



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108318690 A

(43)申请公布日 2018.07.24

(21)申请号 201810206451.9

(22)申请日 2018.03.13

(71)申请人 深圳市第二人民医院

地址 518037 广东省深圳市福田区华富街  
道笋岗西路3002号

(72)发明人 谢妮 何盛南 张赛 徐鹏

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有  
限公司 44281

代理人 李小焦 彭家恩

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

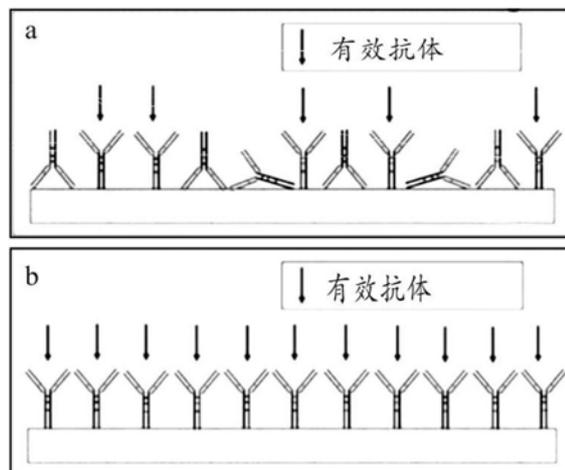
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用

(57)摘要

本申请公开了一种免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用。本申请的免疫荧光层析试纸，包括依序搭接在PVC底板上的样品垫、标记垫、层析条和吸水纸，其中，层析条以反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜为固相载体。本申请的免疫荧光层析试纸，采用反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜替换传统的硝酸纤维素膜，不仅提高了免疫荧光层析试纸的检测灵敏度，同时也能降低假阳性和假阴性等非特异性结合，而且，有效降低了背景信号干扰，提高了信噪比和分辨率，缩短了反应时间，还可较大的降低捕获抗体包被浓度，降低试剂成本，为心肌损伤标志物免疫荧光层析试纸检测技术提供了一种新的灵敏度高、重复性好的免疫荧光层析试纸。



1. 一种免疫荧光层析试纸,包括依序搭接在PVC底板上的样品垫、标记垫、层析条和吸水纸,其特征在于:所述层析条以反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜为固相载体。

2. 根据权利要求1所述的免疫荧光层析试纸,其特征在于:所述标记垫上喷涂有荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体、荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体、荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体,以及荧光微球标记的亲合素。

3. 根据权利要求2所述的免疫荧光层析试纸,其特征在于:所述标记垫上,荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;

荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;

荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;

荧光微球标记的亲合素的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为0.5%~5%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上。

4. 根据权利要求2或3所述的免疫荧光层析试纸,其特征在于:所述反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜上包被有三条检测线和一条质控线,三条检测线分别为cTnI检测线、CK-MB检测线和Myo检测线;

所述cTnI检测线包被有与所述荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体处于不同表位的另一种抗cTnI单克隆抗体,所述CK-MB检测线包被有与所述荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体处于不同表位的另一种抗CK-MB单克隆抗体,所述Myo检测线包被有与所述荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体处于不同表位的另一种抗Myo单克隆抗体;

所述质控线包被有特异性识别亲合素的兔抗亲合素抗体。

5. 根据权利要求4所述的免疫荧光层析试纸,其特征在于:所述cTnI检测线上,与所述荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体处于不同表位的另一种抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至cTnI检测线上;

所述CK-MB检测线上,与所述荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体处于不同表位的另一种抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至CK-MB检测线上;

所述Myo检测线上,与所述荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体处于不同表位的另一种抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至Myo检测线上;

所述质控线上,所述兔抗亲合素抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至质控线上。

6. 根据权利要求2-5任一项所述的免疫荧光层析试纸,其特征在于:所述荧光微球标记中所采用的荧光微球的粒径为100~500nm,所述荧光微球的激发波长为310~550nm,发射波长为340~620nm。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的免疫荧光层析试纸在制备检测心肌标志物的装置或试剂盒中的应用;

或者在制备急性心肌损伤性疾病临床检测试剂盒或装置中的应用,所述急性心肌损伤性疾病包括但不限于急性冠心病、急性心肌梗死或急性心肌炎。

8. 反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜在免疫荧光层析试纸中的应用。

9. 根据权利要求1-6任一项所述的免疫荧光层析试纸的制备方法,其特征在於:包括以下步骤,

荧光微球标记单克隆抗体或亲和素的制备:荧光微球于10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用10~100mM pH6.0~7.0的磷酸盐缓冲液调节浓度为0.1%~1%,并超声分散;加入终浓度为0.1~5mg/mL的碳二亚胺,混匀,再加入终浓度为0.1~5mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀;室温孵育20~40分钟后10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用10~100mM pH6.0~7.0的磷酸盐缓冲液溶解,将复溶后的荧光微球超声分散,按照0.1~1.0mg/mL荧光微球的比例分别加入抗cTnI单克隆抗体、抗CK-MB单克隆抗体、抗Myo单克隆抗体和亲和素中,混匀后室温旋转混合反应1.5~3小时,10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用含10~40mM乙醇胺和0.05%~1%酪蛋白的10~40mM pH 7.0~8.0的Tris-HCl复溶,超声分散后旋转混合反应0.5~1h;10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀用微球保存液复溶,2~8℃保存备用,即获得荧光微球标记的单克隆抗体或亲和素;

样品垫的预处理:将样品垫用封闭液浸泡后,置于湿度<20%、温度为40~50℃的烘箱,干燥12~24h,然后于2~30℃密封保存;

标记垫的制备:将荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体、荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体、荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体和荧光微球标记的亲和素分别用标记垫处理液喷涂在标记垫上,喷量为3~6μL/cm,喷涂完成后,将标记垫置于湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥12~24h,然后于2~30℃密封保存;

层析条的制备:将另一种抗cTnI单克隆抗体、另一种抗CK-MB单克隆抗体、另一种抗Myo单克隆抗体,以及兔抗亲和素抗体分别用包被缓冲液调节至浓度为0.1~0.5mg/mL,然后分别喷到反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜的三条检测线或一条质控线上,喷量均为0.1~0.2μL/mm,三条检测线和质控线分别间隔2~5mm、5~8mm、9~12mm,喷涂完成后,将反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜置于湿度<20%的40~50℃烘箱,干燥24~72h,然后于2~30℃密封保存;

将制备的样品垫、标记垫、层析条,以及吸水纸依序搭接黏贴在PVC底板上,并按照切割要求切割成3~4mm宽度的试纸条,即得所述免疫荧光层析试纸。

10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在於:所述样品垫的预处理中,封闭液含0.1~1%的Tris,0.1~1%的Tween20,0.1~1%的酪蛋白,0.1~2%的PEG,0.005~0.05%的鼠抗人红细胞单克隆抗体;

所述标记垫的制备中,标记垫处理液含0.2~2%的酪蛋白,5%~20%的蔗糖,0.1~1%的Tween-20,0.1~0.5%的PVP,0.02~0.05%的Proclin300,0.01~0.05M、pH7.4的PBS缓冲液。

