



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102411052 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201110365180. X

(22) 申请日 2011. 11. 17

(73) 专利权人 成都创宜生物科技有限公司

地址 610041 四川省成都市高新区科园南路
88 号天府生命科技园 B7-302

(72) 发明人 胡怀忠

(74) 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任
公司 51202

代理人 黄幼陵

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2010/0016173 A1, 2010. 01. 21,

CN 202351243 U, 2012. 07. 25,

Katsuhiko Naruse. Peripheral blood

concentrations of adiponectin an
adipocyte-speciﬁ

c plasma protein, in normal pregnancy
and preeclampsia. 《Journal of Reproductive
Immunology》. 2005, 第 65 卷第 65-75 页.

AnneM. Lynch. Alternative complement
pathway activation fragment Bb in early
pregnancy as a predictor of preeclampsia.
《American Journal of Obstetrics &
Gynecology》. 2008, 第 385e1-385e9 页.

Guillermina Girardi. Complement
activation in animal and human pregnancies
as a model for immunological recognition.
《Molecular Immunology》. 2011, 第 48 卷第
1621-1630 页.

审查员 刘迎鸣

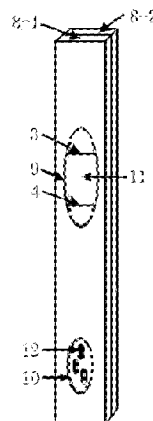
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

以补体因子 D 为检测指标的子痫前期快速检测
工具与试剂盒及制作方法

(57) 摘要

以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测
工具, 由吸水纸、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫
由上至下依次相接固定在底板上构成, 所述金标
垫被样品垫部分覆盖; 硝酸纤维素膜上设置有由
兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多
克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体包被形
成的检测线和由羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体
包被形成的控制线, 检测线位于控制线之下且它
们之间相隔有间距; 金标垫为吸水材料制作且包
被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物的垫
体。以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测
盒, 由外壳和装入外壳内的上述检测工具构成。上
述快速检测工具的制作方法: (1) 检测线、控制线
的包被; (2) 金标垫的制备; (3) 组合。



CN 102411052 B

1. 以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具,其特征在于包括底板(1)、吸水垫(2)、硝酸纤维素膜(5)、金标垫(6)和样品垫(7),所述吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接固定在底板上,且金标垫的一部分被样品垫覆盖;

硝酸纤维素膜(5)上设置有由兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体包被形成的检测线(4)和由羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体包被形成的控制线(3),检测线位于控制线之下且它们之间相隔有间距;

金标垫(6)为吸水材料制作且包被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物的垫体,所述吸水材料为玻璃纤维、聚酯纤维膜、无纺布、纤维素滤纸中的一种。

2. 根据权利要求1所述的以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具,其特征在于所述检测线(4)和控制线(3)的宽度为 0.5mm ~ 1mm。

3. 根据权利要求1或2所述的以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具,其特征在于所述检测线(4)与控制线(3)之间的间距为 4mm ~ 12mm。

4. 根据权利要求1或2所述的以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具,其特征在于它的形状为矩形条。

5. 以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒,其特征在于由外壳(8)和装入外壳内的检测工具构成;

所述检测工具包括底板(1)、吸水垫(2)、硝酸纤维素膜(5)、金标垫(6)和样品垫(7),所述吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接固定在底板上,且金标垫被样品垫部分覆盖,硝酸纤维素膜(5)上设置有由兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体包被形成的检测线(4)和由羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体包被形成的控制线(3),检测线位于控制线之下且它们之间相隔有间距,金标垫(6)为包被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物的玻璃纤维;

所述外壳(8)的内腔与检测工具的形状和尺寸相匹配,所述外壳(8)的侧壁设置有加样孔(10)和观察孔(9),所述加样孔(10)的设置位置与检测工具装入外壳后其样品垫(7)的位置相对应,所述观察孔(9)的设置位置与检测工具装入外壳后其检测线(4)和控制线(3)的位置相对应。

6. 根据权利要求5所述的以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒,其特征在于所述外壳(8)由两个设置有凹槽腔体的盒体(8-1、8-2)组合而成。

7. 根据权利要求6所述的以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒,其特征在于两个设置有凹槽腔体的盒体(8-1、8-2)的连接方式为卡接或扣连。

8. 一种以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的制作方法,其特征在于步骤如下:

(1) 检测线、控制线的包被

①以 pH = 7.2 ~ 7.4 的磷酸盐缓冲液、或者 pH = 8 ~ 10 的碳酸盐缓冲液、或者 pH = 8.3 ~ 9.3 的硼酸盐缓冲液、或者 pH = 7.2 ~ 7.4 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体浓度为 0.75mg/mL ~ 5mg/mL 的检测线溶液;以 pH = 7.2 ~ 7.4 的磷酸盐缓冲液、或者 pH = 8 ~ 10 的碳酸盐缓冲液、或者 pH = 8.3 ~ 9.3 的硼酸盐缓冲液、或

