



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102087285 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201010619652. 5

(22) 申请日 2010. 12. 31

(73) 专利权人 广州万孚生物技术股份有限公司  
地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城荔  
枝山路 8 号

(72) 发明人 王继华 李凯

(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 曾旻辉

CN 1580778 A, 2005. 02. 16, 权利要求 1, 3 ;  
说明书第 2 页第 25-28 行, 第 7 页第 15-20 行 ;图  
1.

宋欣明. 乳胶致敏技术的发展现状. 《免疫学  
杂志》. 1993, 第 9 卷 (第 3 期), 第 203-206 页.

陈春晓等. 快速尿胰蛋白酶原试纸法检测在  
急性胰腺炎中的诊断意义. 《浙江医学》. 2000, 第  
22 卷 (第 12 期), 第 763-764 页.

审查员 刘彦宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101762700 A, 2010. 06. 30, 全文.

EP 0514489 B1, 1998. 01. 07, 全文.

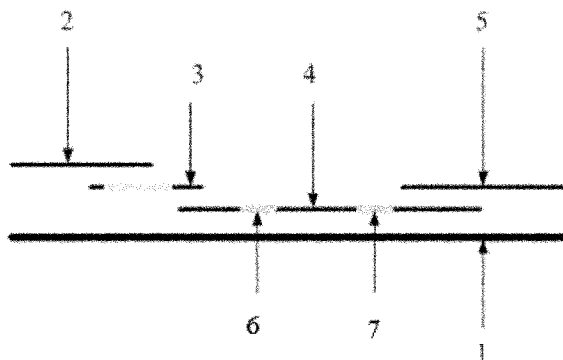
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条及其制  
备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种急性胰腺炎免疫层析快速  
检测试纸条及制备方法, 所述试纸条由样品垫、玻  
璃纤维膜标记垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次  
搭接粘贴在底衬上构成, 所述玻璃纤维膜标记垫  
上涂覆有生物素-亲和素-彩色胶乳复合物标记  
的胰蛋白酶原-2 高特异性单克隆抗体, 硝酸纤维  
素包被膜包括检测区和控制区, 所述检测区包被  
与玻璃纤维膜标记垫上标记的单克隆抗体不同表  
位的另一胰蛋白酶原-2 特异性单克隆抗体, 所述  
控制区包被抗鼠抗体。本发明所述的试纸条与放  
射性免疫、酶联免疫法相比, 具有操作安全、简便、  
适合单人/份检测和快速等优点; 不需要专门技  
术, 无创伤, 结果易读, 可实现对急性胰腺炎及时  
现场和家庭自检。



1. 一种急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条,所述试纸条由样品垫(2)、玻璃纤维膜标记垫(3)、硝酸纤维素包被膜(4)、吸水纸(5)顺次搭接粘贴在底衬(1)上构成,其特征在于,所述玻璃纤维膜标记垫(3)上涂覆有生物素-亲和素-彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体,硝酸纤维素包被膜(4)包括检测区(6)和控制区(7),所述检测区(6)包被与玻璃纤维膜标记垫(3)上的单克隆抗体不同表位的另一胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体,所述控制区(7)包被抗鼠抗体;所述生物素:亲和素:彩色乳胶为1:1:1~2:2:3,生物素-亲和素-彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体在玻璃纤维膜标记垫(3)上的喷膜用量为 $20\mu\text{l}\sim 50\mu\text{l}/\text{cm}$ ;所述硝酸纤维素包被膜(4)上胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体的浓度为 $6\sim 15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在所述检测区的用量为 $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ ;所述抗鼠抗体的浓度为 $6\sim 15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在所述控制区的用量为 $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ 。

2. 根据权利要求1所述的急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条,其特征在于,所述硝酸纤维素包被膜(4)上胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在所述检测区的用量为 $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ ;所述抗鼠抗体的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在所述控制区的用量为 $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ 。

3. 一种制备急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备彩色胶乳;

(2) 制备亲和素-彩色乳胶标记探针

将步骤(1)的彩色胶乳超声波处理 $30\sim 60\text{s}$ ,按重量比1:2~1:3将亲和素与彩色胶乳混匀,室温反应2~3小时,磷酸缓冲液洗涤后离心,PBS-TBN重悬沉淀并超声波处理 $30\sim 60\text{s}$ ,用磷酸缓冲液恢复体积后,室温放置备用;

