



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103837677 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 04

(21) 申请号 201310727014. 9

(22) 申请日 2013. 12. 25

(71) 申请人 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

(72) 发明人 张静 邱笑违

(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 孟宪功

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

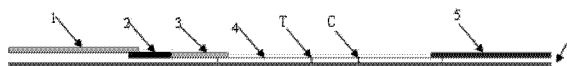
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

检测心脏标记物的试纸条及制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及临床免疫学检测领域,公开了一种检测心脏标记物的试纸条,其包括底板和依次交错设置在底板上的样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫,所述胶体金垫与包被膜之间设有缓冲液垫,且缓冲液垫分别和胶体金垫、包被膜接触,所述胶体金垫和缓冲液垫为一体式结构垫,所述一体式结构垫的一侧喷涂有胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液作为所述胶体金垫,其另一侧作为所述缓冲液垫,本发明还公开了一种该试纸条的制备方法及检测方法。本发明灵敏度高、稳定性好、可信度高、操作简便、适合大规模生产。



1. 一种检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,包括底板和依次交错设置在底板上的样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫,所述胶体金垫与包被膜之间设有缓冲液垫,且缓冲液垫分别和胶体金垫、包被膜接触。

2. 如权利要求1所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述胶体金垫和缓冲液垫为一体式结构垫,所述一体式结构垫的一侧喷涂有胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液作为所述胶体金垫,其另一侧作为所述缓冲液垫。

3. 如权利要求2所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述胶体金垫和缓冲液垫均由玻璃纤维或聚酯纤维材料制成。

4. 如权利要求3所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述胶体金垫上喷涂有颗粒直径为20nm-100nm的胶体金标记的单克隆抗体或多克隆抗体蛋白。

5. 如权利要求4所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述包被膜上间隔设有一条检测带和一条质控带。

6. 如权利要求5所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述缓冲液垫与包被膜上的检测带之间的距离不小于0.5cm。

7. 如权利要求6所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述检测带涂覆有单克隆抗体或多克隆抗体蛋白。

8. 如权利要求7所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述质控带涂覆有能与所述胶体金标记的单克隆抗体或多克隆抗体蛋白相结合的抗抗体。

9. 如权利要求8所述的检测心脏标记物的试纸条,其特征在于,所述包被膜由硝酸纤维素膜制成。

10. 一种如权利要求1-9任一项所述的检测心脏标记物的试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备胶体金垫:将牛血清白蛋白或聚乙二醇封闭的胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液喷洒于玻璃纤维膜或聚酯纤维膜的一端,烘干备用;其另一端作为缓冲液垫;

(2) 制备包被膜:将抗心脏标志物抗体稀释液和抗抗体稀释液喷涂于硝酸纤维素膜上,烘干备用;

(3) 将样品垫用样品溶液处理后烘干备用;

(4) 选取一种吸水性强的材质制作成吸水垫;

(5) 在所述底板上依次相互交错地粘上制备的样品垫、胶体金垫、缓冲液垫、包被膜以及吸水垫,然后在其上表面覆盖透明塑料密封膜得到所述试纸条。

11. 一种利用如权利要求1-9任一项所述的检测心脏标记物的试纸条的检测方法,其特征在于,首先将缓冲液滴加在所述缓冲液垫上,随着缓冲液的渗析,待缓冲液渗透整个包被膜后,再将待测样品滴加在样品垫上,待测样品再次将包被膜浸湿,15-20min后,根据包被膜上的检测带与质控带的颜色变化,读取检测结果;当检测线与质控线均为显色时检测结果为阳性;当只有检测线为显色时检测结果为阴性;当检测线与质控线均未显色时检测结果为无效。

