



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105259341 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201510711946. 3

(22) 申请日 2015. 10. 28

(71) 申请人 苑振贵

地址 110003 辽宁省沈阳市和平区南五经街
125 号 332 室

(72) 发明人 周伊娃 雷耀辉 苑振贵 吴玉宝
刘丹

(74) 专利代理机构 沈阳利泰专利商标代理有限
公司 21209

代理人 张玉甫

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

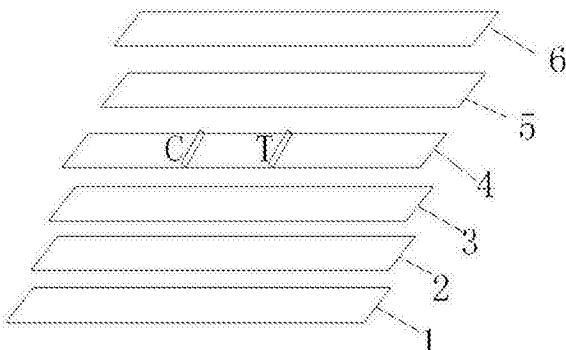
权利要求书1页 说明书3页 附图5页

(54) 发明名称

一种猝死病分子探针及其制备方法

(57) 摘要

一种猝死病分子探针，其特征是依次由 ABS 衬垫、样品垫、金标垫、硝酸纤维素垫、吸水垫和保护垫叠粘在一起构成。其中，样品垫叠贴金标垫厚为 1mm，金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1mm，吸水垫叠硝酸纤维素垫厚为 1mm。本发明的优势在于：生产工艺简单，探针小巧便携；无创取病样：口液、鼻液、泪液、尿液；检测速度快，分钟完成试验；单克隆金标，定性结果准确稳定；本发明为抢救猝死病患者提供一种快速检验方法，提高了猝死病人的抢救成功率。



1. 一种猝死病分子探针,其特征是依次由 ABS 衬垫(1)、样品垫(2)、金标垫(3)、硝酸纤维素垫(4)、吸水垫(5)和保护垫(6)叠粘在一起构成;其中,样品垫(2)叠贴金标垫厚为 1mn,金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1mn,吸水垫叠硝酸纤维素垫厚为 1mn。

2. 根据权利要求 1 所述的一种猝死病分子探针及其制备方法,其特征在于:样品垫(2)叠贴金标垫厚为 0.9mn,金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 0.9mn,吸水垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 0.9mn。

3. 根据权利要求 1 所述的一种猝死病分子探针及其制备方法,其特征在于:样品垫(2)叠贴金标垫厚为 1.1mn,金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1.1mn,吸水垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1.1mn。

4. 根据权利要求 1 所述的一种猝死病分子探针及其制备方法,其特征在于:所述的样品垫为经 Tris、酪蛋白钠盐液处理过的包被 ProteinA 的玻璃纤维素膜,所述的金标垫为经 Tris、牛血清液处理过的包被鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物的玻璃纤维膜,所述的硝酸纤维素垫的检测区为包被特异性的基因重组猝死抗原的 T 线,所述的硝酸纤维素垫的质控区为包被羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的 C 线,所述的 T 线包被的猝死抗原量高于样液中能与金标垫中交联抗体结合的猝死抗原量。

5. 根据权利要求 1 所述的一种猝死病分子探针的制备方法,其特征在于:包括下述步骤:

1)、制备鼠抗人猝死抗原单克隆抗体:以人猝死抗原为抗原,脾内注射免疫鼠,取免疫鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤细胞,再将杂交瘤细胞接种于鼠腹腔制备腹水,提取鼠抗人猝死抗原单克隆抗体;

2)、制备羊抗鼠 IgG 多克隆抗体:以鼠抗人猝死抗原单克隆抗体免疫山羊,取血清经离心制得羊抗鼠 IgG 多克隆抗体;

3)、制备胶体金:取 0.01%HauCl4 水溶液 100ml,加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 0.75ml,加热煮沸至溶液呈红色,冷却至 4℃,加入 0.1Mol/L K2C03 0.5ml 制成 50nm 胶体金;

