



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398565 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810417752.6

(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)

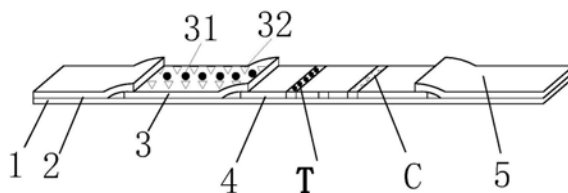
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

用于检测犬C-反应蛋白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犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡与制备方法;旨在提供一种灵敏度高,检测结果可靠的用于检测犬C-反应蛋白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、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的CRP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CRP单克隆抗体的检测T线;属于动物疫病检测领域。



1. 一种用于检测犬C-反应蛋白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CRP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CRP单克隆抗体的检测T线。

2. 根据权利要求1所述的用于检测犬C-反应蛋白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2所述的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述的样品稀释液瓶(6)中含的样品稀释液含1% S9和0.1% Triton X-100的的0.1M的pH7.8 Tris-盐酸缓冲液。

4. 制备权利要求1所述的一种用于检测犬C-反应蛋白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1%牛血清白蛋白、2%聚乙二醇4000和0.5%Triton X-100的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液;

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;

B)所述的结合垫(3)的制备方法为:

1) 将用荧光微球标记CRP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CRP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犬C-反应蛋白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CRP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20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入500 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 CRP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犬C-反应蛋白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的标记缓冲液标记缓冲液0.1M MES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或者6所述的一种用于检测犬C-反应蛋白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。

8. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;所述的标记荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白、0.5%牛丙种球蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

9. 根据权利要求5或6所述的一种用于检测犬C-反应蛋白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 NHS的0.05M MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL EDC的0.05M MES缓冲液。

用于检测犬C-反应蛋白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,是一种用于检测犬C-反应蛋白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] C反应蛋白(CRP)是机体非免疫系统的组成成分,在多种哺乳动物疾病的急性期有重要的诊断警示作用。CRP在肝脏的合成反应主要由IL-1、IL-6和TNF- α 等炎症因子所调节。CRP浓度受年龄、性别和体重的影响不大。在人类临床医学诊断中,CRP作为炎性或非炎症性疾病的诊断标志物进行检测已超过30年。在兽医临床上,犬CRP的检测在临床应用中也比较广泛,包括急性感染性疾病的诊断和鉴别诊断、手术后感染的监测、抗生素疗效的观察、病程监测及预后判断等。犬CRP对疾病敏感度高,能在疾病早期快速升高,及时反映病情;而且CRP的浓度不受到抗生素及免疫抑制剂的影响,在治疗中可以准确地对疾病的发展进行监测,在临床诊疗中具有很高的价值。因此作为炎症标记物,CRP在兽医临床上的作用日趋显著,检测犬CRP对临床诊断、疗效及预后观察等具有重要价值。

[0003] CRP是由肝脏合成的一种能与肺炎链球菌C多糖反应形成复合物的急性时相反应蛋白。它由5个相同的亚基单位以非共价方式联接,与人CRP不同,犬CRP的5个亚基中有两个被糖基化。研究表明,各种抗其他物种CRP蛋白的抗血清,都不能和急性期犬血清或者分离的犬CRP发生交叉反应,说明其他物种CRP和犬CRP没有共同的抗原性,这种现象也说明犬CRP的快速检测方法不能依赖于人的商品化CRP快速检测试纸条。目前,临床中快速检测犬CRP的方法多是依赖于临床检测仪器,这在普通宠物医院并不具备。而且,对于动物疫病诊断行业,很多情况下,对于疾病的诊断需要在野外进行,这对于现行犬CRP检测方法是没办法完成的。时间分辨荧光免疫层析技术采用稀土元素(如Eu³⁺等)克服了荧光微球灵敏度较差的缺点。与放射性免疫分析相比,时间分辨荧光免疫层析技术无放射性污染,具有灵敏度高、抗基质干扰性好,稳定性强等优点。

