



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102879586 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201210383644. 4

(22) 申请日 2012. 10. 11

(71) 申请人 南京基蛋生物科技有限公司

地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业
开发区博富路 9 号

(72) 发明人 苏恩本 王勇 陈伟 黄力

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

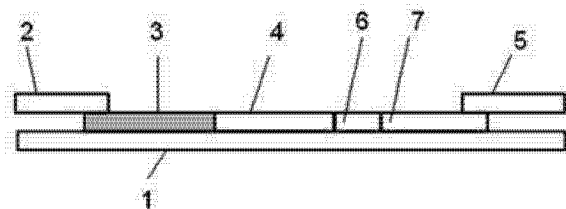
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,定量检测试剂盒的底衬上依次搭接地粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的结合垫上包被有荧光胶乳微球标记的人白蛋白抗体,所述的硝酸纤维素膜上包被有白蛋白重组抗原的检测线和兔抗鼠 IgG 抗体的质控线。本发明能够准确定量检测人尿液中微量白蛋白含量,具有操作简便、准确度高、灵敏度高、成本低等特点。



1. 一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,在底衬(1)上依次搭接地粘贴样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)和吸水纸(5),其特征在于所述的结合垫(3)上包被有荧光胶乳微球标记的人白蛋白抗体,所述的硝酸纤维素膜(4)上包被有白蛋白重组抗原的检测线(6)和兔抗鼠 IgG 抗体的质控线(7)。

2. 根据权利要求 1 所述微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述胶乳微球粒径范围为 50nm-500nm。

3. 根据权利要求 2 所述微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述胶乳微球粒径为 153nm。

4. 根据权利要求 1 所述微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述荧光胶乳微球是由胶乳微球吸附荧光标记的链霉亲和素制备得到。

5. 根据权利要求 1 所述的微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述荧光胶乳微球的荧光为直接荧光物质。

6. 根据权利要求 5 所述微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述直接荧光物质为异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、荧光素 Cy5、荧光素 Cy7 中的一种。

7. 根据权利要求 1 所述的微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,其特征在于所述结合垫(3)材质为玻璃纤维素膜或聚酯膜。

8. 一种如权利要求 1 所述一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

1) 包被荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体结合垫的制备:

将荧光标记的链霉亲和素和胶乳微球吸附结合,制备得到荧光胶乳微球;

将生物素与人白蛋白单克隆抗体结合,制备得到生物素化白蛋白抗体;

将所得荧光胶乳微球和生物素化白蛋白抗体混合,即得荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体;

将所得荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体喷涂在结合垫上;

2) 硝酸纤维素膜的制备:

用包被缓冲液分别稀释白蛋白重组抗原和兔抗鼠 IgG 抗体,并将稀释后的白蛋白重组抗原和兔抗鼠 IgG 抗体分别平行地喷于硝酸纤维素膜上形成白蛋白检测线和兔抗鼠 IgG 抗体质控线;

3) 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫体外诊断领域,具体涉及一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 正常情况下,血浆中白蛋白通过肾小球毛细血管网时,很少进入原尿,即使少量通过,99%可被曲肾小管重新吸收,因此终尿中白蛋白不存在。但是由于肾功能衰竭、糖尿病和心血管疾病并发症等因素可以导致白蛋白病理性升高。一般情况下,尿蛋白明显升高,常见于严重肾小球病变,轻度增加表示肾小管损害。人尿液中的白蛋白达到在 30-300mg/天或 20-200mg/L 浓度称为微量白蛋白(又名微量尿白蛋白,Micoralbuminuria,MAU)。微量白蛋白通常被认为是肾功能衰竭、糖尿病和心血管疾病并发症等重要临床标志之一。因此,尿液中白蛋白存在水平的检测对上述疾病的早期诊断、早期治疗和减小风险由重要的参考价值 and 临床意义。

[0003] 目前,测定微量白蛋白的方法有芯片电泳法、毛细管电泳法、酶联免疫分析法、高效液相色谱法等。在这些检测方法较为繁琐、历时较长、费用较高,不利于临床医生的及时诊断和疗效观察。

