



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109655625 A

(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201910073429.6

(22)申请日 2019.01.25

(71)申请人 三诺生物传感股份有限公司

地址 410205 湖南省长沙市高新技术开发
区谷苑路265号

(72)发明人 石沙丽

(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 刘猛 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/72(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及
其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及免疫检测技术领域，公开了一种
检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方
法和应用。本发明所述胶体金试纸条包括样品
垫、金标结合垫、NC膜、吸水垫和基板；所述金标
结合垫上含有糖化血红蛋白单克隆抗体-胶体金
标记物或者抗人血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记
物；所述NC膜上标记有检测线和质控线，所述
检测线上包被有糖化血红蛋白。本发明基于
ELISA竞争法原理构建糖化血红蛋白的胶体金检
测试纸条，使检测样品中的糖化血红蛋白和检测
线上的糖化血红蛋白抗原竞争结合金标结合垫
上的金标抗体，从而将检测线的条带显色程度与
检测样品中的糖化血红蛋白浓度建立关联，实现
半定量检测的目的。

1. 一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条，其特征在于，包括样品垫、金标结合垫、NC膜、吸水垫和基板；

所述NC膜上标记有检测线和质控线，所述检测线上包被有糖化血红蛋白；

所述金标结合垫上含有糖化血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记物或者抗人血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记物。

2. 根据权利要求1所述胶体金试纸条，其特征在于，所述基板为PVC板。

3. 根据权利要求1所述胶体金试纸条，其特征在于，所述质控线包被有标准比对品。

4. 根据权利要求3所述胶体金试纸条，其特征在于，所述标准比对品为羊抗鼠 IgG。

5. 权利要求1-4任意一项所述胶体金试纸条在半定量检测糖化血红蛋白浓度和/或制备半定量检测糖化血红蛋白的试剂盒中的应用。

6. 一种半定量检测糖化血红蛋白的试剂盒，其特征在于，包括权利要求1-4任意一项所述胶体金试纸条和比色卡，所述比色卡由系列浓度的糖化血红蛋白经权利要求1-4任意一项所述胶体金试纸条检测制备而成。

7. 根据权利要求6所述试剂盒，其特征在于，所述系列浓度的糖化血红蛋白为<5 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、300-500 μ g/ml、500-700 μ g/ml、800-900 μ g/ml和1mg/ml的糖化血红蛋白。

8. 权利要求1所述胶体金试纸条的制备方法，其特征在于，包括：

制备胶体金颗粒；胶体金颗粒标记糖化血红蛋白单克隆抗体或抗人血红蛋白单克隆抗体，并滴加至结合垫上干燥，获得胶体金结合垫；

将糖化血红蛋白包被在NC膜上作为检测线，将标准对照品包被在NC膜上作为质控线；

将样品垫、胶体金结合垫、NC膜和吸水垫黏贴到基板上，获得所述胶体金试纸条。

9. 根据权利要求8所述制备方法，其特征在于，所述检测线由0.1-0.5mg/ml糖化血红蛋白溶液包被。

10. 根据权利要求8所述制备方法，其特征在于，所述质控线由0.4mg/ml标准对照品溶液包被。

一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 现在糖尿病已成为继心脑血管疾病和肿瘤之后第三大非传染病,亦必然成为导致病残和死亡的重要原因之一,糖化血红蛋白可作为糖尿病患者长期血糖控制的指标,而且与糖尿病慢性并发症的发生及发展有密切关系。

[0003] 糖化血红蛋白反映长期血糖水平,可以反映最近2~3个月的平均血糖水平。目前,临幊上测定HbA1c的方法有很多,较常用的是HPLC法、酶法、胶乳免疫比浊法等。其中,HPLC方法作为检测糖化血红蛋白的金标准方法被广泛采用,但成本较高;酶法检测的精密度、准确度较差;胶乳免疫比浊法因为能够用于全自动生化分析仪,且结果比酶法准确,价格相比HPLC方法低,但其操作比较复杂,且适用于通量高,时间较长。因此,临幊上急需寻求一种操作简单、快速,成本较低的糖化血红蛋白检测方法。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法,使得所述胶体金试纸条能够用于肉眼识别的半定量检测全血中的糖化血红蛋白含量,并可应用于糖化血红蛋白半定量检测试剂盒的制备中。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供了如下技术方案:

[0006] 一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条,其特征在于,包括样品垫、金标结合垫、NC膜、吸水垫和基板;

