



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103048457 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201210491594. 1

(22) 申请日 2012. 11. 27

(73) 专利权人 同昕生物技术(北京)有限公司
地址 102206 北京市昌平区生命园路 29 号
孵化科研生产大楼 A 座 204 室

(72) 发明人 吴凡 焦守恕 满慧娟

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

审查员 肖吉

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

心肌梗死预警胶体金试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明“心肌梗死预警胶体金试剂盒及其制备方法”，涉及医学检测装置。一种心肌梗死预警试剂盒及其制备方法，包括制备胶体金标记脂蛋白相关磷脂酶 A2 单抗的胶体金标记蛋白溶液以及检测反应载体，其特征在于：所述胶体金标记蛋白溶液中加入有 0. 24mg/ml 的 PEG20000, 1. 5%(w/w) BSA, 3% (w/w) 的蔗糖, 0. 5% (w/w) 的海藻糖, 1% (w/w) 的酪蛋白和 2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠 SDS。本发明通过制备方法的改进提供了两种快速检测全血中脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA₂) 的胶体金检测试剂盒, 还提供了使该试剂盒性能优化的胶体金标记蛋白溶液。

1. 一种用于酶联免疫反应的胶体金标记稳定液,其特征在于,在胶体金标记蛋白溶液中还加入有 0.24mg/ml 的 PEG20000,1.5% (w/w) 牛血清白蛋白,3% (w/w) 的蔗糖,0.5% (w/w) 的海藻糖,1% (w/w) 的酪蛋白和 2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠 SDS,

所述胶体金标记蛋白溶液指胶体金标记脂蛋白相关磷脂酶 A2 单抗的溶液。

2. 一种心肌梗死预警试剂盒的制备方法,包括制备胶体金标记脂蛋白相关磷脂酶 A2 单抗的胶体金标记蛋白溶液以及检测反应载体,其特征在于:所述胶体金标记蛋白溶液中加入有 0.24mg/ml 的 PEG20000,1.5% (w/w) 牛血清白蛋白,3% (w/w) 的蔗糖,0.5% (w/w) 的海藻糖,1% (w/w) 的酪蛋白和 2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠 SDS。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,所述检测反应载体为铺有膜材料的试纸条,所述试纸条从点样端开始依次为胶体金结合区域、测试区域、手持端,所述胶体金结合区域的膜材料为玻璃纤维纸,测试区域的膜材料为硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上设置有质控线和测试线,测试线上包被有 1mg/ml 的脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体,质控线包被有 1mg/mL 的羊抗鼠免疫球蛋白 IgG,其特征在于:所述玻璃纤维纸上包被有权利要求 1 所述的胶体金标记稳定液,所述测试区域采用孔径为 5um 的硝酸纤维素膜。

4. 根据权利要求 2 所述的制备方法,所述检测反应载体为渗滤盒,所述渗滤盒内部为吸水垫料,渗滤盒上表面设置有一个开阔的通孔为检测反应区,所述通孔下垫有硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜下表面与所述吸水垫料紧贴着,上表面使所述通孔封闭,所述通孔中心位置对应的硝酸纤维素膜上设置有呈十字交叉状的质控线和检测线,测试线上包被有 1mg/ml 的脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体,质控线包被有 1mg/mL 的羊抗鼠免疫球蛋白 IgG,所述硝酸纤维素膜的孔径为 5um。

5. 根据权利要求 2 ~ 4 任一所述的制备方法,还包括配制全血处理液,所述全血处理液为含有 3mg/ml EDTA-2K,0.5% (w/w) TritonX-100,0.6% (w/w) 脱氧胆酸钠,0.05% (w/w) ProClin300 的 pH 值 7.4 的 PBS 溶液。

6. 权利要求 2 ~ 5 任一制备方法得到的心肌梗死预警试剂盒。

心肌梗死预警胶体金试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学预诊断试剂,特别是一种心肌梗死预警胶体金试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 心肌梗死(Myocardial infarction, MI 或 acute myocardial infarction, AMI), 常常发生在心冠状动脉突然阻塞,造成部分心脏液供应突然中断,产生缺血和氧气短缺,如不及时治疗就会导致心肌细胞死亡。心肌梗死是心血管疾病(又可总称为冠心病)的终极转归,具有突发、无特异性前兆症状的特点,导致救治不及造成高死亡率。最近的流行病学资料显示,全球每年因冠心病死亡约 1700 万人,其中一半以上死于心肌梗死。我国平均每天就有 2778 人死于心肌梗死,堪称“第一杀手”。

[0003] 心肌梗死虽然在一瞬间突发,但起因却是缘于一系列的病理生理过程。首先是出现心脏冠状动脉粥样硬化,血小板聚集和血栓形成,导致冠状动脉管腔渐变狭窄、此时心肌已经出现逐渐加重的缺血和再灌注的损伤。最后极度加厚的内膜十分粗糙的动脉会突然闭塞或者动脉粥样硬化斑溃破脱落,导致心肌细胞骤然毫无血液和氧气的供应而死亡。从临床角度看,它涵盖了一组连续进展的病症,包括不稳定心绞痛、非 ST 段抬高的心肌梗死(NSTEMI) 和 ST 段抬高的心肌梗死(STEMI)。心肌梗死的及时诊断通常是很困难的,特别是梗死前的心肌缺血阶段更是不易。心电图常首先用来评估因胸部不适就诊的病人,但心肌缺血的病人也可多表现为心电图未见异常,其灵敏度低于 50%,致使延误治疗发展至心肌梗死。目前临床上常用的血清学检查项目,如肌钙蛋白(tropins:TnI, TnT)、肌红蛋白(myoglobin, Myo)、酸激酶 MB 同功酶(creatine kinase-MB, CK-MB)和 B-型钠尿肽(B-type natriuretic peptide, BNP)等,仅在不可逆的细胞损害以及细胞膜的完整性被破坏之后,在血中才会升高。短期和可逆的缺血发作,不会导致这些标志物血中水平升高,因此都是心肌已经发生坏死的标志物,不能用作预警指标。只有在心肌发生缺血时就能高度表达的标志物才能作为即将发生心肌梗死的预警信号,指导患者及时得到救助,避免心肌梗死的发生。

