



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108931635 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201810420878.9

(22) 申请日 2018.05.04

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108931635 A

(43) 申请公布日 2018.12.04

(73) 专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72) 发明人 王侃 洪立新 颜文强 杨金川
何井华

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220

代理人 郑立

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102051352 B, 2012.07.04

CN 107422129 A, 2017.12.01

CN 103487313 A, 2014.01.01

CN 102628863 A, 2012.08.08

Helena de Puig, et al., Challenges of the Nano-Bio Interface in Lateral Flow and Dipstick Immunoassays.《Trends in Biotechnology》.2017,第35卷(第12期),全文.

审查员 盛志

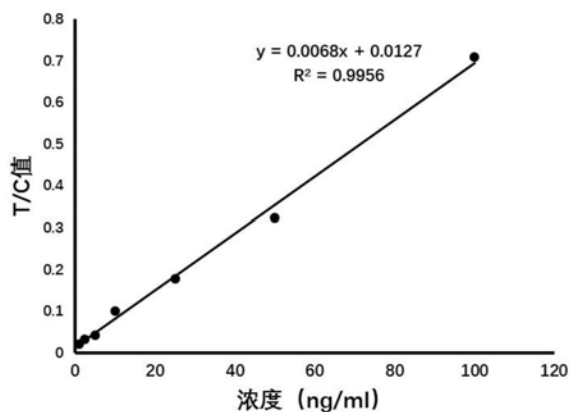
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液

(57) 摘要

本发明公开了一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液,含有:浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲溶液和浓度为25~50mmol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液中的一种或两种、浓度为0.1%~2%的牛血清蛋白、浓度为0.1~0.2%的甘氨酸和浓度为0.5~2%的蔗糖,且上述成分配置的标准抗原稀释液pH为7.4~8.0。本标准抗原稀释液针对超顺磁性免疫层析芯片设计,能保持超顺磁性纳米磁珠的稳定性,达到增加超顺磁性免疫层析芯片实验灵敏度、特异度的目的,而且适合超顺磁性免疫层析技术应用和推广。



1. 一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液, 含有: 浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲溶液、浓度为25mmol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液、浓度为2%的牛血清蛋白、浓度为0.1%的甘氨酸和浓度为2%的蔗糖、浓度为0.05%的表面活性剂吐温-20, 且上述成分配置的标准抗原稀释液pH为7.4。

一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析检测技术领域,尤其涉及一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液。

背景技术

[0002] 免疫层析芯片技术因其快速、简便、价格低廉等优点广泛应用于生物检测中,常见的有胶体金芯片、荧光免疫层析芯片等。这些芯片都是通过对检测线表面的光信号进行检测从而得到定量数据。而近年来出现的超顺磁性免疫层析芯片因能对整条检测线表面及内部的标记物进行磁信号检测,其灵敏度可以提高10倍以上。另外超顺磁性纳米磁珠具有高生物相容性、磁性富集等作用而越来越受到科研工作者及研发机构的关注。

[0003] 随着超顺磁性免疫层析芯片应用越来越广泛,超顺磁性纳米磁珠的不稳定性、容易出现假阳性等情况也常见于许多实验过程或文献报道中。而且传统的抗原或样本稀释液为单纯的缓冲液,如磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液等,在抗原稀释倍数较高的情况下(1万倍以上)会使标准抗原降解或失活,导致检测灵敏度下降。

[0004] 超顺磁性纳米磁珠的表面经过官能团修饰后因静电排斥等作用而具有很好的分散性,但经过偶联抗体或所处的酸碱环境改变会使超顺磁性纳米磁珠表面的电荷数量急剧减少从而导致稳定性下降。在实际操作中发现许多免疫层析过程存在假阳性的现象,这可能是超顺磁性纳米磁珠表面的蛋白与硝酸纤维素膜上的抗体发生非特异性反应或超顺磁性纳米磁珠之间聚集使其粒径变大的结果。

[0005] 超顺磁性免疫层析芯片在应用时多有将抗体标记的免疫磁珠与标准抗原稀释液进行预孵育的过程。该过程中单纯的离子环境会使免疫磁珠粒径变大或表面电荷发生变化而发生团聚现象,导致层析时结合垫释放不充分,背景加深等情况

[0006] 超顺磁性免疫层析芯片比较容易出现假阳性,如文献Challenges of the Nano-Bio Interface in Lateral Flow and Dipstick Immunoassays (Trends in biotechnology 35 (12) : 1169-1180. DePuig, H., et al. (2017)) 指出可以通过人阴性血清一定程度上消除假阳性,但人阴性血清价格昂贵、血清资源稀缺不适合免疫层析技术应用和推广。另外阴性血清的内含成分多为未知,在层析过程中出现交叉反应也时有发生。

