



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 205280731 U

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201420471435. X

(22) 申请日 2014. 08. 20

(73) 专利权人 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 号纳米科技园 B2 栋 313 室

(72) 发明人 陈菲 霍如松 周阳 吴根现

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(ESM) 同样的发明创造已同日申请发明专利

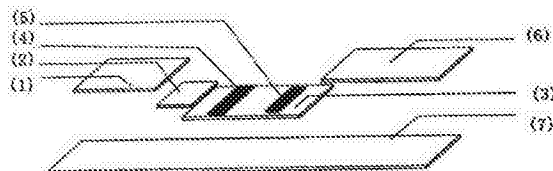
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 实用新型名称

一种抗 alpha- 烯醇化酶抗体免疫层析试纸条

(57) 摘要

本实用新型公开了一种抗 alpha- 烯醇化酶抗体免疫层析试纸条。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), 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。本实用新型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 α -烯醇化酶抗体免疫层析试纸条, 其特征在于: 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, 结合垫(2)或分析膜(3)上含有 α -烯醇化酶抗原蛋白。

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(2)包被有标记的 α -烯醇化酶抗原蛋白和标记物b层; 所述的检测带T线(4)包被有抗人IgG抗体; 所述的质控带C线(5)包被有蛋白C。

4. 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)包被有标记物a层和标记物b层; 所述的检测带T线(4)包被有 α -烯醇化酶抗原蛋白, 所述的质控带C线(5)包被有蛋白C。

5. 根据权利要求4所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述标记物a层的标记蛋白为抗人IgG单克隆抗体、抗人IgG多克隆抗体、葡萄球菌A蛋白、链球菌G蛋白中的一种或多种。

6. 根据权利要求5所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述的抗人IgG多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源、骆驼源或豚鼠源中的一种; 所述的抗人IgG单克隆抗体为鼠源、骆驼源或兔源中的一种。

7. 根据权利要求3或4所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述的质控带C线上的蛋白C与标记物b层中的标记蛋白B同时或不同时为单克隆抗体或多克隆抗体中的一种, 并且标记物b层中的标记蛋白B和质控带C线上的蛋白C可发生特异性结合形成免疫复合物。

8. 根据权利要求7所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源、骆驼源或豚鼠源中的一种, 所述的单克隆抗体为鼠源、骆驼源或兔源中的一种。

一种抗 α -烯醇化酶抗体免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种层析试纸条,属于医学免疫分析检测领域。

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,诱发病道炎症反应,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。

实用新型内容

[0010] 本实用新型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检测带上,实现对样品中NNE抗体的高特异、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] 本实用新型所要解决的技术问题在于提供一种免疫层析法抗NNE抗体测试纸条。

[0012] 本实用新型所要解决的技术问题可以通过以下技术方案来实现:

[0013] 一种抗NNE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),所述底板的上部贴合有分析膜,所述分析膜上部的两端分别贴合有结合垫和吸水垫,所述结合垫上部的一端贴合有样品垫,所述检测带T线和质控带C线设置在分析膜上。

[0014] 所述的结合垫(2)包被胶体金或彩色胶乳标记物。

[0015] 优选例1中,所述的结合垫(2)包被有标记的NNE抗原蛋白,所述的检测带T线(4)包被有抗人IgG,所述的质控带C线(5)包被有NNE的单克隆或多克隆抗体的一种或多种。

[0016] 所述的NNE单克隆或多克隆抗体是指用NNE抗原蛋白作为免疫原所获得的鼠源、兔源、马源、豚鼠源、骆驼源的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0017] 优选例2中,所述的结合垫(2)包被有标记的NNE抗原蛋白和标记物b层;所述的检测带T线(4)包被有抗人IgG,所述的质控带C线(5)包被有蛋白C。

