



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102841208 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201110174611. 4

CN 102103145 A, 2011. 06. 22,

(22) 申请日 2011. 06. 24

CN 101105497 A, 2008. 01. 16,

(73) 专利权人 北京乐普医疗科技有限责任公司
地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路
37 号 7-1 号楼

审查员 苗君叶

(72) 发明人 余占江 胡光宇 王长青 张芳

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王加岭 张庆敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2010/061992 A1, 2010. 06. 03,

WO 2010/061992 A1, 2010. 06. 03,

CN 1490407 A, 2004. 04. 21,

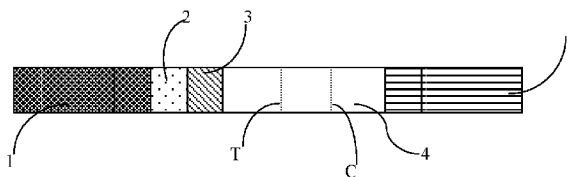
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

快速检测肌钙蛋白 I 的胶体金试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及临床免疫学检测领域, 具体涉及一种快速检测肌钙蛋白 I 胶体金试纸条及其制备方法。本发明提供的试纸条, 其为在底板上依次相互交错地粘贴包被膜、喷涂有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 抗体的胶体金垫 1、喷涂有胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体或抗 PEG 单克隆抗体的胶体金垫 2、样品垫和吸水垫, 所述的包被膜涂覆有抗心肌肌钙蛋白 I 抗体检测线和兔抗鼠抗体质控线。通过对试纸条的改进, 首次将抗 PEG 技术和抗 BSA 单克隆抗体技术引入心肌肌钙蛋白 I 的检测中, 大大提高了心肌肌钙蛋白 I 的检测灵敏度, 扩大了现有胶体金快速诊断试纸条的临床应用。



1. 一种快速检测心肌肌钙蛋白 I 胶体金试纸条,其包括包被膜、喷涂有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的胶体金垫 1、喷涂有胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体或抗 PEG 单克隆抗体的胶体金垫 2、样品垫、吸水垫和底板,所述的包被膜涂覆有抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体检测线和兔抗鼠抗体质控线;

与上述喷涂有胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体的胶体金垫 2 配套使用的胶体金垫 1 的制备方法为:用碳酸钾调节颗粒粒径 10nm ~ 100nm 胶体金溶液的 pH 值至 7.0 ~ 8.0,加入 1 ~ 50 μ g 抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,室温搅拌 10 ~ 60min 后,加入终浓度 0.1% ~ 5% 的 BSA 溶液终止,冷冻离心后,用 pH5.0 ~ pH6.5,含 0.01% ~ 5% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 硼酸盐缓冲液或 pH7.0 ~ 8.0,含 0.01% ~ 1% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液清洗后再次离心,加入 pH6.5 ~ 8.0,含 0.01 ~ 3% BSA,0.01 ~ 1% PEG20000、1 ~ 8% 蔗糖的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液复溶后,使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1 ~ 5 μ L/cm 的速度喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,于 25 ~ 40 $^{\circ}$ C 烘干 8 ~ 24 小时;

与上述喷涂有胶体金标记的抗 PEG 单克隆抗体的胶体金垫 2 配套使用的胶体金垫 1 的制备方法为:用碳酸钾调节颗粒粒径 10nm ~ 100nm 胶体金溶液的 pH 值至 7.0 ~ 8.0,加入 1 ~ 50 μ g 抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,室温搅拌 10 ~ 60min 后,加入终浓度 0.01% ~ 1% 的 PEG20000 溶液终止,冷冻离心后,用 pH5.0 ~ pH6.5,含 0.01% ~ 5% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 硼酸盐缓冲液或 pH7.0 ~ 8.0,含 0.01% ~ 1% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液清洗后再次离心,加入 pH6.5 ~ 8.0,含 0.01 ~ 3% BSA,0.01 ~ 1% PEG20000、1 ~ 8% 蔗糖的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液复溶后,使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1 ~ 5 μ L/cm 的速度喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,于 25 ~ 40 $^{\circ}$ C 烘干 8 ~ 24 小时;

