



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108931653 A

(43)申请公布日 2018.12.04

(21)申请号 201810746679.7

(22)申请日 2018.08.31

(71)申请人 广州华澳生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市广州高新技术  
产业开发区科学城开源大道11号B3栋  
第五层505室

(72)发明人 于龙波 于永涛 黎权 刘日俊

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

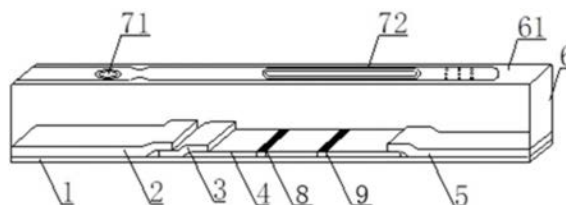
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

### (54)发明名称

一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡  
及其制备方法

### (57)摘要

本发明公开了一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡及其制备方法,旨在提供一种快速简便,灵敏度高且检测结果可靠的 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶检测方法;一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡,包括盒体,所述盒体设有底板和盒盖,所述盒盖设有加样孔和结果检测窗口,所述盒体内设有检测试纸,所述检测试纸下方设有底板,所述检测试纸设有检测区,所述检测区设有样品垫、抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫、包被膜和吸水垫,所述包被膜上设有一条 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体检测区T线和一条质控区C线,T线与C线平行排列。利用本发明的试剂盒和方法具有灵敏度高、特异性强、快速、简便、可实现对分析物进行定量或定性的测定等优点。



1. 一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡, 包括盒体, 其特征在于: 所述盒体设有底板和盒盖, 所述盒盖设有加样孔和结果检测窗口, 所述盒体内设有检测试纸, 所述检测试纸下方设有底板, 所述检测试纸设有检测区, 所述检测区设有样品垫、抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫、包被膜和吸水垫, 所述包被膜上设有一条 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线和一条质控区C线, 所述 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线与质控区C线平行排列。

2. 根据权利要求1所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡, 其特征在于: 所述包被膜两端分别与吸水垫和抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫相互交叠连接, 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫上压贴有样品垫, 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物表面设有修饰活性基团; 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物为量子点、镧系稀土络合物、纳米荧光微球或有色纳米颗粒, 所述量子点为CdSe、ZnS; 所述镧系稀土络合物为Eu (TTA) 3Phen; 所述纳米荧光微球为聚苯乙烯纳米荧光微球; 所述有色纳米颗粒为胶体金、有色聚苯乙烯微球。

3. 根据权利要求1所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡, 其特征在于: 所述样品垫为玻璃纤维样品垫; 所述包被膜为硝酸纤维素膜; 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫为玻璃纤维或聚酯纤维。

4. 一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法, 其特征在于: 所述方法包括样品垫、抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫与包被膜的制备方法。

5. 根据权利要求4所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法, 其特征在于: 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫包括量子点标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体、稀土络合物标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体、聚苯乙烯纳米荧光微球标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体、有色聚苯乙烯微球标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体和胶体金标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体。

6. 根据权利要求5所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法, 其特征在于: 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点与稀土络合物标记垫的制备步骤为:

①用标记缓冲液将水溶性羧基量子点、镧系稀土络合物溶解;

②在量子点、镧系稀土络合物溶液中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液, 室温反应1~2小时, 超滤除去未反应的化学物质后加入标记缓冲液;

③将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体加入上述活化的量子点、镧系稀土络合物溶液中, 室温偶联反应1~2小时, 加入封闭液反应30~60min, 超滤除去未反应的化学物质后加入抗体保存液, 即可得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记溶液;

④将上述所得的抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上, 喷量为1~5 $\mu$ L/cm, 干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记垫;

所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记垫的制备步骤为:

①用标记缓冲液将羧基聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球稀释至固含量约0.2%;

②在上述聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球溶液中加入EDC溶液和sulfo-NHS溶液, 活化10~20min, 高速离心30min, 去上清后加入适量抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体溶液, 混合偶联反应1~2h;

