



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107045062 B

(45)授权公告日 2019.01.29

(21)申请号 201710193928.X

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2017.03.28

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107045062 A

CN 105974110 A, 2016.09.28,

CN 106066399 A, 2016.11.02,

CN 205539004 U, 2016.08.31,

(43)申请公布日 2017.08.15

CN 103074303 A, 2013.05.01,

CN 104459133 A, 2015.03.25,

(73)专利权人 广州瑞博奥生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市萝岗区瑞和路
79号

CN 102776153 A, 2012.11.14,

CN 102775473 A, 2012.11.14,

(72)发明人 周腊梅 黄若磐 胡守旺

唐曙明等. 抗人中性粒细胞明胶酶相关脂质
运载蛋白单克隆抗体的研制及其检测试剂的初
步应用.《中国现代医学杂志》.2015,第25卷(第
13期),

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 万志香

审查员 李倩

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

G01N 33/531(2006.01)

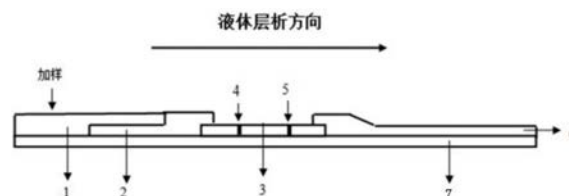
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂
盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法,所述试纸条包括底衬、以及依次设在所述底衬上的样品垫、金标垫、包被膜和吸水纸,所述金标垫上包被有胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体,所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区,所述检测区包被有抗人NGAL包被抗体,所述对照区包被有山羊抗鸡IgY抗体,所述抗人NGAL检测抗体对应具有如SEQ ID No:5所示氨基酸序列的抗原表位。本发明的胶体金免疫层析试纸条具有简便、快捷、实用、灵敏、高效的有益效果吗,可批量生产,适用于临床快速诊断和现场快速检测,易于保存,适合在基层医院的推广使用。



1. 一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述试纸条包括底衬、以及依次设在所述底衬上的样品垫、金标垫、包被膜和吸水纸,所述金标垫上包被有胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体,所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区,所述检测区包被有抗人NGAL包被抗体,所述对照区包被有山羊抗鸡IgY抗体,所述抗人NGAL检测抗体对应具有如SEQ ID No:5所示氨基酸序列的抗原表位。

2. 根据权利要求1所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体的浓度分别为0.2~0.5mg/ml和0.2mg/ml,在所述金标垫上的包被量均为1.2 μ l/cm。

3. 根据权利要求1所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述金标垫上的胶体金颗粒直径为35~45nm。

4. 根据权利要求1所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测区靠近所述金标垫,所述对照区靠近所述吸水纸,所述检测区和所述对照区的间隔为0.4cm。

5. 根据权利要求1所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述抗人NGAL包被抗体的浓度为2mg/ml,在所述检测区的包被量为1.2 μ l/cm。

6. 根据权利要求1所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述山羊抗鸡IgY抗体的浓度为0.7mg/ml,在所述对照区的包被量为1.2 μ l/cm。

7. 权利要求1~6任一项所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)、制备抗人NGAL包被抗体,在包被膜上分别固定抗人NGAL包被抗体和山羊抗鸡IgY抗体,形成检测区和对照区;

(2)、将抗人NGAL检测抗体和鸡IgY抗体用胶体金进行标记,并喷涂在金标垫上;所述抗人NGAL检测抗体对应具有如SEQ ID No:5氨基酸序列的抗原表位;

(3)、在底衬上搭接粘贴样品垫、金标垫、包被膜和吸水纸,即得。

8. 根据权利要求7所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述抗人NGAL检测抗体的制备方法为:根据NGAL全蛋白序列设计不同肽段,免疫动物获得特异性抗体;将特异性抗体进行配对,筛选得到抗人NGAL检测抗体。

9. 一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1~6任一项所述的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条。

检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,本发明涉及一种半定量检测尿液中的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophilgelatinase-associated lipocalin,NGAL)由Kjeldsen等人于1993年在中性粒细胞内发现的,是一种25kD的糖蛋白。它具有lipocalin家族的典型 β -折叠桶结构,与炎症、胚胎发育、免疫应答、趋化作用、信号转导以及多种肿瘤的发生与发展等过程密切相关。NGAL可参与细胞分化且作为一种存活因子抑制细胞凋亡;在人类肿瘤中如肺腺癌、食管癌、胰腺癌、结肠癌和乳腺癌中可见NGAL高表达,并且NGAL蛋白可通过保护MMP-9的活性而促进肿瘤细胞的侵袭。近年来有研究证明,NGAL作为小分子铁配合物结合蛋白直接参与了机体铁代谢和天然免疫反应等功能(Goetz DH,2002;Yang J,2002),与肾缺血,肾毒性损伤以及动脉粥样硬化(Forsblad J,2002;Hemdah1 AL,2006)等疾病的发生发展密切相关,且作为一种早期标志物帮助判定缺血性肾损伤程度(Mishra J,2003;Mishra J,2005)。因此,制备重组NGAL蛋白对深入研究NGAL的功能及其临床诊断的应用具有重要的意义。

[0003] 寻找急性肾损伤(AKI)早期诊断标记物的研究中,人们发现NGAL是一个很好的预测及诊断指标。有学者在急性缺血再灌注和顺铂诱导的AKI小鼠模型中,发现在损伤发生数小时之内即可检测到NGAL的表达明显增高。尿NGAL是缺血性肾损伤的一个早期、敏感的指标,即AKI时血、尿NGAL水平均升高,尿NGAL水平升高更为显著。并且NGAI升高较早期肾脏损伤的其他指标如肾脏损伤分子(kidneyinjurymolecular1,KIM-1)、Cyr61(cysteinrichprotein61)、132-微球蛋白等出现得要早。同时,NGAL水平与肾脏损伤程度呈正相关,血和尿NGAL可作为诊断AKI的早期、敏感、特异性的早期生物学标记物,并在一定程度上可以反映AKI严重程度及判断预后。NGAL已被证实作为小儿心脏搭桥手术后,预测急性肾损害的早期可靠指标。

