



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 208443852 U

(45)授权公告日 2019.01.29

(21)申请号 201820668151.8

(22)申请日 2018.05.04

(73)专利权人 广州敏捷生物技术有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区瑞和路
39号G2栋601

(72)发明人 汤永平 梁展鹏

(74)专利代理机构 广州市科丰知识产权代理事
务所(普通合伙) 44467

代理人 王海曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

(ESM)同样的发明创造已同日申请发明专利

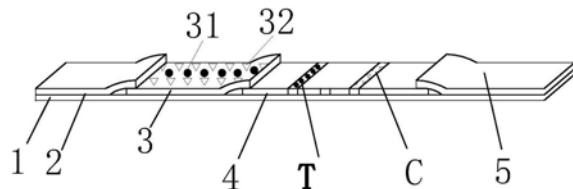
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)实用新型名称

用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检
测卡

(57)摘要

本实用新型公开了一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡；其技术要点包括底板，在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫，所述结合垫上设有荧光微球标记的CRP单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY，所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线，以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。



1. 一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,包括底板(1),在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于,所述结合垫(3)上设有荧光微球标记的CRP单克隆抗体(31)和荧光微球标记的羊抗鸡IgY(32),所述的硝酸纤维膜(4)设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线。

2. 根据权利要求1所述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,还包括盒体(9),所述盒体(9)内设有样品稀释瓶(6)和用于检测犬CDV的免疫荧光层析检测卡。

3. 根据权利要求2所述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述盒体(9)内还设有吸管(8)。

4. 根据权利要求1所述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述的免疫荧光层析检测卡位于壳体(7)内,所述的壳体(7)上设有与样品垫(2)相适配的加样孔(72),与结合垫(3)相适配的观察窗口(71)。

5. 根据权利要求4所述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述的壳体(7)上表面还设有防滑条(73)。

用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡

技术领域

[0001] 本实用新型公开了一种免疫荧光层析检测卡,具体地说,是一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡。

背景技术

[0002] C反应蛋白(CRP)是机体非免疫系统的组成成分,在多种哺乳动物疾病的急性期有重要的诊断警示作用。CRP在肝脏的合成反应主要由IL-1、IL-6和TNF- α 等炎症因子所调节。CRP浓度受年龄、性别和体重的影响不大。在人类临床医学诊断中,CRP作为炎性或非炎性疾病诊断标志物进行检测已超过30年。在兽医临幊上,犬CRP的检测在临幊应用中也比较广泛,包括急性感染性疾病的诊断和鉴别诊断、手术后感染的监测、抗生素疗效的观察、病程监测及预后判断等。犬CRP对疾病敏感度高,能在疾病早期快速升高,及时反映病情;而且CRP的浓度不受到抗生素及免疫抑制剂的影响,在治疗中可以准确地对疾病的发展进行监测,在临幊诊疗中具有很高的价值。因此作为炎症标记物,CRP在兽医临幊上的作用日趋显著,检测犬CRP对临幊诊断、疗效及预后观察等具有重要价值。

[0003] CRP是由肝脏合成的一种能与肺炎链球菌C多糖反应形成复合物的急性时相反应蛋白。它由5个相同的亚基单位以非共价方式联接,与人CRP不同,犬CRP的5个亚基中有两个被糖基化。研究表明,各种抗其他物种CRP蛋白的抗血清,都不能和急性期犬血清或者分离的犬CRP发生交叉反应,说明其他物种CRP和犬CRP没有共同的抗原性,这种现象也说明犬CRP的快速检测方法不能依赖于人的商品化CRP快速检测试纸条。目前,临幊中快速检测犬CRP的方法多是依赖于临幊检测仪器,这在普通宠物医院并不具备。而且,对于动物疫病诊断行业,很多情况下,对于疾病的诊断需要在野外进行,这对于现行犬CRP 检测方法是没有办法完成的。时间分辨荧光免疫层析技术采用稀土元素(如Eu³⁺等)克服了荧光微球灵敏度较差的缺点。与放射性免疫分析相比,时间分辨荧光免疫层析技术无放射性污染,具有灵敏度高、抗基质干扰性好,稳定性强等优点。

