



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103487578 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310485886. 9

(22) 申请日 2013. 10. 16

(71) 申请人 深圳市大爱医疗科技有限公司  
地址 518000 广东省深圳市宝安区西乡固戍  
社区茶西下围园工业区 B 栋 7 楼

(72) 发明人 张二盈 章国建

(74) 专利代理机构 深圳市精英专利事务所  
44242

代理人 李新林

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

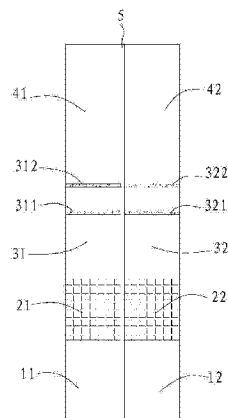
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种 CRP/PCT 联合诊断试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物医学检测技术领域, 具体为一种 CRP/PCT 联合诊断试纸及其制备方法, 试纸的底板中部纵向设有一防渗水胶条, 并在防渗水胶条两侧的底板上分别设样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫; 一结合垫上固定有标记 CRP 抗体 I, 另一结合垫上固定有标记 PCT 抗体 I, 两反应膜上均设有定量带和质控带。本发明将 CRP 检测和 PCT 检测整合于同一检测试纸中, 可同时检测 CRP 和 PCT 的浓度, 不仅提高了检测效率, 还同时具备 CRP 检测和 PCT 检测的优点。并且本发明中量子点标记的 CRP 和 PCT 抗体的制备方法, 量子点的标记效率高, 所制备的标记抗体的稳定性高、活性高, 将其分别固定于结合垫上可提高试纸的灵敏度和准确性。



1. 一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,包括设于底板上且依次紧密相连的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,其特征在于,所述底板的中部纵向设有一防渗水胶条,所述防渗水胶条将样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫分隔为第一样品垫、第二样品垫、第一结合垫、第二结合垫、第一反应膜、第二反应膜、第一吸水垫和第二吸水垫;所述第一结合垫上固定有标记 CRP 抗体 I,所述第二结合垫上固定有标记 PCT 抗体 I,所述第一反应膜和第二反应膜均设有定量带和质控带。

2. 根据权利要求 1 所述一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,其特征在于,所述标记 CRP 抗体 I 为量子点标记的 CRP 抗体 I,所述标记 PCT 抗体 I 为量子点标记的 PCT 抗体 I;所述量子点标记的 CRP 抗体 I 与量子点标记的 PCT 抗体 I 具有不同的发射波长。

3. 根据权利要求 2 所述一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,其特征在于,所述第一反应膜上设有第一定量带和第一质控带,所述第一定量带固定有与标记 CRP 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 CRP 抗体 II,所述第一质控带固定有标记 CRP 抗体 I 的二抗。

4. 根据权利要求 3 所述一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,其特征在于,所述第二反应膜上设有第二定量带和第二质控带,所述第二定量带固定有与标记 PCT 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 PCT 抗体 II,所述第一质控带固定有标记 PCT 抗体 I 的二抗。

5. 根据权利要求 4 所述一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,其特征在于,所述定量带和质控带的间距为 3-5mm。

6. 根据权利要求 5 所述一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,其特征在于,所述底板为黑色底板。

7. 根据权利要求 6 所述一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,其特征在于,所述试纸具有一个双插槽塑料卡,所述底板设于双插槽塑料卡内。

8. 一种如权利要求 1-6 任一项所述 CRP/PCT 联合诊断试纸的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、将具有不同发射波长的量子点标记的 CRP 抗体 I 溶液和量子点标记的 PCT 抗体 I 溶液分别喷涂于第一结合垫和第二结合垫上并在室温下晾干,于 4℃ 下保存,备用;

所述量子点标记的 CRP 抗体 I /PCT 抗体 I 溶液为每 100mL, 1.5-2.5mg/mL 的量子点标记的 CRP 抗体 I /PCT 抗体 I 中分别加入 2-5g 蔗糖、0.5-1g BSA、0.05-0.1g Tween 的溶液;

b、用标记 CRP 抗体 I 的二抗溶液在第一反应膜上画线并吹干形成第一质控线,用与标记 CRP 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 CRP 抗体 II 溶液在第一反应膜上画线并吹干形成第一定量线;用标记 PCT 抗体 I 的二抗溶液在第二反应膜上画线并吹干形成第二质控线,用与标记 PCT 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 PCT 抗体 II 溶液在第二反应膜上画线并吹干形成第二定量线;备用;

c、将第一样品垫、第一结合垫、第一反应膜和第一吸水垫依次固定在防渗水胶条一侧的底板上并使之紧密搭接;将第二样品垫、第二结合垫、第二反应膜和第二吸水垫依次固定在防渗水胶条另一侧的底板上并使之紧密搭接;得 CRP/PCT 测试条。

