



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111413506 A

(43)申请公布日 2020.07.14

(21)申请号 202010279263.6

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2018.01.30

G01N 33/543(2006.01)

(62)分案原申请数据

G01N 33/533(2006.01)

201810091384.0 2018.01.30

G01N 33/52(2006.01)

(71)申请人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区南山街道月亮湾大道2076号高科集团大楼6楼604、605、607、608、611、612、615、618

(72)发明人 王洪涛 张永顶 张大准

(74)专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事务所(普通合伙) 44285

代理人 夏欢

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种检测试纸条在制备检测PLA2R抗体的试剂盒中的应用

(57)摘要

本发明属于生物检测技术领域,公开了一种PLA2R抗体的检测试纸条及检测方法。本发明所述PLA2R抗体的检测试纸条,包括在粘性底板上依次搭接样品垫,结合垫1,结合垫2、NC膜和吸水纸;所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物,所述结合垫2喷涂有SA荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物,所述NC膜上包被有捕获体作为检测线,所述NC膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。本发明采用捕获法检测PLA2R抗体的试纸条显色速度更快,从加样到判读结果只要7min,检测时间更短,试纸条显色信号更强,弱阳不易发生漏检,特异性更好,能定量、准确、便捷的测试人血清、血浆及全血中PLA2R抗体的含量。

1. 一种检测试纸条在制备检测PLA2R抗体的试剂盒中的应用,其中所述检测试纸条,包括在粘性底板上依次搭接样品垫、结合垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物,所述结合垫2喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物,所述硝酸纤维素膜上包被有捕获体作为检测线,所述硝酸纤维素膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。

2. 根据权利要求1所述的应用,所述PLA2R生物素化偶联物中PLA2R为PLA2R分子全长或部分片段的蛋白,或能起到PLA2R蛋白类似作用的变异体、类似物、替代物。

3. 根据权利要求1所述的应用,所述检测试纸条中荧光微球的粒径为200nm;所述捕获体为抗人IgG抗体或能与人IgG抗体结合的物质。

4. 权利要求1所述的应用,所述检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

A、将PLA2R蛋白生物素化获得PLA2R生物素化偶联物,喷涂在结合垫1上;

B、分别将预处理的亲和素和DNP-BSA与活化的荧光微球偶联,获得亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物喷涂在结合垫2上;

C、将捕获体包被到硝酸纤维素膜上作为检测线,将抗DNP-BSA抗体包被到硝酸纤维素膜上作为质控线;

D、在粘性底板上依次搭接样本垫、喷涂有PLA2R生物素化偶联物的结合垫1、喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物的结合垫2、包被捕获体和抗DNP-BSA抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸。

5. 根据权利要求4所述的应用,所述检测试纸条的制备方法步骤B所述偶联为将活化的荧光微球离心去上清后,用pH7.0~8.0 50mM MES缓冲液洗涤后,按每100μl微球加入0.1mg~0.2mg亲和素或0.2~0.4mg DNP-BSA,室温混匀反应1~2h。

6. 根据权利要求4所述的应用,所述检测试纸条的制备方法所述步骤C具体为分别用包被液稀释捕获体和抗DNP-BSA抗体至1~2mg/ml,用喷金划膜仪分别将稀释好的捕获体和抗DNP-BSA抗体按1μl/cm划在硝酸纤维素膜上,37℃干燥16~22h;所述包被液为含5%~10%(g/ml)海藻糖的PBS。

7. 根据权利要求4所述的应用,所述检测试纸条的制备方法所述样本垫预先用含5~10%(g/ml)的海藻糖的0.5M pH=7.4的Tris-HCL缓冲液浸泡5~10min,37℃干燥2h;所述亲和素和DNP-BSA的预处理为用pH7.0~8.0 50mM MES缓冲液透析;所述微球的活化的方法为微球用50mM pH6.0~6.5MES溶液洗涤后,按每100μl微球加入0.2~0.4μgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)和0.2~0.4μgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)室温混匀反应30~40min;所述亲和素和DNP-BSA与活化的荧光微球偶联后还包括封闭的步骤,具体为加入BSA至浓度为1%~5%(g/ml),室温混匀反应30~40min。

