



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110554197 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201810559251.1

(22)申请日 2018.06.01

(71)申请人 常州博闻迪医药股份有限公司

地址 213022 江苏省常州市经开区富民路
218号3号楼3楼

(72)发明人 章燕 李亚楠 刘凤鸣

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种荧光免疫层析联合检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种复合型定量检测超敏C反应蛋白(Hs-CRP)、髓过氧化物酶(MPO)、脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,包括干燥剂、密封袋和检测卡。所述检测卡包括三联体扣卡与试剂条;所述试剂条包括样品垫、结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜、吸水纸和PVC底板,所述结合垫包被有hsCRP抗体、MPO抗体和Lp-PLA2抗体;所述hsCRP抗体为hsCRP单克隆抗体和hsCRP多克隆抗体的一种或组合;所述MPO抗体为MPO单克隆抗体和MPO多克隆抗体的一种或组合;所述Lp-PLA2抗体为Lp-PLA2单克隆抗体和Lp-PLA2多克隆抗体的一种或组合。本发明方法具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化、假阳性达到了最小化、检测效率高,检测成本低等突出优点,有重要的实用意义。

1. 一种复合型定量检测超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法,其特征在于,所述检测试剂盒包括检测卡、干燥剂和密封袋,所述检测卡包括扣卡和试剂条;所述试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸和PVC底板,所述结合垫包被有hsCRP抗体、MPO抗体和Lp-PLA2抗体;所述hsCRP抗体为hsCRP单克隆抗体和hsCRP多克隆抗体的一种或多种配对组合;所述MPO抗体为MPO单克隆抗体和MPO多克隆抗体的一种或多种配对组合;所述Lp-PLA2抗体为Lp-PLA2单克隆抗体和Lp-PLA2多克隆抗体的一种或多种配对组合。

2. 根据权利要求1所述检测试剂盒,其特征在于,所述试剂条还包括滤血膜。

3. 根据权利要求1或2所述检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

(1) 样品垫的制备:样品垫选用玻璃纤维素膜,用缓冲液溶解NaCl、BSA等盐离子和蛋白,然后加入少量的表面活性剂,调节pH到7-8,按玻璃纤维吸水量均匀铺于玻璃纤维素膜上,置于37℃干燥8小时即可。

(2) 结合垫的制备:将处理好的样品垫均匀的铺上稀释好的荧光微球标记抗体(抗超敏C反应蛋白抗体、抗髓过氧化物酶抗体或抗脂蛋白磷脂酶A2抗体)溶液,真空冷冻干燥后密封,室温保存即可。

(3) 滤血膜的制备:将滤血膜裁剪成10cm×4mm每条。

(4) 硝酸纤维素膜的处理:

a. 检测线制备:将羊抗标记抗体用稀释包被液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在硝酸纤维素膜上划线得到检测线,划线完毕后将硝酸纤维素膜置于37℃干燥8小时即得;

b. 质控线制备:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/LpH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在硝酸纤维素膜上划线得到质控线,划线完毕后将硝酸纤维素膜置于37℃干燥8小时即得。

(5) 吸水纸的制备:将吸水纸裁剪成30cm×2.7cm每条。

(6) 组装:将上述处理好的样品垫、微球标记结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于PVC底板上,贴好后裁剪成宽4mm的试纸条,并置于三联体扣卡内,加入干燥剂封装即得。

4. 根据权利要求3所述检测试剂盒,其特征在于,所述的样品垫的制备的缓冲液选自Tris、PBS或甘氨酸中的一种,所述表面活性剂选自Tween20或TritonX-100中的一种。

5. 根据权利要求3所述检测试剂盒,其特征在于,所述的结合垫的制备的荧光微球选自荧光素cy5、荧光素cy7、含铈聚苯乙烯微球、2-甲氧基荧光增强素、罗丹明、藻红蛋白中的一种。

一种荧光免疫层析联合检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床医学检验领域,具体地说,涉及一种联合定量检测超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 心血管性疾病是临床上常见的急危重症,病死率高、病情凶险,严重威胁着人类的健康与生命。有资料表明,心血管病的基本病理变化是动脉粥样硬化,近年来的研究显示炎症反应是动脉粥样硬化及心血管疾病的基础,尤其是慢性炎症被认为能增加动脉损伤疾病风险,使动脉粥样硬化斑块易于破裂,在动脉粥样硬化的形成中起了关键作用。动脉损伤是全身心血管系统的一种慢性炎症反应结果。但由于动脉损伤早期缺乏明显的临床表现,所以确诊时多处于疾病的中晚期,导致患者的预后差和过多的医疗费用。于是寻找有效的监测早期动脉病变、预测严重心脑血管病风险的心脑血管标志物具有重要的临床意义。