[0007] 在已公布的专利(如专利CN102628863A、CN103487313A)公开的血液样品或抗原抗体稀释液多针对ELISA(酶联接免疫吸附剂测定)检测法,其稀释液配方中金属离子或金属离子螯合剂(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、柠檬酸钠盐、EDTA等物质等)对显色背景影响不大,但却可以使超顺磁性免疫磁珠之间发生团聚,稳定性降低。经过检索,目前没有针对超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液配方相关文献或专利。

[0008] 因此急需一种能够模拟血清环境的标准抗原稀释液,以保持超顺磁性纳米磁珠的稳定性,达到增加超顺磁性免疫层析芯片(或试纸条)实验灵敏度、特异度的目的,而且适合超顺磁性免疫层析技术应用和推广。

发明内容

[0009] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本领域的技术人员致力于开发一种针对超顺磁性免疫层析芯片使用的标准抗原稀释液。本发明所要解决的技术问题是提供一种能够模拟血清环境的标准抗原稀释液,以保持超顺磁性纳米磁珠的稳定性,达到增加超顺磁性免疫层析芯片实验灵敏度、特异度的目的,而且还适合超顺磁性免疫层析技术商业化应用和推广。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供了一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液,含有:浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲溶液和浓度为25~50mmol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液中的一种或两种、浓度为0.1%~2%的牛血清蛋白、浓度为0.1~0.2%的甘氨酸和浓度为0.5~2%的蔗糖,且上述成分配置的标准抗原稀释液pH为7.4~8.0。

[0011] 进一步地,还含有浓度为0.05%~2%的表面活性剂。

[0012] 进一步地,所述表面活性剂选自聚乙烯吡咯烷酮、曲拉通X-100、吐温-20中任一种或者组合。

[0013] 进一步地,所述聚乙烯吡咯烷酮的浓度为0.05%、曲拉通X-100的浓度为0.05%、吐温-20的浓度为0.05%。

[0014] 进一步地,所述表面活性剂为吐温-20。

[0015] 进一步地,含有浓度为10mmol/L的磷酸盐和25mmol/L的三羟甲基氨基甲烷混合的缓冲液。

[0016] 进一步地,牛血清蛋白的浓度为2%。

[0017] 进一步地,甘氨酸的浓度为0.1%。

[0018] 进一步地,蔗糖的浓度为2%。

[0019] 进一步地,所述pH为7.4。

[0020] 本发明与现有的技术相比,至少具有以下优势:

[0021] 1、本发明是首次提出针对超顺磁性免疫层析试芯片使用的标准抗原稀释液;

[0022] 2、本标准抗原稀释液一定程度上代替人血清,起到稳定超顺磁性纳米磁珠、促进抗原-抗体的特异性结合、减少背景干扰而增加灵敏度、特异度的作用,而且适合工业化生产、制备简便、价格低廉、层析效果好、可操作性强,适合超顺磁性免疫层析技术商业化应用和推广;

[0023] 3、本标准抗原稀释液一定程度上可以使其在大倍数的稀释下或稀释后一段时间内依然保持抗原活性,确保检测的准确性;

[0024] 4、本标准抗原稀释液添加一定量的表面活性剂,在确保检测的准确性情况下进一步缩短层析时间。

[0025] 以下将结合附图对本发明的构思、具体实施及产生的技术效果作进一步说明,以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

[0026] 图1是本发明的一个优选实施例制得的心梗三项超顺磁性免疫层析芯片示意图;

[0027] 图2是15号标准抗原稀释液稀释cTnI抗原测得的T/C值—浓度曲线;

[0028] 图3是15号标准抗原稀释液稀释CKMB抗原测得的T/C值—浓度曲线;

[0029] 图4是15号标准抗原稀释液稀释Myoglobin抗原测得的T/C值—浓度曲线;

[0030] 其中,1-样品垫,2-结合垫,3-硝酸纤维素膜,4-检测线1,5-检测线2,6-检测线 3,7-控制线,8-吸水垫,9-PVC背板。

具体实施方式

[0031] 以下参考说明书附图介绍本发明的优选实施例,使其技术内容更加清楚和便于理解。本发明可以通过许多不同形式的实施例来得以体现,本发明的保护范围并非仅限于文中提到的实施例。