8. 一种PLA2R抗体的检测试剂盒,包括检测PLA2R抗体的检测试纸条、样品缓冲液和/或不同浓度梯度的PLA2R抗体标准品;其中所述检测试纸条包括在粘性底板上依次搭接样品垫、结合垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物,所述结合垫2喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物,所述硝酸纤维素膜上包被有捕获体作为检测线,所述硝酸纤维素膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。

9. 一种PLA2R抗体的检测方法,取待测样本加入样品缓冲液,混合后10秒钟,加到权利

要求8所述检测试剂盒的检测试纸条的样本垫上,将检测试纸条插入荧光分析仪的检测孔,放置3-4分钟,以检测线(T带)、质控线(C带)的荧光强度比值为纵坐标,PLA2R抗体标准溶液浓度为横坐标计算PLA2R抗体的浓度值。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,所述待测样本为全血、血清、血浆、尿液或唾液。

## 一种检测试纸条在制备检测PLA2R抗体的试剂盒中的应用

[0001] 本申请是申请日为2018年01月30日、发明名称为“一种PLA2R抗体的检测试纸及检测试方法”、申请号为201810091384.0的发明的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明属于生物检测技术领域，具体涉及一种PLA2R抗体的检测试纸条及检测方法。

### 背景技术

[0003] 膜性肾病(MN)是成人肾病综合征最常见的病理类型之一,其特征性的病理学改变是肾小球毛细血管袢上皮侧可见大量免疫复合物沉积。MN按发病原因可分为特发性膜性肾病(IMN)和继发性膜性肾病(SMN)两大类。IMN是一种肾小球慢性炎症性疾病,大多与抗磷脂酶A2受体抗体相关,抗磷脂酶A2受体抗体与足细胞上的相应抗原结合,形成原位免疫复合物,继而通过旁路途径激活补体,形成C5b-9膜攻击复合物,损伤足细胞,破坏肾小球滤过屏障,其典型特征是蛋白尿,随着尿蛋白含量的增加,有肾衰竭的发展趋势。而SMN与IMN不同,是继发性疾病或并发性疾病,药物治疗、滥用毒品、感染性疾病、其他的自身免疫疾病和肿瘤都可能导致SMN的发生。如系统性红斑狼疮,类风湿性关节炎,乙肝病毒感染,以及药物、毒物、肿瘤或环境因素等。引起继发性膜性肾病的药物主要有一些金制剂、汞、青霉素、布洛芬、双氯芬酸等。同时,SMN可以随着根本疾病的治疗而好转。

[0004] IMN和SMN的诊断主要依靠临床表现和肾脏穿刺。肾脏穿刺即肾活检,也称肾穿刺活检术。是一种侵入式的创伤诊断方法,对病人有一定的伤害,而根据临床表现的诊断需要一定的经验,并且也需要组织病理学的验证。近年来的研究和文献报道,IMN是一种自身免疫性疾病,已经发现的自身免疫抗原磷脂酶A2受体(PLA2R)是其主要靶抗原,对IMN的诊断阳性率可达70%-82%,且在其他疾病和正常人血清样本中未检测出该抗体。血清学PLA2R抗体定量检测可以为特发性的膜性肾病的初筛和病情监测提供辅助作用。因此开发非创伤、低风险、快速、安全、廉价、精确的定量检测血清、血浆和全血中IMN相关自身抗体的含量的方法对特发性的膜性肾病的检测具有十分重要的意义。

