



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109061200 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 201810966690.4

(22) 申请日 2018.08.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109061200 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(73) 专利权人 复星诊断科技(上海)有限公司

地址 200437 上海市宝山区城银路830号

(72) 发明人 孙卫星 景晟 孙卫兵

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 陈亮

(51) Int.Cl.

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107703110 A, 2018.02.16

CN 107219371 A, 2017.09.29

CN 107219371 A, 2017.09.29

CN 104913963 A, 2015.09.16

CN 104897889 A, 2015.09.09

CN 106380617 A, 2017.02.08

CN 204228722 U, 2015.03.25

CN 106501502 A, 2017.03.15

CN 106928477 A, 2017.07.07

审查员 李倩

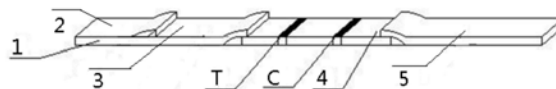
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡及其制备方法,检测试剂卡包括PVC底板,在PVC底板上依次连接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,结合垫喷有用化学试剂和表面活性剂复溶的不同粒径时间分辨微球标记的抗胃泌素17标记抗体及时间分辨微球标记的鸡IgY;硝酸纤维素膜T线位置包被有抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被有羊抗鸡IgY。与现有技术相比,本发明可以方便,迅速的检测出不同浓度的胃泌素17,并且检测结果可靠的,灵敏度可以达到市场要求。



1. 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡,包括PVC底板(1),该PVC底板(1)上依次连接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)和吸水垫(5),

其特征在于,所述结合垫(3)喷有用化学试剂和表面活性剂复溶的不同粒径时间分辨微球标记的抗胃泌素17标记抗体及时间分辨微球标记的鸡IgY;所述硝酸纤维素膜(4)T线位置包被有抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被有羊抗鸡IgY;

所述不同粒径时间分辨微球为粒径196nm及292nm的时间分辨微球,采用含有N,N-二甲基甲酰胺和十二烷基聚乙二醇醚的复溶液进行复溶处理;

粒径196nm的时间分辨微球和粒径292nm的时间分辨微球的质量比为1:1~3:1,时间分辨微球的材质为稀土镧系元素材质,包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)的镧系元素的任意一种;

复溶处理中N,N-二甲基甲酰胺的体积含量为5-30 μ l/ml,十二烷基聚乙二醇醚的重量含量为0.5-5 mg/mL。

2. 根据权利要求1所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡,其特征在于,时间分辨微球的材质为掺杂稀土络合物的铕(Eu)的微球。

3. 如权利要求1所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于,该方法在PVC底板上依次连接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。

4. 根据权利要求3所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于,所述结合垫采用以下方法制备得到:

1) 制备196nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比为1:4~1:20,然后加入 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

2) 制备292nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入292nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比1:10~1:40;加入 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

3) 制备时间分辨微球标记鸡IgY抗体

在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和鸡IgY抗体,两者质量比为1:4~1:40;加入 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

4) 微球复溶液的制备

分别制备含有N,N-二甲基甲酰胺和十二烷基聚乙二醇醚的复溶液,十二烷基聚乙二醇醚含量为0.3-5mg/mL;N,N-二甲基甲酰胺的体积含量为5-30 μ l/ml,上述复溶液中其他试剂重量百分比含量为1mg/mL SDS、10mg/mL BSA、5 mg/mL PVP和10mg/mL PVA用0.05M 4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶解;

5) 将制备的196nm、292nm粒径时间分辨微球按重量比1:1~3:1混合,混合后离心去除

上清液,用步骤4)所制备的复溶液进行复溶处理,得混合标记液,混合后的标记液与步骤3)时间分辨微球标记鸡IgY抗体按照重量比10:1混合,用喷金划膜仪喷至玻纤上,喷量为5 μ L/cm,干燥后得到结合垫。

5.根据权利要求4所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于,196nm、292nm粒径时间分辨微球在复溶液中的固含量为1%。

6.根据权利要求3所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于,在酸纤维素膜T线位置包被抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被羊抗鸡IgY。

