



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104345149 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 11

(21) 申请号 201310320111. 6

G01N 33/533 (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 33/577 (2006. 01)

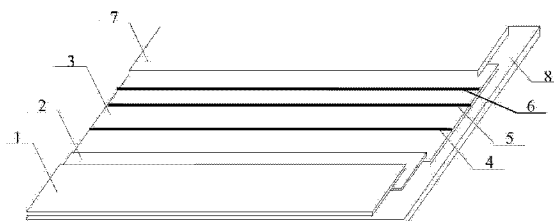
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测糖化血红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血红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,检测线包括糖化血红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血红蛋白免疫层析试纸条的制备。本发明提出的一种检测糖化血红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血红蛋白的含量,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. 一种检测糖化血红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血红蛋白检测线和血红蛋白检测线,所述质控线、所述血红蛋白检测线和所述糖化血红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所述的检测糖化血红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所述的检测糖化血红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) 检测糖化血红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,即为检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条。

4. 如权利要求3所述的检测糖化血红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所述的检测糖化血红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所述的检测糖化血红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 所述的检测糖化血红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 所述的检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 4 中抗体为抗糖化血红蛋白单克隆抗体、抗血红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 所述的检测糖化血红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。

一种检测糖化血红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血红蛋白免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 糖尿病的发病率呈不断上升趋势,是严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题。传统的糖尿病诊断和治疗监测采用空腹血糖、餐后血糖和口服葡萄糖耐量试验等,但是血糖参数仅代表抽血时的瞬间血糖水平,而糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, GHb)作为反映长期血糖水平的金标准,也是监测糖尿病治疗的重要指标。

[0003] GHb 是指结合了任何形式碳水化合物的血红蛋白(haemoglobin, Hb)。人类 Hb 主要是 HbA(95%~97%)、HbA2(<3%)、HbF(<1%)。HbA 中未结合糖的为 HbA0(90%)、结合糖的为 HbA1(5%~7%)即 GHb。其中 HbA1 包括结合果糖-1,6-二磷酸葡萄糖的 HbA1a1、结合葡萄糖-6-磷酸的 HbA1a2、结合未知碳水化合物的 HbA1b 和结合葡萄糖的 HbA1c, HbA1c 占 GHb 的 70%~90%。HbA1c 在组织中由葡萄糖的游离醛基与 HbA 的 β 链 N 末端缬氨酸的氨基进行不可逆的非酶促的反应,此过程称为糖基化, GHb 的形成主要取决于血糖浓度及血糖与 Hb 的接触时间。GHb 可以反映最近 2~3 个月的平均血糖水平。2002 年美国糖尿病协会已明确规定应定期检测 HbA1c,并将其作为监测糖尿病血糖控制的金标准。

[0004] GHb 的测定方法有几十种之多,目前常用的基本上可分为两大类:一类是基于 GHb 和 Hb 的电荷不同,如离子交换层析法、电泳法;另一类是基于 Hb 上糖化基团的结构特点,如亲和层析法、免疫法和酶法等。多个研究表明不同的原理测定的结果存在差别,而糖尿病患者治疗目标要求测定值不受测定方法的影响,因此在实验室里应用不同 GHb 测定方法所产生的结果可比性非常重要。

[0005] 离子交换层析法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和手工微柱法。此方法是基于血红蛋白 β 链 N 末端缬氨酸糖化后所带电荷不同而建立。但由于此方法所使用的仪器昂贵,难以在比较基层的医院和实验室普及;微柱法手工操作步骤繁琐,层析时间和微柱的质量不易控制,易产生操作技术误差,重复性欠佳;而且干扰因素很多,尤其对 pH 值和温度的变化敏感, HbF 及变异血红蛋白(HbS、HbC、HbE 等)对结果干扰,干扰程度根据柱的分离能力而定,所以一定要仔细观察图谱。

[0006] 电泳法(以琼脂凝胶电泳为例)Hb 于酸性缓冲液条件下(pH6.0)在琼脂糖凝胶上的电泳迁移取决于 Hb 在凝胶上的吸附情况及其所带的电荷。该方法标本用量少,分辨率高,重复性好,有研究发现血糖值与 HbA1c 值有显著相关性,且结果不受温度及胎儿血红蛋白的影响。另外,因为它可测定的 Hb 线性范围较宽(13.0~39.0g/L),可发现异常 Hb。该方法的缺点是每次测定均需成批进行样本分析,速度比较慢,无法进行实时个体检测,自动化程度较差,所测结果与技术人员扫描和对电泳的波峰判断有关,受主观因素影响,并且费用昂贵,因此并不适合临床实验室常规使用。

