



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799334 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201910109522.8

(22)申请日 2019.02.06

(71)申请人 吉林双正生物工程有限公司
地址 130000 吉林省长春市北湖科技开发
区盛北大街3333号

(72)发明人 王珺楠 杨小军 李欣 赵旻

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 魏征骥

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

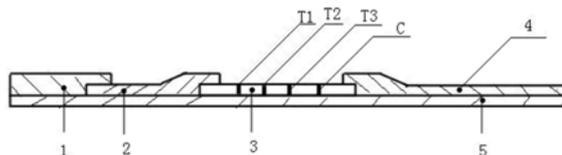
权利要求书3页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

心脏标志物的荧光微球联合检测装置及其
制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置及其制备方法,属于医疗检测设备领域。样品垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板上,硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜搭接,免疫荧光抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫搭接,硝酸纤维素膜上设置固相有高特异性MPO抗体的第一检测线T1、固相有高特异性cTnI抗体的第二检测线T2、固相有高特异性NT-proBNP抗体的第三检测线T3、固相有高特异性D二聚体抗体的第四检测线T4和质控线C;质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。优点是有效的提高了反应的灵敏度,特异性,同样的阈值下,还可降低免疫微球的用量,节约成本,操作简便,实用性强。



1. 一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置,其特征在於:样品垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板上,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫搭接;所述硝酸纤维素膜上设置第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3、和质控线C;所述的第一检测线T1上固相有高特异性MPO抗体,所述的第二检测线T2上固相有高特异性cTnI抗体,所述的第三检测线T3上固相有高特异性NT-proBNP抗体,所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置,其特征在於:所述硝酸纤维素膜上还设置第四检测线T4,所述的第四检测线T4上固相有高特异性D二聚体抗体。

3. 如权利要求1所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在於:包括下列步骤:

(a) 免疫荧光微球的制备,取100u1固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000u1,加入到试管中,取40u1的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40u1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000~14000r/min、15~25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

(b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,加入抗体后,反应1~1.5min后,再到超声波上超声25~35秒,然后再反应1~1.5小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1~1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000~14000r/min,15~20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

(c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜;

(d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1u1/cm,制得硝酸纤维素膜;

(e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

4. 如权利要求3所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在於:所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%。

5. 如权利要求3所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在於:所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200uL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25uL、浓度40uM/L的

MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200~300r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的混合溶液用超速离心机在12000~13000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物和石墨NT-proBNP抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存。

6.如权利要求3所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

7.如权利要求3所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200ul/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

8.如权利要求2所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置,其特征在于:包括下列步骤:

(a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到试管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000~14000r/min、15~25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

(b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,加入抗体后,反应1~1.5min后,再到超声波上超声25~35秒,然后再反应1~1.5小时,加牛血清白蛋白BSA进行封闭1~1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000~14000r/min,15~20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

(c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜;

(d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得硝酸纤维素膜;

(e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

9.如权利要求8所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%。

10. 如权利要求8所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200 μ L、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25 μ L、浓度40 μ mol/L的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP和D二聚体抗体抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25 $^{\circ}$ C,转速为200~300r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的混合溶液用超速离心机在12000~13000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物、石墨NT-proBNP抗体探针复合物和石墨D二聚体抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4 $^{\circ}$ C条件储存。

11. 如权利要求8所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

12. 如权利要求8所述的一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200 μ l/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

心脏标志物的荧光微球联合检测装置及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测设备领域,特别涉及一种心脏标志物的联合检测装置及其制备方法,利用荧光免疫层析技术以及双抗体夹心法原理定量检测临床标本血浆中人髓过氧化物酶(MPO)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)、N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和D二聚体的检测装置及其制备方法,可实现心脏标志物的灵敏、特异、快速检测。