所述喷涂有胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体的胶体金垫 2 的制备方法为:用碳酸钾调节颗粒粒径 10nm ~ 100nm 胶体金溶液的 pH 值至 7.0 ~ 8.0,加入 1 ~ 50 μ g 抗 BSA 单克隆抗体,室温搅拌 10 ~ 60min 后,加入终浓度 0.01% ~ 1% 的 PEG20000 溶液终止,冷冻离心后,用 pH5.0 ~ pH6.5,含 0.01% ~ 5% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 硼酸盐缓冲液或 pH7.0 ~ 8.0,含 0.01% ~ 1% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液清洗后再次离心,加入 pH6.5 ~ 8.0,含 0.01 ~ 3% BSA,0.01 ~ 1% PEG20000、1 ~ 8% 蔗糖的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液复溶后,使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1 ~ 5 μ L/cm 的速度喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,于 25 ~ 40 $^{\circ}$ C 烘干 8 ~ 24 小时;

所述喷涂有胶体金标记的抗 PEG 单克隆抗体的胶体金垫 2 的制备方法为:用碳酸钾调节颗粒粒径 10nm ~ 100nm 胶体金溶液的 pH 值至 7.0 ~ 8.0,加入 1 ~ 50 μ g 抗 PEG20000 单克隆抗体,室温搅拌 10 ~ 60min 后,加入终浓度 0.1% ~ 5% 的 BSA 溶液终止,冷冻离心后,用 pH5.0 ~ pH6.5,含 0.01% ~ 5% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 硼酸盐缓冲液或 pH7.0 ~ 8.0,含 0.01% ~ 1% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液清洗后再次离心,加入 pH6.5 ~ 8.0,含 0.01 ~ 3% BSA、0.01 ~ 1% PEG20000、1 ~ 8% 蔗糖的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液复溶后,使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1 ~ 5 μ L/cm 的速度喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,于 25 ~ 40 $^{\circ}$ C 烘干 8 ~ 24 小时;

所述包被膜的制备方法为:将抗心肌肌钙蛋白 I 抗体稀释液和兔抗鼠抗体稀释液喷涂于硝酸纤维素膜上,烘干备用;

所述样品垫的制备方法为:用样品垫溶液处理后烘干备用;

所述试纸条的制备方法为：在底板上依次相互交错地粘上制备的样品垫、胶体金垫 1、胶体金垫 2、包被膜、和吸水垫，然后在上面覆盖透明塑料密封膜得到试纸。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条，其特征在于，所述的胶体金垫 1、胶体金垫 2 和样品垫为聚酯膜或玻璃纤维素膜。

快速检测肌钙蛋白 I 的胶体金试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床免疫学检测领域,具体涉及一种快速检测肌钙蛋白 I 胶体金试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 心肌梗死是全球范围内致死和致残的主要疾病之一。全球每年有 1700 万人死于心血管疾病,其中一半以上死于急性心肌梗死 (AMI)。在中国,冠心病患者超过 2 千万人,而每年有超过 100 万人被急性心肌梗死夺去生命。因此,快速识别出早期急性心肌梗死患者并及时治疗是提高其存活率的关键。对于无典型胸痛和心电图改变的 AMI 患者,检测血清心肌标志物是诊断 AMI 的必要依据。以往世界卫生组织 (WHO) 定义的心梗标准包括缺血症状、心电图 (ECG) 异常改变和血清心肌酶学变化。然而随着敏感性和特异性更高的生化标志物——肌钙蛋白 (cTn) 的发现以及更精确的无创影像学技术的发展,使得检测到更小的心梗病灶成为可能。诊断心肌梗死的重要一条就是如何快速准确检测体内心脏生化标志物的水平。选择特异性的心肌梗死生化标志物和选择特异性高灵敏度的方法检测心肌梗死生化标志物水平 (免疫诊断试剂盒) 是快速诊断急性心肌梗死首先需要解决的问题。因此,各种以心肌梗死心脏标志物为检测对象的免疫诊断试剂盒和生物芯片逐渐应用于临床并得到广泛发展。

