



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110187129 A

(43)申请公布日 2019.08.30

(21)申请号 201910561772.5

(22)申请日 2019.06.26

(71)申请人 浙江伊利康生物技术有限公司
地址 325000 浙江省温州市经济技术开发区滨海一道1655号

(72)发明人 王贤理 贾刚 苗准

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

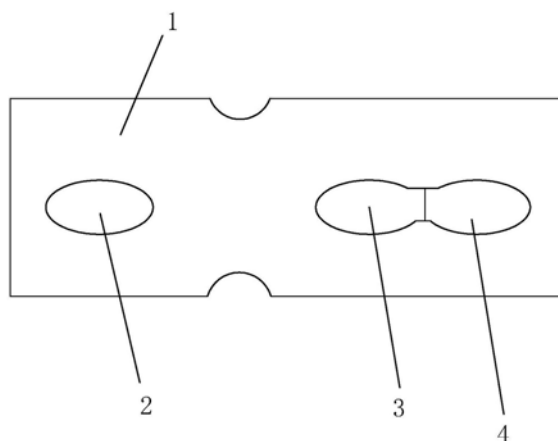
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

C反应蛋白检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种C反应蛋白检测试剂盒,包括免疫层析试纸结合物垫以及测试区,所述免疫层析试纸结合物垫包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物,两者重量份数比为1:1,所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体,本发明具有检测范围大且准确度高的优点。



1. 一种C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:包括免疫层析试纸结合物垫(8)以及测试区,所述免疫层析试纸结合物垫(8)包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物,两者重量份数比为1:1,所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体;

所述CRP单克隆抗体一的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球20-70份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中;

步骤2:向荧光微球内加入10ug-50ug/0.1mg CRP单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后用荧光微球复溶液进行超声处理30s,在4℃条件下保存;

所述IgG单克隆抗体的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球20-70份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中;

步骤2:向荧光微球内加入10ug-50ug/0.1mg IgG单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后用荧光微球复溶液进行超声处理30s,在4℃条件下保存。

2. 根据权利要求1所述的一种C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

3. 根据权利要求1所述的一种C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:选用包被缓冲液对所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体进行稀释,所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体的浓度均为1mg/ml,所述包被缓冲液含有5%海藻糖、0.01mol PH为7.4的PBS。

4. 根据权利要求1所述的一种C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述免疫层析试纸结合物垫(8)包括玻璃纤维素膜,所述玻璃纤维素膜采用预处理,所述预处理包括如下步骤,

将玻璃纤维素膜浸泡在含有0.2%BSA、0.2%Tween-20,0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中,20-25℃条件下干燥,按照每1.5×30cm²均匀喷洒150μL含1%阻断剂、0.5% Tetronic1307与2%BSA的水溶液,再次干燥后,在密封袋中干燥保存。

5. 一种如权利要求1所述的一种C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:还包括有底衬(5),所述底衬(5)上方依次粘贴吸水垫(6)、醋酸纤维素膜(7)和免疫层析试纸结合物垫(8),所述醋酸纤维素膜(7)表面平行设置有检测线(9)和质控线(10),所述检测线(9)由稀释后的CRP单克隆抗体二构成,所述质控线(10)由稀释后的羊抗兔IgG多克隆抗体构成。

6. 一种如权利要求5所述的一种C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述底衬(5)的外部设置有卡壳,所述底衬(5)处于卡壳的底部的卡槽中,所述卡壳连接有外壳(1),所述外壳(1)设置有样品槽(2)、检测槽(3)和质控槽(4),所述样品槽(2)、检测槽(3)和质控槽(4)均设置有倒角,所述外壳(1)一体连接有处于检测槽(3)与质控槽(4)之间分割栏,所述外壳(1)还设置有识别标志。

C反应蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫学技术领域,具体涉及一种C反应蛋白检测试剂盒。

