 以及其他与检测带 T 线和质控带 C 线能形成免疫复合物的蛋白。

(3) 结合垫 (2) 制备: 玻璃纤维膜或聚脂膜作为结合垫, 将步骤 (1) 制备的胶体金标记物或胶乳标记物, 用喷涂仪喷涂在玻璃纤维膜或聚脂膜上, 干燥备用。

步骤 3. 分析膜 (3) 制备

A. 检测带 T 线 (4) 制备: 根据结合垫标记蛋白类型选择检测带 T 线包被蛋白, 如结合垫上的结合蛋白含 α - 烯醇化酶, 检测带 T 线的包被蛋白是抗人 IgG; 如果结合垫上含有抗人 IgG, 检测带 T 线包被蛋白为 α - 烯醇化酶。

B. 质控带 C 线 (5) 制备: 根据结合垫的标记蛋白类型选择质控带的包被蛋白, 如结合垫标记蛋白是单一的 α - 烯醇化酶, 质控带 C 线的包被蛋白为抗 α - 烯醇化酶的抗体; 如果结合垫标记蛋白是单一的抗人 IgG 抗体, 质控带 C 线的标记蛋白为对应的抗人 IgG 抗体的抗体; 结合垫标记蛋白有 2 层时, 质控带 C 线的包被蛋白是能与结合垫对应层结合蛋白形成免疫复合物的蛋白。

步骤 4. 样品垫制备

将玻璃纤维膜或聚酯膜经缓冲液浸渍烘干备用, 或者直接使用。

步骤 5. 试纸条组装

把步骤 1 ~ 4 所制作完成的材料, 按图 1 或图 2 搭接, 根据底板的规格切割成一定的长度和宽度, 安装在底板和卡壳里。

5. 根据权利要求 4 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述的 α - 烯醇化酶抗原蛋白是把全长 α - 烯醇化酶基因或者含有重要抗原表位的基因序列, 克隆到原核或真核表达载体里, 表达纯化获得。

6. 根据权利要求 4 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述的 α - 烯醇化酶抗原

蛋白是用多肽合成仪合成含有 α - 烯醇化酶重要抗原表位的 α - 烯醇化酶多肽, 并偶联到载体蛋白上而获得, 载体蛋白包括但不限于牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OA)、钥孔血蓝蛋白 (KLH)、人血清白蛋白 (HSA) 及人工合成的多聚赖氨酸 (PLL) 等。

7. 根据权利要求 4 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述的抗人 IgG 抗体为鼠源、兔源、羊源、马源、骆驼源或豚鼠源中的一种或多种单克隆抗体或多克隆抗体。

8. 根据权利要求 4 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述的抗 α - 烯醇化酶的抗体是以 α - 烯醇化酶为免疫源产生的单克隆或多克隆单抗或与 α - 烯醇化酶形成免疫复合物的其他蛋白。

9. 根据权利要求 4 所述的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述的抗人 IgG 抗体的抗体是指能与该抗体形成免疫复合物的蛋白。

10. 一种抗 α - 烯醇化酶抗体检测方法, 其特征在于, 用权利要求 1 ~ 9 所述的免疫层析试纸条, 对待检样品进行检测, 具体步骤包括:

(1) 样本处理: 取血清、血浆或全血样本, 用加样缓冲液稀释 0 ~ 100 倍;

(2) 把上述处理过的样品滴加到试纸条的样品垫上, 静置 5 ~ 30 分钟, 观察 T 线和 C 线;

(3) 结果判读: T 线和 C 线均显现, 结果为阳性; T 线不显现, C 线显现, 结果为阴性; T 线和 C 线均不显现或其他现象, 提示试纸失效。

一种抗 α -烯醇化酶抗体层析试纸条及其用途

技术领域

【0001】 本发明涉及免疫分析检测领域。具体而言,本发明涉及一种检测抗 α -烯醇化酶抗体免疫层析检测试纸、制备方法及其应用。

背景技术

【0002】 烯醇化酶 (enolase) 是 1934 年 Lohman 和 Mayerhof 在研究肌肉提取物中磷酸甘油酸向丙酮酸转换的过程中发现的。它既可催化糖酵解过程中 2-磷酸-D-甘油酸 (PGA) 向磷酸-烯醇式丙酮酸 (PEP) 的转化,又可在糖原合成过程中,催化逆向反应,即作为磷酸丙酮酸水合酶,使 PEP 向 PGA 转化,因此烯醇化酶在细胞能量代谢过程中起重要的作用【J Biol Chem,2000,275(8):5958-5965】。在脊椎动物中,烯醇化酶存在 3 种同功酶: α , β , γ 。 α -烯醇化酶在许多组织均存在, β -烯醇化酶几乎仅见于肌肉组织, γ -烯醇化酶则主要存在于神经元和神经内分泌组织。根据它们的分布和作用不同, α -烯醇化酶又称为非神经元烯醇化酶 (non-neural enolase, NNE)、enolase 1 (eno-1)、磷酸烯醇丙酮酸脱氢酶 (phosphopyruvate hydratase)、c-myc 启动子结合蛋白 (c-myc promoter-binding protein, MBP-1)、纤维蛋白溶酶原结合蛋白 (plasminogen-binding protein)。

【0003】 NNE 在结构上高度保守,除了作为糖酵解反应的限速酶,还作为自身抗原参与机体免疫反应。研究证明,多种自身免疫病均可检出抗 NNE 抗体。NNE 作为一种自身抗原,既是胞浆酶,又可表达于肾脏、血管等组织及一些细胞如内皮细胞膜或与细胞表面结合。抗 NNE 自身抗体通过识别 NNE 的膜联形式和 / 或干扰它的功能而于局部诱发免疫炎症反应。自身免疫性视网膜病变患者体内存在抗 NNE 抗体,并特异定位于视网膜神经节细胞层及内核层,诱导该区域细胞凋亡,导致失明【J Autoimmun,2004,23(2):161-167】。存在于人呼吸道上皮细胞中的 NNE 自身抗原诱导的自身免疫反应,造成呼吸道上皮细胞损伤,诱发气道炎症反应,参与重症哮喘和阿斯匹林敏感性哮喘的发生【J Allergy Clin Immunol,2006,118(2):376-381】。类风湿性关节炎患者的关节滑膜中可见大量的 NNE 表达,作为一种自身抗原,NNE 发生氨基甲酰鸟氨酸化,并刺激机体产生特异性自身抗体,从而引发类风湿性关节炎的慢性炎症反应【Arthritis Res Ther,2005,7(6):1421-1429】。研究还发现,大约有 10-18% 的炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 血清中抗 NNE 抗体阳性【Clin Exp Immunol. 1998;112:10-16】。

