



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110749731 A

(43)申请公布日 2020.02.04

(21)申请号 201910993197.6

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.10.18

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 北京协和洛克生物技术有限责任公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开发区科创十四街11号院2号楼

(72)发明人 吴建榕 刘永 黄龙耀 丁琪 王峥辉

(74)专利代理机构 北京市英智伟诚知识产权代理事务所(普通合伙) 11521

代理人 刘丹妮 姚望舒

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

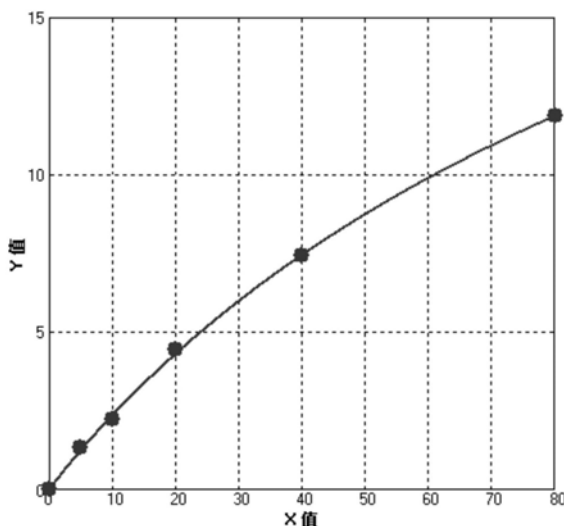
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒及应用

(57)摘要

本发明提供了一种定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒,所述试剂盒包括样本稀释液、测试卡和复制有人氧化低密度脂蛋白标准曲线信息的ID卡,其中所述测试卡由PVC板、样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述标记垫上喷制有标记抗Ox-LDL抗体的Eu荧光微球。本试剂盒只需要在常温对5ul血液样本进行检测,相对传统检测具有采血量少、快速灵敏、准确度好、特异性高、稳定性好的特点。



1. 一种定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括样本稀释液、测试卡和复制有人氧化低密度脂蛋白标准曲线信息的ID卡,其中所述测试卡由PVC板、样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述标记垫上喷制有标记抗Ox-LDL抗体的Eu荧光微球。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上划有一条抗APOB单克隆抗体检测线和一条羊抗鼠多克隆抗体质控线。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述结合垫上包括Eu荧光微球标记的人氧化低密度脂蛋白抗体。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述Eu荧光微球为粒径为200~300nm,优选为200~250nm,最优选为210nm聚苯乙烯-羧基微球;

优选地,所述Eu荧光微球表面无修饰直链手臂、表面修饰6原子直链手臂、表面修饰200原子直链手臂、表面修饰1000原子直链手臂;

更优选地,所述Eu荧光微球表面修饰6原子直链手臂。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述样本稀释液包括0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,0.5%的Proclin 300,0.2%BSA,0.2% (v/v) Tween-20,0.5% (w/v) brij-35,0.1 (w/v) 维生素C。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括校准品稀释液;

优选地,所述校准品稀释液包括0.02M pH 7.4的PBS缓冲液,0.5% (v/v) 的Proclin 300,3g/L BSA,0.5g/L乙二胺四乙酸二钠,1%人血白蛋白。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述标记抗Ox-LDL抗体的Eu荧光微球通过Eu-荧光微球与抗Ox-LDL抗体经活化、偶联、封闭制备得到;

优选地,所述方法包括以下步骤:

(A) Eu荧光微球活化:吸取Eu荧光微球到离心管中,加入硼酸缓冲溶液至浓度1~3mg/ml,振荡混匀;加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液室温振荡活化;

(B) 抗体与微球偶联:将步骤(A)中活化好的微球离心弃上清,用硼酸缓冲溶液复溶;加入抗Ox-LDL抗体,至终浓度200~400g/ml室温振荡孵育;

(C) 封闭:在步骤(B)所得抗体偶联混合液中,加入含有BSA的Tris-HCl封闭液2~8℃封闭;

(D) 储存:封闭后的抗体荧光微球洗涤离心弃上清,加入微球保存液,放入2~8℃条件下保存;

更优选地,所述微球保存液包括0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,含2% (w/v) BSA,3% (w/v) 海藻糖,10% (w/v) 蔗糖,0.2% (v/v) Tween-20,0.1% (v/v) Proclin 300。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 分别制备标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜;

(2) 将硝酸纤维素膜光面向下贴到PVC板中间位置,质控线在上,检测线在下;

(3) 沿硝酸纤维素膜下缘粘贴结合垫,优选地,所述结合垫与硝酸纤维素膜重叠1~1.5mm;

- (4) 沿结合垫下边缘粘贴标记垫;优选地,所述结合垫与标记垫重叠1~1.5mm;
- (5) 沿标记垫下边缘贴样品垫,优选地,所述标记垫与结合垫边缘重叠1~1.5mm;和
- (6) 将吸水纸贴于PVC板上,优选地,所述吸水纸硝酸纤维素膜重叠2~3mm。

9. 根据权利要求8所述方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述结合垫的制备方法包括以下步骤:

用喷金缓冲液配制按照5~20倍、优选为10~20倍、最优选为15倍效价稀释标记微球后,将微球喷制到结合垫上。

10. 权利要求1至7中任一项所述的试剂盒在制备用于检测氧化低密度脂蛋白的产品中的应用。

## 定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测领域,具体涉及一种定量测定人体血浆中氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)浓度时间分辨免疫层析技术的快速检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 低密度脂蛋白(LDL)结构是一个近似球形的乳状液颗粒结构模型。球形的内部呈中性,为胆固醇酯和少量的甘油三酯;外层为亲水亲油的单分子层,包括磷脂、未酯化的胆固醇以及一个分子的载脂蛋白apoB-100。LDL中磷脂、胆固醇以及蛋白质非常容易受到氧自由基和羟自由基的攻击而被氧化成为氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)。在体内LDL可以通过以下两种方式进行氧化:(1)动脉内皮细胞可以在氧自由基的介导下经细胞内脂加氧酶作用,使LDL氧化修饰;(2)过度金属离子(如Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>)同样可以在氧自由基介导下,使脂蛋白卵磷脂分子中的多不饱和脂肪酸(PUFAs)产生脂过氧基诱导的氧化修饰。

[0003] 研究表明,Ox-LDL可引起血管内皮细胞损伤,诱导单核细胞与内皮细胞的黏附,导致巨噬细胞的泡沫化,形成泡沫细胞。而泡沫细胞的形成将促使脂类在动脉壁的沉积,是动脉粥样硬化的主要病因之一。故Ox-LDL作为动脉粥样硬化的独立的危险因素,在动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥了重要的作用。研究表明,患者体内的Ox-LDL量远高于正常人,其浓度与病变范围呈正相关。高水平的Ox-LDL可能代表体内有强的氧化应激反应。它在影响斑块稳定性方面发挥作用。因此,Ox-LDL作为新一代独立检测指标,在冠心病的预警及早期辅助诊断具有重要意义。

[0004] 目前测定氧化低密度脂蛋白的几种方法包括:1)传统的共轭双烯法、硫代巴比妥酸化学测定法、相对电泳迁移速率法、ELISA法等,都存在检测样本因为反应时间长、操作复杂且不适合单人份即时操作,样本容易被氧化而导致不准确的缺点;2)胶乳增强比浊法是一种通过在高分子乳胶微球表面交联的单克隆抗体,而当抗原与交联有抗体的微球结合后,能够在短时间内迅速聚集在一起,改变反应溶液的吸光度,从而确定样品中Ox-LDL的含量的方法,但此方法检测Ox-LDL存在灵敏度差的缺点,难以满足临床的检测需求。3)化学发光法,灵敏度高,但操作繁琐,需要特殊的发光底物-抗原/抗体连接物、需要大型分析仪器、试剂成本较高等缺点,限制了其大规模的发展使用。

[0005] 因此,有必要开发一种同时具有高灵敏度、宽线性范围、特异性好且操作简便,适合于社区医院和基层医疗机构的试剂盒。

### 发明内容

[0006] 因此,本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷,提供一种定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒及应用。

[0007] 在阐述本发明的技术方案之前,定义本文中所使用的术语如下:

[0008] 术语“Ox-LDL”是指:氧化低密度脂蛋白。

- [0009] 术语“LDL”是指：低密度脂蛋白。
- [0010] 术语“NC”是指：硝酸纤维素。
- [0011] 术语“PVC”是指：聚氯乙烯。
- [0012] 术语“APOB”是指：载脂蛋白B。
- [0013] 术语“BSA”是指：牛血清白蛋白。
- [0014] 术语“PBS缓冲液”是指：磷酸缓冲盐溶液。
- [0015] 为实现上述目的，本发明的第一方面提供了一种定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒，所述试剂盒包括样本稀释液、测试卡和复制有人氧化低密度脂蛋白标准曲线信息的ID卡，其中所述测试卡由PVC板、样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成，所述标记垫上喷制有标记抗Ox-LDL抗体的Eu荧光微球。
- [0016] 根据本发明第一方面的试剂盒，其中，所述硝酸纤维素膜上划有一条抗APOB单克隆抗体检测线和一条羊抗鼠多克隆抗体质控线。
- [0017] 根据本发明第一方面的试剂盒，其中，所述结合垫上包括Eu荧光微球标记的人氧化低密度脂蛋白抗体。
- [0018] 根据本发明第一方面的试剂盒，其中，所述Eu荧光微球为粒径为200~300nm，优选为200~250nm，最优选为210nm聚苯乙烯-羧基微球；
- [0019] 优选地，所述Eu荧光微球表面无修饰直链手臂、表面修饰6原子直链手臂、表面修饰200原子直链手臂、表面修饰1000原子直链手臂；
- [0020] 更优选地，所述Eu荧光微球表面修饰6原子直链手臂。
- [0021] 根据本发明第一方面的试剂盒，其中，所述样本稀释液包括0.05M pH8.0的Tris-HCl缓冲液，0.5%的Proclin 300，0.2%BSA，0.2% (v/v) Tween-20，0.5% (w/v) brij-35，0.1 (w/v) 维生素C。
- [0022] 根据本发明第一方面的试剂盒，其中，所述试剂盒中还包括校准品稀释液；
- [0023] 优选地，所述校准品稀释液包括0.02M pH 7.4的PBS缓冲液，0.5%的Proclin 300，3g/L BSA，0.5g/L乙二胺四乙酸二钠，1%人血白蛋白。
- [0024] 根据本发明第一方面的试剂盒，其中，所述标记抗Ox-LDL抗体的Eu荧光微球通过Eu-荧光微球与抗Ox-LDL抗体经活化、偶联、封闭制备得到；
- [0025] 优选地，所述方法包括以下步骤：
- [0026] (A) Eu荧光微球活化：吸取Eu荧光微球到离心管中，加入硼酸缓冲溶液至浓度1~3mg/ml，振荡混匀；加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液室温振荡活化；
- [0027] (B) 抗体与微球偶联：将步骤(A)中活化好的微球离心弃上清，用硼酸缓冲溶液复溶；加入抗Ox-LDL抗体，至终浓度200~400g/ml室温振荡孵育；
- [0028] (C) 封闭：在步骤(B)所得抗体偶联混合液中，加入含有BSA的Tris-HCl封闭液2~8℃封闭；
- [0029] (D) 储存：封闭后的抗体荧光微球洗涤离心弃上清，加入微球保存液，放入2~8℃条件下保存；
- [0030] 更优选地，所述微球保存液包括0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液，含2% (w/v) BSA，3% (w/v) 海藻糖，10% (w/v) 蔗糖，0.2% (v/v) Tween-20，0.1% (v/v) Proclin 300。
- [0031] 本发明的第二方面提供了第一方面所述的试剂盒的制备方法，该制备方法可以包

