



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398557 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810135357.9

(22)申请日 2018.02.09

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心有限公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业
开发区科学大道53号4号楼7层84号

(72)发明人 王云龙 马雪虎 李玉林 王继创
程蕾

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 李静雅

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种髓过氧化物酶荧光免疫层析试纸条及
试纸卡

(57)摘要

本发明公开了一种髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,包括:底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上,所述结合垫上固定有髓过氧化物酶抗体-荧光微球复合物;所述检测区内的硝酸纤维素膜上包被有识别髓过氧化物酶另一个表位的单克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠IgG多克隆抗体构成的质控线。本发明具有高灵敏度、高稳定性,其检测线性为3.125-600ng/ml,无非特异性,检测时间仅需5min,并且能够实现床旁快检,极大提高了临床诊断效率。

1. 一种髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,包括:底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上,所述结合垫上固定有MPO抗体-荧光微球复合物;所述检测区内的硝酸纤维素膜上包被有识别髓过氧化物酶另一个表位的单克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠IgG多克隆抗体构成的质控线,其中,将荧光微球通过碳二亚胺EDC活化,与MPO抗体偶联形成复合物,再通过保护液复溶、封闭液封闭,最终制备成MPO抗体-荧光微球复合物。

2. 根据权利要求1所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述荧光微球为羧基、氨基或羟基荧光微球,优选羧基荧光微球。

3. 根据权利要求2所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述荧光微球为粒径100-300nm的稀土金属螯合物,优选镧系元素铕(Eu^{3+})螯合物。

4. 根据权利要求1所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,活化用EDC的重量是荧光微球体积的8-12倍,优选10.7倍。

5. 根据权利要求1所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,偶联过程中,MPO抗体的重量是荧光微球体积的6-10倍,优选8-8.5倍,偶联时间为1.2-2h,优选1.5h。

6. 根据权利要求1所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,复溶用保护液的组分为0.01-0.05M的Tris-HCl、PB、硼酸盐缓冲液其中一种,质量浓度为0.5%~1%的BSA、PEG、甘氨酸、酪蛋白一种或两种以上,质量浓度为1%~5%的海藻糖、蔗糖、低聚糖一种或两种以上,质量浓度为0.05%~0.5的吐温20、吐温80、曲拉通100、S9一种或两种以上,0.05%~0.1%的 NaN_3 ,所述保护液优选由以下组分组成:0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、0.5%的吐温20、0.2%的BSA、0.5%的酪蛋白、4%的海藻糖和0.05%的 NaN_3 。

7. 根据权利要求1所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,其特征在于,所述MPO抗体是由多肽1和多肽2作为半抗原,制备成完全抗原,再经小鼠腹腔免疫法获得的MPO单克隆抗体或性能相同的其他抗体,所述多肽1的序列为SEQ ID No.1:SGCAYQDVGVTCPEDQKY,所述多肽2的序列为SEQ ID No.2:SKNNIFMSNSYPRDFVNC。

8. 权利要求1-7中任一项所述的髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条的制备方法,所述方法包括:

(1) 制备MPO抗体-荧光微球复合物;

(2) 将硝酸纤维素膜粘贴在底板的中间位置,并与上端的吸水垫进行重叠接触,将稀释的1-2mg/ml MPO单克隆抗体及1-2mg/ml 羊抗鼠IgG多克隆抗体在硝酸纤维素膜上的T线和C线位置划线,烘干;

(3) 将玻璃纤维构件使用处理液处理并烘干,将步骤(1)制备的MPO抗体-荧光微球复合物喷涂在烘干的玻璃纤维构件上,烘干,制成结合垫;

(4) 组条:将样品垫、吸水垫和步骤(3)制备的结合垫依次搭接组装,切割成条状,制成髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条。

9. 一种髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸卡,其特征在于,将上述权利要求1-7中任一项所述的髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条装入长方形卡壳内。

10. 根据权利要求9所述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸卡,其特征在於,所述长方形卡壳包括塑料上壳和塑料下壳,上壳面上对应於硝酸纤维膜的位置设有观察窗,上壳面上对应於样品垫的位置设有加样孔,加样孔位於样品垫中间。