[0018] 优选例3中,所述的结合垫(2)包被有标记物a层和标记物b层;所述的检测带T线(4)包被有NNE抗原,所述的质控带C线(5)包被有蛋白C。

[0019] 所述标记物a层的标记蛋白为抗人IgG单克隆抗体、抗人IgG多克隆抗体、葡萄球菌A蛋白(SPA)、链球菌G蛋白(Protein G)中的一种或多种。

[0020] 所述的抗人IgG多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源、骆驼源或豚鼠源中的一种;所述的抗人IgG单克隆抗体为鼠源、骆驼源或兔源中的一种。

[0021] 所述的控制线上的蛋白C与标记物b层中的标记蛋白B同时或不同时为单克隆抗体

或多克隆抗体中的一种,并且标记物b层中的标记蛋白B和质控线上的蛋白C可发生特异性结合形成免疫复合物。所述的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源、骆驼源或豚鼠源中的一种,所述的单克隆抗体为鼠源、骆驼源或兔源中的一种。

[0022] 本实用新型所用的包被在质控带C线上的蛋白包括但不限于:NNE的特异性单抗或多抗、动物的免疫球蛋白或抗其抗体,但必须能与结合垫b层的标记蛋白发生免疫结合反应,形成免疫复合物。比如结合垫b层的包被蛋白是标记的NNE,质控带的包被蛋白是任何动物来源的抗NNE抗体;如果结合垫b层的包被蛋白是鼠IgG,质控带的包被蛋白是任何动物来源的抗鼠IgG的单抗或多抗。选用哪一对的结合垫b层蛋白和质控带C线蛋白不是本实用新型的关键,实施例例举几组常用的结合垫b层标记蛋白与质控带C线包被蛋白组合,其目的不是限制该组合类型。

[0023] 所述的NNE抗原蛋白为通过原核/真核表达系统克隆化基因获得,或通过氨基酸合成重要抗原表位偶联到载体蛋白上获得。

[0024] 所述检测是定性检测样本中的抗NNE抗体,对炎症性肠病进行辅助诊断。所述样本为血清、血浆、全血或其他体液。

[0025] 本实用新型所用的单克隆抗体用现有技术杂交瘤方法制备或者通过重组DNA法进行制备。

[0026] 本实用新型所用的多克隆抗体或通过免疫动物来制备。

[0027] 本实用新型所用的NNE抗原蛋白、SPA、Protein G用基因工程方法获得。

[0028] 本实用新型的检测原理为(以结合垫上的标记蛋白A为NNE蛋白,B为兔IgG为例):

[0029] 胶体金或彩色胶乳标记的蛋白A和蛋白B喷涂于结合垫,分析膜检测带T线上包被抗人IgG,质控带C线上包被抗兔IgG。当样本随着层析泳动到结合垫并浸润胶体金或胶乳标记物时,其中的人IgG和标记蛋白A结合形成人IgG-标记蛋白A复合物,由于毛细管效应,此复合物沿向吸水垫方向泳动,如果样品中含有抗NNE抗体,此复合物与包被于检测带T线上的抗人IgG发生特异性免疫结合反应,形成金标/胶乳蛋白A(NNE)-人抗NNE IgG抗体-抗人IgG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A到达检测线时,不与包被在检测线上的NNE抗原蛋白发生免疫反应,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羊抗兔IgG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。

[0030] 本实用新型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。与目前市面出现的商品化间接免疫荧光试剂盒相比,本实用新型优点主要包括: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

[0031] 图1本实用新型的侧面结构示意图1。

[0032] 图2本实用新型的侧面结构示意图2。

[0033] 图3本实用新型阳性和阴性结果示意图3。其中3a是条带示意图;3b为阳性结果;3c为阴性结果;3d和3e表示试纸条失效。

具体实施方式

[0034] 本实用新型所述的抗NNE抗体免疫层析试纸,如图1所示,该试纸是在底板(7)上由一端向另一端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)。分析膜(3)材质为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜;结合垫(2)的材质为玻璃纤维膜或聚酯膜。

