



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102539786 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 201110458518.6

(22) 申请日 2011.12.31

(73) 专利权人 上海凯创生物技术有限公司

地址 201317 上海市浦东新区下沙镇工业园区鹤立路

(72) 发明人 张国华

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101666803 A, 2010.03.10,

CN 101666803 A, 2010.03.10,

US 2010/0159471 A1, 2010.06.24,

WO 2005/002416 A2, 2005.01.13,

CN 101918364 A, 2010.12.15,

Kenneth R. Brown 等. Seeding of

Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2.

Improved Control of Particle Size and

Shape. 《Chem. Mater.》. 1999, 第 12 卷 (第 2 期),

Kobra Omidfar 等. Development of a Colloidal Gold-based Immunochemical Test Strip for Screening of

Microalbuminuria. 《HYBRIDOMA》. 2011, 第 30 卷 (第 2 期),

Kobra Omidfar 等. Development of a Colloidal Gold-based Immunochemical Test Strip for Screening of

Microalbuminuria. 《HYBRIDOMA》. 2011, 第 30 卷 (第 2 期),

审查员 周露露

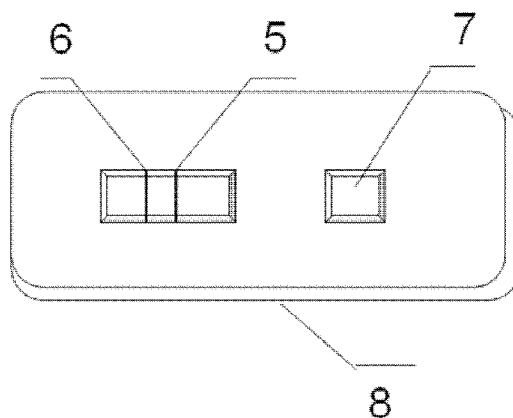
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒及其制备工艺

(57) 摘要

本发明涉及胶体金免疫层析领域,公开了一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒,包括试剂条,所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,所述滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上,所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗人白蛋白单克隆抗体 II 的检测线和包被了羊抗鼠 IgG 的质控线。本发明的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒反应灵敏,检测方便、检测结果稳定,节约成本。



1. 一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的制备方法,所述微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒,包括试剂条,所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,所述滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上,其特征在于,所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗人白蛋白单克隆抗体 II 的检测线和包被了羊抗鼠 IgG 的质控线;所述微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

1) 两步还原法制备胶体金溶液;

2) 用步骤 1) 制备的胶体金标记抗人白蛋白单克隆抗体 I,获得胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I;

3) 免疫胶体金纸片的制备:预处理玻璃纤维纸;稀释步骤 2) 制备的胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,得到免疫胶体金溶液;用所述免疫胶体金溶液包被预处理过的玻璃纤维纸,获得免疫胶体金纸片;

4) 将抗人白蛋白单克隆抗体 II 和羊抗鼠抗体分别喷在硝酸纤维素膜检测线和质控线的位置上,烘干备用,制得免疫硝酸纤维素膜;

5) 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得试剂条;

6) 将试剂条装入塑料盒,获得微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒;

其中,步骤 1) 所述两步还原法的步骤为:

a. 第一次还原氯金酸溶液:制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,加热煮沸 20-30 分钟,之后边搅拌边加入柠檬酸三钠水溶液, $\text{HAuCl}_4$  与柠檬酸三钠的摩尔比为 1:8 ~ 9,超声振荡 2-3 分钟后冷却至室温,即制得 14 ~ 16nm 粒径的胶体金原溶液;

b. 第二次还原氯金酸溶液:将第一步制得的胶体金原溶液放置于 4.0℃ 水浴中保持温度恒定,随后按胶体金原溶液与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液体积比 1:1.9 ~ 2.0 加入 4.0℃ 的 0.003-0.004mol/L  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0℃ 的抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的摩尔比为 25 ~ 26:1,加入的 PVP 与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的重量比为 1:2.0 ~ 2.1,反应中保持温度恒定,搅拌至反应完全,溶液呈透明的酒红色,制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液;

两步还原法中,配置各种水溶液均采用双蒸水。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤 a 中,加入的柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L,超声震荡的频率为 20 - 30KHZ。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤 b 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L,PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

4. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 3) 免疫胶体金纸片的制备为:

A. 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,获得  $\text{OD}_{540}$  值为 1.6 的免疫胶体金溶液;

B. 用预处理液浸泡玻璃纤维纸,干燥后,再用免疫胶体金溶液喷涂预处理后的玻璃纤维纸,干燥,制得免疫胶体金纸片。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 A 中的喷金缓冲液配方如下:

8 ~ 12v% 1.0M Tris 液, 0.2 ~ 0.4w/v% 聚乙二醇 20000, 0.15 ~ 0.25w/v% 牛血清白蛋白, 0.1 ~ 0.3w/v% 脱脂牛奶, 0.25 ~ 0.35w/v% 酪蛋白, 和 0.02 ~ 0.08w/v% 叠氮化钠, 用盐酸调节 pH 至  $8.0 \pm 0.1$ , 余量为水。

6. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 B 中的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20, 12 ~ 18w/v% 蔗糖, 溶剂为水。

7. 一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒, 采用权利要求 1-6 任一权利要求所述方法制备获得; 所述试剂盒包括试剂条, 所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸, 所述滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上, 其特征在于, 所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I, 免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗人白蛋白单克隆抗体 II 的检测线和包被了羊抗鼠 IgG 的质控线。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述胶体金的颗粒大小为 39 ~ 42nm, 所述胶体金是由两步还原法制备获得。

9. 如权利要求 7 所述的试剂盒, 其特征在于, 其特征在于, 所述免疫胶体金纸片是经过预处理的玻璃纤维纸, 所述预处理的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20, 12 ~ 18w/v% 蔗糖, 溶剂为水。

10. 权利要求 7-9 任一权利要求所述的试剂盒在制备微量尿白蛋白检测试剂中的应用。

## 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒及其制备工艺

### 技术领域

[0001] 本发明涉及胶体金免疫层析领域,具体涉及一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒及其制备工艺。

### 背景技术

[0002] 微量白蛋白尿(又名微量尿白蛋白, Microalbuminuria, MAU)是指在尿中出现的微量白蛋白。白蛋白是一种血液中的正常蛋白质,在正常生理条件下尿液中也会出现极少量白蛋白,排泄量一般在30mg/天(或20mg/L)之内。人尿液中的白蛋白达到在30~300mg/天或20~200mg/L浓度间称为微量白蛋白尿,白蛋白浓度大于300mg/天或200mg/L时称为大量白蛋白尿。

[0003] 微量尿白蛋白(MAU)的非正常出现,通常被认为是肾功能衰竭、糖尿病和心血管疾病并发症等的重要临床标志之一。因此,尿液中白蛋白存在水平的检测对肾病、糖尿病和心血管疾病的早期诊断、早期治疗和减小风险有重要的参考价值 and 临床意义。

[0004] 目前,临床检测微量蛋白质诊断早期肾损害的方法有放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫吸附实验法(ELISA)等,这些检查较为繁琐、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。

[0005] 国内现有的微量尿白蛋白检测方法的相关专利有:申请号01126895.6,提供了一种快速检测肾脏损害的尿蛋白芯片,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。本发明的目的在于提供一种检测试剂盒是利用胶体金层析技术,以抗原抗体免疫反应法,来检测人尿液中出现的微量白蛋白,该试剂盒具有等优点。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是克服现有技术缺陷,从提高检测灵敏度出发,提供一种检测灵敏度高、特异性强、检测快速的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒。

[0007] 本发明一方面公开了一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒,包括试剂条,所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于衬底上;所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,所述免疫硝酸纤维素膜上设有包被有抗人白蛋白单克隆抗体 II 的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 的质控线。

[0008] 较优的,所述胶体金的颗粒大小为39~42nm,所述胶体金是由两步还原法制备获得。

[0009] 更优的,所述两步还原法的步骤为:

[0010] a) 第一次还原氯金酸溶液:制备浓度为0.0004~0.0005mol/L的 $\text{HAuCl}_4$ 水溶液,加热煮沸20~30分钟,之后边搅拌边加入柠檬酸三钠水溶液, $\text{HAuCl}_4$ 与柠檬酸三钠的摩尔比为1:8~9,超声振荡2~3分钟后冷却至室温,即制得14~16nm粒径的胶体金原溶液;

[0011] b) 第二次还原氯金酸溶液:将第一步制得的胶体金原溶液放置 4.0℃水浴中保持温度恒定,随后按胶体金原溶液与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液体积比 1 : 1.9 ~ 2.0 加入 4.0℃的 0.003-0.004mol/L/L $\text{HAuCl}_4$  水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0℃的抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的摩尔比为 25 ~ 26 : 1,加入的 PVP 与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的重量比为 1 : 2.0 ~ 2.1,反应中保持温度恒定,搅拌至反应完全,溶液呈透明的酒红色,制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液;

[0012] 两步还原法中,配置各种水溶液均采用双蒸水。

[0013] 最优的,步骤 a) 中,加入柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L。

[0014] 最优的,步骤 a) 中,超声震荡的频率为 20-30KHZ。

[0015] 最优的,步骤 b) 中,抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液的滴加速度为 1-2 滴 /s。

[0016] 最优的,步骤 b) 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L, PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

[0017] 步骤 b) 中,搅拌反应约为 50-70 分钟。

[0018] 采用上述方法制得的胶体金清亮透明,粒径尺寸均一,无凝集颗粒,基本未发现非球形粒子。

[0019] 较优的,所述免疫胶体金纸片是经过预处理的玻璃纤维纸,所述预处理的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20, 12 ~ 18w/v% 蔗糖,溶剂为水。

