



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133257 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910149919.X

(22)申请日 2019.02.28

(71)申请人 上海健耕医药科技股份有限公司
地址 201100 上海市闵行区陈行公路2388号2幢11楼1101室

(72)发明人 刘斌虎 吴云林 傅琳

(74)专利代理机构 上海启核知识产权代理有限公司 31339

代理人 达晓玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

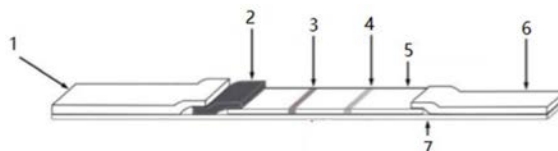
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条

(57)摘要

本发明提出了一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板,所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针,所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备,所述检测线由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。本发明检测灵敏度高,检测范围广,检测稳定可靠,操作简便易行,仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果,拥有良好的商业化应用前景。



1. 一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板,其特征在于,所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针,所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备,所述检测线由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。

2. 根据权利要求1所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其特征在于,所述检测垫为硝酸纤维素膜且为孔径5~12 μm 的多孔样结构膜;所述样品垫、结合垫的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫的材质为吸水滤纸。

3. 根据权利要求1或2所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,包括以下的步骤:

S1. 利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;

S2. 利用步骤S1制备的纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针;

S3. 利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的他克莫司单克隆抗体结合垫;

S4. 利用他克莫司蛋白衍生物制备检测线,利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线,喷涂、再与步骤S3得到的结合垫组装获得层析试纸条。

4. 根据权利要求3所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,所述羧基化聚苯乙烯纳米微球的直径在80nm~120nm之间,所述稀土元素离子为铈离子和/或钆离子,所述 β -二酮体类螯合物为 β -萘甲酰三氟丙酮,所述荧光增强协同剂为三辛基氧化膦。

5. 根据权利要求3所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述纳米荧光微球由包括以下步骤的方法制得:

A. 取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

B. 向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铈60 μL 或0.1mol/L三氯化钆60 μL 、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μL 、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μL ,室温反应16小时,得到反应液b;

C. 将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

6. 根据权利要求3所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,步骤S2中所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由包括以下方法制得:将纳米荧光微球,溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,使得荧光微球含量为0.2wt%,500W超声处理30秒后,缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μL ,振荡反应15分钟后,6000r/min离心10分钟,收集沉淀,用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀,重复离心步骤2次,得到活化的荧光微球;将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,加入400 μg 他克莫司单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应4小时,再离心10分钟,收集沉淀,将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

7. 根据权利要求3所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,步骤S3中所述结合垫裁成8mm的宽度,再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫上,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

8. 根据权利要求3所述一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,步骤S4中所述层析试纸条由包括以下方法制得:将他克莫司蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度0.1mg/mL,得喷膜液A,用喷膜机将喷膜液A喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线,所述百分比为质量体积百分比;将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度1.0mg/mL,得喷膜液B,用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm处形成质控线,质控线与检测线相隔10mm;将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干,在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫、样品垫以及吸水纸,再剪切成4mm宽的试纸条。

一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术领域,具体涉及一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条。

背景技术

[0002] 他克莫司(Tacrolimus)又名FK506,是从链霉菌属(streptomyces tsukubaensis)中分离出的发酵产物,其化学结构属23元大环内酯类抗生素。为一种强力的新型免疫抑制剂,主要通过抑制白介素-2(L-2)的释放,全面抑制T淋巴细胞的作用,较环孢素(CsA)强100倍。近年来,作为肝、肾移植的一线用药,已在日本、美国等14个国家上市。临床实验表明,其在心、肺、肠、骨髓等移植中应用有很好的疗效。同时FK506在治疗特应性皮炎(AD)、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性眼病等自身免疫性疾病中也发挥着积极的作用。

[0003] 由于不同患者对FK506的吸收和代谢往往表现出很大的个体差异,即使使用相同的药物剂量,不同患者的FK506血药浓度也常差异显著;由于FK506的肝、肾毒性及其狭窄的治疗剂量范围,FK506的药效与药毒均与血药浓度密切相关,因此,准确检测FK506的血药浓度对于控制FK506的药毒性和发挥FK506的抗排斥作用均具有重要参考价值。

