



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107907679 A

(43)申请公布日 2018.04.13

(21)申请号 201711075148.1

(22)申请日 2017.11.06

(71)申请人 南京诺唯赞医疗科技有限公司

地址 210038 江苏省南京市经济技术开发区
科创路红枫科技园C2栋诺唯赞

(72)发明人 曹林 唐波 杨晨辰 朱婷婷

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 徐冬涛 杜静

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种免疫层析试纸条及其制作方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种免疫层析试纸条及其制作方法与应用,其特征在于,标记复合物上带有用于质控的连接有特殊标签的惰性蛋白,质控线上含有能与惰性蛋白上所带的特殊标签特异性结合的单克隆抗体。本发明的试纸条拥有独立的质控体系,使得测试结果具有更高的特异性和抗干扰性,可以有效避免人血样中自带抗体带来的非特异性反应,更有效的指示试纸条的有效性。

1. 一种免疫层析试纸条,其特征在于,标记复合物上带有用于质控的连接有特殊标签的惰性蛋白,质控线上含有能与惰性蛋白上所带的特殊标签特异性结合的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述惰性蛋白为牛血清白蛋白或人血清白蛋白;所述特殊标签为脱氧核糖核蛋白、转录终止/抗终止蛋白或编码6~10个氨基酸的亲水性多肽。

3. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫和背衬板,所述硝酸纤维素膜贴在所述背衬板上,所述结合垫与所述吸收垫分别搭接在硝酸纤维素膜的两端,所述样品垫搭接在结合垫的另一端;其中,所述结合垫喷涂有标记复合物,所述标记复合物带有能与待检物质结合的抗体或抗原,和带有特殊标签的惰性蛋白;所述硝酸纤维素膜上包括检测线与质控线,质控线上的标记抗体为能与惰性蛋白上所带的特殊标签结合的抗体。

4. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述带有特殊标签的惰性蛋白的质量为与待检物质结合的抗体或抗原的10%~100%,优选10%~60%,更优选25%。

5. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,结合垫与硝酸纤维素膜搭接的重叠宽度为1~3mm;吸收垫与硝酸纤维素膜搭接的重叠宽度为1~3mm;样品垫与结合垫搭接的重叠宽度为1~3mm。

6. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,当检测全血样本时,所述样品垫上设有滤血膜。

7. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,结合垫喷涂标记复合物的方法具体为:与待检物质结合的抗体或抗原,和带有特殊标签的惰性蛋白混合后偶联至固相载体上,得到标记复合物,将标记复合物固定于结合垫。

8. 根据权利要求7所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述固相载体为胶体金、磁性纳米材料、量子点或上转发光材料中的任意一种。

9. 一种免疫层析技术中的质控方法,其特征在于,通过带有特殊标签的惰性蛋白与能与所述惰性蛋白上所带的特殊标签结合的抗体发生反应并根据反应状况指示产品是否有效在控。

10. 权利要求1~8任一项所述的免疫层析试纸条或权利要求9所述的质控方法在免疫层析体外诊断试剂盒中的应用。

一种免疫层析试纸条及其制作方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,尤其涉及一种免疫层析试纸条及其制作方法与应用。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是近十年来兴起的一种快速诊断技术,它将传统的免疫标记技术与层析技术结合起来,其原理是以微孔滤膜作为固相载体,以待测液为流动相,利用液体的毛细作用,让待测物向前流动并在检测线发生免疫反应形成免疫复合物,最后通过肉眼或者相应仪器检测,实现对待测物的定性、半定量及定量分析。

