



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771168 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611258692.5

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 武汉纽康度生物科技股份有限公司

地址 430206 湖北省武汉市东湖高新技术
开发区高新大道858号生物医药园二
期B16栋

(72)发明人 孙宏浩 朱辉 陈佳 周昌荣
王竞争

(74)专利代理机构 北京天江律师事务所 11537
代理人 朱红来

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

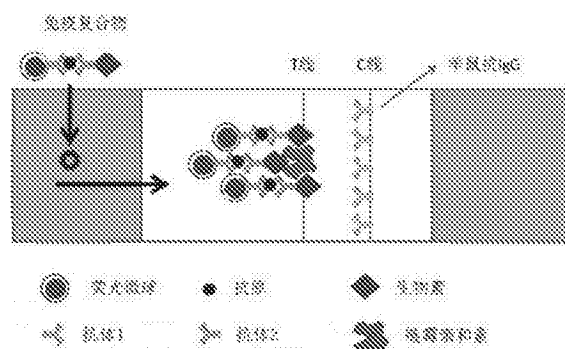
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

荧光免疫层析检测卡及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种荧光免疫层析检测卡及其制备方法和应用,荧光免疫层析检测卡包括处理液A、处理液B和检测卡,所述处理液A中含有偶联荧光微球的针对待测抗原的抗体1;所述处理液B中含有偶联生物素的针对待测抗原的抗体2,所述检测卡包括检测线区域和质控线区域,所述检测线区域固定有链霉亲和素检测T线,所述质控线区域固定有抗体质控C线。制备方法包括:(1)配制处理液A;(2)配制处理液B;(3)检测卡划线。该荧光免疫层析检测卡具有高灵敏度高、高特异性、高稳定性等特点,可应用于疾病标志物的快速检测。



1. 一种荧光免疫层析检测卡,包括处理液A、处理液B和检测卡,其特征在于,所述处理液A中含有偶联荧光微球的针对待测抗原的抗体1;所述处理液B中含有偶联生物素的针对待测抗原的抗体2,所述检测卡包括检测线区域和质控线区域,所述检测线区域固定有链霉亲和素检测T线,所述质控线区域固定有抗体质控C线。

2. 根据权利要求1所述的荧光免疫层析检测卡,其特征在于,所述荧光微球为荧光分子通过内部包埋的方式形成荧光微球,所述T线划线物质为链霉亲和素,所述C线划线抗体为羊抗鼠抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的荧光免疫层析检测卡,其特征在于,所述待测抗原为NT-proBNP。

4. 根据权利要求3所述的荧光免疫层析检测卡,其特征在于,所述抗体1为抗体15C4或抗体5B6,所述抗体2为抗体13G12或抗体15F11。

5. 一种如权利要求1~4任一项所述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

(1) 配制处理液A:

(1.1) 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和N-羧基琥珀酰亚胺溶液加入到羧基荧光微球中进行活化,活化后离心,收集沉淀,用磷酸盐缓冲液重悬,得到活化后的羧基荧光微球分散液;

(1.2) 将抗体1加入到步骤(1.1)所得的活化后的羧基荧光微球分散液中进行偶联反应,离心后取沉淀物,得到偶联抗体1的羧基荧光微球;

(1.3) 向步骤(1.2)所得的偶联抗体1的羧基荧光微球中加入牛血清白蛋白,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,封闭后离心,取沉淀,加入抗体保存液,得到处理液A;

(2) 配制处理液B:将抗体2加入到生物素溶液中进行偶联反应,稀释后透析,以去除未结合的生物素,收集样品,得到处理液B;

(3) 检测卡划线:采用链霉亲和素溶液在检测卡的检测线区域内划T线,采用抗体溶液在检测卡的质控线区域内划C线。

6. 根据权利要求5所述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述步骤(1.1)中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与羧基荧光微球的质量比为1:1,所述N-羧基琥珀酰亚胺与羧基荧光微球之比为1:1,活化时间为45min。

7. 根据权利要求6所述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述步骤(1.2)中,所述抗体1与羧基荧光微球之比为3:500,所述偶联反应温度为4℃,时间为8h~12h。

8. 根据权利要求5所述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述抗体2与所述生物素的摩尔比为1:50~200,偶联反应时间为4h,透析温度为4℃,时间为48h。

