



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106124775 B

(45)授权公告日 2018.10.30

(21)申请号 201610513957.5

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2016.06.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

US 5807752 A,1998.09.15,

申请公布号 CN 106124775 A

CN 101782571 A,2010.07.21,权利要求1-6,说明书第0024-0028段.

(43)申请公布日 2016.11.16

CN 101236198 A,2008.08.06,权利要求1-7.

(73)专利权人 广州瑞博奥生物科技有限公司

US 4727037 A,1988.02.23,权利要求1-15,实施例1、2.

地址 510530 广东省广州市萝岗区瑞和路79号

(72)发明人 周腊梅 毛应清 黄若磐

RayBiotech, Inc..Rapid Mouse

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

Isotyping Kit-Gold Series.《http://

有限公司 44224

www.raybiotech.com/files/manual/

代理人 曾风云 万志香

Isotyping-Arrays/LFM-ISO-1.pdf》.2014,

审查员 张绚

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

小鼠抗体亚型快速分型试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括有用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1,用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2,以及用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3,所述试纸条由样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫顺次搭接在PVC底板上构成,所述胶体金结合垫上包被有胶体金标记的抗小鼠IgG(H+L)抗体;所述硝酸纤维素膜上检测区及质控区包括依次平行设置的、且相互间隔的特异性捕获抗体的和质控小鼠单抗抗体。本发明的试剂盒检测亚型全面,能进行所有的重链和轻链的分型检测,使用方便简单,操作时间短,30分钟可完成样本的亚型检测。

1. 一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒,其特征在于,包括有:

用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1,用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2,以及用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3,所述试纸条1、试纸条2和试纸条3均由样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜、吸水垫顺次搭接在PVC底板上构成,所述胶体金结合垫上包被有胶体金标记的抗小鼠IgG(H+L)抗体;所述硝酸纤维膜包括依次平行设置、且相互间隔的包被抗小鼠分型检测抗体的检测区和包被小鼠单抗对照抗体的质控区;

其中,所述试纸条1中,胶体金标记的抗体的浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在结合垫上的用量为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;检测区包被的抗小鼠IgG1抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠Kappa抗体的浓度为 $0.8\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠Lambda抗体的浓度为 $0.8\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;质控区包被的对照抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在质控区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;

所述试纸条2中,胶体金标记的抗体的浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在结合垫上的用量为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;检测区包被的抗小鼠IgG1抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgG2a抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgG2b抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgG3抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;质控区包被的对照抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在质控区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;所述试纸条3中,胶体金标记的抗体的浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在结合垫上的用量为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;检测区包被的抗小鼠IgA抗体的浓度为 $1.5\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgD抗体的浓度为 $1.5\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgE抗体的浓度为 $1.5\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgM抗体的浓度为 $1.5\text{mg}/\text{mL}$ ,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;质控区包被的对照抗体的浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,在质控区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

2. 权利要求1所述的小鼠抗体亚型快速分型试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、将抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠Kappa抗体、抗小鼠Lambda抗体工作液、以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维膜上进行包被, $36-38^\circ\text{C}$ 下干燥4-6小时,制备得到硝酸纤维膜1;

B、将抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠IgG2a抗体、抗小鼠IgG2b抗体、抗小鼠IgG3抗体工作液以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维膜上进行包被, $36-38^\circ\text{C}$ 下干燥4-6小时,制备得到硝酸纤维膜2;

C、将抗小鼠IgA抗体、抗小鼠IgD抗体、抗小鼠IgE抗体、抗小鼠IgM抗体工作液以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维膜上进行包被, $36-38^\circ\text{C}$ 下干燥4-6小时,制备得到硝酸纤维膜3;

D、在金标垫材料上涂布胶体金标记的抗小鼠IgG(H+L)抗体,经25-35%干燥6小时以上,制备胶体金结合垫;

E、将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜1、和吸水垫顺次搭接在PVC底板,得到用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜2、和吸水垫顺次搭接在PVC底板,得到用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2,将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜3、和吸水垫顺次搭接在PVC底板,得到用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3;试纸条1、试纸条2和试纸条3组合,即得。

