

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810046729.7

[43] 公开日 2008年7月9日

[11] 公开号 CN 101216493A

[22] 申请日 2008.1.21

[21] 申请号 200810046729.7

[71] 申请人 创源生物科技(武汉)有限公司

地址 430223 湖北省武汉市东湖开发区武大科技园内创业楼三楼西区

[72] 发明人 王宇波

[74] 专利代理机构 武汉开元专利代理有限责任公司

代理人 唐正玉

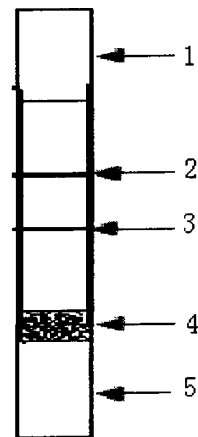
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种用于胎膜早破诊断的试纸条及试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种用于胎膜早破诊断的试纸条及试剂盒,试纸条水平面自上而下依次为:吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫,硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线,其中检测线为单克隆抗体 11B6,质控线为兔抗鼠 IgG 抗体;金标垫上涂覆有胶体金标记的单克隆抗体 14A3;再将吸收垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、涂覆有胶体金标记的单克隆抗体 14A3 的金标垫、样品垫按自上而下的顺序依次粘附在不吸水的支撑薄片上组装而成,且在样品垫上设有一加样孔。本发明的试剂盒中试纸条特异性强,灵敏度高,能够用于胎膜早破的临床诊断。该试剂盒操作简单,结果在十分钟内就可判断出来。



1、一种用于胎膜早破诊断的试纸条，试纸条水平面自上而下依次为：吸收垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫，其特征在于：硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，其中检测线为单克隆抗体 11B6，质控线为兔抗鼠 IgG 抗体；金标垫上涂覆有胶体金标记的单克隆抗体 14A3；再将吸收垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、涂覆有胶体金标记的单克隆抗体 14A3 的金标垫、样品垫按自上而下的顺序依次粘附在不吸水的支撑薄片上组装而成，且在样品垫上设有一加样孔。

2、根据权利要求 1 所述的用于胎膜早破诊断的试纸条，其特征在于：所述单克隆抗体 11B6 和 14A3 的制备方法：(1) 用羊水特异性蛋白 AMNI-Pr 免疫 BALB/c 小鼠：取含 150 μ g 的羊水特异性蛋白 AMNI-Pr 蛋白溶液与等体积的弗氏完全佐剂乳化后注射小鼠腹腔，21 天后，取含 150 μ g 的羊水特异性蛋白 AMNI-Pr 蛋白溶液与等体积的弗氏不完全佐剂乳化后注射小鼠腹腔，最后于融合前三天或与第一次免疫时间相隔 4 周以上，再在 BALB/c 小鼠的腹腔进行强化免疫，抗原量加倍到 300 μ g，不加佐剂；(2) 融合时，取经最后强化免疫的 BALB/c 小鼠一只，眼眶放血处死，收集阳性血清，在浓度 75% 酒精溶液中浸泡 5min 消毒，无菌取出小鼠脾脏，分离出脾细胞，与新鲜制备的 SP2/0 骨髓瘤细胞，按 1~2 \times 10⁷ 个 SP2/0 与 10⁸ 个免疫脾细胞 1:10~1:15 的比例于 50mL 离心管中混匀，1500rpm，离心 10min，倒掉上清，将装有细胞混合物的离心管放于 37 $^{\circ}$ C 水浴中，然后在 1min 内慢慢滴入预温至 37 $^{\circ}$ C 的浓度为 50% 聚乙二醇 (PEG) 0.8mL，边加边用吸管尖搅拌，继续搅拌 1min；然后加入 37 $^{\circ}$ C 预温的 PRMI-1640 基础液 10mL，PRMI-1640 购自 GIBCO，具体方法为：第一分钟逐滴滴入 1mL，第二分钟加 1mL，第 3~4 分钟加 3mL，第 5 分钟加其余的 5mL，最后加入 30mL PRMI-1640 液，800rpm 离心 5min，去上清，于 37 $^{\circ}$ C 放置 5~8min；用 HAT 培养基悬浮；(3) 将用 HAT 培养基悬浮的细胞混合物分种于 96 孔培养板中 250 μ L/孔，每孔接种量含 10⁴ 个 SP2/0 细胞，于 37 $^{\circ}$ C，浓度为 5% CO₂ 培养箱中培养，融合后的第二天开始观察有无污染，于第 4 天补加 1 滴 HAT 培养基，第 8~10 天吸去 100 μ L 培养基换 HT 培养基 100 μ L，待融合细胞集落长至培养孔 1/4，培养基变黄时，进行抗体检测；采用免疫原作为筛选抗原，利用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法筛选出分泌抗 AMNI-Pr 的阳性孔；(4) 对筛选出来的阳性孔用有限稀释法进行克隆、筛选，经过 3~4 次克隆，最终筛选出分泌两株抗 AMNI-Pr 的单克隆杂交瘤细胞，这两株细胞编号为：14A3 和 11B6。