9. 根据权利要求 8 所述 CRP/PCT 联合诊断试纸的制备方法,其特征在于,将步骤 c 所得 CRP/PCT 测试条插入双插槽塑料卡内。

10. 根据权利要求 8 所述 CRP/PCT 联合诊断试纸的制备方法,其特征在于,所述量子点标记的 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 由以下步骤制备:

a、用 pH=7.2-7.5 的磷酸盐缓冲液清洗羧基水溶性量子点,然后向其中加入 EDC 和 NHS,所述 EDC、NHS 和量子点的摩尔比为 20000-25000 :5000:1,混合均匀后在 23-25℃ 下反应 50-70min 得活化量子点;用 pH=8.3-8.5 的硼酸盐缓冲液清洗活化量子点至 EDC、NHS 和磷酸盐缓冲液除去,用 pH=8.3-8.5 硼酸盐缓冲液保存活化量子点,备用;

b、将经 pH=8.3-8.5 的硼酸盐缓冲液清洗后的 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 与步骤 a 所得活化量子点溶液混合均匀,所述活化量子点与 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 的摩尔比为 1:8-10,在 23-25℃ 下反应 5-7h 得反应液;反应液经排阻层析得量子点标记的 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 溶液。

## 一种 CRP/PCT 联合诊断试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学检测技术领域,尤其涉及一种 CRP/PCT 联合诊断试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 在急诊治疗和重症监护过程中,快速而准确的评估细菌脓毒症严重程度是医师必须面临的挑战。C-反应蛋白(C-reactive protein,CRP)和降钙素原(Procalcitonin,PCT)的引入,为早期感染诊断和治疗反应评估提供了有效的方法。荧光免疫层析是一种建立在荧光层析技术和抗原-抗体特异性免疫反应基础上的一种免疫检测技术,荧光免疫层析试纸一般包括依次设于底板上且紧密搭接的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,底板设于塑料卡内,塑料卡上设有分别与样品垫和反应膜配合的加样孔和显示窗口。

[0003] CRP 是由肝脏合成的一种能与肺炎链球菌 C 多糖体反应形成复合物的一种急性时相反应蛋白。它由 5 个相同的亚基单位以非共价方式联结。CRP 不仅对感染性疾病、妊娠期糖尿病的病程检测及预后判断评估、抗生素疗效等具有重要的临床应用前景,同时也是心血管疾病最重要的预测因子之一。正常人血清中 CRP 含量极微。一般新生儿血清 CRP 水平小于 2mg/L,大于此值即与细菌感染的严重程度有关;儿童和成人血清 CRP 水平小于 10mg/L;10-99mg/L 提示局灶性或浅表性感染,大于或等于 100mg/L 提示败血症或侵袭性感染等严重感染。CRP 在感染发生后 6-8h 开始升高,24-48h 达到高峰,比正常值高几百倍甚至上千倍,升高幅度与感染的程度呈正相关。在疾病治愈后其含量急速下降,一周内可恢复正常。临床上 CRP 一般作为鉴别细菌或病毒感染的一个首选指标,用于自身免疫性及感染性疾病的诊断和监测,以及抗生素疗效观察等。低水平的 CRP,又称超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)。在心血管疾病的诊断中,hs-CRP 被认为是心血管炎症病变的生物标志物。在无炎症或感染条件下(代谢稳定下),通常认为:hs-CRP < 1mg/L 时为低危险性;1-3mg/L 为中度危险;大于 3mg/L 为高危险性。

[0004] PCT 是降钙素的前驱物质。正常情况下,降钙素在受到荷尔蒙刺激后仅由甲状腺的 C 细胞分泌,其浓度通常小于 0.1ng/mL。而在促炎症刺激下,特别是在受到细菌感染时,PCT 由大量各类细胞产生。当 PCT 浓度在 0.1-0.25ng/mL 时,不太可能感染细菌;0.25-0.5ng/mL 时可能感染细菌;大于 0.5ng/mL 时非常可能感染细菌,需要使用抗生素治疗。

[0005] PCT 与 CRP 相比,在感染刺激下的 3-6 小时内即可观察到 PCT 不断上升,随着感性的加重 PCT 不断升高。此外,CRP 在病毒和细菌性疾病中均能出现,而 PCT 只有在细菌性感染的疾病中才能出现。因此,PCT 作为诊断指标具有快速和特异性强等特点。而联合应用 CRP 和 PCT,将能更为准确的判断炎症的感染程度。在评估心血管疾病的危险程度时,为了避免个体间的差异,hs-CRP 的检测通常应排除炎症感染。因此,CRP 和 PCT 的联合将非常重要。因此,PCT 和 CRP 的联合应用,将比二者单独使用时应用范围更广,更便捷,诊断结果也更为准确。

