



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105785038 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610196332.0

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2016.03.31

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 广州市微米生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城科丰路31号华南新材料创新园G8栋502号

(72)发明人 汤永平 李之华 张晓丽 潘秀华 解巧丽

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利代理事务所(普通合伙) 44295

代理人 王海曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种双检测线血清淀粉样蛋白A(Serum amyloid A protein,SAA)免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法;旨在提供一种能同时提高灵敏度和检测范围,满足临床上对急性炎症、慢性炎症患者体内SAA水平检测的一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂,其技术要点:包括底板,所述的底板上衔接样品垫,结合垫、包被膜和吸收垫,所述的结合垫上喷有抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY,所述的抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY被同一种荧光微球标记;所述的包被膜上设有检测线T1、检测线T2和质控C线,所述的检测线T1包被的是抗SAA单克隆抗体2,所述的检测线T2包被有抗原SAA蛋白,质控C线包被有羊抗鸡IgY;属于体外诊断试剂技术领域。



1. 一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂,包括PVC底板1,所述的底板上衔接样品垫2,结合垫3、包被膜4和吸收垫5,其特征在于,所述的结合垫上喷有抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY,所述的抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY被同一种荧光微球标记;所述的包被膜上设有检测线T₁、检测线T₂和质控C线,所述的检测线T₁包被的是抗SAA单克隆抗体2,所述的检测线T₂包被有抗原SAA蛋白,质控C线包被有羊抗鸡IgY。

2. 制备权利要求1所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的方法,是在PVC底板上依次衔接样品垫,结合垫、包被膜和吸收垫,其特征在于:

A. 所述的结合垫3的制备方法是:将耦联荧光微球标记抗SAA抗体1与鸡IgY荧光微球溶液按2:1的体积比混合均匀,用喷金划膜仪喷至聚酯纤维素膜上,喷量为3-5 μ L/cm,放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥8小时;

B. 所述的荧光微球标记抗SAA抗体1的制备步骤依次包括下述步骤:

1) 制备荧光微球溶液

2) 将抗SAA单克隆抗体1按100 μ g/1mL的量,加入到步骤1)荧光微球溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

3) 按10 μ g/1mL的量,向步骤2)中加入BSA,封闭未耦联抗体的活化羧基位点,反应30-60min,反应完成后将荧光微球溶液过分子筛层析柱进行纯化,用pH7.4,0.01M PBS为液洗脱,收集荧光微球洗脱液以4 $^{\circ}$ C,16000rpm,30min离心,弃去上清,加入pH 9.0浓度0.05M Tris-HCl的复溶液后超声混匀;

C. 所述的荧光微球标记鸡IgY抗体的制备步骤如下:

1) 制备荧光微球溶液

2) 将鸡IgY抗体按100 μ g/1mL的量,加入到步骤1)荧光微球溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

3) 按10 μ g/1mL的量,向步骤2)中加入BSA,封闭未耦联抗体的活化羧基位点,反应30-60min,反应完成后将荧光微球溶液过分子筛层析柱进行纯化,用pH7.4,0.01M PBS为洗脱液,收集荧光微球洗脱液,以4 $^{\circ}$ C,16000rpm,30min离心,弃去上清,加入pH 9.0浓度0.05M Tris-HCl的复溶液后超声混匀;

D. 所述的包被膜的制备方法如下:

1、包被

1) 检测T₁线:用0.01MPBS,pH7.4内含0.5%-3%的海藻糖,将抗SAA抗体2稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s;

2) 检测T₂线:用0.01MPBS,pH7.4内含0.5%-3%的海藻糖将SAA抗原稀释到2.5mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s;

3) 质控C线:用0.01M的PBS,pH7.4将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s;

2、干燥

放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥8小时。

3. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的样品垫2的制备方法是:将样品垫浸泡在样品垫缓冲液中,30min之后取出,于室温干燥16-18小时。

4. 根据权利要求3所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的样品垫的缓冲液配方如下:将0.5wt% BSA、1wt%海藻糖、1wt% S9溶解于0.01M, pH7.4的PBS缓冲液中。

5. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤B)中所述的荧光微球溶液的制备方法是:用1mI 0.1M PH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸加入0.3mg 0.3 μ m时间分辨荧光微球;加入25 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和30 μ L 50mg/mI N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应30min;以4 $^{\circ}$ C, 16000rpm离心20min,弃上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mI 0.1M PH6.0的MES,超声混匀,得到荧光微球溶液。

6. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的检测线T₁线与包被膜下缘的距离为0.5cm,与上缘的距离为2cm。

7. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的检测线T₂线位于检测线T₁线与质控线C线之间,与T₁线的距离为0.5cm,与C线为0.8cm。

8. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的质控线C线与包被膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm。

9. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的方法,其特征在于,所述的抗SAA单克隆抗体1的克隆号SC-52211,鼠源克隆抗体,亚型IgG1,识别SAA蛋白的氨基端19-30氨基酸序列,所述的氨基端19-30氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

