



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102901828 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210298011. 3

(22) 申请日 2012. 08. 21

(71) 申请人 江建华

地址 436000 湖北省鄂州市鄂城区江广路特
2 号

(72) 发明人 江建华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/573(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

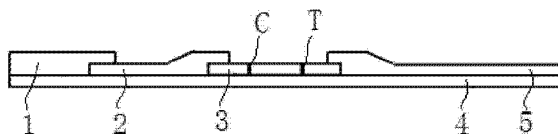
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法,试纸包括底板、附着在底板上依次紧密相连的样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其中,结合垫包被有葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物;层析膜上具有一条检测带和一条质控带,检测带上固定有单克隆抗体;质控带固定有能与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物特异结合的兔抗鼠 IgG 抗体,本发明试剂的敏感范围达到 0. 1ng/mL,并且可实现心肌梗塞病人血清中微量肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶定量检测,点样后 3-5 分钟即可得到结果,操作简便,不需要专业人员操作。



1. 一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:包括底板、附着在底板上依次紧密相连的样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其中,结合垫包被有葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物;层析膜上具有一条检测带和一条质控带,检测带上固定有单克隆抗体;质控带固定有能与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物特异结合的兔抗鼠 IgG 抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:所述单克隆抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶之一。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:其中所述单克隆抗体的制备步骤为:

(1) 使用单克隆抗体免疫抗原免疫小鼠;分别以单克隆抗体抗原与等量弗氏完全佐剂乳化后,采用皮下多点注射方式对 4 只 4 周龄的雌性 BALB/c 小鼠进行皮下免疫;初免后加强免疫数次;

(2) 筛选抗单克隆抗体;

A、将 1×10^8 脾细胞与 2×10^7 骨髓瘤细胞 SP2/0 混合于 50mL 融合管中,加 DMEM 培养基至 30mL;1000rpm 离心 7min,将上清尽量吸净;

B、在手掌上轻击融合管底部,使沉淀细胞松散均匀,置 40°C 水浴中预热,用 1mL 吸管在 1 分钟内加预热至 40°C 的 50%,边加边轻轻摇动混匀,用 5mL 吸管在 90 秒内加 25mL 预热至 37°C 的不完全 DMEM 培养基,室温静置 10min,800rpm 离心 7 分钟,弃上清;

C、加入 5ml HAT 完全培养基,轻轻吹吸沉淀细胞,使其悬浮并混匀,然后补加 HAT 培养基至 90mL,分装至融合前一天培养的含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L;培养板置 37°C 5%CO₂ 培养箱内培养;

D、培养至第 5 天,用 HT 完全培养基换出孔内 1/2HAT 培养液,培养至第 7 天,用 HT 培养基换出孔内全部培养液;

E、每天观察杂交瘤细胞生长情况,待杂交瘤细胞长至 10% 以上孔底面积时,吸出培养液,进行抗体检测;用竞争抑制 ELISA 方法,筛选出分泌抗细菌脂多糖和脂溶性蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞;

(3) 腹水生产,选用标准 BALB/c 小鼠,先用降植烷进行小鼠腹腔注射,一周后每只老鼠按照 5×10^6 杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去;1 周后采集腹水,将腹水置于 37°C 静置 2 小时后,13000rpm 离心 10min,除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清,再过玻璃纤维柱,收集到澄清的腹水;

(4) 抗体纯化,采用辛酸-硫酸铵法进行初步纯化,取 1mL 透析后粗提物加入 1mL 预装柱,用 pH=7.4 的 PBS 进行洗涤,加入 pH=2.7 的 1mL 的 100mM 甘氨酸进行洗脱,重复 6 次;收集流出液,1mL/管,并用 50 μ l 1M Tris 中和反应。

4. 根据权利要求 1 所述的一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:所述的兔抗鼠 IgG 抗体的制备步骤为:

(1) 用含鼠 IgG 的免疫原多次免疫家兔;

(2) 收集、分离得到含有兔抗鼠 IgG 抗体的血清;

(3) 将抗体血清加入到亲和层析柱中纯化得到兔抗鼠 IgG 抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:所述的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物制备步骤为:

(1) 将荧光素分子与以亲水链为骨架的葡聚糖分子反应, 得到结合荧光素的葡聚糖分子;

(2) 将结合荧光素的葡聚糖分子与抗体反应, 纯化, 得到葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物。

6. 根据权利要求 5 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 所述的葡聚糖优选为分子量 20,000 ~ 30,000 的葡聚糖。

7. 根据权利要求 5 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 所述的荧光素优选为异硫氰酸荧光素。

8. 根据权利要求 5 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 所述的纯化优选通过凝胶层析法进行分离纯化。

