(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110389222 A
(43)申请公布日 2019.10.29

(21)申请号 201910658396.1

(22)申请日 2019.07.21

(71)申请人 武汉塞力斯生物技术有限公司
地址 430000 湖北省武汉市东西湖区金山大道1310号

(72)发明人 鲁翌 林霞 田树伟

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 21/78(2006.01)

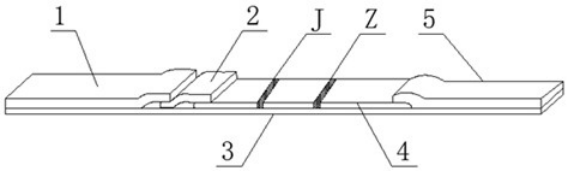
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种胶体金免疫层析卡的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种胶体金免疫层析卡的制备方法，包括底板、上样垫、胶体金结合垫、层析膜和吸样垫，上样垫、胶体金结合垫、层析膜和吸样垫依次粘贴在底板上，所述胶体金结合垫为包被胶体金标记DMD抗体的玻璃纤维膜或聚酯膜，所述层析膜为包被DMD抗体的硝酸纤维素膜，本发明对DMD基因的79个外显子、两侧相邻50bp内含子序列和已知位于内含子区突变附近序列设计并合成探针，DMD基因相关致病突变序列进行富集(外显子与内含子突变、包括了点突变和结构重排、已知突变和未知突变)构建蛋白抗体。



CN 110389222 A

1.一种胶体金免疫层析卡的制备方法,包括底板(3)、上样垫(1)、胶体金结合垫(2)、层析膜(4)和吸样垫(5),其特征在于,上样垫(1)、胶体金结合垫(2)、层析膜(4)和吸样垫(5)依次粘贴在底板(3)上,所述胶体金结合垫(2)为包被胶体金标记DMD抗体的玻璃纤维膜或聚酯膜,所述层析膜(4)为包被DMD抗体的硝酸纤维素膜。

2.根据权利要求1所述的一种胶体金免疫层析卡的制备方法,其特征在于:所述层析膜(4)的两端分别搭 接有吸样垫(5)、胶体金结合垫(2),所述胶体金结合垫(2)的另一端搭接有上样垫(1),所述 上样垫(1)搭接压住胶体金结合垫(2)的1/4,所述胶体金结合垫(2)搭接压住层析垫的1/5, 所述吸样垫(5)搭接压住胶体金结合垫(2)的1/12。

3.根据权利要求1所述的一种胶体金免疫层析卡的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

胶体金溶液制备:向100ml HauCl4的0.01%水溶液中加入1%柠檬酸三钠水溶液2.00— 4.50mL,混匀煮沸,保持沸腾30min得到直径为5-20nm的胶体金溶液;

胶体金结合垫制备:将胶体金溶液调至pH7.0-9.0后加入6μg/mL-15μg/mLDMD抗体和封闭剂,10000rpm离心30min,将离心下来的沉淀复溶至含有BSA、蔗糖的胶体金溶液中,将复溶产物加至玻璃纤维膜或聚酯膜后干燥;

层析垫制备:将DMD抗体用0.01M,pH为7.4的PBS稀释成0.5mg/mL、1.5mg/mL,羊抗鼠IgG分别稀释成1mg/mL、2mg/mL,检测线J包被DMD抗体,质控线Z包被羊抗鼠IgG,然后用喷膜仪在硝酸纤维素膜上按1.2μL/cm进行划线包被后干燥;

试纸卡组装:将已包被的层析膜(4)放置在底板(3)的中部粘贴,在层析膜(4)的T线一侧搭接胶体金结合垫(2),搭胶体金结合垫(2)的1/5粘贴,在胶体金结合垫(2)另一侧搭接粘贴上样垫(1),搭胶体金结合垫(2)的1/4粘贴;在层析膜(4)的C线一侧搭接吸样垫(5),搭吸样垫(5)的1/12粘贴;用裁剪机将贴好的底板(3)切成3～5mm宽的试纸条,再装入塑料卡内,形成试纸卡,任选地,所述封闭剂为1%BSA或0.1%PEG-20000。

4.根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述试纸卡组装是在温度为20～25℃,湿度小于30%的室内完成的。

一种胶体金免疫层析卡的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于胶体金免疫层析卡技术领域,具体涉及一种胶体金免疫层析卡的制备方法。

背景技术

[0002] 假肥大性肌营养不良(DMD), 也称 Duchenne型肌营养不良症(DMD) (OMIM 310200) ,是最常见的一类进行性肌营养不良症,患病率为 3.3/10万,占出生男婴的20-30/10万,为X-连锁隐性遗传,主要是男孩发病,女性为致病基因的携带者,通常5岁左右发病,肌萎缩是进行性的,这是本病的特点,预后差,目前对DMD缺乏有效的治疗,肌营养不良症尚无特效药物和根治方法,包括基因疗 法和施用皮质类固醇。

