



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613256 A
(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201811394061.5

(22)申请日 2018.11.21

(71)申请人 杭州康知生物科技有限公司
地址 311100 浙江省杭州市余杭区余杭经
济技术开发区新颜路22号201G

(72)发明人 张乐之 吴敏华 余铭恩 王立童
吴滨 胡祥叶

(74)专利代理机构 杭州橙知果专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33261

代理人 李品

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

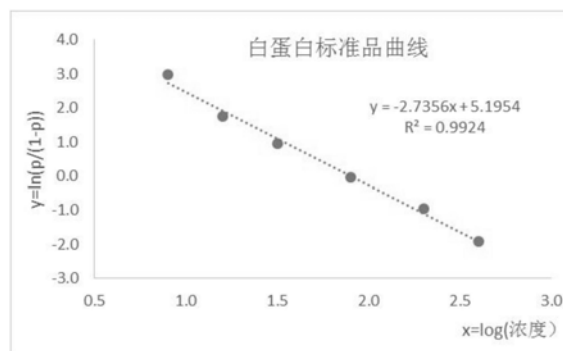
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试
剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明公开了尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒及制备方法,解决了临床检测尿微量蛋白检测不能同时进行检测等问题。一种尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的抗原溶液,免疫层析试纸条上包被有白蛋白捕获抗体、 α_1 -微球蛋白捕获抗体、转铁蛋白捕获抗体、 β_2 -微球蛋白捕获抗体和蛋白A;荧光微球标记的抗原溶液包括荧光微球标记的白蛋白溶液、荧光微球标记的 α_1 -微球蛋白溶液、荧光微球标记的转铁蛋白溶液和荧光微球标记的 β_2 -微球蛋白溶液,荧光微球还标记有IgG免疫球蛋白。本发明具有检测快速等优点。



1. 一种尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的抗原溶液,所述的免疫层析试纸条上包被有白蛋白捕获抗体、 α_1 -微球蛋白捕获抗体、转铁蛋白捕获抗体、 β_2 -微球蛋白捕获抗体和蛋白A;所述的荧光微球标记的抗原溶液包括荧光微球标记的白蛋白溶液、荧光微球标记的 α_1 -微球蛋白溶液、荧光微球标记的转铁蛋白溶液和荧光微球标记的 β_2 -微球蛋白溶液,所述的荧光微球还标记有IgG免疫球蛋白。

2. 根据权利要求1所述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述荧光微球是时间分辨荧光微球和量子点荧光微球中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述的荧光微球标记的抗原溶液还包括微球保存液。

4. 根据权利要求1所述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述的荧光微球标记的抗原溶液中各被标记的抗原蛋白的浓度如下:白蛋白100-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$; α_1 -微球蛋白50-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 转铁蛋白50-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; β_2 -微球蛋白20-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

5. 根据权利要求1所述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述的免疫层析试纸条上白蛋白捕获抗体的包被浓度为1.0-2.0 mg/ml , α_1 -微球蛋白捕获抗体的包被浓度为0.5-1.5 mg/ml , 转铁蛋白捕获抗体的包被浓度为0.5-1.5 mg/ml , β_2 -微球蛋白捕获抗体的包被浓度为0.1-1.0 mg/ml , 蛋白A的包被浓度为0.05-0.5 mg/ml 。

6. 一种试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如权利要求1-5任意一项所述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中的免疫层析试纸条的制备和如权利要求1-5任意一项所述尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中的的荧光微球标记的抗原溶液的制备。

7. 根据权利要求6所述的一种试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的免疫层析试纸条的制备方法如下:

步骤A:在硝酸纤维素膜上依次设置T₁线、T₂线、T₃线、T₄线和C线,在T₁线上包被白蛋白捕获抗体、T₂线上包被 α_1 -微球蛋白捕获抗体、T₃线上包被转铁蛋白捕获抗体、T₄线上包被 β_2 -微球蛋白捕获抗体和C线上包被蛋白A,包被完成后干燥;

步骤B:将样本垫、经步骤A处理后的硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板按顺序组装;

步骤C:将组装后的板切割成形成免疫层析试纸条,常温下加干燥剂密封保存。

8. 根据权利要求6所述的一种试剂盒的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的抗原溶液的制备方法如下:

步骤a:将荧光微球加入硼酸缓冲液中,稀释至荧光微球的浓度为0.1-1 mg/ml ,再加入EDC,混匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10-30 min ,得到混合液1。

步骤b:将混合液1离心并去除上清液,重新悬浮后分别加入白蛋白、 α_1 -微球蛋白、转铁蛋白、 β_2 -微球蛋白和IgG免疫球蛋白,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1-2 h ,得到混合液2;

步骤c:将混合液2离心并去除上清液,加入封闭液封闭1-2 h ,得到混合液3;

步骤d:将混合液3离心并去除上清液,加入微球保存液清洗并重新悬浮,在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

9. 一种尿四种微量蛋白的检测方法,其特征在于,采用如权利要求1-5任意一项所述尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒进行检测,包括如下步骤:

S01:将不同浓度梯度的四种蛋白校准品与荧光微球标记的抗原溶液混合;

S02:取100u1混合后的溶液滴加到免疫层析试纸条上,15min后,使用荧光分析仪读取荧光值;

S03:计算不同浓度各T线 $T/(T+C)$ 的比值,与浓度对应绘制标准曲线,得到标准方程;

S04:取待测样品与荧光微球标记的抗原溶液混合;取100u1混合后的溶液滴加到免疫层析试纸条上,15min后,使用荧光分析仪读取荧光值;计算各T线 $T/(T+C)$ 的比值,将比值带入标准方程得出待测样品中各蛋白的浓度。

10.根据权利要求9所述的一种尿四种微量蛋白的检测方法,其特征在于,所述的校准品中四种蛋白的比值为:(200:100:20:3)。

尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断免疫检测领域,具体涉及尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒及制备方法

背景技术

[0002] 尿液检查,是医学的一种检测方式。包括蛋白成分定量测定等。尿液微量蛋白测定可反映早期肾病、肾损伤情况。尿中微量蛋白升高多见于糖尿病、高血压及妊娠子痫等疾病并发肾病的前期。尿液微量蛋白初期检出增高阶段是肾病发生的早期信号和预兆,此时肾脏损害处在尚可逆转的时期,如及时治疗,可以终止或逆转肾病的发展进程。

[0003] 尿液微量蛋白联合检测可作为全身性或局部炎症反应的肾功能指标(如尿路感染等原因引起的肾脏早期病变,急性胰腺炎并发症的预测指标,服用对肾功能有影响药物的了解判断等),便于早期观察肾功能情况并及早采取治疗措施。

[0004] 当肾小球基膜受损时,尿液中白蛋白明显升高。白蛋白检测是临床反映肾脏和心血管系统改变的早期指征;尿液转铁蛋白检测是反映肾小球损伤的可靠指标;尿液 β_2 -微球蛋白主要与肾小管功能有关,检测 β_2 -微球蛋白是辅助诊断近曲小管损伤敏感而特异的指标;尿液 α_1 -微球蛋白测定是反映肾小管受损及其重吸收功能的一项灵敏指标。

[0005] 现有的临床检测尿液中上述微量蛋白检测通常为单项检测,不能同时进行检测,费时费力。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的在于提供一种尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒;本发明的第二个目的在于提供上述尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒的制备方法;本发明的第三个目的在于提供使用上述尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒进行尿四种微量蛋白检测的检测方法。

[0007] 本发明的第一个目的是通过下面的技术方案得以实现的:一种尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的抗原溶液,所述的免疫层析试纸条上包被有白蛋白捕获抗体、 α_1 -微球蛋白捕获抗体、转铁蛋白捕获抗体、 β_2 -微球蛋白捕获抗体和蛋白A;所述的荧光微球标记的抗原溶液包括荧光微球标记的白蛋白溶液、荧光微球标记的 α_1 -微球蛋白溶液、荧光微球标记的转铁蛋白溶液和荧光微球标记的 β_2 -微球蛋白溶液,所述的荧光微球还标记有IgG免疫球蛋白。

[0008] 在上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中,所述荧光微球是时间分辨荧光微球和量子点荧光微球中的至少一种。

