



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108303549 A

(43)申请公布日 2018.07.20

(21)申请号 201810140293.1

(22)申请日 2018.02.09

(71)申请人 广东优尼德生物科技有限公司

地址 523000 广东省东莞市东莞松山湖高
新技术产业开发区台湾科技园桃园
路1号莞台生物技术合作育成中心3栋
4楼

(72)发明人 夏宣喜 赖华 孔浩杰 刘志文

(74)专利代理机构 深圳市世纪恒程知识产权代
理事务所 44287

代理人 胡海国 徐进之

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

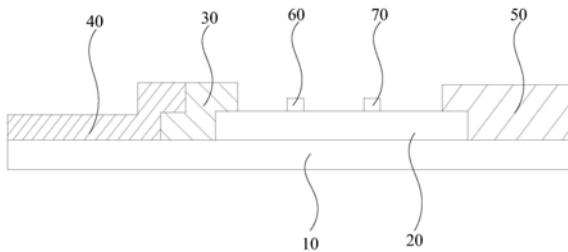
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及
其定量检测方法

(57)摘要

本发明公开一种检测脂联素的荧光免疫层
析试纸条及其定量检测方法，其中，所述检测脂
联素的荧光免疫层析试纸条包括PVC衬板、硝酸
纤维素膜、耦合物结合垫片、样本垫片及吸水垫
片，所述PVC衬板上粘贴有硝酸纤维素膜，所述硝
酸纤维素膜的一端粘贴有耦合物结合垫片，另一
端粘贴有吸水垫片，所述耦合物结合垫片上粘贴
有样本垫片；所述硝酸纤维素膜上设置有测试带
和控制带，所述测试带内包被有鼠抗脂联素抗
体，所述控制带内包被有兔抗鼠抗体；所述耦合
物结合垫片包被有荧光标记脂联素抗体。本发明
的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条具有方便
快捷，操作简单，灵敏度高，便于临床推广应用等
优点。



1. 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，包括PVC衬板、硝酸纤维素膜、耦合物结合垫片、样本垫片及吸水垫片，其特征在于，所述PVC衬板上粘贴有硝酸纤维素膜，所述硝酸纤维素膜的一端粘贴有耦合物结合垫片，另一端粘贴有吸水垫片，所述耦合物结合垫片上粘贴有样本垫片；

所述硝酸纤维素膜上设置有测试带和控制带，所述测试带内包被有鼠抗脂联素抗体，所述控制带内包被有兔抗鼠抗体；所述耦合物结合垫片包被有荧光标记脂联素抗体。

2. 如权利要求1所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，其特征在于，所述检测脂联素的荧光免疫层析试纸条还包括壳体，所述壳体上设置有加样窗口和检测窗口，所述加样窗口位于所述样本垫片处，所述检测窗口位于所述测试带和所述控制带处。

3. 如权利要求1所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，其特征在于，所述硝酸纤维素膜按如下步骤制备：

分别将测试带抗体原液和控制带抗体原液在4℃下以6000～13000r/min速度离心60min，吸取两种上清液；

将两种上清液分别装入透析袋，用双蒸水透析去除盐分后，超滤浓缩后装瓶冷冻，得到测试带抗体和控制带抗体；

用pH值为6.5～6.7的磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液，得到0.8mg/ml测试带包被液和0.8mg/ml控制带包被液；

将所述测试带包被液和所述控制带包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜对应的测试带和控制带位置，喷涂量为1μL/cm；

再将包被好硝酸纤维素膜置于37℃温度下烘干。

4. 如权利要求3所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，其特征在于，所述磷酸盐缓冲液按重量计包括：Na₂HP0₄ 0.263～0.376份，KH₂PO₄ 1.000～1.109份，NaCl 16份，KC10.2份，蒸馏水1000份；

所述Tris缓冲液按重量计包括：三羟甲基氨基甲烷4.6～5.5份，KH₂PO₄ 2.0～3.0份，NaCl 18份，KC1O₄份，牛血清白蛋白9份，蒸馏水1200份。

5. 如权利要求1所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，其特征在于，所述耦合物结合垫片按如下步骤制备：

