



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104865384 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510197628. X

(22) 申请日 2015. 04. 23

(71) 申请人 江苏金标世纪生物科技有限公司
地址 215600 江苏省苏州市张家港市国泰北路 1 号科技创业园 F 栋五层

(72) 发明人 胡文波 李静

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 赵敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

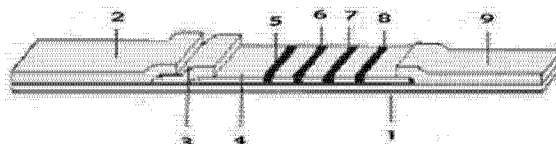
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测肾衰的三联试剂盒及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术检测领域,具体涉及一种用于肾脏衰竭的早期预警、治疗过程和愈后监控的三联试剂盒,并进一步公开了其制备方法和应用。所述试剂卡以血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CysC)、中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白(NAGL)及C反应蛋白(CRP)为检测标志物。本发明三联试剂卡以NGAL-CysC-CRP三联抗体为标记物,可有效监测肾衰的风险,尤其对糖尿病人、交通事故发生者的急性肾衰监测起到了意想不到的效果,其诊断急性肾衰灵敏度高、特异性强,临床监测的准确率高达95%,使糖尿病人肾病的自我检测和监测成为可能,用于肾病的早期预警,可及时阻止病人的病情恶化,减轻病人的肾损伤程度。



1. 一种快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,所述试剂卡以血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (CysC)、中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白 (NGAL) 及 C 反应蛋白 (CRP) 为检测标志物。

2. 根据权利要求 1 所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,所述试剂卡包括样品区、抗体结合区,检测控制区及吸水区;所述抗体结合区含有 CysC、NGAL、CRP 的特异性抗体,所述检测控制区含有分别与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体,或相应的抗原。

3. 根据权利要求 2 所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,所述试剂卡包括:底板 (1) 以及沿所述底板 (1) 的长度方向上依次粘附在所述底板上的样品垫 (2)、结合垫 (3)、抗体承载膜 (4) 和吸样垫 (9),且所述样品垫 (2)、结合垫 (3)、抗体承载膜 (4) 和吸样垫 (9) 之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠;

所述抗体承载膜 (4) 粘附于所述底板 (1) 的中间部位,其上顺次设置有第一检测线 (5)、第二检测线 (6)、第三检测线 (7) 和质控线 (8),所述第一检测线 (5) 靠近所述结合垫 (3),所述质控线 (8) 靠近所述吸样垫 (9);

所述结合垫 (3) 上喷涂有 CysC、NGAL、CRP 三种特异性抗体;

所述第一检测线 (5)、第二检测线 (6)、第三检测线 (7) 分别彼此独立的由与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体或相应的抗原涂层形成,且彼此不同。

4. 根据权利要求 3 所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,

所述第一检测线 (5)、第二检测线 (6) 及第三检测线 (7) 相间隔平行设置,或者彼此不重叠的并列设置。

5. 根据权利要求 3-4 任一所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,所述质控线 (8) 由抗鼠 IgG 抗体涂层形成。

6. 根据权利要求 3-5 任一所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,制备所述结合垫 (3) 的载体包括胶体金纳米颗粒、荧光胶乳、磁珠、量子点或稀土元素。

7. 根据权利要求 3-6 任一所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,所述结合垫 (3) 为胶体金垫,由标记有 CysC、NGAL、CRP 抗体的胶体金纳米颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上制成;或者,

所述结合垫 (3) 为免疫荧光垫,由免疫荧光物质标记的乳胶微球喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上制成。

8. 根据权利要求 3-7 任一所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,其特征在于,所述结合垫 (3) 上,所述 CysC、NGAL、CRP 三种特异性抗体分别与不同颜色的量子点相结合。

9. 一种制备权利要求 1-7 任一所述快速检测肾衰的三联试剂卡的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 结合垫的制备:按照现有技术常规方法将标记有 CysC、NGAL、CRP 特异性抗体的载体颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上,烘干备用;

