



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110361539 A

(43)申请公布日 2019.10.22

(21)申请号 201910641544.9

(22)申请日 2019.07.16

(71)申请人 苏州遵道生物科技有限公司
地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区
华云路1号桑田岛科创园1号楼301

(72)发明人 邵伟 刘佳佳 王丽君

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246

代理人 姚炜炜

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

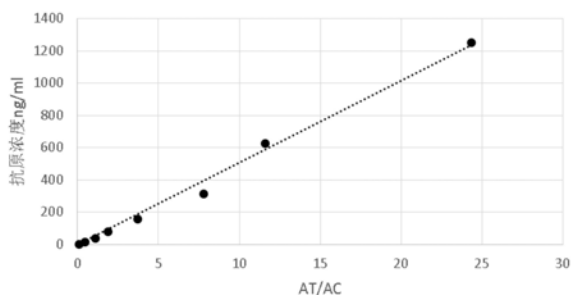
(54)发明名称

定量检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明揭示了一种定量检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的试纸条的制备方法,包括:将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线,检测线使用NGAL包被抗体,质控线使用NGAL捕获抗体的二抗;制备结合垫,其包括:离心洗涤捕获抗体,将纳米增强型时间分辨荧光微球与NGAL捕获抗体溶解于PBS,加入EDC室温反应30min-12h;加入封闭液封闭30min-12小时;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释后定量喷涂到第一载体;其中,捕获抗体为NGAL捕获抗体;还包括制备样品垫,包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中,然后烘干。

NGAL



1. 定量检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述方法包括,

将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线,所述检测线使用NGAL包被抗体,所述质控线使用NGAL捕获抗体的二抗;

还包括制备结合垫,其包括:使用洗涤液离心洗涤捕获抗体,所述洗涤液为纯水;纳米增强型时间分辨荧光微球与NGAL捕获抗体溶解于PH6-8、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min-12h;加入封闭液封闭30min-12h,所述封闭液含有0.1-1%F68、10-50mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到30-120倍,所述微球稀释液为PBS溶液,所述PBS溶液含有1-3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖;将稀释的微球定量喷涂到第一载体;

还包括制备样品垫,其包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中,然后烘干;

其中,所述捕获抗体为NGAL捕获抗体,所述百分比浓度为质量百分比。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min;加入封闭液封闭12h,所述封闭液含有1%F68、50mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到120倍,所述微球稀释液为PBS溶液,所述PBS溶液含有3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH8、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应12h;加入封闭液封闭30min,所述封闭液含有0.1%F68、10mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到30倍,所述微球稀释液为PBS溶液,所述PBS溶液含有1%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述纳米增强型时间分辨荧光微球直径为100nm-300nm。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述捕获抗体与微球混合的重量比是1/5-1/20。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述第一载体为玻璃纤维膜。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述第二载体为玻璃纤维膜。

8. 定量检测NGAL的时间分辨免疫层析试纸条,由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述底板、硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴,其特征在于,所述试纸条由权利要求1-7任一所述的方法制得。

定量检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床免疫学检测领域,具体涉及一种采用时间分辨免疫层析技术进行定量检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)是lipocalin的一种,最初是在激活中性粒细胞中被发现的一种小分子量分泌性蛋白,现代研究表明,NGAL是诊断急性肾损伤的最有效生物学标志之一,也是早期糖尿病肾病的有效标志物之一。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供应用于临床的检测NGAL的定量检测试纸条,以提供高灵敏度、特异性的检测,满足临床的需求。

[0004] 为实现上述发明目的,本发明提供定量检测NGAL的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,其包括:

[0005] 将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线,检测线使用NGAL包被抗体,质控线使用NGAL捕获抗体的二抗;

