



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398562 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810131023.4

(22)申请日 2018.02.09

(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 徐瑞芳 李玉林 王继创

(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 李静雅

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条
及试纸卡

(57)摘要

本发明涉及一种胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条及包含该试纸条的试纸卡,所述试纸条包括底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述结合垫上具有荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有由胱抑素C多克隆抗体或单克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠IgG多克隆抗体构成的质控线。本发明的试纸条实现了对胱抑素C进行快捷、定量检测分析,且试纸条灵敏度高、准确性好、线性范围宽、检测所用时间短、使用方便,能满足床旁急诊和现场快速检测需求。

1. 一种胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,所述试纸条包括底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述结合垫上具有荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有由胱抑素C多克隆抗体或胱抑素C单克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠IgG多克隆抗体构成的质控线。

2. 根据权利要求1所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述荧光微球为羧基荧光微球,优选地,所述羧基荧光微球是粒径为50nm-500nm、优选180nm-210nm的镧系元素铕(Eu^{3+})螯合物。

3. 根据权利要求1所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述样品垫和结合垫均为经处理液浸透处理并干燥的玻璃纤维膜。

4. 根据权利要求3所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述处理液的组成成分包括Tris-HCl缓冲液、BSA、吐温20、蔗糖、 NaN_3 ,优选地,所述处理液的组成成分包括:工作浓度为0.01-0.1M、pH为6.0-9.0的Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.01-1%的BSA,质量浓度为0.01%-1%的吐温20、质量浓度为0.1%-5%蔗糖,以及质量浓度为0.01-1%的 NaN_3 ;更优选地,所述处理液由以下组成成分组成:工作浓度为0.01M、pH为7.5-8.0的Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.05-0.5%的BSA,质量浓度为0.1%-0.5%的吐温20、质量浓度为3%蔗糖,以及质量浓度为0.05%的 NaN_3 。

5. 根据权利要求3所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述样品垫和结合垫由单一的玻璃纤维膜构成,采用喷球工艺将荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体直接喷涂至所述玻璃纤维膜上,形成胱抑素C抗体-荧光微球结合区。

6. 根据权利要求3所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述样品垫和结合垫分别由不同的玻璃纤维膜构成,采用铺球工艺将荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体直接铺至所述玻璃纤维膜上,形成结合垫。

7. 根据权利要求1所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体由以下方法制备获得:将荧光微球和EDC用活化缓冲液进行一步法活化或将荧光微球与EDC、NHS用活化缓冲液进行二步法活化,然后在复溶缓冲液中沉淀,加入胱抑素C单克隆抗体进行震荡偶联,离心,在复溶缓冲液中沉淀,加入封闭液封闭,在2-8℃、优选4℃下保存备用。

8. 根据权利要求7所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述活化缓冲液选自于Tris-HCl缓冲液、PB缓冲液、硼酸缓冲液,优选工作浓度为0.01-0.1M,PH=6.0-9.0;优选地,所述复溶缓冲液选自于Tris-HCl缓冲液、PB缓冲液、硼酸缓冲液,优选工作浓度为0.01-0.1M,PH6.0-9.0;优选地,所述封闭液优选含0.5-20%、更优选含10%的BSA的封闭液。

9. 权利要求1-8中任一项所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条的制备方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 将玻璃纤维膜在处理液中处理,在20-45℃、优选30-37℃恒温干燥箱中干燥0.5-24h、优选1-6h,将荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体按3-40ul/ml、优选8-10ul/ml的量喷涂至所述玻璃纤维膜上的结合区或铺至所述结合垫上,在20-45℃、优选30-37℃干燥0.5-24h,获得样品垫;

(2) 用稀释液分别对胱抑素C多克隆抗体或单克隆抗体、以及羊抗鼠IgG多克隆抗体进

行稀释,将所得的胱抑素C多克隆抗体或单克隆抗体稀释液在硝酸纤维素膜上划线形成检测线(T线);将所得的羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释液在硝酸纤维素膜上划线形成质控线(C线),检测线和质控线相隔3-15mm,在20-45℃烘干0.5-24h,获得处理的硝酸纤维素膜;

(3)将步骤(2)的处理的硝酸纤维素膜粘贴在底板上,一端压有吸水纸,重叠接触1-4mm,另一端压有步骤(1)获得的样品垫的结合区,重叠接触1-4mm,组装后剪切成3-8mm的宽度,制成胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸。