4)、制备鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物:用 0.1M 碳酸钾调胶体金溶液 pH 值至 8.2,按 0.02mgIgM /mL 胶体金的比例加入鼠抗人猝死抗原单克隆抗体混匀,高速离心弃上清液,制得鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物,置 5% 的牛血清白蛋白、1% 聚乙二醇、0.02M Tris-HCl 缓冲液中保存备用;

5)、制备样品垫:将 ProteinA 用 pH 值为 8.2 的 2% 海藻糖和 0.02Mol/L PBS 液稀释至 1mg/mL 后均匀喷涂在玻璃纤维素膜,充分干燥制得样品垫;

6)、制备金标垫:将鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物均匀包被在玻璃纤维膜上,充分干燥制得金标垫;

7)、制备硝酸纤维素垫:将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体和重组猝死病抗原分别包被在硝酸纤维素膜的质控区和检测区,充分干燥制得硝酸纤维素垫;

8)、制备猝死病分子探针:将样品垫、金标垫、硝酸纤维素垫和吸水垫依次贴在 ABS 衬垫上,样品垫叠金标垫 1mn,金标垫叠硝酸纤维素垫 1mn,吸水垫叠硝酸纤维素垫 1mn 制得猝死病分子探针,即得。

一种猝死病分子探针及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种急诊医学检验技术领域,特别是涉及一种猝死分子探针及猝死分子探针的制备方法。

背景技术

[0002] 猝死病是世界上最可怕的疾病,其发病率超过大肠癌、乳腺癌、前列腺癌、流感、肺炎、车祸、HIV、枪支案件和家庭火灾致死人数的总和,全球每年有1200万人猝死,中国每年有180万人猝死。据临床医学统计,猝死症发病后,其小时病死率达2%,周病死率达50%,月病死率达75%,年病死率达90%,10年病死率达100%。研究发现,99%的猝死症患者发病前尿液现猝死抗原,其灵敏度达98%,特异性达100%。

[0003] 研究发现,Ca²⁺绑定亲猝死抗原复合体(troponin complex),使猝死抗原的头部搭在肌动蛋白上形成过桥后,猝死抗原ATP酶水解释放能量,产生张力,并使肌动蛋白滑动。

[0004] 肌动蛋白 + 猝死抗原 -ATP → 肌动猝死抗原 +ADP+P1。

[0005] 心肌舒张,必需充足的ATP激活猝死抗原ATP酶,以恢复收缩力。

[0006] 肌动猝死抗原 +ATP → 肌动蛋白 + 猝死抗原 -ATP。

[0007] 疲劳产生血乳酸、缺氧、感染激活磷脂酶水解心肌细胞膜磷脂和猝死抗原分子上的磷酸基,使猝死抗原失去活性进入血液、尿液,心肌细胞猝死抗原停止运载肌动蛋白,宏观上表现心肌不收缩,猝死抗原分子马达消逝生命动力致猝死病发生。

[0008] 猝死抗原主要存于心肌细胞和骨骼肌细胞,正常人尿液不含猝死抗原。心肌细胞和骨骼肌细胞严重损伤,猝死抗原失活进入血液,机体出现体液免疫反应。猝死抗原经肾排泄进入尿液,遇TMB-SNE-AMS显蓝色反应。因此,猝死抗原成为早期猝死病的血液、尿液生化标志物。

[0009] 猝死症起病急骤病情凶险,恢复缓慢病死率高,威胁中、青年人,已成为IT业等职场上最大的隐形杀手。

[0010] 目前尚无理想的检测设备和检测试剂。

发明内容

[0011] 本发明的目的,在于提供一种猝死病分子探针,使用本发明的猝死病分子探针操作简单快速,结果准确稳定,检测成本低廉,适于个人、家庭和诊所,有益于猝死病患者的及时诊断和抢救。

[0012] 本发明的另一目的,是提供一种猝死病分子探针的制备方法。

[0013] 采用的技术方案是:

一种猝死病分子探针,其特征是依次由ABS衬垫、样品垫、金标垫、硝酸纤维素垫、吸水垫和保护垫叠贴在一起构成。其中样品垫叠贴金标垫厚度为0.9-1.1mn,吸水垫叠贴硝酸纤维素垫厚度为0.9-1.1mn。