[0032] 在附图中,结构相同的部件以相同数字标号表示,各处结构或功能相似的组件以相似数字标号表示。附图所示的每一组件的尺寸和厚度是任意示出的,本发明并没有限定每个组件的尺寸和厚度。为了使图示更清晰,附图中有些地方适当夸大了部件的厚度。

[0033] 除非上下文明细要求,否则整个说明书和权利要求书中“含有”、“包括”、“包含”等类词语应当解释为包含的含义而不是排他或者穷举的含义;也就是说,是“包括但不限于”的含义。

[0034] 本发明提供一种用于超顺磁性免疫层析芯片的标准抗原稀释液,其成分包括:

[0035] 磷酸盐缓冲溶液,其浓度为10mmol/L,和或三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液,其浓度为25~50mmol/L,以10mmol/ml的磷酸盐和25mmol/ml的三羟甲基氨基甲烷混合后的缓冲液为最优;

[0036] 牛血清蛋白,浓度为0.1%~2%,最优的浓度为2%;

[0037] 甘氨酸,浓度为0.1~0.2%,最优的甘氨酸浓度为0.1%;

[0038] 蔗糖,浓度为0.5~2%,最优浓度为2%;

[0039] 表面活性剂,浓度为0.05%~2%;

[0040] 上述成分配置的标准抗原稀释液pH为7.4~8.0,最优pH为7.4。

[0041] 其中所述表面活性剂,可以是聚乙烯吡咯烷酮、曲拉通X-100、吐温-20等,也可以是这些表面活性剂组合;若选曲拉通X-100,其浓度为0.05%~2%,最优浓度为0.05%;若选聚乙烯吡咯烷酮,其浓度为0.05%~2%,最优浓度为0.05%;若选吐温-20,其浓度为0.05%~2%,最优浓度为0.05%;其中以吐温-20为最优表面活性剂,浓度为0.05%。

[0042] 本发明提供的标准抗原稀释液也可以表述为抗原样本稀释液或者简述为样本稀释液。

[0043] 本发明提供的标准抗原稀释液可简便地模拟人阴性血清中的各种成分,其中牛血清蛋白可模拟血清中的各种大蛋白或酶类,甘氨酸、蔗糖可模拟氨基酸、糖类、尿素或其他代谢产物,这些生物分子可在超顺磁性纳米磁珠表面快速地形成一层蛋白冠。形成的蛋白冠一方面可降低免疫磁珠之间的相互吸引以及接触,另外一方面可使标记在超顺磁性纳米磁珠表面的抗体形成保护机制,降低抗体-抗体或抗体-牛血清蛋白之间的非特异性结合,保持免疫磁珠稳定、降低层析过程的假阳性和背景干扰等作用。

[0044] 另外基于本发明的原理涉及到的标准抗原稀释液配方需要简单地模拟血清环境,要求其液体渗透压接近于人体血液渗透压(290~310mOsm/kgH₂O),从而增加标准抗原(特别是一些酶类)的稳定性,促进抗原-抗体的特异性结合,从而提高检测的灵敏度及准确度,本发明的标准抗原稀释液采用浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲溶液、25~50mmol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液,接近于人体血浆的晶体渗透压,而牛血清蛋白提供少量的胶体渗透

压。

[0045] 本发明的标准抗原稀释液中蔗糖在免疫层析过程中还起到保水的作用,一方面使层析过程倾向于减慢流速,更好地使未结合的超顺磁性纳米磁珠与标准抗原充分接触;另一方面可使硝酸纤维素膜检测线保持湿润,尽可能地消除检测线空白的现象,减少检测的假阴性。

[0046] 本发明的标准抗原稀释液中表面活性剂在免疫层析过程中可将在玻璃纤维素及硝酸纤维素非特异性吸附的超顺磁性纳米磁珠洗脱出来,达到充分释放免疫磁珠及降低背景干扰的目的。

[0047] 为实现本发明所要达到的效果,需要实施以下步骤:制备羧基修饰的超顺磁性纳米磁珠、制备抗体修饰的免疫磁珠、制备超顺磁性免疫层析芯片、制备标准抗原稀释液、进行免疫层析验证。

[0048] 第一步:制备羧基修饰的超顺磁性纳米磁珠

[0049] 在持续氮气通气状态下, Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 溶液按照2:1摩尔质量的比例混合后加入过量氨水,反应温度控制在 65 ± 10 摄氏度,持续反应1-5小时。再向反应体系中加入适量的油酸,反应1-5小时得到磁性纳米颗粒。待反应结束后将氨水蒸发,外加磁场洗涤后,真空或氮气保护下干燥得到磁性纳米颗粒粉末。按照细乳液聚合法合成羧基修饰的超顺磁性纳米粒子:取适量制备得到的磁性纳米颗粒粉末,混入含有苯乙烯、正辛烷的溶液中并进行超声处理,制得稳定的油相液体。将制备得到的油相液体与十二烷基硫酸钠溶液混合均匀,持续通氮气的情况下加热至 80 ± 10 摄氏度,加入烯酸和过硫酸钠,持续搅拌均匀后反应 20 ± 10 小时,制备得到羧基修饰的超顺磁性纳米磁珠。

