

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)



## [12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200820141792.4

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 201348633Y

[22] 申请日 2008.8.29

[21] 申请号 200820141792.4

[73] 专利权人 天津中新科炬生物制药有限公司

地址 300150 天津市开发区第六大街 65 号

[72] 发明人 李 洲 王之婴 杨发青

[74] 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司

代理人 关永琴

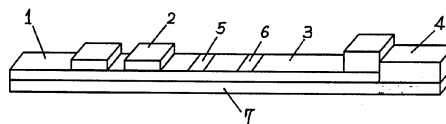
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### [54] 实用新型名称

人血清铁蛋白体外检测试剂

### [57] 摘要

本实用新型涉及免疫学诊断用实用领域，特别涉及一种人血清铁蛋白体外检测试剂，其由塑料支撑板(PVC板)上粘贴上样垫，上样垫一端连接含有铁蛋白抗体标记的胶体金垫，胶体金垫另一端连接包被有彼此分离的检测线 T 线和质控线 C 线的硝酸纤维素(NC)膜，T 线包被有铁蛋白抗体，C 线包被为抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)，NC 膜另一端连接样本吸收垫形成试纸条构成。试纸条亦可以装入塑料卡中形成卡式内包装。此诊断试剂用于人血清铁蛋白的检测，具有操作简便、设备及环境依赖少、反应快速、半定量、准确度高、特异性好、适合现场快速检测和经济实用等优点。



1、一种人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于由PVC板(7)上粘贴上样垫(1)，胶体金垫另一端连接包被有彼此分离的检测线T线和质控线C线的硝酸纤维素(NC)膜，T线包被有铁蛋白抗体，C线包被为抗鼠免疫球蛋白G(IgG)，NC膜(3)另一端连接样本吸收垫(4)形成试纸条构成。

2、根据权利要求1所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于所述铁蛋白抗体来源于小鼠腹水，经蛋白纯化获得；其标记及包被浓度可随检测灵敏度及检测浓度范围而变化设定。

3、根据权利要求1所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于所述上样垫(1)为无纺布，样本吸收垫(4)为吸水滤纸。

## 人血清铁蛋白体外检测试剂

### 技术领域

本实用新型涉及免疫学应用技术领域，特别涉及以胶体金免疫层析法快速半定量检测血清铁蛋白浓度的体外检测试剂。

### 背景技术

铁蛋白(Ferritin),存在于身体内各种细胞中,尤其以肝脏及网状内皮系统细胞浓度最高;其主要功能是将细胞中过多的游离态铁质释放出来,以供身体使用。因此,铁蛋白为身体组织中主要贮存铁质的一种蛋白,是维持铁质平衡中不可缺少的一种重要蛋白。正常的情况下,血清中每1ng/ml的铁蛋白,约相当于身体8~10mg之铁蛋白贮存量;所以血清中铁蛋白浓度,可以直接反映出人体铁代谢的健康状况,通过血清铁蛋白浓度测定人体铁元素代谢状况已逐渐普及,并发现其除了作为估计体内的总贮存量外,血清铁蛋白浓度尚可作为辅助指标用于肝病、及某些恶性肿瘤的诊断。

### 临床应用:

1. 血清铁蛋白值直接反映体内铁元素储藏量,作为贫血的诊断指标。
2. 作为某些疾病特别是肝病(如肝癌)的辅助指标,提高癌症诊断的准确率。

人血清铁蛋白有参考值为:男性:15~200ng/ml,女性:12~150ng/ml,儿童:7~140 ng/ml。由于检测方法的不同和地区差异,参考值略有变化。一般低于30ng/ml则有缺铁性贫血的倾向,需要相应的铁补充。大于300ng/ml应考虑是否存在其它疾病。

免疫层析胶体金技术是新型且较为简单的诊断技术,已得到相当广泛的应用,基本原理为:利用胶体金标记一种抗原或抗体,在试剂的NC膜上包被相应的配对抗原或抗体,检测时当样品中含相应的特异性抗体或抗原时,胶体金标记颗粒和样品中配体相结合形成复合物,然后在NC膜上层析,再被包被抗原或抗体捕获,形成肉眼可见的检测(T)线,通过检测线的有无实现对结果的判定。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点

