



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108469518 B

(45) 授权公告日 2021.08.31

(21) 申请号 201810231945.2

审查员 周洋

(22) 申请日 2018.03.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108469518 A

(43) 申请公布日 2018.08.31

(73) 专利权人 迈克生物股份有限公司

地址 611731 四川省成都市高新区百川路
16号

(72) 发明人 赵书阁 刘东泽

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

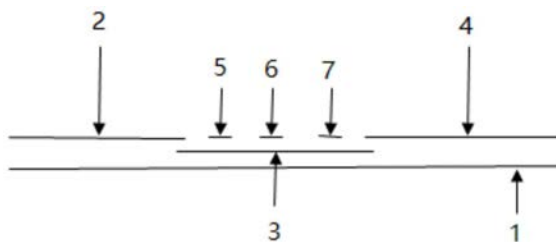
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称

一种胰抑素C荧光免疫层析检测用试纸条及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种胰抑素C荧光免疫层析检测用试纸条及其应用,本发明的试纸条是在硝酸纤维素膜上沿着层析方向依次设置辅助线、检测线和质控线;所述辅助线包被抗胰抑素C单克隆抗体2,所述检测线包被抗胰抑素C单克隆抗体1,所述质控线包被质控物。将本发明的试纸条与含有荧光标记的抗胰抑素C单克隆抗体2的反应液联合使用以检测样品中胰抑素C的浓度,检测的线性范围宽,可达0.20mg/L~10.0mg/L,可检测血清、血浆、全血样本,操作简单,易于推广,具有良好的市场应用前景。



1. 一种朊抑素C荧光免疫层析检测用试纸条在制备用于检测样品中朊抑素C的试剂盒中的应用,其特征在于,所述试纸条是在硝酸纤维素膜上沿着层析方向依次设置辅助线、检测线和质控线;所述辅助线包被抗朊抑素C单克隆抗体2,所述检测线包被抗朊抑素C单克隆抗体1,所述质控线包被质控物,所述质控物为抗兔IgG、抗羊IgG、抗马IgG、生物素、亲和素、结合有生物素或亲和素的蛋白;

所述抗朊抑素C单克隆抗体1与所述抗朊抑素C单克隆抗体2的抗原表位不同;

所述辅助线包被抗体的浓度为0.5-5.0mg/ml;所述检测线包被抗体的浓度为1.0-5.0mg/ml;

所述试纸条在进行所述样品检测时配合反应液使用,所述反应液含有荧光标记的抗朊抑素C单克隆抗体2和能够与质控物特异结合的荧光标记的兔IgG、抗兔IgG、亲和素、生物素、或结合有生物素或亲和素的蛋白;

将待测样品先加入到反应液中,反应液中荧光标记的抗朊抑素C单克隆抗体2与样品中的抗原结合形成抗原抗体复合物,得到混合样品,将所述混合样品滴加到试纸条上,在层析作用下沿着硝酸纤维素膜向前扩散,游离抗原与辅助线反应,抗原抗体复合物被固定在检测线上的抗朊抑素C单克隆抗体1所捕获;

所述样品为血清、血浆或全血样本。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述辅助线和所述检测线间距为3~7mm;检测线和质控线划线间距为3mm~7mm。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述辅助线包被抗体的浓度为1.0-3.0mg/ml。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述辅助线包被抗体的浓度均为2.0mg/ml。

5. 根据权利要求1-4任一所述的应用,其特征在于,所述质控线包被质控物的浓度为0.5-5.0mg/ml。

6. 根据权利要求1-4任一所述的应用,其特征在于,所述检测线包被抗体的浓度为2.0mg/ml,所述质控线包被质控物的浓度为1.0mg/ml。

一种胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体地说,涉及一种胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 胱抑素C(Cys-C),是一种反映肾小球滤过率变化的内源性标志物,并在近曲小管重吸收,但重吸收后被完全代谢分解,不返回血液,因此,其血中浓度同肾小球滤过决定,而不依赖任何外来因素,如性别、年龄、饮食的影响,是一种反映肾小球滤过率变化的理想同源性标志物。