一种髓过氧化物酶荧光免疫层析试纸条及试纸卡

技术领域

[0001] 本发明属于POCT免疫层析检测技术领域,具体涉及一种髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条、包含所述试纸条的试纸卡,以及它们的制备方法。

背景技术

[0002] 冠状动脉粥样硬化性心脏病是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病,简称冠心病(coronary heart disease, CHD)。目前 CHD已成为全球心血管疾病中发病率最高的疾病。我国有近千万人患CHD,每年约80万人以上死于CHD,已远超肿瘤的致死率,且死亡人数随年龄呈增长趋势。冠心病的产生受多种因素影响,如吸烟、性别(男性多于女性)、基因多态性、地域差异、年龄(多在40岁以上)等。CHD发生发展机制与众多病理因素导致的炎症反应及氧化应激密切相关。目前我国CHD具有高死亡率、高病发率、高负担(社会和家庭)等特点,已成为威胁现代国民健康及生命的首要常见病。

[0003] 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)是一种白细胞源性血红素辅基的蛋白酶,是炎症和氧化应激的标志物。伴随科研的深入,人们发现它在发挥正常免疫防御作用的同时,还与其他人类疾病的发生发展有关,如炎症、动脉粥样硬化、血管炎、肺癌、大肠癌等。近年来,许多生物标志物已用于临床或正在被研究,旨在预测心血管疾病风险,因动脉粥样硬化和炎症反应之间有密切联系,所以认为炎症标志物可能成为更好的预测动脉粥样硬化的指标。MPO与心血管疾病存在密切联系—MPO被视为一个动脉粥样硬化推动者,通过氧化反应催化产生的产物和酶,促进斑块形成和不稳定性增加,加速动脉粥样硬化进展,进而引起多种并发症,如急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)又是形成CHD的重要病理基础。血清MPO含量与冠状动脉病变形态相关,也与CHD临床病情严重性相关。在国际实验科研院所中,MPO已被作为预测急性心肌梗死早期指标,其与C反应蛋白检测类似,也作为一种炎症反应指标,其水平变化能够早于心肌缺血改变。MPO水平测定及其在CHD诊断、病情变化及预后评估,扮演极其关键角色。

[0004] 目前检测髓过氧化物酶的常用方法有:

1、酶联免疫吸附法(ELISA):酶联免疫吸附测定法是以免疫学反应为基础,将抗原抗体特异性结合与酶底物的高效催化产物作用相结合的一种敏感性很高的检测技术。此法灵敏度高,可达ng/ml的水平,特异性高,几乎不受体液中激活剂、抑制剂的影响,也不受过氧化物酶和血红蛋白干扰。由于成本较高,并且测定时间较长,操作繁琐,对操作人员技术要求高。

[0005] 2、流式细胞仪测定法:测定中性粒细胞浆中MPO的含量,将全血加入红细胞溶解液中,后使用固定液及细胞膜渗透剂处理细胞,最后加入荧光素标记的抗体MPO单克隆抗体,利用抗原抗体反应对MPO染色,对特定细胞群体进行分析,分析MPO阳性细胞的比例和平均荧光强度。此法特异性强、灵敏度高,但是技术程序复杂,检测需特殊仪器。

[0006] 3、胶金法(GICA法):胶体金免疫层析技术特点主要以胶体金作为标记物。能在弱

碱条件下,这种带负电荷标记物与抗原抗体分子上的带正电荷基团结合,结合是属于静电结合,不影响生物分子特性。此方法只能定性或者半定量,数据不准确。

[0007] 4、胶乳增强免疫比浊法:临床检测MPO较广泛的检测方法,其原理是用聚乙烯或着聚苯乙烯聚合的胶乳微粒作为标记载体,标记抗原/抗体,连接胶乳微粒的抗原/抗体与目标抗体和抗原反应,生成胶乳-抗原-抗体复合物。免疫比浊法灵敏度高,线性范围宽,但检测时间长,不适用床旁。

