



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108614110 A

(43)申请公布日 2018.10.02

(21)申请号 201810418742.4

(22)申请日 2018.05.03

(71)申请人 常州领航量子生物医疗科技有限公司

地址 213000 江苏省常州市天宁区青洋北路143号

(72)发明人 李小冬 高省

(74)专利代理机构 常州智慧腾达专利代理事务所(普通合伙) 32328

代理人 杨雪

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

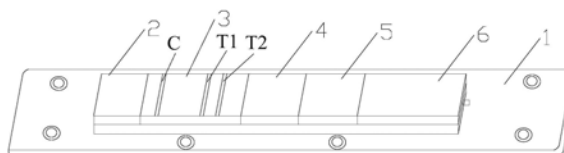
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明属于生物检测领域,具体涉及一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法,检测垫上设有检测线T1、检测线T2和质控线,检测线T1上包被有钙卫蛋白单克隆抗体,检测线T2上包被有血红蛋白单克隆抗体,质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG,标记垫上包被有量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点标记的血红蛋白单克隆抗体的混合物,所述量子点为两种不同颗粒粒径的混合物。本发明的试剂盒可以同步检测粪便中的钙卫蛋白和便潜血,可以快速简便的判断肠粘膜损伤程度,检测灵敏度高,特异性好。



1. 一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒,其特征在于:包括免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板(1),底板(1)的一面上顺序搭接有吸水垫(2)、检测垫(3)、标记垫(4)、第一样品垫(5)和第二样品垫(6),检测垫(3)上设有检测线T1、检测线T2和质控线,检测线T1上包被有钙卫蛋白单克隆抗体,检测线T2上包被有血红蛋白单克隆抗体,质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG,标记垫(4)上包被有量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点标记的血红蛋白单克隆抗体的混合物,所述量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体为量子点荧光微球标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白单克隆抗体混合而成,所述量子点标记的血红蛋白单克隆抗体为量子点荧光微球标记的血红蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的血红蛋白单克隆抗体混合而成,所述量子点荧光微球的粒径与量子点修饰物的粒径不同。

2. 根据权利要求1所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒,其特征在于:所述量子点荧光微球为量子点与微球的复合物,量子点荧光微球表面带有基团,其粒径为150-180nm,所述量子点修饰物为量子点表面经基团修饰而成,其粒径为20-50nm,所述量子点为硅、锗、硫化镉、碲化镉、硒化锌、硫化铅、硒化铅、砷化铟、硒化镉或磷化铟,所述微球为聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚乙烯甲苯微球或二氧化硅微球。

3. 根据权利要求2所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒,其特征在于:所述基团为羧基,量子点荧光微球标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白单克隆抗体的混合比例为1:0.1-10。

4. 根据权利要求1所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒,其特征在于:检测垫(3)的材质为硝酸纤维素膜,标记垫(4)的材质为玻璃纤维素。

5. 根据权利要求1所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒对钙卫蛋白的检测灵敏度达到0.1ng/ml,对血红蛋白的检测灵敏度达到5ng/ml。

6. 一种权利要求1所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(I) 标记垫(4)的制备

取量子点荧光微球标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合,形成量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体,取量子点荧光微球标记的血红蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的血红蛋白单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合,形成量子点标记的血红蛋白单克隆抗体,将量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点标记的血红蛋白单克隆抗体按照1:1的比例混合,将混合液喷涂在玻璃纤维素垫上,干燥,备用;

(II) 检测垫(3)的制备

取硝酸纤维素膜,间隔划出检测线T1、检测线T2和质控线,检测线T1上包被钙卫蛋白单克隆抗体,检测线T2上包被血红蛋白单克隆抗体,质控线上包被羊抗鼠或羊抗兔IgG,将包被好的硝酸纤维素膜干燥,备用;

(III) 免疫层析试纸条制备

在底板(1)上依次搭接吸水垫(2)、检测垫(3)、标记垫(4)、第一样品垫(5)和第二样品垫(6),组装完毕后剪切成条即可;