③将聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球溶液与抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体偶联溶液,加入封闭液反应30~60min,高速离心20min,去上清,加入抗体保存液即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记溶液;

④将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ ,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记垫;

所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫的制备步骤为:

①制备粒径在 30nm左右的胶体金溶液;

②在磁力搅拌下,胶体金溶液中逐滴加入0.05 MK<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>3</sub>调节pH值为8.0~8.5,加入抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体,减慢转速,充分混匀30min;按BSA终浓度质量比1%~2%,加入10%的BSA溶液进行封闭反应,充分混匀30min;

③在冷冻离心机中(4~10)℃、高速离心30min,弃上清,按原初始标记时所用胶体金溶液体积的40%~100%加入抗体保存液复溶,即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记溶液;

④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ ,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫。

7.根据权利要求4所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于:所述包被膜的制备方法的步骤为:

①将羊抗兔或羊抗鼠抗体用0.02M磷酸盐缓冲液稀释0.5~2mg/mL,加入3%的甲醇,即为质控区工作液;

②将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体用0.02M磷酸盐缓冲液稀释至0.8~1.5mg/mL,加入3%的甲醇,即为检测区工作液;

③将步骤①、步骤②所得的溶液,用喷金划膜仪以0.8~1.2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 包被到硝酸纤维膜上,检测区与质控区间距为0.4~0.7cm,位于硝酸纤维素膜中间位置,将硝酸纤维膜放入37℃烘箱中,干燥即可。

8.根据权利要求4所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于:所述样品垫的制备方法为将样品垫用样品垫缓冲液浸泡,所述的样品垫缓冲液为含0.5~5wt%BSA、0.5~5wt%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~5wt%聚乙二醇、0.1~5wt%吐温-20、1~5wt%曲拉通-100的0.01M磷酸盐缓冲液。

9.根据权利要求6所述的一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于:所述标记缓冲液为pH 5.0~9.0的0.1M MES缓冲液;所述抗体保存液为含1wt% BSA,20wt%蔗糖,10wt% 海藻糖,0.1wt%吐温-20,0.1wt%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M Tris-HCl缓冲液。

## 一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种测定血液(血清、血浆、全血)中的 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶含量的检测试剂卡及其制备方法。

### 背景技术

[0002]  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(AAT) 又称 $\alpha 1$  胰蛋白酶抑制剂,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的成员,为单链糖蛋白,由一条连接3个寡糖链的多肽链组成,分子量约为52kDa,PI值为4.8。作为人体内最重要的蛋白酶抑制物, $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶主要由肝细胞合成,在正常的血浆中能抑制90%以上的蛋白酶的活性,其主要能够抑制中性粒弹性蛋白酶,在所有的丝氨酸蛋白酶抑制剂中 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶的血管通透性较强,因此 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶在炎症局部往往浓度很高,而且对弹性蛋白酶的专一性更强,主要抑制胰蛋白酶和嗜中性粒细胞弹性蛋白酶的活性,保护正常细胞不受蛋白酶的破坏和损害,可抑制感染和炎症,起到维持机体环境稳定的作用。

[0003]  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶作为一种重要的急性期反应蛋白,其在正常人体内血清中浓度的参考范围是0.9-2.0g/L,在子宫内膜异位症、炎症反应(如:感染性疾病,类风湿疾病)、组织坏死、急性肝炎、肝硬化、肝坏死、恶性肿瘤、胶原病、妊娠、脑外伤、外科手术后、系统性红斑狼疮、斑疹伤寒、烧伤恢复期等疾病见升高;降低见于先天性缺乏症或减少症、新生儿呼吸窘迫综合征、重症肝炎、急性胰腺炎、肺气肿、十二指肠球部溃疡、肾病综合征、蛋白丧失性胃肠症、甲状腺功能亢进症、弥散性血管内凝血、营养不良、未成熟儿、肾移植早期排斥反应等疾病。