## 一种免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及免疫荧光层析试纸检测领域,特别是涉及一种免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction,AMI)是临床最常见、最危重的心脏急症之一,也是导致患者住院和死亡的主要原因。心肌标志物作为心肌损伤的筛查、诊断、评定预后和随访治疗效果的标志,可用于包括急性冠心病、急性心肌梗死、急性心肌炎等急性心肌损伤性疾病临床检测。目前,用于分析检测心肌损伤标志物的技术有很多,如放射免疫分析(radioimmunoassay,RIA),酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)和化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay,CLIA)等分析方法。这些分析方法灵敏度高、重复性好,但存在样品前处理复杂、操作繁琐、耗时、成本高、需要大型仪器设备和专业人员支持等不足,并且还同时检测多个标志物,这些因素极大的限制了以上分析方法在床旁快速检测(point-of-care,POCT)的应用。

[0003] 免疫层析试纸条(Lateral Flow Immunoassay,LFIA)是二十世纪八十年代初发展起来的一种新型的快速免疫分析技术,与RIA、ELISA和CLIA等分析方法相比,具有操作简单、快速、成本低、无需大型仪器,也无需专业人员操作等优点,并且,可以实现采样现场即时检测,即实现床旁快速检测,被广泛应用于医学诊断和治疗监测、司法科学、环境监测和食品安全等领域中标志物的识别和检测。

[0004] 目前,急性心肌梗死检测的主要方法是,定量检测人血清、血浆和全血样本中的心肌肌钙蛋白I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白(Myo)三种心肌损伤生物标志物。而目前市面上用于即时检测心肌损伤标志物的市售产品屡见不鲜,其中也不乏可同时检测cTnI、CK-MB和Myo三种心肌损伤生物标志物的多靶标免疫荧光层析试纸。虽然这些多靶标快速分析试纸在一定程度上有助于临床上对AMI的早期诊断,但仍然存在两个方面的不足:一是灵敏度不足,抗原抗体等原料对免疫试剂的性能起着决定性的作用,合适的原料可以从根本上提升试剂的性能,因此原材料筛选是开发高灵敏免疫检测试剂的关键步骤;二是重复性不理想,检测结果的可重现性是临床工作者评估试剂性能最关注的指标之一,良好的重复性也为临床工作者评估和判断患者病情提供了进一步的依据。而现有的多靶标免疫荧光层析试纸无论是灵敏度还是重复性都难以满足临床使用需求。因此,缺乏高灵敏度、高精密性的心肌损伤标志物免疫荧光层析试纸检测技术是亟待解决的重大问题。

### 发明内容

[0005] 本申请的目的是提供一种新的免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用。

[0006] 为了实现上述目的,本申请采用了以下技术方案:

[0007] 本申请的一方面公开了一种免疫荧光层析试纸,包括依序搭接在PVC底板上的样品垫、标记垫、层析条和吸水纸,其中,层析条以反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜为

固相载体。

[0008] 需要说明的是,本申请创造性的采用反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜作为免疫荧光层析试纸的固相载体,采用反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜的优点是:

[0009] 1.反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜内部结构高度有序,抗体蛋白能够有序、定向排列固定至膜表面,构象均一,抗原结合部位活性位点充分暴露,增加抗原抗体的结合效率,有效提高试剂检测灵敏度,同时也能降低假阳性和假阴性等非特异性结合。

[0010] 2.反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜内部结构高度有序,孔径大小均一,保证荧光标记物在层析过程中能够均匀释放和流动,有效降低背景信号干扰,提高信噪比和分辨率。

[0011] 3.反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜内部结构高度有序,孔径大小均一,能够加快标记物的释放,提高标记物的层析速度,有效缩短反应时间。

[0012] 4.反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜作为固相载体,抗体在膜表面有序排列,避免堆积,增加有效活性抗体数量,可较大的降低捕获抗体包被浓度,从产业化角度来看,将极大地降低试剂成本。

[0013] 优选的,免疫荧光层析试纸中,标记垫上喷涂有荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体、荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体、荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体,以及荧光微球标记的亲素。

[0014] 优选的,标记垫上,荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的亲素的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为0.5%~5%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上。

[0015] 优选的,免疫荧光层析试纸中,反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜上包被有三条检测线和一条质控线,三条检测线分别为cTnI检测线、CK-MB检测线和Myo检测线;cTnI检测线包被有与荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体处于不同表位的另一种抗cTnI单克隆抗体,CK-MB检测线包被有与荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体处于不同表位的另一种抗CK-MB单克隆抗体,Myo检测线包被有与荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体处于不同表位的另一种抗Myo单克隆抗体;质控线包被有特异性识别亲素的兔抗亲素抗体。

[0016] 优选的,cTnI检测线上,与荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体处于不同表位的另一种抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至cTnI检测线上;CK-MB检测线上,与荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体处于不同表位的另一种抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至CK-MB检测线上;Myo检测线上,与荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体处于不同表位的另一种抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至Myo检测线上;质控线上,兔抗亲素抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至质控线上。

[0017] 优选的,荧光微球标记中所采用的荧光微球的粒径为100~500nm,荧光微球的激发波长为310~550nm,发射波长为340~620nm。

[0018] 需要说明的是,本申请在对急性心肌梗死多靶标检测免疫荧光层析试纸的研究过程中发现采用反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜替换传统的硝酸纤维素膜,能够有效的提高检测的特异性和灵敏度,并且能够降低背景信号干扰,提高信噪比和分辨率,缩短检测时间,提高检测效率,更重要的是能够提高检测重复性,能够满足临床使用需求。可以理解,产生以上效果的关键在于反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜的使用,并不仅限于急性心肌梗死多靶标检测免疫荧光层析试纸,只需要更换相应的包被抗体,即可实现其他靶标的检测,在此不做具体限定。

[0019] 本申请的另一方面公开了本申请的免疫荧光层析试纸在制备检测心肌标志物的装置或试剂盒中的应用;或者在制备急性心肌损伤性疾病临床检测试剂盒或装置中的应用,其中,急性心肌损伤性疾病包括但不限于急性冠心病、急性心肌梗死或急性心肌炎。

[0020] 本申请的免疫荧光层析试纸能够快速、简便、高效、灵敏、特异的对心肌标志物进行检测,心肌标志物作为心肌损伤的筛查、诊断、评定预后和随访治疗效果的标志,可用于包括急性冠心病、急性心肌梗死、急性心肌炎等急性心肌损伤性疾病临床检测。因此,本申请的免疫荧光层析试纸可以制成各种形式的急性冠心病、急性心肌梗死或急性心肌炎的检测装置或试剂盒。

[0021] 本申请的再一方面公开了反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜在免疫荧光层析试纸中的应用。

[0022] 可以理解,本申请的免疫荧光层析试纸由于采用了反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜作为层析条的固相载体,提高了免疫荧光层析试纸的检测效率和质量,因此,反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜可以适用于各种靶标的免疫荧光层析试纸,不限于本申请的心肌标志物多靶标免疫荧光层析试纸。

[0023] 本申请的再一方面公开了本申请的免疫荧光层析试纸的制备方法,包括以下步骤,

[0024] 荧光微球标记单克隆抗体或亲和素的制备:荧光微球于10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用10~100mM pH6.0~7.0的磷酸盐缓冲液调节浓度为0.1%~1%,并超声分散;加入终浓度为0.1~5mg/mL的碳二亚胺,混匀,再加入终浓度为0.1~5mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺,混匀;室温孵育20~40分钟后10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用10~100mM pH6.0~7.0的磷酸盐缓冲液溶解,将复溶后的荧光微球超声分散,按照0.1~1.0mg/mL荧光微球的比例分别加入抗cTnI单克隆抗体、抗CK-MB单克隆抗体、抗Myo单克隆抗体和亲和素中,混匀后室温旋转混合反应1.5~3小时,10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用含10~40mM乙醇胺和0.05%~1%酪蛋白的10~40mM pH 7.0~8.0的Tris-HCl复溶,超声分散后旋转混合反应0.5~1h;10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀用微球保存液复溶,2~8℃保存备用,即获得荧光微球标记的单克隆抗体或亲和素;

