



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024956 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911406131.9

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 江苏美克医学技术有限公司
地址 211800 江苏省南京市江北新区新锦湖路3-1号二期C栋3楼

(72)发明人 张宗慧 孙康俊 黄宝福

(74)专利代理机构 南京泉为知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32408
代理人 许丹丹

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

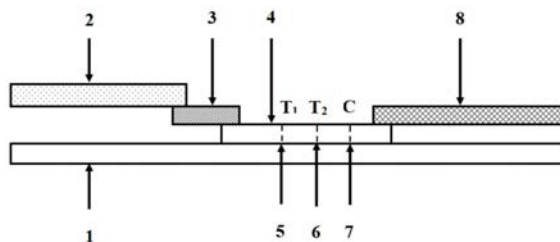
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,包括包含试纸条的检测卡,所述试纸条包括底板,在底板上依次相互交错搭接的滤血垫、结合垫、抗体承载膜和吸水纸;所述结合垫吸附有PTX-3单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球,其中时间分辨荧光微球由直径80~150nm和250~350nm的微球组成,所述时间分辨荧光微球为镧系元素螯合物荧光标记微球。本发明建立了时间分辨荧光免疫层析法测定细胞、组织或血液等中PTX-3的浓度,能在短时间出结果,只需简单设备,能满足快速诊断PTX-3要求,具有检测范围宽、灵敏度高、准确度高、检测快速简便等特点。



1. 一种检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,包括包含试纸条的检测卡,其特征在于,所述试纸条包括底板,在底板上依次相互交错搭接的滤血垫(2)、结合垫(3)、抗体承载膜(4)和吸水纸(8);

所述结合垫吸附有PTX-3单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球,其中时间分辨荧光微球由直径80~150nm和250~350nm的微球组成,所述时间分辨荧光微球为镧系元素螯合物荧光标记微球。

2. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述时间分辨荧光微球由直径80~150nm和250~350nm的微球按质量比3~4:2组成。

3. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,时间分辨荧光微球由直径90~120nm和290~320nm的微球组成。

4. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述镧系元素螯合物荧光标记微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种。

5. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,镧系元素选自铕(EU)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)元素螯合物中的一种。

6. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述抗体承载膜上设置有检测线T₁和T₂以及质控线C,所述检测线T₁和T₂上包被有与所述时间分辨荧光微球标记的PTX-3抗体的单克隆抗体,质控线C上包被有与所述时间分辨荧光微球标记的PTX-3抗体配对的二抗。

7. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述滤血垫和结合垫为玻璃纤维棉材质,所述抗体承载膜为硝酸纤维素膜。

8. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述滤血垫经处理液预处理,以质量分数计,其处理液为pH6.8~7.0的10~15mM PB缓冲液,含3~6%凝集素,1~2%牛血清白蛋白,10~12%蔗糖,0.02~0.03%吐温20,0.01~0.02%防腐剂;所述结合垫经处理液预处理,以质量分数计,其处理液为pH8.0~8.2的10mM Tris缓冲液(pH8.0),含1~2%牛血清白蛋白,0.2~0.3%聚乙烯吡咯烷酮,0.2~0.3%聚乙二醇,10~12%蔗糖,0.02~0.03%吐温20,0.01~0.02%防腐剂。

9. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,还包括样本稀释液或/和含有PTX-3标准曲线的SD卡。

10. 根据权利要求1所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,用于检测人血清、血浆、全血样本、唾液、细胞及组织样本中PTX-3的含量。

一种检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及一种检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒。

背景技术

[0002] 正五聚蛋白 (pentraxin, PTX) 作为模式识别受体,其在炎症反应、突触损伤、神经细胞的凋亡等过程中起到不同程度的作用,可识别一系列外源性物质。正五聚体蛋白的主要结构分为短正五聚体蛋白和长正五聚体蛋白两种,CRP即属于一种经典的短链PTX,经促炎因子白介素 (interleukin, IL) -6诱导由肝脏产生。PTX-3作为长正五聚蛋白的典型代表,PTX3作为一种新型炎性分子,较CRP有着更高的敏感性,一些参与固有免疫的细胞(如树突状细胞、巨噬细胞等)和血管细胞(如血管内皮细胞、平滑肌细胞等)均可以合成分泌PTX-3,且PTX-3在抗原识别、补体激活、细胞增殖及血管再生方面均起到重要作用。

