



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106443007 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610780933.6

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 青岛汉唐生物科技有限公司

地址 266000 山东省青岛市高新技术产业  
开发区

(72)发明人 杨帆 李平原 王德举 朱金剑  
汤红英

(74)专利代理机构 北京华仁联合知识产权代理  
有限公司 11588

代理人 彭淋

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

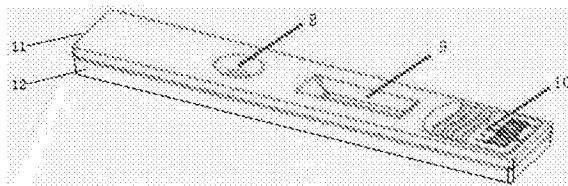
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，包括检测缓冲液、检测板和ID芯片，所述检测缓冲液为荧光染料标记或者标记生物素-亲和素法标记的SAA单克隆抗体；所述检测板包括外包装板和试纸条，外包装板包括上包装板和下包装板，试纸条放在上包装板和下包装板之间，下包装板上设有放置试纸条的卡槽，上包装板和下包装板相扣合，上包装板上设有加样区、反应区和吸水区，所述试纸条包括底板，底板上与加样区、反应区和吸水区对应位置并列设有玻璃纤维、固相抗体反应膜和吸水纸。本发明以液相反应代替固相反应，与传统的试纸条检测方法相比，液相反应具有材料混合均匀，稳定性好，反应活性高等优势，提高了检测结果的准确性。



1. 一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，其特征是，包括检测缓冲液、检测板和ID芯片，所述检测缓冲液为荧光染料标记或者标记生物素-亲和素法标记的SAA单克隆抗体；

所述ID芯片已确定好了线性，由该试剂盒配套的免疫荧光定量分析仪检测系列质控品得到；

所述检测板包括外包装板和试纸条，外包装板包括上包装板和下包装板，试纸条放在上包装板和下包装板之间，下包装板上设有放置试纸条的卡槽，上包装板和下包装板相扣合，上包装板上设有加样区、反应区和吸水区，所述试纸条包括底板，底板上与加样区、反应区和吸水区对应位置并列设有玻璃纤维、固相抗体反应膜和吸水纸。

2. 根据权利要求1所述的一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，其特征是，所述检测板和试纸条均为长条状。

3. 根据权利要求1所述的一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，其特征是，所述玻璃纤维、固相抗体反应膜和吸水纸之间紧密相连并且有部分重叠。

4. 根据权利要求1所述的一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，其特征是，所述固相抗体反应膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求4所述的一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，其特征是，硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，所述检测线包被有与检测缓冲液中标记的SAA单克隆抗体配对的SAA单克隆抗体，所述质控线包被有羊抗鼠抗体。

6. 根据权利要求5所述的一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，其特征是，所述检测线和质控线相互平行，与硝酸纤维素膜的纵轴线垂直。

7. 一种血清淀粉样蛋白A定量检测试剂盒的制备方法，其特征是，包括以下步骤：

(1) 检测缓冲液的制备：

方法一：荧光染料标记SAA单克隆抗体

制备步骤如下：

SAA单克隆抗体的制备：取SAA单克隆抗体，12000转/分离心10min后，用超纯水稀释至浓度为1-3mg/mL，加入10μL的1moI/L NaHCO<sub>3</sub>，混匀；

荧光染料的制备：取荧光染料，用无水DMSO稀释至浓度为10mmoI/L；

按照摩尔比为1:8-1:10的比例将SAA单克隆抗体和荧光染料混合，室温标记1-2h；之后将标记好的SAA单克隆抗体装入透析袋中，放入装有PBS的烧杯中，置2-8℃冰箱中搅拌15h-24h，纯化，然后加入标记物稀释液稀释至1000-1500倍；

