



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107085116 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201710343303.7

(22)申请日 2017.05.16

(71)申请人 张子林

地址 519000 广东省珠海市香洲区狮山路
417号308室

(72)发明人 张子林 廖汉明 张羽

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

代理人 温旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

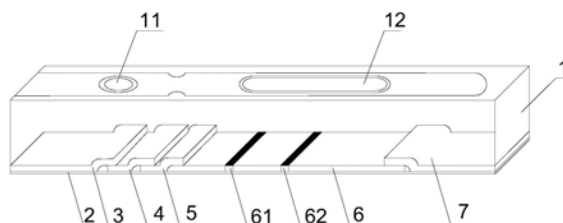
权利要求书3页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒
及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种钙卫蛋白的检测试剂盒及其制备方法和检测方法,该试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸,检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在底板上的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸;第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体,第二结合物垫上含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体;包被膜上由左往右依次设置有平行排列的检测T线和质控C线,检测T线上包被有固相化链霉亲和素,质控C线上包被有固相化羊抗鼠IgG抗体。本发明检测方便快捷,检测灵敏度高,特异性强,可重复性高,客观可靠,可定量检测钙卫蛋白。



1. 一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒,所述试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸,其特征在于:所述检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在所述底板上的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸;所述第一结合物垫上含有 Eu^{3+} 乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体,所述第二结合物垫上含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体;所述包被膜上由左往右依次设置有一条检测T线和一条质控C线,所述检测T线与质控C线平行排列,所述检测T线上包被有用于与生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体结合的固相化链霉亲和素,所述质控C线上包被有用于与 Eu^{3+} 乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体结合的固相化羊抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述包被膜的两端分别与第二结合物垫和吸水纸相互交叠连接,所述第二结合物垫上压贴有第一结合物垫,所述第一结合物垫上压贴有样品垫。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述样品垫为玻璃纤维垫或聚酯纤维垫。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述包被膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述盒体上开设有向所述样品垫添加样品的加样孔和用于观察检测结果的观察窗口。

6. 一种如权利要求1~5中任一项所述的试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 样品垫制备:将样品垫置于样品垫处理液中浸泡或将样品垫处理液均匀喷涂在样品垫上,然后将含有样品垫处理液的样品垫置于温度为 37°C 、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;其中,样品垫处理液为含5%吐温-20、1%BSA的pH为8.0的1mol/L硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液;

2) 第一结合物垫制备:将 Eu^{3+} 乳胶微球活化,向活化后的 Eu^{3+} 乳胶微球加入鼠抗钙卫蛋白抗体制成 Eu^{3+} 乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体,将 Eu^{3+} 乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体喷涂于第一结合物垫上,将含有 Eu^{3+} 乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体的第一结合物垫置于温度为 37°C 、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;

3) 第二结合物垫制备:将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂与鼠抗钙卫蛋白抗体混合反应制成生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体,将生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体喷涂于第二结合物垫上,将含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体的第二结合物垫置于温度为 37°C 、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;

4) 包被膜制备:将链霉亲和素通过点膜机在包被膜上划好检测T线,将羊抗鼠IgG抗体通过点膜机在包被膜上划好质控C线,将包被好的包被膜置于温度为 37°C 、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h,备用;

5) 检测试纸组装:将制得的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸由左往右依次压贴在底板上制得检测试纸,将检测试纸安装在盒体内。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于:步骤2)中包括以下具体步骤:

a、活化 Eu^{3+} 乳胶微球:用pH为4.5-7.5的MES缓冲液洗涤1% Eu^{3+} 乳胶微球,离心10~15min去上清,加入PB缓冲液超声重悬两次,使混合均匀,以上操作重复两次;向 Eu^{3+} 乳胶微球混悬液中按1~1.5:1的比例加入EDC,室温下持续混匀15~20min,得到 Eu^{3+} 乳胶微球溶

液；

b、结合鼠抗钙卫蛋白抗体：向Eu³⁺乳胶微球溶液中加入鼠抗钙卫蛋白抗体，使鼠抗钙卫蛋白抗体的浓度为100~1000ug/ml，18~26℃下持续混匀反应2~4h；反应完成后离心10~15min洗涤两次，用封闭液重悬，缓慢搅拌30min后离心清洗，得到Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体；再用结合物储存液重悬，4℃下储存备用；其中，封闭液为pH为7.4、含30mmol/L甘氨酸、1%BSA的0.05mol/L磷酸盐缓冲液，结合物储存液为pH为7.4、含1%PEG、0.1%BSA、0.5%吐温-20的0.05mol/L磷酸盐缓冲液；

c、制备第一结合物垫：将Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体用第一稀释液稀释至20~80ug/ml，制成第一工作液，然后将第一工作液按3~5u1/cm²的喷涂量均匀喷涂于玻璃纤维垫或聚酯纤维垫上，制成第一结合物垫，将第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，第一稀释液为pH为8.0、含1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于：步骤3) 中包括以下具体步骤：

A、制备生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体：用二甲基甲酰胺将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂溶解至1mg/ml，用pH为9.0的0.1mol/L NaHCO₃把鼠抗钙卫蛋白抗体稀释至1mg/ml；然后将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂和鼠抗钙卫蛋白抗体按质量比0.8~1:7混合，室温下搅拌反应3h，然后置于pH为7.2的0.05mol/L PBS中透析过夜，制得生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体，备用；

