



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680702 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201210133569. 6

(22) 申请日 2012. 04. 28

(73) 专利权人 广州鸿琪光学仪器科技有限公司  
地址 510530 广东省广州市经济技术开发区  
科学城开源大道 11 号科技企业加速器  
A6 栋第三层

(72) 发明人 罗琪 谢爱武 梁万兴

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 王学强

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102023211 A, 2011. 04. 20,

CN 102393463 A, 2012. 03. 28,

CN 1092424 A, 1994. 09. 21,

CN 101710066 A, 2010. 05. 19,

CN 101776601 A, 2010. 07. 14,

CN 202049158 U, 2011. 11. 23,

CN 102087293 A, 2011. 06. 08,

CN 102183647 A, 2011. 09. 14,

US 2009111171 A1, 2009. 04. 30,

EP 0978568 A2, 2000. 02. 09,

李改茹等. 金属钯 / 铂卟啉室温磷光探针在  
生物医学领域的应用研究. 《分析化学评述与进  
展》. 2002, 第 30 卷 (第 12 期),

审查员 黄晓丽

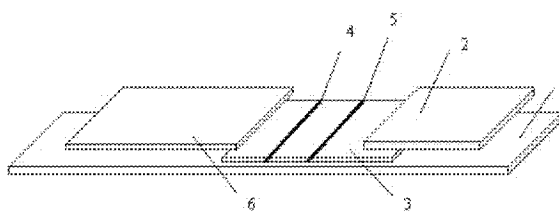
权利要求书4页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光  
试纸条组件、及其制成的检测卡组件和制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件、及其制成的检测卡组件和制备方法。试纸条组件包括试纸条和独立包装的铂卟啉标记特异抗体，试纸条包括底衬、吸水垫、包被分析膜及样品垫，该包被分析膜上设有检测线和质控线，检测线包被的特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体，质控线包被的特异抗体为兔 IgG 抗体；检测卡组件包括试纸条、由盖板和背板组成的卡盒以及独立包装的铂卟啉标记特异抗体；应用本发明所提供的试纸条组件检测液体中 C- 反应蛋白，具备操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点，具有良好的临床应用前景。



1. 一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,其特征在于,它包括试纸条和与试纸条配合使用且独立包装的铂卟啉标记特异抗体;其中试纸条是由底衬(1)和在底衬(1)上的依次接合的吸水垫(2)、包被分析膜(3)、样品垫(6)组成;所述包被分析膜(3)上设有检测线(4)和质控线(5);所述检测线(4)包被特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体,所述质控线(5)包被特异抗体为兔 IgG 抗体,所述铂卟啉标记特异抗体为抗 C 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体;

其中所述快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的制备方法包括以下步骤:

1) 抗体的制备:

选用纯化的基因工程表达的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A、抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B、抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG,其中抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A 和抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 结合于 C- 反应蛋白的不同位点,抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG 可以直接反应结合;

2) 包被分析膜(3)的制备:

采用喷膜机分别在一硝酸纤维膜上划检测线(4)和质控线(5),划线细致均匀,检测线(4)与质控线(5)间隔 5mm;

用检测线包被缓冲液稀释抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A 至浓度为 5—20  $\mu$ g/ml,采用喷膜机将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体喷印在硝酸纤维膜的检测线上;

用质控线包被缓冲液稀释纯化的兔 IgG 抗体至浓度为 5—20  $\mu$ g/ml,采用喷膜机将纯化的兔 IgG 抗体喷印在硝酸纤维膜的质控线上;

将喷膜后的硝酸纤维膜放入 30—50 $^{\circ}$ C 的真空干燥箱内,干燥 20—30 分钟后取出密封备用;

3) 样品垫(6)的制备:

用含 0.01%—0.5% 聚乙二醇、1%—5% 牛血清白蛋白和 0.01%—0.05% 表面活性剂的 0.01—0.1M、PH 值为 7.2—7.6 的磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜,浸泡处理后,将其放入 60—80 $^{\circ}$ C 的真空干燥箱内,干燥 40—60 分钟后取出密封备用;

4) 免疫荧光试纸条的制备:

先将包被分析膜(3)粘附在底衬(1)中间位置上,在包被分析膜(3)一侧粘附吸水垫(2),包被分析膜(3)和吸水垫(2)的连接处重叠 1—2mm;在包被分析膜(3)另一侧粘附样品垫(6),包被分析膜(3)和样品垫(6)的连接处重叠 1—2mm;再将黏贴好包被分析膜(3)、吸水垫(2)和样品垫(6)的底衬(1)裁切成 4mm 宽的细条;

5) 铂卟啉标记抗体的制备:

用 0.05—0.2M、pH 值 9.5—11.0 的碳酸氢钠溶液分别将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体的浓度稀释至 0.8—2mg/ml,接着在抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体中分别加入 30—50mg 的铂卟啉溶解液搅匀,同时在室温下孵育 1—2 小时,其中在孵育过程中每隔 15—20 分钟分别混匀一次;孵育完成后,用规格型号为 G25 的凝胶柱分别进行过柱分离纯化,再分别收集铂卟啉标记好的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体,各自用 0.01—0.1M、pH 值 7.2—7.6 的磷酸盐缓冲液稀释混匀后,于 -20 $^{\circ}$ C 进行保存;

6) 独立包装的铂卟啉标记特异抗体工作液的制备:

确定适量浓度的铂卟啉标记的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体,采用含

5% -20% 甘油、1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 甘氨酸和 0.01% -0.05% 表面活性剂的 0.01-0.1M 磷酸盐缓冲液一并稀释,分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖,其中每个塑料试剂瓶的分装量为 0.3-3ml,统一在 2-8℃ 下保存。

2. 根据权利要求 1 所述的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,所述试纸条的底衬 (1) 表面涂覆有黏胶或双面胶,用于固定所述吸水垫 (2)、所述包被分析膜 (3) 和所述样品垫 (6),所述包被分析膜 (3) 粘附在所述底衬 (1) 的中间,同时所述包被分析膜 (3) 两侧分别与所述吸水垫 (2) 和所述样品垫 (6) 连接。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,其特征在于所述包被分析膜 (3) 由硝酸纤维素膜组成,在所述包被分析膜 (3) 上喷涂抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和兔 IgG 抗体。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,其特征在于所述吸水垫 (2) 为滤纸,具体的为吸水纸或滤油纸;所述吸水垫 (2) 粘附在所述底衬 (1) 上,同时所述吸水垫 (2) 与所述包被分析膜 (3) 的连接处重叠 1-2mm。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,其特征在于所述样品垫 (6) 为磷酸盐缓冲液浸泡过的玻璃纤维膜,所述样品垫 (6) 粘附在所述底衬 (1) 上,所述样品垫 (6) 与所述包被分析膜 (3) 的连接处重叠 1-2mm。

6. 根据权利要求 1 所述的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,其特征在于所述的铂卟啉标记特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体,将所述铂卟啉标记特异抗体用含如下组分的 0.01-0.1M 磷酸盐缓冲液稀释,再用塑料试剂瓶密封包装而得:5% -20% 甘油、1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 甘氨酸和 0.01% -0.05% 表面活性剂。

7. 根据权利要求 1 所述的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,其特征在于所述铂卟啉标记的激发光光源波长范围为 390-420nm,发射光波长范围为 600-700nm。

8. 一种制备权利要求 1 所述的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 抗体的制备:

选用纯化的基因工程表达的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A、抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B、抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG,其中抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A 和抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 结合于 C- 反应蛋白的不同位点,抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG 可以直接反应结合;

2) 包被分析膜 (3) 的制备:

