



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112698027 B

(45) 授权公告日 2022.04.01

(21) 申请号 202011463142.3

审查员 石维平

(22) 申请日 2020.12.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112698027 A

(43) 申请公布日 2021.04.23

(73) 专利权人 广东唯实生物技术有限公司

地址 523808 广东省东莞市松山湖园区桃
园路1号1栋403室

(72) 发明人 刘丽萍 于鸪 李斌 陈展佳

迟晨

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种半抗原免疫层析检测试剂

(57) 摘要

本发明提供了一种新的半抗原侧向免疫检测方法,包括层析试纸条和反应剂,通过载体蛋白抗体和载体蛋白的特异性结合和半抗原抗体与半抗原的特异性结合不仅克服了半抗原在侧向免疫层析上包被难的问题,并且提高了半抗原的检测灵敏度和检测范围。

1. 一种半抗原免疫层析检测试剂,包括层析试纸条和试剂A,层析试纸条包括:样本垫、结合垫、层析膜、吸水垫以及背衬板,所述层析膜包括检测线与质控线,其特征在于,所述半抗原是维生素D或吗啡,所述结合垫上包被有维生素D-BSA或吗啡-BSA,所述检测线上包被有抗BSA抗体,所述试剂A中含有标记物标记的维生素D抗体或吗啡抗体。

2. 根据权利要求1所述的半抗原免疫层析检测试剂,其特征在于,所述标记物为小分子荧光素、荧光蛋白、荧光染料、稀土离子及其螯合剂、半导体纳米微晶粒、胶体金或胶体银。

3. 根据权利要求1所述的半抗原免疫层析检测试剂,其特征在于,所述试剂A中含有标记物标记的维生素D抗体或吗啡抗体,抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体。

4. 一种半抗原免疫层析检测方法包括以下步骤:

(1) 待检测样品与标记物标记的半抗原抗体反应,结合成半抗原-抗体结合物;

(2) 将步骤(1)中的反应试剂加载到权利要求1所述的层析试纸条上,使得待检测样品中的半抗原与试纸条上的半抗原-载体蛋白竞争性结合标记物标记的半抗原抗体;

(3) 标记的半抗原抗体-半抗原-载体蛋白与检测线上的载体蛋白抗体结合;

其特征在于,所述半抗原是维生素D或吗啡,载体蛋白是BSA。

5. 根据权利要求4所述的半抗原免疫层析检测方法,其特征在于,所述待检测样品是血清、血浆、尿液、唾液或组织液。

一种半抗原免疫层析检测试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及一种半抗原免疫层析检测试剂及检测方法。

背景技术

[0002] 免疫层析技术基本原理就是通过毛细作用及虹吸作用使待检样品溶液在层析条上迁移,迁移过程中层析材料上包被的检测物(抗原或抗体)对待检样品进行亲和特异识别,形成免疫复合物后,滞留在检测线上,通过对标记物颜色的深浅或荧光的光密度分析,从而得到直观的检测结果。待包被检测物消耗完全,剩余游离标记物会越过检测区,最后迁移至质控区再与另一检测物免疫结合形成直观显色。

[0003] 免疫层析试纸条主要包含五个部分:加样区(样品垫)、标记区(结合垫)、显示区(硝酸纤维素膜)、吸水区(吸水垫)以及背衬板。

[0004] 样品垫可以是纤维素、玻璃纤维、人造纤维等等滤过性介质,主要目的是过滤样本中的颗粒、调节样本的pH以及结合样本中干扰随后层析反应的成分;结合垫可以是玻璃纤维、聚酯纤维或者人造纤维,主要目的是装载标记物如纳米金标记单抗、二抗等并在层析检测中稳定地释放这些标记物;硝酸纤维素膜的主要作用是固化抗原或者抗体等并提供层析检测反应的场所,在免疫层析实验中主要用接触式或非接触式点样仪在膜上线状固化抗原或抗体等形成检测线(T线)和质控线(C线);吸水垫一般为高密度的纤维素,是层析反应的动力源,控制着层析反应中待检样品持续流动的方向;背衬则为聚苯乙烯或者其他塑料材料,用于为免疫层析试纸条的层叠结构提供刚性支持。