[0020] 更优的,所述预处理的预处理液包括 0.7% Tween-20, 16w/v% 蔗糖,溶剂为水。

[0021] 本发明的另一方面,提供了一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0022] 1) 两步还原法制备胶体金溶液;

[0023] 2) 用步骤 1) 制备的胶体金标记抗人白蛋白单克隆抗体 I,获得胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I;

[0024] 3) 免疫胶体金纸片的制备:预处理玻璃纤维纸;稀释步骤 2) 制备的胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,得到免疫胶体金溶液;用所述免疫胶体金溶液包被预处理过的玻璃纤维纸,获得免疫胶体金纸片;

[0025] 4) 将抗人白蛋白单克隆抗体 II 和羊抗鼠抗体分别喷在硝酸纤维素膜检测线和质控线的位置上,烘干备用,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0026] 5) 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割制得试剂条;

[0027] 6) 将试剂条装入塑料盒制得检测试剂盒,获得微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒。较优的,所述胶体金的颗粒大小为 39 ~ 42nm,所述胶体金是由两步还原法制备获得。更优的,所述两步还原法的步骤为:

[0028] a) 第一次还原氯金酸溶液:制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,加热煮沸 20-30 分钟,之后边搅拌边加入柠檬酸三钠水溶液, $\text{HAuCl}_4$  与柠檬酸三钠的摩尔比为 1 : 8 ~ 9,超声振荡 2-3 分钟后冷却至室温,即制得 14 ~ 16nm 粒径的胶体金原溶液。

[0029] b) 第二次还原氯金酸溶液:将第一步制得的胶体金原溶液放置 4.0℃水浴中保持温度恒定,随后按胶体金原溶液与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液体积比 1 : 1.9 ~ 2.0 加入 4.0℃的 0.003-0.004mol/L/L $\text{HAuCl}_4$  水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0℃的抗坏血酸与 PVP (聚乙

烯吡咯烷酮)的混合水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的摩尔比为 25 ~ 26 : 1,加入的 PVP 与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的重量比为 1 : 2.0 ~ 2.1,反应中保持温度恒定,搅拌至反应完全,溶液呈透明的酒红色,制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液。

[0030] 两步还原法中,配置各种水溶液均采用双蒸水。

[0031] 最优的,步骤 a) 中,加入柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L。

[0032] 最优的,步骤 a) 中,超声震荡的频率为 20-30KHZ。

[0033] 最优的,步骤 b) 中,抗坏血酸与 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)的混合水溶液的滴加速度为 1-2 滴/s。

[0034] 最优的,步骤 b) 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L,PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

[0035] 步骤 b) 中,搅拌反应约为 50-70 分钟。

[0036] 较优的,步骤 2) 中,胶体金标记抗人白蛋白单克隆抗体 I 的比例为:向胶体金中按照 6  $\mu$ g 抗体/(ml 胶体金)的比例加入抗人白蛋白单克隆抗体 I,制备得到免疫胶体金。

[0037] 较优的,所述步骤 3) 免疫胶体金纸片的制备为:

[0038] A. 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体 I,获得  $\text{OD}_{540}$  值为 1.6 的免疫胶体金溶液;

[0039] B. 用预处理液浸泡玻璃纤维纸,干燥后,再用免疫胶体金溶液喷涂预处理后的玻璃纤维纸,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0040] 本发明中,v%指体积百分比;w/v%指重量体积百分比,如 1w/v%即为 100ml 溶液中含 1g。

[0041] 更优的,所述步骤 A 中的喷金缓冲液配方如下:8 ~ 12v% 1.0M Tris 液,0.2 ~ 0.4w/v% 聚乙二醇 20000,0.15 ~ 0.25w/v% 牛血清白蛋白,0.1 ~ 0.3w/v% 脱脂牛奶,0.25 ~ 0.35w/v% 酪蛋白,和 0.02 ~ 0.08w/v% 叠氮化钠,用盐酸调节 pH 至 8.0 $\pm$ 0.1,余量为水。

[0042] 最优的,所述步骤 A 中的喷金缓冲液配方如下:10v% 1.0M Tris 液、0.3w/v% 聚乙二醇 20000、0.2w/v% 牛血清白蛋白,0.2w/v% 脱脂牛奶、0.3w/v% 酪蛋白,和 0.05w/v% 叠氮化钠,用盐酸调节 pH 至 8.0 $\pm$ 0.1,余量为水。

[0043] 更优的,所述步骤 B 中的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20,12 ~ 18w/v% 蔗糖,溶剂为水。

[0044] 最优的,所述步骤 B 中的预处理液包括 0.7v% Tween-20,16w/v% 蔗糖,溶剂为水。

[0045] 更优的,步骤 B 中,每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm $\times$ 220mm,干燥后,再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸,每 261mm $\times$ 220mm 玻璃纤维纸上喷涂 25ml 免疫胶体金溶液,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0046] 较优的,步骤 4) 中,喷在硝酸纤维素膜质控线(C线)上的羊抗鼠 IgG 的浓度为 0.15 ~ 0.3mg/ml,喷在硝酸纤维素膜检测线(T线)上的抗人白蛋白单克隆抗体 II 浓度为 0.2 ~ 0.4mg/ml。

