



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687301 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201911032652.2

(22)申请日 2019.10.28

(71)申请人 河北精硕生物科技有限公司
地址 050000 河北省石家庄市经济技术开
发区丰产路9号博云科技园1幢3层

(72)发明人 陈庆全 李伟甲

(74)专利代理机构 石家庄科诚专利事务所(普
通合伙) 13113

代理人 刘丽丽 刘谟培

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

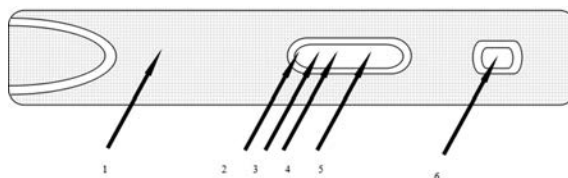
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡,包括盒体和设置在盒体内的试剂条,试剂条包括衬片,衬片上设有免疫硝酸纤维素膜,免疫硝酸纤维素膜的一端衔接有免疫荧光材料释放垫、另一端衔接有吸水纸;免疫荧光材料释放垫包被有TNF α 单克隆抗体;免疫硝酸纤维素膜上设有TNF α 检测线和质控线,TNF α 检测线位于质控线与免疫荧光材料释放垫之间;盒体上开设有加样孔和观察窗。本发明还公开了定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂盒的制备方法。本发明采用干式荧光免疫层析技术及双抗体夹心法原理检测样本中肿瘤坏死因子 α 的浓度,可以有效的排除非特异性荧光的干扰,提高分析灵敏度和定量测定的准确性,适用于肿瘤坏死因子 α 的检测技术领域。



1. 一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡,包括盒体和设置在盒体内的试剂条,其特征在于:所述试剂条包括衬片,所述衬片上设有免疫硝酸纤维素膜,免疫硝酸纤维素膜的一端衔接有免疫荧光材料释放垫、另一端衔接有吸水纸;

所述免疫荧光材料释放垫包被有荧光标记的TNF α 单克隆抗体;

所述免疫硝酸纤维素膜上设有一条包被有TNF α 单克隆抗体的TNF α 检测线、一条包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体的质控线,所述TNF α 检测线位于质控线与免疫荧光材料释放垫之间;

于所述盒体上对应于免疫荧光材料释放垫的位置开设有加样孔、对应于TNF α 检测线和质控线的位置开设有观察窗。

2. 根据权利要求1所述的一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡,其特征在于:所述抗TNF单克隆抗体为鼠源或兔源抗体;

所述多克隆抗体为兔源、鼠源、鸡源和马源抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡,其特征在于:免疫荧光材料释放垫包被的TNF α 单克隆抗体采用Eu的荧光微球标记。

4. 一种权利要求1-3任意一项所述的定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法,其特征在于:包括依次进行的以下步骤,

一、制备免疫荧光材料释放垫

用荧光材料标记抗TNF α 单克隆抗体-1,制备免疫荧光材料标记的抗TNF α 单克隆抗体-1溶液,调整到规定浓度范围后喷在释放垫上,干燥;

二、制备免疫硝酸纤维素膜

使用抗TNF α 单克隆抗体-2溶液在硝酸纤维素膜上划线制备TNF α 检测线、使用羊抗鼠IgG溶液在硝酸纤维素膜上划线制备质控线,干燥;

三、贴膜

将免疫荧光材料释放垫、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在衬片上,组成试剂条;

四、包装

将干燥好的试剂条装进准备好的盒体内,即获得所述定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡。

5. 根据权利要求4所述的定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法,其特征在于:所述步骤四结束后,将定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡和干燥剂装入铝箔袋、密封,包装。

6. 根据权利要求4或5所述的定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法,其特征在于:所述步骤一按照以下步骤顺序进行,

一) 在荧光材料中加入标记缓冲液,将荧光材料稀释至0.2-0.3%,获得溶液A;

其中,荧光材料的量=批量体积 \times 目标荧光材料浓度0.25% \div 原始荧光材料浓度1%,加入标记缓冲液的量=批量体积-荧光材料体积;

二) 将溶液A于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,将沉淀用标记缓冲液复溶,超声,然后于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,加入标记缓冲液,超声,获得溶液B;