[0004] 中国专利ZL201710468621.6公开了一种犬C反应蛋白荧光检测试纸条,由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、底板依次组成,所述结合物释放垫上包被有鼠抗犬C反应蛋白单克隆抗体-荧光微球标记物,所述反应膜上包括检测区和质控区,所述检测区包被有鸡抗犬C反应蛋白多克隆抗体,所述质控区包被有羊抗鼠抗抗体;但是该方法存在下述缺点:检测线包被抗体为多克隆抗体,可能会影响到检测的特异性;另外反应膜检测区和质控区发生免疫反应时,共用一种标记物:鼠抗犬C反应蛋白单克隆抗体-荧光微球标记物,当样本中C反应蛋白变化是,C线荧光值将相应变化,从而可能影响C值和T/C 值的稳定性,从而严重影响定量的准确性。

[0005] 中国专利ZL201710468614.6公开了一种犬C反应蛋白胶体金免疫层析试纸条,由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫、底板依次组成,所述结合物释放垫上包被有鼠抗犬C反应蛋白单克隆抗体-胶体金标记物,所述反应膜上包括检测区和质控区,所述检测区包被有鸡抗犬C反应蛋白多克隆抗体,所述质控区包被有羊抗鼠抗抗体。该方法选用了胶

体金作为示踪物,免疫标记物依靠静电吸附,存在灵敏度较低、难以定量、重复性和稳定性较差等缺陷,无法完全满足临床的检测需求。

实用新型内容

[0006] 针对上述问题,本实用新型的目的是提供一种灵敏度高,检测结果重现性的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡。

[0007] 为此,本申请提供的技术方案是这样的:

[0008] 一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的CRP单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线。

[0009] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,还包括盒体,所述盒体内设有样品稀释瓶和用于检测犬CDV的免疫荧光层析检测卡。

[0010] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,所述盒体内还设有吸管。

[0011] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,所述的壳体上设有与样品垫相适配的加样孔,与结合垫相适配的观察窗口。

[0012] 进一步的,上述的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,所述的壳体上表面还设有防滑条。

[0013] 与现有技术相比,本实用新型提供的技术方案具有如下优点:

[0014] 1、本实用新型操作步骤简单,对样品预处理方法进行优化,只需要采集犬血清,稀释后加入到检测卡的加样孔中即可检测,检测速度快,10分钟出结果,结果即可定性观察又可定量测定,大大降低检测成本,减少工作量。

[0015] 2、本申请提供的技术方案,通过对样品垫处理液和标记荧光微球稀释液的优化,相比传统工艺,灵敏度明显高,最低检测限(LOD)可达到0.86mg/L(原工艺1.56mg/L),线性更好,剂量-反应曲线的决定系数由0.9874提升到0.9989。

[0016] 3、本申请提供的技术方案对结合垫、硝酸纤维膜制备过程严格考究、优化,进一步提高了检测卡的精密度。

附图说明

[0017] 图1是本实用新型提供的检测试纸卡结构示意图;

[0018] 图2是本实用新型提供的检测试纸条结构示意图;

[0019] 图3是本实用新型提供的另一种检测试纸卡结构示意图;

[0020] 图4是本实用新型提供的检测卡判定结果为阳性时示意图;

[0021] 图5是本实用新型提供的检测卡判定结果为阴性示意图;

[0022] 图6是本实用新型提供的检测卡判定结果为无效时一种示意图;

[0023] 图7是本实用新型提供的检测卡判定结果为无效时另一种示意图;

[0024] 图8是本申请提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施方式,对本实用新型的权利要求作进一步的详细说明。

[0026] 实施例1

[0027] 本实用新型提供的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图2,包括壳体7,所述的壳体7内设有用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡包括卡底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记的CRP单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY;所述的硝酸纤维膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条,方便试剂卡的取出与放入。

