



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104422772 B

(45) 授权公告日 2016. 07. 06

(21) 申请号 201310408079. 7

G01N 33/533(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 09. 10

审查员 胡晓佳

(73) 专利权人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市滨湖区钱荣路
20 号江苏省原子医学研究所, 卫生部
核医学重点实验室 / 江苏省分子核医
学重点实验室

(72) 发明人 黄飏 周衍 邹霏 吕坤祥 张珏
张艺 周彬

(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 曾少丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

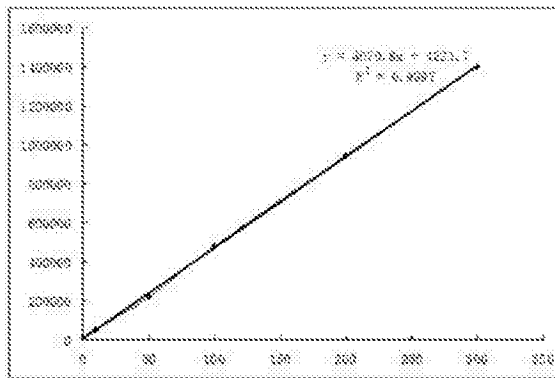
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种定量检测胃蛋白酶原 I 的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及临床免疫学检测领域, 具体涉及一种定量检测胃蛋白酶原 I 的时间分辨免疫层析试纸条。本发明提供的试纸条, 包括塑料卡壳、底板及附着于底板上依次相互交错的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸。所述的结合垫上包被有稀土离子微球标记的胃蛋白酶原 I 单克隆抗体 I; 所述的包被膜上包被有检测带和质控带, 检测带固定有识别不同抗原表位的胃蛋白酶原 I 单克隆抗体 II, 质控带固定有兔抗鼠 IgG 抗体。本发明还公开了该试纸条的制备方法。本发明通过将双抗体夹心测抗原和时间分辨免疫层析技术引入胃蛋白酶原 I 的检测中, 结合荧光检测仪, 实现了胃蛋白酶原 I 的单人份定量检测, 且灵敏度高, 批内、批间差小, 为临床使用提供了极大便利。



1. 一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:该试纸条包括塑料卡壳、底板以及附着于底板上依次相互交错排列的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I;所述包被膜上包被有检测带和质控带,所述检测带固定有识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II,所述质控带固定有兔抗鼠IgG抗体;

所述免疫层析试纸条的制备方法包括如下步骤:

(1)在包被膜的不同位置分别固定识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体,形成检测带和质控带;

(2)制备稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I垫,并喷涂在结合垫上;

(3)在底板上依次相互交错的黏贴上样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,然后切割成宽度为0.5cm大小,装入塑料卡壳;

所述包被膜的制备方法是:使用含有1%-10%蔗糖的0.01-0.02mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,分别将识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体稀释到1mg/ml-1.5mg/ml的浓度,使用定量喷膜仪以1uI/cm的量将二者以0.5cm-1.0cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,35-38℃烘干1-1.5h,加入干燥剂封存备用。

2. 根据权利要求1所述的一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:所述的结合垫为聚酯膜,其能够载有足量的稀土离子微球,且遇样品后又能迅速释放微球。

3. 根据权利要求1所述的一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:所述的包被膜为硝酸纤维素膜。

4. 根据权利要求1所述的一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:所述包被膜上包被的检测带和质控带相互平行,所述检测带靠近所述结合垫,所述质控带靠近所述吸水纸。

5. 根据权利要求1所述的一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:所述的稀土离子微球为球内灌注有时间分辨的镧系元素络合物,且其直径范围为100nm-300nm。

6. 根据权利要求1所述的一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:所述试纸条装于所述塑料卡壳内。

7. 根据权利要求1所述所述的一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I的制备方法包括以下步骤:

(1)将胃蛋白酶原I单克隆抗体I用0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液在4℃温度下透析过夜,之后调整浓度为1mg/ml-1.5mg/ml;