[0003] 目前已知的测定胱抑素C的方法有放射免疫测定法、荧光免疫测定法、时间分辨荧光免疫测定法、酶联免疫测定法。这些方法具有操作繁琐、耗时长、过度浪费资源的缺点,且对操作者有一定的专业技能要求,不适于常规检验,而且均不能够测定全血样本,仅能够测定血清和血浆样品,对检测样品有特殊的要求,在使用便捷性方面收到一定程度的制约,并且现有技术的测定胱抑素C的方法或试剂盒中,检测的线性范围较窄,在检测结果的准确性、高效性、便捷性方面均有待进一步提高以满足临床检测的需求。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种使用方便、快捷,检测线性范围宽且可检测全血样品的检测胱抑素C的试剂盒。

[0005] 本发明首先提高一种胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条,所述试纸条是在硝酸纤维素膜上沿着层析方向依次设置辅助线、检测线和质控线;所述辅助线包被抗胱抑素C单克隆抗体2,所述检测线包被抗胱抑素C单克隆抗体1,所述质控线包被有质控物,所述质控物为抗兔IgG、抗羊IgG、抗马IgG、生物素、亲和素、结合有生物素或亲和素的蛋白。优选地,所述质控物为抗兔IgG。

[0006] 所述抗胱抑素C单克隆抗体1与所述抗胱抑素C单克隆抗体2的抗原表位不同。

[0007] 进一步地,本发明试纸条中,所述辅助线和所述检测线间距为3~7mm;检测线和质控线划线间距为3mm~7mm。优选地,所述辅助线和所述检测线间距为5mm;检测线和质控线划线间距为5mm。

[0008] 所述辅助线包被抗胱抑素C单克隆抗体2的浓度为0.5-5.0mg/ml。

[0009] 优选地,所述辅助线包被抗胱抑素C单克隆抗体2的浓度为1.0-3.0mg/ml。

[0010] 更优选地,所述辅助线包被抗胱抑素C单克隆抗体2的浓度均为2.0mg/ml。

[0011] 另一方面,本发明的试纸条上,所述检测线包被抗胱抑素C单克隆抗体1的浓度为0.5-5.0mg/ml,所述质控包被物的浓度为0.5-5.0mg/ml。

[0012] 优选地,所述检测线包被抗胱抑素C单克隆抗体1的浓度为2.0mg/ml,所述质控包被物的浓度为1.0mg/ml。

[0013] 本发明提供了上述胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条在检测样品中胱抑素C的

应用,所述样品为血清、血浆或全血样本。

[0014] 本发明提供了上述胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条在制备检测胱抑素C试剂盒中的应用。

[0015] 进一步,本发明提供了上述胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条在检测胱抑素C中的应用。

[0016] 本发明还提供了一种用于检测胱抑素C的试剂盒,该试剂盒含有本发明所述胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条。

[0017] 更进一步地,本发明的检测胱抑素C的试剂盒还包括反应液,所述反应液含有荧光标记的抗胱抑素C单克隆抗体2和能够与质控物特异结合的荧光标记的兔IgG、抗兔IgG、亲和素、生物素、或结合有生物素或亲和素的蛋白。

[0018] 在本发明的实施例中,所用反应液的配方为:0.002-0.020D₆₀₀荧光标记的兔IgG、0.01-0.050D₆₀₀荧光标记的抗胱抑素C单克隆抗体2和0.005~0.5mg/mL的抗红细胞抗体,优选地包含0.003-0.010D₆₀₀荧光标记的兔IgG、0.015-0.030D₆₀₀荧光标记的抗胱抑素C单克隆抗体2和0.01~0.1mg/mL的抗红细胞抗体。

[0019] 本发明中,通过在反应液中添加0.005~0.5mg/mL的抗红细胞抗体,能够和全血样本中的红细胞反应,规避了红细胞对检测结果的影响,成功地实现了全血样本的检测。