者 pH=7.2 ~ 7.4 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体为溶质,配制羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体浓度不低于 1mg/mL 的控制线溶液;

②将硝酸纤维素膜贴在底板上,根据控制线、检测线所要求的宽度及它们之间的间距设定划膜机的参数,通过划膜机将所述控制线溶液、检测线溶液包被在硝酸纤维素膜上,然后将完成包被后的硝酸纤维素膜-底板组合体在 37°C 干燥至少 8h;

(2) 金标垫的制备

①取氯金酸溶解于三蒸水中,形成氯金酸浓度为 0.1 ~ 0.2g/100mL 的氯金酸水溶液,并加热至溶液沸腾,在搅拌下将浓度为 0.9 ~ 1.1g/100mL 的柠檬酸三钠水溶液加入到沸腾的氯金酸水溶液中,柠檬酸三钠水溶液与氯金酸水溶液的体积比为 1.35 ~ 1.5:50,当所述混合液呈现透明的酒红色时停止加热,让其自然冷却至室温后用 K_2CO_3 溶液调节 pH 至 6 ~ 7.5,即获得胶体金溶液;

②以 pH = 7.2 ~ 7.4 的磷酸盐缓冲液、或 pH=7.2 ~ 7.4 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制浓度为 0.1mg/mL ~ 2mg/mL 的鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液,将所述鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液与步骤①制备的胶体金溶液混合,所述混合液中,鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体的浓度为 10 μ g/mL ~ 20 μ g/mL,当混合均匀后,将所述混合液摇床标记 20min ~ 30min,然后加入牛血清白蛋白溶液并继续摇床标记 20min ~ 30min,牛血清白蛋白溶液的加入量以牛血清白蛋白在混合液中的浓度达到 0.1g/100mL 为限,标记结束后以 8000 转/分 ~ 12,000 转/分离心 30min ~ 40min,获得的分离产物即为金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于金标复溶液中,配制成浓度 0.2mg/mL ~ 0.4mg/mL 的金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液,所述金标复溶液是将三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、叠氮钠溶于双蒸水中而成,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.01mol/L ~ 0.02mol/L,牛血清白蛋白的浓度为 0.1g/100mL ~ 1g/100mL,叠氮钠的浓度为 0.2g/100mL;

③通过喷金标机将金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液喷在制作金标垫的吸水材料上,然后将喷有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液的吸水材料在 37°C 干燥至少 8h,即获金标垫,所述制作金标垫的吸水材料为玻璃纤维、聚酯纤维膜、无纺布、纤维素滤纸中的一种;

(3) 组合

将吸水垫、金标垫和样品垫固定在完成包被后的硝酸纤维素膜-底板组合体中的底板上,即形成所述快速检测工具;吸水垫、金标垫和样品垫的固定位置是使吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接,且金标垫被样品垫部分覆盖。

9. 根据权利要求 8 所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的制作方法,其特征在于:

配制检测线溶液和控制线溶液的磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01mol/L ~ 0.02mol/L,碳酸盐缓冲液的浓度为 0.05mol/L,硼酸盐缓冲液的浓度为 0.005mol/L,三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液的浓度为 0.05mol/L;

配制鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液的磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01mol/L ~ 0.02mol/L,三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液的浓度为 0.05mol/L。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的制作

方法,其特征在于吸水垫由吸水纸制作,样品垫由玻璃纤维、聚酯纤维膜、无纺布或纤维素滤纸制作;喷金标机的喷量为 $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2 \sim 4 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

以补体因子 D 为检测指标的子痫前期快速检测工具与试剂盒及制作方法

技术领域

[0001] 本发明属于医用检测工具,特别涉及一种检测妊娠期妇女子痫前期(preeclampsia,简称PE)的检测工具。

背景技术

[0002] 子痫前期(preeclampsia,简称PE)是发生于妊娠20周后的产科并发症,是孕妇和围产儿死亡的主要原因之一。子痫前期在全世界范围内孕产妇中的发病率为2-8%,在我国孕产妇中的发病率可达10%。重度子痫前期患者可出现高血压、水肿和重度蛋白尿等严重的临床表现,还容易并发肺水肿、肾功能衰竭、HELLP综合症等不良结局,远期罹患心血管疾病、肾脏疾病和代谢性疾病的风险也明显增高。对于胎儿而言,孕周越小,存活率越低,孕32周之前的早产儿,死亡率高达50%,新生儿发生窒息、颅内出血、感染等严重并发症的机率达5-10%,远期的代谢性疾病、心血管疾病的发病率也增加,严重影响了子代的健康,给家庭及社会带来沉重的心理及经济负担。

[0003] 现有技术关于子痫前期的临床诊断需满足如下三个依据:(1)孕产妇自诉有头痛、头晕等临床症状;(2)经临床医生检测,孕产妇的血压符合高血压诊断标准,收缩压/舒张压 $\geq 140/90$ mmHg;(3)24小时尿白蛋白定量检测结果为24小时蛋白尿 ≥ 0.3 g/day。24小时尿白蛋白定量检测需收集患者连续24小时的尿样进行检测。这种方法采集样本的方法繁琐,耗时长。

