



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105548534 A

(43) 申请公布日 2016.05.04

(21) 申请号 201510938621.9

G01N 33/531(2006.01)

(22) 申请日 2015.12.16

G01N 21/78(2006.01)

(66) 本国优先权数据

201510157438.5 2015.04.04 CN

(71) 申请人 吉林双正医疗科技有限公司

地址 130000 吉林省长春市绿区汽贸小区以东景阳大路以南中海凯旋门A5幢

(72) 发明人 杨小军 李欣 赵旻

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司 22100

代理人 魏征骥

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

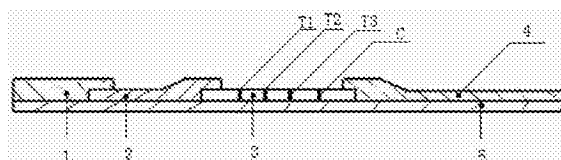
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

心肌标志物的联合检测装置及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,属于医疗检测设备领域。由固相有高特异性MPO、cTnI、NT-proBNP抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。采用多聚赖氨酸处理液对硝酸纤维素膜进行预处理,将MPO、cTnI和NT-proBNP抗体先与二氧化硅纳米颗粒结合再吸附到硝酸纤维素膜上,并配制合适的喷金缓冲液和样品垫处理液,在保证免疫胶体金释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本,既能同时检测标本中MPO、cTnI和NT-proBNP三种心肌标志物,又没有增加生产操作的复杂度。检测试纸灵敏度高、特异性强、操作简便省时、实用性强。



1. 一种心肌标志物的联合检测装置,其特征在于:样品垫(1)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸收垫(4)分别粘贴在塑料板(5),所述硝酸纤维素膜(3)的两端分别与吸收垫(4)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜(2)的另一端与样品垫(1)搭接;所述硝酸纤维素膜(3)上设置第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3)和质控线(C),所述的第一检测线(T1)上固相有高特异性MPO抗体,所述的第二检测线(T2)上固相有高特异性cTnI抗体,所述的第三检测线(T3)上固相有高特异性NT-proBNP抗体,所述的质控线(C)上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

(b)采用步骤(a)中制得的胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体,获得免疫胶体金;

(c)采用喷金缓冲液稀释步骤(b)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

(d)将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理后,喷点与二氧化硅纳米颗粒结合的MPO、cTnI和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,制得免疫硝酸纤维素膜;

(e)将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(d)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

3. 根据权利要求2所述的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

4. 根据权利要求2所述的MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(a)所述的喷金缓冲液由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%。

5. 根据权利要求2所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理是:用多聚赖氨酸处理液浸泡硝酸纤维素膜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。

6. 根据权利要求2所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的二氧化硅纳米颗粒分别结合MPO、cTnI和NT-proBNP抗体是:以二氧化硅作为载体,分别取1mL MPO、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸已酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸已酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

7. 根据权利要求2所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(e)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂烷基酚聚氧乙烯醚组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂烷基酚聚氧乙烯醚浓度为0.5~1%。

8. 根据权利要求2或5所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸稀释到浓度为0.5%组成,经0.22μm滤膜过

滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

9.根据权利要求2或5所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

10.根据权利要求2或5所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

11.根据权利要求2所述的心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的二氧化硅纳米颗粒制备方法:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}$ C和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声3分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散,反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

心肌标志物的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,特别涉及一种心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,利用胶体金免疫层析技术以及双抗体夹心法原理定量检测临床标本(全血/血清/血浆)中人髓过氧化物酶(MPO)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)的检测装置及其制备方法,可实现心肌标志物的灵敏、特异、快速检测。

背景技术

[0002] 急性心肌梗塞(AMI)是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死,严重威胁人类健康。对心肌梗塞预警、快速诊断及有效治疗评价是降低病人死亡率的关键。对于无典型胸痛和心电图改变不明显的心肌梗死患者,仅依靠心电图、超声心动图和心脏核磁共振,难以准确诊断。因此,检测血清心肌标志物是诊断AMI的必要依据。