[0025] 样品垫的预处理:将样品垫用封闭液浸泡后,置于湿度<20%、温度为40~50℃的烘箱,干燥12~24h,然后于2~30℃密封保存;

[0026] 标记垫的制备:将荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体、荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体、荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体和荧光微球标记的亲和素分别用标记垫处理液喷涂在标记垫上,喷量为3~6μL/cm,喷涂完成后,将标记垫置于湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥12~24h,然后于2~30℃密封保存;

[0027] 层析条的制备:将另一种抗cTnI单克隆抗体、另一种抗CK-MB单克隆抗体、另一种抗Myo单克隆抗体,以及兔抗亲和素抗体分别用包被缓冲液调节至浓度为0.1~0.5mg/mL,然后分别喷到反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜的三条检测线或一条质控线上,喷量均为0.1~0.2 $\mu$ L/mm,三条检测线和质控线分别间隔2~5mm、5~8mm、9~12mm,喷涂完成后,将反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜置于湿度<20%的40~50 $^{\circ}$ C烘箱,干燥24~72h,然后于2~30 $^{\circ}$ C密封保存;

[0028] 将制备的样品垫、标记垫、层析条,以及吸水纸依序搭接黏贴在PVC底板上,并按照切割要求切割成3~4mm宽度的试纸条,即得所述免疫荧光层析试纸。

[0029] 优选的,样品垫的预处理中,封闭液含0.1~1%的Tris,0.1~1%的Tween20,0.1~1%的酪蛋白,0.1~2%的PEG,0.005~0.05%的鼠抗人红细胞单克隆抗体;标记垫的制备中,标记垫处理液含0.2~2%的酪蛋白,5%~20%的蔗糖,0.1~1%的Tween-20,0.1~0.5%的PVP,0.02~0.05%的Proclin300,0.01~0.05M、pH7.4的PBS缓冲液。

[0030] 由于采用以上技术方案,本申请的有益效果在于:

[0031] 本申请的免疫荧光层析试纸,采用反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜替换传统的硝酸纤维素膜,不仅提高了免疫荧光层析试纸的检测灵敏度,同时也能降低假阳性和假阴性等非特异性结合,而且,有效降低了背景信号干扰,提高了信噪比和分辨率,缩短了反应时间,还可较大的降低捕获抗体包被浓度,降低试剂成本,为心肌损伤标志物免疫荧光层析试纸检测技术提供了一种新的灵敏度高、重复性好的免疫荧光层析试纸。

## 附图说明

[0032] 图1是本申请实施例中免疫荧光层析试纸的结构示意图;

[0033] 图2是采用不同的固相载体,其有效抗体的分析示意图,图中a图为传统的商品化的硝酸纤维素膜的有效抗体量,b图为本申请反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜的有效抗体量;

[0034] 图3是本申请实施例中218例样品cTnI检测的统计分析结果;

[0035] 图4是本申请实施例中182例样品CK-MB检测的统计分析结果;

[0036] 图5是本申请实施例中183例样品Myo检测的统计分析结果。

## 具体实施方式

[0037] 随着精准医疗、个性化医疗的迅速发展,检测试剂的精密性和准确度越来越被重视和关注,传统技术面临着前所未有的考验和挑战。现有市售免疫荧光试纸产品均采用商品化硝酸纤维素膜作为抗体或抗原的固相载体,硝酸纤维素膜也是抗原抗体免疫复合物的形成和信号的产生地。本申请研究发现,传统商品化的硝酸纤维素膜材孔径大小不均一,内部结构杂乱无序,导致标记物释放不均匀,背景信号提高,信噪比降低;另外,捕获抗体通过疏水作用或静电吸附等物理方式固定在硝酸纤维素膜表面,固相抗体构象不一致,甚至出现抗体堆叠的现象,不利于抗体的舒展和活性位点的暴露,如图2的a图所示。因此,以传统硝酸纤维素膜作为固相载体的市售免疫荧光层析试纸产品存在检测灵敏度低、精密性差、批间差大等缺点。

[0038] 通过人工合成技术将单分散胶体纳米粒子组装成有序的硝酸纤维素胶体晶体结

构薄膜,即反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜,其内部结构高度有序,将其替代传统硝酸纤维素膜运用于免疫层析技术,一方面可以提供较大的孔径以使蛋白通过,另一方面高度有序的内部结构可以使固相抗体发生定向排列,暴露更多的活性位点,定向有序排列也增加了有效活性抗体的数量,且保证标记物的均匀释放,从而提高分辨率和灵敏度,如图2的b图所示;同时,光子晶体薄膜高度有序的内部结构能够使免疫复合物释放均一。相比于市售免疫荧光层析试纸,本申请的基于有序微纳结构的高灵敏、多靶标免疫荧光层析试纸,无论是在检测灵敏度,还是结果精密密度方面均有较大的提升,同时能够在5-10min内快速、定量检测人血清、血浆和全血样本中心肌肌钙蛋白I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白(Myo)三种心肌损伤生物标志物的浓度,有效弥补了传统荧光微球免疫层析技术在诊断心肌损伤生物标志物上缺乏灵敏度的不足,有助于临床上对AMI的诊断和病情进展的分析,对临床急性心肌损伤性疾病早期预警、筛查、诊断、评定预后具有十分重要的现实意义。本申请的免疫荧光层析试纸能够满足心梗、心衰类疾病生物标记物的检测技术需要具备快速准确、高灵敏度、联合检测的特点。

[0039] 下面通过具体实施例和附图对本申请作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明,不应理解为对本申请的限制。

#### [0040] 实施例

[0041] 本例的免疫荧光层析试纸,如图1所示,包括依序搭接在PVC底板9上的样品垫1、标记垫2、层析条3和吸水纸4,其中,层析条以反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜为固相载体。具体的,本例制备了急性心肌梗死检测的多靶标免疫荧光层析试纸,标记垫上喷涂有荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体、荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体、荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体,以及荧光微球标记的亲合素。其中,标记垫上,荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的亲合素的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为0.5%~5%稀释后,喷量为3~6 $\mu$ L/cm喷涂至标记垫上。免疫荧光层析试纸中,反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜上包被有三条检测线和一条质控线5,三条检测线分别为cTnI检测线6、CK-MB检测线7和Myo检测线8;cTnI检测线包被有与荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体处于不同表位的另一种抗cTnI单克隆抗体,CK-MB检测线包被有与荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体处于不同表位的另一种抗CK-MB单克隆抗体,Myo检测线包被有与荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体处于不同表位的另一种抗Myo单克隆抗体;质控线包被有特异性识别亲合素的兔抗亲合素抗体。cTnI检测线上,与荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体处于不同表位的另一种抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至cTnI检测线上;CK-MB检测线上,与荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体处于不同表位的另一种抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至CK-MB检测线上;Myo检测线上,与荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体处于不同表位的另一种抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至Myo检测线上;质控线上,兔抗亲合素抗体的浓度为0.1~0.5mg/mL,喷量为0.1~0.2 $\mu$ L/mm喷涂至质控线上。本例的荧光微球标记

