



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106442999 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610793112.6

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 杨世东

地址 262199 山东省潍坊市安丘市健康路
259号

(72)发明人 杨世东

(74)专利代理机构 贵阳派腾阳光知识产权代理
事务所(普通合伙) 52110

代理人 管宝伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/559(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,所述试剂盒由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成,其其特征在于,所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,划出分布四点分别制有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体;所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体。本发明利用胶体金免疫渗滤的原理,通过对APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体的免疫检测,从肉眼观察显色反应来快速直接诊断类风湿关节炎,操作简单,灵敏度高。

1. 一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,该试剂盒由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成,其特征就在于,所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,划出分布四点分别包被有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体;所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,其特征就在于,所述APF单特异性抗体为抗核周因子抗体的单克隆抗体,所述抗Sa特异性抗体为从人胎盘中提取的抗Sa抗原制备得到的抗Sa单克隆抗体,所述抗CⅡ特异性抗体为从截肢患者骨关节软骨Ⅱ型抗原制备得到的抗CⅡ单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,其特征就在于,所述胶体金标记的APF特异性抗体被胶体金标记的浓度为50-70 $\mu\text{g}/\text{mI}$,胶体金标记的抗Sa特异性抗体被胶体金标记的浓度为60-80 $\mu\text{g}/\text{mI}$,胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体被胶体金标记的浓度为60-80 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,其特征就在于,所述处理液是pH在6.9-8.3的PBS缓冲液,其中还含有2.2%的牛血清蛋白(BSA)和0.1-0.2%的吐温-20。

5. 根据权利要求1所述的一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,其特征就在于,所述胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mI,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mI,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm。

6. 根据权利要求1所述的一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,其特征就在于,所述固相膜联检反应装置的制备:

(1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.2-1.6mg/mL;

(2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,所述质控区在远离其他三点的位置上;

(3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

7. 根据权利要求1-6所述的一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒的制备方法为:

步骤一:固相膜联检反应装置的制备:

(1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.2-1.6mg/mL;

(2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,所述质控区在远离其他三点的位置上;

(3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤

纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

步骤二:胶体金标记物试剂的制备方法:

(1) 胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm,备用;

(2) 胶体金标记抗体的制备方法为:将(1)制备好的胶体金溶液取出20mL的量共三份,取APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体在磁力搅拌条件下分别将其加入上述所取的三份胶体金溶液中,使其最终浓度分别为50-70 μ g/mL、60-80 μ g/mL、60-80 μ g/mL,常温下搅拌20min,再分别加入质量浓度为10%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.7%,搅拌8min,后以5000r/min的转速高速离心,去上清液后将沉淀溶于处理液中保存,用超滤膜过滤后4℃下保存,即为所述的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体,保存备用。

一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及骨科疾病检测技术领域,具体涉及一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒。

背景技术

[0002] 风湿性关节炎是一种常见的急性或慢性结缔组织炎症,风湿性关节炎广义上应该包括类风湿性关节炎,可反复发作并累及心脏。临床以关节和肌肉游走性酸楚、重著、疼痛为特征,属变态反应性疾病,是风湿热的主要表现之一,多以急性发热及关节疼痛起病。类风湿关节炎(RA)是一种病因未明的慢性、以炎性滑膜炎为主的系统性疾病,其特征是手、足小关节的多关节、对称性、侵袭性关节炎症,经常伴有关节外器官受累及血清类风湿因子阳性,可以导致关节畸形及功能丧失,其症状体征为可伴有体重减轻、低热及疲乏感等全身症状。RA的发病可能与遗传、感染、性激素等有关,RA关节炎的病理主要有滑膜衬里细胞增生、间质大量炎性细胞浸润,以及微血管的新生、血管翳的形成及软骨和骨组织的破坏等。类风湿关节炎在女性中好发,发病率为男性的2~3倍,可发生于任何年龄,高发年龄为40~60岁。