[0007] 所述NC膜上标记有检测线和质控线,所述检测线上包被有糖化血红蛋白;

[0008] 所述金标结合垫上含有糖化血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记物或者抗人血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记物。

[0009] 作为优选,所述基板为PVC板;所述质控线包被有标准比对品,在金标结合垫上含有能够与标准对照品结合的金标试剂,用于质控;在本发明具体实施方式中,所述标准比对品为羊抗鼠IgG(购于Arista),对应的金标结合垫上含有小鼠IgG-胶体金标记物。

[0010] 本发明所述胶体金试纸条基于竞争法原理,使检测样品中的糖化血红蛋白和检测线上的糖化血红蛋白抗原竞争结合金标结合垫上的金标抗体,从而将检测线的条带显色程度与检测样品中的糖化血红蛋白浓度建立关联,实现半定量检测的目的。

[0011] 本发明以目前常用的双抗体夹心法胶体金试纸条和本发明胶体金试纸条进行比对,结果显示,以相同样品进行检测,本发明所述试纸条能够清晰的显示出检测线条带,而双抗体夹心法胶体金试纸条无法显示出肉眼可见的检测线条带;同时,本发明所述试纸条能够随着糖化血红蛋白的浓度增加而逐渐减弱检测线条带,完全能够符合肉眼可见的半定量检测要求。基于此,本发明提供所述胶体金试纸条在半定量检测糖化血红蛋白浓度和/或

制备半定量检测糖化血红蛋白的试剂盒中的应用。

[0012] 依据上述应用,本发明具体提供一种半定量检测糖化血红蛋白的试剂盒,包括本发明所述胶体金试纸条和比色卡,所述比色卡由系列浓度的糖化血红蛋白经权利要求1-4任意一项所述胶体金试纸条检测制备而成。

[0013] 在本发明具体实施方式中,本发明选择系列浓度的糖化血红蛋白为 $<5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $300-500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $500-700\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $800-900\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的糖化血红蛋白,将其滴入到本发明所述胶体金试纸条注意检测,随着检测抗原浓度的逐渐增大,检测线条带由最开始的与质控线显色程度相当,逐渐减弱至肉眼无法看到条带,由此可制备出半定量比色卡,示意图见图1。

[0014] 此外,本发明还提供了所述胶体金试纸条的制备方法,包括:

[0015] 制备胶体金颗粒;胶体金颗粒标记糖化血红蛋白单克隆抗体或抗人血红蛋白单克隆抗体,并滴加至结合垫上干燥,获得胶体金结合垫;

[0016] 将糖化血红蛋白包被在NC膜上作为检测线,将标准对照品包被在NC膜上作为质控线;

[0017] 将样品垫、胶体金结合垫、NC膜和吸水垫黏贴到基板上,获得所述胶体金试纸条。

[0018] 其中,胶体金颗粒的制备可以氯金酸法进行制备,在本发明具体实施方式中,胶体金颗粒的制备过程如下:

[0019] 精确量取1L超纯水于圆底烧瓶中并放入适量防暴沸玻璃珠加热至沸腾,加入15-20mL 1%的柠檬酸三钠溶液煮沸1min,加入10mL 1%的氯金酸溶液。待颜色稳定后继续加热8分钟,冷却后加纯水补充至1L待使用。

[0020] 在本发明具体实施方式中,所述胶体金颗粒标记糖化血红蛋白单克隆抗体或抗人血红蛋白单克隆抗体的过程如下:

[0021] 胶体金复溶液的配置:20mM磷酸盐缓冲液PH=7.4含0.5-1%酪蛋白,0.5%肌醇,2%蔗糖,0.3%吐温20。

[0022] 取10mL 0.01%的胶体金颗粒,用加入50-70μL的0.1mol/L的K₂CO₃调节pH;加入K₂CO₃混匀2分钟,加入30~80μg糖化血红蛋白单克隆抗体(购于罗氏)或者抗人血红蛋白单克隆抗体(购于BBI),混匀2分钟,静置10分钟;加入100μL 10%的BSA溶液,静置5-8分钟;将上述溶液12000rpm离心10-30分钟,弃上清,用6.6mL复溶液复溶,此时胶体金标记完成,接下来是金标结合垫的制备,即将上述复溶后的溶液均匀滴加到6mm宽的结合垫上,37℃干燥10-16小时,最终制得金标结合垫。