[0050] 第二步:制备抗体修饰的免疫磁珠

[0051] 第一步得到的羧基修饰的超顺磁性纳米磁珠用MES缓冲液洗涤后在外加磁场下重悬于溶液中,加入适量EDC、NHS充分混匀,旋转活化10分钟以上。再次洗涤活化后的免疫磁珠重悬于硼酸盐缓冲液中,加入适量抗体后持续偶联8小时以上。将偶联完成的免疫磁珠洗涤后加入含一定浓度BSA的封闭液旋转封闭2小时以上。最后将制备得到抗体修饰的免疫磁珠重悬于保存液中,冷藏保存备用。

[0052] 第三步:制备超顺磁性免疫层析芯片

[0053] 将处理过后的结合垫、样品垫、吸水垫和硝酸纤维素膜以一定顺序粘贴于PVC背板中,并用划膜仪将cTnI、CKMB、Myoglobin等单克隆抗体及IgG等多克隆抗体固定于硝酸纤维素膜中,分别以检测线及控制线为标记,裁剪为一定宽度后制备得到超顺磁性免疫层析芯片。保存于干燥筒中备用。

[0054] 第四步:制备标准抗原稀释液

[0055] 首先配制缓冲液作为标准稀释液,并用作空白对照液;其次将制备得到的标准稀释液与不同浓度的牛血清蛋白、甘氨酸、蔗糖和或表面活性剂以一定的组合制备得到数种标准抗原稀释液。

[0056] 第五步:进行免疫层析验证

[0057] 将第四步制备得到的空白对照液和数种标准抗原稀释液进行免疫层析验证,验证内容有假阳性验证,浓度梯度检测等。其中应该仔细观察层析过程中出现的结合垫释放情况、硝酸纤维素膜层析过程是否顺畅、是否有背景干扰、是否出现假阳性、是否出现潜水现

象以及测得T/C信号数据等。另外标准抗原稀释液经过进一步稀释后的稳定性也需要进一步验证。

[0058] 实施例

[0059] 第一步：制备羧基修饰的超顺磁性纳米磁珠

[0060] 取35gFeCl₃·6H₂O和13gFeCl₂·4H₂O置于1L烧杯中，向其中加入600ml水，持续氮气通气，再500rpm搅拌使之溶解。向烧杯中快速通入50ml氨水，70摄氏度水浴反应1小时。然后向其中缓慢滴加入45g油酸，持续水浴反应2小时。反应结束后将氨水蒸发，得到的黑色油状沉淀，外加磁场用丙酮、乙醇洗涤三遍，在氮气保护下干燥得到磁性纳米颗粒粉末。取0.9g得到的磁性纳米颗粒粉末溶解于2.5ml苯乙烯和正辛烷的混合液中并超声处理，形成稳定的油相。再将0.25g碳酸氢钠，0.5g十二烷基硫酸钠溶解于100ml水中形成水相。将油相和水相混合，通氮气下加热搅拌，当反应温度达到80摄氏度时，向其中加入8ul烯酸和0.05g过硫酸钠，反应20小时。反应结束后，洗涤除去上清液，即制备得到羧基修饰的超顺磁性纳米磁珠，重复洗涤干净后确定浓度待用。

[0061] 第二步：制备抗体修饰的免疫磁珠

[0062] 将1mg的羧基磁珠用10Mm的MES缓冲液(pH5.5)洗涤两遍后用磁力架重悬于200ul溶液中，加入2.5mgEDC、NHS后定容250ul，旋转活化25分钟。再次洗涤3次后重悬于234ul硼酸盐缓冲液(pH9)中，加入100mgcTnI单克隆抗体偶联过夜。次日将偶联后的免疫磁珠用5mM的硼酸盐缓冲液(pH8)的洗涤液洗涤后加入250ul含10%BSA的封闭液旋转封闭3小时，最后将制备得到cTnI抗体修饰的免疫磁珠重悬于500ul保存液中，4℃保存备用。按照上述方法制备得到另外两种心梗标记物的抗体(CKMB、Myoglobin)修饰的免疫磁珠。

