



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110346563 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201910614274.2

(22)申请日 2019.07.09

(71)申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司

地址 300300 天津市东丽区东丽开发区四
纬路10号201

(72)发明人 刘萍 栾大伟 刘朝阳

(74)专利代理机构 天津企兴智财知识产权代理
有限公司 12226

代理人 陈雅洁

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

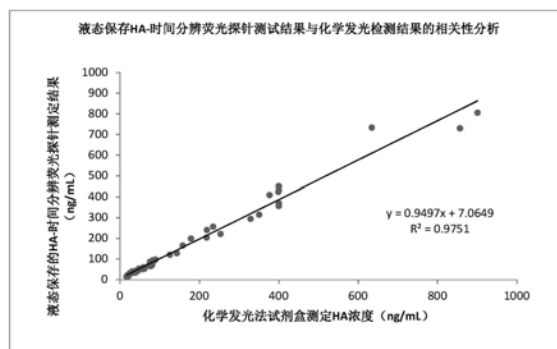
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定
试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,核心检测组件为将时间分辨荧光微球与透明质酸(HA)抗体偶联制成的荧光探针和包被在检测卡NC膜上的HA-BSA偶联物,检测时,NC膜检测区的荧光强度与样本中的HA含量成负相关,可准确定量的检测HA的含量。本发明具有操作简便和测量准确的优点,有利于快速准确的进行肝纤维化的早期诊断。



1. 一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其中检测卡包括吸水纸、NC膜、滤血膜、样品垫依次搭接的粘贴于PVC胶板的检测条和带有读数视窗的卡壳组成,其特征在于:反应部件包括荧光探针和包被在NC膜上的检测区和质控区;其中荧光探针为时间分辨荧光微球偶联HA抗体。

2. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:所述荧光探针的制备包括如下步骤,

- 1) 取0.01~0.05M pH为5.0-7.0的MES缓冲液置于离心管中;
- 2) 向上述离心管中加入羧基修饰的时间分辨荧光微球,加入的荧光微球与缓冲液的体积比为1:5-1:20;
- 3) 超声30s-1min进行重悬;
- 4) 将上述分散均一的体系置于高速冷冻离心机中,2-8℃条件下,8000-12000g离心10-15min,取出后弃上清,保留沉淀物;
- 5) 吸取0.01~0.05M pH为5.0-7.0的MES缓冲液加入到上述沉淀中,超声30s-1min进行重悬;
- 6) 向分散均一的体系中加入10-20mg/mL的EDC和10-20mg/mL的NHS,室温混匀15-20min后,8000-12000g离心10-15min,弃上清,沉淀物用上述MES缓冲液复溶,置于2-8℃储存备用;
- 7) 将一定量的HA抗体加入到步骤6)中所述的体系中进行偶联,使其终浓度为60-500μg/mL,室温旋转混匀2-4h;
- 8) 向步骤7)中所述的偶联体系中加入质量体积比为8-10%的BSA,使其BSA的终浓度为1-2%,终止偶联,此过程需室温旋转混匀0.5-2h;
- 9) 将步骤8)中所述的已终止偶联的体系置于高速冷冻离心机中,2-8℃条件下,8000-12000g离心10-15min,取出后弃上清,保留沉淀物;
- 10) 用含蔗糖质量浓度为5-8%,海藻糖质量浓度为3-5%以及体积浓度为0.03-0.3%的Procline300的pH为5.0-7.0的0.01M MES缓冲液,将沉淀物重悬,得到用于检测HA的荧光探针浓储液;

检测HA的荧光探针浓储液中HA的抗体浓度为60-500μg/mL。

3. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:检测区包被有HA-BSA偶联物;质控区包被有亲和素或链霉亲和素(SA);包被有SA和HA-BSA的NC膜,通过将包被液喷涂在NC膜的质控区和检测区获得;

所述的包被液是将SA和HA-BSA分别用含有质量浓度为0.5%-2%蔗糖、质量浓度0.1%-1%海藻糖、体积浓度0.03%-0.3%procline 300 0.01M的PBS (pH7.0-8.0)的缓冲液配制成终浓度0.5-2.5mg/mL的溶液,优选的配制成终浓度0.6-1mg/mL的溶液;含SA的包被液喷涂在质控区、含HA-BSA的包被液喷涂在检测区,喷涂量控制在0.5-1.5μL/cm,优选的0.75-1μL/cm。

