



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133281 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910371125.8

(22)申请日 2019.05.06

(71)申请人 中生北控生物科技股份有限公司
地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路27号

(72)发明人 张勇

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包含CRP和SAA联合检测试纸条,所述试纸条包括样品垫、结合垫、分析膜、吸收垫和底板,所述分析膜上设有2条检测线(CRP、SAA检测线)和1条质控线,样品垫、结合垫、分析膜和吸收垫依次搭接地粘贴在底板上且分别部分重合;所述结合垫包被有CRP和SAA抗体标记荧光微球。本发明采用荧光免疫层析法制备的试剂盒,可以同时检测CRP和SAA,提高了临床检测效率,具有高灵敏度、高特异性及快速检测的优点,为感染性疾病、组织损伤坏死性疾病等疾病的辅助诊断提供有效手段。

1. CRP和SAA联合检测试纸条,其特征在于,包括样品垫、结合垫、分析膜、吸收垫和底板,所述分析膜上设有2条检测线和1条质控线,所述样品垫、结合垫、分析膜和吸收垫依次搭接地粘贴在底板上且分别部分重合;

其中,2条检测线靠近结合垫一端,质控线靠近吸水垫一端;

2条检测线分别为CRP检测线、SAA检测线;所述CRP检测线包被有CRP检测抗体,所述SAA检测线包被有SAA检测抗体;

所述结合垫包被有CRP抗体标记荧光微球和SAA抗体标记荧光微球;

所述检测线包被的抗体与所述结合垫包被的抗体分别具有不同的抗原结合位点。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述样品垫为玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜;和/或

所述结合垫为玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜;和/或

所述分析膜为硝酸纤维素膜;和/或

所述底板的材质为PVC。

3. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所用荧光微球是含有荧光物质的聚苯乙烯微球,所述荧光物质选自异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、T0、Cy3、Cy5、藻红蛋白、量子点中的至少一种;

所述荧光微球的粒径为20nm~600nm,发射波长为500nm~700nm,荧光微球的使用浓度为0.00001mg/ml~0.1mg/ml;所述荧光微球的表面修饰有官能团,所述官能团选自羧基、氨基或醛基中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述CRP检测抗体为Abgree公司生产的抗体801001,所述SAA检测抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2203;和/或

所述CRP抗体标记荧光微球中使用的CRP抗体为Abgree公司生产的抗体801002,所述SAA抗体标记荧光微球中使用的SAA抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2201;和/或

所述质控线包被有二抗,所述二抗选自羊抗鼠、羊抗兔、兔抗羊抗体中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述CRP抗体标记荧光微球是通过EDC和NHS使CRP抗体与荧光微球上的官能团连接;和/或

所述SAA抗体标记荧光微球是通过EDC和NHS使SAA抗体与荧光微球上的官能团连接。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的试纸条,其特征在于,所述试纸条的长度为5~10cm,宽度为3~5mm。

7. CRP和SAA联合检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求1-6任一项所述的试纸条,任选包含用于装载所述试纸条的卡壳。

8. CRP和SAA联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 微球活化:向1mg/ml荧光微球1~5ml中加入用50mM, pH6.1 MES溶解的0.1~10mg EDC和10mg NHS,活化10~60min,7000~15000rpm离心30min,弃上清,沉淀用pH7.0~8.0的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的荧光微球溶液;

其中,所述荧光微球采用权利要求3中所述的荧光微球;

(2) CRP抗体的偶联:将0.2mg CRP标记抗体加入1mg/ml活化的荧光微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液

中,得到浓度为0.1mg/ml CRP抗体标记荧光微球溶液;

其中,所述CRP标记抗体为Abgree公司生产的抗体801002;

(3) SAA抗体的偶联:将0.4mg SAA标记抗体加入1mg/ml活化的荧光微球溶液2ml中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含1%BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml SAA抗体标记荧光微球溶液;

其中,所述SAA标记抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2201;

(4) 将步骤(2)和步骤(3)所得荧光微球溶液按体积比1:0.1~1:10混合;