[0003] 心肌肌钙蛋白 (cTn) 灵敏度高、特异性强、发病后持续时间长,几乎完全具有心肌组织特异性并具有高度敏感性,因此是评价心肌坏死的首选标志物。即使心肌组织发生微小区域的坏死也能检查到 cTn 的升高。cTn 的升高对于诊断急性心肌梗死至关重要。目前 cTn 主要用于心肌缺血损伤的临床诊断、危险性估计和预后判断,此外还可用于 MI 后临床溶栓治疗效果判定;心肌缺血损伤面积的估计、临床诊断心肌炎、心肌创伤 (心脏手术)、围手术期心脏并发症、严重脓毒血症或脓毒血症导致的左心衰竭、充血性心功能不全,以及某些治疗药物的临床疗效观察等。因此,如何快速、特异性、高灵敏度的检测体内肌钙蛋白的水平对于心肌梗死患者的诊断和治疗具有重要的意义,具有广泛的临床应用前景和市场潜力。

[0004] 目前肌钙蛋白检测主要采用金标免疫法、酶联免疫法、化学发光法、酶联荧光分析法 (ELFA) 等方法。金标免疫法由于标本用量少,简便快速,适合于急性心肌梗死 (AMI) 的床旁检测,不受时间、地点限制,24h 全方位为患者服务,在临床广泛应用,但是胶体金试纸条检测灵敏度低,一般情况最低检出限为 1ng/mL。大量临床试验和循证医学证据表明,心肌肌钙蛋白作为心肌梗死的标志物具有非常高的灵敏度和特异性,在正常人体中用现有的检测方法几乎检测不出肌钙蛋白的含量,至少其在正常人体的含量低于 0.1ng。临床广泛应用的酶联免疫法作为心肌梗死检测的重要手段,其灵敏度的局限性制约了进一步的更广泛应用。因此,提高胶体金检测灵敏度作为快速诊断的一个重要方向受到越来越多的重视。如将生物素-亲和素放大系统、胶体金与荧光结合等技术应用于胶体金试纸条的检测,以实现更精确的检测。

发明内容

[0005] 为了解决上述问题,本发明的目的在于提供一种快速检测肌钙蛋白 I 胶体金试纸条及其制备方法。

[0006] 本发明提供的快速检测肌钙蛋白 I 胶体金试纸条,其包括包被膜、喷涂有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的胶体金垫 1、喷涂有胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体或抗 PEG 单克隆抗体的胶体金垫 2、样品垫、吸水垫和底板,所述的包被膜涂覆有抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体检测线和兔抗鼠抗体质控线。

[0007] 其中,所述的胶体金垫 1 喷涂有 10nm ~ 100nm 的胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。所述的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的量为 1 ~ 50 μ g。

[0008] 其中,所述的胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体为胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体或多克隆抗体。更进一步,所述的胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体用 BSA 或 PEG 封闭。

[0009] 其中,所述的胶体金垫 2 喷涂有 20nm ~ 100nm 胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体或抗 PEG 单克隆抗体。所述的抗 BSA 单克隆抗体或抗 PEG 单克隆抗体的量为 1 ~ 50 μ g。