[0020] 使用本发明的试剂盒检测样本时,将待测样品先加入到反应液中,反应液中荧光标记的胱抑素C单克隆抗体2与样本中的抗原结合形成抗原抗体复合物,将混合样本滴加到检测卡加样孔中,在层析作用下沿着硝酸纤维素膜向前扩散,游离抗原与辅助线反应,复合物被固定在检测线上的抗胱抑素C单克隆抗体1所捕获,层析膜上质控区包被有抗兔IgG,可以直接和反应液中荧光标记的兔IgG结合,在检测高浓度抗原时辅助线优先反应结合过量的抗原,使参与检测线反应的抗原量减少,可以使检测线与荧光标记胱抑素C单克隆抗体2-抗原复合物的实际反应效率降低,测定高浓度抗原浓度梯度时所对应的信号值梯度更大,线性范围更宽。反应后可使用荧光分析仪进行检测,采集检测线(T线)和质控线(C线)的信号值,计算T/C的数值作为最终的试剂发光值。

[0021] 本发明提供的荧光免疫层析检测用试纸条能够检测人血浆、血清和全血中胱抑素C的浓度。比对在售试剂为迈克生物胱抑素C测定试剂盒(胶乳免疫比浊法),线性范围是0.13mg/L~7.8mg/L,测定样本类型是血清、血浆,本发明试剂与在售试剂方法学存在差异,但本发明通过体系优化,设置辅助线的方式,其线性范围能够达到甚至超越与目前市场在售试剂相当的线性范围,其线性范围达到为0.20mg/L~10.0mg/L,线性相关系数由未使用本发明时的 $R^2=0.9104$ 提高到 $R^2=0.9527$,且除了血清、血浆之外,还可以测定全血样本。极大地降低了检测成本,提高了检测准确度,达到快速、准确检测的目的,取得了很好的检测效果,在检测胱抑素C领域具有良好的市场应用前景。

附图说明

[0022] 图1为本发明胱抑素C荧光免疫层析检测用试纸条的结构示意图。其中1为试纸条底板,2为样品垫,3为包被膜,4为吸水纸,5为辅助线,6为检测线,7为质控线。

[0023] 图2A-图2E为辅助线不同包被浓度时的线性拟合图。

[0024] 图3A-图3B为有、无辅助线时的线性拟合图。

[0025] 图4A-图4E为检测线不同浓度时的线性拟合图。

具体实施方式

[0026] 通过下面给出的本发明的具体实施例和实验例可以进一步清楚地理解本发明,但不是对本发明的限定。

[0027] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。本发明实施例所用生化试剂均为市售。

[0028] 实施例1

[0029] 本发明设计的用于检测胱抑素C的免疫层析试纸条结构示意图见图1,在硝酸纤维素膜上沿着层析方向依次设置辅助线、检测线和质控线;辅助线包被抗胱抑素C单克隆抗体2,检测线包被抗胱抑素C单克隆抗体1,质控线包被物为抗兔IgG。

[0030] 本试纸条是指免疫层析技术中常用的层析系统方式,可以是试纸条、试纸卡等常用形式。包含底板、样品垫、包被膜、吸水垫,通过端部互相连接,保证样品连续地依次通过每个部件。

[0031] 底板可以是免疫层析技术中常用的各种惰性底板,优选聚氯乙烯PVC底板。

[0032] 样品垫是将样品从添加点均匀而一致地转移到检测试剂的载体。可以是玻璃纤维素膜、聚酯膜、尼龙膜等,优选玻璃纤维素膜。

[0033] 吸水垫可以是免疫层析技术中常用的吸水材料,可选自吸水滤纸。

[0034] 膜本体可以是免疫层析技术中常用的固相膜,例如硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、尼龙膜等等,优选硝酸纤维素膜。

[0035] 检测时样本先加入到反应液中,反应液含有0.0050D₆₀₀荧光标记的兔IgG、0.020D₆₀₀荧光标记的抗胱抑素C单克隆抗体2和0.01mg/mL的抗红细胞抗体。反应液中荧光标记的胱抑素C单克隆抗体2与样本中的抗原结合形成抗原抗体复合物,将混合样本滴加到检测卡加样孔中,在层析作用下沿着硝酸纤维素膜向前扩散,游离抗原与辅助线反应,复合物被固定在检测线上的抗胱抑素C单克隆抗体1所捕获,层析膜上质控区包被有抗兔IgG,可以直接和反应液中荧光标记的兔IgG结合,在检测高浓度抗原时辅助线优先反应结合过量的抗原,使参与检测线反应的抗原量减少,可以使检测线与荧光标记胱抑素C单克隆抗体2-抗原复合物的实际反应效率降低,测定高浓度抗原浓度梯度时所对应的信号值梯度更大,线性范围更宽。反应后可使用荧光分析仪进行检测,采集检测线(T线)和质控线(C线)的信号值,计算T/C的数值作为最终的试剂发光值。