B、制备第二结合物垫：将生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体用第二稀释液稀释至20~80ug/ml，制成第二工作液，将第二工作液按20~50u1/cm²的喷涂量均匀喷涂在玻璃纤维垫上，制成第二结合物垫，将第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，第二稀释液为1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于：步骤4) 包括以下具体步骤：

a) 配制包被液：用包被液分别将链霉亲和素稀释至1.0~1.2mg/ml、将羊抗鼠IgG抗体稀释至0.5~1mg/ml，制成亲和素工作液和羊抗鼠IgG抗体工作液；其中，包被液为含2%甲醇、pH为7.2的0.01mol/L磷酸盐缓冲液；

b) 制备包被膜：将亲和素工作液通过点膜机按1~1.2u1/cm²的点模量在包被膜上划好检测T线，将羊抗鼠IgG抗体工作液通过点膜机按1~1.2u1/cm²的点模量在包被膜上划好质控C线，将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h，备用。

10. 一种如权利要求1~5中任一项所述的试剂盒的检测方法，其特征在于：该方法依次包括以下步骤：

I、配制稀释缓冲液：配制pH为7.5、含有浓度为0.5%吐温-20、0.15mol/L氯化钠、0.2%曲拉通100的0.02mol/L Tris-HCl缓冲液，备用；

II、采集样本：取人粪便样本，按照粪便质量：稀释缓冲液体积=1:50的比例用稀释缓冲液稀释，涡旋振荡5min，离心10~15min取上清液，再加入稀释缓冲液按照体积比1:50进行稀释，制成样本提取液；

III、加样反应：用移液枪吸取静置后的样本提取液100u1，加入到盒体的加样孔内，反应10~15min，样本提取液通过吸水纸的吸水作用沿着样品垫依次向第一结合物垫、第二结

合物垫、包被膜移动；

IV:结果读取:

定性判读:

采用紫外光照射检测试剂盒的观察窗口,观察检测T线及质控C线位置上是否有橙红色条带,如均有则为阳性;如检测T线无、质控C线有则为阴性;如质控C线无条带则表明试验失败需重新检测;

定量判读:

将反应完成后的检测试纸插入荧光免疫分析仪当中,设置激发光波长为360nm,检测区域发射出波长为610nm的可见光,荧光免疫分析仪读取检测T线和质控C线区域的荧光相对光强度,通过校准曲线读取样本中钙卫蛋白的浓度。

一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肠道炎性疾病标志物蛋白检测试剂盒技术领域,具体涉及一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 钙卫蛋白又叫MRP8/14,L1,(p8,14),p34。由钙粒蛋白A(MRP8)和钙粒蛋白B(MRP14)两种异聚体构成。钙卫蛋白是一种钙结合蛋白,主要由嗜中性粒细胞和单核细胞分泌。粪便中的钙卫蛋白是肿瘤性和炎症性肠道疾病的标志物。钙卫蛋白水平提高预示着相应疾病的复发,如果粪便中钙卫蛋白水平很低,极大程度上说明未患有器官性肠道疾病。在临床实践中,粪便中钙卫蛋白常被用来评估肠道炎症程度、监测克罗恩病、溃疡性结肠炎或息肉摘除后病人状况以及进行粪便检查时区分炎症性肠病和肠易激综合症。

[0003] 现有的检测钙卫蛋白的技术方法主要有酶联免疫学方法、化学发光方法以及利用有色微球、胶体金、荧光微球作为标记物质的免疫层析方法。这些技术方法具有各自的特点,因此其在临床应用中具有各自的优势和劣势。酶联免疫法和化学发光方法检测粪便中钙卫蛋白的产品,需要通过酶作为标记物质,与底物液进行反应,其优点是:1.检测灵敏度较高;2.精密度高,结果偏差相对较小;3.检测仪器成熟。其缺点是:1.酶促反应受温度影响较大,因此其检测过程受到温度控制限,不可应用到现场使用。2.酶、底物液为液体成分,因此储存时间较短,储存需要低温条件。3.整个免疫反应过程耗时较长,一般在1.5h以上;反应过程中需要洗涤,操作较繁琐。

[0004] 在免疫层析方法中,胶体金和有色乳胶的标记物质主要通过肉眼观测判读结果,不需要任何设备辅助,但是使用该种检测方法灵敏度不高,重复性差,检测范围狭窄,不可定量检测,一般只用于对检测灵敏度要求不高的定性项目。荧光微球是一种掺入了有机荧光分子的乳胶微球,由于采用了荧光标记,检测灵敏度要比胶体金高出10-100倍,但是由于现有技术的层析介质和装置中具有较强的荧光背景干扰,尤其是层析用到的硝酸纤维素膜(NC膜)在潮湿状态时,对激发荧光的反射作用,这些干扰都限值了荧光微球的检测灵敏度和特异性。由于大多数有机荧光分子的激发光谱和发射光谱之间斯托克位移小,在检测中需要装置滤镜以过滤激发光的信号,大大增加了检测仪器的制造成本,使得检测设备较为昂贵,限制了该技术的广泛应用。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒及其制备方法,本发明所述的试剂盒检测方便快捷,检测灵敏度高,特异性强,可重复性高,检测结果客观可靠,在钙卫蛋白体外诊断领域具有广阔的应用前景。

[0006] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0007] 一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒,所述试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸,所述检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在所述底板上的样品

垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸；所述第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体，所述第二结合物垫上含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体；所述包被膜上由左往右依次设置有一条检测T线和一条质控C线，所述检测T线与质控C线平行排列，所述检测T线上包被有用于与生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体结合的固相化链霉亲和素，所述质控C线上包被有用于与Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体结合的固相化羊抗鼠IgG抗体。

