



(21)申请号 201710787397.7

(22)申请日 2017.09.04

(71)申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30号

(72)发明人 糜漫天 易龙 张乾勇 周曦
郎和东 吴璐婷

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 李欧

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌
红蛋白的方法

(57)摘要

本发明涉及医学检测技术领域,尤其涉及一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,包括缓冲液配置、分散液A配置、分散液B配置、标液配置、标样检测和样品检测,分散液A为含有 NiFe_2O_4 -CMCS-antibody免疫磁纳米颗粒的溶液,分散液B为含有SNP-ZnSe/ZnS-antibody免疫荧光纳米球的溶液。本发明以 NiFe_2O_4 -CMCS复合纳米颗粒为载体,结合肌红蛋白抗体,与尿液中的肌红蛋白结合形成免疫复合物,再结合负载在SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球上的酶标肌红蛋白抗体,通过检测荧光强度实现了对肌红蛋白的定量检测,该方法具有灵敏度较高、抗干扰性较强、重复性较好等特点。

1. 一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,其特征在于,包括以下步骤:

缓冲液配置:取0.2mol/L磷酸二氢钾溶液与0.2mol/L氢氧化钠溶液按体积比10:7混合,加去离子水稀释混匀得到pH=7.2的10mmol/L的PB缓冲液,取吗啉乙磺酸和盐酸溶液加入去离子水中混匀得到pH=6.5的10mmol/L的MES缓冲液;

分散液A配置:取NiFe₂O₄-CMCS复合纳米颗粒,加入EDC溶液和NHS溶液搅拌,磁分离洗涤后的纳米颗粒与9.5mg/mL肌红蛋白抗体溶液反应,磁分离洗涤得到NiFe₂O₄-CMCS-antibody免疫磁纳米颗粒,浸入保存液中,保存于0℃~5℃的冰箱中;

分散液B配置:取SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球,加入EDC溶液和NHS溶液搅拌,磁分离洗涤后的纳米球与9.5mg/mL酶标肌红蛋白抗体溶液反应,磁分离洗涤得到SNP-ZnSe/ZnS-antibody免疫荧光纳米球,浸入保存液中,保存于0℃~5℃的冰箱中;

标液配置:精确称取3份以上不同质量的肌红蛋白标准品分别加入不同试管中,向各试管中移取PB缓冲液振荡溶解,配制成不同浓度的标准储备液,保存于0℃~5℃的冰箱中;

标样检测:按以下方法分别测定不同浓度标准储备液的荧光值,取400μL标准储备液用PB缓冲液稀释至1mL,加入150μL分散液A,振荡15min后,再加入150μL分散液B,继续振荡15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250μL的PB缓冲液中,用荧光分光光度计进行荧光检测得到荧光值,以标准储备液的浓度为横坐标,对应的荧光值为纵坐标绘制拟合标准曲线;

样品检测:取中段尿液于冷冻离心机中离心10min~15min,取上清液搅拌加入硫酸铵至液体饱和,过滤得到样品液,取350μL~380μL样品液用PB缓冲液稀释至1mL,加入120μL~150μL分散液A,振荡8min~15min后,再加入120μL~150μL分散液B,振荡8min~15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250μL的PB缓冲液中,进行荧光检测得到荧光值,将荧光值带入标准曲线中便得到相应的浓度值,即完成尿液中肌红蛋白的检测。

2. 根据权利要求1所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,其中,所述保存液为含有0.1%BSA、0.03%吐温-20的PB缓冲液。

3. 根据权利要求2所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,其中,所述分散液A的配置方法如下:取NiFe₂O₄-CMCS用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上后,加入2mLPB缓冲液中,配制得到浓度为10mg/mL的溶液,加入85μL0.1mol/L的EDC的溶液和125μL0.1mol/L的NHS溶液,搅拌0.5h,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再均匀分散于2mLPB缓冲液中,搅拌加入3.5μL肌红蛋白抗体溶液,振荡10min,静置1h,慢速搅拌10min~15min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再加入2mLPB缓冲液中,加入150μL0.1mol/L盐酸羟胺溶液搅拌1.5h,磁分离得到的NiFe₂O₄-CMCS-antibody固相产物,用PB缓冲液磁分离洗涤3次,浸入2mL0℃~5℃的保存液中。

4. 根据权利要求3所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,其中,所述NiFe₂O₄-CMCS复合纳米颗粒是以纳米铁酸镍为核心外包覆羧甲基壳聚的多面体多孔颗粒,所述NiFe₂O₄-CMCS颗粒制备如下:将等摩尔量的羧甲基壳聚糖和NiFe₂O₄纳米颗粒超声溶于去离子水中搅拌混匀得到分散相,将聚山梨酯-80和司盘80加入矿物油混匀得到连续相,于连续相中加入分散相搅拌1.5h,再加入戊二醛反应2.5h,过滤得到的颗粒物先后用石油醚、去离子水和乙醇洗涤,于55℃真空干燥10h~13h,得到NiFe₂O₄-CMCS纳米颗粒。

