



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918884 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810589344.9

(22)申请日 2018.06.08

(71)申请人 广州海孚医疗科技有限公司
地址 510000 广东省广州市高新技术产业
开发区新瑞路6号二栋B201

(72)发明人 何浩 王伟

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 万志香

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

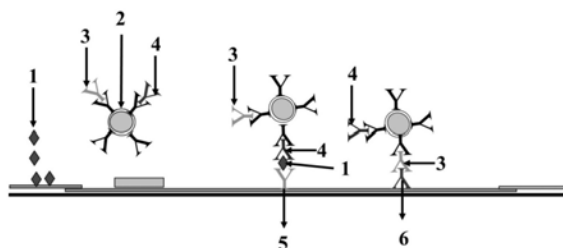
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法,该试纸条由样品垫、包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,包被膜包括标记区、检测区和质控区,标记区包被有荧光胶乳微粒标记的犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY抗体,且犬CRP单克隆抗体、羊抗鸡IgY抗体被标记于同一个荧光胶乳微粒上;检测区包被有与犬CRP单克隆抗体处于不同表位的另一种犬CRP单克隆抗体。本发明将犬CRP抗体、羊抗鸡IgY抗体连接到同一个荧光胶乳上,检测区与质控区共用一个荧光胶乳颗粒的模式能将反应体系的信号量放大,从而大大改善灵敏度和准确性、拓宽线性范围。



1. 一种定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,所述试纸条由样品垫、包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,其特征在于,所述包被膜包括标记区、检测区和质控区,所述标记区包被有荧光胶乳微粒标记的犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY抗体,且犬CRP单克隆抗体、羊抗鸡IgY抗体被标记于同一个荧光胶乳微粒上;所述检测区包被有与所述犬CRP单克隆抗体处于不同表位的另一种犬CRP单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,所述标记区是将标记溶液喷在所述包被膜上制备得到,该标记溶液的制备包括如下步骤:

- (1) 活化荧光胶乳微粒,制备活化荧光胶乳微粒的溶液;
- (2) 向所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入羊抗鸡IgY抗体,室温混合;
- (3) 再向步骤(2)所得混合物中加入犬CRP单克隆抗体,室温混合;
- (4) 将步骤(3)所得混合物离心,溶解所得沉淀,获得标记溶液。

3. 根据权利要求2所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,步骤(1)中,所述活化荧光胶乳微粒的溶液的浓度为 $800\sim 1200\mu\text{g}/100\mu\text{L}$;

步骤(2)中,所述羊抗鸡IgY抗体的加入量为:每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入 $5\sim 20\mu\text{g}$,加入羊抗鸡IgY抗体后室温混合的时间为 $8\sim 12\text{min}$;

步骤(3)中,所述犬CRP单克隆抗体的加入量为:每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入 $20\sim 40\mu\text{g}$;加入犬CRP单克隆抗体后室温混合的时间为 $1.5\sim 3$ 小时;

步骤(4)中,所得沉淀用PBS-TBN溶解,调节所得溶液的体积与活化荧光胶乳微粒的溶液体积相等,获得标记溶液;

所述标记溶液的喷用量为 $0.012\sim 0.024\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光胶乳微粒的直径为 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1至3任一项所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光胶乳微粒受激发后发射的波长为 $180\sim 800\text{nm}$ 。

6. 根据权利要求1至3任一项所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测区是将另一犬CRP单克隆抗体溶液喷在所述包被膜上制备而成,该另一犬CRP单克隆抗体溶液浓度为 $0.5\sim 1.0\text{mg}/\text{mL}$,用量为 $20\mu\text{L}/(27\sim 35)\text{cm}^2$ 。

7. 根据权利要求1至3任一项所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,所述质控区是将鸡IgY抗体溶液喷在所述包被膜上制备而成。

8. 根据权利要求7所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,所述鸡IgY抗体溶液的浓度为 $0.5\sim 1.0\text{mg}/\text{mL}$,该溶液的用量为 $20\mu\text{L}/(27\sim 35)\text{cm}^2$ 。

9. 根据权利要求1至8任一项所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、荧光胶乳微粒共价活化,并制备成活化荧光胶乳微粒的溶液;

B、荧光胶乳微粒标记抗体的制备:向上述活化荧光胶乳微粒的溶液中先加入羊抗鸡IgY抗体室温混匀、再加入犬CRP单克隆抗体室温混匀,获得混合物中含有荧光胶乳微粒标记的犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY抗体,且犬CRP单克隆抗体、羊抗鸡IgY抗体被标记于同一个荧光胶乳微粒上,离心所得混合物并将所得沉淀制备成溶液,得到标记溶液;

C、包被膜的制备:将所得标记溶液喷到标包被膜制备标记区;将另一种犬CRP单克隆抗

体溶液、鸡IgY抗体溶液分别喷到包被膜上制备检测区、质控区；

D、在底板上顺次相互搭接地粘贴样品垫、所述包被膜和吸水纸，切割成适当宽度，获得试纸条。

10. 根据权利要求9所述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于，所述标记溶液的喷用量为 $0.012\sim 0.024\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ；

所述活化荧光胶乳微粒的溶液的浓度为 $800\sim 1200\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ；所述羊抗鸡IgY抗体的加入量为：每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入 $5\sim 20\mu\text{g}$ ，加入羊抗鸡IgY抗体后室温混合 $8\sim 12\text{min}$ ；

所述犬CRP单克隆抗体的加入量为：每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入 $20\sim 40\mu\text{g}$ ，加入犬CRP单克隆抗体后室温混合 $1.5\sim 3$ 小时；

离心所得混合物并将所得沉淀制备成溶液包括：离心所得混合物离心，所得沉淀用PBS-TBN溶解，调节所得溶液的体积与活化荧光胶乳微粒的溶液体积相等，获得标记溶液。

定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检验领域,尤其涉及一种定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法,其特别适用于犬CRP的检测。