[0004] 中国专利ZL201710468614.6公开了一种犬C反应蛋白胶体金免疫层析试纸条,由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、底板依次组成,所述结合物释放垫上包被有鼠抗犬C反应蛋白单克隆抗体-胶体金标记物,所述反应膜上包括检测区和质控区,所述检测区包被有鸡抗犬C反应蛋白多克隆抗体,所述质控区包被有羊抗鼠抗抗体。该方法选用了胶体金作为示踪物,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。

[0005] 中国专利ZL201710468621.6公开了一种犬C反应蛋白荧光检测试纸条,由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、底板依次组成,所述结合物释放垫上包被有鼠抗犬C反应蛋白单克隆抗体-荧光微球标记物,所述反应膜上包括检测区和质控区,所述检测区包被有鸡抗犬C反应蛋白多克隆抗体,所述质控区包被有羊抗鼠抗抗体;但是该方法存在下述缺点:检测线包被抗体为多克隆抗体,可能会影响到检测的特异性;另外反应膜检测区和质控区发生免疫反应时,共用一种标记物:鼠抗犬C反应蛋白单克隆抗体-荧光微球标记物,当

样本中C反应蛋白变化是,C线荧光值将相应变化,从而可能影响C值和T/C值的稳定性,从而严重影响定量的准确性。

发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种灵敏度高,检测结果重现性的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡。

[0007] 本发明的第二个目的是提供上述检测试剂卡的制备方法。

[0008] 为此,本申请提供的第一个技术方案是这样的:

[0009] 一种用于检测犬C-反应蛋白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、硝酸纤维膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的CRP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鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线。

[0010] 进一步的,上述的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,还包括样品稀释液瓶。

[0011] 进一步的,上述的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,所述的样品稀释液瓶中含的样品稀释液为含1% S9和0.1% Triton X-100的的0.1M的pH7.8 Tris-盐酸缓冲液。

[0012] 本发明的第二个技术方案是提供上述检测试剂卡的制备方法。

[0013] 一种用于检测犬C-反应蛋白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、硝酸纤维膜和吸水垫,

[0014] A) 所述的样品垫的制备方法为:

[0015] 1) 配制样品垫处理液:含1%牛血清白蛋白、2%聚乙二醇4000和0.5% Triton X-100的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液;

[0016] 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;

[0017] B) 所述的结合垫的制备方法为:

[0018] 1) 将用荧光微球标记CRP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;

[0019] 2) 按3.5 μ l/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0020] C) 所述的反应膜的制备方法为:

[0021] 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;

[0022] 2) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将CRP单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T检测线工作液;

[0023] 3) 取底板粘贴硝酸纤维膜;

[0024] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

[0025] 5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

[0026] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记CRP单克隆抗体的制备方法为:

[0027] 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;

[0028] 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;

[0029] 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;

[0030] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g CRP单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0031] 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;

[0032] 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。

[0033] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白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:

[0034] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的标记缓冲液标记缓冲液0.1M MES缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

[0035] 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;

[0036] 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;

[0037] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入1000 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0038] 5) 封闭:加入500 μ l标记封闭液,封闭30min;

[0039] 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。

[0040] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白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。

[0041] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;所述的标记荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白、0.5%牛丙种球蛋白、3%蔗糖的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

[0042] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白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 NHS的0.05MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL EDC的0.05M MES缓冲液。

[0043] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有如下优点:

[0044] 1、本发明提供的技术方案操作步骤简单,对样品预处理方法进行优化,只需要采集犬血清,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。

[0045] 2、本发明提供的技术方案,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0.86mg/L(原工艺1.56mg/L),线性更好,剂量-反应曲线的决定系数由0.9874提升到0.9989。

[0046] 3、本发明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。

[0047] 4、本发明采用样品垫处理液处理后的荧光微球释放更充分,重复性好,低中高三个水平质控变异系数均低于10%(7.21%、6.24%和4.26%);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