[0003] 免疫层析技术具有检测快速、操作简单等优点,通常在加样后10-20分钟即可得到实验结果,且不需要复杂的检测设备,符合即时检测(POCT)的形势需求。

[0004] 目前常用的免疫层析试剂的方法学主要有胶体金法和荧光法,所用试纸条结构相似,主要包含五个部分:加样区(样品垫)、标记区(标记物结合垫)、显示区(硝酸纤维素膜)、吸水区(吸收垫)以及背衬板。其中,样品垫主要用于过滤样本中的颗粒、调节样本的 pH 以及结合样本中的干扰物等,若测试全血样本,常需要在这一部分添加滤血膜;标记物结合垫主要装载标记物如胶体金标记抗体、量子点标记抗体等并在有液体上行时稳定的释放这些标记物,并与待测物质结合;硝酸纤维素膜(NC膜)主要作用为固化抗原或抗体并且是免疫反应的检测区域,在试纸条制备时会在膜上划上检测线(T线)和质控线(C线);吸收垫用于控制层析反应中待检测样品持续流动的方向;背衬板则是免疫层析试纸条层叠结构的刚性支持。

[0005] 在免疫层析试纸条的这5个组成部分中,NC膜上的C线有着不可或缺的作用,其主要用于检测该试纸条是否在控,即试纸条仍然是有效可使用的。在中国专利 CN104101708B 和CN104237518B中均有提及,质控线上的包被物为针对所述待测物的标记抗体的二抗,这是在现有的层析技术中常用于C线包被的物质,即待测物标记抗体的二抗,若试纸条有效在控,不论待测样本中是否含有待测物,只要液体上行至C线,包被二抗就会和标记抗体发生反应并显色。另一种常用于C线的包被物质为待测物质或者待测物质的重组蛋白,由于标记物垫上的标记抗体都是过量,因此若试纸条有效在控,那么过量的游离标记抗体就会在C线被捕获,与C线上的包被物发生抗原抗体反应并显色。但是,这两种方法都存在一定的弊端:(1)使用二抗作为C线包被物时,由于现在常用的标记物抗体大多为鼠源抗体,因此常用的二抗一般为抗鼠的IgG,但是在试纸条制备时常会加入一些阻断剂以消除待检人血液样本中异嗜性抗体带来的干扰,而阻断剂一般有两种,一种是鼠源IgG,这就会在检测时与质控线的二抗结合而对检测结果造成干扰,另一种是非IgG阻断剂,但这种阻断剂技术壁垒较高,价格昂贵,并不适合诊断试剂生产的大批量使用;(2)使用待测物质或者待测物质的重组蛋白作为C线包被物时,保证了质控线显色结果的特异性与准确性,但是却会加大试剂研发的难度,众所周知的抗原的研发过程难度系数大、研发周期长且价格昂贵,若每个检测项目均需要研发相应抗原,那么不仅会增加试剂研发的周期也会提高试剂开发的成本,这在实际生产中是很难被接受的。

[0006] 因此,基于上述事实,能够提供一种既能保证质控准确性与特异性又能降低生产成本的免疫层析试纸条的制备方法,是本领域研发人员亟待解决的问题,同时对于免疫层析技术的发展也有着重要的意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种免疫层析试纸条及其制备方法,能够有效保证质控线(C线)指示试纸条有效在控的准确性及特异性,本发明的另一目的是提供这种试纸条在免疫层析体外诊断试剂盒中的应用。

[0008] 本发明提供了一种免疫层析试纸条,其特征在于,标记复合物上带有用于质控的连接有特殊标签的惰性蛋白,质控线上含有能与惰性蛋白上所带的特殊标签特异性结合的单克隆抗体。本发明的试纸条拥有独立的质控体系,使得测试结果具有更高的特异性和抗干扰性,可以有效避免人血样中自带抗体带来的非特异性反应,更有效的指示试纸条的有效性。

[0009] 进一步的,本发明所述的惰性蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或人血清白蛋白(HSA)。

[0010] 进一步的,本发明所述的特殊标签为脱氧核糖核蛋白(DNP)、转录终止/抗终止蛋白(Nusa)或编码6~10个氨基酸的亲水性多肽(FIag)。本发明所选用的特殊标签,在人体内无相似序列或蛋白,在检测时不会造成非特异性反应,抗干扰能力强,准确度高。

