



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104515859 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201410790838. 5

(22) 申请日 2014. 12. 17

(71) 申请人 杭州慧缘泰医疗器械有限公司

地址 310051 浙江省杭州市滨江区江陵路
88 号 6 幢 4 楼 B 区

(72) 发明人 谢福文 詹特斌 丁超

(74) 专利代理机构 杭州金道专利代理有限公司
33246

代理人 赵芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

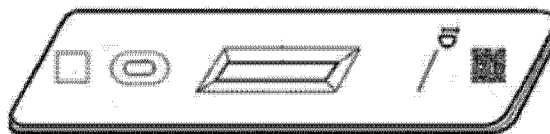
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒及其制备方法、检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,包括上下卡壳、免疫试纸条、检测试纸等,含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物划在硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜上平行设置有3条检测线、质控线(15)以及金标复合物划膜线(8)。本发明还提供了血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒的制备方法和检测方法。本发明操作方便简单,性能稳定,结果准确,在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化道出血症状的肿瘤早期诊断和鉴别有较好的参考价值,对消化道出血性疾病的阳性检出率有显著提高。适合临床医检和家庭自检,同时为此类疾病的大规模普查提供一种手段。



1. 一种血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,包括上卡壳(1)、下卡壳(2)、置于上卡壳和下卡壳之间的免疫试纸条(6)和检测试纸(20),上卡壳设有加样孔(3)、观察窗口(4)和化学试纸观察窗口(17),下卡壳(2)开有与免疫试纸条(6)位置对应的第一凹槽(5)和与化学法试纸位置对应的第二凹槽(21),其特征在于免疫试纸条(6)包括吸水纸(10)、硝酸纤维素膜(9)、样品垫(7)和PVC底板(11),样品垫边缘处黏贴在硝酸纤维素膜上,吸水纸边缘处黏贴在硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜固定在PVC底板上,含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物划在硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜上平行设置有3条检测线、质控线(15)以及靠近硝酸纤维素膜(9)底端的金标复合物划膜线(8),质控线(15)处包被有羊抗鼠IgG,3条检测线处同时包被有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白单抗和转铁蛋白单抗,金标复合物划膜线处含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物。

2. 如权利要求1所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,其特征在于第一凹槽(5)和与化学法试纸位置对应的第二凹槽(21)中间设有凸起的隔断(22),检测试纸(20)上样段与样品垫(7)的底部由隔断(22)分隔开,加样孔(3)位于隔断(22)处正上方。

3. 如权利要求2所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,其特征在于加样孔下方为化学法试纸和样品垫(7),加样孔为圆形或椭圆形并同时外漏出化学法试纸和样品垫,所述的硝酸纤维素膜对应观察窗口(4)放置。

4. 如权利要求3所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,其特征在于上卡壳上设有ID记录处(18)或/和二维码(19)。

5. 如权利要求4所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,其特征在于PVC底板(11)是具有粘性胶质层的PVC底板。

6. 如权利要求5所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,其特征在于样品垫(7)是一层厚度为355.6-508.0um的8964型玻璃纤维。

7. 如权利要求1所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒的制备方法,其特征在于检测试纸(20)是如下方法制备:质量浓度分别为5%过氧化羟基异丙苯、5%邻甲苯胺,和10%过氧化氢溶液按比例混合,比例按质量比:过氧化羟基异丙苯:邻甲苯胺:过氧化氢=1:1:2,将吸水纸裁制成细条,浸泡处理后取出干燥即得;

所述样品垫制备方法是:按质量浓度分别为10%的PH9.0硼酸钠缓冲液、5%酪蛋白、5%PVP-10、1%胆酸钠、1.8%产品型号为RHODASURF ON-870的表面活性剂、0.02%叠氮钠配制,均匀铺在样品垫上并维持在37℃,相对湿度小于20%条件下干燥。

8. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于金标复合物划膜线(8)选自胶体金颗粒、胶体银颗粒、胶体铁颗粒、磁性颗粒、染料颗粒、乳胶颗粒或荧光颗粒中的有颜色颗粒划线于硝酸纤维素膜(9)上。

9. 如权利要求8所述的制备方法,其特征在于金标复合物为60nm胶体金用于抗人血红蛋白单抗、抗人结合珠蛋白单抗和抗人转铁蛋白单抗的标记而得。

10. 如权利要求9所述的制备方法,其特征在于金标复合物的制备方法是:每2000ml烧瓶称取1500g超纯水,磁力加热搅拌器IKA Digital设定到120℃,温控探头插入烧瓶液体中,即热达到设定温度后,沸腾1分钟后加入10%氯金酸溶液30g;继续加热烧制1分钟,

调节旋钮至最大转速,迅速加入 1%柠檬酸三钠溶液 20g,继续加热 5 分钟后停止加热停止搅拌,自然冷却至室温制得 60nm 胶体金溶液,所述烧瓶使用前经过按重铬酸钾:水:浓硫酸 = 1:2:18 的质量比配制处理液浸泡 8 小时后超纯水洗涤 3 次。

11. 如权利要求 10 所述的制备方法,其特征在于含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物的制备过程为:

(1) 取冷却至室温的胶体金溶液 100mL,加入 1mL、0.1mol/L 的碳酸钾溶液,搅拌 30 分钟,加入 0.1mg 抗人血红蛋白单克隆抗体,继续搅拌 30 分钟;

(2) 在步骤 (1) 的溶液中加入 1mL 的 10%的牛血清白蛋白溶液,搅拌 30 分钟,条件为 4℃,12000rpm,离心 30 分钟后,去除上清液,用含 10%牛血清白蛋白、0.05%吐温、20%蔗糖、5%海藻糖、0.02%叠氮钠、5% Tris 的缓冲液重悬沉淀,形成 5ml 的高浓缩倍数的胶体金标记复合物;

(3) 血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗,同样按照步骤 (1) 到步骤 (2) 进行标记,得到相应胶体金标记复合物;