(5) 结合垫的制备:以玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜作为结合垫,将步骤(4)制备的荧光微球混合液按0.25~1.5 μ L/cm喷涂在膜上,干燥备用;

(6) 分析膜的制备:将CRP检测抗体、SAA检测抗体和二抗稀释至0.8~1mg/ml,以0.8~1.2 μ L/cm的喷量喷涂在硝酸纤维素膜上,形成CRP检测线、SAA检测线和质控线,即为分析膜,干燥备用;

其中,所述CRP检测抗体为Abgree公司生产的抗体801001,所述SAA检测抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2203,所述二抗为羊抗鼠IgG;

(7) 试纸条的组装:将样品垫、结合垫、分析膜和吸水垫依次搭接地粘贴在PVC底板上且分别部分重合,裁切成长度为5~10cm,宽度为3~5mm的纸条,即得CRP和SAA联合检测试纸条;

其中,所述样品垫为玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 微球活化:向1mg/ml粒径为100nm发射波长为535nm的羧基荧光微球1ml中加入用50mM,pH6.1 MES溶解的1mg EDC和10mg NHS,活化30min,10000rpm离心30min弃上清,沉淀用pH7.4的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的荧光微球溶液;

(2) CRP抗体的偶联:将0.2mgCRP标记抗体加入2ml浓度为1mg/ml的活化荧光微球溶液中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml CRP抗体标记荧光微球溶液;

(3) SAA抗体的偶联:将0.4mgSAA标记抗体加入2ml浓度为1mg/ml的活化荧光微球溶液中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含1%BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml SAA抗体标记荧光微球溶液;

(4) 将步骤(2)和步骤(3)所得荧光微球溶液按体积比1:1混合;

(5) 结合垫的制备:以玻璃纤维膜作为结合垫,将步骤(4)制备的荧光微球混合液,用点膜仪以0.8 μ L/cm喷涂在预处理的玻璃纤维素膜上,干燥备用;

(6) 分析膜的制备:将CRP检测抗体、SAA检测抗体和二抗羊抗鼠IgG稀释至0.8mg/ml,以1 μ L/cm的喷量喷涂在硝酸纤维素膜上,分别形成CRP检测线、SAA检测线和质控线,即为分析膜,干燥备用;

(7) 试纸条的组装:将样品垫、结合垫、分析膜和吸水垫依次搭接地粘贴在PVC底板上且分别部分重合,裁切成长度为8cm,宽度为4mm的纸条,即得CRP和SAA联合检测试纸条。

10. CRP和SAA联合检测试剂盒的制备方法,其特征在于,将权利要求1-6任一项所述试纸条,或按照权利要求8或9所述方法制备的试纸条装载于卡壳内,即得。

CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测和免疫分析技术领域,具体地说,涉及一种CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] C反应蛋白(CRP)和血清淀粉样蛋白A(SAA)是感染性疾病的早期炎症指标,对于细菌感染、组织感染的诊断及评估炎症程度十分重要。C反应蛋白(CRP)是一种由肝脏合成的急性时相反应蛋白,细菌感染机体后,患者体内CRP明显升高。当CRP浓度大于10mg/L时极可能感染细菌,临床上需要抗生素来治疗,经合理治疗后,一般3~7天可恢复至正常水平。而超敏C反应蛋白(超敏CRP)是一种比普通CRP检测更灵敏、检测限更低的项目,目前已被用于早期检测儿科感染和冠心病风险的评估。临床上,将超敏CRP和心肌肌钙蛋白的联合检测作为冠心病风险的指标和预测复发的指标。

[0003] 血清淀粉样蛋白(SAA)是组织淀粉样蛋白A的前体物质,主要由干细胞产生,其相对分子量约为12000,其含量浓度是反应感染性疾病早期炎症指标。与CRP不同的是,SAA不论在细菌或病毒感染都会明显的升高。在急性时相反应时期,经IL-1、IL-6和TNF刺激,SAA可升高到最初浓度的100-1000倍,升幅高于CRP,但半衰期短,仅50min左右。通过联合检测SAA和CRP恰好能弥补目前对病毒感染检测的空白,为病毒诊断带来依据。

