



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239031 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811048833.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2018.09.10

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 吉林大学

G01N 33/533(2006.01)

地址 130012 吉林省长春市人民大街5988号

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

申请人 长春恒晓生物科技有限责任公司

(72)发明人 王珺楠 李宝民 关恒 赵青

张金玲 刘戈 史永丰 刘宁

李添伟 隋宝珍 仇淑园 孙晓婷

孙净 黄景林 高敏 林林

朱道林 孙玉峰 王贺

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司 22100

代理人 白冬冬

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒

(57)摘要

一种建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,属于时间分辨免疫荧光检测技术领域。本发明的目的是采用侧向免疫层析法(Lateral flow immunoassay,LFIA)测定血液中MYBPC3浓度,能在15分钟内出结果,只需简单设备,能满足快速诊断AMI发生要求的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒。本发明包括试纸卡,是在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,和吸水垫,组装后形成试纸板,然后切割成3-4mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。本发明简单,快速,定量检测血液中MYBPC3浓度,用于早期诊断AMI发生,在临床上有广泛应用,将有很大大市场需求。

1. 一种建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:包括试纸卡,是在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,和吸水垫,组装后形成试纸板,然后切割成3-4mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

2. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:硝酸纤维素膜上包被有MYBPC3抗体形成检测线和抗IgG抗体形成质控线。

3. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:荧光微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种,直径为100-500nm。

4. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:荧光微球标记镧系元素螯合物,包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)元素螯合物中的一种;本发明优先选用铕螯合物(Europium Chelate),其荧光激发波长是420nm,发射波长是615nm。

5. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:用时间分辨荧光(TRFIA)分析仪检测时,在激发光(波长350-430nm)作用后,延时100-400uS,再测定试纸卡荧光(波长600-650nm)强度。

6. 根据权利要求1所述建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:MYBPC3抗体-荧光微球,选用铕螯合物荧光标记羧基修饰微球,用碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)处理羧基修饰荧光微球后,MYBPC3抗体偶联到上述荧光微球上,MYBPC3抗体与荧光微球重量比为1:50-1:5,用喷膜仪将MYBPC3抗体-荧光微球喷涂于结合垫上,干燥后,封存备用;选用MYBPC3抗体识别心肌型MYBPC3抗原表位,而不结合骨骼肌型MYBPC3抗原。

7. 根据权利要求1所述建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,其特征在于:纯化MYBPC3为校准品,用TRFIA分析仪测定不同浓度MYBPC3校准品在试纸卡检测线上呈现荧光强度,制备MYBPC3浓度标准曲线,建立MYBPC3浓度标准卡,输入到TRFIA分析仪,建立TRFIA分析仪自动显示样品中MYBPC3浓度检测系统,用于检测血清,血浆,及全血中MYBPC3浓度。

建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于时间分辨免疫荧光检测技术领域。

背景技术

[0002] 急性心肌梗塞(Acute myocardial infarction,AMI)已成为人类死亡的主要原因,由于AMI发病急、死亡率高的特点,AMI的早期诊断和及时治疗是降低AMI死亡率的关键所在。目前,诊断AMI主要是根据典型的临床表现,心电图的改变及实验室指标检测。约25%的AMI病人发病早期临床症状不明显,约50% AMI病人心电图无典型变化,在这种情况下,检测心肌损伤特异性标志物对AMI早期确诊就起到了关键性作用,需要研制出一种灵敏度高、特异性好、临床诊断符合率高、快捷方便的检测心肌损伤特异性指标试剂盒。

[0003] 临床上常检测血液中肌酸激酶MB同工酶(Creatine kinase-MB,CK-MB),肌钙蛋白T(Cardiac troponin T,cTnT),肌钙蛋白I(Cardiac troponin I,cTnI)心肌损伤标记物,判定AMI发生。

[0004] CK-MB主要存在于心肌细胞中,是常用的心肌损伤标志物之一,CK-MB在AMI发病后4~8h内增高,24h达峰值,两三天恢复正常。血清中CK-MB虽然具有较高的灵敏度,但心肌与骨骼肌中CK-MM有交叉反应,特异性不高,“窗口期”短(开始升高的时间较晚及持续时间较短),CK-MB不是判定心肌组织损伤特异性指标。

发明内容

[0005] 本发明的目的是采用侧向免疫层析法(Lateral flow immunoassay, LFIA)测定血液中MYBPC3浓度,能在15分钟内出结果,只需简单设备,能满足快速诊断AMI发生要求的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒。

[0006] 本发明包括试纸卡,是在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,和吸水垫,组装后形成试纸板,然后切割成3-4mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

[0007] 本发明硝酸纤维素膜上包被有MYBPC3抗体形成检测线和抗IgG抗体形成质控线。

[0008] 本发明荧光微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种,直径为100-500nm。

[0009] 本发明荧光微球标记镧系元素螯合物,包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)元素螯合物中的一种; 本发明优先选用铕螯合物(Europium Chelate),其荧光激发波长是420nm,发射波长是615nm。

[0010] 本发明用时间分辨荧光(TRFIA)分析仪检测时,在激发光(波长350-430nm)作用后,延时100-400uS,再测定试纸卡荧光(波长600-650nm)强度。