中所采用的荧光微球的粒径为100~500nm,荧光微球的激发波长为310~550nm,发射波长为340~620nm。

[0042] 本例检测急性心肌梗死的多靶标免疫荧光层析试纸,具体制备方法如下:

[0043] (1) 荧光微球

[0044] 本例采用购买自Bangs Lab、Merck或Thermo Fisher的粒径为100~500nm,激发波长为310~550nm,发射波长为340~620nm的荧光微球。

[0045] (2) 荧光微球标记单克隆抗体或亲和素的制备

[0046] 取一定量的荧光微球,10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用10~100mM pH 6.0~7.0磷酸盐缓冲液调节浓度为0.1%~1%,并超声分散;加入终浓度为0.1~5mg/mL的碳二亚胺(EDC),混匀,再加入终浓度为0.1~5mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),混匀;室温孵育20~40分钟后10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用10~100mM pH6.0~7.0磷酸盐缓冲液溶解。将复溶后的荧光微球超声分散,按照0.1~1.0mg/mL荧光微球的比例分别加入抗cTnI、抗CK-MB、抗Myo单克隆抗体和亲和素,混匀后室温旋转混合反应1.5~3小时,10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀物用含10~40mM乙醇胺和0.05%~1%酪蛋白的Tris-HCl(10~40mM,pH 7.0-8.0)复溶,超声分散后旋转混合反应0.5~1h;10000~15000rpm离心5~15分钟,沉淀用微球保存液复溶,2~8℃保存备用。

[0047] (3) 样品垫的预处理

[0048] 将样品垫用封闭液浸泡5分钟后,置于湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥12~24h后于2~30℃密封保存。封闭液含0.1~1%的Tris,0.1~1%的Tween20,0.1~1%的酪蛋白,0.1~2%的PEG,0.005~0.05%的鼠抗人红细胞单克隆抗体。

[0049] (4) 标记垫的制备

[0050] 将荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体、抗CK-MB单克隆抗体、抗Myo单克隆抗体和荧光微球标记的亲和素分别用标记垫处理液喷涂在标记垫上,喷量为3~6μL/cm;具体的,荧光微球标记的抗cTnI单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6μL/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的抗CK-MB单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6μL/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的抗Myo单克隆抗体的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6μL/cm喷涂至标记垫上;荧光微球标记的亲和素的浓度为0.1~1.0mg/mL,按照稀释比例为0.5%~5%稀释后,喷量为3~6μL/cm喷涂至标记垫上。

[0051] 其中,标记垫处理液中含有0.2~2%的酪蛋白,5%~20%的蔗糖,0.1~1%的Tween-20,0.1~0.5%的PVP,0.02~0.05%的Proclin300,0.01~0.05M、pH 7.4的PBS缓冲液。

[0052] 将制备好的标记垫置于湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥12~24h后于2~30℃密封保存。

[0053] (5) 层析条的制备

[0054] 将另一株抗cTnI、抗CK-MB、抗Myo单克隆抗体和兔抗亲和素用包被缓冲液调节浓度为0.1~0.5mg/mL,分别喷到层析条3的cTnI检测线6、CK-MB检测线7和Myo检测线8上形成检测线,将兔抗亲和素抗体喷到层析条3上的质控线5上,另一株抗cTnI、抗CK-MB、抗Myo单克隆抗体和兔抗亲和素抗体的包被液量均为0.1~0.2μL/mm,三条检测线和质控线分别间

隔2~5mm、5~8mm、9~12mm；将制备好的包被膜置于湿度<20%的40~50℃的烘箱，干燥24~72h后于2~30℃密封保存备用。

[0055] (6) 在底板上顺次相互搭接地黏贴样品垫、标记垫、有序微纳结构包被膜和吸水纸得到试纸板，按照切割要求切割成3~4mm宽度的试纸条。

[0056] 采用本例的免疫荧光层析试纸，分别对218例cTnI样本，182例CK-MB样本和183例Myo样本进行检测，检测样品中心肌钙蛋白I (cTnI)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 和肌红蛋白 (Myo) 三种心肌损伤生物标志物的含量。具体检测方法包括：

[0057] 1、将试剂和待检样本恢复至室温；

[0058] 2、按深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司出品的UNICELL-S免疫荧光分析仪使用说明书开启分析仪；

[0059] 3、按试剂说明书进行操作：去除试剂外包装，用滴管垂直加入3滴，约100μL，的待测样本至样品垫对应的检测卡加样孔内，孵育15分钟。

[0060] 4、孵育完成后，分析仪对检测卡进行检测，并报告相应的浓度结果，以“ng/mL”表示。

[0061] 同时，采用贝克曼-Access AccuTNI化学发光法对相同的样本进行cTnI、CK-MB和Myo检测，作为对比。

[0062] 结果如表1至表3，以及图3至图5所示。表1和图3为218例样品cTnI检测的统计分析结果，表2和图4为182例样品CK-MB检测的统计分析结果，表3和图5为183例样品Myo检测的统计分析结果。表1至表3中，对比试验为贝克曼-Access AccuTNI的测试结果，本试验为采用本例的免疫荧光层析试纸的测试结果。图3至图5中，横坐标为贝克曼-Access AccuTNI的测试结果，纵坐标为采用本例的免疫荧光层析试纸的测试结果。

[0063] 表1 cTnI临床样本比对结果

[0064]

样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)	样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)	样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)
001	0.007	0.01	074	0.351	0.65	147	4.726	5.99
002	0.036	0.05	075	1.215	1.42	148	0.063	0.05
003	0.050	0.02	076	1.676	1.27	149	0.140	0.06
004	0.187	0.24	077	2.705	2.48	150	0.042	0.02
005	0.504	0.89	078	0.097	0.04	151	2.892	3.16
006	0.110	0.07	079	2.884	3.51	152	0.049	0.25
007	0.322	0.2	080	22.509	22.76	153	0.518	0.35
008	1.084	1.39	081	0.002	0.02	154	1.539	1.15
009	0.149	0.06	082	0.009	0.03	155	0.087	0.02
010	0.727	1.58	083	0.152	0.12	156	0.157	0.14
011	0.066	0.00	084	0.283	0.16	157	0.339	0.24
012	0.084	0.01	085	0.269	0.22	158	17.020	15.64
013	0.015	0.02	086	0.268	0.16	159	0.319	0.37
014	5.735	5.54	087	28.763	25.87	160	0.403	0.23
015	1.285	1.68	088	0.053	0.1	161	0.099	0.05
016	13.776	16.52	089	3.646	2.95	162	0.070	0.01
017	0.631	0.95	090	0.150	0.19	163	0.889	0.99
018	2.875	2.26	091	0.052	0.05	164	0.336	0.28

[0065]