[0008] 5、时间分辨荧光免疫分析法:是目前与化学发光、电化学发光并驾齐驱的三种超敏免疫分析方法之一。其原理是采用较长荧光半衰期的稀土离子作标记物,由于这种标记物Stokes位移大(>150nm)且荧光寿命比本底物质荧光寿命高5~6个数量级,因此,测定时只要延缓测量时间,待本底物质的荧光充分衰减后再测定标记物的信号就可有效地消除各种非特异性荧光的干扰,获得很高的灵敏度。

[0009] 目前已有采用荧光微球免疫层析技术针对髓过氧化物酶进行定量检测的报道,例如,专利申请201120513019.8公开了一种快速检测髓过氧化物酶的试纸,具体公开了采用直径210nm的荧光微球对MPO单克隆抗体进行标记,制备获得试纸条,然而,该文献并未公开试纸条的线性范围、灵敏度等参数;又如,专利申请201611227045.8公开了一种人髓过氧化物酶免疫层析试纸条的制备方法,但其实施例部分仅对试纸条定性检测方面进行了验证,同样未记载检测线性范围、灵敏度等参数。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供一种线性范围宽、灵敏度高、稳定性好的髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,因此,发明人对制备试纸条的多个步骤及条件进行全面优化,从而完成了本发明。

[0011] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案具体如下:

一种髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条,包括:底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接组装在底板上,其中,吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端,并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在结合垫上,所述结合垫上固定有MPO抗体-荧光微球复合物;所述检测区内的硝酸纤维素膜上包被有识别髓过氧化物酶另一个表位的单克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠IgG多克隆抗体构成的质控线,其中,将荧光微球通过碳二亚胺(EDC)活化,与MPO抗体偶联形成复合物,再通过保护液复溶、封闭液封闭,最终制备成MPO抗体-荧光微球复合物。

[0012] 所述荧光微球为羧基、氨基或羟基荧光微球,优选羧基荧光微球,例如粒径180nm的镧系元素铕(Eu^{3+})螯合物。

[0013] 优选地,活化用EDC的重量是荧光微球体积的8-12倍,优选10.7倍。

[0014] 优选地,偶联过程中,MPO抗体的重量是荧光微球体积的6-10倍,优选8-8.5倍,偶联时间为1.2-2h,优选1.5h。

[0015] 优选地,复溶用保护液的组分包括0.01-0.05M的Tris-HCl、PB、硼酸盐缓冲液其中一种,质量浓度为0.5%~1%的BSA、PEG、甘氨酸、酪蛋白一种或两种以上,质量浓度为1%~5%的海藻糖、蔗糖、低聚糖一种或两种以上,质量浓度为0.05%~0.5的吐温20、曲拉通100、S9一种

或两种以上,0.05%~0.1%的NaN₃,所述保护液优选由以下组分组成:0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、0.5%的吐温20、0.2%的BSA、0.5%的酪蛋白、4%的海藻糖和0.05%的NaN₃。

[0016] 优选地,所述MPO抗体是由多肽1(SEQ ID No.1:SGCAYQDVGVTCPEDQKY)和多肽2(SEQ ID No.2:SKNNIFMSNSYPRDFVNC)为半抗原,制备成完全抗原经小鼠腹腔免疫法获得的MPO单克隆抗体或性能相同的其他抗体。

[0017] 优选地,所述结合垫是经处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维构件,处理液包括Tris-HCl、PB、硼酸盐缓冲液其中一种,质量浓度为0.5%~1%的BSA、PEG、甘氨酸、酪蛋白一种或两种以上,质量浓度为1%~5%的海藻糖、蔗糖、低聚糖一种或两种以上,质量浓度为0.05%~0.5%的吐温20、吐温80、曲拉通100、S9一种或两种以上,0.01%~0.05%的NaN₃,所述处理液优选由以下组分组成工作浓度为0.01M pH8.0的Tris-HCl,质量浓度为0.1%的BSA,质量浓度为0.1%的吐温20,以及质量浓度为5%海蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃。

[0018] 本发明还提供了上述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条的制备方法,所述方法包括:

(1) 制备MPO抗体-荧光微球复合物;

(2) 将硝酸纤维素膜粘贴在底板的中间位置,并与上端的吸水垫进行重叠接触,将稀释的1-2mg/ml MPO单克隆抗体及1-2mg/ml羊抗鼠IgG多克隆抗体在硝酸纤维素膜上的T线和C线位置划线,烘干;

(3) 将玻璃纤维构件浸泡在处理液中,捞出后烘干,将步骤(1)制备的MPO抗体-荧光微球复合物喷涂在烘干的玻璃纤维构件上,烘干,制成结合垫;

(4) 组条:将样品垫、吸水垫和步骤(3)制备的结合垫依次搭接组装,切割成条状,制成髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条。

[0019] 本发明还提供了一种髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸卡,其中,将上述髓过氧化物酶荧光免疫层析定量检测试纸条装入长方形卡壳内。

[0020] 优选地,所述长方形卡壳包括塑料上壳和塑料下壳,上壳面上对应于硝酸纤维素膜的位置设有观察窗,上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔,加样孔位于样品垫中间。

[0021] 本发明的有益效果是:

本发明提供了一种基于双抗体夹心法技术、荧光免疫层析技术的高灵敏度髓过氧化物酶(MPO)免疫层析定量检测试纸条。本发明中MPO荧光层析试纸条具有以下优势:1)快速准确定量:集胶体金快速、酶联免疫定量、色谱质谱准确检测的特点于一身,实现5min快速准确定量检测;2)随到随检:对检测样本量无要求,既可单个或少量样本随到随检,也可大量样本同时检测,并可实现现场检测;3)配置要求低:对配套的仪器设备及人员要求低,操作人员仅需短期培训就能熟练掌握;4)性价比高:生产成本比胶体金更低,更具竞争优势。通过荧光免疫层析读数仪对结果进行判读,可实现自动化主观素的影响,提供便利、快速、可靠的诊断结果。本发明的检测具有高灵敏度、高稳定性,其线性范围为3.125-600ng/ml,无非特异性,检测时间仅需5min,并且能够实现床旁快检,极大提高了临床诊断效率。

附图说明

[0022] 图1为本发明实施例1制备的试纸条的结构示意图;

图中:1.样品垫;2.结合垫;3.硝酸纤维素膜;4.吸水垫;5.底板。

[0023] 图2为本发明实施例1制备的试纸条线性标准品的浓度-T/C值标准曲线图；
图3为本发明实施例1中试纸条显示测试结果的照片；
图4为本发明实施例2中不同保护液制备的试纸条的荧光强度值；
图5为本发明实施例2中不同保护液制备的试纸条的荧光照片；
图6为本发明实施例4中采用ELISA法对本发明试纸条定量检测结果进行验证时得到的相关性曲线。

具体实施方式

[0024] 下面通过具体实施例对本发明作进一步说明。以下实施例中采用的MP0单克隆抗体、MP0标准品和MP0质控品、荧光微球、硝酸纤维素膜等均由河南省生物工程技术研究中心提供。荧光层析读数仪的型号为：FIC-2016-A5。

[0025] 实施例1

采用如下方法制备MP0抗体-荧光免疫层析定量检测试纸条：

a. 采用EDC法制备述MP0抗体-荧光微球复合物：

取15ul 荧光微球加入0.6ml 0.05mol/l pH8.0 硼酸盐缓冲液中，旋涡震荡混匀；加入40ul 4mg/ml的EDC，室温震荡活化30min；在活化后的微球溶液中，加入125μg MP0标记抗体，偶联90min；将偶联好的免疫微球复合物，用保护液进行复溶，所述保护液的组成为0.05M pH8.0 Tris-HCl缓冲液、0.5%T-20、0.2%BSA、0.5%酪蛋白、4%海藻糖和0.05%NaN₃，然后用封闭液（包含10%的BSA，0.05%的NaN₃）封闭2h，得到MP0抗体-荧光微球复合物。

