



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107884573 B

(45)授权公告日 2020.03.24

(21)申请号 201711002370.9

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.10.24

审查员 王丽华

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107884573 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(73)专利权人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号天津大学

(72)发明人 常津 张博 宫晓群 高玮辰

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

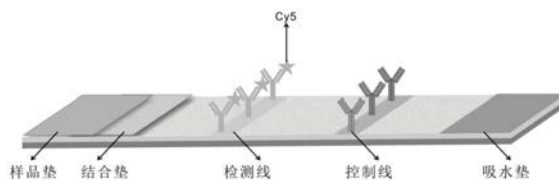
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备和检测方法

(57)摘要

基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备和检测方法。本发明利用磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理,结合超顺磁性纳米颗粒免疫层析试纸条检测结果可视化及荧光检测灵敏度高的优势,拟构建一种可视化的荧光定量检测免疫层析试纸条,通过对淬灭荧光信号的反应机理,消除背景荧光的干扰,并通过荧光的信号强度及磁纳米颗粒的聚集显色,达到裸眼条件下快速定性,暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测,搭建一种基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术,该方法操作简单,无需专业培训,方便快捷,结果直观,其快速高灵敏检测可实现AMI早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。



1. 基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条的制备方法,其特征步骤如下:

1) 磁纳米颗粒免疫探针的制备将2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物改性后的水溶性磁纳米颗粒,急性心肌梗塞(AMI)的相关标志物的标记抗体cTnI,EDC(1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)溶解于反应溶液,室温悬培,活化磁纳米颗粒表面的羧基,离心,洗涤,最后偶联上抗体的磁纳米颗粒用BSA封闭过夜;

2) 试纸条的组装试纸条依次是由样品垫,表面涂有急性心肌梗塞特异性单克隆抗体标记的磁纳米颗粒的结合垫,在硝酸纤维素膜的特定区域喷有用荧光素Cy5标记的cTnI包被抗体即检测线,喷有IgG抗体的区域即质控线,末端的吸水垫以及塑料底板构成。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征是磁纳米颗粒,高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:4-8,以及EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40-80。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是BSA封闭液用量为1%~3%。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征是将样品垫浸入含Tween-20(聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯)的Tris-HCL缓冲液中静置5-10min,然后放入37℃恒温干燥箱中至完全干燥,获得预处理的样品垫,封袋置于4℃保存。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征是结合垫的处理液是蔗糖、牛血清白蛋白BSA、聚乙二醇PEG、聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯Tween-20的混合溶液。

6. 基于权利要求1的反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条的检测方法,其特征是定性检测方法是:根据双抗夹心免疫反应的原理,将上述抗体标记的高分子改性后的水溶性磁纳米颗粒和待检物的混合物加入样品池,免疫反应2-3min,当待测样本中含有目标抗原时,复合物将同时被T线和C线捕获,通过磁性纳米颗粒聚集显色,直接肉眼定性检测结果为阳性;反之,检测样本中不含目标抗原时,则只在C线位置聚集显色,检测结果为阴性;如果T线和C线都不显色则说明本检测试纸条检测结果无效。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征是定量检测方法是:样品池里滴加目标抗原,持续免疫15-20min后放入分析仪中进行荧光信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,建立此检测技术的标准曲线。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征是cTnI抗原不同浓度选择为:0-10ng/mL,建立标准曲线。

## 基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药诊断技术领域,更具体的是涉及一种基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条的制备和检测方法。

### 背景技术

[0002] 急性心肌梗塞(AMI)是最严重的急性心血管疾病之一,发病急,致死率高,其死亡率随着年龄的增长而增加。全国统计资料显示在40岁后,急性心肌梗塞的死亡率急剧上升,老年人心肌梗死的患病率也日趋升高,成为老年人常见的心脏病,其死亡率和患病率逐年上升的主要原因有:首次发病,病人往往对疾病认识不足,未能及时就诊;老年人前驱症状多不典型,易误诊为其他系统疾病,且有不少为无痛者,无痛者的比例常随年龄增长而增加,大于80岁高龄患者,无痛性心肌梗死发病率高达60.69%;并发症、夹杂症较多,在急性期,并发症占90.3%,更增加了症状的不典型和复杂性。据统计约40%的患者死于发病后4小时内,因此及早做出正确的诊断,研究一种敏感性较高的诊断方法对于早期诊断,降低AMI患者死亡率,改善预后至关重要。