4. 根据权利要求1或2所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:时间分辨荧光微球内部包裹有镧系稀土元素;优选的,Eu(铕)和Tb(铽);且时间分辨荧光微球的粒径为100-300nm,优选的,200nm。

5. 根据权利要求1或3所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在

于:所述检测区包被的HA-BSA偶联物,其制备包括如下步骤,

1) 用0.01-0.05M pH为7.0-8.0的PBS缓冲液,将碳二亚胺(EDC)配制成终浓度为10-20mg/mL的EDC溶液;

2) 称取一定量HA,将其置于0.1-0.6M的NaOH溶液中,配制成终浓度为5-10mg/mL的HA溶液;

3) 用0.01-0.05M pH为7.0-8.0的PBS缓冲液,将BSA配制成终浓度为8-10mg/mL的BSA溶液;

4) 将步骤1)中所述的EDC溶液与步骤2)中所述的HA溶液按体积比为1:1-1:5进行室温避光混合15-20min;

5) 将步骤3)中所述的BSA溶液与步骤4)中所述的混合液按体积比为1:1-1:5混匀,室温避光混匀2-4h;

6) 将上述偶联后的混合液进行透析,透析时间为18-24h,即可得到HA-BSA的偶联物。

6. 根据权利要求1或3所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:所述的质控区和检测区的制备包括如下步骤,

1) 用含有质量浓度为0.5%-2%蔗糖、质量浓度0.1%-1%海藻糖、体积浓度0.03%-0.3%procline 300 0.01M的PBS (pH7.0-8.0) 的缓冲液将SA配制成终浓度为0.5-2.5mg/mL的溶液;HA-BSA配制成终浓度0.5-2.5mg/mL的溶液;优选的,用0.01M含质量分数为0.5-0.8%蔗糖和0.2-0.5%海藻糖、0.03-0.1%procline300的PBS缓冲液, PBS缓冲液的pH为pH7.0-8.0,将SA和HA-BSA分别配制成终浓度为0.6-1.5mg/mL和0.6-1.5mg/mL的包被液;

2) 通过喷金划线机将配制好的包被液分别喷涂在NC膜对应质控区和检测区的位置,喷涂量控制在0.5-1.5 μ L/cm,优选的0.75-1 μ L/cm。

7. 根据权利要求1或2所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:所述荧光探针以稀释液或喷涂于结合垫的形式存在;

当保存于样本稀释液中时,样本稀释液为0.01-0.05M且pH为7.0-8.0的PBS缓冲液,其中应至少包含质量浓度为0.5-0.8%的BSA、质量浓度为0.3-0.8%的蔗糖、质量浓度为0.2-0.5%的海藻糖、体积浓度为0.03-0.05%的Procline、体积浓度为0.03-0.05%的tween-20,将荧光探针的浓储液与该稀释液按1:50-1:350稀释,置于2-8 $^{\circ}$ C保存,与检测卡搭配使用;

当喷涂于结合垫时,将荧光探针的浓储液与稀释液按1:1-1:20进行稀释,混匀后按2-4 μ L/cm²进行喷涂于结合垫上,固化后结合垫、滤血膜和样品垫依次搭接的粘贴于包被板上,裁切成4-6mm宽的小条,组装进卡。

8. 根据权利要求7所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:结合垫为玻纤膜、聚酯膜中的一种;在喷涂荧光探针前,进行以下处理,

1) 蔗糖质量浓度为0.5-3%,海藻糖质量浓度0.5-3%,甘露醇质量浓度为0.5-2%,BSA质量浓度为0.05-2%,PEG6000质量浓度为0.05-0.5%,PEG20000质量浓度为0.05-0.5%,TX-100体积浓度为0.03-0.1%,procline300体积浓度为0.03-0.1%,用0.01-0.05M且pH为7.0-8.0的PBS缓冲液配制含以上成份或其中的几种成份的结合垫处理液;

