



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106248958 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(21)申请号 201610575514.9

(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 朱奇朗 石晓强 朱传增 张蕾

张珂 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 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

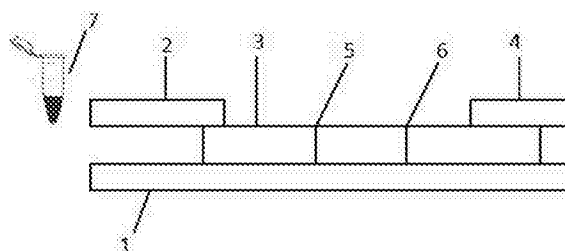
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂及制备方法

(57)摘要

本发明公开一种定量检测cTnI的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cTnI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cTnI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cTnI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. 一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,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cTnI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cTnI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所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,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所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,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所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,其特征在于:所述cTnI单克隆抗体1选自9701 85~95单克隆抗体、MF4 190~196单克隆抗体中的一种;

所述cTnI单克隆抗体2选自M18 18~28单克隆抗体、19C7 41~49单克隆抗体中的一种。

5. 根据权利要求1所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,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。

6. 根据权利要求5所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,其特征在于:所述的镧系元素为铈、钐、钕、镨中的一种。

7. 根据权利要求1所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,其特征在于,所述的荧光液的制备步骤如下:

(1)cTnI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100-300 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、20000-25000rpm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、20000-25000rpm离心,将时间分辨荧光微球用硼酸缓冲液复溶,随后加入cTnI抗体进行反应1h,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、20000-25000rpm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%,cTnI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 $^{\circ}$ C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cTnI抗体、羊抗兔包被的荧光微球分别进行稀释,其中,cTnI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。

8. 根据权利要求6所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,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0.5%。

9. 一种制备权利要求1所述的定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂的方法,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cTnI抗体使用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,即得到所述定量检测cTnI的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

一种定量检测cTnI的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,具体涉及一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂及制备方法。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白(cardiac troponin,cTn)是心肌肌肉收缩的调节蛋白。cTn是由三种不同基因的亚基组成:心肌肌钙蛋白T(cTnT)、心肌肌钙蛋白I(cTn I)和肌钙蛋白C(TnC)1.2。目前,用于ACS实验室诊断的是cTnT和cTnI。

[0003] TnI(肌钙蛋白I)存在三种亚型:骨骼肌肌钙蛋白I(sTnI)中存在快骨骼肌型和慢骨骼肌型,它们具有相似的分子量(20KD),但二者之间的氨基酸序列约存在40%的差异;第三种为心肌型。心肌肌钙蛋白I(cTnI)与骨骼肌型的氨基酸序列也存在40%的差异。但人的cTnI氨基末端比sTnI多31个氨基酸,使其分子量达到22KD,这种独特的顺序使之具有较高的心肌特异性,有助于制备相应的单克隆。cTn是以cTnI-C-T复合物和游离cTnI形式存在于心肌细胞中,心肌损伤时释放到血循环中后,cTnI-C-T可进一步分解为cTnI-C复合物和游离cTnI。故血循环中除cTnI-C-T、游离cTnI外还有cTnI-C,而且cTnI-C是其在血液中的主要形式。其代谢产物由肾脏排出体外。

[0004] 测定心肌功能障碍标志物被作为诊断急性心肌梗塞(AMI:acute myocardial infarction)的标准手法,特别是心电图未发现异常时,可作为对有助于诊断的手法。据报告,cTnI浓度的上升,对诊断AMI、心脏挫伤、不稳定型心绞痛病人的心肌特异性障碍非常有用。AMI时,cTnI会在4-8小时内从损伤的心肌细胞释放到血液中,并超出正常浓度范围。通常,AMI发病12-18小时后,达到最高浓度,在5-10天内维持高值3.4。

