



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108020661 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201711176368.3

(22)申请日 2017.11.22

(71)申请人 中山市创艺生化工程有限公司

地址 528400 广东省中山市火炬开发区国家健康基地康泰路8号

(72)发明人 何平 梁婷婷 李冰 陈润文 肖丝尹

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务有限公司 44205

代理人 丁佳佳

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

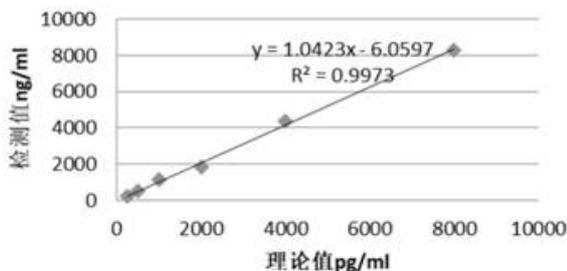
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法。该试剂盒在底衬上依次搭接地粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。结合垫经过结合垫预处理液浸泡、烘干。结合垫喷有D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物，而该D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物由储存液储存、稀释。通过这些改进从而准确检测人体血清样本中的D-二聚体含量。同时，检测过程中出峰效果好、精密度高、灵敏度高，而且有非常不错的稳定性，成本低、操作便捷。



1. 一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,包括底衬,在底衬上依次搭接设置有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,其特征在于,所述结合垫经过结合垫预处理液浸泡、烘干。

2. 根据权利要求1所述的D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,其特征在于,所述结合垫喷有D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,所述D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物由储存液储存、稀释。

3. 根据权利要求1或2所述的D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,其特征在于,所述结合垫预处理液包含0.2%~5.0%质量浓度的PVA、0.1%~5.0%质量浓度的Triton X-100、1.0%~6.0%质量浓度的蔗糖、0.01%~1.5%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 6.5~7.8。

4. 根据权利要求3所述的D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,其特征在于,所述结合垫预处理液包含0.2%~3.0%质量浓度的PVA、0.5%~3.5%质量浓度的Triton X-100、1.0%~2.25%质量浓度的蔗糖、0.03%~0.1%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 7.0~7.8。

5. 根据权利要求1或2所述的D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,其特征在于,所述储存液包含15~50mM的PB、0.5%~10%质量浓度的BSA、0.4%~10%质量浓度的Tween-80、0.4%~10%质量浓度的葡萄糖、1.5%~10%质量浓度的甘氨酸、0.8%~5%质量浓度的PEG4000、1%~8%质量浓度的PEG20000、0.01%~1.5%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 6.5~9.0。

6. 根据权利要求5所述的D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,其特征在于,所述储存液包含20~40mM的PB、0.5%~4.8%质量浓度的BSA、0.5%~6.0%质量浓度的Tween-80、0.5%~3.0%质量浓度的葡萄糖、2%~7%质量浓度的甘氨酸、1.0%~3.0%质量浓度的PEG4000、1.5%~4.0%质量浓度的PEG20000、0.03%~0.1%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 7.0~8.0。

7. 一种如权利要求1所述D-二聚体免疫荧光定量试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

S1、样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,取出备用;

S2、结合垫的制备:用结合垫预处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,切至使用宽度,制得结合垫半成品,备用;

S3、将聚苯乙烯荧光微球先后加入EDC和NHS,在活化缓冲液中活化;

S4、加入鼠源D-二聚体单克隆抗体,在偶联缓冲液中与荧光微球偶联,完毕后加入封闭液,制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,离心后弃上清,加入储存液保存;

S5、用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释,用喷金划膜仪喷于经结合垫预处理液处理过的结合垫上,经鼓风干燥箱干燥后用铝箔袋密封存放备用;

S6、将羊抗鼠IgG多克隆抗体和鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线;

S7、在底衬上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,并剪切成特定宽度的免疫荧光层析试纸条;

S8、将S7中切好的试纸条装卡,过压壳机。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,取出备用;

S2、结合垫的制备:用结合垫预处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,切至使用

宽度,制得结合垫半成品,备用;

S3、将1mg的200nm聚苯乙烯荧光微球先后加入20 μ L的0.5mg/mL的EDC和0.5mg/mL的NHS,在活化缓冲液中活化;

S4、加入0.1mg鼠源D-二聚体单克隆抗体,在200 μ L偶联缓冲液中与荧光微球偶联,完毕后加入封闭液20 μ L,制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,离心后弃上清,加入储存液保存;

S5、用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释到0.5mg/mL,用喷金划膜仪喷于经结合垫预处理液处理过的结合垫上,经鼓风干燥箱干燥后用铝箔袋密封存放备用;

S6、将羊抗鼠IgG多克隆抗体和鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线;