[0036] 固定设置检测线划线位置,从样品垫至NC膜下边缘一端测量,检测线划线位置分别为12mm±1mm。同时需考虑每条线之间的间距不能影响信号值检测,显色峰之间不可交叉,设置辅助线和检测线间距为3mm~7mm,检测线和质控线划线间距为3mm~7mm,质控线作为单独的质控作用,对线性范围不会产生影响,可选择包被浓度范围为0.5~5.0mg/ml,结合试剂性能并从成本上考虑,优选包被浓度为1.0mg/ml。通过每个条件下线性相关系数R²的大小,比较线性范围,R²越趋近于1,表示拟合曲线更趋近于直线,说明浓度及发光值两个变量的相关性更好,相应的线性范围则更宽。具体设置见表1和表2。

[0037] 表1

	名称	包被浓度 mg/mL	优选包被浓度 mg/mL
[0038]	辅助线	0.5-5.0	2.0
	检测线	1.0-5.0	2.0
	质控线	0.5-5.0	1.0
[0039] 表2			
	名称	划膜间距 mm	优选间距 mm
[0040]	辅助线与检测线之间	3-7	5
	检测线与质控线之间	3-7	5

[0041] 替代方案:抗兔IgG可被抗羊、抗马IgG、生物素、亲和素以及结合有生物素或亲和素的蛋白替代。

[0042] 设置辅助线包被抗体浓度从0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、5.0mg/ml,比较辅助线不同浓度时对线性范围的影响,随着辅助线浓度升高,检测信号值逐渐降低,高端信号梯度逐渐增大,通过以下测定数据进行线性拟合。在辅助线浓度为0.1mg/ml,线性范围和无辅助线时基本无差异,相关系数 R^2 仅0.9077,此条件下辅助线对线性范围无改善作用,当辅助线包被浓度在0.5mg/ml~5.0mg/ml时 R^2 逐渐增大,此时辅助线起到了改善线性范围的作用,但浓度大于2.0mg/ml之后, R^2 不再增加,说明包被浓度已得到上限,可作为最优辅助线浓度。辅助线不同包被浓度线性拟合图见图2A-图2E。

[0043] 实施例2有、无辅助线时线性范围的差异比较

[0044] 检测线划线位置12mm,辅助线和检测线间距为4mm,比较有无辅助线时线性范围的差异,通过测定数据进行线性拟合,比较线性拟合 R^2 的大小,有辅助线时,线性相关系数 $R^2=0.9527$,大于无辅助线时 $R^2=0.9104$ 。图3A、图3B为使用和未使用本发明试纸条线性范围比较。两种试纸条除辅助线有无存在差异外,其他结构设置一律相同,参数选择实施例1的优选参数。

[0045] 实施例3辅助线和检测线划线间距确定

[0046] 设置辅助线和检测线间距为3~7mm,检测线和辅助线包被浓度均为2.0mg/ml,检测线划线位置控制在 12 ± 1 mm。随间距增加,辅助线显色减弱,检测线显色增强,但对线性相关系数无显著影响,间距控制在此范围内均可到达效果,但从操作难易度上考虑,优选间距为5mm。

[0047] 实施例4

[0048] 设置检测线包被抗体浓度从0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、5.0mg/ml,比较检测线不同浓度时对线性范围的影响,随着检测线浓度升高,检测信号值逐渐升高,高端信号梯度逐渐增大,通过测定数据进行线性拟合。在检测线浓度为0.5mg/ml时,测定信号值较低,线性相关系数 R^2 为0.7981,提高包被浓度在1.0mg/ml~5.0mg/ml时 R^2 逐渐增大,但浓度大于2.0mg/ml之后, R^2 不再增加,说明包被浓度已得到上限,可作为最优检测线包被浓度。结果见表3,图4A-图4E。

