



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102621312 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 01

(21) 申请号 201110032320. 1

(22) 申请日 2011. 01. 28

(71) 申请人 上海科新生物技术股份有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区哈雷路 1011 号 501 室 A 区

(72) 发明人 韩永俊 高成秀 张玥 葛文斌
孙宏彬 钱杰

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限
公司 31224

代理人 吕伴

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

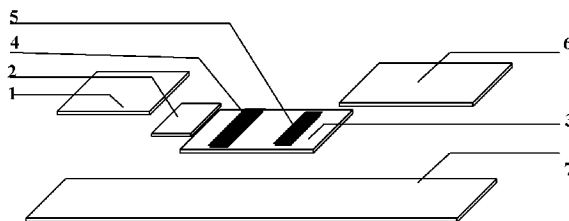
权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 1 页

(54) 发明名称

胶体金层析法肝病检测试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种胶体金层析法肝病检测试纸以及制备方法。其胶体金层析法肝病检测试纸包括有样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫由底板的一侧依次向所述底板的另一侧粘贴在所述底板上,其结合垫包被有金标抗体 a 和金标抗体 b;硝酸纤维素包被膜上设置有检测线和质控线,检测线包被有 Gp210 抗原蛋白,质控线包被有金标抗体 c。本发明采用间接免疫测定法,引入 Gp210 抗原蛋白,对结合垫和样品垫进行了工艺优化,来实现抗 Gp210 抗体的高灵敏度、高特异、高准确性的检测性能,为辅助诊断原发性胆汁肝硬化提供参考依据。



1. 胶体金层析法肝病检测试纸,包括有样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素包被膜(3)、吸水垫(6),所述样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素包被膜(3)、吸水垫(6)由底板(7)的一侧依次向所述底板(7)的另一侧相互搭接粘贴在所述底板(7)上,其特征在于:

所述的结合垫(2)包被有金标抗体 a 和金标抗体 b;

所述的硝酸纤维素包被膜(3)上设置有检测线(4)和质控线(5),所述的检测线(4)包被有 Gp210 抗原蛋白,所述的质控线(5)包被有金标抗体 c。

2. 根据权利要求 1 所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:所述金标抗体 a 中的抗体 A 为抗人 IgG 单克隆抗体、抗人 IgG 多克隆抗体、葡萄球菌 A 蛋白(SPA)、链球菌 G 蛋白(Protein G)中的一种或多种。

3. 根据权利要求 2 所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:所述的抗人 IgG 多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种;所述的抗人 IgG 单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。

4. 根据权利要求 1 所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:所述金标抗体 a 中的抗体 A 为葡萄球菌 A 蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:所述的金标抗体 b 中的抗体 B 和金标抗体 c 中的抗体 C 同时或不同时为单克隆抗体或多克隆抗体中的一种,其中金标抗体 b 中的抗体 B 和金标抗体 c 中的抗体 C 可发生特异性结合形成免疫复合物。

6. 根据权利要求 5 所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:所述的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种,所述的单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。

7. 根据权利要求 1 所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:所述的检测线上包被的 Gp210 抗原蛋白为通过原核表达克隆化基因获得的 Gp210 抗原蛋白。

8. 一种胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法,其特征在于,具体包括如下步骤:

步骤 1,硝酸纤维素包被膜的制备

(1)Gp210 抗原蛋白的制备,通过原核表达克隆化基因获得 Gp210 抗原蛋白;

(2) 金标抗体 c 的制备:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 抗体 C,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用;

(3) 硝酸纤维素包被膜的制备,用包被膜缓冲液稀释步骤(1)制备的 Gp210 抗原蛋白至浓度为 0.5 ~ 1.5mg/mL,包被于硝酸纤维素包被膜的检测线上;用包被膜缓冲液稀释将抗体 c 稀释到 0.8 ~ 2.0mg/mL,以 1 ~ 10 μ l/cm 包被于硝酸纤维素膜的质控线上,硝酸纤维素包被膜制备好以后置放于 37 $^{\circ}$ C 烘干备用;

步骤 2,结合垫的制备

(1) 金标抗体 a 的制备:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 抗体 A,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用;

(2) 金标抗体 b 的制备:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 抗体 B,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌

10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用;

(3) 结合垫的制备: 经处理液浸渍处理的聚脂膜, 烘干后, 将金标抗体 a 和金标抗体 b 混合后, 以 0.5 ~ 4 μ l/cm 的用量喷涂在预处理的聚脂膜上, 25℃ ~ 37℃ 干燥后得结合垫, 结合垫置于 2℃ ~ 8℃ 的环境下备用;

步骤 3, 样品垫的制备

将玻璃纤维膜经处理液浸渍处理后制成样品垫, 样品垫于 37℃ 烘干后备用;

步骤 4, 在底板上顺次相互搭接粘贴经前述步骤 1-3 所制作完成的硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫和吸水垫;

步骤 5, 对步骤 4 所制作完成的材料, 切割成试纸条。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 在所述的步骤 1 的 (2) 中, 金标抗体 c 的制备: 用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 8.0 ~ 9.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 15 μ g 抗体 C, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用; 其中抗体 C 为羊抗兔 IgG。

10. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 在所述的步骤 2 的 (1) 中, 金标抗体 a 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 8.0 ~ 9.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 15 μ g 抗体 A, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用; 其中抗体 A 为羊抗人 IgG。

11. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 在所述的步骤 2 的 (1) 中, 金标抗体 a 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 抗体 A, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用。然后将金标 SPAOD 302 ~ 4 μ l/cm 喷涂于结合垫, 干燥后备用; 其中抗体 A 为鼠抗人 IgG。

12. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 在所述的步骤 2 的 (1) 中, 金标抗体 a 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 5.0 ~ 6.5, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10 ~ 15 μ g 抗体 A, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用。然后将金标 SPA OD 202 ~ 4 μ l/cm 喷涂于结合垫, 干燥后备用; 其中抗体 A 为葡萄球菌 A 蛋白。

13. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 在所述的步骤 2 的 (2) 中, 金标抗体 b 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 15 μ g 抗体 B, 兔 IgG, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4℃ 备用, 其中抗体 B 为兔 IgG。

14. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述的步骤 2 的 (3) 中, 将制备好的金标抗体 a 和金标抗体 b 按体积比 20 ~ 40 : 15 ~ 20 比例混合, 用 BIO-Dot 喷膜机以 2.0 ~ 4 μ l/

cm 喷涂在预处理的聚脂膜上, 25°C ~ 37°C 干燥得结合垫, 结合垫封袋后置于 2°C ~ 8°C 的环境下备用; 其中金标抗体 a 中的抗体 A 为葡萄球菌 A 蛋白, 金标抗体 b 为金标兔 IgG。

胶体金层析法肝病检测试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫应用领域,具体涉及到利用胶体金免疫层析技术检测肝病的试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 原发性胆汁性肝硬化 (Primary biliary cirrhosis, PBC) 是一种原因不明的,由免疫损害介导的慢性进展性肝脏疾病,其主要病理表现为肝内小胆管进行性破坏伴门脉炎症性改变,最终导致肝纤维化及肝硬化。临床表现为慢性梗阻性黄疸与肝脾肿大,后期可出现肝功能衰竭与门脉高压等症。除非进行有效治疗或肝移植,门脉高压和终末期肝病的其他并发症将最终导致患者死亡。PBC 多发于 30 到 60 岁之间,且女性患者较为常见,男女比例可达 1 : 9。早期运用药物治疗可控制疾病的进展,而 PBC 的治疗关键在于早期治疗,而早期治疗的前提是早期诊断,早期诊断就成为大家所关注的焦点。

