



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107490699 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201610402104.4

(22)申请日 2016.06.09

(71)申请人 常州博闻迪医药科技有限公司

地址 213025 江苏省常州市戚墅堰区东方
东路167号

(72)发明人 李亚星 刘凤鸣 刘冰

(51)Int.Cl.

G01N 33/72(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种血液糖化血红蛋白荧光免疫检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种血液糖化血红蛋白荧光免疫检测方法。这种检测方法,包括:(1)荧光免疫检测试剂盒的制备;(2)将待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒,读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b;(3)相同待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒,读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d;(4)计算得出比值 $A=a/b$,比值 $B=c/d$;(5)计算糖化血红蛋白的含量 $=A/B$ 。本发明检测的灵敏度高,特异性强,且可以定量,解决了传统的糖化血红蛋白定量检测方法操作步骤繁琐,检测时间长的问题,同时解决了糖化血红蛋白定性检测准确性低的问题。

1. 一种糖化血红蛋白荧光免疫检测方法,包括如下步骤:

(1)制备荧光免疫检测试剂盒,其中包括标准比对品的制备,所述标准比对品为不与血红蛋白、抗血红蛋白抗体、糖化血红蛋白以及抗糖化血红蛋白抗体发生免疫性结合反应的物质;

(2)将待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒,以标准比对品作为参比品,与糖化血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b;

(3)将与步骤(2)中同一种待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒,以与步骤(2)中同一种标准比对品作为参比品,与血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d;

(4)计算得出比值 $A=a/b$,比值 $B=c/d$;

(5)计算糖化血红蛋白的含量 $=A/B$ 。

2.如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述检测方法所用原料包括标准比对品、抗血红蛋白的抗体、抗糖化血红蛋白的抗体、样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫和底板。

3.如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述标准比对品为兔IgG、驴IgG、马IgG、羊IgG、鼠IgG的一种或两种或两种以上。

4.如权利要求1所述的血液糖化血红蛋白的检测方法,其特征在于:所述抗血红蛋白抗体为抗血红蛋白单克隆抗体和抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种。

5.如权利要求1所述的血液糖化血红蛋白的检测方法,其特征在于:所述抗糖化血红蛋白抗体为抗糖化血红蛋白单克隆抗体、抗糖化血红蛋白多克隆抗体、抗血红蛋白单克隆抗体、抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种或两种以上。

6.如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述载体为硝酸纤维素膜。

一种血液糖化血红蛋白荧光免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析技术领域,特别是指一种血液糖化血红蛋白荧光免疫检测方法。

背景技术

[0002] 糖化血红蛋白(HbA1c)是血液葡萄糖通过非酶作用,经细胞膜与红细胞内血红蛋白-链脞氨酸结合形成的产物,其合成速率与红细胞所处环境中糖的浓度成正比,是人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖结合的产物。

[0003] 血糖和血红蛋白的结合生成糖化血红蛋白是不可逆反应,并与血糖浓度成正比,且保持120天左右。血糖是从食物中的碳水化合物分解而来的血液中的单糖,通常仅指葡萄糖,血糖测试结果反映的是即刻的血糖水平。所以糖化血红蛋白较血糖测定更有临床意义,被誉为糖尿病病情监测的“金标准”,在临床检测中进行日常检测作为血糖控制的指标。

[0004] 目前临床上测定糖化血红蛋白的主要检测方法有高效液相色谱、电泳法、亲和层析法等。

[0005] 离子交换高效液相色谱分析法,它是在经典液相层析法基础上,引进了气相层析的理论具有气相层析的全部优点。测试前需要采用专用仪器对血样中的血红蛋白和糖化血红蛋白进行分离,测试时需使用大型色谱分析设备进行检测,故检测必须在医院由专人进行,难以满足糖化血红蛋白即时检测的需求。

[0006] 电泳法,相比于非糖化血红蛋白,因糖化而变化的总电荷和糖化血红蛋白的等电点变化是琼脂糖凝胶或者pH梯度5.0~6.5的凝胶等电聚焦电泳分离的基础。琼脂糖凝胶电泳的血红蛋白亚组分分辨率很小,而等电聚焦可以更好地使亚组分分离。可能由于试验的自动化程度不足,重要性已经下降。