[0049] 表3

胱抑素 C 浓度 (mg/L)	不同检测线包被浓度测定信号值				
	包被浓度	包被浓度	包被浓度	包被浓度	包被浓度
	0.5mg/ml	1.0mg/ml	1.5mg/ml	2.0mg/ml	5.0mg/ml
0	54	61	63	63	72
0.2	69	172	223	301	322
0.5	198	495	632	815	821
1	325	812	1099	1398	1412
2	521	1501	1974	2487	2568
5	756	3018	4115	5278	5317
10	832	3978	5556	7382	7401

[0051] 实施例5

[0052] 使用本发明试纸条检测EDTA-Na₂抗凝的全血样本25例,各取一半体积离心后取得相应的血浆,以及同源性的血清样本,同时检测,分别计算全血和血清及全血和血浆结果的偏差,偏差均在±20%以内,检测结果无显著差异,一致性较好,说明本发明试纸能够用于血清、血浆、全血检测。

[0053] 表4

样本编号	全血(mg/L)	血清(mg/L)	血浆(mg/L)	全血/血清偏差	全血/血浆偏差
1	1.06	1.13	1.19	-6%	-11%
2	1.69	1.52	1.77	11%	-5%
3	1.62	1.69	1.49	-4%	9%
4	1.5	1.31	1.38	15%	9%
5	1.05	1.11	1.17	-5%	-10%
6	1.13	1.08	1.05	5%	8%
7	1.08	1.09	0.99	-1%	9%
8	1.21	1.22	1.09	-1%	11%
9	1.09	1.16	1.07	-6%	2%
10	1.41	1.51	1.36	-7%	4%
11	1.07	1.12	1.12	-4%	-4%
[0054] 12	1.29	1.5	1.3	-14%	-1%
13	1.33	1.32	1.22	1%	9%
14	3.27	3.06	3.14	7%	4%
15	1.24	1.36	1.3	-9%	-5%
16	1.84	1.75	1.57	5%	17%
17	1.49	1.59	1.4	-6%	6%
18	1.67	1.59	1.46	5%	14%
19	1.14	1.05	1.1	9%	4%
20	1.03	1.12	1.07	-8%	-4%
21	5.24	4.68	4.95	12%	6%
22	0.93	0.96	0.94	-3%	-1%
23	1.08	1.05	0.93	3%	16%
24	1.14	1.1	1.03	4%	11%
25	1.98	1.84	1.99	8%	-1%