[0004] 目前, $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶检测的主要方法有:血清胰蛋白酶抑制容量试验、单向免疫扩散法、火箭免疫电泳法和ELISA 法,但均存在操作繁琐,耗时长缺点,不适用于急诊病人和临床病人及时诊断。

### 发明内容

[0005] 针对上述不足,本发明的目的在于提供一种操作简单、诊断迅速、检测结果可靠的 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡。

[0006] 为了达到本发明的目的,本发明提供的技术方案如下:一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡,包括盒体,所述盒体设有底板和盒盖,所述盒盖设有加样孔和结果检测窗口,所述盒体内设有检测试纸,所述检测试纸下方设有底板,所述检测试纸设有检测区,所述检测区设有样品垫、抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫、包被膜和吸水垫,所述包被膜上设有一条 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线和一条质控区C线,所述 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线与质控区C线平行排列。

[0007] 进一步,所述包被膜两端分别与吸水垫和抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫相互交叠连接,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫上压贴有样品垫,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物表面设有修饰活性基团,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物为量子点、镧系

稀土络合物、纳米荧光微球或有色纳米颗粒,所述量子点为CdSe、ZnS,所述镧系稀土络合物为Eu (TTA) 3Phen,所述纳米荧光微球为聚苯乙烯纳米荧光微球,所述有色纳米颗粒为胶体金、有色聚苯乙烯微球。

[0008] 进一步,所述样品垫为玻璃纤维样品垫,所述包被膜为硝酸纤维素膜,所述抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫为涂布标记 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体的玻璃纤维或聚酯纤维。

[0009] 一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法,包括样品垫、抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫与包被膜的制备方法。

[0010] 进一步,所述抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫包括量子点、稀土络合物标记抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体,聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体和胶体金标记抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体。

[0011] 进一步,所述抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体量子点与稀土络合物标记垫的制备步骤为:

- ① 用标记缓冲液将水溶性羧基量子点、镧系稀土络合物溶解;
- ② 在量子点、镧系稀土络合物溶液中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液,室温反应1~2小时,超滤除去未反应的化学物质后加入标记缓冲液;
- ③ 将抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体加入上述活化的量子点、镧系稀土络合物溶液中,室温偶联反应1~2小时,加入封闭液反应30~60min,超滤除去未反应的化学物质后加入抗体保存液,即可得抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记溶液;
- ④ 将上述所得的抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记垫;

所述抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记垫的制备步骤为:

- ① 用标记缓冲液将羧基聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球稀释至固含量约0.2%;
- ② 在上述聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球溶液中加入EDC溶液和sulfo-NHS溶液,活化10~20min,高速离心30min,去上清后加入适量抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体溶液,混合偶联反应1~2h;
- ③ 将聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球溶液与抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体偶联溶液,加入封闭液反应30~60min,高速离心20min,去上清,加入抗体保存液即得抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记溶液;
- ④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记垫;

所述抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫的制备步骤为:

- ② 制备粒径在 30nm左右的胶体金溶液;
- ② 在磁力搅拌下,胶体金溶液中逐滴加入0.05 M  $K_2CO_3$ 调节pH值为8.0~8.5,加入抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体,减慢转速,充分混匀30min;按BSA终浓度质量比1%~2%,加入10%的BSA溶液进行封闭反应,充分混匀30min;
- ③ 在冷冻离心机中(4~10)  $^{\circ}C$ 、高速离心30min,弃上清,按原初始标记时所用胶体金

溶液体积的40%~100%加入抗体保存液复溶,即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记溶液;

④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫。

[0012] 进一步,所述包被膜的制备方法的步骤为:

① 将羊抗兔或羊抗鼠抗体用0.02M磷酸盐缓冲液稀释0.5~2mg/mL,加入3%的甲醇,即为质控区工作液;

② 将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体用0.02M磷酸盐缓冲液稀释至0.8~1.5mg/mL,加入3%的甲醇,即为检测区工作液;