[0004] CN201610826542.3公开了一种检测CRP、SAA的免疫层析试剂盒及制备和使用方法,该试剂盒采用胶体金免疫层析法,能够一次取样,同时检测两个指标,简单快捷,但是受胶体金方法学的限制,浓度相近样本的信号值不易区分,易造成测量偏差。目前尚缺少可以同时快速、定量准确检测上述两种指标的联检试剂盒。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种CRP和SAA联合检测试纸条,包括样品垫、结合垫、分析膜、吸收垫和底板,所述分析膜上设有2条检测线和1条质控线,所述样品垫、结合垫、分析膜和吸收垫依次搭接地粘贴在底板上且分别部分重合。

[0007] 其中,2条检测线靠近结合垫一端,质控线靠近吸水垫一端;

[0008] 2条检测线分别为CRP检测线、SAA检测线;所述CRP检测线包被有CRP检测抗体,所述SAA检测线包被有SAA检测抗体;

[0009] 所述结合垫包被有CRP抗体标记荧光微球和SAA抗体标记荧光微球;

[0010] 所述检测线包被的抗体与所述结合垫包被的抗体分别具有不同的抗原结合位点。

[0011] 本发明中,所述样品垫为玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜。

[0012] 所述结合垫为玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜。

[0013] 所述分析膜为硝酸纤维素膜。

[0014] 所述底板的材质为PVC。

[0015] 所用荧光微球是用二氧化硅包裹荧光物质制得的微球，

[0016] 所述荧光物质选自异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、T0、Cy3、Cy5、藻红蛋白、量子点等中的至少一种。

[0017] 所述荧光微球的粒径为20nm~600nm，发射波长为500nm~700nm（优选525nm~620nm），荧光微球的使用浓度为0.00001mg/ml~0.1mg/ml；所述荧光微球的表面修饰有官能团，所述官能团选自羧基、氨基或醛基等中的至少一种。

[0018] 所述CRP检测抗体为Abgree公司生产的抗体801001，所述SAA检测抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2203。

[0019] 所述CRP抗体标记荧光微球中使用的CRP抗体为Abgree公司生产的抗体801002，所述SAA抗体标记荧光微球中使用的SAA抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2201。

[0020] 所述质控线包被有二抗，所述二抗选自羊抗鼠、羊抗兔、兔抗羊抗体中的至少一种。优选所述二抗为羊抗鼠抗体。

[0021] 所述CRP抗体标记荧光微球是通过EDC和NHS使CRP抗体上N端氨基与荧光微球上的羧基通过化学键连接。

[0022] 所述SAA抗体标记荧光微球是通过EDC和NHS使SAA抗体上N端氨基与荧光微球上的羧基通过化学键连接。

[0023] 本发明CRP和SAA联合检测试纸条的长度为5~10cm，宽度为3~5mm。

[0024] 第二方面，本发明提供一种CRP和SAA联合检测试剂盒，所述试剂盒包含上述CRP和SAA联合检测试纸条，任选包含用于装载所述试纸条的卡壳。

[0025] 第三方面，本发明提供CRP和SAA联合检测试纸条的制备方法，包括如下步骤：

[0026] (1) 微球活化：向1mg/ml荧光微球1~5ml中加入用50mM，pH6.1MES溶解的0.1~10mg EDC和10mg NHS，活化10~60min，7000~15000rpm离心30min，弃上清，沉淀用pH7.0~8.0的50mM PBS重悬，得到1mg/ml活化的荧光微球溶液；

[0027] (2) CRP抗体的偶联：将0.2mg CRP标记抗体加入1mg/ml活化的荧光微球溶液2ml中，室温混匀2~4h，10000rpm离心30min，弃上清，沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min，搅拌混匀，10000rpm离心30min，收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中，得到浓度为0.1mg/ml CRP抗体标记荧光微球溶液；