[0004] 高达50%的重症监护室患者可能患有一定程度的急性肾功能衰竭。急性肾功能衰竭死亡率处于危重病死亡率前列。在过去40年内,急性肾功能衰竭的预测并没有显著进步。目前的诊断方法,如血清肌酐或胱蛋白酶抑制剂C,只在肾功能恶化后才有所表达,而这可能在器官损伤1天以上才显现甚至仍不明显。NGAL是载脂蛋白的一种,最初是在激活中性粒细胞中被发现的一种小分子量分泌性蛋白,现代研究表明,NGAL是诊断急性肾损伤的最有效生物学标志之一,也是早期糖尿病肾病的有效标志物之一。人体研究发现心脏术后患者在急性肾脏病发生的2h内,血、尿NGAL显著升高,据此,NGAL被认为是肾功能损伤早期的生物标志物。NGAL水平偏高通常出现以下情况:心血管手术患者、病危人员、脓血性或出血性休克、肾移植、静脉X射线造影剂的反应和肾毒性治疗反应。

[0005] 最早对血、尿标本中的NGAL检测方法是酶联免疫吸附试验(ELISA)或者免疫印记法来检测。但这些都是靠人工操作,无法标准化,检测周期较长而且费用昂贵,因此并不推

荐用于临床实践,仅仅用于科学研究。目前所使用的检测NGAL的ELISA试剂盒既可用于手工检测,也可用于自动化分析,提供实验室检测效率。同时,有多个厂家使用免疫比浊法检测血液或尿液中的NGAL的试剂盒获得注册证书。比浊法也称浊度法,属于散射光谱分析,是在比色的基础上发展起来的,其测定理论、方法、计算等许多方面和比色法相似,但本质上又有区别。各种浊度都没有特异(吸收光谱),只是悬液中的粒子将入射光散射(遮挡),致使透光度减弱。浊度法分正免疫透射比浊测定技术和免疫散射比浊测定技术,是目前检测人血清中特定蛋白的常用方法。目前以散射比浊为原理的特定蛋白分析仪已在医学检验领域普遍使用。后出现了微量免疫沉淀测定法,即免疫透射比浊测定和免疫散射比浊,自此免疫比浊测定逐渐被广泛应用于临床体液中蛋白质含量检测的领域。近几年来,免疫透射比浊测定技术被广泛使用在全自动生化分析仪上,实现高速、灵敏和自动化。

[0006] 目前NGAL检测方法有:

[0007] 1、双抗夹心免疫化学发光法——该法操作简便,特异性强,敏感性高。但存在操作繁琐,标本需要预处理,检测时间长等缺点。

[0008] 2、金标法——该法具有快速简便,易观察的特点。

[0009] 3、透射免疫浊度法——该测定方法简便、快速,可自动化,适合于批量检测,但是免疫透射比浊的方法学及临床应用尚需做进一步的验证。

发明内容

[0010] 基于此,为了克服上述现有技术的缺陷,本发明提供了一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法,该检测试纸条具有能实现半定量检测、检测时间短、特异性好,经济成本低等优点。

[0011] 为了实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0012] 一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,包括底衬、以及依次设在所述底衬上的样品垫、金标垫、包被膜和吸水纸,所述金标垫上包被有胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体,所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区 and 对照区,所述检测区包被有抗人NGAL包被抗体,所述对照区包被有山羊抗鸡IgY抗体,所述抗人NGAL检测抗体对应具有如SEQ ID No:1~SEQ ID No:7任一所示氨基酸序列的抗原表位。

[0013] 在其中一些实施例中,所述胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体的浓度分别为0.2-0.5mg/ml和0.2mg/ml,在所述金标垫上的包被量均为1.2u1/cm。

[0014] 在其中一些实施例中,所述金标垫上的胶体金颗粒直径为35~45nm。

[0015] 在其中一些实施例中,所述检测区靠近所述金标垫,所述对照区靠近所述吸水纸,所述检测区和所述对照区的间隔为0.4cm。

[0016] 在其中一些实施例中,所述抗人NGAL包被抗体的浓度为2mg/ml,在所述检测区的包被量为1.2u1/cm。

[0017] 在其中一些实施例中,所述山羊抗鸡IgY抗体的浓度为0.7mg/ml,在所述对照区的包被量为1.2u1/cm。

[0018] 本发明还提供了上述检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1)、制备抗人NGAL包被抗体,在包被膜上分别固定抗人NGAL包被抗体和山羊抗鸡

IgY抗体,形成检测区和对照区;

[0020] (2)、将抗人NGAL检测抗体和鸡IgY抗体用胶体金进行标记,并喷涂在金标垫上;所述抗人NGAL检测抗体具有如SEQ ID No:1~SEQ ID No:7任一所示氨基酸序列的抗原表位;

[0021] (3)、在底衬上搭接粘贴样品垫、金标垫、包被膜和吸水纸,即得。

[0022] 在其中一些实施例中,步骤(1)中所述抗人NGAL检测抗体的制备方法为:根据NGAL全蛋白序列设计不同肽段,免疫动物获得特异性抗体;将特异性抗体进行配对,筛选得到灵敏度最高的抗体,即得。

[0023] 本发明还提供了一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试剂盒,包括上述检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条。

[0024] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0025] 1、采用本发明的胶体金免疫层析试纸条进行临床验证,共检测尿液样本135例(其中阳性33例,阴性102例),阳性符合率为100%,阴性符合率为100%,总符合率为100%,约登指数为1,Kappa值为1(Kappa检验, $P<0.05$),检测结果符合率为100%,与现有对照试纸条有很好的一致性,结果表明本发明的试纸条稳定性好,结果较为准确可靠;试纸条操作简单方便,且成本较进口试纸条价格低廉,具有很好的市场应用价值;