[0014] 所述的样品垫为经 Tris、酪蛋白钠盐液处理过的包被 ProteinA 的玻璃纤维素膜，所述的金标垫为经 Tris、牛血清液处理过的包被鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物的玻璃纤维膜，所述的硝酸纤维素垫的检测区为包被特异性的基因重组猝死抗原的 T 线，所述的硝酸纤维素垫的质控区为包被羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的 C 线，所述的 T 线包被的猝死抗原量高于样液中能与金标垫中交联抗体结合的猝死抗原量。

[0015] 一种猝死病分子探针的制备方法，包括下述步骤：

1)、制备鼠抗人猝死抗原单克隆抗体：以人猝死抗原为抗原，脾内注射免疫鼠，取免疫鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤细胞，再将杂交瘤细胞接种于鼠腹腔制备腹水，提取鼠抗人猝死抗原单克隆抗体；

2)、制备羊抗鼠 IgG 多克隆抗体：以鼠抗人猝死抗原单克隆抗体免疫山羊，取血清经离心制得羊抗鼠 IgG 多克隆抗体；

3)、制备胶体金：取 0.01%HAuCl4 水溶液 100ml，加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.75ml，加热煮沸至溶液呈红色，冷却至 4℃，加入 0.1Mol/L K2C03 0.5ml 制成 50nm 胶体金；

4)、制备鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物：用 0.1M 碳酸钾调胶体金溶液 pH 值至 8.2，按 0.02mgIgM /mL 胶体金的比例加入鼠抗人猝死抗原单克隆抗体混匀，高速离心弃上清液，制得鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物，置 5% 的牛血清白蛋白、1% 聚乙二醇、0.02M Tris-HCl 缓冲液中保存备用；

5)、制备样品垫：将 ProteinA 用 pH 值为 8.2 的 2% 海藻糖和 0.02Mol/L PBS 液稀释至 1mg/mL 后均匀喷涂在玻璃纤维素膜，充分干燥制得样品垫；

6)、制备金标垫：将鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物均匀包被在玻璃纤维膜上，充分干燥制得金标垫；

7)、制备硝酸纤维素垫：将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体和重组猝死病抗原分别包被在硝酸纤维素膜的质控区和检测区，充分干燥制得硝酸纤维素垫；

8)、制备猝死病分子探针：将样品垫、金标垫、硝酸纤维素垫和吸水垫依次贴在 ABS 衬垫上，样品垫叠金标垫 1mn，金标垫叠硝酸纤维素垫 1mn，吸水垫叠硝酸纤维素垫 1mn 制得猝死病分子探针，即得。

[0016] 本发明的优势在于：

- (1) 生产工艺简单，探针小巧便携；
- (2) 无创取病样：口液、鼻液、泪液、尿液；
- (3) 检测速度快，5 分钟完成试验；
- (4) 单克隆金标，定性结果准确稳定；

本发明为抢救猝死病患者提供一种快速检验方法，提高了猝死病人的抢救成功几率。

附图说明

[0017] 图 1 是本发明的猝死病分子探针分解结构示意图。

[0018] 图 2、图 3、图 4、图 5、图 6 和图 7 为猝死病分子探针检测流程图。

[0019] 图 8、图 9、图 10 和图 11 为本发明的猝死分子探针检测结果显示图。

具体实施方式

[0020] 实施例一

一种猝死病分子探针,其特征是依次由 ABS 衬垫 1、样品垫 2、金标垫 3、硝酸纤维素垫 4、吸水垫 5 和保护垫 6 叠粘在一起构成。其中,样品垫 2 叠贴金标垫厚为 1mn,金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1mn,吸水垫叠硝酸纤维素垫厚为 1mn。

[0021] 金标垫包被鼠抗人猝死抗原单克隆抗体 - 胶体金复合物,硝酸纤维素垫检测区包被特异性的基因重组猝死抗原,硝酸纤维素垫质控区包被羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。

[0022] 实施例二

一种猝死病分子探针及其制备方法,其结构与实施例一基本相同,其不同之处是样品垫 2 叠贴金标垫厚为 0.9mn,金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 0.9mn,吸水垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 0.9mn。

