



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133258 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910149920.2

(22)申请日 2019.02.28

(71)申请人 上海健耕医药科技股份有限公司

地址 201100 上海市闵行区陈行公路2388
号2幢11楼1101室

(72)发明人 刘斌虎 吴云林 傅琳

(74)专利代理机构 上海启核知识产权代理有限公司 31339

代理人 达晓玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

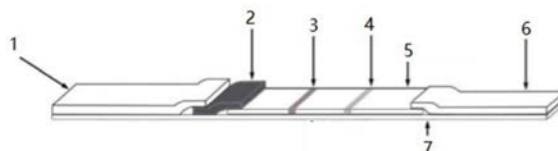
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条

(57)摘要

本发明提出了一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板,所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针,所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备,所述检测线由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。本发明检测灵敏度高,检测范围广,检测稳定可靠,操作简便易行,仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果,拥有良好的商业化应用前景。



1. 一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板,其特征在于,所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针,所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备,所述检测线由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。

2. 根据权利要求1所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其特征在于,所述检测垫为硝酸纤维素膜且为孔径5~12 μ m的多孔样结构膜;所述样品垫、结合垫的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫的材质为吸水滤纸。

3. 根据权利要求1或2所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,包括以下的步骤:

S1. 利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;

S2. 利用步骤S1制备的纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针;

S3. 利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的环孢霉素单克隆抗体结合垫;

S4. 利用环孢霉素蛋白衍生物制备检测线,利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线,喷涂、再与步骤S3得到的结合垫组装获得层析试纸条。

4. 根据权利要求3所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,所述羧基化聚苯乙烯纳米微球的直径在80nm~120nm之间,所述稀土元素离子为铈离子和/或钐离子,所述 β -二酮体类螯合物为 β -萘甲酰三氟丙酮,所述荧光增强协同剂为三辛基氧化膦。

5. 根据权利要求3所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述纳米荧光微球由包括以下步骤的方法制得:

A. 取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

B. 向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铈60 μ L或0.1mol/L三氯化钐60 μ L、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μ L、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μ L,室温反应16小时,得到反应液b;

C. 将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

6. 根据权利要求3所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,其特征在于,步骤S2中所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由包括以下方法制得:将纳米荧光微球,溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,使得荧光微球含量为0.2wt%,500W超声处理30秒后,缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L,振荡反应15分钟后,6000r/min离心10分钟,收集沉淀,用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀,重复离心步骤2次,得到活化的荧光微球;将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,加入400 μ g环孢霉素单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,再离心10分钟,收集沉淀,将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

7. 根据权利要求3所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法, 其特征在于, 步骤S3中所述结合垫裁成8mm的宽度, 再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫上, 并置于恒温鼓风干燥箱中, 37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

8. 根据权利要求3所述一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法, 其特征在于, 步骤S4中所述层析试纸条由包括以下方法制得: 将环孢霉素蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度0.1mg/mL, 得喷膜液A, 用喷膜机将喷膜液A喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线, 所述百分比为质量体积百分比; 将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度1.0mg/mL, 得喷膜液B, 用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm处形成质控线, 质控线与检测线相隔10mm; 将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干, 在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫、样品垫以及吸水纸, 再剪切成4mm宽的试纸条。

一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术领域,具体涉及一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条。

背景技术

[0002] 环孢霉素A (Cyclosporine A, CsA) 作为一种免疫抑制剂在移植排异治疗中发挥了重大作用,在全球范围内推动了器官移植术的发展。尽管CsA的使用往往伴有多种不良反应,至今全球仍有数十万例患者使用CsA抑制移植后的排异反应。

[0003] 由于不同患者对CsA的吸收和代谢往往表现出很大的个体差异,即使使用相同的药物剂量,不同患者的CsA血药浓度也常差异显著;由于CsA的肝、肾毒性及其狭窄的治疗剂量范围,CsA的药效与药毒均与血药浓度密切相关,因此,准确检测CsA的血药浓度对于控制CsA 的药毒性和发挥CsA的抗排斥作用均具有重要参考价值。

