



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106932592 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201710090594.3

(22)申请日 2017.02.20

(71)申请人 徐立

地址 401121 重庆市渝北区中华坊2栋2单元402

(72)发明人 陈晨语

(74)专利代理机构 北京元本知识产权代理事务所 11308

代理人 黎昌莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

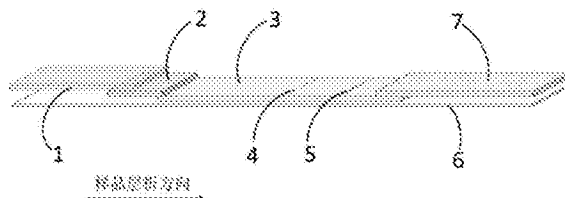
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明属于医学检验领域,涉及一种检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条及其制备方法和应用。本发明的检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条,依次由吸水垫、硝酸纤维素膜、免疫胶体金垫、样品垫和聚氯乙烯底板构成;所述硝酸纤维素膜包有质控线C线和检测线T线,C线为二抗,T线为兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II;所述免疫胶体金垫为包被有胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I的玻璃纤维。本发明的胶体金试纸条能快速检测液体中人表面活性蛋白A,兼具灵敏性和特异性,操作简单,使用方便,用时短,能应用在新生儿呼吸窘迫综合征早期检测或诊断产品和检测其他液体中人表面活性蛋白A的产品中。



1. 检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条,其特征在于,依次由吸水垫、硝酸纤维素膜、免疫胶体金垫、样品垫和聚氯乙烯底板构成;所述硝酸纤维素膜包有质控线C线和检测线T线,C线为二抗,T线为兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II;所述免疫胶体金垫为包被有胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I的玻璃纤维。

2. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,所述样品垫为玻璃纤维膜;所述吸水垫为吸水纸。

3. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,所述二抗选用羊抗鼠二抗。

4. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,所述胶体金试纸条的宽度为3-5mm;所述T线和C线的各相邻线的间隔为4-6mm;所述样品垫与免疫胶体金垫之间重叠1-2mm;所述免疫胶体金垫与硝酸纤维素膜之间重叠1-2mm;所述硝酸纤维素膜与吸水垫之间重叠1-2mm。

5. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于,所述胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I为每80-150 μ g鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I采用1mL OD_{520nm}值为1.5-2.0的胶体金溶液标记,胶体金颗粒平均直径为30-50nm;所述T线上兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II的合适包被量为0.3-1.5 μ g;所述C线上二抗的合适包被量为0.15-0.75 μ g。

6. 权利要求1-5任一项所述的胶体金试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 胶体金溶液的制备:将氯化金水溶液用柠檬三钠还原成的胶体金溶液;

2) 人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液的制备:将步骤1)制得的胶体金溶液pH值调至7-8.5,根据上述配比将鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I加入胶体金溶液,混合均匀反应,再加入BSA溶液进行封闭后1500r/min离心,弃沉淀后12000r/min离心去掉上清得沉淀,将沉淀液用金标复溶液稀释,即获得人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液;

3) 免疫胶体金垫的制备:向步骤2)制得的人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液用喷金机喷涂到处理好的硝酸纤维素膜上,烘干后得到免疫胶体金垫;

4) 反应膜的制备:先将兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II用0.01M的磷酸盐缓冲液进行稀释,加入2%的蔗糖,用划膜喷金仪将该溶液划在硝酸纤维素膜T线上;后将羊抗鼠二抗用0.01M的磷酸盐缓冲液进行稀释,加入2%的蔗糖,用划膜喷金仪将该溶液划在硝酸纤维素膜C线上;烘后得到反应膜;

5) 组装切条:将样品垫、步骤3)制得的免疫胶体金垫、步骤4)制得的反应膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的聚氯乙烯胶板上,并贴上带有插入液体面最高限位的指示线MAX的胶带,然后切割成试纸条进行密封包装,得胶体金试纸条。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤4)中兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II稀释后的浓度为0.5-2mg/ml;步骤4)中羊抗鼠二抗稀释后的浓度为0.5-2mg/ml。

8. 权利要求1-5任一项所述的胶体金试纸条在检测体液中人表面活性蛋白A中的应用,其特征在于,所述体液包括羊水、血液、胃液、肺液。

9. 用于检测表面活性蛋白A的胶体金试纸条在制备新生儿呼吸窘迫综合征早期检测或诊断产品中的应用。

10. 新生儿呼吸窘迫综合征的早期检测或诊断的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1-5任一项所述的胶体金试纸条。

