



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107167596 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710568471.6

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2017.07.13

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区兴海路
荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 胡鹏辉 夏福臻 钱纯亘 张赛
宋永波

(74)专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公司 44218

代理人 袁燕清

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

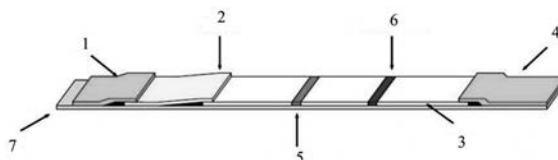
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种荧光定量检测FSH的免疫层析试剂条及其制备方法

(57)摘要

一种荧光定量检测FSH的免疫层析试剂条及其制备方法,本发明属于免疫诊断技术领域,本发明的目的在于针对现有技术中存在的不足,本发明采用以下技术方案:一种荧光定量检测FSH的免疫层析试剂条,由样品垫、标记垫、包被膜、吸水纸顺次搭接在PVC底板上构成。本发明与现有技术相比有如下优点:本发明检测线和质控线采用独立的反应系统,互不干扰和影响,并采用T/C值的方式进行定标,保证了测试结果的准确度。本发明采用荧光免疫层析法,该检测方法灵敏度高、操作简单、成本低。一步法直接加样,无需样本稀释液,可检测血液样本中浓度低至1.0 mIU/mL的促卵泡生成素,使用的检测仪无需专业操作人员,15分钟即可得到检测结果。



1. 一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条,所述的免疫层析试纸条包括有PVC底板,其特征在于,所述的PCV底板上依次设有样品垫、标记垫、包被膜、吸水纸,所述的标记垫和所述的样品垫相接,所述的包被膜和所述的标记垫相接,所述的吸水纸和所述的包被膜相接;所述标记垫上喷涂有荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲素;所述包被膜包含检测线和质控线,检测线和质控线间隔4~8 mm,所述检测线包被有与所述荧光微球标记的FSH单克隆抗体处于不同表位的另一种FSH单克隆抗体,所述质控线包被有特异性识别亲素的兔抗亲和素抗体。

2. 如权利要求1所述的免疫层析试纸条, 其特征在于, 荧光微球的粒径为100~500 nm。

3. 如权利要求4所述的免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球的激发波长为310~550 nm, 发射波长为340~ 620 nm。

4. 一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述的制备方法包含有如下步骤:

(1) 荧光微球标记蛋白的制备

取荧光微球, 10000~15000 rpm第一次离心5~15分钟, 第一次离心得到沉淀物用10~100 mM、pH 6.0~7.0磷酸盐缓冲液调节浓度为0.1%~1%, 并超声分散; 加入终浓度为0.1~5 mg/mL的碳二亚胺, 混匀, 再加入终浓度为0.1~5 mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺, 混匀; 室温孵育20~40分钟后10000~15000 rpm第二次离心5~15分钟, 第二次离心分离得到沉淀物用10~100 mM、pH 6.0~7.0磷酸盐缓冲液溶解, 将复溶后的荧光微球超声分散, 按照0.1~1.0 mg/mL荧光微球的比例分别加入FSH单克隆抗体和亲和素, 混匀后室温旋转混合反应1.5~3小时, 10000~15000 rpm第三次离心5~15分钟, 第三次离心分离得到的沉淀物用10~40 mM、pH 为7.0~8.0含10~40 mM乙醇胺和0.05%~1%酪蛋白的Tris-HCl复溶, 超声分散后旋转混合反应0.5~1小时, 10000~15000 rpm第四次离心5~15分钟, 第四次离心分离得到的沉淀物用微球保存液复溶, 2~8℃保存;

(2) 样品垫的预处理

将样品垫用封闭液浸泡后, 置于湿度<20%的40~50℃的烘箱, 干燥12~24 h后于2~30℃密封保存; 所述封闭液含0.1~1%的Tris、0.1~1%的Triton X-100、0.1~1%的BSA、0.1~2%的PEG 6000和0.005~0.05%的鼠抗人红细胞;

(3) 标记垫的制备

将荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲素用标记垫处理液喷涂在标记垫上; 所述标记垫处理液中含有0.2~2%的酪蛋白, 5%~20%的蔗糖, 0.1~1%的Tween-20, 0.1~0.5%的PEG20000, 0.02~0.05%的Proclin300, 0.01~0.05M、pH 8.0的Tris-HCL缓冲液, 将制备好的标记垫置于湿度<20%的40~50℃的烘箱, 干燥12~24 h后于2~30℃密封保存;

