(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107942076 A
(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711181772.X
(22)申请日 2017.11.23
(71)申请人 中山市创艺生化工程有限公司
地址 528400 广东省中山市火炬开发区国家健康基地康泰路8号
(72)发明人 陈润文 何平 李冰 肖丝尹 周琼华
(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
代理人 舒胜英
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条。本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条精密度好，37℃加速七天后，检测效果仅下降5%以内；检测值与理论值偏差小，检测的准确率高；检测结果的出峰效果较好，出峰信号高，基线平整，前段几乎无抬起，不影响软件对峰面积的计算，读值准确度高；荧光微球释放效果更好，软件计算面积更加准确有关。适合临床上检测，具有很好的临床指导意义，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

CN 107942076 A

1.一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条，其特征在于，该试纸条的结合垫的材质为玻璃纤维素膜，结合垫经过结合垫预处理液浸泡，烘干，喷上储存液稀释的N末端心房利钠肽单克隆抗体-荧光微球偶联物。

2.根据权利要求1所述的试纸条，其特征在于，所述的结合垫预处理液的配方为：PVA的百分浓度是0.2%～5.0%、Triton X-100的百分浓度是0.1%～5.0%、蔗糖的百分浓度是1.0%～6.0%、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.01%～1.5%，余量为水，pH为6.5～7.5。

3.根据权利要求1所述的试纸条，其特征在于，所述的储存液配方为：PB的质量浓度为15～50mM、BSA的百分浓度为1.6%～10%、Tween-80的百分浓度为0.4%～10%，葡萄糖的百分浓度为0.4%～10%、甘氨酸的百分浓度为1.5%～10%、PEG4000的百分浓度为0.8%～5%、PEG20000的百分浓度为1%～8%、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.01%～1.5%，余量为水，pH为6.5～9.0。

4.根据权利要求2所述的试纸条，其特征在于，结合垫预处理液配方为：PVA的百分浓度是0.2%～3.0%，Triton X-100的百分浓度是0.5%～3.5%，蔗糖的百分浓度是1.0%～2.25%，Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.03%～0.1%，余量为水，pH为7.0～7.8。

5.根据权利要求3所述的试纸条，其特征在于，储存液配方为：PB的质量浓度为20～40mM、BSA的百分浓度为0.5%～4.8%、Tween-80的百分浓度为0.5～6.0%，葡萄糖的百分浓度为0.5～3.0%、甘氨酸的百分浓度为2.0～7.0%、PEG4000的百分浓度为1.0～3.0%、PEG20000的百分浓度为1.5～4.0%、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.03～0.1%，余量为水，pH为7.0～8.0。

6.根据权利要求1所述的试纸条，其特征在于，该试纸条还含有样品垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸；由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸依次搭接地粘贴在PVC底板上制成。

7.根据权利要求6所述的试纸条，其特征在于，将羊抗鼠lgG多克隆抗体和鼠源N末端心房利钠肽单克隆抗体分别用包被液包被，以分别固定于硝酸纤维素膜上分别作为质控线和检测线。

8.根据权利要求6所述的试纸条，其特征在于，所述样品垫的材质为玻璃纤维膜。

9.权利要求1～8任一项所述的试纸条的检测方法，其特征在于，将该试纸条加样层析后，检测质控线和检测线的荧光信号强度，并以质控线荧光信号强度校正检测线的荧光信号强度，实现N末端心房利钠肽的定量检测。

一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条

技术领域

[0001] 本发明免疫学检测领域，更具体地涉及一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条。

背景技术

[0002] 心力衰竭是各种心脏结构或功能性疾病导致心室充盈和(或)射血能力受损而引起的一组综合征，它是老年人住院或者死亡的最常见原因之一。随着人口老龄化及心肌梗死生存率的上升，心力衰竭作为心血管疾病中唯一一个发病率和流行性仍在持续上升的疾病，其防治已成为近年来临床心脏病学研究的热点。近年来的研究表明，N末端B型脑钠肽前体(NT-proBNP)早期诊断的价值更高，是诊断心力衰竭和评价心脏功能的最佳心肌标志物。NT-proBNP是B型脑钠肽前体(proBNP)在蛋白酶的作用下分解产生的。proBNP由108个氨基酸组成，在心肌细胞中合成，是心脏为弥补收缩无力而增大时，心壁被拉伸时由心脏释放到血液中的化学物质，它的释放水平与心肌负担水平有直接相关性。因此提高NT-proBNP检测的灵敏度，以便临床医生可以准确发现早期的和轻度的心力衰竭。此外，BNP水平还受到所选择的医疗干预的影响，例如使用奈西立肽(基于BNP的治疗)对患者进行治疗时；治疗结果可导致血液中BNP水平升高。在这种情况下，临床医生未必可以通过检测BNP的水平来区分BNP的升高是由药物治疗所致，还是心功能障碍所致。通过检测患者血液中的NT-proBNP浓度水平，临床医生可以对有关心衰的可能性和严重程度方面的重要信息进行收集，甚至可以对无任何症状的患者进行监测。

