



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102087293 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 08

(21) 申请号 201010619731. 6

(22) 申请日 2010. 12. 31

(71) 申请人 广州万孚生物技术有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城荔
枝山路 8 号

(72) 发明人 王继华 周楠

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 万志香 胡杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

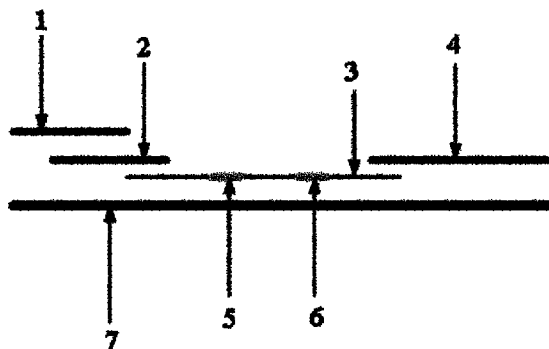
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条,所述试纸条由样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维膜包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,所述玻璃纤维膜标记垫上包被有荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体;所述硝酸纤维膜包被膜包括检测区和质控区,所述检测区包被有与所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体处于不同表位的另一种肌钙蛋白 I 单克隆抗体,所述质控区包被羊抗鼠 IgG。本发明具有操作安全、简便、适合单人份检测和快速等优点;仅 10 秒就能对全程肌钙蛋白 I 进行灵敏的定量测定,更快更精确的诊断疾病和鉴别感染,能检测感染病情和确定抗生素的疗效。



1. 一种全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条, 所述试纸条由样品垫 (1)、玻璃纤维膜标记垫 (2)、硝酸纤维膜包被膜 (3)、吸水纸 (4) 顺次搭接粘贴在底板 (7) 上构成, 其特征在于, 所述玻璃纤维膜标记垫 (2) 上包被有荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体; 所述硝酸纤维膜包被膜 (3) 包括检测区 (5) 和质控区 (6), 所述检测区 (5) 包被有与所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体处于不同表位的另一种肌钙蛋白 I 单克隆抗体, 所述质控区 (6) 包被羊抗鼠 IgG。

2. 根据权利要求 1 所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 0.1-1mg/ml, 按 1 : 20-1 : 500 的稀释度, 100 μ l/20-30cm 的喷膜用量涂覆在玻璃纤维膜标记垫上。

3. 根据权利要求 1 所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述检测区包被的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 0.5 ~ 2mg/ml, 在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/20-30cm。

4. 根据权利要求 1 所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述羊抗鼠 IgG 的浓度为 1.0 ~ 2mg/ml, 在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/20-30cm。

5. 根据权利要求 1 所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述荧光胶乳微粒的直径为 100-1000nm。

6. 根据权利要求 1 所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述荧光胶乳微粒受激发后发射的波长为 600nm-700nm。

7. 一种权利要求 1 所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

- A. 按常规方法共价活化荧光胶乳;
- B. 制备玻璃纤维膜标记垫

将活化后的荧光胶乳超声波 200W 处理 30 秒后, 按照 1 μ g ~ 125 μ g 抗体 /100 μ l 荧光胶乳的比例加入肌钙蛋白 I 单克隆抗体, 混匀后室温搅拌反应 1.5-3 小时, 离心洗涤 2-4 次, 每次 10000 ~ 15000xg、离心 5 ~ 15 分钟, 沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 秒, 用 PBS-TBN 恢复离心前体积, 按 100 μ l/20-30cm 的喷膜用量涂覆到玻璃纤维膜标记垫上;

- C. 制备硝酸纤维素包被膜

分别将与玻璃纤维膜标记垫上的肌钙蛋白 I 单克隆抗体位于不同表位另一株肌钙蛋白 I 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 用包被缓冲液分别调节至 0.5 ~ 2mg/ml 和 1.0 ~ 2mg/ml, 按膜包被液量为 100 μ l/20-30cm, 将肌钙蛋白 I 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 喷到硝酸纤维素包被膜上对应的检测区和质控区进行包被, 凉干, 备用;

D. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维素包被膜和吸水纸, 即得。

一种全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,尤其涉及一种全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 心血管疾病发病率高、致残率高、死亡率高、并发症多,对健康危害极为严重。心血管检验是整个心血管领域中的“瓶颈”学科,只有在尽可能段的时间内正确诊断疾病,才有可能及时有效的将先进治疗手段用于临床,使患者受益。随着对心血管诊断标志物研究的日益深入,更加明确了相关标志物对于临床意义,心脏标志物的检测可直接影响心血管病患者的临床诊断、危险分层、治疗方案选择和预后判断。因此缩短心脏标志物检测的周转时间(turn-aroundtime, TAT)对于临床早期诊断和早期治疗心血管疾病具有重要的意义,其中心肌肌钙蛋白(cTn)又是目前心血管疾病临床敏感性和特异性最好的心肌损伤标志物,已成为心肌组织损伤(如心肌梗死)最重要的诊断依据。

[0003] 在心脏疾病的临床诊断与筛查过程中,各种检测技术的应用为及时早发现、诊断和治疗提供了严格的科学依据。目前常用的心脏疾病检测诊断方法,主要包括:非实验室诊断的如家族心脏病史调查、心电图检查、X射线胸透检查、心电图负荷实验、心导管术、心脏超声波检查等和实验室检验的如心脏标志物肌酸激酶(CK)与肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白 I(cTnI)或肌钙蛋白 T(cTnT)、肌红蛋白(Myoglobin)、BNP 或 NT-proBNP 检测等。

[0004] 心脏疾病非实验室检测操作需要专业的仪器设备和人员,成本高;实验室方法心脏标志物的检测目前已经广泛应用于心脏疾病的检测诊断,但主要集中在检验科或生化室的如贝克曼、西门子、罗氏、德灵等大型生化检测系统,由于检测成本高、样本检测周转时间较长,通常也很难保证心脏标志物对于时间的要求,血管病发紧急,预后危重,所以心脏标志物的 POCT(POINT-OF-CAREtesting)检测是发展最快的一部分。目前市场上主要的检测系统包括:美国 Biosite 的 Biosite Triage 检测系统、加拿大的 Response 的 RAMP 检测系统,美国 Abbott 的 i-SATA 检测系统以及日本 Mitsubishi Kagaku Iatron 的 Pathfast 检测系统等。

[0005] 荧光免疫分析方法(fluoroimmunoassay, FLA)是近年来发展起来的一种微量分析方法,是目前最灵敏的微量分析技术之一,根据荧光的光谱和荧光强度,对物质进行定性或定量分析,具有高灵敏度、选择性强、需样量少和操作简便等优点。其检测灵敏度较放射免疫分析(RIA)高出多个数量级;其测定灵敏度通常比分光光度法高2-4个数量级,在生化分析中的应用较为广泛。但目前的荧光免疫分析绝大多数为液相的均相体系,试剂受制于保存条件与效期,不利于现场、基层单位的项目开展。而固相荧光免疫分析法则在保持高灵敏度的同时,又很好的解决试剂的保存、现场操作的问题,成为便携式诊断医疗器械的研究热点。该技术尚未在疾病诊断领域获得较广泛的运用,在国际上属于领先技术,在国内处于初级研究阶段。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术中存在的不足,提供一种灵敏度高、稳定性强、测定准确的全程肌钙蛋白 I 检测试纸条。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0008] 一种全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条,所述试纸条由样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维素膜包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成,所述玻璃纤维膜标记垫上包被有荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜包被膜包括检测区和质控区,所述检测区包被有与所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体处于不同表位的另一种肌钙蛋白 I 单克隆抗体,所述质控区包被羊抗鼠 IgG。

[0009] 优选地,所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 0.1-1mg/ml,按 1:20-1:500 的稀释度,100 μ l/20-30cm 的喷膜用量涂覆在玻璃纤维膜标记垫上。所述检测区包被的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 0.5 ~ 2mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/20-30cm。所述羊抗鼠 IgG 的浓度为 1.0 ~ 2mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/20-30cm。

[0010] 优选地,所述荧光胶乳微粒的直径为 100-1000nm。所述荧光胶乳微粒受激发后发射的波长为 600nm-700nm。

[0011] 本发明还提供了一种制备全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条的方法,采取了以下技术方案:

[0012] 包括以下步骤:

[0013] A. 按常规方法共价活化荧光胶乳;