[0007] 亲和层析法硼酸具有与整合在 Hb 分子上葡萄糖的顺位二醇基作可逆结合反应的

性质。通常使用的是间-氨基苯硼酸琼脂糖,将血样本加到层析柱后,所有的GHb与硼酸结合留在柱中,非GHb直接流出层析柱;再加入高浓度也包含顺位二醇基的多羟基复合物(如山梨醇),GHb与硼酸的结合被替换而被洗脱下来,分别测量两组分,并计算比值。亲和层析法对变异血红蛋白和病理血红蛋白的影响相对其他方法不敏感,但测定的是HbA1即GHb总量。另外,金标法和硼酸亲和层析法密切相关,操作均简便易行、快速准确、试剂稳定。据报道,该法不受除Hbs和Hbc之外的任何血红蛋白变异体和降解产物的干扰,结果可靠,比较适用于临床随时检测。

[0008] 免疫比浊法利用抗原、抗体反应的原理进行测定。GHb的 β 链N末端提供了一个容易被抗体识别的抗原表位,可以用单克隆抗体或多克隆抗体,特异识别GHb的 β 链N末端最后4~6个氨基酸组成的抗原表位,结合比色或比浊法,以GHb为标准,测定HbA1c的含量,再测定Hb的含量,最后计算出HbA1c占总Hb的百分含量。此类方法只能作为判断糖尿病血糖水平的指标,不可用于变异血红蛋白的研究。与其相比,免疫比浊法检测的方法更为简单,不需要额外添加仪器,为临床提供了一种快速、准确、可靠、简便的常规方法,在临床应用中有着更为广阔的前景。

[0009] 酶法全血经溶血处理后,用特异蛋白内切酶将Hb酶解消化成果糖氨基酸,再经果糖氨基酸氧化酶作用下产生过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2), H_2O_2 的浓度与血液中GHb的含量成正比, H_2O_2 在过氧化物酶的作用下与相应的色原耦联,从而根据颜色变化程度可得 H_2O_2 浓度,进而得知样本中GHb的含量;同时测定同一管消化液的总Hb浓度,计算GHb和Hb的浓度比值,即为GHb结果。此法提供了一个像临床生化反应一样快速均一的反应系统(如葡萄糖、谷氨酸氨基转移酶),有很好的精密度,可同时检测GHb和Hb,且与常规HPLC法和免疫测定法有很好的相关性。

[0010] 离子捕获法应用抗原抗体反应原理,并联以荧光标志物,通过连接带负电的多阴离子复合物,吸附到带正电的的纤维表面,经过一系列彻底清洗等步骤后,测定荧光强度变化率,计算GHb浓度。其检测系统易于规范和重复,可减少操作技术误差,检测的敏感度和特异度高,批内、批间变异系数小。有文献报道此法影响因素少,准确度高,回收率达98.85%,交叉污染率 $<0.01\%$ 。该方法是近几年发展起来的新方法,采用自动分析仪,适用于批量标本的检测。

[0011] 综上所述的几种方法,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

[0012] 本发明的一个目的是提供一种检测糖化血红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血红蛋白的含量,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。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种检测糖化血红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。

[0014] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0015] 一种检测糖化血红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血红蛋白检测线和血红蛋白检测线,所述质控线、所述血红蛋白检测线和所述糖化血红蛋白检测线沿着所述分析膜上部一端到另一端依次排列。

[0016] 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。

[0017] 一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0018] 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;

[0019] 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;

[0020] 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;

[0021] 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;

[0022] 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;

[0023] 6) 检测糖化血红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,即为检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 优选地,所述步骤 4 中抗体为抗糖化血红蛋白单克隆抗体、抗血红蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体中的一种。

[0029] 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。

[0030] 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血红蛋白免疫层析试

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血红蛋白的含量,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血红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

[0031] 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。

[0032] 图 1 为本发明一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条中苯硼酸标记物反应原理示意图;

[0033] 图 2 为本发明一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条的结构示意图;

[0034] 图 3 为本发明一种检测糖化血红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;