[0023] 作为优选,所述检测线由0.1-0.5mg/ml糖化血红蛋白溶液包被,所述质控线由0.4mg/ml标准对照品溶液包被。在本发明具体实施方式中,糖化血红蛋白抗原(美国PTS合成)和标准比对品用pH6.5含2%蔗糖的Tris-HCl缓冲液稀释,糖化血红蛋白抗原浓度为0.1-0.5mg/ml,羊抗鼠IgG抗体浓度为0.4mg/ml。按照1μl/cm的速度包被检测线和控制线,为防止扩散,包被好的基板立即放到37℃干燥2小时。

[0024] 由以上技术方案可知,本发明基于ELISA竞争法原理构建糖化血红蛋白的胶体金检测试纸条,使检测样品中的糖化血红蛋白和检测线上的糖化血红蛋白抗原竞争结合金标结合垫上的金标抗体,从而将检测线的条带显色程度与检测样品中的糖化血红蛋白浓度建立关联,实现半定量检测的目的。相比于目前的双抗体夹心法的产品,本发明能够以肉眼直

接半定量确定糖化血红蛋白的含量,使检测方法更加快捷方便,同时也可以使用胶体金读卡仪实现定量检测。

附图说明

[0025] 图1所示为本发明所述比色卡;其中,C1-C9以及B依次代表<5 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、300-500 μ g/ml、500-700 μ g/ml、800-900 μ g/ml和1mg/ml糖化血红蛋白浓度;

[0026] 图2所示为本发明胶体金试纸条的结构示意图;

[0027] 图3所示为双抗体夹心试纸条1的15组试验结果;

[0028] 图4所示为双抗体夹心试纸条2的10组试验结果;

[0029] 图5所示为本发明试纸条7组竞争法检测结果;

[0030] 图6所示为本发明试纸条4组竞争法检测结果。

具体实施方式

[0031] 本发明公开了一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法和应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述胶体金试纸条及其制备方法和应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述胶体金试纸条及其制备方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0032] 在本发明具体实施方式中,如无特别说明,所涉及的对比试验中,除去各组应有的技术区别外,其他试验所用试剂、样本等材料以及试验环境均一致。

[0033] 以下就本发明所提供的一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法和应用做进一步说明。

[0034] 实施例1:制备本发明所述胶体金试纸条

[0035] 1、胶体金颗粒的制备:

[0036] 精确量取1L超纯水于圆底烧瓶中并放入适量防暴沸玻璃珠加热至沸腾,加入15-20m11%的柠檬酸三钠溶液煮沸1min,加入10m11%的氯金酸溶液。待颜色稳定后继续加热8分钟,冷却后加纯水补充至1L待使用。

[0037] 2、胶体金的标记:

[0038] 胶体金复溶液的配置:20mM磷酸盐缓冲液PH=7.4含酪蛋白0.5-1%,肌醇0.5%,蔗糖2%,0.3%吐温20。

[0039] 取10m10.01%的胶体金颗粒,用加入50-70 μ L的0.1mol/L的K₂CO₃调节pH;加入K₂CO₃混匀2分钟,加入30~80 μ g糖化血红蛋白单克隆抗体(购于罗氏)或者抗人血红蛋白单克隆抗体(购于BBI),混匀2分钟,静置10分钟;加入100 μ l 10%的BSA溶液,静置5-8分钟;将上述溶液12000rpm离心10-30分钟,弃上清,用6.6ml复溶液复溶,此时胶体金标记完成,接下来是金标结合垫的制备,即将上述复溶后的溶液均匀滴加到6mm宽的结合垫上,37℃干燥10-16小时,最终制得金标结合垫。

[0040] 3、硝酸纤维膜的包被:

[0041] 包括糖化血红蛋白抗原包被及标准比对品包被,其中标准比对品选取羊抗鼠 IgG(购于Arista)。

[0042] 糖化血红蛋白抗原(美国PTS合成)和羊抗鼠 IgG抗体(购于Arista)用pH6.5含2%蔗糖的Tris-hcl缓冲液稀释,糖化血红蛋白抗原浓度为0.1-0.5mg/ml,羊抗鼠 IgG抗体浓度为0.4mg/ml。

[0043] 按照1 μ l/cm的速度包被检测线和控制线,为防止扩散,包被好的PVC板立即放到37℃干燥2小时。

[0044] 4、组装

[0045] 在上述步骤均完成后,分别将所述糖化血红蛋白试条的样品垫、金标结合垫、NC膜和吸水垫分别依次搭接并黏贴到PVC板上,切成3mm条,装袋封口,室温保存备用,结构示意图见图2。

