



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104345150 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 11

(21) 申请号 201310320849. 2

G01N 33/532 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 26

(71) 申请人 深圳市艾瑞生物科技有限公司

地址 518048 广东省深圳市宝安区西乡街道  
臣田社区宝田三路宝田工业区 22 栋 5  
楼西边

(72) 发明人 谢爱武

(74) 专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理  
事务所 (普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

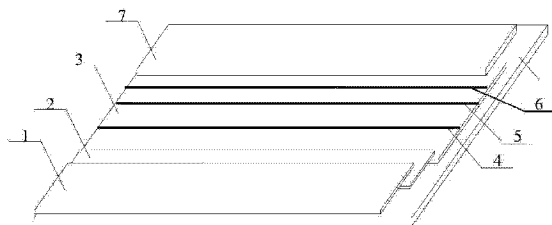
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条及其制备方法,包括衬垫、设置于衬垫中部的分析膜、设置于分析膜上部一端的吸水垫、设置于分析膜上部另一端的结合物垫以及设置于结合物垫上部一端的样品垫,分析膜上设置有检测线和质控线,检测线包括糖化白蛋白检测线和血红蛋白检测线;制备方法包括:苯硼酸标记物的制备、样品垫的制备、结合物垫的制备、分析膜上检测线和质控线的制备、吸水垫的制备和检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备。本发明提出的一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条,其只需要微量的全血样本,即可在 3-5 分钟内实现定量检测糖化白蛋白的含量,大大提高了筛查的速度,具有灵敏度高、特异性好和结构简单的优点。



1. 一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条,其特征在于:包括衬垫、设置于所述衬垫中部的分析膜、设置于所述分析膜上部一端的吸水垫、设置于所述分析膜上部另一端的结合物垫以及设置于所述结合物垫上部一端的样品垫,所述分析膜上设置有检测线和质控线,所述检测线包括糖化白蛋白检测线和白蛋白检测线,所述质控线、所述白蛋白检测线和所述糖化蛋白检测线沿着所述分析膜上部一端到另一端依次排列。

2. 如权利要求 1 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条,其特征在于:所述吸水垫与所述分析膜重叠 1 ~ 2mm,所述结合物垫与所述分析膜重叠 1 ~ 2mm,所述样品垫与所述结合物垫重叠 1 ~ 2mm。

3. 一种如权利要求 1 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 苯硼酸标记物的制备:将荧光材料用缓冲液稀释,加入苯硼酸溶解液,20 ~ 25℃反应至少 1 小时,用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记物,即为苯硼酸标记物;

2) 样品垫的制备:用纤维素膜作为样品垫固相材料,用物质的量浓度为 0.01 ~ 0.3mol/L 的第一磷酸盐缓冲液浸泡,所述第一磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.2 ~ 7.6,浸泡后,将其干燥处理,即得样品垫;

3) 结合物垫的制备:用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料,用物质的量浓度为 0.01 ~ 0.1mol/L、pH 值为 7.2 的第二磷酸盐缓冲液稀释所述苯硼酸标记物,制成悬液,将所述悬液喷涂在玻璃纤维素膜上,对其进行干燥处理,即得结合物垫;

4) 分析膜上检测线和质控线的制备:用硝酸纤维素膜作为固相载体,即为分析膜,用第三磷酸盐缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体,采用喷膜机分别喷涂在所述分析膜的检测线和质控线位置上,将喷膜后的分析膜进行干燥处理,即得带有检测线和质控线的分析膜;

5) 吸水垫的制备:选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25×300mm 的条带,即得吸水垫;

6) 检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备:首先将所述分析膜粘附在衬垫中间位置上,在所述分析膜上端粘附吸水垫和结合物垫,再在所述结合物垫上端粘贴样品垫,将所述衬垫以及设置于所述衬垫上部的所述样品垫、所述结合物垫、所述分析膜和所述吸水垫一同裁切成条状,即为检测糖化白蛋白免疫层析试纸条。

4. 如权利要求 3 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 1 中缓冲液和所述步骤 2 中第一磷酸盐缓冲液组分相同,其包括:以质量百分数计,0.01% ~ 0.5% 的聚乙二醇、1% ~ 5% 的牛血清白蛋白和 0.01% ~ 0.05% 的第一表面活性剂。