[0028] 实施例2

[0029] 本申请提供的另一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图3,包括盒体9,所述的盒体9内设有样品稀释液瓶6,吸管8以及检测卡,所述检测卡位于壳体7内,所述用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡包括底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记的CRP单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY。所述的硝酸纤维膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条,方便试剂卡的取出与放入。

[0030] 更为具体的说,所述的样品稀释液瓶中样品稀释液为含1%S9、1%SDS、0.1%Triton X-100的0.1M pH7.8的Tris-盐酸缓冲液。

[0031] 实施例3

[0032] 实施例1或者2中提供的一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡的制备方法是在温度(18~26)℃、湿度≤30%的环境下进行装配,在底板1上依次衔接有硝酸纤维膜4、吸水垫5、结合垫3和样品垫2;将粘贴好的大板切成4.0MM宽的试纸条,装入塑料卡壳内,即CDV检测卡;将每一检测卡置于铝膜袋中,加入干燥剂1包,热合封口备用。

[0033] 具体制备方法如下:

[0034] 1.1结合垫的制备

[0035] 1.1.1 CRP单克隆抗体的标记

[0036] 1)选择微球:微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0037] 2)稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL 0.1M的MES标记缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入荧光微球1mg,涡旋混匀。

[0038] 3)微球的活化:在上述离心管中加入(20~50)μl(优选30μl)50mg/mL标记活化剂A[50mg/mL-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.05M的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)],涡旋混匀后加入(20~50)μl(优选30μl)50mg/mL标记活化剂B[50mg/mL1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)],旋转培养器上反应30min;

[0039] 4) 活化淬灭: 将活化后的荧光微球20000g离心30min, 弃上清, 留取沉淀, 加入2mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液), 超声2s;

[0040] 5) 抗体的标记: 在超声重悬后的荧光微球中加入20 μ g CRP单克隆抗体, 涡旋混匀, 置于旋转培养器上反应30min;

[0041] 6) 封闭: 加入200.0 μ l标记封闭液[含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液], 超声2s, 间歇5s, 重复3次, 超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

[0042] 7) 纯化: 完成上述反应后, 19000g离心30min, 吸去上清, 留取沉淀, 加入600.0 μ l标记荧光微球稀释液[含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.5%牛丙种球蛋白、3%蔗糖的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液], 超声, 工作2S, 间歇5S, 重复3次。

[0043] 1.1.2 质控C线抗体的标记

[0044] 1) 稀释微球: 取一离心管, 加入1mL的标记缓冲液, 取荧光微球0.5mg, 涡旋混匀;

[0045] 2) 微球的活化: 在上述离心管中加入20 μ l-50 μ l(优选30 μ l)标记活化剂A[含50mg/mL-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.05M的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)]和20 μ l-50 μ l(优选30 μ l)标记活化剂B[含50mg/mL1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)], 旋转培养器上反应30min;

[0046] 3) 活化淬灭: 将活化后的荧光微球19000g离心30min, 弃上清, 留取沉淀, 加入1mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液), 90W超声, 工作2s, 间歇5s, 重复1次;

[0047] 4) 抗体的标记: 在超声重悬后的荧光微球中加入0.25mg羊抗鸡IgY, 涡旋混匀, 置于旋转培养器上反应30min;

[0048] 5) 封闭: 加入标记封闭液[含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液], 封闭30min;

[0049] 6) 纯化: 完成上述反应后, 19000g离心30min, 吸去上清, 留取沉淀, 加入1mL标记荧光微球稀释液[含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.5%牛丙种球蛋白、3%蔗糖的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液], 90W超声, 工作2s, 间歇5s, 重复3次。

[0050] 1.1.3 喷膜

[0051] 1) 将玻纤裁切为(10±1)mm×(300±10)mm大小为结合垫;