[0028] 其中，所述CRP标记抗体为Abgree公司生产的抗体801002；

[0029] (3) SAA抗体的偶联：将0.4mg SAA标记抗体加入1mg/ml活化的荧光微球溶液2ml中，室温混匀2~4h，10000rpm离心30min，弃上清，沉淀用含1%BSA的50mM PBS溶液封闭60min，搅拌混匀，10000rpm离心30min，收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中，得到浓度为0.1mg/mlSAA抗体标记荧光微球溶液；

[0030] 其中，所述SAA标记抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2201；

[0031] (4) 将步骤(2)和步骤(3)所得荧光微球溶液按体积比1:0.1~1:10混合；

[0032] (5) 结合垫的制备：以玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜作为结合垫，将步骤(4)制备的荧光微球混合液1μL/cm喷涂在膜上，干燥备用；

[0033] (6) 分析膜的制备：将CRP检测抗体、SAA检测抗体和二抗（羊抗鼠IgG）稀释至0.8~1mg/ml，在点膜仪上以0.8~1.2μL/cm的喷量喷涂在硝酸纤维素膜上，形成CRP检测线、SAA检测线和质控线，即为分析膜，干燥备用；

[0034] 其中,所述CRP检测抗体为Abgree公司生产的抗体801001,所述SAA检测抗体为Medix Biochemica公司生产的抗体2203,所述二抗为羊抗鼠IgG;

[0035] (7) 试纸条的组装:将样品垫(玻璃纤维素膜或聚酯纤维素膜)、结合垫、分析膜和吸水垫依次搭接地粘贴在PVC底板上且分别部分重合,裁切成长度为5~10cm,宽度为3~5mm的纸条,即得CRP和SAA联合检测试纸条。

[0036] 优选地,步骤(1)向所述荧光微球中加入活化剂EDC和NHS,活化20~30min,离心所得沉淀用pH7.4的50mM PBS重悬,得到活化的荧光微球溶液,其中EDC和NHS的质量比为1:2-5,EDC与荧光微球的质量比为1:20-100。

[0037] 在本发明的一个具体实施方式中,CRP和SAA联合检测试纸条的制备方法如下:

[0038] (1) 微球活化:向1mg/ml粒径为100nm发射波长为535nm的羧基荧光微球1ml中加入用50mM,pH6.1MES溶解的1mg EDC和10mg NHS,活化30min,10000rpm离心30min弃上清,沉淀用pH7.4的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的荧光微球溶液;

[0039] (2) CRP抗体的偶联:将0.2mgCRP标记抗体加入2ml浓度为1mg/ml的活化荧光微球溶液中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml CRP抗体标记荧光微球溶液;

[0040] (3) SAA抗体的偶联:将0.4mgSAA标记抗体加入2ml浓度为1mg/ml的活化荧光微球溶液中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含1%BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml SAA抗体标记荧光微球溶液;

[0041] (4) 将步骤(2)和步骤(3)所得荧光微球溶液按体积比1:1混合;

[0042] (5) 结合垫的制备:以玻璃纤维膜作为结合垫,将步骤(4)制备的荧光微球混合液,用点膜仪以0.8 μ L/cm喷涂在预处理的玻璃纤维素膜上,干燥备用;

[0043] (6) 分析膜的制备:将CRP检测抗体、SAA检测抗体和二抗羊抗鼠IgG稀释至0.8mg/ml,以1 μ L/cm的喷量喷涂在硝酸纤维素膜上,分别形成CRP检测线、SAA检测线和质控线,即为分析膜,干燥备用;

[0044] (7) 试纸条的组装:将样品垫、结合垫、分析膜和吸水垫依次搭接地粘贴在PVC底板上且分别部分重合,裁切成长度为8cm,宽度为4mm的纸条,即得CRP和SAA联合检测试纸条。

