



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107271692 A

(43)申请公布日 2017. 10. 20

(21)申请号 201710691668.9

(22)申请日 2017.08.14

(71)申请人 浙江博华医药科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区碧波路518号
215A

(72)发明人 王宇飞 李强

(74)专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有
限公司 31227

代理人 曹莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书3页 说明书37页 附图8页

(54)发明名称

一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其应用

(57)摘要

本发明属于生物医药领域,具体而言涉及一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其制备方法与应用,特别是一种快速定量检测人尿样或血样中KIM-1、NGAL、IGFBP7、TIMP-2、IL-18、PCT、cTnI的即插荧光检测卡。本发明提供的标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的方法,具体为先对荧光微球活化;然后将活化的荧光微球放入装有磷酸缓冲液的透析袋中得到透析后的荧光微球液;加入氨基聚乙二醇羧基,二次透析后的荧光微球液再进行进一步活化,并用重组抗体标记,反应后离心,清洗沉淀,再重悬沉淀。本发明提供的荧光微球,能够显著提高免疫荧光的反应下线,使得制得的检测卡比传统方法灵敏度提高10-100倍,检测范围也得到显著提升。



1. 一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1用1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺溶液和N-羟基琥珀酰亚胺溶液分别对荧光微球液进行活化,得到荧光微球活化混合物;

S2将步骤S1中的荧光微球活化混合物放入透析袋中,在磷酸盐缓冲液中透析除去多余的1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,得到透析后的荧光微球液;

S3将步骤S2透析后的荧光微球液里加入氨基聚乙二醇羧基,37℃搅拌反应1-3小时,在弱酸性N-吗啉乙磺酸缓冲溶液中进行第二次透析,除去多余的氨基聚乙二醇羧基,得到二次透析后的荧光微球液;所述氨基聚乙二醇羧基分子量为1000~5000Da;

S4将步骤S3二次透析后的荧光微球液通过加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺再次活化,再加入抗体于2-8℃下反应8-12小时,加入牛血清白蛋白封闭,离心沉淀,再将沉淀用磷酸盐缓冲液PBS重悬,离心沉淀,用荧光微球复溶液重悬,即制得标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球;

所述荧光微球复溶液为含有0.1-1.5wt%明胶或BSA、0.01-1wt%曲拉通X-100、0.05-0.1wt%叠氮钠、0.01-0.2mol/L pH 6.5-8.5磷酸盐缓冲液。

2. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:步骤S1中所述的荧光微球粒径为250-350nm,固含量1%;所述1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺溶液浓度为10-100mg/ml;所述N-羟基琥珀酰亚胺混合溶液浓度为10-100mg/ml;所述荧光微球液、1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺溶液、N-羟基琥珀酰亚胺混合溶液体积比为100:1-2:1-2。

3. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:步骤S2与步骤S4中所述的缓冲液为10-100mmol/L pH 7.2-7.6的磷酸缓冲液。

4. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:步骤S3中所述荧光微球液里氨基聚乙二醇羧基终浓度10-100mmol/L。

5. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:步骤S3中所述的弱酸性N-吗啉乙磺酸缓冲溶液为0.1mol/L pH 4.5-6.1的N-吗啉乙磺酸缓冲溶液。

6. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人K1M-1重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人NGAL重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人IGFBP-7重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

9. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人TIMP-2重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

10. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人IL-18重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

11. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征

在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人PCT重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

12. 根据权利要求1所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中的抗体为鼠抗人cTnI重组单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

13. 用权利要求1-12中所述任何一种方法制得的标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球。

14. 用权利要求13中所述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球制得的荧光垫。

15. 一种快速定量检测K1M-1的检测卡,其特征在于:所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将权利要求6中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人K1M-1抗体的荧光微球和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人K1M-1单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

16. 一种快速定量检测NGAL的检测卡,其特征在于:所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将权利要求7中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人NGAL抗体的荧光微球和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人NGAL重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

17. 一种快速定量检测1GFBP-7的检测卡,其特征在于:所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将权利要求8中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人1GFBP-7抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人1GFBP-7的重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

18. 一种快速定量检测TIMP-2的检测卡,其特征在于:所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将要求9中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人TIMP-2抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人TIMP-2重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

19. 一种快速定量检测IL-18的检测卡,其特征在于:所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将权利要求10中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人IL-18抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人1L-18重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

20. 一种快速定量检测PCT的检测卡, 其特征在于: 所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将权利要求11中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人PCT抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合, 然后加在聚酯膜结合垫上, 冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人PCT重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

21. 一种快速定量检测cTnI的检测卡, 其特征在于: 所述检测卡包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

所述荧光垫是将权利要求12中所述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人cTnI抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合, 然后加在聚酯膜结合垫上, 冷冻干燥制成的;

所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人cTnI重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体而言涉及一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其制备方法与应用,特别是一种快速定量检测人尿样或血样中肾损伤分子-1(KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)、胰岛素样生长因子结合蛋白-7(IGFBP-7)、组织金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)、白介素18(IL-18)、降钙素原(PCT)、心肌肌钙蛋白1(cTnI)的即插荧光检测卡。

背景技术

[0002] KIM-1(肾损伤分子-1)是由334个氨基酸残基组成的跨膜糖蛋白,在正常肾组织中几乎不表达,但是在缺血及肾损伤后的人近曲小管上皮细胞中呈高表达状态,其胞外域在金属基质蛋白酶作用下降解为可溶性片段释放到细胞外,并排入尿中,成为急性肾损伤的一项重要检测指标。相对于血肌酐及其它一些标志物,KIM-1无论从特异性还是敏感性方面都有其明显优势,且它对区分近端小管损伤有较高的特异性。

[0003] 目前临床上判断人肾损伤最常用的生物学指标是血清肌酐浓度,但血清肌酐只有在肾损伤一定程度以后才能检测到浓度有明显变化,且血清肌酐并不是早期诊断的理想指标。近年临床上出现的较新的生物学指标血清胱抑素C虽能较为敏感的反映肾损伤程度,特别是评估肾小球过滤功能受损等相关的病变,但仍不能反应早期急性肾损伤(AKI)。最新研究发现,KIM-1作为新型标志物,在正常肾组织中不表达,在缺血及肾损伤后的近曲小管上皮中呈高表达,能够及时准确的发现肾脏早期病变,对于AKI病情监控、预后评估、精准诊疗具有非常重要的价值。

[0004] 由于尿液中KIM-1含量KIM低至pg/ml,检测这样一个衡量标志物,迫切需要高精准度、灵敏度的抗体和与之配套的检测方法。同时快速检测在AKI诊断上比较迫切,以期赢得最佳治疗窗口期。目前临床上国内外尚无快速检测人尿液KIM-1的相关试剂产品。

[0005] NGAL(中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白),是一个由中性粒细胞和部分上皮细胞如肾小管所表达的微量蛋白。缺血性或肾毒性肾损伤时,NGAL由肾脏大量表达,并被释放到尿液和血浆。NGAL含量在损伤发生后2h内升高,半衰期为6h,当感染得到控制后可在1-2d内快速下降,使之成为早期且敏感的肾损伤标志物。

[0006] TIMP-2(组织金属蛋白酶抑制剂-2),主要抑制MMOL/LP-2活性,缺血性肾损伤后,TIMP-2被诱导高表达保护肾小管上皮和促进损伤修复。作为新AKI标志物,可预测2-3期AKI发生。

[0007] IGFBP-7(胰岛素样生长因子结合蛋白-7),是一种富含半胱氨酸的分泌性蛋白,IGF-1受体拮抗剂。IGFBP-7升高改变肾脏血流动力学,加重肾脏损伤。尿中IGFBP-7含量可预测2-3期AKI发生。TIMP-2与IGBP-7联用可更准确诊断AKI。

[0008] IL-18(白介素-18)是一种由单核巨噬细胞产生的促炎因子,在结构和功能上都属于IL-1家族。研究发现IL-18在许多肾脏疾病中扮演重要的角色,包括缺血再灌注、同种异体移植排斥、自身免疫状态以及恶性肿瘤。作为急性肾损伤时释放的炎症介质,已作为新型

肾损伤标志物被广泛研究,显示出极大的临床诊断价值。

[0009] PCT(降钙素原)主要由甲状腺C细胞合成分泌。在细菌感染时,肝脏的巨噬细胞和单核细胞、肺及肠道组织的淋巴细胞及内分泌细胞,在内毒素、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及IL-6等作用下合成分泌大量的PCT,导致血清PCT水平显著升高。PCT在细菌感染引起的全身性炎症反应早期(2~3h)即可升高,感染后12~24h达到高峰,PCT浓度与感染严重程度呈正相关,感染消失后恢复正常,因此对严重细菌感染的早期诊断、判断病情严重程度、预后、评价抗感染疗效、指导抗菌药物应用等方面都具有较高的临床价值。

[0010] cTnI(心肌肌钙蛋白I),在心肌细胞损伤早期,游离于胞浆内的cTnI快速释放出来,血清/血浆中水平在4~6h升高。随着肌原纤维不断崩解破坏,以固定形式存在的cTnI不断释放,血清/血浆中cTnI水平在AMI发生后8~14h达高峰,1~2周后降至正常。由于cTnI具有心肌特异性,胸痛发生4h后的患者,可直接采用cTnI检测,其血清/血浆中水平升高具有诊断的特异性,AMI的早期诊断可为患者的治疗赢得宝贵时间。

[0011] 自标记免疫测定技术出现以来,其在医学和生物科学研究中已被广泛应用。其原理就是将抗原抗体反应的特异性和敏感性与显微示踪的精确性相结合,以显色或荧光物质标记抗体,对组织或细胞内的抗原物质进行定位检测。在免疫测定中,用酶或荧光物质标记抗体/抗原是必需的。一般传统方法或其它专利中的机械离心法,对标记过程中的荧光微粒进行纯化,这种方法荧光微粒的标记效率低,免疫荧光微粒的生活活性也不高。

[0012] 而上述特异性的生物标志物在人体血液或尿液中含量均较低,通常都在皮克至纳克/毫升,采用传统方法制备的免疫荧光检测试剂很难达到所需的高敏感度及高精度的要求。而从这些标志物的临床诊断应用场景来看,其一般都属于临床急症,急需在很短的时间内快速灵敏的完成高精度测定。

发明内容

[0013] 本发明针对当前技术存在缺点和不足,本发明提供了一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其制备方法与应用,特别是一种能快速定量检测人尿样或血样中肾损伤分子-1(KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)、胰岛素样生长因子结合蛋白-7(IGFBP-7)、组织金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)、白介素18(IL-18)、降钙素原(PCT)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)的即插荧光检测卡。

[0014] 本发明提供的一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其制备方法与应用是用以下技术方案实现的:

[0015] 一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的制备方法,包括以下步骤:

[0016] S1 用1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺溶液(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS)分别对荧光微球液进行活化,得到荧光微球活化混合物;所述的荧光微球液中荧光微球的粒径为250-350nm,固含量1%;所述1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺溶液浓度为1-100mg/ml;所述N-羟基琥珀酰亚胺混合溶液浓度为1-100mg/ml;所述荧光微球液、1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺溶液、N-羟基琥珀酰亚胺混合溶液的体积比为100:1-2:1-2。

[0017] S2 将步骤S1中得到的荧光微球活化混合物放入透析袋中,在磷酸盐缓冲液PBS中透析除去多余的1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,得到透析后

的荧光微球液；优选的，本发明中所述的缓冲液为10-100mmol/L pH 7.2-7.6的磷酸缓冲液。

[0018] S3 将步骤S2中透析后的荧光微球液里加入氨基聚乙二醇羧基(NH₂-PEG-COOH)，37℃搅拌反应1-3h后，在弱酸性N-吗啉乙磺酸(MES)缓冲溶液中进行第二次透析，除去多余的氨基聚乙二醇羧基，得到二次透析后的荧光微球液；所述氨基聚乙二醇羧基的分子量为1000~5000Da；优选的，加入的氨基聚乙二醇羧基终浓度10-100mmol/L。优选的，其中缓冲溶液为0.1mol/L pH4.5-6.1的N-吗啉乙磺酸缓冲溶液。

