

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102759623 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

(21) 申请号 201210231509. 8

(22) 申请日 2012. 07. 06

(83) 生物保藏信息

C201249 2012. 05. 09

C201250 2012. 05. 09

(71) 申请人 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 颜彬 王勇 黄力 陈伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

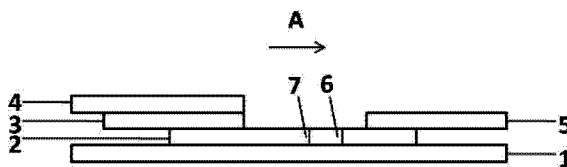
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种检测 NGAL 胶体金试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)胶体金试纸条及其制备方法。该试纸条包括塑料底衬、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫,所述的硝酸纤维素膜上设有相互平行的质控线和检测线;所述的质控线上含有兔抗人 IgG 抗体,所述检测线含有一种 NGAL 单克隆抗体,所述的金标垫上有金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体。本发明可对急性肾功能衰竭进行早期预测,特异性强、结果准确、操作简单,适合床边快速诊断。



1. 一种检测 NGAL 胶体金试纸条,包括塑料底衬、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上设有相互平行的质控线和检测线;所述的质控线上含有兔抗人 IgG 抗体,所述检测线含有一种 NGAL 单克隆抗体,所述的金标垫上有金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 NGAL 胶体金试纸条,其特征在于检测线上的一种 NGAL 单克隆抗体和金标垫上的金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体能够相互配对。

3. 根据权利要求 1 所述的检测 NGAL 胶体金试纸条,其特征在于一种 NGAL 单克隆抗体为 3B1,金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体为 4C2。

4. 根据权利要求 1 所述的检测 NGAL 胶体金试纸条,其特征在于一种 NGAL 单克隆抗体为 4C2,金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体为 3B1。

5. 一种检测 NGAL 胶体金试纸条的制备方法,包括以下步骤:

1)将一种 NGAL 单克隆抗体液喷到硝酸纤维素膜上形成检测线,将兔抗人 IgG 抗体液喷到硝酸纤维素膜的另一区域形成质控线;

2)将另一种 NGAL 单克隆抗体加到胶体金中,得到胶体金——抗体复合物溶液,将该复合物溶液涂覆玻璃纤维素膜或聚酯膜上得到金标垫;

3)将塑料底衬、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫进行粘贴,组装成检测 NGAL 胶体金试纸条。

一种检测 NGAL 胶体金试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于临床医学诊断领域,具体涉及一种检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)胶体金试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 继发于肾小管细胞损伤(包括缺血性损伤或肾毒性损伤)的急性肾功能衰竭(AFR),尽管在支持治疗法中取得了重大的进展,但是仍然是临床医学和肾病学中普遍而潜在破坏性的难题,该疾病具有持续的死亡率和高发率的特点。研究表明,中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)作为 lipocalin 家族的一个新的成员,是诊断急性肾损伤的重要标志物之一。美国专利 2004/0219603 描述了中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)最为检测肾小管细胞损伤早期发作的尿生物标记物。

[0003] 近年美国临床化学协会(AACC)年度会议的研究结果发表得知检测尿中中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白可能有助于临床医生检测心脏移植患者环孢霉素诱导的毒性,以及调节环孢霉素剂量以预防其对肾脏造成的不可逆伤害。Kim RW 等表明心脏手术后尿及血中的 NGAL 在术后 6 小时达到最高水平,且尿 NGAL 及血 NGAL 水平与术后急性肾损伤 AKI 及不良预后相关。

[0004] 目前,检测 NGAL 的方法主要有免疫吸附剂测定法(ELISA),中国专利 CN101566633 涉及胶乳增强免疫比浊法、夹心法 ELISA、竞争法 ELISA 来测定 NGAL 的水平。然而,该方法对检测设备有一定要求,操作繁琐,检测时间长,不能对急性肾功能衰竭进行快速早期预测,不能用于床边快速诊断。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种特异性强、结果准确、操作简单,适合床边快速诊断的检测 NGAL 胶体金试纸条及其制备方法,为急性肾功能衰竭进行早期预测提供一种简单的检测诊断及工具。

[0006] 为解决该问题,本发明采用以下技术方案得以实现:

一种检测 NGAL 胶体金试纸条,包括塑料底衬、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上设有相互平行的质控线和检测线;所述的质控线上含有兔抗人 IgG 抗体,所述检测线含有一种 NGAL 单克隆抗体,所述的金标垫上有金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体。

