



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593924 A

(43)申请公布日 2018. 09. 28

(21)申请号 201810211804.4

(22)申请日 2018.03.15

(71)申请人 福建医科大学附属第一医院

地址 350000 福建省福州市茶中路20号

(72)发明人 张文明 李文波 康加祥 洪海峰

汪大明 白国昌 张翀景

(74)专利代理机构 北京华际知识产权代理有限公司

公司 11676

代理人 陈晓蕾

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

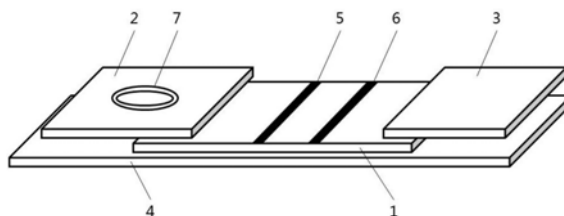
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

关节液 α 防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用

(57)摘要

本申请涉及关节液 α 防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用。关节置换术是治疗终末期关节疾病的有效治疗方式。但是关节假体周围感染是关节置换术后严重的并发症。关节液 α 防御素诊断人工关节感染具有较高的敏感性和特异性。用荧光颗粒作为标记物,通过免疫层析方法制备关节液 α 防御素的诊断试剂盒(试纸条)。应用免疫荧光定量分析仪,可以对关节液标本进行定量检测和即时检测,实现诊断人工关节感染。本申请中的关节液 α 防御素检测试剂和诊断试剂盒使用简单,反应灵敏,诊断准确性高。



1. 一种定量检测关节液 α 防御素的免疫荧光试纸条,所述试纸条包括反应膜(1)、样品垫(2)、吸收垫(3)和底板(4);所述反应膜(1)位于所述底板(4)上,所述反应膜(1)上固定有检测带(5)和质控带(6),所述样品垫(2)与所述反应膜(1)的一侧部分重叠并位于所述反应膜(1)和所述底板(4)上,所述吸收垫(3)与所述反应膜(1)的另一侧部分重叠并位于所述反应膜(1)和所述底板(4)上,所述样品垫(2)上包括加样点(7);其中所述检测带包被有荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体,所述质控带包被有羊抗鼠IgG抗体。

2. 如权利要求1所述的免疫荧光试纸条,所述底板(4)的材料选自ABS、PS、PE、PVC或PC中的任意一种;所述样品垫(2)或吸收垫(3)的材料选自纤维素、玻璃纤维或纺织聚合物中的任意一种;所述反应膜(1)的材料选自硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、尼龙膜或聚四氟乙烯膜中的任意一种。

3. 如权利要求1所述的免疫荧光试纸条,所述抗 α 防御素抗体的终浓度为0.1~0.4mg/mL(优选0.2mg/mL),包被量为0.5~2 μ L/cm(优选1 μ L/cm);所述羊抗鼠IgG抗体的终浓度为0.5~2.0mg/mL(优选1.0mg/mL),包被量为0.5~2 μ L/cm(优选1 μ L/cm)。

4. 如权利要求1所述的免疫荧光试纸条,所述检测带(5)与质控带(6)之间的距离约1.0~10mm(优选5.0mm),所述检测带(5)与质控带(6)的宽度约0.5~2.0mm(优选0.8~1.0mm);所述反应膜(1)和样品垫(2)的连接处重叠1~2mm;所述反应膜(1)和吸收垫(3)的连接处重叠1~2mm。

5. 一种如权利要求1所述的免疫荧光试纸条的制备方法,包括以下步骤:

1) 抗体的制备:采用基因工程方法制备抗 α 防御素抗体、羊抗鼠IgG抗体;采用荧光颗粒标记抗 α 防御素抗体;用含BSA的PBS稀释荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体至合适的浓度;再用同样的溶液稀释羊抗鼠IgG抗体至合适的浓度;

2) 包被反应膜(1)的制备:采用喷膜机分别在反应膜(1)上喷印检测带(5)与质控带(6),检测带(5)与质控带(6)之间保留合适的距离,检测带(5)与质控带(6)保留合适的宽度;抗 α 防御素抗体或羊抗鼠IgG抗体的包被量适合反应膜(1);喷印完成后,干燥备用;