[0003] PTX-3作为微炎症标志物,是由肿瘤坏死因子作用下分泌的炎症介质,并参与多种炎症信号通路,因此,PTX-3反映人体炎症活动与炎症状态更加直观。PTX-3作为一种可溶性的模式识别受体,参与了宿主免疫反应调控,已被证实在预防肺部感染中起重要作用,在炎症状态下,迅速导致炎症细胞及局部固有细胞迅速产生和释放PTX-3,这个过程在肝脏释放CRP和血清淀粉样蛋白P之前产生,故PTX-3在外周血升高的时间非常快(6-8h),而CRP在外周循环中的升高往往在24h后,说明PTX-3作为急性期反应蛋白血清学标志比CRP更具优势,并更能反映局部组织的炎症状态,鉴于PTX-3与肺部感染的相关密切,因此有望成为一种新型生物学标记物。炎性反应是促进心血管疾病发生、发展的重要因素,PTX-3可直接反应局部血管的炎症状态,PTX-3水平可用于预测心力衰竭患者的预后情况。PTX-3也能促进心肾综合症(CHF)患者局部炎症反应,加重心肌损害,有望成为CHF诊断及预后的新型标志物。PTX-3可结合多种可溶性受体配基,参与机体免疫防御、女性生殖生育、动脉粥样硬化、细胞凋亡和血管再生等多种病理生理,目前发现PTX-3在多种肿瘤中高度表达,并参与肿瘤细胞的增殖、分化等过程,因此,PTX-3的检测在呼吸病、心血管疾病和肿瘤等的诊断上意义重大。

[0004] 目前,有现有技术中测定PTX-3的方法主要有酶联免疫法和RT-PCR。酶联免疫法在医疗或检验机构使用较多,但是其多为手工操作,步骤复杂,检测耗时长,不利于快速得到检测报告;PCR检测方法灵敏度高,但是操作流程复杂、费时,且需要昂贵的仪器和试剂。

[0005] 免疫荧光是将PTX-3抗体共价结合于荧光微球表面活性基团上,通过激发后检测线是否产生荧光来判断结果,快速便捷,可准确定量的同时具有高灵敏度、标记物稳定等优点,在医学免疫检测领域广泛应用。

[0006] 在生物流体和血清中的许多复合物和蛋白本身就可以发荧光,因此使用传统的荧光素等发色团进行荧光检测时灵敏度就会严重下降,但大部分背景荧光信号是短时存在的,可利用镧系元素螯合物作为标记物来标记抗体或抗原,用时间分辨荧光分析仪测定免疫反应最后产物的获光强度,再根据荧光强度和相对荧光强度比值,更为准确地判断反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。与传统标记物相比,稀土掺杂纳米材料具有稳

定的物理化学性质,窄带发射,长寿命等优点,从而排除激发光干扰,可通过时间分辨消除本底荧光干扰,在生物标记过程中不容易受环境影响。

[0007] 目前,市面体外诊断产品中,尤其是在层析平台上对全血样本的检测多采用滤血膜或者抗红细胞抗体来富集红细胞,从而达到全血样本的分离。其中滤血膜负荷量有限,材料不均一,拦截率低,使用条件苛刻,血量的多少受到严格限制;抗细胞抗体富集红细胞除了受到抗体结合效率和固相载体孔径等条件的限制,还受到加工工艺和运输保存条件的影响,导致红细胞分离不稳定,容易引起较大的偏差。

发明内容

[0008] 本发明的目的是针对现有技术的不足和缺陷,建立了时间分辨荧光免疫层析法测定细胞、组织或血液等中PTX-3的浓度,能在短时间出结果,只需简单设备,能满足快速诊断PTX-3要求,提供了一种PTX-3荧光免疫层析测定试剂盒。

[0009] 本发明提供了一种检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,包括包含试纸条的检测卡,所述试纸条包括底板,在底板上依次相互交错搭接的滤血垫(2)、结合垫(3)、抗体承载膜(4)和吸水纸(8);

[0010] 所述结合垫吸附有PTX-3单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球,其中时间分辨荧光微球由直径80~150nm和250~350nm的微球组成,所述时间分辨荧光微球为镧系元素螯合物荧光标记微球。

[0011] 本发明利用免疫层析检测细胞、组织或血液等中PTX-3的浓度,其中的PTX-3抗体荧光微球,选用镧系元素螯合物荧光标记修饰微球,PTX-3抗体偶联到上述荧光微球上,PTX-3抗体与荧光微球重量比为1:50~1:5,用喷膜仪将PTX-3单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球喷涂于结合垫上,干燥后,封存备用;选用PTX-3抗体识别样本中抗原表位。

