



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102323401 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201110142214. 9

CN 101470116 A, 2009. 07. 01,

(22) 申请日 2011. 05. 30

曹丹如等. 快速检测血清 HCG 的半定量金免疫渗滤法的建立. 《检验医学》. 2008, 第 23 卷 (第 1 期),

(73) 专利权人 上海北加生化试剂有限公司  
地址 201802 上海市嘉定区南翔镇科富路 265 号

谌志强等. 大肠埃希菌 0157 : H7 的金增强胶体金免疫渗滤检测法. 《环境与健康杂志》. 2011, 第 28 卷 (第 2 期),

(72) 发明人 刘颖冰 陆梅生 刘中令

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司  
31001

审查员 寇飞

代理人 林炜

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1558239 A, 2004. 12. 29,

CN 1405564 A, 2003. 03. 26,

CN 101320041 A, 2008. 12. 10,

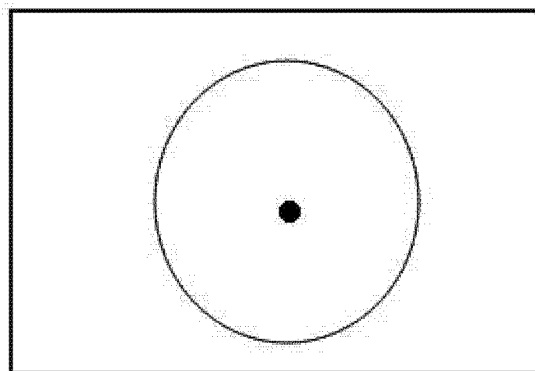
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

葡萄糖-6-磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物工程领域, 提供了一种葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)抗原体外检测试剂盒, 包括检测板、羊抗 GPI 抗体、胶体金结合物、封闭液、洗涤液、阳性参考品和阴性参考品。本发明还提供了上述的 GPI 抗原体外检测试剂盒的制备方法。本发明采用双抗体夹心胶体金免疫吸附法原理检测人血清中的 GPI 抗原, 将羊抗 GPI 抗体包被于硝酸纤维素膜, 制成固相抗体, 用以捕获人外周血清中可能存在的 GPI 抗原。再将胶体金标记于羊抗 GPI 抗体, 形成胶体金结合物作为示踪物, 如被测人血清中含有 GPI 抗原, 则形成固相羊抗 GPI 抗体-GPI 抗原-胶体金结合物。本发明可应用于类风湿性关节炎辅助诊断。



1. 一种葡萄糖-6-磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒,其特征在于:包括检测板、羊抗 GPI 抗体、由胶体金标记的羊抗 GPI 抗体结合物、封闭液、洗涤液、阳性参考品和阴性参考品,所述的检测板由一个塑料盒底盒,所述的塑料盒底盒中设置有一层吸水层,所述的吸水层上设置有一层硝酸纤维素膜,所述的硝酸纤维素膜上设置有一个塑料盒面盖,所述的塑料盒面盖中央设置有一个检测反应孔,在检测反应孔对应的硝酸纤维素膜上点加羊抗 GPI 抗体和胶体金标记的羊抗 GPI 抗体结合物,所述的封闭液是含有牛血清白蛋白的磷酸盐溶液,磷酸盐溶液的 pH7.0 ~ 7.5 之间,牛血清白蛋白在磷酸盐溶液中的重量百分比为 1.0%,所述的洗涤液是含有 Tween-20 的 Tris-HCl 溶液,Tris-HCl 溶液的 pH 在 7.0 ~ 7.5 之间,Tween-20 在 Tris-HCl 溶液中的重量百分比为 0.05%,在每毫升胶体金结合物中,羊抗 GPI 抗体的质量为 0.025 毫克,所述的阳性参考品为浓度大于 0.2 mg/L 的 GPI 抗原,所述的阴性参考品为浓度小于 0.2 mg/L 的 GPI 抗原。

2. 权利要求 1 所述的一种葡萄糖-6-磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒的制备方法,其特征在于包括一个配制羊抗 GPI 抗体溶液的步骤,一个制备检测板的步骤,一个制备胶体金标记的羊抗 GPI 抗体结合物的步骤,一个配制封闭液的步骤,一个配制洗涤液的步骤,一个制备阳性参考品的步骤和一个制备阴性参考品的步骤。

