



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633162 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811434397.X

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.11.28

(71)申请人 浙江聚康生物工程有限公司

地址 315000 浙江省宁波市杭州湾新区滨海二路77号

(72)发明人 杨永芳 张守涛 陶新博 郭亚楠  
邓川

(74)专利代理机构 北京国翰知识产权代理事务所(普通合伙) 11696

代理人 徐佳晶

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

S-100  $\beta$  蛋白检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供S-100  $\beta$  蛋白检测试剂盒，属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，包括检测卡、IC卡和稀释液，检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100  $\beta$  单克隆抗体的结合垫；硝酸纤维素膜，其包被C反应S-100  $\beta$  单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线；样品垫；衬板和吸水纸。本发明试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血样本，具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、稳定性、操作的简便性，其用途为在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中S-100  $\beta$  蛋白的含量，用于临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后。

1. S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其特征在于:所述检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫。

2. 根据权利要求1所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.2-1.5%BSA、0.5-0.8%岩藻糖的1.5-1.6M Tris-HCL处理液中,在28-34KHz的超声波条件下浸泡15-25min,然后在60-70℃下干燥2-3h,取出备用。

3. 根据权利要求1所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述检测卡还包括硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线。

4. 根据权利要求3所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到1-3mg/ml,膜液量为1-2 $\mu$ l/cm;

2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,烘干,所述检测线和质控线间隔为3-4mm。

5. 根据权利要求4所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述包被稀释液为含有0.5-0.8%岩藻糖、pH 7-7.5的4-6mM BS缓冲液;所述岩藻糖中含有4-5%的D-岩藻糖。

6. 根据权利要求3所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述结合垫中的荧光物质标记的抗S-100 $\beta$ 单克隆抗体与所述的硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体包夹检测样本中S-100 $\beta$ 蛋白。

7. 根据权利要求1所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述检测卡包括样品垫、衬板和吸水纸;所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% TritonX-100、2.5%BSA、pH 7-7.5的4-6mM BS缓冲液中,于0-5℃浸泡3-5h,烘干。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血。

9. 权利要求1-8任一项所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中S-100 $\beta$ 蛋白的含量的用途。

10. 根据权利要求9任一项所述的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒的用途,其特征在于:所述的用途包括临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后。

## S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体涉及S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] S100蛋白是分子量为10-12kDa大小的小酸性蛋白,并且形成同二聚体和异二聚体。S100蛋白通常参与大量的细胞活动事件,例如信号转导、细胞分化、细胞运动性调节、转录和细胞周期进程等。S100蛋白由两个亚单位 $\alpha$ 、 $\beta$ 结合形成S100 $\alpha\alpha$ 、S100 $\alpha\beta$ 、S100 $\beta\beta$ 。其中, S100- $\beta$  (S100 $\alpha\beta$ 与S100 $\beta\beta$ )蛋白是一种低分子量的酸性钙结合蛋白,又叫中枢神经特异蛋白,大量存在于中枢神经系统中。正常成人血清中含量小于0.2ng/mL,生理浓度下的S100 $\beta$ 蛋白具有神经营养作用。当人在脑梗塞、脑外伤或心脏外科手术时,S100- $\beta$ 蛋白从胞液中渗出进入脑脊液,再经受损的血脑屏障进入血液,从而导致血液中S100- $\beta$ 蛋白的浓度升高,可刺激胶质细胞和神经元产生致炎细胞因子,从而进一步激活胶质细胞,通过一氧化氮依赖机制杀死神经元。S100 $\beta$ 蛋白的过表达将增加大脑对缺血,缺氧的易感性,导致神经元的凋亡。当中枢神经系统损害后,血液和脑脊液中的浓度都增高,S100 $\beta$ 蛋白从神经胶质细胞渗出到脑脊液中,通过受损的血脑屏障进入血液,从而血清检测S100 $\beta$ 蛋白浓度出现升高。S100- $\beta$ 蛋白作为脑损伤的生化标志物在脑损伤后有一定的时间变化规律,稳定性较好,其浓度值的检测有助于临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后等。因此血清S100- $\beta$ 蛋白浓度测定是评估脑卒中发生,发展的可靠标志物。