[0003] 在 PBC 患者体内可检出多种自身抗体,如抗核抗体 (ANA)、抗线粒体抗体 (AMA)、抗平滑肌抗体 (SMA)、抗肝肾微粒体抗体 (LKM-1) 抗可溶性酸性核蛋白 (Sp100) 抗体、抗核膜糖蛋白 (Gp210) 抗体、抗早幼粒细胞白血病蛋白 (PML)、抗可溶性肝抗原 / 肝胰抗原 (SLA/LP) 抗体等,其中最主要的抗体是 AMA, PBC 常伴有高滴度的 AMA,病程早期就出现 AMA 是本病的特点,但仍有一部份 PBC 患者的 AMA 阴性,因此需要其他的免疫学指标来实现这部分患者的检出。

[0004] 抗核抗体中 (antinuclear antibody, ANA) 的抗核膜糖蛋白 (GP210) 抗体是 PBC 的高特异性自身抗体,它可与抗线粒体抗体同时出现,也可出现在抗线粒体抗体阴性的 PBC 患者中,特异性高达 99%,大约有 10% -40% 的 PBC 患者血清中可检测出此抗体。抗 GP210 抗体在其他患者如自身免疫性肝炎、风湿性疾病、多发性肌炎及干燥综合症中是很少见的,故可作为 PBC 的一个重要的辅助诊断指标。且抗 GP210 抗体可以作为 PBC 的预后指标。研究表明,抗 GP210 抗体持续高滴度阳性患者的生存率明显低于经过临床药物治疗后抗 GP210 抗体阴转患者和初检抗 GP210 抗体阴性的患者。

[0005] 1985 年, Ruffati 等首次发现 PBC 患者血清中存在针对核包膜、免疫荧光下呈环型的抗核抗体 (Ruffati A, et al. Nuclear membrane-staining antinuclear antibody in patients with primary biliary cirrhosis. J Clin Immunol. 1985 ;5(5) :357-61.)。

[0006] 1988 年, Lozano, Lassoued 等以免疫印迹和免疫沉淀的方法检测到具有这种免疫荧光下环型 ANA 的 PBC 患者血清识别核包膜中分子量 200KD 左右的多肽 (Lassoued K, et al. Autoantibodies to 200kD polypeptide(s) of the nuclear envelope : a new serologic marker of primary biliary cirrhosis. Clin Exp Immunol. 1988 ;74(2) : 283-8. Lozano F. et al. Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. Hepatology. 1988 ;8(4) :930-8.)。

[0007] 1990 年 Courvalin 等从大鼠肝组织中提取和纯化得到一种 210KD 的位于核孔的完整糖蛋白并可以和具有环型 ANA 的 PBC 患者血清反应,从而确定了该种抗体所针对

的抗原成分,即 Gp210,其抗原决定簇为氨基末端的 15 个线性氨基酸片段和羧基末端的氨基酸片段。(Courvalin JC, Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997 ;(17) :79-90.)。

[0008] 抗 Gp210 抗体对 PBC 诊断的敏感性为 10% -42%,平均约为 25%,而特异性可达 99% 以上;抗 Gp210 抗体在 AMA 阴性的 PBC 患者中阳性率 20% -75%,平均 50% 左右,有一定的诊断价值。Nakamura 认为持续的针对 Gp210 的反应和界面肝炎的严重程度有关,抗 Gp210-C 末端肽可作为 UDCA 治疗效果监测及早期发现有发展为终末期肝衰竭的 PBC 患者的指标。(Nakamura M, et al. Increased expression of nuclear envelope GP210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006 ; 26(2) :138-45.)。

[0009] 最近有学者用免疫组化方法研究 Gp210 在肝穿刺标本上的表达情况,研究表明 PBC 患者胆管上皮细胞 (BEC) 核被膜上有明显的 Gp210 抗原表达,正常对照组无表达,自身免疫性肝炎、慢性乙肝、慢性丙肝仅有微弱的表达;而且在 PBC 患者中 Gp210 的表达强度和汇管区炎症、界面肝炎和小叶炎症正相关,这表明 Gp210 在 PBC 患者小胆管上的表达可能和 BEC 的炎性损害有关,对 Gp210 的自身免疫反应可能导致了 PBC 患者向末期肝衰竭的进展。

[0010] 其中抗核膜糖蛋白 gp210 抗体是 PBC 的高度特异性抗体,其特异性高达 96% 以上,极少出现于自身免疫性肝炎、类风湿性关节炎、干燥综合症和多发性肌炎病人中。检测抗 gp210 抗体对于 AMA 阴性或者缺乏一般临床特征的 PBC 患者以及其实验室、病理结果、异常的 PBC 患者的确诊具有重要的意义 (Nickowitz RE, Worman HJ. Autoantibodies against integral membrane protein of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Gastroenterology*, 1994(106) :193-199)。

[0011] 另外,抗核膜糖蛋白 gp210 抗体也可以作为疾病恶性转归的预测指标。国外报道抗核膜糖蛋白 gp210 抗体阳性率为 9.5% ~ 41%,其特异性为 96% ~ 99%,且存在于 20% ~ 47% 的 AMA 阴性的 PBC 患者中。朱焯等报道抗核膜糖蛋白 gp210 抗体其敏感性达 16.9%,特异性达 96% (朱焯,屠小卿,周琳等. 原发性胆汁肝硬化患者血清中抗线粒体抗体及其亚型和抗核抗体的联合检测的临床价值 [J]. *现代免疫学*. 2006, 26(2) :136-138.)。

[0012] Gp210 是核孔复合物中一种相对分子质量为 210000 完整的跨膜蛋白,特异性的位于核孔区,是核孔复合物中一种完整的膜蛋白,特异性部分位于核孔区,因此免疫荧光检测中,在核孔处呈环状核膜型荧光反应 (Wozniak RW, Bartnik E, Blobel G. Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore [J]. *J Cell Biol.* 1989(108) :2083-2087.)。主要抗原表位位于蛋白胞浆段羧基端的 15 个氨基酸内,对该抗体的进一步研究不仅可加强对 PBC 致病机制的认识,并有助于诊断不典型 PBC,解决临床上确诊 PBC 中的一些困难,尤其是对于 AMA 阴性的或者实验室、病理结果异常的 PBC 患者的确诊具有特殊意义。

[0013] 因此,抗 Gp210 抗体检测是诊断 AMA 阴性 PBC 的非常重要的血清学诊断依据,对于 AMA 阴性的 PBC 患者的诊断具有重要的意义。抗 Gp210 抗体是 PBC 的特异性自身抗体,该抗体在 PBC 诊断中特异性高达 97-100%,极少出现在其他自身免疫性疾病中,敏感性为 20% -30%,可作为 PBC 的一个重要辅助诊断指标。

[0014] 目前实验室常用的检测抗核膜糖蛋白 (GP210) 抗体的方法主要有酶联免疫吸

附剂试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence, IFF)、免疫印迹法 (immunoblotting test, IBT)、线性免疫分析法 (Line immuno assay, LIA) 等。