[0007] 所述的检测线上的 NGAL 单克隆抗体和金标垫上的另一种 NGAL 单克隆抗体由杂交瘤细胞株 3B1 和杂交瘤细胞株 4B2 分泌产生。杂交瘤细胞株 3B1 和杂交瘤细胞株 4C2 来源于南京基蛋生物科技有限公司,保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号分别为 CCTCC NO :C201249 和 CCTCC NO :C201250,保藏日期均为 2012 年 5 月 9 日。

[0008] 所述检测线上的一种 NGAL 单克隆抗体和金标垫上的金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体能够相互配对。

[0009] 所述一种 NGAL 单克隆抗体为 3B1, 金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体为 4C2。

[0010] 所述一种 NGAL 单克隆抗体为 4C2, 金标记的另一种 NGAL 单克隆抗体为 3B1。

[0011] 制备一种检测 NGAL 胶体金试纸条的制备方法, 其步骤包括:

1) 将一种 NGAL 单克隆抗体液喷到硝酸纤维素膜上形成检测线, 将兔抗人 IgG 抗体液喷到硝酸纤维素膜的另一区域形成质控线;

2) 将另一种 NGAL 单克隆抗体加到胶体金中, 得到胶体金—抗体复合物溶液, 将该复合物溶液涂覆玻璃纤维素膜或聚酯膜上得到金标垫;

3) 将塑料底衬、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水垫进行粘贴, 组装成检测 NGAL 胶体金试纸条。

[0012] 所述的硝酸纤维素膜包被过程中, NGAL 单克隆抗体液是用 20mmol/L、pH7.4 的 PB (磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠) 缓冲液稀释到 2.0mg/ml。

[0013] 杂交瘤细胞株 3B1 和杂交瘤细胞株 4C2 分泌产生的单克隆抗体具有不同的表位, 已通过双抗夹心法进行了鉴定。

[0014] 所述的质控线包被兔抗人 IgG 抗体。

[0015] 所述金标垫与样品垫的材料为聚酯膜、玻璃纤维膜。

[0016] 本发明利用双抗夹心原理来检测 NGAL 的含量, 根据检测线上条带颜色来判断样品液中 NGAL 的含量, 质控线上如果没有紫红色条带出现, 则该试纸条失效。

[0017] 本发明的检测 NGAL 胶体金试纸条具有以下优点: 1) 与目前 ELISA 法检测 NGAL 试剂盒相比, 不需要专业人员, 可直接观察得到结果, 也可以根据 FIA8000 系列免疫定量分析仪在十分钟内得到定量结果; 2) 检测方法简单, 快速, 适用于 NGAL 床边快速诊断。本发明对急性肾功能衰竭进行快速早期预测, 应用前景广阔。

附图说明

[0018] 图 1 为一种用于检测 NGAL 胶体金试纸条结构示意图。

[0019] 图 2 为一种用于检测 NGAL 胶体金试纸条检测模式图。

[0020] 图 3 为本发明实施例 1 制备的试纸条的线性范围相关性。

[0021] 图 4 为本发明实施例 1 制备的试纸条与雅培 ARCHITECT 尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试剂盒检测结果相关性。

[0022] 其中, 1. 塑料底衬; 2. 硝酸纤维素膜; 3. 金标垫; 4. 样品垫; 5. 吸水垫; 6. 质控线; 7. 检测线; 8. 样品槽; A. 层析方向。

[0023] 具体实施方式:

下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的阐述。

[0024] 以下对本发明的实施例作详细说明: 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。下列实施例中未注明的具体条件的实验方法, 通常按照常规条件。

[0025] 实施例 1 检测 NGAL 胶体金试纸的制备

1、胶体金—抗体复合物的制备

(1) 配制氯金酸水溶液: 将 10g 氯金酸 1000ml 的三蒸水溶解, 配制成 1% 的水溶液, 置于 4℃ 备用, 有效期 3 个月;

(2) 配制柠檬酸三钠 : 用三蒸水溶解柠檬酸三钠, 配制 1% 的水溶液, 用 0.22 μ 膜滤过, 置于 4 $^{\circ}$ C 备用, 有效期 7 天 ;