[0004] 中国专利申请号 200810305085.9 公开了一种半定量检测尿微量白蛋白胶体硒试纸,该试纸条能够检测含量不低于 $20\mu\text{g/ml}$ 尿液中白蛋白。此法虽然简单,但是准确度不高、且不能定量检测。中国专利申请号 01126895.6 提供了一种快速检测肾脏损害的尿白蛋白芯片,但其未对芯片的制备工艺、检测灵敏度、最低检出量等重要特性给予阐述,限制了其应用的可靠性。中国专利申请号 201110458518.6 公开了微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒及其制备工艺,具体描述了该试剂盒的制备,还说明了试剂盒检测灵敏度 $15\mu\text{g/ml}$ 。但是胶体金免疫层析存在以下缺陷:

(1) 胶体金标记过程是静电吸附过程,是一种物理过程,故在液相中稳定性较差,往往造成已标记上的蛋白分子又再次脱落;

(2) 只有当金颗粒集聚到一定量时,人肉眼才能观察到紫红色的条带,且该颜色与背景对比度不大,从而限制了检测灵敏度。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对上述现有技术的缺陷,提供一种灵敏度高、操作简便和能进行定量检测微量白蛋白的荧光免疫定量测定试纸条及其制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题所采取的技术方案为:一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒,在底衬上依次搭接地粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的结合垫上包被有荧光胶乳微球标记的人白蛋白抗体,所述的硝酸纤维素膜上包被有白蛋白重组抗原的检测线和兔抗鼠 IgG 抗体的质控线。

[0007] 所述胶乳微球粒径范围为 50nm-500nm,优选 153nm。

[0008] 所述荧光胶乳微球是由胶乳微球吸附荧光标记的链霉亲和素制备得到。

[0009] 所述荧光胶乳微球的荧光为直接荧光物质, 优选异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、荧光素 Cy5、荧光素 Cy7 中的一种。

[0010] 所述结合垫材质为玻璃纤维素膜或聚酯膜。

[0011] 一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒的制备方法, 包括如下步骤:

1) 包被荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体结合垫的制备:

将荧光标记的链霉亲和素和胶乳微球吸附结合, 制备得到荧光胶乳微球;

将生物素与人白蛋白单克隆抗体结合, 制备得到生物素化白蛋白抗体;

将所得荧光胶乳微球和生物素化白蛋白抗体混合, 即得荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体;

将所得荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体喷涂在结合垫上;

2) 硝酸纤维素膜的制备:

用包被缓冲液分别稀释白蛋白重组抗原和兔抗鼠 IgG 抗体, 并将稀释后的白蛋白重组抗原和兔抗鼠 IgG 抗体分别平行地喷于硝酸纤维素膜上形成白蛋白检测线和兔抗鼠 IgG 抗体质控线;

3) 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸得到试纸板, 按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0012] 本发明能够准确定量检测人尿液中微量白蛋白含量, 具有操作简便、准确度高、灵敏度高、成本低等特点。

附图说明

[0013] 图 1 为本发明微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒结构示意图。

[0014] 图 2 为本发明实施例 1 所制备的试剂盒的标准曲线。

[0015] 图 3 为本发明实施例 1 所制备的试剂盒的线性范围相关性。

[0016] 图 4 为本发明实施例 1 所制备的试剂盒与奥林巴斯 AU5400 全自动生化仪及配套英国朗道生产的微量白蛋白试剂盒检测结果相关性比较。

[0017] 其中, 图 1: 1、底衬; 2、样品垫; 3、结合垫; 4、硝酸纤维素膜; 5、吸水纸; 6、检测线; 7、质控线。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0019] 微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒, 在底衬 1 上依次搭接地样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水纸 5, 所述结合垫 3 上喷涂有荧光胶乳微球标记的人白蛋白抗体, 所述硝酸纤维素膜 4 上有包被白蛋白重组抗原的检测线 6 和兔抗鼠 IgG 抗体的质控线 7。

[0020] 进一步所述的胶乳微球粒径范围为 50nm-500nm, 优选 153nm。

[0021] 所述的荧光胶乳微球是由胶乳微球吸附荧光标记的链霉亲和素制备得到。

[0022] 所述荧光为直接荧光物质, 优选异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、荧光素 Cy5、荧光素 Cy7 中的一种。

[0023] 实施例 1 微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒制备方法如下:

1) 荧光胶乳微球的制备

荧光胶乳微球的制备:用吸附缓冲液(50mM、pH5.8的柠檬酸盐缓冲液)稀释粒径为153nm胶乳微球至终浓度20mg/ml,体积为5ml,制得胶乳微球悬浮液;添加适量的荧光素Cy5标记链霉亲和素(购自上海研晶生物科技有限公司)在吸附缓冲液里,终体积为5ml;将上述胶乳微球悬浮液加入到上述含有荧光素标记链霉亲和素的吸附缓冲液中,制得混合液;将所得混合液在室温下温浴1-2小时,并不断搅拌,然后离心,收集沉淀,沉淀用储存缓冲液(含有0.05%酪蛋白的吸附缓冲液)溶解,放置4℃保存,备用。

[0024] 2) 生物素化白蛋白抗体的制备

将人白蛋白单克隆抗体用0.1mol/L、pH8.0碳酸氢钠缓冲液稀释至1mg/ml,交互用0.1mol/L、pH8.0碳酸氢钠缓冲液对人白蛋白单克隆抗体充分透析;用1ml DMSO溶解1mg的NHSB,得到NHSB溶液;向上述1ml白蛋白单克隆抗体溶液加入20 μ l NHSB溶液,室温搅拌2-4小时,继续室温搅拌10分钟,然后用20mM、pH7.2 PBS缓冲液透析,即得生物素化白蛋白单克隆抗体。

[0025] 3) 荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体的制备

将步骤1)制得的荧光胶乳微球和步骤2)制得的生物素化白蛋白单克隆抗体混合在一起,反应30分钟后离心,沉淀物用储存缓冲液溶解,恢复至原体积。

[0026] 4) 包被荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体结合垫3的制备

将步骤3)制得的荧光胶乳微球标记人白蛋白单克隆抗体,按3.0 μ l/cm³的用量喷在玻璃纤维素膜3上。

[0027] 5) 硝酸纤维素膜4的制备

a)包被缓冲液的制备:将0.025M、pH7.4的PBS,用0.22 μ 膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0028] b)封闭液的制备:将含1%BSA,1%蔗糖,0.025M、pH7.5的PBS,用0.22 μ 膜过滤,置于4℃备用,有效期3天。

[0029] c)白蛋白重组抗原检测线6的制备:将白蛋白重组抗原按2.0mg/ml的浓度,蠕动泵授液量0.4ml/min,划线速度50m/20min,在干燥箱内20℃鼓风干燥12小时。

[0030] d)质控线7的制备:将兔抗鼠IgG抗体按8mg/ml的浓度,蠕动泵授液量0.4ml/min,划线速度50m/20min,在硝酸纤维素膜5上划线,该线与检测线6平行,放入干燥箱内20℃鼓风干燥12小时。

[0031] e)用上述封闭液将含有检测线6和质控线7的硝酸纤维素膜4于37℃封闭60分钟,取出后置37℃下烘干处理两个小时,封袋备用。

[0032] 6) 试纸条组装

在底衬1上顺次相互搭接地粘贴样品垫2、玻璃纤维素膜3、硝酸纤维素膜4和吸水纸5得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0033] 实施例2 另一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒制备方法如下:

1) 荧光胶乳微球的制备

荧光胶乳微球的制备:用吸附缓冲液(50mM、pH5.8的柠檬酸盐缓冲液)稀释粒径为500nm胶乳微球至终浓度30mg/ml,体积为6ml,制得胶乳微球悬浮液;添加适量的红色荧光素罗丹明标记链霉亲和素(购自上海酶联生物科技有限公司)在吸附缓冲液里,终体积为

6ml ;将上述胶乳微球悬浮液加入到上述含有红色荧光素罗丹明标记链霉亲和素的吸附缓冲液中,制得混合液;将所得混合液在室温下温浴 1-2 小时,并不断搅拌,然后离心,收集沉淀,沉淀用储存缓冲液(含有 0.06% 酪蛋白的吸附缓冲液)溶解,放置 4℃ 保存,备用。

[0034] 2) 生物素化白蛋白抗体的制备(同实施例 1 中的生物素化白蛋白抗体的制备)

3) 荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体的制备(同实施例 1 中的荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体的制备)

4) 涂覆荧光胶乳微球标记人白蛋白抗体结合垫 3 的制备

将步骤 3) 制得的荧光胶乳微球标记人白蛋白单克隆抗体,按 $2.0 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 的用量喷在聚酯膜 3 上。