检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,涉及一种检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 新生儿呼吸窘迫综合征 (Neonatal Respiratory Distress Syndrome, NRDS) 是一种因肺表面活性物质缺乏而导致的新生儿早期死亡的严重疾病,其病死率极高,主要见于早产儿。新生儿呼吸窘迫综合征的防治目标是尽早干预,尽可能提高存活率,同时最大程度减少潜在的不良反应。自肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 替代疗法问世以来, NRDS的病死率虽降至20%,但新生儿呼吸窘迫综合征仍是导致新生儿死亡的主要原因。虽然肺表面活性物质的应用能降低NRDS的发生率或减少并发症发生,但预防性给药是必会很大程度上会造成肺表面活性物质的滥用,可能导致诸多不良反应。因此,在启动预防性给予肺表面活性物质之前快速的确诊是治愈新生儿呼吸窘迫综合征的关键。

[0003] 虽然X射线检查是判定新生儿呼吸窘迫综合征的金标准,但患儿大多在出生24小时后的胸片才表现出显著的X射线特征,但由于该病发展迅速,等待X射线的确诊将耽误新生儿呼吸窘迫综合征的治疗。因此,临床上常通过检测新生儿的肺成熟度来指导肺表面活性物质的预防性给药。通过羊水检测肺成熟度的方法有多种,比如泡沫稳定性法,卵磷脂/鞘磷脂比值法,PS/白蛋白比值法等。虽然综合上述方法可在一定程度预测新生儿的肺成熟度,但这些方法操作复杂、检测时间较长,并需要专门的仪器设备和专业的技术人员。而目前临床上尚无适于急救需要的简便、快捷而准确的预测新生儿呼吸窘迫综合征的方法。

[0004] 胎儿肺成熟有赖于肺表面活性物质的存在,因此,通过测定羊水中肺表面活性物质的成分,可间接预测胎儿肺成熟度。肺表面活性物质中的活性成分除了磷脂外,尚有与之结合的4种表面活性蛋白 (surfactant protein, SP), 其中表面活性蛋白A (SPA) 是含量最多的一种表面活性蛋白,其含量在一定程度上可以反映SP的浓度。目前,已有报道通过测定羊水、脐血、胃液中表面活性蛋白A含量可预测新生儿肺成熟度,其中检测羊水中SPA的方法的敏感度和特异度分别为88.2%和68.5%,且联合传统的泡沫稳定性法可实现100%的新生儿呼吸窘迫综合征的诊断准确率。因此,羊水中表面活性蛋白A可作为一种特异性的肺成熟度标志物用于新生儿呼吸窘迫综合征的早期筛查和辅助预测,而如何快速、特异性、高灵敏度的检测羊水中表面活性蛋白A的水平对于新生儿呼吸窘迫综合征患者的诊断和治疗具有重要的临床意义,且具有广泛的临床应用前景和市场潜力。

[0005] 目前,SPA的检测方法主要是酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 由于该方法操作繁琐、耗时长,不适宜SPA的快速检测。胶体金试纸条是集单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新型层析材料为一体的一项新型体外诊断技术,该技术利用微孔膜的毛细管作用,使滴加在样品垫上的溶液缓慢经过金标垫和醋酸纤维素膜到达试纸条的另一端,待测物金标试剂复合物与之发生抗原抗体特异性结合而被截留,使得胶体金标记物聚集在检测带上,可通过目测得到直观的检测结果。胶体金试纸条具有简

单、快速、灵敏、准确、可现场操作等优点,已被广泛应用于传染病、肿瘤、早孕等领域的体外检测。

[0006] 目前国内外尚无基于表面活性蛋白A检测的胶体金试纸条用于新生儿呼吸窘迫综合征的快速检测中,因此开发一种用于快速检测新生儿呼吸窘迫综合征的胶体金试纸条,具有重要的临床意义,可满足临床儿科和产科的迫切需求,有利于新生儿呼吸窘迫综合征的预防性给药,从而降低新生儿呼吸窘迫综合征的死亡率。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条,该胶体金试纸条能快速检测液体中人表面活性蛋白A,兼具灵敏性和特异性,操作简单,使用方便,用时短,能应用在新生儿呼吸窘迫综合征早期检测或诊断产品中。

[0008] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0009] 检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条,依次由吸水垫、硝酸纤维素膜、免疫胶体金垫、样品垫和聚氯乙烯底板构成;所述硝酸纤维素膜包有质控线C线和检测线T线,C线为二抗,T线为兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体Ⅱ;所述免疫胶体金垫为包被有胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I的玻璃纤维。

[0010] 所述检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条在高度方向上的排布包括聚氯乙烯底板和反应试剂载体吸附层,所述反应试剂载体吸附层固定在所述聚氯乙烯底板上;从沾液端到手持端依次设有样品垫、免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,在所述免疫胶体金垫和吸水垫上覆盖有保护膜层,在所述硝酸纤维素膜上包被有条状的检测线T线和条状的质控线C线,所述检测线T线和所述质控线C线均呈与胶体金试纸条长度方向垂直的条状。