10. 根据权利要求2所述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的抗SAA单克隆抗体2为抗体克隆号SC-52216,鼠源克隆抗体,亚型IgG1,识别SAA蛋白氨基端70-79,氨基酸序列SEQ ID NO.2所示。

双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明提供一种免疫荧光层析定量检测试剂,具体地说,是一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法;属于体外诊断试剂技术领域。

背景技术

[0002] 血清淀粉样蛋白A(Serum amyloid Aprotein,SAA),是一种敏感的急性期炎症标志物,正常人血清SAA值为0-0.78mg/l,当机体受到感染、炎症、损伤、肿瘤等刺激后,肝脏细胞大量分泌SAA,血清中SAA水平随着机体炎症反应的发展可在5-6小时内迅速升高约1000倍,8-12h内SAA即可达到峰值,增高幅度可达正常值的2000倍,在临床诊断中当SAA含量>10mg/l时,才作为急性炎症的标志。当机体的炎症反应被控制以后,SAA迅速降低至正常水平,正是这种特征使SAA可作为反应机体感染或创伤的等炎症状态的敏感指标,同时作为炎症恢复的评价指标。临床意义与CRP相类似,检测血液中SAA的浓度水平,有助于诊断非特异炎症、评估炎症活动程度、监控炎症活动及治疗后效果。

[0003] 除了急性期由肝脏大量分泌SAA外,在正常的脂肪细胞、肿瘤细胞以及动脉粥样硬化斑块中的多种细胞也能合成。因此,在过度肥胖处于亚健康状态的人群及患有动脉粥样硬化的人群中,血清SAA的含量也高于正常人,而处于慢性炎症的状态。SAA不仅仅是炎症标志物,也是炎症信号触发剂,可诱导IL-6、IL-8和MCP-1等多种促炎性细胞因子的分泌,促发全身系统性慢性低度炎症的发生,同时SAA能够刺激巨噬细胞、内皮细胞等相关靶细胞,上调各种炎症因子的表达,进一步加重机体的炎症水平。SAA进入血浆后,能迅速与HDL结合,形成SAA-HDL复合物,SAA结合到HDL上后能使其更容易与血管上的蛋白聚糖黏附,从而引起和加重血管动脉粥样硬化的形成。

[0004] 此外,类风湿性关节炎、结核病、麻风病患者体内SAA浓度的变化是一个慢性升高的过程,是合成AA-淀粉纤维的先决条件,继而会引发淀粉样变性。因此,能对慢性变化的SAA进行检测,有利于临床对患者治疗方案的调整。

[0005] 临床目前针对的是急性期SAA进行检测,而对非急性期,SAA含量低于急性期,却又明显高于正常人血清的含量,长期处于慢性炎症的患者缺乏快速检测的方法。因此,发明一种能同时适用于急性期和慢性炎症期SAA含量检测的试纸在个人在诊断、体检等方面的运用具有重要的意义。

[0006] 目前,SAA的检测方法主要有以下几种:

[0007] 酶联免疫吸附法(ELISA),采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接,然后通过酶与底物产生颜色反应,用于定量测定。采用这种方法进行测定具有较高的灵敏度,但是操作过程繁琐,每次测值均需要绘制标准曲线,准确度误差大,测定时间较长,仪器昂贵且需要经过一定专业培训的人员进行操作,因此不符合临床快速检测的要求。

[0008] 胶体金免疫层析法,该方法操作简单,但灵敏度低,当样本中的含量低时会出现漏检的情况,通常用于定性或者半定量的测定,不符合临床上进行含量测定的需求,因此受到一定的限制。

[0009] 免疫比浊法,利用抗原抗体反应形成一定结构的免疫复合物,根据复合物在溶液中所具有的特殊光学性质进行检测,但在检测时抗原或抗体过量会造成误差较大,并且容易受到血脂的影响。

[0010] 荧光免疫层析法,利用荧光物质在特定的激发光照射下发射荧光的特点,具有特异性强、重复性好的特点,针对急性炎症时SAA含量进行检测,目前已在医学上进行推广,并且发展迅猛。

[0011] 中国专利201510583004.1公开了一种CRP/SAA定量联合检测免疫荧光层析试纸及其制备方法,中国专利201510014077.9公开了PCT/SAA联合快速检测用试纸条及其制备方法,但是,针对SAA快速的检测免疫层析法中,胶体金免疫层析和荧光免疫层析在进行质控线C的设置时,一般在包被膜4上包被一条抗IgG的单克隆抗体或者是抗IgG的多克隆抗体,用来捕获胶体金或者是荧光微球标记的单克隆抗体,因此在测值的过程中受层析效果的影响造成C值的波动较大,起到的作用也仅仅是试纸条检测结果是否有效,在定量检测的实验中,测值的重复性差。

发明内容

[0012] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种能同时提高灵敏度高和检测范围,满足了临床上对急性炎症、慢性炎症患者体内SAA水平的检测的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂,本发明还公开上述检测试剂的制备方法。

