



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104483477 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201410596438. 0

(22) 申请日 2014. 10. 30

(71) 申请人 南京爱思唯志生物科技有限公司
地址 210038 江苏省南京市南京经济技术开发区兴科路 12 号科技企业加速器大楼 104 室

(72) 发明人 杨昕

(74) 专利代理机构 江苏致邦律师事务所 32230
代理人 栗仲平

(51) Int. Cl.
G01N 33/531(2006. 01)
G01N 33/68(2006. 01)

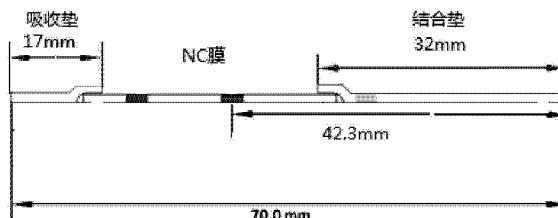
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法

(57) 摘要

偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法:步骤(1)-步骤(7)为试纸条制作;步骤(8)-步骤(9). 为磁珠包被方法:以 MES buffer 作为活化缓冲液,对表面有羧基的磁珠进行活化;以 BST buffer 作为缓冲液,将活化后的磁珠与单克隆抗体 16A11/810 进行偶联。步骤(10)-步骤(11)为封闭方法;(12). 保存。本发明的制备方法操作简单,结果可靠。新方法所制备的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条克服了现有技术的不足,能够简单快速地检测肌钙蛋白,检测结果更加精准,应用领域较宽,对抗体原料的利用率较高。



1. 一种偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征在于,步骤如下:

步骤(1) - 步骤(7)为试纸条制作:

(1). 试纸条在 32°C 过夜干燥;

(2). 将 NC 膜从冰箱取出,剪取适当长度置室温平衡至少 2h;

(3). 配所需浓度的抗体,2mg/ml 的 19C7; 方法:19C7 抗体用 buffer 稀释;

(4). 将 NC 膜贴到底板上;

(5). 划线之前先用稀 NaOH 清洗一个循环后静置,再用稀 HCl 清洗一个循环,静置后用纯水清洗一个循环;划线机配置:1.5 μ l/cm,用铅笔将划好的 T 线标记好;

(6). 32~37°C 干燥过夜;

(7). 干燥结束,贴样品垫、吸水垫、AR 膜,随后切条装盒备用;

步骤(8) - 步骤(9). 为磁珠包被方法:

(8). 活化:

以 0.01M 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液作为活化缓冲液,取 10 μ l 表面有羧基的磁珠加入离心管中,MSE buffer 洗涤,用磁分离器分离后,弃上清液;洗涤 3 遍后,在离心管中加入 242.5 μ l MES buffer,再加入新鲜配制的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液 2.5 μ l 和 0.25g/ml N-羟基琥珀酰亚胺溶液 5 μ l,振荡混匀,室温下旋转活化磁珠表面的羧基,反应结束后,用 MSE buffer 洗涤去除反应的活化剂,再用 MSE buffer 洗涤磁珠;

(9). 偶联:

以 0.02M BST buffer 作为偶联过程的缓冲液;用 250 μ l 的 BST buffer 洗涤磁珠;洗涤完成后,加入适量的单克隆抗体 16A11/810,再加入 BST buffer,保持离心管内溶液体积为 250 μ l;振荡混匀,使磁珠表面活化的羧基与抗体的氨基在室温下旋转反应;偶联完成后,磁分离器分离收集上清液,备用于检测偶联效率;

步骤(10) - 步骤(11)为封闭方法:

(10). 上清液吸取后,在离心管中加入 242.5 μ l 的 BST 缓冲液和甘氨酸溶液,旋转封闭;

(11). 磁分离器分离弃上清液后,加入 250 μ l 的 1% (W/V) BSA 封闭液,对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭;

(12). 保存:

BST buffer 洗涤封闭完成的磁珠,最后将免疫磁珠保存重悬在 250 μ l 的免疫微球保存液中。

2. 根据权利要求 1 所述偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征在于,

步骤(3)所述的 19C7 抗体用 buffer 稀释,该 buffer 的组成是:10mM PBS pH7.4,含 1% 蔗糖,3% 的甲醇;