[0011] 本发明的检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条通过双抗原夹心法,结合免疫胶体金技术快速检测羊水表面的表面活性蛋白A,用于新生儿呼吸窘迫综合征的快速辅助检测,兼具灵敏性和特异性,操作简单,使用方便,用时短,可满足临床儿科和产科的迫切需求,有利于新生儿呼吸窘迫综合征的预防性给药,从而降低新生儿呼吸窘迫综合征的死亡率。

[0012] 所述胶体金试纸条的检测原理大体为:在样品垫滴加入待测样品后,通过毛细作用,待测样品将免疫胶体金垫中鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I标记的胶体金溶解释放出来并向吸水垫一端的方向移动。如果被检测样品中含有人表面活性蛋白A,则其与胶体金上标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I发生特异性反应,生成胶体金-鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I-人表面活性蛋白A复合物,当样品在硝酸纤维素膜上继续移动到T线时,其中人表面活性蛋白A和兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体Ⅱ发生特异性反应并被其捕获,形成胶体金-鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I-人表面活性蛋白A-兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体Ⅱ复合物从而将胶体金固定在T线位置,在该检测线由于胶体金的聚集而形成一条红色条带,样品继续移动到C线处时,多余的胶体金-鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I-人表面活性蛋白A复合物会被羊抗鼠二抗(GAM)捕获,因而在C线处形成一条红色条带。C线显色证明该次测试的有效性,C线不显色则视为测试无效,需重新检测。

[0013] 进一步,所述样品垫为玻璃纤维膜;所述吸水垫为吸水纸。

[0014] 进一步,所述二抗选用羊抗鼠二抗。

[0015] 进一步,所述胶体金试纸条的宽度为3-5mm;所述T线和C线的各相邻线的间隔为4-

6mm;所述样品垫与免疫胶体金垫之间重叠1-2mm;所述免疫胶体金垫与硝酸纤维素膜之间重叠1-2mm;所述硝酸纤维素膜与吸水垫之间重叠1-2mm。

[0016] 作为一种优选,所述胶体金试纸条的宽度为4mm;所述T线和C线的各相邻线的间隔为5mm;所述样品垫与免疫胶体金垫之间重叠1mm;所述免疫胶体金垫与硝酸纤维素膜之间重叠1mm;所述硝酸纤维素膜与吸水垫之间重叠2mm。

[0017] 进一步,所述胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I为每80-150 μ g鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I采用1mL OD_{520nm}值为1.5-2.0的胶体金溶液标记,胶体金颗粒平均直径为30-50nm;所述T线上兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II的合适包被量为0.3-1.5 μ g;所述C线上二抗的合适包被量为0.15-0.75 μ g。

[0018] 作为一种优选,所述鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I的合适用量为120 μ L。

[0019] 免疫胶体金技术的反应过程是一个由金颗粒、抗原与抗体动态结合的反应过程,在这个过程中每个环节的好坏都直接影响试验的成败,如:

[0020] 1) 制备颗粒均匀、分散度好的胶体金在金标免疫快速试验中非常关键,如果金颗粒直径的变异范围太大就会影响到试验的稳定性和重复性,如果金颗粒的形状不规则或粒径不均一,使得胶体金标记物容易解离和沉淀而产生金标扩散不完全、反应区底色过深和假阳性现象;而且胶体金质量不好,胶体金结合物就不能快速而完整的从玻璃纤维上解离,从而影响试验结果。胶体金制备基于还原法,改变还原剂的性质和浓度,可制备粒径不同的胶体金悬液,根据试验目的选择胶体金的粒径,根据选择的粒径确定还原剂。

[0021] 2) 标记蛋白、T线和C线的抗原或者抗体的纯度和浓度直接影响金标探针的质量。获得纯度高、浓度适中的抗原、抗体,关键在于制备和纯化方法的选择及条件的优化。试验前须采用高速离心去杂质,应用饱和硫酸铵沉淀、亲和层析、透析除盐等一系列处理方法,尽可能去除单克隆抗体、二抗和相关蛋白溶液中的高浓度的杂质和多余离子,避免其干扰目的蛋白与胶体金的吸附结合,或导致胶体金粒子的凝聚。同时,充分处理各种大分子蛋白,使其尽量分散为单体和具有适当的分子质量,提高胶体金与蛋白质的结合比,便于与胶体金充分而稳定的结合。