括以下步骤：

[0032] 所述方法包括以下步骤：

[0033] (1) 分别制备标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜；

[0034] (2) 将硝酸纤维素膜光面向下贴到PVC板中间位置，质控线在上，检测线在下；

[0035] (3) 沿硝酸纤维素膜下缘粘贴结合垫，优选地，所述结合垫与硝酸纤维素膜重叠1~1.5mm；

[0036] (4) 沿结合垫下边缘粘贴标记垫；优选地，所述结合垫与标记垫重叠1~1.5mm；

[0037] (5) 沿标记垫下边缘贴样品垫，优选地，所述标记垫与结合垫边缘重叠1~1.5mm；  
和

[0038] (6) 将吸水纸贴于PVC板上，优选地，所述吸水纸硝酸纤维素膜重叠2~3mm。

[0039] 根据本发明第二方面的制备方法，其中，所述步骤(1)中，所述结合垫的制备方法包括以下步骤：用喷金缓冲液配制按照5~20倍、优选为10~20倍、最优为15倍效价稀释标记微球后，将微球喷制到结合垫上。

[0040] 本发明的第三方面提供了第一方面所述的试剂盒在制备用于检测氧化低密度脂蛋白的产品中的应用。

[0041] 针对现有Ox-LDL在测试过程中存在的上述问题，本发明提供一种快速灵敏、准确性好、特异性高、稳定性好，操作简便的试剂盒。

[0042] 本发明属于生物医学检测领域，提供了一种快速定量测定人氧化低密度脂蛋白的检测试剂盒及其方法。所述试剂盒由以下成分组成：(1) 测试卡：主要由吸水纸、硝酸纤维素膜、标记垫、结合垫、样品垫、PVC板等组分叠加而成，硝酸纤维素膜包被有抗APOB单克隆抗体和羊抗鼠IgG，结合垫上结合了钬元素微球标记的抗人氧化低密度脂蛋白抗体；(2) 含人氧化低密度脂蛋白标准曲线的ID卡；(3) 样本稀释液。本试剂盒只需要在常温对5u1血液样本进行检测，相对传统检测具有采血量少、快速灵敏、准确度好、特异性高、稳定性好的特点。

[0043] 为实现本发明的目的，提供以下技术方案。

[0044] 本发明涉及一种定量测定人氧化低密度脂蛋白的检测试剂盒，包含样本稀释液、测试卡、复制有人氧化低密度脂蛋白标准曲线信息的ID卡。其中测试卡的结构是由PVC板、样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成。

[0045] 所述的一种人Ox-LDL时间分辨免疫层析试剂盒中测试卡的制备方法，包含标记垫制备，其中包括荧光微球的选择，荧光微球与Ox-LDL抗体的标记。将标记人氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)抗体的Eu偶联荧光微球喷至结合垫，放入37℃烘箱，干燥2~3小时；包被Ox-LDL抗体的硝酸纤维素膜的制备方法是：在硝酸纤维素膜上缘，用包被液将羊抗鼠多克隆抗体稀释到0.3-1mg/ml作为质控线(C线)划线；在硝酸纤维素膜下缘，用包被液将包被有抗APOB单克隆抗体稀释到0.5-1mg/ml作为检测线(T线)划线，将划好T和C线的硝酸纤维素膜放入37℃烘箱，干燥4~5小时。所述测试卡的组装次序为在PVC板上依次衔接样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0046] 在上述定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫层析试剂盒中，所述测试卡上的硝酸纤维素膜包被有抗APOB单克隆抗体和羊抗鼠IgG，选用划膜稀释液配方为：0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液，0.5% (v/v)的Proclin 300，0.2% (v/v) Tween-20，0.5% (w/v) 蔗糖，

0.5% (w/v) 海藻糖。

[0047] 在上述定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫层析试剂盒中,优选实施方式所述测试卡上的结合垫上选用Eu-荧光微球标记的人氧化低密度脂蛋白抗体。

[0048] 所述Eu荧光微球优选粒径为210nm聚苯乙烯-羧基PS(-COOH)微球,表面无修饰直链手臂、表面修饰6原子直链手臂、表面修饰200原子直链手臂、表面修饰1000原子直链手臂。

[0049] 所述Eu荧光微球标记抗Ox-LDL抗体是Eu-荧光微球与对应单克隆抗体经活化、偶联、封闭制备得到。Eu荧光微球标记抗Ox-LDL抗体制备方法为:吸取Eu荧光微球到离心管中,加入0.05M pH=8.0硼酸缓冲溶液至浓度1-3mg/ml,振荡混匀;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液室温振荡活化15分钟;将活化好的微球在14000rpm条件下离心20分钟,弃上清,用0.5ml 0.05M pH 8.0硼酸缓冲溶液复溶;加入抗Ox-LDL抗体,至终浓度200-400g/ml室温振荡孵育2小时后,加入含有10%BSA 0.1M pH 8.0的Tris-HCl封闭液过夜封闭;洗涤离心,弃上清,加入微球保存液,放入2-8℃条件下保存。所述的微球保存液为0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,含2% (w/v) BSA,3% (w/v) 海藻糖,10% (w/v) 蔗糖0.2% (v/v) Tween-20,0.1%的Proclin 300。

