



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104730232 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 24

(21) 申请号 201510147903. 7

(22) 申请日 2015. 03. 27

(71) 申请人 基蛋生物科技股份有限公司

地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业
开发区博富路 9 号

(72) 发明人 金晶 罗雅赛 黄力 朱宗哲
苏恩本

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

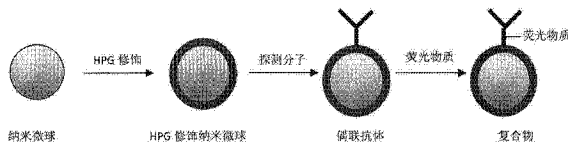
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用。本发明的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微粒在免疫层析上的应用,利用超支化聚缩水甘油醚的亲水性能,制备出亲水且富含官能团的超支化修饰纳米微球材料,并结合干式免疫层析技术制得超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球免疫层析试纸条。在实际使用本发明体系建立的试纸条进行疾病检测时,发现该试剂条较普通微球试剂条灵敏度强,检测范围宽,相关性、重复性、稳定性方面均符合生产要求,具有十分优秀的性能。



1. 超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,包括以下方法:

(I) 超支化聚缩水甘油醚经修饰后包被在纳米微球表面形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球,对超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球活化后连接能与待测分子特异性结合的探测分子形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子复合物,再标记上荧光物质,清洗分离未标记的荧光物质和探测分子,将能够与待测分子特异性结合的捕获分子包被在硝酸纤维素膜检测线上,将荧光超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球复合物均匀涂布于结合垫上,滴加样本后待测分子随液体层析,在结合垫上荧光超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球复合物和待测分子结合形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~待测分子复合物,最后复合物被捕获分子结合,在检测线上形成荧光超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~待测分子~捕获分子复合物,用荧光免疫定量分析仪检测荧光强度进而回算待测样本中的目标分析物的浓度;

或者是,

(II) 超支化聚缩水甘油醚经修饰后包被在纳米微球表面形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球,对超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球活化后连接能与待测分子特异性结合的探测分子形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子复合物,再标记上荧光物质,利用清洗分离未标记的荧光物质和探测分子,将能够和待测分子竞争性结合纳米微球~探测分子的竞争分子包被在硝酸纤维素膜检测线上,纳米微球~探测分子均匀涂布在结合垫上,滴加样本后待测分子随液体层析,硝酸纤维素膜上的竞争分子和待测分子将竞争结合纳米微球~探测分子,用荧光免疫定量分析仪检测荧光强度进而回算待测样本中的目标分析物的浓度,待测分子浓度越高,荧光强度越弱,反之则荧光强度则越强。

2. 根据权利要求 1 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,其特征在于所述超支化聚缩水甘油醚由三羟甲基丙烷和缩水甘油聚合而成,所述超支化聚缩水甘油醚的修饰是用硬脂酸盐修饰超支化聚缩水甘油醚。

3. 根据权利要求 1 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,其特征在于所述的活化是对超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球端基的活化,所述端基优先为氨基、羧基等基团。

4. 根据权利要求 1 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,其特征在于所述的待测分子为抗原、抗体、半抗原、半抗体等物质;所述的探测分子为能特异性结合待测分子的物质;捕获分子是能特异性结合待测分子的另一种物质;竞争分子是和待测分子结构或功能相似且竞争性结合探测分子的物质。

5. 根据权利要求 1 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,其特征在于所述的荧光物质选自异硫氰酸荧光素,3H~吖啶菁类染料、荧光素 cy5、荧光素 cy7、羧基荧光素、2~甲氧基荧光增强素、罗丹明、量子点、EGFP 绿色荧光增强蛋白、藻红蛋白、稀土铈、上转发光物质等物质中的一种或几种或含有上述荧光物质的复合物。

6. 根据权利要求 1 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,其特征在于所述超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球大小为 20nm~500nm。

7. 根据权利要求 1 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用,其特征在于所述超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球制备方法如下:

1) 超支化聚缩水甘油醚的制备:以三羟甲基丙烷(TMP)作为反应的引发剂,采用甲醇

钾 (CH₃OK) 对 TMP 的羟基去质子化,然后将缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合,反应结束后产物溶解在甲醇中,聚合物通过在丙酮中析出,甲醇中溶解,重复两次进行提纯,得超支化聚缩水甘油醚;

2) 超支化聚缩水甘油醚的修饰:将超支化聚缩水甘油醚用琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC) 进行修饰得 DSC 修饰的超支化聚缩水甘油醚 (HPG);

3) 超支化聚缩水甘油醚对纳米微球的修饰:向纳米微球溶液中滴加上一步制备的 DSC 修饰的超支化聚缩水甘油醚溶液,反应结束后向反应体系中加入 PBS 溶液继续反应,水解多余的 NHS 酯后,用 PBS 溶液清洗微球结束后,溶液重悬得超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球;

