

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410011165.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月26日

[11] 公开号 CN 1763531A

[22] 申请日 2004.10.20

[21] 申请号 200410011165.5

[71] 申请人 吉林大学第一医院

地址 130061 吉林省长春市新民大街1号

[72] 发明人 方艳秋 谭岩 刘力华 段秀梅  
许淑芬 姜艳芳 宋艳 刘玲丽  
时阳

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责任  
公司

代理人 白冬冬

权利要求书1页 说明书15页

[54] 发明名称

氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒

[57] 摘要

一种氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒，涉及一种对血液进行检测的方法。本发明采用高亲和力特异性单克隆抗体，按照免疫化学方法和免疫层析技术的原理制备的氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒。本发明具有灵敏度高、特异性好、符号显示结果、操作简便、无需特殊仪器设备、反应迅速、5~15分钟判读结果等特点。虽然 NT pro-BNP 和 BNP 检测的意义相同，但 NT pro-BNP 测定有2个优点，半衰期比 BNP 长而且测定水平的影响因素比 BNP 少。

1、一种氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒，其制备工艺是：

a、胶体金溶液的制备：在磁力搅拌下加热超纯水，再加入氯金酸溶液，待溶液沸腾后，立即加入柠檬酸三钠溶液，保持此溶液沸腾，搅拌，冷却至室温，保存；

b、胶体金标记鼠抗人 NT-pro-BNP 的单克隆抗体制备：以碳酸钾溶液调整胶体金溶液，加入特异性抗体，反应，加入聚乙二醇，离心，调整测 OD 值；

c、硝酸纤维反应膜制备——即检测线和质控线的制备：

①取特异性抗体在已活化硝酸纤维素膜上包被检测线；

②用羊抗鼠IgG多克隆抗体在已活化硝酸纤维素膜上包被对照线。

③在真空下干燥后备用；

d、将粘贴组成板的反应体切割，待包装。

2、根据权利要求 1 所述的氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒，其是应用于对血液中氮末端脑利钠肽前体的临界值定性进行快速检测。

## 氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒

技术领域:

本发明涉及一种对血液进行检测的方法。

背景技术:

脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)又称 B 型利钠肽(B-Type natriuretic peptide), 是心房利钠肽(ANP)系统的成员,因首先从猪脑分离而得名。实际上它主要来源于心室。

人类 BNP 基因片段位于 1 号染色体短臂,其上游与 ANP 基因片段相连,由 1900 个核苷酸组成。mRNA 含 900-1000 个核苷酸。表达产物含信号肽。信号肽降解后的产物为前体 BNP(pro-BNP),含 108 个氨基酸(aa)。pro-BNP 进一步裂解,成为 76aa 的 N 端前体 BNP(NT pro-BNP)和 C 端的 BNP。BNP 具有种属特异性。猪、狗与人的 BNP 都由 32 个氨基酸组成。

pro-BNP 主要从心室分泌。在其分泌过程中或进入血液后分解为具有生物活性的 BNP。心肌延展及室壁张力对 BNP 的释放进行基础调节。病理状态下,水钠潴留、中心静脉压升高以及左心室扩张或肥厚都诱导 pro-BNP 合成、裂解及 BNP 分泌,血浆水平常增加可近百倍之多。

目前 BNP 或其前体测定的常用方法主要有放射免疫法、电化学

发光法以及荧光标记法等，均为定量方法。检查需时较长，不利于快速确诊。

技术内容：

本发明采用高亲和力特异性单克隆抗体，按照免疫化学方法和免疫层析技术的原理制备的氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒。

