



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101609093 B

(45) 授权公告日 2013.05.15

(21) 申请号 200910060027.9

(22) 申请日 2009.07.17

(73) 专利权人 田伏洲

地址 610083 四川省成都市外北天回镇成都
军区总医院全军普外中心

专利权人 任建东
龚加庆

(72) 发明人 田伏洲 任建东 龚加庆

(74) 专利代理机构 成都立信专利事务所有限公
司 51100

代理人 冯忠亮

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101067627 A, 2007.11.07, 说明书第1页
第5,6段,第3页第5段,第7页第5段.

US 4948723 A, 1990.08.14, 说明书第4栏第
22-42, 54-58行,第5栏第3-5, 34-36行,第5栏
第53行至第6栏第1行.

CN 1746675 A, 2006.03.15, 说明书第1页4
段,第2页第4段,第4页第2段,第5页第18段.

Hurley PR, Cook A, Jehanli A,
Austen BM, Hermon-Taylor J. Development
of radioimmunoassays for free
tetra-L-aspartyl-L-lysine trypsinogen
activation peptides (TAP). 《Journal of
Immunological Methods》.1988, 第111卷(第2
期), 195-203.

Tenner S et al..Urinary trypsinogen
activation peptide (TAP) predicts severity
in patients with acute pancreatitis. 《Int J
Pancreatol》.1997, 第21卷(第2期), 105-110.

JP Neoptolemos et al..Early prediction
of severity in acute pancreatitis by
urinary trypsinogen activation peptide: a
multicentre study. 《The Lancet》.2000, 第355
卷(第9219期), 1955-1960.

审查员 胡晓佳

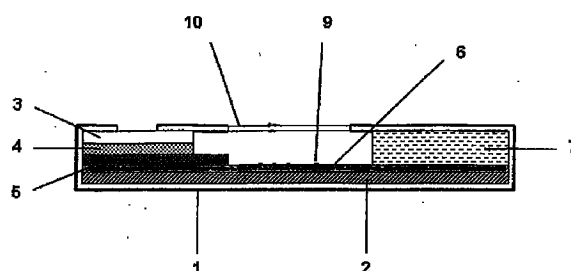
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡及
其测试方法

(57) 摘要

本发明为快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的
测试卡及其测试方法,解决已有诊断方法准确度
不高以及测试方法耗时长,装置成本高,操作不便
的问题。层析膜上有测试线和质控线,测试线为包
被的 TAP 多克隆抗体,质控线为包被的兔抗小鼠
免疫球蛋白抗体, TAP 多克隆抗体和兔抗小鼠免
疫球蛋白抗体的浓度范围为 1-100nmol/L。



1. 快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡,其特征在于层析膜上有测试线和质控线,测试线为包被的胰蛋白酶原激活肽多克隆抗体,质控线为包被的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体,胰蛋白酶原激活肽多克隆抗体和兔抗小鼠免疫球蛋白抗体的浓度范围为 1-100nmol/L,

所述的测试线为三条,线的间距为 3-6mm,第 1-3 条测试线的胰蛋白酶原激活肽多克隆抗体的浓度依次为 1-10nmol/L、10-50nmol/L,50-100nmol/L,所述的质控线为 1 条,与第 3 条测试线之间的间距为 3-8mm,胰蛋白酶原激活肽多克隆抗体测试线的制备方法如下:

(1) 合成胰蛋白酶原激活肽,

(2) 制备胶体金溶胶,

(3) 制备胰蛋白酶原激活肽单克隆抗体,

a. 采用常规的戊二醛交联法,将胰蛋白酶原激活肽分别与血蓝蛋白 KLH 和牛血清蛋白 BSA 交联制成胰蛋白酶原激活肽-KLH 偶联物和胰蛋白酶原激活肽-BSA 偶联物,

b. 用胰蛋白酶原激活肽-KLH 偶联物免疫 Balb/c 小鼠,

c. 取免疫小鼠脾细胞和商品 SP2/0 骨髓瘤细胞在聚乙二醇 PEG-4000 作用下,按照常规方法进行细胞融合,生成杂交瘤细胞株悬液,

d. 采用间接酶联免疫吸附法筛选抗胰蛋白酶原激活肽的杂交瘤细胞株,

e. 将杂交瘤细胞株接种于用福氏不完全佐剂预处理 1 周后的 Balb/c 小鼠腹腔内,收集腹水按照单克隆抗体亚类的不同采用辛酸法/硫酸铵法或聚乙二醇 PEG 沉淀法纯化腹水即收获胰蛋白酶原激活肽单克隆抗体,

