



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918866 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810644711.0

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.06.21

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心有限公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业
开发区科学大道53号4号楼7层84号

(72)发明人 王云龙 贺沁 李玉林 王继创
程蕾

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

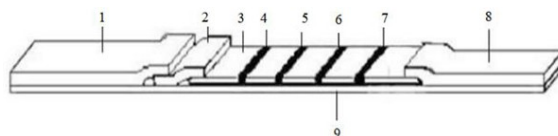
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装

(57)摘要

本发明公开了一种炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,包括检测卡、比色卡、样品收集装置、检测装置,检测卡由试纸条和长方形卡壳组成;试纸条由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,结合垫上固定有CRP和SAA抗体-荧光微球复合物;检测区内的硝酸纤维素膜上包被抗SAA单克隆抗体、抗CRP单克隆抗体,形成T1、T2、T3、T4检测线。本发明提供了一种便携式、体积小、操作简单、使用方便的早期及鉴别诊断的炎症标志物POCT联合检测SAA、CRP试剂盒套装。



1. 一种炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,包括检测卡、比色卡、样品收集装置、检测装置,所述检测卡由试纸条和长方形卡壳组成;所述试纸条由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,所述检测区内的硝酸纤维素膜上包被两种浓度的抗SAA单克隆抗体、两种浓度的抗CRP单克隆抗体,依次作为T1、T2、T3、T4检测线。

2. 根据权利要求1所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,所述抗SAA单克隆抗体和抗CRP单克隆抗体的两种浓度均为:0.5mg/ml和2mg/ml;所述复溶液的组成为0.05M PH 8.0 Tris-HCl、0.1%PVP K30、0.5%BSA、3%海藻糖、1%Triton X-100、0.05%NaN₃;所述封闭液为20%BSA。

3. 根据权利要求1所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,所述检测卡的制备方法,包括以下步骤:

(1) 制备CRP和SAA抗体-荧光微球复合物;

(2) 硝酸纤维素膜上包被单克隆抗体:将硝酸纤维素膜粘贴在底板的中间位置,并依次包被不同浓度的抗SAA单克隆抗体和抗CRP单克隆抗体,形成两条SAA检测线,即T1和T2,两条CRP检测线,即T3和T4,烘干;

(3) 结合垫的制备:将玻璃纤维构件浸泡于处理液后,烘干,将步骤(1)制备的CRP和SAA抗体-荧光微球复合物均匀喷涂于上述玻璃纤维构件上,干燥,制备成结合垫;

(4) 检测卡的制备:将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,切割成条状,制成试纸条;将制备好的试纸条装入长方形卡壳中卡紧,制备成联合检测SAA、CRP的检测卡。

4. 根据权利要求3所述检测卡的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述烘干条件为:于37℃下干燥2h。

5. 根据权利要求3所述检测卡的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述处理液的组成为0.02M Tris-HCL、0.05%BSA、0.1%Triton X-100、3%海藻糖;所述烘干时间为2h;所述干燥条件为:温度37℃、湿度30%。

6. 根据权利要求3所述检测卡的制备方法,其特征在于,步骤(4)所述长方形卡壳包括塑料上壳和塑料下壳,上壳面上对应于硝酸纤维膜的位置设有观察窗,上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔,加样孔位于样品垫中间。

7. 根据权利要求1所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,所述样品垫采用滤血膜直接贴于结合垫下方的底板上。

8. 根据权利要求1所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,所述样品收集装置由一次性采血针、消毒装置、样品收集瓶及样品稀释液组成;所述样品稀释液由去离子水、0.05M PBS缓冲液,0.1%T-20,0.1%BSA,0.05%NaN₃制成;所述消毒装置为碘伏和棉签。

9. 根据权利要求1所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,所述比色卡上依次设有C1、C2、C3、C4线;所述C1、C2、C3、C4线均划有荧光微球溶液,且比色卡上四条C线荧光强度均不相同。

