



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107328926 A

(43)申请公布日 2017. 11. 07

(21)申请号 201710511112.7

(22)申请日 2017.06.29

(71)申请人 海格德生物科技(深圳)有限公司

地址 518118 广东省深圳市坪山区金辉路
14号深圳市生物医药创新产业园区1
号楼604区域

(72)发明人 仇家舟 陈雪 王岳鹏 王朝阳
钟运华 王超 卢岳军

(74)专利代理机构 广东前海律师事务所 44323
代理人 张绍波 何凯威

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/559(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

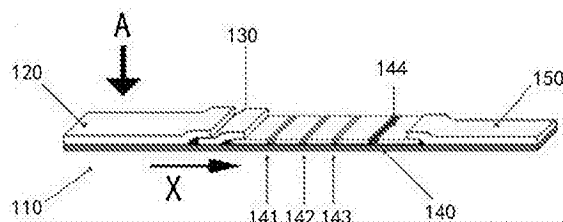
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

快速检测多项心衰标志物的试剂卡、制备方法
及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡、其制备方法和测试方法。所述试剂卡包括：长条状的测试卡底板；用于添加测试样品的样品垫，结合垫的至少一部分与所述样品垫重叠；层析反应区设置在所述结合垫与样品垫相离的一端；用于提供层析动力的吸水区，固定在所述测试卡底板的另一侧。所述层析反应区上，沿预定间隔依次设置有若干用于检测一项心衰标志物的检测线以及质控线；所述心衰标志物为NT-proBNP、galectin-3以及ST2。多项心衰标志物是在同一个试剂卡上进行，避免了时间和空间上的差异，具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济适用等优点。



1. 一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡,其特征在于,包括:
长条状的测试卡底板;
用于添加测试样品的样品垫,所述样品垫固定在所述测试卡底板一侧;
结合垫,所述结合垫的至少一部分与所述样品垫重叠;
层析反应区,所述层析反应区设置在所述结合垫与样品垫相离的一端;
用于提供层析动力的吸水区,所述吸水区设置在层析反应区的末端,固定在所述测试卡底板的另一侧;
所述层析反应区上,沿预定间隔依次设置有若干用于检测一项心衰标志物的检测线以及质控线;所述心衰标志物为NT-proBNP、galectin-3以及ST2。
2. 根据权利要求1所述的试剂卡,其特征在于,所述检测线设置为3条,分别包被有NT-proBNP、galectin-3以及ST2单克隆抗体,用于检测对应的心衰标志物。
3. 根据权利要求1所述的试剂卡,其特征在于,所述检测线设置为2条,分别包被有NT-proBNP以及galectin-3单克隆抗体,用于检测对应的心衰标志物。
4. 根据权利要求1所述的试剂卡,其特征在于,所述检测线设置为2条,分别包被有NT-proBNP以及ST2单克隆抗体,用于检测对应的心衰标志物。
5. 根据权利要求1-4任一所述的试剂卡,其特征在于,所述结合垫上喷涂有胶体金、荧光颗粒、胶乳微球、量子点、碳纳米颗粒、纳米金属粒子、磁性微球或者稀土离子中的一种。
6. 根据权利要求5所述的试剂卡,其特征在于,所述试剂卡使用胶体金法检测所述心衰标志物;所述结合垫包被有对应的胶体金标记的心衰标志物单克隆抗体。
7. 根据权利要求5所述的试剂卡,其特征在于,所述试剂卡使用免疫荧光法检测所述心衰标志物;所述结合垫包被有对应的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体。
8. 一种如权利要求1所述的试剂卡的制备方法,其特征在于,包括:
制备结合垫;
将硝酸纤维素膜和吸水滤纸粘贴在测试卡底板上;
在所述硝酸纤维素膜的一端叠合所述制备完成的金标结合垫;
令样本垫一端与所述测试卡底板的末端对齐,另一端叠合在所述金标结合垫上;
使用划膜仪在所述硝酸纤维素膜上划出若干用于检测心衰标志物的测试线以及质控线;所述心衰标志物为NT-proBNP、galectin-3和/或 ST2;
将所述测试卡底板通过斩切机切割为具有预定宽度的试剂卡。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述制备结合垫,具体包括:
制备胶体金;
使用所述胶体金,制备金标抗体;
在裁剪成预定尺寸的结合物垫上喷涂金标抗体;
干燥预定时间后,制成所述结合垫。
10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述制备结合垫具体包括:
通过荧光微球偶联工艺,制备荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体;
在裁剪成预定尺寸的结合物垫上喷涂所述荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体;
干燥预定时间后,制成所述结合垫。
11. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述使用划膜仪在所述硝酸纤维素膜上

划出若干用于检测心衰标志物的测试线以及质控线,具体包括:

选取稀释至0.1-1mg/mL NT-proBNP单克隆抗体、0.1-1mg/mL galectin-3单克隆抗体以及0.1-1mg/mL ST2单克隆抗体中的至少两种,在所述硝酸纤维素膜的对应位置上,划出所述测试线;

取稀释至0.1-1mg/mL 羊抗鼠IgG抗体,在所述硝酸纤维素膜的对应位置上,划出所述质控线。

12.一种应用如权利要求1所述的试剂卡的检测方法,其特征在于,包括:

将待检测样品加入到所述样品垫中;

层析反应预定的时间后,观察所述测试线以及质控线是否出现反应颜色;

在所述质控线没有出现反应颜色时,判断试剂卡失效;

在所述质控线出现反应颜色时,检测所述测试线的颜色深度;

根据所述颜色深度,通过定标曲线,计算待检测样品中所述心衰标志物的浓度;所述心衰标志物包括NT-proBNP、galectin-3以及ST2。

快速检测多项心衰标志物的试剂卡、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术领域,尤其涉及一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡、制备方法及检测方法。

背景技术

[0002] 心力衰竭(简称心衰)是临床上十分常见的病理表现,它是指在静脉血液回流正常情况下,由于心肌收缩力下降和(或)舒张功能障碍,使心排血量绝对或相对低于全身组织代谢的需要,导致血流动力学和神经-体液活动失常,临床上可出现动脉系统灌注不足、肺和(或)体循环静脉淤血的各种症状与体征。

