



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111289740 A

(43)申请公布日 2020.06.16

(21)申请号 201910731584.2

(22)申请日 2019.08.08

(71)申请人 无锡市第二人民医院

地址 214000 江苏省无锡市中山路68号

(72)发明人 刘浩浩 韩志君 高明珠 胡晓炜  
龚岚

(74)专利代理机构 北京中政联科专利代理事务  
所(普通合伙) 11489

代理人 郭晓佩

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

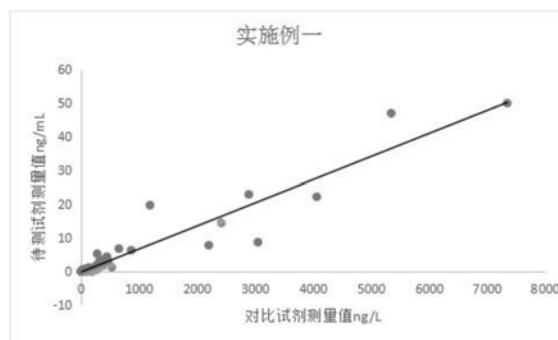
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

### (54)发明名称

一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法

### (57)摘要

本发明涉及hs-cTnI测定技术领域,尤其涉及一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,解决现有技术中存在的普通的荧光标记物不易标记、稳定性差的缺点,包括以下步骤:S1、制备量子点标记蛋白液;S2、制备量子点标记蛋白检测液;S3、制备包被有检测指标的反应膜;S4、制备量子点荧光免疫层析试纸条;S5、取得待测样本;S6、将试纸卡置入荧光定量分析仪分析。本发明中量子点灵敏度高,光稳定好,在环境条件下没有任何聚集或沉淀,其灵敏度相比传统检测方式高,其测定结果与罗氏的相关性好,所需时间较短,检测方便,可以很好的满足临床需求。



1. 一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为 $1\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 的 $0.2\sim 2\text{nmol}$ 的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ 、pH为6.5~7.2的磷酸盐溶液溶解,按照 $0.8\mu\text{mol}\sim 3\mu\text{mol}$  EDC/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入EDC,按照 $0.8\mu\text{mol}\sim 3\mu\text{mol}$  NHS/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入NHS,再按 $20\text{nmol}\sim 50\text{nmol}$ 蛋白/ $1\text{nmol}$ 量子点的比例加入浓度为 $5\sim 8\text{mg/mL}$ 的蛋白,室温下磁力搅拌反应 $1\sim 4$ 小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至 $35\sim 120\mu\text{L}$ ,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为 $0.2\sim 2\mu\text{mol/L}$ ,将其保存于蛋白液缓冲液中, $1\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1所述量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体稀释液稀释 $200\sim 900$ 倍,得量子点标记蛋白检测液, $2\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至 $0.1\sim 5\text{mg/mL}$ ,按照 $0.8\sim 1.2\mu\text{L/cm}$ 的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置 $32\sim 42^\circ\text{C}$ 烘箱处理 $1\sim 3$ 小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血 $2\text{mL}$ ,采血后颠倒混匀 $5\sim 8$ 次,得待测样本;

S6、取 $300\mu\text{L}\sim 500\mu\text{L}$ 量子点标记蛋白检测液与 $20\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 待检测样本充分混匀后,取 $60\mu\text{L}\sim 80\mu\text{L}$ 混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置 $3\sim 10\text{min}$ ,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

2. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白。

3. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为 $25\text{kDa}\sim 95\text{kDa}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,所述蛋白液缓冲液为含有 $10\sim 120\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $10\sim 120\text{mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $65\sim 250\text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、 $35\sim 150\text{mM}$   $\text{KCl}$ 、质量分数 $0.05\%$   $\text{NaN}_3$ 的水溶液,且其pH为 $7.50\sim 8.80$ 。

5. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,所述抗体稀释液为含有 $10\sim 150\text{mM}$  2-(N-吗啉)乙磺酸、质量分数 $0.01\sim 0.2\%$  (v/v) ProClin300、质量分数 $0.05\%\sim 0.2\%$  (v/v) Tween-20的水溶液,且其pH为 $6.10\sim 8.20$ 。

6. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,所述包被缓冲液为含有 $20\text{mM}\sim 150\text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、质量分数 $0.15\%\sim 3.5\%$  PEG 20000、质量分数 $0.2\%\sim 1\%$  海藻糖、 $2\text{mg/mL}\sim 10\text{mg/mL}$  牛血清白蛋白、质量分数 $0.05\%$   $\text{NaN}_3$ 的 $10\text{mM}\sim 100\text{mM}$  磷酸盐溶液。

7. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,所述反应膜上检测区和控制区之间的间隔为 $4\sim 11\text{mm}$ 。

8. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在于,所述抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管或EDTA-K2抗凝真空采血管。

9. 根据权利要求1所述的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,其特征在

于,室温低于25℃时,抗凝真空采血管放入37℃水浴。

## 一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及hs-cTnI测定技术领域,尤其涉及一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法。

### 背景技术

[0002] 心肌损伤标志物是急性心血管疾病早期诊断的重要依据,cTn是目前用于诊断评估急性心血管疾病的首选生化标志物。hs-cTn敏感性高于常规肌钙蛋白,可以检测到微小心肌损伤,利于心肌梗死的早期诊断。心肌损伤标志物的快速检测对筛查AMI来说十分重要,传统的检测cTn的POCT法一般使用基于胶体金颗粒标记的免疫层析的检测方法,具有使用简便、快速的特点,但其灵敏度不高、不能准确定量,基于荧光标记的免疫层析法可以很大程度上提高检测灵敏度,但普通的荧光标记物不易标记,稳定性较差。

[0003] 因此,我们提出了一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法用于解决上述问题。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决现有技术中存在的普通的荧光标记物不易标记、稳定性差的缺点,而提出的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法。

[0005] 一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,包括以下步骤:

[0006] S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为 $1\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 的 $0.2\sim 2\text{nmol}$ 的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用 $20\text{mM}\sim 200\text{mM}$ 、pH为 $6.5\sim 7.2$ 的磷酸盐溶液溶解,按照 $0.8\mu\text{mol}\sim 3\mu\text{mol}$  EDC/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入EDC,按照 $0.8\mu\text{mol}\sim 3\mu\text{mol}$  NHS/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入NHS,再按 $20\text{nmol}\sim 50\text{nmol}$ 蛋白/ $1\text{nmol}$ 量子点的比例加入浓度为 $5\sim 8\text{mg/mL}$ 的蛋白,室温下磁力搅拌反应 $1\sim 4$ 小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至 $35\sim 120\mu\text{L}$ ,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为 $0.2\sim 2\mu\text{mol/L}$ ,将其保存于蛋白液缓冲液中, $1\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

[0007] S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1所述量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体稀释液稀释 $200\sim 900$ 倍,得量子点标记蛋白检测液, $2\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

[0008] S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至 $0.1\sim 5\text{mg/mL}$ ,按照 $0.8\sim 1.2\mu\text{L/cm}$ 的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置 $32\sim 42^\circ\text{C}$ 烘箱处理 $1\sim 3$ 小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

[0009] S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

[0010] S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血 $2\text{mL}$ ,采血后颠倒混匀 $5\sim 8$ 次,得待测样本;

[0011] S6、取300 $\mu$ L $\sim$ 500 $\mu$ L量子点标记蛋白检测液与20 $\mu$ L $\sim$ 100 $\mu$ L待检测样本充分混匀后,取60 $\mu$ L $\sim$ 80 $\mu$ L混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置3 $\sim$ 10min,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

[0012] 优选的,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白。

[0013] 优选的,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为25kDa $\sim$ 95kDa。

[0014] 优选的,所述蛋白液缓冲液为含有10 $\sim$ 120mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、10 $\sim$ 120mMKH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>、65 $\sim$ 250mM NaCl、35 $\sim$ 150mM KCl、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的水溶液,且其pH为7.50 $\sim$ 8.80。