[0050] 在上述定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫层析试剂盒中,所述样本稀释液配方为:0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,0.5%的Proclin 300,0.2%BSA,0.2% (v/v) Tween-20,0.5% (w/v) brij-35,0.1 (w/v) 维生素C。

[0051] 所述定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫层析试剂盒中测试卡的制备方法,所述的偶Eu荧光微球的Ox-LDL抗体溶液喷量为2-4ul/cm,气压为0.4-0.6条件;划膜条件是平台移动速度50-100mm/s,划膜量1-3ul/cm。

[0052] 所述IC卡内的标准曲线是用Ox-LDL校准品稀释液:0.02M pH 7.4的PBS缓冲液,0.5%的Proclin 300,3g/L BSA,0.5g/L乙二胺四乙酸二钠,1%人血白蛋白将Ox-LDL抗原稀释至0g/L、5g/L、10g/L、20g/L、40g/L和80g/L六个浓度点的校准品。

[0053] 与现有技术相比,本发明的试剂盒可以具有但不限于以下有益效果:

[0054] 1、采用时间分辨免疫层析技术,用较长荧光半衰期的稀土离子Eu作标记物,使得Stokes位移大(>150nm)且荧光寿命比本底物质荧光寿命高5~6个数量级,因此,测定时只要延缓测量时间,待本底物质的荧光充分衰减后再测定标记物的信号就可有效地消除各种非特异性荧光的干扰,比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0055] 2、采用聚苯乙烯-羧基PS(-COOH)微球与抗原或抗体为共价偶联,克服了物理吸附的不稳定性,因此免疫微球保存时间久,且更稳定。同时表面修饰6原子直链手臂的Eu荧光微球提高了产品的灵敏度。

[0056] 3、对Ox-LDL试剂盒中样本稀释液、微球保护液、抗体包被液、校准品稀释液配方中各组分的选择,创造性地在校准品稀释液配方中添加人血白蛋白,提高了校准品的稳定性,而且保证了检测试剂的稳定性,提高了产品的准确度。

[0057] 4、本发明提供了一种Ox-LDL定量检测试剂盒,根据试剂盒提供的ID卡中的标准曲线,可以得到待测样品中Ox-LDL的浓度,结合配套检测仪器,操作简单快速,(15分钟即可出结果)为病人节约了宝贵的时间。

## 附图说明

[0058] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0059] 图1示出了本发明的人定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫层析试剂盒中测试卡结构示意图。

[0060] 图2示出了定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫检测试剂盒标准曲线,其中X值为校准品浓度(单位g/L),Y值为T线荧光值与C线荧光值比。

[0061] 图3示出了本发明试剂盒与市售酶免试剂的测试结果比较图。

[0062] 附图标记说明:

[0063] 1、PVC板;2、样本垫;3、标记垫;4、结合垫;5、NC膜;6、吸水纸;7、T线;8、C线。

## 具体实施方式

[0064] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0065] 本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在上下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0066] 以下实施例中使用的试剂和仪器如下:

[0067] 试剂:

[0068] Eu荧光微球,购自南京微测生物科技有限公司;

[0069] 硼酸缓冲溶液,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺,BSA,Tris-HCl封闭液,海藻糖,蔗糖,Tween-20,Proclin 300,brij-35,维生素C,人氧化低密度脂蛋白,乙二胺四乙酸二钠,购自国药集团化学试剂有限公司;

[0070] 人血白蛋白,抗Ox-LDL抗体,购自abcom;

[0071] 抗APOB单克隆抗体,羊抗鼠多克隆抗体,购自北京佰桥瑞景生物科技有限公司;

[0072] PVC板,聚酯纤维素膜,硝酸纤维素膜,购自上海杰一生物技术有限公司;

[0073] 市售酶免试剂,购自Mercodia。

[0074] 仪器:

[0075] 喷金划膜仪,购自上海金标生物科技有限公司、型号HM3030;

[0076] 时间分辨免疫荧光检测仪购自苏州和迈精密仪器有限公司、型号FIC-Q100。

[0077] 实施例1

[0078] 本实施例用于说明本发明试剂盒中标记垫的制备。

[0079] (1) Eu荧光微球选择

[0080] 所述结合垫上结合:抗体标记时间分辨Eu荧光微球是用喷金缓冲液配制按照15倍效价稀释标记微球后,将微球按照表1设置喷制到结合垫上,其中喷金缓冲液含有:10mMTris-HCl+5% (w/v) 蔗糖+3% (w/v) 海藻糖+1% (w/v) BSA+0.1% (v/v) 吐温20+0.1% (v/v) Proclin 300。时间分辨Eu荧光微球为粒径为210nm聚苯乙烯-羧基PS(-COOH)微球,其中包括不带手臂、表面修饰6原子直链手臂、表面修饰200原子直链手臂、表面修饰1000原子

直链手臂四种,优选表面修饰6原子直链手臂Eu荧光微球。

[0081] 表1喷金设置

[0082]	喷金划膜仪设置	要求
	速度	50mm/s
	喷量	3ul/cm
	气压	0.4-0.6MPa

[0083] (2) Eu荧光微球标记

[0084] 所述Eu荧光微球标记Ox-LDL抗体是Eu-荧光微球与对应单克隆抗体经活化、偶联、封闭制备得到。Eu荧光微球标记抗Ox-LDL抗体制备方法

[0085] A. Eu荧光微球活化:

[0086] 吸取Eu荧光微球到离心管中,加入0.05M pH=8.0硼酸缓冲溶液至浓度1-3mg/ml,振荡混匀;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液室温振荡15分钟;

[0087] B. 抗体与微球偶联:

[0088] 将活化好的微球在14000rpm条件下离心20分钟,弃上清,用0.5ml 0.05M pH 8.0硼酸缓冲溶液复溶;加入抗Ox-LDL抗体,至终浓度200-400g/ml室温振荡孵育2小时后;

[0089] C. 封闭:

[0090] 在上述抗体偶联混合液中,加入含有10%BSA 0.1M pH 8.0的Tris-HCl封闭液2-8℃过夜封闭;

[0091] D. 储存:

[0092] 封闭后的抗体荧光微球经14000rpm,20min洗涤离心,弃上清,加入微球保存液,放入2-8℃条件下保存。

[0093] 所述的微球保存液为0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,含2% (w/v) BSA,3% (w/v) 海藻糖,10% (w/v) 蔗糖0.2% (v/v) Tween-20,0.1% (v/v) 的Proclin 300。

[0094] (3) 标记垫喷制工艺

[0095] 先将聚酯纤维素膜剪裁成8\*300mm大小,再用喷金划膜仪按照表1设置进行喷制,最后将喷好的标记垫放入37℃烘箱,干燥2~3小时。

[0096] 实施例2

[0097] 本实施例用于说明本发明试剂盒中硝酸纤维素膜(NC膜)的制备。

[0098] (1) 硝酸纤维素膜划膜工艺硝酸纤维素膜上划有一条抗APOB单克隆抗体检测线T线和一条羊抗鼠多克隆抗体质控线C线,其中T线是用包被液(在本实施例中又称划膜稀释液)配制浓度为0.8mg/ml的抗APOB单克隆抗体,C线是用包被液(在本实施例中又称划膜稀释液)配制浓度为0.5mg/ml羊抗鼠多克隆抗体,并将这两个浓度抗体吸入划膜仪的管路中,通过划膜仪将C线划在硝酸纤维素膜(NC膜)上缘,T线划在在硝酸纤维素膜下缘,具体划膜设置参数见表2。最后将划好的NC膜放入37℃烘箱,干燥4~5小时。

[0099] 表2划膜设置

[0100]	划膜仪及抗体浓度的设置	要求
	速度	50mm/s
	喷量	1ul/cm
	划膜针间距	5mm

检测线(T线)浓度	1mg/ml
质控线(C线)浓度	0.5mg/ml

[0101] (2) 包被液(划膜稀释液)的配制

[0102] 所述划膜稀释液配制为:0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,0.5% (v/v)的Proclin 300,0.2% (v/v) Tween-20,0.5% (w/v) 蔗糖,0.5% (w/v) 海藻糖。

[0103] 实施例3

[0104] 本实施例用于说明本发明试剂盒样本稀释液的制备。

[0105] 所述样本稀释液配制为0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,0.5% (v/v)的Proclin 300,0.2% BSA,0.2% (v/v) Tween-20,0.5% (w/v) brij-35,0.1 (w/v) 维生素C。

[0106] 实施例4

[0107] 本实施例用于说明本发明试剂盒校准品的制备。

[0108] 所述IC卡内的标准曲线是用校准品稀释液把人氧化低密度脂蛋白稀释成六个浓度点的校准品(依次为0g/L、5g/L、10g/L、20g/L、40g/L和80g/L)配制而成。把六个点的作为检测样品,滴入测试卡上,经过15分钟反应,使用时间分辨免疫荧光检测仪激发荧光信号并扫描得到检测线(T线)和质控线(C线)荧光值,把T线和C线荧光值的比值作为Y值,六个浓度点的Ox-LDL蛋白校准品,作为X值。如图2所示,将不同浓度的坐标点,按照四参数的数学模型拟合成曲线,即为标准曲线,根据标准曲线可以得到待测样品中人氧化低密度脂蛋白的浓度。校准品缓冲溶液配方是:0.02M pH 7.4的PBS缓冲液,0.5%的Proclin 300,3g/L BSA,0.5g/L 乙二胺四乙酸二钠,1%人血白蛋白,完全溶解后经过0.22 $\mu$ m滤膜处理制备而成。

[0109] 实施例5

[0110] 本实施例用于说明本发明测试卡的结构。

[0111] 如图1所示,本发明人定量检测Ox-LDL时间分辨荧光免疫层析试剂盒测试卡,包括PVC板、样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0112] (1) 将硝酸纤维素膜(NC膜)光面向下贴到PVC板中间位置,C线在上,T线在下;

[0113] (2) 与硝酸纤维素膜下缘重叠的是结合垫,重叠部分在1-1.5mm以内;

[0114] (3) 沿结合垫下边缘,边缘重叠1-1.5mm,贴标记垫,结合垫和标记垫的材质均为聚酯纤维素膜;

[0115] (4) 紧贴标记垫下边缘贴样品垫,标记垫与结合垫边缘重叠1-1.5mm,贴好后用手将样本垫压紧;

[0116] (5) 最后将吸水纸贴于PVC板上,吸水纸应搭接NC膜2-3mm。

[0117] 试验例1

[0118] 本试验例用于说明本发明试剂盒的最低检测限实验。

[0119] (1) 为选择最佳荧光微球对实施例1中的四种不同手臂大小Eu荧光羧基微球,用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果,计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,带入标准曲线所得值为空白限。