[0003] 荧光定量免疫层析技术原理类似于ELISA方法,该方法基于抗原抗体特异性反应的原理,通过标记抗体或抗原并形成免疫复合物从而达到检测的目的。与ELISA方法不同的是,荧光定量免疫层析技术的免疫反应过程是发生在层析膜上的并通过毛细管作用向前层析。近年来,包括荧光标记免疫层析技术在内的层析技术广泛应用于低浓度样品的检测,由于检测方法在敏感性、操作性和准确性方面具有一定的优势,故该方法在包括临幊化学、生物分析和环境分析在内的各个学科领域都有广泛的应用前景。基于荧光定量免疫层析法的试剂盒可以用于大批量样本的检测,但不可能替代目前的仪器分析技术,它可以作为一种重要的补充技术,应该和其他分析技术连用或互相印证,增加检测的灵敏度又可降低交叉反应,还可进行更准确的定量。因此,荧光定量免疫层析法在现场监控,简单基础实验室的检测,甚至大型实验室的初步筛选上有广泛的应用前景。因此,通过合成半抗原和完全抗原、荧光定量免疫层析平台配对抗原抗体、荧光定量免疫层析平台优化、试剂盒性能评估和临床应用等研究阶段来建立有效的检测S100- $\beta$ 蛋白荧光定量免疫层析法和研发高性能的S100- $\beta$ 蛋白检测试剂盒具有重要的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种测试样本为人的血清、血浆或全血样本,具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、稳定性、操作的简便性的S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,其用途包括

临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后。

[0005] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为：

[0006] 本发明公开一种S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒，包括检测卡、IC卡和稀释液，其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫。

[0007] 作为优选，结合垫采用如下步骤制备：将玻璃纤维棉置于含有1.2-1.5% BSA、0.5-0.8% 岩藻糖的1.5-1.6M Tris-HCl处理液中，在28-34KHz的超声波条件下浸泡15-25min，然后在60-70℃下干燥2-3h，取出备用。该结合垫为稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体即S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物提供一个干燥、保存、重湿润以及释放的场所，岩藻糖和超声波能够发挥增益作用，超声波的作用可促使发生或加速某些化学反应，使得结合垫表面快速形成一层由糖组成的、均匀的光滑表面，减弱了后期S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物与结合垫的吸附作用；另外结合垫表面的糖也可在S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物表面形成一层糖衣，利用其显著的保水作用，使S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物在干燥过程中仍能保持良好的分散性和均匀性，同时也能避免抗体的活性下降，当滴加样品后，糖类遇液体快速溶解，S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物也能快速彻底地从结合垫释放，所以上述制备方法得到的结合垫可提高试剂盒的灵敏度和稳定性。此外，岩藻糖中含有2.8-3.2%的D-岩藻糖时，可降低层析样品的表面张力，在重湿润的过程能更好地保证S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物在结合垫上的均匀性和固定性，能改善结合垫上S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物的释放，优化S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物的释放效果，同时还能加快液体的层析速度，提高试剂盒的检测速率。

[0008] 作为优选，检测卡还包括硝酸纤维素膜，其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线。S-100 $\beta$ 单克隆抗体为重组人源S-100 $\beta$ 蛋白，通过全基因合成人源S-100 $\beta$ 基因，构建S-100 $\beta$ 重组质粒；以S-100 $\beta$ 重组质粒为表达载体，通过酵母真核表达制备S-100 $\beta$ 蛋白；利用表达的S-100 $\beta$ 蛋白制备S-100 $\beta$ 单克隆抗体。

[0009] 进一步优选，硝酸纤维素膜采用如下步骤处理：

[0010] 1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到1-3mg/ml，膜液量为1-2 $\mu$ l/cm；

[0011] 2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被，所述检测线和质控线间隔为3-4mm，然后置于烘箱中，35-40℃烘干2小时。

