



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102192986 B

(45) 授权公告日 2014.06.11

<p>(21) 申请号 201010127883.4</p> <p>(22) 申请日 2010.03.19</p> <p>(73) 专利权人 成都盛泰尔生物医药科技有限公司 地址 610041 四川省成都市科园南路 88 号 天府生命科技园 C1-601 室</p> <p>(72) 发明人 胡卫红</p> <p>(74) 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公司 51202 代理人 邓继轩</p> <p>(51) Int. Cl. G01N 33/68(2006.01) G01N 33/577(2006.01) G01N 33/532(2006.01)</p> <p>(56) 对比文件 CN 101441211 A, 2009.05.27, 权利要求 1-4、7, 说明书第 1-2 页。 CN 101521067 A, 2009.09.02, 权利要求 1-2、9, 说明书第 5 页。 CN 101105497 A, 2008.01.16, 说明书第 4-5</p>	<p>页。 CN 101059519 A, 2007.10.24, 说明书第 2 页。 CN 101566634 A, 2009.10.28, 说明书第 2-4 页。 CN 1662815 A, 2005.08.31, 说明书第 1-7、 11 页。 CN 101231288 A, 2008.07.30, 全文。 CN 101676727 A, 2010.03.24, 全文。 CN 1948383 A, 2007.04.18, 全文。 WO 2009/072657 A1, 2009.06.11, 全文。 审查员 王在竹</p>
--	--

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂

(57) 摘要

本发明公开了一种心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂及其制备方法和用途,其特点是该检测试剂为有机硅包裹的纳米金微粒,微粒的粒径为 10 ~ 150nm, 纳米硅涂层为 5 ~ 100nm, 所述的有机硅涂层表面引入胺基、羧基、羟基、氢硫基、环丙烷基和醛基功能基团,功能化的有机硅表面通过化学反应与生物分子如蛋白质、抗体进行标记,形成稳定的共价键连接,并保持被标记分子的生物活性;这种改性的纳米金可以取代传统胶体金用于免疫学领域,制备免疫试剂;用这种改性的纳米胶体可以制备心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂。

CN 102192986 B

1. 一种心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂,其特征在于该检测试剂含有有机硅包裹的纳米金微粒,该微粒的核心粒径为 10 ~ 150nm,有机硅表面涂层为 5 ~ 100nm,所述有机硅表面涂层引入氨基、羧基、羟基、氢硫基、环丙烷基和醛基功能基团,功能化的有机硅表面涂层通过化学反应与生物分子进行标记,形成稳定的共价键连接,并保持被标记分子的生物活性;

并按以下工艺步骤及工艺参数制备:

(1) 有机硅包裹的纳米金微粒的制备及表面功能化

将浓度为 0.01 ~ 4% 氯金酸溶液 100 重量份加热,在 100 ~ 400rpm 搅拌下煮沸 10 ~ 120 分钟,快速加入浓度为 2N 氨水溶液 0.1 ~ 5 重量份和浓度为 1% 的柠檬酸钠 2 ~ 10 重量份,高速搅拌至溶液呈现橙红色,冷却后高速离心纯化,获得微粒粒径在 10 ~ 150nm 的胶体金微粒,并将制得的胶体金分装保存;再将上述制得的胶体金溶液 100 重量份,加入 200 ~ 500 重量份溶剂,在 100 ~ 400rpm 搅拌 15 ~ 120 分钟,用氨水调节溶液 pH 值至碱性,加入 0.1 ~ 2 重量份 1 : 1 的四乙氧基硅烷和含功能基团的硅烷化试剂的混合溶液,在室温下继续搅拌 18 ~ 24 小时,对产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机硅包裹纳米金表面功能化改性的纳米微粒;

(2) 心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂的制备

采用双抗免疫夹心法将上述制得的纳米微粒标记的心肌肌钙蛋白 I 单克隆检测抗体喷点于玻璃纤维垫片上,另一心肌肌钙蛋白 I 单克隆捕捉抗体和单克隆检测抗体的二抗喷点于硝酸纤维素膜,形成抗心肌肌钙蛋白 I 的快速检测试纸条,再将该检测试纸条制成试剂盒。

2. 如权利要求 1 所述心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂,其特征在于有机硅包裹的纳米金微粒的核心粒径为 50 ~ 100nm。