三) 将浓度为0.01-0.03mL/mL的EDC溶液和浓度为0.08-0.2mL/mL的NHS溶液加入至溶液B中,均匀混合0.5-1.5小时,获得溶液C;

其中,EDC溶液用量=批量体积 \times (0.01-0.03)mL/mL, NHS溶液用量=批量体积 \times (0.08-

0.2)mL/mL;

将溶液C于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,将沉淀用标记缓冲液复溶,超声,获得溶液D;

在溶液D中加入抗体,下搅拌2-4小时,获得溶液E;

其中,抗体用量=批量体积×目标抗体浓度0.1-0.3mg/mL÷抗体浓度

将溶液E于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,沉淀加入批量体积的TBS溶液,并超声混匀,搅拌3-5小时,获得溶液F;

将溶液F于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,将沉淀免疫材料用TBS复溶到批量体积,160-220W超声后,获得免疫荧光材料稀释溶液;

四)将所述免疫荧光材料稀释溶液以2.0-3.0 μ L/cm的参数喷涂到释放垫,然后在40-45 $^{\circ}$ C条件下干燥4-24小时,即获得免疫荧光材料释放垫;

批量体积是指免疫荧光材料稀释溶液的体积。

7.根据权利要求6所述的定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法,其特征在于:所述步骤二按照以下步骤顺序进行,

①质控线溶液配制

量取羊抗鼠IgG溶液,并用CT-S缓冲液稀释至终浓度为0.8-1.5mg/mL,于2~8 $^{\circ}$ C环境下保存,备用;

②TNF α 检测线溶液配制

量取抗TNF α 单克隆抗体-2,并用CT-S缓冲液稀释至终浓度为0.8-1.5mg/mL,于2~8 $^{\circ}$ C环境下保存,备用;

③将制备好的质控线溶液以2.0-3.0 μ L/cm的参数喷点到硝酸纤维素膜,制作出质控线,将制备好的TNF α 检测线溶液喷点到硝酸纤维素膜,制作出TNF α 检测线,然后将硝酸纤维素膜在40-45 $^{\circ}$ C条件下干燥4-24小时,即获得免疫硝酸纤维素膜。

8.根据权利要求7所述的定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法,其特征在于:所述步骤三按照以下步骤顺序进行,

I、将免疫硝酸纤维素膜贴在衬片中间位置;

II、将吸水纸贴衬片的吸水纸端,并向下盖在贴好的免疫硝酸纤维素膜上端,覆盖免疫硝酸纤维素膜1.5~2mm,压紧;

III、将免疫荧光材料释放垫贴在免疫硝酸纤维素膜下端,并覆盖免疫硝酸纤维素膜1.5~2mm,压紧。

一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种试剂卡,具体地说是一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子是一种具有广泛生物学活性的细胞因子。1985年Shalalby把巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子命名为肿瘤坏死因子 α ,研究表明肿瘤坏死因子 α 与细胞凋亡的关系密切,一些细胞表面有死亡受体,死亡受体感受细胞周期环境死亡信号,通过配体与受体的结合激发细胞内的凋亡机制。肿瘤坏死因子是一种17kDa的非糖基化蛋白,其生物学活性组成是三聚体形式。除了 α 肿瘤坏死因子这种可溶性成分外,在产生肿瘤坏死因子的细胞表面存在一种分子量为17kDa的膜结合成分,它作为 α 肿瘤坏死因子溶解池,并从细胞表面经蛋白水解分离出来。

[0003] 人TNF- α 前体由233个氨基酸组成(26 kDa),其中包含由76个氨基酸残基组成的信号肽,在TNF转化酶TACE的作用下,切除信号肽,形成成熟的157个氨基酸残基的TNF- α (17 kDa)。由于没有蛋氨酸残基,故不存在糖基化位点,其中第69位和101位两个半胱氨酸形成分子内二硫键。人类 TNF- α 与小鼠 TNF- α 有79%氨基酸组成同源性,TNF- α 的生物学作用似无明显的种属特异性。最近有人报道通过基因工程技术表达了N端少2个氨基酸(Val、Arg)的155氨基酸人TNF- α ,具有更好的生物学活性和抗肿瘤效应。此外,还有用基因工程方法,将TNF- α 分子氨基端7个氨基酸残基缺失,再将8Pro、9Ser和10Asp改为8Arg、9Lys和10Arg,或者再同时将157Leu改为157Phe,改构后的TNF- α 比天然TNF体外杀伤L929细胞的活性增加1000倍左右,在体内肿瘤出血坏死效应也明显增加。TNF- α 和 β 发挥生物学效应的天然形式是同源性的三聚体。