5. 如权利要求 3 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 3 中第二磷酸盐缓冲液包括:以质量百分数计,1% ~ 5% 的牛血清白蛋白、0.1 ~ 2% 的聚乙二醇、0.5 ~ 2% 的蔗糖和 0.01% ~ 0.1% 的第二表面活性剂。

6. 如权利要求 3 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 4 中第三磷酸盐缓冲液中物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 ~ 7.6,所述第三磷酸盐缓冲液内包括:以质量百分数计,0.5 ~ 1% 的甲醇和 0.8 ~ 1.5% 的牛血清白蛋白。

7. 如权利要求 4 或 5 或 6 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其特征

在于：所述第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Tween20、TritonX-100 和 tetronic1307 中的一种。

8. 如权利要求 3 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于：所述步骤 4 中抗体为抗糖化白蛋白单克隆抗体、抗白蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体中的一种。

9. 如权利要求 3 所述的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于：所述步骤 6 中衬垫为由聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成。

## 一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,尤其涉及一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 血糖监测是糖尿病日常诊治工作中非常重要的一个环节,良好的血糖控制能有效延缓糖尿病急、慢性并发症的发生和发展。临床工作中要使血糖全面长期达标,短期平均血糖的良好控制非常重要。糖化血清白蛋白(glycated albumin, GA)是临床上血糖监测的指标之一,对于评价糖尿病患者近期血糖控制情况及反映短期内血糖水平的变化具有较高的临床价值。

[0003] 人体中葡萄糖与蛋白质发生非酶糖化反应即形成糖化蛋白。糖化血红蛋白(HbA1c)是血中葡萄糖与红细胞内的血红蛋白在其生命的 120 天内非酶促反应形成的一种糖蛋白,故可反映测定前 2~3 个月内患者的总体血糖水平,是国际上评价长期血糖控制的金标准,因血红蛋白半衰期长,其测定值难以反映患者近期血糖水平;果糖胺(GSP)是血清蛋白(主要是白蛋白)与葡萄糖发生非酶促反应的产物,由于白蛋白的半衰期为 17~19 天,故其值能反映测定前 2~3 周血糖的平均水平,是目前临床上用来判断短期血糖控制的指标。但由于 GSP 测定是反映血浆中总的糖化血浆蛋白质,其值易受血液中蛋白浓度、胆红素、乳糜和低分子物质等的影响,尤其在低蛋白血症和白蛋白转化异常的患者;由于血清中非特异性物质也可发生此反应,加之不同蛋白组分的非酶糖化反应率不同,故 GSP 检测法特异性差。而 GA 检测是在 GSP 的基础上对 GA 进行的定量测定,利用血清糖化白蛋白与血清白蛋白的百分比表示 GA 的水平,从而去除了血清白蛋白水平对检测结果的影响,因此 GA 较 GSP 更精确。

[0004] 早在上世纪 80 年代,日本学者就研发了高压液相离子交换法(HPLC 法)进行 GA 测定。HPLC 法测定 GA 可准确检测患者短期内血糖控制的总体水平,但当时由于其代价高昂,处理样本量小,不适宜临床常规开展而未得到广泛应用。近年由日本开发研制的应用液态试剂的酶法检测 GA (GA-L)是一种简单、快速、灵敏、准确定量的检测方法,是在固体酶法(2002 年由美国研制的一种特异性较高的糖化血清白蛋白测定方法)测定糖化血清蛋白的基础上开发出液态试剂,减少了溶解处理,提高了操作性,加用糖化氨基酸以去除内源性糖化氨基酸对检测结果的影响,并利用对氧化性白蛋白特异性更高的溴甲酚紫替代原来的溴甲酚绿,减少了球蛋白对测定结果的影响,因此结果更为准确。GA-L 检测具有良好的稀释直线性、日内重复性和日间稳定性,并与 HPLC 检测法有良好的一致性( $r=0.879$ )。2005 年 Yamaguchi 等(Yamaguchi M, Kambe S, Eto T, et al. Biosens Bioelectron, 2005, 21:426-432)报道了一种应用于干性化学试剂的酶法测定 GA 的检测系统,该检测仪需血标本量小,可在 5min 之内测定 GA 数值,与 GA-L 比较,其检测精确性显示了良好的直线相关性( $r=0.879$ )。