[0046] 实施例2:双抗体夹心法和竞争法胶体金试纸条的对比

[0047] 1、双抗体夹心法试纸条

[0048] (1) 双抗试纸条1:参照实施例1的制备方法,将检测线包被抗血红蛋白单抗,金标结合垫滴加糖化血红蛋白单抗;

[0049] (2) 双抗试纸条2:参照实施例1的制备方法,将检测线包被糖化血红蛋白单抗,金标结合垫滴加糖化血红蛋白单抗;

[0050] 2、本发明竞争法胶体金试纸条

[0051] 参照实施例1的制备方法,金标结合垫滴加糖化血红蛋白单抗;

[0052] 3、单抗

[0053] 采用单抗常规制备方法制备1-15号糖化血红蛋白单抗以及抗血红蛋白单抗,所有单抗经检测均符合要求;

[0054] 4、试验方法

[0055] (1) 双抗试纸条1分组:1-15组中检测线均包被上述相同的抗血红蛋白单抗,金标结合垫滴加上述1-15号糖化血红蛋白单抗;

[0056] (2) 双抗试纸条2分组:1-10组中检测线对应包被上述1-10号糖化血红蛋白单抗,金标结合垫依组别顺序滴加11、12、13、14、15、1、2、3、4、5号糖化血红蛋白单抗;

[0057] (3) 本发明竞争法胶体金试纸条1分组:1-7组中检测线包被PTS合成的糖化血红蛋白抗原,金标结合垫依组别顺序滴加11、12、13、14、15、1、2号糖化血红蛋白单抗;

[0058] (4) 本发明竞争法胶体金试纸条2分组:1-4组中检测线包被PTS合成的糖化血红蛋白抗原,金标结合垫依组别顺序滴加1、2、3、4号糖化血红蛋白单抗;

[0059] 上述双抗试纸条1各组以及双抗试纸条2各组全部采用相同的临床11%高浓度糖化血红蛋白样品进行检测,本发明竞争法胶体金试纸条1中的1-7组依次采用0 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml和1mg/ml糖化血红蛋白标准品溶液进行检测,本发明竞争法胶体金试纸条2中的1-4组全部采用本发明竞争法胶体金试纸条1中的0 μ g/ml糖化血红蛋白标准品溶液进行检测,试验结果见图3-6。

[0060] 5、结果

[0061] 图3所示为双抗试纸条1的15组结果,根据附图中的结果可知,15组的检测线处均无显色条带;图4所示为双抗试纸条2的10组结果,根据附图中的结果可知,10组的检测线处

均无显色条带；临床11%糖化血红蛋白样品属高浓度样品，但是即便是在高浓度样品条件下，两种双抗夹心试纸条仍是无法通过肉眼观察出明显条带；

[0062] 图5所示为本发明竞争法胶体金试纸条1的7个不同样本浓度的检测结果，根据附图中的结果可知，7个不同的检测浓度检测线处的条带随着糖化血红蛋白标准品溶液的浓度增加而逐渐减弱，形成肉眼可见的梯度；

[0063] 图6所示为本发明竞争法胶体金试纸条2的4组结果，根据附图中的结果可知，4组的检测线处均有肉眼可见的显色条带；

[0064] 上述四组结果可以说明，双抗体夹心法的胶体金试纸条无法获得预期的显色信号，并不能用于肉眼观察的半定量检测产品中。

[0065] 实施例3：显色卡的制备

[0066] 参照实施例1方法制备胶体金试纸条（选用购于罗氏的糖化血红蛋白单克隆抗体），将糖化血红蛋白抗原稀释成<5 μ g/ml（C1）、5 μ g/ml（C2）、10 μ g/ml（C3）、25 μ g/ml（C4）、50 μ g/ml（C5）、100 μ g/ml（C6）、300–500 μ g/ml（C7）、500–700 μ g/ml（C8）、800–900 μ g/ml（C9）和1mg/ml（B），每个浓度向试纸条加入55 μ l溶液，15分钟内判读结果，并根据结果制备成如图1所示显色卡，图1结果可以看出，检测不同浓度的抗原，抗原浓度越高本发明试条显色越浅，抗原浓度越低本发明试条显色越深。