[0007] 亲和层析法,将血样本中的血红蛋白加到层析柱后,所有的糖化血红蛋白(HbA1和旁链糖化的血红蛋白;总糖化血红蛋白)与硼酸结合而非糖化血红蛋白通过层析柱可被测量。在加入高浓度也包含顺式-羟基的多羟基复合物,例如山梨醇后,糖化血红蛋白与硼酸的结合被替换而从柱子上洗脱下来。亲和层析法对经翻译以后修饰的血红蛋白和病理血红蛋白的影响相对不敏感。利用亲和层析法,仅能测定总糖化血红蛋白。广泛使用的亲和层析方法,也仅是用经验算法从总糖化血红蛋白值计算出“标准的HbA1c”,因此存在定量无法精准的问题。

发明内容

[0008] 本发明的目的是针对上述现有技术中存在的不足,提供一种灵敏度高、准确性强、操作简便、能够快速诊断糖化血红蛋白的荧光免疫检测方法。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用荧光免疫层析技术,具体的技术方案为:

(1)制备荧光免疫检测试剂盒,其中包括标准比对品的制备,所述标准比对品为不与血红蛋白、抗血红蛋白抗体、糖化血红蛋白以及抗糖化血红蛋白抗体发生免疫性结合反应

的物质；

(2)将待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒,以标准比对品作为参比品,与糖化血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b;

(3)将与步骤(2)中同一种待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒,以与步骤(2)中同一种标准比对品作为参比品,与血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d;

(4)计算得出比值 $A=a/b$,比值 $B=c/d$;

(5)计算糖化血红蛋白的含量 $=A/B$ 。

[0010] 进一步地,所述检测方法所用原料包括标准比对品、抗血红蛋白抗体、抗糖化血红蛋白抗体、样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫和底板。

[0011] 进一步地,所述标准比对品为兔IgG、驴IgG、马IgG、羊IgG、鼠IgG的一种或两种或两种以上。

[0012] 进一步地,所述抗血红蛋白抗体为抗血红蛋白单克隆抗体和抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种。

[0013] 进一步地,所述抗糖化血红蛋白抗体为抗糖化血红蛋白单克隆抗体、抗糖化血红蛋白多克隆抗体、抗血红蛋白单克隆抗体、抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种或两种以上。

[0014] 进一步地,所述载体为硝酸纤维素膜。

具体实施方式

[0015] 本发明的一个实施例提供了一种定量检测糖化血红蛋白的荧光免疫层析试剂盒,包括扣卡、荧光免疫层析试纸条和缓冲液。

[0016] 荧光免疫层析试纸条结构包括样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫和底板。当进行全血样品检测时,试纸条还包括血液分离膜。其中,样品垫、标记垫、血液分离膜、层析膜和吸水垫搭载于底板之上,样品垫位于加样孔的下方,且连接于标记垫,标记垫连接于层析膜,层析膜连接于吸水垫,其上固定有一条定量检测线和一条比对线,优选二者距离3mm~8mm,并位于观察窗的下方。在包括血液分离膜的情况下,血液分离膜设置在标记垫和层析膜之间,此时标记垫连接于血液分离膜,血液分离膜连接于层析膜,或者血液分离膜设置在样品垫和标记垫之间,此时样品垫连接于血液分离膜,血液分离膜连接于标记垫,或者血液分离膜直接与样品垫合并为同一结构。

[0017] 糖化血红蛋白试纸条标记垫及血红蛋白试纸条标记垫上同时固定有荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体,波长范围为300-1300nm。

[0018] 糖化血红蛋白试纸条定量检测线上固定有糖化血红蛋白单克隆抗体,该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫上的荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体所识别的抗原决定簇不同;血红蛋白试纸条定量检测线上固定有血红蛋白多克隆抗体,该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫上的荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体所识别的抗原决定簇不同。

[0019] 比对线上固定有作为标准比对品的羊抗小鼠IgG。

[0020] 本发明的另一个方面提供了上述定量检测糖化血红蛋白的荧光免疫层析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

步骤(1):用化学交联或生物分子间特异性作用分别将荧光染料偶联到血红蛋白单克隆抗体,得到荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体,波长范围为300~1300nm;