[0035] 图 4 为一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条试验例 5 中对比检测回归曲线图;

[0036] 图中:1 样品垫;2 结合物垫;3 分析膜;4 糖化血红蛋白检测线;5 血红蛋白检测线;6 质控线;7 吸水垫;8 衬垫。

具体实施方式

[0037] 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。

[0038] 本发明总的技术方案如下:

[0039] 如图 1~4 所示:一种检测糖化血红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,质控线、血红蛋白检测线和糖化血红蛋白检测线沿着分析膜上部一端到另一端依次排列。

[0040] 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。检测线包括糖化血红蛋白检测线 4 和血红蛋白检测线 5。糖化血红蛋白检测线、血红蛋白检测线、质控线依次间隔 5mm。

[0041] 在本发明中,样品垫是检测糖化血红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血红蛋白检测线、血红蛋白检测线和质控线;检测线含有与待测样品中糖化血红蛋白发生免疫反应的抗体,检测线含有与待测样品中血红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。

[0042] 本发明提出的检测糖化血红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，依次流经检测线、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。

[0043] 一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条的制备方法，包括如下步骤：

[0044] 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；

[0045] 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；

[0046] 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；

[0047] 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；

[0048] 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；

[0049] 6) 检测糖化血红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，即为检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条。

[0050] 在本发明中，荧光材料可以为卟啉、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/钯卟啉，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。

[0051] 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。

[0052] 一种苯硼酸标记技术的糖化血红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血红蛋白的含量检测。

[0053] 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。

[0054] 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，使其中的荧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。

[0055] 实施例 1

[0056] 一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0057] 1) 苯硼酸标记物的制备:

[0058] 将抗血红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 20mg 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血红蛋白抗体和羊抗鼠 IgG 抗体,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,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、3.0% 的牛血清白蛋白、0.02% 的第一表面活性剂,用试剂瓶密封包装,于 2~8℃ 条件下保存。

[0059] 2) 样品垫的制备:

[0060] 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、3.0% 的牛血清白蛋白、0.02% 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℃ 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封备用。

[0061] 3) 结合物垫的制备:

[0062] 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℃ 保存备用的苯硼酸材料标记荧光材料、荧光标记抗血红蛋白抗体和羊抗鼠 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 10ul/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。

[0063] 4) 分析膜中检测线和质控线的制备:

[0064] 糖化血红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%,稀释抗糖化血红蛋白抗体至终浓度 1.6mg/ml。

[0065] 血红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%,稀释抗血红蛋白抗体至终浓度 2mg/ml。

[0066] 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。

[0067] 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,作为糖化血红蛋白检测线检测线;再间隔 5mm 处,从下往上 15mm 处喷膜划线,膜液量为 2ul/mm,作为血红蛋白检测线检测线;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。糖化血红蛋白检测线检测线、血红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。

[0068] 5) 吸水垫的制备：

[0069] 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。

[0070] 6) 制备检测糖化血红蛋白的免疫层析试纸条：

[0071] 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, 即为检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条。

[0072] 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。

[0073] 实施例 2

[0074] 与实施例 1 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 0.01mol/L, pH 值为 7.2, 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。

[0076] 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。

[0077] 第一表面活性剂和第二表面活性剂为 Triton X-100。

[0078] 实施例 3

[0079] 与实施例相同, 不同之处在于：

[0080] 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 0.05% 的第一表面活性剂。

[0081] 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。

[0082] 第一表面活性剂和第二表面活性剂为 tetronic1307。

[0083] 经过测试, 实施例 1 制备出的糖化血红蛋白免疫层析试纸条其性能最佳, 其灵敏度高, 测试糖化血红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。

[0084] 下面对实施例 1 制备出的糖化血红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血红蛋白免疫层析试纸条的性能进行阐述。

[0085] 试验例 1

[0086] 对实施例 1 制备出的糖化血红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。

[0087] 标准工作曲线的绘制：

[0088] 取 HbA1c 为 16.0% 的患者抗凝全血标本、HbA1c 为 7.2% 的患者抗凝全血标本和 HbA1c 为 4.0% 的抗凝全血标本配成 HbA1c 为 16.0、13.6、11.6、7.2、3.2、2.4、2.0% 的全血标本,再分别测定其 HbA1c,以配成值为 X,荧光实测值为 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: $Y=49.964X+7.7175$,拟合系数的平方为 $R^2=0.9917$ 。结果见附图 3,图 3 为线性检测标准工作曲线,糖化血红蛋白测定范围为 3.0% ~ 16.0%。

