



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106018788 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610326807.3

(22)申请日 2016.05.17

(71)申请人 北京美康基因科学股份有限公司  
地址 100070 北京市丰台区南四环西路188  
号楼15区5号楼9层(园区)

(72)发明人 金鑫 曾滨 赵正道

(74)专利代理机构 北京东方汇众知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11296  
代理人 张淑贤

(51) Int. Cl.  
G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒及其  
制备方法

(57)摘要

本发明涉及免疫层析检测技术领域,具体公开了一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括塑料板、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜,样本垫和吸水垫,玻璃纤维素膜上包被有量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物;硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2、检测线3,检测线1上包被有I型胶原羧基末端肽二抗,检测线2上包被有骨钙素二抗,检测线3上包被有I型前胶原氨基端前肽二抗。该试剂盒,利用双抗体/抗原夹心原理结合量子点的荧光特性实现了采用荧光免疫层析的方法对I型前胶原氨基端前肽、骨钙素和I型前胶原氨基端前肽进行快速、灵敏的联合检测。

1. 一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒,包括塑料板、设置在塑料板上的玻璃纤维素膜、设置在玻璃纤维素膜上的硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上一端设有样本垫,对应的另一端设有吸水垫,其特征在于,所述玻璃纤维素膜上包被有量子点标记的I型胶原羧基末端肽(抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物);所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2、检测线3和控制线,所述检测线1上包被有I型胶原羧基末端肽二抗,所述检测线2上包被有骨钙素二抗,所述检测线3上包被有I型前胶原氨基端前肽二抗,所述控制线上包被有羊抗鼠IgG。

2. 如权利要求1所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒,其特征在于,所述玻璃纤维素膜上包被的量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物中量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的质量比为1:1:1。

3. 如权利要求1所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒,其特征在于,所述量子点为硒化镉或硫化镉量子点。

4. 如权利要求1~3任一项所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上设置的检测线1与检测线2之间、检测线2与检测线3之间、检测线1与控制线之间的间隔均不小于5mm。

5. 一种如权利要求1所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下操作步骤:

1) 原材料的制备:

A: 制备玻璃纤维素膜:将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合包被在玻璃纤维素膜上,干燥,备用;

B: 制备硝酸纤维素膜:取硝酸纤维素膜,间隔划分出检测线1、检测线2、检测线3和控制线,然后将I型胶原羧基末端肽二抗、骨钙素二抗、I型前胶原氨基端前肽二抗、羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上,之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭,干燥,备用;

2) 组装:在塑料板上放置步骤1)制备的玻璃纤维素膜,然后在步骤1)制备的玻璃纤维素膜上放置步骤1)制备的硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素膜的一端放置样品垫,对应的另一端放置吸水垫,干燥,即完成。

6. 如权利要求5所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤A中还包括首先制备量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物,具体方法包括以下操作步骤:

a: 在胶乳颗粒悬浊液中加入改性环糊精,混匀24小时,纯化,得改性环糊精-胶乳复合物悬浊液;

b: 在步骤a制备的改性环糊精-胶乳复合物悬浊液中加入量子点,混匀24小时,纯化,得量子点-改性环糊精-胶乳复合物悬浊液;

c: 在步骤b制备的量子点-改性环糊精-胶乳复合物悬浊液中加入活化剂,活化15分钟,纯化,之后加入I型胶原羧基末端肽抗体,混匀2~4小时后,离心得沉淀物颗粒,将沉淀物颗粒用封闭液重悬,室温混匀1小时,之后再进行纯化,即得量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体;

d:按照上述步骤a~c同样的方法制备量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体,然后将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合,备用。

7.如权利要求6所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,所述改性环糊精为羧甲基化改性环糊精或氨基化改性环糊精。

8.如权利要求6所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤a中所述改性环糊精与胶乳颗粒的质量比为20:1;步骤b中所述量子点与环糊精-乳胶复合物的质量比为10:1;步骤c中所述I型胶原羧基末端肽抗体与量子点-改性环糊精-胶乳复合物的质量比为1:20。

9.如权利要求6所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤A中将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合包被在玻璃纤维素膜上的具体方法为:将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合物均匀喷涂于玻璃纤维素膜上。

