



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108362874 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201810067649.3

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.01.24

(71)申请人 天津市协和医药科技集团有限公司

地址 300301 天津市滨海新区高新五路38号

申请人 天津市协和化学发光诊断试剂有限公司

(72)发明人 王立凯 阎尔坤 孙少飞 郑剑锋

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 陆艺

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

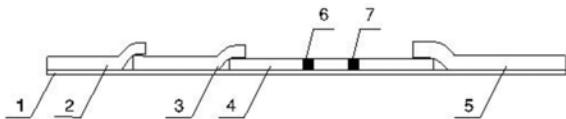
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂

(57)摘要

本发明公开了检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂，该试剂包括底板，在底板的上面设置有样品垫，量子点标记物结合垫，层析反应膜和吸水垫，其中量子点标记物结合垫上吸附有量子点标记的鼠抗人IgG抗体，层析反应膜上有两条分别固定着ZnT8蛋白的检测线和葡萄球菌蛋白A的质控线，将待测人全血或血浆样本滴加至样品垫上后，经过3-4分钟的层析反应，用荧光免疫分析仪检测检测线和质控线的荧光强度，即可通过内置软件计算出该样品中的锌转运蛋白8自身抗体含量。具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。



1. 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂,包括底板(1),在底板的上面设置有样品垫(2),量子点标记物结合垫(3),层析反应膜(4)和吸水垫(5),其特征是:

所述样品垫用下述方法制成:用0.01M, pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.1-0.2mg/ml溶液,用喷膜仪按20-50ul/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

所述量子点标记物结合垫用下述方法制成:

1) 取50ul、5-20mg/ml的量子点加入100ul 20mM pH=7.2的PBS,再加入10-20μL 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化3-6小时;

2) 将步骤1)获得的液体用10-50mM pH=7.2的PBS透析20-24小时,换液2-3次;

3) 将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成3-5mg/ml,取20μL加入步骤2)获得的液体中混匀,2-8℃搅拌反应8-12小时,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液,向沉淀中加入500μL 20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液;

4) 向步骤3)得到的沉淀中加入100-200μL封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散30-60秒,4℃避光保存;封闭液的配制为20mM PBS, pH=7.2, BSA10g/L;

5) 按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按10-20ul/cm<sup>2</sup>的量喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

所述层析反应膜用下述方法制成:

1) 将ZnT8蛋白用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.4-0.8mg/ml为A溶液;

2) 将ProteinA用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为1.5-3.0mg/ml为B溶液;

3) 用划膜仪在硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线(6),用B溶液划出质控线(7)。

2. 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的制备方法,其特征是包括如下步骤:

样品垫的制备:用0.01M, pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.1-0.2mg/ml溶液,用喷膜仪按20-50ul/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

量子点标记物结合垫的制备:

1) 取50ul、5-20mg/ml的量子点加入100ul 20mM pH=7.2的PBS,再加入10-20μL 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化3-6小时;

2) 将步骤1)获得的液体用10-50mM pH=7.2的PBS透析20-24小时,换液2-3次;

3) 将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成3-5mg/ml,取20μL加入步骤2)获得的液体中混匀,2-8℃搅拌反应8-12小时,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液,向沉淀中加入500μL 20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液;

4) 向步骤3)得到的沉淀中加入100-200μL封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散30-60秒,4℃避光保存;封闭液的配制为20mM PBS, pH=7.2, BSA10g/L;

5) 按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按10-20ul/cm<sup>2</sup>的量喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

层析反应膜的制备:

1) 将ZnT8蛋白用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.4-0.8mg/ml为A溶液;

2) 将ProteinA用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为1.5-3.0mg/ml为B溶液;

3) 用划膜仪在硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线(6),用B溶液划出质控线(7);

