



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799355 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201910109523.2

(22)申请日 2019.02.06

(71)申请人 吉林双正生物工程有限公司

地址 130000 吉林省长春市北湖科技开发
区盛北大街3333号

(72)发明人 李志兴 赵旻 李欣

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 魏征骥

(51)Int.Cl.

G01N 33/78(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

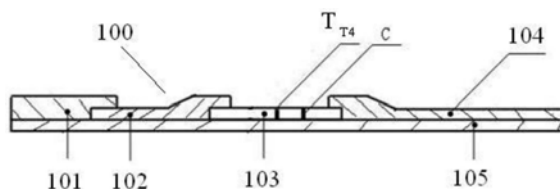
权利要求书3页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称

甲功五项的荧光微球联合检测装置及其制
备方法

(57)摘要

本发明涉及一种甲功五项的荧光微球联合检测装置及其制备方法,属于医疗检测设备领域。样品垫、免疫荧光交联抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联抗体玻璃纤维膜搭接,免疫荧光交联抗体玻璃纤维膜另一端与样品垫搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线T和质控线C;检测线分别标记甲状腺素抗体、三碘甲状腺原氨酸抗体、促甲状腺激素抗体,质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。优点是将甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸和促甲状腺激素抗体包被于硝酸纤维素膜膜上,特异性强,能同时检测标本中T3抗体、T4抗体、TSH抗体、游离T3抗体、游离T4抗体,操作简便,实用性强。



1. 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置,其特征在于:是由以下五种检测装置组成:

检测装置一:样品垫一、免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫一搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素T4抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

检测装置二:样品垫一、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫一搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{T3} 标记三碘甲状腺原氨酸T3抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

检测装置三:样品垫一、免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫一搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线 T_{TSH} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记促甲状腺激素TSH抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

检测装置四:样品垫二、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫二搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记三碘甲状腺原氨酸T3抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

检测装置五:样品垫二、免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫二搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素T4抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

2. 如权利要求1所述一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于,包括下列步骤:

(a) 免疫荧光微球的制备,取100u1固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000u1,加入到EP管中,取40u1的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40u1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)加入微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时,将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000~14000r/min、15~25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

(b) 免疫荧光微球分别交联甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加抗体;加入抗体后,反应1~1.5min后,再到超声波上超声25~35秒,然后再反应1~1.5小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1~1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000~14000r/min,15~20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

(c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,分别制得免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜和免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜;

(d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,分别喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体、甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体为检测线T,喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1 μ l/cm,制得各硝酸纤维素膜;

(e) 五种检测装置的制备,其中

制备检测装置一:

将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

制备检测装置二:

将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸T3抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

制备检测装置三:

将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的促甲状腺激素TSH抗体为检测线T_{TSH}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

制备检测装置四:

将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸T3抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

制备检测装置五:

将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳。

3. 根据权利要求2所述一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(b)、(c)的球缓冲液由Tris-HCl液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

4. 根据权利要求2所述一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在

于:所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200 μ L、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液和25 μ L、浓度40 μ mol/L甲状腺素T4、三碘甲状腺原氨酸T3、促甲状腺激素TSH抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25 $^{\circ}$ C,转速为200~300r/m条件下,将上述混合溶液分别在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的各混合溶液用超速离心机在13 000r/m转速条件下,使用超纯水分别彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体,所得沉淀物即为石墨-甲状腺素T4抗体探针复合物、石墨-三碘甲状腺原氨酸T3抗体探针复合物、石墨-促甲状腺激素TSH抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL,并在4 $^{\circ}$ C条件储存。

5.根据权利要求2所述一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后配成1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

6.根据权利要求2所述一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,其特征在于:所述步骤(e)中的预处理的检测装置一样品垫一、检测装置二样品垫一、检测装置三样品垫一采用样品垫处理液一200 μ L/cm,所述样品垫处理液一由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂Tween-80浓度为1%;

所述步骤(e)中的预处理的检测装置四样品垫二、检测装置五样品垫二采用样品垫处理液二200 μ L/cm,所述样品垫处理液二由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂浓度为1%和抗甲状腺球蛋白抗体10 μ g/mL组成。

甲功五项的荧光微球联合检测装置及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测设备领域,特别涉及一种甲功五项的联合检测装置及其制备方法,利用荧光免疫层析技术定量检测临床标本(全血/血清/血浆)中人甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、促甲状腺激素(TSH)、游离T3、游离T4的检测装置及其制备方法,可实现甲状腺功能标志物的灵敏、特异、快速检测。

背景技术

[0002] 甲状腺疾病是临床上的一类常见病。此类疾病主要包括甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进。甲状腺功能减退又被称为“甲减”,此病多因甲状腺分泌的甲状腺激素总量过少所致,此病患者主要的临床表现为怕冷、记忆力及食欲减退、轻度贫血等症状。甲状腺功能亢进又被称为“甲亢”,此病则是由于甲状腺分泌的甲状腺激素总量过多所致,此病患者主要的临床表现为食欲旺盛、心动过速、焦躁等,此病常给患者的机体带来明显的损伤。相关的研究指出,用合理、有效的检测方法评估甲亢及甲减患者甲状腺的功能,对于诊断与治疗均甲亢与甲减具有非常重要的意义。在临床上,多使用甲功五项联检法对这些患者的甲状腺功能进行测定,“甲功五项”指的是甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、促甲状腺激素(TSH)、游离T3、游离T4。甲功五项联检法在评估甲状腺功能方面具有非常重要的作用,此检测方法在诊断甲状腺疾病时的敏感性和特异性要高于单独对甲功五项进行检测。