## 葡萄糖 -6- 磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明生物工程领域,尤其涉及一种试剂盒及其制备方法,特别是一种葡萄糖 -6- 磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒及制备方法。

### 背景技术

[0002] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种最常见的自身免疫性疾病,在全世界大约有 1.0% 的人患有此病。其特征为对称性的大小关节滑膜的炎症。起初的症状包括批关节肿胀疼痛,并且在关节部位有晨僵,继而引起骨质破坏。因而, RA 的早期诊断和及时开始合适的治疗对控制该病的病情非常重要。中小型医院的类风湿性关节炎 (RA) 患者就诊人数量少,检测样品少,检测报告周期长,容易延误患者明确诊断和用药治疗。

[0003] 类风湿性关节炎 (RA) 患者和约 64% 的健康人群与类风湿性关节炎未控制的患者在血清中和关节腔积液内存在葡萄糖 -6- 磷酸异构酶 (GPI)。主要有体内 T 细胞系统和 B 淋巴细胞系统产生,分泌大量 GPI 抗原进入血清和关节腔内,使得血清中和关节腔内 GPI 浓度升高,是类风湿性关节炎独特的自身免疫生理功能。在 RA 患者有高效价的 GPI 存在,常伴有严重的关节功能受限。提示预后不良或治疗过程中药物没有起到一定作用,当 RA 患者用药物治疗好转,血清和关节腔积液中 GPI 降低,关节肿痛减轻。从 2001 年 Nature Immunology 杂志首次发表文章,从鼠自然生成类风湿性关节炎的 k/BxNT 细胞神经末梢细胞基因中得到 GPI,然后从人类类风湿性关节炎 (RA) 中也得到相同的 GPI,而且在类风湿性关节炎所含高浓度抗原都是一致,几乎完全为 GPI 同一酵素酶。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种葡萄糖 -6- 磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒及制备方法,所述的这种葡萄糖 -6- 磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒及制备方法是采用胶体金渗滤法和层析法原理来检测人血清中的 GPI 浓度,解决了现有技术中检测血清中的 GPI 浓度的时间较长,程序复杂的技术问题。

[0005] 本发明提供了一种葡萄糖 -6- 磷酸异构酶 (GPI) 抗原体外检测试剂盒,包括检测板、羊抗 GPI 抗体、由胶体金标记的羊抗 GPI 抗体结合物、封闭液、洗涤液、阳性参考品和阴性参考品。

[0006] 进一步的,所述的检测板由一个塑料盒底盒,所述的塑料盒底盒中设置有一层吸水层,所述的吸水层上设置有一层硝酸纤维素膜,所述的硝酸纤维素膜上设置有一个塑料盒面盖,所述的塑料盒面盖中央设置有一个检测反应孔,在检测反应孔对应的硝酸纤维素膜上点加羊抗 GPI 抗体。

[0007] 进一步的,所述的检测反应孔为圆形或者其它形状。

[0008] 进一步的,所述的封闭液是含有牛血清白蛋白的磷酸盐溶液,磷酸盐溶液的 pH7.0 ~ 7.5 之间,牛血清白蛋白在磷酸盐溶液中的重量百分比为 1.0%。

[0009] 进一步的,所述的洗涤液是含有 Tween-20 的 Tris-HCl 溶液, Tris-HCl 溶液的

pH7.0 ~ 7.5 之间, Tween-20 在 Tris-HCl 溶液中的重量百分比为 0.05%。

[0010] 进一步的, 在每毫升胶体金结合物中, 羊抗 GPI 抗体的质量为 0.025 毫克。

[0011] 进一步的, 所述的阳性参考品为浓度大于 0.2mg/L 的 GPI 抗原。

[0012] 进一步的, 所述的阴性参考品小于 0.2mg/L 的 GPI 抗原。

[0013] 本发明还提供了上述的一种葡萄糖-6-磷酸异构酶 (GPI) 抗原体外检测试剂盒的制备方法, 包括一个配制羊抗 GPI 抗体溶液的步骤, 一个制备检测板的步骤, 一个制备胶体金标记的羊抗 GPI 抗体结合物的步骤, 一个配制封闭液的步骤, 一个配制洗涤液的步骤, 一个制备阳性参考品的步骤和一个制备阴性参考品的步骤。