[0005] GA 检测可准确全面地反映糖尿病患者短期的平均血糖水平及变化,具有重要临床

价值。GA 检测方法的改进,从上世纪最初应用的 HPLC 法,至近年开发研制的液态试剂法,乃至新近报道的干性酶法,检测方法逐步趋于简便、迅捷、精确和实用。临床上 GA 可作为糖尿病患者近期血糖及代谢情况的控制指标,对早期发现糖尿病、指导糖尿病的治疗有较大意义。

[0006] 综上所述的方法,在一定程度上均存在着不少问题,亟待提出一种新方法来解决这些问题。

### 发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条,其只需要微量的全血样本,即可在 3 ~ 5 分钟内实现定量检测糖化白蛋白的含量,大大提高了筛查的速度,具有灵敏度高、特异性好和结构简单的优点。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其制备方法简单,易于大规模生产。

[0009] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0010] 一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条,包括衬垫、设置于所述衬垫中部的分析膜、设置于所述分析膜上部一端的吸水垫、设置于所述分析膜上部另一端的结合物垫以及设置于所述结合物垫上部一端的样品垫,所述分析膜上设置有检测线和质控线,所述检测线包括糖化白蛋白检测线和白蛋白检测线,所述质控线、所述白蛋白检测线和所述糖化蛋白检测线沿着所述分析膜上部一端到另一端依次排列。

[0011] 优选地,所述吸水垫与所述分析膜重叠 1 ~ 2mm,所述结合物垫与所述分析膜重叠 1 ~ 2mm,所述样品垫与所述结合物垫重叠 1 ~ 2mm。

[0012] 一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 苯硼酸标记物的制备:将荧光材料用缓冲液稀释,加入苯硼酸溶解液,20 ~ 25℃ 反应至少 1 小时,用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记物,即为苯硼酸标记物;

[0014] 2) 样品垫的制备:用纤维素膜作为样品垫固相材料,用物质的量浓度为 0.01 ~ 0.3mol/L 的第一磷酸盐缓冲液浸泡,所述第一磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.2 ~ 7.6,浸泡后,将其干燥处理,即得样品垫;

[0015] 3) 结合物垫的制备:用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料,用物质的量浓度为 0.01 ~ 0.1mol/L、pH 值为 7.2 的第二磷酸盐缓冲液稀释所述苯硼酸标记物,制成悬液,将所述悬液喷涂在玻璃纤维素膜上,对其进行干燥处理,即得结合物垫;

[0016] 4) 分析膜上检测线和质控线的制备:用硝酸纤维素膜作为固相载体,即为分析膜,用第三磷酸盐缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体,采用喷膜机分别喷涂在所述分析膜的检测线和质控线位置上,将喷膜后的分析膜进行干燥处理,即得带有检测线和质控线的分析膜;

[0017] 5) 吸水垫的制备:选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25×300mm 的条带,即得吸水垫;

[0018] 6) 检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备:首先将所述分析膜粘附在衬垫中间位置上,在所述分析膜上端粘附吸水垫和结合物垫,再在所述结合物垫上端粘贴样品垫,将所

述衬垫以及设置于所述衬垫上部的所述样品垫、所述结合物垫、所述分析膜和所述吸水垫一同裁切成条状,即为检测糖化白蛋白免疫层析试纸条。

[0019] 优选地,所述步骤 1 中第一缓冲液和所述步骤 2 中第一磷酸盐缓冲液组分相同,其包括:以质量百分数计,0.01%~0.5%的聚乙二醇、1%~5%的牛血清白蛋白和 0.01%~0.05%的第一表面活性剂。

[0020] 优选地,所述步骤 3 中磷酸盐缓冲液包括:以质量百分数计,1%~5%的牛血清白蛋白、0.1~2%的聚乙二醇、0.5~2%的蔗糖和 0.01%~0.1%的第二表面活性剂。

[0021] 优选地,所述步骤 4 中第三磷酸盐缓冲液中物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4~7.6,所述第三磷酸盐缓冲液内包括:以质量百分数计,0.5~1%的甲醇和 0.8~1.5%的牛血清白蛋白。

[0022] 进一步的,所述第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Tween20、Triton X-100 和 tetronic1307 中的一种。

[0023] 优选地,所述步骤 4 中抗体为抗糖化白蛋白单克隆抗体、抗白蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体中的一种。

[0024] 优选地,所述步骤 6 中衬垫为由聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成。

[0025] 本发明产生的有益效果是:本发明一方面提出一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条,其只需要微量的全血样本,即可在 3-5 分钟内实现定量检测糖化白蛋白的含量,大大提高了筛查的速度,具有灵敏度高、特异性好和结构简单的优点;另一方面提出一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其制备方法简单,易于大规模生产。