[0011] 本发明MYBPC3抗体-荧光微球,选用铕螯合物荧光标记羧基修饰微球,用碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)处理羧基修饰荧光微球后,MYBPC3抗体偶联到上述荧光微球上,MYBPC3抗体与荧光微球重量比为1:50-1:5,用喷膜仪将MYBPC3抗体-荧

光微球喷涂于结合垫上,干燥后,封存备用;选用MYBPC3抗体识别心肌型MYBPC3抗原表位,而不结合骨骼肌型MYBPC3抗原。

[0012] 本发明纯化MYBPC3为校准品,用TRFIA分析仪测定不同浓度MYBPC3校准品在试纸卡检测线上呈现荧光强度,制备MYBPC3浓度标准曲线,建立MYBPC3浓度标准卡,输入到TRFIA分析仪,建立TRFIA分析仪自动显示样品中MYBPC3浓度检测系统,用于检测血清,血浆,及全血中MYBPC3浓度。

[0013] 本发明简单,快速,定量检测血液中MYBPC3浓度,用于早期诊断AMI发生,在临床上广泛应用,将有很大市场需求。用于判断急性心肌梗塞发生。

附图说明

[0014] 图1是侧向免疫层析法试纸条侧面图;

图2是包装外壳后侧向免疫层析法试纸卡示意图;图1和图2中1是底板,2是样品垫,3是结合垫,4是硝酸纤维素膜,5是检测线,6是质控线,7是吸水垫,8是样品窗口,9是检测窗口,10是塑料外壳;

图3是MYBPC3浓度标准曲线;

图4是MYBPC3浓度敏感度曲线;

图5是MYBPC3蛋白结构示意图。

具体实施方式

[0015] cTnT 和cTnI (cTn) 仅存在于心肌细胞中,可用免疫学方法测定,对心肌损伤的诊断具高度敏感和特异性用于临床诊断AMI。cTnT在心肌损伤后3-6小时释放入血,12小时达高峰,升高倍数可达30~200倍,在血中可维持14天左右,所以它的最大有效诊断窗口宽至2小时-14天。在心肌损伤后,cTnT较cTnI更早释放入血,更易被检测到,血中浓度更高,对检测心肌损伤的价值也就可能更高。

[0016] AMI理想标志物是在心肌梗死后,从心肌细胞快速释放到血液中,而心脏肌球蛋白结合蛋白C (Myosin-Binding Protein C, Cardiac-Type, MYBPC3或cMyBP-C) 更符合这一标准。

[0017] 人MYBPC3基因位于11号染色体(11p11.2)上,含有35个外显子,编码1273个氨基酸残基组成MYBPC3蛋白,属于Ⅲ型纤连蛋白超家族和免疫球蛋白超家族,含有3个Ⅲ型纤连蛋白结构域(Fibronectintype3, FN3)和8个免疫球蛋白样结构域(Immunoglobulin, Ig), Pro-Ala结构域(PAdomain), Myosin (S2) 结合区(Mdomain)。FN3是两片反向平行的 β -链形成的层状结构,含FN3的多为受体蛋白;Ig由约70-110氨基酸组成,是两层反向平行的 β -折叠链形成的层状结构,看MYBPC3蛋白结构示意图。

[0018] MYBPC3参与肌节蛋白的结构和功能,MYBPC3的C10结构域与肌球蛋白纤维结合,而C8~C10结构域结合肌联蛋白(Titin),有稳定肌小节结构作用。MYBPC3在C1和C2结构域之间有个特定区域,M domain与肌球蛋白(Myosin)颈部结合,也是MYBPC3磷酸化部位(Phosphorylation sites),作为cAMP依赖的蛋白激酶以及钙调蛋白依赖的蛋白激酶的作用位点,磷酸化心肌特定的模序调节心肌收缩力,MYBPC3不仅参与心肌结构的维持,还参与细胞内信息传递,影响肌丝的舒缩运动。

[0019] 机体内存在3种不同的MyBP-C异构体,通过不同基因编码,但3种MyBP-C异构体氨基酸序列有很高同源性.与骨骼肌型MyBP-C相比较,心脏型MyBP-C的N-端具有独特结构域(C0)并具有特异性抗原表位,可用免疫学方法特异性测定出心脏型 MyBP-C。

[0020] MYBPC3是心肌细胞特有的粗肌丝结构蛋白之一,AMI发生时,血清MYBPC3浓度快升高,主要由于MYBPC3具有高度的可溶性及对蛋白水解酶非常敏感,在心肌缺血时,蛋白水解酶被启动并水解粗肌丝蛋白,MYBPC3去磷酸化并释放入血,导致血清中MYBPC3浓度在短时间内急剧升高。

[0021] MYBPC3在AMI发生后,2小时释放入血,4-6小时达高峰,在12小时,MYBPC3恢复至基线水平。

[0022] 研究发现,需要3-9mg 心肌坏死时,能测出cTNT/I水平增高;而0.07mg心肌坏死时,就能测出MYBPC3水平增高。由于MYBPC3分子量大,在AMI超早期,完整的MYBPC3及其水解产物持续大量释放入血,能高于cTNT/I数倍,甚至数十倍,易于检测,测定血液中MYBPC3浓度,可成为超早期诊断AMI敏感和特异性指标。