【0004】 目前实验室常用的检测抗 NNE 的方法是酶联免疫吸附酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 和免疫印迹法 (immunoblotting test, IBT)。尚未发现有商品化的抗 NNE 抗体检测试剂盒。

【0005】 ELISA 法检测可用于高通量标本测定,灵敏度也较高,目前被广泛认可,但操作比较繁琐,需多次加样和洗涤,完成整个实验过程需三小时左右,且易受温度和孵育条件的影响,需酶标仪,亦需要专业免疫学技术人员在专业实验室中进行实验操作,给实验带来诸多不便。

【0006】 免疫印迹法综合了 SDS-PAGE 的高分辨力和 ELISA 法的高特异性和敏感性,但操作

相对复杂,完成整个实验过程需三小时左右,亦需要专业免疫学技术人员在实验室中进行实验操作,同时易受各种温度和孵育时间等环境条件因素的影响,对试验带来诸多不便。且试剂具有较强的毒性和污染性。

[0007] 免疫层析法 (immunochromatography) 是近几年来兴起的一种快速诊断技术,其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品 (尿液或血清) 后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,形成肉眼可见的检测带。现有的免疫层析试纸条产品常用的示踪标记粒子有纳米金、纳米硒、乳胶等等,其中以纳米金应用最为广泛。

[0008] 与其他检测方法相比,免疫层析法检测时间短,只需要 5 ~ 20 分钟,操作人员无需培训,操作简便、快速,无需低温保存,储运方便等优势。

[0009] 在自体免疫性疾病诊断方面,已出现较多的免疫层析试纸,但抗 NNE 抗体的免疫层析试纸在国内外市场上仍没有问世。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是为了克服现有方法的不足,将免疫层析法应用到抗 NNE 抗体的检测中,采用间接免疫法来实现对样品中的抗 NNE 抗体进行检测,通过把 NNE 抗原蛋白包被在结合垫或分析膜的检测带上,实现对样品中抗 NNE 抗体的高特异、高灵敏度、高准确性的检测,快速筛查抗 NNE 抗体阳性标本,为临床炎症性肠病等自体免疫性疾病提供快速的辅助诊断。

[0011] 本发明的目的之一在于提供一种快速、准确的抗 NNE 抗体的免疫层析检测试纸条及制备方法,目的之二是提供一种基于免疫层析技术的抗 NNE 抗体检测方法。

[0012] 作为本发明第一个方面的抗 NNE 抗体的免疫层析检测试纸条,包括样品垫、结合垫、分析膜、吸水垫和底板,分析膜上设置检测带和质控带,所述底板的上部贴合有分析膜,分析膜上部的两端分别贴合有结合垫和吸水垫,结合垫上部的一端贴合有样品垫。

[0013] 所述的结合垫结合蛋白为纳米金标记物或彩色胶乳标记物,结合垫为 1 层 (图 1) 或 2 层 (图 2),其中 2 层时错落与分析膜搭接。

[0014] 所述抗 NNE 抗体的免疫层析检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0015] 步骤 1. NNE 抗原蛋白的制备

[0016] 步骤 2. 结合垫 (2) 制备

[0017] (1) 纳米金标记物的制备:用 20 ~ 40nm 粒径的纳米金溶液标记 NNE 抗原蛋白、抗人 IgA 抗体、葡萄球菌 A 蛋白 (SPA)、链球菌 G 蛋白 (Protein G),以及其他与质控带 C 线能形成免疫复合物的蛋白。

[0018] (2) 彩色胶乳标记物的制备:用带活性氨基或羧基基团的彩色胶乳标记 NNE 抗原蛋白、抗人 IgA 抗体、葡萄球菌 A 蛋白 (SPA)、链球菌 G 蛋白 (Protein G),以及其他与质控带 C 线能形成免疫复合物的蛋白。

[0019] (3) 结合垫 (2) 制备:玻璃纤维膜或聚脂膜作为结合垫,先用含 BSA 和糖的缓冲液预处理并烘干,将步骤 (1) 制备的纳米金标记物或胶乳标记物,用喷涂仪喷涂在预处理的玻璃纤维膜或聚脂膜上,干燥备用。

[0020] 步骤 3. 分析膜 (3) 制备

[0021] (1) 检测带 T 线 (4) 制备 : 根据结合垫标记蛋白类型选择检测带 T 线包被蛋白, 如结合垫上的结合蛋白含 NNE, 检测带 T 线的包被蛋白是抗人 IgG。如果结合垫上含有抗人 IgG, 检测带 T 线包被蛋白为 NNE。

[0022] (2) 质控带 C 线 (5) 制备 : 根据结合垫的标记蛋白类型选择质控带的包被蛋白, 如结合垫标记蛋白是单一的 NNE, 质控带 C 线的包被蛋白为抗 NNE 的抗体 ; 如果结合垫标记蛋白是单一的抗人 IgG 抗体, 质控带 C 线的标记蛋白为对应的抗人 IgG 抗体的抗体 ; 或者其他结合垫标记蛋白形成免疫复合物的蛋白。

[0023] 步骤 4. 样品垫制备

[0024] 将玻璃纤维膜或聚酯膜经缓冲液浸渍烘干备用, 或者直接使用。

[0025] 步骤 5. 试纸条组装

[0026] 把步骤 1 ~ 4 所制作完成的材料, 按图 1 或图 2 搭接, 根据底板的规格切割成一定的长度和宽度, 安装在底板和卡壳里。优选地, 试纸条长度为 6.5cm, 宽度为 3mm 或 4mm。