[0003] 超敏c反应蛋白(Hs-CRP)是炎症病变的敏感标志物,能准确的检测低浓度C反应蛋白。临床试验表明,血清Hs-CRP水平随着冠心病病情呈渐进性升高趋势。Hs-CRP是反映炎症过程的敏感、精确的指标,体内轻微的炎症就可以导致Hs-CRP升高,流行病学研究显示增高的Hs-CRP可以预示10年内的CHD发生。脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)是钙离子非依赖性的分子量为45KDa的分泌型蛋白。Lp-PLA2由巨噬细胞产生,是血管内皮炎症的标记物,不受其他炎症性疾病影响。可以特异性检测早期血管炎症的发生。多项临床试验研究表明,基础Lp-PLA2水平较高者以后发生心血管事件的比例较基础Lp-PLA2水平较低者显著升高。髓过氧化物酶(MPO)是一种中性溶酶体酶,由活化的中性粒细胞、单核细胞及巨噬细胞产生,参与人体内多种炎症反应和氧化应激过程。MPO升高提示患者可能存在冠状动脉炎症,但血管未完全堵塞,并未引起心肌坏死,可以用于预测早期不良心血管事件发生的可能性。本发明一种复合型定量检测超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒将以上三者结合,通过联合检测患者血清超敏c反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2水平,可以更加准确有效地预测患者严重心脑血管病风险的可能,实现严重心血管事件早期诊断、风险预测和严重性评估。

[0004] 中国发明专利CN201010102136.5公开了一种含血管过氧化物酶蛋白及抗体ELISA试剂盒,该方法通过单一的血管过氧化物酶浓度来判断冠心病病情的严重程度,单个指标诊断准确度不高,且ELISA法判断准确度不高,易出现假阳性,且检测耗时长,试验操作复杂。中国发明专利CN201410623721.8公开了一种用于冠心病诊断的血清标志物Samd3蛋白ELISA试剂盒,同样应用ELISA法,准确度不高,易出现假阳性,且检测耗时长,试验操作复杂,无法对严重心血管事件进行准确的早期诊断、风险预测和严重性评估。

[0005] 近年来,心血管事件已成为我国人口病死原因的第一位,故早期识别诊断及对其进行风险分级具有重要的临床意义。因此,发明一种对心脑血管性疾病诊断和风险分级分析准确度高的检测试剂盒很有必要。本发明联合应用心血管标志物Hs-CRP、MPO、Lp-PLA2的荧光免疫层析法对心血管疾病进行预测和诊断,与传统指标相比,Hs-CRP、MPO、Lp-PLA2的

联合应用在严重心血管事件早期诊断和风险预测方面准确性更高,优势明显。且本发明采用荧光免疫层析法,具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化、阳性检出率达90%以上、假阳性达到了最小化、检测效率高、检测成本低等突出优点,有重要的实用意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于解决现有技术的不足,提供一种灵敏度高、准确性强、操作简便的联合定量检测超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

[0007] 实现本发明目的的技术方案是:一种联合定量检测超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法,其特征在于,所述检测试剂盒包括检测卡、干燥剂和密封袋,所述检测卡包括扣卡和试剂条;所述试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸和PVC底板,所述结合垫包被有hsCRP抗体、MPO抗体和Lp-PLA2抗体;所述hsCRP抗体为hsCRP单克隆抗体和hsCRP多克隆抗体的一种或多种配对组合;所述MPO抗体为MPO单克隆抗体和MPO多克隆抗体的一种或多种配对组合;所述Lp-PLA2抗体为Lp-PLA2单克隆抗体和Lp-PLA2多克隆抗体的一种或多种配对组合。

[0008] 进一步的,所述试剂条还包括滤血膜。

[0009] 进一步的,所述检测试剂盒的制备方法包括如下步骤:

[0010] (1) 样品垫的制备:样品垫选用玻璃纤维素膜,用缓冲液等溶解NaCl、BSA等盐离子和蛋白,然后加入少量的表面活性剂,调节pH到7-8,按玻璃纤维吸水量均匀铺于玻璃纤维素膜上,置于37℃干燥8小时即可。

[0011] (2) 结合垫的制备:将处理好的样品垫均匀的铺上稀释好的荧光微球标记抗体(抗超敏C反应蛋白抗体、抗髓过氧化物酶抗体或抗脂蛋白磷脂酶A2抗体)溶液,真空冷冻干燥后密封,室温保存即可。

