



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702901 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910957602.9

(22)申请日 2019.10.10

(71)申请人 南京欧凯生物科技有限公司
地址 210000 江苏省南京市江北新区浦滨
路211号扬子科创中心一期A栋11层

(72)发明人 戴瞻

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理
有限公司 11616

代理人 李枝玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

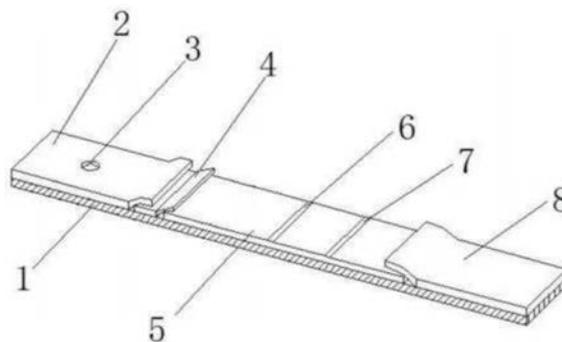
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸

(57)摘要

一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸,包括PVC底板;PVC底板上从左到右依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫;样品垫的一端固定在PVC底板上,样品垫的另一端搭设在结合垫上,样品垫的中心处设有样品滴入孔;结合垫的一端固定在PVC底板上,结合垫的另一端搭设在硝酸纤维素膜上;硝酸纤维素膜上从左到右依次设有检测线和质控线,吸水垫的左端搭设在硝酸纤维素膜上。本发明检测试纸通过时间分辨免疫荧光微球对抗体蛋白进行标记,并且捕获的是cTnI与TnC的复合物,从而使得检测灵敏度更高。大大缩短了检测时间,效率高,具有良好的稳定性和重复性。



1. 一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸,包括PVC底板;其特征在于:所述PVC底板上从左到右依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫;所述样品垫设置在所述PVC底板的最左端,所述样品垫的一端固定在所述PVC底板上,所述样品垫的另一端搭设在所述结合垫上,所述样品垫的中心处设有样品滴入孔;所述结合垫的一端固定在所述PVC底板上,并位于所述样品垫另一端的下方,所述结合垫的另一端搭设在所述硝酸纤维素膜上;所述结合垫中含有复数个时间分辨免疫荧光微球;所述时间分辨免疫荧光微球的表面修饰有与蛋白或抗体共价偶联的羧基基团;所述硝酸纤维素膜上从左到右依次设有检测线和质控线,所述检测线和所述质控线在所述硝酸纤维素膜上平行相距设置;所述检测线为cTnI多抗的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控线为羊抗鼠IgG抗体划线,其浓度为1mg/ml;所述吸水垫设置在所述PVC底板的最右端,所述吸水垫的左端搭设在所述硝酸纤维素膜上。

2. 根据权利要求1所述的检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸,其特征在于:每个所述时间分辨免疫荧光微球中包裹有荧光物质,所述荧光物质为稀土铕离子配合物,其激发光波长为365nm,反射光波长为610nm,所述时间分辨免疫荧光微球的直径为200nm。

3. 根据权利要求1所述的检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸,其特征在于:所述硝酸纤维素膜为硝酸纤维膜,所述硝酸纤维素膜为表面平整的白色或乳色膜,且所述硝酸纤维素膜的含水量在25%-50%之间,所述硝酸纤维素膜的膜孔径为8 μ m。

一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术应用领域,涉及一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸。

背景技术

[0002] 心肌钙蛋白I(cTnI)为心肌钙蛋白(cTn)的三个亚单位(cTnI,cTnC和cTnT)之一,是心脏的特异性抗原,其释放入血循环是心肌细胞损伤的敏感和高度特异的标志,对某些心血管病的诊断、预后及疗效判断等具有重要意义。与其他指标相比,cTnI在血中出现早、持续时间长,且为心肌细胞所特有,因此对AMI诊断敏感性高、特异性强,还可用于对心脏手术的心肌保护、心肌损伤进行评价以及对AMI、心脏手术的术后监护、预后及疗效判断。心肌钙蛋白I在临床上有着广泛的应用前景。