(2)使用0.05mol/L的PH为7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),终浓度为20mmol/L,室温反应10-20分钟,充分洗涤微球,用0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入透析过的胃蛋白酶原I单克隆抗体I,使胃蛋白酶原I单克隆抗体I与微球的质量比为1:50-4:50,室温反应2小时,加入含有1%-10%BSA的0.01-0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤微球,用含有0.05%-1%BSA,0.05%-0.1%Tween-20,0.01-0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液保存液复溶至原体积,使用定量喷膜仪以3uI/cm-5uI/cm喷涂于聚酯膜上,避光,在35-38

℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用。

一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床免疫学检测领域,具体涉及一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 胃蛋白酶原(Pesinogen,PG)是胃液中胃蛋白酶的无活性前体,分为胃蛋白酶原I(简称PGI)和胃蛋白酶原II(简称PGII)。血清PG水平反映了不同部位胃粘膜的形态和功能,PGI主要由胃底腺的主细胞和颈黏液细胞分泌,血清PGI含量与胃溃疡、十二指肠溃疡、萎缩性胃炎、胃癌等上消化道疾病有密切关系。PGI/PGII的比率对于判断胃黏膜状态和功能也有较高的临床价值。测定PGI含量检测出十二指肠溃疡、萎缩性胃炎,胃炎,胃癌等其他消化道疾病,供临床检测和体检筛查需要。PGI检测作为非侵入性方法,降低患者痛苦,简便、经济、具有普查价值。

[0003] 对于胃蛋白酶原I的检测,目前临床常用的方法包括:乳胶增强免疫比浊法,酶联免疫法(eLisa),化学发光法,时间分辨免疫法,但是这些方法都有各自的特点及不足。乳胶增强免疫比浊法,操作简单,可以全自动化,但是,其灵敏度不高,无法实现精确定量;ELISA法和时间分辨免疫法定量准确,但手工操作,过程复杂,且不适合单人份和较小批量检测用。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法。采用该免疫层析试纸条,不仅能够提供较高的灵敏度和特异性,操作简单,满足临床检验的需要,而且降低了成本,满足国内市场需求。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0006] 本发明一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,该试纸条包括塑料卡壳、底板以及附着于底板上依次相互交错排列的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I;所述包被膜上包被有检测带和质控带,所述检测带固定有识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II,所述质控带固定有兔抗鼠IgG抗体。

[0007] 其中,所述的结合垫优选为聚酯膜,其能够载有足量的稀土离子微球,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0008] 其中,所述的包被膜优选为硝酸纤维素膜。

[0009] 其中,所述包被膜上包被的检测带和质控带相互平行,所述检测带靠近所述结合垫,所述质控带靠近所述吸水纸。

[0010] 其中,所述的稀土离子微球选用本领域公知的用于标记抗体的任何镧系元素微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素。优选的稀土离子

微球的直径为100nm-300nm。

[0011] 其中,所述试纸条装于所述塑料卡壳内。

[0012] 本发明还提供了一种制备上述试纸条的方法,其包括如下步骤:

[0013] (1)在包被膜的不同位置分别固定识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体,形成检测带和质控带;

[0014] (2)制备稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I垫,并喷涂在结合垫上;

[0015] (3)在底板上依次相互交错的黏贴上样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,然后切割成宽度为0.5cm大小,装入塑料卡壳。

[0016] 其中,所述包被膜的制备方法是:使用含有1%-10%蔗糖的0.01-0.02mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,分别将识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体稀释到1mg/ml-1.5mg/ml的浓度,使用定量喷膜仪以1uI/cm的量将二者以0.5cm-1.0cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,35-38℃烘干1-1.5h,加入干燥剂封存备用。

[0017] 其中,所述荧光标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I的制备方法包括以下步骤:

[0018] (1)将胃蛋白酶原I单克隆抗体I用0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液在4℃温度下透析过夜,之后调整浓度为1mg/ml-1.5mg/ml;

