



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108387748 A

(43)申请公布日 2018.08.10

(21)申请号 201810417740.3

(22)申请日 2018.05.04

(71)申请人 广州敏捷生物技术有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区瑞和路
39号G2栋601

(72)发明人 汤永平 梁展鹏

(74)专利代理机构 广州市科丰知识产权代理事
务所(普通合伙) 44467

代理人 王海曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

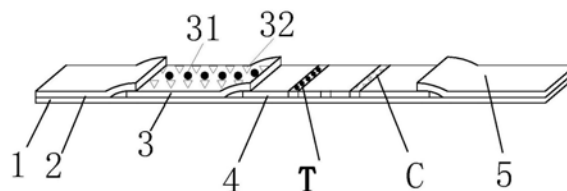
权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡与制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡及其制备方法;旨在提供一种灵敏度高,检测结果可靠的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡;其技术要点包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的SAA单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维膜设有一条包被SAA单克隆抗体的检测T线,以及一条包被鸡IgY的质控C线;属于动物疫病检测领域。



1. 一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,包括壳体(7),所述的壳体(9)内设有用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,所述包括用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡包括底板(1),在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于,所述结合垫(3)上设有荧光微球标记的SAA单克隆抗体(31)和荧光微球标记的羊抗鸡IgY(32),所述的硝酸纤维膜(4)设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被SAA单克隆抗体的检测T线。

2. 根据权利要求1所述的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,还包括样品稀释液瓶(6)。

3. 根据权利要求1所述的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述的样品稀释液瓶中(6)装有样品稀释液,所述样品稀释液为含1% S9、1% SDS、0.1% Triton X-100的0.1M pH7.8的Tris-盐酸缓冲液。

4. 制备权利要求1所述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的方法,在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于:

A) 所述的样品垫的制备方法为:

1) 配制样品垫处理液:含0.1%人血清白蛋白、0.5%牛IgG、2%聚乙二醇4000、0.3% Triton X-100、4%氯化钠和0.05%Prolin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液;

2) 将步骤1)中制备的缓冲液10 μ l/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上;

B) 所述的结合垫(3)的制备方法为:

1) 将用荧光微球标记的SAA单克隆抗体和用荧光微球标记的羊抗鸡IgY按照体积比20:1混合均匀,超声2s,间歇5s,重复3次;

2) 按3.5 μ l/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

C) 所述的反应膜的制备方法为:

1) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

2) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将SAA单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T检测线工作液;

3) 取底板(1)粘贴硝酸纤维膜;

4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

5. 根据权利要求4所述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,荧光微球标记的SAA单克隆抗体的制备方法为:

1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1ml标记缓冲液0.1M MES缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

2) 微球的活化:在步骤1)离心管中加入20 μ l-50 μ l标记活化剂A和20 μ l-50 μ l标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入5000 μ l淬灭剂,超声2s;

4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g SAA单克隆抗体,涡旋混匀,

置于旋转培养器上反应30min;

5) 封闭:加入2ml标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2ml标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

6. 根据权利要求4所述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,荧光微球标记的羊抗鸡IgY的制备方法为:

1) 稀释微球:取一离心管,加入1ml的标记缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ l-50 μ l标记活化剂A和20 μ l-50 μ l标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2ml淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

5) 封闭:加入500 μ l标记封闭液,封闭30min;

6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2ml标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

7. 根据权利要求5或6所述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

8. 根据权利要求5或6所述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;所述的标记封闭液为含0.1%人血清白蛋白的0.2M甘氨酸缓冲液;所述的标记荧光微球稀释液为含1%人血清白蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液。

9. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的微球为含有稀土镧元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡与制备方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种免疫荧光层析检测卡,具体地说,是一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,本发明还公开了该免疫荧光层析检测卡的制备方法。

背景技术

[0002] 血清淀粉样蛋白A(SAA)是存在于许多物种中的一种主要的急相蛋白,包括人、犬、猫和马等。一旦机体受到感染、创伤及外科手术等引起炎症刺激后,SAA的浓度会在数小时内迅速升高;同时SAA半衰期非常短,随着炎症源的清除,SAA的浓度水平又会迅速下降。

[0003] SAA的基因序列在脊椎动物中高度保守。人SAA含有104个氨基酸。而猫的SAA相当于在人的SAA分子中间区域插入了额外的111个氨基酸序列。

[0004] SAA是一种灵敏的炎症和组织损伤标志物。在兽医学中,测定血液中的SAA可以用于诊断亚临床炎症、监控动物炎症和感染的治疗效果以及监控病患外科手术进程。

