



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102323422 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 12

(21) 申请号 201110142274. 0
 (22) 申请日 2011. 05. 30
 (73) 专利权人 中国科学院上海微系统与信息技术研究所
 地址 200050 上海市长宁区长宁路 865 号
 (72) 发明人 毛红菊 祝继敏 金庆辉 赵建龙 朱大年
 (74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所 31233
 代理人 黄志达 谢文凯

CN 102156191 A, 2011. 08. 17,
 CN 201096785 Y, 2008. 08. 06,
 CN 1335502 A, 2002. 02. 13,
 US 2010240149 A1, 2010. 09. 23,
 EP 2122356 A2, 2009. 11. 25,
 CN 1228538 A, 1999. 09. 15,

审查员 黄晓丽

(51) Int. Cl.
 G01N 33/68 (2006. 01)
 G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件
 CN 201087837 Y, 2008. 07. 16,
 US 2008138842 A1, 2008. 06. 12,
 CN 101661034 A, 2010. 03. 03,

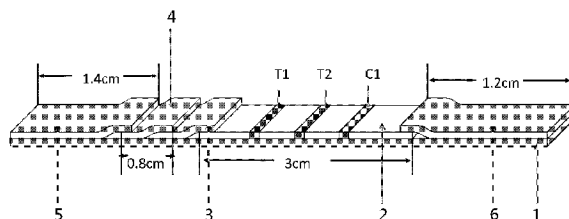
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条及其制备

(57) 摘要

本发明涉及一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条及其制备方法, 试纸条包括底板、硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、样品垫和吸水垫。制备方法包括在底板上依次相互交错黏贴经预处理的硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、经预处理的样品垫和吸水垫, 即得同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条。本发明对两个丰度差异较大蛋白同时进行检测, 为临床上心肌梗死的快速诊断提供了极大的便利, 解决和弥补传统免疫试纸条技术灵敏度低, 同时检测多蛋白时线性范围窄的缺陷; 制备方法工艺简单, 成本低, 操作简便, 具有良好的应用前景。



1. 一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条,包括底板、硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、样品垫和吸水垫,其特征在于:硝酸纤维素膜上预包被有心肌肌钙蛋白 I cTnI 包被抗体、肌血球素 Myo 包被抗体和羊抗鼠 IgG,第一结合垫预包被有 cTnI 捕获抗体胶体金探针 cTnI-AuNP 和 Myo 捕获抗体纳米金探针 Myo-AuNP,胶体金探针结合有生物素化的 DNA,第二结合垫预包被有链亲和素纳米金探针 SA-AuNP。

2. 一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,包括:

(1) 将样品垫置于样品垫处理液中浸泡后干燥,即得经预处理的样品垫;

(2) 将结合垫置于结合垫处理液中浸泡后干燥,再将体积比为 1 : 1 的 cTnI-AuNP 和 Myo-AuNP 的溶液喷印于结合垫上,得第一结合垫;将 SA-AuNP 溶液喷印于结合垫上,得第二结合垫;

(3) 使用 PBS 溶液,将 cTnI 包被抗体、Myo 包被抗体和羊抗鼠 IgG 浓度调整为 1mg/ml,然后分别将上述 1mg/ml 的物质喷印于硝酸纤维素膜上,即得经预处理的硝酸纤维素膜;

(4) 在底板上的一侧依次相互交错黏贴经预处理的硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、经预处理的样品垫,另一侧黏贴吸水垫,即得同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条。

3. 根据权利要求 2 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中的样品垫处理液为含质量百分比 1% 牛血清白蛋白、0.05% Tween-20 和 0.05% 叠氮钠的 10mM PBS 溶液。

4. 根据权利要求 2 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中的结合垫处理液为质量百分比浓度为 5% 的蔗糖溶液。

5. 根据权利要求 2 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (1) 和 (2) 中浸泡时间为 30 ~ 60min,干燥温度为 37 ~ 45℃,干燥时间为 12 ~ 18 小时。

6. 根据权利要求 2 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中的 cTnI-AuNP 溶液由在直径 13nm 的纳米金溶液中加入 cTnI 捕获抗体和生物素化的单链 DNA,并保存于 Tris-HCl 缓冲溶液制得。

7. 根据权利要求 2 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中的 Myo-AuNP 溶液由在直径 41nm 的纳米金溶液中加入 Myo 捕获抗体,并保存于 Tris-HCl 缓冲溶液制得。

8. 根据权利要求 2 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中的链亲和素纳米金探针溶液由在直径 41nm 的纳米金溶液中加入链亲和素,并保存于 Tris-HCl 缓冲溶液制得。

