



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061183 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810907836.8

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2018.08.07

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 杭州莱和生物技术有限公司

地址 310052 浙江省杭州市滨江区长河街
道滨安路688号2幢B楼一层、五层505-
512室

(72)发明人 汪惠泽 欧阳云 叶肖俊 葛秀龙

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限
公司 33246

代理人 黎双华 李欣玮

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

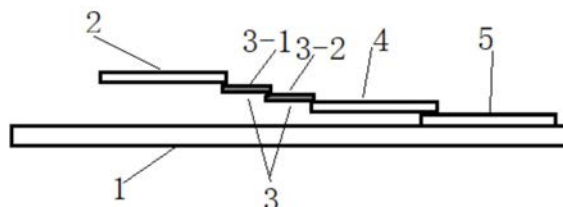
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒。该试剂盒能够快速定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体；其包括试纸条和壳体；试纸条由PVC底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成；结合垫内含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素、时间分辨荧光微球标记鸡IgG、生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体、生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体；硝酸纤维素膜上包含检测线和质控线。该试剂盒具有方便快捷、操作简单、读数时间短、特异性强、灵敏度高、检测结果准确的优点。



1. 一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,该试剂盒能够快速定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体;

该试剂盒包括试纸条和壳体;

所述试纸条由PVC底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成;

所述结合垫内含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素、时间分辨荧光微球标记鸡IgG、生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体、生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体;

所述硝酸纤维素膜(NC膜)上包含检测线和质控线。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次交错固定于PVC底板之上。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述结合垫由结合垫一和结合垫二组成,所述结合垫一搭接在样品垫下,结合垫二的一端搭接在结合垫一下,结合垫二的另一端搭接在硝酸纤维素膜上。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述试纸条的数量为两根;第一根试纸条的结合垫一内包含有生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体;结合垫二内包含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡IgG;第二根试纸条的结合垫一内包含有生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体;结合垫二内包含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡IgG。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体的特异性结合位点为肌钙蛋白I的23-29aa片段,生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体的特异性结合位点为肌酸激酶同工酶的258-272aa片段,生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体的特异性结合位点为肌红蛋白的30-224aa片段,生物素标记的D二聚体多克隆抗体采用鼠多抗,生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体的特异性结合位点为N末端脑钠肽前体的5-20aa片段。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述时间分辨荧光标记物为金属钕元素螯合物与苯乙烯单体共聚而成的微球,激发光波长为350nm,发射光波长为610nm,粒径为300nm。

7. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述第一根试纸条硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线为三条,分别包被有识别肌钙蛋白I 1-100aa位点的单克隆抗体、识别肌酸激酶同工酶全表位多克隆抗体、识别肌红蛋白全表位多克隆抗体,质控线为羊抗鸡IgG;第二根试纸条硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线为两条,分别包被有识别D二聚体全表位的多克隆抗体、识别N末端脑钠肽前体61-76aa位点的单克隆抗体,质控线为羊抗鸡IgG。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述第一根试纸条上硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线,其包被物料的顺序依次为羊抗鸡IgG、识别肌钙蛋白I 1-100aa位点的单克隆抗体、识别肌酸激酶同工酶全表位多克隆抗体、识别肌红蛋白全表位多克隆抗体;第二根试纸条上硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线,其包被物料的顺序依次为羊抗鸡IgG、识别D二聚体全表位的多克隆抗体、识别N末端脑钠肽前体61-76aa位点的单克

隆抗体。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述壳体包含上盖和底板,上盖有加样孔,读数窗口,手柄和一维码。

10. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述一维码包括产品标准曲线及批号信息,通过检测仪器进行读取。

一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,特别是涉及快速定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒。

背景技术

[0002] 急性冠脉综合征(acute coronary syndromes,ACS)是动脉粥样硬化斑块脱落、血小板聚集、血栓形成、心肌缺血和心肌坏死等临床病理生理改变引起的一系列临床症状,它包括了不稳定性心绞痛和急性心肌梗死AMI等各种因冠脉狭窄、阻塞引起心肌缺血以至梗死的综合症状。

[0003] 肌钙蛋白(Troponin)由肌钙蛋白I、T、C三亚基构成,它们和原肌球蛋白一起通过调节Ca²⁺对横纹肌动蛋白ATP酶的活性来调节肌动蛋白和肌球蛋白相互作用。当心肌损伤后,心肌肌钙蛋白复合物释放到血液中,4-6小时后,开始在血液中升高,升高的肌钙蛋白I能在血液中保持6-10天,提供了较长的检测期。心肌肌钙蛋白I(cTnI)具有高度的心肌特异性和灵敏度,所以已成为目前较理想的心肌梗死标志物。

[0004] 肌红蛋白(Myoglobin,Myo)是由一条肽链和一个血红素辅基组成的结合蛋白,是肌肉内储存氧的蛋白质。胸痛发作后最快2小时即可出现升高;严重的充血性心力衰竭和心脏外科手术病人,由于存在心肌损伤,所以也会升高。肌红蛋白是诊断急性心肌梗塞的敏感指标,所以肌红蛋白成为目前心肌梗死标志物之一。