[0006] 还包括制备结合垫,其包括:使用洗涤液离心洗涤捕获抗体,洗涤液为纯水;纳米增强型时间分辨荧光微球与NGAL捕获抗体溶解于PH6-8、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min-12h;加入封闭液封闭30min-12h,封闭液含有0.1-1%的F68、10-50mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到30-120倍,微球稀释液为PBS溶液,该PBS溶液含有1-3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖;将稀释的微球定量喷涂到第一载体。

[0007] 该方法还包括制备样品垫,其包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中,然后烘干;

[0008] 该方法中,捕获抗体为NGAL捕获抗体,百分比浓度为质量百分比。

[0009] 因活化的一COOH易导致抗体分子之间的聚集,通过改进抗体与微球偶联过程,将活化的羧基保护起来,利于提高抗体的偶联效率。与现有技术相比,采用本方法制备结合垫可减少活化抗体自身的聚集,提高偶联效率。

[0010] 作为本发明一实施方式的进一步改进,纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min;加入封闭液封闭12h,封闭液含有1%F68、50mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到120倍,微球稀释液为PBS溶液,PBS溶液含有3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

[0011] 作为本发明一实施方式的进一步改进,纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH8、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应12h;加入封闭液封闭30min,封闭液含有0.1%F68、10mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀

释液稀释到30倍，微球稀释液为PBS溶液，PBS溶液含有1%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

[0012] 作为本发明一实施方式的进一步改进，纳米增强型时间分辨荧光微球直径为100nm-300nm。

[0013] 作为本发明一实施方式的进一步改进，捕获抗体与微球混合的重量比是1/5-1/20。

[0014] 作为本发明一实施方式的进一步改进，第一载体为玻璃纤维膜。

[0015] 作为本发明一实施方式的进一步改进，第二载体为玻璃纤维膜。

[0016] 为实现上述目的，本发明一实施方式提供一种定量检测NGAL的时间分辨免疫层析试纸条，由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成，底板、硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴，该试纸条由上述任一的方法制得。

[0017] 与现有技术相比，本发明通过将双抗体夹心法和时间分辨免疫层析技术引入NGAL的检测中，结合荧光检测仪，实现了NGAL的定量检测，且灵敏度高，批内、批间差小，为临床使用提供了极大便利。

附图说明

[0018] 图1是本发明实施例1NGAL检测的标准曲线图；

[0019] 图2是本发明实施例2NGAL检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0020] 以下将结合附图所示的具体实施方式对本发明进行详细描述。但这些实施方式并不限制本发明，本领域的普通技术人员根据这些实施方式所做出的结构、方法、或功能上的变换均包含在本发明的保护范围内。

[0021] 本发明提供的试纸条由塑料卡壳、底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC膜)和吸水纸组成。结合垫上包被有纳米增强型时间分辨荧光微球标记的NGAL捕获抗体(capture antibody)。NC膜上包被有检测线和质控线，其中，检测线固定有识别不同抗原表位的NGAL包被抗体(test antibody)，质控线固定有能结合抗NGAL捕获抗体的二抗。

[0022] 结合垫为玻璃纤维膜，其上喷涂了连接有抗体的纳米增强型时间分辨微球。

[0023] NC膜上包被的检测线和质控线相互平行，并且相互之间保持一定间隔。

[0024] 纳米增强型时间分辨荧光微球选用直径100nm-300nm的微球。

[0025] 试纸条装于塑料卡壳内，在湿度小于35%的环境中组装。

[0026] 本发明的试纸条由如下步骤制得：

[0027] NC膜上制备检测线和质控线，检测线为NGAL包被抗体，质控线为能结合NGAL捕获抗体的二抗；

[0028] 玻璃纤维膜上喷涂连接有NGAL捕获抗体的纳米增强型时间分辨微球，制得结合垫；

[0029] 处理玻璃纤维膜，使玻璃纤维膜上含有一定量的表面活性剂等，制得样品垫；

[0030] 底板、NC膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴，切割成相应尺寸，装入塑料卡壳。