[0004] α 肿瘤坏死因子可由多种细胞产生,例如巨噬细胞,CD4+T细胞和自然杀伤细胞在脂多糖刺激后可产生 α 肿瘤坏死因子。另外,平滑肌细胞,分叶核嗜中性粒细胞,星形胶质细胞和大量肿瘤细胞都可产生 α 肿瘤坏死因子。 α 肿瘤坏死因子的作用通过细胞表面两种不同受体产生,这两种受体分别被称为 α 肿瘤坏死因子受体I(p55)和 α 肿瘤坏死因子受体II(p75)。除了红细胞之外,这些受体在几乎所有细胞类型表面都可被识别。 α 肿瘤坏死因子受体除了细胞结合成分,通常认为其溶解成分具有结合 α 肿瘤坏死因子的能力。

[0005] TNF α 参与多种免疫性炎症的发生和发展过程,是自身免疫病和全身性炎症反应综合征等主要介质;主要由单核巨噬细胞、中性粒细胞、NK细胞以及活化的T淋巴细胞等产生;TNF α 的生物学活性非常复杂,包括造血、免疫和炎症的调节,对血管和凝血的影响和对多种器官(肝、心脏、骨、软骨、肌肉和其他组织)的作用,能够增强细胞毒性T细胞的作用,增加MHC抗原的表达,引起白细胞增多和内皮细胞吸附性增强;此外,能够抑制多种肿瘤细胞和病毒感染细胞。正常情况下,血浆中有低水平的TNF α 存在,具有增强抗病毒、抗肿瘤、抗感染能力的作用。TNF α 在炎症反应、免疫系统的发展、细胞凋亡及脂质代谢中起着重要的作用,与许多疾病包括哮喘、克罗恩病、类风湿关节炎、神经性疼痛、肥胖症、糖尿病、自身

免疫性疾病及肿瘤等密切相关。但是TNF α 的异常不具有疾病特异性,对血清或体液中 TNF α 浓度的检测不能成为鉴别诊断疾病的特异指标,但可作为疾病病情变化、治疗效果以及预后判断的评价指标。

[0006] 肿瘤坏死因子 α 是一种重要促炎细胞因子,在急性卒中患者的脑脊液和血清中,24 h 内即可见肿瘤坏死因子 α 水平显著升高,大量的肿瘤坏死因子 α 可加重脑组织损伤且与病情严重程度呈正相关,在早期卒中引起的炎症中发挥重要作用。短暂性脑缺血小鼠模型显示,肿瘤坏死因子 α 可引起血脑屏障通透性增加,抗肿瘤坏死因子抗体可明显减轻血脑屏障损伤。肿瘤坏死因子 α 不仅对缺血组织具有损伤作用,对于移植的干细胞也能诱导损伤。肿瘤坏死因子 α 还可促进 NF- κ B 持续活化,诱导细胞凋亡。

[0007] TNF α 作为免疫学研究的重要生物学指标之一,涉及感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等多种疾病的发生机理、预后判断和临床治疗,因此建立简单易行的定量方法,准确测定不同样本中的TNF α 水平对临床研究均具有重要意义。

[0008] POCT试剂因操作简单、判读快速、成本低等优点,已广泛的应用于生殖、心脑血管系统、血液、感染类、内分泌类等疾病的快速检测。免疫层析方法由于干扰因素多一直不能进行准确的定量测定。而荧光免疫层析法,是利用材料标记抗原或抗体,可以有效的排除非特异性荧光的干扰,极大的提高了分析灵敏度,提高了定量测定的准确性,检验方法方便易行,检测灵敏度和准确度高、特异性强、能够同时快速检测大批样本,同时该方法耗时少,为临床患者节省了宝贵的时间。