[0014] B. 制备玻璃纤维膜标记垫

[0015] 将活化后的荧光胶乳超声波 200W 处理 30 秒后,按照 1 μ g ~ 125 μ g 抗体/100 μ l 荧光胶乳的比例加入肌钙蛋白 I 单克隆抗体,混匀后室温搅拌反应 1.5-3 小时,离心洗涤 2-4 次,每次 10000 ~ 15000xg、离心 5 ~ 15 分钟,沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 秒,用 PBS-TBN 恢复离心前体积,按 100 μ l/20-30cm 的喷膜用量涂覆到玻璃纤维膜标记垫上;

[0016] C. 制备硝酸纤维素包被膜

[0017] 分别将与玻璃纤维膜标记垫上的肌钙蛋白 I 单克隆抗体位于不同表位另一株肌钙蛋白 I 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 用包被缓冲液分别调节至 0.5 ~ 2mg/ml 和 1.0 ~ 2mg/ml,按膜包被液量为 100 μ l/20-30cm,将肌钙蛋白 I 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 喷到硝酸纤维素包被膜上对应的检测区和质控区进行包被,凉干,备用;

[0018] D. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维素包被膜和吸水纸,即得。

[0019] 本发明所述的一种肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条的检测原理是双抗体夹心法,将直径范围 0.01 μ m ~ 1 μ m 的荧光胶乳微球与一种肌钙蛋白 I 抗体偶联,当此荧光胶乳标记的肌钙蛋白 I 抗体与检测样本中足够的肌钙蛋白 I 抗原结合形成复合物,该复合物在层析作用下移动至包被膜的检测区,在包被膜的检测区包被有能与肌钙蛋白 I 抗原的另一种抗体,该抗体结合在肌钙蛋白 I 抗原的另一表位上,形成双抗体夹心的复合物。利用荧光定量

光谱检测系统,由光源激发包被膜上检测区 T 线处聚积的荧光胶乳,荧光胶乳发射出的荧光被相应的检测系统接收,并通过光电变换、光电转化等过程将光电信号转化成电信号,并由系统中设置的自动控制系统将信号输出,显示出最终的定量结果。由于选择的荧光胶乳的种类的不同,其激发/发射光的波长 λ 以及自动控制系统也会不同。

[0020] 本发明所述的肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条与放射性免疫、酶联免疫法检测肌钙蛋白 I 抗体相比,具有操作安全(无放射物污染)、简便(简单操作一步完成)、适合单人份检测和快速(3 分钟左右即可有结果)等优点;与免疫胶体金标记试纸条相比,本发明具有灵敏度更高、准确定量、多指标检测(不同波段的荧光胶乳标记应用于多指标同步定量检测)、标记稳定性更好等优点。

[0021] 本发明可以达到仅 10 秒就能对全程肌钙蛋白 I 进行灵敏的定量测定,更快更精确的诊断疾病和鉴别感染,能检测感染病情和确定抗生素的疗效。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明的全程定量检测肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条的结构示意图;

[0023] 附图标记:1、样品垫;2、玻璃纤维膜标记垫;3、硝酸纤维素包被膜;4、吸水纸;5、检测区;6、控制区;7、底板。

具体实施方式

[0024] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0025] 实施例 1

[0026] 在本发明实施例中,所采用的肌钙蛋白 I 抗体为常规单克隆抗体技术制备的单抗,利用双抗体夹心法检测肌钙蛋白 I 抗原的原理检测标本。

[0027] 如图 1 所示,在该实施例中,全程定量检测肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条,包括远端和近端,样品垫 1 位于试纸条的近端,它含有一个亲水性的孔状隔膜,样品垫 1 是加样区,用于吸取待检测肌钙蛋白 I 检测样本。样品垫 1 与远端之间,依次搭接有玻璃纤维膜标记垫 2、硝酸纤维素膜包被膜 3 和吸水纸 4。样品垫 1、玻璃纤维膜标记垫 2、硝酸纤维素包被膜 3 和吸水纸 4 都设置在底板 7 上。

[0028] 在该实施例中,玻璃纤维膜标记垫 2 上是使用特定的激发光(470nm)/发射光(525nm)波长的荧光胶乳(直径约 300nm)标记 1 株肌钙蛋白 I 单克隆抗体(0.5mg/ml);硝酸纤维素包被膜 3 的检测区 5(T 线)处采用肌钙蛋白 I 的另一株单克隆抗体(0.5mg/ml)来包被。在包被膜 3 的质控区 6 处使用浓度为 1mg/ml 的羊抗鼠 IgG 进行包被,起到过滤的作用,防止血清中的非特异性鼠 IgG 对质控区、检测区处反应的影响。