[0012] 更进一步优选，包被稀释液为含有0.5-0.8% 岩藻糖、pH 7-7.5的4-6mM BS缓冲液；岩藻糖中含有4-5%的D-岩藻糖。正常情况下，随着包被液BS在硝酸纤维素膜膜上的扩散，膜上的一些表面活性物质会被带着向纤维膜两边移动，导致膜疏水性增强，点样后，当S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物前沿层析到达检测线附近时，由于检测线上疏水性强，溶液会顺着检测线下的底板潜泳直到检测线另一边亲水性强处，才正常层析，而上述包被稀释液能够提高包被抗体在硝酸纤维素膜上的亲水性，在点样时，可减低S-100 $\beta$ 单克隆抗体扩散的速度，减少检测线处的表面活性剂的大量流失，即使表面活性剂全部流失，岩藻糖的快速溶解性质，也能使得检测线部位的膜迅速浸润，且岩藻糖中D-岩藻糖的存在可降低层析样品的表面张力，确保潜水现象的消失；同时在膜干燥的过程中，糖类羟基可结合S-100 $\beta$ 单克隆抗体表面的极性基团，形成氨键，从而代替S-100 $\beta$ 单克隆抗体极性基团周围的水分子，

在S-100 $\beta$ 单克隆抗体表面形成一层假定的水化膜,保护抗体的氨键连接位置不直接暴露在外界环境中,稳定S-100 $\beta$ 单克隆抗体的高级结构,即使在干燥失水的情况下,尽可能地减少S-100 $\beta$ 单克隆抗体的失活,提高试剂盒的灵敏度和稳定性。

[0013] 进一步优选,结合垫中的荧光物质标记的抗S-100 $\beta$ 单克隆抗体与硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体包夹检测样本中S-100 $\beta$ 蛋白。

[0014] 作为优选,检测卡包括样品垫、衬板和吸水纸;样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% TritonX-100、2.5% BSA、pH 7-7.5的4-6mM BS缓冲液中,于0-5°C浸泡3-5h,然后置于烘箱中,37°C烘干2小时。

[0015] 作为优选,试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血。

[0016] 试剂盒采用免疫荧光双抗夹心法定量检测人血清、血浆或全血中S-100 $\beta$ 蛋白的含量。当样品滴加到检测卡加样孔后,样本中S-100 $\beta$ 蛋白和结合垫中的荧光物质标记的抗S-100 $\beta$ 单克隆抗体结合形成反应复合物,反应复合物随层析作用沿着硝酸纤维素膜前移,被硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体捕获,样本中的S-100 $\beta$ 蛋白捕获量与检测区信号强度正相关,通过荧光分析仪,定量检测样品中S-100 $\beta$ 蛋白的含量。

[0017] 本发明还公开上述S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中S-100 $\beta$ 蛋白的含量的用途。

[0018] 作为优选,用途包括临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后。

[0019] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:1)本发明试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血样本,具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、稳定性、操作的简便性;2)本发明试剂盒能定量检测样本中的S-100 $\beta$ 蛋白的含量,可用于临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后,具有更快速、更有效、更准确等优点;3)本发明试剂盒用结合垫可提高试剂盒的灵敏度和稳定性,还能加快液体的层析速度,提高试剂盒的检测速率;4)本发明试剂盒用硝酸纤维素膜能确保潜水现象的消失,提高试剂盒的灵敏度和稳定性。

[0020] 本发明采用了上述技术方案提供S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,弥补了现有技术的不足,设计合理,操作方便。

## 具体实施方式

[0021] 下面,结合具体实施例对本发明实施方式作进一步说明。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0022] 根据本发明的实施方式,提供了以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限于本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。另外,本发明中的术语“包被”为免疫领域的术语,包含吸附、固定之意。

[0023] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0024] 实施例1:

[0025] 一种S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸(如表1所

示)。S-100 $\beta$ 单克隆抗体为重组人源S-100 $\beta$ 蛋白,通过全基因合成人源S-100 $\beta$ 基因,构建S-100 $\beta$ 重组质粒;以S-100 $\beta$ 重组质粒为表达载体,通过酵母真核表达制备S-100 $\beta$ 蛋白;利用表达的S-100 $\beta$ 蛋白制备S-100 $\beta$ 单克隆抗体。试剂盒采用免疫荧光双抗夹心法定量检测人血清、血浆或全血中S-100 $\beta$ 蛋白的含量。当样品滴加到检测卡加样孔后,样本中S-100 $\beta$ 蛋白和结合垫中的荧光物质标记的抗S-100 $\beta$ 单克隆抗体结合形成反应复合物,反应复合物随层析作用沿着硝酸纤维素膜前移,被硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体捕获,样本中的S-100 $\beta$ 蛋白捕获量与检测区信号强度正相关,通过荧光分析仪,定量检测样品中S-100 $\beta$ 蛋白的含量。