[0026] 2、本发明的胶体金免疫层析试纸条的显色强弱与尿液样本中NGAL浓度成正比,可根据提供的比色卡判读检测样本中NGAL的浓度范围,实现半定量检测,具有简便、快捷、实用、灵敏、高效的有益效果;

[0027] 3、本发明的胶体金免疫层析试纸条可批量生产,适用于临床快速诊断和现场快速检测,易于保存,适合在基层医院的推广使用。

附图说明

[0028] 图1为本发明实施例1的胶体金免疫层析试纸条的结构示意图;

[0029] 图2为本发明试验例1中采用抗NGAL-5抗体作为检测抗体的相关性验证结果;

[0030] 图3为三批本发明实施例1的胶体金免疫层析试纸条的HOOK效应试验结果;

[0031] 附图标记:1、样品垫;2、金标垫;3、包被膜;4、检测区;5、对照区;6、吸水纸;7、底板。

具体实施方式

[0032] 以下通过附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0033] 以下实施例中所使用的原料如无特殊说明,均来源于市售。

[0034] 实施例1 检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

[0035] 请参阅图1,为本发明的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条的结构示意图,本实施例的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条,包括底衬7、以及依次设在所述底衬7上的样品垫1、金标垫2、包被膜3和吸水纸6,所述金标垫2上包被有胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体,所述包被膜3包括平行设置、且相互间隔的检测区4和对照区5,所述检测区4包被有抗人NGAL包被抗体,所述对照区5包被有山羊抗鸡IgY抗体,所述抗人NGAL检测抗体具有如SEQ ID No:5的氨基酸序列。

[0036] 在本实施例中,所述胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体

的浓度分别为0.2mg/ml和0.2mg/ml,在所述金标垫2上的包被量均为1.2ul/cm。所述金标垫2上的胶体金颗粒直径约为40nm。所述检测区4靠近所述金标垫2,所述对照区5靠近所述吸水纸6,所述检测区4和所述对照区5的间隔为0.4cm。所述抗人NGAL包被抗体的浓度为2mg/ml,在所述检测区4的包被量为1.2ul/cm。所述山羊抗鸡IgY抗体的浓度为0.7mg/ml,在所述对照区5的包被量为1.2ul/cm。

[0037] 本实施例的检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0038] (1)、胶体金制备

[0039] 取0.5-1.2%柠檬酸三钠水溶液3ml于297ml三蒸水中,并摇匀加入500ml的圆底烧瓶中;将圆底烧瓶置于加热套上加入合适大小的搅拌子搅拌;加热至沸腾,且开始搅拌,并立刻计时;沸腾3分钟时间,迅速加入3ml的0.5-0.8%氯金酸水溶液,搅拌器搅拌10分钟之后将搅拌速度调低;将圆底烧瓶从加热套中取出,放至放有隔热垫的操作台;制备好的胶体金溶液室温放置温度降下来后,密封避光保存于4℃冰箱。磁力加热搅拌器烧制的胶体金颗粒大小均一,直径约为40nm;

[0040] (2)、金标垫制备

[0041] 将金标垫铺在铺金工具里,15*20cm的金标垫中加入12ml的金标垫处理液;37℃鼓风干燥箱中干燥4小时以上至金标垫完全干燥;将处理干燥好的金标垫取出,用铝箔袋密封。金标垫处理液:20-100mM Tris-HCl、5%蔗糖、5%BSA、0.5%-1.0%柠檬酸三钠和0.1%-0.15%曲拉通-100组成。

[0042] 按包被量1.2ul/cm的量,使用喷膜仪将浓度均为0.2mg/ml的胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体喷于处理好的金标垫上并真空冷冻干燥备用;

[0043] (3)、样品垫制备

[0044] 将样品垫平放在铺金工具里;15*20cm的样品垫中加入25ml的样品垫处理液;用铺金涂布均匀;37℃鼓风干燥箱中干燥4小时以上至样品垫完全干燥。样品垫处理液的配方为:20-100mM Tris-HCl、5%蔗糖、5%BSA、0.5%-1.0%柠檬酸三钠和0.1%-0.15%吐温-20。

[0045] (4)、包被膜的制备

[0046] 按包被量1.2ul/cm的量,使用喷膜仪将浓度为2mg/ml的抗人NGAL包被抗体喷于包被膜的检测区,按包被量1.2ul/cm的量,使用喷膜仪将浓度为0.7mg/ml的山羊抗鸡IgY抗体喷于包被膜的对照区,检测区和对照区平行设置、相互间隔0.4cm。

[0047] (5)、试纸条的组装

[0048] 将吸水纸黏贴在底板的右侧,底板的左侧黏贴样品垫,金标垫黏贴在样品垫与包被膜交接处上面,然后在金标垫表面贴上薄膜胶,包装。

[0049] 试验例1 抗NGAL特异性抗体的制备

[0050] 根据NGAL全蛋白序列设计不同肽段,免疫动物获得特异性抗体,具体步骤如下:

[0051] (1)、NGAL天然蛋白的制备

[0052] 根据Genbank中提供的人NGAL的DNA序列,设计一对引物,由两个引物的5'端分别引入NdeI+XhoI酶切位点,通过PCR扩增得到NGAL的目的基因,将载体pET-28a及经过琼脂糖凝胶纯化的NGAL目的基因片段,均用NdeI+XhoI进行双酶切处理,用T4DNA连接酶将纯化后酶切产物连接,得到重组质粒pET-28a-NGAL,将重组质粒转化进入大肠杆菌DH5α,在含有氨