3) 样品垫(2)的制备:用含BSA的PBS液浸泡样品垫(2),处理后,干燥备用;

4) 免疫荧光试纸条的制备:先将反应膜(1)粘附在底板(4)的中间位置上,在反应膜(1)的一侧粘附吸收垫(3),反应膜(1)和吸收垫(3)的连接处重叠一部分;在反应膜(1)的另一侧粘附样品垫(2),反应膜(1)和样品垫(2)的连接处重叠一部分;再将粘贴好反应膜(1)、样品垫(2)和吸收垫(3)的底板(4)裁切成合适宽度的细条。

6. 如权利要求5所述的制备方法,所述步骤1)中用含1~10%(优选5%)BSA的1~20mM(优选10mM)PBS稀释荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体,使其终浓度为0.1~0.4mg/mL(优选0.2mg/mL);用同样的溶液稀释羊抗鼠IgG抗体,使其终浓度为0.5~2.0mg/mL(优选1.0mg/mL)。

7. 如权利要求5所述的制备方法,所述步骤2)中检测带(5)与质控带(6)之间的距离约1.0~10mm(优选5.0mm),检测带(5)与质控带(6)的宽度约0.5~2.0mm(优选0.8~1.0mm);抗 α 防御素抗体或羊抗鼠IgG抗体的包被量分别为0.5~2 μ L/cm(优选1 μ L/cm)。

8. 如权利要求5所述的制备方法,所述步骤3)中用含1~10%(优选5%)BSA的1~20mM(优选10mM)PBS液浸泡样品垫(2);和/或,反应膜(1)和样品垫(2)的连接处重叠1~2mm;反应膜(1)和吸收垫(3)的连接处重叠1~2mm。

9. 关节液 α 防御素或抗 α 防御素抗体在制备用于诊断人工关节感染的试剂或试剂盒中的用途。

关节液 α 防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学诊断领域,具体涉及关节液 α 防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 人工关节置换术是治疗严重关节疾病的有效方法,但是人工关节感染(Prosthetic Joint Infection,PJI)是关节置换术后严重并发症之一,其发生率在初次关节置换手术约为1%~2%,翻修手术可达3%~10%。PJI的临床表现复杂,其诊断、治疗仍存在很多困难。根据美国骨科医师协会、感染病学会和肌肉骨骼感染学会提出的诊断指南,大部分PJI可以获得明确的诊断和及时的治疗。但是,也有一些临床表现不典型的病人,诊断十分困难。

[0003] 现有的诊断标准依据临床表现和实验室检查综合判断,后者包括ESR、CRP、细菌培养、关节液WBC计数与分类等。这些指标在诊断PJI的特异性、敏感性仍存在一些不足:1、细菌培养是诊断PJI的“金”标准之一,但细菌培养阳性率为60%~70%左右,敏感性不够高。2、关节液白细胞计数与分类是诊断PJI的有效方法,但全身炎症性关节炎病人关节置换后,该指标也会升高,特异性不强。3、现有实验室诊断方法,无法做到即时诊断(Point of Care Testing,POCT,或称床边诊断)。因此,寻找一种快速简便、灵敏度高和特异性强的检测方法,对PJI的诊断有重要意义。

[0004] 近年来,关节液 α 防御素生物标志物在PJI诊断中受到关注。 α 防御素属于抗菌肽家族与脂质运载蛋白(lipocalin)家族,是中性粒细胞颗粒中的主要蛋白质,具有广谱的抗菌活性。现有关节液生物标志物检测多采用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,临床上需收集到一定数量的标本才能检测,价格高,无法满足临床个体化和POCT的需要。胶体金免疫标记技术是一种半定量技术,使用简便,但无法定量检测。免疫荧光层析技术是一种以独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂作为示踪物的非放射性免疫标记技术,已经广泛应用于临床实验室和POCT诊断。因此,本项目将应用荧光颗粒作为标记物,通过免疫层析方法制备 α 防御素标志物的诊断试剂盒(条),应用免疫荧光定量分析仪,可以对关节液标本定量检测和即时检测。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足,提供关节液 α 防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用。