[0006] 量子点是一种由一定数量的实际原子组成的聚集体,三维尺寸均小于 100nm 的半

导体化合物。它具有发光强度高、激发光谱宽、发射光谱窄、荧光寿命长、表面修饰多功能化和稳定性好等众多优点,在荧光检测领域具有取代传统有机荧光染料的潜力,已成为新一代生物荧光标记物。

## 发明内容

[0007] 本发明解决的技术问题是基于 CRP 与 PCT 联合诊断的优势,以及量子点的荧光特性,提供一种灵敏度高、快速、准确的 PCT/CRP 联合诊断试纸。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种 CRP/PCT 联合诊断试纸,包括设于底板上且依次紧密相连的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,所述底板设于塑料卡内,所述底板的中部纵向设有一防渗水胶条,所述防渗水胶条将样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫分隔为第一样品垫、第二样品垫、第一结合垫、第二结合垫、第一反应膜、第二反应膜、第一吸水垫和第二吸水垫;所述第一结合垫上固定有标记 CRP 抗体 I,所述第二结合垫上固定有标记 PCT 抗体 I,所述第一反应膜和第二反应膜均设有定量带和质控带。

[0010] 所述标记 CRP 抗体 I 为量子点标记的 CRP 抗体 I,所述标记 PCT 抗体 I 为量子点标记的 PCT 抗体 I。所述量子点标记的 CRP 抗体 I 与量子点标记的 PCT 抗体 I 具有不同的发射波长。

[0011] 所述第一反应膜上设有第一定量带和第一质控带,所述第一定量带固定有与标记 CRP 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 CRP 抗体 II,所述第一质控带固定有标记 CRP 抗体 I 的二抗。

[0012] 所述第二反应膜上设有第二定量带和第二质控带,所述第二定量带固定有与标记 PCT 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 PCT 抗体 II,所述第一质控带固定有标记 PCT 抗体 I 的二抗。

[0013] 所述定量带和质控带的间距为 3-5mm。

[0014] 所述底板为黑色底板。

[0015] 所述样品垫为玻璃层析膜。

[0016] 所述试纸具有一个双插槽塑料卡,所述底板设于双插槽塑料卡内。

[0017] 所述双插槽塑料卡上设有两个并列的加样孔和两个并列的显示窗口。

[0018] 以上所述 CRP/PCT 联合诊断试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 将具有不同发射波长的量子点标记的 CRP 抗体 I 溶液和量子点标记的 PCT 抗体 I 溶液分别喷涂于第一结合垫和第二结合垫上并在室温下晾干,于 4℃ 下保存,备用。

[0020] 所述量子点标记的 CRP 抗体 I /PCT 抗体 I 溶液为每 100mL, 1.5-2.5mg/mL 的量子点标记的 CRP 抗体 I /PCT 抗体 I 中分别加入 2-5g 蔗糖、0.5-1g BSA、0.05-0.1g Tween 的溶液。

[0021] (2) 用标记 CRP 抗体 I 的二抗溶液在第一反应膜上画线并吹干形成第一质控线,用与标记 CRP 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 CRP 抗体 II 溶液在第一反应膜上画线并吹干形成第一定量线;用标记 PCT 抗体 I 的二抗溶液在第二反应膜上画线并吹干形成第二质控线,用与标记 PCT 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 PCT 抗体 II 溶液在第二反应膜上画线并吹干形成第二定量线;备用。

[0022] (3) 将第一样品垫、第一结合垫、第一反应膜和第一吸水垫依次固定在防渗水胶条一侧的底板上并使之紧密搭接;将第二样品垫、第二结合垫、第二反应膜和第二吸水垫依次固定在防渗水胶条另一侧的底板上并使之紧密搭接;得 CRP/PCT 测试条。

[0023] 所述步骤 c 所得 CRP/PCT 测试条插入双插槽塑料卡内。

[0024] 所述量子点标记的 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 由以下步骤制备:

[0025] (1) 清洗量子点:用 pH=7.2-7.5 的磷酸盐缓冲液清洗量子点至保存量子点的原缓冲液除去,用 pH=7.2-7.5 的磷酸盐缓冲液保存量子点并超滤浓缩。