[0012] 所述时间分辨荧光微球由直径80~150nm和250~350nm的微球按质量比3~4:2组成。相比普通的免疫层析法,具有反应效率高,灵敏度高,检测范围宽的优势。

[0013] 优选,所述时间分辨荧光微球由直径90~120nm和290~320nm的微球组成。

[0014] 所述镧系元素螯合物荧光标记微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种。

[0015] 所述镧系元素选自铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)元素螯合物中的一种,优先选用铕螯合物(Europium Chelate),其荧光激发波长是360nm,发射波长是610nm。

[0016] 所述抗体承载膜上设置有检测线T₁和T₂以及质控线C,所述检测线T₁和T₂上包被有与所述时间分辨荧光微球标记的PTX-3抗体的单克隆抗体,质控线C上包被有与所述时间分辨荧光微球标记的PTX-3抗体配对的二抗。

[0017] 所述滤血垫和结合垫为玻璃纤维棉材质,所述抗体承载膜为硝酸纤维素膜。

[0018] 所述滤血垫经处理液预处理,以质量分数计,其处理液为10~15mM PB缓冲液(pH6.8~7.0),含3~6%凝集素,1~2%牛血清白蛋白,10~12%蔗糖,0.02~0.03%吐温20,0.01~0.02%防腐剂;所述结合垫经处理液预处理,以质量分数计,其处理液为10~15mM Tris缓冲液(pH8.0~8.2),含1~2%牛血清白蛋白,0.2~0.3%聚乙烯吡咯烷酮,0.2~0.3%聚乙二醇,10~12%蔗糖,0.02~0.03%吐温20,0.01~0.02%防腐剂。

[0019] 本发明所述的检测卡,由一壳体 and 所述试纸条组成,所述试纸条位于壳体内部。试

纸卡的两条检测线,大大增加抗原的捕获效率,使检测准确度更高,检测速度更快。

[0020] 所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,还包括样本稀释液或/和含有PTX-3标准曲线的SD卡。

[0021] 以质量分数计,所述样本稀释液为含0.5~0.7%NaCl,0.5~0.7%BSA和1~2% Tween20的pH7.8~8.0Tris-HCl缓冲液。

[0022] 所述的检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,用于检测人血清、血浆、全血样本、唾液、细胞及组织样本中PTX-3的含量。

[0023] 所述SD卡的制备包括:将所述的检测卡中加入不同浓度的人PTX-3抗原校准品,每个浓度设置三个重复,层析15min后,通过干式荧光免疫分析仪读取检测线、制控线的荧光强度比值(检测线检测值/制控线检测值),从而得到PTX-3定标浓度与荧光强度比值标准曲线并输入到SD卡。

[0024] 具体的,本发明所述的SD卡内存储有PTX-3定标浓度与荧光强度比值标准曲线,以纯化的PTX-3为校准品,用江苏苏州和迈精密仪器有限公司生产的半自动FIC-A1型干式荧光免疫分析仪(波长600~650nm)测定不同浓度PTX-3校准品在试纸卡检测线上呈现不同荧光强度,建立PTX-3浓度标准曲线,输入到SD卡中并插入到荧光免疫分析仪,自动读取待测样本的检测线、制控线的荧光强度比值,用于样本中PTX-3定量检测。

[0025] 本发明建立了时间分辨荧光免疫层析法测定细胞、组织或血液等中PTX-3的浓度,能在短时间(如15min内)出结果,只需简单设备,能满足快速诊断PTX-3要求,

[0026] 本发明利用血球凝集素使红细胞凝集,对滤血垫预处理,凝集素是一种无免疫原性蛋白质,分子量为11 000~335 000之间,可从植物或动物中提取,具有凝集红细胞的特性。本发明利用常规无毒害化学试剂(混合有血球凝集素)处理样品垫(玻璃纤维)改变红细胞表面电荷,使其富集在一起,从而替代滤血膜和抗红细胞抗体,能够稳定有效的分离红细胞,不受材质、工艺条件的限制,消除溶血现象对结果造成的干扰,具有分离效果稳定,操作简单,样本用量少和检测速度快等优点。

[0027] 本发明利用时间分辨荧光微球检测技术,可避免样本本身荧光干扰,荧光微球为稀土纳米材料,具有背景低,荧光信号强,信噪比高等优势,标记通过共价键将微球与抗体连接,标记产物稳定,具有检测范围宽(0.5~35ng/mL)、灵敏度高(检出下限为0.32ng/mL,上限为50ng/mL)、准确度高、检测快速简便等特点。