9. 根据权利要求 1 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 所述的葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记物制备步骤:

(1) 结合荧光素的葡聚糖分子的制备: 用有机溶剂溶解荧光素, 在磁力搅拌条件下, 滴加在含葡聚糖的醋酸溶液中, 避光反应, 使得荧光素上的碳原子与葡聚糖上的二乙烯砜反应以便进行标记偶联; 反应结束后, 将 pH 值调至 8.8-9.2, 离心, 取沉淀, 得到结合荧光素的葡聚糖分子;

(2) 葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记物初产物的制备: 洗涤步骤(1) 得到的沉淀, 再用醋酸溶液溶解沉淀, 接着将 pH 值调节为 4.8-5.2; 在磁力搅拌条件下, 滴加入抗体溶液, 抗体加入的量按 1mg 荧光素加入 100mg 免疫球蛋白计算, 进行反应后得到葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物初产物;

(3) 葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记物的制备: 使用葡聚糖凝胶装柱, 用 pH 范围 6.8-7.2、0.002-0.01M 磷酸缓冲液平衡; 将步骤(2) 得到的葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物初产物上样, 再用 pH 6.8-7.2、0.002-0.01M 磷酸缓冲液洗脱, 当黄绿色荧光出现在洗脱液时, 收集全部黄绿色荧光溶液; 将黄绿色荧光溶液透析, 得到葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记物。

10. 根据权利要求 10 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 所述素和葡聚糖按范围是 8-10:1 的质量比进行配比。

11. 根据权利要求 10 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 步骤(1) 中所述的有机溶剂优选为无水乙醇, 荧光素优选为异硫氰酸荧光素。

12. 根据权利要求 10 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 步骤(1) 中, 所述的荧光素溶解于有机溶剂的浓度优选为 1-2mg/ml; 所述的葡聚糖优选为分子量 20,000 ~ 30,000 的葡聚糖; 所述的含葡聚糖的醋酸溶液中葡聚糖的浓度优选为 5-10mg/ml; 醋酸的浓度优选为 0.2-0.5mol/L; 所述的反应的时间优选为 2-6 小时; 所述的 pH 通过氢氧化钠进行调节, 离心的条件优选为 8000-10000rpm 5-10 分钟。

13. 根据权利要求 13 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 所述的 pH 通过 10mol/L NaOH 溶液进行调节。

14. 根据权利要求 10 所述的一种检测急性心梗的试纸, 其特征在于: 步骤(2) 中, 所述的洗涤优选使用蒸馏水进行洗涤, 洗涤至液体为无色为止; 所述的醋酸溶液的浓度优选为质量百分比 1-5%; 所述的醋酸溶液的用量优选为按溶解荧光素的浓度 1-2mg/ml 计算用量,

所述的pH通过氢氧化钠进行调节;所述的抗体溶液的浓度优选为15-25mg/mL;所述的反应的时间优选为15-25分钟。

15. 根据权利要求10所述的一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:步骤(3)中,所述的葡聚糖凝胶优选为Sephadex-G50凝胶;所述的洗脱的速度优选为1ml/min;所述的透析的条件优选为截留分子量1万的透析袋、0.01mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.9-8.1)、(0~4℃)过夜。

16. 根据权利要求1所述的一种检测急性心梗的试纸,其特征在于:其中结合垫制备步骤:

(1)将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物20mg稀释于2000ml的pH7.40.01M的PBS缓冲液中;

(2)缓冲液加入0.1% NaN₃与1% BSA,制备上述混合标记物的浓度0.01mg/ml;

(3)将抗体结合垫浸泡于2000ml的混合标记物中,作用时间控制在2-5分钟,取出后37℃气套式烘箱烘干,在45%湿度下避光保存备用。

17. 根据权利要求1所述的一种检测急性心梗的试纸制备方法,其特征在于:包含以下步骤:

(1)用稀释液将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物稀释到浓度至0.01-0.03mg/ml范围内,然后将结合垫浸泡在稀释液中,经过烘干或者真空冷冻干燥后,再装配到试纸条底板上;稀释液的组成为:pH7.4 0.01M的PBS缓冲液中加入质量百分比0.1% NaN₃、质量百分比1% BSA;

(2)在层析膜上设置两条带,一条检测带和一条质控带;检测带上固定单克隆抗体,所述克隆抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白I和肌酸激酶同工酶单克隆抗体的一种;质控带固定兔抗鼠IgG抗体;

(3)在步骤(2)的层析膜的一侧贴上样品吸收垫和结合垫,另一侧贴上吸水垫;样品吸收垫、结合垫、层析膜的检测带、层析膜的质控带和吸水垫依次排布。

18. 根据权利要求1所述的一种检测急性心梗的试纸应用方法,其特征在于:包含以下步骤:

(1)在样品吸收垫上加入待测血清样品;在毛细作用下,样品液向吸水垫一端泳动,在结合垫处与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物形成免疫复合物,再进一步泳动,免疫复合物与检测带处的单克隆抗体结合形成类似双抗体夹心的免疫复合物,剩余的荧光标记抗体移动至控制线反应形成条带,为阳性结果;

(2)通过荧光检测装置检测;

(3)结果的判断:检测带不显示,质控带显示条带,表明试纸条有效,待测样品不含所测抗原;检测带显示条带,质控带显示条带,表明待测样品含有所测抗原;检测带不显示,质控带不显示,表明试纸条无效;检测带显示条带,质控带不显示,表明试纸条无效。

一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫诊断试剂领域,具体为涉及一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法。

背景技术

[0002] 随着我国人口老龄化进程的加剧,急性心肌梗塞已成为危害中国的重大疾病。世界卫生组织指出全球每年有 850 万人死于急性心肌梗塞。在我国,急性心肌梗塞每年患者为 2 千万人,而有 100 万人被急性心肌梗塞夺去生命。因而急性心肌梗塞已经成为危害国人健康的重大疾病。治疗显示,急性心肌梗塞发病后 3 小时内是治疗的至关重要时间。只有对心肌梗塞患者进行早预防、早发现、早救治,才能最大程度挽救患者生命,最大程度改善患者预后。

[0003] 寻找早期心肌损伤标志物是早期诊断心肌梗塞的关键。目前研究表明:人肌红蛋白、肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白 I 可以在疾病发作后可释放到外周血,可作为心肌梗塞诊断的特异性指标。

[0004] 目前,国内检测心肌梗塞主要免疫学方法有酶联免疫吸附试验法(ELISA)和金标免疫试纸条。酶联免疫吸附试验法涉及加样、温浴、洗涤、显色、终止等多个步骤,至少需要 3 小时,另外,需要在检验科或中心实验室完成,因而不可能在急性心肌梗塞发病后病人家庭,急救车展开。另外酶联免疫吸附试验法灵敏度只能达到 10ng/ml,如果要对 10ng/ml 以下的物质进行检测,就会产生假阴性的结果,即漏检。免疫胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物的一种的免疫技术。相比之下,胶体金技术的敏感性比酶联免疫吸附试验法更差,只能达到 50ng/ml,要对人肌红蛋白、肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶的微量检测几乎是不可能的,另外目前国内胶体金技术尚属于起步阶段,基本上不能对上述指标的定量。

[0005] 鉴于以上特征,目前国内乃至世界在诊断急性心肌梗塞上迫切需要建立一个能够及时、高敏感性、定量检测系统,并将上述检测系统用于急性心肌梗塞产品的开发。

发明内容

[0006] 针对现有技术的上述缺陷和问题,本发明实施例的目的是提供能用于检测急性心梗的一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法。

[0007] 为了达到上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:一种检测急性心梗的试纸,包括底板、附着在底板上依次紧密相连的样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其中,结合垫包被有葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物;层析膜上具有一条检测带和一条质控带,检测带上固定有单克隆抗体;质控带固定有能与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物特异结合的兔抗鼠 IgG 抗体。

[0008] 本发明还提供一种检测急性心梗的试纸制备方法,包含以下步骤:

[0009] (1)用稀释液将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物稀释到浓度至 0.01-0.03mg/ml 范围内,然后将结合垫浸泡在稀释液中,经过烘干或者真空冷冻干燥后,再装配到试纸条底

板上；稀释液的组成为：pH7.4 0.01M的PBS缓冲液中加入质量百分比0.1% NaN₃、质量百分比1% BSA。

[0010] (2) 在层析膜上设置两条带，一条检测带和一条质控带；检测带上固定单克隆抗体，所述克隆抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶单克隆抗体的一种；质控带固定兔抗鼠 IgG 抗体；

[0011] (3) 在步骤(2)的层析膜的一侧贴上样品吸收垫和结合垫，另一侧贴上吸水垫；样品吸收垫、结合垫、层析膜的检测带、层析膜的质控带和吸水垫依次排布。

[0012] 本发明还提供一种检测急性心梗的试纸应用方法，包含以下步骤：

[0013] (1) 在样品吸收垫上加入待测血清样品；在毛细作用下，样品液向吸水垫一端泳动，在结合垫处与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物形成免疫复合物，再进一步泳动，免疫复合物与检测带处的单克隆抗体结合形成类似双抗体夹心的免疫复合物，剩余的荧光标记抗体移动至控制线反应形成条带，为阳性结果；