[0035] 第一组优选例中,结合垫(2)上包被有纳米金或彩色胶乳标记NNE抗原蛋白,检测带上包被抗人IgG,质控带包被NNE的单抗或多抗。

[0036] 第二组优选例中,结合垫(2)上包被有纳米金或彩色胶乳标记蛋白a和标记蛋白b,标记蛋白a层为NNE抗原蛋白,标记蛋白b层为任何能与质控带包被物形成免疫复合物的蛋白。分析膜(3)上设置有检测带T线(4)和质控带C线(5),检测带T线(4)包被有抗人IgG单克隆抗体、抗人IgG多克隆抗体、SPA和链球菌G蛋白的一种或多种,质控带C线(5)包被有能与结合垫标记蛋白b形成免疫复合物的蛋白c。

[0037] 在另一组优选例中,结合垫(2)上包被有纳米金或彩色胶乳标记蛋白a和标记蛋白b,标记蛋白a层的蛋白为羊抗人IgG、鼠抗人IgG、葡萄球菌A蛋白(SPA)、链球菌G蛋白的一种或多种,标记蛋白b层为任何能与质控带包被物形成免疫复合物的蛋白。分析膜(3)上设置有检测带T线(4)和质控带C线(5),检测带T线(4)包被有NNE抗原蛋白,质控带C线(5)包被有能与结合垫标记蛋白b形成免疫复合物的蛋白c。

[0038] 下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本实用新型。

[0039] 实施例1 NNE抗原蛋白的制备

[0040] 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,本实用新型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。

[0041] 实施例2 抗体、葡萄球菌A蛋白和链球菌G蛋白的制备

[0042] 本实用新型包被在结合垫a层的标记蛋白a主要包括NNE重组蛋白和抗人IgG单抗或多抗,抗人IgG单抗和多抗的制备技术已经很成熟,用人免疫球蛋白IgG作为免疫原,分别参照《免疫学常用实验方法》中单克隆抗体制备和多克隆抗体制备章节,在动物上经多次皮下或腹膜内注射纯化的人IgG和佐剂而产生。

[0043] 葡萄球菌A蛋白和链球菌G蛋白的制备方法可参照《分子克隆实验指南》中重组蛋白相关章节,用大肠杆菌原核表达克隆化基因来制备葡萄球菌A蛋白和链球菌G蛋白。这两种蛋白是生物学领域常见的工程蛋白,也可通过购买市售产品获得。

[0044] 实施例3 胶体金层析各组分制备

[0045] (1)胶体金溶液制备

[0046] 用去离子水配制0.01%(w/v)的氯金酸溶液和1%(w/v)的柠檬酸三钠溶液。取

0.01%的氯金酸水溶液100mL,放入水浴锅内加热至沸腾,磁力搅拌下迅速加入1%柠檬酸钠2.8 mL。再保持沸腾,至溶液呈酒红色,得粒径在25-30nm胶体金溶液,所用玻璃仪器均经过酸洗。

[0047] (2)金标蛋白的制备

[0048] a、金标鼠或兔抗人IgG制备:用0.1M碳酸钠调节胶体金pH 7.3~7.5,按每毫升胶体金溶液缓慢加入5~25μg鼠/兔抗人IgG,混匀,静置10min,然后加入BSA至终浓度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;

[0049] b、金标羊或兔IgA制备:用0.1M碳酸钠调节胶体金pH 7.5~8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入6~25μg羊/兔IgA,混匀,静置10min,然后加入BSA至终浓度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;

[0050] c、金标NNE抗原蛋白制备:用0.1M碳酸钾调节制备的胶体金pH7.4,按每毫升胶体金溶液缓慢加入12μg NNE抗原蛋白,搅拌10~30min,然后加入BSA至终浓度0.5%,搅拌10~30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤3次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置4℃备用