苄青霉素的LB平板上挑选克隆,小量制备质粒,通过双酶切/PCR鉴定筛选出阳性克隆,测序结果表明重组的NGAL片段与设计的序列完全一致。

[0053] 重组质粒pET-28a-NGAL经测序验证后,转化进入大肠杆菌(BL21),在含有氨苄青霉素的LB培养基中培养,可在LB平板上挑选阳性克隆并进行质粒酶切鉴定,小量制备质粒,用双酶切PCR鉴定筛选出阳性克隆,最终获得含有NGAL的重组质粒工程菌。

[0054] 在表达时,将NGAL的重组质粒工程菌于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中培养,A₆₀₀达到0.5-0.6之间,然后加入终浓度为0.5mM的Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)于37 $^{\circ}$ C诱导4h,诱导完成后的菌液4,000rpm离心10min,收集菌体,并用PBS洗涤沉淀;PBS重悬沉淀后置于冰浴中,超声破菌后12000rpm离心20min,上清和沉淀分别进行SDS-PAGE电泳,结果表明:表达的NGAL重组蛋白为胞浆不可溶性表达,将该重组蛋白命名为BL21(DE3)-NGAL。

[0055] 将大量表达得到的菌体,经超声破碎后离心,再进行包涵体洗涤,洗涤完成后用GE Healthcare公司的His Trap FF纯化柱将蛋白进行纯化(按照产品说明书进行试剂配制和纯化)。最终获得的蛋白用SDS-PAGE电泳进行分析,用BCA蛋白定量试剂盒测得其浓度为0.23mg/ml。

[0056] (2)、NGAL肽段的制备

[0057] 首先将步骤1得到的NGAL重组蛋白序列导入在线抗原表位设计软件,将位于蛋白构象外部氨基酸序列统计出来。再将全NGAL蛋白序列导入DNASTAR软件,通过抗原表位预测工具统计肽段组合。将两组数据进行比对得出最有可能为抗原表位的7组肽段。通过上海吉尔生化生物公司合成7组肽段,具体序列如下:

[0058] 肽段1:NH₂-CQDSTSDLIPAPPLSKVPLQ (SEQ ID No:1)

[0059] 肽段2:NH₂-CILREDKDPQKMYATIEL (SEQ ID No:2)

[0060] 肽段3:NH₂-CTFVPGCQPGFTLGNIKSY (SEQ ID No:3)

[0061] 肽段4:NH₂-CSQNREYFKITLYGRTKELTS (SEQ ID No:4)

[0062] 肽段5:NH₂-CAPPLSKVPLQQNFQDNQF (SEQ ID No:5)

[0063] 肽段6:NH₂-CRTKELTSELKENFIRFSKS (SEQ ID No:6)

[0064] 肽段7:NH₂-CLPENHIVFPVPIDQCIDG (SEQ ID No:7)

[0065] (3)、特异性抗体的制备与纯化

[0066] 采用NGAL天然蛋白以及上述7组肽段免疫8周龄、体重18g左右且健康的雌性BALB/c小鼠各2只,适应性饲养1周后,采集阴性血作为对照用;采用中程免疫方案(0.3ml/只,2周/次),首次免疫时(50 μ g/只)按免疫原与等体积的弗氏完全佐剂搅拌乳化,背部皮下多点注射,此后按免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂搅拌乳化进行常规免疫;3次免疫时,一般50 μ g抗原+TiterMax等量混合乳化后背部多点注射,7天后测效价。小鼠效价明显达到一定要求后加强免疫,加强免疫不加佐剂,加强免疫剂量为50 μ g,加强免疫后3天,摘眼球采血,分离血清保存。同时取脾脏进行融合。细胞融合时,将脾细胞与骨髓瘤细胞按4:1左右进行混合,并在聚乙二醇(PEG,分子量为1450)的促融作用下进行融合,融合细胞再HAT选择性培养液中进行培养,10天后通过间接ELISA方法筛选出能与NGAL天然蛋白反应的阳性杂交瘤细胞,并将初筛得到的阳性杂交瘤细胞扩大培养,用有限稀释法将获得的阳性杂交瘤细胞连续亚克隆至少两次以上,每次亚克隆用HT选择性培养基进行培养,亚克隆8-10天后进行

ELISA筛选,直至单克隆细胞阳性率为100%为止,获得能稳定分泌针对NGAL天然蛋白与肽段的特异性抗体的单克隆细胞株。

[0067] 选择8-12周龄雌性健康BALB/c小鼠,腹腔注射降植烷,0.5ml/只;7-10天后,给每只小鼠腹腔注射 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个单克隆杂交瘤细胞,注意吹下细胞或稀释细胞需用PBS或无血清培养基;将腹水10,000r/min离心15min,除去细胞成分和其他的沉淀物、脂肪以及油层等,收集中间层,测定抗体效价,分装,置-70℃冻存储用。饱和硫酸铵沉淀:吸取5ml处理好的腹水移入小烧杯中,在搅拌下,逐滴加入过0.22μm滤膜的PBS 5.0ml;混合均匀后,再逐滴加入10ml饱和硫酸铵溶液(pH7.4),继续缓慢搅拌30min;静置2h后10,000r/min离心15分钟,弃去上清,沉淀物用过0.22μm滤膜的PBS重悬,然后再将该重悬液过0.22μm滤膜;根据抗体不同亚型,选定不同的GE Healthcare公司的纯化柱,收集抗体峰;用PBS缓冲液将抗体进行透析,用BCA蛋白定量试剂盒测定抗体浓度,并将抗体分装保存。

[0068] (4) 配对实验,获得针对天然NGAL蛋白效价最高的抗体对

[0069] 由天然NGAL蛋白作为抗原,天然蛋白制备的抗体作为捕获抗体,而肽段制备的抗体作为检测抗体。通过配对实验(将100ng/100ul的捕获抗体包被在96孔板中孵育;依次加入按递度稀释的天然NGAL蛋白100ng,50ng,25ng,12.5ng,6.25ng,3.125ng,1.5625ng,以及空白对照PBS;再加入7组不同的检测抗体以验证其效价)检测配对的抗体对。实验结果如表1所示。