[0004] Adipsin(又名factor D,或complement factor D,中文名为“补体因子D”)是脂肪细胞产生的一种丝氨酸蛋白酶,存在于循环血液中,与机体的脂肪代谢密切相关。健康妊娠妇女和患有子痫前期的妊娠妇女循环血液中的Adipsin含量稳定,两组之间没有显著性差异。但是,由于患有子痫前期的妊娠妇女存在血管内皮损伤,肾脏的血管内皮细胞损伤造成肾脏渗透和回收功能受损,导致高浓度的Adipsin出现在患有子痫前期的妊娠妇女的尿样本中,因此,可以基于这一研究基础将Adipsin作为子痫前期的诊断与预测指标。目前尚未发现以尿样本中的Adipsin含量为检测指标的子痫前期检测工具与检测盒的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种以尿样本中所含的Adipsin为检测指标的子痫前期快速检测工具与检测盒及所述快速检测工具的制作方法,以实现无创检测,且能快速获得检测结果。

[0006] 本专利申请的发明人通过实验发现:Adipsin在健康妊娠妇女和患有子痫前期的妊娠妇女循环血液中含稳定,子痫前期组血液中Adipsin的含量为 2929.37 ± 814.08 ng/mL,健康妊娠组血液中Adipsin的含量为 2359.76 ± 667.63 ng/mL,两组之间没有显著性差异。但是,由于患有子痫前期的妊娠妇女存在血管内皮损伤,肾脏的血管内皮细胞损伤造成肾脏渗透和回收功能受损,导致高浓度的Adipsin出现在患有子痫

前期的妊娠妇女的尿样本中,蛋白芯片筛选实验发现:确诊的子痫前期产妇与确诊的非子痫前期产妇相比(两组产妇的年龄与妊娠周龄匹配,无基础疾病,无其他妊娠合并症),尿样本中的 Adipsin 浓度具有明显差异,定量研究发现:子痫前期组尿样本中 Adipsin 的含量为 $349.04 \pm 557.10 \text{ ng/mL}$,健康妊娠组尿样本中 Adipsin 的含量为 $8.69 \pm 6.34 \text{ ng/mL}$,由于子痫前期组与健康妊娠组尿样本中 Adipsin 的含量存在显著差异,因此可将尿样本中 Adipsin 的含量作为判断妊娠妇女是否患有子痫前期的检测指标。

[0007] 本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具包括底板、吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫,所述吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接固定在底板上,且金标垫被样品垫部分覆盖;硝酸纤维素膜上设置有由兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体包被形成的检测线和由羊抗鼠免疫球蛋白 G(羊抗鼠 IgG, Immunoglobulin G, IgG) 多克隆抗体包被形成的控制线,检测线位于控制线之下且它们之间相隔有间距;金标垫为吸水材料制作且包被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物的垫体,制作金标垫的吸水材料为玻璃纤维、聚酯纤维膜、无纺布或纤维素滤纸。

[0008] 本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒,由外壳和装入外壳内的上述检测工具构成;所述外壳的内腔与检测工具的形状和尺寸相匹配,所述外壳的侧壁设置有加样孔和观察孔,所述加样孔的设置位置与检测工具装入外壳后其样品垫的位置相对应,所述观察孔的设置位置与检测工具装入外壳后其检测线和控制线的位置相对应。

[0009] 所述外壳可以是整体式结构,也可以是分体式结构,从便于安装检测工具的角度考虑,本发明优选分体式结构的外壳。本发明所述外壳由两个设置有凹槽腔体的盒体组合而成,两盒体的连接方式可以是卡接、扣连、螺纹连接等,优选卡接与扣连。

[0010] 上述检测工具中,所述检测线和控制线的宽度优选 $0.5 \text{ mm} \sim 1 \text{ mm}$;所述检测线与控制线之间的间距优选 $4 \text{ mm} \sim 12 \text{ mm}$ 。检测工具的形状无严格要求,从节约成本、方便制作的角度考虑,其形状优选矩形条。所述吸水垫是由吸水纸制作的垫体,所述样品垫是由具有吸水功能的玻璃纤维、聚酯纤维膜、纤维素滤纸或无纺布制作的垫体。

[0011] 本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具,其制作方法如下:

[0012] (1) 检测线、控制线的包被

[0013] ①以 $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$ 的磷酸盐缓冲液、或者 $\text{pH} = 8 \sim 10$ 的碳酸盐缓冲液、或者 $\text{pH} = 8.3 \sim 9.3$ 的硼酸盐缓冲液、或者 $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$ 的三羟甲基氨基甲烷盐(Tris 盐)缓冲液为溶剂,以兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体浓度为 $0.75 \text{ mg/mL} \sim 5 \text{ mg/mL}$ 的检测线溶液;以 $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$ 的磷酸盐缓冲液、或者 $\text{pH} = 8 \sim 10$ 的碳酸盐缓冲液、或者 $\text{pH} = 8.3 \sim 9.3$ 的硼酸盐缓冲液、或者 $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$ 的三羟甲基氨基甲烷盐(Tris 盐)缓冲液为溶剂,以羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体为溶质,配制羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体浓度不低于 1 mg/mL 的控制线溶液;