[0022] 3) 胶体金标记的两个关键环节是标记时的pH和最佳蛋白质标记量的确定。根据胶体金标记的原理,只有在pH接近和稍高于蛋白质的等电点时,胶体金蛋白质的吸附力最强;pH过高过低都不利于两者的结合,因此标记时选择精密的酸碱度测定仪器或者试纸条,采用不同方法重复校正,并进行梯度试验找到最佳的标记pH溶胶与被标蛋白质的用量比例是否合适是影响标记成功的一个重要因素。过多蛋白质标记,造成浪费的同时引起试纸的拖带现象;过少蛋白质标记,导致胶体金标记不完全,从而降低试纸的灵敏度及假阳性现象的出现。也需要在试验中进行梯度试验,反复比较不同标记量的标记物在破坏试验中的稳定性,确定最佳的标记量。

[0023] 本发明的目的之二在于提供一种所述的胶体金试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0024] 1) 胶体金溶液的制备:将氯化金水溶液用柠檬三钠还原成的胶体金溶液;

[0025] 2) 人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液的制备:将步骤1)制得的胶体金溶液pH值调至7-8.5,根据上述配比将鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I加入胶体金溶液,混合均匀反应,再加入BSA溶液进行封闭后1500r/min离心,弃沉淀后12000r/min离心去掉上清得沉淀,

将沉淀液用金标复溶液稀释,即获得人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液;

[0026] 3) 免疫胶体金垫的制备:向步骤2) 制得的人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液用喷金机喷涂到处理好的玻璃纤维素膜上,烘干后得到免疫胶体金垫;

[0027] 4) 反应膜的制备:先将兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体 II 用0.01M的磷酸盐缓冲液进行稀释,加入2%的蔗糖,用划膜喷金仪将该溶液划在硝酸纤维素膜T线上;后将羊抗鼠二抗用0.01M的磷酸盐缓冲液进行稀释,加入2%的蔗糖,用划膜喷金仪将该溶液划在硝酸纤维素膜C线上;烘后得到反应膜;

[0028] 5) 组装切条:将样品垫、步骤3) 制得的免疫胶体金垫、步骤4) 制得的反应膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的聚氯乙烯胶板上,并贴上带有插入液体面最高限位的指示线MAX的胶带,然后切割成试纸条进行密封包装,得胶体金试纸条。

[0029] 具体的一种胶体金试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0030] 1) 胶体金溶液的制备:将100mL 0.01%氯化金水溶液用1-3mL的1%柠檬三钠还原成30-50nm的胶体金溶液。

[0031] 2) 人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液的制备:用0.1mol/L K_2CO_3 溶液将步骤1) 制得的胶体金溶液pH值调至7-8.5,将胶体金溶液按1mL胶体金溶液中加入80-150 μ g鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I,混合均匀反应2小时,再加入10%BSA溶液至终浓度0.5-2%进行封闭。将制备好的免疫金以1500r/min4℃离心20分钟,弃沉淀;后12000rpm离心20分钟,去上清,将沉淀液用金标复溶液稀释到工作浓度,即获得人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液。

[0032] 3) 免疫胶体金垫的制备:向步骤2) 制得的人表面活性蛋白A免疫胶体金溶液用喷金机喷涂到处理好的玻璃纤维素膜上,烘干后得到免疫胶体金垫。

[0033] 4) 反应膜的制备:先将兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体 II 用0.01M的磷酸盐缓冲液进行稀释到工作浓度,加入2%的蔗糖,用划膜喷金仪将该溶液划在硝酸纤维素膜T线上;后将羊抗鼠二抗(GAM) 0.01M的磷酸盐缓冲液进行稀释到工作浓度,加入2%的蔗糖,用划膜喷金仪将该溶液划在硝酸纤维素膜C线上。37℃烘干4-6小时,得到反应膜。

[0034] 5) 组装切条:将样品垫、步骤3) 制得的免疫胶体金垫、步骤4) 制得的反应膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的PVC胶板上,并贴上带有插入液体面最高限位的指示线MAX的胶带,然后根据切割成试纸条,并将组装好的试纸条密封包装保存。

[0035] 进一步,步骤4) 中兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体 II 稀释后的浓度为0.5-2mg/mL;步骤4) 中羊抗鼠二抗稀释后的浓度为0.5-2mg/mL。

[0036] 本发明的目的之三在于提供一种所述的胶体金试纸条在检测体液中人表面活性蛋白A中的应用,所述体液包括羊水、血液、胃液、肺液。

[0037] 本发明的目的还在于提供一种用于检测表面活性蛋白A的胶体金试纸条在制备新生儿呼吸窘迫综合征早期检测或诊断产品中的应用。凡是对本发明的技术方案进行简单替换或修改制备的可用于检测表面活性蛋白A的胶体金试纸条应用在新生儿呼吸窘迫综合征早期检测或诊断产品中,均属于本发明的保护范围。