[0009] 在上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中,所述的荧光微球标记的抗原溶液还包括微球保存液。微球保存液中包括缓冲液、电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂;缓冲液为MES缓冲液、PBS缓冲液、HEPES缓冲液、硼酸缓冲液中的一种,缓冲液pH值为5.0-8.0;电解质为氯化钠、氯化钾、磷酸氢钠、磷酸二氢钠中的一种或两种以上的

混合物,浓度在0.1%-2%之间;稳定剂为酪蛋白、牛血清白蛋白、甘露醇、蔗糖、葡聚糖中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.05%-1.0%之间;表面活性剂为吐温-20、曲拉通-100、聚醚中的一种或两种以上的混合物,浓度在0.01%-0.5%之间;防腐剂为叠氮钠、对羟基苯甲酸、Proclin300中一种,浓度在0.05%-0.1%之间。

[0010] 在上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中,所述的荧光微球标记的抗原溶液中各被标记的抗原蛋白的浓度如下:白蛋白100-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$; α_1 -微球蛋白50-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$;转铁蛋白50-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; β_2 -微球蛋白20-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0011] 在上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中,所述的免疫层析试纸条上白蛋白捕获抗体的包被浓度为1.0-2.0 mg/ml , α_1 -微球蛋白捕获抗体的包被浓度为0.5-1.5 mg/ml ,转铁蛋白捕获抗体的包被浓度为0.5-1.5 mg/ml , β_2 -微球蛋白捕获抗体的包被浓度为0.1-1.0 mg/ml ,蛋白A的包被浓度为0.05-0.5 mg/ml 。

[0012] 本发明的第二个目的是通过下面的技术方案得以实现的:一种试剂盒的制备方法,其特征在于,包括上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中的免疫层析试纸条的制备和上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒中的的荧光微球标记的抗原溶液的制备。

[0013] 在上述的一种试剂盒的制备方法中,所述的免疫层析试纸条的制备方法如下:

[0014] 步骤A:在硝酸纤维素膜上依次设置 T_1 线、 T_2 线、 T_3 线、 T_4 线和C线,在 T_1 线上包被白蛋白捕获抗体、 T_2 线上包被 α_1 -微球蛋白捕获抗体、 T_3 线上包被转铁蛋白捕获抗体、 T_4 线上包被 β_2 -微球蛋白捕获抗体和C线上包被蛋白A,包被完成后干燥;C线距离加样孔最远;

[0015] 步骤B:将样本垫、经步骤A处理后的硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板按顺序组装;

[0016] 步骤C:将组装后的板切割成形成免疫层析试纸条,常温下加干燥剂密封保存。

[0017] 在上述的一种试剂盒的制备方法中,所述荧光微球标记的抗原溶液的制备方法如下:

[0018] 步骤a:将荧光微球加入硼酸缓冲液中,稀释至荧光微球的浓度为0.1-1 mg/ml ,再加入EDC,混匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10-30min,得到混合液1。

[0019] 步骤b:将混合液1离心并去除上清液,重新悬浮后分别加入白蛋白、 α_1 -微球蛋白、转铁蛋白、 β_2 -微球蛋白和IgG免疫球蛋白,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1-2h,得到混合液2;混合液2共有四种,因为有四种不同的蛋白;

[0020] 步骤c:将混合液2离心并去除上清液,加入封闭液封闭1-2h,得到混合液3;混合液3共有四种;

[0021] 步骤d:将混合液3离心并去除上清液,加入微球保存液清洗并重新悬浮,在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。将四种不同蛋白的重新悬浮后的混合液3混合在一起就得到荧光微球标记的抗原溶液。若无需立即使用,则分开保存在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下,若需使用,则混合稀释后使用。

[0022] 本发明的第三目的是通过下面的技术方案得以实现的:一种尿四种微量蛋白的检测方法,其特征在于,采用上述的尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒进行检测,包括如下步骤:

[0023] S01:将不同浓度梯度的四种蛋白校准品与荧光微球标记的抗原溶液混合;

[0024] S02:取100 μl 混合后的溶液滴加到免疫层析试纸条上,15min后,使用荧光分析仪

读取荧光值；

[0025] S03:计算不同浓度各T线T/(T+C)的比值,与浓度对应绘制标准曲线,得到标准方程;

[0026] S04:取待测样品与荧光微球标记的抗原溶液混合;取100ul混合后的溶液滴加到免疫层析试纸条上,15min后,使用荧光分析仪读取荧光值;计算各T线T/(T+C)的比值,将比值带入标准方程得出待测样品中各蛋白的浓度。

[0027] 在上述的一种尿四种微量蛋白的检测方法中,所述的校准品中四种蛋白的比值为:(200:100:20:3)。

[0028] 本发明测定方法的原理:采用竞争法进行检测,在硝酸纤维素膜上T线用4种捕获抗体划线,C线用蛋白A划线。检测时,同时加入样本与荧光微球标记的抗原溶液,样本中的待测物质和荧光微球标记的抗原溶液竞争与硝酸纤维素膜T线上的捕获抗体结合,形成免疫复合物。未与T线反应的荧光微球,与C线上的蛋白A形成蛋白A-IgG-荧光微球的免疫复合物。在365nm波长激发光照射下,荧光微球发出620nm左右波长的荧光。T线上荧光的强度与样本中待测物质的含量成反比。根据标准品曲线,可以计算出样本中待测物质含量。

[0029] 本发明的有益效果:

[0030] 本发明的试剂盒由荧光微球标记的抗原溶液和免疫层析试纸条组成,其中免疫层析试纸条上包被有白蛋白捕获抗体、 α_1 -微球蛋白捕获抗体、转铁蛋白捕获抗体、 β_2 -微球蛋白捕获抗体和蛋白A;荧光微球标记的抗原溶液包含荧光微球标记的白蛋白、 α_1 -微球蛋白、转铁蛋白和 β_2 -微球蛋白,并且荧光微球还标记有IgG免疫球蛋白。抗体和抗原能够发生免疫结合,其中待测样品和荧光微球标记的相应的抗原竞争与捕获抗体结合,形成免疫复合物。蛋白A是从A型金黄色葡萄球菌分离而得的一种细胞壁蛋白。蛋白A可与人的IgG免疫球蛋白结合形成A-IgG-荧光微球的免疫复合物,而不与抗原发生结合,故蛋白A的存在可作为本试剂有效的一种标准,即在后续荧光检测时,能在免疫层析试纸条上检测到包被有蛋白A的区域发出荧光,则证明检测有效。若没有,则证明此次检测无效。

[0031] 且白蛋白捕获抗体、 α_1 -微球蛋白捕获抗体、转铁蛋白捕获抗体、 β_2 -微球蛋白捕获抗体均在同一个免疫层析试纸条上,又因为荧光微球标记的抗原溶液包含了荧光微球标记的白蛋白溶液、荧光微球标记的 α_1 -微球蛋白溶液、荧光微球标记的转铁蛋白溶液和荧光微球标记的 β_2 -微球蛋白溶液这四种溶液,故只需将待测样品和荧光微球标记的抗原溶液混合后滴加一次就能够同时检测待测样品中白蛋白、 α_1 -微球蛋白、转铁蛋白和 β_2 -微球蛋白的含量,进行四联检测,节省时间,检测快速便捷。采用本发明的试剂盒进行检测,不需要对这四种蛋白单独进行检测,而能准确稳定的定量同时测定尿液四种微量蛋白。无需大型的仪器设备,有效地降低了成本。

[0032] 本发明试剂盒针对尿液中的白蛋白、 α_1 -微球蛋白、转铁蛋白和 β_2 -微球蛋白这四种微量蛋白进行检测,将免疫荧光法和层析法结合在一起,还结合了抗原抗体竞争法,具有检测时间短,检测结果准确,操作流程简单等优点。

附图说明

[0033] 图1是本明白蛋白的标准曲线;

[0034] 图2是本发明 α_1 -微球蛋白的标准曲线;