[0009] 如果能够采用荧光免疫层析法检测肿瘤坏死因子 α ,将在 TNF- α 相关基础和临床研究中发挥重要价值。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡,该试剂卡采用荧光免疫层析技术及双抗体夹心法原理测定人血清、血浆、全血样本中的TNF α 含量。

[0011] 本发明的另外一个目的是提供上述定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法。

[0012] 本发明为实现上述目的,所采用的技术方案如下:

一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂盒卡,所述试剂条包括衬片,所述衬片上设有免疫硝酸纤维素膜,免疫硝酸纤维素膜的一端衔接有免疫荧光材料释放垫、另一端衔接有吸水纸;

所述免疫荧光材料释放垫包被有荧光标记的TNF α 单克隆抗体;

所述免疫硝酸纤维素膜上设有一条包被有TNF α 单克隆抗体的TNF α 检测线、一条包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体的质控线,所述TNF α 检测线位于质控线与免疫荧光材料释放垫之间;

于所述盒体上对应于免疫荧光材料释放垫的位置开设有加样孔、对应于TNF α 检测线和质控线的位置开设有观察窗。

[0013] 作为限定:所述抗TNF单克隆抗体为鼠源或兔源抗体;

所述多克隆抗体为兔源、鼠源、鸡源和马源抗体。

[0014] 作为第二种限定:免疫荧光材料释放垫包被的TNF α 单克隆抗体采用Eu的荧光微球标记。

[0015] 一种上述的定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法,包括依次进行的以下步骤,

一、制备免疫荧光材料释放垫

用荧光材料标记抗TNF α 单克隆抗体-1,制备免疫荧光材料标记的抗TNF α 单克隆抗体-1溶液,调整到规定浓度范围后喷在释放垫上,干燥;

二、制备免疫硝酸纤维素膜

使用抗TNF α 单克隆抗体-2溶液在硝酸纤维素膜上划线制备TNF α 检测线、使用羊抗鼠IgG溶液在硝酸纤维素膜上划线制备质控线,干燥;

三、贴膜

将免疫荧光材料释放垫、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在衬片上,组成试剂条;

四、包装

将干燥好的试剂条装进准备好的盒体内,即获得所述定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡。

[0016] 作为限定:所述步骤四结束后,将试剂卡和干燥剂装入铝箔袋、密封,包装。

[0017] 作为第二种限定:所述步骤一按照以下步骤顺序进行,

一)在荧光材料中加入标记缓冲液,将荧光材料稀释至0.2-0.3%,获得溶液A;

其中,荧光材料的量=批量体积 \times 目标荧光材料浓度0.25% \div 原始荧光材料浓度1%,加入标记缓冲液的量=批量体积-荧光材料体积;

二)将溶液A于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,将沉淀用标记缓冲液复溶,超声,然后于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,加入标记缓冲液,超声,获得溶液B;

三)将浓度为0.01-0.03mL/mL的EDC溶液和浓度为0.08-0.2mL/mL的NHS溶液加入至溶液B中,均匀混合0.5-1.5小时,获得溶液C;

其中,EDC溶液用量=批量体积 \times (0.01-0.03)mL/mL, NHS溶液用量=批量体积 \times (0.08-0.2)mL/mL;

将溶液C于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,将沉淀用标记缓冲液复溶,超声,获得溶液D;

在溶液D中加入抗体,搅拌2-4小时,获得溶液E;

其中,抗体用量=批量体积 \times 目标抗体浓度0.1-0.3mg/mL \div 抗体浓度

将溶液E于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,弃上清,沉淀加入批量体积的TBS溶液,并超声混匀,搅拌3-5小时,获得溶液F;

将溶液F于12000-13000rpm条件下离心10-20分钟,将沉淀免疫材料用TBS复溶到批量体积,160-220W超声后,获得免疫荧光材料稀释溶液;

四)将所述免疫荧光材料稀释溶液以2.0-3.0 μ L/cm的参数喷涂到释放垫,然后在40-45 $^{\circ}$ C条件下干燥4-24小时,即获得免疫荧光材料释放垫;