③ 将步骤①、步骤②所得的溶液,用喷金划膜仪以0.8~1.2 $\mu$ L/cm包被到硝酸纤维膜上,检测区与质控区间距为0.4~0.7cm,位于硝酸纤维素膜中间位置,将硝酸纤维膜放入37 $^{\circ}$ C烘箱中,干燥即可。

[0013] 进一步,所述样品垫的制备方法为将样品垫用样品垫缓冲液浸泡,所述的样品垫缓冲液为含0.5~5wt%BSA、0.5~5wt%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~5wt%聚乙二醇、0.1~5wt%吐温-20、1~5wt%曲拉通-100的0.01M磷酸盐缓冲液。

[0014] 进一步,所述标记缓冲液为pH 5.0~9.0的0.1M MES缓冲液;所述抗体保存液为含1wt% BSA,20wt%蔗糖,10wt% 海藻糖,0.1wt%吐温-20,0.1wt%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M Tris-HCl缓冲液。

## 附图说明

[0015] 图1是本发明的检测试剂卡结构示意图;

图2是本发明的检测试剂卡的盒盖俯视图;

图3是本发明的检测试纸结构示意图;

图4是本发明的检测试纸俯视图;

图5是本发明的检测卡判定结果为阴性时示意图;

图6是本发明的检测卡判定结果为阳性时示意图;

图中:1、底板;2、样品垫;3、抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫;4、包被膜;5、吸水垫;6、盒体;61、盒盖;71、加样孔;72、结果观察窗口;8、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线;9、质控区C线。

## 具体实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0017] 除非上下文另有特定清楚的描述,本发明中的检测物名称和参数,数量既可以单个的形式存在,也可以多个的形式存在,本发明并不对此进行限定。本发明中的步骤虽然用标号进行了排列,但并不用于限定步骤的先后次序,除非明确说明了步骤的次序或者某步骤的执行需要其他步骤作为基础,否则步骤的相对次序是可以调整的。可以理解,本文中所使用的术语“和/或”涉及且涵盖相关联的所列项目中的一者或一者以上的任何和所有可能

的组合。

[0018] 参见图1-图6,包括盒体6,所述盒体6设有底板1和盒盖61,所述盒盖61设有加样孔71和结果检测窗口72,所述盒体6内设有检测试纸,所述检测试纸下方设有底板1,所述检测试纸设有检测区,所述检测区设有样品垫2、抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫3、包被膜4和吸水垫5,所述包被膜上设有一条 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线8和一条质控区C线9,所述 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体检测区T线8与质控区C线9平行排列。所述包被膜4两端分别与吸水垫5和抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫3相互交叠连接,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫3上压贴有样品垫2,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物表面设有修饰活性基团,优选地活性基团为氨基、羧基或巯基,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物为量子点、镧系稀土络合物、纳米荧光微球或有色纳米颗粒,所述量子点为CdSe、ZnS,所述镧系稀土络合物为Eu(TTA) 3Phen,所述纳米荧光微球为聚苯乙烯纳米荧光微球,所述有色纳米颗粒为胶体金、有色聚苯乙烯微球。所述样品垫2为玻璃纤维样品垫,所述包被膜4为硝酸纤维素膜,所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫3为涂布标记 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体玻璃纤维或聚酯纤维。

[0019] 一种 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法,包括样品垫、抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫与包被膜的制备方法。所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫包括量子点、稀土络合物标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体,聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体和胶体金标记抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体。

[0020] 所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点与稀土络合物标记垫的制备步骤为:

- ① 用标记缓冲液将水溶性羧基量子点、镧系稀土络合物溶解;
- ② 在量子点、镧系稀土络合物溶液中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液,室温反应1~2小时,超滤除去未反应的化学物质后加入标记缓冲液;
- ③ 将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体加入上述活化的量子点、镧系稀土络合物溶液中,室温偶联反应1~2小时,加入封闭液反应30~60min,超滤除去未反应的化学物质后加入抗体保存液,即可得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记溶液;
- ④ 将上述所得的抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点、稀土络合物标记垫;

所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记垫的制备步骤为:

- ① 用标记缓冲液将羧基聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球稀释至固含量约0.2%;
- ② 在上述聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球溶液中加入EDC溶液和sulfo-NHS溶液,活化10~20min,高速离心30min,去上清后加入适量抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体溶液,混合偶联反应1~2h;
- ③ 将聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球溶液与抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体偶联溶液,加入封闭液反应30~60min,高速离心20min,去上清,加入抗体保存液即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记溶液;
- ④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球、有色聚苯乙烯微球标记

垫;

所述抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫的制备步骤为:

① 制备粒径在 30nm左右的胶体金溶液;

② 在磁力搅拌下,胶体金溶液中逐滴加入0.05 MK<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>3</sub>调节pH值为8.0~8.5,加入抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体,减慢转速,充分混匀30min;按BSA终浓度质量比1%~2%,加入10%的BSA溶液进行封闭反应,充分混匀30min;

③ 在冷冻离心机中(4~10)℃、高速离心30min,弃上清,按原初始标记时所用胶体金溶液体积的40%~100%加入抗体保存液复溶,即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记溶液;

④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至聚酯纤维素膜上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫。

[0021] 所述包被膜的制备方法的步骤为:

① 将羊抗兔或羊抗鼠抗体用0.02M磷酸盐缓冲液稀释0.5~2mg/mL,加入3%的甲醇,即为质控区工作液;

② 将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体用0.02M磷酸盐缓冲液稀释至0.8~1.5mg/mL,加入3%的甲醇,即为检测区工作液;

③ 将步骤①、步骤②所得的溶液,用喷金划膜仪以0.8~1.2 $\mu$ L/cm包被到硝酸纤维素膜上,检测区与质控区间距为0.4~0.7cm,位于硝酸纤维素膜中间位置,将硝酸纤维素膜放入37℃烘箱中,干燥即可。

[0022] 所述样品垫的制备方法为将样品垫用样品垫缓冲液浸泡,所述的样品垫缓冲液为含0.5~5wt%BSA、0.5~5wt%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~5wt%聚乙二醇、0.1~5wt%吐温-20、1~5wt%曲拉通-100的0.01M磷酸盐缓冲液。所述标记缓冲液为pH 5.0~9.0的0.1M MES缓冲液;所述抗体保存液为含1wt% BSA,20wt%蔗糖,10wt% 海藻糖,0.1wt%吐温-20,0.1wt%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M Tris-HCl缓冲液。

[0023] 实施例1, $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法(量子点或稀土络合物标记):

1)样品垫的制备方法是:

将样品垫用含0.5~5wt%BSA、0.5~5wt%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~5wt%聚乙二醇、0.1~5wt%吐温-20、1~5wt%曲拉通-100的0.01M磷酸盐缓冲液(0.01 M 磷酸氢二钠:0.01M磷酸二氢钠=81:19(V:V))(pH 7.4)浸泡完全后,37℃ 烘干或在相对湿度 $\leq$ 35%的环境下干燥,裁剪待用。

[0024] 样品垫缓冲液优选为0.01M磷酸盐缓冲液中溶解0.5wt%BSA、0.5wt%聚乙烯吡咯烷酮、0.5wt%聚乙二醇、0.25wt%吐温-20和1wt%曲拉通-100。

[0025] 2)抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点或稀土络合物标记垫的制备方法是:

① 用pH 8.0的0.1M MES缓冲液(配0.1M MES水溶液,用1 M NaOH溶液调整pH),将水溶性羧基CdSe/ZnS或Eu (TTA) 3Phen溶解并稀释至1 $\mu$ M。

[0026] ② 取1mL 1 $\mu$ M的CdSe/ZnS或Eu (TTA) 3Phen,加入30 $\mu$ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液,室温反应1~2小时。用30kDa的超滤管超滤,除去未反应的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸,吸取超滤管内剩余液体,加入0.1M MES缓