- [0035] 图3是本发明转铁蛋白的标准曲线；
[0036] 图4是本发明 β_2 -微球蛋白的标准曲线；
[0037] 图5是本发明白蛋白检测结果和对照实验结果的散点图；
[0038] 图6是本发明 α_1 -微球蛋白检测结果和对照实验结果的散点图；
[0039] 图7是本发明转铁蛋白检测结果和对照实验结果的散点图；
[0040] 图8是本发明 β_2 -微球蛋白检测结果和对照实验结果的散点图；

具体实施方式

[0041] 下面结合实施例进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此限定本发明 保护范围。尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

[0042] 时间分辨荧光微球标记的抗原溶液的制备

[0043] 首先,称取EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 1.5mg, 加入150ul的硼酸缓冲溶液(0.05M, pH=8.0) 涡旋溶解, 配制为10mg/ml溶液；

[0044] 接着,取4个1.5ml的离心管,分别加入40ul硼酸缓冲溶液(0.05M, pH=8.0) 和10ul时间分辨荧光微球,漩涡振荡,混匀后,在4个离心管中分别加入1.5ul 的EDC (10mg/ml) 溶液,室温振荡活化15min(注意:EDC加入后立即混匀),离心(15000rpm, 10°C, 10min),弃上清,用40ul硼酸缓冲溶液(0.05M)重悬,超声分散(100W, 1s*10)；

[0045] 然后,在4个离心管中,分别按如下量加入抗原和蛋白A,震荡混匀后置4°C 摇床过夜500rpm。

[0046] a) 20ug白蛋白和1ug的人IgG蛋白；

[0047] b) 10ug转铁蛋白和1ug的人IgG蛋白；

[0048] c) 10ug α_1 -微球蛋白和1ug的人IgG蛋白；

[0049] d) 5ug β_2 -微球蛋白和1ug的人IgG蛋白；

[0050] 在4个离心管中分别加入5.5ul封闭液(10X),使BSA最终浓度为1%,置于摇床封闭2h避光震荡。离心(15000rpm, 10°C, 10min),弃上清,用150ul 标记储存液重悬,超声分散(100W, 1s*10),再次离心。用150ul标记储存液重悬,超声分散(100W, 1s*10),置于4°C保存。待使用,需要使用时将四种已标记荧光微球的抗原蛋白混合并稀释得到荧光微球标记的抗原溶液。

[0051] 其中,硼酸缓冲溶液(0.05M, pH=8.0)的制备:称取9.354g四硼酸钠加500ml纯化水溶解得0.05M四硼酸钠溶液,测得pH为9.5。称取1.546g硼酸加500ml纯化水溶解得0.05M硼酸溶液,使用上述四硼酸钠溶液调节硼酸pH至8.0。

[0052] 封闭液(10X):在70ml纯化水中加入6.02g Tris(三羟甲基氨基甲烷),用6N盐酸调节pH至8.0,加纯化水定容至100ml为0.5M Tris-HCl溶液。取10ml 该溶液加入50ul Tween-20(吐温-20)和1g BSA(牛血清白蛋白)溶解得含10%BSA的10倍封闭液。

[0053] 免疫层析试纸条的制备

[0054] 免疫层析试纸条由底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫设置在底板上部,所述的样本垫和吸水垫之间为硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上依次设置4条检测T线和1条质控C线。 T_1 线上包被白蛋白捕获抗体、 T_2 线上包被 α_1 -微球

蛋白捕获抗体、T₃线上包被转铁蛋白捕获抗体、T₄线上包被β₂-微球蛋白捕获抗体和C线上包被蛋白A。硝酸纤维素膜上从加样点从近至远依次设置T₁、T₂、T₃、T₄和C线，C线离加样点最远。

[0055] 样本中的待测物和荧光微球标记的抗原分别与T线上包被的捕获抗体产生特异性竞争反应，C线上的蛋白A与荧光微球标记的IgG结合形成免疫复合物。

[0056] T线上捕获抗体包被浓度是1.0mg/ml；C线上蛋白A包被浓度是0.5mg/ml。

[0057] 采用三维点膜喷金仪，将捕获抗体和蛋白A分别包被在硝酸纤维素膜上，T₁线上包被白蛋白捕获抗体、T₂线上包被α₁-微球蛋白捕获抗体、T₃线上包被转铁蛋白捕获抗体、T₄线上包被β₂-微球蛋白捕获抗体和C线上包被蛋白A。分别作为检测线(T线)和质控线(C线)。在干燥箱中37℃干燥2h，将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装好后，切割成试纸条，加干燥剂于常温下密封保存。

[0058] 具体的，本实施例中划膜稀释液的配制：在950μl水中加入50μl异丙醇，混合均匀。得到5%异丙醇溶液，使用前用0.2μm的滤膜过滤。

[0059] C线溶液配制：C线使用蛋白A，配制前将其4000rpm离心5分钟，取上清液用划膜稀释液稀释到0.5mg/ml，混匀。

[0060] T线溶液配制：T线使用各捕获抗体，配置前将其4000rpm离心5分钟，取上清液用划膜稀释液稀释到1.0mg/ml。

[0061] 划线：在三维划膜仪(金标公司，HM3030)上，分别设置C线溶液的量0.9ul/cm，T线溶液的量1ul/cm。初始化仪器后分别用C线和T线溶液在硝酸纤维素膜(NC膜)上进行划线，划膜结束后将硝酸纤维素膜(NC膜)置37℃过夜烘干。

[0062] 组装：将吸水纸，划线NC膜，样本垫依次组装在PVC粘性底板上，切割成条后装入试纸条卡盒中，加干燥剂保存在湿度≤20%的环境中。

[0063] 标准曲线的建立

[0064] 将四种已标记荧光微球的抗原蛋白混合稀释至工作浓度得到荧光微球标记的抗原溶液(工作浓度按照1:1000-3000的比例稀释)，用10mM的PBS缓冲液将白蛋白、α₁-微球蛋白、转铁蛋白、β₂-微球蛋白四种抗原蛋白稀释成系列梯度浓度的混合蛋白标准品，其浓度为mg/L，具体见表1。

[0065] 表1不同梯度浓度的混合蛋白标准品

[0066]

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
白蛋白	400	200	80	32	16	8	0
α ₁ -微球蛋白	200	100	40	16	8	4	0
转铁蛋白	40	20	8	3.2	1.6	0.8	0
β ₂ -微球蛋白	6	3	1.2	0.48	0.24	0.12	0

[0067] 取标准品溶液20ul，加入到层析试纸条，再加入80ul的混合稀释后的荧光微球标记的抗原溶液。反应15分钟后，使用免疫荧光分析仪读取硝酸纤维素膜上的4条T线、C线荧光信号并分别计算比值T/(T+C)，具体见表2。

[0068] 表2 T/(T+C)的比值

[0069]

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
白蛋白	0.1222	0.2631	0.4611	0.6851	0.8114	0.9071	0.9544
α_1 -微球蛋白	0.1247	0.2238	0.5445	0.7248	0.8377	0.9090	0.9574
转铁蛋白	0.1001	0.1944	0.3884	0.5528	0.7278	0.8436	0.9299
β_2 -微球蛋白	0.0948	0.1848	0.3986	0.5745	0.7874	0.8790	0.9678

[0070] 将标准品溶液的浓度与比值按照Logit-log拟合方式进行数据处理并进行线性拟合,得到4条标准品拟合曲线。(见附图说明图1-4,图中 $y = \ln\left(\frac{p}{q}\right)$, $x = \log(\text{浓度})$,其

中 $p = \frac{t}{t_0}$, $q = 1 - p$, t 为测量信号值 $T/(T+C)$ 比值, t_0 为0浓度测量值 $T/(T+C)$ 比值。)

[0071] 拟合曲线后得到的标准方程为:

[0072] 白蛋白标准方程: $y = -2.7356x + 5.1954, R^2 = 0.9924$;

[0073] α_1 -微球蛋白标准方程: $y = -2.825x + 4.589, R^2 = 0.9956$;

[0074] 转铁蛋白标准方程: $y = -2.4954x + 1.8655, R^2 = 0.9932$;