10.一种胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸卡,所述试纸卡还包含卡壳,权利要求1-8中任一项所述的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条设置在所述卡壳中,卡壳壳面上对应于硝酸纤维素膜的检测线、质控线位置设有观察窗,卡壳壳面上对应于样品垫的加样区设有加样孔。

胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条及试纸卡

[0001]

技术领域

[0002] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种快速、高灵敏度的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条、以及包含所述试纸条的试纸卡。

背景技术

[0003] 胱抑素C(Cystatin C,简称CysC)的基因编码位于人类第20号染色体短臂上,胱抑素C基因含有管家基因,能在所有组织恒定且持续地转录和表达。所有有核细胞均可合成胱抑素C并很快分泌到细胞外,无组织特异性,可分布于肾、肝、胰、肠、胃、肺及胎盘等几乎全身所有组织,在脑脊液和精液中浓度最高,尿液最低。胱抑素C分子量小(13KD),生理条件下带正电荷,能自由从肾小球滤过,完全被肾小管上皮细胞重吸收并于细胞内降解,不重新回到血液中;同时肾小管上皮细胞也不分泌CysC至管腔内。因此,其血清浓度主要由肾小球过滤率(GFR)决定,CysC即成为反映肾小球滤过情况的重要指标。

[0004] 胱抑素C在临床上被视为监测肾功能的一项高灵敏度、高特异性指标血清胱抑素C被认为是较血清肌酐(BUN)、尿素氮等更理想、更灵敏的检测肾小球过滤率内源性指标。此外,作为一种新的评估肾功能的内源性标记物,胱抑素C在评价由糖尿病、急性肾功能衰竭、高血压、类风湿性关节炎等原因引起的早期肾损害方面起着重要的作用。

[0005] 目前临床及实验室检测胱抑素C主要采用抗原、抗体反应为理论基础的免疫学方法。按原理大体上可将检测方法分为二类,一类是非均相法:单向免疫扩散法(RID)、放射免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)、酶联免疫测定法(ELISA);一类是均相法:颗粒计数免疫测定法、颗粒增强透射免疫比浊法(PETIA)、颗粒增强散射免疫比浊(PENIT)、溶胶颗粒免疫测定法(SPIAs)等。目前临床多选择胶乳增强免疫比浊法作为常规检测胱抑素C,例如,中国专利申请201410735830.9公开了一种改良的胱抑素C检测试剂盒及其制备方法,然而,该方法需配套使用大型全自动生化分析仪,虽能作高通量检测,但是仪器贵且体型大,检测时间较长,灵敏度低、准确度不高,不适用于床边及时检测,无法用于急诊检测。

[0006] 时间分辨荧光免疫分析法是一种新型的检测手段,利用稀土离子作为示踪物标记蛋白质、多肽、激素、抗体、核酸探针或生物活性细胞,与其螯合剂、增强液在待反应体系(如:抗原抗体免疫反应、生物素亲和素反应、核酸探针杂交反应、靶细胞与效应细胞的杀伤反应等)发生特异性亲和反应后,用时间分辨荧光分析仪测定最后产物中的荧光强度,根据荧光强度和相对荧光强度比值,推测反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。相较于其他免疫检测技术,可极大地提高灵敏度,并获得较为宽阔的线性范围,实现现场快速定量检测,成为目前国内外研究的新热点。而针对胱抑素C,利用时间分辨荧光免疫分析法对其进行定量检测的相关技术和检测工具尚未见报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种能够对胱抑素C进行高灵敏度、高准确性、宽线性范围、使用方便的定量检测分析工具,使得能够缩短检测时间,满足床旁和现场急诊检测需求。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供以下技术方案:

一种胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条,所述试纸条包括底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述结合区上具有荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上包被有由胱抑素C多克隆抗体或单克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠IgG多克隆抗体构成的质控线。

[0009] 优选地,所述荧光微球为羧基荧光微球,所述羧基荧光微球可以是粒径为50nm-500nm、优选180nm-210nm的镧系元素铕(Eu^{3+})螯合物。

[0010] 优选地,所述胱抑素C单克隆抗体为鼠源胱抑素C单克隆抗体,可市售获得;所述所述胱抑素C多克隆抗体为兔源、羊源、豚鼠源、鼠源胱抑素C多克隆抗体,可市售获得。

