



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101871943 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201010189683. 1

(22) 申请日 2010. 06. 02

(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 7 号研发楼 302
号

(72) 发明人 胡怀忠 关祥乾 向洪发 周容

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 王宝筠

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 201583543 U, 2010. 09. 15, 权利要求书全文.

Mohamed Shaarawy et.al.The Clinical

Value of Assaying Maternal Serum and Amniotic Fluid Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) in cases of Premature Rupture of Membranes.《Cytokine》. 1998, 989 — 992.

ZOU Li et.al..The Value of the Soluable Intercellular Adhesion Molecule-1 Levels in Maternal Serum for Determination of Occult Chorioamnionitis in Premature Rupture of Membranes.《Journal of Huazhong University of Science and Technology [Med Sci]》.2004, 154- 157.

审查员 王胜佳

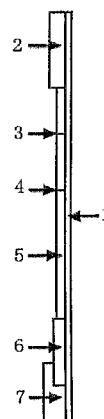
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具与检测盒

(57) 摘要

以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具,包括衬片、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粘贴在衬片上,且金标垫被样品垫部分覆盖;硝酸纤维素膜上设置有由羊抗人细胞间黏附分子-1 多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;金标垫为包被有金标鼠抗人细胞间黏附分子-1 单克隆抗体结合物的吸水纤维。以细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒,由盒体和装入盒体内的上述检测工具构成。



1. 以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具, 其特征在于包括衬片(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衬片上, 且所述金标垫(6)被所述样品垫(7)部分覆盖,

硝酸纤维素膜(5)上设置有由羊抗人细胞间黏附分子-1 多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), 所述检测线(4)位于所述控制线(3)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细胞间黏附分子-1 单克隆抗体结合物的吸水纤维。

2. 根据权利要求 1 所述的以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具, 其特征在于所述检测线(4)和控制线(3)的宽度为 $0.8\text{mm} \sim 1\text{mm}$ 。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具, 其特征在于所述检测线(4)与控制线(3)之间的间距为 $10\text{mm} \sim 12\text{mm}$ 。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具, 其特征在于它的形状为矩形条。

5. 根据权利要求 3 所述的以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具, 其特征在于它的形状为矩形条。

6. 以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒, 由盒体(8)和装入盒体内的检测工具构成;

所述检测工具包括衬片(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(2)、所述硝酸纤维素膜(5)、所述金标垫(6)和所述样品垫(7)由上至下依次相接粘贴在衬片上, 且所述金标垫(6)被所述样品垫(7)部分覆盖, 硝酸纤维素膜(5)上设置有由羊抗人细胞间黏附分子-1 多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), 所述检测线(4)位于所述控制线(3)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细胞间黏附分子-1 单克隆抗体结合物的吸水纤维;

所述盒体的内腔与检测工具的形状和尺寸相匹配, 所述盒体的顶壁设置有检测工具插入孔(11), 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盒体后其样品垫(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盒体后其检测线(4)和控制线(3)的位置相对应。

7. 根据权利要求 6 所述的以阴道分泌物中的细胞间黏附分子-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒, 其特征在于所述检测工具的形状为矩形条。

以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具与检测盒

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胎膜早破 (Premature Rupture of Fetal Membrane, 简称 PROM) 的检测工具。

背景技术

[0002] 胎膜破裂 (Rupture of Fetal Membrane, 简称 ROM) 可能在孕期随时发生,在临产前发生的胎膜破裂称为胎膜早破 (PROM)。足月后 (37 孕周) PROM 发生率约为 10%; 足月前 (37 孕周前) PROM 的发生率为 2-3.5%。胎膜早破是引起产科病人产前、产后并发症的主要因素,是导致胎儿早产和新生儿必须入住重症监护室的主要原因。由于医务人员不得不在延长孕周与宫内及孕妇感染的风险和胎儿肺发育问题之间求平衡,因而对胎膜早破患者的管理成本高、难度大,准确及时诊断孕妇是否发生胎膜早破至关重要。