(4) 三种单抗标记完成后,并按 1:1.5:1 的比例以 2 μ l/cm 均匀包被在硝酸纤维素膜 (9) 上,包被好硝酸纤维素膜 (9) 在 37℃,相对湿度小于 20%的烘箱干燥 8 小时备用。

12. 如权利要求 11 所述的制备方法,其特征在于硝酸纤维素膜上抗体包被的步骤为:用含 0.5%牛血清白蛋白、3%海藻糖、0.02%叠氮钠的 0.01M 的磷酸盐缓冲液 (PH7.2) 将血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗分别稀释到 1.0mg/ml、0.5mg/ml、1.5mg/ml;羊抗鼠 IgG 稀释到 0.8mg/ml,用 BioDotXYZ3060 喷膜仪在硝酸纤维素膜上分别按次序平行划线,喷量设置为 1.8 μ l/cm,划膜完成后立即至于 37℃干燥间,烘干 8 小时备用。

13. 使用如权利要求 1-6 之一所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒的检测方法,其特征在于检测时,在圆形或者椭圆形的加样孔中滴加 3-4 滴由样本采集器处理好的样品液,5 到 8 分钟判读免疫试纸条;同时,在化学试纸观察窗口滴加 10%的过氧化氢溶液,观察颜色变化,最后结合两种检测方法的结果判定最终检测结果:

全阳性:对于免疫学方法,在长条形观察窗口中,均在检测线和质控线位置出现紫色红色带,表示样品中存在血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白,对于化学方法,出现蓝色反应,表明结果呈阳性;

全阴性:对于免疫学方法,在长条形观察窗口中,在质控线位置出现紫红色带,而在检测线位置均未出现紫红色带,表示样品中不存在血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白。对于化学方法,不出现蓝色反应,表明结果呈阴性;

无效:在长条形观察窗口中,在质控线位置不出现紫红色带,无论检测线位置出现或者均未出现紫红色带,表明试验无效,应重新进行检测。

血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒及其制备方法、检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于临床体外诊断试剂技术领域,具体为一种血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,应用免疫学原理、侧向层析技术以及化学邻甲苯胺显色法,通过检测人粪便中的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白,发现下消化道出血症状,早期诊断直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤。

背景技术

[0002] 粪便中的血红蛋白(Hb, Hemoglobin) 又称便隐血(FOB, Fecal Occult Blood), 目前在临床上被看作是诊断直肠癌、结肠癌的肿瘤标志物之一。结合珠蛋白(Hp, Haptoglobin, 也称为触珠蛋白或珠球蛋白) 广泛存在于人类和许多哺乳动物的血液及其他体液中, 个体内的含量比较稳定。结合珠蛋白具有结合游离血红蛋白的能力, 作用类似于血红蛋白的转运蛋白, 血红蛋白容易与结合珠蛋白结合形成稳定不可逆的复合物, 叫做血红蛋白-结合珠蛋白复合物(Hb-Hp Complex)。除作为溶血诊断指标外, 近年来随着研究的深入, 结合珠蛋白还与恶心肿瘤、肾病、组织损伤等高度相关。转铁蛋白(TF), 检测的敏感度和特异性与血红蛋白检测相当, 但是稳定性明显高于血红蛋白, 可以克服被检测标本中的血红蛋白在胃肠道内滞留时间过长而被分解或破坏后出现的假阴性结果。消化道少量出血可不引起大便颜色改变, 只有靠便隐血试验才能确定。凡是消化道疾病引起少量出血的, 均可有隐血便, 因此隐血检查对于诊断多种消化道出血性疾病都有重要价值, 是普查筛选消化道疾病的有效手段, 便隐血试验已经成为人们不断深入研究的热点。

[0003] 便隐血在目前临床上主要检测方法有化学法和免疫学方法: 化学法常用的有邻甲苯胺法、还原酚酞法、联苯胺法、匹拉米洞法、俞创木脂法等。其设计原理基本相同, 都是基于血红蛋白中的含铁血黄素部分有催化过氧化物分解的作用, 能催化试剂中的过氧化氢, 分解释放新生态氧, 氧化上述色原物质而呈色, 显色的深浅反应了血红蛋白的多少。然而在实际应用中由于粪便成份差别很大, 各实验室具体操作细节不同, 用化学法检测结果存在很大差异, 并且缺乏特异性和准确性。外源性食物中如果含有血红蛋白、肌红蛋白, 其血红素的作用均可以使实验呈阳性, 大量生食蔬菜中含有活性的植物过氧化物也可催化过氧化物分解, 出现假阳性反应。血液在肠道中停留过久, 血红蛋白变性, 则会出现与病情不符的阴性结果。此外, 如果患者服用大量的维生素 C 或其他具有还原性的药物, 在实验中可将过氧化物还原, 从而不能氧化色原物质, 也可使实验出现假阴性。因此, 化学法易受干扰因素多、假阳性率高、冰醋酸配成的试剂易形成晶体等条件限制, 未能得到广泛使用, 亟需一种特异性好、灵敏度高、检测快速、简单的隐血检测方法。

[0004] 免疫学方法是目前检测隐血常用的方法, 主要包括免疫单抗法、酶联免疫吸附法、免疫斑点法、胶乳免疫透射比浊法、放射免疫扩散法、反向间接血凝法、胶体金标记夹心免疫检验法等。免疫法检测的指标一般是人血红蛋白或人红细胞基质, 所用抗体是抗人血红蛋白抗体或抗人红细胞基质抗体, 检测人血红蛋白可检出消化道任何部位的出血, 检测人

红细胞基质只能检出下消化道出血,但是血红蛋白由于受到肠道内细菌的作用及大肠粘膜产生的粘液成分影响而变性,易出现假阴性反应。

[0005] 血红蛋白检测的局限性:免疫层析一步法目前是用抗人血红蛋白抗体来特异性结合人血红蛋白抗原,此法简便、快捷,只特异性地针对人血红蛋白抗原表位,基本排除了饮食及药物等因素的干扰,被世界卫生组织胃肠镜检查协会推荐作为粪便隐血实验的一种较为确认的方法。免疫胶体金法隐血试验有一定的灵敏度,高于或低于此范围均可出现假阴性。单克隆抗体胶体金法在检测消化道出血有时候会漏诊,其原因主要有:

[0006] A. 血红蛋白经过消化酶降解而变性,已不具有原来的免疫原性;

[0007] B. 过量的大出血而致使反应体系中抗原过剩,出现后带现象;

[0008] C. 病人的血红蛋白抗原结构改变也会影响血红蛋白或红细胞基质与单克隆抗体亲和度。

[0009] 到目前为止,单一的大便隐血 FOB 诊断方法的灵敏度和特异性都有待进一步提高。临床上往往需要两种或以上的方法联合检测。目前市场上已有相关的联合检测试剂出现。

[0010] 转铁蛋白的检测对于消化道出血的诊断有很重要的价值。转铁蛋白检测,敏感度和特异性与血红蛋白检测相当,但稳定性明显高于血红蛋白,可以克服被检测标本中的血红蛋白在胃肠道内滞留时间过长而被分解或破坏后出现的假阴性结果。

[0011] 血红蛋白-结合珠蛋白复合物检测:隐血反应测的是有无隐血,而不是有无肿瘤标志,隐血反应呈阳性必须用其他方法确认,例如肠镜等,这是因为可能由其他因素引起的偶尔出血阳性,同样潜血反应阴性也有可能是假阴性,这是由于早期肿瘤少量出血和大便中结合珠蛋白形成复合物,而这种复合物抗血红蛋白抗体不能对之识别,检测结果呈阴性。日本的目黑高志对 48 例结肠癌或直肠癌患者的粪便,用放射免疫法检测其血红蛋白-结合珠蛋白复合物(Hb-Hp)及血红蛋白(Hb),结果阳性分别为 44 例及 35 例,这里至少有 9 例便隐血者为假阴性,也就是说测定大便隐血诊断直肠癌或结肠癌的阳性符合率仅在 70%左右,而测定血红蛋白-结合珠蛋白的复合物对直肠癌或结肠癌的阳性符合率在 90%以上,造成测定便隐血对直肠癌或结肠癌 20%-30%假阴性主要原因:由于消化道少量出血,释放出的血红蛋白(Hb)在经过较长的肠道时与粪便内的 Hp 结合成复合物引起隐血假阴性,显然检测粪便中的血红蛋白来诊断是否患直肠癌或结肠癌的肿瘤标志物有严重漏检。

[0012] 临床上往往需要两种或以上的方法联合检测,目前市场上已有血红蛋白-转铁蛋白联检试剂盒、血红蛋白-Hb-Hp 复合物联检试剂盒等。如中国发明专利申请公布号为 CN101965515A(公布日为 2011 年 2 月 2 日)提供了一种用于检测潜血的方法和装置,包括检测在 GI 样品中的转铁蛋白和血红蛋白,以及将检测到的转铁蛋白和血红蛋白的量与转铁蛋白和血红蛋白的各自的预定值相比较,由此去顶来自 GI 的出血,并提供使用横向流动三明治免疫测定装置来实现对转铁蛋白和血红蛋白的检测,该技术方案缺少血红蛋白-结合珠蛋白复合物检测,对直肠癌或结肠癌的阳性符合率较低。

发明内容

[0013] 本发明旨在提供一种血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,由一根同时检测血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白的试纸条,化学

邻甲苯胺试纸,上卡壳和下卡壳组成的试剂盒,该试剂盒的结构简单,检测快速高效,具有很好灵敏度和特异性,在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化道出血症状的肿瘤早期诊断和鉴别有较好的参考价值,对消化道出血性疾病的阳性检出率有显著提高。

[0014] 针对以上根本技术问题,本发明相应的解决技术方案是:

[0015] 一种血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,包括上卡壳、下卡壳、置于上卡壳和下卡壳之间的免疫试纸条和检测试纸,上卡壳设有加样孔、观察窗口和化学试纸观察窗口,下卡壳开有与免疫试纸条位置对应的第一凹槽和与化学法试纸位置对应的第二凹槽,所述免疫试纸条包括吸水纸、硝酸纤维素膜、样品垫和PVC底板,样品垫边缘处黏贴在硝酸纤维素膜上,吸水纸边缘处黏贴在硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜固定在PVC底板上,含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物划在硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜上平行设置有3条检测线、质控线以及靠近硝酸纤维素膜底端的金标复合物划膜线,质控线处包被有羊抗鼠IgG,3条检测线处同时包被有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白单抗和转铁蛋白单抗,金标复合物划膜线处含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物。

[0016] 上述第一凹槽和与化学法试纸位置对应的第二凹槽中间设有凸起的隔断,检测试纸上样段与样品垫的底部由隔断分隔开,加样孔位于隔断处正上方。

[0017] 上述加样孔下方为化学法试纸和样品垫,加样孔为圆形或椭圆形并同时外漏出化学法试纸和样品垫,所述的硝酸纤维素膜对应观察窗口放置。

[0018] 上述上卡壳上设有ID记录处或/和二维码。二维码是用某种特定的几何图形按照一定的规律在平面分布的黑白相间的图形记录数据符号信息的,是信息自动识别中的一项重要技术,也是物联网产业的关键和核心技术之一,其作为一种及时、准确、可靠、经济的数据输入和传输手段已在工业、商业、国防、交通、金融、医疗卫生等许多领域得到了广泛应用,二维码技术现已运用相对成熟。

[0019] 上述PVC底板是具有粘性胶质层的PVC底板,可以选择J-C6底板,6cm*30cm,PVC塑胶板,可商品化购买。

[0020] 所述样品垫是一层厚度为355.6-508.0um,已经商品化的8964的玻璃纤维。

[0021] 本发明还提供了以上所述的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒的制备方法。

[0022] 所述检测试纸是如下方法制备:质量浓度分别为5%(W/W)过氧化羟基异丙苯、5%(W/W)邻甲苯胺,和10%(W/W)过氧化氢溶液按质量比(过氧化羟基异丙苯:邻甲苯胺:过氧化氢=1:1:2)混合后,将吸水纸裁制成细条,浸泡处理后取出干燥即得;