[0003] 类风湿性关节炎目前的检查方法包括血、尿等常规检查,自身抗体RA检测,影像学检查等,类风湿性关节炎的免疫检查准确率低是限制其免疫学诊断的障碍,抗核周因子抗体、抗Sa抗体和抗CⅡ抗体在类风湿性关节炎诊断中具有很高的特异性,可作为检测类风湿性关节炎患者的重要指标,同时,与类风湿性关节炎的严重程度有一定的相关性,可作为类风湿性关节炎病情活动程度的监测指标,这对帮助类风湿性关节炎患者康复治疗有重要的意义和参考价值,故针对现有技术的不足,研制一种更加快速准确的检测类风湿性关节炎的方法是我们面临的问题。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题就是提供一种多抗体检测类风湿性关节炎的试剂盒。

[0005] 本发明的技术方案为:一种多抗体检测类风湿性关节炎的试剂盒,由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成,所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,划出分布四点分别包被有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体;所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体。

[0006] 进一步的,所述APF单特异性抗体为抗核周因子抗体的单克隆抗体,所述抗Sa特异性抗体为从人胎盘中提取的抗Sa抗原制备得到的抗Sa单克隆抗体,所述抗CⅡ特异性抗体为从截肢患者骨关节软骨Ⅱ型抗原制备得到的抗CⅡ单克隆抗体。

[0007] 进一步的,所述胶体金标记的APF特异性抗体被胶体金标记的浓度为50-70μg/mL,胶体金标记的抗Sa特异性抗体被胶体金标记的浓度为60-80μg/mL,胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体被胶体金标记的浓度为60-80μg/mL。

[0008] 进一步的,所述处理液是pH在6.9-8.3的PBS缓冲液,其中还含有2.2%的牛血清蛋白(BSA)和0.1-0.2%的吐温-20。

[0009] 进一步的,所述胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm。

[0010] 进一步的,所述固相膜联检反应装置的制备:

[0011] (1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0℃下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.2-1.6mg/mL;

[0012] (2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为20-30μI,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为30-35μI,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为20-30μI,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为30-40μI,所述质控区在远离其他三点的位置上;

[0013] (3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0014] 一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒的制备方法为:

[0015] 步骤一:固相膜联检反应装置的制备:

[0016] (1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0℃下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.2-1.6mg/mL;

[0017] (2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为20-30μI,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为30-35μI,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为20-30μI,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为30-40μI,所述质控区在远离其他三点的位置上;

[0018] (3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0019] 步骤二:胶体金标记物试剂的制备方法:

[0020] (1) 胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm,备用;

[0021] (2) 胶体金标记抗体的制备方法为:将(1)制备好的胶体金溶液取出20mL的量共三份,取APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体在磁力搅拌条件下分别将其加入上述所取的三份胶体金溶液中,使其最终浓度分别为50-70μg/mL、60-80μg/mL、60-80μg/mL,常温下搅拌20min,再分别加入质量浓度为10%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.7%,搅拌8min,后以5000r/min的转速高速离心,去上清液后将沉淀溶于处理液中保存,用超滤膜过滤后4℃下保存,即为所述的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体,保存备用。

[0022] 本发明的试剂盒使用方法:取出固相膜联检反应装置,水平放置,向其对应的四个

孔内加入三滴处理液,使其表面湿润,再加入分离得到的待测血清40 μ I,等其渗滤入膜内,再加入三滴处理液,稍等片刻后加入两滴胶体金标记物试剂,最后再加入两滴处理液,5min内观察相应位置上有无红色斑点,若检测区1、检测区3和质控区有显色反应则判定为阳性,检测区2的显色反应可作为病情活动度的监测,若质控区未见显色反应,则判断检测无效。

[0023] 本发明的有益效果体现在:本发明利用胶体金免疫渗滤的原理,通过对APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体的免疫检测,从肉眼观察显色反应来快速直接诊断类风湿关节炎,操作简单,灵敏度高。实验表明,抗核周因子抗体、抗Sa抗体和抗CⅡ抗体在类风湿关节炎诊断中具有很高的特异性,三者联合检测对类风湿关节炎的诊断具有重要的参考价值,同时,抗Sa抗体还与类风湿关节炎的严重程度相关,不仅可作为类风湿关节炎的诊断指标,还可对病情的变化进行实时快速监测,对类风湿关节炎的治疗具有很大的帮助。

具体实施方式

[0024] 实施例1:一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成,所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,划出分布四点分别包被有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体;所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体。