[0048] 图1是本发明提供的检测试纸卡结构示意图;

[0049] 图2是本发明提供的检测试纸条结构示意图;

[0050] 图3是本发明提供的另一种检测试纸卡结构示意图;

[0051] 图4是本发明提供的检测卡判定结果为阳性时示意图;

[0052] 图5是本发明提供的检测卡判定结果为阴性示意图;

[0053] 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;

[0054] 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;

[0055] 图8是本申请提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

[0056] 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

[0057] 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。

[0058] 实施例1

[0059] 本发明提供一种用于检测犬C-反应蛋白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内设有用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡包括卡底板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CRP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4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP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,方便试剂卡的取出与放入。

[0060] 实施例2

[0061] 本申请提供的另一种用于检测犬C-反应蛋白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以及检测卡,所述检测卡位于壳体7内,所述用于检测犬C-反应蛋白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CRP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4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP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,方便试剂卡的取出与放入。

[0062] 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。

[0063] 实施例3

[0064] 实施例1或者2中提供的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡的制备方法是在温度(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,装入塑料卡壳内,即CDV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。

[0065] 具体制备方法如下:

[0066] 1.1结合垫的制备

[0067] 1.1.1 CRP单克隆抗体的标记

[0068] 1) 选择微球: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。

[0069] 2) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL 0.1M的MES标记缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),加入荧光微球1mg,涡旋混匀。

[0070] 3) 微球的活化:在上述离心管中加入(20-50)μl(优选30μl)10mg/mL标记活化剂A[10mg/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)],涡旋混匀后加入(20-50)μl(优选30μl)50mg/mL标记活化剂B[10mg/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)],旋转培养器上反应30min;

[0071] 4) 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2mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液),超声2s;

[0072] 5) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20μg CRP单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0073] 6) 封闭:加入200.0μl标记封闭液[含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液],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;

[0074] 7) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入600.0μl标记荧光微球稀释液[含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.5%牛丙种球蛋白、3%蔗糖的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液],超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

[0075] 1.1.2质控C线抗体的标记

[0076] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的标记缓冲液,取荧光微球0.5mg,涡旋混匀;

[0077] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入20μl-50μl(优选30μl)标记活化剂A[含10mg/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)]和20μl-50μl(优选30μl)标记活化剂B[含10mg/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)],旋转培养器上反应30min;

[0078] 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1mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液),90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

[0079] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入0.25mg羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0080] 5) 封闭:加入标记封闭液[含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶

液],封闭30min;

[0081] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入1mL标记荧光微球稀释液[含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.5%牛丙种球蛋白、3%蔗糖的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液],90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

[0082] 1.1.3喷膜

[0083] 1) 将玻璃纤维裁切为 $(10 \pm 1) \text{ mm} \times (300 \pm 10) \text{ mm}$ 大小为结合垫;

[0084] 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;

[0085] 3) 按 $5.0 \mu\text{l/cm}$ 、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0086] 4) 喷完后,37°C干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0087] 1.2反应膜的制备

[0088] 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。

[0089] 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CRP单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T线工作液。

[0090] 3) 取PVC底板,粘贴硝酸纤维膜。

[0091] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为 $1 \mu\text{L/cm}$ 。

[0092] 5) 完成后将片材放置在37°C干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0093] 1.3样品垫制备

[0094] 1) 配制样品垫处理液:含1%牛血清白蛋白(BSA)、2%聚乙二醇4000和0.5% Triton X-100的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液;

[0095] 2) 以 $5.0 \mu\text{l/cm}$ 的浓度将缓冲液喷涂于玻璃纤维上。

[0096] 对比试验

[0097] 本对比比例提供的检测试剂卡结构实施例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中标记荧光微球稀释液和样品垫处理液换为常规缓冲液,比如样品垫处理液为含0.5%Tween-20、0.1%牛血清白蛋白、0.5%Trtion-100的50mM pH 8.0 10mmol/L Tris-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 8.0 10mmol/L Tris-HCl缓冲液,其它参数和条件均与实施例3一致。