[0003] 放射免疫法(radioimmunoassay,RIA)采用放射性碘元素标记抗体检测血清中甲状腺素是传统的检测方法。由于检测过放射免疫分析技术的运用始于20世纪60年代,至今已有40多年历史,目前国内仍有些临床实验室沿用此法测定血清FT3、FT4、TSH。RIA是利用放射性核素标记抗原或抗体,然后与被测的抗体或抗原结合,形成抗原抗体复合物的原理来进行检测的分析法。放射免疫分析技术自创立以来,由于其测定的灵敏度高、特异性强、精密度良好,并可以对抗原半抗原进行测定,常用于各种激素、微量蛋白、肿瘤标志物和药物等微量物质的检测。由于大多数检验项目均有RIA或IRMA试剂盒提供,目前仍然是基层对超微量物质测定的主要手段。但是在检测过程中存在容易产生放射性污染,检测结果受放射性元素的衰减等影响,检测过程多孔加样过程需要手工操作,精确度相对较低等不足。

[0004] 时间分辨荧光免疫法(TRFIA)利用了具有独特荧光特性的3价稀土离子及其螯合物为示踪物代替荧光物质、酶、同位素、化学发光物质等,标记抗体/抗原,待抗原抗体反应发生后,用TRFIA检测仪测定反应产物中的荧光强度,根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,判断反应体系中分析物的浓度,从而达到定量分析。时间分辨荧光免疫法(TRFIA)由于其低本底,高灵敏度和特异性,荧光寿命长,无放射性同位素污染等特点,自20世纪80年代Pettersson和Eskola等人首次报到后得到了迅速发展,并且广泛应用于临床疾病诊断。

[0005] 在荧光免疫层析检测中,荧光抗体的淬灭及抗体包被浓度影响实验结果。蛋白质固着于硝酸纤维素膜(NC膜)作为待测样本的捕获试剂。由于检测结果完全取决于捕获试剂在膜上达到良好的吸附效果,因此蛋白质在膜上均一、良好的吸附对胶体金检测结果非常重要。如果NC膜上结合的蛋白量不足或者蛋白结合力不够强,就会出现相当多的问题,在检

测结果的检测线上非常明显。如果膜上结合的蛋白量太低,那么在结果中检测线显色较弱而且检测灵敏度降低。如果蛋白不能牢固的吸附于NC膜,那么在蛋白吸附于NC膜以前发生扩散,从而导致检测线较宽、显色较弱而不是鲜艳而清晰,使检测结果难以解释。在极端条件下,如果蛋白与NC膜的物理吸附作用太弱,流过的蛋白检测物和表面活性剂溶液可能将固着的蛋白从NC膜上洗掉,从而显示较宽或者根本不清晰的检测线,难以解释检测结果。

发明内容

[0006] 本发明提供甲功五项的荧光微球联合检测装置及其制备方法,以解决现有技术存在的荧光抗体易淬灭和NC膜吸附蛋白量不足、结合力不强的问题。本发明制备的人甲状腺素(T₄)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、促甲状腺激素(TSH)、游离T₃、游离T₄联合检测装置,可实现甲状腺功能标志物的灵敏、特异、快速检测,提高了对甲状腺疾病患者进行甲状腺功能的合理综合判定,能够快速、准确进行甲状腺疾病的早期预警及病情风险判断。

[0007] 本发明采取的技术方案是,一种甲功五项的荧光微球联合检测装置,是由以下五种检测装置组成:

[0008] 检测装置一:样品垫一、免疫荧光交联甲状腺素T₄抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联甲状腺素T₄抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素T₄抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫一搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线T_{T₄}和质控线C,该检测线T_{T₄}标记甲状腺素T₄抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0009] 检测装置二:样品垫一、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T₃抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T₃抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T₃抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫一搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线T_{T₃}和质控线C,该检测线T_{T₃}标记三碘甲状腺原氨酸T₃抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0010] 检测装置三:样品垫一、免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫一搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线T_{TSH}和质控线C,该检测线T_{TSH}标记促甲状腺激素TSH抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0011] 检测装置四:样品垫二、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T₃抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T₃抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T₃抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫二搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线T_{T₃}和质控线C,该检测线T_{TSH}标记三碘甲状腺原氨酸T₃抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0012] 检测装置五:样品垫二、免疫荧光交联甲状腺素T₄抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板,所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联甲状腺素T₄抗体玻璃纤维膜搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素T₄抗体玻璃纤维膜的另一端与样品垫二搭接;所述硝酸纤维素膜上设置检测线T_{T₄}和质控线C,该检测线T_{T₄}标记甲状腺素T₄抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0013] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,包括下列步骤:

[0014] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到EP管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)加入微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时,将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000~14000r/min、15~25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0015] (b) 免疫荧光微球分别交联甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加抗体;加入抗体后,反应1~1.5min后,再到超声波上超声25~35秒,然后再反应1~1.5小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1~1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000~14000r/min,15~20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0016] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,分别制得免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜和免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜;

