



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107449904 A

(43)申请公布日 2017.12.08

(21)申请号 201710793219.5

(22)申请日 2017.09.06

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区兴海路
荔山工业区5栋1-4层

申请人 深圳市药品检验研究院

(72)发明人 胡鹏辉 王栋凯 刘尧 林俊
郑燕萍

(74)专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公司 44218

代理人 胡坚

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

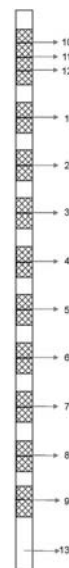
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条、制备和使用方法

(57)摘要

一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条、制备和使用方法,本发明属于生物医学领域,本发明的目的在于针对目前缺乏多种免疫性糖尿病实验检查乃至体格检查专用的免疫印迹法产品,以及现有的免疫印迹试剂存在的一些不足,提供一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,所述的反应膜条包括有底衬板,以及设于所述的底衬板上的一条以上的检测带和指示带,所述的检测带之间、指示带以及检测带和指示带之间相互平行;相对于现有技术,本发明具有如下优点:本发明通过一份临床样本和一次检测反应检测多种自身抗体,克服单一自身抗体检测灵敏度和特异性不足、数种疾病相关自身抗体逐一单独检测在操作上的繁琐,大大提高检测效率和结果判断的准确度。



1. 一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,其特征在于,所述的反应膜条包括有底衬板,以及设于所述的底衬板上的一条以上的检测带和指示带,所述的检测带之间、指示带以及检测带和指示带之间相互平行;

所述的检测带包括有

包被有GAD抗原的第一检测带,和/或
包被有IA-2A抗原的第二检测带,和/或
包被有IAA抗原的第三检测带,和/或
包被有ICA抗原的第四检测带,和/或
包被有ZnT-8A抗原的第五检测带,和/或
包被有CP-HA抗原的第六检测带,和/或
包被有SO-XA抗原的第七检测带,和/或
包被有UBE2L3抗原的第八检测带,和/或
包被有EEF1A1抗原的第九检测带;

所述的指示带包括有

包被有浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG的第一高浓度指示带,和
包被有浓度为12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG的第二中浓度指示带,和
包被浓度为1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG第三低浓度指示带。

2. 如权利要求1所述的一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,其特征在于,所述的检测带和底衬板通过具有双面粘性的PVC板连接。

3. 如权利要求1所述的一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,其特征在于,所述的指示带和底衬板通过具有双面粘性的PVC板连接。

4. 如权利要求1所述的一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,其特征在于,所述的底衬板为透明的PET底衬板。

5. 如权利要求1所述的一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,其特征在于,所述的检测带和指示带采用硝酸纤维素膜或尼龙膜制备而成。

6. 一种自身免疫性糖尿病检测用试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括有如权利要求1-5任一权利要求所述的反应膜条。

7. 一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条的制备方法,其特征在于,所述的方法包括如下步骤:

1) 配制点样溶液:准备GAD、IA-2A、IAA、ICA、ZnT-8A、CP-HA、SO-XA、UBE2L3和EEF1A1九种抗原,及将人IgG、抗鼠IgG或抗羊IgG配制成浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高、中和低浓度三类点样溶液;

2) 固定抗原:将硝酸纤维素膜或尼龙膜裁成膜片,通过物理吸附和共价结合的方式,将1)中准备的九种抗原分别包被到膜片上,形成独立的检测膜片;将高、中和低三类点样溶液包被到膜片上,形成指示膜片;

3) 干燥:将包被好的检测膜片和指示膜片干燥;

4) 贴膜:将干燥好的检测膜片和指示膜片分别贴于双面粘性的PVC板的正面;

5) 切膜:将4)中贴好的检测膜片和指示膜片切成条带;

6) 组装:将5)中的条带按次序贴于透明的PET底衬板上,使得PVC板的背面和所述的PET

底衬板相连接；

7) 切条:将组装好的条带切成单人份反应膜条。

8. 一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条的制备方法,其特征在于,所述的方法包括如下步骤:

1) 配制点样溶液:准备GAD、IA-2A、IAA、ICA、ZnT-8A、CP-HA、SO-XA、UBE2L3和EEF1A1九种抗原,及将人IgG、抗鼠IgG或抗羊IgG配制成浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高、中和低浓度三类点样溶液;

2) 固定抗原:使用免疫印迹点样器在一整张的硝酸纤维膜或尼龙膜上通过物理吸附和共价结合的方式,将1)中准备的九种抗原分别包被到膜片上,形成独立的检测膜片;将高、中和低三类点样溶液包被到膜片上,形成指示膜片;

3) 干燥:将包被好的检测膜片和指示膜片干燥;

4) 切条:将组装好的条带切成单人份反应膜条。

9. 一种自身免疫性糖尿病检测用试剂盒的使用方法,其特征在于,所述的使用方法包括如下步骤:

(一) 洗涤液配制: 0 \times 的浓缩洗涤液和蒸馏水按1:19的体积比,混匀,备用;

(二) 检测步骤

2.1) 将反应膜条放入孵育盘中;

2.2) 用1mL孵育缓冲液润湿检测膜条,1分钟后移弃缓冲液;

2.3) 加入1mL已稀释的样本,室温孵育30分钟,置摇床轻摇;

2.4) 移弃已稀释的样本,不留残液;

2.5) 用1.5mL洗涤液洗涤检测膜条,轻摇,每次5分钟,洗涤完后弃除洗涤液,重复3次;

2.6) 加入1mL酶联物溶液,室温孵育30分钟,置摇床轻摇;

2.7) 移弃酶联物溶液;

2.8) 用1.5mL洗涤液洗涤检测膜条,轻摇,每次5分钟,洗涤完后弃除洗涤液,重复3次;

2.9) 加入1mL TMB底物溶液,室温避光孵育10分钟,置摇床轻摇;

3.0) 移弃底物溶液;

3.1) 用1.5mL蒸馏水洗涤,同时轻摇,1分钟后移弃蒸馏水;

3.2) 加入1mL终止液,室温孵育5分钟;

3.3) 移弃终止液;

3.4) 用滤纸吸干检测膜条上残留的液体;

(三) 结果判断: 采用目测、手工黏贴到扫描仪扫描固定卡然后借助特定的判读软件或使用全自动的判读分析仪器对检测结果进行判读,结果可判断为阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性或输出为量化的数值。

10. 如权利要求9所述的使用方法,其特征在于,所述的酶联物溶液为辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgG。

一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条、制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条、制备和使用方法。

背景技术

[0002] 人体免疫系统的主要功能是识别和清除抗原性异物。正常情况下,机体对自身组织成分一般不会产生免疫应答,称为免疫耐受。一旦这种耐受被打破,就会发生自身免疫性疾病。自身免疫性疾病突出表现为血清中多种自身抗体的形成及全身多脏器损伤。在自身免疫性疾病中,自身免疫性糖尿病较常见。

[0003] 糖尿病主要依据其病因学的不同而进行分型,其中免疫介导的1型糖尿病,患者血清中可检测到针对胰岛 β 细胞的自身抗体,是存在免疫损害的有力佐证。虽然在过去的数十年中,人们在患者血清中发现了多种自身抗体,但目前认为主要以胰岛细胞抗体(ICA)、谷氨酸脱羧酶抗体(GAD)、胰岛素自身抗体(IAA)、蛋白酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)、锌转运蛋白8抗体(Znt-8A)、人类重组酶(E2L3)、真核翻译延长因子(EEF1A1)、羧基肽酶H抗体(CP-HA)、SOX13抗体(SO-XA)等,这些特异性自身抗体是自身免疫性糖尿病诊断标准中重要的组成部分。

[0004] 谷氨酸脱羧酶(GAD)是人及动物体内抑制神经递质 γ -氨基丁酸的合成酶。1型糖尿病是遗传易感个体通过自身抗原介导的免疫反应所引起胰岛 β 细胞破坏的自身免疫性疾病,GAD是此免疫反应关键的始动靶抗原,因此GAD-Ab是糖尿病前期个体较特异的免疫指标。GAD-Ab的测定意义为:①可作为1型糖尿病的预测;②从2型糖尿病患者中鉴别迟发型1型糖尿病,此类患者常可出现GAD-Ab的高水平,并稳定维持,可考虑早期干预治疗;③可作为普查手段,以发现1型糖尿病的高危人群和个体。