[0012] (3) 滤血膜的制备:将滤血膜裁剪成10cm×4mm每条。

[0013] (4) 硝酸纤维素膜的处理:

[0014] a. 检测线制备:将羊抗标记抗体用稀释包被液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在硝酸纤维素膜上划线得到检测线,划线完毕后将硝酸纤维素膜置于37℃干燥8小时即得;

[0015] b. 质控线制备:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/LpH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在硝酸纤维素膜上划线得到质控线,划线完毕后将硝酸纤维素膜置于37℃干燥8小时即得。

[0016] (5) 吸水纸的制备:将吸水纸裁剪成30cm×2.7cm每条。

[0017] (6) 组装:将上述处理好的样品垫、微球标记结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于PVC底板上,贴好后裁剪成宽4mm的试纸条,并置于三联体扣卡内,加入干燥剂封装即得。

[0018] 进一步的,所述的样品垫的制备的缓冲液选自Tris、PBS或甘氨酸中的一种,所述表面活性剂选自Tween20或TritonX-100中的一种。

[0019] 进一步的,所述的结合垫的制备的荧光微球选自荧光素cy5、荧光素cy7、含铈聚苯

乙烯微球、2-甲氧基荧光增强素、罗丹明、藻红蛋白中的一种。

[0020] 本发明具有的积极效果:本发明的荧光免疫层析试剂盒对血液样品中的Hs-CRP、MPO、Lp-PLA2进行定量检测,与传统指标相比,Hs-CRP、MPO、Lp-PLA2的联合应用在严重心血管事件早期诊断和风险预测方面准确性更高,优势明显。另本发明采用荧光免疫层析法,与传统方法相比,具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化、阳性检出率达90%以上、假阳性达到了最小化等突出优点,有重要的实用意义。

附图说明

- [0021] 图1为本发明试剂条结构的示意图。
[0022] 图2为组合扣卡结构示意图。
[0023] 图3为三联体扣卡结构示意图。
[0024] 图4是超敏C反应蛋白检测标准工作曲线图。
[0025] 图5是髓过氧化酶检测标准工作曲线图。
[0026] 图6是脂蛋白磷脂酶A2检测标准工作曲线图。
[0027] 图7是超敏C反应蛋白线性标准工作曲线图。
[0028] 图8是髓过氧化酶线性标准工作曲线图。
[0029] 图9是脂蛋白磷脂酶A2线性标准工作曲线图。

具体实施方式

[0030] 下述实施例结合附图对本发明进行进一步说明,但本发明并不局限于以下说明。

[0031] 如图1、图2、图3所示,本发明检测试剂盒除所述干燥剂和密封袋外,主要结构检测卡包括扣卡7或扣卡10和试剂条1,其中试剂条1包括样品垫5、结合垫3、硝酸纤维素膜2、吸水纸4和PVC底板6;扣卡包括组合扣卡7和三联扣卡10,扣卡均包括加样孔8和观察窗9,试剂条1安置于扣卡1或扣卡10内。

[0032] 实施例1:

[0033] (1) 样品垫的制备

[0034] 样品垫选用玻璃纤维素膜,用缓冲液Tris等溶解NaCl、BSA等盐离子和蛋白,然后加入少量的表面活性剂Tween20,调节pH到7-8,按玻纤吸水量均匀铺于玻纤上,置于37℃干燥8小时即得。

[0035] (2) 结合垫的制备

[0036] 将荧光微球标记的单克隆抗体,用微球稀释液进行稀释,均匀铺在处理好的样品垫上,真空冷冻干燥后密封,室温保存,其中荧光微球标记抗体物制备过程如下:

[0037] a. 荧光微球与抗超敏C反应蛋白单克隆抗体的偶联

[0038] 将粒径大小为300nm的荧光微球先用EDC和NHS活化剂和稳定剂进行活化,活化完后进行清洗,去除活化剂,然后再与250ug/mL的超敏C反应蛋白单克隆抗体混合,室温反应2h,反应完毕后清洗去除上清多余的抗体,然后用2%酪蛋白溶液进行封闭1个小时,然后缓冲液清洗几遍,最后用微球保存液保存,得到荧光微球标记的超敏C反应蛋白单克隆抗体,荧光微球的发射波长为615nm。