[0003] 目前，针对NT-proBNP的检测方法主要有酶联免疫法(EL1SA)、电化学发光法、放射免疫分析法，胶体金免疫层析法等。其中，EL1SA法定量准确性差、操作时间长、自动化程度低，多用于定性检测；放射免疫分析法灵敏度可达到4pg/ml，操作简单，测量准确，缺点是所需时间较长，存在放射性污染和辐射危险；电化学发光法方法特异性强，敏感性高，准确度高，但需要昂贵的仪器设备和经验丰富的操作人员，一般多在特定医疗机构使用。因此开发灵敏度更高、快捷方便的NT-proBNP测量产品，仍是临床诊断产品研究领域亟需解决的重要问题。

[0004] 荧光免疫层析定量检测技术是免疫层析技术和荧光标记技术的结合，其具有检测仪器精巧轻便、操作简单迅速、结果精准等优点，被广泛应用于多类抗原物质的检测。其中，抗体-荧光微球偶联物实施荧光免疫层析定量检测的关键分子之一，其稳定性关乎抗原荧光定量检测的准确度及其产品的保存期。因此，对抗体-荧光微球偶联物的储存液和结合垫预处理液的要求很高。因此寻找一种助稳性能更好、能提高检测准确度的储存液和结合垫预处理液对检测N末端心房利钠肽非常具有现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条。

[0006] 本发明所采取的技术方案是：

[0007] 一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条，该试纸条的结合垫的材质为玻璃纤维素膜，结合垫经过结合垫预处理液浸泡，烘干，喷上储存液稀释的N末端心房利钠肽单克隆抗体-荧光微球偶联物。

[0008] 进一步的，所述的结合垫预处理液的配方为：PVA的百分浓度是0.2％～5.0％、Triton X-100的百分浓度是0.1％～5.0％、蔗糖的百分浓度是1.0％～6.0％、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.01％～1.5％，余量为水，pH为6.5～7.5。

[0009] 进一步的，所述的储存液配方为：PB的质量浓度为15～50mM、BSA的百分浓度为1.6％～10％、Tween-80的百分浓度为0.4％～10％，葡萄糖的百分浓度为0.4％～10％、甘氨酸的百分浓度为1.5％～10％、PEG4000的百分浓度为0.8％～5％、PEG20000的百分浓度为1％～8％、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.01％～1.5％，余量为水，pH为6.5～9.0。

[0010] 进一步的，结合垫预处理液配方为：PVA的百分浓度是0.2％～3.0％，Triton X-100的百分浓度是0.5％～3.5％，蔗糖的百分浓度是1.0％～2.25％，Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.03％～0.1％，余量为水，pH为7.0～7.8。

[0011] 进一步的，储存液配方为：PB的质量浓度为20～40mM、BSA的百分浓度为0.5％～4.8％、Tween-80的百分浓度为0.5～6.0％，葡萄糖的百分浓度为0.5～3.0％、甘氨酸的百分浓度为2.0～7.0％、PEG4000的百分浓度为1.0～3.0％、PEG20000的百分浓度为1.5～4.0％、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.03～0.1％，余量为水，pH为7.0～8.0。

[0012] 进一步的，该试纸条还含有样品垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸；由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸依次搭接地粘贴在PVC底板上制成。

[0013] 进一步的，将羊抗鼠lgG多克隆抗体和鼠源N末端心房利钠肽单克隆抗体分别用包被液包被，以分别固定于硝酸纤维素膜上分别作为质控线和检测线。

[0014] 进一步的，所述样品垫材质为玻璃纤维膜。

[0015] 上述任一项所述的试纸条的检测方法，将该试纸条加样层析后，检测质控线和检测线的荧光信号强度，并以质控线荧光信号强度校正检测线的荧光信号强度，实现N末端心房利钠肽的定量检测。

[0016] 本发明的有益效果是：

[0017] 本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条精密度好，37℃加速七天后，检测效果仅下降5％以内；检测值与理论值偏差小(R^2＝0.998)，检测的准确率高；检测结果的出峰效果较好，出峰信号高，基线平整，前段几乎无抬起，不影响软件对峰面积的计算，读值准确度高；荧光微球释放效果更好，软件计算面积更加准确有关。适合临床上检测，具有很好的临床指导意义，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

附图说明

[0018] 图1为本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条检测罗氏Roche E411的N末端心房利钠肽标准曲线；

[0019] 图2为本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条检测N末端心房利钠肽重组抗原的检测值与理论值散点图；

[0020] 图3为本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的试纸条检测含不同浓度N

末端心房利钠肽的病人血清样本的荧光检测折线图；

[0021]　图4为本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的试纸条检测含N末端心房利钠肽的病人血清样本检测值与罗氏Roche E411 NT-proBNP检测值的相关图。

具体实施方式

[0022]　实施例1 储存液配方及制备方法

[0023]　本发明储存液的优选配方：PB的质量浓度为20mM、BSA的百分浓度为1.8％、Tween-80的百分浓度为0.5％，葡萄糖的百分浓度为0.5％、甘氨酸的百分浓度为2％、PEG4000的百分浓度为1％、PEG20000的百分浓度为1.5％、Proclin300百分浓度为0.03％、PH7.8～8.0。

[0024]　储存液制备方法：称取0.25g葡萄糖，用45mL纯水溶解。加入1mL事先配好的100mM的PB母液，振荡混匀。先后加入1g甘氨酸，0.5gPEG4000，0.75gPEG20000和0.9gBSA，振荡混匀；用加样枪加入0.25mLTween-80，反复打匀；加入15μL的Proclin300，振荡混匀，用1M的HCl调节pH值至7.8～8.0。最后室温定容至50mL，过滤除菌，制得储存液。