5. 根据权利要求4所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法, 其中, 所述 NiFe_2O_4 纳米颗粒的制备如下, 取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入草酸铵溶液中混合, 搅拌反应, 过滤得到 NiFe_2O_4 溶胶, 将 NiFe_2O_4 溶胶加入去离子水中, 超声分散1h, 加入乙酸乙酯和三聚氰胺, 于 150°C 水热反应釜中反应5h后, 蒸馏, 真空干燥, 粉碎, 于 $500^\circ\text{C} \sim 750^\circ\text{C}$ 氮气-氢气混合气流动下热处理5h, 并于 $500^\circ\text{C} \sim 750^\circ\text{C}$ 空气气流中热处理5h, 取出, 洗涤过滤, 干燥研磨得到 NiFe_2O_4 纳米颗粒。

6. 根据权利要求5所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法, 其中, 所述分散液B的配置方法如下: 取SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球, 用MES缓冲液磁分离洗涤3次以上后, 加入2mLMES缓冲液中, 配制得到浓度为 10mg/mL 的荧光纳米球溶液, 先后搅拌加入 $85\mu\text{L}$ EDC溶液和 $125\mu\text{L}$ NHS溶液, 搅拌30min, PB缓冲液磁分离洗涤3次, 均匀分散于2mLPB缓冲液中, 并搅拌加入 $3.5\mu\text{L}$ 酶标肌红蛋白抗体溶液, 振荡10min, 静置1h, 慢速搅拌10min~15min, PB缓冲液磁分离洗涤3次, 再加入2mLPB缓冲液中, 加入 $150\mu\text{L}$ 0.1mol/L 盐酸羟胺溶液搅拌1.5h, 磁分离得到的SNP-ZnSe/ZnS-antibody纳米球, 用PB缓冲液磁分离洗涤3次, 浸入 2mL $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 的保存液中。

7. 根据权利要求6所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法, 其中, 所述SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球制备方法如下: 取羧基化量子点超声波溶解于去离子水中, 加入3-氨丙基三乙氧基避光搅拌反应2.5h, 得到APTES-ZnSe/ZnS, 将硅纳米球和APTES-ZnSe/ZnS分散于去离子水中, 并滴加氨水避光搅拌反应2h, 加入APTES-COOH和正硅酸四乙酯避光搅拌反应8h, 冷冻离心, 洗涤, 即得到SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球, 保存于 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 的去离子水中。

8. 根据权利要求7所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法, 其中, 所述硅纳米球是将TEOS、氨水和乙醇加入去离子水中搅拌反应10h, 离心分离洗涤制得。

9. 根据权利要求8所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法, 其中, 所述APTES-COOH是马来酸酐和APTES冰浴搅拌反应制得。

10. 根据权利要求9所述的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法, 其中, 所述羧基化量子点ZnSe/ZnS的制备如下: 取 0.8g 四甲基氢氧化铵五水合物, 加入 0.3mL 巯基丙酸和 10mL 氯仿混匀, 静置0.5h, 去除上层液, 避光搅拌加入 $100\mu\text{L}$ 的 10mmol/L ZnSe/ZnS量子点溶液, 静置48h后取出悬浮物, 于 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 的去离子水中保存。

一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,尤其涉及一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法。

背景技术

[0002] 运动性骨骼肌微损伤是一种高强度或/和长时间运动后发生的骨骼肌纤维的微细损伤,不同于运动创伤学中的肌肉挫伤、拉伤等,常表现肌肉酸痛。肌肉酸痛是由剧烈的、超过习惯负荷的骨骼肌舒缩活动所引起的,特别是在骨骼肌进行离心收缩后最容易发生。具体表现为,通常在运动结束后24h出现、24h~48h达高峰、持续5d~7d或更长长时间后逐渐缓解、消失;肌肉酸痛程度与肌肉活动的剧烈程度、持续时间以及骨骼肌收缩形式相关,如离心收缩>等长收缩>向心收缩;肌肉酸痛同时伴有肌力减退、僵硬、活动功能下降等,肌电图、血清酶及超微结构形态均有不同程度的改变。

[0003] 军事训练伤防控不仅依赖于科学施训,更应当重视医务监督对训练伤发生预测及现场监测中的重要作用。战士在军事训练中常出现疲劳积累并造成过度疲劳综合征,继续坚持训练往往易发生训练伤病,尤其是骨骼肌微损伤的肌肉酸痛症状具有延迟性,需要运动后一段时间才能知晓。因此,如何早期诊断运动性疲劳是预防训练伤病的关键。业已证明,肌红蛋白是评定肌肉承受训练刺激、运动性疲劳及骨骼肌微损伤的敏感标志物。