[0023] 实施例三

一种猝死病分子探针及其制备方法,其结构与实施例一基本相同,其不同之处是样品垫 2 叠贴金标垫厚为 1.1mn,金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1.1mn,吸水垫叠贴硝酸纤维素垫厚为 1.1mn。

[0024] 图 2-图 7 显示本发明的猝死病分子探针检测方法:用棉签取样液或手持猝死病分子探针,将样品垫垂直浸入样液 1 秒钟,5 分钟定性判断检测猝死病结果。若 C 线、T 线均显红带,提示猝死病风险;若 C 线显红带, T 线不显红带,则提示无猝死病风险;若 C 线不显红带,则提示猝死病分子探针无效。

[0025] 实施例四

图 8-图 11 显示本发明的猝死病分子探针检测原理:检测时,样液中的猝死抗原与金标记鼠抗人猝死抗原单抗结合形成抗原抗体复合物,流向硝酸纤维素垫的 T 区时,固定在硝酸纤维素垫上的重组猝死抗原特异性抗原捕获该复合物并逐渐凝集成一条肉眼可见的红 T 线,未结合的金标记鼠抗人猝死抗原单抗流过 T 区被 C 区的羊抗鼠多抗捕获形成肉眼可见的红 C 线。显示 C 线则表明猝死病分子探针有效;显示 T 线则表明液样中含猝死病抗原。

[0026] 结果判断:如果样液中存在猝死病抗原,则质控线、检测线均显红色条带,结果为阳性;如果样液中不存在猝死病抗原,则仅质控线显红色条带;如质控线处未见条带,则猝死病分子探针无效。