[0010] 其中,所述的包被膜为硝酸纤维素膜;所述的胶体金垫 1、胶体金垫 2 和样品垫为聚酯膜或玻璃纤维素膜。

[0011] 本发明所述的试纸条,在普通胶体金试纸的基础上增加抗 BSA 单克隆抗体或抗 PEG 单克隆抗体胶体金垫,测试时,将标本滴入试纸条的样品垫上,如是阳性标本,则标本中的心肌肌钙蛋白 I 与预先包被在聚酯膜上的金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体结合,结合物在毛细效应下向上层析,随后会被固定在膜上测试线 (T) 的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体结合捕获,从而在测试线 (T) 出现一条紫红色条带。同时金标记的抗 BSA 单克隆抗体或金标记的抗 PEG 单克隆抗体在毛细效应下向上层析,在测试线 (T) 区与之前固定在该区的金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体结合,对测试线 (T) 进行进一步的显色放大。具体金标垫 2 选用金标记抗 BSA 单克隆抗体还是金标记的抗 PEG 单克隆抗体,根据制备胶体金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体时是选用 BSA 封闭还是 PEG 封闭而决定。

[0012] 本发明所述的试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 制备胶体金垫 1:将 BSA 或 PEG 封闭的胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体溶液喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,烘干备用;

[0014] 2) 制备胶体金垫 2:将胶体金标记的抗 BSA 单克隆抗体溶液或抗 PEG 溶液喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,烘干备用;

[0015] 3) 制备包被膜:将抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体稀释液和兔抗鼠抗体稀释液喷涂于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,烘干备用;

[0016] 4) 将样品垫用样品垫溶液处理后烘干备用;

[0017] 5) 底板上依次相互交错 2mm 地粘上包被膜、金标垫 1、金标垫 2、样品垫和吸水垫,然后在上面覆盖透明塑料密封膜得到试纸。

[0018] 具体的,本发明所述的试纸条的制备方法,包括如下具体步骤:

[0019] 胶体金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体金标垫 1 的制备:

[0020] 用碳酸钾调节胶体金溶液(胶体金溶液颗粒粒径 10nm ~ 100nm)的 pH 值至 7.0 ~

8.0,加入抗心肌钙蛋白 I 单克隆抗体,室温搅拌 10 ~ 60min 后,加入终浓度 0.01% ~ 1% 的 PEG20000 溶液或者 0.1% ~ 5% 的 BSA 溶液终止,冷冻离心后,用洗液(洗液为含 0.01% ~ 5% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 硼酸盐缓冲液 (pH5.0 ~ pH6.5),或 0.01% ~ 1% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0 ~ 8.0)) 清洗后再次离心,加入复溶液后(复溶液为 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液, pH6.5 ~ 8.0, 含 0.01 ~ 3% BSA, 0.01 ~ 1% PEG20000、1 ~ 8% 蔗糖,使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1 ~ 5 μ L/cm 的速度喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,于 25 ~ 40°C 烘干 8 ~ 24 小时。加入干燥剂封存备用;

[0021] 金标记抗 BSA 单克隆抗体 / 抗 PEG 单克隆抗体金标垫 2 的制备:

[0022] 用碳酸钾调节胶体金溶液(胶体金溶液颗粒粒径 10nm ~ 100nm) 的 pH 值,加入 1 ~ 50 μ g 抗 BSA 单克隆抗体或者 1 ~ 50 μ g 抗 PEG 单克隆抗体,室温搅拌 10 ~ 60min 后,加入终浓度 0.01% ~ 1% 的 PEG20000 溶液或者 0.1% ~ 5% 的 BSA 溶液终止,冷冻离心后,用洗液为含 0.01% ~ 5% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 硼酸盐 (pH5.0 ~ pH6.5),或 0.01% ~ 1% PEG20000 的 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0 ~ 8.0)) 清洗后再次离心,加入复溶液(复溶液为 0.01 ~ 0.5M 磷酸盐缓冲液, pH6.5 ~ 8.0, 含 0.1 ~ 5% BSA, 0.01 ~ 1% PEG20000、1 ~ 8% 蔗糖)后,使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1 ~ 5 μ L/cm 的速度喷洒于聚酯膜或玻璃纤维素膜上,于 25 ~ 40°C 烘干 8 ~ 24 小时。加入干燥剂封存备用;