[0038] 本发明的目的还在于提供一种新生儿呼吸窘迫综合征的早期检测或诊断的试剂盒,所述试剂盒包括所述的胶体金试纸条。所述试剂盒能设置包括壳体、加样孔、显色观察窗等用于包装、保存、便于操作和观察的装置。

[0039] 本发明的目的还在于提供一种检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条的使用方

法,在检测中,检测样品溶液中人表面活性蛋白A的含量为 $\geq 400\text{ng/ml}$ 。

[0040] 本发明的有益效果在于:本发明的检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条将胶体金免疫层析技术和免疫间接法原理相结合,将测试线包被人表面活性蛋白的抗体,通过免疫间接法原理,一步法就能够快速检测出体液中人表面活性蛋白A;到目前为止,没有关于人表面活性蛋白A通过胶体金试纸条快速检测的相关产品。

[0041] 与现有检测人表面活性蛋白A的ELISA试剂盒相比,本发明的胶体金试纸条具有以下优点:

[0042] (1) 检测羊水中人表面活性蛋白A,检测速度快、效率高,一般在5~15分钟内即可读取显色结果并进行判断,不需要额外的样品培养时间或反应时间,为新生儿呼吸窘迫综合征的快速确诊提供时间基础。

[0043] (2) 该胶体金试纸条特异性强、符合率高。可通过目视的显色(例如显红色或不显色)来体现人表面活性蛋白A的阳性或阴性。根据本发明对实际样品的检测结果来看,其灵敏度和特异度分别为90%和70%,且联合传统的泡沫稳定性法可达到近100%的新生儿呼吸窘迫综合征的诊断准确率。

[0044] (3) 操作简单,价格低廉,不需要专业技术人员或大型仪器设备即可实施检测,尤其适合在偏远贫困地区使用。

[0045] (4) 可适用于新生儿呼吸窘迫综合征的早期诊断,通过肉眼即可读出检测结果,从而获取更多新生儿肺成熟度的相关信息,辅助临床儿科或产科医生给予正确的医疗诊断等,实现新生儿呼吸窘迫综合征早发现、早诊断、早治疗、早痊愈,具有重要的临床意义。

附图说明

[0046] 图1为本发明制备的胶体金的TEM照片(比例尺为100nm)。

[0047] 图2为本发明用于快速检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条的示意图。其中1为样品垫,2为免疫胶体金垫,3为硝酸纤维素膜,4为检测线T,5为质控线C,6为聚氯乙烯底板,7为吸水垫。

[0048] 图3为本发明用于快速检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条检测结果示意图。其中:8为C、T两条线显色为阳性;9为C线一条线显色为阴性;10为C、T两条线均未显色为无效。

[0049] 图4为本发明用于快速检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条检测结果图。

具体实施方式

[0050] 以下将参照附图,对本发明的优选实施例进行详细描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明,但并不是本发明的内容仅限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0051] 实施例1检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条

[0052] 检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条,依次由吸水垫7、硝酸纤维素膜3、免疫胶体金垫2、样品垫1和聚氯乙烯底板6构成;所述硝酸纤维素膜包有质控线C线5和检测线T线4,C线为二抗,T线为兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II;所述免疫胶体金垫为包被有胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I的玻璃纤维。

[0053] 实施例2:检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条的制备方法

[0054] 胶体金的制备:

[0055] 1.在100ml的圆底烧瓶中加入48.5ml去离子水搅拌并煮沸,采用洁净的冷凝管进行回流,保持10min。

[0056] 2.分别取0.5ml的 HAuCl_4 水溶液(1wt%)加入到1ml的柠檬酸三钠水溶液(0.35-1.485wt%),搅拌均匀配置成2.5ml的混合溶液,随后迅速加入到1步中的沸水中。可以观察到溶液的颜色由无色迅速转变为蓝灰色,经由紫色过度最终转变为透亮的红色。

[0057] 3.反应溶液继续加热搅拌回流1h,停止加热,持续搅拌自然降为室温。

[0058] 胶体金标记复合物的制备:

[0059] 1.将1ml胶体金溶液加入到酸洗过的圆底烧瓶中,再加入40 μl 的0.1M的 K_2CO_3 溶液,磁力搅拌混合3分钟(100r/min)。

[0060] 2.快速搅拌下(500r/min)逐滴缓慢加入120 μg 鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I(3min加完),室温不时搅拌(200r/min)反应2小时。

[0061] 3.反应结束后在上述反应液中加入1/50反应液总体积的10%BSA(pH为7.4的0.01M PBS稀释),室温下反应2h并不时搅拌(200r/min)。