[0004] 脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA₂) 是磷酸脂酶 A2 超家族中的非钙离子依赖型磷脂酶,最初发现其可以降解血小板活化因子,曾被称为血小板活化因子乙酰水解酶。1995 年首次被克隆,其编码基因(PLA2G7),有 12 个外显子,染色体定位于 6p21. 2212,由 441 个氨基酸残基组成的一种丝氨酸脂酶,相对分子质量为 50×10^3 (50kDa)。Lp-PLA₂ 以生物膜磷脂为天然底物 优先作用于氧化磷脂 sn22 位上短脂酰链中的酯键,使水溶性强的磷脂产生游离脂肪酸和溶血磷脂参与磷脂的代谢。Lp-PLA₂ 经成熟的巨噬细胞和淋巴细胞合成和分泌,并受炎性介质的调节,主要与低密度脂蛋白 LDL 结合,能水解血小板活化因子使之失去活性,又能水解低密度脂蛋白上的氧化卵磷脂,生成促炎物质溶血卵磷脂和氧化游离脂肪酸,因此具有促炎症和促动脉粥样硬化的作用。众多研究显示,动脉粥样硬化斑块的炎症发展到严重程度,并将要或者已经出现向血管内腔破裂时, Lp-PLA₂ 将会被大量释放入血液,致

使其血液内的水平会大幅提高,因此 Lp-PLA₂ 的血液浓度与粥样斑块的严重程度呈正相关性,而独立于疾病相关的任何其他危险因子,因而成为不可被取代的,直接监测疾病的演变过程和危险性的最佳的动态检测指标,尤其对于心肌梗塞的发生,具有相当关键意义的预警提示作用。

[0005] 与传统的心肌梗塞标记物如肌钙蛋白, CRP 相比, Lp-PLA₂ 能够更加灵敏的反应病人的状况,而且 Lp-PLA₂ 的水平与年龄,病人的身体状况,是否吸烟,高血压,收缩压,舒张压以及甘油三磷酸无关,能够更加特异性地反应病人的状况。

[0006] 美国食品药品监督管理局已批准 Lp-PLA₂ 测定作为预警心肌梗塞的标志物,用于临床诊断。其后大量的临床实践证明 Lp-PLA₂ 对心肌梗塞预警有极高的灵敏度和特异性。

[0007] 综上所述,心肌梗死是一个炎性反应的过程, Lp-PLA₂ 是血管内炎性标志物,是预警心肌梗塞最理想、最可靠的早期标志物。将上述血管内炎性标志物 Lp-PLA₂ 制作成适于临床使用的心肌梗死近期预警试剂盒是心血管病患者的福音。以酶联免疫反应原理为基础的检测试纸,测试卡或类似的检测反应装置技术非常成熟,其主要依赖抗体抗原特异性结合反应原理、层析技术来捕获并分离目标物质。并通过化学发光或胶体金显色等技术来观察结果。胶体金显色具有简便易于操作等优点,但是,胶体金显色需要将胶体金标记蛋白来包被在检测反应载体上,每种包被的蛋白都有其自身特性和结构特点,这一工艺流程是检测反应试纸等装置是否能灵敏特异地完成检测的关键。

发明内容

[0008] 本发明基于上述领域的空白及存在的缺陷,通过制备方法的改进提供了两种快速检测全血中脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA₂) 的胶体金检测试剂盒。

[0009] 一种用于酶联免疫反应的胶体金标记稳定液,其特征在于,在胶体金标记蛋白溶液中还加入有 0.24mg/ml 的 PEG20000,1.5% (w/w) 牛血清白蛋白,3% (w/w) 的蔗糖,0.5% (w/w) 的海藻糖,1% (w/w) 的酪蛋白和 2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠 SDS。

[0010] 所述胶体金标记蛋白溶液指胶体金标记脂蛋白相关磷脂酶 A2 单抗所得的溶液。

[0011] 一种心肌梗死预警试剂盒的制备方法,包括制备胶体金标记脂蛋白相关磷脂酶 A2 单抗的胶体金标记蛋白溶液以及检测反应载体,其特征在于:在胶体金标记蛋白溶液中还加入有 0.24mg/ml 的 PEG20000,1.5% (w/w) 牛血清白蛋白,3% (w/w) 的蔗糖,0.5% (w/w) 的海藻糖,1% (w/w) 的酪蛋白和 2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠 SDS。

[0012] 所述检测反应载体为铺有膜材料的试纸条,所述试纸条从点样端开始依次为胶体金结合区域、测试区域、手持端,所述胶体金结合区域的膜材料为玻璃纤维纸,测试区域的膜材料为硝酸纤维膜,所述硝酸纤维素膜上设置有质控线和测试线,测试线上包被有 1mg/ml 的脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体,质控线包被有 1mg/mL 的羊抗鼠免疫球蛋白 IgG,其特征在于:所述玻璃纤维纸上包被有所述胶体金标记稳定液,所述测试区域采用孔径为 5um 的硝酸纤维素膜。

[0013] 所述检测反应载体为渗滤盒,所述渗滤盒内部为吸水垫料,渗滤盒上表面设置有一个开阔的通孔为检测反应区,所述通孔下垫有硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜下表面与所述吸水垫料紧贴着,上表面使所述通孔封闭,所述通孔中心位置对应的硝酸纤维素膜上设置有呈十字交叉状的质控线和检测线,测试线上包被有 1mg/ml 的脂蛋白相关磷脂酶

A2 单克隆抗体,质控线包被有 1mg/mL 的羊抗鼠免疫球蛋白 IgG,所述硝酸纤维素膜的孔径为 5 μ m。

[0014] 所述制备方法,还包括配制全血处理液,所述全血处理液为含有 3mg/mL EDTA-ZK, 0.5% (w/w) TritonX-100, 0.6% (w/w) 脱氧胆酸钠, 0.05% (w/w) ProClin300 的 pH 值 7.4 的 PBS 溶液。