背景技术

[0002] C反应蛋白(C-reactive protein,CRP),1930年Tillet和Francis在人急性叶性肺炎患者血清中发现能在钙离子存在时与肺炎球菌c多糖起沉淀反应而得名,是人类重要的急性期反应蛋白,急性期浓度可升高上千倍,循环中的CRP半衰期为19小时。

[0003] CRP是急性期蛋白的典型代表。CRP可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用,从而清除入侵机体的病原微生物和损伤、坏死、凋亡的组织细胞,在机体的天然免疫过程中发挥重要的保护作用。

[0004] CRP被广泛应用于临床疾病的早期诊断及鉴别诊断,其升高可见于:1.组织损伤、感染、胰腺炎,骨关节炎。2.术后感染及并发症的指标:手术后CRP升高,术后7~10天CRP水平下降,如CRP不降低或再次升高,提示可能并发感染。3.可作为细菌性感染和病毒性感染的鉴别诊断:大多数细菌性感染会引起患者血清CRP升高,而病毒性感染则多数不升高。4.恶性肿瘤患者CRP大都升高。CRP测定用于肿瘤的治疗和预后积极意义。手术前CRP上升,手术后则下降,且其反应不受放疗、化疗和皮质激素治疗的影响,有助于临床估价肿瘤的进程。

[0005] 犬CRP是一个急性期蛋白,其浓度在急性炎症的发病或是组织损伤时急剧增力口,就像人一样。目前国外已经研发了各种各样的测量方法,并且现在的研究结果已经揭示了浓度和不同疾病之间的关系。犬被认为和人一样是有用的炎症标记物。通过引入敏感的犬检测方法,对健康犬遭受毒性药物的评估或者是其它测试和临床病例诊断可以试图将作为一个炎症标记物。

[0006] 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。

[0007] 国外实验室已经研发出许多犬CRP的检测方法,例如免疫扩散法,免疫比浊法,酶联免疫吸附实验法,时间分辨免疫荧光分析法,以及日本研发的一种犬专用的激光比浊免疫分析法等等,但对疾病时犬CRP浓度变化研究也只是停留在实验室研究阶段。免疫荧光定量快速检测技术,使用双抗夹心,免疫层析技术的原理和优点,使用荧光素标记,使检测可以快速定量;同时目前荧光素标记都是常规标记T线抗体,两个浓度点的T/C值差距完全

靠T线信号的差别 来提供,因此常规标记方法在灵敏度、准确性、线性范围上存在一定不足。

[0008] 因此,亟待开发一种灵敏度高、准确性好、线性范围宽的犬C反应蛋白的 免疫层析试纸条。

发明内容

[0009] 基于此,本发明的目的是提供一种灵敏度高、准确性好、线性范围宽的犬C 反应蛋白的免疫层析试纸条。

[0010] 本发明的上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0011] 一种定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条,所述试纸条由样品垫、包 被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,所述包被膜包括标记区、检测区和 质控区,所述标记区 包被有荧光胶乳微粒标记的犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY 抗体,且犬CRP单克隆抗体、羊 抗鸡IgY抗体被标记于同一个荧光胶乳微粒上; 所述检测区包被有与所述犬CRP单克隆抗 体处于不同表位的另一种犬CRP单克 隆抗体。

[0012] 在其中一些实施例中,所述标记区是将标记溶液喷在所述包被膜上制备得 到,该 标记溶液的制备包括如下步骤:

[0013] (1) 活化荧光胶乳微粒,制备成活化荧光胶乳微粒的溶液;

[0014] (2) 向所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入羊抗鸡IgY抗体,室温混合;

[0015] (3) 再向步骤(2) 所得活化荧光胶乳微粒的溶液中加入犬CRP单克隆抗 体,室温混 合;

[0016] (4) 将步骤(3) 所得混合物离心,溶解所得沉淀,获得标记溶液。

[0017] 在其中一些实施例中,所述标记溶液的喷用量为 $0.012\sim 0.024\mu\text{L}/\text{cm}^2$;

[0018] 步骤(1) 中,所述活化荧光胶乳微粒的溶液的浓度为 $800\sim 1200\mu\text{g}/100\mu\text{L}$;

[0019] 步骤(2) 中,所述羊抗鸡IgY抗体的加入量为:每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶 乳微粒的 溶液中加入 $5\sim 20\mu\text{g}$,加入羊抗鸡IgY抗体后室温混合的时间为 $8\sim 12\text{min}$;

[0020] 步骤(3) 中,所述犬CRP单克隆抗体的加入量为:每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧 光胶乳微粒 的溶液中加入 $20\sim 40\mu\text{g}$;加入犬CRP单克隆抗体后室温混合的时间 为 $1.5\sim 3$ 小时;

[0021] 步骤(4) 中,所得沉淀用PBS-TBN溶解,调节所得溶液的体积与活化荧 光胶乳微粒 的溶液体积相等,获得标记溶液。

[0022] 在其中一些实施例中,所述荧光胶乳微粒的直径为 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 。

[0023] 在其中一些实施例中,所述荧光胶乳微粒受激发后发射的波长为 $180\sim 800\text{nm}$ 。

[0024] 在其中一些实施例中,所述检测区是将另一犬CRP单克隆抗体溶液喷在所 述包被 膜上制备而成,该另一犬CRP单克隆抗体溶液浓度为 $0.5\sim 1.0\text{mg}/\text{mL}$, 用量为 $20\mu\text{L}/(27\sim 35)\text{cm}^2$ 。

[0025] 在其中一些实施例中,所述质控区是将鸡IgY抗体溶液喷在所述包被膜上 制备而 成。

[0026] 在其中一些实施例中,所述鸡IgY抗体溶液的浓度为 $0.5\sim 1.0\text{mg}/\text{mL}$,该 溶液的用 量为 $20\mu\text{L}/(27\sim 35)\text{cm}^2$ 。

[0027] 本发明的另一目的是提供一种上述的定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试 纸条