[0013] 本发明提供的第一个技术方案是这样的:

[0014] 一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂,包括PVC底板,所述的底板上衔接样品垫,结合垫、包被膜和吸收垫,所述的结合垫上喷有抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY,所述的抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY被同一种荧光微球标记;所述的包被膜上设有检测线T₁、检测线T₂和质控C线,所述的检测线T₁包被的是抗SAA单克隆抗体2,所述的检测线T₂包被有抗原SAA蛋白,质控C线包被有羊抗鸡IgY。

[0015] 本发明提供的第二个技术方案是这样的:

[0016] 一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的方法,是在PVC底板上依次衔接样品垫,结合垫、包被膜和吸收垫,其特征在于,

[0017] 所述的结合垫3的制备方法是:将耦联荧光微球标记抗SAA抗体1与鸡IgY荧光微球溶液按2:1的体积比混合均匀,用喷金划膜仪喷至聚酯纤维素膜上,喷量为3-5 μ L/cm,放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥8小时;

[0018] 所述的荧光微球标记抗SAA抗体1的制备步骤依次包括下述步骤:

[0019] 1)制备荧光微球溶液

[0020] 2)将抗SAA单克隆抗体1按100 μ g/1mL的量,加入到步骤1)荧光微球溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0021] 3)按10 μ g/1mL的量,向步骤2)中加入BSA,封闭未耦联抗体的活化羧基位点,反应30-60min,反应完成后将荧光微球溶液过分子筛层析柱进行纯化,用pH7.4,0.01M PBS为液洗脱,收集荧光微球洗脱液以4 $^{\circ}$ C,16000rpm,30min离心,弃去上清,加入pH 9.0浓度0.05M Tris-HCl的复溶液后超声混匀;

[0022] 所述的荧光微球标记鸡IgY抗体的制备步骤如下:

[0023] 1)制备荧光微球溶液

[0024] 2)将鸡IgY抗体按100 μ g/1mL的量,加入到步骤1)荧光微球溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0025] 3)按10 μ g/1mL的量,向步骤2)中加入BSA,封闭未耦联抗体的活化羧基位点,反应30-60min,反应完成后将荧光微球溶液过分子筛层析柱进行纯化,用pH7.4,0.01M PBS为洗脱液,收集荧光微球洗脱液,以4 $^{\circ}$ C,16000rpm,30min离心,弃去上清,加入pH 9.0浓度0.05M Tris-HCl的复溶液后超声混匀;

[0026] D)所述的包被膜的制备方法如下:

[0027] 1、包被

[0028] 1)检测T₁线:用0.01MPBS,pH7.4内含0.5%-3%的海藻糖,将抗SAA抗体2稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s;

[0029] 2)检测T₂线:用0.01MPBS,pH7.4内含0.5%-3%的海藻糖将SAA抗原稀释到2.5mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s;

[0030] 3)质控C线:用0.01M的PBS,pH7.4将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s;

[0031] 2、干燥

[0032] 放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥8小时。

[0033] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的样品垫的制备方法是:将样品垫浸泡在样品垫缓冲液中,30min之后取出,于室温干燥16-18小时;

[0034] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的样品垫的缓冲液配方如下:将0.5wt%BSA、1wt%海藻糖、1wt%S9溶解于0.01M,pH7.4的PBS缓冲液中。

[0035] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,步骤B)中所述的荧光微球溶液的制备方法是:用1mL 0.1M PH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸加入0.3mg0.3 μ M时间分辨荧光微球;加入25 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和30 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应30min;4 $^{\circ}$ C,16000rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mL 0.1M PH6.0的MES,超声混匀,得到荧光微球溶液。

[0036] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的检测线T₁线与包被膜下缘的距离为0.5cm,与上缘的距离为2cm。

[0037] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的检测线T₂线位于检测线T₁线与质控线C线之间,与T₁线的距离为0.5cm,与C线为0.8cm。

[0038] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的质控线C线与包被膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm。

[0039] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的抗SAA单克隆抗体1的克隆号SC-52211,鼠源克隆抗体,亚型IgG1,识别SAA蛋白的氨基端19-30氨基酸序列,所述的氨基端19-30氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0040] 进一步的,上述的双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂的制备方法,所述的抗

SAA单克隆抗体2为抗体克隆号SC-52216,鼠源克隆抗体,亚型IgG1,识别SAA蛋白氨基端70-79,氨基酸序列SEQ ID NO.2所示。

[0041] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案的有益效果:

[0042] (1)在包被膜4上采用双T线形式,低浓度时采用竞争法,高浓度时采用双抗夹心法,提高了检测的灵敏度,拓宽了试剂的检测范围,避免了免疫反应中常常出现的HOOK效应;

[0043] (2)C、T线采用了双控系统,保证了质控线C的荧光值的稳定,减少了测试过程中由于C值波动而造成的误差;