冲液恢复为体积至1mL。

[0027] ③ 将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体(一抗)加入100kDa的超滤管中,用0.1M MES缓冲液调整抗体含量为4mg/mL;按250 $\mu$ g/1mL的量,将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体加入到步骤②活化后CdSe/ZnS或Eu (TTA) 3Phen溶液中,室温反应1~2小时。

[0028] ④ 按10 $\mu$ L/1mL的量,向步骤③中加入10mg/mL的甘氨酸,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应30~60min。

[0029] ⑤ 将偶联抗体的CdSe/ZnS或Eu (TTA) 3Phen溶液加入到30kDa的超滤管中,加入pH 9.0浓度 0.05M Tris-HCl溶液置换溶液缓冲体系,重复3~5次,恢复终体积为1mL。

[0030] ⑥ 将步骤⑤中的溶在液4℃ 1800g离心,取上清液。

[0031] ⑦ 在步骤⑥所得的上清液中加入1mL抗体保存液,所述的抗体保存液为含1wt% BSA,20wt% 蔗糖,10wt% 海藻糖,0.1wt% 吐温-20和0.1wt% 聚乙烯吡咯烷酮的0.05M Tris-HCl缓冲液。

[0032] ⑧ 将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为1~5 $\mu$ L/cm(优选3 $\mu$ L/cm),放入37℃烘箱,干燥2~5小时,裁剪待用。

[0033] 3)包被膜的制备方法是:

① 将羊抗兔/羊抗鼠抗体用0.02M 磷酸盐缓冲液稀释至1mg/mL,加入3%的甲醇,即为质控区工作液。

[0034] ② 将抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体(二抗)用0.02M 磷酸盐缓冲液稀释至1.0mg/mL,加入3%的甲醇,即为检测区工作液。

[0035] ③ 将①、②所得的溶液,用喷金划膜仪以1 $\mu$ L/cm包被到硝酸纤维膜上。检测区与质控区间距为0.4~0.7cm(优选0.5cm),位于硝酸纤维素膜中间位置。

[0036] ④ 将步骤③硝酸纤维膜放入37℃烘箱中,干燥过夜。

[0037] 4)组装:

① 硝酸纤维素膜的粘贴:轻轻揭开PVC板上NC膜粘贴处的保护膜,将NC膜从左向右均匀推进,使其牢固的粘贴在PVC板上。

[0038] ② 吸水垫的粘贴:将PVC板平铺于工作台上,轻轻揭开PVC板上吸收垫粘贴处的保护膜,将吸收垫粘附于其上,均匀、轻微滚动式推进,以加强粘合力,并防止产生气泡,吸收垫覆盖在NC膜上1mm处。

[0039] ③ 抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫的粘贴:将量子点或镧系稀土络合物标记垫裁为5mm $\times$ 300mm。揭开PVC底板标记垫粘贴处的保护膜,将量子点或镧系稀土络合物标记垫粘附于其上,方法同吸收垫。抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体量子点或镧系稀土络合物标记垫3覆盖在NC膜上1mm处。

[0040] ④ 样品垫的粘贴:将干燥后的样品垫裁为18mm $\times$ 300mm后,轻轻揭开PVC底板最上端的保护膜,将样品垫粘附于抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫3上部,方法同吸收垫。样品垫覆盖在抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫上2mm处。

[0041] ⑤ 抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶示踪物标记垫的加固:将衔接胶带裁为12mm $\times$ 300mm,粘贴到样品垫处,顶端距试纸条样品垫端15mm。

[0042] ⑥ 切条与装卡:将粘贴好的PVC板切成3.0mm(2.5~4.5mm)宽的试纸条。将每一试纸条装入塑料卡盒内,将每一试剂卡置于铝膜袋中,并加入1g干燥剂1包,热合封口。

[0043] 实施例2,  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法(纳米荧光微球或有色纳米微球标记):

1) 抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球或有色聚苯乙烯微球标记垫的制备:

① 用pH 6.0的0.1M MES缓冲液(配0.1M MES水溶液,用1 M NaOH溶液调整pH)将羧基聚苯乙烯纳米荧光微球(粒径190nm)或有色聚苯乙烯微球(粒径200nm)稀释至固含量约0.2%;