背景技术

[0002] 心肺功能指标是临床诊断和预防疾病的重要参考依据,监测心肺功能对于慢性心肺疾病患者的诊断治疗及预后具有重要价值。心肺功能指标的检测在临床急诊中广泛应用,有利于医师对患者病情迅速诊断并采取及时有效的治疗方案。急性心力衰竭是急诊科常见的危、急、重症之一,严重危害了患者的健康及生命安全。近年来,国外报道着重强调了急诊早期干预措施对改善急性心力衰竭患者治疗效果及预后的重要性。慢性肺心病是临床发病率较高的一种慢性缺氧缺血性肺源性心脏病,以老年人为高发人群,致死率高,对患者的生命安全构成了严重威胁。肺心病并发心衰时,患者体内多种脏器之间会互相作用,引起血液动力学异常,最终产生一系列的病理性改变。因此,对于慢性肺心病,发病后及时急救是降低患者死亡率的关键。心胸症状异常及呼吸障碍是急诊科常见的危、急、重症疾病,严重危害了患者的健康及生命安全,急诊就诊患者临床表现复杂,常见心胸症状异常合并呼吸系统障碍,对急诊及时准确的诊断和治疗造成干扰。

[0003] 髓过氧化物酶(MPO)的释放是中性粒细胞活化的标志,是由活化中性粒细胞所形成的重要的过氧化物酶类,在心血管疾病的发生和发展中,从早期内皮障碍到形成粥样硬化斑块,炎症反应贯穿整个过程,炎症时激活的中性粒细胞发生脱颗粒并释放髓过氧化物酶(MPO),它能导致冠状动脉粥样硬化病灶不稳定甚至是破裂,使血管内皮下胶原组织暴露,随之发生血小板粘附聚集和血栓形成,造成冠状动脉阻塞,发生急性冠状动脉综合症,甚至是严重的心肌不可逆缺血损伤。近年来的临床研究资料提示髓过氧化物酶等标志物变化与急性冠脉综合症患者的诊断和预后相关,是新一代早期预警心脏生物标示物。髓过氧化物酶(MPO)是冠状动脉粥样硬化病灶不稳定和中性白细胞应激的标志物,也是早期预警信号。大量临床研究资料表明,急性冠状动脉综合症的病人血清中髓过氧化物酶水平显著地升高,是预测冠心病患者发生不良心血管事件的一个新的预测因子。

[0004] 心肌肌钙蛋白(cTn)是组成横纹肌丝的结构蛋白,具有调节肌细胞收缩功能,其由三种不同基因的亚基:心肌肌钙蛋白T(cTnT)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和肌钙蛋白C(TnC)组成,在控制心肌收缩中起重要作用。正常人血液中cTnI的含量一般低于0.3 μ g/L,由于分子量不大,当心肌严重缺血导致心肌细胞膜的完整性被破坏时,cTnI极易释放入血,胸痛发作4~6h升高,增高可持续6~7d,由于心肌肌钙蛋白仅存在于心肌收缩肌上,因此,它是评价心肌坏死的首选标志物,是检测心肌损伤的金标准。目前,心肌肌钙蛋白主要用于心肌缺血损伤的临床诊断、危险性评估和预后判断。

[0005] N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)是脑钠肽前体(proBNP)的裂解产物,心肌细胞受到

刺激后,proBNP裂解为NT-proBNP和BNP,两者分泌密切相关。心脏是循环中脑钠肽的主要来源,BNP主要储存于心肌细胞内。其生理作用为利钠利尿、扩张血管、对抗肾上腺素、肾素-血管紧张素等的水、钠潴留效应,可用于评价心脏功能。NT-proBNP虽然不具有类似的生理作用,但与BNP同时分泌入血,关系密切。近年来,有研究报道,NT-proBNP与BNP相比较,血浆浓度高,半衰期长(60-120min),稳定性强,便于检测,是更敏感地发现早期心功能不全的标志物。

[0006] D二聚体是纤溶酶水解交联纤维蛋白形成的一种降解产物,若D二聚体水平升高说明体内处于高凝状态,有血栓形成。AMI患者发病过程中,由于不稳定动脉粥样斑块溃破,血液及管腔中容易形成血栓,导致管腔闭塞,引起心肌缺血、坏死等症状。血栓形成后,会激活体内纤溶系统,这样也会增加血中D二聚体含量。D-二聚体对于呼吸功能及肺部障碍、心脏功能障碍患者敏感度较高。

[0007] 目前检测MPO、cTnI、NT-proBNP和D二聚体的方法主要有酶联免疫法、化学发光法、免疫比浊法、金标免疫法等。荧光免疫层析法需要标本量少,简便快速,适合于急性心肌梗死的快速检测,不受时间、地点的限制。纵观已有产品和文献报道,均为检测或预警心肌梗塞的某个阶段,而不能全面地、特异性地预警心肌梗塞的发生、发展全程,亟待改进。