[0023] 包被膜的制备

[0024] 使用包被缓冲液分别将抗心肌钙蛋白 I 单克隆抗体以及兔抗鼠抗体稀释到 0.5 ~ 2.0mg/mL 浓度,使用 Biodot 三维喷点平台分别将两者以 0.5 ~ 1.0cm 的间隔喷涂于硝酸纤维素膜上,于 25 ~ 40°C 烘干 8 ~ 24 小时。加入干燥剂封存备用;

[0025] 样品垫的处理:

[0026] 将样品垫放入样品垫处理溶液(0.01 ~ 0.5M Tris 缓冲液,磷酸盐缓冲液或柠檬酸缓冲液,其中含 0.01 ~ 1% 表面活性剂 S9, 0.1 ~ 5% BSA),中浸泡 1 ~ 3 小时后取出于 25 ~ 40°C 烘干 8 ~ 24 小时;

[0027] 试纸条的组装:

[0028] 在透明塑料底板上依次相互交错 2mm 地粘上包被膜、金标垫 1、金标垫 2、样品垫和吸水垫,然后在上面覆盖透明塑料密封膜得到试纸,根据要求宽度切割即得到新型胶体金检测试纸。

[0029] 与现有快速诊断胶体金试纸条相比较,本发明具有以下优点:

[0030] 通过对试纸条的改进,首次将抗 BSA 单克隆抗体技术和抗 PEG 技术引入心肌钙蛋白 I 的检测中,大大提高了心肌钙蛋白 I 的检测灵敏度,扩大了现有胶体金快速诊断试纸条的临床应用。

[0031] 双重金标垫的复合应用,在同一检测项目中利用两次金标抗体的显色,进一步放大金标显色效果,更便于临床检验医师的观察和判断。

附图说明

[0032] 图 1 :A 本发明试纸条的正面示意图;

[0033] B 本发明试纸条的侧面示意图。其中,

[0034] 1 :样品垫;

- [0035] 2:胶体金垫 1 ;
- [0036] 3:胶体金垫 2 ;
- [0037] 4:包被膜,包被 T:涂覆抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体测试线 ;C 涂覆兔抗鼠抗体质控线 ;
- [0038] 5:吸水垫 ;
- [0039] 6:反应支持物。
- [0040] 图 2:检测结果示意图。其中,
- [0041] 从左至右依次为:T、C 两条线显色为阳性 ;C 一条线显色为阴性 ;T、C 两条线均未显色为无效。

具体实施方式

- [0042] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。
- [0043] 实施例 1 心肌肌钙蛋白 I 胶体金试纸及其制备方法 (参见图 1)
- [0044] 心肌肌钙蛋白 I 抗体制备:选用商品化的 cTnI 抗体 (Hytest 公司, cat:4T2), 10mM PBS, pH7.2, 4℃透析过夜。
- [0045] 包被膜 (硝酸纤维素膜 2.5cm×0.6cm) 的制备:
- [0046] 包被缓冲液的配制:10mM pH7.2 的磷酸盐缓冲液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置于 4℃保存备用。
- [0047] 用包被缓冲液将抗心肌肌钙蛋白 I 抗体和兔抗鼠抗体分别稀释到 0.5mg/mL 和 0.7mg/mL, 使用 Biodot 三维喷点平台以 1.5 μL/cm 的量将两者以 1.5cm 的间隔均匀喷印于 3.5cm 宽度的硝酸纤维素膜上, 于 25 ~ 40℃烘干 8 小时, 加入干燥剂封存备用。
- [0048] 金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体金标垫 1 的制备
- [0049] 用碳酸钾调节颗粒粒径 20nm 的胶体金溶液的 pH 值为 7.2, 加入抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体, 室温搅拌 30min 后, 加入终浓度 0.8% 的 BSA 溶液终止, 冷冻离心后, 用洗液清洗后再次离心, 加入复溶液后, 4℃保存备用。使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1.8 μL/cm 的速度喷洒于聚酯膜 (0.8cm×0.6cm) 上, 于 25 ~ 40℃烘干 8 小时。加入干燥剂封存备用 ;
- [0050] 金标记抗 BSA 单克隆抗体金标垫 2 的制备
- [0051] 用碳酸钾调节颗粒粒径 100nm 的胶体金溶液的 pH 值为 7.0, 加入抗 BSA 单克隆抗体, 室温搅拌 40min 后, 加入终浓度 0.09% 的 PEG20000 溶液终止, 冷冻离心后, 用洗液清洗后再次离心, 加入复溶液后, 4℃保存备用。使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1.8 μL/cm 的速度喷洒于聚酯膜 (0.8cm×0.6cm) 上, 于 25 ~ 40℃烘干 8 小时。加入干燥剂封存备用 ;
- [0052] 样品垫 (聚酯膜 2.7cm×0.6cm) 的处理
- [0053] 将样品垫放入样品垫处理溶液 (0.1M Tris 缓冲液含 0.05% 表面活性剂 S9 (购自杭州隆基生物技术有限公司, 下同), 1% BSA) 中浸泡 1 小时后取出于 25 ~ 40℃烘干 8 小时 ;
- [0054] 试纸条的组装及切割 (下列所有操作必须在湿度小于 38%, 温度 18 ~ 26℃的房