(3) 配制 1% 碳酸钾水溶液 : 将 1g 碳酸钾用 100ml 用三蒸水溶解, 用 0.22 μ 膜滤过, 置于 4 $^{\circ}$ C 备用, 有效期 7 天 ;

(4) 配制金标抗体保存液 : 将 15g 的蔗糖, 20 μ l 的叠氮钠, 在 100ml pH 7.4 的 1%BSA 溶解, 用 0.22 μ 膜滤过, 置于 4 $^{\circ}$ C 备用, 有效期 7 天 ;

(5) 制备胶体金颗粒 : 用三蒸水将 1% 氯金酸稀释成 0.01%, 置于 95 $^{\circ}$ C 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 ;

(6) 制备胶体金—抗体复合物 : 用 1% 碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 7.5, 按照 10 μ g 链亲和素 /ml 胶体金的量加入链亲和素溶液充分混匀, 置于 25 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 分钟后再加入 5%BSA, 封闭 20 分钟后, 离心取沉淀, 用 BSA 恢复其终浓度为 1%, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。按 50 μ g 单抗—生物素 /ml 胶体金的量将 NGAL 单克隆抗体 3B1 (或 NGAL 单克隆抗体 4C2)—生物素加入胶体金中, 37 $^{\circ}$ C 搅拌反应 40 分钟, 加入 5%BSA, 封闭搅拌 20 分钟, 6000r/min 离心 20 分钟, 弃上清, 沉淀以金标抗体保存液恢复体积, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0026] 2、免疫层析试纸条的组装

(1) 硝酸纤维素膜的处理

检测线的制备 : 将 NGAL 单克隆抗体 4C2 (或 NGAL 单克隆抗体 3B1) 用 20mmol/L pH7.2 的 PB (磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠) 缓冲液稀释到 2.0mg/ml 的浓度, 0.8 μ l/cm 在硝酸纤维素膜上划线, 在干燥箱内 20 $^{\circ}$ C 鼓风干燥 12h。

[0027] 质控线的制备 : 将兔抗人 IgG 抗体按 4mg/ml 的浓度, 0.8 μ l/cm 在硝酸纤维素膜上划质控线, 该线与检测线平行, 两线间隔 4mm, 然后在干燥箱内 20 $^{\circ}$ C 鼓风干燥 12h, 密封干燥保存。

[0028] (2) 金标垫的制备

金标垫的预处理 : 将制作金标垫的材料玻璃纤维素膜或聚酯膜放入金标缓冲液 (20mM PBS+1% 酪蛋白+1%PVP+1% 蔗糖+0.2%Triton) 中浸泡 2~4 小时, 取出后, 25 $^{\circ}$ C 干燥 8 小时。

[0029] 将采用不同于检测线所用的抗体 NGAL 单克隆抗体 3B1 (或 NGAL 单克隆抗体 4C2) 的胶体金—抗体复合物用喷金仪均匀的铺在处理好的金标垫上, 喷量 1.0 μ l/cm, 25 $^{\circ}$ C 干燥 4~8 小时, 密封干燥保存。

[0030] (3) 样品垫的制备

将样品垫用 100mM PBS 缓冲液浸泡 2~4 小时, 取出后 25 $^{\circ}$ C 干燥 8 小时。

[0031] (4) 吸水垫的制备

吸水纸裁剪成 30*2.7cm 每条。

[0032] (5) 组装

塑料底衬, 样品垫和吸水纸为本领域通用的部件。将上述硝酸纤维素膜, 吸水垫, 金标垫, 样品垫粘贴在塑料底衬上 (如附图 1)。将贴好的中间物用斩切机切成 5.6cm 宽的试纸条。

[0033] 实施例 2 检测 NGAL 胶体金试纸的使用

1. 定性检测

把待检样品滴加在本试纸的样品垫上,当待检样品进入测试端时,由于毛细效应,液体沿着层析方向 A 移动。若在试纸的质控线和检测线的位置处分别出现一条紫红色的条带,表明待检液中含有相应的抗原即为阳性样品;若仅在试纸的质控线位置处出现紫红色的条带,表明待检液中含有相应的抗原在检测下限以下即为阴性样品;若在试纸的质控线和检测线的位置处都无紫红色的条带出现,表明该检测结果为无效结果。