[0025]　PB母液配制方法为：称取29g的$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$和2g的K_2HPO_4，加入1L纯水溶解配成为100mM的PB母液。

[0026]　实施例2 结合垫预处理液配方及制备方法

[0027]　本发明结合垫预处理液的优选配方：PVA(聚乙烯醇)的百分浓度是2.0％、Triton X-100的百分浓度是0.8％、蔗糖的百分浓度是1.25％、Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.03％、PH7.2～7.4。

[0028]　结合垫预处理液制备方法：称取10g的PVA加入480ml纯水浸泡过夜，放置60℃加热溶解。用加样枪加入4mL的Triton X-100，反复打匀；称取6.25g蔗糖，放入磁力搅拌器溶解；加入150μL的Proclin300，用1M的HCl调节PH值至7.2～7.4，振荡混匀。最后室温定容至500mL，过滤除菌，制得结合垫预处理液。

[0029]　实施例3N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条

[0030]　N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条的制备过程如下：

[0031]　(1)储存液的制备：PB的质量浓度为20mM、BSA的百分浓度为1.8％、Tween-80的百分浓度为0.5％，葡萄糖的百分浓度为0.5％、甘氨酸的百分浓度为2％、PEG4000的百分浓度为1％、PEG20000的百分浓度为1.5％、Proclin300百分浓度为0.03％、PH7.8～8.0，按上述配方配制混匀后过滤除菌，制得储存液；

[0032]　(2)样品垫的制备：用样品垫处理液浸泡玻璃纤维膜10min，置于干燥间37℃湿度30％，烘干5h，制得样品垫，备用；

[0033]　(3)结合垫的制备：用结合垫处理液浸泡玻璃纤维素膜10min，浸泡处理后，置于干燥间37℃湿度30％，烘干5h，用裁纸刀切至使用宽度(1cm*30cm)，制得结合垫半成品，备用；

[0034]　(4)将1mg的200nm聚苯乙烯荧光微球先后加入20μL的0.5mg/mL的EDC和0.5mg/mL的NHS，在活化缓冲液37℃活化1h；

[0035]　(5)加入0.1mg鼠源N末端心房利钠肽单克隆抗体，在200μL偶联缓冲液中与荧光微球偶联，完毕后加入封闭液20μL，制得鼠源N末端心房利钠肽单克隆抗体-荧光微球偶联物，19000rpm冷冻离心15min后，加入200μL储存液，制得鼠源N末端心房利钠肽单克隆抗体-荧光微球偶联物浓度为5mg/mL，2～8℃保存；

[0036] (6)用储存液将鼠源N末端心房利钠肽单克隆抗体-荧光微球偶联物稀释到0.5mg/mL,用喷金划膜仪喷于经结合垫处理液处理后的结合垫上,用鼓风干燥箱干燥7h。铝箔袋密封置于20-25℃、湿度约30%的条件下存放备用;

[0037] (7)将1mg/mL羊抗鼠IgG多克隆抗体和1mg/mL鼠源N末端心房利钠肽(NT-proBNP)单克隆抗体分别用包被液包被,以条带状1.0mm用喷金划膜仪分别固定于硝酸纤维素膜上分别作为质控线和检测线;

[0038] (8)在PVC(聚氯乙烯)底板上依次搭接地粘贴:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸,并剪切成宽度4.1mm即成为荧光免疫层析试纸条;

[0039] (9)将上步切好的试纸条装卡,过压壳机,准备检测;

[0040] (10)样品垫处理液:100mMPBS、1%Triton、0.75%BSA、0.5%PVA、0.9%NaCl、0.3%葡聚糖、0.05%Proclin300,pH7.8;

[0041] (11)结合垫处理液:0.8%Triton X-100、2.0%PVA、1.25%蔗糖、0.03%Proclin300、PH7.2～7.4;

[0042] (12)活化缓冲液为75mM MES,pH5.5;

[0043] (13)偶联缓冲液:20mM PB,pH7.5;

[0044] (14)封闭液:20%BSA;

[0045] (15)包被液:20mMPBS,1.2%异丙醇、0.4%葡聚糖20000、1.5%BSA、0.5%Tween-80、0.03%Proclin300,pH7.0。

[0046] 实施例4

[0047] 配制对照储存液,具体配方为:PB的质量浓度为50mM、BSA的百分浓度为1%、Tween-80的百分浓度为1%,葡萄糖的百分浓度为1%、甘氨酸的百分浓度为0.5%、PEG4000的百分浓度为2%、Proclin300百分浓度为0.3%、PH7.0～7.5。

[0048] 配制对照结合垫预处理液,具体配方为:PVA的百分浓度是0.5%,Triton X-100的百分浓度是0.5%,Proclin300或叠氮钠的百分浓度为0.3%、PH7.0～7.2。

[0049] 采用实施例1制备的优选储存液搭配实施例2制备的优选结合垫预处理液(以下简称双液2)与对照储存液搭配对照结合垫预处理液(以下简称双液1)进行稳定性能和精密度对比,实施方法和结果如下:

[0050] 用双液1和双液2,对相同工艺标记N末端心房利钠肽(NT-proBNP)单抗的荧光微球进行喷膜干燥,分别组装成40个试纸条,放铝箔袋、干燥剂封口。一袋放置冰箱4℃保存7天(对照组),另外一袋放置温箱37℃加速7天。完整7天后,取出卡条,分别加入浓度为0.3ng/mL和1.8ng/mL的NT-proBNP重组抗原检测。根据理论37℃加速7天相当于4℃保存1年,模拟1年后的抗原检测情况,结果如下表1、表2所示。

[0051] 表1、2种双液制得的试纸条测试0.3ng/mL NT-proBNP重组抗原的效果对比

[0052]

双液1			双液2		
测试浓度	0.3ng/mL		测试浓度	0.3ng/mL	
保存温度	4℃	37℃加速7天	测试温度	4℃	37℃加速7天
测试1	0.3003527	0.249066	测试1	0.276628	0.268654
测试2	0.2299266	0.254591	测试2	0.282895	0.310698

[0053]

测试3	0.2909005	0.183456	测试3	0.287933	0.317148
测试4	0.3150995	0.259117	测试4	0.274166	0.297869
测试5	0.3890043	0.313557	测试5	0.273041	0.278803
测试6	0.3038979	0.221236	测试6	0.29327	0.292565
测试7	0.3102593	0.268041	测试7	0.280845	0.284121
测试8	0.2856134	0.187334	测试8	0.288929	0.276872
测试9	0.2915594	0.260014	测试9	0.29764	0.265365
测试10	0.2314752	0.224225	测试10	0.285355	0.273568
测试11	0.3309931	0.23329	测试11	0.289143	0.276044
测试12	0.2996064	0.349457	测试12	0.296752	0.303017
测试13	0.2304351	0.246469	测试13	0.2859	0.278946
测试14	0.2834912	0.262073	测试14	0.307534	0.285568
测试15	0.3092383	0.254195	测试15	0.35501	0.266336
测试16	0.2782479	0.189692	测试16	0.301851	0.289461
测试17	0.2954326	0.260198	测试17	0.296499	0.278314
测试18	0.2831777	0.274071	测试18	0.289193	0.258362
测试19	0.305391	0.202134	测试19	0.305805	0.280795
测试20	0.2652827	0.261213	测试20	0.302246	0.272035
AVE	0.2914692	0.247671	AVE	0.293532	0.282727
SD	0.0362383	0.040648	SD	0.017589	0.015308
CV	12.43%	16.41%	CV	5.99%	5.41%
下降比例	15.03%		下降比例	3.68%	

[0054] 表2、2种双液制得的试纸条测试1.8ng/mL NT-proBNP重组抗原的效果对比

[0055]

双液1			双液2		
测试浓度	1.8ng/mL		测试浓度	1.8ng/mL	
保存温度	4℃	37℃加速7天	保存温度	4℃	37℃加速7天
测试1	1.799878	1.403175	测试1	1.900969	1.774304
测试2	1.642706	1.356293	测试2	2.122625	1.773365
测试3	1.98464	1.453438	测试3	2.059657	1.959171
测试4	1.950017	1.465462	测试4	1.950022	1.990353
测试5	1.501154	1.468748	测试5	1.892403	1.82837
测试6	2.003078	1.774099	测试6	1.799463	1.91992
测试7	2.210052	1.304967	测试7	1.845215	1.785653
测试8	1.686465	1.399947	测试8	2.096083	1.779688
测试9	2.00925	1.135864	测试9	1.732894	1.567545
测试10	2.23245	1.776118	测试10	1.782124	1.840752
测试11	1.959103	1.790863	测试11	1.708063	2.051456
测试12	1.959445	1.548571	测试12	1.868229	1.932933
测试13	1.965407	1.491756	测试13	1.874735	1.726951
测试14	1.696629	1.182566	测试14	1.649607	1.959503

[0056]

测试15	2.008701	1.343944	测试15	1.794239	1.768002
测试16	2.264831	1.359906	测试16	2.003119	1.83608
测试17	2.108126	1.027553	测试17	1.971764	2.075037
测试18	1.721039	1.514563	测试18	1.854011	1.957798
测试19	1.891922	1.781681	测试19	1.912765	1.992919
测试20	2.145318	1.828825	测试20	1.789666	1.751687
AVE	1.937011	1.470417	AVE	1.880383	1.863574
SD	0.208448	0.228443	SD	0.126885	0.12726
CV	10.76%	15.53%	CV	6.75%	6.83%
下降比例	24.09%		下降比例	0.89%	

[0057] 从表1、2得出，本发明双液2(实施例1的储存液和实施例2的结合垫预处理液)在37℃加速七天后，仅下降5%以内，且精密度较好，在5%左右；而对照双液1在37℃加速七天后，下降20%左右，精密度相对较差。

[0058] 实施例5

[0059] 将实施例3制备的N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条建立标准曲线并进行检测，实施方法如下：

[0060] (1)建立标准曲线：用罗氏N末端心房利钠肽标准品稀释至100pg/mL、300pg/mL、450pg/mL、900pg/mL、1800pg/mL、4500pg/mL、9000pg/mL、18000pg/mL八个浓度。用制备好的试纸条加样80μL上免疫荧光分析以检测，每个浓度重复3次取平均值。以稀释浓度(Xi)为自变量，以检测结果实测值(Yi)为因变量求出线性回归方程，如图1所示；