2) 取上述结合垫处理液向玻纤膜或聚酯膜上均匀喷涂或浸泡,注液量为60-80 μ L/cm²,优选的70 μ L/cm²。

3) 均匀喷涂的结合垫置于37-50℃恒温鼓风干燥箱中进行烘干处理,放置6-8h;取出备用。

9. 根据权利要求7所述的时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其特征在于:样品垫为玻纤膜、聚酯膜中的一种;在粘贴前,进行以下处理,

1) 配制样品垫处理液应包含质量浓度为1-3%的蔗糖,质量浓度为0.1-0.5%的BSA,质量浓度为0.1%-2%的PEG6000,体积浓度为0.1-0.3%的triton X-100;

2) 按60-80 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的注液量将玻纤或聚酯膜浸泡入上述处理液中1-5min;

3) 取出,置于37-50℃恒温鼓风干燥箱内进行烘干,6-8h。

10. 根据权利要求1~9任一项所述的试剂盒在检测透明质酸试剂中的应用。

一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断用试剂盒技术领域,尤其是涉及一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒。

背景技术

[0002] 时间分辨荧光分析法(TRFIA)实际上是在荧光分析(FIA)的基础上发展起来的,它是一种特殊的荧光分析。时间分辨荧光具有衰变时间长和Stokes位移大的优点,可在没有激发光照射时仍发出荧光效应(1~2ms),且因Stokes位移较大,可容易的区分激发光和发射光,最大程度的避免激发光源杂散光的干扰。在提高检测灵敏度上有明显的优势。

[0003] 时间分辨荧光与免疫层析技术的结合使用,在提高检测灵敏度和快速、准确量上有明显的优势。应用于时间分辨的原料主要为镧系稀土元素,其中最常用的为铕(Eu),因其在水溶液中不稳定,在时间分辨免疫分析中常需要增强剂的辅助。而随着包埋技术和核壳结构的发展,铕包裹于可稳定在水中的微球里,提高了其在水体系中的稳定性。并且微球的表面常修饰有活性基团,如羧基、氨基或其它支链或直链基团,便于与生物活性物质的偶联。

[0004] 据报道中国属于肝病的高发国家,肝病患者一旦合并肝纤维化时,病死率将会提高,最终发展为肝硬化、肝衰竭、肝癌,危害性极大。故早期诊断并积极开展对症治疗对于维护患者生命安全,促进其康复具有重要意义。

[0005] 肝纤维化是指各种类型的急慢性肝损伤病理转归,容易对正常肝组织的功能与结构造成损伤,具有可逆性;及时在肝硬化早期进行逆转,对于阻断肝硬化,保护肝功能意义重大,肝纤维化属于肝脏疾病向肝硬化发展的必经阶段,主要表现为肝细胞内出现细胞外基质的过度沉积,HA、LN、PCⅢ、CIV均为其主要成分,能够在一定程度上呈现肝纤维化进程。HA属于高分子多糖,在肝脏受损时合成加快,同时由于肝脏降解能力的下降,易出现异常升高,能够较好地反映肝细胞损伤及肝纤维化活动情况属于预测肝组织纤维化的敏感指标。当肝脏出现纤维化时,肝窦内皮细胞膜即会出现改变,造成HA吸收受阻,进而导致其水平升高。

[0006] 快速准确的检测血液标本中的HA含量,有利于早期评估肝纤维化的进程,并且是无创检测,避免肝活检时给患者带来的其它风险。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明旨在提出一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,以实现快速无创定量检测肝纤维化指标HA含量。具有灵敏度高,检测便捷、快速的优点。

[0008] 一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒,其中检测卡包括吸水纸、NC膜、结合垫、滤血膜、样品垫依次搭接的粘贴于PVC胶板的检测条和带有读数视窗的卡壳组成,反应部件包括荧光探针和包被在NC膜上的检测区和质控区;其中荧光探针为时间分辨荧光微球偶联HA抗体。

[0009] 优选的,所述荧光探针的制备包括如下步骤,

[0010] 1) 取0.01~0.05M pH为5.0-7.0的MES缓冲液置于离心管中;

[0011] 2) 向上述离心管中加入羧基修饰的时间分辨荧光微球,加入的荧光微球与缓冲液的体积比为1:5-1:20;

[0012] 3) 超声30s-1min进行重悬;