[0003] 现有技术中,采用金标准是诊断胎膜早破的一种准确方法,即在孕妇羊膜腔内注入染料 (如美蓝),若阴道内有被染料着色的液体流出即可诊断为胎膜早破,但采用金标准检测临床很难操作,并且造成患者的痛苦,故临床很少使用。临床上通常采用询问病史、患者自诉阴道有羊水流出、阴道分泌物 pH 值变为偏碱性 (正常阴道分泌物 pH 值为 4.5 ~ 5.5)、显微镜下查见阴道分泌物涂片中出现羊水结晶等方法,这些方法虽然操作简单,但准确性、敏感性均较低。

[0004] 细胞间黏附分子-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, 简称 ICAM-1, 说明书下文以“ICAM-1”表示细胞间黏附分子-1) 属于黏附分子的免疫球蛋白超家族,是分子量 76kD ~ 114kD 的单链糖蛋白。ICAM-1 广泛表达在机体的血管内皮细胞、胸腺上皮细胞和其他种类的上皮细胞等非血源性细胞的表面, T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和树突状细胞等血源性细胞的表面,以及成纤维细胞的表面,与淋巴细胞的浸润有关。虽然在妊娠晚期 (孕周 28-40), 受胎膜和羊水单核细胞上 ICAM-1 的表达和中性粒细胞活化的影响,妊娠妇女的羊水中 ICAM-1 水平升高,但目前尚未发现以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破检测工具的报道。

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 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具与检测盒,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: ICAM-1 是妊娠晚期出现在羊水中的主要蛋白质之一,含量为 $13.08 \pm 6.11 \text{ ng/mL}$ 。胎膜早破时将有羊水从羊膜腔中渗漏至阴道,羊水中的 ICAM-1 则会出现于阴道分泌物 / 宫颈黏液 (Cervical-Vaginal Fluid, CVF) 中。蛋白芯片筛选实验发现: 确诊的 PROM 产妇与确诊的非 PROM 产妇相比 (两组产妇的年龄与妊娠周龄匹配,无基础疾病,无妊娠合并症), 阴道分泌物 / 宫颈黏液样本中 ICAM-1 的浓度具有明显差异。因此,可将 ICAM-1 作为胎膜早破的检测指标。

[0007] 本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具包括衬片、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粘贴在衬片上,且金标垫被样品垫部分覆盖;硝酸纤维素膜上设置有由羊抗人细胞间黏附分子-1(羊抗人 ICAM-1)多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;金标垫为包被有金标鼠抗人细胞间黏附分子-1 单克隆抗体结合物的吸水纤维。

[0008] 本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒,由盒体和装入盒体内的上述检测工具构成;所述盒体的内腔与检测工具的形状和尺寸相匹配,所述盒体的顶壁设置有检测工具插入孔,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盒体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盒体后其检测线和控制线的位置相对应。

[0009] 上述检测工具中,所述检测线和控制线的宽度优选 0.8mm ~ 1mm;所述检测线与控制线之间的间距优选 10mm ~ 12mm。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,样品垫是由吸水纤维制作的垫体,即为吸水纤维垫。

[0010] 本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具,其制作方法如下:

[0011] 1、检测线、控制线的包被

[0012] 羊抗人 ICAM-1 多克隆抗体(购自 R&D 公司)和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(购自上海派坤生物工程有限公司)在硝酸纤维素膜上的包被方法见论文“AFP 免疫层析测试条的研制”(侯惠仁、吴冯波、陈键、刘一兵、贺佑丰,《同位素》,2000,13(3):124-126)。羊抗人 ICAM-1 多克隆抗体工作液的浓度为 1 ~ 3mg/ml,羊抗鼠 IgG 多克隆抗体工作液的浓度为 1 ~ 3mg/ml。

[0013] 2、金标垫的制备

[0014] (1) 胶体金的制备

[0015] 取氯金酸溶解于三蒸水中,形成氯金酸浓度为 0.01g/100ml 的氯金酸水溶液;将所配制的氯金酸水溶液加热至沸腾,在搅拌下加入浓度为 9g ~ 10g/100ml 的柠檬酸三钠水溶液,氯金酸水溶液的加入量为 100ml 氯金酸水溶液中加入 1.35ml ~ 1.5ml,再煮沸至呈现透明的橙红色(约 7 ~ 10 分钟),冷却至室温后用浓度为 0.1 ~ 0.2mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节其 pH 值至 7.0-7.2,获胶体金;