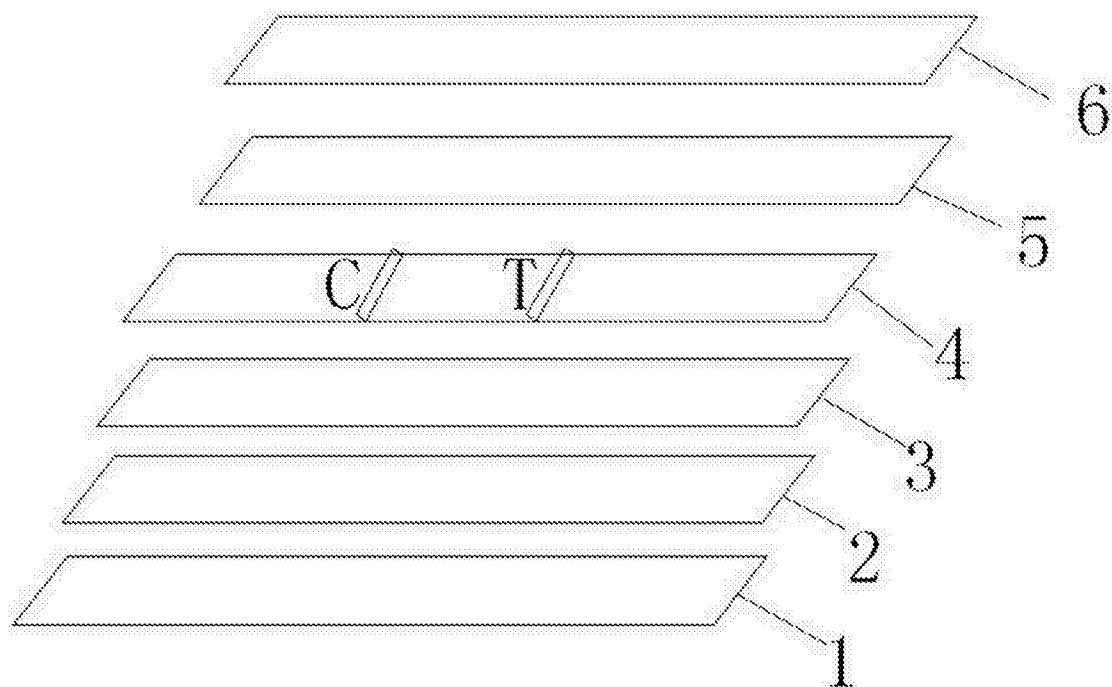


图 1

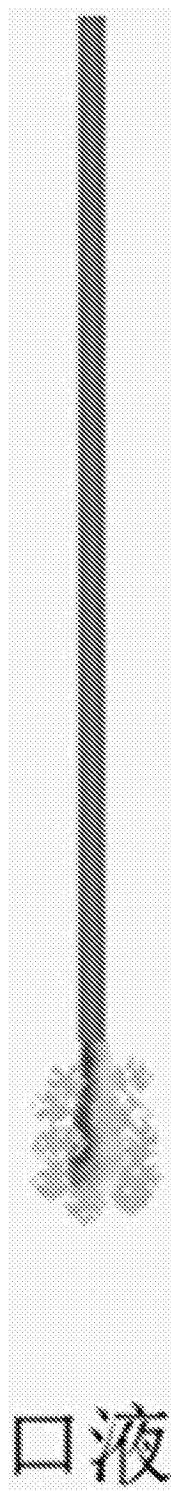