[0055] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

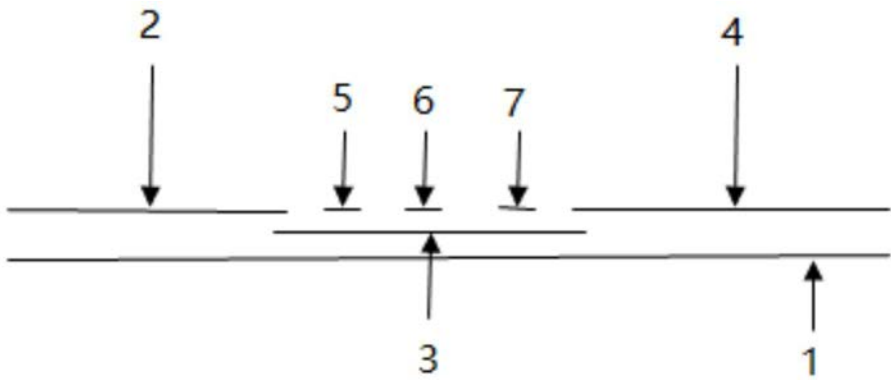


图1

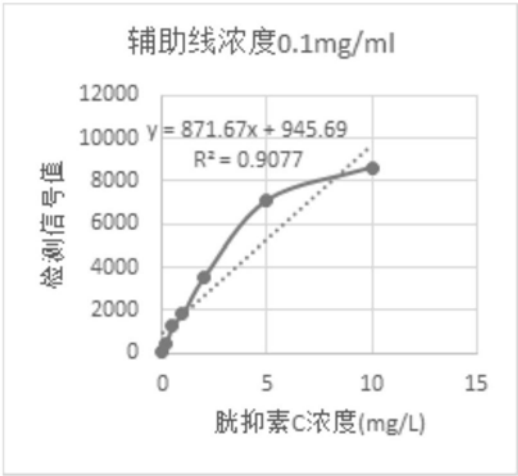


图2A

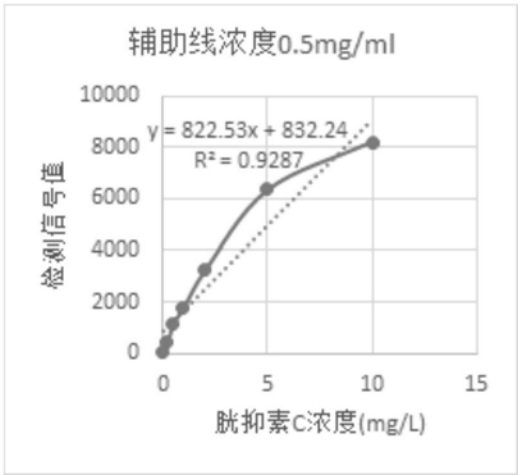


图2B

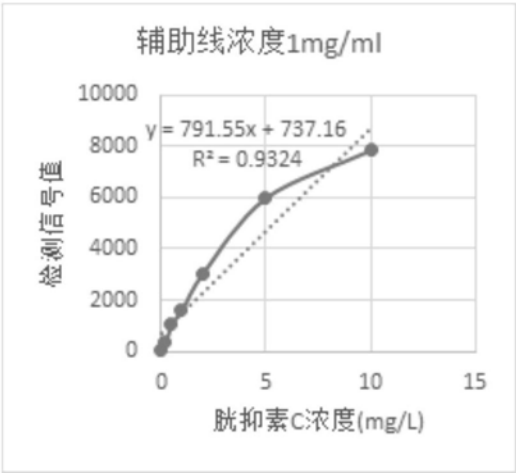


