



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110244060 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201910641543.4

(22)申请日 2019.07.16

(71)申请人 苏州遵道生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区  
华云路1号桑田岛科创园1号楼301

(72)发明人 刘佳佳 邵伟 王丽君

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理  
有限公司 11246

代理人 姚炜炜

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页 附图2页

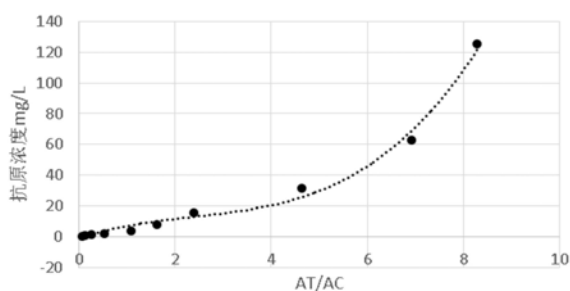
### (54)发明名称

定量联合检测C-反应蛋白与血清淀粉样蛋白A的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法

### (57)摘要

本发明揭示了一种定量检测C-反应蛋白与血清淀粉样蛋白A的试纸条的制备方法,包括:将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线,检测线分别使用CRP和SAA包被抗体,质控线分别使用CRP和SAA捕获抗体的二抗;制备结合垫,其包括:离心洗涤捕获抗体,将纳米增强型时间分辨荧光微球与CRP捕获抗体溶解于PBS,加入EDC室温反应30min-12h;加入封闭液封闭30min-12小时;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释后定量喷涂到第一载体;其中,捕获抗体为CRP捕获抗体和SAA捕获抗体;还包括制备样品垫,包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中,然后烘干。

CRP



1. 定量检测C-反应蛋白与血清淀粉样蛋白A的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括,

将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线, 所述检测线分别使用CRP和SAA包被抗体, 所述质控线分别使用CRP和SAA捕获抗体的二抗;

还包括制备结合垫, 其包括: 使用洗涤液离心洗涤捕获抗体, 所述洗涤液为硼酸缓冲液; 纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH6-8、浓度0.05mol/L的PBS, 加入EDC使终浓度为10mg/ml, 室温反应30min-12h; 加入封闭液封闭30min-12h, 所述封闭液含有0.1-1%F68、10-50mmol/ml甘氨酸; 离心后PBS洗涤沉淀, 使用微球稀释液稀释到30-120倍, 所述微球稀释液为PBS溶液, 所述PBS溶液含有1-3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖; 将稀释的微球定量喷涂到第一载体;

还包括制备样品垫, 其包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%表面活性剂S9的水溶液中, 然后烘干;

其中, 所述捕获抗体分别为CRP捕获抗体和SAA捕获抗体; 所述百分比浓度为质量百分比。

2. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS, 加入EDC使终浓度为10mg/ml, 室温反应30min; 加入封闭液封闭12h, 所述封闭液含有1%F68、50mmol/ml甘氨酸; 离心后PBS洗涤沉淀, 使用微球稀释液稀释到120倍, 所述微球稀释液为PBS溶液, 所述PBS溶液含有3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

3. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH8、浓度0.05mol/L的PBS, 加入EDC使终浓度为10mg/ml, 室温反应12h; 加入封闭液封闭30min, 所述封闭液含有0.1%F68、10mmol/ml甘氨酸; 离心后PBS洗涤沉淀, 使用微球稀释液稀释到30倍, 所述微球稀释液为PBS溶液, 所述PBS溶液含有1%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

4. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述纳米增强型时间分辨荧光微球直径为100nm-300nm。

5. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述捕获抗体与微球混合的重量比是1/5-1/20。

6. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述捕获抗体的洗涤液为PH8-9的0.05硼酸缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述第一载体为玻璃纤维膜。

8. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述第二载体为玻璃纤维膜。

9. 定量检测CRP和SAA的时间分辨免疫层析试纸条, 由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成, 所述底板、硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴, 其特征在于, 所述试纸条由权利要求1-8任一所述的方法制得。

## 定量联合检测C-反应蛋白与血清淀粉样蛋白A的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及临床免疫学检测领域,具体涉及一种采用时间分辨免疫层析技术进行定量检测试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] C-反应蛋白(CRP)是机体非特异性免疫机制的一部分,它结合C-多糖,在 $\text{Ca}^{2+}$ 存在时可结合细胞膜上磷酸胆碱,激活补体的经典途径,增强白细胞的吞噬作用,调节淋巴细胞或单核/巨噬系统功能,促进巨噬细胞组织因子的生成。在动脉粥样硬化斑块中也可检测到CRP。

[0003] 人CRP主要生物学功能:通过与配体(凋亡与坏死的细胞,或入侵的细菌、真菌、寄生虫等的磷酸胆碱)结合,激活补体和单核吞噬细胞系统,将载有配体的病理物质或病原体清除。