[0045] 第四方面,本发明提供CRP和SAA联合检测试剂盒的制备方法,将上述CRP和SAA联合检测试纸条,或按照上述方法制备的试纸条装载于卡壳内,即得。

[0046] 第五方面,本发明提供CRP和SAA联合检测试纸条/试剂盒在联合检测(包括定性和定量检测)CRP和SAA中的应用。

[0047] 第六方面,本发明提供CRP和SAA的定量联检方法,包括以下步骤:

[0048] ①标准曲线的绘制:分别配制不同浓度的CRP和SAA标准品溶液,取60 μ L加至上述CRP和SAA联合检测试纸条的样品垫,10min后将试纸条置于荧光免疫分析仪下,检测T线(检测线)和C线(质控线)的荧光强度,根据C线与T线的荧光强度的比值分别绘制反映CRP和SAA含量的标准曲线;

[0049] ②样本检测:将采集的样本,取60 μ L加至上述CRP和SAA联合检测试纸条的样品垫,10min后将试纸条置于荧光免疫分析仪下,分别检测T线(检测线)和C线(质控线)的荧光强

度,根据C线与T线的荧光强度的比值,代入上述标准曲线,计算获得样本中CRP和SAA的浓度。

[0050] 前述的方法,CRP的线性检测范围为0.1-100mg/L,检测下限为0.1mg/L。

[0051] 前述的方法,SAA的线性检测范围为0.5-250mg/L,检测下限为0.5mg/L。

[0052] 本发明中,上述样本可以是血清、血浆、全血及末梢血的样本。

[0053] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0054] (一)利用本发明提供的CRP和SAA联合检测试剂盒,可实现一份样本同时检测超敏C反应蛋白和血清淀粉样蛋白A两个项目,相较单个项目分开检测的样本用量少,简化了检测步骤,节约了检测时间。

[0055] (二)本方法相比其他检测方法可检样本种类多,包含血清、血浆、全血和末梢血的样本,且无需对样本进行前处理。

[0056] (三)本发明试剂盒的检测灵敏度高,可检测血清样本中0.1mg/L的C反应蛋白和0.5mg/L的血清淀粉样蛋白A;配套荧光检测仪器小巧可随身携带,检测过程操作简单,检测快速,采血后10min即可获得检测结果。

[0057] (四)本发明试剂盒的检测原理基于双抗夹心免疫反应。荧光免疫层析作为一种微量分析方法,具有操作简便、灵敏度高、成本低廉等优点,同时具有POCT快速诊断的优点,为临床检测提供方便。

附图说明

[0058] 图1为本发明实施例1中制备的CRP和SAA联合检测试纸条的结构。

[0059] 图2为本发明实施例2中制备的CRP和SAA联合检测试剂卡的结构。

[0060] 图中,1-样品垫,2-结合垫,3-分析膜,4-吸水垫,5-底板,6-检测线T1,7-检测线T2,8-质控线C,9-加样孔,10-卡壳。

具体实施方式

[0061] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0062] 以下实施例中使用的荧光微球是含有荧光物质的聚苯乙烯微球,购自南京微测生物科技有限公司。

[0063] 实施例1 CRP和SAA联合检测试纸条的制备

[0064] 1、溶液的配制

[0065] 活化液的配制:称量10.66g活化剂MES于烧杯中,加入纯化水1L,搅拌混匀后,用NaOH溶液调pH至6.1,4℃保存备用。

[0066] 偶联液PBS的配制:称量2.865g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 于烧杯中,依次称取0.272g的 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、7.948g的NaCl和1.983g的KCl加入上述烧杯中,用1L纯化水定容,搅拌混匀后,调pH至7.4,4℃保存备用。

[0067] 2、荧光微球标记抗体

[0068] (1)微球活化:向1mg/ml粒径为100nm发射波长为535nm的羧基荧光微球1ml中加入用50mM,pH6.1MES溶解的1mg EDC和10mg NHS,活化30min,10000rpm离心30min弃上清,沉淀

用pH7.4的50mM PBS重悬,得到1mg/ml活化的荧光微球溶液;

[0069] (2) CRP抗体的偶联:将0.2mgCRP标记抗体 (Abgree 801002) 加入2ml浓度为1mg/ml的活化荧光微球溶液中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含5mg BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5% BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml CRP抗体标记荧光微球溶液;