[0015] 优选的,所述抗体稀释液为含有10 $\sim$ 150mM 2-(N-吗啉)乙磺酸、质量分数0.01 $\sim$ 0.2% (v/v) ProClin300、质量分数0.05% $\sim$ 0.2% (v/v) Tween-20的水溶液,且其pH为6.10 $\sim$ 8.20。

[0016] 优选的,所述包被缓冲液为含有20mM $\sim$ 150mM NaCl、质量分数0.15% $\sim$ 3.5% PEG20000、质量分数0.2% $\sim$ 1%海藻糖、2mg/mL $\sim$ 10m/mL牛血清白蛋白、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的10mM $\sim$ 100mM磷酸盐溶液。

[0017] 优选的,所述反应膜上检测区和控制区之间的间隔为4 $\sim$ 11mm。

[0018] 优选的,所述抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管或EDTA-K2抗凝真空采血管。

[0019] 优选的,室温低于25 $^{\circ}$ C时,抗凝真空采血管放入37 $^{\circ}$ C水浴。

[0020] 本发明的有益效果是:

[0021] 1、量子点灵敏度高,光稳定好,荧光寿命长,斯托克斯位移大,量子荧光效率高,在环境条件下没有任何聚集或沉淀,采用量子点技术对全血标本中的hs-cTnI进行检测,其灵敏度相比传统检测方式高。

[0022] 2、采用量子点荧光免疫法检测全血标本中的hs-cTnI,其测定结果与罗氏的相关性好,所需时间较短,检测方便,可以很好的满足临床需求。

## 附图说明

[0023] 图1为本发明提出的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法的实施例一对比试剂与待测试剂一致性分析散点图;

[0024] 图2为本发明提出的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法的实施例二对比试剂与待测试剂一致性分析散点图;

[0025] 图3为本发明提出的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法的实施例三对比试剂与待测试剂一致性分析散点图;

[0026] 图4为本发明提出的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法的实施例四对比试剂与待测试剂一致性分析散点图;

[0027] 图5为本发明提出的一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法的对比例对比试剂与待测试剂一致性分析散点图。

## 具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例对本发明作进一步解说。

[0029] 实施例一:

[0030] 一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法,包括以下步骤:

[0031] S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为 $1\mu\text{M}$ 的 $2\text{nmol}$ 的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用 $20\text{mM}$ 、pH在 $6.5\sim 7.2$ 之间的磷酸盐溶液溶解,按照 $0.8\mu\text{mol}$  EDC/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入EDC,按照 $0.8\mu\text{mol}$  NHS/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入NHS,再按 $20\text{nmol}$ 蛋白/ $1\text{nmol}$ 量子点的比例加入浓度为 $8\text{mg/mL}$ 的蛋白,室温下磁力搅拌反应3小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至 $75\mu\text{L}$ ,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为 $2\mu\text{mol/L}$ ,将其保存于蛋白液缓冲液中, $1\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

[0032] S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体稀释液稀释550倍,得量子点标记蛋白检测液, $2\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

[0033] S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至 $3\text{mg/mL}$ ,按照 $1.0\mu\text{L/cm}$ 的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置于温度范围在 $32\sim 42^\circ\text{C}$ 的烘箱处理2小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

[0034] S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

[0035] S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血 $2\text{mL}$ ,采血后颠倒混匀8次,得待测样本;

[0036] S6、取 $400\mu\text{L}$ 量子点标记蛋白检测液与 $55\mu\text{L}$ 待检测样本充分混匀后,取 $70\mu\text{L}$ 混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置 $6\text{min}$ ,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

[0037] 本实施例中,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为 $25\text{kDa}\sim 95\text{kDa}$ ,蛋白液缓冲液为含有 $60\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $60\text{mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $150\text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、 $100\text{mM}$   $\text{KCl}$ 、质量分数 $0.05\%$   $\text{NaN}_3$ 的水溶液,其pH在 $8.15$ ,抗体稀释液为含有 $60\text{mM}$  2-(N-吗啉)乙磺酸、质量分数 $0.1\%$  (v/v) ProClin300、质量分数 $0.12\%$  (v/v) Tween-20的水溶液,且其pH为 $7.55$ ,包被缓冲液为含有 $85\text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、质量分数 $2.25\%$  PEG20000、质量分数 $0.45\%$  海藻糖、 $5.5\text{mL}$ 牛血清白蛋白、质量分数 $0.05\%$   $\text{NaN}_3$ 的 $55\text{mM}$ 磷酸盐溶液,反应膜上检测区和控制区之间的间隔为 $7\text{mm}$ ,抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管,当室温低于 $25^\circ\text{C}$ 时,抗凝真空采血管放入 $37^\circ\text{C}$ 水浴。

