



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107632159 B

(45)授权公告日 2020.05.12

(21)申请号 201710608436.2

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2017.07.24

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107632159 A

(56)对比文件

CN 104865390 A, 2015.08.26,

汪雨等. 羧基聚苯乙烯荧光微球的制备及其溶胀机制.《功能材料》.2017,第48卷(第6期),

Qinglai Yang et al. Rational Design of Molecular Fluorophores for Biological Imaging in the NIR-II Window.《Adv. Mater.》.2017,第29卷

Zhang XG et al. A New Method for Blood NT-proBNP Determination Based on a Near-infrared Point of Care Testing Device with High Sensitivity and Wide Scope.《Biomed Environ Sci.》.2017,第30卷(第6期),

审查员 王在竹

(43)申请公布日 2018.01.26

(73)专利权人 深圳清华大学研究院

地址 518057 广东省深圳市高新技术产业园南区深圳清华大学研究院

专利权人 深圳无微华斯生物科技有限公司  
纳迈达斯生物科技中心

(72)发明人 王国新 廖滔 唐梅杰 杨晴来  
赵肃

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11201

代理人 赵天月

(51)Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法

(57)摘要

本发明提出了免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法。所述免疫荧光层析检测试纸条包括：本体，所述本体上限定出依次相连的样品区、结合区、检测区、吸附区；荧光微球标记的第一抗体，所述第一抗体包被于所述结合区，所述第一抗体特异性识别待测物；检测线和质控线，所述检测线和质控线设置在所述检测区中；第二抗体，所述第二抗体包被于所述检测线上，所述第二抗体特异性识别所述待测物；以及第三抗体，所述第三抗体包被于所述质控线上，所述第三抗体特异性识别所述第一抗体，其中，所述荧光微球为近红外II区高分子荧光微球。利用本发明的免疫荧光层析检测试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

1. 一种免疫荧光层析检测试纸条,其特征在于,包括:

本体,所述本体上限定出依次相连的样品区、结合区、检测区、吸附区;

荧光微球标记的第一抗体,所述第一抗体包被于所述结合区,所述第一抗体特异性识别待测物;

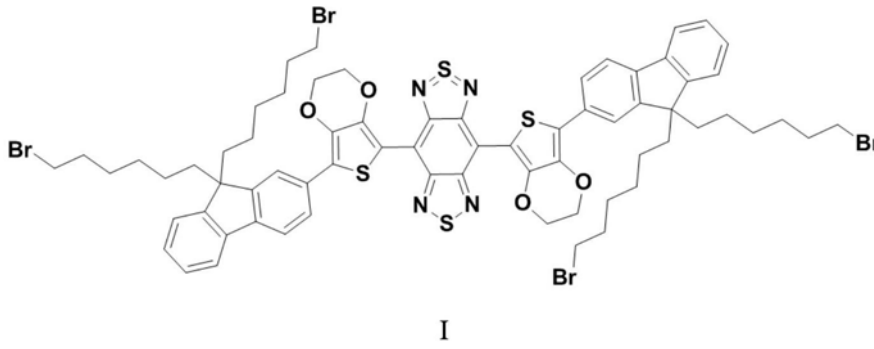
检测线和质控线,所述检测线和质控线设置在所述检测区中,且所述检测线靠近所述结合区;

第二抗体,所述第二抗体包被于所述检测线上,所述第二抗体特异性识别所述待测物;以及

第三抗体,所述第三抗体包被于所述质控线上,所述第三抗体特异性识别所述第一抗体,

其中,所述荧光微球为近红外II区高分子荧光微球,所述近红外II区高分子荧光微球是通过下列方法获得的:

(1) 将荧光染料溶解于二氯甲烷中,以便得到浓度为20mg/mL的染料溶液,所述荧光染料具有式I所示结构



(2) 将190ml水加入至烧瓶中,70度水浴,然后加入16mg SDS作为乳化剂、0.05g碳酸氢钠作为缓冲试剂,搅拌后往烧瓶中加入8ml苯乙烯和0.8mL丙烯酸,一小时后加入0.2g过硫酸钾,氮气保护下聚合反应18小时,反应结束后用乙醇和水溶液离心洗涤,得到羧基聚苯乙烯微球,将所述羧基聚苯乙烯微球分散在SDS水溶液中,以便得到微球载体溶液,其中,所述羧基聚苯乙烯微球的粒径为20nm~1000nm;

(3) 将2mL浓度为20mg/mL的所述荧光染料溶液加入烧瓶中与20mL的30mg/ml的所述微球载体溶液超声混合,并于40摄氏度下磁力搅拌6h;将混合物溶液于50摄氏度水浴中磁力搅拌,使混合物溶液中的二氯甲烷完全挥发;所得产物离心分离后用乙醇超声清洗,再用水超声清洗,以便获得所述近红外II区高分子荧光微球。

2. 根据权利要求1所述的免疫荧光层析检测试纸条,其特征在于,所述待测物为心肌肌钙蛋白,

所述第一抗体为心肌肌钙蛋白抗体1;

所述第二抗体为心肌肌钙蛋白抗体2,

所述第三抗体为二抗。

3. 根据权利要求1所述的免疫荧光层析检测试纸条,其特征在于,所述第三抗体为羊抗鼠抗体。

4. 一种免疫荧光层析检测系统,其特征在于,包括:

荧光免疫分析仪;以及

权利要求1~3任一项所述的免疫荧光层析检测试纸条。

5. 一种非诊断目的确定样品中待测物含量的方法,其特征在于,包括:

(1) 将所述样品施加至权利要求1~3任一项所述的免疫荧光层析检测试纸条的样品区内;

(2) 确定所述免疫荧光层析检测试纸条的荧光信号;以及

(3) 基于所述免疫荧光层析检测试纸条的荧光信号,确定所述样品中待测物含量。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述样品为血清样品。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,利用荧光免疫分析仪确定所述荧光信号。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述荧光免疫分析仪采用800nm的长波通滤色片。

9. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,在步骤(2)中,同时确定所述检测线的荧光信号和所述质控线的荧光信号,

在步骤(3)中,基于所述检测线的荧光信号与所述质控线的荧光信号的比值,确定所述样品中所述待测物的含量。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,利用标准曲线,基于所述检测线的荧光信号与所述质控线的荧光信号的比值,确定所述样品中所述待测物的含量。

## 免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物领域。具体地，本发明涉及免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法。

### 背景技术

[0002] 聚合物荧光微球作为一种特殊的功能微球，每个微球中可包裹数万甚至数十万个荧光分子，可大大提高荧光的标记效率，增强荧光分子的抗光漂白性能，极大地提高分析灵敏度；同时荧光微球表面可非常灵活地修饰多种功能基团（如羧基、氨基、醛基等），有利于与蛋白或抗体的共价偶联和提高标记物的稳定性和标记效率。目前，荧光微球已广泛应用于标记、示踪、检测、成像、固定化酶、免疫医学、高通量药物筛选等。但是，传统荧光微球的发射均在可见光区域（发射波长小于780nm），将其应用在生物活体、细胞或组织成像和体外诊断等领域时，容易造成荧光穿透性能差，背景荧光强。同时，由于其荧光量子效率普遍较低、激发和发射波长比较靠近（通常在20nm左右）等原因引起分析灵敏度降低，对荧光检测所需滤色片的要求很高。

[0003] 因此，聚合物荧光微球有待进一步研究改进。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此，本发明的一个目的在于提出一种免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统、确定样品中待测物含量的方法。本发明的免疫荧光层析检测试纸条上包被有荧光微球标记的抗体，该荧光微球的荧光量子效率高，且激发（365nm或740nm）和发射（900-1400nm）的波长，荧光检测时具有穿透能力强、背景干扰小的特点，从而使得检测结果的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0005] 本发明主要是基于以下发现完成的：传统荧光微球荧光穿透性能差，背景荧光强，且由于荧光量子效率低、激发和发射波长比较靠近等原因，引起分析灵敏度降低、对滤色片要求很高。近红外荧光微球，尤其是近红外II区荧光微球荧光发射具有穿透力强、背景干扰小等特点，在活体成像、生物标记检测等方面具有良好的应用前景。然而，目前制备近红外II区荧光微球的方法仍具有局限性，例如针对疏水性强的荧光染料，无法直接应用于活体成像，必须先进行亲水性改性，这种改性过程不仅步骤繁琐，且改性后的荧光染料分散在水溶液中后，其量子效率大幅度降低，严重影响荧光检测时的灵敏度。

