



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104730231 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 24

(21) 申请号 201510136850. 9

(22) 申请日 2015. 03. 26

(71) 申请人 北京乐普医疗科技有限责任公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路
37 号 7 号楼

(72) 发明人 陈勇 张静 邱笑违

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液及其应用

(57) 摘要

本发明涉及荧光免疫定量检测领域,具体提供了一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液及其应用。所述样本缓冲液由小牛全血离心取血清后,加入 PB 缓冲液混合制得,所述小牛血清与所述 PB 缓冲液以 1:1 的体积比混合。本发明还提供了一种全血样本荧光免疫定量检测的方法,将全血样本与所述样本缓冲液以 1:2 的体积比混合后,加到荧光免疫定量检测试纸条的样品垫上,利用荧光定量分析仪检测待测样本。利用本发明方法可以实现以全血、血浆或血清作为样本进行检测,成本低廉,且对检测结果无干扰。

1. 一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液,其特征在于,所述样本缓冲液由小牛全血离心取血清后,加入 PB 缓冲液混合制得。
2. 根据权利要求 1 所述的样本缓冲液,其特征在于,所述小牛血清与所述 PB 缓冲液以 1:1 的体积比混合。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的样本缓冲液,其特征在于,所述小牛全血离心的离心条件为 4000r/min,5 分钟。
4. 权利要求 1-3 任一项所述的样本缓冲液在全血 / 血浆 / 血清样本荧光免疫定量检测中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在于,所述应用为荧光免疫定量检测全血样本中的心肌标志物。
6. 一种全血样本荧光免疫定量检测的方法,其特征在于,将全血样本与权利要求 1-3 任一项所述的样本缓冲液混合后,加到荧光免疫定量检测试纸条的样品垫上,利用荧光定量分析仪检测待测样本。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述全血样本与所述样本缓冲液以 1:2 的体积比混合。
8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法,其特征在于,所述荧光免疫定量检测试纸条由玻璃纤维膜、聚酯玻纤、硝酸纤维素膜、吸水滤纸和 PVC 板组成;所述玻璃纤维膜的厚度为 0.52mm,纤维直径为 0.6-3.0 μm 。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述聚酯玻纤作为荧光标记垫,其厚度为 0.25mm,吸水量为 49.25mg/cm²。
10. 一种血浆 / 血清样本荧光免疫定量检测的方法,其特征在于,将血浆 / 血清样本与权利要求 1-3 任一项所述的样本缓冲液混合后,加到荧光免疫定量检测试纸条的样品垫上,利用荧光定量分析仪检测待测样本;所述血浆 / 血清样本与所述样本缓冲液以 1:3 的体积比混合。

一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光免疫定量检测领域,具体涉及一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液及其应用。

背景技术

[0002] 免疫标记技术指用荧光素、放射性同位素、酶、铁蛋白、胶体金及化学(或生物)发光剂等作为示踪物,标记抗体或抗原进行的抗原抗体反应,并借助于荧光显微镜、射线测量仪、酶标检测仪、电子显微镜和发光免疫测定仪等精密仪器,应用各种液相和固相免疫分析方法,对体液中的半抗原、抗原或抗体进行定性和定量测定的方法。时间分辨荧光免疫分析(Timed-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是一种灵敏的高端定量免疫检测技术,是以镧系稀土离子作为标记物来标记抗原或抗体,因镧系稀土离子具有独特的荧光特性,该技术能够获得极高的信噪比,从而具有很高的灵敏度,且还具有标记物制备简便、储存时间长、无放射性污染、检测重复性好、操作流程短、标准曲线范围宽、不受样品自然荧光干扰和应用范围十分广泛等优点。时间分辨荧光免疫分析相对于酶免分析、放射免疫分析有更高的临床应用价值。该技术适用于各种抗原抗体的临床检测,在市场上已得到广泛应用。