步骤(5)中所述的用稀 NaOH 清洗,是用 0.1M 的 NaOH 清洗一个循环后静置 10min;所述的用稀 HCl 清洗,是用 0.1M HCl 清洗一个循环,静置 10min 后用纯水清洗一个循环;

步骤(7)中所述的切条装盒备用,相对湿度控制在 35%;

步骤(8)中所述的室温下旋转活化磁珠表面的羧基,时间为 3-30 分钟;

步骤(11)所述的封闭方法:是在室温下旋转反应 30 分钟;

步骤(12)所述的免疫微球保存液的组成是 :BST 缓冲液中加入 0.1%BSA 和 0.02% 叠氮钠中。

3. 根据权利要求 1 所述偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(11)所述的 BSA 封闭液为 BST 缓冲液稀释的牛血清白蛋白封闭液。

4. 根据权利要求 1 所述偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征在于,

步骤(1)中所述的试纸条,其吸收垫、结合垫与 NC 膜之间的连接缝隙控制在 2mm, T 线位置位于距离结合垫 42.3mm 处 ;

步骤(2)中所述的“将 NC 膜从冰箱取出”,为 4℃的冰箱 ;

步骤(5)中所述的划线,划线时相对湿度控制在 60% ;步骤(5)中所述静置,为静置 10min ;

步骤(6)中所述的干燥过夜温度为 32℃ ;

步骤(8)中所述的振荡混匀,是用旋涡混合器振荡混匀 ;步骤(9)中所述的振荡混匀,是用旋涡混合器振荡混匀 ;

步骤(12)所述的 BST buffer 洗涤封闭完成的磁珠,是操作 4 次。

5. 根据权利要求 1-4 之一所述偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述的试纸条中,NC膜孔径选择范围为 :millipore N135, Sartorius N95 ;所述吸水垫厚度选择范围 :GE Whatman CF6 或捷宁 H1 ;

步骤(8)中所述的洗脱, MES buffer 的 pH 值为 5.0~6.4 ;所述的活化时间为 5 分钟 ;

所述 EDC 与 NHS 的摩尔比是 1:2, EDC 的浓度范围在 $1\ \mu\text{mol}$ ~ 10mmol , NHS 的浓度范围是 $2\ \mu\text{mol}$ ~ 2mmol ;

步骤(9)中所述的 BST 缓冲液 pH 值为 9 时 ;单克隆抗体的用量范围为 $10\ \mu\text{g}$;室温下的偶联旋转反应时间应为 3 小时 ;

步骤(11)所述的封闭方法,甘氨酸体积为 $7.5\ \mu\text{l}$ 时 ;甘氨酸的浓度为 25mM ;旋转封闭甘氨酸时间为 0.5 小时 ;BSA 的浓度为 0.1~3% (w/v) ;室温旋转时间为 30 分钟。

6. 根据权利要求 5 所述偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征在于,本方法制备的所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是 : 16A11 磁抗 $4-5\ \mu\text{l}$, 810 磁抗 $4-5\ \mu\text{l}$, 待测血样 $2.5-3.5\ \mu\text{l}$, 混合缓冲液 $138-152\ \mu\text{l}$ 。

7. 根据权利要求 5 所述的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条,其特征在于,本方法制备的所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是 :16A11 磁抗 $4.6\ \mu\text{l}$, 810 磁抗 $4.6\ \mu\text{l}$, 待测血样 $3\ \mu\text{l}$, 混合缓冲液 $147\ \mu\text{l}$ 。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条,其特征在于,所述混合缓冲液的组成是 :2%BSA + 1% 吐温 +2.5%蔗糖 + 0.3% PVP-K30,溶于 10mM pH7.4 磷酸缓冲液中。

9. 根据权利要求 8 所述的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条,其特征在于,所述的试纸条中,NC膜孔径选择范围为 :millipore N135, Sartorius N95 ;所述吸水垫厚度选择范围 :GE Whatman CF6,或捷宁 H1。

10. 根据权利要求 9 所述的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条,其特征在于,所述的试纸条,其吸收垫、结合垫与 NC 膜之间的连接缝隙控制在 2mm, T 线位置位于距离结合垫 42.3mm 处。

偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备方法,具体涉及一种偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 肌钙蛋白是一种调节心肌收缩的蛋白质分子,由肌钙蛋白 C (TnC)、肌钙蛋白 T (TnT)和肌钙蛋白 I (TnI)三个亚基组成。随着心脏生物标志物应用的不断发展,肌钙蛋白已成为诊断心肌梗死(MI)的首选标志物。该标志物的临床快检(POCT)的发展,能够让患者得到及时适当的治疗。以罗氏的肌钙蛋白 T 测试卡为例,cTnT 的临界值为 0.1ng/ml,检测卡的检测范围为 0.1-2ng/ml,检测时间为 8-12 分钟。

[0003] 目前用于 POCT 诊断 cTnT 和 cTnI 的免疫学方法主要包括了胶体金免疫层析法和荧光法。这两种方法都能够应用于诊断试纸条。

[0004] 胶体金免疫层析法制备的胶体金诊断试纸条,其检测结果可通过肉眼观察到显色现象。但肌钙蛋白的浓度无法通过颜色变化准确定量。此外,金纳米与抗体的连接通常采用被动吸附法,该反应虽然简单快速,但无法控制抗体的 Fab 端在纳米颗粒表面的方向性,降低了抗原捕获效率,对抗体原料的利用率也有一定的影响。

[0005] 荧光法与胶体金免疫层析法类似,相对于金纳米颗粒而言,荧光微球在诊断试纸条上流动时,由于微球尺寸较大(200nm 及以上),容易产生团聚;流动过程中,微球-抗体连接物在未到达 T 线时已经发生了部分的沉积,造成较强的非特异性吸附;在检测时,由于光学检测器只能收集试纸条表面的光强信号,对血样全部流过 T 线后的情况无法完全反映,使得检测结果不精准。

[0006] 半导体量子点虽然光稳定性好、发射谱带较窄、量子产率较高、发光可调,但其潜在的生物毒性及间歇发光性(光闪烁)限制了在生物检测领域的应用。

[0007] 稀土上转换发光材料的晶体高晶化程度对材料的发光能力影响显著。但提高高晶化程度会大大增加合成材料的工序和成本。配套的光学检测器对激发光的波长范围要求很高,而常规激发光的发射功率又偏低,导致了包括发光材料和检测器在内的整套检测产品的制造成本偏高,限制了该类材料的大规模生产与普及应用。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种改进的、偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法。本方法中提供了新的磁珠包被方法:特别是包括活化步骤与偶联步骤:以 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液(MES buffer)作为活化缓冲液,对表面有羧基的磁珠进行活化;以硼酸-吐温作为缓冲液(BST buffer),将活化后的磁珠与单克隆抗体 16A11/810 进行偶联。本发明的制备方法操作简单,结果可靠。新方法所制备的诊断试纸条克服了现有技术的不足,能够简单快速地检测肌钙蛋白,检测结果更加精准,应用领域较宽,对抗体原料的利用率较高。

[0009] 本发明的方法所制备的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条,与现有技术有所区别,该诊断试纸条的结构是,在结合垫与吸收垫之间设有 NC 膜(硝酸纤维膜),该 NC 膜为滴入待检测的血样的区域,其特征在于,在所述的 NC 膜中,含有免疫磁珠;该免疫磁珠是指:直径约 200nm 的由聚苯乙烯包裹的铁纳米颗粒,表面有羧基,并在活化缓冲液中与单克隆抗体偶联后构成的偶联了抗体的免疫磁珠。

[0010] 偶联了抗体的免疫磁珠,可以简称为“磁抗”,其中,所述被偶联的抗体,可以是 16A11 和 / 或 810。根据偶联抗体的不同,可以分别称为:16A11 磁抗或 810 磁抗。

[0011] 完成本申请发明任务的技术方案是,一种偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法,其特征不在于,步骤如下:

步骤(1) - 步骤(7)为试纸条制作:

- (1). 试纸条在 32°C 过夜干燥;
- (2). 将 NC 膜从冰箱取出,剪取适当长度置室温平衡至少 2h;
- (3). 配所需浓度的抗体,2mg/ml 的 19C7; 方法:19C7 抗体用 buffer 稀释;
- (4). 将 NC 膜贴到底板上;
- (5). 划线之前先用稀 NaOH 清洗一个循环后静置,再用稀 HCl 清洗一个循环,静置后用纯水清洗一个循环;划线机配置:1.5 μ l/cm,用铅笔将划好的 T 线标记好;
- (6). 32~37°C 干燥过夜;
- (7). 干燥结束,贴样品垫、吸水垫、AR 膜,随后切条装盒备用;