[0008] 时间分辨荧光免疫法(TRFIA)利用了具有独特荧光特性的3价稀土离子及其螯合物为示踪物代替荧光物质、酶、同位素、化学发光物质等,标记抗体/抗原,待抗原抗体反应发生后,用TRFIA检测仪测定反应产物中的荧光强度,根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,判断反应体系中分析物的浓度,从而达到定量分析。时间分辨荧光免疫法(TRFIA)由于其低本底,高灵敏度和特异性,荧光寿命长,无放射性同位素污染等特点,自20世纪80年代Pettersson和Eskola等人首次报到后得到了迅速发展,并且广泛应用于临床疾病诊断。

[0009] 在荧光免疫层析检测中,荧光抗体的淬灭及抗体包被浓度影响实验结果。蛋白质固着于硝酸纤维素膜(NC膜)作为待测样本的捕获试剂。由于检测结果完全取决于捕获试剂在膜上达到良好的吸附效果,因此蛋白质在膜上均一、良好的吸附对胶体金检测结果非常重要。如果NC膜上结合的蛋白量不足或者蛋白结合力不够强,就会出现相当多的问题,在检测结果的检测线上非常明显。如果膜上结合的蛋白量太低,那么在结果中检测线显色较弱而且检测灵敏度降低。如果蛋白不能牢固的吸附于NC膜,那么在蛋白吸附于NC膜以前发生扩散,从而导致检测线较宽、显色较弱而不是鲜艳而清晰,使检测结果难以解释。在极端条件下,如果蛋白与NC膜的物理吸附作用太弱,流过的蛋白检测物和表面活性剂溶液可能将固着的蛋白从NC膜上洗掉,从而显示较宽或者根本不清晰的检测线,难以解释检测结果。

发明内容

[0010] 本发明提供一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置及其制备方法,以解决现有技术存在的荧光抗体易淬灭和NC膜吸附蛋白量不足、结合力不强的问题。本发明制备的人髓过氧化物酶(MPO)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)、N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和D二聚体联合检测装置,可实现心肌标志物的灵敏、特异、快速检测,提高了对急性心肌梗塞患者进行心梗风险的合理综合判定,能够快速、准确进行心肌梗塞早期预警及病情风险判断。

[0011] 本发明采取的技术方案是,一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置,样品垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板上,所述硝酸纤维素膜的

两端分别与吸收垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫搭接;所述硝酸纤维素膜上设置第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3、和质控线C;所述的第一检测线T1上固相有高特异性MPO抗体,所述的第二检测线T2上固相有高特异性cTnI抗体,所述的第三检测线T3上固相有高特异性NT-proBNP抗体,所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0012] 所述硝酸纤维素膜3上还设置第四检测线T4,所述的第四检测线T4上固相有高特异性D二聚体抗体。

[0013] 一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法,包括下列步骤:

[0014] (a) 免疫荧光微球的制备,取100u1固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000u1,加入到试管中,取40u1的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40u1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000~14000r/min、15~25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0015] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,加入抗体后,反应1~1.5min后,再到超声波上超声25~35秒,然后再反应1~1.5小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1~1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000~14000r/min,15~20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0016] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜;

[0017] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1u1/cm,制得硝酸纤维素膜;

[0018] (e) 将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘贴在塑料板上,剪裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0019] 本发明所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0020] 本发明所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200~300r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的混合溶液用超速离心机在12000~13000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探

针复合物和石墨NT-proBNP抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存。

[0021] 本发明所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

[0022] 本发明所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200ul/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0023] 一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置,包括下列步骤:

[0024] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到试管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000~14000r/min、15~25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0025] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,加入抗体后,反应1~1.5min后,再到超声波上超声25~35秒,然后再反应1~1.5小时,加牛血清白蛋白BSA进行封闭1~1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000~14000r/min,15~20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0026] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜;

[0027] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得硝酸纤维素膜;

[0028] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘贴在塑料板上,剪裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0029] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0030] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP和D二聚体抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200~300r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的混合溶液用超速离心机在12000~13000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物、石墨NT-proBNP抗体探针复合物和石墨D二聚体

抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存;

[0031] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用;