[0008] 作为本发明优选的实施方式，所述包被膜的两端分别与第二结合物垫和吸水纸相互交叠连接，所述第二结合物垫上压贴有第一结合物垫，所述第一结合物垫上压贴有样品垫。

[0009] 作为本发明优选的实施方式，所述样品垫为玻璃纤维垫或聚酯纤维垫。

[0010] 作为本发明优选的实施方式，所述包被膜为硝酸纤维素膜。

[0011] 作为本发明优选的实施方式，所述盒体上开设有向所述样品垫添加样品的加样孔和用于观察检测结果的观察窗口。

[0012] 本发明还提供了一种如上所述的试剂盒的制备方法，其包括以下步骤：

[0013] 1) 样品垫制备：将样品垫置于样品垫处理液中浸泡或将样品垫处理液均匀喷涂在样品垫上，然后将含有样品垫处理液的样品垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，样品垫处理液为含5%吐温-20、1%BSA的pH为8.0的1mol/L硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液；

[0014] 2) 第一结合物垫制备：将Eu³⁺乳胶微球活化，向活化后的Eu³⁺乳胶微球加入鼠抗钙卫蛋白抗体制成Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体，将Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体喷涂于第一结合物垫上，将含有Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体的第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；

[0015] 3) 第二结合物垫制备：将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂与鼠抗钙卫蛋白抗体混合反应制成生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体，将生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体喷涂于第二结合物垫上，将含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体的第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；

[0016] 4) 包被膜制备：将链霉亲和素通过点膜机在包被膜上划好检测T线，将羊抗鼠IgG抗体通过点膜机在包被膜上划好质控C线，将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h，备用；

[0017] 5) 检测试纸组装：将制得的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸由左往右依次压贴在底板上制得检测试纸，将检测试纸安装在盒体内。

[0018] 具体地，步骤2)中包括以下具体步骤：

[0019] a、活化Eu³⁺乳胶微球：用pH为4.5~7.5的MES缓冲液洗涤1%Eu³⁺乳胶微球，离心10~15min去上清，加入PB缓冲液超声重悬两次，使混合均匀，以上操作重复两次；向Eu³⁺乳胶微球混悬液中按1~1.5:1的比例加入EDC，室温下持续混匀15~20min，得到Eu³⁺乳胶微球溶液；

[0020] b、结合鼠抗钙卫蛋白抗体：向Eu³⁺乳胶微球溶液中加入鼠抗钙卫蛋白抗体，使鼠抗钙卫蛋白抗体的浓度为100~1000ug/ml，18~26℃下持续混匀反应2~4h；反应完成后离心10~15min洗涤两次，用封闭液重悬，缓慢搅拌30min后离心清洗，得到Eu³⁺乳胶微球标记鼠

抗钙卫蛋白抗体；再用结合物储存液重悬，4℃下储存备用；其中，封闭液为pH为7.4、含30mmol/L甘氨酸、1%BSA的0.05mol/L磷酸盐缓冲液，结合物储存液为pH为7.4、含1%PEG、0.1%BSA、0.5%吐温-20的0.05mol/L磷酸盐缓冲液；

[0021] c、制备第一结合物垫：将Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体用第一稀释液稀释至20~80ug/ml，制成第一工作液，然后将第一工作液按3~5ul/cm²的喷涂量均匀喷涂于玻璃纤维垫或聚酯纤维垫上，制成第一结合物垫，将第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，第一稀释液为pH为8.0、含1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

[0022] 具体地，步骤3)中包括以下具体步骤：

[0023] A、制备生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体：用二甲基甲酰胺将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂溶解至1mg/ml，用pH为9.0的0.1mol/L NaHCO₃把鼠抗钙卫蛋白抗体稀释至1mg/ml；然后将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂和鼠抗钙卫蛋白抗体按质量比0.8~1:7混合，室温下搅拌反应3h，然后置于pH为7.2的0.05mol/L PBS中透析过夜，制得生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体，备用；

[0024] B、制备第二结合物垫：将生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体用第二稀释液稀释至20~80ug/ml，制成第二工作液，将第二工作液按20~50ul/cm²的喷涂量均匀喷涂在玻璃纤维垫上，制成第二结合物垫，将第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，第二稀释液为1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

[0025] 具体地，步骤4)包括以下具体步骤：

[0026] a) 配制包被液：用包被液分别将链霉亲和素稀释至1.0~1.2mg/ml、将羊抗鼠IgG抗体稀释至0.5~1mg/ml，制成亲和素工作液和羊抗鼠IgG抗体工作液；其中，包被液为含2%甲醇、pH为7.2的0.01mol/L磷酸盐缓冲液；

[0027] b) 制备包被膜：将亲和素工作液通过点膜机按1~1.2ul/cm²的点模量在包被膜上划好检测T线，将羊抗鼠IgG抗体工作液通过点膜机按1~1.2ul/cm²的点模量在包被膜上划好质控C线，将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h，备用。

[0028] 本发明还提供了一种如上所述的试剂盒的检测方法，该方法依次包括以下步骤：

[0029] I、配制稀释缓冲液：配制pH为7.5、含有浓度为0.5%吐温-20、0.15mol/L氯化钠、0.2%曲拉通100的0.02mol/L Tris-HCl缓冲液，备用；

[0030] II、采集样本：取人类便样本，按照粪便质量：稀释缓冲液体积=1:50的比例用稀释缓冲液稀释，涡旋振荡5min，离心10~15min取上清液，再加入稀释缓冲液按照体积比1:50进行稀释，制成样本提取液；

