



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102103145 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201110044828. 3

G01N 33/532 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 24

审查员 张小勇

(73) 专利权人 南京基蛋生物科技有限公司

地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业  
开发区博富路 9 号

(72) 发明人 苏恩本 王勇 王路海 陈伟

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任  
公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

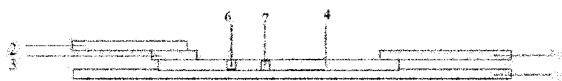
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种双放大系统的胶体金试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于医学临床即时检验领域,涉及一种双放大系统的胶体金试纸条及其制备方法。一种双放大系统的胶体金试纸条,包括试纸条底衬,以及试纸条底衬上顺次相互搭接粘贴的样品垫、涂覆有金标抗体的聚酯膜、包被膜及吸水纸,所述的包被膜中部平行设有一条包被链亲和素-待测抗原单克隆抗体F(ab)<sub>2</sub>片段的检测线和一条包被兔抗鼠IgG抗体的控制线,所述的样品垫中包被了待测抗原单克隆抗体F(ab)<sub>2</sub>片段-生物素,所述的金标抗体为胶体金标记ProteinA-待测抗原单克隆抗体。该试纸条具有特异性强,灵敏度高,检测速度快的优点,且不需使用仪器设备,成本低廉,操作简单,能广泛应用于待测抗原的检测,为及时发现和预见疾病,有效的进行检测奠定了基础。



1. 一种双放大系统的胶体金试纸条,包括试纸条底衬,以及试纸条底衬上顺次相互搭接粘贴的样品垫、涂覆有金标抗体的聚酯膜、包被膜及吸水纸,其特征在于所述的包被膜中部平行设有一条包被链亲和素-待测抗原单克隆抗体 F(ab)<sub>2</sub> 片段的检测线和一条包被兔抗鼠 IgG 抗体的控制线,所述的样品垫中包被了待测抗原单克隆抗体 F(ab)<sub>2</sub> 片段-生物素,所述的金标抗体为胶体金标记 ProteinA-待测抗原单克隆抗体;所述的链亲和素-待测抗原单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段为链亲和素与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段偶联后的结合产物;所述的胶体金标记 ProteinA-待测抗原单克隆抗体为胶体金标记的 ProteinA-心肌蛋白 I 单克隆抗体。

2. 一种权利要求 1 所述的胶体金试纸条的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 制备包被膜,用包被缓冲液稀释链亲和素-待测抗原单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段以及兔抗鼠 IgG 抗体,并将稀释后的两种抗体分别平行地喷于包被膜的中部,两种抗体渗入包被膜后分别形成待测抗原检测线和兔抗鼠 IgG 抗体的控制线;

2) 制备涂覆金标抗体的聚酯膜:由金颗粒标记 ProteinA,通过 ProteinA 与待测抗原的单克隆抗体的 Fc 片段非特异性结合,将待测抗原的单克隆抗体间接结合在金颗粒上;

3) 制备待测抗原单克隆抗体 F(ab)<sub>2</sub> 片段-生物素包被的样品垫;

4) 试纸条组装;

其中,所述的链亲和素-待测抗原单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段为链亲和素与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段偶联后的结合产物;

步骤 2) 所述的金标抗体为由胶体金颗粒标记 ProteinA,通过 ProteinA 与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的 Fc 段非特异性结合,将心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体放大的间接结合在胶体金颗粒上。

## 一种双放大系统的胶体金试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学临床即时检验领域,涉及一种双放大系统的胶体金试纸条及其制备方法,具体是涉及一种检测心肌肌钙蛋白 I 的胶体金试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 目前,全球每年有 1700 万人死于心血管疾病,其中有一半以上死于急性心肌梗死,我国急性心肌梗死发病率约为 0.02%~0.06%,每年死于急性心肌梗死的人数超过了 100 万,且发病人群出现“年轻化”趋势,心脑血管疾病现已成为我国人口死亡的主要原因,特别是由心肌梗死引起的缺血性心肌损伤的发病率逐年增加。因此早期对心肌损伤进行诊断和积极治疗至关重要,专家指出,抓住胸痛发作后 6 小时的“黄金时间”是治疗患者生命的关键,cTnI 因其出众的灵敏度及特异性,目前已被作为心肌损伤诊断的“金标准”,国内外将其广泛应用于急性心肌梗死的诊断、溶栓再通的判断、不稳定型心绞痛危险度分层及预后判断、急性心肌炎持续心肌损伤的临床监测等中。