[0005] 对于AMI病人,cTnI浓度随着时间变化的增减,类似于CKMBmass(总肌酸激酶MB异构体量)。发病初期的浓度上升,虽然比CK-MB迟,但在美国心脏病学会和美国心脏协会的最近指南5.6显示,由于对心肌的高特异性和诊断效率等原因,cTnI对检测心肌功能障碍,具有较高的应用价值。cTnI作为一种新的诊断标志物被应用于AMI的临床诊断,特别是对那些没有心电图诊断的患者更加重要7.8。

[0006] 中国专利申请号201510070592.9披露了一种肌钙蛋白I超敏检测试剂盒及超敏检测方法,该申请号专利利用磁性微球标记不同目标物的抗体,实现肌钙蛋白I超敏检测。该申请号专利需要100 μ L的样本测试,而且最高只能到50ng/mL,特别是对于样本量少的和严重的心梗患者,该专利的测试还不能达到要求。

[0007] 中国专利申请号201110440258.X公布了一种胶乳增强免疫比浊法测试心肌肌钙蛋白T的超敏感方法。该申请号专利采用聚苯乙烯胶乳颗粒作为标记物,该方法需要大量的抗体原料,大大提高了抗体的用量和试剂的成本。此外,该方法还是需要25 μ L的样本测试,而且最高仅仅能达到10ng/mL。

[0008] 中国专利申请号201420648352.3披露了一种利用量子点标记测试肌钙蛋白I超敏检测试剂盒,该申请号专利利用量子点标记不同目标物的抗体,实现肌钙蛋白I超敏检测。

该申请号专最高也只能到20ng/ml,特别是对严重的心梗患者,该专利的测试还不能达到要求。

[0009] 现有的cTnI检测方法主要有酶联免疫法(ELISA),化学发光法和酶联荧光分析法。ELISA方法测定周期长;化学发光法和酶联荧光分析法价格昂贵,需有专门仪器和专业人员操作,只适用于中心实验室使用,检测结果到达医生手中的时间较长,不能满足临床快速检测需要,也不适合于中小医院尤其是没有中心实验室的乡镇医院。

[0010] 胶乳增强免疫比浊法操作简单,但一般可以采用物理吸附法和化学偶联法,物理吸附法稳定性较化学偶联法要差,易受到类风湿性因子(RF)和嗜异性抗体的干扰,导致检测结果假阳性或假性升高。两种偶联方法将导致抗体结合力的损失,增加了抗体用量和生产成本。

[0011] 胶体金免疫层析法标本用量少,简便快速,适合于cTnI的床旁检测。但胶体金免疫层析法仅能进行定性测定,对于定量测定则灵敏度很差。基于胶体金免疫层析法开发的检测卡,虽然可快速完成cTnI定性检测,但同样由于灵敏度较低的问题,在AMI早期,血清中仅含有少量cTnI的情况下,胶体金免疫层析法无法准确诊断出AMI的发作,所以在临床应用上还是有很大的局限性。

[0012] 现在的有些试剂的检测范围太窄,不能达到临床检验的目的。

[0013] CN201510012347.2需要10 μ L的样本,但需要有样本的稀释过程,操作繁琐。而现在的有很多的测试方法CN201410561126.6需要100 μ L的全血样本。因为全血样本中含有很多的干扰物质,随着检测样本全血量的增加,干扰因素也会逐渐提高。所以在检测全血样本时,降低全血样本所需要的量变的越来越重要。

发明内容

[0014] 本发明的目的是提一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂,该试剂能在较短的检测时间内完成cTnI的检测,检测时间短,检测灵敏度高。

[0015] 本发明还提供了定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂的制备方法。

[0016] 一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂由试纸条和荧光液两部分组成。

[0017] 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)。

[0018] 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。

[0019] 所述硝酸纤维素膜(3)上包被有cTnI单克隆抗体1(5)、的检测线和兔IgG抗体(6)构成的质控线。

[0020] 所述的荧光液(7)包含cTnI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。

[0021] 所述的时间分辨荧光微球选自修饰过的聚苯乙烯微球。

[0022] 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。

[0023] 所述cTnI单克隆抗体1选自9701 85~95单克隆抗体、MF4 190~196单克隆抗体中的一种;