背景技术

[0002] C反应蛋白(CRP)是一种能和肺炎链球菌的荚膜C多糖结合,是机体受到微生物入侵或组织损伤等刺激时肝细胞合成的急性时相蛋白,恒量存在于健康人血清中(约580ng/ml)。当发生炎症疾病或组织发生溃烂或坏死时,会在血液中急速升高,但随着组织结构和功能的复原,含量也恢复正常。因此,高浓度CRP的测定在诊断细菌感染、癌症等疾病的严重性、进程、预后以及治疗效果方面具有广泛临床意义。

[0003] 另一方面,CRP作为心血管疾病最强的危险指标,其水平可预测将来心肌梗塞及中风的危险性。健康人CRP参考范围基本为0.58~1.13mg/L。CRP含量>2.1mg/L的人,比较CRP含量≤1mg/L者,将来发生心肌梗塞的危险性为后者的2.9倍;发生缺血性中风的危险性为后者的1.9倍;发生外周动脉血管性疾病的危险性为后者的4.1倍、CRP与血脂(总胆固醇,总胆固醇:高密度脂蛋白胆固醇的比值)的联合测定,较其他的危险因子更能预示发生心、脑血管疾病的危险性,是目前仅限冠心病危险评估的最佳模型。最近研究表明,低浓度CRP的测定还可作为新生儿感染,局部感染等疾病以及各种相关疾病如牙周病的诊断标志物。

[0004] CRP是一种由肝脏合成的,能与肺炎链球菌C多糖体起反应的急性相蛋白。当机体发生传染、组织损伤和炎性疾病时,CRP迅速升高,可至上千倍,在疾病治愈后,其含量急速下降。因此CRP检测可为炎症过程和相关疾病的诊断、治疗和监控提供有价值的信息。CRP检测常用于评估感染或慢性炎症性疾病的风险。

[0005] 目前常规C反应蛋白检测试剂盒的检测范围3mg/L-350mg/L,改反应的检测范围较窄,需要进一步优化。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种C反应蛋白检测试剂盒,其具有较宽的检测范围的优点。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:一种C反应蛋白检测试剂盒,包括免疫层析试纸结合物垫以及测试区,所述免疫层析试纸结合物垫包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物,两者重量份数比为1:1,所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体;

所述CRP单克隆抗体一的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球20-70份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中;

步骤2:向荧光微球内加入10ug-50ug/0.1mg CRP单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后用荧光微球复溶液进行超声处理30s,在4℃条件下保存;

所述IgG单克隆抗体的荧光微球的制备方法为：

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球20-70份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中；

步骤2:向荧光微球内加入10ug-50ug/0.1mg IgG单克隆抗体；

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后用荧光微球复溶液进行超声处理30s,在4℃条件下保存。

[0008] 本发明进一步设置为:所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0009] 本发明进一步设置为:选用包被缓冲液对所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体进行稀释,所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体的浓度均为1mg/ml,所述包被缓冲液含有5%海藻糖、0.01mol PH为7.4的PBS。

[0010] 本发明进一步设置为:所述免疫层析试纸结合物垫包括玻璃纤维素膜,所述玻璃纤维素膜采用预处理,所述预处理包括如下步骤,

将玻璃纤维素膜浸泡在含有0.2%BSA、0.2%Tween-20,0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中,20-25℃条件下干燥,按照每 $1.5 \times 30\text{cm}^2$ 均匀喷洒150μL含1%阻断剂、0.5% Tetronic1307与2%BSA的水溶液,再次干燥后,在密封袋中干燥保存。

[0011] 本发明进一步设置为:还包括有底衬,所述底衬上方依次粘贴吸水垫、醋酸纤维素膜和免疫层析试纸结合物垫,所述醋酸纤维素膜表面平行设置有检测线和质控线,所述检测线由稀释后的CRP单克隆抗体二构成,所述质控线由稀释后的羊抗兔IgG多克隆抗体构成。