采用喷膜机分别在一硝酸纤维素膜上划检测线 (4) 和质控线 (5),划线细致均匀,检测线 (4) 与质控线 (5) 间隔 5mm;

用检测线包被缓冲液稀释抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A 至浓度为 5-20  $\mu$ g/ml,采用喷膜机将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体喷印在硝酸纤维素膜的检测线上;

用质控线包被缓冲液稀释纯化的兔 IgG 抗体至浓度为 5-20  $\mu$ g/ml,采用喷膜机将纯化的兔 IgG 抗体喷印在硝酸纤维素膜的质控线上;

将喷膜后的硝酸纤维素膜放入 30-50℃ 的真空干燥箱内,干燥 20-30 分钟后取出密封备用;

3) 样品垫 (6) 的制备:

用含 0.01% -0.5% 聚乙二醇、1% -5% 牛血清白蛋白和 0.01% -0.05% 表面活性剂

的 0.01-0.1M、PH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜,浸泡处理后,将其放入 60-80℃的真空干燥箱内,干燥 40-60 分钟后取出密封备用;

4) 免疫荧光试纸条的制备:

先将包被分析膜 (3) 粘附在底衬 (1) 中间位置上,在包被分析膜 (3) 一侧粘附吸水垫 (2),包被分析膜 (3) 和吸水垫 (2) 的连接处重叠 1-2mm;在包被分析膜 (3) 另一侧粘附样品垫 (6),包被分析膜 (3) 和样品垫 (6) 的连接处重叠 1-2mm;再将黏贴好包被分析膜 (3)、吸水垫 (2) 和样品垫 (6) 的底衬 (1) 裁切成 4mm 宽的细条;

5) 铂卟啉标记抗体的制备:

用 0.05-0.2M、pH 值 9.5-11.0 的碳酸氢钠溶液分别将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体的浓度稀释至 0.8-2mg/ml,接着在抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体中分别加入 30-50mg 的铂卟啉溶解液搅匀,同时在室温下孵育 1-2 小时,其中在孵育过程中每隔 15-20 分钟分别混匀一次;孵育完成后,用规格型号为 G25 的凝胶柱分别进行过柱分离纯化,再分别收集铂卟啉标记好的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体,各自用 0.01-0.1M、pH 值 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液稀释混匀后,于 -20℃ 进行保存;

6) 独立包装的铂卟啉标记特异抗体工作液的制备:

确定适量浓度的铂卟啉标记的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体,采用含 5% -20% 甘油、1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 甘氨酸和 0.01% -0.05% 表面活性剂的 0.01-0.1M 磷酸盐缓冲液一并稀释,分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖,其中每个塑料试剂瓶的分装量为 0.3-3ml,统一在 2-8℃ 下保存。

9. 根据权利要求 8 所述的制备快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,其特征在于所述步骤 2) 中,检测线包被缓冲液的制备方法:用 50mM 的 pH 值 7.6 的磷酸盐缓冲液稀释,此磷酸盐缓冲液含 1% 甲醇、0.5% 海藻糖、0.5% 牛血清白蛋白和 10  $\mu$ g/ml 抗 C- 反应蛋白抗体 A;

质控线包被缓冲液的制备方法:用 50mM、pH 值 7.6 的磷酸盐缓冲液稀释,此磷酸盐缓冲液含 1% 甲醇、0.8% 牛血清白蛋白和 0.5mg/ml 兔 IgG 抗体;包被分析膜 (3) 的制备:调试喷膜机,使其膜液量为 25  $\mu$ l/35cm,机器划线令检测线 4 与质控线 5 间隔保持 5mm,划线细致均匀。

10. 根据权利要求 8 所述的制备快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,其特征在于在步骤 2) 中,检测线 (4) 包被缓冲液的制备方法:用 20mM 的 pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液,此磷酸盐缓冲液含 0.8% 甲醇、1.0% 海藻糖、0.6% 牛血清白蛋白和 15  $\mu$ g/ml 抗 C- 反应蛋白抗体 A;质控线 (5) 包被缓冲液的制备方法:用 50mM、pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液,此磷酸盐缓冲液含 0.7% 甲醇、0.5% 牛血清白蛋白和 0.5mg/ml 兔 IgG 抗体。

11. 根据权利要求 8 所述的制备快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,其特征在于在步骤 5) 中,分别收集铂卟啉标记好的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体后,各自用 0.01M、pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释混匀,于 -20℃ 进行保存,其中所述磷酸盐缓冲液含 0.5% 聚乙二醇、5% 牛血清白蛋白、15% 甘油和 0.01% 表面活性剂。

12. 根据权利要求 8 所述的制备快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,其特征在于在步骤 5) 中,分别收集铂卟啉标记好的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体后,各自用 0.01M、pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释混匀后同时于 -20℃ 进行保

存,其中所述磷酸盐缓冲液含 0.01%聚乙二醇、5%牛血清白蛋白、10%甘油和 0.02%表面活性剂。

13. 根据权利要求 8 所述的制备快速定量检测 C-反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,其特征在于在步骤 4) 中,用含 0.4%聚乙二醇 8000、1.5%牛血清白蛋白、0.02%表面活性剂的 0.02M、PH 值 7.2 磷酸盐缓冲液浸泡,浸泡处理后,将样品垫 (6) 放入 60℃的真空干燥箱内,干燥 40 分钟后取出密封备用。

14. 一种由权利要求 1 所述的快速定量检测 C-反应蛋白的免疫荧光试纸条组件制成的检测卡组件,其特征在于:所述检测卡组件包括试纸条组件以及由聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的盖板 (11) 和聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的背板 (13) 组成的卡盒;其中,所述背板 (13) 包括放置所述试纸条组件的卡槽 (12) 和用于与所述盖板 (11) 结合的卡齿 (14),所述盖板 (11) 包括可观测检测结果的检测窗 (8)、可滴加样品的加样孔 (7) 和用于与所述背板的卡齿 (14) 结合的固定孔 (10);所述试纸条组件通过所述卡齿 (14) 与所述固定孔 (10) 结合而嵌合在所述背板 (13) 和所述盖板 (11) 之间;特别的,所述包被分析膜 (3) 正对所述检测窗 (8),所述样品垫 (6) 正对所述加样孔 (7);独立包装的铂卟啉标记特异抗体分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖。

15. 一种制备权利要求 14 所述的快速定量检测 C-反应蛋白的免疫荧光试纸条组件制成的检测卡组件的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 制成背板 (13) 和盖板 (11):

用聚苯乙烯或聚氯乙烯制成背板 (13) 和盖板 (11),所述背板 (13) 包括放置所述试纸条组件的卡槽 (12) 和用于与所述盖板 (11) 结合的卡齿 (14),所述盖板 (11) 包括可测结果的检测窗 (8)、可滴加样品的加样孔 (7) 以及用于与所述背板的卡齿 (14) 结合的固定孔 (10);

2) 组装:

将试纸条组件放在所述背板 (13) 的所述卡槽内 (12),通过所述背板 (13) 的卡齿 (14) 与所述盖板 (11) 的固定孔 (10) 结合,将试纸条组件嵌合在背板 (13) 和盖板 (11) 之间,其中,包被分析膜 (3) 正对所述检测窗 (8),样品垫 (6) 正对所述加样孔 (7);

3) 包装:

将 1 人份的试纸条、卡盒和一包干燥剂封装在铝箔塑料袋内,并将多组所述铝箔塑料袋和对应的多组所述独立包装的铂卟啉标记特异抗体装入一个包装盒,在 2℃ -8℃ 环境下避光不冻存的进行保存。

## 一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件、及其制成的检测卡组件和制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,尤其涉及一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件及其制备方法,和由免疫荧光试纸条组件支撑的检测卡组件及其制备方法。

