



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104374927 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201410737714.0

CN 102879559 A, 2013.01.16,

(22) 申请日 2014.12.05

审查员 周露露

(73) 专利权人 重庆中元生物技术有限公司

地址 400039 重庆市九龙坡区科园四街  
70-1、70-2 号 J 座三层

(72) 发明人 潘能科

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 张艳 李慧

(51) Int. Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56) 对比文件

CN 103627677 A, 2014.03.12,

CN 101451993 A, 2009.06.10,

CN 104059144 A, 2014.09.24,

US 5486476 A, 1996.01.23,

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及生物检测领域,特别是涉及一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒及其制备方法和用途。本发明提供一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒,包括试纸卡,试纸卡包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述金标垫上包含 Lp-a 抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线,所述金标垫上的 Lp-a 抗体采用荧光微球标记。本发明所提供的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒首次将脂蛋白 a 通过荧光微球免疫层析技术进行检测,兼具灵敏性和特异性,具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点。

1. 一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒, 包括试纸卡, 试纸卡包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 所述金标垫上包含脂蛋白 a 抗体, 所述硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线, 所述金标垫上的脂蛋白 a 抗体采用荧光微球标记, 所述检测线上包被有脂蛋白 a 抗体, 质控线上包被羊抗鼠抗体, 所述样品垫采用缓冲液处理, 所述缓冲液选自醋酸盐缓冲液、巴比妥缓冲液、Hepes 缓冲液中的一种或多种的组合, 缓冲液的浓度为 15-150mM;

所述的金标垫还经过预处理, 预处理中所使用的预处理缓冲液包括下列组分: 水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸, 且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 - 7.5g/L, 缓冲液的 pH 值为 7.2 - 7.6, 各组分在缓冲液中的浓度为:

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L

所述预处理缓冲液的溶剂为水。

2. 如权利要求 1 所述的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒, 其特征在于, 所述硝酸纤维素膜上, 检测线位于离加样端较近一侧, 质控线位于离加样端较远一侧。

3. 如权利要求 1 所述的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒, 其特征在于, 还包括卡壳, 所述卡壳包括背卡和上盖, 所述背卡设有试纸卡卡槽, 所述试纸卡嵌于所述试纸卡卡槽内, 所述上盖设有测试窗和加样孔, 所述测试窗的位置与所述检测线和质控线的位置相配合, 所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

4. 如权利要求 1 所述的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒, 其特征在于, 所述检测试剂盒用于定量检测血清或血浆中脂蛋白 a 的含量。

5. 如权利要求 1-4 任一权利要求所述的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒的制备方法, 包括如下步骤:

1) 用荧光微球标记的脂蛋白 a 抗体溶液喷涂经预处理的金标垫, 制得包含脂蛋白 a 抗体的金标垫;

2) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂脂蛋白 a 抗体及羊抗鼠抗体, 制得包被后的硝酸纤维素膜;

3) 将样品垫、步骤 1 制备的金标垫、步骤 2 制备的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴在底板上, 切裁制得检测试纸卡; 最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

## 一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别是涉及一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 脂蛋白 a(Lp-a) 是一种特殊独立的血浆脂蛋白,是 1963 年挪威遗传学家 Berg 在研究低密度脂蛋白的遗传变异时发现的。20 世纪 80 年代末,人们发现 Lp(a) 与动脉粥样硬化有关,特别是 Mclean 等发现脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)] 与纤溶酶原(plasminogen, PLG) 的结构具有高度同源性后,有关 Lp(a) 的性质、特点等以及它与血栓性疾病以及肾脏疾病关系方面的研究取得了一些进展 [1 ~ 3]。另外,人们对 Lp(a) 的生理功能和致血栓性疾病的机理等许多方面还不十分清楚, Lp(a) 仍是当今脂蛋白研究中最热门的内容之一。

### 发明内容

[0003] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒,用于解决现有技术中的问题。

[0004] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒,包括试纸卡,试纸卡包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述金标垫上包含 Lp-a 抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线,所述金标垫上的 Lp-a 抗体采用荧光微球标记。

[0005] 优选的,为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果,本发明中所述的金标垫还经过预处理,预处理中所使用的预处理缓冲液包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 - 7.5g/L,缓冲液的 pH 值为 7.2 - 7.6。

[0006] 优选的,各组分在缓冲液中的浓度为:

[0007]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0008] 所述预处理缓冲液的溶剂为水。

[0009] 所述预处理的具体步骤为:将金标垫在预处理液中浸泡 1.5-2.5h,取出放于 36-38℃ 烘干。

[0010] 所述预处理缓冲液可使用本领域各种常用的 pH 调节剂进行 pH 值的调节。

[0011] 优选的,所述底板为 PVC 底板。

[0012] 优选的,所述硝酸纤维素膜上,检测线位于离加样端较近一侧,质控线位于离加样端较远一侧。

[0013] 优选的,所述检测线上包被有 Lp-a 抗体。所述金标垫上的 Lp-a 抗体与检测线上的 Lp-a 抗体可以是相同的抗体,也可以是不同的抗体。

[0014] 优选的,质控线上包被羊抗鼠抗体。

[0015] 优选的,所述样品垫采用缓冲液处理,所述缓冲液选自醋酸盐缓冲液、巴比妥缓冲液、Hepes 缓冲液中的一种或多种的组合,缓冲液的浓度为 15-150mM。

[0016] 优选的,所述金标垫采用缓冲液处理,所述缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合,缓冲液的浓度为 5-50mM。

[0017] 优选的,还包括卡壳,所述卡壳包括背卡和上盖,所述背卡设有试纸卡卡槽,所述试纸卡嵌于所述试纸卡卡槽内,所述上盖设有测试窗和加样孔,所述测试窗的位置与所述检测线和质控线的位置相配合,所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

[0018] 更优选的,所述卡壳为塑料卡壳。

[0019] 优选的,所述检测试剂盒用于定量检测血清或血浆中脂蛋白 a(Lp-a) 的含量。

[0020] 本发明所提供的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒在检测脂蛋白 a 时采用双抗体夹心免疫层析法,配套免疫定量分析仪器使用。免疫分析仪器通过采集检测线(T)和质控线(C)条带荧光信号,计算 T/C 信号值。使用前先将不同标准品滴加到试纸卡上,分析处理建立定标曲线(T/C 信号值与标准品真实值的关系),再将检测样品时获得的 T/C 值与标准曲线比较,即可获得检测样品中的 Lp-a 含量。

[0021] 本发明第二方面提供所述的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0022] 1) 用荧光微球标记的 Lp-a 抗体溶液喷涂经预处理的金标垫,制得包含 Lp-a 抗体的金标垫;

[0023] 2) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂 Lp-a 抗体及羊抗鼠抗体,制得包被后的硝酸纤维素膜;

[0024] 3) 将样品垫、步骤 1 制备金标垫、步骤 2 制备的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴在底板上,切裁制得检测试纸卡;最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

[0025] 优选的,为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果,本发明中所述的金标垫还经过预处理,预处理中所使用的预处理缓冲液包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 - 7.5g/L,缓冲液的 pH 值为 7.2 - 7.6。

[0026] 优选的,各组分在缓冲液中的浓度为:

[0027]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0028] 所述预处理缓冲液的溶剂为水。

[0029] 所述预处理的具体步骤为：将金标垫在预处理液中浸泡 2h，取出放于 37℃ 烘干。

[0030] 本发明第三方面提供所述定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒在脂蛋白 a 检测领域的用途。

[0031] 本发明所提供的定量检测脂蛋白 a 的检测试剂盒首次将脂蛋白 a 通过荧光微球免疫层析技术进行检测，兼具灵敏性和特异性，能够快速评估冠心病相关临床症状。此外，所述检测试剂盒具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点，受血清（或血浆）严重血脂、溶血干扰小，当血清（或血浆）血红蛋白  $\leq 500\text{mg/L}$ 、甘油三酯  $\leq 50\text{mg/dL}$  时、胆红素  $\leq 15\text{mg/dL}$ ，对准确度的影响变差  $< 10\%$ 。

### 具体实施方式

[0032] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0033] 在进一步描述本发明具体实施方式之前，应理解，本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案；还应当理解，本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案，而不是为了限制本发明的保护范围；在本发明说明书和权利要求书中，除非文中另外明确指出，单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0034] 当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0035] 除非另外说明，本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明，具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS

IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 等。

[0036] 实施例 1

[0037] 本发明试纸卡的制备:

[0038] 1) 使用预处理缓冲液对金标垫进行预处理, 预处理缓冲液为: 水苏糖 2g/L, 明矾 0.5g/L, 果糖二磷酸钠 1.5g/L, 六偏磷酸钠 0.3g/L, 甘氨酸 1.88g/L 的水溶液, pH = 7.4, 预处理的具体步骤为: 将金标垫在预处理液中浸泡 2h, 取出放于 37℃ 烘干; 用荧光微球标记的 Lp-a 抗体溶液喷涂经预处理的金标垫, 制得包被 Lp-a 抗体的金标垫, 溶液中荧光微球与抗体的质量比为 5:1, 溶液的浓度为 10mg/ml, 喷涂量为 4 $\mu$ l/cm, 溶液中荧光微球与标记物的质量比为 5:1, 溶液的浓度为 10mg/ml, 喷涂量为 4 $\mu$ l/cm;