[0052] 2) 将标记后的T、C线抗体按20:1(V:V)混合均匀, 90W超声, 工作2s, 间歇5s, 重复3次;

[0053] 3) 按3.5 μ l/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0054] 4) 喷完后, 37°C干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0055] 1.2 反应膜的制备

[0056] 1) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将鸡IgY稀释到1mg/mL, 即为C线工作液。

[0057] 2) 用含3%蔗糖的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将另一株CRP单克隆抗体稀释到1mg/mL, 即为T线工作液。

[0058] 3) 取PVC底板, 粘贴硝酸纤维膜。

[0059] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线, 划线浓度均为1 μ L/cm。

[0060] 5) 完成后将片材放置在37°C干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0061] 1.3 样品垫制备

[0062] 1) 配制样品垫处理液:含1%牛血清白蛋白(BSA)、2%聚乙二醇4000和0.5% Triton X-100的pH9.0 0.1M的甘氨酸缓冲液;

[0063] 2) 以10 μ l/cm的浓度将缓冲液喷涂于玻璃纤维上。

[0064] 检测方法

[0065] 为了便于使用本申请提供的检测卡,下面给出本申请提供的检测卡提供两种检测方法。

[0066] 方法一:采用紫外灯照射,参阅图4至图7:用手持式紫外线灯照射观察窗口,当质控线和检测线都有量荧光出现时(图4),说明样品中CRP抗原为阳性;当只有质控线有荧光而检测线无荧光出现时(图5),说明样品中CRP抗原为阴性;质控线未出现荧光(图6、图7),则代表操作有误或检测结果无效,需重复试验。

[0067] 方法二:免疫荧光检测仪检测结果:

[0068] 1) 收集犬血清;

[0069] 2) 取10 μ l加入含有1.0mL样品稀释液(含1% S9和0.1% Triton X-100的的0.1M 的pH7.8Tris-盐酸缓冲液的样品管中,充分混匀;

[0070] 3) 取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0071] 4) 吸取稀释后的样本75 μ l,加入到检测卡的加样孔中,将检测卡放入到仪器的卡槽中,开始计时;

[0072] 5) 10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0073] 6) 荧光强度与样品中的CRP浓度成正比,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算,剂量反应曲线 $\text{Log}(Y) = 0.59476\text{Log}(X) - 0.5267$, $R = 0.9994$ ($R^2 = 0.9989$),参阅图3。

[0074] 免疫荧光检测仪检测结果:

[0075] 1、线性范围

[0076] 1.1.1 将CRP校准品用阴性血清分别稀释到0mg/L、2.5mg/L、7.5mg/L、20mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L、700mg/L 和800mg/L;

[0077] 1.1.2 将以上各浓度样本分别取75 μ L,加入至制备好的犬CRP检测试剂中,每浓度重复测试2次;

[0078] 1.1.3 反应10min后,将试纸放入干式免疫荧光分析仪中,读取T/C值,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算。

[0079] 1.1.4 测试结果显示:试剂在检测2.5~300mg/L的CRP线性拟合关系较好, $r > 0.9900$,当CRP浓度增加到400mg/L时,线性拟合 r 值小于0.9900,T/C增长减缓,CRP在400~500mg/L时T/C值平缓,CRP达到600mg/L时,T/C值反而降低。因此本检测的最大检测范围可以达到300mg/L。

[0080] 2、最低检出限

[0081] 将阴性血清,重复测试20次,计算T/C均值,将其代入剂量-反应曲线中,得出本方法的最低检出限为0.86mg/L。具体见表1和图8;

[0082] 表1

[0083]

本申请提供的检测试剂卡	剂量反应曲线			
	原始数值		取对数	
浓度 (mg/L)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C	
0	0.02			
2.5	0.52	0.40	-0.28	
7.5	0.95	0.88	-0.02	
20	1.85	1.30	0.27	
50	2.93	1.70	0.47	
100	4.65	2.00	0.67	
200	6.98	2.30	0.84	
最低检测限 (LOD) : 0.86 mg/L				
r: 0.9994				
r ² : 0.9989				