的制备方法,包括以下步骤:

[0028] A、荧光胶乳微粒共价活化,并制备成活化荧光胶乳微粒的溶液;

[0029] B、荧光胶乳微粒标记抗体的制备:向上述活化荧光胶乳微粒的溶液中先加入羊抗鸡IgY抗体室温混匀、再加入犬CRP单克隆抗体室温混匀,获得混合物中含有荧光胶乳微粒标记的犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY抗体,且犬CRP单克隆抗体、羊抗鸡IgY抗体被标记于同一个荧光胶乳微粒上,离心所得混合物并将所得沉淀制备成溶液,得到标记溶液;

[0030] C、包被膜的制备:将所得标记溶液喷到标包被膜制备标记区;将另一种犬CRP单克隆抗体溶液、鸡IgY抗体溶液分别喷到包被膜上制备检测区、质控区;

[0031] D、在底板上顺次相互搭接地粘贴样品垫、所述包被膜和吸水纸,切割成适当宽度,获得试纸条。

[0032] 在其中一些实施例中,所述标记溶液的喷用量为 $0.012\sim 0.024\mu\text{L}/\text{cm}^2$;

[0033] 所述活化荧光胶乳微粒的溶液的浓度为 $800\sim 1200\mu\text{g}/100\mu\text{L}$;所述羊抗鸡IgY抗体的加入量为:每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入 $5\sim 20\mu\text{g}$,加入羊抗鸡IgY抗体后室温混合 $8\sim 12\text{min}$;

[0034] 所述犬CRP单克隆抗体的加入量为:每 $100\mu\text{L}$ 所述活化荧光胶乳微粒的溶液中加入 $20\sim 40\mu\text{g}$,加入犬CRP单克隆抗体后室温混合 $1.5\sim 3$ 小时;

[0035] 离心所得混合物并将所得沉淀制备成溶液包括:离心所得混合物离心,所得沉淀用PBS-TBN溶解,调节所得溶液的体积与活化荧光胶乳微粒的溶液体积相等,获得标记溶液。

[0036] 与现有技术相比,本发明具备如下有益效果:

[0037] 犬CRP由5个相同的亚基单位以非共价方式联接,且5个亚基中有两个被糖基化,该特性使得各种抗其他物种CRP蛋白的抗血清都不能与犬CRP发生交叉反应。而现有已被报道的能够与犬CRP发生交叉反应的抗体,在免疫层析检测中普遍存在灵敏度不高、线性范围窄、准确度不足的问题。

[0038] 对此,发明人在大量尝试的基础上,改变荧光胶乳颗粒分别标记犬CRP抗体、羊抗鸡IgY抗体的传统操作,将犬CRP抗体、羊抗鸡IgY抗体用同一个荧光胶乳标记,让两种抗体连接到同一胶乳上形成混标复合物,当此混标复合物与检测样本中的犬CRP抗原结合后形成犬CRP抗原-混标复合物,该犬CRP抗原-混标复合物通过层析作用在包被膜的检测区与预先包被的另一种犬CRP抗体特异性结合而大量聚积,其余没有结合犬CRP抗原的混标复合物由于羊抗鸡IgY抗体的存在,将会与质控区处预先包被的鸡IgY抗体结合,这种检测区与质控区共用一个荧光胶乳颗粒的模式能将反应体系的信号量放大,从而大大改善灵敏度和准确性、扩宽线性范围。

附图说明

[0039] 图1为本发明的定量检测犬CRP免疫层析试纸条的结构示意图:1、样品垫;2、包被膜;3、吸水纸;4、标记区;5、检测区;6、质控区;7、底板。

[0040] 图2为本发明的犬CRP免疫层析试纸条标记工艺及其反应模式示意图:1、犬CRP抗原;2、荧光胶乳微粒;3、羊抗鸡IgY;4、犬CRP标记抗体;5、犬CRP包被抗体;6、鸡IgY抗体;

[0041] 图3为实施例4对200例犬样进行检测的结果图;

- [0042] 图4为实施例2与对比例1的标准曲线低端灵敏度比较图；
[0043] 图5为实施例2与对比例1的标准曲线高端灵敏度比较图；
[0044] 图6为实施例2与对比例1的整体线性比较图；
[0045] 图7为实施例2与对比例1的T峰线性比较图；
[0046] 图8为实施例2与对比例1的C峰线性比较图。

具体实施方式

[0047] 以下结合具体实施例对本发明作进一步详细的说明。

[0048] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:ColdSpring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0049] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0050] 实施例1、定量检测犬CRP的免疫层析试纸条的构成

[0051] 在本发明实施例中,所采用的犬CRP单克隆抗体为常规单克隆抗体技术制备的单抗,利用双抗体夹心法检测犬CRP抗原。本发明实施例采用检测区(T线)和质控区(C线)抗体同时标记到一个荧光胶乳微粒上的混合标记技术,其原理是T线和C线竞争同一个荧光胶乳微粒,当T线信号低时C线信号高,当T线信号高时C线信号低,这种结合模式拉大了两个浓度点的T/C值,从而能大大改善灵敏度,提高检测结果的准确性,拓宽了检测线性范围。

[0052] 如图1所示,在该实施例中,定量检测犬CRP的免疫层析试纸条,包括远端和近端,样品垫1位于试纸条的近端,其材质为玻璃纤维素膜,样品垫1是加样区,用于吸取待检测犬CRP样本。样品垫1与远端之间,依次搭接有硝酸纤维素膜材质的包被膜2和吸水纸3,样品垫1、包被膜2和吸水纸3都设置在底板7上,该底板可选PVC。

[0053] 在该实施例中,包被膜2上:

[0054] 标记区4使用激发光(470nm)/发射光(525nm)波长的荧光胶乳微粒(直径约500nm)混合标记1株犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY;