[0027] 所述的 NNE 抗原蛋白是把全长 NNE 基因或者含有重要抗原表位的基因序列, 克隆到原核或真核表达载体里, 表达纯化获得。

[0028] 所述的 NNE 抗原蛋白是用多肽合成仪合成含有 NNE 重要抗原表位的 NNE 多肽, 并偶联到载体蛋白上而获得。

[0029] 所述的抗人 IgG 抗体为鼠源、兔源、羊源、马源、骆驼源或豚鼠源中的一种或多种单克隆抗体或多克隆抗体。

[0030] 所述的抗 NNE 的抗体是以 NNE 为免疫源, 鼠源、兔源、羊源、马源、骆驼源或豚鼠源中的一种或多种单克隆抗体或多克隆抗体。

[0031] 所述的抗人 IgG 抗体的抗体是指能与该抗体形成免疫复合物的抗体, 比如该抗人 IgG 抗体是鼠抗人 IgG, 它的抗体是羊抗鼠 IgG 的抗体或其他非鼠源的鼠 IgG 抗体。

[0032] 在本发明的另一方面, 提供一种抗 NNE 抗体检测方法, 用本发明第一方面方法及步骤所制备的抗 NNE 抗体免疫层析试纸条, 对待检样品进行检测, 具体步骤 :

[0033] (1) 样本处理 : 取血清、血浆或全血样本, 用加样缓冲液稀释 0 ~ 100 倍 ;

[0034] (2) 把上述处理过的样品滴加到试纸条的样品垫上, 静置 5 ~ 20 分钟, 观察 T 线和 C 线 ;

[0035] (3) 结果判读 : T 线和 C 线均显现, 结果为阳性 ; T 线不显现, C 线显现, 结果为阴性 ; T 线和 C 线均不显现, 提示试纸失效。

[0036] 本发明的检测原理 :

[0037] 选用金标 / 胶乳等标记 NNE 抗原蛋白或其他能与待检样品中目的物结合的蛋白, 喷涂在结合垫上, 制成结合垫 ; 在检测带上包被能与标记蛋白 - 目的物蛋白复合物发生免疫反应的蛋白, 当把待检样本加样到样品垫上后, 样本中的 NNE 抗体与结合垫上的标记蛋白形成免疫复合物, 由于毛细管效应, 该复合物向吸水垫方向泳动, 此复合物与包被于检测带 T 线上的抗原蛋白发生特异性免疫结合反应, 形成金标 / 胶乳蛋白 - 抗 NNE 抗体 - NNE 抗原蛋白三联体复合物而被截留在检测线上, 逐渐富集形成较深的紫红色条带或胶乳颜色 ; 由于毛细效应继续泳动向前, 金标 / 胶乳兔 IgG 与包被在质控线上的羊抗兔 IgG 发生特异的免疫反应被截留, 逐渐富集在质控线上形成较深的紫红色条带或胶乳颜色, 多余的未结

合的物质继续层析到吸水垫上,因此在检测线和质控线都出现条带的判为阳性结果;若血清样品中不含有抗 NNE 抗体,标记蛋白到达检测线时,不与包被在检测线上的相应蛋白发生免疫反应,因此在检测线处没有出现显色带,而金标/胶乳兔 IgG 继续泳动向前与包被于质控线处的相应包被蛋白发生特异的免疫反应而被截留,逐渐富集在质控线上形成紫红色条带或胶乳颜色,因此仅在质控上出现条带判为阴性结果。

[0038] 本发明首次将免疫层析技术应用于抗 NNE 抗体检测,实现了高特异性、高灵敏度的检测性能。与现有文献报道的 ELISA 和化学发光试剂盒相比,本发明的优点主要包括:检测时间短(5~20min);不需要任何特殊仪器,可实现床边检测和门诊即时检测;操作简便,只需一步反应,操作人员无需培训,检测成本低;对温度无特殊要求,无需冷冻,储存运输方便,室温可保存 24 个月。

附图说明

图 1 本发明的侧面结构示意图 1。

图 2 本发明的侧面结构示意图 2。

图 3 本发明的阳性和阴性结果示意图 3。

具体实施方式

[0039] 本发明所述的 NNE 抗体检测免疫层析试纸,如图 1 所示,该试纸是在底板(7)上由一侧向另一侧顺次相互搭接地粘贴分析膜(3)、结合垫(2)、样品垫(1)、吸水垫(6)。

[0040] 结合垫(2)上喷涂有金标/胶乳标记蛋白,分析膜(3)上设置检测带(4)和质控带(5),根据结合垫上标记蛋白的不同,选用相应的检测带包被蛋白和质控带包被蛋白。优选地,在结合垫上喷涂的标记蛋白为 NNE 抗原蛋白和鼠 IgG,则检测带上的包被蛋白为抗人 IgG 抗体,质控带上的包被蛋白为抗鼠 IgG。另一优选,在结合垫上喷涂的标记蛋白为抗人 IgG 抗体,则检测带上的包被蛋白为 NNE 抗原蛋白。

[0041] 下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。

[0042] 实施例 1. NNE 抗原蛋白制备

[0043] 重组蛋白方法:应用于本试纸的 NNE 抗原蛋白是通过基因克隆技术构建重组基因,然后采用原核表达载体或真核表达载体,本发明所用的原核表达载体为 pET28a(+),表达菌为 BL21 大肠杆菌;真核表达载体为 pcDNA3.1(+),表达菌为酵母菌。两种表达技术均能成功表达出全部为人源的 NNE 抗原蛋白,操作方法见《分子克隆实验指南》。其中,NNE 抗原蛋白来源于亲和纯化以及脱盐工艺所获得的基因工程抗原蛋白。

[0044] NNE 抗原蛋白制备方法 2:筛选 NNE 重要抗原表位多肽 2-6 个,用多肽合成仪进行从 C 端(羧基端)向 N 端(氨基端)合成,然后与载体蛋白偶联,使分子量增大,便于结合在结合垫和分析膜上。常用的载体蛋白包括但不限于牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)及人工合成的多聚赖氨酸(PLL)等。