12. 如权利要求11所述的利用检测心脏标记物的试纸条的检测方法,其特征在于,所述缓冲液与待测样本添加的时间间隔为0.5-1min。

13. 如权利要求12所述的利用检测心脏标记物的试纸条的检测方法,其特征在于,所

述缓冲液与待测样本添加的体积分别为 20-80u1 和 80-120u1。

检测心脏标记物的试纸条及制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床免疫学检测技术领域,特别是涉及一种检测心脏标记物的胶体金试纸条及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] POCT (point-of-care testing,即时检验),指在病人旁边进行的临床检测,通常不一定是临床检验师来进行,是在采样现场即刻进行分析,省去标本在实验室检验时的复杂处理程序,快速得到检验结果的一类新方法。当今社会,随着医学的诊断和治疗水平的不断提高及实际工作的需要,以及医学模式的转变和医疗体制的改革,从而带动了 POCT 的发展,而且随着免疫反应和分子生物技术的引进,POCT 在检验医学中的新领域受到人们的关注和重视,是随着医学模式和人们对健康理念的转变发展起来的,POCT 的使用更为便捷,检测和应用的范围更为广泛。

[0003] 心脏标志物检测是 POCT 检测的一个重要领域,急性心血管疾病如 AMI (急性心肌梗死)是大多数心血管疾病的最主要死亡病因,如何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,如果无法在短时间内确诊胸痛病人是否患有致命的 AMI 的话,那么那些非 AMI 的病人不但要无端的担惊受怕,而且每天要承担额外的大额医药费和住院费,不仅如此,有些 AMI 患者因诊断不及时得不到及时治疗而延误病情甚至死亡,因此,临床快速诊断对于患者抢救和治疗以及控制病情发展十分重要,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,其中的心肌蛋白质类标志物如心肌肌钙蛋白 I (cTnI)对心肌损伤有高度的特异性和敏感性,已成为临床诊断心肌损伤的确定标志物,尤其对于 AMI 的临床诊断具有重要意义。肌红蛋白(MyO)是早期诊断 AMI 最重要的指标,肌酸激酶同功酶(CK ~ MB)是临床医师诊断 AMI 最信赖的心肌标志物,心肌肌钙蛋白 I 是心肌损伤检测的金标准,B 钠尿肽(BNP)是全新的充血性心力衰竭诊断的标志物,可协助诊断充血性心力衰竭,判断病情的严重程度,预防以及指导治疗等。目前上述指标都已可以用 POCT 方法测定,这对于心肌损伤性疾病特别是心肌梗死的早期诊断、及时采取有效的治疗措施具有非常重要的意义。

[0004] 尽管心脏标志物检测具有一系列的优点,但目前 POCT 产品中仍然存在问题,例如灵敏度和重复性欠佳,不能正确反映患者病情;检测结果误差大即变异系数(CV)太大,同一批产品可能出现不同的检测结果。因此无法保证每一批产品,每一个测试单元质量都一样、结果都一致,这一问题也直接制约着心脏标志物 POCT 产品的使用和发展。

发明内容

[0005] (一)要解决的技术问题

[0006] 本发明要解决的技术问题是如何提供一种灵敏度高、稳定性好和可信度高的用于检测心脏标记物的胶体金试纸条。

[0007] (二)技术方案

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种检测心脏标记物的试纸条,其包括底板和依次交错设置在底板上的样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫,所述胶体金垫与包被膜之间设有缓冲液垫,且缓冲液垫分别和胶体金垫、包被膜接触。

[0009] 其中,所述胶体金垫和缓冲液垫可以为一体式结构垫,在所述一体式结构垫的一侧喷涂有胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液作为所述胶体金垫,其另一侧作为所述缓冲液垫。

[0010] 其中,所述胶体金垫和缓冲液垫均由玻璃纤维或聚酯纤维材料制成。

[0011] 其中,所述胶体金垫上喷涂有颗粒直径为 20nm-100nm 的胶体金标记的单克隆抗体或多克隆抗体蛋白。

[0012] 其中,所述包被膜上间隔设有一条抗心脏标志物抗体检测带和一条兔抗鼠抗体质控带,所述抗心脏标志物抗体的量为 1 ~ 50 μ g。

[0013] 其中,所述缓冲液垫与包被膜上的检测带之间的距离不小于 0.5cm。

[0014] 其中,所述检测带涂覆有单克隆抗体或多克隆抗体蛋白。

[0015] 其中,所述质控带涂覆有能与所述胶体金标记的单克隆抗体或多克隆抗体蛋白相结合的抗抗体。

[0016] 其中,所述包被膜由硝酸纤维素膜制成。

[0017] 本发明还提供一种如上述任一项技术方案所述的检测心脏标记物的试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0018] (1) 制备胶体金垫:将牛血清白蛋白或聚乙二醇封闭的胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液喷洒于玻璃纤维膜或聚酯纤维膜的一端,烘干备用;另一端作为缓冲液垫;