[0005] 胰岛素自身抗体(IAA)出现在未使用过外源性胰岛素或使用时间不超过7-10天的个体中产生针对内源性胰岛素的自身抗体,与年龄呈负相关,随着增龄,IAA阳性率呈现下降趋势,被认为是持续时间最短的抗体。IAA单独测定意义不大,但与ICA、GAD等联合检测,可增加对1型糖尿病的预测程度。

[0006] 胰岛细胞抗体(ICA)为抗胰岛 β 细胞所有抗体的总称。目前认为,ICA阳性预示 β 细胞的自身免疫损害,只能作为糖尿病的高危指标。在儿童阳性或高水平持续阳性,对1型糖尿病才具有较高的预测率。

[0007] 蛋白酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)特异性较强,在不伴有1型糖尿病的自身免疫患者中较少发现。可作为1型糖尿病高危人群筛查指标。

[0008] 锌转运蛋白8抗体(Znt-8A)具有高度的 β 细胞特异性,锌转运蛋白8(Znt-8)抗原是通过影响锌离子浓度而在胰岛素合成和分泌中发挥重要作用,对糖尿病自身抗体免疫介导的1型糖尿病有着重要的诊断和预测价值。特别是其他自身抗体阴性的患者有着重要的诊断价值。

[0009] 人类重组酶(E2L3)以及真核翻译延长因子(EEF1A1)分别参与蛋白质的翻译和退

化,EEF1A1与felty综合征有关,一种自身免疫性疾病。UBE2L3有自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、克罗恩病和系统性红斑狼疮有关,蛋白质体内平衡与这些自身抗体有关,可以反映出T1DM的自身免疫。相应的两个自身抗原免疫荧光染色胰腺,结果抗原都结合在胰腺胰岛 β -cells而不是腺泡细胞和 α -cells。这两个新颖的自身抗体可以添加一个新维度的诊断、分类、治疗和1型糖尿病的发病机理。

[0010] 几种抗体联合检测可提高1型糖尿病的诊断敏感性和诊断符合率,对1型糖尿病早期诊断具有重要价值。

[0011] 另外,世界卫生组织在对糖尿病分型的新建议中提出,成人隐匿性自身免疫糖尿病(LADA)属于1型糖尿病的亚型,与1型糖尿病的自身免疫发病机制相同。胰岛自身抗体为目前诊断该疾病的主要依据。

[0012] 羧基肽酶位于胰岛细胞分泌颗粒及神经内分泌细胞,是与肽类激素和神经递质的产生有关的一种糖蛋白酶可催化胰岛素原向胰岛素的转化。羧基肽酶H抗体(CP-HA)对成人隐匿性自身免疫糖尿病(LADA)有诊断价值。

[0013] SOX13抗体(SO-XA)诱发的自身免疫反应可发生于GAD-Ab和CP-HA均阴性的DM患者在,SO-XA的检测可以提高诊断LADA的敏感性,SO-XA阳性患者具有病程长、临床多样等特点。

[0014] GAD、CP-HA、SO-XA等是诊断LADA的主要传统学指标。

[0015] 本发明的自身免疫性糖尿病免疫印迹检测试剂盒可针对自身免疫性糖尿病的9种抗体同时进行检测,从而使得我们该类患者的病况有了更快速、直观、准确、全面的判断,利于对患者进行及时的诊断和正确的治疗,减少和延缓糖尿病并发症的发生和发展。

[0016]

发明内容

本发明的目的在于针对目前缺乏多种免疫性糖尿病实验检查乃至体格检查专用的免疫印迹法产品,以及现有的免疫印迹试剂存在的一些不足,采用上述九种抗原对糖尿病的筛查、鉴别诊断、预后判断、疗效评估,使之有了更明确具体的客观实验指标,从而提出的一种检测自身免疫性糖尿病的免疫印迹试剂盒及其制备方法。

[0017] 为实现本发明的目的,采用如下技术方案:

一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,所述的反应膜条包括有底衬板,以及设于所述的衬板上的一条以上的检测带和指示带,所述的检测带之间、指示带以及检测带和指示带之间相互平行;