[0047] 较优的,每 1m 长硝酸纤维素膜分别包被有 1ml 的羊抗鼠 IgG 和抗人白蛋白单克隆抗体 II 溶液,检测线和质控线的间距为 4.0 ~ 6.0mm。

[0048] 本发明的关键在于 (1) 两步还原法制备分子大小均一的胶体金颗粒, (2) 免疫胶体金纸片制备工艺的改进, 其余步骤均可采用常规制备胶体金检测试剂条的条件进行。

[0049] 本发明的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的工作原理, 即是利用高度特异的抗体-抗原特异结合反应及免疫膜层析技术来定性检测人尿液中出现的白蛋白。

[0050] 检测时, (一) 如果尿液中没有白蛋白: 尿液中的其他成分不与免疫胶体金纸片上的抗人白蛋白单克隆抗体 I- 胶体金结合, 尿液经毛细作用在硝酸纤维素膜上层析, 依次通过 T 线和 C 线, 在样品混合物通过 T 线时, 不会被包被在 T 线的抗人白蛋白单克隆抗体 II 结合, T 线捕捉不到胶体金因而不显色, 只在 C 线出现一条红色线条。(二) 如果尿液中含有白蛋白: 尿液中白蛋白首先与免疫胶体金纸片上的抗人白蛋白单克隆抗体 I- 胶体金结合, 形成“人白蛋白-抗人白蛋白单克隆抗体 I- 胶体金”; 样品混合物继续在硝酸纤维素膜上层析, 依次通过 T 线和 C 线, 在样品混合物通过 T 线时, 包被在 T 线的抗人白蛋白单克隆抗体 II 与尿样中的人白蛋白结合形成“抗人白蛋白单克隆抗体 II- 人白蛋白-抗人白蛋白单克隆抗体 I- 胶体金”复合物, T 线捕捉到胶体金颗粒因而显色; 尿液中白蛋白浓度的越高, T 线的颜色越深。(三) 包被在质控线 (C 线) 上的羊抗鼠 IgG 为多克隆抗体, 其总是能捕获鼠源性的单克隆抗体, 所以总能与抗人白蛋白单克隆抗体 I- 胶体金形成“羊抗鼠 IgG- 抗人白蛋白单克隆抗体 I- 胶体金”复合物; 因此, 在 C 线处总是形成一定深度的红线, C 线的出现和尿液中无人白蛋白无关, 它的出现表明: 检测操作正确、试剂盒反应系统工作正常; 同时, C 线也是判断 T 线强度的参照线。

[0051] 本发明试剂盒的使用方法为:

[0052] 1. 将试剂盒放置在水平台面上。

[0053] 2. 用加样吸管吸取尿样, 然后滴 3 滴 (约 120  $\mu$ l) 尿样到试剂盒的加样孔中。每检测一份不同的样品注意要使用不同的吸管。

[0054] 3. 观察结果: 在滴加样品后 10-15 分钟判读结果。

[0055] 检测结果的判断方法:

[0056] 阳性: 在结果观察窗口内出现两条色带, 即检测线 (T 线) 和质控线 (C 线) 位置各出现一条红色线条, 表示样品中有尿白蛋白的存在。

[0057] 阴性: 只在结果观察窗口的质控线 (C 线) 位置出现一条红色线条, 检测线 (T 线) 未出现任何线条, 表示样品中无尿白蛋白的存在。

[0058] 无效: 质控线 (C 线) 不出现。任何情况下, C 线均应形成, 表示加样和操作正确。C 线未出现表明测试结果是不确定的, 应重做。

[0059] 本发明的有益效果:

[0060] (1) 采用了两步还原法制备胶体金分子, 使得到的胶体金分子呈大小均一的 40nm 的球形颗粒; 由于胶体金颗粒大小适中、整体均一, 使其与单克隆抗体的结合效率更高、效果更稳定。

[0061] (2) 免疫胶体金纸片制备步骤中, 通过采用合理配方对玻璃纤维膜进行预处理及采用较好的喷金缓冲液, 在保障胶体金释放完全的基础上可有效减慢检测时免疫胶体金的释放层析, 有利于抗原抗体充分反应结合, 有效的提高了反应的灵敏度, 同样的阈值下, 还可降低免疫胶体金的用量, 节约成本。

[0062] (3) 本发明制备的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒操作简单, 检测结果肉眼可见,

无需特殊实验仪器和专业技术人员;检测快速,10-15分钟内可显示检测结果;特异性强,与牛奶、人血红蛋白、PBS缓冲液反应结果均为阴性;而且检测结果费用低廉,储存和运输方便等优点。

#### 附图说明

[0063] 图1:微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒试剂条示意图(1.滤样纸 2.免疫胶体金纸 3.免疫硝酸纤维素膜 4.吸水纸 5.检测线 6:质控线)

[0064] 图2:微量白蛋白尿胶体金检测试剂盒示意图(5.检测线 6.质控线 7.加样口 8.盒座)

[0065] 图3:胶体金透射电镜图

#### 具体实施方式

[0066] 以下结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而非限制本发明的范围。

[0067] 实施例1 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的制备

[0068] 一、试剂来源:

[0069] 抗人白蛋白单克隆抗体 I、抗人白蛋白单克隆抗体 II、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(购自美国美迪生物技术有限公司 MAXMED LABORATORIES INC.)