7.根据权利要求3所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于,所述样品垫采用以下方法制备得到:将样品垫裁剪后浸泡在缓冲液中,浸渍完全后取出干燥,所述缓冲液样品垫缓冲液配方如下:20mg/mL海藻糖、5 mg/mL S9、0.1mg/mL兔抗人红细胞抗体和10mg/mL吐温,溶解于0.05M、pH值为7.4 的PB缓冲液中。

8.根据权利要求4所述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,其特征在于,所述保存液为:200 mg/mL蔗糖、100mg/mL海藻糖、25 mg/mL BSA溶解于0.05M、pH值为8.0的HEPES溶液。

胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术,尤其是涉及胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 胃泌素,通常由胃肠道的G细胞分泌的多肽类激素。G17主要参与刺激胃酸分泌及营养胃肠道黏膜,近些年来一些研究表明血清G17还有促进增殖和抑制凋亡的作用。血清G17可以提示患者胃黏膜功能状态,用于胃癌及癌前疾病的筛查,因此在胃肠疾病的诊断中有重要意义。

[0003] 胃泌素是一种重要的胃肠道肽类激素,其合成经历由胃泌素原、甘氨酸、延伸型胃泌素到成熟胃泌素的阶段,人体中95%活性胃泌素为 α -酰胺胃泌素,包括G17,G34,G6等等,其中G17是胃窦中胃泌素的主要形式。胃泌素与胃泌素受体结合后通过一系列信号转导二发挥生物学效应。胃泌素与胆囊收缩素具有相同的羧基末端五肽序列。

[0004] 血清G17在胃内发挥刺激分泌胃酸作用,主要靶细胞是肠嗜铬样细胞。血清G17与ECL细胞上面受体结合后,释放组胺,再由组胺与邻近细胞膜上受体H2结合,从而刺激分泌胃酸。

[0005] 血清G17不仅能促进正常胃黏膜生长,而且对癌细胞生长及细胞恶性转化产生影响。众多研究表明胃癌、结肠癌等肿瘤复合表达胃泌素和胃泌素受体,同时也提出了“自分泌环假说”与消化系肿瘤密切相关。

[0006] 在正常及健康的个体中,其血清浓度极低,仅为1-7pmol/mL,一般方法检测不到。在患有结肠癌、胃癌或胃萎缩等患者体内,会促进G17的分泌,使得其体内G17增高。当患有重度的胃部疾病时,患者体内的G17水平会急剧增高,其浓度比正常水平大几倍甚至几十倍。而其他类非胃部等疾病时,其浓度不增高或者轻微变化。因此这个现象决定了G17的高度特异性,因此可以用于胃萎缩类疾病的检测。

[0007] 免疫层析(Lateral Flow Immunoassay,LFIA)技术是近几年来国内外兴起的一种快速诊断技术。LFIA以硝酸纤维素膜(NC膜)为载体,先将特异的抗体(抗原)固定于NC膜的某一区带,当膜条一端滴加样品(尿液或血清或血浆或全血)后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体(抗原)的区域时,样品中相应的抗原(抗体)即与该抗体发生特异性结合,用免疫胶体金等染色可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。目前的LFIA快速检测试剂盒有胶体金、彩色乳胶层析、普通荧光免疫层层析和时间分辨免疫层析为标记物。基于胶体金标记技术开发的快速检测产品,存在灵敏度低、主要应用于定性或者半定量、批间差异较大等问题;基于彩色乳胶颗粒虽然批间差异有所改善,但灵敏度依然较低,也只能用于定性或半定量;至于普通荧光免疫层析,灵敏度尚可,可以进行定量检测但是由于样本中含有较高的荧光本底信号,同时stock位移较小,会对检测产生较大的影响,使得检测结果准确度有待提高。

[0008] 中国专利CN 201710852552.9公开了一种胃泌素17检测试剂盒及其制备方法,但

是该试剂盒采用90-110nm的时间分辨微球,使其检测区间在0-20ng/ml,检测区间足够,但是一般人检测区间较低,对于低值的灵敏度有待提高。所以目前提搞检测试剂盒的灵敏度,对于进一步提高试剂的质量有着非常重要的作用。

发明内容

[0009] 本发明的目的就是为了解决上述现有技术存在的缺陷而提供一种胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡及其制备方法。

[0010] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0011] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡,包括PVC底板,该PVC底板上依次连接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