[0017] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,分别喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体、甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体为检测线T,喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得各硝酸纤维素膜;

[0018] (e) 五种检测装置的制备,其中

[0019] 制备检测装置一:

[0020] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0021] 制备检测装置二:

[0022] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸T3抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0023] 制备检测装置三:

[0024] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联促甲状腺激素TSH抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的促甲状腺激素TSH抗体为检测线T_{TSH}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0025] 制备检测装置四:

[0026] 将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的三碘甲状腺原氨酸T3抗体玻璃纤维膜,步骤

(d) 制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸T3抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0027] 制备检测装置五:

[0028] 将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的甲状腺素T4抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳。

[0029] 所述步骤(b)、(c)的球缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

[0030] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液和25μL、浓度40μmol/L甲状腺素T4、三碘甲状腺原氨酸T3、促甲状腺激素TSH抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200~300r/m条件下,将上述混合溶液分别在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的各混合溶液用超速离心机在13 000r/m转速条件下,使用超纯水分别彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的甲状腺素T4抗体、三碘甲状腺原氨酸T3抗体、促甲状腺激素TSH抗体,所得沉淀物即为石墨-甲状腺素T4抗体探针复合物、石墨-三碘甲状腺原氨酸T3抗体探针复合物、石墨-促甲状腺激素TSH抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存。

[0031] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后配成1%,经0.22μm滤膜过滤,备用。

[0032] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置一样品垫一、检测装置二样品垫一、检测装置三样品垫一采用样品垫处理液一200ul/cm,所述样品垫处理液一由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂Tween-80浓度为1%;

[0033] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置四样品垫二、检测装置五样品垫二采用样品垫处理液二200ul/cm,所述样品垫处理液二由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂浓度为1%和抗甲状腺球蛋白抗体10ug/ml组成。

[0034] 本发明聚乙烯醇的结构中含有多个羟基可供偶联,活化过程简单,方便NC膜表面固定蛋白。聚乙烯醇水凝胶由于具有与人体自然组织相近的含水量、弹性模量、低摩擦系数及较高的机械强度、丰富的孔漏网络结构、良好的生物相容性等特点,在生物医学领域有着广泛的应用。常规条件下,单位面积的NC膜上结合抗体的数量是有限的,采用聚乙烯醇处理之后,可以让单位面积的NC膜上结合抗体数量增加,进而可以实现更高的检测灵敏度。Triton X-100可与NC膜的位点发生吸附作用,在蛋白包被后,可以吸收蛋白的结合水,导致蛋白更加疏水,这样蛋白与NC膜的结合更加牢固,通过疏水作用明显提高蛋白的包被效率。综上,多聚乙烯醇和Triton X-100组合配方,可以从电荷作用和疏水作用两方面来提高NC

膜蛋白的包被效率。

[0035] 本发明在改善NC膜对蛋白吸附基础上,探讨蛋白对NC膜吸附效果也是提高胶体金灵敏度的另一途径。石墨纳米颗粒具有较好的稳定性、易于制备、生物相容性较好及较低的免疫原性等优势,在生物医学领域研究较为广泛。但在荧光免疫层析技术中尚未有报道应用。本发明通过石墨纳米颗粒对NC膜包被抗体的影响,先将划膜用的抗体先与石墨纳米颗粒结合,封闭,离心纯化,去掉未结合的抗体,然后复溶到一定比例,然后划膜,这样一个石墨粒子可以结合多个抗体,从而增加了包被抗体效率,灵敏度也会大大提高。又由于石墨纳米颗粒是无色透明的,所以不会影响显色,只是借助其更大的表面积增加抗体的包被效率,提高荧光免疫层析实验的灵敏度。

[0036] 本发明为了提高荧光免疫层析技术的灵敏度,通过对硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液进行了预处理,将包被NC的抗体与石墨纳米颗粒结合,达到了提高试纸灵敏度的目的。

[0037] 本发明的有益效果在于:

[0038] 1、本发明的检测装置结构新颖,将甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)和TSH抗体包被于硝酸纤维膜膜上,特异性强,既能同时检测标本中T3抗体、T4抗体、TSH抗体、游离T3抗体、游离T4抗体,又没有增加生产操作的复杂度。

[0039] 2、免疫胶体金制备步骤中,通过配合合适的荧光微球缓冲液和样品垫处理液,可保证免疫荧光微球释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫微球的用量,节约成本。

[0040] 3、游离T3、游离T4样品垫处理液可有效的阻断已与蛋白结合T3、T4,配方简单,有效。

[0041] 4、本发明对硝酸纤维素膜进行预处理,对包被硝酸纤维素膜的抗体进行了修饰,提高了检测试纸灵敏度、特异性。

[0042] 5、本发明的检测装置操作简便,不需要专业人员操作。实用性强。

附图说明

[0043] 图1是本发明检测标本中甲状腺素T4抗体的检测装置一的结构示意图;

[0044] 图2是本发明检测标本中三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体的检测装置二的结构示意图;

[0045] 图3是本发明检测标本中促甲状腺激素(TSH)抗体的检测装置三的结构示意图;

[0046] 图4是本发明检测标本中游离三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体的检测装置四的结构示意图;

[0047] 图5是本发明检测标本中游离甲状腺素(T4)抗体的检测装置五的结构示意图。

具体实施方式

[0048] 实施例1

[0049] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置,是由以下五种检测装置组成:

[0050] 检测装置一100:样品垫一101、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102、硝酸纤维素膜103、吸收垫104分别粘贴在塑料板105,所述硝酸纤维素膜103的两端分别与吸收垫104、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102搭接,所述免疫荧光交联甲状

腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜102的另一端与样品垫一101搭接;所述硝酸纤维素膜103上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素 (T4) 抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0051] 检测装置二200:样品垫一201、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜202、硝酸纤维素膜203、吸收垫204分别粘贴在塑料板205,所述硝酸纤维素膜203的两端分别与吸收垫204、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜202搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜202的另一端与样品垫一201搭接;所述硝酸纤维素膜203上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{T3} 标记三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0052] 检测装置三300:样品垫一301、免疫荧光交联促甲状腺激素 (TSH) 抗体玻璃纤维膜302、硝酸纤维素膜303、吸收垫304分别粘贴在塑料板305,所述硝酸纤维素膜303的两端分别与吸收垫304、免疫荧光交联促甲状腺激素 (TSH) 抗体玻璃纤维膜302搭接,所述免疫荧光交联促甲状腺激素 (TSH) 抗体玻璃纤维膜302的另一端与样品垫一301搭接;所述硝酸纤维素膜303上设置检测线 T_{TSH} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记促甲状腺激素 (TSH) 抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0053] 检测装置四400:样品垫二401、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜402、硝酸纤维素膜403、吸收垫404分别粘贴在塑料板405,所述硝酸纤维素膜403的两端分别与吸收垫404、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜402搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜402的另一端与样品垫二401搭接;所述硝酸纤维素膜403上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0054] 检测装置五500:样品垫二501、免疫荧光交联甲状腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜502、硝酸纤维素膜503、吸收垫504分别粘贴在塑料板505,所述硝酸纤维素膜503的两端分别与吸收垫504、免疫荧光交联甲状腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜502搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜502的另一端与样品垫二501搭接;所述硝酸纤维素膜3上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素 (T4) 抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0055] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,包括下列步骤:

[0056] (a) 免疫荧光微球的制备,取100u1固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000u1,加入到EP管中,取40u1的N-羟基琥珀酰亚胺液 (NHS) 加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40u1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液 (EDC) 加入微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时,将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件8000r/min、15min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0057] (b) 免疫荧光微球分别交联甲状腺素 (T4) 抗体、三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体、促甲状腺激素 (TSH) 抗体,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加抗体;加入抗体后,反应1min后,再到超声波上超声25秒,然后再反应1小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为8000r/min,15min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0058] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,分别制得免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜和免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜;

[0059] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,分别喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体、甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体为检测线T,喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得各硝酸纤维素膜;

[0060] (e) 五种检测装置的制备,其中

[0061] 制备检测装置一:

[0062] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0063] 制备检测装置二:

[0064] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0065] 制备检测装置三:

[0066] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的促甲状腺激素(TSH)抗体为检测线T_{TSH}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0067] 制备检测装置四:

[0068] 将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0069] 制备检测装置五:

[0070] 将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0071] 所述步骤(b)、(c)的球缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5%,海藻糖浓度为1%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%;

[0072] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨

纳米颗粒溶液和25 μ L、浓度40 μ mol/L甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、促甲状腺激素(TSH)抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25 $^{\circ}$ C,转速为200r/m条件下,将上述混合溶液分别在摇床内避光震荡培养2h,反应后的各混合溶液用超速离心机在13000r/m转速条件下,使用超纯水分别彻底离心洗涤3次,分别去除上清液中过量的未反应的甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体,所得沉淀物即为石墨-甲状腺素(T4)抗体探针复合物、石墨-三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体探针复合物、石墨-促甲状腺激素(TSH)抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL,并在4 $^{\circ}$ C条件储存;

[0073] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后配成1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0074] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置一样品垫一、检测装置二样品垫一、检测装置三样品垫一采用样品垫处理液一200 μ l/cm,所述样品垫处理液一由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂Tween-80浓度为1%;

[0075] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置四样品垫二、检测装置五样品垫二采用样品垫处理液二200 μ l/cm,所述样品垫处理液二由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂浓度为1%和抗甲状腺球蛋白抗体10 μ g/ml组成。

[0076] 实施例2

[0077] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置,是由以下五种检测装置组成:

[0078] 检测装置一100:样品垫一101、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102、硝酸纤维素膜103、吸收垫104分别粘贴在塑料板105,所述硝酸纤维素膜103的两端分别与吸收垫104、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102的另一端与样品垫一101搭接;所述硝酸纤维素膜103上设置检测线T_{T4}和质控线C,该检测线T_{T4}标记甲状腺素(T4)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0079] 检测装置二200:样品垫一201、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜202、硝酸纤维素膜203、吸收垫204分别粘贴在塑料板205,所述硝酸纤维素膜203的两端分别与吸收垫204、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜202搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜202的另一端与样品垫一201搭接;所述硝酸纤维素膜203上设置检测线T_{T3}和质控线C,该检测线T_{T3}标记三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0080] 检测装置三300:样品垫一301、免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜302、硝酸纤维素膜303、吸收垫304分别粘贴在塑料板305,所述硝酸纤维素膜303的两端分别与吸收垫304、免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜302搭接,所述免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜302的另一端与样品垫一301搭接;所述硝酸纤维素膜303上设置检测线T_{TSH}和质控线C,该检测线T_{TSH}标记促甲状腺激素(TSH)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0081] 检测装置四400:样品垫二401、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤

维膜402、硝酸纤维素膜403、吸收垫404分别粘贴在塑料板405,所述硝酸纤维素膜403的两端分别与吸收垫404、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜402搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜402的另一端与样品垫二401搭接;所述硝酸纤维素膜403上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0082] 检测装置五500:样品垫二501、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜502、硝酸纤维素膜503、吸收垫504分别粘贴在塑料板505,所述硝酸纤维素膜503的两端分别与吸收垫504、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜502搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜502的另一端与样品垫二501搭接;所述硝酸纤维素膜3上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素(T4)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0083] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,包括下列步骤:

[0084] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到EP管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)加入微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时,将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件11000r/min、20min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0085] (b) 免疫荧光微球分别交联甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加抗体;加入抗体后,反应1.2min后,再到超声波上超声30秒,然后再反应1.2小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1.2小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为11000r/min,18min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0086] (c) 采用缓冲液稀释步骤(b)的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,分别制得免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜和免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜;

[0087] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,分别喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体、甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体为检测线T,喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得各硝酸纤维素膜;

[0088] (e) 五种检测装置的制备,其中

[0089] 制备检测装置一:

[0090] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体为检测线 T_{T4} 、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0091] 制备检测装置二:

[0092] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体

玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸(T₃)抗体为检测线T_{T₃}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0093] 制备检测装置三:

[0094] 将预处理的样品垫一、步骤(c)制备的免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的促甲状腺激素(TSH)抗体为检测线T_{TSH}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0095] 制备检测装置四:

[0096] 将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的三碘甲状腺原氨酸(T₃)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸(T₃)抗体为检测线T_{T₃}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0097] 制备检测装置五:

[0098] 将预处理的样品垫二、步骤(c)制备的甲状腺素(T₄)抗体玻璃纤维膜,步骤(d)制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T₄)抗体为检测线T_{T₄}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0099] 所述步骤(b)、(c)的球缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为12%,海藻糖浓度为3%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.8%;

[0100] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T₄)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T₃)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200μL、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液和25μL、浓度40μmol/L甲状腺素(T₄)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、促甲状腺激素(TSH)抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200r/m条件下,将上述混合溶液分别在摇床内避光震荡培养2h,反应后的各混合溶液用超速离心机在13000r/m转速条件下,使用超纯水分别彻底离心洗涤3次,分别去除上清液中过量的未反应的甲状腺素(T₄)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T₃)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体,所得沉淀物即为石墨-甲状腺素(T₄)抗体探针复合物、石墨-三碘甲状腺原氨酸(T₃)抗体探针复合物、石墨-促甲状腺激素(TSH)抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL,并在4℃条件储存;

[0101] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后配成1%,经0.22μm滤膜过滤,备用;

[0102] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置一样品垫一、检测装置二样品垫一、检测装置三样品垫一采用样品垫处理液一200ul/cm,所述样品垫处理液一由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂Tween-80浓度为1%;

[0103] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置四样品垫二、检测装置五样品垫二采用样品垫处理液二200ul/cm,所述样品垫处理液二由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面

活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂浓度为1%和抗甲状腺球蛋白抗体10ug/ml组成。

[0104] 实施例3

[0105] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置,是由以下五种检测装置组成:

[0106] 检测装置一100:样品垫一101、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102、硝酸纤维素膜103、吸收垫104分别粘贴在塑料板105,所述硝酸纤维素膜103的两端分别与吸收垫104、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜102的另一端与样品垫一101搭接;所述硝酸纤维素膜103上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素(T4)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0107] 检测装置二200:样品垫一201、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜202、硝酸纤维素膜203、吸收垫204分别粘贴在塑料板205,所述硝酸纤维素膜203的两端分别与吸收垫204、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜202搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜202的另一端与样品垫一201搭接;所述硝酸纤维素膜203上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{T3} 标记三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0108] 检测装置三300:样品垫一301、免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜302、硝酸纤维素膜303、吸收垫304分别粘贴在塑料板305,所述硝酸纤维素膜303的两端分别与吸收垫304、免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜302搭接,所述免疫荧光交联促甲状腺激素(TSH)抗体玻璃纤维膜302的另一端与样品垫一301搭接;所述硝酸纤维素膜303上设置检测线 T_{TSH} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记促甲状腺激素(TSH)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0109] 检测装置四400:样品垫二401、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜402、硝酸纤维素膜403、吸收垫404分别粘贴在塑料板405,所述硝酸纤维素膜403的两端分别与吸收垫404、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜402搭接,所述免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体玻璃纤维膜402的另一端与样品垫二401搭接;所述硝酸纤维素膜403上设置检测线 T_{T3} 和质控线C,该检测线 T_{TSH} 标记三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0110] 检测装置五500:样品垫二501、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜502、硝酸纤维素膜503、吸收垫504分别粘贴在塑料板505,所述硝酸纤维素膜503的两端分别与吸收垫504、免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜502搭接,所述免疫荧光交联甲状腺素(T4)抗体玻璃纤维膜502的另一端与样品垫二501搭接;所述硝酸纤维素膜3上设置检测线 T_{T4} 和质控线C,该检测线 T_{T4} 标记甲状腺素(T4)抗体;所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0111] 一种甲功五项的荧光微球联合检测装置的制备方法,包括下列步骤:

[0112] (a) 免疫荧光微球的制备,取100ul固含为1%的微球悬浮液,用超纯水稀释10倍,即1000ul,加入到EP管中,取40ul的N-羟基琥珀酰亚胺液(NHS)加入微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐液(EDC)加入微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时,将反应后的悬浮液用超声波超声,使管壁上的微球重新悬

浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件14000r/min、25min,倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀;

[0113] (b) 免疫荧光微球分别交联甲状腺素 (T4) 抗体、三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体、促甲状腺激素 (TSH) 抗体,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,然后边搅拌边分别滴加抗体;加入抗体后,反应1.5min后,再到超声波上超声35秒,然后再反应1.5小时,加牛血清白蛋白BSA分别进行封闭1.5小时,将封闭好的微球分别进行离心,速度为4000r/min,20min,将缓冲液分别加入到离心后的免疫荧光微球中,使各微球分散均匀,待用;

[0114] (c) 采用缓冲液稀释步骤 (b) 的免疫荧光微球获得免疫荧光微球溶液,用免疫荧光微球溶液分别喷涂于玻璃纤维垫,分别制得免疫荧光交联甲状腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜、免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜和免疫荧光交联促甲状腺激素 (TSH) 抗体玻璃纤维膜;

[0115] (d) 将硝酸纤维素膜用聚乙烯醇处理液预处理后,分别喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素 (T4) 抗体、三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体、促甲状腺激素 (TSH) 抗体、甲状腺素 (T4) 抗体、三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体为检测线T,喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,各检测线喷点量1ul/cm,制得各硝酸纤维素膜;

[0116] (e) 五种检测装置的制备,其中

[0117] 制备检测装置一:

[0118] 将预处理的样品垫一、步骤 (c) 制备的免疫荧光交联甲状腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜,步骤 (d) 制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素 (T4) 抗体为检测线T_{T4}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0119] 制备检测装置二:

[0120] 将预处理的样品垫一、步骤 (c) 制备的免疫荧光交联三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜,步骤 (d) 制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0121] 制备检测装置三:

[0122] 将预处理的样品垫一、步骤 (c) 制备的免疫荧光交联促甲状腺激素 (TSH) 抗体玻璃纤维膜,步骤 (d) 制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的促甲状腺激素 (TSH) 抗体为检测线T_{TSH}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0123] 制备检测装置四:

[0124] 将预处理的样品垫二、步骤 (c) 制备的三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体玻璃纤维膜,步骤 (d) 制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的三碘甲状腺原氨酸 (T3) 抗体为检测线T_{T3}、喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0125] 制备检测装置五:

[0126] 将预处理的样品垫二、步骤 (c) 制备的甲状腺素 (T4) 抗体玻璃纤维膜,步骤 (d) 制备的硝酸纤维素膜、且其喷点与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素 (T4) 抗体为检测线T_{T4}、喷点

羊抗兔IgG抗体作为质控线,吸收垫分别依次粘贴在塑料板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条分别装入塑料外壳;

[0127] 所述步骤(b)、(c)的球缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为20%,海藻糖浓度为5%,牛血清白蛋白BSA浓度为1%;

[0128] 所述步骤(d)与石墨纳米颗粒结合的甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体的制备方法是:以石墨作为载体,取200 μ L、浓度1mg/mL石墨纳米颗粒溶液和25 μ L、浓度40 μ mol/L甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、促甲状腺激素(TSH)抗体溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL,充分混匀后,设置摇床温度为25 $^{\circ}$ C,转速为200~300r/m条件下,将上述混合溶液分别在摇床内避光震荡培养2~3h,反应后的各混合溶液用超速离心机在13 000r/m转速条件下,使用超纯水分别彻底离心洗涤3~4次,分别去除上清液中过量的未反应的甲状腺素(T4)抗体、三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体、促甲状腺激素(TSH)抗体,所得沉淀物即为石墨-甲状腺素(T4)抗体探针复合物、石墨-三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体探针复合物、石墨-促甲状腺激素(TSH)抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL,并在4 $^{\circ}$ C条件储存;

[0129] 所述步骤(d)中的聚乙烯醇处理液由聚乙烯醇与Triton X-100混合后配成1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0130] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置一样品垫一、检测装置二样品垫一、检测装置三样品垫一采用样品垫处理液一200 μ L/cm,所述样品垫处理液一由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂Tween-80浓度为1%;

[0131] 所述步骤(e)中的预处理的检测装置四样品垫二、检测装置五样品垫二采用样品垫处理液二200 μ L/cm,所述样品垫处理液二由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂Tween-80组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为1%,酪蛋白浓度为0.2%、表面活性剂浓度为1%和抗甲状腺球蛋白抗体10 μ g/ml组成。

[0132] 通过荧光定量检测仪检测,上述实施例检测T4血清甲状腺素最低检测值:65nmol/L、FT4血清游离甲状腺素最低检测值:0.3pmol/L、T3血清三碘甲状腺原氨酸最低检测值:1.8nmol/L、FT3血清游离三碘甲状腺原氨酸最低检测值:2.0pmol/L、TSH血清促甲状腺素最低检测值:0.3mU/L。

