



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102023211 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201010550610. 0

页,附图 1, 2.

(22) 申请日 2010. 11. 19

CN 101017168 A, 2007. 08. 15, 说明书第 1-2, 6-8 页 .

(73) 专利权人 广州万孚生物技术股份有限公司  
地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城荔  
枝山路 8 号

CN 1342902 A, 2002. 04. 03, 全文 .

审查员 许珊萍

(72) 发明人 王继华

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理  
有限公司 44224

代理人 万志香 曾旻辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 201096787 Y, 2008. 08. 06, 说明书第 1-2

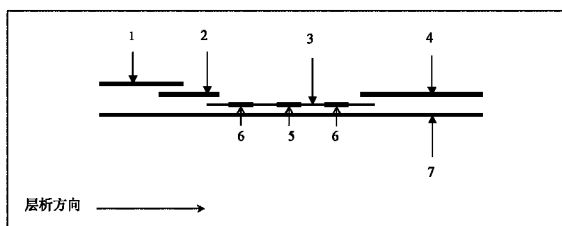
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条,所述试纸条由样品垫、标记垫、包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,所述标记垫上包被有荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体和荧光胶乳微粒标记的兔 IgG ;所述包被膜包括检测区和质控区,所述检测区包被有与所述荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体处于不同表位的另一种 CRP 单克隆抗体。本发明的 C 反应蛋白免疫层析试纸条可以达到仅 10 秒就能对全程 CRP 进行灵敏的定量测定,更快更精确的诊断疾病和鉴别感染,能检测感染病情和确定抗生素的疗效;全程 CRP 能同时检测出具 hs-CRP 和常规 CRP 两个结果,且有全面的线性范围和良好的检测灵敏度,需要的样品量少,操作非常简便。



1. 一种全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条,所述试纸条由样品垫 (1)、标记垫 (2)、包被膜 (3)、吸水纸 (4) 顺次搭接粘贴在底板上构成,其特征在于,所述标记垫 (2) 上包被有荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体和荧光胶乳微粒标记的兔 IgG;所述包被膜 (3) 包括检测区 (5) 和质控区 (6),所述检测区 (5) 包被有与所述荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体处于不同表位的另一种 CRP 单克隆抗体;所述包被膜上的质控区包括包被抗人 IgG 的 C1 线和包被抗兔 IgG 的 C2 线;所述抗人 IgG 的浓度为 0.8mg/ml,抗兔 IgG 的浓度为 1.0mg/ml,抗人 IgG 和抗兔 IgG 的用量按膜包被液量分别为  $20\mu\text{l}/34\text{cm}$  和  $20\mu\text{l}/27\text{cm}$ ;所述荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体的浓度为 1.0mg/ml,在试纸条上的用量为  $0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;所述荧光胶乳微粒标记的兔 IgG 的浓度为 1.0mg/ml,在试纸条上的用量为  $0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;所述检测区包被的 CRP 单克隆抗体的浓度为 1.0mg/ml,用量按膜包被液量为  $20\mu\text{l}/30\text{cm}$ ;所述荧光胶乳微粒的直径为 300nm;所述荧光胶乳微粒的激发光波长为 470nm,所述荧光胶乳微粒受激发后发射的波长为 525nm。

2. 一种权利要求 1 所述的全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A. 荧光胶乳的共价活化

超声波处理荧光胶乳微球体 30 秒后,调节荧光胶乳微球体浓度为  $1.0\times 10^{12}\sim 1.0\times 10^{13}/\text{ml}$ , $10000\sim 15000\text{xg}$  离心 10 分钟,沉淀物用蒸馏水或 100mM pH6.0 磷酸钠溶液溶解,并超声波 200W 处理 30 秒;先加入  $50\mu\text{l}$  的 100mg/ml 碳二亚胺,混匀,再加入  $50\mu\text{l}$  的 50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,混匀;室温孵育 30 分钟后  $10000\sim 15000\text{xg}$ 、离心 5~15 分钟,沉淀用 100mM、pH5.0~6.0 的柠檬酸缓冲液溶解,放置于 2~8℃ 条件下备用;