[0012] 所述结合垫喷有用化学试剂和表面活性剂复溶的不同粒径时间分辨微球标记的抗胃泌素17标记抗体及时间分辨微球标记的鸡IgY;所述硝酸纤维素膜T线位置包被有抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被有羊抗鸡IgY。

[0013] 所述不同粒径时间分辨微球为粒径196nm及292nm的时间分辨微球,采用含有N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和十二烷基聚乙二醇醚(BRIJ35)的复溶液进行复溶处理。

[0014] 粒径196nm的时间分辨微球和粒径292nm的时间分辨微球的质量比为1:1~3:1。采用的时间分辨微球的材质为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种;优选掺杂铕(Eu)材质的微球。

[0015] 复溶处理中DMF含量为5-30ul/mL,BRIJ35含量为0.3-5mg/mL。

[0016] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,在PVC底板上依次连接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。

[0017] 所述结合垫采用以下方法制备得到:

[0018] 1) 制备196nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

[0019] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比为1:4~1:20,然后加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

[0020] 2) 制备292nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

[0021] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入292nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比1:10~1:40;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

[0022] 3) 制备时间分辨微球标记鸡IgY抗体

[0023] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和鸡IgY抗体,两者质量比为1:4~1:40;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀

[0024] 4) 微球复溶液的制备

[0025] 分别制备含有BRIJ35及DMF的复溶液,BRIJ35含量为0.3-5mg/mL;,DMF含量为5-

30u1/mL,上述复溶液中其他试剂含量为1mg/mLSDS、10mg/mLBSA、5mg/mL PVP和10mg/mL PVA用0.05M 4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶解;

[0026] 5) 将制备的196nm、292nm粒径时间分辨微球按重量比1:1~3:1混合,混合后离心去除上清液,用步骤4)所制备的复溶液进行复溶处理,得混合标记液,混合后的标记液与步骤3)时间分辨微球标记鸡IgY抗体按照重量比10:1混合,用喷金划膜仪喷至玻纤上,喷量为5μL/cm,干燥后得到结合垫。

[0027] 196nm、292nm粒径时间分辨微球在复溶液中的固含量为1%。

[0028] 在酸纤维素膜T线位置包被抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被羊抗鸡IgY。

[0029] 所述样品垫采用以下方法制备得到:将样品垫裁剪后浸泡在缓冲液中,浸渍完全后取出干燥,所述缓冲液样品垫缓冲液配方如下:2mg/mL海藻糖、0.5mg/mL S9、0.1mg/mL兔抗人红细胞抗体和10mg/mL吐温,溶解于0.05M、pH值为7.4的PB缓冲液中。

[0030] 所述保存液为200mg/mL蔗糖、100mg/mL海藻糖、25mg/mLBSA溶解于0.05M、pH值为8.0的HEPES溶液。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0032] (1) 本发明提供的技术方案具体检测时将稀释后的样品(血清、血浆、全血)加入样品垫时,样品依次透过样品垫,结合垫,在毛细管作用样品将沿着试剂条向吸收垫的方向移动。当样品中含有高浓度胃泌素17时,样品中的胃泌素17可同时与偶联两种粒径(292nm和196nm)时间分辨微球的胃泌素17标记抗体和包被在NC膜上抗胃泌素17包被抗体发生特异结合,在T线处形成双抗体夹心结构,此时在T线处的荧光强度为两种粒径时间分辨微球的总和,即检测高值信号较强。

[0033] (2) 当样品中胃泌素17浓度低时,样品中的胃泌素17主要与偶联292nm粒径的时间分辨微球的胃泌素17标记抗体和包被在NC膜上胃泌素17包被抗体发生特异结合,在T处形成双抗体夹心结构,此时在T线处的荧光强度为292nm粒径时间分辨微球的荧光;有效解决了粒径小的时间分辨微球能检测出高浓度的胃泌素17而在低浓度时无法检测,粒径大的时间分辨微球能检测出低浓度的抗原,而在高浓度时信号区分较小检测,本发明提供的技术方案选择两种粒径微球可以同时检测出低浓度和高浓度的胃泌素17,即可以检测低值信号。总体检测区间较大。