步骤(8) - 步骤(9). 为磁珠包被方法:

(8). 活化:

以 0.01M 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液(MES buffer)作为活化缓冲液,取 10 μ l 表面有羧基的磁珠(固体含量 10%, Millipore 公司提供)加入离心管中,用 MSE buffer 洗涤,用磁分离器分离后,弃上清液;洗涤 3 遍后,在离心管中加入 242.5 μ l MES buffer,再加入新鲜配制的 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液(EDC 溶液) 2.5 μ l 和 0.25g/ml N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS 溶液) 5 μ l,振荡混匀,室温下旋转活化磁珠表面的羧基,反应结束后,用 MSE buffer 洗涤去除反应的活化剂,再用 MSE buffer 洗涤磁珠;

(9). 偶联:

以 0.02M BST buffer 作为偶联过程的缓冲液;用 250 μ l 的 BST buffer 洗涤磁珠;洗涤完成后,加入适量的单克隆抗体 16A11/810,再加入 BST buffer,保持离心管内溶液体积为 250 μ l;振荡混匀,使磁珠表面活化的羧基与抗体的氨基在室温下旋转反应;偶联完成后,磁分离器分离收集上清液,备用于检测偶联效率;

步骤(10) - 步骤(11)为封闭方法:

(10). 上清液吸取后,在离心管中加入 242.5 μ l 的 BST 缓冲液和甘氨酸溶液,旋转封闭;

(11). 磁分离器分离弃上清液后,加入 250 μ l 的 1%(W/V)BSA 封闭液(BST 缓冲液稀释),对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭;

(12). 保存:

BST buffer 洗涤封闭完成的磁珠,最后将免疫磁珠保存重悬在 250 μ l 的免疫微球保存液中。

[0012] 本发明的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条使用方法如下：

16A11 磁抗 $4.6 \mu\text{l}$, 810 磁抗 $4.6 \mu\text{l}$, 待测血样 $3 \mu\text{l}$, 加入 $149.5 \mu\text{l}$ 混合缓冲液 (2%BSA + 1% 吐温 + 2.5% 蔗糖 + 0.3% PVP-K30, 溶于 10mM pH7.4 磷酸缓冲液) 中, 混合反应 3 分钟后加入试纸条的点样口。

[0013] 进样 $128 \mu\text{l}$, 15 分钟后, 用 Magnasense 磁检测器读数。

[0014] 说明：

1) 混合缓冲液 : 2%BSA (w/v) + 1% 吐温 -20 (w/v) + 2.5% 蔗糖 (w/v) + 0.3% PVP-K30 (w/v), 溶于 10mM pH7.4 磷酸缓冲液；

其中, BSA 范围是 0.3~3% (w/v); 吐温 -20 范围是 0~2% (w/v); 蔗糖范围 0.5~3% (w/v); PVP-K30 范围是 0.1~1% (w/v)；

2) 检测时间在 15 分钟前为不稳定变化, 15 分钟 ~30 分钟时检测的数值较稳定。

[0015] 更优化和更具体地说,

步骤(1)中所述的试纸条, (参照图 1), 其吸收垫、结合垫与 NC 膜之间的连接缝隙控制在 2mm, T 线位置位于距离结合垫 42.3mm 处。

[0016] 步骤(2)中所述的“将 NC 膜从冰箱取出”, 一般为 4°C 的冰箱。

[0017] 步骤(3)中所述的 19C7 抗体用 buffer, 其组成为 : 10mM PBS pH7.4, 含 1% 蔗糖, 3% 的甲醇。

[0018] 步骤(5)中所述的用 NaOH 清洗, 是用 0.1M 的 NaOH 清洗一个循环后静置 10min ; 再用 0.1M HCl 清洗一个循环, 静置 10min 后用纯水清洗一个循环。

[0019] 步骤(5)中所述的划线, 划线时相对湿度控制在 60% 左右。

步骤(5)中所述静置, 推荐静置 10min。

[0020] 步骤(5)中所述的用稀 NaOH 清洗, 是用 0.1M 的 NaOH 清洗一个循环后静置 10min ;