[0031] III、加样反应：用移液枪吸取静置后的样本提取液100ul，加入到盒体的加样孔内，反应10~15min，样本提取液通过吸水纸的吸水作用沿着样品垫依次向第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜移动；

[0032] IV、结果读取：

[0033] 将反应完成后的检测试纸插入荧光免疫分析仪当中，设置激发光波长为360nm，检测区域发射出波长为610nm的可见光，荧光免疫分析仪读取检测T线和质控C线区域的荧光

相对光强度,通过校准曲线读取样本中钙卫蛋白的浓度。

[0034] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0035] 本发明所述的试剂盒在侧向免疫层析技术的基础上,结合使用融合了镧系元素离子 Eu^{3+} 的乳胶微球进行标记,使得试剂盒的荧光强度大、荧光寿命长、荧光激发光谱和发射光谱的斯托克位移大,远小于其他荧光标记物的本底干扰,保证了本发明的高灵敏度,也能够快速完成检测。此外其激发波长和发射波长的较大差异以及较强的荧光激发,只需通过紫外光源便可实现定性检测,方便病人在家自检;同时,本发明的试剂盒还采用了生物素-亲和素放大检测荧光信号,从而使检测结果达到更高的灵敏度和更宽的线性范围。本发明通过第一结合物垫和第二结合物垫相结合,能够通过紫外光源快速、准确地实现定性检测;另外,本发明还能够通过荧光分析仪进行荧光信号的测试得出定量检测结果,解决胶体金免疫层析方法无法定量检测的问题,能够给临床医生提供既准确又简单快速的检测方法,指导治疗;最后,本发明对于人体样本来源的钙卫蛋白均能有效检出,在临床应用中,不但可以应用于粪便样本的检测,也可以检测血清样本中的钙卫蛋白。

[0036] 本发明的优点如下:

[0037] 1.方便快捷:本发明应用于检测样本时,只需加样后等待10-15min即可获得检测结果,操作简单;

[0038] 2.检测设备便宜:由于本发明采用了斯托克位移大的荧光材料,不需要对激发光源进行滤波,减少了昂贵的滤波片的投入;

[0039] 3.检测灵敏度高:本发明所采用的荧光材料荧光寿命长达1ms,因此如采用时间分辨检测设备,可以进一步降低背景荧光的影响,提高检测的灵敏度和特异性;采用生物素、亲和素分别偶联抗体和标记物,放大检测荧光信号,减少抗体用量,增加检测的灵敏度。

[0040] 4.特异性强:本发明对于钙卫蛋白的针对性强,对多数干扰蛋白及微生物均无阳性结果。

附图说明

[0041] 图1为本发明所述的检测试剂盒的结构示意图;

[0042] 图2为本发明所述的检测试纸判读结果为阳性时的示意图;

[0043] 图3为本发明所述的检测试纸判读结果为阴性时的示意图;

[0044] 图4为本发明所述的试剂盒线性拟合曲线图;

[0045] 图1中,1、盒体;11、加样孔;12、观察窗口;2、底板;3、样品垫;4、第一结合物垫;5、第二结合物垫;6、包被膜;61、检测T线;62、质控C线;7、吸水纸。

[0046] 图2~3中,▲为钙卫蛋白,人形为 Eu^{3+} 乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体,⊥为生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体,⊕为链霉亲和素,∩为羊抗鼠IgG抗体。

具体实施方式

[0047] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0048] 需要说明的是,在本发明中,如未作特殊说明,溶剂与相关试剂的用量为反应的常规用量,本领域的技术人员根据现有技术即可确定;本发明使用的试剂为常规试剂,可通过

市场购买得到,所用起始原料和反应物均可通过现有技术或公开的现有文献制备得到。除特殊说明外,本发明所述的百分比含量均为质量百分比;除特殊说明外,本发明所述“室温”均为18~26℃。

[0049] 如图1所示,为本发明所述的一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒,该试剂盒包括盒体1和设置于盒体1内的检测试纸。具体地,盒体1上开设有用于添加样品的加样孔11和用于观察检测结果的观察窗口12。检测试纸包括底板2、以及由左往右依次连接并通过压敏胶设置在底板2上的样品垫3、第一结合物垫4、第二结合物垫5、包被膜6和吸水纸7。底板2优选为PVC底板2,样品垫3优选为玻璃纤维垫或聚酯纤维垫。第一结合物垫4上含有Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体,第二结合物垫5上含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体。包被膜6上由左往右依次设置有一条检测T线61和一条质控C线62,检测T线61与质控C线62平行排列,检测T线61上包被有用于与生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体结合的固相化链霉亲和素,质控C线62上包被有用于与Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体结合的固相化羊抗鼠IgG抗体。优选地,包被膜6为硝酸纤维素膜。