[0016] (2) 金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物的制备

[0017] 在步骤(1)制备的胶体金中加入鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体(购自 R&D 公司),搅拌混合均匀后加入牛血清白蛋白(BSA, Roche 公司),再搅拌混合均匀后加入浓度为 10g/100ml 的 NaCl 溶液,鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体的加入量以胶体金溶液中鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体的浓度达到 200 μ g/100ml 为限,牛血清白蛋白的加入量以胶体金溶液中牛血清白蛋白的浓度达到 250mg/100ml 为限,NaCl 溶液的加入量以胶体金溶液中 NaCl 的浓度达到 1g/100ml 为限;继后分别以 2,000 转/分、4,000 转/分、10,000 转/分的条件各离心至少 10 分钟,获得的分离产物即为金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中,4℃贮存备用,所述磷酸盐缓冲液中含有叠氮钠,叠氮钠的浓度为 90mg/100ml;

[0018] (3) 金标垫的制备

[0019] 用浓度为 0.5g/100ml 的牛血清白蛋白 (BSA, Roche 公司) 溶液在 22 ~ 25℃ 浸泡吸水纤维至少 1 小时, 将步骤 (2) 制备的金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物包被在吸水纤维上 (包被方法见论文“AFP 免疫层析测试条的研制”, 侯惠仁、吴冯波、陈键、刘一兵、贺佑丰,《同位素》, 2000, 13 (3): 124-126), 即获得金标垫。

[0020] 3、以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具的制备

[0021] 将片状吸水垫 2、包被有检测线和控制线的硝酸纤维素膜 5、金标垫 6 和样品垫 7 粘在片状衬片 1 上, 然后切成矩形条。

[0022] 使用本发明所述检测工具和检测盒, 控制线上可见一条清晰的紫红色线, 证明试纸条有效; 当检测线上可见一条清晰的紫红色线, 此结果判定为阳性 (即发生胎膜早破); 若检测线上没有色线出现, 则判定为阴性 (即未发生胎膜早破)。

[0023] 本发明所述检测工具和检测盒具有以下有益效果:

[0024] 1、本发明为胎膜早破的检测提供了一种采用新检测指标的检测工具。

[0025] 2、使用本发明所述检测盒对确诊胎膜破裂组和确诊胎膜未破组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 96% 左右, 特异性为 91% 左右。

[0026] 3、使用本发明所述检测盒, 操作简单, 检测一个样品仅需 10-15 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。

[0027] 4、由于检测样品是妊娠妇女的阴道分泌物, 因而是一种无创检测。

[0028] 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。

[0029] 本发明所述检测工具和检测盒适用于所有妊娠期妇女, 尤其是存在早产风险、腹部受到损伤的妊娠期妇女。

附图说明

[0030] 图 1 是本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具的一种结构示意图;

[0031] 图 2 是图 1 的左视图;

[0032] 图 3 是本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒盒体的一种结构示意图;

[0033] 图 4 是图 3 的俯视图;

[0034] 图 5 是图 3 的 A-A 剖视图;

[0035] 图 6 是本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒的一种结构示意图。

[0036] 图中, 1-衬片、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-盒体、9-观察孔、10-加样孔、11-检测工具插入孔、12-检测工具、13-待测样品中的 ICAM-1。

具体实施方式

[0037] 下面结合附图对本发明所述以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具与检

测盒的结构、制作方法和使用方法做进一步说明。

[0038] 实施例 1

[0039] 本实施例中,以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具如图 1、图 2 所示,其形状为矩形条,其构造包括衬片 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衬片上,且金标垫被样品垫部分覆盖。衬片 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 由吸水纸制作;硝酸纤维素膜 5 上设置有由羊抗人 ICAM-1 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 1mm(或 0.8mm 或 0.9mm),它们之间的间距为 10mm(或 11mm 或 12mm);金标垫 6 为包被有金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜或聚酯纤维膜;样品垫是由玻璃纤维膜或聚酯纤维膜制作的垫体。

[0040] 本实施例中,以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具的制作方法如下:

[0041] 1、检测线、控制线的包被

[0042] 羊抗人 ICAM-1 多克隆抗体(购自 R&D 公司)和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(购自上海派坤生物工程有限公司)在硝酸纤维素膜上的包被方法见论文“AFP 免疫层析测试条的研制”(侯惠仁、吴冯波、陈键、刘一兵、贺佑丰,《同位素》,2000,13(3):124-126)。