3、一种用于胎膜早破诊断的试剂盒，其特征在于：将所述的试纸条、样品稀释液、棉签、离心管、吸管放置在同一个盒中，样品稀释液为浓度 0.85% 的生理盐水。

一种用于胎膜早破诊断的试纸条及试剂盒 技术领域

本发明属于免疫应用领域，涉及分子生物学、免疫、医学等相关领域。具体地讲涉及胎膜早破、羊水外溢，然后检测外溢羊水中特异性的标记物进而诊断胎膜早破这种疾病的试纸条及试剂盒。

背景技术

胎膜早破 (premature rupture of membrane, PROM) 是产科常见的并发症，易导致胎儿宫内感染、胎儿窘迫等并发症，围生儿死亡率和发病率升高，但无理想方法准确评估胎儿宫内安危。在所有病人中分娩之前胎膜破裂发生率在 6.6%-13.9%，而且在接下来的 48 小时，在这些病例中 70%-90% 会发生自发流产。胎膜早破不但直接或间接引起 4.5%-14% 的早产，而且引起显著的死亡率和与分娩相关的患病率。在对 109 位和 111 位孕妇研究中分别对新生儿研究结果显示，在 34 周或之前 PROM 会导致一个总体上 16.8%-26.6% 的死亡率，和 68.8% 的发病率。因此建立一种简单准确的 PROM 诊断方法是有很重要意义的。在有些情况下，PROM 可以根据阴道里释放的清澈的羊水和之后羊水的继续存在，而很容易的判断出。在某些情况下 PROM 不是那样明显，而且很难区分泄露的羊水和尿液以及阴道的宫颈分泌物。

据文献报道可以通过很多程序诊断 PROM，这些程序主要包括：胎儿鳞片状上皮细胞或绒毛的鉴定、在胎儿细胞着色后在其内部或外部对胎儿细胞脂肪球显微镜鉴定的方法、阴道粘液 pH 的估算、干燥羊水的结晶型、加热的羊水、阴道粘液中二元胺氧化酶活性的测量、阴道粘液泌乳刺激素、阴道粘液中透明的胎蛋白、阴道粘液中的类胰岛素生长因子结合蛋白、抑制素 B 的测量等等。然而，所有这些诊断方法都是在 PROM 已经发生的情况下进行的，它们不是完全准确的。因为在大多数情况下，干扰物质的存在而且有些在阴道里面产生，比如尿、胎粪、孕妇血清和血。这些干扰物质的存在很容易引起对 PROM 的误判。

免疫层析 (immunochromatography) 是出现于八十年代初期的一种独特的免疫分析方式，该方法的核心技术是以条状纤维层析材料为固相，通过毛细管作用使样品溶液在层析条上泳动，并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体如抗原或抗体发生高特异、高亲和性的免疫反应。胶体金免疫层析分析 (gold-immunochromatography assay GICA) 是应用胶体金标记技术，以胶体金作为示踪物，应用于抗原抗体反应的一种新

型免疫标记技术。层析过程中，金标记物与事先固相化于层析材料：如硝酸纤维素膜即 NC 膜上的抗原或抗体发生特异性的免疫反应而被截留，进一步富集，形成肉眼可见紫红色条带，从而得到直观的实验结果，达到检测的目的。这种方法对所使用的抗原抗体的要求较高，要求具有好的特异性和高纯度。

依据这种原理，已经发展出了很多胶体金免疫层析快速检测试纸条。在人医应用方面，国内外已在激素、传染病病原的抗原和抗体、性病病原、细菌、寄生虫、肿瘤标记物、心血管病标志物、药物以及其他一些蛋白质等方面应用了金标免疫层析试纸条。在兽医应用方面，例如在猪瘟、犬细小病毒病等方面也应用了金标免疫层析试纸条。在胎膜早破诊断相关方面，存在有三个专利。第一个名称为检测阴道分泌物中羊水的装置和方法（国际申请号为：PCT/US2003/025125 2003.8.12），虽然该专利与本发明申请的专利原理相同：均为双抗夹心胶体金免疫层析法。但本发明与已有的这个专利在运用上述方法上的关键性物质完全不同：已有的专利使用的两种单克隆抗体是针对 $\alpha 1$ -微球蛋白（PAMG -1）的不同抗原表位的，而本发明所使用的两种单克隆抗体是针对 AMNI-Protein or AMNI-Pr 的。本发明组装的试剂盒特异性较好，敏感度较高。另一专利名称为一次性胎膜早破 pH 试纸诊断棒（200620083734.1），这个发明的缺点是敏感度不高，易引起假阴性。又一专利名称 A MARKER FOR PROLONGED RUPTURE OF MEMBRANES（WO2007030890），该专利中检测羊水的方法为 ELISA 方法，该方法与胶体金免疫层析方法相比缺点是耗时长，需要操作仪器，对操作人员要求较高。

发明内容

本发明的目的为了克服上述现有技术存在的问题，而提供一种用于检测胎膜早破的试纸条及试剂盒，本发明的试纸条及试剂盒特异性较好，敏感度较高。

本发明是这样实现的：

一种用于胎膜早破诊断的试纸条，试纸条水平面自上而下依次为：吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫，其特征在于：硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，其中检测线为单克隆抗体 11B6，质控线为兔抗鼠 IgG 抗体；金标垫上涂覆有胶体金标记的单克隆抗体 14A3；再将吸收垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、涂覆有胶体金标记的单克隆抗体 14A3 的金标垫、样品垫按自上而下的顺序依次粘附在不吸水的支撑薄片上组装而成，且在样品垫上设有一加样孔，其中单克隆抗体 11B6 和单克隆抗体 14A3 为：羊水中的特异性标记物即 AMNI-Protein or AMNI-Pr，公开的专利号为：WO/2007/030890，针对特异性标记物 AMNI-Protein or AMNI-Pr