[0050] 具体地,样品垫3的右端与第一结合物垫4的左端上相互交叠连接且样品垫3位于第一结合物垫4的上方,第一结合物垫4的右端与第二结合物垫5的左端上相互交叠连接且第一结合物垫4位于第二结合物垫5的上方,包被膜6的两端分别与第二结合物垫5和吸水纸7相互交叠连接。由于相邻的两个组件的首尾部分通过压贴形成较为紧密的重叠结构,使得样本能够从上游组件的尾部通过该重叠结构移动至下游组件上。在检测时,可以将液体状态的样本加样到样品垫3上,该液态状态的样品可以通过吸水纸7的吸水作用,沿着样品垫3向与之连接的第一结合物垫4移动,接触到第一结合物垫4后再沿着第一结合物垫4向与之连接的第二结合物垫5移动,接触到第二结合物垫5之后再沿着第二结合物垫5向与之连接的包被膜6移动,接触到包被膜6之后再沿着包被膜6向与之连接的吸水纸7移动。这样的移动通常称为层析作用,由此可知,进一步的,样品垫3与第一结合物垫4的交叠连接处在其延伸方向上与第一结合物垫4与第二结合物垫5的交叠连接处留有间距,第一结合物垫4与第二结合物垫5的交叠连接处在其延伸方向上与第二结合物垫5与包被膜6的交叠连接处留有间距,可以使得第一结合物垫4上Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体能够与样本中的待测抗原留有充分的结合时间,如待测样品中存在所要检测的特异性抗原,则可以在第一结合物垫4处形成抗原—Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体复合物;同样地,第二结合物垫5与包被膜6的交叠连接处与包被膜6与吸水纸7之间的交叠连接处之间留有间距,预留充分的结合时间。

[0051] 本发明的基本原理如下:

[0052] 本发明在免疫层析技术基础上应用了含有镧系元素离子Eu³⁺的乳胶微球作为高敏感性和特异性的标记物质,并采取生物素、亲和素放大检测荧光信号,能够快速、准确检测人粪便中的钙卫蛋白。当样本加入到本发明的检测试剂盒中时,钙卫蛋白会先与Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体结合,接着会与生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体结合,形成夹心结构,该结构随着样本液体在固相的层析介质上流动,经过链霉亲和素固定的区域时,被捕获形成检测T线,再流经羊抗鼠IgG抗体固定的区域时,被捕获形成质控C线,其余不反应的抗体以及其他物质会随着层析作用流至吸水纸中,自行与参加反应的抗原抗体结合区域分离开来。反应后的检测试纸通过波长365nm的紫外灯激发检测区域,检测区域发射出610nm的可

见发射光,该可见发射光的强度与样本中的钙卫蛋白抗原浓度呈正相关,可以通过CCD或荧光检测仪进行测量光强度,再拟合计算出样本中的钙卫蛋白浓度,实现定量检测;也可以直接通过目测检测T线区域荧光条带的有无,进行定性检测。

[0053] 实施例1:

[0054] 一、钙卫蛋白试剂盒的制备方法:

[0055] 步骤1) 样品垫制备:通过对玻璃纤维垫或聚酯纤维垫等多孔径介质进行处理,从而让加样到样品垫的理化性质达到免疫反应的最优条件,降低样本中干扰物质引起的偏差。

[0056] 所需材料:

[0057] 玻璃纤维垫,型号为Ahlstrom8964;

[0058] 样品垫处理液:pH为8.0、含5%吐温-20、1%BSA的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液。

[0059] 处理方法:

[0060] 用裁纸刀将玻璃纤维裁切成30cm×10cm,放入样品垫处理液中,浸泡处理,也可以通过气泵喷头按20u1/cm²的喷涂量将处理液均匀的喷涂在样品垫上。将处理好的样品垫放入37℃、相对湿度小于20%的干燥环境中烘干4h,置于干燥环境保存待用。

[0061] 步骤2) 第一结合物垫制备:

[0062] 所需材料:

[0063] 玻璃纤维垫,型号为Ahlstrom8964;

[0064] Eu³⁺乳胶微球,购自武汉华科微科科技有限公司;

[0065] 碳二亚胺盐酸盐(EDC);

[0066] 鼠抗钙卫蛋白抗体,购自Meridian公司;

[0067] pH为6.0的0.1mol/L MES缓冲液;

[0068] pH为7.4的0.05mol/L磷酸盐缓冲液;

[0069] 封闭液:pH为7.4、含1%BSA、30mmol/L甘氨酸的0.05mol/L磷酸盐缓冲液;

[0070] 结合物储存液:pH为7.4、含1%PEG、0.1%BSA、0.5%吐温-20的0.05mol/L磷酸盐缓冲液;

[0071] 第一稀释液:pH为8.0、含1%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)、1%的吐温-20、10%蔗糖的0.1mol/L硼酸盐缓冲液。

[0072] 处理方法:

[0073] a、活化Eu³⁺乳胶微球:

[0074] 吸取0.5ml 1%Eu³⁺乳胶微球,用0.5ml MES缓冲液洗涤两次,每次洗涤后,在转速13000g下离心,去上清,加入pH为8.0的0.05mol/L硼酸盐缓冲液超声(100w、1min、3s、3s)重悬两次,使混合均匀。在洗涤后的混悬液中,加入100mg/ml的EDC溶液60u1(需现配现用)混合,室温下180r/min持续混匀15-20min,得到Eu³⁺乳胶微球溶液;

[0075] b、结合鼠抗钙卫蛋白抗体:

[0076] 向活化后的2ml Eu³⁺乳胶微球溶液中立即加入240ug鼠抗钙卫蛋白抗体,使鼠抗钙卫蛋白抗体的浓度为120ug/ml,室温下180r/min持续混匀反应3h;反应完成后离心洗涤两次,用封闭液重悬,室温下180r/min缓慢搅拌30min后离心,用结合物储存液清洗2次,得到Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体;然后加入0.5ml结合物储存液重悬,4℃下储存备用。

[0077] c、制备第一结合物垫：

[0078] 将得到的Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体用第一稀释液稀释至30ug/ml，制成第一工作液，用气泵喷头将第一工作液按4ul/cm²的喷涂量均匀连续喷涂在玻璃纤维垫(30cm×20cm)上，每条间隔距离8mm，制成第一结合物垫，将第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3h，置干燥环境保存备用。