[0019] (2) 制备包被膜:将抗心脏标志物抗体稀释液和抗抗体稀释液喷涂于硝酸纤维素膜上,烘干备用;

[0020] (3) 将样品垫用样品溶液处理后烘干备用;

[0021] (4) 选取一种吸水性强的材质制作成吸水垫;

[0022] (5) 在所述底板上依次相互交错地粘上制备的样品垫、胶体金垫、缓冲液垫、包被膜以及吸水垫,然后在其上表面覆盖透明塑料密封膜得到所述试纸条。

[0023] 本发明还提供一种利用上述任一技术方案所述的检测心脏标记物的试纸条的检测方法,首先将缓冲液滴加在所述缓冲液垫上,随着缓冲液的渗析,待缓冲液渗透整个包被膜后,再将待测样品滴加在样品垫上,待测样品再次将包被膜浸湿,15-20min 后,根据包被膜上的检测带与质控带的颜色变化,读取检测结果:当检测线与质控线均为显色时检测结果为阳性;当只有检测线为显色时检测结果为阴性;当检测线与质控线均未显色时检测结果为无效。

[0024] 其中,所述缓冲液与待测样本添加的时间间隔为 0.5-1min。

[0025] 其中,所述缓冲液与待测样本添加的体积分别为 20-80 μ l 和 80-120 μ l。

[0026] (三) 有益效果

[0027] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0028] 本发明提供了一种检测心脏标记物的试纸条设有缓冲液垫,预先用合适的缓冲液湿润包被膜上的抗体,使其从干燥状态变为溶液状态,在测试时可大大提高抗体抗原的灵敏度,通过对试纸条的改进,从而大大提高了该心脏标志物试纸条的检测灵敏度,降低了试

纸条之间的变异系数(CV),提高了现有试纸条的稳定性和可信度。

[0029] 本发明操作简便、适合大规模生产,这对于心脏标志物特别是心肌钙蛋白的定量诊断有着积极的意义。

附图说明

[0030] 图 1a 为本发明一种检测心脏标记物的试纸条的正面示意图;

[0031] 图 1b 为本发明一种检测心脏标记物的试纸条的侧面示意图;

[0032] 图 2 为本发明一种检测心脏标记物的试纸条的检测结果示意图;

[0033] 图 3 为本发明实施例二中以检测线的信号强度为纵坐标和以心肌钙蛋白 I 的溶液浓度为横坐标拟合的曲线图。

[0034] 图中:1:样品垫;2:胶体金垫;3:缓冲液垫;4:包被膜;T:检测带;C:质控带;5:吸水垫;6:底板。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0036] 如图 1a 和图 1b 所示,为本发明提供的一种检测心脏标记物的试纸条,其包括底板 6 和依次交错设置在底板 6 上的样品垫 1、胶体金垫 2、包被膜 4 和吸水垫 5,所述胶体金垫 2 与包被膜 4 之间设有缓冲液垫 3,且缓冲液垫 3 分别和胶体金垫 2、包被膜 4 接触,所述缓冲液垫 3 与包被膜 4 有部分重叠,以便于在层析过程中,滴加在所述缓冲液垫 3 上的液体能够快速渗透整个包被膜 4。

[0037] 其中,所述胶体金垫 2 和缓冲液垫 3 为一体式结构垫,所述一体式结构垫的一侧喷涂有胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液作为所述胶体金垫 2,其另一侧作为所述缓冲液垫 3。其喷涂的一端与样品垫 1 接触,未喷涂的一端与包被膜 4 接触。

