



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105092832 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510535669. 5

(22) 申请日 2015. 08. 28

(71) 申请人 宁波瑞源生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市江北高新工业园
区皇吉浦路 288 号

(72) 发明人 蒋海 张闻 周海滨 王建飞

(74) 专利代理机构 宁波市鄞州盛飞专利代理事
务所(普通合伙) 33243

代理人 张向飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

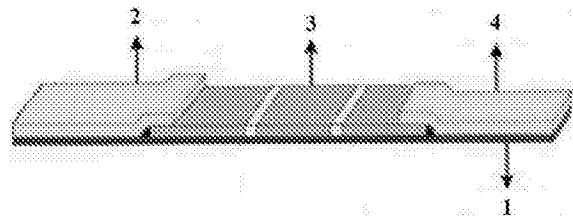
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂及其制备方法,属于医学检验测定技术领域。所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液,粒子重悬液:含 100-200mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液(含 250-500 μg/ml 鼠 IgG,1-5% 小牛血清,0.1-0.5% Pluronic F68,0.5-1% 酪蛋白,0.9% NaCl,0.05% Na₂S₂O₃),pH8-9;样品垫处理液:10mM PBS(含 0.1mg/ml-0.5mg/ml 植物凝集素),pH7-8。并具体公开了 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法,包括特定的粒子标记、样品垫预处理、抗体在 NC 膜上的包被、以及试纸组装。本发明的 NT-proBNP 荧光免疫试剂灵敏度较高、应用范围广泛,可降低血清实验中的干扰,对红细胞具有更好的拦截效果。



1. 一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂,其特征在于,所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液,其中粒子重悬液:含 100-200mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 8-9;样品垫处理液:10mM PBS, pH 7-8。

2. 根据权利要求 1 所述的 NT-proBNP 荧光免疫试剂,其特征在于,所述的 Tris-HCl 重悬液还含 250-500 μ g/ml 鼠 IgG,1-5%小牛血清,0.1-0.5% Pluronic F68,0.5-1% 酪蛋白,0.9% NaCl,0.05% NaN_3 。

3. 根据权利要求 2 所述的 NT-proBNP 荧光免疫试剂,其特征在于,所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 55-60 $^{\circ}$ C 下处理 10min。

4. 根据权利要求 1 所述的 NT-proBNP 荧光免疫试剂,其特征在于,所述的 PBS 还含 0.1mg/ml-0.5mg/ml 植物凝集素。

5. 一种如权利要求 1-4 任一所述的 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括粒子标记、样品垫预处理、抗体在 NC 膜上的包被、以及试纸组装,其中,粒子标记为在粒子中同时加入 EDC、NHS、BSA,以及 NT-proBNP1 抗体或羊抗鸡 IgY 抗体,在 45-55 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h;交联后先清洗、乙醇胺封闭,然后用粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子,最后将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合得到粒子浓度分别为 0.1-0.5mg/ml 和 0.001-0.01mg/ml 的粒子混合液。

6. 根据权利要求 5 所述的 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法,其特征在于,抗体标记中,在交联反应前,NT-proBNP1 抗体和羊抗鸡 IgY 抗体均分别在 45-55 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 24-48 小时。

一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂及其制备方法,属于医学检验测定技术领域。

[0002] 本专利文件中所涉及之术语含义:

[0003] 0.9% NaCl :表示配置完成后的溶液中每 100ml 含 NaCl0.9g。

[0004] 类似格式均表示类似含义,本文另有说明的除外。

背景技术

[0005] 心力衰竭是各种心血管疾病的终末阶段,具有较高的死亡率,相当于一些恶性肿瘤,研究显示心力衰竭的死亡率为 43%,5 年死亡率达 90%,重度心力衰竭的死亡率更高。脑利钠肽 (BNP) 由于心室受到牵拉刺激或者张力升高而分泌,能够早期反映整体甚至局部心脏结构改变导致的功能变化。BNP 来自心室肌细胞,最初合成的为前脑利钠肽原 (pre-proBNP),是由 134 个氨基酸组成的多肽链。pre-proBNP 在心室肌细胞中裂解为脑利钠肽原 (proBNP, 108 个氨基酸) 和信号肽 (26 个氨基酸)。proBNP 进入血液后裂解为具有生理活性的 BNP 和氨基端 - 脑利钠肽原 (NT-proBNP),理论上两者是 1 : 1 的关系。

[0006] 相对于 BNP,NT-proBNP 具有更长的血浆半衰期 (60-120 分钟),BNP 的血浆半衰期只有 20 分钟。NT-proBNP 在血液中的分泌和存在具有累积作用,实际存在比 BNP 的浓度更高,更容易被检测到,即检测的敏感性提高,NT-proBNP 更容易反映早期或者轻微心脏功能的变化。NT-proBNP 具有更低的个体差异,不受个体生理性节律的影响。体外存放稳定性好,室温下可达 3 天,对本体运送、保存等非常重要。