[0039] b. 荧光微球与抗髓过氧化酶单克隆抗体的偶联

[0040] 将粒径大小为300nm的荧光微球先用EDC和NHS活化剂和稳定剂进行活化,活化完后进行清洗,去除活化剂,然后再与250ug/mL的髓过氧化物酶蛋白单克隆抗体混合,室温反应2h,反应完毕后清洗去除上清多余的抗体,然后用2%酪蛋白溶液进行封闭1个小时,然后缓冲液清洗几遍,最后用微球保存液保存,得到荧光微球标记的髓过氧化物酶单克隆抗体,荧光微球的发射波长为615nm。

[0041] c. 荧光微球与抗脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体的偶联

[0042] 将粒径大小为300nm的荧光微球先用EDC和NHS活化剂和稳定剂进行活化,活化完后进行清洗,去除活化剂,然后再与250ug/mL的脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体混合,室温反应2h,反应完毕后清洗去除上清多余的抗体,然后用2%酪蛋白溶液进行封闭1个小时,然后缓冲液清洗几遍,最后用微球保存液保存,得到荧光微球标记的脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体,荧光微球的发射波长为615nm。

[0043] (3) 滤血膜的制备:将滤血膜裁剪成10cm×4mm每条。

[0044] (4) 硝酸纤维素膜的处理

[0045] a. 超敏C反应蛋白硝酸纤维素膜的处理:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/L pH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在NC膜上端C线标注位置划线得到质控线;将羊抗人超敏C反应蛋白多克隆抗体也用稀释包被液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在NC膜上T线标注位置划线得到定量检测线,检测线和质控线间隔为5mm,划线完毕后置于37℃干燥8小时即得。

[0046] b. 髓过氧化物酶试纸条NC膜的处理:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/L pH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在NC膜上端C线标注位置划线得到质控线,将羊抗人髓过氧化物酶多克隆抗体也用稀释包被液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在NC膜上T线标注位置划线得到定量检测线,检测线和质控线间隔为5mm,划线完毕后置于37℃干燥8小时即得。

[0047] c. 脂蛋白磷脂酶A2试纸条NC膜的处理:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/L pH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在NC膜上端C线标注位置划线得到质控线,将羊抗人脂蛋白磷脂酶A2多克隆抗体用稀释包被液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8ul/cm的划线速率在NC膜上T线标注位置划线得到定量检测线,检测线和质控线间隔为5mm,划线完毕后置于37℃干燥8小时即得。

[0048] (5) 吸水纸的制备:将吸水纸裁剪成30cm×2.7cm每条。

[0049] (6) 组装:将上述处理好的样品垫、微球标记结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴于PVC底板上,贴好后用切条机切成宽4mm的试纸条,并置于三联体扣卡内,加入干燥剂封装,与稀释缓冲液共同构建为超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒。

[0050] 实施例2:

[0051] (1) 样品垫的制备

[0052] 样品垫选用玻璃纤维素膜,用缓冲液PBS等溶解NaCl、BSA等盐离子和蛋白,然后加入少量的表面活性剂TritonX-100,调节pH到7-8,按玻纤吸水量均匀铺于玻纤上,置于37℃干燥8小时即得。

[0053] (2) 结合垫的制备

[0054] 将荧光微球标记的单克隆抗体,用微球稀释液进行稀释,均匀铺在处理好的样品垫上,真空冷冻干燥后密封,室温保存,其中荧光微球标记抗体物制备过程如下:

[0055] a. 荧光微球与抗超敏C反应蛋白单克隆抗体的偶联

[0056] 将粒径大小为300nm的荧光微球先用EDC和NHS活化剂和稳定剂进行活化,活化完后进行清洗,去除活化剂,然后再与250ug/mL的超敏C反应蛋白单克隆抗体混合,室温反应2h,反应完毕后清洗去除上清多余的抗体,然后用2%酪蛋白溶液进行封闭1个小时,然后缓冲液清洗几遍,最后用微球保存液保存,得到荧光微球标记的超敏C反应蛋白单克隆抗体,荧光微球的发射波长为615nm。

[0057] b. 荧光微球与抗髓过氧化物酶单克隆抗体的偶联

[0058] 将粒径大小为300nm的荧光微球先用EDC和NHS活化剂和稳定剂进行活化,活化完后进行清洗,去除活化剂,然后再与250ug/mL的髓过氧化物酶蛋白单克隆抗体混合,室温反应2h,反应完毕后清洗去除上清多余的抗体,然后用2%酪蛋白溶液进行封闭1个小时,然后缓冲液清洗几遍,最后用微球保存液保存,得到荧光微球标记的髓过氧化物酶单克隆抗体,荧光微球的发射波长为615nm。