(3) 制备生物素化胰蛋白酶原-2单克隆抗体

按体积比1:1~2:1将Biotin-LC-NHS与胰蛋白酶原-2单克隆抗体混合,充分反应后,用PBS透析除去未标记的Biotin-LC-NHS;

(4) 制备蛋白探针

按体积比为1:6~1:10,将步骤(3)得到的生物素化胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体与步骤(2)得到的亲和素-彩色胶乳标记探针混合反应,形成蛋白探针;室温搅拌反应1~3小时后离心洗涤,沉淀用PBS-TBN溶解并超声波处理 $10\sim 30$ 秒,用磷酸缓冲液恢复体积,放置室温备用,按喷膜用量为 $20\mu\text{l}\sim 50\mu\text{l}/\text{cm}$ ,将蛋白探针喷洒到玻璃纤维膜标记垫上,并在 $30\sim 35^\circ\text{C}$ ,湿度30%以下,将已标记的玻璃纤维膜标记垫干燥12个小时以上,备用;

(5)  $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ 的膜液量,将浓度为 $6\sim 15\mu\text{g}/\text{ml}$ 的与玻璃纤维膜标记垫上的胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体处于不同表位的另一株胰蛋白酶原-2单克隆抗体和浓度为 $6\sim 15\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗鼠抗体包被到硝酸纤维素包被膜上;干燥备用;

(6)将样品垫、步骤(4)的玻璃纤维膜标记垫、步骤(5)的硝酸纤维素包被膜、吸水纸按序粘贴于底衬上,即得。

## 急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体地说,本发明涉及一种急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 急性胰腺炎,特别是重症型急性胰腺炎是威胁人们健康的一种严重疾病,已被列为三大急腹症之一,多数急性胰腺炎病情较轻,约有 20% 的患者为严重坏死症,急性重症胰腺炎的死亡率可达 40%,因此急性胰腺炎的早期诊断对急性重症胰腺炎的治疗和预后有重要意义。

[0003] CT 为诊断急性胰腺炎最准确的手段之一,但由于费用昂贵,性价比不高。传统的血、尿淀粉酶作为急性胰腺炎临床诊断、监测病程的常用指标,应用很广泛,但由于它存在于多器官中,有一些疾病临床表现酷似胰腺炎,血清淀粉酶也可升高,诸如消化性溃疡穿孔、阑尾炎、肠梗塞、宫外孕及患者淀粉酶都可能增高,因此测定灵敏度及特异性不够理想,而且淀粉酶可以滤过肾小球在尿中出现,随着胰腺炎发作时间延长,灵敏度会相对降低,必须及时检测才能得到阳性结果。但在急性胰腺炎发作, TSGII 浓度显著增高,且在肾脏中, TSGII 在肾小管的重吸收率比 TSG I 低,因而更多 TSGII 被排泄到尿液中。故尿中主要为 TSGII,使之成为 AP 的一个非常重要的诊断指标。

[0004] 胰蛋白酶原是胰蛋白酶的非活性前体,由胰腺生成,主要有胰蛋白酶原 -1 (TSG I) 与胰蛋白酶原 -2 (TSG II) 两种异构体。通常情况下,血清 TSG I 浓度高于 TSG II。在急性胰腺炎情况下,血清中胰蛋白酶原 -2 的含量剧增,由于相对分子量较小,胰蛋白酶原很容易从肾小球滤过,且能在肾小管重吸收。其中胰蛋白酶原 -2 的重吸收率远远较胰蛋白酶原 -1 低,因此尿中的胰蛋白酶原 -2 增高,尤其是急性胰腺炎时,更是显著增高。故检测胰蛋白酶原 -2 可以作为检测和评估急性胰腺炎病情的一种可靠指标,其敏感性与特异性很高,显著高于血尿淀粉酶, C 反应蛋白等标志物,胰蛋白酶原 -2 是筛选急性胰腺炎的可靠指标,阴性结果基本可以排除 96.2% 胰腺炎,有关尿胰蛋白酶原 -2 的监测临界值一般认为是浓度大于 50ng/L 时为阳性。

