



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110346578 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201910493157.5

(22)申请日 2019.06.06

(71)申请人 安徽惠邦生物工程有限公司

地址 230088 安徽省合肥市高新区潜水东路18号

(72)发明人 胡容 王忠亮

(74)专利代理机构 合肥市上嘉专利代理事务所
(普通合伙) 34125

代理人 李璐

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

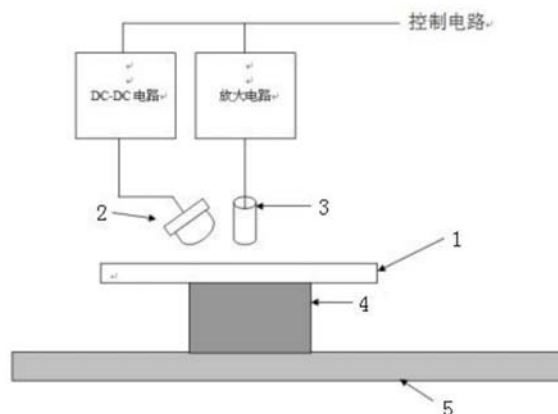
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统

(57)摘要

本发明公开了一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,包括试剂盒、检测设备;试剂盒运用双抗体夹心法免疫层析技术,与配套仪器使用,实现对孕妇阴道分泌物或阴道流出液中胰岛素样生长因子结合蛋白-1与胎儿纤维连接蛋白的定量检测,为诊断胎膜早破与预测早产提供参考依据。还公开了一种同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法及其制备的金标垫,所述金标垫采用两种抗体标记胶体金并混合复溶液喷金的方法实现两种蛋白的同时检测,实现了一次取样同时定量检测两个指标,操作快速简单,检测准确度高。



1. 一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,其特征在于,包括试剂盒、检测设备;

所述试剂盒主要包括检测卡、标准曲线对照表、样本稀释液,所述检测卡包括卡壳、设置在卡壳中的试条,所述试条包括衬底、依次粘附在衬底上的样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫,所述金标垫采用两种抗体标记胶体金并混合复溶液喷金的方法实现两种蛋白的同时检测;

所述检测设备用于对试剂盒中两种蛋白的定量检测,为诊断胎膜早破与预测早产提供参考依据。

2. 根据权利要求1所述的用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,其特征在于,所述卡壳包括相互卡接的上卡壳、下卡壳,上卡壳上开有位于样品垫上部的加样孔、位于NC膜上部的观测口,下卡壳的内表面设置有用于放置试条的卡槽。

3. 根据权利要求1所述的用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,其特征在于,所述NC膜上依次等间隔设置有T2检测线、T1检测线、质控线,T2检测线上包被IGFBP-1单克隆抗体2,T1检测线上包被fFN单克隆抗体2,质控线上包被羊抗鼠抗体。

4. 根据权利要求1所述的用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,其特征在于,所述样品垫与金标垫为玻璃纤维膜。

5. 根据权利要求1所述的用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,其特征在于,所述标准曲线对照表设置在条形码或SD卡上,条形码印在卡壳的表面。

6. 一种同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法,包括以下步骤:

(1) 在调节好pH值的胶体金溶液中分别标记胎儿纤维连接蛋白抗体1和胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1;

(2) 将两种标记物沉淀混合,加入pH值为7.0—7.4的金标复溶液进行复溶,混匀得到用于金标垫制备的金标液;

(3) 利用喷金仪将步骤(2)制备的金标液喷涂于亲水性的未处理金标垫上,置于37℃烘干,得到标记的金标垫。

7. 根据权利要求6所述的同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法,其特征在于,在步骤(1)中,所述胎儿纤维连接蛋白抗体1的标记方法包括以下步骤:

(101) 在1ml胶体金加入0.1mol/L碳酸钾溶液调节pH至fFN最适标记pH,该pH值为6.9—7.4;

(102) 混匀后,边迅速搅拌边逐滴加入6 μ g浓度为0.1mg/ml的胎儿纤维连接蛋白抗体1,反应30min;

(103) 再加入50 μ l 10% BSA,搅拌均匀,反应15min后,再加入20 μ l 15% PEG20000,反应15min。

8. 根据权利要求6所述的同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白

含量的金标垫的制备方法,其特征在于,在步骤(1)中,所述胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1的标记方法包括以下步骤:

(111) 在1ml胶体金加入0.1mol/L碳酸钾溶液调节pH至IGFBP-1最适标记pH,该pH值为7.0—7.7;

(112) 混匀后,边迅速搅拌边逐滴加入6 μ g浓度为0.1mg/ml的胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1,反应30min;

(113) 再加入50 μ l10%BSA,搅拌均匀,反应15min后,再加入20 μ l5%PEG20000,反应15min。

9. 根据权利要求6所述的同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述金标复溶液的组成包括:

PB缓冲液:基质成分,pH值为7.0—7.4;

10%蔗糖及5%海藻糖;

1%BSA;

0.5%PVP;

0.5%Tween20。

10. 利用权利要求6至9任一项所述的同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法制备的金标垫。

用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测领域,特别是涉及一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统。

背景技术

[0002] 临产前的胎膜破裂称为胎膜早破 (PROM), 孕龄<37孕周的胎膜早破又称为早产(未足月)胎膜早破。胎膜早破是围生期最常见的并发症,可导致早产率升高,围生儿病死率增加,宫内感染率及产褥感染率均升高,妊娠满37周后的胎膜早破发病率约为10%,妊娠不满37周的胎膜早破发病率约为2.0%—3.5%。PROM可并发早产、脐带脱垂及母儿感染,一旦发生,若处理不当可危及母儿生命,因此准确及时诊断PROM至关重要。胰岛素样生长因子结合蛋白-1(insulin-like growth factor binding protein-1,简称IGFBP-1)主要存在于羊水中,是孕期羊水中的一种标志性蛋白质。当发生胎膜破裂时,羊水从胎膜的破口中漏到宫颈阴道中,其中含有的IGFBP-1成为胎膜早破诊断的标志,由于其在羊水含量极高,为母亲血液中的100—1000倍,因此灵敏度非常高,可以检测出常规手段无法测出的微量羊水,解决了隐匿性胎膜早破和高位破水难以检测的问题。

[0003] 早产是指在满28孕周至37孕周之间的分娩,国内早产占分娩总数的5%—15%,约15%的早产儿死于新生儿期。早产防控是降低围生儿死亡率和提高新生儿素质的主要措施之一。国外学者建议将早产定义时间上限提前到妊娠20周。胎儿纤维连接蛋白(fetal Fibronectin, fFN),是子宫绒毛膜细胞外的基质成分,存在于绒毛膜与蜕膜之间,主要由滋养层细胞产生。由于孕21周以后,绒毛膜与蜕膜的融合阻止了fFN的释放,而使正常的孕妇在22—35孕周时,fFN的含量极低,只有在绒毛膜与蜕膜分离、绒毛膜与蜕膜界面的细胞外基质遭到机械损伤或蛋白水解酶的降解时,fFN才可见于宫颈阴道分泌物中。因此,在孕22—35周之间,宫颈阴道分泌物中fFN的水平与是否发生早产有很大的相关性。国内早产占分娩总数的5%—15%,约15%的早产儿死于新生儿期,因此,早产防控是降低围生儿死亡率和提高新生儿素质的主要措施之一。

[0004] 胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白这两种物质都在子宫发生收缩、胎盘和蜕膜发生剥离时释放至孕妇阴道的物质,当孕妇阴道中上述两种物质出现异常升高,可预测早产早破的发生。目前检测胎膜早破准确性最高的方法为检测是否出现胰岛素样生长因子结合蛋白-1,准确率可达90%;胎儿纤维连接蛋白检测在生物标志物中阴性预测值极高,因此极具价值,美国妇产科医师协会(ACOG)推荐为早产诊断常规项目。

[0005] 如上所述,目前临床上已经存在对早产和胎膜早破诊断的方法,但是,胎膜早破和早产是密切关联的,可又相对独立的产科常见症状,因为胎膜早破是导致早产的部分原因,而出现胎膜早破并不意味着就会早产,因此临床上对早产和胎膜早破都需要进行风险评估。但是目前临床诊断方法都是多次取样并分开进行的,这样既增加了操作繁琐程度,同时因为对孕妇多次取样,会刺激孕妇发生宫缩以及增加感染的几率,进而增加早产和胎膜早