(2) 抗体承载膜的制备:将与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体或相应的抗原稀释,划线喷涂于抗体承载膜,形成所述第一检测线、第二检测线、第三检测线,并将抗鼠 IgG 抗体稀释并划线喷涂形成所述质控线,烘干备用;

(3) 组装:在底板上顺次粘结样品垫、结合垫、抗体承载膜和吸样垫,各部分依次与且

仅与相邻部位相接触且部分重叠,切割成条,装入塑料卡内即形成所述试纸卡。

10. 根据权利要求 9 所述的制备快速检测肾衰的三联试剂卡的方法,其特征在于:

所述结合垫为胶体金垫,其制备步骤具体包括:将标记有 CysC、NAGL、CRP 抗体的胶体金纳米颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上,烘干备用;或者

所述结合垫为免疫荧光垫,其制备步骤具体包括:

(a) 取荧光物质标记的乳胶微球与抗 CysC、NGAL、CRP 的特异性抗体结合,制得标记有特异性抗体的荧光乳胶微球;

(b) 将步骤 (a) 中制得的免疫荧光乳胶微球涂布于玻璃纤维素膜或无纺布上制成免疫荧光结合垫。

11. 一种快速检测肾衰的三联试剂盒,其特征在于,由权利要求 1-9 任一所述的试剂卡与比色卡和 / 或胶体金定量读数仪组成;或者,

由权利要求 1-9 任一所述的试剂卡与荧光检测仪组成。

一种快速检测肾衰的三联试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术检测领域,具体涉及一种用于肾脏衰竭的早期预警、治疗过程和愈后监控的三联试剂盒,并进一步公开了其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 急性肾损伤 (AKI) 是急性肾衰竭的连续性过程,AKI 广泛发生于糖尿病人、交通事故伤害、重症患者、大手术后患者,它按 FIFLE 标准分为风险、损伤、衰竭、肾功能丧失和终末期肾病。急性肾损伤尽早诊断有助于对病人实施保护性治疗,降低死亡率。

[0003] 现有技术中,临床急性肾损伤诊断的生物标志物是肌酐、尿素氮和尿量。肌酐是骨骼肌中肌酸到磷酸肌酸,并在肝脏中转化形成,并从肾小球滤过,其中少部分肌酐分泌入尿,肌酐不能在肾小管重吸收或在肾脏代谢。血清肌酐作为急性肾损伤的标志物的局限性主要体现在:第一,肌酐产生因年龄、性别、饮食、肌肉情况、药物及激烈运动差异明显,影响了其诊断的准确性;第二,肌酐分泌约占肌酐清除的 10-40%,这将导致 GFR 的假性降低;第三,血清肌酐试验精确性可因假象而降低;第四,肌酐出现异常时,GFR 减少大都已超过 50%,并且需超过 24 小时才能检测到血肌酐浓度。这些因素都会导致以肌酐作为急性肾损伤的早期诊断标志存在严重的局限性。

[0004] 尿素氮是水溶性的、低分子量的蛋白质代谢产物。它的血浓度与 GFR 相反,部分因素可影响它的产生和清除,这就限制了它评估 GFR 的可靠性。尿素氮的产生是多变的,它的值可因循环血量、蛋白质摄入、胃肠道出血等的变化而改变。肾脏尿素氮清除率也是变化的;40-50%滤过的尿素氮在肾小管重吸收。所以,尿素氮是不太适合评估 GFR 的,因为浓度升高需时间累积,不能及时反映 GFR 变化而耽搁诊断。

[0005] 更重要的是,由于很多 AKI 病人并没有出现少尿,或者很多手术及 ICU 病人仅出现了少尿,但并没有出现急性肾损伤。因此,这些依赖传统的生物标志物(肌酐,尿素氮,尿量)来诊断 AKI,多在损伤后几小时才出现异常(肌酐,尿素氮),同时也缺乏特异性(尿量),这些均会造成治疗上耽搁,这也是临床 AKI 治疗效果不佳的重要原因之一。

