



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104730245 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201410704446.2

C07K 16/18(2006.01)

(22)申请日 2014.11.28

审查员 许珊萍

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104730245 A

(43)申请公布日 2015.06.24

(73)专利权人 威海纽普生物技术有限公司

地址 264200 山东省威海市高区火炬路

213-1号创新创业基地C座301-303室

(72)发明人 王有志 王鹏浩 蔡荣

(74)专利代理机构 威海科星专利事务所 37202

代理人 初姣姣

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

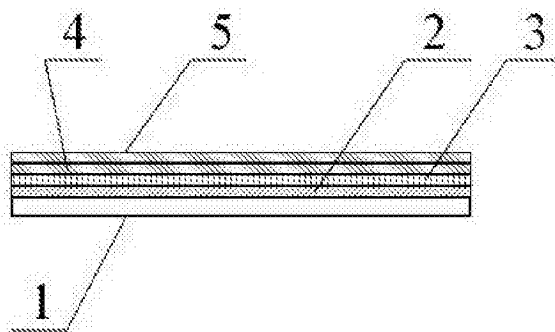
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

D二聚体检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体地说是一种D二聚体检测试剂盒及检测方法,设有试纸卡,其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为60-120nm,稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素,在基态下稳定,在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的D二聚体抗原表位的单克隆抗体细胞株,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。



1. 一种D二聚体检测试剂盒, 设有试纸卡, 其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有: PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体, 稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素, 在基态下稳定, 在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光; 所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体;

所述结合垫的稀土荧光微球的直径是70-90nm; 所述稀土荧光微球掺杂稀土络合物; 结合垫上稀土荧光微球标记的抗体来源于针对2个不同抗原表位的单克隆抗体细胞株;

所述结合垫采用如下步骤制得: 将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCl处理液中, 4℃浸泡4小时, Tris-HCl处理液含1.0% Triton X-100, 2.5%BSA, pH7.4, 然后取出, 放置在37℃烘箱烘干4小时, 备用, 将玻璃纤维膜放置在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上, 用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体喷到玻璃纤维膜, 37℃烘干1小时后制得;

结合垫上的所述稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体采用如下步骤制得:

步骤1: 单克隆抗体细胞株的获得: 用D二聚体纯品免疫小鼠, 采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株, 对所获得的单抗细胞株进行配对筛选, 根据配对结果和亲和力数据优选出用于试剂盒的单抗细胞株;

步骤2: 单克隆抗体的制备: 采用标准的腹水生产工艺制备并纯化D二聚体单克隆抗体, 分装后保存于-20℃备用;

步骤3: 稀土荧光微球的醛基化: 取5mg稀土荧光微球, 用20mM, pH9.5的碳酸盐缓冲液, 采用离心法洗涤3遍, 离心速度为12000rpm, 时间为5分钟, 最后重悬于100μl的上述碳酸盐缓冲液中, 加入500μl醛基化的葡聚糖, 混匀, 室温下暗反应4小时, 采用同样的离心法洗涤和重悬到100μl的上述碳酸盐缓冲液中, 置于4℃备用;

步骤4: 稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体的制备: 选取来自2个不同抗原表位的单克隆抗体细胞株的单克隆抗体, 按照质量比1:1将2mg D二聚体单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜, 然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合, 4℃反应过夜; 然后, 加入硼氢化钠至终浓度5mM, 4℃反应4小时; 再加入等体积的封闭液, 封闭液为50mM Tris-HCl, pH7.4, 含2%BSA, 5%蔗糖, 4℃封闭过夜; 然后用50mM Tris-HCl, pH7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍, 重悬于100μl的50mM Tris-HCl缓冲液中, Tris-HCl缓冲液含1.2%NaCl, 0.5%BSA, 0.1%Tween 20, 4℃避光保存备用;

包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

步骤1: 采用与结合垫上所用D二聚体单克隆抗体细胞株不同的细胞株, 采用标准的腹水生产工艺制备并纯化D二聚体单克隆抗体, 保存于-20℃备用;