[0013] 4) 将上述分散均一的体系置于高速冷冻离心机中,2-8℃条件下,8000-12000g离心10-15min,取出后弃上清,保留沉淀物;

[0014] 5) 吸取0.01~0.05M pH为5.0-7.0的MES缓冲液加入到上述沉淀中,超声30s-1min进行重悬;

[0015] 6) 向分散均一的体系中加入10-20mg/mL的EDC和10-20mg/mL的NHS,室温混匀15-20min后,8000-12000g离心10-15min,弃上清,沉淀物用上述MES缓冲液复溶,置于2-8℃储存备用;

[0016] 7) 将一定量的HA抗体加入到步骤6)中所述的体系中进行偶联,使其终浓度为60-500μg/mL,室温旋转混匀2-4h;

[0017] 8) 向步骤7)中所述的偶联体系中加入质量体积比为8-10%的BSA,使其BSA的终浓度为1-2%,终止偶联,此过程需室温旋转混匀0.5-2h;

[0018] 9) 将步骤8)中所述的已终止偶联的体系置于高速冷冻离心机中,2-8℃条件下,8000-12000g离心10-15min,取出后弃上清,保留沉淀物;

[0019] 10) 用含蔗糖质量浓度为5-8%,海藻糖质量浓度为3-5%以及体积浓度为0.03-0.3%的Procline300的pH为5.0-7.0的0.01M MES缓冲液,将沉淀物重悬,得到用于检测HA的荧光探针浓储液;

[0020] 检测HA的荧光探针浓储液中HA的抗体浓度为60-500μg/mL。

[0021] 优选的,检测区包被有HA-BSA偶联物;质控区包被有亲和素或链霉亲和素(SA)。包被有SA和HA-BSA的NC膜,通过将包被液喷涂在NC膜的质控区和检测区获得;

[0022] 所述的包被液是将SA和HA-BSA分别用含有质量浓度为0.5%-2%蔗糖、质量浓度0.1%-1%海藻糖、体积浓度0.03%-0.3%procline 300 0.01M的PBS (pH7.0-8.0)的缓冲液配制成分终浓度0.5-2.5mg/mL的溶液,优选的配制成分终浓度0.6-1mg/mL的溶液;含SA的包被液喷涂在质控区、含HA-BSA的包被液喷涂在检测区,喷涂量控制在0.5-1.5μL/cm,优选的0.75-1μL/cm。

[0023] 优选的,时间分辨荧光微球内部包裹有镧系稀土元素;优选的,Eu(铕)和Tb(铽);且时间分辨荧光微球的粒径为100-300nm,优选的,200nm。

[0024] 优选的,所述检测区包被的HA-BSA偶联物,其制备包括如下步骤,

[0025] 1) 用0.01-0.05M pH为7.0-8.0的PBS缓冲液,将碳二亚胺(EDC)配制成分终浓度为10-20mg/mL的EDC溶液;

[0026] 2) 称取一定量HA,将其置于0.1-0.6M的NaOH溶液中,配制成分终浓度为5-10mg/mL的HA溶液;

[0027] 3) 用0.01-0.05M pH为7.0-8.0的PBS缓冲液,将BSA配制成分终浓度为8-10mg/mL的BSA溶液;

[0028] 4) 将步骤1)中所述的EDC溶液与步骤2)中所述的HA溶液按体积比为1:1-1:5进行

室温避光混合15-20min;

[0029] 5) 将步骤3)中所述的BSA溶液与步骤4)中所述的混合液按体积比为1:1-1:5混匀, 室温避光混匀2-4h;

[0030] 6) 将上述偶联后的混合液进行透析, 透析时间为18-24h, 即可得到HA-

[0031] BSA的偶联物。

[0032] 优选的, 所述的质控区和检测区的制备包括如下步骤,

[0033] 1) 用含有质量浓度为0.5%-2%蔗糖、质量浓度0.1%-1%海藻糖、体积浓度0.03%-0.3%procline 300 0.01M的PBS (pH7.0-8.0) 的缓冲液将SA配制成终浓度为0.5-2.5mg/mL的溶液; HA-BSA配制成终浓度0.5-2.5mg/mL的溶液; 优选的, 用0.01M含质量分数为0.5-0.8%蔗糖和0.2-0.5%海藻糖、0.03-0.1% procline300的PBS缓冲液, PBS缓冲液的pH为pH7.0-8.0, 将SA和HA-BSA分别配制成终浓度为0.6-1.5mg/mL和0.6-1.5mg/mL的包被液;