[0006] 本发明提供了一种定量检测关节液 α 防御素的免疫荧光试纸条,所述试纸条包括反应膜1、样品垫2、吸收垫3和底板4;所述反应膜1位于所述底板4上,所述反应膜1上固定有检测带5和质控带6,所述样品垫2与所述反应膜1的一侧部分重叠并位于所述反应膜1和所述底板4上,所述吸收垫3与所述反应膜1的另一侧部分重叠并位于所述反应膜1和所述底板

4上,所述样品垫2上包括加样点7;其中所述检测带包被有荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体,所述质控带包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0007] 在一个方面中,所述底板4的材料选自ABS、PS、PE、PVC或PC中的任意一种;所述样品垫2或吸收垫3的材料选自纤维素、玻璃纤维或纺织聚合物中的任意一种;所述反应膜1的材料选自硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、尼龙膜或聚四氟乙烯膜中的任意一种。

[0008] 在一个方面中,所述抗 α 防御素抗体的终浓度为0.2mg/mL,包被量为1 μ L/cm;所述羊抗鼠IgG抗体的终浓度为1.0mg/mL,包被量为1 μ L/cm。

[0009] 在一个方面中,所述检测带5与质控带6之间的距离为约3.0mm,带的宽度为约0.8-1.0mm。

[0010] 本发明提供了一种定量检测关节液 α 防御素的免疫荧光试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 抗体的制备:采用基因工程方法制备抗 α 防御素抗体、羊抗鼠IgG抗体;采用荧光颗粒标记抗 α 防御素抗体;用含BSA的PBS稀释荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体至合适的浓度;再用同样的溶液稀释羊抗鼠IgG抗体至合适的浓度;

[0012] 2) 包被反应膜1的制备:采用喷膜机分别在反应膜1上喷印检测带5与质控带6,检测带5与质控带6之间保留合适的距离,检测带5与质控带6保留合适的宽度;抗 α 防御素抗体或羊抗鼠IgG抗体的包被量适合反应膜1;喷印完成后,干燥备用;

[0013] 3) 样品垫2的制备:用含BSA的PBS液浸泡样品垫2,处理后,干燥备用;

[0014] 4) 免疫荧光试纸条的制备:先将反应膜1粘附在底板4的中间位置上,在反应膜1的一侧粘附吸收垫3,反应膜1和吸收垫3的连接处重叠一部分;在反应膜1的另一侧粘附样品垫2,反应膜1和样品垫2的连接处重叠一部分;再将粘贴好反应膜1、样品垫2和吸收垫3的底板4裁切成合适宽度的细条。

[0015] 在一个方面中,所述步骤1)中用含1~10% (优选5%) BSA的1~20mM (优选10mM) PBS稀释荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体,使其终浓度为0.1~0.4mg/mL (优选0.2mg/mL);用同样的溶液稀释羊抗鼠IgG抗体,使其终浓度为0.5~2.0mg/mL (优选1.0mg/mL)。

[0016] 在一个方面中,所述步骤2)中检测带5与质控带6之间的距离约1.0~10mm (优选5.0mm),检测带5与质控带6的宽度约0.5~2.0mm (优选0.8~1.0mm);抗 α 防御素抗体或羊抗鼠IgG抗体的包被量分别为0.5~2 μ L/cm (优选1 μ L/cm)。

[0017] 在一个方面中,所述步骤3)中用含1~10% (优选5%) BSA的1~20mM (优选10mM) PBS液浸泡样品垫2;和/或,反应膜1和样品垫2的连接处重叠1-2mm;反应膜1和吸收垫3的连接处重叠1-2mm。

[0018] 本发明提供了关节液 α 防御素或抗 α 防御素抗体在制备用于诊断人工关节感染的试剂或试剂盒中的用途。

[0019] 本发明的积极效果包括:关节液 α 防御素诊断人工关节感染(PJI)具有较高的敏感性和特异性。抗干扰能力、稳定性等。关节液 α 防御素生物标志物的检测、免疫荧光诊断试剂盒(条)的研发及在PJI的应用研究,有望给PJI提供一种简便快速、个体化的辅助诊断方法。本发明的免疫荧光试纸条具有很强的检测敏感性、很好的抗干扰能力、很好的稳定性。其配套的检测分析仪方便携带,适合一般实验室应用,可以实现POCT,具有良好的应用和产业化前景。