[0007] NT-proBNP 与临床心衰的严重程度成比例,心衰越严重,NT-proBNP 就越高;而且 NT-proBNP 能够区分轻度心衰和心功能正常者。鉴于 NT-proBNP 优于 BNP 对心力衰竭的诊断特点,2000 年左右,国际上已经认定是 NT-proBNP 测定心衰的一个划时代的具有特异性的标志物。

[0008] 目前国内外已有商品化的 NT-proBNP 试剂盒,如美国罗氏生产的 NT-proBNP 免疫检测试剂盒通过了美国 FDA 得认证,用于对充血性心衰的辅助诊断,使用了电化学发光的方法,灵敏度和精密度,准确度都很好,但是试剂价格昂贵。国外另有一些公司生产的 NT-proBNP 试剂盒利用酶联免疫技术开发。国内一些公司的 N 端脑钠肽原检测试剂采用了胶体金的技术等,存在诸多缺点,如酶联免疫试剂不稳定,血清实验中的干扰严重,样品垫对红细胞的拦截效果差,分辨率低,胶体金为定性检测或半定量检测等等。随着医学诊断技术向微量,高灵敏度,高特异性方向发展,酶联免疫,胶体金等技术已经出现不适应倾向。

发明内容

[0009] 本发明的目的是针对现有技术中存在的上述问题,提出了一种可降低血清实验中的干扰,使样品垫对红细胞的拦截效果好的 NT-proBNP 荧光免疫试剂。

[0010] 本发明的目的可通过下列技术方案来实现:一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂,所述

NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液,其中各组分:

[0011] 标记用 NT-proBNP1 抗体:100-300 μ g/1mg 荧光粒子;

[0012] 标记用羊抗鸡 IgY 抗体:100-300 μ g/1mg 荧光粒子;

[0013] NC 膜上划线的包被用 NT-proBNP2 抗体:2-3mg/ml,划线量:1 μ l/cm;

[0014] NC 膜上划线的包被用鸡 IgY 抗体:2-3mg/ml,划线量:1 μ l/cm;

[0015] 粒子重悬液:含 100-200mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 8-9;

[0016] 样品垫处理液:10mM PBS, pH 7-8。

[0017] 在上述 NT-proBNP 荧光免疫试剂中,所述的 Tris-HCl 重悬液还含 250-500 μ g/ml 鼠 IgG,1-5%小牛血清,0.1-0.5%Pluronic F68,0.5-1%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN₃。

[0018] 作为优选,所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 55-60 $^{\circ}$ C 下处理 10min。

[0019] 在上述 NT-proBNP 荧光免疫试剂中,所述的 PBS 还含 0.1mg/ml-0.5mg/ml 植物凝集素。

[0020] 一种上述的 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法,所述的制备方法包括粒子标记、样品垫预处理、抗体在 NC 膜上的包被、以及试纸组装,其中,粒子标记为在粒子中同时加入 EDC、NHS、BSA,以及 NT-proBNP1 抗体或羊抗鸡 IgY 抗体,在 45-55 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h;交联后先清洗、乙醇胺封闭,然后用粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子或羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子,最后将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合得到粒子浓度分别为 0.1-0.5mg/ml 和 0.001-0.01mg/ml 的粒子混合液。

[0021] 本发明 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法生产方便,在粒子标记时可以同时加入 EDC、NHS、BSA,以及 NT-proBNP1 抗体或羊抗鸡 IgY 抗体。与现有技术中 37 $^{\circ}$ C 左右交联相比,本发明在 45-55 $^{\circ}$ C 下交联反应标记的粒子更加稳定,受血清干扰物质干扰相对较少。

[0022] 在上述 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法中,在粒子标记中,交联反应前 NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体均分别在 45-55 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 24-48 小时。通过不断试验发现,将 NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体在交联反应前先进过上述处理后抗体相对稳定,检测结果也会相对稳定,血清相关性也会有所提高。

[0023] 在上述 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法中,在粒子标记中,加入少量 BSA 可以降低试剂本底。

[0024] 进一步的,粒子标记的具体步骤为:

[0025] 在 1mg 粒子中同时加入 0.5mg-1mg EDC、0.5mg-1mg NHS,10-20 μ g BSA,以及 100-300 μ g NT-proBNP1 抗体或 100-300 μ g 羊抗鸡 IgY 抗体,在 45-55 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h;

[0026] 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗,再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时,接着用粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子;

[0027] 将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合在一起,得到粒子浓度分别为 0.1-0.5mg/ml 和 0.001-0.01mg/ml 的粒子混合液。

[0028] 与现有技术相比,本发明 NT-proBNP 荧光免疫试剂的组分配方合理有效,通过将

荧光粒子分别与 NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体进行稳定简单有效率的交联,再将交联后的两种荧光粒子用特定的粒子重悬液重悬处理混合,同时采用含植物凝集素的样品垫处理液处理样品,使制得的 NT-proBNP 荧光免疫试剂灵敏度较高、应用范围广泛,可降低血清实验中的干扰,对红细胞具有更好的拦截效果。