[0015] 免疫印迹法虽综合了 SDS-PAGE 的高分辨力和 ELISA 法的高特异性和敏感性,但操作相对复杂,完成整个实验过程需三小时左右,亦需要专业免疫学技术人员在实验室中进行实验操作,同时易受各种温度和孵育时间等环境条件因素的影响,对试验带来诸多不便。且试剂具有较强的毒性和污染性。目前市场上商品化抗 Gp210 抗体检测试剂盒主要为免疫印迹法。

[0016] 间接免疫荧光法可作半定量测定,但需要专业人员操作特殊的荧光显微镜观察结果,结果判定有一定的主观人为判断误差,客观性不足;另外易受其他干扰产生假阳性,标准化困难,技术程序比较复杂,检测时间长,也不适合高通量标本的检测。

[0017] 线性免疫分析法主要用于疾病大类的筛查,针对性相对较差,同时也不适合高通量样本的检测。

[0018] ELISA 法检测可用于高通量标本测定,灵敏度也较高,目前被广泛认可,但操作比较繁琐,需多次加样和洗涤,完成整个实验过程需三小时左右,且易受温度和孵育条件的影响,需酶标仪,亦需要专业免疫学技术人员在专业实验室中进行实验操作,给实验带来诸多不便。

[0019] 胶体金免疫层析法 (gold-immunochromatography assay, GICA) 是应用胶体金标记技术,以胶体金作为示踪物,以条状纤维层析材料为固相,通过毛细效应使样品溶液在层析条上泳动,使样品中的待测物与结合垫上针对待测物的受体 (如抗原或抗体) 发生免疫反应,并与条状纤维层析材料上的抗原 (或抗体) 发生免疫反应而被截留,进而形成肉眼可见的紫红色条带,得到直观的实验结果,达到快速检测的目的 (Sikowicz G et al. One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choricogonadotropin in urine. Clin Chem. 1990 (36) 1579-1586.)。使用时只将样品加样到样品垫上,数分钟就根据检测线上紫红色条带出现情况来判断阴阳性结果。与其他检测方法相比,检测时间短,只需要 5 ~ 10 分钟,操作人员无需培训,操作简便、快速,无需低温保存,储运方便等优势。

[0020] 在自身免疫性疾病方面,目前国外市场上出现了一些检测自身免疫疾病的试纸条产品,但抗 Gp210 抗体的胶体金免疫试纸在国内外市场上仍没有问世。

发明内容

[0021] 本发明所要解决的技术问题是为了克服以上方法学的不足,将胶体金层析法应用到抗 Gp210 抗体的检测中,同时首次将 Gp210 抗原蛋白应用到胶体金层析法中,采用间接法来实现血液中的抗 GP210 抗体检测,实现高特异、高灵敏度、高准确性的检测性能,快速筛选出抗 GP210 抗体的阳性样本,能快速、便捷地辅助诊断原发性胆汁肝硬化。

[0022] 本发明所要解决的技术问题之一在于提供一种胶体金层析法肝病检测试纸。

[0023] 本发明所要解决的技术问题之二在于提供一种胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法。

[0024] 作为本发明第一方面的一种胶体金层析法肝病检测试纸,包括有样品垫、结合垫、

硝酸纤维素包被膜、吸水垫,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫由底板的一侧依次向所述底板的另一侧粘贴在所述底板上,其特症在于:

[0025] 所述的结合垫包被有金标抗体 a 和金标抗体 b;

[0026] 所述的硝酸纤维素包被膜上设置有检测线和质控线,所述的检测线包被有 Gp210 抗原蛋白,所述的质控线包被有金标抗体 c。

[0027] 进一步,所述的金标抗体 a 中的抗体 A 为抗人 IgG 单克隆抗体、抗人 IgG 多克隆抗体、葡萄球菌 A 蛋白 (SPA)、链球菌 G 蛋白 (Protein G) 中的一种或多种。

[0028] 所述的抗人 IgG 多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种。

[0029] 所述的抗人 IgG 单克隆抗体为羊源或兔源中的一种。

[0030] 所述金标抗体 a 中的抗体 A 优选为葡萄球菌 A 蛋白。

[0031] 所述的金标抗体 b 中的抗体 B 和金标抗体 c 中的抗体 C 同时或不同时为单克隆抗体或多克隆抗体中的一种,其中金标抗体 b 中的抗体 B 和金标抗体 c 中的抗体 C 可发生特异性结合形成免疫复合物。

[0032] 所述的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种,单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。

[0033] 所述的金标抗体 b 中的抗体 B 优选为兔 IgG,相应地金标抗体 c 中的抗体 C 优选为羊抗兔 IgG。

[0034] 所述的检测线上包被的 Gp210 抗原蛋白为通过原核表达克隆化基因获得的 Gp210 抗原蛋白。

[0035] 所述检测是定性检测人血清中抗 GP210 抗体,辅助诊断早期原发性胆汁肝炎。

[0036] 所述 Gp210 抗原蛋白是通过大肠杆菌原核表达的克隆化基因所获得的重组蛋白。

[0037] 所述样本来自人血清、血浆、全血样本。

[0038] 根据本发明应用的单克隆抗体可通过由 Kohler 等 (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975 (256): 495-497) 首先描述的杂交瘤法进行制备,或者可通过重组 DNA 法进行制备 (见美国专利 4816567)。“单克隆抗体”由 Clackson 等 (Making antibody fragments using phage display libraries [J]. Nature, 1991: 624-628) 和 Marks 等 (By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage [J]. Journal of Molecular Biology, 1991: 581-597) 所述技术从噬菌体抗体文库中分离。

[0039] 根据本发明应用的多克隆抗体可通过陈学清等 (免疫学常用实验方法. [M], 2000: 15-26) 通过免疫动物来制备。

[0040] 本发明的 SPA、Protein G 通过原核表达克隆化重组基因,由 J. 萨姆布鲁克等 (分子克隆实验指南. [M], 2002: 1228-1232) 描述的大肠杆菌原核表达克隆化基因。

[0041] 作为本发明第二方面的一种胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法,该试纸由样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫和底板共同组成,其特症在于该方法包括有以下步骤:

[0042] 步骤 1,硝酸纤维素包被膜的制备

[0043] (1)Gp210 抗原蛋白的制备,通过原核表达克隆化基因获得 Gp210 抗原蛋白;

[0044] (2) 金标抗体 c 的制备 :用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 抗体 C,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用 ;

[0045] 3) 硝酸纤维素包被膜的制备,用包被膜缓冲液稀释步骤 (1) 制备的 Cenp-B 抗原蛋白至浓度为 0.5 ~ 1.5mg/mL,包被于硝酸纤维素包被膜的检测线上 ;用包被膜缓冲液稀释将抗体 c 稀释到 0.8 ~ 2.0mg/mL,以 1 ~ 10 μ l/cm 包被于硝酸纤维素膜的质控线上,硝酸纤维素包被膜制备好以后置放于 37 $^{\circ}$ C 烘干备用 ;

[0046] 步骤 2,结合垫的制备

[0047] (1) 金标抗体 a 的制备 :用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 抗体 A,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用 ;

[0048] (2) 金标抗体 b 的制备 :用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 抗体 B,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用 ;

[0049] (3) 结合垫的制备 :经处理液浸渍处理的聚脂膜,烘干后,将金标抗体 a 和金标抗体 b 混合后,以 0.5 ~ 4 μ l/cm 的用量喷涂在预处理的聚脂膜上,25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 干燥后得结合垫,结合垫置于 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 的环境下备用 ;