[0003] 冠心病诊断检查技术发展迅速,除了ECG、血清生化指标、心肌损伤标志物之外,另有心脏彩超、心血管造影、核磁共振成像、计算机断层扫描等等。但是此类检查手段价格高昂,不适用于动态连续监测。上述各类检查手段中,ECG、心肌损伤标志物检测依然是临床价格最低廉、使用最广泛的方法,可是结果早期诊断急性心梗的特异性仅为90%左右,敏感性仅为45%左右,并且相当部分急性心梗的老年患者的ECG结果不会见到特异性ST-T改变。近年来的临床研究资料提示髓过氧化物酶等标志物变化与急性冠脉综合征患者的诊断和预后相关,是新一代早期预警心脏生物标示物。髓过氧化物酶(MPO)是冠状动脉粥样硬化病灶不稳定和中性白细胞应激的标志物,也是早期预警信号。MPO是一种过氧化物酶,炎症时激活的嗜中性粒细胞发生脱颗粒并释放髓过氧化物酶,它能导致冠状动脉粥样硬化病灶不稳定甚至是破裂,使血管内皮下胶原组织暴露,随之发生血小板粘附聚集和血栓形成,造成冠状动脉阻塞,发生急性冠状动脉综合症,甚至是严重的心肌不可逆缺血损伤。大量临床研究资料表明,急性冠状动脉综合症的病人血清中髓过氧化物酶水平显著地升高,是预测冠心病患者发生不良心血管事件的一个新的预测因子。

[0004] 心肌肌钙蛋白(cTn)是组成横纹肌丝的结构蛋白,具有调节肌细胞收缩功能,其由三种不同基因的亚基:心肌肌钙蛋白T(cTnT)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和肌钙蛋白C(TnC)组成,在控制心肌收缩中起重要作用。正常人血液中cTnI的含量一般低于0.3 $\mu\text{g/L}$,由于分子量不大,当心肌严重缺血导致心肌细胞膜的完整性被破坏时,cTnI极易释放入血,胸痛发作4~6h升高,增高可持续6~7d,由于心肌肌钙蛋白仅存在于心肌收缩肌上,因此,它是评价心肌坏死的首选标志物,是检测心肌损伤的金标准。目前,心肌肌钙蛋白主要用于心肌缺血损伤的临床诊断、危险性评估和预后判断。

[0005] N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)是脑钠肽前体(proBNP)的裂解产物,心肌细胞受到刺激后,proBNP裂解为NT-proBNP和BNP,两者分泌密切相关。心脏是循环中脑钠肽的主要来源,BNP主要储存于心室肌细胞内。其生理作用为利钠利尿、扩张血管、对抗肾上腺素、肾素-血管紧张素等的水、钠潴留效应,可用于评价心脏功能。NT-proBNP虽然不具有类似的生理作用,但与BNP同时分泌入血,关系密切。近年来,有研究报道,NT-proBNP与BNP相比较,血浆

浓度高,半衰期长(60-120min),稳定性强,便于检测,是更敏感地发现早期心功能不全的标志物。

[0006] 目前检测MPO、cTnI、NT-proBNP的方法主要有酶联免疫法、化学发光法、免疫比浊法、金标免疫法等。金标免疫法需要标本量少,简便快速,适合于急性心肌梗死的快速检测,不受时间、地点的限制。MPO可以预警心肌梗塞发生前3小时的风险,但其他炎症也可导致MPO指标的升高。cTnI心肌损伤后4-6小时开始升高,是评价心肌坏死的首选标志物,是检测心肌损伤的金标准。NT-proBNP可用于评价心肌梗塞后心脏功能,对预测疾病预后有辅助作用。

[0007] 纵观已有产品和文献报道,它们均是针对单一指标进行控制,只能检测或预警心肌梗塞的某个阶段,而不能全面地、特异性地预警心肌梗塞的发生、发展全程,亟待改进。

