



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106248927 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(21)申请号 201610575106.3

(22)申请日 2016.07.21

(71)申请人 上海奥普生物医药有限公司

地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路526号

(72)发明人 朱传增 石晓强 安永君 李福刚
徐建新

(74)专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 吴泽群

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

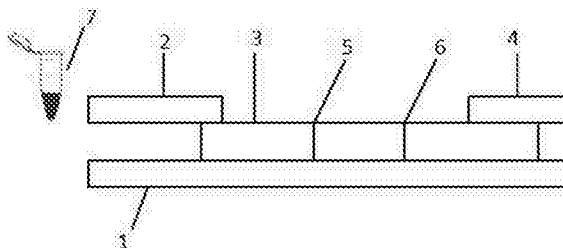
权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及制备方法

(57)摘要

本发明公开一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及其制备方法,属于临床医学诊断领域。该试剂由试纸条和荧光液两部分组成。其中,试纸条包括底板、Fusion5、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述Fusion5、硝酸纤维素膜和吸水垫水平方向顺序连接固定于底板上。所述硝酸纤维素膜上包被有CK-MB单克隆抗体1的检测线和兔IgG抗体构成的质控线。荧光液包含CK-MB单克隆抗体2标记的荧光微球、羊抗兔抗体标记的荧光微球。本发明利用时间分辨荧光微球提高荧光强度,降低背景信号,同时定量检测全血、血清或血浆中的CK-MB含量,样本仅需要10~20微升。该试纸条具有方便快捷、操作简单、检测时间短、特异性强、灵敏度高、检测结果更加准确,适用于临床POCT的快速诊断。



1. 一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,其特征在于:该试剂由试纸条和荧光液两部分组成;所述的试纸条包括底板(1)、Fusion5(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4);

所述Fusion5(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4)水平方向顺序连接固定于底板上;所述硝酸纤维素膜(3)上包被有CK-MB单克隆抗体1(5)的检测线和兔IgG抗体(6)构成的质控线;

所述的荧光液(7)包含CK-MB单克隆抗体2标记的时间分辨荧光微球、羊抗兔抗体标记的时间分辨荧光微球。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,其特征在于:所述的时间分辨荧光微球选自修饰过的聚苯乙烯微球。

3. 根据权利要求2所述的快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,其特征在于:所述的聚苯乙烯微球,表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种,粒径为100~500nm。

4. 根据权利要求1所述的快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,其特征在于:所述的时间分辨荧光微球内部填充镧系元素的螯合物。

5. 根据权利要求4所述的快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,其特征在于:所述的镧系元素为铈、钐、铕、镱中的一种。

6. 根据权利要求1所述的一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,其特征在于,所述的荧光液的制备步骤如下:

(1)CK-MB单克隆抗体2标记时间分辨荧光微球的制备及稀释:

将时间分辨荧光微球溶于100mmol/L MES缓冲液中,每1mg时间分辨荧光微球对应100~300μL MES缓冲液,加入活化剂NHS和EDC,EDC的终浓度为0.05%~0.1%,NHS的终浓度为0.1%~0.2%;随后加入氨基乙酸,使得微球表面连接手臂,每1mg时间分辨荧光微球对应10~100μL 50mmol/L氨基乙酸;洗涤、10000~15000rpm离心后,再次加入活化剂活化,EDC的终浓度为0.05%~0.1%,NHS的终浓度为0.1%~0.2%;再次洗涤、10000~15000rpm离心,将时间分辨荧光微球用硼酸缓冲液复溶,随后加入CK-MB单克隆抗体2进行反应,微球与抗体的质量比为10mg:0.01mg~2.0mg;反应完后加入封闭剂进行封闭,封闭剂的终浓度为2~3%;封闭2h,洗涤、10000~15000rpm离心,再次用pH为7~9的60~100mmol/L硼酸缓冲液及封闭剂复溶、超声,封闭剂的终浓度为2~3%,CK-MB抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在0.5~50μg/mL,使微球均匀分散在缓冲液中,2~8℃避光保存;

(2)羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备及稀释过程同(1)所述;

(3)滴配:

用pH为8.0、200mmol/L的Tris缓冲液将步骤(1)和(2)中同等量的CK-MB、羊抗兔包被的荧光微球分别进行稀释,其中,CK-MB包被的荧光微球稀释200~300倍,羊抗兔包被的荧光微球稀释2000~3000倍,混合后即为其所需要的荧光混合液。

7. 根据权利要求6所述的一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂。其特征在于:所述洗涤采用0.9%NaCl,0.05%Tween 20,剩余为5mmol/L的PB混合而成的洗涤剂,其pH为7.8,加入洗涤剂后微球终浓度在2%。

8. 一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂的制备方法,包括如下步骤:

(1)制备检测线和质控线:硝酸纤维素膜(3)在免疫荧光试纸条中用于固定包被抗体,同时也是免疫反应的发生的场所;检测线(5)是将CK-MB单克隆抗体1使用50mmol/L柠檬酸盐或蔗糖稀释液稀释,划线于所述硝酸纤维素膜(3)上;质控线(6)是将兔IgG抗体使用50mmol/L柠檬酸盐或蔗糖稀释液稀释,划线与所述质控线(6),将划好的硝酸纤维素膜置于真空干燥箱,在37~45℃下,烘干24~48小时,检测线(5)位于质控线(6)左侧,即液体首先接触的位置;

(2)试纸条的组装:试纸条底板(1)由左到右依次粘附Fusion5(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水纸(4),将组装好的大板切成小条,即得到所述快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于临床医学诊断领域,具体涉及一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及制备方法。

背景技术

[0002] CK-MB是肌酸激酶(CK)的三个异构体(另两个是CK-BB和CK-MMOL/L)之一。CK是一种肌肉代谢的主酶。CK-MB由两个亚单位组成(MW=40000每个):亚单位M表示肌肉,亚单位B表示大脑。CK-MB主要存在于心肌中,少量存在于骨骼肌中。定量测定CK-MB是心脏常规检查的一部分,并且有利于AMI的诊断。当发生AMI时,CK-MB即出现于血循环中并说明心肌层受到了损伤。CK-MB浓度在疼痛发作后4-8小时内升高,在12-24小时中达到峰值,然后在48小时后下降到正常状态。CK-MB是在疼痛发作后的第一个48小时中围手术期心肌梗塞选择的标记物。CK-MB浓度还用于评定AMI的程度以及后来的再梗塞。从诊断灵敏性、特异性以及效率来看,CK-MB都要优于依据电泳的CK同工酶。CK-MB的测定亦有助于溶栓疗法下对心肌多次灌注液的效应而进行的非侵入性评估。同时CK-MB水平的升高也和骨骼肌损伤有关,但并不像在AMI中CK-MB水平会有升高和下降的变化形式。