(IV) 试剂盒组装

将试纸条装入塑料板卡上,扣上上盖,密封保存。

7. 根据权利要求6所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤(I)中,量子点荧光微球标记的钙卫蛋白/血红蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白/血红蛋白单克隆抗体的制备方法为:取量子点荧光微球或量子点修饰物,加入标记缓冲液中,混匀后,分别使用不同的活化缓冲液活化,活化完成后,加入钙卫蛋白单克隆抗体或血红蛋白单克隆抗体,超声混匀并振荡反应,然后加入封闭缓冲液进行封闭反应,最后离心去上清液,对沉降的固体重悬,超声混匀即可。

8. 根据权利要求7所述的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述标记缓冲液为4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液,所述活化缓冲液为N-羟基琥珀酰亚胺活化缓冲液和碳二亚胺活化缓冲液,所述封闭缓冲液为甘氨酸溶液和酪蛋白钠溶液。

一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 钙卫蛋白(calprotectin)属于S-100家族,是一个相对分子质量为36kDa的钙-锌结合蛋白,由两条MRP-8链和一条MRP-14链构成的异源三聚体,主要来源于中性粒细胞,是中性粒细胞更新的重要标志物。

[0003] 粪便中钙卫蛋白的出现是肠胃增生性疾病和肠道炎症感染性疾病的标志。一般情况下,单从疾病症状上很难区分急性肠道激惹所引起的不适病症与慢性感染性胃肠道疾病,从而导致了无必要及过度的肠镜滥用,钙卫蛋白是急性胃肠道感染的一种标志,并且由此可以判断感染的程度。

[0004] 便隐血(FOBT):也称为便潜血,是指消化道出血量很少时,红细胞也被破坏,血红蛋白分子释放到粪便中,粪便外观无异常改变,肉眼和显微镜均不能证实的出血,只能化学方法或免疫学方法检测到。

[0005] 由于肠道的出血是间断性的,不是持续性出血,出血速度可能低于或超出潜血试验的检测阈值等原因,便潜血试验的敏感性还是不尽人意。同粪便潜血相比较,粪便钙卫蛋白能发现早期不出血病灶,而且结果不受全身情况、饮食成分、一般药物及营养支持治疗的影响。

[0006] 目前评价肠炎的金标准是结肠镜活检。这项技术可以让我们对肠道进行目测检查,并且能够获得粘膜活检标本用于组织学检查。疾病的位置、范围和严重性都可以用这种方法确立,但是它具有侵害性,不能检查全部的胃肠道,而且需要熟练的操作员和不舒服的肠道准备。无线胶囊内镜使我们能够形象化的看到整个小肠。然而,这种检查也有点侵害性且受到费用和不能够获得组织样本的限制,从而阻碍了内镜技术对疾病活动性的评估。这样,用一个简单、快速、灵敏、特异和非侵入性的标志物去检测和监控炎症性肠病患者是非常有必要的。粪便钙卫蛋白(FC)具有这些特性。

[0007] 同结肠镜相比,粪便钙卫蛋白和便潜血的检测具有简便、经济、无创性等优点,一定程度上可以避免结肠镜检查的痛苦,弥补患者不能随时复查的不足。为了能够准确测定肠粘膜损伤,很多时候需要同时测定粪便中钙卫蛋白及潜血症状。

[0008] 目前,检测便潜血的试剂相对较多,但是都是定性检测,没有定量检测的试剂。粪便钙卫蛋白的检测试剂很少,只有酶联免疫和胶体金免疫层析的方法。酶联免疫的方法存在操作繁琐,检测时间长和无法及时进行单人份检测等诸多问题;胶体金免疫层析的方法虽然操作简便,检测时间短,但是存在检测灵敏度较低和检测线性范围窄等因素,检测结果不准确。

发明内容

[0009] 本发明主要提供了一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法,该试剂盒可以同步检测粪便中的钙卫蛋白和便潜血,可以快速简便的判断肠粘膜损伤程度,检测灵敏度高,特异性好。