[0061] (2)用抗原稀释液对重组抗原N末端心房利钠肽倍比稀释至100pg/mL、200pg/mL、400pg/mL、800pg/mL、1600pg/mL、3200pg/mL、6400pg/mL、12800pg/mL、25600pg/mL九个浓度。抗原稀释液：20mMPBS，0.5%BSA，0.5%Tween-20，PH7.2。将求得T/C峰面代入y＝0.00014x+0.00166中Y，求得X为所测抗原值，如图2所示。

[0062] 如图2所示，可以看出实施例2制备的试纸条检测值与理论值偏差小(R^2＝0.9981)，检测的准确率高。

[0063] 实施例6

[0064] 用双液1和双液2(同实施例4)，作结合垫半成品并对相同工艺标记NT-proBNP单抗的荧光微球进行喷膜干燥，组装好试纸条，分别用浓度为21.67pg/mL、89.23pg/mL、292.6pg/mL、3530pg/mL、11467pg/mL、32918pg/mL的含NT-proBNP罗氏Roche E411赋值的病人血清样本对两种试纸条加样检测，随后用配套检测仪器对试纸条窗口信息进行读取。通过仪器激光对窗口的荧光微球进行激发，再采集窗口300个位置(作横坐标)的发射荧光强度(作纵坐标)，利用荧光分析软件将300个点按顺序连在一起形成折线图。

[0065] 结果如图3所示，折线图可反映荧光微球在NC膜上的跑膜情况，图中有两个峰，左边为T峰(对应肉眼视卡条为检测线)，右边为C峰(对应肉眼视卡条为质控线)。从图中可以看出，使用双液2的整体出峰效果较好，说明双液2对抗体-荧光微球偶联物从结合垫释放到NC膜效果较好。使用双液1的则出峰信号不高，基线不平整，前段抬起较明显，影响软件对峰面积的计算，进而影响读值的准确度。双液2还可以提高该项目的灵敏度，同一个浓度的样本，T峰明显比双液1的要高。

[0066] 实施例7

[0067] 用双液1和双液2(同实施例4),作结合垫半成品并对相同工艺NT-proBNP单抗标记的荧光微球进行喷膜干燥,分别组装33个试纸条,用33个不同浓度的含NT-proBNP抗原的病人血清样本同时对两种试纸条加样检测。用配套检测仪器对试纸条窗口信息进行读取,用荧光分析软件计算T峰面积与C峰面积,同时用1VD行业权威公司罗氏旗下的E411全自动免疫发光仪检测的结果值。

[0068] 以罗氏-E411评价2种双液制备的试纸条检测结果的临床诊断准确性。结果如图4所示,纵坐标为T峰面积/C峰面积,横坐标罗氏-E411结果值,双液2制备的试纸条检测结果与罗氏公司的E411仪器检测结果较吻合(R^2=0.986),而双液1的血清线性相关较差(R^2=0.903),重复性也不好。这与前述双液2让荧光微球释放效果更好,软件计算面积更加准确有关。

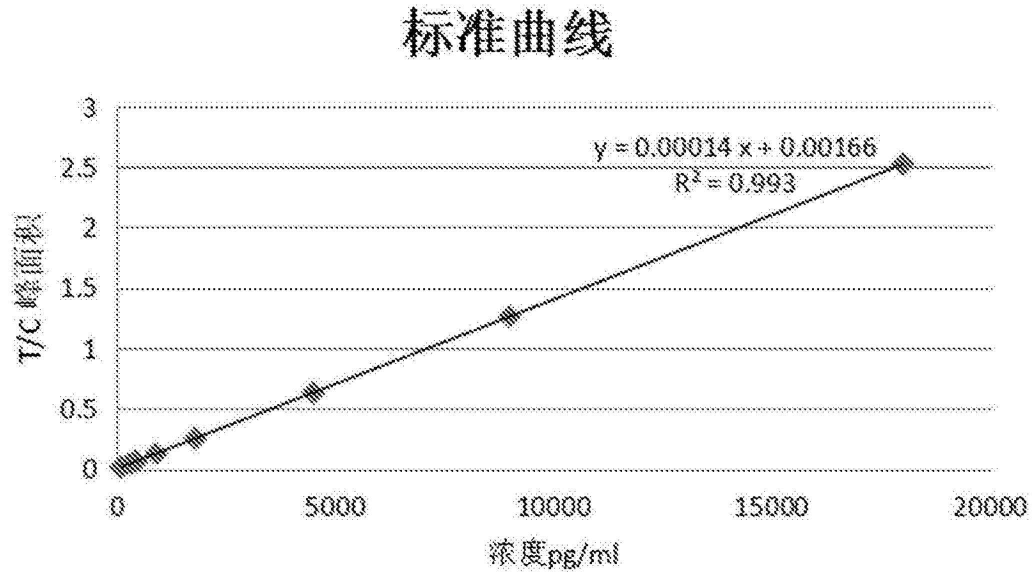

标准曲线
y = 0.00014 x + 0.00166
R² = 0.993
T/C 峰面积
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0
5000
10000
15000
20000
浓度pg/ml