附图说明

[0029] 图 1 为本发明试纸的结构示意图。

[0030] 图 2 为本发明实施例 6 中试剂的实际检测浓度平均值与理论浓度的线性回归分析图。

[0031] 图 3 为本发明实施例 6 中的试剂与对比例 1 中的试剂比对临床血清样品的相关性分析图。

[0032] 图 4 为对比例 1 中的试剂与对比例 2 中的试剂比对临床血清样品的相关性分析图。

[0033] 图 5 为本发明实施例 6 中的试剂与对比例 3 中的试剂比对临床全血样品的滤血效果图(箭头所指为样品垫和 NC 膜交界处)。

[0034] 附图标记列表:1、PVC 胶板;2、样品垫;3、醋酸纤维膜;4、吸水纸。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图和具体实施方式,进一步阐明本发明,应理解下述具体实施方式仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。需要说明的是,下面描述中使用的词语“前”、“后”、“左”、“右”、“上”和“下”指的是附图中的方向,词语“内”和“外”分别指的是朝向或远离特定部件几何中心的方向。

[0036] 如图 1 所示,所述的试纸包括样品垫 2、醋酸纤维膜 3、吸水纸 4 和 PVC 胶板 1,所述样品垫 2、醋酸纤维膜 3、吸水纸 4 和 PVC 胶板 1 均为长条形,所述样品垫 2、醋酸纤维膜 3 和吸水纸 4 均设置在 PVC 胶板 1 的表面,所述样品垫 2、醋酸纤维膜 3 和吸水纸 4 顺次由 PVC 胶板 1 一端向 PVC 胶板 1 另一端设置。

[0037] 进一步优选,所述样品垫 2 与醋酸纤维膜 3 相邻端、醋酸纤维膜 3 与吸水纸 4 相邻端重叠,重叠部分宽度均为 2mm,所述样品垫 2 与醋酸纤维膜 3 相邻端为样品垫 2 叠放在醋酸纤维膜 3 上,所述醋酸纤维膜 3 与吸水纸 4 相邻端为醋酸纤维膜 3 叠放在吸水纸 4 上。通过叠放部分形成不同结构间良好的桥接作用,便于展开剂展开并且与介质充分接触,提高试纸响应速度、改善检测效果和检测稳定性。

[0038] 再进一步优选,所述样品垫 2、醋酸纤维膜 3、吸水纸 4 和 PVC 胶板 1 均为等宽长条形,宽度为 4mm,所述样品垫 2 的长度为 20mm,醋酸纤维膜 3 的长度为 25mm,吸水纸 4 的长度为 19mm。如此不仅规格整齐,还可以保证试纸具有稳定的结构便于保存,同时能够保证在稳定的尺寸下,保证层析过程具有良好的稳定性和显示平滑性。

[0039] 实施例 1

[0040] 一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂,所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液,其中粒子重悬液:含 250 μ g/ml 鼠 IgG,1% 小牛血清,0.1%

Pluronic F68, 0.6% 酪蛋白, 0.9% NaCl, 0.05% NaN_3 , 100mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 8; 其中, 所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 55℃ 下处理 10min; 样品垫处理液: 10mM PBS (含 0.1mg/ml 植物凝集素), pH 7。

[0041] 实施例 2

[0042] 一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂, 所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液, 其中粒子重悬液: 含 300 $\mu\text{g/ml}$ 鼠 IgG, 5% 小牛血清, 0.3% Pluronic F68, 0.8% 酪蛋白, 0.9% NaCl, 0.05% NaN_3 , 200mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 9; 其中, 所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 60℃ 下处理 10min; 样品垫处理液: 10mM PBS (含 0.4mg/ml 植物凝集素), pH 7。

[0043] 实施例 3

[0044] 一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂, 所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液, 其中粒子重悬液: 含 400 $\mu\text{g/ml}$ 鼠 IgG, 2% 小牛血清, 0.5% Pluronic F68, 0.5% 酪蛋白, 0.9% NaCl, 0.05% NaN_3 , 150mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 8-9; 其中, 所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 55℃ 下处理 10min; 样品垫处理液: 10mM PBS (含 0.5mg/ml 植物凝集素), pH 8。

[0045] 实施例 4

[0046] 一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂, 所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液, 其中粒子重悬液: 含 500 $\mu\text{g/ml}$ 鼠 IgG, 3% 小牛血清, 0.2% Pluronic F68, 1% 酪蛋白, 0.9% NaCl, 0.05% NaN_3 , 100mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 8; 其中, 所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 58℃ 下处理 10min; 样品垫处理液: 10mM PBS (含 0.3mg/ml 植物凝集素), pH 8。

[0047] 实施例 5

[0048] 一种 NT-proBNP 荧光免疫试剂, 所述 NT-proBNP 荧光免疫试剂包括标记用 NT-proBNP1 抗体、标记用羊抗鸡 IgY 抗体、包被用 NT-proBNP2 抗体、包被用鸡 IgY 抗体、粒子重悬液、样品垫处理液, 其中粒子重悬液: 含 250-500 $\mu\text{g/ml}$ 鼠 IgG, 4% 小牛血清, 0.4% Pluronic F68, 0.9% 酪蛋白, 0.9% NaCl, 0.05% NaN_3 , 200mM Tris 的 Tris-HCl 重悬液, pH 8; 其中, 所述的鼠 IgG、小牛血清在加入粒子重悬液前均先在 55℃ 下处理 10min; 样品垫处理液: 10mM PBS (含 0.2mg/ml 植物凝集素), pH 7。