[0003] 时间分辨荧光(TRF)分析技术是以具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂作为示踪物,建立的一种新型的非放射性微量分析技术。自从1983年Pettersson等采用时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)法定量测定hCG以来,TRFIA方法学研究和临床应用发展迅速,成为既RIA之后标记免疫分析发展的一个新的里程碑,国内外相继研制出了多种TRFIA仪和配套的商业化试剂盒。TRFIA技术具有灵敏度高、标准曲线范围宽、操作简便、无放射性污染、多标记等优点,广泛地应用于肿瘤、传染病、内分泌疾病、自身免疫性疾病、遗传性疾病的临床实验室诊断,已成为生物医学研究和临床超微量生化检验常用的分析手段之一。将TRF、聚苯乙烯微球及硝酸纤维素膜结合,可用于快速体外诊断领域。专利(ZL 03819391.4)涉及一种采用时间分辨荧光的基于膜的检测,用于检测测试样本中分析物的存在和含量;专利(CN 202149903U)发明C反应蛋白时间分辨荧光免疫层析定量检测;专利(CN 202166649U)发明新喋呤时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条;专利(CN 102879559A)发明一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂盒方法;专利(CN 103760368A)发明一种AFP和Free- β -HCG时间分辨荧光双标的定量检测试剂盒;专利(CN 204514928U)发明一种基于时间分辨荧光免疫层析法检测胃蛋白酶原I和II的试纸条以及其应用的试纸条。

[0004] 专利(CN 2783324Y)发明一种心血管疾病诊断和预测多指标蛋白芯片检测试剂盒,用于CRP、Myo、cTnI、cTnT、NT-proBNP、CKMB、CK-MB、GPBB的联合检测。

[0005] 目前,CK-MB检测的方法主要有酶联免疫吸附法、胶乳增强免疫比浊法、胶体金免疫层析法、荧光免疫层析法等。酶联免疫吸附法操作复杂、检测时间长、检测范围窄;胶乳增强免疫比浊需要结合大型仪器,成本高;胶体金免疫层析法定性或定量检测,灵敏度低、线性范围窄,不能满足定量、准确检测的要求;荧光免疫层析法大多数采用荧光素或其他物质

作为发光源,虽然有较高的线性范围,但受背景信号的干扰,不能够保证低端灵敏度。

[0006] 尽管时间分辨荧光免疫层析法已经广泛用于多种项目的检测,但是大多数都采用将时间分辨荧光微球固定在结合物释放垫上,由于微球的释放不均一,导致不精密度很大,无法满足灵敏度要求高的项目,尤其是肌钙蛋白I的检测。此外,为了检测全血样本,多数厂家的样品垫采用人工处理过玻璃纤维作为结合物释放垫,同样增加了不精密度。

[0007] 综上所述,在CK-MB定量检测时,迫切需要一种样本量少、精密度高、检测背景信号低、灵敏度高、线性范围宽、样品垫不需处理就能检测全血样本的时间分辨荧光免疫层析试剂。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂,该试剂能在较短的检测时间内完成CK-MB的检测,检测时间短,检测灵敏度高。

[0009] 本发明还提供了快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂的制备方法。

[0010] 一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂由试纸条和荧光液两部分组成。

[0011] 所述的试纸条包括底板(1)、Fusion5(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4)。

[0012] 所述Fusion5(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4)水平方向顺序连接固定于底板上。

[0013] 所述硝酸纤维素膜(3)上包被有CK-MB单克隆抗体1(5)的检测线和兔IgG抗体(6)构成的质控线。

[0014] 所述的荧光液(7)包含CK-MB单克隆抗体2标记的时间分辨荧光微球、羊抗兔抗体标记的时间分辨荧光微球。

[0015] 所述的时间分辨荧光微球选自修饰过的聚苯乙烯微球。

[0016] 所述的聚苯乙烯微球,表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种,粒径为100~500nm。

[0017] 所述的时间分辨荧光微球内部填充镧系元素的螯合物。

[0018] 所述的镧系元素为铕、钐、铒、镝中的一种。

[0019] 所述的荧光液的配制方法如下:

[0020] (1)CK-MB单克隆抗体2标记时间分辨荧光微球的制备及稀释:

[0021] 将时间分辨荧光微球溶于100mmol/L MES缓冲液中,每1mg时间分辨荧光微球对应100-300 μ L MES缓冲液,加入活化剂NHS和EDC,EDC的终浓度为0.05%-0.1%,NHS的终浓度为0.1%-0.2%;随后加入氨基乙酸,使得微球表面连接手臂,每1mg时间分辨荧光微球对应10-100 μ L 50mmol/L氨基乙酸;洗涤、10000-15000rpm离心后,再次加入活化剂活化,EDC的终浓度为0.05%-0.1%,NHS的终浓度为0.1%-0.2%;再次洗涤、10000-15000rpm离心,将时间分辨荧光微球用硼酸缓冲液复溶,随后加入CK-MB单克隆抗体2进行反应,微球与抗体的质量比为10mg:0.01mg~2.0mg;反应完后加入封闭剂进行封闭,封闭剂的终浓度为2-3%;封闭2h,洗涤、10000-15000rpm离心,再次用pH为7-9的60-100mmol/L硼酸缓冲液及封闭剂复溶、超声,封闭剂的终浓度为2-3%,CK-MB抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在0.5~50 μ g/mL,使微球均匀分散在缓冲液中,2-8℃避光保存;荧光微粒活化过程中添加氨基乙

酸作为手臂,使得抗体与微球之间的距离增加,有效的降低了空间位阻效应,提高了检测系统灵敏度。

[0022] (2)羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备及稀释过程同(1)所述;

[0023] (3)滴配:

[0024] 用pH为8.0、200mmol/L的Tris缓冲液将步骤(1)和(2)中同等量的CK-MB、羊抗兔包被的荧光微球分别进行稀释,其中,CK-MB包被的荧光微球稀释200~300倍,羊抗兔包被的荧光微球稀释2000~3000倍,混合后即为所需要的荧光混合液。

[0025] 优选的,采用钨粒子螯合物填充的时间分辨荧光微球,粒径为:100~500nm;

[0026] 优选的,微球与抗体的包被比例为:10mg:0.01mg~2.0mg;

[0027] 所述洗涤采用0.9%NaCl,0.05%Tween 20,剩余为5mmol/L的PB混合而成的洗涤剂,其pH为7.8,加入洗涤剂后微球终浓度在2%。

[0028] 一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及制备方法,包括如下步骤:

[0029] (1)制备检测线和质控线:硝酸纤维素膜(3)在免疫荧光试纸条中用于固定包被抗体,同时也是免疫反应的发生的场所;检测线(5)是将CK-MB单克隆抗体1使用50mmol/L柠檬酸盐或蔗糖稀释液稀释,划线于所述硝酸纤维素膜(3)上;质控线(6)是将兔IgG抗体使用50mmol/L柠檬酸盐或蔗糖稀释液稀释,划线与所述硝酸纤维质控线(6)上。将划好的硝酸纤维素膜置于真空干燥箱,在37~45℃下,烘干24~48小时。检测线(5)位于质控线(6)左侧,即液体首先接触的位置;

[0030] (2)试纸条的组装:试纸条底板(1)由左到右依次粘附Fusion5(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水纸(4)。将组装好的大板切成小条,即得到所述快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0031] 优选的,检测线和质控线抗体的划膜浓度为0.5~2mg/mL;

[0032] 优选的,检测线和质控线抗体的划膜喷量为0.5~2.0μL/cm;

[0033] 以上快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂的检测方法,其步骤包括:

[0034] (1)标准曲线的绘制:取10~20μL的CK-MB标准品与80~500μL的荧光混合液(CK-MB、羊抗兔荧光液)混合,取混合液70~100μL滴加到试纸条的Fusion5上,反应时间15~20分钟,通过与试纸条配套的时间分辨免疫层析定量分析仪读取系统检测信号,然后以标准品的各浓度为横坐标,各浓度系统检测信号的平均值为纵坐标,拟合制备标准品曲线;

[0035] (2)待测样品的检测,分别取10~20μL的待测样品与80~500μL的荧光混合液(CK-MB、羊抗兔荧光液)混合,取混合液70~100μL滴加到试纸条的Fusion5上,反应时间15~20分钟,通过系统检测信号的值即可得到待测样品中的CK-MB的浓度值。

[0036] 所述(1)中,CK-MB标准品的浓度分别为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/mL。

[0037] 本发明的有益效果是:

[0038] (1)本发明采用Fusion5为样品垫,摒弃了传统的样品垫及结合物释放垫,无需预处理,可以进行全血、血清、血浆样本的检测,能够极大的提高检测精密度和准确性。

[0039] (2)本发明将荧光液置于硝酸纤维素膜之外,不同于传统方法将荧光微球固定于结合物释放垫上,不存在荧光微球释放不均一的现象,同样能够极大的提高检测精密度和

准确性。

[0040] (3)本发明采用铈粒子螯合物填充的时间分辨荧光微球,由于其大的Stokes位移(激发波长为340nm左右,发射波长为615nm左右,差值为275nm左右),能够明显降低背景信号值,提高检测的灵敏度。

[0041] (4)本发明的采用极少的样本量(10~20 μ I),能够有效的排除样本的干扰。

附图说明

[0042] 图1是本发明快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂的结构示意图(1为底板、2为Fusion5、3为硝酸纤维素膜、4为吸水垫、5为CK-MB检测线、6为兔IgG质控线):

[0043] 图2是本发明(实施例1)CK-MB的标准品曲线;

[0044] 图3是本发明(实施例2)CK-MB的标准品曲线;

[0045] 图4是本发明(实施例3)CK-MB的标准品曲线;

[0046] 图5是本发明奥普(实施例1)与化学发光法CK-MB的相关性曲线(横坐标为化学发光法检测浓度(ng/mL),纵坐标为本发明检测浓度(ng/mL));

[0047] 图6是本发明奥普(实施例2)与化学发光法CK-MB的相关性曲线(横坐标为化学发光法检测浓度(ng/mL),纵坐标为本发明检测浓度(ng/mL));

[0048] 图7是本发明奥普(实施例3)与化学发光法CK-MB的相关性曲线(横坐标为化学发光法检测浓度(ng/mL),纵坐标为本发明检测浓度(ng/mL))。

具体实施方式

[0049] 下面结合实施例,对本发明作进一步说明:

[0050] 本发明中,CK-MB抗体和荧光微球的供应商和货号如下所示

[0051]

抗体名称	目录号	厂家
CKMB-03	无	深圳市菲鹏生物股份有限公司
CKMB-04	无	深圳市菲鹏生物股份有限公司
200nm荧光微球	FC02F	Bangs Laboratories

[0052] 实施例1

[0053] 1、CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备

[0054] (1)检测线(T)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释CK-MB单克隆抗体1至0.5mg/mL;

[0055] (2)质控线(C)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释兔IgG抗体至0.5mg/mL;

[0056] 在带有背胶的底板(1)上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜(3),然后再硝酸纤维素膜(3)的两端分别粘贴Fusion5膜(2)和吸水纸(4)。在硝酸纤维素膜(3)且靠近Fusion5膜(2)处,划T(CK-MB捕获线(5)),在靠近吸水纸(4)的一端划C(兔IgG)线,T、C的间距为5mm。

[0057] 在T线处划T线,在C线处划C线。T线抗体的终浓度为0.5mg/mL,C线兔IgG的终浓度为0.5mg/mL,C、T线的喷量为0.5 μ I/cm。

[0058] 将喷好的大卡置于37℃恒温烘箱中烘烤24小时。烘烤完后,在湿度小于40%的房间,用切条机将其切成3.85mm宽度的试纸条,将其装入塑料壳中压实,然后装入一袋干燥剂,封口置于干燥柜中保存,待用。具体如图1所示。

