



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101949925 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010516358. 1

C07K 14/77(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 22

C07K 16/44(2006. 01)

(71) 申请人 南通市伊士生物技术有限责任公司

地址 226000 江苏省南通市经济技术开发区
星湖大道 1692 号 15 号厂房 A 座

(72) 发明人 欧卫军 吴迪宏

(74) 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司

32206

代理人 顾伯兴

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

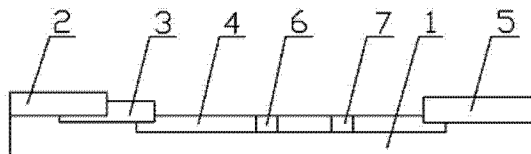
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,由衬板和衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、包被膜和吸水垫组成,金标结合垫为吸附醋酸泼尼松衍生物的金标抗体的聚酯纤维毡,在包被膜上有用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体蛋白溶液包被直线式检测线 T 线,和用羊抗鼠 IgG 溶液包被直线式对照线 C 线,两条线竖向平行排列。其具体步骤:制备人工结合抗原;制备醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体;制成胶体金溶液;获得抗醋酸泼尼松衍生物单克隆抗体的胶体金标记物和金标结合垫。本发明具有特异性强,敏感度高,简便、快速、时效性强,结果显示形象、准确的优点。



1. 一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,其特征在于:由衬板(1)和在衬板(1)上依次衔接的样品垫(2)、金标结合垫(3)、包被膜(4)和吸水垫(5)组成,金标结合垫(3)为吸附醋酸泼尼松衍生物的金标抗体的聚酯纤维毡,在包被膜(4)上有用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体蛋白溶液包被直线式检测线T线(6),和用羊抗鼠IgG溶液包被直线式对照线C线(7),两条线竖向平行排列。

2. 根据权利要求1所述一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,其特征在于:所述衬板(1)为不吸水的PCV韧性材料。

3. 根据权利要求1或2所述一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,其特征在于:所述包被膜(4)为硝酸纤维素膜,或混合纤维素膜。

4. 根据权利要求1所述一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,其特征在于:所述吸水垫(5)为植物纤维棉纸。

5. 根据权利要求1所述一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,特征在于:醋酸泼尼松衍生物的金标抗体为胶体金标记的抗醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体复合物,所述偶联醋酸泼尼松衍生物的载体蛋白为牛血清白蛋白BSA。

6. 一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条的制备方法,其特征在于:制备偶联醋酸泼尼松衍生物的载体牛血清白蛋白BSA,用于制备相应的检测线T线(6);制备偶联醋酸泼尼松衍生物的载体鸡卵清白蛋白,用于制备单克隆抗体,制备醋酸泼尼松衍生物金标抗体,用于制备吸附醋酸泼尼松衍生物金标抗体的聚酯纤维毡;制备羊抗鼠IgG抗体,用于制备对照线C线(7),包括如下步骤:

(A)将醋酸泼尼松衍生物与载体牛血清白蛋白BSA/鸡卵清白蛋白OVA进行偶联制备人工合成抗原;

a、生成水溶性碳化二亚胺(EDC):往反应瓶中加入干燥的二甲基甲酰胺(DMF)及那非类原料或拉非类原料,并通 N_2 保护,在室温下进行搅拌,待二甲基甲酰胺(DMF)完全溶解后,快速称取浓度为60%的氢化钠(NaH),并将其加入所述反应瓶中,搅拌50-70分钟,直至溶液无气泡产生,然后用注射器吸取溴乙酸乙酯慢慢注入所述反应瓶中,注入完毕后,在室温下搅拌11-13小时,之后将反应液倾入水中分散,以氯仿进行提取,合并提取液,以无水 Na_2SO_4 进行干燥,之后过滤,再经过减压浓缩后得到固体,加入无水乙醚打浆洗涤所述固体,之后进行过滤,最后真空干燥得到新的固体,此固体为烷基化物;将无水乙醇和上述步骤所得的烷基化物加入新的反应瓶中,进行搅拌分散,再加入NaOH溶液,加热回流反应2小时,停止加热稍冷却后,将反应液转入单口瓶中,减压浓缩得糊状物,再加入水,以盐酸调节至pH值为7-9的液体,以氯仿进行提取,合并提取液,再用饱和食盐水洗一次,以无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,减压浓缩得白色固体,用甲醇重结晶,得白色粉状固体,此固体为水溶性碳化二亚胺(EDC);