附图说明

[0020] 图1:本发明的荧光免疫试纸条的结构示意图。图中标号说明:

[0021] 1、反应膜,2、样品垫,3、吸收垫,4、底板,5、检测带,6、质控带,7、加样点。

具体实施方式

[0022] 下述实验方法中所用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。在不背离本发明精神的情况下,本领域技术人员结合公知技术,可以对本发明做出诸多修改,这样的修改也落入本发明的保护范围之内。

[0023] 实施例1关节液 α 防御素免疫荧光试纸条的制备

[0024] 一、抗体的制备

[0025] 1) 采用基因工程方法制备抗 α 防御素抗体、羊抗鼠IgG抗体;抗体可通过实验室自行制备,或者可委托商业公司制备。

[0026] 2) 选择时间分辨荧光乳胶颗粒,在粒径、表面基团等方面进行筛选;比如,高分子聚苯乙烯微粒,直径100nm,内部包埋钨铬合物,具有时间分辨荧光的特征,微粒表面具有高密度功能团-COOH(上述颗粒及其参数不作为本发明的限制性条件);可从商业公司直接购买。

[0027] 3) 荧光颗粒标记抗体,采用共价包被法:取25mg颗粒用含0.1% Tween20、pH6.0、0.1mol/L的PBS缓冲液洗涤2次后,配成2.5mL悬液,使颗粒浓度为10mg/mL;取含10% 6-氨基正乙酸的PBS缓冲液120 μ L加入到上述悬液中,室温摇15min;加入含10% 碳化二亚胺(EDC)的PBS缓冲液100 μ L,室温摇1h;离心20min,弃上清,用PBS洗2次后,制成10mg/mL的悬液;加入抗体至浓度为2mg/mL,室温下摇30min;加入10% EDC和NHS各10 μ L,室温摇4h,加10% BSA缓冲液封闭过夜;离心,弃上清,加入2.5mL含1% BSA的PBS溶液,混悬,4 $^{\circ}$ C贮存。

[0028] 二、反应膜的制备

[0029] 1) 选取硝酸纤维素膜作为反应膜(可从商业公司直接购买),将膜裁剪成合适的大小。

[0030] 2) 使用含5% BSA的10mM PBS稀释荧光颗粒标记的抗 α 防御素抗体,使其终浓度为0.2mg/mL;使用同样的溶液稀释羊抗鼠IgG抗体,使其终浓度为1.0mg/mL。

[0031] 3) 采用喷膜机分别在反应膜上喷印检测带与质控带,检测带与质控带的宽度约0.8~1.0mm,检测带与质控带之间的距离约5.0mm;抗 α 防御素抗体或羊抗鼠IgG抗体的包被量分别为1 μ L/cm;喷印完成后,干燥备用。

[0032] 三、样品垫的制备

[0033] 使用含5% BSA的10mM PBS液浸泡样品垫,处理后,干燥备用。

[0034] 四、试纸条的组装

[0035] 按照图1所示,先将反应膜1粘附在底板4的中间位置上,在反应膜1的一侧粘附吸收垫3,反应膜1和吸收垫3的连接处重叠1-2mm;在反应膜1的另一侧粘附样品垫2,反应膜1和样品垫2的连接处重叠1-2mm;再将粘贴好反应膜1、样品垫2和吸收垫3的底板4裁切成5mm宽度的细条;封装于塑料外壳中,放于铝箔当中,4 $^{\circ}$ C密封保存。

[0036] 实施例2关节液标本和临床资料的收集

[0037] 经福建医科大学附属第一医院伦理委员会批准,收集人工关节置换术后因各种原因再次入院的患者关节液。同时,收集患者详细的临床资料。根据美国肌肉骨骼感染学会(MSIS)诊断标准,分成感染组22例与非感染组23例,将关节液离心后收集上清,冻存备用。在使用前,将储存的关节液化冻,室温下稳定后备用。