[0010] 一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒,包括免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板,底板的一面上顺序搭接有吸水垫、检测垫、标记垫、第一样品垫和第二样品垫,检测垫上设有检测线T1、检测线T2和质控线,检测线T1上包被有钙卫蛋白单克隆抗体,检测线T2上包被有血红蛋白单克隆抗体,质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG,标记垫上包被有量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点标记的血红蛋白单克隆抗体的混合物,所述量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体为量子点荧光微球标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白单克隆抗体混合而成,所述量子点标记的血红蛋白单克隆抗体为量子点荧光微球标记的血红蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的血红蛋白单克隆抗体混合而成,所述量子点荧光微球的粒径与量子点修饰物的粒径不同。

[0011] 优选的,所述量子点荧光微球为量子点与微球的复合物,量子点荧光微球表面带有基团,其粒径为150-180nm,所述量子点修饰物为量子点表面经基团修饰而成,其粒径为20-50nm,所述量子点为硅、锗、硫化镉、碲化镉、硒化锌、硫化铅、硒化铅、砷化铟、硒化镉或磷化铟,所述微球为聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚乙烯甲苯微球或二氧化硅微球。

[0012] 优选的,所述基团为羧基,量子点荧光微球标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白单克隆抗体的混合比例为1:0.1-10。

[0013] 优选的,检测垫的材质为硝酸纤维素膜,标记垫的材质为玻璃纤维素。

[0014] 优选的,所述试剂盒对钙卫蛋白的检测灵敏度达到0.1ng/ml,对血红蛋白的检测灵敏度达到5ng/ml。

[0015] 一种上述测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (I) 标记垫的制备

[0017] 取量子点荧光微球标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合,形成量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体,取量子点荧光微球标记的血红蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的血红蛋白单克隆抗体按照1:0.1-10的比例混合,形成量子点标记的血红蛋白单克隆抗体,将量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点标记的血红蛋白单克隆抗体按照1:1的比例混合,将混合液喷涂在玻璃纤维素垫上,干燥,备用;

[0018] (II) 检测垫的制备

[0019] 取硝酸纤维素膜,间隔划出检测线T1、检测线T2和质控线,检测线T1上包被钙卫蛋白单克隆抗体,检测线T2上包被血红蛋白单克隆抗体,质控线上包被羊抗鼠或羊抗兔IgG,将包被好的硝酸纤维素膜干燥,备用;

[0020] (III) 免疫层析试纸条制备

[0021] 在底板上依次搭接吸水垫、检测垫、标记垫、第一样品垫和第二样品垫,组装完毕后剪切成条即可;

[0022] (IV) 试剂盒组装

[0023] 将试纸条装入塑料板卡上,扣上上盖,密封保存。

[0024] 优选的,步骤(I)中,量子点荧光微球标记的钙卫蛋白/血红蛋白单克隆抗体与量子点修饰物标记的钙卫蛋白/血红蛋白单克隆抗体的制备方法为:取量子点荧光微球或量子点修饰物,加入标记缓冲液中,混匀后,分别使用不同的活化缓冲液活化,活化完成后,加入钙卫蛋白单克隆抗体或血红蛋白单克隆抗体,超声混匀并振荡反应,然后加入封闭缓冲液进行封闭反应,最后离心去上清液,对沉降的固体重悬,超声混匀即可。

[0025] 优选的,所述标记缓冲液为4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液,所述活化缓冲液为N-羧基琥珀酰亚胺活化缓冲液和碳二亚胺活化缓冲液,所述封闭缓冲液为甘氨酸溶液和酪蛋白钠溶液。

[0026] 采用上述方案,本发明具有以下优点:

[0027] (1) 在判断肠粘膜损伤时,通常需要首先确定是急性胃肠道感染还是慢性感染性胃肠道疾病,并且需辨别是否有潜血症状,本发明试剂盒可以联合检测粪便中的钙卫蛋白和便潜血,能够快速判断是否是急性胃肠道感染,对于不出血的肠道病灶也能检测的出,对于肠粘膜损伤疾病的诊断具有重要意义。通过实现联检,使用通用的样本缓冲液,一次加样,可以同时获得两个结果,联合检测可以提高检测的灵敏度和特异性。不仅如此,对于单克隆抗体,采用不同粒径混合的量子点标记,既能提高检测灵敏度,又提高了检测的线性范围;

[0028] (2) 通常情况下,钙卫蛋白的检测,如果使用胶体金的方法,检测的灵敏度只能做到20ng/ml,其线性范围大概在30-600ng/ml。使用ELISA的方法,灵敏度大概在1-5ng/ml,线性范围大概在5-1200ng/ml。临床的样本有一部分会超过1200ng/ml的含量,遇到这样的样本,需要进行稀释后重新检测,而采用本方法,可以完全覆盖所有样本的检测,最高可以检测到4000ng/ml的量,不仅如此,对钙卫蛋白的检测灵敏度可以达到0.1ng/ml。目前对于FOB的检测,市面上的大多数产品都只能做到200ng/ml的检测下限,极少部分可以达到100或50ng/ml的检测下限。而采用本方法,我们可以做到5ng/ml的检测灵敏度;

[0029] (3) 量子点产品具有发光信号持久、稳定和抗光漂白的特性,因此检测的重复性大幅提升,变异值在3%以内,产品的稳定性好,同时,批内和批间变异系数(CV值)分别可以达到5%和8%以内,检测的精密度高。

附图说明

[0030] 图1为本发明的测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒的内部结构示意图;

[0031] 图2为图1所示测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒的外部结构示意图。

[0032] 其中:1、底板,2、吸水垫,3、检测垫,4、标记垫,5、第一样品垫,6、第二样品垫。

具体实施方式

[0033] 实施例1

[0034] 1、制备量子点标记的钙卫蛋白抗体1的混合物

[0035] (1) 取量子点荧光微球1ml (浓度为10mg/ml,粒径为180nm,CdSe/ZnS,表面基团为羧基,激发波长410,发射波长615,采购自:苏州为度生物技术有限公司),加入16.5ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0036] 标记缓冲液

[0037]

名称	每升液体用量
Hepes(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)	0.476 g
纯化水	调整PH值至7.40±0.05并定容至1000ml
储存条件：2-8℃冷藏保存10天	

[0038] (2) 分别加入活化缓冲液1和活化剂缓冲液2各0.5ml, 37℃振荡反应25分钟, 期间每隔4分钟超声分散20秒;

[0039] 活化缓冲液1

[0040]

名称	每升液体用量
NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)	120g
纯化水	1000ml
现用现配, 有效期30分钟	

[0041] 活化缓冲液2

[0042]

名称	每升液体用量
EDC (碳二亚胺)	45g
纯化水	1000ml
现用现配, 有效期30分钟	

[0043] (3) 加入1.4mg钙卫蛋白抗体1(采购自:Medix Biochemica公司), 超声混匀, 37℃振荡反应1小时20分钟, 期间每隔8分钟超声分散25秒;

[0044] (4) 加入1.5ml封闭缓冲液1, 37℃混匀8分钟;

[0045] 封闭缓冲液1

[0046]

名称	每升液体用量
甘氨酸	15g
纯化水	1000ml
现用现配	

[0047] (5) 加入6ml封闭剂缓冲液2, 37℃振荡反应1.5小时;

[0048] 封闭缓冲液2

[0049]

名称	每升液体用量
CASEIN(酪蛋白钠)	120g
纯化水	1000ml
现用现配	

[0050] (6) 低温离心机3500g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散,超声3次,每次30秒,直至混匀。

[0051] 重悬缓冲液

[0052]

试剂	每升液体用量
HEPES	0.536g
BSA	30g
CASEIN	12g
甘氨酸	8g
蔗糖	100g
吐温-20	30mL
加纯化水至	1000 ml
现用现配	