[0004] 血清淀粉样蛋白A(SAA)是一种由肝细胞产生后被分泌到血清中的急性时相蛋白,当机体发生感染或损伤时,可在4-6h内迅速升高约1000倍,当机体抗原清除后则迅速降低至正常水平。因此,SAA是反映机体感染情况和炎症恢复的灵敏指标。

[0005] 与目前临床广泛使用的CRP相比较,SAA升高见于病毒、支原体、细菌感染,且敏感性高于CRP,而CRP升高见于细菌感染,对于病毒、支原体等病原体感染CRP不升高或仅轻微升高。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供应用于临床的联合检测CRP与SAA的定量检测试纸条,以提供高灵敏度、特异性的检测,满足临床的需求。

[0007] 为实现上述发明目的,本发明提供定量检测CRP和SAA的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,包括,

[0008] 将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线,所述检测线使用CRP和SAA包被抗体,所述质控线分别使用CRP和SAA捕获抗体的二抗;

[0009] 还包括制备结合垫,其包括:使用洗涤液离心洗涤捕获抗体,所述洗涤液为硼酸缓冲液;纳米增强型时间分辨荧光微球与CRP捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min-12h;加入封闭液封闭30min-12h,所述封闭液含有0.1-1%F68、10-50mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到30-120倍,所述微球稀释液为PBS溶液,所述PBS溶液含有1-3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖;将稀释的微球定量喷涂到第一载体;

[0010] 还包括制备样品垫,其包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中,然后烘干;

[0011] 其中,捕获抗体为CRP捕获抗体和SAA捕获抗体;所述百分比为质量百分比浓度。

[0012] 因活化的一COOH易导致抗体分子之间的聚集,通过改进抗体与微球偶联过程,将活化的羧基保护起来,利于提高抗体的偶联效率。与现有技术相比,采用本方法制备结合垫可减少活化抗体自身的聚集,提高偶联效率。

[0013] 作为本发明一实施方式的进一步改进,纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min;加入封闭液封闭12h,封闭液含有1%F68、50mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到120倍,微球稀释液为PBS溶液,PBS溶液含有3%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

[0014] 作为本发明一实施方式的进一步改进,纳米增强型时间分辨荧光微球与捕获抗体溶解于PH8、浓度0.05mol/L的PBS,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应12h;加入封闭液封闭30min,封闭液含有0.1%F68、10mmol/ml甘氨酸;离心后PBS洗涤沉淀,使用微球稀释液稀释到30倍,微球稀释液为PBS溶液,PBS溶液含有1%吐温20及20%海藻糖或蔗糖。

[0015] 作为本发明一实施方式的进一步改进,纳米增强型时间分辨荧光微球直径为100nm-300nm。

[0016] 作为本发明一实施方式的进一步改进,捕获抗体与微球混合的重量比是1/5-1/20。

[0017] 作为本发明一实施方式的进一步改进,捕获抗体的洗涤液为PH8-9的0.05硼酸缓冲液。

[0018] 作为本发明一实施方式的进一步改进,第一载体为玻璃纤维膜。

[0019] 作为本发明一实施方式的进一步改进,第二载体为玻璃纤维膜。

[0020] 为实现上述目的,本发明一实施方式提供一种定量检测CRP与SAA的时间分辨免疫层析试纸条,由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述底板、硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴,该试纸条由上述任一所述的方法制得。

[0021] 与现有技术相比,本发明通过将双抗体夹心法和时间分辨免疫层析技术引入CRP与SAA的检测中,结合荧光检测仪,实现了CRP与SAA的定量检测,且灵敏度高,批内、批间差小,为临床使用提供了极大便利。

## 附图说明

[0022] 图1是本发明实施例1CRP检测的标准曲线图;

[0023] 图2是本发明实施例1SAA检测的标准曲线图;

[0024] 图3是本发明实施例2CRP检测的标准曲线图;

[0025] 图4是本发明实施例2SAA检测的标准曲线图。

## 具体实施方式

[0026] 以下将结合附图所示的具体实施方式对本发明进行详细描述。但这些实施方式并不限制本发明,本领域的普通技术人员根据这些实施方式所做出的结构、方法、或功能上的变换均包含在本发明的保护范围内。

[0027] 本发明提供的试纸条由塑料卡壳、底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC膜)和吸水纸组成。结合垫上包被有纳米增强型时间分辨荧光微球标记的CRP捕获抗体与SAA捕获抗体(capture antibody)。NC膜上包被有检测线和质控线,其中,检测线固定有识别不同抗