[0045] 实施例 2 抗体制备

[0046] 结合垫及检测带包被抗体抗人 IgG 单克隆抗体和多克隆抗体,以及用于质控带和结合垫其他动物来源的单克隆抗体和多克隆抗体,可通过免疫动物获得。

[0047] 1、单克隆抗体制备的具体操作方法为:

[0048] 1) 通过将 0.05mg ~ 5mg 免疫制剂 (分别针对山羊、小鼠、豚鼠、兔子、马、骆驼) 与 1 倍体积的弗氏完全佐剂混合得到注射溶液, 将该注射溶液在动物皮内多部位注射;

[0049] 2) 一个月后将动物用的弗氏完全佐剂混合液经多部位动物皮下注射而加强免疫。7 ~ 14 天后将动物放血, 测定抗血清滴度。

[0050] 3) 对动物加强免疫直至滴度达到平台期。通过从被免疫的动物回收脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 筛选后即可得到能稳定表达目的抗体的杂交瘤细胞。

[0051] 4) 体外培养的杂交瘤细胞, 接种小鼠或大鼠腹腔, 取腹水纯化获得单克隆抗体; 或者从培养上清液中纯化获得单克隆抗体。

[0052] 2、多克隆抗体制备:

[0053] 同单克隆抗体步骤 1) 和 2), 在获得抗血清后, 纯化抗血清获得多克隆抗体。

[0054] 3、葡萄球菌 A 蛋白和链球菌 G 蛋白制备

[0055] 根据葡萄球菌 A 蛋白和链球菌 G 蛋白的基因序列, 可通过大肠杆菌原核表达克隆化基因来制备, 具体操作方法可参见 (分子克隆实验指南), 或实施例 1NNE 的步骤。

[0056] 实施例 3 胶体金液制备

[0057] 1) 将 0.01% (w/v) 的 HAuCl_4 溶液加热至沸腾, 迅速加入每 100mL HAuCl_4 溶液加入适量的还原剂溶液, 颜色从蓝色, 然后浅蓝、蓝色, 再加热出现红色, 煮沸 7 ~ 10min 出现透明的橙红色。再用超滤或微孔滤膜 (0.45 μM) 过滤, 以除去其中的聚合物和其它可能混入的杂质。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物, 液面出现油状物和大量黑色颗粒状沉淀物杂质时弃用。

[0058] 2) 其中所使用的还原剂可以为柠檬酸三钠、鞣酸 - 柠檬酸三钠、白磷, 优选使用柠檬酸三钠, 更优选地使用 1% (w/v) 柠檬酸三钠。

[0059] 3) 其中所用玻璃容器应绝对清洁, 用前需经酸洗。其水应为去离子超纯水, 电阻率达 18.2 $\text{M}\Omega$ 。

[0060] 4) 胶体金溶液制备过程中, 各溶液的配制方法如下: HAuCl_4 的配制: 用超纯水溶解氯金酸, 配成 1% 溶液, 置 4℃ 备用, 有效期三个月; 1000mL 1% HAuCl_4 溶液配方: 10g HAuCl_4 、超纯水定容至 1000mL; 1% 柠檬酸三钠 (Sodium Citrate) 的配制: 用超纯水溶解 Sodium Citrate, 配成 1% 溶液, 0.22 μM 膜滤过, 现配现用。

[0061] 实施例 4 金标蛋白制备

[0062] 本发明的金标蛋白包括但不限于鼠抗人 IgG、羊抗人 IgG、兔 IgM、NNE 抗原蛋白、SPA、Protein G 和兔 IgG。根据具体蛋白的性质, 调节不同 pH 的反应缓冲液, 优选地, 用 0.1M 碳酸钠调节胶体金 pH7.0 ~ 9.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 25 μg 待标记蛋白, 混匀, 静置 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 混匀, 静置 5min, 3000rpm 离心 5min, 去沉淀, 将上层溶液转至新管, 9000rpm 离心 30min, 去上清, 加入重悬液至原量, 将溶液移至新管, 9000rpm 再次离心 30min, 加入用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用。

[0063] 实施例 5 胶体金标记抗 NNE 抗体检测试纸 1 制备

[0064] 试纸条 1 的结合垫为 1 层, 结合金标鼠抗人 IgG, 检测带包被 NNE 抗原蛋白, 质控带包被羊抗鼠 IgG, 试纸条长度约 6.5cm, 宽 4mm。结合垫材质为玻璃纤维膜, 分析膜材质为硝酸纤维素膜 (NC)。制备步骤如下:

[0065] 1) 分析膜制备：

[0066] 用包被缓冲液稀释 NNE 抗原蛋白至浓度为 0.8mg/mL，用划膜喷金仪 HM3035，距离结合垫 1cm 处，以 1 μ L/cm 喷涂于 NC 上，构成检测带 (4)。用包被缓冲液将羊抗鼠 IgG 稀释到 0.5mg/mL，距离检测带约 5mm 处，以 1 μ L/cm 用划膜喷金仪仪器喷涂于同一张 NC 膜上，构成质控带，质控带同时距离吸水垫约 1cm。分析膜 37℃ 烘干，封装备用。

[0067] 所使用的包被缓冲液可以是硼酸盐、碳酸盐、磷酸盐、Tris-HCl 或 Tris-磷酸盐等，缓冲液的作用是提供一定 pH 和离子强度使蛋白牢固包被于 NC 膜，缓冲液 pH 值一般约为 6~9.5 范围内，优选为 6.5~7.5 的中性缓冲范围内，且最优选缓冲液的 pH 值为 7.0~7.4 范围内。

[0068] 本实施例所用缓冲液 pH 值 7.2 的 0.01M 磷酸盐缓冲液。

[0069] 分析膜的材质可选硝酸纤维素膜 (NC) 或者醋酸纤维素膜，商品化的硝酸纤维素膜包括 S&SAE99、whatman8 μ m、millipore M135、sartorius CN140 等。使用哪种规格的具体 NC 膜或醋酸纤维素膜不是本发明的关键，但是在每次测定中，上述几种 NC 膜可以作为优选。不同厂家使用的含不同表面活性剂的不同缓冲液处理的膜，与所用检测线抗体溶液亲和力和力有不同程度的差距，也会很大程度造成线条不均匀，拖带或是弥散的现象，因此运用组装试纸来选择优选的 NC 膜或醋酸纤维素膜。

