



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106405103 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610792065.3

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 杨世东

地址 262199 山东省潍坊市安丘市健康路
259号

(72)发明人 杨世东

(74)专利代理机构 贵阳派腾阳光知识产权代理
事务所(普通合伙) 52110

代理人 管宝伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析
试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,所述试剂盒由包括试纸条、微孔条、微孔试剂和微孔塞,所述试纸条由样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2、检测线3和一条质控线,所述检测线1包被有抗RA33特异性抗体,所述检测线2包被有抗角蛋白特异性抗体(AKA),所述检测线3包被有抗免疫球蛋白IgG抗体,所述质控线包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体;所述微孔试剂为冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体;本发明操作简单、特异性强、灵敏度高,可对类风湿关节炎进行快速诊断,具有很好的临床意义。

1. 一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,包括试纸条、微孔条、微孔试剂和微孔塞,所述试纸条由样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2、检测线3和一条质控线,所述检测线1包被有抗RA33特异性抗体,所述检测线2包被有抗角蛋白特异性抗体(AKA),所述检测线3包被有抗免疫球蛋白IgG抗体,所述质控线包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体;所述微孔试剂为冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述微孔条底部含有冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体的微孔试剂,所述微孔条上具有微孔塞,所述微孔塞能够紧密地塞在微孔条中。

3. 根据权利要求1所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述抗RA33特异性抗体为来自HeLa细胞的单克隆抗体,所述抗角蛋白特异性抗体(AKA)为角蛋白与载体蛋白偶联物为免疫原制备的单克隆抗体,所述抗免疫球蛋白IgG抗体为抗免疫球蛋白的单克隆抗体。

4. 根据权利要求3所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

5. 根据权利要求1所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述样品吸收垫经处理液处理,所述处理液是由1.5g牛血清蛋白(BSA)和1.2g氯化钠,1g的海藻糖用0.01mol/LPBS定容至100mL。

6. 根据权利要求1所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述的胶体金标记抗体的制备方法为:

a. 所述胶体金溶液的制备方法为:将质量浓度为0.01%的氯金酸溶液200mL,加热至沸腾后迅速加入2mL浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,加热煮沸10min,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到胶体金溶液;

b. 将制备好的胶体金溶液取出10mL的量共3份,取抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗免疫球蛋白IgG抗体各40μg分别加入上述所取的三份胶体金溶液中,搅拌,再分别加入质量浓度为5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.9%,先以350r/min的转速低速离心,再以2000r/min的转速高速离心,取上清液,4℃下保存,即得到纯化的胶体金标记的抗RA33特异性抗体、胶体金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗胶体金标记的免疫球蛋白IgG抗体。

7. 根据权利要求1所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜的包被方法为:在硝酸纤维素膜特定位置上划出检测线1,检测线2,检测线3和质控线的位置,检测线1上喷涂包被有胶体金标记的抗RA33单克隆抗体,检测线2上喷涂包被有胶体金标记的抗角蛋白单克隆抗体,检测线3上喷涂包被有胶体金标记的抗免疫球蛋白IgG单克隆抗体,质控线上喷涂包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体。

8. 根据权利要求1-7所述的一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒的制备方法为:

(1) 分别制备冻干有纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性

抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体的微孔试剂,包括以下方法:a.所述胶体金溶液的制备方法为:将质量浓度为0.01%的氯金酸溶液200mL,加热至沸腾后迅速加入2mL浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,加热煮沸10min,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到胶体金溶液;b.将制备好的胶体金溶液取出10mL的量共3份,取抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗免疫球蛋白IgG抗体各40 μ g分别加入上述所取的三份胶体金溶液中,搅拌,再分别加入质量浓度为5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.9%,先以350r/min的转速低速离心,再以2000r/min的转速高速离心,取上清液,4 $^{\circ}$ C下保存,即得到纯化的胶体金标记的抗RA33特异性抗体、胶体金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗胶体金标记的免疫球蛋白IgG抗体,对其进行冻干处理即得;

(2) 样品吸收垫的制备方法:样品吸收垫经处理液处理,所述处理液是由1.5g牛血清蛋白(BSA)和1.2g氯化钠,1g的海藻糖用0.01mol/LPBS定容至100mL;

(3) 所述硝酸纤维素膜的包被方法为:在硝酸纤维素膜特定位置上划出检测线1,检测线2,检测线3和质控线的位置,检测线1上喷涂包被有胶体金标记的抗RA33单克隆抗体,检测线2上喷涂包被有胶体金标记的抗角蛋白单克隆抗体,检测线3上喷涂包被有胶体金标记的抗免疫球蛋白IgG单克隆抗体,质控线上喷涂包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体;