[0014] 本发明的工作原理是: 本试剂盒采用双抗体夹心免疫吸附法原理、及胶体金渗滤、胶体金层析检测技术检测人血清中的 GPI 抗原, 将羊抗 GPI 抗体包被于硝酸纤维素膜, 制成固相抗体, 用以捕获人血清中可能存在的 GPI 抗原, 再将羊抗 GPI 抗体标记于胶体金, 形成胶体金结合物作为示踪物。如被测人血清中含有 GPI 抗原, 则形成固相羊抗 GPI 抗体-GPI 抗原-胶体金结合物, 呈红色斑点反应, 其颜色深浅与被测血清中含有的 GPI 抗原的浓度有关, 但不呈比例关系。

[0015] 本发明和已有技术相比, 其技术进步是显著的。本发明可以用于检测人血清样本中葡萄糖-6-磷酸异构酶 (GPI) 抗原, 作为类风湿性关节炎辅助诊断使用。采用本发明的试剂盒当天能收到检测报告, 检测结果准确而且方便。

#### 附图说明

[0016] 图 1 显示了检测板反应孔中心检测点有红色斑点, 为阳性结果。

[0017] 图 2 显示了检测板反应孔中心检测点无红色斑点, 为阴性结果。

#### 具体实施方式

[0018] 实施例 1. 胶体金制备条件选择:

[0019] 1. 10.05%氯化金溶液 300 毫升, 加热至沸;

[0020] 1. 2 加入 5.0%柠檬酸三钠 3.6 毫升;

[0021] 1. 3 继续加热煮沸 15 分钟, 停止加热, 待冷至室温, 用蒸馏水恢复至原体积;

[0022] 1. 4 实验结果:

[0023] 波长  $\lambda$ : 540 535 530 525 520 510nm。

[0024] ABS 值: 0.528 0.715 1.481 0.902 0.699 0.601

[0025] 目测胶体金溶液颜色: 红色透明。

[0026] 实施例 2. 胶体金结合物制备条件选择:

[0027] 2. 1 胶体金标记羊抗 GPI 抗体 pH 值的选择:

[0028] 选择胶体金标记羊抗 GPI 抗体的适宜 pH 值, 使用 1.0%无水碳酸钠溶液调节胶体金标记 pH 值, 通过检测灵敏度比较胶体金标记羊抗 GPI 抗体的合适 pH 值范围。

[0029] 实验结果:

[0030]

胶体金标记羊抗 GPI 抗体的 pH 值比较			
pH 值范围	6.4~7.2	7.2~7.5	7.5~8.0
阴性样本	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
临界值样本	—	±	±
	—	±	±
	—	±	±
阳性样本	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+

[0031] 实验结果表明,胶体金标记物的 pH 值范围在 pH7.2 ~ 7.5、pH7.5 ~ 8.0 组时灵敏度较好,但是目测观察阳性斑点时发现 pH7.5 ~ 8.0 组的阳性斑点色泽偏暗、偏紫,据此建议胶体金标记的 pH 值范围应控制在 pH7.2 ~ 7.5 较宜,亦即每 100 毫升胶体金,加 1.0% 无水碳酸钠溶液 2.4 毫升。

[0032] 2.2 胶体金标记羊抗 GPI 抗体浓度选择:

[0033] 取胶体金按照每 100 毫升加入 1.0% 无水碳酸钠溶液 2.4 毫升,再按下表操作选择羊抗 GPI 抗体浓度:

[0034]

管数	1	2	3	4	5	6
胶体金 (mL)	1	1	1	1	1	1
1.0 mg/mL 羊抗 GPI 抗体 (mL)	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	0.0
蒸馏水 (mL)	0	0.05	0.075	0.0875	0.09375	0.1
羊抗 GPI 抗体量 (mg)	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	0.0
混合, 室温, 静止 30 分钟						
10%氯化钠 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
室温静止 2 小时, 观察各管颜色						
	红色	红色	红色	微紫红	紫红	紫

[0035] 室温静止 2 小时后观察, 胶体金第 3 管呈红色透明, 第 4 管即呈微紫红色。结果提示合适的每毫升胶体金标记羊抗 GPI 抗体量为 0.025 毫克。

[0036] 实施例 3. 检测板制备条件选择:

[0037] 3.1 检测点包被介质 pH 条件的比较:

[0038] 实验材料:

[0039] (1) 硝酸纤维素膜, 孔径为  $0.45 \mu\text{m}$ ;

[0040] (2) 包被缓冲液:  $1.0\text{M NaHCO}_3$ ;

