



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110488006 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201910917872.7

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 天津华科泰生物技术有限公司
地址 300000 天津市北辰区天津北辰经济
技术开发区医药园京福公路东侧优谷
新科技园

(72)发明人 林斯 石岗 胡文翔

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限
公司 11228

代理人 李岩

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

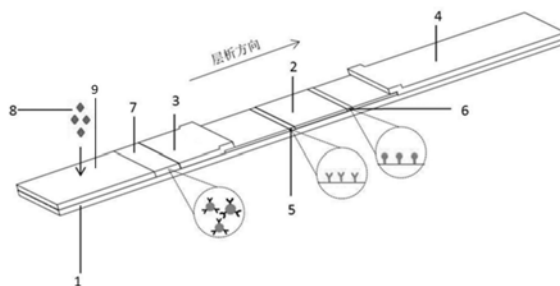
权利要求书2页 说明书15页 附图4页

(54)发明名称

一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,包括试纸条,所述试纸条包括检测线及质控线,所述检测线上包被有一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体,所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体。本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其可用于血清、血浆和全血的检测,以用于肝纤维、肝硬化及其进展程度的诊断。



1. 一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,包括试纸条,所述试纸条包括检测线及质控线,其特征在于,所述检测线上包被有一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体,所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其特征在于,所述试纸条还包括PVC板,所述PVC板上固定有依次连接的样品垫、标记物垫、包被垫及吸水垫,所述包被垫上依次设有检测线及质控线,所述样品垫和标记物垫连接为一体。

3. 如权利要求2所述的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其特征在于,所述包被垫靠近检测线的一端连接有标记物垫,靠近质控线的一端连接有吸水垫。

4. 如权利要求3所述的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其特征在于,所述标记物垫上包被有另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球,所述另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球的摩尔比为1:0.2~4。

5. 如权利要求4所述的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其特征在于,所述快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡还包括用于卡设试纸条的卡壳。

6. 如权利要求5所述的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其特征在于,所述卡壳包括:

底槽,其连接于所述PVC板;

上盖,其连接于所述底槽,所述上盖上设置有用于向所述样品垫上加样的加样孔;

观察窗,其设置于上盖上并用于检测线和质控线的数据采集。

7. 一种权利要求1-6任一项所述的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 包被垫的制备:将一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体分别包被到硝酸纤维素膜上,干燥备用;

2) 标记物垫的制备:将另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球混合后,喷涂在玻璃纤维素膜上,干燥备用;

3) 组装试纸条:在PVC板上粘接包被垫,并在靠近该包被垫上的质控线的一端搭接吸水垫,在靠近该包被垫上的检测线的一端搭接标记物垫及其连接的样品垫;然后将其切成所需宽度的试纸条,之后将该试剂条放入卡壳。

8. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述表面活化的荧光乳胶微球通过以下步骤制得:

1) 取表面活性剂加入0.1~0.5mol/L, pH值为8~10的硼酸-硼砂缓冲溶液中,再加入二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌反应;所述硼酸-硼砂缓冲溶液包含0.5wt%~3wt%的PEG2000;

2) 取表面带有羧基的荧光乳胶微球的分散液,以硼酸-硼砂缓冲溶液调pH至8~10后,加入到步骤1)所得的产物中,在25℃下搅拌反应1~5h,反应完毕后,离心去除上清液,得到表面活化的荧光乳胶微球,用硼酸-硼砂缓冲溶液复溶备用;所述硼酸-硼砂缓冲溶液包含0.5wt%~3wt%的PEG2000。

9. 如权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述表面活性剂包含有N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、聚乙二醇单月硅酸酯、十二烷基苯磺酸盐和月桂酰谷氨酸盐,四者的

重量比为(0.5~6):(4~9):(0.8~3):(5~14);所述表面活性剂与所述氨基表面的荧光乳胶微球的重量比为(0.5~120):1。

10.如权利要求8或9所述的制备方法,其特征在于,所述另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球通过以下步骤制得:

取表面活化的荧光乳胶微球加入碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺中室温搅拌2~6h,然后加入另一株鼠抗人壳多糖酶3样蛋白1单克隆抗体,室温下搅拌1~4h,再加入10~50mg BSA封闭液,继续搅拌1~4h;在2~8℃下,离心,除去上清液;最后,用0.01M~0.5M,pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液将固体沉淀物复溶,再加入Proclin300在4℃下保存待用;

其中,所述表面活化的荧光乳胶微球与另一株羊抗CHI3L1单克隆抗体的质量比例为1:0.01~4。

一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断领域,涉及一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 壳酶蛋白,全称:壳多糖酶3样蛋白1(Chitinase 3-like protein 1,CHI3L1)是一种含383个氨基酸,它又被常被称为YKL-40,取其N端三个氨基酸(Tyr酪-Lys赖-Leu亮,YKL)及其分子量(40Kda)而得。为糖基水解酶家族成员之一。它可以结合壳多糖,但没有壳多糖酶的活性。

[0003] 近年来,大量的研究表明:YKL-40是一种功能强大的纤维化标志物,具有较高的诊断准确性,尤其是在hcv相关肝病中。它的测定可证实和提高诊断准确性,尤其是在肝纤维化的早期阶段;并且YKL-40血清标志物可预测晚期纤维化和肝硬化。随着肝纤维化程度的加重而增加。CHI3L1的优势在于,它似乎与NAFLD患者的任何脂肪变性、炎症和肿胀评分无关。CHI3L1在鉴别中国hbv相关肝纤维化患者的晚期肝纤维化方面优于透明质酸(HA)、III型前胶原蛋白(PCIII)、层粘连蛋白(LN)和IV型胶原蛋白(CIV),它们也是肝纤维化的血清生物标志物。

[0004] 几丁质酶3like 1(CHI3L1)被认为是乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和患者纤维化的生物标志物。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的主要目的在于提供一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡及其制备方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0007] 一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,包括试纸条,所述试纸条包括检测线及质控线,所述检测线上包被有一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体,所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体。

[0008] 在本发明的一个具体方案中,其中所述试纸条还包括PVC板,所述PVC板上固定有依次连接的样品垫、标记物垫、包被垫及吸水垫,所述包被垫上依次设有检测线及质控线,所述样品垫和标记物垫连接为一体。

[0009] 在本发明的一个具体方案中,其中所述包被垫靠近检测线的一端连接有标记物垫,靠近质控线的一端连接有吸水垫。

[0010] 在本发明的一个具体方案中,其中所述标记物垫上包被有另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球,所述另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球的摩尔比为1:0.2~4。

[0011] 在本发明的一个具体方案中,其中所述快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡还包括用于卡设试纸条的卡壳。