b、生成人工合成抗原:将上述步骤中所得的水溶性碳化二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二甲基甲酰胺(DMF)、半抗原化合物平衡至室温;取上述步骤中所得的水溶性碳化二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺和半抗原化合物,三者的摩尔比为:半抗原化合物:水溶性碳化二亚胺:N-羟基琥珀酰亚胺=1:8-12:13-16,将其置入圆底烧瓶,然后加入上述步骤中所得的二甲基甲酰胺溶解,为保证反应完全,在室温避光的条件下进行搅拌,最后生成的溶液记为二号反应液;当所述水溶性碳化二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺和半抗原化合物在二

甲基甲酰胺中反应完全后,现配载体蛋白溶液(BSA / OVA),将载体蛋白与硼酸缓冲液按 1:0.15-0.2 的量溶解于另一容器中的硼酸缓冲液,然后转入另一圆底烧瓶中,此溶液记为三号反应液;将二号反应液按每 10 秒 1 滴的速度滴入三号反应液中,直至将二号的反应液加完后,先在室温避光的条件下进行搅拌,之后在 3-5°C 条件下避光搅拌,待反应完全后,生成溶液,并将生成的溶液记为四号反应液,四号反应液中载体蛋白与半抗原化合物比例为: 1:15-25;等所有反应结束后,将四号反应液置于 20000-30000 分子截留透析袋中,透析袋中还装有 0.01-0.02M 磷酸盐缓冲液, pH 值为 7.0-7.5,将透析袋在 3-5°C 的条件下进行透析,每隔 3-5 小时换一次磷酸盐缓冲液;经上述透析步骤最终所得的产品,经冷冻干燥为白色絮状产品,即为人工合成抗原;

(B) 将人工合成抗原 OVA 按常规方法免疫制备醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体细胞株,用 Babc 小鼠免疫制备抗体腹水,将腹水纯化得到高纯度的单克隆抗体蛋白,测定蛋白浓度,备胶体金标记用;

(C) 用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 的胶体金溶液;

(D) 用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节胶体金溶液至最适 PH 值(8.5-9.0),将适量纯化的单克隆抗体纯水透析(4hr)后,加入胶体盆中,室温电磁搅拌(15-30min),逐滴加入 1% 络蛋白溶液,使络浓度为 0.1%,持续搅拌 5min,4°C 下 15000rpm 离心 10min,弃去上清去沉淀物,将沉淀物用重悬液重新恢复至原体积混匀,再次离心一次,用重悬溶液将沉淀物混悬至原体积 1/20,4°C 保存备用,即获得抗醋酸泼尼松衍生物单克隆抗体的胶体金标记物,所述重悬液为含 5% 海藻的 0.02Tris-HCL 缓冲液;

(E) 将 1:20-1:10 稀释的醋酸泼尼松衍生物胶体进标记抗体喷涂吸附于聚酯纤维毡中,27°C 保温干燥,制备醋酸泼尼松衍生物金标结合垫(3);

(F) 在包被膜(4)上用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体牛血清白蛋白 BSA 溶液包被直线式检测线 T 线(6),用羊抗鼠 IgG 溶液包被直线式对照线 C 线(7),两条线竖向平行排列;

(G) 试纸条的组装:将样品垫(2)、金标组合垫(3)、包被膜(4)和吸水垫(5)依次粘附在衬板(1)上,样品垫(2)置于衬板(1)的一端,吸水垫(5)置于衬板(1)的另一端,包被膜(4)置于衬板(1)的中间,金标结合垫(3)置于样品垫(2)和包被膜(4)之间,即得到用于免疫检测的醋酸泼尼松衍生物胶体金层析检测试验纸大板,将大板按顾客要求分切成 2.5mm-7.0mm 宽度规格的试纸条,密封干燥保存。

