



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106153896 A

(43)申请公布日 2016. 11. 23

(21)申请号 201510545476.8

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2015.08.31

(66)本国优先权数据

201510157438.5 2015.04.04 CN

(71)申请人 吉林双正医疗科技有限公司

地址 130000 吉林省长春市绿园区中海凯
旋门A5幢

(72)发明人 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 王怡敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

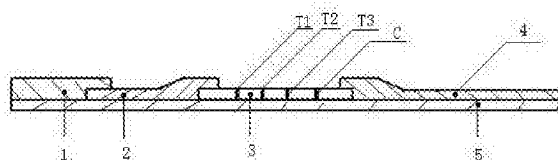
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置及其制
备方法

(57)摘要

本发明涉及一种MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置及其制备方法,属于医疗检测设备领域。由固相有纯化的高特异性MPO、cTnI和NT-proBNP抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。优点在于:结构简单,构思新颖,特异性强,既能同时检测标本中MPO、cTnI和NT-proBNP三种心肌标志物,又没有增加生产操作的复杂度。通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液,可保证免疫胶体金释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本。检测装置灵敏度高、特异性强、操作简便省时、实用性强。



1. 一种MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置,其特征在于:样品垫(1)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸收垫(4)分别粘贴在塑料板(5),所述硝酸纤维素膜(3)的两端分别与吸收垫(4)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜(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MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中缓慢加入浓度为0.5~2 mg/mL的单克隆抗体MPO、cTnI和NT-proBNP,形成单克隆抗体MPO、cTnI和NT-proBNP胶体金标记物,采用喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

(b)MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体、羊抗鼠IgG 抗体分别以1~2mg/mL 的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥,制得免疫硝酸纤维素膜;

(c)将预处理的样品垫、步骤(a)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(b)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸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。

3. 根据权利要求2所述的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

4. 根据权利要求2所述的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(a)所述的喷金缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-HcI浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

5. 根据权利要求2所述的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(c)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂S17组成,其中Tris-HCL液的浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂S17浓度为0.5~1%。

MPO、cTnI和NT-proBNP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MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置及其制备方法,利用胶体金免疫层析技术以及双抗体夹心法原理定量检测临床标本(全血/血清/血浆)中人髓过氧化物酶(MPO)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)的检测装置及其制备方法,可实现心肌标志物的灵敏、特异、快速检测。

背景技术

[0002] 急性心肌梗塞(AMI)是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死,严重威胁人类健康。对心肌梗塞预警、快速诊断及有效治疗评价是降低病人死亡率的关键。对于无典型胸痛和心电图改变不明显的心肌梗死患者,仅依靠心电图、超声心动图和心脏核磁共振,难以准确诊断。因此,检测血清心肌标志物是诊断AMI的必要依据。

[0003] 冠心病诊断检查技术发展迅速,除了ECG、血清生化指标、心肌损伤标志物之外,另有心脏彩超、心血管造影、核磁共振成像、计算机断层扫描等等。但是此类检查手段价格高昂,不适用于动态连续监测。上述各类检查手段中,ECG、心肌损伤标志物检测依然是临床价格最低廉、使用最广泛的方法,可是结果早期诊断急性心梗的特异性仅为90%左右,敏感性仅为45%左右,并且相当部分急性心梗的老年患者的ECG结果不会见到特异性ST-T改变。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征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。MPO是一种过氧化物酶,炎症时激活的嗜中性粒细胞发生脱颗粒并释放髓过氧化物酶,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。大量临床资料表明,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主要储存于心室肌细胞内。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] 目前检测MPO、cTnI、NT-proBNP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。金标免疫法需要标本量少,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。MPO可以预警心肌梗塞发生前3小时的风险,但其他炎症也可导致MPO指标的升高。cTnI心肌损伤后4-6小时开始升高,是评价心肌坏死的首选标志物,是检测心肌损伤的金标准。NT-proBNP可用于评价心肌梗塞后心脏功能,对预测疾病预后有助作用。