[0012] 在本发明的一个具体方案中,其中所述卡壳包括:

[0013] 底槽,其连接于所述PVC板;

[0014] 上盖,其连接于所述底槽,所述上盖上设置有用于向所述样品垫上加样的加样孔;

[0015] 观察窗,其设置于上盖上并用于检测线和质控线的数据采集。

[0016] 一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 包被垫的制备:将一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体分别包被到硝酸纤维素膜上,干燥备用;

[0018] 2) 标记物垫的制备:将另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球混合后,喷涂在玻璃纤维素膜上,干燥备用;

[0019] 3) 组装试纸条:在PVC板上粘接包被垫,并在靠近该包被垫上的质控线的一端搭接吸水垫,在靠近该包被垫上的检测线的一端搭接标记物垫及其连接的样品垫;然后将其切成所需宽度的试纸条,之后将该试剂条放入卡壳。

[0020] 在本发明的一个具体方案中,其中所述表面活化的荧光乳胶微球通过以下步骤制得:

[0021] 1) 取表面活性剂加入0.1~0.5mol/L, pH值为8~10的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)中,再加入二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌反应;

[0022] 2) 取表面带有羧基的荧光乳胶微球的分散液,以硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)调pH值至8~10后,加入到步骤1)所得的产物中,在25℃下搅拌反应1~5h,反应完毕后,离心去除上清液,得到表面活化的荧光乳胶微球,用硼酸-硼砂缓冲溶液复溶备用。

[0023] 在本发明的一个具体方案中,其中所述表面活性剂包含有N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、聚乙二醇单月硅酸酯、十二烷基苯磺酸盐和月桂酰谷氨酸盐,四者的重量比为(0.5~6):(4~9):(0.8~3):(5~14);所述表面活性剂与所述氨基表面的荧光乳胶微球的重量比为(0.5~120):1。

[0024] 在本发明的一个具体方案中,其中所述另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球通过以下步骤制得:

[0025] 取表面活化的荧光乳胶微球加入碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)中室温搅拌2~6h,然后加入另一株鼠抗人壳多糖酶3样蛋白1单克隆抗体,室温下搅拌1~4h,再加入10~50mg BSA封闭液,继续搅拌1~4h;在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液;最后,用0.01M~0.5M的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶,再加入Proclin300在4℃下保存待用。

[0026] 在本发明的一个具体方案中,其中所述表面活化的荧光乳胶微球与另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体的质量比例为1:(0.01~4)。

[0027] 本发明的有益效果:

[0028] 1、本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其可用于血

清、血浆和全血的检测,以用于肝纤维、肝硬化及其进展程度的诊断,早期诊断肝纤维化并及时进行有效治疗,有助于预防肝纤维化向肝硬化、肝癌等转化的发生;

[0029] 2、本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其能够通过血清、血浆和全血检测壳多糖酶3样蛋白1,避免了肝组织活检带来的侵袭性以及并发症的风险,易于被患者接受,检测在5~20min之内即可完成,线性检测范围为5pg/mL-200ng/mL,极大地提高了检测效率。

[0030] 3、本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其灵敏度高、稳定性强、线性范围宽,具有优异的准确性和精密度。

[0031] 4、本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡,其通过采用表面活化的荧光乳胶微球,克服了市面上荧光染料灵敏度差和湿式荧光微球稳定性差的缺陷,能够保证颗粒间的相对距离不易团聚,无需缓冲液,加入待测样本后能即刻复溶并顺利层析。

附图说明

[0032] 图1为本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析试纸条示意图;

[0033] 图2A为本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡中一种上盖的内部结构示意图;

[0034] 图2B为本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡中一种底槽的内部结构示意图;

[0035] 图3为本发明实施例1中壳多糖酶3样蛋白1 (CHI3L1) 的校准曲线;

[0036] 图4为本发明实施例2中壳多糖酶3样蛋白1 (CHI3L1) 的校准曲线;

[0037] 图5为本发明实施例3中壳多糖酶3样蛋白1 (CHI3L1) 的校准曲线;

[0038] 图6为本发明实施例4中壳多糖酶3样蛋白1 (CHI3L1) 的校准曲线;

[0039] 其中,1-PVC板,2-包被垫,3-标记物垫,4-吸水垫,5-检测线,6-质控线,7-标记物结合处,8-样本,9-样品垫,11-上盖,12-底槽,13-加样孔,14-观察窗,15-试纸条放置区域,16-定位柱,17-定位孔,18-第一限定部,19-第二限定部,20-第三限定部。

具体实施方式

[0040] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0041] 以下材料或试剂,除非特别说明,均为市售。

[0042] 实施例1:

[0043] 1. CHI3L1免疫层析检测卡的制备

[0044] 1) 表面活化的荧光乳胶微球的制备:

[0045] N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、聚乙二醇单月硅酸酯、十二烷基苯磺酸盐和月桂酰谷氨酸盐,三者的重量比为0.5:4:0.8:5。

[0046] ①取表面活性剂(包含0.5mg的N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、4mg的聚乙二醇单月硅酸酯、0.8mg的十二烷基苯磺酸盐和5mg的月桂酰谷氨酸盐)加入0.2mol/L, pH=

8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)中,再加入1mL二甲基甲酰胺、1mg的N,N'-二环己基碳二亚胺和0.5mgN-羟基琥珀酰亚胺,在120r/min的搅拌速度下进行反应;

[0047] ②取1mL含1wt%的表面带有羧基的荧光乳胶微球分散液(购自上海甄准生物技术有限公司),用10mL,0.2mol/L,pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)稀释分散均匀后,加入到步骤①所得的产物中,在25℃,120r/min的搅拌速度下搅拌反应3h,反应完毕后,按照12000r/min的转速离心30min去除上清液,得到表面活化的荧光乳胶微球,用0.2mol/L,pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液复溶至1mL备用。

[0048] 2) 另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0049] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照12000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0050] 3) 兔IgG多克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0051] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL mg羊兔IgG多克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照12000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0052] 4) 包被垫的制备

[0053] 将一株CHI3L1单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体分别用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)稀释成1mg/mL,用划膜喷金仪在硝酸纤维素膜(NC膜)上进行划膜。含有一株CHI3L1单克隆抗体的作为检测线(T线)5,含有羊抗兔多克隆抗体的作为质控线(C线)6,然后在37℃,湿度<30%的环境下干燥4h制成包被垫2。

[0054] 5) 标记物垫的制备

[0055] ①将玻璃纤维素膜在0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中浸泡2h,然后在35℃下干燥8h,备用。

[0056] ②将摩尔比为1:1的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球混合均匀后,按照10μL/cm的速度喷涂在玻璃纤维素膜上,然后放置在45℃下干燥2h制成标记物垫3。标记物垫上包被有另一株鼠抗人CHI3L1抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球的地方叫做标记物结合处7。