[0038] 实施例二:

[0039] S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为 $10\mu\text{M}$ 的 $0.2\text{nmol}$ 的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用 $200\text{mM}$ 、pH在 $6.5\sim 7.2$ 之间的磷酸盐溶液溶解,按照 $3\mu\text{mol}$  EDC/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入EDC,按照 $3\mu\text{mol}$  NHS/ $2\text{nmol}$ 量子点的比例加入NHS,再按 $50\text{nmol}$ 蛋白/ $1\text{nmol}$ 量子点的比例加入浓度为 $5\text{mg/mL}$ 的蛋白,室温下磁力搅拌反应3小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至 $75\mu\text{L}$ ,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为 $0.2\mu\text{mol/L}$ ,将其保存于蛋白液缓冲液中, $1\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

[0040] S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体稀释液稀释550倍,得量子点标记蛋白检测液, $2\sim 12^\circ\text{C}$ 保存备用;

[0041] S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至 $3\text{mg/mL}$ ,按照 $1.0\mu\text{L/cm}$ 的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到

反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置于温度范围在32~42℃的烘箱处理2小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

[0042] S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

[0043] S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血2ml,采血后颠倒混匀8次,得待测样本;

[0044] S6、取400μL量子点标记蛋白检测液与55μL待检测样本充分混匀后,取70μL混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置6min,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

[0045] 本实施例中,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为25kDa~95kDa,蛋白液缓冲液为含有60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、60mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、150mM NaCl、100mM KCl、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的水溶液,其pH在8.15,抗体稀释液为含有60mM 2-(N-吗啉)乙磺酸、质量分数0.1%(v/v)ProClin300、质量分数0.12%(v/v)Tween-20的水溶液,且其pH为7.55,包被缓冲液为含有85mMNaCl、质量分数2.25%PEG20000、质量分数0.45%海藻糖、5.5m/mL牛血清白蛋白、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的55mM磷酸盐溶液,反应膜上检测区和控制区之间的间隔为7mm,抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管,当室温低于25℃时,抗凝真空采血管放入37℃水浴。

[0046] 实施例三:

[0047] S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为5μM的1nmol的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用110mM、pH在6.5~7.2之间的磷酸盐溶液溶解,按照3μmol EDC/2nmol量子点的比例加入EDC,按照3μmolNHS/2nmol量子点的比例加入NHS,再按50nmol蛋白/1nmol量子点的比例加入浓度为5mg/mL的蛋白,室温下磁力搅拌反应3小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至75μL,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为1μmol/L,将其保存于蛋白液缓冲液中,1~12℃保存备用;

[0048] S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体稀释液稀释500倍,得量子点标记蛋白检测液,2~12℃保存备用;

[0049] S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至3mg/mL,按照1.0μL/cm的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置于温度范围在32~42℃的烘箱处理2小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

[0050] S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

[0051] S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血2ml,采血后颠倒混匀8次,得待测样本;

[0052] S6、取400μL量子点标记蛋白检测液与55μL待检测样本充分混匀后,取70μL混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置6min,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

[0053] 本实施例中,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为25kDa~95kDa,蛋白液缓冲液为含有60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、60mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、150mM NaCl、100mM KCl、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的水溶液,其pH在8.15,抗体稀释液为含有60mM 2-(N-吗啉)乙磺酸、质量分数0.1%(v/v)ProClin300、质量分数0.12%(v/v)Tween-20的水溶液,且其pH为7.55,包被缓冲液为含有85mM NaCl、质量分数2.25%PEG20000、质量分数0.45%海