10. 根据权利要求1所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装,其特征在于,所述检测装置包括方形检测盒,方形检测盒的顶部设有紫外光源(波长:300-350nm),光源外侧设有聚光装置,检测盒的侧面中间部位设有读数窗,检测盒的底部设有检测卡反应区。

一种炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装

技术领域

[0001] 本发明属于免疫层析检测技术领域,具体涉及一种便携式家用的炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装。

背景技术

[0002] 感染性疾病指各种病原微生物入侵人体,导致机体炎症或器官功能障碍的疾病,严重威胁人类健康,影响生活质量。其早期诊断,合理使用抗生素对控制感染的扩散有非常重要的作用。C反应蛋白(CRP)是一种由肝脏合成的急性时相反应蛋白,在多数病毒感染时处于较低水平;而细菌感染或损伤时,可增高数倍、数十倍甚至数百倍以上,升高幅度与细菌感染的程度呈正相关,经合理治疗后,约3~7d可下降至正常水平,对鉴别细菌和病毒感染有非常重要的作用。血清淀粉样蛋白(SAA)是组织淀粉样蛋白A的前体物质,正常情况下其含量较少且比较稳定,机体在病毒和(或)细菌病原菌侵袭后,4~6 h内达到峰值、增幅大,疾病的恢复期又迅速下降。SAA可作为敏感的诊断性疾病的标志物用于临床诊疗,成为继白细胞计数和CRP之后早期辅助诊断的又一个新指标,联合检测SAA、CRP对细菌和病毒感染鉴别诊断具有较大的临床意义。

[0003] 目前医院检测CRP、SAA等炎性标志物主要采用大型生化仪,其优点主要是检测结果准确,但存在检测时间长,所需标本量多,操作复杂,对操作人员水平要求较高等缺点,且检测仪器价格昂贵,只有部分大型医院才能配备,使其应用受到限制。近年来,POCT检测技术发展迅速,成为一项新型检验技术。其中荧光免疫层析技术以其独特的性能正在为临床实验室所接受,与传统方法相比,它具有操作简单、速度快、污染少、结果稳定准确;可以采用微创末梢(手指、耳垂)采血,减少采血量;还可能缩短病人住院时间,节省住院费用等诸多优点。

[0004] 目前有联合检测CRP和SAA的荧光免疫层析试剂盒专利(申请号:201521063805.7),但若同时定量检测CRP和SAA,需要有配套的荧光免疫分析仪,一台荧光免疫分析仪亦需要几万元,限制了其在家庭的应用。而本发明提供的试剂盒检测套装成本低廉,体积轻巧,不需配套专门的荧光免疫层析仪,使用方便。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种便携式、体积小、操作简单、使用方便的感染性疾病早期诊断及鉴别诊断的炎症标志物POCT联合检测SAA、CRP试剂盒套装。

[0006] 本发明所采用的技术方案如下:

本试剂盒套装,包括检测卡、比色卡、样品收集装置、检测装置,所述检测卡由试纸条和长方形卡壳组成;所述试纸条由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上,所述结合垫上固定有CRP和SAA抗体-荧光微球复合物;所述检测区内的硝酸纤维素

膜上包被两条抗SAA单克隆抗体、两条抗CRP单克隆抗体,依次作为T1、T2、T3、T4检测线,其中,将Eu-羧基荧光微球通过EDC-NHS两步法活化,与CRP和SAA抗体偶联形成复合物,再经复溶液复溶、封闭液封闭,最终制得CRP和SAA抗体-荧光微球复合物。

[0007] 优选的,所述抗SAA单克隆抗体和抗CRP单克隆抗体的两种浓度均为:0.5mg/ml和2mg/ml;所述复溶液的组成为0.05M PH 8.0 Tris-HCl、0.1%PVP K30、0.5%BSA、3%海藻糖、1%Triton X-100、0.05%NaN₃;所述封闭液为20%BSA。

[0008] 优选的,所述检测卡的制备方法,包括以下步骤:

(1) 制备CRP和SAA抗体-荧光微球复合物;