[0006] 有鉴于此，发明人发现可以利用溶胀法将荧光染料包裹在聚合物微球内部，效果非常理想，该微球荧光量子效率可达到20%以上，在水溶液中可良好分散，方便各种生物大分子的标记，且针对不同荧光染料具有广泛适用性。进一步地，将获得的荧光微球标记于抗体上，并将该抗体包被于试纸条的结合区，从而使得利用该试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0007] 为此,在本发明的一个方面,本发明提出了一种免疫荧光层析检测试纸条。根据本发明的实施例,所述试纸条包括:本体,所述本体上限定出依次相连的样品区、结合区、检测区、吸附区;荧光微球标记的第一抗体,所述第一抗体包被于所述结合区,所述第一抗体特异性识别待测物;检测线和质控线,所述检测线和质控线设置在所述检测区中,且所述检测线靠近结合区;第二抗体,所述第二抗体包被于所述检测线上,所述第二抗体特异性识别所述待测物;以及第三抗体,所述第三抗体包被于所述质控线上,所述第三抗体特异性识别所述第一抗体,其中,所述荧光微球为近红外II区高分子荧光微球,所述近红外II区高分子荧光微球是通过下列方法获得的:

[0008] (1) 利用与水不混溶的有机溶剂对荧光染料进行溶解,以便得到荧光染料溶液;

[0009] (2) 将高分子微球分散于十二烷基磺酸钠水溶液中,以便得到微球载体溶液;

[0010] (3) 将所述荧光染料溶液与所述微球载体溶液混合并进行超声处理,以便得到乳化混合液;

[0011] (4) 将所述乳化混合液进行溶胀,以便使所述荧光染料溶液浸入所述高分子微球溶胀过程中产生的纳米孔内;以及

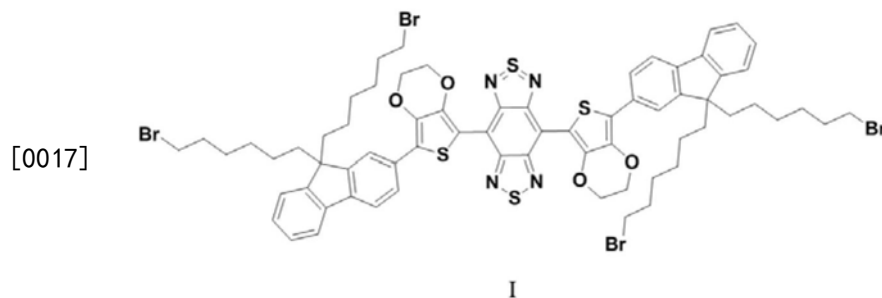
[0012] (5) 对步骤(4)中所得混合物进行加热,随着所述有机溶剂的挥发,所述荧光染料结晶析出并被包裹在所述纳米孔内,以便获得所述近红外II区高分子荧光微球。

[0013] 根据本发明上述实施例的近红外II区高分子荧光微球的制备方法,首先利用有机溶剂对荧光染料进行溶解并得到荧光染料溶液,然后将荧光染料溶液与微球载体溶液混合后依次进行超声处理、溶胀和加热,使荧光染料被成功地包裹在高分子荧光微球的内部,最终得到近红外II区高分子荧光微球。本发明上述实施例的近红外II区高分子荧光微球的制备方法过程简单、快速,且制备出的近红外II区高分子荧光微球在水溶液中具有较好的分散性、量子效率高达25%、激发(365nm或740nm)和发射(900-1400nm)的波长。由此,通过采用本发明实施例的近红外II区高分子荧光微球的制备方法,针对不同荧光染料具有广泛适用性,而且制备得到的近红外II区高分子荧光微球在荧光检测时还具有穿透能力强、背景干扰小的特点,能够极大地放大荧光信号,提高检测灵敏度,在活体成像、生物标记等方面具有良好的应用前景。

[0014] 进一步地,将获得的荧光微球标记于抗体上,并将该抗体包被于试纸条的结合区,从而使得利用该试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0015] 根据本发明的实施例,上述免疫荧光层析检测试纸条还可以具有下列附加技术特征:

[0016] 根据本发明的实施例,所述荧光染料具有式I所示结构



由此,利用根据本发明实

施例的免疫荧光层析检测试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0018] 根据本发明的实施例,待测物为心肌钙蛋白,所述第一抗体为心肌钙蛋白抗体1;所述第二抗体为心肌钙蛋白抗体2,所述第一抗体和第二抗体上特异性识别所述待测物的位点并不相同,所述第三抗体为二抗,优选羊抗鼠抗体。由此,利用根据本发明实施例的免疫荧光层析检测试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0019] 根据本发明的实施例,所述荧光染料溶液中所述荧光染料的浓度为1-50mg/mL。由此,可以使高分子微球能够包裹更多的荧光染料,进而进一步提高检测的灵敏度。

[0020] 根据本发明的实施例,所述有机溶剂为选自乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、1,2-二氯乙烷和芳烃中的至少一种,优选二氯甲烷。

[0021] 根据本发明的实施例,所述高分子微球为聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸甲酯微球、聚甲醛微球、聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球中的至少一种,这些微球可良好地分散于水溶液中,同时表面可灵活地修饰各类基团,方便后续偶联。由此,可以有效制备得到具有穿透能力强、背景干扰小,且在水溶液中分散性强的近红外II区高分子荧光微球。

[0022] 根据本发明的实施例,所述高分子微球的粒径为20nm~1000nm。由此,可以进一步提高高分子微球包裹荧光染料的能力,进而能够进一步提高检测的灵敏度。

[0023] 根据本发明的实施例,步骤(2)中,将所述高分子微球按照10-200mg/ml的质量体积比分散于所述十二烷基磺酸钠水溶液中。由此,不仅可以保证高分子微球稳定地分散于溶液中,还可以使高分子微球在后续的溶胀过程中充分与二氯甲烷接触,进而能够最大限度地溶胀。

[0024] 根据本发明的实施例,所述荧光染料溶液与所述微球载体溶液的体积比为1:(5-20)。由此适量的二氯甲烷能够使得高分子微球充分溶胀,进而提高荧光染料的包封率,提高近红外II区高分子荧光微球质量。

[0025] 根据本发明的实施例,所述荧光染料与所述高分子微球的质量比为(0.1-30):100。由此,每个微球中可包裹数十万至数千万个荧光分子,极大地提高检测灵敏度。

[0026] 根据本发明的实施例,步骤(4),所述溶胀是在10-50摄氏度下搅拌1-10小时完成的。由此,可以使高分子荧光微球在二氯甲烷的作用下充分溶胀,从而使荧光染料能够顺利地浸入高分子微球溶胀过程中产生的纳米孔内。

[0027] 根据本发明的实施例,步骤(5)中,所述加热的温度为50-90摄氏度。由此,可以在较短时间内使二氯甲烷挥发完全。

[0028] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种免疫荧光层析检测系统。根据本发明的实施例,所述系统包括:荧光免疫分析仪;以及前面所述的荧光免疫检测试纸条。本发明的试纸条能够产生荧光检测信号,通过荧光免疫分析仪对信号进行分析,以便实现对待测物的定性/定量检测。如前所述,利用根据本发明实施例的免疫荧光层析检测系统检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0029] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种确定样品中待测物含量的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:(1)将所述样品施加至前面所述的免疫荧光检测试纸条的样品区内;(2)确定所述免疫荧光检测试纸条的荧光信号;以及(3)基于所述免疫荧光检测试纸条的荧光信号,确定所述样品中待测物含量。由此,利用根据本发明实施例的确定样品中待测物含量的方法准确性强、灵敏度高、精密度高,且操作简便。

[0030] 根据本发明的实施例,所述样品为血清样品。

[0031] 根据本发明的实施例,利用荧光免疫分析仪确定所述荧光信号。

[0032] 根据本发明的实施例,所述荧光免疫分析仪采用800nm的长波通滤色片。由此,能够产生强烈荧光,便于观察和确定荧光强度。

[0033] 根据本发明的实施例,在步骤(2)中,同时确定所述检测线的荧光信号和所述质控线的荧光信号,在步骤(3)中,基于所述检测线的荧光信号与所述质控线的荧光信号的比值,确定所述样品中所述待测物的含量。

[0034] 根据本发明的实施例,利用标准曲线,基于所述检测线的荧光信号与所述质控线的荧光信号的比值,确定所述样品中所述待测物的含量,其中,所述标准曲线是采用:含量分别为50、25、12.5、6.25、3.2、2.0、1.0、0.5、0.2、0ng/mL心肌肌钙蛋白的标准品确定的。由此,以便提高检测结果的准确性。

### 附图说明

[0035] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0036] 图1显示了根据本发明一个实施例的免疫荧光层析检测试纸条的结构示意图;

[0037] 图2显示了根据本发明一个实施例的近红外II区高分子荧光微球的制备方法流程图;