[0034] 2) 通过喷金划线机将配制好的包被液分别喷涂在NC膜对应质控区和检测区的位置, 喷涂量控制在0.5-1.5μL/cm, 优选的0.75-1μL/cm。

[0035] 优选的, 所述荧光探针以稀释液或喷涂于结合垫的形式存在;

[0036] 当保存于样本稀释液中时, 样本稀释液为0.01-0.05M且pH为7.0-8.0的PBS缓冲液, 其中应至少包含质量浓度为0.5-0.8%的BSA、质量浓度为0.3-0.8%的蔗糖、质量浓度为0.2-0.5%的海藻糖、体积浓度为0.03-0.05%的Procline、体积浓度为0.03-0.05%的tween-20, 将荧光探针的浓储液与该稀释液按1:50-1:350稀释, 置于2-8℃保存, 与检测卡搭配使用;

[0037] 当喷涂于结合垫时, 将荧光探针的浓储液与稀释液按1:1-1:20进行稀释, 混匀后按2-4μL/cm²进行喷涂于结合垫上, 固化后结合垫、滤血膜和样品垫依次搭接的粘贴于包被板上, 裁切成4-6mm宽的小条, 组装进卡。

[0038] 优选的, 结合垫为玻纤膜、聚酯膜中的一种; 在喷涂荧光探针前, 进行以下处理,

[0039] 1) 蔗糖质量浓度为0.5-3%, 海藻糖质量浓度0.5-3%, 甘露醇质量浓度为0.5-2%, BSA质量浓度为0.05-2%, PEG6000质量浓度为0.05-0.5%, PEG20000质量浓度为0.05-0.5%, TX-100体积浓度为0.03-0.1%, procline300体积浓度为0.03-0.1%, 用0.01-0.05M且pH为7.0-8.0的PBS缓冲液配制含以上成份或其中的几种成份的结合垫处理液;

[0040] 2) 取上述结合垫处理液向玻纤膜或聚酯膜上均匀喷涂或浸泡, 注液量为60-80μL/cm², 优选的70μL/cm²。

[0041] 3) 均匀喷涂的结合垫置于37-50℃恒温鼓风干燥箱中进行烘干处理, 放置6-8h; 取出备用。

[0042] 优选的, 样品垫为玻纤膜、聚酯膜中的一种; 在粘贴前, 进行以下处理,

[0043] 1) 配制样品垫处理液应包含质量浓度为1-3%的蔗糖, 质量浓度为0.1-0.5%的BSA, 质量浓度为0.1%-2%的PEG6000, 体积浓度为0.1-0.3%的triton X-100;

[0044] 2) 按60-80μL/cm²的注液量将玻纤或聚酯膜浸泡入上述处理液中1-5min;

[0045] 3) 取出, 置于37-50℃恒温鼓风干燥箱内进行烘干, 6-8h。

[0046] 本发明还提供了一种如上所述的试剂盒在检测透明质酸试剂中的应用。

[0047] 检测区包被有HA-BSA偶联物, 其荧光强度与样本中的抗原含量呈负相关。质控区

包被有亲和素或链霉亲和素 (SA)，其荧光强度稳定，不随样本浓度的变化而产生差异，优选的采用链霉亲和素 (SA)。

[0048] 所述的检测卡由检测条和含有读数视窗及加样口的卡壳组成。

[0049] 所述的检测条由吸水纸、包被有SA和HA-BSA的NC膜，(结合垫)滤血膜和样品垫依次搭接的粘贴于PVC胶板上。裁切成4-6mm的小条，即成备用。

[0050] 所述的结合垫由聚酯经过处理液浸泡烘干获得。

[0051] 相对于现有技术，本发明所述的一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒，具有以下优势：