[0005] 生物素 - 亲和素系统 (biotin-avidin system, BAS) 是以生物素和亲和素具有的独特结合特性为基础,结合二者即可偶联抗原抗体等大分子生物活性物质,它们的结合迅速、专一、稳定,并具有多级放大效应。BAS 即可用于微量抗原、抗体及受体的定量、定性检测及定位观察研究,亦可制成亲和介质用于上述各类反应体系中反应物的分离、纯化。BAS 在实际应用中所具有的巨大优越性,比如灵敏度高,具有多级放大作用,特异性强,稳定性好,实用性广等。这些优点使其在生物学、分子生物学、生物化学和临床医学等领域都有广泛应用。但目前把 BAS 应用到快速检测试剂的实例还很少,而且主要应用于核酸检测,把生物素 - 亲和素技术应用到检测试剂有助于大大提高检测的灵敏度。

[0006] 生物素 - 亲和素系统 (BAS) 具有以下显著特点:

[0007] 1. 高度特异性生物素 - 亲和素系统的结合反应因其亲合力极高而呈现高度专一

性,生物素、亲和素一旦结合则很难分离,这种高度特异、稳定地结合,使反应试剂可经得起高度稀释,因而可明显降低或避免了反应中可能存在的非特异性作用。

[0008] 2. 高度灵敏性亲和素可通过4个结合位点多价桥联生物素的反应物和标记物。另外,生物素化的大分子蛋白、核酸、酶等物质不仅保持其活性不受影响,更因生物素化形成许多“触手”的多价制剂,使整个反应体系出现多级放大效应,因而赋予BAS极高的灵敏性。

[0009] 3. 简易、快速、安全、稳定、BAS的高度特异性及灵敏性,使其在反应体系应用中用量极微,故成本低廉。反应程序于数小时即完成,结果易观察。生物素标记试剂可于4℃存放两年而效价不变。

[0010] 4. 应用广泛BAS可与多种标记系统如酶、荧光素、铁蛋白、凝集素、SPA、放射性核素等联合用于抗原、抗体、蛋白、激素、受体、核酸系统等多种生物学反应体系,也可作为亲合介质用于上述各类反应体系中反应物的分离、纯化。近年研究提出,生物素亲和素系统尚可作为均相酶免疫试验中高效的酶活性调变系统及新型的标记生物免疫传感器系统,因此,BAS有着极广的研究与应用潜力。

[0011] 目前用于急性胰腺炎早期诊断的试剂和产品不多,免疫层析技术产品主要有胶体金标记胰蛋白酶原-2和羧肽酶B来检测胰腺炎。胶体金标记的制备过程复杂,且成本较高,在灵敏性上有待提高。

## 发明内容

[0012] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条,具有快速、简便、灵敏、操作方便的优点。

[0013] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0014] 一种急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条,所述试纸条由样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底衬上构成,所述玻璃纤维膜标记垫上涂覆有生物素-亲和素-彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体,硝酸纤维素包被膜包括检测区和控制区,所述检测区包被与玻璃纤维膜标记垫上标记的单克隆抗体不同表位的另一胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体,所述控制区包被抗鼠抗体。

[0015] 优选地,所述生物素:亲和素:彩色乳胶为1:1:1~2:2:3,生物素-亲和素-彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体在玻璃纤维膜标记垫上的喷膜用量为 $20\mu\text{l} \sim 50\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0016] 优选地,所述硝酸纤维素包被膜上胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体的浓度为 $6 \sim 15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在所述检测区的用量为 $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ ;所述抗鼠抗体的浓度为 $6 \sim 15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在所述控制区的用量为 $20\mu\text{l}/35\text{cm}$ 。

[0017] 更优选地,所述抗-胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体和抗鼠抗体的浓度均为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0018] 优选地,所述彩色胶乳颗粒的直径为300nm-800nm。

[0019] 本发明还提供了上述急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0020] (1) 采用常规方法制备彩色胶乳;

[0021] (2) 亲和素 - 彩色乳胶标记探针的制备

[0022] 将步骤 (1) 的彩色胶乳超声波处理 30 ~ 60s, 按重量比 1 : 2 ~ 1 : 3 将亲和素与彩色胶乳混匀, 室温反应 2 ~ 3 小时, 磷酸缓冲液洗涤后离心, PBS-TBN 重悬沉淀并超声波处理 30 ~ 60s, 用磷酸缓冲液恢复体积后, 室温放置备用;

