



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702900 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910957592.9

(22)申请日 2019.10.10

(71)申请人 南京欧凯生物科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江北新区浦滨  
路211号扬子科创中心一期A栋11层

(72)发明人 戴瞻

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理  
有限公司 11616

代理人 李枝玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

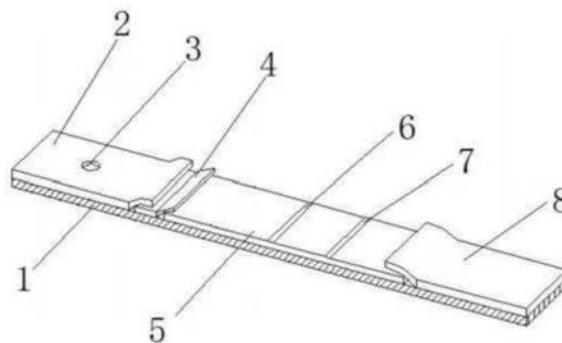
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡

### (57)摘要

一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡;包括底板,所述底板上依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述样品垫的中心处设有样品滴入区;所述结合垫上设有荧光微球标记的血清淀粉蛋白A单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY抗体;所述硝酸纤维素膜上平行相距设有检测T线和质控C线,所述检测T线为SAA单克隆抗体的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控C线为羊抗鸡IgY抗体划线,其浓度为0.8mg/ml。本发明可同时对大量样本进行检测,具有良好的稳定性和重复性,检测灵敏度高,结果准确,操作简单,经济成本较低,无需特殊的仪器设备,便于临床推广使用。



1. 一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡;其特征在于:包括底板,所述底板上依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述样品垫的中心处设有样品滴入区;所述结合垫上设有荧光微球标记的血清淀粉蛋白A单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY抗体;所述硝酸纤维素膜上平行相距设有检测T线和质控C线,所述检测T线为SAA单克隆抗体的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控C线为羊抗鸡IgY抗体划线,其浓度为0.8mg/ml。

2. 根据权利要求1所述的用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于:所述样品垫的一端固定在所述底板上,所述样品垫的另一端搭设在所述结合垫上。

3. 根据权利要求1所述的用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于:所述结合垫的一端固定在所述底板上,并位于所述样品垫另一端的下方,所述结合垫的另一端搭设在所述硝酸纤维素膜上。

4. 根据权利要求1所述的用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于:所述荧光微球中包裹有荧光物质,所述荧光物质为稀土镧离子配合物,其激发光波长为365nm,反射光波长为610nm,所述荧光微球的直径为200nm。

5. 根据权利要求1所述的用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于:所述硝酸纤维素膜为硝酸纤维膜,所述硝酸纤维素膜为表面平整的白色或乳色膜,且所述硝酸纤维素膜的含水量在25%-50%之间,所述硝酸纤维素膜的膜孔径为8 $\mu$ m。

6. 根据权利要求1所述的用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,其特征在于:所述吸水垫设置在所述底板上,所述吸水垫与所述硝酸纤维素膜相邻的一端搭设在所述硝酸纤维素膜上。

## 一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术应用领域,涉及一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡。

### 背景技术

[0002] 血清淀粉样蛋白A (serum amyloid A, SAA) 是一种急性时限反应蛋白,属于载脂蛋白家族中的异质类蛋白质,相对分子量约12000。在急性时限反应中,经IL-1、IL-6和TNF刺激,SAA在肝脏中由被激活的巨噬细胞和纤维母细胞合成,可升高到最初浓度的100-1000倍,但半衰期极短,只有50分钟左右。血清淀粉样蛋白A一个特别重要的特性是其降解产物能以淀粉样蛋白A原纤维的方式沉积在不同的器官中,在慢性炎症疾病中这是一种严重的并发症。血清淀粉样蛋白A升高还见于淀粉样变性病、移植排斥反应、冠心病、动脉粥样硬化、糖尿病肾病等。SAA是反应感染性疾病早期炎症的敏感指标,主要用于炎症的诊断、治疗监测及预后评估。