[0038] 图3显示了根据本发明另一个实施例的近红外II区高分子荧光微球的制备方法流程图;

[0039] 图4显示了用于制备本发明实施例的近红外II区高分子荧光微球的荧光染料的吸收光谱和发射的荧光光谱图;

[0040] 图5显示了根据本发明一个实施例的羧基聚苯乙烯颗粒和羧基聚苯乙烯荧光微球的扫描电镜图;

[0041] 图6显示了根据本发明一个实施例的羧基聚苯乙烯微球分散液、染料溶液和羧基聚苯乙烯荧光微球液;

[0042] 图7显示了根据本发明一个实施例的羧基聚苯乙烯荧光微球在740nm光的照射下的荧光照片和荧光光谱图;

[0043] 图8显示了根据本发明另一个实施例的免疫荧光层析检测试纸条的结构示意图;

[0044] 图9显示了根据本发明另一个实施例的近红外荧光免疫试纸条阅读仪的结构示意图和分析图;

[0045] 图10显示了根据本发明一个实施例的荧光信号图;

[0046] 图11显示了根据本发明一个实施例的荧光强度曲线图;

[0047] 图12显示了根据本发明一个实施例的标准曲线图;以及

[0048] 图13显示了根据本发明一个实施例的免疫层析检测结果与临床检测结果的分析图。

### 具体实施方式

[0049] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0050] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0051] 本发明提出了一种免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法,下面将分别对其进行详细描述。

[0052] 免疫荧光层析检测试纸条

[0053] 在本发明的一个方面,本发明提出了一种免疫荧光层析检测试纸条。利用本发明的免疫荧光层析试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。为了方便理解,下面将结合图1进行详细描述。

[0054] 根据本发明的实施例,该免疫荧光层析检测试纸条包括:

[0055] 本体1,该本体上限定出依次相连的样品区100、结合区200、检测区300、吸附区400;

[0056] 荧光微球标记的第一抗体,第一抗体包被于结合区200,第一抗体特异性识别待测物;

[0057] 检测线310和质控线320,检测线310和质控线320设置在检测区200中,且检测线310靠近结合区200;

[0058] 第二抗体,第二抗体包被于检测线310上,第二抗体特异性识别待测物;以及

[0059] 第三抗体,第三抗体包被于质控线320上,第三抗体特异性识别第一抗体。

[0060] 为了方便理解,下面简要阐述利用本发明的免疫荧光层析检测试纸条的检测原理:

[0061] 结合区上荧光微球标记的第一抗体与检测线(亦称作T线)上包被的第二抗体分别与待测物(抗原)的两个不同位点结合。例如,针对阳性样本,在吸附区的毛细管作用力下,样品区上滴加的待测物首先与结合区上的荧光微球标记的第一抗体特异性结合,荧光微球-第一抗体-抗原再通过检测线,检测线上附着的第二抗体再与抗原表面的另一位点结合,形成三明治夹心结构。随着时间的推移,待测物逐渐增多,检测线上的荧光强度越高。未结合在检测线上的荧光微球标记第一抗体继续层析,由于质控线(亦称作C线)上的第三抗体与抗原不存在相互作用,当荧光微球标记第一抗体到达质控线时,与质控线上包被的第三抗体特异性结合并不断累积,直到显色。所体现的阳性结果为:检测线和质控线都显色;阴性结果为:检测线变浅或消失,质控线显色;质控线不显色则为失效。

[0062] 根据本发明的实施例,待测物为心肌肌钙蛋白,第一抗体为心肌肌钙蛋白抗体1(anti-CTNI1);第二抗体为心肌肌钙蛋白抗体2(anti-CTNI2),第一抗体和第二抗体上特异性识别待测物的位点并不相同,第三抗体为二抗,优选羊抗鼠抗体。

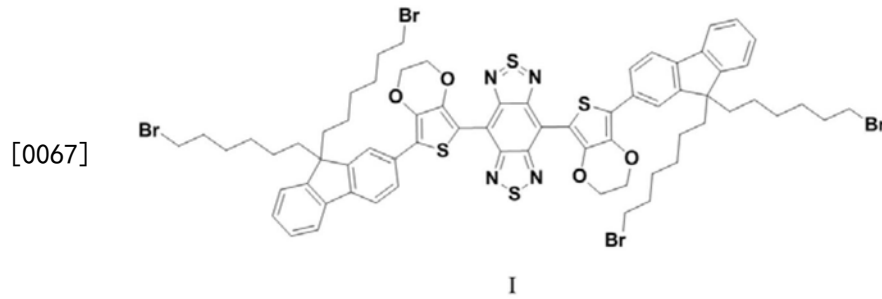
[0063] 根据本发明的实施例,荧光微球为近红外II区高分子荧光微球,参考图2和3,近红外II区高分子荧光微球是通过下列方法获得的:

[0064] S100:制备荧光染料溶液

[0065] 根据本发明的实施例,利用与水不混溶的有机溶剂对荧光染料进行溶解,以便得到荧光染料溶液。

[0066] 需要说明的是,本发明对于荧光染料的种类不作严格限定,只要能够在近红外II

区产生可检测信号即可。根据本发明的具体实施例,所述荧光染料具有式I所示结构



[0068] 发明人意外发现,具有式I所示结构的荧光染料在365nm和740nm处有强烈的吸收,在此激发光下可以发射900-1400nm的荧光,其吸收光谱和发射的荧光光谱分别如图4(A)和图4(B)所示。由于其激发(740nm)和发射(900-1400nm)波长长,在活体成像应用中具有穿透距离大(几毫米)、背景荧光低等诸多优点,可以替代近红外荧光微球用于生物活体、细胞或组织成像和体外诊断等领域。但是,其本身疏水性强,无法直接应用于活体成像。进而,利用溶胀法将荧光染料包裹在分子微球内部,效果非常理想,该微球荧光量子效率可达到20%以上,在水溶液中可良好分散,方便各种生物大分子的标记。本发明通过采用该荧光染料制备得到的近红外II区高分子荧光微球具有穿透能力强、背景干扰小的特点,在活体成像、生物标记等方面具有良好的应用前景。进一步地,将获得的荧光微球标记于抗体上,并将该抗体包被于试纸条的结合区,从而使得利用该试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0069] 根据本发明的具体实施例,首先制备的荧光染料溶液中荧光染料的浓度可以为1  
[0070] -50mg/mL。由此,可以使高分子微球能够包裹更多的荧光染料,从而使制备得到的近红外II区高分子荧光微球在进行荧光检测时可以具有更高的荧光强度,进而进一步提高检测的灵敏度。

[0071] 根据本发明的具体实施例,有机溶剂可以为选自乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、1,2-二氯乙烷和芳烃中的至少一种。根据本发明的具体示例,有机溶剂优选二氯甲烷。由此通过采用二氯甲烷可以进一步促进高分子微球溶胀,进而提高荧光染料的包封率。

[0072] S200:制备微球载体溶液

[0073] 根据本发明的实施例,将高分子微球分散于十二烷基磺酸钠水溶液中,以便得到微球载体溶液。

[0074] 根据本发明的具体实施例,高分子微球可以为聚苯乙烯微球、聚甲基丙烯酸甲酯微球、聚甲醛微球、聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球中的至少一种。由于上述高分子微球的内部均为疏水性,因此恰好可以很好地将上述疏水性荧光染料包裹在其内部而不会泄漏出来。并且一个高分子颗粒可以包裹数万甚至数十万个荧光分子,其外部由于电荷或亲水基团作用可良好地分散于水溶液中。由此,通过采用上述高分子微球可以有效制备得到具有穿透能力强、背景干扰小,且在水溶液中分散性强的近红外II区高分子荧光微球。根据本发明的具体实施例,高分子微球的粒径可以为20nm-1000nm。由此,可以进一步提高高分子微球包裹荧光染料的能力,使制备得到的近红外II区高分子荧光微球在进行荧光检测时可以具有更高的荧光强度,进而进一步提高检测的灵敏度。根据本发明的具体实施例,十二烷基磺酸钠水溶液的浓度可以为0.25%。本发明中采用十二烷基磺酸钠水溶液作为乳化剂,由

此,通过选用上述浓度的十二烷基磺酸钠水溶液,不仅可以使高分子微球能够更好地分散于十二烷基磺酸钠水溶液中,而且还有利于后续超声处理中得到均匀地乳化混合液。

[0075] 根据本发明的具体实施例,可以将高分子微球按照10-200mg/ml的质量体积比分散于十二烷基磺酸钠水溶液中。发明人发现,将当高分子微球按照10-200mg/ml的质量体积比分散于十二烷基磺酸钠水溶液中时,不仅可以有效提高近红外II去高分子荧光微球的产率,还可以使高分子微球在后续的溶胀过程中能够最大限度地溶胀,进一步提高高分子微球包裹荧光染料的能力,使制备得到的近红外II区高分子荧光微球在进行荧光检测时可以具有更高的荧光强度,进而能够进一步提高检测的灵敏度。