[0011] 优选地,所述样品垫为经处理液浸透处理并干燥的玻璃纤维膜,更优选地,所述处理液的组成成分包括Tris-HCl缓冲液、BSA、吐温20、蔗糖、 NaN_3 ,发明人通过设计正交实验对各组分浓度、PH进行研究,优选的处理液由以下组成组成:工作浓度为0.01-0.1M、pH为6.0-9.0的 Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.01-1%的BSA,质量浓度为0.01%-1%的吐温20、质量浓度为0.1%-5%蔗糖,以及质量浓度为0.01-1%的 NaN_3 ;更优选地,所述处理液由以下组分组成:工作浓度为0.01M、pH为7.5-8.0的 Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.05-0.5%的BSA,质量浓度为0.1%-0.5%的吐温20、质量浓度为3%蔗糖,以及质量浓度为0.05%的 NaN_3 。通过采用特定组成的处理液对玻璃纤维膜进行处理,可提高样品垫的微球释放率,减少聚集,并且在检测线后方无荧光干扰。

[0012] 在具体实施方式中,所述样品垫和结合垫可以由分离的、不同的两部分构成,例如,由两片部分重叠摆放的经处理的玻璃纤维膜分别构成样品垫和结合垫,其中,采用铺球工艺将荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体直接铺至结合垫上。

[0013] 优选地,所述样品垫和结合垫可以由单一的玻璃纤维膜构成,例如,采用喷球工艺将荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体直接喷涂至一片经处理的玻璃纤维膜的一端,形成结合区,所述玻璃纤维膜的另一端形成加样区。

[0014] 具体而言,所述样品垫在20℃-45℃、优选37℃下干燥0.5-24h、例如2h后,将所述荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体以3-40u1/ml、优选8-10u1/ml的量喷涂至玻璃纤维膜上,在20℃-45℃、优选37℃下干燥0.5-24h,放于干燥环境备用。经上述工艺优化,可直接在单一的玻璃纤维膜上形成结合区,相较于样品垫与结合垫分离的形式,简化了试纸条的结构和制备工艺,并且相较于铺球工艺,减少微球聚集,有利于微球释放,使得检测线(T线)和质控线(C线)以外的荧光干扰更少,试纸条质量更优。

[0015] 具体地,所述荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体由以下方法制备获得:

将荧光微球和EDC用活化缓冲液进行一步法活化或者将荧光微球与EDC、NHS用活化缓冲液进行二步法活化,然后在复溶缓冲液中沉淀,加入胱抑素C单克隆抗体进行震荡偶联,离心,在复溶缓冲液中沉淀,加入封闭液封闭,在2-8℃、优选4℃下保存备用。

[0016] 优选地,所述活化缓冲液选自于Tris-HCl缓冲液、PB缓冲液、硼酸缓冲液,优选工作浓度0.01-0.1M,PH=6.0-9.0;所述复溶缓冲液选自于Tris-HCl缓冲液、PB缓冲液、硼酸

缓冲液,优选工作浓度0.01-0.1M,PH6.0-9.0;优选地,所述封闭液优选含1-20%BSA、优选含10%BSA的封闭液。

[0017] 优选地,所述底板为聚苯乙烯构件或者聚乙烯构件,例如PVC板,当样品垫和结合垫由单一的玻璃纤维膜构成时,所述玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸依次设置在所述底板上,所述玻璃纤维膜上的结合区压在硝酸纤维素膜的一端,所述吸水纸压在硝酸纤维素膜的另一端。当样品垫和结合垫由分离的、不同的两片玻璃纤维膜构成时,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次设置在所述底板上,重叠接触。

[0018] 本发明还提供了上述胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸的制备方法,所述方法包括如下步骤:

(1)将玻璃纤维膜在处理液中浸透处理,在20-45℃、优选30-37℃恒温干燥箱中干燥0.5-24h、优选1-6h,将荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体按3-40ul/ml、优选8-10ul/ml的量喷涂至所述玻璃纤维膜上的结合区或铺至所述结合垫上,在20-45℃恒温干燥箱中干燥0.5-24h,获得样品垫;