[0079] 步骤3) 第二结合物垫制备：

[0080] 所需材料：

[0081] 玻璃纤维垫，型号为Ahlstrom8964；

[0082] 生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂 (BNHS)，购自阿拉丁试剂有限公司，也可将生物素偶联抗体经过活化生成生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂，制备过程如下：将双环己基碳化二亚胺 (DCCI) 加入到含生物素和N-羟基琥珀酰亚胺的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中，各部分比例为4 (W) : 5 (W) : 3 (W) : 60 (V) (W为质量比、V为体积比)。室温下放置过夜，过滤沉淀物；滤液减压蒸干后，将残留物用乙醚反复洗涤，产物用异丙醇重结晶，可获得纯化的BNHS。

[0083] 二甲基甲酰胺 (DMF) ；

[0084] 鼠抗钙卫蛋白抗体，购自Meridian公司；

[0085] PBS透析液：pH为7.2的0.05mol/L PBS缓冲液；

[0086] 第二稀释液：pH为8.0的1% BSA、1% 聚乙烯吡咯烷酮、1% 吐温-20、5% 蔗糖的0.1mol/L的0.1mol/L硼酸盐缓冲液；

[0087] 处理方法：

[0088] A、制备生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体：

[0089] 用二甲基甲酰胺将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂溶解至1mg/ml，用pH为9.0的0.1mol/L NaHCO₃把鼠抗钙卫蛋白抗体稀释至1mg/ml；然后将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂和鼠抗钙卫蛋白抗体按质量比1:7混合，室温下搅拌反应3h，然后置于pH为7.2的0.05mol/L PBS中透析过夜，期间更换PBS透析液一次，制得生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体，备用；

[0090] B、制备第二结合物垫：

[0091] 将生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体用第二稀释液稀释至50ug/ml，制成第二工作液，将第二工作液按50ul/cm²的喷涂量均匀喷涂在玻璃纤维垫(30cm×20cm)上，制成第二结合物垫，将第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3h，置于干燥环境保存备用。

[0092] 步骤4) 包被膜制备：

[0093] 所需材料：

[0094] 链霉亲和素，购自Sigma-Aldrich公司；

[0095] 羊抗鼠IgG抗体，购自菲鹏生物股份有限公司；

[0096] PVC底板；

[0097] 硝酸纤维素 (NC) 膜，型号为sartorius CN95, 25mm；

[0098] 包被缓冲液：含2% 甲醇、pH为7.2的0.01mol/L磷酸盐缓冲液；

[0099] 处理方法：

[0100] a) 配制包被液：用包被液分别将链霉亲和素稀释至1.0mg/ml、将羊抗鼠IgG抗体稀释至0.5mg/ml，制成亲和素工作液和羊抗鼠IgG抗体工作液；

[0101] b) 制备包被膜:

[0102] 将NC膜粘贴到覆盖有压敏胶的PVC塑料薄底板上,底板宽度为80mm,NC膜位于底板中间,上端留18mm,下端留37mm。将底板置于专用的点膜机点膜平台上,调整好点膜机相关参数,将亲和素工作液通过点膜机按 $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 的点模量在包被膜上划好检测T线,将羊抗鼠IgG抗体工作液通过点膜机按 $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 的点模量在包被膜上划好质控C线,将包被好的包被膜置于温度为 37°C 、相对湿度小于20%的环境中烘干2h,置于干燥环境保存备用。

[0103] 步骤5) 检测试纸组装:

[0104] 所需材料:

[0105] 吸水纸, $30\text{cm}\times 20\text{cm}$;

[0106] 步骤1)~4) 制得的半成品;

[0107] 处理方法:

[0108] 将步骤1) 的样品垫切割成 $30\text{cm}\times 2\text{cm}$,步骤2) 的第一结合物垫切割成 $30\text{cm}\times 1\text{cm}$,步骤3) 的第二结合物垫切割成 $30\text{cm}\times 1\text{cm}$,将吸水纸切割成 $30\text{cm}\times 2\text{cm}$ 。在步骤4) 的PVC底板上端贴附切割好的吸水纸,与NC膜交叠2mm;在PVC底板上依次贴附切割好的第二结合物垫、第一结合物垫、样品垫,两两之间各自交叠1mm;将贴附好的PVC板用切割机中切割成宽度3.5mm的检测试纸,将检测试纸安装到盒体上,加入干燥剂置于铝箔袋中封口。

[0109] 检测例1:

[0110] I、配制稀释缓冲液:配制pH为7.5、含有浓度为0.5%吐温-20、 $0.15\text{mol}/\text{L}$ 氯化钠、0.2%曲拉通100的 $0.02\text{mol}/\text{L}$ Tris-HCl缓冲液,混合均匀, 4°C 下储存备用;

[0111] II、采集样本:用洁净采便器皿取人粪便样本,按照粪便质量:稀释缓冲液体积=1:50的比例用稀释缓冲液稀释,涡旋振荡5min,离心10~15min取上清液,再加入稀释缓冲液按照体积比1:50进行稀释,总稀释比率为1::2500,制成样本提取液;

[0112] III、加样反应:用移液枪吸取静置后的样本提取液 $100\mu\text{l}$,加入到盒体的加样孔内,反应10~15min,样本提取液通过吸水纸的吸水作用沿着样品垫依次向第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜移动;

[0113] IV:结果读取:

[0114] 定性判读:采用紫外光照射检测试剂盒的观察窗口,观察检测T线及质控C线位置上是否有橙红色条带,如均有则为阳性,如图2所示;如检测T线无、质控C线有则为阴性,如图3所示;如质控C线无条带则表明试验失败需重新检测;

[0115] 定量判读:将反应完成后的检测试纸插入荧光免疫分析仪当中,设置激发光波长为 360nm ,检测区域发射出波长为 610nm 的可见光,荧光免疫分析仪读取检测T线和质控C线区域的荧光相对光强度,通过校准曲线读取样本中钙卫蛋白的浓度。

[0116] 对比例1:性能评估试验

[0117] 为了验证本发明的有益效果,以市售的瑞士BUHLMANN粪便钙卫蛋白ELISA检测试剂盒作为对比组,以本发明的试剂盒作为实验组,在相同的条件下进行灵敏度对比试验和特异性对比试验,具体实验过程和实验结果如下:

[0118] 一、灵敏度对比试验

[0119] 实验方法:

[0120] 以生理盐水作为空白样本(0浓度质控品),对比组和实验组分别重复测定20次,计

算20次测量结果平均值M和标准差SD,计算出M+2SD,即为灵敏度结果。实验结果见表1。

[0121]

项目	20次测定值(ug/g)										M	SD	M+2SD
	2.3	5.9	6.5	4.8	6.2	2.1	1.8	6	1.4	6.7			
实验组	2.4	6	2.6	4.1	5.1	2.3	3.5	5.8	1.8	1.7	3.9	0.4	4.7
	1.5	4.2	6.8	1.8	6.4	5.5	2.9	5.5	4.6	6.4			
对比组	5	1.8	6.5	3	3.6	6.5	3.3	1.6	3.5	3.4	4.2	1.8	7.8

[0122] 由表1可知,本发明的空白检出限小于4.7ug/g,而ELISA产品空白检出限小于7.8ug/g,由此可见本发明的试剂盒检测灵敏度较高。

[0123] 二、特异性对比试验

[0124] 实验样本制备:配制100ug/ml的乳铁蛋白溶液,将金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌用生理盐水稀释至 3×10^8 CFU/ml。

[0125] 实验方法:用对比组和实验组的试剂盒分别对以上4种实验样本,每种实验样本重复2次,以50ug/g为临界值,检测结果见表2。

[0126] 表2特异性对比试验结果

[0127]

样本	对比组	实验组
乳铁蛋白溶液(1ug/ml)	-	-
金黄色葡萄球菌(3×10^8 CFU/ml)	-	-
粪肠球菌(3×10^8 CFU/ml)	-	-
大肠杆菌(3×10^8 CFU/ml)	-	-

[0128] 注:“-“:表示阴性结果;”+“:表示阳性结果。

[0129] 由表2可知,本发明的试剂盒与对比组试剂盒对多数干扰微生物均无阳性结果,特异性好。

[0130] 三、线性拟合验证

[0131] 以钙卫蛋白浓度为625ug/g的粪便样品分别对倍稀释至312ug/g、156ug/g、78ug/g、39ug/g、20ug/g、10ug/g,以浓度值为自变量X,检测信号发光值为因变量Y,以直线拟合的拟合方式曲线拟合如图4所示:

[0132]