在底板(1)上设置样品垫,量子点标记物结合垫(3),层析反应膜(4)和吸水垫(5)。

## 检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析及医学检验技术领域,具体的,本发明涉及一种检测人血液锌转运蛋白8自身抗体的量子点荧光层析免疫分析试剂及制备方法。

### 背景技术

[0002] 糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢综合症,其主要是由于胰岛素的绝对不足,外周组织细胞对胰岛素的生物效应有抵抗性或耐受性,或者两者兼而有之。根据主要病因不同,糖尿病分为1型和2型两种。1型糖尿病是一种以胰岛 $\beta$ 细胞选择性破坏为特征的代谢紊乱性自身免疫性疾病,主要由于基因缺陷,不能自主产生足够的胰岛素,无法让细胞对多余的血糖进行储存,人体从而出现高血糖现象并引发诸多并发症。而2型糖尿病主要是由于后天出现胰岛素抵抗作用,胰岛素分泌正常,但胰岛素受体无法正常工作,细胞无法回应胰岛素而进行多余血糖的储存,从而出现高血糖现象并引起并发症。

[0003] 糖尿病是现代疾病中的第二大杀手,其对人体的危害仅次于癌症。糖尿病的直接危险包括低血糖休克,糖尿病酮症酸中毒,高血糖伴高渗非酮昏迷等。但大多数糖尿病患者的死因来自于疾病的长期并发症和后遗症。人体最易受累的是视网膜、肾脏、血管及神经组织,最终可导致失明、肾功能衰竭、肢体坏疽、多发性神经炎及心脑血管疾病等。

[0004] 由于在糖尿病明确诊断以前,患者的并发症其实早已经开始,尤其1型糖尿病发病时已经有80%~90%的胰岛 $\beta$ 细胞功能丧失,此时各种免疫干预措施均难以奏效,所以防治工作的关键在于早期诊断,争取在糖尿病前期甚至更早给予免疫干预或使用外源性胰岛素保护剩余胰岛功能。因此,应用适当的诊断标准进行早期诊断和分型,对不同类型的糖尿病采取相应的治疗措施,对糖尿病的控制以及对其并发症的治疗都是十分重要的。

[0005] 锌是胰岛素储存和分泌机制中的一个重要组分, $\beta$ 细胞需要有效且特异的转运蛋白来累积足够量的锌。锌转运蛋白8(ZnT8)是人类1型糖尿病的主要自身抗原之一,具有高度 $\beta$ 细胞特异性,其通过影响锌离子浓度而在胰岛素合成和分泌中发挥重要作用。锌转运蛋白8自身抗体(ZnT8A)对自身免疫性糖尿病有着重要的诊断与预测价值。

[0006] 因此测定ZnT8A对临床糖尿病诊断及药物治疗效果的观察十分重要,ZnT8A是糖尿病前期个体较特异的免疫指标。ZnT8A的测定意义为:①可作为1型糖尿病的预测。ZnT8A的存在,提示胰岛 $\beta$ 细胞的破坏及部分功能的丧失,因此对1型糖尿病的预测、诊断、治疗都有独特的价值。②从2型糖尿病患者中鉴别迟发型1型糖尿病。此类患者常可出现ZnT8A的高水平,并稳定维持,可考虑早期胰岛素干预治疗。③作为糖尿病的普查手段,ZnT8A升高就预示其内源性胰岛素的丧失,一般在糖尿病出现临床症状前数年就能检测到,以发现糖尿病的高危人群和个体。

[0007] 目前对ZnT8A的检测方法主要有ELISA技术、化学发光免疫分析技术和免疫印迹技术等,如深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司建立了一种检测人血清中ZnT8A的化学发光免疫分析方法。主要是以锌转运蛋白8包被的磁微粒作为固液分离介质,以吖啶酯标记的锌转运蛋白8为示踪物建立的双抗原夹心法化学发光体系;该方法的优点是灵敏度高、易实现