[0004] 肌红蛋白(Mb)是一种小分子单体血红素蛋白,存在于肌细胞中,其功能是储存和运输氧气,即把血液中的氧通过细胞膜运输到肌细胞中,以氧合Mb的形式暂时储存,保证肌肉剧烈活动时对氧的需要,因此Mb对运动能力有重要作用。此外Mb对微血管和组织中的一氧化氮具有调节作用,促进血红素中的 Fe^{3+} 释放并造成线粒体膜脂质过氧化。剧烈运动后Mb在30min内升高并可持续数天,故可作为训练负荷的监控指标。当肌肉组织受损伤时,Mb可大量释放至细胞外进入血循环,一旦血浆中出现肌红蛋白,因其相对分子质量较小可迅速通过肾小球滤过而由肾脏排出,其浓度超过肾阈,出现肌红蛋白尿,尿液呈粉红色,但很快变为棕色或棕黑色。因此,可以通过从尿液中检测肌红蛋白浓度判断是否发生骨骼肌微损伤,为科学施训提供参考指导数据。

[0005] 目前临床常用检测肌红蛋白的方法多用于血液中肌红蛋白的检测,主要有ELISA法、胶体金法和化学发光法等。其中ELISA法适合大批量检测,但重复性差,操作复杂;胶体金法特异性相对较好,但敏感度偏低;化学发光法灵敏度高,特异性好,但成本要求过高。从血液中检测肌红蛋白必定会涉及血液的采集,这会给施训人员带来痛苦,从尿液中检测肌红蛋白可以取样对施训人员造成的痛苦,但是目前相关检测方法报道较少,因此需要寻找一种能够快速从尿液中检测肌红蛋白的高灵敏度、抗干扰性强、重复性好的方法。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的是提供一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,该方法以 NiFe_2O_4 -CMCS复合纳米颗粒为载体,与尿液中的肌红蛋白结合形成免疫复

合物,再结合负载在SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球上的酶标肌红蛋白抗体,通过检测荧光强度实现了对肌红蛋白的定量检测,该方法具有灵敏度较高、抗干扰性较强、重复性较好等特点。

[0007] 本发明通过以下技术手段解决上述技术问题:

[0008] 一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法,包括以下步骤:

[0009] 缓冲液配置:取0.2mol/L磷酸二氢钾溶液与0.2mol/L氢氧化钠溶液按体积比10:7混合,加去离子水稀释混匀得到pH=7.2的10mmol/L的PB缓冲液,取吗啉乙磺酸和盐酸溶液加入去离子水中混匀得到pH=6.5的10mmol/L的MES缓冲液。

[0010] 分散液A配置:取NiFe₂O₄-CMCS复合纳米颗粒,加入EDC溶液和NHS溶液搅拌,磁分离洗涤后的纳米颗粒与9.5mg/mL肌红蛋白抗体溶液反应,磁分离洗涤得到NiFe₂O₄-CMCS-antibody免疫磁纳米颗粒,浸入保存液中,保存于0℃~5℃的冰箱中。

[0011] 分散液B配置:取SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球,加入EDC溶液和NHS溶液搅拌,磁分离洗涤后的纳米球与9.5mg/mL酶标肌红蛋白抗体溶液反应,磁分离洗涤得到SNP-ZnSe/ZnS-antibody免疫荧光纳米球,浸入保存液中,保存于0℃~5℃的冰箱中。

[0012] 标液配置:精确称取3份以上不同质量的肌红蛋白标准品分别加入不同试管中,向各试管中移取PB缓冲液振荡溶解,配制成不同浓度的标准储备液,保存于0℃~5℃的冰箱中。

[0013] 标样检测:取400μL标准储备液用PB缓冲液稀释至1mL,加入150μL分散液A,振荡15min后,再加入150μL分散液B,继续振荡15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250μL的PB缓冲液中,用荧光分光光度计进行荧光检测得到荧光值,以标准储备液的浓度为横坐标,对应的荧光值为纵坐标绘制拟合标准曲线。

[0014] 样品检测:取中段尿液于冷冻离心机中离心10min~15min,取上清液搅拌加入硫酸铵至液体饱和,过滤得到样品液,取350μL~380μL样品液用PB缓冲液稀释至1mL,加入120μL~150μL分散液A,振荡8min~15min后,再加入120μL~150μL分散液B,振荡8min~15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250μL的PB缓冲液中,进行荧光检测得到荧光值,将荧光值带入标准曲线中便得到相应的浓度值,即完成尿液中肌红蛋白的检测。