[0023] 所述样品垫制备方法是:按质量浓度分别为10%(W/W)硼酸钠缓冲液(PH9.0)、5%(W/W)酪蛋白、5%(W/W)PVP-10、1%(W/W)胆酸钠、1.8%(W/W)RHODASURF ON-870(已商品化的表面活性剂)、0.02%(W/W)叠氮钠配制,均匀铺在样品垫上并维持在37℃,相对湿度小于20%干燥。

[0024] 所述金标复合物划膜线选自胶体金颗粒、胶体银颗粒、胶体铁颗粒、磁性颗粒、染料颗粒、乳胶颗粒或荧光颗粒中的有颜色颗粒划线于硝酸纤维素膜上。

[0025] 上述金标复合物为60nm胶体金用于抗人血红蛋白单抗、抗人结合珠蛋白单抗和抗人转铁蛋白单抗的标记而得。

[0026] 金标复合物的制备方法是：每 2000ml 经过处理的烧瓶称取 1500g 超纯水，磁力加热搅拌器 IKA Digital 设定到 120℃，温控探头插入烧瓶液体中，即热达到设定温度后，沸腾 1 分钟后加入 10% 氯金酸溶液 30g。继续加热烧制 1 分钟，调节旋钮至最大转速，迅速加入 1% 柠檬酸三钠溶液 20g，继续加热 5 分钟后停止加热停止搅拌，自然冷却至室温制得 60nm 胶体金溶液，所述烧瓶的处理是用重铬酸钾：水：浓硫酸按照 1:2:18 的质量比配制处理液后浸泡 8 小时后，再超纯水洗涤 3 次。

[0027] 所述含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物的制备过程为：

[0028] (1) 取冷却至室温的胶体金溶液 100mL，加入 1mL、0.1mol/L 的碳酸钾溶液，搅拌 30 分钟，加入 0.1mg 抗人血红蛋白单克隆抗体，继续搅拌 30 分钟；

[0029] (2) 在步骤 (1) 的溶液中加入 1mL 的 10% 的 BSA 溶液（牛血清白蛋白），搅拌 30 分钟，条件为 4℃，12000rpm，离心 30 分钟后，去除上清液，用含 10% BSA（牛血清白蛋白）、0.05% 吐温、20% 蔗糖、5% 海藻糖、0.02% 叠氮钠、5% Tris 的缓冲液重悬沉淀，形成 5ml 的高浓缩倍数的胶体金标记复合物；

[0030] (3) 血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗，同样按照步骤 (1) 到步骤 (2) 进行标记，得到相应胶体金标记复合物；

[0031] (4) 三种单抗标记完成后，并按 1:1.5:1 的质量比以 2ul/cm 均匀包被在硝酸纤维素膜上，包被好硝酸纤维素膜 (9) 在 37℃，相对湿度小于 20% 的烘箱干燥 8 小时备用。

[0032] 所述硝酸纤维素膜上抗体包被的步骤为：用含 0.5% BSA（牛血清白蛋白）、3% 海藻糖、0.02% 叠氮钠的 0.01M 的 PB (PH7.2) 将血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗分别稀释到 1.0mg/ml、0.5mg/ml、1.5mg/ml；羊抗鼠 IgG 稀释到 0.8mg/ml，用 BioDotXYZ3060 喷膜仪在硝酸纤维素膜上分别按次序平行划线，喷量设置为 1.8ul/cm，划膜完成后立即至于 37℃ 干燥间，烘干 8 小时备用。

[0033] 使用上述血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒的检测方法，其特征在于检测时，在圆形或者椭圆形的加样孔中滴加 3-4 滴由样本采集器处理好的样品液，5 到 8 分钟判读免疫试纸条；同时，在化学试纸观察窗口滴加 10% 的过氧化氢溶液，观察颜色变化，最后结合两种检测方法的结果判定最终检测结果：

[0034] 全阳性：对于免疫学方法，在长条形观察窗口中，均在检测线和质控线位置 出现紫色红色带。表示样品中存在血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白。对于化学方法，出现蓝色反应，表明结果呈阳性；

[0035] 全阴性：对于免疫学方法，在长条形观察窗口中，在质控线位置出现紫红色带，而在检测线位置均未出现紫红色带，表示样品中不存在血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白。对于化学方法，不出现蓝色反应，表明结果呈阴性；

[0036] 相比现有技术，本发明提供的联检试剂盒及其制备方法，有益效果在于：

[0037] (1) 本发明是血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒，采用免疫层析胶体金技术结合化学显色方法，快速、简便同时检测大便中的血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白，可以消除现有技术的弊端，准确发现消化道癌变引起的少量出血，提高早期直肠癌或结肠癌诊断准确率，也可以为早期诊断此病提供快速、简便的手段和药物治疗时的监测。检测结果血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白都

是阳性或者血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物(Hb-Hp)都是阳性者或者血红蛋白、转铁蛋白都是阳性,则高度怀疑是消化道出血,很可能患直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤,建议进一步诊断加以确认,例如肠镜;如果血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白都是阴性而血红蛋白(Hb)阳性可能由于突发性炎症引起的;血红蛋白(Hb)、血红蛋白-结合珠蛋白复合物(Hb-Hp)、转铁蛋白(TF)都是阴性者,说明消化道没有出血。

[0038] (2) 本发明试剂盒上使用ID或二维码,一方面,ID处可以手工填写样本信息,避免检测结果的混淆。另一方面,二维码可以高密度编码,信息容量大,可以存入大量的零件信息。编码范围广,可以存入文字、图片、声音等信息。容错能力强,具有纠错能力,表面受到油污、损耗等照样可以得到识读。译码可靠性高,误码率不超过千万分之一。还有成本低,易制作,持久耐用等优点,二维码可以选择性的根据条件进行检测结果录入,对患者的治愈和康复过程有一个很好的监测,结果查询更加方便,医生统筹治疗方案也更加得心应手。甚至在病理方面也具有统计学上的意义。