[0005] 现有的SAA检测方法主要是酶联免疫法,由于酶联免疫测定周期长,不能在自动生化分析仪上使用,不适合急诊的快速检测,是SAA检测试剂盒普及的弊端,而胶乳增强免疫比浊法操作简单,经济,可以在绝大多数医院的自动生化分析仪上使用,特别是急诊能快速定量检测,其基本原理是:将抗体包被在胶乳颗粒上,与相应抗原发生免疫反应后,形成聚集颗粒,在一定波长下,通过测定聚集物所产生的浊度,即可测出标本中被检物含量。

[0006] 中国专利ZL 201210575603.5一种快速定量检测血清淀粉样蛋白A试剂盒,所述试剂盒包括由SAA单抗包被于胶体金制成的冻干抗SAA免疫胶体金、反应板、样品稀释液、冻干胶体金复溶液、洗涤液和封闭液;所述反应板为胶体金检测板,反应板上的硝基纤维素膜由针对另一反应决定簇的另一纯化SAA单抗或多抗包被;但是该方法采用免疫渗滤法,需要溶解抗SAA金标液冻干品并稀释、稀释样本、滴加封闭液、渗入、滴加稀释好的抗SAA金标液、加洗涤液、最后检测等一系列步骤,非常繁琐费时,不利于疾病早期快速诊断与治疗。另外该专利采用胶体金作为示踪物,免疫标记物依靠静电吸附,存在灵敏度较低、难以定量、重复性和稳定性较差等缺陷,无法完全满足临床的检测需求。

[0007] 中国专利ZL201510497125.4公开了一种人血清淀粉样蛋白A检测试剂盒,所述的试剂盒包括试剂R1、试剂R2,所述的试剂R1为适当的缓冲液;所述的试剂R2是用血清淀粉样蛋白A抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒、置于适当的缓冲液中组成,但是该方法使用到两种缓冲液,液体需要冷藏,检测时需要采用日立7080型等自动生化分析仪,体积比较庞大,不适合现场检测,不能对进行进行尽早的诊断与治疗。

[0008] 中国专利ZL201511020151.4公开了一种血清淀粉样蛋白A的荧光免疫层析检测试剂盒,包括试剂盒体以及稀释液瓶,所述试剂盒体包括免疫层析检测卡,所述免疫层析检测卡包括PVC衬板以及固定在PVC衬板上的样品垫、探针固定垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述样品垫搭接在探针固定垫上,所述探针固定垫和吸水纸分别搭接在所述硝酸纤维素膜两侧,所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和控制线,所述检测线内包被有血清淀粉样蛋白A单

克隆抗体,所述控制线内包被有羊抗兔IgG;所述探针固定垫由血清淀粉样蛋白A单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗兔IgG荧光胶乳微粒组成的混合荧光胶乳微粒干燥制得;但是该方法存在下述缺点:荧光乳胶微粒需要先与白蛋白进行偶联,然后再与血清淀粉样蛋白A单克隆抗体进行偶联,虽然可以减少检测过程中双夹心结构的空间阻力,同时也增加了偶联的步骤,可能影响检测的重复性。

发明内容

[0009] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种灵敏度高、重复性好、定量准确的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡。

[0010] 本发明的第二个目的是提供上述检测试剂卡的制备方法。

[0011] 为此,本申请提供的第一个技术方案是这样的:

[0012] 一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,包括壳体,所述的壳体内设有用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,所述包括用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的SAA单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维素膜设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被SAA单克隆抗体的检测T线。

[0013] 进一步的,上述的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,还包括样品稀释液瓶。

[0014] 进一步的,上述的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,所述的样品稀释液瓶中装有样品稀释液,所述样品稀释液为含1% S9、1% SDS、0.1% Triton X-100的0.1M pH7.8的Tris-盐酸缓冲液。

[0015] 本申请提供的第二个技术方案是这样的:

[0016] 一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。

[0017] 一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

[0018] A) 所述的样品垫的制备方法为:

[0019] 1) 配制样品垫处理液:含0.1% 人血清白蛋白、0.5% 牛IgG、2% 聚乙二醇4000、0.3% Triton X-100、4% 氯化钠和0.05% Prolin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液;

[0020] 2) 将步骤1)中制备的缓冲液5.0 μ l/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上;

[0021] B) 所述的结合垫的制备方法为:

[0022] 1) 将用荧光微球标记的SAA单克隆抗体和用荧光微球标记的羊抗鸡IgY按照体积比20:1混合均匀,超声2s,间歇5s,重复3次;

[0023] 2) 按3.5 μ l/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0024] C) 所述的反应膜的制备方法为:

[0025] 1) 用含3% 蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

[0026] 2) 用含3% 蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将SAA单克隆抗体稀释到1mg/

mL,即为T检测线工作液;

[0027] 3)取底板(1)粘贴硝酸纤维膜;

[0028] 4)在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

[0029] 5)完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

[0030] 进一步的,上述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记的SAA单克隆抗体的制备方法为:

[0031] 1)稀释荧光微球:取一离心管,加入1ml标记缓冲液0.1M MES缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