[0057] 设置标记物结合处7的目的在于:将待测血液样本8滴加到样品垫9上,在吸水垫4的作用下,血液样本向前层析,在标记物结合处7的血液样本中的CHI3L1与标记物结合处包被的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球反应,反应后的物质、未参加反应的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的荧光乳胶微球、兔IgG标记的荧光乳胶微球随着血液样本继续层析,在检测线处参加反应的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球与检测线包被的一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体反应而停

留在检测线,在质控线处兔IgG标记的荧光乳胶微球与质控线包被的羊抗兔多克隆抗体反应而停留在质控线,其他物质继续层析,最后通过荧光免疫层析仪分别采集检测线的荧光微球的信号(记作T)和质控线的荧光微球的信号(记作C),计算T/C值,从CHI3L1的标准曲线中读取血液样本中CHI3L1的浓度。

[0058] 6) 免疫层析检测卡的组装

[0059] 首先在PVC板1上粘接包被垫2,然后在靠近包被垫2上的质控线6的一端搭接吸水垫4,在靠近包被垫2的检测线5的一端搭接标记物垫3及其连接的样品垫9,用切条机切成 $4\text{mm}\pm 0.1\text{mm}$ 的试纸条(见图1),将试纸条放入卡壳中制备成壳多糖酶3样蛋白1免疫层析检测卡。

[0060] 所述卡壳选自现有技术,例如,所述卡壳(如图2A、图2B所示)可以包括:底槽12,其连接于所述PVC板1;上盖11,其连接于所述底槽12,所述上盖11上设置有用于向所述样品垫9上加样的加样孔13;观察窗14,其设置于上盖11上,用于检测线5和质控线6的数据采集。

[0061] 如图2B所示,所述底槽12包括:位于其内表面的对称分布的多个定位孔17,多个所述定位孔17之间设有多个用于限定试纸条横向移动的第一限定部18以及用于限定试纸条纵向移动的第二限定部19;对称设置的所述第一限定部18与所述第二限定部19围设成纸条放置区域15(虚线区域),用于放置试纸条;

[0062] 如图2A所示,所述上盖11包括:与多个所述定位孔17相配合的多个定位柱16,这样配合使用以将上盖11和底槽12固定在一起;所述上盖11还包括用于限定试纸条的上下移动的第三限定部20。

[0063] 所述包被垫2的上方设有用于数据采集的观察窗14,以露出全部所述检测线5和质控线6,用于收集其检测结果;且所述观察窗14开设于所述上盖11上与试纸条放置区域15的中部相对应的位置。所述上盖11在与所述样品垫9相对应的位置处开设有加样孔,以用于样品垫9上滴加样本8。所述检测线距离加样孔15-25mm。

[0064] 2. 检测

[0065] 取60 μL 的待测样本滴加到步骤1制备的CHI3L1免疫层析检测卡的加样孔13(对应试纸条的样品垫9)中待测样本,室温静置15min,然后将CHI3L1免疫层析检测卡插入到荧光免疫分析仪进行检测,即时可获得检测结果。

[0066] 3. 试纸条的评价

[0067] 1) 配置不同浓度的CHI3L1校准品(0、5、15、50、100、200ng/mL),用本实施例1步骤1中制备的CHI3L1荧光免疫层析检测卡按照步骤2的检测过程依次进行测定,空白检测线不高于5ng/mL,检测范围为5~200ng/mL。检测结果如表1所示,以样本浓度为横坐标,检测线与质控线的比值(T/C)为纵坐标,用logistic(四参数)进行曲线拟合,拟合度 R^2 分别为0.9995, $n=6$,制备的CHI3L1校准曲线如图3所示,T/C值与校准品在浓度为5-200ng/mL的范围内具有良好的相关性。

[0068] 表1检测数据

[0069]

标准浓度ng/mL	0	5	15	50	100	200
T/C值	0.001	0.024	0.084	0.313	0.656	1.020

[0070] 2) 定量限

[0071] 定量限(limit of quantitation,LoQ),参照CLSI发布的EP17-A文件。

[0072] 依据临床要求和室间质量评价的允许误差,设定本试剂CHI3L1的总误差目标为30%。在不考虑分析偏差的情况下,允许总误差(TEa)=2CV,即 $CV=1/2TEa$ 。CHI3L1浓度在5.00ng/mL时检测的CV为4.37%,小于15%,符合质量目标要求,因此LoQ=5ng/mL,表明CHI3L1荧光微球免疫层析检测卡的具有较高的灵敏度。

[0073] 3) 精密度

[0074] 抽取三个批次的CHI3L1免疫层析检测卡,分别检测浓度为15、50、100ng/mL的样本进行检测,每个浓度点平行测定10次,计算三个批号检测试纸条的批内变异系数和批间变异系数,从表2中可以看出批间和批内变异系数均小于3.34%,说明CHI3L1荧光免疫层析检测卡的精密度较高。

[0075] 表2检测数据

批次	样本浓度 (pg/mL)	平均值	标准差	变异系数%
[0076] 1	15	15.09	1.24	3.09%
	50	50.89	1.63	1.63%
	100	100.89	3.53	1.77%
2	15	15.94	1.19	2.98%
	50	50.99	1.76	1.76%
[0077] 3	100	100.33	4.26	2.15%
	15	15.01	1.24	3.10%
	50	50.82	1.44	1.44%
	100	100.86	2.96	1.48%
	15	15.12	1.34	3.34%
三批批次	50	50.23	1.61	1.59%
	100	100.89	3.64	1.82%

[0078] 4) 回收率

[0079] 取三批次浓度为200ng/mL的CHI3L1校准品,分别加入到浓度接近于0的阴性样本中,其中所加入的CHI3L1校准品与阴性样本的体积比为1:9,重复测定3次,计算回收率。三批样本校准品回收率的结果分别为98.46%、108.91%、92.37%,回收率均在90%-110%之间,说明测定结果符合标准。

[0080] 5) 比对实验

[0081] 收集20位临床样本,采用本实施例制备的CHI3L1免疫层析检测卡与杭州普望生物技术有限公司的CHI3L1检测试剂盒(酶联免疫法)进行比对实验。

[0082] 表3检测数据

[0083]