[0050] 步骤 3,样品垫的制备

[0051] 将玻璃纤维膜经处理液浸渍处理后制成样品垫,样品垫于 37 $^{\circ}$ C 烘干后备用 ;

[0052] 步骤 4,在底板上顺次相互搭接粘贴经前述步骤 1-3 所制作完成的硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫和吸水垫 ;

[0053] 步骤 5,对步骤 4 所制作完成的材料,切割成试纸条。

[0054] 在所述的步骤 1 的 (2) 中,金标抗体 c 的制备 :用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 8.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 15 μ g 抗体 C,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用 ;其中抗体 C 为羊抗兔 IgG。

[0055] 在所述的步骤 2 的 (1) 中,金标抗体 a 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 8.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 15 μ g 抗体 A,,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用 ;其中抗体 A 为羊抗人 IgG。

[0056] 在所述的步骤 2 的 (1) 中,金标抗体 a 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 抗体 A,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用。然后将金标 SPAOD 30 2 ~ 4 μ l/cm 喷涂于结合垫,干燥后备用 ;其中抗体 A 为鼠抗人 IgG。

[0057] 在所述的步骤 2 的 (1) 中, 金标抗体 a 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 5.0 ~ 6.5, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10 ~ 15 μ g 抗体 A, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。然后将金标 SPA OD 20 2 ~ 4 μ l/cm 喷涂于结合垫, 干燥后备用; 其中抗体 A 为葡萄球菌 A 蛋白。

[0058] 在所述的步骤 2 的 (2) 中, 金标抗体 b 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾缓冲液调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 5 ~ 15 μ g 抗体 B, 兔 IgG, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4 $^{\circ}$ C 备用, 其中抗体 B 为兔 IgG。

[0059] 所述的步骤 2 的 (3) 中, 将制备好的金标抗体 a 和金标抗体 b 按体积比 20 ~ 40 : 15 ~ 20 比例混合, 用 BIO-Dot 喷膜机以 2.0 ~ 4 μ l/cm 喷涂在预处理的聚脂膜上, 25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 干燥得结合垫, 结合垫封袋后置于 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 的环境下备用; 其中金标抗体 a 中的抗体 A 为葡萄球菌 A 蛋白, 金标抗体 b 为金标兔 IgG。

[0060] 所述的缓冲液的目的是提供一定 pH 和离子强度使氯金酸胶体金呈现所需的电荷状态和离子强度, 使其被标记的蛋白包被于氯金酸胶体金以 AuCl $^{-}$ 为核心的离子周围, 且形成相对稳定的一种状态。每种蛋白由于其电荷状态和氨基酸组成不同, 因此包被所需的条件也不同, 需由试验来确定其缓冲液的种类、浓度、pH。一般来说, 抗体标记所需的缓冲液可以为碳酸钾、硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、碳酸缓冲液等, 其浓度为 0.1 ~ 0.5M, pH 为 5 ~ 10。

[0061] 所述的步骤 3 中, 切割成的试纸的宽度优选为 4mm 和 3mm 两种。

[0062] 本发明采用大肠杆菌原核表达人源基因工程方法 Gp210, 即为本发明的检测抗原。

[0063] 本发明的检测原理具体为选用亲和层析纯化的重组表达的 GP210 抗原蛋白, 金标抗体 a 和金标兔 IgG 作为胶体金标记复合物, 喷涂于结合垫, 利用间接法来检测血清样品中是否含有抗 GP210 抗体。检测时, 样本随着层析泳动到结合垫并浸润金标复合物, 其中的人 IgG 和金标抗体 a 结合形成人 IgG- 金标抗体 a 复合物, 由于毛细效应, 此复合物沿包被膜泳动向前, 若血清样品中有抗 GP210 抗体, 此复合物与包被于硝酸纤维素膜上的抗原蛋白发生特异性免疫结合反应, 形成金标抗体 a- 人 IgG-Gp210 抗原蛋白三联体复合物而被截留在检测线上, 逐渐富集形成较深的紫红色条带; 由于毛细效应继续泳动向前, 金标兔 IgG 与包被在质控线上的羊抗兔 IgG 发生特异的免疫反应被截留, 逐渐富集在质控线上形成较深的紫红色条带, 多余的未结合的物质继续层析到吸水垫上, 因此在检测线和质控线都出现条带的判为阳性结果; 若血清样品中不含有抗 GP210 抗体, 金标抗体 a 到达检测线时, 不与包被在检测线上的抗原蛋白发生免疫反应, 因此在检测线处没有出现紫红色条带, 金标抗体 a 继续泳动向前到达吸水垫, 而金标兔 IgG 继续泳动向前与包被于质控线处羊抗兔 IgG 发生特异的免疫反应而被截留, 逐渐富集在质控线上形成紫红色条带, 因此仅在质控上出现条带判为阴性结果。

[0064] 本发明将基因工程菌表达的抗原蛋白首次引入到试纸条中, 实现了高特异性、高灵敏度、高准确度的检测性能。与目前市面出现的商品化 ELISA 试剂盒相比, 仍有诸多不同之处, 其不受场地人员之限, 检测时间短即 5-10 分钟, 判读结果简便。此外本发明的试纸具

有高特异性、高灵敏度、高准确度,能满足市场的快速筛选 PBC,为病人及早诊断治疗提供条件,同时,也能满足基层实验室、即时检测、床边检测的需求。

[0065] 与现有的检测方法相比,本发明优点:

[0066] 1. 本发明的独特性在于基因重组表达的 Gp210 抗原蛋白首次应用于胶体金层析试纸,大大提高了其检测灵敏度,通过胶体金试纸可快速筛选出抗 GP210 抗体所有阳性样本(能检出大于 25RU/ml 的样本)。

[0067] 2. 本发明的优点是生产成本低。本发明所提供的抗 GP210 抗体的检测试纸所需的核试剂是抗体 A 即抗人 IgG 或 SPA 或 PROTEING、抗体 C、抗体 B、抗原蛋白,其单条试纸所用试剂量少,且可通过购买商品化试剂或自制,抗原蛋白来源于自制的纯化基因工程抗原蛋白。

[0068] 3. 与已公开的用于抗 GP210 抗体检测的其他方法相比,本发明的试纸具有许多其他方法所不能比拟的优点,如检测时间短(5~10min);不需要任何特殊仪器,可实现床边检测和门诊即时检测;操作简便,只需一步反应,操作人员无需培训,检测成本低;对温度无特殊要求,无需冷冻,储存运输方便,室温可保存 24 个月。

附图说明

[0069] 图 1 为本发明的侧面结构示意图。

[0070] 图 2 为本发明的检测结果示意图。

[0071] 其中:

[0072] 图 2a 所示为:加样后,反应 3~5min 即可看到检测区 D 和控制区 E 相应位置上出现紫红色条带;

[0073] 图 2b 所示为:当控制区 E 和检测区 D 均出现紫红色条带,结果为阳性,说明血清中含有抗 Gp210 抗原蛋白;

[0074] 图 2c 所示为:如只在控制区 E 出现一条紫红色条带,检测区 D 不出现紫红色条带,结果为阴性,说明血清中不含抗 Gp210 抗体;

[0075] 图 2d、2e 所示为:如控制区 E 不出现紫红色条带,无论检测区 D 是否有条带出现,都说明试纸失效。

具体实施方式

[0076] 本发明所述的胶体金免疫层析法肝病检测试纸,如图 1 所示,该试纸是在底板 7 上由一侧向另一侧顺次相互搭接地粘贴硝酸纤维素包被膜 3、结合垫 2、样品垫 1、吸水垫 6。