[0032] 2)微球的活化:在步骤1)离心管中加入20 μ l-50 μ l标记活化剂A和20 μ l-50 μ l标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0033] 3)活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入500 μ l淬灭剂,超声2s;

[0034] 4)抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g SAA单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0035] 5)封闭:加入2ml标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

[0036] 6)纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2ml标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

[0037] 进一步的,上述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记的羊抗鸡IgY的制备方法为:

[0038] 1)稀释微球:取一离心管,加入1ml的标记缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

[0039] 2)微球的活化:在上述离心管中加入20 μ l-50 μ l标记活化剂A和20 μ l-50 μ l标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0040] 3)活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2ml淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

[0041] 4)抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0042] 5)封闭:加入500 μ l标记封闭液封闭30min;

[0043] 6)纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2ml标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

[0044] 进一步的,上述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;所述的标记封闭液为含0.1%人血清白蛋白的0.2M甘氨酸缓冲液。

[0045] 进一步的,上述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25 $^{\circ}$ C;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0046] 进一步的,上述的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制

备方法,所述的标记荧光微球稀释液为含1%人血清白蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液。

[0047] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有如下优点:

[0048] 1、本发明操作步骤简单,对样品预处理方法进行优化,只需要用采集猫血清,稀释后加入到检测卡的加样孔中即可检测,检测速度快,10分钟出结果,结果即可定性观察又可定量测定,大大降低检测成本,减少工作量。

[0049] 2、本申请提供的技术方案,通过对样品垫处理液和标记荧光微球稀释液的优化,相比传统工艺,灵敏度明显高,最低检测限 (LOD) 可达到1.55mg/L (原工艺3.26mg/L),线性更好,剂量-反应曲线的决定系数由0.9953提升到0.9996;重复性好,低中高三个水平质控变异系数均低于10% (8.52%、7.95%和5.63%)。

[0050] 3、本申请提供的技术方案对结合垫、硝酸纤维膜制备过程严格考究、优化,进一步提高了检测卡的精密度与可靠性。

[0051] 4、本申请提供的样品垫处理液,与血浆高密度脂蛋白 (HDL) 解离更充分,试剂准确性提高,另外缓冲液中加入生物防腐剂Proclin 300,可以有效保持检测试剂的稳定性,并且防止减少了常规催化剂对检测结果的影响,确保检测结果的精确度,并保护检测者不受常规防腐剂例如叠氮钠等的危害。

附图说明

[0052] 图1是本发明提供的检测试纸卡结构示意图;

[0053] 图2是本发明提供的检测试纸条结构示意图;

[0054] 图3是本发明提供的另一种检测试纸卡结构示意图;

[0055] 图4是本发明提供的检测卡判定结果为阳性时示意图;

[0056] 图5是本发明提供的检测卡判定结果为阴性示意图;

[0057] 图6是本发明提供的检测卡判定结果为无效时一种示意图;

[0058] 图7是本发明提供的检测卡判定结果为无效时另一种示意图;

[0059] 图8是本申请提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

[0060] 图9是对比例提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0061] 下面结合具体实施方式,对本发明的权利要求作进一步的详细说明。

[0062] 实施例1

[0063] 本发明提供一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图2,包括壳体7,所述的壳体7内设有用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡包括底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记的SAA单克隆抗体31和荧光微球标记的羊抗鸡IgY32,所述的硝酸纤维膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被SAA单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条73,方便试剂卡的取出与放入。

[0064] 实施例2

[0065] 本申请提供的另一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图3,包括壳体9,所述的壳体9内设有样品稀释液瓶6,吸管8以及用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡,所述的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡位于壳体7内,所述用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡包括底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记的SAA单克隆抗体31和荧光微球标记的羊抗鸡IgY32,所述的硝酸纤维素膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被SAA单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条73,方便试剂卡的取出与放入。

[0066] 更为具体的说,所述的样品稀释液瓶中样品稀释液为含1% S9、1% SDS、0.1% Triton X-100的0.1M pH7.8的Tris-盐酸缓冲液。

[0067] 实施例3

[0068] 实施例1或者2中提供的一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在温度(18~26)℃、湿度≤30%的环境下进行装配,在底板1上依次衔接有硝酸纤维素膜4、吸水垫5、结合垫3和样品垫2;将粘贴好的大板切成4.0mm宽的试纸条,装入塑料卡壳7内,即SAA检测卡;将每一检测卡置于铝膜袋中,加入干燥剂1包,热合封口备用。

[0069] 具体地说:

[0070] 1.1结合垫的制备

[0071] 1.1.1 SAA单克隆抗体的标记

[0072] 1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1ml标记缓冲液0.1M MES (2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;所述的微球采用含有稀土镧元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm, 25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0073] 2) 微球的活化:在步骤1)离心管中加入20μl-50μl标记活化剂A和20μl-50μl标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0074] 所述的标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.05M的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸);所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)。