原表位的CRP与SAA包被抗体(test antibody),质控线固定有能结合抗CRP与SAA捕获抗体的二抗。

[0028] 结合垫为玻璃纤维膜,其上喷涂了连接有抗体的纳米增强型时间分辨微球。

[0029] NC膜上包被的检测线和质控线相互平行,并且相互之间保持一定间隔。

[0030] 纳米增强型时间分辨荧光微球选用直径100nm-300nm的微球。

[0031] 试纸条装于塑料卡壳内,在湿度小于35%的环境中组装。

[0032] 本发明的试纸条由如下步骤制得:

[0033] NC膜上制备检测线和质控线,检测线分别为CRP与SAA包被抗体,质控线为能结合CRP与SAA捕获抗体的二抗;

[0034] 玻璃纤维膜上喷涂连接有CRP与SAA捕获抗体的纳米增强型时间分辨微球,制得结合垫;

[0035] 处理玻璃纤维膜,使玻璃纤维膜上含有一定量的表面活性剂等,制得样品垫;

[0036] 底板、NC膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴,切割成相应尺寸,装入塑料卡壳。

[0037] 其中,NC膜上包被检测线、质控线的方法包括如下步骤:

[0038] 检测线使用CRP与SAA包被抗体,用量为每检测线0.5-2.5mg。抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液选择PBS+(1-10)%海藻糖+(0-5)%NaCl。

[0039] 质控线使用抗CRP与SAA捕获抗体的二抗,用量为每质控线0.5-2.5mg。高于此浓度的抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液选择PBS+(1-10)%海藻糖+(0-5)%NaCl。

[0040] 使用定量喷膜仪以1-2 $\mu$ l/cm的浓度将上述二种抗体分划于NC膜上,保持两线间隔0.5cm以上。

[0041] 25-60℃烘干1-5小时,干燥保存。

[0042] 结合垫的制作方法包括如下步骤:

[0043] 制作CRP结合垫:

[0044] CRP捕获抗体使用Minipore®的超滤离心管洗涤3遍,洗涤液为PH8-9的0.05硼酸缓冲液;

[0045] 纳米增强型时间分辨荧光微球与CRP捕获抗体溶解于PH6-8、浓度0.05mol/L的PBS,控制抗体与微球重量比为1/5-1/20,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应30min-12h。

[0046] 加入封闭液封闭,反应30min-12小时。封闭液含有0.1-1%质量百分比浓度的F68、10-50mmol/ml甘氨酸。

[0047] 15000-25000rpm/min离心10min,去上清,PBS洗涤2遍;

[0048] 使用微球稀释液稀释到30-120倍,微球稀释液配方:PBS+20%海藻糖或者蔗糖+1-3%吐温20。

[0049] 将上述溶液定量(3.0-8.0 $\mu$ l/cm)喷涂到玻纤上制成结合垫。25-60℃烘干1-4小时,干燥保存。

[0050] 同上述步骤制作SAA结合垫。

[0051] 样品垫的制作方法包括如下步骤:

[0052] 配制含有0.9%NaCl+0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液；

[0053] 将玻璃纤维膜浸泡于上述溶液中；

[0054] 取出玻璃纤维膜，25-60℃烘干，至重量不再变化，取出切割成1.7cm x 30cm宽度的长条备用。

[0055] 使用时，在样品垫上加入待测样品液。在毛细作用下，样品液向吸水纸一端泳动，当待测样品中含有CRP和/或SAA时，CRP和/或SAA与微球上的捕获抗体形成抗原-抗体复合物，随着层析作用，复合物向前移动，到达检测线时与对应的包被抗体(test antibody)形成抗体-抗原-抗体夹心复合物，聚集在检测线T线处。未结合的微球继续前行，到达质控线C时，二抗与微球上的捕获抗体结合，在C线处出现聚集。整个反应在15分钟内完成。进行上机读卡，T线和C线都会产生相应的荧光信号，荧光检测仪会根据定标卡上的信息将实际检测荧光信号值带入预设的标准曲线中计算出CRP和SAA的含量。

[0056] 本发明通过应用纳米增强型时间分辨荧光微球，将时间分辨免疫层析技术引入CRP和SAA的检测中，结合时间分辨荧光免疫检测仪，有效的提高了平台灵敏度，提升对低值荧光信号的检测效果，从而实现了CRP和SAA的简单、快速、低成本检测，且灵敏度高，批内、批间差小，为临床使用提供了极大便利，为实现床旁检测提供了方法。

[0057] 实施例1

[0058] 本实施例的试纸条由如下步骤制得：

[0059] NC膜上制备检测线和质控线。

[0060] 其中，检测线使用CRP与SAA包被抗体，浓度为0.5mg，高于此浓度的抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用，稀释液是PBS+1%海藻糖。

[0061] 质控线使用抗CRP与SAA捕获抗体的二抗，用量为0.5mg。抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用，稀释液是PBS+1%海藻糖。

