



## (12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 207301081 U

(45)授权公告日 2018.05.01

(21)申请号 201720990234.4

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2017.08.09

(73)专利权人 厦门依柯利斯医疗科技有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧区翁角西路2050号603、703单元

(72)发明人 许元峰 袁新 吕怀谷 袁玲  
赵静

(74)专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所  
有限公司 35204

代理人 张松亭 秦彦苏

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

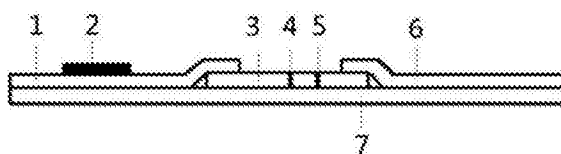
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

### (54)实用新型名称

一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条

### (57)摘要

本实用新型公开了一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,包括背衬底板,该背衬底板上依次设置有样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水膜,该样品结合垫和吸水膜分别叠压在硝酸纤维素膜的两端上;该样品结合垫上包被有时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体;该硝酸纤维素膜上设有包被有另一个表位的胰蛋白酶原-2单克隆抗体的检测线和包被有羊抗鼠IgG的质控线。本实用新型具有灵敏度高,特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点,可广泛应用于胰蛋白酶原的临床免疫检验和科学研究中。



1. 一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,其特征在于:包括背衬底板,该背衬底板上依次设置有样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水膜,该样品结合垫和吸水膜分别叠压在硝酸纤维素膜的两端上;该样品结合垫上包被有时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体;该硝酸纤维素膜上设有包被有另一个表位的胰蛋白酶原-2单克隆抗体的检测线和包被有羊抗鼠IgG的质控线。

2. 根据权利要求1所述的一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,其特征在于:所述时间分辨荧光物质为镧系元素、镧系元素与乳胶的结合物、镧系元素的螯合物中的一种。

3. 根据权利要求2所述的一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,其特征在于:所述镧系元素为铈,铽,钐或镝中的一种。

4. 根据权利要求1所述的一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,其特征在于:所述样品结合垫为玻璃纤维素膜或聚酯膜。

5. 根据权利要求4所述的一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,其特征在于:所述玻璃纤维素膜或聚酯膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得。

6. 根据权利要求1所述的一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,其特征在于:所述试纸条外还包裹有一壳体。

## 一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条

### 技术领域

[0001] 本实用新型属于胰蛋白酶免疫层析检测技术领域,具体涉及一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条。

### 背景技术

[0002] 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症之一,据国外统计,其发病率在 6.5~80/10万人,约占急腹症的10%。有学者认为,其发病机制与基因改变导致胰蛋白酶的过度活化有关。本症起病急,病情险恶,约20%~30%的AP病例可转化为坏死性胰腺炎,导致败血症等严重并发症,因此,早期确诊和治疗十分重要。血淀粉酶(AMS)是诊断AP的常用检测项目,但是其敏感性和特异性都不是十分理想。胰蛋白酶原(trypsinogen, TPS)是胰蛋白酶的前体,有2种同工酶:胰蛋白酶原-1(TPS-1)和胰蛋白酶原-2(TPS-2)。其中TPS-2是丝氨酸蛋白酶,具有激活基质金属酶功能,能引起组织胶原蛋白的溶解。TPS-2相对分子质量较小,能透过肾小球毛细血管壁,并在肾小管吸收较少。因此,血液和尿液中的TPS-2浓度相差不大。国内外关于TPS-2诊断胰腺炎的价值评价几乎都认为在灵敏度和特异性方面优于淀粉酶(amyIase, AMY)和血清脂肪酶。免疫层析法检测尿胰蛋白酶原-2,诊断急性胰腺炎的敏感性和特异性分别为96.3%和93.3%,证明免疫层析法尿胰蛋白酶原-2的检测可作为诊断急性胰腺炎较好的指标。北京军区总医院研究报道,采用ELISA法定量检测,以44.05 $\mu$ g/L为临界值,血清胰蛋白酶原-2鉴别胰腺癌与胰腺炎的敏感度和特异度分别为63.3%和73.9%;以1.85  $\mu$ g/L为临界值,鉴别诊断胰腺癌与健康人的敏感度为91.4%,特异度为95.7%。虽然胰蛋白酶原-2是辅助诊断胰腺炎的特异性和敏感性指标,但是该指标目前常用的检测方法为酶联免疫法和免疫层析法。酶联免疫法检测样本的准确度较高,灵敏度好,但是检测过程繁琐,耗时较长,且样本需要批量检测,不适用于及时检验;同时酶联免疫法检测自动化程度低,检测结果受人为因素影响较大。免疫层析法是近几年来国外兴起的一种快速诊断技术,这种方法检测样本迅速,但一般不能定量检测只能用作定性判断。胶乳增强透射免疫比浊检测(PETIA)技术是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫测定法,可以对各种微量的抗原物质和小分子半抗原进行精确的定量测定,同时该检测方法耗时短,自动化程度高,目前越来越多的应用到临床实验室中。鉴于胰蛋白酶原-2具有明确的诊断意义,开发一种对于胰蛋白酶原-2能够快速检测和准确定量的检测试剂盒,对于临床上急性胰腺炎的快速准确诊断具有重要的意义。