[0026] 所述 pH=7.2-7.5 的磷酸盐缓冲液的浓度为 10mmol/L。

[0027] 所述超滤浓缩为在 20-25℃ 和 5000-7000r/min 的条件下,用 100K 的超滤管离心 6-8min。

[0028] 所述量子点为羧基水溶性量子点;所述羧基水溶性量子点为核壳型量子点或单一化合物形成的量子点。

[0029] 所述核壳型量子点为 ZnS/CdSe 或 ZnS/CdTe 形成的量子点。

[0030] 所述单一化合物为以下化合物中的任一种:第 IIIA 族元素和第 VA 族元素形成的化合物、第 IIA 族元素和第 VIA 族元素形成的化合物、第 IIB 族元素和第 VIA 族元素形成的化合物、第 IVA 族元素和第 IVA 族元素组成的化合物、第 IVA 族元素和第 VIA 族元素组成的化合物。具体地,所述单一化合物为 GaSb、InAs、InP、InGaAs、InAlAs、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、SiC、SiGe、SiSe、SiTe 和 SiS 中的任一种。

[0031] (2) 活化:按比例分别称取 EDC(1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)和 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),并将 EDC 和 NHS 直接加入步骤(1)所得的量子点溶液中,用振荡器混合 5-8 次后在 23-25℃ 下反应 50-70min,得活化量子点;所述 EDC、NHS 和量子点的摩尔比为(20000-25000):5000:1。优选地,EDC、NHS 和量子点的摩尔比为 25000:5000:1。优选地,在 0-4℃ 且空气湿度小于或等于 30% 的条件下称取 EDC 和 NHS,并将其迅速加入反应液中。更优选地,在 0-4℃ 的冰盒中称取 EDC 和 NHS。

[0032] (3) 二次清洗量子点:用 pH=8.3-8.5 的硼酸盐缓冲液清洗步骤(2)所得活化量子点至 EDC、NHS 和磷酸盐缓冲液除去,用 pH=8.3-8.5 硼酸盐缓冲液保存活化量子点并超滤浓缩,备用。

[0033] 所述 pH=8.5 的硼酸盐缓冲液的浓度为 50mmol/L;所述超滤浓缩为在 20-25℃ 和 5000-7000r/min 的条件下,用 100K 的超滤管离心 6-8min。

[0034] (4) 清洗抗体:用 pH=8.3-8.5 的硼酸盐缓冲液清洗 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 并超滤浓缩除去抗体原保存液中的  $\text{NaN}_3$ ,用 pH=8.3-8.5 硼酸盐缓冲液保存 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I,备用。

[0035] 所述 pH=8.3-8.5 的硼酸盐缓冲液的浓度为 50mmol/L;所述超滤浓缩为在 1-4℃ 和 3000-5000r/min 的条件下,用 50K 的超滤管离心 8-10min。

[0036] (5) 偶联:将步骤(3)所得活化量子点溶液与步骤(4)所得 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 溶液混合均匀,在 23-25℃ 及不断摇动下反应 5-7h,得 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I-量子点偶联物反应液;活化量子点与 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 的摩尔比为 1:8-10。优选地,活化量子点与 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 的摩尔比为 1:10,活化量子点的浓度为  $0.8 \mu\text{mol/L}$ 。

[0037] (6)分离:通过排阻层析分离步骤(5)的反应液得 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I - 量子点偶联物溶液和 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 回收液;CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I - 量子点偶联物溶液经超滤浓缩后加入封闭液并在 4℃ 下保存;CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 回收液经超滤浓缩后回收再利用。排阻层析中使用的排阻层析柱的填料为 superdex200 或 Sephacryl300, 流速为 1.5ml/min, 柱长为 40-60cm。所述封闭液为 Gly 封闭液, Gly 的浓度为 1mg/mL, 溶剂为 50mmol/L、pH=8.3-8.5 的硼酸盐缓冲液。

[0038] 向步骤(6)中浓缩后的 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I - 量子点偶联物溶液中加入  $\text{NaN}_3$ , 使蛋白-量子点偶联物溶液中  $\text{NaN}_3$  的浓度为 0.01-0.05mg/mL, 以使蛋白-量子点偶联物溶液可长期保存。

[0039] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明将 CRP 检测和 PCT 检测整合于同一检测试纸中,可同时检测 CRP 和 PCT 的浓度,不仅提高了检测效率,还同时具备 CRP 检测和 PCT 检测的优点。在结合垫上固定量子点标记的抗体,利用量子点优越的荧光特性,提高试纸的灵敏度和准确度。并且本发明制备量子点标记的 CRP 抗体 I 或 PCT 抗体 I 的方法,量子点的标记效率高,所制备的标记抗体的稳定性高、活性高,从而进一步提高试纸的灵敏度和准确性。