3. 如权利要求 1 所述心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂,其特征在于有机硅包裹的纳米金微粒的核心粒径为 55-75nm。

4. 如权利要求 1 所述心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂,其特征在于生物分子为蛋白质或抗体。

5. 如权利要求 1 所述心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂,其特征在于溶剂为乙醇、异丙醇、甲醇、正丁醇中的任一种。

6. 如权利要求 1 所述心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂,其特征在于含功能基团的硅烷化试剂为 3-氨基丙基三乙氧基硅烷、马来酰胺酸丙基三乙氧基硅烷、3-硫基丙基三乙氧基硅烷或(3-环氧丙氧基丙基)二甲基乙氧基硅烷中的任一种。

## 一种心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种心肌肌钙蛋白 I (TROPONIN I) 的检测试剂及其制备方法和用途, 属于生物医药检测试剂领域。

### 背景技术

[0002] 心血管疾病是威胁人类生命健康的第一重大疾病。根据世界卫生组织最新统计, 全球每年有 1670 万人死于各类心脑血管疾病, 这一数字占有所有疾病死亡的 29.2%, 其中有一半以上死于急性心肌梗死。在我国, 近 10 年来, 我国急性心肌梗死的发病率明显上升, 已接近国际平均水平。冠心病发病率占总人口的 6% 左右, 实际的冠心病患者人数达 780 万人。而且由于缺乏冠心病的防治常识, 很多患者就诊时已到晚期, 以急性心肌梗死 (AMI) 为首发症状。

[0003] 目前国内外对 AMI 诊断标准是临床症状如胸痛, 心电图异常以及血清心肌生化标志物异常。但是在 AMI 初期, 约 25% 病人没有典型的临床症状, 约一半的病人心电图没有典型异常变化, 因此检测 AMI 初期病人心脏损伤时的血液样品中生化标志物异常在 AMI 临床诊断中具有重要参考意义。

[0004] 在我国各级医院中, 在化验室中检测的主要生化标志物包括: 肌钙蛋白 Troponin-I (TNI), Troponin-T (TNT), 肌红蛋白 Myoglobin 和肌酸磷酸激酶 CK-MB。其中 CK-MB 大量存在于心肌中, 一般在 AMI 发病 4-8 小时升高, 12-20 小时达到高峰, 七十年代初以来被公认为是检测 AMI 的“金标准”。但是 CK-MB 特异性较差, 马拉松赛跑、骨骼肌损伤、肾衰者 CK-MB 含量均可异常增高。CK-MB 在血液中存在的时间也较短 (1-4 天)。随着检测技术的发展, 心肌肌钙蛋白 I (CTnI) 已被证实为心肌损伤最特异, 最敏感的血清标志物之一。正常人血液中 CTnI 的含量一般低于 0.4ng/ml, 在 AMI 发生后, CTnI 可在 6-8 小时内快速升高, 在 18-24 小时内达到峰值, 并在 10-15 天内都维持较高浓度。对 CTnI 的临床快速检测具有重要的社会和经济效益。

[0005] 现有的 CTnI 检测方法主要有酶联免疫法 (ELISA, 化学发光法和免疫荧光法。ELISA 的最低检测灵敏度可达到 0.2ng/mL, 测定周期长, 达 5-6 小时。化学发光法是将发光分析和免疫反应相结合而建立起来的微量抗原或抗体的标记免疫分析技术, 其灵敏度高达 0.03ng/mL, 检测时间也较短, 约 1-2 小时, 但需要采用专用大型设备, 操作复杂。免疫荧光法采用夹心和酶联荧光相结合的方法, 检测时间较快, 最高灵敏度可达到 0.1ng/mL, 也需要专门仪器。这些检测方法都需要昂贵仪器和专业人员操作, 只适用于在中心实验室使用, 检测结果到达医生手中的时间较长, 不能满足临床快速检测需要, 也不适合于中小医院尤其是没有中心实验室的乡镇医院。

[0006] 国内现有的快速检测 CTnI 的试剂盒主要采用传统胶体金免疫层析法制备。其基本原理是采用胶体金标记单株或多株抗 CTnI 的单克隆抗体, 采用双抗免疫夹心来检测 CTnI, 中国专利 200710022815. x, 200810036418. 2 已有报导。市场上所有的基于 CTnI 快速检测试剂盒检测灵敏度一般在 2-10ng/ml 范围内。