(2) 硝酸纤维素膜上包被单克隆抗体:将硝酸纤维素膜粘贴在底板的中间位置,从硝酸纤维素膜中间靠近结合垫的一侧起以1 μ l/cm速度依次包被两种浓度的抗SAA单克隆抗体、两种浓度的抗CRP单克隆抗体,形成两条SAA检测线,即T1和T2,两条CRP检测线,即T3和T4,烘干;

(3) 结合垫的制备:将玻璃纤维构件浸泡于处理液后,烘干,采用三维点膜喷金仪将步骤(1)制备的CRP和SAA抗体-荧光微球复合物均匀喷涂于上述玻璃纤维构件上,干燥,制备成结合垫;

(4) 检测卡的制备:将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上得到试纸大板,切割成宽3.9mm的条状,制成试纸条;将制备好的试纸条装入长方形卡壳中卡紧,放入加有干燥剂的铝箔袋中,制备成联合检测SAA、CRP的检测卡。

[0009] 优选的,步骤(2)中所述烘干条件为:于37 $^{\circ}$ C下干燥2h。

[0010] 优选的,步骤(3)中所述处理液的组成为0.02M Tris-HCl、0.05%BSA、0.1%Triton X-100、3%海藻糖;所述烘干时间为2h;所述干燥条件为:温度37 $^{\circ}$ C、湿度30%。

[0011] 优选地,步骤(4)中所述长方形卡壳包括塑料上壳和塑料下壳,上壳面上对应于硝酸纤维素膜的位置设有观察窗,上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔,加样孔位于样品垫中间。

[0012] 优选的,所述样品垫采用滤血膜直接贴于结合垫下方的底板上,可直接使用指尖血或新鲜血液进行检测,使产品在使用时更加方便简捷,节省检测时间,提高检测效率。

[0013] 优选的,所述样品收集装置由一次性采血针、消毒装置、样品收集瓶及样品稀释液组成;所述样品稀释液由去离子水、0.05M PBS缓冲液,0.1%T-20,0.1%BSA,0.05%NaN₃制成;所述消毒装置为碘伏和棉签。

[0014] 优选的,所述检测装置包括方形检测盒,方形检测盒的顶部设有光源,光源外侧设有聚光装置,检测盒的侧面中间部位设有读数窗,检测盒的底部设有检测卡反应区;所述光源为紫外灯,可照射于检测卡内试纸条的硝酸纤维素膜上,荧光微球上的Eu元素受到紫外光照射后发出荧光,荧光强度与荧光微球的含量呈正相关,加样5min后开启检测装置进行结果判读,实现了对CRP、SAA的联合检测,结合本发明提供的结果判读方法对感染早期诊断及鉴别诊断提供依据,同时本发明试剂盒套装可避免背景荧光信号的干扰,提高检测的灵敏度及特异性。

[0015] 优选的,本发明还包括所述炎症标志物POCT联合检测试剂盒套装的使用说明书。

[0016] 本发明的应用范围及优点:

本发明形成的试剂盒套装可应用于社区基层医院、社区保健、幼儿园、学校、厂矿、社区

的小诊所或私人医师诊所、战地急救、或在救护车上以及家庭在内使用,检测操作简便,所得试剂盒套装对检测人员无特殊要求,非专业检验师、非医学专业人员,甚至是被检测对象本人,均可按照说明书进行操作及时检测;可做到床旁检测,对检验结果做出正确的判断和解释,有利于及时了解病情并采取有效的治疗措施;本发明为微创检测,即采用末梢(手指、耳垂)采血,仅需1滴全血样本,即可完成超敏CRP、SAA检测,减少病人因采血造成的痛苦和交叉感染的风险。

附图说明

[0017] 图1是试纸条的结构示意图;

图中,1-样品垫;2-结合垫;3-硝酸纤维素膜;4-T1线;5-T2线;6-T3线;7-T4线;8-吸水垫;9-底板。

[0018] 图2是检测卡的结构示意图;