[0120] 表3空白限检测

T/C	不带手臂	6原子直链手臂	200原子直链手臂	1000原子直链手臂
1	0.154	0.143	1.279	3.387
2	0.143	0.108	0.937	3.676
3	0.017	0.143	1.279	2.857
4	0.235	0.170	1.511	3.142
5	0.129	0.164	1.940	2.777
6	0.175	0.129	1.256	3.469
7	0.206	0.171	1.318	2.575
8	0.178	0.129	1.279	2.696
9	0.164	0.119	1.511	3.593
10	0.140	0.175	1.013	3.060
11	0.150	0.140	1.511	2.777
12	0.147	0.150	0.975	2.979
13	0.175	0.147	1.203	2.418
14	0.143	0.175	1.940	2.495
15	0.196	0.143	1.279	2.575
16	0.051	0.196	1.522	2.097
17	0.095	0.175	1.979	2.097
18	0.192	0.206	1.395	3.060
19	0.217	0.192	1.472	2.857
20	0.105	0.178	1.356	3.552
AV	0.151	0.158	1.398	2.907
SD	0.053	0.027	0.294	0.468
AV+2SD	0.257	0.211	1.986	3.842
空白限 g/L	0.888	0.716	8.135	17.293

[0122] 由表3结果可知,本发明所述试剂盒优选的表面修饰6原子直链手臂的Eu荧光羧基微球空白限值最低为0.716g/L。

[0123] (2) 对3份浓度近似空白限 (LOD) 的低值样本进行检测,每份样本检测3次,测试的样本最低检测限为2.3g/L进一步验证使用6原子直链手臂羧基微球制成的测试卡样本最近检测限检测结果如表4所示。

[0124] 表4样本最低检测限

	不带手臂	6 原子 直链手臂	200 原子 直链手臂	1000 原子 直链手臂
[0125] 样本 1	1.503	2.216	4.087	5.402
	1.639	2.050	4.271	6.716
	1.422	1.975	4.969	5.213
AV	1.521	2.080	4.442	5.777
SD	0.110	0.123	0.465	0.819
CV%	7.20%	5.91%	10.48%	14.17%
[0125] 样本 2	1.522	1.756	4.250	5.346
	1.434	1.650	4.764	5.217
	1.314	1.709	3.995	5.587
AV	1.423	1.705	4.336	5.384
SD	0.105	0.053	0.391	0.188
CV%	7.34%	3.09%	9.03%	3.49%
[0125] 样本 3	0.828	0.986	4.771	4.973
	0.698	1.088	4.096	5.380
	1.119	1.150	4.606	5.891
AV	0.882	1.074	4.491	5.415
SD	0.216	0.082	0.352	0.460
CV%	24.47%	7.67%	7.84%	8.49%

[0126] 试验例2

[0127] 本试验例用于说明本发明试剂盒的精密度实验。

[0128] 实施例5中,为提高测试卡的精密度,相对传统测试卡结构,故发明专利的测试卡结构增加一层结合垫。精密度实验方法是:用两个浓度水平的样本(低值10 $\mu\text{g/L}$ 和高值50 $\mu\text{g/L}$ ),各重复检测10次,分别计算两个浓度样本10次测量结果的浓度平均值 $\bar{X}$ 、标准差SD,求出变异系数CV,结果应符合精密度不大于12%的要求。具体数据如表5所示。

[0129] 计算公式(1):  $CV\% = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$  ( $\bar{X} = \frac{\sum X}{n}, SD = \sqrt{\frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$ )

[0130] 表5精密度对比结果

	测试卡增加结合垫				测试卡未加结合垫			
	低值质控血清		高值质控血清		低值质控血清		高值质控血清	
精密度	荧光 T/C	浓度 值	荧光 T/C	浓度 值	荧光 T/C	浓度值	荧光 T/C	浓度值
1	2.235	9.281	7.698	41.639	2.196	9.100	7.829	42.621
2	2.543	10.734	8.034	44.180	1.834	7.448	9.047	52.342
3	2.371	9.918	8.527	48.055	2.049	8.423	10.218	62.824
4	2.098	8.648	7.983	43.790	2.347	9.805	8.561	48.329
5	2.347	9.805	8.947	51.501	2.493	10.495	9.473	56.017
6	2.403	10.069	9.052	52.384	2.206	9.147	8.665	49.172
7	2.189	9.068	9.674	55.804	2.318	9.669	9.716	58.182
8	2.267	9.430	7.938	43.446	2.085	8.588	10.408	64.643
9	2.346	9.800	8.627	48.863	2.603	11.021	10.092	61.637
10	2.021	8.295	8.975	51.736	2.472	10.396	8.396	47.008
AV	2.282	9.505	8.546	48.140	2.260	9.409	9.241	54.278
SD	0.154	0.717	0.628	4.719	0.234	1.087	0.873	7.504
CV%	6.73%	7.54%	7.35%	9.80%	10.34%	11.55%	9.45%	13.83%

[0132] 增加一层结合垫后有利于均匀层析,故增加结合垫后的测试卡精密度符合设计要求。

#### [0133] 试验例3

[0134] 本试验例用于说明本发明试剂盒的准确性回收实验。

[0135] 用ox-LDL抗原纯品配制浓度为100g/L的ox-LDL溶液A液;用正常人血浆样本分为两份;一份作为基础样本,另外一份加入A液,制成浓度为10g/L回收样本,基础样本和回收样本分别做三孔重复测试,并取平均测值,回收小于15%,如表6所示。

[0136] 表6回收率计算

	检测值 1 (g/L)	检测值 2 (g/L)	检测值 3 (g/L)
空白	5.297	5.804	5.672
本底 +10ug/L	14.467	16.413	15.682
回收率	91.7%	106.1%	100.1%