4) 探测分子~荧光物质的制备:探测分子溶解于 PBS 缓冲液中,荧光物质溶解于二甲基亚砜 (DMF) 中,然后将探测分子与荧光物质以 1 : 1 ~ 1 : 3 混合,充分搅拌,然后将溶液置于透析袋中梯度换液透析,得到的溶液即为探测分子~荧光物质;

5) 超支化聚缩水甘油醚修饰微球连接探测分子~荧光物质:对前面制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的微球的羧基进行活化,活化结束后使用 PBS 溶液清洗,将探测分子~荧光物质用碳酸氢钠缓冲液稀释到后,加入到微球溶液中,摇床上反应,反应结束后使用 PBS 溶液清洗悬浮微球,制得超支化聚缩水甘油醚纳米微球~探测分子~荧光物质。

8. 一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球干式免疫层析试纸条,其特征在于所述试剂盒工作原理如权利要求 1 所述,该试剂条由底板,样品垫,结合垫,硝酸纤维素膜,吸水纸,所述硝酸纤维素膜上有包被捕获分子的检测线和包被羊抗鼠二抗的质控线。

9. 根据权利要求 8 所述的试纸条,其特征在于制备方法包括以下步骤:

1) 结合垫的制备:结合垫选用玻璃纤维或者聚酯材质,然后将结合垫用 PBS 缓冲液浸泡,取出后干燥,将上述权利要求 7 中制得的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~荧光物质均匀喷洒在结合垫上;

2) 硝酸纤维素膜的制备:

A. 检测线的制备:将待测分子捕获分子用 PB 缓冲液稀释,在硝酸纤维素膜右端划线得到检测线;

B. 质控线的制备:将羊抗鼠 IgG 二抗在硝酸纤维素膜右端划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔,后在干燥箱内鼓风干燥;

3) 组装:在底板上顺次相互搭接的粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,得到试纸条。

超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及到生物学诊断领域,特别是涉及到一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是利用液体的毛细作用,让待测物通过层析在检测线处发生特异性的免疫反应,通过肉眼或者相应仪器检测,获得判断结果。它结合了亲和技术、标记技术、印记技术和层析等技术方法,是制备体外诊断试剂的一种重要方法,具有价格低,检测快速等特点。免疫层析的另一大优势是几乎不需要繁复的设备,有着便利的用户操作性,符合床边检测(POCT)的策略。它已经成为高度细化检测诊断平台的有力竞争者,伴随着简便的读数和样本处理,加上集成的打印设备和随声携带功能,不仅在实验室研究上,更在家庭和小型门诊使用等方面开拓了广大的市场。

[0003] 目前所用的免疫层析试剂方法学可分为胶体金法和荧光法。以胶体金为代表的层析技术已经发展了 20 多年,目前仍然广泛使用,但由于只能用于定性或者半定量的检测,定性检测的结果只有阳性和阴性,而人体内的一些物质的含量常在一定范围内变动,仪器得出的阳性或阴性判定常常不能让人满足,难以满足临床检测指标具体的要求,同时检测结果呈弱阳性时,极易造成人为漏检现象,因此存在灵敏度较低等问题。荧光技术逐渐在免疫层析中占主导地位,然而该技术仍然存在灵敏度欠佳,标记步骤复杂,抗体成本高等缺点。免疫层析快速检测技术的主要发展方向有:提高灵敏度并拓宽免疫层析分析的检测范围,采用信号聚集放大系统并简化检测仪器。

[0004] 微球作为免疫层析分析中的重要组成,其本身的性质十分重要。目前常用的商品化微球是聚苯乙烯微球,功能性基团通过共聚、枝接、包裹等方式结合在微球上。这种为求有两个确定。其一,聚苯乙烯微球为疏水材料,直接应用会产生非特异性吸附,影响检测的可信度,易造成误诊和漏诊;其二,无论是如何偶联的基团,都不能突破单层表面最大理论密度,结合基团越多,对结果的影响就越大

[0005] 聚乙二醇(PEG)是在生物医药方向中使用非常广泛的一个亲水性物质,其生物相容性以及非免疫源性的特征使得它在很多领域作为改性材料使用,例如抗体、蛋白、核苷酸、脂质体的修饰,聚合物和聚合物微球的表面改性等。在免疫分析中,纳米粒子表面的PEG可以有效的降低非特异性吸附,减少本底值,提高反应的灵敏度,降低假阳性和假阴性结果。但是线性的PEG聚合物由于其结构中只在聚合物端基部分有官能团,整个聚合物结构中只有一个或者两个活性位点可供于偶联,结合能力较弱,偶联效率不高,这点限制了其更广泛的应用。