[0004] 目前,检测CsA血药浓度的方法主要有高效液相-质谱联用(HPLC-MS)、微粒子酶免疫测定(MEIA)、化学发光微粒子免疫测定(CMIA)以及酶联免疫吸附法(ELISA)等。其中HPLC-MS法测定血药浓度准确、灵敏,但其操作繁琐,检测时间长,检测成本高,需要昂贵设备,主要用于科研领域或作为一种参考方法。MEIA和CMIA是目前常用的检测方法,其检测自动化程度高,检测结果准确,但试剂价格昂贵,需要使用配套的大型仪器。酶联免疫吸附法则存在检测时间长,操作复杂,重复性差等缺点。时间分辨荧光免疫层析法具有操作简单、快速、无需大型设备等特点、如能开发出时间分辨荧光免疫层析法试剂用于检测全血中环孢霉素A,将为广大应用环孢霉素A作为免疫抑制剂的移植患者实现在采样现场即刻进行分析,省去标本在实验室检验时的复杂处理程序,以便快速得到检验结果,从而节省大量往返医院及等待结果时间。

发明内容

[0005] 为了解决上述的技术问题,本发明提供一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条及其制备方法,制备方法简单,检测灵敏度高,检测范围广,检测稳定可靠,操作简便易行。

[0006] 本发明提供一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板,所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针,所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备,所述检测线由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。

[0007] 作为本发明进一步的改进,所述检测垫为硝酸纤维素膜且为孔径5~12 μ m的多孔样结构膜;所述样品垫、结合垫的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫的材质为吸水滤纸。

[0008] 本发明进一步保护一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,包括以下的步骤:

[0009] S1.利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;

[0010] S2.利用步骤S1制备的纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针;

[0011] S3.利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的环孢霉素单克隆抗体结合垫;

[0012] S4.利用环孢霉素蛋白衍生物制备检测线,利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线,喷涂、再与步骤S3得到的结合垫组装获得层析试纸条。

[0013] 作为本发明进一步的改进,所述羧基化聚苯乙烯纳米微球的直径在80nm~120nm之间,所述稀土元素离子为铕离子和/或钐离子,所述 β -二酮体类螯合物为 β -萘甲酰三氟丙酮,所述荧光增强协同剂为三辛基氧化膦。

[0014] 作为本发明进一步的改进,步骤S1中所述纳米荧光微球由包括以下步骤的方法制得:

[0015] A.取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

[0016] B.向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铕60 μ L或0.1mol/L三氯化钐60 μ L、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μ L、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μ L,室温反应16小时,得到反应液b;

[0017] C.将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0018] 作为本发明进一步的改进,步骤S2中所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由包括以下方法制得:将纳米荧光微球,溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,使得荧光微球含量为0.2wt%,500W超声处理30秒后,缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L,振荡反应15 分钟后,6000r/min离心10分钟,收集沉淀,用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀,重复离心步骤2次,得到活化的荧光微球;将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,加入400 μ g环孢霉素单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,再离心10分钟,收集沉淀,将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0019] 作为本发明进一步的改进,步骤S3中所述结合垫裁成8mm的宽度,再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫上,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0020] 作为本发明进一步的改进,步骤S4中所述层析试纸条由包括以下方法制得:将环孢霉素蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度0.1mg/mL,得喷膜液A,用喷膜机将喷膜液A喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线,所述百分比为质量体积百分比;将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度1.0mg/mL,得喷膜液B,用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm处形成质控线,

质控线与检测线相隔10mm;将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25℃恒温真空干燥箱中烘干,在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫、样品垫以及吸水纸,再剪切成4mm宽的试纸条。

[0021] 本发明具有如下有益效果:本发明提供的一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条检测灵敏度高,其定量限最小至20ng/mL;检测范围广,其定量线性范围能够达到 20-1000ng/mL;检测稳定可靠,其准确度达到±10%。该试剂条操作简便易行,仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果,拥有良好的商业化应用前景。

附图说明

[0022] 图1为本发明一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的结构示意图;

[0023] 1.样品垫;2.结合垫;3.检测线;4.质控线;5.检测垫;6.吸收垫;7.背衬板。

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所述的实施例只是本发明的部分具有代表性的实施例,而不是全部实施例,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其他所有实施例都属于本发明的保护范围。

[0025] 实施例1

[0026] 参照附图1,一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫1、结合垫2、具有检测线3和质控线 4的检测垫5、吸收垫6以及背衬板7,所述结合垫2喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针,所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备,所述检测线3由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线4由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。所述检测垫5为硝酸纤维素膜且为孔径5μm的多孔样结构膜;所述样品垫1、结合垫2的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫6的材质为吸水滤纸。

[0027] 一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,包括以下的步骤:

[0028] S1.利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、β-二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;具体步骤如下:

[0029] A.取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

[0030] B.向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铈60μL、0.1mol/Lβ-萘甲酰三氟丙酮150μL、0.1mol/L三辛基氧化膦150μL,室温反应16小时,得到反应液b;

[0031] C.将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0032] S2.利用步骤S1制备的纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针;所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由包括以下方法制

得：将纳米荧光微球，溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中，使得荧光微球含量为0.2wt%，500W超声处理30秒后，缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200μL，振荡反应15分钟后，6000r/min离心10分钟，收集沉淀，用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀，重复离心步骤2次，得到活化的荧光微球；将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中，加入 400μg环孢霉素单克隆抗体，4℃搅拌反应4小时，再离心10分钟，收集沉淀，将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0033] S3. 利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的环孢霉素单克隆抗体结合垫2，具体步骤如下：将所述结合垫2裁成8mm的宽度，再使用喷金仪以5μL/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫2上，并置于恒温鼓风干燥箱中，37℃烘干16小时。

[0034] S4. 利用环孢霉素蛋白衍生物制备检测线，利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线4，喷涂、再与步骤S3得到的结合垫2组装获得层析试纸条，具体步骤如下：所述层析试纸条由包括以下方法制得：将环孢霉素蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20 的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度0.1mg/mL，得喷膜液A，用喷膜机将喷膜液A 喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线3，所述百分比为质量体积百分比；将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度1.0mg/mL，得喷膜液B，用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm 处形成质控线4，质控线4与检测线3相隔10mm；将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25℃恒温真空干燥箱中烘干，在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线3和质控线4的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫2、样品垫1以及吸水纸，再剪切成4mm宽的试纸条。

[0035] 本实施例试剂条的定量限为30ng/mL，定量线性范围能够达到50-900ng/mL，准确度达到±15%。

[0036] 实施例2

[0037] 参照附图1，一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条，其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪，所述检测卡包括样品垫1、结合垫2、具有检测线3和质控线 4的检测垫5、吸收垫6以及背衬板7，所述结合垫2喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针，所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备，所述检测线3由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备，所述质控线4由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备，所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。所述检测垫5为硝酸纤维素膜且为孔径12μm的多孔样结构膜；所述样品垫1、结合垫2的材质为玻璃纤维素膜或无纺布，所述吸收垫6的材质为吸水滤纸。

[0038] 一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法，包括以下的步骤：

[0039] S1. 利用羧基化聚苯乙烯纳米微球，制备纳米荧光微球；所述纳米荧光微球中，稀土元素离子、β-二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3；具体步骤如下：

[0040] B. 取羧基化聚苯乙烯纳米微球，加入去离子水和丙酮混合液，使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%，所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1，搅拌均匀，得反应液a；

[0041] B. 向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化钪60μL、0.1mol/Lβ-萘甲酰三氟丙酮150μL、0.1mol/L三辛基氧化膦150μL，室温反应16小时，得到反应液b；

[0042] C.将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0043] S2.利用步骤S1制备的纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针;所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由包括以下方法制得:将纳米荧光微球,溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,使得荧光微球含量为0.2wt%,500W超声处理30秒后,缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L,振荡反应15分钟后,6000r/min离心10分钟,收集沉淀,用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀,重复离心步骤2次,得到活化的荧光微球;将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,加入 400 μ g环孢霉素单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,再离心10分钟,收集沉淀,将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0044] S3.利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的环孢霉素单克隆抗体结合垫2,具体步骤如下:将所述结合垫2裁成8mm的宽度,再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫2上,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0045] S4.利用环孢霉素蛋白衍生物制备检测线,利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线4,喷涂、再与步骤S3得到的结合垫2组装获得层析试纸条,具体步骤如下:所述层析试纸条由包括以下方法制得:将环孢霉素蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20 的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度0.1mg/mL,得喷膜液A,用喷膜机将喷膜液A 喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线3,所述百分比为质量体积百分比;将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲溶解至终浓度1.0mg/mL,得喷膜液B,用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm 处形成质控线4,质控线4与检测线3相隔10mm;将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干,在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线3和质控线4的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫2、样品垫1以及吸水纸,再剪切成4mm宽的试纸条。