用pH值为6.4～6.6的MES溶液洗涤荧光微球，8000～15000r/min速度离心30min，去除上清液，重复操作两次；

用MES溶液重悬荧光微球，并加入活化剂，活化30min；

用pH值为6.4～6.6的MES溶液洗涤活化的荧光微球，8000～15000r/min速度离心30min，去除上清液，重复操作两次；

用pH值为8.5～9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球，加入脂联素鼠单克隆抗体，室温下震荡混匀，8000～15000r/min速度离心30min，去除上清液；

用质量分数为5%的BSA溶液重悬活化的荧光微球，室温下震荡反应1h，8000～15000r/min速度离心30min，去除上清液；

用pH值为8.5～9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球，8000～15000r/min速度离心30min，去除上清液，即得荧光标记脂联素抗体；

用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后，均匀地喷涂到耦合物结合垫片上，

喷涂量为 $25\mu\text{L}/\text{cm}$,于 37°C 温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片。

6. 如权利要求5所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球为羧基荧光微球,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;或者所述荧光微球为氨基微球,所述活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺;或者所述活化剂为羟基微球,所述活化剂为BrCN。

7. 如权利要求1所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述耦合物结合垫片按如下步骤制备:

用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬荧光微球,加入脂联素鼠单克隆抗体,室温下震荡混匀,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

用质量分数为5%的BSA溶液重悬荧光微球,室温下震荡反应1h,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;

用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片上,喷涂量为 $25\mu\text{L}/\text{cm}$,于 37°C 温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片。

8. 如权利要求7所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球包括肼基微球、氯甲基微球中的任意一种或者其组合物。

9. 如权利要求5至8任一项所述的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球与所述活化剂EDC的质量比为1:1,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为5:1。

10. 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

采集血样2~3ml,室温放置15min~120min,以3000r/min速度离心30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,即得待测样本;

利用移液器准确吸取 $80\mu\text{L}$ 待测样本,滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片上;

待测样本层析完全后,检测荧光试纸条的测试带信号值和控制带信号值,通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度,定量判定其质量浓度。

一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及其定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,特别涉及一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及其定量检测方法。

背景技术

[0002] 脂肪组织 (adipose tissue) 主要由大量聚集成团的脂肪细胞构成,脂联素 (Adiponectin) 是脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性多肽或蛋白质。正常人血清中脂联素的浓度范围在3~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,占血浆蛋白总量的0.01%,不随饮食或昼夜节律而改变,女性血清中的脂联素含量大于男性。随着对脂联素研究的不断深入,已发现,脂联素在肥胖症患者和II型糖尿病患者血清中的浓度明显低于非肥胖者,其浓度的降低导致了胰岛素抵抗和高胰岛素血症,而脂联素有防止动脉粥样硬化斑块形成的作用,因此,脂联素与肥胖症患者II型糖尿病及冠心病的发生发展密切相关,即脂联素的明显降低预示着II型糖尿病及冠心病的发生明显增加。测定血中脂联素水平,对这些疾病的诊断和预后有重要意义。

[0003] 而现有技术中一般采用酶联免疫分析试剂盒来检测脂联素浓度,虽然酶联免疫法检测的准确度较高,但是该方法检测过程繁琐,耗时较长,灵敏度较低,且不适用于临床推广。

发明内容

[0004] 本发明的主要目的是提出一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及其定量检测方法,具有方便快捷、操作简单、灵敏度高的特点,且有利于进行临床推广应用。

[0005] 为实现上述目的,本发明提出的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,包括PVC衬板、硝酸纤维素膜、耦合物结合垫片、样本垫片及吸水垫片,所述PVC衬板上粘贴有硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜的一端粘贴有耦合物结合垫片,另一端粘贴有吸水垫片,所述耦合物结合垫片上粘贴有样本垫片;所述硝酸纤维素膜上设置有测试带和控制带,所述测试带内包被有鼠抗脂联素抗体,所述控制带内包被有兔抗鼠抗体;所述耦合物结合垫片包被有荧光标记脂联素抗体。

[0006] 优选地,所述检测脂联素的荧光免疫层析试纸条还包括壳体,所述壳体上设置有加样窗口和检测窗口,所述加样窗口位于所述样本垫片处,所述检测窗口位于所述测试带和所述控制带处。

[0007] 优选地,所述硝酸纤维素膜按如下步骤制备:

[0008] 分别将测试带抗体原液和控制带抗体原液在4°C下以6000~13000r/min速度离心60min,吸取两种上清液;

[0009] 将两种上清液分别装入透析袋,用双蒸水透析去除盐分后,超滤浓缩后装瓶冷冻,得到测试带抗体和控制带抗体;