[0024] 所述cTnI单克隆抗体2选自M18 18~28单克隆抗体、19C7 41~49单克隆抗体中的

一种。

[0025] 所述的时间分辨荧光微球内部填充镧系元素的螯合物。

[0026] 所述的镧系元素为铈、钐、钕、镨中的一种。

[0027] 优选的,所述镧系元素为铈。

[0028] 所述的荧光液的配制方法如下:

[0029] (1)cTnI单克隆抗体2标记时间分辨荧光微球的制备及稀释:

[0030] 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%;随后加入氨基己酸,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、20000-25000rpm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、20000-25000rpm离心,将时间分辨荧光微球用硼酸缓冲液复溶,随后加入cTnI单克隆抗体2进行反应1h,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、20000-25000rpm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%,cTnI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 $^{\circ}$ C避光保存;荧光微粒活化过程中添加氨基己酸作为手臂,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。

[0031] (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;

[0032] (3)滴配:

[0033] 用pH为8.0、200mmol/L的Tris缓冲液将步骤(1)和(2)中同等量的cTnI、羊抗兔包被的荧光微球分别进行稀释,其中,cTnI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。

[0034] 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;

[0035] 优选的,微球与抗体的包被比例为:10mg:0.01mg~2.0mg;

[0036] 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0.5%。

[0037] 一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂及制备方法,包括如下步骤:

[0038] (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cTnI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 $^{\circ}$ C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;

[0039] (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。

[0040] 优选的,检测线和质控线抗体的划膜浓度为0.5~2mg/ml;

[0041] 优选的,检测线和质控线抗体的划膜喷量为0.5~2.0 μ l/cm;

[0042] 以上快速定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂的检测方法,其步骤包括:

[0043] (1)标准曲线的绘制:取10~20 μ I的cTnI标准品与80~500 μ I的荧光混合液(cTnI、羊抗兔荧光液)混合,取混合液70~100 μ I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;

[0044] (2)待测样品的检测,分别取10~20 μ I的待测样品与80~500 μ I的荧光混合液(cTnI、羊抗兔荧光液)混合,取混合液70~100 μ I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cTnI的浓度值。

[0045] 所述(1)中,cTnI标准品的浓度分别为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/ml。

[0046] 本发明的有益效果是:

[0047] 1、本发明所采用的检测方法应该具有样品的用量少(10~20 μ L)能够有效的排除全血样本的干扰。检测范围宽、操作简单、适用范围广、精确度高生产成本低等特点。

[0048] 2、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。

[0049] 3、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。

[0050] 4、本发明试剂盒中采用结构稳定、能被多数抗体识别的人源的I-T-C复合物作为校准品配制材料,进一步提高了试剂的检测性能。

附图说明

[0051] 图1是本发明快速定量检测cTnI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):

[0052] 图2是本发明(实施例1)cTnI的标准品曲线;

[0053] 图3是本发明(实施例2)cTnI的标准品曲线;

[0054] 图4是本发明(实施例3)cTnI的标准品曲线;

[0055] 图5是本发明(实施例1)与化学发光法cTnI的相关性曲线;

[0056] 图6是本发明(实施例2)与化学发光法cTnI的相关性曲线;

[0057] 图7是本发明(实施例3)与化学发光法cTnI的相关性曲线;

具体实施方式

[0058] 下面结合实施例,对本发明作进一步说明:

[0059] 以下实施例中cTnI单克隆抗体1选自9701 85~95单克隆抗体;

[0060] 所述cTnI单克隆抗体2选自M18 18~28单克隆抗体。

[0061] 实施例1

[0062] 1、cTnI的荧光免疫层析试纸条的制备:

[0063] (1)检测线(T)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释cTnI单克隆抗体1至0.5mg/ml;

[0064] (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/

mI;

[0065] 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(cTnI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。