[0028] 本发明中的标准曲线预设于SD卡中,可实现单人份、小批量检测,无需每次检测都制作标准曲线,检测样本为人血清、血浆、全血样本、唾液以及细胞和组织中,不受检测场地限制。同时其配套使用的设备精巧,无需大型仪器设备,适用于基层医院的检验科和病理科。

[0029] 该时间分辨荧光免疫层析试剂盒能够简单,快速,准确定量检测血液及细胞、组织中PTX-3浓度,用于早期诊断各种炎症以及引发的呼吸病、心血管疾病和肿瘤等发生,在临床上广泛应用,将有很大市场需求。

附图说明

[0030] 图1是免疫层析试纸条侧面图;

[0031] 图2是免疫层析试纸条正面图;

[0032] 图3是本发明中检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒中SD卡存储的标准曲线;

[0033] 图4是应用本发明中的时间分辨荧光免疫层析试剂盒与酶联免疫法检测不同抗原PTX3浓度相关性的比较;

[0034] 图5是应用本发明中的时间分辨荧光免疫层析试剂盒与酶联免疫法检测25例全血样本中PTX3浓度相关性的比较。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例对一种检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒进行进一步的描述:

[0036] 实施例1一种检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试纸条和检测卡的制备

[0037] 本发明所述的检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试纸条(见图1和图2),是由PVC底板1(尺寸为80~300mm)上依次相互交错搭接的滤血垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水纸8组成的。

[0038] 其中滤血垫2,尺寸为30*300mm,玻璃纤维棉材质;

[0039] 结合垫3,其前端搭在滤血垫2的后端下方,玻璃纤维棉材质,吸附有PTX-3抗体荧光微球;

[0040] 硝酸纤维素膜4,其前端搭在综合垫3的后端下方,为硝酸纤维素膜,喷涂所述荧光微球标记的PTX-3抗体的单克隆抗体(检测线5和6)和与荧光微球标记的PTX-3单克隆抗体所配对的二抗(质控线7);

[0041] 吸水纸8,其前端搭在硝酸纤维素膜4的后端上方,尺寸为28*300mm;

[0042] 所述滤血垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水纸8依次相互交错1.8~2.3mm搭接,相互交错尺寸优选为2mm,其中检测线—T线靠近滤血垫,质控线—C线靠近吸水纸,检测线和质控线优选间距为3~5mm。组装后形成试纸板,然后切割成3~4mm宽试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

[0043] 所述滤血垫经处理液(以质量分数计)为10mM PB缓冲液(pH6.8),含5%WGA(凝集素,购买于Sigma公司,货号为L9640),1%BSA(牛血清白蛋白),10%Sucrose(蔗糖),0.02%Tween 20(吐温20),0.02%Proclin 300(防腐剂)预先处理。

[0044] 所述结合垫通过以下方法制备:

[0045] (1) 缓冲液置换:分别将10mg直径100nm和300nm钬螯合物荧光标记羧基修饰微球(购买于Huge, Lot No:9200320L)加1mL 50mM MES缓冲液,pH5.5~6.0(以下MES皆为50mM),离心去除上清(15000rpm,4℃,30min),加入250μL MES超声复溶(240W,超声3s,停止3s,1min),备用;

[0046] (2) 活化:分别向微球中加入2μL浓度为10mmol碳二亚胺(EDC)和2μL浓度为20mM N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),混匀,在37℃下反应20min;

[0047] (3) 清洗:活化结束后,离心去除上清(15000rpm,4℃,30min),用500μL 50mM HEPES(pH8.0)缓冲液超声重悬(240W,超声3s,停止3s,1min),洗涤微球后离心(重复2~3次),去除上清后加入500μL 50mM HEPES超声重悬后备用;

[0048] (4) 抗体反应:分别加入相应量PTX-3抗体(购买于R&D公司,货号为MAB1826-100),

其抗体预先用50mM HEPES透析,PTX-3抗体与荧光微球质量比为0.3~0.7:10,混匀后室温下反应2小时;

[0049] (5) 封闭1:分别加入7 μ L浓度为2M甘氨酸(Gly)和14 μ L浓度为1M乙醇胺(EA)封闭;

[0050] (6) 封闭2:分别加入2mg BSA和0.5mg兔IgG,BSA与荧光微球质量比为2:1,兔IgG与荧光微球质量比为0.5~2:1,混匀后封闭;

[0051] (7) 清洗:分别加入1mL PBST离心去除上清(15000rpm,4 $^{\circ}$ C,30min),清洗两次,再加入1mL微球保存液清洗一次,去除上清后加入100 μ L的微球保存液超声重悬(240W,超声3s,停止3s,1min),置于2~8 $^{\circ}$ C保存备用;