[0014] (2) 通过荧光检测装置检测；

[0015] (3) 结果的判断：检测带不显示，质控带显示条带，表明试纸条有效，待测样品不含所测抗原；检测带显示条带，质控带显示条带，表明待测样品含有所测抗原；检测带不显示，质控带不显示，表明试纸条无效；检测带显示条带，质控带不显示，表明试纸条无效。

[0016] 本发明将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记的信号放大系统技术与传统免疫层析技术相结合，开发一种具有高灵敏度的荧光定量试纸用于诊断急性心肌梗塞。本荧光定量试纸通过荧光强度变化来反应样品中的抗原含量，可实现抗原的特异定量检测。这对于心肌梗塞的早期诊断、心肌梗塞的严重程度评估、治疗方案选择和预后判断具有重要的意义。同时本荧光试纸中的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记的信号放大系统技术能够将灵敏度提高至0.1ng/ml，这对于检测血清中微量物质是极重要的。另外，此高灵敏度荧光定量诊断试纸3-5分钟内即可观察结果，标本用量少，可检测人血清/血浆中人肌红蛋白、人肌钙蛋白 I 及人肌酸激酶同工酶三项指标，这对于早期诊断心肌梗塞是极重要的。本发明产品为临床诊断心肌梗塞提供了敏感、特异、快捷的新手段。

[0017] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

[0018] (1) 特异性，利用抗原与抗体特异反应原理检测人肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶，其相对特异性可分别达到96.6%，97.0%，98.0%；

[0019] (2) 敏感性，采用葡聚糖-抗体-荧光素混合标记技术信号放大技术，可将诊断试剂的敏感范围从10-100ng/mL推进到0.1ng/mL，即敏感性提高了100-1000倍，并且可实现心肌梗塞病人血清中微量肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶定量检测；

[0020] (3) 快速性，本发明开发产品点样后3-5分钟即可得到结果；

[0021] (4) 简便性，本发明开发产品操作简便，不需要专业人员操作。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些图获得其他的图。

[0023] 图 1 是本发明所提供的试纸条的结果判读示意图,其中:T 为检测带,C 为质控带。

[0024] 图 2 是本发明提供的试纸条的结构示意图,其中:1 为样品吸收垫,2 为结合垫,3 为层析膜,4 为底板,5 为吸水垫。

具体实施方式

[0025] 下面将结合本发明的图,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 本发明的原理是本发明所涉及的检测方法是双抗体夹心法,一个是包被抗体,一个是标记抗体,对血清中的抗原进行检测,常规抗体标记采用辣根过氧化物酶标记抗体,但是辣根过氧化物酶标记存在敏感性差的问题。荧光素标记抗体技术,可极大提高检测试剂的敏感性。就标记抗体而言,常规的荧光素标记只有少量荧光素分子,与单位抗体结合,因而其阳性信号/背景信号之间的读数比值过低。本发明特别使用葡聚糖-抗体-荧光素混合标记技术。基于每个葡聚糖分子能含有 1000 个 divinylsulfone (二乙烯砜)活性基团,除少部分的 divinylsulfone 活性基团自身偶联之外,形成类似口罩的结构,每个葡聚糖分子中绝大部分的 divinylsulfone 活性基团可与荧光素或抗体分别进行偶联。因此,先将葡聚糖活化与成百上千的荧光素分子结合,结合后的葡聚糖-荧光素混合物再与抗体结合,利用这种技术阳性信号/背景信号之间的读数比值成百上千的提高。

[0027] 本发明所提供的荧光免疫试纸,原理包括双抗体夹心法和间接法两种免疫学方法。双抗体夹心法是检测带的反应方法,待测抗原在结合垫处与葡聚糖-抗体-荧光素混合物中的抗体结合,形成免疫复合物,该免疫复合物在层析膜上进行泳动并与膜上的检测带抗体进行结合,形成固化的免疫复合物;间接法是质控带的反应方法,葡聚糖-荧光素混合物标记的抗体在膜上泳动并与质控带上的抗抗体进行结合,形成固化的免疫复合物。

[0028] 本发明的目的通过下述技术方案实现:本发明一种检测急性心梗的试纸,包括底板、附着在底板上依次紧密相连的样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其中,结合垫包被有葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物;层析膜上具有一条检测带和一条质控带,检测带上固定有单克隆抗体;质控带固定有能与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物特异结合的兔抗鼠 IgG 抗体。通过试纸检测带上固定有单克隆抗体检测人全血中的人肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和人肌酸激酶同工酶。每一种抗原试纸条上均有对照线 C (Control) 和检测线 T (Test),对照线包被有兔抗鼠 IgG 抗体,检测线上包被抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶单克隆抗体中的之一,形成葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物-抗原-抗体复合物,剩余的荧光标记抗体移动至控制线(C 线)反应形成条带,为阳性结果。若相应项目检测区不出现条带,则相应项目结果为阴性,对照线 C 处形成条带,表明检测系统运行正常。