B. 荧光胶乳微粒标记蛋白的制备

将上述活化后的荧光胶乳超声波 200W 处理 30 秒后,按照  $50\mu\text{g}$  蛋白/ $100\mu\text{l}$  荧光胶乳的比例分别加入 CRP 单克隆抗体和兔 IgG,混匀后室温搅拌反应 2 小时,离心洗涤 3 次,每次  $10000\sim 15000\text{xg}$ 、离心 10 分钟,沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 秒,用 PBS-TBN 恢复离心前体积调节至浓度为 1mg/ml,按  $0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$  的用量涂覆在标记垫上;

C. 包被膜的制备

分别将另一种 CRP 单克隆抗体和抗兔 IgG 用包被缓冲液调节至浓度为 1.0mg/ml,将抗人 IgG 用包被缓冲液调节至浓度为 0.8mg/ml,将 CRP 单克隆抗体喷到包被膜 (3) 上的检测区,将抗兔 IgG 和抗人 IgG 喷到包被膜 (3) 上的质控区,所述 CRP 单克隆抗体、抗兔 IgG 和抗人 IgG 的用量按膜包被液量分别为  $20\mu\text{l}/30\text{cm}$ 、 $20\mu\text{l}/27\text{cm}$ 、 $20\mu\text{l}/34\text{cm}$ ,检测区和质控区间隔 5mm,在湿度 < 30% 的室温下凉干 24 小时,封袋,备用;

D. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫 (1)、标记垫 (2)、包被膜 (3) 和吸水纸 (4) 得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

## 一种全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,尤其涉及一种全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP),1930 年 Tillet 和 Francis 在急性大叶性肺炎患者血清中发现能在钙离子存在时与肺炎球菌 C 多糖起沉淀反应而得名,是人类重要的急性期反应蛋白,急性期浓度可升高上千倍,循环中的 CRP 半衰期为 19 小时。

[0003] C 反应蛋白可以和肺炎链球菌的荚膜 C 多糖结合,是机体受到微生物入侵或组织损伤等刺激时肝细胞合成时的急性时相蛋白,当发生炎症疾病或者组织发生溃烂或者坏死时,会在血液中急速升高,但随着组织结构和功能的复原,其含量也恢复正常。因此,高浓度的 CRP 测定在诊断细菌感染、癌症等疾病的严重性、进程、愈后以及治疗效果方面具有广泛的临床意义。

[0004] CRP 作为心血管疾病最强的危险指标,其水平可以预测将来心肌梗塞及中风的危险性。健康人 CRP 参考范围基本为 0.58-1.13mg/L。CRP 含量大于 2.1mg/L 的人,比较 CRP 含量小于等于 1mg/L 者,将来发生心肌梗塞的危险性为后者的 2.9 倍,发生缺血性中风的危险性为后者的 1.9 倍,发生外周动脉血管性疾病的危险性为后者的 4.1 倍。CRP 与血脂的联合测定,较其他危险因子更能预示发生心、脑血管疾病的危险性,是目前进行冠心病危险评估的最佳模型。最近研究表明,低浓度的 CRP 测定,还可以作为新生儿感染,局部感染等疾病,以及相关疾病的诊断标志物。

[0005] C 反应蛋白是细菌感染和严重组织损伤的一项诊断指标,其升高可见于:

[0006] 1. 组织损伤、感染、肿瘤、心肌梗塞及一系列急慢性炎症性疾病,如风湿性关节炎、全身性血管炎、多肌痛风湿病等。

[0007] 2. 术后感染及并发症的指标:手术后病人 CRP 升高,术后 7-10 天 CRP 水平应下降,如 CRP 不降低或再次升高,提示可能并发感染或血栓栓塞。

