



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102062777 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 18

(21) 申请号 200910198706. 2

(22) 申请日 2009. 11. 12

(71) 申请人 上海科新生物技术股份有限公司

地址 201203 上海市张江高科技园区哈雷路
1011 号 501 室 A 区

(72) 发明人 张玥 韩永俊 高成秀 杨超文

孙宏彬 孙潇 张宇婷 钱杰

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限

公司 31224

代理人 吕伴

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

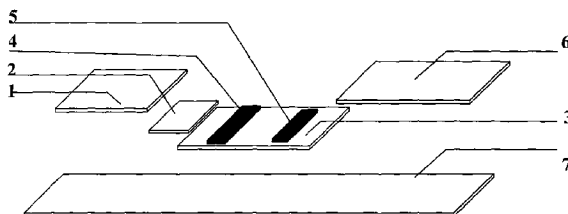
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 1 页

(54) 发明名称

胶体金层析法肝病检测试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了胶体金层析法肝病检测试纸, 以及制备方法。本发明所述的胶体金层析法肝病检测试纸, 是在 PVC 塑料底板上顺次相互搭接地粘贴硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫而形成的膜条, 硝酸纤维素膜有检测线和质控线, 检测线包被 M2 型线粒体抗原蛋白, 质控线包被抗体 (c), 结合垫包被金标抗体 (a) 和金标抗体 (b)。本发明所述的试纸条引入 M2 型线粒体抗原蛋白, 并对结合垫和样品垫进行了工艺优化, 实现了对 M2 型抗线粒体抗体的高灵敏度、高特异、高准确性的检测性能。



1. 一种胶体金层析法肝病检测试纸,包括有硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫,它们依次粘贴在底板上,其特征在于:

所述的结合垫包被有金标抗体(a)和金标抗体(b),

所述的硝酸纤维素包被膜上有检测线(T)和质控线(C),

其中的检测线包被有M2型线粒体抗原蛋白,其中的质控线(C)包被有抗体(c)。

2. 根据权利要求1所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:抗体(a)为抗人IgG单克隆抗体或抗人IgG多克隆抗体,或葡萄球菌A蛋白(SPA)或链球菌G蛋白(Protein G)中的一种或多种。

3. 根据权利要求2所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:抗体(a)中的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种,抗体(a)中的单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。

4. 根据权利要求1所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:抗体(b)和抗体(c)均为单克隆抗体或多克隆抗体中的一种,其中(b)和(c)可发生特异性结合形成免疫复合物。

5. 根据权利要求4所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:抗体(b)和抗体(c)中的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种,单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。

6. 根据权利要求1所述的胶体金层析法肝病检测试纸,其特征在于:检测线上包被的蛋白为通过原核表达克隆化基因获得的M2型线粒体抗原蛋白。

7. 一种胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法,该试纸如前述的权项1-6所述,该试纸由硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫和底板共同组成,其特征在于该方法包括有以下步骤:

步骤1,抗原的制备,是通过原核表达克隆化基因获得M2线粒体抗原蛋白,

以及包被膜的制备,是用包被膜缓冲液稀释抗原蛋白至浓度为1.0~1.5mg/mL,将抗体(c)稀释到0.8~1.5mg/mL,以1~10 μ l/cm硝酸纤维素膜上,置放于37 $^{\circ}$ C烘干备用,

以及金标抗体的制备,是用0.1M碳酸钾调节胶体金pH 7.0~9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入4~25 μ g蛋白,搅拌10~30min,然后加入BSA至终浓度0.5~5%,搅拌10~30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤2~3次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置4 $^{\circ}$ C备用,

以及结合垫的制备,是经处理液浸渍处理的聚脂膜,烘干后,将金标抗体(a)和金标抗体(b)混合后,以0.5~4 μ l/cm的用量喷涂在预处理的聚脂膜上,25 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C干燥后,置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C的环境下备用,

以及样品垫的制备,是经处理液浸渍处理的玻璃纤维膜,于37 $^{\circ}$ C烘干后备用;

步骤2,在底板上顺次相互搭接粘贴经前述步骤1所制作完成的硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫;

步骤3,对步骤2所制作完成的材料,切割成试纸条。

8. 根据权利要求7所述的胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法,其特征在于:所述的步骤1中,金标抗体的制备方法为用0.1M碳酸钾调节胶体金pH值至8.0~9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入8~12 μ g羊抗人IgG,搅拌10~30min,然后加入BSA至终浓度

0.5 ~ 1%，搅拌 10 ~ 30min，离心，弃上清，将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次，末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬，置 4℃ 备用。

9. 根据权利要求 7 所述的胶体金层析法肝病检测试纸条的制备方法，其特征在于：所述的步骤 1 中，金标抗体的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0，按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μg 兔 IgG，搅拌 10 ~ 30min，然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%，搅拌 10 ~ 30min，离心，弃上清，将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次，末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬，置 4℃ 备用。

10. 根据权利要求 7 所述的胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的步骤 1 中，金标 SPA 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 5.0 ~ 6.5，按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10 ~ 15 μg SPA，搅拌 10 ~ 30min，然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%，搅拌 10 ~ 30min，离心，弃上清，将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次，末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬，置 4℃ 备用。然后将金标 SPA OD 20 2 ~ 4 μl/cm 喷涂于结合垫，干燥后备用。

11. 根据权利要求 7 所述的胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的步骤 1 中，金标 SPA 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0，按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μg 鼠抗人 IgG，搅拌 10 ~ 30min，然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%，搅拌 10 ~ 30min，离心，弃上清，将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次，末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬，置 4℃ 备用。然后将金标 SPA OD 30 2 ~ 4 μl/cm 喷涂于结合垫，干燥后备用。

12. 根据权利要求 7 所述的胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的步骤 1 中，将制备好的金标抗体 (a) 和金标兔 IgG 按 20 ~ 40/15 ~ 20 比例混合，用 BIO-Dot 喷膜机以 2.0 ~ 4 μl/cm 喷于预处理的聚脂膜上，25℃ ~ 37℃ 干燥，封袋，置 2℃ ~ 8℃ 备组装粘板用。

13. 根据权利要求 7 所述的胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的步骤 3 中，切割成的试纸条的宽度优选为 4mm 和 3mm 两种。

胶体金层析法肝病检测试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫应用领域,具体涉及到利用胶体金免疫层析技术检测肝病的试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 原发性胆汁性肝硬化 (Primary biliary cirrhosis, PBC) 是以破坏肝内小及中等大小胆管为主的器官特异性自身免疫性肝病,表现为肝门脉区炎症导致纤维化,肝硬化甚至功能性衰竭。肝炎、肝硬化病人各种病原检测指标呈阴性,需要考虑原发性胆汁性肝硬化或自身免疫性肝炎。早期运用药物治疗可控制疾病的进展,而 PBC 的治疗关键在于早期治疗,而早期治疗的前提是早期诊断,早期诊断就成为大家所关注的焦点。

