



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108931636 A

(43)申请公布日 2018.12.04

(21)申请号 201810708125.8

(22)申请日 2018.07.02

(71)申请人 威海纽普生物技术有限公司

地址 264200 山东省威海市高区火炬路-
213-1号创新创业基地C座301

(72)发明人 王有志 刘衍亮 陈萍萍 宋璐琳
王文亮 李红江

(74)专利代理机构 威海科星专利事务所 37202
代理人 初姣姣

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及医学免疫学中免疫层析技术领域,具体地说是一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,其由免疫层析试纸条和塑料外壳,所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成的试纸条,所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上,所述试剂垫包被有鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜上的检测线包被有兔抗人ST2多克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体,该试剂盒定性测定分界线浓度为40-55ng/ml,荧光免疫分析仪检测灵敏度为1ng/ml,线性范围为1-400ng/ml,采用彩色荧光微球可以快速得到定性结果并稍迟得到定量结果,具有操作简单、反应迅速、灵敏度高等特点,有助于满足不同检验场景的需求。

1. 一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,由免疫层析试纸条和塑料外壳组成,所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上,其特征在于所述试剂垫包被有鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜上的检测线包被有兔抗人ST2多克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于所述试剂垫的彩色荧光微球的直径范围是150-180nm;所述彩色荧光微球掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)中的任意一种或几种的混合物;所述彩色荧光微球掺杂的彩色染料含有氨基或者羟基官能团,为酸性紫1、酸性紫7、酸性蓝25、分散红58中的任意一种或几种的混合物。

3. 根据权利要求1所述的一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于所述试剂垫采用如下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含2.0% Triton X-100,3.0% BSA, pH7.5的150mM Tris-HCL处理液中,4℃浸泡3小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用,将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将鼠抗人ST2单克隆抗体标记彩色荧光微球喷到玻璃纤维膜,37℃烘干2小时。

4. 根据权利要求1所述的一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于试剂垫上的鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球采用如下步骤制得:

步骤1:彩色荧光微球的醛基化:取2mg彩色荧光微球,用50mM, pH9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为15000rpm,时间为15分钟,最后重悬于100μl的上述碳酸盐缓冲液中,加入200μl醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μl的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

步骤2:制备鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,将0.8mg用于检测的鼠抗人ST2单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的彩色荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(200mM Tris-HCL, pH7.5, 含2% BSA, 8% 蔗糖),4℃封闭过夜;然后用200mM Tris-HCL, pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μl的200mM Tris-HCL缓冲液中(含0.9% NaCl, 1% BSA, 0.5% Tween 20),4℃避光保存备用。

5. 根据权利要求1所述的一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

步骤1:采购ST2蛋白并按照常规兔多克隆抗体制备流程进行用于捕获的兔抗人ST2多克隆抗体的免疫,收集抗血清,采用蛋白亲和纯化的工艺对抗体进行亲和纯化,预实验验证与前述鼠抗人ST2单克隆抗体的匹配性,然后用包被稀释液作为透析液进行透析处理,保存于-20℃备用;

步骤2:分别用包被稀释液将兔抗人ST2多克隆抗体和山羊抗鼠多克隆抗体调整浓度到2-8mg/ml,膜液量为1-2μl/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

6. 根据权利要求1所述的一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有2.0% Triton X-100, 2% BSA, 0.2M Tris缓冲液, pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体地说是一种能够快速准确的对ST2进行同时定性和定量分析的一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] ST2是IL-1受体超家族成员,最先由Tominaga在1989年发现,长期以来被认为是一个孤儿受体与炎症和免疫性疾病相关,到2005年发现了它的特异性配体IL-33,于是对ST2的研究扩展到一个新的领域。人ST2的基因位于染色体2q12,约40KD,表达于肥大细胞、巨噬细胞、激活的辅助性T细胞2(Th2)、心肌细胞和心肌成纤维细胞。ST2基因有4种转录产物,其中2个最重要的亚型是跨膜型ST2(ST2L)和可溶性ST2(sST2),是由启动子选择性剪切和3'端加工形成的。ST2L包括一个胞外结构域是由3个连续的免疫球蛋白模体组成、一个跨膜结构域和一个Toll/IL-1受体(TIR)胞内结构域;与ST2L相比,sST2缺失跨膜及胞内结构域,仅由一个含9个氨基酸的C末端序列组成,可以分泌到细胞外;而ST2V缺失第3个免疫球蛋白模体,并在C末端选择性剪接形成一个特殊的疏水区;ST2LV是选择性剪切掉了ST2L的跨膜结构域而形成的。ST2基因在心肌细胞和心肌成纤维细胞遭受机械张力时均会上调表达,sST2作为IL-33的诱骗受体,与IL-33结合后阻断IL-33与ST2L的结合,减弱其下游通路激活所起的保护心脏作用,进而加重心肌重塑和心功能障碍,并与增加心衰、心肌梗死、心血管性死亡等不良心血管事件的发生相关。