的不同抗原表位而制备的杂交瘤细胞株 11B6 和 14A3。这两株细胞编号为：14A3 和 11B6，于 2008 年 01 月 17 日保藏在中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号分别为：CCTCC-C200801 和 CCTCC-C200802。所述硝酸纤维素膜、吸收垫、金标垫、样品垫、不吸水的支撑薄片均可购自 Millipore 公司。

所述单克隆抗体 11B6 和 14A3 的制备方法：（1）用羊水特异性蛋白 AMNI-Pr 免疫 BALB/c 小鼠：取含 150 μ g 的羊水特异性蛋白 AMNI-Pr 蛋白溶液与等体积的弗氏完全佐剂乳化后注射小鼠腹腔，21 天后，取含 150 μ g 的羊水特异性蛋白 AMNI-Pr 蛋白溶液与等体积的弗氏不完全佐剂乳化后注射小鼠腹腔，最后于融合前三天或与第一次免疫时间相隔 4 周以上，再在 BALB/c 小鼠的腹腔进行强化免疫，抗原量加倍到 300 μ g，不加佐剂；（2）融合时，取经最后强化免疫的 BALB/c 小鼠一只，眼眶放血处死，收集阳性血清，在浓度 75% 酒精溶液中浸泡 5min 消毒，无菌取出小鼠脾脏，分离出脾细胞，与新鲜制备的 SP2/0 骨髓瘤细胞，按 1~2 \times 10⁷ 个 SP2/0 与 10⁸ 个免疫脾细胞 1:10~1:15 的比例于 50mL 离心管中混匀，1500rpm，离心 10min，倒掉上清，将装有细胞混合物的离心管放于 37 $^{\circ}$ C 水浴中，然后在 1min 内慢慢滴入预温至 37 $^{\circ}$ C 的浓度为 50% 聚乙二醇（PEG）0.8mL，边加边用吸管尖搅拌，继续搅拌 1min；然后加入 37 $^{\circ}$ C 预温的 PRMI-1640 基础液 10mL，PRMI-1640 购自 GIBCO 公司，具体方法为：第一分钟逐滴滴入 1mL，第二分钟加 1mL，第 3~4 分钟加 3mL，第 5 分钟加其余的 5mL，最后加入 30mL PRMI-1640 液，800rpm 离心 5min，去上清，于 37 $^{\circ}$ C 放置 5~8min；用 HAT 培养基悬浮；（3）将用 HAT 培养基悬浮的细胞混合物分种于 96 孔培养板中 250 μ L/孔，每孔接种量含 10⁴ 个 SP2/0 细胞，于 37 $^{\circ}$ C，浓度为 5% CO₂ 培养箱中培养，融合后的第二天开始观察有无污染，于第 4 天补加 1 滴 HAT 培养基，第 8~10 天吸去 100 μ L 培养基换 HT 培养基 100 μ L，待融合细胞集落长至培养孔 1/4，培养基变黄时，进行抗体检测；采用免疫原作为筛选抗原，利用酶联免疫吸附试验（ELISA）方法筛选出分泌抗 AMNI-Pr 的阳性孔；（4）对筛选出来的阳性孔用有限稀释法进行克隆、筛选，经过 3~4 次克隆，最终筛选出分泌两株抗 AMNI-Pr 的单克隆杂交瘤细胞，这两株细胞编号为：14A3 和 11B6。

一种用于胎膜早破诊断的试剂盒，将所述的试纸条、样品稀释液、棉签、离心管、吸管放置在同一个盒中，样品稀释液为浓度 0.85% 的生理盐水。

本发明的原理是单克隆抗体 11B6 作为检测线包被物，单克隆抗体 14A3 作为胶体金标记的抗体，利用双抗夹心法来检测待检样品中是否含有羊水。

检测时,待检样品中若有羊水存在时羊水中多肽标记物首先与金标记抗体 14A3 发生抗原抗体反应形成复合物多肽标记物-金标记单克隆抗体 14A3 复合物,由于毛细管作用,反应复合物沿硝酸纤维素膜(NC膜)向前泳动,到达检测线时,遇到NC膜上的单克隆抗体 11B6,就会形成单克隆抗体 11B6-多肽标记物-金标记单克隆抗体 14A3 复合物,从而富集在检测线上,形成红色沉淀线,未结合在检测线上的复合物继续向前涌动,最后富集在质控线上,判为阳性结果;若样品中不含有羊水时金标单克隆抗体 14A3 到达检测线时,遇到包被在检测线上的单克隆抗体 11B6 就不会发生抗原抗体反应,因此也就不会在检测线上富集,金标单克隆抗体 14A3 通过检测线,富集在质控线上,形成红色沉淀线,判为阴性结果。

与现有技术相比本发明具有如下优点:

1、对胎膜早破中外溢的羊水检测具有特异性强,灵敏度高,检测时间短,只要 5~10 分钟,检测样品可以是血液、阴道粘液、宫颈液,这样检测样品范围宽;