方法二：标记生物素-亲和素法标记SAA单克隆抗体

制备步骤如下：

SAA单克隆抗体的制备：取SAA单克隆抗体，使用PBS透析1-2天；

将生物素和SAA单克隆抗体按照体积比10:1的比例混合，室温反应2h，得到生物素化的SAA单克隆抗体；

使用超纯水溶解亲和素粉末，配置成5-8mg/mI的亲和素溶液，将荧光染料和亲和素溶液以体积比8:1的比例混合，室温下反应2h，得到荧光染料标记的亲和素；

将荧光染料标记的亲和素和生物素化的SAA单克隆抗体以体积比6:1的比例混合，室温下透析48h；

(2) 检测板的制备：

将配制好的0.8-1.2mg/mL SAA单克隆抗体和1.0-1.5mg/mL羊抗鼠抗体包被于硝酸纤维素膜上，在35℃条件下干燥2h，按顺序依次将玻璃纤维、固相抗体反应膜、上端吸水纸组装在底板上，得到试纸条，将试纸条裁切，放入下包装板的卡槽内，之后将上包装板和下包装板相扣合；

(3) ID芯片的制备

将购买的SAA抗原稀释，浓度分别为3mg/L、6mg/L、10mg/L、20mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L，经标定合格后分装，然后用免疫荧光定量分析仪检测系列质控品，以T/C值和理论浓度做拟合曲线，将确定好的线性写入相应批号的ID芯片。

## 一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于医疗器械领域,具体涉及到一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 目前血清淀粉样蛋白A(SAA)的检测试剂盒不仅可以定性,也可以做到定量检测。SAA的检测方法主要有散射比浊法、胶体金法、酶联免疫法。

[0003] 散射比浊法是抗原抗体复合物微粒通过对入射光的折射和衍射形成散射光,其强度与抗原抗体复合物的量呈正相关,但由于检测成本相对较高,需配套仪器等原因,该方法尚未在临床中广泛应用。胶体金法以胶体金为标记物,利用抗原抗体反应,对抗原抗体进行定性及半定量研究的技术,因其操作快速简便、稳定性强、价格低廉等优点已在临床检验中取得广泛的应用,但是只能进行定性或半定量检测,容易漏检弱阳性样本。酶联免疫法是让抗体与酶复合物结合,然后通过显色来检测,该方法检测速度快、费用低廉、仪器简单易携、灵敏度高和选择性强等优点,可用于现场检验,但其特异性和重复性有待提高。

[0004] 目前与本发明相近的荧光定量免疫层析技术,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。中国专利申请号201610196332.0(申请日为2016.03.31)的《双检测线SAA免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法》公开了一种SAA免疫荧光层析定量检测试剂及其制备方法,采用双检测线形式检测SAA,对不同浓度的SAA利用不同的测量数据计算SAA含量,操作比较复杂,且利用荧光微球进行标记的效率比较低。中国专利申请号201510583004.1(申请日为2015.09.14)的《一种CRP/SAA定量联合检测免疫荧光层析试纸及其制备方法》公开了一种CRP/SAA定量联合检测免疫荧光层析试纸,该专利技术使用SAA单克隆抗体与样品中的SAA特异性结合,特异性较低,且荧光微球标记抗体的效率比较低。荧光定量免疫层析技术保留了胶体金免疫层析技术操作简便、检测快速、便携性强的优点,但是使用传统的试纸条进行反应,样品混合不完全,反应活性低。

### 发明内容

[0005] 为了解决现有技术的问题,本发明提供了一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒及其检测方法,试剂盒内的检测缓冲液采用荧光染料标记SAA抗体或者用标记生物素-亲和素法标记的SAA抗体,可准确高效的测定SAA含量,仅需3分钟时间即可得到测量结果。

[0006] 为了达到上述目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒,包括检测缓冲液、检测板和ID芯片,所述检测缓冲液为荧光染料标记或者标记生物素-亲和素法标记的SAA单克隆抗体;

[0008] 所述ID芯片已确定好了线性,由该试剂盒配套的免疫荧光定量分析仪检测系列质控品得到;

[0009] 所述检测板包括外包装板和试纸条,外包装板包括上包装板和下包装板,试纸条放在上包装板和下包装板之间,下包装板上设有放置试纸条的卡槽,上包装板和下包装板相扣合,上包装板上设有加样区、反应区和吸水区,所述试纸条包括底板,底板上与加样区、

