



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106546725 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201610946339.X

(22)申请日 2016.10.26

(71)申请人 沈阳优宁生物科技有限公司

地址 110171 辽宁省沈阳市浑南新区南屏
东路18-1号综合楼2207-2213

(72)发明人 黄雪莹 吴琼 王建伟 高占岩
宋佳美 李祝华 吕辉 宋建英
孙秒

(74)专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限
公司 21107

代理人 史力伏

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

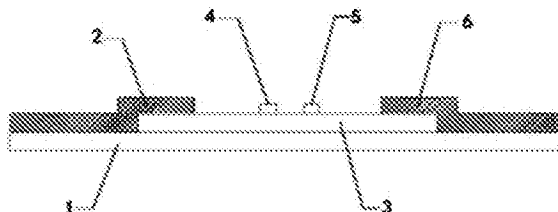
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的
制备方法及应用

(57)摘要

本发明属于免疫检测领域,尤其涉及一种荧光免疫层析用稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的制备方法及应用。荧光免疫层析用稀土元素-聚苯乙烯微球冻干粉,包括稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体和稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体。冻干粉中的抗体与待测抗原在溶液中反应充分,明显降低了批间差异,提高了试验稳定性和可靠性,且提高了检测的敏感性,可达到定性和定量检测的目的。



1. 一种稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉,其特征在于,成分包括:稀土元素-聚苯乙烯微球-抗体和稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体。

2. 如权利要求1所述冻干粉,其特征在于,制备方法具体包括以下步骤:

(1) 稀土元素-聚苯乙烯微球的活化处理:稀土元素-聚苯乙烯微球原球置于离心管中,进行超声3-5分钟处理,在转数为8000-12000rpm条件下,离心8-10min;离心得到的沉淀加入初洗缓冲液,重复超声和离心处理2-5次;按100ul稀土元素-聚苯乙烯微球加入25-50ul EDC溶液的比例,向离心管中加入0.1mg/ul EDC溶液,反应5-10min,按100ul稀土元素-聚苯乙烯微球加入50-100ul NHS溶液,再加入0.1mg/ul NHS溶液,反应7-20min,超声处理3-5min,即得活化的稀土元素-聚苯乙烯微球;

(2) 偶联反应:将活化的稀土元素-聚苯乙烯微球,在转数为8000-12000rpm条件下,离心处理8-10min,离心得到的沉淀加入初洗缓冲液,进行超声处理3-5min,重复超声和离心处理2-5次后:按每100ul活化稀土元素-聚苯乙烯微球加入30-300ug的比例加入待测抗原的抗体,然后于旋转培养器中,进行偶联反应1-5h,得到稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原抗体复合物溶液;将活化的稀土元素-聚苯乙烯微球,转数为8000-12000rpm条件下,离心处理8-10min,离心得到的沉淀加入初洗缓冲液,进行超声处理3-5min,重复超声和离心处理2-5次:每100ul活化稀土元素-聚苯乙烯微球加入30-300ug质控抗体,然后于旋转培养器中,进行偶联反应1-5h,得到稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体复合物溶液;

(3) 封闭处理:分别将步骤(2)制备的两个偶联反应得到的微球-抗体溶液,超声处理3-5min后,加入封闭溶液,反应0.5-3h后,超声处理3-5min;最后在8000-12000rpm条件下离心处理8-10min,离心得到的沉淀加入终洗缓冲液超声清洗,重复离心、超声和清洗2-5次,分别获得稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体以及稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体复合物;

(4) 按比例(1:5-5:1)取稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体和稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体复合物,加入冻干液,两种微球标记物总量与冻干液的用量比例为1:100-500,冷冻干燥,即成冻干粉。

3. 如权利要求2所述的冻干粉的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:(1)向10-50mM Tris缓冲液中加入蔗糖,使Tris缓冲液中蔗糖终浓度为5-30%;(2)向步骤(1)得到的溶液中加入BSA,并使Tris缓冲液中BSA终含量达到0.1-1.0%;(3)向步骤(2)得到的溶液中加入Tween-20,并使Tris缓冲液中Tween-20最终含量达到0.1-1.0%;(4)加入Proclin300,至其终浓度0.1-1.0%。

4. 如权利要求2所述的冻干粉的制备方法,其特征在于,所述的稀土元素-聚苯乙烯微球为包裹稀土元素的COH-聚苯乙烯微球;所述的稀土元素为钐、铈、钕、铽和镝中镧系元素;所述的质控抗体为动物免疫球蛋白抗体,优选为兔IgG或鸡IgY;所述的微球尺寸为10-500nm,优选为100-300nm。