9. 根据权利要求5所述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中,所述链霉亲和素溶液的浓度为10μg/μL,所述抗体溶液的浓度为1μg/cm。

10. 一种如权利要求1~4任一项所述的荧光免疫层析检测卡或如权利要求5~9任一项所述的荧光免疫层析检测卡的制备方法所制备的荧光免疫层析检测卡在疾病的早期诊断中的应用。

荧光免疫层析检测卡及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫测定技术领域,尤其涉及一种荧光免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 目前,检测疾病标志物的方法主要有放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫分析法(ELISA)、电化学发光免疫分析法(ECLIA)和POCT法等。

[0003] 放射免疫法因提取样本或¹²⁵I标记不稳定常出现较大误差,灵敏度和特异性相对较低,测定方法复杂、耗时长,并且所需样本量也较大,不是理想的测定方法。近年来,酶联免疫分析法在疾病的临床诊断中取得了广泛的应用,但是此方法试剂制备困难,操作步骤复杂、耗时长,影响因素多,控制难以保证,最后测定的是颜色的光密度,其精密度和敏感性不如发光免疫技术。目前,血清中的疾病标志物检测国内外主要采用Roche Eiesys电化学发光免疫分析系统,化学发光免疫分析法具有极高的灵敏度,可定量分析样本中疾病标志物的含量,且准确度高,但检测操作较POCT法复杂,且采用电化学发光免疫荧光法进行检测时多为批量采集样品进行检测,不适用于中小型医院及个人进行疾病标志物浓度的检测。除此之外,检测所需的昂贵的仪器和试剂价格限制了化学发光免疫分析法的广泛应用。采用POCT法使用现有的检测卡检测疾病标志物时,具有操作简单、成本低、能快速得到结果、仪器体积小方便携带等优点,但是灵敏度不高。因此有待开发一种通用的高灵敏度的疾病标志物检测卡。

[0004] 例如,心力衰竭是各种心血管疾病发展的终末阶段,病情凶险,死亡率高,如不能早期识别并及时处理,往往预后不佳,因此,对心力衰竭患者特别是急诊送诊的患者进行快速诊断并给予尽早的治疗非常重要。众多研究表明,氨基末端B型钠尿肽原(NT-proBNP)是很好的心衰诊断标志物。NT-proBNP浓度的检测对于临床上诊断心衰具有重要意义,NT-proBNP是美国和欧洲心脏病学会推荐使用的目前最好的用于评价心力衰竭的实验室检测指标。由于血清中NT-proBNP浓度极低,通常情况下,采用POCT法时,判断标准为NT-proBNP浓度>300ng/L即为阳性,使用传统的免疫荧光技术制备的心衰标志物检测卡在检测NT-proBNP时,灵敏度低,浓度极低的NT-proBNP很难被T线捕捉,难以检测。因此开发一种高灵敏度的心衰标志物检测卡应用于POCT法检测NT-proBNP十分重要。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种高灵敏度高、高特异性、高稳定性的荧光免疫层析检测卡及其制备方法和在疾病标志物快速检测中的应用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种荧光免疫层析检测卡,包括处理液A、处理液B和检测卡,所述处理液A中含有偶联荧光微球的针对待测抗原的抗体1;所述处理液B中含有偶联生物素的针对待测抗原的抗体2,所述检测卡包括检测线区域和质控线区域,所述检测线区域固定有链霉亲和素检测

T线,所述质控线区域固定有抗体质控C线。

[0008] 上述的荧光免疫层析检测卡,优选地,所述荧光微球为荧光分子通过内部包埋的方式形成荧光微球,所述T线划线物质为链霉亲和素,所述C线划线抗体为羊抗鼠抗体。

[0009] 上述的荧光免疫层析检测卡,优选地,所述待测抗原为NT-proBNP。

[0010] 上述的荧光免疫层析检测卡,优选地,所述抗体1为抗体15C4或抗体5B6,所述抗体2为抗体13G12或抗体15F11。

[0011] 作为一个总的发明构思,本发明还提供一种荧光免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 配制处理液A:

[0013] (1.1) 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和N-羟基琥珀酰亚胺溶液加入到羧基荧光微球中进行活化,活化后离心,收集沉淀,用磷酸盐缓冲液重悬,得到活化后的羧基荧光微球分散液;

[0014] (1.2) 将抗体1加入到步骤(1.1)所得的活化后的羧基荧光微球分散液中进行偶联反应,离心后取沉淀物,得到偶联抗体1的羧基荧光微球;

[0015] (1.3) 向步骤(1.2)所得的偶联抗体1的羧基荧光微球中加入牛血清白蛋白,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,封闭后离心,取沉淀,加入抗体保存液,得到处理液A;

[0016] (2) 配制处理液B:将抗体2加入到生物素溶液中进行偶联反应,稀释后透析,以去除未结合的生物素,收集样品,得到处理液B;

[0017] (3) 检测卡划线:采用链霉亲和素溶液在检测卡的检测线区域内划T线,采用抗体溶液在检测卡的质控线区域内划C线。

[0018] 上述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,优选地,所述步骤(1.1)中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与羧基荧光微球的质量比为1:1,所述N-羟基琥珀酰亚胺与羧基荧光微球的质量比为1:1,活化时间为45min。

[0019] 上述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,优选地,所述步骤(1.2)中,所述抗体1与羧基荧光微球的质量比为3:500,所述偶联反应温度为4℃,时间为8h~12h。

[0020] 上述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,优选地,所述步骤(2)中,所述抗体2与所述生物素的摩尔比为1:50~200,偶联反应时间为4h,透析温度为4℃,时间为48h。

[0021] 上述的荧光免疫层析检测卡的制备方法,优选地,所述步骤(3)中,所述链霉亲和素溶液的浓度为10μg/μL,所述抗体溶液的浓度为1μg/cm。

[0022] 作为一个总的发明构思,本发明还提供一种上述的荧光免疫层析检测卡或上述的荧光免疫层析检测卡的制备方法所制备的荧光免疫层析检测卡在疾病的早期诊断中的应用。

[0023] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0024] 1、本发明基于荧光免疫层析法,同时结合生物素-链霉亲和素标记技术,提供了一种高灵敏度待测抗原检测卡及其制备方法。链霉亲和素与生物素都可与蛋白质(包括抗原、抗体、酶等)、荧光素等分子结合而不影响后者的生物活性,是理想的标记剂。一个抗体分子可偶联数十个生物素或链霉亲和素分子,而链霉亲和素或生物素分子又可与酶或荧光素结合,利用生物素和链霉亲和素之间极强的亲和力以及链霉亲和素具有多个结合位点的特性,从而组成一个生物放大系统,将信号多极放大,并且生物素-链霉亲和素系统(BAS)具有

高特异性、高灵敏度、高稳定性的特点,使各种示踪免疫分析的特异性和灵敏度进一步提高。从而实现痕量物质快速灵敏的检测,成功地解决了痕量物质浓度太低造成难以检测的困扰。

[0025] 2、进一步地,本发明的目的通过以下技术方案实现:使用荧光分子通过内部包埋的方式形成荧光微球,所形成的荧光微球稳定,不易淬灭,亮度强,灵敏度高。链霉亲和素包被微粒子高效、均一、稳定、通用,生物素化抗体与样品中的抗原结合,使用链霉亲和素划线,利用生物素-链霉亲和素之间极强的结合力,促进标记有荧光微球的抗体1和生物素化的抗体2捕捉样品中的抗原,形成夹心结构的免疫复合物,通过标记有生物素的免疫复合物与T线上的链霉亲和素相结合,分别检测T线(检测线)上和C线(控制线)上的荧光强度,通过T线和C线上荧光强度的比值来定量样品中疾病标志物的浓度。链霉亲和素-生物素是最牢固和特异的结合,保证了牢固的包被效果和特异的检测结果。

[0026] 3、本发明的检测卡所需仪器设备体积小,携带如方便,操作简单易于掌握,无需专业人员操作,并且检测成本低。另外,只要针对不同的检测项目更换相应的处理液A和B,即可检测不同的疾病标志物。