[0015] 上述任一制备方法得到的心肌梗死预警试剂盒。

[0016] 本发明利用血管内炎性标志物脂蛋白相关磷脂酶 A2,制作出了成适于临床使用的检测患者脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平以预警心肌梗死的试剂盒。本发明的贡献在于试剂盒制备方法上的改进,这些改进使制备得到的试剂盒的灵敏性,稳定性,特异性都得以提高。本发明的第一个改进在于提供了专门适合于脂蛋白相关磷脂酶 A2 与胶体金偶联的稳定液配方,使两者结合更快,更紧密稳定共价键。

[0017] 本发明的制备方法的第二个改进在于,制备的检测反应载体如试纸条上采用孔径为 5 μ m 的硝酸纤维素膜,可以有效的减少杂波。

[0018] 本发明的制备方法的第三个贡献在于,还提供了制备全血处理液的配方。该全血处理液对待测血清进行预处理,可使检测更灵敏,结果更准确。

附图说明

[0019] 图 1. 试纸条检测结果示意图。

[0020] 图 2. 渗滤盒结构示意图。

[0021] 图 3. 试纸条对比试验结果,其中左 1 为测试试纸条,右 1 的对照组。

[0022] 图 4. 试纸条对比试验结果,其中左 1 边为测试试纸条,右 2~4 试纸条为对照。

[0023] 图 5. 渗滤盒对比试验结果,上 1 为本发明的测试渗滤盒,下 4 为对照。

具体实施方式

[0024] 实施例 1、免疫胶体金层析法检测 Lp-PLA₂

[0025] 本发明应用双抗体夹心法检测人血清或血浆中的 Lp-PLA₂,采用基因工程表达并纯化的 Lp-PLA₂ 蛋白制作的单抗包被硝酸纤维素膜,用胶体金标记另一株单抗或多抗均匀涂布于玻璃纤维纸上,运用纸层析技术及免疫金的显色反应达到检测 Lp-PLA₂ 的目的。特点:整个操作时间约 20 分钟,既可以由专业的医院检验科检验人员操作使用,也可以由检测人独立使用。

[0026] 本发明的试剂盒组成:Lp-PLA₂ 测试卡,说明书 1 份,样品稀释液一瓶

[0027] 步骤 1. 各种试剂的配制

[0028] 1. 样品稀释液:用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾 (KCl) (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 1.44g 十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O) (北京化学试剂公司, 500g/瓶) 和 0.24g 二水合磷酸二氢钾 (KH₂PO₄·2H₂O) (北京化学试剂公司, 500g/瓶),用盐酸 (HCl) (北京化学试剂公司, 500mL/瓶) 调节溶液的 pH 值至 7.4,加水至 1L,摇匀。

[0029] 2. 磷酸盐缓冲液 (PBS):用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠 (NaCl) (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 0.2g 氯化钾 (KCl) (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 1.44g 十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O) (北京化学试剂公司, 500g/瓶) 和 0.24g 二水合磷酸二氢钾

($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 用盐酸 (HCl) (北京化学试剂公司, 500ml/瓶) 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1L, 摇匀。

[0030] 3. 硝酸纤维素膜: Whatman ImmunoporeFP, 2.5cm*50m 带背衬, 孔径 5 μm 。

[0031] 4. 质控线条包被用抗体(简称 C 抗体): 羊抗鼠免疫球蛋白(IgG) 抗体, 购自 Abnova。用 PBS 稀释, 摇匀, 使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/mL。

[0032] 5. 全血处理剂: 3mg/ml EDTA - ZK (Sigma 500g/瓶), 0.5% TritonX-100 (北京化学试剂公司, 500ml/瓶), 0.6% 脱氧胆酸钠 (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 0.05% ProClin300 (Sigma 500g/瓶) 加入 pH 值 7.4 的 PBS 溶液。

[0033] 6. 检测线条包被用抗体(简称 T 抗体): 鼠抗人单克隆抗体, 购自 Abnova。用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释 Lp-PLA₂ 单克隆抗体, 摇匀, 优选浓度为 1mg/ml, 制得 T 抗体溶液。

[0034] 步骤 2. 制备 Lp-PLA₂ 金标单克隆抗体反应溶液

[0035] 1. 制备胶体金溶液: 浓度为万分之一, 直径 10nm, 购自北京华美公司。用重量百分比浓度为 1% 的碳酸钾 (K_2CO_3) (北京化学试剂公司, 500ml/瓶), 水溶液调节 pH 至 8.9。

[0036] 2. 鼠抗人 Lp-PLA₂ 单克隆抗体, 购自 Abnova。用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释 Lp-PLA₂ 单克隆抗体, 摇匀, 优选重量百分比浓度为 0.1-0.2mg/mL。鼠抗人 Lp-PLA₂ 单克隆抗体只与血液中相应的 Lp-PLA₂ 抗原发生特异性反应, 从而决定了本检测技术的特异性。

[0037] 3. 标记蛋白最适胶体金溶液稳定量的测定: 未加入蛋白或加入蛋白量不足以稳定胶体金溶液的试管, 即呈现由红变蓝的聚沉现象, 而加入蛋白量达到或超过最低稳定量的试管则胶体金溶液的红色不变。其中含蛋白量最低的试管即含稳定 1ml 胶体金溶液的必须蛋白量, 在此基础上加上 20% 的量, 即为稳定 1ml 胶体金溶液所需蛋白的实际用量。实验如表 1 所示。管 1、2、3、4 中, 有明显蓝色聚沉现象, 管 5 略有淡红色沉淀, 管 6、7、8 稳定, 无聚沉现象, 由此确定, 25mg/L 为稳定胶体金溶液的蛋白最小用量, 在此基础上加 20%, 即 30mg/L 为稳定胶体金溶液的抗人 Lp-PLA₂ 单克隆抗体的实际用量。

[0038] 表 1 标记蛋白最适胶体金溶液稳定量实验表

[0039]