(4) 包被膜的制备

分别将另一FSH单克隆抗体和兔抗亲和素用包被缓冲液调节其浓度为0.5~2 mg/mL, 将FSH单克隆抗体喷到包被膜上的检测线, 将兔抗亲和素抗体喷到包被膜上的质控线, 所述FSH单克隆抗体和兔抗亲和素抗体的用量按膜包被液量均为0.1~0.2 μL/mm, 检测线和质控线间隔4~8 mm, 湿度<20%的40~50℃的烘箱, 干燥24~72 h后于2~30℃密封保存, 备用;

(5) 在底板上顺次相互搭接地黏贴样品垫、标记垫、包被膜和吸水纸得到试纸板, 按照切割要求切割成3~4 mm宽度的试纸条。

5.如权利要求4所述的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的FSH单克隆抗体的浓度为0.1~1.0 mg/mL,按照稀释比例为5%~20%稀释后,喷量为3~6 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 喷涂至标记垫上。

6.如权利要求4所述的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的亲合素的浓度为0.1~1.0 mg/mL,按照稀释比例为0.5%~5%稀释后,喷量为3~6 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 喷涂至标记垫上。

7.如权利要求4所述的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述包被膜检测线上包被的FSH单克隆抗体的喷量0.1~0.2 $\mu\text{L}/\text{mm}$ 。

8.如权利要求4所述的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述质控线上包被的兔抗亲和素抗体的喷量0.1~0.2 $\mu\text{L}/\text{mm}$ 。

一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种荧光定量检测促卵泡生成素(FSH)的免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 促卵泡生成素(FSH)是一种糖蛋白激素,带有两个亚基。 α 亚基类似于黄体生成素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)以及促甲状腺激素(TSH)的 α 亚基。 β 亚基不同于其他糖蛋白激素的 β 亚基,并显示出其特殊的生物化学特性。

[0003] 对于女性,FSH在下丘脑-垂体-卵巢调节环路中发挥作用,控制月经周期。FSH和LH从垂体的促性腺细胞中阵发性释放,血中的浓度由类固醇类激素通过下丘脑的负反馈机制控制。在卵巢中FSH和LH一起刺激卵泡的成熟,进而刺激卵泡中雌激素的生物合成。FSH水平在月经周期的中期呈现一高峰,但不如LH明显,由于卵巢功能的变化和雌激素水平的下降,绝经期FSH达到高水平。FSH的水平会因绝经期、阉割以及卵巢早衰的影响而上升。FSH和LH或FSH和雌激素浓度出现异常时,可能为神经性厌食症或多囊卵巢疾病。

[0004] 对于男性,FSH能够调节细精管的发育以及精子发生过程。与雌激素不同,雄性激素不能降低FSH的水平,男性体内的FSH水平只受血清中LH的调节。少精症和无精子症的患者通常会出现FSH升高,睾丸肿瘤患者血清的FSH浓度一般会下降,男性体内出现高水平FSH时,可能为先天性睾丸发育不全或原发性睾丸衰竭。

[0005] 目前临床上FSH的检测方法有酶联免疫法(ELISA)、化学发光法和胶体金免疫层析法等,这些方法都有各自的优点和不足。ELISA法检测步骤多、耗时长,操作过程的影响因素较多,易造成假阳性和假阴性结果。因此目前逐步被化学发光法替代,但这类方法为全封闭系统,价格昂贵,需要专门培训仪器使用人员,维修及检测成本高,并且不适合单人份和小批量检测用,目前不利于FSH检测在国内的广泛开展,胶体金法操作简单、适合单人份检测,但测试结果只能通过肉眼观察,给出定性或半定量结果。

[0006] 鉴于目前尚无快速、准确的定量检测FSH的方法,本发明的目的是提供一种可用于快速定量检测FSH的免疫层析试纸条,用于评估和监测体内促卵泡生成素的水平,所述试剂具有操作简单、方便快捷、经济、准确定量等优点,更适用于在各医疗机构广泛开展。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于针对现有技术中存在的不足,提供一种操作简单、方便快捷、经济、测定准确的FSH检测试纸条。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条,由样品垫、标记垫、包被膜、吸水纸顺次搭接在PVC底板上构成,所述的标记垫和所述的样品垫相接,所述的包被膜和所述的标记垫相接,所述的吸水纸和所述的包被膜相接;所述标记垫上喷涂有荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲合素;所述包被膜包含检测线和质控线,检测线和质控线间隔4~8