步骤2: 分别用包被稀释液将D二聚体单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-5mg/ml, 膜液量为1-2μl/cm, 将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被, 检测线和质控线间隔为3-7mm, 然后置于烘箱中, 37℃烘干2小时;

所述样品垫通过以下步骤制得: 将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0%Triton X-100, 2.5%BSA, 0.15M Tris缓冲液, pH7.5的处理液中, 于4℃浸泡4个小时, 然后置于烘箱中, 37℃烘干2小时。

D二聚体检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体地说是一种能够快速准确的对D二聚体进行定量分析的D二聚体检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] D二聚体(D-Dimer)来源于纤溶酶溶解的交联纤维蛋白凝块,是纤维蛋白单体经活化因子XIIIa交联后再经纤溶酶水解产生的一种特异性降解产物,是一个特异性的纤溶过程标记物。

[0003] 在生理状态下,机体保持着凝血与纤溶动态平衡,以保证纤维蛋白及时形成和清除,而人体正常D二聚体的水平一般在 $200\mu\text{g}/\text{l}$ 以下,如果体内凝血和纤溶系统双重激活,D二聚体水平就会升高,因此D二聚体可以作为体内高凝状态和纤溶亢进的分子标志物之一。D二聚体的特异性反映的是有凝血和纤溶过程的这一类疾病的共同病理特点,因此在临床应用十分广泛。D二聚体作为测定纤溶系统的主要因子,对于诊断与治疗纤溶系统疾病及与纤溶系统有关的疾病以及溶栓治疗检测有着重要的意义,因此D二聚体是深静脉血栓(DVT),肺栓塞(PE),弥散性血管内凝血(DIC)的关键指标。由此可见,血液中D二聚体含量测定对血栓性疾病的早期诊断、病程监测以及对溶栓药物的治疗监测等都具有重要的临床意义。

[0004] 目前,针对D二聚体的检测方法主要有胶乳凝集法,双抗夹心法(ELISA)、免疫金标法、胶乳颗粒增强免疫比浊法等。胶乳凝集法简单快速,适用于即时检验(point-of-care testing,POCT),但是只能用于定性测定,大多用于筛查;ELISA法灵敏度高,但定量准确性差、操作时间长、自动化程度低,不适合POCT的需要;胶乳颗粒增强免疫比浊法(PETIA)可以很方便的应用于全自动生化仪,但是需要仪器,耗时较长,适合处理大量样本,对于急诊科和基层医院,无法满足快速检测的目的;免疫金标法与胶乳凝集法类似,具有操作简单快速的优点,但是同样定量准确性差,特别是重复性差这一缺点限制了其在临床上的应用,尤其不适用于需通过准确定量来帮助对疾病进行诊断的体液标志蛋白的定量检测。因此开发定量准确、快捷方便的D二聚体检测产品,仍是临床诊断产品研究领域亟需解决的重要问题。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术中存在的缺点和不足,提出了一种利用荧光免疫层析的灵敏性,结合荧光免疫层析分析仪实现的灵敏度高、快捷简便,可以准确定量的D二聚体检测试剂盒及检测方法。

[0006] 本发明可以通过以下措施达到:

[0007] 一种D二聚体检测试剂盒,设有试纸卡,其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为 $60-120\text{nm}$,稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素,在基态下稳定,在 $340-380\text{nm}$ 的激发光源作用下发射出波长范围在 $540-600\text{nm}$ 的荧

光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的D二聚体抗原表位的单克隆抗体细胞株。

[0008] 本发明所述结合垫的稀土荧光微球的直径优选是70-90nm;所述稀土荧光微球优选掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述稀土荧光微球优选掺杂稀土络合物;结合垫上稀土荧光微球标记的抗体优选来源于针对2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株。

[0009] 本发明所述结合垫采用如下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCL处理液中(含1.0% Triton X-100,2.5%BSA,pH7.4),4℃浸泡2小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用,将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体喷到玻璃纤维膜,37℃烘干1小时后制得。