[0133] 下边通过实验例来进一步说明本发明。

[0134] 实验例1

[0135] 1、聚乙烯醇处理液对硝酸纤维素膜抗淬灭能力的比较

[0136] 1.1材料与方法

[0137] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5 μ m,购自美国通用电气公司,聚乙烯醇购自Sigma公司

[0138] 1.2硝酸纤维素膜处理方法

[0139] 1.2.1配制聚乙烯醇处理液

[0140] 配制聚乙烯醇处理液:聚乙烯醇和Triton X-100由蒸馏水配置成浓度为1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0141] 1.2.2硝酸纤维素膜处理方法

[0142] 将硝酸纤维素膜放入聚乙烯醇处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥。

[0143] 1.3实验方法

[0144] 分别将未处理和已处理过的硝酸纤维素膜按照上述实施例工艺流程制备甲功五项荧光微球检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较硝酸纤维素膜未处理和处理后荧光指标差异。

[0145] 1.4结果:

[0146] 1.4.1荧光强度比较

[0147] 取处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察荧光显色情况判断处理后膜对荧光淬灭能力的影响,结果见表1。结果显示,处理后的硝酸纤维素膜在溶液浸润性方面要明显优于未处理膜,尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明荧光淬灭能力降低,提高了反应灵敏度。

[0148] 表1硝酸纤维素膜荧光淬灭能力比较

[0149]

组别	T4 血清甲状腺素					
	300ng	250ng	200ng	150ng	100ng	65ng
聚乙烯醇组	310	255	198	153	99	68
未处理组	303	248	195	151	-	-

[0150] 1.4.2硝酸纤维素膜稳定性比较

[0151] 取聚乙烯醇处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察显色情况来判断处理后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表2。表2结果与表1结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0152] 表2硝酸纤维素膜加速稳定性比较 (37℃放置10天)

[0153]

组别	T4 血清甲状腺素					
	300ng	250ng	200ng	150ng	100ng	65ng
聚乙烯醇组	308	254	202	154	98	64
未处理组	301	245	195	152	-	-

[0154] 实验例2:

[0155] 2、石墨纳米颗粒修饰T4血清甲状腺素抗体

[0156] 2.1材料与方法

[0157] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司

[0158] 2.2.1石墨纳米颗粒修饰T4血清甲状腺素抗体

[0159] 以石墨作为载体,取200μL石墨纳米颗粒(1mg/mL)溶液和25μT4血清甲状腺素抗体

(40 μ mol/L) 溶液加入到超纯水中,使最终反应体系1mL。充分混匀后,设置摇床温度为25℃,转速为200r/m条件下,将上述混合溶液在摇床内避光震荡培养2h。反应后的混合溶液用超速离心机在13 000r/m转速条件下,使用超纯水彻底离心洗涤4次,去除上清液中过量的未反应的T4血清甲状腺素抗体。所得沉淀物即为石墨-T4血清甲状腺素抗体探针复合物,用超纯水将其定容至1mL并在4℃条件储存。

[0160] 2.3实验方法

[0161] 分别将石墨纳米颗粒修饰的T4血清甲状腺素抗体与未修饰的T4血清甲状腺素抗体按照上述实施例工艺流程制备T4血清甲状腺素抗体检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较石墨纳米颗粒处理和未处理对蛋白吸附力和稳定性指标差异。

[0162] 2.4结果

[0163] 2.4.1蛋白吸附力比较

[0164] 取石墨纳米颗粒处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察显色情况判断处理后膜对蛋白吸附能力,结果见表3。结果显示,石墨纳米颗粒修饰组尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明蛋白吸附能力明显增强,提高了反应灵敏度。

[0165] 表3石墨纳米颗粒修饰对蛋白吸附能力比较

[0166]

组别	T4 血清甲状腺素					
	300ng	250ng	200ng	150ng	100ng	65ng
石墨组	315	255	199	153	104	67
未处理组	305	248	198	150	-	-

[0167] 2.4.2稳定性比较

[0168] 取石墨纳米颗粒处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察显色情况来判断石墨修饰后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表4。表4结果与表3结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0169] 表4加速稳定性比较 (37℃放置10天)

[0170]

组别	T4 血清甲状腺素					
	300ng	250ng	200ng	150ng	100ng	65ng
石墨组	305	249	198	145	98	66
未处理组	298	245	195	140	-	-

[0171] 以上所述仅为本发明的优选实例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡对本发明所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