本发明的制备工艺是：

a、胶体金溶液的制备：在磁力搅拌下加热超纯水，再加入氯金酸溶液，待溶液沸腾后，立即加入柠檬酸三钠溶液，保持此溶液沸腾，搅拌，冷却至室温，保存；

b、胶体金标记鼠抗人 NT-pro-BNP 的单克隆抗体制备：以碳酸钾溶液调整胶体金溶液，加入鼠抗人特异性抗体，反应，加入聚乙二醇，离心，调整测 OD 值；

c、硝酸纤维反应膜制备——即检测线和质控线的制备：

①取特异性抗体在已活化硝酸纤维素膜上包被检测线；

②用羊抗鼠 IgG 多克隆抗体在已活化硝酸纤维素膜上包被对照线。

③在真空下干燥后备用；

d、将粘贴组成板的反应体切割，待包装。

本发明的检测盒，是应用于对血液中氮末端脑利钠肽前体的临界值定性进行快速检测。

本发明采用高亲和力特异性单克隆抗体，按照免疫化学方法和免

疫层析技术的原理制备的快速检测试纸条,特异地检测病人全血或血清中的 NT-proBNP 抗原从而反映心脏功能。具有灵敏度高、特异性好、符号显示结果、操作简便、无需特殊仪器设备、反应迅速、5~15 分钟判读结果等特点。虽然 NT pro-BNP 和 BNP 检测的意义相同,但 NT pro-BNP 测定有 2 个优点,半衰期比 BNP 长而且测定水平的影响因素比 BNP 少。

具体实施方式:

## 一、试剂盒的制备

### 1. 设备、仪器

1.1 紫外分光光度计。

1.2 SDS-PAGE 电泳仪。

1.3 凝胶成像分析系统。

1.4 包被仪。

1.5 真空抽干腔。

1.6 可调式电脑切条机。

1.7 普通冰箱。

1.8 低温冰箱。

### 2. 试剂和辅助材料:

#### 2.1 特异性抗体

两株单抗经 SDS-PAGE 电泳鉴定其目标抗体纯度不低于 90%, BCA 法测蛋白含量大于 3.5mg/ml, 用 ELISA 法测抗体效价不低于 1:1000000。

## 2.2羊抗鼠IgG多克隆抗体

经 SDS-PAGE 电泳鉴定其目标抗体纯度不低于 95%,经 BCA 法测定蛋白含量大于 1mg/ml,用 ELISA 法测抗体效价不低于 1: 100000, PEG 浓缩蛋白大于 3mg/ml, 低温保存。

## 2.3活化的硝酸纤维膜

孔径 12 $\mu$ m。吸水速度应不低于4cm/100s。

## 2.4内控阳性参比血清

## 2.5内控阴性参比血清

## 2.6牛血清白蛋白

经SDS-PAGE电泳鉴定其纯度不低于95%,蛋白含量大于1mg/ml。

## 2.7氯金酸

分子式为HAuCl<sub>4</sub>, 分子量为399.78, 分析纯。

## 2.8无纺布

规格为90×28cm, 重量为5.0±0.2g。厚薄均匀, 颜色均一。

## 2.9粗纤维吸水纸

定做。

## 2.10塑料板

外观平整, 质地均匀, 无裂缝PVC板。

## 2.11单、双面胶带

质地均匀, 粘度适中, 无皱折的透明胶带。

## 2.12铝箔袋

定做。

## 2.13 包装盒、标签

定做。

## 3. 主要工艺

### 3.1 胶体金溶液的制备

采用枸橼酸三钠还原法，即在磁力搅拌下加热一定量超纯水至90℃时加入10%氯金酸溶液，待溶液沸腾后，立即加入相应量的12%柠檬酸三钠溶液，保持此溶液沸腾，搅拌10分钟，待胶体金溶液颜色由蓝-紫-红，冷却至室温，4℃避光保存。同时取1ml测定胶体金溶液吸光值，读取并记录峰波长吸光度值。用于抗体标记的胶体金溶液质量标准为峰波长532nm，吸光度（OD）大于0.8，溶液清澈透明。