[0003] 对心肌肌钙蛋白 I 的检测方法的很多,而免疫金标法是九十后发展起来的,因其快速,操作简便,试剂稳定,可室温储运,不易污染的特点得到广泛的应用。它是免疫亲和技术,印记技术,免疫标记和层析技术的组合。将包被抗体,胶体金标记抗体固相化,与样本吸附材料等组合在一起,制备出免疫层析诊断试条,使用时只需要将样品溶液滴加在试纸条上,10 分钟内就可以判断结果。

[0004] 由于胶体金存在灵敏度的问题,目前还没有进一步提高胶体金灵敏度的方法。针对这种技术背景,我们在现有的技术上开发了双放大系统。

### 发明内容:

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供了一种双放大系统的胶体金试纸条以解决现有技术存在的灵敏度和特异性问题。

[0006] 本发明的另一目的是提供该试纸条的制备方法。

[0007] 本发明的目的可采用以下技术方案予以实现:

[0008] 一种双放大系统的胶体金试纸条,包括试纸条底衬,以及试纸条底衬上顺次相互搭接粘贴的样品垫、涂覆有金标抗体的聚酯膜、包被膜及吸水纸,所述的包被膜中部平行设有一条包被链亲和素-待测抗原单克隆抗体 F(ab)<sub>2</sub> 片段的检测线和一条包被兔抗鼠 IgG 抗体的控制线,所述的样品垫中包被了待测抗原单克隆抗体 F(ab)<sub>2</sub> 片段-生物素,所述的金标抗体为胶体金标记 ProteinA-待测抗原单克隆抗体。

[0009] 所述的链亲和素-待测抗原单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段为链亲和素与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的 F(ab)<sub>2</sub> 片段偶联后的结合产物。

[0010] 所述的胶体金标记 ProteinA-待测抗原单克隆抗体为胶体金标记的 ProteinA-心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。

[0011] 上述的胶体金试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0012] 1) 制备包被膜,用包被缓冲液稀释链亲和素-待测抗原单克隆抗体的 $F(ab)_2$ 片段以及兔抗鼠 IgG 抗体,并将稀释后的二种抗体分别平行地喷于包被膜的中部,二种抗体渗入包被膜后分别形成待测抗原检测线和兔抗鼠 IgG 抗体的控制线;

[0013] 2) 制备涂覆金标抗体的聚酯膜:由金颗粒标记 ProteinA,通过 ProteinA 与待测抗原的单克隆抗体的 Fc 片段非特异性结合,将待测抗原的单克隆抗体间接结合在金颗粒上;

[0014] 3) 制备待测抗原单克隆抗体  $F(ab)_2$  片段-生物素包被的样品垫;

[0015] 4) 试纸条组装。

[0016] 所述的链亲和素-待测抗原单克隆抗体的  $F(ab)_2$  片段为链亲和素与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的  $F(ab)_2$  片段偶联后的结合产物。

[0017] 步骤 2) 所述的金标抗体为由胶体金颗粒标记 ProteinA,通过 ProteinA 与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的 Fc 段非特异性结合,将心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体放大的间接结合在胶体金颗粒上。

[0018] 有益效果及其原理:本发明的胶体金试纸条利用胶体金免疫层析技术,当待测抗原流经样品垫时,被样品垫中的待测抗原单克隆抗体的  $F(ab)_2$  片段-生物素的中的  $F(ab)_2$  片段捕获,被  $F(ab)_2$  片段捕获的待测抗原流经到聚酯膜上,待测抗原的另一个位点被聚酯膜上涂覆的金标抗体所捕获,形成抗体-抗原-抗体的复合物。由于 ProteinA 与待测抗原的单克隆抗体的 Fc 段具有强烈的结合能力,本发明先利用胶体金标记 ProteinA,然后再通过 ProteinA 与待测抗原的单克隆抗体的 Fc 段结合从而使待测抗原的单克隆抗体间接放大结合在金颗粒上,这种结合方式能增强胶体金与待测抗原的单克隆抗体的结合力,克服常规方法中因胶体金直接标记待测抗原的单克隆抗体而引起的胶体金与待测抗原单克隆抗体结合能力不强,以及单克隆抗体与待测抗原结合的位点容易被胶体金占据,造成特异性下降的缺陷。本发明金标抗体的改进,一方面可以大大提高灵敏度,另一方面可以提高特异性,这是第一次放大。抗体-抗原-金标抗体复合物在毛细效应下向上层析,随后生物素会在与检测线 6 中的链亲合素结合,由于链亲合素 4 个亚基能结合 4 个分子的生物素,因此形成第二次放大。由于链亲合素不易固定在硝酸纤维素包被膜上,而抗体片段可以很容易固定在包被膜上。所以检测线 6 中的待测抗原单克隆抗体的  $F(ab)_2$  片段起到将链亲合素间接固定在包被膜上的作用。多余的金标抗体继续层析到控制线位置,由于鼠源心肌肌钙单克隆抗体和兔抗鼠 IgG 抗体发生免疫反应,从而使控制线因桥连胶体金而显色,因此不论样品中是否含有待测抗原,只要试纸条能正常使用,控制线都会显色。两次放大能够大大提高灵敏度和特异性,为待测抗原的检测和预见提供了更准确的结果。该试纸条具有特异性强,灵敏度高,检测速度快的优点,且不需使用仪器设备,成本低廉,操作简单,能广泛应用于待测抗原的检测,为及时发现和预见疾病,有效的进行检测奠定了基础。