[0053] (7) 取量子点修饰物1ml (浓度为10mg/ml,粒径为30nm,CdSe/ZnS,表面基团位羧基,激发波长410,发射波长615),加入19ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0054] (8) 分别加入0.8ml活化缓冲液1和0.8ml活化剂缓冲液2,37℃振荡反应30分钟,期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0055] (9) 加入1.8mg钙卫蛋白抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时40分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0056] (10) 加入2ml封闭缓冲液1,37℃混匀10分钟;

[0057] (11) 加入6.5ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应2小时;

[0058] (12) 低温离心机11000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散,超声5次,每次30秒,直至混匀。

[0059] (3) 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比1:1的比例进行混合,混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0060] 2、制备量子点标记的血红蛋白抗体1的混合物

[0061] (1) 取量子点荧光微球1ml (浓度为10mg/ml,粒径为180nm,CdSe/ZnS,表面基团为羧基,激发波长410,发射波长615),加入16.5ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0062] (2) 分别加入活化缓冲液1和活化剂缓冲液2各0.5ml,37℃振荡反应25分钟,期间

每隔4分钟超声分散20秒；

[0063] (3) 加入1.5mg血红蛋白抗体1(采购自：兰州雅华生物技术有限公司)，超声混匀，37℃振荡反应1小时20分钟，期间每隔8分钟超声分散25秒；

[0064] (4) 加入1.7ml封闭缓冲液1，37℃混匀8分钟；

[0065] (5) 加入6ml封闭剂缓冲液2，37℃振荡反应1.5小时；

[0066] (6) 低温离心机3500g离心30min，弃去上清液，使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散，超声3次，每次30秒，直至混匀；

[0067] (7) 取量子点修饰物1ml(浓度为10mg/ml，粒径为30nm，CdSe/ZnS，表面基团位羧基，激发波长410，发射波长615)，加入19ml的标记缓冲液，超声混匀；

[0068] (8) 分别加入0.8ml活化缓冲液1和0.8ml活化剂缓冲液2，37℃振荡反应30分钟，期间每隔5分钟超声分散30秒；

[0069] (9) 加入1.8mg血红蛋白抗体1，超声混匀，37℃振荡反应1小时40分钟，期间每隔5分钟超声分散20秒；

[0070] (10) 加入2.5ml封闭缓冲液1，37℃混匀10分钟；

[0071] (11) 加入8ml封闭剂缓冲液2，37℃振荡反应2小时；

[0072] (12) 低温离心机11000g离心30min，弃去上清液，使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散，超声5次，每次30秒，直至混匀。

[0073] (13) 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比1:1的比例进行混合，混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0074] 3、制备玻璃纤维素垫(标记垫)

[0075] 将上述的量子点标记的钙卫蛋白抗体1(混合物)和量子点标记的血红蛋白抗体1(混合物)按照体积比1:1混合后，用喷膜仪按20μL/cm的量喷涂在玻璃纤维素垫上(8975)，37℃干燥5小时，备用。4、制备硝酸纤维素膜(检测垫)

[0076] (1) 包被液的配置

[0077] T1检测线：取2.5mg钙卫蛋白抗体2(采购自：Medix Biochemica公司)，使用包被缓冲液定容至5ml；

[0078] T2检测线：取3mg血红蛋白抗体2(采购自：兰州雅华生物技术有限公司)，使用包被缓冲液定容至5ml；

[0079] 质控线(C线)：取羊抗鼠IgG1.4mg，使用包被缓冲液定容至5ml。

[0080] 包被缓冲液

[0081]	包被缓冲液	
	名 称	每升液体用量

[0082]	磷酸氢二钠	14.5g
	磷酸二氢钠	1.48g
	氯化钠	9g
	纯化水	1000ml
储存条件: 2-8℃ 14 天		

[0083] (2) 包被:取硝酸纤维素膜(赛多利斯CN 95 25mm),使用划膜仪按照30 μ L/板的用量喷涂,T1检测线、T2检测线和控制线之间的间隔为6mm,之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭,37℃干燥5小时,备用。