(4) 将胰蛋白酶原激活肽单克隆抗体用磷酸盐缓冲液溶解作为母液加入胶体金溶胶,再加入聚乙二醇 PEG-10000 共反应后去上清液后用磷酸盐缓冲液复溶即制成胶体金标记的胰蛋白酶原激活肽单克隆抗体,备用,

(5) 以合成的胰蛋白酶原激活肽作为抗原,用磷酸盐缓冲液制备溶液与福氏完全佐剂混合后在家兔的不同部位进行皮下注射,重复多次后收集家兔血液,去除血凝块后通过离心机收集含多克隆抗体的抗血清,将抗血清纯化后即得胰蛋白酶原激活肽多克隆抗体溶液,将胰蛋白酶原激活肽多克隆抗体溶液制成不同浓度后包被在层析膜上即成测试线,所述的测试卡的结构如下:层析膜(6)位于外壳(1)内,下有底衬(2),层析膜(6)上的测试线和质控线面向外壳上的透明观察窗(10),测试线左侧有结合垫(5)与样品垫(4)连接,样品垫(4)上有过滤层(3),过滤层(3)上的外壳上有样品孔(11),质控线的右侧有吸水垫(7),结合垫(5):由玻璃纤维纸制成,用 pH7.0-8.4 的 PBS 浸泡 2min 后取出,80℃以下烘干,冷却后浸入到 10-100nmol/L 浓度范围的胶体金标记的胰蛋白酶原激活肽单克隆抗体溶液中,10min 后取出在室温下干燥。

2. 根据权利要求 1 所述的测试卡,其特征在于兔抗小鼠免疫球蛋白抗体质控线的制备方法如下:

将 Balb/c 小鼠的免疫球蛋白作为抗原,对家兔不同部位进行皮下注射,重复多次后收集家兔血液,离心收集抗血清,将纯化后的抗体溶液包被在层析膜上即成质控线。

快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡及其测试方法

技术领域：

[0001] 本发明与用免疫学诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的装置和方法有关。

背景技术：

[0002] 胰腺创伤和急性胰腺炎是临床上常见的急危重病,若不及时治疗往往危及患者生命,因此对胰腺创伤和急性胰腺炎的及时诊断对于挽救患者的生命非常重要。目前胰腺创伤和急性胰腺炎的常规诊断主要是测定腹腔渗出液及血液中的淀粉酶活性,以其活性的急剧升高作为诊断依据,但该方法的准确性欠佳,往往造成漏诊和误诊而危及患者生命。除此之外临床上还通过 APACHE II 评分对胰腺创伤和急性胰腺炎进行诊断,但该评分方法过于繁琐,若评分不足则容易导致患者病情延误;若评分过高则容易导致治疗过度,因此该评分方法也不能满足对胰腺创伤和急性胰腺炎的快速诊断的要求。近年来,随着研究的深入,发现在胰腺创伤和急性胰腺炎发生时,其关键事件——胰蛋白酶原激活时产生一个小分子肽,叫做胰蛋白酶原激活肽(TAP),该分子在腹水、血液以及尿液中含量的升高与胰腺创伤和急性胰腺炎的发生密切相关。通过 TAP 含量测定不仅可以较为准确地诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的病情,还可以对患者预后进行有效评估,因此有研究者开始把该分子作为胰腺创伤和急性胰腺炎的特异性诊断物并取得良好的效果。目前对 TAP 的检测方法主要是酶联免疫吸附法(ELISA),但该方法耗时较长(4~5 小时),还需要特定的吸光度检测仪器和专业人员操作,另外价格也较昂贵,因此不能满足对病情快速诊断的要求,更不适合在基层医疗机构使用。

发明内容：

[0003] 本发明的目的是提供一种检测方便、快速,灵敏度高,成本低廉,适合现场使用的快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡及其测试方法。

[0004] 本发明的目的是这样实现的：

[0005] 本发明快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡,层析膜上有测试线和质控线,测试线为包被的 TAP 多克隆抗体,质控线为包被的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体,TAP 多克隆抗体和兔抗小鼠免疫球蛋白抗体的浓度范围为 1-100nmol/L。