[0010] 本发明中结合垫上的所述稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体采用如下步骤制得:

[0011] 步骤1:单克隆抗体细胞株的获得:用D二聚体纯品免疫小鼠,采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株,对所获得的单抗细胞株进行配对筛选,根据配对结果和亲和力数据优选出用于试剂盒的单抗细胞株;

[0012] 步骤2:单克隆抗体的制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化D二聚体单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用;

[0013] 步骤3:稀土荧光微球的醛基化:取5mg稀土荧光微球,用20mM,pH 9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100μl的上述碳酸盐缓冲液中,加入500μl醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μl的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0014] 步骤4:稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体的制备:选取来自2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株的单克隆抗体,按照质量比1:1将2mg D二聚体单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(50mM Tris-HCL,pH7.4,含2%BSA,5%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用50mM Tris-HCL,pH7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μl的50mM Tris-HCL缓冲液中(含1.2%NaCL,0.5%BSA,0.1%Tween 20),4℃避光保存备用。

[0015] 本发明所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

[0016] 步骤1:采用与结合垫上所用D二聚体单克隆抗体细胞株不同的细胞株,采用标准的腹水生产工艺制备并纯化D二聚体单克隆抗体,保存于-20℃备用;

[0017] 步骤2:分别用包被稀释液将上述D二聚体单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-5mg/ml,膜液量为1-2μl/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0018] 本发明所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0%Triton X-100,2.5% BSA,0.15M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0019] 本发明还提供了一种如上所述试剂盒实现的D二聚体检测方法,其特征在于包括

以下步骤:

[0020] 步骤1:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0021] 步骤2:精确吸取10 μ l血清样本,样本为全血时吸取20 μ l样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入150 μ l样本稀释液,样本稀释液采用生理盐水或PBS,15-30分钟内用荧光免疫层析分析仪定量判定结果;

[0022] 步骤3:设置好荧光免疫层析分析仪的相关参数后,将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示出样品浓度的定量测定结果,所述荧光免疫层析分析仪是一种光学检测系统,对D二聚体的检测范围为0.1-10.0mg/L。

[0023] 本发明提供一种利用稀土荧光免疫层析技术制备的D二聚体快速定量免疫层析检测试剂盒,同时适合血清和全血样本,并适合临床上单人份检测,相对于D二聚体定性胶体金试剂,能定量检测样本中的D二聚体含量,具有更明确的临床指导意义,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

[0024] 附图说明:

[0025] 附图1是本发明中试纸卡的结构示意图。

[0026] 附图2是本发明中实施例2的准确度分析结果示意图。

[0027] 附图标记:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4、吸水垫5。

[0028] 具体实施方式:

[0029] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明:

[0030] 如附图1所示,本发明首先提出了一种D二聚体检测试剂盒,盒内设有试纸卡,所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5,其中结合垫3上吸附有稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为60-120nm,稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素,在基态下稳定,在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的D二聚体抗原表位的单克隆抗体细胞株;

[0031] 所述结合垫3的稀土荧光微球的直径优选是70-90nm;所述稀土荧光微球优选掺杂有稀土镧系元素,为铈(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述稀土荧光微球优选掺杂稀土络合物;结合垫上稀土荧光微球标记的抗体优选来源于针对2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株。

[0032] 实施例1:

[0033] D二聚体检测试剂盒中试纸卡的各组成部分可以通过以下措施制得:

[0034] 1、样品垫2的制备:

[0035] 将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% Triton X-100,2.5% BSA,0.15M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4 $^{\circ}$ C浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干2小时。

[0036] 2、吸附荧光微球标记抗体的结合垫3的制备:

[0037] 将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCL处理液中(含1.0% Triton X-100,2.5%BSA,pH7.4),4 $^{\circ}$ C浸泡2小时,然后取出37 $^{\circ}$ C烘箱烘干4小时,备用。将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体喷到玻璃纤维膜,37 $^{\circ}$ C烘干1小时,备用;