[0062] 4.将制备好的免疫金以1500r/min 4℃离心20分钟,弃沉淀。

[0063] 5.上清液以12000r/min 4℃离心20分钟,小心除去上清液,收集离心沉淀并用金标清洗液稀释。

[0064] 6.重复步骤4、5两次。

[0065] 7.最终沉淀用金标复溶液复合物溶到金原液体积的1/10,2-8℃保存备用(长期保存的话需要向其中加入0.02%的叠氮钠)。

[0066] 结合垫的处理:

[0067] 结合垫是标记蛋白干燥的载体,结合垫吸收并将检测液传递到固相层析膜上。结合垫的处理要保证金标复合物的稳定性且需要能够将金标复合物完全释放,考虑到与同蛋白的长期共存因素,结合垫只能保持偏中性的pH,低的盐离子浓度,为蛋白创造一个好的保存环境,减少甚至消除金标复合物在结合垫上的滞留。具体处理步骤如下:

[0068] 将玻璃纤维剪切成10cm*10cm的规格,放在预先配置好的40ml处理液(0.5% Tween-20,20%蔗糖,0.2% TritonX-100的0.01M的PBS溶液(pH=7.4))中,常温浸泡30min。处理好的玻纤放在网格托架上,37℃烘箱中鼓风干燥12h,切割成0.7*0.4cm的方块,密封保存在相对湿度小于15%,室温条件下的干燥皿中备用。

[0069] 样品垫的处理:

[0070] 样品垫主要用于平缓测试液流速,使其在结合垫上均匀展开,同时调整检测溶液pH和粘度并滤除溶液中可能存在的较大的杂质。样品垫的前处理液一般要有缓冲体系、去污剂、增稠剂、阻滞剂等组成,使样品垫具有较大的前处理和过滤能力。对样品垫前处理液的优化,目的在于膜的封闭和水化,最大限度减少样品溶液的干扰。具体处理步骤如下:

[0071] 将玻璃纤维剪切成10cm*10cm的规格,放在预先配置好的40ml处理液(0.1% Tween-20,2%氯化钠,1%BSA的0.01M的PBS溶液(pH=7.4))中,常温浸泡30min。处理好的玻纤放在网格托架上,37℃烘箱中鼓风干燥12h,切割成1.5*0.4cm的方块,密封保存在相对湿度小于15%,室温条件下的干燥皿中备用。

[0072] 硝酸纤维素膜上抗体的包被:

[0073] 硝酸纤维素膜切割成0.4cm宽的小块,调整最终单支试纸条上T线上兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II的包被量为0.5 μ g。C线上羊抗鼠二抗(GAM)的合适包被量为0.3 μ g。C、T两线包被抗体的距离为5mm。37℃烘箱中鼓风干燥5h,切割成1.5*0.4cm的方块,密封保存在相对湿度小于15%,室温条件下的干燥皿中备用。

[0074] 鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I金标垫的制备:

[0075] 在处理好的小块结合垫(0.7*0.4cm)上,将鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I金标复合物2.5 μ l喷洒于硝酸纤维素膜上,于37℃烘干8h,密封保存在相对湿度小于15%,室温条件下的干燥皿中备用。

[0076] 检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条的组装:

[0077] 如图2所示,以表面涂有生物惰性粘胶的PVC粘板(长8cm,宽4mm)为基底,在其表面从样品端起顺序粘贴有样品垫1、胶体金复合物标记的结合垫2、电纺硝酸纤维素纳米纤维膜3和吸水垫7。其中样品垫1一端盖住结合垫2,交叠宽度为1mm;结合垫3的另一端盖住硝酸纤维素纳米纤维膜3的一端,交叠宽度为1mm;吸收垫7盖住硝酸纤维素纳米纤维膜膜3的另一端,交叠宽度为2mm。

[0078] 具体操作过程为:撕去粘板上粘胶保护纸层露出生物惰性粘胶,包被好检测线和质控线的硝酸纤维素纳米纤维膜贴于距样品端2.1cm处,将胶体金复合物标记的结合垫2贴于距样品端1.4cm处,再将样品垫和吸收垫按照图1中顺序贴于两端。检测样品时,将100 μ l待检样品溶液加入组装好的试纸条的样品垫上,样品溶液在毛细作用下向前泳动,经过结合垫时其上干燥的金标复合物复溶并随样品溶液向前迁移,在特定的抗原或抗体区带位置发生特异性结合,胶体金颗粒在相应区域聚集增强显色,可用肉眼进行观察,从而实现定性和半定量的检测。以夹心式反应为例说明检测结果:阳性结果呈现C、T两条线显色,即检测线4和质控线5;阴性结果只出现C一条线,即质控线5;如果无线条出现则说明该次检测时间太短或是试纸条失效。