[0077] 结合垫 2 上包被有金标抗体 a 和金标抗体 b,金标抗体 a 的抗体 A 为羊抗兔 IgG 金标抗体或鼠抗人 IgG 金标抗体或葡萄球菌 A 蛋白(SPA)金标抗体或链球菌 G 蛋白金标抗体;金标抗体 b 中的抗体 B 为兔 IgG。

[0078] 硝酸纤维素包被膜 3 上设置有检测线 4 和质控线 5,检测线 4 包被有 Gp210 抗原蛋白,质控线 5 包被有金标抗体 c,金标抗体 c 中的抗体为羊抗兔 IgG。

[0079] 下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。

[0080] 实施例 1 Gp210 抗原蛋白制备

[0081] 应用于本试纸的 Gp210 抗原蛋白是通过基因克隆技术构建重组基因,然后采用原

核表达技术成功表达出全部为人源的 Gp210 抗原蛋白。其中, Gp210 抗原蛋白来源于纯化基因工程抗原蛋白。

[0082] 实施例 2 抗体制备

[0083] 抗体 A 及抗体 C、抗体 B 用下述方法来制备。其中抗体 A 中的抗人 IgG、抗体 C 及抗体 B 一般可通过在动物上经多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射纯化的免疫原和佐剂而产生。

[0084] 通过将 0.05mg ~ 1mg 免疫制剂 (分别针对山羊或小鼠) 与 3 倍体积的 Freund's 完全佐剂混合得到注射溶液, 将该注射溶液在动物皮内多部位注射, 一个月后将动物用 1/5 至 1/10 原初量的人 IgG 的 Freund's 完全佐剂混合液经多部位动物皮下注射而加强免疫。7 ~ 14 天后将动物放血, 测定血清抗人 IgG 滴度。对动物加强免疫直至滴度达到平台期。在许多免疫学教科书中描述了生产多克隆抗体的方法, 例如, 陈学清等《免疫学常用实验方法》。通过从被免疫的动物回收脾细胞并使细胞永生化, 例如通过与骨髓瘤细胞融合或通过 Epstein-Barr 病毒转化, 并且筛选能表达目的抗体的单克隆抗体 (Kohler, Milstein. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion[J]. European Journal of Immunology, 1976 :501-511)。

[0085] 可通过大肠杆菌原核表达克隆化基因来制备抗体 A 中的重组葡萄球菌 A 蛋白和链球菌 G 蛋白, 具体操作方法参见 J. 萨姆布鲁克等 (分子克隆实验指南. [M], 2002 : 1228-1232), 或购买商品化的重组葡萄球菌 A 蛋白或链球菌 G 蛋白。

[0086] 实施例 3

[0087] 胶体金溶液制备

[0088] 将 0.01% 的 HAuCl_4 溶液加热至沸腾, 迅速加入每 100mL HAuCl_4 溶液加入适量的还原剂溶液, 颜色从蓝色, 然后浅蓝、蓝色, 再加热出现红色, 煮沸 7 ~ 10min 出现透明的橙红色。再用超滤或微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 以除去其中的聚合物和其它可能混入的杂质。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物, 液面出现油状物和大量黑色颗粒状沉淀物时弃用。

[0089] 其中所使用的还原剂可以为柠檬酸三钠 (Frens 1973)、鞣酸-柠檬酸三钠 (Slot 与 Gueeze 1985 年)、白磷, 优选使用柠檬酸三钠, 更优选地使用 1% 柠檬酸三钠。

[0090] 其中所用玻璃容器应绝对清洁, 用前需经酸洗、硅化。其水应为去离子超纯水, 电阻率达 18.2M Ω 。

[0091] 胶体金溶液制备过程中, 各溶液的配制方法如下:

[0092] 1. HAuCl_4 的配制: 用超纯水溶解氯金酸, 配成 1% 溶液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用, 有效期四个月。1000mL 1% HAuCl_4 溶液配方: 10g HAuCl_4 、超纯水定容至 1000mL。

[0093] 2. 1% 柠檬酸三钠的配制: 1% 柠檬酸三钠 (Sodium Citrate) 的配制: 用超纯水溶解 Sodium Citrate, 配成 1% 溶液, 0.22 μm 膜滤过, 现配现用。

[0094] 实施例 4

[0095] 本发明的胶体金免疫层析法肝病检测试纸的制备方法, 具体包括如下步骤:

[0096] 步骤 1, 硝酸纤维素包被膜的制备

[0097] (1) 采用实施例 1 的方法制备 Gp210 抗原蛋白;

[0098] (2) 羊抗兔 IgG 金标抗体的制备:

[0099] 用 0.1M 碳酸钾调节实施例 3 制备的胶体金 pH 7.0 ~ 9.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 羊抗兔 IgG, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4 $^{\circ}$ C 备用;

[0100] (3) 硝酸纤维素包被膜 3 的制备, 用包被膜缓冲液稀释 Gp210 抗原蛋白至浓度为 1.0 ~ 1.5mg/mL, 调整 BIO-Dot 仪器, 喷涂于硝酸纤维素膜 (NC) 上检测线 4 处, 靠近结合垫 2 端, 距结合垫 2 约 9.5mm, 使 Gp210 抗原蛋白包被于硝酸纤维素包被膜的检测线 4 上;

[0101] 用包被缓冲液将羊抗兔 IgG 稀释到 0.8 ~ 1.5mg/mL, 以 1 ~ 10 μ l/cm 用 BIO-Dot 仪器喷涂于硝酸纤维素膜 (NC) 上靠近吸水垫 6 的质控线 5 处, 距吸水垫 6 约 9mm。检测线 4 与质控线 5 两线距离约 5 ~ 8mm, 喷线应粗细均匀。37 $^{\circ}$ C 烘干, 封装备用。

[0102] 其使用的包被缓冲液可以是硼酸盐, 碳酸盐, 磷酸盐, Tris-HCl 或 Tris-磷酸盐, 醋酸盐, 巴比妥, 等等, 其缓冲液的目的是提供一定 pH 和离子强度使蛋白包被并牢固包被于 NC 膜, 其缓冲液 pH 值一般约为 6 ~ 9.5 范围内, 优选为 6.5 ~ 7.5 的中性缓冲范围内, 且最优选缓冲液的 pH 值为 7.0 ~ 7.4 范围内。缓冲液优选为磷酸盐。

[0103] 其中的硝酸纤维素膜 (NC) 可以为任何商品化硝酸纤维素膜, S&SAE99、whatman 8 μ m, millipore M135、sartorius CN140 等。使用的具体的 NC 膜不是本发明的关键, 但是在每次测定中, 上述几种 NC 膜可以作为优选。不同厂家使用的含不同表面活性剂的不同缓冲液处理的膜, 与所用检测线抗体溶液亲和力有不同程度的差距, 也会很大程度造成线条不均匀, 拖带或是弥散的现象, 因此运用组装试纸来选择优选的 NC 膜。

[0104] 步骤 2, 结合垫的制备

[0105] (1) 羊抗人 IgG 金标抗体的制备: 用 0.1M 碳酸钾调节实施例 3 制备的胶体金 pH 8.0 ~ 9.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 羊抗人 IgG, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4 $^{\circ}$ C 备用;