(4) 试纸条制备:将样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成试纸条,干燥处理即得;

(5) 将微孔试剂、微孔条、微孔塞和试纸条组装成试剂盒。

一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及骨科疾病检测技术领域,具体涉及一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒。

背景技术

[0002] 类风湿关节炎的病因至今并不十分明了,目前大多认为其是人体自身免疫性疾病,亦可视为一种慢性的综合征,表现为外周关节的非特异性炎症,此时患病关节及其周围组织呈现进行性破坏,并致使受损关节发生功能障碍。类风湿关节炎的发病率女性高于男性,女性是男性的2~3倍,欧美国家的发病率明显高于国人。其临床症状和体征特点有:疼痛、僵硬、肿胀、畸形、皮下结节、体温升高等。本病早期即有关节局部痛感,尤其是在活动期,并伴有触痛及压痛,此为最早出现、也是患者最敏感的体征;在晨起时会有受累关节僵硬症状,且受累关节周围软组织呈弥漫性肿胀,表面温度略高于正常关节;后期病例一般均出现掌指关节屈曲及尺偏畸形;30%~40%的患者可出现皮下结节,此有助于对本病的诊断;急性期的某些患者可出现发热,多为38℃以下的低热。本病早期可通过药物疗法和物理理疗进行治疗,后期严重患者需进行手术治疗,故对本病进行早期诊断,有利于其积极有效的治疗。

[0003] 目前,具有与类风湿关节炎相类似症状及体征的疾病很多,如骨性关节炎、痛风、银屑病性关节炎等。类风湿性关节炎目前的检查方法包括实验室检查,X线检查等,也有免疫球蛋白(IgM,IgG)检查,具有一定的诊查效果,但准确率不高。抗RA33是一种分子量33KD的核酸结合蛋白,在早期类风湿关节炎病人血清中出现;抗角蛋白抗体(AKA)在研究中发现其阳性患者几乎均发展成类风湿关节炎,故可作为类风湿关节炎的早期诊断指标;免疫球蛋白IgG在一些病程长,病情重的患者血清中有很明显高比例,对类风湿关节炎病程及病情的诊断具有很好的参考价值,故研究一种更加准确的免疫检测类风湿关节炎的方法,就是本发明要研究的问题。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题就是提供一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒。

[0005] 本发明的技术方案为:一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,包括试纸条、微孔条、微孔试剂和微孔塞,所述试纸条由样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2、检测线3和一条质控线,所述检测线1包被有抗RA33特异性抗体,所述检测线2包被有抗角蛋白特异性抗体(AKA),所述检测线3包被有抗免疫球蛋白IgG抗体,所述质控线包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体;所述微孔试剂为冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体。

[0006] 进一步的,所述微孔条底部含有冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体的微孔试剂,所述微孔条上具有微孔塞,所述微孔塞能够紧密地塞在微孔条中。

[0007] 进一步的,所述抗RA33特异性抗体为来自HeLa细胞的单克隆抗体,所述抗角蛋白特异性抗体(AKA)为角蛋白与载体蛋白偶联物为免疫原制备的单克隆抗体,所述抗免疫球蛋白IgG抗体为抗免疫球蛋白的单克隆抗体。

[0008] 进一步的,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0009] 进一步的,所述样品吸收垫经处理液处理,所述处理液是由1.5g牛血清蛋白(BSA)和1.2g氯化钠,1g的海藻糖用0.01mol/LPBS定容至100mL。

[0010] 进一步的,所述的胶体金标记抗体的制备方法为:

[0011] a.所述胶体金溶液的制备方法为:将质量浓度为0.01%的氯金酸溶液200mL,加热至沸腾后迅速加入2mL浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,加热煮沸10min,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到胶体金溶液;

[0012] b.将制备好的胶体金溶液取出10mL的量共3份,取抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗免疫球蛋白IgG抗体各40μg分别加入上述所取的三份胶体金溶液中,搅拌,再分别加入质量浓度为5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.9%,先以350r/min的转速低速离心8min,再以2000r/min的转速高速离心15min,取上清液,4℃下保存,即得到纯化的胶体金标记的抗RA33特异性抗体、胶体金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗胶体金标记的免疫球蛋白IgG抗体。