[0005] 肌酸激酶(Creatine Kinase,CK)有四种同工酶形式:肌肉型(MM)、脑型(BB)、杂化型(MB)和线粒体型(MiMi),其中MB型主要存在于心肌细胞中。心肌梗死时,肌酸激酶在发病6小时内升高,24小时达高峰,3-4日内恢复正常,其中肌酸激酶同工酶CK-MB诊断特异性较高,所以其成为目前心肌梗死标志物之一。

[0006] D-二聚体(D-Dimer)是交联纤维蛋白经纤溶酶水解后的一种特异性降解产物,对于诊断和治疗纤溶系统疾病(DIC,各种血栓)及与纤溶系统有关疾病,以及溶栓治疗监测,有着重要的意义。纤维蛋白降解产物D的水品升高,表明体内存在着频繁的纤维蛋白降解过程。因此,纤维D二聚体是深静脉血栓(DVT),肺栓塞(PE),弥漫性血管内凝血(DIC)的关键指标。

[0007] BNP隶属于钠尿肽家族,是一种肽类激素,具有利尿、利钠、抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统、舒张血管和降低血压等作用,并参与人体水盐平衡的调节。而NT-proBNP则是BNP形成过程中所产生的无生物活性的氨基酸片段。正常人体内NT-proBNP水平极低,当因容量负荷引起心室压力的改变以及室壁张力的增加时,就会刺激BNP分泌,因此血液中BNP/NT-proBNP浓度的升高能很好地反映心室结构和功能的改变,心脏有无损伤及损伤程度。大量基础和临床研究表明,BNP/NT-proBNP是心功能紊乱最敏感和最特异的指标,是诊断心力衰竭的一个具有划时代意义的客观标志物,与美国纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级比较,能更真实反映心功能的变化,有利于在早期阶段或病变轻微阶段发现心衰,区分无症状或者症状轻微的心衰患者(NYHA I级和II级)与非心衰患者。对于慢性心衰患者的危险分层及

预后评估,心衰治疗效果的监测等也有很好指导意义

[0008] cTnI、CK-MB、Myo是诊断急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的早期较佳的高特异性指标,而NT-proBNP、cTnI是诊断急性冠脉综合征(acute coronary syndromes,ACS)的有效指标且与ACS的病变严重程度有一定的相关性。cTnI、NT-proBNP对慢性心力衰竭(CHF)的诊断具有较高特异性,同时,NT-proBNP、cTnI、D-Dimer在对肺栓塞(PE)诊断具有较高的临床诊断意义,因此,本发明五项指标的联合检测则更有助于早期准确地诊断心肺功能,根据有临床指导意义。

[0009] 目前,时间分辨荧光免疫分析技术是与化学发光、电化学发光并驾齐驱的三种超敏免疫分析方法之一。其原理是采用较长荧光半衰期的稀土离子作标记物,由于这种标记物Stokes位移大($>150\text{nm}$)且荧光寿命比本底物质荧光寿命高5~6个数量级,因此,测定时只要延缓测量时间,待本底物质的荧光充分衰减后再测定标记物的信号就可有效地消除各种非特异性荧光的干扰,获得很高的灵敏度。

[0010] 时间分辨荧光微球(Time Resolved Fluorescent Microsphere)作为一种特殊的功能微球,每个微球中可包裹成千上万个荧光分子,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度;同时荧光微球表面修饰有合适密度的羧基或其它功能基团,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高了标记物的稳定性。更为重要的是由于微球包埋的稀土离子已经过了螯合,无需解离增强步骤,因此从根本上解决了传统的DELFI A法只能在液相中而不能在固相界面反应的问题,从而解决了将时间分辨荧光应用于免疫层析平台的技术瓶颈,在此基础上可开发出灵敏度高于普通胶体金或有色乳胶免疫层析方法1-3个数量级的定量检测技术。同样时间分辨荧光微球也可以用于微孔板超敏定量检测技术平台,只需洗涤几次后即可进行荧光测定,操作步骤比传统的DELFI A简单很多,更容易实现自动化操作。

[0011] 生物素-亲合素系统(Biotin-Avidin-System,BAS)是70年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。随着各种生物素衍生物的出现,BAS很快被广泛应用于医学各领域。近年大量研究证实,生物素-亲合素系统几乎可与目前研究成功的各种标记物结合,如酶、荧光素、同位素、凝集素、铁蛋白、SPA等。生物素-亲合素与标记试剂高亲和力的牢固结合及多级放大效应,使BAS免疫标记和有关示踪分析更加灵敏。BAS已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。

[0012] 链霉亲和素(streptavidin SA)是由链霉菌streptomyces avidinii分泌的一种蛋白质,分子量为65kD。链霉亲和素分子由4条相同的肽链组成,其氨基酸组成中甘氨酸和丙氨酸的含量较大,而且结合生物素的活性基团也是肽链中的色氨酸残基。链霉亲和素分子中每条肽链都能结合一个生物素,因此与亲和素一样,一个链霉亲和素分子也能结合4个生物素分子。二者亲和常数K亦为 $10^{15}/\text{mol}$ 。

发明内容

[0013] 本发明的目的在于提供一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒。本发明能够快速定量地对肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体进行检测,检测方便,成本低,准确度高,特异性高,能够有效的在临床心肺功能疾病的诊断中进行应用。

[0014] 为了达到上述的目的,本发明采取以下技术方案:

[0015] 一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,该试剂盒能够快速定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体;

[0016] 该试剂盒包括试纸条和壳体;