## 附图说明

[0026] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0027] 图 1 为本发明一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条中苯硼酸标记物反应原理示意图;

[0028] 图 2 为本发明一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的结构示意图;

[0029] 图 3 为本发明一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条试验例 1 中线性检测标准工作曲线图;

[0030] 图 4 为一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条试验例 5 中对比检测回归曲线图;

[0031] 图中:1 样品垫;2 结合物垫;3 分析膜;4 糖化白蛋白检测线;5 白蛋白检测线;6 质控线;7 吸水垫;8 衬垫。

## 具体实施方式

[0032] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 本发明总的技术方案如下：

[0034] 如图 1-4 所示：一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条，包括衬垫 8、设置于衬垫中部的分析膜 3、设置于分析膜上部一端的吸水垫 7、设置于分析膜上部另一端的结合物垫 2 以及设置于结合物垫上部一端的样品垫 1，分析膜上设置有检测线和质控线 6，所述质控线、所述白蛋白检测线和所述糖化蛋白检测线沿着所述分析膜上部一端到另一端依次排列。

[0035] 吸水垫与分析膜重叠 1 ~ 2mm，结合物垫与分析膜重叠 1 ~ 2mm，样品垫与结合物垫重叠 1 ~ 2mm。检测线包括糖化白蛋白检测线 4 和白蛋白检测线 5。糖化白蛋白检测线、白蛋白检测线、质控线依次间隔 5mm。

[0036] 在本发明中，样品垫是检测糖化白蛋白免疫层析试纸条在使用过程中滴加待测样品的部位。结合物垫中固定有苯硼酸材料标记荧光材料和荧光材料标记抗体等活性分子结合物，在加入待测样品后，在此开始发生抗原-抗体免疫反应。分析膜是层析试纸的核心部分，在其表面上分别固定有糖化白蛋白检测线、白蛋白检测线和质控线；检测线含有与待测样品中糖化白蛋白发生免疫反应的抗体，检测线含有与待测样品中白蛋白发生免疫反应的抗体，质控线含有与荧光材料标记物产生免疫反应的抗体。吸水垫在整个检测过程中，通过虹吸作用提供液体流过整个试纸条的动力。各部分之间有重叠区域，以保证液体在试纸条上流动的连续性。

[0037] 本发明提出的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的原理是：当进行检测时，样品滴加在样品垫上，样品通过渗透和虹吸作用进入结合物垫，使其中的荧光材料标记物溶解释放，在吸水垫的虹吸作用下，液体进入分析膜，依次流经糖化白蛋白检测线、白蛋白检测线和质控线，并发生特异性免疫反应，产生具有指示性的荧光信号。

[0038] 一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法，包括如下步骤：

[0039] 1) 苯硼酸标记物的制备：将荧光材料用缓冲液稀释，加入苯硼酸溶解液，20 ~ 25℃ 反应至少 1 小时，用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化，收集标记物，即为苯硼酸标记物；

[0040] 2) 样品垫的制备：用纤维素膜作为样品垫固相材料，用物质的量浓度为 0.01 ~ 0.3mol/L 的第一磷酸盐缓冲液浸泡，第一磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.2 ~ 7.6，浸泡后，将其干燥处理，即得样品垫；

[0041] 3) 结合物垫的制备：用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料，用物质的量浓度为 0.01 ~ 0.1mol/L、pH 值为 7.2 的第二磷酸盐缓冲液稀释苯硼酸标记物，制成悬液，将悬液喷涂在玻璃纤维素膜上，对其进行干燥处理，即得结合物垫；

[0042] 4) 分析膜上检测线和质控线的制备：用硝酸纤维素膜作为固相载体，即为分析膜，用第二缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体，采用喷膜机分别喷涂在分析膜的检测线和质控线位置上，将喷膜后的分析膜进行干燥处理，即得带有检测线和质控线的分析膜；

[0043] 5) 吸水垫的制备：选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料，将其裁切成 25×300mm 的条带，即得吸水垫；

[0044] 6) 检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备：首先将分析膜粘附在衬垫中间位置上，在所述分析膜上端粘附吸水垫和结合物垫，再在所述结合物垫上端粘贴样品垫，将所述衬垫以及设置于所述衬垫上部的所述样品垫、所述结合物垫、所述分析膜和所述吸水垫一