(2)用稀释液分别对胱抑素C多克隆抗体或单克隆抗体、以及羊抗鼠IgG多克隆抗体进行稀释,将所得的胱抑素C多克隆抗体或单克隆抗体稀释液在硝酸纤维素膜上划线作为检测线(T线);将所得的羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释液在硝酸纤维素膜上划线作为质控线(C线),检测线和质控线相隔3-15mm,在20-45℃烘干0.5-24h,获得处理的硝酸纤维素膜;

(3)将步骤(2)的处理的硝酸纤维素膜粘贴在底板上,一端压有吸水纸,重叠接触1-4mm,另一端压有步骤(1)获得的样品垫的结合区,重叠接触1-4mm,组装后剪切成3-8mm的宽度,制成胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸。

[0019] 优选地,步骤(1)的处理液的组成成分包括Tris-HCl缓冲液、BSA、吐温20、蔗糖、NaN₃,优选的处理液由以下组分组成:工作浓度为0.01-0.1M、pH为6.0-9.0的 Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.01-1%的BSA,质量浓度为0.01%-1%的吐温20、质量浓度为0.1%-5%蔗糖,以及质量浓度为0.01-1%的NaN₃;更优选地,所述处理液由以下组分组成:工作浓度为0.01M、pH为7.5-8.0的 Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.05-0.5%的BSA,质量浓度为0.1%-0.5%的吐温20、质量浓度为3%蔗糖,以及质量浓度为0.05%的NaN₃。经处理液处理的样品垫可提高微球释放率,减少聚集。

[0020] 优选地,步骤(2)的稀释液为PBS缓冲液,优选0.01-0.1M pH6.50-9.0的PBS缓冲液,更优选0.02M pH7.0-8.0的 PBS缓冲液。

[0021] 本发明还提供了一种胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸卡,所述试纸卡还包含卡壳,上述胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条设置在所述卡壳中,所述卡壳壳面上对应于硝酸纤维素膜的检测线、质控线位置设有观察窗,卡壳壳面上对应于样品垫的加样区设有加样孔。

[0022] 优选地,所述观察窗为长方形孔,所述加样孔为椭圆形。

[0023] 本发明的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸卡组装好后装入铝箔袋中,加入干燥剂后封口保存,于室温干燥环境下至少可以保存一年。

[0024] 本发明建立了一种生产工艺简单、操作简便、精密型好,灵敏度高、适用于床旁和现场快速检测人胱抑素C。本发明与现有技术相比,具有如下优点:

(1)本发明将荧光微球作为标记物,此标记物稳定性良好,有利于提高检测稳定性。

[0025] (2)本发明通过利用荧光微球作为标记物,提高检测灵敏度,降低非特异性结合,有利于提高试剂盒性能。

[0026] (3)利用本发明进行胱抑素C的检测时间约为5-15分钟,检测线性范围为0.05mg/L-20mg/L,相较于现有市场产品胶乳免疫比浊法(检测线性范围一般在0.4mg/L-7.80mg/L),扩大了检测范围。

[0027] (4)本发明可通过荧光免疫层析读数仪对结果进行判读,可实现自动化,检测线和质控线清晰,除此以外的区域几乎无荧光干扰,减少主观因素的影响,提供便利、快速、可靠的诊断结果。

[0028] (5)本使用新型卡壳设有样品进入的加样孔和供观测结果的观察窗,根据荧光层析读数仪判定结果,准确可靠。

[0029] (6)本发明的试纸条和试纸卡结构简化,制作方便,体积小、便于携带。

[0030] (7)本发明的试纸条和试纸卡大大降低了检测成本。

[0031] (8)本发明可批量生产,适用于临床快速诊断和现场快速诊断:易于保存,有利于基层单位推广。

附图说明

[0032] 图1为本发明实施例2中,采用不同方式对样品垫进行处理后,试纸条的荧光照片,其中,1号的样品垫未经处理,2号的样品垫采用加入了表面活化缓冲剂的处理液进行处理,3号的样品垫采用优化组成的处理液进行处理。

[0033] 图2为本发明实施例2中,采用两种不同工艺制备的试纸条的荧光照片,其中,左图为采用喷球工艺制得的获得的试纸条检测结果示意图,右图为采用铺球工艺制得的试纸条检测结果示意图。

[0034] 图3示出了本发明实施例4制备的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条的结构示意图。

[0035] 图4示出了本发明实施例5制备的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸卡的结构示意图。