[0059] 2、CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条的检测

[0060] (1)制备CK-MB、羊抗兔时间分辨荧光微球

[0061] 将100mg时间分辨荧光微球(粒径为200nm左右)溶于10mI pH为6.0的100mmoI/L MES缓冲液中,加入5mgNHS和EDC活化15分钟;洗涤、15000rpm离心,随后加入5mI 50mmoI/L 氨基乙酸,使得微球表面连接手臂,洗涤、15000rpm离心后,再次加入活化剂活化,EDC的终浓度为0.05%,NHS的终浓度为0.1%;再次洗涤、15000rpm离心,加入50mI pH为8.5的60mmoI/L 硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球完全溶解,随后加入5mg CK-MB单克隆抗体2进行反应2小时;反应完后加入BSA进行封闭2小时,BSA的终浓度为2%;封闭过后,洗涤、15000rpm离心,再次用pH为8.5的60mmoI/L 硼酸缓冲液及BSA复溶、超声,使微球均匀分散在缓冲液中,BSA的终浓度为2%,CK-MB抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在5μg/mI,4℃避光保存。

[0062] 羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备过程同CK-MB制备微球的过程相同。

[0063] (2)滴配

[0064] 用pH为8.0、200mmoI/L的Tris缓冲液将步骤(1)中的CK-MB、羊抗兔包被的荧光微球各0.1mI进行稀释。其中,CK-MB包被的荧光微球稀释200倍,羊抗兔包被的荧光微球稀释2000倍,混合后即为其所需要的荧光混合液。

[0065] (3)标准曲线的绘制

[0066] 用小牛血清稀释CK-MB标准品,浓度为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/mI。分别取10μI混合标准品与80μI步骤(2)中荧光混合液混合,再取80μI混合液滴加在步骤1中的CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条上,反应15分钟后,通过与CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条配套的免疫层析读数仪,读取系统检测信号,每个混合标准品的浓度检测三次,具体数值如表1所示。

[0067] 表1标准品检测值

[0068]

CKMB 标准品浓度 (ng/ml)	0	0.5	2	10	25	50	100
系统检测信号	0.014	0.045	0.202	0.953	1.891	2.543	5.233
	0.016	0.042	0.186	0.989	2.032	2.885	5.204

[0069]

	0.018	0.048	0.195	0.882	1.722	2.811	5.686
平均值	0.016	0.045	0.194	0.941	1.882	2.746	5.374
SD	0.002	0.003	0.008	0.054	0.155	0.180	0.270
CV	12.50%	6.67%	4.13%	5.78%	8.25%	6.55%	5.03%

[0070] 由表1数据可知,CK-MB的灵敏度可达0.5ng/mI,检测上限可达100ng/mI。本发明CK-MB检测性能均优于胶体金层析法,同化学发光法试剂性能相近,体现出时间分辨荧光免疫层析法的优势。

[0071] (4)制作ID卡

[0072] 以标准品CK-MB浓度值为横坐标,各浓度的系统检测信号平均值为纵坐标,绘制标准品曲线,具体如图2所示,烧录ID卡,并导入配套仪器中。

[0073] 3、精密度检测

[0074] 用步骤2中的测试方法,测试CK-MB的标准品(浓度为10和50ng/ml),每个标准品重复检测十次,具体检测数值如下表2所示。

[0075] 表2精密度测试结果表

序号	CKMB 标准品 (ng/ml)	
	10	50
1	10.82	49.09
2	11.98	45.50
3	10.54	49.34
4	11.24	52.17
5	11.03	46.90
[0076] 6	11.19	50.13
7	11.40	45.29
8	11.72	53.15
9	11.05	51.15
10	11.34	53.44
mean	11.23	49.62
SD	0.42	2.97
CV	3.7%	6.0%

[0077] 如表2数据可知,采用本发明的CK-MB检测试纸条,CK-MB的误差小于10%,完全符合POCT产品误差小于15%的要求。

[0078] 4、临床样本的相关性检测

[0079] 用步骤2中的测试方法,选取40例国外化学发光法检测CK-MB的临床样本(样本浓度覆盖标准品的检测范围),采用本发明的CK-MB试剂进行检测。以化学发光法检测的CK-MB浓度为横坐标,以本发明检测CK-MB浓度为纵坐标,绘制样本相关性曲线,如图5。其中,CK-MB的相关性系数R均大于0.95,完全符合临床试验的要求。

[0080] 实施例2

[0081] 1、CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备

[0082] (1)检测线(T)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释CK-MB单克隆抗体1至1mg/ml;

[0083] (2)质控线(C)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释兔IgG抗体至1mg/ml;

[0084] 在带有背胶的底板(1)上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜(3),然后再硝酸纤维素膜(3)的两端分别粘贴Fusion5膜(2)和吸水纸(4)。在硝酸纤维素膜(3)且靠近Fusion5膜(2)处,划T(CK-MB捕获线(5)),在靠近吸水纸(4)的一端划C(兔IgG)线,T、C的间距为5mm。

[0085] 在T线处划T线,在C线处划C线。T线抗体的终浓度为1mg/ml,C线兔IgG的终浓度为1mg/ml,C、T线的喷量为1.0 μ l/cm。

[0086] 将喷好的大卡置于37℃恒温烘箱中烘烤24小时。烘烤完后,在湿度小于40%的房间,用切条机将其切成3.85mm宽度的试纸条,将其装入塑料壳中压实,然后装入一袋干燥

剂,封口置于干燥柜中保存,待用。具体如图1所示。

[0087] 2、CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条的检测

[0088] (1)制备CK-MB、羊抗兔时间分辨荧光微球

[0089] 将100mg时间分辨荧光微球(粒径为200nm左右)溶于20mI pH为6.0的100mmoI/L MES缓冲液中,加入10mgNHS和EDC活化15分钟;洗涤、15000rpm离心,随后加入5mI 50mmoI/L 氨基乙酸,使得微球表面连接手臂,洗涤、15000rpm离心后,再次加入活化剂活化,EDC的终浓度为0.1%,NHS的终浓度为0.1%;再次洗涤、15000rpm离心,加入50mI pH为8.5的60mmoI/L硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球完全溶解,随后加入1mg CK-MB单克隆抗体2进行反应2小时;反应完后加入BSA进行封闭2小时,BSA的终浓度为3%;封闭过后,洗涤、15000rpm离心,再次用pH为8.5的60mmoI/L硼酸缓冲液及BSA复溶、超声,使微球均匀分散在缓冲液中,BSA的终浓度为3%,CK-MB抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在5 μ g/mI,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0090] 羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备过程同CK-MB制备微球的过程相同。