#### 附图说明

[0040] 图 1 为未设双插槽塑料卡的 PCT/CRP 联合诊断试纸的结构示意图;

[0041] 图 2 为设有双插槽塑料卡的 PCT/CRP 联合诊断试纸的结构示意图;

[0042] 图 3 为毛细管电泳鉴定实施例 1 和实施例 2 的量子点标记效率;

[0043] 图 4 为实施例 2 制备的 PCT-QDs 放置不同时间后的荧光光谱图。

#### 具体实施方式

[0044] 为了更充分理解本发明的技术内容,下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步介绍和说明。

[0045] 实施例 1

[0046] 量子点标记的 CRP 抗体 I 和 PCT 抗体 I 的制备:

[0047] 选取发射波长为 525nm 的羧基水溶性量子点 CdTe/Zn 进行 CRP 抗体 I 的标记,记为 CdTe/Zn-525;选取发射波长 650nm 的量子点 CdTe/Zn 进行 PCT 抗体 I 的标记,记为 CdTe/Zn-650。

[0048] 取 10  $\mu\text{L}$ , 8  $\mu\text{mol/mL}$  的 CdTe/Zn-525 和 10  $\mu\text{L}$ , 8  $\mu\text{mol/mL}$  的 CdTe/Zn-650 分别置于 10  $\mu\text{L}$  的 EP (eppendorf) 管中,并分别加入 2mL, 10mmol/L, pH=7.2 的磷酸盐缓冲液,混合均匀后分别用 100K 超滤管在 5000r/min, 25℃ 下离心 6min, 分别回收 CdTe/Zn-525 和 CdTe/Zn-650 于 EP 管中。重复以上步骤三次,并最后使量子点溶液的体积不超过 50  $\mu\text{L}$ 。用微量 pH 计检量子点溶液的 pH 并调节 pH 值至 7.3。在湿度不超过 30% 及 0-4℃ 的冰盒中分别称取 2mmolEDC 和 0.5mmolNHS 两份并分别迅速加入两种量子点溶液中,涡旋振荡器震荡均匀后分别置摇床上反应 60min, 反应温度为 24℃, 分别得活化 CdTe/Zn-525 和活化 CdTe/Zn-650。反应结束后向两活化量子点中分别加入 2mL, 50mmol/L, pH=8.5 的硼酸盐缓冲液,混匀后分别用 100K 超滤管在 5000r/min, 25℃ 条件下离心 6min, 分别回收活化量子点于 EP

管中。重复以上步骤三次,最后使两活化量子点溶液的体积分别不超过 200  $\mu$  L。用微量 pH 计检测活化量子点溶液的 pH 并调节 pH 值至 8.5。

[0049] 取 0.8  $\mu$  mol CRP 抗体 I 和 0.8  $\mu$  mol PCT 抗体 I 分别置于不同 EP 管中,并分别加入 2 mL, 50 mmol/L, pH=8.5 硼酸盐缓冲液,混匀后用 50K 超滤管在 3000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min; 重复以上步骤三次,最后使 CRP 抗体 I 溶液和 PCT 抗体 I 溶液体积不超过 50  $\mu$  L。用微量 pH 计检测抗体溶液的 pH 并调节 pH 值至 8.5。

[0050] 将 CdTe/Zn-525 溶液与 CRP 抗体 I 溶液混合, CdTe/Zn-650 溶液与 PCT 抗体 I 溶液混合,混匀后分别在摇床上反应 6 h, 反应温度 23-25 $^{\circ}$ C, 得 CRP 抗体 I -CdTe/Zn-525 复合物反应液和 PCT 抗体 I -CdTe/Zn-650 复合物反应液。用毛细管电泳检测 CdTe/Zn-650 与 PCT 抗体 I 的偶联情况,检测结果如图 3 所示,相对 PCT 抗体 I -CdTe/Zn-650 复合物的峰面积,量子点(QDs)的峰面积很小,即量子点的标记效率很高。

[0051] 分别用排阻层析分离两种反应液得 CRP 抗体 I -CdTe/Zn-525 复合物和 PCT 抗体 I -CdTe/Zn-650 复合物,并用 100K 超滤管将复合物浓缩到 200  $\mu$  L 以内,检测复合物的浓度后加入 Gly (甘氨酸)浓度为 1 mg/mL 的 Gly 封闭液,并置于 4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

[0052] 排阻层析柱的填料为 superdex200,流速为 1.5 mL/min,凝胶长 40 cm。

[0053] 结合垫:

[0054] 第一结合垫喷涂液为每 100 mL, 1.5-2.5 mg/mL 的量子点标记的 CRP 抗体 I 中分别加入 2-5 g 蔗糖、0.5-1 g BSA、0.05-0.1 g Tween 的溶液;第二结合垫喷涂液为每 100 mL, 1.5-2.5 mg/mL 的量子点标记的 PCT 抗体 I 中分别加入 2-5 g 蔗糖、0.5-1 g BSA、0.05-0.1 g Tween 的溶液。

[0055] 将第一结合垫喷涂液均匀喷涂于第一结合垫 21 上,将第二结合垫喷涂液均匀喷涂于第二结合垫 22 上,室温晾干,置于 4 $^{\circ}$ C 保持,备用。

[0056] 反应膜:

[0057] 用标记 CRP 抗体 I 的二抗溶液在第一反应膜上画线并吹干形成第一质控线,用与标记 CRP 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 CRP 抗体 II 溶液在第一反应膜上画线并吹干形成第一定量线;用标记 PCT 抗体 I 的二抗溶液在第二反应膜上画线并吹干形成第二质控线,用与标记 PCT 抗体 I 具有不同抗原结合位点的 PCT 抗体 II 溶液在第二反应膜上画线并吹干形成第二定量线;备用。

[0058] 标记 CRP 抗体 I 的二抗溶液的浓度为 1.2 mg/ml; CRP 抗体 II 溶液的浓度为 0.8 mg/ml; 标记 PCT 抗体 I 的二抗溶液的浓度为 1.2 mg/ml; PCT 抗体 II 溶液的浓度为 1.5 mg/ml。

[0059] PCT/CRP 联合诊断试纸的组装:

[0060] 参照图 1 和图 2,试纸的底板为黑色底板,并且在底板的中部纵向设置一条防渗水胶条 5,防渗水胶条 5 将底板分为左右两半。第一样品垫 11 和第二样品垫 12 为玻璃层析膜。将第一样品垫 11、第一结合垫 21、第一反应膜 31 和第一吸水垫 41 依次设于底板的一半并紧密搭接,将第二样品垫 12、第二结合垫 22、第二反应膜 32 和第二吸水垫 42 依次设于底板的另一半并紧密搭接。将固定了样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫的底板插入双插槽塑料卡内。双插槽塑料卡 6 上设有两个并列的加样孔 62 和两个并列的显示窗口 61。两加样孔 62 分别位于第一样品垫 11 和第二样品垫 12 的上方,通过加样孔 62 把样品滴至样品垫上。两显示窗口 61 分别位于第一反应膜 31 和第二反应膜 32 的上方,通过显示窗口 61 分



别观察和测量第一质控带 312、第二质控带 322、第一定量带 311 和第二定量带 321 的检测情况。

[0061] PCT/CRP 联合诊断试纸的使用：

[0062] 分别向第一反应膜 31 和第二反应膜 32 上滴加 20  $\mu$  L 检测用缓冲液，并层析反应 20s。然后将 90  $\mu$  L 全血或血清样品分别滴加于第一样品垫 11 和第二样品垫 12 上，并层析反应 8min。将反应后的试纸置于 365nm 紫外灯下观察反应膜上质控带的情况，若条带清晰则将试纸置于紫外荧光定量仪中获取定量带和质控带的荧光强度，校正后根据已制作的标准曲线进行定量操作。输出检测报告，并根据 CRP 和 PCT 的值进行临床综合判断。

[0063] 所述检测用缓冲液为 pH=7.4 且含 1wt%BSA 和 0.05%Tween20 的 PBS 缓冲液。

[0064] 实施例 2

[0065] 本实施例与实施例 1 的不同之处为：制备量子点标记的 PCT 抗体 I 的工艺参数不同。

[0066] 取 10  $\mu$  L 8  $\mu$  mol/mL 的 CdTe/ZnS-650 于 EP 管中，并向 EP 管中加入 2mL10mmol/L, pH=7.2 磷酸盐缓冲液，混匀后用 100K 超滤管在 5000r/min, 25 $^{\circ}$ C 条件下离心 6min，回收量子点于 EP 管中。重复以上步骤三次，并使最后一次 CdTe/ZnS-650 溶液的体积不超过 50  $\mu$  L。用微量 pH 计检测量子点溶液的 pH 并调节 pH 值至 7.2。在湿度不超过 30% 及 0-4 $^{\circ}$ C 的冰盒中称取 2mmolEDC 和 0.5mmolNHS 并迅速加入 CdTe/ZnS-650 溶液中，用涡旋振荡器震荡均匀后置于摇床上反应 50min，反应温度为 23 $^{\circ}$ C，得活化 CdTe/ZnS-650 溶液。向活化 CdTe/ZnS-650 溶液中加入 2mL50mmol/L、pH=8.3 的硼酸盐缓冲液，混匀后用 100K 超滤管在 5000r/min、20 $^{\circ}$ C 条件下离心 6min，回收量子点于 EP 管中。重复以上步骤三次，使最后一次活化 CdTe/ZnS-650 溶液的体积不超过 200  $\mu$  L。用微量 pH 计检测活化 CdTe/ZnS-650 溶液的 pH 并调节 pH 值至 8.3。