[0023] AMI是急症,需要快速诊断和治疗。本发明采用侧向免疫层析法(Lateral flow immunoassay, LFIA)测定血液中MYBPC3浓度,能在15分钟内出结果,只需简单设备,能满足快速诊断AMI发生要求。

[0024] 本发明试剂盒是利用铕螯合物(Europium Chelate)荧光寿命长特征,延时测定,即时间分辨荧光法(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA),结合侧向免疫层析技术(Lateral flow immunoassay, LFIA),实现定量检测MYBPC3。本发明试剂盒主要有检测MYBPC3试纸卡,由在底板上顺次相互搭接样品垫,结合垫,硝酸纤维素膜,和吸水垫组成试纸条,装在塑料外壳中成为试纸卡。制备方法包括:MYBPC3抗体偶联铕螯合物荧光微球;MYBPC3抗体-荧光微球喷涂到结合垫上,MYBPC3抗体喷涂到硝酸纤维素膜上;加MYBPC3校准品到MYBPC3试纸卡后,用时间分辨荧光(TRFIA)分析仪进行检测,建立TRFIA分析仪自动显示MYBPC3浓度检测系统。

[0025] 本发明选用铕螯合物荧光,荧光寿命长,采用延时测定,排出背景信号;增加检测时间,提高检测敏感性。

[0026] 本发明包括试纸卡,是在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,和吸水垫,组装后形成试纸板,然后切割成3-4mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

[0027] 本发明硝酸纤维素膜上包被有MYBPC3抗体形成检测线和抗IgG抗体形成质控线。

[0028] 本发明荧光微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种,直径为100-500nm。

[0029] 本发明荧光微球标记镧系元素螯合物,包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)元素螯合物中的一种;本发明优先选用铕螯合物(Europium Chelate),其荧光激发波长是420nm,发射波长是615nm。

[0030] 本发明用时间分辨荧光(TRFIA)分析仪检测时,在激发光(波长350-430nm)作用后,延时100-400uS,再测定试纸卡荧光(波长600-650nm)强度。

[0031] 本发明MYBPC3抗体-荧光微球,选用铕螯合物荧光标记羧基修饰微球,用碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)处理羧基修饰荧光微球后,MYBPC3抗体偶联

到上述荧光微球上,MYBPC3抗体与荧光微球重量比为1:50-1:5,用喷膜仪将MYBPC3抗体-荧光微球喷涂于结合垫上,干燥后,封存备用;选用MYBPC3抗体识别心肌型MYBPC3抗原表位,而不结合骨骼肌型MYBPC3抗原。

[0032] 本发明纯化MYBPC3为校准品,用TRFIA分析仪测定不同浓度MYBPC3校准品在试纸卡检测线上呈现荧光强度,制备MYBPC3浓度标准曲线,建立MYBPC3浓度标准卡,输入到TRFIA分析仪,建立TRFIA分析仪自动显示样品中MYBPC3浓度检测系统,用于检测血清,血浆,及全血中MYBPC3浓度。

[0033] 一.建立TRFIA免疫层析检测MYBPC3试纸卡

本发明所述的TRFIA免疫层析法检测MYBPC3试剂盒,含有试纸卡,是在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球结合垫、喷涂有MYBPC3抗体(检测线)和抗IgG抗体(质控线)硝酸纤维素膜,和吸水垫,组装后形成试纸板,然后切割成3-5mm宽试纸条,将试纸条装入塑料外壳中形成试纸卡。

[0034] 所述结合垫上吸附的铈螯合物荧光微球,直径范围100-500nm,进一步优选,所选用荧光微球直径是300nm。

[0035] 所述荧光微球标记镧系元素,包括铈(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)中的任意一种或几种。进一步优选,所选用镧系元素为铈螯合物(Europium Chelate),在基态下稳定,在420nm激发光源作用下,能够发射出波长615nm荧光。

[0036] 所述与荧光微球偶联抗体为3个MYBPC3单克隆抗体混合,识别心肌型MYBPC3抗原表位,不结合骨骼肌型MYBPC3抗原;所述检测线的抗体为抗心肌型MYBPC3多克隆抗体。

[0037] 制备MYBPC3单克隆抗体-荧光微球

(1)将MYBPC3单克隆抗体加到抗体净化和浓缩离心柱中(Innova Biosciences),按说明书步骤,净化和浓缩MYBPC3抗体,用磷酸盐缓冲液调节MYBPC3单克隆抗体浓度到1.0mg/ml;

(2)用50mmol MES缓冲液(pH6.0)洗涤铈螯合物荧光标记羧基修饰微球,加入10mmol碳二亚胺(EDC)和20mmol N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),室温下,反应20分钟。

[0038] (3)用上述MES缓冲液洗涤微球,用100mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)复溶微球后,加入净化后MYBPC3抗体,使MYBPC3抗体与微球的质量比为1:40,室温下,反应2小时。

[0039] (4)用200mM Tris(pH7.5)终止反应。

[0040] (5)用0.2% BSA,0.01% Tween-20,50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)洗涤微球,再悬浮MYBPC3抗体-荧光微球。