试剂盒	本发明制备的 CHI3L1 荧光免疫层析检测卡 (ng/mL)			杭州普望生物 技术有限公司 (ng/mL)
	检测 1	检测 2	检测 3	
样本 1	70.36	70.97	69.65	70.35
样本 2	82.66	82.12	83.35	83.75
样本 3	98.69	97.39	98.39	97.61
样本 4	120.33	122.49	119.47	124.59
样本 5	56.66	56.98	54.96	55.36
样本 6	46.33	46.03	44.16	43.62
样本 7	23.23	23.93	23.01	23.29
样本 8	19.63	18.67	19.65	16.35
样本 9	27.86	26.78	25.14	24.63
样本 10	37.64	36.98	35.96	34.85
样本 11	56.94	54.23	54.71	55.69
样本 12	49.28	50.23	48.47	47.16
样本 13	37.76	36.78	38.95	40.13
样本 14	37.93	38.96	36.21	34.56
样本 15	34.21	36.97	34.59	33.16
样本 16	34.38	30.26	30.24	29.65
样本 17	31.43	30.46	28.95	27.46
样本 18	31.46	26.49	27.83	29.35
样本 19	69.34	70.46	73.41	74.86
样本 20	62.46	58.63	60.28	61.49

[0084] 从表3的检测结果中可以看出,本发明实施例1的制备CHI3L1免疫层析检测卡重复检测三次,检测1分别与检测2、检测3的结果进行相关性分析,回归方程分别为: $y = 1.0177x - 1.5469, R^2 = 0.9943$; $y = 1.0198x - 2.0808, R^2 = 0.9954$;表明实施例1制备的CHI3L1免疫层析检测卡的稳定性良好。将实施例1制备的Tau蛋白免疫层析检测卡与杭州普望生物的CHI3L1检测试剂盒(酶联免疫法)的结果进行相关性分析,回归方程为: $y = 1.0623x - 4.2389, R^2 = 0.9941, n = 20$,表明本发明实施例1制备的CHI3L1免疫层析检测卡与杭州普望生物的CHI3L1检测试剂盒(酶联免疫法)的检测结果显著相关。因此本发明实施例1的CHI3L1荧光免疫层析检测卡可以满足辅助临床诊断的需求。

[0085] 实施例2

[0086] 1. CHI3L1免疫层析检测卡的制备

[0087] 1) 表面活化的荧光乳胶微球的制备:

[0088] N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、聚乙二醇单月硅酸酯、十二烷基苯磺酸盐和月桂酰谷氨酸盐,三者的重量比为3:5:2:6。

[0089] ①取表面活性剂(包含3mg的N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、5mg的聚乙二醇单月硅酸酯、2mg的十二烷基苯磺酸盐和6mg的月桂酰谷氨酸盐)加入0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)中,再加入1mL二甲基甲酰胺、1mg的N,N'-二环己基碳二亚胺和0.5mgN-羟基琥珀酰亚胺,在120r/min的搅拌速度下进行反应;

[0090] ②取1mL含1wt%的表面带有羧基的荧光乳胶微球的分散液(购自上海甄准生物技术有限公司),用10mL,0.2mol/L,pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)稀释分散均匀后,加入到步骤①所得的产物中,在25℃,120r/min的搅拌速度下反应3h,反应完毕后,按照12000r/min的转速离心30min去除上清液,得到表面活化的荧光乳胶微球,用0.2mol/L,pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液复溶至1mL备用。

[0091] 2) 另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0092] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0093] 3) 兔IgG多克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0094] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL mg羊兔IgG多克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0095] 4) 包被垫的制备

[0096] 将一株CHI3L1单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体分别用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)稀释成1mg/mL,用划膜喷金仪在硝酸纤维素膜(NC膜)2上进行划膜。含有一株CHI3L1单克隆抗体的作为检测线(T线)5,含有羊抗兔多克隆抗体的作为质控线(C线)6,然后在37℃,湿度<30%的环境下干燥4h制成包被垫2。

[0097] 5) 标记物垫的制备

[0098] ①将玻璃纤维素膜在0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中浸泡2h,然后在35℃下干燥8h,备用。

[0099] ②将摩尔比为1:1的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球混合均匀后,按照10μL/cm的速度喷涂在玻璃纤维素膜上,然后放置在45℃下干燥2h制成标记物垫3。标记物垫上包被有另一株鼠抗人CHI3L1抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球的地方叫做标记物结合处7。设置标记物结合处7的目的同实施例1。

[0100] 6) 免疫层析检测卡的组装

[0101] 首先在PVC板1上粘接包被垫2,然后在靠近包被垫2上的质控线6的一端搭接吸水垫4,在靠近包被垫2的检测线5的一端搭接标记物垫3及其连接的样品垫9,用切条机切成4mm±0.1mm的试纸条(见图1),将试纸条放入卡壳中制备成壳多糖酶3样蛋白1免疫层析检测卡。所述卡壳的结构同实施例1。

[0102] 2. 检测

[0103] 取60μL的待测样本滴加到步骤1制备的CHI3L1免疫层析检测卡的加样孔13(对应试纸条的样品垫9)中,室温静置15min进行免疫层析反应,然后将CHI3L1免疫层析检测卡插入到荧光免疫分析仪进行检测,即时可获得检测结果。

[0104] 3. 试纸条的评价

[0105] 1) 配置不同浓度的CHI3L1校准品 (0、5、15、50、100、200ng/mL), 用本实施例2步骤1中制备的CHI3L1荧光免疫层析检测卡按照步骤2的检测过程依次进行测定, 空白检测线不高于5ng/mL, 检测范围为5~200ng/mL。检测结果如表4所示, 以样本浓度为横坐标, 检测线与质控线的比值 (T/C) 为纵坐标, 用logistic (四参数) 进行曲线拟合, 拟合度 R^2 分别为0.9998, $n=6$, 制备的CHI3L1校准曲线如图4所示, T/C值与校准品在浓度为5-200ng/mL的范围内具有良好的相关性。

[0106] 表4检测数据

[0107]

标准浓度ng/mL	0	5	15	50	100	200
T/C值	0.001	0.012	0.0833	0.302	0.596	0.966

[0108] 2) 定量限

[0109] 定量限 (limit of quantitation, LoQ), 参照CLSI发布的EP17-A文件。

[0110] 依据临床要求和室间质量评价的允许误差, 设定本试剂CHI3L1的总误差目标为30%。在不考虑分析偏差的情况下, 允许总误差 (TEa) = 2CV, 即 $CV=1/2TEa$ 。CHI3L1浓度在5.00ng/mL时检测的CV为8.37%, 小于15%, 符合质量目标要求, 因此 $LoQ=5.00ng/mL$, 表明CHI3L1荧光微球免疫层析检测卡的具有较高的灵敏度。

[0111] 3) 精密度

[0112] 抽取三个批次的CHI3L1免疫层析检测卡, 分别检测浓度为15、50、100ng/mL的样本进行检测, 每个浓度点平行测定10次, 计算三个批号检测试纸条的批内变异系数和批间变异系数, 从表5中可以看出批间和批内变异系数均小于8.12%, 说明CHI3L1荧光免疫层析检测卡的精密度较高。