5. 如权利要求1所述的冻干粉的制备方法,其特征在于,所述的初洗缓冲液为50mM的MES溶液;所述的封闭溶液为40mM的乙醇胺溶液,其中含有0.5%BSA;所述的终洗缓冲液为20mM的Tris溶液,其中含有0.5%的BSA和0.1%的吐温20;所述的初洗缓冲液、封闭缓冲液和终洗缓冲液的具体用量为:每100ul稀土元素-聚苯乙烯微球加入100-500ul初洗缓冲液;每100ul稀土元素-聚苯乙烯微球-抗体复合物溶液加入100-250ul的封闭缓冲液;每100ul稀

土元素-聚苯乙烯微球-抗体复合物加入100-500u1终洗缓冲液。

6. 如权利要求2所述的冻干粉的制作方法,其特征在于,所述的冷冻干燥条件为:置于冷冻干燥机中,冻干条件为-40℃预冻3小时,然后再-50℃冷阱条件下,冷冻干燥5-15小时,升温至10℃,维持2-5小时,最终得到微黄色冻干粉。

7. 一种采用权利要求1所述的冻干粉制备得荧光免疫层析用的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括冻干粉、样本稀释液及检测卡。

8. 如权利要求7所述的所述的试剂盒,其特征在于,所述的样本稀释液为含有封闭剂、表面活性剂及防腐剂的缓冲液;所述的缓冲液为磷酸盐、醋酸盐或Tris缓冲液,所述的表面活性剂为吐温20、吐温80、S9、S17中的一种或几种;所述的防腐剂为叠氮钠或proclin;所述的封闭剂为牛血清白蛋白或酪蛋白;所述的磷酸盐为 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 ;所述的醋酸盐为醋酸钙或醋酸钠。

9. 如权利要求7所述的所述的试剂盒,其特征在于,所述的检测卡包括检测线区域和质控线区域;检测线区域固定有待测抗原的抗体,质控线区域固定有质控二抗,优选为羊抗兔IgG或羊抗鸡IgY系统。

10. 如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述的荧光免疫层析用检测卡的制备方法,具体包括如下步骤:

(1) 大卡粘贴:在带有背胶的底板上依次粘贴硝酸纤维膜、样品垫、吸水纸,所述的硝酸纤维膜分为检测区域和质控区域;(2) 捕获抗体包被:将待测抗原的抗体用包被液稀释至0.5-2mg/ml,用包被仪包被在硝酸纤维膜检测区域,包被量为0.5-2u1/cm;(4) 质控抗体包被:将质控二抗用包被液稀释至0.5-2mg/ml,用包被仪包被在硝酸纤维膜质控区域,包被量为0.5-2u1/cm;(5) 干燥:将上述步骤(3)和步骤(4)得到的包被试剂的大卡,放入恒温烘箱中,37-60℃烘干6-24小时;(6) 切条、装卡:将干燥好的大卡,用切条机或滚刀切割成特定宽度4mm的检测卡,将其装在塑料外壳中,并用铝箔袋封装,封装袋中加入硅胶干燥剂;所述的包被液具体为10mM,pH为7.3的磷酸盐缓冲液,其中含3%海藻糖。

一种稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,尤其涉及一种荧光免疫层析用稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 免疫层析法是近几年兴起的一种快速检测方法。现有免疫层析法以抗原抗体特异性反应为基本原理,以胶体金、乳胶微粒或荧光素等作为标记物,将检测所需生物试剂全部固定于商品试纸上,实验者只需直接滴加液体样品,检测过程在数分钟内即可完成。因此免疫层析法是最为简单、快捷的定性检测手段。目前已用于临床标本、卫生检验、食品安全等多个领域。

[0003] 但是,目前市场提供的免疫层析技术快速检测产品,存在着灵敏度较低,批间差异大,稳定性差,产品保质期短等现象。因此,改进技术方法,提高产品质量,研究一种稳定性好,灵敏度高的免疫层析技术快速检测产品,对进一步推广应用免疫层析技术至关重要。

发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明提供一种稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的制备方法及应用。该冻干粉应用于荧光免疫层析技术中,其灵敏度高,稳定性好,并且保质期相对较长。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供一种荧光免疫层析用稀土元素-聚苯乙烯微球冻干粉,包括稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体和稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体。