[0011] 进一步的,本发明还提供一种更为具体的试剂条结构,试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫和背衬板,所述硝酸纤维素膜贴在所述背衬板上,所述结合垫与所述吸收垫分别搭接在硝酸纤维素膜的两端,所述样品垫搭接在结合垫的另一端;其中,所述结合垫喷涂有标记复合物,所述标记复合物带有能与待检物质结合的抗体或抗原,和带有特殊标签的惰性蛋白;所述硝酸纤维素膜上包括检测线(T线)与质控线(C线),质控线上的标记抗体为能与惰性蛋白上所带的特殊标签结合的抗体。

[0012] 本发明在标记复合物上标记能与待检物质结合的抗体或者抗原外,再标记一中带有特殊标签的惰性蛋白,同时在硝酸纤维素膜上C线处标记特异性针对该标签的抗体,通过这种方法,既保证了C线处反应的特异性,同时这一方法的使用不受待检物质的限制,只需经过一次研发,就可以适用于针对不同检测项目的免疫层析试剂中。

[0013] 进一步的,本发明所述带有特殊标签的惰性蛋白的质量为与待检物质结合的抗体或抗原的10%~100%,优选10%~60%,更优选25%。

[0014] 进一步的,所述结合垫与硝酸纤维素膜搭接的重叠宽度为1~3mm;吸收垫与硝酸纤维素膜搭接的重叠宽度为1~3mm;样品垫与结合垫搭接的重叠宽度为1~3mm。在此范围内,可以降低试纸条测试结果的CV,保证测试准确性与稳定性。

[0015] 当检测全血样本时,本发明所述样品垫上可以设有滤血膜。

[0016] 本发明所述所述结合垫喷涂标记复合物的方法具体可以为:与待检物质结合的抗体或抗原,和带有特殊标签的惰性蛋白混合后偶联至固相载体上,得到标记复合物,将标记复合物固定于结合垫。

[0017] 进一步的,所述固相载体为胶体金、磁性纳米材料、量子点、上转发光材料或者其他金属粒子中的任意一种。

[0018] 本发明还提供一种免疫层析技术中的质控方法,其特征在于,通过带有特殊标签

的惰性蛋白与能与所述惰性蛋白上所带的特殊标签结合的抗体发生反应并根据反应状况指示产品是否有效在控。

[0019] 本发明还提供上述的免疫层析试纸条或质控方法在免疫层析体外诊断试剂盒中的应用,特别是在量子点免疫荧光检测试剂盒中的应用。

[0020] 本发明还提供一种所述试纸条的制备方法,具体采取的技术方案如下:

[0021] (1) 将与待检物质结合的抗体或抗原与带有特殊标签的惰性蛋白按照一定比例混合,并将混合后的蛋白偶联至固相载体上,得到标记复合物;所述的带有特殊标签的惰性蛋白的用量可以是与待检物质结合的抗体或抗原用量的10%~100%;

[0022] (2) 将步骤(1)制备所得的标记复合物固定于结合垫;

[0023] (3) 在硝酸纤维素膜上制作检测线(T线)及质控线(C线),其中质控线上包被的蛋白为能与带有特殊标签的惰性蛋白上的标签特异性结合的抗体;

[0024] (4) 制作样品垫,若需要测试全血样本,样品垫上可增加滤血膜;

[0025] (5) 在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、吸收垫、结合垫及样品垫,其中硝酸纤维素膜最靠近背衬板,结合垫与吸收垫分别搭接在硝酸纤维素膜的两端,样品垫搭接在结合垫的另一端,各相邻垫之间相互重叠,重叠宽度约为1~3mm。

[0026] 与现有技术相比,本发明具有如下优势:

[0027] 1、使用本发明提供的免疫层析试纸条制备方法制备所得的试纸条,其独立的质控体系使得测试结果具有更高的特异性和抗干扰性,可以有效的避免由于人血样本中自带的抗体带来的非特异性反应,并更有效的指示试纸条的有效性。

[0028] 2、本发明中使用的蛋白标签均为非人源蛋白,在人体内无相似序列或者蛋白,并且这些标签均具有已商业化的高特异性抗体,在检测时不会造成非特异性反应,抗干扰能力强,准确度高。

[0029] 3、试纸条制备时,C线包被蛋白和包被工艺仅需要经过一次研发,即可应用于不同项目,可以很大程度上降低试纸条的研发成本。

附图说明

[0030] 图1为发明所述试纸条的结构示意图;