[0075] β_2 -微球蛋白标准方程: $y = -2.6228x + 0.2086, R^2 = 0.9948$ 。

[0076] 实施例1灵敏度测试

[0077] 将四种已标记荧光微球的抗原蛋白混合稀释至工作浓度得到荧光微球标记的抗原溶液(工作浓度按照1:1000-3000的比例稀释),取20 μ l的10mM PBS作为空白样本,加入到层析试纸条,再加入80 μ l的混合稀释后的荧光微球标记的抗原溶液。反应15分钟后,使用免疫荧光分析仪读取硝酸纤维素膜上的4条T线、C线荧光信号并分别计算比值 $T/(T+C)$ 。重复测试20次。并计算20次测试结果的平均值M和标准偏差SD。再计算M-2SD的值,结果如下表所示。将M-2SD的数值代入到拟合的标准品曲线,计算其对应的浓度值,即为试剂的灵敏度。具体见表3

[0078] 表3试剂条四种蛋白的灵敏度

[0079]

#	T/(T+C)			
	白蛋白	α_1 -微球蛋白	转铁蛋白	β_2 -微球蛋白
1	0.9544	0.9574	0.9299	0.9678
2	0.9610	0.9424	0.9341	0.9487
3	0.9528	0.9512	0.9534	0.9326
4	0.9551	0.9664	0.9130	0.9733
5	0.9462	0.9519	0.9573	0.9509
6	0.9505	0.9428	0.9325	0.9258
7	0.9678	0.9661	0.9518	0.9014
8	0.9607	0.9673	0.9219	0.9841
9	0.9532	0.9541	0.9369	0.9420
10	0.9607	0.9517	0.9145	0.9710

[0080]

11	0.9535	0.9500	0.9418	0.9503
12	0.9764	0.9672	0.9187	0.9277
13	0.9615	0.9472	0.9527	0.9392
14	0.9568	0.9636	0.9230	0.9621
15	0.9618	0.9568	0.9259	0.9734
16	0.9721	0.9610	0.9617	0.9316
17	0.9595	0.9646	0.9389	0.9695
18	0.9551	0.9510	0.9214	0.9499
19	0.9560	0.9573	0.9435	0.9840
20	0.9699	0.9671	0.9036	0.9310
平均值M	0.9593	0.9569	0.9338	0.9508
标准偏差SD	0.0077	0.0085	0.0167	0.0224
变异系数CV	0.81%	0.89%	1.79%	2.35%
M-2SD	0.9438	0.9399	0.9005	0.9061
灵敏度 (mg/L)	1.812	1.639	0.238	0.079

[0081] 实验试剂条白蛋白灵敏度为1.812mg/L, α_1 -微球蛋白的灵敏度为1.639mg/L, 转铁蛋白的灵敏度为0.238mg/L, β_2 -微球蛋白的灵敏度为0.079mg/L。本发明的灵敏度高。

[0082] 实施例2精密性测试

[0083] 将四种已标记荧光微球的抗原蛋白混合稀释至工作浓度得到荧光微球标记的抗原溶液(工作浓度按照1:1000-3000的比例稀释),用三个不同浓度的样本进行测试。取样本20u1,加入到层析试纸条,再加入80u1混合稀释后的荧光微球标记的抗原溶液。反应15分钟后,使用免疫荧光分析仪读取硝酸纤维素膜上的4条T线、C线荧光信号,重复测试10次。分别计算比值T/(T+C)并将比值代入标准品拟合曲线方程,计算其对应的浓度值,并计算其平均值M和标准偏差SD。根据公式变异系数CV(%)=SD/M*100%,分别计算高、中、低三个不同浓度样本的CV(%)值,并计算其平均CV(%)值,如表4所示。

[0084] 表4高、中、低三个样本的批内CV(%)值计算结果

[0085]

#	白蛋白			α_1 -微球蛋白			转铁蛋白			β_2 -微球蛋白		
	高	中	低	高	中	低	高	中	低	高	中	低
1	205.32	32.43	8.16	100.27	16.09	4.23	20.53	3.20	0.800	3.00	0.480	0.120
2	217.68	33.01	8.20	104.25	15.91	4.01	20.69	3.47	0.796	3.14	0.453	0.116

[0086]

3	211.61	35.39	8.27	96.63	15.28	4.19	19.24	3.18	0.948	3.13	0.506	0.132
4	210.80	32.64	7.52	97.96	17.24	4.58	21.04	3.29	0.718	2.85	0.495	0.103
5	208.74	38.05	8.22	102.54	16.68	3.78	20.62	3.08	0.826	3.16	0.475	0.109
6	221.52	33.32	9.26	102.38	16.79	4.19	22.34	3.06	0.816	3.23	0.517	0.121
7	193.59	33.14	7.93	99.74	18.46	4.73	20.50	3.32	0.791	3.19	0.495	0.112
8	205.33	31.56	9.62	97.01	16.09	4.09	19.76	3.17	0.781	2.88	0.500	0.132
9	219.84	34.28	7.68	105.51	15.51	3.75	21.65	3.08	0.795	2.97	0.455	0.116
10	194.98	30.57	7.56	104.29	16.50	3.69	20.25	3.03	0.837	2.76	0.485	0.114
M	208.94	33.44	8.24	101.06	16.45	4.12	20.66	3.19	0.811	3.03	0.486	0.117
SD	9.55	2.09	0.70	3.20	0.92	0.34	0.88	0.14	0.058	0.16	0.021	0.009
CV	4.57%	6.26%	8.45%	3.17%	5.60%	8.29%	4.27%	4.29%	7.14%	5.34%	4.31%	7.77%
CV _均	6.43%			5.69%			5.23%			5.81%		

[0087] 实验的试剂条白蛋白的平均精密性为6.34%， α_1 -微球蛋白的平均精密性为5.69%，转铁蛋白的平均精密性为5.23%， β_2 -微球蛋白的平均精密性为5.81%。

[0088] 实施例3准确度测试

[0089] 将四种已标记荧光微球的抗原蛋白混合稀释至工作浓度得到荧光微球标记的抗原溶液(工作浓度按照1:1000-3000的比例稀释)。

[0090] 配制2份高浓度的蛋白混合液:第1份(C₁)中白蛋白为800mg/L, α_1 -微球蛋白为400mg/L,转铁蛋白为100mg/L、 β_2 -微球蛋白为10mg/L。第2份(C₂)中白蛋白为400mg/L, α_1 -微球蛋白为200mg/L,转铁蛋白为50mg/L、 β_2 -微球蛋白为5mg/L。

[0091] 配制三个回收样本:取临床样本3-4份混合均匀后平均分成3份,每份体积1ml,在第一份样本中加入0.1ml的PBS缓冲液,在第二份样本中加入0.1ml的C₁,在第三份样本中加入0.1ml的C₂。

[0092] 取样本20ul,加入到层析试纸条,再加入80ul的混合稀释后的荧光微球标记的抗原溶液。反应15分钟后,使用免疫荧光分析仪读取硝酸纤维素膜上的4条T线、C线荧光信号并分别计算比值T/C。并代入标准品拟合曲线计算其浓度值。重复测试3次,结果如表5所示。根据公式:回收率=回收浓度÷加入浓度×100%,计算样本的回收率,如表6所示。

[0093] 表5浓度值结果

[0094]

	白蛋白 (mg/L)				α 1-微球蛋白 (mg/L)			
	1	2	3	均值	1	2	3	均值
回收样本1	19.36	18.81	19.65	19.27	6.37	6.07	6.57	6.34
回收样本2	90.56	91.34	91.98	91.29	44.39	45.83	43.81	44.68
回收样本3	58.82	57.27	56.36	57.48	24.77	25.17	23.97	24.64
	转铁蛋白 (mg/L)				β 2-微球蛋白 (mg/L)			
	1	2	3	均值	1	2	3	均值
回收样本 1	1.16	1.31	1.23	1.23	0.095	0.090	0.109	0.098
回收样本 2	10.05	10.36	11.02	10.48	1.111	1.089	0.998	1.066
回收样本 3	6.14	6.05	6.22	6.14	0.533	0.541	0.564	0.546

[0095] 表6回收率结果(浓度单位:mg/L)

[0096]