[0059] c. 荧光微球与抗脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体的偶联

[0060] 将粒径大小为300nm的荧光微球先用EDC和NHS活化剂和稳定剂进行活化,活化完后进行清洗,去除活化剂,然后再与250ug/mL的脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体混合,室温反应2h,反应完毕后清洗去除上清多余的抗体,然后用2%酪蛋白溶液进行封闭1个小时,然后缓冲液清洗几遍,最后用微球保存液保存,得到荧光微球标记的脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体,荧光微球的发射波长为615nm。

[0061] (3) 滤血膜的制备:将滤血膜裁剪成10cm×4mm每条。

[0062] (4) 硝酸纤维素膜的处理

[0063] a. 超敏C反应蛋白硝酸纤维素膜的处理:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/L pH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8uL/cm的划线速率在NC膜上端C线标注位置划线得到质控线;将羊抗人超敏C反应蛋白多克隆抗体也用稀释液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8uL/cm的划线速率在NC膜上T线标注位置划线得到定量检测线,检测线和质控线间隔为5mm,划线完毕后置于37℃干燥8小时即得。

[0064] b. 髓过氧化物酶试纸条NC膜的处理:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/L pH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8uL/cm的划线速率在NC膜上端C线标注位置划线得到质控线,将羊抗人髓过氧化物酶多克隆抗体也用稀释液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8uL/cm的划线速率在NC膜上T线标注位置划线得到定量检测线,检测线和质控线间隔为5mm,划线完毕后置于37℃干燥8小时即得。

[0065] c. 脂蛋白磷脂酶A2试纸条NC膜的处理:将羊抗鼠IgG抗体用50mM/L pH7.2的PB缓冲液稀释到1.0mg/mL的浓度,0.8uL/cm的划线速率在NC膜上端C线标注位置划线得到质控线,将羊抗人脂蛋白磷脂酶A2多克隆抗体用稀释液稀释至1.0mg/mL的浓度,0.8uL/cm的划线速率在NC膜上T线标注位置划线得到定量检测线,检测线和质控线间隔为5mm,划线完毕后置于37℃干燥8小时即得。

[0066] (5) 吸水纸的制备:将吸水纸裁剪成30cm×2.7cm每条。

[0067] (6) 组装:将上述处理好的样品垫、微球标记结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜和吸水

垫依次粘贴于PVC底板上,贴好后用切条机切成宽4mm的试纸条,并置于三联体扣卡内,加入干燥剂封装,与稀释缓冲液共同构建为超敏C反应蛋白、髓过氧化酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒。

[0068] 实施例3:

[0069] 超敏C反应蛋白、髓过氧化酶和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫层析检测试剂盒的检测。

[0070] (1) 绘制标准曲线

[0071] 在按实施例1制备好的试剂盒样品垫上分别加入不同浓度超敏C反应蛋白、髓过氧化酶、脂蛋白磷脂酶A2抗原标准品(各取7个不同浓度,超敏C反应蛋白抗原标准品分别为0、0.5、5、10、40、100、150ng/mL,髓过氧化酶抗原标准品分别为0、10、50、100、200、500、1000ng/mL,脂蛋白磷脂酶A2抗原标准品分别为0.50、100、200、500、1000和1500ng/mL,每个浓度设3个重复),15分钟后,置于荧光定量免疫层析仪中获取荧光信号强度,根据检测线与质控线荧光信号比值,由标准曲线求所检样品的浓度。实验结果及分析见表1~3:

[0072] 表1超敏C反应蛋白标准品检测结果

[0073]

CRP 标准品 (ng/mL)		0	0.5	5	10	40	100	150
重复3次 信号值	1	0.021	0.065	0.102	0.195	0.265	0.396	0.612
	2	0.019	0.059	0.112	0.187	0.239	0.402	0.596
	3	0.022	0.064	0.096	0.162	0.245	0.412	0.602
均值		0.021	0.063	0.103	0.181	0.250	0.403	0.603
SD		0.00153	0.00321	0.0081	0.0172	0.0136	0.00808	0.00808

[0074]

CV	0.0739	0.0513	0.078	0.0949	0.0545	0.0200	0.0134
----	--------	--------	-------	--------	--------	--------	--------

[0075] 表2髓过氧化酶标准品检测结果

[0076]