[0070] 2) 结合垫制备

[0071] 用结合垫缓冲液浸泡玻璃纤维膜约 30 分钟，37℃ 烘干，将实施例 4 中制备的鼠抗人 IgG 金标抗体用划膜喷金仪仪器，以 3 μ L/cm 的用量喷涂在预处理的玻璃纤维膜上，37℃ 烘干即构成结合垫，置 2~8℃ 备用。

[0072] 结合垫缓冲液配方：0.01M PB、1% BSA、0.05% NaN₃、0.1% TritonX、10% 蔗糖。

[0073] 3) 样品垫制备

[0074] 用样品垫处理液浸泡样品垫，然后在 37℃ 下 1h 烘干，备用。

[0075] 样品垫缓冲液的组成为：pH 为 7.2 的 0.01M PB 缓冲溶液，含 1% BSA，10% 蔗糖，0.1% Tween-20。

[0076] 4) 试纸裁剪及装配

[0077] 用裁切机将上述步骤制备并干燥的样品垫、结合垫、分析膜、吸水纸分别剪切 1.7cm、0.8cm、2.5cm 和 1.5cm 宽的窄条，按图 1 方式搭接成大板，用切条机将大板切成单人份，每人一份宽度根据底板卡壳的不同而异，本实施例选用 4mm 宽度。将单人份已切好的试纸组装在备好的试纸卡里，使加样窗对应试纸的样品垫，结果显示窗对应检测区和质控区，组装温度控制在 25~37℃，湿度 20~30%。

[0078] 实施例 6 胶体金标记抗 NNE 抗体检测试纸 2 制备

[0079] 试纸条 2 的结合垫结合蛋白为金标羊抗人 IgG 多克隆抗体和兔 IgM，检测带包被 NNE 抗原蛋白，质控带包被鼠抗兔 IgM 单克隆抗体，试纸条长度约 6.5cm，宽 3mm。结合垫材质为聚酯膜，分析膜材质为硝酸纤维素。制备步骤如下：

[0080] 1) 分析膜的制备

[0081] 同实施例 5，所不同的是鼠抗兔 IgM 的浓度为 0.3mg/mL，缓冲液 pH 为 6.9。

[0082] 2) 结合垫的制备

[0083] 结合垫选用聚酯膜，用划膜喷金仪把实施例 4 制备的金标羊抗人 IgG 多克隆抗体

和兔 IgG 分别涂布 2 层聚酯膜上,涂布量为 $4\ \mu\text{L}/\text{cm}$,结合垫缓冲液 pH 为 7.0,含 15%。

[0084] 3) 试纸裁剪及装配

[0085] 同实施例 5,所不同的是按图 2 方式搭接大板,剪切宽度为 3mm。

[0086] 实施例 7. 胶体金标记抗 NNE 抗体检测试纸 3 制备

[0087] 试纸条 3 的结合垫结合蛋白为金标 NNE 抗原蛋白和兔 IgG,检测带包被兔抗人 IgG 多克隆抗体,质控带包被羊抗兔 IgG 单克隆抗体,试纸条长度约 6.5cm,宽 3mm。结合垫材质为玻璃纤维膜,分析膜材质为醋酸纤维素膜。制备步骤如下:

[0088] 1) 分析膜的制备

[0089] 选用醋酸纤维素膜,制备同实施例 5,所不同的是检测带包被蛋白鼠抗人 IgG 稀释浓度为 1.0mg/mL,质控带包被蛋白羊抗兔 IgG 的稀释浓度为 0.8mg/mL,缓冲液 pH 为 7.5。

[0090] 2) 结合垫的制备

[0091] 选用玻璃纤维膜,制备方法同实施例 5,所不同的是结合垫分两层,2a 层为金标 NNE 抗原蛋白,2b 层为金标兔 IgG,涂布量为 $3.5\ \mu\text{L}/\text{cm}$,缓冲液 pH 为 7.3,含 12%蔗糖。

[0092] 3) 试纸裁剪及装配

[0093] 同实施例 6。

[0094] 实施例 8. 胶体金标记抗 NNE 抗体检测试纸 4 制备

[0095] 试纸条 4 的结合垫结合蛋白为金标 NNE 抗原蛋白,检测带包被豚鼠抗人 IgG 多克隆抗体,质控带包被鼠抗 NNE 单克隆抗体 IgM,试纸条长度约 6.5cm,宽 4mm。结合垫材质为玻璃纤维膜,分析膜材质为硝酸纤维素膜 (NC)。制备步骤如下:

[0096] 1) 分析膜制备:

[0097] 同实施例 5,所不同的是检测带用包被蛋白豚鼠抗人 IgG 单克隆抗体的浓度为 1.2mg/mL,喷涂量为 $0.8\ \mu\text{L}/\text{cm}$,缓冲液 pH 为 7.0。质控带制备包被蛋白鼠抗 NNE 单克隆抗体 IgM 稀释浓度为 0.6mg/mL,喷涂量为 $1\ \mu\text{L}/\text{cm}$ 。缓冲液 pH 为 7.2。

[0098] 2) 结合垫制备

[0099] 同实施例 5,所不同的是金标 NNE 抗原蛋白的喷涂用量为 $5\ \mu\text{L}/\text{cm}$,结合垫缓冲液蔗糖浓度为 12%,缓冲液 pH 为 7.2。