[0044] (3)在荧光微球标记的过程中,利用分子筛的原理对微球进行纯化,将未与微球结合的抗体分开,提高了微球上抗体的标记效率,较少了层析过程中未标记抗体与抗原的结合,减小了误差,提高了检测的准确度。

附图说明

[0045] 图1是本发明提供的试纸条结构示意图;

[0046] 图2是全范围SAA测值 T_1 、 T_2 、C线荧光值变化曲线;

[0047] 图3是低浓度样本检测与荧光值曲线;

[0048] 图4高浓度样本检测与荧光值曲线;

[0049] 图5芯片拟合曲线;

[0050] 图6荧光值 $T_1 < T_2$ 时,芯片 T_2/C 线性拟合曲线;

[0051] 图7荧光值 $T_1 \geq T_2$ 时,芯片 T_1/C 线性拟合曲线。

[0052] 图中符号代表元件或者类似元件如下:

[0053] 底板1、样品垫2、结合垫3、包被膜4、吸收垫5。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施,对本发明的权利要求做进一步的详细说明,任何人在本发明权利要求范围内所做的有限次的修改,仍在本发明的权利要求保护范围之内。

[0055] 实施例1

[0056] 本发明提供一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂,其结构如图1所示,依次由PVC底板1、样品垫2、结合垫3、包被膜4、吸收垫5构成。在结合垫3上喷有同一种荧光微球标记的抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY;在包被膜4上 T_1 位置包被的是抗SAA单克隆抗体2, T_2 位置包被的是抗原SAA蛋白,C线位置包被的是羊抗鸡IgY。SAA荧光微球免疫层析检测试剂的制备方法

[0057] (1)样品垫的制备方法

[0058] 将规格为 $20\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的大小样品垫浸泡在样品垫缓冲液中,30min之后取出,于室温干燥16-18小时,干燥后切割成 $1.6\text{cm} \times 30\text{cm}$ 规格的样品垫。

[0059] 样品垫的缓冲液配方如下:0.5wt%BSA、1wt%海藻糖、1wt%S9溶解于0.01M PBS (pH7.4)缓冲液中。

[0060] (2)偶联荧光微球的抗SAA抗体1/鸡IgY与结合垫3的制备方法

[0061] 荧光微球标记抗SAA抗体1的步骤

[0062] ①在1mI 0.1M PH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)加入0.3mg 0.3μM时间分辨荧光微球;加入25μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和30 μL 50mg/mI N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应30min。4℃,16000rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mI 0.1M PH6.0的MES,超声混匀。

[0063] ②将抗SAA单克隆抗体1按100μg/1mL的量,加入到步骤①荧光微球溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min。

[0064] 所述的SAA1:抗体克隆号SC-52211;鼠源克隆抗体,亚型IgG₁,识别SAA蛋白的氨基端19-30;氨基酸序列,具体为:Arg-Ser-Phe-PheSer-Phe-Leu-GIy-GIu-AIaPhe-Asp,如SEQ ID NO.1所示

[0065] ③按10μg/1mL的量,向步骤②中加入BSA,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应30-60min。

[0066] ④反应完成后将荧光微球溶液过分子筛层析柱进行纯化,用0.01M PBS(pH7.4)为洗脱液,分离溶液中为与微球结合的蛋白。

[0067] ⑤收集荧光微球洗脱液以4℃,16000rpm,30min离心,弃去上清,加入pH 9.0浓度0.05M Tris-HCl的复溶液后超声混匀。

[0068] 荧光微球标记鸡IgY抗体的步骤

[0069] ①在1mI 0.1M PH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)加入0.3mg 0.3μM时间分辨荧光微球;加入25μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和30 μL 50mg/mI N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应30min。16000rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mI 0.1M PH6.0的MES,超声混匀。

[0070] ②将鸡IgY抗体按100μg/1mL的量,加入到步骤①荧光微球溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min。

[0071] ③按10μg/1mL的量,向步骤②中加入BSA,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应30-60min。

[0072] ④反应完成后将荧光微球溶液过分子筛层析柱进行纯化,用0.01M PBS(pH7.4)为洗脱液,分离溶液中为与微球结合的蛋白。

[0073] ⑤收集荧光微球洗脱液以4℃,16000rpm,30min离心,弃去上清,加入pH 9.0浓度0.05M Tris-HCl的复溶液后超声混匀。

[0074] 将上述所得的抗SAA抗体1荧光微球溶液与鸡IgY荧光微球溶液按2:1的体积比混合均匀,用喷金划膜仪喷至聚酯纤维素膜上,喷量为3-5μL/cm(优选4μL/cm),放入37℃烘箱,干燥8小时。