[0075] 3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入5000μl淬灭剂,超声2s;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;

[0076] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200μg SAA单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0077] 5) 封闭:加入2ml标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;所述的标记封闭液为含0.1%人血清白蛋白的0.2M甘氨酸缓冲液

[0078] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2ml标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。所述的荧光微球稀释液含1%人血清白蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液。

[0079] 1.1.2质控C线抗体的标记

[0080] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1ml的标记缓冲液0.1M MES缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;所述的微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0081] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入20μl-50μl标记活化剂A和20μl-50μl标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0082] 所述的标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.05M的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸);所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)。

[0083] 3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2ml淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;

[0084] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100μg羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0085] 5) 封闭:加入500μl标记封闭液,封闭30min;所述的标记封闭液为含0.1%人血清白蛋白的0.2M甘氨酸缓冲液;

[0086] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2ml标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次,所述的荧光微球稀释液含1%人血清白蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液。

[0087] 1.1.3喷膜

[0088] 1) 将玻璃纤维裁切为(10±1)mm×(300±10)mm大小为结合垫;

[0089] 2) 将标记后的T、C线抗体按20:1(V:V)混合均匀,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次;

[0090] 3) 按3.5μl/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0091] 4) 喷完后,37℃干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0092] 1.2反应膜的制备

[0093] 1) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C线工作液。

[0094] 2) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将另一株SAA单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T线工作液。

[0095] 3) 取PVC底板,粘贴硝酸纤维膜。

[0096] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1μL/cm。

[0097] 5) 完成后将片材放置在37℃干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0098] 1.3样品垫制备

[0099] 1) 配制样品垫处理液:含0.1%人血清白蛋白、0.5%牛IgG、2%聚乙二醇4000、0.3%Triton X-100、4%氯化钠和0.05%Prolin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液。

[0100] 2) 以10μl/cm的浓度将缓冲液喷涂于玻璃纤维上。

[0101] 对比试验

[0102] 本对比实验提供的检测试剂卡结构与实施例1提供的检测试剂卡结构基本一致,其不同之处在于,在制备过程中将实施例3中的样品垫处理液即含0.5%Tween-20、0.1%牛

血清白蛋白、0.5%Trition-100的50mM pH 8.0 10mmol/LTris-HCl缓冲液;比如标记荧光微球稀释液为含2%BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖、0.05%叠氮钠的pH 8.010mmol/LTris-HCl缓冲液,叠氮钠0.5mg/mL,其它参数和条件均与实施例3一致。

[0103] 检测方法

[0104] 为了便于使用本申请提供的检测卡,下面给出本申请提供的检测卡提供两种检测方法。

[0105] 方法一:采用紫外灯照射,结果参阅图4至图7:用手持式紫外线灯照射观察窗口,当质控线和检测线都有量荧光出现时(图4),说明样品中SAA抗原为阳性;当只有质控线有荧光而检测线无荧光出现时(图5),说明样品中SAA抗原为阴性;质控线未出现荧光(图6、图7),则代表操作有误或检测结果无效,需重复试验。

[0106] 方法二:本申请实施例3制备的免疫荧光检测仪检测结果:

[0107] 1)收集猫血清;

[0108] 2)取10 μ l加入含有1.0ml样品稀释液(含1% S9、1% SDS、0.1% Triton X-100的0.1MpH7.8的Tris-盐酸缓冲液)的样品管中,充分混匀;

[0109] 3)取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0110] 4)吸取稀释后的样本75 μ l,加入到检测卡的加样孔中,将检测卡放入到仪器的卡槽中,开始计时;

[0111] 5)10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0112] 6)荧光强度与样品中的SAA浓度成正比,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算,剂量反应曲线 $\text{Log}(Y) = 0.6706\text{Log}(X) - 0.5366$, $R = 0.9996$ ($R^2 = 0.9998$),参阅图3。

[0113] 免疫荧光检测仪检测结果:

[0114] 1、线性范围

[0115] 1.1.1将SAA校准品用阴性血清分别稀释到0mg/L、5mg/L、8mg/L、12mg/L、20mg/L、40mg/L、80mg/L、120mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L、700mg/L和800mg/L;

[0116] 1.1.2将以上各浓度样本分别取75 μ L,加入至制备好的猫SAA检测试剂中,每浓度重复测试2次;

[0117] 1.1.3反应10min后,将试纸放入干式免疫荧光分析仪中,读取T/C值,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算。

[0118] 1.1.4测试结果显示:试剂在检测5~300mg/L的SAA线性拟合关系较好, $r > 0.9900$,当SAA浓度增加到400mg/L时,线性拟合 r 值小于0.9900,T/C增长减缓,SAA在400~500mg/L时T/C值平缓,SAA达到800mg/L时,T/C值反而降低。因此本检测的最大检测范围可以达到400mg/L。