S7、在底衬上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,并剪切成特定宽度的免疫荧光层析试纸条;

S8、将S7中切好的试纸条装卡,过压壳机。

9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,取出备用;

S2、结合垫的制备:用结合垫预处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,切至使用宽度,制得结合垫半成品,备用;

S3、将1mg的200nm聚苯乙烯荧光微球先后加入20 μ L的0.5mg/mL的EDC和0.5mg/mL的NHS,在活化缓冲液中活化;

S4、加入0.1mg鼠源D-二聚体单克隆抗体,在200 μ L偶联缓冲液中与荧光微球偶联,完毕后加入封闭液20 μ L,制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,离心后弃上清,加入储存液保存;

S5、用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释到0.5mg/mL,用喷金划膜仪喷于经结合垫预处理液处理过的结合垫上,经鼓风干燥箱干燥后用铝箔袋密封存放备用;

S6、将1mg/mL羊抗鼠IgG多克隆抗体和1mg/mL鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状1.0mm用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线;

S7、在底衬上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,并剪切成特定宽度的免疫荧光层析试纸条;

S8、将S7中切好的试纸条装卡,过压壳机。

10. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述活化缓冲液为75mM的MES、pH 5.5;所述偶联缓冲液为20mM的PB、pH 7.5;所述封闭液为20%BSA;所述包被液包含:20mM PBS、1.2%异丙醇、0.4%葡聚糖20000、1.5%BSA、0.5%Tween-80、0.03%Proclin300、pH 7.0。

一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测领域,特别是涉及一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] D-二聚体是交联纤维蛋白的特异降解产物之一,为继发性纤溶的特有代谢物。在一定病理或生理状态下,机体凝血及纤溶动态平衡遭到破坏,凝血系统激活,凝血倾向不断增加,导致凝血酶将纤维蛋白原转化成纤维蛋白体,并在活化因子XIII的作用下形成交联纤维蛋白。交联纤维蛋白在纤溶酶作用下降解出的碎片进一步降解产生含有 γ 链的片段, γ 链交联产生D-二聚体。因此D-二聚体的生成或增高反映了血浆中凝血系统和纤溶系统的激活,是唯一反映凝血和纤溶的理想指标,在临床上已被视为体内高凝状态和纤溶亢进的分子标志物。D-二聚体在一系列疾病,包括弥散性血管内凝血(DIC)、血栓性疾病、恶性肿瘤、肝病、系统性红斑狼疮、妊高症、糖尿病并发症等的早期诊断、病情监测和指导治疗中有重大作用,同时D-二聚体的变化可作为药物溶栓治疗监测和指导用药的指标。

[0003] 当前,针对D-二聚的测定方法主要有以下几种:乳胶凝集法、胶乳免疫比浊法、酶联免疫吸附法(ELISA)、胶体金法和荧光免疫层析法。乳胶凝集法只能做到定性检测,而无法对D-二聚体含量的变化进行准确表征。胶乳散射比浊法线性范围窄、稳定性欠佳。酶联免疫吸附法精确定量、敏感性高,但操作严格、步骤繁琐,不适用于快速诊断和监测。胶体金法定量准确、操作快速,但肝素及血脂等对结果有一定干扰,不适于大规模推广使用。荧光免疫层析技术,是免疫荧光技术和传统免疫层析技术相结合发展创新的一种定量新型检测技术。该技术在保留胶体金法操作简便、检测快速、便携性强的优点外,还通过荧光示踪增强技术实现了检测结果的精确定量。

[0004] 荧光免疫层析技术与传统快速检测技术性能比较,具有如下优势:①灵敏度高:该产品以功能化纳米微球载体技术,结合荧光标记物探针,直接检测激发荧光信号。②检测范围宽:荧光免疫层析技术采用荧光直接激发发光检测手段,信号强度与荧光微球数量呈直线相关。避免了酶催化发光技术存在的催化效率及底物量限制等问题,定量范围与反应体系内参与反应的特异性蛋白量直接相关。③价格低廉:与传统定量检测技术相比,该技术具有快速、价格低廉等优点。

[0005] 目前,为提高本技术产品的各项性能,研究人员已经从多方面进行了改进,但这些改进大多集中于对抗原、抗体、荧光颗粒的选择和制备上。而通过对包括样品垫、结合垫在内的载体部分进行改进来达到有效提高产品性能的研究较少。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种能够有效提高包括加速稳定性、出峰效果、准确度、精密程度、灵敏度等在内产品性能的D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0008] 一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒,包括底衬在底衬上依次搭接设置有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,该结合垫在经过结合垫预处理液的浸泡后烘干处理。

[0009] 进一步地,将在储存液中储存、并由该储存液稀释的D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物喷于结合垫上。