[0113] 表5检测数据

批次	样本浓度 (pg/mL)	平均值	标准差	变异系数%
1	15	15.09	2.24	5.45%
	50	49.89	1.63	2.66%
	100	100.89	3.53	1.76%
2	15	15.94	2.19	5.35%
	50	49.14	2.76	1.86%
	100	100.33	4.26	2.64%
3	15	15.21	2.24	7.90%
	50	50.82	2.44	3.44%
	100	100.86	2.96	1.48%
三批批次	15	15.12	2.34	8.12%
	50	51.23	2.61	3.57%
	100	99.89	3.64	1.82%

[0115] 4) 回收率

[0116] 取三批次浓度为200ng/mL的CHI3L1校准品, 分别加入到浓度接近于0的阴性样本

中,其中所加入的CHI3L1校准品与阴性样本的体积比为1:9,重复测定3次,计算回收率。三批样本校准品回收率的结果分别为99.46%、108.91%、92.37%,回收率均在90%-110%之间,说明测定结果符合标准。

[0117] 从检测结果中可以看出,本发明实施例2的CHI3L1荧光免疫层析检测卡具有良好灵敏度、精密度、和稳定性,因此本发明实施例2的CHI3L1荧光免疫层析检测卡可以满足辅助临床诊断的需求。

[0118] 实施例3

[0119] 1. CHI3L1免疫层析检测卡的制备

[0120] 1) 表面活化的荧光乳胶微球的制备:

[0121] N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、聚乙二醇单月硅酸酯、十二烷基苯磺酸盐和月桂酰谷氨酸盐,三者的重量比为4:7:2.5:13。

[0122] ①取表面活性剂(包含4mg的N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、7mg的聚乙二醇单月硅酸酯、2.5mg的十二烷基苯磺酸盐和13mg的月桂酰谷氨酸盐)加入0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)中,再加入1mL二甲基甲酰胺、1mg的N,N'-二环己基碳二亚胺和0.5mgN-羟基琥珀酰亚胺,在120r/min的搅拌速度下进行反应;

[0123] ②取1mL含1wt%的表面带有羧基的荧光乳胶微球分散液(购自上海甄准生物技术有限公司),用10mL,0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)稀释分散均匀后,加入到步骤①所得的产物中,在25℃,120r/min的搅拌速度下反应3h,反应完毕后,按照12000r/min的转速离心30min去除上清液,得到表面活化的荧光乳胶微球,用0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液复溶至1mL备用。

[0124] 2) 另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0125] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0126] 3) 兔IgG多克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0127] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL mg羊兔IgG多克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0128] 4) 包被垫的制备

[0129] 将一株CHI3L1单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体分别用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)稀释成1mg/mL,用划膜喷金仪在硝酸纤维素膜(NC膜)2上进行划膜。含有一株CHI3L1单克隆抗体的作为检测线(T线)5,含有羊抗兔多克隆抗体的作为质控线(C线)6,然后在37℃,湿度<30%的环境下干燥4h制成包被垫2。

[0130] 5) 标记物垫的制备

[0131] ①将玻璃纤维素膜在0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中浸泡2h,然后在35℃下干燥8h,备用。

[0132] ②将摩尔比为1:1的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球混合均匀后,按照10 μ L/cm的速度喷涂在玻璃纤维素膜上,然后放置在45℃下干燥2h制成标记物垫3。标记物垫上包被有另一株鼠抗人CHI3L1抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球的地方叫做标记物结合处7。设置标记物结合处7的目的同实施例1。

[0133] 6) 免疫层析检测卡的组装

[0134] 首先在PVC板1上粘接包被垫2,然后在靠近包被垫2上的质控线6的一端搭接吸水垫4,在靠近包被垫2的检测线5的一端搭接标记物垫3及其连接的样品垫9,用切条机切成4mm \pm 0.1mm的试纸条(见图1),将试纸条放入卡壳中制备成壳多糖酶3样蛋白1免疫层析检测卡。所述卡壳的结构同实施例1。

[0135] 2. 检测

[0136] 取60 μ L的待测样本滴加到步骤1制备的CHI3L1免疫层析检测卡的加样孔13(对应试纸条的样品垫9)中待测样本,室温静置15min,然后将CHI3L1免疫层析检测卡插入到荧光免疫分析仪进行检测,即时可获得检测结果。

[0137] 3. 试纸条的评价

[0138] 1) 配置不同浓度的CHI3L1校准品(0、5、15、50、100、200ng/mL),用本实施例3步骤1中制备的CHI3L1荧光免疫层析检测卡按照步骤2的检测过程依次进行测定,空白检测线不高于5ng/mL,检测范围为5~200ng/mL。检测结果如表6所示,以样本浓度为横坐标,检测线与质控线的比值(T/C)为纵坐标,用logistic(四参数)进行曲线拟合,拟合度R²分别为0.9996,n=6,制备的CHI3L1校准曲线如图5所示,T/C值与校准品在浓度为5-200ng/mL的范围内具有良好的相关性。

[0139] 表6检测数据

[0140]

标准浓度ng/mL	0	5	15	50	100	200
T/C值	0.001	0.011	0.079	0.303	0.623	1.2156

[0141] 2) 定量限

[0142] 定量限(limit of quantitation,LoQ),参照CLSI发布的EP17-A文件。

[0143] 依据临床要求和室间质量评价的允许误差,设定本试剂CHI3L1的总误差目标为30%。在不考虑分析偏差的情况下,允许总误差(TEa)=2CV,即CV=1/2TEa。CHI3L1浓度在5.00ng/mL时检测的CV为5.37%,小于15%,符合质量目标要求,因此LoQ=5.00ng/mL,表明CHI3L1荧光微球免疫层析检测卡的具有较高的灵敏度。

[0144] 3) 精密度

[0145] 抽取三个批次的CHI3L1免疫层析检测卡,分别检测浓度为15、50、100ng/mL的样本进行检测,每个浓度点平行测定10次,计算三个批号检测试纸条的批内变异系数和批间变异系数,从表7中可以看出批间和批内变异系数均小于5.69%,说明CHI3L1荧光免疫层析检测卡的精密度较高。

[0146] 表7检测数据

批次	样本浓度 (pg/mL)	平均值	标准差	变异系数%
1	15	15.09	2.24	5.45%
	50	49.18	2.63	1.63%
	100	100.89	3.53	1.76%
2	15	15.94	2.19	5.35%
	50	50.90	1.86	2.79%
	100	99.36	5.26	2.14%
3	15	15.01	3.24	5.46%
	50	49.38	3.44	2.47%
	100	101.23	2.96	1.47%
三批批次	15	15.12	3.34	5.69%
	50	50.34	3.61	2.58%
[0148]	100	99.76	3.64	1.82%