藻糖、5.5m/mL牛血清白蛋白、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的55mM磷酸盐溶液,反应膜上检测区和控制区之间的间隔为7mm,抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管,当室温低于25℃时,抗凝真空采血管放入37℃水浴。

[0054] 实施例四:

[0055] S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为5μM的1nmol的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用110mM、pH在6.5~7.2之间的磷酸盐溶液溶解,按照3μmol EDC/2nmol量子点的比例加入EDC,按照3μmol NHS/2nmol量子点的比例加入NHS,再按50nmol蛋白/1nmol量子点的比例加入浓度为5mg/mL的蛋白,室温下磁力搅拌反应3小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至75μL,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为1μmol/L,将其保存于蛋白液缓冲液中,1~12℃保存备用;

[0056] S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体稀释液稀释900倍,得量子点标记蛋白检测液,2~12℃保存备用;

[0057] S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至0.1mg/mL,按照1.0uL/cm的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置于温度范围在32~42℃的烘箱处理2小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

[0058] S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

[0059] S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血2ml,采血后颠倒混匀8次,得待测样本;

[0060] S6、取400μL量子点标记蛋白检测液与55μL待检测样本充分混匀后,取70μL混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置6min,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

[0061] 本实施例中,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为25kDa~95kDa,蛋白液缓冲液为含有60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、60mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、150mM NaCl、100mM KCl、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的水溶液,其pH在8.15,抗体稀释液为含有60mM 2-(N-吗啉)乙磺酸、质量分数0.1%(v/v)ProClin300、质量分数0.12%(v/v)Tween-20的水溶液,且其pH为7.55,包被缓冲液为含有85mM NaCl、质量分数2.25%PEG20000、质量分数0.45%海藻糖、5.5m/mL牛血清白蛋白、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的55mM磷酸盐溶液,反应膜上检测区和控制区之间的间隔为7mm,抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管,当室温低于25℃时,抗凝真空采血管放入37℃水浴。

[0062] 对比例:

[0063] S1、制备量子点标记蛋白液:取浓度为0.2μM的5nmol的CdTe/CdSe/ZnS水溶性量子点平衡至室温,超声波处理;将量子点、EDC、NHS、蛋白分别用5mM、pH在6.5~7.2之间的磷酸盐溶液溶解,按照0.1μmol EDC/2nmol量子点的比例加入EDC,按照0.1μmol NHS/2nmol量子点的比例加入NHS,再按10nmol蛋白/1nmol量子点的比例加入浓度为5mg/mL的蛋白,室温下磁力搅拌反应3小时,反应结束后用离心超滤管超滤浓缩至75μL,然后用凝胶渗透色谱法进行纯化,收集荧光部分,再用离心超滤器浓缩至量子点浓度为1μmol/L,将其保存于蛋白液缓冲液中,1~12℃保存备用;

[0064] S2、制备量子点标记蛋白检测液:将S1量子点标记蛋白液取出放置至室温,用抗体



稀释液稀释500倍,得量子点标记蛋白检测液,2~12℃保存备用;

[0065] S3、制备包被有检测指标的反应膜:将NC膜固定粘贴在PVC背衬的中间部位,将hs-cTnI抗体用包被缓冲液调节浓度至3mg/mL,按照1.0uL/cm的膜液量,将hs-cTnI抗体喷涂到反应膜上对应的检测区和控制区上进行包被,放置于温度范围在32~42℃的烘箱处理2小时,置于恒温恒湿保藏箱里备用;

[0066] S4、在上述PVC背衬上依次粘贴样品垫、步骤S3制得的反应膜以及吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得量子点荧光免疫层析试纸条;

[0067] S5、用抗凝真空采血管收集患者的静脉血2ml,采血后颠倒混匀8次,得待测样本;

[0068] S6、取400μL量子点标记蛋白检测液与55μL待检测样本充分混匀后,取70μL混合液滴加到试纸卡上的加样孔内,静置6min,将试纸卡置入荧光定量分析仪,测得hs-cTnI含量。