[0070] (3) SAA抗体的偶联:将0.4mgSAA标记抗体 (Medix Biochemica 2201) 加入2ml浓度为1mg/ml的活化荧光微球溶液中,室温混匀2~4h,10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用含1%BSA的50mM PBS溶液封闭60min,搅拌混匀,10000rpm离心30min,收集的沉淀保存于pH7.8含0.5%BSA的20mM Tris缓冲液中,得到浓度为0.1mg/ml SAA抗体标记荧光微球溶液;

[0071] (4) 两种抗体标记荧光微球溶液的混合:将上述(2)、(3)中制备的溶液按体积比1:1混合,充分混匀后备用;

[0072] (5) 结合垫的制备:以玻璃纤维膜作为结合垫,将步骤(4)制备的荧光微球混合液,用点膜仪以0.8 μ L/cm喷涂在预处理的玻璃纤维素膜上,干燥备用;

[0073] 3、含C线、T线分析膜的制备

[0074] 将CRP检测抗体 (Abgree 801001)、SAA检测抗体 (Medix Biochemica 2203) 和二抗羊抗鼠IgG稀释至0.8mg/ml,用点膜仪在分析膜上划线(以1 μ L/cm的量分别喷涂在硝酸纤维素膜上):分别形成CRP检测线(T1线)、SAA检测线(T2线)和质控线(C线),或者,分别形成CRP检测线(T2线)、SAA检测线(T1线)和质控线(C线),即为分析膜,干燥备用;

[0075] 4、试纸条的组装:将样品垫(玻璃纤维素膜)、结合垫、分析膜和吸水垫依次搭接地粘贴在PVC底板上且分别部分重合,裁切成长度为8cm,宽度为4mm的纸条,即得CRP和SAA联合检测试纸条。

[0076] 试纸条的结构如图1所示。其中,样品垫1,样品垫搭在结合垫2上,结合垫2搭在分析膜3左侧,吸水垫4搭在分析膜3右侧,而分析膜3贴在底板5上,分析膜上依次有CRP检测抗体划线的T1线6、SAA检测抗体划线的T2线7和二抗羊抗鼠IgG划线的线8。

[0077] 实施例2 CRP和SAA联合检测试剂盒的制备

[0078] 本实施例提供一种超敏C反应蛋白和血清淀粉样蛋白A联合检测的试剂盒,包含试剂卡。试剂卡结构如图2所示。其中,9为加样孔,10为用于装载实施例1制备的试纸条的卡壳,观察窗口上6、7、8分别对应CRP检测T1线、SAA检测T2线和质控C线。

[0079] 实施例3 CRP和SAA联合检测试剂盒的性能评估

[0080] 1、线性的评估

[0081] 采用新生牛血清作为稀释液,将超敏C反应蛋白标准品配制成浓度为100、50、20、10、2、0.5、0.1和0mg/L的标准品溶液,取60 μ L加样进行检测,10min后将试纸条置于荧光免疫分析仪下,检测T线(检测线)和C线(质控线)的荧光强度,根据T线与C线的荧光强度的比值分别绘制反映CRP含量的标准曲线,每个浓度重复检测3次,取平均值为检测浓度,用配制浓度与检测浓度做线性方程计算相关系数。结果表明,线性的相关系数 $r > 0.99$,曲线方程 $y = 0.9781x + 0.163$ 。CRP的线性检测范围为0.1-100mg/L,检测下限为0.1mg/L。

[0082] 采用新生牛血清作为稀释液,将血清淀粉样蛋白A标准品配制成浓度为250、100、50、20、10、2、0.5和0mg/L的标准品溶液,取60 μ L加样进行检测,10min后将试纸条置于荧光

免疫分析仪下,检测T线(检测线)和C线(质控线)的荧光强度,根据T线与C线的荧光强度的比值分别绘制反映SAA含量的标准曲线,每个浓度重复检测3次,取平均值为检测浓度,用配制浓度与检测浓度做线性方程计算相关系数。结果表明,线性的相关系数 $r > 0.99$,曲线方程 $y = 0.9484x + 0.7498$ 。SAA的线性检测范围为0.5-250mg/L,检测下限为0.5mg/L。