[0003] 在评价炎症、监控其活动及治疗中,血清淀粉样蛋白A与C反应蛋白(CRP)类似;血清淀粉样蛋白A的含量浓度是反映感染性疾病早期炎症的敏感指标,有助于诊断炎症、评估其活性、监控其活动及治疗。血清淀粉样蛋白A(SAA)检测在诊断发生病毒感染、肾移植排斥反应的患者(特别是进行免疫抑制治疗的患者)以及肾上腺皮质激素治疗的囊性纤维化患者方面,比C反应蛋白检测更确凿。研究发现,在患关节炎的案例中,血清淀粉样蛋白A与疾病活动性的关系最密切。对于淀粉样蛋白A淀粉样变性患者,以将血清淀粉样蛋白A水平回复至正常为宗旨的治疗,能改善病情。

[0004] 目前,应用于血清SAA检测的方法包括酶联免疫吸附法、放射性免疫检测法、免疫散射比浊法、胶乳增强免疫比浊法等。酶联免疫吸附法操作繁琐、耗时,自动化水平低;放射性免疫分析法虽然具有特异性强灵敏度高的特点,但也存在潜在放射性污染,因此也逐渐不被接受;胶乳颗粒增强比浊法 (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA) 是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法。在高分子胶乳微球的表面交联单克隆抗体,当交联有抗体的微球与抗原结合后,在短时间内会迅速聚集在一起,改变了反应液的散光性能或透光性能。反应液透光性能(即吸光度)的改变与被测抗原的浓度有较强的相关性,在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。PETIA检测方法是在均相反应体系中进行抗原、抗体反应及结果的测定,抗原、抗体反应后,直接测定反应液的吸光度值,可用于自动化分析,该方法具有较好的敏感度和特异性,操作简单,省时省力。中国专利公布CN108872592A公开了一种胶乳增强免疫比浊法测定血清淀粉样蛋白A检测试剂盒,该试剂盒有R1和R2两种试剂,但没有校准品和质控品,精密度CV在1.23%以上,线性偏差在1.81%以上。中国专利公告CN106053862B公开了一种血清淀粉样蛋白A(SAA)测定试剂盒,也采用了胶乳免疫比浊技术,但所用胶乳颗粒粒径单一,并未公开其准确度、精密度及其线性。目前已知检测血清淀粉样蛋白A的试剂盒较少,方法也存在较大的缺陷,如测定灵敏度不足,操作繁琐,成本昂贵等,均不利于临床推广使用。

[0005] 因此,如何解决上述问题,是本领域技术人员着重要研究的内容。

### 发明内容

[0006] 为克服上述现有技术中的不足,本发明目的在于提供一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡。

[0007] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡;包括底板,所述底板上依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述样品垫的中心处设有样品滴入区;所述结合垫上设有荧光微球标记的血清淀粉蛋白A单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY抗体;所述硝酸纤维素膜上平行相距设有检测T线和质控C线,所述检测T线为SAA单克隆抗体的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控C线为羊抗鸡IgY抗体划线,其浓度为0.8mg/ml。

[0008] 上述方案中,有关内容解释如下:

[0009] 1、上述方案中,所述样品垫的一端固定在所述底板上,所述样品垫的另一端搭设在所述结合垫上。

[0010] 2、上述方案中,所述结合垫的一端固定在所述底板上,并位于所述样品垫另一端的下方,所述结合垫的另一端搭设在所述硝酸纤维素膜上。

[0011] 3、上述方案中,所述荧光微球中包裹有荧光物质,所述荧光物质为稀土镧离子配合物,其激发光波长为365nm,反射光波长为610nm,所述荧光微球的直径为200nm。