10.如权利要求6所述的骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤B中将I型胶原羧基末端肽二抗、骨钙素二抗、I型前胶原氨基端前肽二抗、羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上的具体方法为:分别取浓度均为1mg/ml的I型胶原羧基末端肽二抗、骨钙素二抗、I型前胶原氨基端前肽二抗和羊抗鼠IgG,以1 $\mu$ l/cm,10cm/秒的速度分别喷涂到硝酸纤维的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上。

## 一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析检测技术领域,具体涉及一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 骨质疏松症是一种以骨量低下,骨微结构损坏,导致骨脆性增加,易发生骨折为特征的全身性骨病。2001年美国NIH专家组对骨质疏松症的定义增加了骨强度的降低。骨质疏松症分为三类,第一类为原发性骨质疏松,是一种随着年龄的增长必然发生的生理性退行性病变,约占所有骨质疏松的90%以上;第二类为继发性骨质疏松,是由于其他疾病或药物等一些因素诱发的;第三类为特发性骨质疏松,多见于8—14岁的青少年或成人,多半有家族遗传病史,女性多于男性,妊娠妇女及哺乳期女性所发生的骨质疏松也可以归入此类。

[0003] 当前诊断骨质疏松的主要依据是:通过双能X线设备(DXA)测量骨密度(BMD)数值下降及或低能量外伤后出现的骨折(脆性骨折),中国老年学学会骨质疏松委员会(OCCGS)推荐BMD低于峰值骨量2个标准差或下降25%作为骨质疏松症的诊断标准。BMD是确诊骨质疏松症的良好方法,但是对于骨折风险预测、骨质疏松症的治疗效果评判却欠缺足够的敏感性和及时性,存在一定局限。因此,《中国人群骨质疏松症防治手册2015版》认为骨质疏松症的鉴别诊断、个体化治疗及疗效观察需要进行骨转化生化标志物的检测。骨转换生化标志物(BTM)是骨组织本身的代谢产物,其在体液中的改变早于BMD的改变,可以及时地反映全身骨骼的骨吸收与骨形成的动态变化情况。正常成熟骨代谢主要是以骨重建的形式,即骨形成和骨吸收周而复始地循环,成骨细胞调节骨形成过程,增加骨矿物质含量或密度,破骨细胞调节骨吸收过程,减少骨矿物质含量或密度。因此,骨转换生化标志物主要分为两类,即骨形成标志物和骨吸收标志物。因此联合检测骨转换生化标志物对骨质疏松症的早期诊断、代谢性骨病的鉴别诊断、评估骨量减少程度、预测骨折风险及抗骨质疏松药物治疗效果等方面存在重要价值。

### 发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺陷,本发明的目的是提供一种灵敏度高、准确度高、操作简便、成本低的骨标志物检测用免疫层析试剂盒,实现对I型胶原羧基末端肽(CTX)、骨钙素(OC)和I型前胶原氨基端前肽(P1NP)三种成分的同时联合检测。

[0005] 本发明的目的还在于提供一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒的制备方法。

[0006] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种骨标志物检测用试剂盒,包括塑料板、设置在塑料板上的玻璃纤维素膜、设置在玻璃纤维素膜上的硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜一端设有样本垫,对应的另一端设有吸水垫,所述玻璃纤维素膜上包被有量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物;所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2、检测线3和控制线,所述检测线1上包被有I型胶原羧基末端肽

二抗,所述检测线2上包被有骨钙素二抗,所述检测线3上包被有I型前胶原氨基端前肽二抗,所述控制线上包被有羊抗鼠IgG。

[0008] 所述玻璃纤维上包被的量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物中量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的质量比为1:1:1。

[0009] 所述量子点为硒化镉或硫化镉量子点。

[0010] 所述硝酸纤维素膜上设置的检测线1与检测线2之间、检测线2与检测线3之间、检测线1与控制线之间的间隔均不小于5mm。

[0011] 上述骨标志物检测用试剂盒的制备方法,包括以下操作步骤:

[0012] 1)原材料的制备:

[0013] A:制备玻璃纤维素膜:将量子点标记的I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体、量子点标记的骨钙素(OC)抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体混合包被在玻璃纤维素膜上,干燥,备用;

[0014] B:制备硝酸纤维素膜:取硝酸纤维素膜,间隔划分出检测线1、检测线2、检测线3和控制线,然后将I型胶原羧基末端肽二抗、骨钙素二抗、I型前胶原氨基端前肽二抗、羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上,之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭,干燥,备用;