[0106] (2) 兔 IgG 金标抗体的制备: 用 0.1M 碳酸钾调节实施例 3 制备的胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0, 按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 兔 IgG, 搅拌 10 ~ 30min, 然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%, 搅拌 10 ~ 30min, 离心, 弃上清, 将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次, 末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0107] (3) 结合垫的制备: 经缓冲液将聚脂膜浸泡 30 分钟, 37 $^{\circ}$ C 烘干, 将羊抗人 IgG 金标抗体和兔 IgG 金标抗体按一定的比例混合后, 用 BIO-Dot 仪器, 以 0.5 ~ 4 μ l/cm 的用量喷涂在预处理的聚脂膜上, 25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 干燥, 待干燥完毕之后得结合垫 2, 结合垫 2 真空包装, 置 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 备用。置于 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 的环境下备用;

[0108] 结合垫的制备过程中, 可以使用的缓冲液包括以下几种:

[0109] (a) 含有 1% PVA、0.71% Na_3PO_4 、1% BSA、0.05% NaN_3 、0.1% TritonX-100;

[0110] (b) 1% PVA、1% BSA、0.05% PROCLINTM300、0.1% TritonX-100, pH7.0PBS;

[0111] (c) 1% PVA、1% BSA、0.05% PROCLINTM300, pH7.0PBS;

[0112] (d) 含有 1% PVA、0.71% Na_3PO_4 、1% BSA、0.05% NaN_3 、0.1% Tween-20;

[0113] (e) 含有 1% PVA、0.71% Na_3PO_4 、1% BSA、0.05% NaN_3 、0.1% Tween-20, pH7.0PBS;

[0114] 其优选的缓冲液是缓冲液 (d), 因为它具有区别阴阳性样品的最大分辨率。

PROCLIN™300 和 NaN_3 起防腐作用,而 Tween-20 具有去污和亲水作用。

[0115] 羊抗人 IgG 金标抗体和兔 IgG 金标抗体之间的混合比例可以依照下述方法进行:

[0116] 通过预实验基本确定兔 IgG 金标抗体的 OD₂₀,用 BIO-Dot 喷量 $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ 喷于预处理的聚脂膜上,用 0.01MPBS 为上样缓冲液,即能得到预期的颜色强度的条带,确定兔 IgG 金标抗体的应用 OD 喷量为 $1 \mu\text{l}$ 。

[0117] 随后将羊抗人 IgG 金标抗体进行梯度稀释到终浓度 OD 100、80、60、40、20,然后将兔 IgG 金标抗体稀释到终浓度 OD 20,用 BIO-Dot 将以上羊抗人 IgG 金标抗体和兔 IgG 金标抗体混合物喷量为 $3 \mu\text{l}/\text{cm}$ 喷于处理好的聚酯膜,将制备的硝酸纤维素包被膜 3、结合垫 2、样本垫 1、吸水垫 6 依次粘贴于底板 7 上,用阳性血清、临界参考值血清、阴性血清为调试对象。判定依据:阳性血清的检测线 4 和质控线 5 两者的条带颜色强度一致为依据,临界参考值血清能出现,阴性血清无条带出现的那个 OD 值,即为这批的应用量。通过本试验得出 OD₂₀ ~ 40 较为符合要求。

[0118] 步骤 3,样品垫的制备

[0119] 将玻璃纤维膜按 45mL/片,用缓冲液均匀洒涂于玻璃纤维膜上,于 37℃ 烘干后得样品垫,样品垫用铝箔袋封装,备用;

[0120] 该步骤可以用的缓冲液包括以下几种:

[0121] (a)0.05M Borax、0.01MPBS(pH 7.0)、0.1% Sodium Casein、1% PEG20000、2% BSA、0.05% NaN_3 ;

[0122] (b)0.05M Borax、0.01MPBS(pH 7.0)、0.1% Sodium Casein、1% PEG20000、2% Casein、0.05% NaN_3 ;

[0123] (c)0.05M Tris-cl(pH 7.0)、0.01MPBS、0.1% Sodium Casein、1% PEG20000、2% Case in、0.05% NaN_3 。

[0124] 优选的缓冲液是缓冲液 (a),因为它具有区别阴阳性样品的最大分辨率, NaN_3 起防腐作用。

[0125] 步骤 4

[0126] 首先进行原材料预裁剪:

[0127] 样品垫的裁切:用裁切机将样品垫切成与 PVC 制成的底板等长度即长 28cm,宽 2.4cm,置干燥房间备用。

[0128] 吸水垫的裁切:用裁纸机将吸水纸切成与 PVC 制成的底板等长度即长 28cm,宽 3cm 制成吸水垫,置干燥房间备用。

[0129] 结合垫的裁切:用裁切机将结合垫切成与 PVC 制成的底板等长度即长 28cm,宽 2.4cm,置干燥房间备用。

[0130] 硝酸纤维素包被膜的裁切:用裁纸机将硝酸纤维素包被膜切成与 PVC 制成的底板等长度即长 28cm,宽 1cm,置干燥房备用。

[0131] 将硝酸纤维素包被膜 3、结合垫 2、样本垫 1、吸水垫 6 按图 1 所示依次层叠在 PVC 塑料制成的底板 7 上,组成大板。组装车间温度应控制在 25℃ ~ 37℃,湿度 20% ~ 30%。

[0132] 步骤 5

[0133] 切条:用切条机将大板切成单人份,每人份宽度按照一定要求切成 2.5mm ~ 4mm 的宽度,随机抽检,灵敏度能检出室内质控样品(即弱阳性样本),条带显色程度达到如图 2d,

且无非特异性条带,则产品通过质控规定成为合格产品。

[0134] 组装、包装:将 1 人份已切好的试纸组装在备好的试纸卡里,使加样窗对应试纸的样品垫,结果显示窗对应检测区和控制区,组装车间温度应控制在 25℃~37℃,湿度 20%~30%。再与干燥剂、说明书、样品加样器封装在外包装袋里,于 4~25℃避光保存。

[0135] 在上述胶体金层析法抗 Ccnp-B 抗体检测试纸的制备过程中,各溶液的配制方法如下:

[0136] 1. 0.1M 碳酸钾的配制:用超纯水配制,0.22 μm 膜滤过,置 4℃备用,有效期一个月。1000mL 0.1M K₂CO₃ 溶液配方:13.8g K₂CO₃;超纯水定容至 1000mL。

[0137] 2. 10% BSA 的配制:用超纯水配制,0.05%叠氮钠 (NaN₃),0.22 μm 膜滤过,置 4℃备用,有效期两周。1000mL 10% BSA 溶液配方:100g BSA,0.5g NaN₃;超纯水定容至 1000mL。

[0138] 3、包被缓冲液的配制:9gNaCl、1.15gNa₂HPO₄、0.23g NaH₂PO₄、10gSucrose、0.5gEDTA 溶于 1L 超纯水中,过滤置于 4℃备用。

[0139] 4. 洗涤液也即保存液的配制:

[0140] 2% BSA、0.05% (NaN₃)、0.01M pH 7.2PBS,0.22 μm 膜滤过,置 4℃备用,有效期两周。1000mL 标记洗涤保存液配方:20g BSA、0.5g NaN₃、0.01M pH 7.2PBS 定容至 1000mL。

[0141] 5. 金标稀释液的配制:

[0142] 1000mL 稀释液的配制:2.423g tris,10gBSA,0.2gNaN₃ 溶于超纯水中,调 pH 8.0,定容到 1000mL。

[0143] 用稀释液将金标稀释到工作浓度后,加入 20% Sucrose 和 5% 的海藻糖。

[0144] 实施例 5

[0145] 该实施例的胶体金免疫层析法肝病检测试纸的制备方法,其步骤基本与实施例 4 相同,只是将该实施例的步骤 2 中 (1) 的羊抗人 IgG 金标抗体的制备步骤替换为葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 金标抗体的制备,具体如下:

[0146] 用 pH 9.00. 2M 硼酸缓冲液调节胶体金 pH 值至 5.0~6.5,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10~15 μg SPA 蛋白,搅拌 10~30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5~1%,搅拌 10~30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2~3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4℃备用。

[0147] 该实施例步骤 2 中的葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 金标抗体和兔 IgG 金标抗体之间的混合比例可以依照实施例 4 的方法进行。

[0148] 实施例 6

[0149] 该实施例的胶体金免疫层析法肝病检测试纸的制备方法,其步骤基本与实施例 4 相同,只是将该实施例的步骤 2 中 (1) 的羊抗人 IgG 金标抗体的制备步骤替换为鼠抗人 IgG 金标抗体的制备,具体如下:

[0150] 用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0~8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8~12 μg 鼠抗人 IgG,搅拌 10~30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5~1%,搅拌 10~30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2~3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4℃备用。

[0151] 该实施例步骤 2 中的鼠抗人 IgG 金标抗体和兔 IgG 金标抗体之间的混合比例可以依照实施例 4 的方法进行。

[0152] 实施例 7

[0153] 该实施例的胶体金免疫层析法肝病检测试纸的制备方法,其步骤基本与实施例 4 相同,只是将该实施例的步骤 2 中 (1) 的羊抗人 IgG 金标抗体的制备步骤替换为链球菌 G 蛋白金标抗体的制备,具体如下:

[0154] 用 pH 9.0 0.2M 硼酸缓冲液调节胶体金 pH 值至 5.0 ~ 6.5,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10 ~ 15 μ g 链球菌 G 蛋白,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0155] 该实施例步骤 2 中的链球菌 G 蛋白金标抗体和兔 IgG 金标抗体之间的混合比例可以依照实施例 4 的方法进行。

[0156] 本发明将重组表达的 Gp210 抗原蛋白引入到胶体金层析法抗 Gp210 抗体检测试纸,能实现血液样本中的 Gp210 抗体的检测,能快速、便捷地辅助诊断原发性胆汁肝硬化。

[0157] 实施例 8

[0158] 样本处理

[0159] 取全血 1 ~ 5ml,自然凝集 5 分钟后,3000 ~ 5000g/5min ~ 10min,取上清即得到待测样品溶液,至少有 100 μ l 以上待测样品溶液。

[0160] 用微量加样器吸取以上血清 50 ~ 70 μ l 样本于样品垫,缓慢加样。或者用吸管将血清样本缓慢滴加 3 ~ 5 滴于样品垫上,5 ~ 10min 观察结果,根据条带出现情况来判读阴阳性结果。

[0161] 实施例 9

[0162] 试剂盒的检测和临床性能评估

[0163] 本发明的胶体金肝病检测试纸的金标抗体 a 的抗体 A 优选为 SPA,抗体 b 的抗体 B 为兔 IgG,抗体 c 的抗体为羊抗兔 IgG,对其试纸进行的临床性能进行以下评估。

[0164] 1. 稳定性试验

[0165] 1.1 37 $^{\circ}$ C 加速稳定性

[0166] 将试纸置于 37 $^{\circ}$ C 进行加速实验,每天取出用室内质控品进行测试,通过阴阳性参考品 (各 10 份) 的阴阳性符合率的批内精密度来判断试纸的稳定性。4 个月后结果显示,质控品的检测结果符合预期,各个阴阳性参考品的阴阳性符合率为 100%。阴阳性参考品为 10 份抗 GP210 抗体阳性血清和 10 份抗 GP210 抗体阴性血清。

[0167] 1.2 4 $^{\circ}$ C 稳定性实验

[0168] 将试纸置于 4 $^{\circ}$ C 进行常规稳定性实验,每月取出用室内质控品测试,同样通过阴阳性参考品 (各 10 份) 的阴阳性符合率的批内精密度来判断试纸的稳定性。12 个月后结果显示,质控品检测结果符合预期,各个阴阳性参考品的阴阳性符合率为 100%。18 个月后结果显示,各个阴阳性参考品的阴阳性符合率仍为 100%。24 个月后检测结果显示,出现一例假阴性。综合以上结果说明试纸在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 贮存,2 年内是稳定的。

[0169] 2. 诊断灵敏度

[0170] 从临床中收集到 100 份确诊为原发性胆汁肝炎 (PBC) 病人的血清,用自制的胶体金试纸按照说明书上的操作步骤对上面收集到的 PBC 病人血清进行检测。5min 后统计结果如下:

[0171]	临床确诊 PBC 病人	样本数	阴性	阳性
		100	71	29

[0172] 根据上面统计的结果,根据对 100 份确认的 PBC 病人血清的检测,可以发现抗 GP210 抗体阳性的样本数量为 29 例,阴性样本数量为 71 例。因此通过计算得出:

[0173] 诊断灵敏性 (%) = $22 / (29 + 71) \times 100\% = 29\%$

[0174] 3. 诊断特异性

[0175] 从临床中收集到健康献血者血清和非 PBC 病人(包括其他自身免疫性疾病如类风湿关节炎和自免肝病人)血清各 300 份,用自制的胶体金试纸按照说明书上的操作步骤对上面收集到的健康献血者和非 PBC 病人的血清进行检测。5min 后统计结果如下:

[0176]	健康献血者血清	样本数	阴性	阳性
		300	295	5

[0177]	非 PBC 病人血清	样本数	阴性	阳性
		300	296	4

[0178] 根据对非 PBC 病人和健康献血者各 300 份血清的检测的统计结果,发现在健康献血者中测得抗 GP210 抗体阴性的样本数量为 295 例,而非 PBC 病人血清的抗 GP210 抗体阴性的样本数量为 296 例。因此通过计算得出:

[0179] (健康献血者) 诊断特异性 (%) = $295 / 300 \times 100\% = 98.33\%$

[0180] (非 PBC 病人血清) 诊断特异性 (%) = $296 / 300 = 98.66\%$

[0181] 600 例对照组(包括健康献血者和非 PBC 病人血清)

[0182] 诊断特异性 (%) = $591 / 600 = 98.5\%$

[0183] 4. 诊断准确性

[0184] 根据上面诊断特异性和诊断灵敏度的统计,可以得到下面这个总表:

	测定结果	临床明确诊断 PBC 患者	非 PBC 患者和健康献血者	合计
[0185]	阳性	71	9	80
	阴性	29	591	620
	合计	100	600	700

[0186] 根据上面的统计表可以看到,对于确认 PBC 的病人血清,检测得到的阳性样本数为 80 例,对于 600 例健康献血者和非 PBC 病人血清中,检测到阴性样本为 591 例。

[0187] 即:诊断准确性 = $(81 + 591) / 700 = 96\%$

[0188] 5. 批内不精确度

[0189] 选用生产的某一批试纸,同时选择四种不同浓度的血清(强、中、弱、阴性)各一份,每份血清做10个重复,5min后观察结果。

[0190]

不同血清	阴性结果数	阳性结果数
强阳血清	0	10

[0191]