破的风险。

[0006] 目前,IGFBP-1诊断胎膜早破特异性高,但仅限于检测胎膜完整程度,即使胎膜完整,孕妇是否有发动早产的风险仍是未知结果;fFN阴性预测值高,但阳性时无法判断fFN来自于羊水还是绒毛膜蜕膜间隙,无法判断是否是胎膜早破导致的早产风险。虽然IGFBP-1与fFN均为临床指南推荐性指标,但是将两种物质的诊断联合应用并实现一次取样同时定量检测蛋白含量的技术还未出现。

[0007] 申请号为201020565061.X的专利公开了一种孕妇早产及胎膜早破联检试剂盒,其虽实现了可以通过一次取样同时诊断早产和胎膜早破,但该试剂盒存在以下缺陷:

[0008] (1) 该方案为定性检测,即只能给出阴阳性结果,无法得知指标蛋白的准确含量,且定性检测靠肉眼判断存在辨别误差,容易造成错误的结果分析,甚至严重影响医生判断及其临床应用;

[0009] (2) 该方案虽然只给出了分别制备两种金标垫进行组装的步骤,其实际还是制备两种检测条,将两种检测条装入一张卡或将两种检测条背靠背粘贴在一起,并非真正做成一根测试条;

[0010] (3) 该方案是裸测试条且肉眼观察,试条容易受到污染,影响测量结果的判断。

[0011] 因此亟需提供一种新型的同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的检测系统来解决上述问题。

发明内容

[0012] 本发明所要解决的技术问题是提供一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,能够实现一次取样同时快速定量检测两个蛋白含量,为诊断胎膜早破与预测早产提供参考依据。

[0013] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统,包括试剂盒、检测设备;

[0014] 所述试剂盒主要包括检测卡、标准曲线对照表、样本稀释液,所述检测卡包括卡壳、设置在卡壳中的试条,所述试条包括衬底、依次粘附在衬底上的样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫,所述金标垫采用两种抗体标记胶体金并混合复溶液喷金的方法实现两种蛋白的同时检测;

[0015] 所述检测设备用于对试剂盒中两种蛋白的定量检测,为诊断胎膜早破与预测早产提供参考依据。

[0016] 在本发明一个较佳实施例中,所述卡壳包括相互卡接的上卡壳、下卡壳,上卡壳上开有位于样品垫上部的加样孔、位于NC膜上部的观测口,下卡壳的内表面设置有用于放置试条的卡槽。

[0017] 在本发明一个较佳实施例中,所述NC膜上依次等间隔设置有T2检测线、T1检测线、质控线,T2检测线上包被IGFBP-1单克隆抗体2,T1检测线上包被fFN单克隆抗体2,质控线上包被羊抗鼠抗体。

[0018] 在本发明一个较佳实施例中,所述样品垫与金标垫为玻璃纤维膜。

[0019] 在本发明一个较佳实施例中,所述标准曲线对照表设置在条形码或SD卡上,条形码印在卡壳的表面。

[0020] 为解决上述技术问题,本发明采用的另一个技术方案是:提供一种同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法,包括以下步骤:

[0021] (1) 在调节好pH值的胶体金溶液中分别标记胎儿纤维连接蛋白抗体1和胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1;

[0022] (2) 将两种标记物沉淀混合,加入pH值为7.0—7.4的金标复溶液进行复溶,混匀得到用于金标垫制备的金标液;

[0023] (3) 利用喷金仪将步骤(2)制备的金标液喷涂于亲水性的未处理金标垫上,置于37℃烘干,得到标记的金标垫。

[0024] 在本发明一个较佳实施例中,在步骤(1)中,所述胎儿纤维连接蛋白抗体1的标记方法包括以下步骤:

[0025] (101) 在1ml胶体金加入0.1mol/L碳酸钾溶液调节pH至fFN最适标记pH,该pH值为6.9—7.4;

[0026] (102) 混匀后,边迅速搅拌边逐滴加入6μg浓度为0.1mg/ml的胎儿纤维连接蛋白抗体1,反应30min;

[0027] (103) 再加入50μl 10%BSA,搅拌均匀,反应15min后,再加入20μl 5%PEG20000,反应15min。

[0028] 在本发明一个较佳实施例中,在步骤(1)中,所述胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1的标记方法包括以下步骤:

[0029] (111) 在1ml胶体金加入0.1mol/L碳酸钾溶液调节pH至IGFBP-1最适标记pH,该pH值为7.0—7.7;

[0030] (112) 混匀后,边迅速搅拌边逐滴加入6μg浓度为0.1mg/ml的胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1,反应30min;