[0015] 2)组装:在塑料板上放置步骤1)制备的玻璃纤维素膜,然后在步骤1)制备的玻璃纤维素膜上放置步骤1)制备的硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素的一端放置样品垫,对应的另一端放置吸水垫,干燥,即完成。

[0016] 步骤A中还包括首先制备量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物,具体方法包括以下操作步骤:

[0017] a:在胶乳颗粒悬浊液中加入改性环糊精,混匀24小时,纯化,得改性环糊精-胶乳复合物悬浊液;

[0018] b:在步骤a制备的改性环糊精-胶乳复合物悬浊液中加入量子点,混匀24小时,纯化,得量子点-改性环糊精-胶乳复合物悬浊液;

[0019] c:在步骤b制备的量子点-改性环糊精-胶乳复合物悬浊液中加入活化剂,活化15分钟,纯化,之后加入I型胶原羧基末端肽抗体,混匀2~4小时后,离心得沉淀物颗粒,将沉淀物颗粒用封闭液重悬,室温混匀1小时,之后再纯化,即得量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体;

[0020] d:按照上述步骤a~c同样的方法制备量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体,然后将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合,备用;

[0021] 所述改性环糊精为羧甲基化改性环糊精或氨基化改性环糊精。

[0022] 所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。

[0023] 步骤c中所述量子点-改性环糊精-胶乳复合物悬浊液与活化剂的质量比为1:10。

[0024] 步骤B中所用的封闭液为牛血清白蛋白溶液。

[0025] 步骤c中所用的封闭液为牛血清白蛋白溶液。

[0026] 步骤a中所述改性环糊精与胶乳颗粒的质量比为20:1;步骤b中所述量子点与环糊精-乳胶复合物的质量比为10:1;步骤c中所述I型胶原羧基末端肽抗体与量子点-改性环糊精-胶乳复合物的质量比为1:20。

[0027] 步骤a中胶乳颗粒使用前进行纯化处理,所述纯化处理的具体方法为:取胶乳颗粒加入第一缓冲液中,离心分离,弃去上清,再用第一缓冲液重悬沉淀物颗粒,然后再离心分离,弃去上清,再用第一缓冲液重悬沉淀物颗粒,4℃保存备用。

[0028] 上述纯化后的胶乳颗粒在使用时取胶乳颗粒,采用第二缓冲液将胶乳颗粒稀释成浓度为10mg/ml。

[0029] 上述步骤b中还包括首先将步骤a中制备的改性环糊精-胶乳复合物悬浊液,采用第二缓冲液稀释成浓度为10mg/ml的悬浊液,然后再加入量子点。

[0030] 上述步骤c中还包括首先将步骤b中制备的量子点-改性环糊精-胶乳复合物悬浊液,采用第二缓冲液稀释成浓度为10mg/ml的悬浊液,然后再加入活化剂活化。

[0031] 步骤c中所述封闭后进行纯化的具体方法为:8000rpm条件下离心15min,弃去上清,沉淀复溶于分散液中。

[0032] 步骤A中将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合包被在玻璃纤维素膜上的具体方法为:将量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合物均匀喷涂于玻璃纤维素膜上。

[0033] 步骤a和步骤b中所述纯化的具体方法为:8000rpm条件下离心,弃去上清,沉淀用第一缓冲液进行重悬,之后在8000rpm条件下离心,弃去上清,沉淀复溶于第一缓冲液中。

[0034] 步骤c中活化后纯化的具体方法为:8000rpm条件下离心弃去上清,沉淀用第一缓冲液进行重悬。

[0035] 步骤B中将I型胶原羧基末端肽二抗、骨钙素二抗、I型前胶原氨基端前肽二抗、羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上的具体方法为:分别取浓度均为1mg/ml的I型胶原羧基末端肽二抗、骨钙素二抗、I型前胶原氨基端前肽二抗和羊抗鼠IgG,以1 $\mu$ l/cm,10cm/秒的速度分别喷涂到硝酸纤维的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上。