[0062] 使用定量喷膜仪以1ul/cm数量将两者划于NC膜上，保持两线间隔0.5cm以上，距离NC膜边缘0.2mm以上。

[0063] 60℃烘干1小时，干燥保存。

[0064] 另一方面，制备结合垫。CRP捕获抗体使用Minipore®的超滤离心管洗涤3遍，洗涤液为PH8的0.05硼酸缓冲液；

[0065] 选择100nm的纳米增强型时间分辨荧光微球，与CRP捕获抗体溶解于PH6、浓度0.05mol/L的PBS，控制抗体与微球重量比为1/5，加入EDC使终浓度为10mg/ml，室温反应30min。

[0066] 加入封闭液封闭，反应12小时。封闭液含有1%质量百分比浓度的F68、50mmol/ml甘氨酸。

[0067] 15000rpm/min离心10min，去上清，PBS洗涤2遍；

[0068] 使用微球稀释液稀释到120倍，微球稀释液配方：PBS+20%海藻糖或者蔗糖+3%吐温20。

[0069] 定量(8.0ul/cm)喷涂到玻纤上制成结合垫。60℃烘干4小时，干燥保存。

[0070] 同上述步骤制作SAA结合垫。

[0071] 另一方面，处理玻璃纤维膜，使玻璃纤维膜上含有一定量的表面活性剂等，以制备样品垫。

- [0072] 具体地,配制含有0.9%NaCl+0.5%的表面活性剂S9的水溶液;
- [0073] 将玻璃纤维膜浸泡上述溶液中;
- [0074] 取出玻璃纤维膜,25℃烘干,至重量不再变化,取出切割成1.7cm\*30cm宽度的长条备用。
- [0075] 最后,将底板、NC膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴,切割成3.7mm,装入塑料卡壳。
- [0076] 参阅图1及图2,采用本实施例制得的试纸条绘制标准曲线。
- [0077] CRP标准品及质控品采用如下步骤制得:
- [0078] 购买CRP重组蛋白,使用超纯水配置成1mg/ml的储存原液,用PBS稀释到工作浓度,使用CRP检测试剂(Orion)检测确定浓度,稀释到指定浓度制成标准品和质控品。
- [0079] SAA标准品及质控品采用如下步骤制得:
- [0080] 购买SAA重组蛋白,使用超纯水配置成1mg/ml的储存原液,用PBS稀释到工作浓度,使用SAA检测试剂(Simens)检测确定浓度,稀释到指定浓度制成标准品和质控品。
- [0081] 具体的,采用制得的时间分辨免疫层析试纸条,检测不同浓度的CRP与SAA标准品。取CRP 10个不同浓度的标准品,分别为0ng/L、0.48828125ng/L、0.9765625ng/L、1.953125ng/L、3.90625ng/L、7.8125ng/L、15.625ng/L、31.25ng/L、62.5ng/L、125ng/L,每个浓度做5个平行样;取SAA 10个不同浓度的标准品,分别为0mg/L、0.9765625mg/L、1.953125mg/L、3.90625mg/L、7.8125mg/L、15.625mg/L、31.25mg/L、62.5mg/L、125mg/L、250mg/L,每个浓度做5个平行样。膜层析反应15分钟后,仪器读取质控线C、检测线T信号,以检测的样品荧光值信号比值T/C为横坐标,CRP或SAA标准品浓度为纵坐标,建立方程并拟合成标准曲线。
- [0082] 图1标准曲线 $y=0.4276x^3-3.0498x^2+10.753x-1.0872$ ,  $R^2=0.9926$ , y代表加入的抗原浓度, x代表试纸条上T线与C线的荧光强度比值。结果显示,该标准曲线的相关系数 $R^2$ 大于0.99,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含CRP浓度进行定量分析。
- [0083] 图2标准曲线 $y=2.9821x^3-12.606x^2+28.477x-1.0872$ ,  $R^2=0.998$ 。结果显示,该标准曲线的相关系数 $R^2$ 大于0.99,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含SAA浓度进行定量分析。
- [0084] 实施例2
- [0085] 本实施例的试纸条由如下步骤制得:
- [0086] NC膜上制备检测线和质控线。
- [0087] 其中,检测线使用CRP与SAA包被抗体,浓度为2.5mg,高于此浓度的抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液是PBS+1%海藻糖+5%NaCl。
- [0088] 质控线使用抗CRP与SAA捕获抗体的二抗,用量为2.5mg。抗体使用稀释液稀释到浓度范围后使用,稀释液是PBS+10%海藻糖+5%NaCl。
- [0089] 使用定量喷膜仪以2ul/cm数量将两者划于NC膜上,保持两线间隔0.5cm以上,距离NC膜边缘0.2mm以上。
- [0090] 25℃烘干5小时,干燥保存。
- [0091] 另一方面,制备结合垫。CRP捕获抗体使用Minipore®的超滤离心管洗涤3遍,洗涤液为PH9的0.05硼酸缓冲液;