[0070] 表1 配对实验结果

检测抗体	抗 NGAL -1 抗体	抗 NGAL -2 抗体	抗 NGAL -3 抗体	抗 NGAL -4 抗体	抗 NGAL -5 抗体	抗 NGAL -6 抗体	抗 NGAL -7 抗体
NGAL 天然 抗原制备的 抗体	肽段 1	肽段 2	肽段 3	肽段 4	肽段 5	肽段 6	肽段 7
[0071] 100ng	1.992	2.32	1.795	1.203	0.524	1.673	0.356
50ng	1.641	1.842	1.24	0.95	0.49	1.251	0.344
25ng	1.142	1.511	0.906	0.813	0.393	0.841	0.311
12.5ng	0.845	1.042	0.735	0.665	0.342	0.653	0.296
6.25ng	0.413	0.812	0.541	0.493	0.327	0.492	0.291
3.125ng	0.313	0.566	0.352	0.338	0.251	0.402	0.266
1.5625ng	0.257	0.421	0.266	0.255	0.217	0.341	0.25
NC	0.175	0.194	0.172	0.171	0.205	0.297	0.169

[0072] 表1结果表明,由抗NGAL-1抗体、抗NGAL-2抗体、抗NGAL-3抗体和抗NGAL-6抗体(肽段1,2,3,6制备的抗体)作为检测抗体,抗NGAL抗体作为捕获抗体可获得针对天然NGAL蛋白效价较高的抗体对。

[0073] (5)、血清学验证特异性抗体对

[0074] 采用抗NGAL抗体作为捕获抗体,抗NGAL-1抗体,抗NGAL-2抗体,抗NGAL-3抗体,抗NGAL-4抗体、抗NGAL-5抗体、抗NGAL-6抗体和抗NGAL-7抗体作为检测抗体分别测定了30例样本并做了相关性分析,结果证明抗NGAL-1抗体,抗NGAL-2抗体,抗NGAL-3抗体,抗NGAL-6抗体对血清中的NGAL识别比较弱,而且相关性均较低,普遍测定值比样本真实值低的较多;经过交叉配对后,筛选得到了一对对血清识别较好的抗体对:抗NGAL抗体与抗NGAL-5抗体,因此,说明肽段5(SEQ ID No:5)为特异性较高的抗原表位。

[0075] 采用抗NGAL-5抗体作为检测抗体的相关性验证结果如图2所示,从图2可知,采用抗NGAL-5抗体与抗人NGAL抗体的组合检测,与医院的检测值的相关性一致, R^2 达到0.9853。

[0076] 试验例2 实施例1的胶体金免疫层析试纸条的性能检测

[0077] 1、阴性参考品符合率

[0078] 1.1试验方法

[0079] 将各批次的本发明实施例1的检测试纸条分别各取5人份,每个批次检测5份阴性参考品,每个阴性参考品样本(混合健康人血清)测定1次,保证结果的正确,5~10min内观察结果,统计各检测试纸条的阴性参考品符合率。

[0080] 1.2试验结果如表2所示。

[0081] 表2 阴性参考品符合率试验结果

[0082]

批号	5份阴性参考品显色情况	阴性参考品符合率
2015001	无显色	100%
2015002	无显色	100%
2016001	无显色	100%

[0083] 1.3试验结论

[0084] 通过表2结果可见,检测试纸条阴性参考品无显色,符合率为100%。

[0085] 2、阳性参考品符合率

[0086] 2.1试验方法

[0087] 将各批次的本发明实施例1的检测试纸条分别各取3人份,对阳性参考品(经校准的NGAL重组蛋白)进行检测,每个阳性参考品样本测定1次,保证结果的正确,5~10min内观察结果,将各批次参考品显色情况与相应批次参考比色卡进行比较,统计显色结果一致性,从而统计各检测试纸条的阳性参考品符合率。

[0088] 2.2试验结果如表3所示。

[0089] 表3 阳性参考品符合率试验结果

[0090]

批号	阳性参考品	参考品显色与参考比色卡一致性	阳性参考品符合率
2015001	300ng/mL	一致	100%
	100ng/mL	一致	
	300ng/mL	一致	
2015002	100ng/mL	一致	100%
2016001	300ng/mL	一致	100%
	100ng/mL	一致	

[0091] 2.3试验结论

[0092] 通过表3结果可见,本发明实施例1的检测试纸条的阳性参考品显色与参考比色卡一致,符合率为100%。

[0093] 3、最低检测限

[0094] 3.1验证最低检测限试验方法

[0095] 从2015001产品随机抽取10人份试纸条,取阳性参考品(经校准的NGAL重组蛋白,100ng/mL),采用阴性新生牛血清做为稀释液将阳性参考品(100ng/mL)逐级稀释至60ng/mL、30ng/mL、15ng/mL、0(稀释液)。用实施例1的检测试纸条对以上样品(60ng/mL、30ng/mL、15ng/mL、0(稀释液))进行检测,以上实验重复2次,最低检测限以试纸条检测线能显示结果的NGAL最低浓度值来表示。

[0096] 3.2最低检测限重复试验方法

[0097] 各批次的本发明实施例1的检测试纸条分别取20人份,对最低检测限进行检测,5~10min内观察结果,显色情况与相应批次参考比色卡进行比较,应都能显色,且显色一致。

[0098] 3.3试验结果如表4和表5所示。

[0099] 表4 最低检测限检测结果

批号	检测浓度 (ng/mL)	检测是否显色	重复实验 1	重复实验 2
[0100] 2015001	100	是	是	是
	60	是	是	是
	30	是	是	是
	15	否	否	否
	0(稀释液)	否	否	否