[0017] 所述试纸条由PVC底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成;

[0018] 所述结合垫内含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素、时间分辨荧光微球标记鸡IgG、生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体、生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体;

[0019] 所述硝酸纤维素膜(NC膜)上包含检测线和质控线。

[0020] 在上述试剂盒中,进一步地,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次交错固定于PVC底板之上。

[0021] 在上述试剂盒中,进一步地,所述结合垫由结合垫一和结合垫二组成,所述结合垫一搭接在样品垫下,结合垫二的一端搭接在结合垫一下,结合垫二的另一端搭接在硝酸纤维素膜上。

[0022] 在上述试剂盒中,进一步地,所述试纸条的数量为两根;第一根试纸条的结合垫一内包含有生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体;结合垫二内包含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡IgG;第二根试纸条的结合垫一内包含有生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体;结合垫2内包含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡IgG。

[0023] 更进一步地,所述生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体的特异性结合位点为肌钙蛋白I的23-29aa片段,生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体的特异性结合位点为肌酸激酶同工酶的258-272aa片段,生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体的特异性结合位点为肌红蛋白的30-224aa片段,生物素标记的D二聚体多克隆抗体采用鼠多抗,生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体的特异性结合位点为N末端脑钠肽前体的5-20aa片段。

[0024] 在上述试剂盒中,进一步地,所述时间分辨荧光标记物为金属铕元素螯合物与苯乙烯单体共聚而成的微球,激发光波长为350nm,发射光波长为610nm,粒径为300nm。

[0025] 更进一步地,所述第一根试纸条硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线为三条,分别包被有识别肌钙蛋白I 1-100aa位点的单克隆抗体、识别肌酸激酶同工酶全表位多克隆抗体、识别肌红蛋白全表位多克隆抗体,质控线为羊抗鸡IgG;第二根试纸条硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线为两条,分别包被有识别D二聚体全表位的多克隆抗体、识别N末端脑钠肽前体61-76aa位点的单克隆抗体,质控线为羊抗鸡IgG。

[0026] 更进一步地,所述第一根试纸条上硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线,其包被物料的顺序依次为羊抗鸡IgG、识别肌钙蛋白I 1-100aa位点的单克隆抗体、识别肌酸激酶同工酶全表位多克隆抗体、识别肌红蛋白全表位多克隆抗体;第二根试纸条上硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线,其包被物料的顺序依次为羊抗鸡IgG、识别D二聚体全表位的多克隆抗体、识别N末端脑钠肽前体61-76aa位点的单克隆抗体。

[0027] 在上述试剂盒中,进一步地,所述壳体包含上盖和底板,上盖有加样孔,读数窗口,手柄和一维码。

[0028] 在上述试剂盒中,进一步地,所述一维码包括产品标准曲线及批号信息,通过检测仪器进行读取。

[0029] 本发明可以定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体的应用原理在于:首先通过完整的企业内部参考品溯源链分别配制不同浓度的肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D二聚体和N末端脑钠肽前体企业内部参考品(肌钙蛋白I的线性范围为0.1-50ng/ml,其企业内部参考品浓度分别为0.1、0.3、2、10、30、50ng/ml;肌酸激酶同工酶的线性范围为2.5-80ng/ml,其企业内部参考品浓度分别为2.5、5、15、30、60、80ng/ml;肌红蛋白线性范围为30-600ng/ml,其企业内部参考品浓度分别为30、50、100、250、450、600ng/ml;D二聚体线性范围为100-8000ng/ml,其企业内部参考品浓度分别为100、500、1000、2000、5000、8000ng/ml;N末端脑钠肽前体线性范围为100-30000pg/ml,其企业内部参考品浓度分别为100、300、1000、5000、15000、30000pg/ml),根据每个指标不同浓度的企业内部参考品检测结果的信号值及对应的参考品浓度建立标准曲线,并记录保存到相应的一维码中,然后在临床的应用过程中,根据每个临床样本的检测信号值反推出相应的浓度,即可通过标准曲线定量检测结果。

[0030] 本发明与现有技术相比,具有如下优点:

[0031] 1、本发明提供的抗体标记方法和生物素标记方法不需要借助复杂昂贵的设备即可大规模的生产应用。

[0032] 2、本发明提供的标记抗体的位点、对应的包被抗体的结合位点以及两根试纸条上不同位置的包被方式可以有效的解决五个指标之间彼此交叉反应所产生的干扰问题,从而更好的在临床心肺功能疾病中的诊断应用。

[0033] 3、本发明的方法及在免疫诊断中的应用不需要昂贵仪器,操作流程简便,成本低,快速、准确度高,特异性高等便于在条件落后及不发达地区开展应用。

附图说明

[0034] 图1本发明的试纸条的结构示意图;

[0035] 图2本发明的壳体的结构示意图;

[0036] 图3本发明实施例1中肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体的标准曲线;

[0037] 图4本发明中实施例1的与雅培化学发光检测试剂的临床相关性分析结果。

具体实施方式

[0038] 以下具体实施例是对本发明提供的方法与技术方案的进一步说明,但不应理解成对本发明的限制。

[0039] 实施例1本发明提供的一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒的制备

[0040] (1) 样品垫的处理

[0041] 配制处理液(0.1M Tris+1.5%BSA+1%Tw-20,pH7.4),然后通过移液枪移取50ml至一张20*30cm样品垫上,均匀涂抹后,放置37℃烘干6h,烘干后干燥保存备用。