[0003] 从血流动力学而言,由于心脏舒缩功能障碍,使心腔压力高于正常(左室舒张末期压或称左室充盈压 $>2.4\text{kPa}$;右室舒张末期压或称右室充盈压 $>1.3\text{kPa}$)即为心力衰竭,亦称心功能不全(cardiac insufficiency)。

[0004] 心衰是多种疾病的终末共同通路。因其居高不下的住院率及病死率,已然成为了全球急需解决的难题之一。我国心衰的发病率、患病率和死亡率都呈上升趋势,成年人心衰患病率为0.9%,其中男性为0.7%,女性为1.0%。目前,35-74岁成年人中约有400万心衰患者,由此造成了严重的社会和经济负担,已经成为公共卫生研究热点。

[0005] 尽管这些年来,心衰诊断和治疗已经取得突破性的进展,但其中仍存在许多问题亟需解决。以往临床上对心衰诊断往往基于病史、体格检查及心功能测定。然而临床上许多心衰患者症状和体征可能表现并不特异,根据上述诊断标准,很难做出快速准确诊断。即便 β 受体阻滞剂,ACEI及植入性器械(CRT或CRT-D)等应用在心衰治疗中取得巨大进展,心衰症状最终仍会不断加重,患者生存时间很短,一般来讲,慢性心衰患者5年内死亡率50%、10年内死亡率为90%。曾任美国心衰指南撰写委员会主席的Yancy CW指出,假如能在正确的时间,以正确的方式,对正确的心衰患者采取最佳的治疗,那么死亡风险就能非常显著地降低,降低幅度可能多达50%。因此在临床工作中迫切需要寻找一种简单而实用的生物标志物用于心衰的早期诊断、鉴别诊断、指导治疗及判断预后。

[0006] 以下详细介绍几种近来研究较为全面,特异性较好的新型生物标志物:

一、NT-proBNP全名氨基末端脑钠肽前体,有研究显示:心室功能障碍患者的NT-proBNP含量会升高,而且含量与心衰的严重程度直接相关(NYHA,纽约心脏协会分级)。NT-proBNP升高是患者疗效的独立标志物,比左心室射血分数(LVEF)和 VO_2 峰更有意义。在急性冠脉综合征患者中,检测NT-proBNP能预测心肌受损病人(有或没有ST段抬高)或不稳定性心绞痛病人的死亡危险性。

[0007] 有大量一手资料表明,NT-proBNP可用于指导心衰的治疗。大剂量的药物治疗心衰后,血清或血浆的NT-proBNP水平会下降,以NT-proBNP水平来指导药物治疗,不仅减少了心血管事件的总发生数,而且与临床知道治疗方案相比,延迟了首次发生心血管事件的时间。因此,依据NT-proBNP水平指导临床治疗,是一项有效的心衰治疗措施。2000年11月美国食品药品监督管理局批准美国Biosite公司的BNP检测应用于临床,美国心脏协会(AHA)

和欧洲心脏病学会(ESC)等全球心血管权威机构以及美国临床生化学院(NACP)在制订的“心衰诊断和治疗指南”及“心脏标志物的应用指南”中,把BNP/NT-proBNP列为不可缺少的心脏标志物,以指导心衰的治疗。NT-proBNP能客观反映充血性心力衰竭(CHF)及严重程度,其血浆水平随心衰程度增加而增高,能更好地辅助诊断心衰分级。

[0008] 二、半乳糖凝集素(galectin-3)是一类糖粘合蛋白家族,具有多种生物学行为。这些蛋白包含至少一个保守的糖识别域(CRD),其具有大约130个氨基酸。galectin-3在galectins家族中具有独特的结构,也就是galectins中唯一的嵌合体型,并且具有如下三个独特的结构域:①一个短的N.末端结构域包含一个丝氨酸磷酸化位点;②一个包含氨基乙酸,酪氨酸,脯氨酸的重复序列;③一个包含了一个糖识别域(CRD)的C-末端结构,C端作用有:碳水化合物识别即凝集素作用、抗凋亡作用、核转运——内有核定位信号。2012年5月14日,美国马萨诸塞州的BG医学公司公布了心衰患者中瑞舒伐他汀多中心对照研究(CORONA)亚组分析的结果,并发表在本期欧洲心脏病学杂志(European Heart Journal)网络版上。研究表明,galectin-3基线水平低于19.0 ng/mL的心衰患者能够从瑞舒伐他汀治疗中得到显著的临床获益。相比之下, galectin-3较高的心衰患者没有显著的临床获益。CORONA研究galectin-3亚组的研究目的是评估galectin-3的基线水平是否能作为一项临床指标,区分出有可能从瑞舒伐他汀治疗中得到临床获益的心衰患者。该项亚组研究共纳入1,462名研究对象(约占CORONA全部研究对象的三分之一)。结果表明,与安慰剂组相比,瑞舒伐他汀治疗组中galectin-3基线水平低于19.0 ng/mL心衰患者的主要不良心血管事件减少了35%,而galectin-3高于19.0 ng/mL的心衰患者没有显著的临床获益($P = 0.036$)。研究的主要终点是包括心血管死亡、非致命性心肌梗死、非致命性中风在内的复合终点。挪威奥斯陆Rikshospitalet大学医院心内科教授Gullestad博士主持了该项研究,并指出:“心力衰竭是人类的主要死因之一。随着认识的逐渐加深,研究发现很多心衰患者中galectin-3是促进心肌纤维化、引起不良临床预后的因素之一。”Galectin-3可以独立预测全因死亡、心血管死亡及进展性心衰死亡,可以为住院心衰患者的风险判定模型提供额外的预测价值,但对猝死或住院死亡的风险判别能力不强。

[0009] 三、ST2是白细胞介素1(IL-1)受体家族成员,有可溶性ST2、跨膜型ST2等多种形式,跨膜型ST2与其配体IL-33结合对心肌有保护作用,而可溶性ST2可竞争抑制这一作用。针对ST2的作用机制和临床作用做了大量研究,发现ST2与急性心力衰竭和急性心肌梗死有密切的关系。