[0084] 5、制备检测试纸条

[0085] 将检测垫3(硝酸纤维素(NC)膜)、标记垫4(玻璃纤维素垫)、吸水垫2、第一样品垫5、第二样品垫6和底板1(带背衬),按照图1-2所示情况进行组合粘贴,成品组装顺序为:靠近NC膜T线上方贴吸水纸,覆盖NC膜约3mm;NC膜下方依次贴量子点标记垫4、第一样品垫5、第二样品垫6;第二样品垫6覆盖第一样品垫5约3mm,第一样品垫5覆盖标记垫4约3mm,标记垫4覆盖NC膜下端约3mm。组装时的环境温度为24℃,湿度为27%。

[0086] 6、组装

[0087] 将上述步骤5中组装的大板使用裁切机裁切成宽度4mm的试纸条,在塑料板卡(底盖)上放置试纸条,扣上塑料板卡上盖,用力按压扣紧,装入铝箔袋中,放入干燥剂后用封口机封口即完成组装。

[0088] 7、对试剂进行检测

[0089] (1) 使用配套的量子点荧光定量分析仪进行检测,先用六个由低到高的标准品进行曲线标定,保存标定好的曲线待用;

[0090] (2) 使用定量粪便采集器,对粪便样本进行采集,10mg粪便样本加入到2ml样本稀释液中。取50微升样本液加入测试卡的加样孔内。

[0091] (3) 将板卡放入分析仪中,开始计时,10分钟后分析仪自动读取试剂条上荧光信号,通过标定曲线直接计算处样本浓度。

[0092] 检测时,分别配制低、中、高三种不同浓度的钙卫蛋白和血红蛋白的混合品,检测的批内精密度分别为:钙卫蛋白4.3%,3.6%,2.5%;血红蛋白3.8%,3.1%,2.4%。批间精密度分别为:钙卫蛋白7.4%,5.5%,4.8%;血红蛋白7.1%,5.8%,4.9%。说明检测的精密度高。

[0093] 使用中浓度值的钙卫蛋白和血红蛋白的混合品检测,钙卫蛋白的重复性为1.9%,血红蛋白的重复性为1.6%。说明产品检测的重复性好。制备的试剂盒对钙卫蛋白的检测下限均可以达到0.05ng/ml,检测上线可达到4000ng/ml,对血红蛋白可以做到5ng/ml的检测灵敏度。

[0094] 实施例2

[0095] 1、制备量子点标记的钙卫蛋白抗体1的混合物

[0096] (1) 取量子点荧光微球1ml(浓度为10mg/ml,粒径为160nm,InP,表面基团为羧基,激发波长405,发射波长605),加入15.5ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0097] 标记缓冲液

[0098]

名称	每升液体用量
Hepes(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)	0.476g
纯化水	调整 PH 值至 7.40+0.05 并定容至 1000ml
储存条件: 2-8℃冷藏保存 10 天	

[0099] 该量子点荧光微球还可以为硅、锗、硫化镉、碲化镉、硒化锌、硫化铅、硒化铅、砷化镉与聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸酯微球、聚乙烯甲苯微球或二氧化硅微球的复合;

[0100] (2) 分别加入活化缓冲液1和活化缓冲液2各0.45ml, 37℃振荡反应30分钟, 期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0101] 活化缓冲液1

[0102]

名称	每升液体用量
NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)	120g

[0103]

纯化水	1000ml
现用现配, 有效期 30 分钟	

[0104] 活化缓冲液2

[0105]

名称	每升液体用量
EDC (碳二亚胺)	45g
纯化水	1000ml
现用现配, 有效期 30 分钟	

[0106] (3) 加入1.6mg钙卫蛋白抗体1, 超声混匀, 37℃振荡反应1小时30分钟, 期间每隔10分钟超声分散30秒;