[0007] 胶体金即指金微粒的悬浮液,其直径在 1 ~ 100nm,具有高电子密度、介电特性和催化作用,能与多种生物大分子结合,且不影响其生物活性。其颜色依直径大小而呈红色至紫色。传统胶体金的合成过程,其对单克隆抗体的标记,固相免疫层析试纸条的制备均有报导。在二十世纪八十年代,胶体金首先被应用于蛋白分子的标记和体外检测领域。

[0008] 胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,这种结合是静电结合,虽然不影响蛋白质的生物特性,也比较稳定,但是这种结合受溶液离子强度, pH 影响很大,尤其是在高离子强度溶液中,胶体金发生凝聚,用纳米金标记的生物分子也随时间变化变得不稳定,影响了胶体金对很多生物分子的标记以及在生物样品中的应用。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂及其制备方法和用途,其特点是合成新型纳米微粒,纳米微粒表面功能化,以及纳米微粒对抗体的标记方法。它还包含试剂条,试剂条上含有抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体以及改性纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗。

[0010] 本发明的目的由下技术措施实现:其中所述原料份数除特殊说明外,均为重量份数。

[0011] 心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂及其制备方法:

[0012] 心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂

[0013] 有机硅包裹纳米金微粒的核心粒径为 10 ~ 150nm,优选为 50 ~ 100nm,最优选为 55 ~ 75nm,有机硅表面涂层为 5-100nm,所述有机硅涂层表面引入氨基、羧基、羟基、氢硫基、环丙烷基和醛基功能基团,功能化的有机硅表面通过化学反应与生物分子如蛋白质、抗体进行标记,形成稳定的共价键连接,并保持被标记分子的生物活性。

[0014] 心肌肌钙蛋白 I 检测试剂的制备方法包括以下步骤:

[0015] 1. 传统的胶体金的制备

[0016] 将浓度为 0.01 ~ 4% 氯金酸溶液 100 份加热,在 100 ~ 400rpm 搅拌下煮沸 10 ~ 120 分钟,快速加入浓度为 2N 氨水溶液 0.1 ~ 5 份和浓度为 1% 的柠檬酸钠 2 ~ 10 份,高速搅拌至溶液呈现橙红色,冷却后高速离心纯化,获得微粒径在 10 ~ 200nm 的胶体金微粒,并将制得的胶体金分装保存;

[0017] 2. 有机硅包裹的纳米金微粒的制备

[0018] 将上述制得的胶体金溶液 100 份,加入 0.1 ~ 2 份 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,在 100 ~ 400rpm 搅拌 15 ~ 120 分钟,加入 200 ~ 500 份溶剂,用氨水调节溶液 pH 值至碱性,加入 0.1 ~ 2 份四乙氧基硅烷混合物,在室温下继续搅拌 18-24 小时,对产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机硅包裹的纳米金微粒;

[0019] 3. 有机硅包裹纳米金的表面功能化

[0020] 将上述制得的胶体金 100 份加入 200 ~ 500 份溶剂,在 100 ~ 400rpm 搅拌 15 ~ 120 分钟,用氨水调节 pH 值至碱性,加入 0.1 ~ 2 份 1 : 1 的四乙氧基硅烷和含有有机功能基团的硅烷化试剂的混合溶液,在室温下继续搅拌 18 ~ 24 小时,产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机包裹纳米金表面功能化改性的纳米微粒;

[0021] 4. 有机硅包裹的纳米金对心肌钙蛋白 I 单克隆抗体的标记

[0022] 采用表面羧基化有机硅包裹纳米金通过乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)活化其表面羧基并与心肌钙蛋白 I 单克隆抗体 Fc 的氨基反应,形成化学性能稳定的酰胺结构,这种稳定的化学键不受溶液的离子强度,酸碱性影响,从而增加了标记的心肌钙蛋白 I 单克隆抗体的化学和储存稳定性。将标记好的心肌钙蛋白 I 单克隆抗体喷涂在玻璃纤维垫片上,形成金标垫。