9. 根据权利要求 6、7 或 8 所述的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述 Tris-HCl 缓冲溶液含质量百分比 5% 的聚乙烯吡咯烷酮、1.25% 的蔗糖、0.05% 的聚乙二醇 8000、0.2% 的牛血清白蛋白和 0.05% 的 Tween-20。

半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条及其制备

技术领域

[0001] 本发明属于 cTnI 和 Myo 的检测领域,特别涉及一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是心血管系统的急危重症,发病率高,预后较差,死亡率高。早期快速的诊断对于该病及时治疗及预后具有重大意义,是检验医学中一个重要的研究方向。在急性心肌梗死的早期诊断中,肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 和肌血球素 (myoglobin, Myo) 的联合检测有着重要的诊断指导意义。cTnI 是存在于心肌细胞肌丝中的一种心肌调节蛋白,它是 AMI 发生时较为特异的一种蛋白。它在正常人血液中含量很低,约为 20.4pg/ml。在 AMI 发生 2.2-6.8 小时,它的浓度开始升高,大约在 11.2 小时达到峰值 195.9ng/ml。Myo 是目前公认的检测早期心肌损伤的较好的指标之一,广泛存在于心肌和骨骼肌的横纹肌中,它在正常人血液中含量小于 50ng/ml,在 AMI 发病 2-3 小时后浓度开始升高,9-12 小时达到峰值,24-36 小时后恢复正常。虽然不是心肌损伤特异的标志蛋白,但是近来的研究表明,在心肌梗死发生早期 (5 小时内),它与 cTnI 联合检测使 AMI 诊断的灵敏度、特异性得到了最佳体现,明显优于肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 T (cTnT)、C 反应蛋白 (CRP) 和脑钠尿多肽 (BNP) 等指标。

[0003] 目前临床上检测血液中蛋白的方法主要有:放射免疫分析法 (Radioimmunoassay, RIA),生化免疫分析法,酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和免疫荧光法 (immunofluorescence, IF) 等。但这些方法都有一定的局限性:RIA 的优点是结果精确,线性范围宽,缺陷是操作过程复杂,样品处理耗时,同时,放射性标记会对操作者造成伤害并对环境造成污染;生化免疫分析法虽已被广泛应用,但其检测灵敏度较差;ELISA 则由于方法间差异较大,导致结果不均一,且线性范围较窄,此外,因为其操作复杂,不适于做单人份或少量标本的检测;IF 中荧光强度随 pH 值和荧光燃料与抗体的比例而改变,难以定量反映抗原-抗体的结合。因此建立简单、特异、快速、便捷的多蛋白检测方法就显得尤为重要,这不仅能降低病人的诊断费用,更重要的是能够节省时间,从而尽快对病人开展治疗。

[0004] 近年来,试纸条检测技术的发展为生化以及医学快速检测蛋白提供便捷的途径。然而临床医学中现有的试纸条法多采用单蛋白的检测方式,不仅增加检测成本,更浪费检测样品;同时,由于检测灵敏度低 (通常为 1ng/ml),难以对疾病早期的一些微量蛋白标志物进行检测,也很难同时检测两种丰度差异较大的蛋白,从而最终延误治疗时间。目前,提高灵敏度不是通过对样品预先处理 (延长检测时间),就是使用荧光技术 (需要额外荧光检测仪) 来实现。生物素-链亲和素系统 (biotin-streptavidin system, BSS) 是 70 年代后期开始广泛应用于免疫学,并得到迅速发展的一种新型生物反应放大系统。由于它具有生物素与链亲和素之间高度亲和力及多级放大效应,并与胶体金、荧光素、酶、同位素等免疫标记技术有机地结合于一体,使各种免疫分析的特异性和灵敏度进一步提高。BSS 已经广泛应用于生物医学实验和研究的各个领域,用于微量抗原、抗体及受体的定量、定性检测及定

位观察研究。但目前试纸条上的应用也是结合荧光技术,不仅增加了检测成本,还需要额外的荧光检测仪。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条及其制备方法,该试纸条对两个丰度差异较大蛋白同时进行检测,为临床上心肌梗死的快速诊断提供了极大的便利,解决和弥补传统免疫试纸条技术灵敏度低,同时检测多蛋白时线性范围窄的缺陷。

[0006] 本发明的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条,包括底板、硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、样品垫和吸水垫,其特征在于:硝酸纤维素膜上预包被有心肌肌钙蛋白 I cTnI 包被抗体(检测线, T1)、肌血球素 Myo 包被抗体(检测线, T2)和羊抗鼠 IgG(质控线, C1),第一结合垫预包被有 cTnI 捕获抗体胶体金探针 cTnI-AuNP 和 Myo 捕获抗体纳米金探针 Myo-AuNP,胶体金探针结合有生物素化的 DNA,第二结合垫预包被有链亲和素纳米金探针 SA-AuNP。