[0041]  $\text{NaHCO}_3$  (分析纯) 8.401 克, 放入容器, 用量筒量取工艺用水倒入容器, 待溶解, 再取工艺用水补足体积到 100 毫升, 混匀;

[0042] (3) 检测点抗体: 羊抗 GPI 抗体 ( $1.0\text{mg/mL}$ );

[0043] 实验过程:

[0044] (1) 检测点抗原处理:

[0045] 羊抗 GPI 抗体 ( $1.0\text{mg/mL}$ ) 原液,  $\text{pH} = 7.0 \sim 7.5$ , 中性;

[0046] 羊抗 GPI 抗体 ( $1.0\text{mg/mL}$ ) 原液 0.05 毫升加入  $1.0\text{M NaHCO}_3$

[0047] 0.005 毫升, 混匀,  $\text{pH} \geq 8.0$ ;

[0048] (2) 包被: 取检测点抗原  $2.0\mu\text{L}$ , 点加在硝酸纤维素膜上制成检测板;

[0049] (3) 测试阴性、阳性样本各 10 次比较检测点呈色程度;

[0050] 实验结果:

[0051]

包被介质 pH 条件的比较		检测点	
实验次数	包被介质 pH 条件	中性	碱性
1	阴性样本	—	—
	阳性样本	+	+
2	阴性样本	—	—
	阳性样本	+	+
3	阴性样本	—	—
	阳性样本	±	+
4	阴性样本	—	—
	阳性样本	+	+
5	阴性样本	—	—
	阳性样本	+	+
6	阴性样本	—	—
	阳性样本	+	+
7	阴性样本	—	—
	阳性样本	±	+
8	阴性样本	—	—
	阳性样本	±	+
9	阴性样本	—	—
	阳性样本	±	+
10	阴性样本	—	—
	阳性样本	+	+

[0052] 检测点包被介质 pH = 7.0 ~ 7.5, 中性条件时阳性样品呈色结果不稳定, 说明中性包被条件的包被效果不理想, 据此认为检测点包被介质的 pH 条件以 pH ≥ 8.0 为宜, 宜采用 1.0M NaHCO<sub>3</sub> 来调整羊抗 GPI 抗体的 pH 值使包被条件为碱性。拟定包被介质采用在包被抗体中加入十分之一的 1.0M NaHCO<sub>3</sub> 调整 pH ≥ 8.0。

[0053] 3.2 检测点抗体使用浓度选择：

[0054] 实验材料：

[0055] (1) 硝酸纤维素膜, 孔径为 0.45 μm；

[0056] (2) 检测点抗体：羊抗 GPI 抗体 (1.0mg/mL) 原液 0.1 毫升加入 1.0M NaHCO<sub>3</sub> 0.01 毫升, 混匀, 此抗体浓度为 1.0mg/mL, 再用 100mM NaHCO<sub>3</sub> 作梯度稀释成抗体浓度为 0.5mg/

mL、0.25mg/mL；

[0057] 实验过程：

[0058] 按抗体浓度分组，取检测点抗体，点加在硝酸纤维素膜上制成检测板；

[0059] 测试阴性、阳性、灵敏度参考品各 5 次比较检测点呈色程度；

[0060] 实验结果：

[0061] (1) 包被抗体浓度：羊抗 GPI 抗体 (1.0mg/mL)；

[0062]

样本	阴性参考品	灵敏度参考品	阳性参考品
序号	检测点	检测点	检测点
1	-	±	+
2	-	±	+
3	-	±	+
4	-	±	+
5	-	±	+

[0063] (2) 包被抗体浓度：羊抗 GPI 抗体 (0.5mg/mL)；

[0064]

样本	阴性参考品	灵敏度参考品	阳性参考品
序号	检测点	检测点	检测点
1	-	-	+
2	-	-	+
3	-	-	+
4	-	-	+
5	-	-	+

[0065] (3) 包被抗体浓度：羊抗 GPI 抗体 (0.25mg/mL)；

[0066]

样本	阴性参考品	灵敏度参考品	阳性参考品
序号	检测点	检测点	检测点
1	-	-	±
2	-	-	±
3	-	-	±
4	-	-	±
5	-	-	±

[0067] 实验结果表明检测点羊抗 GPI 抗体 (1.0mg/mL) 的包被浓度以 1.0mg/mL 为宜。而包被浓度 0.5mg/mL 时,灵敏度参考品偏阴。