[0006] 鉴于现有临床上面临的这些问题,新的早期急性肾损伤的生物标志物已被逐步开发出来。包括中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (CysC), C 反应蛋白 (CRP), 均已在 AKI 的诊断中发挥重要作用。

[0007] 中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白 (NGAL) 是一种小分子量分泌型蛋白,由 Kjeldsedn 等人于 1993 年发现,是 Lipocalin 家族的新成员。生理条件下,NCAL 少量合成于骨髓中性粒细胞和肾小管等多个系统的上皮细胞,炎症反应和恶性肿瘤可诱使其在多组织(如子宫、前列腺、唾液腺、肺、肾、气道及消化道上皮等)中大量生成,几个小时内就可以达到峰值,产生速度明显快于其它相关生物标记物。NGAL 在急性肾小管损伤早期就已经表达,反映肾小管功能紊乱,它浓度的升高提示肾小管损伤发生,而传统指标血肌酐升高则需 24 小时以上。NGAL 也是目前新型 AKI 诊断的首选指标物。

[0008] 胱抑素 C 也称半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C, CysC 分子量为 13KD,由 120 个氨基酸组

成,它编码的基因是存在于机体所有有核细胞中的一种管家基因,因此人体几乎所有的有核细胞均可以产生 CysC,且产生率恒定。生理条件下,CysC 抑制内源性半胱氨酸蛋白酶的活性,CysC 是一种低分子量蛋白质,能经肾小球滤过而被清除,在肾小球近曲小管重吸收并被完全分解代谢,且肾脏是唯一清除 CysC 的器官,机体产生 CysC 的速率也相当恒定。研究证明,CysC 是一种比较接近理想的反映肾小球滤过功能的内源性标志物。当肾小球出现轻微损伤时,CysC 在血液中的浓度会迅速升高。CysC 能灵敏的检测到肾小球滤过功能的改变,对肾功能早期损坏进行诊断。

[0009] C 反应蛋白 (C-reactive protein,CRP) 是由肝细胞所合成,具有激活补体和促进粒细胞及吞噬细胞的吞噬作用。CRP 是第一个被认为是急性时相反应蛋白,正常情况下含量极微量,在 AKI、急性创伤和感染时其血浓度急剧升高。CRP 浓度升高可反映体内炎症处于急性活动期,如急性炎症、组织损伤和 AKI 等疾病,说明有进行性组织坏死或并发感染的存在,CRP 是临床上 AKI 最常用的急性时相反应指标。

[0010] 现有技术中已经开发出了诸如以 NGAL、CysC 或者 CRP 为单一指标的胶体金试纸条或免疫荧光试纸条,意在通过检测 NGAL、CysC 或者 CRP 的指标变化对肾衰的发生、发展进行监测。但是临床实践证明,上述单一指标的检测试剂,由于临床各种难于预测的情况而存在着准确性欠佳的问题,依然难于保证肾衰的快速及准确的检测,不能全面地、特异性地预警急性肾衰的发生、发展过程。而且目前以 NGAL、CysC、CRP 为目标物产品均以不同形式在临床上应用,制作原理及操作程序各不相同,兼容性比较差,很难在短时间内同时、快速地检测出三者的结果,极大地影响了对急性肾衰患者的准确诊断,从而造成很多病人因延误救治而病情恶化或导致死亡。

[0011] 因此,目前临床上急需开发一种可全面、快速、简便的诊断、监测肾衰的发生、发展的试剂,可随时监控发生肾衰的风险,避免因病情的延误而发生严重的后果。

发明内容

[0012] 为此,本发明所要解决的技术问题在于现有技术中用于检测肾衰竭的试剂由于检测指标单一而导致检测结果不稳定的问题,进而提供一种可全面、快速、简便的诊断、监测肾衰的发生、发展的试剂盒,并进一步公开其制备方法及应用。