[0069] 本实施例中,步骤S1所用的蛋白为牛血清白蛋白,步骤S1所用的离心超滤管的截留分子量为25kDa~95kDa,蛋白液缓冲液为含有60mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、60mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的水溶液,其pH在8.15,抗体稀释液为质量分数0.12%(v/v) Tween-20的水溶液,且其pH为7.55,包被缓冲液为含有85mM NaCl、质量分数2.25%PEG20000、质量分数0.05%NaN<sub>3</sub>的55mM磷酸盐溶液,反应膜上检测区和控制区之间的间隔为7mm,抗凝真空采血管为肝素锂抗凝真空采血管。

[0070] 将实施例一至实施例四以及对比例所得数据与同一样本采用罗氏电化学发光法测得的数据进行对比,绘制X、Y散点图,并拟合直线回归方程,X、Y散点图见图1-图5(采用罗氏电化学发光法测得的数据为对比试剂测量值,实施例一至实施例四以及对比例所得数据为待测试剂测量值)。

[0071] 实施例一所得数据与罗氏电化学发光法测得的数据的直线回归方程为: $y = 0.0069x - 0.2045$ ,  $R^2 = 0.9184$ 。

[0072] 实施例二所得数据与罗氏电化学发光法测得的数据的直线回归方程为: $y = 0.0071x - 0.2024$ ,  $R^2 = 0.9317$ 。

[0073] 实施例三所得数据与罗氏电化学发光法测得的数据的直线回归方程为: $y = 0.0067x - 0.192$ ,  $R^2 = 0.9238$ 。

[0074] 实施例四所得数据与罗氏电化学发光法测得的数据的直线回归方程为: $y = 0.0068x - 0.1922$ ,  $R^2 = 0.9279$ 。