[0027] 4、本发明尤其适用于NT-proBNP的快速检测,利用生物素-链霉亲和素标记技术与免疫荧光法制备的NT-proBNP检测卡能够较灵敏地检测出样本中微量的NT-proBNP从而对心衰病人进行准确的快速诊断,结构合理,使用链霉亲和素划线检测线,建立免疫层析法检测样品中NT-proBNP的含量。特异性强,灵敏度高,最低检测浓度达20ng/ml;另外,本发明制备的抗体15C4标记的荧光微球和生物素标记的抗体13G12冷冻干燥后进行保存,稳定性好,常温保存12个月检测卡与4℃保存的检测结果一致。

附图说明

[0028] 图1为本发明的荧光免疫层析检测卡的结构原理示意图。

[0029] 图2为本发明实施例1的NT-proBNP荧光免疫层析检测卡检测不同NT-proBNP浓度对应的荧光强度拟合曲线。

具体实施方式

[0030] 以下结合说明书附图和具体优选的实施例对本发明作进一步描述,以下实施例描述了本发明的特殊实施例子,以便对本发明作进一步的说明,这些实施例只是说明而不表示本发明所有的可能性,本发明并不仅仅局限于这些实施例中的材料、反应条件或参数。任何在相关领域具备经验的人,都可以按照本专利的原理利用其他的材料或反应条件实现本发明所描述的生物素-链霉亲和素标记技术结合免疫层析技术制备疾病标志物检测卡。这些并不脱离本发明描述的基本概念,因此这些修改的或者不同的应该都在本发明覆盖的范围内。

[0031] 实施例1:

[0032] 一种本发明的NT-proBNP荧光免疫层析检测卡,包括处理液A、处理液B和检测卡,其中,处理液A中含有偶联荧光微球的抗体15C4;处理液B中含有偶联生物素的抗体13G12,检测卡包括检测线区域和质控线区域,检测线区域固定有链霉亲和素检测T线,所述质控线区域固定有羊抗鼠抗体质控C线。

[0033] 上述本实施例的NT-proBNP荧光免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0034] (1) 配制处理液A:

[0035] (1.1) 吸取200 μ L羧基荧光微球(浓度为10mg/mL),离心(14400rpm,10min)。取1000 μ L pH6.0MES缓冲液清洗,离心(14400rpm,8min),重复该操作一次。称取0.0110g1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶于110 μ L的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液中,称取0.0034gN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于34 μ LMES缓冲液中。向荧光微球中分别加入1250 μ LMES缓冲液、25 μ L上述EDC溶液和25 μ L上述NHS溶液,室温下搅拌(60rpm),活化45min。取1000 μ L pH7.4的10mM磷酸盐(PB)缓冲液清洗,离心(14400rpm,10min),重复该操作一次。清洗结束后,用1250 μ L PB缓冲液重悬,得到活化后的羧基荧光微球分散液。

[0036] (1.2) 在步骤(1.1)所得的活化后的羧基荧光微球分散液中加入1.64 μ L抗体15C4(9.2mg/mL),在4 $^{\circ}$ C的条件下过夜进行偶联反应。离心(14400rpm,8min)后取沉淀物,得到偶联抗体15C4的羧基荧光微球。

[0037] (1.3) 向步骤(1.2)所得的偶联抗体15C4的羧基荧光微球中加入250 μ L牛血清白蛋白(BSA),室温下封闭2h,以封闭未偶联抗体的活化羧基位点,封闭后离心(14400rpm,8min),取沉淀,用1000 μ L 10mM PB清洗一次,加入250 μ L抗体保存液,4 $^{\circ}$ C保存,得到处理液A。

[0038] (2) 配制处理液B:

[0039] 取100 μ g抗体13G12加入到生物素中进行偶联反应,抗体与生物素的摩尔比1:100,总体积50 μ L,室温下反应4h;反应完成后稀释溶液到250 μ L,4 $^{\circ}$ C透析48h;以去除未结合的生物素,收集样品,得到处理液B;

[0040] (3) 检测卡划线:

[0041] 制备浓度10 μ g/ μ L的链霉亲和素溶液,浓度为1 μ g/cm的羊抗鼠IgG;分别使用上述浓度的链霉亲和素溶液在检测卡的检测线区域内划T线,羊抗鼠IgG在检测卡的质控线区域内划C线;4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0042] 上述本实施例制备的NT-proBNP荧光免疫层析检测卡在检测NT-proBNP中的应用,包括如下步骤:

[0043] S1:将步骤(1)配制的处理液A(含偶联荧光微球的抗体15C4)与血液样品混合,抗体15C4与血液样品中的NT-proBNP(抗原)形成抗原抗体复合物,再向其中加入步骤(2)配制的处理液B(含生物素标记的抗体13G12),抗体13G12与NT-proBNP结合,形成夹心结构复合物。将混合物样本滴入检测卡的滴样孔内。检测原理示意图如图1所示,

[0044] (2) 结果判定:使用定量荧光免疫分析仪进行扫描,得到荧光强度曲线,经特定算法分析计算后得到一个无量纲的比值T/C(检测线上与质控线上荧光强度比值),参照标准浓度曲线就可以得到待测样本中NT-proBNP的浓度。检测结果如表1和图2所示。

[0045] 表1不同NT-proBNP浓度对应的荧光强度比值

[0046]

编号	T/C	抗原浓度
1	1.5960	2097
2	1.2951	1573
3	0.8872	1049

4	0.7091	699
5	0.6206	525
6	0.5162	393
7	0.4538	262
8	0.4134	233
9	0.3571	131
10	0.3231	78
11	0.3153	66
12	0.2956	33
13	0.2917	26
14	0.2887	20
15	0.2651	16
16	0.2412	0

[0047] 由表1和图2可知,本发明利用生物素-链霉亲和素标记技术与免疫荧光法制备的NT-proBNP检测卡能够较灵敏地检测出样本中微量的NT-proBNP从而对心衰病人进行准确的快速诊断,结构合理,使用链霉亲和素划检测线,建立免疫层析法检测样品中NT-proBNP的含量。

[0048] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,本发明的保护范围并不局限于上述实施例。凡属于本发明思路下的技术方案均属于本发明的保护范围。应该指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下的改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