[0003] 目前,心肌标志物是快速检测急性心肌梗死的有效方法,可作为诊断急性心肌梗死的必要条件。其研究有助于尽早发现病情并且将理想的心肌梗塞标志物用于治疗疗效评价和预后评估,有很高的临床应用价值。肌钙蛋白cTnI存在于心肌细胞中,由于它们在正常血清中含量极微,在AMI发病6~8小时明显增高,释放到血循环中,血中浓度迅速升高,持续10~14天,其含量的变化与治疗效果密切相关,是诊断AMI和监测术后、观察疗效的最佳指标,我们可根据cTnI测定值大小判断心肌损伤的程度并进行危险分层,判断愈后,以及进一步采取治疗措施。因此将cTnI作为心肌标志物对高危人群进行筛查,对AMI的早期诊断、病情发展和预后监测等工作将有极大帮助。综上所述,对生物体内的特异标志物实现高灵敏度的检测是生命科学领域研究的一项重要课题,发展一种新的高灵敏的检测方法也是目前研究者们努力的目标。

[0004] 免疫层析试纸条是一种操作简单,无需专业培训,方便快捷,结果直观的免疫学检测技术,在现代POCT中占有重要地位。目前试纸条技术已经比较成熟,在诊断领域得到迅速推广,已逐渐发展为检验医学的一种新模式并成功应用于多种生物小分子、重金属和肿瘤标志物的检测。如传统的胶体金试纸条通过金纳米颗粒显示出一定的颜色从而实现特异性检测的免疫分析,此方法虽然检测结果肉眼可见,但无法完成精准定量检测;荧光免疫层析试纸条检测技术是胶体金免疫层析试纸条技术后为实现定量检测兴起的新技术,但在研究过程中发现,对于血清中的痕量标志物的精准定量,现有荧光免疫层析检测技术仍难以满足其诊断要求,其原因主要在于:1)在信号报告上,信号强度仍不够高;2)在信噪比上,背景噪音干扰严重。3)舍弃了胶体金试纸条快速显色检测的优势。因此,如何建立一种高灵敏可视化的AMI标志物免疫层析技术成为目前AMI早诊的关键问题。磁性纳米微球是一种通过修饰表面包被有某种化学基团或者免疫配基的球形纳米微粒其与靶物质的结合特异性良好,

由于这种球形磁性纳米微粒的大小和形状具有良好的均一性,因此可使靶物质迅速且有效地结合到磁性微球上。此外,磁纳米颗粒可作为一种荧光淬灭剂,对荧光染料具有较强的淬灭性能。因此,结合超顺磁性纳米颗粒试纸条的可视化检测特性以及荧光检测灵敏度高的优势,利用磁纳米颗粒在特定条件下淬灭荧光信号的反应机理和磁纳米颗粒免疫层析试纸条检测结果可视化,拟构建一种可视化的荧光定量检测免疫层析试纸条,通过对淬灭荧光信号的反应机理,消除背景荧光的干扰,并通过荧光的信号强度及磁纳米颗粒的聚集显色,达到肉眼条件下快速定性,暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测,来提高AMI早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

## 发明内容

[0005] 本发明利用磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理,结合超顺磁性纳米颗粒免疫层析试纸条检测结果可视化及荧光检测灵敏度高的优势,拟构建一种可视化的荧光定量检测免疫层析试纸条,通过对淬灭荧光信号的反应机理,消除背景荧光的干扰,并通过荧光的信号强度及磁纳米颗粒的聚集显色,达到肉眼条件下快速定性,暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测,来提高AMI早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

[0006] 本发明的技术方法如下:

[0007] 基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备方法,步骤如下:

[0008] 1) 磁纳米颗粒免疫探针的制备:

[0009] 将高分子(2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物)改性后的水溶性磁纳米颗粒,急性心肌梗塞的相关标志物的标记抗体cTnI,EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)溶解于反应溶液,室温悬培,活化磁纳米颗粒表面的羧基,离心,洗涤,最后偶联上抗体的磁纳米颗粒用BSA封闭过夜;

[0010] 2) 试纸条的组装:

[0011] 本发明的试纸条依次是由样品垫,表面涂有急性心肌梗塞特异性单克隆抗体标记的磁纳米颗粒的结合垫,在硝酸纤维素膜的特定区域喷有用荧光素Cy5标记的cTnI包被抗体即检测线,喷有IgG抗体的区域即质控线,末端的吸水垫以及塑料底板构成。

[0012] 基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条检测方法如下:

[0013] 定性检测:根据双抗夹心免疫反应的原理,将上述抗体标记的高分子改性后的水溶性磁纳米颗粒和待检物的混合物加入样品池,免疫反应2-3min,当待测样本中含有目标抗原时,复合物将同时被T线和C线捕获,通过磁性纳米颗粒聚集显色,直接肉眼定性检测结果为阳性;反之,检测样本中不含目标抗原时,则只在C线位置聚集显色,检测结果为阴性;如果T线和C线都不显色则说明本检测试纸条检测结果无效。

[0014] 定量检测:检测步骤同上,样品池里滴加目标抗原,持续免疫15-20min后放入分析仪中进行荧光信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号;建立此发明检测技术的标准曲线。

[0015] 所述步骤1)中,油性磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:4-8;及EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40-80。

- [0016] 所述步骤1)中,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是80-180:1。
- [0017] 所述步骤1)中,磁纳米颗粒偶联抗体悬培1.5~2h后,离心,洗涤。
- [0018] 所述步骤1)中,BSA封闭液用量为1%~3%。
- [0019] 所述步骤2)中,样品垫的预处理液是蔗糖、牛血清白蛋白BSA、聚乙二醇PEG、聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯Tween-20的混合溶液。
- [0020] 所述步骤5)中,cTnI标准曲线抗原不同浓度选择为:0.01-10ng/ml。
- [0021] 本发明制备的基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的优势在于:
- [0022] 1.显著提高POCT荧光免疫层析技术的检测灵敏度。主要通过放大检测信号,降低背景噪音两方面的有机结合,即以磁纳米颗粒大空间作用范围内的高效荧光淬灭特性实现检测信号的显著放大;通过荧光信号淬灭的方式克服背景噪音干扰,从而显著提高荧光免疫层析检测技术的灵敏度。
- [0023] 2.实现血清标志物cTnI的快速、灵敏检测。以免疫层析技术为基础,实现快速检测;通过反向荧光增强技术,实现高灵敏度检测。
- [0024] 3.实现快速可视化定性检测与高灵敏荧光定量检测。以磁性纳米粒子在T线的快速聚集显色,实现快速可视化定性检测;以荧光淬灭强度,实现高灵敏定量检测。

#### 附图说明

- [0025] 图1试纸条组装示意图;
- [0026] 图2制备的基于磁纳米颗粒的免疫层析试纸条高分子改性后的磁纳米颗粒的透射电镜照片。
- [0027] 图3制备的基于磁纳米颗粒的免疫层析试纸条的特异性实验数值。
- [0028] 图4制备的基于磁纳米颗粒的免疫层析试纸条关于cTnI的灵敏度实验数值。