[0039] 本发明申请的联检试剂盒特异性强,灵敏度高,易储存,无须专门技术人员操作,不需任何仪器设备,而且结果易读。对直肠癌或结肠癌等下消化道出血症状的肿瘤早期诊断和鉴别有较好的参考价值,对消化道出血性疾病的阳性检出率效果更佳。

附图说明

[0040] 附图1是本试剂盒的立体模型示意图。

[0041] 附图2是本试剂盒的拆分结构示意图。

[0042] 图中,1. 上卡壳,2. 下卡壳,3. 加样孔,4. 观察窗口,5. 第一凹槽,6. 试纸条,17. 化学试纸观察窗口,18. ID记录,19. 二维码,20. 化学试纸,21. 第二凹槽,22. 隔断。

[0043] 附图3是免疫试纸条的结构示意图。

[0044] 附图4是免疫试纸条的结构示意图。

[0045] 图中:7. 样品垫,8. 金标复合物划膜线,9. 硝酸纤维素膜,10. 吸水纸,11. PVC底板,12. 抗人转铁蛋白单抗检测线,13. 抗人血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗检测线,14. 抗人血红蛋白单抗检测线,15. 质控线。

[0046] 附图5是本试剂盒正面塑料外壳的外部形态示意图。

[0047] 图中由上至下分别是二维码,ID记录处,“C”是控制线的位置,“Hb”是血红蛋白检测线的位置,“Hb-Hp”是血红蛋白-结合珠蛋白复合物检测线的位置,“TF”是转铁蛋白检测线的位置。椭圆形为样本滴加处,最下端正方形窗口为化学试纸显色窗口。

[0048] 附图6是本试剂盒的全阳性结果示意图。

[0049] 图中6血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白均是阳性。

[0050] 附图7是本试剂盒的全阴性结果示意图

[0051] 图中7血红蛋白(Hb)、血红蛋白-结合珠蛋白复合物(Hb-Hp)、转铁蛋白(TF)均是阴性。

具体实施方式

[0052] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步的说明,但需要指出的是,本发明的联检试剂盒并不限于这种特定的形状或结构。对于本领域技术人员显然可以理解的是,以下

的说明内容即使不做任何调整或修正,也可以直接适用于在此未指明的其他类型或结构的试纸条。

[0053] 如图 1- 图 7 所示,一种血红蛋白、血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒,包括免疫试纸条 6、化学试纸 20(邻甲苯胺试纸)、上卡壳 1、下卡壳 2 组成。

[0054] 联检试剂盒的上卡壳表面设计有一个圆形或椭圆形加样孔 3、一个观察窗口 4、化学试纸观察窗口 17、ID 记录 18、二维码 19,下卡壳 2 内部设有与试纸条 6 相对应的第一凹槽 5、与化学法试纸对应的第二凹槽 21、防止试剂混淆的塑料隔断 22,免疫试纸条 6 和化学法试纸 20 置于上卡壳 1 和下卡壳 2 之间。免疫试纸条 6 由 PVC 底板 11、吸水纸 10、硝酸纤维素膜 9 和样品垫 7 组成。

[0055] 硝酸纤维素膜 9 黏贴在 PVC 底板 11 上,金标复合物划膜线 8 划在硝酸纤维素膜 9 上,样品垫 7 少部分即边缘黏贴在硝酸纤维素膜 9 下端,吸水纸 10 的边缘黏贴在硝酸纤维素膜 9 上段,所述的样品垫 7 对应圆形或椭圆形加样孔 3,所述的硝酸纤维素膜 9 对应长条形观察窗口 4。

[0056] 所述的免疫试纸条 6 为一条。化学试纸 20 上样段的顶部与样品垫 7 的底部由塑料卡壳上的隔断 22 分隔开,防止了化学物质可能的干扰。加样孔 3 的位置正好位于隔断 22 处上方。

[0057] 60nm 大颗粒的胶体金制备过程:2000ml 经过特殊处理(重铬酸钾:水:浓硫酸=1:2:18,按此质量比配制处理液后浸泡玻璃烧瓶 8 小时后超纯水洗涤 3 次)的烧瓶精确称取 1500g 超纯水, IKA Digital 设定到 120℃,温控探头插入烧瓶液体中。加热达到设定温度后,沸腾 1 分钟后加入 10% 氯金酸溶液 30g。继续加热烧制 1 分钟,调节旋钮至最大转速,迅速加入 1% 柠檬酸三钠溶液 20g。继续加热 5 分钟,停止加热停止搅拌,自然冷却至室温备用。上述超纯水是指电阻率达到 18.2MΩ*cm(25℃)的水。

[0058] 一般胶体金颗粒在 20—40nm 是最稳定的,超过 40nm,胶体金颗粒的均一性和稳定性就会急剧降低,但产品灵敏度和原料效价也会随着颗粒的增大而增加。本发明专利利用氯金酸 - 柠檬酸三钠体系,改进控温装置,改变和精确反应时间点和选取高纯度原物料,最终制备出高度稳定,均一胶体金溶液。

[0059] 制备的 60nm 大颗粒胶体金用于抗人血红蛋白单抗、抗人结合珠蛋白单抗、抗人转铁蛋白单抗的标记,具有低投入,高产出,灵敏性高,特异性好等优点。

[0060] 60nm 大颗粒胶体金标记抗人血红蛋白单克隆抗体:取上述冷却至室温的胶体金溶液 100mL,加入 1mL0.1mol/L 的碳酸钾溶液,搅拌 30 分钟。加入 0.1mg 抗人血红蛋白单克隆抗体,继续搅拌 30 分钟。加入 1mL 的 10% 的 BSA(牛血清白蛋白)溶液,搅拌 30 分钟。4℃,12000rpm,离心 30 分钟后,去除上清液,用含 1% BSA(牛血清白蛋白)的 0.01mol/L PH7.0 的磷酸钠缓冲液重悬沉淀,形成 5ml 高浓缩倍数的抗人血红蛋白胶体金标记物。