[0091] (2)滴配

[0092] 用pH为8.0、200mmoI/L的Tris缓冲液将步骤(1)中的CK-MB、羊抗兔包被的荧光微球各0.1mI进行稀释。其中,CK-MB包被的荧光微球稀释250倍,羊抗兔包被的荧光微球稀释2500倍,混合后即为我们所需要的荧光混合液。

[0093] (3)标准曲线的绘制

[0094] 用小牛血清稀释CK-MB标准品,浓度为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/mI。分别取10 μ I混合标准品与80 μ I步骤(2)中荧光混合液混合,再取80 μ I混合液滴加在步骤1中的CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条上,反应15分钟后,通过与CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条配套的免疫层析读数仪,读取系统检测信号,每个混合标准品的浓度检测三次,具体数值如表3所示。

[0095] 表3标准品检测值

[0096]

CKMB 标准品浓度 (ng/ml)	0	0.5	2	10	25	50	100
系统检测信号	0.014	0.043	0.200	0.973	1.743	2.543	5.142
	0.015	0.047	0.191	0.961	1.914	2.746	5.233
	0.013	0.046	0.192	0.892	1.822	2.876	5.675
平均值	0.014	0.045	0.194	0.942	1.826	2.722	5.35
SD	0.001	0.002	0.005	0.047	0.086	0.168	0.285
CV	7.14%	4.44%	2.58%	4.99%	4.71%	6.17%	5.33%

[0097] 由表3数据可知,CK-MB的灵敏度可达0.5ng/mI,检测上限可达100ng/mI。本发明CK-MB检测性能均优于胶体金层析法,同化学发光法试剂性能相近,体现出时间分辨荧光免疫层析法的优势。

[0098] (4)制作ID卡

[0099] 以标准品CK-MB浓度值为横坐标,各浓度的系统检测信号平均值为纵坐标,绘制标准品曲线,具体如图3所示,烧录ID卡,并导入配套仪器中。

[0100] 3、精密度检测

[0101] 用步骤2中的测试方法,测试CK-MB的标准品(浓度为10和50ng/ml),每个标准品重复检测十次,具体检测数值如下表4所示。

[0102] 表4精密度测试结果表

序号	CKMB 标准品 (ng/ml)	
	10	50
1	11.32	46.33
2	10.73	49.74
3	11.01	51.58
4	11.59	50.78
5	11.30	47.51
6	11.54	53.26
7	11.26	52.86
8	10.63	53.27
9	11.74	50.46
10	10.88	51.37
mean	11.2	50.72
SD	0.38	2.34
CV	3.4%	4.6%

[0104] 如表4数据可知,采用本发明的CK-MB检测试纸条,CK-MB的误差小于10%,完全符合POCT产品误差小于15%的要求。

[0105] 4、临床样本的相关性检测

[0106] 用步骤2中的测试方法,选取40例国外化学发光法检测CK-MB的临床样本(样本浓度覆盖标准品的检测范围),采用本发明的CK-MB试剂进行检测。以化学发光法检测的CK-MB浓度为横坐标,以本发明检测CK-MB浓度为纵坐标,绘制样本相关性曲线,如图6。其中,CK-MB的相关性系数R均大于0.95,完全符合临床试验的要求。

[0107] 实施例3

[0108] 1、CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备

[0109] (1)检测线(T)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释CK-MB单克隆抗体1至2mg/ml;

[0110] (2)质控线(C)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释兔IgG抗体至2mg/ml;

[0111] 在带有背胶的底板(1)上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜(3),然后再硝酸纤维素膜(3)的两端分别粘贴Fusion5膜(2)和吸水纸(4)。在硝酸纤维素膜(3)且靠近Fusion5膜(2)处,划T(CK-MB捕获线(5)),在靠近吸水纸(4)的一端划C(兔IgG)线,T、C的间距为5mm。

[0112] 在T线处划T线,在C线处划C线。T线抗体的终浓度为2mg/ml,C线兔IgG的终浓度为2mg/ml,C、T线的喷量为2.0 μ l/cm。

[0113] 将喷好的大卡置于37℃恒温烘箱中烘烤24小时。烘烤完后,在湿度小于40%的房间,用切条机将其切成3.85mm宽度的试纸条,将其装入塑料壳中压实,然后装入一袋干燥剂,封口置于干燥柜中保存,待用。具体如图1所示。

[0114] 2、CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条的检测

[0115] (1)制备CK-MB、羊抗兔时间分辨荧光微球

[0116] 将100mg时间分辨荧光微球(粒径为200nm左右)溶于30mI pH为6.0的100mmoI/L MES缓冲液中,加入10mgNHS和EDC活化15分钟;洗涤、15000rpm离心,随后加入10mI 50mmoI/L氨基乙酸,使得微球表面连接手臂,洗涤、15000rpm离心后,再次加入活化剂活化,EDC的终浓度为0.1%,NHS的终浓度为0.2%;再次洗涤、15000rpm离心,加入50mI pH为8.5的60mmoI/L硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球完全溶解,随后加入5mg CK-MB单克隆抗体2进行反应2小时;反应完后加入BSA进行封闭2小时,BSA的终浓度为2%;封闭过后,洗涤、15000rpm离心,再次用pH为8.5的60mmoI/L硼酸缓冲液及BSA复溶、超声,使微球均匀分散在缓冲液中,BSA的终浓度为2%,CK-MB抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在5 μ g/mI,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0117] 羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备过程同CK-MB制备微球的过程相同。

[0118] (2)滴配

[0119] 用pH为8.0、200mmoI/L的Tris缓冲液将步骤(1)中的CK-MB、羊抗兔包被的荧光微球各0.1mI进行稀释。其中,CK-MB包被的荧光微球稀释300倍,羊抗兔包被的荧光微球稀释3000倍,混合后即为其所需要的荧光混合液。