髓过氧化酶标准品 (ng/mL)		0	10	50	100	200	500	1000
重复3次 信号值	1	0.032	0.093	0.123	0.21	0.285	0.512	0.845
	2	0.035	0.091	0.125	0.213	0.309	0.495	0.795
	3	0.031	0.089	0.135	0.236	0.276	0.463	0.842
均值		0.033	0.091	0.128	0.220	0.290	0.490	0.827
SD		0.00208	0.00200	0.0064	0.0142	0.0171	0.02488	0.02804
CV		0.0637	0.0220	0.050	0.0648	0.0588	0.0508	0.0339

[0077] 表3脂蛋白磷脂酶A2标准品检测结果

[0078]

脂蛋白磷脂酶 A2 (ng/mL)		0	50	100	200	500	1000	1500
重复 3 次 信号值	1	0.013	0.052	0.082	0.136	0.213	0.396	0.512
	2	0.012	0.049	0.079	0.146	0.226	0.402	0.589
	3	0.014	0.051	0.081	0.129	0.206	0.413	0.503
均值		0.013	0.051	0.081	0.137	0.215	0.404	0.535
SD		0.00100	0.00153	0.0015	0.0085	0.0101	0.00862	0.04727
CV		0.0769	0.0301	0.019	0.0624	0.0472	0.0214	0.0884

[0079] 分别以超敏C反应蛋白、髓过氧化物酶、脂蛋白磷脂酶A2抗原标准液浓度与测定的信号比值平均值绘制标准曲线,如附图1~3所示。

[0080] (2) 检测线性范围

[0081] 采用本发明实施例1制备的试剂盒,做检测线性范围实验。

[0082] 取超敏C反应蛋白标准品,用生理盐水分别稀释成6个浓度,超敏C反应蛋白浓度范围是0.5ng/mL-150ng/mL,每个浓度重复测定3次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程 $y=0.9957X+0.4789$,相关系数 $r=0.999$,表明本试剂盒在0.5ng/mL-150ng/mL线性范围内相关性较好(见附图4)。

[0083] 取髓过氧化物酶标准品,用生理盐水稀释成6个浓度,其浓度范围是10-1000ng/mL,每个浓度重复测定3次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程 $y=0.9986X+5.2168$,相关系数 $r=0.999$,表明本试剂盒在10-1000ng/mL线性范围内相关性较好(见附图5)。

[0084] 取脂蛋白磷脂酶A2标准品,用生理盐水稀释成6个浓度,其浓度范围是50-1500ng/mL,每个浓度重复测定3次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程 $y=1.0346X-9.3357$,相关系数 $r=0.999$,表明本试剂盒在50-1500ng/mL线性范围内相关性较好(见附图6)。

[0085] (3) 灵敏度(最低检测限)

[0086] 以人血浆为空白样本,用本发明实施例1制备的试纸条进行测定,重复20次,计算超敏C反应蛋白结果均值为0.0208,标准差为0.0024,根据空白均值加两倍标准差报告方法计算荧光免疫定量分析仪测定度数变化量为0.025,代入标准曲线中得到最低检出限为0.12ng/mL;计算髓过氧化物酶结果均值为0.0306,标准差为0.0035,根据空白均值加两倍标准差报告方法计算荧光免疫定量分析仪测定度数变化量为0.0375,代入标准曲线中得到最低检出限为5.13ng/mL;计算脂蛋白磷脂酶A2结果均值为0.015,标准差为0.0096,根据空白均值加两倍标准差报告方法计算荧光免疫定量分析仪测定度数变化量为0.0342,代入标准曲线中得到最低检出限为20.5ng/mL。

[0087] (4) 重复性和准确性

[0088] 配制1.0ng/mL和10ng/mL的超敏C反应蛋白标准品溶液,采用本发明实施例1制备的试剂盒进行测定,各浓度分别重复测定5次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果显示变异系数分别为5.6%和0.9%;以 $(1-均值/标准值) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为4%和6%。

[0089] 配制50ng/mL和200ng/mL的髓过氧化酶标准品溶液,采用本发明实施例1制备的试剂盒进行测定,各浓度分别重复测定5次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果显示变异系数分别为9.5%和6.3%;以 $(1-\text{均值}/\text{标准值}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为8.3%和4.6%。

[0090] 配制100ng/mL和500ng/mL的脂蛋白磷脂酶A2标准品溶液,采用本发明实施例1制备的试剂盒进行测定,各浓度分别重复测定5次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果显示变异系数分别为10.6%和3.6%;以 $(1-\text{均值}/\text{标准值}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为8.6%和10.6%。