[0052] 其中本发明选用的微球保存液的配方为10mM Tris缓冲液(pH7.0~7.5),以质量分数计,含1%BSA,0.9%NaCl,0.02%Proclin 300(防腐剂);

[0053] (8) 铺结合垫:将100nm和300nm荧光微球分别标记好的微球偶联物按照3:2(以质量比为准)的比例混匀,按1/50的使用浓度固定在处理过的玻璃纤维上,置于鼓风干燥箱中干燥,37 $^{\circ}$ C烘干过夜;

[0054] 其中本发明选用玻璃纤维结合垫进行预处理,室温下,在10mM Tris缓冲液(pH8.0),以质量分数计,含1%BSA(牛血清白蛋白),0.2%PVP(聚乙烯吡咯烷酮),0.2%PEG(聚乙二醇),10%Sucrose(蔗糖),0.02%Tween 20(吐温20),0.02%Proclin 300(防腐剂),浸泡1小时,37 $^{\circ}$ C烘干5小时备用。

[0055] 所述包被PTX-3抗体的硝酸纤维素膜通过以下方法制备:

[0056] (1) T线划线液配制:T₁和T₂线均用划膜缓冲液将PTX-3单克隆抗体(购买于R&D公司,货号为AF1826)稀释至1.0~2.0mg/mL,所述划膜缓冲液为0.01mol/L PBS(含10g/L蔗糖),pH7.0~7.4;

[0057] (2) C线划线液配制:用划膜稀释液将与荧光微球标记的单克隆抗体所配对的羊抗鼠IgG抗体稀释至1.5~2.0mg/mL,所述划膜稀释液为0.01mol/L PBS(含10g/L蔗糖),pH7.0~7.4;

[0058] (3) 采用喷金划膜仪,将C线抗体、T线抗体分别包被在固定于底板上的硝酸纤维素膜上,划液量:1 μ L/cm;划膜速度:50mm/s;

[0059] (4) 将划好的试纸板置于鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干4h,加入干燥剂封存备用。

[0060] 所述检测卡的制备:检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析的试纸条组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳上设有加样孔和观察窗,加样孔对应于检测试纸条的滤血垫2,结果观察窗对应于PTX-3检测试纸条的检测线5、6和质控线7。

[0061] 实施例2:一种检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析SD卡的制备

[0062] 所述SD卡通过以下方法制备:

[0063] 按实施例1制备好的检测卡中加入不同浓度的人PTX-3抗原校准品(0.2、0.8、3.2、6.4、12.8、25.6ng/mL)共六个浓度,每个浓度设置三个重复,均由实施例2中所用样本稀释液稀释而成),层析15min后,通过江苏苏州和迈精密仪器有限公司生产的半自动FIC-A1型干式荧光免疫分析仪读取检测线、制控线的荧光强度比值(检测线检测值/制控线检测值)。

[0064] (1) PTX-3定标浓度与荧光强度比值标准曲线建立:配制不同浓度梯度的PTX-3抗原缓冲液,通过所述PTX-3的时间分辨荧光免疫层析检测卡测定不同浓度的校准品,以校准品浓度为X轴,检测线、制控线荧光强度的比值(即T₁+T₂/C)为Y轴,绘制成标准曲线,如图3所

示,得出回归方程,其R值为0.9992;

[0065] (2) 校准品制备:用样品稀释液将校准品稀释至覆盖线性范围的几个浓度点,分装冻存储备用;

[0066] (3) 校准品测试:取不同浓度的校准品滴加到免疫层析试纸条的加样孔,通过荧光免疫分析仪读取检测信号值;

[0067] (4) 校准曲线生成:根据校准品的制备浓度和荧光值采用合适的拟合方式(如线性最小二乘法)生成该批试剂的校准曲线,写入并生成相应信息存储在SD卡中。

[0068] 该实施例中包含的样本稀释液(以质量分数计)为在pH 8.0的Tris-HCL缓冲液中溶入0.5%NaCl,0.5%BSA和1%Tween 20,以100 μ l/管分装于离心管中。该样本稀释液用于层析样品,其能够样品更加均一,提高检测的准确度和精密度。

[0069] 实施例3:时间分辨荧光免疫层析检测PTX-3浓度的操作方法

[0070] 该过程具体包括下列步骤:

[0071] (1) 将待检测样本及检测试剂复温至室温;

[0072] (2) 取50 μ L待测全血加入100 μ L样本稀释液中(如前所述,已分装成100 μ L/管),获得混合样本;