[0149] 4) 回收率

[0150] 取三批次浓度为200ng/mL的CHI3L1校准品,分别加入到浓度接近于0的阴性样本中,其中所加入的CHI3L1校准品与阴性样本的体积比为1:9,重复测定3次,计算回收率。三批样本校准品回收率的结果分别为99.46%、107.91%、94.37%,回收率均在90%-110%之间,说明测定结果符合标准。

[0151] 从检测结果中可以看出,本发明实施例3的CHI3L1荧光免疫层析检测卡具有良好灵敏度、精密度、和稳定性,因此本发明实施例3的CHI3L1荧光免疫层析检测卡可以满足辅助临床诊断的需求。

[0152] 实施例4

[0153] 1. CHI3L1免疫层析检测卡的制备

[0154] 1) 表面活化的荧光乳胶微球的制备:

[0155] N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、聚乙二醇单月硅酸酯、十二烷基苯磺酸盐和月桂酰谷氨酸盐,三者的重量比为6:9:3:14。

[0156] ①取表面活性剂(包含6mg的N,N'-双月桂酰基乙二胺二丙烯酸钠、9mg的聚乙二醇单月硅酸酯、3mg的十二烷基苯磺酸盐和14mg的月桂酰谷氨酸盐)加入0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)中,再加入1mL二甲基甲酰胺、1mg的N,N'-二环己基碳二亚胺和0.5mgN-羟基琥珀酰亚胺,在120r/min的搅拌速度下进行反应;

[0157] ②取1mL含1wt%的表面带有羧基的荧光乳胶微球的分散液(购自上海甄准生物技术有限公司),用10mL,0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液(包含0.5wt%~3wt%的PEG2000)稀释分散均匀后,加入到步骤①所得的产物中,在25℃下搅拌反应3h,反应完毕后,按照12000r/min的转速离心30min去除上清液,得到表面活化的荧光乳胶微球,用0.2mol/L, pH=8.4的硼酸-硼砂缓冲溶液复溶至1mL备用。

[0158] 2) 另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0159] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL另一株鼠抗人

CHI3L1单克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0160] 3) 兔IgG多克隆抗体标记表面活化的荧光乳胶微球

[0161] 取0.5mL步骤1)中制备的表面活化的荧光乳胶微球加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),于室温,120r/min的转速下搅拌3h,然后加入100μL mg羊兔IgG多克隆抗体,于室温,120r/min的转速下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将固体沉淀物复溶至1mL,再加入1μL的Proclin300在4℃下保存待用。

[0162] 4) 包被垫的制备

[0163] 将一株CHI3L1单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体分别用0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)稀释成1mg/mL,用划膜喷金仪在硝酸纤维素膜(NC膜)上进行划膜。含有一株CHI3L1单克隆抗体的作为检测线(T线)5,含有羊抗兔多克隆抗体的作为质控线(C线)6,然后在37℃,湿度<30%的环境下干燥4h制成包被垫2。

[0164] 5) 标记物垫的制备

[0165] ①将玻璃纤维素膜在0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中浸泡2h,然后在35℃下干燥8h,备用。

[0166] ②将摩尔比为1:1的另一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球混合均匀后,按照10μL/cm的速度喷涂在玻璃纤维素膜上,然后放置在45℃下干燥2h制成标记物垫3。标记物垫上包被有另一株鼠抗人CHI3L1抗体标记的表面活化的荧光乳胶微球和兔IgG标记的表面活化的荧光乳胶微球的地方叫做标记物结合处7。设置标记物结合处7的目的同实施例1。

[0167] 6) 免疫层析检测卡的组装

[0168] 首先在PVC板1上粘接包被垫2,然后在靠近包被垫2上的质控线6的一端搭接吸水垫4,在靠近包被垫2的检测线5的一端搭接标记物垫3及其连接的样品垫9,用切条机切成4mm±0.1mm的试纸条(见图1),将试纸条放入卡壳中制备成壳多糖酶3样蛋白1免疫层析检测卡。所述卡壳的结构同实施例1。

[0169] 2. 检测

[0170] 取60μL的待测样本滴加到步骤1制备的CHI3L1免疫层析检测卡的加样孔(对应试纸条的样品垫9)中,室温静置15min进行免疫层析反应,然后将CHI3L1免疫层析检测卡插入到荧光免疫分析仪进行检测,即时可获得检测结果。

[0171] 3. 试纸条的评价

[0172] 1) 配置不同浓度的CHI3L1校准品(0、5、15、50、100、200ng/mL),用本实施例4步骤1中制备的CHI3L1荧光免疫层析检测卡按照步骤2的检测过程依次进行测定,空白检测线不高于5ng/mL,检测范围为5~200ng/mL。检测结果如表8所示,以样本浓度为横坐标,检测线与质控线的比值(T/C)为纵坐标,用logistic(四参数)进行曲线拟合,拟合度R²分别为0.9998,n=6,制备的CHI3L1校准曲线如图6所示,T/C值与校准品在浓度为5-200ng/mL的范围内具有良好的相关性。

[0173] 表8检测数据

[0174]

标准浓度ng/mL	0	5	15	50	100	200
T/C值	0.001	0.011	0.065	0.303	0.678	0.988

[0175] 2) 定量限

[0176] 定量限(limit of quantitation,LoQ),参照CLSI发布的EP17-A文件。

[0177] 依据临床要求和室间质量评价的允许误差,设定本试剂CHI3L1的总误差目标为30%。在不考虑分析偏差的情况下,允许总误差(TEa)=2CV,即 $CV=1/2TEa$ 。CHI3L1浓度在5ng/mL时检测的CV为13.37%,小于15%,符合质量目标要求,因此LoQ=5.00ng/mL,表明CHI3L1荧光微球免疫层析检测卡的具有较高的灵敏度。

[0178] 3) 精密度

[0179] 抽取三个批次的CHI3L1免疫层析检测卡,分别检测浓度为15、50、100ng/mL的样本进行检测,每个浓度点平行测定10次,计算三个批号检测试纸条的批内变异系数和批间变异系数,从表9中可以看出批间和批内变异系数均小于8.29%,说明CHI3L1荧光免疫层析检测卡的精密度较高。

[0180] 表9检测数据

批次	样本浓度 (pg/mL)	平均值	标准差	变异系数%
1	15	15.09	3.24	8.29%
	50	48.89	3.63	3.67%
	100	99.89	3.53	1.77%
2	15	15.94	2.19	5.35%
	50	50.69	2.76	2.76%
	100	101.34	4.26	2.14%
3	15	15.01	3.24	7.90%
	50	50.82	2.44	2.42%
	100	99.86	2.96	1.49%
三批批次	15	15.12	3.34	8.12%
[0182]	50	50.23	2.61	2.63%
	100	98.89	3.64	1.83%