管号	胶体金溶液 (ml)	单抗溶液浓度 (mg/ml)	单抗溶液用量 (ml)	10%NaCl
1	1	0	0.2	0.1
2	1	5	0.2	0.1
3	1	10	0.2	0.1
4	1	15	0.2	0.1
5	1	20	0.2	0.1
6	1	25	0.2	0.1
7	1	30	0.2	0.1
8	1	35	0.2	0.1

[0040] 4. 单克隆抗体的胶体金标记具体步骤如下: ①根据用以标记的胶体金的总量计算出所需的待标记单抗的总量。②在电磁搅拌下, 将单抗溶液逐滴加入胶体金溶液中 (1mg 单抗溶液约 5min 加完)。③在电磁搅拌下, 相继逐滴加入 5% 的牛血清白蛋白 (稳定剂), 使其终浓度为 1%。④将标记好的胶体金装入透析袋, 埋于蔗糖中浓缩, 浓缩为原体积的 1/10。⑤用 pH7.0、0.005mol/L NaCl 充分透析, 去除蔗糖。⑥ 15000r/min 离心 20min, 收集上清, 分

装入试剂瓶中。

[0041] 5. 在收集的上清中加入 0.24mg/ml 的 PEG20000 (sigma500g/瓶), 1.5% (w/w) 的牛血清白蛋白 BSA (amresco, 250g/瓶), 3% (w/w) 的蔗糖 (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 0.5% 的海藻糖 (sigma500g/瓶), 1% (w/w) 的酪蛋白 (sigma500g/瓶), 以及 2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠 SDS (北京化学试剂公司, 500g/瓶), 得胶体金标记稳定液。

[0042] 步骤 3. 检测试纸条的制备

[0043] 试纸条结构与现有技术中常规的胶体金检测试纸条构造相同, 其由支撑层和反应层构成, 反应层为铺在支撑层上的膜材料, 反应层从一端到另一端依次为点样区、胶体金结合区、测试反应区、吸水区。胶体金结合区的膜材料为玻璃纤维纸 (北京普莱斯德新型保温建材有限公司, 规格为 5 μm), 测试反应区的膜材料为孔径 5 μm 的硝酸纤维素膜, 吸水区的膜材料为吸水材料如吸水纸。

[0044] 硝酸纤维素膜上设置有质控线和检测线, 质控线的位置包被羊抗鼠免疫球蛋白 (IgG) 抗体, 购自 Abnova; 包被液为用 PBS 稀释的 1mg/ml 的多克隆抗体羊抗鼠免疫球蛋白 (IgG) 抗体。检测线上包被 Lp-PLA₂ 单克隆抗体, 包被液为: 1mg/ml 用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释的 Lp-PLA₂ 单克隆抗体, 抗体购自 Abnova。

[0045] 玻璃纤维纸上包被有步骤 2 制备得到的胶体金标记包被液。

[0046] 按照上述方法制备出试纸条 1。

[0047] 对照 1: 胶体金标记包被液为步骤 2 第 4 步所得的上清液, 其它同步骤 3。

[0048] 对照 2 ~ 5: 硝酸纤维素膜的孔径采用的规格依次为: 6 μm, 8 μm, 10 μm, 13 μm 试纸条的使用方法

[0049] 1. 血液样品的采集与贮存: (1) 于手指尖处针刺取全血, 无须抗凝, 立即吸 50 μL 加入到 50 μL 瓶 A 全血处理液中, 摇匀, 离心 10000rpm 3 分钟, 吸取上清, 不可贮存。(2) 血清或血浆样本可在 2-8℃ 保存 5 天, 在 -20℃ 可保存三个月, 在 -80℃ 可保存一年。(3) 抗凝的全血标本可在 4℃ 短时间保存, 但必须在取样 48h 内检测。(4) 各种样品在检测前必须调至室温 (20-25℃) 才能检测, 切忌加热或反复冻融。(5) 血液样品只有在检测前才能稀释。

[0050] 2. 实验步骤: (1) 确认所测样品和试剂盒各组分已至室温。(2) 取出测试卡。卡水平放置, 样品孔向上。(3) 在反应卡的样品孔中加入 40 μL 血清, (4) 在反应卡的样品孔中精确加入 5 滴样品稀释液 (200 μL), (5) 在反应进行到 5 分钟时在样品 (6) 反应 15-20 分钟判读结果。

[0051] 3. 结果判读: (1) 通过质控线和检测线的颜色对比的强弱来判定检测的半定量结果。如果检测线不显色, 说明血样中 Lp-PLA₂ 浓度低于 175ng/ml; 如果检测线颜色显色比质控线弱, 说明 Lp-PLA₂ 浓度处于 175ng/ml-235ng/ml 之间; 如果检测线颜色显色比质控线强, Lp-PLA₂ 浓度处于 235ng/ml 以上。(2) 如果没有明显的条带出现在反应区和质控区, 或者反应区出现条带, 而质控区没有出现条带, 实验无效, 建议重复实验。

[0052] 注意事项

[0053] (1) 处理试剂和样品时需戴一次性手套, 操作后应彻底洗手。

[0054] (2) 所有标本应视为潜在的传染性物质, 废弃处理时, 请按照当地政府和有关国家规定进行。

[0055] (3) 存放在冰箱的试剂盒, 充分恢复室温后再打开包装使用。

[0056] (4) 请在试剂盒有效期内使用。

[0057] (5) 贮存条件及效期:4—30℃阴凉避光干燥处贮存,有效期为 18 个月。

[0058] 实施例 2、对比试验

[0059] 参试试纸条:实施例 1 所制备的试纸条 1, 对照 1~5。

[0060] 对比试验 1:用已知 Lp-PLA₂ 浓度处于 235ng/ml 以上的血清样本,按照实施例 1 中所述检测步骤进行检测,试纸条 1 与对照 1 的检测结果如图 3

[0061] 对比试验 2:用已知 Lp-PLA₂ 浓度处于 235ng/ml 以上的血清样本,按照实施例 1 中所述检测步骤进行检测,试纸条 1 与对照 2~5 的检测结果如图 4:

[0062] 实施例 3、免疫胶体金渗滤法检测 Lp-PLA₂

[0063] 本发明应用酶免疫双抗体夹心法原理,使用纳米胶体金快速斑点免疫渗滤技术检测人血清或血浆中的 Lp-PLA₂,采用基因工程表达并纯化的 Lp-PLA₂ 蛋白制作的单抗包被硝酸纤维素膜,用胶体金标记另一株单抗或多抗配制结合物试剂,运用渗滤技术及免疫金的显色反应达到检测 Lp-PLA₂ 的目的。设计原理是免疫反应是通过垂直穿透固定有配体的硝酸纤维素膜而进行的以硝酸纤维素膜(NC 膜)为载体,利用微孔滤膜的可滤过性,使抗原抗体反应和洗涤在专门设计的渗滤装置上以液体渗滤过膜的方式迅速完成。

[0064] 本发明的试剂盒组成组成,包括:

[0065] 1. 渗滤装置(结构见图 2),是斑点金渗滤试剂盒中主要组成成分之一,由塑料的渗滤盒、吸水垫料和点加了抗 Lp-PLA₂ 抗体的硝酸纤维素膜片三部分组成。塑料小盒盖的中央有一圆进样孔,盒内垫放吸水垫料,NC 膜片安放在正对盒盖的圆孔下,紧紧关闭盒盖,使 NC 膜片紧贴吸水垫料。如此即制备渗滤装置。整个反应过程都在渗滤装置上进行。

[0066] 2. 样品稀释液,

[0067] 3. 纳米级胶体金溶液,

[0068] 4. 洗涤液。

[0069] 特点:整个操作时间约 10 分钟,既可以由专业的医院检验科检验人员操作使用,也可以由检测人独立使用。结果判断形象、直观,易于非专业人员解读。

[0070] 步骤 1. 各种试剂的配制

[0071] 1. 磷酸盐缓冲液(PBS):用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠(NaCl)(北京化学试剂公司,500g/瓶),0.2g 氯化钾(KCl)(北京化学试剂公司,500g/瓶),1.44g 十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)(北京化学试剂公司,500g/瓶)和 0.24g 二水合磷酸二氢钾(KH₂PO₄·2H₂O)(北京化学试剂公司,500g/瓶),用盐酸(HCl)(北京化学试剂公司,500ml/瓶)调节溶液的 pH 值至 7.4,加水至 1L,摇匀。

[0072] 2. 样品稀释液:用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾(KCl)(北京化学试剂公司,500g/瓶),1.44g 十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)(北京化学试剂公司,500g/瓶)和 0.24g 磷酸二氢钾(KH₂PO₄·2H₂O)(北京化学试剂公司,500g/瓶),用盐酸(HCl)(北京化学试剂公司,500ml/瓶)调节溶液的 pH 值至 7.4,加水至 1L,摇匀。

[0073] 3. 洗涤液:用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠(NaCl)(北京化学试剂公司,500g/瓶),0.2g 氯化钾(KCl)(北京化学试剂公司,500g/瓶),1.44g 十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)(北京化学试剂公司,500g/瓶)和 0.24g 二水合磷酸二氢钾(KH₂PO₄·2H₂O)(北京化学试剂公司,500g/瓶),用盐酸(HCl)(北京化学试剂公司,500ml/瓶)调节溶液的 pH 值至

7.4,加水至 1L,摇匀,加入 200ul 的吐温 20(amresco,500ml/瓶),摇匀。

[0074] 4. 全血处理剂:3mg/ml EDTA-ZK(sigma500g/瓶),0.5% TritonX-100(北京化学试剂公司,500ml/瓶),0.6%脱氧胆酸钠(北京化学试剂公司,500g/瓶),0.05%ProClin300(sigma500g/瓶)加入 pH 值 7.4 的 PBS 溶液。

[0075] 5. 硝酸纤维素膜:whatman ImmunoporeFP,2.5cm*50m 带背衬,孔径 5um。

[0076] 6. 质控线条包被用抗体(简称 C 抗体):羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)抗体,购自 Abnova。用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/mL。

[0077] 7. 检测线条包被用抗体(简称 T 抗体):鼠抗人单克隆抗体,购自 Abnova。用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释 Lp-PLA₂ 单克隆抗体,摇匀,优选重量百分比浓度为 1mg/mL,制得 T 抗体溶液。

[0078] 8. 胶体金标记稳定液:在标记好的单抗胶体金溶液中加入 0.24mg/ml 的 PEG20000(sigma500g/瓶),1.5%(w/w)的牛血清白蛋白 BSA(amresco,250g/瓶),3%(w/w)的蔗糖(北京化学试剂公司,500g/瓶),0.5%的海藻糖(sigma500g/瓶),1%(w/w)的酪蛋白(sigma500g/瓶),以及 2%(w/w)的十二烷基磺酸钠 SDS(北京化学试剂公司,500g/瓶)。

[0079] 步骤 2. 渗滤装置制备

[0080] 1. 塑料小盒:聚乙烯(PE)塑料材料制成高 5mm、边长为 45mm 的正方形塑料小盒,包括底盒和盒盖。在盒盖上压塑出一个 5mm 凸起的直径为 35mm 的圆形平台,平台中央开出一个直径约 13mm 的小圆进样孔。NC 膜片安放在正对盒盖的圆孔下,膜下面填满吸水滤纸作为垫料。将盒盖在底盒上,注意要使 NC 膜片紧贴吸水垫料,将塑料小盒用胶密封。

[0081] 2. NC 膜试纸片:孔径 5 μm,裁切成直径 15mm 的圆形硝酸纤维素膜试纸片安放在正对盒盖的圆孔下。在 NC 膜上用两种抗体点样呈短线条式:(1)质控线条 C 抗体横向包被成横线条,如“—”;(2)反应线 T 抗体纵向包被成竖线条,如“|”;两者相交成“+”。这样,阳性反应结果在膜上显示红色的正号(+),阴性结果则显示为负号(-),若无线条显示则表明反应失败。