[0100] 3) 样品垫制备

[0101] 同实施例 5,所不同的样品垫不作预处理。

[0102] 4) 试纸裁剪及装配

[0103] 同实施例 5。

[0104] 实施例 9. 彩色胶乳标记蛋白制备

[0105] 1) 彩色胶乳标记液的制备

[0106] 胶乳的共价活化:超声波处理胶乳微球体 30 秒,调节胶乳微球体浓度为 $1.0 \times 10^{12}/\text{mL}$,15000rpm 离心 10 分钟,离心后收集沉淀物用蒸馏水溶解,并用 200W 超声波分散 30 秒;先加入 $50\ \mu\text{L}$ 的 50mg/mL EDC,振荡混匀,再加入 $50\ \mu\text{L}$ 的 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,振荡混匀,室温下平衡 30 分钟后在 15000rpm 离心 10 分钟,沉淀用 50mM 柠檬酸缓冲液溶解,静置于 4℃冰箱。

[0107] 2) 彩色胶乳标记蛋白的制备

[0108] 将活化后的胶乳于 200W 超声波处理 30 秒,按照 $100 \sim 150\ \mu\text{g}$ 蛋白/ $100\ \mu\text{L}$ 彩色

胶乳的比例加入待标记的 NNE 抗原蛋白、豚鼠抗人 IgG、兔 IgM、马抗人 IgG、马 IgG 或骆驼 IgG, 混匀室温搅拌反应 2 小时, 离心洗涤, 每次 15000rpm 下离心 10 分钟, 共洗涤 3 次, 沉淀用 PBS-TBN 溶解并 100W 超声波处理 30 秒, 然后用 PBS-TBN 稀释至离心前体积, 4℃ 保存备用。

[0109] 实施例 10. 彩色胶乳标记抗 NNE 抗体检测试纸 5 制备

[0110] 试纸条 5 的结合垫结合蛋白为红色胶乳标记豚鼠抗人 IgG, 检测带包被 NNE 抗原蛋白, 质控带包被羊抗豚鼠 IgG 的 IgG 单克隆抗体和 SPA。试纸条长度约 6.5cm, 宽 4mm。结合垫材质为聚酯膜, 分析膜材质为硝酸纤维素膜 (NC)。制备步骤如下:

[0111] 1) 分析膜的制备

[0112] 同实施例 5, 所不同的是质控带的包被蛋白 SPA 和羊抗鼠 IgG 分别稀释至到 0.8mg/mL, 1 : 1 混匀, 以 1 μ L/cm 用划膜喷金仪喷涂, 缓冲液 pH 为 7.7。

[0113] 2) 结合垫的制备

[0114] 选用聚脂膜, 不作预处理, 直接把实施例 9 中红色胶乳标记的 NNE 抗原蛋白用划膜喷金仪, 以 3 μ L/cm 的用量喷涂在预处理的聚脂膜上, 结合垫缓冲液 pH 为 7.5。

[0115] 3) 样品垫制备

[0116] 同实施例 5。

[0117] 4) 试纸裁剪及装配

[0118] 同实施例 5。

[0119] 实施例 11 彩色胶乳标记抗 NNE 抗体检测试纸 6 制备

[0120] 试纸条 6 的结合垫 2 层, 2a 结合蛋白为紫色胶乳标记的 NNE 抗原蛋白, 2b 层为兰色胶乳标记的兔 IgM, 检测带包被兔抗人 IgG 单克隆抗体, 质控带包被鼠抗兔 IgM, 试纸条长度约 6.5cm, 宽 4mm。结合垫材质为玻璃纤维膜, 分析膜材质为硝酸纤维素膜。制备步骤如下:

[0121] 1) 分析膜制备:

[0122] 同实施例 5, 所不同的是检测带的包被蛋白兔抗人 IgG 单克隆抗体的稀释浓度约为 1.0mg/mL, 缓冲液 pH 为 7.4。质控带的包被蛋白鼠抗兔 IgG 稀释浓度为 0.9mg/mL, 缓冲液 pH 为 7.4。

[0123] 2) 结合垫制备

[0124] 同实施例 5, 所不同的是结合垫为 2 层, 2a 层为紫色胶乳标记的 NNE 抗原蛋白, 2b 层为蓝色胶乳标记的兔 IgM, 喷涂量分别为 3.5 μ L/cm 和 3.0 μ L/cm。

[0125] 3) 样品垫制备

[0126] 同实施例 5。

[0127] 4) 试纸裁剪及装配

[0128] 同实施例 6。

[0129] 实施例 12 彩色胶乳标记抗 NNE 抗体检测试纸 7 制备

[0130] 试纸条 7 的结合垫为 2 层, 2a 层为紫色胶乳标记的 NNE 抗原蛋白, 2b 层为兰色胶乳标记的羊抗鼠 IgG, 检测带包被骆驼抗人 IgG 单克隆抗体, 质控带包被 Protein G, 试纸条长度约 6.5cm, 宽 4mm。结合垫材质为聚酯膜, 分析膜材质为醋硝酸纤维素膜。制备步骤如下:

[0131] 1) 分析膜制备：

[0132] 检测带制备：用包被缓冲液分别稀释骆驼抗人 IgG 单克隆抗体至浓度约为 1.0mg/mL，用划膜喷金仪 HM3035，距离结合垫 1cm 处，以 1 μ L/cm 喷涂于 NC 上，构成检测带 (4)。

[0133] 质控带制备：用包被缓冲液分别将 Protein G 稀释至约 1.5mg/mL，距离检测带约 5mm 处，以 1 μ L/cm 用划膜喷金仪喷涂于同一张 NC 膜上，构成质控带 (5)，质控带同时距离吸水垫 (6) 约 1cm。

[0134] 分析膜 37℃ 烘干，封装备用。

[0135] 2) 结合垫制备

[0136] 用结合垫缓冲液浸泡聚酯膜约 30 分钟，37℃ 烘干，将实施例 9 中制备的紫色胶乳标记的 NNE 抗原蛋白和蓝色胶乳标记的鼠 IgG 按 1 : 1 混匀，用划膜喷金仪以 5 μ L/cm 的用量喷涂在预处理的玻璃纤维膜上，37℃ 烘干即构成结合垫，置 2 ~ 8℃ 备用。