[0010] 进一步地,所述结合垫预处理液包含0.2%~5.0%质量浓度的PVA、0.1%~5.0%质量浓度的Triton X-100、1.0%~6.0%质量浓度的蔗糖、0.01%~1.5%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 6.5~7.8。

[0011] 进一步地,所述结合垫预处理液包含0.2%~3.0%质量浓度的PVA、0.5%~3.5%质量浓度的Triton X-100、1.0%~2.25%质量浓度的蔗糖、0.03%~0.1%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 7.0~7.8。

[0012] 进一步地,所述储存液包含15~50mM的PB、0.5%~10%质量浓度的BSA、0.4%~10%质量浓度的Tween-80、0.4%~10%质量浓度的葡萄糖、1.5%~10%质量浓度的甘氨酸、0.8%~5%质量浓度的PEG4000、1%~8%质量浓度的PEG20000、0.01%~1.5%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 6.5~9.0。

[0013] 进一步地,所述储存液包含20~40mM的PB、0.5%~4.8%质量浓度的BSA、0.5%~6.0%质量浓度的Tween-80、0.5%~3.0%质量浓度的葡萄糖、2%~7%质量浓度的甘氨酸、1.0%~3.0%质量浓度的PEG4000、1.5%~4.0%质量浓度的PEG20000、0.03%~0.1%质量浓度的Proclin300或叠氮钠、pH 7.0~8.0。

[0014] 本发明还包括一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0015] S1、样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,取出备用;

[0016] S2、结合垫的制备:用结合垫预处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,切至使用宽度,制得结合垫半成品,备用;

[0017] S3、将聚苯乙烯荧光微球先后加入EDC和NHS,在活化缓冲液中活化;

[0018] S4、加入鼠源D-二聚体单克隆抗体,在偶联缓冲液中与荧光微球偶联,完毕后加入封闭液,制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,离心后弃上清,加入储存液保存;

[0019] S5、用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释,用喷金划膜仪喷于经结合垫预处理液处理过的结合垫上,经鼓风干燥箱干燥后用铝箔袋密封存放备用;

[0020] S6、将羊抗鼠IgG多克隆抗体和鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线;

[0021] S7、在底衬上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,并剪切成特定宽度的免疫荧光层析试纸条;

[0022] S8、将S7中切好的试纸条装卡,过压壳机。

[0023] 一种优选的制备方法,包括以下步骤:

[0024] S1、样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,取出备用;

[0025] S2、结合垫的制备:用结合垫预处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,切至使用宽度,制得结合垫半成品,备用;

[0026] S3、将1mg的200nm聚苯乙烯荧光微球先后加入20 μ L的0.5mg/mL的EDC和0.5mg/mL

的NHS,在活化缓冲液中活化;

[0027] S4、加入0.1mg鼠源D-二聚体单克隆抗体,在200 μ L偶联缓冲液中与荧光微球偶联,完毕后加入封闭液20 μ L,制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,离心后弃上清,加入储存液保存;

[0028] S5、用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释到0.5mg/mL,用喷金划膜仪喷于经结合垫预处理液处理过的结合垫上,经鼓风干燥箱干燥后用铝箔袋密封存放备用;

[0029] S6、将羊抗鼠IgG多克隆抗体和鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线;

[0030] S7、在底衬上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,并剪切成特定宽度的免疫荧光层析试纸条;

[0031] S8、将S7中切好的试纸条装卡,过压壳机。

[0032] 一种优选的制备方法,包括以下步骤:

[0033] S1、样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,取出备用;

[0034] S2、结合垫的制备:用结合垫预处理液浸泡玻璃纤维素膜,浸泡处理后烘干,切至使用宽度,制得结合垫半成品,备用;

[0035] S3、将1mg的200nm聚苯乙烯荧光微球先后加入20 μ L的0.5mg/mL的EDC和0.5mg/mL的NHS,在活化缓冲液中活化;

[0036] S4、加入0.1mg鼠源D-二聚体单克隆抗体,在200 μ L偶联缓冲液中与荧光微球偶联,完毕后加入封闭液20 μ L,制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物,离心后弃上清,加入储存液保存;

[0037] S5、用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释到0.5mg/mL,用喷金划膜仪喷于经结合垫预处理液处理过的结合垫上,经鼓风干燥箱干燥后用铝箔袋密封存放备用;

[0038] S6、将1mg/mL羊抗鼠IgG多克隆抗体和1mg/mL鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状1.0mm用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线;

[0039] S7、在底衬上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,并剪切成特定宽度的免疫荧光层析试纸条;