[0052] (1) 本发明所述的试剂盒，使用HA荧光探针，具有检测灵敏度高，准确可靠的优点。

[0053] (2) 本发明所述的HA荧光探针，既可固化在检测卡上，又可以液体形式保存，使用方式灵活。

附图说明

[0054] 图1为本发明实施例所述的荧光探针保存于液态形式时的检测结果与全自动化学发光检测结果的相关性。

[0055] 图2为本发明实施例所述的荧光探针固化于检测卡时的检测结果与全自动化学发光检测结果的相关性。

具体实施方式

[0056] 除有定义外，以下实施例中所用的技术术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义。以下实施例中所用的试验试剂，如无特殊说明，均为常规生化试剂；所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

[0057] 在说明书和权利要求书中使用的，单数型“一个”和“这个”包括复数参考，除非上下文另有清楚的表述。例如，术语“(一个)细胞”包括复数的细胞，包括其混合物。

[0058] 所有的数字标识，例如pH、温度、时间、浓度，包括范围，都是近似值。要了解，虽然不总是明确的叙述所有的数字标识之前都加上术语“约”。同时也要了解，虽然不总是明确的叙述，本文中描述的试剂仅仅是示例，其等价物是本领域已知的。

[0059] 下面结合实施例来详细说明本发明。

[0060] 将100 μ L时间分辨荧光微球(采购于Bangs Laboratories, Inc.FCEU002)，分散于900 μ L 0.01M pH=6.0的MES缓冲液中，混匀后离心分离，弃除上清，再用0.01M pH=6.0的MES缓冲液进行重悬。

[0061] 活化：向分散均一的体系中加入10mg/mL的EDC和NHS各50 μ L，室温混匀15min后，12000g离心15min，弃上清，沉淀物用上述MES缓冲液复溶至1mL，置于2-8 $^{\circ}$ C储存备用。

[0062] 将一定量的HA鼠抗单克隆抗体加入到活化好的荧光体系中，进行偶联。使其终浓度为60-500 μ g/mL，本实施例优选浓度为200 μ g/mL，室温旋转混匀2-4h。

[0063] 向上述的偶联体系中加入终浓度为1% (质量浓度)的BSA，终止偶联，此过程可室温旋转混匀1h，亦可2-8 $^{\circ}$ C保存过夜。

[0064] 将所述的已终止偶联的体系置于高速冷冻离心机中，4 $^{\circ}$ C条件下，12000g离心15min，取出后弃上清，保留沉淀物。

[0065] 用含蔗糖质量浓度为5%，海藻糖质量浓度为3%以及体积浓度为0.05%的Procline的pH为6.0的0.01M MES缓冲液，将沉淀物重悬至1mL，得到用于检测HA的荧光探针浓储液。

[0066] 一种实施例为将上述浓储液与稀释液按1:200的比例稀释成荧光探针工作液。置于2-8℃保存备用。

[0067] 一种实施例为将上述浓储液与稀释液按1:10稀释，稀释后的探针溶液喷涂于处理过的结合垫上。置于37℃恒温干燥箱中烘干，室温保存备用。

[0068] 所述的处理过的结合垫为聚酯或玻纤中的一种，处理液为包含蔗糖1.5% (质量浓度)、甘露醇0.6% (质量浓度)、BSA0.3% (质量浓度)、PEG6000 0.5% (质量浓度)、PEG20000 0.5% (质量浓度)、triton X-100 0.05% (体积浓度)。采用浸泡或喷涂的方式，使结合垫被处理液浸润，并置于50℃恒温干燥箱中烘干6h。

[0069] 检测卡的制备，荧光探针以液体形式保存时，检测卡膜条的结构为吸水纸、NC膜(包被有SA和HA-BSA)、滤血膜、样品垫依次搭接的粘贴于PVC板，并裁切成4mm的小条，组装于卡壳中，与液态的荧光探针组合使用。

[0070] 荧光探针固化到结合垫上时，检测卡膜条的结构为吸水纸、NC膜(包被有SA和HA-BSA)、结合垫、滤血膜、样品垫，依次搭接的粘贴于PVC板上，并裁切成4mm的小条，可直接用于检测。

[0071] 检测时，若选用液态保存的荧光探针，需提前将荧光探针工作液以及待检样本取出，室温下平衡至少30min。使其恢复至室温，再用于检测。

[0072] 每个测试取150μL的工作液，并向其中加入25μL的待检测标本，吹吸混匀后，取100μL混合液，滴入检测卡的加样孔中，计时10min，检测卡插入荧光免疫分析仪中，进行检测，记录或打印检测结果即可。