[0012] 本发明进一步设置为:所述底衬的外部设置有卡壳,所述底衬处于卡壳的底部的卡槽中,所述卡壳连接有外壳,所述外壳设置有样品槽、检测槽和质控槽,所述样品槽、检测槽和质控槽均设置有倒角,所述外壳一体连接有处于检测槽与质控槽之间分割栏,所述外壳还设置有识别标志。

[0013] 综上所述,本发明具有以下有益效果:

1、本发明采用外壳与卡壳的配合,并在内安装有底衬,所述底衬上方依次粘贴吸水垫、醋酸纤维素膜和免疫层析试纸结合物垫,在使用时,只需要将样本进行稀释,放入样品槽内即可,之后采用365nm波长测定荧光信号强度,根据荧光信号强度测定样本中C反应蛋白的含量的比值。

[0014] 2、本发明利用特有的荧光微球复溶液、包被缓冲液提高标记CRP单克隆抗体的荧光微球与C蛋白之间的反应敏感度、标记IgG单克隆抗体的荧光微球与C蛋白之间的反应敏感度、CRP单克隆抗体二与C蛋白之间的反应敏感度、羊抗兔IgG多克隆抗体与C蛋白之间的反应敏感度,并且增强荧光信号强度与C蛋白含量之间的相关度,提高整体检测的准确度。

附图说明

[0015] 图1是实施例1-3中外壳、样品槽、检测槽和质控槽之间连接关系的结构示意图；

图2为实施例1-3中底衬、吸水垫、醋酸纤维素膜、免疫层析试纸结合物垫、检测线和质

控线之间连接关系的结构示意图。

[0016] 附图标记:1、外壳;2、样品槽;3、检测槽;4、质控槽;5、底衬;6、吸水垫;7、醋酸纤维素膜;8、免疫层析试纸结合物垫;9、检测线;10、质控线。

具体实施方式

[0017] 参照附图对本发明做进一步说明。

[0018] 实施例1:

实施例1:

一种C反应蛋白检测试剂盒,如图1和图2所示包括免疫层析试纸结合物垫8以及测试区,所述免疫层析试纸结合物垫8包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物,CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物采用喷射方式附着到样品垫上,两者重量份数比为1:1,

所述CRP单克隆抗体一的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球20份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中直至溶解,所述Tris-HCl缓冲液由50ml 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与5-30ml 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至300ml制得;

步骤2:向荧光微球内加入10ug/0.1mg CRP单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后进行超声处理30s复溶,在4℃条件下保存,即可得到CRP单克隆抗体一的荧光微球。

[0019] 所述IgG单克隆抗体的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球20份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中直至溶解,所述Tris-HCl缓冲液由50ml 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与5-30ml 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至300ml制得;

步骤2:向荧光微球内加入10ug-50ug/0.1mg IgG单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后进行超声处理30s复溶,在4℃条件下保存,即可得到IgG单克隆抗体的荧光微球。

[0020] 其中每毫克荧光微球标记的CRP克隆抗体和荧光微球标记的IgG克隆抗体均0.20mg,并且上述荧光微球均选取含有Eu³⁺的聚苯乙烯乳胶微球。

[0021] 所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,按照重量分数,稀释比例为荧光复溶液:荧光微球=2-10:1所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0022] 所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0023] 所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体;

选用包被缓冲液对所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体进行稀释,所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体的浓度均为1mg/ml,按照重量分数,稀释比例为包被

缓冲液:CRP单克隆抗体二=2-10:1。包被缓冲液:羊抗兔IgG多克隆抗体=2-10:1。

[0024] 所述包被缓冲液为含有5%海藻糖、0.1-2L的PH为7.4的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液市售可得。