[0019] (2)使用0.05mol/L的PH为7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),终浓度为20mmol/L,室温反应10-20分钟,充分洗涤微球,用0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入透析过的胃蛋白酶原I单克隆抗体I,使胃蛋白酶原I单克隆抗体I与微球的质量比为1:50-4:50,室温反应2小时,加入含有1%-10%BSA的0.01-0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤微球,用含有0.05%-1%BSA,0.05%-0.1%Tween-20,0.01-0.05mol/L的PH为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液保存液复溶至原体积,使用定量喷膜仪以3uI/cm-5uI/cm喷涂于聚酯膜上,避光,在35-38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用。

[0020] 本发明在使用时,在样品垫上加入样品液,在毛细作用下,样品液向吸水纸一段泳动,当待测标本中含有胃蛋白酶原I时,胃蛋白酶原I与稀土离子微球上的抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II检测线T处,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测线T处。未结合单克隆抗体II的稀土离子微球继续前行,到达质控线C时,兔抗鼠IgG抗体与稀土离子微球上的鼠源性单抗结合,在C线处出现稀土离子微球的聚集。整个反应在15分钟内完成,并进行上机读卡。T线和C线都会产生相应的荧光信号,荧光检测仪会根据定标卡上的信息将实际检测值带入预设的标准曲线中算出定量的结果。

[0021] 本发明所达到的有益效果是:

[0022] (1)通过对试纸条的改进,将时间分辨免疫层析技术引入胃蛋白酶原I的检测中,结合时间分辨荧光检测仪,实现了胃蛋白酶原I的单人份定量检测,且灵敏度高,批内、批间差小,为临床使用提供了极大便利。

[0023] (2)本发明操作简便,适合大规模生产,对于胃蛋白酶原I的定量检测有着积极的意义。

附图说明

[0024] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0025] 图1为实施例1和实施例2的标准曲线图。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0027] 实施例1

[0028] 本发明一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,该试纸条包括塑料卡壳、底板以及附着于底板上依次相互交错排列的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I;所述包被膜上包被有检测带和质控带,所述检测带固定有识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II,所述质控带固定有兔抗鼠IgG抗体。

[0029] 所述的结合垫为聚酯膜,其能够载有足量的稀土离子微球,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0030] 所述的包被膜为硝酸纤维素膜;所述包被膜上包被的检测带和质控带相互平行,所述检测带靠近所述结合垫,所述质控带靠近所述吸水纸。

[0031] 所述的稀土离子微球选用本领域公知的用于标记抗体的任何镧系元素微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素。所述稀土离子微球的直径为100nm其中,所述试纸条装于所述塑料卡壳内。

[0032] 本实施例的试纸条制备方法包括以下步骤:

[0033] (1)在包被膜的不同位置分别固定识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体,形成检测带和质控带;

[0034] (2)制备稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I垫,并喷涂在结合垫上;

[0035] (3)在底板上依次相互交错的黏贴上样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,然后切割成宽度为0.5cm大小,装入塑料卡壳。

[0036] (4)所述试纸条的组装需在操作过程必须在湿度小于35%,温度为20-25℃的房间内进行。

[0037] 其中,所述包被膜的制备方法是:使用含有1%蔗糖的0.01mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液,分别将识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体稀释到1mg/ml的浓度,使用定量喷膜仪以1 μ l/cm的量将二者以0.5cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,35℃烘干1h,加入干燥剂封存备用。

[0038] 其中,所述荧光标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I的制备方法包括以下步骤:

[0039] (1)将胃蛋白酶原I单克隆抗体I用0.05mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液在4℃温度下透析过夜,之后调整浓度为1mg/ml;

[0040] (2)使用0.05mol/L的PH为7.2的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),终浓度为20mmol/L,室温反应10分钟,充分洗涤微球,用0.05mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液复溶后加入透析过的胃蛋白酶原I单克隆抗体I,使胃蛋白酶原I单克隆抗体I与微球的质量比为1:50,室温反应2小时,加入含有1%BSA的0.01mol/L的PH为

7.2的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤微球,用含有0.05%BSA,0.05%Tween-20,0.01mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液复溶至原体积,使用定量喷膜仪以3uI/cm喷涂于聚酯膜上,避光,在35℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用。

[0041] 试纸条的定量检测

[0042] A绘制标准曲线(图1)