[0031] (113) 再加入50μl 10%BSA,搅拌均匀,反应15min后,再加入20μl 5%PEG20000,反应15min。

[0032] 在本发明一个较佳实施例中,在步骤(2)中,所述金标复溶液的组成包括:

[0033] PB缓冲液:基质成分,pH值为7.0—7.4;

[0034] 10%蔗糖及5%海藻糖;

[0035] 1%BSA;

[0036] 0.5%PVP;

[0037] 0.5%Tween20。

[0038] 本发明还提供了一种利用所述同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法制备的金标垫。

[0039] 本发明的有益效果是:

[0040] (1) 本发明试剂盒和配套设备的联合检测系统能够准确确定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白的含量的多少,避免肉眼判断造成错误结果,IGFBP-1与fFN联合用于胎膜早破的诊断与早产预测应用范围更广,可明确是单纯的早产风险还是早产合并胎膜早破,方便医生对患者进行针对性的治疗,同时实现了一次取样同时定量检测两个指标,使用同一份阴道分泌物标本即可检测两个指标,根据蛋白含量值判断胎膜早破严重程度及早产的风险概率大小,避免对孕妇多次取样,减少刺激孕妇发生宫缩或者感染的几

率,不仅方便医生操作,提高了患者的依从性,且本发明具有操作快速简单的优点;

[0041] (2)所述检测卡由卡壳和试条组合测试,保护了试条不受污染,还起到固定的作用,使得试条不易滑动,影响测定,也使得加样量流速均一,从而降低了CV值,提高了其精密度,进一步提高了检测的准确性;另外该卡壳与检测设备能够配套使用,卡壳插入该检测设备相应的通道,使得自动稳定送样检测,进一步提高检测结果的准确性,蛋白含量测定值更加精确;

[0042] (3)所述金标垫采用两种抗体标记胶体金并混合复溶液喷金的方法实现两种蛋白的同时检测,真正意义上实现两种标记pH的标记物均稳定存在于一种复溶液及金标垫上,且可达到两种检测项目间不会相互干扰的目的,并能够最大限度地带动标记金量,提高其灵敏度,使得最终的检测线也更加均匀,不会出现深浅不一或不连续的现象,进一步降低了CV值,提高了其精密度;

[0043] (4)本发明可以同时快速灵敏检测特定蛋白含量,避免了复杂的操作,可以适应多种检测环境,并且所述检测设备具有打印功能,检测结果可以长期保存,便于对照分析,使检测更具有普遍性。

附图说明

[0044] 图1是所述检测卡的结构示意图;

[0045] 图2是所述试条的结构示意图;

[0046] 图3是所述检测设备的结构示意图;

[0047] 图4是所述检测设备的工作原理框图;

[0048] 附图中各部件的标记如下:1、检测卡,11、卡壳,111、加样孔,112、观测口,12、试条,121、衬底,122、样品垫,123、金标垫,124、NC膜,125、吸收垫,2、冷光源,3、光电传感器、4、滑块,5、导轨。

具体实施方式

[0049] 下面结合附图对本发明的较佳实施例进行详细阐述,以使本发明的优点和特征能更易于被本领域技术人员理解,从而对本发明的保护范围做出更为清楚明确的界定。

[0050] 请参阅图1和图2,本发明实施例包括:

[0051] 一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1(IGFBP-1)和胎儿纤维连接蛋白(fFN)含量的联合定量检测系统,包括试剂盒、检测设备。所述检测设备用于对试剂盒中两种蛋白的定量检测,为诊断胎膜早破与预测早产提供参考依据。优选的,所述检测设备采用HR201胶体金试纸分析仪。

[0052] 所述试剂盒主要包括检测卡1、标准曲线对照表、样本稀释液,所述样本稀释液的主要成分为Tris缓冲液,pH值为8.5。结合图1,所述检测卡1包括卡壳11、设置在卡壳11中的试条12。结合图2,所述试条12包括衬底121、依次粘附在衬底121上的样品垫122、金标垫123、NC膜124、吸收垫125。所述样品垫122与金标垫123为玻璃纤维膜。所述吸收垫125提供吸力,吸收反应后的液体,使层析流畅。所述NC膜124上依次等间隔设置有T2检测线、T1检测线、质控线C,T2检测线上包被IGFBP-1单克隆抗体2,T1检测线上包被fFN单克隆抗体2,质控线上包被羊抗鼠抗体。所述T2检测线与T1检测线之间、T1检测线与质控线C之间的距离均相