[0003] 在 PBC 患者体内可检出多种自身抗体,如抗核抗体 (ANA)、抗

[0004] 线粒体抗体 (AMA)、抗平滑肌抗体 (SMA)、抗肝肾微粒体抗体 (LKM) 等,其中最主要的抗体是 AMA, PBC 常伴有高滴度的 AMA,病程早期就出现 AMA 是本病的特点。AMA 于 1965 年由 WalRer 等在 PBC 患者血清中用间接免疫荧光法首次发现,其后的研究显示, PBC 患者的 AMA 阳性率可高达 90%, 此项检测已成为 PBC 诊断的主要检查项目。(Neuberger J, Thomson R. PBC and AMA---what is the connection[J]. Hepatology, 1999, 29(1) 265-271)

[0005] 近年研究发现,AMA 存在若干亚型,迄今已发现的亚型共有 9 种 (M1 ~ M9), 与 PBC 有关的有 4 种,即 M2、M4、M8、M9, 其中 M2 亚型抗体 (AMA-M2) 为 PBC 的特异性抗体,对本病有确诊意义。AMA-M2 线粒体抗体对 PBC 检测的敏感性达 93% 以上,特异性几乎达 95%。(Leung P S, Van de water J, Coppel R L. et al. Molecular aspects and the pathoh) gi (al basis of primary biliary cirrhosis[J] Autoimmlun, 1996, 9(2) :119-128.)

[0006] PBC 病人在出现临床症状和组织学特征变化之前几年甚至十几年就可出现 M2 型抗线粒体抗体 (姜小华, 仲人前, 孔宪涛. 原发性胆汁肝硬化发病机制研究进展. 中国免疫学杂志, 2002, 18 :586-588)。因此 M2 型抗线粒体抗体即时检出对 PBC 早期检出及辅助诊断有非常重要的意义。2000 年美国肝病学会 (AASLD) 在发表的《PBC 诊断指南》中,其中有一很重要的一项为 M2 亚型抗线粒体抗体 (AMA-M2) 阳性。

[0007] 随着对 M2 靶抗原的研究深入,鉴定出 M2 的靶抗原为线粒体上的 2- 氧酸脱氢酶复合体 (2-OADC) 的一些组分:丙酮酸脱氢酶 (PDC-E2)、2- 氧酸脱氢酶 (BCOADC-E2)、2- 氧戊二酸脱氢酶 (OGDC-E2)、X 蛋白等,而其中 PDC 的抗原表位主要位于内酯酰区和部分外酯酰区,在 PBC 病人血清中的阳性率为 95%。BCOADC, OGDC 的抗原表位位于内酯酰区,阳性率分别为 53% ~ 55%, 39% ~ 88%。三抗原间无交叉反应, PBC 病人血清中 M2 型抗线粒体抗体能与一种或一种以上抗原反应。三个靶抗原联合检测,其阳性率可达 95% ~ 99%,而且特异性也很高,正常人阳性仅为 0.5% (贾继东自身抗体检测在自身免疫性肝病诊断中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(2) 116-120)。

[0008] 本产品采用基因工程方法 (定康, 陈燕等人源 M2 二联体靶抗原

[0009] PO-E2 融合蛋白的克隆表达与鉴定. [J] 临床军医杂志. 2007, 636(3) :323 :325.)

成功克隆、原核表达全部为人源的 M2 三个靶抗原,即丙酮酸脱氢酶 (PDC)、2- 氧酸脱氢酶 (BCOADC)、2- 氧戊二酸脱氢酶 (OGDC),且成功连接形成抗原蛋白三联体即为本产品的检测抗原。

[0010] 目前 M2 型抗线粒体抗体的检测方法有间接免疫荧光 Indirectimmunofluorescence, IIF) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)。

[0011] 目前市场上商品化 M2 型抗线粒体抗体检测试剂盒主要为 ELISA 试剂盒。ELISA 法操作程序烦琐,完成整个实验过程需三小时左右,亦需要专业免疫学技术人员在实验室中进行实验操作,并且需经酶标仪检测后读取实验结果,这在基层医疗机构的实验室和小型门诊中较难实现该项目的实验检测,同时基于 ELISA 方法学易受各种温度和孵育时间等环境条件因素的影响,对试验带来诸多不便。

[0012] 间接免疫荧光,观察结果需要专业人员操作特殊的仪器设备,间接免疫荧光法存在检测时间长但须有荧光显微镜观察结果,并有一定的主观人为判断误差,另外易受其他干扰产生假阳性,标准化困难,也不适合高通量标本的检测。

[0013] 为了克服上述检测方法的不足,我们将胶体金层析法应用到 M2 型抗线粒体抗体的检测中。胶体金免疫层析法 (gold-immunochromatography assay, GICA) 是应用胶体金标记技术,以胶体金作为示踪物,以条状纤维层析材料为固相,通过毛细效应使样品溶液在层析条上泳动,使样品中的待测物与结合垫上针对待测物的受体 (如抗原或抗体) 发生免疫反应,并与条状纤维层析材料上的抗原 (或抗体) 发生免疫反应而被截留,进而形成肉眼可见的紫红色条带,得到直观的实验结果,达到快速检测的目的 (Sikowicz Getal. One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choricogonadotropin in urine. Clin Chem. 1990 (36) 1579-1586.)。使用时只将样品加样到样品垫上,数分钟就根据检测线上紫红色条带出现情况来判断阴阳性结果。与其他检测方法相比,检测时间短,只需要 5 ~ 10 分钟,操作人员无需培训,操作简便、快速,无需低温保存,储运方便等优势。

[0014] 在自身免疫性疾病方面,目前国外市场上出现了一些检测自身免疫疾病的试纸条产品,但 M2 型抗线粒体抗体的胶体金免疫试纸在国内外市场上仍没有问世。本发明将基因工程菌表达的抗原蛋白首次引入到试纸条中,实现了高特异性、高灵敏度、高准确度的检测性能。目前市面上也出现了商品化 ELISA 试剂盒,但金标层析试纸与之相比,仍有诸多不同之处,不受场地人员之限,检测时间短即 5-10 分钟,判读结果简便。此外该试纸具有高特异性、高灵敏度、高准确度,能满足市场的快速筛选 PBC,为病人及早诊断治疗提供条件,同时,也能满足基层实验室、即时检测、床边检测的需求。