一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条及制备方法,属于生物学免疫方法的检测技术领域。

背景技术

[0002] 醋酸泼尼松是一种肾上腺皮质激素类药,具有抗炎、抗过敏、抗风湿、免疫抑制作用。近几年来,一些不法生产企业为牟取暴利,在未经获得批准的情况下,在治疗免疫性疾病(例如红斑狼疮、关节炎、肾炎等等)的中药中非法添加醋酸泼尼松等激素,患者在不知情的情况下,短期内使用这些有问题的“纯中药制剂”,疗效确实不错,但是这些作用其实就是激素的作用,但是长期使用或是突然停药,问题就出来了:长期使用引起肾上腺抑制,诱发柯兴氏综合症(满月脸、女性多毛、痤疮、高血压、骨质疏松、性功能紊乱等);增加感染机会;影响外伤愈合;增加消化道溃疡出血和穿孔的可能性;生长发育迟缓、精神失调、白内障、青光眼、骨骼坏死等等。突然停药,导致内源性皮质激素过低(肾上腺萎缩)引起对激素反应缺乏,病情迅速复发,甚至于恶化。一些急性肾功能不全的病人,突然停止使用激素非常危险,甚至于致死。如果使用添加了激素的“纯中药制剂”,病人并不知情,而这些病人恰好又是激素禁忌症和慎用患者,例如活动性消化性溃疡、骨折、高血压、糖尿病、孕妇等,一旦使用,危险就大了。所以,为了保证人民群众的饮食用药安全,我们必须加大力度打击这种现象。然而近年来,不法分子非法生产的手段日趋隐蔽,而且由于中药成分比较复杂,检测难度较大,需要精密的分析仪器和专业技术人员,因而造成监管部门监督抽验成本很大,收效却不甚理想。

发明内容

[0003] 本发明的目的是为了克服以上的不足,提供一种能快速、灵敏、简便地检测醋酸泼尼松衍生物的醋酸泼尼松胶体金层析检测试纸条及制备方法。

[0004] 本发明是通过以下技术方案来实现:一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,由衬板和衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、包被膜和吸水垫组成,金标结合垫为吸附醋酸泼尼松衍生物的金标抗体的聚酯纤维毡,在包被膜上有用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体蛋白溶液包被直线式检测线 T 线,和用羊抗鼠 IgG 溶液包被直线式对照线 C 线,两条线竖向平行排列。衬板为不吸水的 PCV 韧性材料。包被膜为硝酸纤维素膜,或混合纤维素膜。吸水垫为植物纤维棉纸。醋酸泼尼松衍生物的金标抗体为胶体金标记的抗醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体复合物,偶联醋酸泼尼松衍生物的载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA。

[0005] 一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条的制备方法,制备偶联醋酸泼尼松衍生物的载体牛血清白蛋白 BSA,用于制备相应的检测线 T 线;制备偶联醋酸泼尼松衍生物的载体鸡卵清白蛋白,用于制备单克隆抗体,制备醋酸泼尼松衍生物金标抗体,

用于制备吸附醋酸泼尼松衍生物金标抗体的聚酯纤维毡；制备羊抗鼠 IgG 抗体，用于制备对照线 C 线，包括如下步骤：

(A)将醋酸泼尼松衍生物与载体牛血清白蛋白 BSA/ 鸡卵清白蛋白 OVA 进行偶联制备人工合成抗原；

a、生成水溶性碳化二亚胺(EDC):往反应瓶中加入干燥的二甲基甲酰胺(DMF)及那非类原料或拉非类原料，并通 N₂ 保护，在室温下进行搅拌，待二甲基甲酰胺(DMF)完全溶解后，快速称取浓度为 60% 的氢化钠(NaH)，并将其加入所述反应瓶中，搅拌 50-70 分钟，直至溶液无气泡产生，然后用注射器吸取溴乙酸乙酯慢慢注入所述反应瓶中，注入完毕后，在室温下搅拌 11-13 小时，之后将反应液倾入水中分散，以氯仿进行提取，合并提取液，以无水 Na₂SO₄ 进行干燥，之后过滤，再经过减压浓缩后得到固体，加入无水乙醚打浆洗涤所述固体，之后进行过滤，最后真空干燥得到新的固体，此固体为烷基化物；将无水乙醇和上述步骤所得的烷基化物加入新的反应瓶中，进行搅拌分散，再加入 NaOH 溶液，加热回流反应 2 小时，停止加热稍冷却后，将反应液转入单口瓶中，减压浓缩得糊状物，再加入水，以盐酸调节至 pH 值为 7-9 的液体，以氯仿进行提取，合并提取液，再用饱和食盐水洗一次，以无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤，减压浓缩得白色固体，用甲醇重结晶，得白色粉状固体，此固体为水溶性碳化二亚胺(EDC)；