所述的用稀 HCl 清洗, 是用 0.1M HCl 清洗一个循环, 静置 10min 后用纯水清洗一个循环。

[0021] 步骤(6)中所述的 $32\sim 37^{\circ}\text{C}$ 干燥过夜, 以 32°C 为佳。

[0022] 步骤(7)中所述的切条装盒备用, 相对湿度控制在 35% 左右。

[0023] 其中,

1. NC 膜孔径选择范围为 : millipore N135, Sartorius N95。Sartorius N95 对于磁抗的流动和不团聚有较好的作用。

[0024] 2. 吸水垫厚度选择范围 : GE Whatman CF6, 捷宁 H1。采用 H1 时, 抗原在 $0\sim 1\text{ng/ml}$ 浓度下的检测信号差别明显, 建议采用。

[0025] 步骤(8)中所述的振荡混匀, 是用旋涡混合器振荡混匀。

[0026] 步骤(8)中所述的室温下旋转活化磁珠表面的羧基, 一般为 3-30 分钟。

[0027] 其中：

1) MES buffer 的 pH 值为 5.0~6.4, 在 pH5.0 时洗脱磁珠的效果最佳。

[0028] 2) 活化时间 5 分钟时, 活化效果最好, 抗体的连接量既满足检测信号强度的需要, 又节约抗体用量。

[0029] 3) EDC 与 NHS 的摩尔比是 1:2, EDC 的浓度范围在 $1 \mu\text{mol}\sim 10\text{mmol}$, NHS 的浓度范围是 $2 \mu\text{mol}\sim 2\text{mmol}$, 其中以 EDC $2 \mu\text{mol}$, NHS $4 \mu\text{mol}$ 时, 活化效果最佳。参照图 2。

[0030] 步骤(9)中所述的振荡混匀,是用旋涡混合器振荡混匀。

[0031] 其中:

1) BST 缓冲液 pH 值大于 4,选择 pH9 时,抗体的偶联最佳。

[0032] 2)单克隆抗体的用量范围为 2~40 μg ,其中 10 μg 时,既能达到高包被效率和灵敏信号,又节约原料。

[0033] 3)室温下的偶联旋转反应时间应大于 1 小时,以 3 小时为最佳。参照图 3。

[0034] 步骤(10)所述的封闭方法:是在室温下旋转反应 30 分钟。

[0035] 其中:

1)根据磁珠比表面积的计算,甘氨酸用量应不超过总体系。当体积为 7.5 μl 时,能够起到充分封闭的效果,同时用量最经济。甘氨酸的浓度应不低于 10mM,达到 25mM 时既能充分封闭抗体的小位点,又能保持磁抗不团聚。

[0036] 2)旋转封闭甘氨酸时间在 0.5~3 小时内均可,0.5 小时反应对之后的 BSA 封闭影响最小。

[0037] 3)BSA 的浓度为 0.1~3% (w/v),在 1% 时室温旋转 15 分钟以上均能达到封闭目的,其中室温 30 分钟和 2~10 度冷藏一天的效果大致相同,为最优参数。参照图 4。

[0038] 步骤(12)所述的 BST buffer 洗涤封闭完成的磁珠,推荐操作 4 次。

[0039] 步骤(12)所述的免疫微球保存液的组成是:BST 缓冲液中加入 0.1%BSA 和 0.02% 叠氮钠中。

[0040] 本发明所制备的偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:

16A11 磁抗 4~5 μl ,810 磁抗 4~5 μl ,待测血样 2.5~3.5 μl ,混合缓冲液 138~152 μl 。

[0041] 其中,混合缓冲液是在检测前与待测血样一起滴入本诊断试纸条的 NC 膜。与现有技术不同的是:磁抗既可以固定在本诊断试纸条的 NC 膜中;也可以通过磁抗与血样、缓冲液的外混反应后,直接加样到 NC 膜上。

[0042] 本申请推荐以下最佳比例:

16A11 磁抗 4.6 μl ,810 磁抗 4.6 μl ,待测血样 3 μl ,混合缓冲液 149.5 μl 。

[0043] 上述混合缓冲液的组成是:2%BSA + 1% 吐温 +2.5%蔗糖 + 0.3% PVP-K30,溶于 10mM pH7.4 磷酸缓冲液中。

[0044] 所述的试纸条中,NC 膜孔径选择范围为:millipore N135, Sartorius N95。Sartorius N95 对于磁抗的流动和不团聚有较好的作用。

[0045] 所述的试纸条中,吸水垫厚度选择范围:GE Whatman CF6,捷宁 H1。采用 H1 时,抗原在 0~1ng/ml 浓度下的检测信号差别明显,建议采用。

