



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105092832 B

(45)授权公告日 2016.11.30

(21)申请号 201510535669.5

(22)申请日 2015.08.28

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105092832 A

(43)申请公布日 2015.11.25

(73)专利权人 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)

(56)对比文件  
CN 103197074 A,2013.07.10,  
CN 104714025 A,2015.06.17,  
CN 104714025 A,2015.06.17,  
CN 102565423 A,2012.07.11,  
CN 102565423 A,2012.07.11,  
CN 103197074 A,2013.07.10,

CN 201886025 U,2011.06.29,  
CN 1641352 A,2005.07.20,  
CN 201096785 Y,2008.08.06,  
Noora Ristiniemi等.Dry-reagent  
double-monoclonal assay for cystatin C.  
《Clinical Chemistry》.2010,第56卷  
王全溪 等.番鸭呼肠孤病毒乳胶凝集试验  
检测方法的建立.《中国兽医科技》.2005,第35卷  
(第4期),  
Kreutzer Joose等.Dried nanoparticle  
label reagents for microfluidic  
immunoassays.《Proceedings of the 2010 5th  
IEEE International Conference on Nano/  
Micro Engineered and Molecular Systems  
IEEE-NEMS 2010》.2010,  
黄绮玲.抗人N末端B型钠尿肽原(NT-  
proBNP)单克隆抗体的研制.《中国优秀硕士学位  
论文全文数据库》.2014,(第2014/05期),  
黄绮玲.抗人N末端B型钠尿肽原(NT-  
proBNP)单克隆抗体的研制.《中国优秀硕士学位  
论文全文数据库》.2014,(第2014/05期),

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书9页 附图3页

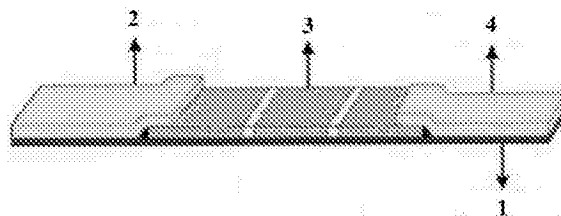
(54)发明名称

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250-500μg/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%NaN<sub>3</sub>),pH 8-9;样品垫处理液:10mM PBS(含0.1mg/ml-0.5mg/ml植物凝集素),pH 7-8。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。



CN 105092832 B

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;

所述的NT-proBNP荧光免疫试剂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℃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。

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250-500μg/ml鼠IgG,1-5%小牛血清,0.1-0.5%PIuronic F68,0.5-1%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>。

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℃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. 根据权利要求1所述的NT-proBNP荧光免疫试剂,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℃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,对本标运送、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 $\mu$ g/1mg荧光粒子;

[0012] 标记用羊抗鸡IgY抗体:100-300 $\mu$ 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 $\mu$ l/cm;

[0014] NC膜上划线的包被用鸡IgY抗体:2-3mg/ml,划线量:1 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml鼠IgG,1-5%小牛血清,0.1-0.5%PIuronic F68,0.5-1%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>。

[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 $\mu$ g BSA,以及100-300 $\mu$ g NT-proBNP1抗体或100-300 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml鼠IgG,1%小牛血清,0.1%PIuronic F68,0.6%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>,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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g/ml鼠IgG,5%小牛血清,0.3%PIuronic F68,0.8%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>,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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g/ml鼠IgG,2%小牛血清,0.5%PIuronic F68,0.5%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>,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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g/ml鼠IgG,3%小牛血清,0.2%PIuronic F68,1%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>,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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g/ml鼠IgG,4%小牛血清,0.4%PIuronic F68,0.9%酪蛋白,0.9%NaCl,0.05%NaN<sub>3</sub>,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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g BSA,以及180 $\mu$ 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 $\mu$ g BSA,以及180 $\mu$ 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 $\mu$ 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,划线条:1 $\mu$ l/cm;NC膜上划线的包被用鸡IgY抗体:2mg/ml,划线条:1 $\mu$ 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 $\mu$ g BSA,以及100 $\mu$ 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 $\mu$ g BSA,以及100 $\mu$ 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 $\mu$ 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,划线条:1 $\mu$ l/cm;NC膜上划线的包被用鸡IgY抗体:3mg/ml,划线条:1 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g BSA,以及300 $\mu$ g NT-proBNP1抗体,在45 $^{\circ}$ 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 $\mu$ g BSA,以及300 $\mu$ g羊抗鸡IgY抗体,在45 $^{\circ}$ 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 $\mu$ I/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,划线条:1 $\mu$ I/cm;NC膜上划线的包被用鸡IgY抗体:2mg/ml,划线条:1 $\mu$ I/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 $^{\circ}$ C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 $\mu$ g BSA,以及250 $\mu$ 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 $\mu$ g BSA,以及250 $\mu$ 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 $\mu$ I/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,划线条:1 $\mu$ I/cm;NC膜上划线的包被用鸡IgY抗体:2.5mg/ml,划线条:1 $\mu$ I/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℃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,15μg BSA,以及200μg 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,15μg BSA,以及200μg羊抗鸡IgY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8μI/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,划线条:1μI/cm;NC膜上划线的包被用鸡IgY抗体:2mg/ml,划线条:1μI/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EIEcsys 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%NaN<sub>3</sub>);
- [0119] B、该对比例中粒子标记:1mg粒子中同时加入0.6mg EDC,0.6mg NHS,180μg 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] 该对比例中的其他工艺与实施例6中相同,此处不再累述。
- [0121] 对比例3
- [0122] 与本发明实施例6的区别仅在于:该对比例中样品垫用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。