[0014] ②将硝酸纤维素膜贴在底板上,根据控制线、检测线所要求的宽度及它们之间的间距设定划膜机的参数,通过划膜机将所述控制线溶液、检测线溶液包被在硝酸纤维素膜上,然后将完成包被后的硝酸纤维素膜-底板组合体在 37°C 干燥至少 8h;

[0015] (2) 金标垫的制备

[0016] ①取氯金酸溶解于三蒸水中,形成氯金酸浓度为 0.1 ~ 0.2g/100mL 的氯金酸水溶液,并加热至溶液沸腾,在搅拌下将浓度为 0.9 ~ 1.1g/100mL 的柠檬酸三钠水溶液加入到沸腾的氯金酸水溶液中,柠檬酸三钠水溶液与氯金酸水溶液的体积比为 1.35 ~ 1.5 : 50,当所述混合液呈现透明的酒红色时停止加热,让其自然冷却至室温后用 K_2CO_3 溶液调节 pH 至 6 ~ 7.5,即获得胶体金溶液;

[0017] ②以 pH = 7.2 ~ 7.4 的磷酸盐缓冲液、或 pH = 7.2 ~ 7.4 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制浓度为 0.1mg/mL ~ 2mg/mL 的鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液,将所述鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液与步骤①制备的胶体金溶液混合,所述混合液中,鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体的浓度为 10 μ g/mL ~ 20 μ g/mL,当混合均匀后,将所述混合液摇床标记 20min ~ 30min,然后加入牛血清白蛋白溶液并继续摇床标记 20min ~ 30min,牛血清白蛋白溶液的加入量以牛血清白蛋白在混合液中的浓度达到 0.1g/100mL 为限,标记结束后以 8000 转 / 分 ~ 12,000 转 / 分离心 30min ~ 40min,获得的分离产物即为金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于金标复溶液中,配制成浓度 0.2mg/mL ~ 0.4mg/mL 的金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液,所述金标复溶液是将三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、叠氮钠溶于双蒸水中而成,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.01mol/L ~ 0.02mol/L,牛血清白蛋白的浓度为 0.1g/100mL ~ 1g/100mL,叠氮钠的浓度为 0.2g/100mL;

[0018] ③通过喷金标机将金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液喷在制作金标垫的吸水材料上,然后将喷有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液的吸水材料在 37°C 干燥至少 8h,即获金标垫;

[0019] (3) 组合

[0020] 将吸水垫、金标垫和样品垫固定在完成包被后的硝酸纤维素膜 - 底板组合体中的底板上,即形成所述快速检测工具;吸水垫、金标垫和样品垫的固定位置是使吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接,且金标垫被样品垫部分覆盖。

[0021] 上述方法中,配制检测线溶液和控制线溶液的磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01mol/L ~ 0.02mol/L,碳酸盐缓冲液的浓度为 0.05mol/L,硼酸盐缓冲液的浓度为 0.005mol/L,三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液的浓度为 0.05mol/L;配制鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液的磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01mol/L ~ 0.02mol/L,三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液的浓度为 0.05mol/L。

[0022] 上述方法中,制作金标垫的吸水材料为玻璃纤维、聚酯纤维膜、无纺布、纤维素滤纸中的一种,吸水垫由吸水纸制作,样品垫由玻璃纤维、聚酯纤维膜、无纺布或纤维素滤纸制作;喷金机的喷量优选 2 μ L/cm² ~ 4 μ L/cm²。

[0023] 使用本发明所述检测工具和检测盒,当控制线位置可见一条清晰的紫红色线,证明本发明所述快速检测工具有效;在本发明所述快速检测工具有效的情况下,当检测线位置可见一条清晰的紫红色线,此结果判定为阳性(即患有子痫前期);若检测线位置没有紫红色线出现,则判定为阴性(即未患有子痫前期)。

[0024] 本发明所述检测工具和检测盒具有以下有益效果:

[0025] 1、本发明为子痫前期的检测提供了一种采用新检测指标的新型检测工具。

[0026] 2、使用本发明所述检测盒对确诊子痫前期组和确诊健康妊娠妇女进行采样检测，检测结果表明：该检测盒的敏感性为 90% 左右，特异性为 80% 左右。

[0027] 3、使用本发明所述检测盒，操作简单，检测一个样品仅需 5-10 分钟，与临床上通常的现有检测方法相比，检测速度大幅度提高。

[0028] 4、由于检测样品是妊娠妇女的尿样本，因而是一种无创检测。

[0029] 5、本发明所述检测工具和检测盒结构简单，易于加工制作，生产成本低，便于工业化生产。

[0030] 本发明所述检测工具和检测盒适用于所有妊娠期妇女。

附图说明

[0031] 图 1 是本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的一种结构示意图；

[0032] 图 2 是图 1 的左视图；

[0033] 图 3 是本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒外壳的一种结构示意图；

[0034] 图 4 是图 3 的 A-A 剖视图；

[0035] 图 5 是本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒的一种结构示意图。

[0036] 图中，1- 底板，2- 吸水垫，3- 控制线，4- 检测线，5- 硝酸纤维素膜，6- 金标垫，7- 样品垫，8- 外壳（8-1：第一箱体、8-2：第二箱体），9- 观察孔，10- 加样孔，11- 检测工具，12- 待测样品中的 Adipsin。

具体实施方式

[0037] 下面结合附图对本发明所述以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具与检测盒的结构、制作方法和使用方法做进一步说明。

[0038] 下述实施例中涉及的主要材料及设备来源如下：

[0039] 兔抗人 Adipsin 多克隆抗体，购自美国 RayBiotec 公司；

[0040] 羊抗人 Adipsin 多克隆抗体，购自美国 R&D 公司；

[0041] 鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体，购自美国 R&D 公司

[0042] 羊抗鼠免疫球蛋白 G 多克隆抗体，购自武汉博士德公司

[0043] 碳酸盐缓冲液 (CB)，购自美国 sigma 公司；

[0044] 磷酸盐缓冲液 (PBS)，购自美国 sigma 公司；

[0045] 三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液 (Tris 盐缓冲液)，购自美国 sigma 公司；

[0046] 牛血清白蛋白，购自美国 sigma 公司；

[0047] 喷金标机，型号 HGS510-1，杭州峰航科技有限公司；

[0048] 连续划膜机，型号 HGS101-2，杭州峰航科技有限公司。

[0049] 实施例 1

[0050] 本实施例中，以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具如图 1、图 2 所示，其形状为矩形条，其构造包括底板 1、吸水垫 2、硝酸纤维素膜 5、金标垫 6 和样品垫 7，所述

吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接粘贴在底板上,且金标垫被样品垫部分覆盖。底板 1 由医用塑料高白度 PVC 片材制作,上面涂布压敏胶,对生物活性分子具有惰性;吸水垫 2 选用吸水性能好的吸水纸,型号 H5076;硝酸纤维素膜 5 上设置有由兔抗人 Adipsin 多克隆抗体包被形成的检测线 4 和由羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被形成的控制线 3,检测线 4 位于控制线 3 之下,它们的宽度均为 0.6mm(或 0.8mm 或 0.9mm),它们之间的间距为 5mm(或 4mm 或 6mm 或 8mm 或 12mm);金标垫 6 为玻璃纤维制作且包被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物的垫体;样品垫是由玻璃纤维制作的垫体。

[0051] 本实施例中,以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的制作方法如下:

[0052] (1) 检测线、控制线的包被

[0053] ①以 pH = 7.2、浓度为 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液为溶剂,以兔抗人 Adipsin 多克隆抗体为溶质,配制兔抗人 Adipsin 多克隆抗体浓度为 1.5mg/mL 的检测线溶液;以 pH = 7.2、浓度为 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液为溶剂、以羊抗鼠免疫球蛋白 G(简称羊抗鼠 IgG)多克隆抗体为溶质,配制羊抗鼠 IgG 多克隆抗体浓度为 1mg/mL 的控制线溶液。

[0054] ②将硝酸纤维素膜贴在片状底板材料上,将已贴硝酸纤维素膜的片状底板材料放置在连续划膜机上,将控制线/检测线间距标准卡放置在所述片状底板材料的一侧以确定包被(划膜)时控制线/检测线的位置,根据控制线 3、检测线 4 所要求的宽度及它们之间的间距设定连续划膜机中的参数,然后操作连续划膜机将所述控制线溶液、检测线溶液包被在硝酸纤维素膜上;

[0055] ③将完成包被(划膜)后的硝酸纤维素膜-片状底板材料组合体用电热恒温干燥箱在 37°C 干燥 12h。

[0056] (2) 金标垫的制备

[0057] ①取氯金酸溶解于三蒸水中,形成氯金酸浓度为 0.2g/100mL 的氯金酸水溶液,并加热至溶液沸腾,在搅拌下将浓度为 1g/100mL 的柠檬酸三钠溶液加入到沸腾的氯金酸水溶液中,柠檬酸三钠水溶液与氯金酸水溶液的体积比为 1.4 : 50,当所述溶液呈现透明的酒红色(加热 6min 左右)时停止加热,让其自然冷却至室温后用 K_2CO_3 溶液调节 pH 至 7.5,即获得胶体金溶液(胶体金颗粒的平均粒径为 40nm);