图 2
口液

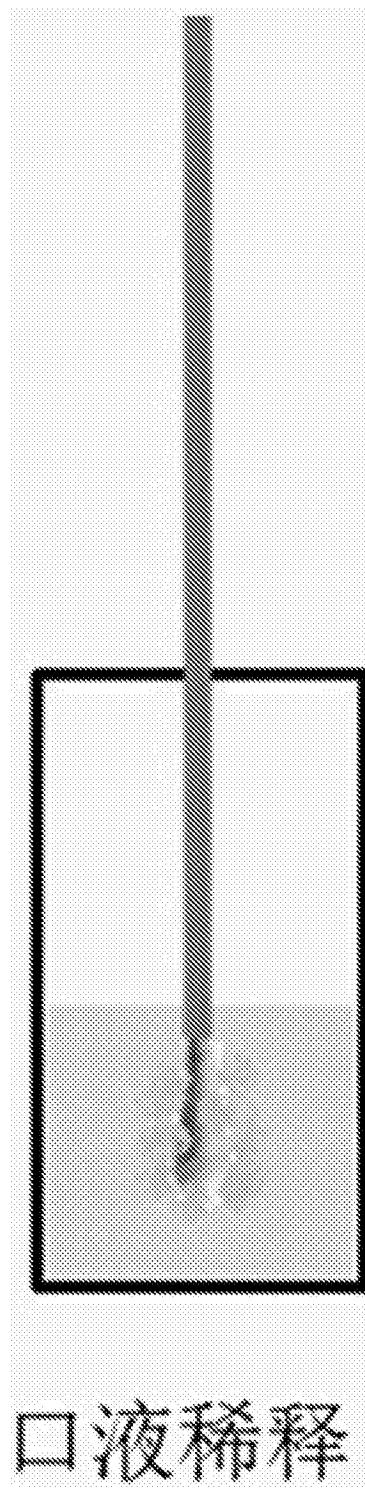


图 3
口液稀释

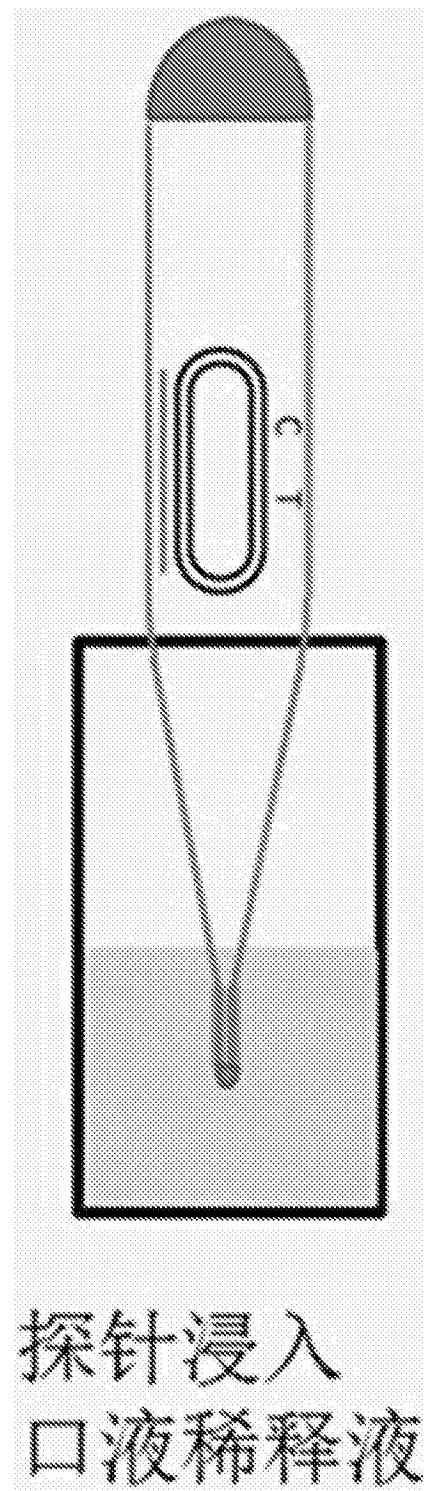