同,检测效果好,也便于划线,T1检测fFN,T2检测IGFBP-1。

[0053] 所述卡壳11包括相互卡接的上卡壳、下卡壳,上卡壳上开有位于样品垫122上部的加样孔111、位于NC膜124上部的观测口112,NC膜124上的T2检测线、T1检测线、质控线C位于观测口112的中部,下卡壳的内表面设置有用于放置试条12的卡槽。卡壳11不仅保护了试条,避免其受损污染,还起到固定的作用,使得试条不易滑动,影响测定。上下卡壳能够将试条12固定且微微试压,金标垫123上的标记抗体和样品稀释液能够同步运行,保证液体流速均一,进一步降低CV系数,提高精密度,同时操作方便,放平直接加样即可快速测试,对操作人员无硬性技术要求。另外该卡壳11与检测设备能够配套使用,卡壳11插入该检测设备相应的通道,使得自动稳定送样检测,进一步提高检测结果的准确性,蛋白含量测定值更加精确。

[0054] 所述标准曲线对照表设置在条形码或SD卡上,条形码印在卡壳11的表面,条形码或SD卡与检测设备配套使用,为导入该批次试剂盒标准曲线的作用,测出的信号值要根据标准曲线才能计算出标记蛋白浓度。

[0055] 该检测系统中的试剂盒运用双抗体夹心法免疫层析技术,与配套的检测设备使用,实现对孕妇阴道分泌物或阴道流出液中胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (IGFBP-1) 与胎儿纤维连接蛋白 (fFN) 的定量检测。

[0056] 测试时,样本滴入试剂盒检测卡1的加样孔111内,样本中的fFN与预先包被在金标垫123上的胶体金标记fFN单克隆抗体1结合,样本中的IGFBP-1与预先包被在金标垫上的胶体金标记IGFBP-1单克隆抗体1结合,结合物在毛细效应下向上层析,随后fFN结合物会被固定在NC膜124上相应测试区 (T1检测线) 的fFN单克隆抗体2结合捕获,IGFBP-1结合物会被固定在NC膜124上相应测试区 (T2检测线) 的IGFBP-1单克隆抗体2结合捕获,样本中的fFN越多,T1检测线上积聚的结合物越多,信号强度反应了被捕获的fFN数量;样本中的IGFBP-1越多,T2检测线上积聚的结合物越多,信号强度反应了被捕获的IGFBP-1数量。通过检测设备检测T1测试区和T2测试区的信号强度,再经过保存在条形码或SD卡上的定标曲线计算得到fFN和IGFBP-1的检测结果。

[0057] 所述检测设备的测量系统运用特定光源扫描C、T1、T2区,获得光吸收电信号,然后对光吸收电信号进行分析,定量地对靶向待测物进行分析,仅用一步法对样本(孕妇阴道分泌物或阴道流出液中胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (IGFBP-1) 与胎儿纤维连接蛋白 (fFN)) 提供快速定量的检测结果。

[0058] 结合图3和图4,检测设备包括测量卡、光源系统、光电检测系统、主电路控制板热敏打印机、显示屏等,光源系统包括冷光源2、光电传感器3,主电路控制板包括DC-DC电路、放大电路、控制电路。检测设备通过机械运动部件(导轨5、滑块4等),将携带反应完全的金免疫层析试纸原理的检测卡1传输至设备内部,携带样本信息和项目信息的条形码通过45度角的单面玻璃,经条码扫描头进行信息读取,从而让设备对IGFBP-1和fFN项目判读,其判读过程是通过特定波长LED光源照射检测区C、T1、T2线,光电检测系统将该波长光源经样本层析试纸的光信号进行接收,完成光信号到电信号的转换,并经过信号放大,将模拟信号经AD转换板转换为数字信号,最终数字信号进入主板算法系统内,经条形码或SD卡中预设的标准曲线换算,得到最终检测值,通过显示屏和打印机进行结果展示,通过设备内该运行原理,即完成了对样品的金免疫层析定量分析过程。