[0012] 4、上述方案中,所述硝酸纤维素膜为硝酸纤维膜,所述硝酸纤维素膜为表面平整的白色或乳色膜,且所述硝酸纤维素膜的含水量在25%-50%之间,所述硝酸纤维素膜的膜孔径为8 $\mu$ m。

[0013] 5、上述方案中,所述吸水垫设置在所述底板上,所述吸水垫与所述硝酸纤维素膜相邻的一端搭设在所述硝酸纤维素膜上。

[0014] 6、上述方案中,所述荧光微球为时间分辨免疫荧光微球,其中包裹有数以万计的荧光物质,不会泄漏,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度。所述时间分辨免疫荧光微球是一种具有特殊功能的微球,微球表面修饰有一定密度的羧基或其它功能基团,与蛋白或抗体的共价偶联,大大提高标记物的稳定性。

[0015] 由于上述技术方案运用,本发明与现有技术相比具有的有益效果如下:

[0016] 本发明用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,检测灵敏度高。大大缩短了检测时间,效率高,具有良好的稳定性和重复性。操作简便,无需特殊的仪器设备。可同时对大量样本进行检测,检测灵敏度高,结果准确,操作简单,经济成本较低,便于临床推广使用。

### 附图说明

[0017] 图1为本发明用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡的结构示意图;

[0018] 图2为本发明实施例剂量反应曲线示意图。

[0019] 图中:1、PVC底板;2、样品垫;3、样品滴入区;4、结合垫;5、硝酸纤维素膜;6、检测T线;7、质控C线;8、吸水垫。

## 具体实施方式

[0020] 以下由特定的具体实施例结合附图说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0021] 实施例:

[0022] 一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡;包括底板1,所述底板1上依次设有样品垫2、结合垫4、硝酸纤维素膜5和吸水垫8;所述样品垫2的中心处设有样品滴入区3;所述结合垫4上设有荧光微球标记的血清淀粉蛋白A单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY抗体(图中未示出);所述硝酸纤维素膜5上平行相距设有检测T线6和质控C线7,所述检测T线6为SAA单克隆抗体的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控C线7为羊抗鸡IgY抗体划线,其浓度为0.8mg/ml。

[0023] 所述样品垫2的一端固定在所述底板1上,所述样品垫2的另一端搭设在所述结合垫4上。

[0024] 所述结合垫4的一端固定在所述底板1上,并位于所述样品垫2另一端的下方,所述结合垫4的另一端搭设在所述硝酸纤维素膜5上。

[0025] 所述荧光微球中包裹有荧光物质,所述荧光物质为稀土铈离子配合物,其激发光波长为365nm,反射光波长为610nm,所述荧光微球的直径为200nm。

[0026] 所述硝酸纤维素膜5为硝酸纤维膜,所述硝酸纤维素膜5为表面平整的白色或乳色膜,且所述硝酸纤维素膜5的含水量在25%-50%之间,所述硝酸纤维素膜5的膜孔径为8 $\mu$ m。

[0027] 所述吸水垫8设置在所述底板1上,所述吸水垫8与所述硝酸纤维素膜5相邻的一端搭设在所述硝酸纤维素膜5上。

[0028] 所述荧光微球为时间分辨免疫荧光微球,其中包裹有数以万计的荧光物质,不会泄漏,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度。所述时间分辨免疫荧光微球是一种具有特殊功能的微球,微球表面修饰有一定密度的羧基或其它功能基团,与蛋白或抗体的共价偶联,大大提高标记物的稳定性。

[0029] 一种用于检测血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在温度18~26 $^{\circ}$ C、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素膜5、吸水垫8、结合垫4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SAA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。

[0030] 具体地说:

[0031] 1.1结合垫的制备

[0032] 1.1.1SAA单克隆抗体的标记

[0033] 1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1ml标记缓冲液0.01M PB(磷酸盐)缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;直径200nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0034] 2) 微球的活化:在步骤1)离心管中加入5 $\mu$ l-50 $\mu$ l标记活化剂A和5 $\mu$ l-50 $\mu$ l标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0035] 所述的标记活化剂A为含20mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.01M PB缓冲液(磷酸盐);所述标记活化剂B为含20mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.01M PB缓冲液(磷酸盐);