步骤(2):将步骤(1)得到的荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体固定到标记垫(2)上;

步骤(3):在层析膜上分别设置一条定量检测线和一条比对线,其中,比对线上固定有作为标准比对品的羊抗小鼠IgG,糖化血红蛋白试剂条定量检测线上固定有糖化血红蛋白单克隆抗体,且该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫上的荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体所识别的抗原决定簇不同;血红蛋白试剂条定量检测线上固定有血红蛋白多克隆抗体,且该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫上的荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体所识别的抗原决定簇不同;

步骤(4):将样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫和底板构建成荧光免疫层析试纸条,当进行全血样品检测时,试纸条还包括血液分离膜;

步骤(5):将荧光免疫层析试纸条装卡。

[0021] 本发明采用化学交联或生物分子间特异性作用将荧光染料偶联到血红蛋白单克隆抗体的表面,得到荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体。在本发明中,当荧光染料表面存在活性基团时,可将其直接与特异性抗体反应,不需用化学交联剂;反之,则需通过化学交联剂偶联。其中,化学交联剂包括1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及戊二醛等。

[0022] 在本发明的一个优选实施例中,采用有活性基团的荧光染料修饰血红蛋白单克隆抗体,步骤为:将纯化后的荧光染料溶解,然后加入一定量的血红蛋白单克隆抗体,以缓冲液作为反应介质,反应2~4小时,加入盐酸羟胺终止反应,用色谱、层析柱或超滤离心等方式纯化,得到荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体。

[0023] 为了提高信号与背景的分度度,本发明中荧光染料的波长范围为300~1300nm,优选为550~800nm。此外,层析膜、底板和扣卡一般在近红外区域(600~800nm)荧光强度极弱,因此,优选波长范围为550~800nm的荧光染料以进一步提高灵敏度,更优选荧光染料发射波长为665nm。

[0024] 本发明的荧光染料包括有机荧光染料和稀土元素荧光染料。本发明的荧光染料可以偶联到是胶乳微球上,变成了荧光微球的形式。本发明的荧光染料可以是单一化合物的荧光染料或者由几种化合物组成的复合荧光染料,但优选单一化合物荧光染料、且优选具有较强的光稳定性的荧光染料。本发明的荧光染料例如Alexa Fluro系列的荧光素。

[0025] 为了降低对荧光染料荧光信号的影响,本发明采用弱荧光的层析膜、底板以及扣卡,其荧光噪声在大于550nm是会很弱,从而保证获得高荧光信背比,能良好区分信号与背景,进而提高检测灵敏度。优选底板为白色,表面附有不干胶,且扣卡、层析膜、底板及不干胶均不含有荧光剂。

[0026] 本发明中,待测样品可以是血清或血浆,此时荧光免疫层析试纸条不包括血液分离膜。待测样品也可以是全血,此时荧光免疫层析试纸条还包括血液分离膜,用于凝固、过滤细胞。血液分离膜可设置在标记垫和层析膜之间,分别与标记垫和层析膜直接毛细作用接触,或者设置在样品垫和标记垫之间,分别与样品垫和标记垫直接毛细作用接触,也可直

接与样品垫合并为同一结构,从而样品垫同时具有样品收集、释放及过滤的作用。

[0027] 本发明的荧光免疫层析试剂盒对待测样品中的糖化血红蛋白进行定量检测。检测时,将待测样品通过加样孔加入到样品垫中,样品沿层析膜向吸水垫方向层析运动。样品层析时间通常为8~25分钟,优选15分钟。层析过后,用清洗缓冲液清洗层析膜,时间为3~8分钟,优选5分钟,以降低本底,提高检测灵敏度。本发明的清洗缓冲液中包含牛血清白蛋白、蔗糖和表面活性剂,pH值为7.0~8.0,其中,牛血清白蛋白的浓度为0.05~2%,蔗糖的浓度为1~15%,表面活性剂的浓度为0.05~2%。表面活性剂优选吐温20、曲拉通X-100,缓冲液优选Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液。