同裁切成条状,即为检测糖化白蛋白免疫层析试纸条。

[0045] 在本发明中,荧光材料可以为咪唑、吡嗪、噻唑类衍生物或金属卟啉类化合物,本发明人经过试验确定金属卟啉类化合物的性能最优异,本发明中优选金属卟啉类荧光材料,金属卟啉为铂/钨卟啉,金属卟啉的激发光光谱范围为 390 ~ 420nm,发射光波长范围为 600 ~ 700nm。

[0046] 在本发明中,缓冲液、第一磷酸盐缓冲液、第二磷酸盐缓冲液和第三磷酸盐缓冲液其物质的量浓度、pH 值及组分可以相同,可以不同,其均在本发明的保护范围之内,对于具体实施例中所列举出来的不同组分只是本发明人所做试验中的其中一些优选实施例。

[0047] 一种苯硼酸标记技术的糖化白蛋白免疫层析试纸条在检测生物样品中的应用,检测对象为全血标本中糖化白蛋白的含量检测。

[0048] 本发明中,对于定量检测项目,通过建立待测物标准品与荧光信号强度标准曲线,来实现定量检测。

[0049] 当进行样品检测时,将样品滴加在样品垫上,样品通过渗透和虹吸作用进入结合物垫,使其中的磷光材料标记的结合物重新溶解,并在吸水垫的虹吸作用下,从结合物垫释放并进入分析膜,向吸水垫方向流动。在分析膜中移动过程中,荧光标记物、目标待测物、检测线、质控线之间将发生特异性的免疫反应,并在检测线和质控线产生具有指示性的光信号。

[0050] 实施例 1

[0051] 一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0052] 1) 苯硼酸标记物的制备:

[0053] 将抗白蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体,分别用物质的量浓度为 0.1mol/L、pH 为 9.6 的碳酸氢钠-碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 30mg 荧光材料金属卟啉溶解液,搅匀,室温孵育 1 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的金属卟啉标记抗白蛋白抗体和羊抗鼠 IgG 抗体,用物质的量浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.2 的第一磷酸盐缓冲液稀释,其中第一磷酸盐缓冲液包括含质量百分数为 0.1% 的聚乙二醇、2.0% 的牛血清白蛋白、0.05% 的第一表面活性剂,用试剂瓶密封包装,于 2 ~ 8°C 条件下保存。

[0054] 2) 样品垫的制备:

[0055] 选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料,将其裁切成 5×300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容容器内,用物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的第一磷酸盐缓冲液稀释浸泡 30min,其中第一磷酸盐缓冲液包括含质量百分数为 0.2% 的聚乙二醇、2.5% 的牛血清白蛋白、0.03% 的第一表面活性剂。浸泡处理后,将样品垫取出,置于洁净的网状支架上,放入 60°C 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封备用。

[0056] 3) 结合物垫的制备:

[0057] 选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体,将其裁切成 5×300mm 规格的条带。将 2 ~ 8°C 保存备用的苯硼酸材料标记荧光材料、荧光标记抗白蛋白抗体和羊抗鼠 IgG 抗体,用物质的量浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.2 的第二磷酸盐缓冲液稀释制成悬液,其中第二磷酸盐缓冲液包括含质量百分数为 0.3% 的聚乙二醇、2.4% 的牛血清白蛋白、2% 的蔗糖和 0.05% 的第二表面活性剂。用喷膜机喷膜划线,膜液量为 10u1/mm,然后置于洁净的网状支

架上,放入 37℃ 的干燥箱内干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0058] 4) 分析膜中检测线和质控线的制备:

[0059] 糖化白蛋白检测线包被液的制备:用 50ml 物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,其中,以质量百分数计,该磷酸盐缓冲液内含甲醇 0.5%、海藻糖 0.8%、牛血清白蛋白 1.5%,稀释抗糖化白蛋白抗体至终浓度 1.6mg/ml。

[0060] 白蛋白检测线包被液的制备:用 50ml 物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.6 的磷酸盐缓冲液,其中,以质量百分数计,该磷酸盐缓冲液内含甲醇 1%、海藻糖 0.6%、牛血清白蛋白 0.8%,稀释抗白蛋白抗体至终浓度 2mg/ml。