[0025] 所述免疫层析试纸结合物垫8包括玻璃纤维素膜,值得注意的是为了取得更好的检测效果,对所述玻璃纤维素膜采用预处理,所述预处理包括如下步骤,

将玻璃纤维素膜浸泡在含有0.2%BSA、0.2%Tween-20,0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中,20-25℃条件下干燥,按照每 $1.5 \times 30\text{cm}^2$ 均匀喷洒150 μL 含1%阻断剂、0.5% Tetronic1307与2%BSA的水溶液,再次干燥后,在密封袋中干燥保存。Tetronic1307可向杭州隆基生物技术有限公司购买得到。阻断剂选取 HIER阻断剂可向菲鹏生物股份有限公司购买,或市面上其他公司购买。

[0026] 测试原理:

本试剂盒依据双抗体夹心法原理,利用免疫层析技术定量检测人血清、血浆样本中的C反应蛋白(CRP)的含量。样本中的C反应蛋白与标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体结合形成免疫复合物。免疫复合物自毛细管作用流动进而与测试区CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体反应,经特定波长激发后在反应区产生荧光信号,信号的强弱与样本中C反应蛋白的含量成正比,因此可以测得样本中C反应蛋白的含量。

[0027] 一种C反应蛋白检测试剂盒,还包括有底衬5,所述底衬5上方依次粘贴吸水垫6、醋酸纤维素膜7和免疫层析试纸结合物垫8,所述醋酸纤维素膜7表面平行设置有检测线9和质控线10,所述检测线9由稀释后的CRP单克隆抗体二构成,所述质控线10由稀释后的羊抗兔IgG多克隆抗体构成。所述底衬5的外部设置有卡壳,所述底衬5处于卡壳的底部的卡槽中,所述卡壳连接有外壳1,所述外壳1设置有样品槽2、检测槽3和质控槽4,所述样品槽2、检测槽3和质控槽4均设置有倒角,所述外壳1一体连接有处于检测槽3与质控槽4之间分割栏,所述外壳1还设置有识别标志。

[0028] 检测过程:将样品滴入样品槽2内后,样品与免疫层析试纸结合物垫8内的标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体结合形成免疫复合物。免疫复合物自毛细管作用向测试区方向流动,进而与检测槽3和质控槽4内的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体反应。经特定波长激发后在反应区产生荧光信号,信号的强弱与样本中C反应蛋白的含量成正比,因此可以测得样本中C反应蛋白的含量。所述波长采用365nm波长。

[0029] 实施例2:一种C反应蛋白检测试剂盒,如图1和图2所示包括免疫层析试纸结合物垫8以及测试区,所述免疫层析试纸结合物垫8包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物,CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物采用喷射方式附着到样品垫上,两者重量份数比为1:1,

所述CRP单克隆抗体一的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球50份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中直至溶解,所述Tris-HCl缓冲液由50ml 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与5-30ml 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至300ml制得;

步骤2:向荧光微球内加入10 μg -50 μg /0.1mg CRP单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后进行超声处理30s复溶,在4℃条件下保存,即可得到CRP单克隆抗体一的荧光微球。

[0030] 所述IgG单克隆抗体的荧光微球的制备方法为：

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球50份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中直至溶解,所述Tris-HCl缓冲液由50ml 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与5-30ml 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至300ml制得;

步骤2:向荧光微球内加入25ug/0.1mg IgG单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后进行超声处理30s复溶,在4℃条件下保存,即可得到IgG单克隆抗体的荧光微球。

[0031] 其中每毫克荧光微球标记的CRP克隆抗体和荧光微球标记的IgG克隆抗体均0.20mg,并且上述荧光微球均选取含有Eu³⁺的聚苯乙烯乳胶微球。

[0032] 所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,按照重量分数,稀释比例为荧光复溶液:荧光微球=2-10:1所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0033] 所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0034] 所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体;

选用包被缓冲液对所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体进行稀释,所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体的浓度均为1mg/ml,按照重量分数,稀释比例为包被缓冲液:CRP单克隆抗体二=2-10:1。包被缓冲液:羊抗兔IgG多克隆抗体=2-10:1。