[0089] 试验例 2

[0090] 重复性试验:

[0091] 批内重复性试验:取同一患者抗凝全血标本,同时连续重复检测 20 次,计算出 CV 值。批间重复性试验:将同一患者抗凝全血标本分装成 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 2.12%。批间(日间)CV 值为 3.67%。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。

[0092] 实施例 3

[0093] 回收试验:按照内加入法,将 100 μ l 不同浓度的标准物分别加入 1000 μ l 患者抗凝全血标本中,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 95.9%,基本符合临床实验要求。

[0094] 表 1

[0095]

测得浓度(%)	加入浓度(%)	回收浓度(%)	回收率(%)	平均回收率(%)
5.9	-	-	-	95.9
6.0	0.10	0.10	100.0	
6.3	0.41	0.40	97.6	
6.5	0.70	0.63	90.0	

[0096] 试验例 4

[0097] 干扰试验:

[0098] 一、将一新鲜抗凝全血标本,分成 3 份,每份 1000 μ l,第 1 份加入葡萄糖为 40mmol/L 的 100 μ l 高糖物质,第 2 份加入总胆红素为 300.9 μ mol/L 的血清 100 μ l,第 3 份加入甘油三酯为 9.86mmol/L 的血清 100 μ l,混匀后分别测定 HbA1c 值。

[0099] 二、采集一患者全血标本,分别注入含 EDTA-K2、肝素、枸橼酸钠的 3 种抗凝剂管中混匀,然后分别测定 HbA1c 值。

[0100] 结果表明,在葡萄糖为 40mmol/L 以下高糖标本、总胆红素为 300.9 μ mol/L 以下的黄疸标本及甘油三酯为 9.86mmol/L 以下的脂血对本方法测定 HbA1c 无明显干扰。不同的抗凝剂对金标法测定 HbA1c 也无明显干扰。

[0101] 试验例 5

[0102] 实际检测对比试验

[0103] 对实施例 1 的试纸条进行性能方面的测定,取 30 例患者的空腹新鲜全血 EDTA-K2 抗凝标本,每份分别用挪威 NycoCard ReaderII 多功能金标定量检测仪及胶体金试纸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 ($n=30$, $Y=0.9635X+0.0049$, $r=0.9667$, $t=0.0730$, $P>0.05$)。回归曲线图见附图 4,图 4 为对比检测回归曲线图。

[0104] 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。

[0105] 本发明提出的检测糖化血红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血红蛋白的含量,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。