#### [0139] 试验例4

[0140] 本试验例用于说明本发明试剂盒的线性实验。

[0141] 用校准品稀释液将最高浓度点校准品(80g/L)稀释到2.5g/L,接近最低检测限2.3g/L,形成六个浓度点样本。用测试卡测试这些样本,每个稀释浓度测试3次,分别求出测

定结果的均值 (y<sub>i</sub>)。以稀释浓度 (x<sub>i</sub>) 为自变量,以测定结果均值 (y<sub>i</sub>) 为因变量求出线性回归方程。按公式 (2) 计算线性回归的相关系数 (r),结果如表7所示。

[0142] 计算公式 (2): 
$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

[0143] 表7线性实验结果

[0144]

	检测值 1	检测值 2	检测值 3	检测均值	PT
2.5	2.668	2.248	3.081	2.666	1.066
5	5.891	5.131	5.475	5.499	1.100
15	15.959	17.224	17.117	16.767	1.118
30	31.725	28.264	25.501	28.497	0.950
60	59.307	53.046	62.088	58.147	0.969
75	70.029	77.122	81.719	76.290	1.017
线性	Y=0.9908X+0.3478		R=0.9988		

[0145] 试验例4

[0146] 本试验例用于说明本发明试剂盒的临床性能评价。

[0147] 检测80例血清,对比市售酶免试剂测值,如图3所示,相关系数为 $R^2=0.9567$ ,一致性较好。

[0148] 本试验采用聚苯乙烯-羧基PS (-COOH) 微球与抗原或抗体为共价偶联,克服了物理吸附的不稳定性,因此免疫微球保存时间久,且更稳定。对比加Eu微球标记抗体制备标记垫与不加微球抗体直接标记Eu离子后制备标记垫做37度破坏性实验,其中7天破坏性实验Eu微球标记抗体制备标记垫结果曲线线性相关性好且质控在控,结果明显好于不加微球抗体制备的标记垫。

[0149] 表8加微球与不加微球抗体加速稳定性实验结果

[0150]

单位 g/L	微球偶联抗体喷制标记垫 37度7天 单位 ( g/L)				未加微球Eu标记抗体喷制标记 垫37度7天 单位 ( g/L)			
	检测 1	检测 2	均值	PT	检测 1	检测 2	均值	PT
2.5	2.156	2.264	2.397	0.959	1.842	1.709	1.776	0.710
5	4.863	4.735	5.122	1.024	3.483	3.517	3.500	0.700
15	13.584	13.841	14.596	0.973	8.461	8.706	8.584	0.572
30	29.406	27.647	29.695	0.990	20.186	22.243	21.215	0.707
60	54.394	52.193	56.474	0.941	43.159	41.058	42.109	0.702
75	68.179	65.183	69.598	0.928	50.618	52.176	51.397	0.685
C1(7.6-11.4)	10.641	9.364	10.003	在控	5.868	7.074	6.471	出控
C2(38.4-57.6)	44.136	42.776	43.456	在控	34.382	33.055	33.719	出控
线性	Y=0.9268X+0.6846 R <sup>2</sup> =0.9994				Y=0.6967X-0.3415 R <sup>2</sup> =0.9983			

[0151] 综上所述,本发明提供的技术与传统方法相比操作简单,检测时间不超过15分钟,不需要大型仪器设备,无需专门技术人员操作,既节省了检测成本又缩短了检测时间,同时检测灵敏度高,重复性好,试剂准确。

[0152] 尽管本发明已进行了一定程度的描述,明显地,在不脱离本发明的精神和范围的条件下,可进行各个条件的适当变化。可以理解,本发明不限于所述实施方案,而归于权利要求的范围,其包括所述每个因素的等同替换。