[0058] ②以 pH = 7.2、浓度为 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液为溶剂,以鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制浓度为 1mg/mL 的鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液,将所述鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液 10 μ L 与 1mL 步骤(1)制备的胶体金溶液混合,当混合均匀后,用锡箔纸将离心管包好,摇床标记 30min;然后加入浓度为 5g/100mL 的牛血清白蛋白溶液 20 μ L 并混匀,继续摇床标记 20min。标记结束后以 11,000 转/分离心 30 分钟,获得的分离产物即为金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于 50 μ L 金标复溶液中,即获得浓度为 0.2mg/mL 的金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液(4°C 贮存备用);所述金标复溶液是将三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、叠氮钠溶于双蒸水中而成,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.02mol/L,牛血清白蛋白的浓度为 1g/100mL,叠氮钠的浓度为 0.2g/100mL;

[0059] ③将制作金标垫的玻纤裁成 7cm \times 30cm,放置在喷金标机的运行平台上,设定喷量为 4 μ L/cm²,操作喷金标机使其注射泵和管线充满金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液并完成喷金操作,将喷有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液的玻纤用电热恒

温干燥箱在 37℃干燥 12h,即获金标垫。

[0060] (3) 组合

[0061] 将片状吸水垫、片状金标垫和片状样品用压敏胶垫粘在完成划膜后的硝酸纤维素膜-片状底板材料组合体中的片状底板材料上,然后切成 60mm×4mm 矩形条,所述矩形条即为本实施例所述快速检测工具;所述片状吸水垫、片状金标垫和片状样品垫的粘贴位置是使吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接,且金标垫被样品垫部分覆盖。

[0062] 实施例 2

[0063] 本实施例中,以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具如图 1、图 2 所示。与实施例 1 不同之处是:硝酸纤维素膜 5 上设置的检测线 4 由羊抗人 Adipsin 多克隆抗体包被形成,检测线 4、控制线 3 的宽度均为 0.5mm(或 0.7mm 或 1mm),它们之间的间距为 5mm(或 7mm 或 9mm);金标垫 6 为聚酯纤维膜制作且包被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物;样品垫是由聚酯纤维膜制作的垫体。

[0064] 本实施例中,以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的制作方法如下:

[0065] (1) 检测线、控制线的包被

[0066] ①以 pH = 9、浓度为 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液为溶剂,以羊抗人 Adipsin 多克隆抗体为溶质,配制羊抗人 Adipsin 多克隆抗体浓度为 3.0mg/mL 的检测线溶液;以 pH = 9、浓度为 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液为溶剂、以羊抗鼠免疫球蛋白 G(简称羊抗鼠 IgG)多克隆抗体为溶质,配制羊抗鼠 IgG 多克隆抗体浓度为 1mg/mL 的控制线溶液。

[0067] ②包被的操作与实施例 1 相同。

[0068] (2) 金标垫的制备

[0069] ①取氯金酸溶解于三蒸水中,形成氯金酸浓度为 0.1g/100mL 的氯金酸水溶液,并加热至溶液沸腾,在搅拌下将浓度为 0.9g/100mL 的柠檬酸三钠溶液加入到沸腾的氯金酸水溶液中,柠檬酸三钠水溶液与氯金酸水溶液的体积比为 1.5 : 50,当所述溶液呈现透明的酒红色(加热 6min 左右)时停止加热,让其自然冷却至室温后用 K₂CO₃ 溶液调节 pH 至 7,即获得胶体金溶液(胶体金颗粒的平均粒径为 40nm);

[0070] ②以 pH = 7.4、浓度为 0.05mol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制浓度为 0.6mg/mL 的鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液,将所述鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液与步骤(1)制备的胶体金溶液混合,所述混合液中,鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体的浓度为 15 μg/mL,当混合均匀后,用锡箔纸将离心管包好,摇床标记 20min;然后加入浓度为 5g/100mL 的牛血清白蛋白溶液并混匀,继续摇床标记 30min,牛血清白蛋白溶液的加入量以牛血清白蛋白在混合液中的浓度达到 0.1g/100mL 为限,标记结束后以 10,000 转/分离心 40 分钟,获得的分离产物即为金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于金标复溶液配制成浓度 0.3mg/mL 的金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液(4℃贮存备用),所述金标复溶液是将三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、叠氮钠溶于双蒸水中而成,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.01mol/L,牛血清白蛋白的浓度为 0.5g/100mL,叠氮钠的浓度为 0.2g/100mL;

[0071] ③将制作金标垫的玻纤裁成 7cm×30cm,放置在喷金标机的运行平台上,设定喷量为 3 μL/cm²,操作喷金标机使其注射泵和管线充满金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物

溶液并完成喷金操作,将喷有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液的玻纤用电热恒温干燥箱在 37℃干燥 10h,即获金标垫。

[0072] (3) 组合

[0073] 组合的方式与实施例 1 相同。

[0074] 实施例 3

[0075] 本实施例中,以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具如图 1、图 2 所示。与实施例 1 不同之处是:硝酸纤维素膜 5 上设置的检测线 4 由鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体包被形成,检测线 4、控制线 3 的宽度均为 0.5mm 或 0.8mm,它们之间的间距为 6mm 或 10mm;金标垫 6 为无纺布制作且包被有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物;样品垫是由无纺布制作的垫体。