[0036] 图5为本发明实施例6中获得的标品浓度-荧光强度标准曲线。

[0037] 图6示出了本发明实施例7中分别采用市售胱抑素C测定试剂盒和本发明的试纸条进行检测的线性分析比较结果。

[0038] 附图标记:1、吸水纸;2、质控线(C线);3、检测线(T线);4、结合垫;5、样品垫;6、底板;7、硝酸纤维素膜;8、卡壳;9、卡壳壳面;10、观察窗观察到的检测线(T线);11、观察窗观察到的质控线(C线);12、观察窗;13、加样孔。

具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步说明。

[0040] 实施例1、荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体的制备(EDC法)

取1.5ml离心管1支,做好标记,加入500 μ l,0.02M,PH=7.5Tris-HCl后加入10 μ l羧基荧光微球(粒径为180nm的镧系元素铕(Eu^{3+})螯合物)和60 μ l 2mg/ml的EDC活化剂,振荡混匀,放于恒温振荡器上振荡活化20min,15000r/min离心10min,弃上清,加入1000 μ l 0.02M,PH=

7.5Tris-HCl复溶沉淀;加入40 μ g的鼠源胱抑素C单克隆抗体,混匀,放于恒温振荡器上振荡偶联,15000rpm/min离心10min,移出上清液,加入500 μ l复溶液复溶沉淀,加入50 μ l含10%BSA的封闭液封闭1小时,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0041] 实施例2、样品垫的制备

取市售玻璃纤维膜作为样品垫基材,分为三组,每组6个:

第一组:不进行处理,用三维喷金点膜仪,将实施例1制备的荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体以10 μ l/ml的量喷涂至玻璃纤维膜上,在37 $^{\circ}$ C下干燥2h;

第二组:采用处理液进行浸透处理,然后放置于37 $^{\circ}$ C恒温干燥箱中干燥2h,再进行同样的喷涂操作,其中,处理液组成为:工作浓度为0.05M、pH为7.5-8.0的Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.05-0.5%的BSA,以及质量浓度为1%蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃;

第三组:采用处理液进行浸透处理,然后放置于37 $^{\circ}$ C恒温干燥箱中干燥2h,再进行同样的喷涂操作,其中,处理液组成为:工作浓度为0.01M、pH为7.5-8.0的Tris-HCl缓冲液,质量浓度为0.05-0.5%的BSA,质量浓度为0.1%-0.5%的吐温20,以及质量浓度为3%蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃。

[0042] 将上述三组样品垫分别制成试纸条,对样品进行检测,检测结果的荧光照片如图1所示,由图1可以看出,不对样品垫进行任何处理的试纸条,检测线下方出现大量荧光干扰,导致检测线和质控线不够清晰,通过对样品垫进行处理液浸透处理,大大改善了荧光干扰问题,但仍有少量存在,而第三组通过对处理液组成的优化,基本上消除了荧光干扰,改善试纸条显示质量,提高荧光强度检测准确度。

[0043] 另外,取三个玻璃纤维膜,采用第三组使用的处理液进行浸透处理,烘干后采用铺球的工艺将实施例1制备的荧光微球标记的胱抑素C单克隆抗体喷涂在玻璃纤维膜上作为结合垫,组装试纸条时,将结合垫的一端压在经处理液浸透处理并干燥的样品垫上,另一端压在硝酸纤维素膜上,对样品进行测定,试纸条的荧光照片如图2所示,由图2可以看出,相较于样品垫与结合垫分离的形式,一体式样品垫-结合垫简化了试纸条的结构和制备工艺,并且相较于铺球工艺(右图),喷球工艺(左图)能够减少微球聚集,有利于微球释放,使得检测线(T线)和质控线(C线)以外的荧光干扰更少,试纸条质量更优。

[0044] 实施例3、硝酸纤维素膜(NC膜)的制备

用0.02M pH7.5 PBS缓冲液将兔源胱抑素C多克隆抗体稀释至浓度为2mg/mL,用0.02M pH7.5 PBS缓冲液将羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释至浓度为1mg/mL,将所得稀释溶液在NC膜上划线形成检测线(T线)和质控线(C线),两线相隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干过夜后,于室温干燥环境下保存备用。

[0045] 实施例4、胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条的制备

在PVC底板上依次搭接地粘贴:吸水纸、实施例3制备的硝酸纤维素膜、实施例2第三组制备的样品垫,重叠接触1-2mm,组装完成后剪切成3.9mm的宽度,即为胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条。