[0023] (3) 生物素化胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体的制备

[0024] 按体积比 1 : 1 ~ 2 : 1 将 Biotin-LC-NHS 与胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体混合, 充分反应后, 用 PBS 透析除去未标记的 Biotin-LC-NHS;

[0025] (4) 制备蛋白探针

[0026] 按体积比为 1 : 6 ~ 1 : 10, 将步骤 (3) 得到的生物素化胰蛋白酶原 -2 高特异性单克隆抗体与步骤 (2) 得到的亲和素 - 彩色胶乳标记探针混合反应, 形成蛋白探针; 室温搅拌反应 1 ~ 3 小时离心洗涤, 沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波处理 10 ~ 30 秒, 用磷酸缓冲液恢复体积, 放置室温备用, 按喷膜用量为 20  $\mu$  l-50  $\mu$  l/cm, 将蛋白探针喷洒到玻璃纤维膜标记垫上, 并在 30 ~ 35 $^{\circ}$ C, 湿度 30% 以下, 将已标记的玻璃纤维膜标记垫干燥 12 个小时以上, 备用;

[0027] (5) 按常规方法, 20  $\mu$  l/35cm 的膜液量, 将浓度为 6 ~ 15  $\mu$  g/ml 的与玻璃纤维膜标记垫上的胰蛋白酶原 -2 高特异性单克隆抗体处于不同表位的另一株胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体和浓度为 6 ~ 15  $\mu$  g/ml 的抗鼠抗体包被到硝酸纤维素包被膜上;

[0028] (6) 将样品垫、步骤 (2) 的玻璃纤维膜标记垫、步骤 (3) 的硝酸纤维素包被膜、吸水纸按序粘贴于底衬上, 即得。

[0029] 彩色胶乳标记层析检测技术是继胶体金标记技术以后, 在胶乳凝集试验的基础上发展起来的, 即用抗体致敏高分子胶乳, 以直径 1 $\mu$ m 左右或更大一些的球形胶乳颗粒作为载体, 将抗原或抗体结合在此载体上, 即成为带有免疫配基的微球。作为一种免疫学方法, 这种免疫微球兼有固相化试剂特有的优点和免疫反应的高度专一性, 具有快速、操作简便、试剂稳定、可室温储运、不易污染的特点, 在疾病诊断、免疫学测定、细胞的标记和识别以及细胞的分离等领域中应用日益广泛。相对于目前的胶体金产品, 彩色胶乳的制备相对简单, 胶乳载体与蛋白以共价形式结合, 稳定性好, 灵敏度高, 同时彩色胶乳色彩丰富, 有利于 OTC 产品多元分析、批间差小和标记方式多样化。

[0030] 本发明的检测原理是采用双抗夹心法, 将彩色胶乳 - 亲和素 - 生物素标记的胰蛋白酶原 -2 高特异性单抗涂覆到标记垫上, 胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素包被膜上, 分别形成检测区 (T 线) 和质控区 (C 线), 把试纸样本加样区放入待测样本中 (液面不得超过 MAX 线), 由于毛细管作用样品将沿着试纸条向吸水板移动, 当移动到涂覆生物素 - 亲和素 - 彩色胶乳 - 胰蛋白酶原 -2 单抗的玻璃纤维膜标记垫时, 如果样品中胰蛋白酶原 -2 量足够与胰蛋白酶原 -2 单抗蛋白探针发生特异结合形成复合物; 因毛细管作用继续向前移动, 移至检测区 (T 线) 时, 复合物中的胰蛋白酶原 -2 被 NC 膜上包被的另一位点的胰蛋白酶原 -2 单抗捕获, 于是彩色胶乳标记物在相应的配体处于大量聚积时, 所形成的检测带是一条肉眼可见的显色带, 即样本中含有一定浓度的胰蛋白酶原 -2, 致使检测带上积聚的颜色颗粒为肉眼所见。由于亲和素 - 彩色胶乳以 1 : 1 ~ 1 : 3 的比例混合, 所以每个亲和素分子的四个结合位点中有 1 ~ 3 个位点用于结合彩色胶乳微粒, 剩下的位点用于结合生物素标记的抗体复合物, 也就是说每个胰蛋白酶原 -2 分子可以结合 1 ~ 3 个