019	3.215	2.79	092	0.280	0.14	165	0.156	0.20
020	1.880	2.95	093	0.721	0.80	166	0.160	0.15
021	15.358	15.83	094	0.071	0.01	167	0.053	0.03
022	1.292	0.96	095	3.277	2.64	168	0.026	0.2
023	0.047	0.01	096	0.033	0.04	169	0.160	0.19
024	0.057	0.05	097	0.345	0.46	170	0.567	0.66
025	0.156	0.21	098	0.486	0.40	171	0.130	0.04
026	0.045	0.03	099	0.209	0.18	172	0.014	0.00
027	1.159	0.63	100	0.957	0.73	173	0.293	0.33
028	1.356	2.79	101	1.015	2.16	174	6.710	5.75
029	0.124	0.03	102	5.903	6.66	175	0.168	0.18
030	0.375	0.24	103	0.155	0.15	176	1.661	1.26
031	0.088	0.04	104	1.570	1.18	177	1.391	1.69
032	0.072	0.02	105	0.177	0.06	178	2.177	3.28
033	0.092	0.03	106	0.039	0.04	179	2.539	1.88
034	5.245	3.29	107	0.123	0.15	180	0.156	0.35
035	1.781	1.7	108	2.509	1.97	181	0.017	0.09
036	20.358	18.95	109	1.416	1.76	182	0.071	0
037	5.705	4.82	110	0.419	0.34	183	0.049	0.01
038	0.407	0.27	111	0.853	0.95	184	0.172	0.18
039	0.096	0.02	112	0.054	0.02	185	0.283	0.22
040	0.081	0.04	113	1.339	2.57	186	0.008	0.06
041	0.146	0.08	114	0.541	0.97	187	5.304	4.46
042	0.016	0.06	115	0.019	0.04	188	3.231	6.66
043	0.008	0.02	116	1.923	1.15	189	0.450	0.50
044	24.542	25.30	117	0.177	0.18	190	2.507	1.97
045	10.056	15.32	118	0.035	0.05	191	2.594	2.97
046	1.548	1.16	119	0.127	0.07	192	0.053	0.29
047	1.423	1.72	120	0.254	0.23	193	2.057	2.07
048	0.204	0.16	121	0.095	0.04	194	0.156	0.09
049	0.048	0.02	122	0.141	0.05	195	0.008	0.02
050	0.036	0.04	123	0.113	0.06	196	0.610	0.93
051	0.067	0	124	0.113	0.15	197	0.248	0.19
052	2.190	2.90	125	0.074	0.01	198	0.079	0.02
053	4.468	3.69	126	6.453	5.39	199	0.601	0.85
054	0.127	0.08	127	6.516	10.41	200	0.440	0.50
055	7.956	8.21	128	0.366	0.33	201	2.812	2.97
056	1.665	1.33	129	0.031	0.02	202	0.056	0.02
057	0.018	0.03	130	3.234	2.89	203	1.171	1.71
058	0.048	0.05	131	3.442	2.79	204	0.082	0.02
059	0.034	0.01	132	0.389	0.41	205	25.565	25.84
060	0.052	0.01	133	3.422	3.16	206	12.764	12.50
061	0.186	0.25	134	6.515	4.05	207	22.329	22.31
062	0.167	0.1	135	0.273	0.25	208	33.431	31.08
063	0.001	0.03	136	0.009	0.02	209	37.695	37.30
064	0.035	0.00	137	0.179	0.1	210	22.169	22.28
065	0.274	0.23	138	0.064	0.36	211	32.654	27.90
066	0.173	0.12	139	0.009	0.02	212	38.683	32.43
067	0.366	0.38	140	3.696	3.01	213	11.726	10.64
068	5.310	6.85	141	1.220	1.55	214	17.097	15.87
069	1.018	2.15	142	1.226	1.36	215	27.691	29.86
070	1.183	0.98	143	1.712	2.14	216	26.160	30.98

[0066]

<b>071</b>	3.146	4.43	<b>144</b>	0.399	0.40	<b>217</b>	16.341	18.92
<b>072</b>	0.164	0.17	<b>145</b>	0.094	0.03	<b>218</b>	43.231	39.38
<b>073</b>	0.012	0.02	<b>146</b>	6.161	6.55			

[0067]

表2 CK-MB临床样本比对结果

[0068]

样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)	样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)	样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)
<b>001</b>	8.863	7.58	<b>062</b>	8.363	7.84	<b>123</b>	37.830	38.41
<b>002</b>	3.031	2.77	<b>063</b>	2.732	2.42	<b>124</b>	4.163	4.22
<b>003</b>	3.252	3.36	<b>064</b>	34.634	37.98	<b>125</b>	26.293	22.53
<b>004</b>	5.411	5.51	<b>065</b>	9.193	9.12	<b>126</b>	1.407	1.49
<b>005</b>	14.091	12.39	<b>066</b>	8.381	8.29	<b>127</b>	8.495	7.41
<b>006</b>	5.243	4.59	<b>067</b>	19.017	19.39	<b>128</b>	2.846	3.06
<b>007</b>	70.953	76.89	<b>068</b>	7.444	7.88	<b>129</b>	2.829	2.60
<b>008</b>	5.819	5.16	<b>069</b>	12.496	12.97	<b>130</b>	3.925	4.15
<b>009</b>	12.008	12.19	<b>070</b>	2.883	2.95	<b>131</b>	10.616	10.07
<b>010</b>	6.619	7.29	<b>071</b>	2.288	2.30	<b>132</b>	10.776	10.36
<b>011</b>	10.102	9.86	<b>072</b>	1.965	2.14	<b>133</b>	9.311	9.27
<b>012</b>	7.044	6.55	<b>073</b>	6.611	5.89	<b>134</b>	12.012	10.95
<b>013</b>	4.572	5.05	<b>074</b>	2.492	2.51	<b>135</b>	5.989	6.37
<b>014</b>	80.370	73.36	<b>075</b>	4.963	5.66	<b>136</b>	23.228	22.07
<b>015</b>	6.610	6.92	<b>076</b>	5.960	5.22	<b>137</b>	6.257	5.85
<b>016</b>	9.177	9.45	<b>077</b>	31.547	34.88	<b>138</b>	5.308	4.72
<b>017</b>	3.067	3.20	<b>078</b>	7.426	7.29	<b>139</b>	37.891	38.24
<b>018</b>	3.863	3.82	<b>079</b>	12.959	14.88	<b>140</b>	6.770	7.41
<b>019</b>	37.551	33.40	<b>080</b>	15.293	16.78	<b>141</b>	6.229	6.69
<b>020</b>	4.032	4.03	<b>081</b>	20.504	21.79	<b>142</b>	1.343	1.42
<b>021</b>	14.372	13.07	<b>082</b>	1.555	1.67	<b>143</b>	42.020	48.17
<b>022</b>	18.704	16.79	<b>083</b>	15.278	14.36	<b>144</b>	4.105	3.61
<b>023</b>	5.333	5.67	<b>084</b>	1.651	1.86	<b>145</b>	10.330	10.48
<b>024</b>	72.491	72.10	<b>085</b>	14.503	15.71	<b>146</b>	7.290	6.45
<b>025</b>	1.965	1.85	<b>086</b>	3.355	3.00	<b>147</b>	5.809	6.04
<b>026</b>	6.942	7.15	<b>087</b>	60.722	57.77	<b>148</b>	5.394	4.61
<b>027</b>	8.496	7.43	<b>088</b>	21.337	24.19	<b>149</b>	7.399	6.90
<b>028</b>	4.390	3.84	<b>089</b>	63.389	72.30	<b>150</b>	6.298	6.51
<b>029</b>	10.525	9.46	<b>090</b>	12.215	11.49	<b>151</b>	7.565	8.21
<b>030</b>	5.236	4.61	<b>091</b>	5.245	5.86	<b>152</b>	2.767	2.52
<b>031</b>	58.930	56.97	<b>092</b>	3.635	3.79	<b>153</b>	6.693	7.55
<b>032</b>	9.507	10.93	<b>093</b>	9.163	8.07	<b>154</b>	35.941	40.69
<b>033</b>	2.372	2.15	<b>094</b>	5.667	5.03	<b>155</b>	4.974	5.38
<b>034</b>	68.179	65.80	<b>095</b>	16.732	15.01	<b>156</b>	4.670	5.09
<b>035</b>	18.142	18.37	<b>096</b>	26.177	27.47	<b>157</b>	9.724	10.29
<b>036</b>	1.242	1.41	<b>097</b>	7.491	7.36	<b>158</b>	4.180	4.57
<b>037</b>	20.775	20.95	<b>098</b>	38.259	40.43	<b>159</b>	2.986	3.21
<b>038</b>	11.087	11.93	<b>099</b>	32.940	29.77	<b>160</b>	5.303	5.10
<b>039</b>	2.980	3.39	<b>100</b>	2.872	2.91	<b>161</b>	2.366	2.36
<b>040</b>	4.685	4.99	<b>101</b>	5.523	4.95	<b>162</b>	12.349	11.85
<b>041</b>	9.598	9.88	<b>102</b>	4.846	4.48	<b>163</b>	6.004	5.69
<b>042</b>	8.182	9.20	<b>103</b>	10.071	9.37	<b>164</b>	25.004	27.38
<b>043</b>	7.940	9.10	<b>104</b>	10.502	11.24	<b>165</b>	3.216	3.31