[0106] 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。

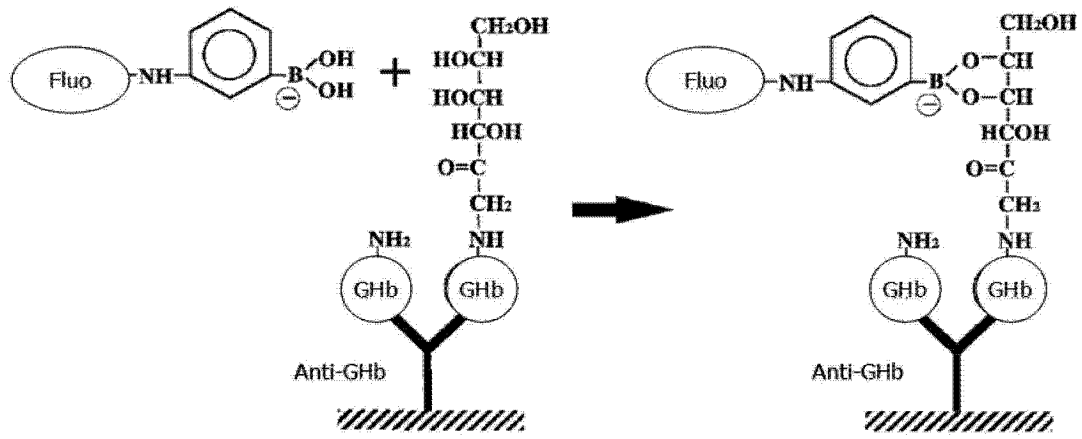


图 1

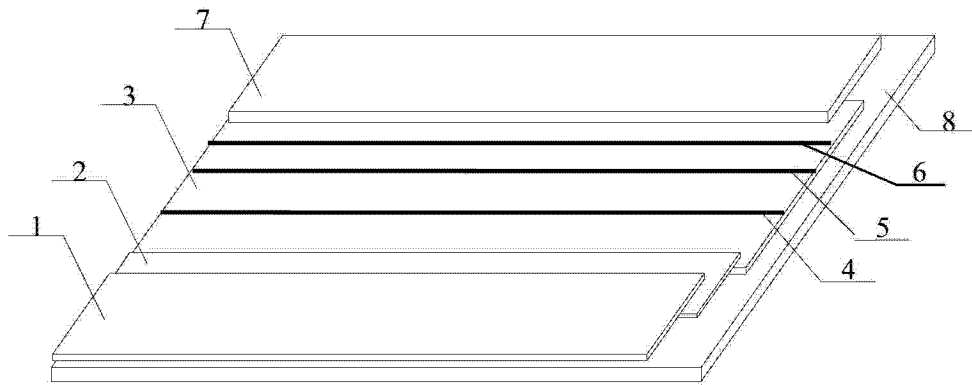


图 2

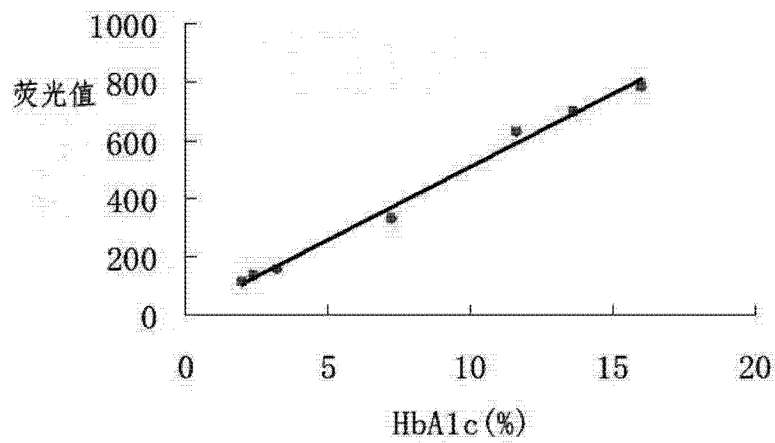


图 3

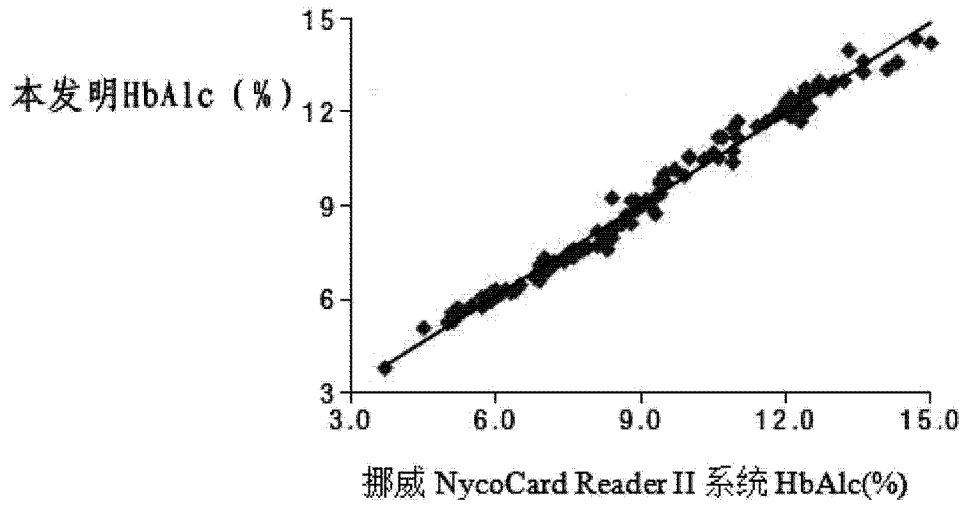


图 4

专利名称(译)	一种检测糖化血红蛋白免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN104345149A	公开(公告)日	2015-02-11
申请号	CN201310320111.6	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 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/723 G01N2333/805 G01N2800/042		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明提出了一种检测糖化血红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，检测线包括糖化血红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血红蛋白免疫层析试纸条的制备。本发明提出的一种检测糖化血红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血红蛋白的含量，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。