### 背景技术

[0002] C- 反应蛋白 (C-reactive protein,CRP) 是环状五球体蛋白,属于 Oligomeric 钙结合蛋白,相对分子质量约 120000,由 5 个相同的单体以非共价键构成,是炎性淋巴因子白介素 -6、白介素 -1,肿瘤坏死因子刺激肝脏上皮细胞合成的。由于 C- 反应蛋白在感染发生后 6 ~ 8h 即开始升高,24 ~ 48h 达到高峰,高峰值可达正常的数百倍,在感染消除后其含量急骤下降,一周内可恢复正常。C- 反应蛋白被公认为是最有价值的急性时相反应蛋白,它的升高可以提示许多炎症事件的发生,因此,很久以来被广泛应用于临床感染性疾病的检测。近年来有研究者发现,炎症在动脉粥样硬化的起始、形成、发展过程中扮演了重要的角色,所以 C- 反应蛋白这个极其灵敏的炎症指标在各种类型心血管疾病中得到了广泛的研究。

[0003] 常规 C- 反应蛋白检验方法可在感染或组织损伤时检测出 C- 反应蛋白 > 10mg/L,但是,不能很好地检测出低水平 (0.1 ~ 10mg/L) 的 C- 反应蛋白变化。该水平的 C- 反应蛋白与心血管疾病的发生有着密切的关系,所以日益受到研究者的关注。随着一些高灵敏度检测方法的出现,低水平的 C- 反应蛋白也可以被检测出来,由于应用的检测方法具有较高的灵敏度,因此,这个水平的 C 反应蛋白又被称为较高的超敏 C 反应蛋白 (high sensitivity C-reactive protein, hs-C- 反应蛋白)。研究显示,在无明显症状的健康男性中,C- 反应蛋白的升高程度与初次发生冠心病的危险性呈正相关,hs-C- 反应蛋白浓度处于高值的那部分人群未来发生中风、心肌梗死、周围血管疾病的危险分别是低值的 2 倍 (RR = 1.9,95% CI 1.1 ~ 3.3)、3 倍 (RR = 2.9,95% )CI 1.8 ~ 6.0) 和 4 倍 (RR = 4.1,95% CI 1.2 ~ 6.0),并且证实不受吸烟因素的影响而独立于冠心病的其他危险因子之外。Hs-C- 反应蛋白对于女性也是一个强有力的未来心血管发病的预测因子 (RR = 4.4,95% CI 2.2 ~ 8.9)。hs-C- 反应蛋白对于急性冠脉综合征的诊断也有十分重要的作用。不稳定性心绞痛或非 ST 段抬高的心肌梗死患者有 hs-C- 反应蛋白升高、则示来可能会发生各种不利事件,如心绞痛的再发、ST 段抬高的心肌梗死或冠心病引起的死亡。

[0004] 临床实验室 C- 反应蛋白检测一直采用透射免疫和散射免疫方法,这些方法的参考值范围变动很大,从 3mg/L 到超过 200mg/L。随着人们对于低水平 C- 反应蛋白与心血管疾病关系的认识,这些测定方法的灵敏度远远不能满足要求,而且目前的检测方法即使使用昂贵的仪器设备和试剂,也不能同时兼顾高值和低值的检测要求。因此,建立一种检测时间短,并且检测除了能在实验室进行外,还要求能够进行床旁检测,同时对高值和低值 C- 反应蛋白都适用的检测方法,从而为临床提供准确的诊断依据,是十分必要的。

[0005] 目前,用来测量 C- 反应蛋白的免疫层析技术中所使用的标记物通常是酶、胶体金以及各种彩色微球标记物,这些标记物应用于免疫层析技术中有相同的特点:物理吸附方

式标记和通过颜色判断检测结果。其中物理吸附方式标记（即疏水性和静电吸附原理）的特点使得其容易形成非特异性干扰，需要在生产工艺配方中添加非特异性干扰消除试剂，如吐温 20 等表面活性剂等，但使用这类试剂的同时，也容易造成基于这类标记物的假阳性或假阴性的结果。另外通过颜色判读结果在使用时必然受观察者主观影响大，尤其是弱阳性结果，且只能做出定性判断，而无法实现精确的定量判定。这些缺点大大限制了免疫层析技术在临床检测中的应用范围。

[0006] 而中国公开第 102087293 号专利揭示了一种全程定量检测 C- 反应蛋白的免疫层析试纸及其制备方法，其虽然采用了荧光定量技术，但没有明确具体的荧光材料；同时，其将荧光乳胶微粒干燥固定在结合垫上，必定会影响其在玻璃纤维素膜上的溶解和释放速度，也影响其在硝酸纤维素膜上的爬行速度，整个检测时间也要远超其要求的 10 秒测定时间。同时，被检测物中的 C- 反应蛋白与荧光乳胶颗粒标记的 C- 反应蛋白抗体，以及硝酸纤维素膜上固定的 C- 反应蛋白抗体，在 10 秒钟内难以形成有效的抗原-抗体反应，免疫学反应是不充分的，必将导致检测灵敏度偏低，检测线性范围窄，难以满足临床检测的需求。

[0007] 而金属卟啉是自然界中广泛存在的一类大环化合物，卟啉分子由 4 个吡咯环通过次甲基连结，形成一四配位卟啉核。卟啉环非常稳定，可与直径为 3.7 埃的金属发生配位。卟啉的电子吸收光谱主要有 Soret 带（又名 B 带）和 Q 带。Soret 带位于 380 ~ 450nm 之间，摩尔吸光系数高 ( $2 \sim 5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ )。而金属卟啉的 Soret 带吸收较弱，当环侧有亲电子基团时，Soret 带将向长波方向移动。卟啉的 Q 带一般在 450 ~ 650nm 之间，有 4 个相关峰；当吡咯环氮上的氢被金属离子取代形成金属卟啉后，4 个相关峰减弱或消失。卟啉和金属卟啉由于具有 18 电子大  $\pi$  离域结构，所以，以其 B 带或 Q 带作为激发波长，均在 500 ~ 800nm 间（或更长的波长范围）有不同程度的荧光发射。室温下，卟啉本身不发磷光，当与某些金属形成络合物并与有序介质（如：表面活性剂、蛋白质和核酸等生物大分子）共存时才在近红外区发射磷光；但只有极少数的金属卟啉发磷光，最常见的为钇卟啉和铂卟啉。钇 / 铂卟啉具有极强的磷光，其特点是长寿命 (ms)，长波长 (600 ~ 1000nm)。最常见的有水溶性 meso- 四 (4- 磺酸苯基) 卟啉 ( $\text{H}_2\text{TSP}^{4-}$ ) 和 meso- 四 (4-N- 三甲氨基苯基) 卟啉 ( $\text{H}_2\text{TMAP}^{4-}$ ) 的钇 / 铂络合物，以及非水溶性的八乙基卟啉 (OEP) 和四苯基 - 四苯并卟啉 ( $\text{Ph}_4\text{TBP}$ ) 的钇 / 铂络合物等。600 ~ 1000nm 的近红外区是研究生物物质发光探针和光化学传感器的一个极为有用的区域。所以，具有特殊磷光特性的钇 / 铂卟啉便成为生物分析方面非常有效的探针分子，结合一些简单的检测仪器便可提供很高的灵敏度和选择性。