[0067] 取 0.8  $\mu$  mol 的 PCT 抗体 I 于 EP 管中，加入 2mL50mmol/L、pH=8.3 硼酸盐缓冲液，混匀后用 50K 超滤管在 3000r/min、1 $^{\circ}$ C 条件下离心 8min。重复以上步骤三次，使最后一次 PCT 抗体溶液总体积不超过 50  $\mu$  L。用微量 pH 计检测 PCT 抗体溶液的 pH 并调节 pH 值至 8.3。

[0068] 将活化 CdTe/ZnS-650 溶液与 PCT 抗体 I 溶液混合，混匀后置于摇床上反应 5h，反应温度 23 $^{\circ}$ C，得 PCT 抗体 I -CdTe/ZnS-650 反应液。用毛细管电泳检测量子点和 PCT 抗体 I 的偶联情况，如图 3 所示。

[0069] 通过排阻层析分离反应液得 PCT 抗体 I -CdTe/Zn-650 复合物，并用 100K 超滤管将 PCT 抗体 I -CdTe/Zn-650 复合物浓缩到 200  $\mu$  L 以内，测复合物浓度后加入 Gly（甘氨酸）浓度为 1mg/mL 的 Gly 封闭液，并置于 4 $^{\circ}$ C 保存，备用。

[0070] 用荧光分光光度计分别检测本实施例制备的纯化后 PCT 抗体 I -CdTe/Zn-650 复合物放置 5min、1h、24h、3d、10d 和 30d 时的荧光光谱，检测结果如图 4 所示。图中 1 为 QDs 的曲线；2 为 QDs-PCT, 5min 的曲线；3 为 QDs-PCT, 1h 的曲线；4 为 QDs-PCT, 3h 的曲线；5 为 QDs-PCT, 10d 的曲线；6 为 QDs-PCT, 30d 的曲线。放置不同时间段的 PCT-QDs 的荧光轻度峰值有降低的趋势，但变化很慢，表明所得 PCT-QDs 比较稳定。

[0071] 以上所述仅以实施例来进一步说明本发明的技术内容，以便于读者更容易理解，但不代表本发明的实施方式仅限于此，任何依本发明所做的技术延伸或再创造，均受本发明的保护。