[0013] 为解决上述技术问题,本发明所述的快速检测肾衰的三联试剂卡,所述试剂卡以血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (CysC)、中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白 (NAGL) 及 C 反应蛋白 (CRP) 为检测标志物。

[0014] 进一步的,所述试剂卡包括样品区、抗体结合区,检测控制区及吸水区;所述抗体结合区含有 CysC、NGAL、CRP 的特异性抗体,所述检测控制区含有分别与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体,或相应的抗原。

[0015] 更优的,所述试剂卡包括:

[0016] 底板以及沿所述底板的长度方向上依次粘附在所述底板上的样品垫、结合垫、抗体承载膜和吸样垫,且所述样品垫、结合垫、抗体承载膜和吸样垫之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠;

[0017] 所述抗体承载膜粘附于所述底板的中间部位,其上顺次设置有第一检测线、第二检测线、第三检测线和质控线,所述第一检测线靠近所述结合垫,所述质控线靠近所述吸样

垫；

[0018] 所述结合垫上喷涂有 CysC、NGAL、CRP 三种特异性抗体；

[0019] 所述第一检测线、第二检测线、第三检测线分别彼此独立的由与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体或相应的抗原涂层形成，且彼此不同。

[0020] 所述第一检测线、第二检测线及第三检测线相间隔平行设置，或者彼此不重叠的并列设置。

[0021] 所述质控线由抗鼠 IgG 抗体涂层形成。

[0022] 制备所述结合垫的载体包括胶体金纳米颗粒、荧光胶乳、磁珠、量子点或稀土元素。

[0023] 所述结合垫为胶体金垫，由标记有 CysC、NAGL、CRP 抗体的胶体金纳米颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上制成；或者，

[0024] 所述结合垫为免疫荧光垫，由免疫荧光物质标记的乳胶微球喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上制成。

[0025] 所述结合垫上，所述 CysC、NGAL、CRP 三种特异性抗体分别与不同颜色的量子点相结合。

[0026] 本发明还公开了一种制备上述快速检测肾衰的三联试剂卡的方法，包括如下步骤：

[0027] (1) 结合垫的制备：按照现有技术常规方法将标记有 CysC、NAGL、CRP 特异性抗体的载体颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上，烘干备用；

[0028] (2) 抗体承载膜的制备：将与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体或相应的抗原稀释，划线喷涂于抗体承载膜，形成所述第一检测线、第二检测线、第三检测线，并将抗鼠 IgG 抗体稀释并划线喷涂形成所述质控线，烘干备用；

[0029] (3) 组装：在底板上顺次粘结样品垫、结合垫、抗体承载膜和吸样垫，各部分依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠，切割成条，装入塑料卡内即形成所述试纸卡。

[0030] 具体而言，所述结合垫为胶体金垫，其制备步骤具体包括：将标记有 CysC、NAGL、CRP 抗体的胶体金纳米颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上，烘干备用；或者，

[0031] 所述结合垫为免疫荧光垫，其制备步骤具体包括：

[0032] (a) 取荧光物质标记的乳胶微球与抗 CysC、NGAL、CRP 的特异性抗体相结合，制得标记有特异性抗体的荧光乳胶微球；

[0033] (b) 将步骤 (a) 中制得的免疫荧光乳胶微球涂布于玻璃纤维素膜或无纺布上制成免疫荧光结合垫。

[0034] 本发明还公开了一种快速检测肾衰的三联试剂盒，由上述的试剂卡与荧光检测仪组成；或者，上述的试剂卡与比色卡和 / 或胶体金定量读数仪组成。

[0035] 本发明还公开了所述的试剂卡或所述的试剂盒用于肾脏衰竭的早期预警、治疗过程和愈后监控的用途。

[0036] 本发明所述快速检测肾衰的三联试剂卡以 NGAL-CysC-CRP 三联抗体为标记物，可有效监测肾衰的风险，尤其对糖尿病人、交通事故发生者的急性肾衰监测起到了意想不到的效果，其诊断急性肾衰灵敏度高、特异性强，临床监测的准确率达 95% 以上，使糖尿病人肾病的自我检测和监测成为可能，对于肾病的早期预警可及时阻止病人的病情恶化，减