[0032] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200u1/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0033] 本发明聚乙烯醇的结构中含有多个羟基可供偶联,活化过程简单,方便NC膜表面固定蛋白。聚乙烯醇水凝胶由于具有与人体自然组织相近的含水量、弹性模量、低摩擦系数及较高的机械强度、丰富的孔漏网络结构、良好的生物相容性等特点,在生物医学领域有着广泛的应用。常规条件下,单位面积的NC膜上结合抗体的数量是有限的,采用聚乙烯醇处理之后,可以让单位面积的NC膜上结合抗体数量增加,进而可以实现更高的检测灵敏度。Triton X-100可与NC膜的位点发生吸附作用,在蛋白包被后,可以吸收蛋白的结合水,导致蛋白更加疏水,这样蛋白与NC膜的结合更加牢固,通过疏水作用明显提高蛋白的包被效率。综上,多聚乙烯醇和Triton X-100组合配方,可以从电荷作用和疏水作用两方面来提高NC膜蛋白的包被效率。

[0034] 本发明在改善NC膜对蛋白吸附基础上,探讨蛋白对NC膜吸附效果也是提高胶体金灵敏度的另一途径。石墨纳米颗粒具有较好的稳定性、易于制备、生物相容性较好及较低的免疫原性等优势,在生物医学领域研究较为广泛。但在荧光免疫层析技术中尚未有报道应用。本发明探讨了石墨纳米颗粒对NC膜包被抗体的影响,先将划膜用的抗体先与石墨纳米颗粒结合,封闭,离心纯化,去掉未结合的抗体,然后复溶到一定比例,然后划膜,这样一个石墨粒子可以结合多个抗体,从而增加了包被抗体效率,灵敏度也会大大提高。又由于石墨纳米颗粒是无色透明的,所以不会影响显色,只是借助其更大的表面积增加抗体的包被效率,提高荧光免疫层析实验的灵敏度。

[0035] 本发明为了提高荧光免疫层析技术的灵敏度,通过对硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液进行了预处理,将包被NC的抗体与石墨纳米颗粒结合,达到了提高试纸灵敏度的目的。

[0036] 本发明的有益效果在于:

[0037] 1、本发明的检测装置结构新颖,将MP0、cTnI、NT-proBNP和D二聚体抗体包被于硝酸纤维膜膜上,特异性强,既能同时检测标本中MP0、cTnI、NT-proBNP和D二聚体,又没有增加生产操作的复杂度。

[0038] 2、免疫胶体金制备步骤中,通过配合合适的荧光微球缓冲液和样品垫处理液,可保证免疫荧光微球释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫微球的用量,节约成本。

[0039] 3、本发明对硝酸纤维素膜进行预处理,对包被硝酸纤维素膜的抗体进行了修饰,提高了检测试纸灵敏度、特异性。

[0040] 4、本发明的检测装置操作简便,不需要专业人员操作,实用性强。

附图说明

[0041] 图1是本发明的结构示意图;

[0042] 图2是本发明还包括第四检测线T4的结构示意图。

具体实施方式

[0043] 实施例1一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置

[0044] 样品垫1、免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4分别粘贴在塑料板5上,所述硝酸纤维素膜3的两端分别与吸收垫4、免疫荧光抗体玻璃纤维膜2搭接,所述免疫荧光抗体玻璃纤维膜2的另一端与样品垫1搭接;所述硝酸纤维素膜3上设置第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3、和质控线C;所述的第一检测线T1上固相有高特异性MP0抗体,所述的第二检测线T2上固相有高特异性cTnI抗体,所述的第三检测线T3上固相有高特异性NT-proBNP抗体,所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0045] 实施例2一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置

[0046] 在实施例1的基础上,所述硝酸纤维素膜3上还设置第四检测线T4,所述的第四检测线T4上固相有高特异性D二聚体抗体。

[0047] 实施例3

[0048] 上述实施例1中的心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法

[0049] 包括下列步骤:

[0050] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到试管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000r/min、15min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0051] (b) 免疫荧光微球分别交联MP0抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MP0抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,加入抗体后,反应1min后,再到超声波上超声25秒,然后再反应1小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000r/min,15min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0052] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜2;

[0053] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MP0抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得硝酸纤维素膜3;

[0054] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜3、吸收垫4依次粘贴在塑料板5上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0055] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0056] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MP0抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MP0抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充

分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2h,反应后的混合溶液用超速离心机在12000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤3次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物和石墨NT-proBNP抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存。