[0035] 所述包被缓冲液为含有5%海藻糖、0.1-2L的PH为7.4的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液市售可得。

[0036] 所述免疫层析试纸结合物垫8包括玻璃纤维素膜,值得注意的是为了取得更好的检测效果,对所述玻璃纤维素膜采用预处理,所述预处理包括如下步骤,

将玻璃纤维素膜浸泡在含有0.2%BSA、0.2%Tween-20,0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中,20-25℃条件下干燥,按照每1.5×30cm²均匀喷洒150μL含1%阻断剂、0.5% Tetronic1307与2%BSA的水溶液,再次干燥后,在密封袋中干燥保存。Tetronic1307可向杭州隆基生物技术有限公司购买得到。阻断剂选取 HIER阻断剂可向菲鹏生物股份有限公司购买,或市面上其他公司购买。

[0037] 测试原理:

本试剂盒依据双抗体夹心法原理,利用免疫层析技术定量检测人血清、血浆样本中的C反应蛋白(CRP)的含量。样本中的C反应蛋白与标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体结合形成免疫复合物。免疫复合物自毛细管作用流动进而与测试区CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体反应,经特定波长激发后在反应区产生荧光信号,信号的强弱与样本中C反应蛋白的含量成正比,因此可以测得样本中C反应蛋白的含量。

[0038] 一种C反应蛋白检测试剂盒,还包括有底衬5,所述底衬5上方依次粘贴吸水垫6、醋酸纤维素膜7和免疫层析试纸结合物垫8,所述醋酸纤维素膜7表面平行设置有检测线9和质控线10,所述检测线9由稀释后的CRP单克隆抗体二构成,所述质控线10由稀释后的羊抗兔

IgG多克隆抗体构成。所述底衬5的外部设置有卡壳,所述底衬5处于卡壳的底部的卡槽中,所述卡壳连接有外壳1,所述外壳1设置有样品槽2、检测槽3和质控槽4,所述样品槽2、检测槽3和质控槽4均设置有倒角,所述外壳1一体连接有处于检测槽3与质控槽4之间分割栏,所述外壳1还设置有识别标志。

[0039] 检测过程:将样品滴入样品槽2内后,样品与免疫层析试纸结合物垫8内的标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体结合形成免疫复合物。免疫复合物自毛细管作用向测试区方向流动,进而与检测槽3和质控槽4内的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体反应。经特定波长激发后在反应区产生荧光信号,信号的强弱与样本中C反应蛋白的含量成正比,因此可以测得样本中C反应蛋白的含量。所述波长采用365nm波长。

[0040] 实施例3:一种C反应蛋白检测试剂盒,如图1和图2所示包括免疫层析试纸结合物垫8以及测试区,所述免疫层析试纸结合物垫8包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物,CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物采用喷射方式附着到样品垫上,两者重量份数比为1:1,

所述CRP单克隆抗体一的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球70份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中直至溶解,所述Tris-HCl缓冲液由50ml 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与5-30ml 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至300ml制得;

步骤2:向荧光微球内加入10ug-50ug/0.1mg CRP单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后进行超声处理30s复溶,在4℃条件下保存,即可得到CRP单克隆抗体一的荧光微球。

[0041] 所述IgG单克隆抗体的荧光微球的制备方法为:

步骤1:活化,按照重量份数称取荧光微球70份,并将所述荧光微球加入20mol/L且含有15%蔗糖的Tris-HCl缓冲液中直至溶解,所述Tris-HCl缓冲液由50ml 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与5-30ml 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至300ml制得;

步骤2:向荧光微球内加入50ug/0.1mg IgG单克隆抗体;

步骤3:将步骤2得到的混合物混匀后,在20-25℃条件下涡旋搅拌1h,离心洗涤2-3次,沉淀后进行超声处理30s复溶,在4℃条件下保存,即可得到IgG单克隆抗体的荧光微球。