[0010] 用pH值为6.5~6.7的磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液,得到0.8mg/ml测试带包被液和0.8mg/ml控制带包被液;

- [0011] 将所述测试带包被液和所述控制带包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜对应的测试带和控制带位置,喷涂量为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$;
- [0012] 再将包被好硝酸纤维素膜置于 37°C 温度下烘干。
- [0013] 优选地,所述样本稀释液包括磷酸盐缓冲液和/或Tris缓冲液。所述磷酸盐缓冲液按重量计包括: Na_2HPo_4 0.263~0.376份, KH_2PO_4 1.000~1.109份, NaCl 6份, KC1 0.2份,蒸馏水1000份;
- [0014] 所述Tris缓冲液按重量计包括:三羟甲基氨基甲烷4.6~5.5份, KH_2PO_4 2.0~3.0份, NaCl 18份, KC1 0.4份,牛血清白蛋白9份,蒸馏水1200份。
- [0015] 优选地,所述耦合物结合垫片按如下步骤制备:
- [0016] 用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;
- [0017] 用MES溶液重悬荧光微球,并加入活化剂EDC,活化30min;
- [0018] 用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤活化的荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;
- [0019] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,加入脂联素鼠单克隆抗体,室温下震荡混匀,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;
- [0020] 用质量分数为5%的BSA溶液重悬活化的荧光微球,室温下震荡反应1h,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;
- [0021] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;
- [0022] 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片上,喷涂量为 $25\mu\text{L}/\text{cm}$,于 37°C 温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片。
- [0023] 优选地,所述荧光微球为羧基荧光微球,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;或者所述荧光微球为氨基微球,所述活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺;或者所述活化剂为羟基微球,所述活化剂为BrCN。
- [0024] 优选地,所述耦合物结合垫片按如下步骤制备:
- [0025] 用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;
- [0026] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬荧光微球,加入脂联素鼠单克隆抗体,室温下震荡混匀,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;
- [0027] 用质量分数为5%的BSA溶液重悬荧光微球,室温下震荡反应1h,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;
- [0028] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;
- [0029] 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片上,喷涂量为 $25\mu\text{L}/\text{cm}$,于 37°C 温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片。
- [0030] 优选地,所述荧光微球包括肼基微球、氯甲基微球中的任意一种或者其组合物。

[0031] 优选地,所述荧光微球与所述活化剂EDC的质量比为1:1,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为5:1。

[0032] 本发明还提出一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0033] 采集血样2~3ml,室温放置15min-120min,以3000r/min速度离心30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,即得待测样本;

[0034] 利用移液器准确吸取80μL待测样本,滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片上;

[0035] 待测样本层析完全后,检测荧光试纸条的测试带信号值和控制带信号值,通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度,定量判定其质量浓度。

[0036] 本发明提供了一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及其定量检测方法,其中,所述检测脂联素的荧光免疫层析试纸条包括PVC衬板、硝酸纤维素膜、耦合物结合垫片、样本垫片及吸水垫片,所述PVC衬板上粘贴有硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜的一端粘贴有耦合物结合垫片,另一端粘贴有吸水垫片,所述耦合物结合垫片上粘贴有样本垫片;所述硝酸纤维素膜上设置有测试带和控制带,所述测试带内包被有鼠抗脂联素抗体,所述控制带内包被有兔抗鼠抗体;所述耦合物结合垫片包被有荧光标记脂联素抗体。与现有技术相比,本发明的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条具有方便快捷,操作简单,灵敏度高,便于临床推广应用等优点。

附图说明

[0037] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图示出的结构获得其他的附图。

[0038] 图1为本发明检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的结构示意图。

[0039] 附图标号说明:

[0040]

标号	名称	标号	名称
10	PVC衬板	50	吸水垫片
20	硝酸纤维素膜	60	测试带
30	耦合物结合垫片	70	控制带
40	样本垫片		

[0041] 本发明目的的实现、功能特点及优点将结合实施例,参照附图做进一步说明。

具体实施方式

[0042] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0043] 本发明提出了一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条。