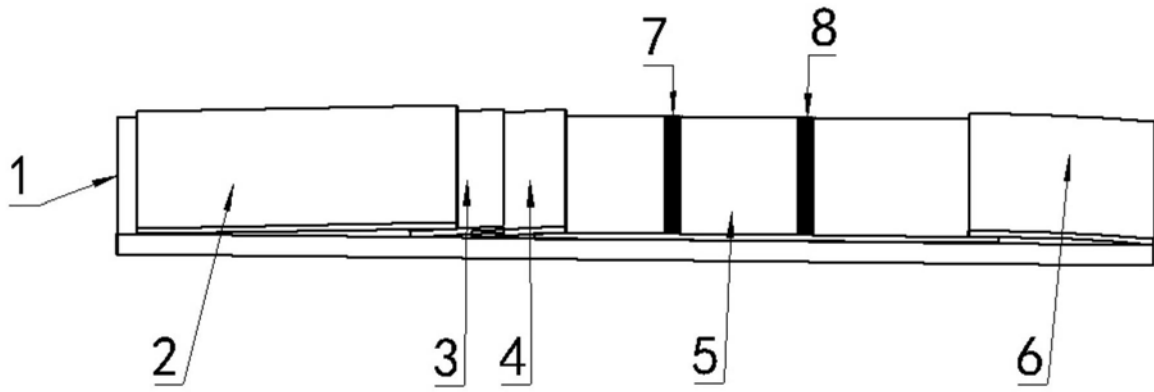


图1

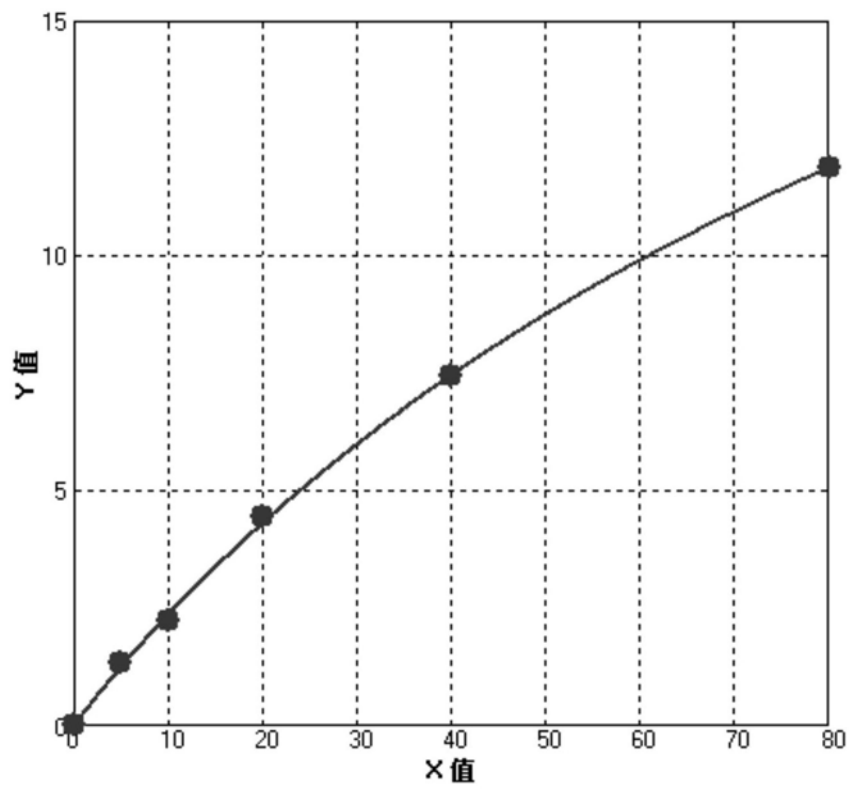


图2

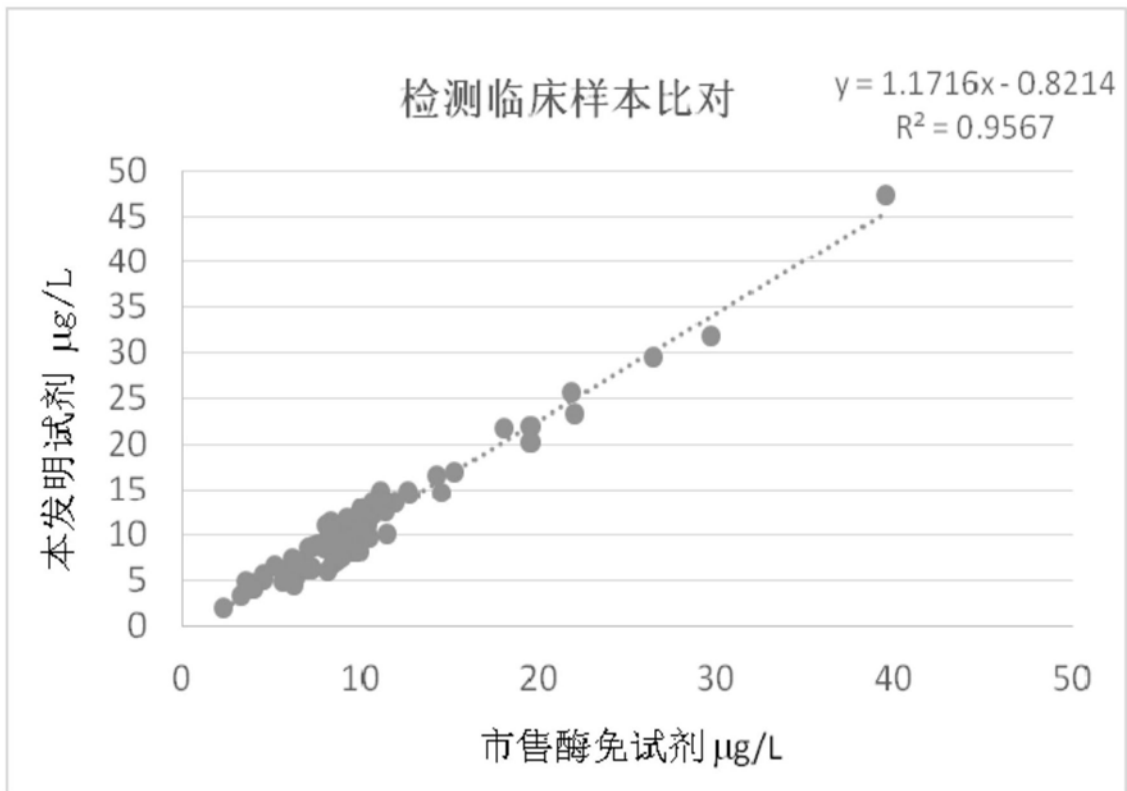


图3

专利名称(译)	定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110749731A</a>	公开(公告)日	2020-02-04
申请号	CN201910993197.6	申请日	2019-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
[标]发明人	吴建榕 刘永 黄龙耀 丁琪 王峥辉		
发明人	吴建榕 刘永 黄龙耀 丁琪 王峥辉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N33/5302 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	刘丹妮 姚望舒		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种定量检测氧化低密度脂蛋白的时间分辨免疫层析试剂盒，所述试剂盒包括样本稀释液、测试卡和复制有人氧化低密度脂蛋白标准曲线信息的ID卡，其中所述测试卡由PVC板、样品垫、标记垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成，所述标记垫上喷制有标记抗Ox-LDL抗体的Eu荧光微球。本试剂盒只需要在常温对5ul血液样本进行检测，相对传统检测具有采血量少、快速灵敏、准确度高、特异性高、稳定性好的特点。