mm,所述检测线包被有与所述荧光微球标记的FSH单克隆抗体处于不同表位的另一种FSH单克隆抗体。所述质控线包被有特异性识别亲和素的兔抗亲和素抗体。

[0009] 优选地,所述荧光微球标记的FSH单克隆抗体的浓度为0.1~1.0 mg/mL,稀释比例为5%~20%。

[0010] 所述荧光微球标记的亲和素的浓度为0.1~1.0 mg/mL,稀释比例为0.5%~5%。所述含荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲和素的标记垫处理液的喷量为3~6 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0011] 优选地,所述荧光微球的粒径为100~500 nm。所述荧光微球的激发波长为310~550 nm,发射波长为340~ 620 nm。

[0012] 优选地,所述包被膜检测线上包被的FSH单克隆抗体的浓度为0.5~2 mg/mL,喷量0.1~0.2 $\mu\text{L}/\text{mm}$ 。

[0013] 所述质控线上包被的兔抗亲和素抗体的浓度为0.5~2 mg/mL,喷量0.1~0.2 $\mu\text{L}/\text{mm}$ 。

[0014] 本发明还提供一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条的方法,包括以下步骤:

(1) 荧光微球标记蛋白的制备

取一定量的荧光微球,10000~15000 rpm第一次离心5~15分钟,第一次离心得到的沉淀物用10~100 mM pH6.0~7.0磷酸盐缓冲液调节浓度为0.1%~1%,并超声分散;加入终浓度为0.1~5 mg/mL的碳二亚胺(EDC),混匀,再加入终浓度为0.1~5 mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),混匀;室温孵育20~40分钟后10000~15000 rpm第二次离心5~15分钟,第二次离心分离得到沉淀物用10~100 mM pH6.0~7.0磷酸盐缓冲液溶解。将复溶后的荧光微球超声分散,按照0.1~1.0 mg/mL荧光微球的比例分别加入FSH单克隆抗体和亲和素,混匀后室温旋转混合反应1.5~3小时,10000~15000 rpm第三次离心5~15分钟,第三次离心分离得到沉淀物用含10~40 mM乙醇胺和0.05%~1%酪蛋白的Tris-HCl(10~40mM,pH 7.0~8.0)复溶,超声分散后旋转混合反应0.5~1小时。10000~15000 rpm第四次离心5~15分钟,第四次离心分离得到的沉淀物用微球保存液复溶,2~8℃保存。

[0015] (2) 样品垫的预处理

将样品垫用封闭液浸泡5分钟后,置于湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥12~24 h后于2~30℃密封保存。所述封闭液含0.1~1%的Tris,0.1~1%的Triton X-100,0.1~1%的BSA,0.1~2%的PEG 6000,0.005~0.05%的鼠抗人红细胞。

[0016] (3) 标记垫的制备

将荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲和素分别按5%~20%和0.5%~5%的稀释比例用标记垫处理液喷涂在标记垫上,喷量为3~6 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。所述标记垫处理液中含有0.2~2%的酪蛋白,5%~20%的蔗糖,0.1~1%的Tween-20,0.1~0.5%的PEG20000,0.02~0.05%的Proclin300,0.01~0.05M、pH 8.0的Tris-HCL缓冲液。将制备好的标记垫置于湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥12~24 h后于2~30℃密封保存。

[0017] (4) 包被膜的制备

分别将另一FSH单克隆抗体和兔抗亲和素用包被缓冲液调节浓度为0.5~2 mg/mL,将FSH单克隆抗体喷到包被膜(3)上的检测线,将兔抗亲和素抗体喷到包被膜(3)上的质控线,所述FSH单克隆抗体和兔抗亲和素抗体的用量按膜包被液量均为0.1~0.2 $\mu\text{L}/\text{mm}$,检测线和质控线间隔4~8 mm,湿度<20%的40~50℃的烘箱,干燥24~72 h后于2~30℃密封保存,备用。