所述的检测带包括有

包被有GAD抗原的第一检测带,和/或

包被有IA-2A抗原的第二检测带,和/或

包被有IAA抗原的第三检测带,和/或

包被有ICA抗原的第四检测带,和/或

包被有ZnT-8A抗原的第五检测带,和/或

包被有CP-HA抗原的第六检测带,和/或

包被有SO-XA抗原的第七检测带,和/或

包被有UBE2L3抗原的第八检测带,和/或

包被有EEF1A1抗原的第九检测带;

所述的指示带包括有

包被有浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG的第一高浓度指示带,和

包被有浓度为12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG的第二中浓度指示带,和

包被浓度为1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG第三低浓度指示带。

[0018] 所述的检测带和底衬板通过具有双面粘性的PVC板连接。

[0019] 所述的指示带和底衬板通过具有双面粘性的PVC板连接。

[0020] 所述的底衬板为透明的PET底衬板。

[0021] 一种检测自身免疫性糖尿病抗体的免疫印迹试剂盒包括:反应膜条、酶结合物、显色底物、洗涤液、样本稀释液和终止液;所述的反应膜条由载体和固定在载体上的硝酸纤维素膜或尼龙膜所组成,在所述的硝酸纤维素膜或尼龙膜上含有:分别由GAD、IA-2A、IAA、ICA、ZnT-8A、CP-HA、SO-XA、UBE2L3及EEF1A1九种天然或重组抗原包被而成的9条平行的第一检测带-第九检测带,1条包被浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的第一高浓度指示带,1条包被浓度为12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的第二中浓度指示带,及1条包被浓度1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的第三低浓度指示带。

[0022] 实现单人份膜条上同时包被有9种抗原,可实现一份临床样本和一次检测反应检测多种自身抗体,可同时检测9种抗体,为自身免疫性糖尿病的临床诊断提供血清学依据。

[0023] 所述的第一高浓度指示带、第二中浓度指示带和第三低浓度指示带由人IgG,或鼠IgG或抗羊IgG划线而成。

[0024] 所述的酶结合物为辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgG。

[0025] 所述的显色底物为四甲基联苯胺。

[0026] 所述的洗涤液为20 \times Tirs缓冲液。

[0027] 所述样本稀释液为含封闭剂的Tirs缓冲液。

[0028] 所述的终止液为0.1 M/L硫酸。

[0029] 所述反应膜条制备方法有两种,包括贴膜法和划线法:

(1)贴膜法:

1)配制点样溶液:准备GAD、IA-2A、IAA、ICA、ZnT-8A、CP-HA、SO-XA、UBE2L3和EEF1A1九种抗原,及将人IgG、抗鼠IgG或抗羊IgG配制成浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高、中和低浓度三类点样溶液;

2)固定抗原:将硝酸纤维膜或尼龙膜裁成膜片,通过物理吸附和共价结合的方式,将1)中准备的九种抗原分别包被到膜片上,形成独立的检测膜片;将高、中和低三类点样溶液包被到膜片上,形成指示膜片;

3)干燥:将包被好的膜片条放入37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥2个小时;

4)贴膜:将干燥好的膜片贴于双面粘性的PVC板的正面,PVC板的背面待用;

5)切膜:将4)中贴好的检测膜片和指示膜片按照独立检测线切成一定宽度的条带;

6)组装:通过模具,将5)中的条带按次序贴于透明的PET底衬板上;

7)切条:用切纸机将组装好的条带切成单人份反应膜条。

[0030] 在2)步完成点样后,将膜片从免疫印迹点样器取出温室下放置1小时。

[0031] 固定抗原和质控的点样量控制在10 ng~30 ng。

[0032] 指示带的宽度均为7 mm,反应膜条的宽度均为5 mm。

[0033] (2)划线法:

1) 配制点样溶液:配制点样溶液:准备GAD、IA-2A、IAA、ICA、ZnT-8A、CP-HA、SO-XA、UBE2L3和EEF1A1九种抗原,及将人IgG、抗鼠IgG或抗羊IgG配制成浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12~25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高、中和低浓度三类点样溶液;