[0042] 其中每毫克荧光微球标记的CRP克隆抗体和荧光微球标记的IgG克隆抗体均0.20mg,并且上述荧光微球均选取含有Eu³⁺的聚苯乙烯乳胶微球。

[0043] 所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,按照重量分数,稀释比例为荧光复溶液:荧光微球=2-10:1所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0044] 所述CRP克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球均使用荧光复溶液进行稀释,所述荧光复溶液选取PH为8.0的10mmol/LTris-HCl缓冲液,

所述Tris-HCl缓冲液含有质量分数为2%的BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖。

[0045] 所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体;

选用包被缓冲液对所述CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体进行稀释,所述CRP

单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体的浓度均为1mg/ml,按照重量分数,稀释比例为包被缓冲液:CRP单克隆抗体二=2-10:1。包被缓冲液:羊抗兔IgG多克隆抗体=2-10:1。

[0046] 所述包被缓冲液为含有5%海藻糖、0.1-2L的PH为7.4的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液市售可得。

[0047] 所述免疫层析试纸结合物垫8包括玻璃纤维素膜,值得注意的是为了取得更好的检测效果,对所述玻璃纤维素膜采用预处理,所述预处理包括如下步骤,

将玻璃纤维素膜浸泡在含有0.2%BSA、0.2%Tween-20,0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中,20-25℃条件下干燥,按照每 $1.5 \times 30\text{cm}^2$ 均匀喷洒150 μL 含1%阻断剂、0.5% Tetronic1307与2%BSA的水溶液,再次干燥后,在密封袋中干燥保存。Tetronic1307可向杭州隆基生物技术有限公司购买得到。阻断剂选取 HIER阻断剂可向菲鹏生物股份有限公司购买,或市面上其他公司购买。

[0048] 测试原理:

本试剂盒依据双抗体夹心法原理,利用免疫层析技术定量检测人血清、血浆样本中的C反应蛋白(CRP)的含量。样本中的C反应蛋白与标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体结合形成免疫复合物。免疫复合物自毛细管作用流动进而与测试区CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体反应,经特定波长激发后在反应区产生荧光信号,信号的强弱与样本中C反应蛋白的含量成正比,因此可以测得样本中C反应蛋白的含量。

[0049] 一种C反应蛋白检测试剂盒,还包括有底衬5,所述底衬5上方依次粘贴吸水垫6、醋酸纤维素膜7和免疫层析试纸结合物垫8,所述醋酸纤维素膜7表面平行设置有检测线9和质控线10,所述检测线9由稀释后的CRP单克隆抗体二构成,所述质控线10由稀释后的羊抗兔IgG多克隆抗体构成。所述底衬5的外部设置有卡壳,所述底衬5处于卡壳的底部的卡槽中,所述卡壳连接有外壳1,所述外壳1设置有样品槽2、检测槽3和质控槽4,所述样品槽2、检测槽3和质控槽4均设置有倒角,所述外壳1一体连接有处于检测槽3与质控槽4之间分割栏,所述外壳1还设置有识别标志。

[0050] 检测过程:将样品滴入样品槽2内后,样品与免疫层析试纸结合物垫8内的标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体结合形成免疫复合物。免疫复合物自毛细管作用向测试区方向流动,进而与检测槽3和质控槽4内的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体反应。经特定波长激发后在反应区产生荧光信号,信号的强弱与样本中C反应蛋白的含量成正比,因此可以测得样本中C反应蛋白的含量。所述波长采用365nm波长。

[0051] 测试实验1:

选择同类产品目前市场上获得良好信誉的广州万孚生物技术股份有限公司全程C-反应蛋白(hsCRP+常规CRP)定量检测试剂盒(免疫层析法)作为对照产品比对验证。选择20份临床病人标本,按1到20的顺序编号,用对照产品和实施例1-3同时进行实验,按照1,2,3...20的样本顺序进行测定。对照和实施例1-3的检测结果相关系数 $R^2=0.98$,说明两种方法检测结果有较好的相关性。