[0183] 4) 回收率

[0184] 取三批次浓度为200ng/mL的CHI3L1校准品,分别加入到浓度接近于0的阴性样本中,其中所加入的CHI3L1校准品与阴性样本的体积比为1:9,重复测定3次,计算回收率。三批样本校准品回收率的结果分别为96.46%、105.91%、95.37%,回收率均在90%-110%之间,说明测定结果符合标准。

[0185] 从检测结果中可以看出,本发明实施例4的CHI3L1荧光免疫层析检测卡的稳定性良好,因此本发明实施例4的CHI3L1荧光免疫层析检测卡可以满足辅助临床诊断的需求。

[0186] 附:所需溶液配置

[0187] (1) 0.2M磷酸盐缓冲溶液

[0188] NaH₂PO₄·H₂O 5.24g;

[0189] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 28.83g;

[0190] 纯化水定容至1000mL;

[0191] (2) 0.2M硼酸-硼砂缓冲溶液

[0192] 硼砂 19.07g;

[0193] 硼酸 12.37g;

[0194] PEG2000 5~30g;

[0195] 纯化水定容至1000mL。

[0196] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

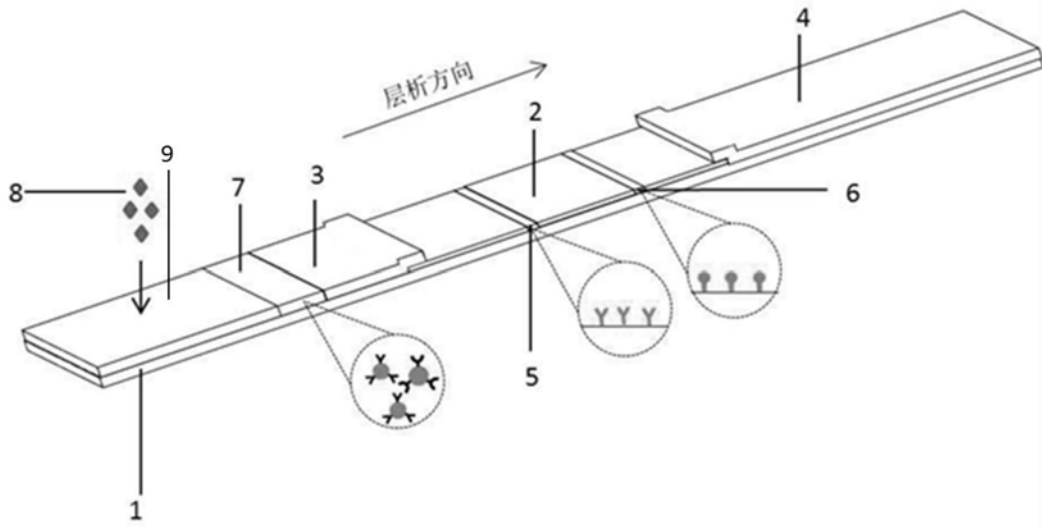


图1

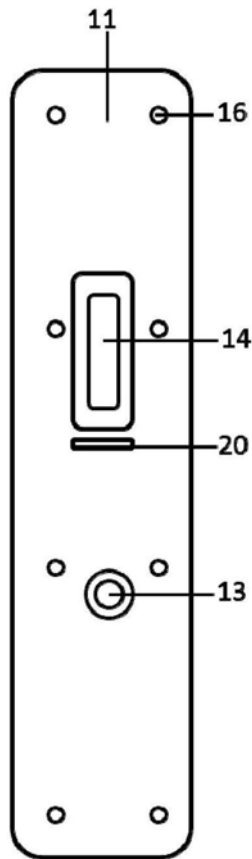


图2A

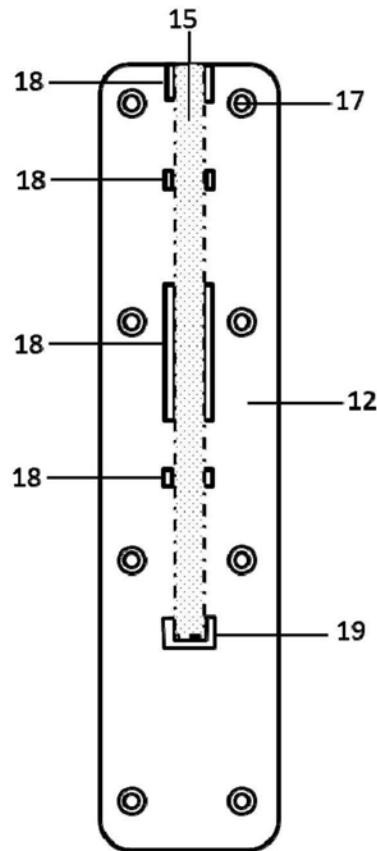


图2B

四参数Logistic曲线拟合

方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$

A = 1.49619
 B = -1.49675
 C = 120.55239
 D = 0.00931
 r² = 0.99956

X	Y-反应值	Y-平均值	CV(%)	Y-计算值	Y-残差
0.0000	0.0010		0.0093	0.0083	
5.0000	0.0240		0.0219	-0.0021	
15.0000	0.0840		0.0722	-0.0118	
50.0000	0.3130		0.3235	0.0105	
100.0000	0.6560		0.6494	-0.0066	
200.0000	1.0200		1.0217	0.0017	

数据个数 6
 残差平方和 0.00037

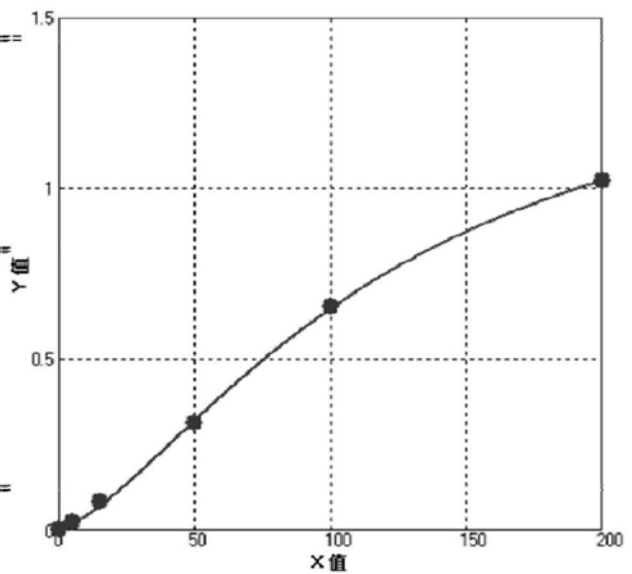


图3

四参数Logistic曲线拟合

方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$

A = 1.72903
 B = -1.27681
 C = 165.99724
 D = -0.00088
 r² = 0.99983

X	Y-反应值	Y-平均值	CV(%)	Y-计算值	Y-残差
0.0000	0.0010			-0.0009	-0.0019
5.0000	0.0120			0.0187	0.0067
15.0000	0.0833			0.0759	-0.0074
50.0000	0.3020			0.3065	0.0045
100.0000	0.5960			0.5936	-0.0024
200.0000	0.9660			0.9665	0.0005