[0005] 现在已有欧蒙公司的间接免疫荧光法试剂盒测试血清中Pla2r抗体,但间接免疫荧光法操作过程繁琐,检测时间长。申请号为201510245291.5的中国专利公开了采用双抗原夹心测试血清PLA2R抗体检测试纸条,但该方法判读结果至少需要15min,显色信号弱,容易发生弱阳性的漏检。申请号为201710047530.5的中国专利公开了采用胶体金免疫层析技术测试血清pla2r抗体的,但该方法无法满足定量测试的要求。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于针对现有技术中操作过程繁琐、检测时间长、显色信号弱、无法定量检测的缺陷,提供一种能定量、准确、便捷的测试人血清、血浆和全血中PLA2R抗体的检测试纸条及检测方法。

[0007] 为了实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一种检测试纸条在制备检测PLA2R抗体的试剂盒中的应用,其中所述检测试纸条,包括在粘性底板上依次搭接样品垫、结合垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物,所述结合垫2喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物,所述硝酸纤维素膜上包被有捕获体作为检测线,所述硝酸纤维素膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。

[0009] 一种PLA2R抗体的检测试纸条,包括在粘性底板上依次搭接样品垫,结合垫1,结合垫2、硝酸纤维素膜(NC)和吸水纸;所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物,所述结合垫2喷涂有亲和素(SA)荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物,所述硝酸纤维素膜上包被有捕获体作为检测线,所述硝酸纤维素膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。

[0010] 其中,所述检测试纸条中所述PLA2R生物素化偶联物中所述PLA2R包括但不限于为PLA2R分子全长或部分片段的蛋白,或能起到PLA2R蛋白类似作用的变异体、类似物、替代物。所述PLA2R可以是天然纯化的PLA2R,也可以是基因工程技术重组获得的。

[0011] 作为优选,所述PLA2R分子部分片段为与THSD7A蛋白序列组合的PLA2R中的分子片段。

[0012] 作为优选,所述的检测试纸条中所述荧光微球的粒径为200nm。

[0013] 作为优选,所述的检测试纸条中所述捕获体为抗人IgG抗体或能与人IgG抗体结合的物质,如蛋白A或蛋白G。更优选为鼠抗人IgG,如鼠抗人IgG4。

[0014] 本发明还提供了所述PLA2R抗体的检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0015] A、将PLA2R蛋白生物素化获得PLA2R生物素化偶联物,喷涂在结合垫1上;

[0016] B、分别将预处理的亲和素和DNP-BSA与活化的荧光微球偶联,获得亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物喷涂在结合垫2上;

[0017] C、将捕获体包被到硝酸纤维素膜上作为检测线,将抗DNP-BSA抗体包被到硝酸纤维素膜上作为质控线;

[0018] D、在粘性底板上依次搭接样本垫、喷涂有PLA2R生物素化偶联物的结合垫1、喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物的结合垫2、包被捕获体和抗DNP-BSA抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸。

[0019] 本发明对PLA2R蛋白生物素化的方法没有限定,可以采用本领域技术人员公知的方法进行。在一些实施方案中,本发明采用常用的生物素化的试剂盒对PLA2R蛋白进行生物素标记。如使用Thermo公司的EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin生物素化试剂盒

[0020] 步骤A中将PLA2R生物素化偶联物喷涂在结合垫1上的具体操作为用喷金划膜仪将PLA2R生物素化偶联物以2 $\mu$ l/cm的量喷涂结合垫1,37℃烘箱干燥2h。

[0021] 本发明所述检测试纸条的制备方法步骤B所述偶联优选为将活化的荧光微球离心去上清后,用pH7.0~8.0 50mM MES缓冲液洗涤后,按每100 $\mu$ l微球加入0.1mg~0.2mg亲和素或0.2~0.4mgDNP-BSA,室温混匀反应1-2h。

[0022] 本发明所述检测试纸条的制备方法步骤B中所述亲和素和DNP-BSA在与荧光微球偶联前需要进行预处理。优选为分别用pH7.0~8.0 50mM MES缓冲液透析亲和素和DNP-BSA三遍。

[0023] 步骤B中所述荧光微球需要预先活化处理。所述微球的活化的方法优选为微

球用50mM pH6.0~6.5MES溶液洗涤后,按每100μl微球加入0.2~0.4μgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)和0.2~0.4μgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)室温混匀反应30~40min。