[0008] 胶体金免疫层析技术(gold immunochromatography assay,GICA)是一种将胶体金标记技术和蛋白质层析技术结合的以微孔滤膜为载体的固相膜免疫分析技术。胶体金免疫层析技术是一种常用的免疫层析检测方法,由于其操作简单、省时、制造成本较低、结果易判读等特点,非常适合于现场检测,广泛用于生物、医药、食品等领域。由于胶体金免疫层析技术是一步完成检测,因此检测过程的干扰因素较多,其灵敏度低是限制胶体金免疫层析应用范围的主要因素,传统的胶体金免疫层析技术的检测限高于ELISA等方法。

[0009] 在胶体金免疫层析检测中,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

[0010] 本发明提供一种心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,以解决现有技术存在的NC膜吸附蛋白量不足、结合力不强的问题。本发明制备的人髓过氧化物酶(MPO)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)三合一联合检测装置,可实现心肌标志物的灵敏、特异、快速检测,提高了对急性心肌梗塞患者进行心梗风险的合理综合判定,能够快速、准确进行心肌梗塞早期预警及病情风险判断。

[0011] 本发明采取的技术方案是,包括下列步骤:

[0012] MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测装置,样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4分别粘贴在塑料板5,所述硝酸纤维素膜3的两端分别与吸收垫4、免疫胶体金玻璃纤维膜2搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜2的另一端与样品垫1搭接;所述硝酸纤维素膜3上设置第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3和质控线C;所述的第一检测线T1上固相有高特异性MPO抗体,所述的第二检测线T2上固相有高特异性cTnI抗体,所述的第三检测线T3上固相有高特异性NT-proBNP抗体,所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗

体。

[0013] 本发明提供一种心肌标志物的联合检测装置及其制备方法,包括如下步骤:

[0014] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

[0015] (b)采用步骤(a)中制得的胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体,获得免疫胶体金;

[0016] (c)采用喷金缓冲液稀释步骤(b)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

[0017] (d)将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理后,喷点与二氧化硅纳米颗粒结合的MPO、cTnI和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0018] (e)将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(d)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,剪裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0019] 步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

[0020] 步骤(a)所述的喷金缓冲液由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%。

[0021] 步骤(d)所述的将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理是:用多聚赖氨酸处理液浸泡硝酸纤维素膜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。

[0022] 步骤(d)所述的二氧化硅纳米颗粒分别结合MPO、cTnI和NT-proBNP抗体是:以二氧化硅作为载体,取1mL MPO、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0023] 步骤(e)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCl液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂烷基酚聚氧乙烯醚组成,其中Tris-HCl液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂浓度为0.5~1%。

[0024] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD~300KD)稀释到浓度为0.5%组成,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0025] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD~300KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0026] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD~300KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0027] 步骤(d)所述的二氧化硅纳米颗粒制备方法:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声3分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散,反复多次洗涤至近中

性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0028] 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine, PLL)的结构中含有多个氨基可供偶联,活化过程简单,方便NC膜表面固定蛋白。多聚赖氨酸带有大量的正电荷,可以显著增加NC膜上活性位点的正电荷数量,而抗体在常规包被条件下是带负电荷的,这样单位面积的NC膜上可以结合更多数量的抗体,这可以显著增加抗体的包被效率。常规条件下,单位面积的NC膜上结合抗体的数量是有限的,采用多聚赖氨酸处理之后,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。研究发现甲醇具有良好的重润湿性,可以保证在预处理NC膜的时候不产生气泡以免气泡的存在导致NC膜处理局部不充分,同时也能够活化NC膜,让NC膜带正电荷,这个与聚赖氨酸相似,两者协同作用,效果更好。PEG20000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,多聚赖氨酸、甲醇和PEG20000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。

[0029] 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。二氧化硅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。但在胶体金免疫层析技术中尚未有报道应用。本研究探讨了二氧化硅纳米颗粒对NC膜包被抗体的影响,先将划膜用的抗体先与二氧化硅纳米颗粒结合,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,这样一个二氧化硅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。又由于二氧化硅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,提高胶体金实验的灵敏度。