图2C

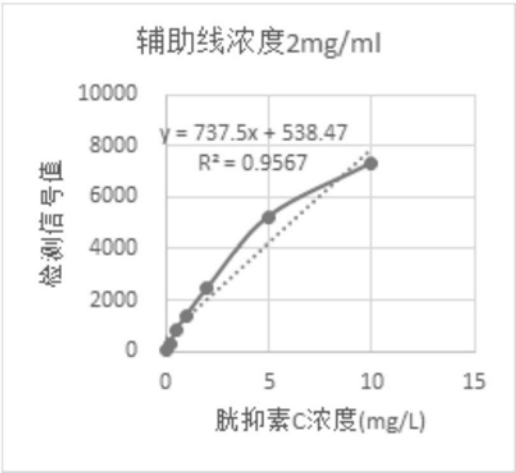


图2D

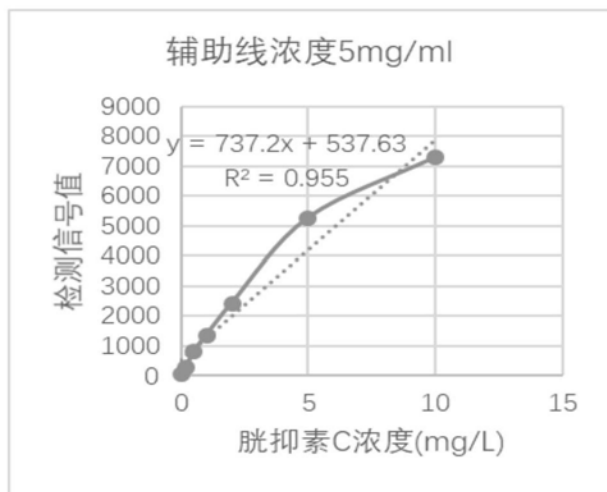


图2E

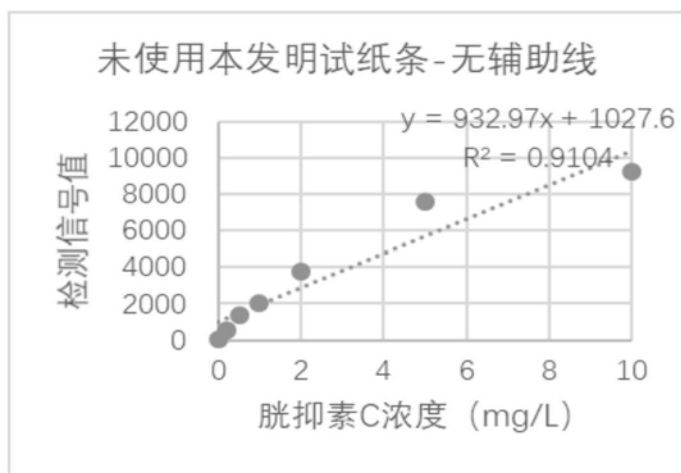


图3A

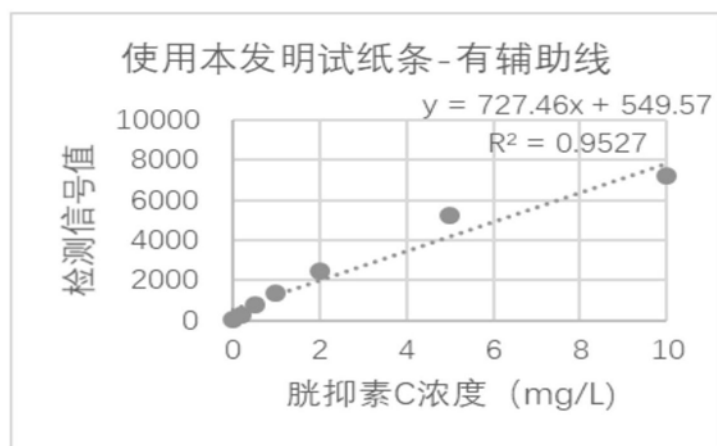


图3B