[0066] 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 L/cm。

[0067] 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。

[0068] 2、cTnI的荧光免疫层析试纸条的检测

[0069] (1)制备cTnI、羊抗兔时间分辨荧光微球

[0070] 将100mg时间分辨荧光微球(粒径为200nm左右)溶于30mL pH为6.0的100mmol/L MES缓冲液中,加入10mg NHS和EDC活化15分钟;洗涤、25000rpm离心,随后加入10mL 50mmol/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%-0.1%,NHS的终浓度为0.1%-0.2%;再次洗涤、25000rpm离心,加入10mL pH为8.5的60mmol/L 硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球完全溶解,随后加入5mg cTnI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、25000rpm离心,再次用pH为9的60mmol/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%,cTnI抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在5 μ g/mL,4℃避光保存。

[0071] 羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备过程同cTnI制备微球的过程相同。

[0072] (2)滴配

[0073] 用pH为8.0、200mmol/L的Tris缓冲液将步骤(1)中的cTnI、羊抗兔包被的荧光微球各0.1mL进行稀释。其中,cTnI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。

[0074] (3)标准曲线的绘制

[0075] 用小牛血清稀释cTnI标准品,浓度为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/mL。分别取10 μ L混合标准品与80 μ L荧光混合液混合,再取80 μ L混合液滴加在实施例1中的cTnI时间分辨荧光免疫层析试纸条上,反应15分钟后,通过与cTnI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。

[0076] (4)制作ID卡

[0077] 以标准品cTnI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。

[0078] 3、最低检出限的测试

[0079] 以空白作样品对试剂盒进行测试,重复测试10次,计算空白响应量的均值(X1)和空白响应量的标准差(SD)。

[0080] $X1(\text{空白响应量的均值})+2SD(\text{空白响应量标准差})\leq X2(0.1\text{ng/mL响应量的均值})$ 为合格。

[0081] 计算公式:空白响应量的均值 $X1=(x1+x2\cdots)/n$

[0082] 说明:

$$SD(\text{标准偏差}) = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$
 为测试数据的平均值。

[0083] 测试结果如表1。

[0084] 表1测试结果1

[0085]

n	结果
1	0.039
2	0.038
3	0.041
4	0.042
5	0.039
6	0.038
7	0.039
8	0.037
9	0.036
10	0.041
X1	0.039
SD	0.002
X1+2SD	0.041

[0086] 由表1数据,将均值+2SD带入标准曲线,得到的结果 $\leq 0.1\text{ng/mL}$ 响应量的均值。

[0087] 4、临床样本的相关性检测

[0088] 按照贝克曼库尔特有限公司的肌肌钙蛋白I测定试剂盒(化学发光法)的参数对血清样本进行测试。

[0089] 按照步骤2中的参数对血清样本进行测试,检测结果与贝克曼库尔特有限公司的肌肌钙蛋白I测定试剂盒(化学发光法)检测结果进行比对,以化学发光法检测的cTnI浓度为横坐标,本发明检测cTnI浓度为纵坐标,绘制样本相关性曲线,如图5,cTnI的相关性相关性系数R大于0.95,完全符合临床试验的要求。

[0090] 实施例2

[0091] 1、cTnI的荧光免疫层析试纸条的制备

[0092] (1)检测线(T)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释cTnI单克隆抗体1至1mg/mL;

[0093] (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;

[0094] 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(cTnI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。

[0095] 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 I/cm。

[0096] 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。

[0097] 2、cTnI的荧光免疫层析试纸条的检测

[0098] (1)制备cTnI、羊抗兔时间分辨荧光微球

[0099] 将100mg时间分辨荧光微球(粒径为200nm左右)溶于20ml pH为6.0的100mmol/L MES缓冲液中,加入5mgNHS和EDC活化15分钟;洗涤、25000rpm离心,随后加入5ml 50mmol/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、25000rpm离心,加入10ml pH为8.5的60mmol/L 硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球完全溶解,随后加入1mg cTnI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、25000rpm离心,再次用pH为8.5的60mmol/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%,cTnI抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在5 μ g/ml,4℃避光保存。