[0008] 3. 可作为细菌性感染和病毒性感染的鉴别诊断:大多数细菌性感染会引起患者血清 CRP 升高,而病毒性感染则多数不升高。

[0009] 4. 近年来有研究指出用超敏乳胶增强法测 CRP,提高测定的敏感性,可用于冠心病和心梗危险性的预测。

[0010] 传统的检测 CRP 的几种方法:在胶乳凝集实验法的灵敏度为 1.0mg/L,是半定量的方法,现在已经较少使用;免疫比浊法的灵敏度为 5.0mg/L,检测范围为 5 ~ 230mg/L,但是需要自动生化分析仪和自动化免疫测定仪等大型仪器,存在操作复杂耗时长,所需要标本量大等问题。化学发光法检测存在时间检测时间长,一般需要耗时 90mins 左右,需要在实验室专业操作。放射免疫测定法的灵敏度在 3 $\mu$ g/L,但是存在同位素污染等问题。

[0011] 全程定量检测 C 反应蛋白是指其测定方法比传统方法更敏感,测定范围更宽广。

临床常规测定 C 反应蛋白的方法为免疫比浊法,测定范围一般为 3 ~ 200mg/L,但其灵敏度相对较低,无法准确测定 3mg/L 以下水平的 C 反应蛋白含量,不能作为心、脑血管疾病的危险指标,预测心、脑血管疾病发生的危险性。临床高敏 C 反应蛋白的测定范围又相对较窄,无法准确测定高浓度水平下 CRP 的含量,不能用于感染性疾病的诊断或者疗效的观察。

## 发明内容

[0012] 本发明的目的在于针对现有技术中存在的不足,提供一种既可以测定低水平 CRP 含量,且灵敏度高、稳定性强、测定准确的全程 C 反应蛋白检测试纸条。

[0013] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0014] 一种全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条,由样品垫、标记垫、包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,所述标记垫上包含有荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体和荧光胶乳微粒标记的兔 IgG;所述包被膜包括检测区和质控区,所述检测区包被有与所述荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体处于不同表位的另一种 CRP 单克隆抗体。

[0015] 优选地,所述荧光胶乳微粒标记的 CRP 单克隆抗体的浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,在试纸条上的用量为 0.4 ~ 1.0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>。所述兔 IgG 的浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,在试纸条上的用量为 0.25~0.45  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>。所述检测区包被的 CRP 单克隆抗体的浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,用量按膜包被液量为 20  $\mu$ l/27~35cm。

[0016] 优选地,所述荧光胶乳微粒的直径为 0.1  $\mu$ m ~ 1  $\mu$ m。所述荧光胶乳微粒受激发后发射的波长为 180nm ~ 800nm。

[0017] 优选地,所述包被膜上的质控区包括包被抗人 IgG 的 C1 线和包被抗兔 IgG 的 C2 线。所述抗人 IgG 的浓度为 0.5 ~ 1mg/ml,抗兔 IgG 的浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,抗人 IgG 和抗兔 IgG 的用量按膜包被液量均为 20  $\mu$ l/27~35cm。

[0018] 本发明还提供了一种制备全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条的方法,采取了以下技术方案:

[0019] 包括以下步骤:

[0020] A. 荧光胶乳的共价活化

[0021] 超声波处理荧光胶乳微球体 30 秒后,调节荧光胶乳微球体浓度为  $1.0 \times 10^{12}$  ~  $1.0 \times 10^{13}$ /ml,10000 ~ 15000xg 离心 5 ~ 15 分钟,沉淀物用蒸馏水或 50 ~ 200mM pH6.0 ~ 7.0 磷酸钠溶液溶解,并超声波 200W 处理 30 秒;先加入 10 ~ 100  $\mu$ l 的 20 ~ 100mg/ml 碳二亚胺,混匀,再加入 10 ~ 100  $\mu$ l 的 20 ~ 100mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,混匀;室温孵育 20~40 分钟后 10000 ~ 15000xg、离心 5 ~ 15 分钟,沉淀用 20 ~ 100mM、pH5.0 ~ 6.0 的柠檬酸缓冲液溶解,放置于 2 ~ 8°C 条件下备用;