发明内容

[0015] 本发明为了克服以上方法学的不足,将胶体金层析法应用到 M2 型抗线粒体抗体的检测中,同时首次将 M2 型线粒体抗原蛋白应用到胶体金层析法中,采用间接法来实现血液中的 M2 型抗线粒体抗体检测,实现高特异、高灵敏度、高准确性的检测性能,快速筛选出 M2 型抗线粒体抗体的阳性样本,能快速、便捷地辅助诊断原发性胆汁肝硬化。

[0016] 本发明目的之一在于提供一种胶体金层析法肝病检测试纸。

- [0017] 本发明目的之二在于提供一种胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法。
- [0018] 一种胶体金层析法肝病检测试纸,包括有硝酸纤维素包被膜(3)、结合垫(2)、样品垫(1)、吸水垫(6),它们依次粘贴在底板上,其特征在于:
- [0019] 所述的结合垫包被有金标抗体(a)和金标抗体(b),
- [0020] 所述的硝酸纤维素包被膜(3)上有检测线(4)和质控线(5),
- [0021] 其中检测线包被有M2型线粒体抗原蛋白,其中的质控线(5)包被有抗体(c)。
- [0022] 进一步,所述的抗体(a)为抗人IgG单克隆抗体或抗人IgG多克隆抗体,或葡萄球菌A蛋白(SPA)或链球菌G蛋白(Protein G)中的一种或多种。
- [0023] 所述的抗体(a)中的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种,抗体(a)中的单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。
- [0024] 所述的抗体(b)和抗体(c)均为单克隆抗体或多克隆抗体中的一种,其中(b)和(c)可发生特异性结合形成免疫复合物。
- [0025] 所述的抗体(b)和抗体(c)中的多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源中的一种,单克隆抗体为鼠源或兔源中的一种。
- [0026] 所述的检测线上包被的蛋白为通过原核表达克隆化基因获得的M2型线粒体抗原蛋白。
- [0027] 所述检测是定性检测人血清中M2型抗线粒体抗体,辅助诊断早期原发性胆汁肝炎。
- [0028] 所述M2型线粒体抗原蛋白是针对M2的靶抗原即线粒体的2-氧酸脱氢酶复合体(2-OADC)的一些组分:丙酮酸脱氢酶(PDC-E2)、2-氧酸脱氢酶复合体E2(BCOADC-E2)、2-氧戊二酸脱氢酶复合体E2(OGDC-E2),通过基因克隆技术构建重组基因,然后采用原核表达技术成功表达出全部为人源的M2三个靶抗原蛋白,且成功连接形成抗原蛋白三联体(姜小华,仲人前等.M2自身抗原及其三联体的克隆表达和初步鉴定.中华消化杂志,2001(21):530-533)。
- [0029] 所述样本来自人血清、血浆、全血样本。
- [0030] 根据本发明应用的单克隆抗体可通过由Kohler等(Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975(256):495-497)首先描述的杂交瘤法进行制备,或者可通过重组DNA法进行制备(见美国专利4816567)。“单克隆抗体”由Clackson等(Making antibody fragments using phage display libraries[J]. Nature, 1991:624-628)和Marks等(By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage[J]. Journal of Molecular Biology, 1991:581-597)所述技术从噬菌体抗体文库中分离。
- [0031] 根据本发明应用的多克隆抗体可通过陈学清等(免疫学常用实验方法.[M], 2000:15-26)通过免疫动物来制备。
- [0032] 本发明的SPA、Protein G通过原核表达克隆化重组基因,由J. 萨姆布鲁克等(分子克隆实验指南.[M], 2002:1228-1232)描述的大肠杆菌原核表达克隆化基因。
- [0033] 一种胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法,该试纸由样品垫、结合垫、包被膜、吸水垫和底板共同组成,其特征在于该方法包括有以下步骤:
- [0034] 步骤1,抗原的制备,是通过原核表达克隆化基因获得M2线粒体抗原蛋白,

[0035] 以及包被膜的制备,是用包被膜缓冲液稀释抗原蛋白至浓度为 1.0 ~ 1.5mg/mL,将抗体 (c) 稀释到 0.8 ~ 1.5mg/mL,以 1 ~ 10 μ l/cm 硝酸纤维素膜上,置放于 37°C 烘干备用,

[0036] 以及金标抗体的制备,是用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 7.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 4 ~ 25 μ g 蛋白,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 5%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4°C 备用,

[0037] 以及结合垫的制备,是经处理液浸渍处理的聚脂膜,烘干后,将金标抗体 (a) 和金标抗体 (b) 混合后,以 0.5 ~ 4 μ l/cm 的用量喷涂在预处理的聚脂膜上,25°C ~ 30°C 干燥后,置于 2°C ~ 8°C 的环境下备用,

[0038] 以及样品垫的制备,是经处理液浸渍处理的玻璃纤维膜,于 37°C 烘干后备用;

[0039] 步骤 2,在底板上顺次相互搭接粘贴经前述步骤 1 所制作完成的硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫;

[0040] 步骤 3,对步骤 2 所制作完成的材料,切割成试纸条。

[0041] 所述的步骤 1 中,金标抗体的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 8.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 羊抗人 IgG,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4°C 备用。

[0042] 所述的步骤 1 中,金标抗体的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 兔 IgG,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4°C 备用。

[0043] 所述的步骤 1 中,金标 SPA 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 5.0 ~ 6.5,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10 ~ 15 μ g SPA,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4°C 备用。然后将金标 SPA OD 20 2 ~ 4 μ l/cm 喷涂于结合垫,干燥后备用。

[0044] 所述的步骤 1 中,金标 SPA 的制备方法为用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 鼠抗人 IgG,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4°C 备用。然后将金标 SPA OD 302 ~ 4 μ l/cm 喷涂于结合垫,干燥后备用。

[0045] 所述的步骤 1 中,将制备好的金标抗体 (a) 和金标兔 IgG 按 20 ~ 40/15 ~ 20 比例混合,用 BIO-Dot 喷膜机以 2.0 ~ 4 μ l/cm 喷于预处理的聚脂膜上,25°C ~ 37°C 干燥,封袋,置 2°C ~ 8°C 备组装粘板用。

[0046] 所述的步骤 3 中,切割成的试纸的宽度优选为 4mm 和 3mm 两种。

[0047] 本发明的检测原理具体为选用亲和层析纯化的 M2 抗原蛋白,金标抗体 (a) 和金标兔 IgG 作为胶体金标记复合物,喷涂于结合垫,利用间接法来检测血清样品中是否含有 M2 型抗线粒体抗体。检测时,样本随着层析泳动到结合垫并浸润金标复合物,其中的人 IgG 和