[0083] 2、重复性的评估

[0084] 将浓度为10mg/L和0mg/L的C反应蛋白溶液,每个浓度重复检测10次,计算变异系数CV。结果表明,CV小于10%。

[0085] 将浓度为0mg/L和0mg/L的血清淀粉样蛋白A溶液,每个浓度重复检测10次,计算变异系数CV。结果表明,CV小于10%。

[0086] 3、准确度的评估

[0087] 将浓度为1mg/L C反应蛋白溶液作为基础样本,加入同体积不同浓度的C反应蛋白人血清,配制成浓度为20mg/L和10mg/L的C反应蛋白溶液;另一份样本加入相同体积的阴性人血清,对回收样本和基础样本重复检测3次,计算回收率。结果表明,回收率在90%-110%范围内。

[0088] 将浓度为1mg/L血清淀粉样蛋白A溶液作为基础样本,加入同体积不同浓度的血清淀粉样蛋白A人血清,配制成浓度为20mg/L和10mg/L的血清淀粉样蛋白A溶液;另一份样本加入相同体积的阴性人血清,对回收样本和基础样本重复检测3次,计算回收率。结果表明,回收率在90%-110%范围内。

[0089] 实施例4样本测试

[0090] 本试剂盒与深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司的CRP试剂及配套检测系统、深圳国赛生物技术有限公司SAA试剂及配套检测系统进行样本测试,表1-表2为本发明试剂盒测定结果与西门子仪器及配套试剂盒测定结果相关系数 r 分别为0.9945和0.9990,相关性良好,可用于临床诊断使用。

[0091] 表1 CRP临床样本比对结果

[0092]

样本编号	本试剂测值 (mg/L)	迈瑞测值 (mg/L)	样本编号	本试剂测值 (mg/L)	迈瑞测值 (mg/L)
1	5.45	5.54	16	25.67	27.88

[0093]

2	3.30	3.19	17	34.58	30.42
3	25.06	22.27	18	38.84	38.77
4	59.35	58.35	19	50.80	50.86
5	25.59	27.86	20	4.11	3.86
6	30.46	31.57	21	5.43	5.91
7	23.48	22.33	22	21.67	21.75
8	12.45	11.05	23	16.39	16.01
9	12.96	12.35	24	25.22	24.20
10	10.35	10.15	25	10.32	10.29
11	28.39	30.28	26	31.74	28.93
12	4.50	4.26	27	11.18	10.25
13	5.19	5.02	28	7.99	7.36
14	3.75	4.03	29	30.22	32.78
15	43.34	41.85	30	44.71	40.47

[0094] 表2 SAA临床样本比对结果

[0095]

样本编号	本试剂测值 (mg/L)	国赛测值 (mg/L)	样本编号	本试剂测值 (mg/L)	国赛测值 (mg/L)
1	22.67	20.71	16	69.43	63.20
2	14.61	14.37	17	3.14	3.11
3	5.12	5.32	18	3.57	3.57
4	6.29	5.76	19	5.44	5.21
5	27.03	26.05	20	4.51	4.82
6	3.13	3.18	21	4.04	3.88
7	227.88	225.23	22	2.19	2.09
8	124.26	132.73	23	10.22	10.95
9	162.86	156.16	24	17.18	17.30
10	3.77	3.51	25	50.75	50.31
11	3.24	3.15	26	26.75	26.98
12	115.28	116.73	27	20.34	20.32
13	10.69	10.96	28	17.13	16.73
14	170.69	168.79	29	55.67	51.41
15	4.61	4.11	30	41.52	44.41

[0096] 实施例5试剂盒稳定性实验

[0097] 本试剂盒保存于2℃-30℃,18个月后测定同一份样本,试剂盒的准确度均满足要求(表3)。将试剂盒保存于37℃和45℃恒温箱保存,观察7天测定同一份样本,试剂盒的准确度满足要求(表4)。