[0043] 在制备好的胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条的加样区加入不同浓度的胃蛋白酶原I标准品(取6个不同的浓度,分别为0ug/L、5ug/L、10ug/L、20ug/L、30ug/L、50ug/L,每个浓度做5个平行样)。膜层析反应15分钟后,仪器读取质控线C、检测线T信号,以检测的样品荧光值信号为纵坐标,胃蛋白酶原I标准品浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线。

[0044] 由图1标准曲线可以看出,该标准曲线的 R^2 为0.999,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含胃蛋白酶原I浓度进行定量分析。

[0045] B样品检测

[0046] 在胃蛋白酶原I的荧光免疫层析试纸条的加样区加入待测样品,膜层析反应15分钟。开启荧光检测设备,并将检测条及校准卡插入荧光检测设备的插卡口,运行仪器,仪器通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的胃蛋白酶原I浓度。

[0047] 实施例2

[0048] 本发明一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条,该试纸条包括塑料卡壳、底板以及附着于底板上依次相互交错排列的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I;所述包被膜上包被有检测带和质控带,所述检测带固定有识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II,所述质控带固定有兔抗鼠IgG抗体。

[0049] 所述的结合垫为聚酯膜,其能够载有足量的稀土离子微球,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0050] 所述的包被膜为硝酸纤维素膜;所述包被膜上包被的检测带和质控带相互平行,所述检测带靠近所述结合垫,所述质控带靠近所述吸水纸。

[0051] 所述的稀土离子微球选用本领域公知的用于标记抗体的任何镧系元素微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素。所述稀土离子微球的直径为100nm其中,所述试纸条装于所述塑料卡壳内。

[0052] 本实施例的试纸条制备方法包括以下步骤:

[0053] (1)在包被膜的不同位置分别固定识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体,形成检测带和质控带;

[0054] (2)制备稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I垫,并喷涂在结合垫上;

[0055] (3)在底板上依次相互交错的黏贴上样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,然后切割成宽度为0.5cm大小,装入塑料卡壳。

[0056] (4)所述试纸条的组装需在操作过程必须在湿度小于35%,温度20-25℃的房间内进行。

[0057] 其中,所述包被膜的制备方法是:使用含有10%蔗糖的0.02mol/L的PH为7.6的磷酸盐缓冲液,分别将识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II和兔抗鼠IgG抗体稀释到

1.5mg/ml的浓度,使用定量喷膜仪以1uI/cm的量将二者以1.0cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,38℃烘干1.5h,加入干燥剂封存备用。

[0058] 其中,所述荧光标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I的制备方法包括以下步骤:

[0059] (1)将胃蛋白酶原I单克隆抗体I用0.05moI/L的PH为7.6的磷酸盐缓冲液在4℃温度下透析过夜,之后调整浓度为1.5mg/ml;

[0060] (2)使用0.05moI/L的PH为7.6的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),终浓度为20mmoI/L,室温反应20分钟,充分洗涤微球,用0.05moI/L的PH为7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入透析过的胃蛋白酶原I单克隆抗体I,使胃蛋白酶原I单克隆抗体I与微球的质量比为4:50,室温反应2小时,加入含有10%BSA的0.05moI/L的PH为7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤微球,用含有1%BSA,0.1% Tween-20,0.05moI/L的PH为7.6的磷酸盐缓冲液保存液复溶至原体积,使用定量喷膜仪以5uI/cm喷涂于聚酯膜上,避光,在38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用。

[0061] 试纸条的定量检测

[0062] A绘制标准曲线(图1)

[0063] 在制备好的胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条的加样区加入不同浓度的胃蛋白酶原I标准品(取6个不同的浓度,分别为0ug/L、5ug/L、10ug/L、20ug/L、30ug/L、50ug/L,每个浓度做5个平行样)。膜层析反应15分钟后,仪器读取质控线C、检测线T信号,以检测的样品荧光值信号为纵坐标,胃蛋白酶原I标准品浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线。

[0064] 由图1标准曲线可以看出,该标准曲线的 R^2 为0.999,线性较好,可以通过该标线对样品中所含胃蛋白酶原I浓度进行定量分析。

[0065] B样品检测

[0066] 在胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条的加样区加入待测样品,膜层析反应15分钟。开启荧光检测设备,并将检测条及校准卡插入荧光检测设备的插卡口,运行仪器,仪器通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的胃蛋白酶原I浓度。。