[0055] 按照要求手工将包被膜、吸水垫 (2.8cm×0.6cm)、金标垫 2、金标垫 1 和样品垫装于 PVC 底板上, 组装成试纸板。

[0056] 使用 Biodot CM4000 型切条刀将组装好的试纸板切成 6mm 宽的成品试纸条, 然后上面覆盖透明塑料密封膜得到试纸。

[0057] 实施例 2 心肌肌钙蛋白 I 胶体金试纸及其制备方法 (参见图 1)

[0058] 包被膜 (硝酸纤维素膜 2.5cm×0.6cm) 的制备:

[0059] 包被缓冲液的配制: 10mM pH7.2 的磷酸盐缓冲液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置于 4℃ 保存备用。

[0060] 用包被缓冲液将实施例 1 制备的抗心肌肌钙蛋白 I 抗体和兔抗鼠抗体 (购自 Abcam) 分别稀释到 1.0mg/mL 和 1.5mg/mL, 使用 Biodot 三维喷点平台以 1.5 μL/cm 的量将两者以 1cm 的间隔均匀喷印于 3.5cm 宽度的硝酸纤维素膜上, 于 37℃ 烘干 8 小时, 加入干燥剂封存备用。

[0061] 金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体金标垫 1 的制备

[0062] 用碳酸钾调节颗粒粒径 100nm 的胶体金溶液的 pH 值为 7.5, 加入抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体, 室温搅拌 30min 后, 加入终浓度 0.05% 的 PEG20000 溶液终止, 冷冻离心后, 用洗液清洗后再次离心, 加入复溶液后, 4℃ 保存备用。使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1.8 μL/cm 的速度喷洒于玻璃纤维素膜 (0.8cm×0.6cm) 上, 于 25 ~ 40℃ 烘干 8 小时。加入干燥剂封存备用;

[0063] 金标记抗 BSA 单克隆抗体金标垫 2 的制备

[0064] 用碳酸钾调节颗粒粒径 40nm 的胶体金溶液的 pH 值为 8.0, 加入抗 PEG 单克隆抗体, 室温搅拌 40min 后, 加入终浓度 1% 的 PEG20000 溶液终止, 冷冻离心后, 用洗液清洗后再次离心, 加入复溶液后, 4℃ 保存备用。使用 Biodot 三维喷点平台将复溶液以 1.8 μL/cm 的速度喷洒于玻璃纤维素膜 (0.8cm×0.6cm) 上, 于 37℃ 烘干 8 小时。加入干燥剂封存备用;

[0065] 样品垫 (玻璃纤维素膜 2.7cm×0.6cm) 的处理

[0066] 将样品垫放入样品垫处理溶液 (0.1M Tris 缓冲液含 0.05% 表面活性剂 S9, 1% BSA) 中浸泡 1 小时后取出于 25 ~ 40℃ 烘干 8 小时;