[0031] 其中，NC膜上包被检测线、质控线的方法包括如下步骤：

[0032] 检测线使用NGAL包被抗体,用量为每检测线0.5-2.5mg。抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液为含有1-10%海藻糖及0-5%NaCl的PBS,所述百分比为质量百分比。

[0033] 质控线使用抗NGAL捕获抗体的二抗,用量为每质控线0.5-2.5mg。高于此浓度的抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液为含有1-10%的海藻糖及0-5%的NaCl的PBS,所述百分比为质量百分比。

[0034] 使用定量喷膜仪以1-2ul/cm的浓度将上述抗体分划于NC膜上,保持两线间隔0.5cm以上。

[0035] 25-60℃烘干1-5小时,干燥保存。

[0036] 结合垫的制作方法包括如下步骤,其中,如无特别说明,浓度百分比均为质量百分比:

[0037] NGAL捕获抗体使用Minipore®的超滤离心管洗涤3遍,洗涤液为纯水;

[0038] 纳米增强型时间分辨荧光微球与NGAL捕获抗体溶解于PH8、浓度0.05mol/L的PBS,控制抗体与微球重量比为1/5-1/20,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min-12h。

[0039] 加入封闭液封闭,反应30min-12h。封闭液含有0.1-1%质量百分比浓度的F68、10-50mmol/ml甘氨酸。

[0040] 15000-25000rpm/min离心10min,去上清,PBS洗涤2遍;

[0041] 使用微球稀释液稀释到30-120倍,微球稀释液配方:PBS+20%海藻糖或者蔗糖+1-3%吐温20。

[0042] 将上述溶液定量(3.0-8.0ul/cm)喷涂到玻纤上制成结合垫。25-60℃烘干1-4小时,干燥保存。

[0043] 样品垫的制作方法包括如下步骤:

[0044] 配制含有0.9%NaCl+0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液;

[0045] 将玻璃纤维膜浸泡于上述溶液中;

[0046] 取出玻璃纤维膜,25-60℃烘干,至重量不再变化,取出切割成1.7cm x 30cm宽度的长条备用。

[0047] 使用时,在样品垫上加入待测样品液。在毛细作用下,样品液向吸水纸一端泳动,当待测样品中含有NGAL时,NGAL与微球上的捕获抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达检测线时与对应的包被抗体(test antibody)形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测线T线处。未结合的微球继续前行,到达质控线C时,二抗与微球上的捕获抗体结合,在C线处出现聚集。整个反应在15分钟内完成。进行上机读卡,T线和C线都会产生相应的荧光信号,荧光检测仪会根据定标卡上的信息将实际检测荧光信号值带入预设的标准曲线中计算出NGAL的含量。

[0048] 本发明通过应用纳米增强型时间分辨荧光微球,将时间分辨免疫层析技术引入NGAL的检测中,结合时间分辨荧光免疫检测仪,有效的提高了平台灵敏度,提升对低值荧光信号的检测效果,从而实现了NGAL的简单、快速、低成本检测,且灵敏度高,批内、批间差小,为临床使用提供了极大便利,为实现床旁检测提供了方法。

[0049] 实施例1

[0050] 本实施例的试纸条由如下步骤制得：

[0051] NC膜上制备检测线和质控线。

[0052] 其中，检测线使用NGAL包被抗体，浓度为0.5mg，高于此浓度的抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用，稀释液是含1%海藻糖的PBS。

[0053] 质控线使用抗NGAL捕获抗体的二抗，用量为0.5mg。抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用，稀释液是PBS+1%海藻糖。

[0054] 使用定量喷膜仪以1ul/cm数量将两者划于NC膜上，保持两线间隔0.5cm以上，距离NC膜边缘0.2mm以上。

[0055] 60℃烘干1小时，干燥保存。

[0056] 另一方面，制备结合垫。NGAL捕获抗体使用Minipore®的超滤离心管洗涤3遍，洗涤液为纯水；

[0057] 选择100nm的纳米增强型时间分辨荧光微球，与NGAL捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS，控制抗体与微球重量比为1/5，加入EDC使终浓度为10mg/ml，室温反应30min。