[0076] S300:超声处理得到乳化混合液

[0077] 根据本发明的实施例,将荧光染料溶液与微球载体溶液混合并进行超声处理,以便得到乳化混合液。

[0078] 根据本发明的具体实施例,荧光染料溶液与微球载体溶液的体积比可以为1:(5-20)。由此,荧光染料溶液适量的二氯甲烷能够使得微球载体溶液中的全部高分子微球得到充分溶胀,进而使荧光染料溶液能够充分进入高分子微球溶胀过程中产生的纳米孔内,提高高分子微球对荧光染料的包裹能力,最终制备得到品质高的近红外II去高分子荧光微球使制备得到的近红外II区高分子荧光微球在进行荧光检测时可以具有更高的荧光强度,进而能够进一步提高检测的灵敏度。

[0079] 根据本发明的具体实施例,荧光染料与高分子微球的质量比为(0.1-30):100。由此,可以进一步将荧光染料与高分子微球的用量进行匹配,提高原料利用率,避免原料浪费。另外,采用上述质量比还可以使荧光染料溶液能够充分进入后续高分子微球溶胀过程中产生的纳米孔内,以便进一步提高高分子微球对荧光染料的包裹能力,使制备得到的近红外II区高分子荧光微球在进行荧光检测时可以具有更高的荧光强度,进而能够进一步提高检测的灵敏度。

[0080] S400:乳化混合液溶胀

[0081] 根据本发明的实施例,将乳化混合液进行溶胀,以便使荧光染料溶液浸入高分子微球溶胀过程中产生的纳米孔内。

[0082] 发明人发现,针对疏水性强的荧光染料,无法直接应用于活体成像,必须要先进行亲水性改性。而这种改性过程步骤繁琐,且改性后的荧光染料分散在水溶液中后,其量子效率大幅度降低。而高分子微球内部疏水,疏水性荧光染料可稳定地包裹在其内部而不会泄漏出来,一个高分子颗粒可以包裹数万甚至数十万个荧光分子,而且其外部由于电荷或亲水基团作用可良好地分散于水溶液中。同时,其外部可灵活地修饰各种功能基团,方便蛋白、DNA等分子的标记。由此,发明人通过采用溶胀法将其包裹于高分子微球内部并得到近红外II区高分子荧光微球,该荧光微球荧光量子效率可达到20%以上,在水溶液中可良好分散,方便各种生物大分子的标记。

[0083] 根据本发明的具体实施例,溶胀可以在10-50摄氏度下搅拌1-10小时完成的。由此,可以使高分子荧光微球在二氯甲烷的作用下充分溶胀,从而使荧光染料能够顺利地浸入高分子微球溶胀过程中产生的纳米孔内,进而使制备得到的近红外II区高分子荧光微球在进行荧光检测时可以具有更高的荧光强度。

[0084] S500:加热挥发有机溶剂

[0085] 根据本发明的实施例,对溶胀得到的混合物进行加热,随着有机溶剂的挥发,荧光染料结晶析出并被包裹在纳米孔内,以便获得近红外II区高分子荧光微球。

[0086] 根据本发明的具体实施例,在加热过程中,有机溶剂慢慢挥发,高分子微球表面的纳米孔伴随着收缩,同时疏水性荧光染料结晶析出,形成疏水颗粒,被包裹在微球内部。有机溶剂挥发完全后,得到近红外II区高分子荧光微球,且包裹在近红外II区高分子荧光微球中的荧光染料在水溶液中几乎不泄露。

[0087] 根据本发明的具体实施例,加热的温度可以为50-90摄氏度。由此,有机溶剂优选二氯甲烷能迅速地从溶液中完全挥发,进而提高近红外II区高分子荧光微球的制备效率。

[0088] 根据本发明的具体实施例,加热可以在50-90摄氏度的水浴中磁力搅拌进行。由此,可以进一步提高二氯甲烷的挥发速率,使二氯甲烷完全挥发,提高近红外II区高分子荧光微球的制备效率。

[0089] 根据本发明的具体实施例,近红外II区高分子荧光微球的制备方法还可以进一步包括:依次采用乙醇和水对得到的近红外II区高分子荧光微球进行超声清洗。

[0090] 根据本发明的具体实施例,将特定数量的采用本发明上述实施例的制备方法得到的近红外II区高分子荧光微球溶解于二氯甲烷中,测得其荧光强度,根据标准曲线计算出每个颗粒中包含的荧光染料分子数目约为8万个。由此,相对于小分子荧光染料,用近红外II区高分子荧光微球做标记可极大地放大荧光信号,提高检测灵敏度。

[0091] 免疫荧光层析检测系统

[0092] 根据本发明的实施例,该系统包括:荧光免疫分析仪;以及前面所述的荧光免疫检测试纸条。本发明的试纸条能够产生荧光检测信号,通过荧光免疫分析仪对信号进行分析,以便实现对待测物的定性/定量检测。如前所述,利用根据本发明实施例的免疫荧光层析检测系统检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

[0093] 本领域技术人员能够理解的是,前面针对免疫荧光层析检测试纸条所描述的特征和优点,同样适用于该免疫荧光层析检测系统,在此不再赘述。

[0094] 确定样品中待测物含量的方法

[0095] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种确定样品中待测物含量的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:(1)将样品施加至前面所述的免疫荧光检测试纸条的样品区内;(2)确定免疫荧光检测试纸条的荧光信号;以及(3)基于免疫荧光检测试纸条的荧光信号,确定样品中待测物含量。由此,利用根据本发明实施例的确定样品中待测物含量的方法准确性强、灵敏度高、精密度高,且操作简便。

[0096] 根据本发明的实施例,样品为血清样品。由此,方便取样,且检测结果的准确性强。

[0097] 根据本发明的实施例,利用荧光免疫分析仪确定荧光信号。

[0098] 根据本发明的实施例,荧光免疫分析仪采用800nm的长波通滤色片。由此,能够产生强烈荧光,便于观察和确定荧光强度。

[0099] 根据本发明的实施例,在步骤(2)中,同时确定检测线的荧光信号和质控线的荧光信号,在步骤(3)中,基于检测线的荧光信号与质控线的荧光信号的比值,确定样品中所述待测物的含量。

[0100] 根据本发明的实施例,利用标准曲线,基于检测线的荧光信号与质控线的荧光信号的比值,确定样品中待测物的含量,其中,标准曲线是采用:含量分别为50、25、12.5、

6.25、3.2、2.0、1.0、0.5、0.2、0ng/mL心肌肌钙蛋白的标准品确定的。由此,以便提高检测结果的准确性。

[0101] 本领域技术人员能够理解的是,前面针对免疫荧光层析检测试纸条所描述的特征和优点,同样适用于该确定样品中待测物含量的方法,在此不再赘述。

[0102] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0103] 实施例1

[0104] (1) 羧基聚苯乙烯微球的合成

[0105] 将190ml水加入至500mL毫升圆底烧瓶中,70度水浴中350rpm搅拌半小时。然后加入16mg SDS作为乳化剂,0.05g碳酸氢钠作为缓冲试剂。继续搅拌10分钟后往烧瓶中加入8ml苯乙烯和0.8mL丙烯酸。一小时后加入0.2g过硫酸钾,氮气保护下聚合反应18小时。反应结束后用2:1 (v/v) 乙醇和水溶液离心洗涤3次,得到羧基聚苯乙烯微球,其扫描电镜图如图5 (A) 所示。然后将羧基聚苯乙烯微球分散在浓度为0.25% (w/v) 的SDS水溶液中,配置成为30mg/ml的羧基聚苯乙烯微球分散液,如图6 (A) 所示,并于4度冰箱中保存。

[0106] (2) 近红外II区羧基聚苯乙烯荧光微球的合成

[0107] 取近红外II区荧光染料40mg溶解于2mL二氯甲烷中,以便得到浓度为20mg/mL的染料溶液,如图6 (B) 所示;取步骤(1)制备的羧基聚苯乙烯微球分散液20mL于50mL平底锥口烧瓶中,超声5min混匀;将上述2mL的染料溶液加入平底锥口烧瓶中与20mL的羧基聚苯乙烯微球分散液超声混合,并于40摄氏度下磁力搅拌6h,以使羧基聚苯乙烯微球充分溶胀,染料溶液进入羧基聚苯乙烯微球溶胀后产生的微孔内;将混合物溶液于50摄氏度水浴中磁力搅拌过夜,使混合物溶液中的二氯甲烷完全挥发;所得产物离心分离后用乙醇超声清洗3次,再用水超声清洗数次,直至离心后上清溶液中几乎不含荧光染料,得到近红外II区羧基聚苯乙烯荧光微球产品。将近红外II区羧基聚苯乙烯荧光微球产品分散在水中(5%w/v),4度冰箱中保存,如图6 (C) 所示。