[0010] 血清ST2浓度对心力衰竭及急性心肌梗死的预后预测有重要价值,对临床诊断、治疗及预后判断有重要指导意义。在PRIDE研究中发现由于急性心力衰竭所致呼吸困难的患者比因其他原因所致呼吸困难患者血中的s ST2的浓度更高,左室收缩功能受损患者比无收缩功能障碍的患者ST2的中位数水平更高,通过感受性曲线分析,对于急性心力衰竭的诊断ST2最佳的浓度分界线为0.2ng/mL。同时,ST2是一个独立于BNP和NT-proBNP的心力衰竭强有力的预后指标。该研究发现1年后死亡患者较生存患者血中a ST2 的水平更高,a ST2与心力衰竭患者1年后的死亡风险成剂量依赖关系,并能和传统的生物标志物如NT-proBNP及galectin-3联合使用有助于心力衰竭患者的危险分层。2013年美国心衰指南提出,可溶性ST2不但可以预测心衰患者的再住院及死亡,还可以为利钠肽类增加额外的预测价值。《中国心力衰竭诊断和治疗指南2014》指出,基线ST2可作为中国住院心衰患者独立的风险

预测因子。

[0011] 根据以上的描述可以看出,上述三种标志物在心衰预测上均具有自己的优势和不足。其中,Galectin-3可以独立预测全因死亡、心血管死亡及进展性心衰死亡,可以为住院心衰患者的风险判定模型提供额外的预测价值,但对猝死或住院死亡的风险判别能力不强。

[0012] 而NT-proBNP能客观反映充血性心力衰竭(CHF)及严重程度,其血浆水平随心衰程度增加而增高,能更好地辅助诊断心衰分级。ST2可作为中国住院心衰患者独立的风险预测因子。不但可以预测心衰患者的再住院及死亡,并能和传统的生物标志物如NT-proBNP及galectin-3联合使用有助于心力衰竭患者的危险分层。

[0013] 如果在检测过程中,联合使用NT-proBNP、galectin-3及ST2这样的多种标记物,诊断效果更佳,更有助于心衰患者的危险分层。但是,现有的检测方法或者检测产品只是针对单一指标进行控制,只能检测或预警心衰的某个阶段,不能全面地、特异地预警心衰的发生、发展及用药全程。

[0014] 另外,现有的心衰诊断产品均以不同的产品形式在临床上应用,制作原理及操作程序不同,兼容性较差,很难在很短的时间内同时快速地检测出多项结果,故极大的影响了心衰患者心衰风险的合理综合评定。

[0015] 因此,现有技术还有待发展。

发明内容

[0016] 鉴于上述现有技术的不足之处,本发明的目的在于提供一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡,旨在解决现有技术的心衰检测产品检测的标志物单一,无法全面的反映心衰的病理进程,影响治疗效果的问题。

[0017] 为了达到上述目的,本发明采取了以下技术方案:

一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡,其中,包括:

长条状的测试卡底板;

用于添加测试样品的样品垫,所述样品垫固定在所述测试卡底板一侧;

结合垫,所述结合垫的至少一部分与所述样品垫重叠;

层析反应区,所述层析反应区设置在所述结合垫与样品垫相离的一端;

用于提供层析动力的吸水区,所述吸水区设置在层析反应区的末端,固定在所述测试卡底板的另一侧;

所述层析反应区上,沿预定间隔依次设置有若干用于检测一项心衰标志物的检测线以及质控线;所述心衰标志物为NT-proBNP、galectin-3以及ST2。

[0018] 可选地,所述检测线设置为3条,分别包被有NT-proBNP、galectin-3以及ST2单克隆抗体,用于检测对应的心衰标志物。

[0019] 可选地,所述检测线设置为2条,分别包被有NT-proBNP以及galectin-3单克隆抗体,用于检测对应的心衰标志物。

[0020] 可选地,所述检测线设置为2条,分别包被有NT-proBNP以及ST2单克隆抗体,用于检测对应的心衰标志物。

[0021] 可选地,所述结合垫上喷涂有胶体金、荧光颗粒、胶乳微球、量子点、碳纳米颗粒、

纳米金属粒子、磁性微球或者稀土离子中的其中一种。

[0022] 可选地,所述试剂卡使用胶体金法检测所述心衰标志物;所述结合垫包被有对应的胶体金标记的心衰标志物单克隆抗体。

[0023] 可选地,所述试剂卡使用免疫荧光法检测所述心衰标志物;所述结合垫包被有对应的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体。

[0024] 本发明实施例还进一步提供了一种快速检测心衰标志物的试剂卡的制备方法,其中,包括:

制备结合垫;

将硝酸纤维素膜和吸水滤纸粘贴在测试卡底板上;

在所述硝酸纤维素膜的一端叠合所述制备完成的金标结合垫;

令样本垫一端与所述测试卡底板的末端对齐,另一端叠合在所述金标结合垫上;

使用划膜仪在所述硝酸纤维素膜上划出若干用于检测心衰标志物的测试线以及质控线;所述心衰标志物为NT-proBNP、galectin-3和/或 ST2;

将所述测试卡底板通过斩切机切割为具有预定宽度的试剂卡。

[0025] 可选地,所述制备结合垫,具体包括:制备胶体金;使用所述胶体金,制备金标抗体;在裁剪成预定尺寸的结合物垫上喷涂金标抗体;干燥预定时间后,制成所述结合垫。

[0026] 可选地,所述制备结合垫具体包括:通过荧光微球偶联工艺,制备荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体;在裁剪成预定尺寸的结合物垫上喷涂所述荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体;干燥预定时间后,制成所述结合垫。

[0027] 可选地,所述使用划膜仪在所述硝酸纤维素膜上划出若干用于检测心衰标志物的测试线以及质控线,具体包括:

选取稀释至0.1-1mg/mL NT-proBNP单克隆抗体、0.1-1mg/mL galectin-3单克隆抗体以及0.1-1mg/mL ST2单克隆抗体中的至少两种,在所述硝酸纤维素膜的对应位置上,划出所述测试线;

取稀释至0.1-1mg/mL 羊抗鼠IgG抗体,在所述硝酸纤维素膜的对应位置上,划出所述质控线。

[0028] 一种应用如上所述的快速检测多项心衰标志物的试剂卡的心衰标志物检测方法,其特征在于,包括:

将待检测样品加入到所述样品垫中;

层析反应预定的时间后,观察所述测试线以及质控线是否出现反应颜色;

在所述质控线没有出现反应颜色时,判断试剂卡失效;

在所述质控线出现反应颜色时,检测所述测试线的颜色深度;