[0036] 步骤1)和步骤2)中所述的干燥为37℃干燥3~5小时。

[0037] 上述第一缓冲液为0.02M,pH7.4的PB缓冲液。上述第二缓冲液为0.02M,pH6.1的MES缓冲液。

[0038] 上述骨标志物检测用试剂盒在使用时,将待测样品加入试剂盒的样品垫中,玻璃纤维素膜上的量子化标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合物首先特异性的捕捉到待测样品中的I型胶原羧基末端肽、骨钙素和I型前胶原氨基端前肽,然后在达到检测线3时,量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体-I型前胶原氨基端前肽结合物与检测线3上的I型前胶原氨基端前肽二抗特异性结合;依次在检测线2时,量子点标记的骨钙素抗体-骨钙素结合物与检测线2上的骨钙素二抗特异性结合;在检测线1时,量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体-I型胶原羧基末端肽结合物与检测线1上的I型胶原羧基末端肽二抗特异性结合。之后通过检测检测线1、

检测线2和检测线3上结合的量子点的荧光效应,定量和定性判断待测样品中I型前胶原氨基端前肽、骨钙素和I型前胶原氨基端前肽。

[0039] 本发明骨标志物检测用试剂盒,以量子化标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体混合物包被在玻璃纤维素膜上,作为检测探针,利用双抗体/抗原夹心原理结合量子点的荧光特性实现了采用荧光免疫层析的方法对I型前胶原氨基端前肽、骨钙素和I型前胶原氨基端前肽进行快速、特异、简便、灵敏的联合检测。本发明骨标志物检测用试剂盒检测线低,检测灵敏度高。

[0040] 本发明骨标志物检测用试剂盒的制备方法,操作简便,易于控制,适于工业化推广应用。

[0041] 进一步优选的,本发明制备方法中,创新量子点标记技术,采用羧甲基化或氨基化改性的环糊精修饰量子点,然后将I型胶原羧基末端肽抗体、骨钙素抗体、I型前胶原氨基端前肽抗体分别结合在改性环糊精的羧基基团或氨基基团上,实现制备获得量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体、量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体。

#### 附图说明

[0042] 图1是采用实施例1制备的试剂盒检测I型胶原羧基末端肽标准样品发光值与实际浓度之间对应关系的标准曲线;

[0043] 图2是采用实施例1制备的试剂盒检测骨钙素标准样品发光值与实际浓度之间对应关系的标准曲线;

[0044] 图3是采用实施例1制备的试剂盒检测I型前胶原氨基端前肽标准样品发光值与实际浓度之间对应关系的标准曲线。

#### 具体实施方式

[0045] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0046] 实施例1

[0047] 本实施例骨标志物检测用试剂盒,包括塑料板、设置在塑料板上的玻璃纤维素膜、设置在玻璃纤维素膜上的硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上一端设有样本垫,对应的另一端设有吸水垫,所述玻璃纤维素膜上包被有质量比为1:1:1的量子点标记的I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体、量子点标记的骨钙素(OC)抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体的混合物;所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2、检测线3和控制线,所述检测线1上包被有I型胶原羧基末端肽(CTX)二抗,所述检测线2上包被有骨钙素(OC)二抗,所述检测线3上包被有I型前胶原氨基端前肽(PINP)二抗,所述控制线上包被有羊抗鼠IgG;所述量子点为硒化镉量子点。

[0048] 本实施例骨标志物检测用试剂盒的制备方法,具体操作步骤为:

[0049] 1)制备玻璃纤维素膜:

[0050] a:取1ml未标记胶乳颗粒加入10ml,0.02M,pH7.4PB缓冲液中;离心机10000rpm离心20min;去掉上清液,再用10ml,0.02M,pH7.4PB缓冲液重悬沉淀颗粒物;之后再离心机10000rpm离心20min,去掉上清并用5ml0.02M,pH7.4,PB缓冲液重悬沉淀颗粒物,4℃保存待用;

[0051] b:取步骤a制备的胶乳颗粒用0.02M,pH6.1的MES缓冲液将胶乳颗粒稀释至10mg/ml,然后取0.05ml稀释后的胶乳颗粒悬浊液加入10mg羧基化改性环糊精,混匀24小时后,离心机8000rpm离心,弃去上清,并用0.02M,pH7.4的PB缓冲液重悬沉淀颗粒物,之后再次离心机8000rpm离心,弃去上清,沉淀颗粒物复溶于0.02M,pH7.4的PB缓冲液中,得羧基化改性环糊精-胶乳复合物悬浊液;