[0038] 稀土荧光纳米微球的醛基化:取5mg稀土荧光纳米微球,用20mM,pH9.5的碳酸盐缓

冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100 μ l的上述碳酸盐缓冲液中,加入500 μ l醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100 μ l的上述碳酸盐缓冲液中,置于4 $^{\circ}$ C备用;

[0039] 稀土荧光纳米微球标记D二聚体单克隆抗体的制备:选取来自2个不同抗原表位的单克隆细胞株的单克隆抗体,按照质量比1:1将2mg D二聚体单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4 $^{\circ}$ C透析过夜,然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合,4 $^{\circ}$ C反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4 $^{\circ}$ C反应4小时;再加入等体积的封闭液(50mM Tris-HCL,pH7.4,含2%BSA,5%蔗糖),4 $^{\circ}$ C封闭过夜;然后用50mM Tris-HCL,pH7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100 μ l的50mM Tris-HCL缓冲液(含1.2%NaCl,0.5%BSA,0.1%Tween 20),4 $^{\circ}$ C避光保存备用;

[0040] 3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4的制备:

[0041] 采用与结合垫上所用D二聚体单克隆抗体细胞株不同的细胞株,采用标准的腹水生产工艺制备并纯化D二聚体单克隆抗体,保存于-20 $^{\circ}$ C备用;

[0042] 分别用包被稀释液将D二聚体单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-5mg/ml,膜液量为1-2 μ l/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干2小时;

[0043] 试纸卡的组装:在PVC板1上依次粘贴经过处理的样品垫2、吸附有稀土荧光标记的抗体的结合垫3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4和吸水垫5,组装后得到试纸大板,按照要求切割成4mm宽,将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0044] 上述各步骤中选用的设备及原料优选以下原料:

[0045] D二聚体特异性配对抗体;D二聚体质控品:英国朗道实验诊断有限公司;稀土荧光微球:上海甄准生物科技有限公司;硝酸纤维素(NC)膜:Millipore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。

[0046] 实施例2:准确度试验

[0047] 选用上述试纸卡以及荧光免疫层析分析仪(型号:NEO-007),

[0048] 荧光免疫分析仪参数的设定:在荧光免疫分析仪上设定好试纸卡工艺参数后,取上述组装好的试纸卡,分别用0.1、0.2、0.5、1、2、5、10mg/L的D二聚体校准品,用试纸卡进行测定,得到各校准品的荧光强度值,将结果输入到分析仪的参数中,完成分析仪的参数的设定。

[0049] 主要检测材料:临床样本由相关医院获得,共200份胶乳增强免疫比浊法定值样本,其中血清样本100份,全血样本100份,D二聚体含量分布区间为0-10mg/L之间。

[0050] 检测方法:

[0051] 步骤1:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0052] 步骤2:精确吸取10 μ l血清样本,样本为全血时吸取20 μ l样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入150 μ l样本稀释液(生理盐水或PBS),15-30分钟内用荧光免疫层析分析仪定量判定结果;

[0053] 步骤3:设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示出样品浓度的定量测定结果。

[0054] 试验结果分析:

[0055] 临床样本检测试剂制备完成后,按检测方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0056] 试验结果:

[0057] 如附图2所示,以实验系统的检测值为Y轴,以对照系统的测验值为X轴,绘制散点图,并进行相关性分析。临床样本检测对200份临床定值样本检测,样本平均偏差值小于10%,最大偏差小于20%, $R^2 > 0.98$,一致性系数 > 0.90 。检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测,满足不同客户不同检测场合的差异化需要。

[0058] 本发明提供一种利用稀土荧光免疫层析技术制备的D二聚体快速定量免疫层析检测试剂盒,同时适合血清和全血样本,并适合临床上单人份检测,相对于D二聚体定性胶体金试剂,能定量检测样本中的D二聚体含量,具有更明确的临床指导意义,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