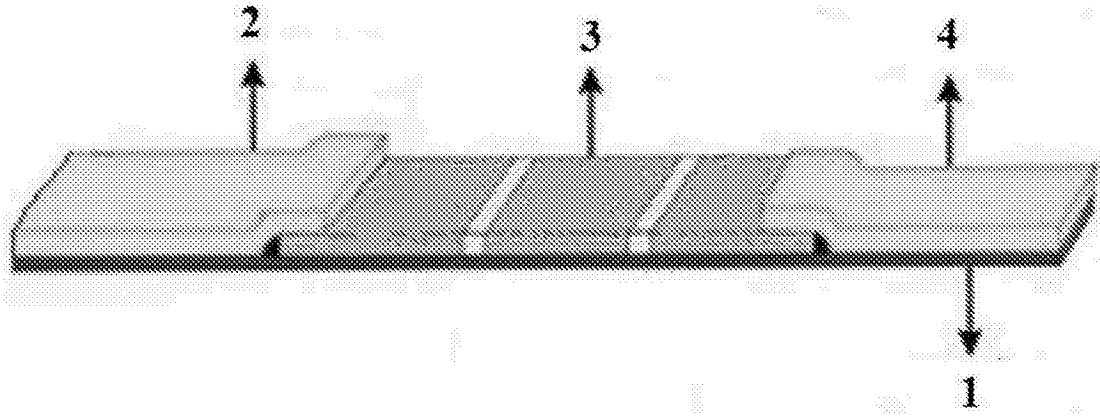


图1

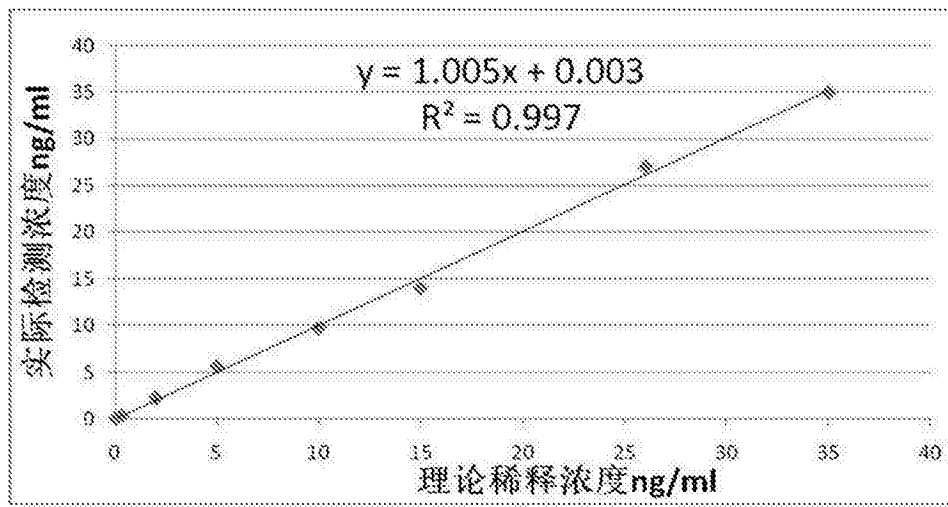


图2

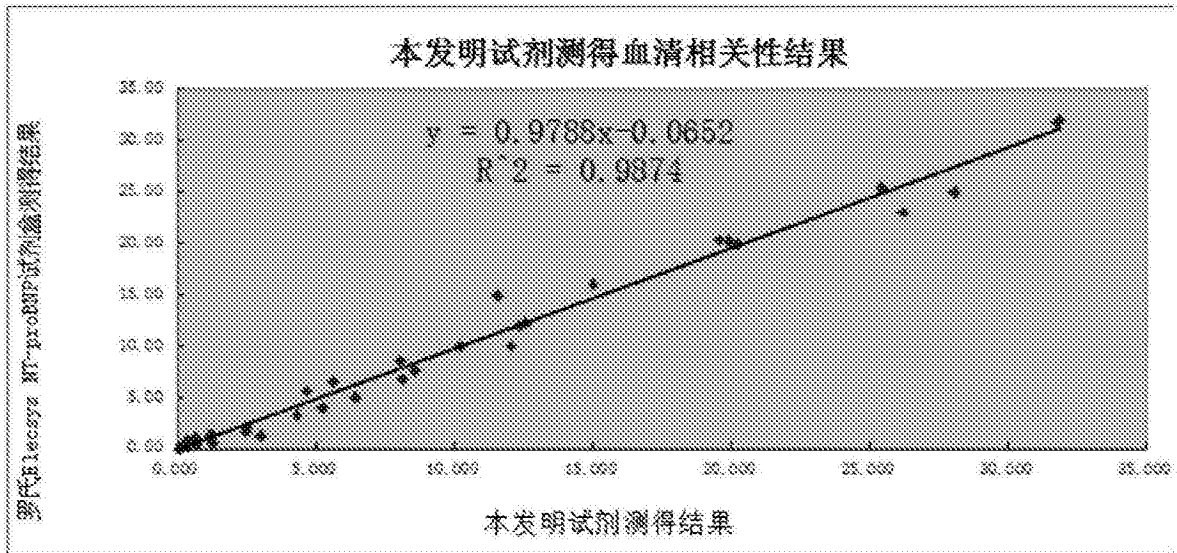


图3

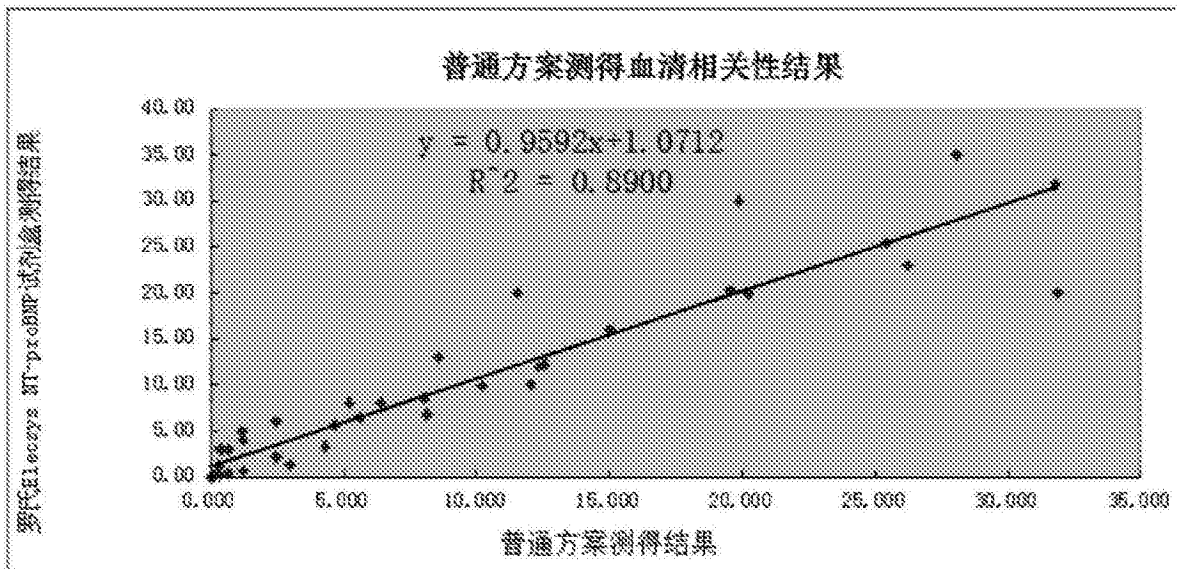


图4

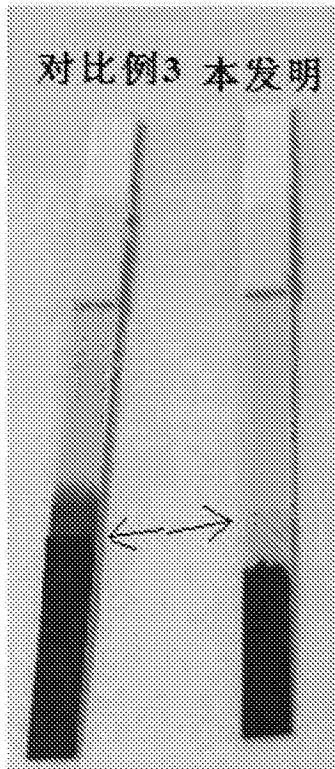


图5

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	<a href="#">CN105092832B</a>	公开(公告)日	2016-11-30
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	CN105092832A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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%NaN<sub>3</sub>)，pH 8-9；样品垫处理液：10mM PBS(含0.1mg/ml-0.5mg/ml植物凝集素)，pH 7-8。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。