[0003] 心肌钙蛋白I(cTnI)对蛋白质降解具有高度敏感性,相比之下,在心肌钙蛋白复合物中,cTnI中心部分与TnC间相互作用力强,这种相互作用可使cTnI免遭蛋白酶降解。因此,位于cTnI中心部分的表位要比位于端部的表位稳定得多。尽管TnC会通过相互作用使cTnI中心部分更加稳定,但TnC也会与抗体竞争性结合cTnI。因此,仅特异性结合于cTnI分子中心部分某些表位的抗体能够识别患者血液中的cTnI,原因是大多数cTnI在血液中与TnC以复合物形式存在;而传统的检测试纸灵敏度均偏低。

[0004] 因此,如何解决上述问题,是本领域技术人员着重要研究的内容。

发明内容

[0005] 为克服上述现有技术中的不足,本发明目的在于提供一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸,包括PVC底板;所述PVC底板上从左到右依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫;所述样品垫设置在所述PVC底板的最左端,所述样品垫的一端固定在所述PVC底板上,所述样品垫的另一端搭设在所述结合垫上,所述样品垫的中心处设有样品滴入孔;所述结合垫的一端固定在所述PVC底板上,并位于所述样品垫另一端的下方,所述结合垫的另一端搭设在所述硝酸纤维素膜上;所述结合垫中含有复数个时间分辨免疫荧光微球;所述时间分辨免疫荧光微球的表面修饰有与蛋白或抗体共价偶联的羧基基团;所述硝酸纤维素膜上从左到右依次设有检测线和质控线,所述检测线和所述质控线在所述硝酸纤维素膜上平行相距设置;所述检测线为cTnI多抗的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控线为羊抗鼠IgG抗体划线,其浓度为1mg/ml;所述吸水垫设置在所述PVC底板的最右端,所述吸水垫的左端搭设在所述硝酸纤维素膜上。

[0007] 上述方案中,有关内容解释如下:

[0008] 1、上述方案中,每个所述时间分辨免疫荧光微球中包裹有数以万计的荧光物质,不会泄漏,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度。所述荧光物质为稀土钪离子配合物,其激发光波长为365nm,反射光波长为610nm,所述时间分辨免疫荧光微球的直径

为200nm。所述时间分辨免疫荧光微球是一种具有特殊功能的微球,微球表面修饰有一定密度的羧基或其它功能基团,与蛋白或抗体的共价偶联,大大提高标记物的稳定性。

[0009] 2、上述方案中,所述硝酸纤维素膜为硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜为表面平整的白色或乳色膜,且所述硝酸纤维素膜的含水量在25%-50%之间,所述硝酸纤维素膜的膜孔径为8 μm 。

[0010] 由于上述技术方案运用,本发明与现有技术相比具有的有益效果如下:

[0011] 传统试纸条单检测cTnI抗原,而游离的cTnI抗原在血液中容易降解。而血液中绝大部分cTnI与TnI结合,该复合物不容易被蛋白酶降解。本发明检测的是cTnI与TnI复合物,该复合物不易被降解,因此灵敏度高于传统试纸条;本发明检测试纸通过时间分辨免疫荧光微球对抗体蛋白进行标记,并且捕获的是cTnI与TnI的复合物,从而使得检测灵敏度更高。大大缩短了检测时间,效率高,具有良好的稳定性和重复性。操作简便,无需特殊的仪器设备。

附图说明

[0012] 图1为本发明荧光免疫层析试纸的结构示意图;

[0013] 图2为本发明时间分辨荧光免疫层析试纸检测CtnI浓度的标准曲线图。

[0014] 图中:1、PVC底板;2、样品垫;3、样品滴入孔;4、结合垫;5、硝酸纤维素膜;6、检测线;7、质控线;8、吸水垫。

具体实施方式

[0015] 以下由特定的具体实施例结合附图说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0016] 实施例:

[0017] 一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸,包括PVC底板1;所述PVC底板1上从左到右依次设有样品垫2、结合垫4、硝酸纤维素膜5及吸水垫8;所述样品垫2设置在所述PVC底板1的最左端,所述样品垫2的一端固定在所述PVC底板1上,所述样品垫2的另一端搭设在所述结合垫4上,所述样品垫2的中心处设有样品滴入孔3;所述结合垫4的一端固定在所述PVC底板1上,并位于所述样品垫2另一端的下方,所述结合垫4的另一端搭设在所述硝酸纤维素膜5上;所述结合垫4中含有复数个时间分辨免疫荧光微球(图中未示出);所述时间分辨免疫荧光微球的表面修饰有与蛋白或抗体共价偶联的羧基基团;所述硝酸纤维素膜5上从左到右依次设有检测线6和质控线7,所述检测线6和所述质控线7在所述硝酸纤维素膜5上平行相距设置;所述检测线6为cTnI多抗的划线,其浓度为1mg/ml;所述质控线7为羊抗鼠IgG抗体划线,其浓度为1mg/ml;所述吸水垫8设置在所述PVC底板1的最右端,所述吸水垫8的左端搭设在所述硝酸纤维素膜5上。

[0018] 每个所述时间分辨免疫荧光微球中包裹有数以万计的荧光物质,不会泄漏,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度。所述荧光物质为稀土钬离子配合物,其激发光波长为365nm,反射光波长为610nm,所述时间分辨免疫荧光微球的直径为200nm。所述时间分辨免疫荧光微球是一种具有特殊功能的微球,微球表面修饰有一定密度的羧基或其它功能基团,与蛋白或抗体的共价偶联,大大提高标记物的稳定性。

[0019] 所述硝酸纤维素膜5为硝酸纤维膜,所述硝酸纤维素膜5为表面平整的白色或乳色膜,且所述硝酸纤维素膜5的含水量在25%-50%之间,所述硝酸纤维素膜5的膜孔径为8 μ m。

[0020] 传统试纸条单检测cTnI抗原,而游离的cTnI抗原在血液中容易降解。而血液中绝大部分cTnI与TnC结合,该复合物不容易被蛋白酶降解。本发明检测的是cTnI与TnC复合物,该复合物不易被降解,因此灵敏度高于传统试纸条。

[0021] 本发明检测心肌钙蛋白的荧光免疫层析试纸的制备方法,步骤如下:

[0022] (1) 时间分辨荧光微球的预处理

[0023] 将时间分辨荧光微球用超声分散处理5min后,取50 μ l,14000rpm高速离心15min后去除上清液,沉淀物用190 μ l 10mmol/L,pH6.0的MES缓冲液洗涤;分别配备20mg/ml的碳二亚胺和琥珀酰亚胺,各加入5 μ l,室温反应30min后,14000rpm高速离心15min,沉淀物用pH为6.0的MES溶液洗涤并重悬至500 μ l,获得时间分辨荧光微球溶液;

[0024] (2) 结合cTnI单克隆抗体的时间分辨荧光微球的制备

[0025] 上述时间分辨荧光微球溶液中加入50 μ g cTnI单克隆抗体,混匀,室温反应2小时,用4%的BSA室温封闭2小时后,14000rpm高速离心15min,用含0.1%BSA、0.2%Tween20、0.1%NaN₃的50mmol/L、pH为8.0的Tris-HCl保存液洗涤并重悬至100 μ l,于4 $^{\circ}$ C避光保存,获得结合cTnI单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液;

[0026] (3) 喷金与划膜的处理

[0027] 用含有1%蔗糖的10mmol/LPBS缓冲液分别稀释羊抗鸡IgG和小鼠抗人cTnI单克隆抗体至浓度1mg/ml,取上述结合cTnI单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液100 μ l,14000rpm高速离心15min;用250 μ l含0.5BSA、0.3%Tween20、10%蔗糖的50mmol/L、pH为7.5的Tris-HCl微球重悬液重悬;用喷金划膜仪以1 μ l/cm的量在硝酸纤维素膜上平行喷涂控制线和检测线,间隔4mm,用喷金划膜仪以2 μ l/cm的量在硝酸纤维素膜上平行喷涂微球线,间隔检测线4mm;放入37 $^{\circ}$ C烘箱避光烘干10小时,加入干燥剂封存备用;