[0019] S4 将步骤S3中得到的二次透析后的荧光微球液再次活化，向S3中透析后的荧光液加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3乙基碳二亚胺(EDC)活化后，再加入特异性高亲和力重组抗体于2-8℃下反应8-12h，加入牛血清白蛋白封闭，离心沉淀，再将沉淀用磷酸盐缓冲液PBS重悬(重悬一次或两次即可达到需要的效果)，离心沉淀，用荧光微球复溶液重悬，即制得标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球。所述荧光微球复溶液为含有0.1-1.5wt%明胶或BSA、0.01-1wt%曲拉通X-100、0.05-0.1wt%叠氮钠、0.01-0.2mol/L pH 6.5-8.5磷酸盐缓冲液。本发明中所述的磷酸盐缓冲液为10-100mmol/L pH 7.2-7.6的磷酸缓冲液。优选的，加入所述牛血清白蛋白封闭时，使牛血清白蛋白终浓度为0.5-1.5wt%。

[0020] 本发明全程采用特定体系下的温和透析方法，而不是一般传统方法或其它专利中的机械离心法，对标记过程中的荧光微粒进行纯化，这样做的益处是大大提高了荧光微粒的标记效率，而且最大程度保留了免疫荧光微粒的生活活性。

[0021] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人K1M-1单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0022] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人NGAL和羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0023] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人IGFBP-7单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0024] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人TIMP-2单克隆抗体和羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0025] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人IL-18和羊抗兔IgG。

[0026] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人PCT和羊抗兔IgG。

[0027] 其中，所述步骤S4中的抗体为鼠抗人cTnI和羊抗兔IgG。

[0028] 上述方法制得的标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球。

[0029] 上述标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球制得的荧光垫。

[0030] 一种快速定量检测K1M-1的检测卡，包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸；

[0031] 其中，所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人K1M-1抗体的荧光微球和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合，然后加在聚酯膜结合垫上，冷冻干燥制成的；

[0032] 其中，所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人K1M-1单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0033] 一种快速定量检测NGAL的检测卡，包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸；

[0034] 其中，所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人NGAL抗体的荧光微球和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合，

然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

[0035] 其中,所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人NGAL重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0036] 一种快速定量检测IGFBP-7的检测卡,包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

[0037] 其中,所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人IGFBP-7抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

[0038] 其中,所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人IGFBP-7的重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0039] 一种快速定量检测TIMP-2的检测卡,包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

[0040] 其中,所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人TIMP-2抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

[0041] 其中,所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人TIMP-2重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0042] 一种快速定量检测IL-18的检测卡,包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

[0043] 其中,所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人IL-18抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

[0044] 其中,所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人IL-18重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0045] 一种快速定量检测PCT的检测卡,包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

[0046] 其中,所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人PCT抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

[0047] 其中,所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人PCT重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0048] 一种快速定量检测cTnI的检测卡,包括底板和底板上设有样品垫、荧光垫、反应垫、吸水纸;

[0049] 其中,所述荧光垫是将上述方法制得的标记特异性高亲和力重组鼠抗人cTnI抗体和羊抗兔IgG抗体的荧光微球按两种荧光微球溶液中的荧光微球1:1等量混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥制成的;

[0050] 其中,所述反应垫包括反应垫本体和其上设有包被另一株鼠抗人cTnI重组单克隆抗体检测线和包被有兔IgG的质控线。

[0051] 本发明的有益效果:

[0052] 1) 本发明提供的荧光微球, 比照传统方法, 能够显著提高免疫荧光微球的反应下线, 使得试剂灵敏度可提高10-100倍。因此待测样本中标志物含量在极微量情况下, 普通荧光微球无法准确检测到, 而本发明荧光微球仍能获得可观的荧光信号强度, 使得免疫荧光微粒的反应活性大大提高, 从而极大的提高了试剂灵敏度和线性范围等反应性能。

[0053] 2) 本发明提供的即插荧光检测卡能够定量检测K1M-1、NGAL、1GFBP-7、T1MP-2、1L-18、PCT、cTnI, 操作简便快速, 定量结果准确可靠, 解决了目前尚无快速定量检测K1M-1、NGAL、1GFBP-7、T1MP-2、1L-18、PCT、cTnI的问题。适合于各级卫生医疗机构, 包括乡镇医院卫生诊所等, 具有重要的社会意义。

附图说明

[0054] 图1为检测卡结构示意图: 1样品垫、2荧光垫、3反应垫、4检测线、5质控线、6吸水纸、7底板。

[0055] 图2为实施例1、对比例1和对比例2的K1M-1标定曲线对比。

[0056] 图3为实施例1、对比例1和对比例2的K1M-1实测值与理论值的回归曲线。

[0057] 图4为实施例2、对比例3和对比例4的NGAL标定曲线对比

[0058] 图5为实施例2、对比例3和对比例4的NGAL实测值与理论值的回归曲线。

[0059] 图6为实施例3、对比例5和对比例6的1GFBP-7标定曲线对比

[0060] 图7为实施例3、对比例5和对比例6的1GFBP-7实测值与理论值的回归曲线。

[0061] 图8为实施例4、对比例7和对比例8的T1MP-2标定曲线

[0062] 图9为实施例4、对比例7和对比例8的T1MP-2实测值与理论值的回归曲线。

[0063] 图10为实施例5、对比例9和对比例10的1L-18标定曲线

[0064] 图11为实施例5、对比例9和对比例10的1L-18实测值与理论值的回归曲线。

[0065] 图12为实施例6、对比例11和对比例12的PCT标定曲线

[0066] 图13为实施例6、对比例11和对比例12的PCT实测值与理论值的回归曲线。

[0067] 图14为实施例7、对比例13和对比例14的cTnI标定曲线

[0068] 图15为实施例7、对比例13和对比例14的cTnI实测值与理论值的回归曲线。

具体实施方式

[0069] 下面结合实施例, 对本发明作进一步说明:

[0070] 实施例1

[0071] 在实施例1与对比例1、2中:

[0072] 荧光微球液: 粒径300nm, 固含量1%;

[0073] EDC溶液: 50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC);

[0074] NHS溶液: 50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);

[0075] MES缓冲液: 0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES);

[0076] PBS缓冲液: 0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS);

[0077] 氨基聚乙二醇羧基(NH_2 -PEG-COOH), 分子量为2000Dalton。

[0078] 荧光微球复溶液: 含0.2wt% BSA、0.1wt% 曲拉X-100、0.08wt% 叠氮钠、0.1M, PH 8.0磷酸盐缓冲液。

- [0079] 制备快速定量检测人尿液中K1M-1的荧光检测卡
- [0080] 1、K1M-1抗体标记荧光微球的制备：
- [0081] 1.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0082] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0083] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0084] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基，氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM，37℃反应1~3小时；
- [0085] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋，在200ml MES缓冲液中透析，除去多余的反应残留物；
- [0086] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液（每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液），室温活化反应15分钟；
- [0087] 1.7 取1mg鼠抗人K1M-1单克隆抗体（8.0mg/ml取125μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0088] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0089] 1.9 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0090] 1.10 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0091] 1.11 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0092] 1.12 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。
- [0093] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备：
- [0094] 2.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0095] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0096] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0097] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基，氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM，37℃反应1~3小时；
- [0098] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋，在200ml MES缓冲液中透析，除去多余的反应残留物；
- [0099] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液（每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液），室温活化反应15分钟；
- [0100] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体（10.0mg/ml取50μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0101] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0102] 2.9 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0103] 2.10 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0104] 2.11 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0105] 2.12 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。

- [0106] 3 制备快速定量检测人尿液中K1M-1的荧光检测卡
- [0107] 3.1 制备样本垫:使用玻璃纤维作为尿液样本垫,浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1M PH 7.40磷酸盐缓冲液,室温干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0108] 3.2 制备荧光垫:用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组鼠抗人K1M-1单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔IgG多克隆抗体的荧光微球,将标记后的微球按1:1体积比混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0109] 3.3 制备反应垫:
- [0110] 包被缓冲液:0.1M PH 8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。
- [0111] 硝酸纤维素膜:外购
- [0112] 制备反应垫:用包被缓冲液稀释另一株鼠抗人K1M-1单克隆抗体至浓度为1.0mg/ml,用包被缓冲液稀释兔IgG,稀释的兔IgG浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。
- [0113] 3.4 吸水纸、底板外购。
- [0114] 3.5 制备快速定量检测人尿液中K1M-1的荧光检测卡:将样本垫、荧光垫、反应垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。
- [0115] 对比例1
- [0116] 1、K1M-1抗体标记荧光微球的制备:
- [0117] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0118] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0119] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟;
- [0120] 1.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;
- [0121] 1.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0122] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0123] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0124] 1.8 取1mg鼠抗人K1M-1单克隆抗体(8.0mg/ml取125μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0125] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0126] 1.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0127] 1.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0128] 1.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0129] 1.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0130] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0131] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0132] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

- [0133] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟；
- [0134] 2.4 去除上清液，沉淀用1ml PBS缓冲液重悬，并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀；
- [0135] 2.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基，氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM，37℃反应1~3小时；
- [0136] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋，在200ml MES缓冲液中透析，除去多余的反应残留物；
- [0137] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液（每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液），室温活化反应15分钟；
- [0138] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体（10.0mg/ml取50μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0139] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0140] 2.10 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0141] 2.11 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0142] 2.12 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0143] 2.13 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。
- [0144] 3.1 制备检测人尿液中K1M-1的荧光检测卡：方法同实施例1所述。
- [0145] 对比例2
- [0146] 1、K1M-1抗体标记荧光微球的制备：
- [0147] 1.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0148] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0149] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0150] 1.4 取1mg鼠抗人K1M-1单克隆抗体（8.0mg/ml取125μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0151] 1.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0152] 1.6 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0153] 1.7 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0154] 1.8 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0155] 1.9 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。
- [0156] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备：
- [0157] 2.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0158] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0159] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0160] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体（10.0mg/ml取50μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；

[0161] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0162] 2.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0163] 2.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0164] 2.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0165] 2.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0166] 3.1 制备检测人尿液中KIM-1的荧光检测卡:方法同实施例1所述。

[0167] 实施例1、对比例1、对比例2测试比较结果如下:

[0168] 分别采用实施例1、对比例1、对比例2的方法制备的KIM-1免疫荧光检测试剂卡,测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异,以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异。

[0169] A使用梯度浓度KIM-1校准品的定标结果及其工作曲线见图2所示:

[0170]

KIM-1 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 1	对比例 1	对比例 2
0	26	33	68
0.5	865	488	159
1	1399	719	229
5	7133	3586	1343
20	18719	11273	2847
100	45576	28663	5801

[0171] 由定标结果可见,实施例1的定标结果信号值明显高于比比例1和对比例2;实施例1工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例1和对比例2。

[0172] B分析灵敏度测试结果

[0173] 比较0.5ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0174]

KIM-1 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 1	对比例 1	对比例 2
0	26	33	68
0.5	865	488	159
Δ 差值	839	455	91

[0175] Δ 差值:测试同样的KIM-1低浓度样品(0.5ng/ml),实施例1信号灵敏度明显高于对比例1和对比例2。

[0176] C线性范围测试结果

[0177] 分别使用三种不同工艺方法制备的KIM-1检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异。

[0178]

KIM-1 理论浓度 ng/ml	KIM-1 实测浓度 ng/ml		
	实施例 1	对比例 1	对比例 2
1	1.05	1.07	1.31
5	5.11	4.92	4.95
20	21.03	19.35	20.07
100	105.1	93.18	92.55
200	195.63	153.02	117.11

[0179] 该回归结果可见图3所示,实施例1的线性范围性能明显优于对比例1和对比例2。

[0180] 实施例2

[0181] 在实施例2与对比例3、4中:

[0182] 荧光微球液:粒径300nm,固含量1%;

[0183] EDC溶液:50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC);

[0184] NHS溶液:50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);

[0185] MES缓冲液:0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES);

[0186] PBS缓冲液:0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS);

[0187] 氨基聚乙二醇羧基($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$),分子量为2000Dalton。