[0036] 3) 活化:将活化后的荧光微球14000g离心15min,弃上清,留取沉淀,加入1000 $\mu$ l

标记液,超声2s;所述的标记液为0.01M的PB缓冲液;

[0037] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-100 $\mu$ gSAA单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应2h;

[0038] 5) 封闭:加入1ml标记封闭液,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;所述的标记封闭液为含3-5%牛血清白蛋白的0.01MPB缓冲液;

[0039] 6) 纯化:完成上述反应后,14000g离心15min,吸去上清,留取沉淀,加入500 $\mu$ l标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。所述的荧光微球稀释液含1%牛血清白蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液。

[0040] 1.1.2质控C线抗体的标记

[0041] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1ml的标记缓冲液0.05M MES缓冲液,取荧光微球1mg,涡旋混匀;直径100nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0042] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入5 $\mu$ l-50 $\mu$ l标记活化剂A和5 $\mu$ l-50 $\mu$ l标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0043] 所述的标记活化剂A为含20mg/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);所述标记活化剂B为含20mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二

[0044] 亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)。

[0045] 3) 活化:将活化后的荧光微球14000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入1ml标记液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;所述的标记液为0.1M的MES缓冲液;

[0046] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 $\mu$ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应2h;

[0047] 5) 封闭:加入1ml标记封闭液,封闭30min;所述的标记封闭液为闭液为含3-5%牛血清白蛋白的0.01M PB缓冲液;

[0048] 6) 纯化:完成上述反应后,15000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入500 $\mu$ l标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次,所述的荧光微球稀释液含1%牛血清白蛋白、3%蔗糖的pH9.00.1M的甘氨酸缓冲液。

[0049] 1.1.3喷膜

[0050] 1)、将玻璃纤维裁切为(10 $\pm$ 1)mm $\times$ (300 $\pm$ 10)mm大小为结合垫;

[0051] 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;

[0052] 3)、按2.0 $\mu$ l/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0053] 4)、喷完后,37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜16~18h。

[0054] 1.2反应膜的制备

[0055] 1)、用含3%蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将鸡IgY稀释到0.8mg/mL,即为C线工作液;

[0056] 2)、用含3%蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将另一株SAA单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T线工作液;

[0057] 3)、取PVC底板,粘贴硝酸纤维膜;

[0058] 4)、在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 $\mu$ L/cm;

[0059] 5)、完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜16~18h。

[0060] 1.3样品垫制备

[0061] 1)、配制样品垫处理液:含1%牛血清白蛋白、2%聚乙二醇4000、0.3%Triton X-100、4%氯化钠和0.05%Prolin 300的0.1M pH8.5 Tris缓冲液。

[0062] 2)、以10 $\mu$ l/cm的浓度将缓冲液浸泡于玻璃纤维上。

[0063] 检测方法

[0064] 1)、收集人血清;

[0065] 2)、取5 $\mu$ l加入含有1.0ml样品稀释液(含1%S9、1%SDS、0.1%Triton X-100的0.1MpH7.8的Tris-盐酸缓冲液)的样品管中,充分混匀;

[0066] 3)、取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0067] 4)、吸取稀释后的样本80 $\mu$ 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;

[0068] 5)、5min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0069] 6)、荧光强度与样品中的SAA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 $\text{Log}(Y) = 0.0324x - 0.0267$ ;  $R^2 = 0.9938$ ;如图2所示。

[0070] 本发明用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡,检测灵敏度高。大大缩短了检测时间,效率高,具有良好的稳定性和重复性。操作简便,无需特殊的仪器设备。可同时对大量样本进行检测,检测灵敏度高,结果准确,操作简单,经济成本较低,便于临床推广使用。