[0043] 2、金标垫的制备

[0044] (1) 胶体金的制备

[0045] 取 0.01g 氯金酸溶解于 100ml 三蒸水中,形成氯金酸水溶液;将 100ml 氯金酸水溶液加热至沸腾,在搅拌下加入浓度为 10g/100ml 的柠檬酸三钠水溶液 1.5ml,再煮沸至呈现透明的橙红色(约 7~10 分钟),冷却至室温后用浓度为 0.2mol/L 的 K₂CO₃ 溶液调节其 pH 值至 7.0-7.2,获胶体金;

[0046] (2) 金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物的制备

[0047] 在步骤(1)制备的 100ml 胶体金中加入 200 μg 鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体(购自 R&D 公司),搅拌混合均匀后加入 250mg 牛血清白蛋白(BSA, Roche 公司),再搅拌混合均匀后加入浓度为 10g/100ml 的 NaCl 溶液,NaCl 溶液的加入量以胶体金溶液中 NaCl 的浓度达到 1g/100ml 为限。继后分别以 2,000 转/分、4,000 转/分、10,000 转/分的条件各离心 10 分钟,获得的分离产物即为金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物,将所述结合物溶于 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中,4℃贮存备用,所述磷酸盐缓冲液中含有叠氮钠,叠氮钠的浓度为 90mg/100ml;

[0048] (3) 金标垫的制备

[0049] 用浓度为 0.5g/100ml 的牛血清白蛋白(BSA, Roche 公司)溶液在 22~25℃浸泡玻璃纤维膜或聚酯纤维膜 1 小时后,将步骤(2)制备的金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体结合物包被在玻璃纤维膜或聚酯纤维膜上(包被方法见论文“AFP 免疫层析测试条的研制”,侯惠仁、吴冯波、陈键、刘一兵、贺佑丰,《同位素》,2000,13(3):124-126),即获得金标垫。

[0050] 3、以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测工具的制备

[0051] 将片状吸水垫 2、包被有检测线和控制线的硝酸纤维素膜 5、金标垫 6 和样品垫 7 粘在片状衬片 1 上,然后切成矩形条。

[0052] 实施例 2

[0053] 本实施例中,以 ICAM-1 为检测指标的胎膜早破快速检测盒的形状和构造如图 6 所示,由箱体 8 和装入箱体内的检测工具 12 构成。所述检测工具 12 为实施例 1 所述形状和构造的检测工具。所述箱体 8 用医用塑料制作,如图 3、图 4、图 5 所示,外形为长方体,内腔与检测工具的形状和尺寸相匹配,其顶壁设置有检测工具插入孔 11,其侧壁设置有加样孔 10 和观察孔 9,所述加样孔 10 的设置位置与检测工具装入箱体后其样品垫 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箱体后其检测线 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。

[0054] 所述检测盒的使用方法和检测原理如下:

[0055] 将待测样品(妊娠妇女阴道分泌物/宫颈粘液)从箱体 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 ICAM-1 单克隆抗体结合物溶解,并带着金标鼠抗人 ICAM-1 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 ICAM-1 抗原存在,检测线 4 上的羊抗人 ICAM-1 多克隆抗体和金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体与样品中的 ICAM-1 抗原将会在检测线上形成一条紫红色的夹心免疫复合物,检测线上可见一条清晰的紫红色线,此结果判为阳性;样品中的 ICAM-1 抗原含量越高,色线颜色越深。如果样品中没有 ICAM-1 抗原,金标鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体则不会与检测线上的羊抗人 ICAM-1 多克隆抗体形成复合物,检测线上没有色线出现,此结果判定为阴性。当待测样品和金标鼠抗人 ICAM-1 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 ICAM-1 单克隆抗体结合,在控制线上形成一条红色或紫红色线,证明测试工具有效。检测结果通过箱体上的观察孔 9 观察获得。