[0049] 实施例 6: 实施例 1 中 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法

[0050] 粒子标记:

[0051] 1mg 荧光粒子, 用 50mM MES pH6 清洗 3 次;

[0052] NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体分别在 55℃ 水浴中孵育 48 小时;

[0053] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.6mg EDC、0.6mg NHS, 20 μg BSA, 以及 180 μg NT-proBNP1 抗体, 在 55℃ 下交联反应 2h; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 1 中所述的粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子;

[0054] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.6mg EDC、0.6mg NHS, 20 μ g BSA, 以及 180 μ g 羊抗鸡 IgY 抗体, 在 55 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 1 中所述的粒子重悬液重悬得羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子;

[0055] 将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合在一起, 得到粒子浓度分别为 0.1mg/ml 和 0.007mg/ml 的粒子混合液。

[0056] 样品垫预处理:

[0057] 用喷膜仪向 30cm*2cm 的样品垫喷实施例 1 中所述的样品处理液 8 μ l/cm, 置于除湿机前烘干。

[0058] 抗体在 NC 膜上的包被:

[0059] 用划线仪分别在距离醋酸纤维膜一端(样品垫方向)9mm、13mm 处分别划 NT-proBNP2 抗体和鸡 IgY 抗体, 其中, NC 膜上划线的包被用 NT-proBNP2 抗体:2mg/ml, 划线量:1 μ l/cm; NC 膜上划线的包被用鸡 IgY 抗体:2mg/ml, 划线量:1 μ l/cm, 然后置于除湿机前烘干。

[0060] 试纸组装:

[0061] 将试纸组装成如图 1 所示, 组装后用切成 4mm 宽的试纸条。

[0062] 实施例 7: 实施例 2 中 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法

[0063] 粒子标记:

[0064] 1mg 荧光粒子, 用 50mM MES pH6 清洗 3 次;

[0065] NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体分别在 50 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 36 小时;

[0066] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 1mg EDC、1mg NHS, 12 μ g BSA, 以及 100 μ g NT-proBNP1 抗体, 在 50 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 2 中所述的粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子;

[0067] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 1mg EDC、1mg NHS, 12 μ g BSA, 以及 100 μ g 羊抗鸡 IgY 抗体, 在 50 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 2 中所述的粒子重悬液重悬得羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子;

[0068] 将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合在一起, 得到粒子浓度分别为 0.1mg/ml 和 0.005mg/ml 的粒子混合液。

[0069] 样品垫预处理:

[0070] 用喷膜仪向 30cm*2cm 的样品垫喷实施例 1 中所述的样品处理液 8 μ l/cm, 置于除湿机前烘干。

[0071] 抗体在 NC 膜上的包被:

[0072] 用划线仪分别在距离醋酸纤维膜一端(样品垫方向)9mm、13mm 处分别划 NT-proBNP2 抗体和鸡 IgY 抗体, 其中, NC 膜上划线的包被用 NT-proBNP2 抗体:3mg/ml, 划线量:1 μ l/cm; NC 膜上划线的包被用鸡 IgY 抗体:3mg/ml, 划线量:1 μ l/cm, 然后置于除湿机前烘干。

[0073] 试纸组装:

- [0074] 将试纸组装成如图 1 所示, 组装后用切成 4mm 宽的试纸条。
- [0075] 实施例 8 : 实施例 3 中 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法
- [0076] 粒子标记 :
- [0077] 1mg 荧光粒子, 用 50mM MES pH6 清洗 3 次 ;
- [0078] NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体分别在 50℃ 水浴中孵育 24 小时 ;
- [0079] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.8mg EDC、0.8mg NHS, 20 μ g BSA, 以及 300 μ g NT-proBNP1 抗体, 在 45℃ 下交联反应 2h ; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 3 中所述的粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子 ;
- [0080] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.8mg EDC、0.8mg NHS, 20 μ g BSA, 以及 300 μ g 羊抗鸡 IgY 抗体, 在 45℃ 下交联反应 2h ; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 3 中所述的粒子重悬液重悬得羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子 ;
- [0081] 将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合在一起, 得到粒子浓度分别为 0.4mg/ml 和 0.008mg/ml 的粒子混合液。
- [0082] 样品垫预处理 :
- [0083] 用喷膜仪向 30cm*2cm 的样品垫喷实施例 1 中所述的样品处理液 8 μ l/cm, 置于除湿机前烘干。
- [0084] 抗体在 NC 膜上的包被 :
- [0085] 用划线仪分别在距离醋酸纤维膜一端 (样品垫方向) 9mm、13mm 处分别划 NT-proBNP2 抗体和鸡 IgY 抗体, 其中 NC 膜上划线的包被用 NT-proBNP2 抗体 : 2mg/ml, 划线量 : 1 μ l/cm ; NC 膜上划线的包被用鸡 IgY 抗体 : 2mg/ml, 划线量 : 1 μ l/cm, 然后置于除湿机前烘干。
- [0086] 试纸组装 :
- [0087] 将试纸组装成如图 1 所示, 组装后用切成 4mm 宽的试纸条。
- [0088] 实施例 9 : 实施例 4 中 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法
- [0089] 粒子标记 :
- [0090] 1mg 荧光粒子, 用 50mM MES pH6 清洗 3 次 ;
- [0091] NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体分别在 45℃ 水浴中孵育 48 小时 ;
- [0092] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.5mg EDC、0.5mg NHS, 18 μ g BSA, 以及 250 μ g NT-proBNP1 抗体, 在 50℃ 下交联反应 2h ; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 4 中所述的粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子 ;
- [0093] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.5mg EDC、0.5mg NHS, 18 μ g BSA, 以及 250 μ g 羊抗鸡 IgY 抗体, 在 50℃ 下交联反应 2h ; 交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 4 中所述的粒子重悬液重悬得羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子 ;
- [0094] 将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合在一起, 得到粒子浓度分别为 0.2mg/ml 和 0.002mg/ml 的粒子混合液。