[0101] 表5 最低检测限重复检测结果

批号	最低检测限浓度 (ng/mL)	与参考比色卡显色一致性 (n=20)
[0102] 2015001	30	全都能显色, 且显色一致
2015002	30	全都能显色, 且显色一致
2015003	30	全都能显色, 且显色一致

[0103] 3.4试验结论

[0104] 经以上表4和表5的最低检测限检测结果,本发明实施例1的检测试纸条的最低检测限为30ng/mL。

[0105] 4、干扰物质试验

[0106] 4.1干扰物质检测试验方法

[0107] 采用阴性新生牛血清将三种干扰物质胆红素、血红蛋白及甘油三酯配制成浓度为1mg/mL的溶液,用本发明实施例1的检测试纸条进行检测,观察以上三种干扰物质添加在阴性样本中对阴性样本检测结果的影响。

[0108] 4.2干扰物质验证试验方法

[0109] 配制胆红素浓度400μg/mL、血红蛋白浓度100μg/mL、甘油三酯浓度100μg/mL,用三批试纸条检测,5~10min内观察显色情况。

[0110] 4.3试验结果如表6~9所示。

[0111] 表6 胆红素干扰检测结果

[0112]

批号	干扰物质	添加至阴性样本中的浓度	检测是否显色	干扰检测结果
2015001	胆红素	3.1 μ g/mL	否	胆红素在浓度低于400 μ g/mL, 不影响检测结果
		6.25 μ g/mL	否	
		12.5 μ g/mL	否	
		25 μ g/mL	否	
		50 μ g/mL	否	
		100 μ g/mL	否	
		200 μ g/mL	否	
		400 μ g/mL	否	
		600 μ g/mL	是	
2015002	胆红素	3.1 μ g/mL	否	胆红素在浓度低于400 μ g/mL, 不影响检测结果
		6.25 μ g/mL	否	
		12.5 μ g/mL	否	
		25 μ g/mL	否	
		50 μ g/mL	否	
		100 μ g/mL	否	
		200 μ g/mL	否	
		400 μ g/mL	否	
		600 μ g/mL	是	
2016001	胆红素	3.1 μ g/mL	否	胆红素在浓度低于400 μ g/mL, 不影响检测结果
		6.25 μ g/mL	否	
		12.5 μ g/mL	否	
		25 μ g/mL	否	
		50 μ g/mL	否	
		100 μ g/mL	否	
		200 μ g/mL	否	
		400 μ g/mL	否	
		600 μ g/mL	是	

[0113] 表7 血红蛋白干扰检测结果

[0114]

批号	干扰物质	添加至阴性样本中的浓度	检测是否显色	干扰检测结果
2015001		1 μ g/mL	否	血红蛋白在低于100 μ g/mL,
		2 μ g/mL	否	

[0115]

[0115]	2015002	血红蛋白	5 μ g/mL	否	不影响检测结果
			10 μ g/mL	否	
			20 μ g/mL	否	
			50 μ g/mL	否	
			100 μ g/mL	否	
			200 μ g/mL	是	
	2016001	血红蛋白	1 μ g/mL	否	血红蛋白在低于 100 μ g/mL, 不影响检测结果
			2 μ g/mL	否	
			5 μ g/mL	否	
			10 μ g/mL	否	
			20 μ g/mL	否	
			50 μ g/mL	否	
			100 μ g/mL	否	
			200 μ g/mL	是	
	2016001	血红蛋白	1 μ g/mL	否	血红蛋白在低于 100 μ g/mL, 不影响检测结果
			2 μ g/mL	否	
			5 μ g/mL	否	
			10 μ g/mL	否	
			20 μ g/mL	否	
			50 μ g/mL	否	
			100 μ g/mL	否	
			200 μ g/mL	是	

[0116] 表8 甘油三酯干扰检测结果

[0117]

批号	干扰物质	添加至阴性样本中的浓度	检测是否显色	干扰检测结果
2015001	甘油三酯	1μg/mL	否	甘油三酯在浓度低于100μg/mL, 不影响检测结果
		2μg/mL	否	
		5μg/mL	否	
		10μg/mL	否	
		20μg/mL	否	
		50μg/mL	否	
		100μg/mL	否	
		200μg/mL	是	
2015002	甘油三酯	1μg/mL	否	甘油三酯在浓度低于100μg/mL, 不影响检测结果
		2μg/mL	否	
		5μg/mL	否	
		10μg/mL	否	
		20μg/mL	否	
		50μg/mL	否	
		100μg/mL	否	
		200μg/mL	是	
2016001	甘油三酯	1μg/mL	否	甘油三酯在浓度低于100μg/mL, 不
		2μg/mL	否	
		5μg/mL	否	

[0118]

		10μg/mL	否	影响检测结果
		20μg/mL	否	
		50μg/mL	否	
		100μg/mL	否	
		200μg/mL	是	

[0119] 表9 干扰验证检测结果

[0120]

批号	干扰物质	浓度 (μg/mL)	检测是否显色
2015001	胆红素	400μg/mL	否
		600μg/mL	是
	血红蛋白	100μg/mL	否
	甘油三酯	100μg/mL	否
2015002	胆红素	400μg/mL	否
		600μg/mL	是
	血红蛋白	100μg/mL	否
	甘油三酯	100μg/mL	否
2016001	胆红素	400μg/mL	否
		600μg/mL	是
	血红蛋白	100μg/mL	否
	甘油三酯	100μg/mL	否

[0121] 4.4试验结论

[0122] 以上表6~9干扰性试验检测结果表明,胆红素低于400μg/mL时不影响检测结果;