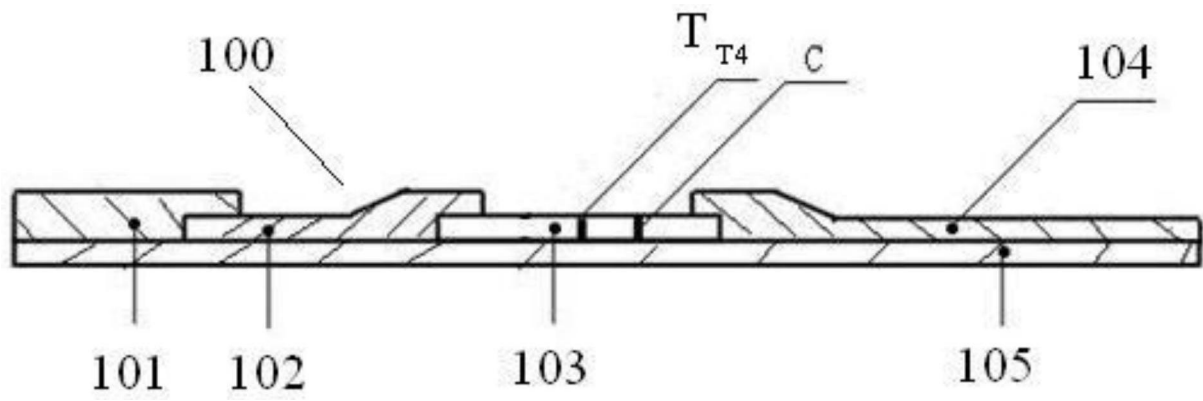


图1

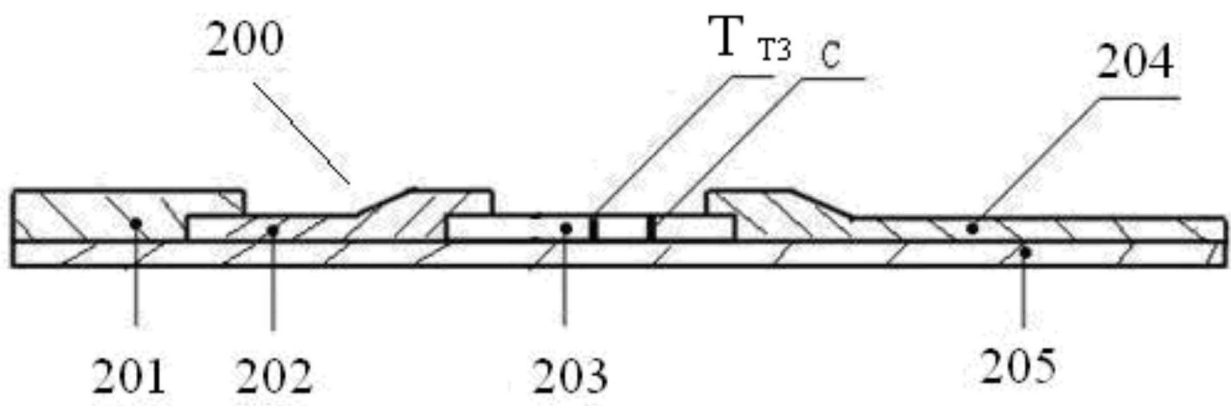


图2

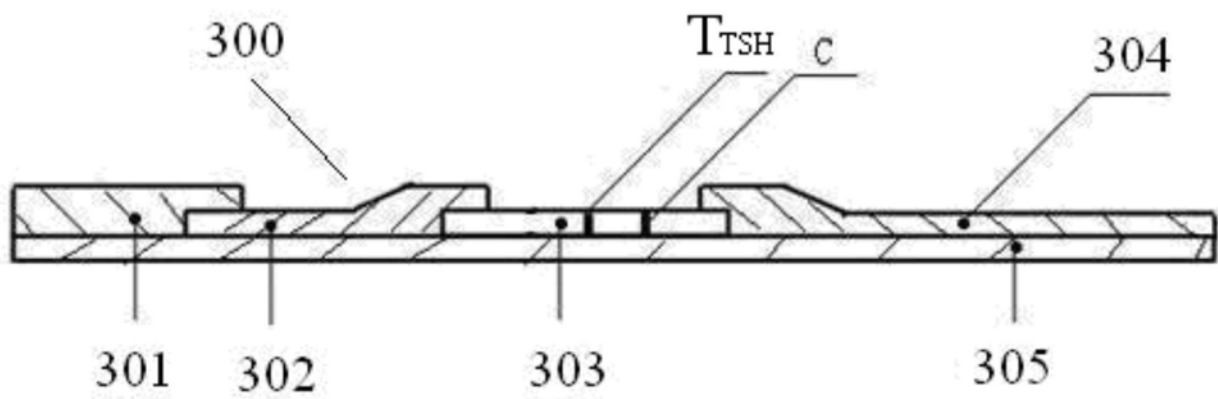


图3

专利名称(译)	甲功五项的荧光微球联合检测装置及其制备方法		
公开(公告)号	CN109799355A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201910109523.2	申请日	2019-02-06
[标]发明人	李志兴 赵旻 李欣		
发明人	李志兴 赵旻 李欣		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/68 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种甲功五项的荧光微球联合检测装置及其制备方法，属于医疗检测设备领域。样品垫、免疫荧光交联抗体玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸收垫分别粘贴在塑料板，所述硝酸纤维素膜的两端分别与吸收垫、免疫荧光交联抗体玻璃纤维膜搭接，免疫荧光交联抗体玻璃纤维膜另一端与样品垫搭接；所述硝酸纤维素膜上设置检测线T和质控线C；检测线分别标记甲状腺素抗体、三碘甲状腺原氨酸抗体、促甲状腺激素抗体，质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。优点是将甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸和促甲状腺激素抗体包被于硝酸纤维素膜膜上，特异性强，能同时检测标本中T3抗体、T4抗体、TSH抗体、游离T3抗体、游离T4抗体，操作简便，实用性强。