[0038] 其中,所述胶体金垫 2 和缓冲液垫 3 均由玻璃纤维或聚酯纤维材料制成。所述样品垫 1 也可以由玻璃纤维或聚酯纤维材料制成,所述样品垫 1 可做预先处理也可不作处理,所述缓冲液垫 3 可做预先处理也可不作处理,所述缓冲液的种类不固定,可以根据实际情况进行选择 and 调整。

[0039] 其中,所述胶体金垫 2 喷涂有颗粒直径为 20nm-100nm 的胶体金标记的单克隆抗体或多克隆抗体蛋白。

[0040] 其中,所述包被膜 4 上间隔设有一条抗心脏标志物抗体检测带 T 和一条兔抗鼠抗体质控带 C,所述抗心脏标志物抗体的量为 $1 \sim 50 \mu\text{g}$ 。

[0041] 其中,所述缓冲液垫 3 与检测带 T 不接触,且两者之间的距离不小于 0.5cm,两者之间的距离可调节。

[0042] 其中,所述检测带 T 包有单克隆抗体或多克隆抗体蛋白。

[0043] 其中,所述质控带 C 包有能与所述胶体金标记的单克隆抗体或多克隆抗体蛋白相结合的抗抗体。

[0044] 其中,所述包被膜 4 优选由硝酸纤维素膜制成。

[0045] 其中,所述吸水垫 5 采用吸水性强的材料制成,用于吸收反应中多余的水分,也可

以起到引流的作用。

[0046] 下面以两个实施例具体说明本发明,但不用来限制本发明的范围:

[0047] 实施例一

[0048] 以心肌肌钙蛋白 I 抗体的制备为实施例用于说明本发明的试纸条的制备方法:

[0049] 心肌肌钙蛋白 I 抗体的制备:选用商品化的心肌肌钙蛋白 I 抗体,10mM PBS, pH7.2, 4℃的透析液。

[0050] 缓冲液的配制:10mM pH7.2 的磷酸缓冲液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置于 4℃ 环境下保存备用;用该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 划膜仪的三维喷点平台将两者以 1.5cm 的间隔均匀喷印于 2.5cm×0.6cm 的硝酸纤维素膜上,于 35 ~ 38℃ 烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用,制作出包被膜 4;

[0051] 胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 抗体的胶体金垫 2 的制备:

[0052] 用 0.1M 碳酸钾调节颗粒粒径为 40nm 的胶体金溶液的 pH 值为 7.2,加入抗心肌肌钙蛋白 I 抗体,在室温搅拌 30min 后,加入浓度为 1% 的牛血清白蛋白溶液终止,于 12000rpm, 4℃ 冷冻离心后,用 10mM 磷酸缓冲液含有 0.5% 牛血清白蛋白清洗后再次离心,用复溶液 (10mM 磷酸缓冲液含有 0.5% 牛血清白蛋白、2% 蔗糖、0.1% 叠氮钠) 将胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 抗体悬浮,4℃ 保存备用,使用 Biodot 划膜仪的三维喷点平台将该悬浮液以 1.8 μL/cm 的速度喷洒于 0.8cm×0.4cm 的聚酯纤维膜上,于 35 ~ 38℃ 烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用,制作出胶体金垫 2;

[0053] 裁剪出 0.5cm×0.4cm 的聚酯纤维膜作为缓冲液垫 3;

[0054] 将 2.5cm×0.4cm 的聚酯纤维膜放入样品溶液 (0.1M Tris 缓冲液含 0.1% S9, 1% BSA, 0.9% NaCl) 中浸泡 1 小时后取出于 35 ~ 38℃ 烘干 8 小时,制作出样品垫 1;

[0055] 选取或裁剪出 2.8cm×0.4cm 的吸水纸作为吸水垫 5;

[0056] 试纸条的组装及切割以及下列所有操作必须在湿度小于 38%, 温度在 20 ~ 25℃ 的房间内进行:

[0057] 按照要求手工将包被膜 4、吸水垫 5、胶体金垫 2、样品垫 1 和缓冲液垫 3 装于 PVC 底板 6 上,组装成试纸板,并切成 4mm 宽的成品试纸条。