[0022] B. 荧光胶乳微粒标记蛋白的制备

[0023] 将上述活化后的荧光胶乳超声波 200W 处理 30 秒后,按照 1  $\mu$ g ~ 125  $\mu$ g 蛋白/100  $\mu$ l 荧光胶乳的比例分别加入 CRP 单克隆抗体和兔 IgG,混匀后室温搅拌反应 1.5~3 小时,离心洗涤 2~4 次,每次 10000 ~ 15000xg、离心 5 ~ 15 分钟,沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 秒,用 PBS-TBN 恢复离心前体积调节至浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,按 0.4 ~ 1.0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> 的用量涂覆在标记垫上;

[0024] C. 包被膜的制备

[0025] 分别将另一种 CRP 单克隆抗体和抗兔 IgG 用包被缓冲液调节至浓度为 0.5 ~ 2mg/ml, 将抗人 IgG 用包被缓冲液调节至浓度为 0.5 ~ 1mg/ml, 将 CRP 单克隆抗体喷到包被膜 (3) 上的检测区, 将抗兔 IgG 和抗人 IgG 喷到包被膜 (3) 上的质控区, 所述 CRP 单克隆抗体、抗兔 IgG 和抗人 IgG 的用量按膜包被液量均为 20  $\mu$  l/27-35cm, 检测区和质控区间隔 3-8mm, 在湿度 < 30% 的室温下凉干 12-24 小时, 封袋, 备用;

[0026] D. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、标记垫、包被膜和吸水纸得到试纸板, 按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0027] 本发明所述的 C 反应蛋白的免疫层析试纸条的检测原理是双抗体夹心法, 将直径范围 0.01  $\mu$  m ~ 1  $\mu$  m 的胶乳微球与一种 CRP 抗体和各类不同的荧光素共价结合, 利用胶乳微球大分子物质具有的羧基、氨基、羟基等基团结合 CRP 抗原的一种抗体, 利用荧光素在激发光作用下可以发射荧光, 当此荧光胶乳标记的 CRP 抗体与检测样本中足够的 CRP 抗原结合形成复合物, 该复合物在层析作用下移动至包被膜的检测区, 在包被膜的检测区包被有能与 CRP 抗原的另一种抗体, 该抗体结合在 CRP 抗原的另一表位上, 形成双抗体夹心的复合物。复合物聚积在包被膜的 T 线处, 受到光源激发释放出相应波长的发射光, 通过荧光检测系统将捕捉的光信号转化为数字信号, 从而可用于准确定量的快速免疫检测中。

[0028] 荧光胶乳标记 CRP 抗体是将直径范围在 0.01  $\mu$  m ~ 1  $\mu$  m 的胶乳微球与 CRP 抗体, 当此荧光胶乳标记的 CRP 抗体与检测样本中的相应 CRP 抗原结合后形成 CRP 抗原 - 抗体复合物, 该荧光胶乳复合物通过层析作用在包被膜的检测区 T 线处与预先包被的另一种 CRP 抗体特异性结合而大量聚积。

[0029] 利用荧光定量光谱检测系统, 由光源激发包被膜上检测区 T 线处聚积的荧光素, 荧光素发射出的荧光被相应的检测系统接收, 并通过光电变换、光电转化等过程将光电信号转化成电信号, 并由系统中设置的自动控制系统将信号输出, 显示出最终的定量结果。由于选择的荧光素的种类的不同, 其激发 / 发射光的波长  $\lambda$  以及自动控制系统也会不同。

[0030] 本发明的 C 反应蛋白免疫层析试纸条与放射性免疫、酶联免疫法检测 CRP 抗体相比, 具有操作安全 (无放射物污染)、简便 (简单操作一步完成)、适合单人份检测和快速 (3 分钟左右即可有结果) 等优点; 与免疫胶体金标记试纸条相比, 本发明具有灵敏度更高、准确定量、多指标检测 (不同波段的荧光胶乳标记应用于多指标同步定量检测)、标记稳定性更好等优点。

[0031] 本发明的 C 反应蛋白免疫层析试纸条可以达到仅 10 秒就能对全程 CRP 进行灵敏的定量测定, 更快更精确的诊断疾病和鉴别感染, 能检测感染病情和确定抗生素的疗效; 全程 CRP 能同时检测出具 hs-CRP 和常规 CRP 两个结果, 且有全面的线性范围 (0.5-200mg/L) 和良好的检测灵敏度 (Pg/ML 级), 需要的样品量少, 操作非常简便。