[0006] 与线性聚合物不同,超支化聚合物(支化程度至少大于等于 2)在结构分支处包含较多的官能团。超支化聚合一般有良好的溶解性,溶解后粘度较低和流动性也较好,使用上简单方便。再者,超支化聚合物合成方法也比较简单,主要分成三种:第一,利用多官能团的单体缩聚制备;第二,在已经制备好的聚合物前驱体中进行接枝修饰,第三,利用环氧的开

环反应来制备超支化的结构。

[0007] 超支化聚缩水甘油醚是一种特殊的超支化聚合物,有着类似聚乙二醇的主链结构,在支链结构上富含羟基,这部分羟基一方面提供了大量结合位点,另一方面又给聚合物带来了良好的亲水性能。这些结构特点使超支化聚缩水甘油醚具有大量的末端官能团,拥有良好的生物相容性、高溶解性和高流变性。所以利用超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球应用于免疫层析上,由于其大量的末端官能团效应,可以大大加强免疫分析中抗原抗体结合效率,能够极大的增强分析的灵敏度。

发明内容

[0008] 本发明针对干式免疫层析分析法现有技术的上述不足,公开了一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用方法。

[0009] 本发明还公开了一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球干式免疫层析试纸条。

[0010] 为实现上述目标,本发明采用以下的技术方案予以实现:

[0011] 超支化聚缩水甘油醚修饰微球纳米在免疫层析上的应用,包括以下方法:

[0012] (I) 超支化聚缩水甘油醚经修饰后包被在纳米微球表面形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球,对超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球活化后连接能与待测分子特异性结合的探测分子形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子复合物,再标记上荧光物质,清洗分离未标记的荧光物质和探测分子,将能够与待测分子特异性结合的捕获分子包被在硝酸纤维素膜检测线上,将荧光超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球复合物均匀分布于结合垫上,滴加样本后待测分子随液体层析,在结合垫上荧光超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球复合物和待测分子结合形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~待测分子复合物,最后复合物被捕获分子结合,在检测线上形成荧光超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~待测分子~捕获分子复合物,用荧光免疫定量分析仪检测荧光强度进而回算待测样本中的目标分析物的浓度;

[0013] 或者是,

[0014] (II) 超支化聚缩水甘油醚经修饰后包被在纳米微球表面形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球,对超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球活化后连接能与待测分子特异性结合的探测分子形成超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子复合物,再标记上荧光物质,清洗分离未标记的荧光物质和探测分子,将能够和待测分子竞争性结合纳米微球~探测分子的竞争分子包被在硝酸纤维素膜检测线上,纳米微球~探测分子均匀涂布在结合垫上,滴加样本后待测分子随液体层析,硝酸纤维素膜上的竞争分子和待测分子将竞争结合纳米微球~探测分子,用荧光免疫定量分析仪检测荧光强度进而回算待测样本中的目标分析物的浓度,待测分子浓度越高,荧光强度越弱,反之则荧光强度则越强。

[0015] 所述超支化聚缩水甘油醚由三羟甲基丙烷和缩水甘油聚合而成,所述超支化聚缩水甘油醚的修饰是用硬脂酸盐修饰超支化聚缩水甘油醚。

[0016] 所述的活化是对超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球端基的活化,所述端基优先为氨基、羧基等基团。

[0017] 所述的待测分子为抗原、抗体、半抗原、半抗体等物质;所述的探测分子为能特异性结合待测分子的物质;捕获分子是能特异性结合待测分子的另一种物质;竞争分子是和

待测分子结构或功能相似且竞争性结合探测分子的物质。

[0018] 所述的荧光物质选自异硫氰酸荧光素, 3H~吖啶菁类染料、荧光素 cy5、荧光素 cy7、羧基荧光素、2~甲氧基荧光增强素、罗丹明、量子点、EGFP 绿色荧光增强蛋白、藻红蛋白、稀土铈、上转发光物质等物质中的一种或几种或含有上述荧光物质的复合物。

[0019] 所述超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球大小为 20nm~500nm。

[0020] 所述超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球制备方法如下：

[0021] 1) 超支化聚缩水甘油醚的制备：以三羟甲基丙烷 (TMP) 作为反应的引发剂, 采用甲醇钾 (CH₃OK) 对 TMP 的羟基去质子化, 然后将缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合, 反应结束后产物溶解在甲醇中, 聚合物通过在丙酮中析出, 甲醇中溶解, 重复两次进行提纯, 得超支化聚缩水甘油醚；

[0022] 2) 超支化聚缩水甘油醚的修饰：将超支化聚缩水甘油醚用琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC) 进行修饰得 DSC 修饰的超支化聚缩水甘油醚 (HPG)；