[0005] 当样品垫加入待检样品如血清、尿液等,如果待检样品中有靶分子,则与结合垫中的标记物反应形成复合物,在毛细作用下通过硝酸纤维素膜向吸收垫方向流动,并被硝酸纤维素膜上固化的相应的抗原或抗体等配体分子捕获(捕获位置分别在检测线和质控线上)而被肉眼或者与标记物对应的设备检测到。

[0006] 荧光免疫层析法虽操作简单,但灵敏度较低并受人为主观因素影响较大。而酶联免疫法、免疫比浊法、液相色谱-质谱法和化学发光法虽然灵敏度高,但是检测成本也较高,操作复杂,需要特定仪器才能进行检测。

[0007] 半抗原通常都是小分子物质,由于半抗原分子量小不能直接固定于NC膜上,现有技术常常用化学方法把半抗原、偶联到BSA等大分子物质上再固定于NC膜上。但是存在检测灵敏度低,存在样本基质效应。

[0008] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0009] 定义

[0010] 本文所用的“半抗原”指的是某些小分子物质,其单独不能诱导免疫应答,即不具备免疫原性,但当其与大分子蛋白质载体交联或结合后可获得免疫原性,诱导免疫应答。这

些小分子物质可与应答效应产物结合,具备抗原性,它只有免疫反应性,不具免疫原性。常见的半抗原有:维生素D、吗啡等。

[0011] 本文中使用的术语“标记物”,是指可以产生检测信号,并能够和生物材料偶联的化合物,包括但不限于小分子荧光素、荧光蛋白、荧光染料、稀土离子及其螯合剂、半导体纳米微晶粒、胶体金、胶体银等。

[0012] 本文使用的术语“抗体”,包括各种动物源的单克隆抗体、多克隆抗体以及抗体片段等,包括不同的抗体种类,例如免疫球蛋白G、免疫球蛋白A、免疫球蛋白E、免疫球蛋白M、免疫球蛋白D和免疫球蛋白Y。

[0013] 本文中使用的术语“半抗原-载体蛋白”,是指半抗原通过共价键与载体蛋白连接形成的化合物,常用的连接方法有碳化二亚胺法、马来酰亚胺法、戊二醛法等。

[0014] 本文中使用的术语“维生素D”、“25-羟基维生素D3”、“VD3”都是指维生素D。

[0015] 本发明所要解决的技术问题在于针对上述现有技术的不足,提供一种检测半抗原的试剂。该试剂是基于竞争性免疫结合原理,采用侧向层析法检测半抗原,其检测方法简单、灵敏度高、检测成本低廉,适合在基层医院、诊所以及体检中心等单位使用。

[0016] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种半抗原免疫层析检测试剂,包括层析试纸条和反应剂,层析试纸条包括:样本垫、结合垫、层析膜、吸水垫以及背衬板,所述层析膜包括检测线与质控线,其特征在于,所述结合垫上包被有半抗原-载体蛋白,所述检测线上包被有抗载体蛋白抗体,所述反应剂中含有标记物标记的半抗原抗体。

[0017] 上述的一种半抗原免疫层析检测试剂,所述载体蛋白为BSA,抗载体蛋白抗体为抗BSA免疫球蛋白。

[0018] 上述的一种半抗原免疫层析检测试剂,所述载体蛋白为鸡卵白蛋白,抗载体蛋白抗体为抗鸡清白蛋白免疫球蛋白。

[0019] 上述的一种半抗原免疫层析检测试剂,所述载体蛋白为血蓝蛋白,抗载体蛋白抗体为抗血蓝蛋白免疫球蛋白。

[0020] 上述的一种维生素D免疫层析检测试剂,所述维生素D为25-羟基维生素D3。

[0021] 上述质控线上包被的是本领域技术人员通常使用的质检二抗,可以是单克隆抗体也可以是多克隆抗体。

[0022] 本发明还提供一种半抗原免疫层析检测方法,包括以下步骤:

[0023] (1) 待检测样品与标记物标记的半抗原抗体反应,结合成半抗原-抗体结合物;

[0024] (2) 将步骤(1)中的反应试剂加载到权利要求1所述的层析试纸条上,使得待检测样品中的半抗原与试纸条上的半抗原-载体蛋白竞争性结合标记物标记的半抗原抗体;

[0025] (3) 标记的半抗原抗体-半抗原-载体蛋白与检测线上的载体蛋白抗体结合。

[0026] 进一步的所述待检测样品可以是血清、血浆、尿液、唾液、组织液。

[0027] 本发明提供一种维生素D免疫层析检测试剂,包括层析试纸条和反应剂,层析试纸条包括:样本垫、结合垫、层析膜、吸水垫以及背衬板,所述层析膜包括检测线与质控线,其特征在于,所述结合垫上包被有维生素D-BSA,所述检测线上包被有抗BSA抗体,所述反应剂中含有标记物标记的维生素D抗体。

[0028] 本发明还提供一种吗啡免疫层析检测试剂,包括层析试纸条和反应剂,层析试纸条包括:样本垫、结合垫、层析膜、吸水垫以及背衬板,所述层析膜包括检测线与质控线,其

特征在于,所述结合垫上包被有维吗啡-BSA,所述检测线上包被有抗BSA抗体,所述反应剂中含有标记物标记的吗啡抗体。

[0029] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

[0030] 1、本发明的半抗原免疫层析检测试剂是基于竞争性免疫结合原理,采用侧向层析法检测半抗原浓度,其检测方法简单、灵敏度高、检测成本低廉、可降低基质反应,适合在基层医院、诊所以及体检中心等单位使用。

[0031] 2、本发明的试剂使用方便,操作简单,灵敏度高,检测速度快,容易普及到基层医疗单位使用,满足市场需求。

[0032] 3、本发明的试纸条不仅可采用胶体金颗粒作为标记物,还可采用荧光化学物质、染色剂、乳胶颗粒、酶或磁性颗粒作为标记物,按照常规方法进行的偶联物的标记。

[0033] 下面结合附图和实施例,对本发明的技术方案作进一步的详细描述。

附图说明

[0034] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0035] 图1为本发明免疫层析检测试剂中试纸条的结构示意图;

[0036] 图2为本发明实验组和对照组检测灵敏度对比图;

[0037] 图3为本发明实验组和对照组与发光法检测结果对比图。

具体实施方式

[0038] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0039] 除非本文另有定义,连同本发明使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应当清晰,然而,在任何潜在不明确性的情况下,本文提供的定义优先于任何字典或外来定义。此外,术语“包括”及其他形式的使用是非限制性的。

[0040] 实施例1维生素D(25-羟基维生素D3)与载体蛋白的偶联物的制备

[0041] 将1mg维生素D(25OHD33-HS,购于TorontoResearchChemicals)溶解于100 μ L有机溶剂(正己烷、乙腈、二甲基亚砷)中,然后向10mL浓度为0.1mg/mL的载体蛋白(牛血清白蛋白BSA,或鸡卵清白蛋白OVA或血蓝蛋白)溶液中逐滴加入溶解后的维生素D,再逐滴加入体积百分比浓度为50%的戊二醛水溶液至溶液中戊二醛的体积百分比浓度为1%,搅拌5min后移至4 $^{\circ}$ C下搅拌反应16h,反应后的反应液在4 $^{\circ}$ C下透析8h至PBS缓冲液中,透析过程中换液2~3次,透析物离心后取上清液,最后将上清液用0.45 μ m滤膜过滤,得到维生素D与载体蛋白的偶联物,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0042] 实施例2荧光素标记维生素D(25-羟基维生素D3)抗体