[0003] 荧光免疫层析是建立在酶联免疫吸附试验、乳胶凝集试验、单克隆抗体技术和免疫荧光微球标记技术基础上的以荧光微球为标记物,利用特异的抗原抗体反应来放大反应,通过荧光定量分析仪判定结果的新技术。该技术具有简单、快速、准确和无污染等优点,在临床医学检测、激素检测、食品安全检测、药物残留和毒品快速检测诸多诊断领域迅速发展。随着即时检验(POCT)产业的深入发展,荧光免疫试剂由于其本身所带有的快速、简便、易于携带、便于深入社区及边远山区等特点,成为目前POCT发展的主要领域,从而那些与发病急、危害大的疾病相关的检测指标的荧光免疫试剂的需求越来越大。

[0004] 但是以全血样本作为荧光免疫定量层析检测样本进行检测仍然是POCT领域的一大热点和难题。荧光免疫定量层析在以血浆/血清作为检测样本时,检测结果灵敏度高,检测方法简便、快速、特异性高。但是以全血样本作为检测样本时,由于全血中红细胞的存在,检测时一旦红细胞泄露到试纸条NC膜上,则会对荧光微球在NC膜检测线和控制线上的聚集产生影响,从而造成检测结果的假阳或假阴性。考虑到分离血清/血浆及若干操作步骤,至少需要一小时左右,而在无技术条件的医疗单位,还无法进行。因此,一种用全血进行分析的床旁诊断分析法,即全血免疫层析法显的至关重要。用于全血样本检测的样本缓冲液也就成为了荧光免疫定量检测试纸条在临床应用的关键。本发明致力于探寻一种能够快速有效检测全血样本的荧光免疫定量检测试纸条和样本缓冲液,来检测全血样本。从而为医院临床和患者提供更有效快速的服务和治疗。

[0005] 然而,目前市面上仅有的几家生产荧光免疫定量试纸的公司多是以抗人红细胞(RBC)抗体作为全血检测样本缓冲液,这种方法需要进行动物免疫实验,培养细胞并涉及提取和纯化RBC抗体等一系列实验操作,过程繁琐,而且对RBC抗体纯度要求很高。一旦纯度达不到要求,对检测结果影响很大。截至目前,还没有关于采用小牛血清作为全血检测的样

本缓冲液报道,因此,本发明第一次公开通过小牛血清作为样本缓冲液与全血样本按一定比例混合进行检测的方法和应用。

发明内容

[0006] 针对现有技术不足,本发明的目的是提供一种荧光免疫定量检测试纸条,能够快速有效检测全血/血浆/血清样本。

[0007] 为实现上述目的,本发明首先提供一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液,所述样本缓冲液由小牛全血离心取血清后,加入 PB 缓冲液混合制得。

[0008] 所述小牛全血为新鲜采集的新生牛血,新生牛血里面的 IgM 含量最大,浓度最高,利于保藏,且来源广泛,价格低廉,而且危险性和传染病源小,制作成的样本缓冲液性质稳定。

[0009] 作为优选,所述小牛血清与所述 PB 缓冲液以 1:1 的体积比混合。该比例是小牛血清与 PB 缓冲液的最佳比例,采用该比例混合的小牛血清中 IgM 浓度为凝集红细胞的最适浓度,且能减少小牛血清的损耗。

[0010] 作为优选,所述离心为低速离心,以 4000r/min 离心 5 分钟最佳,目的是防止血浆中的 IgM 等大分子蛋白被离心出来,从而影响样本缓冲液的使用。

[0011] 本发明还提供了前述样本缓冲液在全血/血浆/血清样本荧光免疫定量检测中的应用。

[0012] 进一步地,所述应用为荧光免疫定量检测全血样本中的心肌标志物。

[0013] 本发明还提供了一种全血样本荧光免疫定量检测的方法,具体为将全血样本与前述样本缓冲液混合后,加到荧光免疫定量检测试纸条的样品垫上,利用荧光定量分析仪检测待测样本。

[0014] 作为优选,所述全血样本与所述样本缓冲液以 1:2 的体积比混合。

[0015] 进一步地,所述荧光免疫定量检测试纸条由玻璃纤维膜、聚酯玻纤、硝酸纤维素膜、吸水滤纸和 PVC 板组成;所述玻璃纤维膜的厚度为 0.52mm,纤维直径为 0.6-3.0 μm ,其作为样品垫滤全血效果最佳。