[0098] 检测方法

[0099] 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。

[0100] 方法一:采用紫外灯照射,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CRP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CRP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。

[0101] 方法二:免疫荧光检测仪检测结果:

[0102] 1) 收集犬血清;

[0103] 2) 取 $10 \mu\text{l}$ 加入含有1.0mL样品稀释液(含1%S9和0.1%Triton X-100的的0.1M的

pH7.8 Tris-盐酸缓冲液的样品管中,充分混匀;

[0104] 3) 取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0105] 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;

[0106] 5) 10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0107] 6) 荧光强度与样品中的CRP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 $\text{Log}(Y) = 0.59476\text{Log}(X) - 0.5267$, $R = 0.9994$ ($R^2 = 0.9989$),参阅图3。

[0108] 免疫荧光检测仪检测结果:

[0109] 1、线性范围

[0110] 1.1.1 将CRP校准品用阴性血清分别稀释到0mg/L、2.5mg/L、7.5mg/L、20mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L、700mg/L和800mg/L;

[0111] 1.1.2 将以上各浓度样本分别取75 μ L,加入至制备好的犬CRP检测试剂中,每浓度重复测试2次;

[0112] 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。

[0113] 1.1.4 测试结果显示:试剂在检测2.5~300mg/L的CRP线性拟合关系较好, $r > 0.9900$,当CRP浓度增加到400mg/L时,线性拟合 r 值小于0.9900,T/C增长减缓,CRP在400~500mg/L时T/C值平缓,CRP达到600mg/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300mg/L。

[0114] 2、最低检出限

[0115] 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0.86mg/L。具体见表1和图8;

[0116] 表1

	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
[0117] 本申请提供的检测试剂卡	0	0.02		
	2.5	0.52	0.40	-0.28
	7.5	0.95	0.88	-0.02
	20	1.85	1.30	0.27
	50	2.93	1.70	0.47
	100	4.65	2.00	0.67
	200	6.98	2.30	0.84
	最低检测限 (LOD) :0.86 mg/L			
	r:0.9994			
	r ² :0.9989			

[0118] 用同样方法检测对比对比试验制备的检测卡,其检测具体见表2和图9

[0119] 表2

对比实验提供的检测试剂 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	0.02		
	2.5	0.36	0.40	-0.44
	7.5	0.85	0.88	-0.07
	20	1.10	1.30	0.04
	50	2.01	1.70	0.30
	100	3.26	2.00	0.51
	200	4.35	2.30	0.64
	最低检测限 (LOD) : 1.56 mg/L			
	r: 0.9937			
	r ² : 0.9874			

[0121] 3、精密度

[0122] 将CRP校准品用阴性血清稀释至10mg/L、30mg/L、100mg/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3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7.21%、6.24%和4.26%),因此本检测方法具有较高的精密度。

[0123] 表3

[0124]

	浓度	CV
质控I	10mg/L	7.21%
质控II	30mg/L	6.24%
质控III	100mg/L	4.26%

[0125] 为了更好的说明本发明的有益效果,下面给出采用本发明提供的检测试剂与其他方法(胶体金法、荧光层析法)等在检测犬C-反应蛋白时的检测性能比较,见表4。

[0126] 表4

检测方法	专利公开号	检测性能
胶体金法	CN 107085100 A	选用多抗包被可能影响试剂特异性；定性检测或定量检测，剂量-反应曲线未提供；
荧光层析法	CN 107271682 A	选用多抗包被可能影响试剂特异性；定量检测，剂量-反应曲线未提供
本发明型提供的方法		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 0.86mg/L