彩色胶乳微粒,与非 BAS 检测系统相比,能放大 1 ~ 3 倍。只有在待测样本胰蛋白酶原 -2 量太低时,以致检测带上积聚的彩色胶乳不能被肉眼所见。本发明控制区包被的是抗鼠抗体,当样品加入后,在标记垫上涂覆的彩色胶乳颗粒标记的胰蛋白酶原 -2 单抗移动至控制线时,无论样品中有没有胰蛋白酶原 -2,蛋白探针复合物都会与已抗鼠抗体结合滞留,控制线(C 线)显示颜色。根据此原理,出现两条线为阳性结果,出现一条线则为阴性结果。而控制线无色带产生则表明检测时样品液面超过 MAX 线或试纸已经过期。

[0031] 本发明的试纸条增加了生物素亲和素系统使用彩色胶乳标记,能发挥亲和素 - 生物素系统多级放大作用的优点从而提高检测灵敏度以及发挥彩色胶乳标记层析检测技术快速、操作方便的优点,大大提高了检测的灵敏度和简便性。

[0032] 本发明所述的急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条与放射性免疫、酶联免疫法相比,具有操作安全(无放射物污染)、简便(简单操作一步完成)、适合单人/份检测(放免、酶免不适合单人/份或少量样品检测)、取样简单(不需要血清,直接以尿液为检测样本)、灵敏度和特异性高(胰蛋白酶原 -2 作为急性胰腺炎 AP 检测指标的高灵敏度和特异性以及生物素 - 亲和素的放大效应)和快速(10 分钟左右即可有结果)等优点。本发明试纸条操作简便、快速、不需要专门技术,无创伤,结果易读,可实现对急性胰腺炎及时现场检测和家庭自检。

#### 附图说明

[0033] 图 1 是本发明的结构示意图;

[0034] 附图标记:1、底衬;2、样品垫;3、玻璃纤维膜标记垫;4、硝酸纤维素包被膜;5、吸水纸;6、检测区;7、控制区。

#### 具体实施方式

[0035] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0036] 实施例 1

[0037] 如图 1 所示,为本发明一种急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条的结构示意图,所述试纸条由样品垫 2、玻璃纤维膜标记垫 3、硝酸纤维素包被膜 4、吸水纸 5 顺次搭接粘贴在底衬 1 上构成,所述玻璃纤维膜标记垫 3 上涂覆有生物素 - 亲和素 - 彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原 -2 高特异性单克隆抗体,硝酸纤维素包被膜 4 包括检测区 6 和控制区 7,所述检测区 6 包被与玻璃纤维膜标记垫 3 上标记的单克隆抗体不同表位的另一胰蛋白酶原 -2 特异性单克隆抗体,所述控制区 7 包被抗鼠抗体。

[0038] 在该实施例中,所述生物素:亲和素:彩色胶乳为 1:1:1~2:2:3,生物素 - 亲和素 - 彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原 -2 高特异性单克隆抗体在玻璃纤维膜标记垫上的喷膜用量为 20  $\mu$  l/cm。所述硝酸纤维素包被膜上胰蛋白酶原 -2 特异性单克隆抗体的浓度为 10  $\mu$  g/ml,在所述检测区的用量为 20  $\mu$  l/35cm;所述抗鼠抗体的浓度为 10  $\mu$  g/ml,在所述控制区的用量为 20  $\mu$  l/35cm。

[0039] 急性胰腺炎亲和素 - 彩色胶乳免疫层析快速检测试纸条制法:

[0040] A. 彩色胶乳微粒采用共价活化方法处理,具体操作步骤可采用 ZL 200410027293.9 专利所披露的方法。

[0041] B. 彩色胶乳与亲和素标记探针的制备 :将步骤 (1) 中活化后的彩色胶乳超声波处理 30s, 将亲和素加入到制备好的彩色胶乳溶液中, 亲和素与彩色胶乳重量比例为 1 : 1, 混匀后室温反应 2 小时。然后用磷酸缓冲液洗涤后  $8000\times g$  离心 5 分钟, 洗涤 3 次后, 用 PBS-TBN 重悬沉淀并超声波处理 30s, 磷酸缓冲液恢复一定体积后, 室温放置备用, 即为亲和素标记的彩色胶乳混合液。