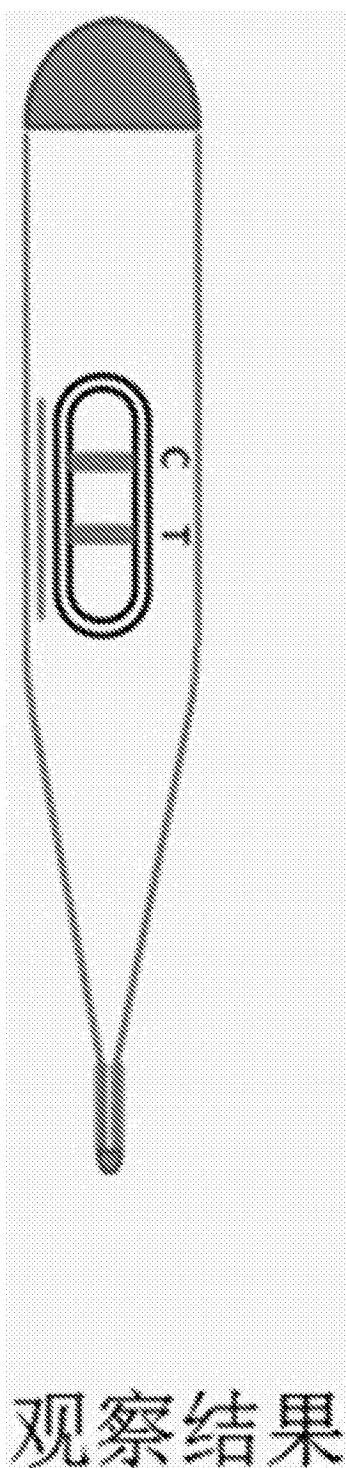
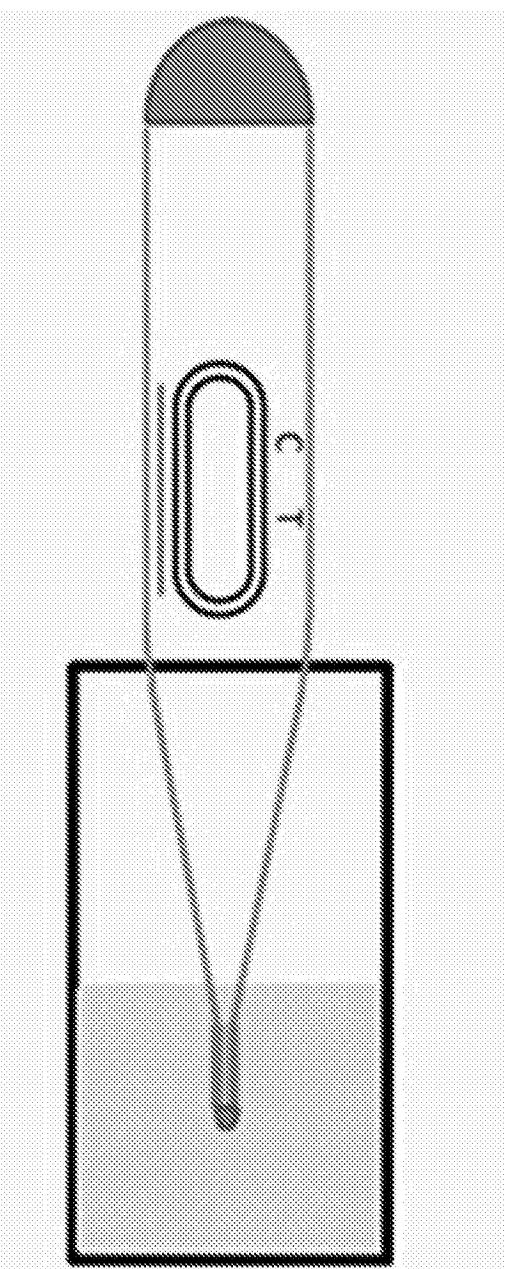