[0188] 荧光微球复溶液:含0.2wt%BSA、0.1wt%曲拉X-100、0.08wt%叠氮钠、0.1M,PH 8.0磷酸盐缓冲液。

[0189] 制备快速定量检测血液中NGAL的荧光检测卡

[0190] 1、NGAL抗体标记荧光微球的制备:

[0191] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0192] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0193] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0194] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;

[0195] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0196] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0197] 1.7 取0.8mg NGAL单克隆抗体(5.8mg/ml取138 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0198] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0199] 1.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0200] 1.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0201] 1.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0202] 1.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

- [0203] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备：
- [0204] 2.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0205] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0206] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0207] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基，氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM，37℃反应1~3小时；
- [0208] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋，在200ml MES缓冲液中透析，除去多余的反应残留物；
- [0209] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液（每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液），室温活化反应15分钟；
- [0210] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体（10.0mg/ml取50μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0211] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0212] 2.9 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0213] 2.10 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0214] 2.11 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0215] 2.12 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。
- [0216] 3 制备快速定量检测人血液中NGAL的荧光检测卡
- [0217] 3.1 制备样本垫：使用玻璃纤维作为尿液样本垫，浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1M 7.40磷酸盐缓冲液，室温干燥，密封袋密封干燥保存。
- [0218] 3.2 制备荧光垫：用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组NGAL单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔IgG多克隆抗体的荧光微球，将标记后的微球按1:1体积比混合，然后加在聚酯膜结合垫上，冷冻干燥，密封袋密封干燥保存。
- [0219] 3.3 制备反应垫：
- [0220] 包被缓冲液：0.1M PH8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。
- [0221] 硝酸纤维素膜：外购
- [0222] 制备反应垫：用包被缓冲液稀释另一株NGAL单克隆抗体至浓度为1.0mg/ml，用包被缓冲液分别稀释兔IgG，稀释的IgG浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。
- [0223] 3.4 吸水纸、底板外购。
- [0224] 3.5 制备快速定量检测人血液中NGAL的荧光检测卡：将样本垫、荧光垫、反应垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。
- [0225] 对比例3
- [0226] 1、NGAL抗体标记荧光微球的制备：
- [0227] 1.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0228] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0229] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟；

[0230] 1.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;

[0231] 1.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;

[0232] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0233] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0234] 1.8 取0.8mg NGAL单克隆抗体(5.8mg/ml取138μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0235] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0236] 1.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0237] 1.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0238] 1.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0239] 1.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0240] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:

[0241] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0242] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0243] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟;

[0244] 2.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;

[0245] 2.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;

[0246] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0247] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0248] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0249] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0250] 2.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0251] 2.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0252] 2.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0253] 2.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0254] 3.1 制备检测血液中NGAL的荧光检测卡:方法同实施例2所述。

[0255] 对比例4

[0256] 1、NGAL抗体标记荧光微球的制备:

- [0257] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0258] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0259] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0260] 1.5 取0.8mg鼠抗人NGAL单克隆抗体(5.8mg/ml取138μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0261] 1.6 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0262] 1.7 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0263] 1.8 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0264] 1.9 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0265] 1.10 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0266] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0267] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0268] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0269] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0270] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0271] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0272] 2.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0273] 2.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0274] 2.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0275] 2.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0276] 3.1 制备检测人尿液中NGAL的荧光检测卡:方法同实施例2所述。
- [0277] 测试数据:
- [0278] 实施例2、对比例3、对比例4测试比较结果如下:
- [0279] 分别采用实施例2、对比例3、对比例4的方法制备的NGAL免疫荧光检测试剂卡,测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异,以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异:
- [0280] A使用梯度浓度NGAL校准品(1:100稀释)的定标结果及其工作曲线见图4所示

[0281]

NGAL (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 2	对比例 3	对比例 4
0	61	112	137
50	1549	734	266
100	3177	1507	418
500	12305	7231	2192
2000	38156	21882	5933
5000	75983	42478	8009

[0282] 由定标结果可见,实施例2的定标结果信号值明显高于对比例3和对比例4;实施例2工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例3和对比例4

[0283] B. 分析灵敏度

[0284] 比较50ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0285]

NGAL (ng/ml)	荧光信号
--------------	------

[0286]

	实施例 2	对比例 3	对比例 4
0	61	112	137
50	1549	734	266
Δ 差值	1488	622	129

[0287] Δ 差值:测试同样的NGAL低浓度样品(0.5ng/ml),实施例2信号灵敏度明显高于对比例3和对比例4.

[0288] C. 线性范围

[0289] 分别使用三种不同工艺方法制备的NGAL检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异。

[0290]

NGAL 理论浓度 ng/ml	NGAL 实测浓度 ng/ml		
	实施例 2	对比例 3	对比例 4
50	48	49	51
100	97	96	108
500	499	513	511
2000	2051	1919	1915
5000	4928	4087	2875

[0291] 该回归结果可见图5所示,实施例2的线性范围性能明显优于对比例3和对比例4。

[0292] 实施例3

[0293] 在实施例3与对比例5、6中:

- [0294] 荧光微球液:粒径250nm,固含量1%;
- [0295] EDC溶液:50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC);
- [0296] NHS溶液:50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);
- [0297] MES缓冲液:0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES);
- [0298] PBS缓冲液:0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS);
- [0299] 氨基聚乙二醇羧基($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$),分子量为1000Dalton。
- [0300] 荧光微球复溶液:含0.2wt%BSA、0.1wt%曲拉X-100、0.08wt%叠氮钠、0.1M,PH 8.0磷酸盐缓冲液。
- [0301] 制备快速定量检测尿液中1GFBP-7的荧光检测卡
- [0302] 1、1GFBP-7抗体标记荧光微球的制备:
- [0303] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0304] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0305] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0306] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0307] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0308] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0309] 1.7 取0.6mg鼠抗人1GFBP-7单克隆抗体(5.3mg/ml取113 μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0310] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0311] 1.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0312] 1.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0313] 1.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0314] 1.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0315] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0316] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0317] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0318] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0319] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度10mM,37℃反应1~3小时;
- [0320] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0321] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0322] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0323] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0324] 2.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0325] 2.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0326] 2.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0327] 2.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0328] 3 制备快速定量检测人血液中1GFBP-7的荧光检测卡

[0329] 3.1 制备样本垫:使用玻璃纤维作为尿液样本垫,浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1MOL/L PH 7.40磷酸盐缓冲液,室温干燥,密封袋密封干燥保存。

[0330] 3.2 制备荧光垫:用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组1GFBP-7单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔1gG多克隆抗体的荧光微球,将标记后的微球按1:1体积比混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥,密封袋密封干燥保存。

[0331] 3.3 制备反应垫:

[0332] 包被缓冲液:0.1MOL/L PH 8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。稀释的1GFBP-7抗体浓度为1.5mg/ml,稀释的1gG浓度为1.0mg/ml。

[0333] 硝酸纤维素膜:外购

[0334] 制备反应垫:用包被缓冲液分别稀释另一株鼠抗人1GFBP-7单克隆抗体至浓度为1.5mg/ml,用包被缓冲液稀释兔1gG,稀释的1gG浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。

[0335] 3.4 吸水纸、底板外购。

[0336] 3.5 制备快速定量检测人尿液中1GFBP-7的荧光检测卡:将样本垫、荧光垫、反应垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。

[0337] 对比例5

[0338] 1、1GFBP-7抗体标记荧光微球的制备:

[0339] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0340] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0341] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟;

[0342] 1.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;

[0343] 1.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度10mM,37℃反应1~3小时;

[0344] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0345] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0346] 1.8 取0.6mg 1GFBP-7单克隆抗体(5.3mg/ml取113 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

- [0347] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0348] 1.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0349] 1.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0350] 1.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0351] 1.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0352] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0353] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0354] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0355] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟;
- [0356] 2.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;
- [0357] 2.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度10mM,37℃反应1~3小时;
- [0358] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0359] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0360] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0361] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0362] 2.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0363] 2.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0364] 2.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0365] 2.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0366] 3.1 制备检测尿液中的IGFBP-7荧光检测卡:方法同实施例3所述。
- [0367] 对比例6
- [0368] 1、IGFBP-7抗体标记荧光微球的制备:
- [0369] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0370] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0371] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0372] 1.4 取0.6mg鼠抗人IGFBP-7单克隆抗体(5.3mg/ml取113μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0373] 1.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0374] 1.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0375] 1.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

- [0376] 1.8 再次离心, 2~8℃ 20000转离心15分钟;
- [0377] 1.9 去上清, 沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬, 超声分散。
- [0378] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0379] 2.1 取1ml荧光微球液, 加入EDC溶液0.1ml, 室温活化反应15分钟;
- [0380] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml, 室温继续活化30分钟;
- [0381] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD), 在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析, 除去多余的反应残留物;
- [0382] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中, 立即混匀, 2~8℃反应8~12小时;
- [0383] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白, 牛血清白蛋白终浓度1wt%, 37℃封闭1小时;
- [0384] 2.6 将上述溶液离心, 2~8℃ 20000转离心15分钟;
- [0385] 2.7 去上清, 沉淀用PBS缓冲液重悬, 超声分散;
- [0386] 2.8 再次离心, 2~8℃ 20000转离心15分钟;
- [0387] 2.9 去上清, 沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬, 超声分散。
- [0388] 3.1 制备检测人尿液中IGFBP-7的荧光检测卡: 方法同实施例3所述。
- [0389] 测试数据:
- [0390] 实施例3、对比例5、对比例6测试比较结果如下:
- [0391] 分别采用实施例3、对比例5、对比例6的方法制备的IGFBP-7免疫荧光检测试剂卡, 测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异, 以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异:
- [0392] A使用梯度浓度IGFBP-7校准品(1:100稀释)的定标结果及其工作曲线见图6所示
- [0393]

IGFBP-7 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 3	对比例 5	对比例 6
0	18	37	35
10	622	483	151
50	2509	1880	499
200	7167	5172	1647
1000	25875	18089	4778

- [0394] 由定标结果可见, 实施例3的定标结果信号值明显高于对比例5和对比例6; 实施例5工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例5和对比例6。
- [0395] B分析灵敏度
- [0396] 比较10ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0397]

IGFBP-7 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 3	对比例 5	对比例 6
0	18	37	35
10	622	483	151
Δ 差值	604	446	116

[0398] Δ 差值:测试同样的1GFBP-7低浓度样品(10ng/ml),实施例3信号灵敏度明显高于对比例5和对比例6。

[0399] C线性范围

[0400] 分别使用三种不同工艺方法制备的1GFBP-7检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异,见图7所示。

[0401]

IGFBP-7 理论浓度 ng/ml	IGFBP-7 实测浓度 ng/ml		
	实施例 3	对比例 5	对比例 6
5	5.2	4.1	3.2
10	9.8	9.8	11
50	49.5	48.6	49.1
200	206.1	198.5	210.5

[0402]

1000	993	987	666.3
------	-----	-----	-------

[0403] 该回归结果可见,实施例3的线性范围性能与明显优于对比例5和对比例6。

[0404] 实施例4

[0405] 在实施例4与对比例7、8中:

[0406] 荧光微球液:粒径350nm,固含量1%;

[0407] EDC溶液:50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC);

[0408] NHS溶液:50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);

[0409] MES缓冲液:0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES);

[0410] PBS缓冲液:0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS);

[0411] 氨基聚乙二醇羧基(NH₂-PEG-COOH),分子量为5000Dalton。

[0412] 荧光微球复溶液:含0.2wt%BSA、0.1wt%曲拉X-100、0.08wt%叠氮钠、0.1M,PH 8.0磷酸盐缓冲液。

[0413] 制备快速定量检测尿液中TIMP-2的荧光检测卡

[0414] 1、TIMP-2抗体标记荧光微球的制备:

[0415] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0416] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0417] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0418] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度100mM,37℃反应1~3小时;

[0419] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0420] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0421] 1.7 取0.6mg鼠抗人TIMP-2单克隆抗体(6.9mg/ml取87μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0422] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0423] 1.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0424] 1.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0425] 1.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0426] 1.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0427] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:

[0428] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0429] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0430] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0431] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度100mM,37℃反应1~3小时;

[0432] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0433] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0434] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0435] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0436] 2.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0437] 2.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0438] 2.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0439] 2.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0440] 3 制备快速定量检测人血液中TIMP-2的荧光检测卡