图1

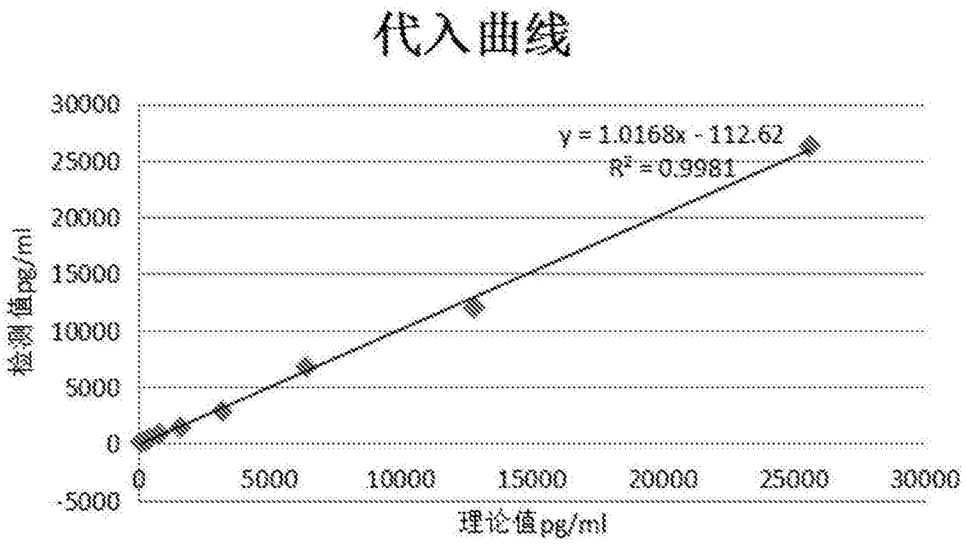
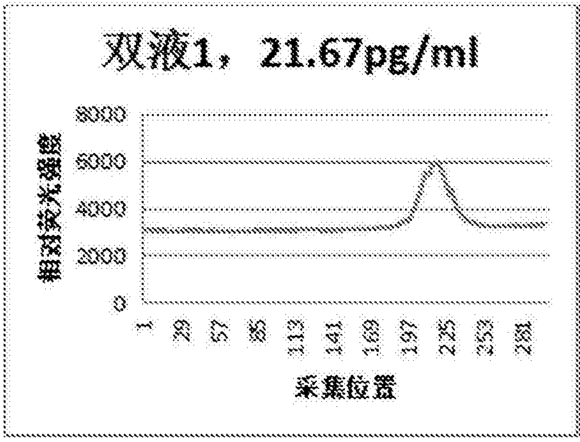
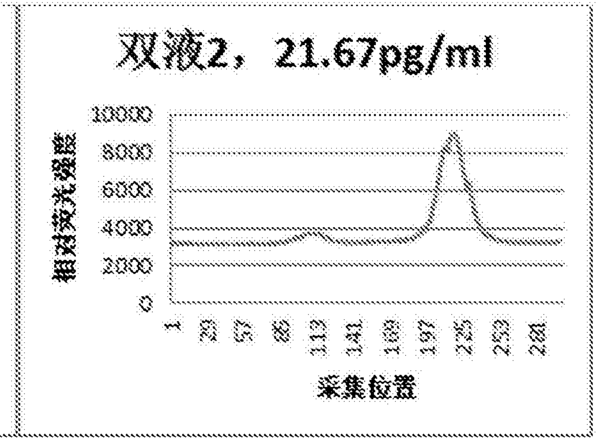
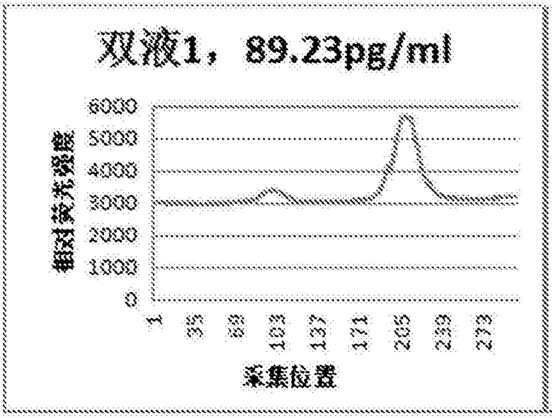
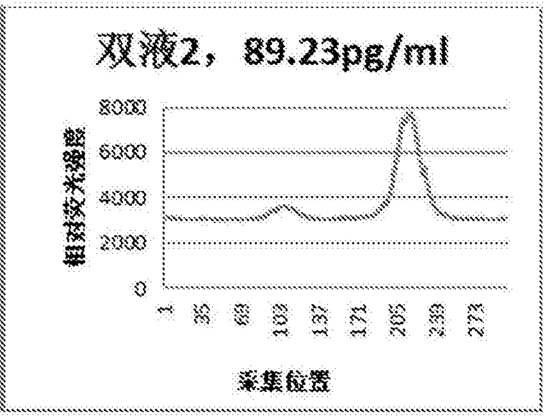

代入曲线
y = 1.0168x - 112.62
R² = 0.9981
检测值pg/ml
-5000
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
理论值pg/ml