金标抗体 (a) 结合形成人 IgG- 金标抗体 (a) 复合物, 由于毛细效应, 此复合物沿包被膜泳动向前, 若血清样品中有 M2 型抗线粒体抗体, 此复合物与包被于硝酸纤维素膜上的抗原蛋白发生特异性免疫结合反应, 形成金标抗体 (a)- 人 IgG-M2 抗原蛋白三联体复合物而被截留在检测线上, 逐渐富集形成较深的紫红色条带; 由于毛细效应继续泳动向前, 金标兔 IgG 与包被在质控线上的羊抗兔 IgG 发生特异的免疫反应被截留, 逐渐富集在质控线上形成较深的紫红色条带, 多余的未结合的物质继续层析到吸水垫上, 因此在检测线和质控线都出现条带的判为阳性结果; 若血清样品中不含有 M2 型抗线粒体抗体, 金标抗体 (a) 到达检测线时, 不与包被在检测线上的抗原蛋白发生免疫反应, 因此在检测线处没有出现紫红色条带, 金标抗体 (a) 继续泳动向前到达吸水垫, 而金标兔 IgG 继续泳动向前与包被于质控线处羊抗兔 IgG 发生特异的免疫反应而被截留, 逐渐富集在质控线上形成紫红色条带, 因此仅在质控上出现条带判为阴性结果。

[0048] 与现有的检测方法相比, 本发明优点:

[0049] 1. 该测定方法的独特性在于基因重组表达的三联体抗原蛋白首次应用于胶体金层析试纸, 大大提高了其检测灵敏度, 通过胶体金试纸可快速筛选出 M2 型抗线粒体抗体所有阳性样本 (能检出大于 25RU/ml 的样本)。

[0050] 2. 本发明的优点是生产成本低。本发明所提供的 M2 型抗线粒体抗体检测

[0051] 试纸所需的核心试剂是抗体 (a) 即抗人 IgG 或 SPA 或 PROTEIN G、抗体 (c)、抗体 (b)、抗原蛋白, 其单条试纸所用试剂量少, 且可通过购买商品化试剂或自制, 抗原蛋白来源于商品化的纯化基因工程抗原蛋白, 或者自行制备。

[0052] 3. 与已公开的用于 M2 型抗线粒体抗体检测的其他方法相比, 本发明的试纸具有许多其他方法所不能比拟的优点, 如检测时间短 (5 ~ 10min); 不需要任何特殊仪器, 可实现床边检测和门诊即时检测; 操作简便, 只需一步反应, 操作人员无需培训, 检测成本低; 对温度无特殊要求, 无需冷冻, 储存运输方便, 室温可保存 24 个月。

附图说明

[0053] 图 1 为本发明的侧面结构示意图。图 1 所示, 该试纸是在支撑胶板 (7) 上顺次相互搭接地粘贴硝酸纤维素包被膜 (3)、结合垫 (2)、样品垫 (1)、吸水垫 (6)。

[0054] 结合垫 (2) 上包被有金标抗体 (a) 和金标抗体 (b); 硝酸纤维素包被膜 (3) 有检测线 (4) 和质控线 (5), 其中, 检测线 (4) 包被有 M2 型线粒体抗原蛋白, 质控线 (5) 包被有抗体 (c)。

[0055] 图 2 为本发明的检测结果示意图。

[0056] 图 2a 所示为: 加样后, 反应 3 ~ 5min 即可看到检测区 4(T) 和控制区 5(C) 相应位置上出现紫红色条带;

[0057] 图 2b 所示为: 当 C 区 5 和 T 区 4 均出现紫红色条带, 结果为阳性, 说明血清中含有 M2 型抗线粒体抗体;

[0058] 图 2c 所示为: 如只在 C 区 5 出现一条紫红色条带, T 区 4 不出现紫红色条带, 结果为阴性, 说明血清中不含 M2 型抗线粒体抗体;

[0059] 图 2d、2e 所示为: 如 C 区 5 不出现紫红色条带, 无论 T 区 4 是否有条带出现, 都说明试纸失效。

具体实施方式

[0060] 本发明所述的胶体金免疫层析法肝病检测试纸,如图 1 所示,该试纸是在支撑胶板(7)上顺次相互搭接地粘贴硝酸纤维素包被膜(3)、结合垫(2)、样品垫(1)、吸水垫(6)。所述的结合垫(2)上包被有金标抗体(a)和金标兔 IgG。所述的硝酸纤维素包被膜(3)有检测线(4)和质控线(5),检测线(4)包被有 M2 型线粒体抗原蛋白,质控线(5)包被有羊抗兔 IgG。

[0061] 如图 2 所示,加样后,反应 3 ~ 5min 即可看到检测区 4(T) 和控制区 5(C) 相应位置上出现紫红色条带,如图 2a 所示;当 C 区 5 和 T 区 4 均出现紫红色条带(如图 2b 所示),结果为阳性,说明血清中含有 M2 型抗线粒体抗体;如只在 C 区 5 出现一条紫红色条带,T 区 4 不出现紫红色条带(如图 2c 所示),结果为阴性,说明血清中不含 M2 型抗线粒体抗体;如 C 区 5 不出现紫红色条带,无论 T 区 4 是否有条带出现(如图 2d、2e 所示),都说明试纸失效。

[0062] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0063] 实施例一抗原组成

[0064] 应用于本试纸的抗原蛋白是针对 M2 的靶抗原即线粒体的 2- 氧酸脱氢酶复合体(2-OADC)的一些组分:丙酮酸脱氢酶(PDC-E2)、2- 氧酸脱氢酶复合体 E2(BCOADC-E2)、2- 氧戊二酸脱氢酶复合体 E2(OGDC-E2),通过基因克隆技术构建重组基因,然后采用原核表达技术成功表达出全部为人源的 M2 三个靶抗原蛋白,且成功连接形成抗原蛋白三联体。

[0065] 实施例二抗体制备

[0066] 抗体(a)及抗体(c)、抗体(b)用下述方法来实现胶体金层析法肝病检测试纸的制备。其中抗人 IgG、抗体(c)及抗体(b)一般可通过在动物上经多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射纯化的免疫原和佐剂而产生。