[0042] (2) 生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体、生物素标记的D-二聚体多克隆抗体和生物素标记

的N末端脑钠肽前体单克隆抗体的方法

[0043] 首先取五个2ml的离心管,分别加入1ml Borax缓冲液(0.1M,pH8.0);然后分别加入肌钙蛋白I单克隆抗体、肌酸激酶同工酶单克隆抗体、肌红蛋白单克隆抗体、D-二聚体多克隆抗体、N末端脑钠肽前体单克隆抗体0.5mg,振荡混匀,接着加入生物素,抗体:生物素的摩尔比为1mol:20-50mol,然后在混匀仪上反应1h;反应结束后将溶液移至透析袋中,透析袋两边系紧后放入透析液中透析,反应后溶液与透析液的体积比至少为1:100,透析4个小时,然后更换透析液,共透析四次,透析结束后收集溶液即为生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体、生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体。

[0044] (3) 时间分辨荧光微球

[0045] 时间分辨荧光微球是采用金属钕元素螯合物与苯乙烯单体共聚而成,激发光波长为350nm,发射光波长为610nm,粒径为300nm。

[0046] (4) 时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和鸡IgG的方法

[0047] 首先取两个2ml的离心管,分别加入0.2ml MES缓冲液(0.1M,pH6.0),然后加入1mg时间分辨荧光微球,振荡混匀,接着加入活化剂EDC(50mg/ml) 30 μ l,NHS(50mg/ml) 15 μ l,活化反应1h,然后离心去上清,沉淀物用0.3ml MES缓冲液(0.1M,pH6.0)复溶,然后分别加入链霉亲和素和鸡IgG 20-30 μ g,反应1h,反应结束后加入BSA 1mg,封闭反应1h,反应结束后离心去上清,沉淀物用0.3ml MES缓冲液(0.1M,pH6.0)复溶即为时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡IgG。

[0048] (5) 硝酸纤维素膜包被方法

[0049] 首先将羊抗鸡IgG、肌钙蛋白I单克隆抗体、肌酸激酶同工酶多克隆抗体、肌红蛋白多克隆抗体分别稀释至浓度1.0-1.5mg/ml,0.6-1.2mg/ml,0.5-1.5mg/ml,1.0-1.5mg/ml然后通过Bio-DotXYZ3050三维喷点平台以1.0 μ l/cm的喷量喷于试纸条其中一根硝酸纤维素膜(NC膜)上;然后再将羊抗鸡IgG、D二聚体多克隆抗体、N末端脑钠肽前体单克隆抗体分别稀释至浓度1.0-1.5mg/ml,0.8-1.2mg/ml,0.7-1.3mg/ml然后通过Bio-DotXYZ3050三维喷点平台以1.0 μ l/cm的喷量喷于另一根硝酸纤维素膜(NC膜)上,然后放置37℃烘箱烘干6h,然后放置干燥环境中备用。

[0050] (6) 试纸条的组装

[0051] 试剂盒中包含两根试纸条,每根试纸条由PVC底板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5组成,具体结构参见示意图1;样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5依次交错固定于PVC底板1之上。

[0052] 结合垫由结合垫一3-1和结合垫二3-2组成,所述结合垫一3-1搭接在样品垫2下,结合垫二3-2的一端搭接在结合垫一3-1下,结合垫二3-2的另一端搭接在硝酸纤维素膜4上。

[0053] 第一根试纸条的结合垫一内包含有生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体;结合垫二内包含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡IgG;第二根试纸条的结合垫一内包含有生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体;结合垫二内包含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素和时间分辨荧光微球标记鸡

IgG。

[0054] 其中,生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体的特异性结合位点为肌钙蛋白I的23-29aa片段,生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体的特异性结合位点为肌酸激酶同工酶的258-272aa片段,生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体的特异性结合位点为肌红蛋白的30-224aa片段,生物素标记的D二聚体多克隆抗体采用鼠多抗,生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体的特异性结合位点为N末端脑钠肽前体的5-20aa片段

[0055] 硝酸纤维素膜(NC膜)上包含五条检测线和两条质控线。第一根试纸条硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线为三条,分别包被有识别肌钙蛋白I 1-100aa位点的单克隆抗体、识别肌酸激酶同工酶全表位多克隆抗体、识别肌红蛋白全表位多克隆抗体,质控线为羊抗鸡IgG;第二根试纸条硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线为两条,分别包被有识别D二聚体全表位的多克隆抗体、识别N末端脑钠肽前体61-76aa位点的单克隆抗体,质控线为羊抗鸡IgG。

[0056] 第一根试纸条上硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线,其包被物料的顺序依次为羊抗鸡IgG、识别肌钙蛋白I 1-100aa位点的单克隆抗体、识别肌酸激酶同工酶全表位多克隆抗体、识别肌红蛋白全表位多克隆抗体;第二根试纸条上硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线,其包被物料的顺序依次为羊抗鸡IgG、识别D二聚体全表位的多克隆抗体、识别N末端脑钠肽前体61-76aa位点的单克隆抗体。

[0057] (7) 试剂盒的组装

[0058] 试剂盒由试纸条和壳体组成。壳体分为包含上盖和底板,上盖结构如图2所示,上盖有加样孔6,读数窗口7,手柄8和一维码9。一维码包括产品标准曲线及批号信息,通过检测仪器进行读取。