[0003] 现有的肌肉活检是能明确诊断是何种DMD基因突变类型,而且能区别是DMD还是BMD,也被作为临床诊断的“金标准”,其缺点具有一定的创伤性。基因检测(多重PCR,MLPA,Sanger测序和高通量测序)虽然能够无创性的并可提供多种信息的检测手段,但检测难度和费用均较大,上述检测方法在生物医学研究及法医学应用实践中存在的突出问题是:只能检出部分突变类型,检出率低,检测周期长;且对人有一定创伤。基因检测虽然检出率高但价格昂贵,普通家庭难以承受的问题,为此本发明提出一种胶体金免疫层析卡的制备方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种胶体金免疫层析卡的制备方法,以解决上述背景技术中提出的现有的肌肉活检是能明确诊断是何种DMD基因突变类型,而且能区别是DMD还是BMD,也被作为临床诊断的“金标准”,其缺点具有一定的创伤性。基因检测(多重PCR,MLPA,Sanger测序和高通量测序)虽然能够无创性的并可提供多种信息的检测手段,但检测难度和费用均较大,上述检测方法在生物医学研究及法医学应用实践中存在的突出问题是:只能检出部分突变类型,检出率低,检测周期长;且对人有一定创伤。基因检测虽然检出率高但价格昂贵,普通家庭难以承受的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种胶体金免疫层析卡的制备方法,包括底板、上样垫、胶体金结合垫、层析膜和吸样垫,上样垫、胶体金结合垫、层析膜和吸样垫依次粘贴在底板上,所述胶体金结合垫为包被胶体金标记DMD抗体的玻璃纤维膜或聚酯膜,所述层析膜为包被DMD抗体的硝酸纤维素膜。

[0006] 优选的,所述层析膜的两端分别搭 接有吸样垫、胶体金结合垫,所述胶体金结合垫的另一端搭接有上样垫,所述 上样垫搭接压住胶体金结合垫的1/4,所述胶体金结合垫搭接压住层析垫的1/5, 所述吸样垫搭接压住胶体金结合垫的1/12。

[0007] 优选的,包括以下步骤:

胶体金溶液制备:向100ml HauCl4的0.01％水溶液中加入1％柠檬酸三钠水溶液2.00— 4.50mL,混匀煮沸,保持沸腾30min得到直径为5-20nm的胶体金溶液;

胶体金结合垫制备:将胶体金溶液调至pH7.0-9.0后加入6μg/mL-15μg/mLDMD抗体和封闭剂,10000rpm离心30min,将离心下来的沉淀复溶至含有BSA、蔗糖的胶体金溶液中,将复溶产物加至玻璃纤维膜或聚酯膜后干燥;

层析垫制备:将DMD抗体用0.01M,pH为7.4的PBS稀释成0.5mg/mL、1.5mg/mL,羊抗鼠IgG分别稀释成1mg/mL、2mg/mL,检测线J包被DMD抗体,质控线Z包被羊抗鼠IgG,然后用喷膜仪在硝酸纤维素膜上按1.2μL/cm进行划线包被后干燥;

试纸卡组装:将已包被的层析膜放置在底板的中部粘贴,在层析膜的T线一 侧搭接胶体金结合垫,搭胶体金结合垫的1/5粘贴,在胶体金结合垫另一侧搭接 粘贴上样垫,搭胶体金结合垫的1/4粘贴;在层析膜的C线一侧搭接吸样垫,搭 吸样垫的1/12粘贴;用裁剪机将贴好的底板切成3～5mm宽的试纸条,再装入塑料卡内,形成试纸卡,

任选地,所述封闭剂为1%BSA或0.1%PEG-20000。

[0008] 优选的,所述试纸卡组装是在温度为20～25 ℃,湿度小于30%的室内完成的。

[0009] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

(1)本发明对DMD基因的79 个外显子、两侧相邻50bp内含子序列和已知位于内含子区突变附近序列设计并合成探针, DMD基因相关致病突变序列进行富集(外显子与内含子突变、包括了点突变和结构重排、已知突变和未知突变)构建蛋白抗体。

[0010] (2)与现有常规检测方法相比,本发明所开发的检测试纸卡能够一次性检测DMD基因各种突变信息,具有全面、快速、准确、价格适中的优点。

[0011] (3)本发明提供的检测DMD的免疫层析试纸卡,采用金标免疫层析技术对DMD抗体进行检测,检测中不需要昂贵的仪器和繁琐的操作过程,简化了检测流程,大大缩短了检测周期,检测时间比基因分析方法缩短了许多。