[0035] 5) 硝酸纤维素膜 4 的制备(同实施例 1 中的硝酸纤维素膜 4 的制备)

6) 试纸条组装(同实施例 1 中试纸条组装)

实施例 3 微量白蛋白荧光免疫定量测定试纸条定量检测

1) 绘制标准曲线

在按实施例 1 制备好的微量白蛋白荧光免疫定量测定试纸条样品垫上加入不同浓度白蛋白抗原标准品(取六个不同浓度,分别为 10、20、40、80、160、200mg/L,每个浓度设 3 个重复),通过南京基蛋生物科技有限公司的荧光免疫定量分析仪 Getein1100 读取检测线 7 和质控线 8 信号,实验结果及分析见表 1。

[0036] 表 1 白蛋白标准品检测结果

微量白蛋白标准品 (mg/L)		10	20	40	80	160	200
样品 信号	1	2411	2184	1892	1559	683	195
	2	2409	2176	1899	1564	675	203
	3	2419	2180	1903	1568	682	204
Mean		2413	2180	1898	1564	680	201
SD		5.29	4.00	5.57	4.51	4.36	4.93

以微量白蛋白抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,如图 2 所示。

[0037] 2) 检测线性范围

采用本发明实施例 1 制备的试纸条,做检测线性范围实验。取微量白蛋白标准品,用 1% 酪蛋白缓冲液稀释成 8 个浓度,其浓度范围是 10mg/L-200mg/L,每个浓度重复测定 3 次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程 $y = 1.003x + 0.491$,相关系数 $r = 0.9994$,表明本发明试纸条在 10mg/L-200mg/L 线性范围内相关性很好(见附图 3)。

[0038] 3) 灵敏度

以 1% 酪蛋白为空白样本,用本发明实施例 1 制备的试纸条进行测定,重复 20 次,计算读数均值 V 为 2381.20,标准差 SD 为 19.62,根据以空白均值加两倍标准差报告方法计算荧光免疫定量分析仪 Getein1100 测定读数变化量计算 $V + 2SD$ 为 2420.449,根据回归方程计算空白样本浓度为 1.71mg/L。

[0039] 用稀释后浓度分别为 8mg/L、10mg/L、12mg/L、14mg/L、20mg/L 白蛋白标准品溶液

测定荧光免疫定量分析仪 Getein1100 重复测定 10 次,分别计算变异系数 CV 为 19.61%、9.46%、8.44%、7.52%、8.46%。由此可见,最低浓度水平 10 mg/L 为可报告范围下限。

[0040] 4) 重复性和准确性

配制 20mg/L 和 100mg/L 的微量白蛋白标准品溶液,采用本发明实施例 1 制备的试纸条进行测定,各浓度分别重复测定 5 次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果显示变异系数分别为 0.05 和 0.06;计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为 0.60% 和 5.30%。

[0041] 表 2 重复性和准确性实验

序号	标准值 20mg/L	标准值 100mg/L
1	21.7	114.8
2	20.4	105.7
3	19.5	104.2
4	19.8	96.3
5	19.2	105.5
平均值	20.12	105.3
标准差	0.99	6.57
变异系数(%)	4.91%	6.24%
相对偏差(%)	0.60%	5.30%

3.5 与奥林巴斯 AU5400 全自动生化仪及配套英国朗道生产的微量白蛋白试剂盒进行临床性能及有效性对比分析

采用本发明实施例 1 制备的试纸条进行测定,将含有微量白蛋白的尿液等分,取 100 μ l 的样品加样至试纸条的样品垫 2 上,通过南京基蛋生物科技有限公司的荧光免疫定量分析仪 Getein1100 读取检测线 7 和质控线 8 信号。从同一等分样品,采用对比系统奥林巴斯 AU5400 全自动生化仪及配套英国朗道生产的微量白蛋白试剂盒进行临床性能及有效性对比分析。采用这种方式制备了 200 份样品并采用两个检测系统,图 4 显示了两个系统的测量值,其相关性很好 $r=0.984$, $P > 0.05$,医学决定水平处相对偏差小于 10%,结果符合临床分析要求。因此,两种方法间无统计学差异。