## 小鼠抗体亚型快速分型试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检验技术领域,更具体地,本发明涉及一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 抗体按理化性质和生物学功能,可将其分为IgM、IgG、IgA、IgE、IgD五类。IgM抗体是免疫应答中首先分泌的抗体,它们在与抗原结合后启动补体的级联反应,它们还把入侵者相互连接起来,聚成一堆便于巨噬细胞的吞噬;IgG抗体激活补体,中和多种毒素,IgG持续的时间长,是唯一能在母亲妊娠期穿过胎盘保护胎儿的抗体,它们还从乳腺分泌进入初乳,使新生儿得到保护,根据重链结构的不同IgG抗体可分为4个亚类,即IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3。这4个亚类的生物学特性不同,因此它们在疾病的发生发展过程中发挥不同的作用。在免疫反应中,因为抗原种类(包括载体的种类,抗原决定簇的结构和性质)、剂量和进入体内途径的不同以及宿主遗传学倾向的不同,可产生不同的IgG;IgA抗体进入身体的黏膜表面,包括呼吸、消化、生殖等管道的黏膜,中和感染因子,还可以通过母乳的初乳把这种抗体输送到新生儿的消化道黏膜中,是在母乳中含量最多,最为重要的一类抗体;IgE抗体的尾部与嗜碱细胞、肥大细胞的细胞膜结合,当抗体与抗原结合后,嗜碱细胞与肥大细胞释放组织胺一类物质促进炎症的发展,这也是引发速发型过敏反应的抗体;IgD抗体的作用还不太清楚,它们主要出现在成熟的B淋巴细胞表面上,可能与B细胞的分化有关。

[0003] 因为抗体具有与抗原决定簇相对应的结合部位(抗原结合簇),所以抗体与抗原的结合具有特异性。另一方面,抗体本身是一种蛋白质,具有本身的氨基酸组成、排列和立体结构,对异种动物来说,它又是抗原。各类Ig都具有可用血清学方法检出的抗原特异性,它们表现出不同的血清学类型。Ig抗原的特异性有3种:1、同种型:同一种属所有个体共同具有的抗原特异性。2、同种异型:同一种属不同个体产生同一类Ig的CH或CL上一个或数个氨基酸(遗传标志)不同而表现的抗原性差异。3、独特型:指不同B细胞克隆所产生的IgV区和T、B细胞表面抗原受体V区所具有的抗原特异性标志。Ig的独特型决定簇数目庞大,且在一定条件下可刺激机体产生抗-独特型抗体,对免疫调节有重要意义。

[0004] 现有小鼠抗体亚型快速分型试剂盒一般采用双抗体夹心ELISA法鉴定单克隆抗体或者特异亲和纯化的亚类。采用共有位点的二抗包被微孔板,与加入的培养上清中的抗体结合,再加入HRP标记物亚型抗体来分别反应,最后用TMB底物系统显色并用稀硫酸终止,再通过酶标仪检测吸光度来判断抗体亚型。ELISA试剂盒具有极高的分辨率,是鉴定抗体亚型的可靠工具。其检测样品数量相对较多,相对经济实惠;相对费时(约3个小时),且需要ELISA检测仪器系统;可以检测一般所含亚型(IgG:IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3)及其他抗体亚型(IgM,IgA),重链亚型检测不全,且很少有产品含有轻链亚型的分类。

[0005] 现有市面同类胶体金检测产品也可以检测一般所含亚型(IgG:IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3)及其他抗体亚型(IgM,IgA),重链亚型检测不全,且很少有产品含有轻链亚型的分类。当前市面也有同类胶体金检测产品,但一般由于受限于开发产品的抗体材料,通常

可以检测常规所含亚型 (IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) 及其他抗体亚型 (IgM, IgA), 重链亚型检测不全, 且很少有产品含有轻链亚型的分类。

## 发明内容

[0006] 基于此, 为了克服上述现有技术的缺陷, 本发明提供了一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒及其制备方法。

[0007] 为了实现以上发明目的, 本发明采取了以下技术方案:

[0008] 一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒, 包括有:

[0009] 用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1, 用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2, 以及用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3, 所述试纸条1、试纸条2和试纸条3均由样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫顺次搭接在PVC底板上构成, 所述胶体金结合垫上包被有胶体金标记的抗小鼠IgG (H+L) 抗体; 所述硝酸纤维素膜包括依次平行设置、且相互间隔的包被抗小鼠分型检测抗体的检测区和包被小鼠单抗对照抗体的质控区。