[0052] 测试实验2:

选取不同含量的C反应蛋白(至少10组)进行测定,并分别测定相应样本的荧光信号,两者成呈现为正相关。以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用于限制本发明,凡在本发明的设计构思之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

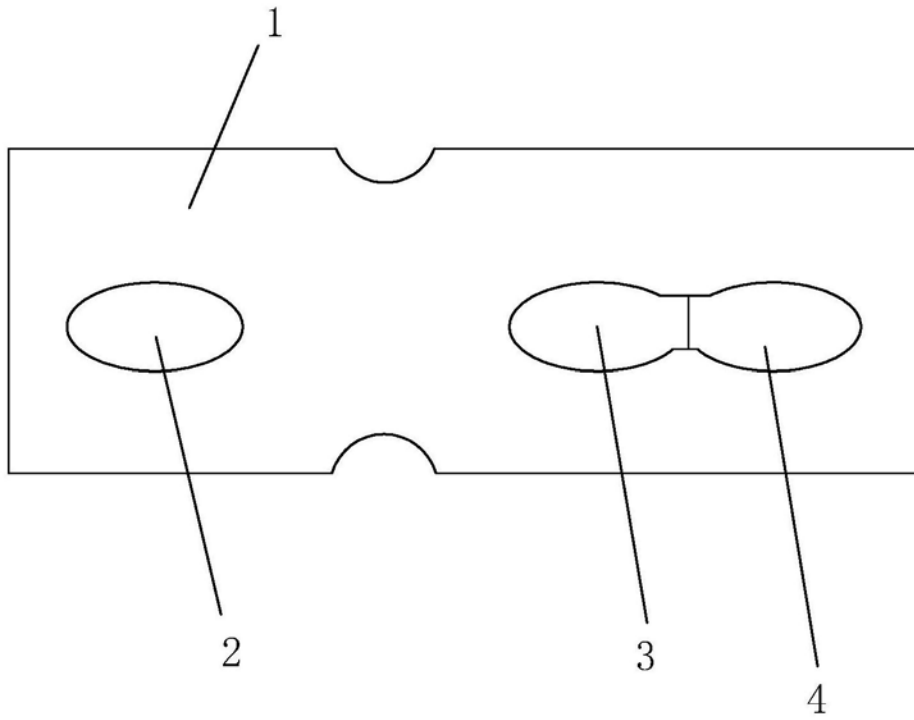


图1

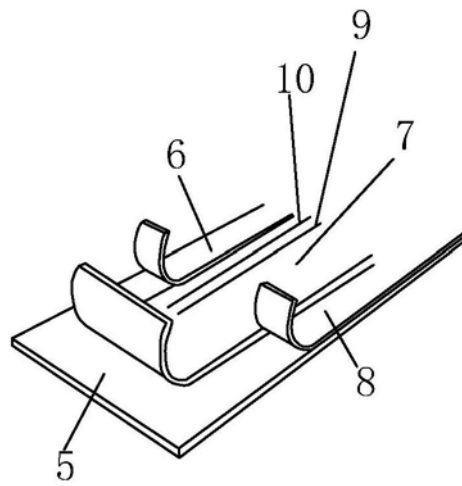


图2

专利名称(译)	C反应蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110187129A	公开(公告)日	2019-08-30
申请号	CN201910561772.5	申请日	2019-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
[标]发明人	王贤理 贾刚 苗准		
发明人	王贤理 贾刚 苗准		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种C反应蛋白检测试剂盒，包括免疫层析试纸结合物垫以及测试区，所述免疫层析试纸结合物垫包括标记CRP单克隆抗体一的荧光微球和标记IgG单克隆抗体的荧光微球两者混合物，两者重量份数比为1:1，所述测试区包括与待测抗原CRP特异性结合的CRP单克隆抗体二和羊抗兔IgG多克隆抗体，本发明具有检测范围大且准确度高的优点。