[0008] 这种以铂为基础的卟啉在外界激发下，在 650nm 发出强磷光，持续时间 100- 微秒（吸收波范围 390-410nm），在 670nm 发出强磷光持续时间 500- 微秒（吸收波范围 400-420nm）。这些卟啉粒子也有很大的 stokes 位移（均为 280nm）。与其它发光材料相比较，铂卟啉的优势在于极微的光漂白，使用便宜的强光源，如发光二极管就能有效激发了。此外，生物样本和硝酸纤维素膜的背景荧光在 390-420nm 激发比在以铕离子为代表的时间分辨荧光的激发光波长 365nm 时都低。尽管 390-420nm 光透过硝酸纤维素膜也不尽理想，但优于 365nm 光，更适合于透射式测量。铂卟啉还可共价标记抗体，为检测各种样本提供了一个灵敏的快速检测技术。

[0009] 将发光材料铂卟啉与生物活性分子通过共价键偶联制备标记物，该标记物在层析的过程中通过免疫反应固定于固相载体的表面，并在绿色激光的激发下发射出红外光。由

此实现铂卟啉发光材料与免疫层析技术相结合对生物样品中的目标被检测物进行检测。

[0010] 因此,如何将铂卟啉发光材料与免疫层析技术相结合,尽量缩短检测时间,并且检测除了能在实验室进行外,还要求能够进行床旁检测,同时能定量测定 C- 反应蛋白方法,从而为临床提供准确的诊断依据,是十分必要的。

### 发明内容

[0011] 为解决上述的现有技术的不足,本发明将铂卟啉发光材料与免疫层析技术相结合,提供了一种试纸条组件以检测人体内 C- 反应蛋白水平,本发明只需要配套常规的专用荧光检测仪即可使用,可同时检测高值和低值 C- 反应蛋白,尤其是低值 C- 反应蛋白,其制作成本低廉,操作简单、快速、灵敏,且特异性好,对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。

[0012] 具体的,为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0013] 一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,包括试纸条和独立包装的铂卟啉标记特异抗体。其中,试纸条是由底衬和在底衬上的依次接合的吸水垫、包被分析膜、样品垫组成;所述包被分析膜上设有检测线和质控线;所述检测线包被特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体,所述质控线包被特异抗体为兔 IgG 抗体。所述铂卟啉标记特异抗体为抗 C 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体,另外,独立包装的铂卟啉标记特异抗体密封分装在塑料试剂瓶中。

[0014] 优选地,所述底衬的表面涂覆有黏胶或特定的双面胶,用以固定所述的吸水垫、包被分析膜和样品垫,包被分析膜粘附在所述底衬的中间,同时包被分析膜两侧分别与所述吸水垫和所述样品垫连接。

[0015] 优选地,所述吸水垫为一种滤纸,具体的为吸水纸或滤油纸; ;所述吸水垫粘附在所述在底衬的一侧,同时吸水垫与包被分析膜的连接处重叠 1-2mm。

[0016] 优选地,所述样品垫为磷酸盐缓冲液缓浸泡过的玻璃纤维膜,所述样品垫粘附在所述底衬的另一侧、样品垫与包被分析膜的连接处重叠 1-2mm。

[0017] 优选地,所述包被分析膜由硝酸纤维素膜组成,同时在包被分析膜上喷涂抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和兔 IgG 抗体。

[0018] 优选地,所述的铂卟啉标记特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体,将所述铂卟啉标记特异抗体用含如下组分的 0.01-0.1M 磷酸盐缓冲液稀释,再用塑料试剂瓶密封包装而得:5% -20% 甘油、1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 甘氨酸和 0.01% -0.05% 表面活性剂。

[0019] 优选地,所述的铂卟啉标记的激发光光源范围为 390-420nm,发射光波长范围为 600-700nm。

[0020] 本发明还提供一种制备快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的方法,包括以下六个步骤。

[0021] 1) 抗体的制备

[0022] 选用纯化的基因工程表达的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A 和 B、抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG。抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 A 和抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 可以结合于 C- 反应蛋白的不同位点。抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG 可以直接反应结合。

[0023] 2) 包被分析膜的制备

[0024] 采用喷膜机分别在一硝酸纤维膜上划检测线和质控线,划线细致均匀,检测线与质控线间隔 5mm;

[0025] 用检测线包被缓冲液稀释抗 C-反应蛋白单克隆抗体 A 至浓度为 5—20ug/ml,采用喷膜机将抗肌红蛋白单克隆抗体喷印在硝酸纤维膜的检测线上;

[0026] 用质控线包被缓冲液稀释纯化的兔 IgG 抗体至浓度为 5—20ug/ml,采用喷膜机将纯化的兔 IgG 抗体喷印在硝酸纤维膜的质控线上;

[0027] 将喷膜后的硝酸纤维膜放入 30—50℃ 的真空干燥箱内,干燥 20—30 分钟后取出密封备用。

[0028] 优选地,检测线包被缓冲液的制备方法:用 50mM 的 pH 值 7.6 的磷酸盐缓冲液稀释,此磷酸盐缓冲液含 1% 甲醇、0.5% 海藻糖、0.5% 牛血清白蛋白和 10ug/ml 抗 C-反应蛋白抗体 A;

[0029] 优选地,质控线包被缓冲液的制备方法:用 50mM、pH 值 7.6 的磷酸盐缓冲液稀释,此磷酸盐缓冲液含 1% 甲醇、0.8% 牛血清白蛋白和 0.5mg/ml 兔 IgG;包被分析膜的制备:调试喷膜机,使其膜液量为 25ul/35cm,机器划线令检测线 4 与质控线 5 间隔保持 5mm,划线细致均匀。

[0030] 3) 样品垫的制备

[0031] 用含 0.01%—0.5% 聚乙二醇、1%—5% 牛血清白蛋白和 0.01%—0.05% 表面活性剂的 0.01—0.1M、PH 值为 7.2—7.6 的磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜,浸泡处理后,将其放入 60—80℃ 的真空干燥箱内,干燥 40—60 分钟后取出密封备用;

[0032] 4) 免疫荧光试纸条的制备:

[0033] 先将包被分析膜粘附在底衬中间位置上,在包被分析膜一侧粘附吸水垫,包被分析膜和吸水垫的连接处重叠 1—2mm;在包被分析膜另一侧粘附样品垫,包被分析膜和样品垫的连接处重叠 1—2mm;再将黏贴好包被分析膜、吸水垫和样品垫的底衬裁切成 4mm 宽的细条。

[0034] 5) 铂卟啉标记抗体的制备

[0035] 用 0.05—0.2M、pH 值 9.5—11.0 的碳酸氢钠溶液分别将抗 C-反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体的浓度稀释至 0.8—2mg/ml,接着在抗 C-反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体中分别加入 30—50mg 的铂卟啉溶解液搅匀,同时在室温下孵育 1—2 小时,其中在孵育过程中每隔 15—20 分钟分别混匀一次;孵育完成后,用规格型号为 G25 的凝胶柱分别进行过柱分离纯化,再分别收集铂卟啉标记好的抗 C-反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体,各自用 0.01—0.1M、pH 值 7.2—7.6 的磷酸盐缓冲液稀释混匀后,于 -20℃ 进行保存。

[0036] 6) 独立包装的铂卟啉标记抗体工作液的制备:

[0037] 确定适量浓度的铂卟啉标记的抗 C-反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体,采用含 5%—20% 甘油、1%—5% 牛血清白蛋白、0.1—2% 甘氨酸和 0.01%—0.05% 表面活性剂的 0.01—0.1M 磷酸盐缓冲液一并稀释,分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖,其中每个塑料试剂瓶的分装量为 0.3—3ml,统一在 2—8℃ 下保存。

[0038] 此外,本发明还提供一种由快速定量检测 C-反应蛋白的免疫荧光试纸条组件制成的检测卡组件,所述检测卡组件包括试纸条组件以及由聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的盖板

和聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的背板组成的卡盒。

[0039] 其中所述背板包括放置所述试纸条组件的卡槽和用于与所述盖板结合的卡齿,所述盖板包括可观测检测结果的检测窗、可滴加样品的加样孔和用于与所述背板的卡齿结合的固定孔;所述试纸条组件通过所述卡齿与所述固定孔结合而嵌合在所述背板和所述盖板之间;特别的,所述包被分析膜正对所述检测窗,所述样品垫正对所述加样孔。独立包装的铂卟啉标记特异抗体分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖。

[0040] 进一步,制备所述快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件制成的检测卡组件的方法,包括以下三个步骤:

[0041] 1) 制成背板和盖板

[0042] 用聚苯乙烯或聚氯乙烯制成背板和盖板,所述背板包括放置所述试纸条组件的卡槽和用于与所述盖板结合的卡齿,所述盖板包括可测结果的检测窗、可滴加样品的加样孔以及用于与所述背板的卡齿结合的固定孔。

[0043] 2) 组装

[0044] 将试纸条组件放在所述背板的所述卡槽内,通过所述背板的卡齿与所述盖板的固定孔结合,将试纸条组件嵌合在背板和盖板之间,其中,包被分析膜正对所述检测窗,样品垫正对所述加样孔。

[0045] 3) 包装:

[0046] 将 1 人份的试纸条、卡盒和一包干燥剂封装在铝箔塑料袋内,并将多组所述铝箔塑料袋和对应的多组所述独立包装的铂卟啉标记特异抗体装入一个包装盒,在 2℃ -8℃ 环境下避光不冻存的进行保存。

[0047] 本发明具有以下有益之处:

[0048] 本发明将铂卟啉发光材料与免疫层析技术相结合的试纸条检测人体内 C- 反应蛋白水平,为传统的免疫层析技术带来了突破性的变革:

[0049] 1)、铂卟啉发光标记物的特点,使得以其作为标记物的免疫层析试纸条可与仪器结合,对目标被检测物进行灵敏度极高的精确定量检测;

[0050] 2)、铂卟啉所具有的特征光谱,使得基于铂卟啉发光技术的免疫层析试纸条可进行灵敏度极高的多重分析,即一次性对生物样品中的多个目标被检测物进行检测;

[0051] 3)、铂卟啉独特的大 Stock 位移的发光现象,使其作为标记物的检测过程排除了由于目标被检测物自发荧光造成干扰的可能,提高了信噪比,从而提高了检测的灵敏度和特异性;

[0052] 4)、通过共价方式交联生物活性分子,在保证检测灵敏度的前提下提高了检测系统的可靠性和稳定性。

[0053] 进一步,本发明提供的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件,利用荧光的高灵敏特点,且样品与铂卟啉标记抗体反应后再加入检测卡,使得样品与铂卟啉标记抗体在液相中全面接触、反应充分,因此可大幅度提高反应灵敏度,同时增加了样品的稀释倍数,去除了样品的基质效应,使定量结果有很好的可重复性,而且提高了定量结果的精密度和准确度,可满足同时检测高值和低值的临床诊断要求。

附图说明

- [0054] 图 1 为本发明试纸条的结构示意图；
- [0055] 图 2 为本发明的卡盒分解结构示意图；
- [0056] 图 3 为本发明的铂卟啉标记特异抗体发光材料的发射光谱曲线；
- [0057] 图 4 为本发明的反应方式示意图；
- [0058] 图 5 为本发明的检测结果示意图；
- [0059] 其中, a :阳性 ;b :阴性 ;c :无效；
- [0060] 图 6 为本发明的 C- 反应蛋白检测标准工作曲线；
- [0061] 其中,  $Y = 1.0177X + 0.8727, R^2 = 0.9976$ ；
- [0062] 图 7 为本发明的 C- 反应蛋白检测结果相关性分析曲线；
- [0063] 其中,  $Y = 0.9993X - 2.6157, r = 0.9988$ 。

### 具体实施方式

[0064] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明。

[0065] 实施例 1：

[0066] 参照附图 1, 一种快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件, 包括试纸条和与试纸条配合使用且独立包装的铂卟啉标记特异抗体 ; 其中试纸条是由底衬 1 和设在底衬 1 上的依次接合的吸水垫 2、包被分析膜 3、样品垫 6 组成 ; 所述包被分析膜 3 上设有检测线 4 和质控线 5 ; 所述检测线 4 包被特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体, 质控线 5 包被特异抗体为抗兔 IgG 抗体 ;

[0067] 其中, 底衬 1 表面涂覆有黏胶或双面胶, 用于固定所述的吸水垫 2、包被分析膜 3 和样品垫 6, 具体的, 包被分析膜 3 粘附在所述底衬 1 的中间, 同时包被分析膜 3 两侧分别与所述吸水垫 2 和所述样品垫 6 连接。

[0068] 包被分析膜 3 由硝酸纤维素膜组成, 包被分析膜 3 上喷涂抗 C 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体。

[0069] 样品垫 6 为磷酸盐缓冲液缓浸泡过的玻璃纤维膜, 样品垫 6 粘附在底衬 1 上, 其中, 样品垫 6 与包被分析膜 3 的连接处重叠 1-2mm。

[0070] 吸水垫 2 为滤纸, 具体的为吸水纸或滤油纸 ; 吸水垫 2 粘附在底衬 1 上, 同时吸水垫 2 与包被分析膜 3 的连接处重叠 1-2mm。

[0071] 所述的铂卟啉标记特异抗体为抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 B 和抗兔 IgG 抗体, 将所述铂卟啉标记特异抗体用含如下组分的 0.01-0.1M 磷酸盐缓冲液稀释, 再用塑料试剂瓶密封包装而得 : 5% -20% 甘油、1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 甘氨酸和 0.01% -0.05% 表面活性剂。

[0072] 上述快速定量检测 C 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件的制备方法, 步骤为：

[0073] 1、抗体的制备

[0074] 选用纯化的基因工程表达的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体、抗兔 IgG 抗体和纯化的兔 IgG 抗体。

[0075] 2、包被分析膜 3 的制备

[0076] 采用喷膜机分别在一硝酸纤维素膜上划检测线 4 和质控线 5, 划线细致均匀, 检测线 4 与质控线 5 间隔 5mm；

[0077] 用检测线包被缓冲液稀释抗 C- 反应蛋白单克隆抗体至浓度为 5--20ug/ml, 采用喷膜机将抗肌红蛋白单克隆抗体喷印在硝酸纤维膜的检测线上;

[0078] 用质控线包被缓冲液稀释纯化的兔 IgG 抗体至浓度为 5--20ug/ml, 采用喷膜机将纯化的兔 IgG 抗体喷印在硝酸纤维膜的质控线上;

[0079] 将喷膜后的硝酸纤维膜放入 30-50℃ 的真空干燥箱内, 干燥 20-30 分钟后取出密封备用。

[0080] 其中, 检测线包被缓冲液为 50mM 的 pH 值 7.6 的磷酸盐缓冲液, 此磷酸盐缓冲液含 1% 甲醇、0.5% 海藻糖、0.5% 牛血清白蛋白和 12D8 抗体 1mg/ml。

[0081] 质控线包被缓冲液为 50mM、pH 值 7.6 的磷酸盐缓冲液, 此磷酸盐缓冲液含 1% 甲醇、0.8% 牛血清白蛋白和 0.5mg/ml 兔 IgG 抗体。

[0082] 3、样品垫 6 的制备:

[0083] 用含 0.2% 聚乙二醇、2.5% 牛血清白蛋白、0.03% 表面活性剂的 0.01M 磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜, 将处理后的玻璃纤维膜放入 30-50℃ 的真空干燥箱内, 干燥 3 小时后取出密封备用。

[0084] 4、制备检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条:

[0085] 按照反应顺序, 先将包被分析膜 3 粘附在底衬 1 中间位置上, 在包被分析膜 3 一侧粘附吸水垫 2, 包被分析膜 3 和吸水垫 2 的连接处重叠 1-2mm; 在包被分析膜 3 另一侧粘附样品垫 6, 包被分析膜 3 和样品垫 6 的连接处重叠 1-2mm; 再将黏贴好包被分析膜 3、吸水垫 2 和样品垫 6 的底衬 1 裁切成 4mm 宽的细条。

[0086] 5、铂卟啉标记抗体的制备

[0087] 将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 7D9、10C11 和抗兔 IgG 抗体, 分别用 0.1M 碳酸氢钠溶液稀释至 1mg/ml, 各取 5ml 抗体溶液, 分别加入 30mg 荧光素铂卟啉溶解液, 搅匀, 室温孵育 1 小时, 每隔 15 分钟混匀一次。最后用 G25 凝胶柱过柱分离纯化, 收集标记好的铂卟啉标记抗体, 用含 0.01% -0.5% 聚乙二醇、1% -5% 牛血清白蛋白、5% -20% 甘油、0.01% -0.05% 表面活性剂的 0.01M 磷酸盐缓冲液稀释, 用塑料瓶密封包装, 于 4℃ 保存。

[0088] 6、铂卟啉标记抗体工作液的制备

[0089] 按照试验及使用需要确定适量浓度的铂卟啉标记的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体, 采用含 5% -20% 甘油、1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 甘氨酸和 0.01% -0.05% 表面活性剂的 0.01-0.1M 磷酸盐缓冲液一并稀释, 分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖, 其中每个塑料试剂瓶的分装量为 0.3-3ml, 统一在 2-8℃ 下保存。

[0090] 参阅图 2 所示, 一种由快速定量检测抗 C 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件制成的检测卡组件, 其包括试纸条、由用聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的盖板 11 和用聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的背板 13 组成的卡盒以及独立包装的铂卟啉标记特异抗体 15。所述背板 13 包括放置试纸条的卡槽 12 和用于与盖板结合的卡齿 14; 所述盖板 11 包括可观测检测结果的检测窗 8、可滴加样品的加样孔 7 和用于与背板 13 的卡齿 14 结合的固定孔 10。所述试纸条通过所述卡齿 14 与所述固定孔 10 结合而嵌合在所述背板 13 和所述盖板 11 之间, 即形成了检测卡。其中, 所述包被分析膜 3 正对所述检测窗 8, 所述样品垫 6 正对所述加样孔 7; 另外, 独立包装的铂卟啉标记特异抗体 15 分装在塑料试剂瓶中并密封瓶盖。

[0091] 本发明提供一种制备快速定量检测抗 C 反应蛋白的免疫荧光试纸条组件制成的

检测卡组件的方法,其包括以下步骤:

[0092] 1) 制成背板 13 和盖板 11

[0093] 用聚苯乙烯或聚氯乙烯制成背板 13 和盖板 11,所述背板 13 包括放置所述试纸条组件的卡槽 12 和用于与所述盖板 11 结合的卡齿 14,所述盖板 11 包括可测结果的检测窗 8、可滴加样品的加样孔 7 以及用于与所述背板的卡齿 14 结合的固定孔 10。

[0094] 2) 组装

[0095] 将试纸条组件放在所述背板 13 的所述卡槽内 12,通过所述背板 13 的卡齿 14 与所述盖板 11 的固定孔 10 结合,将试纸条组件嵌合在背板 13 和盖板 11 之间,其中,包被分析膜 3 正对所述检测窗 8,样品垫 6 正对所述加样孔 7。

[0096] 3) 组装、包装

[0097] 将 1 人份的试纸条、卡盒和一包干燥剂封装在铝箔塑料袋内,并将 25 人份的所述铝箔塑料袋和对应的 25 瓶所述独立包装的铂卟啉标记特异抗体装入一个包装盒,在 2℃ -8℃ 环境下避光不冻存的进行保存。

[0098] 本发明的检测原理

[0099] 对如图 3 所示的铂卟啉发光材料的发射光谱曲线进行分析,发现铂卟啉所具有的特征光谱的激发光光源范围为 390-420nm,发射光波长范围为 600-700nm。由于铂卟啉发光标记物的特点,使得以其作为标记物的免疫荧光试纸条可与仪器结合,使得基于铂卟啉发光技术的免疫层析试纸条可进行灵敏度极高的多重分析,且对目标被检测物进行灵敏度极高的精确定量检测。

[0100] 另外,本发明的快速定量检测 C- 反应蛋白的免疫荧光试纸条及检测卡,利用荧光的高灵敏特点,使待测样品与铂卟啉标记先在试剂瓶内反应,由于待测样品与铂卟啉标记在液相中全面接触,反应充分,因此可大幅度提高反应灵敏度,同时增加了待测样品的稀释倍数,去除了待测样品的基质效应,使定量结果有很好的可重复性;而且铂卟啉标记上的特异抗体与待测样品充分结合形成一复合物,然后将复合物转加到检测卡的加样孔 7 的样品垫 6 上,实现铂卟啉发光材料与免疫层析技术相结合从而检测人体内 C- 反应蛋白水平。如图 4 所示,当复合物加到检测卡的加样孔 7 的样品垫 6 上后,在吸水垫 2 的吸力下铂卟啉标记抗体 15 流经到检测卡中的包被分析膜 3 上,如果该复合物具有 C- 反应蛋白 16,其能被检测线 4 上的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 17 捕获,在绿色光照射下以红外光信号的形式表现出来,所发出的荧光可用专用仪器定量测定,荧光强度与样品中 C- 反应蛋白的浓度成正比。如果复合物中 C- 反应蛋白低于最低检测标准,则检测线 4 不会发出荧光。两外,参阅图 5 的 a、b、c 所示,试纸条有效的情况下,检测线 4 上的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体 17 与质控线 5 上的兔 IgG 抗体 18 均会与复合物反应发出荧光,即检测线 4 与质控线 5 均发光,试纸条检测结果呈阳性;只有质控线 5 发光,试纸条检测结果呈阴性;两条线均未发光,试纸条检测结果无效。

[0101] 本发明的标准工作曲线的绘制

[0102] 首先,将提纯的 C 反应蛋白标准品用 1 : 10 稀释的正常人血清(采用 pH7. 20. 02M PB 缓冲液稀释)作为稀释液配制系列浓度标准品,浓度为 :0ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml 的 6 份样品。其次,每个样品分别用 10 个 C- 反应蛋白试纸条检测 10 次,10 次检测仪器判读的样品检测 T 值和对照 C 值分别取平均值,最终根据二者的

比值得出每个浓度对应的 T/C 结果,列于表 1。

[0103]

浓度 (ng/ml)	0	10	25	50	100	200
T 平均值	0.227	210.974	447.395	879.403	1784.198	3770.301
C 平均值	13.833	12.983	13.766	13.264	12.873	13.037
T/C	0.02	16.25	32.5	66.30	138.61	289.2

[0104] 以 T/C 值作为 X 坐标,以 C- 反应蛋白浓度作为 Y 坐标绘制标准工作曲线,经统计拟合标准工作曲线的表达式为:  $Y = 1.0177X + 0.8727$ , 拟合系数的平方为  $R^2 = 0.9976$ 。结果见附图 6 :C- 反应蛋白检测标准工作曲线。

[0105] 实施例 2 :

[0106] 本实施例的制备方法与实施例一基本相同,不同点在于步骤 2 中 :

[0107] 检测线包被缓冲液为 20mM 的 pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液,此磷酸盐缓冲液含 0.8% 甲醇、1.0% 海藻糖、0.6% 牛血清白蛋白和 15ug/ml 抗 C- 反应蛋白抗体。