[0051] (3)分析膜的制备

[0052] A.分析膜1

[0053] 检测带T线:将纯化的NNE抗原蛋白与pH为7.5的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/mL的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1μL/cm。

[0054] 质控带C线:将羊抗鼠IgG与pH为7.2的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.2mg/mL混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1μL/cm。

[0055] B.分析膜2

[0056] 检测带T线:将纯化的NNE抗原蛋白与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/mL的混合溶液,喷在醋酸纤维膜上,涂布量为12μL/cm²。

[0057] 质控带C线:将鼠抗羊IgA与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.1mg/mL混合溶液,喷在醋酸纤维膜上,涂布量为12μL/cm²。

[0058] C.分析膜3

[0059] 检测带T线:将鼠抗人IgG蛋白与pH为7.5的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/mL的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1μL/cm。

[0060] 质控带C线:Protein G与pH为7.1的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.1mg/mL混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1μL/cm。

[0061] D.分析膜4

[0062] 检测带T线:将羊抗人IgG多克隆抗体与pH为7.6的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/mL的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1μL/cm。

[0063] 质控带C线:将兔抗NNE多克隆抗体IgG与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.2mg/mL混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1μL/cm。

[0064] (4)结合垫的制备

[0065] 结合垫的处理:结合垫材质为玻璃纤维纸或聚酯膜,用配制好的结合垫处理液浸泡结合垫,结合垫处理液的量为100uL/cm²,然后在37℃下1h烘干后,将抗体或者蛋白以80uL/cm²的用量喷涂在预处理的聚脂膜上,37℃干燥1h后得结合垫,结合垫置于2~8℃的环境下备用;结合垫处理液的组成为:pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液,含1%BSA,10%蔗糖,0.1%Tween-20。

[0066] A.结合垫1 单层,标记蛋白为鼠抗人IgG。

[0067] B.结合垫2 双层,标记蛋白a层为兔抗人IgG,标记蛋白b层为羊IgA。

[0068] C.结合垫3 双层,标记蛋白a层为NNE,标记蛋白b层为兔IgA。

[0069] D.结合垫4 单层,结合蛋白均为NNE。

[0070] (5)样品垫的制备

[0071] 样品垫材质为玻璃纤维纸或聚酯膜,用配制好的样品垫处理液浸泡样品垫,样品处理液的量为100uL/cm²,然后在37℃下1h烘干,样品垫缓冲液的组成为:pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液,含1%BSA,10%蔗糖,0.1%Tween-20。

[0072] 实施例4 胶体金NNE抗体检测试纸1 组装

[0073] 如图1所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例3制备的结合垫1,分析膜(3)为实施例3制备的分析膜1,其余组分制备步骤同实施例3,各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图1所示组装。

[0074] 实施例5 胶体金NNE抗体检测试纸2 组装

[0075] 如图2所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例3制备的结合垫2,分析膜(3)为实施例3制备的膜条2,其余组分制备步骤同实施例3。各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图2所示组装。

[0076] 实施例6 胶体金NNE抗体检测试纸3 组装

[0077] 如图2所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例3制备的结合垫3,分析膜(3)为实施例3制备的膜条3,其余组分制备步骤同实施例3。各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图2所示组装。

[0078] 实施例7 胶体金NNE抗体检测试纸4 组装

[0079] 如图1所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例4制备的结合垫1,分析膜(3)为实施例3制备的分析膜4,其余组分制备步骤同实施例3,各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图1所示组装。

[0080] 实施例8 彩色胶乳层析各组分的制备

[0081] (1)彩色胶乳标记液的制备

[0082] 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 1.0×10^{12} /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50μL的50mg/mL EDC,振荡混匀,再加入50μL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。