[0040] S8、将S7中切好的试纸条装卡,过压壳机。

[0041] 优选地,所述活化缓冲液为75mM的MES、pH 5.5;所述偶联缓冲液为20mM的PB、pH 7.5;所述封闭液为20%BSA;所述包被液包含:20mM PBS、1.2%异丙醇、0.4%葡聚糖20000、1.5%BSA、0.5%Tween-80、0.03%Proclin300、pH 7.0。

[0042] 本发明的有益效果是:本发明中的试剂盒能够准确检测人体血清样本中的D-二聚体含量。同时,检测过程中出峰效果好、精密度高、灵敏度高,而且有非常不错的稳定性,成本低、操作便捷。

附图说明

[0043] 图1:优选的储存液搭配优选的结合垫预处理液制备的D-二聚体免疫荧光定量试

纸条检测System的D-二聚体标准曲线。

[0044] 图2:优选的储存液搭配优选的结合垫预处理液制备的D-二聚体免疫荧光定量试纸条检测D-二聚体重组抗原的检测值与理论值的代入曲线。

[0045] 图3:优选的储存液搭配优选的结合垫预处理液制备的试纸条与对照储存液搭配对照结合垫预处理液制备的试纸条检测含不同浓度D-二聚体的病人血清样本的荧光检测折线图,a~f为对照的双液1,g~l为优选的双液2。D-二聚体浓度分别是:a、g为260ng/mL,b、h为450ng/mL,c、i为970ng/mL,d、j为1860ng/mL,e、k为2470ng/mL,f、l为4220ng/mL。

[0046] 图4:对照组双液1制备的试纸条检测含D-二聚体的病人血清样本检测值与System CA7000D-dimer检测值的相关图。

[0047] 图5:优选的储存液搭配优选的结合垫预处理液(双液2)制备的试纸条检测含D-二聚体的病人血清样本检测值与System CA7000D-dimer检测值的相关图。

具体实施方式

[0048] 实施例1

[0049] 本发明申请中储存液的一种优选配方:PB的质量浓度为20mM、BSA的质量浓度为1.8%、Tween-80的质量浓度为0.5%、葡萄糖的质量浓度为0.5%、甘氨酸的质量浓度为2%、PEG4000的质量浓度为1%、PEG20000的质量浓度为1.5%、Proclin300质量浓度为0.03%、pH 7.8~8.0。

[0050] 该储存液的制备方法为:称取0.25g葡萄糖,用45mL纯水溶解。加入1mL事先配好的100mM的PB母液,振荡混匀。先后加入1g甘氨酸,0.5g PEG4000,0.75g PEG20000和0.9g BSA,振荡混匀;用加样枪加入0.25mL Tween-80,反复打匀;加入15 μ L的Proclin300,振荡混匀,用1M的HCl调节pH值至7.8~8.0。最后室温定容至50mL,过滤除菌,制得储存液。

[0051] 其中PB母液的配制方法为:称取29g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和2g的 K_2HPO_4 ,加入1L纯水溶解配成为100mM的PB母液。

[0052] 实施例2

[0053] 本发明申请中结合垫预处理液的一种优选配方:PVA的质量浓度为2.0%、Triton X-100的质量浓度为0.8%、蔗糖的质量浓度为1.25%、Proclin300或叠氮钠的质量浓度为0.03%、pH7.2~7.4。

[0054] 该结合垫预处理液的制备方法为:称取10g的PVA加入480ml纯水浸泡过夜,放置60 $^{\circ}$ C加热溶解。用加样枪加入4mL的Triton X-100,反复打匀;称取6.25g蔗糖,放入磁力搅拌器溶解;加入150 μ L的Proclin300,用1M的HCl调节pH值至7.2~7.4,振荡混匀。最后室温定容至500mL,过滤除菌,制得结合垫预处理液。

[0055] 实施例3

[0056] 本实施例提供一种D-二聚体免疫荧光定量试纸条的具体制备方法如下:

[0057] (1) 储存液的制备:PB的质量浓度为20mM、BSA的质量浓度为1.8%、Tween-80的质量浓度为0.5%、葡萄糖的质量浓度为0.5%、甘氨酸的质量浓度为2%、PEG4000的质量浓度为1%、PEG20000的质量浓度为1.5%、Proclin300质量浓度为0.03%、pH 7.8~8.0,按上述配方配制混匀后过滤除菌,制得储存液;

[0058] (2) 样品垫的制备:用样品垫处理液浸泡玻璃纤维素膜10min,置于干燥间37 $^{\circ}$ C湿

度30%，烘干5h，制得样品垫，备用；

[0059] (3) 结合垫的制备：用结合垫处理液浸泡玻璃纤维素膜10min，浸泡处理后，置于干燥间37℃湿度30%，烘干5h，用裁纸刀切至使用宽度(1cm*30cm)，制得结合垫半成品，备用；