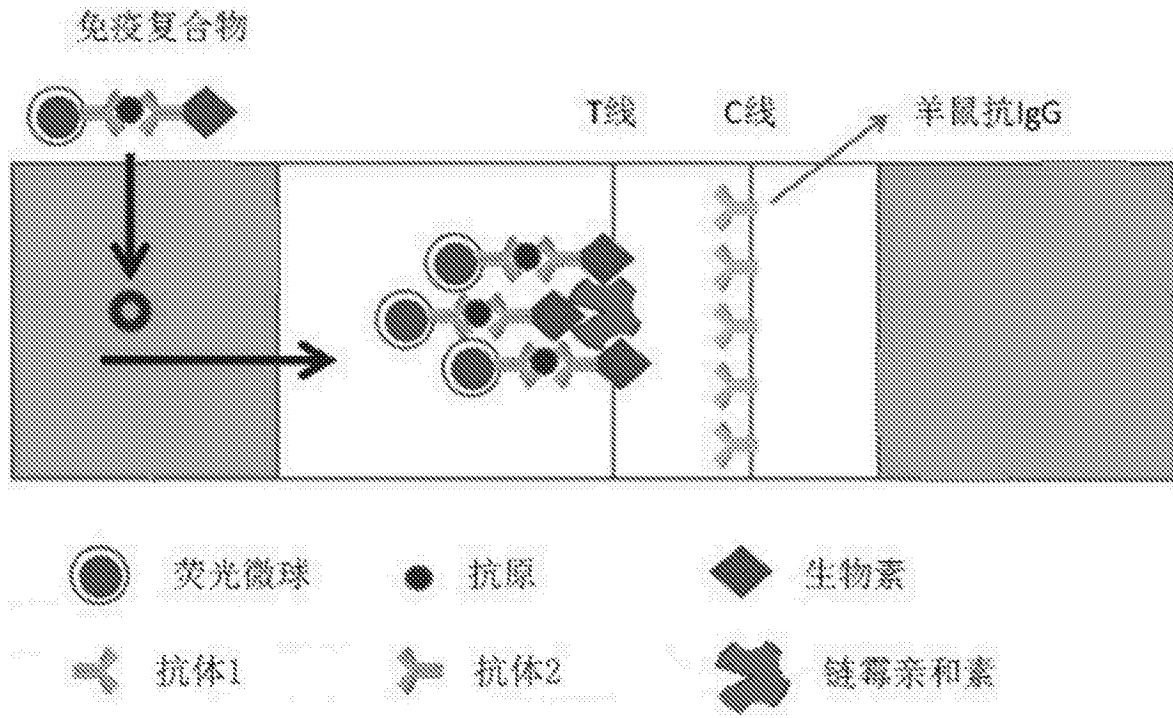


图1

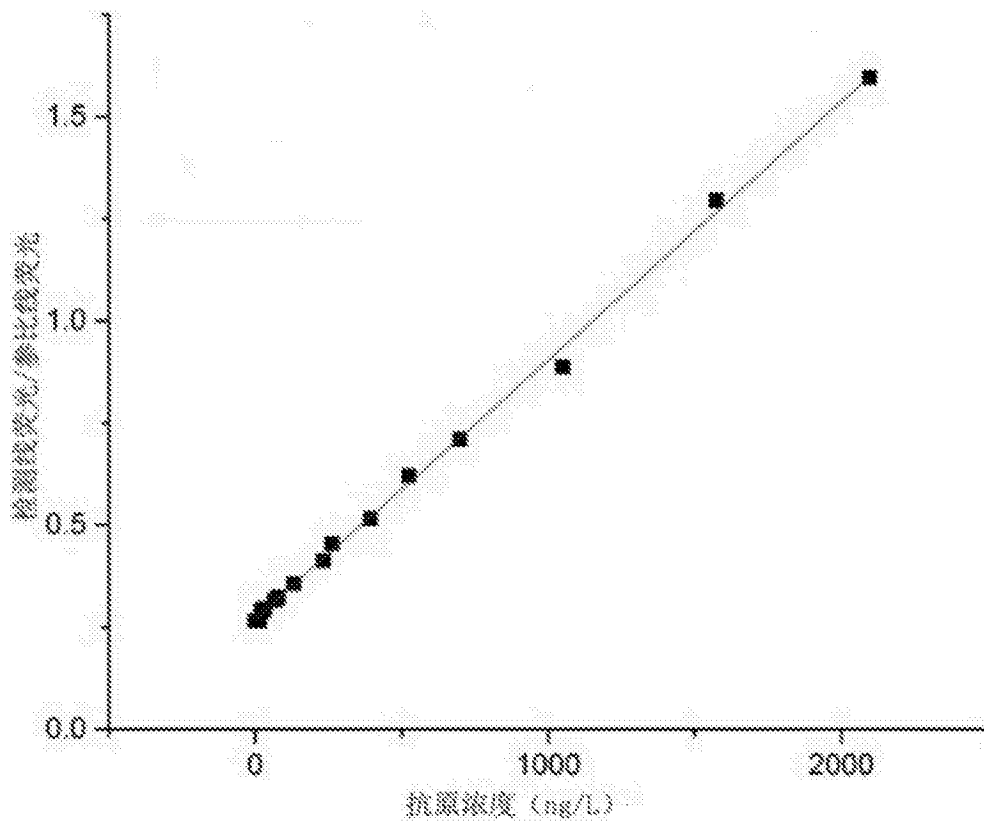


图2

专利名称(译)	荧光免疫层析检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN106771168A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611258692.5	申请日	2016-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	武汉纽康度生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉纽康度生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉纽康度生物科技股份有限公司		
[标]发明人	孙宏浩 朱辉 陈佳 周昌荣 王竞争		
发明人	孙宏浩 朱辉 陈佳 周昌荣 王竞争		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种荧光免疫层析检测卡及其制备方法和应用，荧光免疫层析检测卡包括处理液A、处理液B和检测卡，所述处理液A中含有偶联荧光微球的针对待测抗原的抗体1；所述处理液B中含有偶联生物素的针对待测抗原的抗体2，所述检测卡包括检测线区域和质控线区域，所述检测线区域固定有链霉亲和素检测T线，所述质控线区域固定有抗体质控C线。制备方法包括：(1)配制处理液A；(2)配制处理液B；(3)检测卡划线。该荧光免疫层析检测卡具有高灵敏度高、高特异性、高稳定性等特点，可应用于疾病标志物的快速检测。