[0015] 进一步,所述保存液为含有0.1%BSA、0.03%吐温-20的PB缓冲液。

[0016] 进一步,所述分散液A的配置方法如下:取NiFe₂O₄-CMCS用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上后,加入2mLPB缓冲液中,配制得到浓度为10mg/mL的溶液,加入85μL0.1mol/L的EDC溶液和125μL0.1mol/L的NHS溶液,搅拌0.5h,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再均匀分散于2mLPB缓冲液中,搅拌加入3.5μL肌红蛋白抗体溶液,振荡10min,静置1h,慢速搅拌10min~15min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再加入2mLPB缓冲液中,加入150μL0.1mol/L盐酸羟胺溶液搅拌1.5h,磁分离得到的NiFe₂O₄-CMCS-antibody固相产物,用PB缓冲液磁分离洗涤3次,浸入2mL0℃~5℃的保存液中。

[0017] 进一步,所述NiFe₂O₄-CMCS复合纳米颗粒是以纳米铁酸镍为核心外包覆羧甲基壳聚的多面体多孔颗粒,所述NiFe₂O₄-CMCS颗粒制备如下:将等摩尔量的羧甲基壳聚糖和NiFe₂O₄纳米颗粒超声溶于去离子水中搅拌混匀得到分散相,将聚山梨酯-80和司盘80加入矿物油混匀得到连续相,于连续相中加入分散相搅拌1.5h,再加入戊二醛反应2.5h,过滤得到的颗粒物先后用石油醚、去离子水和乙醇洗涤,于55℃真空干燥10h~13h,得到NiFe₂O₄-

CMCS纳米颗粒。

[0018] 进一步,所述 NiFe_2O_4 纳米颗粒的制备如下,取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入草酸铵溶液中混合,搅拌反应,过滤得到 NiFe_2O_4 溶胶,将 NiFe_2O_4 溶胶加入去离子水中,超声分散1h,加入乙酸乙酯和三聚氰胺,于 150°C 水热反应釜中反应5h后,蒸馏,真空干燥,粉碎,于 $500^\circ\text{C} \sim 750^\circ\text{C}$ 氮气-氢气混合气流动下热处理5h,并于 $500^\circ\text{C} \sim 750^\circ\text{C}$ 空气气流中热处理5h,取出,洗涤过滤,干燥研磨得到 NiFe_2O_4 纳米颗粒。

[0019] 进一步,所述分散液B的配置方法如下:取SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球,用MES缓冲液磁分离洗涤3次以上后,加入2mLMES缓冲液中,配制得到浓度为10mg/mL的荧光纳米球溶液,先后搅拌加入85 μL EDC溶液和125 μL LNHS溶液,搅拌30min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,均匀分散于2mLPB缓冲液中,并搅拌加入3.5 μL 酶标肌红蛋白抗体溶液,振荡10min,静置1h,慢速搅拌10min $\sim$ 15min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再加入2mLPB缓冲液中,加入150 μL 0.1mol/L盐酸羟胺溶液搅拌1.5h,磁分离得到的SNP-ZnSe/ZnS-antibody纳米球,用PB缓冲液磁分离洗涤3次,浸入2mL $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 的保存液中。

[0020] 进一步,所述SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球制备方法如下:取羧基化量子点超声波溶解于去离子水中,加入3-氨丙基三乙氧基硅烷避光搅拌反应2.5h,得到APTES-ZnSe/ZnS,将硅纳米球和APTES-ZnSe/ZnS分散于去离子水中,并滴加氨水避光搅拌反应2h,加入APTES-COOH和正硅酸四乙酯避光搅拌反应8h,冷冻离心,洗涤,即得到SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球,保存于 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 的去离子水中。

[0021] 进一步,所述硅纳米球是将TEOS、氨水和乙醇加入去离子水中搅拌反应10h,离心分离洗涤制得。

[0022] 进一步,所述APTES-COOH是马来酸酐和APTES冰浴搅拌反应制得。

[0023] 进一步,所述羧基化量子点ZnSe/ZnS的制备如下:取0.8g四甲基氢氧化铵五水合物,加入0.3mL巯基丙酸和10mL氯仿混匀,静置0.5h,去除上层液,避光搅拌加入100 μL 的10mmol/L ZnSe/ZnS量子点溶液,静置48h后取出悬浮物,于 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 的去离子水中保存。

