



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107290529 A

(43)申请公布日 2017. 10. 24

(21)申请号 201710668871.4

(22)申请日 2017.08.08

(71)申请人 广州市微米生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市广州高新技术
产业开发区科学城科丰路31号华南新
材料创新园G8栋502号

(72)发明人 汤永平 岳彦弢 李之华 张晓丽
潘秀华 叶向荣

(74)专利代理机构 北京科家知识产权代理事务
所(普通合伙) 11427

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种检测心梗心衰的免疫层析试纸及其制
备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测心梗心衰的免疫层析试纸及其制备方法;旨在提供一种检测结果判读准确,交叉反应少的检测心梗心衰的免疫层析试纸,所述检测试纸包括底板,所述的底板上衔接有样品垫、结合垫、反应膜和吸收垫,所述的结合垫上喷有由300nm免疫荧光微球标记的CRP抗体与鸡IgY,以及由200nm免疫荧光微球标记的NT-proBNP抗体;所述的反应膜平行设有C质控线,T1检测线和T2检测线,所述的C线上包被有羊抗鸡IgY,T1检测线上包被有抗原CRP蛋白,T2检测线包被有抗NT-proBNP抗体。



1. 一种检测心梗心衰的免疫层析试纸,包括底板(1),所述的底板(1)上衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、反应膜(4)和吸收垫(5),其特征在于,所述的结合垫(3)上喷有由300nm免疫荧光微球标记的CRP抗体与鸡IgY,以及由200nm免疫荧光微球标记的NT-proBNP抗体;所述的反应膜(4)平行设有C质控线,T1检测线和T2检测线,所述的C线上包被有羊抗鸡IgY,T1检测线上包被有抗原CRP蛋白,T2检测线包被有抗NT-proBNP抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种检测心梗心衰的免疫层析试纸,其特征在于,所述的T1检测线位于T2检测线与C质控线之间,所述的T1检测线与T2检测线之间的距离为0.5cm,所述的T1检测线与C质控线为0.8cm。

3. 制备权利要求1所述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的方法,其特征在于,在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、反应膜(4)和吸收垫(5);

其中,所述的结合垫依次通过下述方法制得的:

将抗NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液与抗CRP抗体免疫荧光微球溶液按1:1的体积比混合均匀,在混合液中加入10wt%鸡IgY免疫荧光微球溶液混合均匀,用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上,喷量为3~5 μ L/cm,放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥6-12小时。

4. 根据权利要求1所述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述的抗NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液的制备方法依次包括下述步骤:

1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液加入15 μ L 200nm免疫荧光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺溶液,室温反应30min,再在16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液,超声混匀;

2) 将抗NT-proBNP抗体按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1)溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按10 μ g/1mL的量,加入到步骤3)溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,15000rpm,15min离心,弃去上清,加入荧光复溶液后超声混匀。

5. 根据权利要求1所述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述的抗CRP抗体免疫荧光微球溶液依次通过下述步骤制得的:

1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液加入15 μ L 300nm免疫荧光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺溶液,室温反应30min;16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

2) 将抗CRP抗体按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1)溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白以1:8的比例混合后按10 μ g/1mL的量,加入到步骤3)溶

液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

6. 根据权利要求1所述的检测心肌梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述的鸡IgY免疫荧光微球溶液依次通过下述步骤制得的:

1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15μL 300nm免疫荧光微球;加入50μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20μL 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min;16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

2) 将鸡IgY按40μg/mL的量,加入到步骤1) 溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按10μg/mL的量,加入到步骤3) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

7. 根据权利要求6所述的检测心肌梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述的荧光复溶液为:0.1M甘氨酸-氢氧化钠缓冲液pH8.5、1%BSA、8%蔗糖、2%海藻糖、0.5%酪蛋白钠盐、0.02%叠氮钠。

8. 根据权利要求3所述的检测心肌梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述的反应膜通过下述方法依次制得的:

1) 在反应膜上面包被质控C线、检测T1线和检测T2线;

质控C线:在硝酸纤维素膜上划线,C线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.5cm,与上缘的距离为2cm,用包被缓冲液将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