[0128] 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。

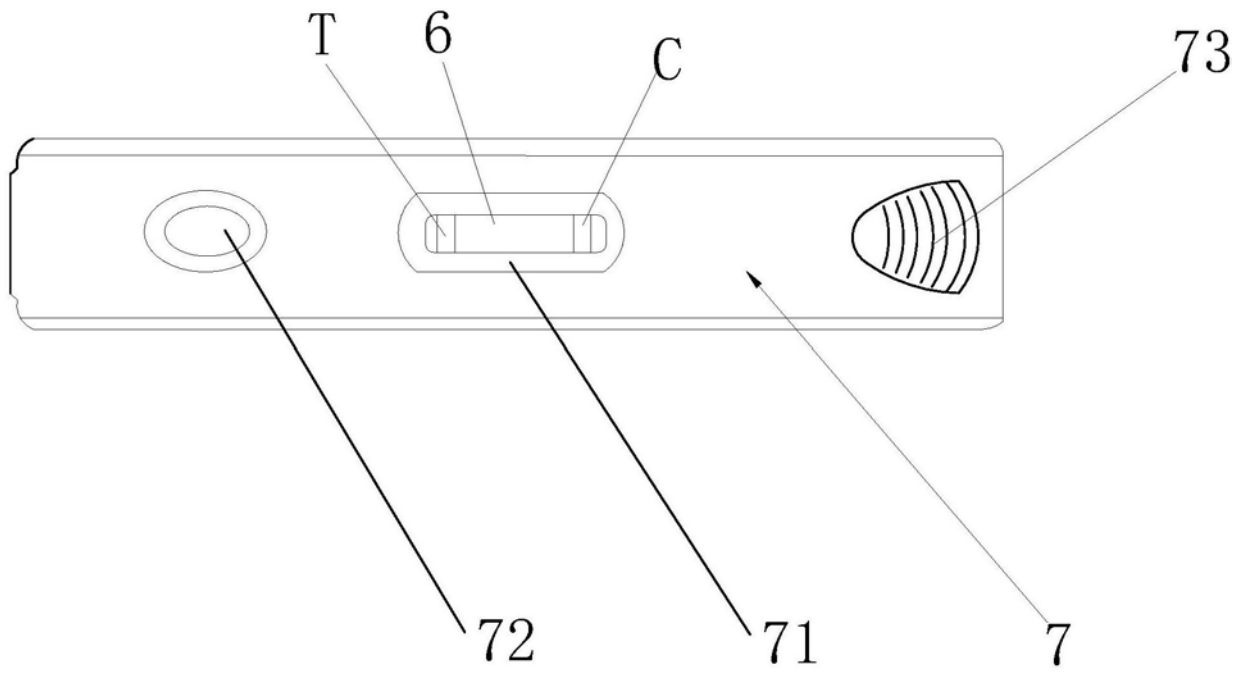


图1

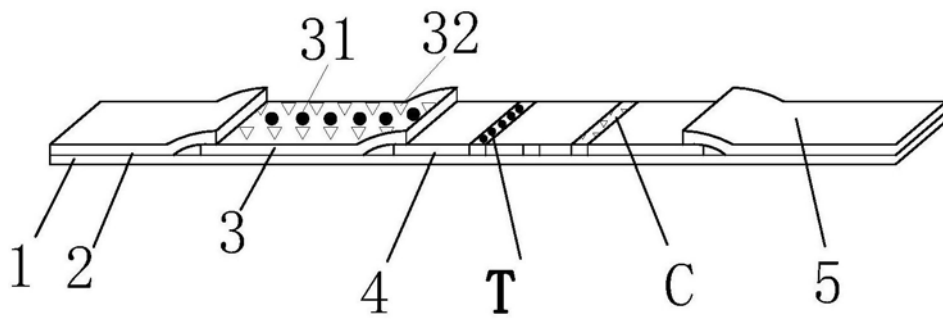


图2

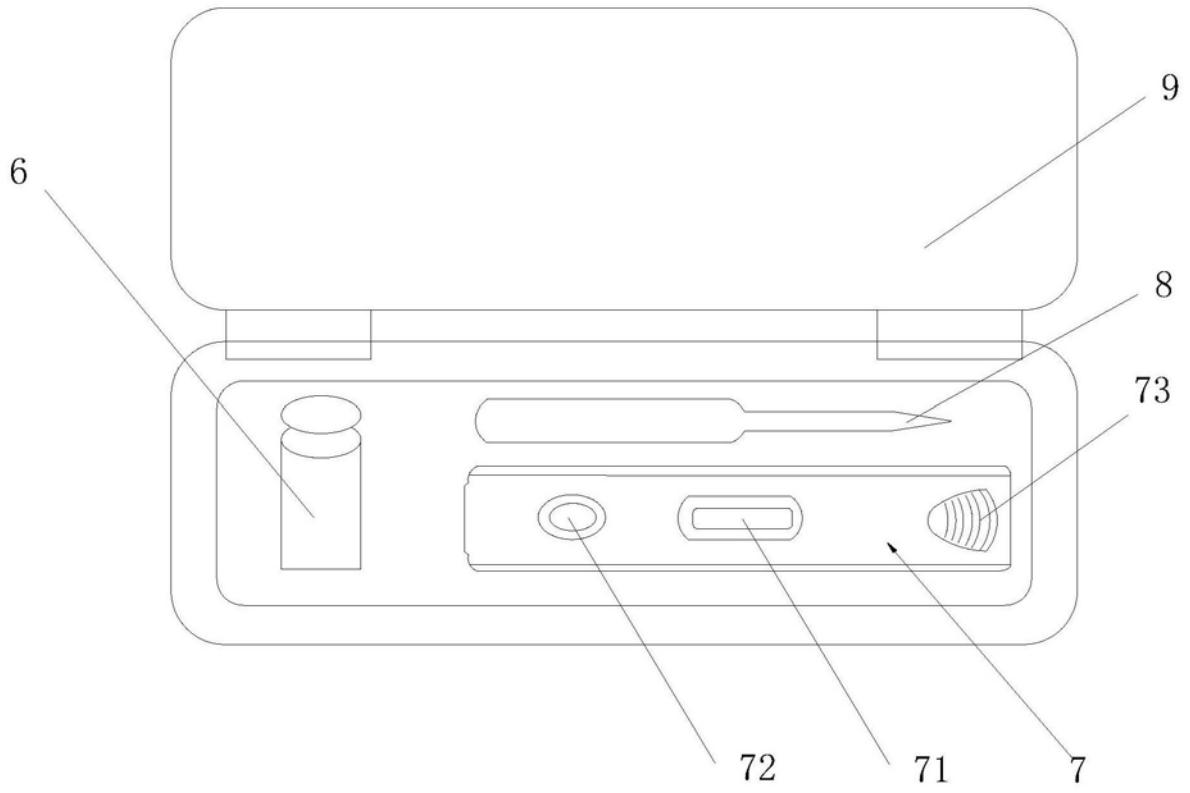


图3

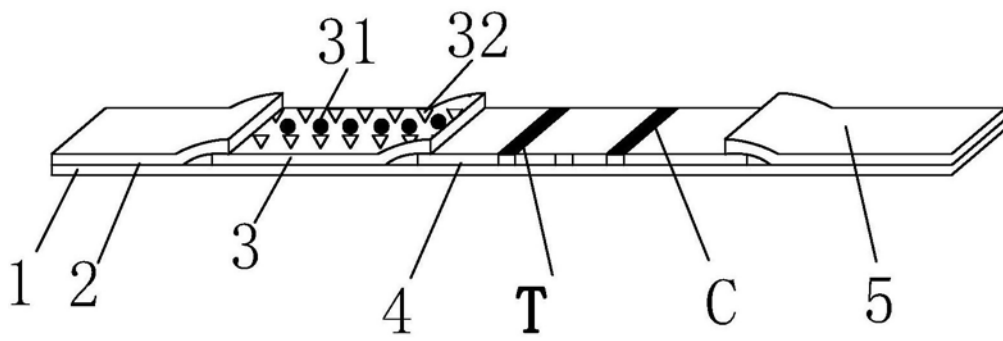


图4