[0082] 3. NC 膜试纸片的封闭:将上述用点样法得到的抗体固定化试纸片放入用双蒸水稀释的重量百分比浓度为 5%的牛血清白蛋白溶液 BSA(Amresco,250g/瓶)中,37℃反应 20-60min 取出,风干,得到待用固定化 NC 膜试纸片。将 NC 膜试纸片正确安放在正对盒盖的通孔下的渗滤装置 1。

[0083] 步骤 3. 制备对照渗滤装置:

[0084] 对照 1~4,制备方法同步骤 2,区别仅在于硝酸纤维素膜试纸的规格依次为:6um,8um,10um,13um

[0085] 步骤 4. 制备 Lp-PLA₂ 金标单克隆抗体反应溶液(简称 G 显色溶液)

[0086] 1. 制备胶体金溶液:浓度为万分之一,直径 10nm,购自北京华美公司。用重量百分比浓度为 1%的碳酸钾(K₂CO₃)(北京化学试剂公司,500ml/瓶)水溶液调节 pH 至 8.9。

[0087] 2. 鼠抗人 Lp-PLA₂ 单克隆抗体,购自 Abnova。用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释 Lp-PLA₂ 单克隆抗体,摇匀,优选重量百分比浓度为 0.1-0.2mg/mL。鼠抗人 Lp-PLA₂ 单克隆抗体只与血液中相应的 Lp-PLA₂ 抗原发生特异性反应,从而决定了本检测技术的特异性。

[0088] 3. 标记蛋白最适胶体金溶液稳定量的测定:未加入蛋白或加入蛋白量不足以稳定胶体金溶液的试管,即呈现由红变蓝的聚沉现象,而加入蛋白量达到或超过最低稳定量的

试管则胶体金溶液的红色不变。其中含蛋白量最低的试管即含稳定 1ml 胶体金溶液的必须蛋白量,在此基础上加上 20% 的量,即为稳定 1ml 胶体金溶液所需蛋白的实际用量。实验如表 1 所示。管 1、2、3、4 中,有明显蓝色聚沉现象,管 5 略有淡红色沉淀,管 6、7、8 稳定,无聚沉现象,由此确定,25mg/L 为稳定胶体金溶液的蛋白最小用量,在此基础上加 20%,即 30mg/L 为稳定胶体金溶液的抗人 Lp-PLA₂ 单克隆抗体的实际用量。

[0089] 表 2 标记蛋白最适胶体金溶液稳定量实验表

[0090]

管号	胶体金溶液 (ml)	单抗溶液浓度 (mg/ml)	单抗溶液用量 (ml)	10%NaCl
1	1	0	0.2	0.1
2	1	5	0.2	0.1
3	1	10	0.2	0.1
4	1	15	0.2	0.1
5	1	20	0.2	0.1
6	1	25	0.2	0.1
7	1	30	0.2	0.1
8	1	35	0.2	0.1

[0091] 4. 单克隆抗体的胶体金标记具体步骤如下:①根据用以标记的胶体金的总量计算出所需的待标记多抗的总量。②在电磁搅拌下,将单抗溶液逐滴加入胶体金溶液中(1mg 多抗溶液约 5min 加完)。③在电磁搅拌下,相继逐滴加入 5% 的牛血清白蛋白(稳定剂),使其终浓度为 1%。④将标记好的胶体金装入透析袋,埋于蔗糖中浓缩,浓缩为原体积的 1/10。⑤对 pH7.0、0.005mol/LNaCl 充分透析,去除蔗糖。⑥ 15000r/min 离心 20min,收集上清,分装入试剂瓶中。

[0092] 5. 在收集的上清中加入 0.24mg/ml 的 PEG20000 (sigma500g/瓶),1.5% 的 BSA(amresco,250g/瓶),3% 的蔗糖(北京化学试剂公司,500g/瓶),0.5% 的海藻糖(sigma500g/瓶),1% 的酪蛋白(sigma500g/瓶),以及 2% 的十二烷基磺酸钠 SDS(北京化学试剂公司,500g/瓶)得胶体金标记稳定液。

[0093] 使用方法

[0094] 1. 血液样品的采集与贮存:(1)于手指尖处针刺取全血,无须抗凝,立即吸 50 μ L 加入到全血处理液中,摇匀,10000rpm 离心 3min,取上清。立即用于测试,不可贮存。(2)血清或血浆样本可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 5 天,在 -20 $^{\circ}$ C 可保存三个月,在 -80 $^{\circ}$ C 可保存一年。(3)抗凝的全血标本可在 4 $^{\circ}$ C 短时间保存,但必须在取样 48h 内检测。(4)各种样品在检测前必须调至室温(20-25 $^{\circ}$ C)才能检测,切忌加热或反复冻融。(5)血液样品只有在检测前才能稀释。

[0095] 2. 测试步骤:(1)确认所测样品和试剂盒各组分已至室温(2)将渗滤装置平放于台面,加样孔向上(3)使用吸管取 50 μ L 血样加入到瓶 1 样品稀释液中,摇匀(4)立即将瓶 1 样品稀释混合液倒入渗滤装置加样孔中的 NC 滤膜上,样品应在 30 秒内被滤膜完全吸入(5)将瓶 2 的 G 显色液再次混悬摇匀,立即倒入加样孔中,10 秒之内胶体金的红色显现(6)将瓶 3 洗涤液倒入孔中,清洗浮色,立即观察结果。

[0096] 3. 结果判读:(1)加样孔中央 NC 滤膜上显示红色的正号(+),表明血样中 Lp-PLA₂ 阳性(2)加样孔中央 NC 滤膜上显示红色的负号(-),表明血样中 Lp-PLA₂ 阴性(3)若加样

孔中央 NC 滤膜上无线条显示则表明反应失败。

[0097] 实施例 4 对比试验

[0098] 对比试验 1, 渗滤装置 1 与对照 1 ~ 4 的检测对比试验, 结果如图 5。

[0099] 实施例 5 血液 Lp-PLA₂ 检测敏感性试验

[0100] 以 250mg/L 的 Lp-PLA₂ 蛋白(购自 Abnova) 为首样, 倍比稀释 11 孔。将各个质量浓度分别作斑点渗滤实验, 并设空白对照。结果观察见表 2, 所标记的金溶液最小检测浓度为 3.9mg/L, 所需的量为 10 μ l。