自动化操作。但是该方法需要与全自动化学发光免疫分析设备相配套,成本较高。又如深圳市伯劳特生物制品有限公司公布了一种用于糖尿病自身抗体6项联检试剂盒,检测人血清中ICA、GADA、IAA、IA-2A、CpH-A和ZnT8A等6种抗体。该方法的优点是可以一次同时检测6中抗体,但是免疫印迹法的最大不足之处是灵敏度低、操作方法繁琐,且只能对自身抗体进行定性检测,无法对血清中的自身抗体进行准确定量测定,因此也就无法判断胰岛 $\beta$ 细胞的破坏程度和自身免疫疾病的严重程度。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种灵敏度高,检测时间短,特异性好,稳定可靠、成本低的检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂。

[0009] 本发明的第二个目的是提供一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的制备方法。

[0010] 本发明的技术方案概述如下:

[0011] 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂,包括底板1,在底板的上面设置有样品垫2,量子点标记物结合垫3,层析反应膜4和吸水垫5;

[0012] 所述样品垫用下述方法制成:用0.01M, pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.1-0.2mg/ml溶液,用喷膜仪按20-50ul/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0013] 所述量子点标记物结合垫用下述方法制成:

[0014] 1)取50ul、5-20mg/mL的量子点加入100ul 20mM pH=7.2的PBS,再加入10-20 $\mu$ L 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化3-6小时;

[0015] 2)将步骤1)获得的液体用10-50mM pH=7.2的PBS透析20-24小时,换液2-3次;

[0016] 3)将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成3-5mg/mL,取20 $\mu$ L加入步骤2)获得的液体中混匀,2-8°C搅拌反应8-12小时,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液,向沉淀中加入500 $\mu$ L 20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液;

[0017] 4)向步骤3)得到的沉淀中加入100-200 $\mu$ L封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散30-60秒,4°C避光保存;封闭液的配制为20mM PBS, pH=7.2, BSA10g/L;

[0018] 5)按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按10-20ul/cm<sup>2</sup>的量喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0019] 所述层析反应膜用下述方法制成:

[0020] 1)将ZnT8蛋白用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.4-0.8mg/ml为A溶液;

[0021] 2)将ProteinA用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为1.5-3.0mg/ml为B溶液;

[0022] 3)用划膜仪在硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线6,用B溶液划出质控线7。

[0023] 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的制备方法,包括如下步骤:

[0024] 样品垫的制备:用0.01M, pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.1-0.2mg/ml溶液,用喷膜仪按20-50ul/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0025] 量子点标记物结合垫的制备:

- [0026] 1) 取50 $\mu$ l、5-20mg/mL的量子点加入100 $\mu$ l 20mM pH=7.2的PBS,再加入10-20 $\mu$ L 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化3-6小时;
- [0027] 2) 将步骤1)获得的液体用10-50mM pH=7.2的PBS透析20-24小时,换液2-3次;
- [0028] 3) 将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成3-5mg/mL,取20 $\mu$ L加入步骤2)获得的液体中混匀,2-8℃搅拌反应8-12小时,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液,向沉淀中加入500 $\mu$ L 20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1-1.5小时,弃去上清液;
- [0029] 4) 向步骤3)得到的沉淀中加入100-200 $\mu$ L封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散30-60秒,4℃避光保存;封闭液的配制为20mM PBS, pH=7.2, BSA10g/L;
- [0030] 5) 按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按10-20 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>的量喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;
- [0031] 层析反应膜的制备:
- [0032] 1) 将ZnT8蛋白用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.4-0.8mg/ml为A溶液;
- [0033] 2) 将ProteinA用0.01M, pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为1.5-3.0mg/ml为B溶液;
- [0034] 3) 用划膜仪在硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线6,用B溶液划出质控线7;
- [0035] 在底板1上设置样品垫,量子点标记物结合垫3,层析反应膜4和吸水垫5。
- [0036] 本发明的方法,具有灵敏度高、特异性好、稳定性强,安全环保、操作简便等优点。只需将末梢全血样品滴加至样品垫上,层析反应约4分钟插入荧光免疫分析仪即可读取ZnT8A的准确含量,且配套的荧光免疫分析仪操作简单、成本低廉,可在中小社区医院乃至诊所中广泛使用。本发明方便快捷、可定量检测、成本低、易普及等。