[0052] c:取步骤b制备的羧基化改性环糊精-胶乳复合物悬浊液,用0.02M,pH6.1的MES缓冲液将其稀释至10mg/ml,然后取20ml稀释后的羧基化改性环糊精-胶乳复合悬浊液,加入20mg硒化镉量子点,混匀24小时,离心机8000rpm离心,弃去上清,并用0.02M,pH7.4的PB缓冲液重悬沉淀颗粒物,之后再次离心机8000rpm离心,弃去上清,沉淀颗粒物复溶于0.02M,pH7.4的PB缓冲液中,得量子点-羧基化改性环糊精-胶乳复合物悬浊液;

[0053] d:取步骤c制备的量子点-羧基化改性环糊精-胶乳复合物悬浊液,用0.02M,pH6.1的MES缓冲液将其稀释至10mg/ml,然后按照量子点-改性环糊精-胶乳复合物与活化剂的质量比为1:10,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,活化15分钟后,8000rpm离心,弃去上清,并用0.02M,pH7.4的PB缓冲液重悬沉淀物颗粒,之后按照I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体:量子点-羧基化改性环糊精-胶乳复合物=1:20的比例加入I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体,混匀3小时后,8000rpm离心15分钟,将沉淀物颗粒用封闭液重悬,室温混匀1小时,之后8000rpm离心15min,沉淀颗粒物复溶于分散液,即得量子点标记的I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体;

[0054] e:按照上述步骤a~c同样的方法制备量子点标记的骨钙素(OC)抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体,然后将量子点标记的I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体、量子点标记的骨钙素(OC)抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体混合,喷涂于玻璃纤维素膜上,37℃干燥4小时,即得量子点标记的I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体、量子点标记的骨钙素(OC)抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体混合物标记的玻璃纤维素膜;

[0055] 2)制备硝酸纤维素膜:取硝酸纤维素膜,间隔6mm依次划分检测线3、检测线2、检测线1和控制线,之后取浓度均为1mg/ml的I型胶原羧基末端肽(CTX)二抗、骨钙素(OC)二抗、I型前胶原氨基端前肽(PINP)二抗、羊抗鼠1gG,以1 $\mu$ l/cm,10cm/秒的速度分别喷涂到硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2、检测线3和控制线上,之后将硝酸纤维素膜放入牛血清白蛋白溶液中封闭,37℃干燥3小时,即得所述的硝酸纤维素膜;

[0056] 3)组装:在塑料板上放置步骤1)制备的玻璃纤维素膜,在步骤1)制备的玻璃纤维素膜上放置步骤2)制备的硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素的一端放置样品垫,对应的另一端放置吸水垫,37℃干燥5小时,即完成。

[0057] 实施例2

[0058] 本实施例骨标志物检测用试剂盒,与实施例不同的地方在于,采用的量子点为硫化镉量子点,采用的改性环糊精为氨基化干性环糊精,制备I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体、量子点标记的骨钙素(OC)抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体的过程中,在活化的量子点-改性环糊精-胶乳悬浊液中加入抗体或抗原的混匀时间为2小时,其他同实施例1。

[0059] 实施例3

[0060] 本实施例骨标志物检测用试剂盒,与实施例不同的地方在于,制备I型胶原羧基末端肽(CTX)抗体、量子点标记的骨钙素(OC)抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽(PINP)抗体的过程中,在活化的量子点-改性环糊精-胶乳悬浊液中加入抗体或抗原的混匀时间为4小时,其他同实施例1。

[0061] 试验例:

[0062] 将I型胶原羧基末端肽(CTX)稀释为7.8125ng/L、15.625ng/L、31.25ng/L、62.5ng/L、125ng/L、250ng/L、500ng/L、1000ng/L;I型前胶原氨基端前肽(PINP)稀释为3.90625ug/L、7.8125ug/L、15.625ug/L、31.25ug/L、62.5ug/L、125ug/L、250ug/L、500ug/L;骨钙素(OC)稀释为1.5625ug/L、3.125ug/L、6.25ug/L、12.5ug/L、25ug/L、50ug/L、100ug/L、200ug/L作为标准品溶液,并同时配制空白溶液。

