



## (12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 209356509 U

(45)授权公告日 2019.09.06

(21)申请号 201822096208.4

(22)申请日 2018.12.13

(73)专利权人 迪亚莱博(张家港)生物科技有限  
公司

地址 215600 江苏省苏州市张家港保税区  
新兴产业育成中心A栋211室

(72)发明人 顾悦 蒋理国 钱梦姣 张瑜

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 孙仿卫

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

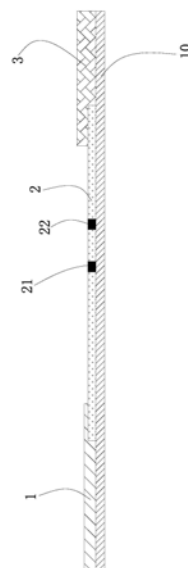
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

### (54)实用新型名称

一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层  
析试剂盒

### (57)摘要

本实用新型涉及一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套,检测卡包括底板、设于底板上的硝酸纤维素膜、设于底板上的且分别位于硝酸纤维素膜长度方向两侧的样本垫和吸水纸、设于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线,护套包括分别位于检测卡上方和下方的上盖和下盖,上盖开设有分别与硝酸纤维素膜和样本垫对应的可视窗和加样口,上盖还开设有用于添加缓冲液的缓冲液添加口。本实用新型快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,相较于ELISA和化学发光法,操作简单,耗时短,成本低。本试剂盒可以定性、定量测定抗CCP抗体,弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测抗CCP抗体的不足。



1. 一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,所述试剂盒包括检测卡和套设在所述检测卡外周的护套,其特征在于:所述检测卡包括底板、设于所述底板上的硝酸纤维素膜、设于所述底板上的且分别位于所述硝酸纤维素膜长度方向两侧的样本垫和吸水纸、设于所述硝酸纤维素膜上的检测线和质控线,所述护套包括分别位于所述检测卡上方和下方的上盖和下盖,所述上盖开设有分别与所述硝酸纤维素膜和样本垫对应的可视窗和加样口,所述上盖还开设有用于添加缓冲液的缓冲液添加口,所述缓冲液添加口位于所述加样口远离所述可视窗的一侧且与所述样本垫相对应设置,所述检测线和质控线有且仅设置有一条。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述缓冲液由包含有牛血清白蛋白、Tween 20及抗人IgG标记的荧光微球的Tris缓冲液构成。

3. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述检测线位于靠近所述样本垫的一侧,所述质控线位于靠近所述吸水纸的一侧。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述检测线由包含有PBS缓冲液的CCP抗原检测溶液包被于所述硝酸纤维素膜上构成。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述质控线由包含有PBS缓冲液的羊抗鼠IgG抗体质控溶液包被于所述硝酸纤维素膜上构成。

6. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述样本垫的材质为玻璃纤维。

7. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述硝酸纤维素膜、样本垫和吸水纸沿所述底板的长度方向将所述底板覆盖,所述样本垫的长度为所述底板长度的 $1/4 \sim 1/3$ 。

8. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述样本垫的靠近所述硝酸纤维素膜的一侧覆盖在所述硝酸纤维素膜之上,所述吸水纸的靠近所述硝酸纤维素膜的一侧覆盖在所述硝酸纤维素膜之上。

9. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述护套还包括形成于所述上盖的内表面且分别位于所述可视窗长度方向两侧的压条柱和压条板。

10. 根据权利要求1所述的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述护套还包括分别形成于所述下盖长度方向两侧的第一限位框和第二限位框、形成所述下盖中部且位于所述下盖宽度方向两侧的压块。

