



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370839 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610778092.5

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 江苏莱博德医疗科技有限公司
地址 225312 江苏省泰州市中国医药城
泰路东侧、新阳路北侧G26幢9楼B019
室

(72)发明人 郝中禾

(74)专利代理机构 北京东方灵盾知识产权代理
有限公司 11506
代理人 冯琼 苏向银

(51)Int.Cl.
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)

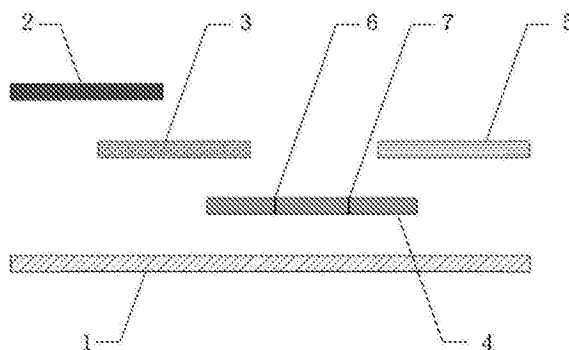
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

快速检测量子点免疫层析试纸条、试剂盒及
制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测的量子点免疫层析试纸条、试剂盒、制备方法和使用方法。本发明试纸条将磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体和量子点偶联物喷涂在玻璃纤维素膜上得到探针固定垫，VASP蛋白鼠源单克隆抗体包被在检测膜检测线上，羊抗鼠多克隆抗体包被在检测膜的质控线上，PCV衬板上依次组装检测膜、探针固定垫、样品垫和吸水纸，切成小条制备得到。本发明所述量子点免疫层析试纸条操作简便，灵敏度高、准确度高、成本低、适合临床快检。



1. 一种快速检测量子点免疫层析试纸条,其特征在于:包括PVC衬板(1)、样品垫(2)、探针固定垫(3)、检测膜(4)和吸水纸(5),所述检测膜(4)上设有检测线(6)和质控线(7),检测线(6)包被VASP蛋白鼠源单克隆抗体,质控线(7)包被羊抗鼠多克隆抗体,探针固定垫(3)上喷涂磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体和量子点偶联物;检测膜(4)贴合在PVC衬板(1)侧面中部上;探针固定垫(3)贴合在PVC衬板(1)上,一侧压覆在检测膜(4)一侧边缘上;样品垫(2)贴合在PVC衬板(1)上,一侧压覆在探针固定垫(3)边缘上,另一侧端与PVC衬板(1)的一边对齐;吸水纸(5)一侧压覆在检测膜(4)另一侧边缘上,另一侧端与PVC衬板(1)的另一边对齐。

2. 如权利要求1所述快速检测量子点免疫层析试纸条,其特征在于:探针固定垫(3)压覆在检测膜(4)的边缘2~4mm;样品垫(2)压住探针固定垫(3)的边缘2~4mm;吸水纸(5)压住检测膜(4)的边缘2~4mm。

3. 一种快速检测量子点免疫层析试剂卡,其特征在于:包括权利要求1所述快速检测量子点免疫层析试纸条,以及壳体(11),壳体(11)上设有把手(8)、加样孔(9)、检测窗口(10)、产品编码区域(12)和信息区域(13),贴覆有样品垫(2)、探针固定垫(3)、检测膜(4)和吸水纸(5)的PVC衬板(1)设在壳体(11)内,把手(8)位于加样孔(9)一侧,加样孔(9)位于样品垫(2)处,检测窗口(10)位于检测线(6)和质控线(7)处,产品编码区域(12)位于检测窗口(10)和信息区域(13)之间,信息区域(13)位于壳体(11)上位于靠近吸水纸(5)的一侧。

4. 一种快速检测量子点免疫层析试剂盒,其特征在于:包括权利要求1所述试纸条或权利要求3所述试剂卡,还包括样品刺激剂、样品抑制剂和样品裂解液。

5. 一种如权利要求1所述快速检测量子点免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)、探针固定垫(3)的制备:将活化的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体进行交联制备得到量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物,用稀释液稀释量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物,喷涂在预处理液浸泡且干燥后的玻璃纤维素膜上,充分干燥;所述稀释液为含有蔗糖、牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液,所述缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述表面活性剂为吐温20或吐温80;所述预处理液含有PEG20000、BSA、Tween-20和Trion X-100中的一种或几种;

(2)、检测膜(4)检测线和质控线制备:在检测膜(4)上贴覆包被VASP蛋白鼠源单克隆抗体的检测线(6)和包被羊抗鼠多克隆抗体的质控线(7),充分干燥;