[0006] 所述冻干粉的制备方法,具体包括以下步骤。

[0007] (1) 稀土元素-聚苯乙烯微球的活化处理:稀土元素-聚苯乙烯微球原球置于离心管中,进行超声3-5分钟处理,在转数为8000-12000rpm条件下,离心8-10min;离心得到的沉淀加入初洗缓冲液,重复超声和离心处理2-5次;按100ul稀土元素-聚苯乙烯微球加入25-50ul EDC溶液的比例,向离心管中加入0.1mg/ul EDC溶液,反应5-10min,按100ul稀土元素-聚苯乙烯微球加入50-100ul NHS溶液,再加入0.1mg/ul NHS溶液,反应7-20min,超声处理3-5min,即得活化稀土元素-聚苯乙烯微球。

[0008] (2) 偶联反应:将活化稀土元素-聚苯乙烯微球,在转数为8000-12000rpm条件下,离心处理8-10min,离心得到的沉淀,加入初洗缓冲液,进行超声处理3-5min,重复超声、离心处理2-5次;按每100ul活化稀土元素-聚苯乙烯微球加入30-300ug的比例加入待测抗原的抗体,然后于旋转培养器中,进行偶联反应1-5h,得到稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原抗体复合物溶液;将活化稀土元素-聚苯乙烯微球,在转数为8000-12000rpm条件下,离心处理8-10min,离心得到的沉淀加入初洗缓冲液,进行超声处理3-5min,重复超声和离心处理2-5次;按每100ul活化稀土元素-聚苯乙烯微球加入30-300ug的比例加入质控抗体,然后于旋转培养器中,进行偶联反应1-5h,得到稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体复合物溶液。

[0009] (3) 封闭处理:分别将步骤(2)两个偶联反应得到的微球-抗体复合物溶液,经超声

处理3-5min后,加入封闭溶液,反应0.5-3h,超声处理3-5min;最后在8000-12000rpm条件下离心处理8-10min,离心得到的沉淀加入终洗缓冲液超声清洗,重复离心、超声和清洗2-5次,分别获得稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体以及稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体复合物。

[0010] (4)按比例(1:5-5:1)取稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体和稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体复合物,加入冻干液,两种微球-抗体复合物总量与冻干液的用量比例为1:10-500,冷冻干燥,即成冻干粉。

[0011] 所述的冻干液的制备方法,包括以下步骤:(1)向10-50mM Tris缓冲液中加入蔗糖,使Tris缓冲液中蔗糖终浓度为5-30%;(2)向步骤(1)得到的溶液中加入BSA,并使Tris缓冲液中BSA终含量达到0.1-1.0%;(3)向步骤(2)得到的溶液中加入Tween-20,并使Tris缓冲液中Tween-20最终含量达到0.1-1.0%;(4)加入Proclin300,至其终浓度0.1-1.0%。

[0012] 所述的稀土元素-聚苯乙烯微球为包裹稀土元素的COOH-聚苯乙烯微球;所述的稀土元素为钐、铈、钐、铈或镧中的一种镧系元素;所述的质控抗体为动物免疫球蛋白抗体,优选为兔IgG或鸡IgY。

[0013] 所述的微球尺寸为10-500nm,优选为100-300nm。

[0014] 所述的初洗缓冲液为50mM的MES溶液;所述的封闭溶液为40mM的乙醇胺溶液,其中含有0.5%BSA;所述的终洗缓冲液为20mM的Tris溶液,其中含有0.5%的BSA和0.1%的吐温20。

[0015] 所述的初洗缓冲液、封闭缓冲液和终洗缓冲液的具体用量为:每100ul稀土元素-聚苯乙烯微球加入100-500ul初洗缓冲液;每100ul稀土元素-聚苯乙烯微球-抗体复合物溶液加入100-250ul的封闭缓冲液;每100ul稀土元素-聚苯乙烯微球-抗体复合物加入100-500ul终洗缓冲液。

[0016] 所述的冷冻干燥条件为:置于冷冻干燥机中,冻干条件为-40℃预冻3小时,然后在-50℃冷阱条件下,冷冻干燥5-15小时,升温至10℃,维持2-5小时,最终得到微黄色冻干粉。