[0024] 进一步作为优选,步骤B中所述亲和素和DNP-BSA与活化的荧光微球偶联后还包括封闭的步骤。更优选的,所述封闭的具体操作为加入BSA至浓度为1%~5%(g/ml),室温混匀反应30~40min。即加入BSA至浓度为每100ml 1g~5g,室温混匀反应30~40min。

[0025] 亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物可以现用现制,也可预先制备后保存于保存液中。所述保存方法具体为将亲和素荧光微球偶联物或DNP-BSA荧光微球偶联物用pH8.5 10mmol/L硼酸溶液离心洗涤后再加保存液保存。优选的,所述保存液为含1%~5%BSA,1%~2%海藻糖的pH8.510mmol/L硼酸溶液。其中,所述BSA和海藻糖的浓度均为质量体积浓度,按g/ml计,即每100ml保存液含1g~5g BSA,1g~2g海藻糖。

[0026] 步骤B中亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物喷涂在结合垫2上的具体操作为用喷金划膜仪分别将亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物以2μl/cm的量喷涂结合垫2,37℃烘箱干燥2h。

[0027] 本发明所述检测试纸条的制备方法步骤C、将捕获体包被到硝酸纤维素膜上作为检测线,将抗DNP-BSA抗体包被到硝酸纤维素膜上作为质控线。所述步骤C具体为分别用包被液稀释捕获体和抗DNP-BSA抗体至1~2mg/ml,用喷金划膜仪分别将稀释好的捕获体和抗DNP-BSA抗体按1μl/cm划在硝酸纤维素膜上,37℃干燥16~22h;所述包被液为含5%~10%海藻糖的PBS。其中,所述海藻糖的浓度为质量体积浓度,按g/ml计,即每100ml包被液含5g~10g海藻糖。

[0028] 本发明所述检测试纸条的制备方法步骤D在粘性底板上依次搭接样本垫、喷涂有PLA2R生物素化偶联物的结合垫1、喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物的结合垫2、包被捕获体和抗DNP-BSA抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸组装获得试纸条。

[0029] 其中,作为优选,所述样本垫预先用含5~10%的海藻糖的0.5M pH=7.4的Tris-HCL缓冲液浸泡5~10min,37℃干燥2h。其中,所述海藻糖的浓度为质量体积浓度,按g/ml计,即每Tris-HCL缓冲液含5g~10g海藻糖。

[0030] 本领域技术人员可以理解本发明对所述PLA2R抗体的检测试纸条的样品垫、结合垫1、结合垫2的材质没有特殊限制,可以为常用材质,如聚酯膜、玻璃纤维。

[0031] 本发明还提供了一种PLA2R抗体的检测试剂盒,包括上述的检测试纸条、样品缓冲液和/或不同浓度梯度的PLA2R抗体标准品。如6~7个浓度梯度的PLA2R抗体标准品用于对试纸条进行定标测试,按照统计学方法,以检测线(T带)、质控线(C带)的荧光强度比值(T带检测值/C带检测值)为纵坐标,PLA2R标准溶液浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线数据储存到仪器。

[0032] 在一些实施方案中,所述不同浓度梯度的PLA2R抗体标准品具体选用2RU/ml、20RU/ml、100RU/ml、500RU/ml、1000RU/ml、1500RU/ml 6个PLA2R抗体单位浓度进行定标测试,用同一批次的试纸条,每个点测试6次。按照统计学方法,以检测线(T带)、质控线(C带)的荧光强度比值(T带检测值/C带检测值)为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线,数据储存到仪器。

[0033] 本发明还提供了一种PLA2R抗体的检测方法,取待测样本加入样品缓冲液,混合后10秒钟,加到上述的检测试纸条的样本垫上,将检测试纸条插入荧光分析仪的检测孔,放置