[0095] 样品垫预处理：

[0096] 用喷膜仪向 30cm*2cm 的样品垫喷实施例 1 中所述的样品处理液 8 μ l/cm, 置于除湿机前烘干。

[0097] 抗体在 NC 膜上的包被：

[0098] 用划线仪分别在距离醋酸纤维膜一端(样品垫方向)9mm、13mm 处分别划 NT-proBNP2 抗体和鸡 IgY 抗体, 其中 NC 膜上划线的包被用 NT-proBNP2 抗体 :2.5mg/ml, 划线量 :1 μ l/cm ;NC 膜上划线的包被用鸡 IgY 抗体 :2.5mg/ml, 划线量 :1 μ l/cm, 然后置于除湿机前烘干。

[0099] 试纸组装：

[0100] 将试纸组装成如图 1 所示, 组装后用切成 4mm 宽的试纸条。

[0101] 实施例 10 :实施例 5 中 NT-proBNP 荧光免疫试剂的制备方法

[0102] 粒子标记：

[0103] 1mg 荧光粒子, 用 50mM MES pH6 清洗 3 次；

[0104] NT-proBNP1 抗体、羊抗鸡 IgY 抗体分别在 55 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 24 小时；

[0105] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.6mg EDC、0.6mg NHS, 15 μ g BSA, 以及 200 μ g NT-proBNP1 抗体, 在 55 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h ;交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 5 中所述的粒子重悬液重悬分别得 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子；

[0106] 向清洗好的荧光粒子中同时加入 0.6mg EDC、0.6mg NHS, 15 μ g BSA, 以及 200 μ g 羊抗鸡 IgY 抗体, 在 55 $^{\circ}$ C 下交联反应 2h ;交联后先用 10mM PBS pH 7.4 清洗, 再用 40mM 乙醇胺 37 度封闭 1 小时, 接着用实施例 5 中所述的粒子重悬液重悬得羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子；

[0107] 将 NT-proBNP1 抗体标记的荧光粒子和羊抗鸡 IgY 抗体标记的荧光粒子混合在一起, 得到粒子浓度分别为 0.5mg/ml 和 0.01mg/ml 的粒子混合液。

[0108] 样品垫预处理：

[0109] 用喷膜仪向 30cm*2cm 的样品垫喷实施例 1 中所述的样品处理液 8 μ l/cm, 置于除湿机前烘干。

[0110] 抗体在 NC 膜上的包被：

[0111] 用划线仪分别在距离醋酸纤维膜一端(样品垫方向)9mm、13mm 处分别划 NT-proBNP2 抗体和鸡 IgY 抗体, 其中 NC 膜上划线的包被用 NT-proBNP2 抗体 :2mg/ml, 划线量 :1 μ l/cm ;NC 膜上划线的包被用鸡 IgY 抗体 :2mg/ml, 划线量 :1 μ l/cm, 然后置于除湿机前烘干。

[0112] 试纸组装：

[0113] 将试纸组装成如图 1 所示, 组装后用切成 4mm 宽的试纸条。

[0114] 对比例 1

[0115] 罗氏 Elecsys NT-proBNP 检测试剂盒。

[0116] 对比例 2

[0117] 该对比例中的 NT-proBNP 检测试剂盒, 与实施例 6 的区别仅在于：

[0118] A、该对比例中试剂的粒子重悬液 :10mM pH 7-8PBS(含 1% BSA, 0.2% Tween 20,

5%蔗糖,0.05% NaN₃) ;

