



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109358191 A

(43)申请公布日 2019. 02. 19

(21)申请号 201811492834.3

(22)申请日 2018.12.07

(71)申请人 上海荣盛生物药业有限公司

地址 201108 上海市闵行区向阳路888号

(72)发明人 段江波 朱绍荣

(51)Int.Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

用于免疫试剂的组合物及其制备方法

(57)摘要

一种用于免疫试剂的组合物,在包被液中添加聚合物,聚合物富含羟基/氨基/羧基,达到提高荧光层析试纸条灵敏度的目标。本发明的组合物在保证试纸条同等灵敏度的条件下,可降低包被浓度50%,从而降低该试纸条制造成本。

1. 一种用于免疫试剂的组合物,其特征在于在包被液中添加聚合物,聚合物富含羟基、氨基和羧基之一种或几种,达到提高荧光层析试纸条灵敏度的目标。

2. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述的聚合物为改性壳聚糖和改性纤维素。

3. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述的聚合物选自于羧甲基壳聚糖、羟丙基壳聚糖、壳聚糖季铵盐、壳聚糖盐酸盐和壳聚糖乳酸盐之一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述的聚合物为选自于羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和羧甲基淀粉钠。

5. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述的包被液选自于磷酸缓冲盐溶液、碳酸缓冲盐溶液、Tris-HCL、MES、HEPES缓冲液或硼酸-硼酸钠缓冲液,pH值范围为6.0~10.0,浓度为2mM~50mM。

6. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述聚合物的使用浓度为0.001wt%~1.0wt%。

7. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述聚合物为羧甲基壳聚糖,于组合物中的终浓度为0.01wt%~0.05wt%。

8. 根据权利要求1所述的用于免疫试剂的组合物,其特征在于所述聚合物为羧甲基纤维素钠,于组合物中的终浓度为0.005wt%~0.01wt%。

9. 一种制取权利要求1~8之一所述的用于免疫试剂的组合物的方法,包括:其特征在于,将所述的聚合物加入水中,至终浓度为2wt%,加热至50℃~100℃溶解后冷却,按添加到包被液中,使聚合物在包被液中的终浓度为0.001wt%~0.1wt%。

用于免疫试剂的组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种组合物,尤其涉及一种用于免疫试剂的组合物,达到提高荧光层析试纸条灵敏度的目标。

背景技术

[0002] 荧光免疫层析检测(Fluorescent Immunoassays, FIA)是一种基于侧向层析法检测技术建立起来的一种POCT快速检测技术手段。相比于传统的胶体金方法,该方法通过荧光信号标记,既可以定性,也可以定量测定各种病原体的抗原、抗体,该技术在医学检验、科研、环境监测和食品安全等有着广泛的应用。

[0003] 该类试剂常常以完整的试剂盒的方式提供,并且配套专门的阅读仪,根据荧光信号产生方式的不同,可以分为自发荧光和激发荧光两大类。激发荧光由于斯托克斯位移效应的存在,可以在荧光检测时保持更底的本地信号,从低起到提高S/CO值得作用,因此在临床诊断上应用最广泛。

[0004] 该类试剂盒的性能指标通常包括:分析灵敏度、临床灵敏度、特异性、精密性、准确度、线性范围和稳定性等。只有同时满足上述指标的综合要求,才能通过注册上市申请,取得上市销售许可证。

[0005] 荧光层析试纸条通常包含以下部件:背板、吸水纸、NC膜、荧光垫和样品垫。其制备过程包括以下流程:NC膜选型,梅毒抗原包被到NC膜,抗原标记到荧光微球,荧光微球装载到荧光垫,荧光垫粘贴到背板,样品垫粘贴到背板,吸水纸粘贴到背板,最后组装好的大板裁切成试纸条。

[0006] 在试纸条的制备过程中,抗原、抗体包被到NC膜上的操作步骤对试纸条的灵敏度有重要影响,通常要增加试纸条的灵敏度,工程师会选择两种主要解决方案,一种是增加包被浓度,另一种是增加标记物浓度。在大部分情况下,这两种解决方案可以有效提高试纸条的灵敏度。但是在某些情况下,通过这两种技术方案难以实现提高灵敏度的目标。为满足试剂盒的性能指标要求,必须采取其他的技术手段实现提高灵敏度,才能实现开发目标。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种用于免疫试剂的组合物,提高试剂检测的灵敏度。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种制备用于免疫试剂的组合物的方法。

[0009] 本发明的用于免疫试剂的组合物,通过在包被时在包被液中添加微量聚合物,该聚合物富含羟基、氨基和羧基之一种或几种,达到提高荧光层析试纸条灵敏度的目标。

[0010] 本发明使用的聚合物为改性壳聚糖,如:但不限于羧甲基壳聚糖、羟丙基壳聚糖、壳聚糖季铵盐、壳聚糖盐酸盐和壳聚糖乳酸盐,这些物质单独或组合应用于本发明。

[0011] 本发明使用的聚合物为改性纤维素,如:但不限于羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和羧甲基淀粉钠,这些物质单独或组合应用于本发明。