[0073] (3) 吸取上述混合后样本100 μ L,加入到检测卡的加样孔中,室温避光反应15min;

[0074] (4) 开启荧光免疫分析仪,初始化自检完毕后,将对应检测PTX-3的SD卡插入仪器对应的插口中;

[0075] (5) 将检测卡插入仪器的检测卡插口中,运行仪器读取检测结果,通过标准曲线和相应的分析软件自动计算出待测样本中的PTX-3的浓度。

[0076] 实施例4:不同直径的荧光微球标记的抗体的检测范围比较

[0077] 利用实施例1中微球标记抗体的方法,将100nm和300nm钕螯合物荧光微球分别标记PTX-3抗体,并制作结合垫,按照实施例3中免疫层析检测PTX-3浓度的操作方法,检测不同浓度的PTX-3抗原,最终其检测范围分别为(5~50)和(0.2~15)ng/mL,并优化标记产物的混合比例,最终确定100nm和300nm荧光微球标记产物的最佳质量比例为3:2,检测范围宽(0.5~35ng/mL),灵敏度高(检出下限为0.32ng/mL,上限为50ng/mL)。

[0078] 实施例5:时间分辨荧光免疫层析法和酶联免疫法检测不同PTX-3抗原浓度的比较

[0079] 时间分辨荧光免疫层析法测定PTX-3浓度是利用本发明的新型的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,酶联免疫吸附法(enzyme linked immuno sorbent assay,ELISA)测定PTX-3浓度是利用美国R&D公司的PTX-3试剂盒。

[0080] 利用实施例2中所用样本稀释液稀释成不同浓度的人PTX-3抗原校准品(0.5、2.5、5.0、7.5、10、15、20、25ng/mL)共八个浓度,每个浓度设置三个重复,层析15min后,通过江苏苏州和迈精密仪器有限公司生产的FIc-S1型干式荧光免疫分析仪读取检测线、制控线的荧光强度比值(检测线检测值/制控线检测值,即 T_1+T_2/C)。

[0081] 同一稀释浓度,采用美国R&D公司的PTX-3试剂盒进行对比检测,每个浓度设置三个重复,按照说明进行加样并孵育,放置于酶标仪中进行读数分析。

[0082] 两种方法检测结果进行线性分析,如图4所示,其相关性很好 $R^2=0.9806$, $P<0.05$,平均相对偏差小于10%。

[0083] 统计分析采用SPSS 20.0软件对定量数据进行方差分析和t检验等相关分析。

- [0084] 实施例6:时间分辨荧光免疫层析法和酶联免疫法检测待测样本中PTX-3的比较
- [0085] 时间分辨荧光免疫层析法检测PTX-3浓度是利用本发明的新型的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,酶联免疫吸附法检测PTX-3浓度是利用美国R&D公司的PTX-3试剂盒。
- [0086] 采集待检测PTX-3的全血样本25份,混合均匀后取样本50 μ L,加入本发明的新型试剂盒中的样本稀释液100 μ l,混匀后加入到检测卡加样孔中,每个浓度设置三个重复,层析15min后通过苏州和迈精密仪器有限公司生产的FIc-S1型干式荧光免疫分析仪读取数据并分析。
- [0087] 同一血样采用美国R&D公司的PTX-3试剂盒进行对比浓度检测,采集的待测样本使用EDTA作为抗凝剂,3000rpm/min离心5min后分离血浆,按照说明进行加样并孵育,每个浓度设置三个重复,放置于酶标仪中进行读数分析。
- [0088] 两种方法检测结果进行线性分析,如图5所示,其相关性较好 $R^2=0.9781$, $P<0.05$,平均相对偏差小于10%,结果符合临床分析要求,适合用于临床检测。
- [0089] 统计分析采用SPSS 20.0软件对定量数据进行方差分析和t检验等相关分析。