[0026] 上述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.3%BSA、0.6%岩藻糖的1.55M Tris-HCl处理液中,在30KHz的超声波条件下浸泡20min,然后在65℃下干燥2.5h,取出备用。该结合垫为稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体即S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物提供一个干燥、保存、重湿润以及释放的场所,岩藻糖和超声波能够发挥增益作用,超声波的作用可促使发生或加速某些化学反应,使得结合垫表面快速形成一层由糖组成的、均匀的光滑表面,减弱了后期S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物与结合垫的吸附作用;另外结合垫表面的糖也可在S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物表面形成一层糖衣,利用其显著的保水作用,使S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物在干燥过程中仍能保持良好的分散性和均匀性,同时也能避免抗体的活性下降,当滴加样品后,糖类遇液体快速溶解,S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物也能快速彻底地从结合垫释放,所以上述制备方法得到的结合垫可提高试剂盒的灵敏度和稳定性。

[0027] 硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

[0028] 1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到2mg/ml,膜液量为1.5 $\mu$ l/cm;

[0029] 2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,所述检测线和质控线间隔为3.5mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。其中,包被稀释液为含有0.6%岩藻糖、pH 7.4的5mM BS缓冲液;岩藻糖中含有4.5%的D-岩藻糖。正常情况下,随着包被液BS在硝酸纤维素膜膜上的扩散,膜上的一些表面活性物质会被带着向纤维膜两边移动,导致膜疏水性增强,点样后,当S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物前沿层析到达检测线附近时,由于检测线上疏水性强,溶液会顺着检测线下的底板潜泳直到检测线另一边亲水性强处,才正常层析,而上述包被稀释液能够提高包被抗体在硝酸纤维素膜上的亲水性,在点样时,可减低S-100 $\beta$ 单克隆抗体扩散的速度,减少检测线处的表面活性剂的大量流失,即使表面活性剂全部流失,岩藻糖的快速溶解性质,也能使得检测线部位的膜迅速浸润,且岩藻糖中D-岩藻糖的存在可降低层析样品的表面张力,确保潜水现象的消失;同时在膜干燥的过程中,糖类羟基可结合S-100 $\beta$ 单克隆抗体表面的极性基团,形成氢键,从而代替S-100 $\beta$ 单克隆抗体极性基团周围的水分子,在S-100 $\beta$ 单克隆抗体表面形成一层假定的水化膜,保护抗体的氢键连接位置不直接暴露在外界环境中,稳定S-100 $\beta$ 单克隆抗体的高级结构,即使在干燥失水的情况下,尽可能地减少S-100 $\beta$ 单克隆抗体的失活,提高试剂盒的灵敏度和稳定性。

[0030] 样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0%TritonX-100、2.5%BSA、pH 7.4的5mM BS缓冲液中,于4℃浸泡4h,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0031] 衬板:选择PVC板。

[0032] 吸水纸通过以下步骤制得:吸水纸被裁剪成合适大小充当吸水垫,在检测过程为溶液的层析提供动力。

[0033] 表1 S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒的组成

名称		10 人份/盒	25 人份/盒	40 人份/盒
[0034] 检测卡	结合垫	1 人份/袋		
	硝酸纤维素膜			
	样品垫		1 人份/袋	1 人份/袋
	衬板			
	吸水纸			

干燥剂	1 包/袋	1 包/袋	1 包/袋
说明书	1 份	1 份	1 份
IC 卡	1 张	1 张	1 张
稀释液	1*5mL/支	1*5mL/支	2*5mL/支

[0036] 上述结合垫中的荧光物质标记的抗S-100 $\beta$ 单克隆抗体与硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体包夹检测样本中S-100 $\beta$ 蛋白。

[0037] 上述试剂盒的储存条件及有效期:检测试剂4~30℃保存,有效期24个月,试剂铝箔袋开封后,2小时内有效。

[0038] 上述试剂盒的用仪器:威海纽普生物技术有限公司的NP007干式荧光免疫分析仪、广州蓝勃生物科技有限公司的AFS1000干式荧光免疫分析仪。

[0039] 上述试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血。血清、血浆、全血样本按常规方法采集,抗凝剂可使用枸橼酸钠、EDTA、或肝素抗凝血浆;对于血清或血浆,分离后请于4小时内测定,血清或血浆2~8℃可保存5天,超过5天需保存在-20℃,检测前,将样本恢复至室温后1小时内完成检测。请勿反复冻融;全血样本于2~8℃可保存3天,不得冻存。