检测T1线:T1线位于T2线与C线之间,与T2线的距离为0.5cm,与C线为0.8cm,用包被缓冲液将CRP抗原稀释到1.0mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

检测T2线:T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm,用包被缓冲液将抗NT-proBNP抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

2) 干燥

放入37℃烘箱,干燥6-12小时。

9. 根据权利要求8所述的检测心肌梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述的样品垫的缓冲液配方如下:pH8.0硼酸-硼砂缓冲液、0.5%酪蛋白钠盐、1%BSA、1%蔗糖、1%Tetronic1307。

一种检测心梗心衰的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种联合检测试纸,具体的说,是一种检测心梗心衰的免疫层析试纸,本发明还是涉及该检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] C反应蛋白是急性时相反应蛋白之一,研究发现急性感染患者的血清能和肺炎双球菌细胞壁上的C多糖发生沉淀反应,后证实参与反应的是一种蛋白质,故称之为C反应蛋白。基因位于1号染色体q23,序列上高度保守,C反应蛋白属于穿透素家族成员之一,由5个相同的亚单位以非共价键形式结合,形成对称的环状五球体,中间环绕一孔型结构,其凹面含有配体结合位点,每个亚单位有206个氨基酸残基,相对分子质量为 23×10^3 。正常状态下,分子以五聚体形式存在,在酸性或碱性环境中也可分解为单体,从而引起某些免疫反应,但由于C反应蛋白单体存在于细胞膜而非血清中,故很难检测。炎症、感染、组织损伤时,在细胞因子(如白细胞介素、肿瘤坏死因子)等的刺激下,主要由肝脏生成并可在其他组织局部如神经细胞、单核细胞、淋巴细胞及动脉粥样硬化斑块内合成。

[0003] C反应蛋白具有多种生物学功能,参与多种自身生理及病理生理过程,与磷脂胆碱残基具有高度亲和力,并且可以和多种自身配体如浆细胞脂蛋白,损伤细胞的细胞膜,小核糖体蛋白颗粒,调理素细胞等或外来配体如多聚糖、磷脂以及细菌、真菌、寄生虫等微生物的组分相结合,与这些配体结合后,可以激活补体活化的经典途径,但经典途径的激活仅限于其初级阶段,即产生调理素几乎不能激活晚期补体蛋白。因此不激活膜攻击复合体的强烈促炎作用,限制补体激活晚期炎症反应的发展及强度。同时,还能通过因子的介导抑制补体激活替代途径。可以看出C反应蛋白一方面参与机体的防御功能,另一方面对补体激活后的炎症反应所带来的潜在破坏性具有限制作用。

[0004] 近年来,随着检测方法的改进,特别是采用一些新的敏感的方法检测血清高敏C-反应蛋白,发现其轻度升高与冠状事件、中风及周围血管病相关联,是一种独立的危险因素,是预测急性冠脉综合征(ACS)患者、稳定性和不稳定性心绞痛及支架置入患者未来事件的因素。hs-CRP作为炎症标志物及AS、血栓形成疾病的介导和标志物在心血管疾病诊治中的应用越来越受到临床广泛重视。

[0005] N末端脑钠肽前体是proBNP经酶切后的裂解产物。心肌细胞受牵拉或血管透壁压超负荷时,可促使proBNP大量合成和分泌释放。ProBNP在分泌过程中或进入血液时等摩尔分解为具有生物活性的含32个氨基酸的C端片断(BNP)和含76个氨基酸的N端片断(NT-proBNP)。相对BNP,NT-proBNP在人体的生物半衰期较长(约1~2h;BNP约为20分钟),血中浓度也相对较高(约BNP的15~20倍)。因此,NT-proBNP被认为是较好的能反映心脏功能的生化标志物,诊断有症状的心衰患者,心衰和急性冠脉综合症患者的预后评估和对用于指导心衰的治疗。

[0006] NT-proBNP的检测,无论是单独进行或与其他标志物联合使用,确定无症状的心脏结构和功能异常,包括左室收缩功能障碍(LVSD)与左心室肥厚(LVH),使得在临床前期这些