[0092] 选择300nm的纳米增强型时间分辨荧光微球,与CRP捕获抗体溶解于PH8、浓度0.05mol/L的PBS,控制抗体与微球重量比为1/20,加入EDC使终浓度为10mg/ml,室温反应12h。

[0093] 加入封闭液封闭,反应30min。封闭液含有0.1%质量百分比浓度的F68、10mmol/ml甘氨酸。

[0094] 25000rpm/min离心10min,去上清,PBS洗涤2遍;

[0095] 使用微球稀释液稀释到30倍,微球稀释液配方:PBS+20%海藻糖或者蔗糖+1%吐温20。

[0096] 定量(3.0ul/cm)喷涂到玻纤上制成结合垫。25℃烘干1h,干燥保存。

[0097] 同上述步骤制作SAA结合垫。

[0098] 另一方面,处理玻璃纤维膜,使玻璃纤维膜上含有一定量的表面活性剂等,以制备样品垫。

[0099] 具体地,配制含有0.9%NaCl+3%的表面活性剂S9的水溶液;

[0100] 将玻璃纤维膜浸泡上述溶液中;

[0101] 取出玻璃纤维膜,60℃烘干,至重量不再变化,取出切割成1.7cm\*30cm宽度的长条备用。

[0102] 最后,将底板、NC膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次交错黏贴,切割成3.7mm,装入塑料卡壳。

[0103] 参图3及图4,采用本实施例制得的试纸条绘制标准曲线,方法同实施例1。

[0104] 图3标准曲线 $y=0.3846x^3-3.0861x^2+11.735x-2.2828$ , $R^2=0.9946$ 。结果显示,该标准曲线的相关系数 $R^2$ 大于0.99,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含CRP浓度进行定量分析。

[0105] 图4标准曲线 $y=1.9698x^3-10.173x^2+28.592x-1.0872$ , $R^2=0.9909$ 。结果显示,该标准曲线的相关系数 $R^2$ 大于0.99,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含SAA浓度进行定量分析。

[0106] 实施例3

[0107] CRP质控品浓度分别为1mg/L(质控品1)和10mg/L(质控品2)。SAA质控品浓度分别为10mg/L(质控品3)和50mg/L(质控品4)。

[0108] 采用上述实施例1及2的试纸条对质控品1至4分别进行CRP及SAA检测,以验证准确度。参表1及表2,结果显示,本发明的试纸条具有较高的准确度。

[0109] 表1:本发明试纸条CRP检测准确度验证

[0110]		实施例 1	实施例 2
--------	--	-------	-------



[0111]

测定次数	质控品 1	质控品 2	质控品 1	质控品 2
1	1.023	10.891	0.975	10.669
2	1.024	10.334	0.950	9.896
3	1.085	9.557	1.072	9.862
平均值 (mg/L)	1.044	10.261	0.999	10.142
靶值 (mg/L)	1	10	1	10
相对偏差 (B%)	4.40	2.61	-0.10	1.42

[0112] 表2:本发明试纸条SAA检测准确度验证

[0113]

	实施例 1		实施例 2	
测定次数	质控品 3	质控品 4	质控品 3	质控品 4
1	9.244	53.406	10.020	54.530
2	9.435	51.178	10.529	47.244
3	10.785	47.529	10.466	47.834
平均值 (mg/L)	9.821	50.704	10.338	49.869
靶值 (mg/L)	10	50	10	50

[0114]	相对偏差 (B%)	-1.79	1.41	3.38	-0.26
--------	--------------	-------	------	------	-------

[0115] 实施例4

[0116] 以PBS稀释标准品至目标浓度作为待测样品,对实施例1及2的试纸条进行重复性试验,重复次数n=10。

[0117] 参表3及表4,结果显示 $CV \leq 15.0\%$ ,本发明的试纸条重复性好。

[0118] 表3:本发明试纸条CRP检测重复性验证

[0119]	测定次数	实施例 1	实施例 2	测定次数	实施例 1	实施例 2
	1	1.014	1.026	1	9.562	10.564
	2	1.031	0.979	2	10.503	10.759
	3	0.920	1.085	3	10.776	9.330
	4	1.071	0.953	4	9.304	9.985
	5	0.904	1.082	5	9.666	9.718
	6	1.018	0.916	6	9.555	9.644
	7	1.077	0.993	7	10.106	10.465
	8	1.087	1.054	8	10.033	10.736
	9	1.018	0.928	9	10.797	10.150
	10	1.036	1.023	10	9.420	9.960
	平均值 (mg/L)	1.018	1.004	平均值 (ng/mL)	9.972	10.131
	标准差	0.062	0.060	标准差(S)	0.559	0.490