### 发明内容

[0003] 本实用新型的目的在于克服现有技术的不足之处,提供了一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条。

[0004] 本实用新型解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0005] 一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条,包括背衬底板,该背衬底板上依次设置有样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水膜,该样品结合垫和吸水膜分别

叠压在硝酸纤维素膜的两端上；该样品结合垫上包被有时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体；该硝酸纤维素膜上设有包被有另一个表位的胰蛋白酶原-2单克隆抗体的检测线和包被有羊抗鼠IgG的质控线。

[0006] 一实施例中：所述时间分辨荧光物质为镧系元素、镧系元素与乳胶的结合物、镧系元素的螯合物中的一种。

[0007] 一实施例中：所述镧系元素为铕，铽，钐或镝中的一种。

[0008] 一实施例中：所述样品结合垫为玻璃纤维素膜或聚酯膜。

[0009] 一实施例中：所述玻璃纤维素膜或聚酯膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得。

[0010] 一实施例中：所述试纸条外还包裹有一壳体。

[0011] 本技术方案与背景技术相比，它具有如下优点：

[0012] 本实用新型的胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条，利用时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoro-immunoassay, TRFIA)这种新型非放射性标记免疫分析技术。与传统的荧光素标记不同，采用具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物作为时间分辨荧光物质，镧系元素激发光与发射光之间的Stokes位移较大，避免了激发及发射光谱存在的重叠问题，排除激发光的干扰，通过波长分辨方式使其明显的区别于背景荧光；且镧系元素激发光光谱较宽，可采用只允许发射荧光通过的滤光片，从而进一步将特异性荧光和背景荧光区分开，消除干扰；镧系离子螯合物的荧光衰变时间长，为传统荧光的103~106倍，通过测定时间差可以实现高信噪比；同时其可以反复接受激发，从而大大提高仪器探测到的信号值，有效排除样品自然荧光的干扰，具有灵敏度高，特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点，可广泛应用于胰蛋白酶原-2的临床免疫检验和科学研究中。

## 附图说明

[0013] 下面结合附图和实施例对本实用新型作进一步说明。

[0014] 图1为本实用新型的胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条结构示意图。

[0015] 附图标记：样品结合垫1；时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体2；硝酸纤维素膜3；检测线4；质控线5；吸水膜6；背衬底板7。

## 具体实施方式

[0016] 下面通过实施例具体说明本实用新型的内容：

[0017] 实施例

[0018] 请查阅图1，一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条，包括背衬底板 7，该背衬底板7上依次设置有样品结合垫1、硝酸纤维素膜3和吸水膜6，该样品结合垫1和吸水膜6分别叠压在硝酸纤维素膜3的两端上；该样品结合垫1上包被有时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体2；该硝酸纤维素膜3上设有检测线4(T线)和质控线5(C线)，检测线4(T线)包被有另一个表位的胰蛋白酶原-2单克隆抗体，质控线5(C线)包被有羊抗鼠IgG。