2) 固定抗原:使使用免疫印迹点样器在一整张的硝酸纤维膜或尼龙膜上通过物理吸附和共价结合的方式,将1)中准备的九种抗原分别包被到膜片上,形成独立的检测膜片;将高、中和低三类点样溶液包被到膜片上,形成指示膜片;

3) 干燥:将包被好的膜片条放入37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥2个小时;

4) 切条:用切纸机将组装好的条带切成单人份反应膜条。

[0034] 一种自身免疫性糖尿病检测用试剂盒的使用方法,所述的使用方法包括如下步骤:

1) 洗涤液配制: 0 \times 的浓缩洗涤液和蒸馏水按1:19的体积比,混匀,备用;

2) 检测步骤

2.1) 将反应膜条放入孵育盘中;

2.2) 用1mL孵育缓冲液润湿检测膜条,1分钟后移弃缓冲液;

2.3) 加入1mL已稀释的样本,室温孵育30分钟,置摇床轻摇;

2.4) 移弃已稀释的样本,不留残液;

2.5) 用1.5mL洗涤液洗涤检测膜条,轻摇,每次5分钟,洗涤完后弃除洗涤液,重复3次;

2.6) 加入1mL酶联物溶液,室温孵育30分钟,置摇床轻摇;

2.7) 移弃酶联物溶液;

2.8) 用1.5mL洗涤液洗涤检测膜条,轻摇,每次5分钟,洗涤完后弃除洗涤液,重复3次;

2.9) 加入1mL TMB底物溶液,室温避光孵育10分钟,置摇床轻摇;

3.0) 移弃底物溶液;

3.1) 用1.5mL蒸馏水洗涤,同时轻摇,1分钟后移弃蒸馏水;

3.2) 加入1mL终止液,室温孵育5分钟;

3.3) 移弃终止液;

3.4) 用滤纸吸干检测膜条上残留的液体;

3) 结果判断:采用目测、手工黏贴到扫描仪扫描固定卡然后借助特定的判读软件或使用全自动的判读分析仪器对检测结果进行判读,结果可判断为阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性或输出为量化的数值。

[0035] 相对于现有技术,本发明具有如下优点:

本发明通过一份临床样本和一次检测反应检测多种自身抗体,克服单一自身抗体检测灵敏度和特异性不足、数种疾病相关自身抗体逐一单独检测在操作上的繁琐,大大提高检测效率和结果判断的准确度。

[0036] 另外还有:

反应膜条上包被的抗原为从动物组织中提取的天然抗原或采用昆虫细胞或杆状病毒真核表达的方式获得的重组蛋白,提高了自身免疫性疾病诊断的敏感性和特异性;

抗原包被采用全自动点样仪,保证膜条上判断指示带及各抗原带位置的准确性,且可

根据检查需求进行合理排序,区别于传统的SDS~PAGE技术按分子量大小将抗原依次分开转移至印迹膜上,同时保证了抗原决定簇构象的完整性;

单人份膜条上同时包被有9种抗原,可实现一份临床样本一次实验同时检测9种抗体,为自身抗体免疫性糖尿病的临床诊断提供血清学依据;

具有高浓度判断指示带、中浓度判断指示带和低浓度判断指示带,使结果判断更为直观准确,为自身免疫性糖尿病病程检测及治疗后提供全面指导。

[0037]

附图说明

[0038] 图1为本发明所述的试剂盒中反应膜条上抗原及判断指示带分布示意图;

图2为本发明所述的试剂盒中反应膜条的PVC板、硝酸纤维素膜或尼龙膜和PET底衬板的组合结构图。

[0039]

具体实施方式

[0040] 本发明公开了一种检测自身免疫性糖尿病相关抗体的免疫印迹试剂盒及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,通过适当改进工艺参数而实现。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,他们都被视为包括在本发明所要求保护的技术方案之内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施实例进行了描述,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的方法和应用程序进行改动或适当变更组合,来实现和应用本发明技术。

[0041] 实施例1

请参照图1和图2,一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条,所述的反应膜条包括有底衬板(13),以及设于所述的底衬板(13)上的一条以上的检测带和指示带,所述的检测带之间、指示带以及检测带和指示带之间相互平行;