[0108] (3) 对制备得到的羧基聚苯乙烯荧光微球产品的评价

[0109] 1)、图6 (A) 显示了分散在SDS水溶液中的羧基聚苯乙烯颗粒图呈白色;图6 (B) 显示了溶解在二氯甲烷中的荧光染料呈青色;而图6 (C) 显示了包裹荧光染料的羧基聚苯乙烯荧光微球产品呈青色。由此,从颜色的变化可以说明荧光染料已被成功地包裹在微球内部,同时颗粒表面的性质未发生大的改变。并且从图6 (C) 中可以看出合成的近红外II区羧基聚苯乙烯荧光微球可稳定地分散在水溶液中。

[0110] 2)、对羧基聚苯乙烯荧光微球产品进行电镜扫描,扫描电镜图如图5 (B) 所示。从图5中可以看出,羧基聚苯乙烯颗粒包裹荧光染料前后颗粒形貌未发生明显改变,且合成后的荧光微球大小均一,无任何聚集现象。

[0111] 3)、采用740nm激发光照射羧基聚苯乙烯荧光微球产品得到的荧光照片和荧光光谱图分别如图7 (A)、图7 (B) 所示。图中显示该荧光微球在800-1400nm处发出强烈的荧光,通过测量,其量子效率高达25%。

[0112] (4) 羧基聚苯乙烯荧光微球产品的应用

[0113] 1) 近红外II区羧基聚苯乙烯荧光微球偶联抗体

[0114] 将上述制备得到的近红外II区羧基聚苯乙烯荧光微球用分散剂MES (10mM pH=6.2), 配置成1% (w/v) 的均匀分散液。向分散液中加入EDC (5mg/mL) 和sulfo-NHS (5mg/mL), 活化15min。离心丢弃上清液, 重新分散于MES (10mM pH=6.5) 中, 往溶液中加入0.4mg/mL的anti-CTNI1鼠源单抗, 搅拌反应2h。离心分离, 弃上清, 将颗粒分散于超声分散在20mM PBS (0.5%酪蛋白、2.5%BSA、1%蔗糖、2%PEG-2000和0.03wt%NaN<sub>3</sub>, pH=8.0) 中, 配置成1% (w/v) 固含量的抗体结合荧光微球分散液, 于4度冰箱中保存备用。

[0115] 2) 免疫荧光层析试纸条制作

[0116] 免疫荧光层析试纸条主要由五部分组成: 包括塑料支撑壳、样品垫、结合垫、吸附垫和硝酸纤维素膜, 如图8所示。组装成完整的检测试纸之前, 其各部分均需相应的预处理: 首先, 样品垫浸泡在样品垫缓冲中 (1%BSA, 2%TritonX-100, 2%PVP 40, 20mM Tris-HCl, 50mM NaAc) 处理1h, 然后在37度真空干燥箱中干燥过夜处理。标记好的荧光微球 (标记anti-CTNI1) 分散液通过免疫层析专用喷头喷散在样品垫上制作成结合垫, 然后冷冻干燥10h备用。然后, anti-CTNI2 (1.0mg/mL, 75 $\mu$ L) 和羊抗鼠 (0.5mg/mL, 75 $\mu$ L) 溶液通过免疫层析专用划线仪均匀地喷散在硝酸纤维素膜上, 分别形成检测线 (T线) 和控制线 (C线), 37度烘箱中过夜处理。然后, 样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸附垫整齐地沿轴固定到硬质粘贴纸板上, 其中吸附垫与NC膜、NC膜与结合垫、结合垫与样品垫相互叠置, 使其紧密接触, 保证检测过程中液流顺利。最后, 组装好的层析板通过免疫层析试纸切割机切割成4mm宽的试纸条, 并将其保存在密封的铝质包装袋中保存。

[0117] 3) 荧光免疫分析仪的搭建

[0118] 采用近红外荧光免疫试纸条阅读器观察和分析试纸条产生的荧光信号, 其结构如图9 (A) 所示, 分析方法如图9 (B) 所示。

[0119] 具体地, 光源采用365nm 1W的LED, 通过组合透镜将LED发散光准直。利用共聚焦光学系统激发收集荧光, 在步进电机传送带驱动免疫层析试纸扫描通过激发光源时, 免疫层析试纸条上C线和T线上稀土荧光微球发射出来的荧光, 通过长波通滤色片 (800nm) 后将激发的荧光聚焦至光电池感光面板上, 此硅光电池对500nm-1100nm的光波具有较高的响应灵敏度。A/D芯片采集光电池电压信号, 最终获得扫描荧光曲线。下位机处理器分别求得C线和T线对应峰的积分面积, 然后计算T线与C线峰面积的比值, 拟合标准样品的浓度获得标准曲线, 并将标准曲线保存至免疫分析仪中。在检测实际样品的过程中, 仪器测得T线和C线峰面积比值, 根据标准曲线反推出样品中心肌钙蛋白的浓度。

[0120] 4) 检测

[0121] 为了初步评价所制作的免疫荧光试纸条的检测效果, 首先通过初生牛血清配置的心肌钙蛋白样品进行检测, 分别加入0ng/mL和20ng/mL心肌钙蛋白样品后15min, 在808nm激光的照射下, 通过InGaAs照相机可清晰地看到免疫层析试纸上C线和T线发出的强烈荧光 (如图10)。当心肌钙蛋白浓度为0时, T线上的荧光非常微弱; 而当心肌钙蛋白浓度达到20ng/mL时, T线上显示强烈的荧光, 这可初步证明所制荧光试纸条的有效性。

[0122] 标准曲线的绘制: 用新生牛血清配置50、25、12.5、6.25、3.2、2.0、1.0、0.5、0.2、0ng/mL心肌钙蛋白。取75 $\mu$ L样品加至样品垫上, 在毛细管力的作用下, 标准样品和控制样品朝着吸附垫的方向运动。15min后, 将试剂卡放入荧光免疫分析仪中读取荧光信号, 每个

样本分别检测三次。所获得的荧光信号与标准样品的浓度值做曲线拟合,然后输入至分析仪中保存。荧光强度如图11所示,标准曲线如图12所示。

[0123] 血清检测:75 $\mu$ L人血清加至样品垫上,在毛细管力的作用下,标准样品和控制样品朝着吸附垫的方向运动。15min后,将试剂卡放入荧光免疫分析仪中读取样本中心肌肌钙蛋白的浓度。图13给出了利用本发明的试纸条和临床检测结果的比较,可以看出,本发明试纸条的检测结果基本与临床检测结果一致,从而表明本发明试纸条的检测结果准确。

[0124] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0125] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