根据所述颜色深度,通过定标曲线,计算待检测样品中所述心衰标志物的浓度;所述心衰标志物包括NT-proBNP、galectin-3以及ST2。

[0029] 有益效果:本发明提供的快速检测多项心衰标志物的试剂卡、其制备方法及检测方法,基于免疫层析的方法,通过多条测试线,实现了对样品中的多项标志物同时进行检测。通过对心衰三项标志物的检测,可以实现对于心衰的全面追踪,并对风险作出相应的判断,填补了现有临床诊断的不足。

[0030] 另外,由于多项心衰标志物是在同一个试剂卡上进行,避免了时间和空间上的差

异,具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济适用等优点。

附图说明

[0031] 图1为本发明具体实施例的试剂卡的结构示意图;

图2为本发明另一实施例的试剂卡的结构示意图;

图3为本发明具体实施例的试剂卡的制备方法的方法流程图;

图4为本发明另一实施例的试剂卡的检测层析原理的示意图;

图5为本发明具体实施例的试剂卡的心衰标志物检测方法的方法流程图。

具体实施方式

[0032] 本发明提供一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡、其制备方法及检测方法。为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下参照附图并举实施例对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0033] 如图1所示,为本发明具体实施例的提供的快速检测多项心衰标志物的试剂卡。在本实施例中,该试剂卡使用三条测试线,以同时检测三项心衰标志物。如图1所示,所述试剂卡包括:长条状的测试卡底板110,用于添加测试样品的样品垫120,结合垫130、层析反应区140、用于提供层析动力的吸水区150、沿预定间隔依次设置在所述层析反应区上的第一检测线141、第二检测线142、第三检测线143以及质控线144。其中,所述样品垫120固定在所述测试卡底板一侧。所述结合垫130的至少一部分与所述样品垫120重叠。所述层析反应区140设置在所述结合垫与样品垫相离的一端。所述吸水区150设置在层析反应区的末端,固定在所述测试卡底板的另一侧。所述第一检测线141用于检测NT-proBNP,所述第二检测线142用于检测galectin-3,所述第三检测线143用于检测ST2。

[0034] 在一些实施例中,所述层析反应区可以为固定在所述测试卡底板上的硝酸纤维素膜,所述吸水区为吸水滤纸。所述测试卡底板可以选用PVC底板,作为整个测试卡的主体承载结构。如图1所示,所述样品垫与测试卡底板的一端对齐,另一端搭在所述结合垫上,所述结合垫的另一端则搭在所述硝酸纤维素膜上。吸水滤纸的一端与所述测试卡底板的末端对齐,另一端则部分搭在所述硝酸纤维素膜上,提供层析动力。

[0035] 在本发明实施例中,该试剂卡基于免疫层析技术,通过第一、第二以及第三检测线分别进行NT-proBNP,galectin-3以及ST2的检测。该检测是同步进行的,避免了时间和空间上的差异,具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济适用等优点。应当说明的是,所述第一检测线、第二检测线以及第三检测线可以用于检测其中的任意一种心衰标志物,不同的心衰标志物并无检测顺序的要求,可任意调换。

[0036] 具体的,所述试剂卡可以使用基于胶体金标的抗原抗体免疫反应来完成上述标志物的检测。亦即,所述结合垫可以包被有金标NT-proBNP、galectin-3以及ST2单克隆抗体。所述第一检测线则相应的包被有NT-proBNP单克隆抗体;所述第二检测线包被有galectin-3单克隆抗体;所述第三检测线包被有ST2单克隆抗体。在本实施例中,所述预定间隔可以设置为10-20mm以满足免疫层析的需求。所述质控线包被有羊抗鼠抗IgG抗体,作为判断标记,确定试剂卡是否失效。

[0037] 上述试剂卡的层析原理具体如下：

当含有NT-proBNP、galectin-3及ST2的样本A(例如病人的血液样本)加入到加样垫后，样本会向吸水纸端移动(如图1所示的X方向)。首先样本经过所述结合垫，与其中的金标抗体特异结合。

[0038] 在通过结合垫以后，样本继续向吸水纸端移动。当样本移动到第一测试线时，样本中的NT-proBNP(已经在结合垫上与对应的金标抗体结合)能够以双夹心的方式与第一测试线中的包被抗体特异结合，从而停留在第一检测线的位置，形成一条紫红色的胶体金条带。

[0039] 未与NT-proBNP结合的样本继续向上层析，移动到第二测试线时，样本中的galectin-3(已经在结合垫上与对应的金标抗体结合)能够以双夹心的方式与第二测试线中的包被抗体特异结合，从而停留在第二检测线的位置，形成一条紫红色的胶体金条带。

[0040] 样本可以继续向上层析，当移动到第三测试线时，样本中的ST2(已经在结合垫上与对应的金标抗体结合)能够以双夹心的方式与第三测试线中的包被抗体特异结合，从而停留在第三检测线的位置，形成一条紫红色的胶体金条带。

[0041] 最后，未与NT-proBNP、galectin-3及ST2结合的金标记抗体继续向上层析，移动到质控线时，能够与C线中的包被抗体特异结合，从而留在C线位置，形成一条紫红色的胶体金条带。

[0042] 这样的，第一测试线、第二测试线以及第三测试线上形成的颜色深度可以分别用于计算NT-proBNP、galectin-3以及ST2的浓度。质控线可以作为判断标准，若质控线没有出现颜色表明试剂卡失效。

[0043] 在另一些实施例中，还可以仅选择检测其中的两个心衰标志物。亦即只选择使用两条测试线。图2为本发明另一实施例提供的，用于同时检测心衰标志物NT-proBNP、galectin-3的试剂卡。如图2所示，所述试剂卡包括：长条状的测试卡底板110，用于添加测试样品的样品垫120，结合垫130、层析反应区140、用于提供层析动力的吸水区150、沿预定间隔依次设置在所述层析反应区上的第一检测线141、第二检测线142以及质控线144。所述试剂卡具体的层析原理、测试线的设置等操作均与上述方法实施例中的描述相同，为陈述简便，不再赘述。

[0044] 在另一些实施例中，所述试剂卡还可以进一步的选择检测NT-proBNP、ST2，并提供相应的检测结果。只要相对应的将如图2所示的试剂卡中的第一检测线、第二检测线分别用于NT-proBNP和ST2的检测即可。