[0060] (4) 将1mg的200nm聚苯乙烯荧光微球先后加入20μL的0.5mg/mL的EDC和0.5mg/mL的NHS，在活化缓冲液37℃活化1hr；

[0061] (5) 加入0.1mg鼠源D-二聚体单克隆抗体，在200μL偶联缓冲液中与荧光微球偶联，完毕后加入封闭液20μL，制得鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物，19000rpm冷冻离心15min后，弃去上清，加入200μL储存液，制得浓度为5mg/mL的鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物，2~8℃保存；

[0062] (6) 用储存液将鼠源D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释到0.5mg/mL，通过喷金划膜仪将其喷于经结合垫处理液处理过的结合垫上，用鼓风干燥箱干燥7h。铝箔袋密封置于20-25℃、湿度约30%的条件下存放备用；

[0063] (7) 将1mg/mL羊抗鼠IgG多克隆抗体和1mg/mL鼠源D-二聚体单克隆抗体分别用包被液包被，以条带状1.0mm用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线；

[0064] (8) 在PVC底板上依次搭接地粘贴：样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，并剪切成宽度4.1mm的荧光免疫层析试纸条；

[0065] (9) 将(8)中切好的试纸条装卡，过压壳机，备用。

[0066] 上述制备过程中，所采用的部分试剂配方如下：

[0067] 样品垫处理液：100mM PBS、1% Triton、0.75% BSA、0.5% PVA、0.9% NaCl、0.3% 葡聚糖、0.05% Proclin300，pH 7.8；

[0068] 结合垫处理液：0.8% Triton X-100、2.0% PVA、1.25% 蔗糖、0.03% Proclin300，pH 7.2~7.4；

[0069] 活化缓冲液为75mM MES，pH 5.5；

[0070] 偶联缓冲液：20mM PB，pH 7.5；

[0071] 封闭液：20% BSA；

[0072] 包被液：20mM PBS、1.2% 异丙醇、0.4% 葡聚糖20000、1.5% BSA、0.5% Tween-80、0.03% Proclin300，pH 7.0。

[0073] 实施例4

[0074] 配制对照储存液，具体配方为：PB的质量浓度为50mM、BSA的质量浓度为1%、Tween-80的质量浓度为1%、葡萄糖的质量浓度为1%、甘氨酸的质量浓度为0.5%、PEG4000的质量浓度为2%、Proclin300质量浓度为0.3%，pH 7.0~7.5。

[0075] 配制对照结合垫预处理液，具体配方为：PVA的质量浓度为0.5%、Triton X-100的质量浓度为0.5%、Proclin300或叠氮钠的质量浓度为0.3%、pH 7.0~7.2。

[0076] 采用实施例1制备的优选储存液搭配实施例2制备的优选结合垫预处理液(以下简称双液2)与对照储存液搭配对照结合垫预处理液(以下简称双液1)进行稳定性能和精密度对比，实施方法和结果如下：

[0077] 用双液1和双液2，对相同工艺标记D-二聚体(D-dimer)单抗的荧光微球进行喷膜干燥，分别组装成40个试纸条，放铝箔袋、干燥剂封口。一袋放置冰箱4℃保存7天(对照组)，另外一袋放置温箱37℃加速7天。完整7天后，取出卡条，分别加入浓度为50ng/mL和500ng/

mL的D-dimer重组抗原检测。根据理论37℃加速7天相当于4℃保存1年,模拟1年后的抗原检测情况,结果如下表1、表2所示。

[0078] 表1两种双液制得的试纸条测试50ng/mL D-dimer重组抗原的效果对比

双液 1			双液 2		
测试浓度	50ng/mL		测试浓度	50ng/mL	
加速七天	4℃	37℃	加速七天	4℃	37℃
测试 1	59.50758	47.28943	测试 1	48.22923	47.7551
测试 2	55.24828	43.82605	测试 2	45.42153	49.7973
测试 3	43.15183	38.75389	测试 3	52.87279	40.84042
测试 4	55.324	30.91709	测试 4	49.0318	43.2155
测试 5	55.33414	40.57585	测试 5	53.58832	42.75528
测试 6	44.56152	36.96739	测试 6	51.03673	41.42598
测试 7	36.92429	35.76141	测试 7	50.59927	47.17558
测试 8	40.8245	33.59471	测试 8	49.16493	45.92084
测试 9	48.85952	38.46073	测试 9	49.99307	44.86075
测试 10	52.07389	43.6205	测试 10	51.20834	44.81711
测试 11	47.21508	41.23012	测试 11	47.49236	46.61582
测试 12	54.26693	34.58832	测试 12	47.06303	41.58235
测试 13	41.42981	34.00171	测试 13	59.57186	39.05554
测试 14	45.46787	38.94673	测试 14	55.24384	42.97068
测试 15	54.281	41.23879	测试 15	53.27922	49.19401
测试 16	52.55735	43.15364	测试 16	57.55807	45.04492
测试 17	47.73803	56.38796	测试 17	47.44841	46.35326
测试 18	39.98223	36.54384	测试 18	47.54735	49.98264
测试 19	41.31697	33.07969	测试 19	42.97646	39.35718
测试 20	43.46133	29.5536	测试 20	41.69982	41.97487
AVE	47.97631	38.92457	AVE	50.05132	44.53476
SD	6.482808	6.196736	SD	4.486017	3.318188
CV	13.51%	15.92%	CV	8.96%	7.45%
下降比例	18.87%		下降比例	11.02%	