#### 附图说明

[0032] 图 1 为本发明的全程定量检测 CRP 免疫层析试纸条的结构示意图;

[0033] 附图标记: 1、样品垫; 2、标记垫; 3、包被膜; 4、吸水纸; 5、检测区; 6、质控区; 7、底板。

#### 具体实施方式

[0034] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0035] 实施例 1

[0036] 在本发明实施例中,所采用的 CRP 抗体为常规单克隆抗体技术制备的单抗,利用双抗体夹心法检测 CRP 抗原的原理检测标本。

[0037] 如图 1 所示,在该实施例中,全程定量检测 CRP 免疫层析试纸条,包括远端和近端,样品垫 1 位于试纸条的近端,它含有一个亲水性的孔状隔膜,样品垫 1 是加样区,用于吸取待检测 CRP 检测样本。样品垫 1 与远端之间,依次搭接有玻璃纤维素膜材质的标记垫 2、硝酸纤维素膜材质的包被膜 3 和吸水纸 4。样品垫 1、标记垫 2、包被膜 3 和吸水纸 4 都设置在底板 7 上。

[0038] 在该实施例中,标记垫 2 上是使用特定的激发光 (470nm)/ 发射光 (525nm) 波长的荧光胶乳 (直径约 300nm) 标记 1 株 CRP 单克隆抗体和兔 IgG ;包被膜 3 的检测区 T 线处采用 CRP 的另一株单克隆抗体 (0.5 ~ 2mg/ml) 来包被。在包被膜 3 的质控区 C1 线处使用浓度为 0.5 ~ 1mg/ml 的抗人 IgG 进行包被,用于中和血清中的非特异性人 IgG,起到过滤的作用,防止血清中的非特异性人 IgG 对质控 C1、C2 线、T 线处反应的影响,C2 线包被有抗兔 IgG,浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,用于结合荧光胶乳标记的兔 IgG,用于检测试纸条的有效性,CRP 单克隆抗体、抗兔 IgG 和抗人 IgG 的用量按膜包被液量均为 20  $\mu$  l/27-35cm。

[0039] 在该实施例中,全程定量检测 C 反应蛋白的免疫层析试纸条的制备包括以下步骤:

[0040] 1. 荧光胶乳的共价活化

[0041] 超声波处理胶乳微球体 30 秒后,调节胶乳微球体浓度为  $1.0 \times 10^{12} \sim 1.0 \times 10^{13}$ /ml, 10000 ~ 15000xg 离心 10 分钟,离心后收集沉淀物用蒸馏水或者 100mM pH6.0 磷酸钠溶液溶解,并超声波 200W 处理 30 秒;先加入 50  $\mu$  l 的 100mg/ml EDC,震荡混匀,再加入 50  $\mu$  l 的 50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS),震荡混匀;室温孵育 30 分钟后 10000 ~ 15000xg、离心 5 ~ 15 分钟,沉淀用 100mM、pH5.0 ~ 6.0 的柠檬酸缓冲液溶解,放置在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 条件下备用;

[0042] 2. 荧光胶乳微粒标记蛋白的制备

[0043] 将上述活化后的荧光胶乳超声波 200W 处理 30 秒后,按照 50  $\mu$  g 蛋白/100  $\mu$  l 荧光胶乳的比例加入 CRP 抗体和兔 IgG, Vortex 混匀后室温搅拌反应 2 小时,离心洗涤 3 次,每次 10000 ~ 15000xg、离心 10 分钟,沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 秒,用 PBS-TBN 恢复离心前体积调节至浓度为 1.0mg/ml,按 0.8  $\mu$  g/cm<sup>2</sup> 的用量涂覆在标记垫上;