[0007] 本发明的一种半定量同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条的制备方法,包括:

[0008] (1) 将样品垫(SK06,金标公司)置于样品垫处理液中浸泡后干燥,即得经预处理的样品垫;

[0009] (2) 将结合垫(VL68,金标公司)置于结合垫处理液中浸泡后干燥,再将体积比为 1 : 1 的 cTnI-AuNP 和 Myo-AuNP 的溶液喷印于结合垫上,得第一结合垫;将 SA-AuNP 溶液喷印于结合垫上,得第二结合垫;

[0010] (3) 使用 PBS 溶液,将 cTnI 包被抗体、Myo 包被抗体和羊抗鼠 IgG 浓度调整为 1mg/ml,然后分别将上述 1mg/ml 的物质喷印于硝酸纤维素膜(Hi-Flow Plus 180, Millipore)上,即得经预处理的硝酸纤维素膜;

[0011] (4) 在底板上的一侧依次相互交错黏贴经预处理的硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、经预处理的样品垫,另一侧黏贴吸水垫(CH37K,金标公司),即得同时检测 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条。

[0012] 所述步骤(1)中的样品垫处理液为含质量百分比 1%牛血清白蛋白(BSA)、0.05% Tween-20 和 0.05%叠氮钠的 10mM PBS 溶液。

[0013] 所述步骤(2)中的结合垫处理液为质量百分比浓度为 5%的蔗糖溶液。

[0014] 所述步骤(1)和(2)中浸泡时间为 30 ~ 60min,干燥温度为 37 ~ 45℃,干燥时间为 12 ~ 18 小时。

[0015] 所述步骤(2)中的 cTnI-AuNP 溶液由在直径 13nm 的纳米金溶液中加入 cTnI 捕获抗体和生物素化的单链 DNA,并保存于 Tris-HCl 缓冲溶液制得。

[0016] 所述步骤(2)中的 Myo-AuNP 溶液由在直径 41nm 的纳米金溶液中加入 Myo 捕获抗体,并保存于 Tris-HCl 缓冲溶液制得。

[0017] 所述步骤(2)中的链亲和素纳米金探针溶液由在直径 41nm 的纳米金溶液中加入链亲和素,并保存于 Tris-HCl 缓冲溶液制得。

[0018] 所述 Tris-HCl 缓冲溶液含质量百分比 5%的聚乙烯吡咯烷酮、1.25%的蔗糖、0.05%的聚乙二醇 8000、0.2%的牛血清白蛋白和 0.05%的 Tween-20。

[0019] 本发明所采用的 cTnI 和 Myo 包被和捕获抗体均为单克隆技术制备的抗体。利用抗原抗体结合原理,当待检样品中含有 Myo 抗原时, Myo 抗原和 Myo 捕获抗体会发生结合,然后通过毛细管层析作用,向前移动到 Myo 包被抗体位置, Myo 抗原会再次和 Myo 包被抗体结合,以“三明治”形式形成双抗夹心复合物而聚集于 T1 线上显示红色条带,而未结合的 Myo 捕获抗体则会继续前行,到达质控线处,与羊抗鼠 IgG 结合,从而在 C1 处聚集显示红色条带。当待检样品中含有 cTnI 抗原时, cTnI 抗原和 cTnI 捕获抗体会发生结合,然后通过毛细管层析作用,向前移动到相应的 cTnI 包被抗体位置, cTnI 抗原会再次和 cTnI 包被抗体结合,以“三明治”形式形成双抗夹心复合物而聚集于 T2 线上显示红色条带,而未结合的 cTnI 捕获抗体则会继续前行,到达质控线处,与羊抗鼠 IgG 结合,从而在 C1 处聚集显示红色条带。此外,移动相对缓慢的含有链亲和素的 41nm 胶体金会和 T2 线上含有生物素的 13nm 的胶体金再次以“三明治”形式结合,形成双三明治结构,从而增强了 T2 条带的显色。整个反应在 20 分钟内完成,15 分钟后可上机读卡, T1, T2, C1 处都会产生相应的颜色信号值,从而确定相应量读数。

