



(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 胡鹃辉 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)

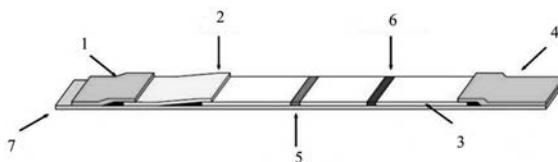
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(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。



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和素；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。

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°C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°C的烘箱，干燥12~24 h后于2~30°C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和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Proclin300，0.01~0.05 M、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°C的烘箱，干燥12~24 h后于2~30°C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°C的烘箱，干燥24~72 h后于2~30°C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  $\mu$ L/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和素的浓度为0.1~1.0 mg/mL，按照稀释比例为0.5%~5%稀释后，喷量为3~6  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/mm。

## 一种荧光定量检测FSH的免疫层析试剂条及其制备方法

### 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。 $\alpha$ 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 $\alpha$ 亚基。 $\beta$ 亚基不同于其他糖蛋白激素的 $\beta$ 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] 目前临幊上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和素;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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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  $\mu$ L/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°C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°C的烘箱,干燥12~24 h后于2~30°C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  $\mu$ L/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°C的烘箱,干燥12~24 h后于2~30°C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  $\mu$ L/mm,检测线和质控线间隔4~8 mm,湿度<20%的40~50°C的烘箱,干燥24~72 h后于2~30°C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°C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°C的烘箱，干燥12 h后于20~30°C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和素分别按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  $\mu$ L/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和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0.15 $\mu$ L/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  $\mu$ L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。

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和素;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和素的兔抗亲和素抗体。

[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。

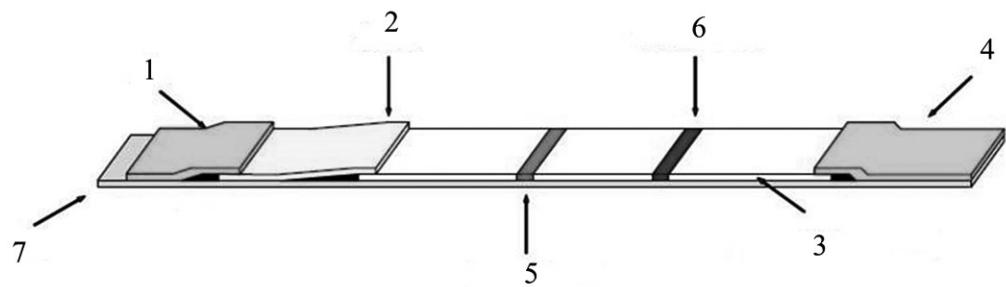


图1

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	<a href="#">CN107167596A</a>	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股份有限公司		
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	胡鹤辉 夏福臻 钱纯亘 张赛 宋永波		
发明人	胡鹤辉 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	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 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。