[0081] 表2两种双液制得的试纸条测试500ng/mL D-dimer重组抗原的效果对比

双液 1			双液 2		
测试浓度	500ng/mL		测试浓度	500ng/mL	
加速七天	4℃	37℃	加速七天	4℃	37℃
测试 1	580.7275	379.6338	测试 1	444.5233	458.8538
测试 2	528.828	389.2607	测试 2	508.0779	440.4919
测试 3	482.9411	365.6787	测试 3	528.2185	449.3783
测试 4	618.8053	352.8328	测试 4	498.3401	468.2043
测试 5	509.4797	427.4111	测试 5	491.9698	489.914
测试 6	402.5926	471.2359	测试 6	506.9886	501.1989
测试 7	462.9552	451.7699	测试 7	483.1997	432.4149
测试 8	437.1846	465.482	测试 8	499.9418	488.5886
测试 9	541.4277	364.8437	测试 9	515.9064	469.3833
测试 10	381.4428	414.8992	测试 10	508.2633	458.6444
测试 11	522.0587	396.4315	测试 11	527.4627	499.9029
测试 12	451.2813	343.7033	测试 12	515.6038	473.6958
测试 13	503.6886	356.5579	测试 13	508.2163	450.0622
测试 14	380.6874	489.4944	测试 14	440.7781	498.2606
测试 15	533.301	427.9761	测试 15	520.6631	491.1668
测试 16	589.5683	444.5773	测试 16	496.8875	464.3301
测试 17	496.3269	352.11	测试 17	483.1811	462.4027
测试 18	487.6641	368.7768	测试 18	528.1929	475.3494
测试 19	566.3715	371.0111	测试 19	509.429	499.0003
测试 20	508.1417	453.6277	测试 20	472.2714	461.8765
AVE	499.2737	404.3657	AVE	499.4058	471.656
SD	66.20904	46.24674	SD	24.70493	20.77902
CV	13.26%	11.47%	CV	4.95%	4.41%
下降比例	19.01%		下降比例	5.56%	

[0083] 从表1、2得出,优选的双液2在37℃加速七天后,仅下降5%以内,且精密度较好,在5%左右;而对照双液1在37℃加速七天后,下降18%左右,精密度相对较差。

[0084] 实施例5

[0085] 将实施例2制备的D-二聚体免疫荧光定量试纸条建立标准曲线并进行检测,实施方法如下:

[0086] (1) 建立标准曲线:用希森美康D二聚体浓度为高低值校准品混合稀释至200ng/mL、500ng/mL、900ng/mL、1800ng/mL、3600ng/mL、6000ng/mL、8000ng/mL七个浓度。用制备好的试纸条加样80μL上免疫荧光分析以检测,每个浓度重复3次取平均值。以稀释浓度(Xi)为自变量,以检测结果实测值(Yi)为因变量求出线性回归方程,如图1所示;

[0087] (2) 用抗原稀释液对重组抗原D-二聚体倍比稀释至250ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、2000ng/mL、4000ng/mL、8000ng/mL六个浓度。抗原稀释液配方为:20mM PBS、0.5%BSA、0.5%Tween-20,pH 7.2。将求得T/C峰面代入 $y=0.001x+0.050$ 中Y,求得X为所测抗原值。

[0088] 如图2所示,可以看出实施例2制备的试纸条检测值与理论值偏差小($R^2=0.997$),

检测的准确率高。

[0089] 实施例6

[0090] 用双液1和双液2(同实施例4),作结合垫半成品并对相同工艺标记D-dimer单抗的荧光微球进行喷膜干燥,组装好试纸条,分别用浓度为260ng/mL、450ng/mL、970ng/mL、1860ng/mL、2470ng/mL、4220ng/mL的含D-dimer的希森美康CA7000赋值的病人血清样本对两种试纸条加样检测,随后用配套检测仪器对试纸条窗口信息进行读取。通过仪器激光对窗口的荧光微球进行激发,再采集窗口300个位置(作横坐标)的发射荧光强度(作纵坐标),利用荧光分析软件将300个点按顺序连在一起形成折线图。