疾病就可得到预防性治疗,以延缓或防止进展至心力衰竭(HF)。此外,最近的数据表明,某些生物标志物,包括 NT-proBNP,也可确定没有明显心脏异常但心血管疾病发病率和病死率增加的个体。

[0007] 但是,hs-CRP和NT-proBNP检测试剂单一检测结果并不明确,在临床上仅能起指导意义;

[0008] hs-CRP和NT-proBNP检测试剂单独检测一方面浪费样本,另一方面多次加样可能导致结果没有相关性。

[0009] 而将两个不同的项目结合在一条检测卡上,一方面存在着两种项目之间的干扰,通常存在着交叉反应,另一方面两个项目的结果解读也有比较大的困难。

发明内容

[0010] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种检测结果判读准确,交叉反应少的检测心梗心衰的免疫层析试纸。

[0011] 本发明的另外一个目的是提供上述检测试剂的制备方法。

[0012] 为解决以上技术问题,本发明提供的技术方案是这样的:

[0013] 一种检测心梗心衰的免疫层析试纸,包括底板,所述的底板上衔接有样品垫、结合垫、反应膜和吸收垫,所述的结合垫上喷有由300nm免疫荧光微球标记的CRP抗体与鸡IgY,以及由200nm免疫荧光微球标记的NT-proBNP 抗体;所述的反应膜平行设有C质控线,T1检测线和T2检测线,所述的C 线上包被有羊抗鸡IgY,T1检测线上包被有抗原CRP蛋白,T2检测线包被有抗NT-proBNP抗体。

[0014] 进一步的,上述的一种检测心梗心衰的免疫层析试纸,所述的T1检测线位于T2检测线与C质控线之间,所述的T1检测线与T2检测线之间的距离为0.5cm,所述的T1检测线与C质控线为0.8cm。

[0015] 本发明提供的后一个技术方案是这样的:

[0016] 一种检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、反应膜和吸收垫;

[0017] 其中,所述的结合垫依次通过下述方法制得的:

[0018] 将抗NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液与抗CRP抗体免疫荧光微球溶液按1:1的体积比混合均匀,在混合液中加入10wt%鸡IgY免疫荧光微球溶液混合均匀,用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上,喷量为3~5 μ L/cm,放入 37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥6-12小时。

[0019] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的抗 NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液的制备方法依次包括下述步骤:

[0020] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15 μ L 200nm免疫荧光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min,再在16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC 和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

[0021] 2) 将抗NT-proBNP抗体按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1) 溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0022] 3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用

0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

[0023] 4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按10 μ g/1mL 的量,加入到步骤3)溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应 20~40min;

[0024] 5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

[0025] 一种检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、反应膜和吸收垫;

[0026] 其中,所述的结合垫依次通过下述方法制得的:

[0027] 将抗NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液与抗CRP抗体免疫荧光微球溶液按1:1的体积比混合均匀,在混合液中加入10wt%鸡IgY免疫荧光微球溶液混合均匀,用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上,喷量为3~5 μ L/cm,放入 37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥6-12小时。

[0028] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的抗 NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液的制备方法依次包括下述步骤:

[0029] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15 μ L 200nm免疫荧光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min,再在16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC 和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

[0030] 2) 将抗NT-proBNP抗体按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1)溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0031] 3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入 1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

[0032] 4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按10 μ g/1mL 的量,加入到步骤3)溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应 20~40min;

[0033] 5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

[0034] 5、根据权利要求1所述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的抗CRP抗体免疫荧光微球溶液依次通过下述步骤制得的:

[0035] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15 μ L 300nm免疫荧光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min;16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和 NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

[0036] 2) 将抗CRP抗体按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1)溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0037] 3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入 1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

[0038] 4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白以1:8的比例混合后按10 μ g/1mL的量,加入到步骤

3) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

[0039] 5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

[0040] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的鸡IgY免疫荧光微球溶液依次通过下述步骤制得的:

[0041] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15μL 300nm免疫荧光微球;加入50μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20μL 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min;16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和 NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