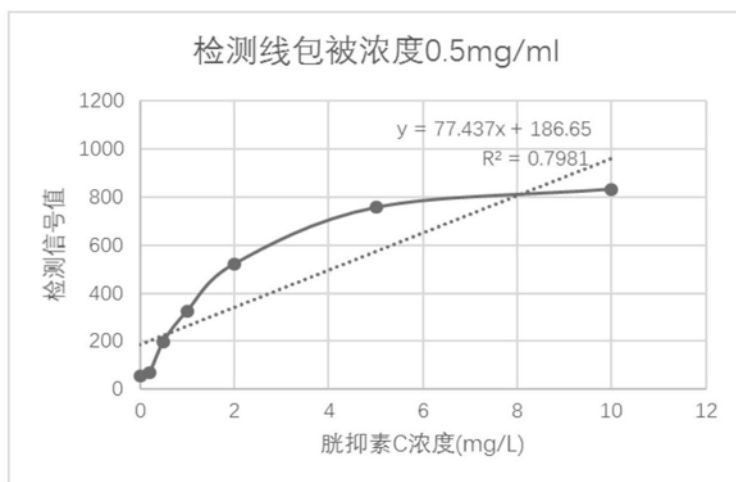


图4A

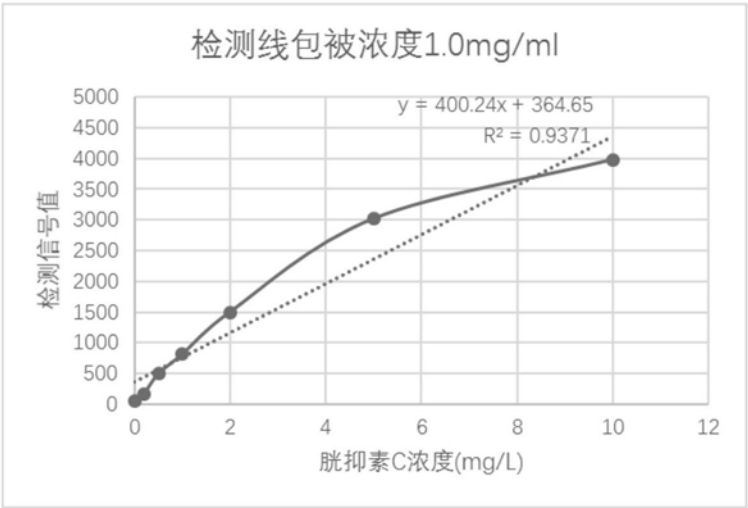


图4B

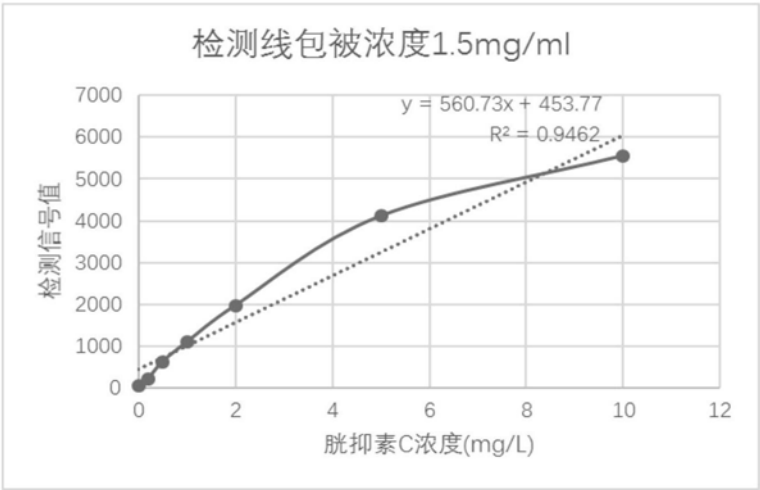


图4C

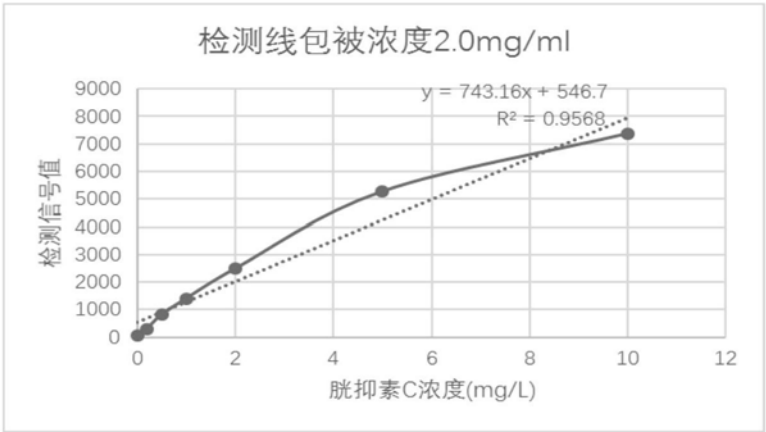


图4D

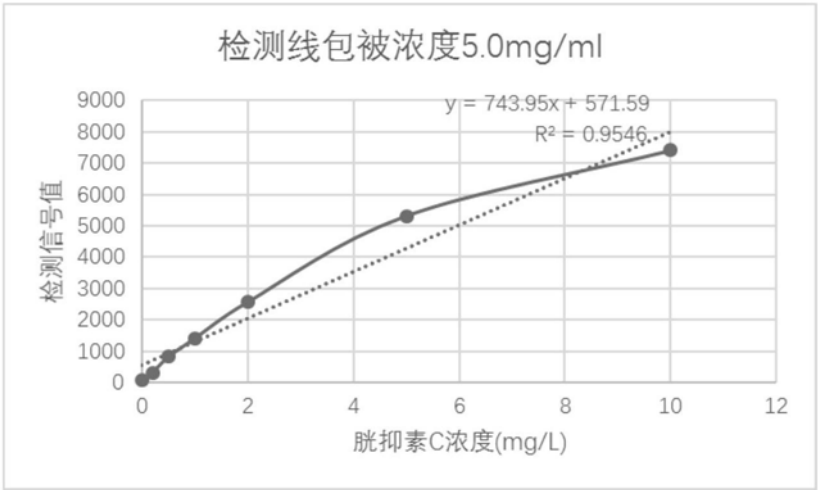


图4E