[0055] 检测区5(T线)处采用犬CRP的另一株单克隆抗体来包被。

[0056] 质控区6(C线)包被有鸡IgY抗体,用于结合荧光胶乳标记的羊抗鸡IgY,用于检测试纸条的有效性。

[0057] 实施例2、定量检测犬CRP的免疫层析试纸条的制备

[0058] 在该实施例中,定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条的制备包括以下步骤:

[0059] 1. 荧光胶乳微粒-犬CRP抗体-羊抗鸡IgY抗体复合物的制备

[0060] 1.1 荧光胶乳微粒活化

[0061] 超声波处理荧光胶乳微粒30秒,调节荧光胶乳微粒浓度为 $1.0 \times 10^{12}/\text{mL}$, $10000 \times \text{g}$ 离心5分钟,沉淀物用80 μL 的蒸馏水溶解,并超声波200W处理30秒;先加入10 μL 的20mg/mL

碳二亚胺,混匀,再加入10 μ L的20mg/mL N-羧基琥珀酰亚胺,混匀;室温孵育20分钟后10000 \times g、离心5分钟,沉淀用20mM、pH5.0~6.5的柠檬酸缓冲液溶解,放置于2 $^{\circ}$ C条件下备用。

[0062] 1.2 荧光胶乳微粒-犬CRP抗体-羊抗鸡IgY抗体复合物制备

[0063] 将上述活化后的荧光胶乳超声波200W处理30秒后,按照5 μ g/100 μ L荧光胶乳的比例先加入羊抗鸡IgY抗体室温混匀10分钟,再按照20 μ g/100 μ L荧光胶乳的比例向同一荧光胶乳中加入犬CRP单克隆抗体,混匀后室温搅拌反应1.5小时,离心洗涤2次,每次10000 \times g、离心5分钟,沉淀用PBS-TBN溶解并超声波100W处理30秒,用PBS-TBN恢复离心前体积,标记完成后的混标复合物模型及层析反应模式如图2所示。

[0064] 2. 包被膜的制备

[0065] 将以上制备的犬CRP浓度为0.2mg/mL、羊抗鸡IgY抗体浓度为0.05mg/mL的标记溶液,按0.012 μ g/cm²的用量涂覆在包被膜2的标记区4上。另一种犬CRP单克隆抗体用常规包被缓冲液调节至浓度为0.5mg/mL,将鸡IgY抗体用常规包被缓冲液调节至浓度为0.5mg/mL,分别喷到包被膜2上制备检测区5、质控区6,该犬CRP单克隆抗体和鸡IgY抗体的用量按膜包被液量均为20 μ L/27cm²,检测区5和质控区6间隔3mm,在湿度<30%的50 $^{\circ}$ C条件下烘干48小时,封袋,备用。

[0066] 3. 样品垫的制备

[0067] 配置样品垫处理液,按4 μ L/cm²的量喷涂于样品垫上。该样品垫处理液为含有0.1mg/mL阻断剂、0.1mg/mL红细胞拦截剂、0.5%染料的pH6.8、0.01M的PB(磷酸缓冲液)。

[0068] 阻断剂能与犬血液样本中的异嗜性抗体和类风湿因子等反应,从而达到减小干扰的目的;红细胞拦截剂能与全血样本中的红细胞结合,从而达到改善因红细胞的影响带来测试结果不准确的目的;磷酸缓冲液主要作用是提供一个稳定的免疫反应环境。阻断剂主要为常规小鼠免疫球蛋白,红细胞拦截剂主要为常规鼠抗犬红细胞类抗体,染料主要为常规伊文斯蓝类染料。

[0069] 4. 试纸条的组装

[0070] 在底板上依次相互搭接地粘贴样品垫1、包被膜2和吸水纸3得到试纸条,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0071] 定量检测犬CRP免疫层析试纸条,在使用时,组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳设有两个开孔,加样窗和显示孔,加样窗对应于所述的定量检测犬CRP免疫层析试纸条样品垫1,结果显示窗对应于所述定量检测犬CRP免疫层析试纸条的检测区5和质控区6,该定量检测犬CRP免疫层析试纸条可以从该塑料外壳中取出。

[0072] 实施例3、定量检测犬CRP的免疫层析试纸条的反应模式的建立

[0073] 1. 标准曲线绘制

[0074] 将犬CRP抗原标准品用犬CRP阴性血清配制系列浓度标准品:0mg/L、2.5mg/L、5.0mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L、80mg/L、160mg/L、400mg/L,取10 μ L滴加到CRP样本缓冲液中反复颠倒(8~10次)混匀,再吸取混匀后的液体75 μ L滴加到试纸条的加样孔中,3min后通过定量检测装置Healvet仪器HV-FIA 3000进行检测,读出检测区与质控区信号强度比值,即T/C值(每个浓度点分别测定10次,取平均值),绘制浓度T/C标准曲线。

[0075] 2. ID芯片刻录

[0076] 将犬CRP免疫层析试纸条制备参数(检测区、质控区喷涂位置,T/C公式,全血系数,检测范围等)以及标准曲线绘制对应的浓度和T/C,输入ID芯片刻录软件AFS-1000,得到浓度T/C一一对应的犬CRP数据芯片。

[0077] 3.临床样本数据读取

[0078] 打开广州海孚医疗科技有限公司的HV-FIA 3000仪器,将刻录好的犬CRP芯片插入仪器ID数据录入口,点击仪器操作界面上的读ID卡按键读取犬CRP芯片数据,将加好临床样本的犬CRP免疫层析测试卡(内含犬CRP试纸条)放入仪器测试区,将仪器测试方式调到标准测试后点击测试按键,仪器将在3分钟后自动测试,并打印测试结果。

[0079] 实施例4、定量检测犬CRP的免疫层析试纸条性能的评价

[0080] 1、最低检出限的测定

[0081] 根据标准曲线计算可知,定量检测犬CRP的免疫层析试纸条对CRP浓度小于2.0mg/L的样本只能部分检出,对2.0mg/L的样本全部检出,其最低检测限为2.0mg/L,并在2.0~250mg/L的范围具有良好的线性,T线的荧光强度与样本中CRP的浓度成正比。