[0108] 质控线 5 包被缓冲液为 50mM、pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液,此磷酸盐缓冲液含 0.7% 甲醇、0.5% 牛血清白蛋白和 0.5mg/ml 兔 IgG 抗体。

[0109] 包被分析膜 3 的制备:调试 BIO-DOT 喷膜机,使其膜液量为 20ul/40cm,将喷膜后的硝酸纤维膜放置在 50℃ 真空干燥箱处理 20 分钟,装袋密封备用。

[0110] 实施例 3 :

[0111] 本实施例的制备方法与实施例一基本相同,不同点在于 :

[0112] 步骤 3 中,用 0.05M、pH 值 10 的碳酸氢钠溶液分别将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体的浓度稀释至 2mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,接着在抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体中分别加入 40mg 荧光材料铂卟啉溶解液搅匀,同时在室温孵育 1.5 小时,其中在孵育过程中每隔 15 分钟混匀一次。

[0113] 实施例 4 :

[0114] 本实施例的制备方法与实施例一基本相同,不同点在于 :

[0115] 步骤 3 中,用 0.2M、pH 值 11 的碳酸氢钠溶液分别将抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体的浓度稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,接着在抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体中分别加入 50mg 荧光材料铂卟啉溶解液搅匀,同时在室温孵育 2 小时,其中在孵育过程中每隔 15 分钟混匀一次。孵育完成后,用规格型号为 G25 的凝胶柱分别进行过柱分离纯化再分别收集铂卟啉标记好的抗 C- 反应蛋白单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体,各自用 0.01M、pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液稀释混匀,于 -20℃ 进行保存,其中所述磷酸盐缓冲液含 0.01% 聚乙二醇、5% 牛血清白蛋白、10% 甘油和 0.02% 表面活性剂。

[0116] 实施例 5 :

[0117] 本实施例的制备方法与实施例一基本相同,不同点在于 :

[0118] 步骤 4 中,用含 0.4% 聚乙二醇 8000、1.5% 牛血清白蛋白、0.02% 表面活性剂的 0.02M、PH 值 7.2 磷酸盐缓冲液浸泡,浸泡处理后,将样品垫 6 放入 60℃ 的真空干燥箱内,干

燥 40 分钟后取出密封备用。

[0119] 对实施例 1-5 的试纸条进行性能方面的测定,最低检测限为 0.01ng/ml。同时对临床样品进行检测。将 58 例收集自医院的 C- 反应蛋白临床样品 (其中阳性 37 份,阴性 21 份) 同时用胶体金免疫层析试纸与本系统进行双盲法检测:

[0120] 胶体金免疫层析试纸法——31 份阳性,27 份阴性 (即 6 份阳性漏检);

[0121] 铂卟啉试纸与仪器法——37 份阳性,21 份阴性,与实际结果完全吻合。同时,与胶体金免疫层析试纸的定性检测相比,铂卟啉试纸与仪器法给出了每份样品的最终准确浓度。

[0122] 将此 58 例收集自医院的 C- 反应蛋白临床样品,同时与美国罗氏 (Roche) 公司 C- 反应蛋白 化学发光法试剂检测进行相关性分析,以化学发光检测结果作为 X 坐标,铂卟啉试纸与仪器法结果作为 Y 坐标绘制相关性分析曲线,表达式为  $Y = 0.9993X - 2.6157$ ,相关性系数为  $r = 0.9988$ 。分析结果见附图 7。按照统计学分析,  $r > 95\%$ ,  $P < 0.01$ ,具有正相关关系。

[0123] 在批内精密度方面,利用实施例 1-5 的试纸条,对含量分别为高值、中值和低值的样品,连续进行至少 10 次检测,计算变异系数 (CV)。对于 C 反应蛋白含量高值 (200ng/ml)、中值 (90ng/ml)、低值 (15ng/ml) 样品各一份分别测定 10 次,根据其测定的数据,采用 SPSS 统计方法分析,以测定结果均值  $\pm$  标准差表示,高值  $201.8 \pm 2.7$ ng/ml, CV2.3%;中值  $89.6 \pm 1.3$ ng/ml, CV5.2%;低值  $15.1 \pm 1.2$ ng/ml, CV7.9%;检测结果 CV 值均小于 15%。

[0124] 在批间精密度方面,利用实施例 1-5 的试纸条,对一份 C- 反应蛋白临床阳性样品用 pH7.20.02M PB 缓冲液稀释 10 倍,连续进行至少 10 次检测,结果列于表 2。计算该份样品重复检测的变异系数 (CV) 为 1.83%。

[0125]

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	36.73	35.46	37.82	36.89	38.13
C-反应蛋白浓度 (ng/ml)	30.2	29.7	31.3	30.3	31.7
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	35.48	38.24	37.63	34.77	34.82
C-反应蛋白浓度 (ng/ml)	29.7	31.8	31.2	29.1	29.2

[0126] 由上述检测可见,本发明检测方法具有更高的灵敏度,且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好地重复性。

[0127] 以上实施例仅用于阐述本发明,而本发明的保护范围并非仅仅局限于以上实施例。本技术领域的普通技术人员依据以上实施例对本发明公开的内容和各项参数所取范围作出适当的修改和变动,均属于本发明的保护范围。

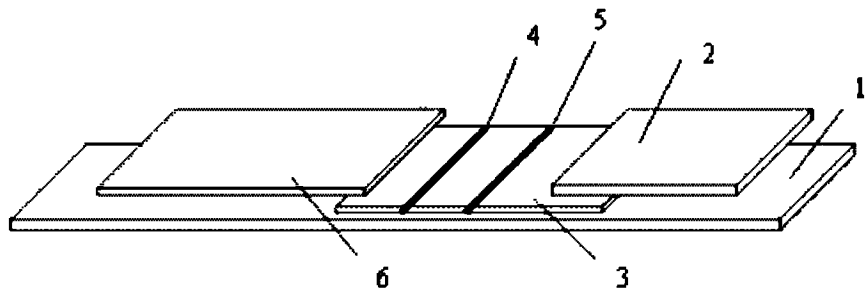


图 1

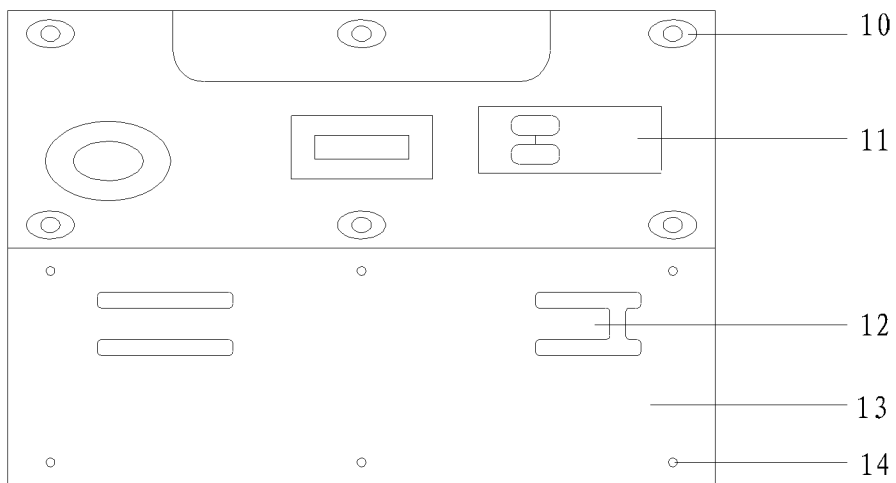
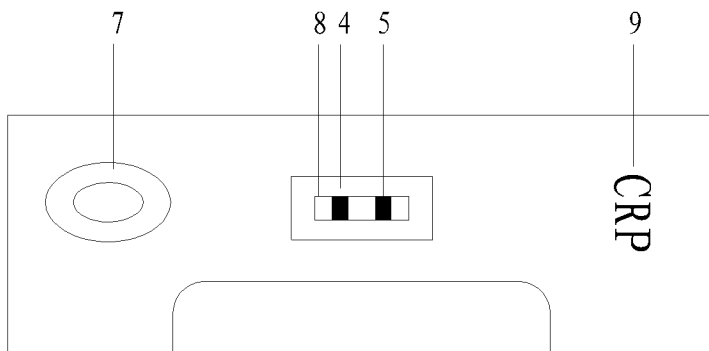