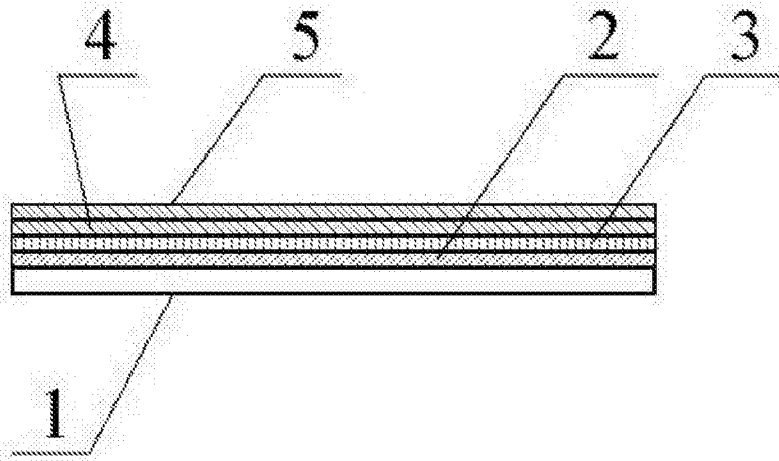


图1

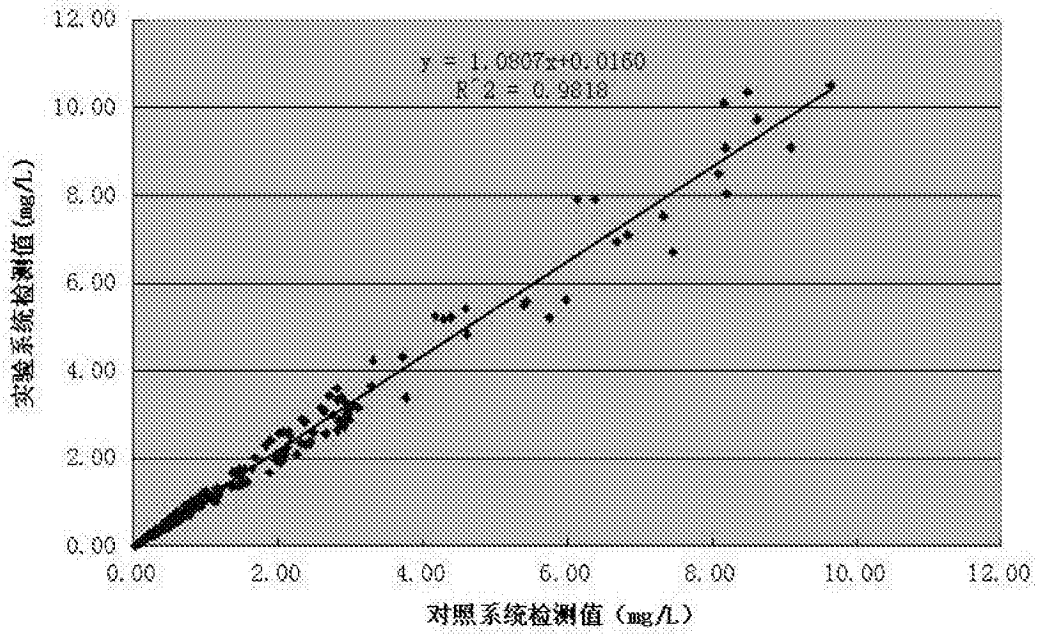


图2

专利名称(译)	D二聚体检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN104730245B	公开(公告)日	2016-09-28
申请号	CN201410704446.2	申请日	2014-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
[标]发明人	王有志 王鹏浩 蔡荣		
发明人	王有志 王鹏浩 蔡荣		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/558 G01N2800/226 G01N2800/52		
其他公开文献	CN104730245A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，具体地说是一种D二聚体检测试剂盒及检测方法，设有试纸卡，其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有：PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的D二聚体单克隆抗体，所述稀土荧光微球的直径为60-120nm，稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素，在基态下稳定，在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光；所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体，来源于针对2-6个不同的D二聚体抗原表位的单克隆抗体细胞株，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。