[0107] (4) 加入1.8ml封闭缓冲液1, 37℃混匀10分钟;

[0108] 封闭缓冲液1

[0109]

名称	每升液体用量
甘氨酸	15g
纯化水	1000ml
现用现配	

[0110] (5) 加入7.5ml封闭剂缓冲液2, 37℃振荡反应1.5小时;

[0111] 封闭缓冲液2

[0112]

名称	每升液体用量
CASEIN(酪蛋白钠)	120g
纯化水	1000ml
现用现配	

[0113] (6) 低温离心机4000g离心30min, 弃去上清液, 使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散, 超声3次, 每次30秒, 直至混匀。

[0114] 重悬缓冲液

[0115]

试剂	每升液体用量
HEPES	0.536g
BSA	30g

[0116]

CASEIN	12g
甘氨酸	8g
蔗糖	100g
吐温-20	30mL
加纯化水至	1000 ml
现用现配	

[0117] (7) 取量子点修饰物1ml (浓度为10mg/ml, 粒径为20, InP, 表面基团为羧基, 激发波长405, 发射波长605), 加入18ml的标记缓冲液, 超声混匀; 该量子点修饰物还可以为硅、锗、硫化镉、碲化镉、硒化锌、硫化铅、硒化铅、砷化铟、硒化镉表面经羧基修饰而成;

[0118] (8) 分别加入0.9ml活化缓冲液1和0.9ml活化剂缓冲液2, 37℃振荡反应30分钟, 期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0119] (9) 加入2.1mg钙卫蛋白抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时40分钟,期间每隔5分钟超声分散25秒;

[0120] (10) 加入2ml封闭缓冲液1,37℃混匀10分钟;

[0121] (11) 加入8.5ml封闭缓冲液2,37℃振荡反应2小时;

[0122] (12) 低温离心机12000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散,超声5次,每次30秒,直至混匀;

[0123] (13) 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比2:1的比例进行混合,混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0124] 2、制备量子点标记的血红蛋白抗体1的混合物

[0125] (1) 取量子点荧光微球1ml (浓度为10mg/ml,粒径为160,InP,表面基团位羧基,激发波长405,发射波长605),加入18.5ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0126] (2) 分别加入活化缓冲液1和活化剂缓冲液2各0.45ml,37℃振荡反应30分钟,期间每隔5分钟超声分散25秒;

[0127] (3) 加入1.7mg血红蛋白抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔10分钟超声分散25秒;

[0128] (4) 加入1.75ml封闭缓冲液1,37℃混匀8分钟;

[0129] (5) 加入7ml封闭缓冲液2,37℃振荡反应1.5小时;

[0130] (6) 低温离心机4000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散,超声3次,每次30秒,直至混匀。

[0131] (7) 取量子点修饰物1ml (浓度为10mg/ml,粒径为20,InP,表面基团位羧基,激发波长405,发射波长605),加入19ml的标记缓冲液,超声混匀;

[0132] (8) 分别加入0.9ml活化缓冲液1和0.9ml活化缓冲液2,37℃振荡反应30分钟,期间每隔5分钟超声分散30秒;

[0133] (9) 加入2.0mg血红蛋白抗体1,超声混匀,37℃振荡反应1小时30分钟,期间每隔5分钟超声分散20秒;

[0134] (10) 加入2.5ml封闭缓冲液1,37℃混匀10分钟;

[0135] (11) 加入7.5ml封闭剂缓冲液2,37℃振荡反应2小时;

[0136] (12) 低温离心机12000g离心30min,弃去上清液,使用重悬缓冲液20ml重悬并超声分散,超声5次,每次30秒,直至混匀。

[0137] 把量子点荧光微球标记的抗体1与量子点修饰物标记的抗体1按照质量比2:1的比例进行混合,混合后的溶液将用于进行玻璃纤维素垫的喷涂。

[0138] 其他步骤同实施例1中的3-7步骤。

[0139] 检测时,分别配制低、中、高三种不同浓度的钙卫蛋白和血红蛋白的混合品,检测的批内精密度分别为:钙卫蛋白4.5%,3.8%,2.3%;血红蛋白3.6%,3.0%,2.5%。批间精密度分别为:钙卫蛋白7.2%,5.8%,4.5%;血红蛋白7.1%,5.6%,4.9%。