图中,10-长方形卡壳;11-T2线;12-T3线;13-T4线;14-加样孔;15-T1线;16-观察窗。

[0019] 图3是检测装置的结构示意图;

图中,17-紫外灯;18-聚光装置;19-读数窗;20-检测卡反应区;21-方形检测盒。

[0020] 图4是比色卡的结构示意图。

具体实施方式

[0021] 下面通过具体实施例对本发明作进一步说明。

[0022] 实施例1 检测卡的制备

1. CRP和SAA抗体-荧光微球复合物制备

取10 μ L Eu-羧基荧光微球加入400 μ L 0.05M PH=7.6的硼酸缓冲液,混匀;加入40 μ L 1mg/ml的EDC活化剂及10 μ L 1mg/ml NHS溶液,于恒温振荡器上振荡活化20min;然后于5000rpm下离心20min,弃上清,加入500 μ L 0.05M pH=7.6硼酸缓冲液复溶沉淀,漩涡混匀,分别加入40ug CRP、SAA,漩涡混匀,放入摇床低速振荡偶联2h;于5000rpm下离心15 min,弃上清,加入1500 μ L复溶液复溶,再用10 μ L 封闭液(20%BSA)封闭30min,所述复溶液的组成为0.05M PH 8.0 Tris-HCl、0.1%PVP K30、0.5%BSA、3%海藻糖、1%Triton X-100、0.05% NaN₃。

[0023] 2. 硝酸纤维素膜上包被单克隆抗体

采用0.05M PBS稀释抗CRP单克隆抗体、抗SAA单克隆抗体,分别稀释至0.5mg/ml、2mg/ml并标记;将硝酸纤维素膜粘贴在底板(PVC板)的中间位置,设置三维点膜喷金仪在硝酸纤维素膜上从靠近结合垫的一侧起以1 μ l/cm速度依次包被 2mg/ml抗SAA单克隆抗体、0.5mg/ml抗SAA单克隆抗体、2mg/ml 抗CRP单克隆抗体、0.5mg/ml抗CRP单克隆抗体,分别作为检测线1(T1)、检测线2(T2)、检测线3(T3)、检测线4(T4),置于37 $^{\circ}$ C下干燥2h。

[0024] 3. 结合垫的制备

将玻璃纤维构件裁成30mm*7mm宽大小,按照每4cm加150 μ L处理液进行浸泡处理,捞出后置于电热鼓风干燥箱中干燥2h,采用三维点膜喷金仪将制备的CRP和SAA抗体-荧光微球复合物,按照每4cm加150 μ L的比例均匀喷涂于处理好的玻璃纤维构件上,置于干燥间,于温度37 $^{\circ}$ C、湿度30%下干燥2h,制备成结合垫;所述处理液的组成为0.02M Tris-HCL、0.05%

BSA、0.1%Triton X-100、3%海藻糖。

[0025] 4. 检测卡的制备:将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板(PVC板)上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上,组装后得到试纸大板,切割成宽3.9mm的条状,制成试纸条;将制备好的试纸条装入具有塑料上壳和塑料下壳的长方形卡壳中卡紧,放入加有干燥剂的铝箔袋中,制备成联合检测SAA、CRP的检测卡;其中,上壳面上对应于硝酸纤维素膜的位置设有观察窗,上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔,加样孔位于样品垫中间。

[0026] 6. 结果判断

从检测卡的加样孔加样5min后,将检测卡置于检测装置的检测卡反应区中判读结果并与比色卡对比。

[0027] 若检测卡检测区T1、T2、T3、T4均有荧光,且T2、T4荧光强度与比色卡C2荧光强度相当,表示测定样品中SAA、CRP含量均高于20mg/L,提示阳性(+),可能存在感染。

[0028] 若检测卡检测区T1、T2、T3、T4均有荧光,且T2、T4荧光强度与比色卡C3荧光强度相当,表示测定样品中SAA含量在8~20mg/L、CRP含量在16~20mg/L,提示弱阳性(±),需进一步检查明确诊断。