[0083] (2)彩色胶乳标记蛋白的制备

[0084] 将活化后的胶乳于200W超声波处理30秒,按照100μg蛋白/100μL荧光胶乳的比例

加入待标记的抗体或者蛋白,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。

[0085] 将上述制备好的红色胶乳微粒标记的SPA和彩色胶乳微粒标记鼠IgG抗体用抗体稀释液按1:1000比例稀释混合,分装备用。

[0086] (3)分析膜的制备

[0087] 分析膜1

[0088] 检测线:将纯化的NNE抗原蛋白与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/ml的混合溶液,喷在醋酸纤维膜上,涂布量为12 μ l/cm²。

[0089] 质控线:将鼠抗羊IgG与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.1mg/ml混合溶液,喷在醋酸纤维膜上,涂布量为12 μ l/cm²。

[0090] 分析膜2

[0091] 检测线:将纯化的NNE抗原蛋白与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/ml的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1 μ L/cm。

[0092] 质控线:将羊抗鼠IgA与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.1mg/ml混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1 μ L/cm。

[0093] 分析膜3

[0094] 检测线:将兔抗人IgG与pH为7.5的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.5mg/ml的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1 μ L/cm。

[0095] 质控线:将鼠抗兔IgG与pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液混合配制成为浓度为0.1mg/ml混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为1 μ L/cm。

[0096] (4)结合垫的制备

[0097] 结合垫的处理:结合垫材质为玻璃纤维纸或聚酯膜,用配制好的结合垫处理液浸泡结合垫,结合垫处理液的量为100 μ l/cm²,然后在37℃下1h烘干后,将抗体或者蛋白以80 μ l/cm²的用量喷涂在预处理的聚脂膜上,37℃干燥1h后得结合垫,结合垫置于2℃~8℃的环境下备用;结合垫处理液的组成为:pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液,含1%BSA,10%蔗糖,0.1%Tween-20。

[0098] 结合垫1 单层,标记蛋白为羊抗人IgG。

[0099] 结合垫2 双层,标记蛋白a层为proteinG,标记蛋白b层为鼠IgA。

[0100] 结合垫3 双层,标记蛋白a层为NNE,标记蛋白b层为兔IgG。

[0101] (5)样品垫的制备

[0102] 样品垫材质为玻璃纤维纸或聚酯膜,用配制好的样品垫处理液浸泡样品垫,样品处理液的量为100 μ l/cm²,然后在37℃下1h烘干,样品垫的组成为:pH为7.0~9.0的10mM PB缓冲溶液,含1%BSA,10%蔗糖,0.1%Tween-20。

[0103] 实施例9 彩色乳胶NNE抗体检测试纸1 组装

[0104] 如图1所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例7制备的结合垫1,分析膜(3)为实施例7制备的膜条1,其余组分制备步骤同实施例8,各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图1所示组装。

[0105] 实施例10 彩色乳胶NNE抗体检测试纸2 组装

[0106] 如图2所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例7制备的结合垫2,分析膜(3)为实施例7制备的膜条2,其余组分制备步骤同实施例8,各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图2所示组装。

[0107] 实施例11 彩色乳胶NNE抗体检测试纸3 组装

[0108] 如图2所示的抗NNE抗体检测试纸,其中结合垫(2)为实施例7制备的结合垫3,分析膜(3)为实施例7制备的膜条4,其余组分制备步骤同实施例8,各组分烘干后根据底板的大小剪切成条,按图2所示组装。

[0109] 实施例12 试纸条临床性能检测

[0110] 样品处理:用抗凝管或非抗凝管采集全血1~5mL,静置30~60分钟后,3000~5000g离心5~10min,取上清即得到待测样品血浆或血清,至少有200μL以上待测样品溶液。用微量加样器吸取以上血清100μL样本于样品垫,缓慢加样。10~15min观察结果,根据图3条带位置来判读阴阳性结果。

[0111] 临床性能评估:

[0112] 用实施例4-7制备的金标试纸条和实施例9-11制备的胶乳试纸条对40例正常人标本和40例IBD患者(其中CD和UC各20例)标本进行检测,结果如下表,本实用新型制备的金标和胶乳试纸条用于IBD患者的检测灵敏度(阳性患者判为阳性的比例)为12.5~25.0%,特异性为(正常人组判为阴性的比例)92.5~100%,符合临床诊断预期。

[0113]

结果 试纸条	临床 阳性	临床 阴性	诊断 阳性	诊断 阴性	灵敏度	特异性
金标试纸 1	40	40	9	40	22.5%	100.0%
金标试纸 2	40	40	5	40	12.5%	100.0%
金标试纸 3	40	40	7	39	17.5%	97.5%
金标试纸 4	40	40	10	40	25.0%	100.0%
胶乳试纸 1	40	40	7	38	17.5%	95.0%
胶乳试纸 2	40	40	6	37	15.0%	92.5%
胶乳试纸 3	40	40	6	40	15.0%	100.0%

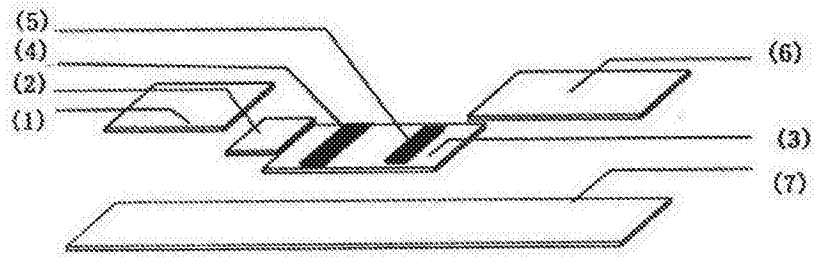


图1

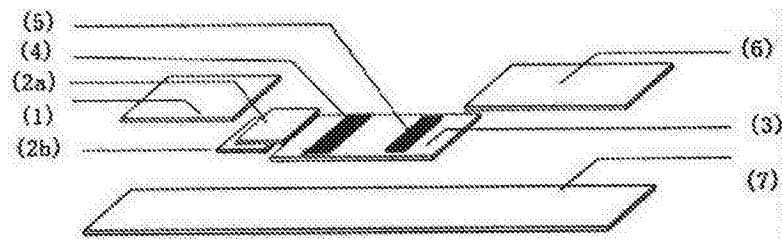


图2

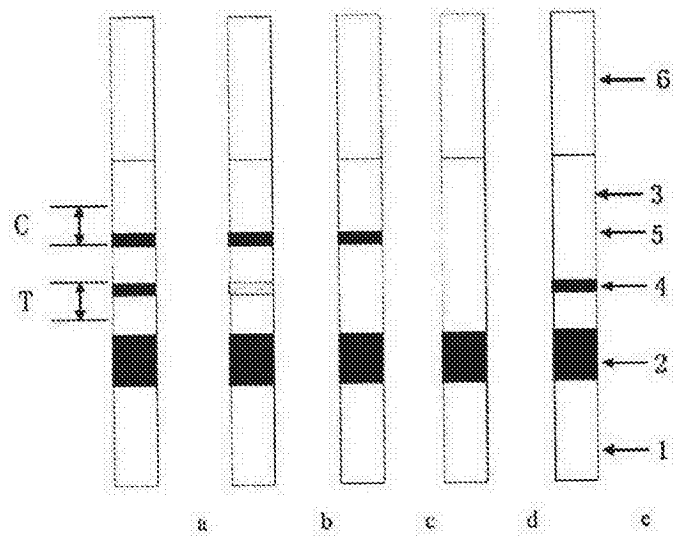


图3

专利名称(译)	一种抗alpha-烯醇化酶抗体免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN205280731U	公开(公告)日	2016-06-01
申请号	CN201420471435.X	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 霍如松 周阳 吴根现		
发明人	陈菲 霍如松 周阳 吴根现		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种抗alpha-烯醇化酶抗体免疫层析试纸条。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)，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。本实用新型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。