[0082] 2、精密度测定

[0083] 将犬CRP抗原标准品用犬CRP阴性血清配制系列浓度标准品:2mg/L、10 mg/L、50mg/L、100mg/L、250mg/L,分别用试纸条进行检测(每个浓度每批次每个浓度点分别平行检测10次,共检测三批,各浓度点批内最大CV为6.8%,平均CV为5.4%;各浓度点批间最大CV为8.9%,平均CV为6.8%,表明本发明所提供的试纸条具有良好的重复性。

[0084] 3、稳定性测定

[0085] 将制备好的试纸条放在50℃环境中进行加速试验。分别在7d、14d、21d、30d、37d、44d、51d、60d取出试纸条,并用其检测实际样品中犬c反应蛋白的浓度。对实测浓度和实际样品浓度数值进行误差分析,得到值在10%以内的结果。

[0086] 4、抗干扰测定

[0087] 配置犬CRP浓度为6.47mg/L、32.64mg/L、59.81mg/L的校准品。向上述三个浓度校准品中分别加入浓度高于病理样本最高浓度的干扰物,使用本发明定量检测犬CRP的免疫层析试纸条进行测定,每个浓度测定3次。结果见表,干扰物对定量检测犬CRP的免疫层析试纸条的干扰均在15%以内。

[0088] 表1

[0089]

干扰物类型	添加浓度 (mg/mL)	低浓度校准品		中浓度校准品		高浓度校准品	
		6.47 mg/L		32.64 mg/L		59.81 mg/L	
		测定值	影响度	测定值	影响度	测定值	影响度
		(mg/L)	(%)	(mg/L)	(%)	(mg/L)	(%)
胆固醇	1	5.93	-8.42	32.13	-1.56	56.49	5.56
甘油三酯	1	5.68	-12.28	34.95	7.08	64.00	7.00
胆红素	0.1	5.76	-11.06	32.53	-0.33	63.26	5.76
血红蛋白	0.1	5.97	-7.73	32.43	-0.63	68.30	14.19

[0090] 5、临床相关性测定

[0091] 从宠物医院收集30例临床诊断有炎症犬血清样本,从狗场收集200例健康犬临床样本,用本发明定量检测犬CRP的免疫层析试纸条进行测定。

[0092] 结果显示,30例临床诊断有炎症犬血清样本测试值有28例大于10mg/L,阳性符合率为93.3%(表2),200例健康犬临床样本测试值有181例小于等于10mg/L,阴性符合率为90.5%(图3)。综合上述测试结果可将本发明所制定量检测犬CRP免疫层析试纸条cutoff值定为10mg/L。

[0093] 表2

[0094]

样本编号	测试值 (mg/L)	临床诊断结果
Y1	56.33	口炎
Y2	17.40	口炎
Y3	23.15	口炎
Y4	74.66	呼吸道感染
Y5	87.73	呼吸道感染
Y6	14.03	呼吸道感染
Y7	10.80	皮肤病
Y8	11.76	皮肤病
Y9	19.50	皮肤病
Y10	18.73	皮肤病
Y11	11.82	皮肤病
Y12	36.41	皮肤病
Y13	9.84	皮肤病
Y14	26.44	伤口感染
Y15	33.32	伤口感染
Y16	27.90	伤口感染
Y17	119.48	伤口感染
Y18	19.46	伤口感染
Y19	47.05	伤口感染

[0095]

Y20	29.72	伤口感染
Y21	58.34	伤口感染
Y22	11.17	去势
Y23	21.29	去势
Y24	5.58	去势
Y25	67.06	鼻炎
Y26	36.24	鼻炎
Y27	55.43	鼻炎
Y28	34.62	消化道感染
Y29	83.80	消化道感染
Y30	112.99	消化道感染

[0096] 实施例5、犬CRP的免疫层析试纸条及其制备方法

[0097] 本实施例的定量检测犬CRP的免疫层析试纸条结构同实施例1,如图1所示。与实施例1相比,变化之处包括:在该实施例中,包被膜2上的标记区3使用特定的激发光(470nm)/发射光(525nm)波长的荧光胶乳(直径约1000nm)混合标记1株犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY;包被膜2的检测区5T线处采用犬CRP的另一株单克隆抗体(1.0mg/mL)来包被。在包被膜2的质控区6C线包被有鸡IgY抗体,浓度为1.0mg/mL,用于结合荧光胶乳标记的羊抗鸡IgY,用于检测试纸条的有效性,犬CRP单克隆抗体和鸡IgY抗体的用量按膜包被液量均为20 μ L/35cm。

[0098] 本实施例的定量检测犬CRP的免疫层析试纸条,其制备方法参照实施例2,与实施例2相比,变化之处包括:

[0099] 1.1荧光胶乳微粒活化:超声波处理荧光胶乳微粒30秒后,调节荧光胶乳微粒浓度为 1.0×10^{13} /mL,15000 \times g离心15分钟,沉淀物用800 μ L的200mM pH6.0~7.0磷酸钠溶液溶解,并超声波200W处理30秒;先加入100 μ L的100 mg/mL碳二亚胺,混匀,再加入100 μ L的100mg/mLN-羟基琥珀酰亚胺,混匀;室温孵育40分钟后15000 \times g、离心15分钟,沉淀用100mM、pH5.0~6.5的柠檬酸缓冲液溶解,放置于8 $^{\circ}$ C条件下备用;

[0100] 1.2荧光胶乳微粒-犬CRP抗体-羊抗鸡IgY抗体复合物制备

[0101] 将上述活化后的荧光胶乳超声波200W处理30秒后,按照20 μ g/100 μ L荧光胶乳的比例先加入羊抗鸡IgY抗体室温混匀10分钟,再按照40 μ g/100 μ L荧光胶乳的比例向同一荧光胶乳中加入犬CRP单克隆抗体,混匀后室温搅拌反应3小时,离心洗涤4次,每次15000 \times g、离心15分钟,沉淀用PBS-TBN溶解并超声波100W处理30秒,用PBS-TBN恢复离心前体积,标记完成后的混标复合物模型及层析反应模式如图2所示。