[0030] 为了提高胶体金免疫层析技术的灵敏度,我们通过对硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液进行了预处理,将包被NC的抗体与二氧化硅纳米颗粒结合,达到了提高试纸灵敏度的目的。

[0031] 本发明的有益效果在于:

[0032] 1、本发明的检测装置结构新颖,将MP0、cTnI和NT-proBNP抗体包被于硝酸纤维素膜上,特异性强,既能同时检测标本中MP0、cTnI和NT-proBNP,又没有增加生产操作的复杂度。

[0033] 2、免疫胶体金制备步骤中,通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液,可保证免疫胶体金释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本。

[0034] 3、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。

[0035] 4、本发明的检测装置不需要任何特殊仪器设备,检测成本低。

[0036] 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

[0037] 图1为本发明的结构示意图。

具体实施方式

[0038] 参见图1所示,本发明的MP0、cTnI和NT-proBNP联合检测装置,包括样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4、塑料板5,其中,所述样品垫1、免疫胶体金玻璃纤维膜2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4分别粘贴在塑料板5,所述硝酸纤维素膜3的两端分别与吸收垫4、免疫胶体金玻璃纤维膜2搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜2的另一端与样品垫1搭接;所述硝酸纤维素膜3上设置第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3和质控线C,所述的第一检测线T1上固相有高特异性MP0抗体,所述的第二检测线T2上固相有高特异性cTnI抗体,所述的第三检测线T3上固相有高特异性NT-proBNP抗体,所述的质控线C上喷点羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0039] 本发明的MP0、cTnI和NT-proBNP联合检测装置的制备方法,包括下列步骤:

[0040] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

[0041] (b)采用步骤(a)中制得的胶体金标记MP0、cTnI和NT-proBNP抗体,获得免疫胶体金;

[0042] (c)采用喷金缓冲液稀释步骤(b)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

[0043] (d)将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理后,喷点与二氧化硅纳米颗粒结合的MP0、cTnI和NT-proBNP抗体作为检测线,喷点羊抗鼠IgG抗体作为质控线,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0044] (e)将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(d)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0045] 步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

[0046] 步骤(a)所述的喷金缓冲液由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%。

[0047] 步骤(d)所述的将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理是:用多聚赖氨酸处理液浸泡硝酸纤维素膜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。

[0048] 步骤(d)所述的二氧化硅纳米颗粒分别结合MP0、cTnI和NT-proBNP抗体是:以二氧化硅作为载体,分别取1mL MP0、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0049] 步骤(e)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂(烷基酚聚氧乙烯醚)组成,其中Tris-HCL液浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂浓度为0.5~1%。

[0050] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD~300KD)稀释到浓度为0.5%组成,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0051] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD~300KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0052] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸(SIGMA, 150KD~300KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0053] 步骤(d)所述的二氧化硅纳米颗粒制备方法:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}$ C左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声3分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm, 8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散,反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0054] 实施例1:

[0055] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0056] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠1:0.5,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为20nm;

[0057] (b)免疫胶体金制备

[0058] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液,加入pH调节剂140 μ l,混匀;静置5min;

[0059] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液14 μ g的比例分别加入MPO、cTnI和NT-proBNP抗体,共1.4mg,混匀;静置5min;

[0060] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升,混匀,静置5分钟;

[0061] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0062] (c)、采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0063] (d)、固相硝酸纤维素膜

[0064] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0065] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA, 150KD)、浓度为0.5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0066] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡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;

[0067] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体

[0068] 二氧化硅纳米颗粒制备:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}$ C左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm, 8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性.最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0069] 二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体:

[0070] 以二氧化硅作为载体,分别取1mL MPO、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm, 8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍;