[0024] 本发明的尿液中肌红蛋白的检测方法中,以 NiFe_2O_4 -CMCS复合纳米颗粒为载体,结合肌红蛋白抗体,肌红蛋白抗体再与尿液中的肌红蛋白结合后,再结合负载在SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球上的酶标肌红蛋白抗体,形成双抗体夹心结构,通过检测荧光强度实现了对肌红蛋白的定量检测。使用比表面积较大的 NiFe_2O_4 纳米颗粒与抗体载体壳聚糖在交联剂戊二醛的作用下交联接枝,得到 NiFe_2O_4 -CMCS纳米磁性颗粒,该纳米磁性颗粒具有磁分离和快速固定生物分子的作用,利用表面修饰的肌红蛋白抗体能够快速地从尿液中将肌红蛋白分离出来,灵敏度较高;本发明使用了量子点作为特异性抗体的标记物,具有发光强度高、激发光谱宽、荧光寿命长、表面修饰多功能化和稳定性好等优势,进一步提高了检测的灵敏度和准确度。

[0025] 肌红蛋白能溶于80%饱和度的硫酸铵溶液中,而血红蛋白则不能,因此本发明的检测方法中,先对尿液样品进行离心处理,再加入硫酸铵至溶液饱和后,过滤,这样可以除去尿液中的血红蛋白,提高抗干扰性。

[0026] 本发明的尿液中肌红蛋白的检测方法操作简单、快速,能够实现对尿液中肌红蛋白的定量检测,其检测稳定性较强,准确度较高,灵敏度较高,选择性好。

附图说明

[0027] 图1是本发明的肌红蛋白标准曲线图。

具体实施方式

[0028] 以下将结合具体实施例对本发明进行详细说明：

[0029] 本发明的一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法，以 NiFe_2O_4 -CMCS复合纳米颗粒为载体，结合肌红蛋白抗体，与尿液中的肌红蛋白结合形成免疫复合物，再结合负载在SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球上的酶标肌红蛋白抗体，通过检测荧光强度实现了对肌红蛋白的定量检测。

[0030] 本发明的检测方法中需要两种缓冲液，这两种缓冲液的配制方法如下：取0.2mol/L磷酸二氢钾溶液与0.2mol/L氢氧化钠溶液按体积比10:7混合，加去离子水稀释混匀，配制得到pH=7.2的10mmol/L的PB缓冲液；取吗啉乙磺酸和盐酸溶液加入去离子水中混匀，配制得到pH=6.5的10mmol/L的MES缓冲液。

[0031] 要得到 NiFe_2O_4 -CMCS复合纳米颗粒，需要先制备 NiFe_2O_4 纳米颗粒，本发明中的 NiFe_2O_4 纳米颗粒为多面体多孔纳米颗粒， NiFe_2O_4 纳米颗粒采用以下方法进行制备：

[0032] NiFe_2O_4 纳米颗粒制备实施例一

[0033] 取70mL无水乙醇加入80mL去离子水中，并加入0.03mol草酸铵搅拌溶解，得到草酸铵溶液，再称取0.014mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.007mol $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100mL去离子水中，得到金属盐溶液；于65℃将金属盐溶液搅拌加入草酸铵溶液中，搅拌反应1h，过滤得到 NiFe_2O_4 溶胶，按 NiFe_2O_4 溶胶与去离子水的质量比为1:6的比例混合后，用频率为25kHz、功率600W的超声波分散1h，加入0.01mol乙酸乙酯和0.01mol三聚氰胺，转入水热反应釜中，于150℃反应5h后得到的产物，经蒸馏除去溶剂乙酸乙酯后，于65℃真空干燥5h，粉碎后在流量比为1:1的氮气-氢气混合气流动下，于500℃热处理5h，并于500℃空气气流中热处理5h，冷却取出，先后用乙醇、去离子水洗涤过滤，干燥研磨得到 NiFe_2O_4 纳米颗粒。经表征检测本实施例制备得到的 NiFe_2O_4 纳米颗粒为表面多孔的四面体结构，平均粒径为80nm，比表面积为 $1600\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0034] NiFe_2O_4 纳米颗粒制备实施例二

[0035] 取70mL无水乙醇加入70mL去离子水中，并加入0.03mol草酸铵搅拌溶解，得到草酸铵溶液，再称取0.014mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.007mol $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100mL去离子水中，得到金属盐溶液；于65℃将金属盐溶液搅拌加入草酸铵溶液中，搅拌反应1h，过滤得到 NiFe_2O_4 溶胶，按 NiFe_2O_4 溶胶与去离子水的质量比为1:6的比例混合后，用频率为25kHz、功率600W的超声波分散1h，加入0.01mol乙酸乙酯和0.01mol三聚氰胺，转入水热反应釜中，于150℃反应5h后得到的产物，经蒸馏除去溶剂乙酸乙酯后，于65℃真空干燥5h，粉碎后在流量比为1:1的氮气-氢气混合气流动下，于600℃热处理5h，并于600℃空气气流中热处理5h，冷却取出，先后用乙醇、去离子水洗涤过滤，干燥研磨得到 NiFe_2O_4 纳米颗粒。经表征检测本实施例制备得到的 NiFe_2O_4 纳米颗粒为多孔的多面体结构，该多面体结构至少为六面，平均粒径为65nm，比表面积为 $1850\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0036] NiFe_2O_4 纳米颗粒制备实施例三