[0044] 参照图1,本发明提出的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条包括PVC衬板10、硝酸纤维素膜20、耦合物结合垫片30、样本垫片40及吸水垫片50,所述PVC衬板10上粘贴有硝酸纤维素膜20,所述硝酸纤维素膜20的一端粘贴有耦合物结合垫片30,另一端粘贴有吸水垫片50,所述耦合物结合垫片30上粘贴有样本垫片40。所述硝酸纤维素膜20上设置有测试带60和控制带70,所述测试带60内包被有鼠抗脂联素抗体,所述控制带70内包被有兔抗鼠抗体。所述耦合物结合垫片30包被有荧光标记脂联素抗体。

[0045] 其中,荧光试纸条检测原理是让待测样本通过耦合物结合垫片30,与耦合物垫片上包被的荧光标记脂联素抗体特异性结合,结合物在硝酸纤维素膜20上层析到达包被有鼠抗脂联素抗体区域后,脂联素-荧光标记脂联素抗体复合物被脂联素抗体捕获,待测样本中脂联素浓度越高,测试带60光密度值越高;游离的荧光标记脂联素抗体继续层析至控制带70区域,并与控制带70抗体结合,通过仪器检测测试带60和控制带70的信号值,即可定量待测样本中脂联素的浓度。

[0046] 具体地,所述测试带60位于所述硝酸纤维素的左侧,所述控制带70位于所述硝酸纤维素的右侧,所述测试带60与所述控制带70之间的距离为3mm~7mm。优选地,所述测试带60与所述控制带70之间的距离为5mm。

[0047] 所述硝酸纤维素膜20的厚度为0.3cm~0.5cm,所述硝酸纤维素膜20的宽度为0.2mm~0.4mm。优选地,所述硝酸纤维素膜20的厚度为0.4cm,所述硝酸纤维素膜20的宽度为0.3mm。另外,所述吸水垫片50由吸水性较强的吸水滤纸制成。

[0048] 在本实施例中,所述硝酸纤维素膜20按如下步骤制备:

[0049] 分别将测试带60抗体原液和控制带70抗体原液在4℃下以6000~13000r/min速度离心60min,吸取两种上清液;将两种上清液分别装入透析袋,用双蒸水透析去除盐分后,超滤浓缩后装瓶冷冻,得到测试带60抗体和控制带70抗体;用pH值为6.5~6.7的磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液分别稀释两种抗体,得到0.8mg/ml测试带60包被液和0.8mg/ml控制带70包被液;将所述测试带60包被液和所述控制带70包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜20对应的测试带60和控制带70位置,喷涂量为1μL/cm;再将包被好硝酸纤维素膜20置于37℃温度下烘干。

[0050] 具体地,所述磷酸盐缓冲液按重量计包括:Na₂HP040.263-0.376份,KH₂P041.000-1.109份,NaCl16份,KC10.2份,蒸馏水1000份;所述Tris缓冲液按重量计包括:三羟甲基氨基甲烷4.6-5.5份,KH₂P042.0-3.0份,NaCl18份,KC10.4份,牛血清白蛋白9份,蒸馏水1200份。

[0051] 在一实施例中,所述包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30按如下步骤制备:

[0052] 用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

[0053] 用MES溶液重悬荧光微球,并加入活化剂,活化30min;

[0054] 用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤活化的荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

[0055] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,加入脂联素鼠单克隆抗体,室温下震荡混匀,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0056] 用质量分数为5%的BSA溶液重悬活化的荧光微球,室温下震荡反应1h,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0057] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;

[0058] 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片30上,喷涂量为25μL/cm,于37℃温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30。

[0059] 在本实施例中,所述荧光微球可以为羧基荧光微球、氨基微球、羟基微球中的任意一种或者其组合物。例如,若所述荧光微球为羧基荧光微球,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC);若所述荧光微球为氨基微球,所述活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);若所述活化剂为羟基微球,所述活化剂为BrCN。

[0060] 需要说明的是,所述荧光微球与所述活化剂的质量比为1:5~5:1;所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为6:1~4:1。优选地,所述荧光微球与所述活化剂的质量比为1:1,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为5:1。

[0061] 为了使得制备包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30的工艺更简单,可以减少活化步骤。在另一实施例中,所述包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30可以按如下步骤制备:

[0062] 用pH值为6.4~6.6的MES溶液洗涤荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

[0063] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬荧光微球,加入脂联素鼠单克隆抗体,室温下震荡混匀,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0064] 用质量分数为5%的BSA溶液重悬荧光微球,室温下震荡反应1h,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0065] 用pH值为8.5~9.5的硼酸溶液重悬荧光微球,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;