[0003] ST2检测方法主要有定量检测方法和定性检测方法,定量检测方法有双抗夹心法(ELISA)、化学发光法、胶乳颗粒增强免疫比浊法等。定性方法主要有胶体金免疫层析法和时间分辨免疫荧光法。定量方法普遍需要昂贵的仪器,并且获得结果时间都偏长,而ST2检测相关的心肌梗死、心衰等疾病迫切需要尽快获得检测结果;而现有的定性检测虽然可以用时较短,但是定性结果容易存在偏差,获得阳性结果的时候也无法获得病情的严重程度。如何能够解决快速获得结果用于心肌梗死等时效性强的诊治以及获得定量结果确定后期的针对性治疗,是目前临床诊断产品研究领域亟需解决的重要问题。

发明内容:

[0004] 本发明针对现有检测产品存在的缺点和不足,提出了一种结合了用彩色微球快速定性和荧光微球准确定量的优点,既能满足只需定性但是要求出结果尽可能快,或者缺乏仪器、没有电源等特殊检验场景的需求,又能结合荧光免疫层析分析仪实现需要灵敏度高、准确定量的测定ST2指标的测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明可以通过以下措施达到:

[0006] 一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒,由免疫层析试纸条和塑料外壳组成,所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上,所述试剂垫包被有鼠抗人ST2单

克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜上的检测线包被有兔抗人ST2多克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体。

[0007] 本发明所述试剂垫的彩色荧光微球的直径范围是150-180nm;所述彩色荧光微球掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述彩色荧光微球掺杂的彩色染料含有氨基或者羟基官能团,为酸性紫1、酸性紫7、酸性蓝25、分散红58中的任意一种或几种的混合物。

[0008] 本发明所述试剂垫采用如下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含2.0% Triton X-100,3.0% BSA,pH7.5的150mM Tris-HCL处理液中,4℃浸泡3小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用,将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将鼠抗人ST2单克隆抗体标记彩色荧光微球喷到玻璃纤维膜,37℃烘干2小时。

[0009] 本发明中试剂垫上的鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球采用如下步骤制得:

[0010] 步骤1:彩色荧光微球的醛基化:取2mg彩色荧光微球,用50mM,pH9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为15000rpm,时间为15分钟,最后重悬于100μl的上述碳酸盐缓冲液中,加入200μl醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μl的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0011] 步骤2:制备鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,将0.8mg用于检测的鼠抗人ST2单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的彩色荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(200mM Tris-HCL,pH7.5,含2% BSA,8%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用200mM Tris-HCL,pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μl的200mM Tris-HCL缓冲液中(含0.9% NaCl,1% BSA,0.5% Tween 20),4℃避光保存备用。

[0012] 本发明所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

[0013] 步骤1:采购ST2蛋白并按照常规兔多克隆抗体制备流程进行用于捕获的兔抗人ST2多克隆抗体的免疫,收集抗血清,采用蛋白亲和纯化的工艺对抗体进行亲和纯化,预实验验证与前述鼠抗人ST2单克隆抗体的匹配性,然后用包被稀释液作为透析液进行透析处理,保存于-20℃备用;