### 3.2 胶体金标记鼠抗人NT-pro-BNP的IgG抗体制备

#### 3.2.1 金标条件的选择

氯金酸在还原剂的作用下可聚合成一定大小的金颗粒，形成带负电疏水胶溶液，由于静电作用成为稳定的胶体状态，即为胶体金。胶体金颗粒粒径不同、颜色也各不相同的。颗粒由大变小，颜色也由黑变为橙黄色。这种球形的粒子对蛋白质有很强的吸附能力，胶体金的标记，实质上就是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。

金标抗原制备的主要影响因素表现在：①胶体金颗粒的大小：由还原剂的浓度控制，大小的确定由分光光度计的光谱中最大吸收峰的位置判定。作为一步法免疫检测试剂所用的胶体金颗粒直径选择在60nm左右为宜，溶液显示紫红色，在530~535nm处有明显吸收峰。

- ②蛋白质最适量：采用方阵滴定法，将待标记的抗体溶液作系列稀释后，分别交叉配比。不同浓度、同体积(100ul)抗体溶液中加入定量(1ml)的胶体金溶液，混匀，再加入0.1M的NaCl混匀，静置2小时，抗体蛋白浓度过高或过低都能使胶体金变得不稳定，易产生沉淀或聚集。能使胶体金稳定（无沉淀产生，溶液清澈透明）的蛋白质最适量再加入10%即为最佳标记蛋白量，我们采用的标记抗体浓度为1.5mg/ml。
- ③PH值：在接近并略为高于蛋白质等电点的条件下标记比较合适，在此条件下蛋白质分子在金颗粒表面的吸附量最大，我们所选PH=7.4，采用碳酸钾溶液调节。

### 3.2.2金标抗体的制备

以碳酸钾溶液调整胶体金溶液PH=7.4，加入鼠抗人NT-pro-BNP的IgG，反应15分钟，加入聚乙二醇，离心，调整532nm测OD值不低于0.5。

### 3.2.3金标抗体固相载体的制备

取工作浓度胶体金标记抗体溶液，将无纺布浸湿、平整、干燥、检测。

## 3.3硝酸纤维反应膜制备（即检测线和质控线的制备）

### 3.3.1反应膜制备条件的选择

浓度、温度、时间、溶液的PH值。我们通过大量的实验，得出结论：①抗体的包被量要相对饱和：我们采用方阵滴定法，选用不同浓度的抗体进行包被，与相对应的金标抗体配对，包被检测抗体的最适浓度为1.5mg/ml，包被质控抗体的最适浓度为1.0mg/ml。

②包被好的膜一定要充分干燥：温度24℃，相对湿度40%以下，经真空干燥10小时以上，否则灵敏度将大受影响。

③包被液的最适PH值为7.4。

### 3.3.2反应膜制备

①取工作浓度为1.5mg/ml的特异性抗体在已活化硝酸纤维素膜上包被检测线。

②用工作浓度为1.0mg/ml的羊抗鼠IgG多克隆抗体在已活化硝酸纤维素膜上包被对照线。

③置真空24℃，相对湿度40%以下，干燥10小时后备用。

### 3.4反应体组装

#### 3.4.1反应体组装材料及规格（单位：mm）

塑料基板：295×87 S1：260×25

大双面胶：270×60 S3：8

小双面胶：270×28 S2：硬，30×27

箭头胶带：270×50 S4：270×34

即时贴：大：270×45；中：270×20；小：270×2。

#### 3.4.2组装顺序

3.4.2.1贴S1：按上下标识，S1下缘距板下边29mm平行贴于板上。

3.4.2.2贴硬S2：细纹面朝下，圆边压S1 0.5mm。

3.4.2.3贴S4：S4平行压S1下缘1mm。

3.4.2.4贴S3：S3在S4基础上距S1下缘4mm。

3.4.2.5贴中即时贴：压S4 2mm。

3.4.2.6贴小即时贴：距中即时贴2mm。

3.4.2.7贴大即时贴：压过S1标志线1~1.5mm处，用手沿S2边缘压实，上面用钢板尺刮平，剩余部分向后反折。

### 3.5裁测

将粘贴组成板的反应体切割为适宜宽度（3.0mm），待包装。

### 3.6产品检定及质量研究

3.6.1外观及性能：外观平整，材料附着牢固，内容齐全。无边缘效应，无水色分离，无空心杠，两线间距合理，线体饱满度好。

3.6.2物理检查：膜条宽度为 $3.0\pm 0.1\text{mm}$ ，液体移行速度不低于 $20\text{mm}/\text{min}$ 。本底消退在5分钟内完成。