轻病人的肾损伤程度。

[0037] 本发明所述试剂卡将原本只能应用于医院检验科的试剂盒,经过技术创新,使其可以方便、简易、准确的应用于有肾衰风险的家庭、养老院、条件简陋的社区卫生所,其使用方法也仅是由病人或家属针刺一滴血来实现自我检测,减轻去医院挂号、排队、化验、取报告等繁琐过程,减轻公共医疗机构的压力,更有益于患者的日常治疗。

附图说明

[0038] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中

[0039] 图 1 为本发明所述试剂卡的结构示意图;

[0040] 图中附图标记表示为:1-底板,2-样品垫,3-结合垫,4-抗体承载膜,5-第一检测线,6-第二检测线,7-第三检测线,8-质控线,9-吸样垫。

具体实施方式

[0041] 本发明所述快速检测肾衰的三联试剂卡,是以血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CysC)、中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白(NGAL)及C反应蛋白(CRP)为检测标志物进行肾衰的快速检测。所述试剂卡包括样品区、抗体结合区,检测控制区及吸水区;所述抗体结合区含有CysC、NGAL、CRP的特异性抗体,所述检测控制区含有分别与CysC、NGAL、CRP相对应的单克隆抗体、多克隆抗体,或相应的抗原。

[0042] 如图 1 所示,给出了一种具体的试剂卡的结构,所述试剂卡包括:

[0043] 底板 1,以及沿所述底板 1 的长度方向上依次粘附在所述底板上的样品垫 2、结合垫 3、抗体承载膜 4 和吸样垫 9;且所述样品垫 2、结合垫 3、抗体承载膜 4 和吸样垫 9 之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠。

[0044] 所述抗体承载膜 4 粘附于所述底板 1 的中间部位,其上顺次设置有第一检测线 5、第二检测线 6、第三检测线 7 和质控线 8,所述第一检测线 5 靠近所述结合垫 3,所述质控线 8 靠近所述吸样垫 9。

[0045] 所述结合垫 3 上喷涂有 CysC、NGAL、CRP 三种特异性抗体,各特异性抗体的喷涂量不限,以喷涂均匀为宜,最好是等量均匀喷涂为优。所述第一检测线 5、第二检测线 6、第三检测线 7 分别彼此独立的由与 CysC、NGAL、CRP 相对应的单克隆抗体、多克隆抗体或相应的抗原涂层形成,且彼此不同。作为可实施的方式,所述第一检测线 5、第二检测线 6 及第三检测线 7 相间隔平行设置,或者也可以彼此不重叠的并列设置,以各检测线的检测互不影响为准。

[0046] 本发明以下实验例部分以 CysC、NGAL、CRP 分别涂层形成所述第一检测线 5、第二检测线 6、第三检测线 7 形成的试剂卡,以阐述技术效果。所述质控线 8 由抗鼠 IgG 抗体涂层形成。

[0047] 本发明所述的结合垫 3 上的载体为可与抗体结合的载体,包括但不限于胶体金纳米颗粒、荧光胶乳、磁珠、量子点或稀土元素。所述结合垫 3 上,所述 CysC、NGAL、CRP 三种特异性抗体分别与不同颜色的量子点相结合。

[0048] 作为现有技术可以实施的方式,所述结合垫 3 为胶体金垫,由标记有 CysC、NAGL、

CRP 抗体的胶体金纳米颗粒喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上制成 ;或者,所述结合垫 3 还可以为免疫荧光垫,由免疫荧光物质标记的乳胶微球喷涂于玻璃纤维素膜或无纺布上制成。