批量体积是指免疫荧光材料稀释溶液的体积。

[0018] 作为进一步限定:所述步骤二按照以下步骤顺序进行,

①质控线溶液配制

量取羊抗鼠IgG溶液,并用CT-S缓冲液稀释至终浓度为0.8-1.5mg/mL,于2~8 $^{\circ}$ C环境下

保存,备用;

②TNF α 检测线溶液配制

量取抗TNF α 单克隆抗体-2,并用CT-S缓冲液稀释至终浓度为0.8-1.5mg/mL,于2~8℃环境下保存,备用;

③将制备好的质控线溶液以2.0-3.0 μ L/cm的参数喷点到硝酸纤维素膜,制作出质控线,将制备好的TNF α 检测线溶液参数喷点到硝酸纤维素膜,制作出TNF α 检测线,然后将硝酸纤维素膜在40-45℃条件下干燥4-24小时,即获得免疫硝酸纤维素膜。

[0019] 作为更进一步限定:所述步骤三按照以下步骤顺序进行,

I、将免疫硝酸纤维素膜贴在衬片中间位置;

II、将吸水纸贴衬片的吸水纸端,并向下盖在贴好的免疫硝酸纤维素膜上端,覆盖免疫硝酸纤维素膜1.5~2mm,压紧。

[0020] III、将免疫荧光材料释放垫贴在免疫硝酸纤维素膜下端,并覆盖免疫硝酸纤维素膜1.5~2mm,压紧。

[0021] 本发明由于采用了上述的技术方案,其与现有技术相比,所取得的技术进步在于:

(1)本本发明提供的试剂卡,使用时检验方法方便易行,检测灵敏度和准确度高、特异性强,线性范围浓度内,回收率在85%~115%之间,线性:在(10~1000)pg/mL线性范围内,相关系数 $r \geq 0.990$,同时能够同时快速检测大批样本,耗时少,为临床患者节省了宝贵的时间;

(2)本发明提供的试剂卡,空白限不高于5pg/mL;

(3)本发明提供的试剂卡,重复性:在试剂卡的线性区间内,用低浓度和高浓度的TNF α 样本各重复检测10次,其变异系数 $CV \leq 15\%$;

(4)本发明中制作荧光材料用到的材料为包含稀土镧系元素中铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)中的任意一种或几种元素的物质的混合物;镧系离子螯合物的荧光衰变时间长,为传统荧光的103-106倍,例如:用荧光分析仪测量其荧光时,在脉冲光源激发之后,可以延迟一段时间再进行测量,此时其他成分的短半衰期荧光已经衰变,只存在Eu³⁺标记物的特异性荧光,通过测量免疫反应后试纸条检测带上Eu³⁺螯合物的含量,参照标准浓度曲线就可以定量得到待测样品中对应抗原的浓度;

(5)采用本发明提供的试剂卡,检测速度快,全程仅需10分钟,可以实现单个样品或大量样本的检测;灵敏度高,最低检测单位为pg/mL;特异性强,和其它炎症或免疫性疾病的标志物无交叉干扰;操作简捷,操作人员无需经过专业培训,按说明书即可完成操作,易于推广使用;检测样本范围广,全血、血清和 / 或血浆均可用作试验样本,所需试剂和样本量少,样本量最低可至50-100 μ L。

[0022] 本发明适用于肿瘤坏死因子 α 的检测技术领域。

附图说明

[0023] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。

[0024] 在附图中:

图1为本发明实施例1的结构示意图;

图2为本发明实施例1的试剂条的局部结构示意图。

[0025] 图中:1、盒体;2、观察窗;3、试剂条;31、衬片;32、免疫硝酸纤维素膜;33、免疫荧光材料释放垫;34、吸水纸;4、质控线;5、TNF α 检测线;6、加样孔。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明。应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0027] 实施例1 一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡

如图1和图2所示,本实施例包括盒体1和设置在盒体1内的试剂条3。试剂条3包括衬片31,衬片31上设有免疫硝酸纤维素膜32,免疫硝酸纤维素膜32的一端衔接有免疫荧光材料释放垫33、另一端衔接有吸水纸34。