[0067] 通过将 0.05mg ~ 1mg 免疫制剂(分别针对山羊或小鼠)与 3 倍体积的 Freund's 完全佐剂混合,将该溶液在皮内多部位注射,一个月后将动物用 1/5 至 1/10 原初量的人 IgG 的 Freund's 完全佐剂混合液经多部位皮下注射而加强免疫。7 ~ 14 天后将动物放血,测定血清抗人 IgG 滴度。对动物加强免疫直至滴度达到平台期。在许多免疫学教科书中描述了生产多克隆抗体的方法,例如,陈学清等《免疫学常用实验方法》。通过从被免疫的动物回收脾细胞并使细胞永生化,例如通过与骨髓瘤细胞融合或通过 Epstein-Barr 病毒转化,并且筛选能表达目的抗体的单克隆抗体(Kohler, Milstein. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion[J]. European Journal of Immunology, 1976 :501-511)。

[0068] 可通过大肠杆菌原核表达克隆化基因来制备重组葡萄球菌 A 蛋白和链球菌 G 蛋白,具体操作方法参见 J. 萨姆布鲁克等(分子克隆实验指南. [M], 2002 :1228-1232),或购买商品化的 SPA 或 Protein G。

[0069] 实施例三羊抗人 IgG 标记

[0070] 羊抗人 IgG 的标记:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 8.0 ~ 9.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μ g 羊抗人 IgG,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保

存液将沉淀重悬,置 4℃ 备用。

[0071] 实施例四兔 IgG 标记

[0072] 兔 IgG 的标记:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μg 兔 IgG,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4℃ 备用。

[0073] 实施例五葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 的标记

[0074] SPA 蛋白的标记:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 5.0 ~ 6.5,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 10 ~ 15 μg SPA 蛋白,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4℃ 备用。

[0075] 实施例六鼠抗人 IgG 的标记

[0076] 鼠抗人 IgG 的标记:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金 pH 值至 7.0 ~ 8.0,按每毫升胶体金溶液缓慢加入 8 ~ 12 μg 鼠抗人 IgG,搅拌 10 ~ 30min,然后加入 BSA 至终浓度 0.5 ~ 1%,搅拌 10 ~ 30min,离心,弃上清,将沉淀用洗涤液洗涤 2 ~ 3 次,末次用十分之一初始体积的保存液将沉淀重悬,置 4℃ 备用。

[0077] 实施例七

[0078] 本发明所述胶体金层析法肝病检测试纸的制备方法:

[0079] 步骤 1,包被膜的制备

[0080] 用包被缓冲液将 M2 蛋白稀释到 1.0 ~ 1.5mg/mL,调整 BIO-Dot 仪器,喷涂检测线 (T),靠近结合垫端,距结合垫端约 9.5mm;用包被缓冲液将羊抗兔 IgG 稀释到 0.8 ~ 1.5mg/mL,用 BIO-Dot 仪器喷涂羊抗兔 IgG 于质控线 (C) 靠近吸水垫,距吸水垫约 9mm。两线距离约 5 ~ 8mm,喷线应粗细均匀。37℃ 烘干,封装备用。

[0081] 其中的包被缓冲液可以是硼酸盐,碳酸盐,磷酸盐,Tris-HCl 或 Tris-磷酸盐,醋酸盐,巴比妥,等等,其缓冲液的目的是提供一定 pH 和离子强度使蛋白包被并牢固包被于 NC 膜,其缓冲液 pH 值一般约为 6 ~ 9.5 范围内,优选为 6.5 ~ 7.5 的中性缓冲范围内,且最优选缓冲液的 pH 值为 7.0 ~ 7.4 范围内。缓冲液优选为磷酸盐。

[0082] 其中的 NC 膜可以为任何商品化硝酸纤维素膜,S&S AE99、whatman 8 μm、millipore M135、sartorius CN140 等。使用的具体的 NC 膜不是本发明的关键,但是在每次测定中,上述几种 NC 膜可以作为优选。不同厂家使用的含不同表面活性剂的不同缓冲液处理的膜,与所用检测线抗体溶液亲和力有不同程度的差距,也会很大程度造成线条不均匀,拖带或是弥散的现象,因此运用组装试纸来选择优选的 NC 膜。

[0083] 2. 胶体金溶液制备

[0084] 将 0.01% 的 H₂AuCl₄ 溶液加热至沸腾,迅速加入每 100mL H₂AuCl₄ 溶液加入还原剂溶液,开始有些蓝色,然后浅蓝、蓝色,再加热出现红色,煮沸 7 ~ 10min 出现透明的橙红色。再用超滤或微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤,以除去其中的聚合物和其它可能混入的杂质。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,液面出现油状物和大量黑色颗粒状沉淀物时弃用。

[0085] 其中所使用的还原剂可以为柠檬酸三钠 (Frens 1973)、鞣酸 - 柠檬酸三钠 (Slot

与 Gueeze 1985 年)、白磷,优选使用柠檬酸三钠,更优选地使用 1% 柠檬酸三钠。

[0086] 其中所用玻璃容器应绝对清洁,用前需经酸洗、硅化。其水应为去离子超纯水,电阻率达 18.2MΩ。

[0087] 3. 金标抗体的制备

[0088] 参见实施例 3、实施例 4、实施例 5、实施例 6。

[0089] 其中所述洗涤液也即保存液为含 0.2 ~ 1% 大分子蛋白的硼酸盐,碳酸盐,磷酸盐, Tris-HCl 或 Tris- 磷酸盐,醋酸盐,巴比妥,等等,大分子蛋白可以为牛血清白蛋白、PEG20000、酪蛋白等,缓冲液优选为磷酸盐缓冲液,更优选为 0.2% BSA pH7.2 磷酸盐缓冲液。

[0090] 4. 结合垫的预处理

[0091] 用缓冲液将聚脂膜浸泡 30 分钟,37℃ 烘干。

[0092] 可以用于此目的的缓冲液包括

[0093] (a) 含有 1% PVA、0.71% Na₃PO₄、1% BSA、0.05% NaN₃、0.1% TritonX-100 ;

[0094] (b) 1% PVA、1% BSA、0.05% PROCLIN™300、0.1% TritonX-100, pH7.0PBS ;

[0095] (c) 1% PVA、1% BSA、0.05% PROCLIN™300, pH7.0 PBS ;

[0096] (d) 含有 1% PVA、0.71% Na₃PO₄、1% BSA、0.05% NaN₃、0.1% Tween-20 ;

[0097] (e) 含有 1% PVA、0.71% Na₃PO₄、1% BSA、0.05% NaN₃、0.1% Tween-20, pH7.0PBS ;

本文所述测定法优选的缓冲液是缓冲液 (a),因为它具有区别阴阳性样品的最大分辨率。PROCLIN™300 和 NaN₃ 起防腐作用,而 Tween-20 具有去污和亲水作用。

[0098] 5. 结合垫的制备 :