[0034] 2. 定量检测

(1) 线性范围

采用本发明制备的试纸条做检测线性范围实验。取 NGAL 标准品,用生理盐水稀释成 8 个浓度,其浓度范围是 20ng/mL-1500ng/mL,每个浓度重复测定 3 次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程 $y = 0.905x - 22.17$,相关系数 $r=0.9995$,表明本发明试纸条在 20ng/mL-1500ng/mL 线性范围内相关性很好(见图 3)。

[0035] (2) 灵敏度

以生理盐水为空白样本,用本发明试纸条进行测定,重复 20 次,计算读数均值 V 为 23.95,标准差 SD 为 8.319。计算 $V+2SD$ 为 40.59,根据回归方程计算空白样本浓度为 15.58ng/mL。

[0036] (3) 检测范围

在线性检测范围下限每隔 8% 取浓度值,将标准品稀释成 16.8 ng/mL,18.4 ng/mL,20 ng/mL,21.6 ng/mL,23.2 ng/mL,利用 FIA8000 系列免疫定量分析仪重复测定 10 次,分别计算变异系数 CV 。16.8 ng/mL,18.4 ng/mL NGAL 测定 CV 分别为 12.65%,10.89%。而 20 ng/mL,21.6 ng/mL,23.2 ng/mL NGAL 测定 CV 在 8% 左右,均小于 10%。由此可见,最低浓度水平 20 ng/mL 为检测下限。

[0037] (4) 与雅培 ARCHITECT 尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试剂盒相关性比较

取 100 份尿液样品,将其等分,一份采用本发明制备的试纸条及其配套仪器 FIA8000 系列免疫定量分析仪进行测定,另一份雅培 ARCHITECT 尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试剂盒及其配套仪器 ARCHITECT® 免疫分析仪进行测定,测定结果见图 4,结果显示其相关性很好 $r=0.9905$, $P > 0.05$,两种方法间无统计学差异。