[0028] (4) 试纸条的组装

[0029] 在PVC底板(尺寸为80*300mm)上依次相互交错2mm搭接粘贴全血滤垫(尺寸为30*300mm,玻璃纤维棉材质)、硝酸纤维素膜(尺寸为25*300mm,硝酸纤维材质)和吸水纸(尺寸为28*300mm),其中检测线靠近标记垫,质控线靠近吸水纸,从而得到试纸板,切割成4mm的试纸条。检测cTnI的试纸条组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳上设有加样孔和观察窗,加样孔对应于cTnI检测试纸条的全血滤垫2,结果观察窗对应于cTnI检测试纸条的检测线6和质控线7。

[0030] 该实施例试剂盒中,每盒均匹配一个含有cTnI标准曲线的ID卡,相同批次的产品标准曲线相同,通过所述cTnI试纸条测定不同浓度的校准品,以校准品浓度为X轴,检测线、质控线荧光强度的比值为Y轴,绘制成标准曲线,写入并生成相应条码信息存储在ID卡中,并打印出匹配的条码粘贴在试纸条外壳上。检测浓度时,ID卡插入仪器ID卡插口,干式荧光免疫分析仪读取试纸条外壳上对应的条码信息,获取相应的标准曲线。

[0031] 实施例2:时间分辨荧光免疫层析检测cTnI浓度

[0032] 按实施例1制备好的试纸条中加入不同浓度的人cTnI抗原校准品(40.0ng/ml、20.0ng/ml、10.0ng/ml、5.0ng/ml、2.0ng/ml、0.5ng/ml、0.2ng/ml、0.05ng/ml共八个浓度,每个浓度设置三个重复,均由1.0mg/ml人cTnI抗原用样本缓冲液稀释而成),层析15min后,

通过江苏苏州和迈精密仪器生物制药有限公司生产的FIC-S1型干式荧光免疫分析仪读取检测线、控制线的荧光强度比值(检测线检测值/控制线检测值)。

[0033] 以cTnI校准品浓度为X轴,以样品检测线荧光强度质控线荧光强度为Y轴建立方程并拟合成标准曲线,如图2所示,R值为0.9957。

[0034] 该过程具体包括下列步骤:

[0035] (1) 将待检测样本及检测试剂复温至室温;

[0036] (3) 吸取全血样本100u1,加入到试纸条的加样孔中,室温避光反应15分钟;

[0037] (4) 开启干式荧光免疫分析仪,初始化自检完毕后插入对应检测cTnI的ID卡;

[0038] (5) 将试纸条插入仪器的试纸条插口中,运行仪器,通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的cTnI的浓度。

[0039] 临床样本检测

[0040] 采集医院检测cTnI的全血样本60份,用本发明的试剂盒与贝克曼标本进行比较。本发明试剂盒中,取全血100u1加入到检测卡加样孔中,层析15分钟后通过苏州和迈精密仪器有限公司生产的FIC-S1型干式荧光免疫分析仪读取浓度,同一血样采用对比系统贝克曼cTnI试剂盒进行浓度检测。两种方法检测结果进行线性分析,其相关性很好 $R=0.983$,平均相对偏差小于10%,结果符合临床分析要求,适合用于临床检测。