[0058] 加入封闭液封闭，反应12小时。封闭液含有1%质量百分比浓度的F68、50mmol/ml甘氨酸。

[0059] 15000rpm/min离心10min，去上清，PBS洗涤2遍；

[0060] 使用微球稀释液稀释到120倍，微球稀释液配方：PBS+20%海藻糖或者蔗糖+3%吐温20。

[0061] 定量(8.0ul/cm)喷涂到玻纤上制成结合垫。60℃烘干4小时，干燥保存。

[0062] 另一方面，处理玻璃纤维膜，使玻璃纤维膜上含有一定量的表面活性剂等，以制备样品垫。

[0063] 具体地，配制含有0.9%NaCl+0.5%的表面活性剂S9的水溶液；

[0064] 将玻璃纤维膜浸泡于上述溶液中；

[0065] 取出玻璃纤维膜，25℃烘干，至重量不再变化，取出切割成1.7cm x 30cm宽度的长条备用。

[0066] 最后，将底板、NC膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴，切割成3.7mm，装入塑料卡壳。

[0067] 参图1，对采用本实施例制得的试纸条绘制标准曲线。

[0068] NGAL标准品及质控品采用如下步骤制得：

[0069] 购买NGAL重组蛋白，使用超纯水配置成1mg/ml的储存原液，用PBS稀释到工作浓度，使用NGAL检测试剂(北京九强生物)检测确定浓度，稀释到指定浓度制成标准品和质控品。

[0070] 具体的，采用制得的时间分辨免疫层析试纸条，检测不同浓度的NGAL标准品(取NGAL8个不同浓度的标准品，分别为0ng/mL、19.53125ng/mL、39.0625ng/mL、78.125ng/mL、156.25ng/mL、312.5ng/mL、625ng/mL、1250ng/mL，每个浓度做5个平行样)。膜层析反应15分钟后，仪器读取质控线C、检测线T信号，以检测的样品荧光值信号比值T/C为横坐标，NGAL标准品浓度为纵坐标，建立方程并拟合成标准曲线。

[0071] 图1标准曲线 $y = 50.754x$ ， $R^2 = 0.9923$ ，y代表加入的抗原浓度，x代表试纸条上T

线与C线的荧光强度比值。结果显示,该标准曲线的相关系数 R^2 大于0.99,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含NGAL浓度进行定量分析。

[0072] 实施例2

[0073] 本实施例的试纸条由如下步骤制得:

[0074] NC膜上制备检测线和质控线。

[0075] 其中,检测线使用NGAL包被抗体,浓度为2.5mg,高于此浓度的抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液是PBS+1%海藻糖+5%NaCl。

[0076] 质控线使用抗NGAL捕获抗体的二抗,用量为2.5mg。抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液是PBS+10%海藻糖+5%NaCl。

[0077] 使用定量喷膜仪以2ul/cm数量将两者划于NC膜上,保持两线间隔0.5cm以上,距离NC膜边缘0.2mm以上。

[0078] 25℃烘干5小时,干燥保存。

[0079] 另一方面,制备结合垫。NGAL捕获抗体使用Minipore®的超滤离心管洗涤3遍,洗涤液为纯水;

[0080] 选择300nm的纳米增强型时间分辨荧光微球,与NGAL捕获抗体溶解于pH8、浓度0.05mol/L的PBS,控制抗体与微球重量比为1/20,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应12h。

[0081] 加入封闭液封闭,反应30min。封闭液含有0.1%质量百分比浓度的F68、10mmol/ml甘氨酸。

[0082] 25000rpm/min离心10min,去上清,PBS洗涤2遍;