[0019] 本实施例之中，所述时间分辨荧光物质为镧系元素、镧系元素与乳胶的结合物、镧

系元素的螯合物中的一种;所述镧系元素为铈,铽,钐或镝中的一种。

[0020] 本实施例之中,所述样品结合垫为经表面活性剂缓冲液浸泡处理后再经干燥的玻璃纤维素膜或聚酯膜,所述表面活性剂例如为吐温-20等。

[0021] 具体制备方法例如为:

[0022] 1) 硝酸纤维素膜(NC膜)处理

[0023] 将NC膜贴至背衬底板的制定位置,取10mm的pH 7.4磷酸盐缓冲液将胰蛋白酶原-2单克隆抗体稀释至1mg/mL,用于制备T线;另取羊抗鼠IgG抗体,用稀释液稀释至1mg/mL,用于制备C线;按1 $\mu$ I/cm划液量,通过biodot划膜仪将上述两种稀释后的抗体均匀的划至NC膜上制备T线和C线;将划好的NC膜放置于37℃干燥箱中,干燥过夜。

[0024] 2) 样品结合垫的处理

[0025] 玻璃纤维素膜用含有表面活性剂的缓冲液(配方:100mM PB(pH 7.4),其中含有1.5% NaCl,5% BSA、0.5%吐温-20和5%蔗糖)浸泡进行预封闭后,50℃干燥过夜;通过Biodot仪器的airjet喷头,将标记有时间分辨荧光物质含铈乳胶微球的胰蛋白酶原-2单克隆抗体按照10  $\mu$ I/cm的量喷至干燥好的玻璃纤维素膜上,50℃干燥过夜,制备得到样品结合垫。

[0026] 结合有含铈乳胶微球的胰蛋白酶原-2单克隆抗体可以替换为时间分辨荧光物质为镧系元素、镧系元素与乳胶的结合物、镧系元素的螯合物中的一种;所述镧系元素为铈,铽,钐或镝中的一种。

[0027] 3) 组装

[0028] 在步骤1)制备好的硝酸纤维素膜的制定位置贴上步骤2)制备好的样品结合垫,并在硝酸纤维素膜的另一端贴上吸水膜,用裁膜仪按每条4mm的宽度进行裁剪,并装入层析条壳体中,即得成品。

[0029] 本实用新型的试纸条利用双抗夹心法进行检测:将待测样品量取75 $\mu$ L滴加到样品垫上,样品中的胰蛋白酶原-2与样品垫上时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体结合,形成抗原-标记抗体复合物。经层析原理,依次与硝酸纤维素膜上的另一个表位的胰蛋白酶原-2 抗体(T线)和羊抗鼠IgG抗体(C线)形成抗体-抗原-标记抗体复合物。在时间分辨荧光分析仪的激发光激发下,标记元素显现荧光,结合的标记抗体越多,荧光强度越高,从而进行定量检测。

[0030] 健康人群尿液中胰蛋白酶原-2平均浓度为5.3ng/mL(范围0.7~9.6ng/mL);血浆中胰蛋白酶原-2平均浓度63ng/mL(范围3~106ng/mL)。肾损伤后胰蛋白酶原-2水平急剧上升。任意选择的重症监护室患者尿液中胰蛋白酶原-2浓度可达到110ng/mL~40,000ng/mL;血浆中胰蛋白酶原-2平均浓度25ng/mL~3491ng/mL。尿胰蛋白酶原-2水平高于350ng/mL或血浆胰蛋白酶原-2水平高于400ng/mL,急性肾功能衰竭阳性预测值约为90%。

[0031] 实验例:样品的定量检测

[0032] 1. 标准曲线制作

[0033] 1.1 取胰蛋白酶原-2校准品一套,具体值见下表

	编号	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6
[0034]	浓 度 (ng/ml)	0	10	50	100	250	500	1000

[0035] 1.2 检测方法

[0036] 1.2.1 取校准品75μI,加入实施例1制备的层析条中样品窗口;