b、生成人工合成抗原：将上述步骤中所得的水溶性碳化二亚胺(EDC)、N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二甲基甲酰胺(DMF)、半抗原化合物平衡至室温；取上述步骤中所得的水溶性碳化二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺和半抗原化合物，三者的摩尔比为：半抗原化合物：水溶性碳化二亚胺：N- 羟基琥珀酰亚胺 = 1 : 8-12 : 13-16，将其置入圆底烧瓶，然后加入上述步骤中所得的二甲基甲酰胺溶解，为保证反应完全，在室温避光的条件下进行搅拌，最后生成的溶液记为二号反应液；当所述水溶性碳化二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺和半抗原化合物在二甲基甲酰胺中反应完全后，现配载体蛋白溶液(BSA / OVA)，将载体蛋白与硼酸缓冲液按 1:0.15-0.2 的量溶解于另一容器中的硼酸缓冲液，然后转入另一圆底烧瓶中，此溶液记为三号反应液；将二号反应液按每 10 秒 1 滴的速度滴入三号反应液中，直至将二号的反应液加完后，先在室温避光的条件下进行搅拌，之后在 3-5℃ 条件下避光搅拌，待反应完全后，生成溶液，并将生成的溶液记为四号反应液，四号反应液中载体蛋白与半抗原化合物比例为：1:15-25；等所有反应结束后，将四号反应液置于 20000-30000 分子截留透析袋中，透析袋中还装有 0.01-0.02M 磷酸盐缓冲液，pH 值为 7.0-7.5，将透析袋在 3-5℃ 的条件下进行透析，每隔 3-5 小时换一次磷酸盐缓冲液；经上述透析步骤最终所得的产品，经冷冻干燥为白色絮状产品，即为人工合成抗原；

(B) 将人工合成抗原 OVA 按常规方法免疫制备醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体细胞株，用 Babc 小鼠免疫制备抗体腹水，将腹水纯化得到高纯度的单克隆抗体蛋白，测定蛋白浓度，备胶体金标记用；

(C) 用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 的胶体金溶液；

(D) 用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节胶体金溶液至最适 PH 值(8.5-9.0)，将适量纯化的单克隆抗体纯水透析(4hr)后，加入胶体盆中，室温电磁搅拌(15-30min)，逐滴加入 1% 络蛋白溶液，使络浓度为 0.1%，持续搅拌 5min，4℃ 下 15000rpm 离心 10min，弃去上清去沉淀物，将沉淀物用重悬液重新恢复至原体积混匀，再次离心一次，用重悬溶液将沉淀物混悬至原体积

1/20, 4℃保存备用,即获得抗醋酸泼尼松衍生物单克隆抗体的胶体金标记物,重悬液为含5%海藻的0.02Tris-HCL缓冲液;

(E)将1:20-1:10稀释的醋酸泼尼松衍生物胶体进标记抗体喷涂吸附于聚酯纤维毡中,27℃保温干燥,制备醋酸泼尼松衍生物金标结合垫;

(F)在包被膜上用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体牛血清白蛋白BSA溶液包被直线式检测线T线,用羊抗鼠IgG溶液包被直线式对照线C线,两条线竖向平行排列;

(G)试纸条的组装:将样品垫、金标组合垫、包被膜和吸水垫依次粘附在衬板上,样品垫置于衬板的一端,吸水垫置于衬板的另一端,包被膜置于衬板的中间,金标结合垫置于样品垫和包被膜之间,即得到用于免疫检测的醋酸泼尼松衍生物胶体金层析检测试验纸大板,将大板按顾客要求分切成2.5mm-7.0mm宽度规格的试纸条,密封干燥保存。

[0006] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

1、特异性强,敏感性高。该胶体金层析检测试纸条以胶体金标记高特异性高亲和力静电吸附的单克隆抗体为基础制备而成;

2、简便、快速、时效性强,使用胶体金层析检测试纸条和试纸卡,无需任何其它试剂和仪器,可现场操作,将样品用提取液混合后,取上清液进行检测,在5min即可判定检测结果;