[0020] 有益效果

[0021] (1) 本发明灵敏度高,心肌肌钙蛋白 I 灵敏度达到 1.0pg/ml,肌血球素灵敏度达到 1ng/ml,特异性好,只需手持式仪器,可即时得到检测结果,线性范围宽,操作简便,费用低廉,可以单人份进行检测,并可以大批量生产;对两个丰度差异较大蛋白同时进行检测,为临床上心肌梗死的快速诊断提供了极大的便利,并可扩展应用于临床医学中遗传病、传染性疾病、肿瘤和心血管疾病,以及兽医学,食品微生物检测等领域中丰度差异较大的两种蛋白的同时检测,解决和弥补传统免疫试纸条技术灵敏度低,同时检测多蛋白时线性范围窄的缺陷;

[0022] (2) 本发明的制备方法工艺简单,成本低,操作简便,具有良好的应用前景。

附图说明

[0023] 图 1 为本发明 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条结构示意图;其中,1 为底板,2 为硝酸纤维素膜,3 为第一结合垫,4 为第二结合垫,5 为样品垫,C1 为质控线,T1 为 cTnI 检测线,T2 为 Myo 检测线,6 为吸水垫;

[0024] 图 2 为本发明 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条中预包被的 cTnI-AuNP, Myo-AuNP 和 streptavidin-AuNP 探针示意图;其中,1 为 streptavidin-AuNP,2 为 cTnI-AuNP,3 为 Myo-AuNP,4 为 Myo 包被抗体,5 为 cTnI 包被抗体,6 为羊抗鼠 IgG。

[0025] 图 3 为本发明 cTnI 和 Myo 的免疫层析试纸条发生反应后结合方式示意图;其中,1 为 streptavidin-AuNP,2 为 cTnI-AuNP,3 为 Myo-AuNP,4 为 Myo 包被抗体,5 为 cTnI 包被抗体,6 为羊抗鼠 IgG。

[0026] 图 4 为实施例 1 制备的试纸条灵敏度测试图片;其中,A 为从左至右,单用 100pg/ml cTnI,单用 100ng/ml Myo,使用 10ng/ml C 反应蛋白;B 为固定 1ng/ml Myo,从左至右,cTnI 浓度分别为 1pg/ml,10pg/ml,100pg/ml,1000pg/ml 和 10000pg/ml;C 为固定 1pg/ml cTnI,从左至右,cTnI 浓度分别为 1ng/ml,10ng/ml,100ng/ml,1000ng/ml 和 10000ng/ml;

[0027] 图 5 为实施例 1 制备的试纸条灵敏度测试的峰值曲线图;其中,(1) 为上述 B 对应的峰值曲线图,(2) 为上述 C 对应的峰值曲线图。

具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0029] 实施例 1

[0030] 1) 将样品垫放于样品垫处理液中浸泡 30min 后,取出于 37℃干燥箱中干燥 12 小时,然后加入干燥剂封存备用;样品垫处理液是含有 1% BSA,0.05% Tween-20,0.05% 叠氮钠的 10mMPBS 溶液。

[0031] 2) 使用 10mM,pH 7.4PBS,分别将 cTnI 包被抗体,Myo 包被抗体和羊抗鼠 IgG 抗体浓度调整到 1mg/ml,将三者分别均匀的喷印于硝酸纤维素膜,然后于 37℃干燥箱中干燥 12 小时,加入干燥剂封存备用。

[0032] 3) 采用直径 13nm 的纳米金溶液,使用 0.2M K_2CO_3 调整溶液的 pH 值至 8.5,加入 cTnI 捕获抗体,使其终浓度调整为 8 μ g/ml,室温静置 30min,然后加入生物素化的单链 DNA,使其终浓度为 1 μ M,室温静置 16h。接着加入终浓度为 0.5% PEG 8000,充分混匀,室温静置 15min,然后放入离心机中,以 9000rpm,4℃,离心 50min,小心弃上清,加入含有 0.5% PVP,1.25% 蔗糖,0.05% PEG 8000,0.2% BSA,0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液,混匀后,再次离心,此操作重复两次,最后保存于含有 0.5% PVP,1.25% 蔗糖,0.05% PEG 8000,0.2% BSA,0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液,4℃保存备用。

[0033] 4) 采用直径 41nm 的纳米金溶液,使用 0.2M K_2CO_3 调整溶液的 pH 值至 8.5,加入 Myo 捕获抗体,使其终浓度为 6 μ g/ml,室温静置 30min,随后加入 1/10 体积含 10% BSA 的 10mM,pH 7.4PBS 溶液,室温静置 10min 后放入离心机中,以 12000rpm,4℃,离心 30min,小心弃上清,加入含有 1% BSA 的 10mM pH 7.4PBS 溶液,室温静置 10min,然后放入离心机中,此操作重复两次,最后保存于含有 0.5% PVP,1.25% 蔗糖,0.05% PEG 8000,0.2% BSA,0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液,4℃保存备用。