[0026] b. 制备组装试纸条：

(1) 将玻璃纤维构件浸在处理液中，处理液包括工作浓度为0.01M、pH为8.0的 Tris-HCl缓冲液，质量浓度为0.1~0.5%的BSA，质量浓度为0.05%~0.5%的吐温20，以及质量浓度为3%蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃，浸泡后干燥，作为结合垫；

(2) 用包被稀释液将MP0单克隆抗体稀释至2mg/ml，将羊抗鼠IgG抗体稀释至1.5mg/ml，膜液量为1-2μl/cm，将它们分别作为检测线(T线)和质控线(C线)均匀划于硝酸纤维素膜上，检测线(T线)和质控线(C线)间隔为5mm，置于干燥间中，于温度37℃，湿度10%下烘干不低于8h；

(3) 将样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫4依次搭接组装在底板5(PVC板)上，其中，吸水垫和结合垫分别交叠压在硝酸纤维素膜的两端，并在硝酸纤维素膜的表面形成检测区；样品垫交叠压在结合垫上，组装后得到试纸大板，切割成宽3.9mm，制成试纸条，结构如图1所示。

[0027] c. 制备试纸卡：

采用具有塑料上壳和塑料下壳的长方形卡壳，将上述制成的试纸条装入卡壳内形成试纸卡，其中，上壳面上对应于硝酸纤维膜的位置设有观察窗，上壳面上对应于样品垫的位置设有加样孔，加样孔位于样品垫中间。

[0028] 对上述制备的试纸条功能性指标(线性)进行研究：

将上述制备的试纸条恢复室温，分别使用浓度为3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 600ng/ml的线性MP0标准品在试纸条上加样，将试纸卡放入仓内，5min后在荧光免疫层析读数仪上读取T线和C线的荧光强度值，以上述标准品浓度作为横坐标，T/C值作为纵

坐标,绘制标准曲线,如图2所示,线性范围为3.125~600ng/ml, R^2 达0.9841。试纸卡定性检测结果的图片如图3所示,其中存在三种判读结果:1)C线有荧光亮度出现,而T线无荧光亮度,判定结果为阴性或低于检测限(左侧);2)C和T线均显示荧光亮度,判定结果为阳性(中间);3)C线无荧光亮度出现,T线有或无荧光亮度,判定试纸条结果无效(右侧)。

[0029] 实施例2:反应条件优化

EDC量的优化:

取15 μ l 荧光微球加入0.6ml 0.05mol/l pH8.0 硼酸盐缓冲液中,旋涡震荡混匀;依次加入4mg/ml EDC各10、20、40、60、80 μ l,室温震荡活化30min,按实施例1的方法制备5组试纸条,用线性标准品分别加样检测,拟合获得标准方程,检测线性范围和 R^2 值,结果如表1所示:

表1

线性	EDC 量				
	40 μ g	80 μ g	160 μ g	240 μ g	320 μ g
线性范围 (ng/ml)	6.25~400	3.125~500	3.125~600	6.25~500	6.25~500
R^2	0.9432	0.9264	0.9803	0.9045	0.8779

如表1所示,在加入EDC 160 μ g条件下,线性最好,最佳线性范围3.125~600 ng/ml, $R^2=0.9803$ 。

[0030] 偶联蛋白量与偶联时间的优化:

在活化后的微球溶液中,依次加入75、100、125、150 μ g MP0标记抗体,按30min、60min、90min、120min时间分别偶联。按实施例1的方法制备不同偶联蛋白量和偶联时间的试纸条,用100ng/ml的质控品对不同条件试纸条重复检测3条,结果取3次平均T线荧光值,结果如表2所示。

[0031] 表2

偶联蛋白量 (μ g)	偶联时间 (h)			
	0.5	1	1.5	2
75	7238	7482	8444	8532
100	7451	7536	8495	8487
125	7764	7654	9101	8805
150	7832	8234	8578	8634

如表2所示,随着蛋白标记量的增加,T线荧光值逐渐上升;随着偶联时间增长,T线荧光值先升后降。偶联蛋白量125 μ g,偶联1.5h时,T线荧光值最高,最佳偶联蛋白量125 μ g,偶联1.5h。