血红蛋白浓度低于100 μ g/mL时不会影响检测结果;甘油三酯浓度低于100 μ g/mL时不会影响检测结果。

[0123] 5、HOOK效应

[0124] 5.1试验方法

[0125] 将NGAL校准抗原(美国Raybiotech公司)分别添加至阴性新生牛血清中,得到以下浓度的溶液:10ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、400ng/mL、800ng/mL、1000ng/mL、1200ng/mL、1500ng/mL,用本发明实施例1的检测试纸条进行检测,将检测校准抗原的浓度作为X轴,以试纸条在5~10min内显色的强度(用数值表示)作为Y轴,做曲线,观察产生高剂量Hook效应的检测浓度。

[0126] 5.2试验结果如图3所示。

[0127] 5.3试验结论

[0128] 通过图3结果可见,本发明的检测试纸条在不超过1000ng/mL情况下不会观察到高剂量Hook效应。

[0129] 6重复性

[0130] 6.1试验方法

[0131] 从每批试纸条中随机抽样20条,分别加入高浓度精密性参考品(300ng/mL),重复测定10次;加入低浓度精密性参考品(100ng/mL),重复测定10次,保证结果的正确,5~10min内观察结果。将各批次高、低浓度精密性参考品显色情况与相应批次的高、低浓度精密性参考比色卡进行比较,统计显色结果一致性从而统计各批次内试纸条的重复性。

[0132] 6.2试验结果如表10所示。

[0133] 表10 重复性检测结果

批号	精密性参考品 浓度 (ng/mL)	与参考比色卡显色一致性 (n=10)
	300	一致
2015001	100	一致
	300	一致
2015002	100	一致
	300	一致
2016001	100	一致
	300	一致

[0135] 6.3试验结论

[0136] 3个批次的检测试纸条的低、高浓度精密性参考品重复检测10次,都与参考比色卡显色条带显色一致。

[0137] 试验例3 本发明实施例1的检测试纸条的临床性能验证

[0138] 本试验例共收集尿液样本135例,其中阳性样本(对照试剂检测>100ng/mL)33例,阴性检测(对照试剂检测<30ng/mL)102例。用本发明实施例1的检测试纸条与已上市的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试纸条对收集的135份尿液样本分别进行检测,汇总检测结果。用四格表分析135份数据的阴阳性符合率、约登指数,并进行Kappa检验,评价本发明实施例1的检测试纸条与对照试纸条的一致性。结果如表11所示。

[0139] 表11 临床性能验证结果

	实验	对照试纸条		合计
		阳性	阴性	
[0140]	本发明试纸条	阳性	33	0
		阴性	0	102
	总数	33	102	135

[0141] 从表11,计算结果如下:

[0142] 阳性样本符合率(真阳性率) = $33/33 \times 100\% = 100\%$

[0143] 阴性样本符合率(真阴性率) = $102/102 \times 100\% = 100\%$

[0144] 假阳性率 = $0/76 \times 100\% = 0$

[0145] 假阴性率 = $0/34 \times 100\% = 0$

[0146] 总符合率 = $135/135 \times 100\% = 100\%$

[0147] 约登指数 = $33/33 + 102/102 - 1 = 1$

[0148] kappa值 = 1, > 0.75, 说明本发明实施例1的检测试纸条与对照试纸条一致性很好。

[0149] 检测结果符合率 = (总样本数 - 差异样本数) / 总样本数 $\times 100\% = (135 - 0) / 135 \times 100\% = 100\%$

[0150] 从以上数据可以看出,采用本发明实施例1的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)检测试纸条(胶体金法)进行临床验证,以已上市的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试纸条(胶乳增强免疫比浊法)为对照,共检测尿液样本135例(其中阳性33例,阴性102例),整理并分析检测结果,评价试剂盒的临床性能,阳性符合率为100%,阴性符合率为100%,总符合率为100%,约登指数为1。Kappa值为1 (Kappa检验, $P < 0.05$),检测结果符合率为100%,本发明实施例1的检测试纸条与对照试纸条有很好的一致性。考核结果表明本发明实施例1的检测试纸条与对照试纸条检测性能相仿,稳定性好,结果较为准确可靠。试纸条操作简单方便,且成本较进口试纸条价格低廉,具有很好的市场应用价值。

[0151] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0152] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 广州瑞博奥生物科技有限公司
[0003]	<120> 检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法
[0004]	<130> 7
[0005]	<170> PatentIn version 3.1
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 20
[0008]	<212> PRO
[0009]	<213> 人工序列
[0010]	<400> 1
[0011]	cys-gln-asp-ser-thr-ser-asp-leu-ile-pro-ala-pro-pro-leu-ser-lys-val-pro-leu-gln
[0012]	5 10 15 20
[0013]	<210> 2
[0014]	<211> 19
[0015]	<212> PRO
[0016]	<213> 人工序列
[0017]	<400> 2
[0018]	cys-ile-leu-arg-glu-asp-lys-asp-pro-gln-lys-met-tyr-ala-thr-ile-tyr-glu-leu
[0019]	5 10 15 19
[0020]	<210> 3
[0021]	<211> 20
[0022]	<212> PRO
[0023]	<213> 人工序列
[0024]	<400> 3
[0025]	cys-thr-phe-val-pro-gly-cys-gln-pro-gly-glu-phe-thr-leu-gly-asn-ile-lys-ser-tyr
[0026]	5 10 15 20
[0027]	<210> 4
[0028]	<211> 23
[0029]	<212> PRO
[0030]	<213> 人工序列
[0031]	<400> 4
[0032]	cys-ser-gln-asn-arg-glu-tyr-phe-lys-ile-tyr-leu-tyr-leu-tyr-gly-arg-thr-lys-glu-
[0033]	5 10 15 20
[0034]	leu-thr-ser
[0035]	23
[0036]	<210> 5
[0037]	<211> 19
[0038]	<212> PRO
[0039]	<213> 人工序列