[0099] 将金标抗人 IgG (a) 和金标抗体 (b) 按一定比例混合,用 BIO-Dot 仪器 0.5 ~ 4 μ l/cm 喷涂在预处理的聚脂膜上,25℃ ~ 30℃ 干燥,待干燥完毕之后,封袋,置 2℃ ~ 8℃ 备用。

[0100] 6. 样品垫的处理

[0101] 将样品垫按 45mL/片用处理液均匀洒涂于样品垫上,于 37℃ 烘干后,用铝箔袋封装,备用。

[0102] 可以用于此目的的缓冲液包括 (a) 0.05M Borax、0.01MPBS (pH7.0)、0.1% Sodium Casein、1% PEG20000、2% BSA、0.05% NaN₃; (b) 0.05M Borax、0.01MPBS (pH 7.0)、0.1% Sodium Casein、1% PEG20000、2% Casein、0.05% NaN₃; (c) 0.05M Tris-cl (pH 7.0)、0.01MPBS、0.1% Sodium Casein、1% PEG20000、2% Casein、0.05% NaN₃。本文所述测定法优选的缓冲液是缓冲液 (a),因为它具有区别阴阳性样品的最大分辨率,NaN₃ 起防腐作用。

[0103] 7. 原材料预裁剪

[0104] 玻璃纤维膜的裁切 :用裁切机将玻璃纤维膜切成与 PVC 胶板等长度即长 28cm,宽 2.4cm,置干燥房间备用。

[0105] 吸水纸的裁切 :用裁纸机将吸水纸切成与 PVC 板等长度即长 28cm,宽 3cm,置干燥房间备用。

[0106] 聚脂膜的裁切 :用裁纸机将其切成与 PVC 板等长度即长 28cm,宽 1cm,置干燥房备用。

[0107] 将硝酸纤维素膜、吸水纸、聚脂膜、玻璃纤维膜按图 1 所示依次层叠在 PVC 塑料底板上,组成大板。组装车间温度应控制在 25℃ ~ 37℃,湿度 20% ~ 30%。

[0108] 8. 切条

[0109] 用切条机将大板切成单人份,每人份宽度按照一定要求切成 2.5mm ~ 4mm 的宽度,随机抽检,灵敏度能检出室内质控样品(即弱阳性样本),条带显色程度达到如图 2d,且无非特异性条带,则产品通过质控规定成为合格产品。

[0110] 9. 组装、包装

[0111] 将 1 人份已切好的试纸组装在备好的试纸卡里,使加样窗对应试纸的样品垫,结果显示窗对应检测区和控制区,组装车间温度应控制在 25°C ~ 37°C,湿度 20% ~ 30%。再与一包干燥剂、说明书、样品加样器封装在外包装袋里,于 4 ~ 25°C 避光保存。

[0112] 实施例八确定金标抗体 (a) 和金标抗体 (b) 的混合比例

[0113] 以金标羊抗人 IgG 和兔 IgG 为例来说明比例的确定,其他抗体如鼠抗人 IgG 和兔 IgG、葡萄球菌 A 蛋白和兔 IgG、链球菌 G 蛋白和兔 IgG 也可据此方法来确定。

[0114] 1. 在实施例 7 的步骤 3 中,所述两者混合比例确定具体为:通过预实验基本确定金标兔 IgG 的 OD₂₀,用 BIO-Dot 喷量 1 μl/cm 喷于结合垫上,用 0.01MPBS 为上样缓冲液,即能得到预期的颜色强度的条带,确定兔 IgG 的应用 OD 喷量为 1 μl。

[0115] 2. 随后将金标羊抗人 IgG 进行梯度稀释到终浓度 OD₁₀₀、80、60、40、20,然后将金标兔 IgG 稀释到终浓度 OD₂₀,用 BIO-Dot 将以上金标羊抗人 IgG 和金标兔 IgG 混合物喷量为 3 μl/cm 喷于处理好的聚酯膜,将制备的包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫依次粘贴于塑料底板上,用阳性血清、临界参考值血清、阴性血清为调试对象。判定依据:阳性血清的检测线 (T) 和质控线 (C) 两者的条带颜色强度一致为依据,临界参考值血清能出现,阴性血清无条带出现的那个 OD 值,即为这批的应用量。通过本试验得出 OD₂₀ ~ 40 较为符合要求。

[0116] 实施例九试纸组成及试剂配制

[0117] 本发明提供的一种胶体金层析法肝病检测试纸的组成:是在支撑塑料 PVC 板 (7) 上顺次相互搭接地粘贴硝酸纤维素包被膜 (3)、结合垫 (2)、样品垫 (1)、吸水垫 (4)。所述的结合垫 (2) 上包被有金标抗体 (a) 和金标抗体 (b),所述硝酸纤维素包被膜 (3) 有检测线和质控线,检测线 (T) 包被有 M2 型线粒体抗原蛋白 (5),质控线处 (C) 包被有抗体 (c),其中, M2 型线粒体抗原蛋白来源于商品化的纯化基因工程抗原蛋白,或者自行制备。

[0118] 将重组表达的 M2 型线粒体抗原蛋白引入到胶体金层析法肝病检测试纸,能实现血液样本中的 M2 型抗线粒体抗体的检测,能快速、便捷地辅助诊断原发性胆汁肝硬化。

[0119] 本发明所述的胶体金层析法肝病检测试纸,所用的试剂配制如下:

[0120] 1. 包被缓冲液的配制:9gNaCl、1.15gNa₂HPO₄、0.23g NaH₂PO₄、10gSucrose、0.5gEDTA 溶于 1L 超纯水中,过滤置于 4°C 备用。

[0121] 2. HAuCl₄ 的配制:用超纯水溶解氯金酸,配成 1% 溶液,置 4°C 备用,有效期四个月。1000mL 1% HAuCl₄ 溶液配方:10g HAuCl₄、超纯水定容至 1000mL。

[0122] 3. 1% 柠檬酸三钠 (Sodium Citrate) 的配制:用超纯水溶解 Sodium Citrate,配成 1% 溶液,0.22 μm 膜滤过,现配现用。

[0123] 4. 0.1MK₂CO₃ 的配制:用超纯水配制,0.22 μm 膜滤过,置 4°C 备用,有效期一个月。1000mL 0.1M K₂CO₃ 溶液配方:13.8g K₂CO₃;超纯水定容至 1000mL。

[0124] 5. 10% BSA 的配制:用超纯水配制,0.05% 叠氮钠 (NaN₃),0.22 μm 膜滤过,置 4°C 备用,有效期两周。1000mL 10% BSA 溶液配方:100gBSA,0.5g NaN₃;超纯水定容至 1000mL。