[0068] 实施例 4. 生产工艺:

[0069] 4.1 胶体金结合物制备工艺;

[0070] 4.1.1 制备胶体金;

[0071] 4.1.1.1 10.05%氯化金溶液 300 毫升,加热至沸;

[0072] 4.1.1.2 加入 5.0%柠檬酸三钠 3.6 毫升;

[0073] 4.1.1.3 继续加热煮沸 15 分钟,停止加热,待冷至室温,用蒸馏水恢复至原体积;

[0074] 4.1.2 胶体金标记;

[0075] 4.1.2.1 胶体金 100mL;

[0076] 4.1.2.2 加 1.0%无水碳酸钠溶液 2.4 毫升,校 pH 值 6.4 ~ 7.2;

[0077] 4.1.2.3 加羊抗 GPI 抗体 (1.0mg/mL) 2.5 毫升,室温静止 30 分钟;

[0078] 4.1.2.4 搅拌加入 10X Tris-HCl 20 毫升调控 pH 7.2 ~ 7.5;

[0079] 4.1.2.5 搅拌加入 BSA :2 克、PEG20000 :1 克、ProClin-300 :0.2 毫升;

[0080] 4.2 检测板制备工艺;

[0081] 4.2.1 装配检测板,取塑料盒底盖,放置吸水层,在吸水层上放置硝酸纤维素膜,盖上塑料盒面盖,压紧;

[0082] 4.2.2 检测点抗体:羊抗 GPI 抗体 (1.0mg/mL) 1.0 毫升加入 1.0M  $\text{NaHCO}_3$  :0.1 毫升,混匀;

[0083] 4.2.3 取检测点抗体 2.0uL,点加在检测板反应孔中心的硝酸纤维素膜上制成检测板;

[0084] 4.3 配制封闭液及洗涤液;

[0085] 4.3.1 配制封闭液,1.0%牛血清白蛋白,0.02M pH7.0 ~ 7.5 磷酸盐溶液;

- [0086] 4.3.2 配制洗涤液,0.05% Tween-20,0.05M pH7.0 ~ 7.5Tris-HCl 溶液;
- [0087] 4.4 制备 GPI 参考品;
- [0088] 4.4.1 阳性参考品制备,将封闭液 14.85 毫升加入 GPI 抗原 (1.0mg/mL)0.015 毫升,混匀,约为 GPI 抗原 1.0mg/L;
- [0089] 4.4.2 阴性参考品制备,将封闭液 9.0 毫升加入阳性参考品 1.0 毫升,混匀,为 GPI 抗原 < 0.2mg/L;
- [0090] 4.5 正常参考范围确定,以葡萄糖 -6- 磷酸异构酶 (GPI) 抗原测定试剂盒 (ELISA) 的正常参考范围 GPI 抗原含量 < 0.2mg/L 为依据,由于本法为定性检测,样品 GPI 抗原含量在正常参考范围内检测点不显色,故选择以 GPI 抗原含量约 0.2mg/L 的样品做灵敏度检测;
- [0091] 4.5.1 实验方法:
- [0092] 1、使用前先将试剂和样品取出,在室温中放置 15 ~ 30 分钟,使其恢复至室温;
- [0093] 2、取出检测板;
- [0094] 3、在检测板反应孔中心加入封闭液 2 滴,待封闭液完全渗入;
- [0095] 4、用移液器在检测板反应孔中心加入待测样品 40 微升,待样品完全渗入;
- [0096] 5、在检测板反应孔中心加入洗涤液 4 滴,待洗涤液完全渗入;
- [0097] 6、在检测板反应孔中心加入胶体金结合物 3 滴,待胶体金结合物完全渗入;
- [0098] 7、在检测板反应孔中心加入洗涤液 4 滴,待洗涤液完全渗入,目测结果;
- [0099] **【检验结果判读】**
- [0100] 使用者在进行样品检测时,可能会出现如下情况:
- [0101] a. 检测板反应孔中心检测点有红色斑点,为阳性结果 (如图 1 所示);
- [0102] b. 检测板反应孔中心检测点无红色斑点,为阴性结果 (如图 2 所示)。
- [0103] **【参考值 (参考范围)】**
- [0104] 以葡萄糖 -6- 磷酸异构酶 (GPI) 抗原测定试剂盒 (ELISA) 的正常参考范围 GPI 抗原含量 < 0.2mg/L 为依据,样品 GPI 抗原含量在正常参考范围内检测板反应孔中心检测点无红色斑点,显示阴性结果;
- [0105] 正常参考范围:显示阴性结果 (提示 GPI 抗原含量小于 0.2mg/L)。
- [0106] **【检验结果的解释】**
- [0107] 1、阴性结果,则提示该样本的 GPI 抗原含量 < 0.2mg/L 是正常范围;
- [0108] 2、阳性结果,则提示该样本的 GPI 抗原含量  $\geq$  0.2mg/L 是不正常范围。
- [0109] **【检验方法的局限性】**
- [0110] 1、本方法只能定性测定人血清样本中葡萄糖 -6- 磷酸异构酶 (GPI),仅作为辅助诊断使用;
- [0111] 2、反应斑点的稳定性:在 30 分钟内阳性斑点不会褪色,阴性结果仍无变化。
- [0112] **【产品性能指标】**
- [0113] 1、物理性状
- [0114] 外观:整洁,标志 (名称、批号、有效期等) 完整,文字清晰。各液体试剂应清晰、无不溶物。封闭液为淡黄色透明液体,洗涤液为无色透明液体,胶体金结合物为红色透明液体,阳性参考品呈淡黄色透明液体,阴性参考品呈淡黄色透明液体。试剂盒内容物应准确无