[0070] 硝酸纤维素薄膜、玻璃纤维纸(购自德国赛多利斯公司 SARTORIUS)

[0071] 二、制备步骤:

[0072] 方法1:

[0073] 1、胶体金的制备:

[0074] a) 第一次还原氯金酸溶液:将6ml 0.0164mol/L的 $\text{HAuCl}_4$ 水溶液加入200ml双蒸水中,加热煮沸30分钟,之后缓慢搅动并准确加入50ml 0.016mol/L柠檬酸三钠水溶液。超声振荡2分钟后冷却至室温,超声震荡的频率为25KHZ,制得约15nm粒径的胶体金原溶液。

[0075] b) 第二次还原氯金酸溶液:取第一步制得的胶体金原核溶液26ml,并放置于4℃水浴锅中稳定温度,随后加入50ml预冷为4.0℃的0.0035mol/L  $\text{HAuCl}_4$ 水溶液并立即缓慢滴加250ml预冷为4.0℃的含0.018mol/L的抗坏血酸与0.138g/L PVP的混合水溶液,滴加速度为1-2滴/s,搅拌反应1小时,溶液呈透明的酒红色,制得40nm粒径的胶体金溶液。

[0076] 制备好的胶体金颗粒通过透射电镜观察,结果见图3,所制备的胶体金颗粒分散性好,粒径大小均一,为40nm左右。

[0077] 2. 免疫胶体金制备

[0078] a) 将抗人白蛋白单克隆抗体 I 用0.1M pH 7.9的磷酸盐缓冲液稀释至浓度为1.0mg/ml的抗体溶液。

[0079] b) 取1000ml的胶体金溶液,往里加入1/10倍胶体金体积的0.1M pH7.9磷酸盐缓冲液混合3分钟。在快速搅拌下,再缓缓将稀释的抗人白蛋白单克隆抗体 I 溶液6ml加入其中,室温反应5分钟并不时缓缓搅拌。

[0080] c) 反应结束后,在上述反应液中快速加入25ml的10%的牛血清白蛋白(BSA)溶液。室温反应5分钟并不时缓缓搅拌。

[0081] d) 将制备好的免疫胶体金 8000 转 / 分钟离心 20 分钟, 保留沉淀, 并收集上清 10000 转 / 分钟离心 30 分钟, 弃上清。收集两次离心沉淀用含有 0.1% BSA 的硼酸缓冲液复溶到 OD<sub>540</sub> 为 14。

[0082] 3. 免疫胶体金纸片的制备

[0083] 1) 预处理液的制备: 准确称取 7ml Tween-20, 160g 蔗糖, 加纯化水定容至 1000ml ;

[0084] 2) 喷金缓冲液的制备: 取 800ml 纯化水, 往里加入 100ml 1.0M Tris 液, 用盐酸调节 pH 至 8.0。准确称取 3.0g 聚乙二醇 20000、2.0g 牛血清白蛋白, 2.0g 脱脂牛奶, 3.0g 酪蛋白溶液和 0.5g 叠氮化钠加入纯化水中, 充分溶解, 混合均匀, 用纯化水定容至 1000ml。

[0085] 3) 用喷金缓冲液稀释免疫胶体金, 至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 1.6, 获得免疫胶体金溶液。

[0086] 4) 用第一步获得的预处理液浸泡玻璃纤维纸, 每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm, 干燥后, 再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸, 每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 25ml 免疫胶体金溶液, 干燥, 制得免疫胶体金纸片。

[0087] 4、免疫硝酸纤维素膜的制备

[0088] 1) 将羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释成 0.2mg/ml, 制得质控线 (C 线) 溶液。

[0089] 2) 将抗人白蛋白单克隆抗体 II 用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.3mg/ml 制得检测线 (T 线) 溶液。

[0090] 3) 用点膜机喷点 C、T 线溶液, 制得免疫硝酸纤维素膜。每 1m 长硝酸纤维素膜各包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液, 检测线和质控线的间距为 5.0mm。

[0091] 5、将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上, 剪裁成宽度为 4mm 的试剂条 (如图 1 所示)。

[0092] 6、将检测试剂条装入塑料盒内即得微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒。

[0093] 方法 2 :

[0094] 1、胶体金的制备: 参考本实施例方法 1 的步骤。

[0095] 2、抗体的制备: 参考本实施例方法 1 的步骤。

[0096] 3、免疫胶体金纸片的制备:

[0097] 1) 预处理液的制备: 准确称取 8ml Tween-20, 120g 蔗糖, 加纯化水定容至 1000ml ;

[0098] 2) 喷金缓冲液的制备: 取 800ml 纯化水, 往里加入 80ml 1.0M Tris 液, 用盐酸调节 pH 至 8.0。准确称取 4.0g 聚乙二醇 20000、1.5g 牛血清白蛋白, 3.0g 脱脂牛奶, 2.5g 酪蛋白溶液和 0.2g 叠氮化钠加入纯化水中, 充分溶解, 混合均匀, 用纯化水定容至 1000ml。

[0099] 3) 用喷金缓冲液稀释免疫胶体金, 至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 1.6。

[0100] 4) 用第一步获得的预处理液浸泡玻璃纤维纸, 每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm, 干燥后, 再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸, 每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 25ml 免疫胶体金溶液, 干燥, 制得免疫胶体金纸片。

[0101] 4、免疫硝酸纤维素膜的制备:

[0102] 1) 将羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释成 0.3mg/ml, 制得质控线 (C 线) 溶液。

[0103] 2) 将抗人白蛋白单克隆抗体 II 用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.2mg/ml 制得检测线 (T 线) 溶液。

[0104] 3) 用点膜机喷点 C、T 线溶液,制得免疫硝酸纤维素膜。每 1m 长硝酸纤维素膜各包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液,检测线和质控线的间距为 4.0mm。

[0105] 5、将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割成宽度为 4mm 的试剂条。

[0106] 6、将检测试剂条装入塑料盒内即得检测试剂盒。

[0107] 方法 3:

[0108] 1、胶体金的制备:参考本实施例方法 1 的步骤。

[0109] 2、抗体的制备:参考本实施例方法 1 的步骤。

[0110] 3、免疫胶体金纸片的制备:

[0111] 1) 预处理液的制备:准确称取 5ml Tween-20,180g 蔗糖,加纯化水定容至 1000ml;

[0112] 2) 喷金缓冲液的制备:取 800ml 纯化水,往里加入 120ml 1.0M Tris 液,用盐酸调节 pH 至 8.0。准确称取 2.0g 聚乙二醇 20000、2.5g 牛血清白蛋白,1.0g 脱脂牛奶,3.5g 酪蛋白溶液和 0.8g 叠氮化钠加入纯化水中,充分溶解,混合均匀,用纯化水定容至 1000ml。

[0113] 3) 用喷金缓冲液稀释免疫胶体金,至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 1.6。

[0114] 4) 用第一步获得的预处理液浸泡玻璃纤维纸,每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm,干燥后,再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸,每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 25ml 免疫胶体金溶液,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0115] 4、免疫硝酸纤维素膜的制备:

[0116] 1) 将羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释成 0.15mg/ml,制得质控线(C 线)溶液。

[0117] 2) 将抗人白蛋白单克隆抗体 II 用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.4mg/ml 制得检测线(T 线)溶液。

[0118] 3) 用点膜机喷点 C、T 线溶液,制得免疫硝酸纤维素膜。每 1m 长硝酸纤维素膜各包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液,检测线和质控线的间距为 6.0mm。

[0119] 5、将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割成宽度为 4mm 的试剂条。

[0120] 6、将检测试剂条装入塑料盒内即得检测试剂盒。

[0121] 实施例 2 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的灵敏度实验

[0122] 检测方法:

[0123] 1、取实施例 1 制得的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台面上。

[0124] 2、用加样吸管吸取待测尿样,然后滴 2-3 滴(约 100 μl)样品到试剂盒的加样孔中,每检测一份不同的样品使用不同的吸管。

[0125] 3、观察结果:在滴加样品后 10-15 分钟判读结果。

[0126] 检测样品:

[0127] 配置人白蛋白浓度为 7.5 μg/ml、10 μg/ml、15 μg/ml、30 μg/ml 的质控参考品作为标准品。

[0128] 检测结果:

[0129] 表 1 试剂盒灵敏度结果

|        | 白蛋白浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 试剂盒检测结果 |
|--------|----------------------------|---------|
|        | 7.5                        | 阴性      |
| [0130] | 10                         | 阴性/阳性   |
|        | 15                         | 阳性      |
|        | 30                         | 阳性      |

[0131] 表 1 结果证实,本发明制得的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒灵敏度为  $15 \mu\text{g/ml}$ ,符合检测要求。

[0132] 实施例 3 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的特异性实验

[0133] 取实施例 1 制备的检测试剂盒,按下述表格分别加样检测,检测结果如表 2:

[0134] 表 2 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒特异性试验结果

|        | 样品     | 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 结果 |
|--------|--------|-------------------------|----|
| [0135] | 血红蛋白   | 500                     | 阴性 |
|        | 对乙酰氨基酚 | 20                      | 阴性 |
|        | 维生素 C  | 20                      | 阴性 |