[0061] 60nm 大颗粒胶体金标记血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物单抗:取上述冷却至室温的胶体金溶液 100mL,加入 1mL0.1mol/L 的碳酸钾溶液,搅拌 30 分钟。加入 0.1mg 血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物单抗,继续搅拌 30 分钟。加入 1mL 的 10% 的 BSA(牛血清白蛋白)溶液,搅拌 30 分钟。4℃,12000rpm,离心 30 分钟后,去除上清液,用含 1% BSA(牛血清白蛋白)的 0.01mol/L PH7.0 的磷酸钠缓冲液重悬沉淀,形成 5ml 高浓缩倍数的血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物单抗胶体金标记物。

[0062] 60nm 大颗粒胶体金标记转铁蛋白单抗 :取上述冷却至室温的胶体金溶液 100mL, 加入 1mL0. 1mol/L 的碳酸钾溶液, 搅拌 30 分钟。加入 0. 1mg 转铁蛋白单抗, 继续搅拌 30 分钟。加入 1mL 的 10% 的 BSA(牛血清白蛋白) 溶液, 搅拌 30 分钟。4℃, 12000rpm, 离心 30 分钟后, 去除上清液, 用含 1% BSA(牛血清白蛋白) 的 0. 01mol/L PH7. 0 的磷酸钠缓冲液重悬沉淀, 形成 5ml 高浓缩倍数的转铁蛋白单抗胶体金标记物。

[0063] BioDotXYZ3060 气动微量喷头将胶体金复合物 8 划线在硝酸纤维素膜上 :将三种分别标记好的胶体金标记物按 1:1. 5:1 的比例用 PG2 稀释后均匀混合, 形成胶体金复合物 8, 划线在硝酸纤维素膜 9 上, 包被好的硝酸纤维素膜 9 在 37℃, 相对湿度小于 20% 的烘箱干燥 8 小时。PG2 配方如下表 :

[0064]

物料名称	含量 (%)
牛血清白蛋白	10%
Tris	5%
蔗糖	20%
海藻糖	5%
吐温	0. 05%
叠氮钠	0. 02%

[0065] 硝酸纤维素膜 9 上抗体包被的过程为 :用 PH7. 2 的 PB 将血红蛋白单抗、血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗分别稀释到 1. 0mg/ml、0. 5mg/ml、1. 5mg/ml, 羊抗鼠 IgG 稀释到 0. 8mg/ml 用 BioDotXYZ3060 喷膜仪在硝酸纤维素膜 9 上分别按次序平行划线, 喷量设置为 1. 8ul/cm。划膜完成后立即置于 37℃ 干燥间, 烘干 8 小时备用。包被液配方如下表 :

[0066]

物料名称	含量
牛血清白蛋白	0. 5%
PB	0. 01M
海藻糖	3%
叠氮钠	0. 02%

[0067] 所述的硝酸纤维素膜 9 上设置有平行的质控线 15 和检测线、金标复合物划膜线 8。控制线 15 处包被有羊抗鼠 IgG, 检测线处同时包被有抗人血红蛋白单抗、抗人结合珠蛋白单抗、抗人转铁蛋白单抗, 金标复合物划膜线 8 处含有血红蛋白单抗、血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗 12 的金标复合物。

[0068] 所述吸水纸 10 是吸水能力较强的纸质材料, PVC 底板 11 是具有粘性胶质层的 PVC 底板, 所述样品垫 7 是一层致密的有一定厚度的玻璃纤维, 所述金标复合物划膜线 8 是硝酸纤维素膜上包埋有颜色颗粒, 可以是一种胶体金颗粒、胶体银颗粒、胶体铁颗粒、磁性颗粒、燃料颗粒、乳胶颗粒、或荧光颗粒。

[0069] 样品垫 7 处理 :按下表配方 (按百分比计算) 配制, 均匀铺在样品垫 7 上并维持在 37℃, 相对湿度小于 20% 干燥。样品垫配方如表 :

[0070]

物料名称	含量 (%)
硼酸钠缓冲液 (PH9.0)	10%
Casein (酪蛋白)	5%
PVP-10	5%
胆酸钠	1%
RHODASURF ON-870	1.8%
叠氮钠	0.02%

[0071] 粘性 PVC 底板 11 依次粘贴包被好的硝酸纤维素膜 9、样品垫 7 和吸水纸 10。

[0072] 化学试纸 20 (化学法便隐血检测试纸) 含有 5% (W/W) 过氧化羟基异丙苯, 5% (W/W) 邻甲苯胺, 10% (W/W) 过氧化氢溶液。将上述溶液按质量比 (过氧化羟基异丙苯: 邻甲苯胺: 过氧化氢 = 1:1:2) 混合后, 将吸水纸裁制成长 6mm, 宽 4mm 的细条, 浸泡处理后取出干燥, 将吸水纸片固定于玻纤下端的凹槽中, 吸水纸与玻纤之间有塑料卡壳上塑料隔断分隔, 避免化学物质互相干扰。

[0073] 检测时, 在圆形或者椭圆形的加样孔中滴加 3-4 滴由样本采集器处理好的样品液, 5 到 8 分钟判读免疫试纸条。同时, 在化学试纸观察窗口滴加 10% 的过氧化氢溶液, 观察颜色变化。最后结合两种检测方法的结果判定最终检测结果。

[0074] 全阳性: 对于免疫学方法, 在长条形观察窗口中, 均在检测线和质控线位置出现紫色红色带。表示样品中存在血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白。对于化学方法, 出现蓝色反应, 表明结果呈阳性。

[0075] 全阴性: 对于免疫学方法, 在长条形观察窗口中, 在质控线位置出现紫红色带, 而在检测线位置均未出现紫红色带, 表示样品中不存在血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白。对于化学方法, 不出现蓝色反应, 表明结果呈阴性。

[0076] 无效: 在长条形观察窗口中, 在质控线位置不出现紫红色带, 无论检测线位置出现或者均未出现紫红色带, 表明试验无效, 应重新进行检测。

[0077] 本发明试剂盒快速准确, 操作方便, 性能稳定, 不需要任何专业仪器设备, 适合医院的临检和家庭的自检。由于此试剂盒在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化道肿瘤的早期诊断和鉴别有较大的参考意义, 加上它快速、简便、准确性高的特点为此类疾病的普查和医疗条件相对落后的地方基本诊断提供一种手段。