[0018] (5)在底板上顺次相互搭接地黏贴样品垫、标记垫、包被膜和吸水纸得到试纸板,按照切割要求切割成3~4 mm宽度的试纸条。

[0019] 本发明所述的FSH的免疫层析试纸条的检测原理是双抗体夹心法,样本中的FSH抗原在层析作用下与标记垫上荧光微球标记的FSH抗体结合形成复合物,该复合物在层析作用下移动至包被膜的检测线,在包被膜检测线上包被有识别FSH抗原另一表位的抗体,形成双抗体夹心复合物。复合物聚集在包被膜的检测线处,受到光源激发释放出相应波长的发射光,样本中抗原浓度越高,检测线发射光的强度越高,通过荧光检测系统将光信号转化为数字信号,以浓度点为横坐标,检测线信号值比质控线信号值(T/C)为纵坐标绘制标准曲线,从而可准确定量的计算出样本中FSH的浓度。

[0020] 本发明与现有技术相比,有如下优点:

本发明检测线和质控线采用独立的反应系统,互不干扰和影响,并采用T/C值的方式进行定标,保证了测试结果的准确度。

[0021] 本发明采用荧光免疫层析法,该检测方法灵敏度高、操作简单、成本低。一步法直接加样,无需样本稀释液,可检测血液样本中浓度低至1.0 mIU/mL的促卵泡生成素,使用的检测仪无需专业操作人员,15分钟即可得到检测结果。

[0022] 本发明将荧光免疫层析技术引入FSH的检测中,结合荧光检测仪,实现FSH的单人份定量检测,为临床使用提供了极大的便利。

附图说明

[0023] 图1为本发明的荧光定量检测FSH免疫层析试纸条的结构示意图;

附图标记:1、样品垫;2、标记垫;3、包被膜;4、吸水纸;5、检测线;6、质控线;7、底板。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明进一步详细描述,应当理解为,以下实施例是为了方便本领域技术人员对本发明方案的理解,但不作为对本发明的限定。

[0025] 实施例1

FSH荧光免疫层析试纸条的制备:

(1) 荧光微球标记蛋白的制备

取0.1mL 10%荧光微球,15000 rpm离心15分钟,沉淀物用50 mM pH 6.5 MES缓冲液调节浓度为1%,并超声分散;加入终浓度为2 mg/mL的碳二亚胺(EDC),混匀,再加入终浓度为5 mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),混匀;室温孵育20分钟后15000 rpm离心15分钟,沉淀物用50 mM pH6.5 MES缓冲液溶解。将复溶后的荧光微球超声分散,并分两管分别加入0.2mg FSH单克隆抗体和0.1mg亲和素,混匀后室温旋转混合反应2小时,15000 rpm离心15分钟,沉淀物用含30 mM乙醇胺和0.5%酪蛋白的Tris-HCl(20 mM,pH 8.0)复溶,超声分散后旋转混合反应1小时。15000 rpm离心15分钟,沉淀用微球保存液复溶,2~8℃保存。

[0026] (2) 样品垫的预处理

将样品垫用封闭液浸泡5分钟后,置于湿度<20%的50℃的烘箱,干燥12 h后于20~30℃密封保存。所述封闭液含0.05%的Tris,1%的Triton X-100,0.4%的BSA,0.5%的PEG 6000,0.02%的鼠抗人红细胞。

[0027] (3) 标记垫的制备

将荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲素分别按10%和1%的稀释比例用标记垫处理液喷涂在标记垫上,喷量为4 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。所述标记垫处理液中含有0.5%的酪蛋白,5%的蔗糖,0.5%的Tween-20,0.3%的PEG20000,0.03%的Proclin300,0.05M、pH 8.0的Tris-HCL缓冲液。将制备好的标记垫置于湿度<20%的50℃的烘箱,干燥24 h后于20~30℃密封保存。

[0028] (4) 包被膜的制备

分别将另一FSH单克隆抗体和兔抗亲素抗体用包被缓冲液调节浓度为1.5 mg/mL,将FSH单克隆抗体喷到包被膜(3)上的检测线,将兔抗亲素抗体喷到包被膜(3)上的质控线,所述FSH单克隆抗体和兔抗亲素抗体的用量按膜包被液量均为0.15 $\mu\text{L}/\text{mm}$,检测线和质控线间隔4mm,湿度<20%的50℃的烘箱,干燥72 h后于20~30℃密封保存,备用。

[0029] (5) 在底板上顺次相互搭接地黏贴样品垫、标记垫、包被膜和吸水纸得到试纸板,按照切割要求切割成4 mm宽度的试纸条。

[0030] 实施例2

荧光免疫层析定量检测血样中促卵泡生成素(FSH)的浓度

(1) 标准曲线绘制

将FSH抗原用阴性血浆配制成150 mIU/mL、75 mIU/mL、30 mIU/mL、15 mIU/mL、5 mIU/mL、1mIU/mL、0 mIU/mL,用同一批次的试剂,每个浓度点测试6次。以检测线(T带)、质控线(C带)的荧光强度比值为纵坐标,FSH参考品浓度为横坐标,建立方程并拟合成标准曲线,将标曲信息用烧录软件写到ID芯片中。