所述的检测带包括有

包被有GAD抗原的第一检测带(1),

包被有IA-2A抗原的第二检测带(2),

包被有IAA抗原的第三检测带(3),

包被有ICA抗原的第四检测带(4),

包被有ZnT-8A抗原的第五检测带(5),

包被有CP-HA抗原的第六检测带(6),

包被有SO-XA抗原的第七检测带(7),

包被有UBE2L3抗原的第八检测带(8),

包被有EEF1A1抗原的第九检测带(9);

所述的指示带包括有

包被有浓度为30~50 μ g/mL的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG的第一高浓度指示带(10),和

包被有浓度为12~25 μ g/L的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG的第二中浓度指示带(11),和

包被浓度为1~10 μ g/mL的人IgG、鼠IgG和/或抗羊IgG第三低浓度指示带(12)。

[0042] 所述的检测带(1、2、3、4、5、6、7、8、9)和底衬板(13)通过具有双面粘性的PVC板(14)连接。

[0043] 所述的指示带(10、11、12)和底衬板(13)通过具有双面粘性的PVC板(14)连接。

[0044] 所述的底衬板(13)为透明的PET底衬板。

[0045] 实施例2

所述贴膜法,所述反应膜条的载体为双面粘性的PVC板(14),正面与形成检测带(1、2、3、4、5、6、7、8、9)和指示带(10、11、12)的所述硝酸纤维素或尼龙膜固定粘接,背面固定粘接有透明的PET底衬板(13)。所述的第一高浓度指示带(10)、第二中浓度指示带(11)、第三低浓度指示带(12)由人IgG,或鼠IgG或抗羊IgG划线而成。所述的酶结合物为辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgG;所述的显色底物为四甲基联苯胺;所述的洗涤液为20×Tirs缓冲液;所述样本稀释液为含封闭剂的Tirs缓冲液;所述的终止液为0.1 M/L硫酸。所述划线法中的反应膜条直接使用硝酸纤维素或尼龙膜15为抗原载体。

[0046] 为是本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0047] 实施例3

将GAD、IA-2A、IAA、ICA、ZnT-8A、CP-HA、SO-XA、UBE2L3及EEF1A1抗原按照0.05~0.1 mg/mL的浓度,及人IgG、抗鼠IgG或抗羊IgG质控按照浓度范围为30~50 μg/mL的第一高浓度指示带(10)、浓度范围为12~25 μg/mL的第二中浓度指示带(11)、浓度范围为1~10 μg/mL的第三低浓度指示带(12)配制成相应的包被浓度待用。根据免疫印迹点样器的大小,将硝酸纤维素膜或尼龙膜裁成膜片,通过物理吸附和共价结合的方式,将上述配置好的点样溶液以一定的排列次序包被在膜片上,形成独立的检测线和判断指示带。将包被好的膜片放入37℃恒温烘箱中干燥2小时后取出贴于双面粘性的PVC板的正面,PVC板的背面待用,再按照独立检测线切成一定宽度条带,其中判断指示带的宽度为7mm,抗原条带宽度为5mm。通过模具将切好的各条带按次序粘贴于透明的PET底衬板上,再用滚切机将其切成宽度为2mm的单人份反应膜条。本实施例制备的膜条可适用于1型糖尿病的检测。