[0012] 本发明使用的包被液如:但不限于磷酸缓冲盐溶液(PBs)、碳酸缓冲盐溶液(CBs)、Tris-HCL、MES、HEPES缓冲液或硼酸-硼酸钠缓冲液等,pH值范围为6.0~10.0,浓度为2mM~50mM。

[0013] 将本发明的各种改性壳聚糖和/或改性纤维素添加到包被液中,再将包被用抗原或抗体加入到包被液中,最终将上述混合物包被到NC膜上。

[0014] 由于上述添加剂均为高粘度物料,直接添加到包被液中,容易团聚成块,难以段时间内溶解,使得包被液均一性较差,因此本发明需要先将改性壳聚糖和改性纤维素配制成2wt%浓度的母液,再将母液添加到包被液中,以便降低最终浓度的误差。

[0015] 本发明包被液使用的聚合物通常只需要选择一种,特殊情况下也可以选择两种以上,此时可能造成检测非必要的假阳性结果。使用聚合物时,应当根据实际情况使用。较佳的,聚合物的使用浓度为0.001wt%~1.0wt%,尤其是0.01wt%~0.1wt%。

[0016] 必要时可以使用DMSO、DMF、甲醇和乙醇作为溶剂,加快添加剂的溶解速度。

[0017] 应用于本发明组合物的聚合物,优先选择羧甲基壳聚糖和羧甲基纤维素钠,单独或组合应用于本发明。

[0018] 用于免疫试剂的组合物,优先选择羧甲基壳聚糖于组合物中的终浓度为0.01wt%~0.05wt%。

[0019] 用于免疫试剂的组合物,优先选择羧甲基纤维素钠于组合物中的终浓度为0.005wt~0.01wt%。

[0020] 本发明技术方案具有的有益效果:

[0021] 本发明的用于免疫试剂的在保证试纸条同等灵敏度的条件下,可降低包被浓度50%,从而降低该试纸条制造成本。

具体实施方式

[0022] 以下详细描述本发明的技术方案。本发明实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对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精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

[0023] 实施例1配制含0.01wt%羧甲基壳聚糖的CB包被液100g。

[0024] 配制壳聚糖母液:取200mL试剂瓶,加入纯水80g,称取羧甲基壳聚糖2g,补加纯水至100g。将上述溶液置于80℃水浴中温浴30min,使完全溶解,取出备用。

[0025] 配制CB母液:取200mL试剂瓶,加入纯水80g,称取碳酸钠1.59g,称取碳酸氢钠2.93g,补加纯水至100g,摇晃混匀,使完全溶解。

[0026] 配制海藻糖母液:取200mL试剂瓶,加入纯水50g,称取无水海藻糖20g,补加纯水至100g,摇晃混匀,使完全溶解。

[0027] 配制包被液:取200mL试剂瓶,加入壳聚糖母液0.5g,加入CB母液2g,加入海藻糖母液10g,补加纯水至100g。

[0028] 实施例2制含0.01%羧甲基纤维素钠的Tris包被液100mL。

[0029] 配制羧甲基纤维素钠母液:取200mL试剂瓶,加入纯水80mL,称取羧甲基纤维素钠2g,补加纯水至100mL。将上述溶液置于80℃水浴中温浴30min,使彻底溶解,取出备用。

[0030] 配制Tris-HCL母液:取200mL试剂瓶,加入纯水80mL,称取Tris 12.1g,补加纯水至100mL,用浓盐酸调节pH至8.0,摇晃混匀,使彻底溶解。

[0031] 配制海藻糖母液:取200mL试剂瓶,加入纯水50g,称取无水海藻糖20g,补加纯水至100g,摇晃混匀,使彻底溶解。

[0032] 配制包被液:取200mL试剂瓶,加入羧甲基纤维素钠母液0.5mL,加入Tris-HCL 母液10mL,加入海藻糖母液10mL,补加纯水至100g。

[0033] 实施例3用不含羧甲基纤维素钠的包被液制备梅毒荧光层析试纸条检测参考品

[0034] 制备NC膜大板:用10mM的Tris-HCL缓冲液将TP包被抗原稀释到1.0mg/mL,用喷金划膜仪将稀释好的包被液按1uL/cm划线包被到赛多利斯CN140硝酸纤维素膜上。

[0035] 制备荧光垫:将荧光微球与TP标记抗原按10:1的比例进行偶联,偶联后用的荧光微球标记TP抗原按1:500倍稀释,按5uL/cm的喷量,用喷金划膜仪将耦联好抗原的荧光微球喷涂到荧光结核垫上。

[0036] 将包被好的NC膜和喷涂好的荧光垫放置到37℃的干燥箱中,在相对湿度<30%的条件下,干燥4小时候取出。

[0037] 制备样品垫:将含10%BSA、1%PVP、1%酪蛋白钠的0.1M的Tris-HCL缓冲液涂布到玻璃纤维纸上,将涂布好的玻璃纤维纸烘干备用。

[0038] 组装大板:将吸水纸、荧光垫、样品垫按合适的尺寸裁切成细条,粘贴到已经粘贴好NC膜的PVC背板上,使吸水纸压紧NC膜上端,荧光垫压紧NC膜下端,样品垫压紧荧光垫下端。