[0023] 5. 试剂盒的制备

[0024] 将一株 CTnI 的单克隆抗体作为检测抗体配制浓度为 1.5mg/ml 的抗体磷酸缓冲溶液,加入 2% 海藻糖 1 ~ 20 份,喷印到活化的硝酸纤维素膜上,形成检测线;将 CTnI 的单克隆抗体的二抗如羊抗鼠 IgG 喷印到硝酸纤维素膜上形成质量控制线;将硝酸纤维素膜干燥 2-10 小时,制备检测 CTnI 的硝酸纤维素膜。将金标垫,样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫粘贴在塑料板上,把塑料板切割成 5mm 宽度检测 CTnI 试纸条,再将 CTnI 检测试纸条装入塑料盒,制成检测 CTnI 的试剂盒。

[0025] 6. 心肌钙蛋白 I 的快速检测方法

[0026] 将全血 / 血清样品加入试剂盒上的样品孔,渗透到样品垫上,样品中 CTnI 与有机硅包裹纳米金标记的 CTnI 的单克隆检测抗体相遇结合形成复合物,复合物继续顺硝酸纤维素膜渗透到检测线与固定在检测线上的 CTnI 单克隆捕捉抗体形成夹心双抗体的复合结合,在检测线上显示纳米金的红色,检测结果为阳性;多余纳米金标记的 CTnI 单克隆检测抗体在渗析到质量控制线时,与固定在质量控制线上的二抗形成夹心结合,使质控线也显示红色,表明样品在硝酸纤维素膜上的渗析完全,该检测结果有效。如果样品中 CTnI 含量低于检测灵敏度,纳米金标记的 CTnI 单克隆检测抗体不能与检测线上固定的捕捉抗体形成有效夹心复合结合,检测线不会显示红色,检测结果为阴性,但是纳米金标记的 CTnI 单克隆检测抗体仍然能与固定在质控线上的单克隆二抗形成夹心结合,在质控线上显示红色,表明检测结果有效。这种方法是本领域技术人员熟知的技术。

[0027] 有机功能基团为氨基、羧基、氢硫基、羟基、环丙烷基或醛基功能基团中的任一种。

[0028] 溶剂为乙醇、异丙醇、甲醇、正丁醇中的任一种。

[0029] 有机硅包裹纳米金表面功能化改性的纳米金微粒通过化学反应与生物分子进行标记,形成稳定的共价键连接。

[0030] 检测试剂用于临床快速检测心肌梗塞病人血液中的心肌钙蛋白 I 的含量。

[0031] 本发明具有如下优点:

[0032] 1、本发明采用有机硅对传统的纳米金微粒进行包裹,在其表面形成纳米厚度的硅涂层,对硅涂层表面进行化学改性,引入羧基,氨基,羟基,氢硫基,环丙烷基和醛基功能基团。有机硅改性的纳米金较传统的胶体金具有更好的稳定性,不容易发生金颗粒的凝聚。硅表面引入的化学功能基团与生物分子如蛋白,抗体,抗原形成稳定化学共价键结合,制备更加稳定的纳米金标记物。这种改性的纳米金可以取代传统胶体金用于免疫学领域,制备免疫试剂。

[0033] 2、利用该纳米金对生物蛋白,抗体进行标记,在生物分子和纳米金微粒间形成稳定共价键,提高了被标记分子的化学和储存稳定性。

[0034] 3、表面硅涂层可以提高纳米材料的表面反射光强度,从而提高该材料的肉眼分辨

率,提高了免疫试剂的灵敏度,可达到 0.4ng/mL。

[0035] 4、利用该有机硅包裹的纳米金对心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体标记并通过免疫层析法制备检测心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂盒,大大提高了心肌肌钙蛋白 I 的检测速度。

### 具体实施方式

[0036] 下面通过实施例对本发明进行具体的描述,有必要在此指出的是本实施例只用于对本发明进行进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,该领域的技术熟练人员可以根据上述本发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