3.6.3敏感性：用10份内控阳性参比血清进行检定，每份取1支检测试条检测，结果应全部为阳性。

3.6.4特异性：用10份内控阴性参比血清进行检定，每份取1支检测试条检测，结果应全部为阴性。

3.6.5最低检出限：用定值阳性参考血清进行人NT-pro BNP检测，20分钟内观察结果，最低检出量对应于大于 $0.9\text{ng}/\text{ml}$ 。

3.6.6精密度测试：取内控阳性参比血清3份，每份平行检测10条，要求反应结果一致，显色度均一。取内控阴性参比血清1份，每份平行检测10条，要求反应结果一致，显色均一。

3.6.7稳定性试验： $37^{\circ}\text{C}$ 放置20天后，其灵敏度、特异性、最低检出限和均一性应符合要求。

## 二、设计原理

NT-pro BNP 抗原检测试剂利用胶体金标记技术与反应膜体系结合，形成直接免疫法反应模式，用以特异性地检测人血清中的 NT-proBNP 特异性抗原。

### 1、金标抗体反应体系

根据胶体金标技术特性，使胶体溶液中细微的金颗粒与鼠抗人 NT-proBNP 抗体稳定结合，形成紫红色的胶体金标记抗体复合物。

### 2、膜反应体系

NT-proBNP 抗原检测试剂整体反应体系是以硝酸纤维膜为固相包被材料，借助吸水材料的虹吸作用，将抗原抗体免疫反应结果以金标记红色沉积线的符号特征表现出来，作为检测试剂的主体，其膜反应体系分别由以下部分构成。

S<sub>1</sub>: 亲和性硝酸纤维膜，经预先处理后制备成反应膜用来显示整体系统的反应结果。

S<sub>2</sub>: 吸附力较强的粗纤维吸水纸，主要起虹吸作用。

S<sub>3</sub>: 吸附力较强的无纺布，作为金标记抗原的固相载体吸附材料。

S<sub>4</sub>: 无纺布，其作用加速吸水。

S<sub>5</sub>、S<sub>6</sub>: 分别为不同规格的双面胶和单面胶带，用于固定各种反应膜和吸附材料。

S<sub>7</sub>: 塑料基板，作为反应体的支撑物。

S<sub>8</sub>: 箭头胶带，起指示作用。

### 3、操作程序

用取样吸管取 80μl 全血或血清于样本检测端，加入 PH 值为 7.0 的

PBS样本缓冲液100ul。5~15分钟观察测试区显示的结果。

#### 4、预期反应状况及结果

肉眼观察结果。滴加血清样本后，吸水材料使待检样品缓慢上移，反应体系开始启动。

(1) 阴性：若被检样品中NT-pro BNP特异性抗原浓度小于检测临界值，反应体系中的金标鼠抗人NT-pro-BNP抗体和包被在醋酸纤维膜的抗体无法形成可见的夹心抗原抗体反应，即在检测区无红色反应线（T线）出现。这时，反应体系中的金标抗体继续向试纸上端爬升，爬至对照线位置时，金标记的抗体即于包被的羊抗鼠IgG多抗反应结合，在反应区形成一条红色沉积对照线（C线）。这表明被测样品中NT-pro BNP浓度低于最低阳性判别水平，为阴性结果；同时说明试纸整体反应系统工作正常。