#### 具体实施方式

- [0029] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述,但本发明不限于此。
- [0030] 本发明的试纸条组装如图1所示,从左到右依次是样品垫,表面涂有磁纳米颗粒标记的心肌梗塞特异性单克隆抗体的结合垫,在硝酸纤维素膜的特定区域喷有用荧光素Cy5标记的cTnI包被抗体即检测线,喷有IgG抗体的区域即质控线,末端的吸水垫以及塑料底板构成;本专利发明的新型试纸条检测技术用高分子对油溶性磁纳米颗粒进行改性,改性成水溶性磁纳米颗粒,其改性后的纳米颗粒在水溶液中的分散情况如图2所示,大小较均一;上面组装好的试纸条放在一个塑料底板里,在塑料底板的样品池里滴加不同种类的抗原,反应一段时间后放入分析仪中进行信号读出,该免疫层析试纸条的特异性实验数值如图3所示,实验组荧光信号强度变化远高于对照组荧光强度变化;最后滴加不同浓度的cTnI抗原,测定本技术的检测灵敏度,如图4所示,其灵敏度可以达到0.049ng/mL。
- [0031] 本发明的实施过程步骤如下:
- [0032] 1)精确称取定量的EDC,用移液枪取定量的高分子改性后的水溶性磁纳米颗粒溶液,和心肌梗塞相关标志物cTnI标记抗体溶于260 $\mu$ L反应水溶液。混合溶液于2mL的EP管中,EP管放在旋转培养器上,调制旋转培养器转速约50r/min,室温旋转约1.5-2h。然后将上述

液体转入1.5mL的尖头EP管,充分收集沉淀物,离心,洗涤,用65 $\mu$ L的1%~3%的BSA溶液与4 $^{\circ}$ C冰箱封闭过夜。

[0033] 2) 用荧光素Cy5标记心肌梗塞标志物cTnI包被抗体,将荧光标记后的抗体喷在硝酸纤维素膜上,作为检测线,将1mg/mL的羊抗鼠抗体溶液喷在检测线的上方,作为质控线,检测线和质控线喷好后放入37 $^{\circ}$ C烘箱烘1.5~2h;切割玻璃纤维素膜宽度约为2cm,浸没在含有0.5%Tween-20的0.01M的PH=7.4的Tris-HCl缓冲液作为样品垫的处理液,浸润10~15min后,放入37 $^{\circ}$ C烘箱烘1.5~2h。将处理好的样品垫,涂有磁纳米颗粒标记的心肌梗塞特异性单克隆抗体的结合垫,依次粘贴在试纸条上,装入用公司定制的塑料底板进行组装。

[0034] 3) 用移液枪取50 $\mu$ L的不同浓度的抗原滴加到组装好的塑料底板的样品池里,反应约2分钟后,根据检测线区域是否有黑色磁性纳米粒子聚集,进行肉眼定性检测。

[0035] 4) 继续反应15~20min后,放到凝胶分析仪进行拍照并统计和计算荧光值变化。

[0036] 以上反应为制备基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的一般步骤,在实施例不作详述。

[0037] 实施案例1:

[0038] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:4,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为36746;反应18min后,荧光差值结果为36927;继续反应20min后,荧光差值结果为37001。

[0039] 实施案例2:

[0040] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为39219;反应18min后,荧光差值结果为39636;继续反应20min后,荧光差值结果为39991。

[0041] 实施案例3:

[0042] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将

荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:8,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/ml的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为38020;反应18min后,荧光差值结果为38461;继续反应20min后,荧光差值结果为38997。

[0043] 实施案例4:

[0044] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是80:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为38116,反应18min后,荧光差值结果为38476;继续反应20min后,荧光差值结果为38849。

[0045] 实施案例5:

[0046] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是180:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为38907,反应18min后,荧光差值结果为39133;继续反应20min后,荧光差值结果为39334。

[0047] 实施案例6:

[0048] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:

20,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为38211,反应18min后,荧光差值结果为38577;继续反应20min后,荧光差值结果为38914。

[0049] 实施案例7:

[0050] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:60,BSA封闭液用量为2%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为38804,反应18min后,荧光差值结果为39017;继续反应20min后,荧光差值结果为39243。

[0051] 实施案例8:

[0052] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为1%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为39110,反应18min后,荧光差值结果为39472;继续反应20min后,荧光差值结果为39899。

[0053] 实施案例9:

[0054] 基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术的制备方法;将荧光素Cy5标记的急性心肌梗塞相关标志物cTnI包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,磁纳米颗粒和高分子2,5-呋喃二酮与1-十八烯的聚合物的质量分数配比是1:6,磁纳米颗粒和cTnI抗体用量的质量分数配比是120:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为3%,滴加浓度为5ng/mL的cTnI标准抗原50 $\mu$ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线和控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线以及控制线区域条带颜色接近

2min时条带颜色,3min后检测线以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,未滴加样品的试纸条检测线区域与滴加样品后检测区域的荧光淬灭差值作为读出信号,统计荧光差值结果为36741,反应18min后,荧光差值结果为36902;继续反应20min后,荧光差值结果为37111。

[0055] 本发明基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备和检测方法;利用磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理,结合超顺磁性纳米颗粒免疫层析试纸条检测结果可视化及荧光检测灵敏度高的优势,拟构建一种可视化的荧光定量检测免疫层析试纸条,通过对淬灭荧光信号的反应机理,消除背景荧光的干扰,并通过荧光的信号强度及磁纳米颗粒的聚集显色,达到裸眼条件下快速定性,暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测,搭建一种基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术,该方法操作简单,无需专业培训,方便快捷,结果直观,其快速高灵敏检测可实现AMI早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