[0063] 第三步，制备心梗三项超顺磁性免疫层析芯片

[0064] 如图1所示的，将处理过后的样品垫1、结合垫2、吸水垫8和硝酸纤维素膜3以一定的顺序粘贴于8cm×30cm的PVC背板9中，并用划膜仪将2mg/ml的cTnI、CKMB、Myoglobin单克隆抗体及1mg/ml的IgG多克隆抗体固定于硝酸纤维素膜3中，分别标记为检测线1、2、3(以下简称T线，T1、T2、T3对应检测线1、2、3，图中对应的标记为分别4、5、6)及控制线7(以下简称C线)，干燥2小时后切成4mm宽的芯片，保存于干燥筒中备用。

[0065] 第四步，制备标准抗原稀释液

[0066] 首先配制10mMpH7.4的磷酸盐缓冲液作为标准稀释液，以用作空白对照液。制备方法：称取：氯化钠8.0g、磷酸二氢钾0.2g、磷酸氢二钠2.9g、氯化钾0.2g，溶解于1000ml超纯水中并调节pH至7.4，高压灭菌后备用。

[0067] 其次制备标准抗原稀释液1-12号：

[0068] 标准抗原稀释液1号：称取0.1g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、0.5g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0069] 标准抗原稀释液2号：称取0.1g的牛血清白蛋白、0.2g甘氨酸、0.5g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0070] 标准抗原稀释液3号：称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、0.5g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0071] 标准抗原稀释液4号：称取2g的牛血清白蛋白、0.2g甘氨酸、0.5g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0072] 标准抗原稀释液5号：称取0.1g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0073] 标准抗原稀释液6号：称取0.1g的牛血清白蛋白、0.2g甘氨酸、2g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0074] 标准抗原稀释液7号：称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0075] 标准抗原稀释液8号：称取2g的牛血清白蛋白、0.2g甘氨酸、2g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0076] 标准抗原稀释液9号：称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、1.5g蔗糖溶解于100ml10mM的磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0077] 标准抗原稀释液10号：称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖溶解于100ml50mM的三羟甲基氨基甲烷缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到8.0；

[0078] 标准抗原稀释液11号：称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖溶解于100ml50mM的三羟甲基氨基甲烷缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4；

[0079] 标准抗原稀释液12号：称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖、0.3g 三羟甲基氨基甲烷溶解于100ml10mM磷酸盐缓冲液中搅拌均匀，将pH值调节到7.4。

[0080] 选取最优的标准抗原稀释液：

[0081] 取13个200ul的EP管标记为1~12号以及一个空白对照管。每管加入第二步制备得到的三种抗体修饰的免疫磁珠，每种5ul，再分别取1至12号标准抗原稀释液及空白对照液30ul滴加入对应的EP管中，充分混匀孵育10分钟。另取13张第三步制备得到的心梗三项超顺磁性免疫层析芯片，将预孵育结束后的免疫磁珠混合物滴加至层析芯片的结合垫2上，样品垫1追加40ul对应的稀释液，同时观察记录层析时间、层析过程的状态及T线产生假阳性等情况，实验条件控制为温度22-25℃、湿度 50-60%，经过20分钟层析结束后观察结果如表1所示。

[0082] 表1为1~12号标准抗原稀释液层析情况表，其中编号“1~12”表示1至12号标准抗原稀释液，“+”表示强阳性，“±”表示弱阳性，“-”表示阴性，“T/C”表示检测线与控制线的比值。

[0083] 表1

稀释液 编号	层析时间	背景 干扰	假阳 性	潜水 现象	T ₁ /C 信号	T ₂ /C 信号	T ₃ /C 信号
1	15 分钟	+	+	-	0.0582	0.0368	0.0864
2	13 分 45 秒	±	±	-	0.0284	0.0375	0.0388
3	14 分钟	±	-	-	0.0125	0.0216	0.0195
[0084] 4	14 分 30 秒	-	-	-	0.0105	0.0208	0.0254
5	15 分 30 秒	±	±	-	0.0225	0.0268	0.0364
6	14 分钟	±	±	-	0.0298	0.0415	0.0227
7	13 分钟	-	-	-	0.0115	0.0201	0.0198
8	13 分钟 20 秒	-	-	-	0.0126	0.0198	0.0157
9	12 分 30 秒	-	-	-	0.0105	0.0204	0.0184