	(S)				
[0120]	变异系数 (CV)	6.05%	6.02%	变异系数 (CV)	5.61% 4.84%

[0121] 表4: 本发明试纸条SAA检测重复性验证

[0122]

测定次数	实施例 1	实施例 2	测定次数	实施例 1	实施例 2
1	10.456	9.054	1	45.904	48.969
2	9.835	9.312	2	49.762	50.762
3	10.331	9.141	3	52.833	54.506
4	10.045	9.717	4	49.999	50.152
5	9.369	10.622	5	46.379	52.016
6	10.182	10.987	6	50.518	51.582
7	9.920	9.543	7	48.704	51.411
8	9.997	9.364	8	49.553	52.212
9	10.891	10.934	9	46.876	50.234
10	10.624	9.756	10	53.094	52.701
平均值 (mg/L)	10.165	9.843	平均值 (ng/mL)	49.362	51.455
标准差 (S)	0.434	0.734	标准差(S)	2.481	1.550
变异系数	4.27%	7.45%	变异系数	5.03%	3.01%

[0123]

(CV)			(CV)		
------	--	--	------	--	--

[0124] 实施例5

[0125] 采用阴性样本分别对实施例1及2的试纸条进行灵敏度检测,检测次数 $n=20$ ,得到试纸条相应的测量结果的相对荧光值,分别计算其测定结果平均值AVERAGE和标准偏差SD,得出AVERAGE+2SD所对应的相对荧光值;根据图1到图4得到的定标曲线方程计算出 $\bar{X}+2SD$ 所对应的浓度值,即为最低检出限。

[0126] 参表5及表6,结果显示,本发明的试纸条最低检出限能达到CRP小于1mg/L,SAA小于1mg/L。

[0127] 表5:本发明试纸条CRP检测灵敏度验证

[0128]

标本号	实施例 1	实施例 2
$X_1$	0.071	0.046
$X_2$	0.008	0.076
$X_3$	0.041	0.001
$X_4$	0.050	0.014
$X_5$	0.065	0.035
$X_6$	0.005	0.006
$X_7$	0.048	0.045
$X_8$	0.004	0.013
$X_9$	0.048	0.079
$X_{10}$	0.061	0.072

[0129]

$X_{11}$	0.071	0.014
$X_{12}$	0.062	0.069
$X_{13}$	0.072	0.000
$X_{14}$	0.055	0.062
$X_{15}$	0.012	0.016
$X_{16}$	0.063	0.015
$X_{17}$	0.030	0.060
$X_{18}$	0.041	0.047
$X_{19}$	0.025	0.059
$X_{20}$	0.063	0.037
AVERAGE	0.045	0.038
SD	0.023	0.027
AVERAGE+2SD	0.091	0.092
最低检出浓度 mg/L	0.042	0.109

[0130] 表6:本发明试纸条SAA检测灵敏度验证

[0131]

标本号	实施例 1	实施例 2
$X_1$	0.049	0.036
$X_2$	0.078	0.076
$X_3$	0.027	0.031
$X_4$	0.062	0.007
$X_5$	0.018	0.065

[0132]

$X_6$	0.068	0.018
$X_7$	0.006	0.033
$X_8$	0.078	0.069
$X_9$	0.064	0.035
$X_{10}$	0.072	0.072
$X_{11}$	0.051	0.002
$X_{12}$	0.045	0.042
$X_{13}$	0.017	0.003
$X_{14}$	0.012	0.067
$X_{15}$	0.037	0.029
$X_{16}$	0.040	0.019
$X_{17}$	0.031	0.050
$X_{18}$	0.007	0.055
$X_{19}$	0.045	0.042
$X_{20}$	0.005	0.030
AVERAGE	0.041	0.039
SD	0.025	0.023
AVERAGE+2SD	0.090	0.085
最低检出浓度 mg/L	0.027	0.039

[0133] 应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施方式中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可

以理解的其他实施方式。

[0134] 上文所列出一系列的详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施方式的具体说明，它们并非用以限制本发明的保护范围，凡未脱离本发明技艺精神所作的等效实施方式或变更均应包含在本发明的保护范围之内。