[0040]	<400>	5			
[0041]	cys-ala-pro-pro-leu-ser-lys-val-pro-leu-gln-gln-asn-phe-gln-asp-asn-gln-phe				
[0042]		5	10	15	19
[0043]	<210>	6			
[0044]	<211>	20			
[0045]	<212>	PRO			
[0046]	<213>	人工序列			
[0047]	<400>	6			
[0048]	cys-arg-thr-lys-glu-leu-thr-ser-glu-leu-lys-glu-asn-phe-ile-arg-phe-ser-lys-ser				
[0049]		5	10	15	20
[0050]	<210>	7			
[0051]	<211>	19			
[0052]	<212>	PRO			
[0053]	<213>	人工序列			
[0054]	<400>	7			
[0055]	cys-leu-pro-glu-asn-his-ile-val-phe-pro-val-pro-ile-asp-gln-cys-ile-asp-gly				
[0056]		5	10	15	19

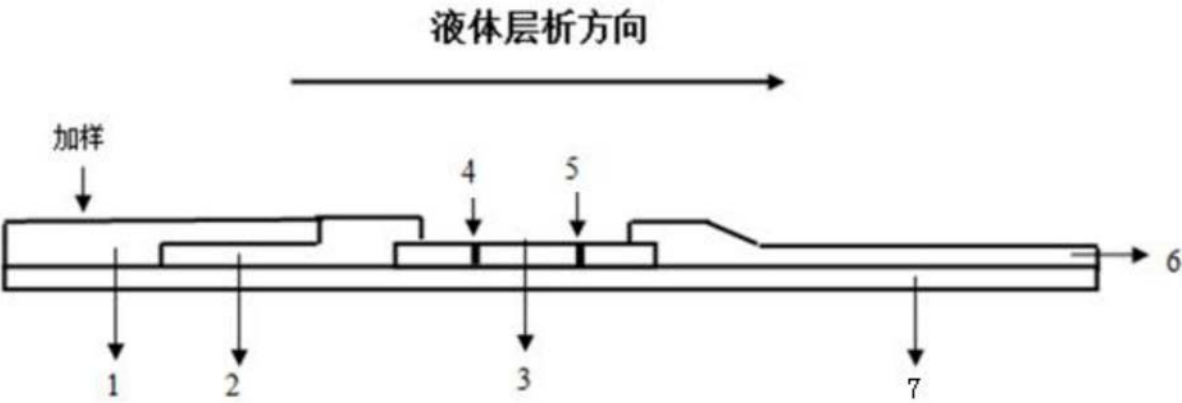


图1

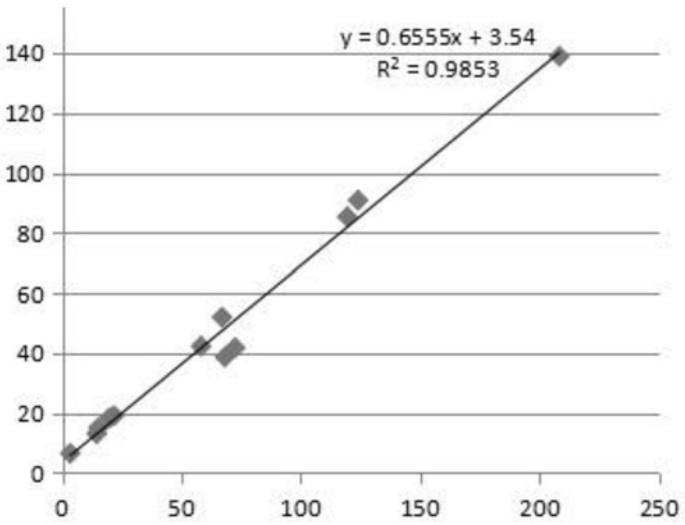


图2

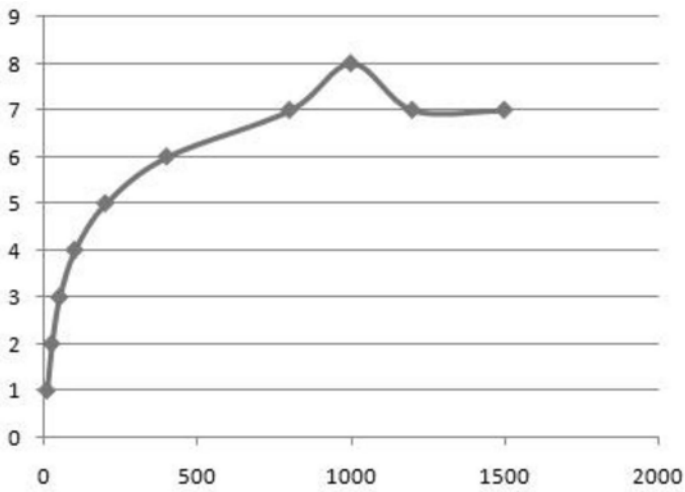


图3

专利名称(译)	检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107045062B	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201710193928.X	申请日	2017-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
[标]发明人	周腊梅 黄若磐 胡守旺		
发明人	周腊梅 黄若磐 胡守旺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577 G01N2800/347		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN107045062A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测人NGAL的胶体金免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法，所述试纸条包括底衬、以及依次设在所述底衬上的样品垫、金标垫、包被膜和吸水纸，所述金标垫上包被有胶体金标记的抗人NGAL检测抗体和胶体金标记的鸡IgY抗体，所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区，所述检测区包被有抗人NGAL包被抗体，所述对照区包被有山羊抗鸡IgY抗体，所述抗人NGAL检测抗体对应具有如SEQ ID No:5所示氨基酸序列的抗原表位。本发明的胶体金免疫层析试纸条具有简便、快捷、实用、灵敏、高效的有益效果吗，可批量生产，适用于临床快速诊断和现场快速检测，易于保存，适合在基层医院的推广使用。