	稀释液 编号	层析时间	背景 干扰	假阳 性	潜水 现象	T ₁ /C 信号	T ₂ /C 信号	T ₃ /C 信号
[0085]	10	12 分钟	-	-	-	0.0135	0.0154	0.0198
	11	12 分钟	-	-	-	0.0113	0.0138	0.0119
	12	11 分 50 秒	-	-	-	0.0084	0.0094	0.0107
	空白 对照液	18 分钟 45 秒	+	+	±	0.0768	0.0516	0.0765

[0086] 从表1的结果可以看出,常用的磷酸盐缓冲液(空白对照液)可造成明显的检测线假阳性,而随着加入的牛血清蛋白及甘氨酸的浓度升高,检测线的假阳性也随之降低,并且层析时间也缩短。其原因在于,牛血清白蛋白及甘氨酸在层析过程中不仅能够使免疫磁珠维持稳定,另外还起到了流动封闭的作用防止免疫磁珠非特异性吸附。优选地,可以认为8号~12号的标准抗原稀释液配方更适合用于磁性免疫层析实验中。最优选择12号标准抗原稀释液,因背景干扰更少,T/C阴性信号更低。

[0087] 由于本次检测的时间接近12分钟,因此可以通过加入促进免疫磁珠释放、加快层析速度的表面活性剂来缩短时间以满足即时检测的要求。常用于免疫层析技术的表面活性剂有聚乙烯吡咯烷酮、曲拉通X-100、吐温-20等。因此,可以在12号标准抗原稀释液的基础上,加入一定量的表面活性剂达到缩短层析时间的效果。以下为给出的具体方案:

[0088] 标准抗原稀释液13号:称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖、0.3g三羟甲基氨基甲烷、0.05g聚乙烯吡咯烷酮溶解于100ml10mM磷酸盐缓冲液,搅拌均匀后将pH值调节到7.4;

[0089] 标准抗原稀释液14号:称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖、0.3g三羟甲基氨基甲烷、溶解于99.95ml10mM磷酸盐缓冲液,再加入50ul曲拉通X-100表面活性剂搅拌均匀后将pH值调节到7.4;

[0090] 标准抗原稀释液15号:称取2g的牛血清白蛋白、0.1g甘氨酸、2g蔗糖、0.3g三羟甲基氨基甲烷、溶解于99.95ml10mM磷酸盐缓冲液,再加入50ul吐温-20表面活性剂搅拌均匀后将pH值调节到7.4。

[0091] 将配置好的12至15号标准抗原稀释液照上述同样的方法再次验证,得到结果见表2。

[0092] 表2是12~15号标准抗原稀释液层析情况表。其中编号“12~15”表示12至15号标准抗原稀释液,“+”表示强阳性,“±”表示弱阳性,“-”表示阴性,“T/C”表示检测线与控制线的比值。

[0093] 表2

	稀释液 编号	层析时间	背景 干扰	假阳 性	潜水 现象	T ₁ /C 信号	T ₂ /C 信号	T ₃ /C 信号
[0094]								

	稀释液 编号	层析时间	背景 干扰	假阳 性	潜水 现象	T ₁ /C 信号	T ₂ /C 信号	T ₃ /C 信号
[0095]	12	11 分 50 秒	-	-	-	0.0084	0.0094	0.0107
	13	10 分钟	-	-	-	0.0091	0.0112	0.0098
	14	9 分钟 20 秒	-	-	-	0.0100	0.0115	0.0113
	15	7 分钟 55 秒	-	-	-	0.0090	0.0114	0.0108

[0096] 从表2中可以看出,当加入表面活性剂后层析芯片的层析时间有明显缩短,最明显的为加入吐温-20表面活性剂的15号标准抗原稀释液。因此,有理由认为15号抗原稀释液的配方更适合用于本心梗三项超顺磁性免疫层析芯片。虽然加入的表面活性剂可以缩短检测时间,但是检测线上的单克隆抗体与免疫磁珠捕获的抗原结合时间太短反而会使得检测的灵敏度出现下降。另一方面,有些免疫磁珠自身稳定性并不强,加入过多的表面活性剂可能会导致假阳性的出现,因此表面活性剂的量也需要根据不同免疫磁珠的稳定性及实验需要而定。

[0097] 图2、图3、图4是以15号标准抗原稀释液稀释三种标准抗原,即cTnI抗原、CKMB 抗原、Myoglobin抗原后检测得到T/C值—浓度曲线。

[0098] 基于得到的图2:15号标准抗原稀释液稀释cTnI抗原测得的T/C值—浓度曲线,本发明还针对cTnI标准抗原在15号标准抗原稀释中的稳定性进一步证明。具体实施方案如下:

[0099] 通过按照一定稀释比例将1ul浓度为0.621mg/ml的cTnI标准抗原用15号标准抗原稀释液稀释1242倍至0.5ug/ml,并分装成7份,4℃冰箱保存。在30分钟、1小时、3小时、12小时、24小时、72小时、1周时,利用制备好的心梗三项超顺磁性免疫层析芯片检测稀释后的cTnI标准抗原的T/C值,得到对应的检测浓度。每个样品均检测三次,取平均值,得到结果见表3。

[0100] 表3是cTnI标准抗原稀释液稳定性实验检测结果表。

[0101] 表3

	时间 (h)	0.5	1	3	12	24	75	168
	次数	ug/ml						
[0102]	1	0.4955	0.4881	0.4806	0.4661	0.4495	0.4238	0.3841
	2	0.4854	0.4893	0.4774	0.4709	0.4365	0.4189	0.3846
	3	0.5088	0.4906	0.4761	0.4590	0.4294	0.4205	0.3951
	均值	0.4966	0.4893	0.4780	0.4653	0.4385	0.4210	0.3879

[0103] 从表3中可以看出,本发明采用的15号标准抗原稀释液测得的浓度与稀释得到的浓度在12小时内偏差基本小于10%,因此抗原的稳定性能得到一定保障。虽然随着保存时间的延长,测得的浓度呈下降趋势,但可以将稀释后的标准抗原进行冻存,以达到更好的保存效果。