[0120] (3)标准曲线的绘制

[0121] 用小牛血清稀释CK-MB标准品,浓度为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/mI。分别取10 μ I混合标准品与80 μ I步骤(2)中荧光混合液混合,再取80 μ I混合液滴加在步骤1中的CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条上,反应15分钟后,通过与CK-MB时间分辨荧光免疫层析试纸条配套的免疫层析读数仪,读取系统检测信号,每个混合标准品的浓度检测三次,具体数值如表5所示。

[0122] 表5标准品检测值

[0123]

CKMB 标准品浓度 (ng/ml)	0	0.5	2	10	25	50	100
系统检测信号	0.014	0.043	0.200	0.973	1.743	2.543	5.142
	0.015	0.047	0.191	0.961	1.914	2.746	5.233
	0.013	0.046	0.192	0.892	1.822	2.876	5.675
平均值	0.014	0.045	0.194	0.942	1.826	2.722	5.35
SD	0.001	0.002	0.005	0.047	0.086	0.168	0.285
CV	7.14%	4.44%	2.58%	4.99%	4.71%	6.17%	5.33%

[0124] 由表5数据可知,CK-MB的灵敏度可达0.5ng/mI,检测上限可达100ng/mI。本发明CK-MB检测性能均优于胶体金层析法,同化学发光法试剂性能相近,体现出时间分辨荧光免疫层析法的优势。

[0125] (4)制作ID卡

[0126] 以标准品CK-MB浓度值为横坐标,各浓度的系统检测信号平均值为纵坐标,绘制标准品曲线,具体如图4所示,烧录ID卡,并导入配套仪器中。

[0127] 3、精密度检测

[0128] 用步骤2中的测试方法,测试CK-MB的标准品(浓度为10和50ng/mI),每个标准品重复检测十次,具体检测数值如下表6所示。

[0129] 表6精密度测试结果表

[0130]

序号	CKMB 标准品 (ng/ml)	
	10	50
1	10.78	49.67
2	11.38	53.15
3	11.13	52.53
4	11.06	51.58
5	10.86	51.12
6	11.70	49.52
7	11.35	47.98
8	11.45	50.28
9	10.93	51.76
10	11.22	51.43
mean	11.19	50.9
SD	0.31	1.55
CV	2.8%	3.0%

[0131] 如表6数据可知,采用本发明的CK-MB检测试纸条,CK-MB的误差小于10%,完全符合POCT产品误差小于15%的要求。

[0132] 4、临床样本的相关性检测

[0133] 用步骤2中的测试方法,选取40例国外化学发光法检测CK-MB的临床样本(样本浓度覆盖标准品的检测范围),采用本发明的CK-MB试剂进行检测。以化学发光法检测的CK-MB浓度为横坐标,以本发明CK-MB浓度为纵坐标,绘制样本相关性曲线,如图7。其中,CK-MB的相关性系数R均大于0.95,完全符合临床试验的要求。