附图说明

[0012] 图1为本发明的胶体金免疫层析卡结构示意图;

图中:1、上样垫;2、胶体金结合垫;3、底板;4、层析膜;5、吸样垫;J、检测线;Z、质控线。

具体实施方式

[0013] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0014] 实施例1

本实施例提供了一种检测DMD的胶体金免疫层析试纸卡,并提供了该试纸卡的制备方法。

[0015] 一、主要材料

DMD特异性配对抗体、羊抗鼠IgG抗体:Abnova公司产品;氯金酸:Sigma公司产品; 硝酸纤维素(NC)膜:SARTORIUS(德国),CN140;德国赛多利斯公司产品;牛血清白蛋白 (BSA),聚乙二醇PEG20000,水解酪蛋白:Sigma产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0016] 二、胶体金的制备方法

1、将100ml HauCl4的0.01％水溶液加入1％柠檬酸三钠水溶液2.00—4.50mL，混匀煮沸；

2、继续加热煮沸30min。此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后 很快变灰色，续而转成黑色，随后逐渐稳定成橙红—红色-紫红。全过程约2～3min，得到直 径为5-20nm的胶体金溶液.

3、冷却至室温后用蒸馏水恢复至100ml。

[0017] DMD抗体免疫金标记：用柠檬酸三钠作为还原剂制备直径为5-20nm的胶体金溶液，制备完成后取三份胶体金，分别用0.2M K2CO3将溶液调到pH7.0、pH7.5和pH8.0，然后将溶液 置于磁力搅拌器上缓慢搅拌，按每100ml溶液加入0.5mg、1mg将标记用DMD抗体缓慢滴加到 胶体金溶液中，继续搅拌2小时，再加入到终浓度为0.1％的PEG20000或1％的BSA进行封闭 20min，标记结束后以10000r/m离心，弃上清，沉淀按50％原体积复溶至不同配比的胶体金 工作液中(含BSA、蔗糖，可适当添加表面活性剂)。然后将标记胶体金溶液按1ml溶液铺20cm2的比例加样于玻璃纤维膜或聚酯膜上，在温度37℃真空干燥2～5小时，制成免疫金结合垫。

[0018] 层析垫制备：用0.01M pH7.4PBS将包被DMD抗体稀释成0.5mg/ml、1.5mg/ml，羊抗鼠IgG分别稀释成1mg/ml、2mg/ml，然后用喷膜仪在NC膜上按1.2ul/cm进行分别划线包被，检测线J通过包被DMD抗体形成，质控线Z包被羊抗鼠IgG，包被完成后将NC膜在温度37℃，相对湿度＜30％的干燥间干燥2～5小时。

[0019] 试纸卡组装：在干燥室内，温度20～25℃，湿度小于30％，取塑料底板，将已包被的NC膜放置在塑料底板的中部粘贴，将胶体金结合垫裁切成合适的宽度，在NC膜T线一侧搭接胶体金结合垫，搭胶体金结合垫的1/5粘贴，在胶体金结合垫另一侧搭接粘贴上样垫，搭胶体金结合垫的1/4粘贴；在NC膜C线一侧搭接吸样垫，搭吸样垫的1/12粘贴；最后用裁剪机将贴好塑料板切成3～5mm宽的试纸条，再装入塑料卡内，形成试纸卡。

[0020] 本实施例中，优选的，检测试纸由上样垫、胶体金结合垫、层析膜及吸样垫依次相互交错粘贴在底 板上构成。

[0021] 本实施例中，优选的，检测线J，质控线Z相互平行且沿着层析膜的长度方向依次设置。

[0022] 本实施例中，优选的，检测线J通过包被人DMD的配对抗体形成。

[0023] 本实施例中，优选的，质控线Z通过包被羊抗鼠IgG抗体形成。

[0024] 本实施例中，优选的，质控线位于所述层析膜的靠近所述吸样垫的端部。

[0025] 本实施例中，优选的，层析膜为硝酸纤维素膜且为孔径5～15μm的多孔样结构膜。

[0026] 本实施例中，优选的，上样垫为玻璃纤维膜或聚酯膜，吸样垫为吸水滤纸。

[0027] 本实施例中，优选的，上样垫为玻璃纤维膜或聚酯膜，吸样垫为吸水滤纸。

[0028] 本发明的工作原理及使用流程：采用以上方法得到的检测DMD的免疫层析试纸卡，试纸卡由上样垫、胶体金结合垫、层析膜、吸样垫依次粘贴在塑料底板上构成，所述层析膜的两端分别搭接有吸样垫、胶 体金结合垫，所述胶体金结合垫的另一端搭接有上样垫。胶体金结合垫为标记有DMD标记物 的抗体的胶体金垫。层析膜为硝酸纤维素膜，是孔径5～15μm的多孔样结构膜，在层析膜上 形成有相互平行的检测线J和质控线Z。其中靠近胶体金结合垫的检测线J为DMD检测线，通过包被DMD的配对抗体形成；所述DMD的配对抗体能够与胶