[0119] 2、最低检出限

[0120] 将阴性血清,重复测试20次,计算T/C均值,将其代入剂量-反应曲线中,得出本方法的最低检出限为1.55mg/L,具体见表1和图8;

[0121] 表1

[0122]

本申请提供的检测试剂卡	剂量反应曲线	
	原始数值	取对数

[0123]

浓度 (mg/L)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
0	0.18		
5	1.023	0.70	-0.07
8	1.358	0.90	0.07
12	1.71	1.08	0.18
20	2.4245	1.30	0.35
40	3.592	1.60	0.53
80	5.554	1.90	0.73
120	7.5365	2.08	0.87
240	11.57	2.38	1.06
最低检测限 (LOD) : 1.55 mg/L			
r: 0.9998			
r ² :0.9996			

[0124] 用同样方法检测对比例1制备的检测卡,其检测具体见表2和图9

[0125] 表2

[0126]

对比例提供的检测试剂卡	剂量反应曲线			
	原始数值		取对数	
	浓度 (mg/L)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
	0	0.35		
	5	0.75	0.70	-0.40
	8	0.98	0.90	-0.20
	12	1.21	1.08	-0.07
	20	1.65	1.30	0.11
	40	2.76	1.60	0.38
	80	4.12	1.90	0.58
	120	5.65	2.08	0.72
	240	7.98	2.38	0.88
	最低检测限 (LOD) :3.26 mg/L			
	r:0.9949			

[0127]

	$r^2:0.9899$
--	--------------

[0128] 3、精密度

[0129] 将SAA校准品用阴性血清稀释至20mg/L、60mg/L、150mg/L,用本方法检测卡每浓度重复测试10次,计算测试浓度的变异系数。结果表31所示,由此可以看出,本试剂盒检测的变异系数均小于10%(三个浓度分别为8.52%、7.95%和5.63%),因此本检测方法具有较高的精密度。

[0130] 表3

[0131]

	浓度	变异系数 (CV)
质控I	20mg/L	8.52%
质控II	60mg/L	7.95%
质控III	150mg/L	5.63%

[0132] 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免疫比浊法、免疫层析法在检测SAA时的检测性能对比结果。

[0133]

检测方法	专利公开号	操作	待检物质	检测原理及性能
乳胶比浊法	CN 107015004 A CN 106568978 A CN 105929173 A CN 106018299 A	比较繁琐费时	人血液中的 SAA	乳胶比浊法，采用一株 SAA 抗体；需要用到生化分析仪，试剂冷藏，无法满足现场快速检测
免疫层析法	CN 106706926 A CN 106443007 A	稀土荧光微球 需要醛基化	人血液中的 SAA	T 线和 C 线采用同一系统；定量检测，剂量-反应曲线未提供；
本发明型提供的方法		简单快捷	猫血液中 SAA	选用两株单抗和夹心法层析，特异性好，与其他同类物质无交叉反应；T 线和 C 线采用双系统；既可定性检测，也可定量检测；灵敏度可达到 1.55 mg/L