## 附图说明

- [0037] 图1为本发明一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂结构示意图。

## 具体实施方式

- [0038] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。
- [0039] 本方法各实施例所用量子点是表面富含氨基基团、直径在2-4nm的CdTe/MgSe复合型核壳量子点,实验证明,也可以选择其它的量子点。
- [0040] 实施例1
- [0041] 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的制备方法,包括如下步骤:
- [0042] 样品垫的制备:用0.01M, pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.15mg/ml溶液,用喷膜仪按35 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至1.2cm×30cm的聚酯纤维膜上,晾干备用;
- [0043] 量子点标记物结合垫的制备:
- [0044] 1) 取50 $\mu$ l、10mg/mL的量子点(量子点的直径在3nm)加入100 $\mu$ l 20mM pH=7.2的PBS,再加入15 $\mu$ L 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化5小时;
- [0045] 2) 将步骤1)获得的液体用10-50mM pH=7.2的PBS透析22小时,换液2次;
- [0046] 3) 将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成4mg/mL,取20 $\mu$ L加入步骤2)获得的液体中混匀,5℃搅拌反应10小时,20000RPM离心1.5小时,弃去上清液,向沉淀中加入500 $\mu$ L

20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1.5小时,弃去上清液;

[0047] 4) 向步骤3)得到的沉淀中加入150μL封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散45秒,4℃避光保存;封闭液的配制为20mM PBS,pH=7.2,BSA10g/L;

[0048] 5) 按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按15ul/cm<sup>2</sup>的量喷至0.8cm×30cm聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0049] 各实施例中标记物稀释液配方:20mM pH=7.2的PBS,5g/L BSA和0.5g/L Triton 100。

[0050] 层析反应膜的制备:

[0051] 1) 将ZnT8蛋白用0.01M,pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.6mg/ml为A溶液;

[0052] 2) 将ProteinA用0.01M,pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为2mg/ml为B溶液;

[0053] 3) 用划膜仪在2.5cm×30cm硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线6,用B溶液划出质控线7;A溶液和B溶液的用量分别为1.0ul/cm,检测线和质控线平行,相距0.6cm;

[0054] 吸水垫:

[0055] 是将吸水滤纸切割成2.5cm×30cm规格的长条。

[0056] 底板1是规格为5cm×30cm低荧光背景硬纸板,单面有不干胶,将样品垫2,量子点标记物结合垫3,层析反应膜4和吸水垫5相接粘贴在底板上粘贴固定好。然后用切条机横向切割成0.3cm×5cm的试纸条。

[0057] 实施例2

[0058] 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的制备方法,包括如下步骤:

[0059] 样品垫的制备:用0.01M,pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.2mg/ml溶液,用喷膜仪按20ul/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0060] 量子点标记物结合垫的制备:

[0061] 1) 取50ul、5mg/mL的量子点(量子点的直径在2nm)加入100ul 20mM pH=7.2的PBS,再加入10μL 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化6小时;

[0062] 2) 将步骤1)获得的液体用50mM pH=7.2的PBS透析20小时,换液3次;

[0063] 3) 将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成3mg/mL,取20μL加入步骤2)获得的液体中混匀,2℃搅拌反应12小时,20000RPM离心1小时,弃去上清液,向沉淀中加入500μL 20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1小时,弃去上清液;

[0064] 4) 向步骤3)得到的沉淀中加入100μL封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散60秒,4℃避光保存;封闭液的配制为20mM PBS,pH=7.2,BSA10g/L;

[0065] 5) 按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按10ul/cm<sup>2</sup>的量喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0066] 层析反应膜的制备:

[0067] 1) 将ZnT8蛋白用0.01M,pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.4mg/ml为A溶液;