[0067] 试纸条的组装及切割 (下列所有操作必须在湿度小于 38%, 温度 18 ~ 26℃ 的房间内进行)

[0068] 按照要求手工将包被膜、吸水垫 (2.8cm×0.6cm)、金标垫 2、金标垫 1 和样品垫装于 PVC 底板上, 组装成试纸板。

[0069] 使用 Biodot CM4000 型切条刀将组装好的试纸板切成 6mm 宽的成品试纸条, 然后上面覆盖透明塑料密封膜得到试纸。

[0070] 实施例 3 本发明试纸条灵敏度测试

[0071] 随机抽取按照上述实施例 1 或 2 制作的新型肌钙蛋白 I 胶体金试纸 25 条, 普通市售的肌钙蛋白 I 胶体金试纸条 25 条作为对照组 (在底板上依次相互交错地粘贴包被膜、喷涂有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的胶体金垫、样品垫和吸水垫)。将心肌肌钙蛋白 I 三元复合物 (SRM2921, 购自 Hytest 公司) 溶解于无肌钙蛋白 I 血清中 (购自 Hytest 公司), 并使用该血清稀释到 5ng/mL, 1ng/mL, 0.5ng/mL, 0.1ng/mL, 每个样品浓度测试 5 条。表 1 所示为通过肉眼判读结果。从结果中可以看出, 当血清中肌钙蛋白 I 含量低

于 0.5ng/mL, 普通胶体金试纸条未能检测, 及时含量为 0.5ng/ml 也只有 40% 的检出率。而新型肌钙蛋白 I 胶体金试纸条即使血清中肌钙蛋白 I 浓度为 0.1ng/mL, 仍能准确判断, 而且检出率为 100%。这一实验结果表明, 本发明提供的胶体金试纸条大大提高了现有胶体金试纸条的灵敏度, 具有重要的临床应用价值。

[0072] 表 1 本发明试纸条的灵敏度检测

[0073]

	0ng/mL	0.1ng/mL	0.5ng/mL	1ng/mL	5ng/mL
本发明试纸条	0%	100%	100%	100%	100%
普通胶体金试纸条	0%	0%	40%	100%	100%

[0074] 实施例 4 本发明试纸条的临床试验

[0075] 为了进一步评价新型胶体金试纸条的临床效果, 收集 50 份经 Dade Behring 公司 Stratus CS STAT 荧光分析仪检测肌钙蛋白 I 含量的血清, 其中 0ng/mL 10 份, 0.01 ~ 0.1ng/mL 5 份, 0.1 ~ 0.5ng/mL 5 份, 0.5 ~ 1.0ng/mL 10 份, 1.0 ~ 5.0ng/mL 10 份, 5.0ng/mL 以上 10 份。同时采用新型胶体金试纸条和普通胶体金试纸条检测以上血清, 结果如下表 2 所示。

[0076] 表 2 本发明胶体金试纸条与普通胶体金试纸条的阳性检出率比较

[0077]

	0ng/mL	0.01~0.1 ng/mL	0.1~0.5 ng/mL	0.5~1.0 ng/mL	1.0~5.0 ng/mL	5.0ng/mL 以上
本发明试纸条	0	30%	100%	100%	100%	100%

[0078]

普通胶体金试纸条	0	0%	10%	30%	100%	100%
----------	---	----	-----	-----	------	------

[0079] 以上临床试验结果表明, 本发明提供的新型肌钙蛋白 I 胶体金试纸条相比现有普通胶体金试纸条, 灵敏度大大提高, 进一步拓宽了肌钙蛋白 I 胶体金试纸条的临床应用范围。

[0080] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明技术原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