[0029] 若检测卡检测区T4、T2未见荧光,T1、T3有荧光,表示测定样品中SAA含量低于4mg/L、CRP含量低于8mg/L,提示阴性(-),机体未感染。

[0030] 实施例2 荧光免疫层析比色卡制备

1. 梯度荧光微球稀释

a. 取浓度为10mg/mL的微球原液10 μ L至离心管中。

[0031] b. 加0.05M PBS稀释成浓度依次为12.5 μ g/mL、6.25 μ g/mL、3.125 μ g/mL的微球溶液;

2. 划线

a. 取硝酸纤维素薄膜,粘贴在PVC板上,放置在三维点膜喷金仪的相应位置,待用;

b. 用纯水清洗三维点膜喷金仪的两根管路3次;

c. 调整管路位置,使两根管路间隔6mm;

d. 划线参数设置为:划线速度50mm/s,划线量1 μ L/cm;

e. 用三维点膜喷金仪将配制好的不同浓度的微球溶液依次吸入管路中;其中C1、C2、C3、C4线荧光微球浓度依次为12.5 μ g/mL、6.25 μ g/mL、3.125 μ g/mL、0 μ g/mL),点击开始按钮后在硝酸纤维素膜上划线,划线完毕后,清洗管路3次,关闭仪器。

[0032] 3. 干燥

将制备好的PVC板在37 $^{\circ}$ C干燥2小时。

[0033] 4. 切条

取干燥过后的PVC底板,放入斩切机中,切成宽度为3.9mm的试纸条。

[0034] 5. 加卡壳

将切好的比色条放于卡盒卡槽内部,压壳后按浓度分别收集于铝箔袋中,放入干燥剂后封口保存。

[0035] 6. 检测

将上述比色卡依次放于本试剂盒检测系统中,观察荧光强度并拍照打印制备成比色卡套装。

[0036] 实施例3

对本发明检测卡上的SAA和CRP抗体的检测限进行测定

样本处理:采用本试剂盒套装提供的样品收集装置采集血液。

[0037] 检测卡的准备:将实施例1制备的检测卡放置在室温下15min后备用。

[0038] 将SAA和CRP抗原稀释成2mg/L、4mg/L、8mg/L、16mg/L、32mg/L、64mg/L、128mg/L,使用本发明建立的联合检测SAA、CRP荧光免疫层析试剂盒套装进行检测,加样5min后,置于检测装置中判读结果。结果如表1:

表1 SAA和CRP抗体的检测限测定结果

	2mg/L	4mg/L	8mg/L	16mg/L	32mg/L	64mg/L	128mg/L
SAA	-	-	±	±	+	+	+
CRP	-	-	-	±	+	+	+

由表1可知:该检测卡检测血清淀粉样蛋白A(SAA)和C反应蛋白(CRP)抗原稀释的系列样品,由检测结果知检测卡上SAA和CRP抗体的检测限分别为8mg/L和16mg/L。

[0039]

实施例4

对本发明建立的联合检测SAA、CRP荧光免疫层析试剂盒套装的准确性进行测定

取SAA和CRP阳性标本各10份,正常人标本10份,使用本发明建立的联合检测SAA、CRP荧光免疫层析试剂盒套装进行检测,加样5min后,置于检测装置中判读结果,并与比色卡观察对比。结果如表2:

表2 准确性的测定结果

SAA 阳性 标本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SAA 检测 结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRP 阳性 标本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CRP 检测 结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
正常人 标本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SAA 检测 结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRP 检测 结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

由表2可知,SAA阳性标本和CRP阳性标本检测结果均为阳性,正常人标本(阴性标本)检测结果均为阴性。该结果与预期完全相符,说明本发明提供的试纸条准确率高,符合要求。