[0037] 取70mL无水乙醇加入70mL去离子水中,并加入0.03mol草酸铵搅拌溶解,得到草酸铵溶液,再称取0.014mol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.007mol $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100mL去离子水中,得到金属盐溶液;于65℃将金属盐溶液搅拌加入草酸铵溶液中,搅拌反应1h,过滤得到 NiFe_2O_4 溶胶,按 NiFe_2O_4 溶胶与去离子水的质量比为1:6的比例混合后,用频率为25kHz、功率600W的超声波分散1h,加入0.01mol乙酸乙酯和0.01mol三聚氰胺,转入水热反应釜中,于150℃反应5h后得到的产物,经蒸馏除去溶剂乙酸乙酯后,于65℃真空干燥5h,粉碎后在流量比为1:1的氮气-氢气混合气流动下,于750℃热处理5h,并于750℃空气气流中热处理5h,冷却取出,先后用乙醇、去离子水洗涤过滤,干燥研磨得到 NiFe_2O_4 纳米颗粒。经表征检测本实施例制备得到的 NiFe_2O_4 纳米颗粒为镂空球体结构,平均粒径为50nm,比表面积为 $1550\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0038] 本发明的方法中需要使用比表面积较大的 NiFe_2O_4 纳米颗粒,一便增加检测的灵敏度,因此选用实施例二制备得到 NiFe_2O_4 纳米颗粒来制备 NiFe_2O_4 -CMCS纳米颗粒, NiFe_2O_4 -CMCS复合纳米颗粒是以纳米铁酸镍为核心外包覆羧甲基壳聚的多面体多孔颗粒,其制备如下:

[0039] NiFe_2O_4 -CMCS颗粒制备实施例四

[0040] 取25mL质量分数为40%的NaOH溶液,加入2.5g壳聚糖混合搅拌混匀后,于-15℃冷冻20h取出解冻,加入20mL异丙醇搅拌1h,升温至50℃,每间隔5min加入10mL溶有12g氯乙酸的异丙醇溶液中,加完后升温至65℃反应4h,冷却,离心沉降,去除上清液,将得到的沉淀物用乙醇洗涤五次后,加入去离子水中使其完全溶解,滴加冰醋酸调节 $\text{pH}=7.5$,再加入乙醇使其沉淀,过滤得到的滤渣用乙醇洗涤后,于60℃下真空干燥,得到羧甲基壳聚糖。

[0041] 取等摩尔量的羧甲基壳聚糖和 NiFe_2O_4 纳米颗粒超声溶于去离子水中搅拌混匀得到分散相,将聚山梨酯-80和司盘80加入矿物油混匀得到连续相,于连续相中加入分散相搅拌1.5h,再加入戊二醛反应2.5h,过滤得到的颗粒物先后用石油醚、去离子水和乙醇洗涤,于55℃真空干燥10h~13h,得到 NiFe_2O_4 -CMCS纳米颗粒。

[0042] 分散液A配置实施例五

[0043] 取 NiFe_2O_4 -CMCS用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上后,加入2mLPB缓冲液中,配制得到浓度为10mg/mL的溶液,加入85 μL 0.1mol/L1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺溶液和125 μL 0.1mol/L的N-羟基琥珀酰亚胺溶液,搅拌0.5h后,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再均匀分散于2mLPB缓冲液中,搅拌加入3.5 μL 肌红蛋白抗体溶液,振荡10min,静置1h,慢速搅拌10min~15min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再加入2mLPB缓冲液中,加入150 μL 0.1mol/L盐酸羟胺溶液搅拌1.5h,磁分离得到的 NiFe_2O_4 -CMCS-antibody固相产物,用PB缓冲液磁分离洗涤3次,浸入2mL0℃~5℃的保存液中。

[0044] 分散液B配置实施例六

[0045] 采用Stober法制备硅纳米球,取2mL正硅酸四乙酯、2.5mL氨水和2.5mL180%的乙醇溶液,常温搅拌反应10h,离心分离30min,去除上清液,加入乙醇和水离心洗涤3次,过滤得到的滤渣分散于乙醇中,得到10mg/mL的硅纳米球溶液。