[0046] 本实施例试剂条的定量限为30ng/mL,定量线性范围能够达到50-900ng/mL,准确度达到 $\pm 15\%$ 。

[0047] 实施例3

[0048] 参照附图1,一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条,其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪,所述检测卡包括样品垫1、结合垫2、具有检测线3和质控线4的检测垫5、吸收垫6以及背衬板7,所述结合垫2喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针,所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备,所述检测线3由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备,所述质控线4由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备,所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。所述检测垫5为硝酸纤维素膜且为孔径7 μ m的多孔样结构膜;所述样品垫1、结合垫2的材质为玻璃纤维素膜或无纺布,所述吸收垫6的材质为吸水滤纸。

[0049] 一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备方法,包括以下的步骤:

[0050] S1.利用羧基化聚苯乙烯纳米微球,制备纳米荧光微球;所述纳米荧光微球中,稀土元素离子、 β -二酮体类螯合物和荧光增强协同剂的摩尔比为1.2:3:3;具体步骤如下:

[0051] C.取羧基化聚苯乙烯纳米微球,加入去离子水和丙酮混合液,使得羧基化的聚苯乙烯微球的含量为1wt%,所述去离子水和所述丙酮的体积比为1:1,搅拌均匀,得反应液a;

[0052] B.向反应液a中依次加入0.1mol/L三氯化铈30 μ L、0.1mol/L β -萘甲酰三氟丙酮150 μ L、0.1mol/L三辛基氧化膦150 μ L,室温反应16小时,得到反应液b;

[0053] C.将反应液b通过减压蒸馏方式将溶液中的有机溶剂去除,离心洗涤两次,将沉淀重新分散到去离子水中保存。

[0054] S2.利用步骤S1制备的纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体,制备纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针;所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由包括以下方法制得:将纳米荧光微球,溶于0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,使得荧光微球含量为0.2wt%,500W超声处理30秒后,缓慢加入15mg/mL的碳二亚胺200 μ L,振荡反应15分钟后,6000r/min离心10分钟,收集沉淀,用0.01mol/L pH 8.0的硼酸缓冲液反复洗涤沉淀,重复离心步骤2次,得到活化的荧光微球;将活化的荧光微球复溶于5mL 0.01mol/L pH8.0的硼酸缓冲液中,加入 400 μ g环孢霉素单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C搅拌反应4小时,再离心10分钟,收集沉淀,将沉淀复溶于含1wt%牛血清白蛋白的、0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液中保存。

[0055] S3.利用步骤S2制备的纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针喷涂在玻纤膜上得到纳米荧光微球标记的环孢霉素单克隆抗体结合垫2,具体步骤如下:将所述结合垫2裁成8mm的宽度,再使用喷金仪以5 μ L/cm的喷量将步骤S2中制备完成的标记复合物稀释50倍后固定于结合垫2上,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0056] S4.利用环孢霉素蛋白衍生物制备检测线,利用羊抗鼠IgG抗体制备质控线4,喷涂、再与步骤S3得到的结合垫2组装获得层析试纸条,具体步骤如下:所述层析试纸条由包括以下方法制得:将环孢霉素蛋白衍生物用含1wt%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温-20 的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度0.1mg/mL,得喷膜液A,用喷膜机将喷膜液A 喷涂在距硝酸纤维素膜左端20mm处形成检测线3,所述百分比为质量体积百分比;将羊抗鼠IgG用含1%海藻糖、1wt%牛血清白蛋白、0.05wt%吐温20的0.01mol/L pH7.4的磷酸缓冲液溶解至终浓度1.0mg/mL,得喷膜液B,用喷膜机将喷膜液B喷涂在距硝酸纤维素膜右端30mm 处形成质控线4,质控线4与检测线3相隔10mm;将喷涂好的硝酸纤维素膜置于25 $^{\circ}$ C恒温真空干燥箱中烘干,在硬板纸上依次搭接并粘贴划有检测线3和质控线4的硝酸纤维素膜、滤纸、结合垫2、样品垫1以及吸水纸,再剪切成4mm宽的试纸条。

[0057] 本实施例试剂条的定量限为20ng/mL,定量线性范围能够达到20-1000ng/mL,准确度达到 $\pm 10\%$ 。

[0058] 本发明的使用方法:将待测样品滴加到快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条样本垫区域,层析5min后插入荧光读数仪中读数,得到检测结果。