[0441] 3.1 制备样本垫:使用玻璃纤维作为尿液样本垫,浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1M PH 7.40磷酸盐缓冲液,室温干燥,密封袋密封干燥保存。

[0442] 3.2 制备荧光垫:用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组TIMP-2单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔IgG多克隆抗体的荧光微球,将标记后的微球按1:1体积比混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥,密封袋密封干燥保存。

[0443] 3.3 制备反应垫:

[0444] 包被缓冲液:0.1M PH 8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。稀释的另一株鼠抗人TIMP-2单克隆抗体浓度为0.8mg/ml,稀释的兔IgG浓度为1.0mg/ml。

[0445] 硝酸纤维素膜:外购

[0446] 制备反应垫:用包被缓冲液分别稀释另一株鼠抗人TIMP-2单克隆抗体浓度为0.8mg/ml,稀释的兔IgG浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。

[0447] 3.4 吸水纸、底板外购。

[0448] 3.5 制备快速定量检测人尿液中TIMP-2的荧光检测卡:将样本垫、荧光垫、反应垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。

[0449] 对比例7

[0450] 1、TIMP-2抗体标记荧光微球的制备:

[0451] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0452] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0453] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟;

[0454] 1.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;

[0455] 1.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度100mM,37℃反应1~3小时;

[0456] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0457] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0458] 1.8 取0.6mg鼠抗人TIMP-2单克隆抗体(6.9mg/ml取87μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0459] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0460] 1.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0461] 1.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0462] 1.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0463] 1.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0464] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:

[0465] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0466] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0467] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟;

[0468] 2.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;

[0469] 2.5 向上述离心后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;

[0470] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0471] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0472] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0473] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0474] 2.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0475] 2.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0476] 2.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0477] 2.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0478] 3.1 制备检测尿液中TIMP-2的荧光检测卡:方法同实施例4所述。

[0479] 对比例8

[0480] 1、TIMP-2抗体标记荧光微球的制备:

[0481] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0482] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0483] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0484] 1.4 取0.6mg鼠抗人TIMP-2单克隆抗体(6.5mg/ml取87 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0485] 1.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0486] 1.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0487] 1.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0488] 1.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0489] 1.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0490] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:

[0491] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0492] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0493] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0494] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0495] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0496] 2.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0497] 2.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0498] 2.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0499] 2.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0500] 3.1 制备检测人尿液中TIMP-2的荧光检测卡:方法同实施例4所述。

[0501] 测试数据:

[0502] 实施例4、对比例7、对比例8测试比较结果如下:

[0503] 分别采用实施例4、对比例7、对比例8的方法制备的TIMP-2免疫荧光检测试剂卡,测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异,以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异:

[0504] A使用梯度浓度TIMP-2校准品(1:100稀释)的定标结果及其工作曲线见图8所示

[0505]

TIMP-2 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 4	对比例 7	对比例 8
0	62	51	88
20	1233	860	235
100	5871	4219	1073
500	21609	16732	4311

[0506]

2000	65875	45089	9778
------	-------	-------	------

[0507] 由定标结果可见,实施例4的定标结果信号值明显高于对比例7和对比例8;实施例4工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例7和对比例8。

[0508] B分析灵敏度

[0509] 比较20ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0510]

TIMP-2 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 4	对比例 7	对比例 8
0	62	51	88
20	1233	860	235
Δ 差值	1171	809	147

[0511] Δ 差值:测试同样的TIMP-2低浓度样品(20ng/ml),实施例4信号灵敏度明显高于对比例7和对比例8

[0512] C线性范围

[0513] 分别使用三种不同工艺方法制备的TIMP-2检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异。

[0514]

TIMP-2 理论浓度 ng/ml	TIMP-2 实测浓度 ng/ml		
	实施例 4	对比例 7	对比例 8
10	9.9	9.1	8.7
50	48.3	50.5	46
200	206.2	210.3	195.7
1000	995.9	1085	993.9
2000	1981.1	1822.6	1385.5

[0515] 如图9所示,该回归结果可见,实施例4的线性范围性能明显优于对比例7和对比例8。

[0516] 实施例5

[0517] 在实施例5与对比例9、10中:

[0518] 荧光微球液:粒径300nm,固含量1%;

[0519] EDC溶液:50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC);

[0520] NHS溶液:50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);

[0521] MES缓冲液:0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES);

[0522] PBS缓冲液:0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS);

[0523] 氨基聚乙二醇羧基($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$),分子量为2000Dalton。

[0524] 荧光微球复溶液:含0.2wt%BSA、0.1wt%曲拉X-100、0.08wt%叠氮钠、0.1M,PH 8.0磷酸盐缓冲液。

[0525] 制备快速定量检测尿液中IL-18的荧光检测卡

[0526] 1、IL-18抗体标记荧光微球的制备:

[0527] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0528] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0529] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0530] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;

[0531] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0532] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0533] 1.7 取1.2mg鼠抗人IL-18单克隆抗体(8.0mg/ml取182 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0534] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0535] 1.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0536] 1.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0537] 1.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

- [0538] 1.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0539] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0540] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0541] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0542] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0543] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0544] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0545] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0546] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0547] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0548] 2.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0549] 2.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0550] 2.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0551] 2.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0552] 3 制备快速定量检测人尿液中1L-18的荧光检测卡
- [0553] 3.1 制备样本垫:使用玻璃纤维作为尿液样本垫,浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1M PH 7.40磷酸盐缓冲液,室温干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0554] 3.2 制备荧光垫:用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组鼠抗人1L-18单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔IgG多克隆抗体的荧光微球,将标记后的微球按1:1体积比混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0555] 3.3 制备反应垫:
- [0556] 包被缓冲液:0.1M PH 8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。稀释的另一株鼠抗人1L-18抗体浓度为0.8mg/ml,稀释的IgG浓度为1.0mg/ml。
- [0557] 硝酸纤维素膜:外购
- [0558] 制备反应垫:用包被缓冲液分别稀释另一株鼠抗人1L-18单克隆抗体至浓度为0.8mg/ml,用包被缓冲液稀释兔IgG,稀释的IgG浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。
- [0559] 3.4 吸水纸、底板外购。
- [0560] 3.5 制备快速定量检测人尿液中1L-18的荧光检测卡:将样本垫、荧光垫、反应垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。
- [0561] 对比例9
- [0562] 1、1L-18抗体标记荧光微球的制备:
- [0563] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

- [0564] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0565] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟;
- [0566] 1.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;
- [0567] 1.5 向上述离心后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0568] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0569] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0570] 1.8 取1.2mg 1L-18单克隆抗体(6.6mg/ml取182μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0571] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0572] 1.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0573] 1.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0574] 1.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0575] 1.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0576] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0577] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0578] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0579] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟;
- [0580] 2.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;
- [0581] 2.5 向上述离心后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0582] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0583] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0584] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0585] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0586] 2.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0587] 2.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0588] 2.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0589] 2.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0590] 3.1 制备检测尿液中1L-18的荧光检测卡:方法同实施例5所述。

- [0591] 对比例10
- [0592] 1、1L-18抗体标记荧光微球的制备：
- [0593] 1.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0594] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0595] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0596] 1.4 取1.2mg鼠抗人1L-18单克隆抗体（6.6mg/ml取182μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0597] 1.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0598] 1.6 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0599] 1.7 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0600] 1.8 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0601] 1.9 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。
- [0602] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备：
- [0603] 2.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；
- [0604] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；
- [0605] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋（截留分子量30KD），在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析，除去多余的反应残留物；
- [0606] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体（10.0mg/ml取50μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；
- [0607] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；
- [0608] 2.6 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0609] 2.7 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；
- [0610] 2.8 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；
- [0611] 2.9 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。
- [0612] 3.1 制备检测人尿液中1L-18的荧光检测卡：方法同实施例5所述。
- [0613] 测试数据：
- [0614] 实施例5、对比例9、对比例10测试比较结果如下：
- [0615] 分别采用实施例5、对比例9、对比例10的方法制备的1L-18免疫荧光检测试剂卡，测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异，以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异：
- [0616] A使用梯度浓度1L-18校准品的定标结果及其工作曲线见图10所示

[0617]

IL-18 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 5	对比例 9	对比例 10
0	15	22	19
0.01	361	206	49
0.05	1526	1030	283
0.5	12082	8491	1722
2	31193	23667	4985

[0618] 由定标结果可见,实施例5的定标结果信号值明显高于对比例9和对比例10;实施例5工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例9和对比例10.

[0619] B分析灵敏度

[0620] 比较0.01ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0621]

IL-18 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 5	对比例 9	对比例 10
0	15	22	19
0.01	361	206	49
Δ 差值	346	184	30

[0622] Δ 差值:测试同样的IL-18低浓度样品(0.01ng/ml),实施例5信号灵敏度明显高于对比例9和对比例10.

[0623] C.线性范围

[0624] 分别使用三种不同工艺方法制备的IL-18检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异。

[0625]

IL-18 理论浓度 pg/ml	IL-18 实测浓度 ng/ml		
	实施例 5	对比例 9	对比例 10
10	9	8	3
50	51	48	35
500	508	503	497
2000	2027	2107	1966
10000	9863	9517	9799

[0626] 如图11所示回归结果可见,实施例5的线性范围性能明显优于对比例9和对比例10。

[0627] 实施例6

[0628] 在实施例6与对比例11、12中:

[0629] 荧光微球液:粒径300nm,固含量1%;

[0630] EDC溶液:50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC);

[0631] NHS溶液:50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);

[0632] MES缓冲液:0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES);

- [0633] PBS缓冲液:0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS) ;
- [0634] 氨基聚乙二醇羧基(NH₂-PEG-COOH),分子量为2000Dalton。
- [0635] 荧光微球复溶液:含0.2wt%BSA、0.1wt%曲拉X-100、0.08wt%叠氮钠、0.1M,PH 8.0磷酸盐缓冲液。
- [0636] 制备快速定量检测血液中PCT的荧光检测卡
- [0637] 1、PCT抗体标记荧光微球的制备:
- [0638] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0639] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0640] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0641] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0642] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0643] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0644] 1.7 取0.5mg PCT单克隆抗体(3.2mg/ml取156μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0645] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0646] 1.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0647] 1.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0648] 1.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0649] 1.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0650] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0651] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0652] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0653] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0654] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0655] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0656] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0657] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0658] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

- [0659] 2.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0660] 2.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0661] 2.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0662] 2.12去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0663] 3 制备快速定量检测人血液中PCT的荧光检测卡
- [0664] 3.1 制备样本垫:使用玻璃纤维作为血液样本垫,浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1MOL/L PH 7.40磷酸盐缓冲液,室温干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0665] 3.2 制备荧光垫:用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组鼠抗人PCT单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔IgG多克隆抗体的荧光微球,将标记后的微球按1:1体积比混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0666] 3.3 制备反应垫:
- [0667] 包被缓冲液:0.1MOL/L PH 8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。
- [0668] 硝酸纤维素膜:外购
- [0669] 制备反应垫:用包被缓冲液分别稀释另一株鼠抗人PCT单克隆抗体至浓度为1.0mg/ml,用包被缓冲液稀释兔IgG至浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。
- [0670] 3.4 吸水纸、底板外购。
- [0671] 3.5 制备快速定量检测人血液中PCT的荧光检测卡:将样本垫、荧光垫、反应垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。
- [0672] 对比例11
- [0673] 1、PCT抗体标记荧光微球的制备:
- [0674] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0675] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0676] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟;
- [0677] 1.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;
- [0678] 1.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0679] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0680] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0681] 1.8 取0.5mg PCT单克隆抗体(3.2mg/ml取156μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0682] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0683] 1.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0684] 1.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0685] 1.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

- [0686] 1.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0687] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0688] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0689] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0690] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟;
- [0691] 2.4 去除上清液,沉淀用1ml PBS缓冲液重悬,并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀;
- [0692] 2.5 向上述离心后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0693] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0694] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0695] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0696] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0697] 2.10 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0698] 2.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0699] 2.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0700] 2.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0701] 3.1 制备检测血液中PCT的荧光检测卡:方法同实施例6所述。
- [0702] 对比例12
- [0703] 1、PCT抗体标记荧光微球的制备:
- [0704] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0705] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0706] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0707] 1.6 取0.5mg鼠抗人PCT单克隆抗体(3.2mg/ml取156 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0708] 1.7 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0709] 1.8 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0710] 1.9 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0711] 1.10 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0712] 1.11 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0713] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0714] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0715] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0716] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0717] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

[0718] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;

[0719] 2.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0720] 2.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;

[0721] 2.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;

[0722] 2.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。

[0723] 3.1 制备检测人血液中PCT的荧光检测卡:方法同实施例6所述。

[0724] 测试数据:

[0725] 实施例6、对比例11、对比例12测试比较结果如下:

[0726] 分别采用实施例6、对比例11、对比例12的方法制备的PCT免疫荧光检测试剂卡,测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异,以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异:

[0727] A使用梯度浓度PCT校准品的定标结果及其工作曲线见图12所示

[0728]

PCT (ng/ml)	荧光信号		
	实施例6	对比例 11	对比例 12

[0729]

0	35	69	63
0.1	861	534	247
0.5	5277	3482	1539
2	16308	10321	4208
10	59495	41710	13808

[0730] 由定标结果可见,实施例6的定标结果信号值明显高于比列例11和对比例12;实施例6工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例11和对比例12.