[0017] 所述的冻干粉用于制备荧光免疫层析用的试剂盒。

[0018] 所述的试剂盒包括本发明的冻干粉、样本稀释液、检测卡。

[0019] 所述的样本稀释液为含有封闭剂、表面活性剂及防腐剂的缓冲液;所述的缓冲液为磷酸盐、醋酸盐或Tris缓冲液;所述的封闭剂为牛血清白蛋白或酪蛋白;所述的表面活性剂为吐温20、吐温80、S9、S17中的一种或几种;所述的防腐剂为叠氮钠或proclin。

[0020] 所述的磷酸盐为 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 或 NaH_2PO_4 ;所述的醋酸盐为醋酸钾或醋酸钠。

[0021] 所述的检测卡包括检测线区域和质控线区域;检测线区域固定有待测抗原的抗体,质控线区域固定有质控二抗,优选为羊抗兔IgG或羊抗鸡IgY系统。

[0022] 所述的荧光免疫层析用的检测卡制备方法,具体包括如下步骤。

[0023] (1)大卡粘贴:在带有背胶的底板上依次粘贴硝酸纤维膜、样品垫、吸水纸,所述的硝酸纤维膜分为检测线区域和质控线区域;(2)捕获抗体包被:将待测抗原的抗体用包被液稀释至0.5-2mg/ml,用包被仪包被在硝酸纤维膜检测线区域,包被量为0.5-2ul/cm;(4)质控抗体包被:将质控二抗用包被液稀释至0.5-2mg/ml,用包被仪包被在硝酸纤维膜质控线区域,包被量为0.5-2ul/cm;(5)干燥:将上述步骤(3)和步骤(4)得到的包被试剂的大卡,放

入恒温烘箱中,37-60℃条件下烘干6-24小时;(6)切条、装卡:将干燥好的大卡,用切条机或滚刀切割成特定宽度4mm的检测卡,将其装在塑料外壳中,并用铝箔袋封装,封装袋中加入硅胶干燥剂。

[0024] 所述的包被液具体为10mM,pH为7.3的磷酸盐缓冲液,其中含3%海藻糖;所述的磷酸盐为 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 或 NaH_2PO_4 。

[0025] 本发明的有益效果。

[0026] 本发明中包裹稀土元素的聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体复合物和包裹稀土元素的聚苯乙烯微球-质控抗体复合物,经冻干处理后,使生物活性受外环境影响小,干扰因素少,产品保质期长,可延长6-12个月,冻干粉中的抗体与待测抗原在溶液中反应充分,明显降低了批间差异,提高了试验稳定性和可靠性,且提高了检测的敏感性,可达到定性和定量检测的目的。

附图说明

[0027] 图1免疫层析检测卡的结构;其中1.PVC背板,2.样品垫,3.硝酸纤维素膜,4.包被的待测抗原的抗体,5.包被质控的抗体,6.吸水纸。

[0028] 图2以不同浓度的CRP质控品浓度和荧光信号绘制标准曲线。

[0029] 图3 以不同浓度的CK-MB质控品浓度和荧光信号绘制标准曲线。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

[0031] 实施例1。

[0032] C-反应蛋白定量检测试剂盒制备。

[0033] 一、铈-COOH-聚苯乙烯微球-C-反应蛋白抗体偶联复合物制备方法如下。

[0034] (1)将200u1铈-COOH-聚苯乙烯微球(微球尺寸为200nm),加入离心管中,进行超声处理3min,10000rpm,4℃离心10min,弃上清,将得到的沉淀加入50mM的MES溶液(初洗缓冲液)1ml,重复超声和离心处理3次,弃上清;再向离心管中加入1ml初洗缓冲液及EDC溶液100u1,100rpm搅拌反应10min,加入NHS溶液200u1,继续搅拌反应15min,超声处理3min,10000rpm,4℃离心10min,弃上清,将得到的沉淀加入50mM的MES溶液200u1。

[0035] (2)取步骤(1)制备的活化稀土元素-聚苯乙烯微球平均分成两份,每份100u1,分别加入60ug C-反应蛋白的单克隆抗体和60ug兔IgG质控抗体,于旋转培养器中,进行偶联反应2h,得到铈-COOH-聚苯乙烯微球-C-反应蛋白抗体复合物溶液和铈-COOH-聚苯乙烯微球兔IgG抗体。

[0036] (3)将步骤(2)完成偶联反应的两种铈-COOH-聚苯乙烯微球-抗体复合物溶液,分别经超声处理3min后,加入100u1 40mM的乙醇胺溶液封闭溶液,反应1h,超声处理3min;在4℃条件下,经10000rpm离心处理10min,弃上清,超声机超声处理3min。弃去上清,加100u1 20mM的Tris溶液超声清洗,重复离心、超声和清洗3次,分别得到铈-COOH-聚苯乙烯微球-C-反应蛋白抗体和铈-COOH-聚苯乙烯微球-兔IgG抗体。