[0091] 如图3所示,折线图可反映荧光微球在NC膜上的跑膜情况,图中有两个峰,左边为T峰(对应肉眼视卡条为检测线),右边为C峰(对应肉眼视卡条为质控线)。使用双液2的整体出峰效果较好,说明双液2对抗体-荧光微球偶联物从结合垫释放到NC膜效果较好。使用双液1的则出峰信号不高,基线不平整,前段抬起较明显,影响软件对峰面积的计算,进而影响读值的准确度。双液2还可以提高该项目的灵敏度,同一个浓度的样本,T峰明显比双液1的要高。

[0092] 实施例7

[0093] 用双液1和双液2(同实施例4),作结合垫半成品并对相同工艺D-dimer单抗标记的荧光微球进行喷膜干燥,分别组装33个试纸条,用33个不同浓度的含D-dimer抗原的病人血清样本同时对两种试纸条加样检测。用配套检测仪器对试纸条窗口信息进行读取,用荧光分析软件计算T峰面积与C峰面积,同时用血凝方面权威公司希森美康旗下的CA7000全自动血凝仪检测的结果值。

[0094] 以希森美康CA7000评价2种双液制备的试纸条检测结果的临床诊断准确性。如图4、5所示,纵坐标为T峰面积/C峰面积,横坐标希森美康CA7000结果值,双液2制备的试纸条检测结果与希森美康公司的CA7000仪器检测结果较吻合($R^2=0.982$),而双液1的血清线性相关较差($R^2=0.925$),重复性也不好。这与前述双液2让荧光微球释放效果更好,软件计算面积更加准确有关。

