



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568192 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910801610.4

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 千藤(南京)环保科技有限公司

地址 211300 江苏省南京市高淳区古檀大道3号科创中心

(72)发明人 于海东 郭雪英 许智惠

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及方法

(57)摘要

本发明公开了基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及纸基分析方法,包括检测层A、样品加入层B,所述检测层A包括三个检测区域,分别用于检测脂肪酸结合蛋白FABP、心肌肌钙蛋白cTnI和肌红蛋白myoglobin,样品被加入到所述样品加入层B的中心区域,然后将所述样品加入层B折叠到所述检测层A上让所述样品分流到所述三个检测区域实现对所述脂肪酸结合蛋白FABP、心肌肌钙蛋白cTnI和肌红蛋白myoglobin的同时检测。本发明的纸基分析装置及分析方法可以实现对三种心肌标志物的同时检测,并且对FABP、cTnI和myoglobin的检测都具有高灵敏度和良好的选择性,其检测限分别为1.36 ng/mL、1.00 ng/mL和2.38 ng/mL。



1. 基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置, 其特征在于, 包括检测层A、样品加入层B, 所述检测层A包括三个检测区域, 分别用于检测脂肪酸结合蛋白FABP、心肌肌钙蛋白cTnI和肌红蛋白myoglobin, 样品被加入到所述样品加入层B的中心区域, 然后将所述样品加入层B折叠到所述检测层A上让所述样品分流到所述三个检测区域实现对所述脂肪酸结合蛋白FABP、心肌肌钙蛋白cTnI和肌红蛋白myoglobin的同时检测。

2. 基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤SS1: 制备氧化锌纳米线纸基;

步骤SS2: 制备纸基荧光免疫装置;

步骤SS3: 采用双抗体夹心免疫法测定心肌标志物。

3. 根据权利要求2所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法, 其特征在于, 所述步骤SS1具体包括:

步骤SS11: 制备氧化锌种子纸基;

步骤SS12: 制备氧化锌纳米线生长溶液;

步骤SS13: 将所述步骤SS11制备的所述氧化锌种子纸基放入所述步骤SS12制备的所述氧化锌纳米线生长溶液中并用锡箔纸密封, 置于烘箱中90 °C反应3 h后取出, 并用超纯水充分冲洗, 90 °C干燥, 即得到氧化锌纳米线纸基。

4. 根据权利要求3所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法, 其特征在于, 所述步骤SS11具体包括: 将反应所用的纸基板浸没在氧化锌种子溶液即0.1 mol/L的二水乙酸锌里60 s, 取出放在烘箱中100 °C干燥1 h, 得到氧化锌种子纸基备用。

5. 根据权利要求3所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法, 其特征在于, 所述步骤SS12具体包括: 按照以下比例称量3.72 g硝酸锌六水合物、0.88 g六亚甲基四胺、1.52 g聚乙烯亚胺溶于500 mL超纯水中, 再移取13.06 mL的氨水加入所述超纯水中, 超声得到均一相的溶液即为氧化锌纳米线生长液。

6. 根据权利要求2所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法, 其特征在于, 所述步骤SS2中的所述制备纸基荧光免疫装置具体包括:

步骤SS21: 设计图案, 使用蜡打印机将图案打印在所述氧化锌纳米线纸基上; 冷却后, 将所述氧化锌纳米线纸基放在烘箱中加热, 让蜡熔化渗入到整个所述氧化锌纳米线纸基的内部, 所述纸基分析装置三个检测区域最终的孔直径为3.5 mm;

步骤SS22: 用三甲氧基硅烷GPTMS处理所述氧化锌纳米线纸基的表面, 以获得能与氨基反应的环氧基团;

步骤SS23: 将anti-FABP捕获抗体溶液、anti-cTnI捕获抗体溶液和anti-myoglobin捕获抗体溶液分别滴入相应的检测区域, 室温孵育30 min;

步骤SS24: 使用1%的甲氧基聚乙二醇硫醇和1%的牛血清白蛋白BSA封闭所述氧化锌纳米线纸基表面上未反应的环氧基团和降低非特异性吸附, 获得纸基荧光免疫装置;

步骤SS25: 将所述纸基荧光免疫装置储存在4 °C下以备进一步使用。

7. 根据权利要求2所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法, 其特征在于, 所述步骤SS3具体包括:

步骤SS31:将含有心肌标志物的样品加入纸基荧光免疫装置的中心样品区;