[0037] 冻干粉制备方法具体如下。

[0038] (1)冻干液的制备:0.02M Tris缓冲液中加入蔗糖,至蔗糖终浓度15%;向溶液中加入

入BSA,并使BSA最终含量达到0.5%;向溶液中加入Tween-20,并使Tween-2最终含量达到0.5%;最后加入Proclin300,至终浓度0.3%。

[0039] (2)将铈-COOH-聚苯乙烯微球-C-反应蛋白抗体0.2u1和铈-COOH-聚苯乙烯微球-兔IgG抗体0.04u1装入西林瓶中,加入步骤(1)制备的冻干液100u1。

[0040] (3)西林瓶置于冷冻干燥机中,冻干条件为-40℃预冻3小时,然后再-50℃冷阱条件下,冷冻干燥10小时,升温至10℃,维持2小时,最终为微黄色冻干粉。

[0041] 二、样品稀释液配制:配制A液:称取1.71g K_2HPO_4 、4.5g NaCl、5ml吐温-20、4g BSA,加入500ml纯化水中,超声使其溶解,混匀;配制B液:称取0.47g NaH_2PO_4 、1.8g NaCl、2ml吐温-20、1.6gBSA,加入200ml纯化水中,超声使其溶解,混匀;用B液调节A液pH值至7.4,得到稀释液;取500ml稀释液,加入0.15m lProclin300(0.3%),混匀,即得样品稀释液。

[0042] 三、检测卡的制备:(1)大卡粘贴:在带有背胶的底板上依次粘贴硝酸纤维膜、样品垫、吸水纸,所述的硝酸纤维膜分为检测区域和质控区域;(2)捕获抗体包被:将C反应蛋白单克隆抗体用包被液稀释至2mg/ml,用包被仪包被在硝酸纤维膜检测区域,包被量为2u1/cm;(4)质控抗体包被:将羊抗兔IgG用包被液稀释至2mg/ml,用包被仪包被在硝酸纤维膜质控区域,包被量为2u1/cm;(5)干燥:将上述步骤(3)和步骤(4)得到的包被试剂的大卡,放入恒温烘箱中,45℃烘干15小时;(6)切条、装卡:将干燥好的大卡,用切条机或滚刀切割成特定宽度4mm的检测卡,将其装在塑料外壳中,并用铝箔袋封装,封装袋中加入硅胶干燥剂。检测卡的结构,见图1。

[0043] 四、稀土元素微球冻干法的荧光免疫层析快速定量检测卡性能测定。

[0044] (1)标准曲线:以牛血清或阴性血清作为溶剂,配制浓度为0 ug /ml、0.1 ug /ml、0.50 ug /ml、1.0 ug /ml、10 ug /ml、50 ug /ml、100 ug /ml、200 ug /ml的CRP质控品进行检测,每个浓度作5次实验,反应时间为15min,在荧光免疫层析分析仪上检测,以不同浓度的CRP和荧光信号绘制标准曲线。检测结果,见表1,标准曲线,见图2。

[0045] 表1 CRP质控品检测结果。

CRP(ug/ml)	0	1	5	10	50	100	200
样品号	1	0.0062	0.0681	0.2588	0.4295	1.2252	1.9755
	2	0.0059	0.0728	0.2662	0.4469	1.1566	2.1051
	3	0.0054	0.0779	0.2751	0.4226	1.1759	1.8644
	4	0.0051	0.0821	0.2822	0.4362	1.2361	1.9658
	5	0.0063	0.079	0.2637	0.4052	1.1597	2.1129
平均值	0.0058	0.076	0.2692	0.4281	1.1907	2.0047	3.4654
SD	0.0005	0.0056	0.0094	0.0156	0.0374	0.1047	0.1114

[0046] (2)精密度测试:以已知浓度分别为1ug/ml、5ug/ml和10ug/ml CRP作为抗原,测定荧光免疫层析快速定量检测卡的精密度,结果见表2。

[0047] 表2 精密度测定结果。

浓度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	SD	CV
1	0.895	1.024	1.168	0.947	1.004	1.028	0.946	0.968	1.121	1.048	1.015	0.083	8.18
5	4.867	5.215	5.311	4.795	5.334	4.928	5.157	4.864	4.928	5.229	5.063	0.206	4.07
10	11.526	9.587	10.638	11.071	9.845	9.924	10.975	10.267	11.621	9.478	10.492	0.787	7.5