[0006] 测试线为三条,线的间距为 3-6mm,第 1-3 条测试线的 TAP 多克隆抗体的浓度依次为 1-10nmol/L、10-50nmol/L、50-100nmol/L,质控线为 1 条,与第 3 条测试线之间的间距为 3-8mm。

[0007] 层析膜 6 位于外壳 1 内,下有底衬 2,层析膜 6 上的测试线和质控线面向外壳上的透明观察窗 10,测试线左侧有结合垫 5 与样品垫 4 连接,样品垫 4 上有过滤层 3,过滤层 3 上的外壳上有样品孔 11,质控线的左侧有吸水垫 7。

[0008] 测试卡,TAP 多克隆抗体测试线的制备方法如下：

[0009] (1) 合成 TAP,

[0010] (2) 制备胶体金溶胶,

[0011] (3) 制备 TAP 单克隆抗体,

[0012] a. 采用常规的戊二醛交联法,将 TAP 分别与血蓝蛋白和牛血清白蛋白交联制成 TPA-KLH 偶联物和 TAP-BSA 偶联物,

[0013] b. 用 TAP-KLH 偶联物免疫 Balb/c 小鼠,

[0014] c. 取免疫小鼠脾细胞和商品 SP2/0 骨髓瘤细胞在聚乙二醇 PEG-4000 作用下,按照常规方法进行细胞融合,生成杂交瘤细胞株悬液,

[0015] d. 采用间接酶联免疫吸附法筛选抗 TAP 的杂交瘤细胞株,

[0016] e. 将杂交瘤细胞株接种于用福氏不完全佐剂预处理 1 周后的 Balb/c 小鼠腹腔内,收集腹水按照单克隆抗体亚类的不同采用辛酸法或硫酸铵法或聚乙二醇 PEG 沉淀法纯化腹水即收获 TAP 单克隆抗体。

[0017] (4) 将 TAP 单克隆抗体用磷酸盐缓冲液溶解作为母液加入胶体金溶胶,再加入聚乙二醇 PEG-10000 共反应后去上清液后再用磷酸盐缓冲液复溶即制成胶体金标记的 TAP 单克隆抗体,

[0018] (5) 以合成的 TAP 作为抗原,用磷酸盐缓冲液制备溶液与福氏完全佐剂混合后在家兔的不同部位进行皮下注射,重复多次后收集家兔血液,去除血凝块后通过离心机收集含多克隆抗体的抗血清,将抗血清纯化后即得 TAP 多克隆抗体溶液,将 TAP 多克隆抗体溶液制成不同浓度后包被在层析膜上即成测试线。

[0019] 测试卡,其特征在于兔抗小鼠免疫球蛋白抗体质控线的制备方法如下:

[0020] 将 Balb/c 小鼠的免疫球蛋白作为抗原,对家兔不同部位进行皮下注射,重复多次后收集家兔血液,离心收集抗血清,将纯化后的抗体溶液包被在层析膜上即成质控线。

[0021] 测试卡的测试方法,包括如下步骤:

[0022] 将病人体液标本直接滴入样品孔中放置 10min 后观察,若无测试线显色,诊断为无适用症发生;若仅第一条测试线显色,诊断为可能发生适用症;若第 1、2 条测试线显色,诊断为极有可能发生适用症;若三条测试线均显色,诊断为重症适用症;若质控线无显色,表明测试卡失效。

[0023] 本发明测试卡属于一种新的特异性诊断试剂,主要用于胰腺创伤和急性胰腺炎病情的快速诊断。该测试卡主要利用免疫学中抗原抗体能特异结合的原理,利用成熟的胶体金免疫层析技术,以人源 TAP 作为抗原,制备检测 TAP 含量的测试卡,可快速半定量检测病人尿液和腹腔渗出液中的 TAP 来反映胰腺创伤和急性胰腺炎的病情发展程度,整个测试过程只需 10 ~ 15 分钟,且具有灵敏度高、特异性强、价格低廉及不需要任何辅助仪器设备等优点,非常适合在基层医疗机构现场使用。

附图说明:

[0024] 图 1 为本发明测试卡主视图。

[0025] 图 2 为图 1 的 A-A 剖视图。

具体实施方式:

[0026] 测试卡的结构组成及处理

[0027] 本测试卡由塑料外壳 1 和试纸条组成,其长度为 80 ~ 110mm,宽度为 20 ~ 35mm,

其中塑料外壳正面有样品孔 11 和结果观察窗 10 便于加样和观察结果,尾部的手持区便于操作时手持,具体结构见图 1。试纸条由多层材料组成,主要包括样品过滤层 3、样品垫 4、结合垫 5、层析膜 6(膜上有 3 条测试线和 1 条质控线)、吸水垫 7 和底衬 2。试纸条各组成部分的选择材料及处理方法如下:

[0028] (1) 样品过滤层:由 3 ~ 5 层滤纸组成

[0029] (2) 样品垫:由玻璃纤维纸制成,用 pH 7.0 ~ 8.4 的 PBS 浸泡 2min 后取出,80℃ 以下烘干或者其它方式干燥。

[0030] (3) 结合垫:由玻璃纤维纸制成,用 pH 7.0 ~ 8.4 的 PBS 浸泡 2min 后取出,80℃ 以下烘干,冷却后浸入到 10 ~ 100nmol/L 浓度范围的胶体金标记的 TAP 单克隆抗体溶液中,10min 后取出在室温下干燥 (4) 层析膜:材料为硝酸纤维素膜 (NC 膜),用 0.8% (g/ml) 的戊二醛溶液浸泡 30min,取出,室温下干燥,在上面包被 3 条不同浓度的 TAP 多克隆抗体线作为检测线,同时包被 1 条兔抗小鼠免疫球蛋白抗体线作为质控线。

[0031] 吸水垫:由 3 ~ 5 层滤纸或者吸水纸组成

[0032] (5) 底衬:为一面涂有不干胶的非吸水材料,如 PVC 板

[0033] 在 3 条检测线上采用喷涂机 (市售) 包被 TAP 多克隆抗体,3 条检测线上包被物的浓度依次递增,其浓度范围分别是 1 ~ 10nmol/L、10 ~ 50nmol/L、50 ~ 100nmol/L;质控线包被范围为 1 ~ 100nmol/L 的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体。3 条检测线之间的距离为 3 ~ 6mm,第 3 条检测线和质控线之间的距离为 3 ~ 8mm。当 3 条检测线任意一条呈现红色时,表示样品为阳性;当检测线第 1 条显色,第 2、3 条检测线不显色时,表示待测样品中 TAP 的含量大于 2nmol/L;当第 1、2 条检测线显色,第 3 条检测线不显色时,表明待测样品中的 TAP 含量大于 25nmol/L;当 3 条检测线均显色时,表示待测样品中 TAP 含量大于 90nmol/L;质控线始终显色,若不显色表明试纸条失效。

[0034] 测试原理

[0035] 本发明所依据的原理是:待检样品中的 TAP 与结合垫上的胶体金标记的 TAP 单克隆抗体特异性结合,结合物以及被样品中的水份溶解的胶体金标记的单克隆抗体在层析作用的推动下向试纸另一端移动,当移动至包被 TAP 多克隆抗体的检测线时,形成双抗体夹心复合物并聚集显色,而游离的胶体金标记的 TAP 单克隆抗体在移动到质控线时与兔抗小鼠免疫球蛋白抗体捕获并显色以表明测试卡的有效性。

[0036] 应用实例

[0037] (一) 配制不同浓度的样品液进行检测

[0038] 1、用磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L, pH 7.0 ~ 7.5) 配制浓度为 1nmol/L 的 TAP 溶液作为待测样品液,取 2 ~ 3 滴直接滴在测试卡的样品孔上,放置 10min 后观察,质控线显色而检测线无明显显色带出现,表明样品中 TAP 含量低于 2nmol/L。

[0039] 2、用磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L, pH 7.0 ~ 7.5) 配制浓度为 10nmol/L 的 TAP 溶液作为待测样品液,取 2 ~ 3 滴直接滴在测试卡的样品孔上,放置 10min 后观察,第 1 条检测线和质控线均显色。表明样品中 TAP 含量在 2 ~ 25nmol/L 之间。

[0040] 3、用磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L, pH 7.0 ~ 7.5) 配制浓度为 50nmol/L 的 TAP 溶液作为待测样品液,取 2 ~ 3 滴直接滴在测试卡的样品孔上,放置 10min 后观察,第 1、2 条检测线和质控线均显色,表明样品中 TAP 含量在 25 ~ 90nmol/L 之间。