[0004] 目前,检测FK506血药浓度的方法主要有高效液相-质谱联用(HPLC-MS)、微粒子酶免疫测定(MEIA)、化学发光微粒子免疫测定(CMIA)以及酶联免疫吸附法(ELISA)等。其中HPLC-MS法测定血药浓度准确、灵敏,但其操作繁琐,检测时间长,检测成本高,需要昂贵设备,主要用于科研领域或作为一种参考方法。MEIA和CMIA是目前常用的检测方法,其检测自动化程度高,检测结果准确,但试剂价格昂贵,需要使用配套的大型仪器。酶联免疫吸附法则存在检测时间长,操作复杂,重复性差等缺点。时间分辨荧光免疫层析法具有操作简单、快速、无需大型设备等特点、如能开发出时间分辨荧光免疫层析法试剂用于检测全血中他克莫司A,将为广大应用FK506作为免疫抑制剂的移植患者实现在采样现场即刻进行分析,省去标本在实验室检验时的复杂处理程序,以便快速得到检验结果,从而节省大量往返医院及等待结果时间。

发明内容

[0005] 为了解决上述的技术问题,本发明提供一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条及其制备方法,制备方法简单,检测灵敏度高,检测范围广,检测稳定可靠,操作简便易行。

[0006] 本发明提供一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板,所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针,所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备,所述检测线由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。

[0007] 作为本发明进一步的改进,所述检测垫为硝酸纤维素膜且为孔径5~12 μm 的多孔样结构膜;所述样品垫、结合垫的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫的材质为吸水滤纸。

[0008] 本发明进一步保护一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,包括以下的步骤:

[0009] S1.利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;

[0010] S2.利用步骤S1制备的纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针;

[0011] S3.利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的他克莫司单克隆抗体结合垫;

[0012] S4.利用他克莫司蛋白衍生物制备检测线,利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线,喷涂、再与步骤S3得到的结合垫组装获得层析试纸条。

[0013] 作为本发明进一步的改进,所述羧基化聚苯乙烯纳米微球的直径在80nm~120nm之间,所述稀土元素离子为铈离子和/或钐离子,所述 β -二酮体类螯合物为 β -萘甲酰三氟丙酮,所述荧光增强协同剂为三辛基氧化膦。

[0014] 作为本发明进一步的改进,步骤S1中所述纳米荧光微球由包括以下步骤的方法制得:

[0015] A.取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

[0016] B.向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铈60 μL 或0.1mol/L三氯化钐60 μL 、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μL 、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μL ,室温反应16小时,得到反应液b;

[0017] C.将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0018] 作为本发明进一步的改进,步骤S2中所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由包括以下方法制得:将纳米荧光微球,溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,使得荧光微球含量为0.2wt%,500W超声处理30秒后,缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μL ,振荡反应15分钟后,6000r/min离心10分钟,收集沉淀,用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀,重复离心步骤2次,得到活化的荧光微球;将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,加入400 μg 他克莫司单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应4小时,再离心10分钟,收集沉淀,将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0019] 作为本发明进一步的改进,步骤S3中所述结合垫裁成8mm的宽度,再使用喷金仪以5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫上,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干16小时。

[0020] 作为本发明进一步的改进,步骤S4中所述层析试纸条由包括以下方法制得:将他克莫司蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度0.1mg/mL,得喷膜液A,用喷膜机将喷膜液A喷涂在距硝酸纤

纤维素膜左端20mm处形成检测线,所述百分比为质量体积百分比;将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度1.0mg/mL,得喷膜液B,用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm处形成质控线,质控线与检测线相隔10mm;将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25℃恒温真空干燥箱中烘干,在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫、样品垫以及吸水纸,再剪切成4mm宽的试纸条。

[0021] 本发明具有如下有益效果:本发明提供的快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条检测灵敏度高,其定量限最小至2ng/mL;检测范围广,其定量线性范围能够达到2-30ng/mL;检测稳定可靠,其添加回收率为85%-115%。此外,该试剂条操作简便易行,仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果,拥有良好的商业化应用前景。