[0075] 包被膜的制备方法

[0076] 1)包被,包被包被膜4宽度为25mm。

[0077] 检测线(T₁线):在硝酸纤维素膜上划线,在膜的一端用记号笔做好T₁线、T₂线、C线的标记,T₁线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.5cm,与上缘的距离为2cm,用0.01MPBS(pH7.4)内含0.5%-3%的海藻糖将抗SAA抗体2稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1μL/cm,速度100mm/s。所述的SAA2的抗体克隆号SC-52216;鼠源克隆抗体,亚型IgG₁,识别SAA蛋白氨基端70-79氨基酸序列Trp-AIaAIa-GIuAIa-Ile-Ser-Asp-AIa-Arg,SEQ ID NO.2所示。

[0078] 检测线(T₂线):T₂线位于T₁线与C线之间,与T₁线的距离为0.5cm,与C线为0.8cm,用

0.01MPBS(pH7.4)内含0.5%-3%的海藻糖将SAA抗原稀释到2.5mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s。

[0079] 质控线(C线):C线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm用0.01M的PBS(pH7.4)将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s。

[0080] 2)干燥

[0081] 放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥8小时。

[0082] SAA荧光微球免疫层析检测试剂的组装方法如下

[0083] 各组件在底板上的排列顺序依次为吸收垫5—硝酸纤维素膜—结合垫3—样品垫

[0084] ①吸收垫5的粘贴:将底板平铺于工作台上;揭开底板上缘吸收垫5粘贴处的保护膜,将吸收垫5粘附于其上,均匀、轻微滚动式推进,以加强粘合力,并防止产生气泡,吸收垫5覆盖在硝酸纤维素膜上2mm。

[0085] ②结合垫3粘贴:将结合垫3裁为宽15mm \times 长300mm,揭开硝酸纤维素膜下缘结合垫3粘贴处的保护膜,将结合垫3粘附于其上,方法同吸收垫5,结合垫3覆盖在硝酸纤维素膜上2mm。

[0086] ③样品垫2粘贴:将样品垫粘附于结合垫3下部,方法同吸收垫5。样品垫覆盖在结合垫3上2mm。

[0087] ④试纸条切割:将粘贴好的底板放入切条机中,切成4mm宽的试纸条。

[0088] ⑤装卡与入袋:将每一试纸条装入塑料卡内,将每一试剂置于铝膜袋中,并加入1g干燥剂1包,热合封口。

[0089] 双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂检测原理

[0090] 在SAA浓度为0-500mg/L范围内测值, T_1 、 T_2 、C线荧光仪读数曲线如图2所示,检测时,将稀释后的样品(血清、血浆、全血)加入样品孔时,样品依次透过样品垫2,结合垫3,在毛细管作用下样品将沿着试剂条向吸收垫5的方向移动。

[0091] 当机体处于慢性炎症时,SAA浓度约在0.78-10mg/L范围内,样品中SAA的浓度低时,样品中的SAA可与偶联荧光微球的抗SAA抗体1和包被在包被膜4上抗SAA抗体2发生特异结合,在 T_1 处形成双抗体夹心结构,而未与SAA蛋白结合的荧光微球抗体1则与包被膜4上 T_2 处的SAA蛋白结合,形成荧光微球抗体1-SAA蛋白的复合物,随着SAA浓度的升高, T_1 捕获的带荧光微球的SAA蛋白增多,使 T_2 处捕获的带荧光微球的SAA蛋白减少,此时 T_1 荧光强度与SAA含量呈正相关, T_2 荧光强度与样本中SAA含量呈负相关。相对于 T_1 , T_2 对浓度变化敏感,此时 $T_1 < T_2$,表明测试机体处于非急性感染期,此时SAA含量由 T_2 、C线的荧光强度根据 T_2/C 进行计算,在此范围内荧光仪读数曲线如图3所示。

[0092] 当机体处于急性炎症时,机体SAA浓度迅速上升至10mg/L以上,样品中的SAA可与偶联荧光微球的抗SAA单克隆抗体1和包被在包被膜4上抗SAA单克隆抗体2发生特异结合,在 T_1 处形成双抗体夹心结构,即荧光微球抗体1-SAA-抗体2复合物,而随着SAA浓度的升高, T_1 捕获的带荧光微球的SAA蛋白增多, T_2 处捕获的荧光微球标记的抗SAA抗体1减少,此时 T_1 荧光强度与SAA含量呈正相关, T_2 荧光强度与样本中SAA含量呈负相关。相对于 T_2 , T_1 对浓度变化敏感增加趋势明显,包被膜4上荧光值 $T_1 \geq T_2$ 时,表明测试机体处于急性感染期,此时样本中SAA含量由 T_1 、C的荧光强度根据 T_1/C 进行计算,在此范围内荧光仪读数曲线如图4所示。

[0093] 如果测试时C处不出现荧光,则表明此次测值无效,应进行重复实验。

[0094] 这种在低浓度时采用竞争法检测抗原,而高浓度时采用双抗体夹心法进行检测的方式,与单纯的双抗体夹心法或竞争法相比,表现出了该试纸条同时提高灵敏度高和检测范围,满足了临床上对急性炎症、慢性炎症患者体内SAA水平的检测。

[0095] SAA荧光微球免疫层析检测试剂使用:

[0096] SAA荧光微球免疫层析检测试剂荧光读数仪芯片数据拟合曲线如图5所示:

[0097] 当样本低浓度时包被膜4上荧光强度 $T_1 < T_2$,表明测试机体处于非急性感染期,此时SAA含量由 T_2 、C线的荧光强度根据 T_2/C 进行计算,拟合曲线如图6所示。

[0098] 当样本高浓度时包被膜4上荧光值 $T_1 \geq T_2$ 时,表明测试机体处于急性感染期,此时样本中SAA含量由 T_1 、C的荧光强度根据 T_1/C 进行计算,线性拟合如图7所示。

[0099] 打开仪器,插入与试剂批号相同的芯片;使用时除去试剂外包装,取出试剂,水平放置;精确吸取稀释后75 μ l血清或血浆,或100 μ l全血样品,加入到检测卡的加样孔中,然后开始计时;待室温反应10min后,将检测卡放入到仪器的卡槽中;点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试,并显示结果;点击“打印”,可打印检测结果报告。

[0100] 为了更好的说明本发明型的有益效果,下面给出采用本发明型提供的检测试剂与传统的酶联免疫分析法、胶体金免疫层析法、传统荧光免疫层析法在检测SAA时的结果对比实验。

[0101]

	酶联免疫分析法	胶体金免疫层析	免疫比浊法	传统荧光免疫层析法	本发明提供方法
所需仪器	酶标仪	肉眼或胶体金读卡仪	分光光度计、比浊仪等	免疫层析读卡仪	免疫层析读卡仪
检测时间	60-90min	10min	10min	10min	10min
最低检出限	1mg/l	10mg/l	5mg/l	10mg/l	1mg/l
检测范围	1-200mg/l	>10mg/l	5-200mg/l	10-200mg/l	1-500mg/l
优势	设备普及率高	操作简便、快速	操作简便,快速	操作简便、快捷、特异性较强	操作简便、快捷测值、准确、特异性较强
缺陷	耗时长,受标准曲线影响	只能定性判断	受样本干扰较大,特异性差	测定的线性范围小,测纸重复性差	生产技术工艺要求较高

SEQUENCE LISTING

<110> 广州市微米生物科技有限公司

<120> 双检测线 SAA 免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法

<130> 2016

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 未知

[0102]