[0069]

<b>044</b>	29.061	25.69	<b>105</b>	1.614	1.42	<b>166</b>	14.013	15.23
<b>045</b>	3.554	3.72	<b>106</b>	8.116	7.44	<b>167</b>	5.002	5.03
<b>046</b>	31.588	27.35	<b>107</b>	17.141	15.41	<b>168</b>	4.790	5.19
<b>047</b>	14.956	16.53	<b>108</b>	13.295	12.56	<b>169</b>	5.795	6.00
<b>048</b>	8.857	8.06	<b>109</b>	7.458	8.27	<b>170</b>	4.359	4.99
<b>049</b>	50.831	48.58	<b>110</b>	12.530	12.80	<b>171</b>	12.519	10.79
<b>050</b>	3.681	3.82	<b>111</b>	11.003	10.73	<b>172</b>	2.707	2.50
<b>051</b>	8.785	8.20	<b>112</b>	9.182	9.31	<b>173</b>	2.547	2.50
<b>052</b>	19.034	20.77	<b>113</b>	17.176	17.24	<b>174</b>	5.540	5.19
<b>053</b>	6.979	7.01	<b>114</b>	3.094	3.05	<b>175</b>	46.299	43.03
<b>054</b>	10.499	9.61	<b>115</b>	5.791	6.45	<b>176</b>	1.266	1.21
<b>055</b>	6.688	6.87	<b>116</b>	16.531	14.10	<b>177</b>	5.660	5.01
<b>056</b>	3.192	3.47	<b>117</b>	27.466	30.43	<b>178</b>	1.885	2.14
<b>057</b>	5.533	5.79	<b>118</b>	13.651	15.12	<b>179</b>	3.257	3.60
<b>058</b>	9.072	9.01	<b>119</b>	3.907	3.85	<b>180</b>	8.058	8.22
<b>059</b>	14.152	15.22	<b>120</b>	10.438	10.10	<b>181</b>	10.451	9.28
<b>060</b>	7.104	6.90	<b>121</b>	5.905	6.37	<b>182</b>	5.632	5.99
<b>061</b>	9.427	8.94	<b>122</b>	3.209	3.32			

[0070] 表3 Myo临床样本比对结果

[0071]

样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)	样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)	样本编号	对比试验 (ng/mL)	本试验 (ng/mL)
<b>001</b>	110.174	131.91	<b>062</b>	25.846	29.96	<b>123</b>	233.422	246.86
<b>002</b>	82.717	89.08	<b>063</b>	64.647	59.74	<b>124</b>	11.257	12.32
<b>003</b>	53.853	53.50	<b>064</b>	76.758	65.78	<b>125</b>	114.423	92.31
<b>004</b>	137.776	122.53	<b>065</b>	60.550	56.11	<b>126</b>	30.745	31.49
<b>005</b>	58.508	47.14	<b>066</b>	75.927	79.80	<b>127</b>	21.062	19.90
<b>006</b>	41.763	42.01	<b>067</b>	28.510	27.94	<b>128</b>	43.482	34.92
<b>007</b>	40.063	41.88	<b>068</b>	17.398	20.52	<b>129</b>	390.079	349.53
<b>008</b>	50.846	42.82	<b>069</b>	47.716	53.57	<b>130</b>	98.800	113.49
<b>009</b>	220.072	195.24	<b>070</b>	104.233	105.64	<b>131</b>	226.248	212.84
<b>010</b>	41.905	40.01	<b>071</b>	13.566	14.77	<b>132</b>	124.054	106.04
<b>011</b>	141.926	169.69	<b>072</b>	48.212	46.26	<b>133</b>	101.503	119.24
<b>012</b>	13.032	12.50	<b>073</b>	183.143	196.99	<b>134</b>	101.664	82.93
<b>013</b>	35.368	37.20	<b>074</b>	282.318	227.93	<b>135</b>	10.714	9.47
<b>014</b>	113.755	132.38	<b>075</b>	94.928	98.80	<b>136</b>	122.560	103.74
<b>015</b>	163.775	138.86	<b>076</b>	45.071	51.60	<b>137</b>	52.360	48.41
<b>016</b>	12.167	14.54	<b>077</b>	46.254	53.90	<b>138</b>	42.646	40.57
<b>017</b>	211.700	248.14	<b>078</b>	66.933	78.89	<b>139</b>	232.787	195.27
<b>018</b>	21.231	19.23	<b>079</b>	16.674	17.69	<b>140</b>	27.583	26.07
<b>019</b>	109.712	90.68	<b>080</b>	47.651	44.42	<b>141</b>	14.999	12.63
<b>020</b>	113.068	111.70	<b>081</b>	14.086	15.93	<b>142</b>	175.131	183.08
<b>021</b>	39.166	42.28	<b>082</b>	16.080	13.74	<b>143</b>	86.793	88.44
<b>022</b>	68.493	81.49	<b>083</b>	116.536	133.63	<b>144</b>	87.109	92.46
<b>023</b>	42.052	48.47	<b>084</b>	15.176	15.66	<b>145</b>	78.865	76.12
<b>024</b>	262.910	275.73	<b>085</b>	47.682	42.84	<b>146</b>	14.176	14.49
<b>025</b>	31.214	30.61	<b>086</b>	90.255	75.12	<b>147</b>	129.407	110.81
<b>026</b>	20.893	19.55	<b>087</b>	114.550	91.65	<b>148</b>	304.216	309.69
<b>027</b>	78.807	81.74	<b>088</b>	11.112	9.65	<b>149</b>	299.532	293.02
<b>028</b>	201.240	225.50	<b>089</b>	141.407	143.90	<b>150</b>	121.099	136.71
<b>029</b>	270.786	322.54	<b>090</b>	24.119	23.01	<b>151</b>	121.665	97.52

[0072]