[0068] 2) 将ProteinA(葡萄球菌蛋白A)用0.01M,pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为1.5mg/ml为B溶液;

[0069] 3) 用划膜仪在2.5cm×30cm硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线6,用B溶液划出质控线7;A溶液和B溶液的用量分别为1.0ul/cm,检测线和质控线相距0.5cm;

[0070] 吸水垫:

[0071] 是将吸水滤纸切割成2.5cm×30cm规格的长条。

[0072] 底板1是规格为5cm×30cm低荧光背景硬纸板,单面有不干胶,将样品垫2,量子点标记物结合垫3,层析反应膜4和吸水垫5相接粘贴在底板上粘贴固定好。然后用切条机横向切割成0.3cm×5cm的试纸条。

[0073] 实施例3

[0074] 一种检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的制备方法,包括如下步骤:

[0075] 样品垫的制备:用0.01M,pH=7.2的Tris-HCl作溶剂,将抗红细胞抗体配成0.1mg/ml溶液,用喷膜仪按50ul/cm<sup>2</sup>的量将红细胞抗体溶液喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0076] 量子点标记物结合垫的制备:

[0077] 1)取50ul、20mg/mL的量子点(量子点的直径在4nm)加入100ul 20mM pH=7.2的PBS,再加入20μL 25%的戊二醛,混匀,室温搅拌活化3小时;

[0078] 2)将步骤1)获得的液体用10mM pH=7.2的PBS透析24小时,换液2次;

[0079] 3)将鼠抗人IgG抗体用20mM pH=7.2的PBS配成5mg/mL,取20μL加入步骤2)获得的液体中混匀,8℃搅拌反应8小时,20000RPM离心1.5小时,弃去上清液,向沉淀中加入500μL 20mM pH=7.2的PBS,使沉淀悬浮起来,20000RPM离心1.5小时,弃去上清液;

[0080] 4)向步骤3)得到的沉淀中加入200μL封闭溶液使沉淀悬浮混匀,超声分散30秒,4℃避光保存;封闭液的配制为20mM PBS,pH=7.2,BSA10g/L;

[0081] 5)按体积比为1:4的比例,将步骤4)获得的液体与标记物稀释液,混匀,用喷膜仪按20ul/cm<sup>2</sup>的量喷至聚酯纤维膜上,晾干备用;

[0082] 层析反应膜的制备:

[0083] 1)将ZnT8蛋白用0.01M,pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为0.8mg/ml为A溶液;

[0084] 2)将ProteinA用0.01M,pH=7.3的Tris-HCl稀释至浓度为3.0mg/ml为B溶液;

[0085] 3)用划膜仪在2.5cm×30cm硝酸纤维素膜上用A溶液划出检测线6,用B溶液划出质控线7;A溶液和B溶液的用量分别为1.0ul/cm,检测线和质控线相距0.8cm;

[0086] 吸水垫:

[0087] 是将吸水滤纸切割成2.5cm×30cm规格的长条。

[0088] 底板1是规格为5cm×30cm低荧光背景硬纸板,单面有不干胶,将样品垫2,量子点标记物结合垫3,层析反应膜4和吸水垫5相接粘贴在底板上粘贴固定好。然后用切条机横向切割成0.3cm×5cm的试纸条。

[0089] 实施例4

[0090] 检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂的使用:

[0091] 操作:将全血(或血浆)样品滴加至样品垫2上,层析反应约4分钟,将试纸条插入荧光定量免疫分析仪(HF201型,深圳市华科瑞科技有限公司生产)。

[0092] 将全血(或血浆)样品滴加至样品垫2上,样品流经量子点标记物结合垫3时,带动量子点标记的抗体沿着层析反应膜做毛细运动,分别流经层析反应膜上的检测线及质控线;若样品中有ZnT8A分子,则与量子点标记的鼠抗人IgG抗体相结合,流经检测线时ZnT8A会被包被于此的ZnT8抗原所捕获,从而构成抗原抗体复合物。而剩余的量子点标记的鼠抗