2、本发明的检测方法不需要任何特殊仪器、设备,具有检测成本低的特点;

3、本发明的检测试剂盒操作简便,不需由专业人员操作;

4、本发明的试剂盒储存方便,对温度要求不高,在 4~8℃下有效保存期可达一年;在室温下可保存六个月。

附图说明

图 1 为本发明的试纸条的俯视图。

图 2 为本发明试纸条的侧视图。

图中: 1-吸水垫, 2-质控线, 3-检测线, 4-金标垫, 5-样品垫, 6-硝酸纤维素膜, 7-衬板。

具体实施方式

实施例 1

AMNI-Pr 的制备

羊水标本从经剖腹产手术的妇女身上获取 25-975ml,并在以 2ml 一份分装到 5ml 离心管中,分装之前用玻璃棉过滤。

每管 2ml,混合二十管羊水制备样品池,然后用如下方法纯化:首先用 Affi-Gel 蓝胶(Aurum Affi-Gel Blue Mini Kit)预处理除去内源性白蛋白,Affi-Gel 蓝胶购自美国 Bio-Rad 公司,根据所购买的 Affi-Gel 蓝胶说明书预处理样品池中的样品。

被用 Affi-Gel 蓝胶处理过的样品接下来用国际专利号为 W003/018634 描述的免疫层析法处理,可得到羊水特异性的蛋白。

最后用两种截留分子量分别为 300kD 和 100kD 离心超滤管 (Amicon Ultra-4), 300kD 和 100kD 离心超滤管购自美国密理博 (Millipore) 公司, 按照所购买离心超滤管说明书处理羊水特异性蛋白, 最后可得到三种滤过液, 按分子量大小排列分别为 AF1、AF2 和 AF3, 这三种标记物均为羊水 中的特异性标记物即 AMNI-Pr 的制备。

实施例 2

抗 AMNI-Pr 单克隆抗体的制备

参照薛庆善《体外培养的原理与技术》科学出版社 2001 年版中的方法: 用上述所制备的 AF1、AF2 和 AF3 分别免疫 BALB/c 小鼠, BALB/c 小鼠购自湖北省医科院实验动物中心, 免疫程序是取含 150 μ g 的 AF1 或 AF2 或 AF3 蛋白溶液与等体积的弗氏完全佐剂乳化, 弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司, 注射小鼠腹腔, 21 天后加强免疫, 换用弗氏不完全佐剂乳化, 弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; 最后于融合前三天, 也可以是与第一次免疫时间相隔 4 周以上, 在 BALB/c 小鼠的腹腔强化免疫, 抗原量加倍到 300 μ g, 不加佐剂, 融合时, 取经最后强化免疫的 BALB/c 小鼠一只, 眼眶放血处死, 收集阳性血清, 在 75% 酒精中浸泡 5min 消毒, 无菌取出小鼠脾脏, 分离出脾细胞, 与新鲜制备的 SP2/0 骨髓瘤细胞, 按 2×10^7 个 SP2/0 与 10^8 个免疫细胞 1:15 的比例于 50mL 离心管中混匀, SP2/0 骨髓瘤细胞购自卫生部武汉生物制品所, 1500rpm, 离心 10min。倒掉上清, 也可用灭菌的滤纸吸干, 轻轻敲击管底, 使细胞沉淀略加松动; 将装有细胞混合物的离心管放于 37 $^{\circ}$ C 水浴中, 然后在 1min 内慢慢滴入预温至 37 $^{\circ}$ C 的 50% 聚乙二醇 (PEG) 0.8mL, 50% 聚乙二醇购自 Sigma 公司, 边加边轻轻用吸管尖搅拌, 继续搅拌 1min; 然后慢慢加入 37 $^{\circ}$ C 预温的 PRMI-1640 基础液 10mL, PRMI-1640 购自 Sigma 公司, 基础液的配方: PRMI-1640 10.4g, NaHCO₃ 2g, 用蒸馏水定容至 1000mL, 调 pH 至 7.2; 具体方法为: 第一分钟逐滴滴入 1mL, 第二分钟加 1mL, 第 3~4 分钟加 3mL, 第 5 分钟加其余的 5mL, 每次加时需缓慢加入, 并不断轻轻地搅拌; 最后加入 30mL PRMI-1640 液, 也需慢慢加入, 800rpm 离心 5min, 去上清, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 5~8min; 用 HAT 培养基悬浮, HAT 购自 Sigma 公司, HAT 培养基的成分: 80mL 基础液, 20mL 灭菌小牛血清, 1mL 100% 的 HAT, 1mL 双抗, 双抗配制: 取青霉素 G 钠 100 万单位和硫酸庆大霉素 1g 溶于 100mL 三蒸水; 同时也用 HAT 培养基悬浮制备好的饲养细胞并与融合后的细胞混合。根据需要补加 HAT 培养基, 分种于 96 孔培养板中, 约 250 μ L/孔。一次融合可接种 4~8 块 96 孔板。根据需要也可少种, 一般按 SP2/0 的细胞数计算, 每孔接种量约含 104 左右个 SP2/0 细胞。于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。融合后的第二天开始观察有无污染, 于第 4 天补加 1