030	29.495	25.56	091	261.180	218.13	152	13.194	15.68
031	149.322	131.96	092	60.992	59.12	153	330.902	366.15
032	47.855	51.53	093	211.542	173.06	154	50.678	43.57
033	20.941	17.54	094	220.006	229.46	155	25.987	28.82
034	89.228	95.80	095	68.915	67.10	156	95.629	82.29
035	11.924	13.73	096	110.429	117.46	157	63.916	59.63
036	19.671	22.05	097	69.482	76.74	158	134.911	158.92
037	90.687	84.05	098	61.581	56.51	159	30.039	30.65
038	42.857	46.18	099	54.709	54.60	160	194.077	210.66
039	52.133	44.80	100	299.904	261.76	161	400.265	374.91
040	60.886	60.37	101	154.155	155.09	162	162.083	185.31
041	49.270	57.61	102	109.004	95.43	163	66.925	73.31
042	50.512	50.25	103	139.042	138.49	164	49.707	55.49
043	108.201	89.90	104	10.255	9.58	165	146.779	154.10
044	77.058	86.69	105	257.186	275.08	166	18.546	20.95
045	40.148	40.99	106	63.591	72.65	167	71.795	85.74
046	88.777	101.21	107	153.886	173.87	168	235.217	252.79
047	15.154	17.15	108	13.531	12.80	169	15.681	17.55
048	73.133	76.92	109	14.540	15.22	170	48.004	42.93
049	42.316	50.30	110	23.160	19.14	171	20.685	21.22
050	122.362	102.92	111	43.281	45.14	172	99.076	84.19
051	86.347	74.00	112	22.689	23.60	173	59.297	62.19
052	17.366	18.58	113	44.195	37.75	174	155.947	172.72
053	37.012	38.80	114	80.401	90.46	175	41.448	45.73
054	51.658	52.18	115	27.948	27.07	176	56.824	61.32
055	184.000	185.99	116	75.087	60.50	177	255.532	255.00
056	66.525	73.45	117	84.107	82.37	178	44.107	48.31
057	136.122	162.92	118	21.031	24.46	179	109.226	125.14
058	113.380	127.11	119	131.348	107.67	180	10.916	8.96
059	52.281	46.79	120	53.718	54.43	181	99.126	94.80
060	135.800	144.05	121	84.482	70.03	182	18.039	15.50
061	122.336	139.38	122	13.385	14.42	183	117.167	125.35

[0073] 表1和图3的结果显示,采用本例的免疫荧光层析试纸,即心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白三合一测定试剂盒,对218例cTnI样本进行测试,结果与贝克曼库尔特Access AccuTNI(化学发光法)进行方法学比对,经统计,本申请制备的心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白三合一测定试剂盒(免疫荧光层析法)与贝克曼库尔特贝克曼库尔特Access AccuTNI(化学发光法)具有较高的临床一致性,斜率 $K=0.9626$ ,和较好的临床相关性 $r \geq 0.99$ 。

[0074] 表2和图4的结果显示,使用本申请制备的心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白三合一测定试剂盒(免疫荧光层析法)对182例CK-MB样本进行测试,结果与贝克曼库尔特Access CK-MB(化学发光法)进行方法学比对,经统计,本申请制备的心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白三合一测定试剂盒(免疫荧光层析法)与贝克曼库尔特贝克曼库尔特Access CK-MB(化学发光法)具有较高的临床一致性,斜率 $K=0.9998$ ,和较好的临床相关性 $r \geq 0.99$ 。

[0075] 表3和图5的结果显示,使用本申请制备的心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白三合一测定试剂盒(免疫荧光层析法)对183例Myo样本进行测试,结果与贝克曼库尔特

Access Myoglobin(化学发光法)进行方法学比对,经统计,本申请制备的心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白三合一测定试剂盒(免疫荧光层析法)与贝克曼库尔特贝克曼库尔特Access Myoglobin(化学发光法)具有较高的临床一致性,斜率 $K=0.981$ ,和较好的临床相关性 $r \geq 0.98$ 。

[0076] 以上测试结果说明,本申请的免疫荧光层析试纸能够稳定,且灵敏的对心肌肌钙蛋白I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白(Myo)进行检测;为临床评估和判断患者病情提供了一种新的灵敏度高、重复性好的检测工具和途径。