[0023] 3) 超支化聚缩水甘油醚对纳米微球的修饰：向纳米微球溶液中滴加上一步制备的 DSC 修饰的超支化聚缩水甘油醚溶液, 反应结束后向反应体系中加入 PBS 溶液继续反应, 水解多余的 NHS 酯后, 用 PBS 溶液清洗微球, 清洗结束后, 溶液重悬得超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球；

[0024] 4) 探测分子~荧光物质的制备：探测分子溶解于 PBS 缓冲液中, 荧光物质溶解于二甲基亚砜 (DMF) 中, 然后将探测分子与荧光物质以 1 : 1~1 : 3 混合, 充分搅拌, 然后将溶液置于透析袋中梯度换液透析, 得到的溶液即为探测分子~荧光物质；

[0025] 5) 超支化聚缩水甘油醚修饰微球连接探测分子~荧光物质：对前面制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的微球的羧基进行活化, 活化结束后使用 PBS 溶液清洗, 将探测分子~荧光物质用碳酸氢钠缓冲液稀释到后, 加入到微球溶液中, 摇床上反应, 反应结束后使用 PBS 溶液清洗悬浮微球, 制得超支化聚缩水甘油醚纳米微球~探测分子~荧光物质。

[0026] 一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球干式免疫层析试纸条, 其特征在于所述试剂盒工作原理如上所述, 该试剂条由底板, 样品垫, 结合垫, 硝酸纤维素膜, 吸水纸, 所述硝酸纤维素膜上有包被捕获分子的检测线和包被羊抗鼠二抗的质控线。

[0027] 所述试纸条的制备方法包括以下步骤：

[0028] 1) 结合垫的制备：结合垫选用玻璃纤维或者聚酯材质, 然后将结合垫用 PBS 缓冲液浸泡, 取出后干燥, 将上述制得的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~荧光物质均匀喷洒在结合垫上；

[0029] 2) 硝酸纤维素膜的制备：

[0030] A. 检测线的制备：将待测分子捕获分子用 PB 缓冲液稀释, 在硝酸纤维素膜右端划线得到检测线；

[0031] B. 质控线的制备：将羊抗鼠 IgG 二抗在硝酸纤维素膜右端划质控线, 该线与检测线平行, 与检测线间隔, 后在干燥箱内鼓风干燥；

[0032] 3) 组装：在底板上顺次相互搭接的粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸, 得到试纸条。

[0033] 有益效果

[0034] 本发明专利将超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球和干式免疫层析结合在一块, 利

用超支化聚缩水甘油醚的超强亲水性,大大降低在检测过程中因疏水作用造成的非特异性结合,提高检测质量,同时因为超支化的高官能团密度能够增加结合抗体数量,拓宽了检测范围。

附图说明

[0035] 图 1 超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球技术路线图

[0036] 图 2 超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球的免疫层析试纸条结构图

[0037] 图 3 本发明体系试纸条灵敏度评估图

[0038] 图 4 本发明体系试纸条相关性评估图

[0039] 图 5 本发明体系试纸条稳定性评估图

[0040] 其中,1 为样品垫,2 为结合垫,3 为检测线,4 为质控线,5 为硝酸纤维素膜,6 为吸水纸。

具体实施方式

[0041] 以下通过实施例进一步说明本发明,但不作为对本发明的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何修改、等同变化与改型、仍属于本发明技术方案的保护范围。

[0042] 实施例一:超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球干式免疫层析试纸条制备方法

[0043] 1. 超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球的制备:

[0044] 1) 超支化聚缩水甘油醚的制备:在配有机械搅拌和微量恒流泵的三口烧瓶中,加入 0.24g 三羟甲基丙烷 (TMP),作为反应的引发剂,采用 3.7M 甲醇钾 (CH₃OK) 对 TMP 的羟基部分去质子化,去质子化部分占总部分的 10%,多余甲醇通过加热蒸发除去;然后将 50ml 缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合,注意滴加速度,过快可能引起爆聚,反应温度 95℃,反应时间 12h;

[0045] 反应结束后产物溶解在甲醇中,通过强酸性阳离子交换树脂 (AMBERJET™ 1500H Resin) 聚合物通过在丙酮中析出,甲醇中溶解,重复两次进行提纯,最后在 80℃ 的真空中干燥 15 小时得超支化聚缩水甘油醚;

[0046] 2) 超支化聚缩水甘油醚的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 中,配置成 10mg/ml 的溶液,取 1ml,加入 20mg 琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC) 与常温下进行反应,得 DSC 修饰的超支化聚缩水甘油醚 (HPG);