[0043] 以0.01mol/LPBS (pH7.0) 调整抗体浓度到20mg/ml;取相当于蛋白量1/100的FITC (购自Sigma公司),溶解于相当蛋白溶液1/10体积的0.5mol/L碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 中;在搅拌条件下将FITC缓慢的加入抗体中,20℃,磁力搅拌标记4h。标记完成后Sephadex G-50凝胶过滤纯化得到带荧光素标记的维生素D抗体,分装至50ng/管-500ng/管冻干(优选100ng/管-400ng/管、优选200ng/管-300ng/管), -20℃保存备用。

[0044] 实施例3维生素D与载体蛋白的偶联物结合垫的制备

[0045] 将玻纤膜(Ahlstrom8964) 剪成5mm宽的长条,将剪好的玻纤膜置于平坦干净的玻璃板上,将实施例1制备的维生素D与载体蛋白的偶联物用稀释液稀释1.5倍,然后按每试纸条20μL~50μL的量均匀地加在玻纤膜上,使玻纤膜均匀浸透,在37℃烘干(60分钟),防潮避光保存备用,所述稀释液为含有蔗糖、Tween-20和PEG20000的四硼酸钠溶液,稀释液中四硼酸钠的浓度为2mM~20mM,每100mL稀释液中含有0.5g~10g蔗糖,0.1mL~1mLTween-20和0.5g~5gPEG20000。

[0046] 实施例4层析膜的制备

[0047] 层析膜选醋酸纤维素膜(milliporeHF13502),裁成30mm宽的条形;检测T线上包被抗载体蛋白抗体(抗BSA抗体或抗鸡卵白蛋白抗体或抗抗血蓝蛋白抗体),包被浓度0.25mg/mL~5mg/mL,按2μL/试纸条抗体量制备,当采用的载体蛋白为牛血清白蛋白时,质控C线上包被羊抗鼠抗体,包被浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL,将裁好的醋酸纤维素膜固定于干净的有机玻璃板上,应用划膜仪(上海杰一生物科技公司)制备检测T线以及质控C线,检测T线与质控C线间距1cm;将制备好的层析膜在室温下真空干燥1小时,密封避光防潮保存。

[0048] 实施例5组装试纸条及试剂

[0049] 试纸条支撑板1购于上海杰一生物科技公司,支撑板1长7.8cm,宽5mm;将实施例4制备的层析膜裁成宽5mm,长3cm的层析膜,使检测T线位于层析膜的中央;样品垫尺寸5mm×2.3cm,吸收垫尺寸5mm×2.0cm;将样品垫、结合垫、层析膜和吸收垫依次粘贴于支撑板上,样品垫和结合垫之间、结合垫和层析膜之间以及层析膜和吸收垫之间均有1mm~2mm的重叠,得到快速检测维生素D的试纸条,配套实施例2中制备的荧光素标记维生素D(25-羟基维生素D3)抗体组合成本发明的维生素D免疫层析检测试剂。2℃~8℃的环境中避光防潮储存,有效期12个月。

[0050] 实施例7维生素D试纸条的应用

[0051] 实验组:实施例5组装的试剂

[0052] 对照组:南京岚煜生物25-羟基维生素D3检测试剂盒,该试剂盒结合垫上包被的是标记25-羟基维生素D3羊单克隆抗体的荧光微球,T线上包被的是VD3-BSA全抗原。

[0053] 1) 临床样品检测结果见表1。

[0054] 表1临床样品检测结果

临床样本浓度(ng/mL)	C/T	
	实验组	对照组
6.51	0.1649	1.2624
8.36	0.2266	1.3016
11.63	0.3938	1.4603
18.73	0.7462	1.7391
30.41	1.6937	2.2507
45.97	3.5303	3.0843
67.58	6.5762	4.2627
89.47	9.1479	5.8724

[0055] 结果显示,使用实验组比对照组的C/T范围更广,各浓度间区分度更好,灵敏度更高。

[0057] 2) 用梯度浓度维生素D标准样品评价本发明与化学发光法检测的符合度

[0058] 表2与发光法比较

质控品浓度 (ng/mL)	结果 (ng/mL)		
	实验组	化学发光试剂	对照组
5	5.6	5.15	3.21
10	11.54	10.37	8.19
30	27.13	29.17	23.5
50	53.07	49.39	39.4
70	66.24	68.06	52.57
90	83.75	91.24	72.17