[0057] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用;

[0058] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200ul/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0059] 实施例4

[0060] 上述实施例1中的心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法

[0061] 包括下列步骤:

[0062] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到试管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件11000r/min、20min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0063] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,加入抗体后,反应1.2min后,再到超声波上超声30秒,然后再反应1.2小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1.2小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为11000r/min,17min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0064] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜2;

[0065] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得硝酸纤维素膜3;

[0066] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜3、吸收垫4依次粘贴在塑料板5上,剪裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0067] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0068] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为250r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避

光震荡培养2.5h,反应后的混合溶液用超速离心机在12500r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物和石墨NT-proBNP抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存;

[0069] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

[0070] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200uL/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0071] 实施例5

[0072] 上述实施例1中的心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法

[0073] 包括下列步骤:

[0074] (a) 免疫荧光微球的制备,取100uL固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000uL,加入到试管中,取40uL的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40uL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件14000r/min、25min,倒掉上清液,加入1mL超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0075] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,分别取1mL活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,加入抗体后,反应1.5min后,再到超声波上超声35秒,然后再反应1.5小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为14000r/min,20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0076] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜2;

[0077] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1uL/cm,制得硝酸纤维素膜3;

[0078] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜3、吸收垫4依次粘贴在塑料板5上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0079] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0080] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为300r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的混合溶液用超速离心机在13000r/m转速条件下,使用超纯水彻

底离心洗涤4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体和NT-proBNP抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物和石墨NT-proBNP抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存。

[0081] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

[0082] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200uL/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0083] 实施例6

[0084] 上述实施例2中的心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法

[0085] 包括下列步骤:

[0086] (a) 免疫荧光微球的制备,取100uL固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000uL,加入到试管中,取40uL的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40uL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000r/min、15min,倒掉上清液,加入1mL超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0087] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,分别取1mL活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,加入抗体后,反应1.5min后,再到超声波上超声25秒,然后再反应1小时,加牛血清白蛋白BSA进行封闭1小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000r/min,15min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0088] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜2;

[0089] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1uL/cm,制得硝酸纤维素膜3;

[0090] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜3、吸收垫4依次粘贴在塑料板5上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0091] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0092] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP和D二聚体抗体抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养2h,反应后的混合溶液用超速离心机在12000r/m转

速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤3次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物、石墨NT-proBNP抗体探针复合物和石墨D二聚体抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存;

[0093] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

[0094] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200uL/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0095] 实施例7

[0096] 上述实施例2中的心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法

[0097] 包括下列步骤:

[0098] (a) 免疫荧光微球的制备,取100uL固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000uL,加入到试管中,取40uL的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40uL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件11000r/min、20min,倒掉上清液,加入1mL超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0099] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,分别取1mL活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,加入抗体后,反应1.2min后,再到超声波上超声30秒,然后再反应1.2小时,加牛血清白蛋白BSA进行封闭1.2小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为11000r/min,17min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0100] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜2;

[0101] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1uL/cm,制得硝酸纤维素膜3;

[0102] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜3、吸收垫4依次粘贴在塑料板5上,剪裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0103] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0104] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP和D二聚体抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为250r/m条件下,分别将

上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养3h,反应后的混合溶液用超速离心机在12500r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物、石墨NT-proBNP抗体探针复合物和石墨D二聚体抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存;

[0105] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用;

[0106] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200ul/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0107] 实施例7

[0108] 上述实施例2中的心脏标志物的荧光微球联合检测装置的制备方法

[0109] 包括下列步骤:

[0110] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到试管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)于微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件14000r/min、25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0111] (b) 免疫荧光微球分别交联MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,分别取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,加入抗体后,反应1.5min后,再到超声波上超声35秒,然后再反应1.5小时,加牛血清白蛋白BSA进行封闭1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为14000r/min,20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0112] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用各免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,或将各免疫荧光微球溶液混合后喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫荧光抗体玻璃纤维膜2;

[0113] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,喷点与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得硝酸纤维素膜3;

[0114] (e) 将预处理的样品垫1、步骤(c)制备的免疫荧光抗体玻璃纤维膜2、步骤(d)制备的硝酸纤维素膜3、吸收垫4依次粘贴在塑料板5上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0115] 所述步骤(b)、(c)所述的缓冲液由Tris-HCL液、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0116] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液分别和25μL、浓度40μmol/L的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP和D二聚体抗体抗体溶液加入到超纯水