[0007] 纵观已有产品和文献报道,它们均是针对单一指标进行控制,只能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。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置及其制备方法,解决了现有技术存在的上述问题。本发明制备的人髓过氧化物酶(MPO)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)三合一联合检测装置,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。包括底板,在底板的一面顺次相互搭接地粘附有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。金标垫为涂覆有胶体金MPO/cTnI/NT-proBNP抗体的玻璃纤维素膜。硝酸纤维素膜上有三条检测线和一条质控线,所述三条检测线分别包被有MPO抗体、cTnI抗体、NT-proBNP抗体,所述质控线上包被有羊抗鼠IgG抗体。可实现MPO、cTnI和NT-proBNP的灵敏、特异、快速检测。

[0009] 本发明的上述目的通过以下技术方案实现:

MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置,样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4分别粘贴在塑料板5,所述硝酸纤维素膜3的两端分别与吸收垫4、免疫胶体金玻璃纤维膜2搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜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。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,包括如下步骤:

(a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中缓慢加入浓度为0.5~2 mg/mL的单克隆抗体MPO、cTnI和NT-proBNP,形成单克隆抗体MPO、cTnI和NT-proBNP胶体金标记物,采用喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

(b)MPO、cTnI、NT-proBNP抗体、羊抗鼠IgG抗体分别以1~2mg/mL的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥,制得免疫硝酸纤维素膜;

(c)将预处理的样品垫、步骤(a)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(b)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸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。

[0011] (d)通过胶体金检测仪检测,本联合检测装置检测人MPO最低检测浓度为5ng/mL、cTnI最低检测浓度为0.1ng/mL、NT-proBNP最低检测浓度为20pg/mL。

[0012] 步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

[0013] 步骤(a)所述的喷金缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-HcI浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

[0014] 步骤(c)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂S17组成,其中Tris-HCL液的浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂S17浓度为0.5~1%。

[0015] 本发明的有益效果在于:

1、本发明的检测装置结构简单,构思新颖,将MPO、cTnI和NT-proBNP抗体包被于硝酸纤维素膜膜上,特异性强,既能同时检测标本中MPO、cTnI和NT-proBNP,又没有增加生产操作的复杂度。

[0016] 2、免疫胶体金制备步骤中,通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液,可保证免疫胶体金释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本。

[0017] 3、本发明的检测装置不需要任何特殊仪器设备,检测成本低。

[0018] 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

[0019] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本申请的一部分,本发明的示意性实例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0020] 图1为本发明的结构示意图。

[0021] 图中:1、样品垫;2、免疫胶体金玻璃纤维膜;3、硝酸纤维素膜;4、吸收垫;5、塑料板;T1、第一检测线;T2、第二检测线;T3、第三检测线;C、质控线。

具体实施方式

[0022] 下面结合附图进一步说明本发明的详细内容及其具体实施方式。

[0023] 参见图1所示,本发明的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置,包括样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4、塑料板5,其中,所述样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4分别粘贴在塑料板5,所述硝酸纤维素膜3的两端分别与吸收垫4、免疫胶体金玻璃纤维膜2搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜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。

[0024] 本发明的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,包括固相有纯化的高特异性MPO、cTnI和NT-proBNP 抗体(检测线T1、T2和T3)和羊抗鼠IgG多克隆抗体(对照线)

的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料因此粘贴制成。具体如下步骤：

(a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中缓慢加入单克隆抗体MPO、cTnI和NT-proBNP,形成单克隆抗体MPO、cTnI和NT-proBNP胶体金标记物,采用喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜。

[0025] (b)MPO、cTnI、NT-proBNP抗体、羊抗鼠IgG 抗体分别以1~2mg/mL 的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥,制得免疫硝酸纤维素膜。

[0026] (c)将预处理的样品垫、步骤(a)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(b)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸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。

[0027] (d)通过胶体金检测仪检测,本联合检测装置检测人MPO最低检测浓度为5ng/mL、cTnI最低检测浓度为0.1ng/mL、NT-proBNP最低检测浓度为20pg/mL。

[0028] 步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

[0029] 步骤(a)所述的喷金缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、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,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,BSA浓度为0.5~1%。

[0030] 步骤(c)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂S17组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂S17浓度为0.5~1%。

[0031] 实施例：

1、胶体金溶液制备

在加热的100mL纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠1:(0.5~2),继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可。胶体金颗粒为20~60nm,本实施例选取30nm胶体金进行下一步实验。