数据个数 6
 残差平方和 0.00013

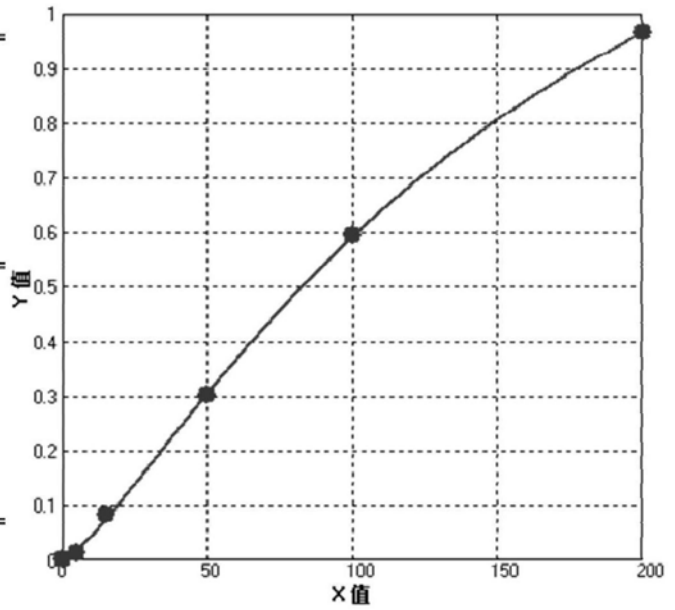


图4

四参数Logistic曲线拟合

方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$

A = 2.01210
 B = -1.54711
 C = 152.91614
 D = 0.01181
 r² = 0.99962

X	Y-反应值	Y-平均值	CV(%)	Y-计算值	Y-残差
0.0000	0.0010			0.0118	0.0108
5.0000	0.0250			0.0218	-0.0032
15.0000	0.0790			0.0654	-0.0136
50.0000	0.3030			0.3132	0.0102
100.0000	0.7000			0.6947	-0.0053
200.0000	1.2156			1.2167	0.0011

数据个数 6
 残差平方和 0.00044

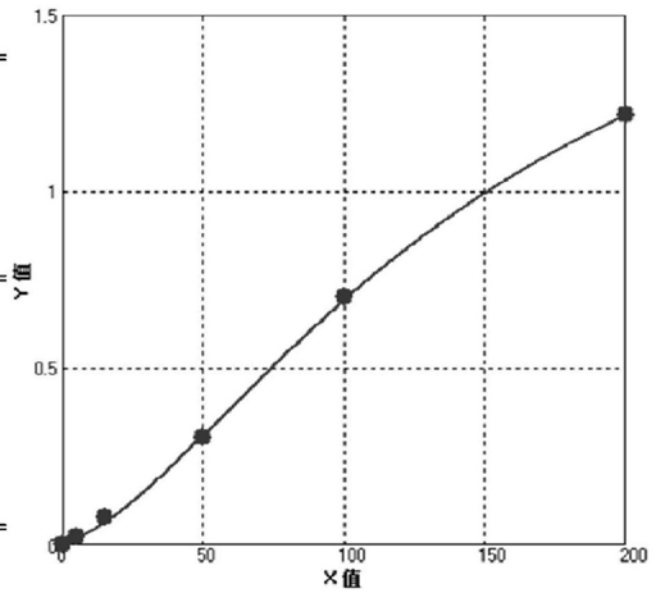


图5

四参数Logistic曲线拟合

方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$

A = 1.20167
 B = -1.88356
 C = 88.66666
 D = 0.00882
 r² = 0.99950

X	Y-反应值	Y-平均值CV(%)	Y-计算值	Y-残差
0.0000	0.0010		0.0088	0.0078
5.0000	0.0110		0.0141	0.0031
15.0000	0.0650		0.0494	-0.0156
50.0000	0.3030		0.3114	0.0084
100.0000	0.6780		0.6725	-0.0055
200.0000	0.9880		0.9897	0.0017

数据个数 6
 残差平方和 0.00042

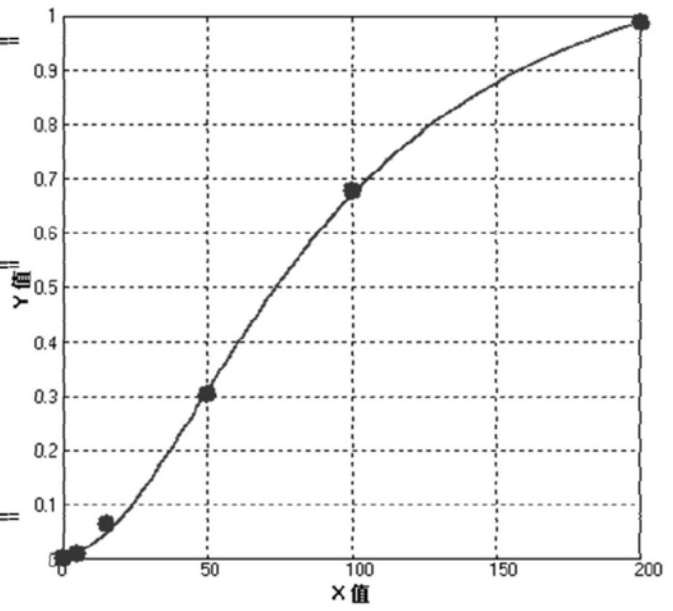


图6

专利名称(译)	一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN110488006A	公开(公告)日	2019-11-22
申请号	CN201910917872.7	申请日	2019-09-26
[标]发明人	林斯 石岗 胡文翔		
发明人	林斯 石岗 胡文翔		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558		
代理人(译)	李岩		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡，包括试纸条，所述试纸条包括检测线及质控线，所述检测线上包被有一株鼠抗人CHI3L1单克隆抗体，所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体。本发明所提供的快速检测壳多糖酶3样蛋白1的免疫层析检测卡，其可用于血清、血浆和全血的检测，以用于肝纤维、肝硬化及其进展程度的诊断。