[0059] 所述试剂盒的制备方法为：

[0060] 1、所述金标垫123采用两种抗体标记胶体金并混合复溶液喷金的方法实现两种蛋白的同时检测。在碱性条件下，胶体金颗粒表面带负电荷，可与目标蛋白质所带正电荷基团之间形成非共价键的静电吸引而牢固结合，这些标记物在抗原抗体反应处聚集达到一定密度时，出现肉眼可见的红色斑点。胶体金与蛋白质的结合成功与否，取决于pH值，最适pH值一般接近或略大于被标记物的等电点，才能被牢固地结合，而被标记物的用量取决于胶体金颗粒的大小。所述金标垫123的制备方法包括以下步骤：

[0061] (1) 在调节好pH值的胶体金溶液中分别标记胎儿纤维连接蛋白抗体1和胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1；具体包括：

[0062] 所述胎儿纤维连接蛋白抗体1的标记方法包括以下步骤：

[0063] (101) 在1ml胶体金加入0.1mol/L碳酸钾溶液调节pH至fFN最适标记pH，该pH值为6.9—7.4；

[0064] (102) 混匀后，边迅速搅拌边逐滴加入6 μ g浓度为0.1mg/ml的胎儿纤维连接蛋白抗体1，反应30min；

[0065] (103) 再加入50 μ l 10%BSA，搅拌均匀，反应15min后，再加入20 μ l 5%PEG20000，反应15min。

[0066] 所述胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1的标记方法包括以下步骤：

[0067] (111) 在1ml胶体金加入0.1mol/L碳酸钾溶液调节pH至IGFBP-1最适标记pH，该pH值为7.0—7.7；

[0068] (112) 混匀后，边迅速搅拌边逐滴加入6 μ g浓度为0.1mg/ml的胰岛素样生长因子结合蛋白-1抗体1，反应30min；

[0069] (113) 再加入50 μ l 10%BSA，搅拌均匀，反应15min后，再加入20 μ l 5%PEG20000，反应15min。

[0070] BSA和PEG20000为稳定剂，保护胶体金标记物的稳定性，可以封闭胶体金颗粒上多余位点的作用，使之便于长期保存，也防止或减少免疫金复合物的非特异性吸附反应，使用BSA及PEG20000封闭后再混合使得两种胶体金标记物混合后不会产生交叉吸附。

[0071] (2) 采用低温超速离心去除未标记蛋白/抗体及未充分标记的胶体金，具体方法为：8000rpm离心30min，去掉上清，将两种标记物沉淀混合，加入pH值为7.0—7.4的金标复溶液进行复溶，该pH保证两种抗体标记物均能够稳定存在，两种抗体标记胶体金沉淀混合复溶至40 μ l，复溶完全后，混匀得到用于金标垫制备的金标液；

[0072] 其中，所述金标复溶液的组成包括：

[0073] PB缓冲液：基质成分，pH值为7.0—7.4，提供最佳混溶环境；

[0074] 10%蔗糖及5%海藻糖：为免疫金复合物提供保护作用；

[0075] 1%BSA：进一步消除混溶时免疫金复合物的非特异性吸附反应；

[0076] 0.5%PVP：促进检测时免疫金复合物的重新润湿及释放；

[0077] 0.5%Tween20：为了降低CV，金标垫不进行预处理，添加Tween20是为了弥补金标垫不处理带来的亲水性损失。

[0078] (3) 利用喷金仪将步骤(2)制备的金标液喷涂于亲水性的未处理金标垫上，设置喷金浓度3 μ l/cm进行喷涂，然后置于37 $^{\circ}$ C烘干，得到标记的金标垫。两种抗体混合复溶喷金，

能够最大限度地带动标记金量,提高其灵敏度,C、T1、T2也更加均匀,不会出现深浅不统一或不连续的现象,进一步降低了CV值,提高了其精密性,进而提高其结果的准确性。

[0079] 本标记方案将两种抗体混合一起的方法,能够一次取样加样,并同时快速测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白的含量,进一步提高精密性,降低CV值,从而提高检测结果的准确性,并且所使用的抗体及原料较少,节约成本,结果准确性较高,具有经济适用性快速简单等优点。

[0080] 2、NC膜:

[0081] T1、T2检测线均以1.2mg/mL的浓度包被,C线以0.7mg/mL的浓度包被。划线浓度一般为1 μ l/cm进行划线,包被的抗体/抗原划线后需37 $^{\circ}$ C烘干,得到包被的划线胶板(即在NC膜上包被T1、T2、C线)。采用以上浓度包被质控线C、T1、T2检测线,包被后使用效果更好,C、T线也更加均匀,确保不会出现深浅不统一或不连续的现象,同时使用的包被抗体用量最少,降低成本,经济效益好。