(3)、样品垫(2)制备:样品垫(2)用预处理液浸泡,充分干燥;所述预处理液为含有蔗糖、牛血清白蛋白、表面活性剂和分散剂的缓冲液,所述缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述的表面活性剂为吐温20或吐温80,所述的分散剂为聚乙烯吡咯烷酮10K、聚乙烯吡咯烷酮40K或聚乙烯醇中的一种或几种;

(4)、免疫层析试纸条制备:PCV衬板(1)上依次组装检测膜(4)、探针固定垫(3)、样品垫(2)和吸水纸(5),切成小条。

6. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,采用NHS活化后的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体混合,在交联剂EDC作用下制备得到的偶联物,其中反应体系中主要组分的摩尔比是量子点:EDC:抗体=20:20:1。

7. 一种如权利要求1所述快速检测量子点免疫层析试纸条的使用方法,包括以下步骤:

①、样品刺激剂和抑制剂制备:将前列腺素和二磷酸腺苷混合物用缓冲液稀释,制备成

冻干粉,用前纯水复溶;

②、样品裂解液制备:将组织裂解液和防腐剂的混合物用缓冲液稀释;

③、样品检验:取临床枸橼酸钠抗凝血分别加入到复溶的样品刺激剂和抑制剂,颠倒混匀静置5分钟,加入到步骤②样品裂解液,颠倒混匀静置5分钟;滴加入免疫层析试纸条进行免疫层析反应,层析结束后经荧光检测器检测试剂卡检测线和质控线荧光强度,计算PRI值。

8.如权利要求7所述使用方法,其特征在于:步骤①中,样品刺激剂和抑制剂缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种。

9.如权利要求7所述使用方法,其特征在于:步骤②中,样品裂解液缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述组织裂解液含有Triton-X 100、SDS、NP-40中的一种或几种,所述防腐剂为叠氮钠或procIn300。

10.如权利要求7所述使用方法,其特征在于:步骤③中,PRI值计算公式为:

$$PRI = \frac{\{ \text{检测器样品检测线荧光强度} / \text{检测器样品质控线荧光强度} - \text{检测器样品检测线荧光强度} / \text{检测器样品质控线荧光强度} \}}{\{ \text{检测器样品检测线荧光强度} / \text{检测器样品质控线荧光强度} \}} \times 100\%$$

。

快速检测量子点免疫层析试纸条、试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床医学诊断技术领域,尤其是涉及一种快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 进入21世纪,我国心脑血管疾病患者已经超过2.7亿人,每年死于心脑血管疾病人数近300万人,给家庭和社会带来沉重的经济和社会负担。心脑血管疾病(如冠心病、心肌梗死、脑卒中)都是由于长期动脉粥样硬化,继而引起血小板功能异常,最终以血栓或出血形式而发病。2010年“中国高血压病防治指南”中指出,伴稳定型心绞痛的高血压患者的治疗方案中应有阿司匹林或氯吡格雷,目前临床患者PCI术后和急性冠状综合征(ACS),阿司匹林和氯吡格雷联合用药作为抗血小板治疗的主要预防措施,氯吡格雷已成为临床工作中抗血小板治疗的重要药物。

[0003] 近年研究表明,患者存在对氯吡格雷治疗反应性的差异,约2%的患者使用氯吡格雷后血小板残余活性偏高,多种原因造成患者对氯吡格雷治疗不敏感,即所谓的氯吡格雷抵抗。文献报道残余血小板聚集率(RPA)定义氯吡格雷抵抗,尚无统一的诊断标准,有报道称服用氯吡格雷24小时,氯吡格雷抵抗发生率为4%~30%,ACS患者中,氯吡格雷抵抗发生率25%~40%。氯吡格雷抵抗与阿司匹林抵抗一样,可导致心血管事件。

[0004] 由于个体对氯吡格雷的反应性差异明显,需要一种可靠的方式分析个体对氯吡格雷的特异性反应,辅助临床工作者确定患者是否需要改变临床治疗方案或调整临床用药剂量。目前,测定个体对氯吡格雷抵抗的检测方式主要是血小板聚集抑制率,基于检测血小板聚集抑制率的POCT检测仪器有VerifyNow、TEG等;BIOCYTEX公司生产的酶联免疫试剂盒CY-QUANT VASP/P2Y12也可检测氯吡格雷抵抗;另有,根据细胞色素酶P450系统药物代谢酶CYP2C19基因型进行预测氯吡格雷抵抗并指导氯吡格雷的临床治疗。

[0005] 目前,基于血小板聚集抑制率的POCT检测仪器,需要专业人员,成本昂贵。BIOCYTEX公司生产的CY-QUANT VASP/P2Y12酶免产品操作及检测周期长,不合适作为快速检测手段。