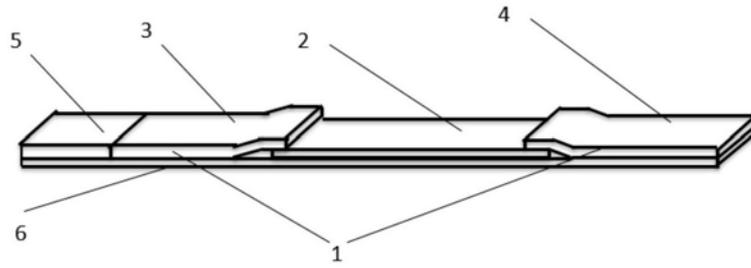


图1

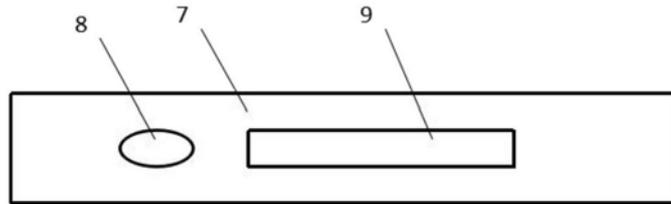


图2

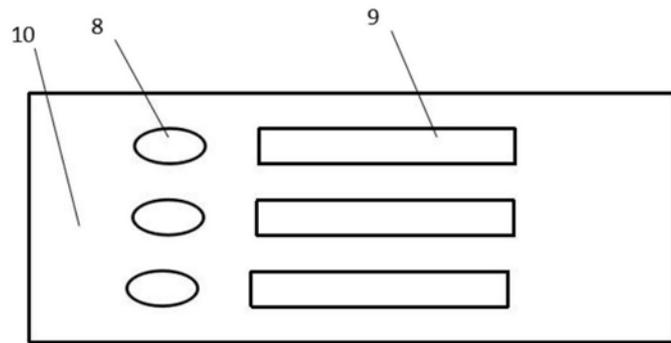


图3

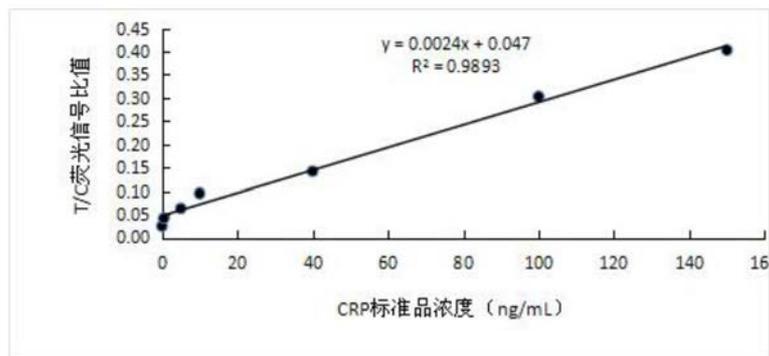


图4

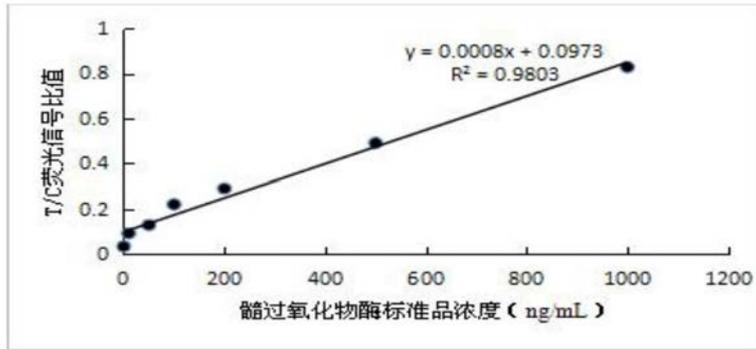


图5

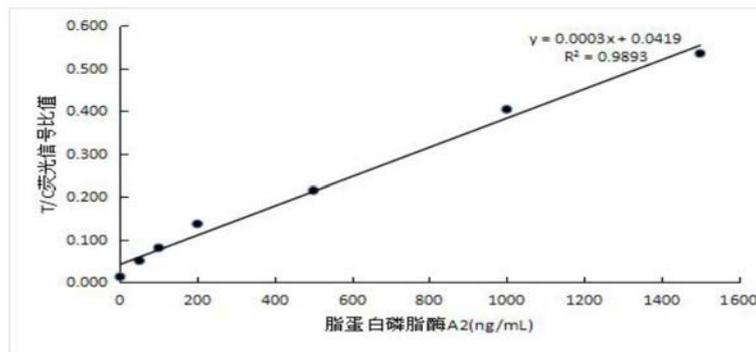


图6

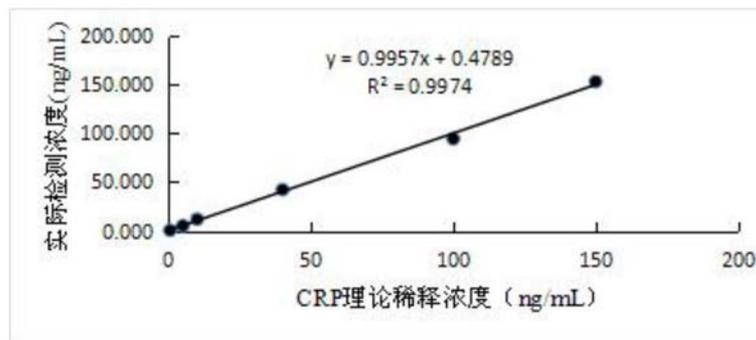


图7

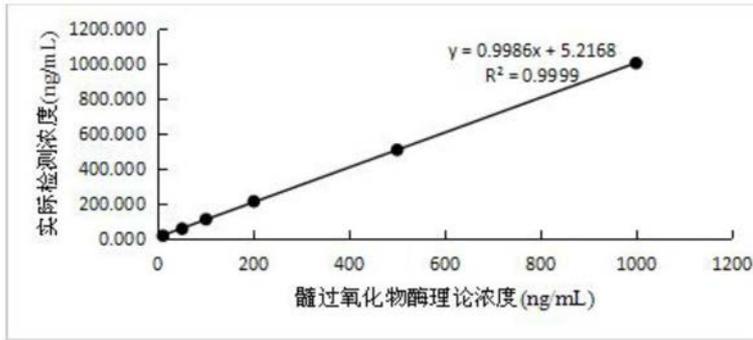


图8

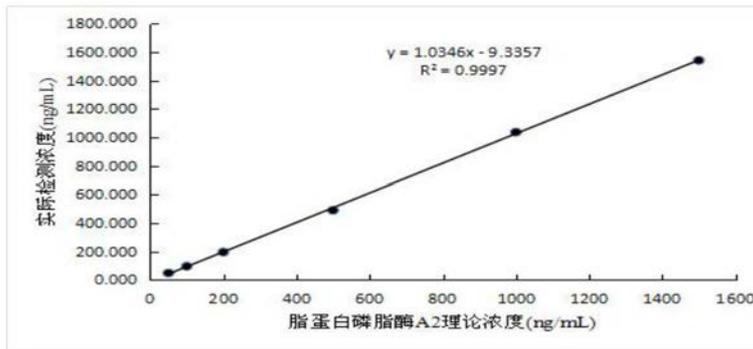


图9

专利名称(译)	一种荧光免疫层析联合检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110554197A	公开(公告)日	2019-12-10
申请号	CN201810559251.1	申请日	2018-06-01
[标]发明人	章燕 李亚楠 刘凤鸣		
发明人	章燕 李亚楠 刘凤鸣		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/58 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/6803 G01N2496/05		