[0034] (3) 在微球复溶液中添加DMF和BRIJ35,其对于聚苯乙烯制成的微球有着非常好的溶解度,使球分散均匀,同时对于灵敏度有着非常好的提高作用。检测低值灵敏度非常高。

[0035] (4) 综合上述即采用了两种微球较好的解决了灵敏度和检测区间的问题,采用DMF和BRIJ35可以更好的使球溶解并且分散均匀,对于灵敏度的提高有着非常好的促进作用。

附图说明

[0036] 图1为胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡结构示意图。

[0037] 图2为胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡检测曲线图。

具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术

人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0039] 实施例1

[0040] 本发明提供的一种胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡,其结构如图1所示,包括PVC底板1,在PVC底板1上依次连接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5,结合垫3喷涂有含有DMF和BRIJ35复溶的粒径为196nm时间分辨微球标记的胃泌素17标记抗体和292nm时间分辨微球标记的胃泌素17标记抗体,以及时间分辨微球标记的鸡IgY;所述的粒径为196nm时间分辨微球和292nm时间分辨微球的比重为1:1~3:1;所述的包被膜T线位置包被有胃泌素17包被抗体,C线位置包被有羊抗鸡IgY。

[0041] 上述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法如下:

[0042] (1) 样品垫的制备方法

[0043] 样品垫的缓冲液配方如:20mg/mL海藻糖、5mg/mL S9、0.1mg/mL兔抗人红细胞抗体和10mg/mL吐温溶解于0.05M PB pH7.4中

[0044] (2) 结合垫的制备方法

[0045] 196nm时间分辨微球标记胃泌素17标记抗体的步骤

[0046] 在1mL 0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者比重为1:4~1:20;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应120min,加入商品化封闭剂10 μ l,室温反应60min,14000rpm离心30min,去上清,加入保存液,超声混匀,4摄氏度保存备用。

[0047] (3) 292nm时间分辨微球标记胃泌素17标记抗体的步骤

[0048] 在1mL 0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入292nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者比重为1:10~1:40;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应120min加入商品化封闭剂10 μ l,14000rpm离心30min,去上清,加入保存液,超声混匀,4摄氏度保存备用。

[0049] (4) 时间分辨微球标记鸡IgY抗体的步骤为:

[0050] 在1mL 0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入292nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者比重为1:4~1:40;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应120min加入商品化封闭剂10 μ l,14000rpm离心30min,去上清,加入保存液,超声混匀,4摄氏度保存备用。

[0051] (5) 微球复溶液的制备

[0052] 制备含有BRIJ35的复溶液,其中BRIJ35含量为0.3-5mg/mL;含有DMF试剂的复溶液,其中DMF含量为5-30 μ l/mL。其他试剂含量为1mg/mL SDS、10mg/mL BSA、5mg/mL PVP和10mg/mL PVA用0.05M 4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶解。

[0053] 采用的保存液为:200mg/mL蔗糖、100mg/mL海藻糖、25mg/mL BSA溶解于0.05M PH8.0HEPES溶液中。

[0054] 将所制备的196nm、292nm粒径时间分辨微球按重量比1:1~3:1混合(优选2:1),混合后离心去上清,用复溶液复溶,得混合标记液,混合后的标记液与时间分辨微球标记鸡IgY抗体按照重量比10:1混合,用喷金划膜仪喷至聚酯纤维素膜上,喷量为5 μ L/cm,放入37

℃烘箱,干燥不少于4小时。

[0055] 包被膜的制备方法为:

[0056] 在检测线T线将0.01M PH7.4的PBS (现配现用) 将胃泌素17包被抗体稀释至1mg/mL,进行划膜,划膜参数为1 μ L/cm。

[0057] 在检测线C线将0.01M的PBS (现配现用) 将羊抗鸡IgY抗体稀释至0.5mg/mL,进行划膜,划膜参数为1 μ L/cm,再在37℃烘箱干燥,干燥时间不少于24h。

[0058] 上述的胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的组装方法如下:

[0059] 各组件在PVC底板上的排列顺序依次为吸水垫--硝酸纤维素膜--结合垫--样品垫

[0060] ①吸收垫的粘贴:将底板平铺于工作台上;揭开底板上缘吸收垫粘贴处的保护膜,将吸收垫粘附于其上,均匀、轻微滚动式推进,以加强粘合力,并防止产生气泡,吸收垫覆盖在硝酸纤维素膜上2mm。