[0134] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

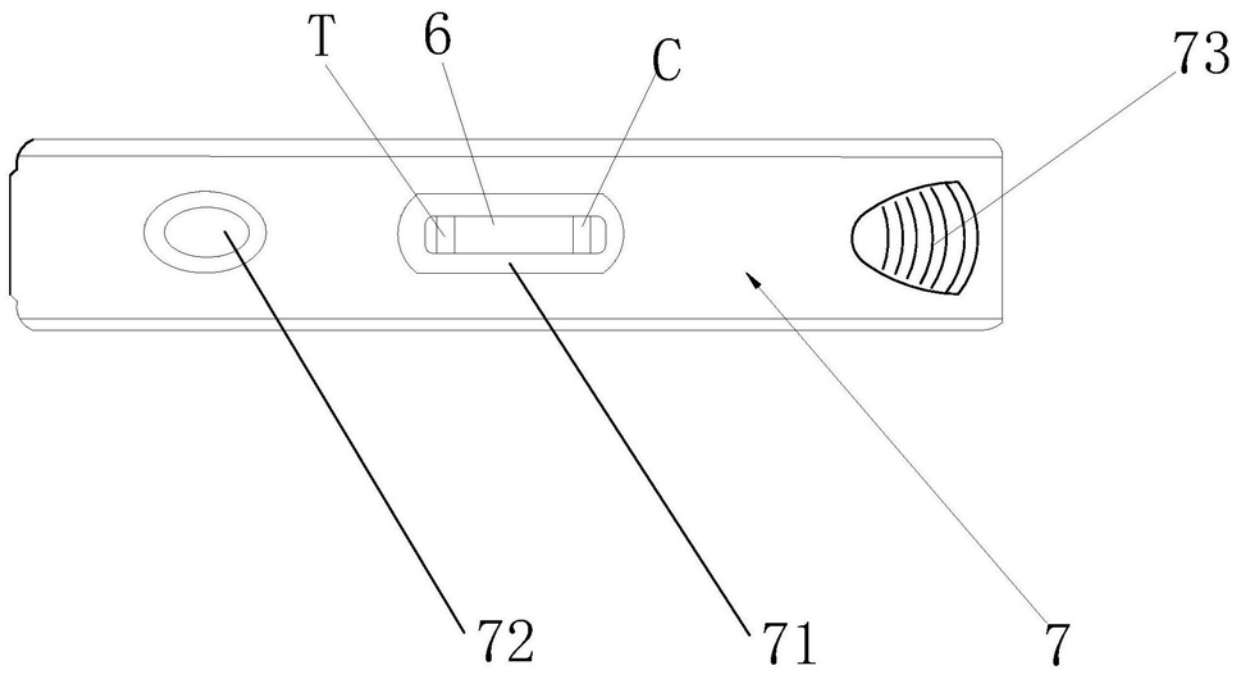


图1

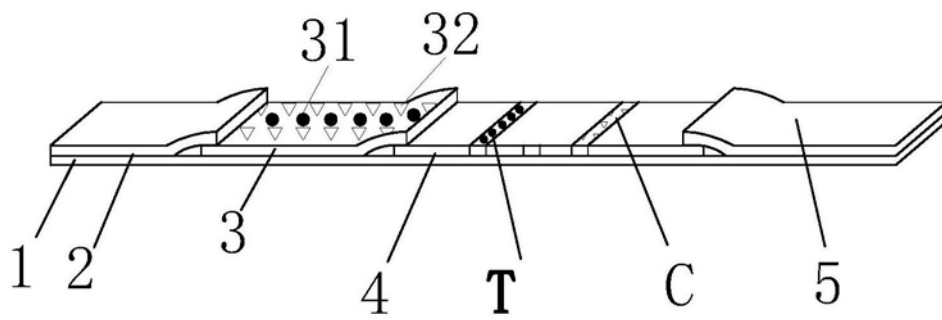


图2

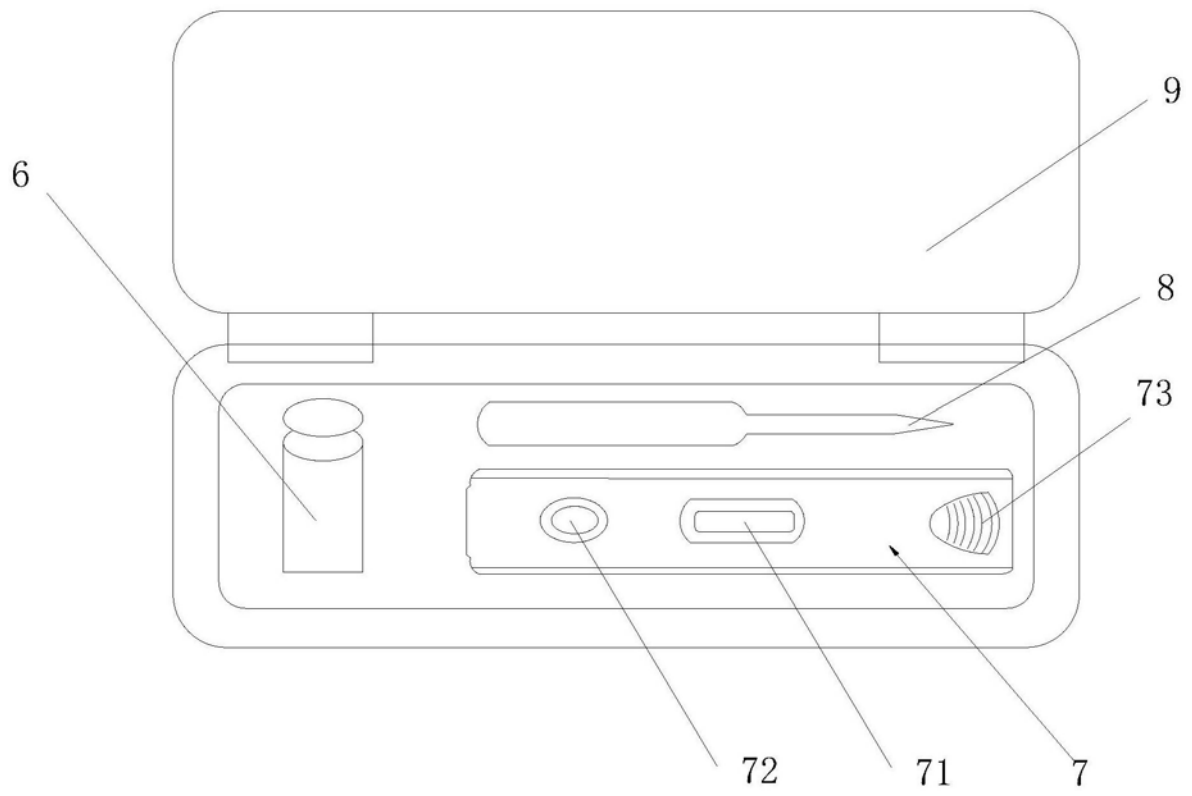


图3

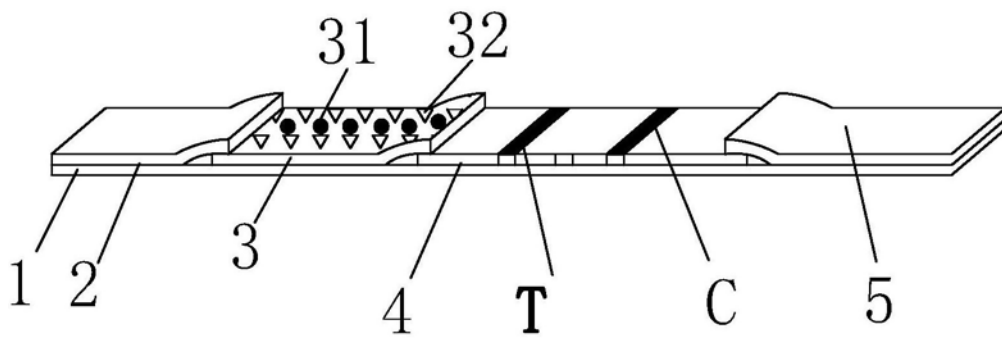


图4

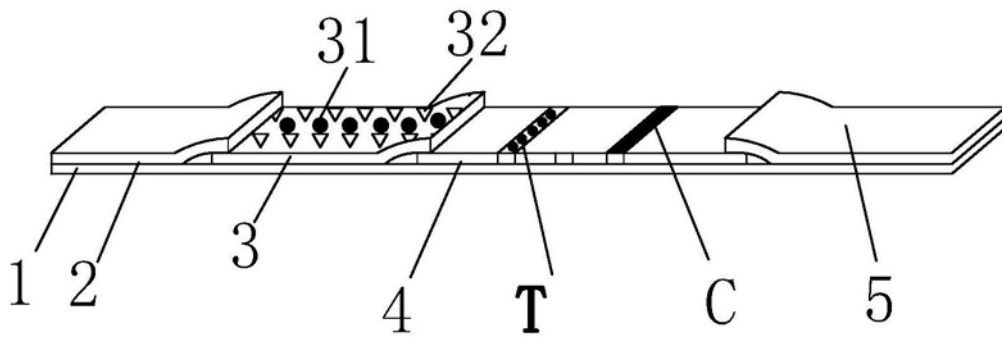


图5

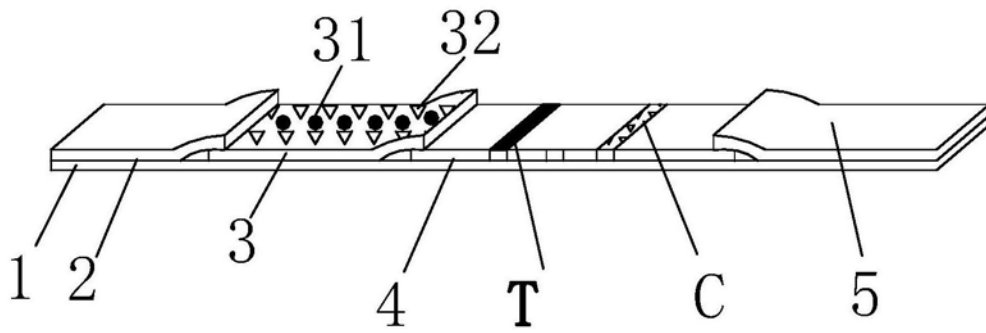


图6