[0098] 表3 试剂盒2℃-30℃保存稳定性结果

[0099]

时间	试剂盒项目	
	CRP	SAA
3月	1.83%	2.56%
6月	3.26%	1.29%
9月	4.73%	3.57%
12月	3.28%	2.92%
15月	4.25%	3.34%
18月	4.87%	3.55%

[0100] 表4 试剂盒于37℃和45℃加速稳定性考察结果

[0101]

时间	37℃保存试剂盒		45℃保存试剂盒	
	CRP	SAA	CRP	SAA
1天	3.52%	2.75%	2.19%	2.67%
3天	4.14%	3.13%	3.43%	3.72%
5天	3.94%	3.92%	5.25%	4.12%
7天	5.50%	4.77%	4.38%	4.34%

[0102] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

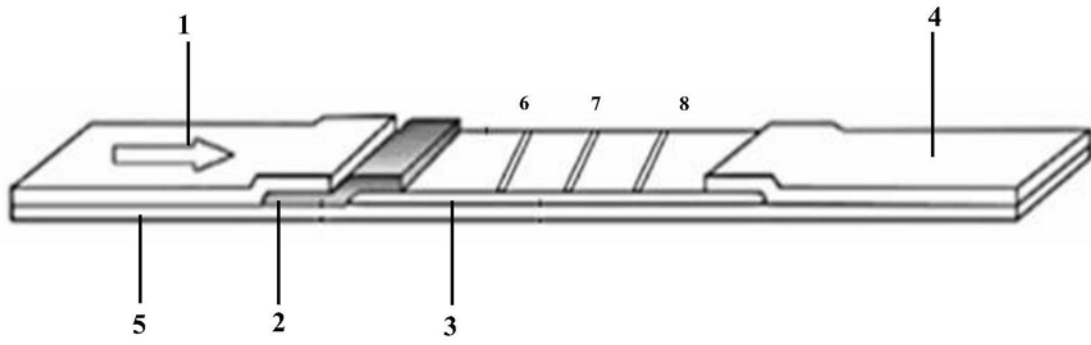


图1

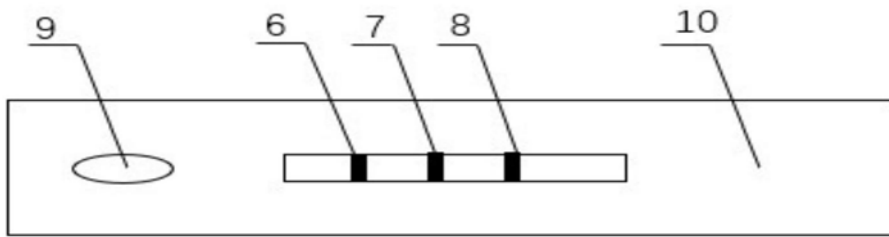


图2

专利名称(译)	CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110133281A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910371125.8	申请日	2019-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中生北控生物科技股份有限公司		
[标]发明人	张勇		
发明人	张勇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	王文君 黄爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种CRP和SAA联合检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包含CRP和SAA联合检测试纸条，所述试纸条包括样品垫、结合垫、分析膜、吸收垫和底板，所述分析膜上设有2条检测线(CRP、SAA检测线)和1条质控线，样品垫、结合垫、分析膜和吸收垫依次搭接地粘贴在底板上且分别部分重合；所述结合垫包被有CRP和SAA抗体标记荧光微球。本发明采用荧光免疫层析法制备的试剂盒，可以同时检测CRP和SAA，提高了临床检测效率，具有高灵敏度、高特异性及快速检测的优点，为感染性疾病、组织损伤坏死性疾病等疾病的辅助诊断提供有效手段。

样本编号	本试剂测值 (mg/L)	迈瑞测值 (mg/L)	样本编号	本试剂测值 (mg/L)	迈瑞测值 (mg/L)
1	5.45	5.54	16	25.67	27.88