[0084] 3、精密度

[0085] 将CRP校准品用阴性血清稀释至10mg/L、30mg/L、100mg/L,用本方法检测卡每浓度重复测试10次,计算测试浓度的变异系数。结果表2所示,由此可以看出,本试剂盒检测的变异系数均小于10% (三个浓度分别为7.21%、6.24%和4.26%),因此本检测方法具有较高的精密度。

[0086] 表2

[0087]

	浓度	CV
质控I	10mg/L	7.21%
质控II	30mg/L	6.24%
质控III	100mg/L	4.26%

[0088] 为了更好的说明本实用新型的有益效果,下面给出采用本实用新型提供的检测试剂与其他方法(胶体金法、荧光层析法)等在检测犬C-反应蛋白时的检测性能比较,见表3。

[0089] 表3

[0090]

检测方法	专利公开号	检测性能
胶体金法	CN 107085100 A	选用多抗包被可能影响试剂特异性；定性检测或定量检测，剂量-反应曲线未提供；
荧光层析法	CN 107271682 A	选用多抗包被可能影响试剂特异性；定量检测，剂量-反应曲线未提供
本实用新型提供的方法		选用两株单抗和夹心法层析，特异性好，与其他同类物质无交叉反应；T线和C线采用双系统；既可定性检测，也可定量检测；灵敏度可达到 0.86mg/L

[0091] 上述实施例为本实用新型较佳的实施方式，但本实用新型的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本实用新型的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本实用新型的保护范围之内。