[0076] 本实施例中,以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测工具的制作方法如下:

[0077] (1) 检测线、控制线的包被

[0078] ①以 pH = 7.4、浓度为 0.05mol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体浓度为 4.5mg/mL 的检测线溶液;以 pH = 7.4、浓度为 0.05mol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂、以羊抗鼠免疫球蛋白 G(简称羊抗鼠 IgG)多克隆抗体为溶质,配制羊抗鼠 IgG 多克隆抗体浓度为 1mg/mL 的控制线溶液。

[0079] ②包被的操作与实施例 1 相同。

[0080] (2) 金标垫的制备

[0081] ①取氯金酸溶解于三蒸水中,形成氯金酸浓度为 0.15g/100mL 的氯金酸水溶液,并加热至溶液沸腾,在搅拌下将浓度为 1.1g/100mL 的柠檬酸三钠溶液加入到沸腾的氯金酸水溶液中,柠檬酸三钠水溶液与氯金酸水溶液的体积比为 1.35 : 50,当所述溶液呈现透明的酒红色(加热 6min 左右)时停止加热,让其自然冷却至室温后用 K_2CO_3 溶液调节 pH 至 6.5,即获得胶体金溶液(胶体金颗粒的平均粒径为 40nm);

[0082] ②以 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液为溶剂,以鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体为溶质,配制浓度为 1.5mg/mL 的鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液,将所述鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体溶液与步骤 (1) 制备的胶体金溶液混合,所述混合液中,鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体的浓度为 20 μ g/mL,当混合均匀后,用锡箔纸将离心管包好,摇床标记 25min;然后加入浓度为 5g/100mL 的牛血清白蛋白溶液并混匀,继续摇床标记 25min,牛血清白蛋白溶液溶液的加入量以牛血清白蛋白在混合液中的浓度达到 0.1g/100mL 为限,标记结束后以 8,000 转 / 分离心 40 分钟,获得的分离产物即为金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于金标复溶液配制成浓度 0.4mg/mL 的金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液(4℃贮存备用),所述金标复溶液是将三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、叠氮钠溶于双蒸水中而成,三羟甲基氨基甲烷的浓度为 0.015mol/L,牛血清白蛋白的浓度为 0.3g/100mL,叠氮钠的浓度为 0.2g/100mL;

[0083] ③将制作金标垫的玻纤裁成 7cm×30cm,放置在喷金标机的运行平台上,设定喷量为 2 μ L/cm²,操作喷金标机使其注射泵和管线充满金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液并完成喷金操作,将喷有金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶液的玻纤用电热恒温干燥箱在 37℃干燥 12h,即获金标垫。

[0084] (3) 组合

[0085] 组合的方式与实施例 1 相同。

[0086] 实施例 4

[0087] 本实施例中,以 Adipsin 为检测指标的子痫前期快速检测盒的形状和构造如图 5 所示,由外壳 8 和装入外壳内的检测工具 11 构成。所述检测工具 11 为实施例 1 或实施例 2 或实施例 3 所述形状和构造的检测工具。所述外壳 8 用医用塑料制作,由设置有凹槽腔体的第一盒体 8-1 和设置有凹槽腔体的第二盒体 8-2 组合而成,两盒体的连接方式为卡接,如图 3、图 4 所示。两盒体组合而成的外壳,其外形为长方体,内腔与检测工具的形状和尺寸相匹配,其一侧壁上设置有加样孔 10 和观察孔 9,所述加样孔 10 的设置位置与检测工具装入外壳后其样品垫 7 的位置相对应,所述观察孔 9 的设置位置与检测工具装入外壳后其检测线 4 和控制线 3 的位置相对应。所制作的检测盒用放置有干燥剂的铝箔袋密封封装备用。

[0088] 所述检测盒的使用方法和检测原理如下:

[0089] 将待测样品(妊娠妇女尿样本)从外壳 8 的加样孔 10 加入检测工具的样品垫 7,由于层析原理,待测样品从样品垫 7 沿条状检测工具向上移动,当移动至金标垫 6,将金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合物溶解,并带着金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体继续向上移动,当移动至硝酸纤维素膜上的检测线 4,如果待测样品中有 Adipsin 抗原存在,检测线 4 上的兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体和金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体与样品中的 Adipsin 抗原将会在检测线位置形成一条紫红色的夹心免疫复合物,检测线位置可见一条清晰的紫红色线,此结果判为阳性;样品中的 Adipsin 抗原含量越高,色线颜色越深。如果样品中没有 Adipsin 抗原,金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体则不会与检测线上的兔抗人 Adipsin 多克隆抗体、或羊抗人 Adipsin 多克隆抗体、或鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体形成复合物,检测线位置没有紫红色线出现,此结果判定为阴性。当待测样品和金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体继续向上移动至控制线 3 时,控制线上的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体将会与金标鼠抗人 Adipsin 单克隆抗体结合,在控制线位置形成一条紫红色线,证明检测工具有效。检测结果通过外壳上的观察孔 9 观察获得。