	白蛋白				α 1-微球蛋白			
	测定浓度	加入浓度	回收浓度	回收率 (%)	测定浓度	加入浓度	回收浓度	回收率 (%)
回收样本1	19.27	\	\	\	6.34	\	\	\
回收样本2	91.29	72.73	72.02	99.03	44.68	36.36	38.34	105.44
回收样本3	57.48	36.36	38.21	105.08	24.64	18.18	18.30	100.65
平均回收率	\	\	\	102.05	\	\	\	103.04
	转铁蛋白				β 2-微球蛋白			
	测定浓度	加入浓度	回收浓度	回收率 (%)	测定浓度	加入浓度	回收浓度	回收率 (%)
回收样本1	1.23	\	\	\	0.098	\	\	\
回收样本2	10.48	9.09	9.24	101.68	1.066	0.909	0.968	106.51
回收样本3	6.14	4.55	4.90	107.87	0.546	0.455	0.448	98.60
平均回收率	\	\	\	104.78	\	\	\	102.56

[0097] 其中:回收样本2的加入浓度= $C_1 * \left(\frac{0.1}{(0.1+1)} \right)$ 。

[0098] 回收样本3的加入浓度= $C_2 * \left(\frac{0.1}{(0.1+1)} \right)$ 。

[0099] 回收样本2的回收浓度=回收样本2的测定浓度—回收样本1的测定浓度。

[0100] 回收样本3的回收浓度=回收样本3的测定浓度—回收样本1的测定浓度。

[0101] 综上,4种尿液微量蛋白的测定线性范围、线性相关系数、灵敏度、精密性、准确度平均回收率如表8所示:

[0102] 表8 4种尿液微量蛋白各指标

[0103]

	白蛋白	α 1-微球蛋白	转铁蛋白	β 2-微球蛋白
线性范围 (mg/L)	8-400	4-200	0.8-40	0.12-6
线性相关系数r	-0.9962	-0.9978	-0.9966	-0.9974
灵敏度 (mg/L)	1.812	1.639	0.238	0.079
精密性 (%)	6.43	5.69	5.23	5.81
准确度平均回收率 (%)	102.05	103.04	104.78	102.56

[0104] 本发明具有有灵敏度高、稳定性好等特点。

[0105] 实施例4检测临床样品

[0106] 收集30例临床样本(西门子特定蛋白分析仪测定特定蛋白后的样本),用本发明的测试条进行对比测试。测试方法:将四种已标记的抗原蛋白混合稀释至工作浓度得到荧光微球标记的抗原溶液(工作浓度按照1:1000-3000的比例稀释)。取样本20u1,加入到层析试纸条,再加入80u1的混合稀释后的荧光微球标记的抗原溶液。反应15分钟后,使用免疫荧光分析仪读取硝酸纤维素膜上的4条T线、C线荧光信号并分别计算比值T/C。将其代入拟合的标准品曲线,计算出临床样本的测试浓度值。将计算结果与用西门子特定蛋白分析仪测试的结果进行相关性分析,结果如表7所示

[0107] 表7样品检测结果对比

[0108]

#	白蛋白 (mg/L)		α 1-微球蛋白 (mg/L)		转铁蛋白 (mg/L)		β 2-微球蛋白 (mg/L)	
	对照试剂	本发明	对照试剂	本发明	对照试剂	本发明	对照试剂	本发明
1	96.71	105.37	90.07	89.31	16.22	16.54	3.50	3.03
2	27.57	32.26	19.32	19.13	6.78	7.08	0.703	0.652
3	17.18	19.92	3.46	3.75	7.02	6.83	0.252	0.245
4	94.16	87.72	37.60	30.26	6.49	6.25	0.511	0.445
5	215.78	242.38	98.68	105.17	13.60	12.89	2.80	3.10
6	226.75	256.08	116.48	120.15	23.45	27.15	2.58	2.19

[0109]

7	66.47	60.55	8.24	7.62	13.37	11.37	1.33	1.24
8	134.74	124.37	67.54	67.45	15.54	15.27	1.17	1.09
9	10.26	14.13	21.46	24.95	4.76	4.58	0.108	0.131
10	109.03	92.90	71.02	70.80	19.05	18.80	2.02	2.17
11	107.55	115.65	43.87	49.59	19.28	20.15	1.93	1.79
12	79.07	72.71	24.54	22.35	10.15	10.17	0.882	0.988
13	180.72	173.67	91.63	96.16	25.65	27.57	1.51	1.61
14	135.06	143.51	84.64	79.36	28.32	26.57	2.86	2.71
15	252.70	237.17	117.73	125.57	24.94	23.69	3.79	3.99
16	145.89	155.29	73.07	64.81	10.74	11.27	0.492	0.505
17	14.47	10.25	57.15	50.91	7.15	8.21	0.431	0.374
18	15.56	19.26	3.56	3.16	1.32	1.23	0.552	0.455
19	67.21	73.42	15.36	18.84	2.40	2.80	0.139	0.123
20	80.34	89.73	22.76	19.48	2.02	2.42	0.026	0.033
21	59.02	51.80	15.94	13.49	0.44	0.51	0.701	0.730
22	196.37	206.54	54.06	60.81	21.53	22.34	3.07	3.37
23	56.55	65.76	32.20	33.50	5.73	4.87	0.132	0.143
24	223.92	199.19	132.86	118.59	23.81	20.92	2.17	2.47
25	192.69	179.37	103.89	92.64	13.27	15.13	1.74	1.65
26	163.17	153.92	76.18	83.52	15.42	13.24	3.13	3.00
27	119.66	111.27	56.26	63.93	18.30	20.83	2.47	2.03
28	27.98	15.60	33.07	29.51	9.30	8.30	0.944	0.954
29	165.75	175.38	45.43	40.84	10.85	11.46	1.04	1.12
30	45.10	37.71	3.11	4.61	8.54	9.86	0.289	0.217

[0110] 以西门子特定蛋白分析仪试剂的测试结果为纵坐标,本发明试剂条的测量值为横坐标绘制散点图,并作趋势线,结果如图5-8所示。从散点图可以看出,结果与对照试剂的相关性好。临床样本检测结果与西门子特定蛋白分析仪测定结果高度相关,其相关系数分别为($r=0.9862, 0.9889, 0.9847, 0.9866$)。本发明检测时间短,检测结果准确,操作流程简单,无需大型仪器设备,适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。

[0111] 结论:采用本发明的试剂盒进行检测既价格低廉,又能准确稳定的定量同时测定尿液四种微量蛋白,不需要单独进行这四种尿液微量蛋白的测定。使用本发明试剂盒的检测方法检测时间短,检测结果准确,操作流程简单,无需大型仪器设备,广泛适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。