[0032] 2、免疫胶体金制备

1)分别取100毫升30nm胶体金溶液,加入pH调节剂 140 μ L,混匀;静置5min;

2)在30nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液14 μ g的比例加入MPO、cTnI和NT-proBNP抗体,混匀;静置5min;

3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂 0.4毫升,混匀,静置5分钟;

4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀。

[0033] 3、采用优化喷金缓冲液(浓度为0.02mol/L的Tris-HCL液、浓度为5~20%的蔗糖、浓度为1~5%的海藻糖、浓度为1%的BSA,PH为8.5)稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜。

[0034] 4、固相硝酸纤维素膜

4.1对照线喷液量的选择

将纯化好的羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释到浓度为1mg/mL,用自动喷膜机喷涂质控线,喷膜量分别为1.6 μ L/cm、1.4 μ L/cm、1.2 μ L/cm,比较用不同喷膜量所得的划线效果。结果表明

1.4 μ I/cm喷膜量时所划线边缘整齐,线条精细。

[0035] 4.2硝酸纤维素膜检测线与对照线抗体的包被

当喷膜量为5 μ I/cm,将MPO、cTnI和NT-proBNP抗体稀释至1~2mg/ml,对照线羊抗鼠IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线。室温干燥过夜,储存备用。

[0036] 4.3样品垫预处理

将玻璃纤维用样品垫处理液(浓度为0.1mol/L的Tris-HCL液、浓度为0.5~1%的牛血清白蛋白BSA、浓度为0.1~0.2%的酪蛋白、浓度为0.5~1%的表面活性剂S17)浸泡10min,37 $^{\circ}$ C烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度。

[0037] 5、检测装置的组装

见图1所示,样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4分别粘贴在塑料板5,所述硝酸纤维素膜3的两端分别与吸收垫4、免疫胶体金玻璃纤维膜2搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜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。切成4mm宽小条,装于塑料壳中,用铝箔袋密封保存。常温保存,有效期18个月。

[0038] 6、定量检测:通过胶体金检测仪检测,本联合检测装置检测人MPO最低检测浓度为5ng/ml、cTnI最低检测浓度为0.1ng/ml、NT-proBNP最低检测浓度为20pg/ml。

[0039] 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。

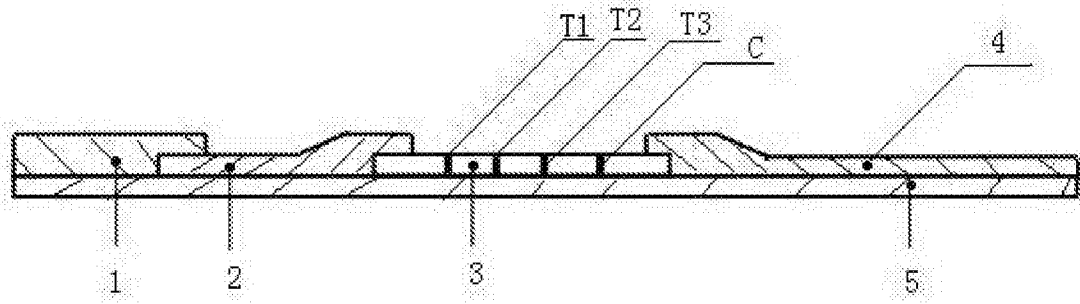


图1

专利名称(译)	MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置及其制备方法		
公开(公告)号	CN106153896A	公开(公告)日	2016-11-23
申请号	CN201510545476.8	申请日	2015-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
[标]发明人	杨小军 李欣 赵旻		
发明人	杨小军 李欣 赵旻		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/68 G01N33/573 G01N33/532		
代理人(译)	王怡敏		
优先权	201510157438.5 2015-04-04 CN		
外部链接	SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置及其制备方法，属于医疗检测设备领域。由固相有纯化的高特异性MPO、cTnI和NT-proBNP抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。优点在于：结构简单，构思新颖，特异性强，既能同时检测标本中MPO、cTnI和NT-proBNP三种心肌标志物，又没有增加生产操作的复杂度。通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液，可保证免疫胶体金释放完全的基础上，有效的提高了反应的灵敏度，同样的阈值下，还可降低免疫胶体金的用量，节约成本。检测装置灵敏度高、特异性强、操作简便省时、实用性强。