[0060] 结果显示,本发明提供的试剂与对化学发光法试剂性能接近,符合度高。

[0061] 实施例8用浓度为30.00ng/mL和70.00ng/mL的维生素D标准品,重复检测3次,并计算偏差。

[0062] 偏差检测结果见表2。

[0063] 表3偏差检测

维生素D浓度 (ng/mL)	检测结果 (ng/mL)	偏差
30	30.57	1.90%
30	32.07	6.90%
30	28.34	-5.53%
70	76.15	8.79%
70	71.39	1.99%
70	73.48	4.97%

[0065] 按本发明的方法制备的试剂偏差可控制在 $\pm 10\%$ 以内,准确度好。

[0066] 实施例9按照上述实施例1-6的制备方法,制备基于本发明同样设计原理的检测吗啡的检测试剂,检测试剂包括单独分装的荧光素标记的吗啡抗体以及检测试剂卡,试剂卡结合垫上包被有吗啡-BSA蛋白,层析膜上的T线包被有抗BSA抗体。

[0067] 实施10吗啡试纸条的应用

[0068] 实验组:实施例9组装的试剂

[0069] 对照组：广州万孚生物技术股份有限公司吗啡检测试剂盒，该试剂盒结合垫上包被的是标记吗啡羊单克隆抗体的荧光微球，T线上包被的是吗啡-BSA全抗原。

[0070] 1) 标准样品检测结果见表1。

[0071] 表4标准样品检测结果

临床样本浓度(ng/mL)	C/T	
	实验组	对照组
200	0.1547	1.3654
300	0.2386	1.3802
400	0.3975	1.4213
500	0.7512	1.6511
1000	1.7134	2.1957
1500	3.6112	3.1347
2000	6.4982	4.1871
3000	9.6494	5.7382