[0731] B分析灵敏度

[0732] 比较0.1ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0733]

PCT (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 1	对比例 1	对比例 2
0	35	69	63
0.01	861	534	247
Δ 差值	826	465	184

[0734] Δ 差值:测试同样的PCT低浓度样品(0.1ng/ml),实施例6信号灵敏度明显高于对

比例11和对比例12.

[0735] C线性范围

[0736] 分别使用三种不同工艺方法制备的PCT检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异。

[0737]

PCT 理论浓度 ng/ml	PCT 实测浓度 ng/ml		
	实施例 6	对比例 11	对比例 12
0.1	0.11	0.15	0.21
0.5	0.49	0.52	0.62
2	2.02	2.03	2.13
10	9.95	10.5	9.91
20	19.88	18.31	16.57

[0738] 如图13所示回归结果可见,实施例6的线性范围性能明显优于对比例11和对比例12。

[0739] 实施例7

[0740] 在实施例7与对比例13、14中:

[0741] 荧光微球液:粒径300nm,固含量1%;

[0742] EDC溶液:50mg/ml 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),;

[0743] NHS溶液:50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);

[0744] MES缓冲液:0.1M MES PH 5N-吗啉乙磺酸(MES),;

[0745] PBS缓冲液:0.05M PBS PH 7.4磷酸盐(PBS);

[0746] 氨基聚乙二醇羧基($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$),分子量为2000Dalton。

[0747] 荧光微球复溶液:含0.2wt%BSA、0.1wt%曲拉X-100、0.08wt%叠氮钠、0.1M,PH 8.0磷酸盐缓冲液。

[0748] 制备快速定量检测血液中cTnI的荧光检测卡

[0749] 1、cTnI抗体标记荧光微球的制备:

[0750] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;

[0751] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;

[0752] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;

[0753] 1.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;

[0754] 1.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;

[0755] 1.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;

[0756] 1.7 取0.9mg cTnI单克隆抗体(7.2mg/ml取125 μ l)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;

- [0757] 1.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0758] 1.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0759] 1.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0760] 1.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0761] 1.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0762] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0763] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0764] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0765] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0766] 2.4 向上述透析后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基,氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM,37℃反应1~3小时;
- [0767] 2.5 将上述反应后的微球溶液装入透析袋,在200ml MES缓冲液中透析,除去多余的反应残留物;
- [0768] 2.6 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液(每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液),室温活化反应15分钟;
- [0769] 2.7 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0770] 2.8 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0771] 2.9 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0772] 2.10 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0773] 2.11 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0774] 2.12 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0775] 3 制备快速定量检测人血液中cTnI的荧光检测卡
- [0776] 3.1 制备样本垫:使用玻璃纤维作为尿液样本垫,浸泡含1%脱脂奶粉或BSA、0.1%吐温-20、0.1M PH7.40磷酸盐缓冲液,室温干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0777] 3.2 制备荧光垫:用荧光微球复溶液分别稀释标记特异性高亲和力重组鼠抗人cTnI单克隆抗体的荧光微球和羊抗兔IgG多克隆抗体的荧光微球,将标记后的微球按1:1体积比混合,然后加在聚酯膜结合垫上,冷冻干燥,密封袋密封干燥保存。
- [0778] 3.3 制备反应垫:
- [0779] 包被缓冲液:0.1M PH 8的磷酸盐、5wt%蔗糖、0.05wt%的吐温-20。
- [0780] 硝酸纤维素膜:外购
- [0781] 制备反应垫:用包被缓冲液分别稀释另一株鼠抗人cTnI单克隆抗体至浓度为1.2mg/ml,用包被缓冲液分别稀释兔IgG,稀释的IgG浓度为1.0mg/ml。然后采用稀释后的两种抗体在硝酸纤维素膜上依次平行的划线形成检测线、质控线。
- [0782] 3.4 吸水纸、底板外购。
- [0783] 3.5 制备快速定量检测人血液中cTnI的荧光检测卡:将样本垫、荧光垫、反应

垫、吸水纸和底板进行组合成如图1所示。

[0784] 对比例13

[0785] 1、cTnI抗体标记荧光微球的制备：

[0786] 1.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；

[0787] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；

[0788] 1.3 离心20000转/分钟离心30分钟；

[0789] 1.4 去除上清液，沉淀用1ml PBS缓冲液重悬，并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀；

[0790] 1.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基，氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM，37℃反应1~3小时；

[0791] 1.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋，在200ml MES缓冲液中透析，除去多余的反应残留物；

[0792] 1.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液（每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液），室温活化反应15分钟；

[0793] 1.8 取0.9mg cTnI单克隆抗体（7.2mg/ml取125μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；

[0794] 1.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；

[0795] 1.10 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；

[0796] 1.11 去上清，沉淀用PBS缓冲液重悬，超声分散；

[0797] 1.12 再次离心，2~8℃20000转离心15分钟；

[0798] 1.13 去上清，沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬，超声分散。

[0799] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备：

[0800] 2.1 取1ml荧光微球液，加入EDC溶液0.1ml，室温活化反应15分钟；

[0801] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml，室温继续活化30分钟；

[0802] 2.3 离心20000转/分钟离心30分钟；

[0803] 2.4 去除上清液，沉淀用1ml PBS缓冲液重悬，并用超声仪超声处理10分钟使微球溶液分散均匀；

[0804] 2.5 向上述离心处理后的荧光微球溶液中加入氨基聚乙二醇羧基，氨基聚乙二醇羧基终浓度50mM，37℃反应1~3小时；

[0805] 2.6 将上述反应后的微球溶液装入透析袋，在200ml MES缓冲液中透析，除去多余的反应残留物；

[0806] 2.7 向上述透析后的荧光微球溶液中加入EDC溶液（每1ml荧光微球液加0.1ml EDC溶液），室温活化反应15分钟；

[0807] 2.8 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体（10.0mg/ml取50μl）加入上述活化后的荧光微球溶液中，立即混匀，2~8℃反应8~12小时；

[0808] 2.9 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白，牛血清白蛋白终浓度1wt%，37℃封闭1小时；

[0809] 2.10 将上述溶液离心，2~8℃20000转离心15分钟；

- [0810] 2.11 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0811] 2.12 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0812] 2.13 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0813] 3.1 制备检测血液中cTN1的荧光检测卡:方法同实施例7所述。
- [0814] 对比例14
- [0815] 1、cTN1抗体标记荧光微球的制备:
- [0816] 1.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0817] 1.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0818] 1.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0819] 1.4 取0.9mg鼠抗人cTN1单克隆抗体(7.2mg/ml取125μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0820] 1.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0821] 1.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0822] 1.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0823] 1.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0824] 1.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0825] 2、羊抗兔抗体标记荧光微球的制备:
- [0826] 2.1 取1ml荧光微球液,加入EDC溶液0.1ml,室温活化反应15分钟;
- [0827] 2.2 向上述溶液加入NHS溶液0.1ml,室温继续活化30分钟;
- [0828] 2.3 将上述活化后的荧光微球溶液装入透析袋(截留分子量30KD),在200ml PBS缓冲液中于2~8℃透析,除去多余的反应残留物;
- [0829] 2.4 取0.5mg羊抗兔多克隆抗体(10.0mg/ml取50μl)加入上述活化后的荧光微球溶液中,立即混匀,2~8℃反应8~12小时;
- [0830] 2.5 然后向上述溶液中加入牛血清白蛋白,牛血清白蛋白终浓度1wt%,37℃封闭1小时;
- [0831] 2.6 将上述溶液离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0832] 2.7 去上清,沉淀用PBS缓冲液重悬,超声分散;
- [0833] 2.8 再次离心,2~8℃20000转离心15分钟;
- [0834] 2.9 去上清,沉淀用50ml荧光微球复溶液重悬,超声分散。
- [0835] 3.1 制备检测人血液中cTN1的荧光检测卡:方法同实施例7所述。
- [0836] 测试数据:
- [0837] 实施例7、对比例13、对比例14测试比较结果如下:
- [0838] 分别采用实施例7、对比例13、对比例14的方法制备的cTN1免疫荧光检测试剂卡,测试比较不同工艺方法所制备的检测试剂在定标工作曲线上的差异,以及在分析灵敏度、线性范围主要性能指标上的差异:
- [0839] A使用梯度浓度cTN1校准品的定标结果及其工作曲线见图14所示

[0840]

cTnI (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 7	对比例 13	对比例 14
0	22	50	51
0.05	171	139	72
0.5	1632	1051	683
5	13098	8637	6008
50	68817	38249	18766

[0841] 由定标结果可见,实施例7的定标结果信号值明显高于对比例13和对比例14;实施例7工作曲线上各浓度点信号区分度明显高于对比例13和对比例14.

[0842] B分析灵敏度

[0843] 比较0.05ng/ml样品与空白样品(0ng/ml)之间荧光信号差

[0844]

cTnI (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 7	对比例 13	对比例 14
0	22	50	51
0.05	171	139	72
Δ 差值	149	89	21

[0845] Δ 差值:测试同样的cTnI低浓度样品(0.05ng/ml),实施例7信号灵敏度明显高于对比例13和对比例14.