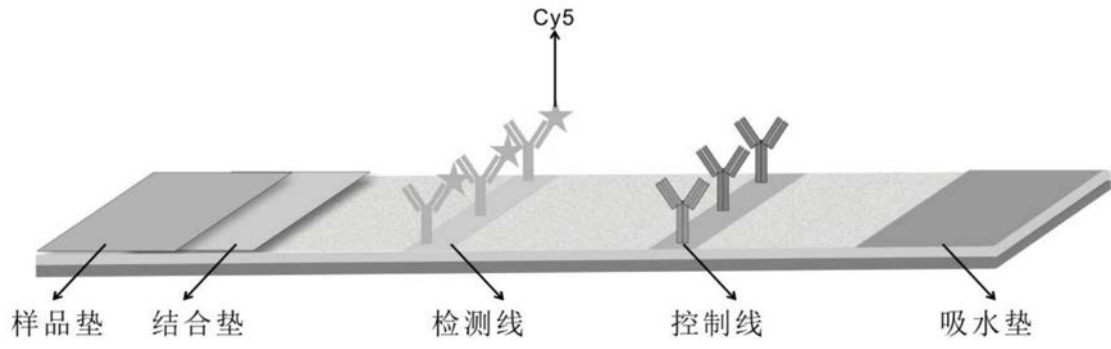


图1

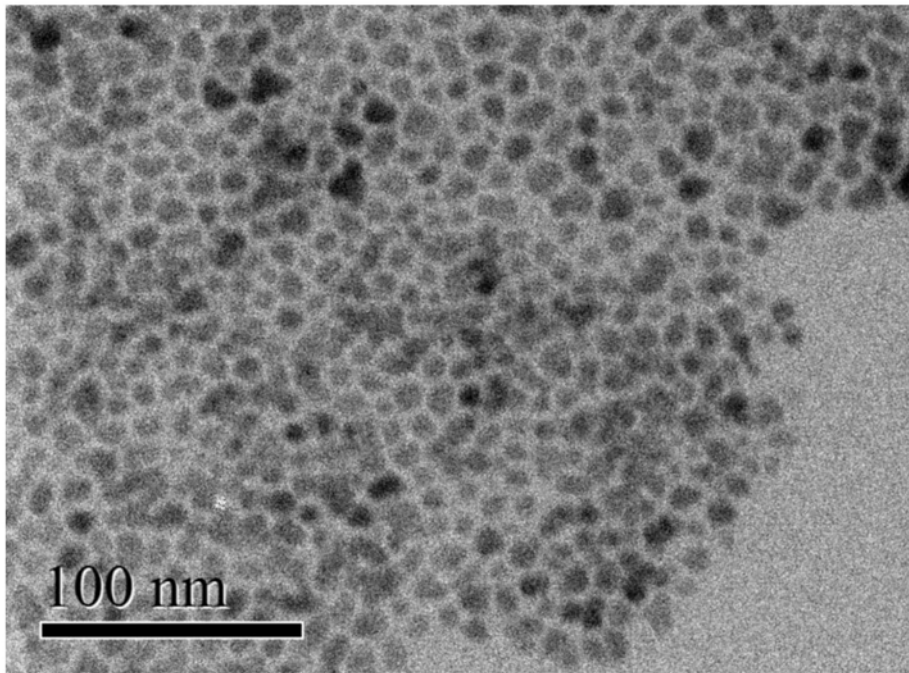


图2

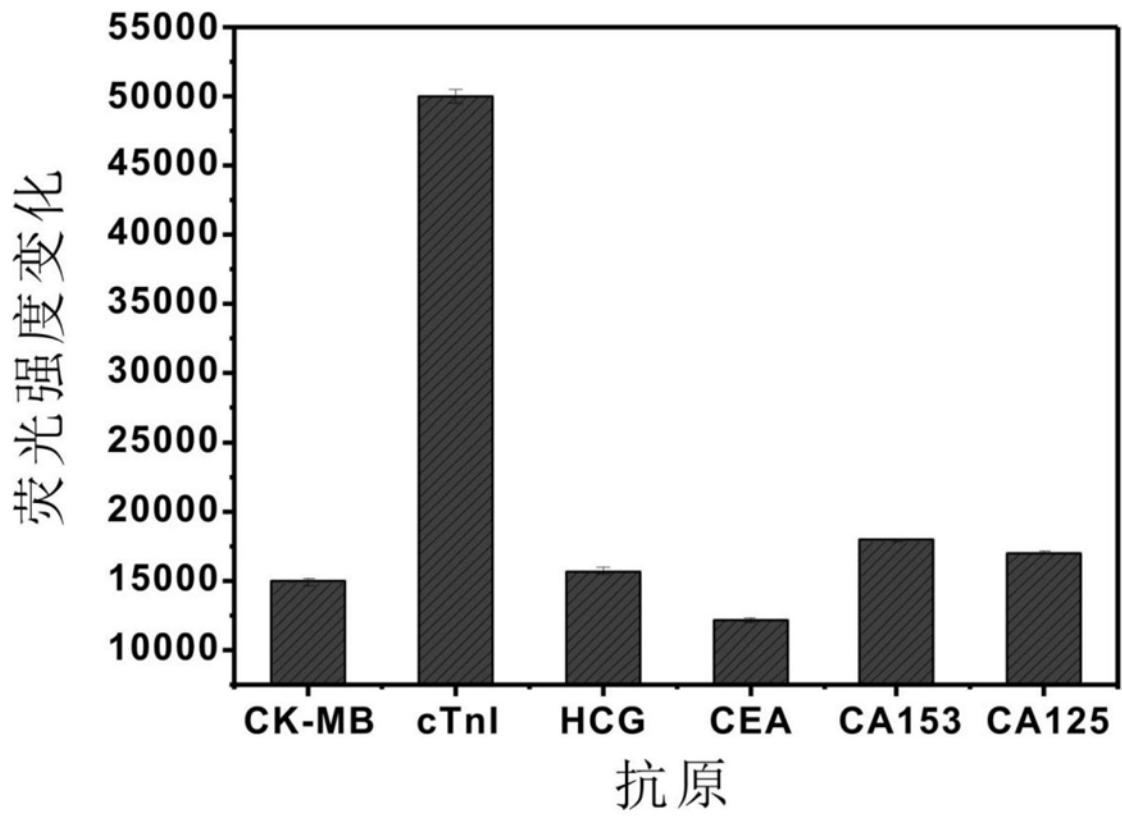


图3

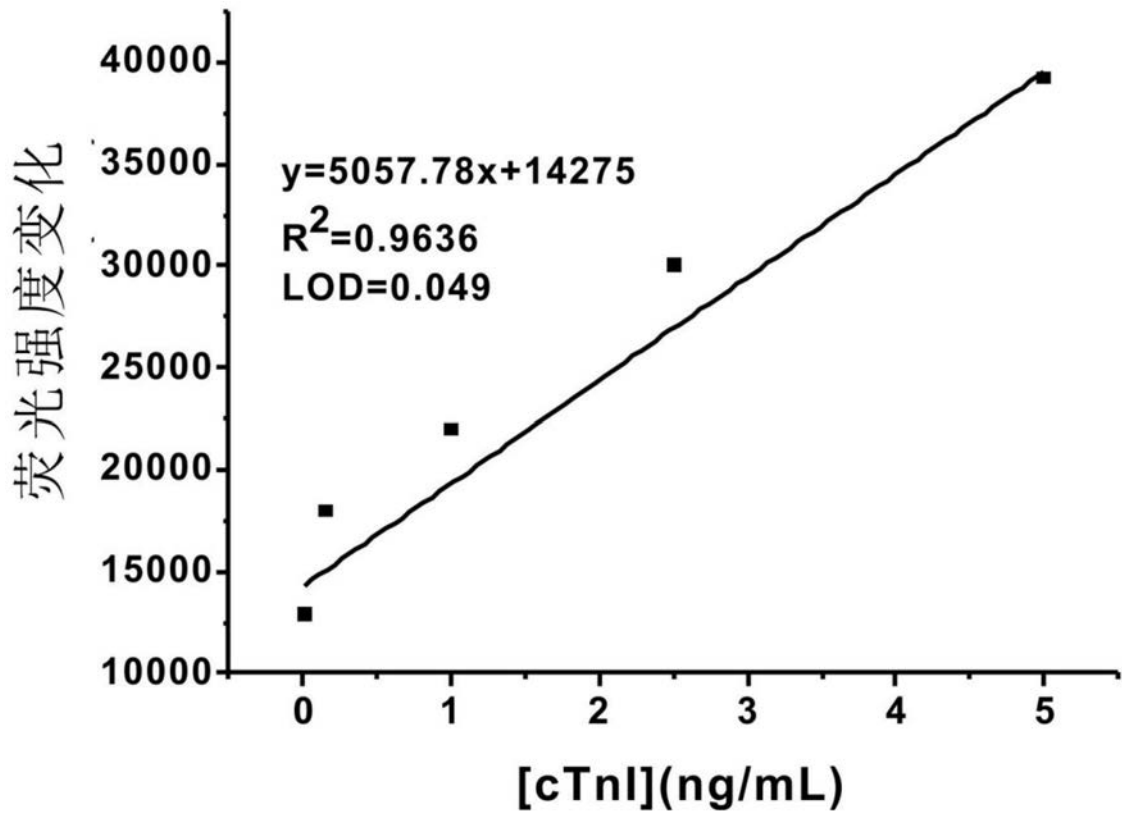


图4

专利名称(译)	基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107884573B</a>	公开(公告)日	2020-03-24
申请号	CN2017111002370.9	申请日	2017-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 张博 宫晓群 高玮辰		
发明人	常津 张博 宫晓群 高玮辰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N33/558 G01N2800/324		
代理人(译)	王丽		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN107884573A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

基于反向荧光增强的高灵敏可视化双模态急性心肌梗塞免疫层析试纸条制备和检测方法。本发明利用磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理，结合超顺磁性纳米颗粒免疫层析试纸条检测结果可视化及荧光检测灵敏度高的优势，拟构建一种可视化的荧光定量检测免疫层析试纸条，通过对淬灭荧光信号的反应机理，消除背景荧光的干扰，并通过荧光的信号强度及磁纳米颗粒的聚集显色，达到肉眼条件下快速定性，暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测，搭建一种基于反向荧光增强高灵敏可视化双模态免疫层析试纸条检测技术，该方法操作简单，无需专业培训，方便快捷，结果直观，其快速高灵敏检测可实现AMI早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