[0034] 5) 采用直径 41nm 的纳米金溶液,使用 0.2M K_2CO_3 调整溶液的 pH 值至 9.0,加入链亲和素,使其终浓度为 8 μ g/ml,室温静置 30min,加入 1/10 体积含 10% BSA 的 10mM pH 7.4PBS 溶液,室温静置 10min,放入离心机中,以 12000rpm,4℃,离心 30min,小心弃上清,加入含有 1% BSA 的 10mM pH 7.4 的 PBS 溶液,室温静置 10min,然后放入离心机中,以 12000rpm,4℃,离心 30min,此操作重复两次,最后保存于含有 0.5% PVP,1.25% 蔗糖,0.05% PEG 8000,0.2% BSA,0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液,4℃保存备用。

[0035] 6) 将结合垫放于结合垫处理液中浸泡 30min 后,取出于 37℃干燥箱中干燥 12 小时;干燥后,将体积比为 1:1 的 cTnI-AuNP 和 Myo-AuNP 溶液均匀喷印于结合垫上,37℃干燥箱中干燥 12 小时,加入干燥剂封存备用。所述结合垫处理液为 5% 蔗糖溶液。

[0036] 7) 试纸条的组装和切割

[0037] 下述操作都必须在湿度小于 20%,温度 25℃的环境中完成。

[0038] 试纸板的组装:底板上依次相互交错 2mm 的黏贴 3cm 硝酸纤维素膜、0.8cm 第一结合垫、0.8cm 第二结合垫、1.4cm 样品垫和 1.2cm 吸水垫,硝酸纤维素膜上预包被有 Myo 包被

抗体（检测线 T1）、cTnI 包被抗体（检测线 T2）和羊抗鼠 IgG（质控线），组装成试纸板。

[0039] 试纸条的裁剪：使用切条机将组装好的试纸板切成 0.3cm 宽的试纸条。

[0040] 8) 检测结果判断

[0041] 将试纸条放入 150 μ l 含 cTnI 和 Myo 蛋白的标准样品溶液中，15 分钟后观察，判断试纸条

[0042] 检测结果的标准为：

[0043] 1. 阳性：在检测线和质控线都有红色条带出现。

[0044] 2. 阴性：在检测线无红色条带出现，质控线有红色条带出现。

[0045] 3. 试纸条失败：在检测线和质控线均无红色条带出现。

[0046] 9) 试纸条灵敏度实验

[0047] 单用 cTnI 蛋白进行 10 次重复检测，其灵敏度约为 1pg/ml。单用 Myo 蛋白进行 10 次重复检测，其灵敏度约为 1ng/ml。固定 cTnI 蛋白浓度为 1pg/ml，Myo 蛋白浓度分别为 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml 和 1000ng/ml，另外一组实验，固定 Myo 蛋白浓度为 1ng/ml，cTnI 蛋白浓度分别为 1pg/ml, 10pg/ml, 100pg/ml 和 1000pg/ml，固定蛋白的灵敏度未见明显差异。见图 4 和图 5。表明了该方法用于同时对 cTnI 和 Myo 半定量检测的可行性和准确性。

[0048] 10) 试纸条特异性实验

[0049] 与心肌梗死其他标志物：C 反应蛋白和脑钠尿多肽做交叉反应实验，交叉反应率 < 0.01%。

[0050] 11) 样品检测实验分三组完成。

[0051] 第一组，使用全血对 10 例心肌梗死病人的样品进行检测。cTnI 和 Myo 阳性 5 例，Myo 阳性 3 例，cTnI 阳性 1 例，cTnI 和 Myo 阴性 1 例。

[0052] 第二组，使用血清检测相同 10 例样品，结果与全血检测一样。

[0053] 第三组，使用血浆检测相同 10 例样品，结果与全血检测一样。

[0054] 实施例 2

[0055] 1) 将样品垫放于样品垫处理液中浸泡 60min 后，取出于 45℃干燥箱中干燥 18 小时，然后加入干燥剂封存备用；所述样品垫处理液是含有 1% BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% 叠氮钠的 10mM PBS 溶液。

[0056] 2) 使用 10mM, pH 7.4PBS, 分别将 cTnI 包被抗体, Myo 包被抗体和羊抗鼠 IgG 抗体浓度调整到 1mg/ml, 将三者分别均匀的喷印于硝酸纤维素膜, 然后于 45℃干燥箱中干燥 18 小时, 加入干燥剂封存备用。