3、结果显示形象、直观、准确。检测试纸条均以显示红色线T线和C线作为检测结果阳性和阴性标记,即在包被膜上显示一条红色线C线时,表示在被检样品中含有被检物,显示两条红色线T线和C线时,表示在被减样品中不含被检物。结果判定形象、直观、准确、简单明了,不易出现假阳性和假阴性等人为误判;

4、制备方法采用喷涂工艺,简单快速,喷涂均匀,干燥快。

[0007] 附图说明:

图1为本发明的剖面结构示意图;

图2为本发明的俯视结构示意图;

图中标号:1-衬板、2-样品垫、3-金标结合垫、4-包被膜、5-吸水垫、6-T线、7-C线。

[0008] 具体实施方式:

为了加深对本发明的理解,下面将结合实施例和附图对本发明作进一步详述,该实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明保护范围的限定。

[0009] 如图1、图2所示一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条,由衬板1和在衬板1上依次衔接的样品垫2、金标结合垫3、包被膜4和吸水垫5组成,金标结合垫3为吸附醋酸泼尼松衍生物的金标抗体的聚酯纤维毡,在包被膜4上有用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体蛋白溶液包被直线式检测线T线6,和用羊抗鼠IgG溶液包被直线式对照线C线7,两条线竖向平行排列。衬板1为不吸水的PCV韧性材料。包被膜4为硝酸纤维素膜,或混合纤维素膜。吸水垫5为植物纤维棉纸。醋酸泼尼松衍生物的金标抗体为胶体金标记的抗醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体复合物,偶联醋酸泼尼松衍生物的载体蛋白为牛血清白蛋白BSA。制备偶联醋酸泼尼松衍生物的载体牛血清白蛋白BSA,用于制备相应的检测线T线6;制备偶联醋酸泼尼松衍生物的载体鸡卵清白蛋白,用于制备单克隆抗体,制备醋酸泼尼松衍生物金标抗体,用于制备吸附醋酸泼尼松衍生物金标抗体的聚酯纤维毡;制

备羊抗鼠 IgG 抗体,用于制备对照线 C 线 7,包括如下步骤:

(A)将醋酸泼尼松衍生物与载体牛血清白蛋白 BSA/ 鸡卵清白蛋白 OVA 进行偶联制备人工合成抗原;

a、生成水溶性碳化二亚胺(EDC):往反应瓶中加入干燥的二甲基甲酰胺(DMF)及那非类原料或拉非类原料,并通 N_2 保护,在室温下进行搅拌,待二甲基甲酰胺(DMF)完全溶解后,快速称取浓度为 60% 的氢化钠(NaH),并将其加入所述反应瓶中,搅拌 50-70 分钟,直至溶液无气泡产生,然后用注射器吸取溴乙酸乙酯慢慢注入所述反应瓶中,注入完毕后,在室温下搅拌 11-13 小时,之后将反应液倾入水中分散,以氯仿进行提取,合并提取液,以无水 Na_2SO_4 进行干燥,之后过滤,再经过减压浓缩后得到固体,加入无水乙醚打浆洗涤所述固体,之后进行过滤,最后真空干燥得到新的固体,此固体为烷基化物;将无水乙醇和上述步骤所得的烷基化物加入新的反应瓶中,进行搅拌分散,再加入 NaOH 溶液,加热回流反应 2 小时,停止加热稍冷却后,将反应液转入单口瓶中,减压浓缩得糊状物,再加入水,以盐酸调节至 pH 值为 7-9 的液体,以氯仿进行提取,合并提取液,再用饱和食盐水洗一次,以无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,减压浓缩得白色固体,用甲醇重结晶,得白色粉状固体,此固体为水溶性碳化二亚胺(EDC);