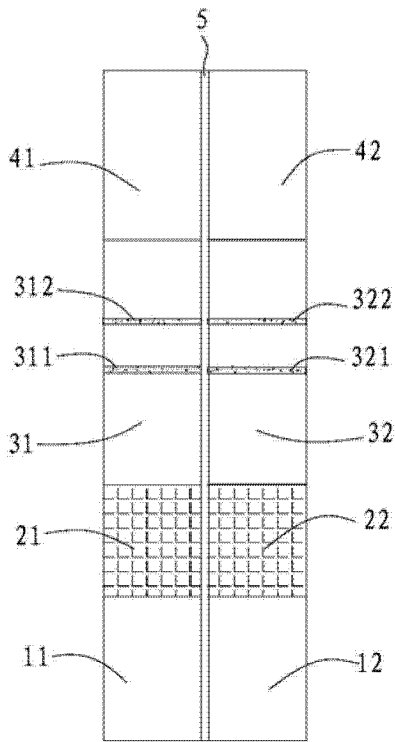


图 1

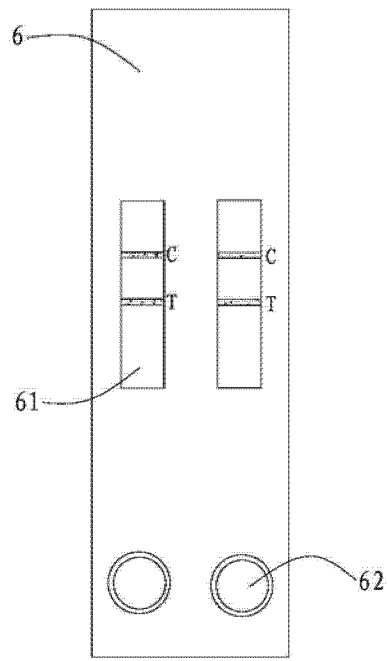


图 2

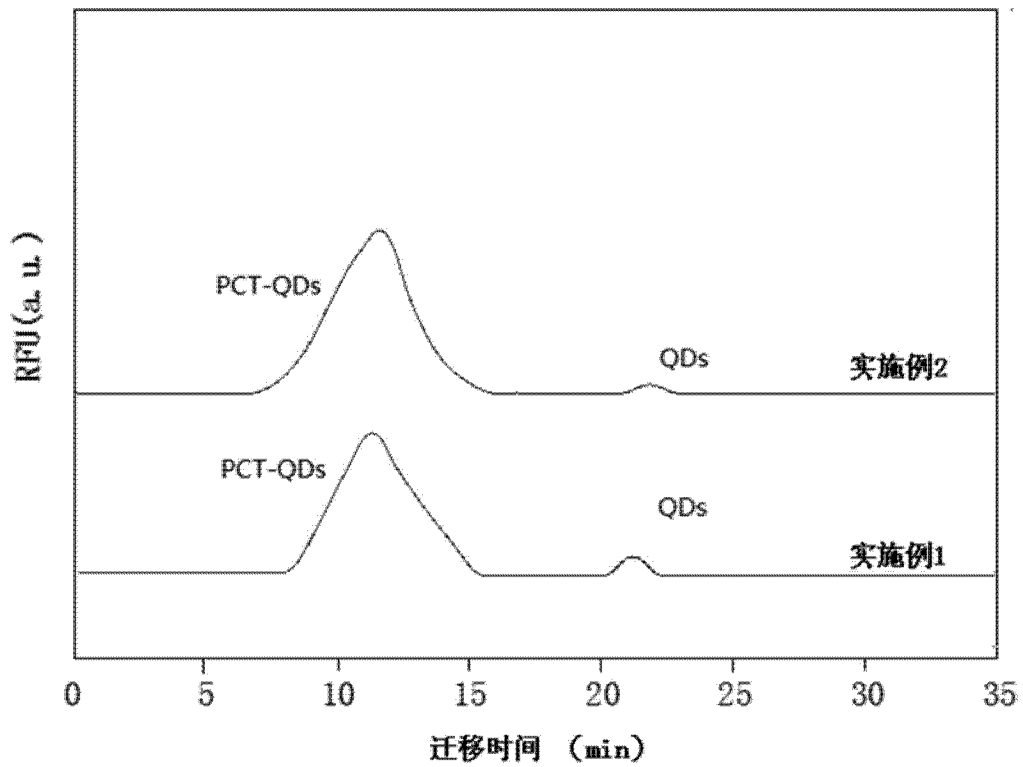


图 3

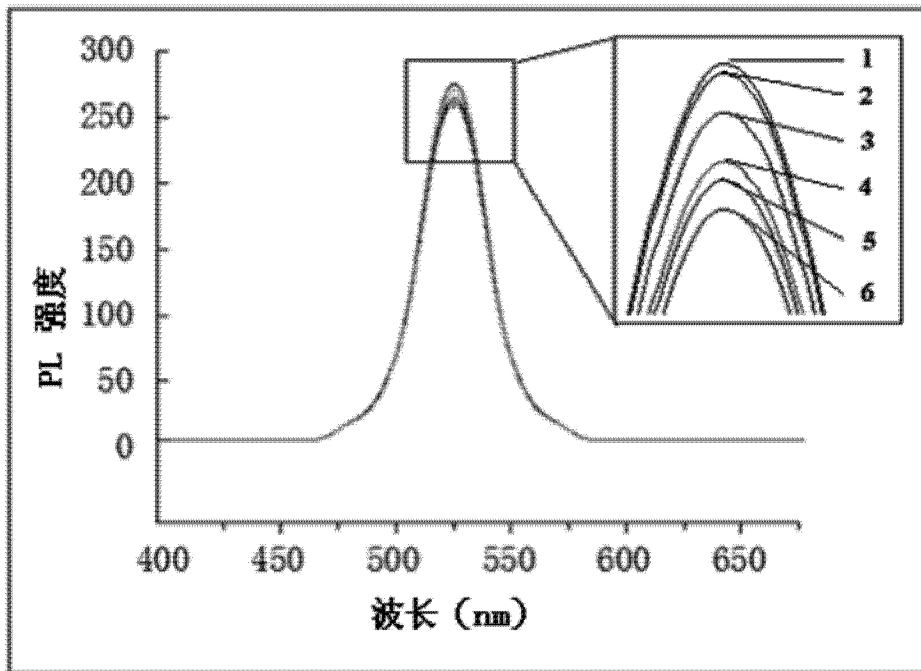


图 4