[0037] 1.2.2 10分钟之后,用时间分辨荧光定量分析仪定量检测发光值。

[0038] 1.2.3 每个校准品检测三次,取T/C值的平均值。具体结果见下表:

[0039]

校准品编号	检测结果	平均值
C0	0.012	0.013
	0.013	
C1	0.061	0.057
	0.053	

[0040]

C2	0.150	0.169
	0.187	
C3	0.253	0.236
	0.221	
C4	0.375	0.383
	0.392	
C5	0.525	0.531
	0.537	
C6	0.586	0.606
	0.625	

[0041] 1.3 标准曲线制备

[0042] 根据上述检测结果,以T/C值的对数值为X轴,以浓度的对数值为Y轴进行线性回归,,得到线性方程 $y = -0.054x^2 + 1.0185x - 4.9287$ ,  $R^2 = 0.999$ 。

[0043] 2 精密度测试:

[0044] 2.1 取制备好的9张层析条,配置一个浓度(700ng/mL)的胰蛋白酶原-2工作校准品,

[0045] 2.2 取75μI样品,一次性加入层析条的检测口;

[0046] 2.3 待样品层析10min之后,用时间分辨荧光定量分析仪对结果进行扫描分析,结果如下表,说明本实用新型的胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条精密度良好。

[0047]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	t/c 均值	标准偏差	CV(%)
T/C	0.583	0.569	0.567	0.553	0.542	0.573	0.589	0.497	0.538	0.56	0.03	5.08

[0048] 3 准确性测试:

[0049] 3.1 配置30ng/mL,60ng/mL,150ng/mL,400ng/mL,800ng/mL浓度的工作校准品。

[0050] 3.2 各取75 $\mu$ I样品,一次性加入层析条的检测口;

[0051] 3.3 待样品层析10min之后,用时间分辨荧光定量分析仪对结果进行扫描分析,结果如下表,说明本实用新型的胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条准确度良好。

	配置浓度	T/C 值	换算浓度	CV (%)
[0052]	30	0.130356	32.5	5.66
	60	0.196017	63.7	4.23
	150	0.297121	140.2	4.78
[0053]	400	0.470427	411.8	2.06
	800	0.584132	788.6	1.01

[0054] 以上所述,仅为本实用新型较佳实施例而已,故不能依此限定本实用新型实施的范围,即依本实用新型专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆应仍属本实用新型涵盖的范围内。

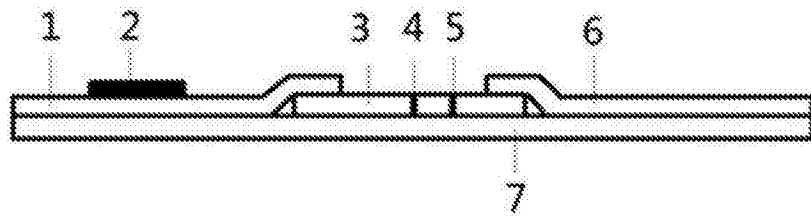


图1



专利名称(译)	一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN207301081U</a>	公开(公告)日	2018-05-01
申请号	CN201720990234.4	申请日	2017-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	厦门依柯利斯医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	厦门依柯利斯医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	厦门依柯利斯医疗科技有限公司		
[标]发明人	许元峰 袁新 吕怀谷 袁玲 赵静		
发明人	许元峰 袁新 吕怀谷 袁玲 赵静		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	张松亭		
外部链接	<a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本实用新型公开了一种胰蛋白酶原时间分辨荧光纳米免疫层析定量检测试纸条，包括背衬底板，该背衬底板上依次设置有样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水膜，该样品结合垫和吸水膜分别叠压在硝酸纤维素膜的两端上；该样品结合垫上包被有时间分辨荧光物质标记的胰蛋白酶原-2单克隆抗体；该硝酸纤维素膜上设有包被有另一个表位的胰蛋白酶原-2单克隆抗体的检测线和包被有羊抗鼠IgG的质控线。本实用新型具有灵敏度高，特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点，可广泛应用于胰蛋白酶原的临床免疫检验和科学研究中。