[0047] 3) 超支化聚缩水甘油醚对纳米微球的修饰:取 5mg 氨基微球 (粒径大小为 20nm~500nm) 根据固含量 5mg/ml 换算,去除上清保留固体物质,向纳米微球溶液中滴加 500 μL 上一步制备的 DSC 修饰的超支化聚缩水甘油醚溶液,摇床反应 30 分钟,结束后向反应体系中加入 1ml 50mM PBS (pH7.5) 溶液继续反应 30min,水解多余的 NHS 酯后,用 50mM PBS (pH7.5) 溶液清洗微球,清洗结束后,用 50mM PBS (pH7.5) 溶液重悬得超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球;

[0048] 4) 探测分子~荧光物质的制备:探测分子溶解于 20~100mmol PBS 缓冲液中,荧光物质溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 中,然后将探测分子与荧光物质以 1:1~1:3 混合

搅拌 1h,然后将溶液置于透析袋中梯度换液透析 3 次,每次 6 ~ 8h,得到的溶液即为探测分子~荧光物质;

[0049] 5) 超支化聚缩水甘油醚修饰微球连接探测分子~荧光物质:对前面制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的微球的羧基进行活化,通常方法为加入 EDC,其摩尔含量为羧基摩尔含量的 1 ~ 10 倍,混合均匀后震荡反应 30 分钟,活化结束后离心使用 500 μ L 50mM PBS 溶液 (pH = 7.5) 清洗微球。将探测分子~荧光物质用 100mM 碳酸氢钠缓冲液 (pH = 8.0) 稀释到 1mg/mL 后,加入到微球溶液中,置于 220rpm 37 $^{\circ}$ C 摇床上反应 3h。反应结束后使用 400 μ L 50mM PBS 溶液 (pH = 7.5) 清洗悬浮微球,清洗三次,制得超支化聚缩水甘油醚纳米微球~探测分子~荧光物质。

[0050] 2. 超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球干式免疫层析试纸条的制备:

[0051] 1) 结合垫的制备:结合垫选用玻璃纤维或者聚酯材质,然后将结合垫用 50mM PBS 溶液 (pH = 7.5) 缓冲液浸泡,取出后干燥,将制得的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球~探测分子~荧光物质均匀喷洒在结合垫上;

[0052] 2) 硝酸纤维素膜的制备:

[0053] A. 检测线的制备:将待测分子捕获分子用 50mM PBS 溶液 (pH = 7.5) 缓冲液稀释至 4mg/ml 的浓度,0.8 μ L/cm 在硝酸纤维素膜右端划线得到检测线;

[0054] B. 质控线的制备:将羊抗鼠 IgG 抗体按 4mg/ml 的浓度,0.8 μ L/cm 在硝酸纤维素膜右端划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔 5mm,后在干燥箱内 20 $^{\circ}$ C 鼓风干燥 12h,密封干燥保存;

[0055] 3) 组装:在底板上顺次相互搭接的粘贴样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,按要求切割成适当宽度的试纸条。

[0056] 实施例 2 中作为对照组的试纸条制作方法与上述方法相同,仅仅是商品化的聚苯乙烯微球(实验对照一样,生产厂家 JSR 诊断试剂,货号 MS 160/Carboxyl)没有做超支化的修饰。实施例 2:超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球干式免疫层析试纸条检测指标评估

[0057] 使用超支化缩水甘油醚修饰纳米微球免疫层析试纸条的心肌肌钙蛋白 I(cTnI)项目上进行了试剂的性能分析,用普通纳米微球免疫层析试纸条在心肌肌钙蛋白 I(cTnI)项目上实验作为对照组,实验时,将 50 μ l 的待分析物从样品垫处加入,15min 后通过 Getein1100 荧光免疫定量分析仪(南京基蛋生物科技有限公司)测定其荧光值,进而算出其相关性能指标。

[0058] 1. 灵敏度评估

[0059] 样品垫上加入不同浓度的 cTnI 抗原标准品(取 14 个不同浓度,分别为 0,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1,1.5,2,2.5,3,3.5,4ng/ml,每个样本浓度设定三次重复)分别滴加 50 μ l 于四种试剂条加样孔中,15min 后通过南京基蛋生物有限公司的 Getein1100 荧光免疫定量分析仪,实验结果见图 3。

[0060] 如图 3 所示,普通微球的检测范围下限仅为 0.1ng/mL,利用本发明所述的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球免疫层析试纸条检测范围下限 0.02ng/mL,同时其荧光强度有了 4 倍左右的提高。这一结果证实了本发明体系实现了超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球的增强性能,同时进一步大幅提高了灵敏度。