<400> 1

Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp

1

5

10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<400> 2

Trp Ala Ala Glu Ala Ile Ser Asp Ala Arg

1

5

10

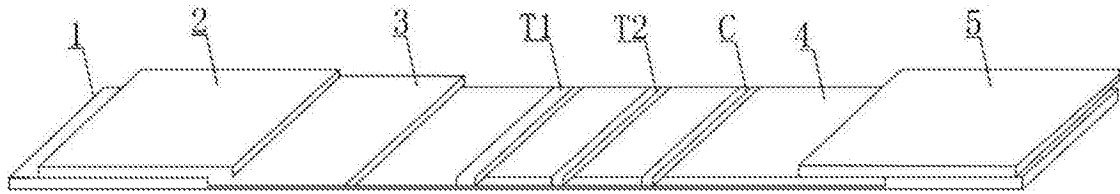


图1

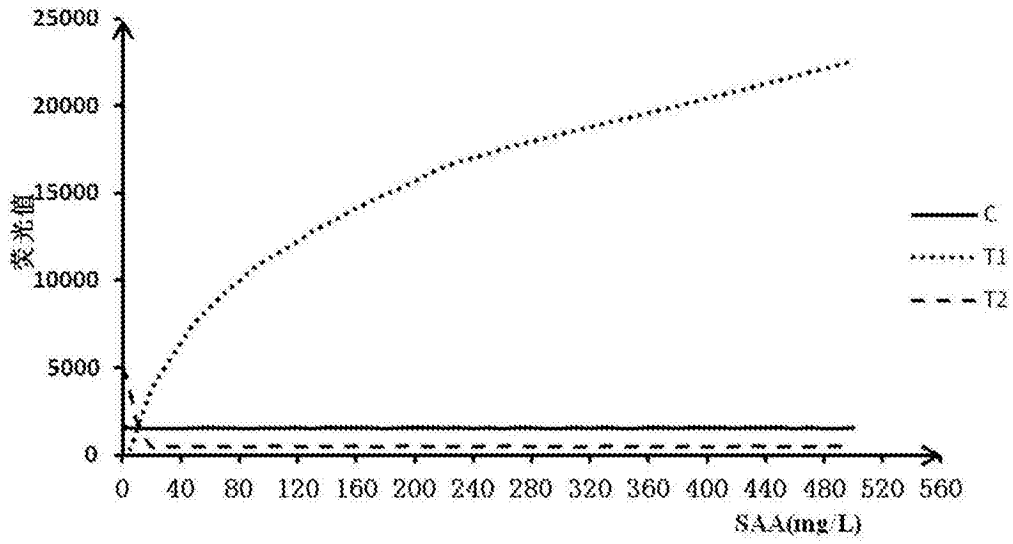


图2

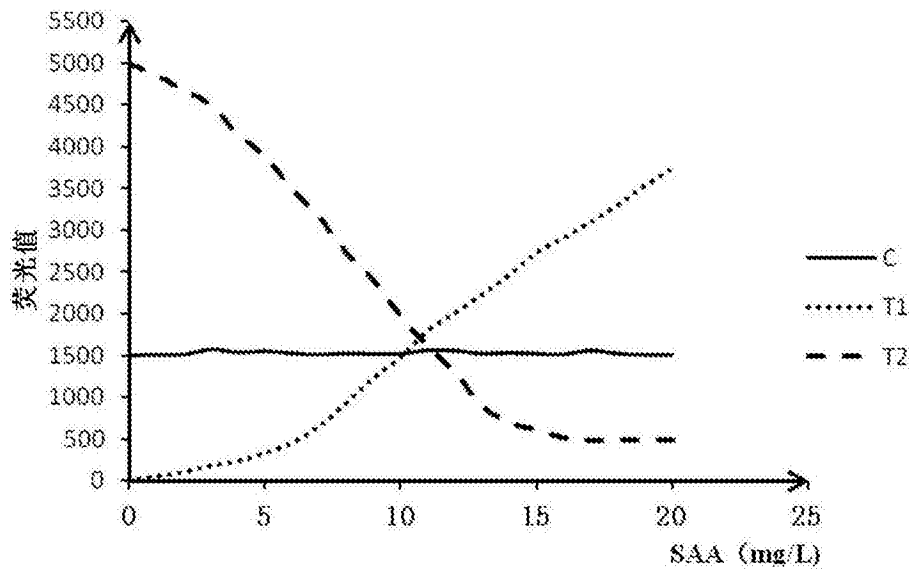


图3

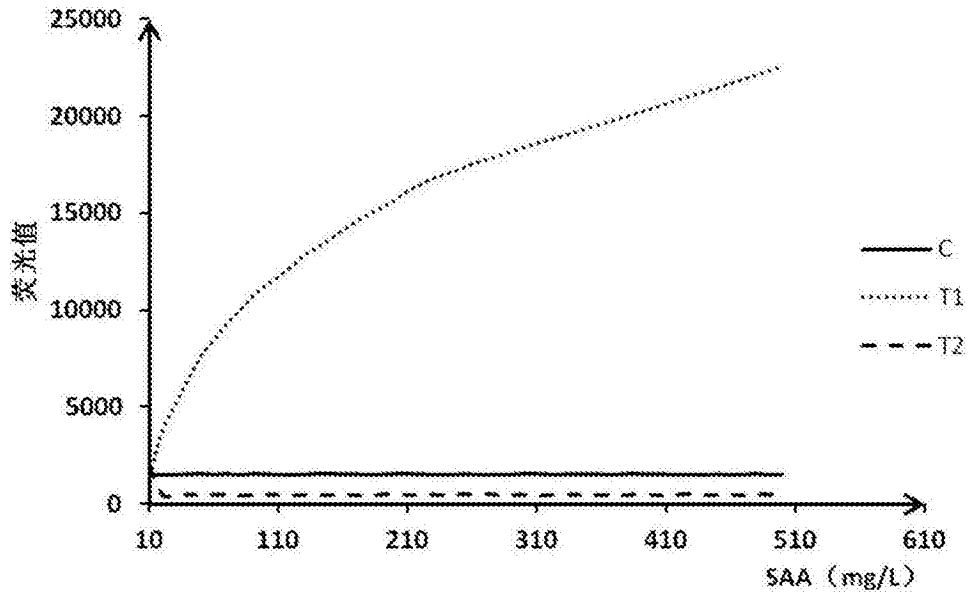


图4

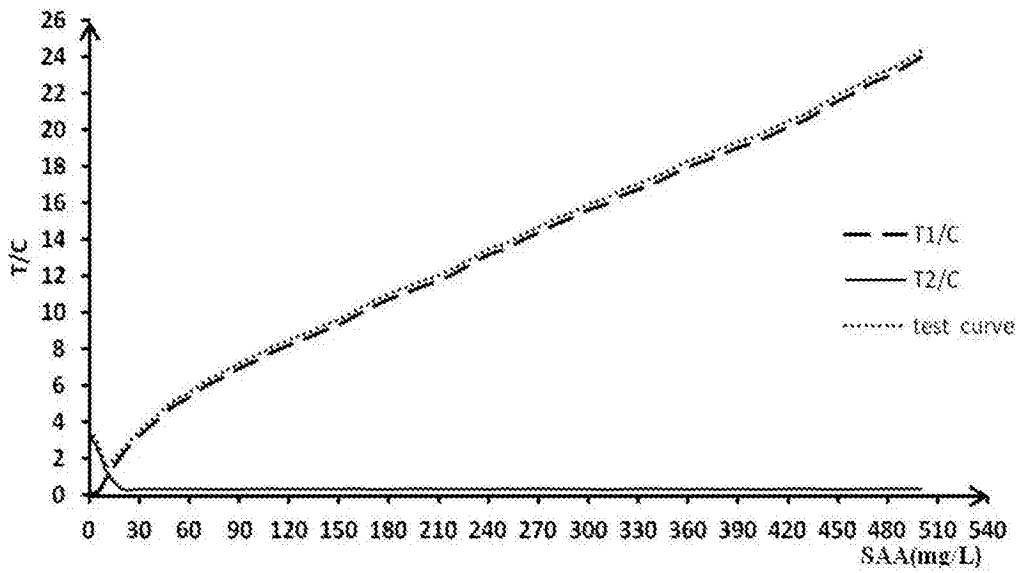


图5

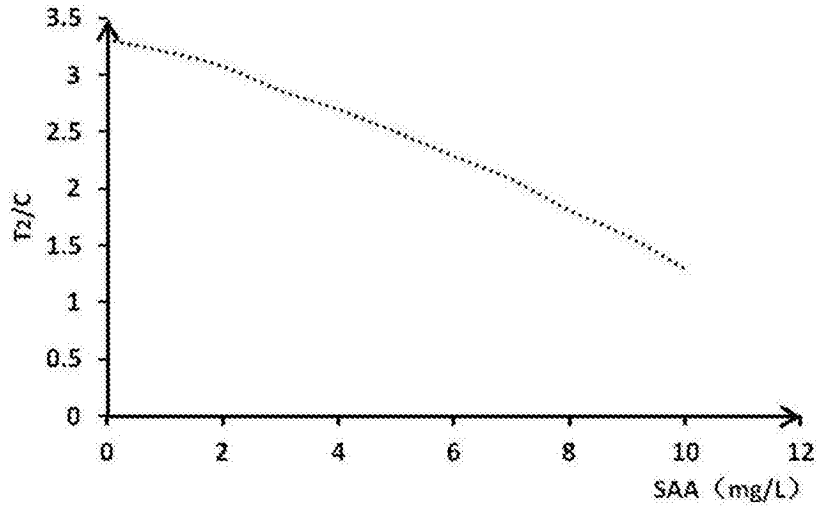


图6

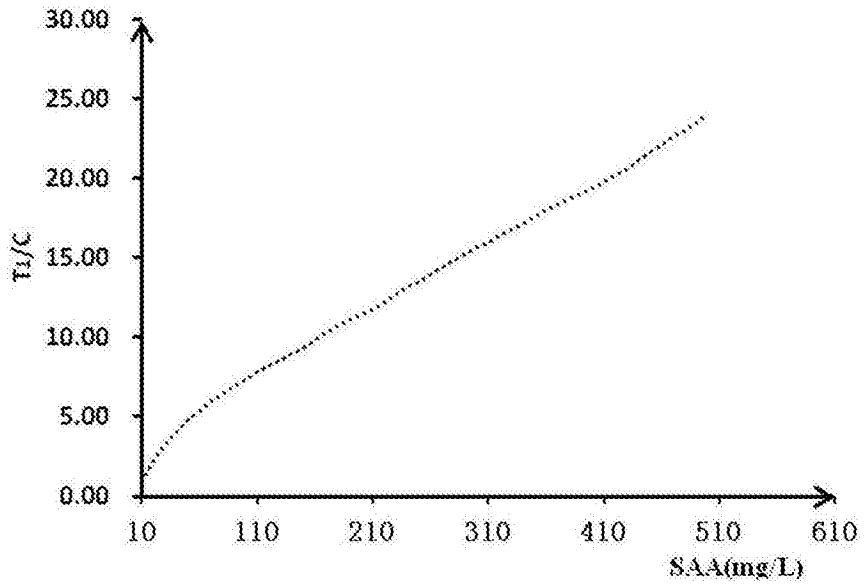


图7

专利名称(译)	双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN105785038A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610196332.0	申请日	2016-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
[标]发明人	汤永平 李之华 张晓丽 潘秀华 解巧丽		
发明人	汤永平 李之华 张晓丽 潘秀华 解巧丽		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577 G01N2333/47 G01N2800/7095		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种双检测线血清淀粉样蛋白A(Serum amyloid A protein, SAA)免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法；旨在提供一种能同时提高灵敏度和检测范围，满足临床上对急性炎症、慢性炎症患者体内SAA水平检测的一种双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂，其技术要点：包括底板，所述的底板上衔接样品垫，结合垫、包被膜和吸收垫，所述的结合垫上喷有抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY，所述的抗SAA单克隆抗体1和鸡IgY被同一种荧光微球标记；所述的包被膜上设有检测线T1、检测线T2和质控C线，所述的检测线T1包被的是抗SAA单克隆抗体2，所述的检测线T2包被有抗原SAA蛋白，质控C线包被有羊抗鸡IgY；属于体外诊断试剂技术领域。