[0048] 实施例4

样本要求:样本为人血清,使用新鲜样本或于~20℃冻存样本,冻存样本只能复溶一次,勿使用热灭活的样本,避免使用严重脂血、黄疸、溶血及污染的样本。

[0049] 1. 洗涤液配制:用19份蒸馏水稀释1份20×的浓缩洗涤液,混匀,备用。

[0050] 2. 检测步骤

1.1) 将检测膜条放入孵育盘中,有编码的一面朝上。

[0051] 1.2) 用1mL孵育缓冲液润湿检测膜条,1分钟后移弃缓冲液。

[0052] 1.3) 加入1mL已稀释的样本,室温孵育30分钟(置摇床轻摇)。

[0053] 1.4) 移弃已稀释的样本,不留残液。

[0054] 1.5) 用1.5mL洗涤液洗涤检测膜条,轻摇,每次5分钟,洗涤完后弃除洗涤液,重复3次。

[0055] 1.6) 加入1mL酶联物溶液,室温孵育30分钟(置摇床轻摇)。

[0056] 1.7) 移弃酶联物溶液。

[0057] 1.8) 重复步骤5。

1.9) 加入1mL TMB底物溶液,室温避光孵育10分钟(置摇床轻摇)。

[0058] 2.0) 移弃底物溶液。

[0059] 2.1) 用1.5mL蒸馏水洗涤,同时轻摇,1分钟后移弃蒸馏水。

[0060] 2.2) 加入1mL终止液,室温孵育5分钟。

[0061] 2.3) 移弃终止液。

[0062] 2.4) 用滤纸吸干检测膜条上残留的液体。

[0063] 3. 结果判断

完成后,可采用目测、手工黏贴到扫描仪扫描固定卡然后借助特定的判读软件或使用全自动的判读分析仪器对检测结果进行判读,结果可判断为阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性或输出为量化的数值。

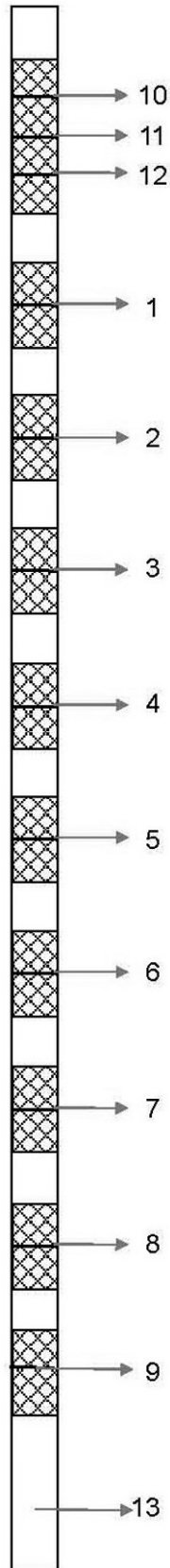


图1

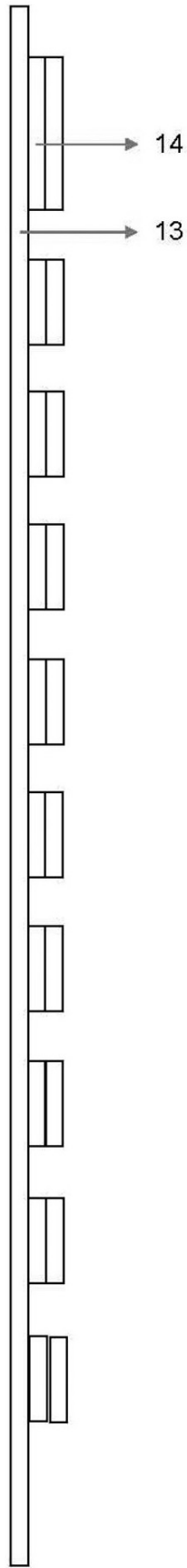


图2

专利名称(译)	一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条、制备和使用方法		
公开(公告)号	CN107449904A	公开(公告)日	2017-12-08
申请号	CN2017110793219.5	申请日	2017-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	胡鸱辉 王栋凯 刘尧 林俊 郑燕萍		
发明人	胡鸱辉 王栋凯 刘尧 林俊 郑燕萍		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N2800/042		
代理人(译)	胡坚		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条、制备和使用方法，本发明属于生物医学领域，本发明的目的在于针对目前缺乏多种免疫性糖尿病实验检查乃至体格检查专用的免疫印迹法产品，以及现有的免疫印迹试剂存在的一些不足，提供一种自身免疫性糖尿病检测用反应膜条，所述的反应膜条包括有底衬板，以及设于所述的底衬板上的一条以上的检测带和指示带，所述的检测带之间、指示带以及检测带和指示带之间相互平行；相对于现有技术，本发明具有如下优点：本发明通过一份临床样本和一次检测反应检测多种自身抗体，克服单一自身抗体检测灵敏度和特异性不足、数种疾病相关自身抗体逐一单独检测在操作上的繁琐，大大提高检测效率和结果判断的准确度。