#### 附图说明

[0019] 图 1 本发明的胶体金试纸条的横断面结构示意图;

[0020] 其中:1. 底衬;2. 样品垫;3. 聚酯膜;4. 包被膜;5. 吸水纸;6. 检测线;7. 控制线。

#### 具体实施方式

[0021] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0022] 实施例 1

[0023] 如图 1 所示,一种双放大系统的胶体金试纸条,包括试纸条底衬 1,以及试纸条底衬 1 上顺次相互搭接粘贴的样品垫 2、涂覆有金标抗体的聚酯膜 3、包被膜 4 及吸水纸 5,包被膜 4 上包被有检测线 6 和控制线 7,包被膜 4 中部平行设有一条包被链亲和素-心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段的检测线 6 和一条包被兔抗鼠 IgG 抗体的控制线 7,样品垫 2 中包被了鼠源性心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段-生物素,金标抗体为由金颗粒标记 ProteinA,通过 ProteinA 与心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 M155 的 Fc 段非特异性结合,将心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 M155 放大的间接结合在金颗粒上。以上链亲和素,4C2 单克隆抗体, M155 单克隆抗体,兔抗鼠 IgG 抗体均购自 Fitzgerald 公司。

[0024] 胶体金试纸条的具体制备方法如下:

[0025] 包被膜的制备:

[0026] 包被缓冲液的制备:将 0.025M, pH7.4 的 PBS,用 0.22μ 膜过滤,置于 4℃ 备用,有效期 7 天。

[0027] 封闭液的制备:将含 1% BSA,1% 蔗糖,0.025M, pH7.5 的 PBS,用 0.22μ 膜过滤,置于 4℃ 备用,有效期为 3 天。

[0028] 心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段的制备:单克隆抗体 4C2 经胰蛋白酶酶切,过 SPA-SepharoseCL-4B 凝胶层析柱除去 Fc 片段,收集 F(ab)<sub>2</sub> 片段。

[0029] 链亲和素-F(ab)<sub>2</sub> 片段的制备:将链亲和素和单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段通过戊二醛化学偶联,然后利用亲和层析柱进行纯化得到。

[0030] 链亲和素-F(ab)<sub>2</sub> 片段检测线 6 的制备:将抗体 F(ab)<sub>2</sub> 片段按 4mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 0.4ml/min,划线速度 50m/20min,在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时。

[0031] 控制线 7 的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 8mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 0.4ml/min,划线速度 50m/20min,在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时。

[0032] 包被膜 4 制备:用上述封闭液将含有检测线 6 和控制线 7 的硝酸纤维素膜于 37℃ 封闭 60 分钟,取出后置 37℃ 下烘干处理两个小时,封袋备用。

[0033] 涂覆金标抗体的聚酯膜 3 的制备:

[0034] 氯金酸水溶液的配制:将 10g 氯金酸 1000ml 的三蒸水溶解,配成 1% 的水溶液,置于 4℃ 备用,有效期 3 个月。

[0035] 柠檬酸三钠的配制:用三蒸水溶解柠檬酸三钠,配成 1% 的水溶液,用 0.22μ 膜滤过,置于 4℃ 备用,有效期 7 天。

[0036] 1% 碳酸钾水溶液的配制:将 1g 碳酸钾用 100ml 用三蒸水溶解,用 0.22μ 膜滤过,置于 4℃ 备用,有效期为 7 天。

[0037] 金标抗体保存液的配制:将 15g 的蔗糖,20μl 的叠氮钠,在 100ml 的 pH = 7.4 的 1% BSA 溶解,用 0.22μ 膜滤过,置于 4℃ 备用,有效期为 7 天。