[0083] 使用微球稀释液稀释到30倍,微球稀释液配方:PBS+20%海藻糖或者蔗糖+1%吐温20。

[0084] 定量(3.0ul/cm)喷涂到玻纤上制成结合垫。25℃烘干1h,干燥保存。

[0085] 另一方面,处理玻璃纤维膜,使玻璃纤维膜上含有一定量的表面活性剂等,以制备样品垫。

[0086] 具体地,配制含有0.9%NaCl+3%的表面活性剂S9的水溶液;

[0087] 将玻璃纤维膜浸泡上述溶液中;

[0088] 取出玻璃纤维膜,60℃烘干,至重量不再变化,取出切割成1.7cm x 30cm宽度的长条备用。

[0089] 最后,将底板、NC膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴,切割成3.7mm,装入塑料卡壳。

[0090] 参图2,采用本实施例制得的试纸条绘制标准曲线,方法同实施例1。

[0091] 图2标准曲线 $y=16.785x$, $R^2=0.9934$ 。结果显示,该标准曲线的相关系数 R^2 大于0.99,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含NGAL浓度进行定量分析。

[0092] 实施例3

[0093] NGAL质控品浓度分别为130ng/mL(质控品1)和700ng/mL(质控品2)。

[0094] 采用上述实施例1及2的试纸条对质控品1及质控品2分别进行NGAL检测,以验证准确度。参表1,结果显示,本发明的试纸条具有较高的准确度。

[0095] 表1:本发明试纸条NGAL检测准确度验证

[0096]

	实施例 1		实施例 2	
测定次数	质控品 1	质控品 2	质控品 1	质控品 2
1	130.229	693.267	130.446	723.754
2	129.735	728.924	121.109	664.072
3	140.348	705.143	125.016	667.818
平均值 (ng/mL)	133.437	709.111	125.524	685.215
靶值 (ng/mL)	130	700	130	700
相对偏差 (B%)	2.64	1.30	-3.44	-2.11

[0097] 实施例4

[0098] 以PBS稀释标准品至目标浓度作为待测样品,对实施例1及2的试纸条 进行重复性试验,重复次数n=10。

[0099] 参表2,结果显示 $CV \leq 15.0\%$,本发明的试纸条重复性好。

[0100] 表2:本发明试纸条NGAL检测重复性验证

测定次数	实施例 1	实施例 2	测定次数	实施例 1	实施例 2
1	131.911	118.362	1	657.478	719.792
2	127.744	129.542	2	707.717	747.031
3	131.447	136.299	3	745.672	642.775
4	132.655	134.972	4	723.664	727.500
5	124.923	125.992	5	698.619	667.118
6	136.965	129.457	6	664.335	692.764
7	133.677	126.920	7	726.121	657.161
8	139.982	140.898	8	690.687	653.659
9	135.353	136.650	9	630.656	638.149
10	136.008	119.110	10	746.604	742.451
平均值 (ng/mL)	133.067	129.820	平均值 (ng/mL)	699.155	688.840
标准差(S)	4.423	7.507	标准差(S)	38.773	42.339
变异系数 (CV)	3.32%	5.78%	变异系数 (CV)	5.55%	6.15%

[0102] 实施例5

[0103] 采用阴性样本分别对实施例1及2的试纸条进行灵敏度检测,检测次数 $n=20$,得到试纸条相应的测量结果的相对荧光值,分别计算其测定结果平均值AVERAGE和标准偏差SD,得出 $AVERAGE+2SD$ 所对应的相对荧光值;根据图1到图2得到的定标曲线方程 计算出 $\bar{X}+2SD$ 所对应的浓度值,即为最低检出限。

[0104] 参表3,结果显示,本发明的试纸条最低检出限能达到NGAL小于 5ng/mL。

[0105] 表3:本发明试纸条NGAL检测灵敏度验证

[0106]