步骤SS32:心肌标志物特异性结合相应的捕获抗体;

步骤SS33:心肌标志物夹在捕获抗体和FITC标记的抗体之间;

步骤SS34:在自制紫外箱中进行检测,使用电池供电的紫外灯照射装置,用智能手机捕获紫外灯激发的荧光图像。

8.根据权利要求7所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法,其特征在于,所述步骤SS31具体包括:将纸基荧光免疫装置的样品加入层B的纸基折叠到检测层A纸基的顶部;将含有不同浓度的FABP、cTnI和myoglobin的样品溶液加入样品加入层B纸基的中心样品区,通过样品加入层B纸基的毛细驱动力将样品溶液分流到检测层A纸基的三个检测区域。

9.根据权利要求7所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法,其特征在于,所述步骤SS32具体包括:样品溶液中的目标抗原与检测区域上预先固定的捕获抗体反应后,将样品加入层B纸基剪去,只留下检测层A纸基。

10.根据权利要求7所述的基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法,其特征在于,所述步骤SS33具体包括:将FITC标记的抗FABP、FITC标记的抗cTnI和FITC标记的抗myoglobin分别加入相应的检测区域,反应一段时间;向检测区域加入包含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲溶液分别洗涤每个检测区域,在所述纸基分析装置的底部用一张吸水纸吸收过量的剩余溶液并洗去多余的抗体。

基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及方法,具体涉及一种将氧化锌纳米线集成在纸基上,利用氧化锌纳米线荧光增强信号的方式同时检测多种心肌标志物的纸基分析装置及方法,属于纸基分析检测技术领域。

背景技术

[0002] 自2007年哈佛大学Whitesides课题组开启了纸基分析检测方面的研究,利用光刻法制备了纸基分析装置用于检测葡萄糖和蛋白质,促进了纸基分析技术在医学上的应用。他们还将多层平面纸芯片进行叠加,采用双面胶固定制成了首个三维纸基分析装置,实现了高通量检测多种物质,提出了将纸基作为多重分析物检测的微流体平台的概念。此后,纸基分析技术引起了越来越多的研究者的关注。纸基分析装置具有以下优点:①原料丰富、廉价易得;②纸的主要成分是纤维素,其内部结构是三维网状结构,具有毛细作用力,液体在纸上通过自身毛细作用流动,不需外接泵;③样品用量少;④生物兼容性好,可通过物理或化学修饰对纸基进行改性;⑤纸基柔性好、可折叠、可以实现高通量检测;⑥质地轻、便于携带、操作简便。基于这些优点,纸基分析装置在近几年引起了人们广泛的关注,为分析检测提供了很大的便利,可用于临床诊断、食品质量控制和环境监控等方面的分析检测。

[0003] 急性心肌梗塞(AMI)是威胁生命的严重心血管疾病,为了缓解急性心肌梗塞对人类的危害和提高人们的健康水平,需要研制更灵敏的急性心肌梗塞疾病的检测办法。目前,主要使用酶联免疫吸附实验、电化学发光、免疫比浊法和表面等离子体共振监测患者的AMI,然而这些检测方法只能在医院或专业诊断中心进行,需要使用大型仪器和专业人员操作,因此导致许多人不能得到及时诊断和治疗。而且传统检测方法耗时长、价格昂贵、灵敏度低限制了其实际应用,尤其限制了其在医疗资源匮乏地区的使用。纸基分析装置因其便宜、简单、便携、灵敏有望解决以上难题,开发一种简便廉价、灵敏度高、检测速度快的纸基分析检测新技术有助于早期预防急性心肌梗塞疾病的发生。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于,克服现有技术存在的缺陷,解决上述技术问题,提出基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及方法。

[0005] 本发明要解决的技术问题包括:第一,研发纸基分析装置价格低廉,解决了检测AMI费用昂贵的问题;第二,研发的纸基分析装置具有可携带性,解决了检测AMI过度依赖检测中心和医院的问题;第三,研发的纸基分析方法可同时检测三种心肌标志物,提高了对AMI诊断的准确性。

[0006] 本发明采用如下技术方案:基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置,其特征在于,包括检测层A、样品加入层B,所述检测层A包括三个检测区域,分别用于检测脂肪酸结合蛋白(FABP)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和肌红蛋白(myoglobin),样品被加入到所述样品加入层B的中心区域,然后将所述样品加入层B折叠到所述检测层A上让所述样品分流到所述