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种复合型定量检测超敏C反应蛋白(Hs-CRP)、髓过氧化物酶(MPO)、脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法，包括干燥剂、密封袋和检测卡。所述检测卡包括三联体扣卡与试剂条；所述试剂条包括样品垫、结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜、吸水纸和PVC底板，所述结合垫包被有hsCRP抗体、MPO抗体和Lp-PLA2抗体；所述hsCRP抗体为hsCRP单克隆抗体和hsCRP多克隆抗体的一种或组合；所述MPO抗体为MPO单克隆抗体和MPO多克隆抗体的一种或组合；所述Lp-PLA2抗体为Lp-PLA2单克隆抗体和Lp-PLA2多克隆抗体的一种或组合。本发明方法具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化、假阳性达到了最小化、检测效率高，检测成本低等突出优点，有重要的实用意义。

CRP 标准品 (ng/mL)	0	0.5	5	10	40	100	150	
重复3次 信号值	1	0.021	0.065	0.102	0.195	0.265	0.396	0.612
	2	0.019	0.059	0.112	0.187	0.239	0.402	0.596
	3	0.022	0.064	0.096	0.162	0.245	0.412	0.602
均值		0.021	0.063	0.103	0.181	0.250	0.403	0.603
SD		0.00153	0.00321	0.0081	0.0172	0.0136	0.00808	0.00808