[0073] 检测时，若选用固化在结合垫上的荧光探针，需将待检样本在室温下平衡至少30min。使其恢复至室温，再用于检测。直接取100μL血清或血浆标本滴加于检测卡加样孔处，计时10min，检测卡插入荧光免疫分析仪中，进行检测，记录或打印检测结果即可。

[0074] 最低检出限：用0浓度的校准品或样本稀释液作为样本，重复测定20次，计算20次荧光测量结果的平均值(M)和标准差(SD)，计算出M-2SD的荧光值，记为LOB，根据0浓度校准品与相邻校准品的浓度—荧光值进行两点回归拟合得出一次方程，将LOB代入上述方程中，求出对应的最低检出限。

[0075] 表1最低检出限测定结果

[0076]

序号	荧光强度	分析
1	3.48	0 浓度荧光均值 (M)
2	3.497	
3	3.473	3.4018
4	3.445	
5	3.479	0 浓度标准差 (SD)
6	3.41	
7	3.311	0.0778
8	3.367	
9	3.337	M-2SD
10	3.495	
11	3.218	3.2478
12	3.422	
13	3.326	两点回归曲线
14	3.429	
15	3.338	$y = -48.333x + 164.42$
16	3.295	
17	3.427	最低检出限
18	3.382	
19	3.431	7.48
20	3.474	

[0077] 取50例临床标本,分成两份,与博奥赛斯(天津)生物科技有限公司生产的透明质酸(HA)测定试剂盒(化学发光法)同时进行测定,以液态保存的HA-时间分辨荧光探针与化学发光法测定结果的相关性系数 r 为0.987,已经固化在检测卡上的HA-时间分辨荧光探针与化学发光法测定结果的相关性系数 r 为0.991,测定结果相关性良好。