[0006] 量子点免疫层析技术是近年来兴起的一种快速免疫分析技术,具有精度高、动态检测范围广、灵敏度高等优点,需要配套定量检测仪器。量子点免疫层析定量检测技术综合了生物学、临床医学、光学、机械学、电子学、计算机等学科知识,通过量子点荧光强度定量检测临床样品中目标蛋白,对临床工作者判断患者病情、预后、监测治疗过程等均具有十分重要的意义。该技术具有操作简单快速,不需要专业人员、灵敏度高、稳定性好、精确可靠等优点,适合基层医疗单位和医院开展的快速体外诊断检测。

[0007] 综上所述,血小板聚集抑制率检测氯吡格雷抵抗的POCT机器存在以下缺点:专业检测设备,单一检测试剂成本高;酶联免疫测定试剂盒检测存在以下缺点:检测周期长,不适合临床快速诊断;所以临床上急需能快速检测氯吡格雷抵抗的检测试剂。

发明内容

[0008] 本发明针对现有技术的不足,提出一种快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条,结构巧妙,使用方便。

[0009] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:一种快速检测的量子点免疫层析试纸条,包括PVC衬板、样品垫、探针固定垫、检测膜和吸水纸,所述检测膜上设有检测线和质控线,检测线包被VASP蛋白鼠源单克隆抗体,质控线包被羊抗鼠多克隆抗体,探针固定垫上喷涂磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体和量子点偶联物;检测膜贴合在PVC衬板侧面中部上;探针固定垫贴合在PVC衬板上,一侧压覆在检测膜一侧边缘上;样品垫贴合在PVC衬板上,一侧压覆在探针固定垫边缘上,另一侧端与PVC衬板的一边对齐;吸水纸一侧压覆在检测膜另一侧边缘上,另一侧端与PVC衬板的另一边对齐。

[0010] 优选的,探针固定垫压覆在检测膜的边缘2~4mm;样品垫压住探针固定垫的边缘2~4mm;吸水纸压住检测膜的边缘2~4mm。

[0011] 优选的,本发明提供快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试剂卡,包括量子点免疫层析试纸条以及壳体,壳体上设有把手、加样孔、检测窗口、产品编码区域和信息区域,贴覆有样品垫、探针固定垫、检测膜和吸水纸的PVC衬板设在壳体内,把手位于加样孔一侧,加样孔位于样品垫处,检测窗口位于检测线和质控线处,产品编码区域位于检测窗口和信息区域之间,信息区域位于壳体上位于靠近吸水纸的一侧。

[0012] 优选的,本发明还提供一种快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试剂盒,包括所述量子点免疫层析试纸条、样品刺激剂、样品抑制剂和样品裂解液。

[0013] 本发明提供上述快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0014] (1)、探针固定垫的制备:将活化的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体进行交联制备得到量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物,用稀释液稀释量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物,喷涂在预处理液浸泡且干燥后的玻璃纤维素膜上,充分干燥;

[0015] (2)、检测膜检测线和质控线制备:在检测膜上贴覆包被VASP蛋白鼠源单克隆抗体的检测线和包被羊抗鼠多克隆抗体的质控线,充分干燥;

[0016] (3)、样本垫制备:样本垫用预处理液浸泡,充分干燥;

[0017] (4)、免疫层析试纸条的制备:PCV衬板上依次组装检测膜、探针固定垫、样品垫和吸水纸,切成小条。

[0018] 优选的,步骤(1)中,采用NHS活化后的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体混合,在交联剂EDC作用下制备得到的偶联物,其中反应体系中主要组分的摩尔比是量子点:EDC:抗体=20:20:1。

[0019] 优选的,步骤(1)中,量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物稀释到5 μ M,以1~2 μ I/cm的速度均匀喷在宽度为1.0~1.2cm的玻璃纤维膜上,在37 $^{\circ}$ C下干燥24h。

[0020] 优选的,步骤(1)中,预处理液含有PEG20000、BSA、Tween-20和Trion X-100中的一种或几种。

[0021] 优选的,步骤(1)中,稀释液为含有蔗糖、牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液,所

述缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述表面活性剂为吐温20或吐温80。

[0022] 优选的,步骤(3)中,预处理液为含有蔗糖、牛血清白蛋白、表面活性剂和分散剂的缓冲液,所述缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述的表面活性剂为吐温20或吐温80,所述的分散剂为聚乙烯吡咯烷酮10K、聚乙烯吡咯烷酮40K或聚乙烯醇中的一种或几种。

[0023] 本发明还提供所述快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条的使用方法,包括以下步骤:

[0024] ①、样品刺激剂和抑制剂制备:将前列腺素和二磷酸腺苷混合物用缓冲液稀释,制备成冻干粉,用前纯水复溶;

[0025] ②、样品裂解液制备:将组织裂解液和防腐剂的混合物用缓冲液稀释;