附图说明

[0022] 图1为本发明一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的结构示意图;

[0023] 1.样品垫;2.结合垫;3.检测线;4.质控线;5.检测垫;6.吸收垫;7.背衬板。

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所述的实施例只是本发明的部分具有代表性的实施例,而不是全部实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的其他所有实施例都属于本发明的保护范围。

[0025] 实施例1

[0026] 参照附图1,一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫1、结合垫2、具有检测线3和质控线4的检测垫5、吸收垫6以及背衬板7,所述结合垫2喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针,所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备,所述检测线3由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线4由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。所述检测垫5为硝酸纤维素膜且为孔径5 μ m的多孔样结构膜;所述样品垫1、结合垫2的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫6的材质为吸水滤纸。

[0027] 一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,包括以下的步骤:

[0028] S1.利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;具体步骤如下:

[0029] A.取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

[0030] B.向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铈60 μ L、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μ L、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μ L,室温反应16小时,得到反应液b;

[0031] C.将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀

重新分散到去离子水中保存。

[0032] S2. 利用步骤S1制备的纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体, 制备纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针; 所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由包括以下方法制得: 将纳米荧光微球, 溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中, 使得荧光微球含量为0.2wt%, 500W超声处理30秒后, 缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L, 振荡反应15分钟后, 6000r/min离心10分钟, 收集沉淀, 用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀, 重复离心步骤2次, 得到活化的荧光微球; 将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中, 加入 400 μ g他克莫司单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时, 再离心10分钟, 收集沉淀, 将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0033] S3. 利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的他克莫司单克隆抗体结合垫2, 具体步骤如下: 将所述结合垫2裁成8mm的宽度, 再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫2上, 并置于恒温鼓风干燥箱中, 37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0034] S4. 利用他克莫司蛋白衍生物制备检测线, 利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线4, 喷涂、再与步骤S3得到的结合垫2组装获得层析试纸条, 具体步骤如下: 所述层析试纸条由包括以下方法制得: 将他克莫司蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20 的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度0.1mg/mL, 得喷膜液A, 用喷膜机将喷膜液A 喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线3, 所述百分比为质量体积百分比; 将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度1.0mg/mL, 得喷膜液B, 用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm 处形成质控线4, 质控线4与检测线3相隔10mm; 将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干, 在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线3和质控线4的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫2、样品垫1以及吸水纸, 再剪切成4mm宽的试纸条。

[0035] 本实施例试剂条的定量限为5ng/mL, 定量线性范围能够达到5-25ng/mL, 添加回收率为 85%。

[0036] 实施例2

[0037] 参照附图1, 一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条, 其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪, 所述检测卡包括样品垫1、结合垫2、具有检测线3和质控线 4的检测垫5、吸收垫6以及背衬板7, 所述结合垫2喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针, 所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备, 所述检测线3由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备, 所述质控线4由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备, 所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。所述检测垫5为硝酸纤维素膜且为孔径12 μ m的多孔样结构膜; 所述样品垫1、结合垫2的材质为玻璃纤维素膜或无纺布, 所述吸收垫6的材质为吸水滤纸。

[0038] 一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法, 包括以下的步骤:

[0039] S1. 利用羧基化聚苯乙烯纳米微球, 制备纳米荧光微球; 所述纳米荧光微球中, 稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3; 具体步骤如下:

[0040] B. 取羧基化聚苯乙烯纳米微球, 加入去离子水和丙酮混合液, 使得羧基化的聚苯

乙烯微球的含量为1wt%，所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1，搅拌均匀，得反应液a；

[0041] B. 向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化钆60 μ L、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μ L、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μ L，室温反应16小时，得到反应液b；