误；

[0115] 2、特异性

[0116] 检测 330 例 GPI 抗原含量小于 0.2mg/L 的样本，目测检测结果，检测板反应孔中心检测点不显示红色斑点，呈阴性反应结果；

[0117] 3、分析灵敏度

[0118] 取 GPI 抗原含量 0.2mg/L 的样品进行检测，目测检测结果，检测板反应孔中心检测点应显示红色斑点。

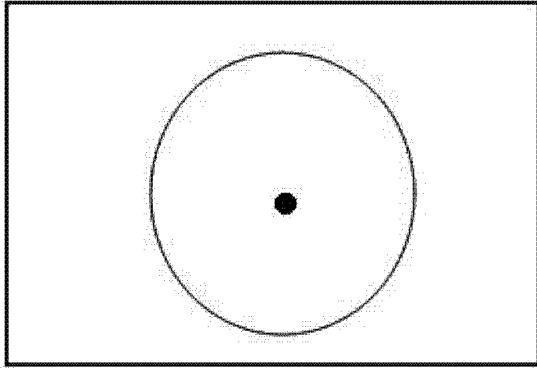


图 1

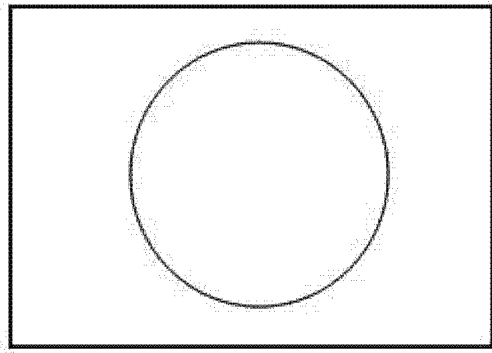


图 2

专利名称(译)	葡萄糖-6-磷酸异构酶抗原体外检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102323401B</a>	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201110142214.9	申请日	2011-05-30
[标]发明人	刘颖冰 陆梅生 刘中令		
发明人	刘颖冰 陆梅生 刘中令		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/532		
代理人(译)	林炜		
审查员(译)	寇飞		
其他公开文献	CN102323401A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物工程领域，提供了一种葡萄糖-6-磷酸异构酶（GPI）抗原体外检测试剂盒，包括检测板、羊抗GPI抗体、胶体金结合物、封闭液、洗涤液、阳性参考品和阴性参考品。本发明还提供了上述的GPI抗原体外检测试剂盒的制备方法。本发明采用双抗体夹心胶体金免疫吸附法原理检测人血清中的GPI抗原，将羊抗GPI抗体包被于硝酸纤维素膜，制成固相抗体，用以捕获人外周血清中可能存在的GPI抗原。再将胶体金标记于羊抗GPI抗体，形成胶体金结合物作为示踪物，如被测人血清中含有GPI抗原，则形成固相羊抗GPI抗体-GPI抗原-胶体金结合物。本发明可应用于类风湿性关节炎辅助诊断。