[0028] 免疫荧光材料释放垫33包被有荧光标记的TNF α 单克隆抗体。免疫硝酸纤维素膜32上平行设有一条包被有TNF α 单克隆抗体的TNF α 检测线5、一条包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体的质控线4,TNF α 检测线5位于质控线4与免疫荧光材料释放垫33之间;

于盒体1上对应于免疫荧光材料释放垫33的位置开设有加样孔6、对应于TNF α 检测线5和质控线4的位置开设有观察窗2。

[0029] 其中,抗TNF单克隆抗体为鼠源或兔源抗体,多克隆抗体为兔源、鼠源、鸡源和马源抗体,免疫荧光材料释放垫33包被的TNF α 单克隆抗体采用Eu的荧光微球标记。

[0030] 本实施例中,盒体1和衬片31均采用塑料材质。

[0031] 本实施例的工作原理:本实施例采用干式荧光免疫层析技术及双抗体夹心法原理检测样本中肿瘤坏死因子 α 的浓度;检测时,将血样加入到检测卡的加样孔6中,样本中肿瘤坏死因子 α 和荧光标记抗肿瘤坏死因子 α 单克隆抗体发生免疫反应而形成免疫结合物,结合物层析至检测卡TNF α 检测线5时,被TNF α 检测线5的抗肿瘤坏死因子 α 单克隆抗体捕获,TNF α 检测线5处荧光信号强度与样品中肿瘤坏死因子 α 浓度正相关,因此,用适用的干式荧光仪器便可检测出样本中肿瘤坏死因子 α 的浓度。图2中的箭头方向代表实际使用时的层析方向。

[0032] 实施例2 一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法

本实施例用于制备实施例1,包括依次进行的以下步骤:

一、制备免疫荧光材料释放垫33

一)在荧光材料中加入标记缓冲液,将荧光材料稀释至VOL₁=0.25%,获得溶液A;

其中,荧光材料的量=批量体积 \times 目标荧光材料浓度0.25% \div 原始荧光材料浓度1%,加入标记缓冲液的量=批量体积-荧光材料体积;

二)将溶液A于n₁=12500rpm条件下离心t₁=15分钟,弃上清,将沉淀用标记缓冲液复溶,超声,然后于n₂=12500rpm条件下离心t₂=15分钟,弃上清,加入标记缓冲液,超声,获得溶液B;

三)将浓度为VOL₂=0.02mL/mL的EDC溶液和浓度为VOL₃=0.1mL/mL的NHS溶液加入至溶液B中,均匀混合t₃=1小时,获得溶液C;

其中,EDC溶液用量=批量体积 \times 0.02mL/mL,NHS溶液用量=批量体积 \times 0.1mL/mL;

将溶液C于n₃=12500rpm条件下离心t₄=15分钟,弃上清,将沉淀用标记缓冲液复溶,超

声,获得溶液D;

在溶液D中加入抗体,于室温下搅拌 $t_5=3$ 小时,获得溶液E;

其中,抗体用量=批量体积 \times 目标抗体浓度 $0.25\text{mg/mL} \div$ 抗体浓度

将溶液E于 $n_4=12500\text{rpm}$ 条件下离心 $t_6=15$ 分钟,弃上清,沉淀加入批量体积的TBS溶液,并超声混匀,于室温下搅拌 $t_7=4$ 小时,获得溶液F;

将溶液F于 $n_5=12500\text{rpm}$ 条件下离心 $t_8=15$ 分钟,将沉淀免疫材料用TBS溶液复溶到批量体积, $P=200\text{W}$ 超声后,获得免疫荧光材料稀释溶液;

四)将免疫荧光材料稀释溶液装入适用容器,连接好管路,操作仪器的驱动系统,设置好喷量系统参数为 $y_1=2.5\mu\text{L/cm}$,调整好喷头的位置,运行仪器,均匀喷涂上述制备好的免疫荧光材料稀释溶液到释放垫,然后在干燥箱内干燥,干燥箱温度 $T_1=42^\circ\text{C}$,干燥时间 $t_9=6$ 小时,即获得免疫荧光材料释放垫33;