[0079] 实施例3:实施例2制备的胶体金试纸条的灵敏度分析

[0080] 取上述实施例2制作的检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条25条。将人表面活性蛋白A抗原梯度溶解于标准稀释液中,浓度分别为1000ng/ml,500ng/ml,400ng/ml,200ng/ml,0ng/ml,每个样品浓度测试5条,测试时间为10分钟。表1所示为目测判读结果。结果显示,当检测样品溶液中人表面活性蛋白A的含量低于200ng/ml时,本发明试纸条不显色,即检出率为0。当检测样品溶液中人表面活性蛋白A的含量 $\geq$ 400ng/ml时,试纸条能正常检测判读,检出率为100%。结果表明,本发明提供的人表面活性蛋白A的胶体金试纸条大大提高了检测的方便性,且准确率高,具有重要的临床应用价值。

[0081] 表1胶体金试纸条的灵敏度分析

[0082]

样品浓度	0 ng/ml	200 ng/ml	400 ng/ml	500 ng/ml	1000ng/ml
一种快速检测人表面 活性蛋白 A 的胶 体金试纸条	0%	0%	100%	100%	100%
结果备注	T 线不显色	T 线不显色	T 线正常 显色	T 线显色明 显	T 线显色明 显

[0083] 实施例4:实施例2制备的胶体金试纸条的临床应用

[0084] 检测羊水中人表面活性蛋白A:取上述实施例2制备的胶体金试纸条,在室温平衡10分钟,用吸管吸取2-3滴待测羊水滴于样品垫上,检测结果在5-20分钟后读取。

[0085] 临床检测验证:我们随机检测了10例新生儿呼吸窘迫综合征患者和10例正常新生儿的血清,经过ELISA验证发现结果发现本试纸条对于人表面活性蛋白A含量 $\geq 400\text{ng/ml}$ 的样品的检出率为100%,这也验证了实施3的分析结果;临床检测中对新生儿呼吸窘迫综合征检测的灵敏度和特异度分别为90%和70%,检测结果如图4,示意图3和表2所示,其中:C、T两条线显色为阳性;C线一条线显色为阴性;C、T两条线均未显色为无效。实验结果表明本发明实施例2制备的胶体金试纸条的准确性好、灵敏度高,对新生儿呼吸窘迫综合征具有较好的预测性。

[0086] 表2胶体金试纸条的对实际临床样本检测的灵敏度和特异度分析

[0087]

组号 N (正常)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10
显色情况	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
判定结果	阴性	阴性	阳性	阴性	阴性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性
组号 R (患儿)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
显色情况	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
判定结果	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阳性	阳性

[0088] 最后说明的是,以上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,可以对本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宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