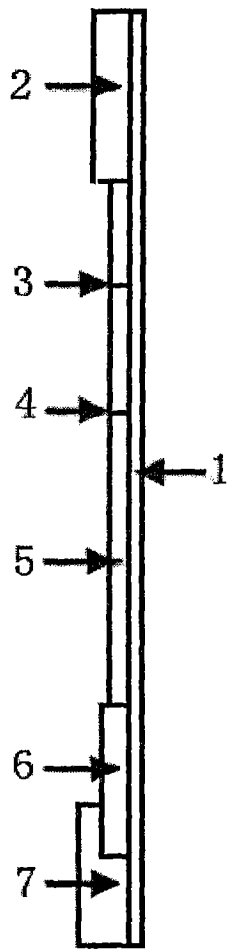


图 1

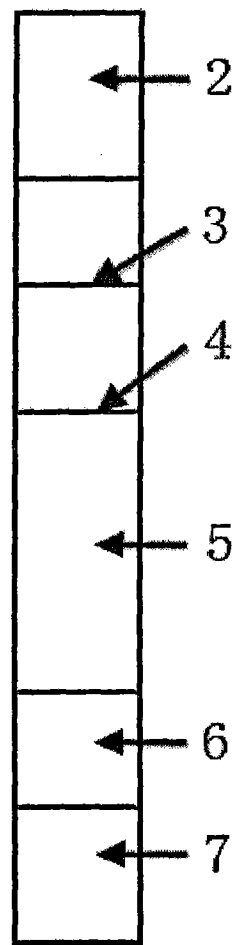


图 2

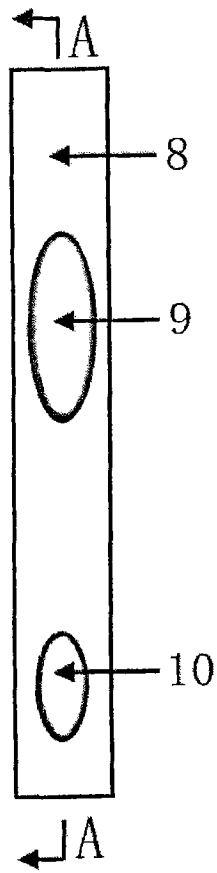


图 3



图 4

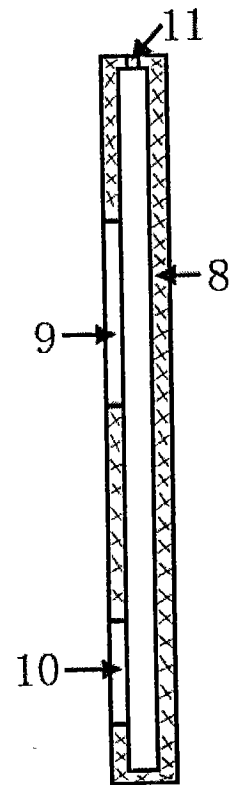


图 5

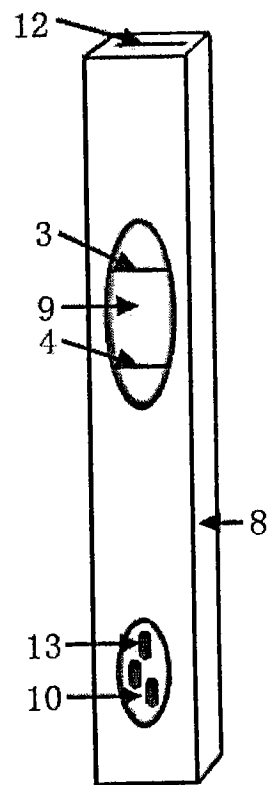


图 6

专利名称(译)	以ICAM-1为检测指标的胎膜早破快速检测工具与检测盒		
公开(公告)号	CN101871943B	公开(公告)日	2015-01-07
申请号	CN201010189683.1	申请日	2010-06-02
[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 关祥乾 向洪发 周容		
发明人	胡怀忠 关祥乾 向洪发 周容		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N2333/70525 G01N2800/368 G01N33/689		
审查员(译)	王胜佳		
其他公开文献	CN101871943A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

以ICAM-1为检测指标的胎膜早破快速检测工具，包括衬片、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粘贴在衬片上，且金标垫被样品垫部分覆盖；硝酸纤维素膜上设置有由羊抗人细胞间黏附分子-1多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；金标垫为包被有金标鼠抗人细胞间黏附分子-1单克隆抗体结合物的吸水纤维。以细胞间黏附分子-1为检测指标的胎膜早破快速检测盒，由盒体和装入盒体内的上述检测工具构成。