中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为300r/m条件下,分别将上述各混合溶液在摇床内避光震荡培养3h,反应后的混合溶液用超速离心机在13000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤4次,分别去除上清液中过量的未反应的MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体和D二聚体抗体,所得沉淀物分别为石墨MPO抗体探针复合物、石墨cTnI抗体探针复合物、石墨NT-proBNP抗体探针复合物和石墨D二聚体抗体探针复合物,分别用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存;

[0117] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后稀释到浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用;

[0118] 所述步骤(e)中的预处理的样品垫采用样品垫处理液200ul/cm,所述样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,表面活性剂浓度为1%。

[0119] 定量检测:通过荧光定量检测仪检测,上述实施例所得检测装置检测MPO最低检测值:1ng、cTnI最低检测值:0.2ng、NT-proBNP最低检测值:0.2ng、D二聚体最低检测值:0.2ng。

[0120] 下边通过实验例来进一步说明本发明。

[0121] 实验例1:

[0122] 1、聚乙烯醇处理液对硝酸纤维素膜抗淬灭能力的比较

[0123] 1.1材料与amp;方法

[0124] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司,聚乙烯醇购自Sigma公司

[0125] 1.2硝酸纤维素膜处理方法

[0126] 1.2.1配制聚乙烯醇处理液

[0127] 配制聚乙烯醇处理液:聚乙烯醇和Triton X-100由蒸馏水配置成浓度为1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

[0128] 1.2.2硝酸纤维素膜处理方法

[0129] 将硝酸纤维素膜放入聚乙烯醇处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥。

[0130] 1.3实验方法

[0131] 分别将未处理和已处理过的硝酸纤维素膜按照上述实施例工艺流程制备心脏标志物联合检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较硝酸纤维素膜未处理和处理后荧光指标差异。

[0132] 1.4结果:

[0133] 1.4.1荧光强度比较

[0134] 取处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察荧光显色情况判断处理后膜对荧光淬灭能力的影响,结果见表1。结果显示,处理后的硝酸纤维素膜在溶液浸润性方面要明显优于未处理膜,尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明荧光淬灭能力降低,提高了反应灵敏度。

[0135] 表1硝酸纤维素膜荧光淬灭能力比较

[0136]

组别	MPO					
	200ng	100ng	50ng	10ng	5ng	1ng
聚乙烯醇组	205	98	52	11	4.9	1.1
未处理组	195	95	48	10	4.5	-

[0137] 1.4.2硝酸纤维素膜稳定性比较

[0138] 取聚乙烯醇处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察实验数据来判断处理后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表2。表2结果与表1结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0139] 表2硝酸纤维素膜加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0140]

组别	MPO					
	200ng	100ng	50ng	10ng	5ng	1ng
聚乙烯醇组	202	99	52	9.8	4.8	0.9
未处理组	198	93	47	9.5	4.6	-

[0141] 实验例2:

[0142] 2、石墨纳米颗粒修饰MPO抗体

[0143] 2.1材料与amp;方法

[0144] 2.1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司

[0145] 2.1.2石墨纳米颗粒修饰MPO抗体

[0146] 以石墨作为载体,取200μL石墨纳米颗粒(1mg/mL)溶液和25μMPO(40μmol/L)溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL。充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200r/m条件下,将上述混合溶液在摇床内避光震荡培养2h。反应后的混合溶液用超速离心机在13000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤4次,去除上清液中过量的未反应的MPO抗体。所得沉淀物即为石墨-MPO抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL并在4℃条件储存。

[0147] 2.2实验方法

[0148] 分别将石墨纳米颗粒修饰的MPO抗体与未修饰的MPO抗体按照上述实施例工艺流程制备MPO抗体检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较石墨纳米颗粒处理和未处理对蛋白吸附力和稳定性指标差异。

[0149] 2.3结果

[0150] 2.3.1蛋白吸附力比较

[0151] 取石墨纳米颗粒处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察显色情况判断处理后膜对蛋白吸附能力,结果见表3。结果显示,石墨纳米颗粒修饰组膜尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明蛋白吸附能力明显增强,提高了反应灵敏度。

[0152] 表3石墨纳米颗粒修饰对蛋白吸附能力比较

[0153]