[0101] 表 3 血液 Lp-PLA₂ 检测敏感性实验

[0102]

Lp-PLA ₂ (mg/L)	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	
结果	+++	+++	+++	+++	+++	++	
Lp-PLA ₂ (mg/L)	3.9	1.95	0.98	0.49	0.25	0.13	0
结果	+	+-	-	-	-	-	-

[0103] 注: +++: 强阳性, ++ 阳性, + 弱阳性, +- 可疑阳性, - 阴性

[0104] 实施例 6 应用的实施例

[0105] 试验 1. 免疫胶体金层析法检测人血清中 Lp-PLA₂ 浓度的胶体金试剂盒的应用

[0106] (1) 用试剂盒检测人血清中 Lp-PLA₂ 浓度

[0107] 用移液器吸取 50 μ L 血样加入在反应卡的样品孔中再精确加入 5 滴样品稀释液(200u1), 在反应进行到 5 分钟时在样品孔中再加 1 滴样品稀释液, 再反应 15-20 分钟判读结果。

[0108] (2) 结果解释

[0109] 如果检测线不显色, 说明血样中 Lp-PLA₂ 浓度低于 175ng/ml; 如果检测线颜色显色比质控线弱, 说明 Lp-PLA₂ 浓度处于 175ng/ml-235ng/ml 之间; 如果检测线颜色显色比质控线强, Lp-PLA₂ 浓度处于 235ng/ml 以上。如果没有明显的条带出现在反应区和质控区, 或者反应区出现条带, 而质控区没有出现条带, 实验无效, 建议重复实验。

[0110] (3) 利用本专利试剂盒检测 87 份病人血清, 同时检测 75 份正常人血清, 结果如下: 利用免疫胶体金层析试剂盒, 阳性血清检测出 80 份, 血清 Lp-PLA₂ 浓度在 235ng/ml 以上, 5 份阳性血清 Lp-PLA₂ 浓度在 175-235ng/ml 之间, 2 份阳性血清 Lp-PLA₂ 浓度在 175ng/ml 以下, 72 份阴性血清 Lp-PLA₂ 浓度在 175 以下。3 份阴性血清 Lp-PLA₂ 浓度在 175-235ng/ml 之间。试剂盒特异性为 97.4%, 灵敏度为 96.5%。

[0111] 试验 2. 免疫胶体金渗滤法检测人血清中 Lp-PLA₂ 浓度的胶体金试剂盒的应用

[0112] (1) 用试剂盒检测人血清中 Lp-PLA₂ 浓度

[0113] 用移液器吸取 50 μ L 血样, 50 μ L 阳性标准, 50 μ L 阴性标准加入到瓶 1 样品稀释液中, 立即将瓶 1 样品稀释混合液倒入渗滤装置加样孔中的 NC 滤膜上, 计时, 样品在 30 秒内被滤膜完全吸入。将瓶 2 的 G 显色液再次混悬摇匀, 立即倒入加样孔中, 10 秒之内胶体金的红色显现, 将瓶 3 洗涤液倒入孔中, 清洗浮色, 立即观察结果。

[0114] (2) 结果解释

[0115] 加入血样的渗滤试剂盒显示为红色的正号(+), 而阳性标准也显示红色的正号(+), 阴性标准显示为红色的负号(-)。说明血清样本中含有 Lp-PLA₂。

[0116] (3) 利用本专利试剂盒检测 87 份病人血清, 同时检测 75 份正常人血清, 结果如

下:利用免疫胶体金层析试剂盒,检测出 81 份血清 Lp-PLA₂ 浓度显示阳性,6 份阳性血清 Lp-PLA₂ 浓度显示阴性,73 份阴性血清 Lp-PLA₂ 浓度全部阴性。2 份阴性血清 Lp-PLA₂ 浓度显示阳性。试剂盒特异性为 92.5%,灵敏度为 97.5%。