[0041] 4、用磷酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH 7.0 ~ 7.5)配制浓度为100nmol/L的TAP溶液作为待测样品液,取2~3滴直接滴在测试卡的样品孔上,放置10min后观察,3条检测线和质控线均显色,表明样品中TAP大于90nmol/L。

[0042] (二) 干扰测定

[0043] 将正常人的尿液以及用pH 7.0 ~ 8.4的磷酸盐缓冲液配制成浓度为10、50、100nmol/L的人胰蛋白酶、人蛋白酶原-1、人蛋白酶原-2、人血清白蛋白、人免疫球蛋白溶液,用测试卡进行检测,结果均为阴性,表明上述物质均不对测试造成干扰。

[0044] (三) 病人标本检测

[0045] 1、尿液标本:取2~3滴病人尿液直接滴在测试卡的样品孔上,放置10min后观察,若无检测线显色,表明尿液中的TAP含量低于2nmol/L,诊断为无胰腺创伤和急性胰腺炎发生;若仅第1条检测线显色,表明尿液中的TAP含量在2~25nmol/L之间,诊断为可能发生胰腺创伤和急性胰腺炎;若仅第1、2条检测线显色,表明尿液中的TAP含量在25~90nmol/L之间,诊断为极有可能发生胰腺创伤和急性胰腺炎;若3条检测线均显色,表明尿液中的TAP含量高于90nmol/L,诊断为重症胰腺创伤和急性胰腺炎;若质控线无显色,表明测试卡失效。

[0046] 2、腹腔渗出液标本:取2~3滴病人腹腔渗出液直接滴在测试卡的样品孔上,放置10min后观察,若无检测线显色,表明腹腔渗出液中的TAP含量低于2nmol/L,诊断为无胰腺创伤和急性胰腺炎发生;若仅第1条检测线显色,表明腹腔渗出液中的TAP含量在2~25nmol/L之间,诊断为可能发生胰腺创伤和急性胰腺炎;若仅第1、2条检测线显色,表明腹腔渗出液中的TAP含量在25~90nmol/L之间,诊断为极有可能发生胰腺创伤和急性胰腺炎;若3条检测线均显色,表明腹腔渗出液中的TAP含量高于90nmol/L,诊断为重症胰腺创伤和急性胰腺炎;若质控线无显色,表明测试卡失效。

[0047] 测试线和质抗线的抗体制备方法如下:

[0048] 1、人源TAP的合成

[0049] 采用多肽自动合成仪(美国BECKMAN公司生产)合成TAP分子Ala-Pro-Phe-Asp-Asp-Asp-Lys(APFDDDDK)。

[0050] 2、胶体金溶胶的制备将氯金酸(HAuCl_4)用去离子水配制成浓度为1%(g/ml)的溶液,再用去离子水稀释成0.01%的工作液,加热至沸腾,再加入15ml的1%(g/ml)柠檬酸三钠水溶液,继续加热至出现透明的橙红色为止,此溶液即为胶体金溶胶。

[0051] 3、TAP单克隆抗体的制备

[0052] (1)TAP偶联物的制备:采用常规的戊二醛交联法,将TAP与血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)交联,具体方法为:将5mg合成的TAP分别加入到7mg的KLH和BSA中,边振荡边缓慢加入1ml新鲜配制的0.3%(g/ml)戊二醛溶液,室温下反应2h,以pH8.5硼酸缓冲液透析过夜即得。制成的TAP-KLH偶联物和TAP-BSA偶联物分别用于小鼠免疫和单克隆抗体筛选;

[0053] (2)动物免疫:用TAP-KLH偶联物免疫6周龄的Balb/C小鼠,首先用300 μg 的TAP-KLH偶联物与福氏完全佐剂等量混合成的油包水乳化液进行腹腔注射。之后每隔4周,用同样剂量的TAP-KLH偶联物与福氏不完全佐剂等量混合进行腹腔注射。如此共免疫4次,最后1次腹腔和尾静脉各注射TAP-KLH偶联物150 μg 进行加强免疫,3天后取脾细胞进行