[0063] 分别取各浓度的标准品100u1分别加入到实施例1制备的试剂盒的样品垫上,5min后将显色完成的试剂盒放入荧光免疫层析读数仪(南京美宁康诚生物科技有限公司)中,读取相应检测线的发光值,并记录各浓度标准样品检测的发光值与实际浓度之间的对应关系,绘制标准曲线,如图1~图3所示,I型胶原羧基末端肽的标准曲线回归方程为: $y = -0.0000005x^2 + 0.00104x + 0.00377$ ,  $R^2 = 0.99997$ ;骨钙素的标准曲线回归方程为: $y = -0.00007x^2 + 0.02597x + 0.01507$ ,  $R^2 = 0.99899$ ;I型前胶原氨基端前肽的标准曲线回归方程: $y = -0.000004x^2 + 0.00938x + 0.00885$ ,  $R^2 = 0.99942$ ,由上述标准曲线可知本发明制备的试剂盒针对I型胶原羧基末端肽的最低检测限为3ng/L、骨钙素的最低检测限为0.5μg/L、I型前胶原氨基端前肽的最低检测限为2.5μg/L。

[0064] 另外,取空白溶液加入到实施例1制备的试剂盒中,未检测到荧光效应。

[0065] 取100例随机的临床样本,采用本发明实施例1制备的试剂盒对I型胶原羧基末端肽、I型前胶原氨基端前肽、骨钙素的浓度进行联合检测。检测方法为:100u1待测样品(50u1样品+50u1样品稀释液)滴入试剂盒样本垫上,5min后将显色完成的标准品与待测样品的试纸条放入荧光免疫层析读数仪(南京美宁康诚生物科技有限公司)中,读取T/C线的发光值,并记录,将待测样品T/C值带入标准曲线中,得到I型胶原羧基末端肽、I型前胶原氨基端前肽、骨钙素的浓度,结果如下表1所示:

[0066] 表1

		项目名称	
样本编号	骨钙素 (ug/L)	I 型前胶原氨基端前肽 (ug/L)	I 型胶原羧基末端肽 (ng/L)
1	26.09	247.01	101.18
2	2.73	901.38	134.43
3	12.77	67.88	81.28

[0067]

[0068]

4	14.82	860.70	471.35
5	32.56	653.89	162.69
6	33.81	102.71	87.68
7	46.14	666.47	246.15
8	4.65	237.95	19.02
9	4.14	354.04	27.21
10	18.37	971.16	393.27
11	3.45	647.72	227.81
12	47.88	934.02	171.98
13	40.03	916.71	350.95
14	36.17	285.46	289.17
15	11.51	175.19	326.62
16	16.97	155.95	327.88
17	38.51	580.70	78.98
18	14.93	977.54	157.50
19	44.06	715.80	195.05
20	33.60	456.88	314.84
21	8.83	468.09	111.79
22	43.37	259.28	309.26

[0069]

23	29.39	247.93	44.03
24	6.30	825.90	364.82
25	19.54	385.03	205.30
26	43.04	684.01	320.68
27	4.58	333.57	83.72
28	26.26	464.14	446.01
29	10.47	503.33	426.40
30	21.59	857.80	244.74
31	30.97	197.91	69.47
32	34.70	595.38	17.06
33	11.54	114.75	13.06
34	38.08	928.11	470.56
35	8.79	999.87	97.62
36	29.90	222.80	306.37
37	43.03	339.38	461.99
38	15.37	897.26	173.06
39	7.39	472.51	365.13
40	19.05	250.04	206.52
41	6.51	841.11	471.51

[0070]

42	9.74	470.42	352.41
43	26.25	801.77	317.46
44	11.23	423.95	209.79
45	33.80	458.59	226.79
46	42.45	360.80	366.58
47	47.04	678.05	434.49
48	34.05	264.20	201.27
49	31.50	237.63	66.45
50	14.17	771.19	8.00
51	9.27	688.29	31.64
52	10.34	343.04	410.42
53	38.42	370.26	41.21
54	10.49	489.60	193.20
55	28.37	841.36	285.23
56	11.44	53.01	164.28
57	2.91	719.96	347.83
58	3.36	700.13	378.76
59	40.96	241.29	24.09
60	23.05	836.13	489.87

[0071]