[0031] 图2试纸条的校准曲线。

图3试纸条的校准曲线。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图通过具体实施方式的详细描述来进一步阐明本发明,以使本发明的优点和特征能更易于被本领域技术人员理解,从而对本发明的保护范围做出更为清楚明确的界定,但并不是对本发明的限制,仅作示例说明。下述实施例中未注明具体条件的实验方法,均按照常规条件,或者按照制造厂商所建议的条件执行。

[0033] 实施例1脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)量子点免疫荧光检测试剂盒的制备

[0034] 1、实施例中所用关键材料信息

[0035] 标记物结合垫:上海捷宁生物科技有限公司

[0036] 硝酸纤维素膜:MiIipore公司;

- [0037] Lp-PLA2单克隆抗体(L-1#,L-2#):南京诺唯赞生物科技有限公司;
- [0038] DNP标记BSA(DNP-BSA):南京诺唯赞生物科技有限公司;
- [0039] 抗DNP单克隆抗体:南京诺唯赞生物科技有限公司;
- [0040] 羧基量子点(QDs):南京诺唯赞生物科技有限公司。
- [0041] 2、QDs偶联L-1#抗体、DNP-BSA
- [0042] (1) QDs活化:取50 μ I固含量为10%的QDs原液,用50mM硼酸-硼砂缓冲液(pH 9.0)稀释至500 μ I,混匀后加入5 μ I EDC溶液(50mg/mI),5 μ I NHS溶液(75mg/mI),混匀后室温(25 $^{\circ}$ C)搅拌反应30分钟,反应完成离心清洗1次,并用500 μ I的20mM HEPES 缓冲液(pH 7.0)重悬,超声1分钟;
- [0043] (2) L-1#抗体、DNP-BSA偶联:各取75 μ g的L-1#抗体与DNP-BSA,混匀后添加至步骤(1)中的QDs重悬液中,混匀后室温搅拌反应1小时;
- [0044] (3) 封闭:向步骤(2)完成反应后的体系中加入500 μ I的封闭液(5%BSA),混匀后室温搅拌反应30分钟,反应完成后离心清洗1次,并用500 μ I的标记物储存液(10 mM MOPS, 15%蔗糖,1%吐温20,pH 8.0)重悬,超声1分钟,保存于2~8 $^{\circ}$ C。
- [0045] 3、结合垫的处理及标记复合物的固定
- [0046] (1) 将结合垫裁成8mm的宽度;
- [0047] (2) 将结合垫浸泡在含有5%海藻糖、1%吐温20的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中(pH8.0, 20mM)5分钟,室温晾干;
- [0048] (3) 晾干后的结合垫置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时;
- [0049] (4) 使用喷金仪以5 μ I/cm的喷量将步骤2中制备完成的标记复合物固定于结合垫上,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。
- [0050] 4、硝酸纤维素膜上T线与C线的固定
- [0051] (1) 用含有5%蔗糖的50mM HEPES (pH 7.5)缓冲液将L-2#抗体及抗DNP多克隆抗体分别稀释至1mg/mI;
- [0052] (2) 用Bio Dot喷膜机在硝酸纤维素膜上分别包被不同的抗体作为T线和C线。T线上喷膜1mg/mI的L-2#抗体,C线上喷膜1mg/mI的抗DNP多抗,C线和T线间隔8mm;
- [0053] (3) 喷膜完成后将硝酸纤维素膜置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。
- [0054] 5、样品垫的处理
- [0055] 将样品垫浸泡在含有5%海藻糖、1%吐温20、0.5%BSA的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中 (pH8.0,20mM)5分钟,室温晾干,并将晾干后的结合物垫置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时;
- [0056] 6、试纸条的组装
- [0057] 如图1所示,在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜,在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、吸收垫、结合垫及样品垫,各相邻垫之间相互重叠,重叠宽度约为1.5mm;其中硝酸纤维素膜最靠近背衬板,结合垫与吸收垫分别搭接在硝酸纤维素膜的两端,样品垫搭接在结合垫的另一端。
- [0058] 将组装好的试纸条用自动斩切机进行切割,每条宽度为3.5mm,并将切割完成的试纸条与干燥剂仪器装入铝箔袋内密封保存,并包装为试剂盒,下称试剂盒1。
- [0059] 7、现有技术制备Lp-PLA2量子点免疫荧光检测试纸条