[0045] 图3为本发明实施例提供的，用于制备图1或图2所示的试剂卡的制备方法。如图3所示，该方法可以包括如下步骤：

201、制备金标结合垫。

[0046] 202、将硝酸纤维素膜和吸水滤纸粘贴在测试卡底板上。所述测试卡底板可以选用常规使用的PCV底板。

[0047] 203、在所述硝酸纤维素膜的一端叠合所述制备完成的金标结合垫，令样本垫一端与所述测试卡底板的末端对齐，另一端叠合在所述金标结合垫上。

[0048] 204、使用划膜仪在所述硝酸纤维素膜上划出若干测试线以及质控线。其中，所述检测线可分别用于检测NT-proBNP，galectin-3以及ST2。

[0049] 205、将所述测试卡底板通过斩切机切割为具有预定宽度的试剂卡。所述预定宽度

具体可以根据实际情况所确定,在一些实施例中,可以设置为2-8mm宽。

[0050] 具体的,所述制备金标结合垫的方法具体可以包括:制备胶体金、制备金标抗体以及金标结合垫三个步骤。

[0051] 以下制备100ml胶体金溶液为例阐述所述胶体金的制备过程。但本领域技术人员可以根据实际情况,按比例调整各组分的量,制备更多或者更少的胶体金溶液。

[0052] 首先,量取120ml纯化水装入锥形瓶中,调高加热温度至340℃,300rpm搅拌加热至沸腾。然后,加入2ml 1%氯金酸,继续加热2分钟后,快速加入2ml 2%柠檬酸钠并继续加热5分钟。当液体颜色稳定为酒红色,室温冷却获得胶体金溶液。

[0053] 对于金标抗体的制备(以制备10ml金标抗体为例):量取10ml胶体金溶液,加入0.2M K_2CO_3 溶液,至溶液pH 8.2 ± 0.05 。然后,放置在摇床上(设定速度为80rpm)混匀5min。

[0054] 混匀后加入HbA1c、Hb标记抗体各50 μ g,放置在摇床上(设定速度为80rpm)标记30min。加入100 μ l 10%BSA溶液,放置在摇床上(设定速度为80rpm)封闭10min。最后,以15000rpm,4℃离心30min,弃上清。沉淀用600 μ l金标重悬液重悬,2-8℃保存备用。

[0055] 可以使用制备完成后的金标抗体,通过喷涂的方式,制成最终需要使用的结合垫。其具体的制备过程为:

首先,选取裁切好的金标垫和金标抗体,并按照《三维平面划膜仪标准操作规程》的要求清洗仪器,将仪器调节至“喷金”模式。

[0056] 然后,将制备好的金标抗体加入2号泵中,设置喷量2 μ l/cm,进行喷金操作。喷金结束后,将金标垫置于干燥箱($37 \pm 1^\circ C$,湿度10%-30%)中,干燥12-18小时。干燥过程2小时监测1次,确保干燥期间温湿度符合要求在采集成预定尺寸的金标垫上喷涂金标抗体。经过预定的干燥时间后,制成所述结合垫,可以用于所述试剂卡。

[0057] 在另一些实施例中,所述第一测试线、第二测试线、第三测试线以及质控线可以使用划膜仪在所述硝酸纤维素膜上划出。

[0058] 其中,划膜仪的具体操作方法包括:取稀释至0.1-1mg/mL NT-proBNP单克隆抗体、0.1-1mg/mL galectin-3单克隆抗体、0.1-1mg/mL ST2单克隆抗体、0.1-1mg/mL 羊抗鼠IgG抗体,分别在所述硝酸纤维素膜的对应位置上,划出所述第一测试线、第二测试线、第三测试线以及质控线。并且,控制所述划膜仪的划膜浓度为0.5-3 μ L/cm,平台移动速度为20-80mm/s,在所述硝酸纤维素膜上划出对应的检测线。

[0059] 在上述方法实施例中,揭露了可以使用胶体金标的免疫层析方法。本领域技术人员可以理解的是,通过制备不同类型的结合物垫,所述试剂卡在进行相应的调整后,还可以进一步的采用其他合适的标记方法而不限于胶体金标的方法进行所述心衰标志物的检测。例如,可以使用免疫荧光法或乳胶层析法来进行检测。

[0060] 图4为本发明实施例提供的,使用免疫荧光法的试剂卡的层析检测原理。如图4所示,其包括:

401、当含有NT-proBNP、galectin-3及ST2的样本A(例如病人的血液样本)加入到加样垫后,样本会向吸水纸端移动。首先样本经过所述结合垫,与其中的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体特异结合。

[0061] 402、在通过结合垫以后,样本继续向吸水纸端移动。当样本移动到第一测试线时,样本中的NT-proBNP(已经在结合垫上与对应的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体结

合)能够以双夹心的方式与第一测试线中的包被抗体特异结合,形成复合物从而停留在第一检测线的位置。

[0062] 403、未与NT-proBNP结合的样本继续向上层析,移动到第二测试线时,样本中的galectin-3(已经在结合垫上与对应的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体结合)能够以双夹心的方式与第二测试线中的包被抗体特异结合,从而停留在第二检测线的位置。

[0063] 404、样本可以继续向上层析,当移动到第三测试线时,样本中的ST2(已经在结合垫上与对应的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体结合)能够以双夹心的方式与第三测试线中的包被抗体特异结合,从而停留在第三检测线的位置。

[0064] 405、未与NT-proBNP、galectin-3及ST2结合的荧光微球标记抗体继续向上层析,移动到质控线时,能够与C线中的包被抗体特异结合,从而留在C线位置。

[0065] 406、在激发光源的作用下,荧光微球会发射特定波长的影响信号。由此,可以根据第一测试线、第二测试线以及第三测试线处荧光信号的强度,分别用于计算NT-proBNP, galectin-3以及ST2的浓度。而质控线可以作为判断标准,若质控线没有出现足够的荧光强度表明试剂卡失效。

[0066] 在本实施例中需要使用到的荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体具体可以通过常用的荧光微球偶联工艺制备获得,在此不作赘述。