[0010] 在其中一些实施例中, 所述试纸条1中, 所述检测区包被的抗小鼠IgG1抗体的浓度为0.7-1.0mg/mL, 在检测区的包被量为1-1.2uL/cm; 抗小鼠Kappa抗体的浓度为0.5-0.8mg/mL, 在检测区的包被量为0.7uL/cm; 抗小鼠Lambda抗体的浓度为0.5-0.8mg/mL, 在检测区的包被量为1-1.2uL/cm; 质控区包被的小鼠单抗对照抗体的浓度为1mg/mL, 在质控区的包被量为1.0uL/cm。

[0011] 在其中一些实施例中, 所述试纸条2中, 所述检测区包被的抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠IgG2a抗体、抗小鼠IgG2b抗体、和抗小鼠IgG3抗体的浓度均为0.7-1.0mg/mL, 在检测区的包被量均为1-1.2uL/cm; 质控区包被的小鼠单抗对照抗体的浓度为0.7-1.0mg/mL, 在质控区的包被量为1-1.2uL/cm。

[0012] 在其中一些实施例中, 所述试纸条3中, 所述检测区包被的抗小鼠IgA抗体、抗小鼠IgD抗体、抗小鼠IgE抗体、抗小鼠IgM抗体的浓度均为1.0-1.5mg/mL, 在检测区的包被量均为1-1.2uL/cm; 质控区包被的小鼠单抗对照抗体的浓度为0.7-1.0mg/mL, 在质控区的包被量为1-1.2uL/cm。

[0013] 在其中一些实施例中, 所述试纸条1、试纸条2和试纸条3中, 所述胶体金标记的抗小鼠IgG (H+L) 抗体的浓度为20-30ug/mL胶体金, 在胶体金结合垫上的用量为1.5-2.5ug/cm<sup>2</sup>。

[0014] 本发明还提供了一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0015] A、将抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠Kappa抗体、抗小鼠Lambda抗体工作液、以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维素膜上进行包被, 36-38℃下干燥4-6小时, 制备得到硝酸纤维素膜1;

[0016] B、将抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠IgG2a抗体、抗小鼠IgG2b抗体、抗小鼠IgG3抗体工作液以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维素膜上进行包被, 36-38℃下干燥4-6小时, 制备得到硝酸纤维素膜2;

[0017] C、将抗小鼠IgA抗体、抗小鼠IgD抗体、抗小鼠IgE抗体、抗小鼠IgM抗体工作液以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维素膜上进行包被, 36-38℃下干燥4-6小时, 制备得到硝

酸纤维膜3;

[0018] D、在金标垫材料上涂布胶体金标记的抗小鼠 IgG (H+L) 抗体,经25-35%干燥6小时以上,制备胶体金结合垫;

[0019] E、将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜1、和吸水垫顺次搭接在PVC底板,得到用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜2、和吸水垫顺次搭接在PVC底板,得到用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2,将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜3、和吸水垫顺次搭接在PVC底板,得到用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3;试纸条1、试纸条2和试纸条3组合即得本发明的试剂盒。

[0020] 本发明的小鼠抗体亚型快速分型试剂盒是运用侧向层析原理,用于快速且精确的确定小鼠单克隆抗体的亚型和轻链的种类。该试剂盒由三组试纸条组成,其中第一组为小鼠抗体IgG1和轻链(IgG1/Kappa/Lambda)分型检测试纸条,第二组为小鼠抗体IgG(IgG1/IgG2a/IgG2b/IgG3)分型检测试纸条,第三组为小鼠抗体IgA/D/E/M分型检测试纸条。其分别将抗小鼠IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, IgD, IgE,  $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链的特异性捕获抗体包被在三个不同试纸条的固相硝酸纤维素膜上,并且用胶体金标记广谱检测抗小鼠IgG (H+L) 抗体。使用时将少量样品(杂交瘤细胞培养上清或经纯化的单克隆抗体稀释液)点在试纸条箭头指示前端的样品垫处或直接将试纸条箭头指示前端的样品垫插入细胞培养液中,经侧向层析作用,样本中的待测抗体与胶体金标记的检测抗体结合形成复合物。此复合物由于层析作用沿试纸条向前移动时,与不同检测线内固定的相应的捕获抗体形成“捕获抗体-小鼠单抗-胶体金标记抗小鼠IgG (H+L) 抗体”双抗体夹心复合物而凝聚显色在相应的亚型位置,从而达到对小鼠单抗进行分型检测的目的;若为阴性标本,在检测线区域不能形成双抗体夹心复合物,因此不显色。无论小鼠单抗是否存在于测试样本中,一条红色条带都会出现在对照线区内。对照线区内所显现的红色条带是判定是否有足够标本,层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准。