[0137] 3) 样品垫制备

[0138] 用样品垫处理液浸泡样品垫，然后在 37℃ 下 1h 烘干，备用。

[0139] 4) 试纸裁剪及装配

[0140] 同实施例 6。

[0141] 实施例 13 彩色胶乳标记抗 NNE 抗体检测试纸 8 制备

[0142] 试纸条 8 的结合垫 1 层，为紫色胶乳标记的马抗人 IgG 和蓝色胶乳标记的马 IgG，检测带包被 NNE 抗原蛋白，质控带包被鼠抗马 IgG，试纸条长度约 6.5cm，宽 3mm。结合垫材质为聚酯膜，分析膜材质为醋硝酸纤维素膜。制备步骤如下：

[0143] 1) 分析膜制备：

[0144] 同实施例 5，所不同的是检测带包被蛋白为 NNE 抗原蛋白，稀释浓度为 0.9mg/mL，喷涂量为 1.2 μ L/cm。质控带包被蛋白为鼠抗马 IgG，稀释浓度 0.3mg/mL，喷涂量为 1 μ L/cm。包被缓冲液 pH 值 7.3。

[0145] 2) 结合垫制备

[0146] 同实施例，所不同的是选用聚酯膜，不作浸泡处理。结合垫结合蛋白为紫色胶乳标记的 NNE 抗原蛋白和蓝色胶乳标记的鼠 IgG，分别稀释成 1.6mg/mL 和 1.0mg/mL，按 1 : 1 混匀，喷涂量为 5 μ L/cm。

[0147] 3) 样品垫制备

[0148] 同实施例 5。

[0149] 4) 试纸裁剪及装配

[0150] 同实施例 5。

[0151] 实施例 14 样本处理

[0152] 血清样本：取全血 1 ~ 5mL 于血清采集管中，静置 30min ~ 2h，3000 ~ 5000g 离心 5 ~ 10min，取上清即得。根据试纸条的检测精度，把样本用加样缓冲液稀释 0 ~ 100 倍，取 50 ~ 100 μ L 滴加到试纸条的加样孔中，静置 5 ~ 20 分钟后观察结果。

[0153] 血浆样本：取全血 1 ~ 5mL 于枸橼酸钠或肝素钠抗凝管中混匀，1000 ~ 3000g 离心 5 ~ 10min，取上清即得到血浆样本。根据试纸条的检测精度，把样本用加样缓冲液稀释 0-100 倍，取 50 ~ 100 μ L 滴加到试纸条的加样孔中，静置 5 ~ 20 分钟后观察结果。

[0154] 全血标本：取指尖或耳垂新鲜血约 50 μ L，滴加到加样孔中，马上用 50 μ L 加样缓

冲液滴加到加样孔中稀释,静置 5 ~ 20 分钟后观察结果。

[0155] 实施例 15 试纸条性能评估

[0156] 本发明试剂条的性能包括稳定性、批内不精确度和批间不精确度评估。

[0157] 1、37℃稳定性试验

[0158] 将试纸条放置 37℃,每日取出用质控品和阴阳性参考品各 10 份的阴阳性符合率的批内精密度来判断试纸的稳定性。4 个月后质控品以及各个阴阳性参考品的阴阳性符合率均为 100%。推测试纸条的保质期在 18 个月以上。

[0159] 2、批内不精确度

[0160] 取实施例 5 ~ 8 各一个批次的金标试纸条,和实施例 10 ~ 12 各一个批次的胶乳试纸条,分别用高、中、低三种阳性血清和阴性血清各一份,每份血清分别用金标试纸条和胶乳试纸条重复检测 10 次,结果如下表所示,所有阳性血清的检测结果均为阳性,所有阴性血清的检测结果均为阴性,提示本发明的胶体金试纸条和胶乳试纸条批内不精确度符合标准。

[0161]

		强阳性血清	中度阳性血清	弱阳性血清	阴性血清
试纸条1	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条2	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条3	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条4	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条5	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条6	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条7	阳性结果数	10	10	10	0
	阴性结果数	0	0	0	10

[0162] 3、批间不精确度

[0163] 试纸条 1 和试纸条 6 各三个批次,用高、中、低三种阳性血清和阴性血清检测,每份血清检测 10 条,10 分钟后观察结果并填入下表,试纸条 1 和试纸条 6 各三个不同批次的检测结果一致,说明批间不精确度符合标本。

[0164]

		强阳性血清	中度阳性血清	弱阳性血清	阴性血清
试纸条1	阳性结果数	10	10	10	0
第一批	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条1	阳性结果数	10	10	10	0
第二批	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条1	阳性结果数	10	10	10	0
第三批	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条6	阳性结果数	10	10	10	0
第一批	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条6	阳性结果数	10	10	10	0
第二批	阴性结果数	0	0	0	10
试纸条6	阳性结果数	10	10	10	0
第三批	阴性结果数	0	0	0	10

[0165] 实施例 16 试纸条检测及临床性能评估

[0166] 用实施例 5～8 制备的金标试纸条和实施例 10～12 制备胶乳试纸条检测确诊的 IBD 患者和正常人血清或血浆各 100 例。检测结果如下表所示,其中检测灵敏度为在所有临床阳性病例数中,试纸条检测阳性数所占的百分比,检测特异性为在所有临床阴性病例数中试纸条检测阴性数所占的百分比,检测准确性为临床阳性病例中检测的阳性数与临床阴性病例中的阴性数之和占总数的百分比。

[0167] 从表 3 的结果可以看出,本发明制备的金标和胶乳试纸条用于 IBD 患者的检测灵敏度为 7～25%,特异性为 94～100%,符合临床诊断预期。

[0168]

结果 试纸条	临床阳性 100 例		临床阴性 100 例		检测 灵敏度 (%)	检测 特异性 (%)
	检测 阳性数	检测 阴性数	检测 阳性数	检测 阴性数		
1	19	81	1	99	19	99
2	16	84	6	94	16	94
3	15	85	2	98	15	98
4	10	90	3	97	10	97
5	25	75	2	98	25	99
6	13	100	4	100	13	100
7	18	82	2	98	18	98
8	7	90	3	97	7	97