[0136] 由上表可知,本发明的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒对  $500 \mu\text{g/ml}$  的血红蛋白、 $20 \mu\text{g/ml}$  的乙酰氨基酚、 $20 \mu\text{g/ml}$  的维生素 C 无交叉反应,特异性良好。

[0137] 实施例 4 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的重复性和稳定性实验

[0138] 一、试剂盒的批内和批间重复性实验

[0139] 1. 实验方法:

[0140] 将同批和不同批次的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒分别检测  $10$ 、 $15$ 、 $30 \mu\text{g/ml}$  的标准品,每个浓度重复 5 次,观察试剂盒的重复性。

[0141] 2. 实验结果:经验证,微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的批内和批间重复性为  $100\%$ ,假阳性率和假阴性率均为  $0$ 。

[0142] 二、试剂盒的稳定性实验

[0143] 1. 实验目的:

[0144] 将微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒密封保存,并存放于  $4^\circ\text{C}$  及室温 ( $25^\circ\text{C}$  左右) 下,观察不同存放温度对试剂盒稳定性的影响。

[0145] 2. 实验方法:

[0146] 保存于  $4^\circ\text{C}$  的试剂盒每周取出 3 盒,分别检测  $10$ 、 $15$ 、 $30 \mu\text{g/ml}$  标准品;保存于室温 ( $25^\circ\text{C}$ ) 的试剂盒每 3 天取出 3 盒,分别检测  $10$ 、 $15$ 、 $30 \mu\text{g/ml}$  标准品。

[0147] 3. 实验结果:

[0148] 经验证,试纸盒在  $4^\circ\text{C}$  下可保存 20 个月,在室温下可保存 15 个月;在可保存的期限内,试剂盒均可达到  $15 \mu\text{g/ml}$  的检测灵敏度。

[0149] 实施例 5 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的临床试验

[0150] 采集 100 份人体尿液样本,其中 40 份为微量尿白蛋白阳性患者的尿液样本,60 份为正常人的尿液样本,使用 100 份微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒分别对尿样进行检测。分别在试剂盒加样孔滴加 2-3 滴尿样,8 分钟后试剂盒全部开始显色,10 分钟后显色稳定,达到 15 分钟内显色的目的。结果显示 39 份微量尿白蛋白阳性患者的尿样呈阳性,60 份正

常人的检测结果全部为阴性,未出现无显色的试剂盒。

[0151] 以酶联免疫吸附实验法 (ELISA) 的检测结果为参比试剂对临床试验结果进行统计,统计数据见表 3:

[0152] 表 3 临床试验结果汇总表

[0153]

| 项 目   | ELISA 检测结果 |          | 合 计 |     |
|-------|------------|----------|-----|-----|
|       | 阳性结果 (+)   | 阴性结果 (-) |     |     |
| 胶体金检测 | 阳性结果 (+)   | 39       | 0   | 39  |
| 试剂盒结果 | 阴性结果 (-)   | 1        | 60  | 61  |
|       | 合 计        | 40       | 60  | 100 |

[0154] 酶联免疫吸附实验法 (ELISA) 检测试剂为参照,本发明的微量白蛋白尿胶体金检测试剂盒的临床试验结果如下:

[0155] 灵敏度 =  $39/40 \times 100\% = 97.5\%$

[0156] 特异度 =  $60/60 \times 100\% = 100\%$

[0157] 阳性试验的预示值 =  $39/39 \times 100\% = 100\%$

[0158] 阴性试验的预示值 =  $60/61 \times 100\% = 98.4\%$

[0159] 符合率 (粗一致性) =  $(39+60)/100 \times 100\% = 99\%$

[0160] 在已考察的 100 份样品中,灵敏度为 97.5%,特异度为 100%,阳性试验预示值 100%,阴性试验预示值 98.4%,符合率为 99%。

[0161] 由此可见,依据本发明制备的“微量尿白蛋白 (MAU) 胶体金检测试剂盒”和现有成熟的微量尿白蛋白检测技术在灵敏度、特异性方面具有很好的一致性,其操作简单,检测迅速,适合于医疗机构或个人用于诊断微量蛋白尿。

[0162] 对比实验

[0163] 一、试剂盒的制备:

[0164] 1. 免疫胶体金纸片制备:取 pH 为 8.0 的 0.1M Tris 缓冲液稀释实施例 1 方法 1 制备的免疫胶体金至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 1.6,获得免疫胶体金溶液,采用该免疫胶体金溶液直接喷涂未经预处理液浸泡的玻璃纤维纸,每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 25ml 免疫胶体金溶液,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0165] 2. 将滤样纸、本对比实验制备的免疫胶体金纸片、实施例 1 方法 1 制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁成宽度为 4mm 的试剂条。

[0166] 3. 将检测试剂条装入塑料盒内获得检测试剂盒。

[0167] 二、试剂盒灵敏度检测:

[0168] (1) 分别取实施例 1 方法 1 和本实验制得的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台面上。