[0032] 保护液组成优化:

将偶联好的免疫微球复合物,分别用4种保护液进行复溶:

- 1) 0.05M pH8.0 硼酸缓冲液,1%T-20,0.2%BSA,0.5%酪蛋白,4%海藻糖,0.05%NaN₃;
- 2) 0.05M pH8.0 Tris-HCl缓冲液,1%T-20,0.2%BSA,0.5%酪蛋白,4%海藻糖,0.05%NaN₃;
- 3) 0.05M pH8.0 硼酸缓冲液,0.5%T-20,0.2%BSA,0.5%酪蛋白,4%海藻糖,0.05%NaN₃;

4) 0.05M pH8.0 Tris-HCl缓冲液, 0.5%T-20, 0.2%BSA, 0.5%酪蛋白, 4%海藻糖, 0.05% NaN₃,

按实施例1的方法制备4组试纸条, 用100ng/ml的质控品重复检测3条, 取3次平均T线荧光值并在紫外分析仪下观察4个条件荧光现象, 结果如图4和图5所示。

[0033] 两种缓冲液相比, Tris-HCl缓冲液复溶效果最好, Tris-HCl缓冲液T线荧光值比硼酸缓冲液荧光值高(图4); 通过改变T-20的含量, 试纸条上聚集现象明显减少(图5)。最终确定4号为最佳保护液。

[0034] 实施例3

对本发明实施例1制备的试纸条进行稳定性检测:

将实施例1制备的试纸条分别保存在37℃和4℃环境下, 通过用线性标准品检测37℃、4℃保存的试纸条, 各个条件线性R²变化结果见表3。

[0035] 表3

温度 (℃)	保存时间 (d)	R ²
37	0	0.984
	2	0.983
	4	0.979
	6	0.976
	8	0.973
	10	0.968
4	0	0.984
	30	0.984
	60	0.982
	90	0.983
	120	0.980
	180	0.978

由表3可以看出, 本发明的试纸条在4℃保存条件下, 保存180天线性R²均能达到0.97以上, 稳定性良好。试纸条37℃保存条件下, 在保存10天时, R²值降低到0.96, 检测误差增大。在37℃存放1天接近于在4℃存放约45天的效果, 推测试纸条在4℃条件下至少可以储存8个月。

[0036] 实施例4 临床实验

样本情况: 临床样本由相关医院获得, 共45份血浆样本。

[0037] 检测步骤: 精确吸取7μl血清样本置于1.5ml离心管, 加入693μl样本稀释液(生理盐水)到离心管中。设置好荧光层析读数仪相关参数后, 将试纸条恢复室温后, 在加样孔位置加入待检样品70μL, 将试纸卡放入仓内, 5min后试纸条在荧光层析读数仪读取荧光强度值, 根据标准曲线计算MPO含量。

[0038] 用美国Cleveland HeartLab ELISA法平行检测上述45份血浆样本, 测定MPO含量在0~600ng/ml之间, 以荧光层析法检测浓度作为横坐标(X轴), ELISA法检测浓度作为纵坐标(Y轴), 绘制散点图, 进行线性回归分析, 结果如图6所示: 线性回归方程为: $y = 1.0164x + 11.825$, $R^2 = 0.9795$, 表明这两种检测方法具有良好的相关性, 可见, 本发明实施例1制备的试纸条很好地实现了MPO的定性检测, 准确度高, 检测速度快, 适合用于临床检测。

[0039] 对本发明的试纸条进行灵敏度实验

用生理盐水做空白对照, 重复测定20次, 获得T/C值, 并计算平均值(M)和标准差(SD),

根据零浓度和相邻标准品之间的浓度结果进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD的结果代入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检出限。结果:最低检出限0.9ng/ml,灵敏度高。

[0040] 对本发明的试纸条进行反应时间实验

用300 ng/ml、100ng/ml、10ng/ml质控品血清作为样本,在加样孔位置加入质控血清70 μ L,将试纸卡插入荧光定量检测仪中,每隔一分钟检测荧光强度,结果显示:三种质控品检测荧光值在5min左右后趋于稳定,本发明的试纸条检测速度快。