[0058] 实施例二

[0059] 对本发明一种检测心脏标记物的试纸条的灵敏度的检测:

[0060] 1. 标准曲线的绘制

[0061] 将心肌肌钙蛋白 I 的标准溶液配制成 100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、10ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0.1ng/mL 不同浓度的溶液,用同一批次的试纸条,每个样品浓度测试 5 条,通过肉眼判读结果,对比图 2 中所示的检测结果,判断心肌肌钙蛋白 I 的含量,(a) 中:T、C 两条线均为显色时检测结果为阳性;(b) 中:只有 C 一条线为显色时检测结果为阴性;(c) 中:当 T、C 两条线均未显色时检测结果为无效。当血清中的心肌肌钙蛋白 I 含量低于 0.5ng/mL 时,普通胶体金试纸条无法检测,而本发明的试纸条即使血清中的心肌肌钙蛋白 I 的浓度为 0.1ng/mL,仍能准确判断。这一实验结果表明,该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。按照统计学方法,以检测线的信号强度为纵坐标,心肌肌钙蛋白 I 的溶液浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线,如图 3 所示,由图可见,在

心肌肌钙蛋白 I 的溶液浓度很低,接近于零时,检测线仍然有信号显示,随着心肌肌钙蛋白 I 的溶液浓度的逐渐增大,检测线的信号强度也随之增强,两者呈正比例显示,由实验可得,本发明的检测心脏标记物的试纸条具有很高的灵敏度。

[0062] 2. 样品的检测:

[0063] (1) 平放试纸条,量取 30u1 缓冲液加到缓冲液垫 3,30s 后量取 100u1 样本血清加到样品垫上,室温反应 15 分钟;

[0064] (2) 开启检测设备,并将检测条及校准卡插入检测设备的插卡口,运行仪器,仪器通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的心肌肌钙蛋白溶液的浓度。其中,待测试纸条分为两组,一组为根据本发明制作的试纸条作为实验组;一组为不加缓冲液的常用试纸条作为对照组,按照统计学方法,观察检测线的信号强度,并计算信号强度的平均值和变异系数(CV),如表 1 所示。

[0065] 表 1 为本发明所述的试纸条的检测与对照组的比较。

[0066]

样品浓度 (ng/ml)	实验组		对照组	
	信号强度	CV%	信号强度	CV%
0.1	40.01	9.7	0	0
0.5	78.75	6.0	36.60	19.5
1	108.26	5.6	80.05	14.2
10	198.50	8.5	160.88	7.6
25	314.61	1.3	211.72	11.0
50	445.82	3.9	405.32	10.0
100	702.80	4.1	599.86	6.0

[0067] 可见本发明提供的试纸条的灵敏度远大于不加缓冲液的常见的试纸条。

[0068] 本发明提供的一种检测心脏标记物的试纸条设有缓冲液垫 3,预先用合适的缓冲液湿润包被膜 4 上的抗体,使其从干燥状态变为溶液状态,在测试时可大大提高抗体抗原的灵敏度,通过对试纸条的改进,从而大大提高了该心脏标志物试纸条的检测灵敏度,降低了试纸条之间的变异系数,提高了现有试纸条的稳定性和可信度。

[0069] 本发明操作简便、适合大规模生产,这对于心脏标志物特别是心肌钙蛋白的定量诊断有着积极的意义。

[0070] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,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。