[0073] 结果显示，使用实验组比对照组的C/T范围更广，各浓度间区分度更好，灵敏度更高。

[0074] 最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

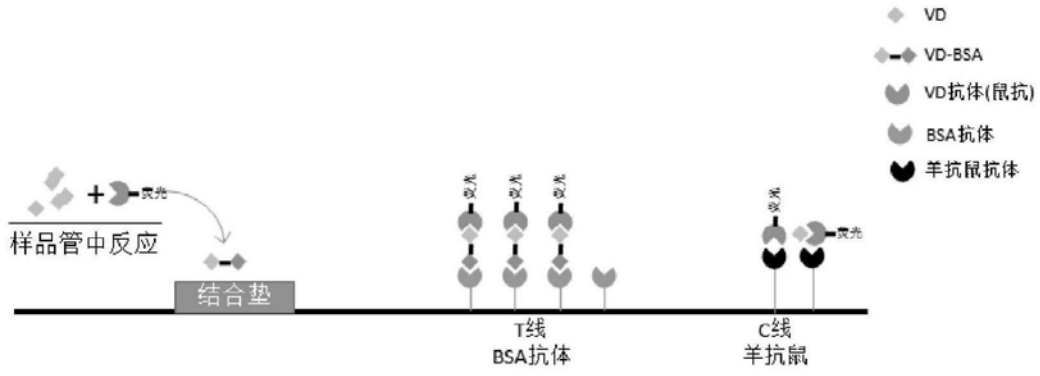


图1

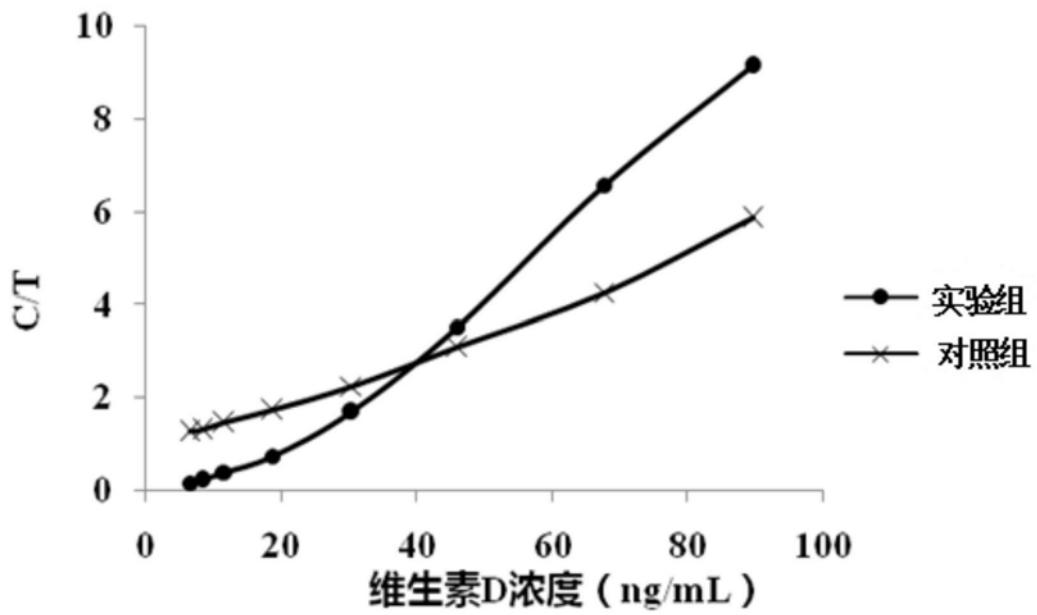


图2

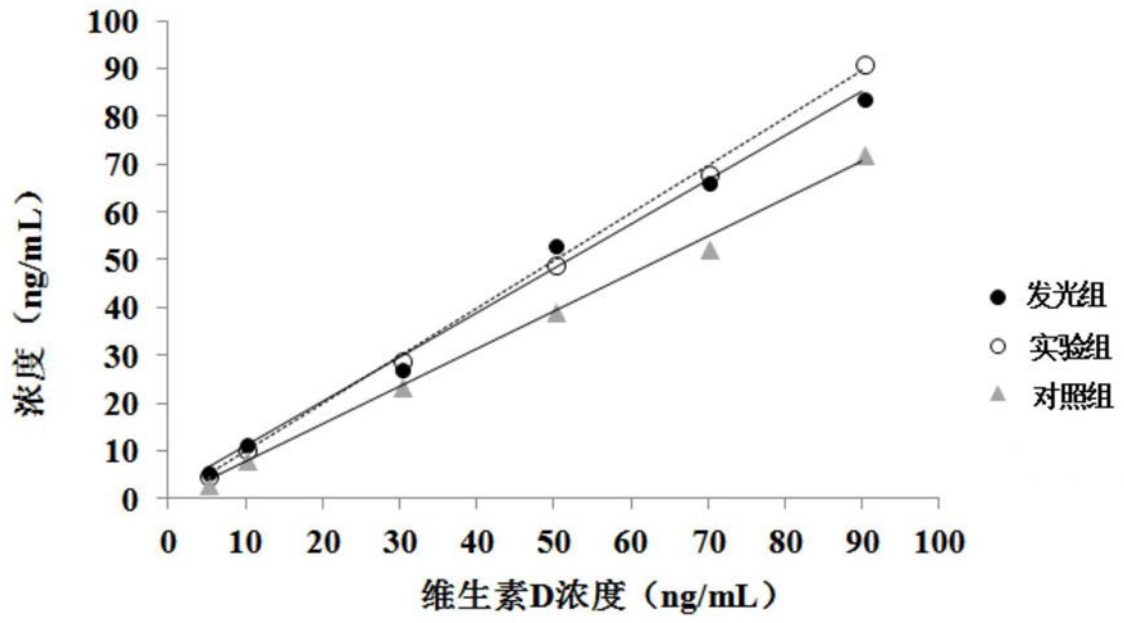


图3