[0046] 取量子点ZnSe和ZnS混合,表征量子点荧光特征,合成荧光发射波长为630nm的ZnSe/ZnS量子点,取该ZnSe/ZnS量子点分散于去离子水中得到10mmol/LZnSe/ZnS量子点溶液。取0.8g四甲基氢氧化铵五水合物,加入0.3mL巯基丙酸和10mL氯仿混匀,静置0.5h,去除上层液,避光搅拌加入100 μL ZnSe/ZnS量子点溶液,静置48h后取出悬浮物,得到羧基化量子

点ZnSe和ZnS,于0℃~5℃的去离子水中保存。

[0047] 精确称取2.00g马来酸酐于圆底烧瓶中,将圆底烧瓶置于冰水中,向圆底烧瓶中缓慢滴加4.00mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌反应得到羧基化的硅烷偶联剂APTES-COOH。

[0048] 取羧基化量子点超声波溶解于去离子水中,加入3-氨丙基三乙氧基硅烷避光搅拌反应2.5h,得到APTES-ZnSe/ZnS,将硅纳米球和APTES-ZnSe/ZnS分散于去离子水中,并滴加氨水避光搅拌反应2h,加入APTES-COOH和正硅酸四乙酯避光搅拌反应8h,冷冻离心,洗涤,即得到SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球,保存于0℃~5℃的去离子水中。

[0049] 取SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球,用MES缓冲液磁分离洗涤3次以上后,加入2mLMES缓冲液中,配制得到浓度为10mg/mL的荧光纳米球溶液,先后搅拌加入85μLEDC溶液和125μL NHS溶液,搅拌30min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,均匀分散于2mLPB缓冲液中,并搅拌加入3.5μL酶标肌红蛋白抗体溶液,振荡10min,静置1h,慢速搅拌10min~15min,PB缓冲液磁分离洗涤3次,再加入2mLPB缓冲液中,加入150μL0.1mol/L盐酸羟胺溶液搅拌1.5h,磁分离得到的SNP-ZnSe/ZnS-antibody纳米球,用PB缓冲液磁分离洗涤3次,浸入2mL0℃~5℃的保存液中。

[0050] 以上完成了缓冲液的配制和分散液A、分散液B的配制,做好了检测前的溶剂配制准备,下面将通过具体实施例来描述从尿液中检测肌红蛋白的方法。

[0051] 标液配置:精确称取5份不同质量的肌红蛋白标准品分别加入不同试管中,向各试管中移取PB缓冲液振荡溶解,配制成浓度为0ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL的标准储备液,保存于0℃~5℃的冰箱中。

[0052] 标样检测:按照以下方法分别检测肌红蛋白浓度在5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL标准储备液的荧光值,取400μL标准储备液用PB缓冲液稀释至1mL,加入150μL分散液A,振荡15min后,再加入150μL分散液B,继续振荡15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250μL的PB缓冲液中,用荧光分光光度计进行荧光检测得到荧光值。对应浓度的荧光值如下表:

[0053]

浓度 (ng/mL)	5	10	50	100	500	1000
荧光值	6.199	12.051	73.593	153.332	842.901	1608.253

[0054] 以标准储备液的浓度为横坐标,对应的荧光值为纵坐标绘制拟合标准曲线,如图1所示,得到标准曲线 $y=1.6246x-1.4391$,线性相关系数 $R^2=0.99936$,由此说明荧光值与肌红蛋白的浓度线性关系良好。

[0055] 正常人尿液中的肌红蛋白含量极少,但是在剧烈运动之后出现了运动性骨骼肌微损伤时,肌红蛋白大量释放至细胞进入血液循环中,因其相对分子质量较小可迅速通过肾小球滤过由肾脏排出,浓度超过肾阈时,尿液中的肌红蛋白浓度就增加,出现肌红蛋白尿。尿液中检测肌红蛋白的方法如下:取中段尿液于冷冻离心机中离心10min~15min,取上清液搅拌加入硫酸铵至液体饱和,过滤得到样品液,取350μL~380μL样品液用PB缓冲液稀释至1mL,加入120μL~150μL分散液A,振荡8min~15min后,再加入120μL~150μL分散液B,振荡

8min~15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250 μ L的PB缓冲液中,进行荧光检测得到荧光值,将荧光值带入标准曲线中便得到相应的浓度值,即完成尿液中肌红蛋白的检测。以下将通过在正常人自然状态下的尿液中加入肌红蛋白标准品配置成不同肌红蛋白浓度的尿液为样品,模拟肌红蛋白尿进行检测。