[0060] (1) QDs偶联L-1#抗体:按照步骤2(1)中的方法活化QDs,取75 μ g的L-1# 抗体添加至活化后的QDs重悬液中,混匀并室温搅拌反应1小时;结束反应后按照步骤 2(3)进行封闭处理;

[0061] (2) 结合垫的处理及标记复合物的固定:将结合垫裁成8mm的宽度后浸泡在含有5%海藻糖、1%吐温20以及0.2mg/mL阻断剂(鼠源IgG)的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中(pH8.0,20mM)5分钟,室温晾干后并按照步骤3(3)和步骤3(4)进行处理。

[0062] (3) 硝酸纤维素膜上T线与C线的固定:用含有5%蔗糖的50mM HEPES(pH 7.5) 缓冲液将L-2#抗体及羊抗鼠单克隆抗体分别稀释至1mg/mL;并按照步骤4(2)和步骤4(3)完成T、C线的固定。

[0063] (4) 按照步骤5和步骤6完成试剂盒制备,下称试剂盒2。

[0064] 实施例2脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)量子点免疫荧光检测试剂盒的检测

[0065] 1、试纸条定标及校准曲线绘制

[0066] 取实施例1制备的试剂盒1和试剂盒2各5个试纸条,分别将5个浓度()的校准品加入试纸条的样品垫上,每个浓度点进行一次重复测试,加样量为120 μ L,反应15分钟后在全自动免疫荧光分析仪上检测,以校准品浓度值为X轴,每个点测试所得2次信号值平均值为Y轴,绘制标准曲线,如图2、3。

[0067] 2、临床样本检测

[0068] 收集95例已测试Lp-PLA2项目的患者血清,诊断方法学为酶法试剂盒,来源为南京鼓楼医院;

[0069] 用Lp-PLA2质量法检测试剂盒(购自Diazyme,酶联免疫吸附法,本试验中称试剂盒A)及实施例1中制得的试剂盒1和和试剂盒2同时对这95例样本进行检测比对。用四格表统计结果如表1和表2:

[0070] 特异性=真阴性/阴性总数 \times 100%

[0071] 敏感性=真阳性/阳性总数 \times 100%

[0072] 表1试剂盒1统计结果

		试剂盒 A			
		阴性	阳性	总计	
[0073]	试剂盒 1	阴性	49	0	49
		阳性	0	46	46
		总计	49	46	95

[0074] 表2试剂盒2统计结果

		试剂盒 A			
		阴性	阳性	总计	
[0075]	试剂盒 2	阴性	44	0	44
		阳性	5	46	51
		总计	49	46	95

[0076] 表1结果表明,试剂盒1的阴阳符合率为100%,准确度高,抗干扰能力强。表2结果表明,试剂盒2由于制备技术的弊端导致了一定程度上的假阳性产生,敏感性仅有 90.2%。