## 一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒

### 技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒。

### 背景技术

[0002] 抗环瓜氨酸肽抗体 (CCP) 是风湿自身抗体系统的一种,它是一种环状聚丝蛋白的多肽片段,是以IgG型为主的抗体,对类风湿性关节炎 (RA) 具有很好的特异性和敏感性。类风湿性关节炎 (RA) 是一种常见的慢性自身免疫性疾病。在全世界大约有1%的人罹患此病。RA能引起关节的疼痛、僵直及肿胀。在发病两年内极可能出现不可逆的骨关节损伤,并可引起多种并发症,如神经系统疾病、心包炎、淋巴腺炎等。因此,及早诊断RA并及时给予缓解病情的药物治疗,对控制病情非常重要。CCP抗体对类风湿性关节炎 (RA) 具有相当高的特异性和敏感性 (68%~75%),即使是RA早期患者,敏感度也有40%~60%。虽然抗CCP抗体在RA发病的致病机制尚未阐明,但作为疾病的早期诊断和进展标记显示了较好的前景。抗CCP抗体主要为IgG类抗体,对RA的特异性约为96%,在RA的早期阶段即可出现阳性,并且具有很高的阳性预报道。抗CCP抗体除早期诊断RA外,对疾病的预后评估也有重要意义,它是鉴别侵蚀性、非侵蚀性RA的灵敏指标,抗CCP抗体阳性患者通常出现、或较抗体阴性者更易发展成更严重的关节骨质破坏。目前抗环瓜氨酸肽 (CCP) 抗体的检测方法主要包括酶联免疫试验 (ELISA)、化学发光法 (CLIA)、胶体金免疫层析法、荧光免疫层析法等,这些方法都有各自的优势和缺点。

[0003] 在目前较常用的抗环瓜氨酸肽 (CCP) 抗体的检测方法中,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。化学发光法成本高,在基层医疗机构的实验室和小型门诊中较难实现该检测项目的广泛应用。胶体金层析只能定性或半定量检测抗CCP抗体。传统免疫荧光层析检测抗CCP抗体采用一步法检测,因CCP抗原小肽难以同待检测物 (抗CCP抗体) 充分结合,导致检测的灵敏度低、准确性差。

### 发明内容

[0004] 本实用新型所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,其操作简单,耗时短,可以定性及定量测定抗CCP抗体,且成本较低。

[0005] 为解决上述技术问题,本实用新型采取的技术方案如下:

[0006] 一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套,检测卡包括底板、设于底板上的硝酸纤维素膜、设于底板上的且分别位于硝酸纤维素膜长度方向两侧的样本垫和吸水纸、设于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线,护套包括分别位于检测卡上方和下方的上盖和下盖,上盖开设有分别与硝酸纤维素膜和样本垫对应的可视窗和加样口,上盖还开设有用于添加缓冲液的缓冲液添加口,缓冲液添加口位于加样口远离可视窗的一侧且与样本垫相对应设置,检测线和质控线有且仅设置

有一条。

[0007] 根据两步法检测的操作需求,增设了缓冲液添加口,其作用一是延长样本流动时间,使待测样本中的抗CCP抗体与硝酸纤维素膜上包被的CCP抗原充分结合,提高检测灵敏度。作用二是提示用户准确加样,检测时可以根据缓冲液添加口处的样本垫浸润情况进行判断,以免错加或漏加缓冲液,在同时使用多卡条分别检测多个样本时尤为重要。

[0008] 优选地,缓冲液由包含有牛血清白蛋白、Tween 20及抗人IgG标记的荧光微球的Tris缓冲液构成。

[0009] 优选地,检测线位于靠近样本垫的一侧,质控线位于靠近吸水纸的一侧。

[0010] 优选地,检测线由包含有PBS缓冲液的CCP抗原检测溶液包被于硝酸纤维素膜上,

[0011] 优选地,质控线由包含有PBS缓冲液的羊抗鼠IgG抗体质控溶液包被于硝酸纤维素膜上构成。

[0012] 优选地,样本垫的材质为玻璃纤维。

[0013] 优选地,硝酸纤维素膜、样本垫和吸水纸沿底板的长度方向将底板覆盖,样本垫的长度为底板长度的1/4~1/3。

[0014] 优选地,样本垫的靠近硝酸纤维素膜的一侧覆盖在硝酸纤维素膜之上,吸水纸的靠近硝酸纤维素膜的一侧覆盖在硝酸纤维素膜之上。

[0015] 优选地,护套还包括形成于上盖的内表面且分别位于可视窗长度方向两侧的压条柱和压条板。

[0016] 优选地,护套还包括分别形成于下盖长度方向两侧的第一限位框和第二限位框、形成下盖中部且位于下盖宽度方向两侧的压块。

[0017] 由于以上技术方案的实施,本实用新型与现有技术相比具有如下优点:

[0018] 本实用新型快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,相较于ELISA和化学发光法,操作简单,耗时短,成本低。本试剂盒可以定性、定量测定抗CCP抗体,弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测抗CCP抗体的不足。此外,相较于传统的免疫荧光层析,本试剂盒采用两步法检测,大大提高了检测的灵敏度和准确性。