② 取1mL固含量0.2%的聚苯乙烯纳米荧光微球或有色聚苯乙烯微球,加入50 $\mu$ L EDC溶液(10mg/mL)和50 $\mu$ L sulfo-NHS溶液(50mg/mL),活化10min,16500r/min离心30min,去上清后加入300 $\mu$ g抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体(一抗),混合偶联反应1h;

③ 在偶联溶液中,加入650 $\mu$ L封闭液(10%BSA溶液),反应30min,13000r/min离心20min,去上清,加入2500 $\mu$ L抗体保存液,超声分散即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球或有色聚苯乙烯微球标记溶液;

④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为4 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体聚苯乙烯纳米荧光微球或有色聚苯乙烯微球标记垫;

2) 其他的步骤如样品垫制备、包被膜制备、组装等与实施例1相同。

[0044] 实施例3,  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的制备方法(胶体金标记):

1) 抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫的制备:

① 使用粒径为30nm的胶体金溶液,取20ml,逐滴加入0.05 M  $K_2CO_3$ 调节pH值为8.0;

② 在磁力慢速搅拌下,在上述胶体金溶液中加入300 $\mu$ g抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体(一抗),充分混匀30min;然后逐滴加入10%的BSA溶液2mL进行封闭反应,缓慢搅拌30min;

③ 在冷冻离心机中(4~10)  $^{\circ}C$ 、10000rpm离心30min,弃上清,加入1mL抗体保存液复溶,即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记溶液;

④ 将上述所得的标记溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维或聚酯纤维上,喷量为4 $\mu$ L/cm,干燥裁剪后即得抗 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抗体胶体金标记垫;

2) 其他的步骤如样品垫制备、包被膜制备、组装等与实施例1相同。

[0045] 实施例4,该 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡的具体使用方法:

精确吸取10 $\mu$ l样本(血清、血浆、全血),加入到稀释液中,混合均匀;打开铝箔袋包装,取出检测卡,水平放置;吸取稀释后的样本75 $\mu$ l,加入到检测卡的加样孔中,然后开始计时,室温反应5min。

[0046] 用有色纳米颗粒作为示踪标记物的试剂卡,凭肉眼观察,根据质控区C线、检测区T线显色结果进行定性判读。当C线显色,T线不显色,结果为阴性,即样本中无目标分析物或目标分析物低于试剂卡灵敏度;当C线显色,T线也显色,结果为阳性,即样本中含目标分析物,并且T线显色越深,目标分析物含量越高。当C线不显色,无论T线显不显色,表明该测试无效,需要重测。

[0047] 用荧光示踪物标记的试剂卡可通过荧光定量仪对试纸条进行检测,获取测试线及质控线的荧光信号强度,并依据标准曲线实现对目标分析物的定量检测。正常人群的血液 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶界限值为14 $\mu$ mol/L,少于或等于该数值为阴性,高于该数值为阳性。