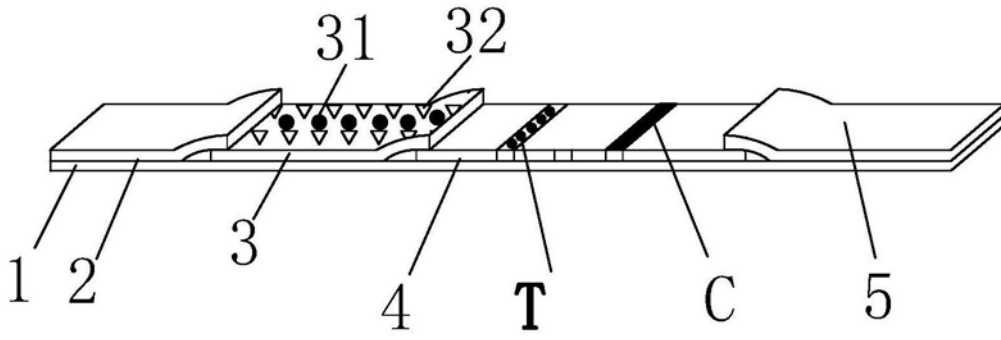


图5

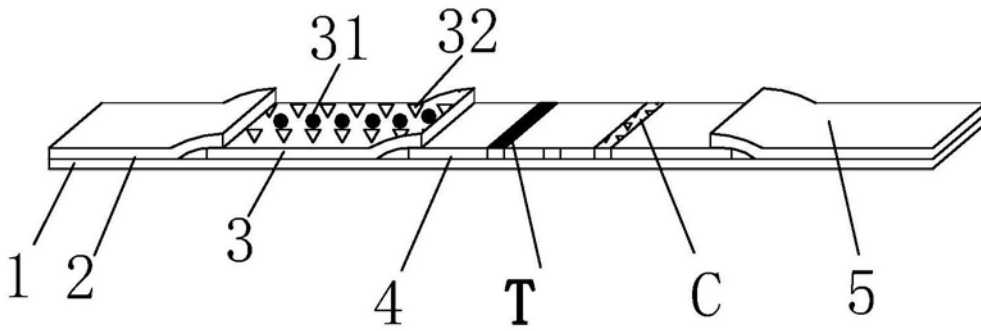


图6

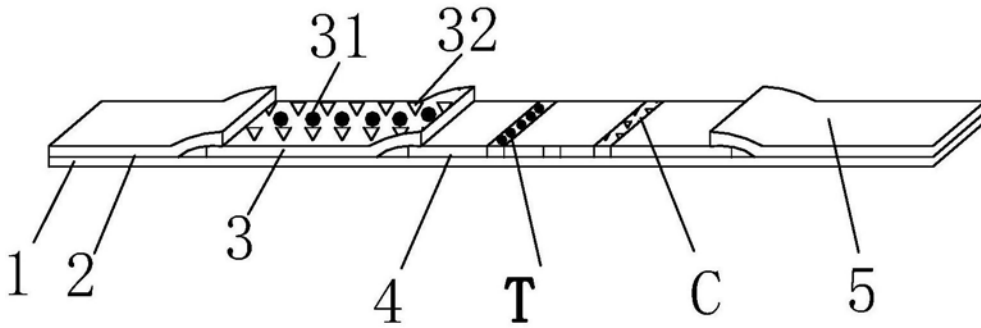


图7

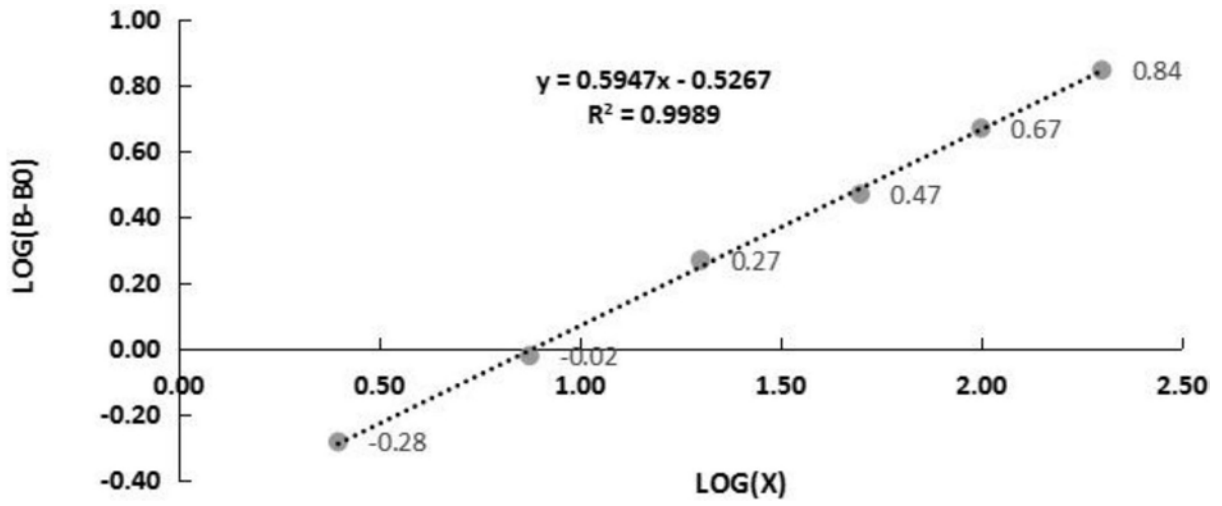


图8

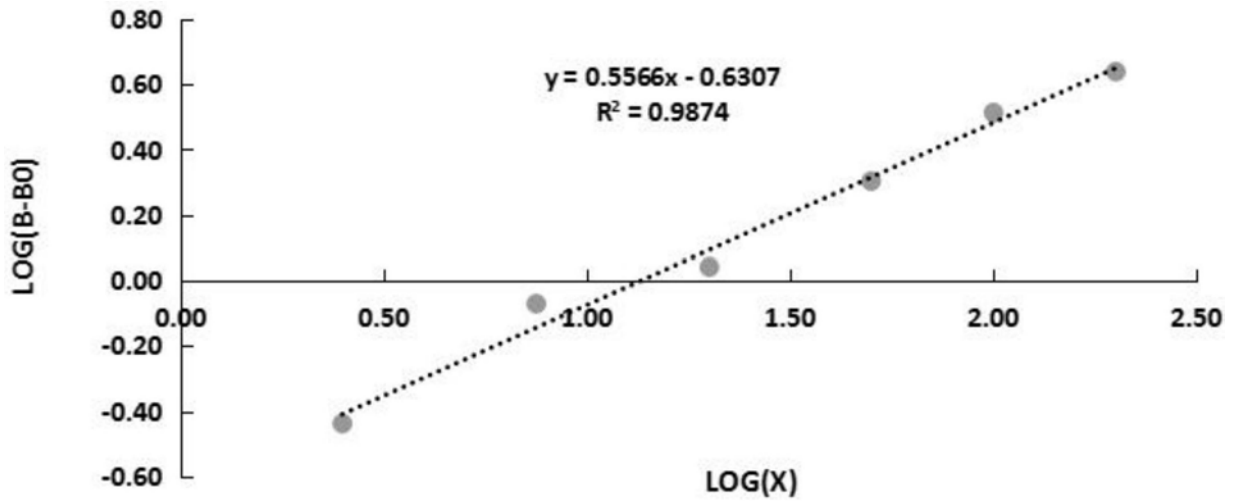


图9

专利名称(译)	用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡与制备方法		
公开(公告)号	CN108398565A	公开(公告)日	2018-08-14
申请号	CN201810417752.6	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 G01N2333/4737		
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犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡与制备方法；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬C-反应蛋白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CRP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鸡IgY的质控C线，以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。