反应区和吸水区对应位置并列设有玻璃纤维、固相抗体反应膜和吸水纸。

[0010] 所述检测板和试纸条均为长条状。

[0011] 所述玻璃纤维、固相抗体反应膜和吸水纸之间紧密相连并且有部分重叠。

[0012] 所述固相抗体反应膜为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，所述检测线包被有与检测缓冲液中标记的SAA单克隆抗体配对的SAA单克隆抗体，所述质控线包被有羊抗鼠抗体。

[0013] 本发明还提供了一种血清淀粉样蛋白A定量检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0014] (1) 检测缓冲液的制备：

[0015] 方法一：荧光染料标记SAA单克隆抗体

[0016] 制备步骤如下：

[0017] SAA单克隆抗体的制备：取SAA单克隆抗体，12000转/分离心10min后，用超纯水稀释至浓度为1-3mg/mL，加入10μL的1moI/L NaHCO<sub>3</sub>，混匀；

[0018] 荧光染料的制备：取荧光染料，用无水DMSO稀释至浓度为10mmoI/L；

[0019] 按照摩尔比为1:8-1:10的比例将SAA单克隆抗体和荧光染料混合，室温标记1-2h；之后将标记好的SAA单克隆抗体装入透析袋中，放入装有PBS的烧杯中，置2-8℃冰箱中搅拌15h-24h，纯化，然后加入标记物稀释液稀释至1000-1500倍；

[0020] 方法二：标记生物素-亲和素法标记SAA单克隆抗体

[0021] 制备步骤如下：

[0022] SAA单克隆抗体的制备：取SAA单克隆抗体，使用PBS透析1-2天；

[0023] 将生物素和SAA单克隆抗体按照体积比10:1的比例混合，室温反应2h，得到生物素化的SAA单克隆抗体；

[0024] 使用超纯水溶解亲和素粉末，配置成5-8mg/mI的亲和素溶液，将荧光染料和亲和素溶液以体积比8:1的比例混合，室温下反应2h，得到荧光染料标记的亲和素；

[0025] 将荧光染料标记的亲和素和生物素化的SAA单克隆抗体以体积比6:1的比例混合，室温下透析48h；

[0026] (2) 检测板的制备：

[0027] 将配制好的0.8-1.2mg/mL SAA单克隆抗体和1.0-1.5mg/mL羊抗鼠抗体包被于硝酸纤维素膜上，在35℃条件下干燥2h，按顺序依次将玻璃纤维、固相抗体反应膜、上端吸水纸组装在底板上，得到试纸条，将试纸条裁切，放入下包装板的卡槽内，之后将上包装板和下包装板相扣合。

[0028] (3) ID芯片的制备

[0029] 将购买的SAA抗原稀释，浓度分别为3mg/L、6mg/L、10mg/L、20mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L，经标定合格后分装，然后用免疫荧光定量分析仪检测系列质控品，以T/C值和理论浓度做拟合曲线，将确定好的线性写入相应批号的ID芯片。

[0030] 本发明检测试剂盒的检测原理为：样品加入到检测缓冲液中形成混合样本，检测缓冲液中荧光染料标记或标记生物素-亲和素法标记的SAA单克隆抗体和样品中的SAA抗原结合形成抗原抗体复合物，通过上包装板上的加样区滴加混合样本，混合样本在扩散的过程中，抗原抗体复合物被检测线上的SAA单克隆抗体所捕获，因此，样品中的SAA含量越多，

在检测线上抗原抗体复合物积累量越多，荧光抗体的信号强弱反映了被捕获的SAA数量的多少。

[0031] 有益效果：

[0032] (1) 本发明采用荧光染料标记SAA单克隆抗体，特异性好，抗干扰能力强，可排除因检测样品中各种各样的蛋白质的非特异性吸附而产生的干扰，使荧光标记的抗体与其配对的抗体与样品中的抗原紧密结合在一起，所形成的双抗体夹心免疫复合物稳定性好，具有灵敏度高，特异性强等优点。