3-4分钟,以检测线(T带)、质控线(C带)的荧光强度比值(T带检测值/C带检测值)为纵坐标,PLA2R抗体标准溶液浓度为横坐标计算PLA2R抗体的浓度值。

[0034] 本发明在硝酸纤维素膜上包被抗人IgG4(或IgG)的捕获体,用来捕获样品中存在的PLA2R抗体,同时利用生物素-亲和素的信号放大系统将PLA2R抗原先用生物素化的试剂进行生物素化,同时将亲和素(SA)用荧光微球标记偶联。检测样本时,待测样本中的PLA2R抗体与结合垫1上的生物素化的PLA2R发生特异性的结合反应,而生物素化的PLA2R又可与结合垫2上亲和素的荧光微球结合,在经过硝酸纤维素膜包被的捕获体时被捕获体捕获,同时结合生物素与亲和素的信号放大反应,通过荧光微球的信号显色,可得到仪器读取的信号反应值结果(见图2)。

[0035] 作为优选,所述待测样本为全血、血清、血浆、尿液或唾液。如静脉血,末梢血等。

[0036] 由上述技术方案可知,本发明提供了一种PLA2R抗体的检测试纸条及检测方法。本发明所述PLA2R抗体的检测试纸条,包括在粘性底板上依次搭接样品垫,结合垫1,结合垫2、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物,所述结合垫2喷涂有亲和素荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物,所述硝酸纤维素膜上包被有捕获体作为检测线,所述硝酸纤维素膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。本发明采用捕获法检测样本中的PLA2R抗体,检测试纸条的硝酸纤维素膜上包被捕获体,生物素化的抗原PLA2R结合了待测样本中的PLA2R抗体同时结合了亲和素偶联的荧光微球移动至硝酸纤维素膜上被包被了捕获体的检测线位置捕获,截留的荧光微球产生信号。本发明采用捕获法检测PLA2R抗体的试纸条显色速度更快,从加样到判读结果只要7min,与申请号为201510245291.5的中国专利公开的采用双抗原夹心测试血清PLA2R抗体的方法相比检测时间更短(双抗原夹心法判读结果至少要15min),并且本发明采用捕获法检测PLA2R抗体的试纸条显色信号更强,弱阳不容易发生漏检,而且特异性更好,能定量、准确、便捷的测试人血清、血浆及全血中PLA2R抗体的含量。

## 附图说明

[0037] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0038] 图1示本发明所述PLA2R抗体的检测试纸条结构图;

[0039] 图2示本发明所述PLA2R抗体的检测方法的原理图。

## 具体实施方式

[0040] 本发明公开了一种PLA2R抗体的检测试纸条及检测方法。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0041] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所

获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0042] 如无特殊说明，本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品，均可以通过商业渠道购买获得。

[0043] 实施例1、本发明的检测PLA2R抗体的荧光试纸条的制作

[0044] 1. 亲和素(SA)荧光微球偶联物、DNP-BSA荧光微球偶联物的制备

[0045] 1.1配制50mM pH7.0 MES溶液

[0046] 1.2配制50mM pH6.5 MES溶液

[0047] 1.3将要偶联的亲和素、DNP-BSA分别用50mM pH7.0MES缓冲液透析三遍，4℃暂存备用。

[0048] 1.4微球的活化：200nm微球20μl，加入50mM pH6.5 MES溶液，12000r/min离心洗涤两遍后，按每100μl微球加入0.25μgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)和0.25μgEDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)，室温混匀反应40min。

[0049] 1.5微球的偶联：上述活化好的微球12000r/min离心去上清后，用pH7.0的50mM MES缓冲液离心洗涤2遍后按每100μl微球分别加入透析好的0.2mg亲和素，或0.25mgDNP-BSA，室温混匀反应1h。