[0038] 胶体金的颗粒的制备:用三蒸水将 1% 氯金酸稀释成 0.01%,置于 95℃ 反应 10 分钟,加入 1ml 柠檬酸三钠,继续反应 15 分钟,待胶体金溶液颜色由蓝经紫变红后,冷却后加入 2ml 1% 碳酸钾溶液备用。外观应纯净,透亮,无沉淀和漂浮物。

[0039] 金标抗体的制备:用 1% 碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 7.5,按 20 微克 ProteinA/

ml 的胶体金加入 ProteinA, 混匀后反应 15 分钟, 以 10000rpm 离心 10 分钟, 去上清液, 沉淀用 1% BSA 封闭洗涤两次, 最后一次去上清液, 将沉淀用十分之一的 1% pH = 7.4 的 BSA 溶解, 然后按 5ug 抗体 /ml 胶体金加入心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体, 混匀反应 15 分钟, 用标记洗涤液洗涤两次, 再用金标抗体保存液溶解。置于 4℃ 备用, 有效期为 7 天。

[0040] 将标记好的胶体金均匀的铺在聚酯膜上, 喷量为 0.9ul/cm\*3 道, 干燥, 封袋, 备用。

[0041] 样品垫的处理: 将样品垫用 100mMPBS 缓冲液浸泡数小时, 取出干燥后, 按 20ug- 鼠源性心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段 - 生物素 / 每根样品垫 (22mm\*300mm) 的量喷涂鼠源性心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段 - 生物素。

[0042] 底衬 1, 样品垫 2 和吸水纸 5 是本领域通用的部件。将上述样品垫 2、涂覆有金标抗体的聚酯膜 3、包被膜 4 及吸水纸 5 顺次相互搭接粘贴得到试纸板, 最后将试纸板切割成不同宽度的试纸条即可。

[0043] 上述的胶体金试纸条在检测心肌肌钙蛋白 I 的应用。

[0044] 本试纸条可以用来检测心肌肌钙蛋白 I 的液体样品, 操作时, 将全血、血浆或血清滴加在本试纸条的样品垫 2 上, 当出现的结果是在试纸条的检测线 6 和控制线 7 位置上各出现一条紫红色条带时, 为阳性结果, 表明样品中含有心肌肌钙蛋白 I; 仅试纸条的控制线 7 位置上出现一条紫红色条带时, 为阴性结果, 表明样品中含有心肌肌钙蛋白 I 或其中所含心肌肌钙蛋白 I 的浓度在本试纸条的检测下限以下; 在试纸条的控制性 8 位置上未出现紫红色条带时为无效结果。

[0045] 实施例 2 采用常规方法的胶体金试纸条的具体制备方法如下:

[0046] 心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 和 M155 (配对抗体), 均购自 Fitzgerald。

[0047] 包被膜的制备:

[0048] 1) 包被缓冲液的制备: 将 0.025M, pH7.4 的 PBS, 用 0.22u 膜过滤, 置于 4℃ 备用, 有效期 7 天。

[0049] 2) 封闭液的制备: 将含 1% BSA, 1% 蔗糖, 0.025M, pH7.5 的 PBS, 用 0.22U 膜过滤, 置于 4℃ 备用, 有效期为 3 天。

[0050] 3) 单克隆抗体 4C2 的 F(ab)<sub>2</sub> 段的制备: 单克隆抗体经胰蛋白酶酶切, 过 SPA-SepharoseCL-4B 凝胶层析柱除去 Fc 片段, 收集 F(ab)<sub>2</sub> 片段。

[0051] 4) F(ab)<sub>2</sub> 段检测线 6 的制备: 将抗体按 4mg/ml 的浓度, 蠕动泵授液量 0.4ml/min, 划线速度 50m/20min, 在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时。

[0052] 5) 控制线 7 的制备: 将兔抗鼠 IgG 抗体按 8mg/ml 的浓度, 蠕动泵授液量 0.4ml/min, 划线速度 50m/20min, 在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时。

[0053] 6) 包被膜 4 制备: 用上述封闭液将含有检测线和控制线的硝酸纤维素 NC 膜于 37℃ 封闭 60 分钟, 取出后置 37℃ 下烘干处理两个小时, 封袋备用。