61	41.70	674.52	403.01
62	11.54	697.52	348.85
63	48.66	908.88	89.19
64	3.11	428.28	214.08
65	21.71	418.12	467.67
66	19.35	741.83	488.90
67	16.97	123.58	380.29
68	47.82	146.30	386.11
69	34.74	151.62	101.52
70	39.40	588.81	179.55
71	28.16	832.90	84.65
72	45.40	416.28	213.60
73	9.51	734.47	326.41
74	29.85	975.82	135.27
75	31.59	855.50	21.91
76	38.93	761.92	194.22
77	24.34	628.39	303.96
78	29.06	716.60	302.53
79	31.87	940.68	306.47

[0072]

80	37.27	992.08	13.14
81	48.86	638.15	350.03
82	33.84	549.79	428.00
83	31.83	252.72	444.76
84	32.34	86.23	164.36
85	46.33	698.81	475.70
86	12.16	463.94	298.24
87	43.75	581.33	240.56
88	42.60	990.90	446.57
89	39.39	352.40	408.15
90	11.19	100.75	463.76
91	11.25	687.34	144.08
92	9.49	191.40	163.31
93	6.63	733.02	378.42
94	19.25	51.46	327.37
95	32.94	262.08	353.85
96	4.78	176.12	325.67
97	8.20	782.93	242.98
98	44.57	780.81	308.15

[0073]	99	44.06	942.61	69.48
	100	4.73	57.43	208.13

[0074] 由此可见,本方法可以直接定量检测I型胶原羧基末端肽(CTX)、骨钙素(OC)、I型前胶原氨基端前肽(PINP),不需专业培训,操作方便,快速,10min即可获得结果,适合在基层医院和体检中心推广和运用。