[0050] 1.6微球的封闭：将上述偶联好的微球加入BSA，使BSA浓度为1% (1g/100ml)，室温继续混匀反应40min。

[0051] 1.7微球的保存：将上述封闭好的SA微球、DNP-BSA微球分别用pH=8.510mmol/L硼酸溶液12000r/min洗涤两遍后加保存液4℃保存，所述保存液成分为含1%BSA (1g/100ml)，2% (2g/100ml) 海藻糖的pH8.5 10mmol/L硼酸溶液。

[0052] 2. PLA2R生物素化偶联物的制备：使用Thermo EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin生物素化试剂盒将PLA2R生物素化，4℃暂存备用。

[0053] 3.结合垫1、结合垫2的制备

[0054] 将上述制备的PLA2R生物素化偶联物用喷金划膜仪以2μl/cm的体积喷涂于1cm宽玻璃纤维上，制成结合垫1，将上述制备的SA荧光微球偶联物、DNP-BSA荧光微球偶联物用喷金划膜仪以2μl/cm的体积喷涂于1cm宽玻璃纤维上，制成结合垫2；分别将结合垫1和结合垫2置于37℃烘箱干燥2h，密封储存备用。

[0055] 4. 硝酸纤维素膜(NC膜)的包被

[0056] 用含5% (5g/100ml) 海藻糖的0.01M PBS作为包被液，将鼠抗人IgG4稀释成1mg/ml，将兔抗DNP-BSA稀释成1mg/ml，使用喷金划膜仪把稀释好的鼠抗人IgG4、兔抗DNP-BSA按1μl/cm划在NC膜上，分别作T线和C线，37℃烘箱干燥22h，密封储存备用。

[0057] 5. 试纸条的组装

[0058] 在粘性PVC底板上依次搭接样品垫、结合垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜(按上述步骤已包被)、吸水纸，并裁成4mm宽的试纸条组装于卡上(见图1)。

[0059] 6. 试纸条的定标测试

[0060] 选用2RU/ml、20RU/ml、100RU/ml、500RU/ml、1000RU/ml、1500RU/ml，6个PLA2R单位浓度进行定标测试，用同一批次的试纸条，每个点测试6次。按照统计学方法，以检测线(T带)、质控线(C带)的荧光强度比值(T带检测值/C带检测值)为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，建立方程并拟合成标准曲线，数据储存到仪器。

[0061] 实施例2、本发明的PLA2R抗体的荧光试纸条的性能测试

[0062] 以下测试每个样本加60 $\mu$ l血清检测,7min仪器读取检测结果。

[0063] 1. 本发明所述试纸条临界值的确定:通过检测220份正常人血清,抗PLA2R抗体浓度的平均值为12.8RU/ml和标准差为1.17RU/ml,以平均值加3倍标准差之和作为临界值,则临界值为16.31RU/ml。

[0064] 2. 本发明所述试纸条精密度确定:选取高、中、低值3份质控血清(高值控靶值:300RU/mL,中质控靶值:70RU/mL,低值控靶值:30RU/ml),在同次试验内每份重复测定10次,分别计算平均值、标准差,计算试验内变异系数CV(%);每天测定1次,连续测定10天,计算试验间CV(%)值。计算公式为:CV(%) = 标准差/平均值  $\times$  100%。实验数据如下表1。

[0065] 表1试纸条精密度结果

[0066]	质控血清	实验内		试验间	
		平均值 (RU/mL)	CV(%)	平均值 (RU/mL)	CV(%)
[0067]	1	287.2	6.23	299.6	8.37
	2	63.9	7.49	61.4	9.06
	3	25.1	8.95	27.2	11.55

[0068] 注:试验内是指在一次试验中,对相同试验反复测试多次;试验间指相同试验在不同时间内重复测试。

[0069] 表1结果显示,本发明所述试纸条精密度符合要求。

[0070] 3. 本发明所述试纸条准确性的检测(回收率实验):

[0071] 选择抗PLA2R抗体浓度分别为57和301RU/ml的2份血清,此低值血清和高值血清分别以1:4、1:1和9:1比例混合成3份不同浓度的血清,理论值分别为252.2、207.5和81.4RU/ml。通过试剂盒检测,计算检测值与理论值的一致性,即回收率。回收率计算结果见表2。计算公式为:回收率=测试值/理论值  $\times$  100%。