[0061] 质控线包被液的制备:用 50ml 物质的量浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,其中,以质量百分数计,该磷酸盐缓冲液内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%,稀释鼠 IgG 抗体至终浓度 0.5mg/ml。

[0062] 选用硝酸纤维素膜作为固相载体,即为分析膜,将其裁切成 25×300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上依次划线,从下往上 10mm 处喷膜划线,膜液量为 2ul/mm,作为糖化白蛋白检测线检测线;再间隔 5mm 处,从下往上 15mm 处喷膜划线,膜液量为 2ul/mm,作为白蛋白检测线检测线;用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 20mm 处喷膜划线,膜液量为 1.5ul/mm,作为质控线。糖化白蛋白检测线检测线、白蛋白检测线检测线与质控线依次间隔 5mm,划线细致均匀,将分析膜放置 37℃ 干燥箱处理 50 分钟,取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0063] 5) 吸水垫的制备:

[0064] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25×300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0065] 6) 制备检测糖化白蛋白的免疫层析试纸条:

[0066] 首先将分析膜粘附在聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成的衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附吸水垫和结合物垫,再在结合物垫上端粘贴样品垫,将衬垫以及设置于衬垫上部的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫一同裁切成条状,即为检测糖化白蛋白免疫层析试纸条。

[0067] 第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Tween20、Triton X-100 和 tetronic1307 中的一种,在本实施例中优选第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Tween20。

[0068] 实施例 2

[0069] 与实施例 1 相同,不同之处在于:

[0070] 步骤 1 和步骤 2 中,缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同,其物质的量浓度为 0.05mol/L,pH 值为 7.4,其包括:以质量百分数计,0.01%的聚乙二醇、1%的牛血清白蛋白和 0.01%的第一表面活性剂。

[0071] 步骤 3 中,第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为 0.5mol/L,pH 值为 7.2,其包括:以质量百分数计,1%的牛血清白蛋白、0.1%的聚乙二醇、0.5%的蔗糖和 0.01%的第二表面活性剂。

[0072] 第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Triton X-100。

[0073] 实施例 3

[0074] 与实施例相同,不同之处在于:

[0075] 步骤 1 和步骤 2 中,缓冲液和第一磷酸盐缓冲液组分相同,其物质的量浓度为 0.3mol/L, pH 值为 7.6,其包括:以质量百分数计,0.5%的聚乙二醇、5%的牛血清白蛋白和 0.03%的第一表面活性剂。

[0076] 步骤 3 中,第二磷酸盐缓冲液其物质的量浓度为 0.1mol/L, pH 值为 7.2,其包括:以质量百分数计,5%的牛血清白蛋白、2%的聚乙二醇、1%的蔗糖和 0.1%的第二表面活性剂。

[0077] 第一表面活性剂和第二表面活性剂为 tetronic1307。

[0078] 经过测试,实施例 1 制备出的糖化白蛋白免疫层析试纸条其性能最佳,其灵敏度高,测试糖化白蛋白免疫层析试纸条的性能的方法为本领域技术人员普遍应用的方法,在此不做赘述。

[0079] 下面对实施例 1 制备出的糖化白蛋白免疫层析试纸条进一步通过试验例来对本发明提出的糖化白蛋白免疫层析试纸条的性能进行阐述。

[0080] 试验例 1

[0081] 对实施例 1 制备出的糖化白蛋白免疫层析试纸条进行检测,其具体检测方法是:将待检测全血样品 20ul 加入 500ul 含有溶血素的 pH 值为 7.2、物质的量浓度为 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,再加入检测卡加样孔中,待反应 3min 后,用荧光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线,以得出结果。

[0082] 标准工作曲线的绘制:

[0083] 取 GA 为 100.0% 的人工制备的血清标本配成 GA 为 100.0、80.0、60.0、40.0、20.0、10.0、0.0% 的血清标本,再分别测定其 GA,以配成值为 X 实测值为 Y 绘制标准工作曲线,经统计拟合标准工作曲线的表达式列出回归方程为:  $Y=1.97X-1.46$ , 拟合系数的平方为  $R^2=0.999$ 。结果见附图 3,图 3 为线性检测标准工作曲线,糖化白蛋白测定范围为 3.2% ~ 68.1%。

[0084] 试验例 2

[0085] 重复性试验:

[0086] 批内重复性试验:取同一患者血清标本,同时连续重复检测 20 次,计算出 CV 值。批间重复性试验:将同一患者血清标本分装成 20 份,贮存于冰箱,每天取 1 份检测,共 20 天,计算出 CV 值。批内 CV 值为 3.5%。批间(日间)CV 值为 4.2%。按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件要求的批内、批间不精密度水平应小于 5%,该方法符合要求。

[0087] 实施例 3

[0088] 回收试验:按照内加入法,将 100  $\mu$ l 不同浓度的标准物分别加入 1000  $\mu$ l 患者血清标本中,进行高、中、低不同浓度的回收试验检测。高、中、低不同浓度的回收试验结果如表 1 所示,平均回收率为 95.4%,基本符合临床实验要求。

[0089] 表 1

[0090]

测得浓度(%)	加入浓度(%)	回收浓度(%)	回收率(%)	平均回收率(%)
5.9	-	-	-	95.4
6.0	0.10	0.093	93.0	
10.3	4.2	4.0	95.2	
16.5	10.7	10.5	98.1	

[0091] 试验例 4

[0092] 干扰试验：

[0093] 将一新鲜血清标本，分成 3 份，每份 1000  $\mu$  l，第 1 份加入 196mg/dl 的血红蛋白，第 2 份加入总胆红素为 29.8mg/dl 的血清 100  $\mu$  l，第 3 份加入乳糜为 200mmol/L 的血清 100  $\mu$  l，混匀后分别测定 GA 值。

[0094] 结果表明，在血红蛋白为 196mg/dl 以下溶血标本、总胆红素为 29.8mg/dL 以下的黄疸标本及乳糜为 200mmol/L 以下的脂血对本方法测定 GA 无明显干扰。

[0095] 试验例 5

[0096] 实际检测对比试验

[0097] 对实施例 1 的试纸条进行性能方面的测定，取 28 例患者的新鲜血清标本，每份分别用日本旭化成制药株式会社 GA 试剂与本系统进行双盲法检测。将结果应用相关回归和配对 t 检验分析方法进行比较。结果显示，两方法相关性良好，差异无统计学意义 ( $n=28$ ,  $Y=0.996X+0.846$ ,  $r=0.993$ ,  $t=0.0870$ ,  $P>0.05$ )。回归曲线图见附图 4，附图 4 为对比检测回归曲线图。图 4 中实心点表示糖化标准(glycated standard)，空心点表示纯化白蛋白(purified albumin)。

[0098] 由上述检测可见，本发明检测方法具有更高的灵敏度，且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0099] 本发明提出的检测糖化白蛋白免疫层析试纸条，其只需要微量的全血样本，即可在 3 ~ 5 分钟内实现定量检测糖化白蛋白的含量，大大提高了筛查的速度，具有灵敏度高、特异性好和结构简单的优点，且其制备方法简单，易于大规模生产。