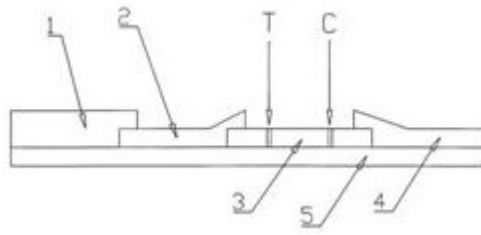


图1

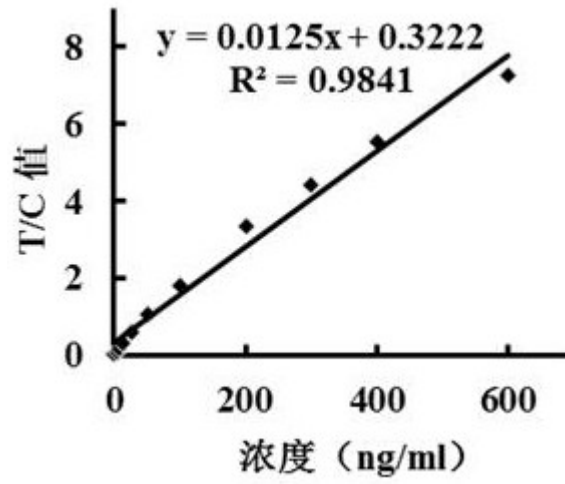


图2

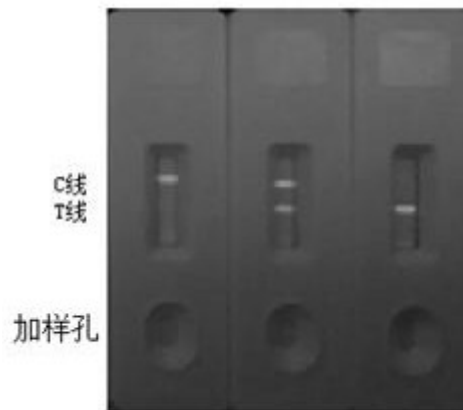


图3

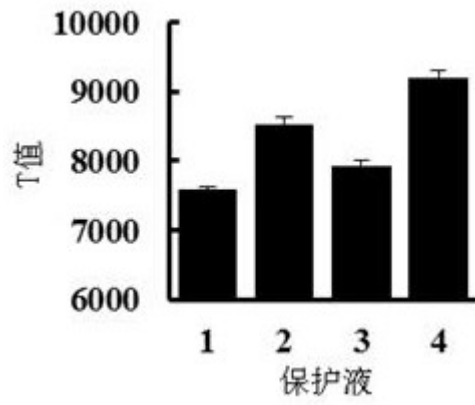


图4

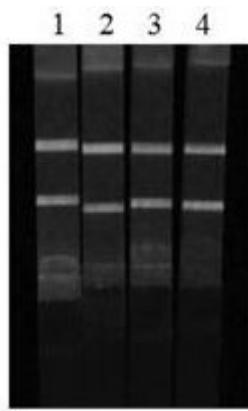


图5

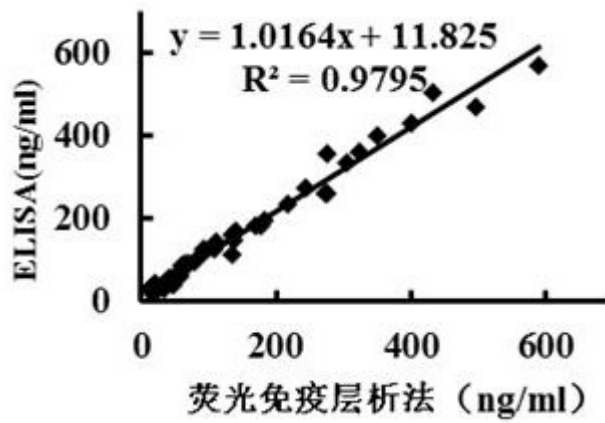


图6