[0072] 表2回收率计算结果

[0073]	测试	低血清 ( $\mu$ l)	高血清 ( $\mu$ L)	理论值 (RU/mL)	测试值 (RU/mL)	回收率 (RU/ml)
	1	2	8	252.2	246.4	97.7
	2	5	5	207.5	189.9	91.5
	3	9	1	83.4	90.6	108.6

[0074] 结果显示,回收率在91%-109%之间,平均回收率为99.3%。准确性符合要求。

[0075] 4. 本发明所述试纸条符合率评价

[0076] 与金标准对比:选取通过肾脏穿刺术确诊为特发性膜性肾病患者血清113份,非特发性膜性肾病患者血清43份,以肾脏穿刺术为金标准,统计结果如下表3。

[0077] 表3符合率实验

检测结果		n	一致的例数	一致率分母	一致率 (%)
金标准	本发明所述试纸条				
+	+	96	96	113	85
+	-	17			
-	+	3			
-	-	40			
合计		156	136	156	87

[0079] 结果显示,本发明所述试纸条的特异性为93.0%,敏感性为85.0%。

[0080] 实施例3、与申请号为201510245291.5中国专利比较

[0081] 1.选取10个弱阳性质控血清进行测试,分别采用本发明试纸条和申请号为201510245291.5中国专利的试纸条进行血清中PLA2R抗体浓度的检测,分别于7min和15min读取结果,结果见表4。

[0082] 表4弱阳性质控血清不同读取时间的检测结果比较

质控血清	理论浓度 (RU/ml)	本发明所述试纸条 测试浓度 (RU/ml)		申请号为201510245291.5中国专利的测试浓度 (RU/ml)	
		7min	15min	7min	15min
1	24.8	24.8	24.9	16.9	24.4
2	25.6	25.5	25.7	21.2	25.0
3	28.7	28.9	28.8	15.8	28.0
4	31.8	31.8	31.8	17.8	31.2
5	23.7	24	24.1	19.0	23.2
6	26.6	26.8	26.8	20.2	25.0
7	19.8	20	19.9	11.2	19.6
8	21.3	21.2	21.5	10.2	21.2
9	22.5	22.6	22.5	12.8	22.3
10	22.7	22.8	22.8	10.9	22.5

[0084] 结果显示,申请号为201510245291.5中国专利的试纸条测试7min判读结果与理论浓度相差较大,采用本发明所述试纸条测试7min与15min判断结果与理论浓度一致,且测试结果要更准确。

[0085] 2.选取15个阴性临床样本,分别用本发明所述试纸条与申请号为201510245291.5中国专利的试纸条同时进行测试比较,结果见表5。

[0086] 表5阴性临床样本比较结果

临床阴性 血清样本	本发明所述试纸 条7min测试浓度	申请号为201510245291.5中国 专利的试纸条15min测试浓度
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	±
6	-	-
7	-	-
8	-	±
9	-	-
[0087]	10	-
	11	-
	12	±
	13	±
	14	-
	15	-
[0088]	10	-
	11	-
	12	±
	13	±
	14	-
	15	-

[0089] 注：“-”表示阴性，“±”表示弱阳

[0090] 结果显示,15个临床阴性血清采用本发明所述试纸条测试全部阴性,而采用申请号为201510245291.5中国专利的试纸条测试出现4个假阳,说明本发明所述试纸条特异性更好。