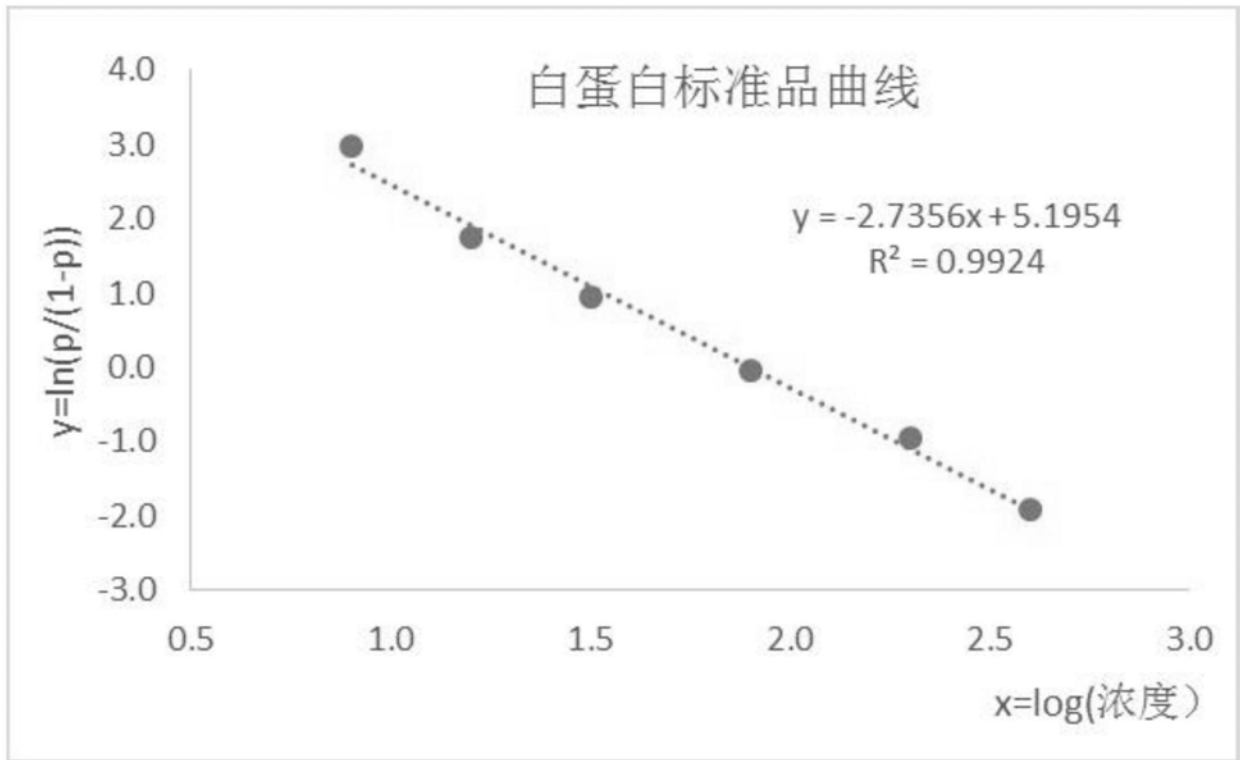


图1

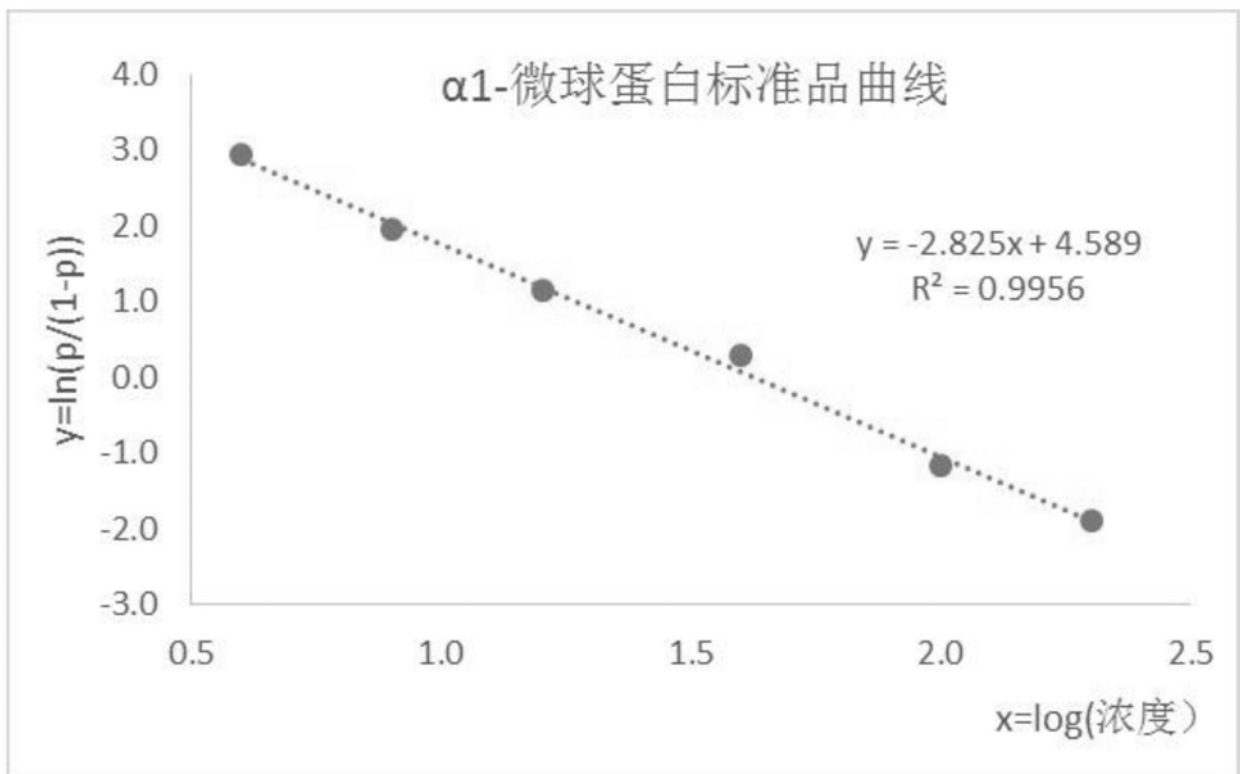


图2

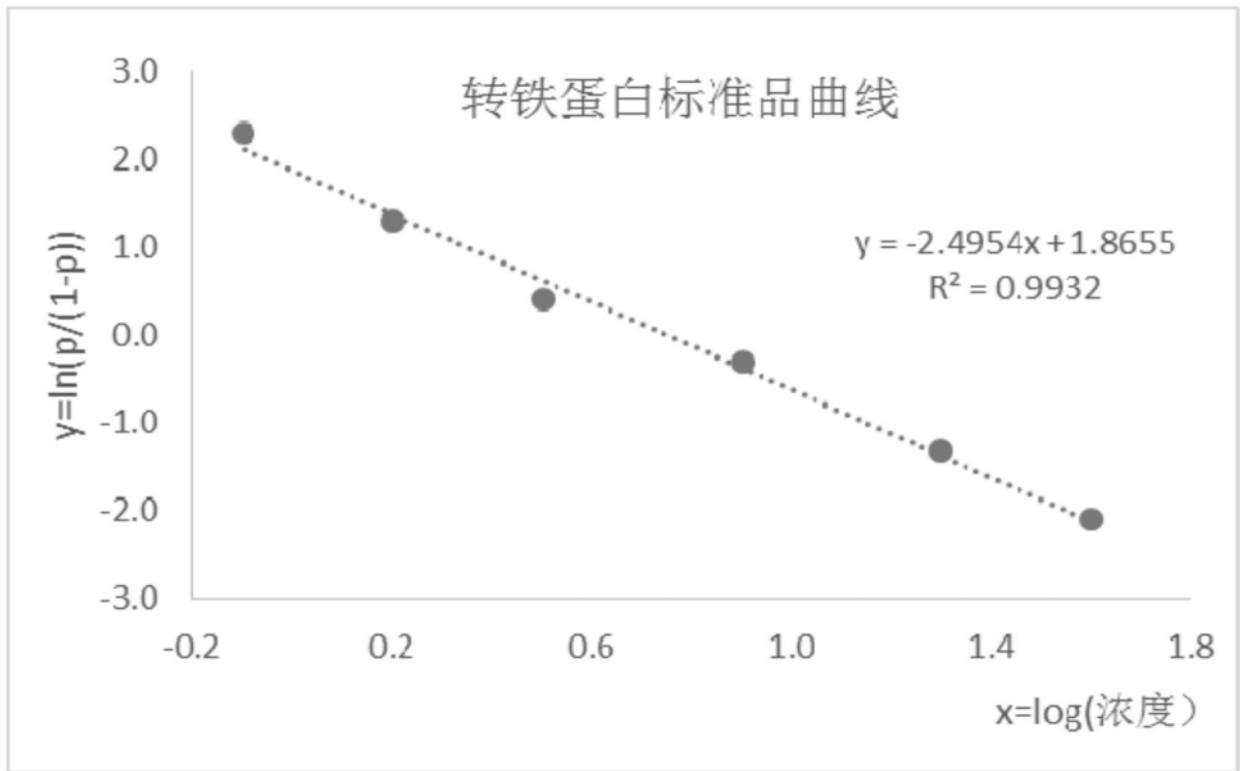


图3

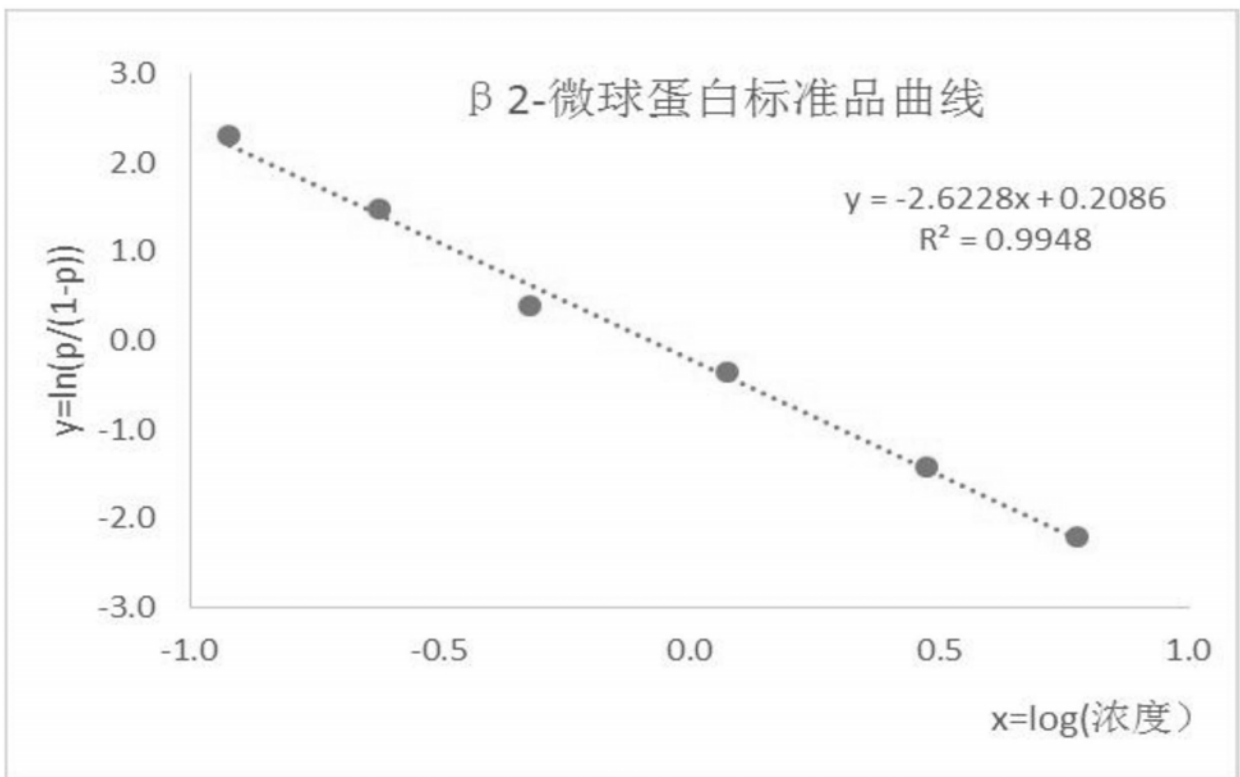


图4

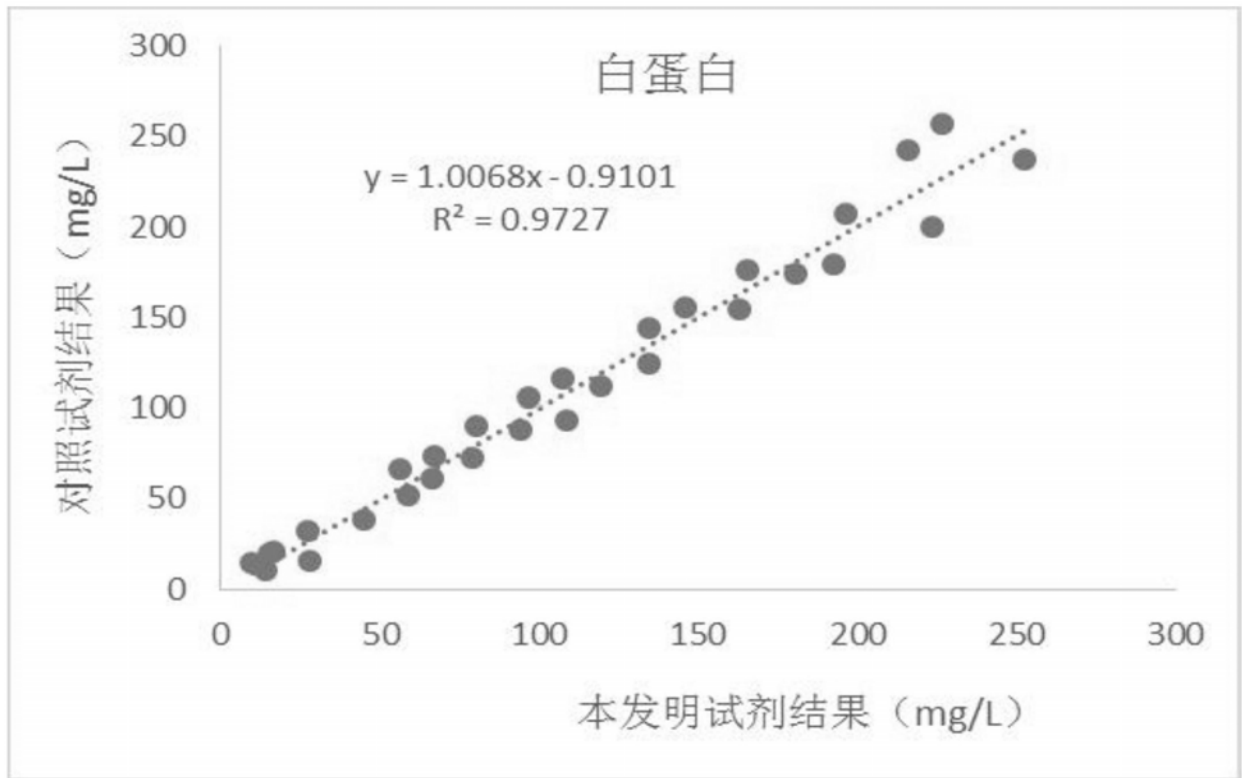


图5

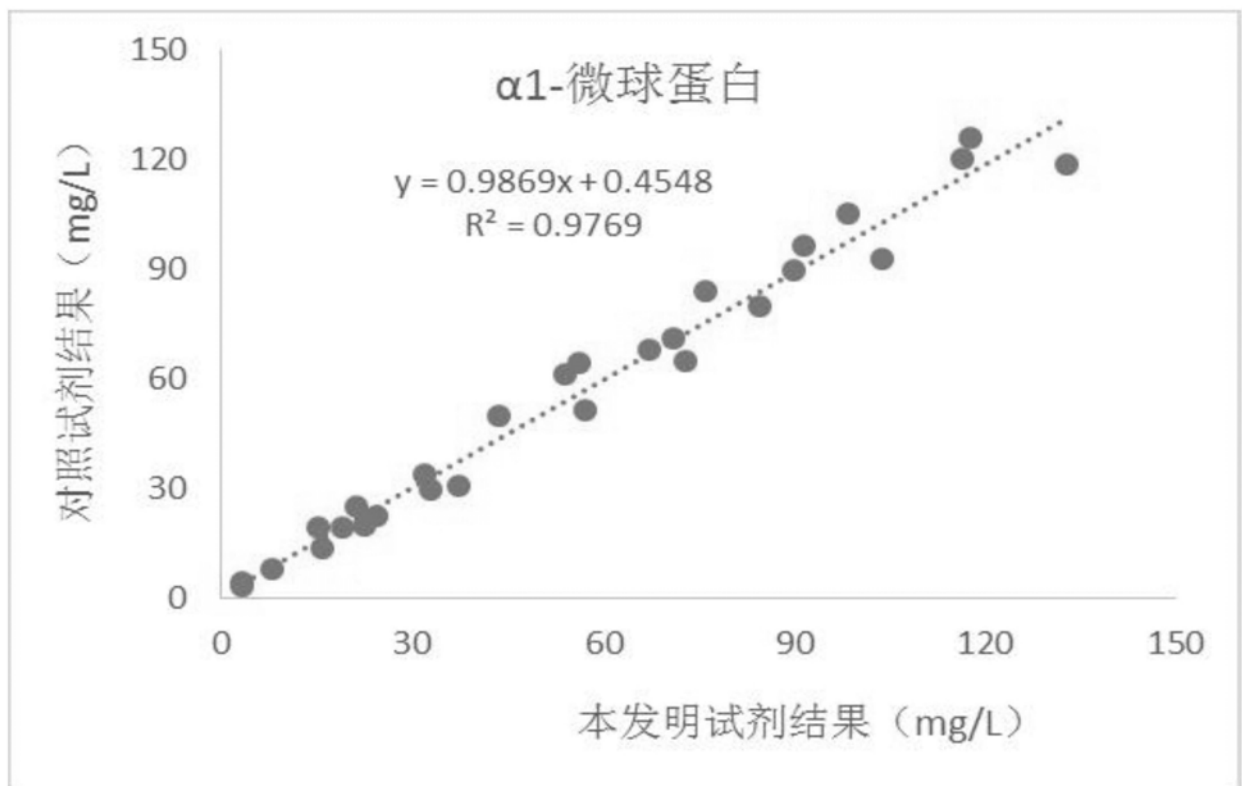


图6

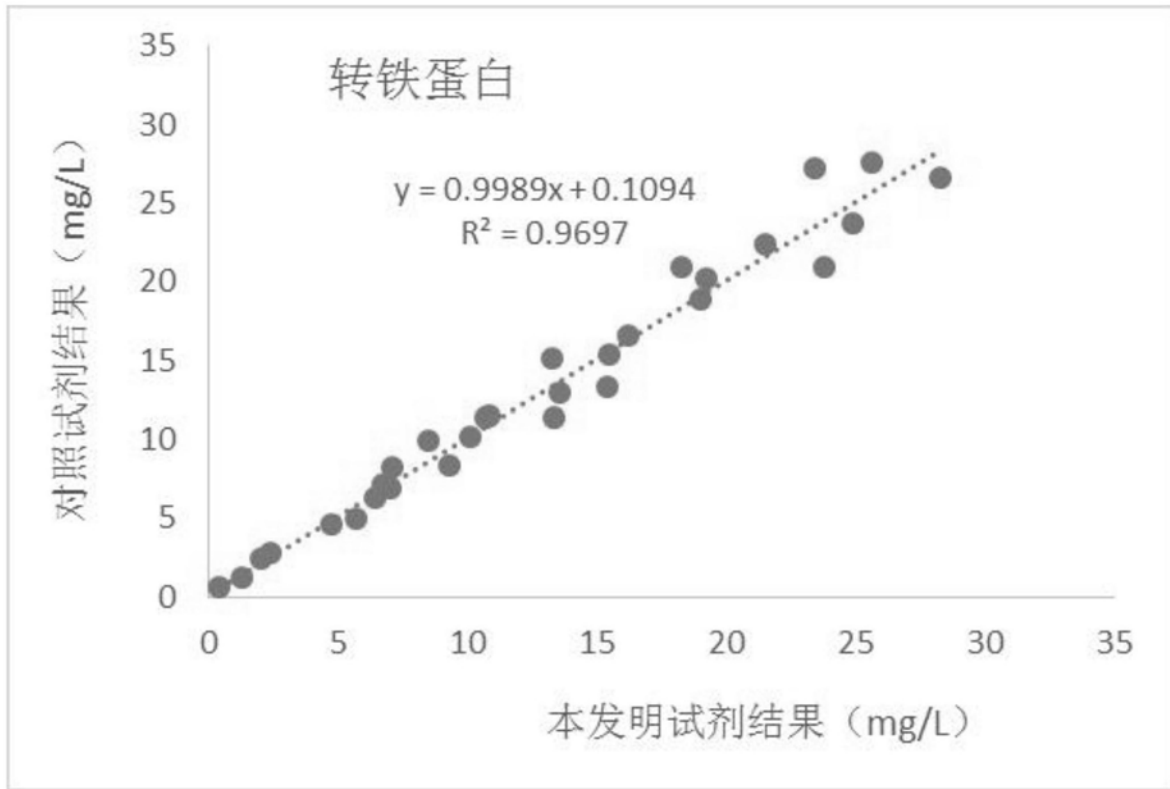


图7