[0016] 进一步地,所述聚酯玻纤作为荧光标记垫,其厚度为 0.25mm,吸水量为 49.25mg/cm²,其具有良好的亲水性和释放性,能减小对检测结果的干扰。所述荧光检测试纸中硝酸纤维素膜作为反应区。

[0017] 本发明还提供了一种血浆/血清样本荧光免疫定量检测的方法,具体为将血浆/血清样本与前述样本缓冲液混合后,加到荧光免疫定量检测试纸条的样品垫上,利用荧光定量分析仪检测待测样本。

[0018] 作为优选,所述血浆/血清样本与所述样本缓冲液以 1:3 的体积比混合。

[0019] 本发明的有益效果在于:

[0020] 本发明采用小牛血清制备样本缓冲液,不仅降低了产品的成本,而且具有良好的稳定性和重复性;通过在小牛血清中加入一定比例的 PB 缓冲液,制备的荧光检测试纸样本缓冲液,呈液体状,相比于目前国内外市场上的其他全血检测方法,以小牛血清作为样本缓冲液,可以实现以全血、血浆或血清作为样本进行检测,成本低廉,且对检测结果无干扰。并能够更好地用于荧光免疫定量分析,检测快速,结果准确,操作简便,而其他的全血检测方

法多以抗人红细胞抗体处理全血样本,制作成本高,过程繁琐,而且检测过程容易造成非特异性反应,从而影响检测结果。

附图说明

- [0021] 图 1 为荧光免疫定量检测试纸示意图；
 [0022] 图 2 为红细胞凝集反应示意图；
 [0023] 图 3 为 BCA 法测蛋白浓度标准曲线；
 [0024] 图 4 为荧光免疫定量检测试纸条全血检测效果示意图 (1 ~ 6 分别为全血与样本缓冲液按 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1 比例混合)；
 [0025] 图 5 为心肌钙蛋白 I 浓度标准曲线。

具体实施方式

- [0026] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。
 [0027] 实施例 1 用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液的制备
 [0028] 用电子天平分别称取 71.6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 31.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 分别溶于 1000mL 蒸馏水,各自配制成 0.2M 母液。取 19mL 0.2M NaH_2PO_4 母液, 81mL 0.2M Na_2HPO_4 母液, 混合置于容量瓶中,加蒸馏水定容至 1000mL, 配制成 0.02M pH7.4 的 PB 缓冲液。取一定量新鲜采集的小牛血清 (新鲜小牛全血 4000r/min 离心 5 分钟), 以 1:1 的比例与前述 PB 缓冲液混合, 振荡均匀。按 180 μL / 支分装, 待用。
 [0029] 实施例 2 样本缓冲液中小牛血清与 PB 缓冲液混合比例的优化
 [0030] 将新鲜采集的小牛血清原液, 以及与 PB 缓冲液经 2:1, 1:1, 1:3 系列稀释后, 与定量的红细胞溶液进行免疫沉淀反应, 优化小牛血清与 PB 缓冲液的最适混合比, 检测结果如表 1 所示。
 [0031] 表 1: 小牛血清与 PB 缓冲液混合比例优化结果
 [0032]

小牛血清稀 释比例	小牛血清原 液	2:1 稀释	1:1 稀释	1:2 稀释	1:3 稀释
OD 值	2.1	3.2	3.4	2.8	2.2

[0033] 从表 1 可以看出, 小牛血清原液中 IgM 含量过高, 导致免疫反应过程中过早出现前带效应, 红细胞凝集不完全。当小牛血清稀释比例超过 1:2 之后, IgM 的浓度也相应降低, 出现钩状效应, 红细胞未全部凝集。当小牛血清与 PB 缓冲液混合比例为 2:1 或 1:1 时, IgM 的浓度较为适合, 与红细胞反应较完全, 两者凝集效果相近。考虑到生产成本的问题, 最终取小牛血清与 PB 缓冲液按 1:1 比例混合。

[0034] 实施例 3

[0035] 1、小牛血清的制备

[0036] 采血瓶内预先放入 30ml 左右生理盐水, 充分打湿采血瓶、采血管, 以便于血和瓶壁的分。从小牛颈动脉取血, 让血自然缓慢流入采血瓶内, 取血完毕将采血瓶室温 (约