[0061] 2. 相关性评估

[0062] 取多份血清标本分别用罗氏相关产品和本发明体系试纸条测试 cTnI 含量后,挑选出其中梯度合适的 15 份,作图比较相关性由图 4,两种体系表现出良好地相关性, R^2 值高达 0.993。证实了本发明体系以及依据该体系的试剂盒除了具有超高灵敏度,更宽的检测范围外,还有极佳的准确性。

[0063] 3. 重复性评估

[0064] 配制 5.0ng/mL 和 0.2ng/mL 的 cTnI 标准品溶液,采用本发明体系试纸条进行测定浓度,分别重复测定 10 次,分别计算测定均值和标准偏差、CV 值如表 1 所示。进行重复性考察,结果显示两种浓度重复性分别为 9.20%、9.30%,完全能够满足临床要求。

[0065] 表 1. 本发明体系试纸条重复性评估数据

[0066]

序号	标准值 5ng/ml	标准值 0.20ng/ml
1	5.674	0.183
2	4.591	0.211
3	5.232	0.194
4	5.717	0.220
5	4.388	0.189
6	4.796	0.188
7	5.125	0.199
8	4.866	0.186
9	5.143	0.234
10	4.331	0.236
平均值	4.986	0.204
标准偏差	0.459	0.019

[0067]

CV	9.20%	9.30%
----	-------	-------

[0068] 4. 稳定性评估

[0069] cTnI 检测试纸条置于 37℃ 恒温培养箱,每隔 1d 检测分别为 1ng/mL 和 5ng/mL 的两个浓度的检测值,每个样本重复测定 3 次,共计 7 天,计算每天检测结果的均值。结果如图 5 所示,本发明所建体系以及依赖该体系的检测试纸条于 37℃ 保存 7 天后,检测结果同第一天检测结果稍有降低,但最大相对偏差不高于 15%,表明试剂稳定性好,可以进行长期保存。

[0070] 5. 时间衍变性

[0071] 配制浓度为 1.00ng/ml 的检测样本,分别滴加 50 μ l 于试纸条加样孔中分别于 1min,3min,5min,10min,20min 和 30min 使用 Getein1 100 免疫定量分析仪(南京基蛋生物科技有限公司)重复测定,比较不同时间检测结果的差异,计算相对偏差(以 3min 为基准),结果如表 2 所示。结果显示在 3~30min 内样本检测浓度差异性均较小,时间衍变性 < 5%。证实了本发明体系以及依据该体系的试纸条检测时间衍变性小,更好体现测量准确

性。

[0072] 表 2. 本发明体系时间衍变性数据

[0073]

时间	3min	5min	8min	10min	20min	30min
浓度	0.97	0.99	0.98	0.10	0.10	0.99
相对偏差	0	2.06%	1.03%	3.09%	3.09%	2.06%