b、生成人工合成抗原:将上述步骤中所得的水溶性碳化二亚胺(EDC)、N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二甲基甲酰胺(DMF)、半抗原化合物平衡至室温;取上述步骤中所得的水溶性碳化二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺和半抗原化合物,三者的摩尔比为:半抗原化合物:水溶性碳化二亚胺:N- 羟基琥珀酰亚胺=1:8-12:13-16,将其置入圆底烧瓶,然后加入上述步骤中所得的二甲基甲酰胺溶解,为保证反应完全,在室温避光的条件下进行搅拌,最后生成的溶液记为二号反应液;当所述水溶性碳化二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺和半抗原化合物在二甲基甲酰胺中反应完全后,现配载体蛋白溶液(BSA / OVA),将载体蛋白与硼酸缓冲液按 1:0.15-0.2 的量溶解于另一容器中的硼酸缓冲液,然后转入另一圆底烧瓶中,此溶液记为三号反应液;将二号反应液按每 10 秒 1 滴的速度滴入三号反应液中,直至将二号的反应液加完后,先在室温避光的条件下进行搅拌,之后在 3-5°C 条件下避光搅拌,待反应完全后,生成溶液,并将生成的溶液记为四号反应液,四号反应液中载体蛋白与半抗原化合物比例为:1:15-25;等所有反应结束后,将四号反应液置于 20000-30000 分子截留透析袋中,透析袋中还装有 0.01-0.02M 磷酸盐缓冲液, pH 值为 7.0-7.5,将透析袋在 3-5°C 的条件下进行透析,每隔 3-5 小时换一次磷酸盐缓冲液;经上述透析步骤最终所得的产品,经冷冻干燥为白色絮状产品,即为人工合成抗原;

(B) 将人工合成抗原 OVA 按常规方法免疫制备醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体细胞株,用 Babc 小鼠免疫制备抗体腹水,将腹水纯化得到高纯度的单克隆抗体蛋白,测定蛋白浓度,备胶体金标记用;

(C) 用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 的胶体金溶液;

(D) 用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节胶体金溶液至最适 PH 值(8.5-9.0),将适量纯化的单克隆抗体纯水透析(4hr)后,加入胶体盆中,室温电磁搅拌(15-30min),逐滴加入 1% 络蛋白溶液,使络浓度为 0.1%,持续搅拌 5min,4°C 下 15000rpm 离心 10min,弃去上清去沉淀物,将沉淀物用重悬液重新恢复至原体积混匀,再次离心一次,用重悬溶液将沉淀物混悬至原体积 1/20,4°C 保存备用,即获得抗醋酸泼尼松衍生物单克隆抗体的胶体金标记物,重悬液为含

5% 海藻的 0.02Tris-HCL 缓冲液；

(E) 将 1:20-1:10 稀释的醋酸泼尼松衍生物胶体进标记抗体喷涂吸附于聚酯纤维毡中, 27℃ 保温干燥, 制备醋酸泼尼松衍生物金标结合垫 3；

(F) 在包被膜 4 上用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体牛血清白蛋白 BSA 溶液包被直线式检测线 T 线 6, 用羊抗鼠 IgG 溶液包被直线式对照线 C 线 7, 两条线竖向平行排列；

(G) 试纸条的组装: 将样品垫 2、金标组合垫 3、包被膜 4 和吸水垫 5 依次粘附在衬板 1 上, 样品垫 2 置于衬板 1 的一端, 吸水垫 5 置于衬板 1 的另一端, 包被膜 4 置于衬板 1 的中间, 金标结合垫 3 置于样品垫 2 和包被膜 4 之间, 即得到用于免疫检测的醋酸泼尼松衍生物胶体金层析检测试验纸大板, 将大板按顾客要求分切成 2.5mm-7.0mm 宽度规格的试纸条, 密封干燥保存。

[0010] 醋酸泼尼松胶体金层析试纸条的检测反应原理: 醋酸泼尼松属于小分子物质。本发明采用竞争法, 即样品中的醋酸泼尼松和固定在包被膜 4 上的包被抗原 M2-BSA 竞争胶体进标记的抗醋酸泼尼松单克隆抗体。当试纸条以样品垫 2 末端浸入样本后, 样品溶液沿着试纸条通过毛细作用从下往上泳动, 溶解金标垫上干燥的金标抗体, 若待测样品中不存在待测药物, 则金标抗体会直接泳动到检测线和硝酸纤维膜上的 M2-BSA 发生免疫反应, 从而胶体金颗粒发生聚集, 形成红色线条, 然后其他未结合的金标抗体继续通过毛细管作用向前泳动, 与对照线上的羊抗鼠二抗发生第二次免疫反应, 同样形成红色线条, 这样包被膜 4 上就会有两条红色线条, 表示样品为阴性。若待测样品中存在待测药品, 则金标抗体首先会和样品中的检测物发生免疫反应, 当未发生反应的金标抗体有剩余时, 才会在检测线上与 M2-BSA 发生免疫反应, 形成红色线条, 其颜色强度弱于阴性时的线条强度; 而当金标抗体全部和样品中的醋酸泼尼松发生免疫结合时, 就不会再有抗体与对照线包被原结合, 从而检测线就不会有红色线条出现。对照线是为检验金标免疫层析方法本身是否存在待测药物, 对照线都应该显现。如果对照线不显色, 则说明试纸否有效而设定的, 所以无论样品中是条失效。