[0119] B、该对比比例中粒子标记 :1mg 粒子中同时加入 0.6mg EDC,0.6mg NHS,180 μg NT-proBNP1 抗体或羊抗鸡 IgY 抗体,在 37℃ 下交联反应 2h,交联后用 10mM PBS pH 7.4 洗一遍,之后用 1% BSA 封闭,用 A 中的粒子重悬液洗 2 次后用将两种粒子混合在一起,NT-proBNP1 抗体和羊抗鸡 IgY 抗体的粒子终浓度分别为 0.1mg/ml 和 0.007mg/ml。

[0120] 该对比比例中的其他工艺与实施例 6 中相同,此处不再累述。

[0121] 对比比例 3

[0122] 与本发明实施例 6 的区别仅在于 :该对比比例中样品垫用 PBS(不含植物凝集素) 进行预处理,其他工艺与实施例 6 中相同,此处不再累述。

[0123] 样品测试 :

[0124] 1、实施例 6 中制备好的试纸条,向试纸条上的样品垫加入不同浓度的 NT-proBNP 抗原标准品(取 7 个不同的浓度,以 35ng/ml 为第一个浓度,4 倍梯度稀释,最后一个浓度为 0),每个浓度测 3 次,通过荧光分析仪计算 T 线和 C 线信号的比值,NT-proBNP 抗原标准品检测结果见表一。

[0125] 表一 :NT-proBNP 抗原标准品检测结果

[0126]

浓度 ng/ml	0	0.034	0.137	0.547	2.188	8.750	35.000
1	0.018	0.078	0.242	0.701	2.244	6.732	20.868
2	0.020	0.081	0.230	0.723	2.362	6.540	20.561
3	0.017	0.083	0.240	0.695	2.256	6.456	20.456
mean	0.018	0.081	0.237	0.706	2.231	6.576	20.628
sd	0.002	0.003	0.006	0.015	0.065	0.141	0.214
cv	8.332%	3.120%	2.679%	2.081%	2.912%	2.149%	1.039%

[0127] 2、检测线性范围

[0128] 用 PBS(含 4% BSA) 将 NT-proBNP 抗原标准品稀释成 8 个不同浓度的标准品,浓度范围为 0.034-35ng/ml,每个浓度重复测 3 次。

[0129] 将本发明实施例 6 试剂的实际检测浓度平均值与理论浓度进行线性回归分析,对比结果见图 2。

[0130] 分析图 2,可得方程 $y = 1.005x + 0.003$,相关系数 $R^2 = 0.997$,表明本发明 NT-proBNP 荧光免疫试剂在 0.034-35ng/ml 范围内线性相关较好。

[0131] 3、灵敏度检测

[0132] 用本发明实施例 6 的试剂对空白样品和浓度为 0.034ng/ml 的抗原标准品进行 10 次测定,计算得到 T/C 信号比值分别为 0.019 和 0.080,标准差 SD 分别为 0.002 和 0.003,以空白值 $0.019 + 3SD$ 计算灵敏度,空白值 T/C 比值 = $0.019 + 3 * 0.002 = 0.025 < 0.080$,所以灵敏度小于 0.034ng/ml。

[0133] 4、重复性测试

[0134] 配置 1ng/ml 和 10ng/ml 的标准品,用本发明实施例 6 中的试剂对 1ng/ml 和 10ng/ml 的标准品进行测定,各浓度重复测定 10 次,分别计算 CV,结果如表 2 所示。

[0135] 表 2:本发明 NT-proBNP 荧光免疫试剂对 1ng/ml 和 10ng/ml 的标准品重复性测试的结果

[0136]

测定结果 标准品浓度	1ng/ml的标准品	10ng/ml的标准品
1	1.05	9.80
2	1.03	10.30
3	0.98	9.80
4	1.04	10.00
5	1.02	9.94
6	1.00	10.00
7	1.03	9.94
8	0.98	9.80
9	1.04	10.30
10	1.02	10.10

[0137]

mean	1.02	9.70
sd	0.02	0.20
cv	2.30%	2.06%

[0138] 从表 2 的结果显示, CV 分别为 2.30% 和 2.06%。

[0139] 5、相关性实验

[0140] (1)、将本发明实施例 6 中的试剂与对比例 1 中的试剂比对临床血清样品, 测得结果的相关性如图 3 所示。

[0141] (2)、将对比例 1 的试剂与对比例 2 中的试剂比对临床血清样品, 测得结果的相关性如图 4 所示。

[0142] 对比图 3 和图 4, 可知与对比例 1 也就是现有技术中普通的试剂相比, 在测临床血清时, 本发明的试剂与目前认可度较高的罗氏试剂具有较高的相关性, R^2 为 0.987, 准确度较高, 受血清干扰物质的影响较小。

[0143] 6、将本发明实施例 6 中的试剂与对比例 3 中的试剂比对临床全血样品, 滤血效果图如图 5 所示, 图中箭头所指为样品垫和醋酸纤维膜的交界处。

[0144] 从图中可以看出, 采用本发明样品垫处理液即使用含有植物凝集素的 PBS 处理后, 全血样品的红细胞不会跑到醋酸纤维膜上。

[0145] 综上所述, 本发明的 NT-proBNP 荧光免疫试剂可以降低血清实验中的干扰, 使样品垫对红细胞有较好拦截效果。

[0146] 本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种修改或补充或采用类似的方式替代, 但并不会偏离本发明的精神或者超越所附权利要求书所定义的范围。