25℃为宜)斜放置4小时左右,待血液充分冷却后,再放入4℃冰箱过夜,让血清充分析出。次日在超净工作台内,小心吸取上清液,移入10ml具塞离心管,以4000转/分钟离心5分钟,收集血清。小牛血清离心后的得率如表2所示。

[0037] 表2 小牛血清离心后的得率

[0038]

	A1	A2	A3	平均
新鲜牛血mL	1000	1000	1000	1000
小牛血清mL	135	141	158	144.7
得率%	13.5	14.1	15.8	14.5

[0039] 2、蛋白浓度检测

[0040] 小牛血清含有高浓度的蛋白质,包括血浆蛋白,IgG,IgM等。其中,起主要作用的成分是IgM。IgM是大分子蛋白,能与红细胞膜上的特异性抗原发生抗原-抗体反应,从而达到偶联红细胞,促进红细胞凝集的效果,偶联凝集反应见图2。小牛血清中蛋白浓度越高,IgM浓度则越高,产生的效果越好。因此,采用BCA法对小牛血清中蛋白浓度进行测定。按图3蛋白浓度标准曲线换算,小牛血清蛋白浓度测定结果为48.5mg/ml。因此选择小牛血清作为样本缓冲液的组分。

[0041] 3、荧光免疫定量检测试纸条的制备

[0042] 取荧光微球溶液,加入抗心肌标志物抗体,在室温搅拌30min后,加入浓度为1%的牛血清白蛋白溶液终止,于12000rpm,4℃冷冻离心后,用10mM磷酸缓冲液含有0.5%牛血清白蛋白清洗后再次离心,用复溶液(10mM磷酸缓冲液含有0.5%牛血清白蛋白、2%蔗糖、0.1%叠氮钠)将荧光标记的抗心肌标志物抗体悬浮,4℃保存备用,使用Biodot划膜仪的三维喷点平台将该悬浮液以1.8μL/cm的速度喷洒于玻璃纤维膜上,于35~38℃烘干8小时。用pH7.2的PBS缓冲液将抗心肌标志物抗体和羊抗鼠多抗分别稀释到0.5mg/mL和0.7mg/mL,使用Biodot划膜仪的三维喷点平台将两者以1.5cm的间隔均匀喷印于NC膜上(如图1),于35~38℃烘干8小时。取上述玻璃纤维膜(样品垫)、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水滤纸(吸收垫)依次粘贴于PVC板上。组装完毕后,用切条机按需要的规格切条。与实施例1制备好的样本缓冲液配合使用。

[0043] 实施例4

[0044] 1、滤全血测试

[0045] 取同一批次荧光免疫定量检测试纸条,将人静脉全血与样本缓冲液分别按1:5,1:4,1:3,1:2,1:1,2:1的比例混合后,取100μL混合液加样,进行测试。荧光免疫定量检测试纸条滤全血效果如图4所示。由图4可以看出,当全血样本与样本缓冲液按1:2的比例稀释时,样本缓冲液中的IgM与全血中红细胞表面的抗原浓度比例最为合适,达到最适比,抗原抗体充分结合,滤全血的效果达到最佳。当采用其他比例混合时,由于抗原抗体比例不合适而导致出现前带效应或后带效应,红细胞无法完全凝集,从而泄露出样品垫。

[0046] 2、心肌标志物心肌钙蛋白I测试

[0047] 2.1 标准曲线的绘制

[0048] 将心肌肌钙蛋白 I 的标准溶液配制成 50ng/mL、25ng/mL、10ng/mL、2.5ng/mL、0.5ng/mL、0.1ng/mL 不同浓度的溶液,用同一批次的试纸条,每个样品浓度测试 5 条,通过荧光定量检测仪判读结果,如表 2 所示。按照统计学方法,以检测线的信号强度为纵坐标,心肌肌钙蛋白 I 的溶液浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线,如图 5 所示。由图 5 和表 3 可见,在心肌肌钙蛋白 I 的溶液浓度为 0.1ng/mL 时,检测线仍然有信号显示,随着心肌肌钙蛋白 I 的溶液浓度的逐渐增大,检测线的信号强度也随之增强,两者呈正比例显示,由实验可得,本发明的试纸条心肌肌钙蛋白 I 的检测灵敏度达到 0.1ng/mL, CV 在 10% 以内,重复性好。