[0067] 在制备荧光微球标记的心衰标志物单克隆抗体完成后,可以取取裁切好的结合物垫和荧光微球标记抗体,按照《三维平面划膜仪标准操作规程》的要求清洗仪器,将仪器调节至“喷金”模式,将制备好的抗体吸入2号泵中,设置喷量 $4\mu\text{l}/\text{cm}$,进行喷垫操作。并且,在喷垫操作结束后,将结合物垫置于干燥箱($37\pm 1^{\circ}\text{C}$,湿度10%-30%)中,干燥8~12小时。

[0068] 图5为本发明实施例提供的应用如上所述的试剂卡的多项心衰标志物检测方法。该测试方法可以同时检测三项心衰标志物,可以更好的实现对于心衰的全面追踪,并能够对风险作出相应的判断,填补了现有临床诊断的不足。

[0069] 如图5所示,所述方法可以包括如下步骤:

501、将待检测样品加入到所述样品垫中。所述样品垫上还可以设置供加样的加样孔,便于滴加样品。所述待检测样品可以是病人的血清等。

[0070] 502、层析反应预定的时间后,观察所述第一测试线、第二测试线、第三测试线以及质控线是否出现反应颜色。

[0071] 503、在所述质控线没有出现反应颜色时,判断试剂卡失效。

[0072] 504、在所述质控线出现反应颜色时,检测所述第一测试线、第二测试线和第三测试线的颜色深度。

[0073] 505、根据所述颜色深度,通过定标曲线,计算待检测样品中NT-proBNP、galectin-3以及ST2的浓度。所述定标曲线可以通过预先的进行的实验数据计算获得,为本领域常用的技术手段,在此不作赘述。

[0074] 相对应地,根据图5所示的实施例提供的心衰标志物检测方法。基于相同的检测原理以及思想,也可以应用到图2所示的包括了两条测试线的试剂卡中。亦即,在步骤502中,观察所述第一测试线、第二测试线以及质控线是否出现反应颜色,并且在步骤504中,在所述质控线出现反应颜色时,检测所述第一测试线和第二测试线的颜色深度。最后,在步骤505中,根据所述颜色深度,通过定标曲线,计算待检测样品中NT-proBNP和galectin-3或者

galectin-3和ST2的浓度。

[0075] 综上所述,本发明实施例提供的试剂卡,可以实现多项心衰标志物的快速联检,检测效果和临床指导作用远优于单独检测各个心衰标志物的技术方案。

[0076] 可以理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据本发明的技术方案及本发明构思加以等同替换或改变,而所有这些改变或替换都应属于本发明所附的权利要求的保护范围。