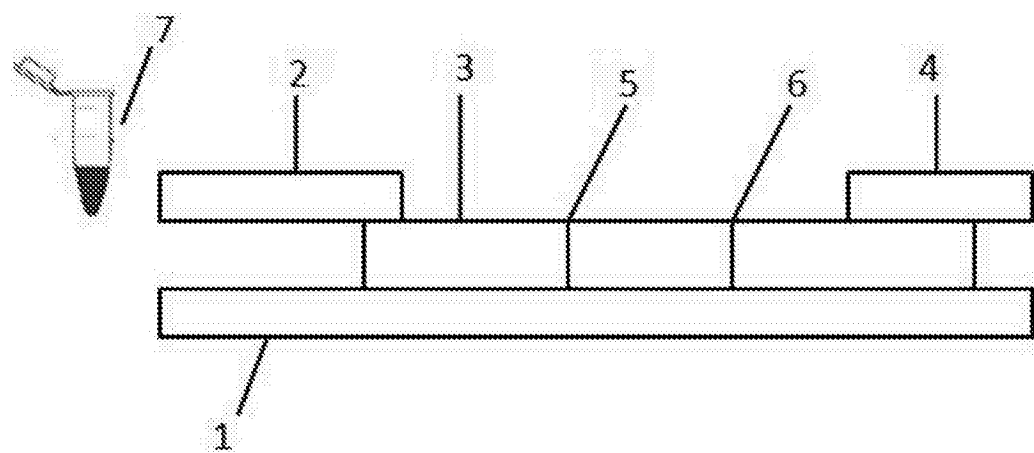


图1

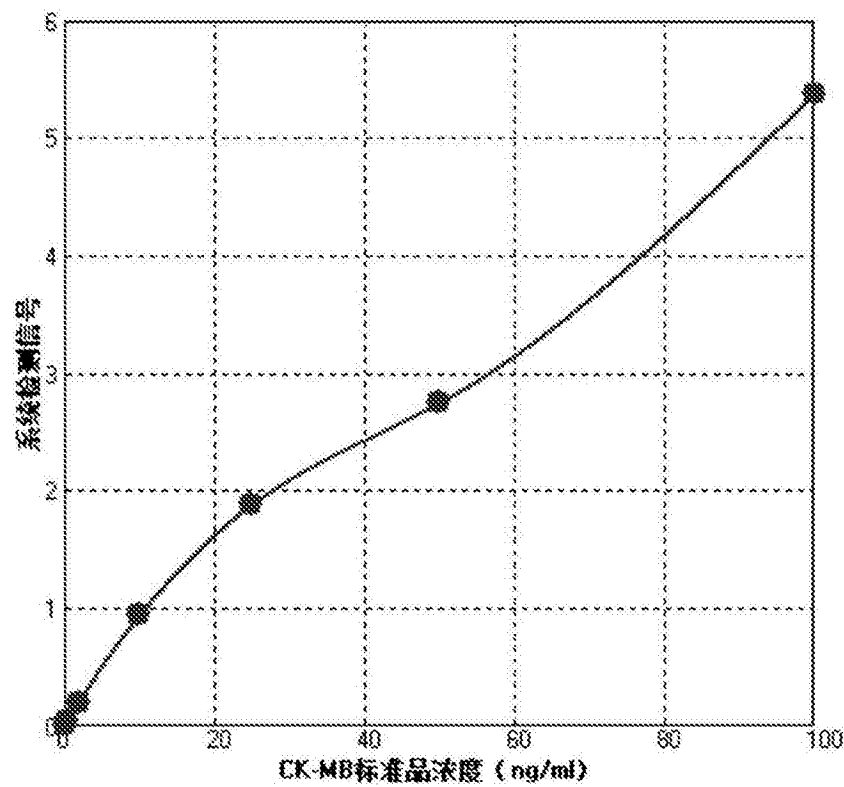


图2

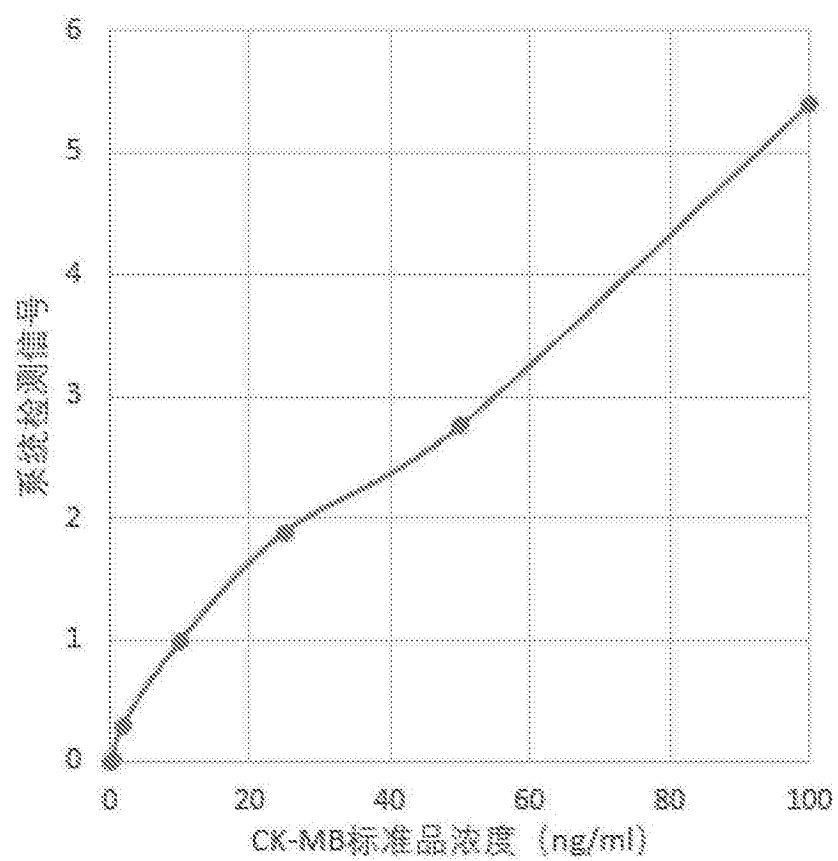


图3

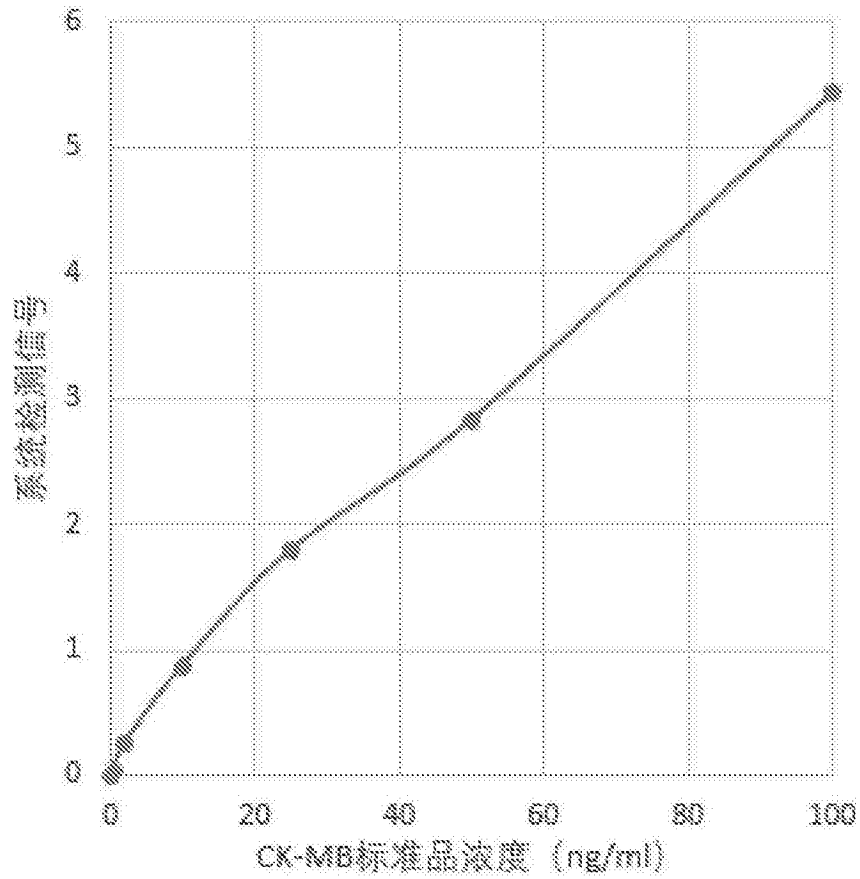


图4

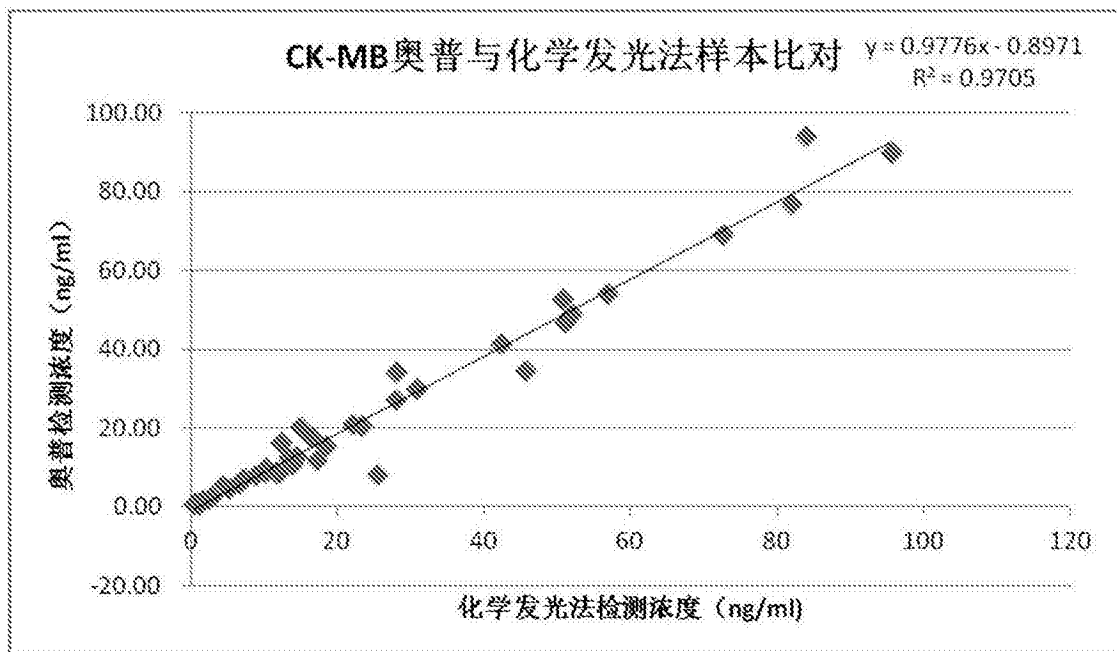


图5

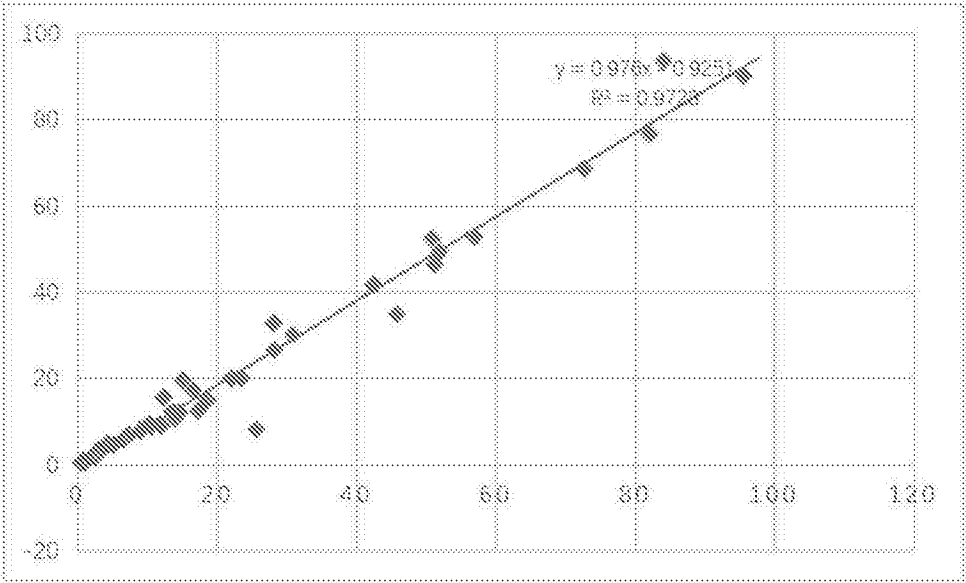


图6

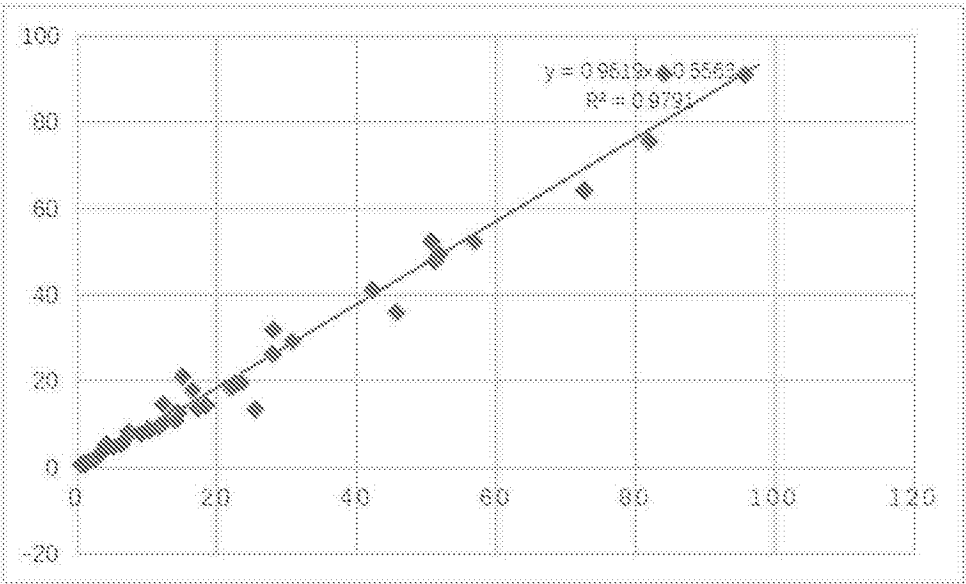


图7

专利名称(译)	一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN106248927A	公开(公告)日	2016-12-21
申请号	CN201610575106.3	申请日	2016-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
[标]发明人	朱传增 石晓强 安永君 李福刚 徐建新		
发明人	朱传增 石晓强 安永君 李福刚 徐建新		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/558 G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/54313		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种快速定量检测CK-MB的时间分辨荧光免疫层析试剂及其制备方法，属于临床医学诊断领域。该试剂由试纸条和荧光液两部分组成。其中，试纸条包括底板、Fusion5、硝酸纤维素膜和吸水垫；所述Fusion5、硝酸纤维素膜和吸水垫水平方向顺序连接固定于底板上。所述硝酸纤维素膜上包被有CK-MB单克隆抗体1的检测线和兔IgG抗体构成的质控线。荧光液包含CK-MB单克隆抗体2标记的荧光微球、羊抗兔抗体标记的荧光微球。本发明利用时间分辨荧光微球提高荧光强度，降低背景信号，同时定量检测全血、血清或血浆中的CK-MB含量，样本仅需要10~20微升。该试纸条具有方便快捷、操作简单、检测时间短、特异性强、灵敏度高、检测结果更加准确，适用于临床POCT的快速诊断。