[0102] 5. 包被膜的制备

[0103] 将以上制备的犬CRP浓度为0.4mg/mL、羊抗鸡IgY浓度为0.2mg/mL的标记溶液,按 $0.024\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的用量涂覆在包被膜的标记区4上。另一种犬CRP单克隆抗体用常规包被缓冲液调节至浓度为1.0mg/mL,将鸡IgY抗体用常规包被缓冲液调节至浓度为1.0mg/mL,分别喷到包被膜2上制备检测区5、质控区6,该犬CRP单克隆抗体和鸡IgY抗体的用量按膜包被液量均为 $20\mu\text{L}/35\text{cm}$,检测区5和质控区6间隔8mm,在湿度 $<30\%$ 的 50°C 条件下烘干72小时,封袋,备用。

[0104] 参照实施例4的方法对本实施例所得定量检测犬CRP的免疫层析试纸条的性能进行验证,结果显示,本实施例的定量检测犬CRP的免疫层析试纸条具有与实施例1的相当的最低检出限及检测限、精密度、稳定性、抗干扰及临床相关性。

[0105] 对比例1

[0106] 本对比例是实施例1的对比例,提供一种定量检测犬CRP的免疫层析试纸条,该例的定量检测犬CRP的免疫层析试纸条与实施例1的区别主要为标记区4,该例的标记区4喷有荧光胶乳标记的犬CRP单克隆抗体、荧光胶乳标记的羊抗鸡IgY,即犬CRP单克隆抗体、羊抗鸡IgY是分别标记的。

[0107] 该例的定量检测犬CRP的免疫层析试纸条的制备参照实施例2,与实施例相比的主要区别为步骤“1.2”,在该例的步骤1.2中,羊抗鸡IgY、犬CRP单克隆抗体是同时加入荧光胶乳微粒的。

[0108] 将实施例1记作“同时偶联”、将对比例1记作“分开偶联”,对二者的灵敏度、线性进行测试,结果参见图4、图5、图6、图7、图8。根据图4至图8,同时偶联标记在标准曲线灵敏度、高端线性及整体线性均明显优于分开偶联标记;同时偶联标记与分开偶联标记T峰信号线性相当;同时偶联标记C峰信号线性明显优于分开偶联标记。根据以上结果可以看出,定量检测犬C反应蛋白的犬CRP试纸条,其标记区包被同时偶联标记工艺用于犬CRP试纸条的制作,其性能明显优于分开偶联标记工艺。

[0109] 本发明提供的定量检测犬C反应蛋白(CRP)的试纸条,其测试结果是由检测区信号(T)与质控区信号(C)的比值T/C通过公式转换为浓度值,如果将二者分开连接到不同荧光胶乳,随着样本CRP浓度升高,T升高,C不变,T/C值只受T变化影响;而将两者连接到同一荧光胶乳,随着样本CRP浓度升高,T升高的同时C下降,T/C值同时受T升高和C下降影响,且同时T升高C下降这种模式会大大提高相邻两个浓度点间T/C值的差距,因此也显著改善了标准曲线的灵敏度。

[0110] 本发明所述的犬C反应蛋白的免疫层析试纸条的检测原理是双抗体夹心法,将直径范围 $0.1\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 的胶乳微粒与一种犬CRP单克隆抗体和各类不同的荧光素共价结合,利用胶乳微粒大分子物质具有的羧基、氨基、羟基等基团结合犬CRP抗原的一种抗体,利用荧光素在激发光作用下可以发射荧光,当此足够的荧光胶乳标记的犬CRP单克隆抗体与检测样本中犬CRP抗原结合形成复合物,该复合物在层析作用下移动至包被膜的检测区,在被膜的检测区包被有能与犬CRP抗原结合的另一种抗体,该抗体结合在犬CRP抗原的另一表位上,形成双抗体夹心的复合物。复合物聚积在包被膜的T线处,受到光源激发释放出相应波长的发射光,通过荧光检测系统将捕捉的光信号转化为数字信号,从而可用于准确定量的快速免疫检测中。

[0111] 利用荧光定量光谱检测系统,由光源激发包被膜上检测区T线处聚积的荧光素,荧光素发射出的荧光被相应的检测系统接收,并通过光电变换、光电转化等过程将光电信号转化成电信号,并由系统中设置的自动控制系统将信号输出,显示出最终的定量结果。由于选择的荧光素的种类的不同,其激发/发射光的波长以及自动控制系统也会不同。

[0112] 本发明实施例的犬C反应蛋白免疫层析试纸条与放射性免疫、酶联免疫法检测犬CRP抗体相比,具有操作安全(无放射物污染)、简便(简单操作一步完成)、适合单份检测和快速(3分钟左右即可有结果)等优点;与免疫胶体金标记试纸条相比,本发明具有灵敏度更高、准确定量、多指标检测(不同波段的荧光胶乳标记应用于多指标同步定量检测)、标记稳定性更好等优点。

[0113] 本发明实施例的犬C反应蛋白免疫层析试纸条可以达到3分钟就能对犬CRP进行灵敏的定量测定,更快更精确的诊断疾病和鉴别感染,能检测感染病情和确定抗生素的疗效;同时犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY抗体混合标记到同一荧光胶乳微粒上的标记方法大大提高了灵敏度和线性,综合上述特点,本发明提供的定量检测犬C反应蛋白免疫层析试纸条具备灵敏度高,特异性好,操作快速简便、结果准确等诸多优点。

[0114] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0115] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求要求为准。