## 附图说明

[0019] 图1为本实用新型检测卡的侧向剖面结构示意图;

[0020] 图2为本实用新型上盖的俯视结构示意图;

[0021] 图3为本实用新型上盖的仰视结构示意图;

[0022] 图4为本实用新型下盖的俯视结构示意图;

[0023] 其中:10、底板;1、样本垫;2、硝酸纤维素膜;21、检测线;22、质控线;3、吸水纸;4、上盖;401、加样口;402、缓冲液添加口;403、可视窗;404、压条柱;405、压条板;5、下盖;501、第一限位框;502、第二限位框;503、压块。

## 具体实施方式

[0024] 下面结合附图和具体的实施例对本实用新型做进一步详细的说明。

[0025] 如图1至图4所示,一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套,检测卡包括底板10、设于底板10上的硝酸纤维素膜

2、设于底板10上的且分别位于硝酸纤维素膜2长度方向两侧的样本垫1(样本垫1的材质为玻璃纤维)和吸水纸3、设于硝酸纤维素膜2上的检测线21和质控线22,护套包括分别位于检测卡上方和下方的上盖4和下盖5(上盖4、下盖5均为塑料材质,),上盖4开设有分别与硝酸纤维素膜2和样本垫1对应的可视窗403和加样口401,上盖4还开设有用于添加缓冲液的缓冲液添加口402,缓冲液添加口402位于加样口401远离可视窗403的一侧且与样本垫1相对应设置,检测线21和质控线22有且仅设置有一条,检测线21位于靠近样本垫1的一侧,质控线22位于靠近吸水纸3的一侧。根据两步法检测的操作需求,增设了缓冲液添加口402,其作用一是延长样本流动时间,使待测样本中的抗CCP抗体与硝酸纤维素膜2上包被的CCP抗原充分结合,提高检测灵敏度。作用二是提示用户准确加样,检测时可以根据缓冲液添加口402处的样本垫1浸润情况进行判断,以免错加或漏加缓冲液,在同时使用多卡条分别检测多个样本时尤为重要。

[0026] 具体地,样本垫1的靠近硝酸纤维素膜2的一侧覆盖在硝酸纤维素膜2之上,吸水纸3的靠近硝酸纤维素膜2的一侧覆盖在硝酸纤维素膜2之上,硝酸纤维素膜2、样本垫1和吸水纸3沿底板10的长度方向将底板10覆盖,样本垫1的长度为底板10长度的1/4。

[0027] 缓冲液由包含有牛血清白蛋白、Tween 20及抗人IgG标记的荧光微球的Tris缓冲液构成。检测线21由包含有缓冲液的CCP抗原检测溶液包被于硝酸纤维素膜2上,质控线22由包含有缓冲液的羊抗鼠IgG抗体质控溶液包被于硝酸纤维素膜2上构成。经特殊修饰的CCP抗原浓度为1.5mg/ml-2.5mg/ml,作为捕获抗原。羊抗鼠IgG抗体浓度为1-2mg/ml,作为控制线。

[0028] 进一步地,护套还包括形成于上盖4的内表面且分别位于可视窗403长度方向两侧的压条柱404和压条板405。护套还包分别形成于下盖5长度方向两侧的第一限位框501和第二限位框502、形成下盖5中部且位于下盖5宽度方向两侧的压块503。

[0029] 本实用新型的快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒包括如下生产工艺:

[0030] (一)将CCP抗原进行特殊修饰:

[0031] 1、配制1% BSA溶于10mM PBS缓冲液、50mg/ml EDC溶于10mM PBS缓冲液、4mg/ml CCP抗原溶于10mM PBS缓冲液。2、按2:1:5的比例将步骤(1)中配制好的1% BSA、50mg/ml EDC、4mg/ml CCP抗原溶液混匀,置于摇床孵育2小时,孵育条件:室温,250rpm。3、将孵育后的混合溶液(2)加入超滤管,14000xg离心12min。4、在超滤管中加入400ul 10mM PBS缓冲液,洗涤后14000xg离心12min。5、弃去过滤液,用10mM PBS缓冲液洗涤管底并弃去清洗缓冲液,不留残余液体。将超滤管倒扣,10000xg离心2min。6、取出管底浓缩液,用10mM PBS缓冲液复溶,终浓度2.5mg/ml,置于2-8℃保存。