[0071] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

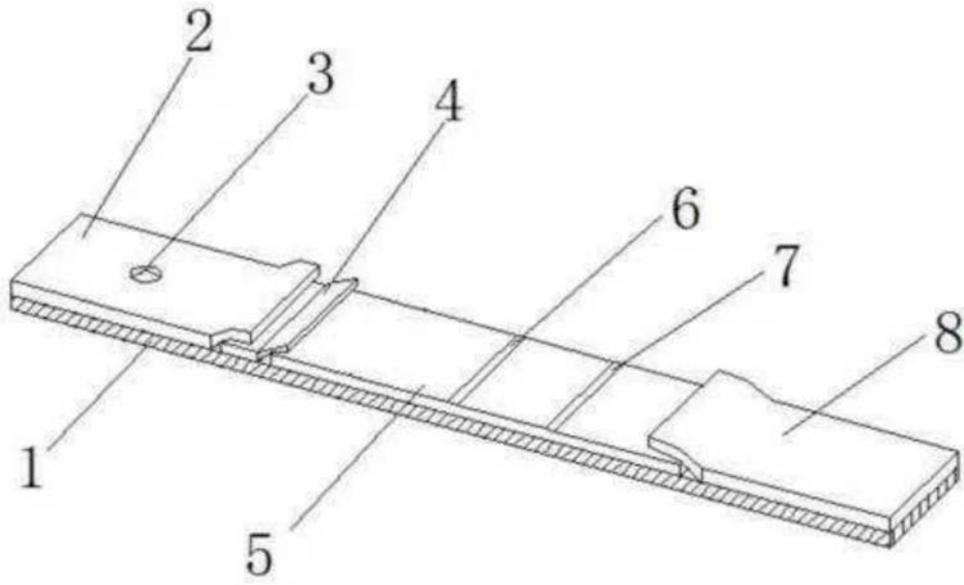


图1

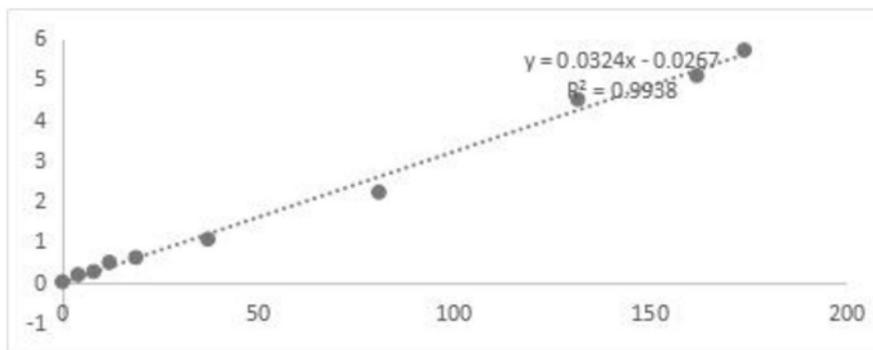


图2

专利名称(译)	一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡		
公开(公告)号	<a href="#">CN110702900A</a>	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910957592.9	申请日	2019-10-10
[标]发明人	戴瞻		
发明人	戴瞻		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/5436 G01N33/68		
代理人(译)	李枝玲		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种用于血清淀粉蛋白A的免疫荧光层析检测卡；包括底板，所述底板上依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫；所述样品垫的中心处设有样品滴入区；所述结合垫上设有荧光微球标记的血清淀粉蛋白A单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY抗体；所述硝酸纤维素膜上平行相距设有检测T线和质控C线，所述检测T线为SAA单克隆抗体的划线，其浓度为1mg/ml；所述质控C线为羊抗鸡IgY抗体划线，其浓度为0.8mg/ml。本发明可同时对大量样本进行检测，具有良好的稳定性和重复性，检测灵敏度高，结果准确，操作简单，经济成本较低，无需特殊的仪器设备，便于临床推广使用。