[0046] 实施例5、胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸卡的制备

将实施例4制备的胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条固定在塑料卡壳中,试纸条表面用面卡压紧,面卡在对应该试纸条的样本垫和NC膜的部位分别预留椭圆形加样孔和长方形观察窗。胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸卡组装好后装入铝箔袋中,加入干燥

剂后封口保存,于室温干燥环境下至少可以保存一年。

[0047] 实施例6、定量检测人血清胱抑素C浓度:

标准曲线的绘制:将胱抑素C标准品配制成一系列浓度(0.039mg/L、0.05mg/L、0.078mg/L、0.156mg/L、0.39mg/L、0.78mg/L、1.56mg/L、3.125mg/L、6.25mg/L、12.5mg/L、20mg/L、25mg/L),用同一批次的数条实施例4制备的试纸条检测各浓度的标准品溶液。以检测线的荧光强度为纵坐标,胱抑素C标准品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,如图5所示。拟合获得标准曲线方程 $Y = 0.2831X + 0.0553$, $R^2 = 0.9953$,将该数据和对应的标准质控线荧光强度保存在荧光分析仪中。

[0048] 样品的检测:

(1) 平放实施例5制备的试纸卡,待测血清平衡至室温后,用样品稀释液稀释100倍,取其50 μ L加入加样孔中,于室温下反应5min,将试纸卡放入检测窗口;

(2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下,发出强烈的荧光;

(3) 发射的荧光经滤除杂光后,通过聚集系统将采集的光学信号,送入光电倍增管,光信号得到增强,再经过信号转换元件,获得检测线与质控线的荧光数值;

(4) 荧光分析仪中的内置分析软件对检测线荧光强度进行校正,并把校正值代入内置标准曲线,自动计算出待测血清中胱抑素C。

[0049] 实施例7、胱抑素C荧光微球免疫层析定量检测试纸条性能评价

评价试纸性能的指标

1) 线性范围:各浓度线性质控品重复检测10次,绘制校准曲线,经数据拟合和统计分析,本发明试纸线性检测范围为0.05mg/L-20mg/L。正常人胱抑素C参考区间为:0.51mg-1.09mg/L,胱抑素C在血液中的浓度随肾小球滤过率变化而变化,肾衰时,肾小球滤过率下降,胱抑素C在血液中浓度可增加10多倍,本方法制备的试纸条可以满足正常人及病患血清胱抑素C的检测。

[0050] 2) 精密性:用本发明的胱抑素C荧光微球免疫层析试纸卡分别检测胱抑素C浓度分别为0.5mg/L、1mg/L、10mg/L精密性质控品,重复检测10次,进行批内精密度测定。并用以上三个精密性质控品对三个不同批次的胱抑素C荧光微球免疫层析试纸条进行测定,10条/批,进行批间精密性测定,结果如表1所示。

[0051] 表1

浓度 (mg/L)	批内精密性			批间精密性		
	0.5	1	10	0.5	1	10
检测带和质控带荧光信号强度比的平均值	0.213	0.355	2.907	0.212	0.357	2.921
标准差 SD	0.008	0.011	0.085	0.009	0.011	0.093
CV (%)	3.67%	3.04%	2.92%	4.41%	3.01%	3.17%

批内CV(变异系数)和批间CV均小于5%,说明该试剂精密性良好。此外,本试纸检测胱抑素C的线性范围宽、灵敏度好。

[0052] 3) 方法学比对:取50份经过四川迈克生物科技股份有限公司生产的胱抑素C测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)测定过的临床血清,用实施例5制备的胱抑素C荧光微球免疫层析试纸卡进行检测,以自建系统检测结果为纵坐标,以临床检测值为横坐标,建立相关线性分析如图6所示,拟合获得的方程为 $Y = 0.928X + 0.2964$,相关系数 R^2 为0.9711,两者相关性

良好。

[0053] 以上仅描述了本发明的较佳实施方式,但本发明并不限于上述实施例。本领域技术人员可以理解的是,能够实现本发明技术效果的任何相同或相似手段,均应落入本发明的保护范围内。