[0029] 本发明所述的单克隆抗体、抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶之一。

[0030] 其中所述单克隆抗体的制备:

[0031] 本发明所述的单克隆抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶单克隆抗体,它们分别将上述三种抗原免疫小鼠,再经过细胞融合、筛选及克隆化培养制得。

[0032] 制备步骤为：

[0033] (1) 使用单克隆抗体免疫抗原免疫小鼠；分别以单克隆抗体抗原与等量弗氏完全佐剂乳化后，采用皮下多点注射(100 μ g/0.2mL/只)方式对4只4周龄的雌性BALB/c小鼠进行皮下免疫；初免后加强免疫数次。

[0034] (2) 筛选抗单克隆抗体；

[0035] A、将 1×10^8 脾细胞与 2×10^7 骨髓瘤细胞SP2/0混合于50mL融合管中，加DMEM培养基至30mL。1000rpm离心7min，将上清尽量吸净；

[0036] B、在手掌上轻击融合管底部，使沉淀细胞松散均匀，置40℃水浴中预热。用1mL吸管在1分钟内加预热至40℃的50%，边加边轻轻摇动混匀，用5mL吸管在90秒内加25mL预热至37℃的不完全DMEM培养基，室温静置10min，800rpm离心7分钟，弃上清；

[0037] C、加入5mL HAT完全培养基，轻轻吹吸沉淀细胞，使其悬浮并混匀，然后补加HAT培养基至90mL。分装至融合前一天培养的含有饲养细胞的96孔细胞培养板，每孔100 μ L；培养板置37℃ 5%CO₂培养箱内培养；

[0038] D、培养至第5天，用HT完全培养基换出孔内1/2HAT培养液。培养至第7天，用HT培养基换出孔内全部培养液；

[0039] E、每天观察杂交瘤细胞生长情况，待杂交瘤细胞长至10%以上孔底面积时，吸出培养液，进行抗体检测；用竞争抑制ELISA方法，筛选出分泌抗细菌脂多糖和脂溶性蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0040] (3) 腹水生产，选用标准BALB/c小鼠，先用降植烷进行小鼠腹腔注射，一周后每只老鼠按照 5×10^6 杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去。1周后采集腹水，将腹水置于37℃静置2小时后，13000rpm离心10min，除去细胞成分和其他的沉淀物，收集上清，再过玻璃纤维柱，收集到澄清的腹水。

[0041] (4) 抗体纯化，采用辛酸-硫酸铵法进行初步纯化，取1mL透析后粗提物加入1mL预装柱，用pH=7.4的PBS进行洗涤，加入pH=2.7的1mL的100mM甘氨酸进行洗脱，重复6次。收集流出液，1mL/管，并用50 μ l 1M Tris中和反应。采用SDS-PAGE电泳检测其纯度及浓度，同时使用ELISA检测纯化抗体效价。

[0042] 其中所述的兔抗鼠IgG抗体的制备：

[0043] 制备步骤为：

[0044] (4) 用含鼠IgG的免疫原多次免疫家兔；

[0045] (5) 收集、分离得到含有兔抗鼠IgG抗体的血清；

[0046] (6) 将抗体血清加入到亲和层析柱中纯化得到兔抗鼠IgG抗体。

[0047] 其中所述的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物制备

[0048] 制备步骤为：

[0049] (1) 将荧光素分子与以亲水链为骨架的葡聚糖分子反应，得到结合荧光素的葡聚糖分子；

[0050] (2) 将结合荧光素的葡聚糖分子与抗体反应，纯化，得到葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物；

[0051] 所述的抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白I和肌酸激酶同工酶单克隆抗体中的一种，根据检测的抗原确定使用相应抗原的单克隆抗体。