[0078] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

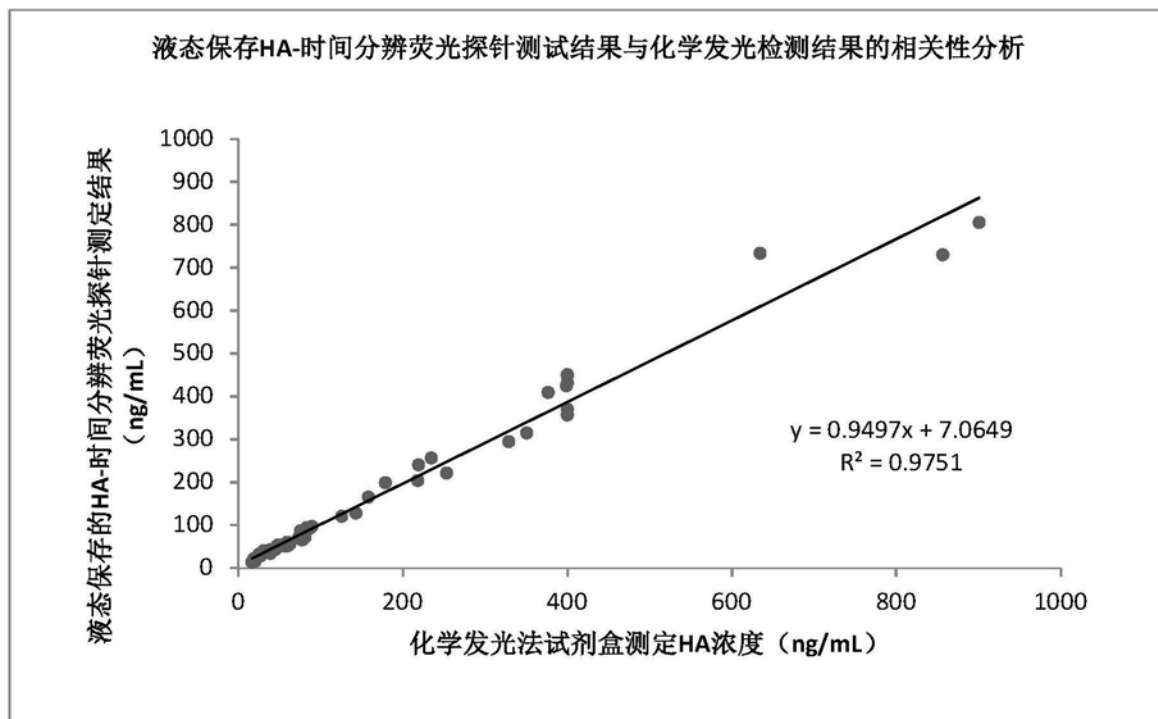


图1

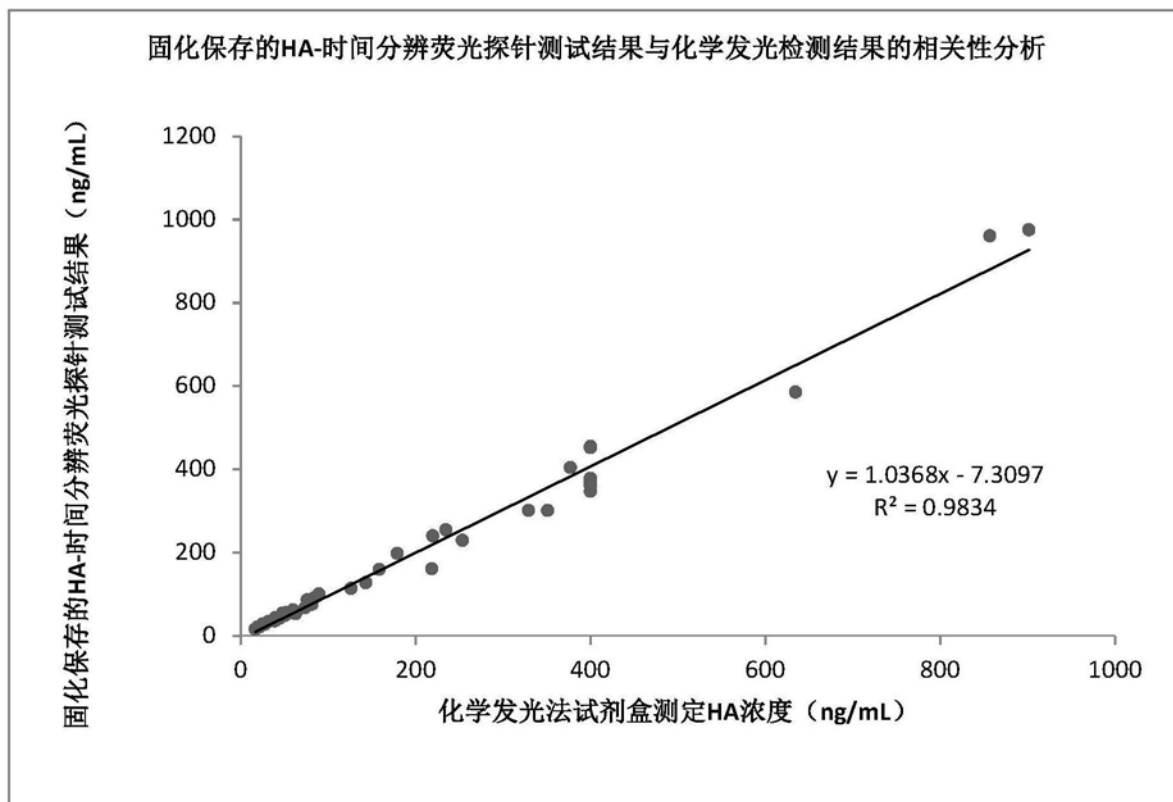


图2

专利名称(译)	一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒		
公开(公告)号	CN110346563A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201910614274.2	申请日	2019-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	刘萍 栾大伟 刘朝阳		
发明人	刘萍 栾大伟 刘朝阳		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	陈雅洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种时间分辨荧光免疫层析透明质酸测定试剂盒，核心检测组件为将时间分辨荧光微球与透明质酸(HA)抗体偶联制成的荧光探针和包被在检测卡NC膜上的HA-BSA偶联物，检测时，NC膜检测区的荧光强度与样本中的HA含量成负相关，可准确定量的检测HA的含量。本发明具有操作简便和测量准确的优点，有利于快速准确的进行肝纤维化的早期诊断。