滴 HAT 培养基, 第 8~10 天吸去 100 μ L 培养基换 HT 培养基 100 μ L, HT 购自 Sigma 公司, HT 培养基的成分: 80mL 基础液, 20mL 灭菌小牛血清, 1mL100% 的 HT, 1mL 双抗; 待融合细胞集落长至培养孔 1/4, 培养基变黄时, 进行抗体检测; 采用免疫原作为筛选抗原, 利用 ELISA 方法筛选出分泌抗 AMNI-Pr 的阳性孔。对筛选出来的阳性孔立刻用有限稀释法进行克隆、筛选, 有限稀释法参照薛庆善《体外培养的原理与技术》科学出版社 2001 年版; 经过 3~4 次克隆, 最终筛选出分泌两株抗 AMNI-Pr 的单克隆杂交瘤细胞, 这两株细胞编号为: 14A3 和 11B6, 于 2008 年 01 月 17 日保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号分别为: CCTCC-C200801 和 CCTCC-C200802。对该细胞进行了染色体计数, 结果显示, SP2/0 的染色体平均数为 70, 脾细胞染色体为 40 条, 而杂交瘤细胞的数目在 81~93 之间。均高于两亲本细胞的染色体数目, 说明融合细胞的确是 SP2/0 细胞与脾细胞的杂交产物, 杂交瘤细胞的染色体明显多于骨髓瘤细胞 SP2/0 的染色体。将该细胞注射 BALB/c 小鼠腹腔, 生产单克隆抗体。采用购自 ROCKLAND 公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒 (Mouse Mab Isotyping Test Kit) 对本发明所得到的单克隆抗体进行亚型鉴定, 结果小鼠 IgG2b 亚类。

实施例 3

1. 腹水的制备

采用灭菌液体石蜡预处理 BALB/c 小鼠后, 再注射杂交瘤细胞的方法生产腹水, 其具体过程如下:

BALB/c 小鼠的预处理: 用灭菌的液体石蜡处理小鼠, 腹腔注射 0.5mL/只, 十天后即可注射杂交瘤细胞。

阳性孔的扩大培养: 在 24 孔细胞培养板加入饲养细胞, 4 滴/孔, 将 96 孔板内的阳性细胞转到 24 孔细胞培养板进行扩大培养。

注射: 待到细胞长满孔底将 24 孔板的细胞重悬, 1200r/min, 离心 5min, 细胞计数, 用 RPMI-1640 基础培养液稀释成 5×10^6 个/毫升, 腹腔注射小鼠 0.5mL/只, 8 天左右观察到小鼠腹部隆起, 即可采集腹水。

2. 腹水的预处理

3000g, 离心 10min, 取上清, 上清用 0.45 μ m 滤膜过滤。

3. 腹水中单抗的初步纯化使用羟基磷灰石层析柱纯化

羟基磷灰石 (HA) 层析柱购自 BioRad 公司

羟基磷灰石 (HA) 层析柱的原理

HA 的 Ca²⁺基团和生物分子: 蛋白质、核酸、病毒和其它生命物质表面的负电荷基团的相互反应, 在用 HA 分离生物分子过程中起着重要作用。而 HA 的 PO₄⁻³ 基团与生物分子表面的阳电荷基团的相互反应, 则起着次要作

用。

羟基磷灰石 (HA) 层析柱缓冲液的制备

平衡柱子的缓冲液: 25mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0。具体配方为:
5.45gNa₂HPO₄·12H₂O, 1.52gNaH₂PO₄·2H₂O, 定容至 1000ml。

洗脱柱子的缓冲液: 500mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0。具体配方为:
109gNa₂HPO₄·12H₂O, 30.4gNaH₂PO₄·2H₂O, 定容至 1000ml。

羟基磷灰石 (HA) 层析柱使用的步骤:

将预处理的腹水上清直接上柱。

用 25mmol/L 磷酸盐缓冲液冲洗柱子, 直至 OD280 小于 0.2。

用 500mmol/L 磷酸盐缓冲液洗脱柱子, 收集洗脱峰。

将收集的洗脱峰脱盐, 用超滤杯或透析脱盐, 将磷酸盐降低至 20mmol/L。

4. 用单抗纯化凝胶亲和层析 (HiTrap Protein G HP) 纯化柱将腹水中单抗进一步纯化

HiTrap Protein G HP 纯化柱购自 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱的原理

蛋白 G 是 G 类链球菌细胞表面的一个蛋白, 是一个能够通过非免疫机制与 IgG 的 Fc 结合的 III 型 Fc 受体, 这种结合的原理与金黄色葡萄球菌的蛋白质 A 类似。然而蛋白质 A 与蛋白质 G 有不同的结合特异性, 这主要取决于 IgG 的来源。与蛋白质 A 比较, 蛋白质 G 在结合单抗 IgG 时更强, 比如来自牛、绵羊和马的单抗 IgG。与蛋白质 A 不同的是蛋白质 G 能够结合鼠单抗 IgG、人 IgG3 和小白鼠 IgG1。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱中填充的高性能蛋白质 G 琼脂糖凝胶中的蛋白质 G 由在大肠杆菌中重组蛋白产生, 这种重组蛋白含有两个 IgG 结合区域。天然蛋白质 G 的清蛋白结合区域在遗传过程中已经被删除, 因此这种重组的 IgG 能够避免与清蛋白的交叉反应。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱被设计的目的是将 IgG 从来自腹水、血清和细胞培养上清的多抗或单抗中分离并纯化出来。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱平衡纯化后样品酸度平衡缓冲液的制备:

由于蛋白质 G 与 IgG 在 pH 7.0 时有很强的亲合性, 因此在洗脱时所用的洗脱液 pH 值通常较低。由于某些纯化后的 IgG 可能对过低的酸度敏感从而影响它的活性, 为了避免这种情况的发生, 我们在收集样品时通常提前加入了一些酸度平衡缓冲液。酸度平衡缓冲液的配方为: 1M Tris-HCl, pH

9.0, 用 0.45 μm 滤膜过滤处理。具体配方为: 121g 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris-base), 用浓盐酸调 pH 9.0, 定容至 1000ml。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱缓冲液的制备

吸附缓冲液: 20mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 用 0.45 μm 滤膜过滤。具体配方为: 3.12g 磷酸二氢钠, 用 1M 氢氧化钠调 pH 7.0, 定容至 1000ml。

洗脱缓冲液: 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH 2.7, 用 0.45 μm 滤膜过滤。具体配方 0.75g 甘氨酸, 0.28ml 浓盐酸, pH 2.7, 定容至 100ml。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱对样品处理的要求:

样品首先要进行去盐处理, 这可以通过用吸附缓冲液稀释样品或用 HiTrap、HiPrepTM26/10 或者 PD-10 这几种通过离子交换的脱盐柱子来实现样品脱盐处理。

脱盐处理后的样品需用 0.45 μm 滤膜过滤处理。

HiTrap Protein G HP 这种纯化柱使用的操作步骤:

在收集管中添加 200 μL 酸度平衡缓冲液。

用 10 倍柱体积的吸附缓冲液洗柱子, 流速为 1ml/min。

根据柱子结合单抗的容量大小, 适当选择一次上柱样品的量。

用 10 倍体积的吸附缓冲液洗柱子, 去除样品中非结合物。

用 5 倍体积的洗脱缓冲液洗脱柱子, 每个收集管收集 1ml。

收集的纯化物可以通过 HiTrap、HiPrepTM26/10 或者 PD-10 这几种通过离子交换的脱盐柱子来实现样品脱盐处理。

实施例 4

兔抗鼠 IgG 抗体的制备:

参照何昭阳等主编,《动物免疫学实验技术》 长春: 吉林科学技术出版社, 2002 中的方法: 利用发明人所在的微生物与免疫实验室提取的 BALB/c 小鼠 IgG 免疫健康家兔, 制备高特异性、高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清, 对高免血清采用饱和硫酸铵沉淀法进行粗提, 经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG 抗体。利用该抗体可作为质控线。

实施例 5

包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜的制备

1、包被缓冲液的配制: 0.01M pH 7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS 缓冲液) 为包被缓冲液, 0.22 μm 膜滤过, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用, 有效期一周; 1000 ml 0.01M pH 7.2 PBS 缓冲液配方: NaCl 8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KH_2PO_4 0.2g, 双蒸去离子水定容至 1000 ml。

2、包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜的制备: 用包被缓冲液将 11B6 稀释到 1mg/ml, 调整机器, 划线为 T 线, 即为检测线, T 线靠近金标垫端,

距金标垫端约 5 mm; 用包被缓冲液将兔抗鼠 IgG 抗体稀释到 0.5mg/ml, 调整机器, 划线为 C 线, 即为质控线, C 线靠近吸收垫, 距吸收垫约 3 mm。两线距离 5~8 mm, 线应细致、均匀。37℃烘干, 封装备用。

实施例 6

胶体金、金标记单克隆抗体的制备

1、溶液的配制

(1) 1%氯金酸的配制: 用双蒸去离子水溶解氯金酸, 配成 1%溶液, 置 4℃备用, 有效期四个月。1000ml 1%氯金酸溶液配方: 10g 氯金酸; 双蒸去离子水定容至 1000 ml。

(2) 柠檬酸三钠的配制: 用双蒸去离子水溶解柠檬酸三钠, 配成 1%溶液, 0.22μ膜滤过, 置 4℃备用, 定容至 1000ml。

(3) 0.1MK₂CO₃的配制: 用双蒸去离子水配制, 0.22μ膜滤过, 置 4℃备用, 有效期四个月。1000 ml 0.1MK₂CO₃溶液配方: 13.8gK₂CO₃, 双蒸去离子水定容至 1000 ml。

(4) 5%牛血清白蛋白 (BSA) 的配制: 用双蒸去离子水配制, 0.22μ膜滤过, 置 4℃备用, 有效期四个月。100ml 5%BSA 溶液配方: 5g BSA; 双蒸去离子水定容至 100 ml。

(5) 硼酸缓冲液的配制: 2mM 的硼酸, 0.2%的 PEG-20000, 0.02%的叠氮钠 (NaN₃)。1000ml 硼酸缓冲液的配方为: 0.124g 硼酸, 2g PEG-20000, 0.2g NaN₃, 0.22μ膜滤过, 用双蒸去离子水定容至 1000ml。

2、胶体金的制备:

用双蒸去离子水将 1%氯金酸稀释成 0.01%, 置加热磁力搅拌器上加热搅拌煮沸, 按每 100 ml 0.01%氯金酸加入 2 ml 1%柠檬酸三钠, 继续煮沸, 直到液体呈亮红色即停止加热, 冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物, 有效期一周。

3、胶体金标记单克隆抗体的制备:

用 0.1MK₂CO₃调胶体金的 pH 值至 8.2, 按 8μg 抗体/ ml 胶体金加入单克隆抗体 14A3, 磁力搅拌器混匀 30 min, 搅拌下加入 BSA 至终浓度为 1%, 静置 1 小时。8600 rpm、4℃离心 45min, 弃上清, 沉淀用硼酸缓冲液重悬, 然后用 12000 rpm、4℃离心 30 min, 弃上清, 沉淀重复上述离心一次, 最后用十分之一初始胶体金体积的硼酸缓冲液将沉淀重悬, 置 4℃备用, 有效期一周。

实施例 7

涂覆胶体金标记的单克隆抗体 14A3 的金标垫的制备

1、封闭液的配制:

2% BSA, 2%聚乙烯吡咯烷酮 K-30 (PVP-K30)、0.05% NaN_3 , 0.01M pH 7.2 PBS 溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 置 4 $^\circ\text{C}$ 备用, 有效期四个月。1000 ml 封闭液配方: 20g BSA, 0.5g NaN_3 、20g PVP-K30、0.01M pH7.2PBS 溶液定容至 1000 ml。

2、涂覆胶体金标记的单克隆抗体 14A3 的金标垫的制备:

将金标垫浸泡于封闭液中 30 min 后, 于 37 $^\circ\text{C}$ 烘干。将实施例 4 中浓缩好的标记抗体的胶体金溶液用硼酸缓冲液稀释, 比例为 1: 4.5。然后将制备好的标记抗体的胶体金溶液均匀的铺在金标垫上, 每毫升溶液铺 20 平方厘米, 冷冻干燥, 封装, 置 4 $^\circ\text{C}$ 备用。

实施例 8

试纸条样品垫的制备

1、封闭液的配制:

2% BSA, 2% PVP-K30、0.05% NaN_3 , 0.01M pH 7.4PBS 溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 置 4 $^\circ\text{C}$ 备用, 有效期四个月。1000 ml 封闭液配方: 20g BSA, 0.5g NaN_3 、20g PVP-K30、8gNaCl、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2gKCl、0.2g KH_2PO_4 溶液定容至 1000 ml。

2、样品垫的制备:

将样品垫浸泡于封闭液中 30 min 后, 于 37 $^\circ\text{C}$ 烘干, 封装, 置 4 $^\circ\text{C}$ 备用。

实施例 9

试纸条的组装

将包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜、涂覆胶体金标记的单克隆抗体 14A3 的金标垫、吸收垫、样品垫按图 1 依次粘附在不吸水的支撑薄片上组装而成, 且在样品垫上设有一加样孔, 切成 3mm 宽的小条。每十小条一包, 加入干燥剂, 真空封装。4~8 $^\circ\text{C}$ 保存, 有效期一年; 常温保存, 有效期 6 个月。

实施例 10

胎膜早破诊断试剂盒的组成

1、胎膜早破诊断试剂盒包括:

- (1)、试纸条
- (2)、样品稀释液
- (3)、棉签
- (4)、离心管
- (5)、吸管

2、相关溶液的配制

样品稀释液: 样品稀释液为 0.85% 的 NaCl 溶液。配制方法: 8.5g NaCl,

加双蒸去离子水定容至 1000 ml。

本发明试剂盒的使用方法：

1、样品制备：用棉签蘸取阴道或宫颈外口的粘液，然后用约 0.5ml 的 0.85% 生理盐水冲洗并积压棉签获得。

2、检测：取出试剂盒，室温平衡 20 分钟；打开包装袋，取出试纸条，用吸管吸取已制备好的样品，然后在试纸条加样孔中滴加 2-3 滴即可。

3、结果判定：当试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线，没有出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阴性，记为“-”；当试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线，同时也出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阳性，记为“+”；检测线颜色越深说明被检测样品的羊水含量越高；当试纸条没有出现肉眼可见的紫红色质控线，不管有没有出现肉眼可见的紫红色检测线，结果都判为检测试纸条失效，应废弃。

实施例 11

胎膜早破诊断试剂盒试剂盒的应用

1、样品的采集 样品采集的来源地为武汉和襄樊这两地的多家医院。羊水的采集主要从剖腹产的妇女身上获得。其它的临床样品来自孕妇的阴道粘液、血液及宫颈液等，采集的途径是用棉签蘸取阴道或宫颈外口的粘液，然后用约 0.5ml 的 0.85% 生理盐水冲洗并积压棉签获得。

2. 特异性试验 将 0.85% 的生理盐水、取自正常孕妇阴道粘液的样品、取自孕妇羊水的样品、取自正常未怀孕的妇女阴道粘液的样品分别滴加到试纸条加样孔。得到的试验结果为除羊水样品为阳性外，其它的几种样品均为阴性。另外还采集了 26 份正常的孕妇的血液和尿液，测试的结果为：