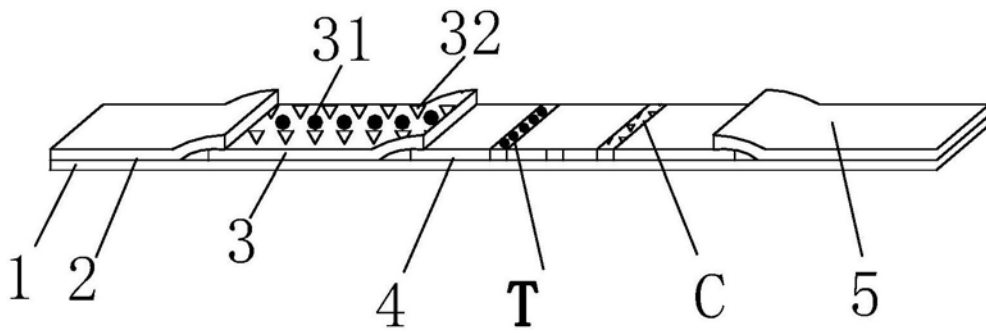


图7

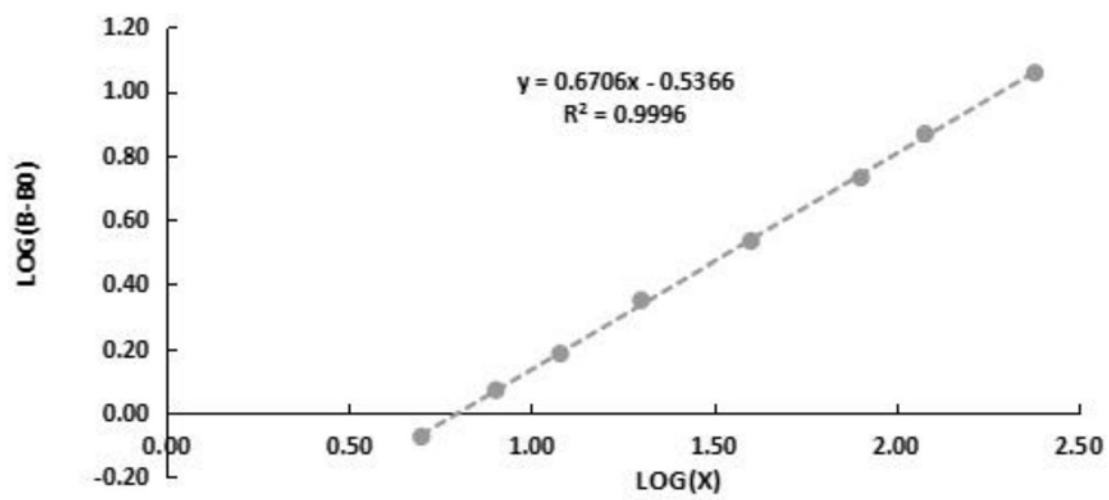


图8

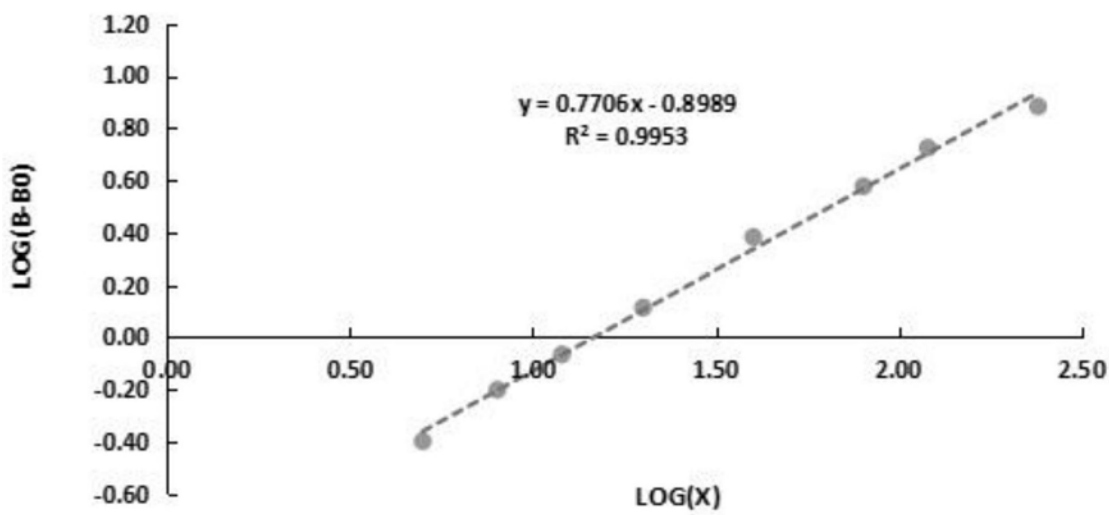


图9

专利名称(译)	用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡与制备方法		
公开(公告)号	CN108387748A	公开(公告)日	2018-08-10
申请号	CN201810417740.3	申请日	2018-05-04
[标]发明人	汤永平 梁展鹏		
发明人	汤永平 梁展鹏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N2333/47		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡及其制备方法；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测猫血清淀粉样蛋白A的免疫荧光层析检测卡；其技术要点包括底板，在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫，所述结合垫上设有荧光微球标记的SAA单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY，所述的硝酸纤维膜设有一条包被SAA单克隆抗体的检测T线，以及一条包被鸡IgY的质控C线；属于动物疫病检测领域。