[0021] 使用时可先选用第一组小鼠抗体IgG1和轻链分型检测试纸条测定小鼠抗体是否为IgG1亚型及区分 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链;若还无法判定检测抗体的亚型,则用第二组小鼠抗体IgG分型检测试纸条测定小鼠抗体是否为IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3亚型;和第三组小鼠抗体IgA/D/E/M分型检测试纸条测定抗体是否为IgA, IgM, IgD, IgE亚型。此三组试纸条联合使用可测定小鼠的IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, IgD, IgE以及 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下显著优点:

[0023] 1、本发明发明人对小鼠抗体亚型快速分型试剂盒的试纸条的特异性捕获抗体在试纸条上的包被参数进行了大量的实验验证,获得了最佳的包被参数,使得本发明的试纸条可以灵敏地进行样本的亚型检测,本发明的试剂盒检测亚型全面,能进行所有的重链IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, IgD, IgE的分型检测和 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链的分型检测;

[0024] 2、本发明的小鼠抗体亚型快速分型试剂盒的试纸条对样本的最低检测浓度可达100ng/mL,且各亚型之间不存在交叉性;

[0025] 3、本发明的小鼠抗体亚型快速分型试剂盒设计巧妙,考虑小鼠杂交瘤抗体亚型多数为IgG1亚型,在亚型检测过程中用户可根据产品说明书最先使用试剂盒中的IgG1/Kappa/Lambda分型检测试纸条1初步判断样本是否为IgG1亚型及进行轻链的初筛,再决定是否需要使用其他两个分型检测试纸条,减少工作量及节省检测成本;

[0026] 4、本发明的小鼠抗体亚型快速分型试剂盒使用方便简单,不需要辅助仪器,操作人员不需要专业培训;操作时间短,30分钟可完成样本的亚型检测。

### 附图说明

[0027] 图1为本发明实施例1中的试纸条1的结构示意图,其中附图标记为:11、PVC底板;12、样品垫;13、胶体金结合垫;14、硝酸纤维膜;15、吸水垫;16、IgG1检测线;17、Kappa检测线;18、Lambda检测线;19、质控线;

[0028] 图2为本发明实施例1中的试纸条2的结构示意图,其中附图标记为:21、PVC底板;22、样品垫;23、胶体金结合垫;24、硝酸纤维膜;25、吸水垫;26、IgG1检测线;27、IgG2a检测线;28、IgG2b检测线;29、IgG3检测线;20、质控线;

[0029] 图3为本发明实施例1中的试纸条3的结构示意图,其中附图标记为:31、PVC底板;32、样品垫;33、胶体金结合垫;34、硝酸纤维膜;35、吸水垫;36、IgA检测线;37、IgD检测线;38、IgE检测线;39、IgM检测线;30、质控线。

### 具体实施方式

[0030] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案,具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0031] 实施例中的步骤除了特殊说明外,均为本领域常规操作步骤,以下实施例中所使用的原料,均来源于市售。

[0032] 实施例1一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒

[0033] 请参考图1-3,为本发明的一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒,包括有:

[0034] 1、用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1(图1),所述试纸条由样品垫12、胶体金结合垫13、硝酸纤维膜14、吸水垫15顺次搭接在PVC底板1上构成,所述胶体金结合垫13上包被有胶体金标记的广谱检测抗小鼠IgG(H+L)抗体(Jackson Immuno Research cat#715-545-151);所述硝酸纤维膜14包括依次平行设置的、且相互间隔的包被抗小鼠IgG1抗体的检测线16、抗小鼠Kappa抗体的检测线17和抗小鼠Lambda抗体的检测线18和包被对照小鼠单抗抗体(Jackson Immuno Research cat#315-155-006)的质控线19;

[0035] 其中,胶体金标记的抗体的浓度分别为25ug/mL胶体金,在结合垫上的用量为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;检测区包被的抗小鼠IgG1抗体的浓度为1.0mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠Kappa抗体的浓度为0.8mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠Lambda抗体的浓度为0.8mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;质控区包被的对照抗体的浓度为1.0mg/mL,在质控区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0036] 2、用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2(图2),所述试纸条由样品垫22、胶体金结合垫23、硝酸纤维膜24、吸水垫25顺次搭接在PVC底板21上构成,所述胶体金结合垫23上包被有胶体金标记的广谱检测抗小鼠IgG(H+L)抗体;所述硝酸纤维膜24检测区上包括依次平行设置的、且相互间隔的包被抗小鼠IgG1抗体的检测线26、抗小鼠IgG2a抗体的检测线27、抗小鼠IgG2b抗体的检测线的检测线28和抗小鼠IgG3抗体的检测线29和包被小鼠单抗对照抗体的质控线20;