[0042] 2) 将鸡IgY按40μg/1mL的量,加入到步骤1) 溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0043] 3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入 1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

[0044] 4) 将牛血清蛋白与卵清白蛋白以1:8的比例混合后按10μg/1mL的量,加入到步骤3) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

[0045] 5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

[0046] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的荧光复溶液为:0.1M甘氨酸-氢氧化钠缓冲液pH8.5、1%BSA、8%蔗糖、2%海藻糖、0.5%酪蛋白钠盐、0.02%叠氮钠。

[0047] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的反应膜通过下述方法依次制得的:

[0048] 1) 在反应膜上面包被质控C线、检测T1线和检测T2线

[0049] 质控C线:在硝酸纤维膜上划线,C线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.5cm,与上缘的距离为2cm,用包被缓冲液将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

[0050] 检测T1线:T1线位于T2线与C线之间,与T2线的距离为0.5cm,与C线为0.8cm,用包被缓冲液将CRP抗原稀释到1.0mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

[0051] 检测T2线:T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm,用包被缓冲液将抗NT-proBNP抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

[0052] 2) 干燥

[0053] 放入37℃烘箱,干燥6-12小时。

[0054] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的样品垫的缓冲液配方如下:pH8.00.2M硼酸-硼砂缓冲液、0.5%酪蛋白钠盐、1%BSA、1%蔗糖、1% Tetronic 1307。

[0055] 述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的抗CRP抗体免疫荧光微球溶液依次通过下述步骤制得的:

[0056] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15μL 300nm免疫荧

光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min;16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和 NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

[0057] 2) 将抗CRP抗体按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1) 溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0058] 3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入 1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

[0059] 4) 将牛血清蛋白(BSA)与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按 10 μ g/1mL的量,加入到步骤3) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

[0060] 5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

[0061] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的鸡IgY免疫荧光微球溶液依次通过下述步骤制得的:

[0062] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入15 μ L 300nm免疫荧光微球;加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min;16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和 NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀;

[0063] 2) 将鸡IgY按40 μ g/1mL的量,加入到步骤1) 溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min;

[0064] 3) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,16500rpm,10min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入 1mL 0.1M pH6.0的MES缓冲液重悬;

[0065] 4) 将牛血清蛋白(BSA)与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按 10 μ g/1mL的量,加入到步骤3) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min;

[0066] 5) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4 $^{\circ}$ C,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀。

[0067] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的荧光复溶液为:0.1M甘氨酸-氢氧化钠缓冲液pH8.5、1%BSA、8%蔗糖、2%海藻糖、0.5%酪蛋白钠盐、0.02%叠氮钠。

[0068] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的反应膜通过下述方法依次制得的:

[0069] 1) 在反应膜上面包被质控C线、检测T1线和检测T2线

[0070] 质控C线:在硝酸纤维膜上划线,C线与硝酸纤维素膜下缘的距离为 0.5cm,与上缘的距离为2cm,用包被缓冲液将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0 μ L/cm;

[0071] 检测T1线:T1线位于T2线与C线之间,与T2线的距离为0.5cm,与 C线为0.8cm,用包被缓冲液将CRP抗原稀释到1.0mg/mL进行包被,划线参数为1.0 μ L/cm;

[0072] 检测T2线:T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm,用包

被缓冲液将抗NT-proBNP抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm;

[0073] 2) 干燥

[0074] 放入37℃烘箱,干燥6-12小时。

[0075] 进一步的,上述的检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,所述的样品垫的缓冲液配方如下:pH8.00.2M硼酸-硼砂缓冲液、0.5%酪蛋白钠盐、1%BSA、1%蔗糖、1% Tetronic 1307。

[0076] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有如下有益效果:

[0077] 1、本发明提供的技术方案将抗NT-proBNP抗体的标记采用200nm免疫荧光微球,而鸡IgY与抗CRP抗体采用300nm微球,硝酸纤维素膜采用 CN140,在这种组合下,抗NT-proBNP抗体标记在NC膜上的层析速度相比鸡IgY与抗CRP抗体标记会略快一些,可以使T1线与T2线同时开始反应,最后对结果的判读更加准确;并且还能尽可能的减少交叉反应。