[0026] ③、样品检验:取临床枸橼酸钠抗凝血分别加入到复溶的样品刺激剂和抑制剂,颠倒混匀静置5分钟,加入到步骤②样品裂解液,颠倒混匀静置5分钟;滴加入免疫层析试纸条进行免疫层析反应,层析结束后经荧光检测器检测试剂卡检测线和质控线荧光强度,计算PRI值。

[0027] 优选的,步骤①中,样品刺激剂和抑制剂缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种。

[0028] 优选的,步骤②中,样品裂解液缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述组织裂解液含有Triton-X 100、SDS、NP-40中的一种或几种,所述防腐剂为叠氮钠或proclin300。

[0029] 优选的,步骤③中,PRI值计算公式为:

$$[0030] \quad PRI = \frac{\{ \text{检测线样品检测线荧光强度} / \text{检测线样品质控线荧光强度} - \text{抑制剂样品检测线荧光强度} / \text{抑制剂样品质控线荧光强度} \}}{\{ \text{检测线样品检测线荧光强度} / \text{检测线样品质控线荧光强度} \}} \times 100\%$$

[0031] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0032] ①采用本发明量子点免疫层析方法,实现体外快速检测氯吡格雷疗效,该方法具有灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低等优点。

[0033] ②本发明量子点免疫层析方法,检测线区域采用能与VASP形成复合物的鼠源单克隆抗体,配套探针则使用量子点标记的磷酸化VASP鼠源单克隆抗体。检测线包被抗体与配套探针抗体均为单克隆抗体,增加该方法的灵敏度和准确度。

[0034] ③本发明量子点免疫层析方法,量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物中的量子点为新荧光材料,具备以下优点:

[0035] (a) 量子点的激发光谱的范围宽,发射光谱的范围较窄且呈对称分布。通过调整量子点大小得到不同发射波长的量子点,无需改变量子点的组成和表面性质。使得量子点可以用于多种组分的多色标记,实现多组份的同时检测。

[0036] (b) 量子点荧光强度高,稳定性好。

[0037] (c) 量子点生物相容性好,经化学修饰,可特异性连接官能基团。

[0038] (d) 量子点毒性小,可进行生物活体标记及检测。

[0039] ④本发明制备的快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析检测试剂盒,样品制备周期短,检测周期短,操作简单,无需专业操作人员。

附图说明

[0040] 图1是本发明中免疫层析试纸条的结构示意图；

[0041] 图2是本发明中试剂卡的结构示意图。

[0042] 图中标记的含义如下：1PVC衬板、2样品垫、3探针固定垫、4硝酸纤维素膜、5吸水纸、6检测线、7质控线、8把手、9加样孔、10检测窗口、11壳体、12产品编码区域、13公司信息区域。

具体实施方式

[0043] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例，不用来限制本发明的范围。基于本发明的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0044] 如图1所示，一种快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条，包括PVC衬板1、样品垫2、探针固定垫3、检测膜4和吸水纸5，所述检测膜4上设有检测线6和质控线7，检测线6包被VASP蛋白鼠源单克隆抗体，质控线7包被羊抗鼠多克隆抗体，探针固定垫3上喷涂磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体和量子点偶联物；检测膜4贴合在PVC衬板1侧面中部上；探针固定垫3贴合在PVC衬板1上，一侧压覆在检测膜4一侧边缘上；样品垫2贴合在PVC衬板1上，一侧压覆在探针固定垫3边缘上，另一侧端与PVC衬板1的一边对齐；吸水纸5一侧压覆在检测膜4另一侧边缘上，另一侧端与PVC衬板的另一边对齐。

[0045] 探针固定垫3压覆在检测膜4的边缘2~4mm；样品垫2压住探针固定垫3的边缘2~4mm；吸水纸5压住检测膜4的边缘2~4mm。

[0046] 快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试剂卡包括试纸条，还包括壳体11、壳体11上设有把手8、加样孔9、检测窗口10、产品编码区域12和信息区域13，贴覆有样品垫2、探针固定垫3、检测膜4和吸水纸5的PVC衬板1设在壳体11内，把手8位于加样孔9一侧，加样孔9位于样品垫2处，检测窗口10位于检测线6和质控线7处，产品编码区域12位于检测窗口10和信息区域13之间，信息区域13位于壳体11上位于靠近吸水纸5的一侧。

[0047] 上述快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0048] 步骤1) 探针固定垫3制备：所述的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物制备：是活化剂NHS活化后的量子点，与一定比例的磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体混合。在交联剂EDC作用下交联制备得到的偶联物，偶联物用稀释液稀释至1 μ M备用。玻璃纤维素膜预处理：用含有PEG20000、BSA、Tween-20和Trion X-100的处理液预处理，干燥后，1 μ M的偶联物以1~2 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为1.0~1.2cm预处理的玻璃纤维膜上，在37 $^{\circ}$ C下干燥24h后制得探针固定垫。