[0046] 本申请推荐:所述的试纸条,其吸收垫、结合垫与 NC 膜之间的连接缝隙控制在 2mm, T 线位置位于距离结合垫 42.3mm 处。

[0047] 本发明是一种改进的、偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法。本方法中提供了新的磁珠包被方法:特别是包括活化步骤与偶联步骤:以 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液(MES buffer)作为活化缓冲液,对表面有羧基的磁珠进行活化;以硼酸-吐温缓冲液(BST buffer)作为缓冲液,将活化后的磁珠与单克隆抗体 16A11/810 进行偶联。本发明的制备方法操作简单,结果可靠。新方法所制备的诊断试纸条克服了现有技术的不足,能够简单快速地检测肌钙蛋白,检测结果更加精准,应用领域较宽,对抗体原料的利用率较高。

[0048] 磁信号检测更为敏感,可以定量检测极低浓度的样品。以 CRP 为例:(目前国内没有使用磁检测器作为临床快检的产品,用于类比的产品为胶体金免疫层析法和荧光法仪器检测的结果)。

[0049]

品牌	检测限(ng/ml)	诊断阈值(ng/ml)
南京 基蛋生物	0.5-50	0.5
上海 凯创生物	> 1	> 1
北京 乐普科技	0.1-25	0.5
瑞士 罗氏公司	0.05-2	0.05
Magnasense (本发明)	0.0026-2	0.02

附图说明

[0050] 图 1 为偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条结构示意图;

图 2 为磁珠表面羧基活化时间对抗原检测信号的影响柱状图;

图 3 为不同质量抗体与磁珠偶联后对抗原检测信号的影响柱状图;

图 4 为磁抗分散性优化效果图。

具体实施方式

[0051] 实施例 1,一种偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条,该诊断试纸条的结构是,在结合垫与吸收垫之间设有硝酸纤维膜(NC膜),该 NC膜为滴入待检测的血样的区域,在所述的 NC膜中,含有免疫磁珠;该免疫磁珠是指:直径约 200nm 的由聚苯乙烯包裹的铁纳米颗粒,表面有羧基,并在活化缓冲液中与单克隆抗体偶联后构成的偶联了抗体的免疫磁珠。其中,所述被偶联的抗体,可以是 16A11 和 / 或 810。根据偶联抗体的不同,可以分别称为:16A11 磁抗或 810 磁抗。所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:16A11 磁抗 4-5 μ l,810 磁抗 4-5 μ l,待测血样 2.5-3.5 μ l,混合缓冲液 138-152 μ l。其中,混合缓冲液是在检测前与待测血样一起滴入本诊断试纸条的 NC膜。上述偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方:

步骤(1) - 步骤(7)为试纸条制作:

(1). (参照图 1),吸收垫、结合垫与 NC膜之间的连接缝隙控制在 2mm, T 线位置位于距离结合垫 42.3mm 处;试纸条在 32 $^{\circ}$ C 过夜干燥;

(2). 将 NC膜从 4 $^{\circ}$ C 冰箱取出,剪取适当长度置室温平衡至少 2h;

(3). 配所需浓度的抗体,2mg/ml 的 19C7; 方法:19C7 抗体用 buffer(10mM PBS pH7.4, 含 1% 蔗糖,3% 的甲醇)稀释;

(4). 将 NC膜贴到底板上;

(5). 划线之前先用 0.1M NaOH 清洗一个循环后静置 10min,再用 0.1M HCl 清洗一个循环,静置 10min 后用纯水清洗一个循环;划线机配置:1.5 μ l/cm,用铅笔将划好的 T 线标记好,划线时相对湿度控制在 60% 左右;

(6). 32~37 $^{\circ}$ C 干燥过夜;以 32 $^{\circ}$ C 为佳。

[0052] (7). 干燥结束,贴样品垫、吸水垫、AR膜,随后切条装盒备用;相对湿度控制在 35% 左右;

步骤(8) - 步骤(9). 为磁珠包被方法:以 250 μ l 体系为例

(8). 活化:

以 0.01M MES buffer 作为活化缓冲液,取 10 μ l 表面有羧基的磁珠(固体含量 10%, Millipore 公司提供)加入 1.5ml 离心管中,用 MSE buffer 洗涤 3 次,用磁分离器分离后,弃上清上部清液;洗涤 3 遍后,在离心管中加入 242.5 μ l MES buffer,再加入新鲜配制的 EDC 溶液 2.5 μ l 和 0.25g/ml NHS 溶液 5 μ l,用旋涡混合器振荡混匀,室温下旋转活化磁珠表面的羧基 3-30 分钟,反应结束后,用 MSE buffer 洗涤去除反应的活化剂,再用 MSE buffer 洗涤磁珠;2 遍。参照图 2。

[0053] (9). 偶联:

以 0.02M BST buffer 作为偶联过程的缓冲液;用 250 μ l 的 BST buffer 洗涤磁珠 2 遍,过程同前。洗涤完成后,加入适量的单克隆抗体 16A11/810,再加入 BST buffer,保持离心管内溶液体积为 250 μ l;旋涡混合器振荡混匀,使磁珠表面活化的羧基与抗体的氨基在室温下旋转反应;偶联完成后,磁分离器分离收集上清上部清液,备用于检测偶联效率;参照图 3。

[0054] 步骤(10) - 步骤(11)为封闭方法:

(10). 上清液吸取后,在离心管中加入 242.5 μ l 的 BST 缓冲液和甘氨酸溶液,旋转封闭;

(11). 磁分离器分离弃上清液后,加入 250 μ l 的 1%(W/V)BSA 封闭液(BST 缓冲液稀释),对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭,室温下旋转反应 30 分钟。参照图 4。

[0055] 步骤(11)所述的 BSA 封闭液为 BST 缓冲液稀释的牛血清白蛋白封闭液。

[0056] (12). 保存;BST buffer 洗涤封闭完成的磁珠 4 次,最后将免疫磁珠保存重悬在 250 μ l 的免疫微球保存液中。

[0057] 实施例 2,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:16A11 磁抗 4 μ l,810 磁抗 4 μ l,待测血样 2.5 μ l,混合缓冲液 142 μ l。

[0058] 实施例 3,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:16A11 磁抗 5 μ l,810 磁抗 5 μ l,待测血样 3.5 μ l,混合缓冲液 152 μ l。

[0059] 实施例 4,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:16A11 磁抗 4 μ l,810 磁抗 5 μ l,待测血样 3.5 μ l,混合缓冲液 142 μ l。

[0060] 实施例 5,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:16A11 磁抗 5 μ l,810 磁抗 4 μ l,待测血样 2.5 μ l,混合缓冲液 152 μ l。

[0061] 实施例 6,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠与待检测的血样的比例是:16A11 磁抗 4.6 μ l,810 磁抗 4.6 μ l,待测血样 3 μ l,混合缓冲液 147 μ l。

[0062] 上述混合缓冲液的组成是:2%BSA + 1%吐温 +2.5%蔗糖 + 0.3% PVP-K30,溶于 10mM pH7.4 磷酸缓冲液中。

[0063] 实施例 7 与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠所偶联的抗体替换为 C 反应蛋白抗体(anti-CRP),用于动脉粥样硬化的检测。

[0064] 实施例 8,,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠所偶联的抗体替换为降钙素原抗体(anti-PCT),用于区分细菌感染和病毒感染的检测。

[0065] 实施例 9,与实施例 1 基本相同,但所述偶联了抗体的免疫磁珠所偶联的抗体替换为低密度脂蛋白受体抗体(anti-LDL),用于冠状动脉心脏病的检测。