检测的样品及编号	孕妇的孕期（周）	检测结果
1 孕妇的血液	32	阴性
2 孕妇的血液	34	阴性
3 孕妇的血液	36	阴性
4 孕妇的血液	36	阴性
5 孕妇的血液	34	阴性
6 孕妇的血液	29	阴性
7 孕妇的血液	34	阴性
8 孕妇的血液	33	阴性
9 孕妇的血液	35	阴性
10 孕妇的血液	36	阴性
11 孕妇的血液	37	阴性
12 孕妇的血液	36	阴性

13 孕妇的血液	34	阴性
14 孕妇的血液	36	阴性
15 孕妇的血液	36	阴性
16 孕妇的血液	37	阴性
17 孕妇的血液	33	阴性
18 孕妇的尿液	33	阴性
19 孕妇的尿液	34	阴性
20 孕妇的尿液	36	阴性
21 孕妇的尿液	32	阴性
22 孕妇的尿液	31	阴性
23 孕妇的尿液	36	阴性
24 孕妇的尿液	36	阴性
25 孕妇的尿液	38	阴性
26 孕妇的尿液	37	阴性

由此结果获知，该试纸条与孕妇的尿液或血液无交叉反应。然后取采集到孕妇的羊水 150 份，用本发明的试纸条检测阳性率为 100%。由此获知该试纸条具有良好的特异性。

3、敏感性试验 将从孕妇体中采集的羊水样品倍比稀释，然后分别滴加到试纸条检测得到的结果为孕妇的羊水可稀释到 16 倍。

4、胎膜早破试纸条检测卡在临床上的初步应用

取 20 份人为制造的胎膜早破病例样品，然后用本发明的试纸条检测卡检测，结果如下：

检测的样品及编号	注释	检测结果
1 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
2 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
3 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
4 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
5 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
6 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
7 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
8 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
9 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
10 人造胎膜破裂前样品（采集部位：宫颈外口）	30 分钟内出现结果	阴性
11 人造胎膜破裂后样品（采集部位：宫颈外口）	10 分钟内出现结果	阳性
12 人造胎膜破裂后样品（采集部位：宫颈外口）	10 - 15 分钟内出现结果	弱阳性

13 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10 分钟内出现结果	阳性
14 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10 分钟内出现结果	阳性
15 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10 分钟内出现结果	阳性
16 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10-15 分钟内出现结果	弱阳性
17 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10-15 分钟内出现结果	弱阳性
18 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10 分钟内出现结果	阳性
19 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10 分钟内出现结果	阳性
20 人造胎膜破裂后样品 (采集部位: 宫颈外口)	10 分钟内出现结果	阳性

取 22 份临床上诊断为胎膜早破的患者的样品, 用本发明的试纸条检测卡检测的结果为:

检测的样品及编号	注释	检测结果
1 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
2 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
3 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
4 临床诊断胎膜早破患者	10-15 分钟内出现结果	阳性
5 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
6 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
7 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
8 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
9 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
10 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
11 临床诊断胎膜早破患者	10-15 分钟内出现结果	阳性
12 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
13 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
14 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
15 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
16 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
17 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
18 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
19 临床诊断胎膜早破患者	10-15 分钟内出现结果	阳性
20 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
21 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性
22 临床诊断胎膜早破患者	10 分钟内出现结果	阳性

由此初步获知本发明的胎膜早破试纸条检测卡具有与临床诊断结果很高的符合率。

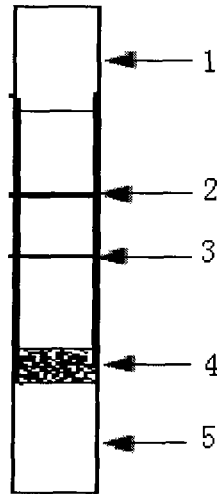


图 1

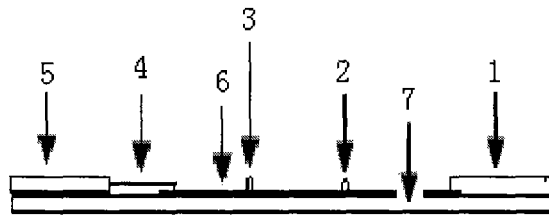


图 2

专利名称(译)	一种用于胎膜早破诊断的试纸条及试剂盒		
公开(公告)号	CN101216493A	公开(公告)日	2008-07-09
申请号	CN200810046729.7	申请日	2008-01-21
[标]发明人	王宇波		
发明人	王宇波		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于胎膜早破诊断的试纸条及试剂盒，试纸条水平面上自而上而下依次为：吸水垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫，硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，其中检测线为单克隆抗体11B6，质控线为兔抗鼠IgG抗体；金标垫上涂覆有胶体金标记的单克隆抗体14A3；再将吸收垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、涂覆有胶体金标记的单克隆抗体14A3的金标垫、样品垫按自上而下的顺序依次粘附在不吸水的支撑薄片上组装而成，且在样品垫上设有一加样孔。本发明的试剂盒中试纸条特异性强，灵敏度高，能够用于胎膜早破的临床诊断。该试剂盒操作简单，结果在十分钟内就可判断出来。

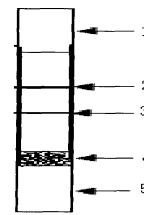


图 1

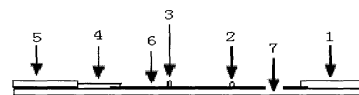


图 2