[0039] 裁切组装:将组装好的大板用裁切机裁切成3.8mm的细条,将切好的试纸条组装到塑料卡壳中压紧,制备成TP荧光检测卡。

[0040] 在检测卡加样孔中加入P1-P10阳性参考品,N1-N10阴性参考品,各100μL,等待15~30分钟后,用广州蓝博FS1200型荧光检测仪测定,选择最大吸收峰面积模式,读数,记录检测结果,详见表1。

[0041] P1-P10阳性参考品峰面积结果保留整数:81245、39178、21210、10473、5616、3250、1215、653、357和313。

[0042] N1-N10阴性参考品峰面积结果保留整数:313、120、156、98、146、86、223、16、211和362。

[0043] CUT-OFF值为500。

[0044] 表1

[0045]

阳性参考品	阳性参考品 峰面积	阴性参考品	阴性参考品 峰面积
P1	81245	N1	313
P2	39178	N2	120
P3	21210	N3	156
P4	10473	N4	98
P5	5616	N5	146
P6	3250	N6	86
P7	1215	N7	223
P8	653	N8	16
P9	357	N9	211
P10	313	N10	362

[0046] 结果显示,根据CUT-OFF值,强阳性样本P1在本试纸条下依次倍比稀释,最低检测限为P8。阴性参考品全部为阴性。

[0047] 实施例4用含0.005wt%羧甲基纤维素钠的包被液制备梅毒荧光层析试纸条检测参考品

[0048] 制备NC膜大板:用含0.005%的10mM的Tris-HCL缓冲液将TP包被抗原稀释到0.5mg/mL,用喷金划膜仪将稀释好的包被液按1uL/cm划线包被到赛多利斯CN140硝酸纤维素膜上。

[0049] 制备荧光垫:将荧光微球与TP标记抗原按10:1的比例进行偶联,偶联后用的荧光微球标记TP抗原按1:500倍稀释,按5uL/cm的喷量,用喷金划膜仪将偶联好抗原的荧光微球喷涂到荧光结核垫上。

[0050] 将包被好的NC膜和喷涂好的荧光垫放置到37℃的干燥箱中,在相对湿度<30%的条件下,干燥4小时候取出。

[0051] 制备样品垫:将含10%BSA、1%PVP、1%酪蛋白钠的0.1M的Tris-HCL缓冲液涂布到玻璃纤维纸上,将涂布好的玻璃纤维纸烘干备用。

[0052] 组装大板:将吸水纸、荧光垫、样品垫按合适的尺寸裁切成细条,粘贴到已经粘贴好NC膜的PVC背板上,使吸水纸压紧NC膜上端,荧光垫压紧NC膜下端,样品垫压紧荧光垫下端。

[0053] 裁切组装:将组装好的大板用裁切机裁切成3.8mm的细条,将切好的试纸条组装到塑料卡壳中压紧,制备成TP荧光检测卡。

[0054] 在检测卡加样孔中加入P1-P10阳性参考品,N1-N10阴性参考品,各100μL,等待15~30分钟后,用广州蓝博FS1200型荧光检测仪测定,选择最大吸收峰面积模式,读数,记录检测结果,详见表2。

[0055] P1-P10阳性参考品峰面积结果保留整数:88714、36177、22453、15660、6030、3618、1925、879、468、355、301。

[0056] N1-N10阴性参考品峰面积结果保留整数:345、222、310、188、290、346、210、99、453、472。

[0057] CUT-OFF值为500。

[0058] 表2

[0059]

阳性参考品	阳性参考品 峰面积	阴性参考品	阴性参考品 峰面积
P1	88714	N1	345
P2	36177	N2	222
P3	22453	N3	310
P4	15660	N4	188
P5	6030	N5	290
P6	3618	N6	346
P7	1925	N7	210
P8	879	N8	99
P9	468	N9	453
P10	355	N10	472

[0060] 结果显示,根据CUT-OFF值,强阳性样本P1在本试纸条下依次倍比稀释,最低检测限为P8。阴性参考品全部为阴性。

专利名称(译)	用于免疫试剂的组合物及其制备方法		
公开(公告)号	CN109358191A	公开(公告)日	2019-02-19
申请号	CN201811492834.3	申请日	2018-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海荣盛生物药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海荣盛生物药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海荣盛生物药业有限公司		
[标]发明人	段江波 朱绍荣		
发明人	段江波 朱绍荣		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/52 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于免疫试剂的组合物，在包被液中添加聚合物，聚合物富含羟基/氨基/羧基，达到提高荧光层析试纸条灵敏度的目标。本发明的组合物在保证试纸条同等灵敏度的条件下，可降低包被浓度50%，从而降低该试纸条制造成本。

阳性参考品	阳性参考品 峰面积	阴性参考品	阴性参考品 峰面积
P1	81245	N1	313
P2	39178	N2	120
P3	21210	N3	156
P4	10473	N4	98
P5	5616	N5	146
P6	3250	N6	86
P7	1215	N7	223
P8	653	N8	16
P9	357	N9	211
P10	313	N10	362