[0061] ②结合垫粘贴:将结合垫裁为宽10mm $\times$ 长300mm,揭开硝酸纤维素膜下缘结合垫粘贴处的保护膜,将结合垫粘附于其上,方法同吸收垫,结合垫覆盖在硝酸纤维素膜上2mm。

[0062] ③样品垫的粘贴:将样品垫粘附于结合垫下部,方法同吸收垫。样品垫覆盖在结合垫上2mm。

[0063] ④试纸条切割:将粘贴好的底板放入切条机中,切成3.9mm宽的试纸条。

[0064] ⑤装卡与入袋:将每一试纸条装入塑料卡内,将每一试剂卡置于铝膜袋中,并加入

[0065] 1g干燥剂1包,热合封口。

[0066] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的具体使用方法:

[0067] 打开仪器,插入与试剂批号相同的芯片;使用时除去试剂卡外包装,取出试剂卡,水平放置;精确吸取稀释后100 μ L血清/血浆,或150 μ L全血样品,加入到检测卡的加样孔中,然后开始计时;待室温反应15min后,将检测卡放入到仪器的卡槽中;点击仪器上的“测试”按键两次,仪器将开始测试,并显示结果;点击“打印”,可打印检测结果报告。

[0068] 本发明型胃泌素17的检测原理如下:

[0069] 将样本(血清、血浆、全血)加入样品孔时,样本依次透过样品垫,结合垫,在毛细管作用。样本将沿着试剂条向吸水垫的方向移动。当样品中含有高浓度胃泌素17时,样品中的胃泌素17可同时与偶联两种粒径(196nm和292nm)时间分辨微球的胃泌素17标记抗体和包被在NC膜上胃泌素17包被抗体发生特异结合,在T处形成双抗体夹心结构。此时在T线处的荧光强度为两种粒径时间分辨微球的总和。

[0070] 当样品中胃泌素17的浓度低时,样品中的胃泌素17主要与偶联292nm粒径的时间分辨微球的胃泌素17标记抗体和包被在NC膜上胃泌素17包被抗体发生特异结合,在T处形成双抗体夹心结构,此时在T线处的荧光强度为292nm粒径时间分辨微球的荧光。

[0071] 这样有效避免了在粒径小的时间分辨微球能检测出高浓度的胃泌素17而在低浓度时无区分度,粒径大的时间分辨微球能检测出低浓度的抗原,而在高浓度出无区分度。选择一定比例的两种粒径微球可以同时检测出低浓度和高浓度的胃泌素17。

[0072] 为了证明本发明提供的技术方案的效果,下述试验例将胃泌素17校准品,稀释浓度至1pmol/L、7pmol/L、20pmol/L、40pmol/L、80pmol/L的样本,使用移液器取100 μ L的样本加入加样孔中,静置15分钟后放入时间分辨荧光检测仪中读值。每个样本浓度检测三次,取平均值后以样本

[0073] 浓度值对检测值作图,参阅图2。图中低值检测可以检测到非常低的水平1pmol检测值和7pmol检测值有着非常明显的区分度。并且高值检测至80pmol未出现检测值上不去的现象。如有必要检测区间仍然可以适量放大。

	标准品	1pmol/L	7pmol/L	20pmol/L	40pmol/L	80pmol/L
[0074]	检测 T/C 值	0.067	0.475	1.325	2.852	5.39

[0075] 为了更好的说明本发明型的有益效果,下面给出采用本发明型提供的检测试剂与其他标记方法在检测胃泌素17的结果对比实验。

[0076] 检测方法 专利公开号 检测限

[0077] 时间分辨免疫层析 CN 107703110A 0-20ng/ml

[0078] 乳胶活化免疫层析 CN 106501502B 10-1000pgng/mL

[0079] 本发明提供的方法1-80pmol/L

[0080] 实施例2

[0081] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡,包括PVC底板,该PVC底板上依次连接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