体金结合垫上结合的DMD的抗体特异性结合。质控线Z通过包被羊抗鼠IgG抗体形成，其位于层析膜的靠近吸样垫的端部。

[0029] 将检测DMD的免疫层析试纸卡用于检测待测样品。将待测样品滴加于试纸卡上，15min内，根据检测线J及质控线Z的显色情况，判断待测样品中DMD抗体的情况。若检测线J及质控线Z均显紫红色，则待测样品中含有DMD抗体；若质控线Z显紫红色，检测线J不显色，则待测样品中无或DMD抗体含量低于检测下限，若质控线Z不显色则检测结果无效，需重新进行检测。

[0030] 将上述检测DMD免疫层析试纸卡用于对患儿样本检测，为DMD患者或携带者人群做筛查，结果与基因检测方法的检测结果完全一致，说明了本试纸卡的有效性。

[0031] 通过检测DMD，初步确认患者的待测样本中是否存在DMD异常。该免疫层析试纸卡可以应用于孕前预防、孕期干预、产后筛查及用药指导中，不需要昂贵的仪器和繁琐的操作过程，该方法操作简便、快速，成本低，检测结果准确。

[0032] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例，对于本领域的普通技术人员而言，可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型，本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

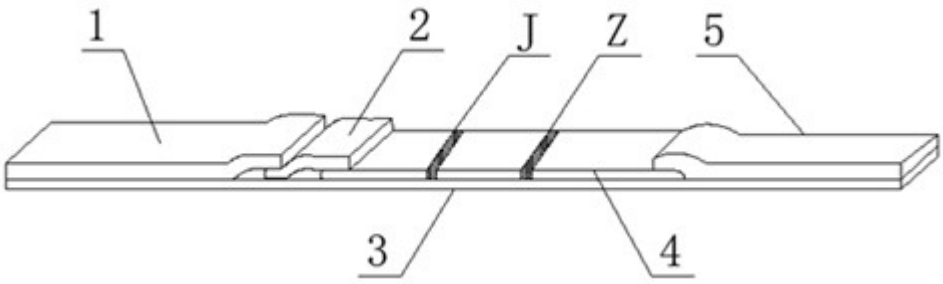
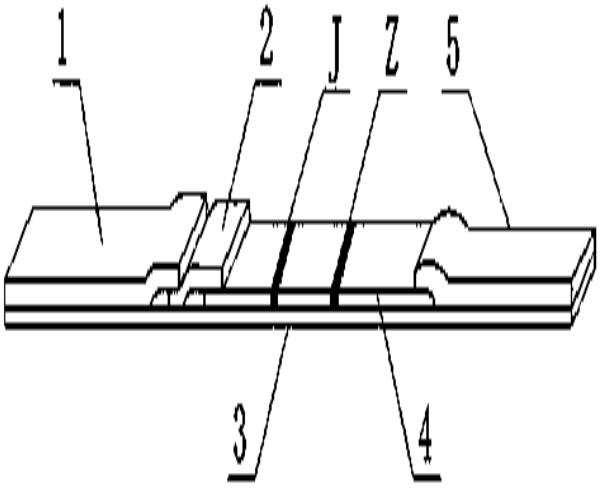


图1

专利名称(译)	一种胶体金免疫层析卡的制备方法		
公开(公告)号	CN110389222A	公开(公告)日	2019-10-29
申请号	CN201910658396.1	申请日	2019-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	武汉塞力斯生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉塞力斯生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉塞力斯生物技术有限公司		
[标]发明人	鲁翌 林霞 田树伟		
发明人	鲁翌 林霞 田树伟		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/54386		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胶体金免疫层析卡的制备方法，包括底板、上样垫、胶体金结合垫、层析膜和吸样垫，上样垫、胶体金结合垫、层析膜和吸样垫依次粘贴在底板上，所述胶体金结合垫为包被胶体金标记DMD抗体的玻璃纤维膜或聚酯膜，所述层析膜为包被DMD抗体的硝酸纤维素膜,本发明对DMD基因的79个外显子、两侧相邻50bp内含子序列和已知位于内含子区突变附近序列设计并合成探针，DMD基因相关致病突变序列进行富集(外显子与内含子突变、包括了点突变和结构重排、已知突变和未知突变)构建蛋白抗体。