[0049] 表 3 心肌肌钙蛋白 I 标准曲线

[0050]

检测信号值 (mV)	心肌肌钙蛋白 I 标准品浓度 (ng/ml)					
	0.1	0.5	2.5	10.0	25.0	50.0
1	12.9	58.6	329.7	1208.1	2419.6	3240.6
2	12.2	55.1	327.8	1365.7	2470.1	3475.5
3	13.4	55.6	267.6	1360.5	2210.4	3383.2
4	12.3	57.2	324.4	1180.4	2549.2	3458.3
5	13.0	64.8	325.2	1378.4	2257.6	3096.2

[0051]

平均值	12.8	58.3	314.9	1298.6	2381.4	3330.7
CV	4.0%	6.7%	8.4%	7.4%	6.0%	4.8%

[0052] 2.2 样品的检测:

[0053] (1) 平放试纸条,取全血样本,颠倒混匀后分成 2 份,取一份以 4000g 离心 10min,取血浆,按 1:3 的比例与样本缓冲液混合后,取 100 μ L 加到样品垫上。取另一份全血样本按 1:2 的比例与样本缓冲液混合后,取 100 μ L 加到样品垫上,室温反应 15 分钟;(2) 开启检测设备,并将检测条及校准卡插入检测设备的插卡口,运行仪器,仪器通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的心肌肌钙蛋白 I 溶液的浓度。用贝克曼库尔特 DXI800 全自动化学发光免疫分析仪检测做对照,按照统计学方法,计算心肌肌钙蛋白 I 浓度的平均值,如表 4 所示。

[0054] 表 4 全血样本准确性检测

[0055]

检测序号	全血样本			血浆样本			Beckman 检测 (ng/ml)
	检测浓度 1 (ng/ml)	检测浓度 2 (ng/ml)	平均值 (ng/ml)	检测浓度 1 (ng/ml)	检测浓度 2 (ng/ml)	平均值 (ng/ml)	
1	1.4	1.2	1.3	1.3	1.2	1.3	1.5
2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
3	5.3	5.2	5.5	6.0	5.4	5.0	4.4
4	11.2	13.1	11.5	12.0	12.3	11.4	14.2
5	2.3	2.6	2.5	2.2	2.4	2.7	3.1
6	30.4	32.3	32.8	32.9	31.1	30.6	38.7

[0056] 由表 3 可以看出,本发明的试纸条和样本缓冲液对同一样本的全血和血浆检测结果偏差不大,样本缓冲液对检测结果无干扰反应,而且两者检测结果与贝克曼库尔特 DXI800 全自动化学发光免疫分析仪检测结果也较一致。表明本发明的试纸条和样本缓冲液具备良好的准确性。