[0032] (二)标记抗人IgG抗体于荧光微球:

[0033] 1、配制50mg/ml EDC溶于10mM PBS缓冲液。2、将20ul的300nm荧光微球加入至80ul 10mM PBS缓冲液中,震荡混匀。3、在荧光微球溶液(2)中加入2.5ul EDC活化溶液(1),震荡混匀,置于摇床活化15min,活化条件:室温,250rpm。4、用10mM PBS缓冲液配制抗人IgG抗体溶液,终浓度0.2mg/ml,配制体积100ul。5、将活化后的荧光微球溶液(3)置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。6、将0.2mg/ml的抗人IgG抗体溶液(4)加入至荧光微球(5)中,震荡混匀。超声3min,再次震荡混匀后置于摇床孵育2小时,孵育条件:室温,250rpm。7、

将20ul 封闭液(1%牛血清白蛋白溶于10mM PBS缓冲液)加入至孵育后的荧光微球溶液(6)中,置于摇床封闭2小时,封闭条件:室温,250rpm。8、将封闭好的荧光微球溶液(7)置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。9、将500ul 10mM PBS缓冲液加入至(8),复溶荧光微球,震荡混匀后置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。10、将200ul微球保存液(0.1%BSA溶于10mM PBS缓冲液)加入至(9),复溶荧光微球,震荡混匀并超声3min,置于2-8℃保存。

[0034] (三)经修饰后的CCP抗原、羊抗鼠IgG抗体包被于NC膜

[0035] 1、配制CCP抗原检测线溶液:使用10mM PBS缓冲液配制,终浓度为2mg/ml CCP抗原。2、配制羊抗鼠IgG质控线溶液:使用10mM PBS缓冲液配制,终浓度为1mg/ml羊抗鼠IgG抗体。3、将硝酸纤维素膜(NC膜)贴于底板,使用划膜喷金仪,将(1)(2)溶液以1ul/cm的划膜速率划于NC膜。将经过上述处理的NC膜置于37℃烘箱烘烤2小时。

[0036] (四)样本垫封闭

[0037] 1、配制封闭液:使用50 mM Tris缓冲液配制,终浓度为1%BSA、0.2% Tween 20、0.5%蔗糖。2、将上述封闭液均匀涂抹于样本垫,置于37℃烘箱烘烤2小时。

[0038] (五)检测卡制作

[0039] 1、NC膜置于37℃烘箱烘烤2小时后取出,分别将吸水纸和封闭好的样本垫贴于底板上的相应位置。2、按固定尺寸裁切,将裁切后的检测卡置于护套下盖中的相应位置(吸水纸一端置于第一限位框内,样本垫一端置于第二限位框内),安装护套上盖,按压固定。

[0040] (六)缓冲液配制

[0041] 1、配制基础缓冲液:0.1%牛血清白蛋白、0.1% Tween20溶于50 mM Tris缓冲液。2、按1:250的比例,在基础缓冲液中添加抗人IgG抗体标记的荧光微球,震荡混匀。

[0042] 本实用新型试剂盒采用两步法检测样本,具体步骤如下:

[0043] 1、吸取40ul待测样本,滴加至样本加入口,计时3min。2、吸取40ul缓冲液,滴加至缓冲液加入口,计时10min,将卡条插入免疫荧光分析仪,检测并读取数据及检测结果。

[0044] 综上所述,本实用新型快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒,相较于ELISA和化学发光法,操作简单,耗时短,成本低。本试剂盒可以定性、定量测定抗CCP抗体,弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测抗CCP抗体的不足。此外,相较于传统的免疫荧光层析,本试剂盒采用两步法检测,大大提高了检测的灵敏度和准确性。

[0045] 以上对本实用新型做了详尽的描述,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本实用新型的内容并加以实施,并不能以此限制本实用新型的保护范围,凡根据本实用新型的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本实用新型的保护范围内。