[0038] 实施例3采用ELISA方法检测关节液 α 防御素

[0039] 1) 取1mL关节液在8000rpm下离心4min,分离关节液上清液和细胞,吸取上清液移至EP管中,置于-80℃冰箱冻存待检。

[0040] 2) 根据ELISA试剂盒说明书方法,使用ELISA试剂盒(CUSABIO公司)对上清液中的 α 防御素进行检测,检测感染组及非感染组患者关节液中 α 防御素的含量,进行统计分析。

[0041] 3) 收集45例患者的临床资料,根据MSIS的诊断标准,诊断PJI的阈值。

[0042] 4) 实验结果如下:感染组中 α 防御素表达的中位数为321.2ng/mL (P25=226.9ng/mL, P75=450.5ng/mL),非感染组中 α 防御素表达的中位数为66.2ng/mL (P25=22.9ng/mL, P75=125.8ng/mL),两组间 α 防御素表达水平比较有统计学差异。通过 α 防御素表达水平的受试者工作特征曲线(ROC),确定诊断阈值为190ng/mL。通过检测关节液中的 α 防御素水平,22例感染组中,有19例患者确诊为PJI,23例非感染组中,有21例确诊为非感染者。

[0043] 实施例4关节液 α 防御素免疫荧光试纸条的敏感性检测

[0044] 一、关节液的预处理

[0045] 1) 选择 α 防御素的表达量接近中位数的感染患者样本,取一定量的关节液,将其分为5份,其中4份加入PBS缓冲液,按梯度稀释10倍、20倍、50倍、100倍,混匀后备用。

[0046] 3) 选择非感染者的样本,取一定量的关节液,不用稀释,备用。

[0047] 二、免疫荧光试纸条检测

[0048] 1) 感染患者的样品作为实验组T,非感染者的样品作为对照组C。

[0049] 2) 每个样品分别与10个免疫荧光试纸条检测10次,10次检测仪器判读的样品检测T值和对照C值分别取平均值,得出每个稀释浓度下对应的T、C结果。

[0050] 3) 检测结果如下表所示。

[0051]

感染患者 样本稀释 倍数	无稀释	10 倍	20 倍	50 倍	100 倍
T 平均值	4253.2 9	399.15	200.78	78.94	36.26
非感染者 样本稀释 倍数	无稀释				
C 平均值	13.21				

[0052] 由免疫荧光试纸条的检测结果可以看出,当感染患者的关节液被稀释100倍后,仍然能够与未稀释的非感染者进行区分。以上结果说明,本发明的免疫荧光试纸条具有很强的检测敏感性。

[0053] 实施例5关节液 α 防御素免疫荧光试纸条的抗干扰能力检测

[0054] 一、关节液的预处理

[0055] 1) 选择 α 防御素的表达量接近中位数的感染患者样本,取一定量的关节液,分成两份,选择其中一份,再分成三小份,备用。

[0056] 2) 选择另一份感染患者关节液,再分成三小份;向其中分别加入血红蛋白、三酰甘油(TG)、胆固醇,使其浓度分别达到4g/L、20mmol/L、15mmol/L,混匀后备用。

[0057] 3) 如果在加入干扰物的过程中,存在稀释感染患者关节液的情形,那么,其对应的未加入干扰物的感染患者关节液,就添加PBS缓冲液稀释到与之相同的倍数。

[0058] 二、免疫荧光试纸条检测

[0059] 1) 加入干扰物的感染患者的样品作为实验组T,未加入干扰物的感染患者的样品作为对照组C。

[0060] 2) 每个样品分别与10个免疫荧光试纸条检测10次,10次检测仪器判读的样品检测T值和对照C值分别取平均值,得出每种类型样品对应的T、C结果。

[0061] 3) 检测结果如下表所示。

[0062]

加入干扰物的 感染患者样本	4g/L 血 红蛋白	20mmol/L 三酰甘油	15mmol/L 胆固醇
T 平均值	3184.36	3879.84	3812.35
未加入干扰物 的感染患者样 本	无干扰物	无干扰物	无干扰物

[0063]