[0041] 制备吸附MYBPC3单克隆抗体-荧光微球的结合垫

用10mM Tris缓冲液(pH8.0)含0.1%BSA,10% Sucrose, 0.2% PEG,0.2%PVP,0.02% Tween20, 0.01% NaN₃复溶MYBPC3 抗体-荧光微球至需要浓度。本发明选用玻璃纤维结合垫,浸泡在, 10mmolTris缓冲液(pH8.0),含0.2% PVP,0.2% PEG, 10% Sucrose, 0.02% Tween-20,0.01% NaN₃,室温下,1 小时,再37°C,烘干5小时。将上述玻璃纤维膜放在Bio-DotXYZ3060三维喷点平台上,用非接触式微量喷头,5ul-15ul/cm 速度,将MYBPC3单克隆抗体-荧光微球喷到玻璃纤维膜上,37°C,烘干4小时,加入干燥剂封存备用。

[0042] 制备有检测线和质控线的硝酸纤维素膜

用10mM Tris缓冲液(pH8.0)含0.1%BSA,5% Sucrose, 0.01% Tween20, 0.01% NaN₃

溶解MYBPC3多克隆抗体和抗鼠IgG 抗体至需要浓度,将硝酸纤维素膜放在Bio-DotXYZ3060 三维喷点平台上,用非接触式微量喷头,0.8-1.5 μ l/cm 速度,将MYBPC3抗体和抗鼠IgG 抗体喷到硝酸纤维素膜上,分别形成检测线和质控线,两线间隔为4-6mm, 37 $^{\circ}$ C,烘干2小时,加入干燥剂封存备用。

[0043] 组装TRFIA免疫层析法检测MYBPC3试纸卡

在底板上依次粘贴预埋样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球结合垫、有检测线和质控线硝酸纤维素膜,和吸水垫,得到试纸板,按照要求切割成4mm宽试纸条,将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

[0044] 二. 建立TRFIA分析仪检测MYBPC3浓度系统

TRFIA分析仪是一种光学检测系统,可在激发光(350-430nm)作用后,延时100-400 μ S,再测定荧光(600-650nm)强度。对MYBPC3检测范围为0.05-200ng/mL。

[0045] 将校准品放室温平衡,取出MYBPC3试纸卡,平放;取20 μ l校准品,加到样品孔中,反应15-20分钟,用TRFIA分析仪,测定试纸卡中检测线和质控线荧光强度,制备校准品浓度与荧光强度关系曲线,进一步设置TRFIA分析仪浓度与荧光强度相关参数后,获得TRFIA分析仪自动显示MYBPC3浓度检测系统。

[0046] 加血清(20 μ l),血浆(20 μ l),或全血(40 μ l)到MYBPC3试纸卡样品孔中,反应15-20分钟,用TRFIA分析仪,选用MYBPC3浓度自动显示系统,检测血清,血浆,或全血中MYBPC3。

[0047] 结合具体实验,对本发明原理和结果作进一步说明,以下列出本发明多步骤实验过程。

[0048] 一、制备TRFIA免疫层析法检测MYBPC3试剂盒

(一)时间分辨荧光免疫层析法测定MYBPC3试纸卡组成

组装试纸卡操作在湿度小于30%,稳定30 $^{\circ}$ C的房间进行。测定MYBPC3侧向免疫层析试纸条(图1)包括底板以及沿所述底板长度方向顺次粘覆于底板上的和样品垫(22mm)、结合垫(10mm)、硝酸纤维素膜(25mm)、吸水纸(30mm);其中,硝酸纤维素膜粘覆于底板中间部位,其上有相间隔的由抗MYBPC3抗体涂层形成的检测线和由羊抗鼠IgG抗体涂层形成的质控线,检测线位于结合垫一侧,质控线靠近吸水纸一侧;结合垫喷涂有MYBPC3抗体-钨螯合物荧光微球涂层;吸水纸、硝酸纤维素膜、结合垫以及样品垫之间,依次与相邻部位接触且部分重叠,形成试纸板。

[0049] 本发明实施例中,检测线与质控线平行设置,检测线与质控线之间的距离为5mm。

[0050] 吸水纸位于硝酸纤维素膜靠近质控线一端,且吸水纸一端与硝酸纤维素膜有部分重叠,其重叠部分长度为2mm;吸水纸重叠在硝酸纤维素膜上方。

[0051] 结合垫位于硝酸纤维素膜靠近检测线一端;且结合垫一端与硝酸纤维素膜部分重叠,其重叠部分长度为2mm;结合垫重叠在硝酸纤维素膜上方。

[0052] 样品垫位于结合垫的外侧,并与结合垫部分重叠,其重叠部分长度为5mm;样品垫重叠在结合垫上方。

[0053] 将上述组装成试纸板切割成宽度为4mm试纸条。

[0054] 将上述结构试纸条装入塑料外壳中构成试纸卡(图2),外壳包括底座和卡盖,卡盖上设置有加样窗口(8)检测窗口(9),露出试纸条局部区域;加样窗口开口于样品垫(2)上部,露出部分样品垫区域;观察窗口开口于硝酸纤维素膜(4)上部,以露出全部检测线(5)和