[0095] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应该以权利要求的保护范围为准。

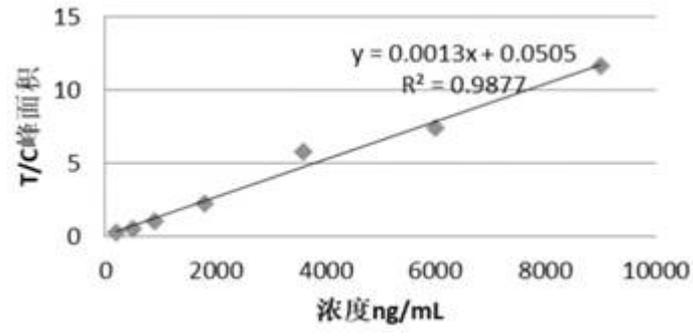


图1

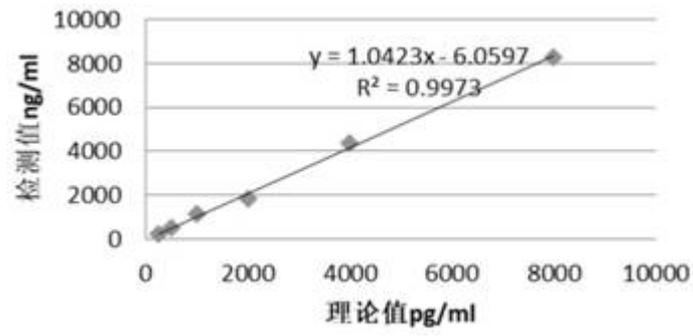


图2

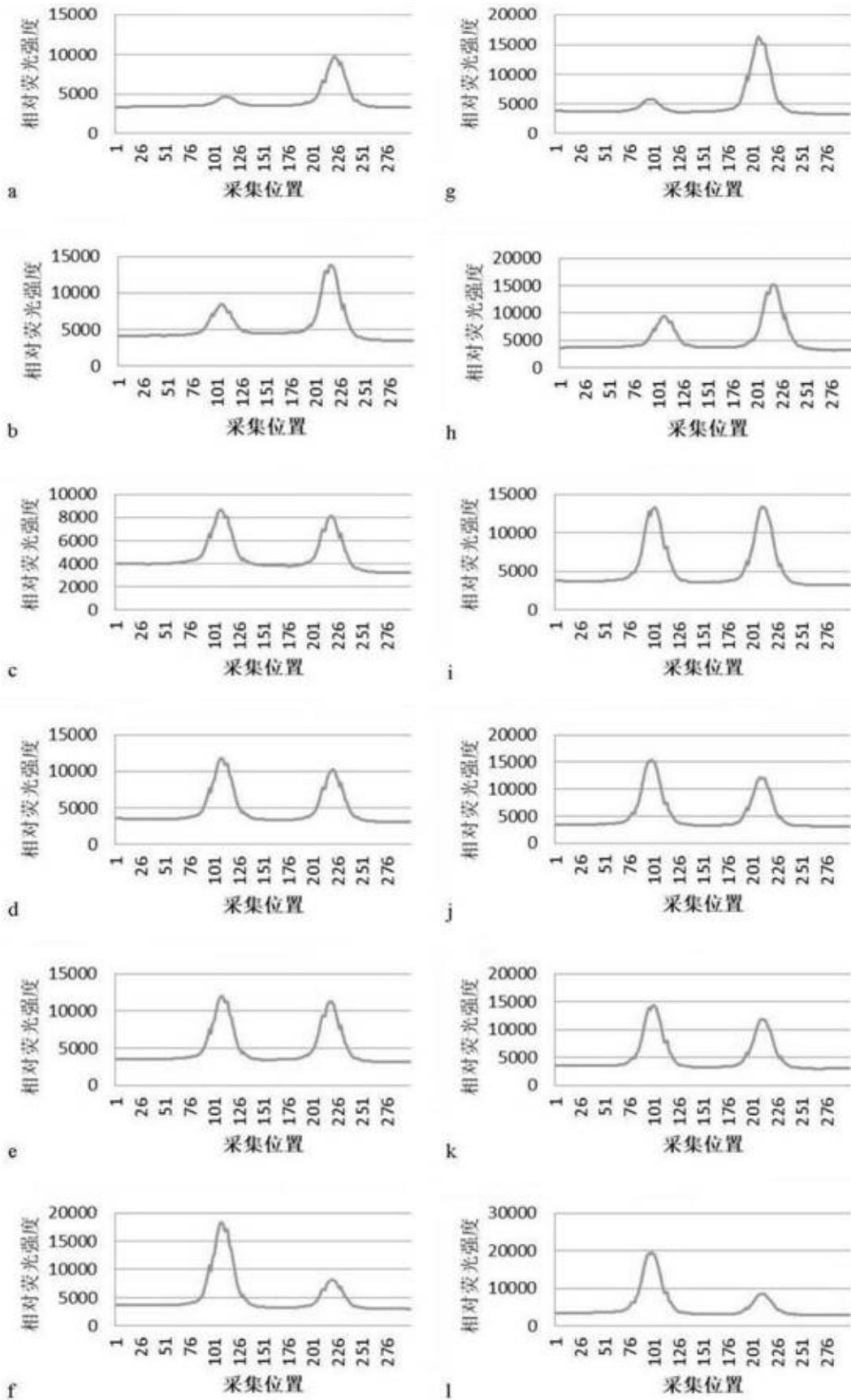


图3

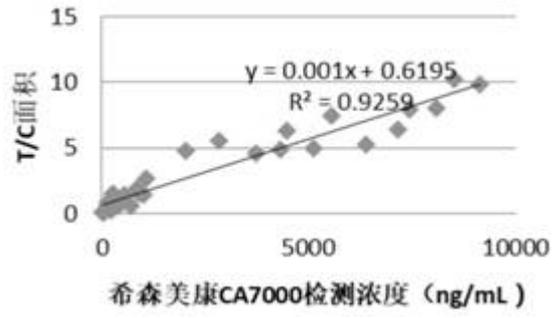


图4

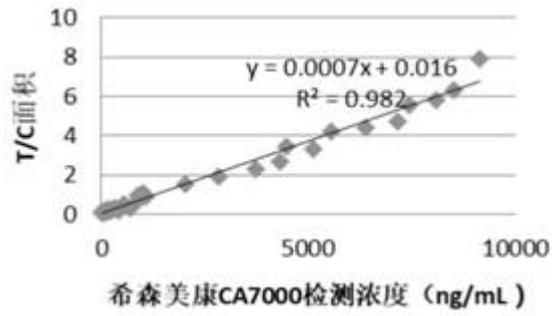


图5

专利名称(译)	一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108020661A	公开(公告)日	2018-05-11
申请号	CN2017111176368.3	申请日	2017-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	中山市创艺生化工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	中山市创艺生化工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中山市创艺生化工程有限公司		
[标]发明人	何平 梁婷婷 李冰 陈润文 肖丝尹		
发明人	何平 梁婷婷 李冰 陈润文 肖丝尹		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	丁佳佳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种D-二聚体免疫荧光定量试剂盒及其制备方法。该试剂盒在底衬上依次搭接地粘样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。结合垫经过结合垫预处理液浸泡、烘干。结合垫喷有D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物，而该D-二聚体单克隆抗体-荧光微球偶联物由储存液储存、稀释。通过这些改进从而准确检测人体血清样本中的D-二聚体含量。同时，检测过程中出峰效果好、精密度高、灵敏度高，而且有非常不错的稳定性，成本低、操作便捷。