[0011] 本发明特异性强, 敏感度高, 检出最低限量可达到 5ppb; 简便、快速、时效性强, 无需任何其它试剂和仪器, 可现场操作, 试纸条加入被检样品液后, 在 15 分钟内即可判定检测结果; 结果显示形象、直观、准确; 节省费用, 适用范围广, 便于推广。

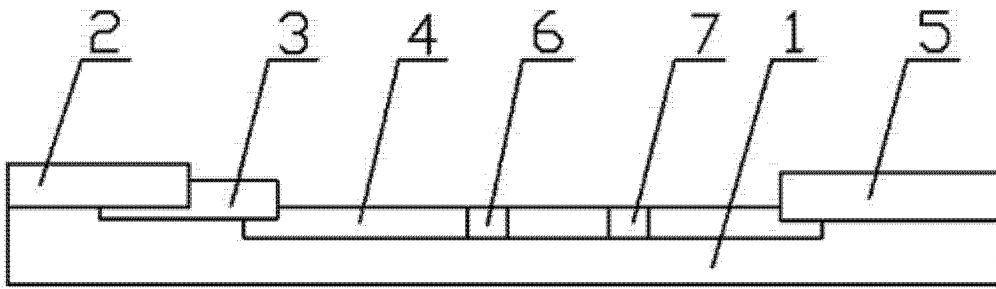


图 1

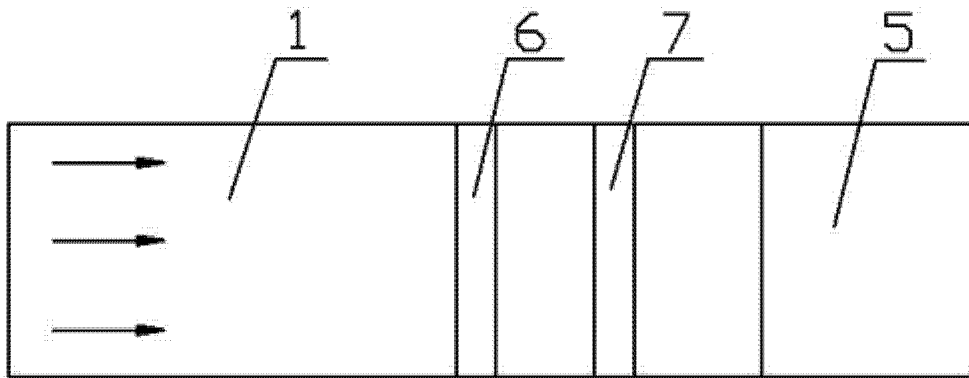


图 2

专利名称(译)	一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN101949925A	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010516358.1	申请日	2010-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	南通市伊士生物技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	南通市伊士生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	南通市伊士生物技术有限责任公司		
[标]发明人	欧卫军 吴迪宏		
发明人	欧卫军 吴迪宏		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/544 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44		
其他公开文献	CN101949925B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种快速检测醋酸泼尼松及其衍生物的胶体金层析试纸条，由衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、包被膜和吸水垫组成，金标结合垫为吸附醋酸泼尼松衍生物的金标抗体的聚酯纤维毡，在包被膜上有用醋酸泼尼松衍生物偶联的载体蛋白溶液包被直线式检测线T线，和用羊抗鼠IgG溶液包被直线式对照线C线，两条线竖向平行排列。其具体步骤：制备人工结合抗原；制备醋酸泼尼松衍生物的单克隆抗体；制成胶体金溶液；获得抗醋酸泼尼松衍生物单克隆抗体的胶体金标记物和金标结合垫。本发明具有特异性强，敏感度高，简便、快速、时效性强，结果显示形象、准确的优点。