质控线(6)。

[0055] 本发明选用玻璃纤维Fusion5样品垫(GE Healthcare),浸泡在20mmolTris缓冲液(pH7.5)含0.02% Tween-20,0.01% NaN₃,室温下,1 小时,再37°C,烘干5小时,干燥封闭,备用。本发明选用玻璃纤维GFDX结合垫(EMD Millipore),浸泡在, 10mmolTris缓冲液(pH8.0),含0.2% PVP,0.2% PEG, 10% Sucrose, 0.02% Tween-20,0.01% NaN₃,室温下,1 小时,再37°C,烘干5小时,干燥封闭,备用。

[0056] (二)MYBPC3单克隆抗体化学偶联到钕螯合物荧光微球上

本发明实施例中,选用钕螯合物(Europium Chelate)荧光标记羧基修饰微粒(Carboxylated Fluorescent Microspheres),购于Ocean NanoTech, 可选用钕螯合物荧光标记羧基修饰微粒直径为100-500nm。

[0057] 本发明实施例中,选用MYBPC3单克隆抗体(Invitrogen),用InnovaBiosciences公司抗体浓缩和净化离心柱(AbSelect™ Antibody Concentration and Clean-Up Kit)预处理MYBPC3抗体, 步骤如下:

1. 加500u1MYBPC3抗体到抗体浓缩和净化离心柱中,
2. 离心,15000g 1-4分钟, 减少MYBPC3抗体到100u1
3. 去除收集管中液体,加400u120mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)到抗体浓缩和净化离心柱中

4. 离心,15000g 1-4分钟, 减少离心柱中液体积到100u1

5. 重复3-4步骤,6次以上

6. 吸出抗体浓缩和净化离心柱中约100u1MYBPC3抗体

7. 测定MYBPC3抗体浓度,50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5) 稀释MYBPC3抗体到需要浓度

本发明实施例中,用EDC和Sulfo-NHS把MYBPC3抗体偶联到钕螯合物荧光标记羧基修饰微球(直径 300nm)上,步骤如下:

1. 取0.4mlCarboxylated Fluorescent Microspheres(10mg/ml),直径300nm,加入1.5ml离心管中,离心,10000rpm,5分钟,去除上清液

2. 再加入1.0ml 50mmolMES缓冲液(pH6.0)到离心管中,悬浮微球

3. 离心,10000rpm,5分钟,去除上清液

4. 重复2-3步骤2次

5. 再加0.5ml50mmol MES缓冲液(pH6.0)含10mmol碳二亚胺(EDC)和20mmol N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)到离心管中,混均,25°C, 反应20分钟

6. 离心,10000rpm,5分钟,去除反应液

7. 加入1.0ml 50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)到离心管中

8. 离心,10000rpm,5分钟,去除上清液,重复8-9步骤1次

9. 加入0.4ml预处理过MYBPC3抗体(0.3mg/ml)加入到上述离心管中,25°C, 反应2小时

10. 加入50u1 of 0.2M Tris(pH7.5)到离心管中,25°C, 反应30分钟

11. 离心,10000rpm,5分钟,去除上清液,

12. 加入1.0ml 0.2% BSA,0.01% Tween-20 50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)到离心管中

13. 离心,10000rpm,5分钟,去除上清液,重复13-14步骤2次

14. 用10mM Tris缓冲液(pH8.0)含0.1%BSA,10% Sucrose, 0.2% PEG, 0.2%PVP,0.02%

Tween20, 0.01% Na₃悬浮MYBPC3抗体-荧光微球至需要浓度, 4°C储存, 备用。

[0058] (三). 喷涂MYBPC3抗体到结合垫和硝酸纤维素膜上

1. 将上述制备MYBPC3抗体-钨螯合物荧光微球液(0.2mg/ml), 用Bio-DotXYZ3060仪, 用非接触式微量喷头方式, 10ul/cm 速度, 将MYBPC3单克隆抗体-荧光微球喷到玻璃纤维膜上, 37°C, 烘干2小时, 加入干燥剂封存备用。

[0059] 2. 用10mM Tris缓冲液(pH8.0)含0.2%BSA, 5% Sucrose, 0.01% Tween20, 0.01% Na₃溶解MYBPC3多克隆抗体(2.2mg/ml)和抗鼠IgG 抗体(0.5mg/ml), 将硝酸纤维素膜放在Bio-DotXYZ3060仪, 用非接触式微量喷头方式, 1.0ul/cm 速度, 将MYBPC3抗体和抗鼠IgG抗体喷到硝酸纤维素膜上, 两线间隔5mm, 37°C, 烘干2小时, 加入干燥剂封存备用。