[0059] (8) 试剂盒标准曲线的制作

[0060] 取肌钙蛋白I浓度分别为0.1、0.3、2、10、30、50ng/ml的企业内部参考品;肌酸激酶同工酶浓度分别为2.5、5、15、30、60、80ng/ml的企业内部参考品;肌红蛋白浓度分别为30、50、100、250、450、600ng/ml的企业内部参考品;D二聚体浓度分别为100、500、1000、2000、5000、8000ng/ml的企业内部参考品;N末端脑钠肽前体浓度分别为100、300、1000、5000、15000、30000pg/ml的企业内部参考品,每个浓度重复检测3次做平均值,然后分别以五个指标各浓度的平均值和信号值以直线拟合方式建立标准曲线,具体见图3。

[0061] (9) 五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒准确度检测

[0062] 取肌钙蛋白I浓度分别为0.1、0.3、10ng/ml的企业内部参考品;肌酸激酶同工酶浓度分别为2.5、5、30ng/ml的企业内部参考品;肌红蛋白浓度分别为30、50、250ng/ml的企业内部参考品,D二聚体浓度分别为500、1000、2000ng/ml的企业内部参考品,N末端脑钠肽前体浓度分别为300、5000、15000pg/ml的企业内部参考品,每个浓度重复检测3次做平均值,然后计算与原始浓度的相对偏差,具体数值分析见表1。

[0063] (10) 五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒精密度检测

[0064] 取肌钙蛋白I浓度分别为0.1、0.3、10ng/ml的企业内部参考品;肌酸激酶同工酶浓度分别为2.5、5、30ng/ml的企业内部参考品;肌红蛋白浓度分别为30、50、250ng/ml的企业内部参考品,D二聚体浓度分别为500、1000、2000ng/ml的企业内部参考品,N末端脑钠肽前体浓度分别为300、5000、15000pg/ml的

[0065] 表1实施例1准确度分析结果

[0066]

准确度分析																			
cTnI	0.1	0.3	10	CK-MB	2.5	5	30	MYO	30	50	250	D-Dimer	500	1000	2000	NT-proBNP	300	5000	15000
1	0.11	0.28	9.27	1	2.44	5.21	28.69	1	29.94	54.61	268.27	1	477.39	1025.87	1945.81	1	294.55	4897.58	14552.61
2	0.11	0.30	9.68	2	2.68	5.51	28.84	2	32.48	52.63	271.84	2	482.19	998.36	1855.94	2	299.28	4951.51	15948.71
3	0.10	0.33	10.02	3	2.69	5.33	29.97	3	31.69	49.94	270.94	3	492.28	1011.18	1901.22	3	278.84	4799.21	16001.78
平均值	0.11	0.30	9.66	平均值	2.60	5.35	29.17	平均值	31.37	52.39	270.35	平均值	483.95	1011.80	1900.99	平均值	290.89	4882.77	15501.03
偏差%	6.67	1.11	-3.43	偏差%	4.13	7.00	-2.78	偏差%	4.57	4.79	8.14	偏差%	-3.21	1.18	-4.95	偏差%	-3.04	-2.34	3.34

[0067] 表2实施例1的精密度分析结果

[0068]

精密度分析																			
cTnI	0.1	0.3	10	CK-MB	2.5	5	30	MYO	30	50	250	D-Dimer	500	1000	2000	NT-proBNP	300	5000	15000
1	0.11	0.28	9.27	1	2.44	5.21	28.69	1	29.94	54.61	268.27	1	477.39	1025.87	1945.81	1	294.5	4897.5	14552.61
2	0.11	0.30	9.68	2	2.68	5.51	28.84	2	32.48	52.63	271.84	2	482.19	998.36	1855.94	2	299.2	4951.5	15948.71
3	0.10	0.33	10.02	3	2.69	5.33	29.97	3	31.69	49.94	270.94	3	492.28	1011.18	1901.22	3	278.8	4799.2	16001.78
4	0.11	0.32	9.18	4	2.39	4.61	28.64	4	32.84	53.21	264.76	4	460.89	1008.78	1889.16	4	281.4	4649.6	14002.18
5	0.10	0.32	9.45	5	2.29	4.98	29.22	5	33.11	51.88	269.98	5	459.67	964.55	1944.82	5	312.5	4778.9	13893.33
6	0.09	0.31	10.42	6	2.31	5.41	32.54	6	28.67	46.38	248.75	6	466.73	922.89	1866.83	6	322.7	5318.6	14778.22
7	0.10	0.29	10.64	7	2.30	5.39	31.84	7	30.17	49.97	250.77	7	520.22	978.18	2108.11	7	278.1	5226.3	16221.30
8	0.12	0.28	10.85	8	2.59	5.38	32.44	8	29.64	50.18	249.59	8	518.99	1064.77	2201.49	8	299.1	5468.7	16000.77
9	0.11	0.27	9.34	9	2.71	4.61	31.95	9	28.78	50.16	247.99	9	533.77	1088.11	2199.17	9	301.2	4600.1	16423.47
10	0.11	0.30	9.28	10	2.69	4.67	30.18	10	28.62	51.27	253.13	10	511.46	1005.79	2111.88	10	311.8	4610.0	15889.99
CV %	7.96	6.67	6.38	CV %	7.18	7.06	5.29	CV %	5.82	4.45	3.98	CV %	5.50	4.69	6.88	CV %	5.10	6.27	6.25