[0037] 其中,胶体金标记的抗体的浓度分别为25ug/mL,在结合垫上的用量为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;检测区包被的抗小鼠IgG1抗体的浓度为1.0mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgG2a抗体的浓度为1.0mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgG2b抗体的浓度为1.0mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgG3抗体的浓度为1.0mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;质控区包被的对照抗体的浓度为1.0mg/mL,在质控区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;

[0038] 以及

[0039] 3、用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3(图3),所述试纸条由样品垫32、胶体金结合垫33、硝酸纤维膜34、吸水垫35顺次搭接在PVC底板31上构成,所述胶体金结合垫33上包被有胶体金标记的广谱检测抗小鼠IgG(H+L)抗体;所述硝酸纤维膜上检测区包括依次平行设置的、且相互间隔的包被抗小鼠IgA抗体的检测线36、抗小鼠IgD抗体的检测线37、抗小鼠IgE抗体的检测线38和抗小鼠IgM抗体的检测线39和包被小鼠单抗对照抗体的质控线30;

[0040] 其中,胶体金标记的抗体的浓度分别为25ug/mL,在结合垫上的用量为 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;检测区包被的抗小鼠IgA抗体的浓度为1.5mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgD抗体的浓度为1.5mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgE抗体的浓度为1.5mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;抗小鼠IgM抗体的浓度为1.5mg/mL,在检测区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ ;质控区包被的对照抗体的浓度为1.0mg/mL,在质控区的包被量为 $1.0\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0041] 本发明还提供了一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0042] A、将抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠Kappa抗体、抗小鼠Lambda抗体工作液、以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维膜上进行包被,36-38℃下干燥4-6小时,制备得到硝酸纤维膜1;

[0043] B、将抗小鼠IgG1抗体、抗小鼠IgG2a抗体、抗小鼠IgG2b抗体、抗小鼠IgG3抗体工作液以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维膜上进行包被,36-38℃下干燥4-6小时,制备得到硝酸纤维膜2;

[0044] C、将抗小鼠IgA抗体、抗小鼠IgD抗体、抗小鼠IgE抗体、抗小鼠IgM抗体工作液以及小鼠单抗对照抗体工作液在硝酸纤维膜上进行包被,36-38℃下干燥4-6小时,制备得到硝酸纤维膜3;

[0045] D、在金标垫材料上涂布胶体金标记的广谱检测抗小鼠IgG(H+L)抗体,经25-35%干燥6小时以上,制备胶体金结合垫;

[0046] E、1)将需要裁切的各组分(样品垫,胶体金结合垫,吸水垫)按照产品的规格要求分别按所需的规格进行裁切;

[0047] 2)轻轻揭开硝酸纤维膜上吸水垫粘贴处的保护膜,将裁切好的吸水垫粘附于其上,均匀、轻微滚动式推进,以加强粘合力,并防止产生气泡,吸收垫覆盖在NC膜上1mm;

[0048] 3)轻轻揭开PVC底板下缘胶体金结合垫粘贴处的保护膜,将裁切好的胶体金结合垫粘附于其上,方法同硝酸纤维膜,胶体金结合垫覆盖在NC膜上1mm;

[0049] 4)轻轻揭开PVC底板最下端的保护膜,将样品垫粘附于胶体金结合垫上,方法同吸水垫,样品垫覆盖在胶体金结合垫上3mm;

[0050] 5)将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维膜1、吸水垫、PVC底板压贴牢固,按所需规格

裁切,得到用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜2、吸水垫、PVC底板压贴牢固,按所需规格裁切,得到用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2,将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜3、吸水垫、PVC底板压贴牢固,按所需规格裁切,得到用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3;试纸条1、试纸条2和试纸条3组合即得本发明的试剂盒。

[0051] 本实施例的一种小鼠抗体亚型快速分型试剂盒的使用方法如下:

[0052] 1、在使用前将试剂盒内的试纸条1-3恢复至室温;