[0147] 尽管对本发明已作出了详细的说明并引证了一些具体实施例, 但是对本领域熟练

技术人员来说,只要不离开本发明的精神和范围可作各种变化或修正是显然的。

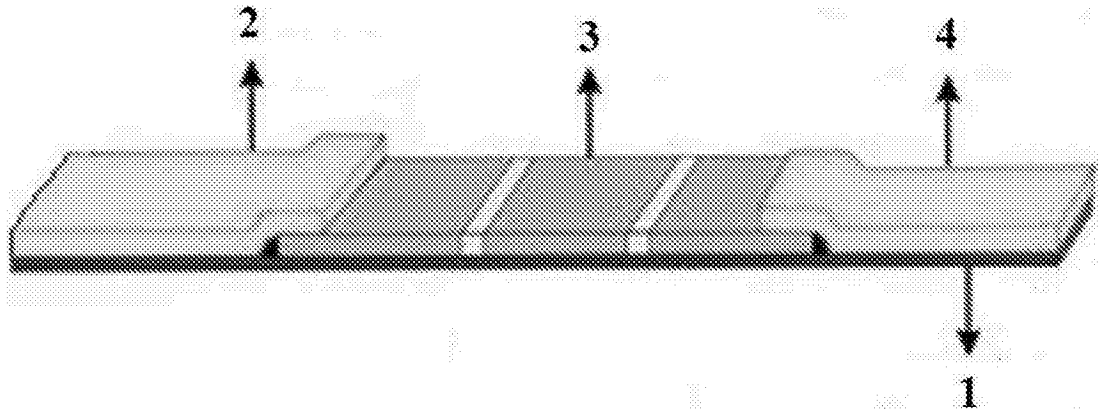


图 1

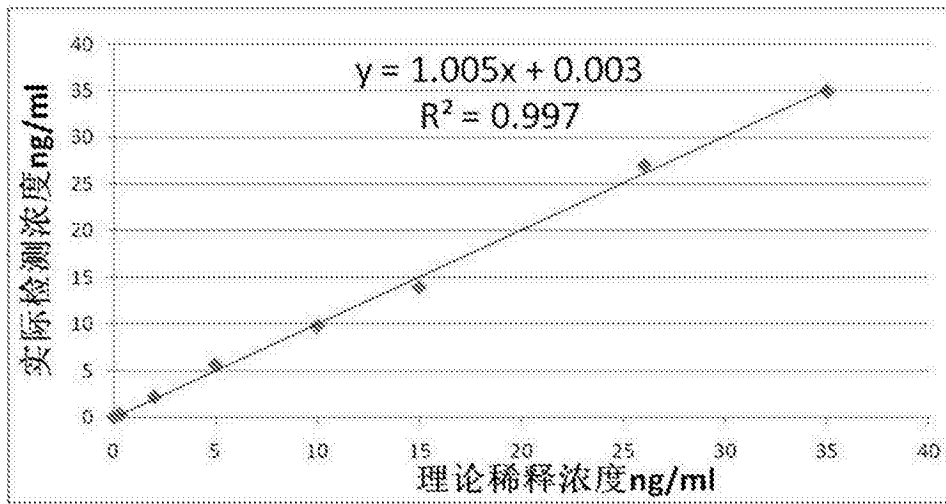


图 2

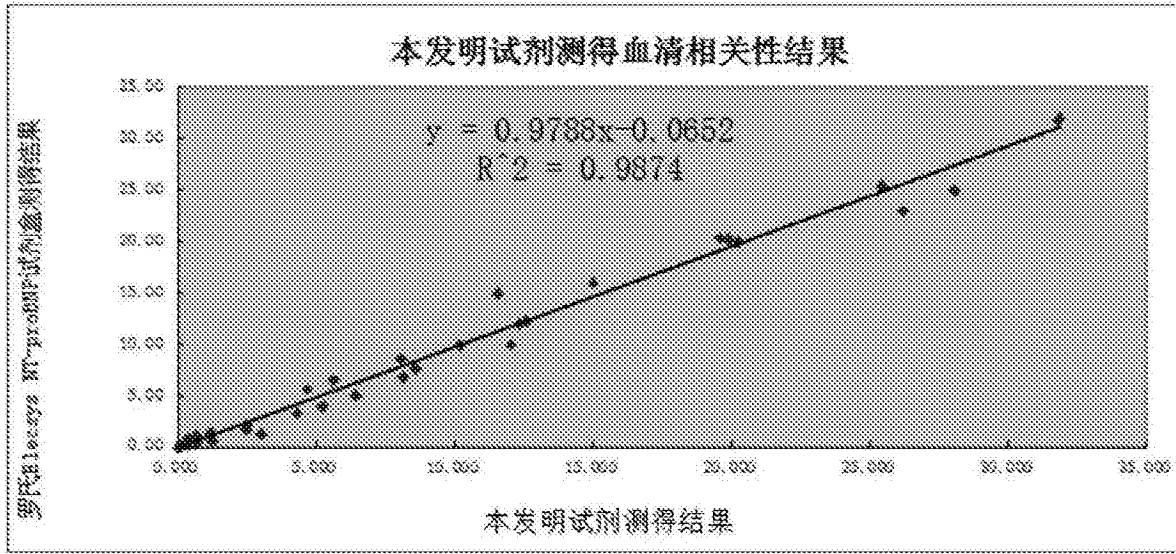


图 3

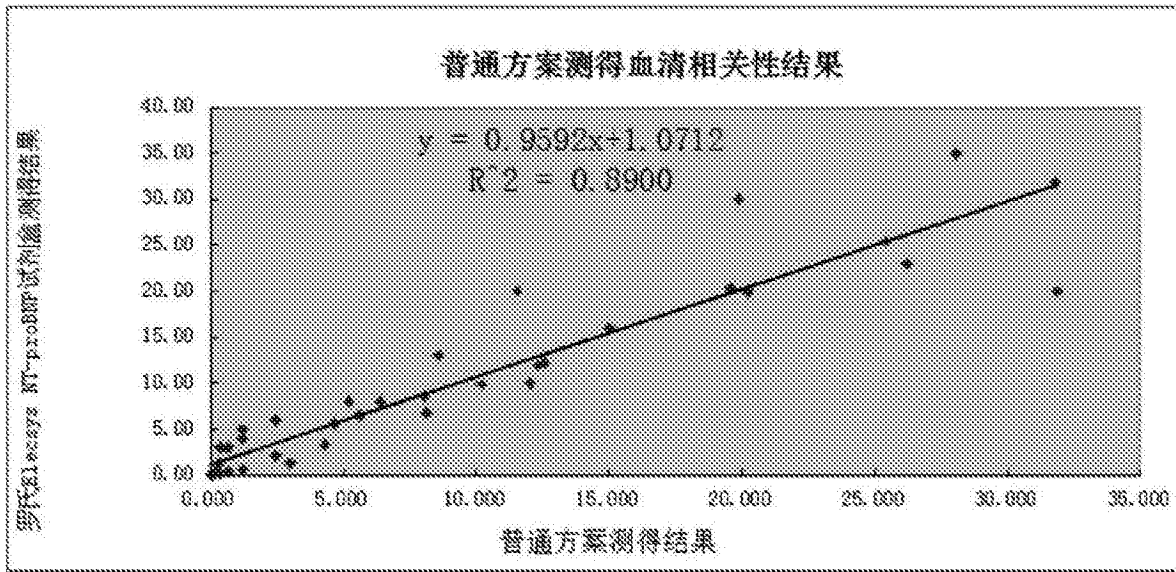


图 4

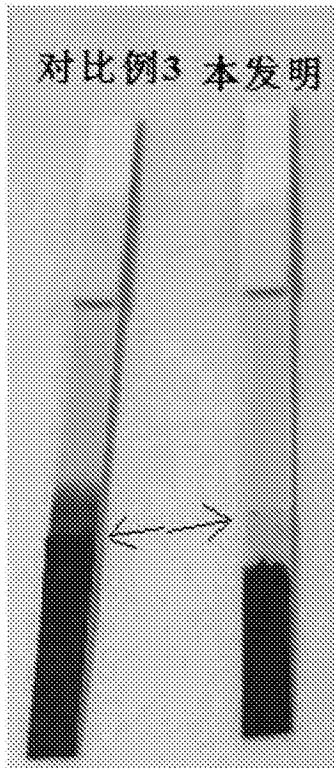


图 5

专利名称(译)	一种NT-proBNP荧光免疫试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN105092832A	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201510535669.5	申请日	2015-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	宁波瑞源生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	宁波瑞源生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宁波瑞源生物科技有限公司		
[标]发明人	蒋海 张闻 周海滨 王建飞		
发明人	蒋海 张闻 周海滨 王建飞		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	张向飞		
其他公开文献	CN105092832B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种NT-proBNP荧光免疫试剂及其制备方法，属于医学检验测定技术领域。所述NT-proBNP荧光免疫试剂包括标记用NT-proBNP1抗体、标记用羊抗鸡IgY抗体、包被用NT-proBNP2抗体、包被用鸡IgY抗体、粒子重悬液、样品垫处理液，粒子重悬液：含100-200mM Tris的Tris-HCl重悬液(含250-500μg/ml鼠IgG，1-5%小牛血清，0.1-0.5% Pluronic F68，0.5-1% 酪蛋白，0.9% NaCl，0.05% NaN3)，pH8-9；样品垫处理液：10mM PBS(含0.1mg/ml-0.5mg/ml植物凝集素)，pH7-8。并具体公开了NT-proBNP荧光免疫试剂的制备方法，包括特定的粒子标记、样品垫预处理、抗体在NC膜上的包被、以及试纸组装。本发明的NT-proBNP荧光免疫试剂灵敏度较高、应用范围广泛，可降低血清实验中的干扰，对红细胞具有更好的拦截效果。