[0082] 3、样品垫:

[0083] 样品垫处理液的pH设置浓度为8.5,烘干保存,按照上述方法制备样品垫。该pH制备的样品垫122使用效果最好,阳性、阴性对照结果较好,使用检测系统中的检测设备进行测定,IGFBP-1与fFN的cutoff值均有较明显的检测信号值,而阴性信号值为0,且不同浓度梯度的阳性样品信号值测试结果有明显的梯度,浓度越大信号值越高。

[0084] 4、将处理好的样品垫122、金标垫123、包被好的NC膜124及吸收垫125组合切条制成试条12,并与相配套的卡壳11组装。

[0085] 5、取铝箔袋和干燥剂;打开热封机,预热;先将试条12与卡壳11组装,然后装入铝箔袋,再取一袋干燥剂装入铝箔袋中,用热封机封好铝箔袋。最终完成试剂盒的制备。

[0086] 根据上述方法在相同生产环境条件下制备的试条及其配套检测设备,各取fFN和IGFBP-1的高、中、低3种浓度的样品,各水平重复测定10次,计算变异系数(CV),fFN的高、中、低3种浓度分别为500ng/ml、200ng/ml、50ng/ml,IGFBP-1的高、中、低3种浓度分别为200ng/ml、80ng/ml、20ng/ml。

[0087] 同一批试剂生产的试条,测试其批内CV,结果如下表:

[0088]

质控项目 均值 (ng/ml)		高浓度	中浓度	低浓度
fFN		497.36	208.76	51.29
IGFBP-1		206.11	78.59	20.48
CV(%)	fFN	6.67	4.73	6.29
	IGFBP-1	8.46	5.85	7.97

[0089] 根据上述方法在相同生产环境条件下制备三批试剂生产的试条,各取fFN和IGFBP-1的高、中、低3种浓度的样品,使用配套设备进行测试,每个批号测试3次,分别计算每批3次测定的均值,测试其批间CV,结果如下表:

[0090]

均值 ng/ml 质控项目		fFN	IGFBP-1	CV (%)	
				fFN	IGFBP-1
高浓度	第一批	507.63	201.21	7.57	9.64
	第二批	511.46	199.16		
	第三批	513.05	203.43		
中浓度	第一批	197.71	83.75	6.74	7.00
	第二批	194.53	83.43		
	第三批	203.05	72.73		
低浓度	第一批	49.57	22.14	8.11	9.25
	第二批	53.40	19.64		
	第三批	53.18	20.12		