[0057] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的

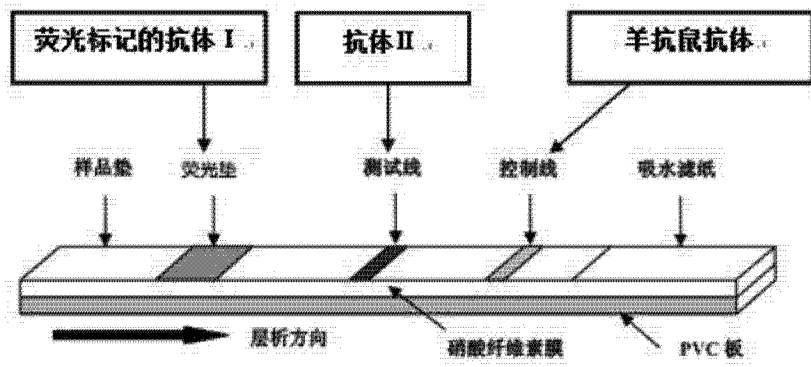


图 1

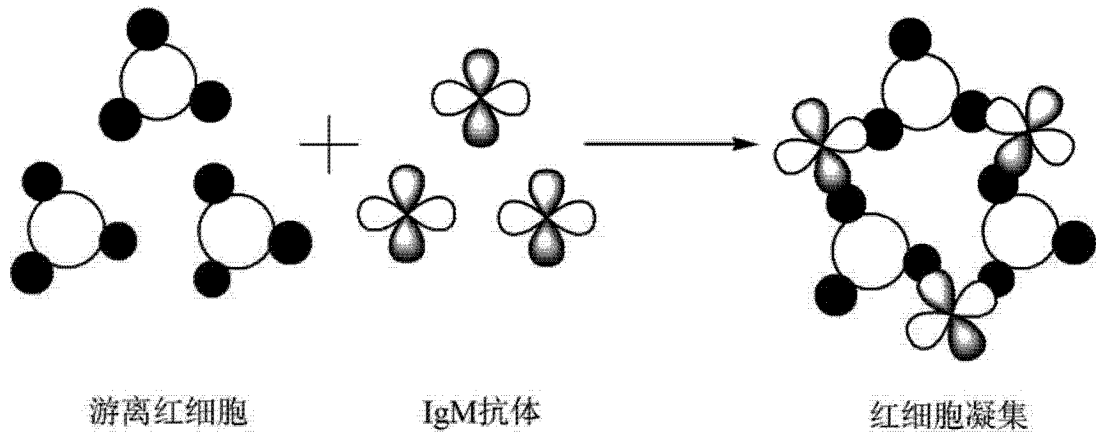


图 2

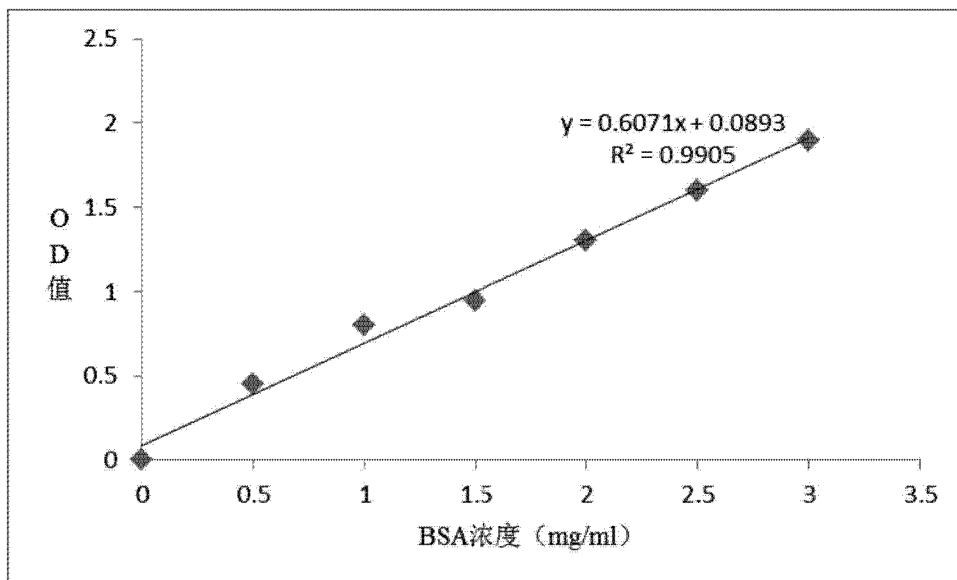


图 3

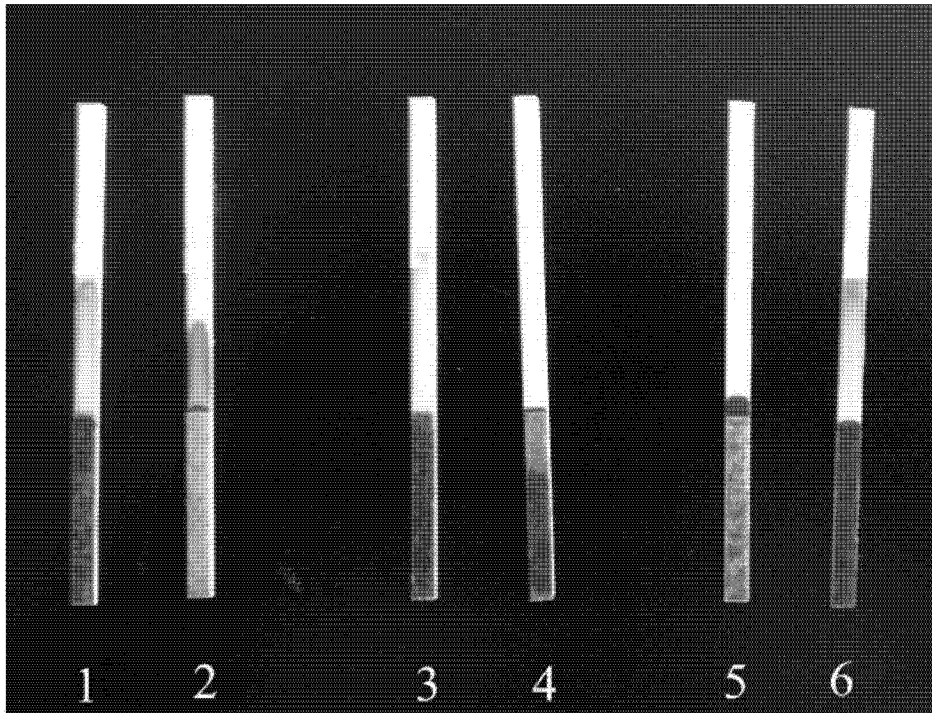


图 4

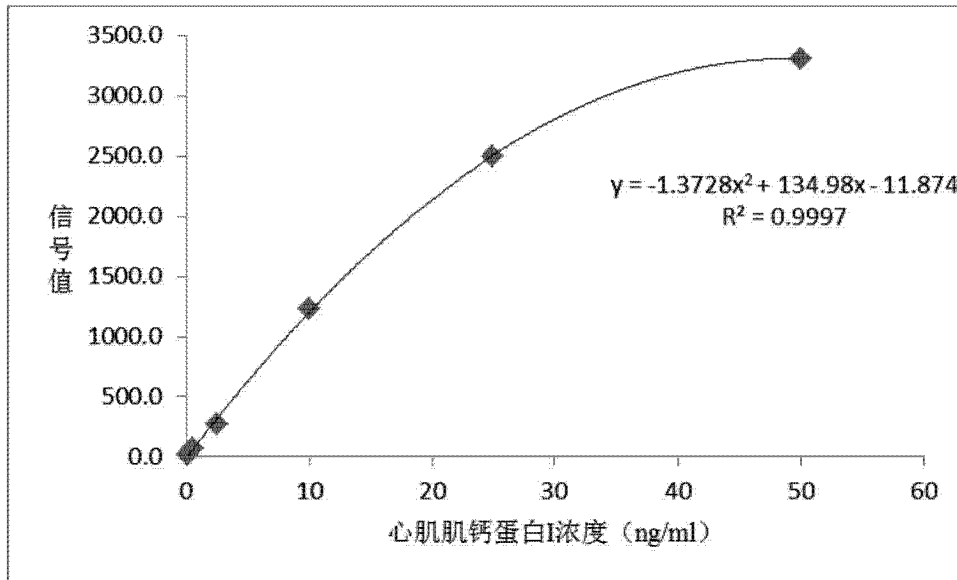


图 5

专利名称(译)	一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液及其应用		
公开(公告)号	CN104730231A	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201510136850.9	申请日	2015-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
[标]发明人	陈勇 张静 邱笑违		
发明人	陈勇 张静 邱笑违		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/545		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN104730231B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及荧光免疫定量检测领域，具体提供了一种用于荧光免疫定量检测的样本缓冲液及其应用。所述样本缓冲液由小牛全血离心取血清后，加入PB缓冲液混合制得，所述小牛血清与所述PB缓冲液以1:1的体积比混合。本发明还提供了一种全血样本荧光免疫定量检测的方法，将全血样本与所述样本缓冲液以1:2的体积比混合后，加到荧光免疫定量检测试纸条的样品垫上，利用荧光定量分析仪检测待测样本。利用本发明方法可以实现以全血、血浆或血清作为样本进行检测，成本低廉，且对检测结果无干扰。

小牛血清稀 释比例	小牛血清原 液	2:1稀释	1:1稀释	1:2稀释	1:3稀释
OD值	2.1	3.2	3.4	2.8	2.2