[0033] (2) 本发明以液相反应代替固相反应，与传统的试纸条检测方法相比，液相反应具有材料混合均匀，稳定性好，反应活性高等优势，提高了检测结果的准确性。

[0034] (3) 本发明采用标记生物素-亲和素法标记SAA单克隆抗体，本方法具有多级放大作用，可极大的提高检测结果的灵敏度和标记效果，同时降低了成本。

## 附图说明

[0035] 图1是本发明试纸条结构示意图；

[0036] 图2是本发明检测板结构示意图；

[0037] 图3是本发明下包装板结构示意图。

[0038] 其中，1玻璃纤维，2固相抗体反应膜，3吸水纸，4底板，5检测线，6质控线，7试纸条，8加样区，9反应区，10吸水区，11上包装板，12下包装板，13卡槽。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合附图和实施例进一步说明本发明。

[0040] 实施例1

[0041] 一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，包括检测缓冲液、检测板和ID芯片，所述检测缓冲液为荧光染料标记或者标记生物素-亲和素法标记的SAA单克隆抗体；

[0042] 所述检测板包括外包装板和试纸条7，外包装板包括上包装板11和下包装板12，试纸条放在上包装板11和下包装板12之间，下包装板12上设有放置试纸条的卡槽13，上包装板11和下包装板12相扣合，上包装板11上设有加样区8、反应区9和吸水区10，所述试纸条包括底板4，底板4上与加样区8、反应区9和吸水区10对应位置并列设有玻璃纤维1、固相抗体反应膜2和吸水纸3，所述ID芯片已经确定好线性，由该试剂盒配套的免疫荧光定量分析仪检测系列质控品得到。

[0043] 所述检测板和试纸条7均为长条状。

[0044] 所述玻璃纤维1、固相抗体反应膜2和吸水纸3之间紧密相连并且有部分重叠。

[0045] 所述固相抗体反应膜2为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上包被有检测线5和质控线6，所述检测线5包被有与检测缓冲液中标记的SAA单克隆抗体配对的SAA单克隆抗体，所述质控线6包被有羊抗鼠抗体。

[0046] 所述底板4为低荧光特性，承载膜结构，根据试纸条7的形状对应裁剪而成，本实施例为长条状。本实施例中玻璃纤维1为待检样品收集区，其前端搭接粘贴于底板4前端上，后端搭接覆盖在硝酸纤维素膜上。

[0047] 硝酸纤维素膜是一种低荧光特性膜，该膜上划设有两条相互平行的检测线5和质

控线6,检测线5和质控线6与硝酸纤维素膜的纵轴线垂直,相互间隔一定距离。吸水纸3的前端覆盖在硝酸纤维素膜上。

[0048] 本发明检测板是将试纸条7放置在下包装板12的卡槽13内,然后将上包装板11和下包装板12相扣合,包装后,外包装板上的加样区8对应于试纸条7的玻璃纤维1,反应区9对应于试纸条7的硝酸纤维素膜,吸水区10对应于试纸条7的吸水纸3。

[0049] 实施例2

[0050] 一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0051] (1) 检测缓冲液的制备:

[0052] SAA单克隆抗体的制备:取SAA单克隆抗体,12000转/分离心10min后,用超纯水稀释至浓度为2mg/mL,加入10μL的1moI/L NaHCO<sub>3</sub>,混匀;

[0053] 荧光染料的制备:取荧光染料,用无水DMSO稀释至浓度为10mmoI/L;

[0054] 按照摩尔比为1:9的比例将SAA单克隆抗体和荧光染料混合,室温标记1h;之后将标记好的SAA单克隆抗体装入透析袋中,放入装有PBS的烧杯中,置2-8℃冰箱中搅拌20h,纯化,然后加入标记物稀释液稀释至1000倍;

[0055] (2) 检测板的制备:

[0056] 将配制好的1.0mg/mL SAA单克隆抗体和1.5mg/mL羊抗鼠抗体包被于硝酸纤维素膜上,在35℃条件下干燥2h,按顺序依次将玻璃纤维1、固相抗体反应膜2、上端吸水纸3组装在底板4上,得到试纸条7,将试纸条7裁切,放入位于下包装板12的卡槽13内,之后将上包装板11和下包装板12相扣合。

[0057] (3) ID芯片的制备

[0058] 将购买的SAA抗原稀释,浓度分别为3mg/L、6mg/L、10mg/L、20mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L,经标定合格后分装,然后用免疫荧光定量分析仪检测系列质控品,以T/C值和理论浓度做拟合曲线,将确定好的线性写入相应批号的ID芯片。