[0075] 对比例所得数据与罗氏电化学发光法测得的数据的直线回归方程为: $y = 0.0035x + 0.1785$ ,  $R^2 = 0.3843$ 。

[0076] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

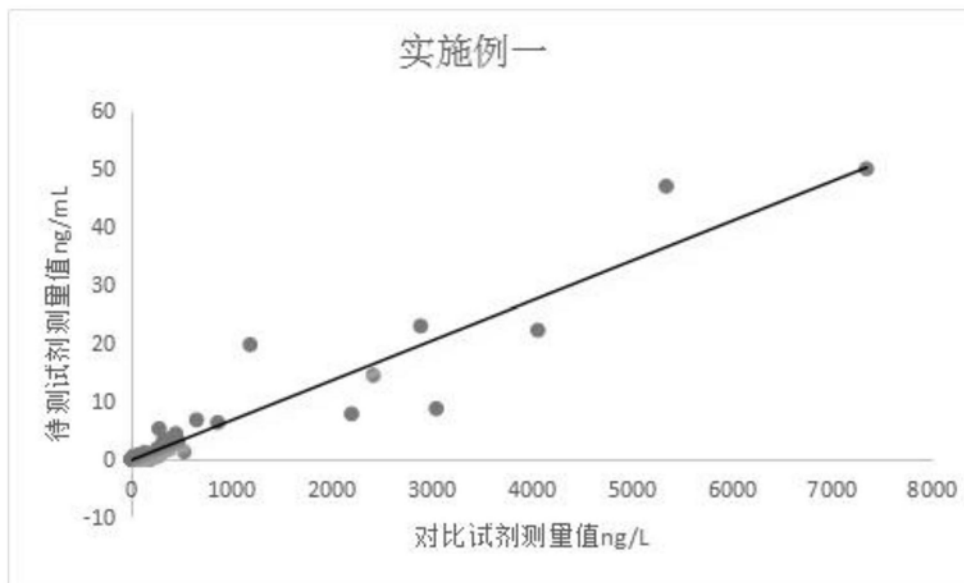


图1

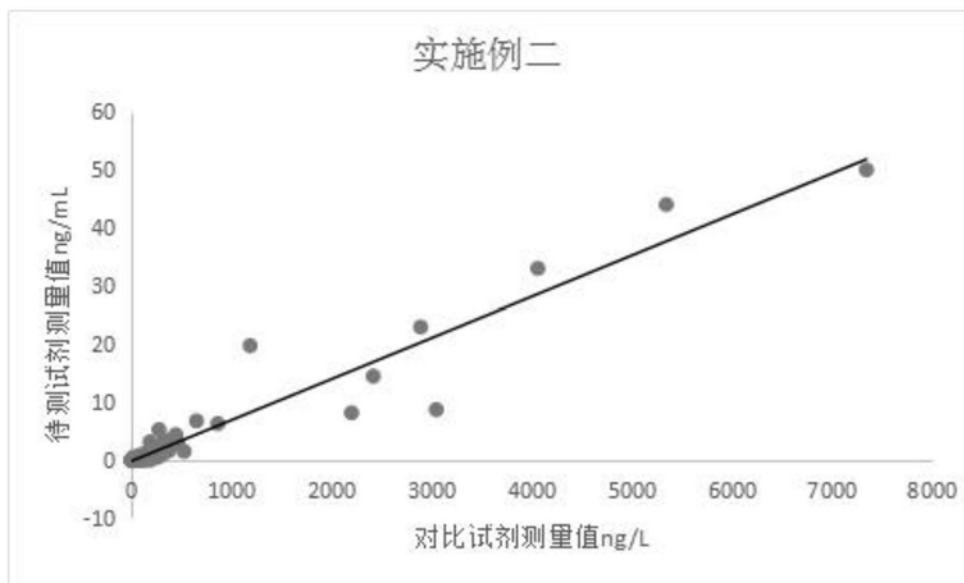


图2

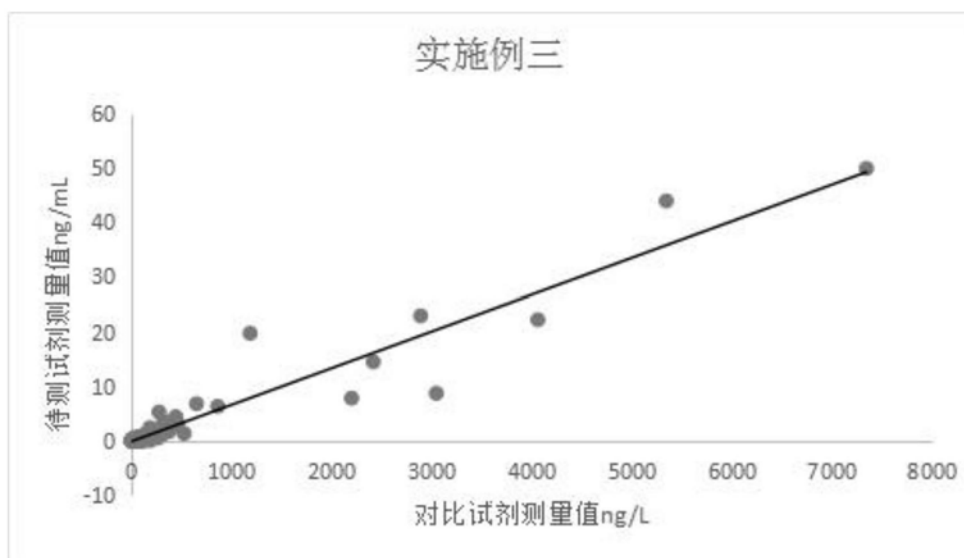


图3

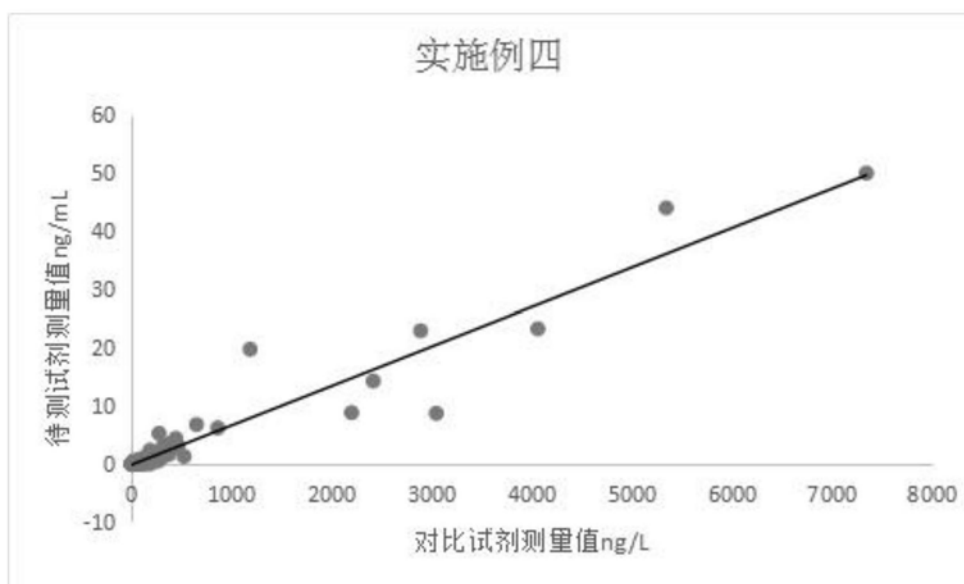
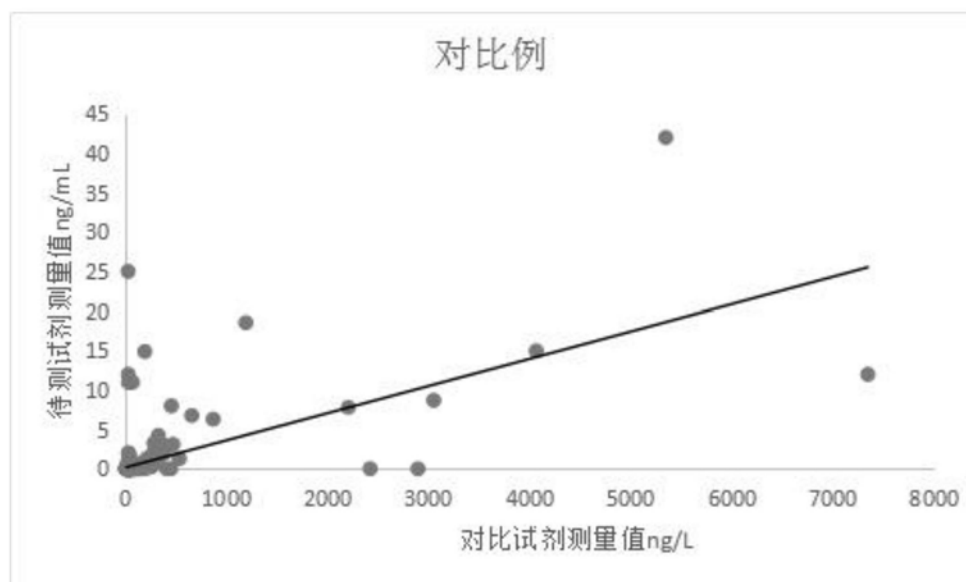


图4



专利名称(译)	一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN111289740A</a>	公开(公告)日	2020-06-16
申请号	CN201910731584.2	申请日	2019-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	无锡市第二人民医院		
申请(专利权)人(译)	无锡市第二人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	无锡市第二人民医院		
[标]发明人	刘浩浩 韩志君 高明珠 胡晓炜 龚岚		
发明人	刘浩浩 韩志君 高明珠 胡晓炜 龚岚		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及hs-cTnI测定技术领域，尤其涉及一种量子点荧光免疫法测定全血hs-cTnI的方法，解决现有技术中存在的普通的荧光标记物不易标记、稳定性差的缺点，包括以下步骤：S1、制备量子点标记蛋白液；S2、制备量子点标记蛋白检测液；S3、制备包被有检测指标的反应膜；S4、制备量子点荧光免疫层析试纸条；S5、取得待测样本；S6、将试纸条置入荧光定量分析仪分析。本发明中量子点灵敏度高，光稳定好，在环境条件下没有任何聚集或沉淀，其灵敏度相比传统检测方式高，其测定结果与罗氏的相关性好，所需时间较短，检测方便，可以很好的满足临床需求。