图 2

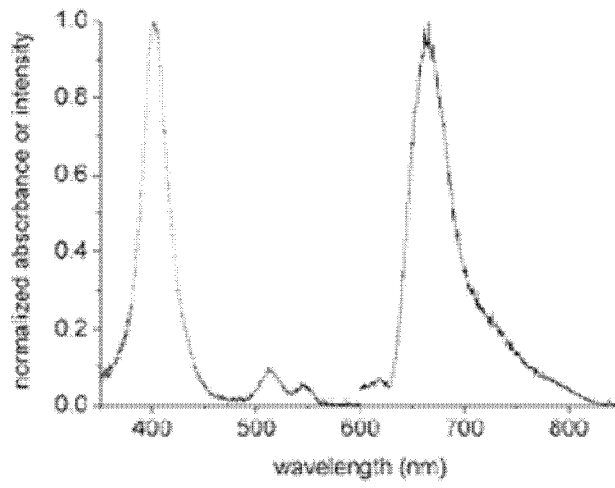


图 3

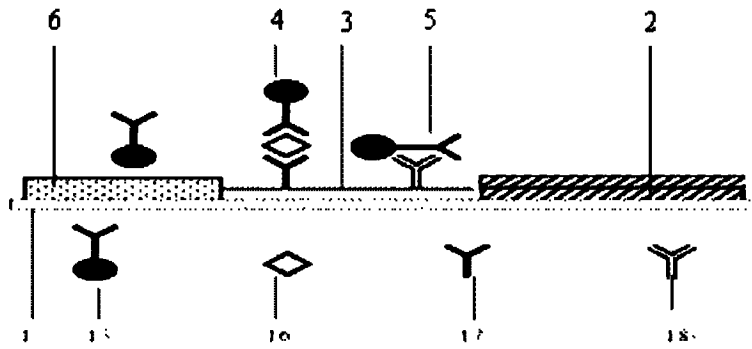


图 4

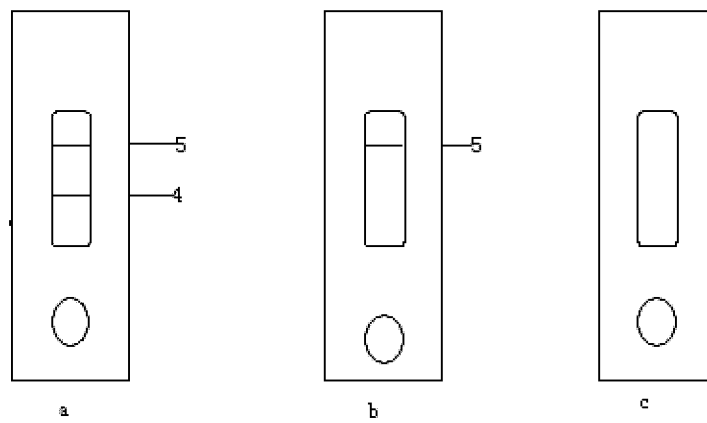


图 5

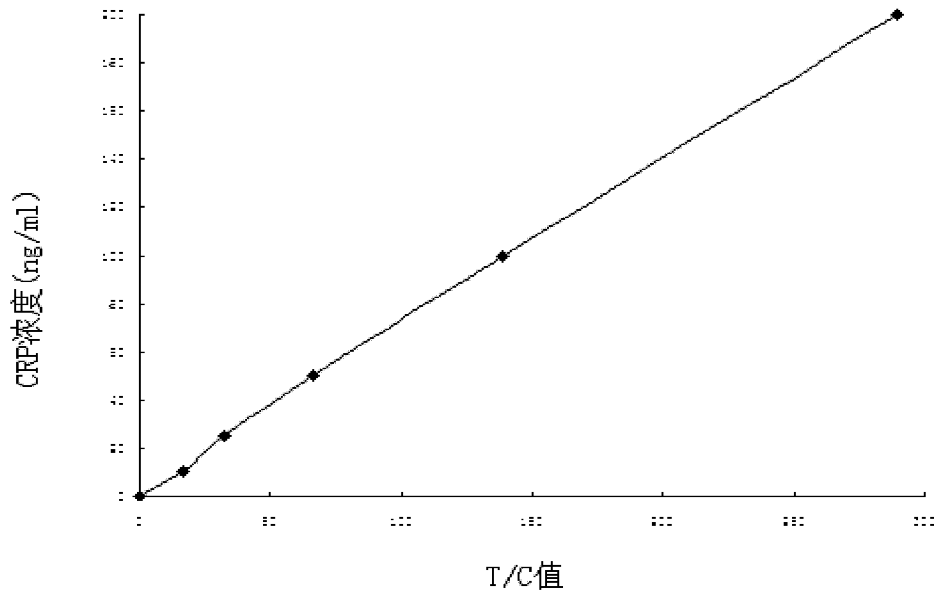


图 6

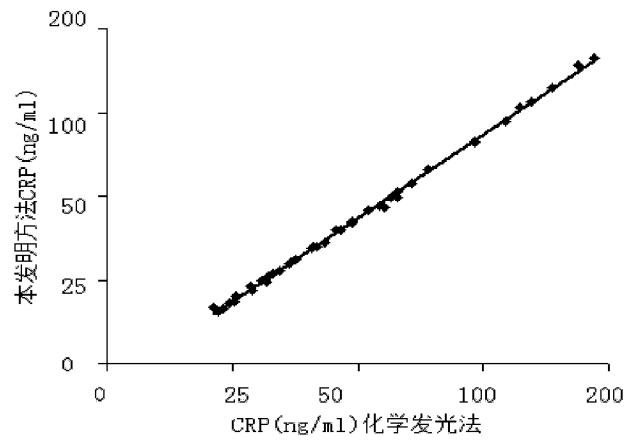


图 7

专利名称(译)	一种快速定量检测C-反应蛋白的免疫荧光试纸条组件、及其制成的检测卡组件和制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102680702B</a>	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201210133569.6	申请日	2012-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州鸿琪光学仪器科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州鸿琪光学仪器科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州鸿琪光学仪器科技有限公司		
[标]发明人	罗琪 谢爱武 梁万兴		
发明人	罗琪 谢爱武 梁万兴		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532 G01N21/64		
代理人(译)	王学强		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102680702A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种快速定量检测C-反应蛋白的免疫荧光试纸条组件、及其制成的检测卡组件和制备方法。试纸条组件包括试纸条和独立包装的铂卟啉标记特异抗体，试纸条包括底衬、吸水垫、包被分析膜及样品垫，该包被分析膜上设有检测线和质控线，检测线包被的特异抗体为抗C-反应蛋白单克隆抗体，质控线包被的特异抗体为兔IgG抗体；检测卡组件包括试纸条、由盖板和背板组成的卡盒以及独立包装的铂卟啉标记特异抗体；应用本发明所提供的试纸条组件检测液体中C-反应蛋白，具备操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点，具有良好的临床应用前景。