[0067] 将图1所示的显色卡与本发明所述胶体金试纸条作为主要组成部分形成半定量检测试剂盒。

[0068] 实施例4：临床样本检测

[0069] 将实施例3中的试条检测临床血，临床血用含1%的曲拉通100按1:30裂解30分钟后，每个试条加入40 μ l的上述裂解溶液后，加入55 μ l的PBST冲洗，临床血低中高值分别是4.5%，7.2%，12.1%，检测结果如下表1；

[0070] 表1

[0071]

医院检测值	4.5%	7.2%	12.1%
色卡值	C1	C3	C5

[0072] 以上结果显示本发明试条检测临床血低中高值的检测与预测结果一致，说明本发明试条可以运用于临床血检测，如果有胶体金读卡仪，可做精确的定量分析，T/C比值可以用于计算糖化血红蛋白与血红蛋白的百分含量等。

[0073] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

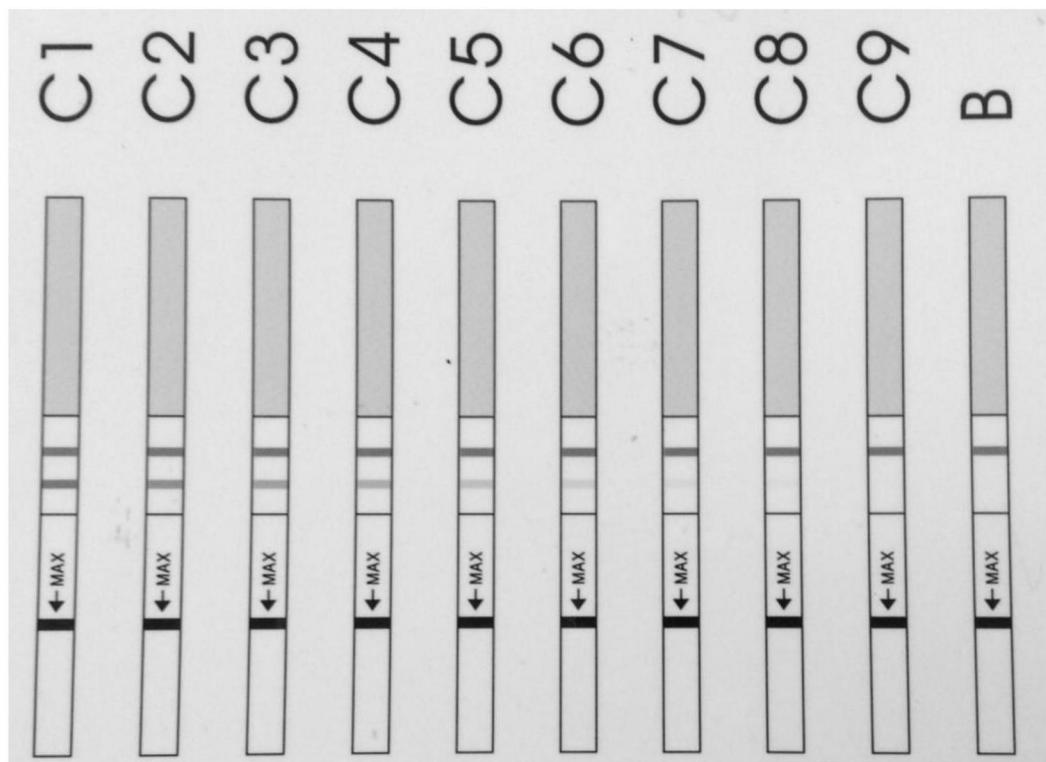


图1

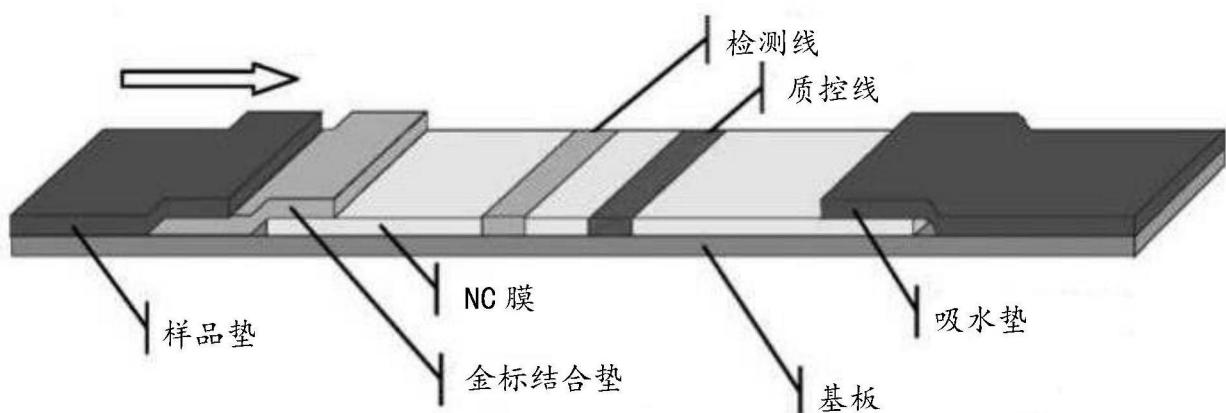


图2

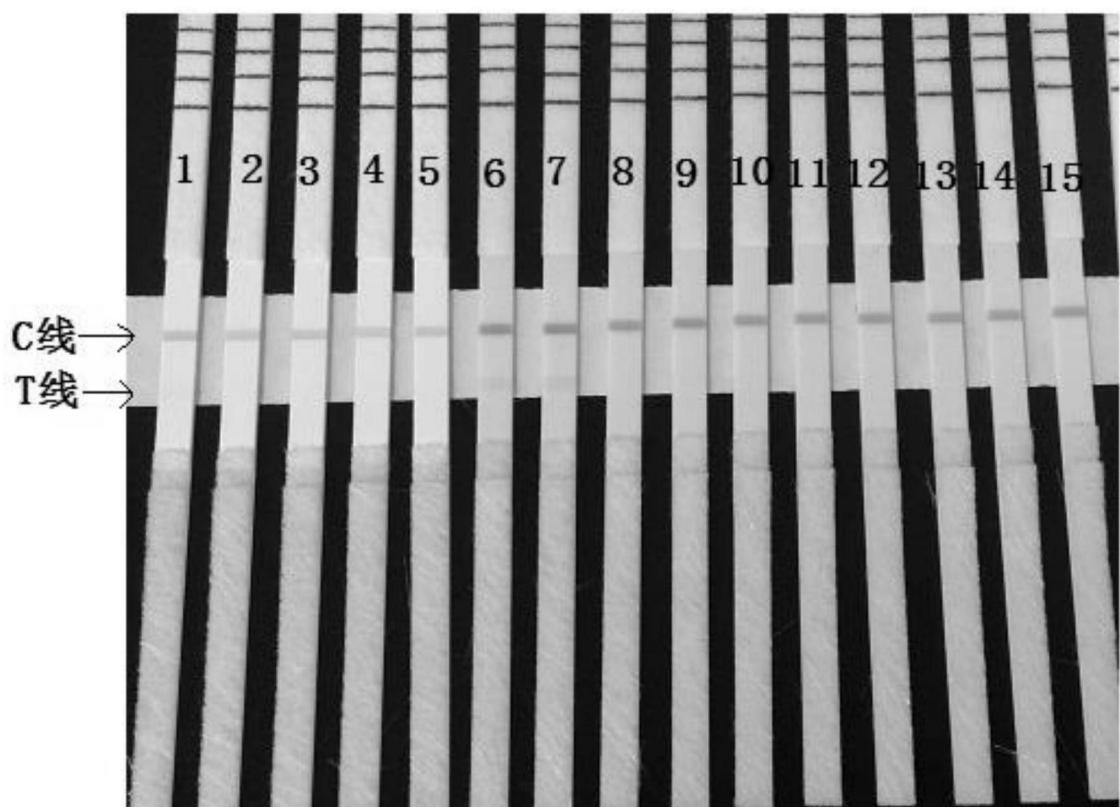


图3

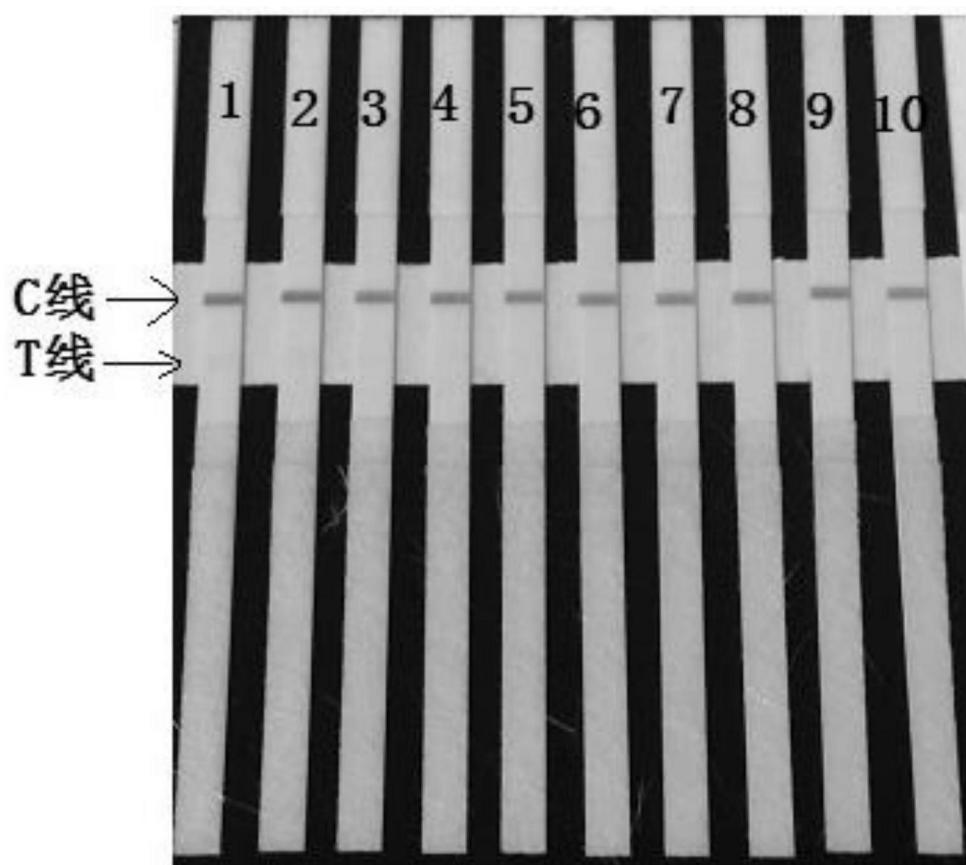


图4

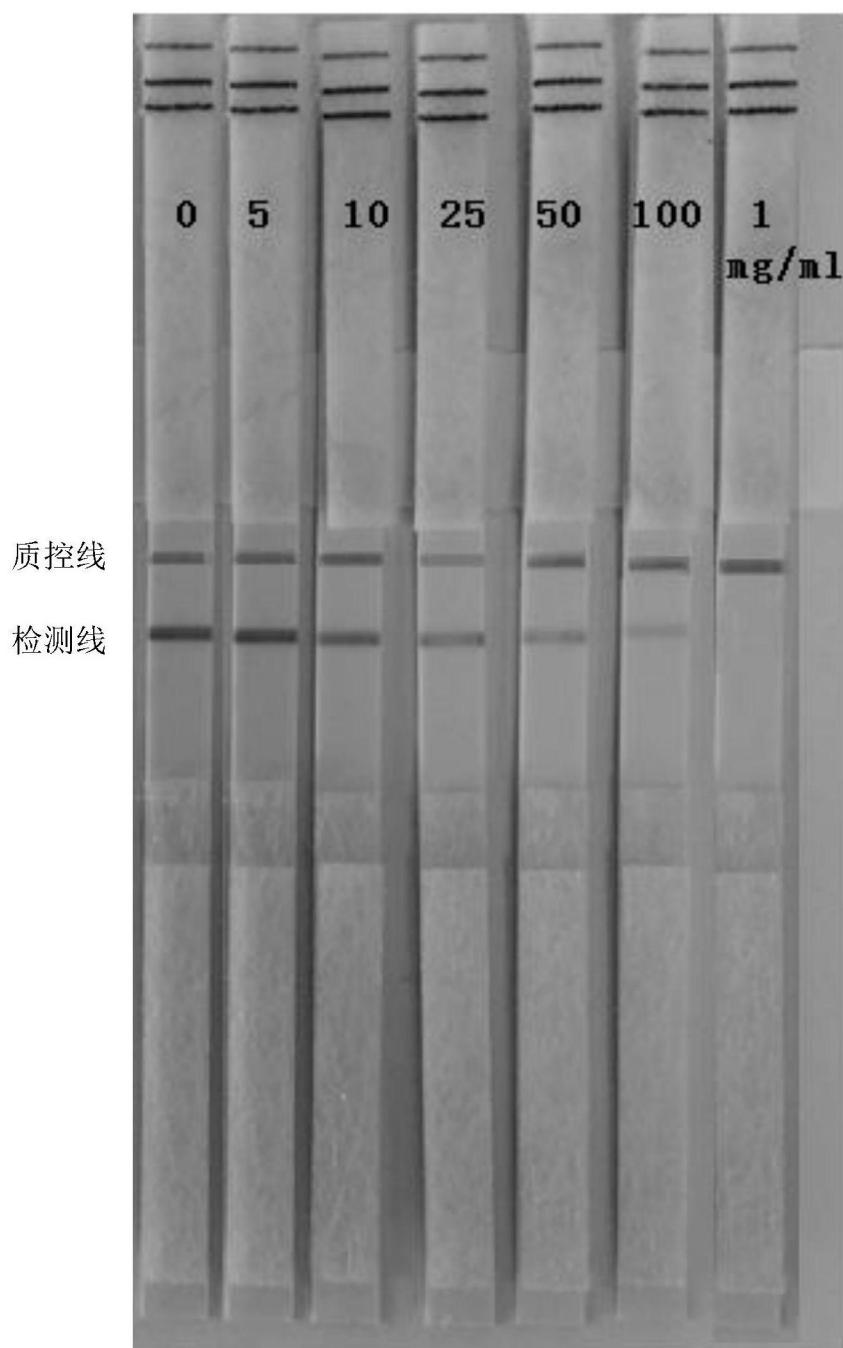


图5

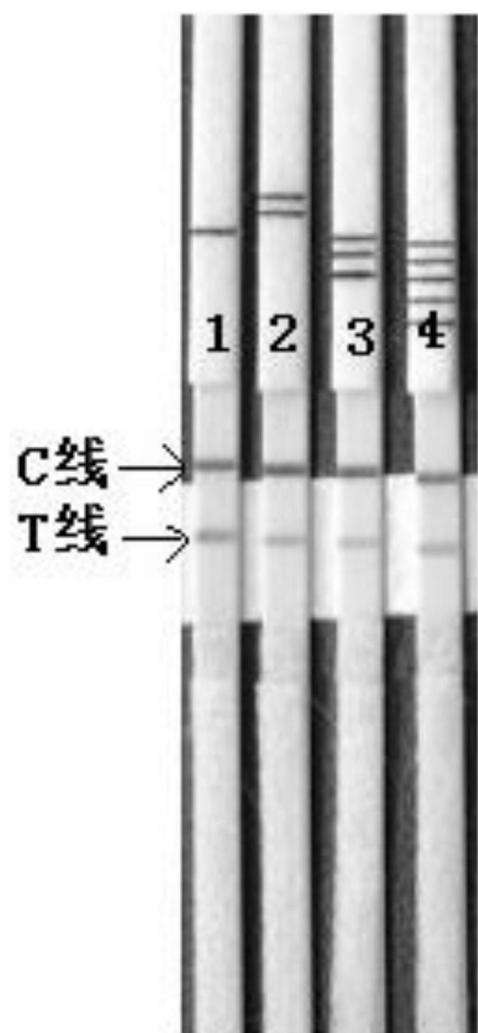


图6

专利名称(译)	一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109655625A	公开(公告)日	2019-04-19
申请号	CN201910073429.6	申请日	2019-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	三诺生物传感股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	三诺生物传感股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	三诺生物传感股份有限公司		
[标]发明人	石沙丽		
发明人	石沙丽		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/723 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	刘猛		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明涉及免疫检测技术领域，公开了一种检测糖化血红蛋白的胶体金试纸条及其制备方法和应用。本发明所述胶体金试纸条包括样品垫、金标结合垫、NC膜、吸水垫和基板；所述金标结合垫上含有糖化血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记物或者抗人血红蛋白单克隆抗体-胶体金标记物；所述NC膜上标记有检测线和质控线，所述检测线上包被有糖化血红蛋白。本发明基于ELISA竞争法原理构建糖化血红蛋白的胶体金检测试纸条，使检测样品中的糖化血红蛋白和检测线上的糖化血红蛋白抗原竞争结合金标结合垫上的金标抗体，从而将检测线的条带显色程度与检测样品中的糖化血红蛋白浓度建立关联，实现半定量检测的目的。

C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 B