[0078] 2、本发明提供的技术方案同时检测可以实现两个试剂的优势互补,对检测结果更加确信,可以排除因某些交叉反应造成的假阳性或分子异构造成的假阴性;可以分析出是否是肾功能代谢障碍造成的NT-proBNP的假阳性,可以提高对心衰快速检测的灵敏度。

[0079] 3、本发明提供的两个项目在同一条测试卡上,测试只需取一次样,不仅降低了样本的消耗,而且完全相同的样本使两个项目结果更有相关性;本检测试剂中,对CRP的检测采用竞争法,而对NT-proBNP的检测采用双抗体夹心法,如此组合使最后的结果清晰明了,容易判别。

附图说明

[0080] 图1是本发明提供的检测心梗心衰的免疫层析试纸结构示意图;

[0081] 图2是样本中仅含有NT-proBNP抗原时T、C线荧光值;

[0082] 图3是样本中仅含有CRP抗原时T、C线荧光值;

[0083] 图4是样本中同时含有NT-proBNP以及CRP抗原。

具体实施方式

[0084] 下面结合具体实施方式,对本发明的技术方案作进一步的详细说明,但不构成对本发明的任何限制,任何人在本发明保护范围之内所做的有限次的修改,仍然在本发明的保护范围之内。

[0085] 且需要说明的是,本发明提供的技术方案中所采用的原料,除特殊说明外,均通过常规手段制备或者通过商业渠道购买。

[0086] 实施例1

[0087] 本发明提供的一种检测心梗心衰的免疫层析试纸,参阅图1,包括底板1,所述的底板1上衔接有样品垫2、结合垫3、反应膜4和吸收垫5,其特征在于,所述的结合垫3上喷有由300nm免疫荧光微球标记的CRP抗体与鸡IgY,以及由200nm免疫荧光微球标记的NT-proBNP抗体;所述的反应膜4平行设有C质控线,T1检测线和T2检测线,所述的C线上包被有羊抗鸡IgY,T1检测线上包被有抗原CRP蛋白,T2检测线包被有抗NT-proBNP抗体。

[0088] 更为具体的说,所述的T1检测线位于T2检测线与C质控线之间,所述的T1检测线与T2检测线之间的距离为0.5cm,所述的T1检测线与C质控线为0.8cm。

[0089] 上述的种检测心梗心衰的免疫层析试纸的制备方法,是各组件在底板上的排列顺序依次为吸收垫—硝酸纤维素膜(包被膜)—结合垫—样品垫。

[0090] 1) 吸收垫的粘贴:将底板平铺于工作台面上;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,吸收垫覆盖在硝酸纤维素膜上2mm。

[0091] 2) 结合垫粘贴: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。

[0092] 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。

[0093] 4) 试纸条切割、装卡:将粘贴好的底板放入切条机中,切成4mm宽的试纸条,然后装入塑料卡壳中。

[0094] 其中:

[0095] 1、样品垫的制备方法如下:

[0096] 将规格为25cm×30cm的样品垫浸泡在样品垫缓冲液中,5min之后取出,挤净液体,于室温干燥6-12小时,干燥后切割成2.3cm×30cm规格的样品垫。

[0097] 样品垫的缓冲液配方如下:pH8.00.2M硼酸-硼砂缓冲液、0.5%酪蛋白钠盐、1%BSA、1%蔗糖、1% Tetronic 1307

[0098] 2、结合垫的制备方法如下:

[0099] 将抗NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液与抗CRP抗体免疫荧光微球溶液按1:1的体积比混合均匀,在混合液中加入10%鸡IgY免疫荧光微球溶液混合均匀,用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上,喷量为3~5μL/cm,放入37℃烘箱,干燥6-12小时。

[0100] 抗NT-proBNP抗体免疫荧光微球溶液

[0101] 1) 在1mL0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入 15μL200nm免疫荧光微球;加入50μL10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20μL50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min。16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mL0.1M pH6.0的MES,超声混匀。

[0102] 2) 将抗NT-proBNP抗体按40μg/1mL的量,加入到步骤1)溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min。