人IgG抗体则继续向前,在质控线处被ProteinA所捕获。层析反应约4分钟以后,将试纸条插入荧光定量免疫分析仪进行检测,在光源激发下,可分别测定检测线和质控线上量子点荧光信号强度,通过荧光分析仪内置软件绘制的标准曲线可计算出该血液样本中ZnT8A的含量。

[0093] 本发明试剂的方法学技术指标如下:

[0094] 根据本领域中常规的制造及检定规程对试剂进行鉴定,经过大量的实验证明,本发明的试剂在ZnT8A含量的测定中,检测的方法学指标如下:

[0095] ①检测范围:0~2500U/ml;

[0096] ②灵敏度:最小检出限为0.21U/ml;

[0097] ③精密度:批内变异系数小于8%,批间变异系数小于15%;④准确性:回收率测定在90~110%之间;

[0098] ⑤特异性:与类似物的交叉反应率小于0.9%;

[0099] ⑥稳定性:试剂于37℃放置7天后,各组分仍稳定。

[0100] 本发明试剂的对临床全血样本的测定实验结果:

[0101] 按照实施例4的操作步骤,使用实施例1的试剂,对149例全血样本进行测定,由58例1型糖尿病患者样本,42例2型糖尿病患者样本以及49例健康人样本组成,测定结果如下表所示:

[0102] 表1.对149例血液样本的检测结果

[0103]

检测样本 结果	1型糖尿病样本 58例	2型糖尿病样本 42例	健康人样本 49例
阳性例数	51例	1	0
阳性率	87.93%	2.38%	0

[0104] 使用本发明的检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂对149例血液样本进行了检测,结果显示,58例1型糖尿病样本病人血液样本中,有51例ZnT8A浓度值大于参考临界值15U/mL,阳性率达87.93%;42例2型糖尿病样本病人血液样本中,仅有1例ZnT8A浓度值大于临界值,阳性率为2.38%;49例健康人血液样本中,ZnT8A浓度值均在临界值以下。以上数据说明本试剂对1型糖尿病的早期诊断及糖尿病的鉴别分型的灵敏度及特异性良好。

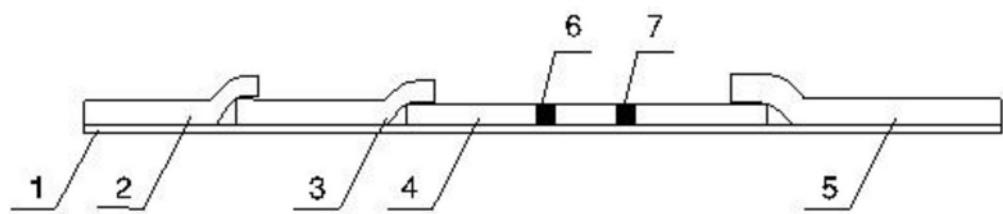


图1

专利名称(译)	检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN108362874A</a>	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201810067649.3	申请日	2018-01-24
[标]发明人	王立凯 阎尔坤 孙少飞 郑剑锋		
发明人	王立凯 阎尔坤 孙少飞 郑剑锋		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/588 G01N33/68		
代理人(译)	陆艺		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了检测人血液ZnT8A的量子点荧光层析免疫分析试剂，该试剂包括底板，在底板的上面设置有样品垫，量子点标记物结合垫，层析反应膜和吸水垫，其中量子点标记物结合垫上吸附有量子点标记的鼠抗人IgG抗体，层析反应膜上有两条分别固定着ZnT8蛋白的检测线和葡萄球菌蛋白A的质控线，将待测人全血或血浆样本滴加至样品垫上后，经过3-4分钟的层析反应，用荧光免疫分析仪检测检测线和质控线的荧光强度，即可通过内置软件计算出该样品中的锌转运蛋白8自身抗体含量。具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。