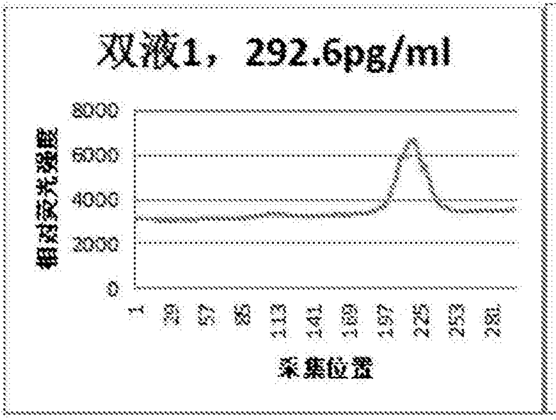
图2

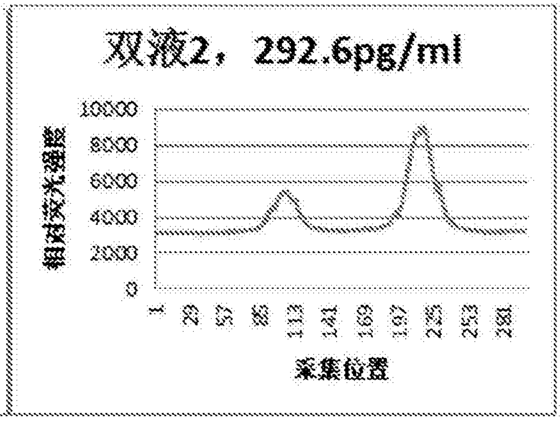

双液1，21.67pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
相对荧光强度
1
29
57
85
113
141
169
197
225
253
281
采集位置

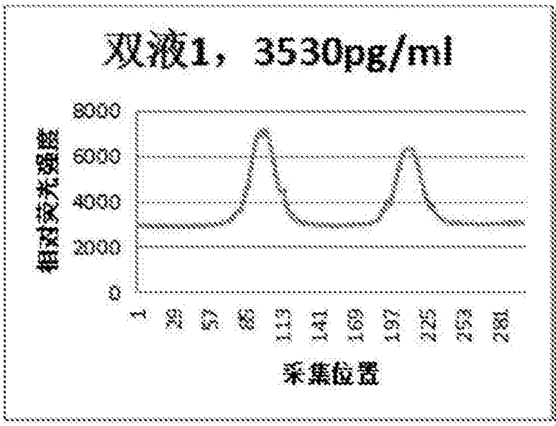

双液2，21.67pg/ml
10000
8000
6000
4000
2000
0
相对荧光强度
1
29
57
85
113
141
169
197
225
253
281
采集位置

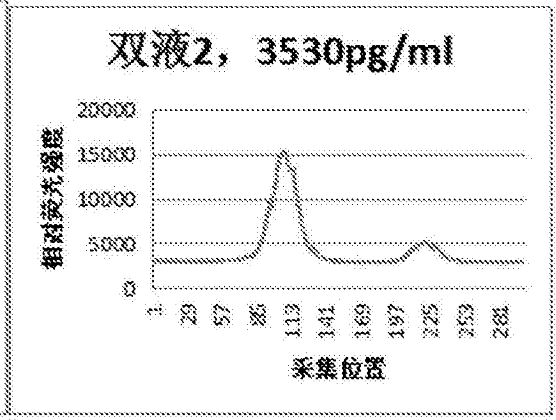

双液1，89.23pg/ml
相对荧光强度
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
1 35 69 103 137 171 205 239 273
采集位置

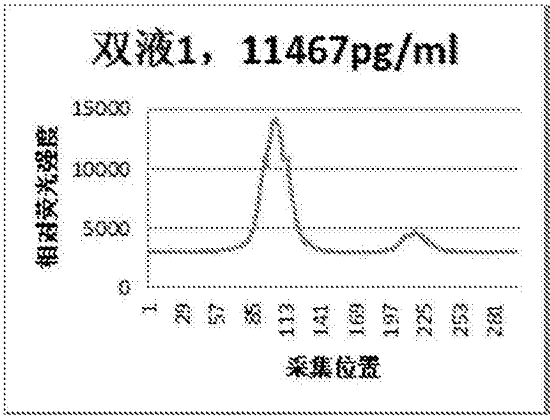

双液2，89.23pg/ml
相对荧光强度
0
2000
4000
6000
8000
1 35 69 103 137 171 205 239 273
采集位置

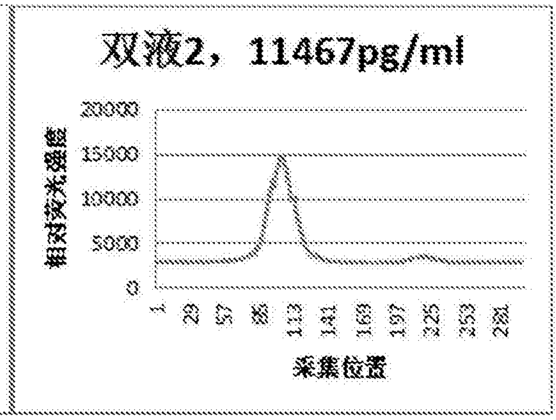

双液1，292.6pg/ml
相对荧光强度
0
2000
4000
6000
8000
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置


双液2，292.6pg/ml
相对荧光强度
0
2000
4000
6000
8000
10000
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置


双液1，3530pg/ml
相对荧光强度
0
2000
4000
6000
8000
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置


双液2，3530pg/ml
相对荧光强度
0
5000
10000
15000
20000
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置


双液1，11467pg/ml
相对荧光强度
0
5000
10000
15000
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置


双液2，11467pg/ml
相对荧光强度
0
5000
10000
15000
20000
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置