- [0052] 所述的葡聚糖优选为分子量 20,000 ~ 30,000 的葡聚糖；
- [0053] 所述的荧光素优选为异硫氰酸荧光素；
- [0054] 所述的纯化优选通过凝胶层析法进行分离纯化；由于葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物与其他物质(葡聚糖、抗体和荧光素)之间分子量存在明显差别,因而可以用分子筛纯化材料进行层析,葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物由于分子量大,首先从纯化柱中洗脱出来,而相对分子量较小的葡聚糖、抗体和荧光素则在上述峰值之后才缓慢从纯化柱中洗脱出来；
- [0055] 所述的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物通过以下更优选的制备步骤：
- [0056] (1) 结合荧光素的葡聚糖分子的制备：用有机溶剂溶解荧光素,在磁力搅拌条件下,滴加在含葡聚糖的醋酸溶液中,避光反应,使得荧光素上的碳原子与葡聚糖上的二乙烯砜反应以便进行标记偶联；反应结束后,将 pH 值调至 8.8-9.2,离心,取沉淀,得到结合荧光素的葡聚糖分子；其中,荧光素和葡聚糖按范围是 8-10:1 的质量比进行配比。
- [0057] (2) 葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物初产物的制备：洗涤步骤(1)得到的沉淀,再用醋酸溶液溶解沉淀,接着将 pH 值调节为 4.8-5.2；在磁力搅拌条件下,滴加入抗体溶液,抗体加入的量按 1mg 荧光素加入 100mg 免疫球蛋白计算,进行反应后得到葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物初产物。
- [0058] (3) 葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物的制备：使用葡聚糖凝胶装柱,用 pH 范围 6.8-7.2、0.002-0.01M 磷酸缓冲液(PB)平衡；将步骤(2)得到的葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物初产物上样,再用 pH6.8-7.2、0.002-0.01M 磷酸缓冲液洗脱,当黄绿色荧光出现在洗脱液时,收集全部黄绿色荧光溶液；将黄绿色荧光溶液透析,得到葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物；
- [0059] 步骤(1)中所述的有机溶剂优选为无水乙醇；
- [0060] 步骤(1)中所述的荧光素优选为异硫氰酸荧光素；
- [0061] 步骤(1)中所述的荧光素溶解于有机溶剂的浓度优选为 1-2mg/ml；
- [0062] 步骤(1)中所述的葡聚糖优选为分子量 20,000 ~ 30,000 的葡聚糖；
- [0063] 步骤(1)中所述的含葡聚糖的醋酸溶液中葡聚糖的浓度优选为 5-10mg/ml；醋酸的浓度优选为 0.2-0.5mol/L；
- [0064] 步骤(1)中所述的反应的时间优选为 2-6 小时；
- [0065] 步骤(1)中所述的 pH 优选通过氢氧化钠进行调节；更优选通过 10mol/L NaOH 溶液进行调节；
- [0066] 步骤(1)中所述的离心的条件优选为 8000-10000rpm5-10 分钟；
- [0067] 步骤(2)中所述的洗涤优选使用蒸馏水进行洗涤,洗涤至液体为无色为止；
- [0068] 步骤(2)中所述的醋酸溶液的浓度优选为质量百分比 1-5%；
- [0069] 步骤(2)中所述的醋酸溶液的用量优选为按溶解荧光素的浓度 1-2mg/ml 计算用量。
- [0070] 步骤(2)中所述的 pH 优选通过氢氧化钠进行调节；更优选通过 10mol/L NaOH 溶液进行调节；
- [0071] 步骤(2)中所述的抗体溶液的浓度优选为 15-25mg/mL；
- [0072] 步骤(2)中所述的反应的时间优选为 15-25 分钟；