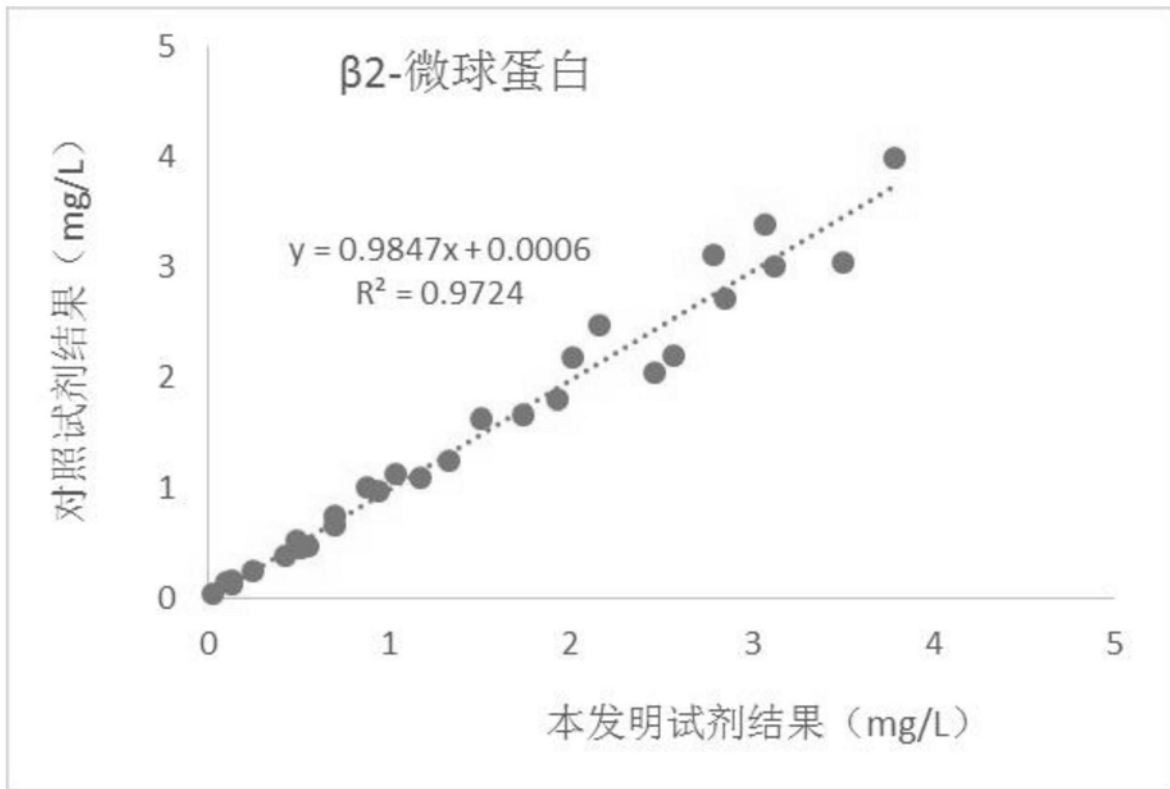


图8

专利名称(译)	尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN109613256A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201811394061.5	申请日	2018-11-21
[标]发明人	张乐之 吴敏华 余铭恩 王立童 吴滨 胡祥叶		
发明人	张乐之 吴敏华 余铭恩 王立童 吴滨 胡祥叶		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/54313		
代理人(译)	李品		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒及制备方法，解决了临床检测尿微量蛋白检测不能同时进行检测等问题。一种尿四种微量蛋白定量联检荧光免疫层析试剂盒，包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的抗原溶液，免疫层析试纸条上包被有白蛋白捕获抗体、 α 1-微球蛋白捕获抗体、转铁蛋白捕获抗体、 β 2-微球蛋白捕获抗体和蛋白A；荧光微球标记的抗原溶液包括荧光微球标记的白蛋白溶液、荧光微球标记的 α 1-微球蛋白溶液、荧光微球标记的转铁蛋白溶液和荧光微球标记的 β 2-微球蛋白溶液，荧光微球还标记有IgG免疫球蛋白。本发明具有检测快速等优点。