[0041] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

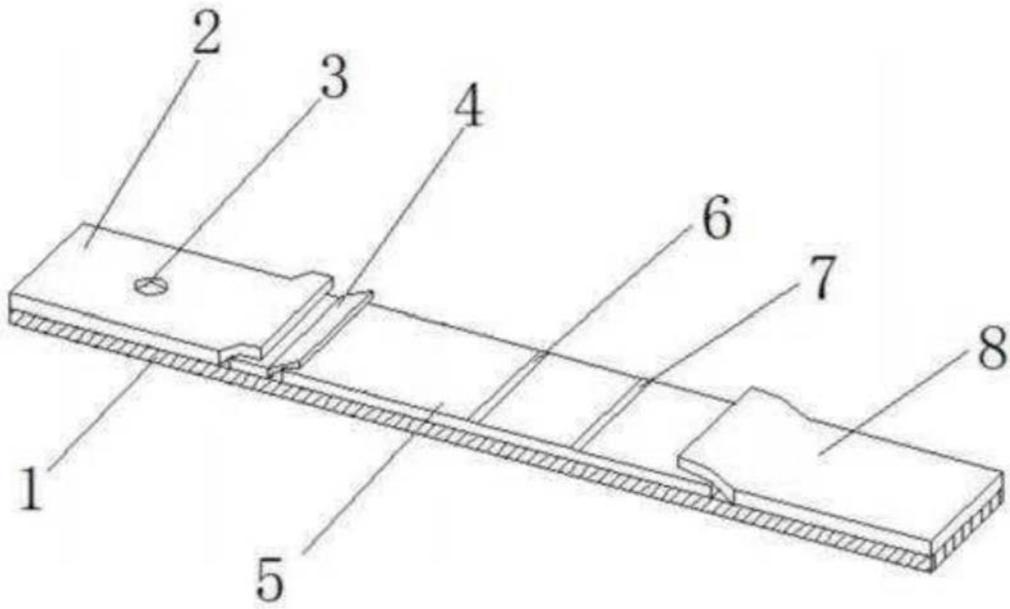


图1

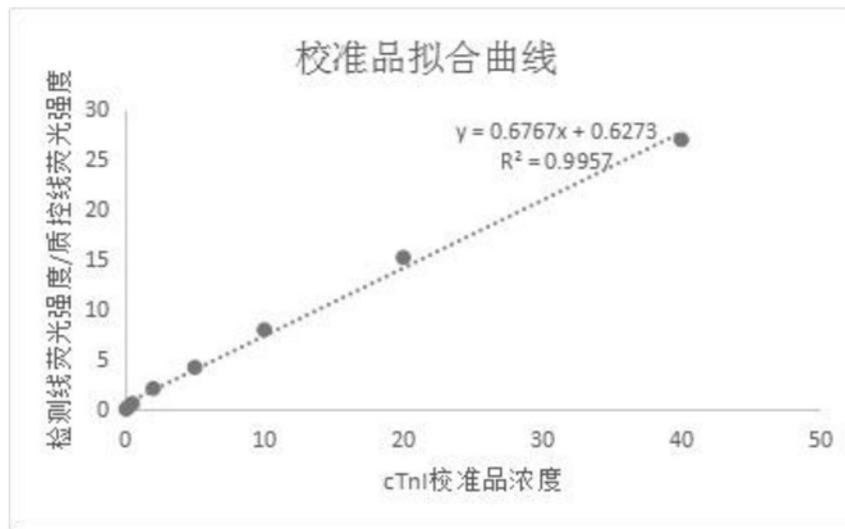


图2

专利名称(译)	一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN110702901A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910957602.9	申请日	2019-10-10
[标]发明人	戴瞻		
发明人	戴瞻		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/68		
代理人(译)	李枝玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测心肌钙蛋白I的荧光免疫层析试纸，包括PVC底板；PVC底板上从左到右依次设有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫；样品垫的一端固定在PVC底板上，样品垫的另一端搭设在结合垫上，样品垫的中心处设有样品滴入孔；结合垫的一端固定在PVC底板上，结合垫的另一端搭设在硝酸纤维素膜上；硝酸纤维素膜上从左到右依次设有检测线和质控线，吸水垫的左端搭设在硝酸纤维素膜上。本发明检测试纸通过时间分辨免疫荧光微球对抗体蛋白进行标记，并且捕获的是cTnI与TnC的复合物，从而使得检测灵敏度更高。大大缩短了检测时间，效率高，具有良好的稳定性和重复性。