- [0073] 步骤(3)中所述的葡聚糖凝胶优选为 Sephadex-G50 凝胶；
- [0074] 步骤(3)中所述的洗脱的速度优选为 1ml/min；
- [0075] 步骤(3)中所述的透析的条件优选为截留分子量 1 万的透析袋、0.01mol / L 磷酸盐缓冲液 (pH7.9-8.1)、(0 ~ 4℃) 过夜。
- [0076] 所述的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物的制备具体实施例：
- [0077] (1) 结合荧光素的葡聚糖分子的制备：称取 10mg 异硫氰酸荧光素(FITC)，溶于 10mL 无水乙醇中，在磁力搅拌条件下逐滴加入到 20mL 葡聚糖浓度为 40mg/ml 的醋酸溶液 (0.2mol/L) 中，避光反应 4 小时，使 FITC 上的碳原子与葡聚糖上的二乙烯砜反应以便进行标记偶联。用 10mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 9，离心 9000rpm，时间 7 分钟，取沉淀。
- [0078] (2) 葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物初产物的制备：用蒸馏水洗涤沉淀，直至滤液澄清呈无色为止。将沉淀重新用质量百分比 2% 醋酸溶液溶解，用 10mol/L NaOH 调节 pH 值至 5，在磁力搅拌条件下逐滴加入 10mL 抗体蛋白溶液，浓度为 20mg/mL，反应 20 分钟后得到葡聚糖、抗体和荧光素混合标记物初产物；
- [0079] (3) 葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物的制备：用 Sephadex-G50 装 25cm 层析柱，凝胶沉淀约 18cm，离管口 7cm，避免凝胶柱干掉，用 pH=7.0 的 0.005M 磷酸缓冲液平衡洗脱约 10 分钟，流速控制为 1ml/分钟。吸取上述标记液上凝胶柱，注意不可使柱面干掉。用 pH=7.0 的 0.005M 磷酸缓冲液洗脱，流速控制为 1ml/分钟。当黄绿色荧光出现在洗脱液时，用试管收集全部黄绿色荧光溶液。黄色荧光溶液洗脱较慢，用蒸馏水洗脱约 15 分钟，直至黄色荧光消失，停止洗脱后，将柱内凝胶回收入凝胶瓶内。上述葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物经透析后置于 pH=7.4 的 0.01M 的 PBS 缓冲液中，加入 0.1% NaN₃、1%BSA，4℃ 避光保存。
- [0080] 其中结合垫制备
- [0081] 制备步骤：
- [0082] (1) 将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物 20mg 稀释于 2000ml 的 pH7.40.01M 的 PBS 缓冲液中；
- [0083] (2) 缓冲液加入 0.1% NaN₃ 与 1%BSA，制备上述混合标记物的浓度 0.01mg/ml；
- [0084] (3) 将抗体结合垫浸泡于 2000ml 的混合标记物中，作用时间控制在 2-5 分钟，取出后 37℃ 气套式烘箱烘干，在 45% 湿度下避光保存备用。
- [0085] 试纸的制备
- [0086] 制备步骤：
- [0087] 1、生产一种试纸条所需材料如下：
- [0088] ① 硝酸纤维膜：由美国 Millipore/NC 进口，硝酸纤维膜的规格为 30cmx3m/HAHY00010；
- [0089] 一条金标试纸条所需硝酸纤维膜面积为：2.5cm×0.9cm。
- [0090] 生产 10 万人份高灵敏度荧光定量试纸条所需要硝酸纤维膜总面积为：
- [0091] 2.5cm×0.9cm×10 万 = 2.25×10⁵cm²
- [0092] 生产 10 万人份试纸条所需硝酸纤维膜的总卷数：
- [0093] 2.25×10⁵cm²/30×300cm²=25 卷
- [0094] ② 检测 T 线上所需抗体：

[0095] 抗体的总量： $0.5\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 30\text{mg}$

[0096] ③检测控制线 C 线上兔抗鼠 IgG：

[0097] 兔抗鼠 IgG 的总量： $1\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 60\text{mg}$

[0098] ④用于标记垫的葡聚糖 - 单克隆抗体 - 荧光素混合标记物：

[0099] 所需单克隆抗体的总量： $0.01\text{mg/ml} \times 20\text{ul} \times 10\text{万} = 20\text{mg}$

[0100] 所述的抗体为抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶单克隆抗体中的一种。

[0101] 2. 纤维膜上的控制线、检测线的喷制

[0102] 将上述制备好的硝酸纤维膜分别喷制 60ml 抗肌红蛋白、肌钙蛋白 I 和肌酸激酶同工酶单克隆抗体，浓度为 0.5mg/ml ， 2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 T 线的位置。然后同时将 60ml 羊抗鼠 IgG，浓度为 1mg/ml ， 2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 C 线的位置。

[0103] 3、标记物结合垫，样品垫的组装

[0104] 将上述制备好的葡聚糖 - 抗体 - 荧光素标记混合物 20mg，制备浓度为 0.01mg/ml 浸泡处理结合垫材料，为避免产生混淆，特此解释：上述 20mg 和浓度 0.01mg/ml 是指混合标记物中抗体的总量和浓度。而不是荧光素，葡聚糖的总量和浓度。然后将浸泡好的标记物晾干后组装到上述硝酸纤维膜上结合垫的位置，此时硝酸纤维膜已喷射有 C 线，T 线。最后，同样原理，将样品垫组装到试纸条中样品垫的位置。

[0105] 4、分切及成品组装

[0106] 样品吸收垫、结合垫、包被有检测线和控制线的硝酸纤维膜、吸水垫，首尾相互衔接，优化衔接条件，按顺序固定于不干胶底板上；用切割机按一定规格切成条，组装试纸条。

[0107] 对于试纸要进行成品检定，主要对试纸的特异性、敏感性和稳定性试验

[0108] 1、荧光免疫定量试纸的特异性检验

[0109] 本发明产品对比检测阳性标本（含有肌红蛋白、肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白 I）及其他临床血液标本中可能存在的物质样品，以确定该产品的特异性。这些物质包括：人血白蛋白（ 100mg/ml ），胎红素（ 5mg/ml ），血红蛋白（ 10mg/ml ），胆固醇（ 5mg/ml ），甘油三酯（ 15mg/ml ），人类骨骼肌钙蛋白 I（ 10.000ng/ml ），心肌肌钙蛋白（ $20,000\text{ng/ml}$ ）。检测样品滴加到本发明的免疫荧光试纸上，利用便携式荧光检测仪（ESE-Quant FLUO, QIAGEN 公司产品）进行检测，试验结果表明阳性样本反应呈阳性。其他样本无呈阴性，说明上述物质在所示浓度下跟本发明产品没有交叉反应。