[0056] 尿液中检测肌红蛋白实施例七

[0057] 取正常人自然状态下的中段尿为样品,于温度10 $^{\circ}$ C,转速4000r/min的条件下离心10min,取上清液搅拌加入硫酸铵至液体饱和,过滤得到样品液,取350 μ L的样品液四份,记为a、b、c、d,向样品液b中加入10 μ L浓度为100ng/mL的肌红蛋白标准液混匀,得到待测样品b,向样品液c中加入10 μ L浓度为500ng/mL的肌红蛋白标准液混匀,得到待测样品c,向样品液d中加入10 μ L浓度为1000ng/mL的肌红蛋白标准液混匀,得到待测样品d,将待测样品a、b、c、d分别用PB缓冲液稀释至1mL,加入120 μ L分散液A,振荡15min后,再加入120 μ L分散液B,振荡15min后,用PB缓冲液磁分离洗涤3次以上,再均匀分散于250 μ L的PB缓冲液中,进行荧光检测得到各自的荧光值,将得到的荧光值带入标准曲线 $y=1.6246x-1.4391$ 中计算得出相应的肌红蛋白浓度,结果如下表:

[0058]	待测样品	肌红蛋白标准液浓度 (ng/mL)	荧光值	浓度 (ng/mL)
	a	0	306.0	495.69
	b	100	299.0	484.32
	c	500	306.1	495.85
	d	1000	314.6	509.66

[0059] 本发明的从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法简单,以NiFe₂O₄-CMCS复合纳米颗粒为载体,结合肌红蛋白抗体,与尿液中的肌红蛋白结合形成免疫复合物,再结合负载在SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球上的酶标肌红蛋白抗体,通过检测荧光强度实现了对肌红蛋白的定量检测,该方法具有灵敏度较高、抗干扰性较强、重复性较好等特点。

[0060] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。本发明未详细描述的技术、形状、构造部分均为公知技术。

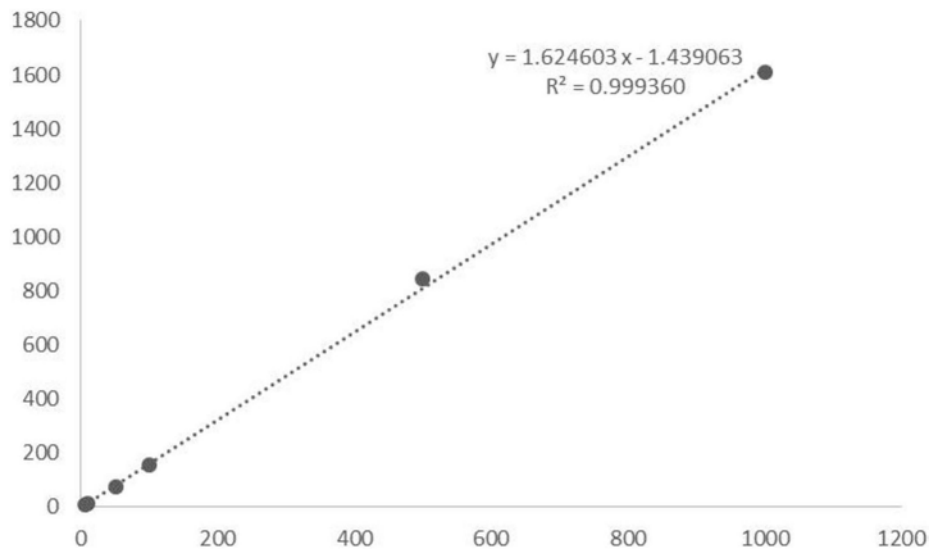


图1

专利名称(译)	一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法		
公开(公告)号	CN107505299A	公开(公告)日	2017-12-22
申请号	CN201710787397.7	申请日	2017-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	糜漫天 易龙 张乾勇 周曦 郎和东 吴璐婷		
发明人	糜漫天 易龙 张乾勇 周曦 郎和东 吴璐婷		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533		
代理人(译)	李欧		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学检测技术领域，尤其涉及一种从尿液中检测骨骼肌微损伤标志物肌红蛋白的方法，包括缓冲液配置、分散液A配置、分散液B配置、标液配置、标样检测和样品检测，分散液A为含有NiFe₂O₄-CMCS-antibody免疫磁纳米颗粒的溶液，分散液B为含有SNP-ZnSe/ZnS-antibody免疫荧光纳米球的溶液。本发明以NiFe₂O₄-CMCS复合纳米颗粒为载体，结合肌红蛋白抗体，与尿液中的肌红蛋白结合形成免疫复合物，再结合负载在SNP-ZnSe/ZnS荧光纳米球上的酶标肌红蛋白抗体，通过检测荧光强度实现了对肌红蛋白的定量检测，该方法具有灵敏度较高、抗干扰性较强、重复性较好等特点。

浓度 (ng/mL)	5	10	50	100	500	1000
荧光值	6.199	12.051	73.593	153.332	842.901	1608.253