[0028] 层析结束后,用荧光定量仪判断检测窗中的检测线和比对线,以得出结果。

具体实施方式

[0029] 实施例1:糖化血红蛋白荧光免疫检测试剂盒的制备

1) 荧光染料与抗体的偶联

将发射波长为665nm的荧光染料罗丹明与1 mg/ml的血红蛋白单克隆抗体混合,室温反应3h,加入1mol/L盐酸羟胺终止反应,并用色谱柱或层析柱分离纯化,得到荧光染料修饰的血红蛋白单克隆抗体,荧光发射波长为665nm;

2) 试剂盒的构建

取荧光染料标记物,加入牛血清白蛋白(含量为1%)、蔗糖(含量为10%)以及表面活性剂曲拉通X-100(含量为0.8%),随后均匀喷涂在标记垫上,40℃干燥后密封,室温下保存;

组装糖化血红蛋白荧光免疫检测试剂条,由样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫组成,顺次粘贴于白色底板上。其中,样品垫为孔状隔膜,选择玻璃纤维,为待测样品收集区;结合垫中含有荧光染料修饰血红蛋白单克隆抗体;层析膜上固定有定量检测线和比对线,检测线和比对线的间隔为5mm,且检测线固定有区别于标记垫中糖化血红蛋白单克隆抗体,比对线固定有羊抗小鼠IgG。组装好后,按照要求切割为所需宽度;

组装血红蛋白荧光免疫检测试剂条,由样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫组成,顺次粘贴于白色底板上。其中,样品垫为孔状隔膜,选择玻璃纤维,为待测样品收集区;结合垫中含有荧光染料修饰血红蛋白单克隆抗体;层析膜上固定有定量检测线和比对线,检测线和比对线的间隔为5mm,且检测线固定有区别于标记垫中血红蛋白多克隆抗体,比对线固定有羊抗小鼠IgG。组装好后,按照要求切割为所需宽度;

将糖化血红蛋白试剂条及血红蛋白试剂条置于扣卡内,加入干燥剂封装,与清洗缓冲液共同构建为糖化血红蛋白荧光免疫检测试剂盒。

[0030] 实施例2:糖化血红蛋白荧光免疫检测试剂盒的检测方式

(1) 取待测血液样本,在上述制得的糖化血红蛋白荧光免疫检测试剂盒加样孔中分别滴加80ul,正向层析反应15min;

(2) 配制清洗缓冲液,pH值为7.5,缓冲系统为20mM的磷酸盐,加入质量浓度为1%的牛血清白蛋白、质量浓度为10%的蔗糖以及质量浓度为0.8%的表面活性剂曲拉通X-100,在2个样品孔各加入50μL,静置5min;

(3) 置于荧光定量仪中获取荧光信号强度;

(4)读取样本糖化血红蛋白检测线信号值a、糖化血红蛋白对应的羊抗小鼠IgG比对线信号值b、样本血红蛋白检测线信号值c以及血红蛋白对应的羊抗小鼠IgG比对线信号值d;

(5)计算得出比值 $A=a/b$,比值 $B=c/d$;

(6)计算糖化血红蛋白的含量 $=A/B$ 。

[0031] 实施例3:试剂盒性能评估试验

1.准确性试验

取同一患者抗凝全血标本,用同一批次的试剂盒重复检测3次,计算出相对偏差B值为0.02%,符合产品设计要求;

2.重复性试验

取同一患者抗凝全血标本,用同一批次的试剂盒同时检测20次,计算出变异系数CV值为11.87%,符合产品设计要求。

[0032] 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。

专利名称(译)	一种血液糖化血红蛋白荧光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN107490699A	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN201610402104.4	申请日	2016-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
[标]发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/723 G01N33/533 G01N33/577 G01N2333/805		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血液糖化血红蛋白荧光免疫检测方法。这种检测方法，包括：(1) 荧光免疫检测试剂盒的制备；(2) 将待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒，读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b；(3) 相同待检测血液样本放入荧光免疫检测试剂盒，读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d；(4) 计算得出比值 $A=a/b$ ，比值 $B=c/d$ ；(5) 计算糖化血红蛋白的含量 $=A/B$ 。本发明检测的灵敏度高，特异性强，且可以定量，解决了传统的糖化血红蛋白定量检测方法操作步骤繁琐，检测时间长的问题，同时解决了糖化血红蛋白定性检测准确性低的问题。