[0140] 使用中浓度值的钙卫蛋白和血红蛋白的混合品检测,钙卫蛋白的重复性为1.8%,血红蛋白的重复性为1.4%。

[0141] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围

之内。

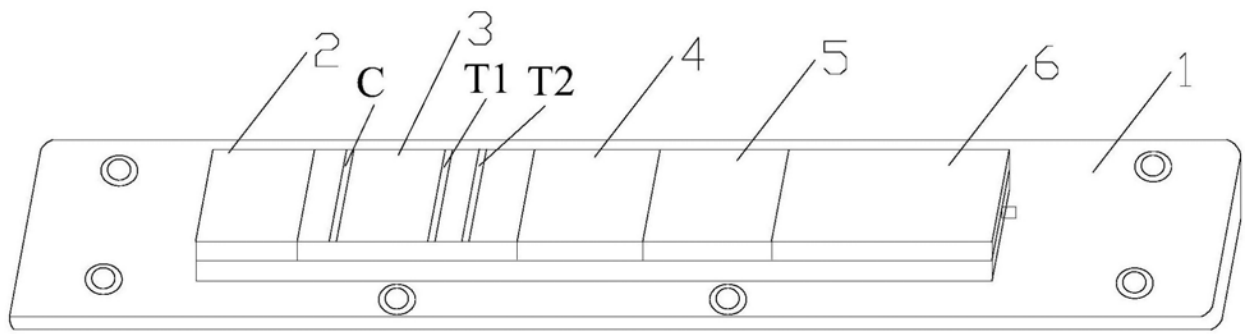


图1

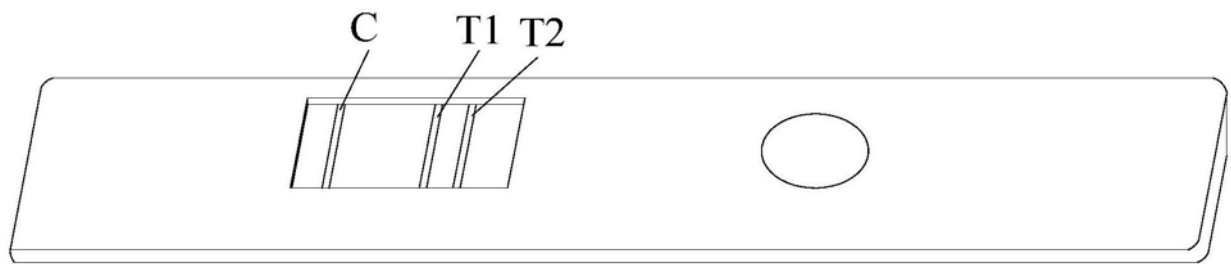


图2

专利名称(译)	一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108614110A	公开(公告)日	2018-10-02
申请号	CN201810418742.4	申请日	2018-05-03
[标]发明人	李小冬 高省		
发明人	李小冬 高省		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	杨雪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物检测领域，具体涉及一种测定肠粘膜损伤的联合检测试剂盒及其制备方法，检测垫上设有检测线T1、检测线T2和质控线，检测线T1上包被有钙卫蛋白单克隆抗体，检测线T2上包被有血红蛋白单克隆抗体，质控线上包被有羊抗鼠或羊抗兔IgG，标记垫上包被有量子点标记的钙卫蛋白单克隆抗体与量子点标记的血红蛋白单克隆抗体的混合物，所述量子点为两种不同颗粒粒径的混合物。本发明的试剂盒可以同步检测粪便中的钙卫蛋白和便潜血，可以快速简便的判断肠粘膜损伤程度，检测灵敏度高，特异性好。