[0059] 使用过程中将ID芯片插入到仪器中,用移液器吸取血清或血浆加入到检测缓冲液中并充分混匀。吸取混合样本液加入到检测板的加样区8孔内,室温放置3分钟。将检测板插入到免疫荧光分析仪的样本槽中,按“检测”键,从免疫荧光分析仪的显示屏幕上可读取数据。

[0060] 本发明检测试剂盒的检测原理为:样品加入到检测缓冲液中形成混合样本,检测缓冲液中荧光染料标记的SAA单克隆抗体和样品中的SAA抗原结合形成抗原抗体复合物,通过上包装板11上的加样区8滴加混合样本,混合样本在扩散的过程中,抗原抗体复合物被检测线5上的SAA单克隆抗体所捕获,因此,样品中的SAA含量越多,在检测线5上抗原抗体复合物积累量越多,荧光抗体的信号强弱反映了被捕获的SAA数量的多少。

[0061] 本实施例采用荧光染料标记SAA单克隆抗体,特异性好,抗干扰能力强,可排除因检测样品中各种各样的蛋白质的非特异性吸附而产生的干扰,使荧光标记的抗体与其配对的抗体与样品中的抗原紧密结合在一起,所形成的双抗体夹心免疫复合物稳定性好,具有灵敏度高,特异性强等优点。并且检测缓冲液中以新型荧光染料替代传统的胶体金、量子点和荧光颗粒,进一步提高了检测的灵敏度和准确性。

[0062] 实施例3

[0063] 一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

- [0064] (1) 检测缓冲液的制备：
- [0065] 标记生物素-亲和素法标记SAA单克隆抗体
- [0066] 制备步骤如下：
- [0067] SAA单克隆抗体的制备：取SAA单克隆抗体，使用PBS透析1天；
- [0068] 将生物素和SAA单克隆抗体按照体积比10:1的比例混合，室温反应2h，得到生物素化的SAA单克隆抗体；
- [0069] 使用超纯水溶解亲和素粉末，配置成6mg/ml的亲和素溶液，将荧光染料和亲和素以体积比8:1的比例混合，室温下反应2h，得到荧光染料标记的亲和素；
- [0070] 将荧光染料标记的亲和素和生物素化的SAA单克隆抗体以体积比6:1的比例混合，室温下透析48h；
- [0071] (2) 检测板的制备：
- [0072] 将配制好的1.0mg/ml SAA单克隆抗体和1.5mg/ml羊抗鼠抗体包被于硝酸纤维素膜上，在35℃条件下干燥2h，按顺序依次将玻璃纤维1、固相抗体反应膜2、上端吸水纸3组装在底板4上，得到试纸条7，将试纸条7裁切，放入位于下包装板12的卡槽13内，之后将上包装板11和下包装板12相扣合。
- [0073] (3) ID芯片的制备
- [0074] 将购买的SAA抗原稀释，浓度分别为3mg/L、6mg/L、10mg/L、20mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L，经标定合格后分装，然后用免疫荧光定量分析仪检测系列质控品，以T/C值和理论浓度做拟合曲线，将确定好的线性写入相应批号的ID芯片。
- [0075] 使用过程中将ID芯片插入到仪器中，用移液器吸取血清或血浆加入到检测缓冲液中并充分混匀。吸取混合样本液加入到检测板的加样区8孔内，室温放置3分钟。将检测板插入到免疫荧光分析仪的样本槽中，按“检测”键，从免疫荧光分析仪的显示屏幕上可读取数据。
- [0076] 本发明检测试剂盒的检测原理为：样品加入到检测缓冲液中形成混合样本，检测缓冲液中标记生物素-亲和素法标记SAA单克隆抗体和样品中的SAA抗原结合形成抗原抗体复合物，通过上包装板上的加样区滴加混合样本，混合样本在扩散的过程中，抗原抗体复合物被检测线上的SAA单克隆抗体所捕获，因此，样品中的SAA含量越多，在检测线上抗原抗体复合物积累量越多，荧光抗体的信号强弱反映了被捕获的SAA数量的多少。
- [0077] 本发明采用标记生物素-亲和素法标记SAA单克隆抗体，本方法具有多级放大作用，可极大的提高检测结果的灵敏度和标记效果，同时降低了成本。
- [0078] 上述虽然结合实施例对本发明的具体实施方式进行了描述，但并非对本发明保护范围的限制，所属领域技术人员应该明白，在本发明的技术方案的基础上，本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