[0078] 试剂盒灵敏度可调在临床意义范围中。例血红蛋白 (Hb) 200ng/ml、血红蛋白-结合珠蛋白复合物 (Hb-Hp) 25ng/ml、转铁蛋白 40ng/ml 是有临床意义的值。

[0079] 尽管上文对本发明的具体实施方式给予了详细描述和说明, 但是应该指明的是, 本领域的熟练技术人员无须过多实验即可对本发明所要求保护的进行实施, 例用类似的替代物: 胶体银颗粒、胶体铁颗粒、磁性颗粒、燃料颗粒、乳胶颗粒、或荧光颗粒代替胶体金颗粒或进行改造, 或用某些在理化上相似的试剂代替本发明描述的试剂, 或进行各种等效改变和修改, 其所产生的功能仍未超出说明书及附图所涵盖的精神时, 均应该在本发明的保护范围之内。

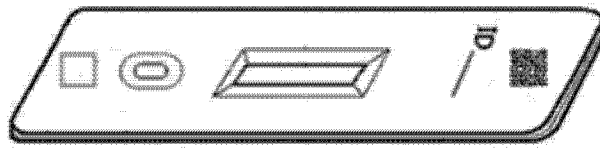


图 1

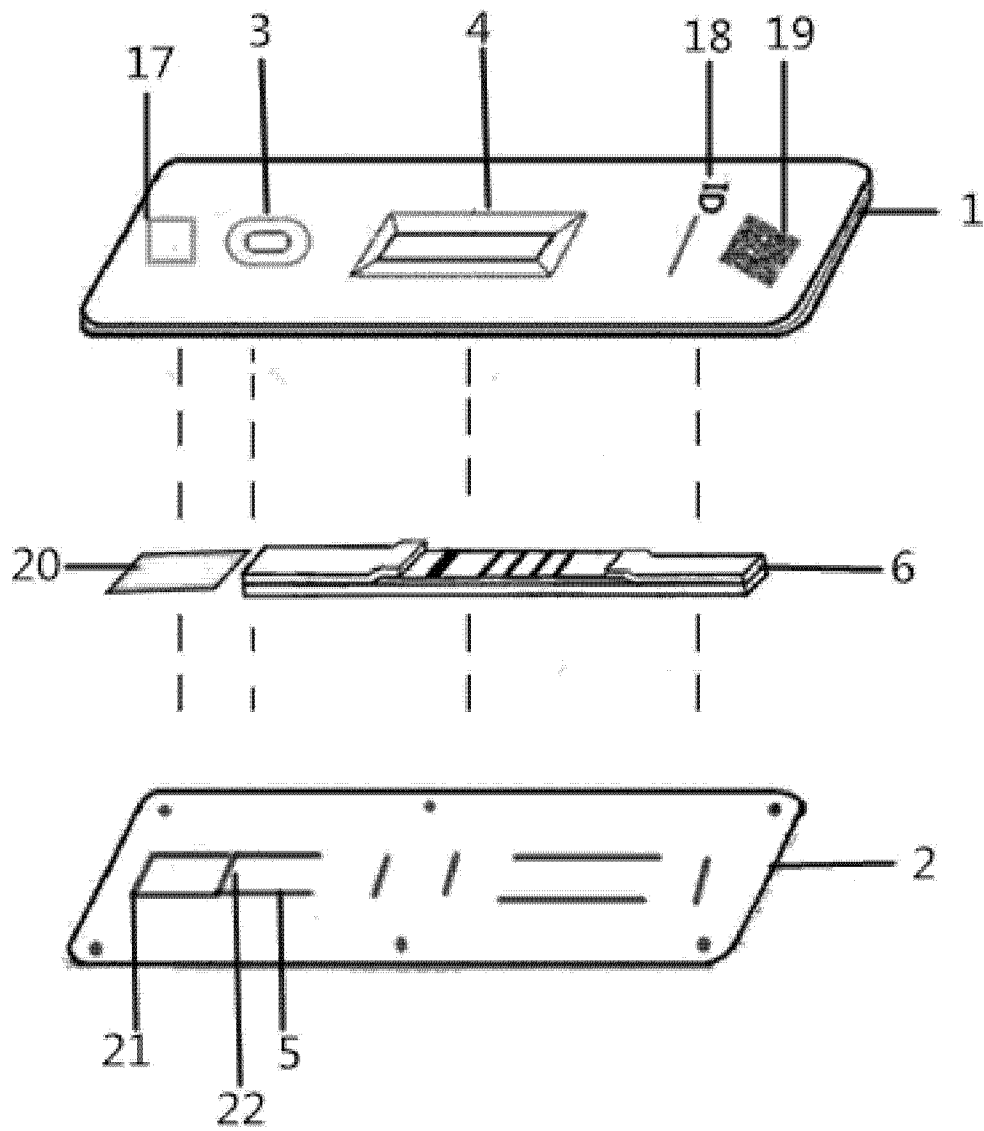


图 2

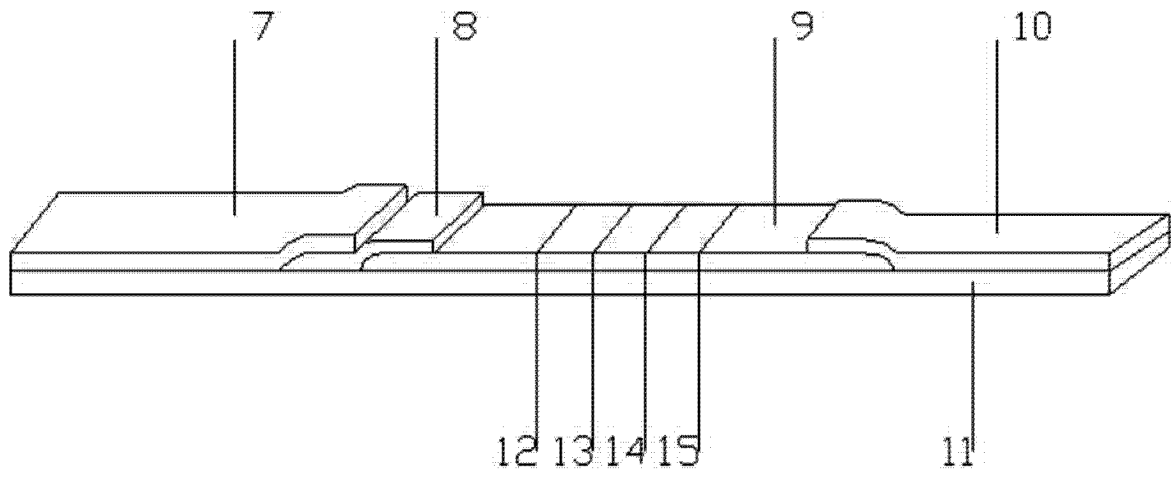


图 3

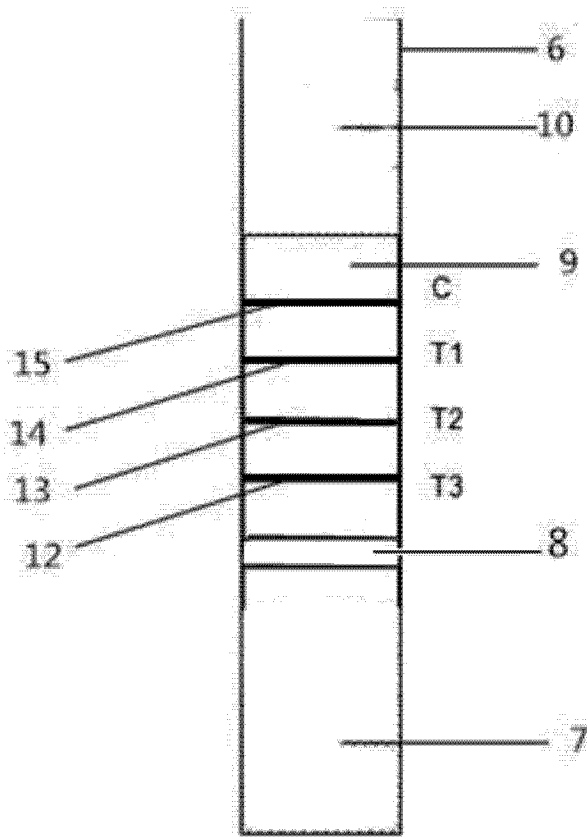


图 4

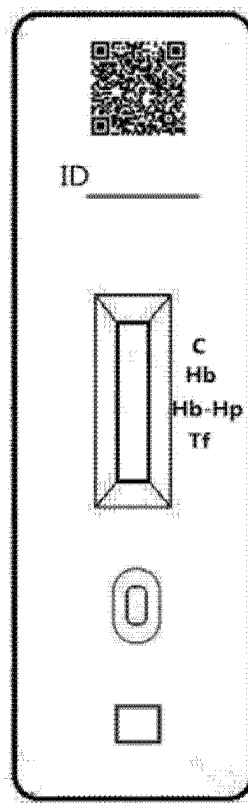


图 5

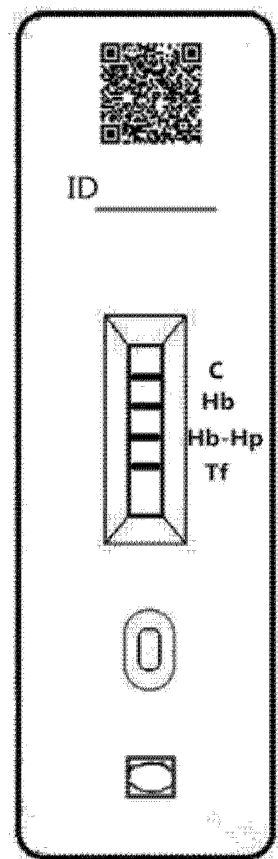


图 6

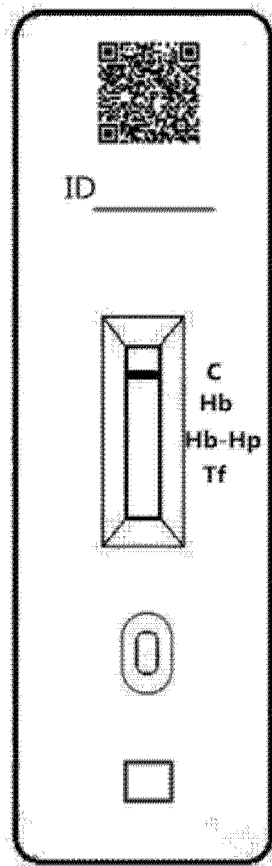


图 7

专利名称(译)	血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒及其制备方法、检测方法		
公开(公告)号	CN104515859A	公开(公告)日	2015-04-15
申请号	CN201410790838.5	申请日	2014-12-17
[标]发明人	谢福文 詹特斌 丁超		
发明人	谢福文 詹特斌 丁超		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/721 G01N33/531 G01N33/57446 G01N33/57484 G01N33/6893		
代理人(译)	赵芳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒，包括上下卡壳、免疫试纸条、检测试纸等，含有血红蛋白单抗、血红蛋白-结合珠蛋白复合物单抗和转铁蛋白单抗的金标复合物划在硝酸纤维素膜上，硝酸纤维素膜上平行设置有3条检测线、质控线(15)以及金标复合物划膜线(8)。本发明还提供了血红蛋白、血红蛋白-结合珠蛋白复合物、转铁蛋白联检试剂盒的制备方法和检测方法。本发明操作方便简单，性能稳定，结果准确，在临床上对直肠癌或结肠癌等下消化道出血症状的肿瘤早期诊断和鉴别有较好的参考价值，对消化道出血性疾病的阳性检出率有显著提高。适合临床医检和家庭自检，同时为此类疾病的大规模普查提供一种手段。