[0042] C. 将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除，离心洗涤两次，将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0043] S2. 利用步骤S1制备的纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体，制备纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针；所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由包括以下方法制得：将纳米荧光微球，溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中，使得荧光微球含量为0.2wt%，500W超声处理30秒后，缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L，振荡反应15分钟后，6000r/min离心10分钟，收集沉淀，用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀，重复离心步骤2次，得到活化的荧光微球；将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中，加入 400 μ g他克莫司单克隆抗体，4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时，再离心10分钟，收集沉淀，将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0044] S3. 利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的他克莫司单克隆抗体结合垫2，具体步骤如下：将所述结合垫2裁成8mm的宽度，再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫2上，并置于恒温鼓风干燥箱中，37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0045] S4. 利用他克莫司蛋白衍生物制备检测线，利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线4，喷涂、再与步骤S3得到的结合垫2组装获得层析试纸条，具体步骤如下：所述层析试纸条由包括以下方法制得：将他克莫司蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度0.1mg/mL，得喷膜液A，用喷膜机将喷膜液A喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线3，所述百分比为质量体积百分比；将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度1.0mg/mL，得喷膜液B，用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm处形成质控线4，质控线4与检测线3相隔10mm；将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干，在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线3和质控线4的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫2、样品垫1以及吸水纸，再剪切成4mm宽的试纸条。

[0046] 本实施例试剂条的定量限为5ng/mL，定量线性范围能够达到5-25ng/mL，添加回收率为95%。

[0047] 实施例3

[0048] 参照附图1，一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条，其包括检测卡和可选的荧光免疫定量分析仪，所述检测卡包括样品垫1、结合垫2、具有检测线3和质控线4的检测垫5、吸收垫6以及背衬板7，所述结合垫2喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针，所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备，所述检测线3由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备，所述质控线4由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备，所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。所述检测垫5为硝酸纤维素膜且为孔径7 μ m的多孔样结构膜；所述样品垫1、结合垫2的材质为玻璃纤维素膜或无纺布，所述吸收垫6的材质为吸水滤纸。

[0049] 一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法，包括以下的

步骤:

[0050] S1. 利用羧基化聚苯乙烯纳米微球, 制备纳米荧光微球; 所述纳米荧光微球中, 稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3; 具体步骤如下:

[0051] C. 取羧基化聚苯乙烯纳米微球, 加入去离子水和丙酮混合液, 使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%, 所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1, 搅拌均匀, 得反应液a;

[0052] B. 向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铊30 μ L、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μ L、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μ L, 室温反应16小时, 得到反应液b;

[0053] C. 将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除, 离心洗涤两次, 将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0054] S2. 利用步骤S1制备的纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体, 制备纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针; 所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由包括以下方法制得: 将纳米荧光微球, 溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中, 使得荧光微球含量为0.2wt%, 500W超声处理30秒后, 缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L, 振荡反应15分钟后, 6000r/min离心10分钟, 收集沉淀, 用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀, 重复离心步骤2次, 得到活化的荧光微球; 将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中, 加入 400 μ g他克莫司单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时, 再离心10分钟, 收集沉淀, 将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0055] S3. 利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的他克莫司单克隆抗体结合垫2, 具体步骤如下: 将所述结合垫2裁成8mm的宽度, 再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫2上, 并置于恒温鼓风干燥箱中, 37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0056] S4. 利用他克莫司蛋白衍生物制备检测线, 利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线4, 喷涂、再与步骤S3得到的结合垫2组装获得层析试纸条, 具体步骤如下: 所述层析试纸条由包括以下方法制得: 将他克莫司蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20 的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度0.1mg/mL, 得喷膜液A, 用喷膜机将喷膜液A 喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线3, 所述百分比为质量体积百分比; 将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度1.0mg/mL, 得喷膜液B, 用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm 处形成质控线4, 质控线4与检测线3相隔10mm; 将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干, 在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线3和质控线4的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫2、样品垫1以及吸水纸, 再剪切成4mm宽的试纸条。

[0057] 本实施例试剂条的定量限为2ng/mL, 定量线性范围能够达到2-30ng/mL, 添加回收率为115%。

[0058] 本发明的使用方法: 将待测样品滴加到快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条样本垫区域, 层析5min后插入荧光读数仪中读数, 得到检测结果。

[0059] 本发明的检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条在使用时, 将待测血液样品加到样品垫后, 样本缓冲液血液样本混合浸入到样品垫上, 当样品垫上的样本达到饱和状态后, 通过毛细管作用将样本输送到结合垫。当血液样本中含有他克莫司时, 他克莫司与荧光微球上的抗体形成抗原-抗体复合物, 随着层析作用, 复合物向前移动, 到达包被识别