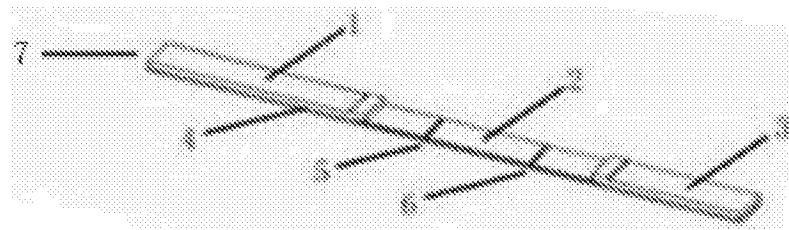


图1

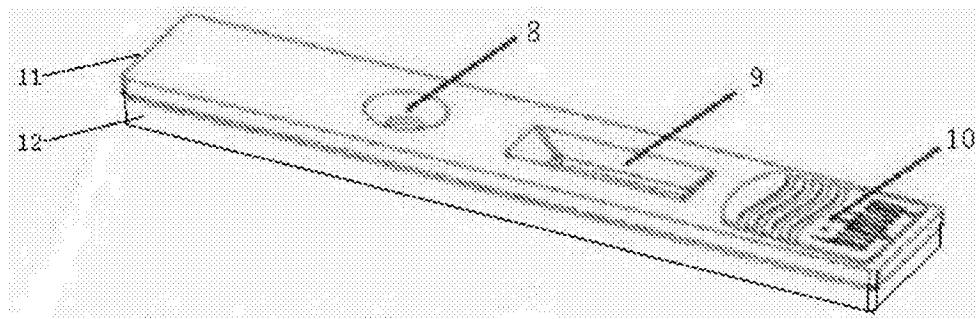


图2

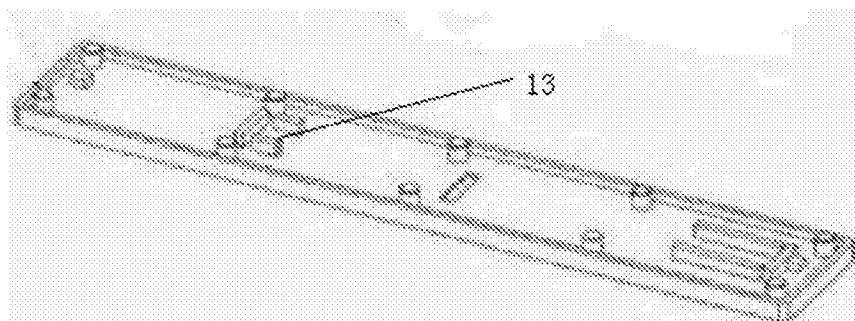


图3

专利名称(译)	一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106443007A</a>	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201610780933.6	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	青岛汉唐生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	青岛汉唐生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	青岛汉唐生物科技有限公司		
[标]发明人	杨帆 李平原 王德举 朱金剑 汤红英		
发明人	杨帆 李平原 王德举 朱金剑 汤红英		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明提供了一种血清淀粉样蛋白A的定量检测试剂盒，包括检测缓冲液、检测板和ID芯片，所述检测缓冲液为荧光染料标记或者标记生物素-亲和素法标记的SAA单克隆抗体；所述检测板包括外包装板和试纸条，外包装板包括上包装板和下包装板，试纸条放在上包装板和下包装板之间，下包装板上设有放置试纸条的卡槽，上包装板和下包装板相扣合，上包装板上设有加样区、反应区和吸水区，所述试纸条包括底板，底板上与加样区、反应区和吸水区对应位置并列设有玻璃纤维、固相抗体反应膜和吸水纸。本发明以液相反应代替固相反应，与传统的试纸条检测方法相比，液相反应具有材料混合均匀，稳定性好，反应活性高等优势，提高了检测结果的准确性。