[0071] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0072] 当喷膜量为 $1.4\mu\text{l}/\text{cm}$,将二氧化硅纳米颗粒-MPO抗体、二氧化硅纳米颗粒-cTnI和二氧化硅纳米颗粒-cTnI和NT-proBNP稀释至 $1.5\text{mg}/\text{ml}$,质控线羊抗鼠 IgG抗体稀释至 $1\text{mg}/\text{ml}$,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与质控线,室温干燥过夜,储存备用;

[0073] 4)、样品垫预处理

[0074] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为 0.1M 、牛血清白蛋白BSA浓度为 0.5% 、酪蛋白浓度为 0.1% 、表面活性剂浓度为 0.5% , 37°C 烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0075] e、组装

[0076] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0077] f、定量检测:通过胶体金检测仪检测,本联合检测装置检测人MPO最低检测浓度为 $5\text{ng}/\text{ml}$ 、cTnI最低检测浓度为 $0.1\text{ng}/\text{ml}$ 、NT-proBNP最低检测浓度为 $20\text{pg}/\text{ml}$ 。

[0078] 实施例2:

[0079] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0080] 在加热的 100ml 纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠 $1:1$,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为 40nm ;

[0081] (b)免疫胶体金制备

[0082] 1)分别取 100 毫升 40nm 胶体金溶液,加入pH调节剂 $140\mu\text{l}$,混匀;静置 5min ;

[0083] 2)在 40nm 胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液 $14\mu\text{g}$ 的比例分别加入MPO、cTnI和NT-proBNP抗体,共 1.4mg ,混匀;静置 5min ;

[0084] 3)分别按照 0.4% 的比例加入胶体金稳定剂 0.4 毫升,混匀,静置 5 分钟;

[0085] 4) 10000 、 12000 、 14000rpm 离心 10min ,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0086] (c)、采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为 20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为 5% 、海藻糖浓度为 1% 、BSA浓度为 1% ,pH为 8.5 ;

[0087] (d)、固相硝酸纤维素膜

[0088] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0089] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA, 200KD)、浓度为 0.5% ,经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤,备用;

[0090] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡 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;

[0091] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体

[0092] 二氧化硅纳米颗粒制备:将 2.48mL 体积分数 25 的氨水和 43.2mL 无水乙醇混合于锥形瓶中,在 35°C 左右和超声条件下,以 $0.4\text{mL}/\text{min}$ 的速度滴入 3.5mL 正硅酸乙酯,滴完后再超声 5 分钟,即可制得粒径 120nm 均一的粒子,分别以 12000rpm , 8500rpm 和 7000rpm 离心 10 分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性.最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用;

[0093] 二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体:

[0094] 以二氧化硅作为载体,分别取1mL MPO、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍;

[0095] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0096] 当喷膜量为1.4 μ l/cm,将二氧化硅纳米颗粒-MPO抗体、二氧化硅纳米颗粒-cTnI和二氧化硅纳米颗粒-cTnI和NT-proBNP稀释至1.5mg/ml,质控线羊抗鼠IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与质控线,室温干燥过夜,储存备用;

[0097] 4)、样品垫预处理

[0098] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37 $^{\circ}$ C烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0099] e、组装

[0100] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0101] f、定量检测:通过胶体金检测仪检测,本联合检测装置检测人MPO最低检测浓度为5.5ng/ml、cTnI最低检测浓度为0.15ng/ml、NT-proBNP最低检测浓度为23pg/ml。

[0102] 实施例3:

[0103] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0104] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠1:2,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为60nm;

[0105] (b)免疫胶体金制备

[0106] 1)分别取100毫升60nm胶体金溶液,加入pH调节剂140 μ l,混匀;静置5min;

[0107] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液14 μ g的比例分别加入MPO、cTnI和NT-proBNP抗体,共1.4mg,混匀;静置5min;

[0108] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升,混匀,静置5分钟;

[0109] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0110] (c)、采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0111] (d)、固相硝酸纤维素膜

[0112] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0113] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)、浓度为0.5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0114] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡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;

[0115] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体

[0116] 二氧化硅纳米颗粒制备:将2.48mL体积分数25和氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散,反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0117] 二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体:

[0118] 以二氧化硅作为载体,分别取1mL MPO、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸乙酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍;

[0119] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0120] 当喷膜量为1.4 μ l/cm,将二氧化硅纳米颗粒-MPO抗体、二氧化硅纳米颗粒-cTnI和二氧化硅纳米颗粒-cTnI和NT-proBNP稀释至1.5mg/ml,质控线羊抗鼠IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与质控线,室温干燥过夜,储存备用;

[0121] 4)、样品垫预处理

[0122] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37℃烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0123] e、组装

[0124] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0125] f、定量检测:通过胶体金检测仪检测,本联合检测装置检测人MPO最低检测浓度为6ng/ml、cTnI最低检测浓度为0.2ng/ml、NT-proBNP最低检测浓度为25pg/ml。

[0126] 实施例4:

[0127] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0128] 其余同实施例2。

[0129] 实施例5:

[0130] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,200KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0131] 其余同实施例2。

[0132] 实施例6:

[0133] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0134] 其余同实施例2。

[0135] 实施例7:

[0136] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0137] 其余同实施例2。

[0138] 实施例8:

[0139] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,200KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0140] 其余同实施例2。

[0141] 实施例9:

[0142] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0143] 其余同实施例2。

[0144] 下边通过实验来进一步说明本发明的效果。

[0145] 实验例1:

[0146] 1、多聚赖氨酸处理液对硝酸纤维素膜蛋白吸附能力的比较

[0147] 1.1材料与amp;方法

[0148] 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,多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)购自Sigma公司

[0149] 1.2硝酸纤维素膜处理方法

[0150] 1.2.1配制多聚赖氨酸处理液

[0151] 配制三种多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸组,多聚赖氨酸浓度为0.5%组成;多聚赖氨酸处理液甲醇组,多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%;多聚赖氨酸、甲醇和PEG20000组,,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为5%,PEG20000浓度为0.1%,三组处理液均经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0152] 1.2.2硝酸纤维素膜处理方法

[0153] 将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡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。

[0154] 1.3实验方法

[0155] 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MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测试纸,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吸附力和稳定性指标差异。

[0156] 1.4结果

[0157] 1.4.1蛋白吸附力比较

[0158] 取3组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,处理后膜阳性条带颜色略深,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。多聚赖氨酸、甲醇和PEG20000处理组吸附效果明显优于多聚赖氨酸组和多聚赖氨酸甲醇组。

[0159] 表1硝酸纤维素膜吸附能力比较

[0160]

组别	MPO、cTnI 和 NT-proBNP 阳性质控品稀释倍数					
	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64
多聚赖氨酸组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 较深 (+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	无颜色	无颜色
多聚赖氨酸甲醇组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 较深 (+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 较淡(+)	无颜色
多聚赖氨酸、甲醇和 PEG2000 组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 较深 (+++)	条带颜色 较深 (+++)	条带颜色 略淡(+)	条带颜色 较淡(+)	无颜色
未处理组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	无颜色	无颜色	无颜色

[0161] 1.4.2 硝酸纤维素膜稳定性比较

[0162] 取3组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。

[0163] 表2硝酸纤维素膜加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0164]

组别	MPO、cTnI 和 NT-proBNP 阳性质控品稀释倍数					
	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64
多聚赖氨酸组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 隐约可见 (+/-)	无颜色	无颜色
多聚赖氨酸甲醇组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 隐约可见 (+/-)	无颜色	无颜色

[0165]

多聚赖氨酸、甲醇和 PEG2000 组	条带颜色 明显 (+++)	条带颜色 较深 (+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 略淡(+)	条带颜色 较淡 (+)	无颜色
未处理组	条带颜色 较深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 隐约可见 (+/-)	无颜色	无颜色	无颜色

[0166] 实验例2:

[0167] 2、二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体

[0168] 2.1材料与amp;方法

[0169] 2.1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司,正硅酸乙酯购自汕头陇西化工厂

[0170] 2.1.2二氧化硅纳米颗粒制备

[0171] 将2.48mL氨水(体积分数25)和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径均一的粒子(120nm)。分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性。最后用水定容至体积与刚准备好时的体积相同,存放待用。

[0172] 2.1.3二氧化硅纳米颗粒修饰MPO、cTnI和NT-proBNP抗体

[0173] 以二氧化硅作为载体,取1mL MPO、cTnI和NT-proBNP抗体溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0174] 2.3实验方法

[0175] 分别将二氧化硅纳米颗粒修饰的MPO、cTnI和NT-proBNP抗体与未修饰的MPO、cTnI和NT-proBNP抗体按照上述实施例工艺流程制备MPO、cTnI和NT-proBNP联合检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较二氧化硅纳米颗粒处理和未处理对蛋白吸附力和稳定性指标差异。

[0176] 2.4结果

[0177] 2.4.1蛋白吸附力比较

[0178] 取二氧化硅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,二氧化硅纳米颗粒修饰组膜阳性条带颜色略深,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。

[0179] 表3二氧化硅纳米颗粒修饰对蛋白吸附能力比较

[0180]

组别	MPO、cTnI 和 NT-proBNP 阳性质控品稀释倍数					
	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色较淡(+)	无颜色	无颜色	无颜色

[0181] 2.4.2稳定性比较

[0182] 取二氧化硅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二氧化硅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。

[0183] 表4加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0184]

组别	MPO、cTnI 和 NT-proBNP 阳性质控品稀释倍数					
	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色较深(++)	条带颜色较淡(+)	条带颜色隐约可见(+/-)	无颜色	无颜色	无颜色

[0185] 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。

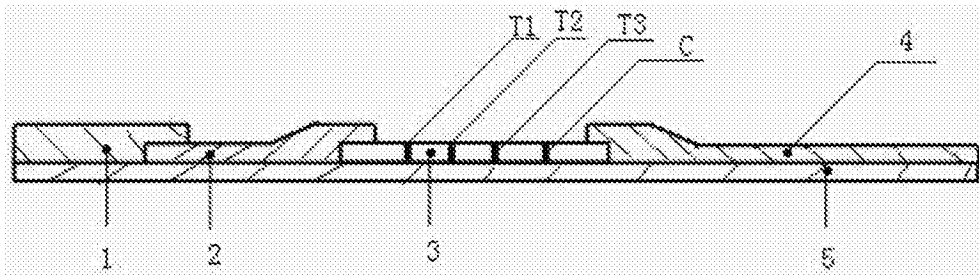


图1

专利名称(译)	心肌标志物的联合检测装置及其制备方法		
公开(公告)号	CN105548534A	公开(公告)日	2016-05-04
申请号	CN201510938621.9	申请日	2015-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
[标]发明人	杨小军 李欣 赵旻		
发明人	杨小军 李欣 赵旻		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/5308 G01N33/531 G01N33/544 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N33/573 G01N33/6881 G01N33/6893 G01N2333/085 G01N2333/952 G01N2800/107 G01N2800/324		
优先权	201510157438.5 2015-04-04 CN		
其他公开文献	CN105548534B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种心肌标志物的联合检测装置及其制备方法，属于医疗检测设备领域。由固相有高特异性MPO、cTnI、NT-proBNP抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记MPO、cTnI和NT-proBNP抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。采用多聚赖氨酸处理液对硝酸纤维素膜进行预处理，将MPO、cTnI和NT-proBNP抗体先与二氧化硅纳米颗粒结合再吸附到硝酸纤维素膜上，并配制合适的喷金缓冲液和样品垫处理液，在保证免疫胶体金释放完全的基础上，有效的提高了反应的灵敏度，同样的阈值下，还可降低免疫胶体金的用量，节约成本，既能同时检测标本中MPO、cTnI和NT-proBNP三种心肌标志物，又没有增加生产操作的复杂度。检测试纸灵敏度高、特异性强、操作简便省时、实用性强。