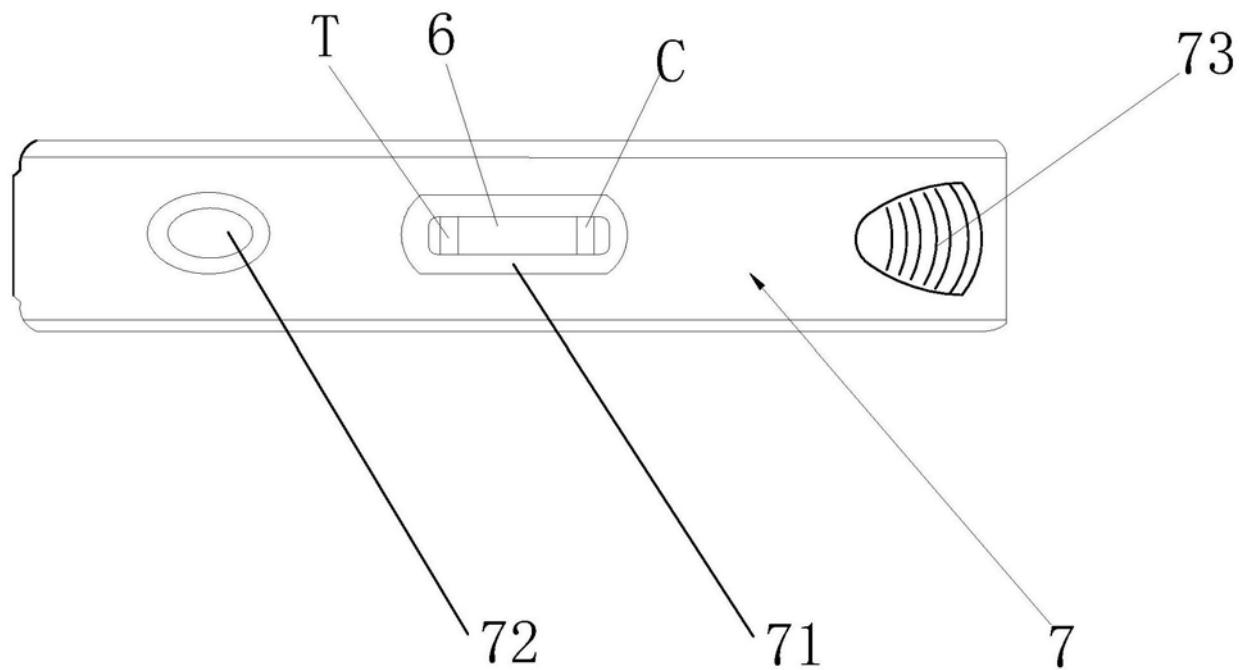


图1

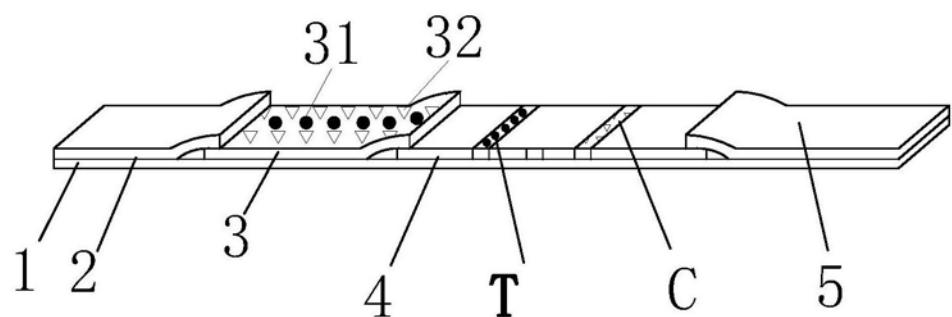


图2

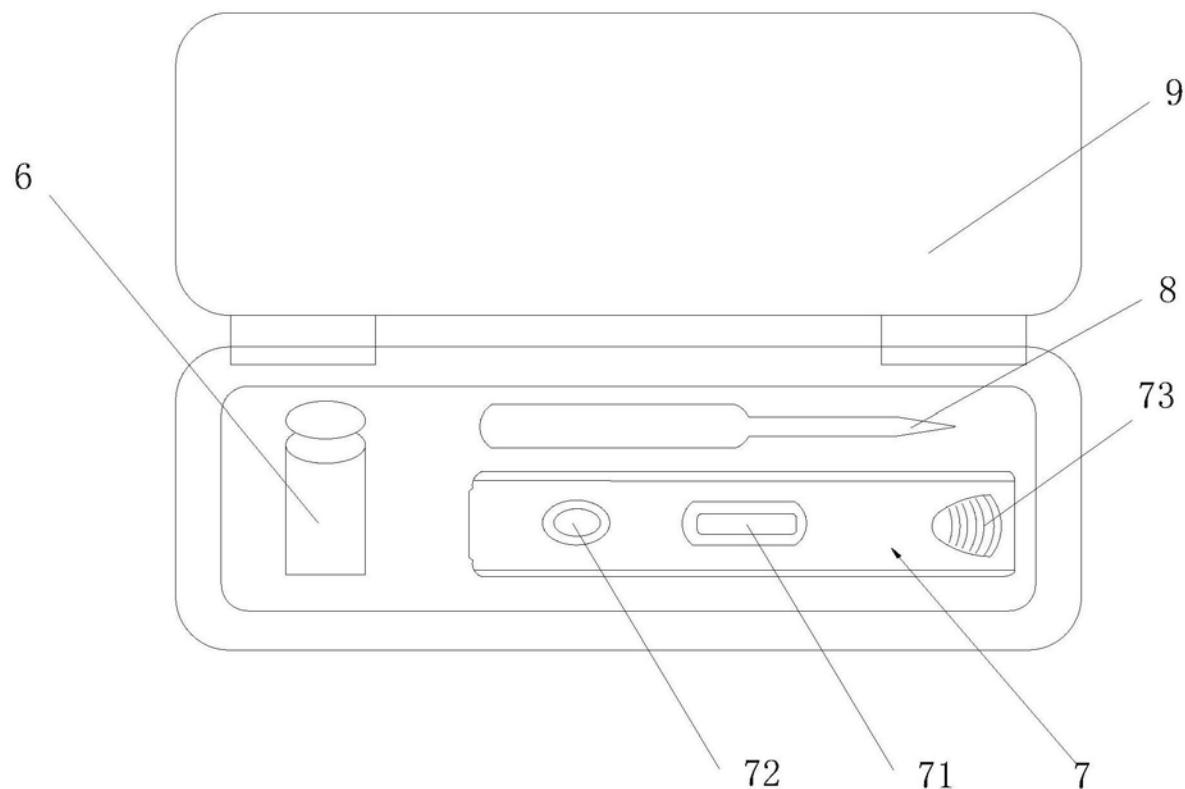


图3

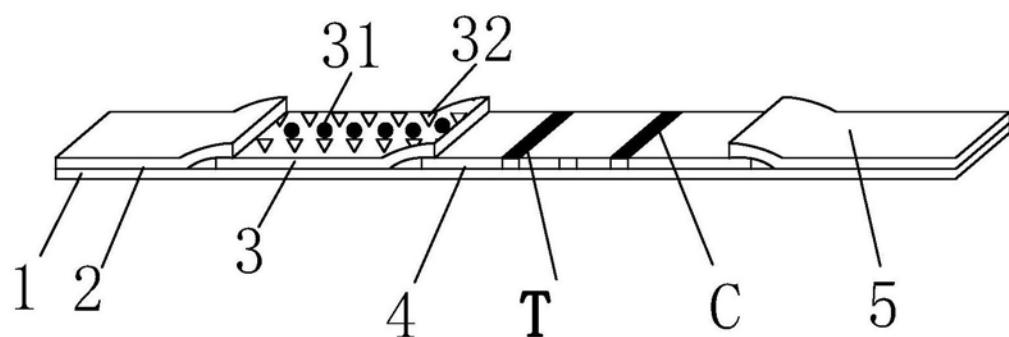


图4

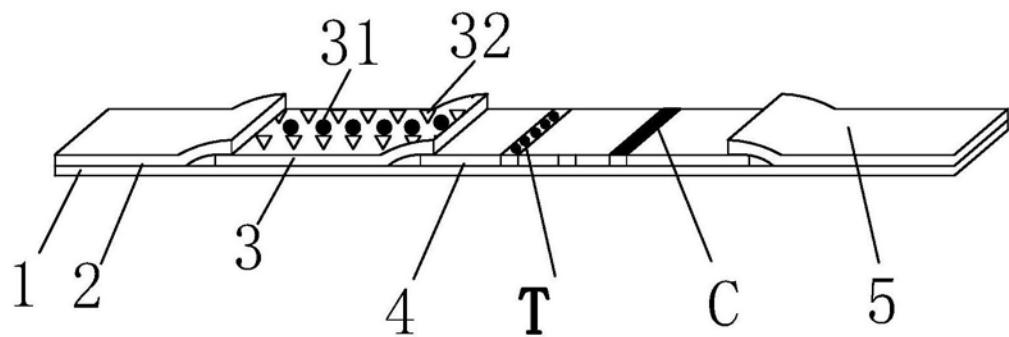


图5

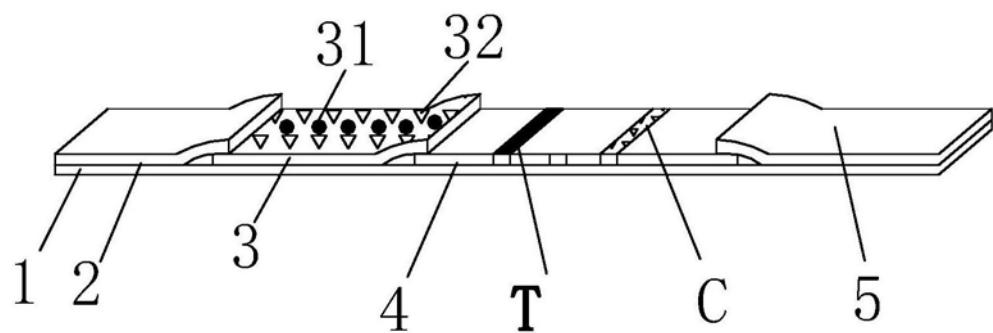


图6

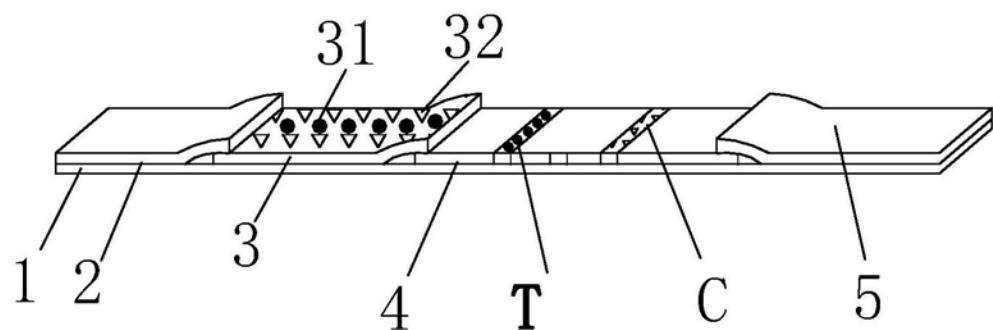