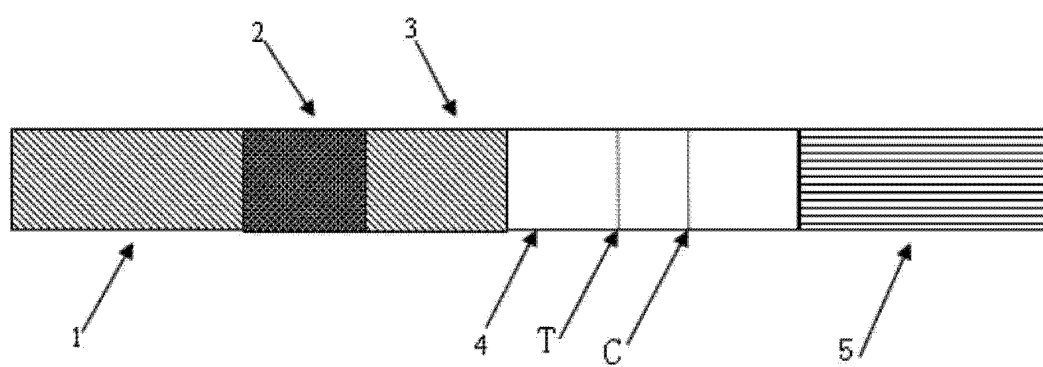


图 1a

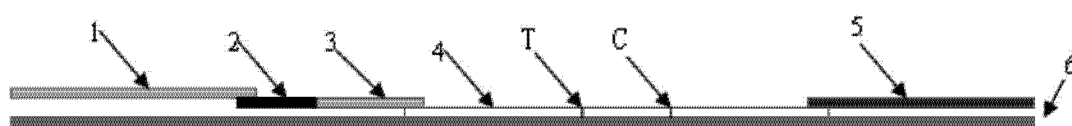


图 1b

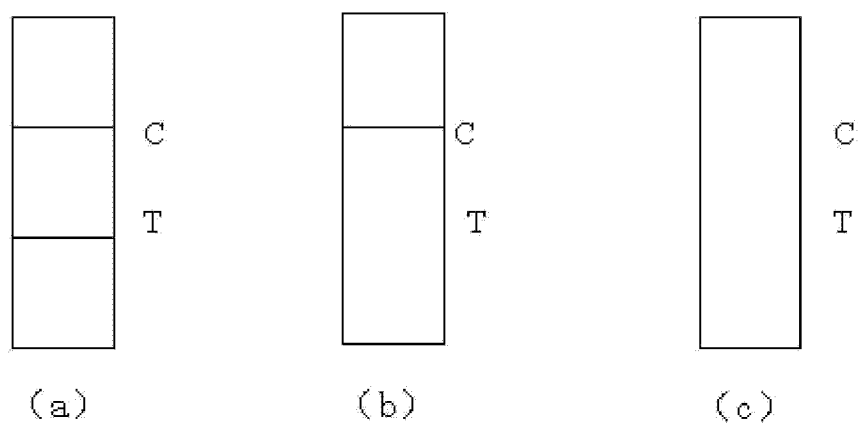


图 2

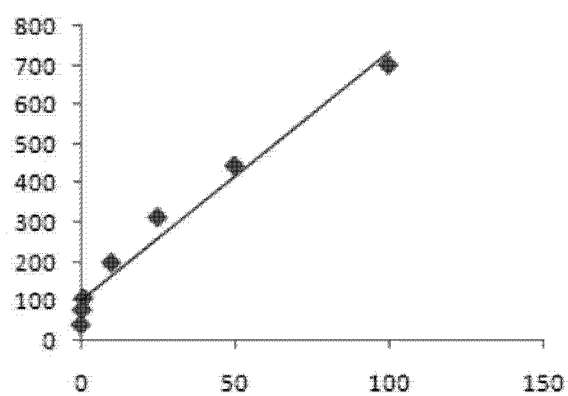


图 3

专利名称(译)	检测心脏标记物的试纸条及制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN103837677A	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201310727014.9	申请日	2013-12-25
[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	张静 邱笑违		
发明人	张静 邱笑违		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/6893		
代理人(译)	孟宪功		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及临床免疫学检测领域，公开了一种检测心脏标记物的试纸条，其包括底板和依次交错设置在底板上的样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫，所述胶体金垫与包被膜之间设有缓冲液垫，且缓冲液垫分别和胶体金垫、包被膜接触，所述胶体金垫和缓冲液垫为一体式结构垫，所述一体式结构垫的一侧喷涂有胶体金标记的抗心脏标志物抗体溶液作为所述胶体金垫，其另一侧作为所述缓冲液垫，本发明还公开了一种该试纸条的制备方法及检测方法。本发明灵敏度高、稳定性好、可信度高、操作简便、适合大规模生产。