[0075] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

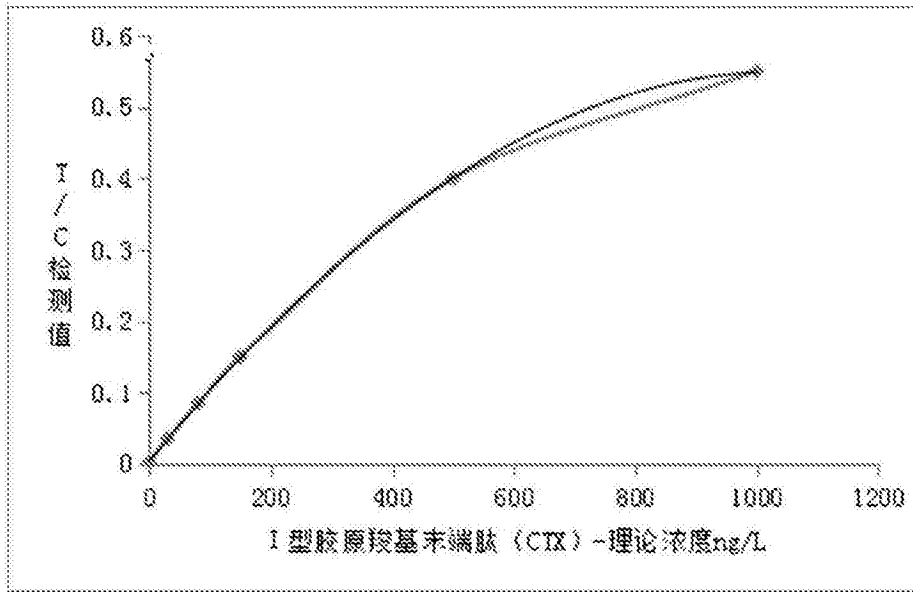


图1

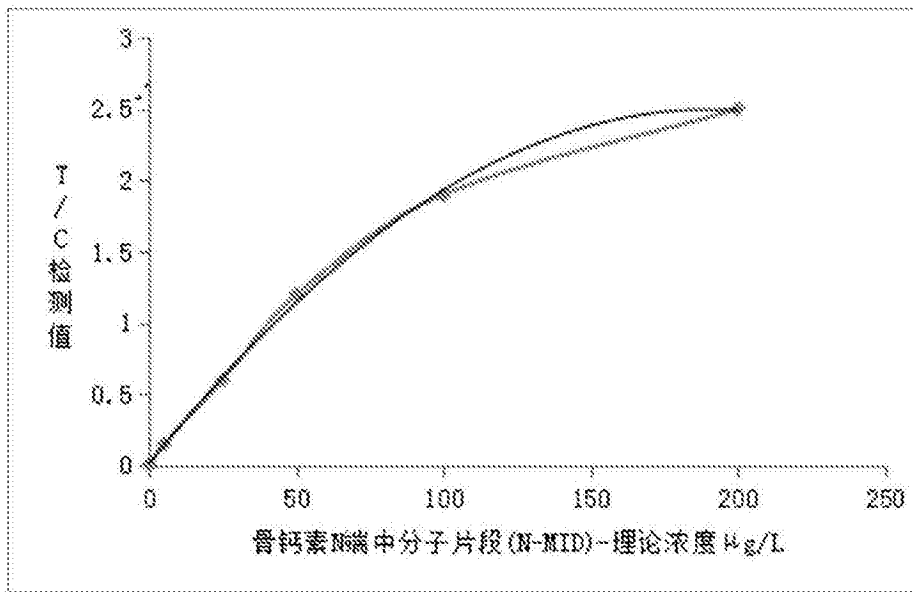


图2

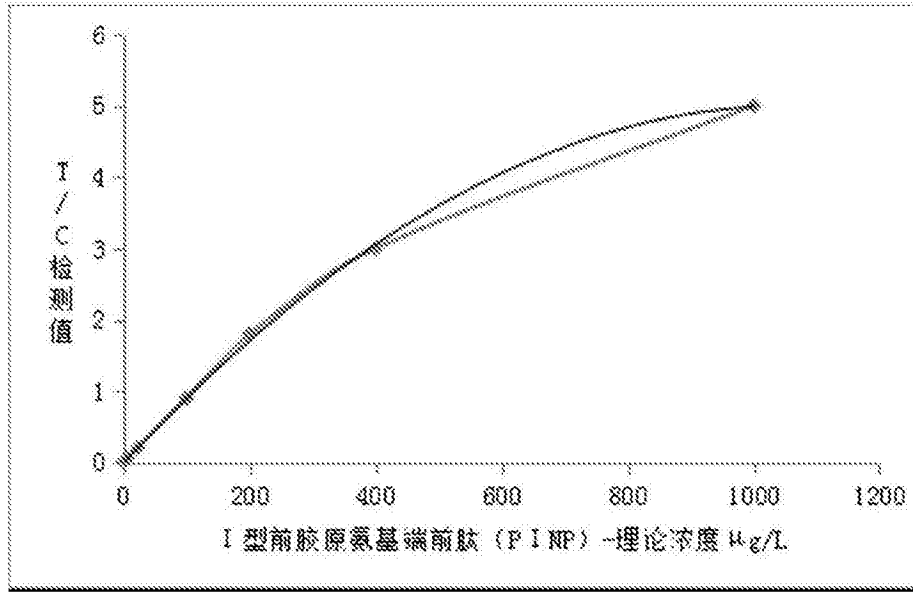


图3

专利名称(译)	一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106018788A</a>	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610326807.3	申请日	2016-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	北京美康基因科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京美康基因科学股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京美康基因科学股份有限公司		
[标]发明人	金鑫 曾滨 赵正道		
发明人	金鑫 曾滨 赵正道		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	张淑贤		
其他公开文献	CN106018788B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及免疫层析检测技术领域，具体公开了一种骨标志物检测用免疫层析试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括塑料板、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜，样本垫和吸水垫，玻璃纤维素膜上包被有量子点标记的I型胶原羧基末端肽抗体、量子点标记的骨钙素抗体和量子点标记的I型前胶原氨基端前肽抗体的混合物；硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2、检测线3，检测线1上包被有I型胶原羧基末端肽二抗，检测线2上包被有骨钙素二抗，检测线3上包被有I型前胶原氨基端前肽二抗。该试剂盒，利用双抗体/抗原夹心原理结合量子点的荧光特性实现了采用荧光免疫层析的方法对I型前胶原氨基端前肽、骨钙素和I型前胶原氨基端前肽进行快速、灵敏的联合检测。

样本编号	项目名称		
	骨钙素 (ug/L)	I 型前胶原氨基端前肽 (ug/L)	I 型胶原羧基末端肽 (ng/L)
1	26.09	247.01	101.18
2	2.73	901.38	134.43
3	12.77	67.88	81.28