x/浓度	y/RLU
625	19616
312	10225
156	5084
78	3438
39	1366
20	631
10	340

[0133] 回归方程: $Y = a X + b$

[0134] $a = 31.159$

[0135] $b = 294.76$

[0136] $R^2=0.9974$

[0137] 由以上数据及图4表明,本发明的试剂盒线性拟合良好,线性相关系数达0.99以上。

[0138] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范畴。

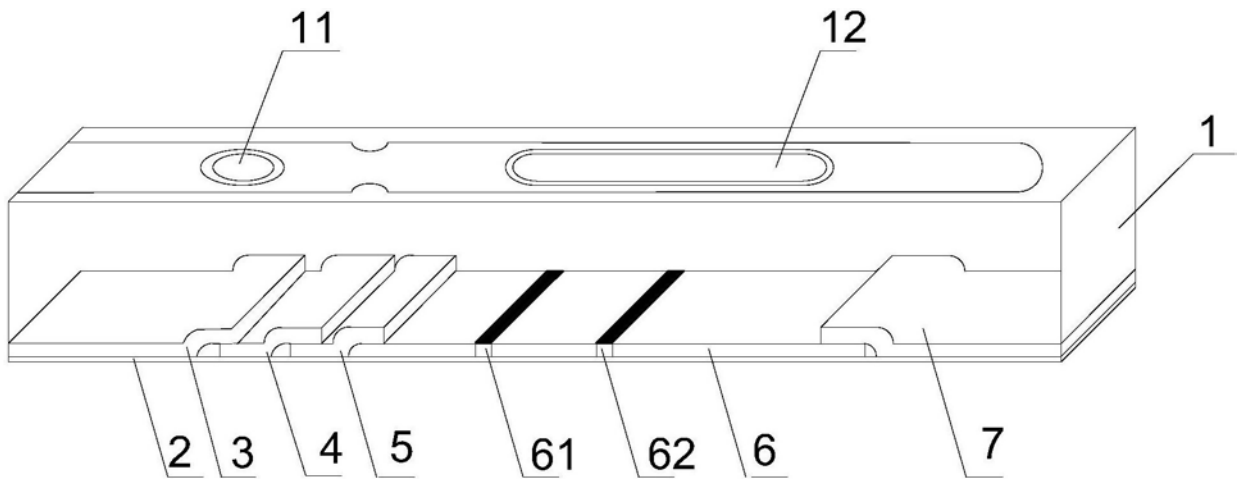


图1

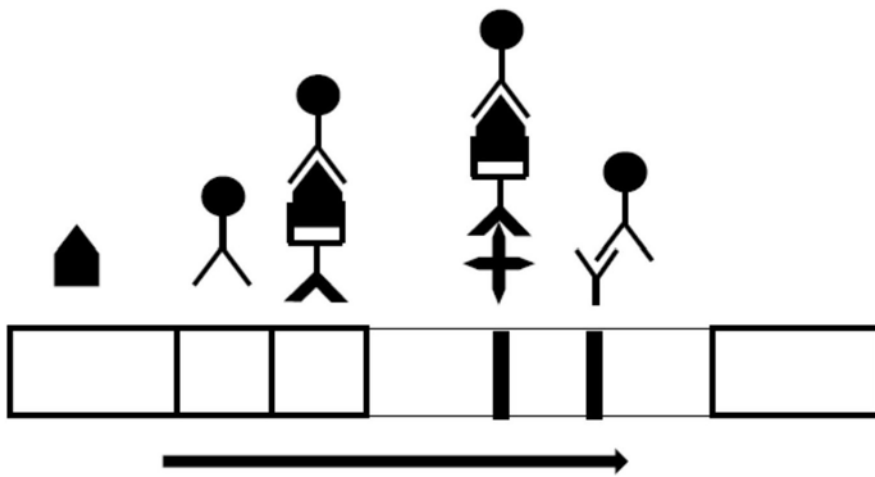


图2

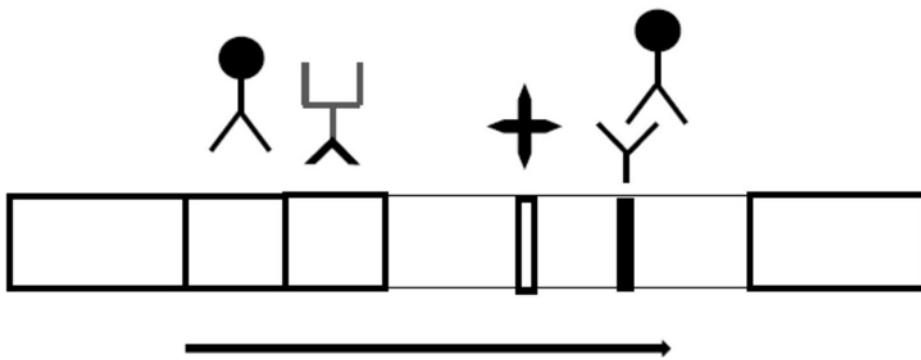


图3

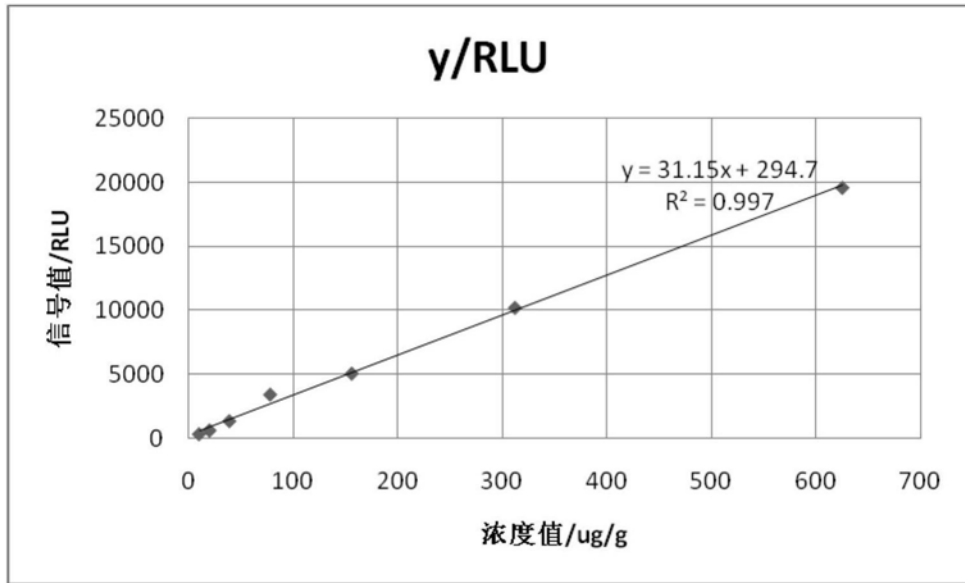


图4

专利名称(译)	一种检测人粪便样本中钙卫蛋白的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107085116A	公开(公告)日	2017-08-22
申请号	CN201710343303.7	申请日	2017-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	张子林		
申请(专利权)人(译)	张子林		
当前申请(专利权)人(译)	张子林		
[标]发明人	张子林 廖汉明 张羽		
发明人	张子林 廖汉明 张羽		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	温旭		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种钙卫蛋白的检测试剂盒及其制备方法和检测方法，该试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸，检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在底板上的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸；第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记鼠抗钙卫蛋白抗体，第二结合物垫上含有生物素化鼠抗钙卫蛋白抗体；包被膜上由左往右依次设置有平行排列的检测T线和质控C线，检测T线上包被有固相化链霉亲和素，质控C线上包被有固相化羊抗鼠IgG抗体。本发明检测方便快捷，检测灵敏度高，特异性强，可重复性高，客观可靠，可定量检测钙卫蛋白。