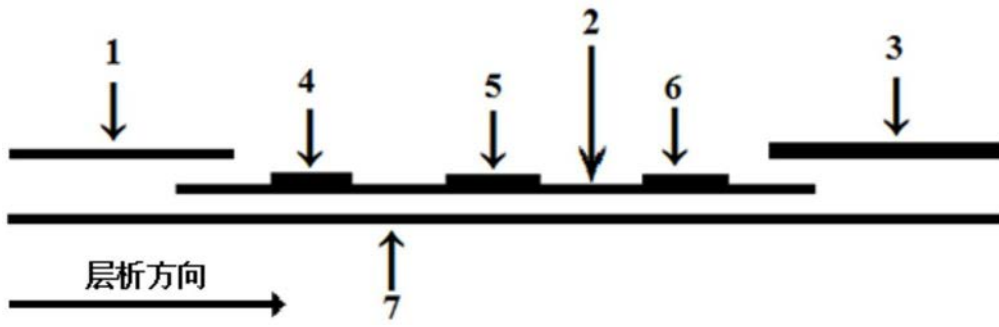


图1

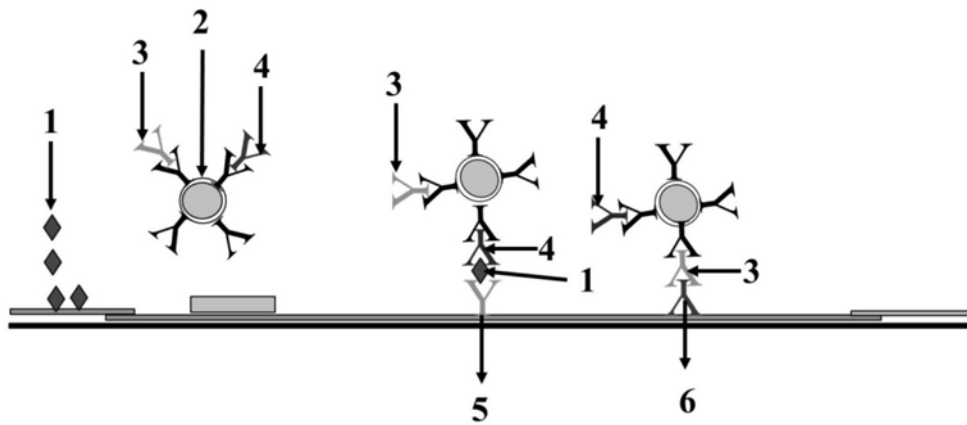


图2

直方图

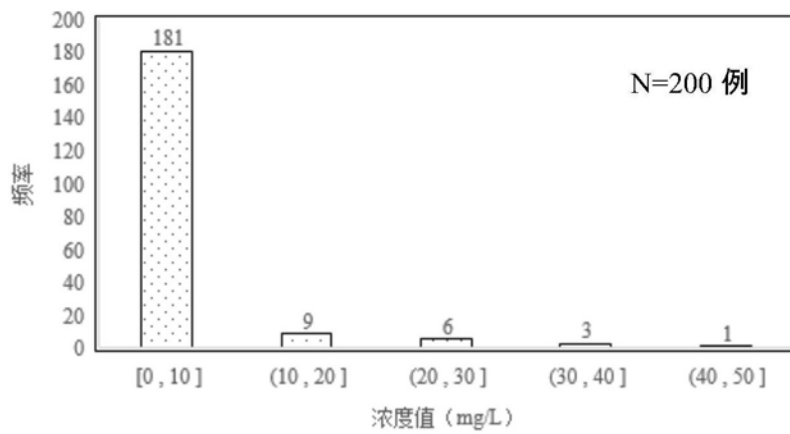


图3

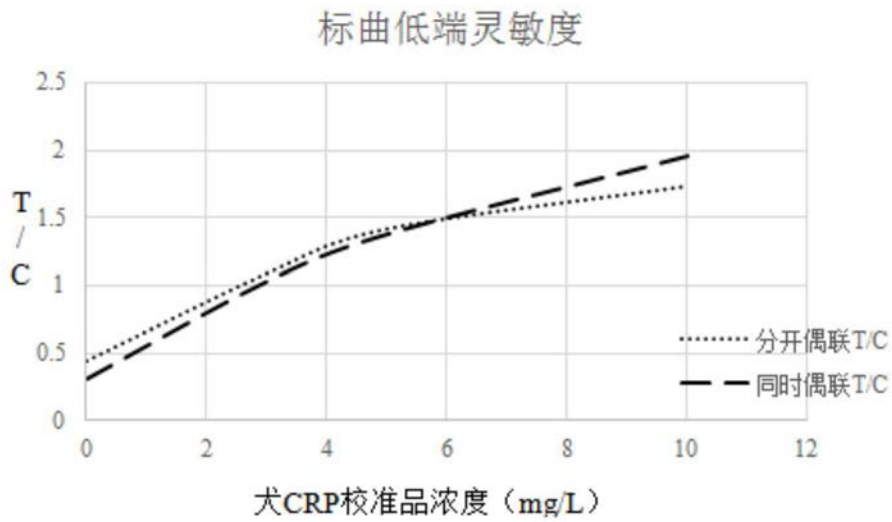


图4

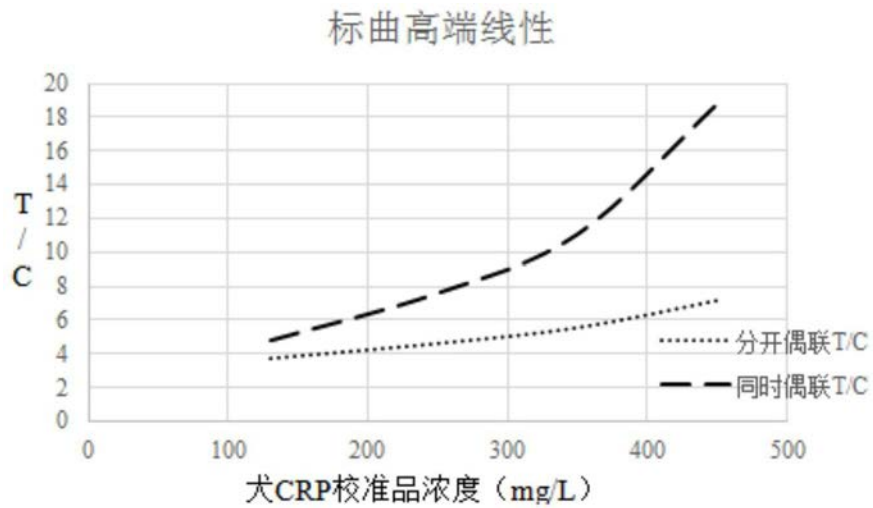


图5

不同标记工艺整体线性

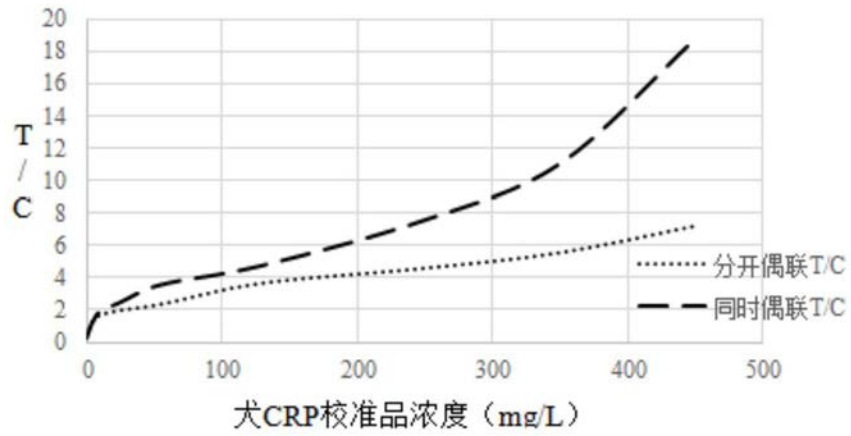


图6

不同标记工艺T峰线性

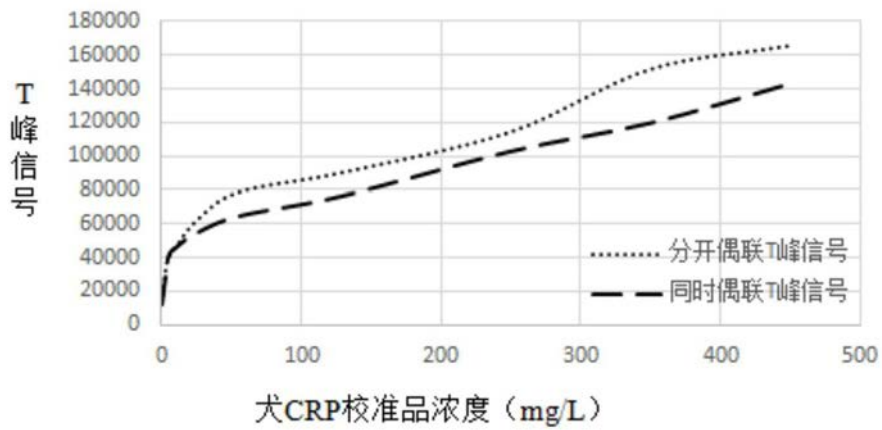


图7

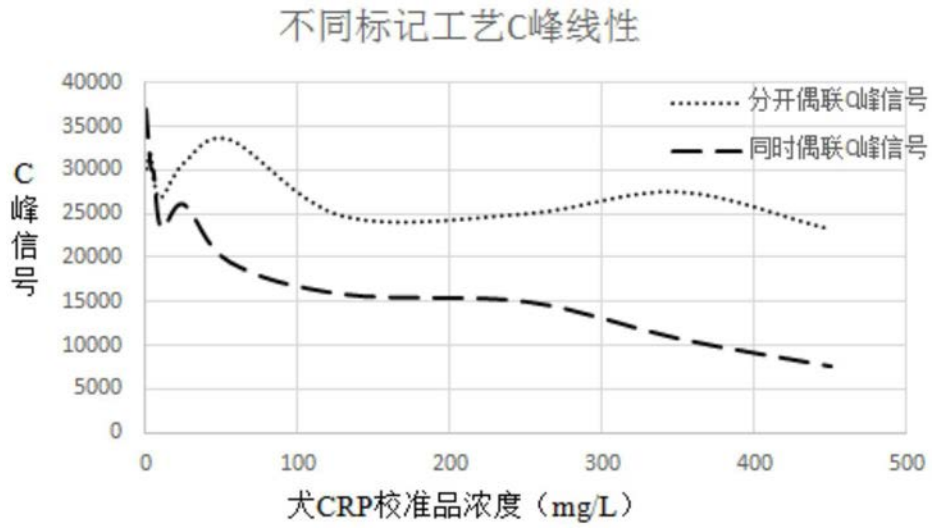


图8

专利名称(译)	定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN108918884A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810589344.9	申请日	2018-06-08
[标]发明人	何浩 王伟		
发明人	何浩 王伟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/56944 G01N33/577 G01N33/68 G01N2800/52 G01N2800/7095		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测犬C反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法，该试纸条由样品垫、包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成，包被膜包括标记区、检测区和质控区，标记区包被有荧光胶乳微粒标记的犬CRP单克隆抗体和羊抗鸡IgY抗体，且犬CRP单克隆抗体、羊抗鸡IgY抗体被标记于同一个荧光胶乳微粒上；检测区包被有与犬CRP单克隆抗体处于不同表位的另一种犬CRP单克隆抗体。本发明将犬CRP抗体、羊抗鸡IgY抗体连接到同一个荧光胶乳上，检测区与质控区共用一个荧光胶乳颗粒的模式能将反应体系的信号量放大，从而大大改善灵敏度和准确性、扩宽线性范围。