[0057] 3) 采用直径 13nm 的纳米金溶液, 使用 0.2M K_2CO_3 调整溶液的 pH 值至 8.5, 加入 cTnI 捕获抗体, 使其终浓度调整为 8 μ g/ml, 室温静置 30min, 然后加入生物素化的单链 DNA, 使其终浓度为 1 μ M, 室温静置 16h。接着加入终浓度为 0.5% PEG 8000, 充分混匀, 室温静置 15min, 然后放入离心机中, 以 9000rpm, 4℃, 离心 50min, 小心弃上清, 加入含有 0.5% PVP, 1.25% 蔗糖, 0.05% PEG 8000, 0.2% BSA, 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 混匀后, 再次离心, 此操作重复两次, 最后保存于含有 0.5% PVP, 1.25% 蔗糖, 0.05% PEG 8000, 0.2% BSA, 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 4℃保存备用。

[0058] 4) 采用直径 41nm 的纳米金溶液, 使用 0.2M K_2CO_3 调整溶液的 pH 值至 8.5, 加入 Myo 捕获抗体, 使其终浓度为 6 μ g/ml, 室温静置 30min, 随后加入 1/10 体积含 10% BSA 的 10mM,

pH 7.4 PBS 溶液, 室温静置 10min 后放入离心机中, 以 12000rpm, 4℃, 离心 30min, 小心弃上清, 加入含有 1% BSA 的 10mM pH 7.4 PBS 溶液, 室温静置 10min, 然后放入离心机中, 此操作重复两次, 最后保存于含有 0.5% PVP, 1.25% 蔗糖, 0.05% PEG 8000, 0.2% BSA, 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 4℃ 保存备用。

[0059] 5) 采用直径 41nm 的纳米金溶液, 使用 0.2M K_2CO_3 调整溶液的 pH 值至 9.0, 加入链亲和素, 使其终浓度为 8 μ g/ml, 室温静置 30min, 加入 1/10 体积含 10% BSA 的 10mM pH 7.4 PBS 溶液, 室温静置 10min, 放入离心机中, 以 12000rpm, 4℃, 离心 30min, 小心弃上清, 加入含有 1% BSA 的 10mM pH 7.4 的 PBS 溶液, 室温静置 10min, 然后放入离心机中, 以 12000rpm, 4℃, 离心 30min, 此操作重复两次, 最后保存于含有 0.5% PVP, 1.25% 蔗糖, 0.05% PEG 8000, 0.2% BSA, 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 4℃ 保存备用。

[0060] 6) 将结合垫放于结合垫处理液中浸泡 60min 后, 取出于 45℃ 干燥箱中干燥 18 小时; 干燥后, 将体积比为 1 : 1 的 cTnI-AuNP 和 Myo-AuNP 溶液均匀喷印于结合垫上, 37℃ 干燥箱中干燥 12 小时, 加入干燥剂封存备用。所述结合垫处理液为 5% 蔗糖溶液。

[0061] 7) 试纸条的组装和切割

[0062] 下述操作都必须在湿度小于 20%, 温度 25℃ 的环境中完成。

[0063] 试纸板的组装: 底板上依次相互交错 2mm 的黏贴 2.6cm 硝酸纤维素膜、0.6cm 第一结合垫、0.6cm 第二结合垫、1.8cm 样品垫和 1.4cm 吸水垫, 硝酸纤维素膜上预包被有 cTnI 包被抗体 (检测线 T1)、Myo 包被抗体 (检测线 T2) 和羊抗鼠 IgG (质控线), 组装成试纸板。

[0064] 8) 试纸条灵敏度实验

[0065] 灵敏度实验分四组完成。第一组, 单用 cTnI 蛋白进行 10 次重复检测, 其灵敏度约为 1pg/ml; 第二组, 单用 Myo 蛋白进行 10 次重复检测, 其灵敏度约为 1ng/ml; 第三组, 固定 cTnI 蛋白浓度为 1pg/ml, Myo 蛋白浓度分别为 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml 和 1000ng/ml; 最后一组, 固定 Myo 蛋白浓度为 1ng/ml, cTnI 蛋白浓度分别为 1pg/ml, 10pg/ml, 100pg/ml 和 1000pg/ml, 固定蛋白的灵敏度未见明显差异。表明了该方法用于同时对 cTnI 和 Myo 半定量检测的可行性和准确性。