[0059] 本发明的检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条在使用时,将待测血液样品加到样品垫后,样本缓冲液血液样本混合浸入到样品垫上,当样品垫上的样本达到饱和状态后,通过毛细管作用将样本输送到结合垫。当血液样本中含有环孢霉素时,环孢霉素与荧光微球上的抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达包被识别单一抗原表位的环孢霉素单克隆捕获抗体的检测区T处,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测区T处。未结合环孢霉素单克隆抗体的稀土离子微球(钐离子或铈离子)继续前行,到达对照区C时,羊抗鼠IgG抗体与稀土离子微球上的鼠源性单抗(即环孢霉素单克隆检

测抗体)结合,在C线处出现稀土离子微球的聚集。整个反应在5分钟内完成,并插入荧光读数仪中读数。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比,当光源照射到试纸条的检测区 and 对照区时,激发附着的荧光物质,发射光收集并转化为电信号,电信号的强弱和荧光分子数量相关,检测仪计算样品中待测物的含量。

[0060] 测试例1

[0061] A、拟合标准曲线

[0062] 在实施例1-3制得的时间分辨免疫层析试纸条的样品垫1加入不同浓度的环孢霉素标准品(取8个不同的浓度,分别为0ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、30ng/mL、50ng/mL,每个浓度做5个平行样),膜层析反应10分钟后,仪器读取质控线4、检测线3的信号,以检测的样品的检测线3荧光值与质控线4的荧光值的比值为横坐标,环孢霉素标准品浓度为纵坐标,建立方程并拟合成标准曲线 $y=0.9572x+0.0855$ 。

[0063] 标准曲线 $R_2=0.9937$,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含环孢霉素浓度进行定量分析。

[0064] B、样品检测

[0065] 在环孢霉素的荧光免疫层析试纸条的样品垫1加入待测样品,膜层析反应5分钟。开启荧光检测设备,读取IC卡里的标准曲线,并将检测条插入荧光检测设备的插卡口,运行仪器,仪器通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的环孢霉素浓度,根据定标卡上的信息将实际检测值带入预设的标准曲线中算出定量的结果。

[0066] 与现有技术相比,本发明提供的一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条检测灵敏度高,其定量限最小至20ng/mL;检测范围广,其定量线性范围能够达到20-1000ng/mL;检测稳定可靠,其准确度达到 $\pm 10\%$ 。该试剂条操作简便易行,仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果,拥有良好的商业化应用前景。

[0067] 本领域的技术人员在不脱离权利要求书确定的本发明的精神和范围的条件下,还可以对以上内容进行各种各样的修改。因此本发明的范围并不仅限于以上的说明,而是由权利要求书的范围来确定的。

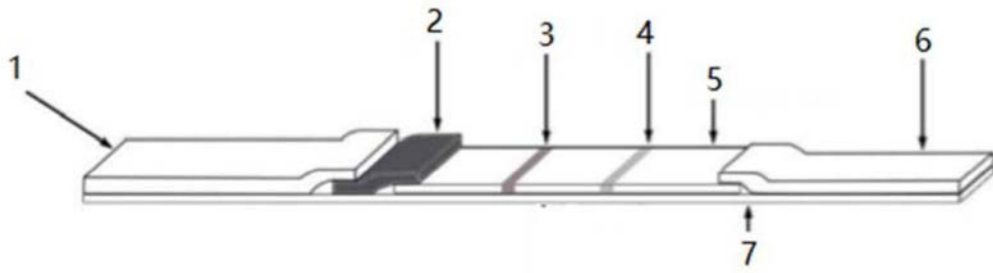


图1

专利名称(译)	一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条		
公开(公告)号	CN110133258A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910149920.2	申请日	2019-02-28
[标]发明人	刘斌虎 吴云林 傅琳		
发明人	刘斌虎 吴云林 傅琳		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了一种快速检测环孢霉素的时间分辨荧光免疫层析试剂条，其包括检测卡和可选择的荧光免疫定量分析仪，所述检测卡包括样品垫、结合垫、具有检测线和质控线的检测垫、吸收垫以及背衬板，所述结合垫喷涂有纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针，所述纳米微球时间分辨荧光-环孢霉素探针由纳米荧光微球和环孢霉素单克隆抗体制备，所述检测线由环孢霉素蛋白衍生物喷涂制备，所述质控线由羊抗鼠IgG抗体喷涂制备，所述环孢霉素抗体为鼠源性抗体。本发明检测灵敏度高，检测范围广，检测稳定可靠，操作简便易行，仅需5分钟就能获得准确、可靠的测定结果，拥有良好的商业化应用前景。