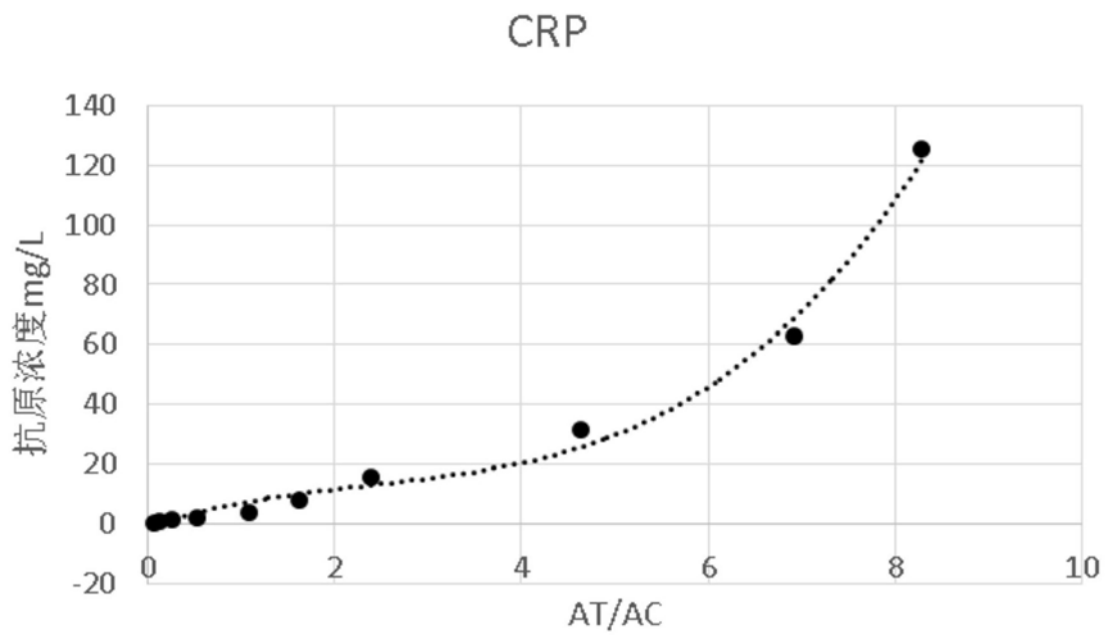


图1

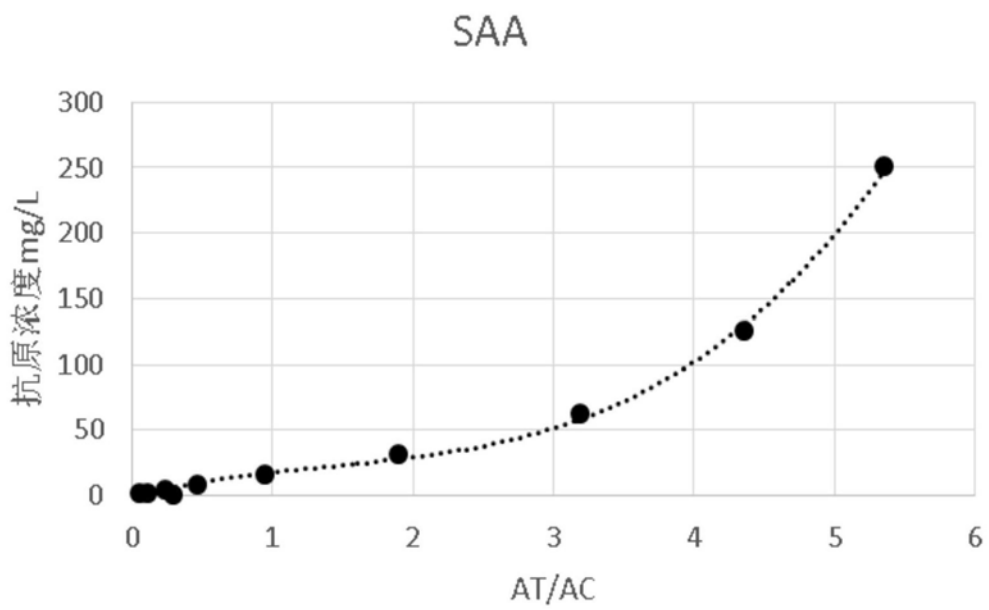


图2



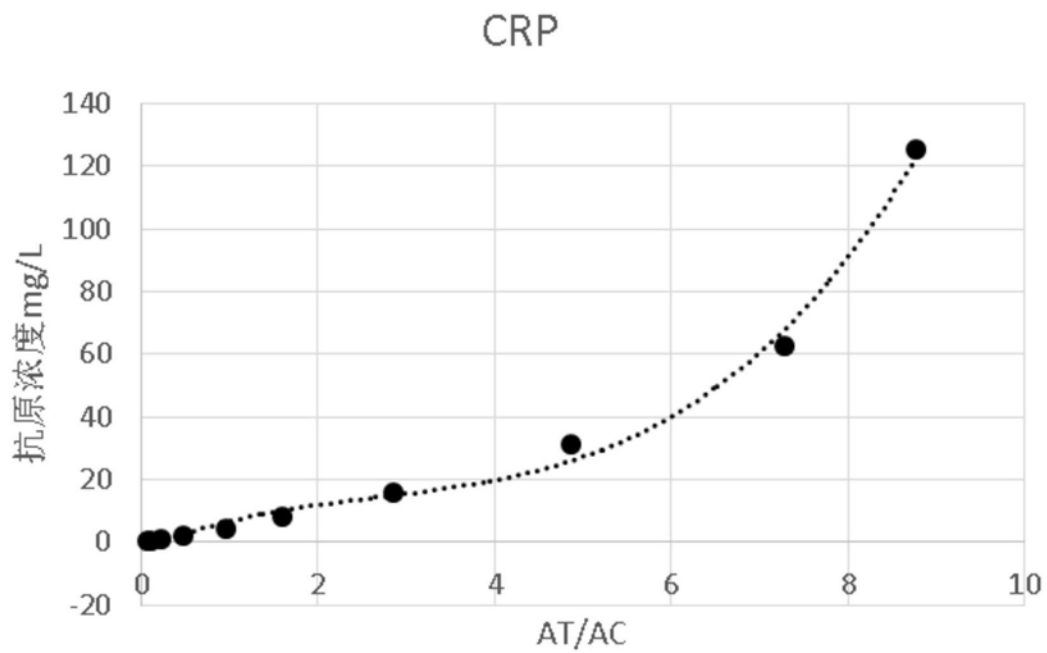


图3

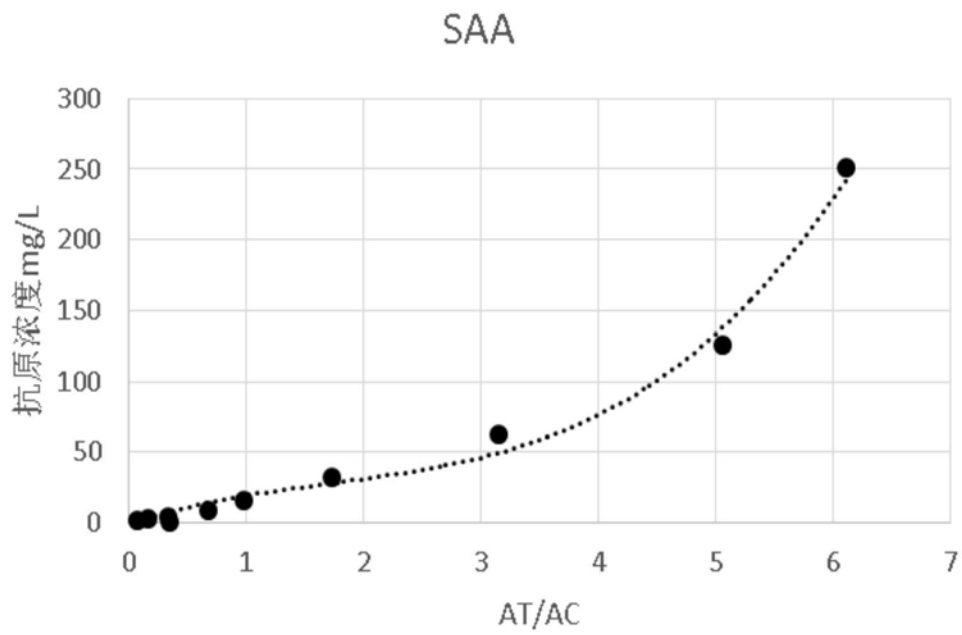


图4

专利名称(译)	定量联合检测C-反应蛋白与血清淀粉样蛋白A的时间分辨免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110244060A</a>	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910641543.4	申请日	2019-07-16
[标]发明人	刘佳佳 邵伟 王丽君		
发明人	刘佳佳 邵伟 王丽君		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54346 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/6854 G01N2333/4737		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

# 摘要(译)

本发明揭示了一种定量检测C-反应蛋白与血清淀粉样蛋白A的试纸条的制备方法，包括：将硝酸纤维素膜包被检测线与质控线，检测线分别使用CRP和SAA包被抗体，质控线分别使用CRP和SAA捕获抗体的二抗；制备结合垫，其包括：离心洗涤捕获抗体，将纳米增强型时间分辨荧光微球与CRP捕获抗体溶解于PBS，加入EDC室温反应30min-12h；加入封闭液封闭30min-12小时；离心后PBS洗涤沉淀，使用微球稀释液稀释后定量喷涂到第一载体；其中，捕获抗体为CRP捕获抗体和SAA捕获抗体；还包括制备样品垫，包括将第二载体浸泡于含有0.9%NaCl和0.5-3%的表面活性剂S9的水溶液中，然后烘干。