中阳血清	0	10
弱阳血清	0	10
阴性血清	10	0

[0192] 根据上面的结果得知,生产的同一批胶体金层析法肝病检测试纸,对四份稀释的不同浓度的血清检测,每个样本重复10次,均能够准确的分出阴阳性,得到一致的阴阳性结果。

[0193] 因此,得出以下结论:胶体金层析法肝病检测试纸没有存在批内不精密现象。

[0194] 6. 批间不精确度

[0195] 选用生产的三批不同的胶体金层析法肝病检测试纸,同时选择四种不同浓度的血清(强、中、弱、阴性)各一份,每份血清重复10次,5min后观察结果。

[0196]

不同血清	第一批		第二批		第三批	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
强阳血清	0	10	0	10	0	10
中阳血清	0	10	0	10	0	10
弱阳血清	0	10	0	10	0	10
阴性血清	10	0	10	0	10	0

[0197] 根据上面的结果得知,生产的不同批次的三批胶体金层析法肝病检测试纸,对四份不同的血清检测,每个检测重复10次,均能够准确的分出阴阳性,得到一致的阴阳性结果。

[0198] 因此,得出以下结论:胶体金层析法肝病检测试纸没有存在批间不精密现象。

[0199] 7. 与同类检测项目不同方法学的产品-IMTECAutoimmundiagnostika GmbH的IMTEC-Gp210Antibodies试剂盒的对比试验。从临床收集随机患者样本血清100份,分别用IMTECAutoimmundiagnostika GmbH的IMTEC-Gp210Antibodies试剂盒和自制胶体金层析法肝病检测试纸进行检测,得到以下结果:

n=100		欧蒙 ELISA 试剂盒			
		阳性	阴性	合计	
[0200]	自制胶体金试纸	阳性	45	2	47
		阴性	1	52	53
		合计	44	56	100

[0201] 阳性符合率： $45/46 \times 100\% = 97.82\%$

[0202] 阴性符合率： $52/54 \times 100\% = 96.29\%$

[0203] 总的符合率： $(45+52)/100 = 97\%$

[0204] 根据上面的统计，自制胶体金层析法肝病检测试纸和 IMTECAutoimmundiagnostika GmbH 的 IMTEC-Gp210Antibodies 试剂盒总的符合率可以达到 97%。

[0205] 以上是对本发明的描述而非限定，基于本发明思想的其它实施方式，均在本发明的保护范围之内。

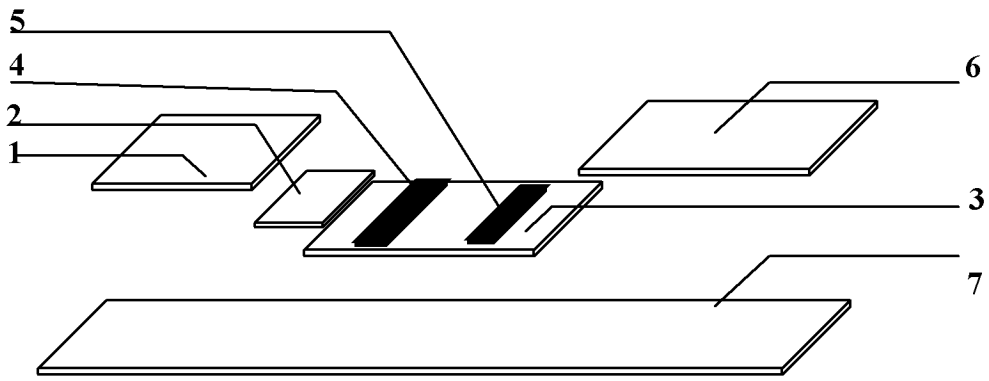


图 1

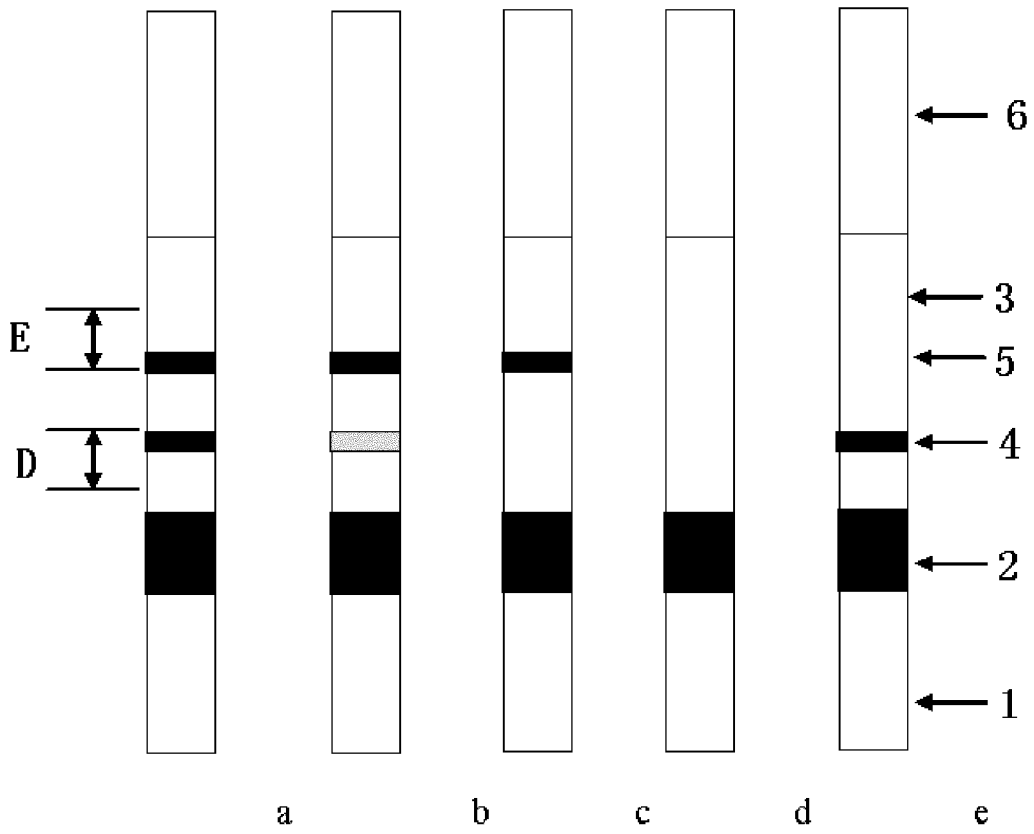


图 2

专利名称(译)	胶体金层析法肝病检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN102621312A	公开(公告)日	2012-08-01
申请号	CN201110032320.1	申请日	2011-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海科新生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海科新生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海科新生物技术股份有限公司		
[标]发明人	韩永俊 高成秀 张玥 葛文斌 孙宏彬 钱杰		
发明人	韩永俊 高成秀 张玥 葛文斌 孙宏彬 钱杰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
其他公开文献	CN102621312B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胶体金层析法肝病检测试纸以及制备方法。其胶体金层析法肝病检测试纸包括有样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫，所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫由底板的一侧依次向所述底板的另一侧粘贴在所述底板上，其结合垫包被有金标抗体a和金标抗体b；硝酸纤维素包被膜上设置有检测线和质控线，检测线包被有Gp210抗原蛋白，质控线包被有金标抗体c。本发明采用间接免疫测定法，引入Gp210抗原蛋白，对结合垫和样品垫进行了工艺优化，来实现抗Gp210抗体的高灵敏度、高特异、高准确性的检测性能，为辅助诊断原发性胆汁肝硬化提供参考依据。