[0049] 步骤2) 检测膜检测线6和质控线7制备：包被抗体稀释液为含有1~3%甲醇和1~5%蔗糖的缓冲液，所述缓冲液包括pBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种。

[0050] 步骤3) 样本垫2制备：样本垫2用处理液浸泡30分钟，37 $^{\circ}$ C干燥24小时，样本垫处理

液是含有PEG20000、BSA、蔗糖、Tween-20的0.01M pBS缓冲液。

[0051] 步骤4) 免疫层析试纸条制备:PCV衬板1上依次组装检测膜4、探针固定垫3、样品垫2和吸水纸5。

[0052] 上述快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条的使用方法,包括以下步骤:

[0053] ①样品刺激剂和抑制剂制备:所述的样品刺激剂和抑制剂缓冲液包括PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种。

[0054] ②样品裂解液制备:所述的样品裂解液缓冲液包括PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述组织裂解液为Triton-X 100、SDS、NP-40中的一种或几种,所述防腐剂为叠氮钠或proclin300。

[0055] ③样品检验:取一定体积的临床枸橼酸钠抗凝血分别加入到复溶的样品刺激剂和抑制剂,颠倒混匀静置刺激5分钟,取一定体积的刺激后的样品加入到样品裂解液中混匀,取裂解后样品加入免疫层析试纸条进行免疫层析反应,层析结束后经荧光检测器检测样品中磷酸化VASP荧光强度。计算PRI值,PRI值辅助临床医生判断患者氯吡格雷疗效。

[0056] 进一步地,步骤1)中,所述的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物制备:利用Millipore滤膜(30KD)将量子点和待标记抗体更换至0.1M MES缓冲液中,分别调整量子点和抗体浓度至5 μ M和2mg/ml。取100 μ l量子点,加入N-羟基丁二酰亚胺(NHS)活化15分钟,加入100 μ l磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体,再加入1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸化物(EDC),交联2小时,得到量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物。用含1~5%蔗糖、0.1~2%牛血清白蛋白、0.5%吐温20和0.1%吐温80的HEPES缓冲液稀释量子点至1 μ M备用。

[0057] 进一步地,步骤1)中,所述的量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物用稀释液稀释至1 μ M,玻璃纤维素膜用预处理液浸泡30分钟,37 $^{\circ}$ C干燥24小时,预处理液是含有0.1~0.5%PEG20000、0.5~5%BSA、0.1~0.5%Tween-20和0.01~0.5%Trion X-100的磷酸盐缓冲液。用划膜喷金一体机将1 μ M量子点偶联物以1~2 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为1.0~1.2cm预处理的玻璃纤维膜上,在37 $^{\circ}$ C下干燥24小时后制得探针固定垫。

[0058] 进一步地,步骤2)中,所述的检测膜检测线和质控线,其抗体包被液是含有1~3%甲醇和1~5%蔗糖的0.1M pBS缓冲液。利用包被液稀释VASP鼠源单克隆抗体至2~4mg/ml,备用;利用包被液稀释羊抗鼠多克隆抗体至1~2mg/ml,备用。利用划膜喷金一体机将检测线和质控线的抗体一起划膜于检测膜上,设检测线与质控线间距约为0.6cm,检测线和质控线分别与检测膜边距约为0.6cm。包被结束后检测膜37 $^{\circ}$ C下干燥24小时后制得检测膜。

[0059] 进一步地,步骤3)中,所述的样本垫用处理液浸泡30分钟,37 $^{\circ}$ C干燥24小时,样本垫处理液是含有0.1~0.5%PEG20000、0.5~5%BSA、1~5%蔗糖、0.1~0.5%Tween-20的0.01M pBS缓冲液。

[0060] 进一步地,步骤4)中,所述的免疫层析试纸条制备:PCV衬板1上依次组装检测膜4、探针固定垫3、样品垫2和吸水纸5。具体流程:

[0061] (a) PVC衬板1中间不干胶条撕去,将干燥好的检测膜4贴于PVC衬板1,反向轻弯PVC衬板1,使检测膜4与PVC衬板1贴合紧实。

[0062] (b) PVC衬板1一侧的不干胶条撕去,将干燥好的探针固定垫3贴于PVC衬板1,要求

探针固定垫3压住检测膜4边缘2~4mm,反向轻弯PVC衬板1,使探针固定垫3与PVC衬板1贴合紧实。

[0063] (c) 将干燥好的样品垫2贴于PVC衬板1,要求样品垫2一边压住探针固定垫3边缘2~4mm,样品垫2另一边与PVC衬板1一边对齐,反向轻弯PVC衬板1,使样品垫2与PVC衬板1贴合紧实。