[0054] 涂覆金标抗体的聚酯膜的制备:

[0055] 1) 氯金酸水溶液的配制: 将 10g 氯金酸 1000ml 的三蒸水溶解, 配成 1% 的水溶液, 置于 4℃ 备用, 有效期 3 个月。

[0056] 2) 柠檬酸三钠的配制: 用三蒸水溶解柠檬酸三钠, 配成 1% 的水溶液, 用 0.22U 膜过滤, 置于 4℃ 备用, 有效期 7 天。

[0057] 3) 1% 碳酸钾水溶液的配制 : 将 1g 碳酸钾用 100ml 用三蒸水溶解, 用 0.22U 膜滤过, 置于 4℃ 备用, 有效期为 7 天。

[0058] 4) 金标抗体保存液的配制 : 将 15g 的蔗糖, 20ul 的叠氮钠, 在 100ml 的 pH = 7.4 的 1% BSA 溶解, 用 0.22U 膜滤过, 置于 4℃ 备用, 有效期为 7 天。

[0059] 5) 胶体金的颗粒的制备 : 用三蒸水将 1% 氯金酸稀释成 0.01%, 置于 95℃ 反应 10 分钟, 加入 1ml 柠檬酸三钠, 继续反应 15 分钟, 待胶体金溶液颜色由蓝经紫变红后, 冷却后加入 2ml 1% 碳酸钾溶液备用。外观应纯净, 透亮, 无沉淀和漂浮物。

[0060] 6) 金标抗体的制备 : 用 1% 碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 7.5, 按 20 微克单克隆抗体 M155/ml 的胶体金加入, 混匀后反应 15 分钟, 以 10000rpm 离心 10 分钟, 去上清液, 沉淀用 1% BSA 封闭洗涤两次, 用标记洗涤液洗涤两次, 再用金标抗体保存液溶解, 置于 4℃ 备用, 有效期为 7 天。

[0061] 7) 将标记好的胶体金均匀的铺在聚酯膜上, 喷量为 0.9ul/cm\*3 道, 干燥, 封袋, 备用。

[0062] 底衬 1, 样品垫 2 和吸水纸 5 是本领域通用的部件。将上述样品垫 2、涂覆有金标抗体的聚酯膜 3、包被膜 4 及吸水纸 5 顺次相互搭接粘贴得到试纸板, 最后将试纸板切割成不同宽度的试纸条即可。

[0063] 两种方法灵敏度和特异性比较

[0064]

	浓度1ng/ml	浓度4ng/ml	浓度8ng/ml	浓度16ng/ml	浓度32ng/ml	特异性 (100例)
常规方法	-	+-	+	++	+++	92%
双放大系统	+	++	+++	++++	+++++	99%

[0065] 备注 : “+” 表示阳性结果, “+” 的数量表示显色程度即阳性的严重程度, 越多代表显色越深即阳性严重度越高, “-” 表示不显色即阴性结果。

[0066] 由上表可见本发明双方大系统的胶体金试纸条能显著提高检测灵敏度和特异性。

[0067] 本发明所述的待测抗原的单克隆抗体并不局限于实施例中所使用的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 和 M155, 任何能与待测抗原或抗体结合的抗体或抗原均可以应用于本发明双放大系统。另外, 本发明不局限于应用在胶体金领域, 也可以用于荧光领域和胶乳领域的免疫反应。

[0068] 在以上的实施例中, 未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0069] 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非是对本发明作其它形式的限制, 任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容, 依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型, 仍属于本发明技术方案的保护范围。

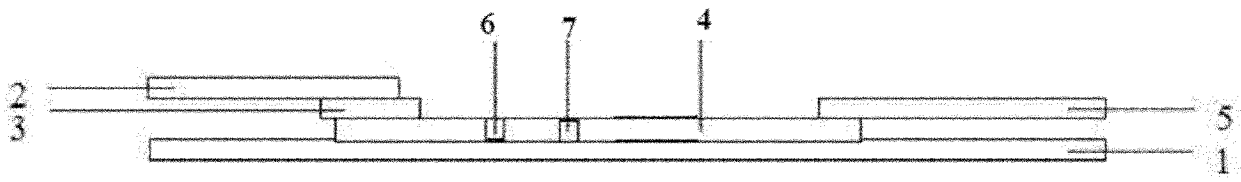


图 1