[0044] 3. CRP 抗体包被到包被膜

[0045] 将另一种 CRP 单克隆抗体和抗兔 IgG 用包被缓冲液调节至浓度为 1.0mg/ml,将抗人 IgG 用包被缓冲液调节至浓度为 0.8mg/ml,按膜包被液量为 20  $\mu$  l/30cm 的用量将 CRP 单克隆抗体喷到包被膜 3 上的检测区,分别按膜包被液量为 20  $\mu$  l/27cm 的用量和膜包被液量为 20  $\mu$  l/34cm 的用量将抗兔 IgG 和抗人 IgG 喷到包被膜 3 上的质控区 6,检测区 5 和质控区 6 间隔 5mm,在湿度 < 30% 的室温下凉干 24 小时,封袋,备用;

[0046] 4. 在底板上依次相互搭接地粘贴样品垫 1、标记垫 2、包被膜 3 和吸水纸 4 得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0047] 在本发明的一个实施例中,全程定量检测 CRP 免疫层析试纸条,在使用时,组装在

由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳设有两个开孔,加样窗和显示孔,加样窗对应于所述的全程定量检测 CRP 免疫层析试纸条样品垫 1,结果显示窗对应于所述全程定量检测 CRP 免疫层析试纸条的检测区 5 和质控区 6,该全程定量检测 CRP 免疫层析试纸条可以从该塑料外壳中取出。

[0048] 本发明的一个实施例中,用来测试免疫层析试纸条的荧光定量光谱检测系统,主要包含荧光光源系统、检测系统及自动软件分析控制系统。

[0049] 荧光光源系统发出单色激发光,照射在试纸条的检测区,检测区通过反应凝集的荧光胶乳在激发光的作用下,发射出荧光信号,该荧光信号被检测系统捕获,检测系统由光电倍增管和固态检测器组成,检测系统接收入射荧光信号,由光电倍增管实现光信号的放大,然后由固态检测器将光信号转换为电信号,由电信号读出电路将电信号输出,再经过自动软件分析控制系统处理,在显示屏上显示结果。实现对样本的精确定量。

[0050] 本发明与德灵 DN-100 特种蛋白测定仪对 417 例临床 CRP 样本(全血/血浆)的测定结果比较表明:在全程范围内测定 CRP(0.5 ~ 200mg/L)的准确性高,两种产品检测结果的相关性  $R^2 > 0.98$  ( $y = 1.0035x + 0.7457$ )。与英国朗道 (RANDOX) CRP 校准系列质控品的线性相关性  $R^2 > 0.9$ 。

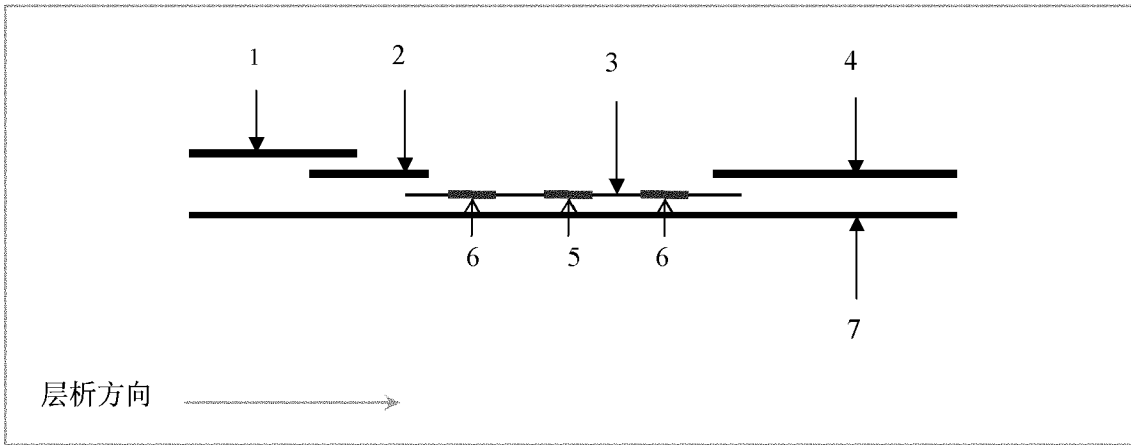


图 1