[0103] 3) 将牛血清蛋白(BSA)与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按 10μg/1mL的量,加入到步骤2)溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min。

[0104] 4) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀

[0105] 抗CRP抗体免疫荧光微球溶液

[0106] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)加入 15μL300nm免疫荧光微球;加入50μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液和20μL 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,室温反应30min。16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀。

[0107] 2) 将抗CRP抗体按40μg/1mL的量,加入到步骤1)溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min。

[0108] 3) 将牛血清蛋白(BSA)与卵清白蛋白(OVA)以1:8的比例混合后按 10μg/1mL的量,

加入到步骤2) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min。

[0109] 4) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀

[0110] 鸡IgY免疫荧光微球溶液

[0111] 1) 在1mL 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉) 乙磺酸缓冲液(MES) 加入 15μL300nm免疫荧光微球;加入50μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 溶液和20μL 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 溶液,室温反应30min,16500rpm离心20min,去上清除去未反应的EDC 和NHS,加入1mL 0.1M pH6.0的MES,超声混匀。

[0112] 2) 将鸡IgY按40μg/1mL的量,加入到步骤1) 溶液中,混匀室温条件下旋转反应30min。

[0113] 3) 将牛血清蛋白(BSA) 与卵清白蛋白(OVA) 以1:8的比例混合后按 10μg/1mL的量,加入到步骤2) 溶液中,封闭未偶联抗体的活化羧基位点,反应20~40min。

[0114] 4) 反应完成后将免疫荧光微球溶液以4℃,15000rpm,15min离心,弃去上清,使用0.1M pH6.0MES缓冲液+0.02%TergitoI NP9洗涤1-3次,加入荧光复溶液后超声混匀

[0115] 荧光复溶液:0.1M甘氨酸-氢氧化钠缓冲液pH8.5、1%BSA、8%蔗糖、2%海藻糖、0.5%酪蛋白钠盐、0.02%叠氮钠

[0116] 3.反应膜的制备方法如下:

[0117] 1) 包被,包被NC膜宽度为25mm。

[0118] 质控线(C线):在硝酸纤维素膜上划线,C线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.5cm,与上缘的距离为2cm,用包被缓冲液将羊抗鸡IgY单克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm。

[0119] 检测线(T1线):T1线位于T2线与C线之间,与T2线的距离为0.5cm,与C线为0.8cm,用包被缓冲液将CRP抗原稀释到1.0mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm。

[0120] 检测线(T2线):T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1.8cm,与上缘的距离为0.7cm,用包被缓冲液将抗NT-proBNP抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线参数为1.0μL/cm。

[0121] 所述的包被缓冲液:0.01M PBS pH7.4+2%蔗糖

[0122] 2) 干燥

[0123] 放入37℃烘箱,干燥6-12小时。

[0124] 本发明提供的技术方案将稀释后的样本(血清、血浆、全血) 加入样品孔时,样品依次透过样品垫,结合垫,在层析作用下样本将沿着试剂条向吸收垫的方向移动,检测结果参见图2至4。当样本中含有NT-proBNP时,样本中的NT-proBNP可与偶联免疫荧光微球的抗NT-proBNP单克隆抗体和包被在NC膜上抗NT-proBNP单克隆抗体发生特异性结合,在T2处形成双抗体夹心结构,即免疫荧光微球偶联抗体—NT-proBNP—抗体,此时通过仪器可以测量得出T2线的荧光信号值以及C线荧光信号值,并且T2线信号值与样本中NT-proBNP含量成正比关系,使用T2/C再通过标准曲线可以反馈得出样本中NT-proBNP的浓度;当样本中含有CRP时,样本中的CRP可与偶联免疫荧光微球的抗CRP单克隆抗体发生特异性结合,形成免疫荧光微球偶联抗体—CRP结构,并更随样本一同在层析作用下向吸收垫方向移动,在移动至T1线处时,包被CRP抗原与样本中的CRP竞争的结合免疫荧光微球偶联抗体,与包被CRP抗原结合的免疫荧光微球偶联抗体在T1线处形成包被 CRP抗原—免疫荧光微球偶联抗体结构,此