标本号	实施例 1	实施例 2
X_1	0.030	0.018
X_2	0.025	0.017
X_3	0.002	0.016
X_4	0.064	0.038
X_5	0.126	0.029
X_6	0.125	0.028
X_7	0.141	0.014
X_8	0.117	0.025
X_9	0.009	0.019
X_{10}	0.054	0.033
X_{11}	0.012	0.019

[0107]	X_{12}	0.013	0.013
	X_{13}	0.094	0.033
	X_{14}	0.133	0.030
	X_{15}	0.114	0.001
	X_{16}	0.031	0.032
	X_{17}	0.150	0.028
	X_{18}	0.052	0.035
	X_{19}	0.019	0.017
	X_{20}	0.001	0.027
	AVERAGE	0.066	0.024
	SD	0.053	0.009
	AVERAGE+2SD	0.172	0.042
	最低检出浓度 ng/mL	0.018	0.065

[0108] 应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施方式中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

[0109] 上文所列出的一系列详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施方式的具体说明,它们并非用以限制本发明的保护范围,凡未脱离本发明技艺精神所作的等效实施方式或变更均应包含在本发明的保护范围之内。

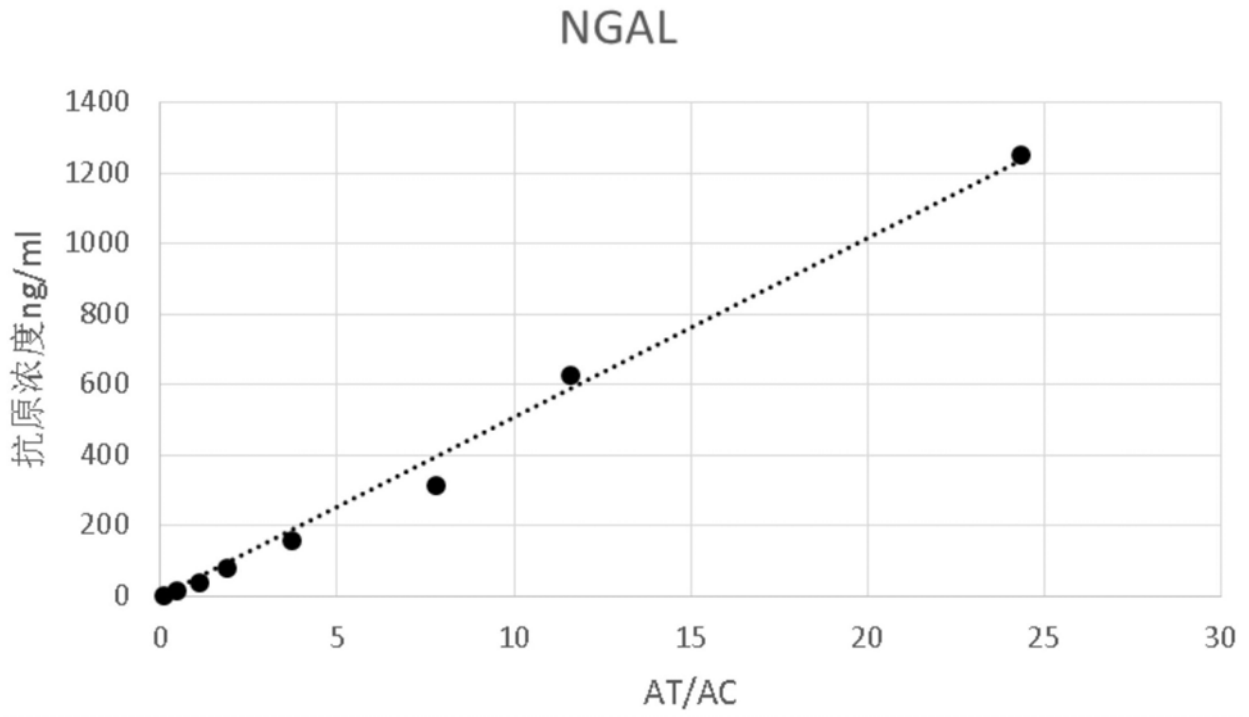


图1

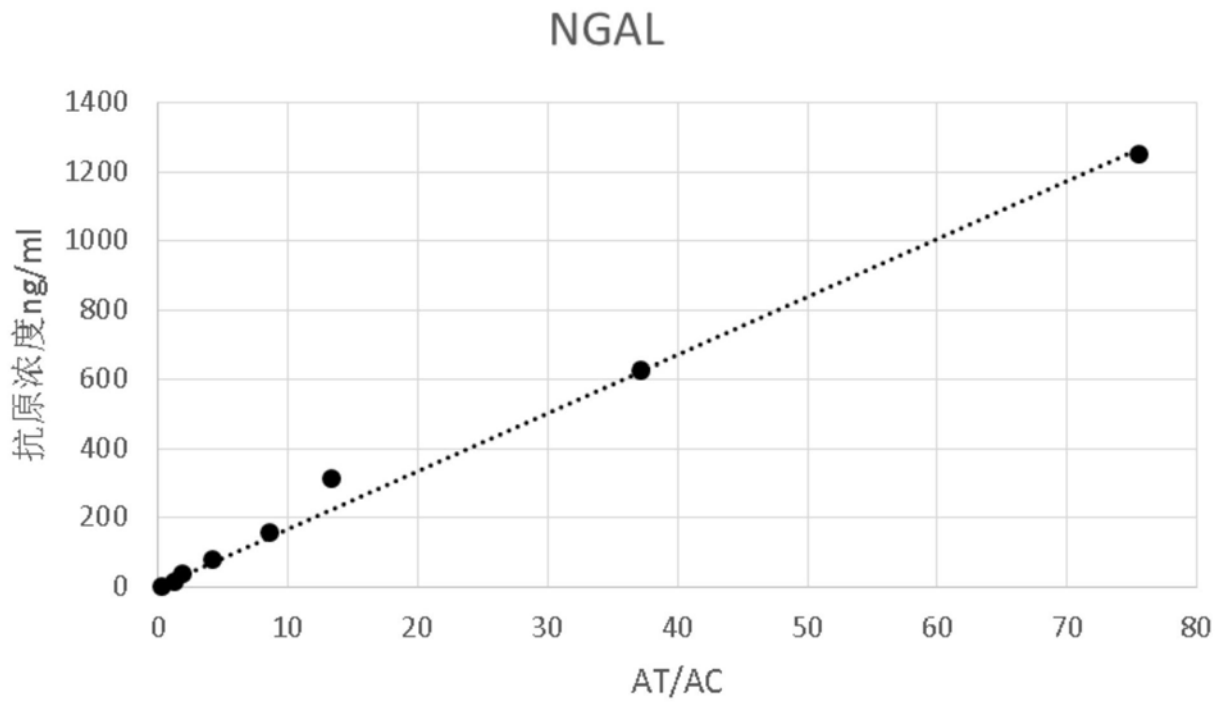


图2

专利名称(译)	定量检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN110361539A	公开(公告)日	2019-10-22
申请号	CN201910641544.9	申请日	2019-07-16
[标]发明人	邵伟 刘佳佳 王丽君		
发明人	邵伟 刘佳佳 王丽君		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明揭示了一种定量检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的试纸条的制备方法，包括：将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线，检测线使用NGAL包被抗体，质控线使用NGAL捕获抗体的二抗；制备结合垫，其包括：离心洗涤捕获抗体，将纳米增强型时间分辨荧光微球与NGAL捕获抗体溶解于PBS，加入EDC室温反应30min-12h；加入封闭液封闭30min-12小时；离心后PBS洗涤沉淀，使用微球稀释液稀释后定量喷涂到第一载体；其中，捕获抗体为NGAL捕获抗体；还包括制备样品垫，包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中，然后烘干。