[0064] (d) PVC衬板1另一侧的不干胶条撕去,将吸水纸5贴于PVC衬板1,要求吸水纸5一边压住检测膜边缘2~4mm,吸水纸5另一边与PVC衬板1一边对齐,反向轻弯PVC衬板1,使吸水纸5与PVC衬板1贴合紧实。

[0065] (e) 切条机将PCV衬板1,切成宽度为3.6~4.0mm小条,制备得到快速定量检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条。

[0066] 进一步地,步骤①中,所述的样品刺激剂和抑制剂配置流程:HEPES缓冲液稀释前列腺素至20~40 μ M,分装至西林瓶,0.5mI/瓶,冻干成粉剂,制成样品刺激剂;HEPES缓冲液稀释前列腺素至20~40 μ M,再加入终浓度为5~20 μ M二磷酸腺苷,混匀,分装至西林瓶,0.5mI/瓶,冻干成粉剂,制成样品刺激剂。用前,用0.5mI蒸馏水或去离子水复溶,10分钟后即可使用。

[0067] 进一步地,步骤②中,所述的样品裂解液缓冲液是PBS缓冲液,组织裂解液中含有Triton-X 100、SDS、NP-40和proclIn300,终浓度为0.1~5%Triton-X 100、0.01~2%SDS、0.01~2%NP-40和0.1%proclIn300,混匀,分装为12mI/瓶。

[0068] 进一步地,步骤③中,所述的样品检验,具体流程:取一定体积的临床枸橼酸钠抗凝血分别加入到复溶的样品刺激剂和抑制剂,颠倒混匀静置刺激5分钟,取一定体积的刺激后的样品加入到样品裂解液中混匀,取裂解后样品加入免疫层析试纸条进行免疫层析反应,层析结束后经荧光检测器检测样品中磷酸化VASP荧光强度。如图1和图2所示,混合液体渗透到样品垫2上,混合液体经过滤杂质和处理后到达探针固定垫3,其中的磷酸化VASP蛋白与探针上的磷酸化VASP单克隆抗体偶合物结合成复合物,复合物顺着检测膜4渗透到检测线上5,与固定在检测线5上的VASP单克隆抗体形成双抗体夹心的新复合物,检测线5上的VASP单克隆抗体与探针中的磷酸化VASP单克隆抗体针对VASP蛋白表位不同。剩余的磷酸化VASP蛋白与探针上的磷酸化VASP单克隆抗体偶合物形成的复合物继续渗透到检测膜上控制线6,探针上的磷酸化VASP鼠源单克隆抗体与羊抗鼠多克隆抗体形成新的复合物。荧光检测器检测时,质控线6上若检测不到信号,证明检测结果是无效的。计算PRI值,PRI值辅助临床医生判断患者氯吡格雷疗效。所述的计算PRI值,计算公式为:

$$[0069] \quad PRI = \frac{\{ \text{刺激剂样品检测线荧光强度} / \text{抑制剂样品质控线荧光强度} - \text{抑制剂样品检测线荧光强度} / \text{抑制剂样品质控线荧光强度} \}}{\{ \text{刺激剂样品检测线荧光强度} / \text{刺激剂样品质控线荧光强度} \}} \times 100\%。$$

[0070] 如图1至2所示,本发明基于上述方法还提供一种快速检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试剂盒,包括样品刺激剂瓶、样品抑制剂瓶、样品裂解液瓶以及免疫层析检测卡,PVC衬板1以及固定在PVC衬板上的样品垫2、探针固定垫3、检测膜4和吸水纸5,样品垫搭接在探针固定垫上,探针固定垫3和吸水纸5分别搭接在检测膜的两侧,检测膜4上设置有检测线6和质控线7,检测线6和控制线7内分别包被VASP蛋白鼠源单克隆抗体和羊抗鼠单克隆抗体;探针固定垫3为由磷酸化VASP鼠源单克隆抗体和量子点的偶联物经喷膜干燥制得,样品刺激剂瓶中是样品刺激剂冻干粉,样品抑制剂瓶中是样品抑制剂冻干粉,样品裂解液瓶中

是样品裂解液。

[0071] 本发明检测试剂盒使用时,取一定体积的临床枸橼酸钠抗凝血分别加入到复溶的样品刺激剂和抑制剂,颠倒混匀静置刺激5分钟,取一定体积的刺激后的样品加入到样品裂解液中混匀,取裂解后样品加入免疫层析试纸条进行免疫层析反应,层析结束后经荧光检测器检测样品中磷酸化VASP荧光强度。如图1和图2所示,混合液体渗透到样品垫2上,混合液体经过滤杂质和处理后到达探针固定垫3,其中的磷酸化VASP蛋白与探针上的磷酸化VASP单克隆抗体偶合物结合成复合物,复合物顺着检测膜4渗透到检测线6上,与固定在检测线6上的VASP单克隆抗体形成双抗体夹心的新复合物,检测线6上的VASP单克隆抗体与探针中的磷酸化VASP单克隆抗体针对VASP蛋白表位不同。剩余的磷酸化VASP蛋白与探针上的磷酸化VASP单克隆抗体偶合物形成的复合物继续渗透到检测膜上质控线7,探针上的磷酸化VASP鼠源单克隆抗体与羊抗鼠多克隆抗体形成新的复合物。荧光检测器检测时,质控线7上若检测不到信号,证明检测结果是无效的。计算PRI值,PRI值辅助临床医生判断患者氯吡格雷疗效。