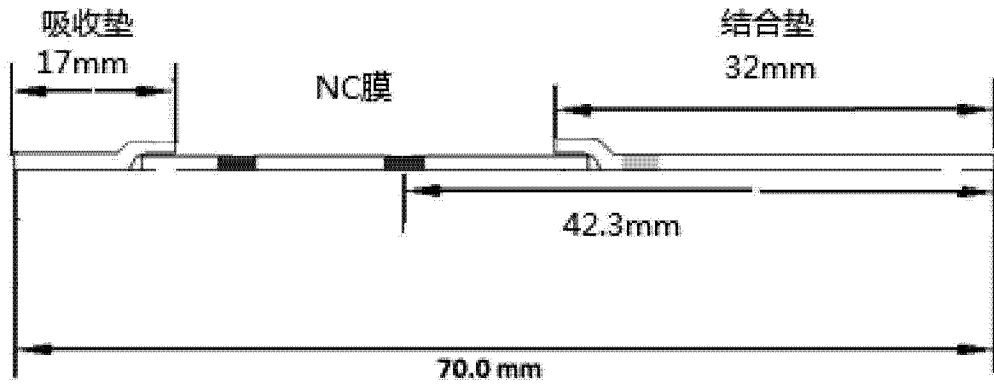


图 1

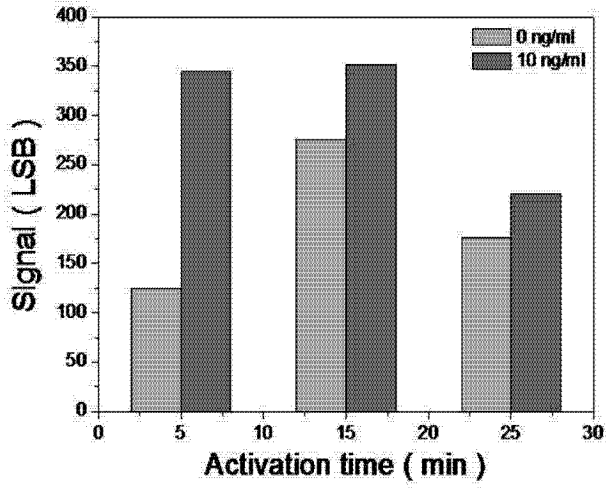


图 2

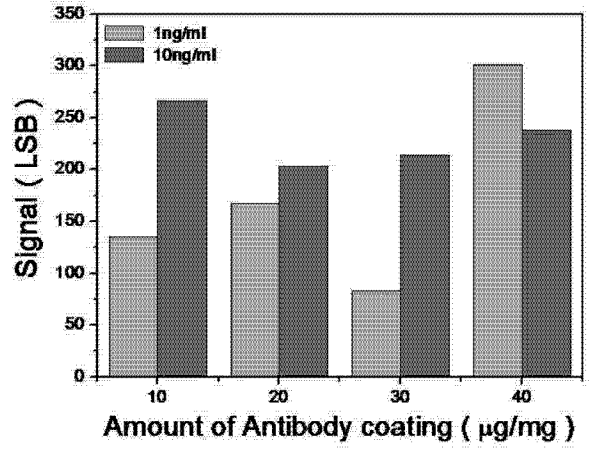


图 3

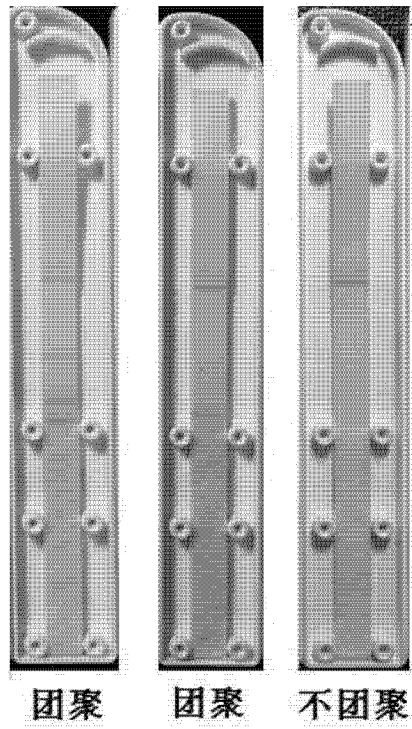


图 4

专利名称(译)	偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN104483477A	公开(公告)日	2015-04-01
申请号	CN201410596438.0	申请日	2014-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	南京爱思唯志生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京爱思唯志生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京爱思唯志生物科技有限公司		
[标]发明人	杨昕		
发明人	杨昕		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/68 G01N2800/324		
其他公开文献	CN104483477B		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条的制备方法：步骤(1)-步骤(7)为试纸条制作；步骤(8)-步骤(9)为磁珠包被方法：以MES buffer作为活化缓冲液，对表面有羧基的磁珠进行活化；以BST buffer 作为缓冲液，将活化后的磁珠与单克隆抗体16A11/810进行偶联。步骤(10)-步骤(11)为封闭方法：(12)保存。本发明的制备方法操作简单，结果可靠。新方法所制备的偶联免疫磁珠的肌钙蛋白诊断试纸条克服了现有技术的不足，能够简单快速地检测肌钙蛋白，检测结果更加精准，应用领域较宽，对抗体原料的利用率较高。