细胞融合；

[0054] (3) 杂交瘤细胞系的建立：取免疫小鼠脾细胞和购买的 SP2/0 骨髓瘤细胞在聚乙二醇 PEG-4000（市售）作用下，按照常规方法进行细胞融合。用市售的 HAT 培养基（即含有黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷的细胞培养基）进行培养，1 周后换用市售采用 HT 培养基（即含有次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷的细胞培养基）培养；

[0055] (4) TAP 单克隆抗体的筛选：采用间接酶联免疫吸附法筛选分泌抗 TAP 的单克隆抗体杂交瘤细胞株，具体操作为：将 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 TAP-BSA 偶联物按常规方法包被在市售聚乙烯软板的孔中，采用 pH 9.6, 0.02mol/L 碳酸盐缓冲液为包被缓冲液。在包被好的孔中加入待检样品 $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 1h, 洗涤，加羊抗小鼠酶标抗体（市售，工作浓度为 1 : 1000 稀释） $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 45min, 洗涤，加底物 3', 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 15min, 加入 2mol/L 的硫酸 $100 \mu\text{l}$ 终止反应，在波长 450nm 下比色以筛选分泌 TAP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，用有限稀释法进行克隆化，共进行 4 次克隆；

[0056] (5) 腹水制备与纯化：将杂交瘤细胞悬液接种于预先以福氏不完全佐剂预处理 1 周后的 Balb/C 小鼠腹腔内，收集腹水，按照单克隆抗体亚类的不同采用辛酸 / 硫酸铵法或聚乙二醇 PEG 沉淀法纯化腹水即收获 TAP 单克隆抗体。

[0057] 4、TAP 单克隆抗体的胶体金标记

[0058] 将 TAP 单克隆抗体用磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L , pH 7.0 ~ 7.5) 溶解并稀释至 $2 \sim 4\text{mg/ml}$, 作为母液。每 100ml 胶体金溶胶加入 $1 \sim 3\text{ml}$ 抗体母液，振荡 2min, 用 0.2mol/L 的 K_2CO_3 调节 pH 至 8.4, 振荡 5min, 加入 2ml 11% (g/ml) 聚乙二醇 PEG-10000（市售），振荡 5min, $8000 \sim 15000\text{rpm}$ 离心 15min, 除去上清后用磷酸盐缓冲液复溶。在 $6000 \sim 13000\text{rpm}$ 离心 15min, 去上清，将沉淀用磷酸盐缓冲液稀释后即得胶体金标记的 TAP 单克隆抗体。

[0059] 5、TAP 多克隆抗体的制备

[0060] 将合成的人源 TAP 作为抗原，以前述磷酸盐缓冲液制备浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ 的溶液，取 1ml 与等体积的福氏完全佐剂混合成的油包水乳化液在家兔 4 个不同部位进行皮下注射。每 4 周重复一次，4 次之后收集家兔血液。收集好的血液在 37°C 放置 30min 后再于 4°C 放置过夜，去除血凝块后将剩余液体转移至塑料离心管中， 4°C 下 $10,000\text{g}$ 离心 10min, 收集上清即为含多克隆抗体的抗血清。抗体的纯化：在抗血清中加入固体叠氮化钠（市售）形成浓度为 0.05% (g/ml) 的溶液， 4°C 下 $15,000\text{g}$ 离心 5min, 移出澄清的抗血清再经过滤器过滤除去多余的脂肪等杂质后用 TBS 缓冲液 (6.06g Tris, 8.78g NaCl 以及 0.5g 叠氮化钠溶于 1L 蒸馏水中，并用 HCl 调节 pH 7.4) 以 1 : 5 比例稀释，再过滤，然后以每分钟 0.5ml 的速度将抗血清注入蛋白 A sepharose CL-4B 亲和层析柱（市售），用 TBS 缓冲液洗脱亲和柱，并收集洗脱液检测其在 280nm 的吸收度，当洗脱液的吸收度小于 0.008 后再加入洗脱缓冲液 (3.75g 甘氨酸溶解于 1L 蒸馏水中，用 HCl 调节 pH 2.7)，以 0.5ml/min 的速度洗脱至所有蛋白均流下来。用已经加入 100ul 中和缓冲溶液 (121.2g Tris, 87.8g NaCl, 0.37g EDTA 及 5g 叠氮化钠溶于 1L 蒸馏水中，并用 HCl 调节 pH 8.0) 的 1.5ml EP 管分管收集洗脱液，混匀后用 pH 试纸检查洗脱液的 pH, 如果 pH 低于 7 可利用中和缓冲液调至约 pH 7.4 以防止抗体的变性。在柱中加入 10ml, pH 1.9 洗脱缓冲溶液，按上述方法收集洗脱液至吸光度小于 0.008, 所有 EP 管中收集的即为纯化的多克隆抗体溶液。