[0040] 上述试剂盒的使用方法如表2:

[0041] 表2试剂盒的使用方法

[0042]

序号	步骤	详解
1	准备	从铝箔包装袋中拿出检测卡, 将其置于水平、干燥的平面上(如从冰箱中取出的检测卡, 需平衡至室温后再从密封铝箔袋中取出使用, 否则将影响实验结果)。
2	校准	确认 IC 卡与检测卡的批号相匹配, 进行 IC 卡校准(详见仪器说明书)。
3	加样	吸取全血 150 $\mu$ L 样本加一滴稀释液或血清、血浆 100 $\mu$ L 样本加入到测试卡的加样孔中。
4	检测	10 分钟后将检测卡插入适用仪器的卡槽内, 进行定量判读结果。

[0043] 正常参考区间为:  $S-100\beta < 0.2\text{ng/mL}$ 。

[0044] 注: 由于地理、人种、性别及年龄等差异, 各实验室应建立自己的参考区间。

[0045] 上述试剂盒的性能指标:

[0046] 1. 线性范围: 在 0.1ng/mL ~ 10.0ng/mL 范围内, 线性相关系数  $r \geq 0.9900$ 。[0047] 2. 重复性: 变异系数 (CV)  $\leq 15\%$ 。[0048] 3. 批间差: 相对极差 (R)  $\leq 20\%$ 。[0049] 4. 准确度: 以内部参考品为检测样本, 测定结果与标示值相对偏差应在  $\pm 15\%$  范围之内。

[0050] 5. 最低检测限: 不高于 0.1ng/mL。

[0051] 上述试剂盒的注意事项:

[0052] 1. 本品为一次性使用体外诊断试剂, 请勿重复使用, 请在有效期内使用。

[0053] 2. 测试卡及组件仅适用于相关的荧光分析仪。

[0054] 3. 产品在使用前请不要开封, 包装明显损坏者, 请勿使用。

[0055] 4. 不同批号的试剂组分不能混用, IC 卡与检测卡不得混批号使用。

[0056] 5. 在收集、处置、储存、混匀样本和检测过程中应采取适当的保护措施。

[0057] 6. 铝箔袋内有干燥剂, 不得食用。

[0058] 7. 应避免实验环境温度过高, 低温保存的测试卡需要恢复至室温后再打开, 以免吸潮。

[0059] 8. 检测卡和荧光分析仪在使用时应避免颤动和电磁环境; 在正常使用中仪器本身产生颤动属正常现象; 检测进行时请勿拔出 IC 卡。

[0060] 9. 建议使用新鲜样本, 若样本中有明显溶血或血凝块则会干扰测试和导致错误结果, 切勿使用。

[0061] 10. 本试剂的检测结果仅供临床参考, 对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

[0062] 11. 所有标本、废液、管子等均按传染性污染物处理方式处理。检测后应将用完的检测卡丢弃在相应的生物危害品容器中, 按生物危害物处理。

[0063] 12. 使用本试剂过程中如有问题或者建议,请与厂家联系。

[0064] S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中S-100 $\beta$ 蛋白的含量的用途。用途包括临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后。

[0065] 实施例2:

[0066] 一种S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0067] 上述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.2%BSA、0.5%岩藻糖的1.5M Tris-HCL处理液中,在28KHz的超声波条件下浸泡15min,然后在60℃下干燥2h,取出备用。

[0068] 硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

[0069] 1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到1mg/ml,膜液量为1 $\mu$ l/cm;

[0070] 2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,所述检测线和质控线间隔为3mm,然后置于烘箱中,35℃烘干2小时。其中,包被稀释液为含有0.5%岩藻糖、pH 7的4mM BS缓冲液;岩藻糖中含有4%的D-岩藻糖。

[0071] 样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0%TritonX-100、2.5%BSA、pH 7-7.5的4-6mM BS缓冲液中,于0-5℃浸泡3-5h,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0072] 衬板:选择PVC板。

[0073] 吸水纸通过以下步骤制得:吸水纸被裁剪成合适大小充当吸水垫,在检测过程为溶液的层析提供动力。

[0074] 实施例3:

[0075] 一种S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0076] 上述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.3%BSA、0.6%岩藻糖的1.55M Tris-HCL处理液中,其中岩藻糖中含有3.0%的D-岩藻糖,在30KHz的超声波条件下浸泡20min,然后在65℃下干燥2.5h,取出备用。岩藻糖中含有D-岩藻糖时,可降低层析样品的表面张力,在重湿润的过程能更好地保证S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物在结合垫上的均匀性和固定性,能改善结合垫上S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物的释放,优化S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物的释放效果,同时还能加快液体的层析速度,提高试剂盒的检测速率。

[0077] 硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

[0078] 1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到2mg/ml,膜液量为1.5 $\mu$ l/cm;

[0079] 2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,所述检测线和质控线间隔为3.5mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。其中,包被稀释液为含有0.6%岩藻糖、pH 7.4的5mM BS缓冲液;岩

藻糖中含有4.5%的D-岩藻糖。

[0080] 样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% TritonX-100、2.5% BSA、pH 7.4的5mM BS缓冲液中,于4℃浸泡4h,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0081] 衬板:选择PVC板。

[0082] 吸水纸通过以下步骤制得:吸水纸被裁剪成合适大小充当吸水垫,在检测过程为溶液的层析提供动力。

[0083] 该试剂盒在使用过程中,吸取全血150μL样本加一滴稀释液或血清、血浆100μL样本加入到测试卡的加样孔中,5分钟后将检测卡插入适用仪器的卡槽内,进行定量判读结果。说明岩藻糖中含有D-岩藻糖时,能加快液体的层析速度,提高试剂盒的检测速率。

[0084] 实施例4:

[0085] 一种S-100β蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100β单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100β单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0086] 上述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.2% BSA、0.5% 岩藻糖的1.5M Tris-HCL处理液中,在28KHz的超声波条件下浸泡15min,然后在60℃下干燥2h,取出备用。

[0087] 硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

[0088] 1) S-100β单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到1mg/ml,膜液量为1μl/cm;

[0089] 2) 将步骤1)得到的S-100β单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,所述检测线和质控线间隔为3mm,然后置于烘箱中,35℃烘干2小时。其中,包被稀释液为含有0.5% 岩藻糖、pH 7的4mM BS缓冲液;岩藻糖中含有4%的D-岩藻糖。

[0090] 样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% TritonX-100、2.5% BSA、pH 7的4mM BS缓冲液中,于0℃浸泡3h,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0091] 衬板:选择PVC板。

[0092] 吸水纸通过以下步骤制得:吸水纸被裁剪成合适大小充当吸水垫,在检测过程为溶液的层析提供动力。

[0093] 对比例1:

[0094] 一种S-100β蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100β单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100β单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0095] 上述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.3% BSA的1.55M Tris-HCL处理液中,在30KHz的超声波条件下浸泡20min,然后在65℃下干燥2.5h,取出备用。其余和实施例1一致。

[0096] 对比例2:

[0097] 一种S-100β蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100β单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100β单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0098] 上述结合垫采用如下步骤制备:将玻璃纤维棉置于含有1.3%BSA、0.6%岩藻糖的1.55M Tris-HCL处理液中浸泡20min,然后在65℃下干燥2.5h,取出备用。其余和实施例1一致。

[0099] 对比例3:

[0100] 一种S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0101] 硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

[0102] 1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到2mg/ml,膜液量为1.5 $\mu$ l/cm;

[0103] 2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,所述检测线和质控线间隔为3.5mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。其中,包被稀释液为pH 7.4的5mM BS缓冲液。其余和实施例1一致。

[0104] 对比例4:

[0105] 一种S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒,包括检测卡、IC卡和稀释液,其中检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫;硝酸纤维素膜,其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线;样品垫;衬板和吸水纸。

[0106] 硝酸纤维素膜采用如下步骤处理:

[0107] 1) S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体用包被稀释液调整浓度到2mg/ml,膜液量为1.5 $\mu$ l/cm;

[0108] 2) 将步骤1)得到的S-100 $\beta$ 单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体溶液分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,所述检测线和质控线间隔为3.5mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。其中,包被稀释液为含有0.6%岩藻糖、pH 7.4的5mM BS缓冲液。其余和实施例1一致。

[0109] 试验例1:

[0110] 灵敏度实验

[0111] 样本稀释液作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果,计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,将M+2SD的结果代入建立的标准方程中,求出对应的浓度值。实施例1对应的浓度值为0.0384ng/mL,实施例3对应的浓度值为0.0352ng/mL,对比例1对应的浓度值为0.0587ng/mL,对比例2对应的浓度值为0.0601ng/mL,对比例3对应的浓度值为0.0556ng/mL,对比例4对应的浓度值为0.0537ng/mL,说明实施例3的零度好于实施例1,实施例1的检测卡的灵敏度好于对比例1、对比例2、对比例3、对比例4。对比实施例1和实施例3可知:岩藻糖中含有D-岩藻糖时,优化S-100 $\beta$ 单克隆抗体-微球复合物的释放效果,提高试剂盒的灵敏度;对比实施例1和对比例1、对比例2可知:岩藻糖和超声波能够发挥增益作用,得到的结合垫可提高试剂盒的灵敏度;对比实施例1和对比例3、对比例4可知:包被稀释液中含有D-岩藻糖的岩藻糖存在,能够确保潜水现象的消失,稳定S-100 $\beta$ 单克隆抗体的高级结构,提高试剂盒的灵敏度。

[0112] 试验例2:

[0113] 稳定性实验

[0114] 检测卡的稳定性:试剂盒中的检测卡通常保存在室温干燥阴凉的环境中。检测卡在50℃烘箱中放置一个月进行加速破坏稳定性测试,相当于检测卡常温下保存1年的有效性。将检测卡在50℃烘箱中分别放置1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周后取出放入干燥房内,与干燥房内常温放置的试剂卡进行对比,样本稀释液使用4℃保存,检测卡的稳定性。实施例1的检测卡放在50℃烘箱中加速破坏1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周在标准品测试的情况下反应曲线与常温保存的检测卡基本吻合,低中高浓度的荧光信号T/C值基本没变化,说明荧光定量免疫层析检测卡经加速破坏测试后,稳定性良好,可以常温放置两年。而对比例1、对比例2、对比例3、对比例4的检测卡放在50℃烘箱中加速破坏1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周在标准品测试的情况下反应曲线与常温保存的检测卡的吻合度差于实施例2的检测卡,说明实施例1的检测卡的稳定性好于对比例1、对比例2、对比例3、对比例4。对比实施例1和对比例1、对比例2可知:岩藻糖和超声波能够发挥增益作用,得到的结合垫可提高试剂盒的稳定性;对比实施例1和对比例3、对比例4可知:包被稀释液中含有D-岩藻糖的岩藻糖存在,能够确保潜水现象的消失,稳定S-100β单克隆抗体的高级结构,提高试剂盒的稳定性。

[0115] 上述实施例中的常规技术为本领域技术人员所知晓的现有技术,故在此不再详细赘述。

[0116] 以上实施方式仅用于说明本发明,而并非对本发明的限制,本领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出各种变化和变型。因此,所有等同的技术方案也属于本发明的范畴,本发明的专利保护范围应由权利要求限定。

专利名称(译)	S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109633162A</a>	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811434397.X	申请日	2018-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	浙江聚康生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江聚康生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江聚康生物工程有限公司		
[标]发明人	杨永芳 张守涛 陶新博 郭亚楠 邓川		
发明人	杨永芳 张守涛 陶新博 郭亚楠 邓川		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	徐佳晶		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**

本发明提供S-100 $\beta$ 蛋白检测试剂盒，属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，包括检测卡、IC卡和稀释液，检测卡包括吸附有稀土荧光微球标记的S-100 $\beta$ 单克隆抗体的结合垫；硝酸纤维素膜，其包被C反应S-100 $\beta$ 单克隆抗体的检测线和包被T反应羊抗鼠IgG抗体的质控线；样品垫；衬板和吸水纸。本发明试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血样本，具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、稳定性、操作的简便性，其用途为在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中S-100 $\beta$ 蛋白的含量，用于临幊上脑损伤的早期辅助诊断、评估脑损伤程度、指导治疗和判断预后。

名称	10人份/盒	25人份/盒	40人份/盒
检测卡	结合垫		
	硝酸纤维素膜		
	样品垫	1人份/袋	1人份/袋
	衬板		
	吸水纸		