图7

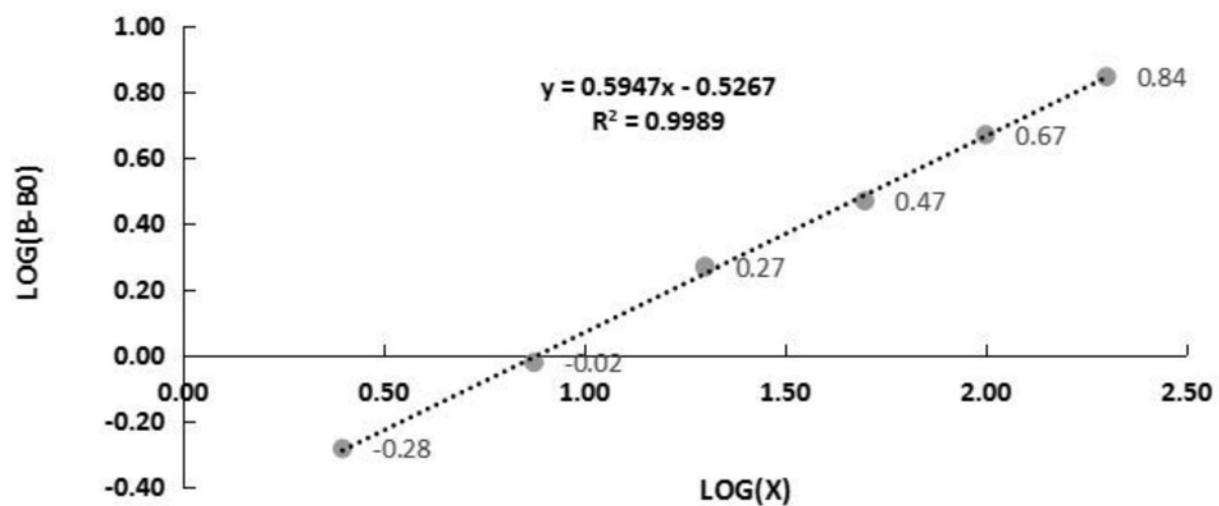


图8

专利名称(译)	用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡		
公开(公告)号	CN208443852U	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201820668151.8	申请日	2018-05-04
[标]发明人	汤永平 梁展鹏		
发明人	汤永平 梁展鹏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本实用新型公开了一种用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬C-反应蛋白的免疫荧光层析检测卡；其技术要点包括底板，在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫，所述结合垫上设有荧光微球标记的CRP单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY，所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线，以及一条包被CRP单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。