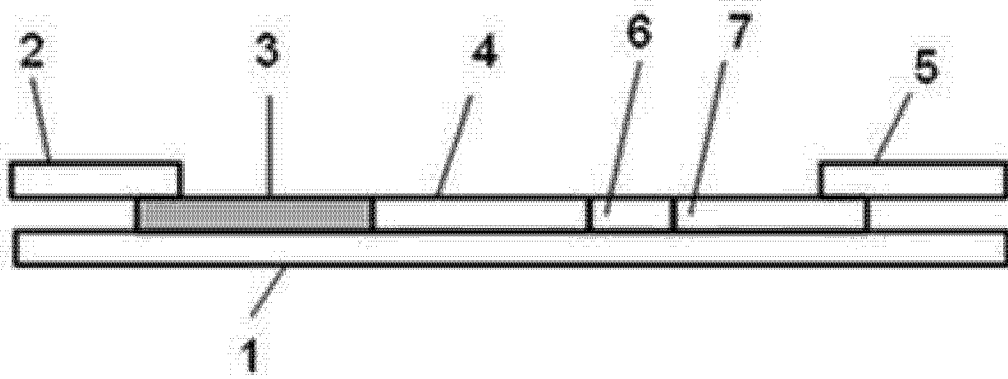


图 1

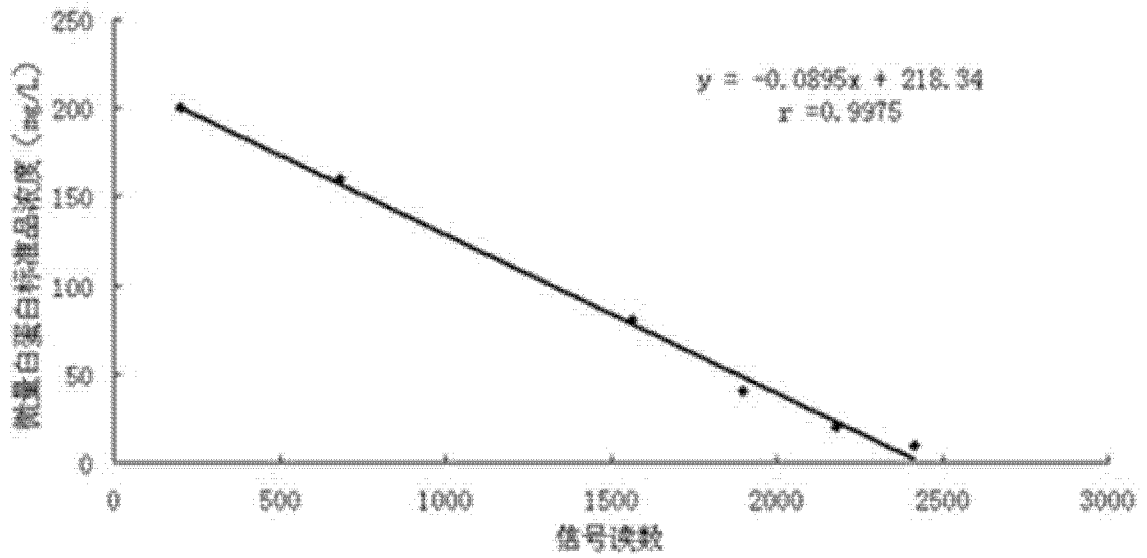


图 2

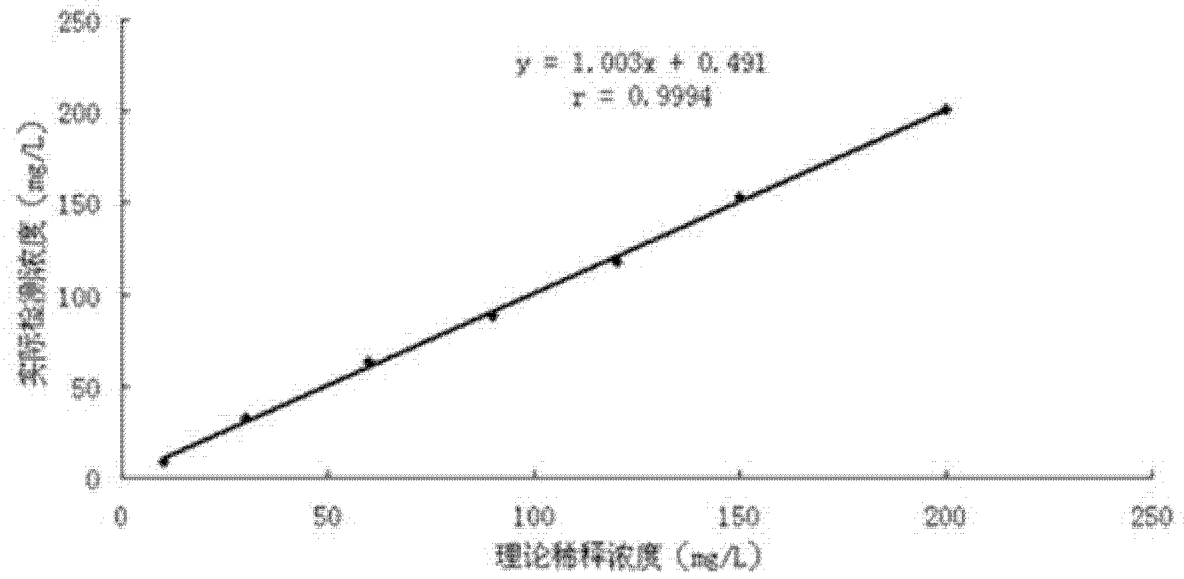


图 3

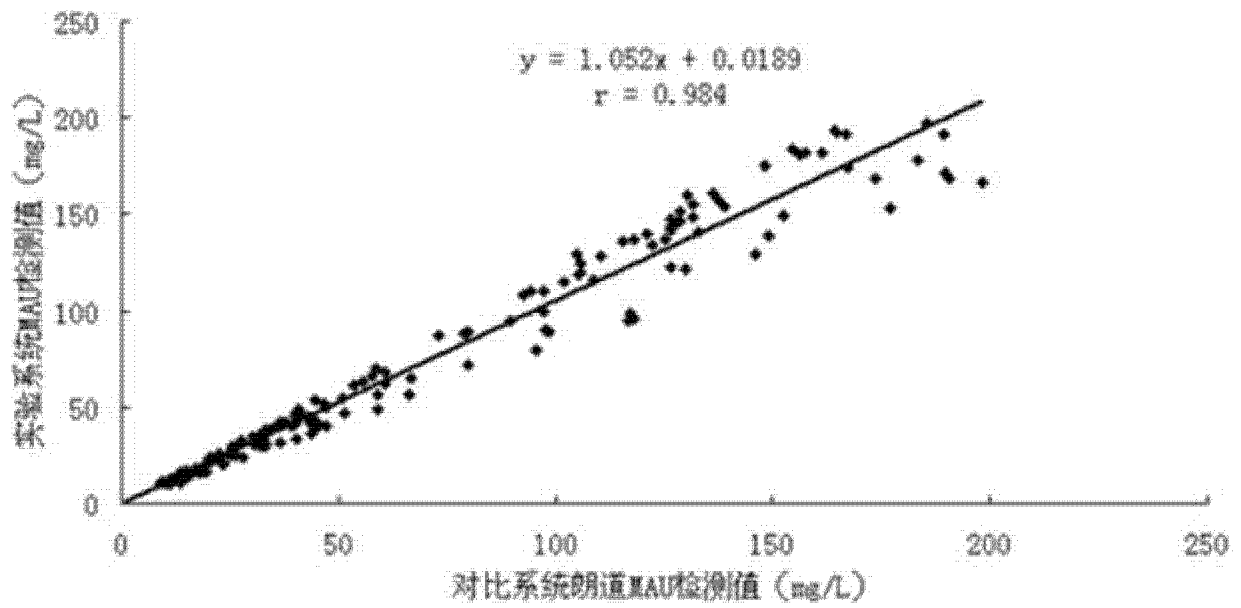


图 4

专利名称(译)	微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102879586A	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201210383644.4	申请日	2012-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
[标]发明人	苏恩本 王勇 陈伟 黄力		
发明人	苏恩本 王勇 陈伟 黄力		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种微量白蛋白荧光免疫定量检测试剂盒及其制备方法，定量检测试剂盒的底衬上依次搭接地粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的结合垫上包被有荧光胶乳微球标记的人白蛋白抗体，所述的硝酸纤维素膜上包被有白蛋白重组抗原的检测线和兔抗鼠IgG抗体的质控线。本发明能够准确定量检测人尿液中微量白蛋白含量，具有操作简便、准确度高、灵敏度高、成本低等特点。