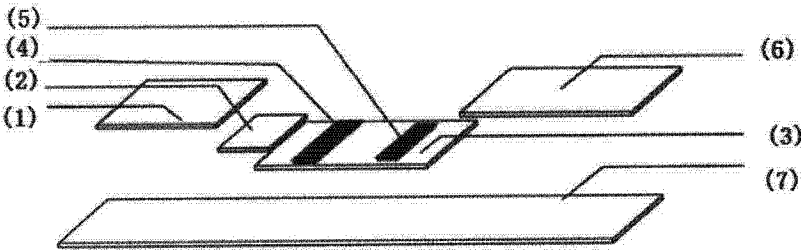


图 1

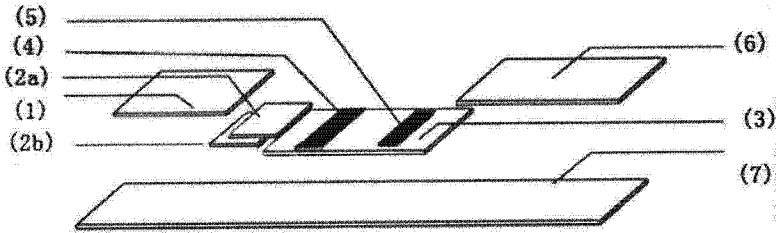


图 2

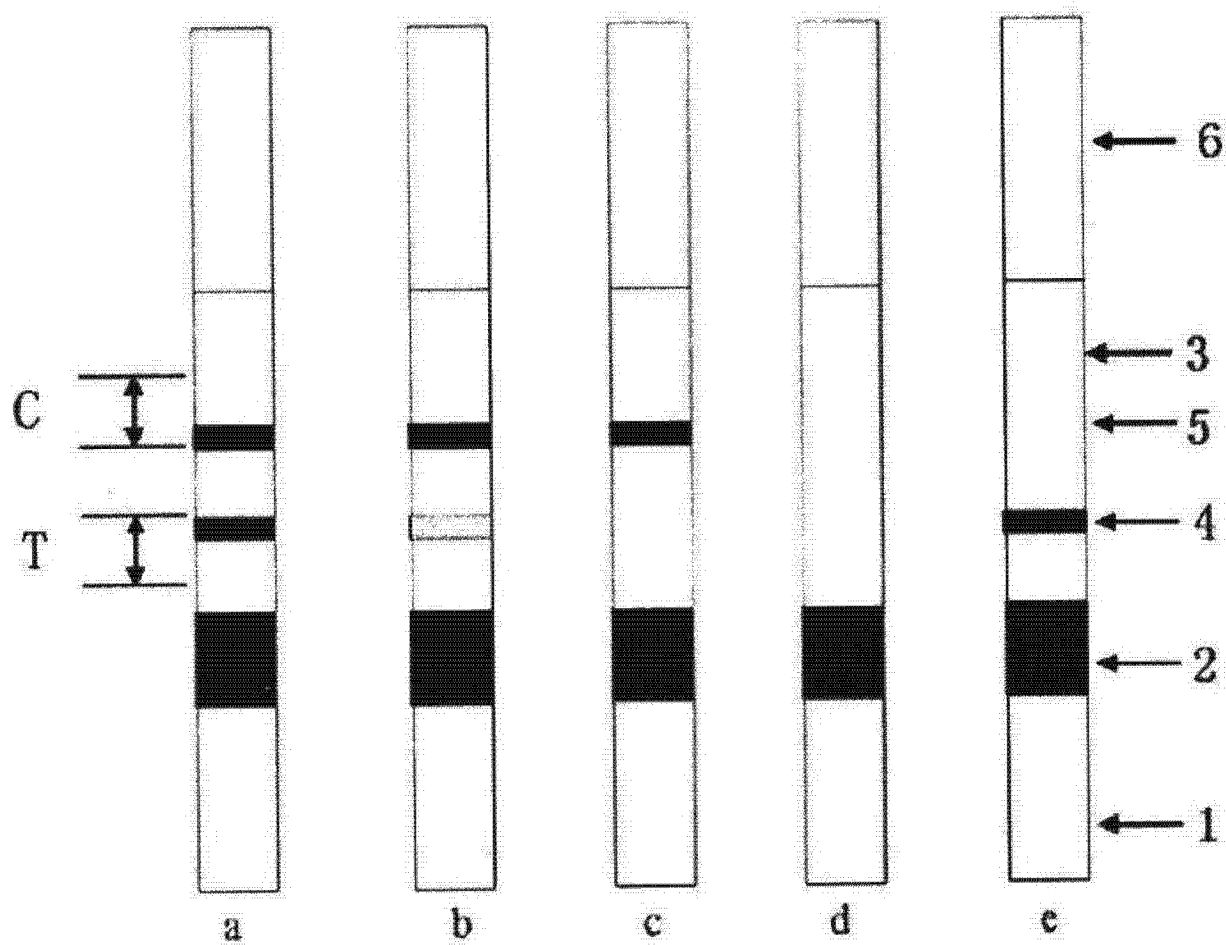


图 3

专利名称(译)	一种抗alpha-烯醇化酶抗体层析试纸条及其用途		
公开(公告)号	CN104764884A	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201410412018.2	申请日	2014-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	苏州和锐医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州和锐医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州和锐医药科技有限公司		
[标]发明人	陈菲 李振军 霍如松 周阳		
发明人	陈菲 李振军 霍如松 周阳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗alpha-烯醇化酶抗体层析试纸条、制备方法及应用。该试纸条包括样品垫(1)、结合垫(2)、分析膜(3)、吸水垫(6)、底板(7)、检测带T线(4)和质控带C线(5)，所述底板(7)的上部贴合有分析膜(3)，所述分析膜(3)上部的两端分别贴合有结合垫(2)和吸水垫(6)，结合垫(2)上部的一端贴合有样品垫(1)，检测带T线(4)和质控带C线(5)设置在分析膜(3)上。本发明采用间接免疫检测法，用alpha-烯醇化酶抗原蛋白，实现对样本中抗alpha-烯醇化酶抗体的高灵敏度、高特异性快速检测，为临床炎症性肠病等自体免疫性疾病的辅助诊断提供依据。