二、制备免疫硝酸纤维素膜32

本步骤按照以下步骤顺序进行,

①质控线溶液配制

量取羊抗鼠IgG溶液,并用CT-S缓冲液稀释至终浓度为 $\rho_1=1.1\text{mg/mL}$,于 $T_2=2^\circ\text{C}$ 环境下保存,备用;

②TNF α 检测线溶液配制

量取抗TNF α 单克隆抗体-2,并用CT-S缓冲液稀释至终浓度为 $\rho_2=1.1\text{mg/mL}$,于 $T_3=2^\circ\text{C}$ 环境下保存,备用;

③将硝酸纤维素膜平放固定在点膜机的平台上,将上述制备好的质控线溶液、TNF α 检测线溶液装入适用容器,连接好管路,启动点膜机驱动系统,设置好系统参数,设置好喷量系统参数为 $y_2=1.0\mu\text{L/cm}$,调整好喷头的位置,运行仪器,连续喷点硝酸纤维素膜制作出质控线4、制作出TNF α 检测线5,然后将喷点好硝酸纤维素膜在干燥箱内干燥,干燥箱温度为 $T_3=42^\circ\text{C}$,干燥时间为 $t_{10}=6$ 小时,即获得免疫硝酸纤维素膜32;

三、贴膜

本步骤按照以下步骤顺序进行,

I、揭开衬片31中间部分的纸片,将免疫硝酸纤维素膜32贴在衬片31中间位置,来回扭动衬片31,使其粘贴牢固,严禁用手按压硝酸纤维素膜;

II、将吸水纸34贴衬片31的吸水纸端,并向下盖在贴好的免疫硝酸纤维素膜32上端,覆盖免疫硝酸纤维素膜32的 $1.5\sim 2\text{mm}$,压紧;

III、将衬片31另一侧的纸片撕开,将免疫荧光材料释放垫33贴在免疫硝酸纤维素膜32下端,并覆盖免疫硝酸纤维素膜32的 $1.5\sim 2\text{mm}$,压紧,获得卡片;

四、裁剪

将卡片分切成宽度一致的试剂条3;

五、包装

将干燥好的试剂条3装进准备好的箱体1内,再将试剂卡和干燥剂装入铝箔袋、密封,包装。

[0033] 本实施例中,批量体积是指免疫荧光材料稀释溶液的体积,标记缓冲液为含有2% BSA、0.1% PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖的pH 8.0 10mmol/L Tris-HCl缓冲液;TBS溶

液为含有含 0.1% Tween-20 和 0.05% 叠氮钠的 0.01M pH 8.0±0.05 的Tris缓冲液；CT-S缓冲液为含有3~4%海藻糖的 0.01~0.05M pH7.4的PBS缓冲液。

[0034] 实施例3-6 一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡的制备方法

实施例3-6的制备过程与实施例2大体相同,不同之处在于参数的差异,具体参数如下表1所示:

表1 实施例3-6的参数

实施例		3	4	5	6
步骤	参数				
一	VOL ₁ (%)	0.2	0.23	0.3	0.28
	n ₁ (rpm)	12260	12000	12760	13000
	t ₁ (min)	10	20	12	17
	n ₂ (rpm)	13000	12300	12000	12800
	t ₂ (min)	12	10	19	20
	VOL ₂ (mL/mL)	0.015	0.01	0.025	0.03
	VOL ₃ (mL/mL)	0.14	0.08	0.18	0.2
	t ₃ (h)	1.5	0.7	0.5	1.2
	n ₃ (rpm)	12000	12320	13000	12690
	t ₄ (min)	10	13	20	17
	t ₅ (h)	2	2	3.5	4
	n ₄ (rpm)	12300	12000	12700	13000
	t ₆ (min)	12	10	17	20
	t ₇ (h)	4.6	5	3	3.7
	n ₅ (rpm)	12000	13000	12260	12770
	t ₈ (min)	13	20	17	10
	P	180	220	210	160
	y ₁ (μ L/cm)	2.3	2.0	2.7	3.0
	T ₁ (°C)	41	40	43	45
	t ₉ (h)	10	4	18	24
二	ρ_1 (mg/mL)	0.8	1.0	1.5	1.3
	T ₂ (°C)	4	6	8	7
	ρ_2 (mg/mL)	0.82	1.3	1.5	0.98
	T ₃ (°C)	8	5	7	4
	T ₄ (°C)	41	40	43	45
	t ₁₀ (h)	10	4	16	24