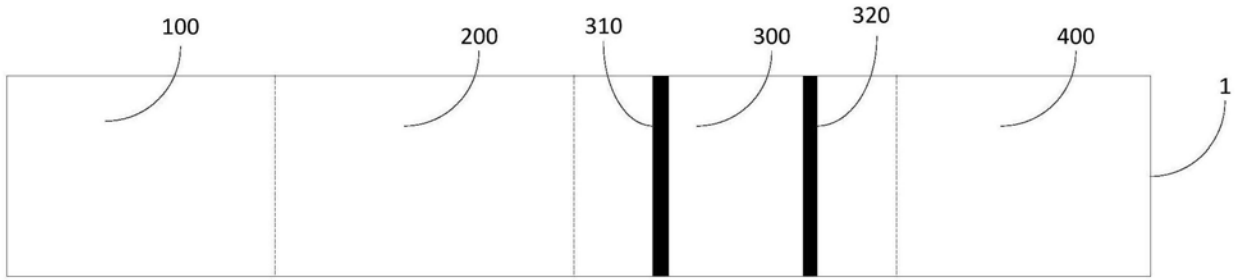


图1

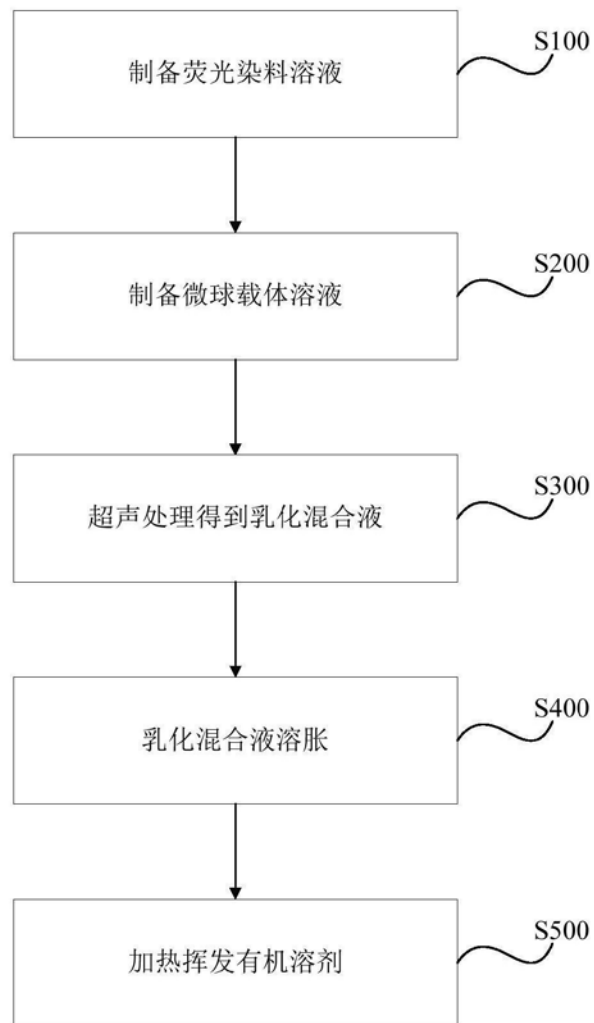


图2

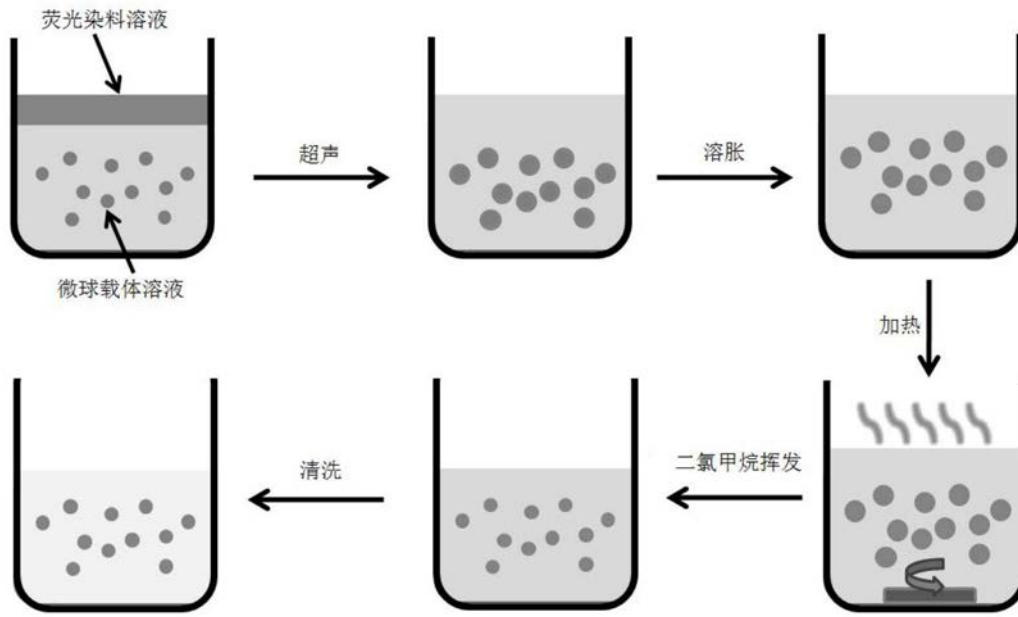


图3

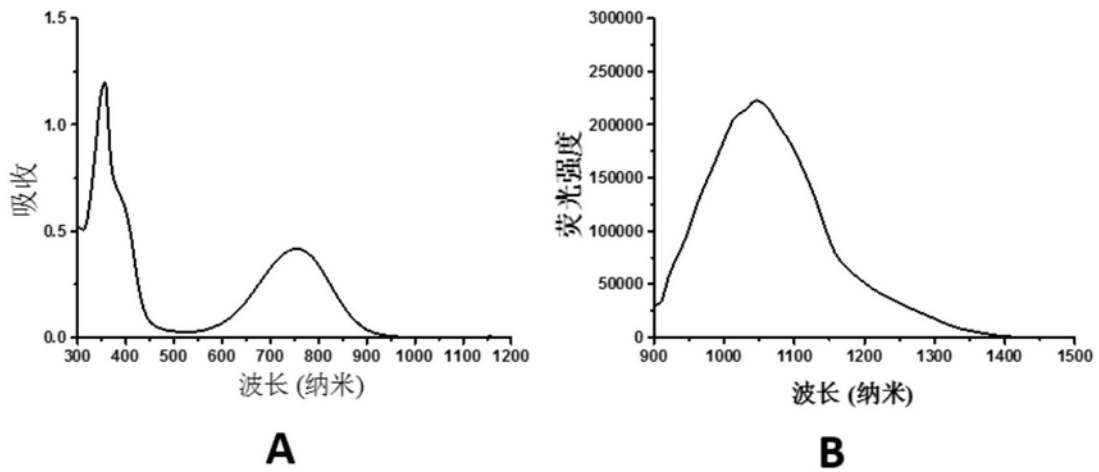


图4

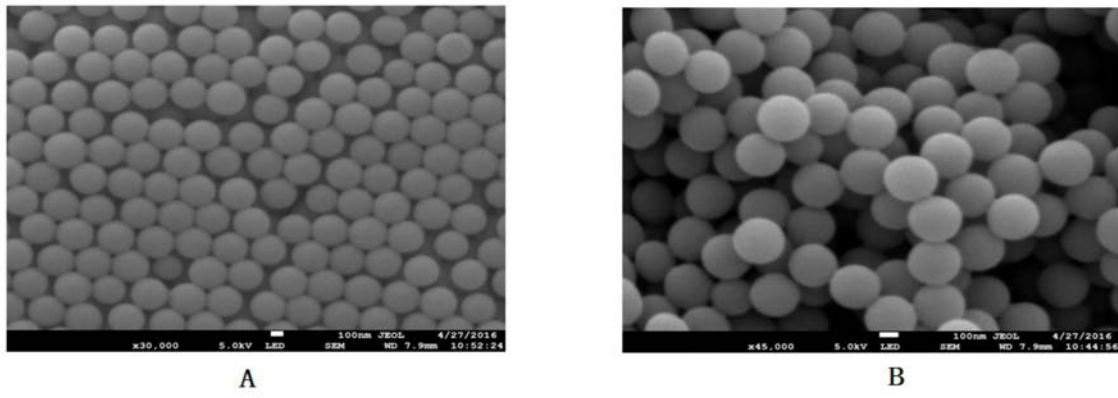


图5

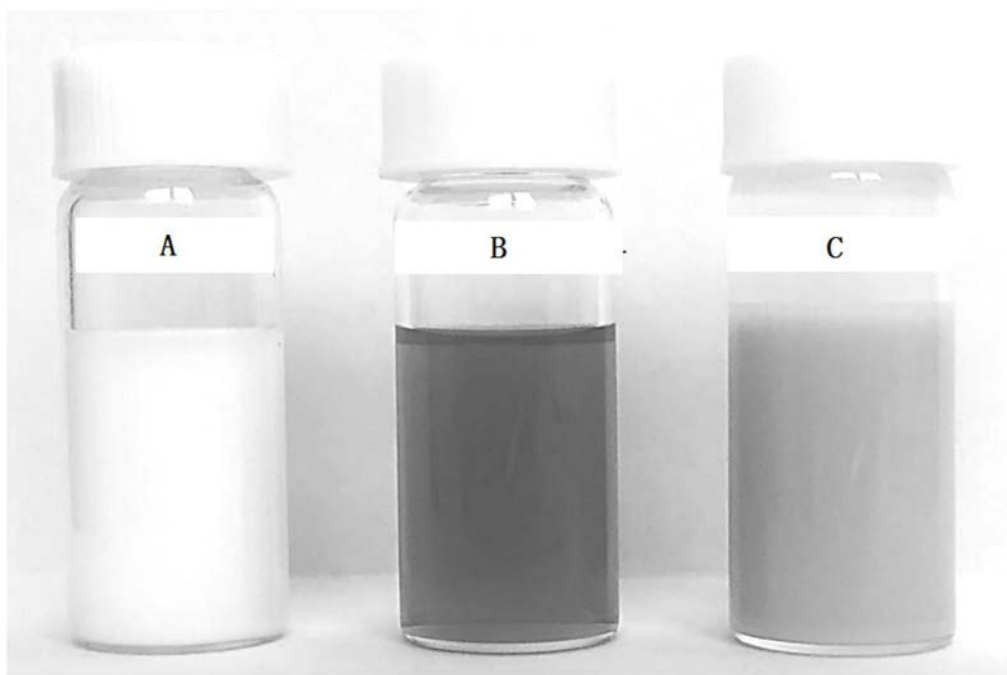


图6

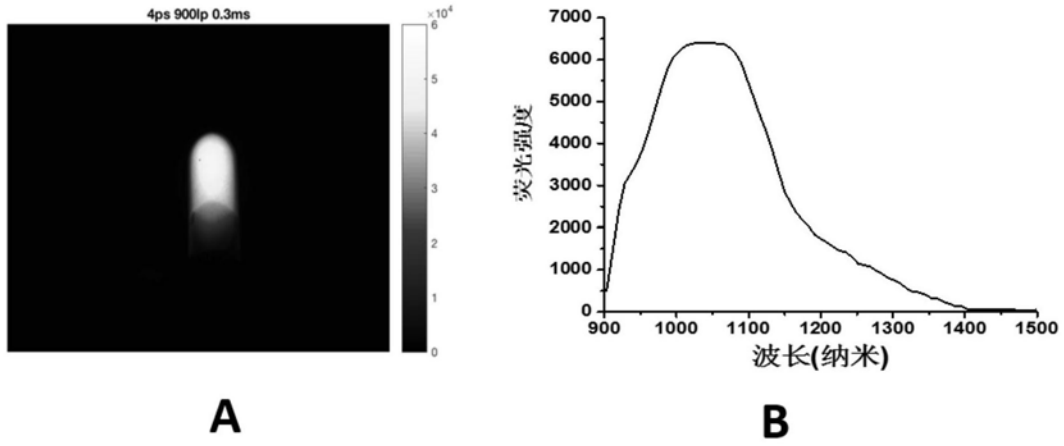


图7

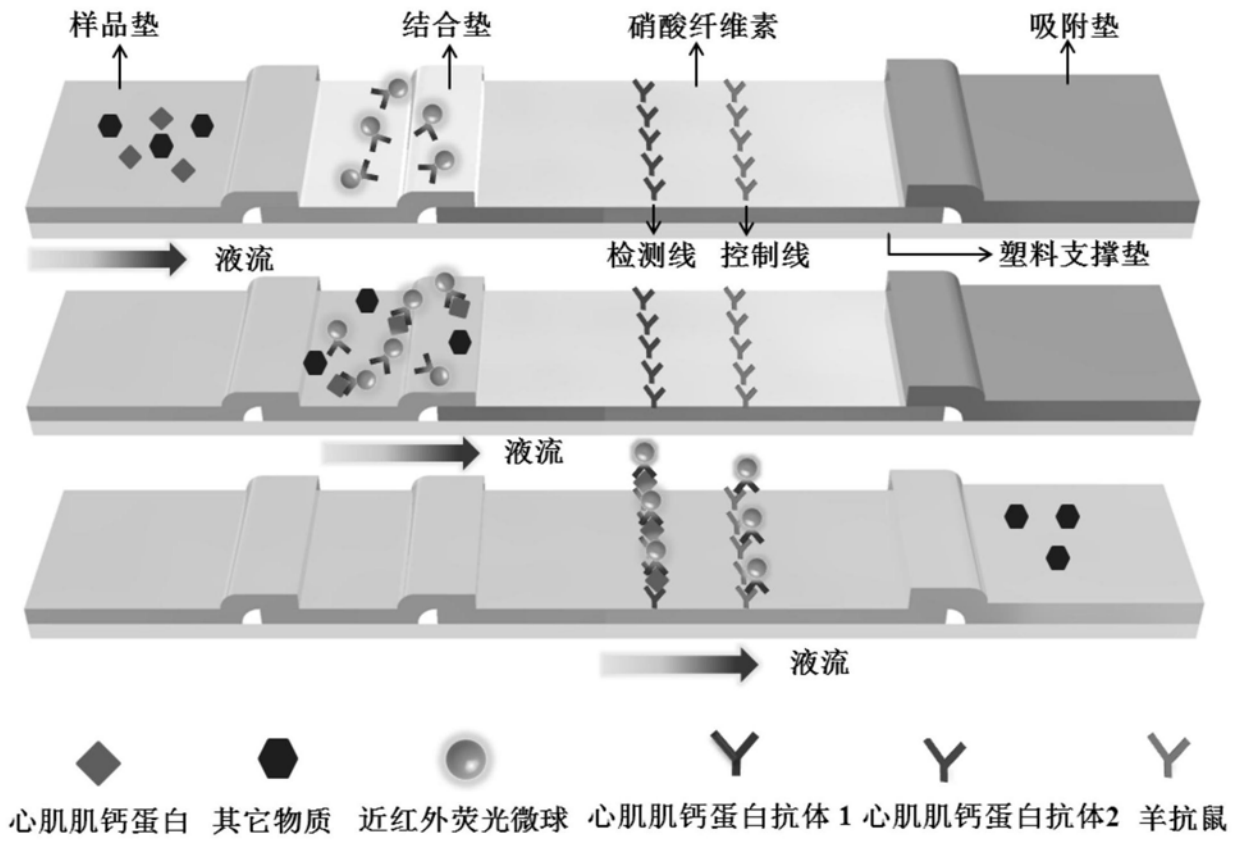


图8

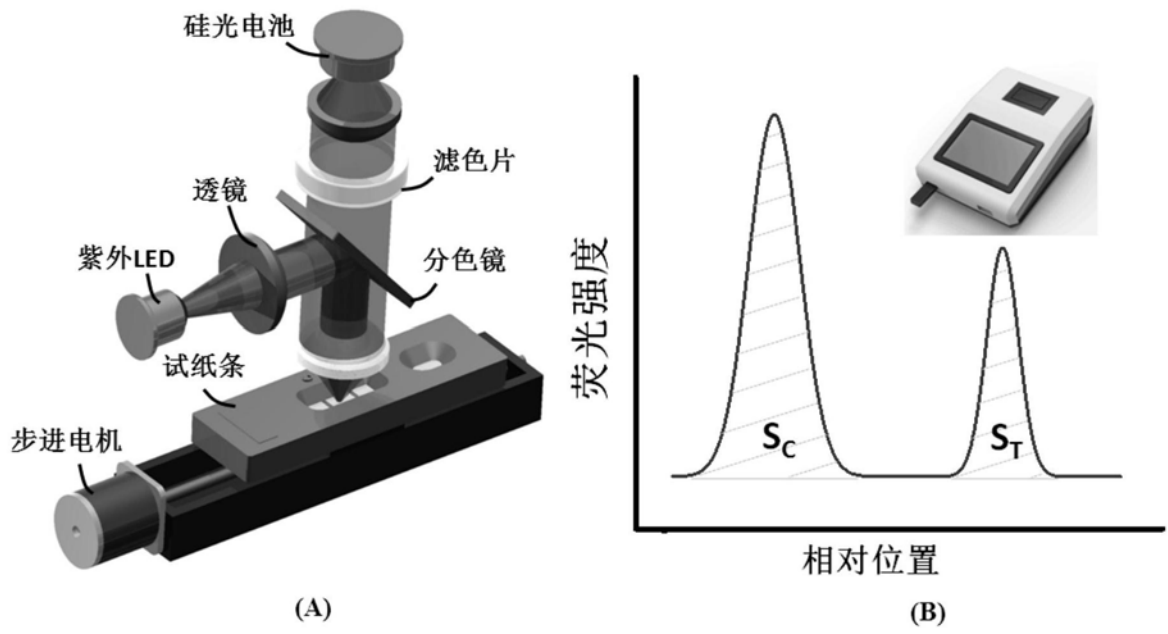


图9

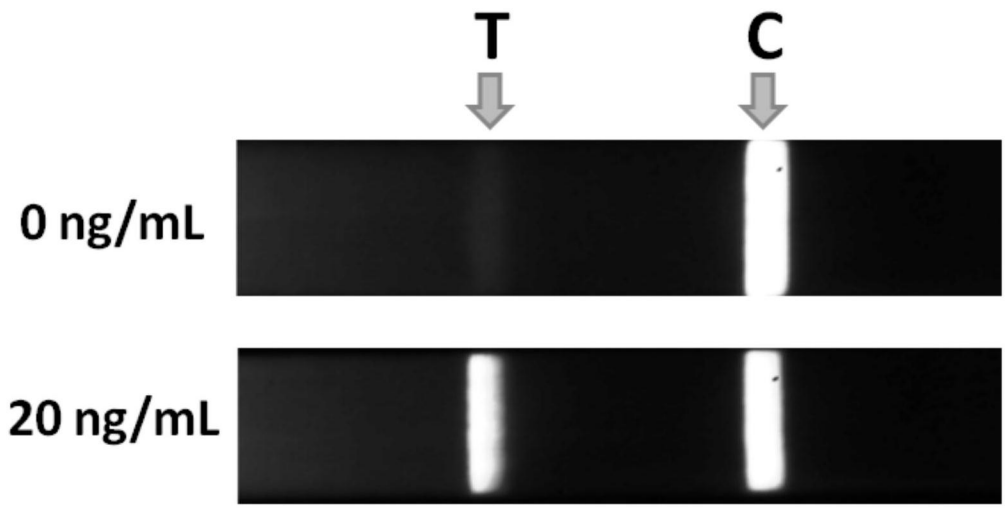


图10