[0025] 其中,所述APF单特异性抗体为抗核周因子抗体的单克隆抗体,所述抗Sa特异性抗体为从人胎盘中提取的抗Sa抗原制备得到的抗Sa单克隆抗体,所述抗CⅡ特异性抗体为从截肢患者骨关节软骨Ⅱ型抗原制备得到的抗CⅡ单克隆抗体;所述胶体金标记的APF特异性抗体被胶体金标记的浓度为50 μ g/mL,胶体金标记的抗Sa特异性抗体被胶体金标记的浓度为60 μ g/mL,胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体被胶体金标记的浓度为60 μ g/mL;所述处理液是pH在6.9的PBS缓冲液,其中还含有2.2%的牛血清蛋白(BSA)和0.1%的吐温-20;所述胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm;所述固相膜联检反应装置的制备:(1)将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0 $^{\circ}$ C下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.2mg/mL,(2)在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为20 μ I,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为30 μ I,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为20 μ I,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为30 μ I,所述质控区在远离其他三点的位置上;(3)将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0026] 一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒的制备方法为:

[0027] 步骤一:固相膜联检反应装置的制备:

[0028] (1)将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0 $^{\circ}$ C下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.2mg/mL;

[0029] (2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为20 μ I,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为30 μ I,抗C II 特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为20 μ I,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为30 μ I,所述质控区在远离其他三点的位置上;

[0030] (3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0031] 步骤二:胶体金标记物试剂的制备方法:

[0032] (1) 胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mI,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mI,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm,备用;

[0033] (2) 胶体金标记抗体的制备方法为:将(1)制备好的胶体金溶液取出20mL的量共三份,取APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗C II 特异性抗体在磁力搅拌条件下分别将其加入上述所取的三份胶体金溶液中,使其最终浓度分别为50 μ g/mI、60 μ g/mI、60 μ g/mI,常温下搅拌20min,再分别加入质量浓度为10%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.7%,搅拌8min,后以5000r/min的转速高速离心,去上清液后将沉淀溶于处理液中保存,用超滤膜过滤后4 $^{\circ}$ C下保存,即为所述的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗C II 特异性抗体,保存备用。

[0034] 实施例2:一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成,所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,划出分布四点分别包被有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗C II 特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体;所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗C II 特异性抗体。

[0035] 其中,所述APF单特异性抗体为抗核周因子抗体的单克隆抗体,所述抗Sa特异性抗体为从人胎盘中提取的抗Sa抗原制备得到的抗Sa单克隆抗体,所述抗C II 特异性抗体为从截肢患者骨关节软骨 II 型抗原制备得到的抗C II 单克隆抗体;所述胶体金标记的APF特异性抗体被胶体金标记的浓度为60 μ g/mI,胶体金标记的抗Sa特异性抗体被胶体金标记的浓度为70 μ g/mI,胶体金标记的抗C II 特异性抗体被胶体金标记的浓度为70 μ g/mI;所述处理液是pH在7.6的PBS缓冲液,其中还含有2.2%的牛血清蛋白(BSA)和0.15%的吐温-20;所述胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mI,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mI,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm;所述固相膜联检反应装置的制备:(1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗C II 特异性抗体分别在处理液中透析处理,0 $^{\circ}$ C下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.4mg/mL,(2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为25 μ I,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为32.5 μ I,抗C II 特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为25 μ I,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为35 μ I,所述质控区在远离其他三点的位置上;(3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对

应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0036] 一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒的制备方法为:

[0037] 步骤一:固相膜联检反应装置的制备:

[0038] (1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0℃下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.4mg/mL;

[0039] (2) 在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为25μI,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为32.5μI,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为25μI,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为35μI,所述质控区在远离其他三点的位置上;

[0040] (3) 将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0041] 步骤二:胶体金标记物试剂的制备方法:

[0042] (1) 胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm,备用;

[0043] (2) 胶体金标记抗体的制备方法为:将(1)制备好的胶体金溶液取出20mL的量共三份,取APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体在磁力搅拌条件下分别将其加入上述所取的三份胶体金溶液中,使其最终浓度分别为60μg/mL、70μg/mL、70μg/mL,常温下搅拌20min,再分别加入质量浓度为10%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.7%,搅拌8min,后以5000r/min的转速高速离心,去上清液后将沉淀溶于处理液中保存,用超滤膜过滤后4℃下保存,即为所述的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体,保存备用。