### 发明内容

本实用新型旨在提供一种用于血清中铁蛋白浓度的半定量快速检测试剂,具有操作简便、设备及环境依赖少、反应快速、半定量准确度高、特

异性好、适合现场快速检测和经济实用等优点的人血清铁蛋白体外检测试剂。

本实用新型提供一种人血清铁蛋白体外检测试剂，其组件包括上样垫（1）、紧密连接于上样垫一端且含有铁蛋白血清浓度体外检测试剂抗体标记的胶体金垫（2）、与胶体金垫另一端紧密相连的硝酸纤维膜（NC膜）（3）和紧密连接于NC膜另一端的样本吸收垫（吸水纸）（4）。NC膜包被有彼此分离的检测线（T line）（5）和质控线（C line）（6），T线包被有一定量的铁蛋白抗体，C线包被为抗鼠IgG。上样垫、胶体金垫、NC膜和样本吸收垫按照图示顺序（图1）粘贴到PVC基板（7）上形成试纸条，试纸条亦可以装入塑料卡中形成卡式内包装。其特征在于T线为包被在NC膜上的一定量的铁蛋白抗体，胶体金垫含有一定量铁蛋白抗体标记的胶体金颗粒。

所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于所述上样垫为无纺布，样本吸收垫为吸水滤纸。

所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于所述铁蛋白抗体包被方法为：以0.003M, pH=7.2磷酸盐缓冲液（PB）将抗体稀释至0.18mg/mL，用喷膜机在NC膜确定位置以0.09 $\mu$ l/mm参数进行T线包被，同时在NC膜上另一确定位置以铁蛋白抗体包被C线，后，将NC膜至于干燥间，其环境为：温度20-25 $^{\circ}$ C，湿度小于30%。干燥8-10小时。

所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于所述的铁蛋白抗体标记胶体金颗粒的方法为：以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为30-50nm的胶体金颗粒溶胶，制备完成后取100ml胶体金液于烧杯内，用0.2M  $K_2CO_3$ 调至pH7.5，按100ml胶体金溶液加入0.5mg铁蛋白抗体，室温搅拌2小时，加入1%体积20%（m/V）牛血清白蛋白（BSA），0.5%体积20%（m/V）聚乙二醇（PEG）20000封闭20min，12000rpm离心30分钟，弃上清，用胶体金工作液复溶至76.5ml，按1ml溶液铺22cm<sup>2</sup>的比例均匀地铺在无纺布上，再置于干燥间，其环境为：温度20-25 $^{\circ}$ C，湿度小于30%。干燥2-4小时，制成胶体金垫

所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于所述的试纸条的装配方法为：在干燥室内，温度20-25 $^{\circ}$ C，湿度小于30%，取PVC板，将已包被的NC膜放置在塑料支撑板的中部粘贴，在NC膜T线一侧搭接胶体金垫（搭胶体金垫1mm）粘贴，在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫，搭胶体金垫的2mm；在NC膜C线一侧搭接样本吸收垫，搭NC膜1mm；最后用裁剪机将贴好塑料

板切成 3mm 或 4mm 宽的试纸条，切好的试纸条可以装入塑料卡内，形成检测卡或盒内，形成检测卡或盒。

所述的人血清铁蛋白体外检测试剂，其特征在于检测方法为：将被检血清、血浆或全血平衡至温室，将试纸条或试剂卡平放，在上样垫上加入 24 $\mu$ l 血清或血浆，或 40 $\mu$ l 全血，并加入 16 $\mu$ l 样本稀释液，样品溶解胶体金并在 NC 膜上层析，然后用肉眼直接观察在 25-30 分钟内 C、T 线的反应情况，对比色卡，并判定检测结果。

本实用新型的有益效果是：提供一种利用胶体金免疫层析技术实现半定量监测人血清铁蛋白体外检测试剂，具有操作简便、设备及环境依赖少、反应快速、半定量准确度高、特异性好、适合现场快速检测和经济实用等优点。

附图说明：

图 1：人血清铁蛋白体外检测试剂试纸条结构示意图。

- |            |            |
|------------|------------|
| 1：上样垫      | 2：胶体金垫     |
| 3：NC 膜     | 4：样本吸收垫    |
| 5：检测线（T 线） | 6：质控线（C 线） |
| 7：PVC 板    |            |

具体实施方式

实施例：制备人血清铁蛋白体外检测试剂

## 1. 主要材料

1.1 鼠源铁蛋白抗体：芬兰 MedixMAB 公司产品，用于胶体金标记；

配对鼠源铁蛋白抗体：芬兰 MedixMAB 公司产品，用于 NC 膜包被；  
氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>)，柠檬酸三钠，牛血清白蛋白(BSA),聚乙二醇(PEG) 20000，美国 sigma 公司产品。NC 膜：美国 Millipore 公司产品，型号为 HF135。其它常用试剂，分析纯

1.2 临床经 ELISA 测定铁蛋白浓度的定值血清 50 份

## 2 方法

2.1 鼠抗铁蛋白胶体金标记，以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液，制备完成后取三份等体积胶体金，分别用 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液调到 pH7.5、pH8.0 和 pH9.0。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌，按每 100ml 溶液加入 0.3mg、0.5mg、1.0mg 铁蛋白抗体缓慢滴加到胶体金溶液中，继续搅拌 0.5 小时，再滴加入到终浓度为 0.1%的 PEG2000 和 0.2%的