[0013] 进一步的,所述硝酸纤维素膜的包被方法为:在硝酸纤维素膜特定位置上划出检测线1,检测线2,检测线3和质控线的位置,检测线1上喷涂包被有胶体金标记的抗RA33单克隆抗体,其包被量为30-40μg,检测线2上喷涂包被有胶体金标记的抗角蛋白单克隆抗体,其包被量为30-40μg,检测线3上喷涂包被有胶体金标记的抗免疫球蛋白IgG单克隆抗体,其包被量为25-35μg,质控线上喷涂包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体,其包被量为25-35μg。

[0014] 一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒的制备方法为:

[0015] (1) 分别制备冻干有纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体的微孔试剂,包括以下方法:a.所述胶体金溶液的制备方法为:将质量浓度为0.01%的氯金酸溶液200mL,加热至沸腾后迅速加入2mL浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,加热煮沸10min,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到胶体金溶液;b.将制备好的胶体金溶液取出10mL的量共3份,取抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗免疫球蛋白IgG抗体各40μg分别加入上述所取的三份胶体金溶液中,搅拌,再分别加入质量浓度为5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.9%,先以350r/min的转速低速离心8min,再以2000r/min的转速高速离心15min,取上清液,4℃下保存,即得到纯化的胶体金标记的抗RA33特异性抗体、胶体金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗胶体金标记的免疫球蛋白IgG抗体,对其进行冻干处理即得;

[0016] (2) 样品吸收垫的制备方法:样品吸收垫经处理液处理,所述处理液是由1.5g牛血清蛋白(BSA)和1.2g氯化钠,1g的海藻糖用0.01mol/LPBS定容至100mL;

[0017] (3) 所述硝酸纤维素膜的包被方法为:在硝酸纤维素膜特定位置上划出检测线1,检测线2,检测线3和质控线的位置,检测线1上喷涂包被有胶体金标记的抗RA33单克隆抗

体,其包被量为30-40 μ g,检测线2上喷涂包被有胶体金标记的抗角蛋白单克隆抗体,其包被量为30-40 μ g,检测线3上喷涂包被有胶体金标记的抗免疫球蛋白IgG单克隆抗体,其包被量为25-35 μ g,质控线上喷涂包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体,其包被量为25-35 μ g;

[0018] (4) 试纸条制备:将样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成试纸条,干燥处理即得;

[0019] (5) 将微孔试剂、微孔条、微孔塞和试纸条组装成试剂盒。

[0020] 本发明的试剂盒使用方法:取血后分离得到血清,将待测血清滴加于微孔试剂中,将其混匀,静置4min,将标有MAX标记线的一端插入上述微孔试剂中,5-10分钟判断结果:如果检测线1,检测线2和质控线均有明显红色显示则判定为阳性,且为类风湿关节炎初期;如果检测线1,检测线2,检测线3和质控线均有红色显示则判定为阳性,且为中晚期;如果质控线未见显色反应,则判断检测无效。

[0021] 本发明的有益效果体现在:本发明通过抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)、抗免疫球蛋白IgG抗体作为三重指标来检测类风湿关节炎,抗RA33特异性抗体和抗角蛋白特异性抗体(AKA)在早期类风湿关节炎患者血清中出现,且其消长与病情和用药无关,为类风湿关节炎的早期诊断标准,免疫球蛋白IgG在中晚期,病程长,病情重的患者中明显升高,不仅可以对类风湿关节炎进行诊断,而且为其病情轻重,病程长短提供重要参考依据,操作简单,灵敏度高,可用于临床推广。

具体实施方式

[0022] 实施例:一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒,包括试纸条、微孔条、微孔试剂和微孔塞,所述试纸条由样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2、检测线3和一条质控线,所述检测线1包被有抗RA33特异性抗体,所述检测线2包被有抗角蛋白特异性抗体(AKA),所述检测线3包被有抗免疫球蛋白IgG抗体,所述质控线包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体;所述微孔试剂为冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体。