[0060] 二. TRFIA分析仪检测MYBPC3浓度过程

(一). MYBPC3试纸卡操作过程

使用MYBPC3试纸卡进行定量检测MYBPC3时, 在样品垫窗口上加入校准液和样品液(20ul), 全血为40ul, 在毛细现象作用下, 样品液向吸水垫方向泳动, 当样品液中含有MYBPC3移动到结合垫时, MYBPC3与MYBPC3抗体-荧光微球结合, 形成MYBPC3-MYBPC3抗体-荧光微粒复合物, 随着层析作用, 复合物向前移动, 到达硝酸纤维素膜检测线处, 与包被MYBPC3抗体进一步结合, 形成MYBPC3抗体-MYBPC3-MYBPC3抗体-荧光微球复合物, 聚集在检测线上; 而未结合MYBPC3抗体-荧光微球继续前移, 到达质控线时, 此处包被抗鼠IgG抗体与MYBPC3抗体-荧光微球结合, 在质控线处出现抗鼠IgG抗体-MYBPC3抗体-荧光微球复合物聚集, 整个反应在10-20分钟内完成, 检测线和质控线都应产生相应的荧光信号, 使用TRFIA分析仪进行检测。

[0061] (二). 建立TRFIA分析仪自动显示检测MYBPC3浓度程序

1. 建立MYBPC3浓度标准曲线

用PBS稀释纯化MYBPC3, 制成不同浓度MYBPC3校准品(0, 5, 10, 20, 50, 100, 200ng/ml), 加20ul MYBPC3校准品到MYBPC3免疫层析试纸卡样品窗口部位, 再加150ul实验液(PBS, pH7.4, 0.02% Tween20)到样品窗口部位, 进行膜层析反应, 15分钟后, 用TRFIA分析仪, 选定激发波长420nm, 检测波长615nm, 延迟测定时间200us, 测定试纸条卡检测线及质控线荧光强度。以MYBPC3校准品浓度为纵坐标, 校准品荧光强度为横坐标, 制备MYBPC3校准品浓度标准曲线, 得到方程式, $y=2.8922x-8.0125$, $R^2=0.9929$, 看图3, 通过此标准曲线得到MYBPC3浓度标准卡, 作为对样品中所含MYBPC3浓度进行定量分析的基础。

[0062]

MYBPC3	0	5	10	20	50	100	200ng/ml
荧光强度	0.42	3.38	5.87	12.41	19.72	38.47	72.58
X100000	0.54	2.25	7.22	10.58	22.46	41.33	66.74
	0.346	3.02	5.85	10.26	24.83	39.82	69.48
Average	0.435333	2.883333	6.313333	11.08333	22.33667	39.87333	69.6

[0063] 输入上述标准卡到TRFIA分析仪, 建立自动运行系统, TRFIA分析仪通过相应的分析软件自动计算出待测样品中MYBPC3浓度。

[0064] 测定0-5ng/ml MYBPC3校准品荧光强度, 1-5ng/ml MYBPC3校准品荧光强度有线性关系, TRFIA分析仪测定1ng/ml MYBPC3校准品荧光强度(0.97)与0mg/ml MYBPC3校准品荧光强度(0.43)相差约2倍, 确定此试剂盒TRFIA分析仪测定MYBPC3敏感度为1ng/ml。

[0065]

MYBPC3	0	0.2	0.5	1	2	5ng/ml
荧光强度	0.37	0.54	0.73	0.88	1.84	3.86
X100000	0.48	0.86	0.55	0.92	1.62	3.41
	0.44	0.48	0.62	1.12	1.58	3.36
Average	0.43	0.626667	0.633333	0.973333	1.68	3.543333

[0066] 用MYBPC3免疫层析试纸卡检测血清中MYBPC3浓度

加20ul血清样品到测定MYBPC3TRFIA层析试纸卡加样窗口部位,进行膜层析反应,15分钟后,用TRFIA分析仪自动检测系统,测定血清样品中MYBPC3浓度,结果如下:

血清样品	1	2	3	4	5	6	7	8	
荧光强度	7.84	12.2	5.53	22.4	3.45	6.83	30.46	10.25	X100000
MYBPC3	14.66	27.26	7.98	56.74	2	11.7	80.02	21.5	ng/ml