BSA 进行封闭 30min, 标记结束后以 12000 r/m 离心, 弃上清, 沉淀按原体积复溶至不同配比的胶体金工作液(Tris 缓冲液, pH7.3, 含一定量的酪蛋白和表面活性剂)中。然后将标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 22cm<sup>2</sup> 的比例加样于无纺布上, 在温度 20-25℃, 相对湿度在 <30% 的干燥间干燥 2-4 小时, 制成胶体金垫。

2. 2 鼠抗铁蛋白的包被, 用 pH=7.3, 0.003M PB 将鼠抗铁蛋白分别稀释成 0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.5mg/ml, 然后用喷膜仪在 NC 膜固定位是按 0.09ul/mm 进行划线包被, 同时在 NC 膜另一固定位置包被配对抗铁蛋白抗体, 用于产品的质控, 包被完成后将 NC 膜在在温度 25℃, 相对湿度在 <30% 的干燥间干燥 8 小时。

2. 3 铁蛋白快速检测试纸的组装, 在干燥室内(温度 20-25℃, 相对湿度 <30%) 取 PVC 基板, 将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴, 在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫(搭胶体金垫 1mm 粘贴, 在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫(搭胶体金垫的 2mm); 在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫(搭样本吸收垫的 2mm); 然后用裁剪机将贴好塑料板切成 3mm 或 4mm 宽的试纸条。切好的试纸条可以再装入塑料卡或盒内, 形成检测卡或盒。

2. 4 检测方法 将被检血清、血浆或全血平衡至温室, 将试纸条或试剂卡平放, 在上样垫上加入 24ul 血清或血浆, 或 40ul 全血, 并加入 16ul 样本稀释液, 样品溶解胶体金并在 NC 膜上层析, 然后用肉眼直接观察在 10mins、15mins、20mins、25mins, 30mins, C、T 线的反应情况, 比对比色卡, 并判定检测结果。

2. 5 试纸工艺参数调试 将浓度不同标记、包被的试剂进行组合配对, 制备小样, 利用质控血清对试剂进行测试, 发现最佳组合。

### 3 结果

3. 1 试纸参数确定, 根据小样的检测结果, 确定了空白金最佳标记 pH 值为 7.5; 铁蛋白的最佳标记量为 0.5mg/100ml 胶体金溶液; 最佳的胶体金工作液为 100mM Tris-Cl 缓冲液, pH7.3, 含 0.5%酪蛋白, 2%蔗糖, 0.2%吐温-20; 最佳铁蛋白包被浓度为 0.2 mg/ml。检测结果的最佳判定时间为 25 分钟。

3. 2 临床血清检测, 以 ELISA 试剂为对照, 50 份 ELISA 定值血清中, 本试剂肉眼定值和 ELISA 试剂相比无显著性差异。

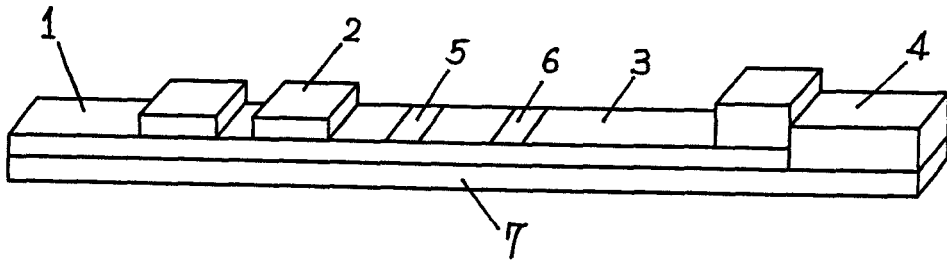


图 1

专利名称(译)	人血清铁蛋白体外检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN201348633Y</a>	公开(公告)日	2009-11-18
申请号	CN200820141792.4	申请日	2008-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 王之婴 杨发青		
发明人	李洲 王之婴 杨发青		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本实用新型涉及免疫学诊断用实用领域，特别涉及一种人血清铁蛋白体外检测试剂，其由塑料支撑板(PVC板)上粘贴上样垫，上样垫一端连接含有铁蛋白抗体标记的胶体金垫，胶体金垫另一端连接包被有彼此分离的检测线T线和质控线C线的的硝酸纤维素(NC)膜，T线包被有铁蛋白抗体，C线包被为抗鼠免疫球蛋白G(IgG)，NC膜另一端连接样本吸收垫形成试纸条构成。试纸条亦可以装入塑料卡中形成卡式内包装。此诊断试剂用于人血清铁蛋白的检测，具有操作简便、设备及环境依赖少、反应快速、半定量、准确度高、特异性好、适合现场快速检测和经济实用等优点。