[0031] (2) 样品的检测:

从试剂盒中取出检测条,撕开铝箔袋包装后,平放检测条,平衡5分钟,取100 μL 样本加入加样孔中,室温避光反应15分钟。将ID芯片插入荧光检测仪,将检测卡插入荧光仪插卡口,点击“测试”,仪器通过分析软件自动计算出待测样本中FSH的浓度。

[0032] (3) 与罗氏促卵泡生成素检测试剂盒(化学发光法)检测的相关性比较。

[0033] 采用本发明的试纸条与罗氏促卵泡生成素检测试剂盒对50例人血清样本进行检测,测定结果显示,在本试纸条检测范围内(1~150 mIU/mL),两种试剂的相关性 $R^2 > 0.95$ ($y = 0.969x + 0.315$)。

[0034] 实施例3

请参照图1,一种荧光定量检测AMH的免疫层析试纸条,所述的免疫层析试纸条包括有PVC底板7,所述的PCV底板7上依次设有样品垫1、标记垫2、包被膜3、吸水纸4,所述的标记垫2和所述的样品垫1相接,所述的包被膜3和所述的标记垫2相接,所述的吸水纸4和所述的包被膜3相接;所述标记垫2上喷涂有荧光微球标记的FSH单克隆抗体和荧光微球标记的亲素;所述包被膜3上设有检测线5和质控线6,检测线5和质控线6间隔4~8 mm,所述检测线5包被有与所述荧光微球标记的FSH单克隆抗体处于不同表位的另一种FSH单克隆抗体,所述质控线6包被有特异性识别亲素的兔抗亲素抗体。

[0035] 目前市面上FSH的检测仅有适合医院检验科用于批量检测的酶联免疫法(ELISA)、化学发光(CLIA),还没有适合单人份、快速检测、即时出结果的定量检测试剂。本专利所述FSH检测试剂在高灵敏检测FSH的同时又能大大缩短检测时间,为临床检验及使用带来极大

方便,更适合临床科室操作。

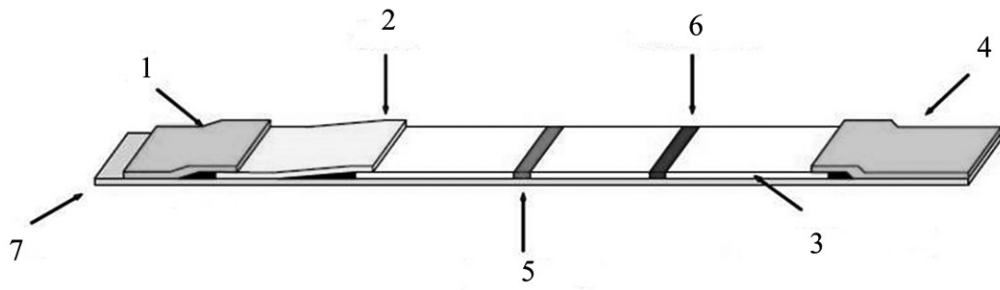


图1

专利名称(译)	一种荧光定量检测FSH的免疫层析试剂条及其制备方法		
公开(公告)号	CN107167596A	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN201710568471.6	申请日	2017-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	胡鹏辉 夏福臻 钱纯亘 张赛 宋永波		
发明人	胡鹏辉 夏福臻 钱纯亘 张赛 宋永波		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条及其制备方法,本发明属于免疫诊断技术领域,本发明的目的在于针对现有技术中存在的不足,本发明采用以下技术方案:一种荧光定量检测FSH的免疫层析试纸条,由样品垫、标记垫、包被膜、吸水纸顺次搭接在PVC底板上构成。本发明与现有技术相比有如下优点:本发明检测线和质控线采用独立的反应系统,互不干扰和影响,并采用T/C值的方式进行定标,保证了测试结果的准确度。本发明采用荧光免疫层析法,该检测方法灵敏度高、操作简单、成本低。一步法直接加样,无需样本稀释液,可检测血液样本中浓度低至1.0 mIU/mL的促卵泡生成素,使用的检测仪无需专业操作人员,15分钟即可得到检测结果。