[0091] 综合以上对比数据可知,本发明所述试纸条检测时间更短,检测结果更准确。

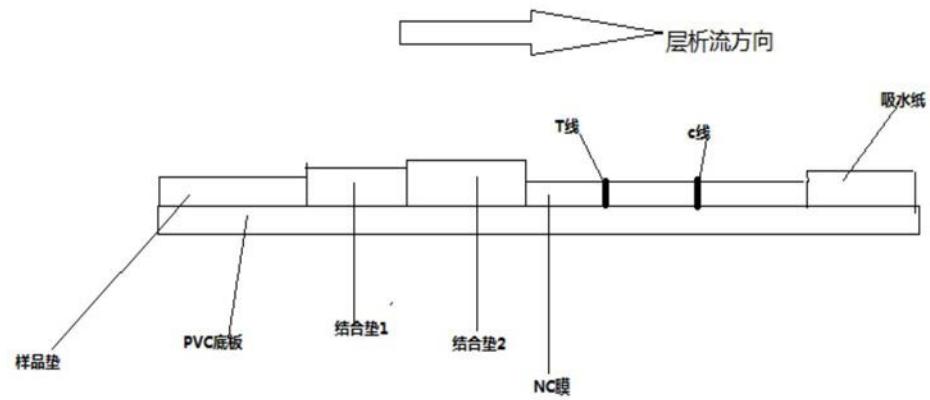


图1

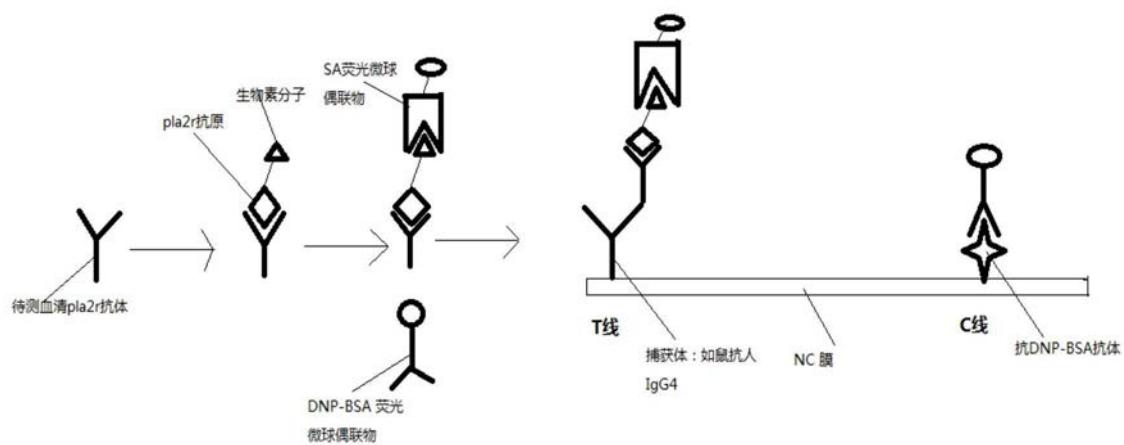


图2

专利名称(译)	一种检测试纸条在制备检测PLA2R抗体的试剂盒中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN111413506A</a>	公开(公告)日	2020-07-14
申请号	CN202010279263.6	申请日	2018-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市伯劳特生物制品有限公司		
[标]发明人	王洪涛 张永顶 张大准		
发明人	王洪涛 张永顶 张大准		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 G01N33/52		
代理人(译)	夏欢		
外部链接	<a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明属于生物检测技术领域，公开了一种PLA2R抗体的检测试纸条及检测方法。本发明所述PLA2R抗体的检测试纸条，包括在粘性底板上依次搭接样品垫，结合垫1，结合垫2、NC膜和吸水纸；所述结合垫1上喷涂有PLA2R生物素化偶联物，所述结合垫2喷涂有SA荧光微球偶联物和DNP-BSA荧光微球偶联物，所述NC膜上包被有捕获体作为检测线，所述NC膜上还包被有抗DNP-BSA抗体作为质控线。本发明采用捕获法检测PLA2R抗体的试纸条显色速度更快，从加样到判读结果只要7min，检测时间更短，试纸条显色信号更强，弱阳不易发生漏检，特异性更好，能定量、准确、便捷的测试人血清、血浆及全血中PLA2R抗体的含量。