[0049] 实施例 1 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒的制备

[0050] 本实施例所述试剂卡的结构如图 1 所示,所述第一检测线 5、第二检测线 6、第三检测线 7 分别由 CysC、NAGL、CRP 抗体涂层形成,所述质控线 8 由抗鼠 IgG 抗体涂层形成。所述结合垫 3 为胶体金垫。

[0051] 本实施例制备所述试剂卡的主要材料包括 :

[0052] 所述 CysC、NGAL 及 CRP 抗体及特异性配对抗体为现有技术中的常规产品即可,本实施例均选用杭州启泰生物技术有限公司产品 ;

[0053] 羊抗鼠 IgG 抗体 :杭州启泰生物技术有限公司 ;

[0054] 氯金酸 :Sigma 公司 ;

[0055] 硝酸纤维素 (NC) 膜 :SARTORIUS(德国), CN140, 德国赛多利斯公司 ;

[0056] 牛血清白蛋白 (BSA)、聚乙二醇 PEG20000、水解酪蛋白为 Sigma 产品 ;

[0057] 其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0058] 所述 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒的制备方法包括 :

[0059] (1) 结合垫的制备 :取三份直径为 15nm-50nm 的胶体金溶液,分别用 0.2M K_2CO_3 将溶液调到 pH7.8、pH7.4 和 pH7.6。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每 1ml 溶液加入 0.5mg、0.35mg、0.55mg 将标记用 CysC 抗体、NGAL 抗体及 CRP 抗体缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌 2 小时,再加入至终浓度为 1% 的 PEG20000 和 1% 的 BSA 进行封闭 20min,标记结束后以 12000r/m 离心,弃上清,沉淀按 50% 原体积复溶至胶体金工作液中 (20mM 硼酸盐缓冲液, pH8.0, 其中含 BSA1%、蔗糖 2% 和吐温 200.2%)。然后将标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 20cm² 的比例加样于玻璃纤维膜或无纺布上,在温度 20 ~ 25℃,相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 3 小时,制成胶体金垫,烘干备用 ;

[0060] (2) 抗体承载膜的制备 :将与 CysC、NGAL、CRP 相对应的抗体稀释至 1mg/ml,划线喷涂于抗体承载膜,形成所述第一检测线、第二检测线、第三检测线,并将抗鼠 IgG 抗体稀释至 1mg/ml 并划线喷涂形成所述质控线,烘干备用 ;

[0061] (3) 组装 :在干燥室内,温度 20 ~ 25℃,湿度小于 40%,取塑底板,将已包被的 NC 膜放置在塑料底板的中部粘贴,将胶体金垫裁切成合适的宽度,在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫,搭胶体金垫的 1/4 粘贴,在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫,搭胶体金垫的 1/3 粘贴 ;在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫,搭吸样垫的 1/10 粘贴 ;最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3 ~ 5mm 宽的试纸条,装入塑料卡内即形成所述试纸卡。

[0062] 所述试剂卡与比色卡和 / 或胶体金定量读数仪搭配,即可构成用于日常肾脏衰竭的早期预警、治疗过程和愈后监控的试剂盒。

[0063] 实施例 2 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒的制备

[0064] 本实施例所述试剂卡的结构如图 1 所示,所述第一检测线 5、第二检测线 6、第三检测线 7 分别由 CysC、NGAL、CRP 抗体涂层形成,所述质控线 8 由抗鼠 IgG 抗体涂层形成。所述结合垫 3 为免疫荧光垫。

[0065] 本实施例所述试剂卡的试验材料包括 :

[0066] 所述 CysC、NAGL、CRP 抗体及特异性配对抗体来源于广州格瑞林生物科技有限公

司；

[0067] EU- 荧光微球：上海生化，激发波长 650nm；

[0068] EDC：sigma 公司，天平称量，用 PB 缓冲液配制 2.5mg/mL；

[0069] PB 缓冲液：浓度 0.01M，pH7.4，自制；

[0070] 硝酸纤维素 (NC) 膜：SARTORIUS (德国)，CN140；

[0071] 牛血清白蛋白 (BSA)，聚乙二醇 PEG20000，水解酪蛋白均为 Sigma 公司产品；

[0072] 羊抗鼠 IgG 抗体：杭州启泰生物科技有限公司；

[0073] 其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0074] 本实施例所述 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒的制备方法包括：