[0042] C. 活化生物素标记胰蛋白酶原 -2 特异性抗体 :

[0043] 利用常规方法从体液中分离胰蛋白酶原 -2, 用胰蛋白酶原 -2 免疫小鼠, 与骨髓瘤细胞融合, 用 ELISA 方法鉴别, 鉴别出来的杂交瘤在腹水中培养, 筛选阳性克隆, 分离纯化 TPG-2 单抗。选择 2 株不同表位的胰蛋白酶原 -2 单抗, 分别作为标记抗体和包被抗体 ; ELISA 方法鉴定胰蛋白酶原 -2 单抗的活性和效价, 纯化备用。

[0044] 所用活化生物素为长臂生物素琥珀酰亚胺酯 (Biotin-LC-NHS)。将 Biotin-LC-NHS 与胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体以 2 : 1 混合, 充分反应后, 用 PBS 透析除去未标记生物素物质, 即得到生物素化抗体。

[0045] D. 玻璃纤维膜标记垫的制备 :将制备好的生物素标记抗体与亲和素 - 彩色胶乳复合物按 1 : 6 的体积比混合反应 2 小时后, 按喷膜用量为  $20\mu l/cm$  将其涂覆玻璃纤维膜标记垫上, 在温度  $30\sim 35^{\circ}C$ , 湿度 30% 以下干燥 12 个小时以上, 备用。

[0046] E. 硝酸纤维素包被膜的制备 :硝酸纤维素包被膜由检测区和质控区两部分组成。检测区包被胰蛋白酶原 -2 另一特异性位点的单克隆抗体, 质控区包被抗鼠抗体。将胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体和抗鼠抗体用包被缓冲液稀释至浓度为  $10\mu g/ml$ , 按膜液量为  $20\mu l/35cm$ , 将单抗及抗鼠抗体喷到硝酸纤维素包被膜上, 两区间隔 5mm, 应细致均匀, 室温凉干 20 分钟 ;  $25^{\circ}C\sim 37^{\circ}C$  在封闭液浸泡 60 分钟, 取出后置  $25^{\circ}C\sim 37^{\circ}C$  烘干处理 2 小时, 封袋, 备用。

[0047] 检测线 :胰蛋白酶原 -2 单抗。

[0048] 控制线 :抗鼠抗体。

[0049] F. 在底衬 1 上顺次互搭地粘贴样品垫 2、玻璃纤维膜标记垫 3、硝酸纤维素包被膜 4 以及吸水纸 5, 得到试纸板, 按照要求切割成不同宽度的试纸条。

[0050] 使用方法及结果判断 :

[0051] 加样后, 反应 1 ~ 2 分钟即可看到检测区 (T 线) 6 和控制区 (C 线) 7 相应的位置上出现颜色条带, 如果 C 线和 T 线均出现颜色条带, 结果为阳性, 说明样品胰蛋白酶原 -2 含量高, 初步检测患有急性胰腺炎 ; T 区 6 不出现颜色条带, 结果为阴性, 说明样品胰蛋白酶原 -2 含量低, 初步检测没有急性胰腺炎。C 线不出现颜色条带, 说明试纸条失效。

[0052] 实施例 2

[0053] 该实施例中的检测试纸条结构均与实施例 1 相同。

[0054] 在该实施例中, 所述生物素 : 亲和素 : 彩色胶乳为 1 : 1 : 1 ~ 2 : 2 : 3, 生物素 - 亲和素 - 彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原 -2 高特异性单克隆抗体在玻璃纤维膜标记垫上的喷膜用量为  $35\mu l/cm$ 。所述硝酸纤维素包被膜上胰蛋白酶原 -2 特异性单克隆抗体的浓度为  $7\mu g/ml$ , 在所述检测区的用量为  $20\mu l/35cm$  ; 所述抗鼠抗体的浓度为  $7\mu g/ml$ , 在所述控制区的用量为  $20\mu l/35cm$ 。