[0072] 上述本发明的检测用荧光检测器,包含激发检测模块、前置放大模块、控制分析模块以及软件系统。其中激发检测模块的光源为发射波长为400~600nm的发光二极管,前置放大模块为一前置放大电路。

[0073] 实施例1氯吡格雷疗效的量子点免疫层析检测

[0074] 第一步:探针固定垫的制备

[0075] 取量子点于超滤管(30KD),8000转/分,离心10分钟,将量子点稀释液更换至0.1M MES缓冲液,调整浓度至5 μ M,备用;取磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体于超滤管(30KD),8000转/分,离心10分钟,将抗体稀释液更换至0.1M MES缓冲液,调整浓度至2mg/ml,备用。

[0076] 取100 μ l量子点于无热原离心管中,加入10 μ l浓度为10mM的N-羟基丁二酰亚胺(NHS),混匀,室温静置,活化量子点15分钟。加入100 μ l浓度为2mg/ml的磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体,混匀,加入10 μ l浓度为10mM的1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸化物(EDC),混匀,室温静置,交联2小时。

[0077] 量子点与磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体偶联物。用含2%蔗糖、0.2%牛血清白蛋白、0.5%吐温20和0.1%吐温80的HEPES缓冲液稀释量子点至1 μ M备用。

[0078] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0079] 检测膜检测线和质控线,其抗体包被液是含有2%甲醇和3%蔗糖的0.1M pBS缓冲液。利用包被液稀释VASP鼠源单克隆抗体至4mg/ml,备用;利用包被液稀释羊抗鼠多克隆抗体至2mg/ml,备用。利用划膜喷金一体机将检测线和质控线的抗体一起划膜于检测膜上,设检测线与质控线间距约为0.6cm,检测线和质控线分别与检测膜边距约为0.6cm。包被结束后,湿度<30%条件下37 $^{\circ}$ C烘干24h后制得检测膜。

[0080] 样本垫用处理液浸泡30分钟,湿度<30%条件下37 $^{\circ}$ C烘干24h后制得样本垫。

[0081] 免疫层析检测卡组装:PCV衬板(1)上依次组装检测膜(4)、探针固定垫(3)、样品垫(2)和吸水纸(5)。具体流程:

[0082] (a) PVC衬板中间不干胶条撕去,将干燥好的检测膜贴于PVC衬板,反向轻弯PVC衬板,使检测膜与PVC衬板贴合紧实。

[0083] (b) PVC衬板侧边不干胶条撕去,将干燥好的探针固定垫贴于PVC衬板,要求探针固

定垫压住检测膜边缘2~4mm,反向轻弯PVC衬板,使探针固定垫与PVC衬板贴合紧实。

[0084] (c) 将干燥好的样品垫贴于PVC衬板,要求样品垫一边压住探针固定垫边缘2~4mm,样品垫另一边与PVC衬板一边对齐,反向轻弯PVC衬板,使样品垫与PVC衬板贴合紧实。

[0085] (d) PVC衬板另一侧边不干胶条撕去,将吸水纸贴于PVC衬板,要求吸水纸一边压住检测膜边缘2~4mm,吸水纸另一边与PVC衬板一边对齐,反向轻弯PVC衬板,使吸水纸与PVC衬板贴合紧实。

[0086] (e) 切条机将PCV衬板,切成宽度为3.6~4.0mm小条,制备得到快速定量检测氯吡格雷疗效的量子点免疫层析试纸条。

[0087] 第三步:样品刺激剂和抑制剂制备

[0088] HEPES缓冲液稀释前列腺素至40 μ M,分装至西林瓶,0.5mI/瓶,冻干成粉剂,制成样品刺激剂;HEPES缓冲液稀释前列腺素至40 μ M,再加入终浓度为20 μ M二磷酸腺苷,混匀,分装至西林瓶,0.5mI/瓶,冻干成粉剂,制成样品刺激剂。用前,用0.5mI蒸馏水或去离子水复溶,10分钟后即可使用。

[0089] 第四步:样品裂解液制备

[0090] 0.01M PBS缓冲液中加入以下组分:Triton-X 100、SDS、NP-40和procIin300,终浓度分别为0.1%、0.01%、0.01%和0.1%,混匀,分装为12mI/瓶。