[0048] 五、结果分析:用稀土元素微球冻干法的荧光免疫层析快速定量检测卡检测CRP线性范围可达0.5-200ug/ml,最低检出限为0.2ug/ml,批内精密度在10%以下。

[0049] 本方法灵敏度较高、批内精确度较好且稳定性好,能达到定性和定量检测目的。

[0050] 实施例2。

[0051] 肌酸激酶同工酶定量检测试剂盒制备。

[0052] 一、铈-COOH-聚苯乙烯微球-肌酸激酶同工酶抗体偶联复合物制备方法如下。

[0053] (1)将200ul铈-COOH-聚苯乙烯微球(微球尺寸为100nm),加入装有MES溶液的离心管中,进行超声处理5min,8000rpm,4℃离心8min,弃上清,将得到的沉淀加入50mM的MES溶液(初洗缓冲液)1ml,重复超声、离心处理2次,弃上清;然后在离心管中加入1m初洗缓冲液及EDC溶液100ul,100rpm搅拌反应6min,加入NHS溶液200ul,继续搅拌反应20min,超声处理5min,8000rpm,4℃离心10min,弃上清,将得到的沉淀加入初洗缓冲液200ul。

[0054] (2)取步骤(1)制备的活化稀土元素-聚苯乙烯微球平均分成两份,每份100ul,分别加入60ug肌酸激酶同工酶的单克隆抗体和60ug兔IgG质控抗体,于旋转培养器中,进行偶联反应2h,得到铈-COOH-聚苯乙烯微球-肌酸激酶同工酶抗体复合物溶液和铈-COOH-聚苯乙烯微球兔IgG抗体。

[0055] (3)分别将步骤(2)完成偶联反应的两种铈-COOH-聚苯乙烯微球-抗体复合物溶液,经超声处理3min后,加入100ul 40mM的乙醇胺溶液,反应1h,超声处理3min;在4℃条件下,经8000rpm离心处理10min,弃上清,超声机超声处理3min。弃去上清,加100ul 20mM的Tris溶液超声清洗,重复离心、超声和清洗3次,分别得到铈-COOH-聚苯乙烯微球-肌酸激酶同工酶抗体和铈-COOH-聚苯乙烯微球-兔IgG抗体。

[0056] 冻干粉制备方法具体如下。

[0057] (1)冻干液的制备:0.02M Tris缓冲液中加入蔗糖,至终浓度10%;向溶液中加入BSA,并使其最终含量达到1.0%;向溶液中加入Tween-20,并使其最终含量达到0.5%;最后加入Proclin300,至终浓度0.3%。

[0058] (2)将铈-COOH-聚苯乙烯微球-肌酸激酶同工酶抗体0.2ul和铈-COOH-聚苯乙烯微球-兔IgG抗体0.07ul装入西林瓶中,加入步骤(1)制备的冻干液100ul。

[0059] (2)西林瓶置于冷冻干燥机中,冻干条件为-40℃预冻3小时,然后再-50℃冷阱条件下冷冻干燥10小时,升温至10℃,维持2小时。最终为微黄色冻干粉。

[0060] 二、样品稀释液配制:称取三(羟甲基)氨基甲烷2.42g, S9 10g,BSA 5g,加入1L纯化水,超声处理使其溶解,用1mol/L盐酸调pH值为7.4,加入0.3ml Proclin300(0.3%),混匀,即得。

[0061] 三、检测卡的制备:同实施例1。

[0062] 四、稀土元素微球冻干法的荧光免疫层析快速定量检测卡性能测定。

[0063] (1)标准曲线:以牛血清或阴性血清作为溶剂,配制浓度为0 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、40 ng/ml、60 ng/ml的CK-MB质控品进行检测,每个浓度作5次实验,反应时间为15min,在荧光免疫层析分析仪上检测,以不同浓度的CK-MB和荧光检测结果,绘制标准曲线。检测结果见表3,标准曲线,见图3。