#### [0037] 实施例 1

##### [0038] 1: 有机硅包裹纳米金颗粒的制备及表面氨基化

[0039] 纳米金颗粒溶液的制备: 采用柠檬酸钠还原法制备胶体金微粒溶液,胶体金的微粒大小控制在 10-150nm。将浓度为 1% 的氯金酸去离子水溶液 100 份,高速搅拌并煮沸 10 分钟。快速加入浓度为 2N 的氢胺溶液 0.1 份和浓度为 1% 的柠檬酸钠 2 份,高速搅拌,溶液呈现橙红色,冷却后高速离心纯化得到微粒的粒径为 55-75nm 的胶体金微粒,得到的胶体金保存一段时间然后对胶体金表面进行有机硅包裹并胺基化改性,取得到的胶体金溶液 100 份,加入 300 份乙醇,在 100 ~ 400rpm 搅拌 15 分钟,用氨水调节溶液 pH 至碱性,加入 1 份 1:1 混合的四乙氧基硅烷和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷混合溶液,在室温下继续搅拌 18-24 小时,产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机硅包裹表面氨基化的新型纳米金微粒。

##### [0040] 2 表面氨基化有机硅包裹纳米金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体

[0041] 在 100 份上述描述的方法制备的有机硅包裹表面胺基化的纳米金溶液中,加入 10 份交联剂和 100 微克抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体继续反应 2 小时,然后加入浓度为 10% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 0.1 份,继续反应 1 小时。高速离心纯化后得到表面氨基化有机硅包裹纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。

##### [0042] 3 心肌肌钙蛋白 I 试剂盒的制备

[0043] 将上述制备的改性纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 的单抗喷涂到玻璃纤维纸片上制备免疫改性纳米金纸片。用喷点仪器将心肌肌钙蛋白 I 的单克隆捕捉抗体和二抗 IgG (1.5mg/mL) 喷点于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线上,在温度 37°C 干燥 2 小时,获得到免疫硝酸纤维素膜片条,将吸水纸粘贴于免疫硝酸纤维素膜片条上,并切割成 5mm 宽试纸条,将切割的试纸条,金标纸和样品垫,过滤垫组装在样品盒中,制成心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒。

#### [0044] 实施例 2

##### [0045] 1 有机硅包裹纳米金颗粒的制备及表面羧基化

[0046] 按实施例 1 所描述的方法制备粒径为 55-75nm 的胶体金微粒,取上述制得胶体金溶液 100 份,加入 250 份乙醇,在 100 ~ 400rpm 搅拌 65 分钟,用氨水调节溶液 pH 至碱性,加入 1 份四乙氧基硅烷,反应 2 小时,再加入 1 份马来酰胺酸丙基三乙氧基硅烷,在室温下继续搅拌 18-24 小时,产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机硅包裹表面羧基化的新型纳米金微粒。

##### [0047] 2 表面羧基化有机硅包裹纳米金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体

[0048] 在 100 份上述描述的方法制备的有机硅包裹表面羧基化的纳米金溶液中,加入 5 份 1:1 混合的浓度为 20mmol/L 乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和浓度为 20mmol/L N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 混合溶液,在室温下反应 45 分钟,加入 50 微克抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体继续反应 2 小时,然后加入浓度为 10% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 0.1 份,继续反应 1 小时。高速离心纯化后得到表面羧基化有机硅包裹纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。

[0049] 3 心肌肌钙蛋白 I 试剂盒的制备

[0050] 将上述制备的改性纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 的单抗喷涂到玻璃纤维纸片上制备免疫改性纳米金纸片。用喷点仪器将心肌肌钙蛋白 I 的单克隆捕捉抗体和二抗 IgG (1.5mg/mL) 喷点于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线上,在温度 37°C 干燥 2 小时,获得到免疫硝酸纤维素膜片条,将吸水纸粘贴于免疫硝酸纤维素膜片条上,并切割成 5mm 宽试纸条,将切割的试纸条,金标纸和样品垫,过滤垫组装在样品盒中,制成心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒。

[0051] 实施例 3

[0052] 1: 有机硅包裹纳米金颗粒的制备及表面氢硫基化

[0053] 按实施例 1 所描述的方法制备粒径为 55-75nm 的胶体金微粒,取上述制得的胶体金溶液 100 份,加入 200 份异丙醇,在 100 ~ 400rpm 搅拌 120 分钟,用氨水调节溶液 pH 至碱性,加入 0.1 份 1:1 混合的四乙氧基硅烷和 3-硫基丙基三乙氧基硅烷混合溶液,在室温下继续搅拌 18-24 小时。产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机硅包裹表面氢硫基化的新型纳米金微粒。