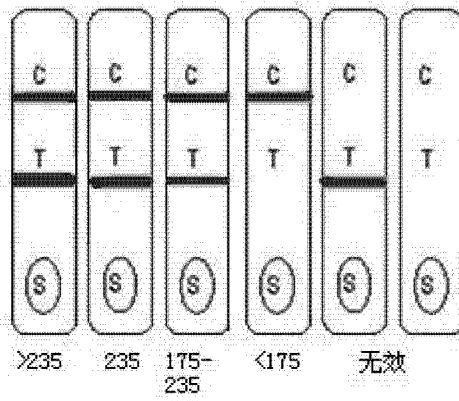


图 1

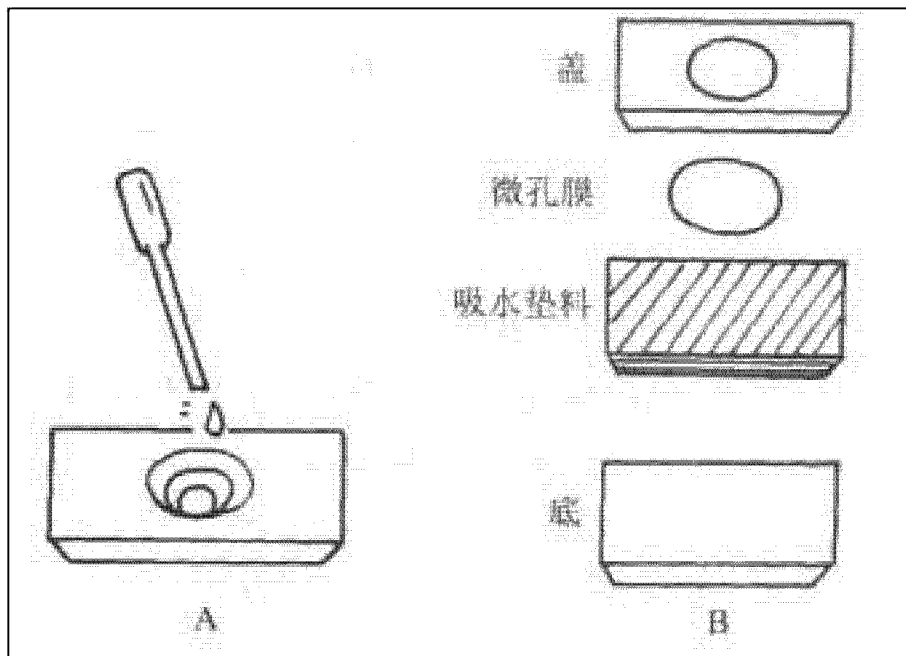


图 2

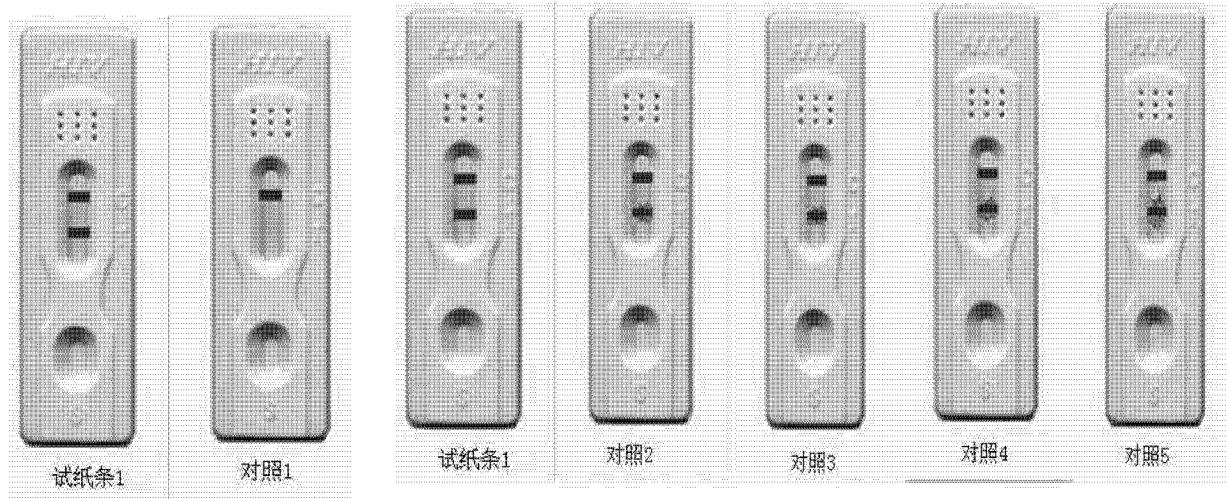


图 3

图 4

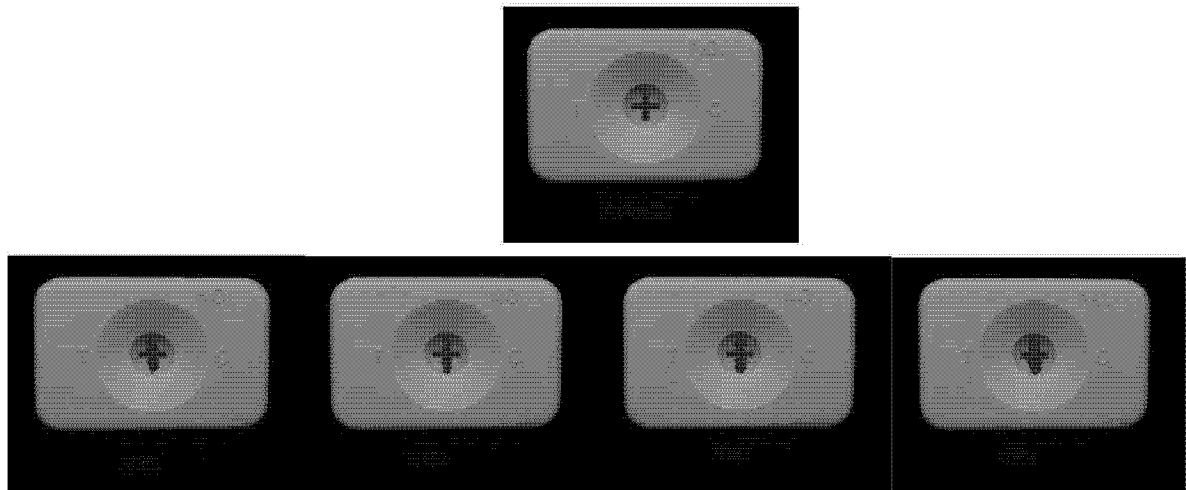


图 5

专利名称(译)	心肌梗死预警胶体金试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103048457B	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201210491594.1	申请日	2012-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	吴凡 焦守恕 满慧娟		
发明人	吴凡 焦守恕 满慧娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/544 G01N33/531		
代理人(译)	张涛		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN103048457A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明“心肌梗死预警胶体金试剂盒及其制备方法”，涉及医学检测装置。一种心肌梗死预警试剂盒及其制备方法，包括制备胶体金标记脂蛋白相关磷脂酶A2单抗的胶体金标记蛋白溶液以及检测反应载体，其特征在于：所述胶体金标记蛋白溶液中加入有0.24mg/ml的PEG20000，1.5% (w/w) BSA，3% (w/w) 的蔗糖，0.5% (w/w) 的海藻糖，1% (w/w) 的酪蛋白和2% (w/w) 的十二烷基磺酸钠SDS。本发明通过制备方法的改进提供了两种快速检测全血中脂蛋白相关磷脂酶A2 (Lp-PLA2) 的胶体金检测试剂盒，还提供了使该试剂盒性能优化的胶体金标记蛋白溶液。

序号	胶体金溶液 (ml)	抗体溶液浓度 (mg/ml)	反应液用量 (ml)	0.2% NaCl
1	:	0	0.2	0.1
2	.	5	0.2	0.1
3	'	10	0.2	0.1
4	:	15	0.2	0.1
5	'	20	0.2	0.1
6	.	25	0.2	0.1
7	:	30	0.2	0.1
8	'	35	0.2	0.1