时通过仪器可以测量得出T1线的信号值以及C线信号值,此时T1线信号值与样本中CRP浓度呈反比关系,使用T1/C再通过标准曲线可以反馈得出样本中CRP的浓度。T2-T1得出的数值越大则患心脑血管疾病的概率就越大,相反T2-T1数值越小则患心脑血管疾病的概率就越小。

[0125] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

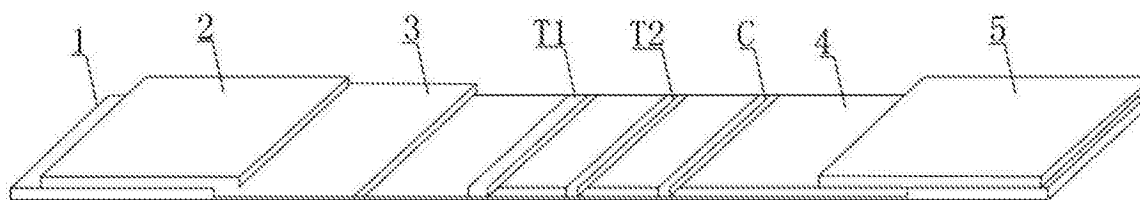


图1

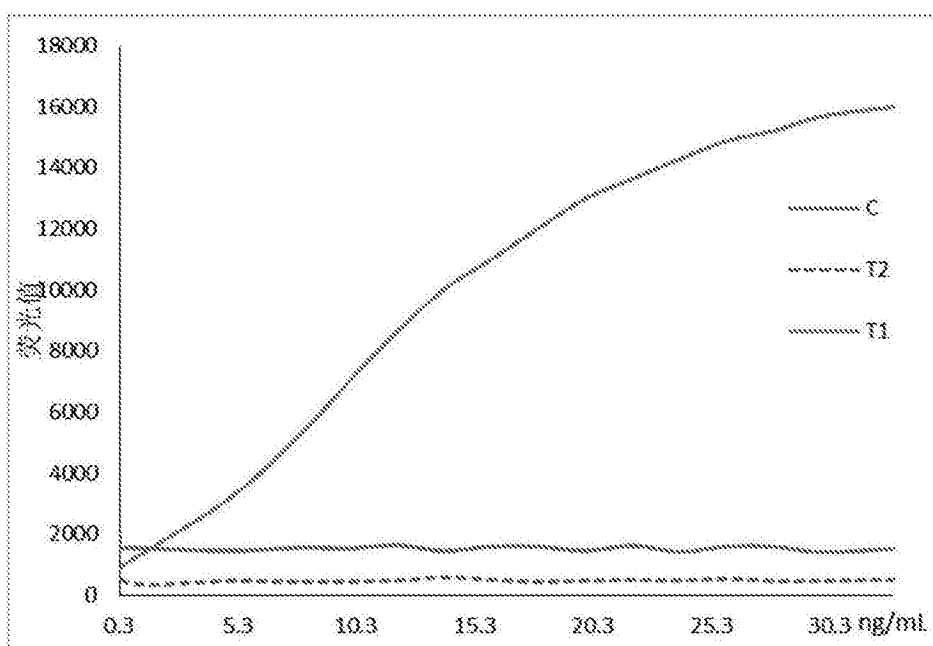


图2

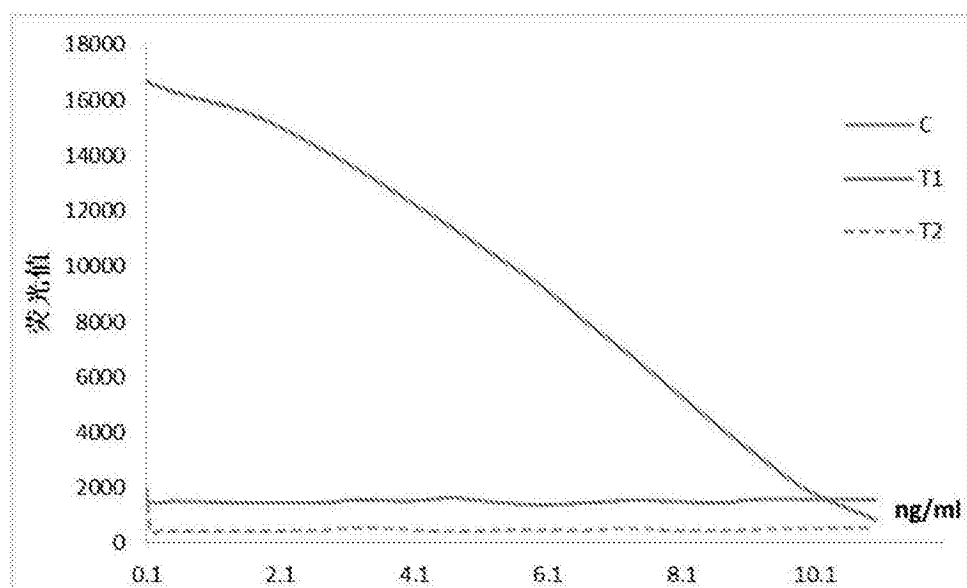


图3

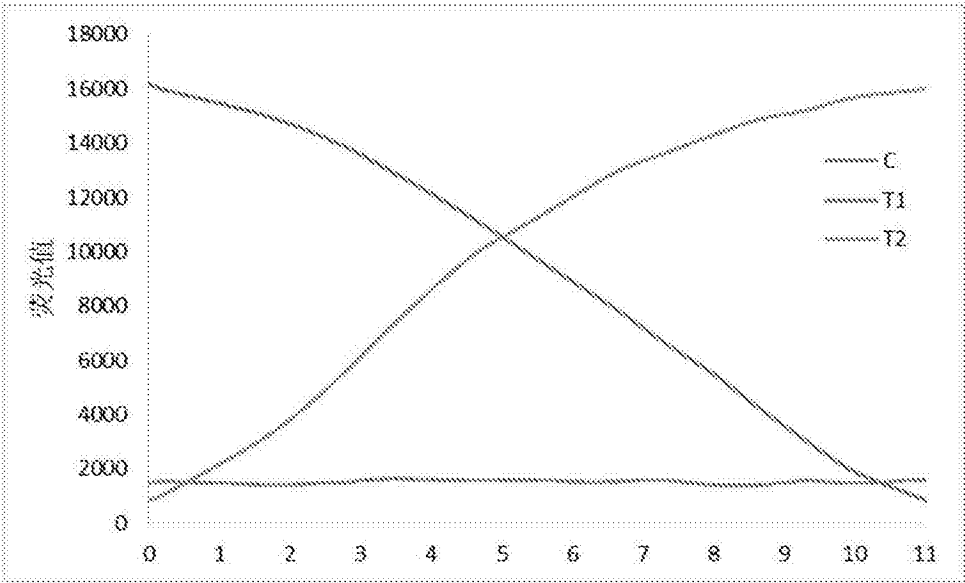


图4

专利名称(译)	一种检测心梗心衰的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN107290529A	公开(公告)日	2017-10-24
申请号	CN201710668871.4	申请日	2017-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
[标]发明人	汤永平 岳彦弢 李之华 张晓丽 潘秀华 叶向荣		
发明人	汤永平 岳彦弢 李之华 张晓丽 潘秀华 叶向荣		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/54313 G01N2800/2871		
代理人(译)	陈娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测心梗心衰的免疫层析试纸及其制备方法；旨在提供一种检测结果判读准确，交叉反应少的检测心梗心衰的免疫层析试纸，所述检测试纸包括底板，所述的底板上衔接有样品垫、结合垫、反应膜和吸收垫，所述的结合垫上喷有由300nm免疫荧光微球标记的CRP抗体与鸡IgY，以及由200nm免疫荧光微球标记的NT-proBNP抗体；所述的反应膜平行设有C质控线，T1检测线和T2检测线，所述的C线上包被有羊抗鸡IgY，T1检测线上包被有抗原CRP蛋白，T2检测线包被有抗NT-proBNP抗体。