(2) 阳性：若被检样品中 NT-pro BNP 特异性抗原浓度大于检测临界值，该抗原先与反应体系的金标鼠抗人 NT-pro-BNP 抗体发生反应，形成金标抗原-抗体复合物。此复合物继续爬行，再与反应体中包被在醋酸纤维膜的抗体相遇，形成金标鼠抗人 NT-pro BNP 抗原-鼠抗人 IgG 抗体（包被在醋酸纤维膜上）的免疫复合物，在检测区有一条红色沉积反应线（T 线）出现。同时，过量的金标物继续爬升与反应膜包被的羊抗鼠 IgG 多抗结合，在反应区形成第二条红色沉积反应线（C 线）。这表明被检样品中有 NT-pro BNP 特异性抗原，为阳性结果。

(3) 无效：若反应后，在检测区无红色沉积对照线（C 线）出

现，说明试纸条整体反应系统工作不正常。

本发明采用单盲方法，通过临床考核对 N-末端 BNP 前蛋白（NT-pro BNP）诊断试剂(胶体金法)（以下简称 BNP 胶体金法诊断试剂）的灵敏度、特异性、精密性等做出评价。

试验对象： 2002 年 12 月至 2004 年 6 月心衰病例 151 例，其中男 71 例,女 80 例;年龄 29-73 岁。另选 294 例非心衰病例（包括正常人群及其它疾病的患者；其中男 145 例,女 149 例;年龄 21-79 岁）做阴性对照组。采集标本为血清、血浆或 EDTA 抗凝全血。标本未经热灭活处理, -20℃低温保存。

表 1 NT-proBNP 试验的特异性评价

	心衰组	非心衰组	合计
NT-proBNP 试验阳性	149	43	192
NT-proBNP 试验阴性	2	251	253
总 数	151	294	445

灵敏性（真阳性率）= 98.7%

特异度（真阴性率）=99.2%

假阳性率 =22.3%

假阴性率 =1.3%

阳性试验的预示值=77.6%

阴性试验的预示值=99.2%

考核试剂盒： NT-pro BNP 诊断试剂盒，吉林大学第一医院中

心实验室提供。以美国 Biosite 公司心梗/心衰酶标记测试仪检测作为参比结果。

表2 临床样本的两种BNP试剂盒平行对照测试

BNP参比试剂盒	NT-proBNP试剂盒		
	+	-	合计
+	174	8	182
-	18	245	263
合计	192	253	445

阳性符合率：95.60%

阴性符合率：93.16%

### 结果评价

结果显示: N-末端BNP前蛋白（NT-pro BNP）胶体金诊断试剂可用于快速检测人全血或血浆中反映心脏功能的NT-pro BNP特异性抗原。假阳性率和假阴性率都较低，具有较高的敏感性、特异性。该检测试剂阳性实验的预示值77.6%，提示阳性结果可能稍有误差；阴性实验预示值99.2%，表明阴性结果可用于心衰的排除诊断。

NT-pro BNP（胶体金法）检测试剂盒对充血性心力衰竭诊断的特异性达到85.4%，而灵敏度高98.7%。有较高的临床参考意义。

此外，NT-pro BNP（胶体金法）检测试剂盒具有下述优势：标本用量小且能检查全血标本，操作简便而无需任何仪器，能快速定性，单人份使用。特别适合基层医院和急诊使用；甚至可作为患者对心功能的自我监测。在日趋社区化的医疗保健体系中，该试剂盒可望获得很高的应用价值。

采用单盲方法，对145例心衰病例和240例非心衰病例（包括正常人群及其它疾病的患者）进行N-末端BNP前体蛋白（NT-pro BNP）胶体金检测试剂盒（以下简称BNP胶体金法诊断试剂）的测定。分析试剂盒的灵敏度、特异性。

检测标本为2002年12月至2004年4月收集的144名心衰病人血清、血浆或EDTA抗凝全血，采集后-20℃低温保存。另选240非心衰病例（包括正常人群及其它疾病的患者；其中男109,女131;年龄24-79岁）做阴性对照组。参比试剂为美国Biosite公司心梗/心衰测试板及测试仪。规格：25人份/盒；试剂注册号：20023210353；有效期：15个月。