[0061] 6、兔抗 Balb/C 小鼠免疫球蛋白抗体的制备

[0062] 将 Balb/C 小鼠的免疫球蛋白作为抗原,对家兔进行免疫,抗体的收集及纯化同上。

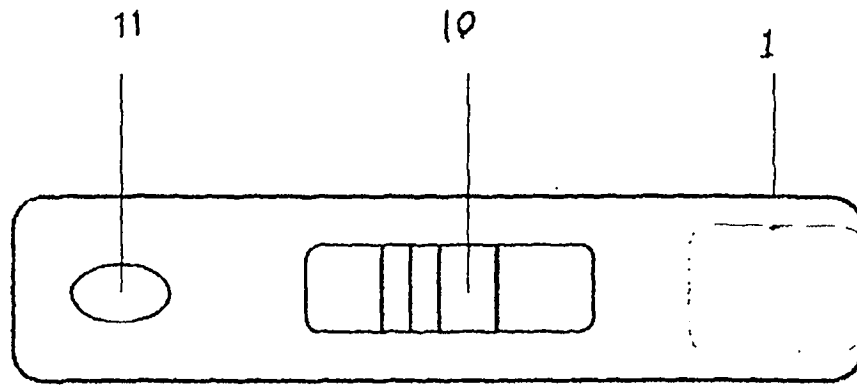


图 1

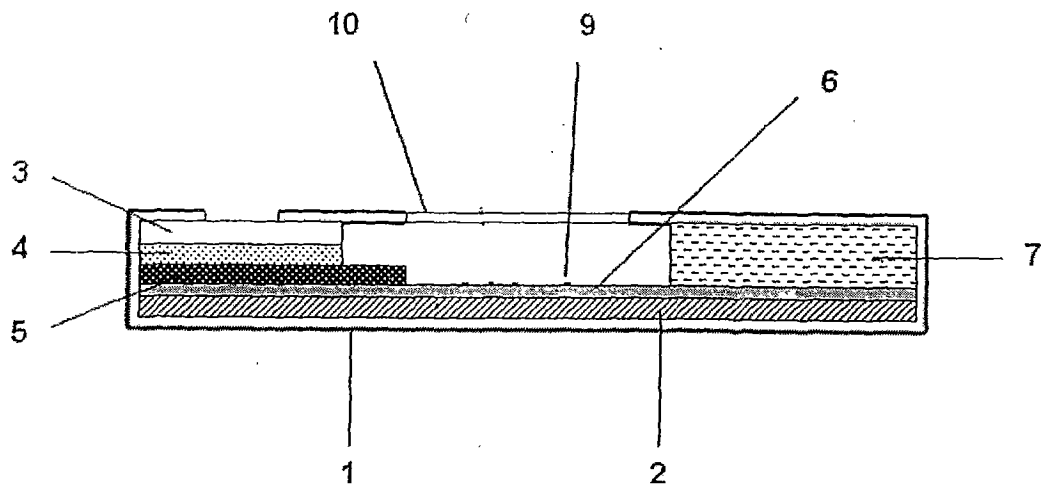


图 2

专利名称(译)	快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡及其测试方法		
公开(公告)号	CN101609093B	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	CN200910060027.9	申请日	2009-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	田伏洲 任建东 龚加庆		
申请(专利权)人(译)	田伏洲 任建东 龚加庆		
当前申请(专利权)人(译)	田伏洲 任建东 龚加庆		
[标]发明人	田伏洲 任建东 龚加庆		
发明人	田伏洲 任建东 龚加庆		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/531 C12N15/06 C12P21/08		
代理人(译)	冯忠亮		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN101609093A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为快速诊断胰腺创伤和急性胰腺炎的测试卡及其测试方法，解决已有诊断方法准确度不高以及测试方法耗时长，装置成本高，操作不便的问题。层析膜上有测试线和质控线，测试线为包被的TAP多克隆抗体，质控线为包被的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体，TAP多克隆抗体和兔抗小鼠免疫球蛋白抗体的浓度范围为1-100nmol/L。