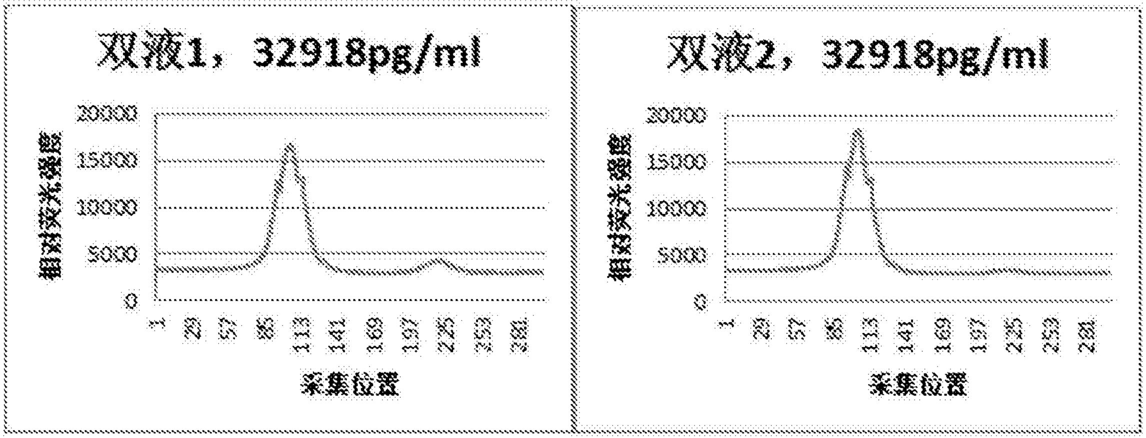

双液1，32918pg/ml
相对荧光强度
20000
15000
10000
5000
0
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置
双液2，32918pg/ml
相对荧光强度
20000
15000
10000
5000
0
1 29 57 85 113 141 169 197 225 253 281
采集位置

图3

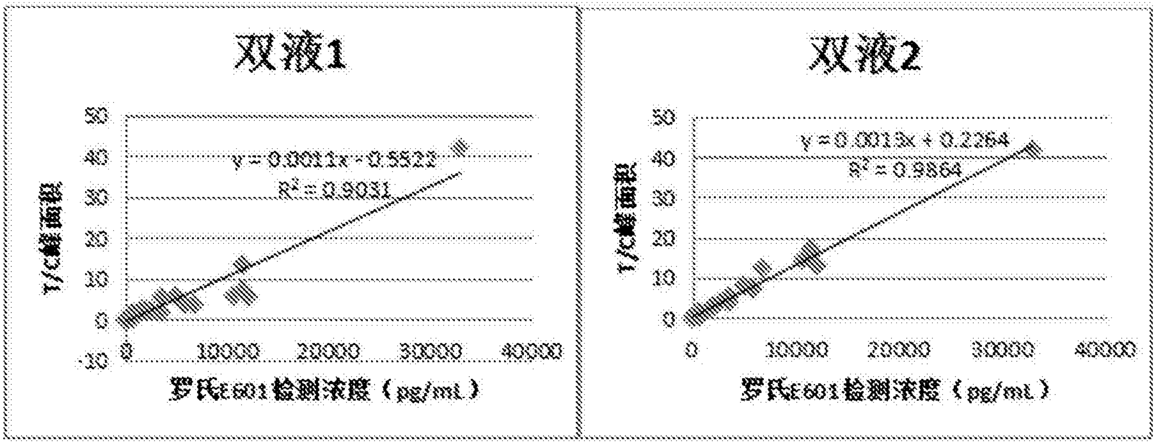

双液1
T/C峰面积
50
40
30
20
10
0
-10
y = 0.0011x - 0.5522
R² = 0.9031
0 10000 20000 30000 40000
罗氏E601检测浓度（pg/mL）
双液2
T/C峰面积
50
40
30
20
10
0
y = 0.0013x + 0.2264
R² = 0.9864
0 10000 20000 30000 40000
罗氏E601检测浓度（pg/mL）

图4

patsnap

专利名称(译)	一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条		
公开(公告)号	CN107942076A	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN201711181772.X	申请日	2017-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	中山市创艺生化工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	中山市创艺生化工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中山市创艺生化工程有限公司		
[标]发明人	陈润文 何平 李冰 肖丝尹 周琼华		
发明人	陈润文 何平 李冰 肖丝尹 周琼华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577 G01N2333/4712 G01N2800/325		
外部链接	Espacenet　SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条。本发明储存液搭配本发明结合垫预处理液制备的N末端心房利钠肽免疫荧光定量试纸条精密度好，37°C加速七天后，检测效果仅下降5%以内；检测值与理论值偏差小，检测的准确率高；检测结果的出峰效果较好，出峰信号高，基线平整，前段几乎无抬起，不影响软件对峰面积的计算，读值准确度高；荧光微球释放效果更好，软件计算面积更加准确有关。适合临床上检测，具有很好的临床指导意义，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

双液1			双液2		
测试浓度	0.3ng/mL		测试浓度	0.3ng/mL	
保存温度	4℃	37℃加速7天	测试温度	4℃	37℃加速7天
测试1	0.3003527	0.249066	测试1	0.276628	0.268654
测试2	0.2299266	0.254591	测试2	0.282895	0.310698