[0067] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。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。

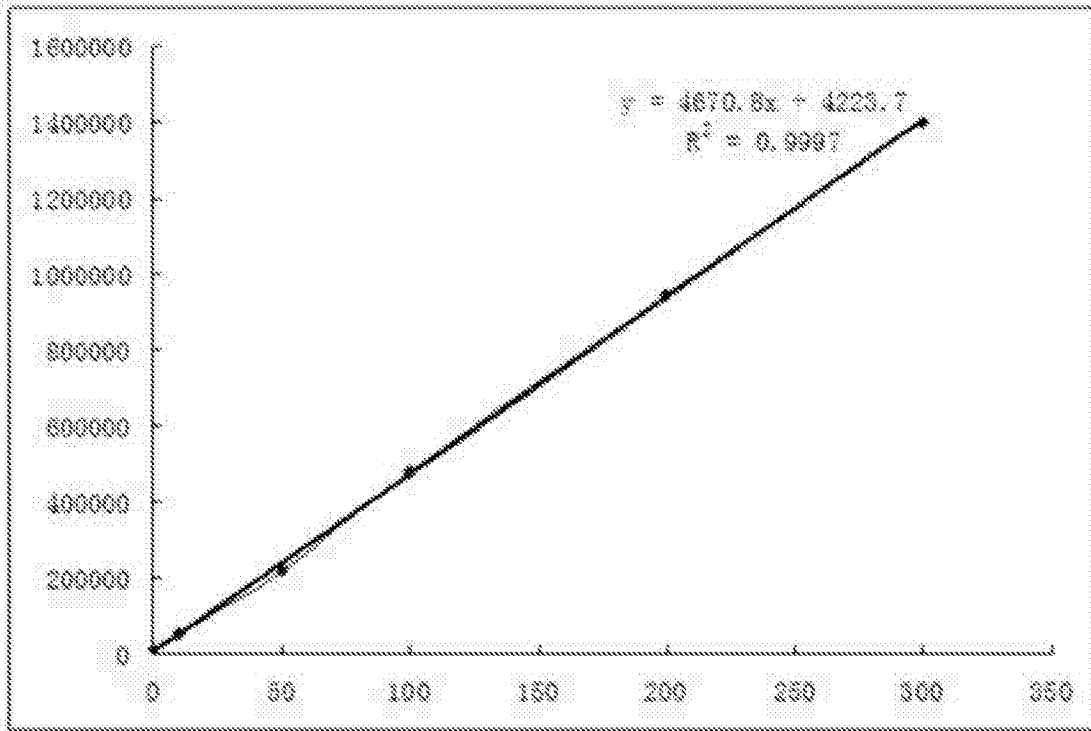


图1

专利名称(译)	一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN104422772B	公开(公告)日	2016-07-06
申请号	CN201310408079.7	申请日	2013-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	黄飏 周衍 邹霏 吕坤祥 张珏 张艺 周彬		
发明人	黄飏 周衍 邹霏 吕坤祥 张珏 张艺 周彬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/577 G01N2800/06		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN104422772A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及临床免疫学检测领域，具体涉及一种定量检测胃蛋白酶原I的时间分辨免疫层析试纸条。本发明提供的试纸条，包括塑料卡壳、底板及附着于底板上依次相互交错的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸。所述的结合垫上包被有稀土离子微球标记的胃蛋白酶原I单克隆抗体I；所述的包被膜上包被有检测带和质控带，检测带固定有识别不同抗原表位的胃蛋白酶原I单克隆抗体II，质控带固定有兔抗鼠IgG抗体。本发明还公开了该试纸条的制备方法。本发明通过将双抗体夹心测抗原和时间分辨免疫层析技术引入胃蛋白酶原I的检测中，结合荧光检测仪，实现了胃蛋白酶原I的单人份定量检测，且灵敏度高，批内、批间差小，为临床使用提供了极大便利。