[0069] 企业内部参考品,每个浓度重复检测10次做变异系数(CV),具体数值分析见表2。

[0070] (11)快速定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D二聚体和N末端脑钠肽前体五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒与罗氏化学发光检测试剂的临床相关性分析结果的步骤如下:

[0071] 取30份经雅培发光试剂检测定值的肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶肌红蛋白临床阳性样本,30份经罗氏发光试剂检测定值的D二聚体、N末端脑钠肽前体临床阳性样本,并将以上用本试剂盒再次检测,然后将各自的检测结果建立线性相关性,计算相关性系数R值。具体见图4。

[0072] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求保护范围内。

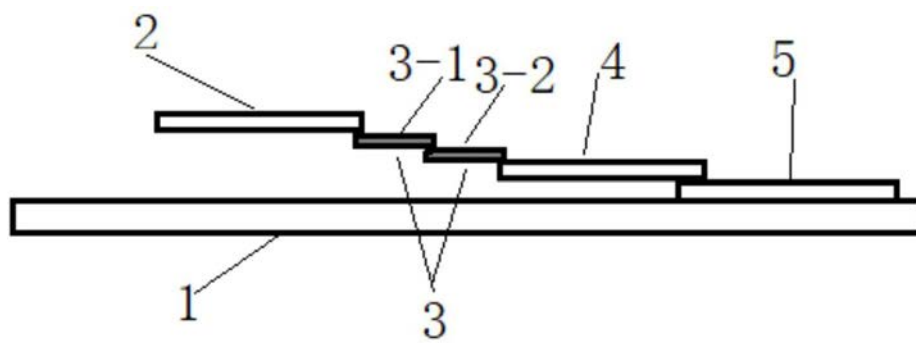


图1

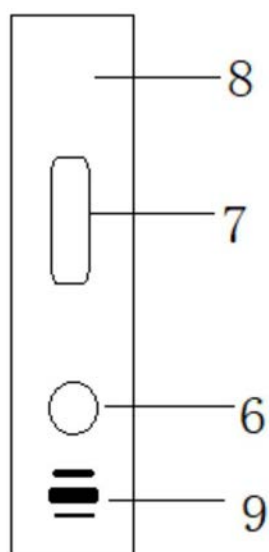
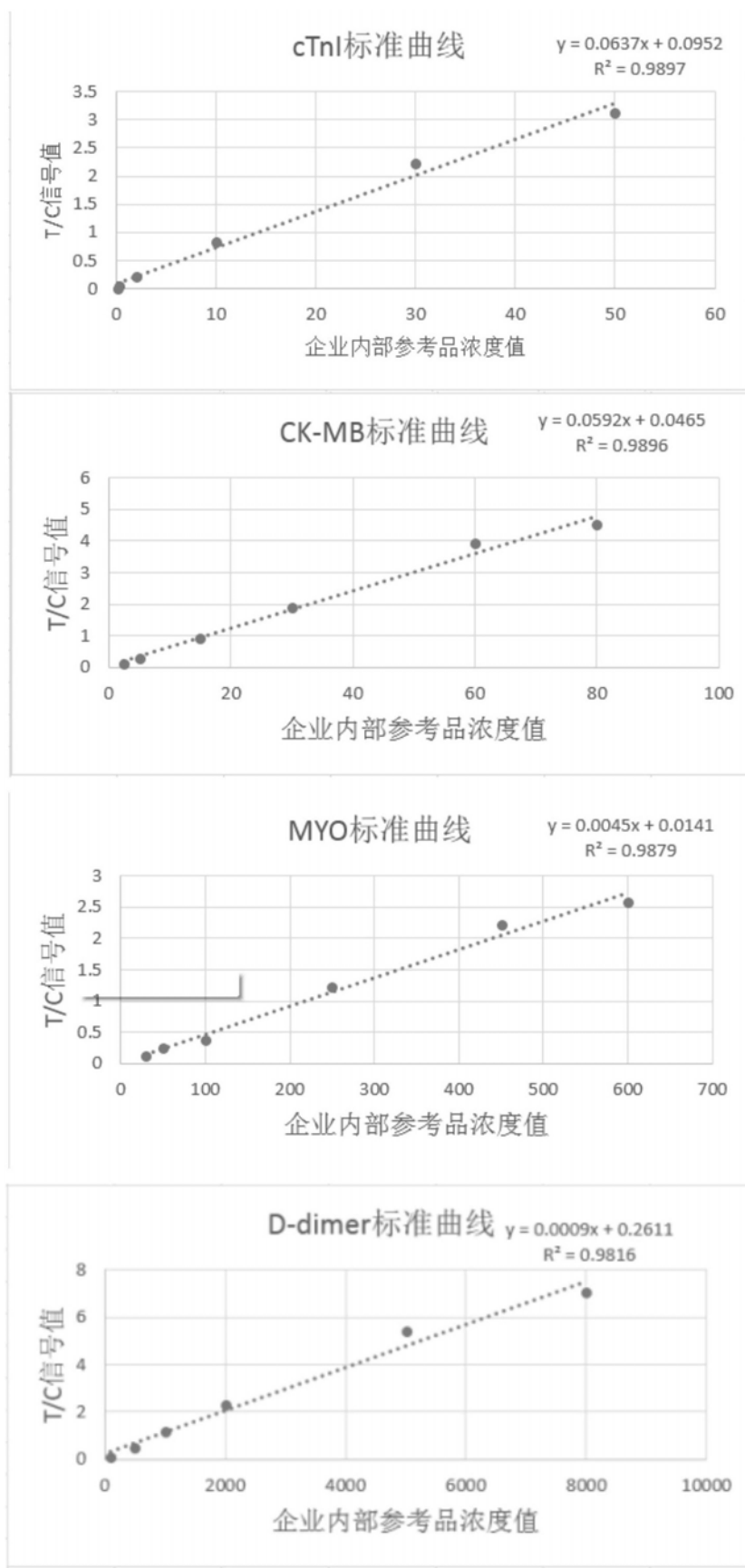