[0039] 2) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂 1mg/ml 的 Lp-a 抗体溶液和羊抗鼠抗体溶液, 喷涂量为 1 $\mu$ l/cm, 制得包被后的硝酸纤维素膜, 喷涂溶液的浓度为 1mg/ml, 喷涂量为 1 $\mu$ l/cm;

[0040] 3) 将样品垫、步骤 1 制备金标垫、步骤 2 制备的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴在 PVC 底板上, 切割制得宽 3-5mm 的检测试纸卡; 最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

[0041] 标准线曲线:

[0042] 分别将浓度为 0、1、3、5、10、15、20、30、50ng/mL 的 Lp-a 缓冲溶液滴加于样品垫上, 每个浓度设 5 个重复 (检测结果取 5 个重复的平均值), 膜层析 10 分钟以后, 使用免疫分析仪器通过采集检测线 (T) 和质控线 (C) 条带荧光信号, 分析仪的对荧光信号的检测范围是 AD 值 0-10000, 计算 T/C 信号值, 建立定标曲线, 其中 Y 轴为 T/C 信号值, X 轴为标准品真实值。

[0043] 脂蛋白 a 含量抗干扰性的检测:

[0044] 将检测样品滴加于样品垫上, 每个样品设 5 个重复 (检测结果取 5 个重复的平均值), 膜层析 10 分钟以后, 将检测样品时获得的 T/C 值与标准曲线比较, 获得检测样品中的 Lp-a 含量的检测数据, 再将检测获得的 Lp-a 含量数据与真实 Lp-a 含量数据进行对比, 获得准确度影响偏差值。

[0045] 样品 1 : 5ng/mL Lp-a、50mg/L 血红蛋白、50mg/dL 甘油三酯、10mg/dL 胆红素;

[0046] 样品 2 : 10ng/mL Lp-a、500mg/L 血红蛋白、10mg/dL 甘油三酯、15mg/dL 胆红素;

[0047] 样品 3 : 15ng/mL Lp-a、100mg/L 血红蛋白、20mg/dL 甘油三酯、12mg/dL 胆红素;

[0048] 样品 4 : 20ng/mL Lp-a、150mg/L 血红蛋白、30mg/dL 甘油三酯、5mg/dL 胆红素;

[0049] 样品 5 : 30ng/mL Lp-a、200mg/L 血红蛋白、40mg/dL 甘油三酯、8mg/dL 胆红素;

[0050] 空白对照样品 : 300mg/L 血红蛋白、80mg/dL 甘油三酯、9mg/dL 胆红素血清样本。

[0051] 样品 1-5 所获得的检测的 Lp-a 含量数据分别为 4.9ng/mL、10.5ng/mL、14.5ng/mL、19.9ng/mL、32ng/mL, 准确度的影响变差 < 10%。

[0052] 实施例 2

[0053] 对比例试纸卡的制备: 只改变预处理缓冲液配方, 对比例试纸卡的预处理缓冲液为 25mM 甘氨酸缓冲液, pH = 7.4, 其他步骤均与实施例 1 中制备步骤相同。

[0054] Lp-a 的灵敏性和检测限对比实验：

[0055] 用荧光仪器进行判断,分析仪的对荧光信号的检测范围是 AD 值 0-10000,根据仪器的性能, CUTOFF 值为 50,在特定浓度下,90%以上检测例 AD 值  $\geq 50$ ,即认为试剂盒能够用于该浓度下的检测。

[0056] 采用 5% BSA 生理盐水溶液作为空白样本,空白样本应不含被测物。取 0.02-1.0 ng/mL 梯度浓度的脂蛋白 a 已知血样进行灵敏性检测,每间隔 0.02ng/mL 设置一个梯度,每个梯度设置 20 个样本,记录检测结果。结果显示实施例 1 所制备的试纸卡最低检测限为 0.06ng/mL,对比例试纸卡的最低检测限高于 1.0ng/mL。

[0057] 综上所述,本发明所提供的检测试剂盒具有良好的抗干扰性和特异性,且具有很好的灵敏性,阴性本底更低,有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0058] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种定量检测脂蛋白a的检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104374927B</a>	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201410737714.0	申请日	2014-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
[标]发明人	潘能科		
发明人	潘能科		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/92		
代理人(译)	张艳 李慧		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN104374927A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及生物检测领域，特别是涉及一种定量检测脂蛋白a的检测试剂盒及其制备方法和用途。本发明提供一种定量检测脂蛋白a的检测试剂盒，包括试纸卡，试纸卡包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述金标垫上包含Lp-a抗体，所述硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，所述金标垫上的Lp-a抗体采用荧光微球标记。本发明所提供的定量检测脂蛋白a的检测试剂盒首次将脂蛋白a通过荧光微球免疫层析技术进行检测，兼具灵敏性和特异性，具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点。

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;