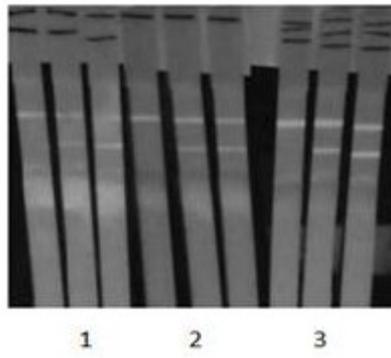


图1

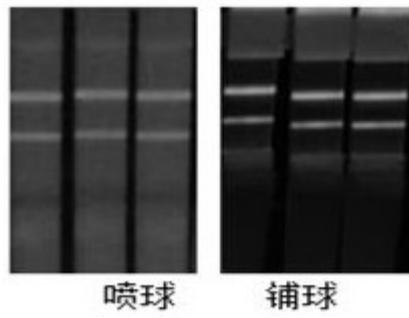


图2

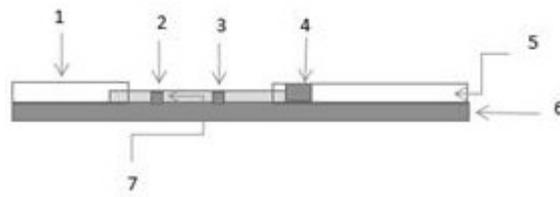


图3

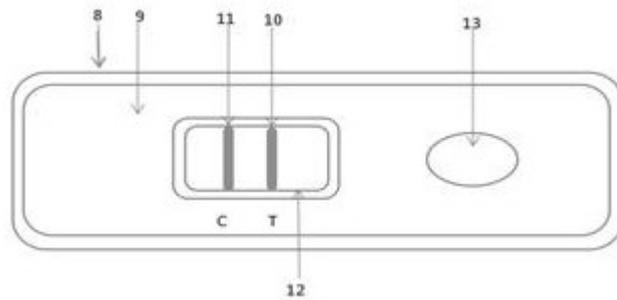


图4

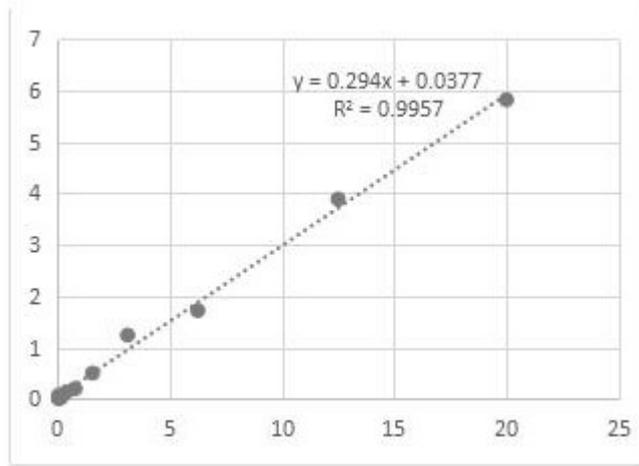


图5

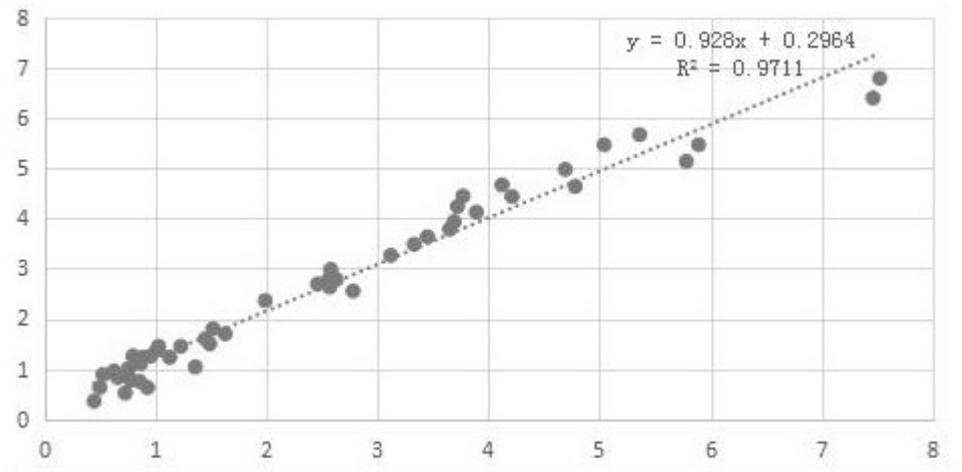


图6