[0100] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

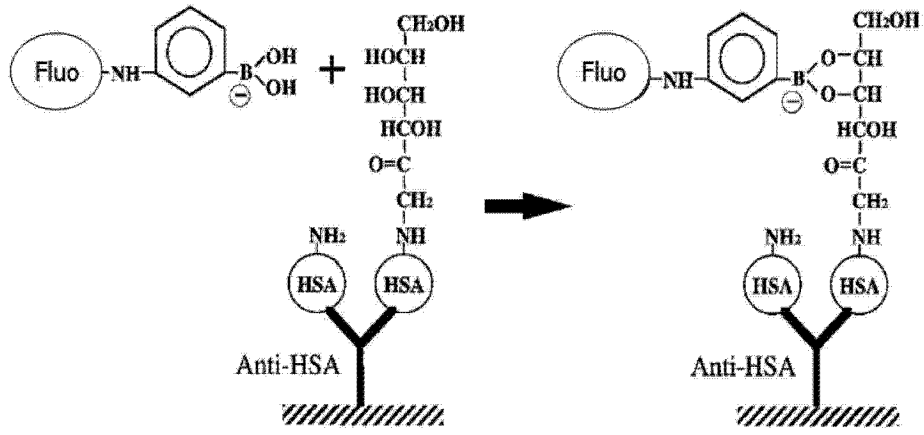


图 1

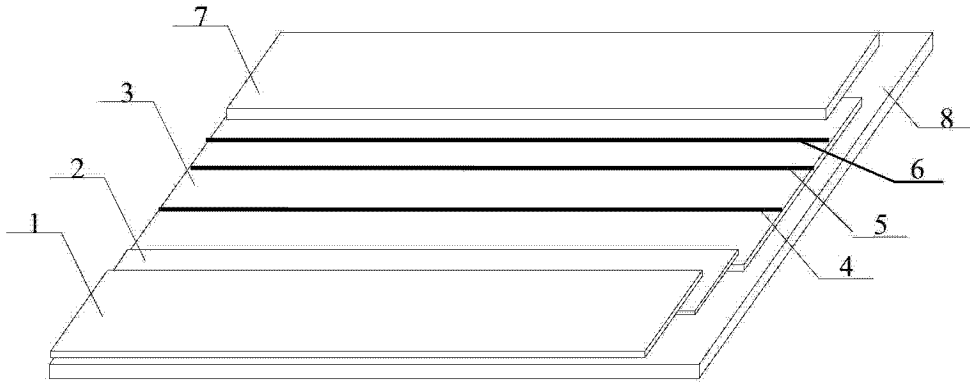


图 2

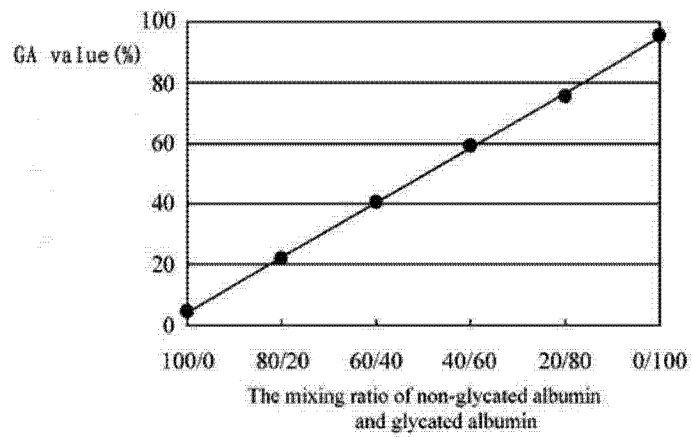


图 3

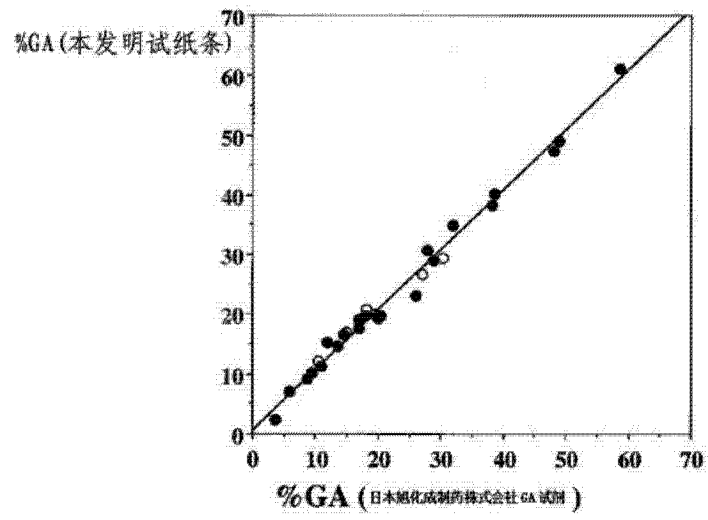


图 4

专利名称(译)	一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104345150A</a>	公开(公告)日	2015-02-11
申请号	CN201310320849.2	申请日	2013-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
[标]发明人	谢爱武		
发明人	谢爱武		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532 G01N2800/042		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">SIPO</a>	

摘要(译)

本发明提出了一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条及其制备方法，包括衬垫、设置于衬垫中部的分析膜、设置于分析膜上部一端的吸水垫、设置于分析膜上部另一端的结合物垫以及设置于结合物垫上部一端的样品垫，分析膜上设置有检测线和质控线，检测线包括糖化白蛋白检测线和血红蛋白检测线；制备方法包括：苯硼酸标记物的制备、样品垫的制备、结合物垫的制备、分析膜上检测线和质控线的制备、吸水垫的制备和检测糖化白蛋白免疫层析试纸条的制备。本发明提出的一种检测糖化白蛋白免疫层析试纸条，其只需要微量的全血样本，即可在3-5分钟内实现定量检测糖化白蛋白的含量，大大提高了筛查的速度，具有灵敏度高、特异性好和结构简单的优点。