[0100] 羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备过程同cTnI制备微球的过程相同。

[0101] (2)滴配

[0102] 用pH为8.0、200mmol/L的Tris缓冲液将步骤(1)中的cTnI、羊抗兔包被的荧光微球各0.1ml进行稀释。其中,cTnI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,混合后即为其所需要的荧光混合液。

[0103] (3)标准曲线的绘制

[0104] 用小牛血清稀释cTnI标准品,浓度为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/ml。分别取10 μ I混合标准品与80 μ I荧光混合液混合,再取80 μ I混合液滴加在实施例2中的cTnI时间分辨荧光免疫层析试纸条上,反应15分钟后,通过与cTnI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。

[0105] (4)制作ID卡

[0106] 以标准品cTnI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。

[0107] 3、最低检出限的测试

[0108] 测试方法同实施例1。测试结果如表2。

[0109] 表2测试结果2

[0110]

n	结果
1	0.038
2	0.039
3	0.036
4	0.038
5	0.038
6	0.040

7	0.036
8	0.042
9	0.037
10	0.041
X1	0.039
SD	0.002
X1+2SD	0.041

[0111] 由表2数据,将均值+2SD带入标准曲线,得到的结果 $\leq 0.1\text{ng/mL}$ 响应量的均值。

[0112] 4、临床样本的相关性检测

[0113] 按照贝克曼库尔特有限公司的肌钙蛋白I测定试剂盒(化学发光法)的参数对血清样本进行测试。

[0114] 按照步骤2中的参数对血清样本进行测试,检测结果与贝克曼库尔特有限公司的肌钙蛋白I测定试剂盒(化学发光法)检测结果进行比对,以化学发光法检测的cTnI浓度为横坐标,本发明检测cTnI浓度为纵坐标,绘制样本相关性曲线,如图6,cTnI的相关性相关性系数R大于0.95,完全符合临床试验的要求。

[0115] 实施例3

[0116] 1、cTnI的荧光免疫层析试纸条的制备

[0117] (1)检测线(T)溶液的制备:用50mmol/L的柠檬酸盐溶液稀释cTnI单克隆抗体1至2mg/mL;

[0118] (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;

[0119] 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(cTnI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。

[0120] 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 $2.0\mu\text{L/cm}$ 。

[0121] 将喷好的大卡置于 37°C 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。

[0122] 2、cTnI的荧光免疫层析试纸条的检测

[0123] (1)制备cTnI、羊抗兔时间分辨荧光微球

[0124] 将100mg时间分辨荧光微球(粒径为200nm左右)溶于10mL pH为6.0的100mmol/L MES缓冲液中,加入10mg NHS和EDC活化15分钟;洗涤、25000rpm离心,随后加入5mL 50mmol/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、25000rpm离心,加入10mL pH为8.5的60mmol/L 硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球完全溶解,随后加入5mg cTnI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、25000rpm离心,再次用pH为9的60mmol/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%,cTnI抗体标记时间分辨荧光微球终浓度在 $5\mu\text{g/mL}$, 4°C 避光保

存。

[0125] 羊抗兔抗体标记的荧光微球的制备过程同cTnI制备微球的过程相同。

[0126] (2)滴配

[0127] 用pH为8.0、200mmol/L的Tris缓冲液将步骤(1)中的cTnI、羊抗兔包被的荧光微球各0.1mL进行稀释。其中,cTnI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。

[0128] (3)标准曲线的绘制

[0129] 用小牛血清稀释cTnI标准品,浓度为:0、0.5、2.0、10.0、25.0、50.0、100.0ng/mL。分别取10 μ L混合标准品与80 μ L荧光混合液混合,再取80 μ L混合液滴加在实施例3中的cTnI时间分辨荧光免疫层析试纸条上,反应15分钟后,通过与cTnI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。