[0169] (2) 配置人血白蛋白浓度为 10、15、20、25、30 μg/ml 的质控参考品作为样品。用加样吸管吸取样品,然后滴 3 滴 (约 120 μl) 样品到试剂盒的加样孔中。每个浓度设 4 个重复,每检测一份不同的样品使用不同的吸管。

[0170] (3) 观察结果:在滴加样品后 10-15 分钟判读结果。

[0171] 三. 检测结果:

[0172] 表 4 不同方法制备的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒的灵敏度实验结果

| 项目       | 标准品浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 实施例 1 方法 1 制备的<br>试剂盒 | 本实验试剂盒 |
|----------|----------------------------------|-----------------------|--------|
| 1        | 10                               | 阳性/阴性                 | 阴性     |
| [0173] 2 | 15                               | 阳性                    | 阳性/阴性  |
| 3        | 20                               | 阳性                    | 阳性     |
| 4        | 25                               | 阳性                    | 阳性     |
| 5        | 30                               | 阳性                    | 阳性     |

[0174] 由表 4 可知,本发明实施例 1 方法 1 制备的微量尿白蛋白胶体金试剂盒的检测灵敏度为  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,而对比试验制备的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒灵敏度为  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  左右,低于含本发明制备方法制备的免疫胶体金纸片的试剂盒。

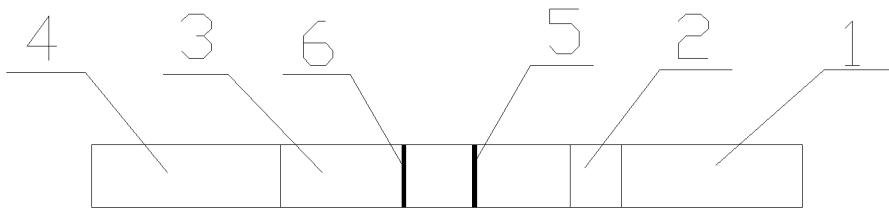


图 1

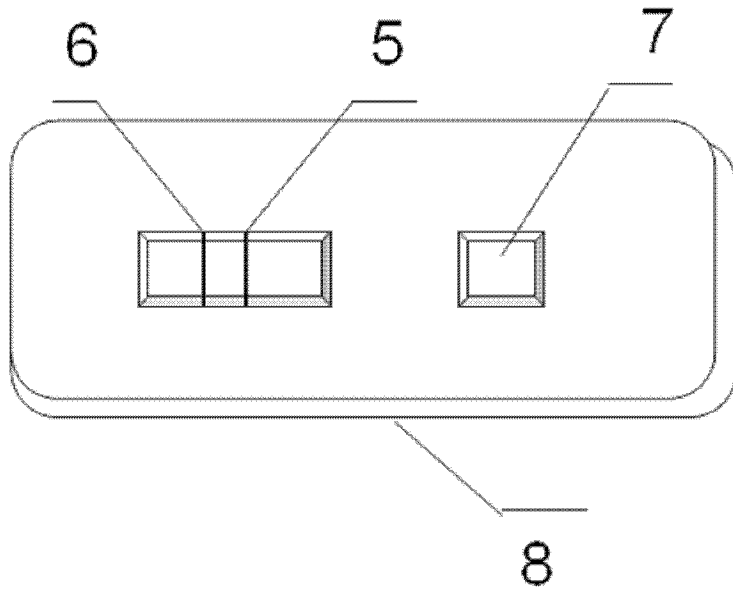


图 2

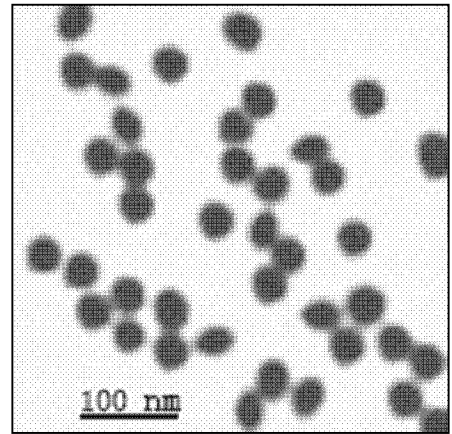


图 3

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒及其制备工艺                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102539786B</a>                   | 公开(公告)日 | 2014-06-04 |
| 申请号            | CN201110458518.6                               | 申请日     | 2011-12-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上海凯创生物技术有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 上海凯创生物技术有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 上海凯创生物技术有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 张国华                                            |         |            |
| 发明人            | 张国华                                            |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/531                           |         |            |
| 代理人(译)         | 余明伟                                            |         |            |
| 审查员(译)         | 周露露                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN102539786A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明涉及胶体金免疫层析领域，公开了一种微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒，包括试剂条，所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸，所述滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上，所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗人白蛋白单克隆抗体I，免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗人白蛋白单克隆抗体II的检测线和包被了羊抗鼠IgG的质控线。本发明的微量尿白蛋白胶体金检测试剂盒反应灵敏，检测方便、检测结果稳定，节约成本。