[0053] 2、在试纸条按箭头指示方向的样品垫中加入60u1待测抗体样本液,或直接将试纸条按箭头方向的样品垫条插入细胞培养液标本中(注意插入液体的位置不能超过箭头前端位置)10分钟后取出平放于干净平整的台面上;检测时,样本中的待测抗体与胶体金标记的检测抗体结合形成复合物。此复合物由于层析作用沿试纸条向前移动时,与不同检测线内固定的相应的捕获抗体形成“捕获抗体-小鼠单抗-胶体金标记抗小鼠IgG(H+L)抗体”双抗体夹心复合物而凝聚显色在相应的亚型位置,从而达到对小鼠单抗进行分型检测的目的;若为阴性标本,在检测线区域不能形成双抗体夹心复合物,因此不显色。无论小鼠单抗是否存在于测试样本中,一条红色条带都会出现在对照线区内。对照线区内所显现的红色条带是判定是否有足够标本,层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准。

[0054] 3、在20-30分钟读取检测结果,如果样本中含有待测抗体,在检测区内(T)会出现一条红色条带,表明是阳性结果,依据比色图片进行判定抗体亚型;当仅出现一条红色条带,即对照线区出现有色条带,检测线区无色,为阴性;无论抗体是否存在于样本中,混合物都会继续层析至质控区(C),质控区的相应抗体与胶体金标记抗体结合物直接反应出现一条红色条带。质控区内(C)所显现的红色条带是判定层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准,当对照线区未出现有色条带,表明试验失败或试剂失效,为无效,需进行重复检测。

[0055] 试验例1实施例1的快速分型试剂盒的最低检测限的测定

[0056] 1、用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1最低检测限的测定

[0057] 使用小鼠IgG1、Kappa和Lambda单抗,将以上三个单抗按400ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml稀释对试纸条1进行检测,以能检测显色颜色的最低浓度表现每个检测指标的最低检测限,经检测,小鼠IgG1最低能检测100ng/ml,小鼠Kappa和Lambda单抗最低能检测25ng/ml;

[0058] 2、用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2最低检测限的测定

[0059] 使用小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3单抗,将以上四个单抗按400ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml稀释对试纸条2进行检测,以能检测显色颜色的最低浓度表现每个检测指标的最低检测限,经检测,小鼠IgG1最低能检测100ng/ml,IgG2a单抗最低能检测50ng/ml;IgG2b和IgG3的最低检测限分别为25ng/ml、100ng/ml;

[0060] 3、用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3最低检测限的测定

[0061] 使用小鼠IgA、IgD、IgE和IgM单抗,将以上四个单抗按400ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml稀释对试纸条3进行检测,以能检测显色颜色的最低浓度表现每个检测指标的最低检测限,经检测,小鼠IgA最低能检测100ng/ml,IgD单抗最低能检测50ng/ml;IgE和IgM的最低检测都为25ng/ml。



[0062] 试验例2实施例1的快速分型试剂盒的精密度的检测

[0063] 1、用于IgG1、Kappa和Lambda分型检测的试纸条1精密度性能检测

[0064] 使用小鼠Kappa单抗稀释至200ng/ml,随机抽检10个试纸条,试纸条显色一致;说明精密度性能良好。

[0065] 2、用于IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3分型检测的试纸条2精密度性能检测