三个检测区域实现对所述FABP、cTnI和myoglobin的同时检测。

[0007] 本发明还提出基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤SS1:制备氧化锌纳米线纸基;

步骤SS2:制备纸基荧光免疫装置;

步骤SS3:采用双抗体夹心免疫法测定心肌标志物。

[0008] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS1具体包括:

步骤SS11:制备氧化锌种子纸基;

步骤SS12:制备氧化锌纳米线生长溶液;

步骤SS13:将所述步骤SS11制备的所述氧化锌种子纸基放入所述步骤SS12制备的所述氧化锌纳米线生长溶液中并用锡箔纸密封,置于烘箱中90 °C反应3 h后取出,并用超纯水充分冲洗,90 °C干燥,即得到氧化锌纳米线纸基。

[0009] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS11具体包括:将反应所用的纸基板浸没在氧化锌种子溶液即0.1 mol/L的二水乙酸锌里60 s,取出放在烘箱中100 °C干燥1 h,得到氧化锌种子纸基备用。

[0010] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS12具体包括:按照以下比例称量3.72 g硝酸锌六水合物、0.88 g六亚甲基四胺、1.52 g聚乙烯亚胺溶于500 mL超纯水中,再移取13.06 mL的氨水加入所述超纯水中,超声得到均一相的溶液即为氧化锌纳米线生长液。

[0011] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS2中的所述制备纸基荧光免疫装置具体包括:

步骤SS21:设计图案,使用蜡打印机将图案打印在所述氧化锌纳米线纸基上;冷却后,将所述氧化锌纳米线纸基放在烘箱中加热,让蜡熔化渗入到整个所述氧化锌纳米线纸基的内部,所述纸基分析装置三个检测区域最终的孔直径为3.5 mm;

步骤SS22:用三甲氧基硅烷GPTMS处理所述氧化锌纳米线纸基的表面,以获得能与氨基反应的环氧基团;

步骤SS23:将anti-FABP捕获抗体溶液、anti-cTnI捕获抗体溶液和anti-myoglobin捕获抗体溶液分别滴入相应的检测区域,室温孵育30 min;

步骤SS24:使用1%的甲氧基聚乙二醇硫醇和1%的牛血清白蛋白BSA封闭所述氧化锌纳米线纸基表面上未反应的环氧基团和降低非特异性吸附,获得纸基荧光免疫装置;

步骤SS25:将所述纸基荧光免疫装置储存在4 °C下以备进一步使用。

[0012] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS3具体包括:

步骤SS31:将含有心肌标志物的样品加入中心样品区;

步骤SS32:心肌标志物特异性结合相应的捕获抗体;

步骤SS33:心肌标志物夹在捕获抗体和FITC标记的抗体之间;

步骤SS34:在自制紫外箱中进行检测,使用电池供电的紫外灯照射装置,用智能手机捕获紫外灯激发的荧光图像。

[0013] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS31具体包括:将纸基荧光免疫装置的样品加入层B的纸基折叠到检测层A纸基的顶部;将含有不同浓度的FABP、cTnI和myoglobin的样品溶液加入样品加入层B纸基的中心样品区,通过样品加入层B纸基的毛细驱动力将样品溶液分流到检测层A纸基的三个检测区域。

[0014] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS32具体包括:样品溶液中的目标抗原与检测区域上预先固定的捕获抗体反应后,将样品加入层B纸基剪去,只留下检测层A纸基。

[0015] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS33具体包括:将FITC标记的抗FABP(FITC-labeled anti-FABP)、FITC标记的抗cTnI(FITC-labeled anti-cTnI)和FITC标记的抗myoglobin(FITC-labeled anti-myoglobin)分别加入相应的检测区域,反应一段时间。向检测区域加入包含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲溶液分别洗涤每个检测区域,在所述纸基分析装置的底部用一张吸水纸吸收过量的剩余溶液并洗去多余的抗体。

[0016] 本发明所达到的有益效果:第一,本发明的纸基分析装置和纸基分析方法可以实现对三种心肌标志物的同时检测,并且对FABP、cTnI和myoglobin的检测都具有高灵敏度和良好的选择性,其检测限分别为1.36 ng/mL、1.00 ng/mL和2.38 ng/mL;第二,本发明的检测时间短,只需5 min即可快速完成检测,而且这种检测装置携带方便(检测过程仅需要智能手机和便携式紫外灯);第三,本发明采用纸是一种可降解的理想材料,用其代替传统的塑料、玻璃等材料减轻了环境压力,价格低廉,环保,后处理简单。