C 平均值	4106.09	4195.73	4161.53
-------	---------	---------	---------

[0064] 由免疫荧光试纸条的检测结果可以看出,当感染患者的关节液加入干扰物后,关节液的粘度大幅度升高,对于荧光检测结果存在一定的影响。但是,根据检测结果仍然能够对感染者样本的 α 防御素进行定量分析。以上结果说明,本发明的免疫荧光试纸条具有很好的抗干扰能力。

[0065] 实施例6关节液 α 防御素免疫荧光试纸条的稳定性检测

[0066] 一、关节液的预处理

[0067] 1) 选择一批免疫荧光试纸条,37℃下放置14d,备用。

[0068] 2) 选择另一批免疫荧光试纸条,室温下放置6个月,备用。

[0069] 3) 在开展检测实验前,采用之前实施例1的制备方法重新制备一批新的免疫荧光试纸条。

[0070] 4) 选择 α 防御素的表达量接近中位数的感染患者样本,取一定量的关节液,分成三份,备用。

[0071] 二、免疫荧光试纸条检测

[0072] 1) 37℃下放置14d的免疫荧光试纸条作为实验组T1,室温下放置6个月的免疫荧光试纸条作为实验组T2,重新制备的免疫荧光试纸条作为对照组C。

[0073] 2) 分别选用三种类型的10个免疫荧光试纸条,对感染患者样本检测10次,10次检测仪器判读的样品检测T1值、T2值和对照C值分别取平均值,得出每种类型的免疫荧光试纸条对应的T、C结果。

[0074] 3) 检测结果如下表所示。

[0075]

免疫荧光试 纸条类型	37℃放置 14d	室温放置 6个月	免疫荧光试 纸条类型	新制备
T 平均值	3949.62	3887.99	C 平均值	4093.06

[0076] 由免疫荧光试纸条的检测结果可以看出,当免疫荧光试纸条在37℃中放置14d和

室温中放置6个月后,对于荧光检测结果的影响很小,定量分析的检测结果仍然真实可信。以上结果说明,本发明的免疫荧光试纸条具有很好的稳定性。

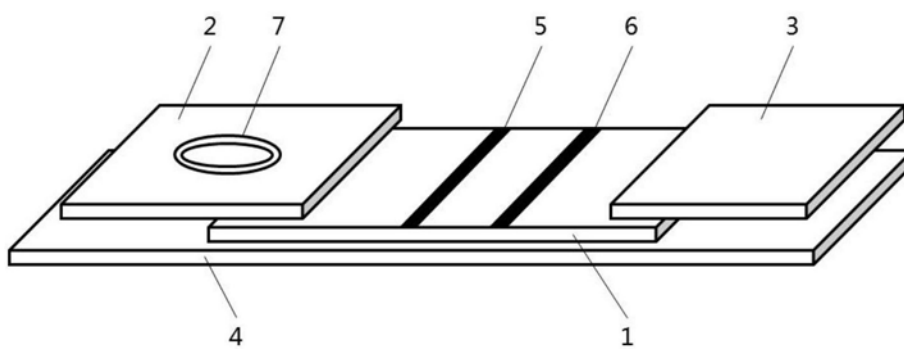


图1

专利名称(译)	关节液α防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用		
公开(公告)号	CN108593924A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201810211804.4	申请日	2018-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学附属第一医院		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学附属第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学附属第一医院		
[标]发明人	张文明 李文波 康加祥 洪海峰 汪大明 白国昌 张翀景		
发明人	张文明 李文波 康加祥 洪海峰 汪大明 白国昌 张翀景		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/6887 G01N2800/10		
代理人(译)	陈晓蕾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及关节液α防御素在人工关节感染的检测及诊断试剂盒中的应用。关节置换术是治疗终末期关节疾病的有效治疗方式。但是关节假体周围感染是关节置换术后严重的并发症。关节液α防御素诊断人工关节感染具有较高的敏感性和特异性。用荧光颗粒作为标记物，通过免疫层析方法制备关节液α防御素的诊断试剂盒(试纸条)。应用免疫荧光定量分析仪，可以对关节液标本进行定量检测和即时检测，实现诊断人工关节感染。本申请中的关节液α防御素检测试剂和诊断试剂盒使用简单，反应灵敏，诊断准确性高。