[0040] 实施例5

对本发明建立的联合检测SAA、CRP荧光免疫层析试剂盒套装的精密性进行测定

将制备好的SAA、CRP精密性质控品从检测卡的加样孔加样,置于检测装置中,5min后检测并读取T1线、T2线、T3线、T4线的荧光强度,重复检测十次,分别计算十次检测结果,四条检测线(T1、T2、T3、T4)荧光强度的变异系数($CV=SD/\bar{x}$),均小于15%,符合精密性要求。

[0041] 实施例6 样本检测

采用经病原学检测确诊的感染性疾病50份及健康体检样本52份,使用本发明建立的联合检测SAA、CRP荧光免疫层析试剂盒套装进行检测,加样5min后,置于检测装置中判读结果。结果显示,本发明的联合检测SAA、CRP荧光免疫层析定量试剂盒套装检测细菌、病毒感染的敏感性分别为94.2%、91.3%、特异性达到100%。

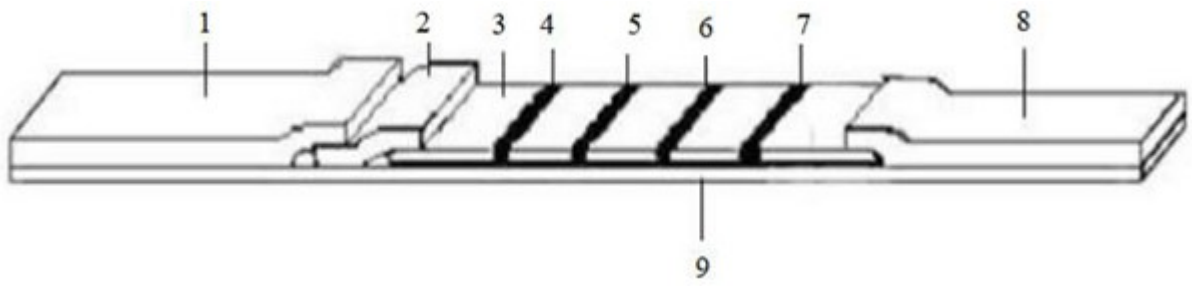


图1

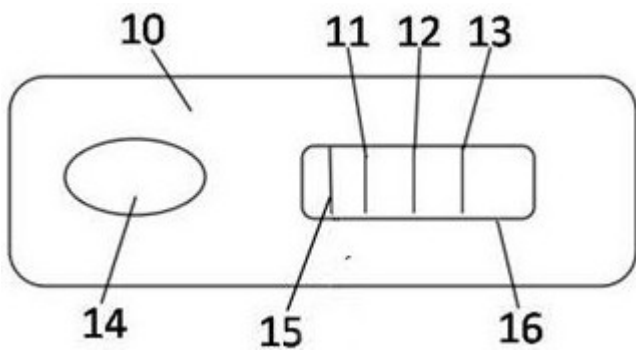


图2

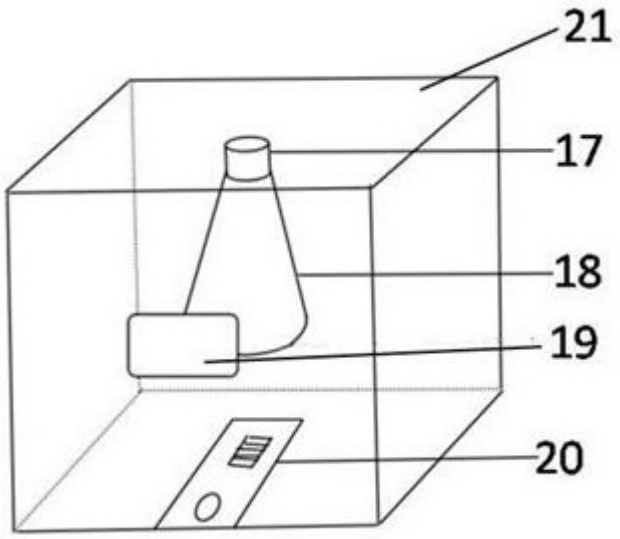


图3



图4