[0048] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

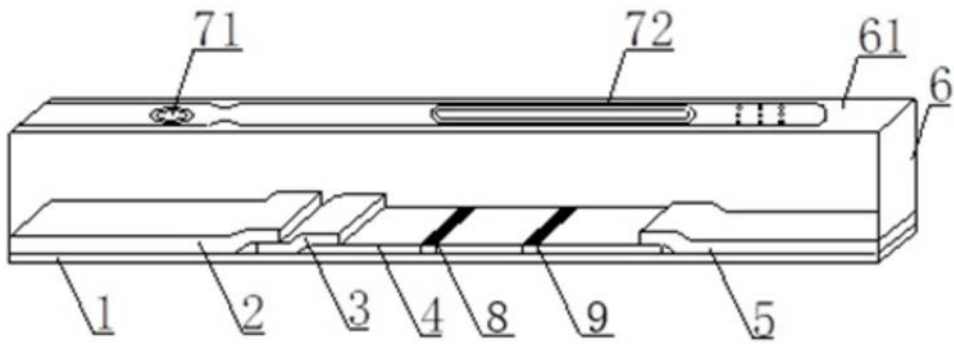


图1

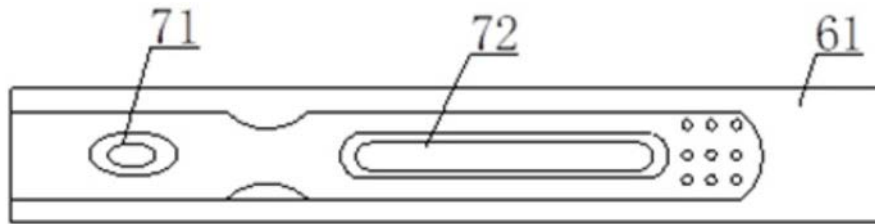


图2

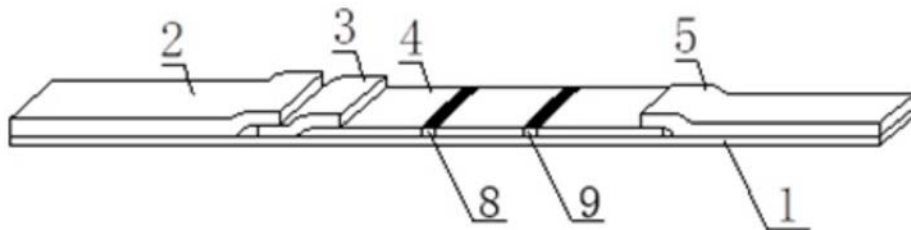


图3

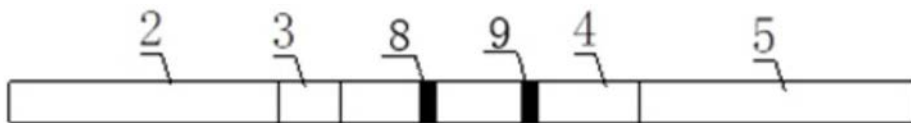


图4

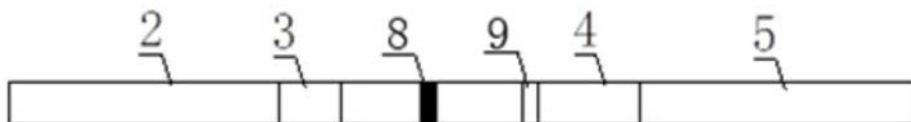


图5

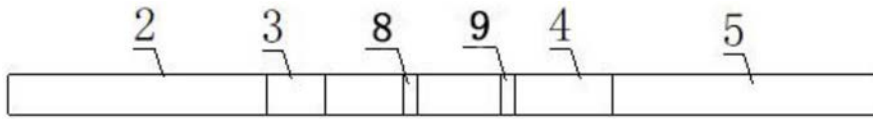


图6

专利名称(译)	一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108931653A</a>	公开(公告)日	2018-12-04
申请号	CN201810746679.7	申请日	2018-08-31
[标]发明人	于龙波 于永涛 黎权 刘日俊		
发明人	于龙波 于永涛 黎权 刘日俊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/582 G01N33/587 G01N33/588 G01N33/68 G01N2800/7095		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡及其制备方法，旨在提供一种快速简便，灵敏度高且检测结果可靠的 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶检测方法；一种 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶免疫层析检测试剂卡，包括盒体，所述盒体设有底板和盒盖，所述盒盖设有加样孔和结果检测窗口，所述盒体内设有检测试纸，所述检测试纸下方设有底板，所述检测试纸设有检测区，所述检测区设有样品垫、抗 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体示踪物标记垫、包被膜和吸水垫，所述包被膜上设有一条 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶抗体检测区T线和一条质控区C线，T线与C线平行排列。利用本发明的试剂盒和方法具有灵敏度高、特异性强、快速、简便、可实现对分析物进行定量或定性的测定等优点。