[0110] 2、产品敏感性检测试验

[0111] 将前述阳性标本按不同浓度配制，并进行荧光试纸检测。检测结果表明：三种肌红蛋白、肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白 I 指标检测的灵敏性都达到 0.1ng/ml 的水平。检测结果如下表所列：

[0112] 肌红蛋白免疫荧光试纸检测结果

	标本浓度	检测试纸编号	检测结果
[0113]	10ng/ml	1	+
		2	+

		3	+
[0114]	1ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
	0.1ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
	0.01ng /ml	1	-
		2	-
		3	-

[0115] 肌钙蛋白 I 免疫荧光试纸检测结果

	标本浓度	检测试纸编号	检测结果
[0116]	10ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
	1ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
	0.1ng/ml	1	+
		2	+
		3	+

[0117]	0.01ng /ml	1	-
		2	-
		3	-

[0118] 肌酸激酶同工酶免疫荧光试纸检测结果

	标本浓度	检测试纸编号	检测结果
[0119]	10ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
	1ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
	0.1ng/ml	1	+
		2	+
		3	+
0.01ng /ml	1	-	
	2	-	
	3	-	

[0120] 3. 稳定性试验

[0121] 将密封保存于 4℃ 试纸每隔 7 天检测一次, 进行稳定性试验, 结果表明 120 天仍可检出阳性。

[0122] 以上所述, 仅为本发明的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此, 任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内, 可轻易想到变化或替换, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此, 本发明的保护范围应所述以权利要求的保护范围为准。

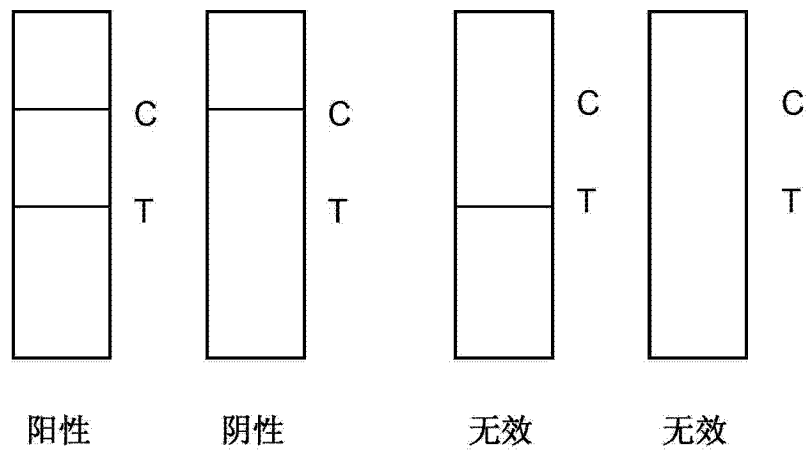


图 1

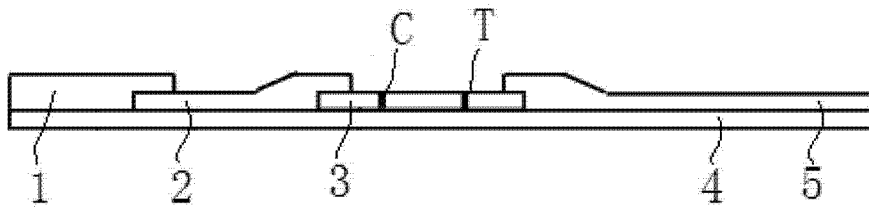


图 2

专利名称(译)	一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法		
公开(公告)号	CN102901828A	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN201210298011.3	申请日	2012-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	江建华		
申请(专利权)人(译)	江建华		
当前申请(专利权)人(译)	江建华		
[标]发明人	江建华		
发明人	江建华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/573 G01N33/558 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测急性心梗的试纸、试纸制备及应用方法，试纸包括底板、附着在底板上依次紧密相连的样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫；其中，结合垫包被有葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物；层析膜上具有一条检测带和一条质控带，检测带上固定有单克隆抗体；质控带固定有能与葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物特异结合的兔抗鼠IgG抗体，本发明试剂的敏感范围达到0.1ng/mL，并且可实现心肌梗塞病人血清中微量肌红蛋白、肌钙蛋白I和肌酸激酶同工酶定量检测，点样后3-5分钟即可得到结果，操作简便，不需要专业人员操作。