### 考核结果

试验结果归纳后填写表1，试验数据按表2填写。

表1 评价试验可信性归纳表

	心衰组	非心衰组	合计
NT-proBNP试验阳性	144	36	180
NT-proBNP试验阴性	1	204	205
总 数	145	240	385

灵敏度（真阳性率）= 99.31%

特异度（真阴性率）= 85.01%

假阳性率 = 14.99%

假阴性率 = 0.69%

阳性试验的预示值=80.00%

阴性试验的预示值=99.51%

表2 临床样本的两种BNP试剂盒平行对照测试

BNP参比试剂盒	NT-proBNP长春博泰考核试剂盒		
	+	-	合计
+	165	4	169
-	15	201	216
合计	180	205	385

阳性符合率：97.63%

阴性和符合率：93.06%

### 结果评价

根据对该试剂盒临床考核结果认为该试剂盒能快速特异地检测人全血或血清中反映心脏功能的NT-pro BNP特异性抗原。具有高敏感性、特异性、假阳性率低、假阴性率低。阳性实验的预示值和阴性实验预测值均较高。尤其是其有很高的阴性预测值可用于心衰的排除诊断，有较高的临床意义。

NT-pro BNP（胶体金法）检测试剂盒对充血性心力衰竭诊断的特异性高（85.01%），灵敏度高99.31%。与美国Biosite公司相关产品阳性符合率为97.63%，阴性符合率为93.06%，具有较高的相关性。

### 典型病例报告

(1) 甘 XX 男 39 岁 2004-5-30 入院，住院号 406105。入院当时表现头面部和下肢水肿，轻度呼吸困难、心前区双期杂音、心率 97 次 / 分；尿常规检查蛋白（+）。取 200 微升指血，经离心后分离血浆；加入试剂盒样品槽中。20 分钟后检测区呈现 2 条阳性反应

的红色沉淀线。这一结果认定水肿并非肾脏病变所致。临床诊断：风湿性心脏病、二尖瓣狭窄及关闭不全、慢性充血性心力衰竭。经强心治疗后病情好转。

(2) 韩XX 女 79岁 2004-4-21入院，住院号403828。既往冠心病史17年，休克入院。本试剂盒检查为阳性结果；心电图左室前壁大面积心肌梗死。入院后虽经保护心肌和升血压治疗，但血压持续下降，2004-4-22死亡。心肌梗塞患者的本试剂盒和阳性参照检查大多为阴性，但阳性时病人常为重患，预后不良。

专利名称(译)	氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1763531A</a>	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN200410011165.5	申请日	2004-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学第一医院		
申请(专利权)人(译)	吉林大学第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学第一医院		
[标]发明人	方艳秋 谭岩 刘力华 段秀梅 许淑芬 姜艳芳 宋艳 刘玲丽 时阳		
发明人	方艳秋 谭岩 刘力华 段秀梅 许淑芬 姜艳芳 宋艳 刘玲丽 时阳		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/52 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒，涉及一种对血液进行检测的方法。本发明采用高亲和力特异性单克隆抗体，按照免疫化学方法和免疫层析技术的原理制备的氮末端脑利钠肽前体的免疫胶体金的快速定性检测盒。本发明具有灵敏度高、特异性好、符号显示结果、操作简便、无需特殊仪器设备、反应迅速、5~15分钟判读结果等特点。虽然NT pro - BNP和BNP检测的意义相同，但NT pro - BNP测定有2个优点，半衰期比BNP长而且测定水平的影响因素比BNP少。

表 1 NT-proBNP 试验的特异性评价

	心衰组	非心衰组	合计
NT-proBNP试验阳性	149	43	192
NT-proBNP试验阴性	2	251	253
总 数	151	294	445

灵敏度(真阳性率) = 98.7%

特异度(真阴性率) = 99.2%