[0075] (1) 结合垫的制备：取 1500 μ L PB 缓冲液到离心管中，记作初始体系；取 50 μ L 荧光微球溶液到初始体系中，充分混匀，记作微球体系；用 PB 缓冲液配置 2.5mg/mL EDC 溶液，向微球体系中加入 10 μ L，立即吹打混匀，活化微球表面羧基 25min 左右，记作活化体系；取 22 μ L 抗体溶液，用 PB 缓冲液稀释到 200 μ L，记作稀释抗体；待活化时间到，将稀释抗体加入活化体系中，立即混匀，室温反应 2h，记作反应体系；将反应完全的反应体系在 8 $^{\circ}$ C，14000rpm 条件下离心 20min，弃上清，用 1000 μ L 重悬液重悬，即为标记溶液；将制得的免疫荧光乳胶微球涂布于玻璃纤维素膜或无纺布上制成免疫荧光结合垫；

[0076] (2) 抗体承载膜的制备：将与 CysC、NGAL、CRP 相对应的抗体用 0.01M pH7.4PBS 稀释成 1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml，划线喷涂于抗体承载膜，形成所述第一检测线、第二检测线、第三检测线，并将抗鼠 IgG 抗体稀释至 1mg/ml 并划线喷涂形成所述质控线。包被完成后将 NC 膜在温度 20 ~ 25 $^{\circ}$ C，相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时。将干燥后的 NC 膜置于封闭液 (含 1% BSA 的 0.01M pH7.4PBS) 中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时，取出后置 37 $^{\circ}$ C 下烘干处理 2 小时备用；

[0077] (3) 组装：在干燥室内 (温度 20 ~ 25 $^{\circ}$ C，湿度小于 40%)，取塑料底板，将已包被的 NC 膜放置在塑料底板的中部粘贴，将结合垫裁切成合适的宽度，在 NC 膜 T 线一侧搭接结合垫，在结合垫另一侧搭接粘贴上样垫，在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫，最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3 ~ 5mm 宽的试纸条，再装入塑料卡内，形成试纸卡。

[0078] 所述试剂卡与荧光检测仪搭配，即可构成用于日常肾脏衰竭的早期预警、治疗过程和愈后监控的试剂盒。

[0079] 实验例 1

[0080] 以实施例 1 所述制备的胶体金垫的 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒为例，对本发明所述的三联试剂盒的检测准确性进行验证。

[0081] 取临床确诊的肾衰病人血样 12 例，以实施例 1 所述胶体金垫的 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒进行定性检测，将血样滴加至所述试剂盒检测口，15 分钟后观察三条检测线的颜色深浅，并配合显色卡进行半定量判断，当 CysC-NAGL-CRP 三条检测线颜色分别深于对应比色卡 CysC 1mg/L、NAGL 100 μ g/L、CRP 8mg/L 位置的颜色时，检测结果为阳性；反之，检测结果为阴性。具体检测结果见表 1，与临床结果对照，该试剂盒的阳性检出率 100%。

[0082] 表 1 肾衰病人的 CysC-NAGL-CRP 检测结果

[0083]