[0077] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本申请的保护范围。

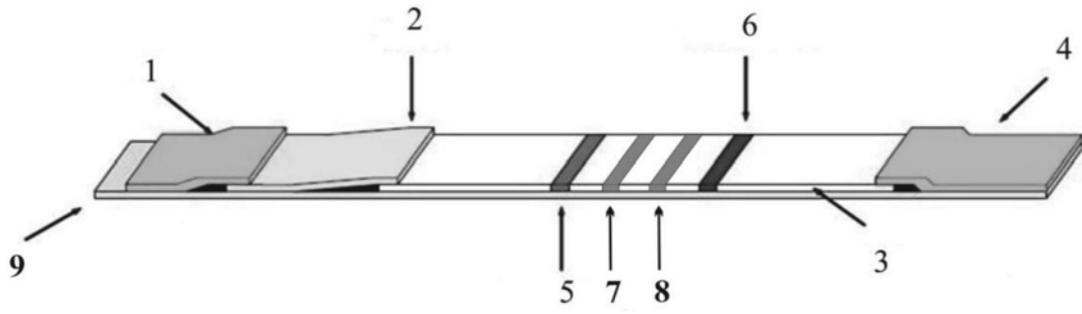


图1

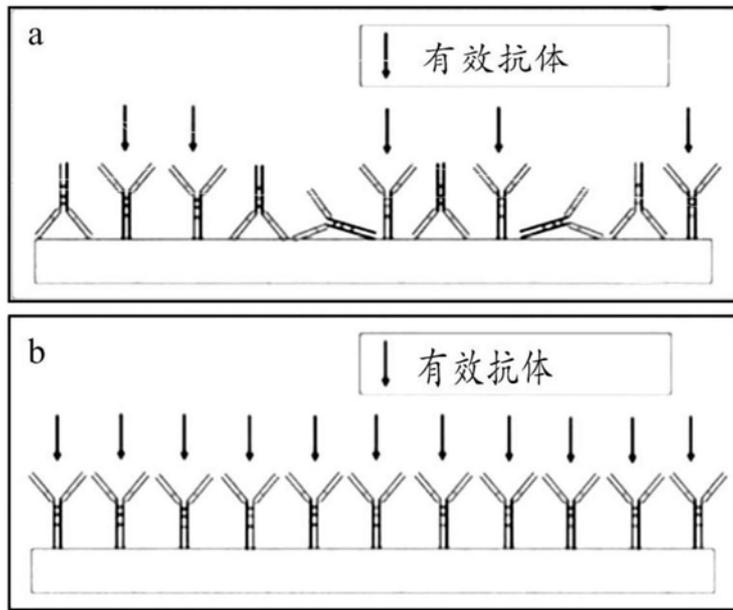


图2

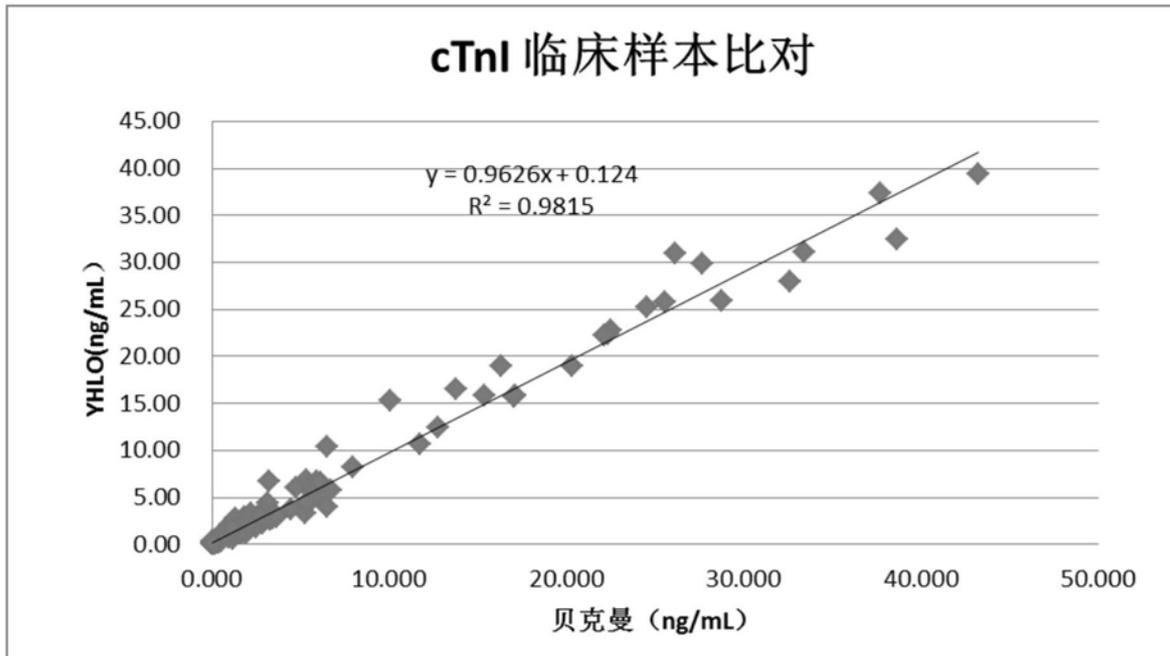


图3

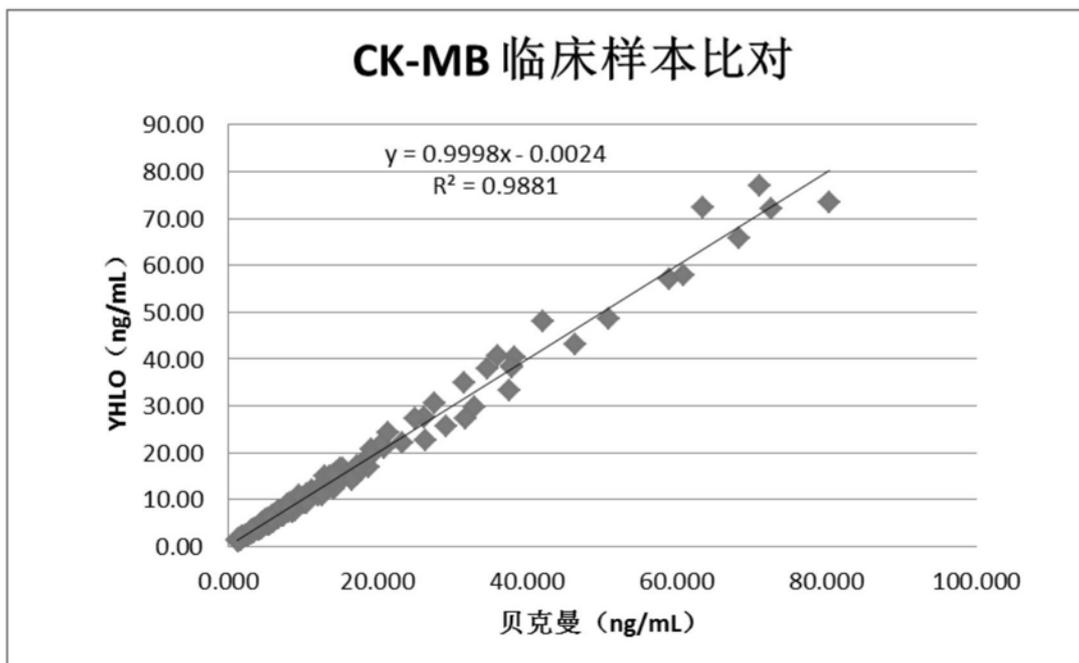


图4

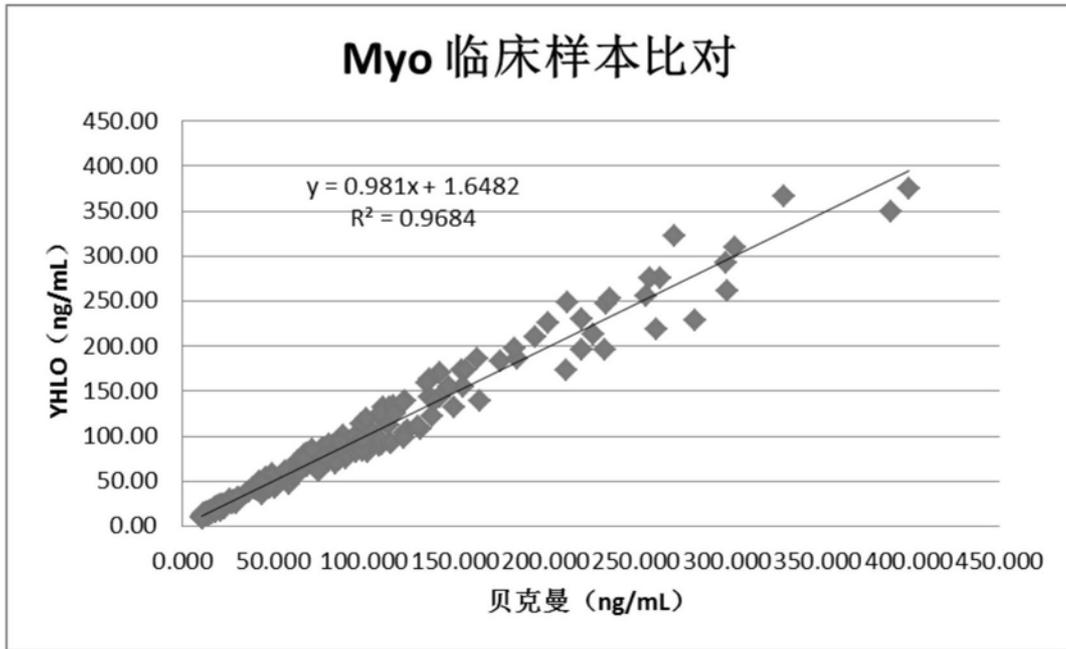


图5

专利名称(译)	一种免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108318690A</a>	公开(公告)日	2018-07-24
申请号	CN201810206451.9	申请日	2018-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市第二人民医院		
申请(专利权)人(译)	深圳市第二人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市第二人民医院		
[标]发明人	谢妮 何盛南 张赛 徐鹏		
发明人	谢妮 何盛南 张赛 徐鹏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533 G01N33/68 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/573 G01N33/6893 G01N2800/324		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本申请公开了一种免疫荧光层析试纸及其制备方法和应用。本申请的免疫荧光层析试纸，包括依序搭接在PVC底板上的样品垫、标记垫、层析条和吸水纸，其中，层析条以反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜为固相载体。本申请的免疫荧光层析试纸，采用反蛋白石结构硝酸纤维素光子晶体薄膜替换传统的硝酸纤维素膜，不仅提高了免疫荧光层析试纸的检测灵敏度，同时也能降低假阳性和假阴性等非特异性结合，而且，有效降低了背景信号干扰，提高了信噪比和分辨率，缩短了反应时间，还可较大的降低捕获抗体包被浓度，降低试剂成本，为心肌损伤标志物免疫荧光层析试纸检测技术提供了一种新的灵敏度高、重复性好的免疫荧光层析试纸。