[0104] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术

方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

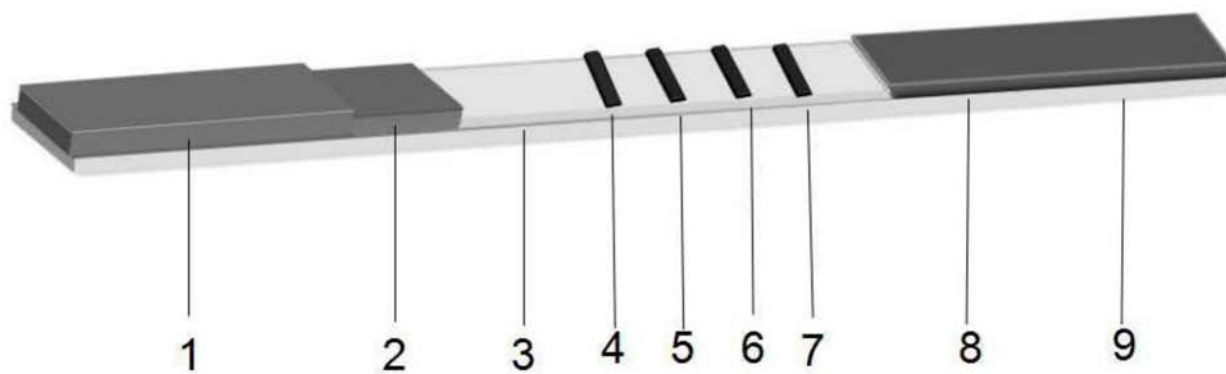


图1

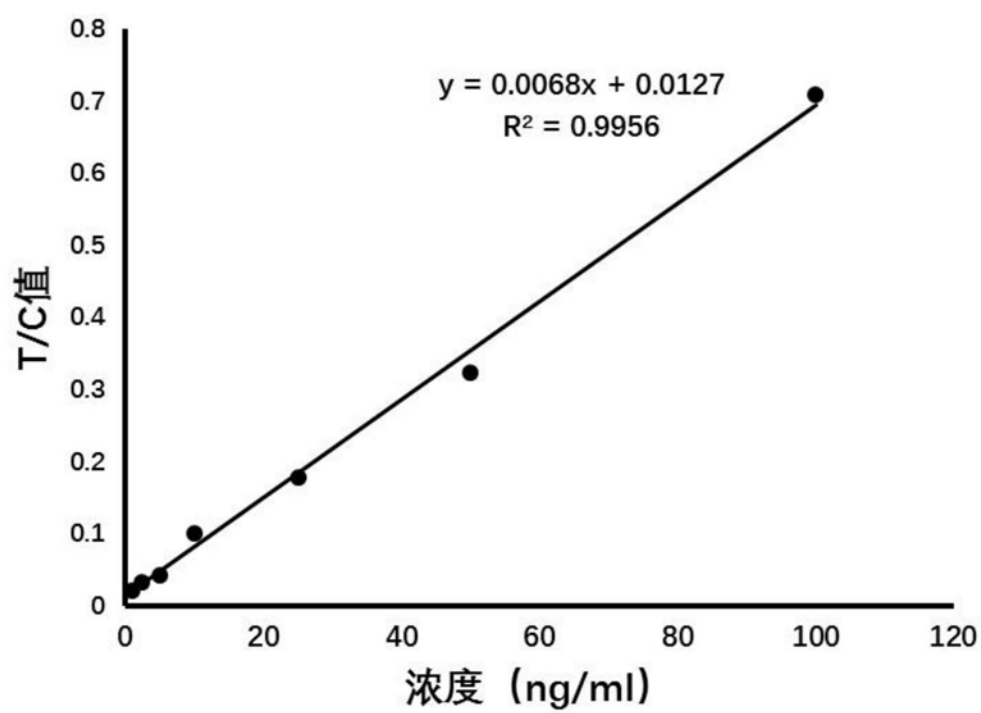


图2

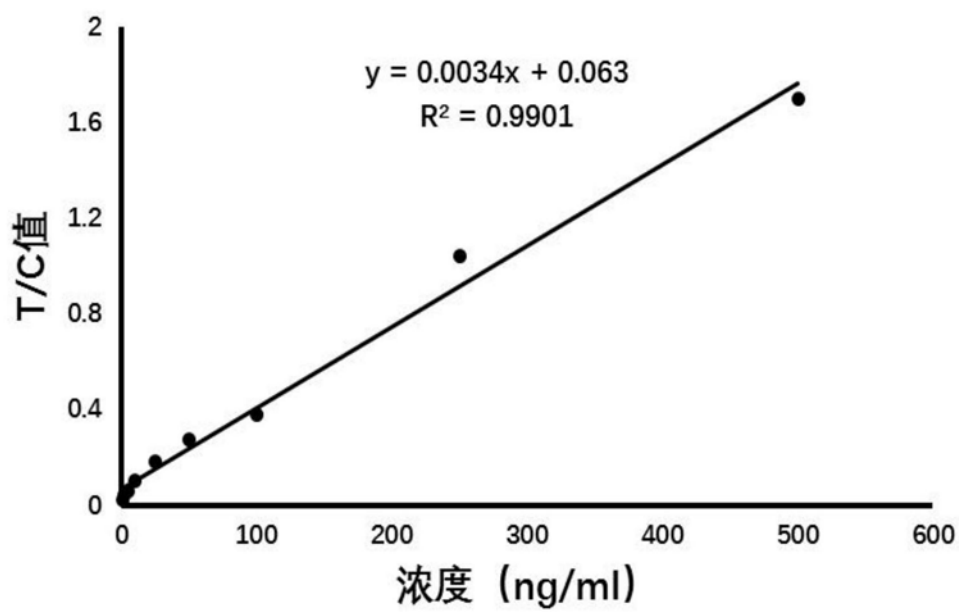


图3

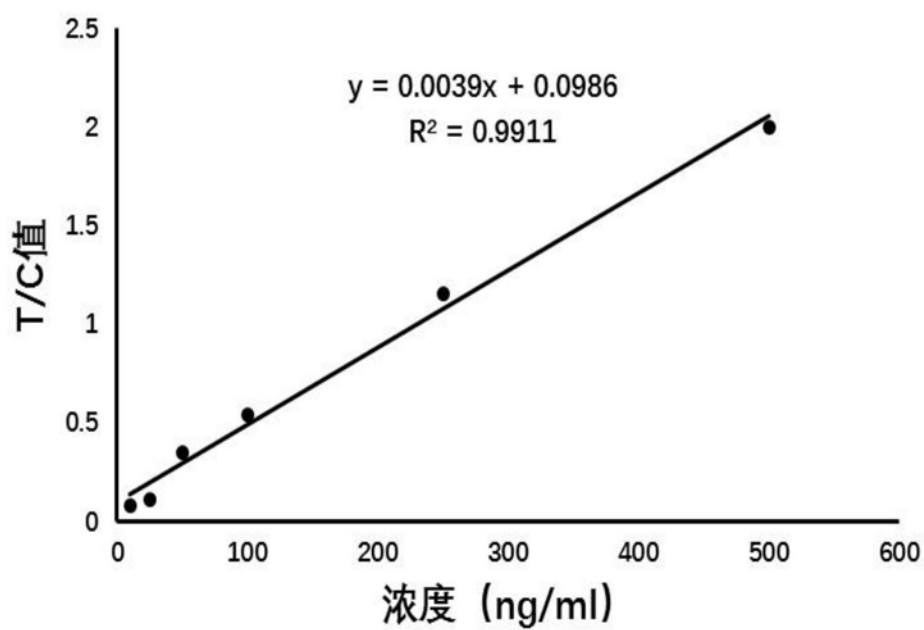


图4