[0055] 该实施例的制备方法除了步骤 B 中亲和素与彩色胶乳重量比例为 2 : 1, 步骤 D 中

生物素标记抗体与亲和素 - 彩色胶乳复合物的体积比为 7 : 1 之外,其余均与实施例 1 相同,使用方法也与实施例 1 相同。

[0056] 实施例 3

[0057] 该实施例中的检测试纸条结构均与实施例 1 相同。

[0058] 在该实施例中,所述生物素 : 亲和素 : 彩色胶乳为 1 : 1 : 1 ~ 2 : 2 : 3,生物素 - 亲和素 - 彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原 -2 高特异性单克隆抗体在玻璃纤维膜标记垫上的喷膜用量为 48  $\mu$  l/cm。所述硝酸纤维素包被膜上胰蛋白酶原 -2 特异性单克隆抗体的浓度为 13  $\mu$  g/ml,在所述检测区的用量为 20  $\mu$  l/35cm;所述抗鼠抗体的浓度为 13  $\mu$  g/ml,在所述控制区的用量为 20  $\mu$  l/35cm。

[0059] 该实施例的制备方法除了步骤 B 中亲和素与彩色胶乳重量比例为 3 : 1,步骤 D 中生物素标记抗体与亲和素 - 彩色胶乳复合物的体积比为 10 : 1 之外,其余均与实施例 1 相同,使用方法也与实施例 1 相同。

[0060] 实施例 1-3 所述的试纸条,以 Actim Pancreatitis Test 尿胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒 (胶体金免疫层析法) 作为对比参考品,检测结果的阳性符合率 (敏感性) 均能达到 96% 以上,阴性符合率 (特异性) 达到 99.5% 以上,与参比试剂符合率达 97% 以上,说明实施例 1-3 所述的试纸条与临床结果的相符率较高,操作方便,且判断结果清晰、迅速、无交叉干扰。5 分钟后就能出结果,用于对来医院就诊的急性腹痛病人进行胰腺炎筛选。

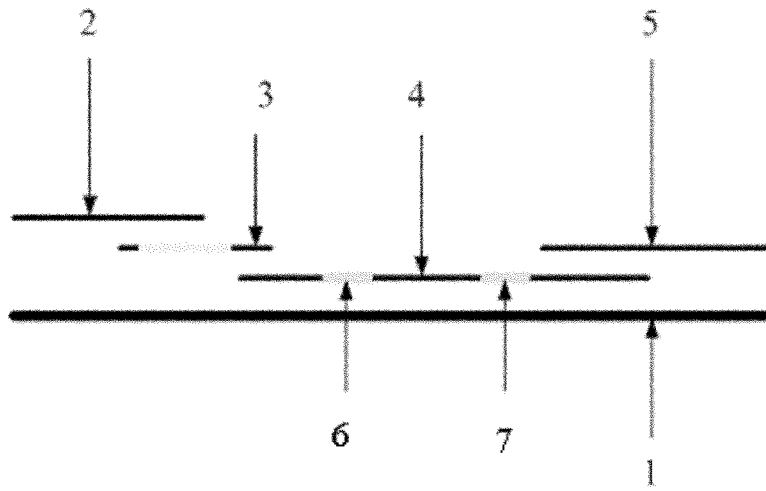


图 1

专利名称(译)	急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102087285B</a>	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	CN201010619652.5	申请日	2010-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
[标]发明人	王继华 李凯		
发明人	王继华 李凯		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN102087285A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种急性胰腺炎免疫层析快速检测试纸条及制备方法，所述试纸条由样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底衬上构成，所述玻璃纤维膜标记垫上涂覆有生物素-亲和素-彩色胶乳复合物标记的胰蛋白酶原-2高特异性单克隆抗体，硝酸纤维素包被膜包括检测区和控制区，所述检测区包被与玻璃纤维膜标记垫上标记的单克隆抗体不同表位的另一胰蛋白酶原-2特异性单克隆抗体，所述控制区包被抗鼠抗体。本发明所述的试纸条与放射性免疫、酶联免疫法相比，具有操作安全、简便、适合单人/份检测和快速等优点；不需要专门技术，无创伤，结果易读，可实现对急性胰腺炎及时现场和家庭自检。