图2



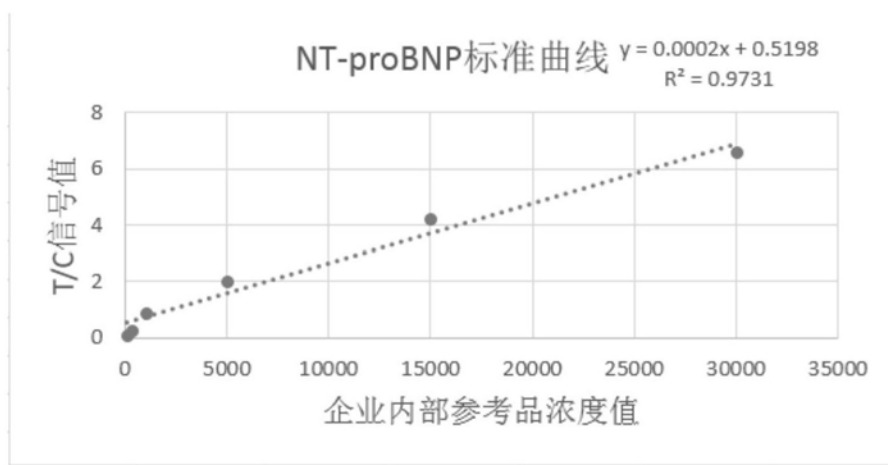
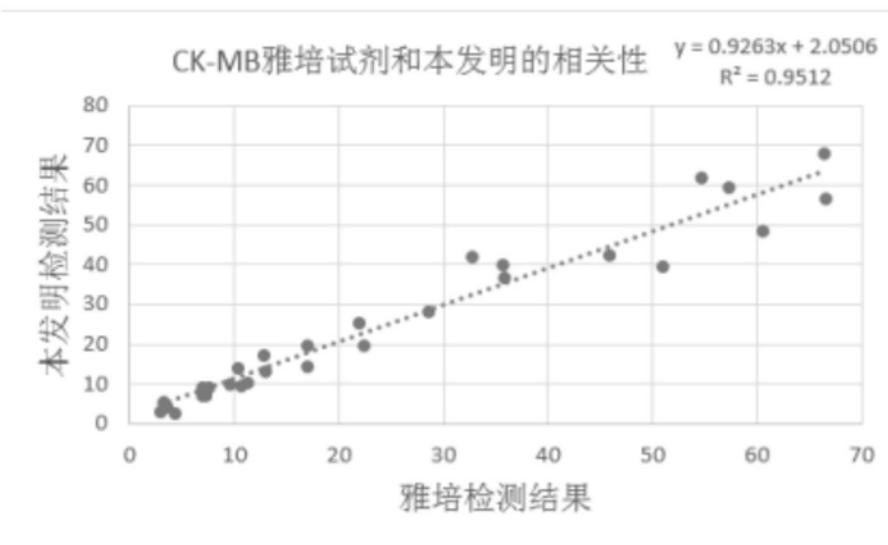
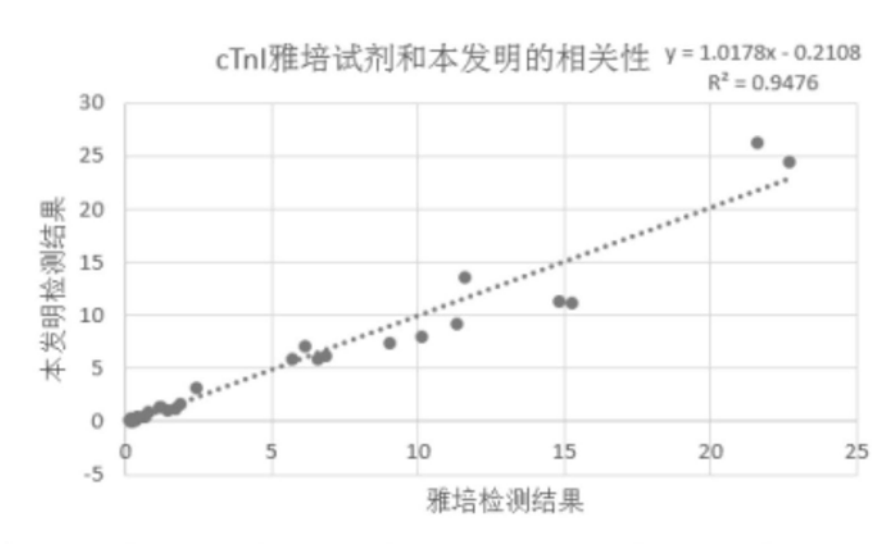