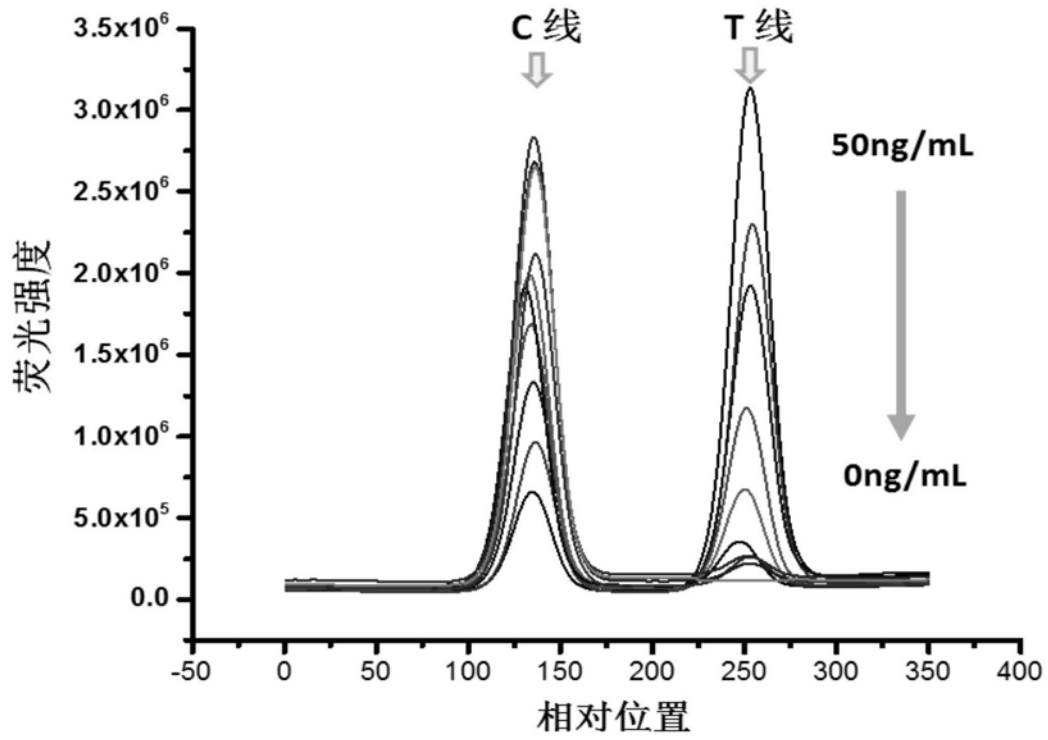


图11

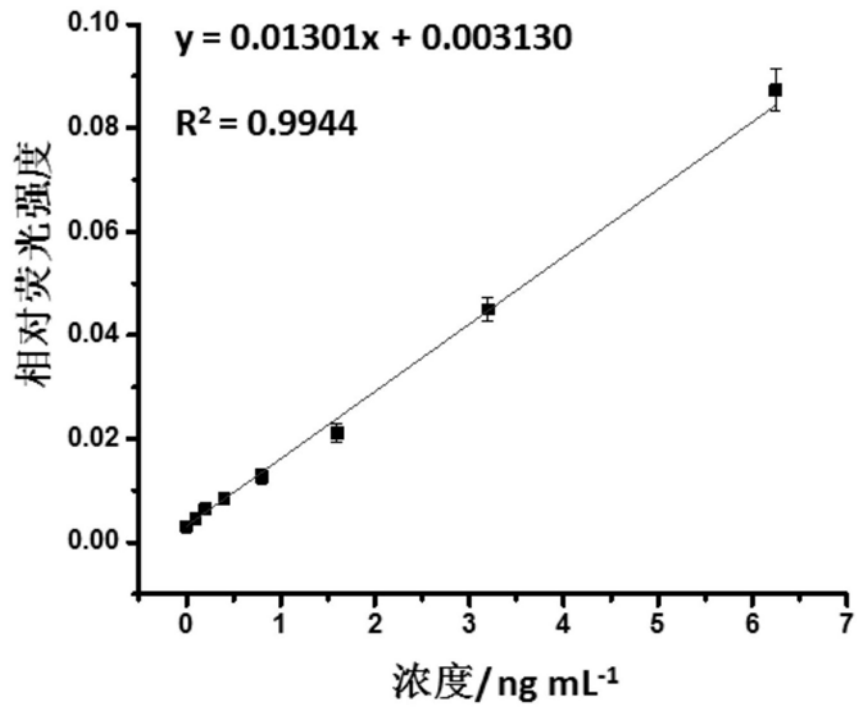


图12

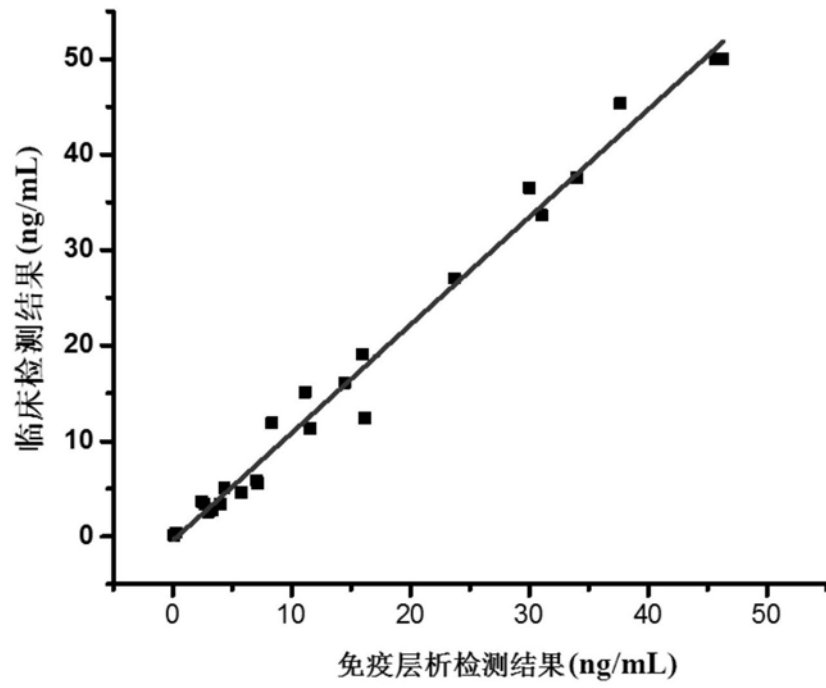


图13

专利名称(译)	免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107632159B</a>	公开(公告)日	2020-05-12
申请号	CN201710608436.2	申请日	2017-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	深圳清华大学研究院 深圳无微华斯生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳清华大学研究院 深圳无微华斯生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳清华大学研究院 深圳无微华斯生物科技有限公司		
[标]发明人	王国新 廖滔 唐梅杰 杨晴来 赵肃		
发明人	王国新 廖滔 唐梅杰 杨晴来 赵肃		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533		
代理人(译)	赵天月		
其他公开文献	CN107632159A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提出了免疫荧光层析检测试纸条、免疫荧光层析检测系统以及确定样品中待测物含量的方法。所述免疫荧光层析检测试纸条包括：本体，所述本体上限定出依次相连的样品区、结合区、检测区、吸附区；荧光微球标记的第一抗体，所述第一抗体包被于所述结合区，所述第一抗体特异性识别待测物；检测线和质控线，所述检测线和质控线设置在所述检测区中；第二抗体，所述第二抗体包被于所述检测线上，所述第二抗体特异性识别所述待测物；以及第三抗体，所述第三抗体包被于所述质控线上，所述第三抗体特异性识别所述第一抗体，其中，所述荧光微球为近红外II区高分子荧光微球。利用本发明的免疫荧光层析检测试纸条检测的准确性强、灵敏度高、精密度高。