[0066] 使用小鼠IgG1单抗稀释至200ng/ml,随机抽检10个试纸条,试纸条显色一致;说明精密度性能良好。

[0067] 3、用于IgA、IgD、IgE和IgM分型检测的试纸条3精密度性能检测

[0068] 使用小鼠IgM单抗稀释至200ng/ml,随机抽检10个试纸条,试纸条显色一致;说明精密度性能良好。

[0069] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

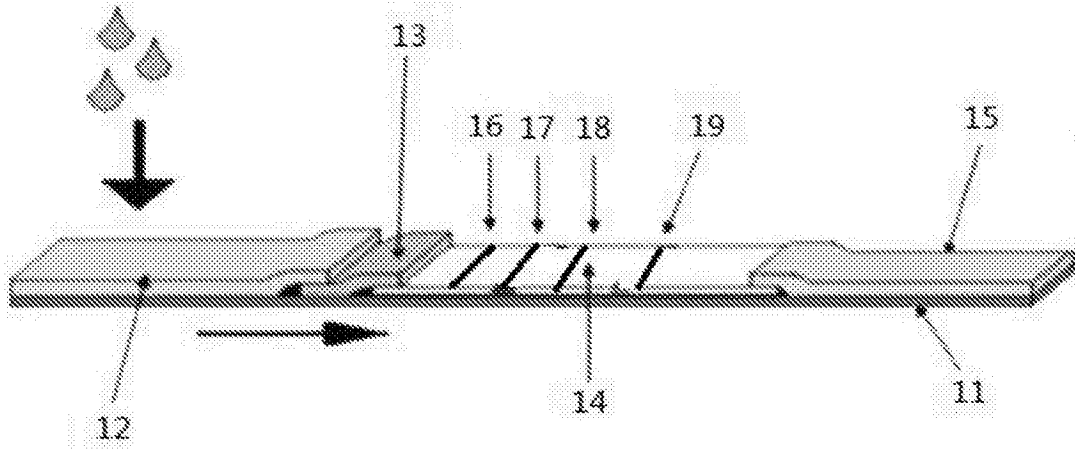


图1

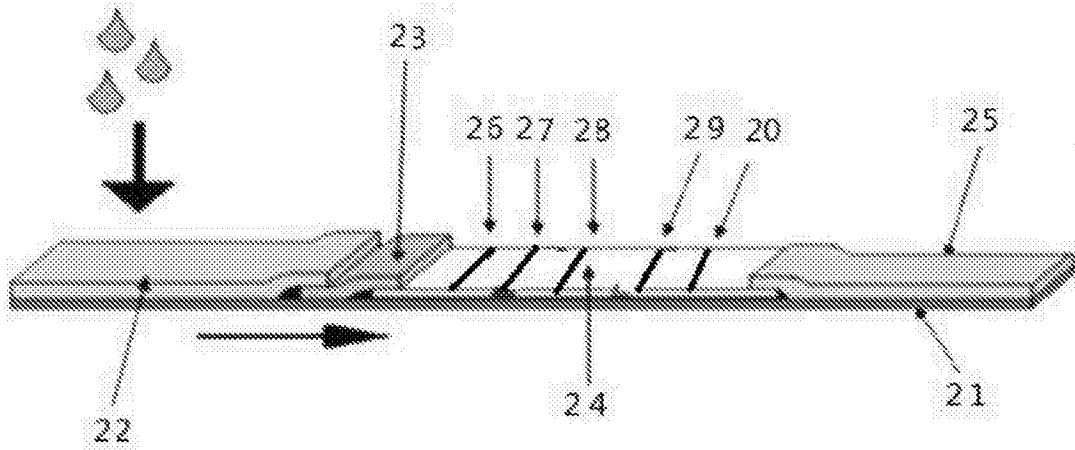


图2

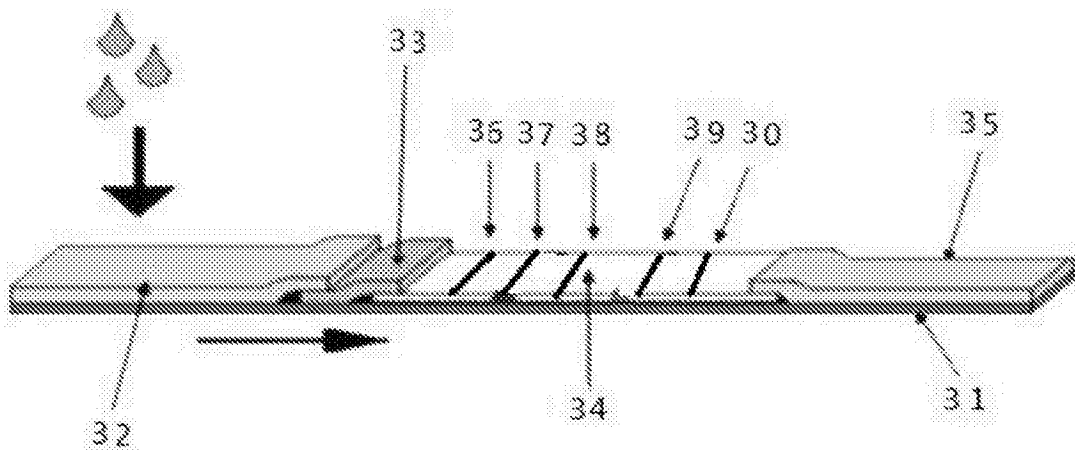


图3