[0091] 上述结果符合国家规定,批内、批间CV均在15%以内,同时也符合本发明规定批内、批间CV (CV<15%) 标准合格指标。

[0092] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

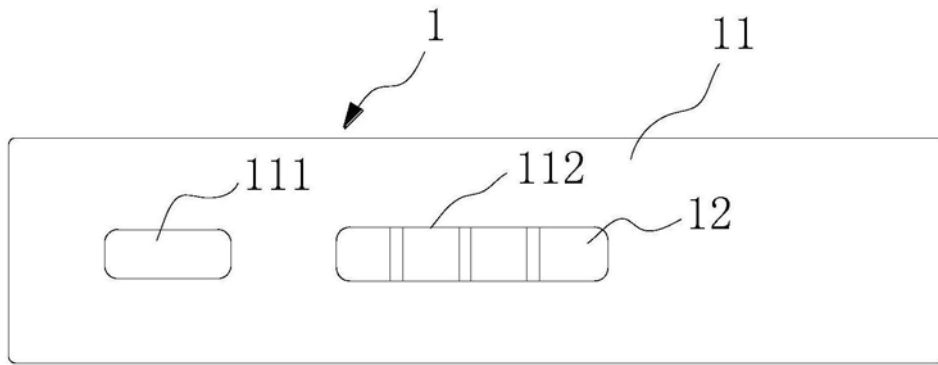


图1

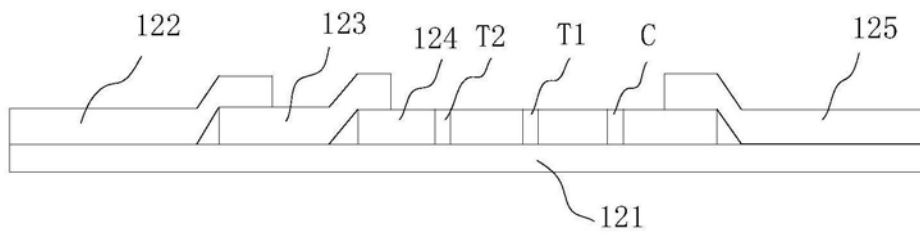


图2

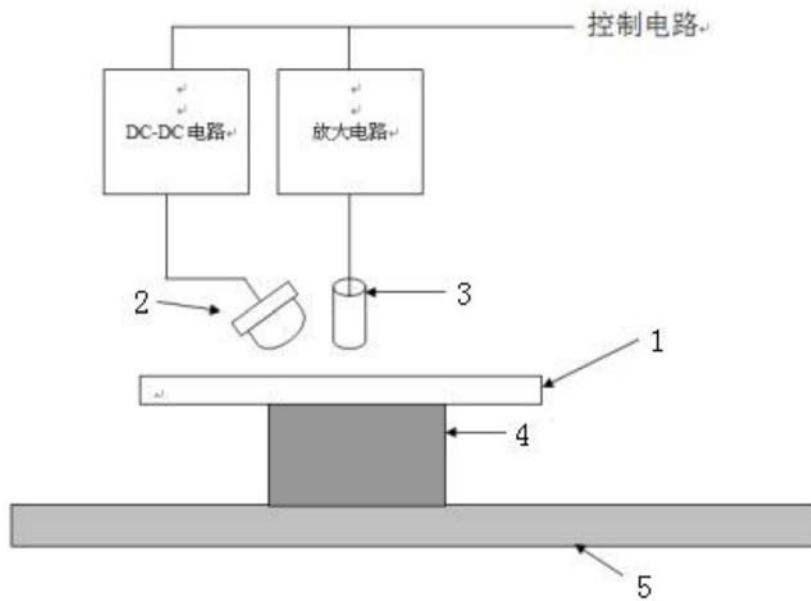


图3

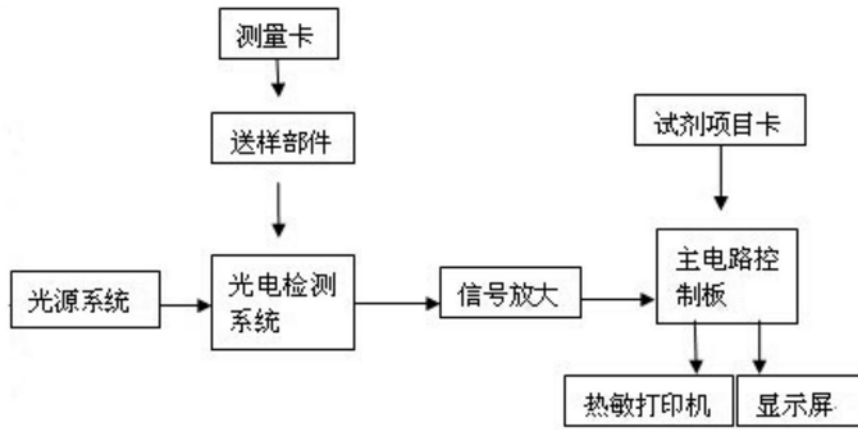


图4

专利名称(译)	用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统		
公开(公告)号	CN110346578A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201910493157.5	申请日	2019-06-06
[标]发明人	胡容 王忠亮		
发明人	胡容 王忠亮		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/6872 G01N33/689		
代理人(译)	李璐		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的联合定量检测系统，包括试剂盒、检测设备；试剂盒运用双抗体夹心法免疫层析技术，与配套仪器使用，实现对孕妇阴道分泌物或阴道流出液中胰岛素样生长因子结合蛋白-1与胎儿纤维连接蛋白的定量检测，为诊断胎膜早破与预测早产提供参考依据。还公开了一种同时测定胰岛素样生长因子结合蛋白-1和胎儿纤维连接蛋白含量的金标垫的制备方法及其制备的金标垫，所述金标垫采用两种抗体标记胶体金并混合复溶液喷金的方法实现两种蛋白的同时检测，实现了一次取样同时定量检测两个指标，操作快速简单，检测准确度高。