图 4
探针浸入
口液稀释液



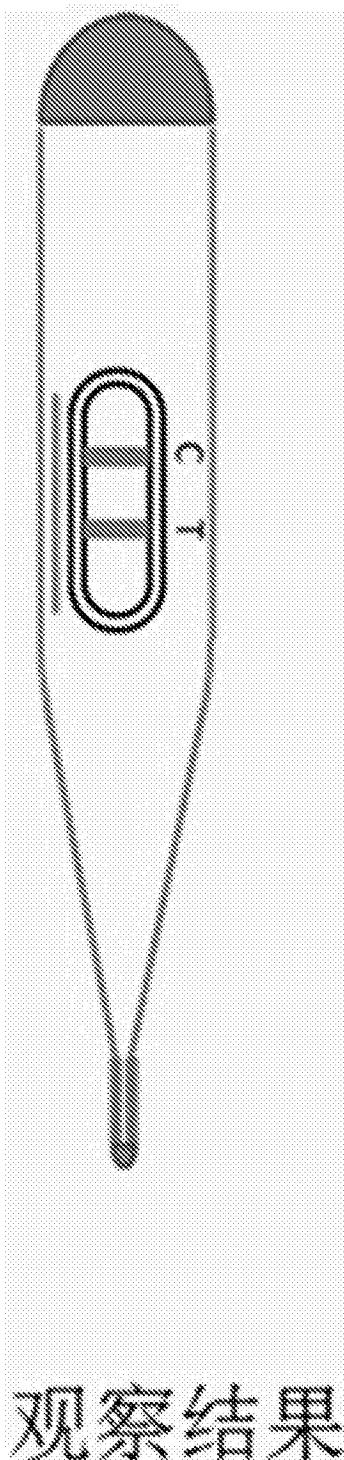
观察结果

图 5



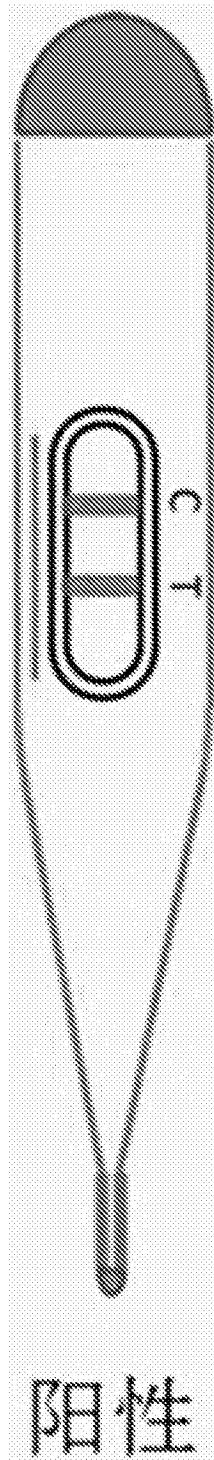
探针浸入尿液

图 6



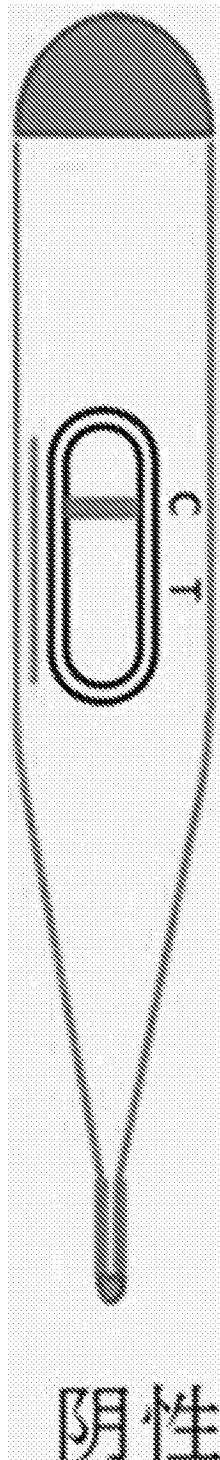
观察结果

图 7



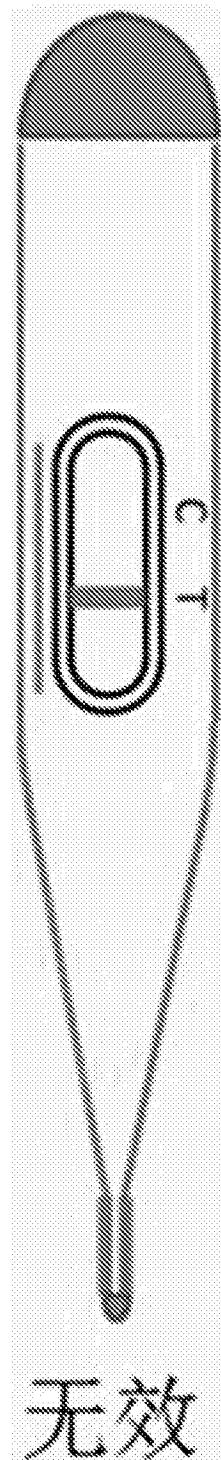
阳性

图 8



阴性

图 9



无效

图 10

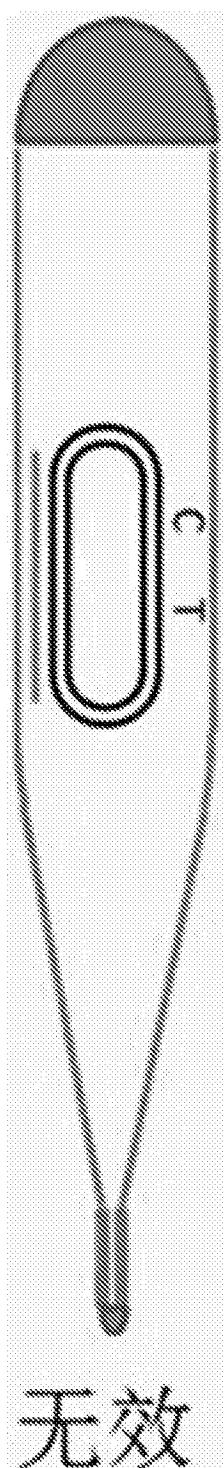


图 11

专利名称(译)	一种猝死病分子探针及其制备方法		
公开(公告)号	CN105259341A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201510711946.3	申请日	2015-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	苑振贵		
申请(专利权)人(译)	苑振贵		
当前申请(专利权)人(译)	苑振贵		
[标]发明人	周伊娃 雷耀辉 苑振贵 吴玉宝 刘丹		
发明人	周伊娃 雷耀辉 苑振贵 吴玉宝 刘丹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	张玉甫		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

一种猝死病分子探针，其特征是依次由ABS衬垫、样品垫、金标垫、硝酸纤维素垫、吸水垫和保护垫叠粘在一起构成。其中，样品垫叠贴金标垫厚为1mn，金标垫叠贴硝酸纤维素垫厚为1mn，吸水垫叠硝酸纤维素垫厚为1mn。本发明的优势在于：生产工艺简单，探针小巧便携；无创取病样：口液、鼻液、泪液、尿液；检测速度快，分钟完成试验；单克隆金标，定性结果准确稳定；本发明为抢救猝死病患者提供一种快速检验方法，提高了猝死病人的抢救成功率。