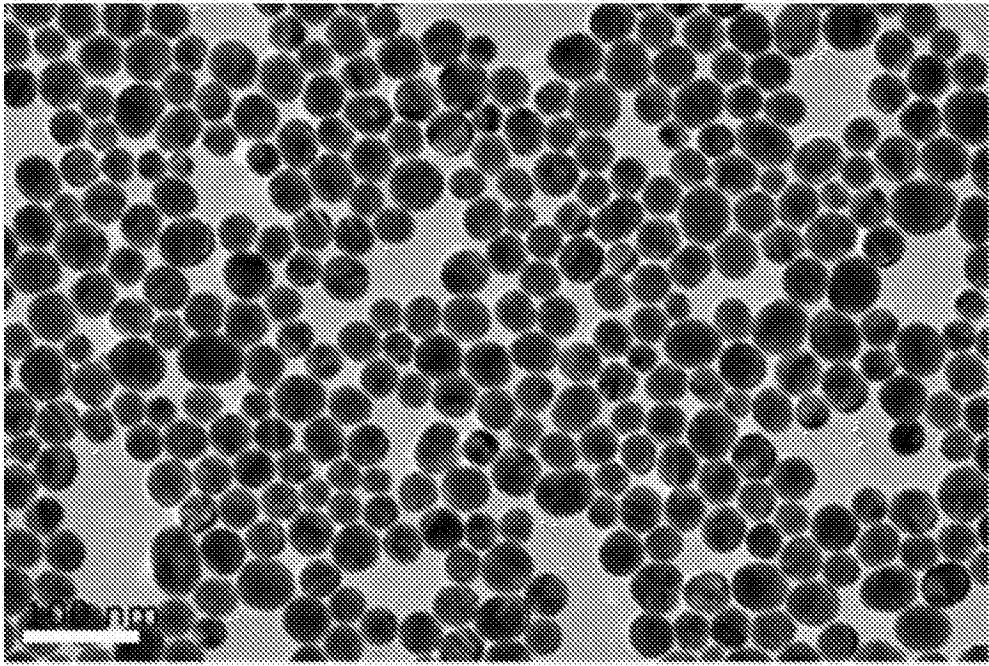


图1

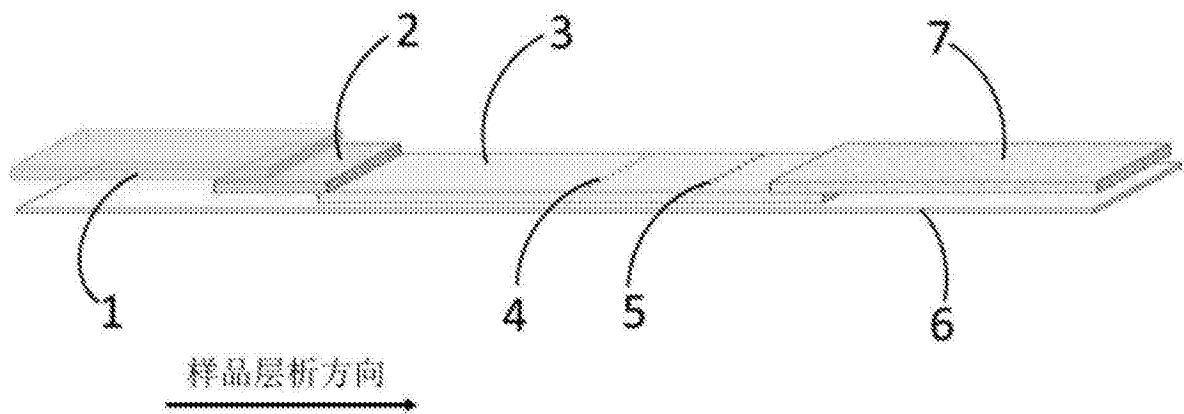


图2

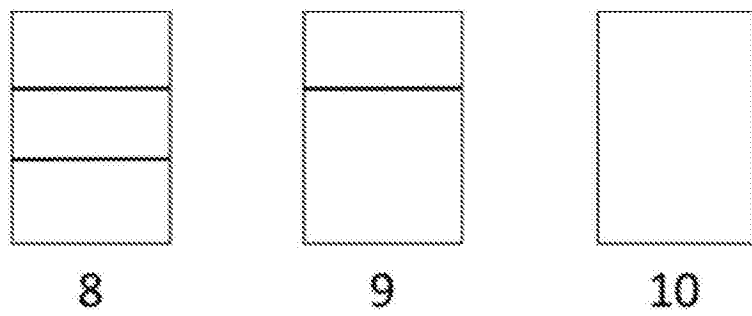


图3

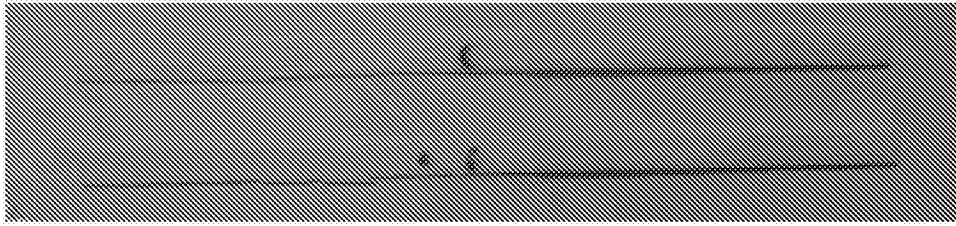


图4

专利名称(译)	检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN106932592A	公开(公告)日	2017-07-07
申请号	CN2017110090594.3	申请日	2017-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	徐立		
申请(专利权)人(译)	徐立		
当前申请(专利权)人(译)	徐立		
[标]发明人	陈晨语		
发明人	陈晨语		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/6803 G01N2800/12 G01N2800/38		
代理人(译)	黎昌莉		
其他公开文献	CN106932592B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于医学检验领域，涉及一种检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条及其制备方法和应用。本发明的检测人表面活性蛋白A的胶体金试纸条，依次由吸水垫、硝酸纤维素膜、免疫胶体金垫、样品垫和聚氯乙烯底板构成；所述硝酸纤维素膜包有质控线C线和检测线T线，C线为二抗，T线为兔抗人表面活性蛋白A多克隆抗体II；所述免疫胶体金垫为包被有胶体金标记的鼠抗人表面活性蛋白A单克隆抗体I的玻璃纤维。本发明的胶体金试纸条能快速检测液体中人表面活性蛋白A，兼具灵敏性和特异性，操作简单，使用方便，用时短，能应用在新生儿呼吸窘迫综合征早期检测或诊断产品和检测其他液体中人表面活性蛋白A的产品中。