附图说明

[0017] 图1是本发明的制备氧化锌纳米线纸基的流程图。

[0018] 图2是本发明的制备荧光免疫装置的流程图。

[0019] 图3是本发明的采用双抗体夹心免疫法测定心肌标志物的流程图。

具体实施方式

[0020] 下面结合附图对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0021] 本发明采用如下技术方案:基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置,其特征在于,包括检测层A、样品加入层B,所述检测层A包括三个检测区域,分别用于检测脂肪酸结合蛋白(FABP)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和肌红蛋白(myoglobin),样品被加入到所述样品加入层B的中心区域,然后将所述样品加入层B折叠到所述检测层A上让所述样品分流到所述三个检测区域实现对所述FABP、cTnI和myoglobin的同时检测。

[0022] 本发明还提出基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置的纸基分析方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤SS1:制备氧化锌纳米线纸基,如图1所示;

步骤SS2:制备纸基荧光免疫装置,如图2所示;

步骤SS3:采用双抗体夹心免疫法测定心肌标志物,如图3所示。

[0023] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS1具体包括:

步骤SS11:制备氧化锌种子纸基;

步骤SS12:制备氧化锌纳米线生长溶液;

步骤SS13:将所述步骤SS11制备的所述氧化锌种子纸基放入所述步骤SS12制备的所述氧化锌纳米线生长溶液中并用锡箔纸密封,置于烘箱中90 °C反应3 h后取出,并用超纯水充分冲洗,90 °C干燥,即得到氧化锌纳米线纸基。

[0024] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS11具体包括:将反应所用的whatman纸基板浸

没在氧化锌种子溶液即0.1 mol/L的二水乙酸锌里60 s,取出放在烘箱中100 °C干燥1 h,得到氧化锌种子纸基备用。

[0025] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS12具体包括:按照以下比例称量3.72 g硝酸锌六水合物、0.88 g六亚甲基四胺、1.52 g聚乙烯亚胺溶于500 mL超纯水中,再移取13.06 mL的氨水加入所述超纯水中,超声得到均一相的溶液即为氧化锌纳米线生长液。

[0026] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS2中的所述制备纸基荧光免疫装置具体包括:

步骤SS21:设计图案,使用蜡打印机将图案打印在所述氧化锌纳米线纸基上;冷却后,将所述氧化锌纳米线纸基放在烘箱中加热,让蜡熔化渗入到整个所述氧化锌纳米线纸基的内部,所述纸基分析装置三个检测区域最终的孔直径为3.5 mm,如图2A和图2B所示;

步骤SS22:为了增强氧化锌纳米线纸基板固定抗体的能力和提高纸基分析装置的检测性能,用(3-缩水甘油基氧基丙基)三甲氧基硅烷GPTMS处理所述氧化锌纳米线纸基的表面,以获得能与氨基反应的环氧基团;

步骤SS23:将anti-FABP捕获抗体溶液、anti-cTnI捕获抗体溶液和anti-myoglobin捕获抗体溶液分别滴入相应的检测区域,室温孵育30 min;

步骤SS24:使用1%的甲氧基聚乙二醇硫醇和1%的牛血清白蛋白BSA封闭所述氧化锌纳米线纸基表面上未反应的环氧基团和降低非特异性吸附,获得纸基荧光免疫装置;

步骤SS25:将所述纸基荧光免疫装置储存在4 °C下以备进一步使用。

[0027] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS3具体包括:

步骤SS31:将含有心肌标志物的样品加入中心样品区;

步骤SS32:心肌标志物特异性结合相应的捕获抗体;

步骤SS33:心肌标志物夹在捕获抗体和FITC标记的抗体之间;

步骤SS34:在自制紫外箱中进行检测,使用电池供电的紫外灯照射装置,用智能手机捕获紫外灯激发的荧光图像,用这种方法完成检测仅需约5 min。也可以通过肉眼方便快捷地直接读取半定量测试结果,如图3A和图3B所示。

[0028] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS31具体包括:将纸基荧光免疫装置的样品加入层B的纸基折叠到检测层A纸基的顶部;将含有不同浓度的FABP、cTnI和myoglobin的样品溶液加入样品加入层B纸基的中心样品区,通过样品加入层B纸基的毛细驱动力将样品溶液分流到检测层A纸基的三个检测区域。