[0064] 表3 肌酸激酶同工酶质控品检测结果。

CK-MB(ng/ml)		0	2.5	5	10	20	40	60
样品号	1	0.0061	0.1455	0.2416	0.3985	0.6332	1.1382	1.5644
	2	0.0053	0.1328	0.2369	0.4055	0.6457	1.2246	1.4315
	3	0.0059	0.1394	0.2428	0.4199	0.6288	1.1705	1.4151
	4	0.0048	0.1468	0.2505	0.4214	0.5984	1.1255	1.5284
	5	0.0065	0.1379	0.2158	0.4327	0.5831	1.1686	1.5559
平均值		0.0057	0.1405	0.2375	0.4156	0.6178	1.1655	1.4991
SD		0.0007	0.0057	0.0131	0.0136	0.0261	0.0383	0.0707

[0065] (2)精密度测试:以已知浓度分别为5ng/ml、10ng/ml和50ng/ml肌酸激酶同工酶质控品作为抗原,测定荧光免疫层析快速定量检测卡的精密度,结果见表4。

[0066] 表4 精密度测定结果。

浓度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	SD	CV
5	5.268	4.869	5.157	5.088	4.928	4.778	5.382	5.41	5.128	4.868	5.069	0.254	5.02
10	9.843	10.768	10.883	11.052	9.844	10.622	10.841	11.152	9.908	10.284	10.48	0.494	4.71
50	51.628	52.111	49.668	50.152	48.371	53.959	52.142	51.477	53.303	47.678	51.049	2.045	4.01

[0067] 五、结果分析:用稀土元素微球冻干法的荧光免疫层析快速定量检测卡检测CK-MB线性范围可达0.1ng -60ng/ml,最低检出限在0.1ng/ml,批内精密度在10%以下。