[0846] C线性范围

[0847] 分别使用三种不同工艺方法制备的cTnI检测试剂卡检测高、中、低不同浓度范围的已知浓度样品,比较实测值与理论值的回归差异。

[0848]

cTnI 理论浓度 ng/ml	cTnI 实测浓度 ng/ml		
	实施例 7	对比例 13	对比例 14
0.05	0.06	0.03	0
1	1.02	0.99	0.81
5	4.95	5.06	4.93
10	10.01	9.91	10.13
50	48.99	40.65	28.37

[0849] 见图15所示该回归结果可见,实施例7的线性范围性能明显优于对比例13和对比例14。

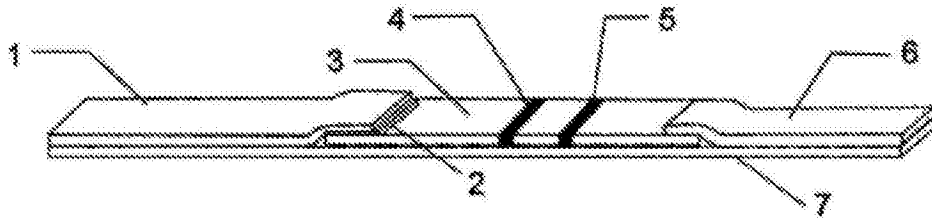


图1

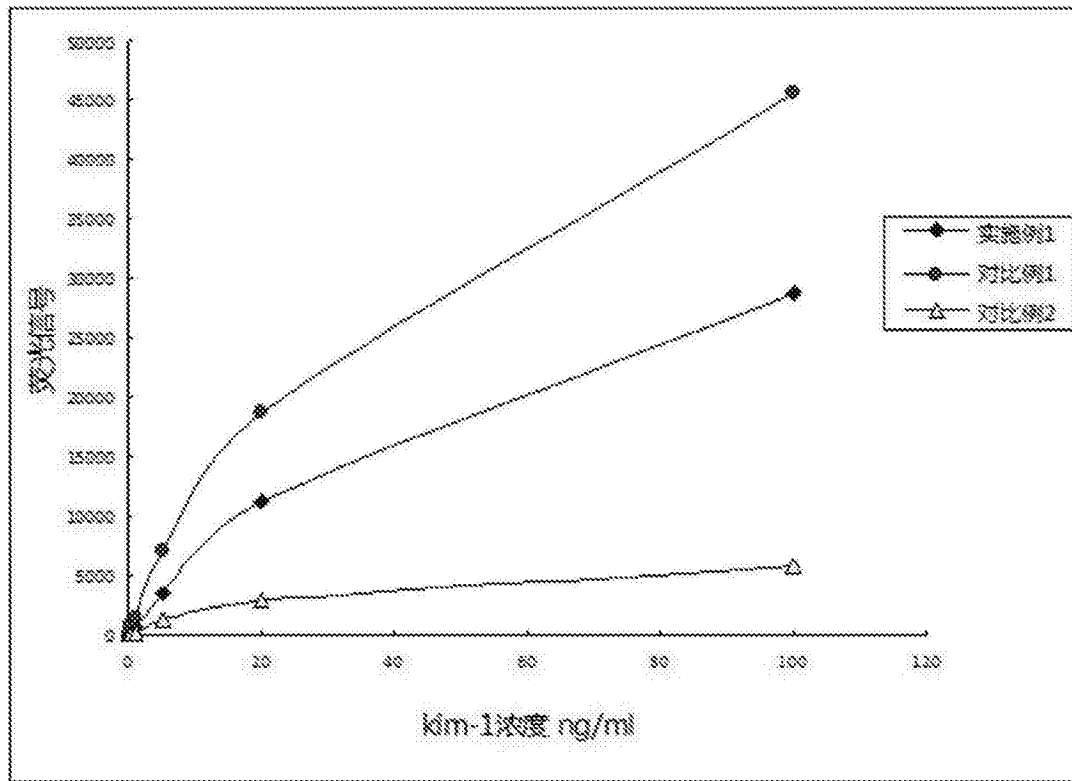


图2

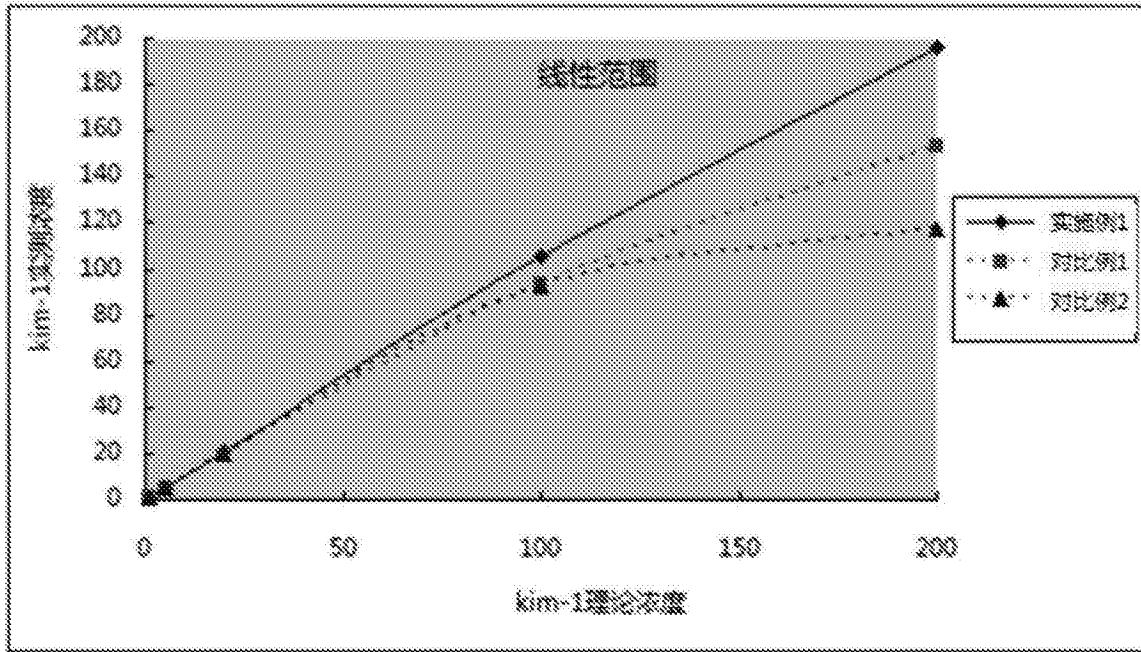


图3

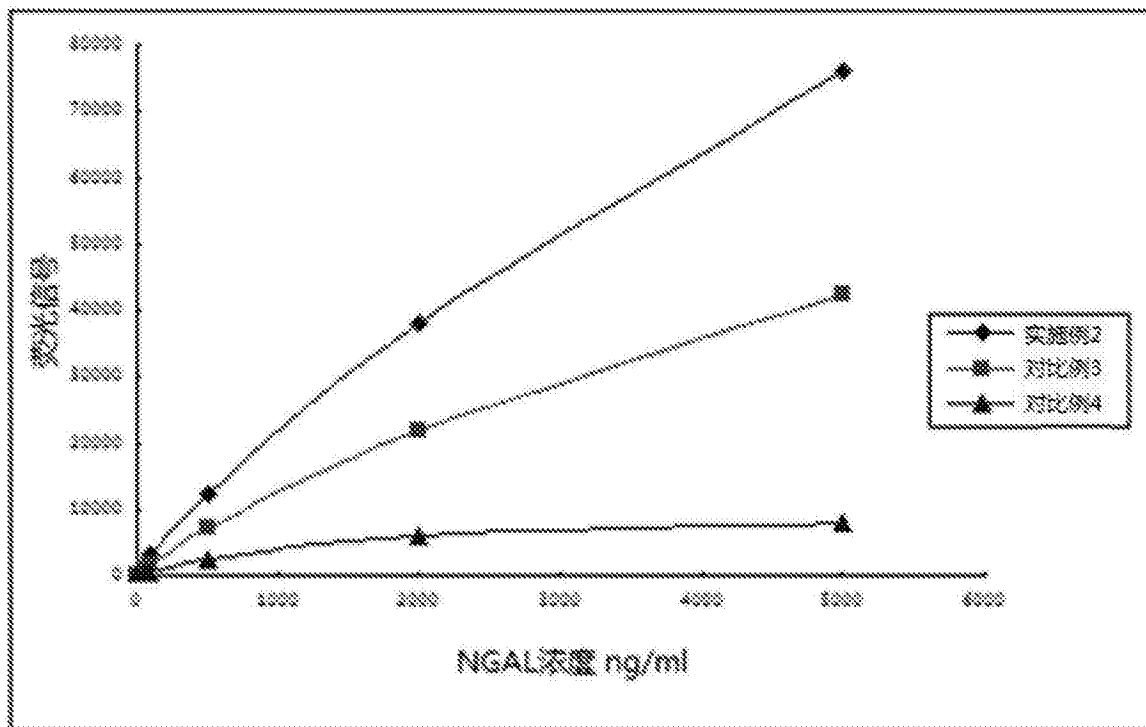


图4

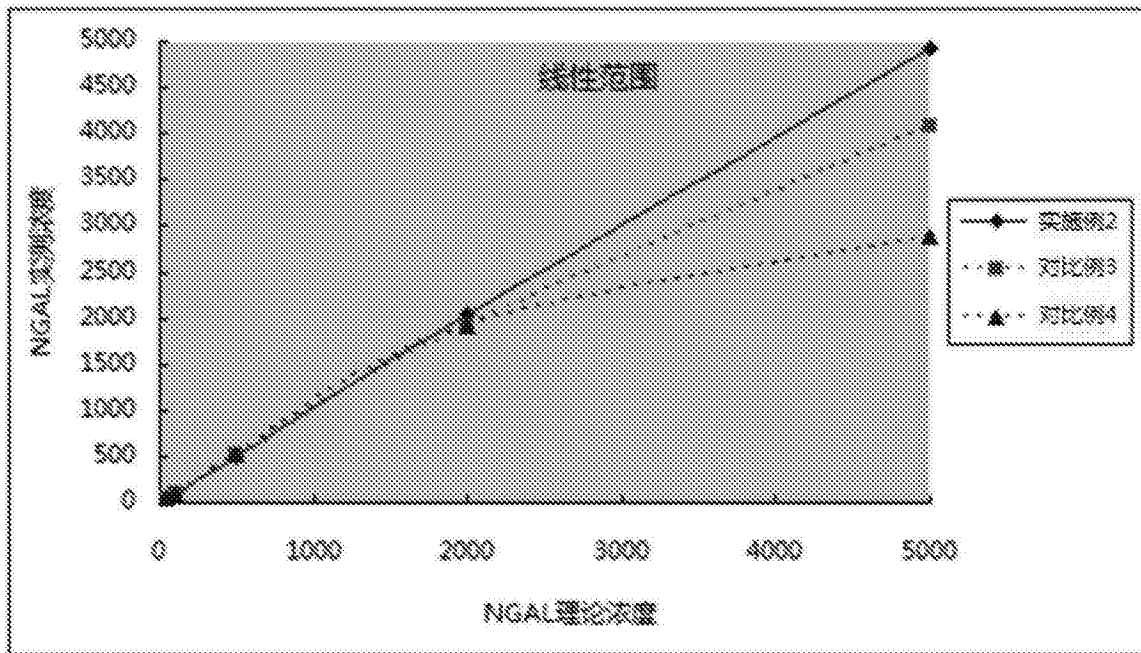


图5

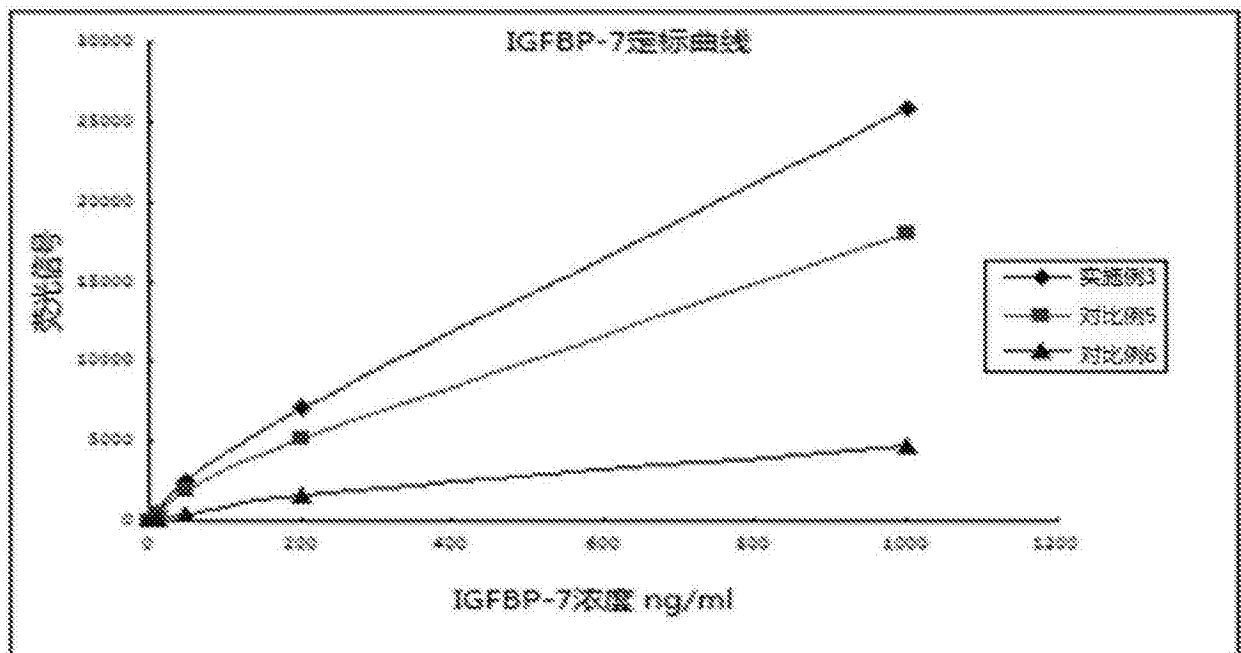


图6

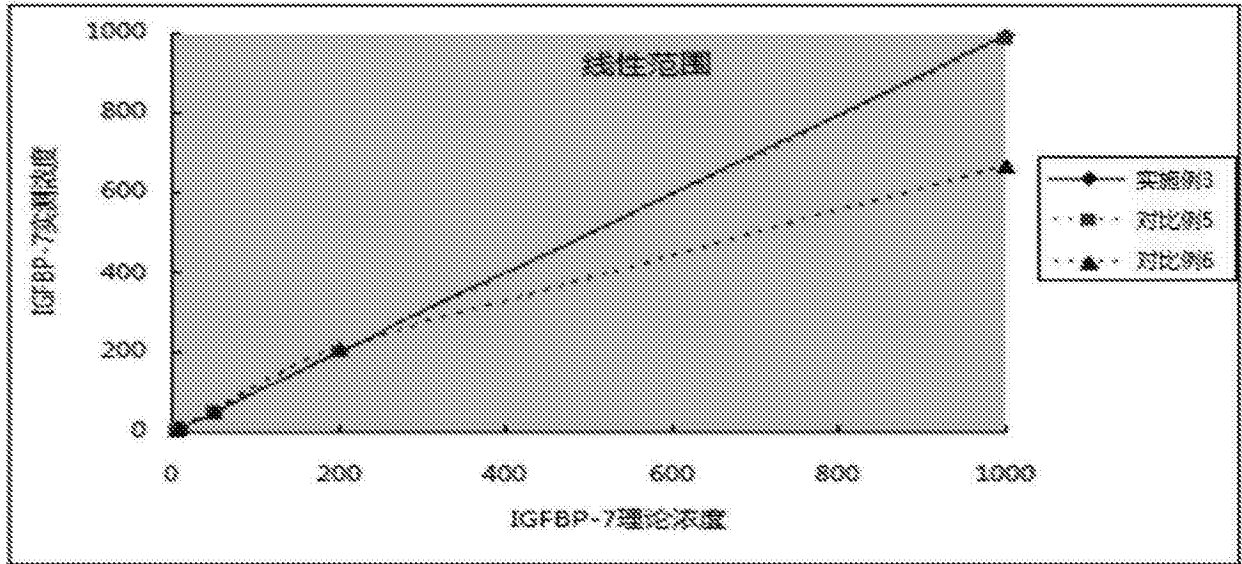