[0130] (4)制作ID卡

[0131] 以标准品cTnI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。

[0132] 3、最低检出限的测试

[0133] 测试方法同实施例1。测试结果如表3。

[0134] 表3测试结果3

[0135]

n	结果
1	0.039
2	0.036
3	0.040
4	0.038
5	0.037
6	0.036
7	0.041
8	0.039
9	0.038
10	0.038
X1	0.038
SD	0.002
X1+2SD	0.040

[0136] 由表3数据,将均值+2SD带入标准曲线,得到的结果 ≤ 0.1 ng/mL响应量的均值。

[0137] 4、临床样本的相关性检测

[0138] 按照贝克曼库尔特有限公司的肌钙蛋白I测定试剂盒(化学发光法)的参数对血清样本进行测试。

[0139] 按照步骤2中的参数对血清样本进行测试,检测结果与贝克曼库尔特有限公司的肌钙蛋白I测定试剂盒(化学发光法)检测结果进行比对,以化学发光法检测的cTnI浓度为横坐标,本发明检测cTnI浓度为纵坐标,绘制样本相关性曲线,如图7,cTnI的相关性相关

性系数R大于0.95,完全符合临床试验的要求。

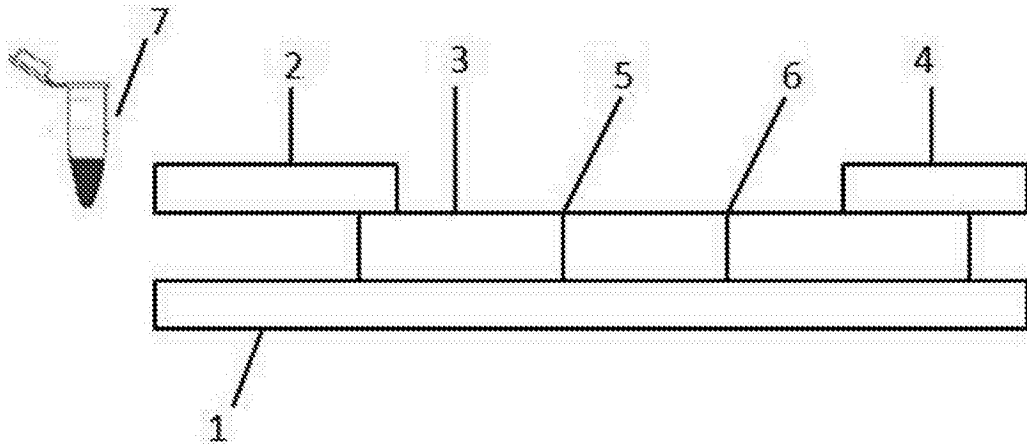


图1

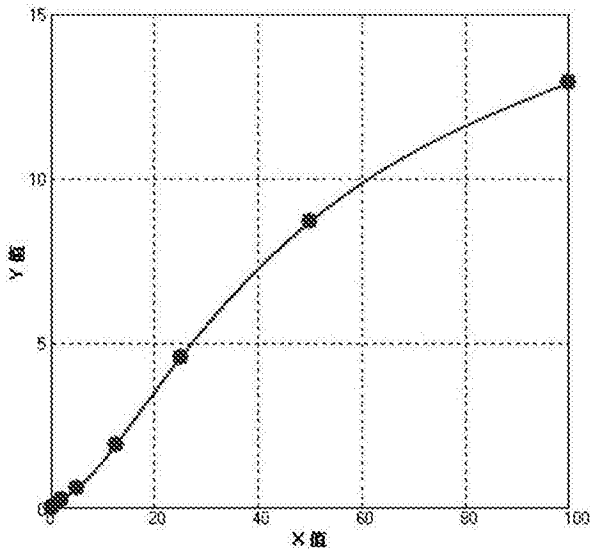


图2

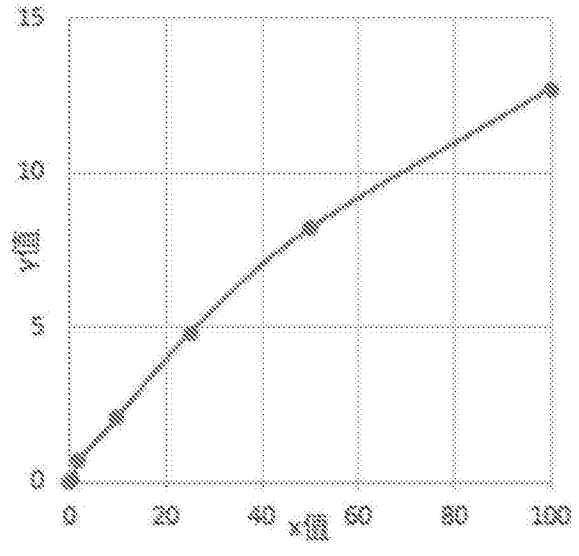


图3

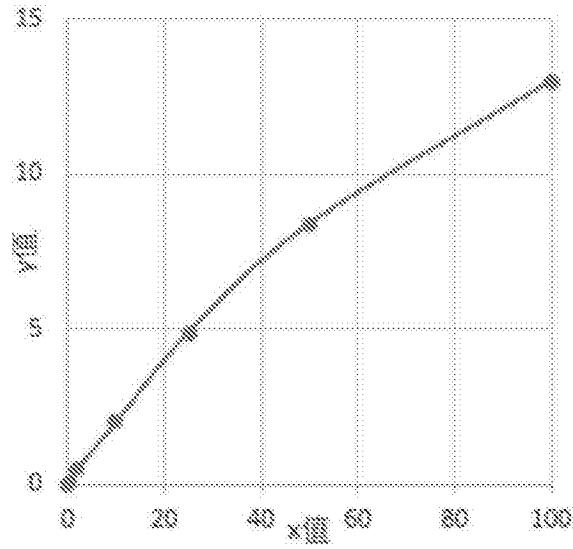


图4

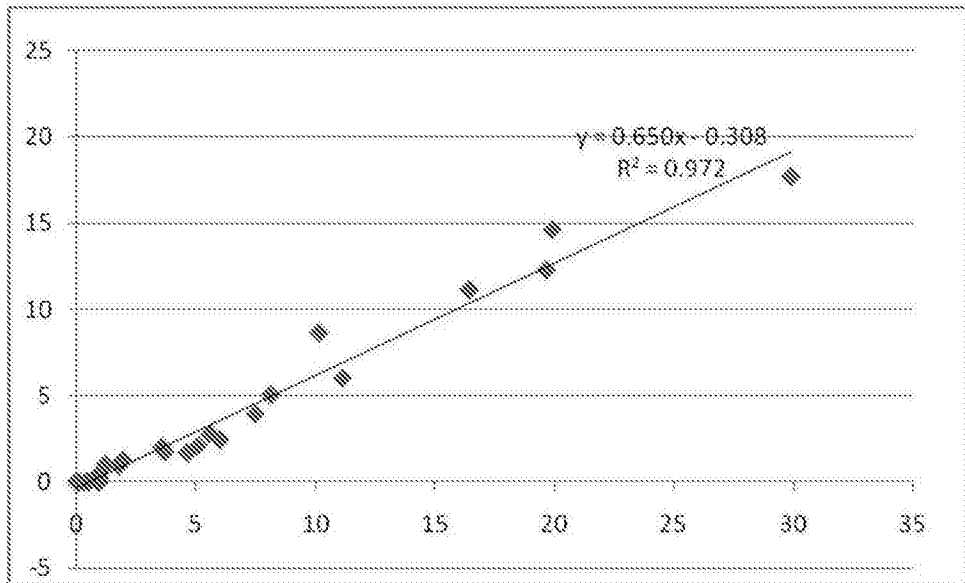


图5

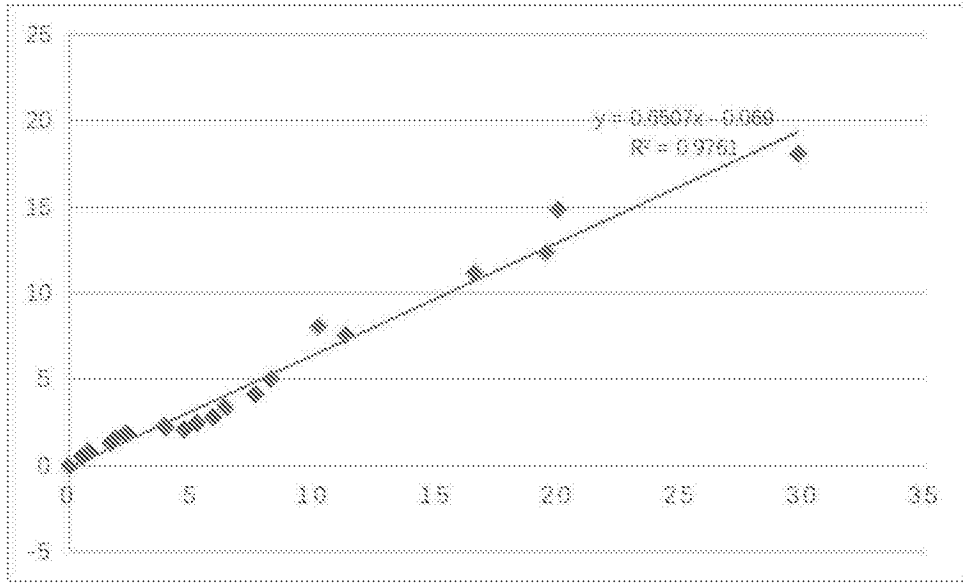


图6

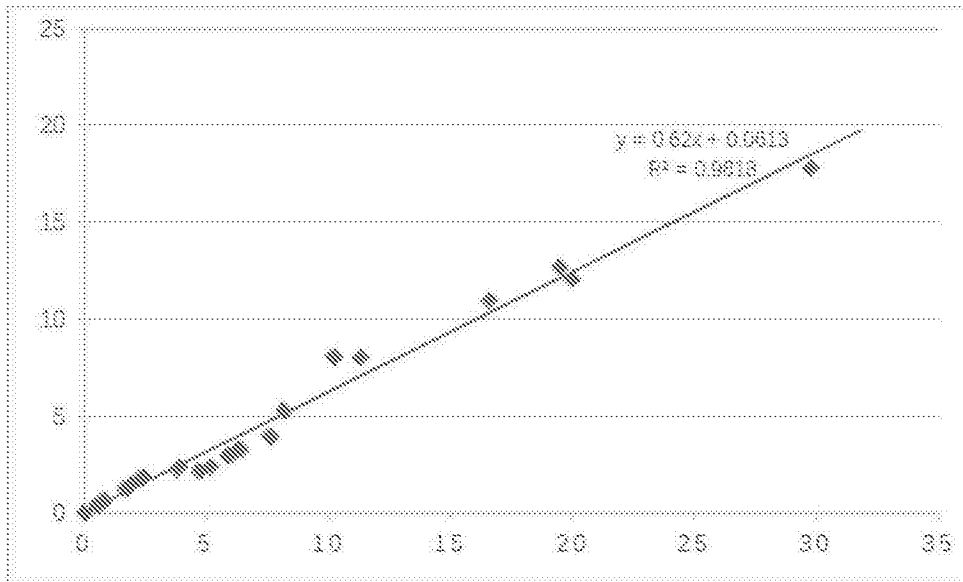


图7

专利名称(译)	一种定量检测cTnI的荧光免疫层析试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN106248958A	公开(公告)日	2016-12-21
申请号	CN201610575514.9	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	朱奇朗 石晓强 朱传增 张蕾 张珂 李福刚 徐建新		
发明人	朱奇朗 石晓强 朱传增 张蕾 张珂 李福刚 徐建新		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2800/324 G01N2800/325		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种定量检测cTnI的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cTnI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cTnI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cTnI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。