组别	MPO					
	200ng	100ng	50ng	10ng	5ng	1ng
石墨组	205	103	199	11	5.1	0.9
未处理组	198	95	198	9.5	4.5	-

[0154] 2.3.2稳定性比较

[0155] 取石墨纳米颗粒处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察显色情况来判断石墨修饰后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表4。表4结果与表3结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0156] 表4加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0157]

组别	MPO					
	200ng	100ng	50ng	10ng	5ng	1ng
石墨组	204	99	48	11	5.1	0.9
未处理组	198	95	45	10	4.8	-

[0158] 以上所述仅为本发明的优选实例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡对本发明所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

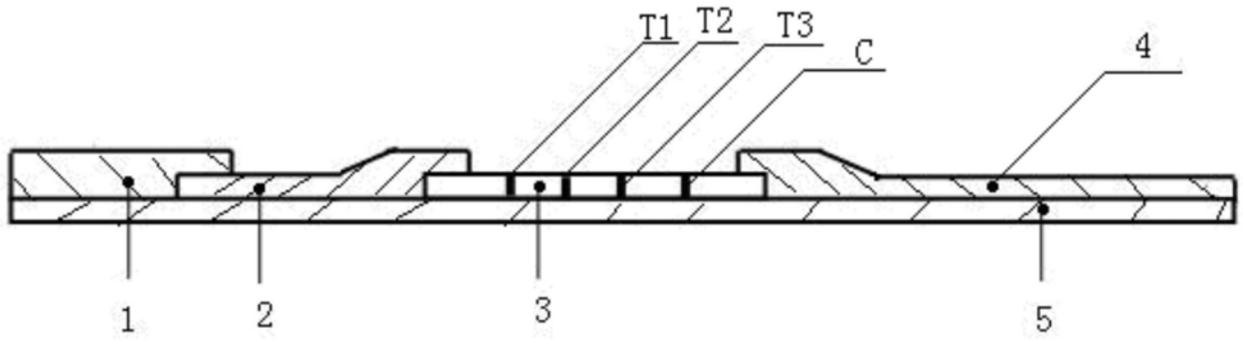


图1

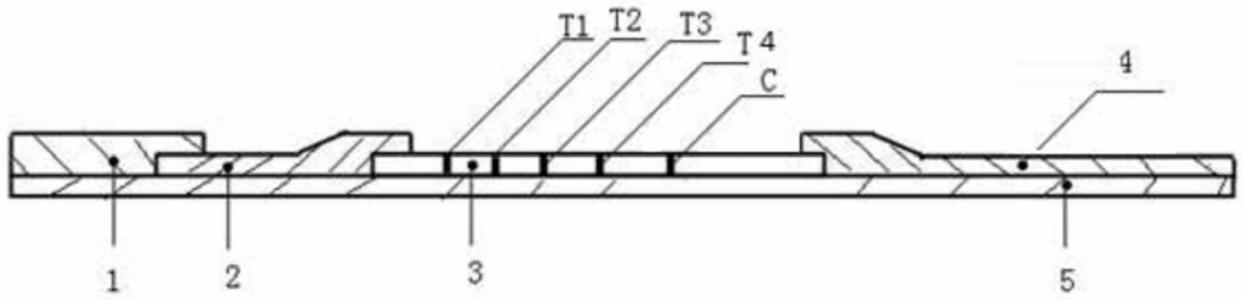


图2

专利名称(译)	心脏标志物的荧光微球联合检测装置及其制备方法		
公开(公告)号	CN109799334A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201910109522.8	申请日	2019-02-06
[标]发明人	王珺楠 杨小军 李欣 赵旻		
发明人	王珺楠 杨小军 李欣 赵旻		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种心脏标志物的荧光微球联合检测装置及其制备方法，属于医疗检测设备领域。样品垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板上，硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光抗体玻璃纤维膜搭接，免疫荧光抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫搭接，硝酸纤维素膜上设置固相有高特异性MPO抗体的第一检测线T1、固相有高特异性cTnl抗体的第二检测线T2、固相有高特异性NT-proBNP抗体的第三检测线T3、固相有高特异性D二聚体抗体的第四检测线T4和质控线C；质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。优点是有效的提高了反应的灵敏度，特异性，同样的阈值下，还可降低免疫微球的用量，节约成本，操作简便，实用性强。