[0029] 在该实施例中,全程定量检测肌钙蛋白 I 的免疫层析试纸条的制备包括以下步骤:

[0030] 1. 荧光胶乳的共价活化

[0031] 超声波处理胶乳微球体 30 秒后,调节胶乳微球体浓度为 $1.0 \times 10^{12} \sim 1.0 \times 10^{13}$ /ml, 10000 ~ 15000xg 离心 10 分钟,离心后收集沉淀物用蒸馏水或者 100mM pH6.0 磷酸钠溶液溶解,并超声波 200W 处理 30 秒;先加入 50 μ l 的 100mg/ml EDC,震荡混匀,再加入 50 μ l 的 50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(S μ lfo-NHS),震荡混匀;室温孵育 30 分钟后 10000 ~

15000xg、离心 5 ~ 15 分钟,沉淀用 100mM、pH5.0 ~ 6.0 的柠檬酸缓冲液溶解,放置在 2 ~ 8℃条件下备用;

[0032] 2. 荧光胶乳微粒标记蛋白的制备

[0033] 利用常规方法从体液中分离肌钙蛋白 I,用肌钙蛋白 I 免疫小鼠,与骨髓瘤细胞融合,用 ELISA 方法鉴别,鉴别出来的杂交瘤在腹水中培养,筛选阳性克隆,分离纯化肌钙蛋白 I 单抗。选择 2 株不同表位的肌钙蛋白 I 单抗,分别作为标记抗体和包被抗体;

[0034] 将活化后的荧光胶乳超声波 200W 处理 30 秒后,按照 50 μ g 标记抗体/100 μ l 荧光胶乳的比例加入肌钙蛋白 I 单克隆抗体,混匀后室温搅拌反应 2 小时,离心洗涤 3 次,每次 10000 ~ 15000xg、离心 10 分钟,沉淀用 PBS-TBN 溶解并超声波 100W 处理 30 秒,用 PBS-TBN 恢复离心前体积,按 100 μ l/20cm 的喷膜用量涂覆到玻璃纤维膜标记垫上;

[0035] 3. 制备硝酸纤维素包被膜

[0036] 分别将与玻璃纤维膜标记垫上的肌钙蛋白 I 单克隆抗体位于不同表位另一株肌钙蛋白 I 单克隆抗体(包被抗体)和羊抗鼠 IgG 用包被缓冲液分别调节至 0.5mg/ml 和 1mg/ml,按膜包被液量为 100 μ l/20cm,将肌钙蛋白 I 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 喷到硝酸纤维素包被膜上对应的检测区和质控区进行包被,检测区和质控区间隔 3-8mm,在湿度 < 30%、室温下凉干 12-24 小时,封袋,凉干,备用;

[0037] 4. 在底板 5 上依次相互搭接地粘贴样品垫 1、玻璃纤维膜标记垫 2、硝酸纤维素包被膜 3 和吸水纸 4 得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0038] 实施例 2

[0039] 该实施例中的检测试纸条结构均与实施例 1 相同。

[0040] 所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 0.1mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/25cm。所述检测区包被的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 1mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/25cm。所述羊抗鼠 IgG 的浓度为 1.5mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/25cm。

[0041] 该实施例的制备方法除了步骤 2 中肌钙蛋白 I 单克隆抗体:荧光胶乳为 15 μ g/100 μ l。其余均与实施例 1 相同,使用方法也与实施例 1 相同。

[0042] 实施例 3

[0043] 该实施例中的检测试纸条结构均与实施例 1 相同。

[0044] 所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 0.8mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/28cm。所述检测区包被的肌钙蛋白 I 单克隆抗体的浓度为 2mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/28cm。所述羊抗鼠 IgG 的浓度为 2mg/ml,在试纸条上的喷膜用量为 100 μ l/28cm。

[0045] 该实施例的制备方法除了步骤 2 中肌钙蛋白 I 单克隆抗体:荧光胶乳为 100 μ g/100 μ l。其余均与实施例 1 相同,使用方法也与实施例 1 相同。