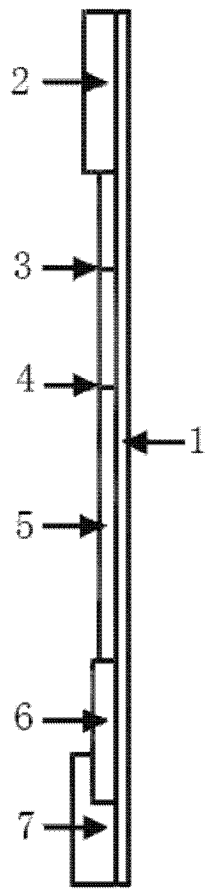


图 1

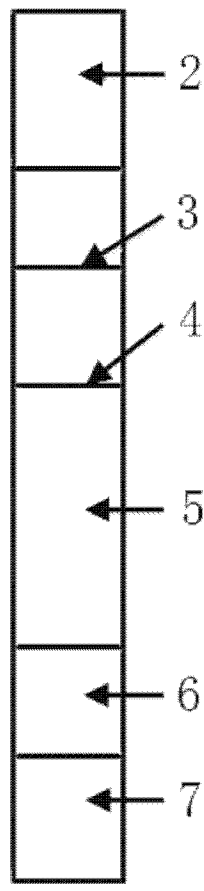


图 2

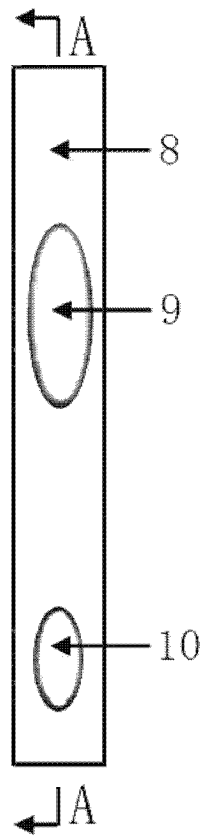


图 3

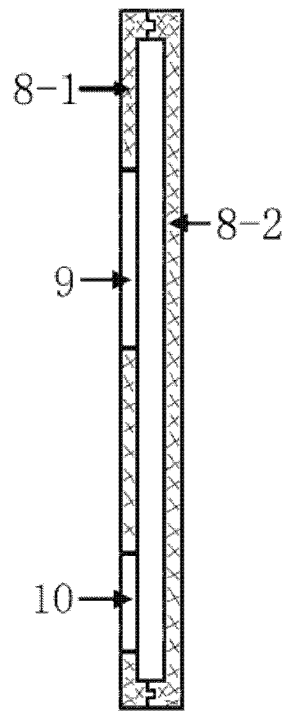


图 4

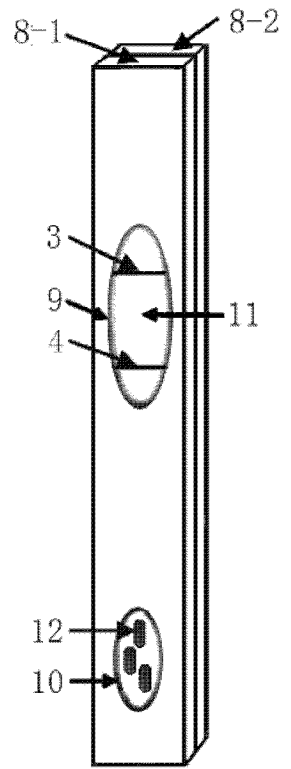


图 5

专利名称(译)	以补体因子D为检测指标的子痫前期快速检测工具与试剂盒及制作方法		
公开(公告)号	CN102411052B	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201110365180.X	申请日	2011-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	成都创宜生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都创宜生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都创宜生物科技有限公司		
[标]发明人	胡怀忠		
发明人	胡怀忠		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/689 G01N33/558 G01N2333/96433 G01N2800/368		
其他公开文献	CN102411052A		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

以Adipsin为检测指标的子痫前期快速检测工具，由吸水纸、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫由上至下依次相接固定在底板上构成，所述金标垫被样品垫部分覆盖；硝酸纤维素膜上设置有由兔抗人Adipsin多克隆抗体、或羊抗人Adipsin多克隆抗体、或鼠抗人Adipsin单克隆抗体包被形成的检测线和由羊抗鼠免疫球蛋白G多克隆抗体包被形成的控制线，检测线位于控制线之下且它们之间相隔有间距；金标垫为吸水材料制作且包被有金标鼠抗人Adipsin单克隆抗体结合物的垫体。以Adipsin为检测指标的子痫前期快速检测盒，由外壳和装入外壳内的上述检测工具构成。上述快速检测工具的制作方法：(1)检测线、控制线的包被；(2)金标垫的制备；(3)组合。