单一抗原表位的他克莫司单克隆捕获抗体的检测区T处,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测区T处。未结合他克莫司单克隆抗体的稀土离子微球(钐离子或铈离子)继续前行,到达对照区C时,羊抗鼠IgG抗体与稀土离子微球上的鼠源性单抗(即他克莫司单克隆检测抗体)结合,在C线处出现稀土离子微球的聚集。整个反应在5分钟内完成,并插入荧光读数仪中读数。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比,当光源照射到试纸条的检测区和对照区时,激发附着的荧光物质,发射光收集并转化为电信号,电信号的强弱和荧光分子数量相关,检测仪计算样品中待测物的含量。

[0060] 测试例1

[0061] A、拟合标准曲线

[0062] 在实施例1-3制得的时间分辨免疫层析试纸条的样品垫1加入不同浓度的他克莫司标准品(取8个不同的浓度,分别为0ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、30ng/mL、50ng/mL,每个浓度做5个平行样),膜层析反应10分钟后,仪器读取质控线4、检测线3的信号,以检测的样品的检测线3荧光值与质控线4的荧光值的比值为横坐标,他克莫司标准品浓度为纵坐标,建立方程并拟合成标准曲线 $y=0.9572x+0.0855$ 。

[0063] 标准曲线 $R_2=0.9937$,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含他克莫司浓度进行定量分析。

[0064] B、样品检测

[0065] 在他克莫司的荧光免疫层析试纸条的样品垫1加入待测样品,膜层析反应5分钟。开启荧光检测设备,读取IC卡里的标准曲线,并将检测条插入荧光检测设备的插卡口,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他克莫司浓度,根据定标卡上的信息将实际检测值带入预设的标准曲线中算出定量的结果。

[0066] 与现有技术相比,本发明提供的快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条检测灵敏度高,其定量限最小至2ng/mL;检测范围广,其定量线性范围能够达到2-30ng/mL;检测稳定可靠,其添加回收率为85%-115%。此外,该试剂条操作简便易行,仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果,拥有良好的商业化应用前景。

[0067] 本领域的技术人员在不脱离权利要求书确定的本发明的精神和范围的前提下,还可以对以上内容进行各种各样的修改。因此本发明的范围并不仅限于以上的说明,而是由权利要求书的范围来确定的。

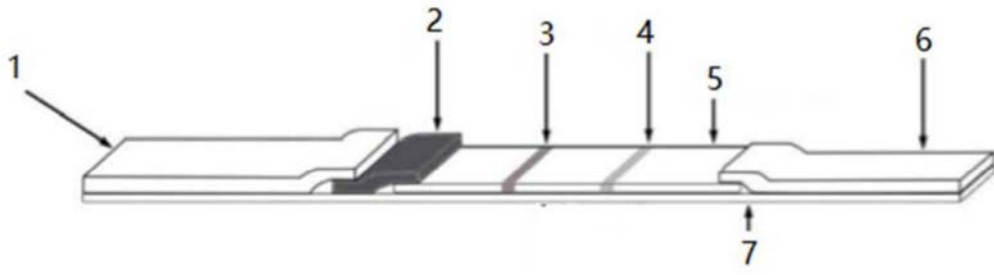


图1

专利名称(译)	一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条		
公开(公告)号	CN110133257A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910149919.X	申请日	2019-02-28
[标]发明人	刘斌虎 吴云林 傅琳		
发明人	刘斌虎 吴云林 傅琳		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了一种快速检测他克莫司的时间分辨荧光免疫层析试剂条，其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪，所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板，所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针，所述纳米微球时间分辨荧光-他克莫司探针由纳米荧光微球和他克莫司单克隆抗体制备，所述检测线由他克莫司蛋白衍生物喷涂制备，所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备，所述他克莫司抗体为鼠源性抗体。本发明检测灵敏度高，检测范围广，检测稳定可靠，操作简便易行，仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果，拥有良好的商业化应用前景。