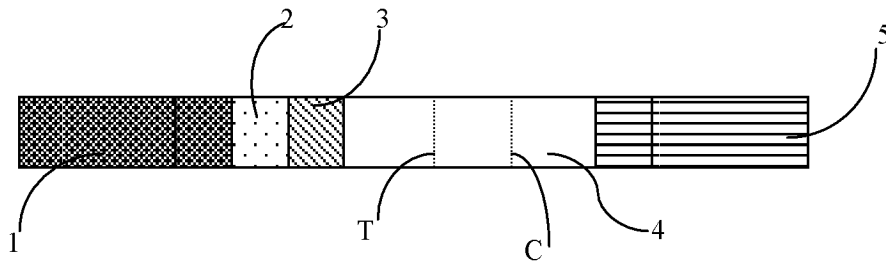


图 1A

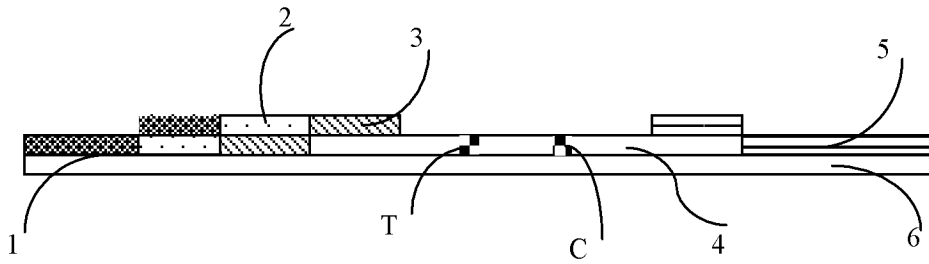


图 1B

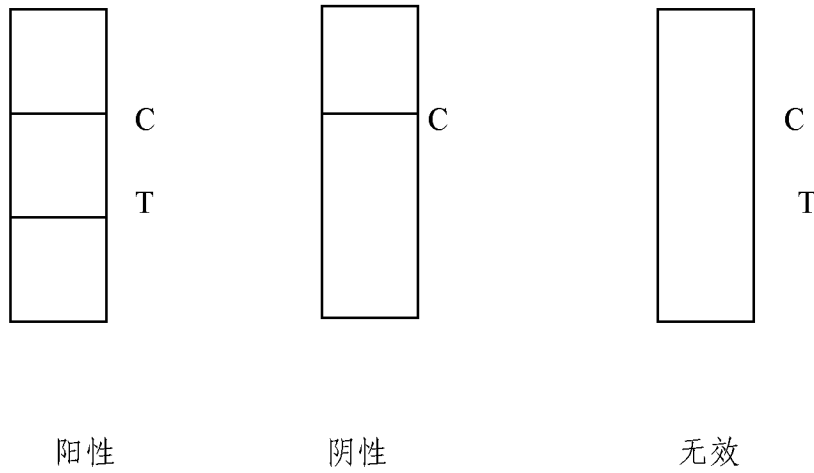


图 2

专利名称(译)	快速检测肌钙蛋白I的胶体金试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN102841208B	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	CN201110174611.4	申请日	2011-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
[标]发明人	余占江 胡光宇 王长青 张芳		
发明人	余占江 胡光宇 王长青 张芳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
代理人(译)	张庆敏		
其他公开文献	CN102841208A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及临床免疫学检测领域，具体涉及一种快速检测肌钙蛋白I胶体金试纸条及其制备方法。本发明提供的试纸条，其为在底板上依次相互交错地粘贴包被膜、喷涂有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白I抗体的胶体金垫1、喷涂有胶体金标记的抗BSA单克隆抗体或抗PEG单克隆抗体的胶体金垫2、样品垫和吸水垫，所述的包被膜涂覆有抗心肌肌钙蛋白I抗体检测线和兔抗鼠抗体质控线。通过对试纸条的改进，首次将抗PEG技术和抗BSA单克隆抗体技术引入心肌肌钙蛋白I的检测中，大大提高了心肌肌钙蛋白I的检测灵敏度，扩大了现有胶体金快速诊断试纸条的临床应用。