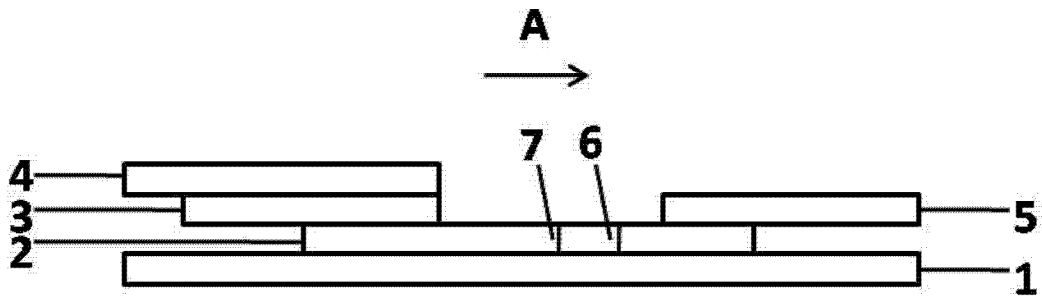


图 1

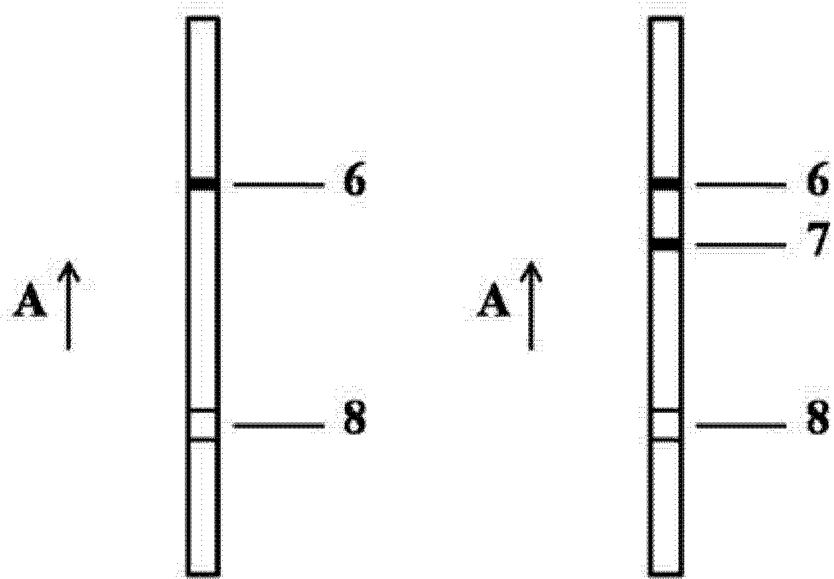


图 2

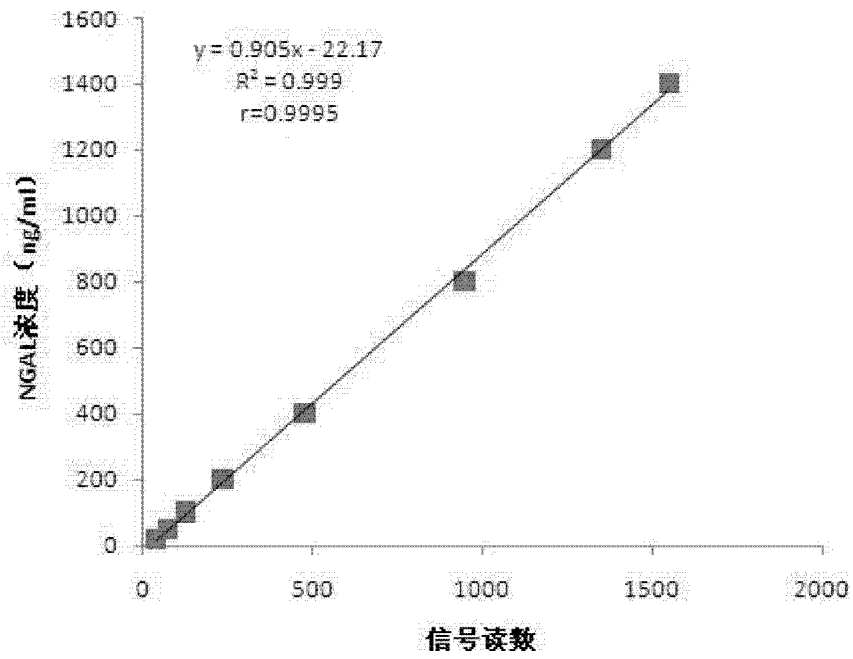


图 3

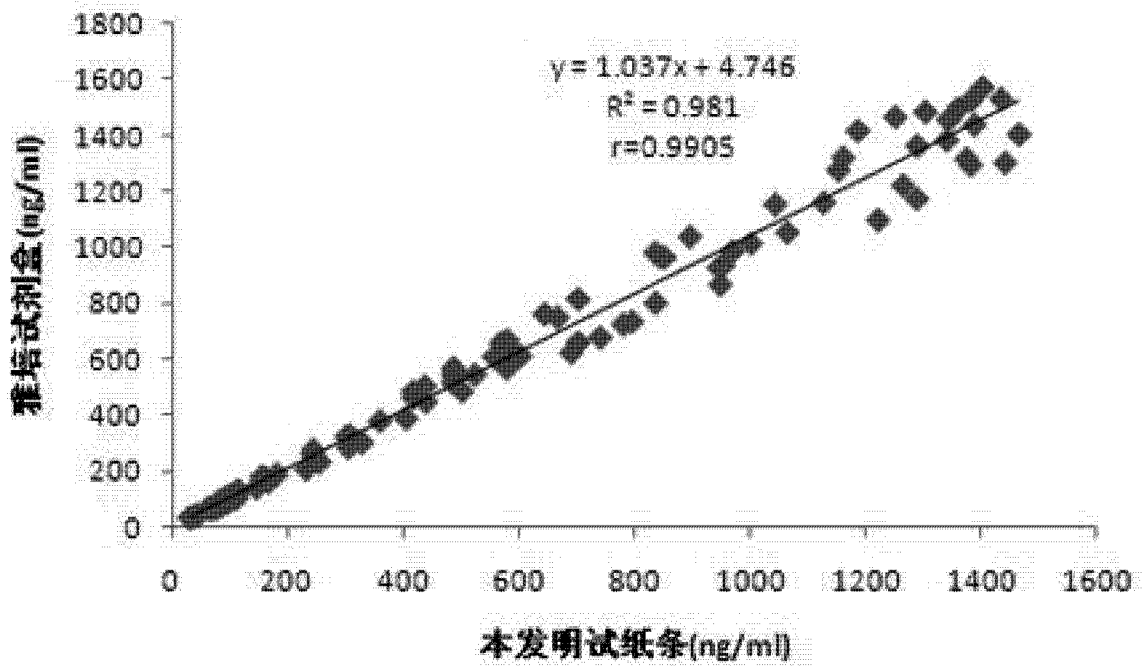


图 4