[0046] 在本发明的一个实施例中,全程定量检测肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条,在使用时,组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳设有两个开孔,加样窗和显示孔,加样窗对应于所述的全程定量检测肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条样品垫 1,结果显示窗对应于所述全程定量检测肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条的检测区 5 和控制区 6,该全程定量检测肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条可以从该塑料外壳中取出。

[0047] 本发明的一个实施例中,用来测试免疫层析试纸条的荧光定量光谱检测系统,主要包含荧光光源系统、检测系统及自动软件分析控制系统。

[0048] 荧光光源系统发出单色激发光,照射在试纸条的检测区,检测区通过反应凝集的荧光胶乳在激发光的作用下,发射出荧光信号,该荧光信号被检测系统捕获,检测系统由光电倍增管和固态检测器组成,检测系统接收入射荧光信号,由光电倍增管实现光信号的放大,然后由固态检测器将光信号转换为电信号,由电信号读出电路将电信号输出,再经过自动软件分析控制系统处理,在显示屏上显示结果。实现对样本的精确定量。

[0049] 对实施例 1-3 的试剂条进行了性能方面的测定,利用实施例 1-3 所述的试剂条对本发明肌钙蛋白 I 的最低检测限是 0.03ng/ML,以 BECKMAN COULTER 公司的 access2 试剂为对照检测标准,总符合率达到 99.1%以上,与临床结果的相关系数 $R^2 > 0.95$; $P < 0.01$; 按 $\alpha = 0.05$; 具有正相关关系。

[0050] 在精密度方面,利用实施例 1-3 的试剂条对含量分别为高值、低值和中值的样本,连续检测至少 10 次,计算变异系数 (CV)。对于肌钙蛋白 I 含量高值 (21.4ng/ML)、中值 (3.39ng/ML)、低值 (0.34ng/ML) 血液样本各一例分别测定 10 次,根据其测定数据,利用 SPSS 统计酸碱分析得 (批内肌钙蛋白重复测定结果以均值 \pm 标准差表示) 高值 (21.92 \pm 0.55)ng/ml, CV2.5%; 中值 (3.18 \pm 0.18)ng/ml, CV5.5%; 低值 (0.33 \pm 0.02)ng/ml, CV7.6%; 检验结果 CV 值均小于 15%。

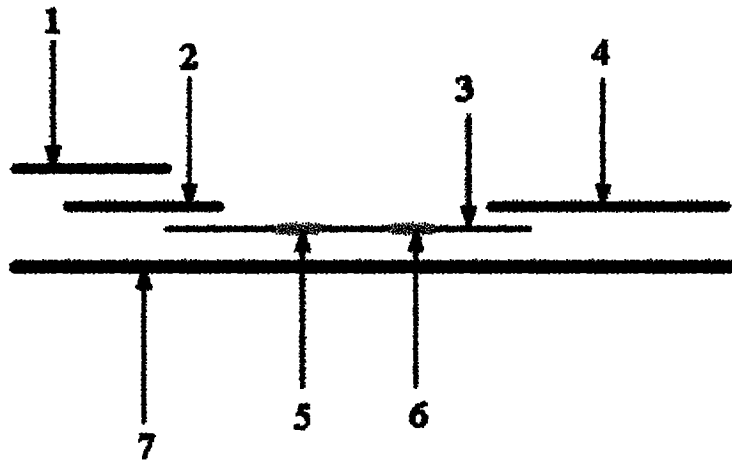


图 1

专利名称(译)	一种全程定量检测肌钙蛋白I的免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN102087293A	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	CN201010619731.6	申请日	2010-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
[标]发明人	王继华 周楠		
发明人	王继华 周楠		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	胡杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种全程定量检测肌钙蛋白I的免疫层析试纸条，所述试纸条由样品垫、玻璃纤维膜标记垫、硝酸纤维膜包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成，所述玻璃纤维膜标记垫上包被有荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白I单克隆抗体；所述硝酸纤维膜包被膜包括检测区和质控区，所述检测区包被有与所述荧光胶乳微粒标记的肌钙蛋白I单克隆抗体处于不同表位的另一种肌钙蛋白I单克隆抗体，所述质控区包被羊抗鼠IgG。本发明具有操作安全、简便、适合单人份检测和快速等优点；仅10秒就能对全程肌钙蛋白I进行灵敏的定量测定，更快更精确的诊断疾病和鉴别感染，能检测感染病情和确定抗生素的疗效。