[0023] 其中,所述微孔条底部含有冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体的微孔试剂,所述微孔条上具有微孔塞,所述微孔塞能够紧密地塞在微孔条中;所述抗RA33特异性抗体为来自HeLa细胞的单克隆抗体,所述抗角蛋白特异性抗体(AKA)为角蛋白与载体蛋白偶联物为免疫原制备的单克隆抗体,所述抗免疫球蛋白IgG抗体为抗免疫球蛋白的单克隆抗体;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;所述样品吸收垫经处理液处理,所述处理液是由1.5g牛血清蛋白(BSA)和1.2g氯化钠,1g的海藻糖用0.01mol/L PBS定容至100mL;所述的胶体金标记抗体的制备方法为:a.所述胶体金溶液的制备方法为:将质量浓度为0.01%的氯金酸溶液200mL,加热至沸腾后迅速加入2mL浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,加热煮沸10min,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到胶体金溶液;b.将制备好的胶体金溶液取出10mL的量共3份,取抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗免疫球蛋白IgG抗体各40 μ g分别加入上述所取的三份胶体金溶液中,搅拌,再分别加入质量浓度为5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.9%,先以350r/min的转速低速离心

8min,再以2000r/min的转速高速离心15min,取上清液,4℃下保存,即得到纯化的胶体金标记的抗RA33特异性抗体、胶体金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗胶体金标记的免疫球蛋白IgG抗体;所述硝酸纤维素膜的包被方法为:在硝酸纤维素膜特定位置上划出检测线1,检测线2,检测线3和质控线的位置,检测线1上喷涂包被有胶体金标记的抗RA33单克隆抗体,其包被量为30-40μg,检测线2上喷涂包被有胶体金标记的抗角蛋白单克隆抗体,其包被量为30-40μg,检测线3上喷涂包被有胶体金标记的抗免疫球蛋白IgG单克隆抗体,其包被量为25-35μg,质控线上喷涂包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体,其包被量为25-35μg。

[0024] 一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒的制备方法为:

[0025] (1) 分别制备冻干有纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体的微孔试剂,包括以下方法:a.所述胶体金溶液的制备方法为:将质量浓度为0.01%的氯金酸溶液200mL,加热至沸腾后迅速加入2mL浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,加热煮沸10min,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到胶体金溶液;b.将制备好的胶体金溶液取出10mL的量共3份,取抗RA33特异性抗体、抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗免疫球蛋白IgG抗体各40μg分别加入上述所取的三份胶体金溶液中,搅拌,再分别加入质量浓度为5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.9%,先以350r/min的转速低速离心8min,再以2000r/min的转速高速离心15min,取上清液,4℃下保存,即得到纯化的胶体金标记的抗RA33特异性抗体、胶体金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和抗胶体金标记的免疫球蛋白IgG抗体,对其进行冻干处理即得;

[0026] (2) 样品吸收垫的制备方法:样品吸收垫经处理液处理,所述处理液是由1.5g牛血清蛋白(BSA)和1.2g氯化钠,1g的海藻糖用0.01mol/LPBS定容至100mL;

[0027] (3) 所述硝酸纤维素膜的包被方法为:在硝酸纤维素膜特定位置上划出检测线1,检测线2,检测线3和质控线的位置,检测线1上喷涂包被有胶体金标记的抗RA33单克隆抗体,其包被量为30-40μg,检测线2上喷涂包被有胶体金标记的抗角蛋白单克隆抗体,其包被量为30-40μg,检测线3上喷涂包被有胶体金标记的抗免疫球蛋白IgG单克隆抗体,其包被量为25-35μg,质控线上喷涂包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体,其包被量为25-35μg;

[0028] (4) 试纸条制备:将样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成试纸条,干燥处理即得;

[0029] (5) 将微孔试剂、微孔条、微孔塞和试纸条组装成试剂盒。

[0030] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明实施例技术方案的精神和范围。

专利名称(译)	一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106405103A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201610792065.3	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	杨世东		
申请(专利权)人(译)	杨世东		
当前申请(专利权)人(译)	杨世东		
[标]发明人	杨世东		
发明人	杨世东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/531 G01N2800/102		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测类风湿关节炎的胶体金免疫层析试剂盒，所述试剂盒由包括试纸条、微孔条、微孔试剂和微孔塞，所述试纸条由样品吸收垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC底板相互粘贴制成；所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2、检测线3和一条质控线，所述检测线1包被有抗RA33特异性抗体，所述检测线2包被有抗角蛋白特异性抗体(AKA)，所述检测线3包被有抗免疫球蛋白IgG抗体，所述质控线包被有羊抗鼠IgM单克隆抗体；所述微孔试剂为冻干的纳米金标记的抗RA33特异性抗体、纳米金标记的抗角蛋白特异性抗体(AKA)和纳米金标记的抗免疫球蛋白IgG抗体；本发明操作简单、特异性强、灵敏度高，可对类风湿关节炎进行快速诊断，具有很好的临床意义。