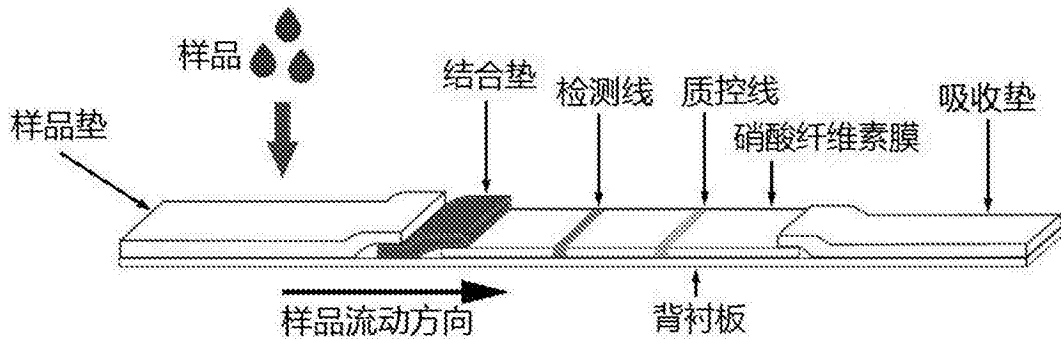


图1

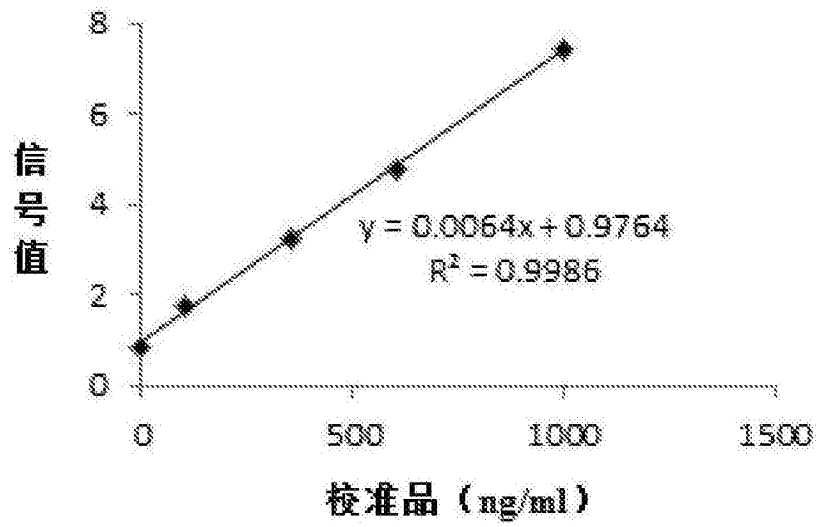


图2

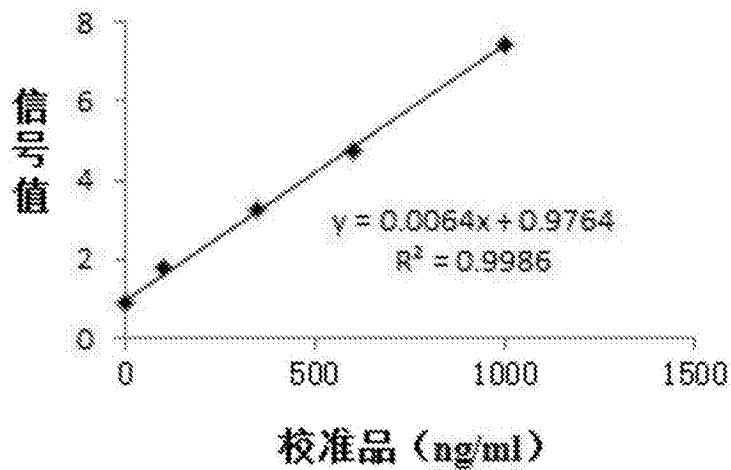


图3

专利名称(译)	一种免疫层析试纸条及其制作方法与应用		
公开(公告)号	CN107907679A	公开(公告)日	2018-04-13
申请号	CN2017111075148.1	申请日	2017-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	南京诺唯赞医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京诺唯赞医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京诺唯赞医疗科技有限公司		
[标]发明人	曹林 唐波 杨晨辰 朱婷婷		
发明人	曹林 唐波 杨晨辰 朱婷婷		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	杜静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫层析试纸条及其制作方法与应用，其特征在于，标记复合物上带有用于质控的连接有特殊标签的惰性蛋白，质控线上含有能与惰性蛋白上所带的特殊标签特异性结合的单克隆抗体。本发明的试纸条拥有独立的质控体系，使得测试结果具有更高的特异性和抗干扰性，可以有效避免人血样中自带抗体带来的非特异性反应，更有效的指示试纸条的有效性。

		试剂盒 A		
		阴性	阳性	总计
试剂盒 1	阴性	49	0	49
	阳性	0	46	46
	总计	49	46	95