[0014] 步骤2:分别用包被稀释液将兔抗人ST2多克隆抗体和山羊抗鼠多克隆抗体调整浓度到2-8mg/ml,膜液量为1-2μl/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0015] 本发明所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有2.0% Triton X-100,2% BSA,0.2M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0016] 本发明在使用的过程中,首先将检测试剂盒及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;然后精确吸取25μl血清样本,样本为全血时吸取50μl样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100μl样本稀释液,样本稀释液采用生理盐水或PBS;5-8分钟后,肉眼观察检测线和质控线颜色变化,即可获得定性结果;设置好荧光免疫层析分析仪的相关参数,15-30分钟内,进行检测获得定量结果。

[0017] 本发明提供一种使用彩色荧光微球,采用免疫层析技术制备的ST2定性和定量免疫层析检测试剂盒,对于同一个试剂盒,可以极短时间内获得定性结果并随后获得准确定量的结果,同时满足了先期获得初步结果和后面获得准确定量结果的需求,并且可以应用于条件比较差,没有仪器或者电源的检验场景,具有操作简便、结果快速、测量准确、适合不同检验场景等优点。

附图说明:

[0018] 附图1是本发明中试纸条的结构示意图。

[0019] 附图2是本发明中实施例2的定性检测分析结果示意图。

[0020] 附图3是本发明中实施例2的定量检测准确度分析结果示意图。

[0021] 附图标记:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4、吸水垫5。

具体实施方式:

[0022] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明:

[0023] 如附图1所示,本发明首先提出了一种定性和定量测定ST2的免疫层析检测试剂盒,该试剂盒包括免疫层析试纸条和塑料外壳,所述免疫层析试纸条是由底板1、样品垫2、试剂垫3、硝酸纤维素膜4和吸收垫5组成的试纸条,所述样品垫2、试剂垫3、硝酸纤维素膜4和吸收垫5依次交错固定于所述底板1上,所述试剂垫3包被有鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜4上的检测线包被有兔抗人ST2多克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体。

[0024] 本发明所述试剂垫3的彩色荧光微球的直径优选是150-180nm;所述彩色荧光微球优选掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述彩色荧光微球优选掺杂的彩色染料含有氨基或者羟基官能团,为酸性紫1、酸性紫7、酸性蓝25分散红58等任意一种或几种的混合物。

[0025] 实施例1:

[0026] 定性和定量测定ST2的免疫层析检测试剂盒中试剂盒的各组成部分可以通过以下措施制得:

[0027] 1、样品垫2的制备:

[0028] 将玻璃纤维膜浸泡于含有2.0% Triton X-100,2% BSA,0.2M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0029] 2、试剂垫3的制备:

[0030] 将玻璃纤维膜浸泡于含2.0% Triton X-100,3.0% BSA,pH7.5的150mM Tris-HCL处理液中,4℃浸泡3小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用。将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将鼠抗人ST2单克隆抗体标记彩色荧光微球喷到玻璃纤维膜,37℃烘干2小时;

[0031] 彩色荧光微球的醛基化:取2mg彩色荧光微球,用50mM,pH9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为15000rpm,时间为15分钟,最后重悬于100μl的上述碳酸盐缓冲液中,加入200μl醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μl的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0032] 鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球的制备:将0.8mg用于检测的鼠抗人ST2单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的彩色荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(200mM Tris-HCL,pH7.5,含2%BSA,8%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用200mM Tris-HCL,pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μl的200mM Tris-HCL缓冲液中(含0.9%NaCl,1%BSA,0.5%Tween 20),4℃避光保存备用;

[0033] 3、硝酸纤维素膜4的制备:

[0034] 采购ST2蛋白并按照常规兔多克隆抗体制备流程进行用于捕获的兔抗人ST2多克隆抗体的免疫,收集抗血清,采用蛋白亲和纯化的工艺对抗体进行亲和纯化,预实验验证与前述鼠抗人ST2单克隆抗体的匹配性,然后用包被稀释液作为透析液进行透析处理,保存于-20℃备用;

[0035] 分别用包被稀释液将兔抗人ST2多克隆抗体和山羊抗鼠多克隆抗体调整浓度到2-8mg/ml,膜液量为1-2μl/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时;

[0036] 4、试剂盒的组装:

[0037] 在PVC板1上依次粘贴经过处理的样品垫2、吸附有鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球的试剂垫3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4和吸水垫5,组装后得到试纸大板,按照要求切割成4mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料卡内形成完整的试剂盒。

[0038] 上述各步骤中选用的设备及原料优选以下原料:

[0039] 鼠抗人ST2单克隆抗体:Medix公司;兔抗人ST2多克隆抗体:本公司自行制备;彩色荧光微球:本公司交由专业微球公司特殊定制;硝酸纤维素(NC)膜:赛多利斯公司产品;牛血清白蛋白(BSA),聚乙二醇PEG20000,水解酪蛋白:Sigma公司产品;其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0040] 实施例2:彩色微球定性试验和荧光免疫测定准确度试验

[0041] 选用上述试剂盒以及荧光免疫层析分析仪(型号:NEO-007),

[0042] 荧光免疫分析仪参数的设定:在荧光免疫分析仪上设定好试剂盒工艺参数后,取上述组装好的试剂盒,分别用2.5、5、10、25、100、200、400ng/ml的ST2校准品,用试剂盒进行测定,得到各校准品的荧光强度值,将结果输入到分析仪的参数中,完成分析仪的参数的最终设定。

[0043] 主要检测材料:临床样本由相关医院获得,共200份定值样本(测试使用Critical Diagnostics公司的Presage ST2酶联免疫吸附法检测试剂盒),其中血清样本100份,全血样本100份,ST2含量分布区间为2-400ng/mL之间。

[0044] 检测方法:

[0045] 步骤1:将检测试剂盒及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0046] 步骤2:精确吸取25μl血清样本,样本为全血时吸取50μl样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100μl样本稀释液,样本稀释液采用生理盐水或PBS;

[0047] 步骤3:8分钟后,肉眼观察检测线和质控线颜色变化,获得定性结果;

[0048] 步骤4:设置好荧光免疫层析分析仪的相关参数,15-30分钟内,进行检测获得定量结果。

[0049] 试验结果分析:

[0050] 临床样本检测试剂制备完成后,按检测方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0051] 试验结果:

[0052] 1、如附图2所示,对定性结果进行分析,参照ST2的参考范围,拟定40ng/ml以下为阴性,55ng/ml以上为阳性,40-55ng/ml之间处于参考范围的高值附近,处于阴性和阳性分界点,不计入统计。数据分析显示,试验系统确定阴性和阳性的样本数目与酶联免疫吸附法的结果一致性超过93.75%,表明所制备的检测试剂盒性能良好,能够满足快速检测的定性检测需求。

[0053] 2、如附图3所示,对定量结果进行分析,以实验系统的检测值为Y轴,以对照系统的测验值为X轴,绘制散点图,并进行相关性分析。临床样本检测对200份临床定值样本检测,样本平均偏差值小于15%,最大偏差小于30%, $R^2 > 0.98$,一致性系数 > 0.90 。检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测,能够满足客户对准确定量检测的需求。

[0054] 本发明提供一种使用彩色荧光微球,采用免疫层析技术制备的ST2定性和定量免疫层析检测试剂盒,该试剂盒定性测定分界线浓度为40-55ng/ml,荧光免疫分析仪检测灵敏度为1ng/ml,线性范围为1-400ng/ml,采用彩色荧光微球可以快速得到定性结果并稍迟得到定量结果,具有操作简单、反应迅速、灵敏度高等特点,有助于满足不同检验场景的需求。