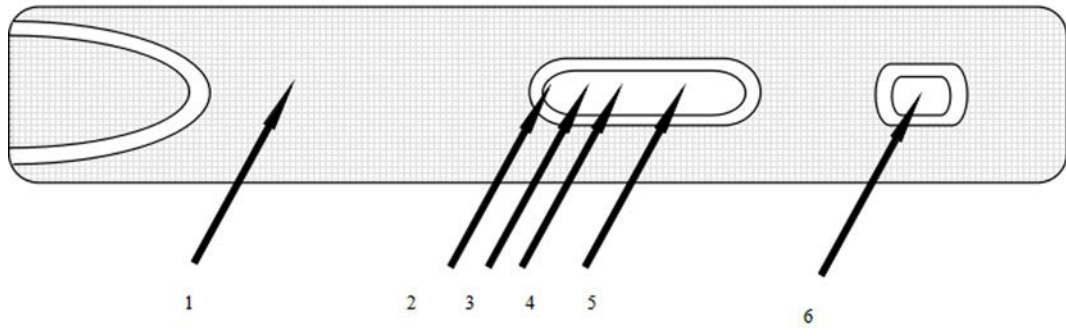


图1

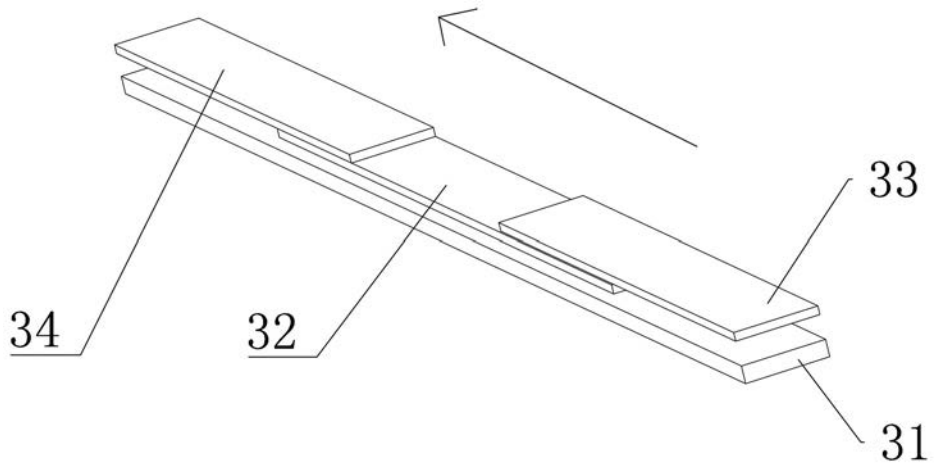


图2

专利名称(译)	一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN110687301A	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201911032652.2	申请日	2019-10-28
[标]发明人	陈庆全 李伟甲		
发明人	陈庆全 李伟甲		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/6863 G01N2333/525		
代理人(译)	刘丽丽		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂卡，包括盒体和设置在盒体内的试剂条，试剂条包括衬片，衬片上设有免疫硝酸纤维素膜，免疫硝酸纤维素膜的一端衔接有免疫荧光材料释放垫、另一端衔接有吸水纸；免疫荧光材料释放垫包被有TNF α 单克隆抗体；免疫硝酸纤维素膜上设有TNF α 检测线和质控线，TNF α 检测线位于质控线与免疫荧光材料释放垫之间；盒体上开设有加样孔和观察窗。本发明还公开了定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂盒的制备方法。本发明采用干式荧光免疫层析技术及双抗体夹心法原理检测样本中肿瘤坏死因子 α 的浓度，可以有效的排除非特异性荧光的干扰，提高分析灵敏度和定量测定的准确性，适用于肿瘤坏死因子 α 的检测技术领域。