[0082] 结合垫喷有用化学试剂和表面活性剂复溶的不同粒径时间分辨微球标记的抗胃泌素17标记抗体及时间分辨微球标记的鸡IgY;在硝酸纤维素膜T线位置包被有抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被有羊抗鸡IgY。

[0083] 上述采用的不同粒径时间分辨微球具体是指粒径196nm及292nm的时间分辨微球,采用含有N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和十二烷基聚乙二醇醚(BRIJ35)的复溶液进行复溶处理,其中DMF含量为5ul/mL,BRIJ35含量为0.3mg/mL。

[0084] 粒径196nm的时间分辨微球和粒径292nm的时间分辨微球的质量比为1:1采用的时间分辨微球的材质为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种;本实施例中使用的是掺杂铕(Eu)材质的微球。

[0085] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,在PVC底板上依次连接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。

[0086] 结合垫采用以下方法制备得到:

[0087] 1) 制备196nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

[0088] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比为1:4,然后加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

[0089] 2) 制备292nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

[0090] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入292nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比1:10;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

[0091] 3) 制备时间分辨微球标记鸡IgY抗体

[0092] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨

微球和鸡IgY抗体,两者质量比为1:4;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应100-150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀

[0093] 4) 微球复溶液的制备

[0094] 分别制备含有BRIJ35及DMF的复溶液,BRIJ35含量为0.3mg/mL;DMF含量为5 μ l/mL,上述复溶液中其他试剂含量为1mg/mL SDS、10mg/mL BSA、5mg/mL PVP和10mg/mL PVA用0.05M 4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶解;

[0095] 5) 将制备的196nm、292nm粒径时间分辨微球按重量比1:1混合,混合后离心去除上清液,用步骤4)所制备的复溶液进行复溶处理,196nm、292nm粒径时间分辨微球在复溶液中的固含量为1%,得混合标记液,混合后的标记液与步骤3)时间分辨微球标记鸡IgY抗体按照重量比10:1混合,用喷金划膜仪喷至玻纤上,喷量为5 μ L/cm,干燥后得到结合垫。

[0096] 上述采用的保存液为200mg/mL蔗糖、100mg/mL海藻糖、25mg/mL BSA溶解于0.05M、pH值为8.0的HEPES溶液。

[0097] 在酸纤维素膜T线位置包被抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被羊抗鸡IgY。

[0098] 样品垫采用以下方法制备得到:将样品垫裁剪后浸泡在缓冲液中,浸渍完全后取出干燥,缓冲液样品垫缓冲液配方如下:2mg/mL海藻糖、0.5mg/mL S9、0.1mg/mL兔抗人红细胞抗体和10mg/mL吐温,溶解于0.05M、pH值为7.4的PB缓冲液。

[0099] 实施例3

[0100] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡,包括PVC底板,该PVC底板上依次连接有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

[0101] 结合垫喷有用化学试剂和表面活性剂复溶的不同粒径时间分辨微球标记的抗胃泌素17标记抗体及时间分辨微球标记的鸡IgY;硝酸纤维素膜T线位置包被有抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被有羊抗鸡IgY。

[0102] 采用的不同粒径时间分辨微球具体是指粒径196nm及292nm的时间分辨微球,采用含有N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和十二烷基聚乙二醇醚(BRIJ35)的复溶液进行复溶处理,DMF含量为30 μ l/mL,BRIJ35含量为5mg/mL,粒径196nm的时间分辨微球和粒径292nm的时间分辨微球的质量比为3:1。采用的时间分辨微球的材质为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种;本实施例采用的是掺杂铒(Er)材质的微球。

[0103] 胃泌素17时间分辨微球免疫层析检测试剂卡的制备方法,在PVC底板上依次连接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。

[0104] 结合垫采用以下方法制备得到:

[0105] 1) 制备196nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

[0106] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比为1:20,然后加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

[0107] 2) 制备292nm时间分辨微球标记抗胃泌素17标记抗体

[0108] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入292nm粒径的时间分辨微球和胃泌素17标记抗体,两者质量比1:40;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基

碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀;

[0109] 3) 制备时间分辨微球标记鸡IgY抗体

[0110] 在浓度为0.05M,pH值为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸中加入196nm粒径的时间分辨微球和鸡IgY抗体,两者质量比为1:40;加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,室温反应150min,加入商品化封闭剂后继续室温反应40-80min,离心后去除上层清液,加入保存液,超声混匀