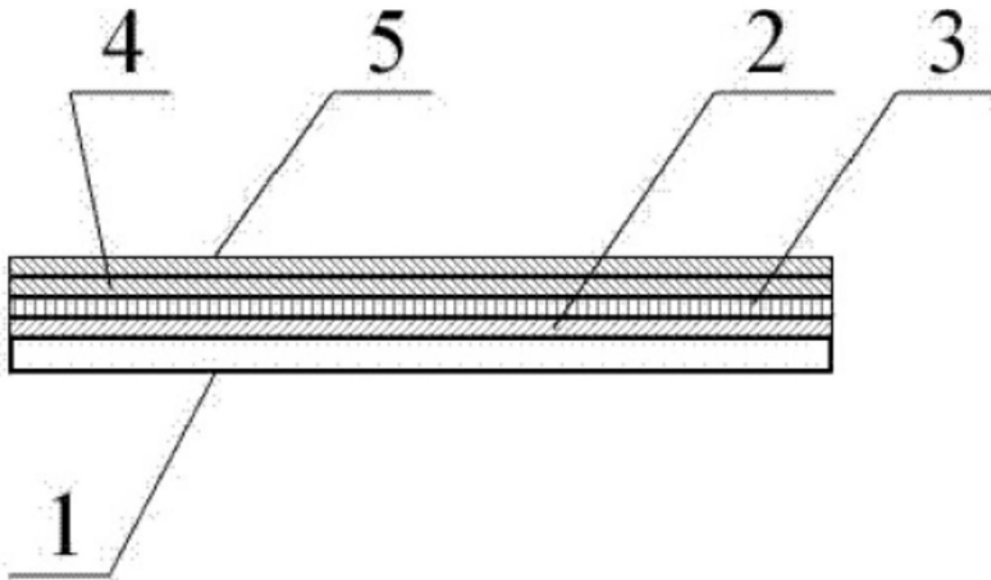


图1

定性分析结果					
	阴性	参考范围高值区间	阳性	总和	一致率
对照系统	89	24	87	200	-
试验系统	83	35	82	200	93.75%

图2

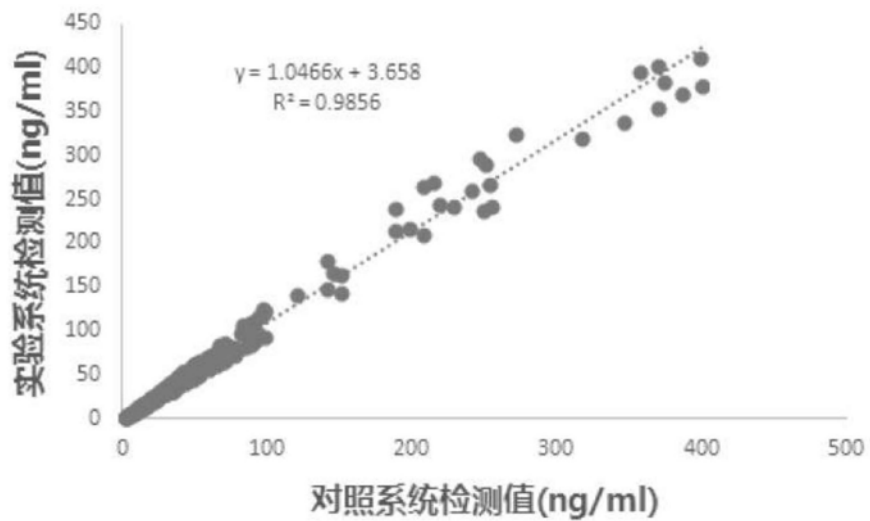


图3

专利名称(译)	测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108931636A	公开(公告)日	2018-12-04
申请号	CN201810708125.8	申请日	2018-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
[标]发明人	王有志 陈萍萍 王文亮 李红江		
发明人	王有志 刘衍亮 陈萍萍 宋璐琳 王文亮 李红江		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/58 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/582 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/585 G01N2800/324 G01N2800/325		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学免疫学中免疫层析技术领域，具体地说是一种测定ST2的荧光免疫层析检测试剂盒，其由免疫层析试纸条和塑料外壳，所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成的试纸条，所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上，所述试剂垫包被有鼠抗人ST2单克隆抗体标记的彩色荧光微球，硝酸纤维素膜上的检测线包被有兔抗人ST2多克隆抗体，质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体，该试剂盒定性测定分界线浓度为40-55ng/ml，荧光免疫分析仪检测灵敏度为1ng/ml，线性范围为1-400ng/ml，采用彩色荧光微球可以快速得到定性结果并稍迟得到定量结果，具有操作简单、反应迅速、灵敏度高等特点，有助于满足不同检验场景的需求。