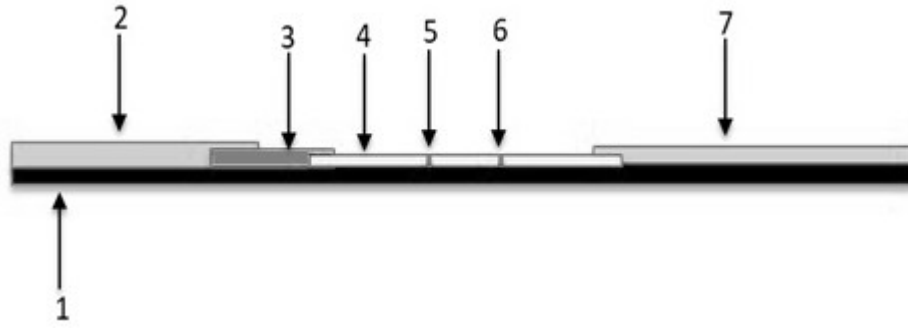


图1

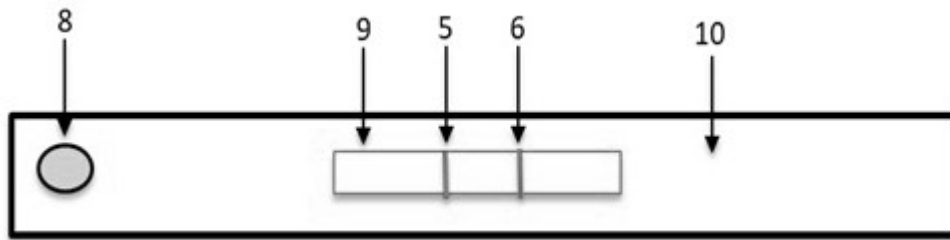


图2

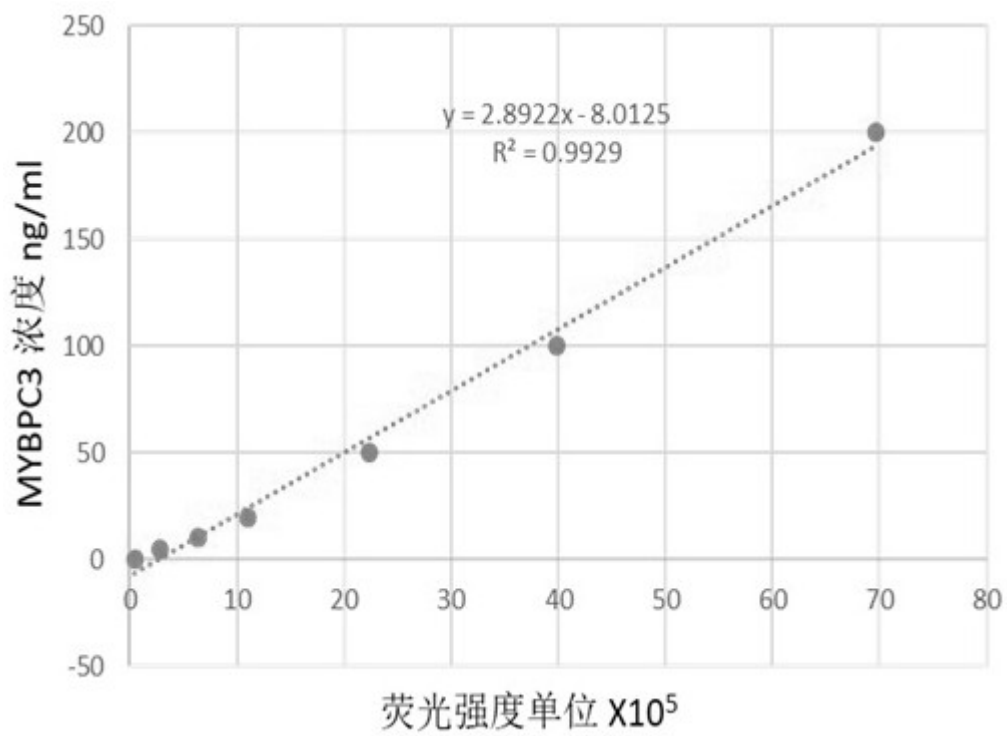


图3

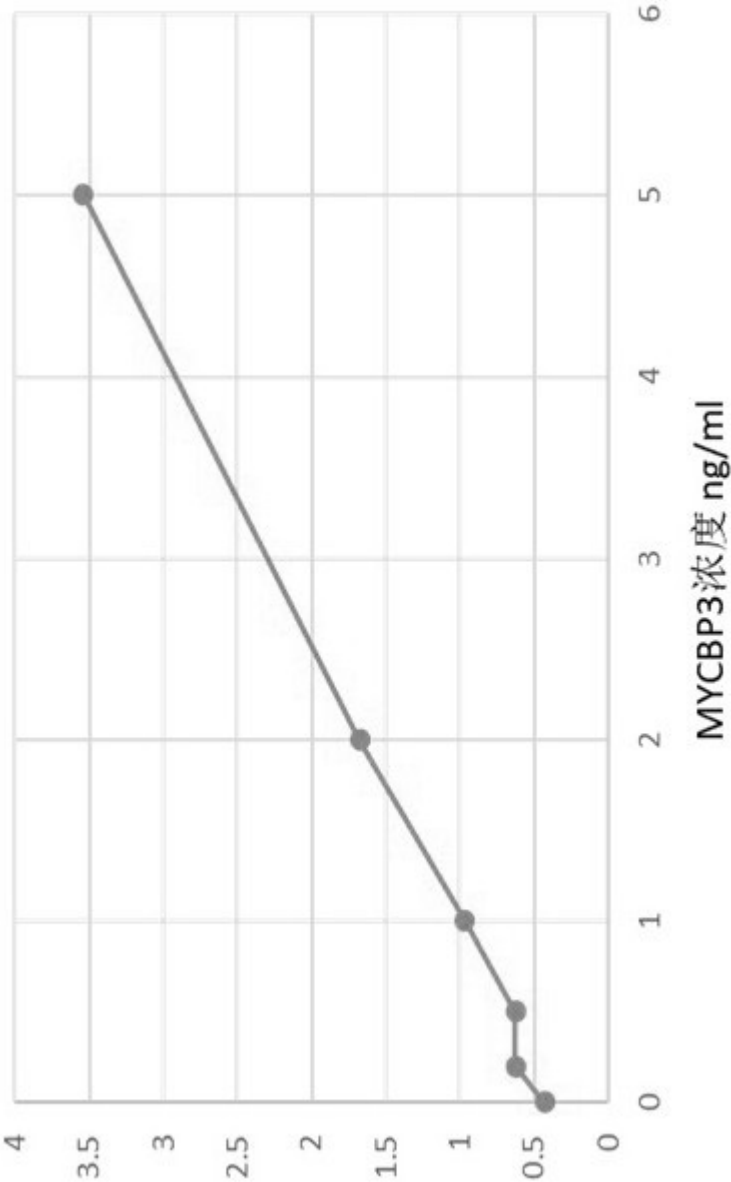


图4

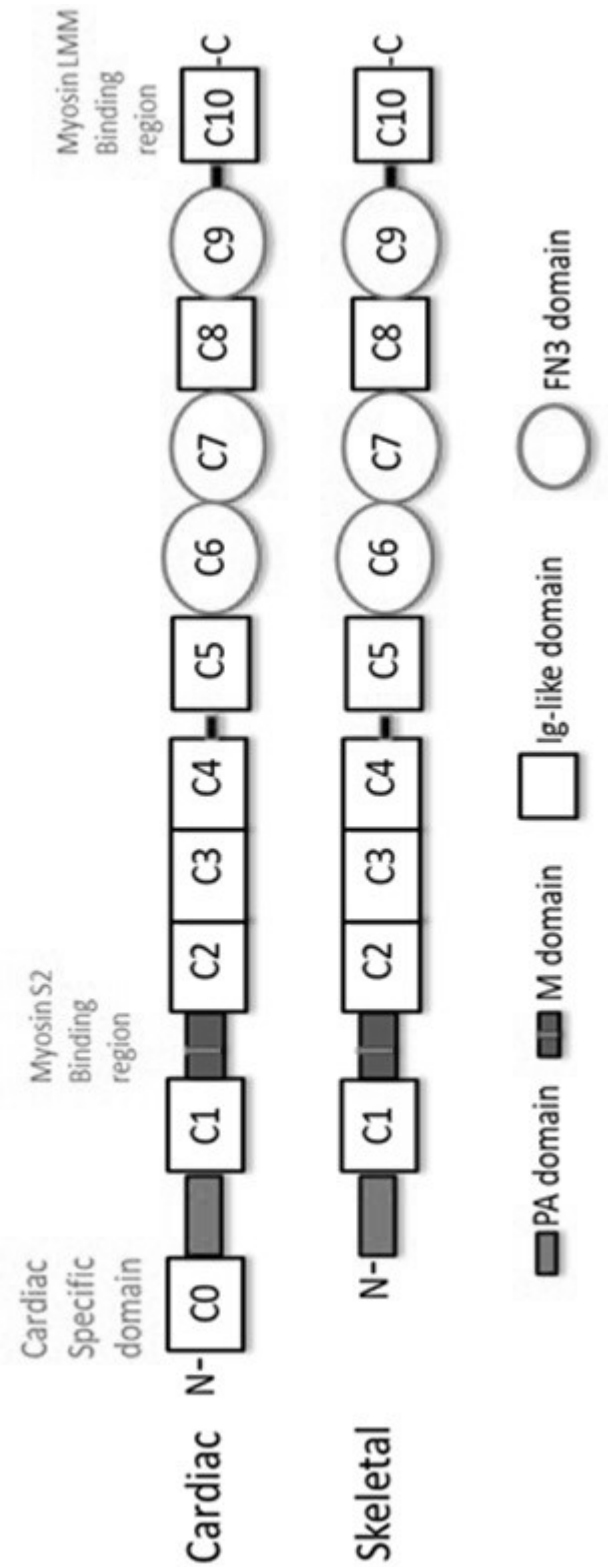


图5

专利名称(译)	建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒		
公开(公告)号	CN109239031A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811048833.X	申请日	2018-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学 长春恒晓生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	吉林大学 长春恒晓生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学 长春恒晓生物科技有限责任公司		
[标]发明人	王珺楠 李宝民 关恒 赵青 张金玲 刘戈 史永丰 刘宁 李添伟 隋宝珍 仇淑园 孙晓婷 孙净 黄景林 高敏 林林 朱道林 孙玉峰 王贺		
发明人	王珺楠 李宝民 关恒 赵青 张金玲 刘戈 史永丰 刘宁 李添伟 隋宝珍 仇淑园 孙晓婷 孙净 黄景林 高敏 林林 朱道林 孙玉峰 王贺		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		

CPC分类号	G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577
外部链接	Espacenet SIPO

摘要(译)

一种建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒，属于时间分辨免疫荧光检测技术领域。本发明的目的是采用侧向免疫层析法（Lateral flow immunoassay,LFIA）测定血液中MYBPC3浓度，能在15分钟内出结果，只需简单设备，能满足快速诊断AMI发生要求的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MYBPC3试剂盒。本发明包括试纸卡，是在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MYBPC3抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜，和吸水垫，组装后形成试纸板，然后切割成3-4mm宽的试纸条，将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。本发明简单，快速，定量检测血液中MYBPC3浓度，用于早期诊断AMI发生，在临床上有广泛应用，将有很大市场需求。