[0029] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS32具体包括:样品溶液中的目标抗原与检测区域上预先固定的捕获抗体反应后,将样品加入层B纸基剪去,只留下检测层A纸基。

[0030] 作为一种较佳的实施例,所述步骤SS33具体包括:将FITC标记的抗FABP(FITC-labeled anti-FABP)、FITC标记的抗cTnI(FITC-labeled anti-cTnI)和FITC标记的抗myoglobin(FITC-labeled anti-myoglobin)分别加入相应的检测区域,反应一段时间;向检测区域加入包含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲溶液分别洗涤每个检测区域,在所述纸基分析装置的底部用一张吸水纸吸收过量的剩余溶液并洗去多余的抗体。

名词解释:脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, FABP)存在于多种组织中,所结合的蛋白是清蛋白,以心肌和骨骼肌中的含量最丰富。FABP是细胞内脂肪酸载体蛋白,其在细胞内利用脂肪酸中起重要作用。

[0031] 心肌肌钙蛋白(cardiac troponin, cTn)是心肌肌肉收缩的调节蛋白。

[0032] cTn是由三种不同基因的亚基组成：心肌肌钙蛋白T(cTnT)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和肌钙蛋白C(TnC)。目前，用于ACS实验室诊断的是cTnT和cTnI。

[0033] 肌红蛋白(Myoglobin)是哺乳动物细胞(主要是肌细胞)储存和分配氧的蛋白质，它是由一条多肽链和一个辅基血红素构成，相对分子质量为16700，含153个氨基酸残基。除去血红素的脱辅基肌红蛋白称球蛋白(globin)，它和血红蛋白的亚基(α 珠蛋白链和 β -珠蛋白链)在氨基酸序列具有明显的同源性，它们的构象和功能也极其相似。

[0034] 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变形，这些改进和变形也应视为本发明的保护范围。