[0066] 9) 试纸条特异性实验

[0067] 与心肌梗死其他标志物: C 反应蛋白和脑钠尿多肽做交叉反应实验, 交叉反应率 < 0.01%。

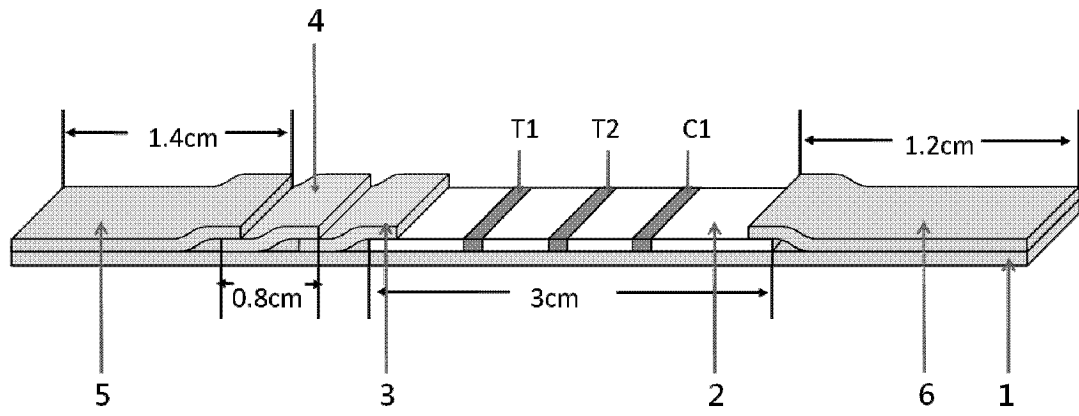


图 1

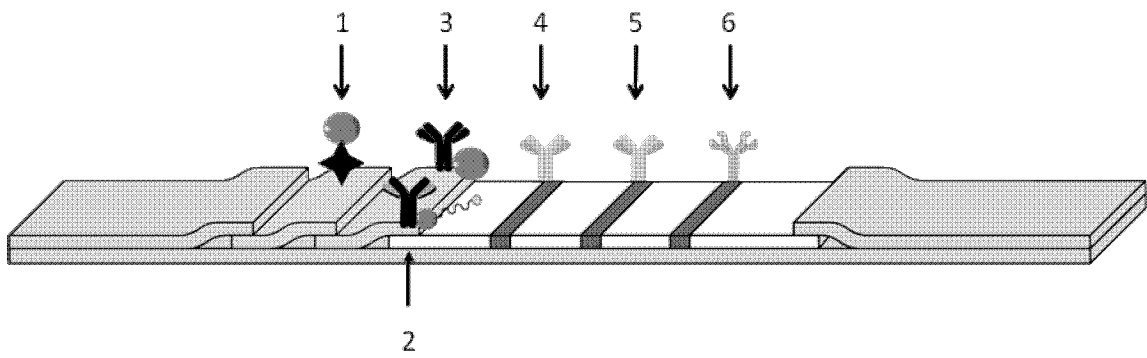


图 2

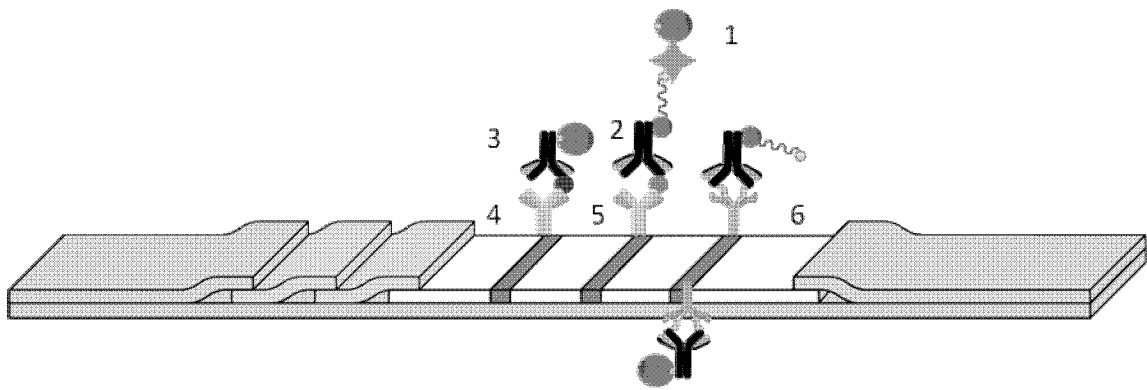


图 3

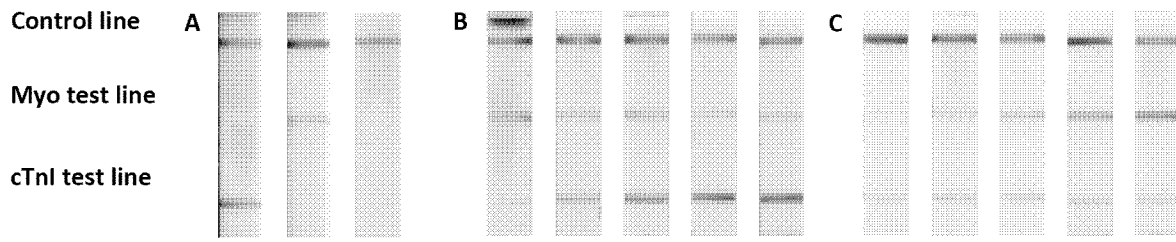


图 4

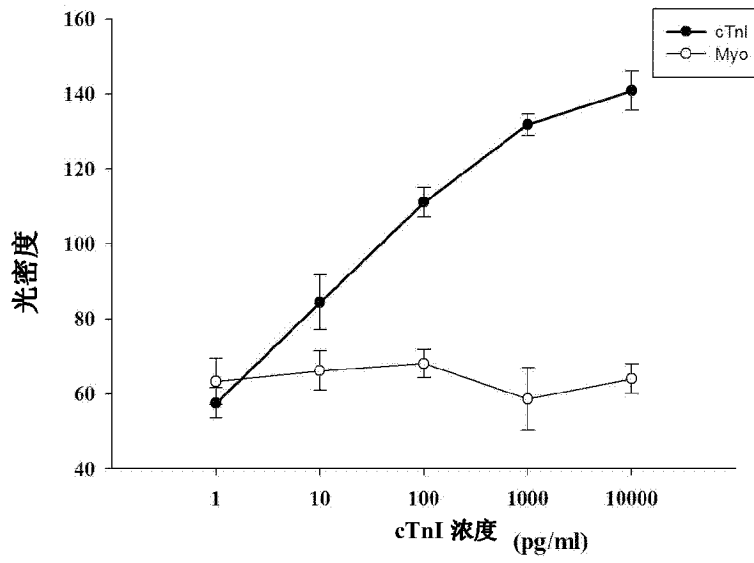
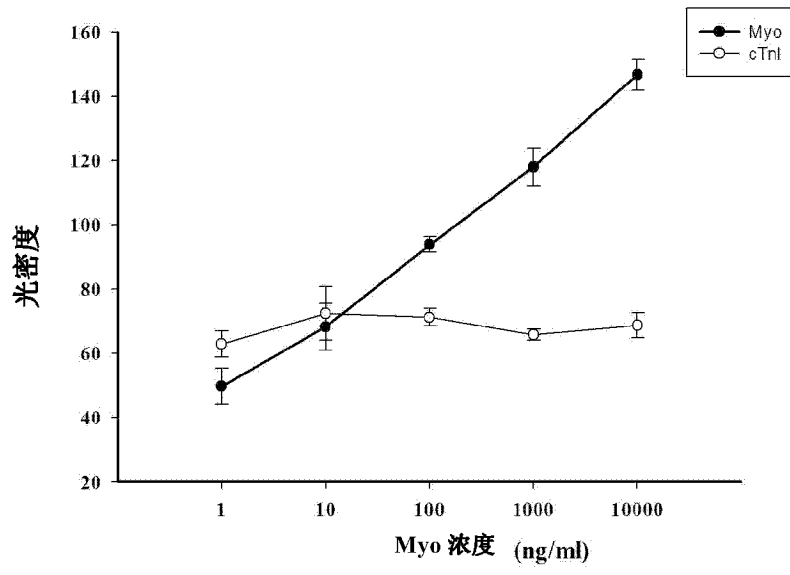


图 5(1)



(2)

专利名称(译)	半定量同时检测cTnI和Myo的免疫层析试纸条及其制备		
公开(公告)号	CN102323422B	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201110142274.0	申请日	2011-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
[标]发明人	毛红菊 祝继敏 金庆辉 赵建龙 朱大年		
发明人	毛红菊 祝继敏 金庆辉 赵建龙 朱大年		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/588 G01N2333/805 G01N33/6887 B82Y15/00		
代理人(译)	黄志达 谢文凯		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102323422A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种半定量同时检测cTnI和Myo的免疫层析试纸条及其制备方法，试纸条包括底板、硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、样品垫和吸水垫。制备方法包括在底板上依次相互交错黏贴经预处理的硝酸纤维素膜、第一结合垫、第二结合垫、经预处理的样品垫和吸水垫，即得同时检测cTnI和Myo的免疫层析试纸条。本发明对两个丰度差异较大蛋白同时进行检测，为临床上心肌梗死的快速诊断提供了极大的便利，解决和弥补传统免疫试纸条技术灵敏度低，同时检测多蛋白时线性范围窄的缺陷；制备方法工艺简单，成本低，操作简便，具有良好的应用前景。