[0068] 本方法灵敏度较高、批内精确度较好且稳定性好,能达到定性和定量检测目的。

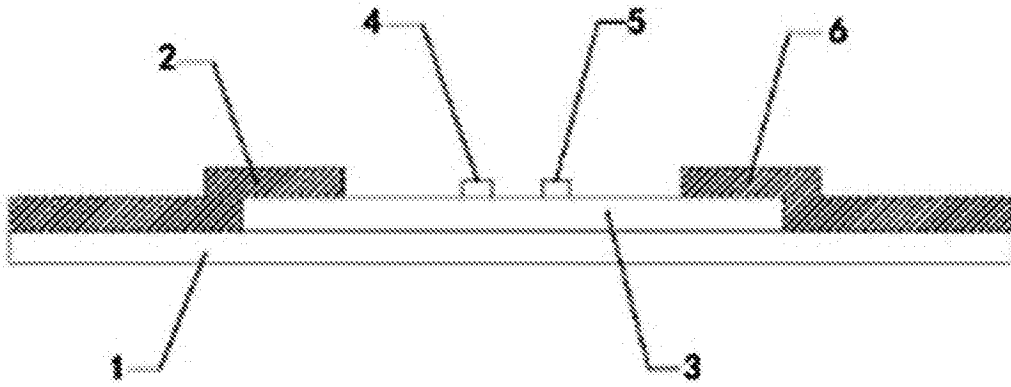


图1

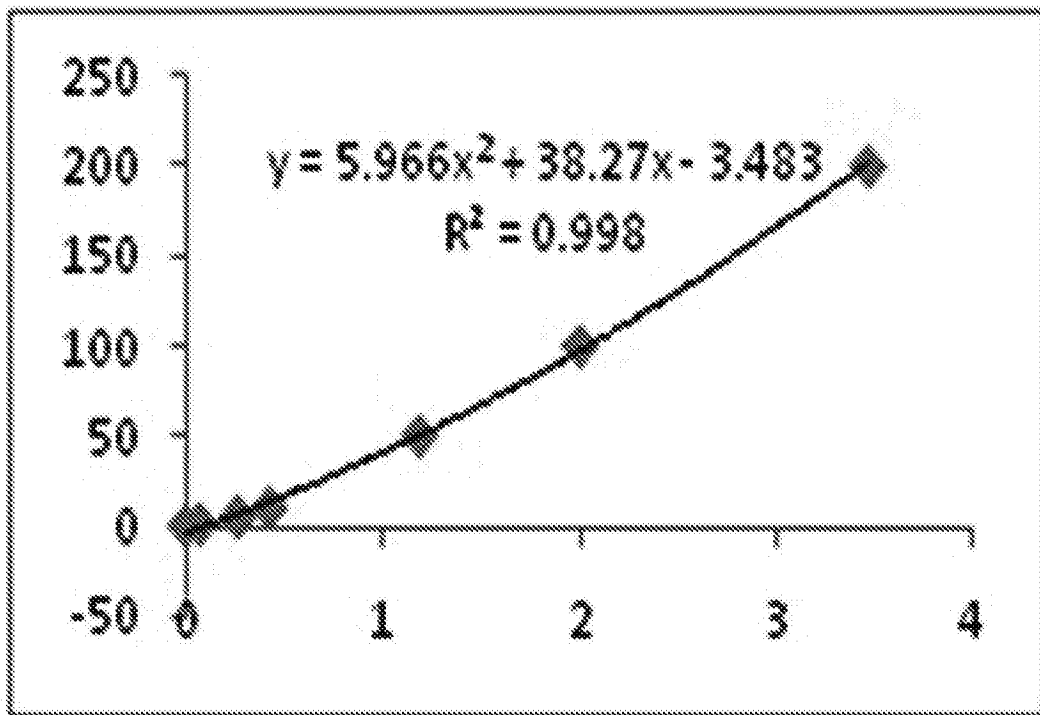


图2

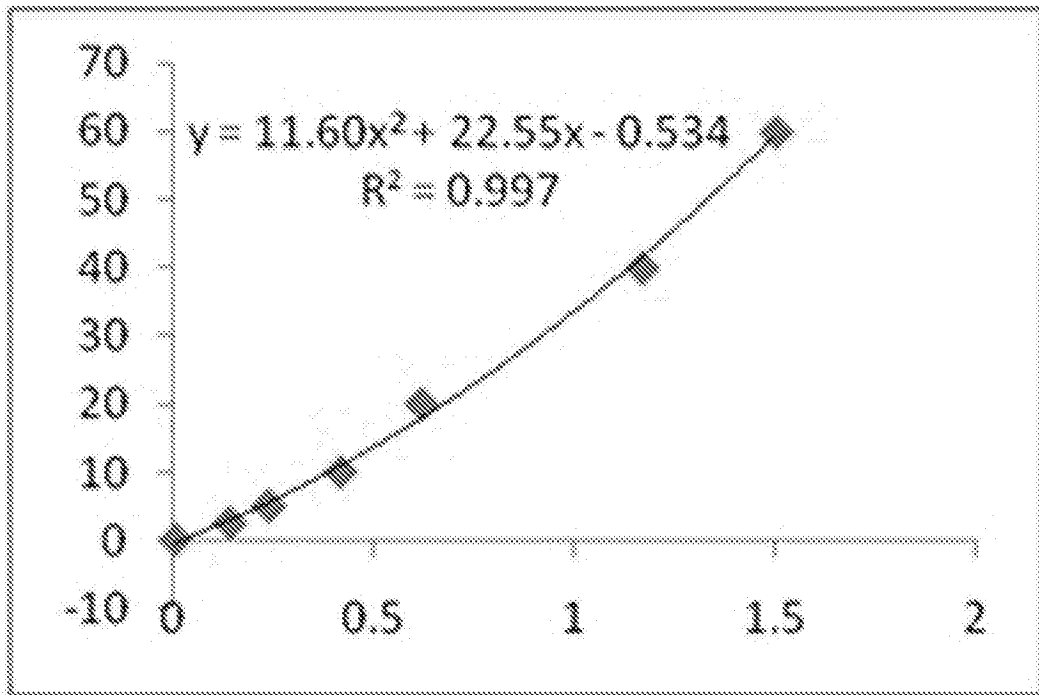


图3

专利名称(译)	一种稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106546725A	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201610946339.X	申请日	2016-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	沈阳优宁生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	沈阳优宁生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	沈阳优宁生物科技有限公司		
[标]发明人	黄雪莹 吴琼 王建伟 高占岩 宋佳美 李祝华 吕辉 宋建英 孙秒		
发明人	黄雪莹 吴琼 王建伟 高占岩 宋佳美 李祝华 吕辉 宋建英 孙秒		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫检测领域，尤其涉及一种荧光免疫层析用稀土元素荧光微球偶联抗体冻干粉的制备方法及应用。荧光免疫层析用稀土元素-聚苯乙烯微球冻干粉，包括稀土元素-聚苯乙烯微球-待测抗原的抗体和稀土元素-聚苯乙烯微球-质控抗体。冻干粉中的抗体与待测抗原在溶液中反应充分，明显降低了批间差异，提高了试验稳定性和可靠性，且提高了检测的敏感性，可达到定性和定量检测的目的。