[0111] 4) 微球复溶液的制备

[0112] 分别制备含有BRIJ35及DMF的复溶液,BRIJ35含量为5mg/mL;DMF含量为30 μ L/mL,上述复溶液中其他试剂含量为1mg/mLSDS、10mg/mLBSA、5mg/mL PVP和10mg/mL PVA用0.05M 4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶解;

[0113] 5) 将制备的196nm、292nm粒径时间分辨微球按重量比3:1混合,混合后离心去除上清液,用步骤4)所制备的复溶液进行复溶处理,196nm、292nm粒径时间分辨微球在复溶液中的固含量为1%,得混合标记液,混合后的标记液与步骤3)时间分辨微球标记鸡IgY抗体按照重量比10:1混合,用喷金划膜仪喷至玻纤上,喷量为5 μ L/cm,干燥后得到结合垫。

[0114] 上述采用的保存液为200mg/mL蔗糖、100mg/mL海藻糖、25mg/mLBSA溶解于0.05M、pH值为8.0的HEPES溶液。

[0115] 在酸纤维素膜T线位置包被抗胃泌素17包被抗体,C线位置包被羊抗鸡IgY。

[0116] 样品垫采用以下方法制备得到:将样品垫裁剪后浸泡在缓冲液中,浸渍完全后取出干燥,缓冲液样品垫缓冲液配方如下:2mg/mL海藻糖、0.5mg/mL S9、0.1mg/mL兔抗人红细胞抗体和10mg/mL吐温,溶解于0.05M、pH值为7.4的PB缓冲液。

[0117] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

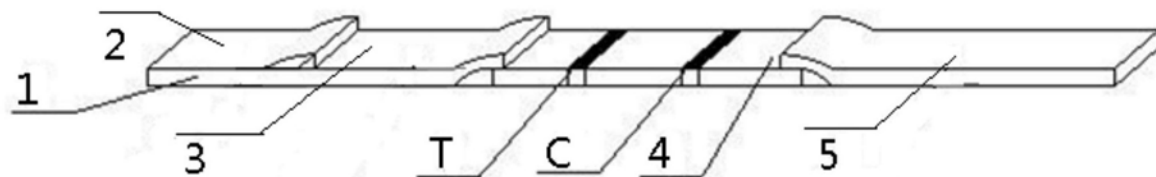


图1

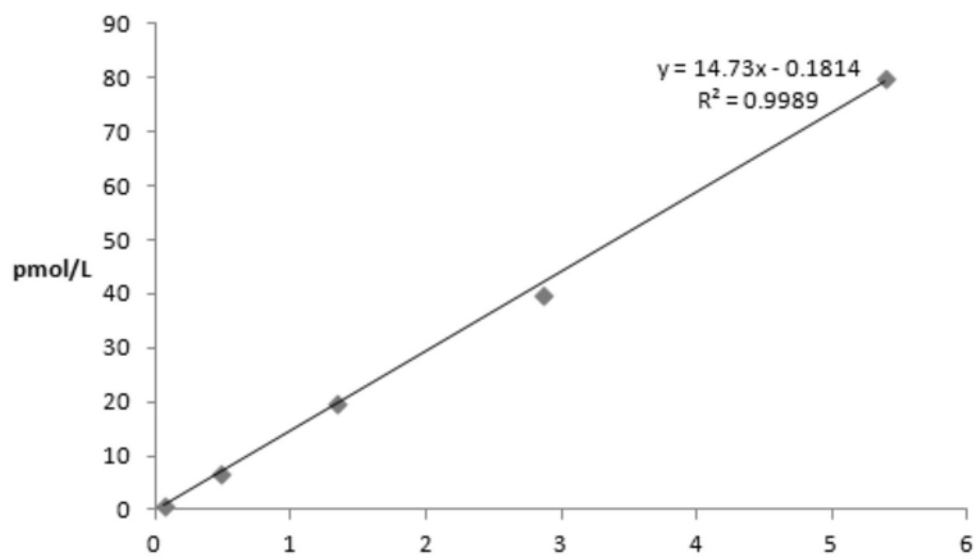


图2