[0054] 2 表面氢硫基化有机硅包裹纳米金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体

[0055] 将 100 微克心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的磷酸缓冲液中加入 5 微克活化剂,室温下反应 20 分钟,用凝胶色谱柱纯化反应物,得到活化的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体溶液。将活化的单克隆抗体中加入 1 份实施例 3 中描述的有机硅包裹的纳米金溶液,室温下反应 1 小时,加入浓度为 5% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 0.1 份,继续反应 1 小时,高速离心纯化后得到表面氢硫基化有机硅包裹纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,标记的抗体与硅包裹纳米金之间形成稳定的化学共价键连接,增加了标记抗体的化学稳定性和储存稳定性。

[0056] 3 心肌肌钙蛋白 I 试剂盒的制备

[0057] 将上述制备的改性纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 的单抗喷涂到玻璃纤维纸片上制备免疫改性纳米金纸片。用喷点仪器将心肌肌钙蛋白 I 的单克隆捕捉抗体和二抗 IgG (1.5mg/mL) 喷点于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线上,在温度 37°C 干燥 2 小时,获得到免疫硝酸纤维素膜片条,将吸水纸粘贴于免疫硝酸纤维素膜片条上,并切割成 5mm 宽试纸条,将切割的试纸条,金标纸和样品垫,过滤垫组装在样品盒中,制成心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒。

[0058] 实施例 4

[0059] 1: 有机硅包裹纳米金颗粒的制备及表面环丙烷基化

[0060] 按实施例 1 所描述的方法制备粒径为 55-75nm 的胶体金微粒,取上述制得胶体金溶液 100 份,加入 250 份乙醇,在 100 ~ 400rpm 搅拌 75 分钟,用氨水调节溶液 pH 至碱性,

加入 1 份四乙氧基硅烷,反应 2 小时,再加入 1 份(3-环氧丙氧基丙基)二甲基乙氧基硅烷,在室温下继续搅拌 18-24 小时,产物在 2000 ~ 10000rpm 高速离心纯化,获得有机硅包裹表面环丙烷基化的新型纳米金微粒。

[0061] 2 表面环丙烷基化有机硅包裹纳米金标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体

[0062] 在 100 份上述描述的方法制备的有机硅包裹表面丙烷基的纳米金溶液中,加入 50 微克抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体在 38°C 继续反应 2 小时,然后加入浓度为 10% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液 0.1 份,继续反应 1 小时。高速离心纯化后得到表面环丙烷基化有机硅包裹纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。

[0063] 3 心肌肌钙蛋白 I 试剂盒的制备

[0064] 将上述制备的改性纳米金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 的单抗喷涂到玻璃纤维纸片上制备免疫改性纳米金纸片。用喷点仪器将心肌肌钙蛋白 I 的单克隆捕捉抗体和二抗 IgG (1.5mg/mL) 喷点于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线上,在温度 37°C 干燥 2 小时,获得到免疫硝酸纤维素膜片条,将吸水纸粘贴于免疫硝酸纤维素膜片条上,并切割成 5mm 宽试纸条,将切割的试纸条,金标纸和样品垫,过滤垫组装在样品盒中,制成心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒。

专利名称(译)	一种心肌肌钙蛋白I的检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN102192986B</a>	公开(公告)日	2014-06-11
申请号	CN201010127883.4	申请日	2010-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	胡卫红		
申请(专利权)人(译)	胡卫红		
当前申请(专利权)人(译)	成都盛泰尔生物医药科技有限公司		
[标]发明人	胡卫红		
发明人	胡卫红		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532		
其他公开文献	CN102192986A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种心肌肌钙蛋白I的检测试剂及其制备方法和用途，其特点是该检测试剂为有机硅包裹的纳米金微粒，微粒的粒径为10~150nm，纳米硅涂层为5~100nm，所述的有机硅涂层表面引入胺基、羧基、羟基、氢硫基、环丙烷基和醛基功能基团，功能化的有机硅表面通过化学反应与生物分子如蛋白质、抗体进行标记，形成稳定的共价键连接，并保持被标记分子的生物活性；这种改性的纳米金可以取代传统胶体金用于免疫学领域，制备免疫试剂；用这种改性的纳米胶体可以制备心肌肌钙蛋白I的检测试剂。