图7

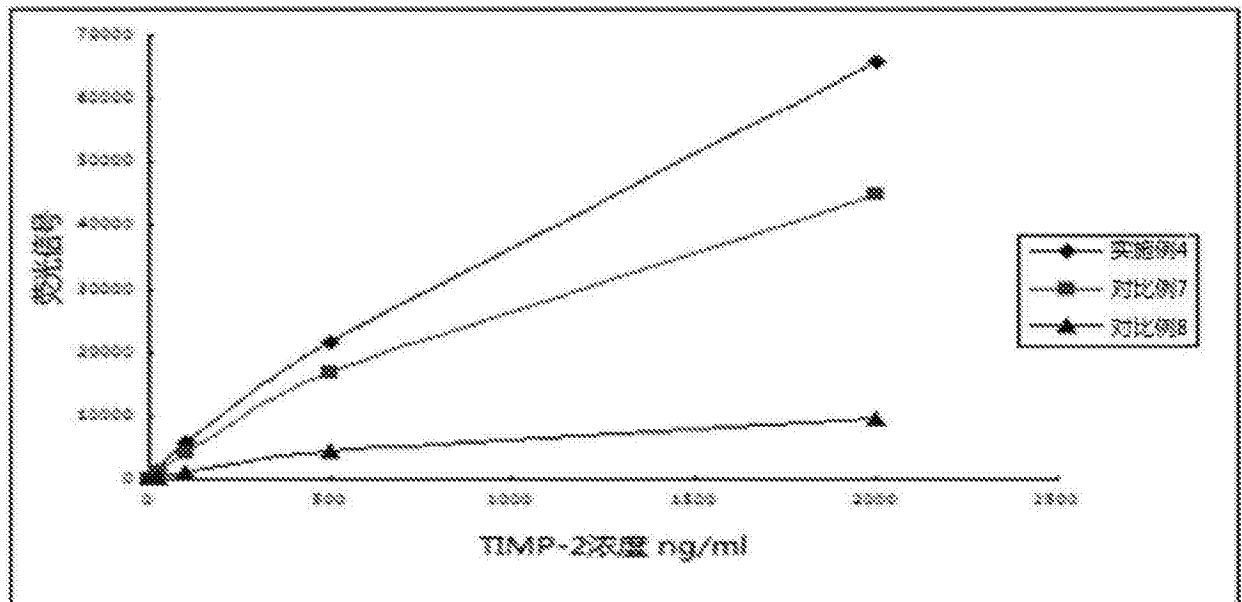


图8

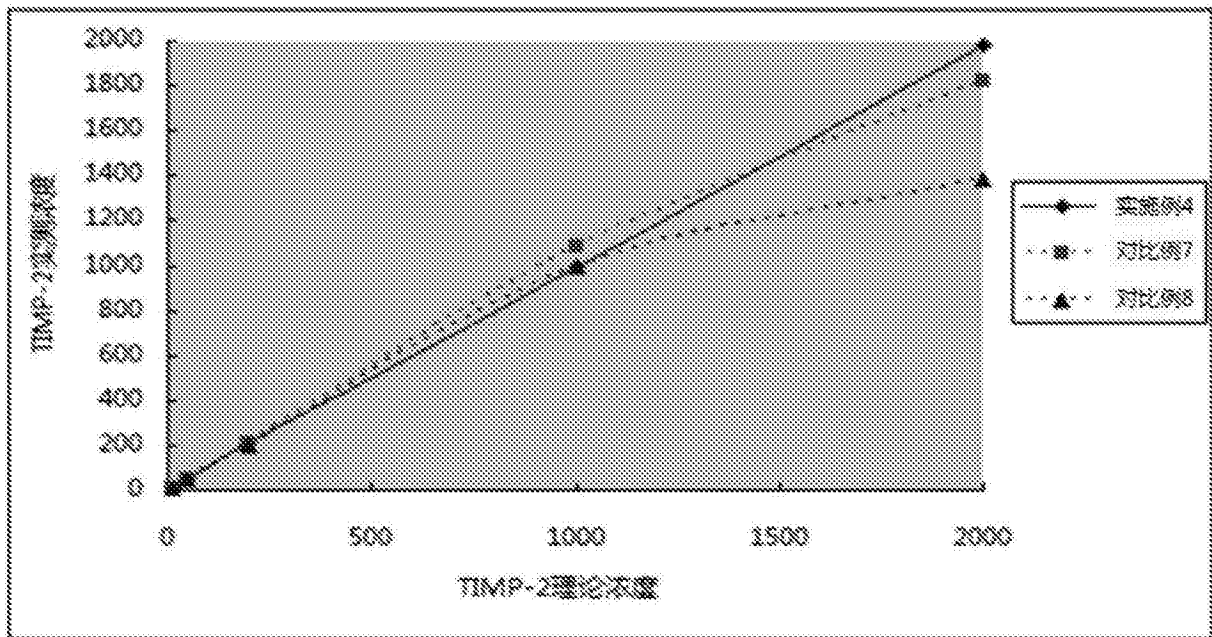


图9

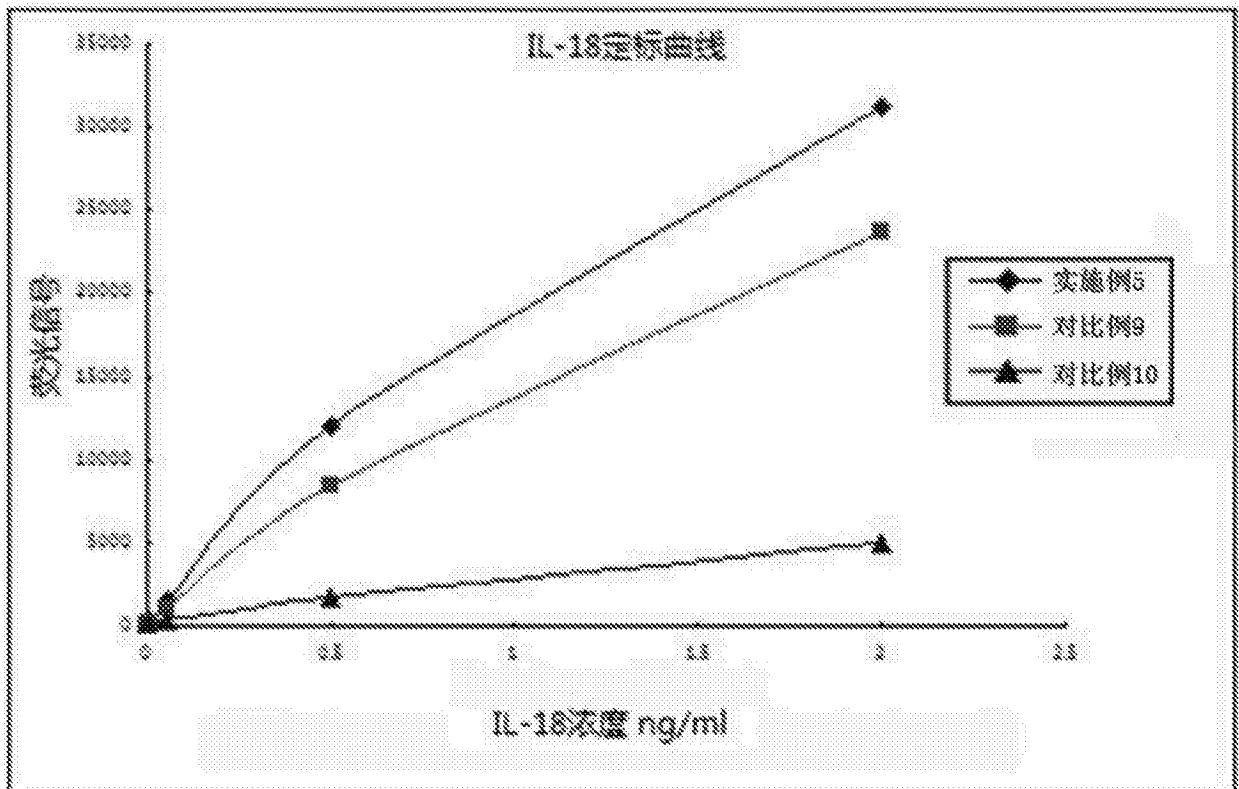


图10

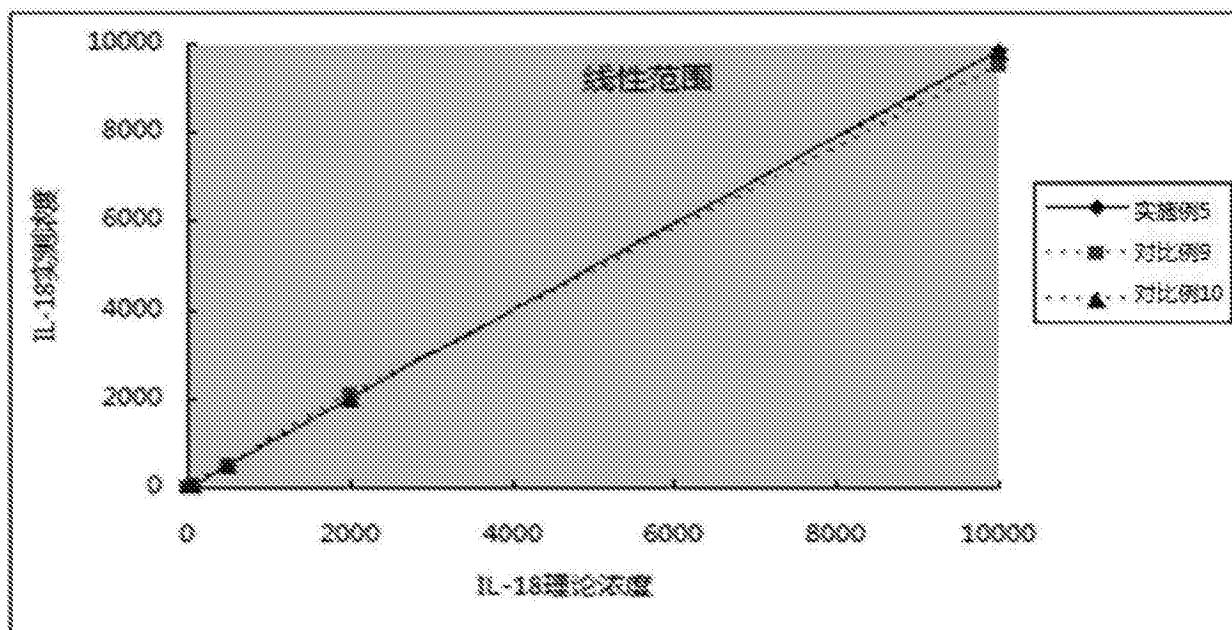


图11

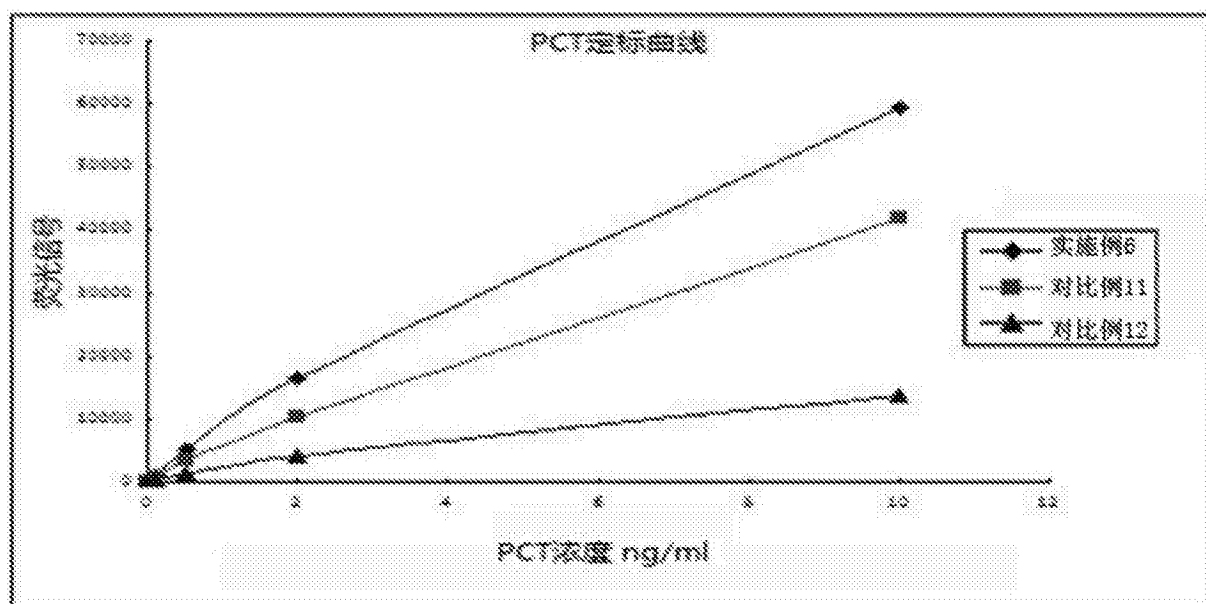


图12

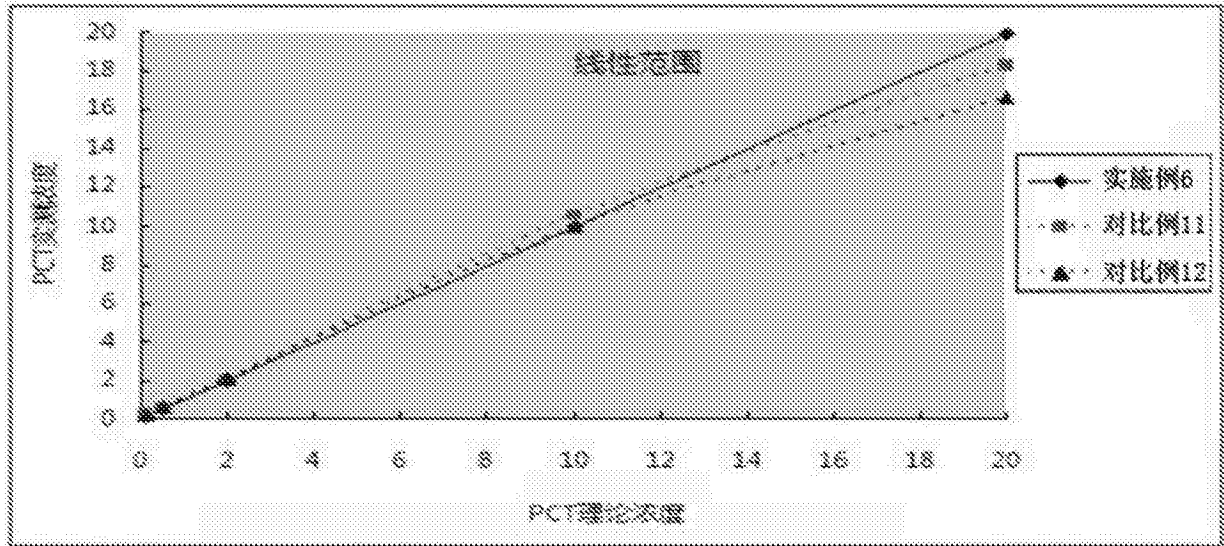


图13

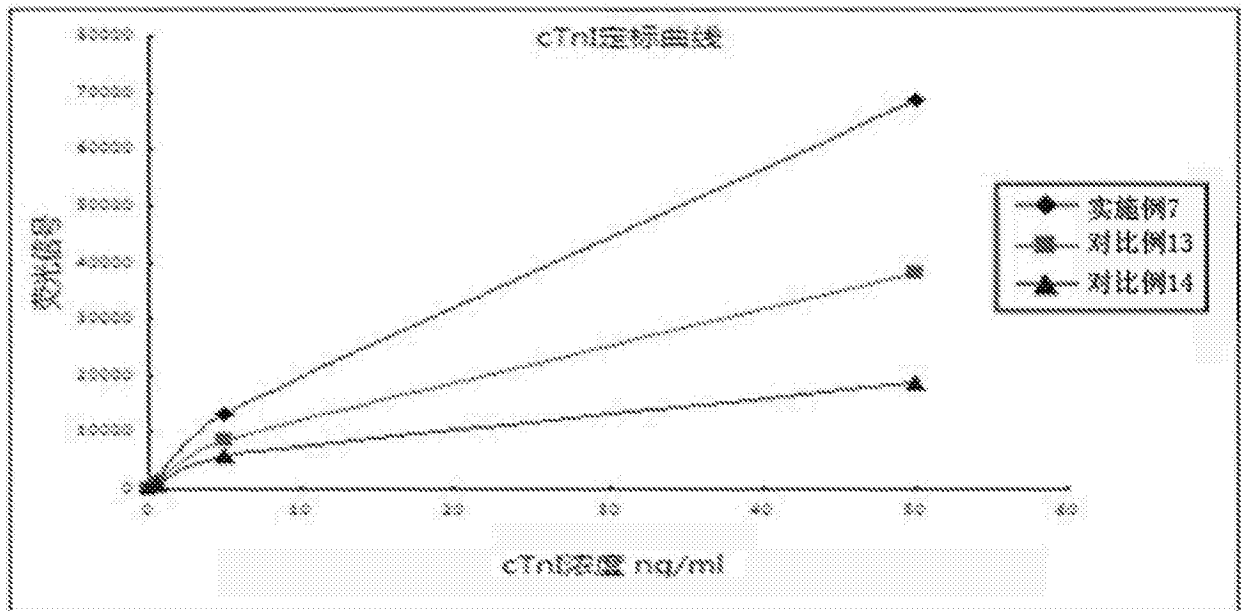


图14

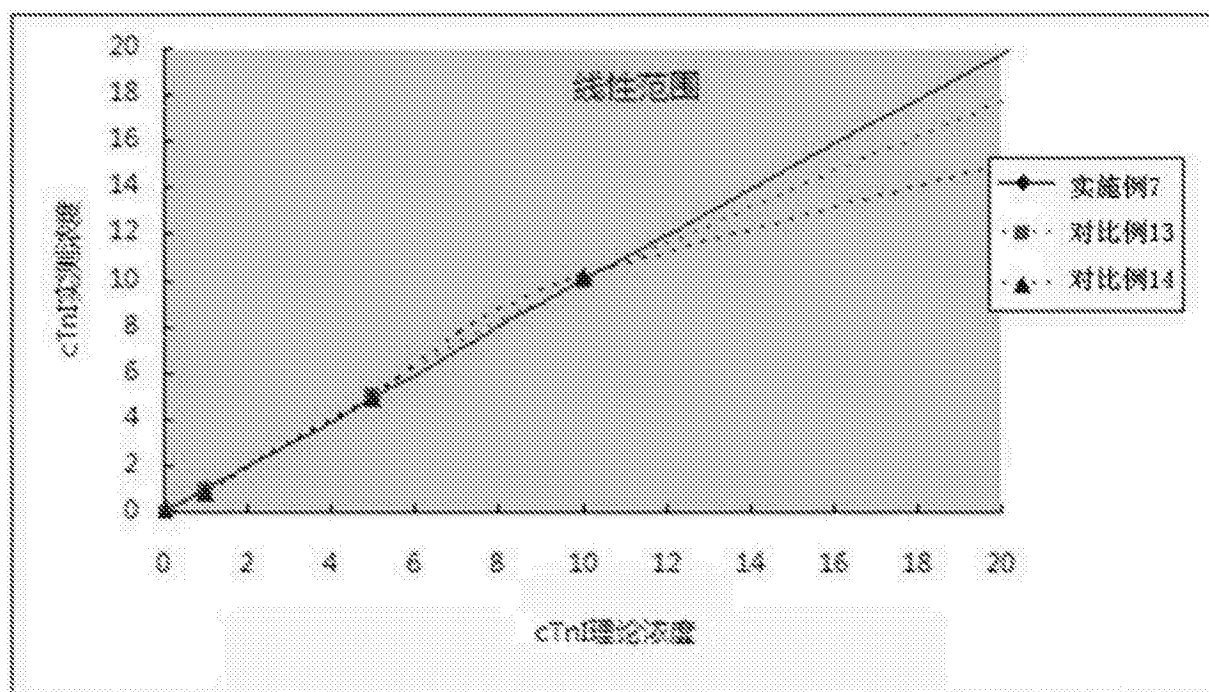


图15

专利名称(译)	一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其应用		
公开(公告)号	CN107271692A	公开(公告)日	2017-10-20
申请号	CN201710691668.9	申请日	2017-08-14
[标]发明人	王宇飞 李强		
发明人	王宇飞 李强		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	曹莉		
其他公开文献	CN107271692B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医药领域，具体而言涉及一种标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球及其制备方法与应用，特别是一种快速定量检测人尿样或血样中KIM-1、NGAL、IGFBP7、TIMP-2、IL-18、PCT、cTnI的即插荧光检测卡。本发明提供的标记特异性高亲和力重组抗体的荧光微球的方法，具体为先对荧光微球活化；然后将活化的荧光微球放入装有磷酸缓冲液的透析袋中得到透析后的荧光微球液；加入氨基聚乙二醇羧基，二次透析后的荧光微球液再进行进一步活化，并用重组抗体标记，反应后离心，清洗沉淀，再重悬沉淀。本发明提供的荧光微球，能够显著提高免疫荧光的反应下线，使得制得的检测卡比传统方法灵敏度提高10-100倍,检测范围也得到显著提升。

KIM-1 (ng/ml)	荧光信号		
	实施例 1	对比例 1	对比例 2
0	26	33	68
0.5	865	488	159
1	1399	719	229
5	7133	3586	1343
20	18719	11273	2847
100	45576	28663	5801