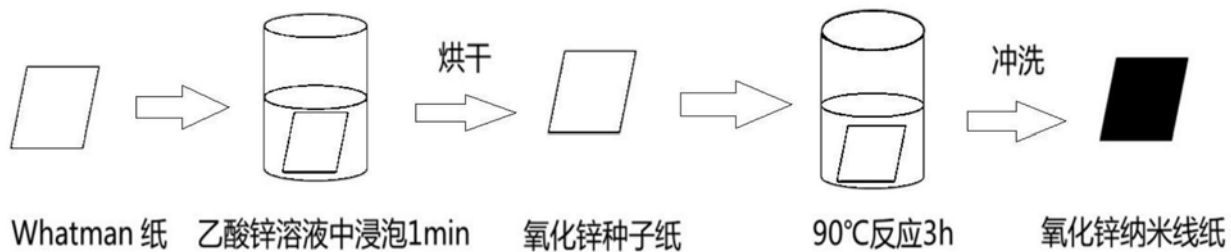


图1

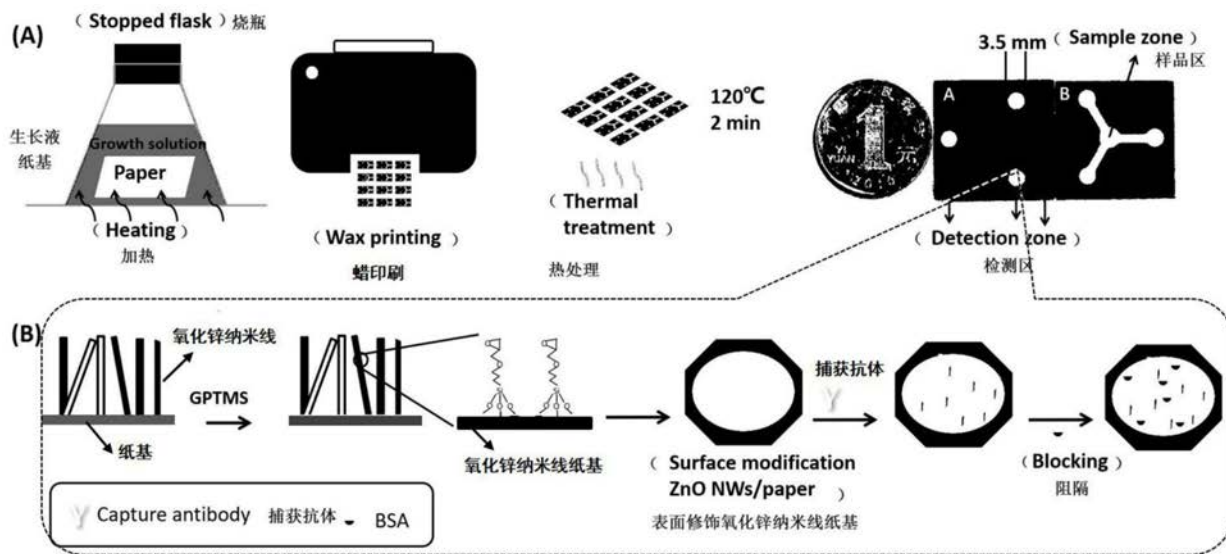


图2

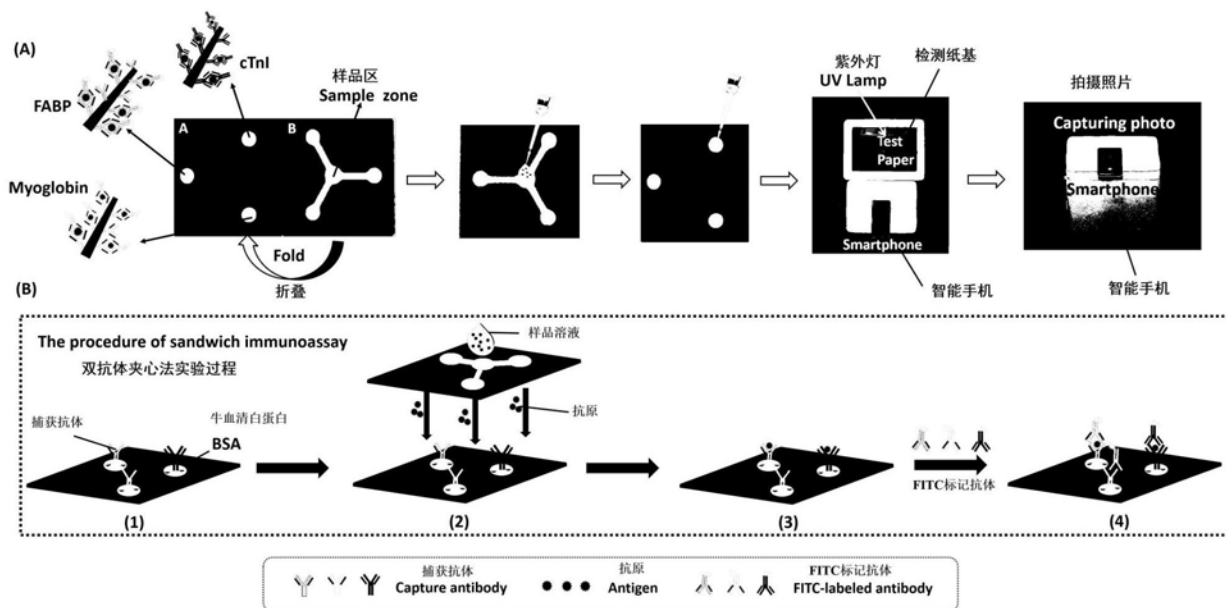


图3

专利名称(译)	基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及方法		
公开(公告)号	CN110568192A	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910801610.4	申请日	2019-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	千藤(南京)环保科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	千藤(南京)环保科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	千藤(南京)环保科技有限公司		
[标]发明人	于海东 郭雪英 许智惠		
发明人	于海东 郭雪英 许智惠		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/54346 G01N33/6803 G01N33/6887		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基于氧化锌纳米线荧光增强的纸基分析装置及纸基分析方法，包括检测层A、样品加入层B，所述检测层A包括三个检测区域，分别用于检测脂肪酸结合蛋白FABP、心肌肌钙蛋白cTnI和肌红蛋白myoglobin，样品被加入到所述样品加入层B的中心区域，然后将所述样品加入层B折叠到所述检测层A上让所述样品分流到所述三个检测区域实现对所述脂肪酸结合蛋白FABP、心肌肌钙蛋白cTnI和肌红蛋白myoglobin的同时检测。本发明的纸基分析装置及分析方法可以实现对三种心肌标志物的同时检测，并且对FABP、cTnI和myoglobin的检测都具有高灵敏度和良好的选择性，其检测限分别为1.36 ng/mL、1.00 ng/mL和2.38 ng/mL。