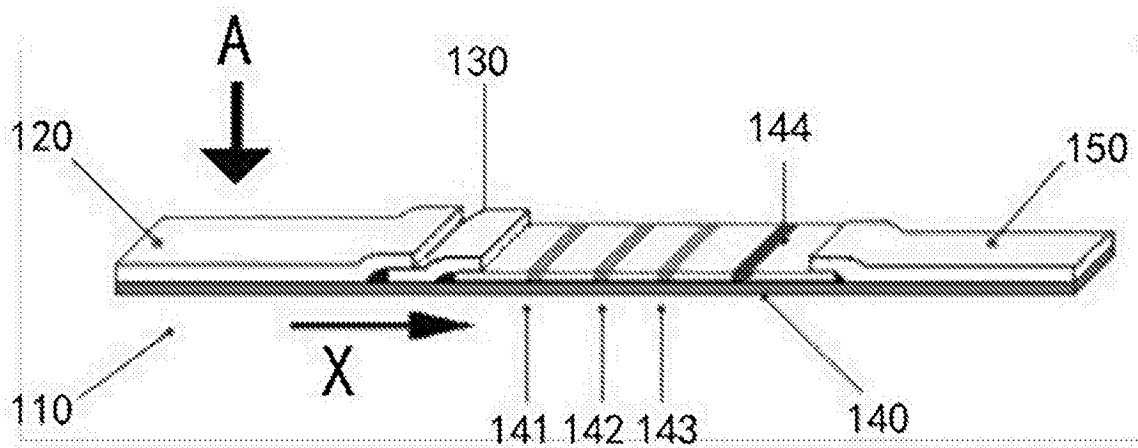


图1

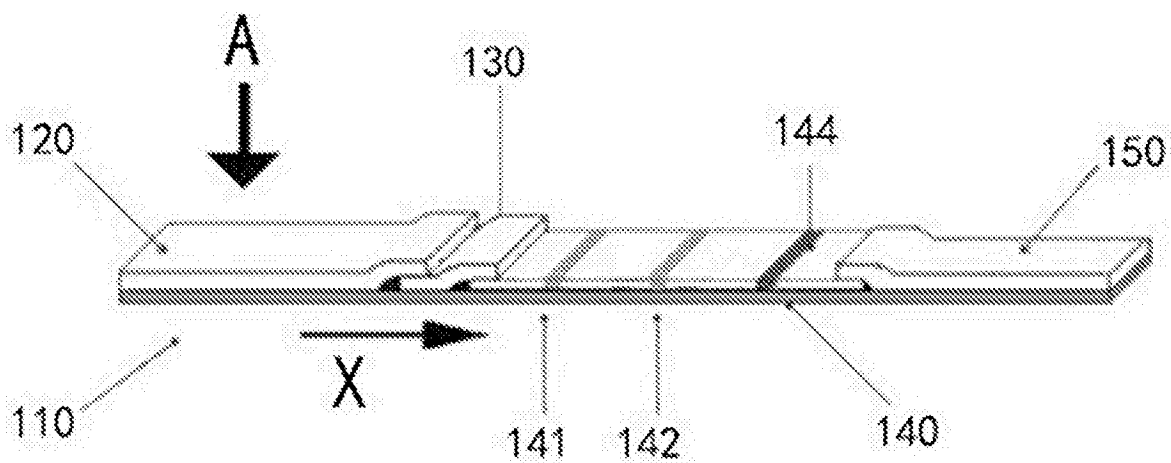


图2

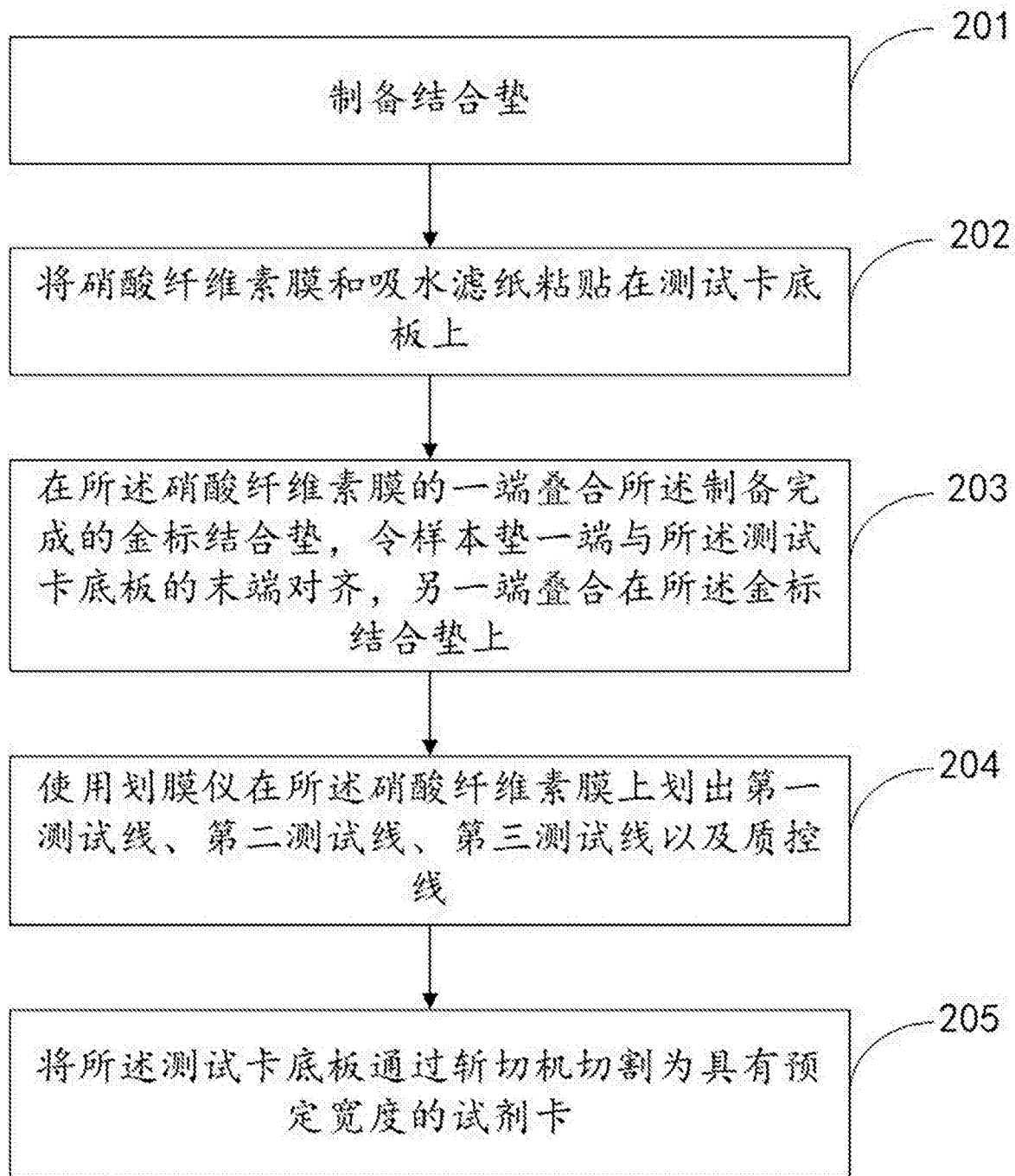


图3

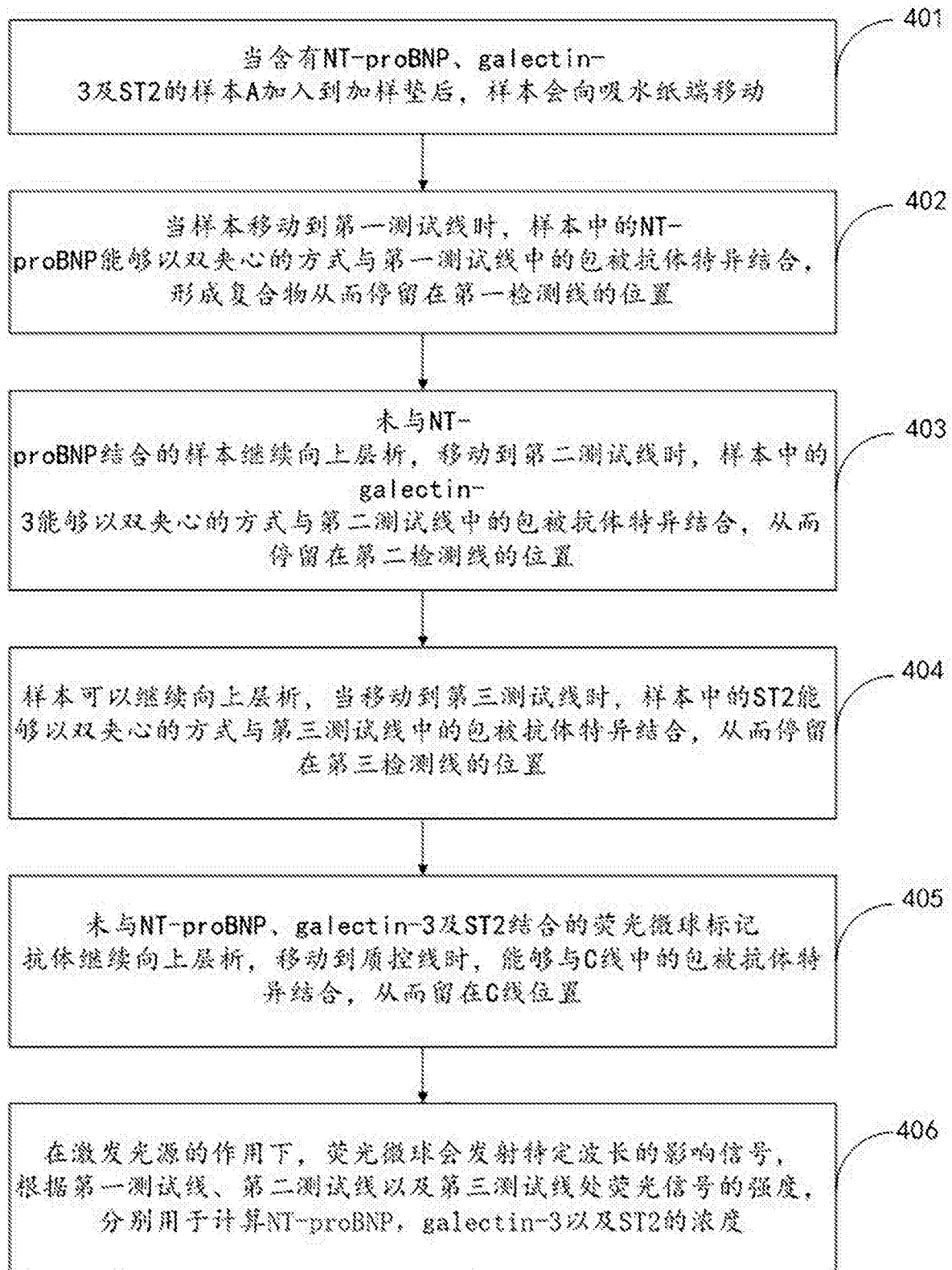


图4

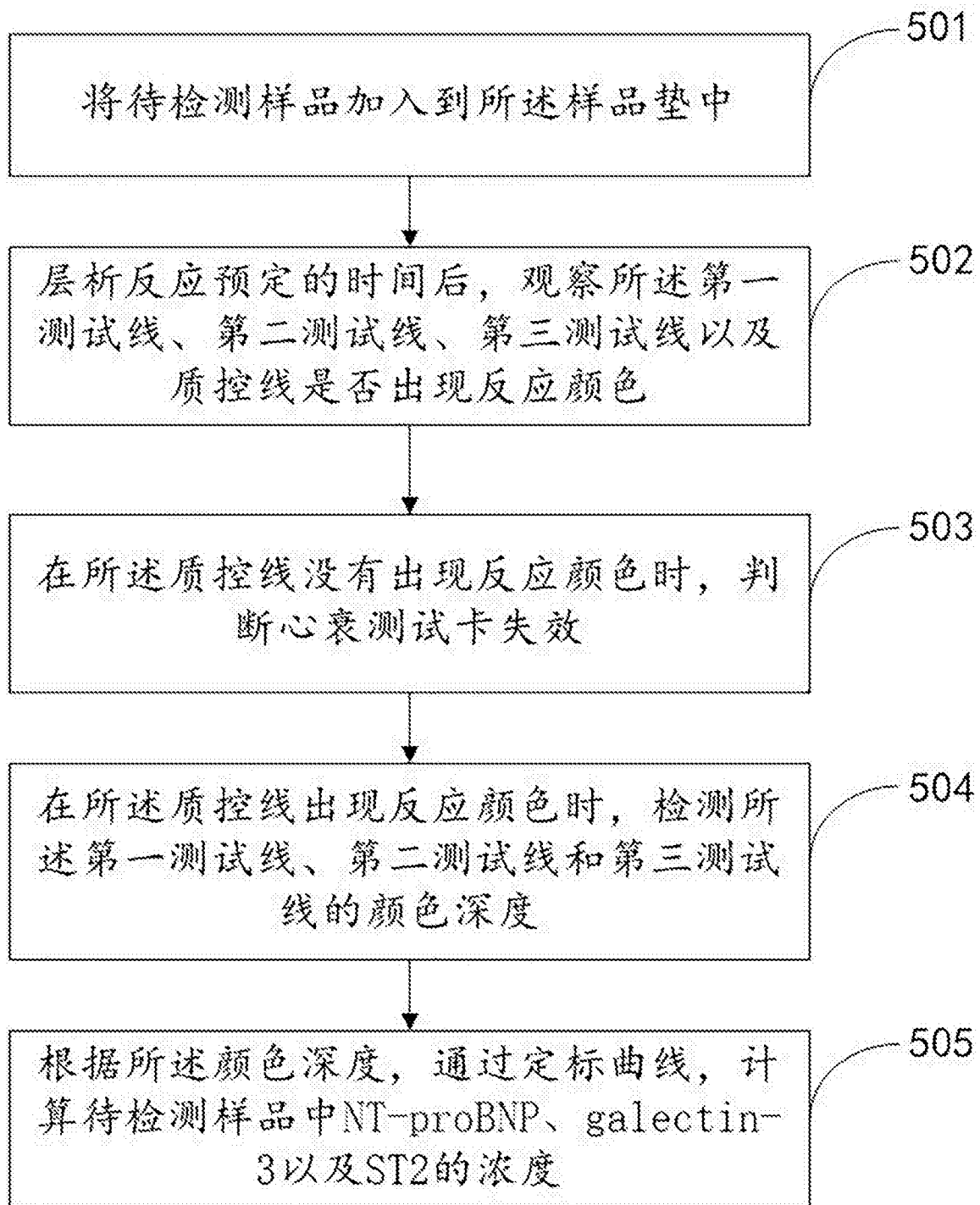


图5

专利名称(译)	快速检测多项心衰标志物的试剂卡、制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN107328926A	公开(公告)日	2017-11-07
申请号	CN201710511112.7	申请日	2017-06-29
申请(专利权)人(译)	海格德生物科技(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	海格德生物科技(深圳)有限公司		
[标]发明人	仇家舟 陈雪 王岳鹏 王朝阳 钟运华 王超 卢岳军		
发明人	仇家舟 陈雪 王岳鹏 王朝阳 钟运华 王超 卢岳军		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/559 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/559 G01N33/577 G01N2800/325		
代理人(译)	张绍波		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测多项心衰标志物的试剂卡、其制备方法和测试方法。所述试剂卡包括：长条状的测试卡底板；用于添加测试样品的样品垫，结合垫的至少一部分与所述样品垫重叠；层析反应区设置在所述结合垫与样品垫相离的一端；用于提供层析动力的吸水区，固定在所述测试卡底板的另一侧。所述层析反应区上，沿预定间隔依次设置有若干用于检测一项心衰标志物的检测线以及质控线；所述心衰标志物为NT-proBNP、galectin-3以及ST2。多项心衰标志物是在同一个试剂卡上进行，避免了时间和空间上的差异，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济适用等优点。