[0091] 第五步:样本检测

[0092] 本发明与已上市CE认证产品(CY-QUANT VASP/P2Y12,BIOCYTEX)同步检测47例PCI术后临床患者的枸橼酸钠抗凝血,在真阳性率(灵敏度)、真阴性率(特异度)及总体符合率临床性能上进行评价。

[0093]		CY-QUANT	VASP/P2Y12	,
		BIOCYTEX		
		阴性(PRI>60%)	阳性(PRI \leq 60%)	
[0094]	本发明阴性(PRI>60%)	30	2	
	本发明阳性(PRI \leq 60%)	2	13	
	合计	32	15	

[0095] 真阴性率(特异度)=93.75%

[0096] 真阳性率(灵敏度)=86.67%

[0097] 总体符合率=91.49%

[0098] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,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,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

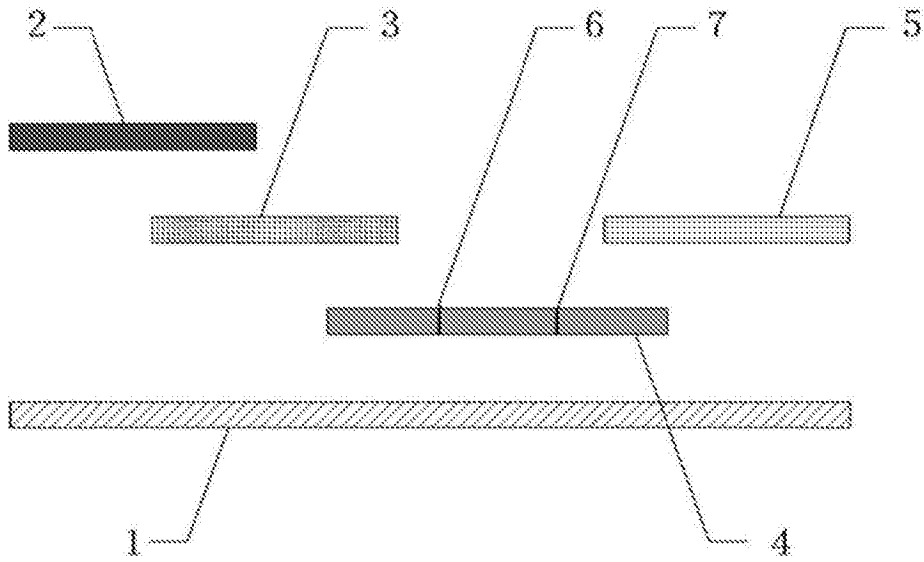


图1

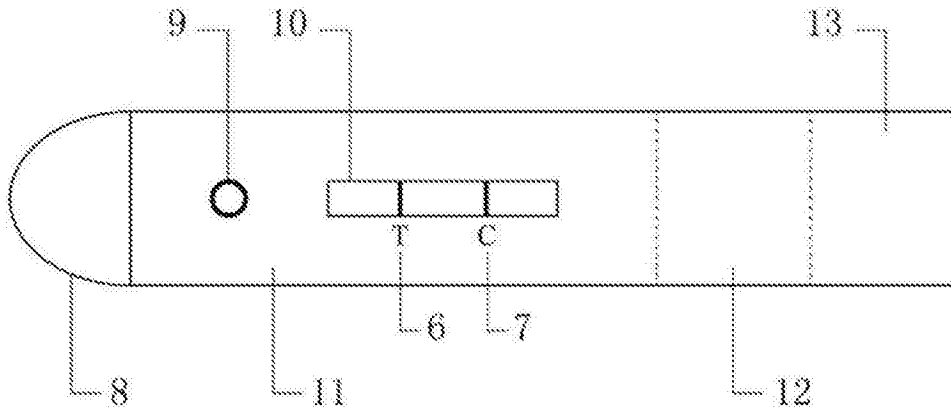


图2

专利名称(译)	快速检测量子点免疫层析试纸条、试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN106370839A	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	CN201610778092.5	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	江苏莱博德医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏莱博德医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏莱博德医疗科技有限公司		
[标]发明人	郝中禾		
发明人	郝中禾		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/588 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	冯琼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测的量子点免疫层析试纸条、试剂盒、制备方法和使用方法。本发明试纸条将磷酸化VASP蛋白鼠源单克隆抗体和量子点偶联物喷涂在玻璃纤维素膜上得到探针固定垫，VASP蛋白鼠源单克隆抗体包被在检测膜检测线上，羊抗鼠多克隆抗体包被在检测膜的质控线上，PCV衬板上依次组装检测膜、探针固定垫、样品垫和吸水纸，切成小条制备得到。本发明所述量子点免疫层析试纸条操作简便，灵敏度高、准确度高、成本低、适合临床快检。