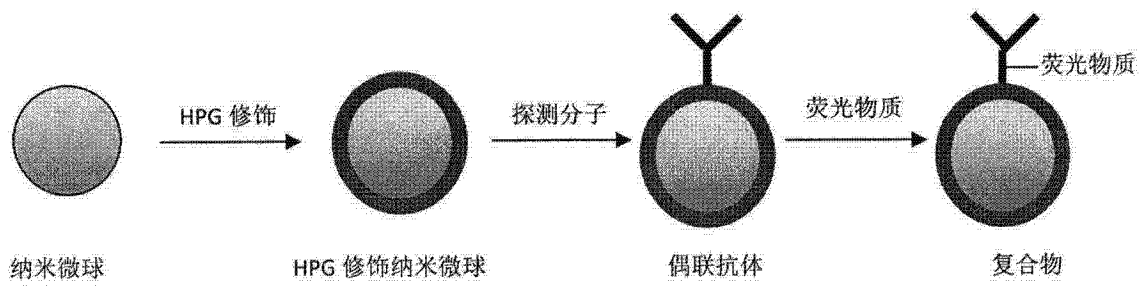


图 1

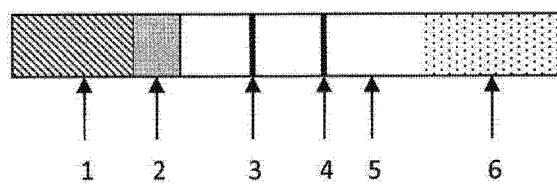


图 2

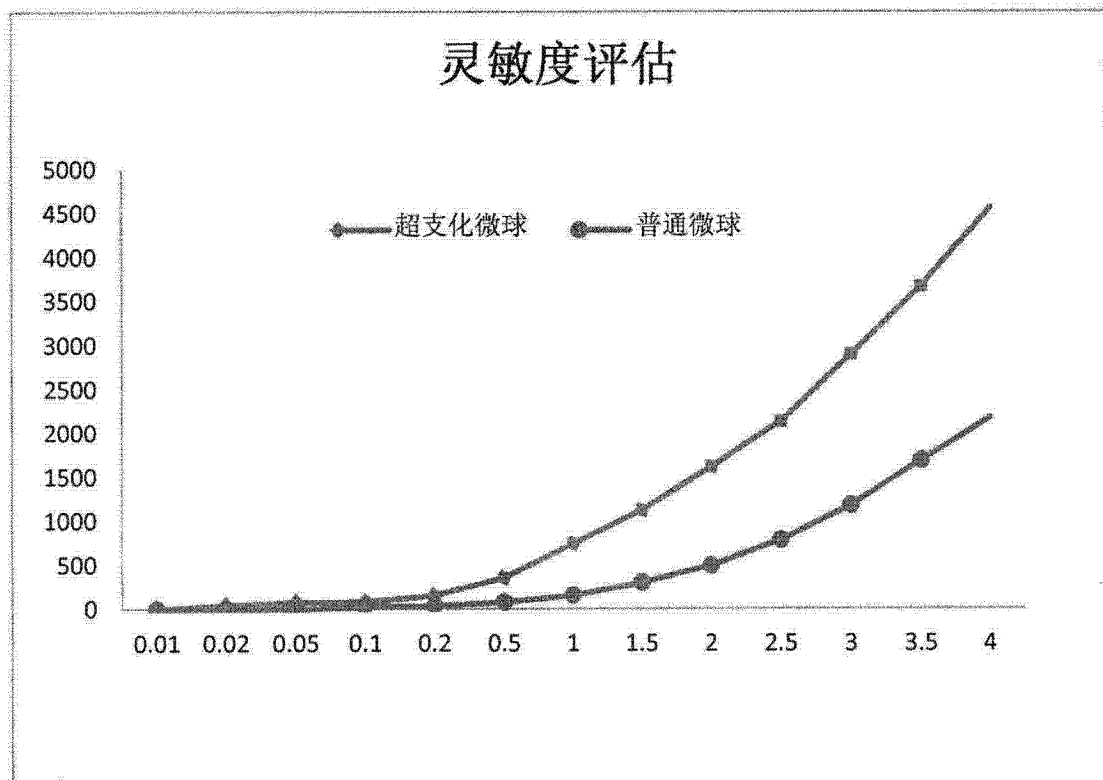


图 3

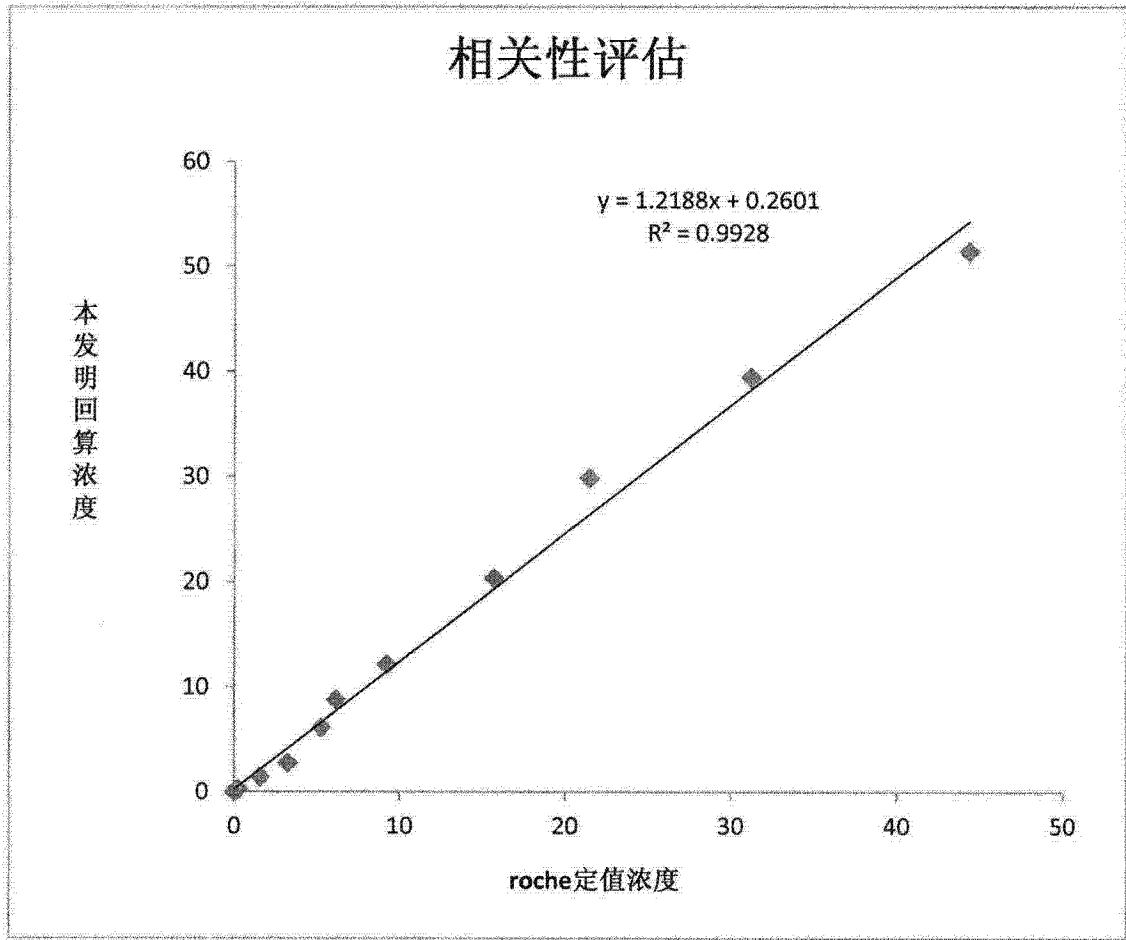


图 4

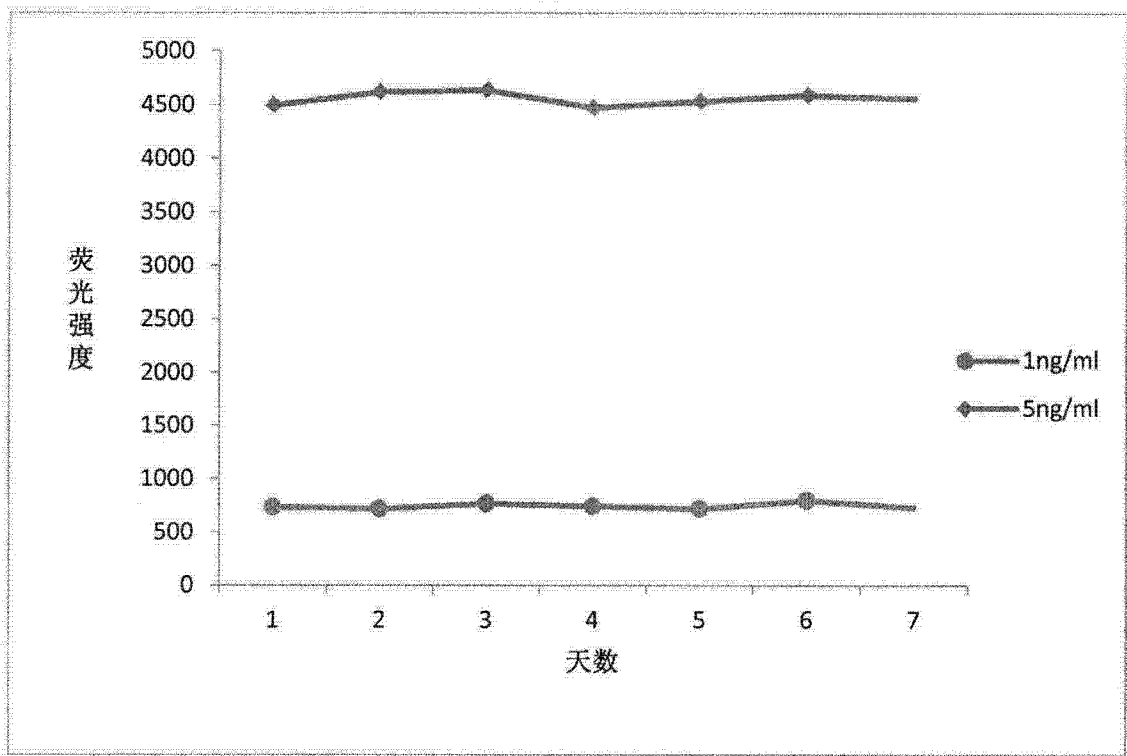


图 5

专利名称(译)	超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用		
公开(公告)号	CN104730232A	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201510147903.7	申请日	2015-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
[标]发明人	金晶 罗雅赛 黄力 朱宗哲 苏恩本		
发明人	金晶 罗雅赛 黄力 朱宗哲 苏恩本		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54346		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球在免疫层析上的应用。本发明的超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微粒在免疫层析上的应用，利用超支化聚缩水甘油醚的亲水性能，制备出亲水且富含官能团的超支化修饰纳米微球材料，并结合干式免疫层析技术制得超支化聚缩水甘油醚修饰纳米微球免疫层析试纸条。在实际使用本发明体系建立的试纸条进行疾病检测时，发现该试剂条较普通微球试剂条灵敏度强，检测范围宽，相关性、重复性、稳定性方面均符合生产要求，具有十分优秀的性能。