[0044] 实施例3:一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒,由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成,所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,划出分布四点分别包被有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体;所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体。

[0045] 其中,所述APF单特异性抗体为抗核周因子抗体的单克隆抗体,所述抗Sa特异性抗体为从人胎盘中提取的抗Sa抗原制备得到的抗Sa单克隆抗体,所述抗CⅡ特异性抗体为从截肢患者骨关节软骨Ⅱ型抗原制备得到的抗CⅡ单克隆抗体;所述胶体金标记的APF特异性抗体被胶体金标记的浓度为70μg/mL,胶体金标记的抗Sa特异性抗体被胶体金标记的浓度为80μg/mL,胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体被胶体金标记的浓度为80μg/mL;所述处理液是pH在8.3的PBS缓冲液,其中还含有2.2%的牛血清蛋白(BSA)和0.2%的吐温-20;所述胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm;所述固相膜联检反应装置的制备:(1) 将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0℃下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.6mg/mL,(2) 在硝酸纤维素膜上划出

四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为30 μ I,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为35 μ I,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为30 μ I,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为40 μ I,所述质控区在远离其他三点的位置上;(3)将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0046] 一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒的制备方法为:

[0047] 步骤一:固相膜联检反应装置的制备:

[0048] (1)将APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体分别在处理液中透析处理,0℃下过夜静置12h,透析后再用处理液将其均稀释到1.6mg/mL;

[0049] (2)在硝酸纤维素膜上划出四点的位置分别为检测区1,检测区2,检测区3和质控区的位置,分别吸取上述APF特异性抗体喷涂包被到检测区1上,包被量为30 μ I,抗Sa特异性抗体喷涂包被到检测区2上,包被量为35 μ I,抗CⅡ特异性抗体喷涂包被到检测区3上,包被量为30 μ I,质控区上喷涂包被有羊抗兔IgG抗体,包被量为40 μ I,所述质控区在远离其他三点的位置上;

[0050] (3)将硝酸纤维素膜装入固相膜联检反应装置外壳中,所述外壳上有四个孔与硝酸纤维素膜上划出的四点位置相对应,并依次标记,即为所述固相膜联检反应装置。

[0051] 步骤二:胶体金标记物试剂的制备方法:

[0052] (1)胶体金溶液的制备方法为柠檬酸三钠还原法:取质量浓度为0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1%的柠檬酸三钠3mL,加热煮沸8min,冷却后得到的酒红色液体即为胶体金溶液,调节pH至8.5;所述胶体金颗粒直径为15-20nm,备用;

[0053] (2)胶体金标记抗体的制备方法为:将(1)制备好的胶体金溶液取出20mL的量共三份,取APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CⅡ特异性抗体在磁力搅拌条件下分别将其加入上述所取的三份胶体金溶液中,使其最终浓度分别为70 μ g/mL、80 μ g/mL、80 μ g/mL,常温下搅拌20min,再分别加入质量浓度为10%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为0.7%,搅拌8min,后以5000r/min的转速高速离心,去上清液后将沉淀溶于处理液中保存,用超滤膜过滤后4℃下保存,即为所述的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CⅡ特异性抗体,保存备用。

[0054] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明实施例技术方案的精神和范围。

专利名称(译)	一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106442999A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201610793112.6	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	杨世东		
申请(专利权)人(译)	杨世东		
当前申请(专利权)人(译)	杨世东		
[标]发明人	杨世东		
发明人	杨世东		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/559 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/559 G01N2800/102		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种多抗体检测类风湿关节炎的试剂盒，所述试剂盒由固相膜联检反应装置、处理液和胶体金标记物试剂组成，其其特征在于，所述固相膜联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，划出分布四点分别制有APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CII特异性抗体和质控物羊抗兔IgG抗体；所述胶体金标记物试剂为冻干的胶体金标记的APF特异性抗体、胶体金标记的抗Sa特异性抗体和胶体金标记的抗CII特异性抗体。本发明利用胶体金免疫渗滤的原理，通过对APF特异性抗体、抗Sa特异性抗体、抗CII特异性抗体的免疫检测，从肉眼观察显色反应来快速直接诊断类风湿关节炎，操作简单，灵敏度高。