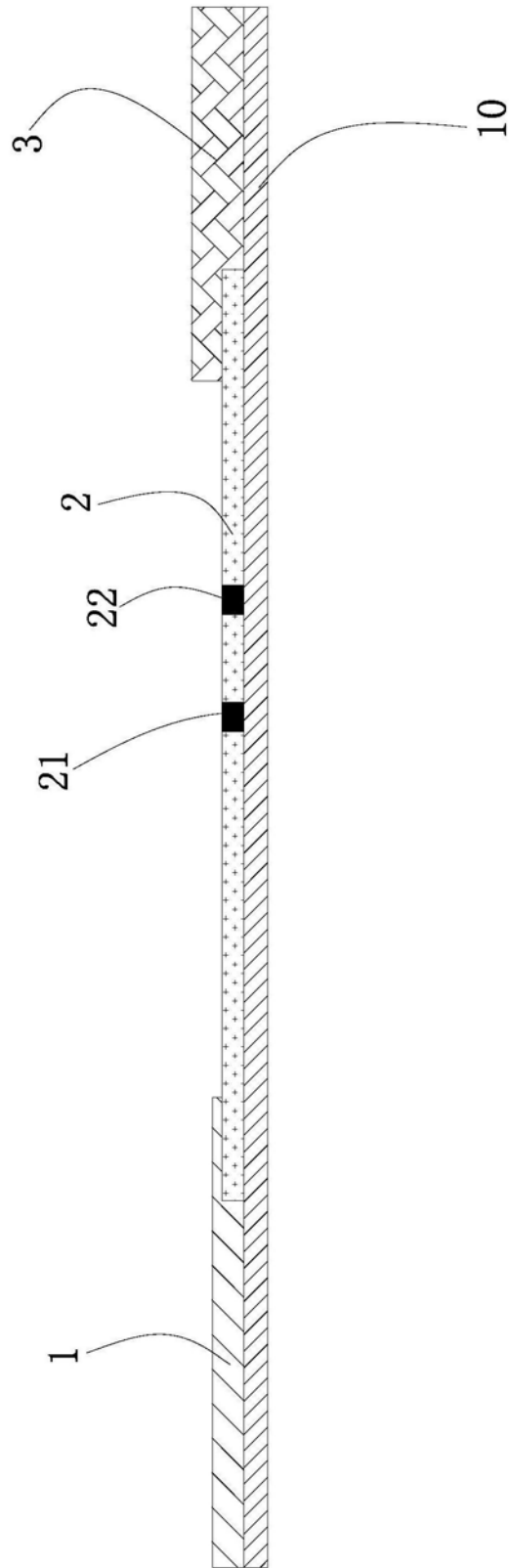


图1

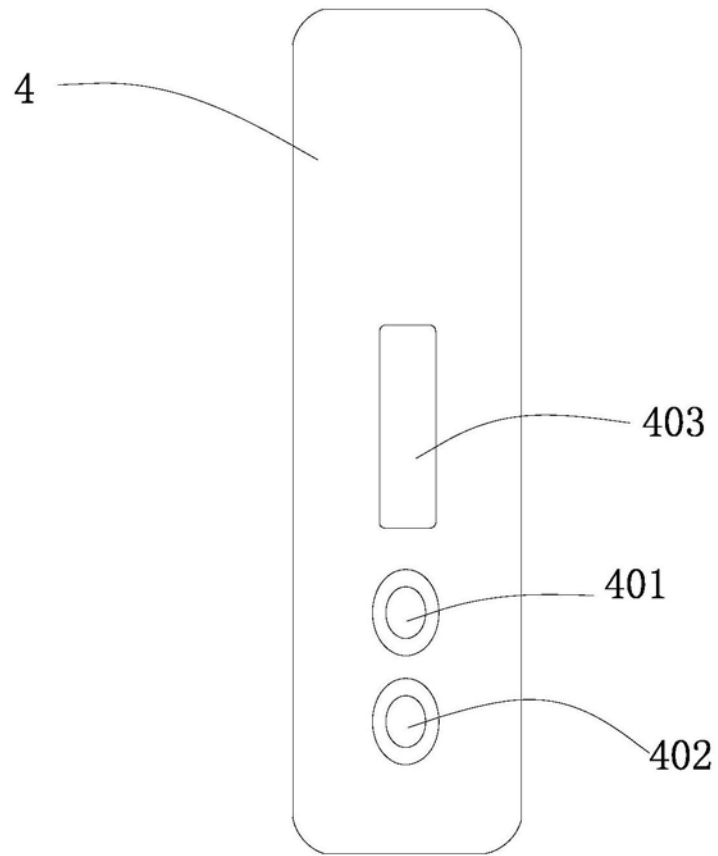


图2



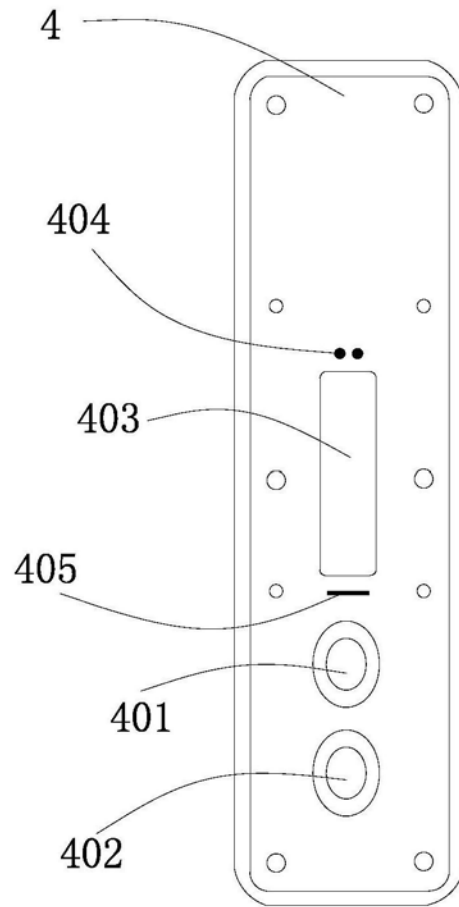


图3

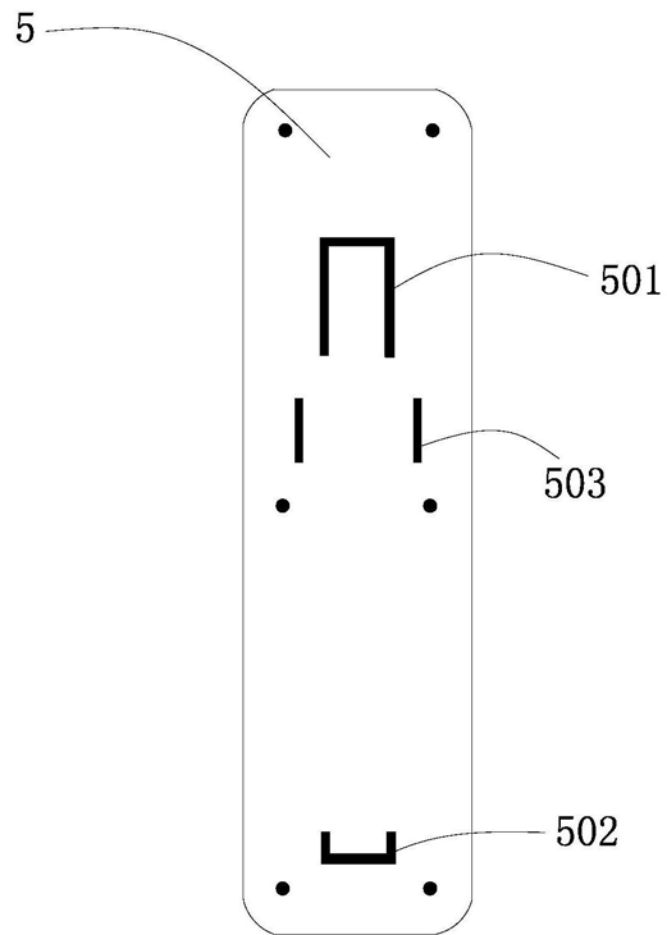


图4

专利名称(译)	一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN209356509U</a>	公开(公告)日	2019-09-06
申请号	CN201822096208.4	申请日	2018-12-13
[标]发明人	顾悦 蒋理国 张瑜		
发明人	顾悦 蒋理国 钱梦姣 张瑜		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本实用新型涉及一种快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒，试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套，检测卡包括底板、设于底板上的硝酸纤维素膜、设于底板上的且分别位于硝酸纤维素膜长度方向两侧的样本垫和吸水纸、设于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线，护套包括分别位于检测卡上方和下方的上盖和下盖，上盖开设有分别与硝酸纤维素膜和样本垫对应的可视窗和加样口，上盖还开设有用于添加缓冲液的缓冲液添加口。本实用新型快速定量检测抗CCP抗体的免疫荧光层析试剂盒，相较于ELISA和化学发光法，操作简单，耗时短，成本低。本试剂盒可以定性、定量测定抗CCP抗体，弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测抗CCP抗体的不足。