[0125] 6. 洗涤液也即保存液的配制：

[0126] 2% BSA、0.05% (NaN₃)、0.01M pH 7.2 PBS, 0.22 μm 膜滤过, 置 4℃ 备用, 有效期两周。1000mL 标记洗涤保存液配方: 20g BSA、0.5g NaN₃、0.01M pH 7.2 PBS 定容至 1000mL。

[0127] 7. 金标稀释液的配制：

[0128] 1000mL 稀释液的配制: 2.423g tris, 10gBSA, 0.2gNaN₃ 溶于超纯水中, 调 pH 8.0, 定容到 1000mL。

[0129] 用稀释液将金标稀释到工作浓度后, 加入 20% Sucrose 和 5% 的海藻糖。

[0130] 实施例十样本处理

[0131] 取全血 1 ~ 5ml, 自然凝集 5 分钟后, 3000 ~ 5000g/5min ~ 10min, 取上清即得到待测样品溶液, 至少有 100 μl 以上待测样品溶液。

[0132] 用微量加样器吸取以上血清 50 ~ 70 μl 样本于样品垫, 缓慢加样。或者用吸管将血清样本缓慢滴加 3 ~ 5 滴于样品垫上, 5 ~ 10min 观察结果, 根据条带出现情况来判读阴阳性结果。

[0133] 实施例十一试剂盒的检测和临床性能评估

[0134] 1. 稳定性试验

[0135] 1.1 37℃ 加速稳定性

[0136] 将试纸置于 37℃ 进行加速实验, 每天取出用室内质控品进行测试, 通过阴阳性参考品 (各 10 份) 的阴阳性符合率的批内精密度来判断试纸的稳定性。4 个月后结果显示, 质控品的检测结果符合预期, 各个阴阳性参考品的阴阳性符合率为 100%。阴阳性参考品为 10 份 M2 型抗线粒体抗体阳性血清和 10 份 M2 型抗线粒体抗体阴性血清。

[0137] 1.2 4℃ 稳定性实验

[0138] 将试纸置于 4℃ 进行常规稳定性实验, 每月取出用室内质控品测试, 同样通过阴阳性参考品 (各 10 份) 的阴阳性符合率的批内精密度来判断试纸的稳定性。12 个月后结果显示, 质控品检测结果符合预期, 各个阴阳性参考品的阴阳性符合率为 100%。18 个月后结果显示, 各个阴阳性参考品的阴阳性符合率仍为 100%。24 个月后检测结果显示, 出现一例假阴性。综合以上结果说明试纸在 2 ~ 8℃ 贮存, 2 年内是稳定的。

[0139] 2. 诊断灵敏度

[0140] 从临床中收集到 100 份确诊为原发性胆汁肝炎 (PBC) 病人的血清, 用自制的胶体金试纸按照说明书上的操作步骤对上面收集到的 PBC 病人血清进行检测。5min 后统计结果如下：

[0141]	临床确诊 PBC 病人	样本数	阴性	阳性
		100	9	91

[0142] 根据上面统计的结果, 根据对 100 份确认的 PBC 病人血清的检测, 可以发现 M2 型抗线粒体抗体阳性的样本数量为 91 例, 阴性样本数量为 9 例。因此通过计算得出：

[0143] 诊断灵敏性 (%) = $91 / (91 + 9) \times 100\% = 91\%$

[0144] 3. 诊断特异性

[0145] 从临床中收集到健康献血者血清和非 PBC 病人 (包括其他自身免疫性疾病如类风

湿关节炎和自免肝病人)血清各 300 份,用自制的胶体金试纸按照说明书上的操作步骤对上面收集到的健康献血者和非 PBC 病人的血清进行检测。5min 后统计结果如下:

[0146]	健康献血者血清	样本数	阴性	阳性
		300	296	4
	非 PBC 病人血清	样本数	阴性	阳性
		300	297	3

[0147] 根据对非 PBC 病人和健康献血者各 300 份血清的检测的统计结果,发现在健康献血者中测得 M2 型抗线粒体抗体阴性的样本数量为 296 例,而非 PBC 病人血清的 M2 型抗线粒体抗体阴性的样本数量为 297 例。因此通过计算得出:

[0148] (健康献血者)诊断特异性(%) = $296/300 \times 100\% = 98.6\%$

[0149] (非 PBC 病人血清)诊断特异性(%) = $297/300 = 99\%$

[0150] 600 例对照组(包括健康献血者和非 PBC 病人血清)

[0151] 诊断特异性(%) = $593/600 = 98.8\%$

[0152] 4. 诊断准确性

[0153] 根据上面诊断特异性和诊断灵敏度的统计,可以得到下面这个总表:

[0154]

测定结果	临床明确诊断 PBC 患者	非 PBC 患者和 健康献血者	合计
阳性	91	7	98
阴性	9	593	602
合计	100	600	700

[0155] 根据上面的统计表可以看到,对于确认 PBC 的病人血清,检测得到的阳性样本数为 98 例,对于 600 例健康献血者和非 PBC 病人血清中,检测到阴性样本为 593 例。

[0156] 即:诊断准确性 = $(91+593)/700 = 97.7\%$

[0157] 5. 批内不精确度

[0158] 选用生产的某一批试纸,同时选择四种不同浓度的血清(强、中、弱、阴性)各一份,每份血清做 10 个重复,5min 后观察结果。

[0159]

不同血清	阴性结果数	阳性结果数
强阳血清	0	10
中阳血清	0	10

[0160]

弱阳血清	0	10
阴性血清	10	0

[0161] 根据上面的结果得知,生产的同一批胶体金层析法肝病检测试纸,对四份稀释的不同浓度的血清检测,每个样本重复 10 次,均能够准确的分出阴阳性,得到一致的阴阳性结果。

[0162] 因此,得出以下结论:胶体金层析法肝病检测试纸没有存在批内不精密现象。

[0163] 6. 批间不精确度

[0164] 选用生产的三批不同的胶体金层析法肝病检测试纸,同时选择四种不同浓度的血清(强、中、弱、阴性)各一份,每份血清重复 10 次,5min 后观察结果。

[0165]

不同血清	第一批		第二批		第三批	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
强阳血清	0	10	0	10	0	10
中阳血清	0	10	0	10	0	10
弱阳血清	0	10	0	10	0	10
阴性血清	10	0	10	0	10	0

[0166] 根据上面的结果得知,生产的不同批次的三批胶体金层析法肝病检测试纸,对四份不同的血清检测,每个检测重复 10 次,均能够准确的分出阴阳性,得到一致的阴阳性结果。