图3



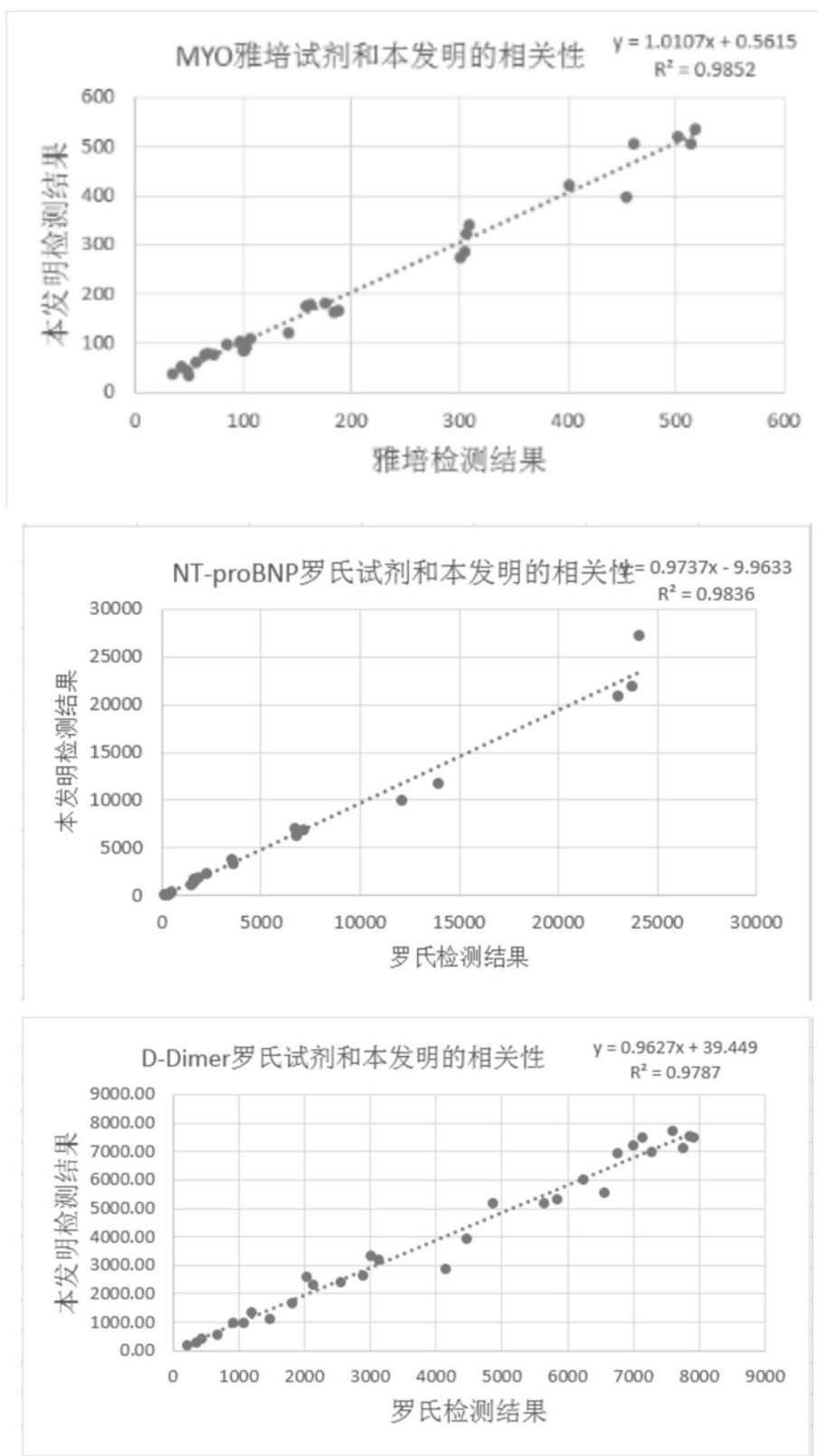


图4

专利名称(译)	一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	CN109061183A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810907836.8	申请日	2018-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	杭州莱和生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州莱和生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州莱和生物技术有限公司		
[标]发明人	汪惠泽 欧阳云 叶肖俊 葛秀龙		
发明人	汪惠泽 欧阳云 叶肖俊 葛秀龙		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/573 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/582 G01N2800/323 G01N2800/325		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种五合一的时间分辨荧光免疫层析试剂盒。该试剂盒能够快速定量检测肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、D-二聚体和N末端脑钠肽前体；其包括试纸条和壳体；试纸条由PVC底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成；结合垫内含有时间分辨荧光微球标记链霉亲和素、时间分辨荧光微球标记鸡IgG、生物素标记的肌钙蛋白I单克隆抗体、生物素标记的肌酸激酶同工酶单克隆抗体、生物素标记的肌红蛋白单克隆抗体、生物素标记的D-二聚体多克隆抗体、生物素标记的N末端脑钠肽前体单克隆抗体；硝酸纤维素膜上包含检测线和质控线。该试剂盒具有方便快捷、操作简单、读数时间短、特异性强、灵敏度高、检测结果准确的优点。