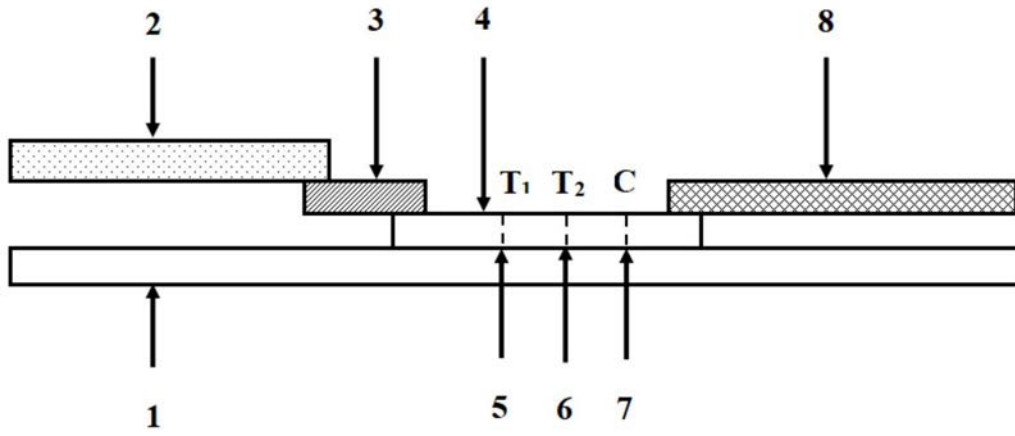


图1

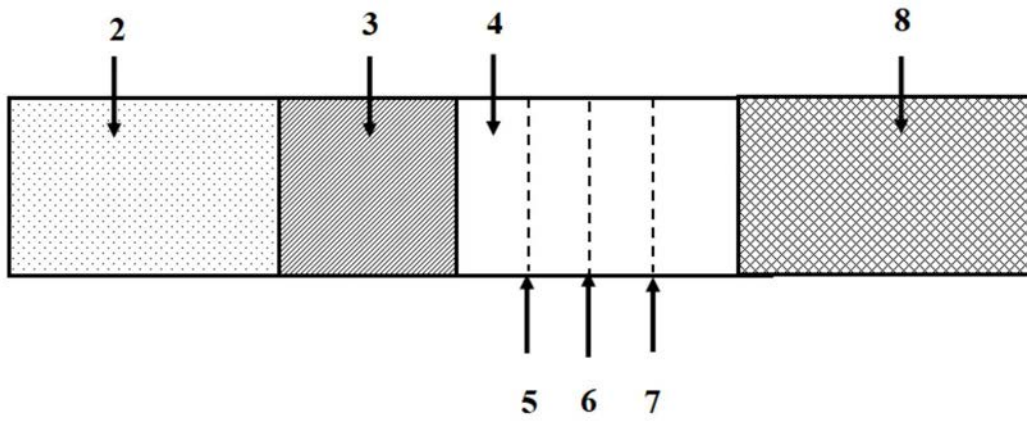


图2

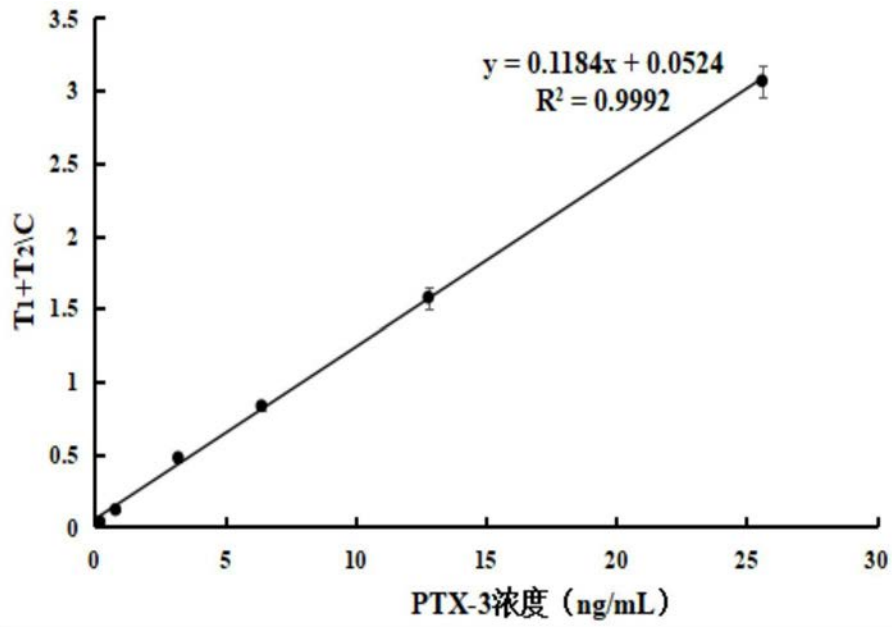


图3

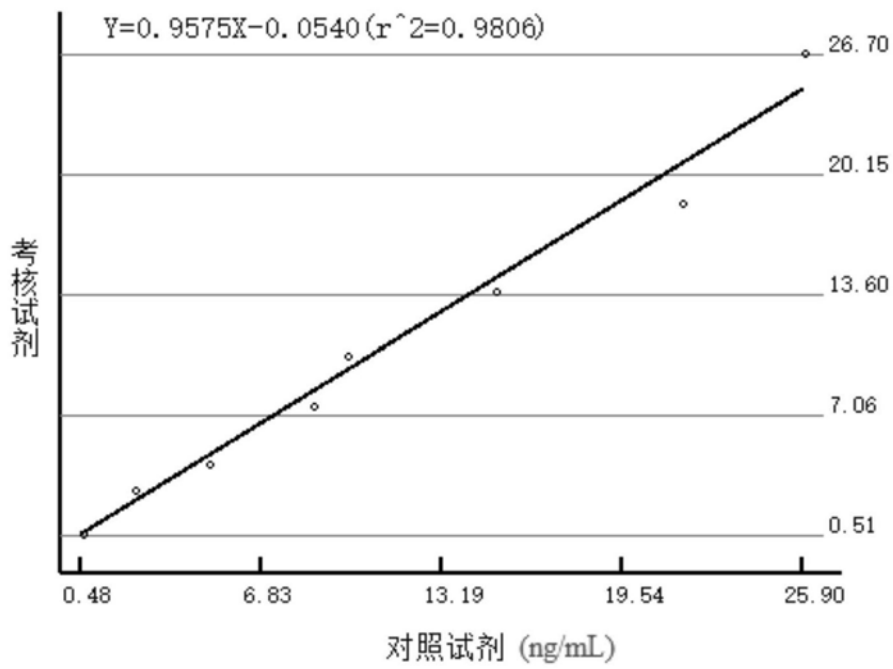


图4

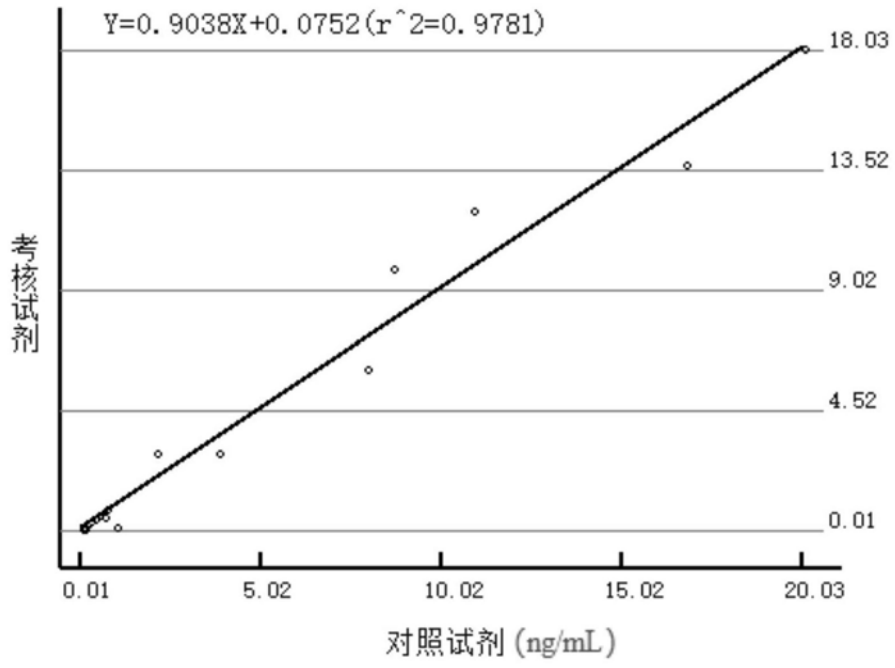


图5

专利名称(译)	一种检测PTX3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	CN111024956A	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN201911406131.9	申请日	2019-12-31
[标]发明人	张宗慧 孙康俊 黄宝福		
发明人	张宗慧 孙康俊 黄宝福		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54386 G01N33/577 G01N33/582 G01N33/6893 G01N2800/52 G01N2800/7095		
代理人(译)	许丹丹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测PTX-3的时间分辨荧光免疫层析试剂盒，包括包含试纸条的检测卡，所述试纸条包括底板，在底板上依次相互交错搭接的滤血垫、结合垫、抗体承载膜和吸水纸；所述结合垫吸附有PTX-3单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球，其中时间分辨荧光微球由直径80~150nm和250~350nm的微球组成，所述时间分辨荧光微球为镧系元素螯合物荧光标记微球。本发明建立了时间分辨荧光免疫层析法测定细胞、组织或血液等中PTX-3的浓度，能在短时间出结果，只需简单设备，能满足快速诊断PTX-3要求，具有检测范围宽、灵敏度高、准确度高、检测快速简便等特点。