[0167] 因此,得出以下结论:胶体金层析法肝病检测试纸没有存在批间不精密现象。

[0168] 7. 与同类检测项目不同方法学的产品-德国欧蒙公司生产的 M2 型抗线粒体抗体检测试剂盒(ELISA 法)的对比试验从临床收集随机患者样本血清 100 份,分别用欧蒙的 ELISA 试剂盒和自制胶体金层析法肝病检测试纸进行检测,得到以下结果:

检测方法和试剂		欧蒙 ELISA 试剂盒		
		阳性	阴性	合计
[0169] 自制胶体金试纸	阳性	56	1	57
	阴性	1	42	43
	合计	57	43	100

[0170] 阳性符合率: $56/57 \times 100\% = 98.2\%$

[0171] 阴性符合率: $42/43 \times 100\% = 97.6\%$

[0172] 总的符合率: $(56+42)/100 = 98\%$

[0173] 根据上面的统计,自制胶体金层析法肝病检测试纸和欧蒙的 ELISA 试剂盒总的符合率可以达到 98%。

[0174] 以上是对本发明的描述而非限定,基于本发明思想的其它实施方式,均在本发明的保护范围之内。

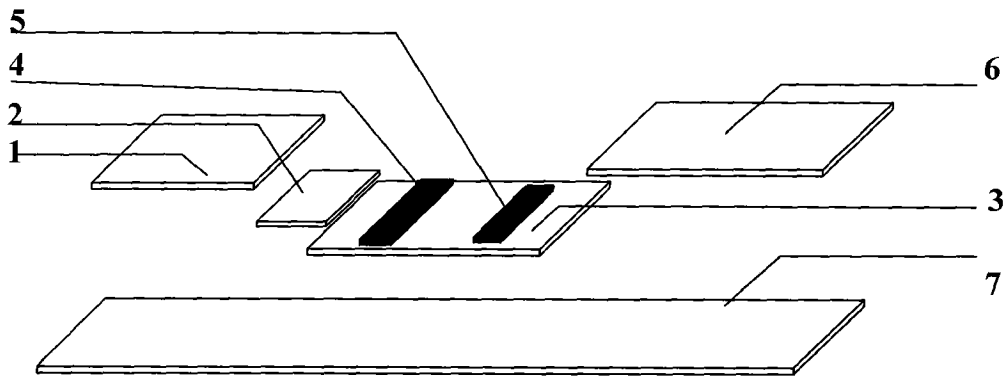


图 1

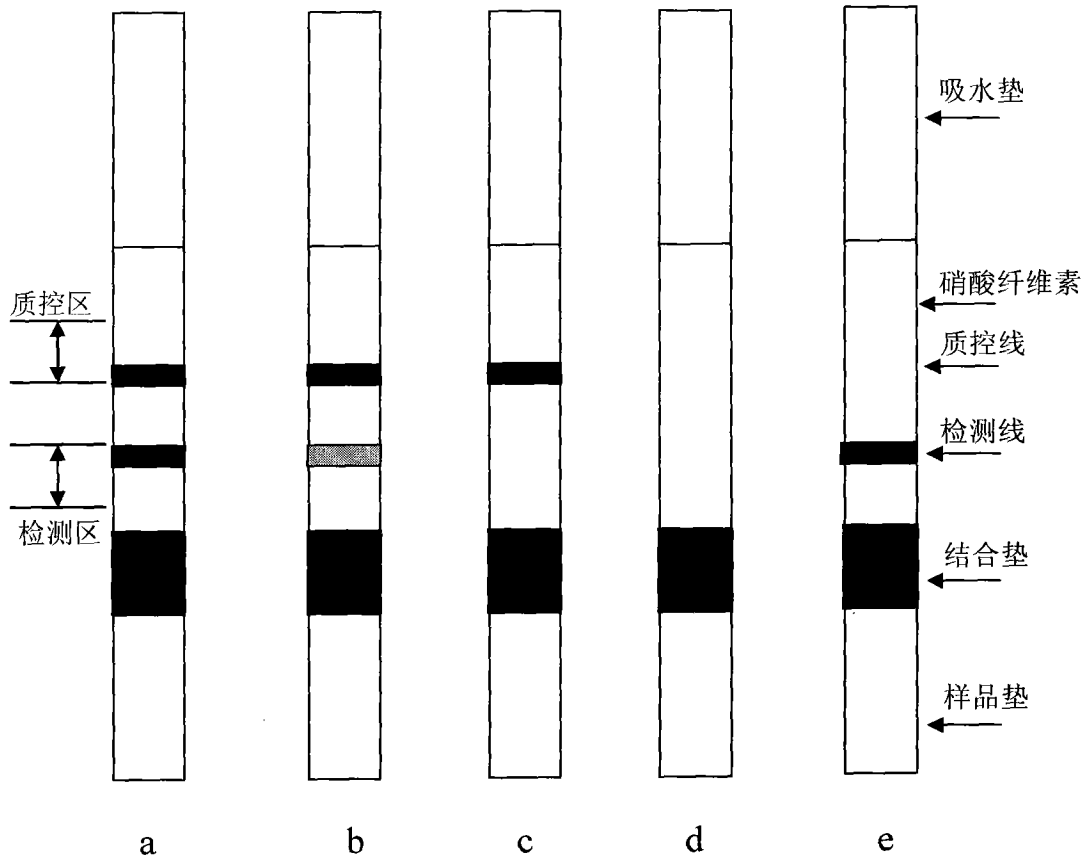


图 2

专利名称(译)	胶体金层析法肝病检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN102062777A	公开(公告)日	2011-05-18
申请号	CN200910198706.2	申请日	2009-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	上海科新生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海科新生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海科新生物技术股份有限公司		
[标]发明人	张玥 韩永俊 高成秀 杨超文 孙宏彬 孙潇 张宇婷 钱杰		
发明人	张玥 韩永俊 高成秀 杨超文 孙宏彬 孙潇 张宇婷 钱杰		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54386		
其他公开文献	CN102062777B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了胶体金层析法肝病检测试纸，以及制备方法。本发明所述的胶体金层析法肝病检测试纸，是在PVC塑料底板上顺次相互搭接地粘贴硝酸纤维素包被膜、结合垫、样品垫、吸水垫而形成的膜条，硝酸纤维素膜有检测线和质控线，检测线包被M2型线粒体抗原蛋白，质控线包被抗体(c)，结合垫包被金标抗体(a)和金标抗体(b)。本发明所述的试纸条引入M2型线粒体抗原蛋白，并对结合垫和样品垫进行了工艺优化，实现了对M2型抗线粒体抗体的高灵敏度、高特异、高准确性的检测性能。