	CysC	NAGL	CRP
阳性	12	12	12
阴性	0	0	0
阳性符合率	100%	100%	100%
阴性符合率	100%	100%	100%

[0084] 可见,本发明所述三联试剂盒有助于快速的定性检测出肾衰的患病情况,为患者的日常保健及监测提供了便利条件。

[0085] 实验例 2

[0086] 以实施例 2 所述制备的免疫荧光垫的 CysC-NAGL-CRP 三联试剂盒为例,对本发明所述的三联试剂盒的检测准确性进行验证。

[0087] 取临床确诊的肾衰病人血样 12 例,进行患病情况的定量检测。取出所需稀释液(自制 0.5%脱脂奶粉液)与试纸条平衡于室温,备用;取血样与稀释液各 50 μ l,混匀;撕开试纸条外铝箔袋,在上样窗口内加入血样;片刻后,当上样窗口内大部分样品已渗入试纸时,逐滴加入 50 μ l 稀释液;等待 15min 后,将试纸条插入免疫定量分析仪(晋百慧生物 GBH R-1000 型)中,开始读数。具体检测结果见表 2。表 2 肾衰病人的 CysC-NAGL-CRP 荧光试剂盒检测结果

[0088]

病例	CysC(mg/L)	NAGL(μ g/L)	CRP(mg/L)
1	1.28	1560	10.4
2	1.32	1680	11.8
3	1.12	1450	10.2
4	1.56	1660	20.5
5	1.38	1420	17.8
6	1.89	2020	33
7	1.62	1880	23.6
8	1.92	2010	22.5
9	1.26	1620	13.2
10	1.81	1980	28

11	1.66	1870	26
12	1.48	1820	18

[0089] 健康人血液中的 CysC、NAGL、CRP 的正常值为小于 1mg/L、100 μ g/L、8mg/L，肾损伤的病人在 1-24 小时之内会出现上述三个指标的明显升高，肾损伤程度与 CysC、NAGL、CRP 血中浓度呈正相关，当血液中的 CysC、NAGL、CRP 的浓度超出 1mg/L、100 μ g/L、8mg/L 时，即可判定有肾脏损伤出现。上述检测数据说明，糖尿病肾损伤病人血液中三个指标的浓度均超出正常值范围，表明该诊断试剂盒的诊断与临床诊断 100% 相符。本发明所述三联试剂盒不仅有助于快速、准确的进行肾衰的日常监测，还可以广泛应用在急诊、缺乏检测设备的社区卫生院和家庭，早期预测肾衰的发生，避免恶性肾衰事件的发生。

[0090] 显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

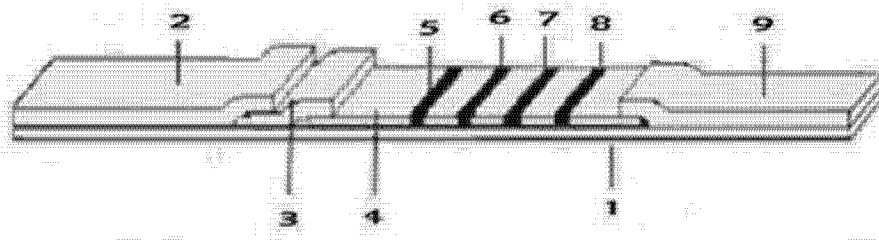


图 1

专利名称(译)	一种快速检测肾衰的三联试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104865384A	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201510197628.X	申请日	2015-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏金标世纪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏金标世纪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏金标世纪生物科技有限公司		
[标]发明人	胡文波 李静		
发明人	胡文波 李静		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/54306 G01N2333/4737 G01N2333/8139 G01N2800/347 G01N2800/50 G01N2800/52 G01N2800/54		
代理人(译)	赵敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术检测领域，具体涉及一种用于肾脏衰竭的早期预警、治疗过程和愈后监控的三联试剂盒，并进一步公开了其制备方法和应用。所述试剂卡以血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CysC)、中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白(NAGL)及C反应蛋白(CRP)为检测标志物。本发明三联试剂卡以NGAL-CysC-CRP三联抗体为标记物，可有效监测肾衰的风险，尤其对糖尿病患者、交通事故发生者的急性肾衰监测起到了意想不到的效果，其诊断急性肾衰灵敏度高、特异性强，临床监测的准确率高达95%，使糖尿病患者肾病的自我检测和监测成为可能，用于肾病的早期预警，可及时阻止病人的病情恶化，减轻病人的肾损伤程度。