[0066] 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片30上,喷涂量为25μL/cm,于37℃温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30。

[0067] 在本实施例中,所述荧光微球包括肼基微球、氯甲基微球中的任意一种或者其组合物。其中,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为6:1~4:1。优选地,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为5:1。

[0068] 在本实施例中,所述检测脂联素的荧光层析试纸条还包括定标卡,所述定标卡为人脂联素梯度质量浓度溶液所检测颜色相对应的检测信号值。优选地,所述梯度质量浓度分别为0.5mg/L、1mg/L、2mg/L、4mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L。

[0069] 与现有技术相比,本发明提供的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条具有方便快捷,操作简单,灵敏度高,便于临床推广应用等优点。

[0070] 在一较佳实施例中,所述检测脂联素的荧光免疫层析试纸条还包括壳体,所述壳体上设置有加样窗口和检测窗口,所述加样窗口位于所述样本垫片40处,所述检测窗口位于所述测试带60和所述控制带70处。

[0071] 本发明还提出一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法，其中，该检测脂联素的荧光免疫层析试纸条采用上述全部实施例中制备的荧光试纸条。所述检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法包括如下步骤：

[0072] 采集血样2~3ml，室温放置15min-120min，以3000r/min速度离心30min，吸取上清液至样本稀释液中混匀，即得待测样本；利用移液器准确吸取80μL待测样本，滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片40上；待测样本层析完全后，检测荧光试纸条的测试带60信号值和控制带70信号值，通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度，定量判定其质量浓度。需要说明的是，所述血样可以为血清、血浆或者全血。所述样本稀释液为含0.2%Tween-20的0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)溶液，样本稀释液的pH值为6.5~6.7。

[0073] 为了进一步对本发明进行解释，下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明，本发明的保护范围不受以下实施例的限制。

[0074] 实施例1

[0075] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，包括PVC衬板10、硝酸纤维素膜20、耦合物结合垫片30、样本垫片40及吸水垫片50，所述PVC衬板10上粘贴有硝酸纤维素膜20，所述硝酸纤维素膜20的一端粘贴有耦合物结合垫片30，另一端粘贴有吸水垫片50，所述耦合物结合垫片30上粘贴有样本垫片40；所述硝酸纤维素膜20上设置有测试带60和控制带70，所述测试带60内包被有鼠抗脂联素抗体，所述控制带70内包被有兔抗鼠抗体；所述耦合物结合垫片30包被有荧光标记脂联素抗体。

[0076] 其中，所述硝酸纤维素膜20按如下步骤制备：

[0077] (1) 抗体的纯化。分别将测试带60抗体原液和控制带70抗体原液在4℃下以6000r/min速度离心60min，吸取两种上清液；将两种上清液分别装入透析袋，用双蒸水透析去除盐分后，超滤浓缩后装瓶冷冻，得到测试带60抗体和控制带70抗体。

[0078] (2) 用pH值为6.5的磷酸盐缓冲液分别稀释两种抗体，得到0.8mg/ml测试带60包被液和0.8mg/ml控制带70包被液。所述磷酸盐缓冲液按重量计包括：Na₂HPO₄ 0.263份，KH₂PO₄ 1.000份，NaCl 6份，蒸馏水1000份。其中，质量分数为2%的吐温-20水溶液为将2ml的吐温-20加入到998ml蒸馏水中配置而成。

[0079] (3) 将所述测试带60包被液和所述控制带70包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜20对应的测试带60和控制带70位置，喷涂量为1μL/cm；再将包被好硝酸纤维素膜20置于37℃温度下烘烤4h，即可得到包被好的硝酸纤维素膜20。

[0080] 所述包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30按如下步骤制备：

[0081] (1) 用pH值为6.4的MES溶液洗涤荧光微球，8000r/min速度离心30min，去除上清液，重复操作两次；

[0082] (2) 用MES溶液重悬荧光微球，并加入活化剂EDC，活化30min；

[0083] (3) 用pH值为6.4的MES溶液洗涤活化的荧光微球，8000r/min速度离心30min，去除上清液，重复操作两次；

[0084] (4) 用pH值为8.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球，加入脂联素鼠单克隆抗体，室温下震荡混匀，8000r/min速度离心30min，去除上清液；

[0085] (5) 用质量分数为5%的BSA溶液重悬活化的荧光微球，室温下震荡反应1h，8000r/

min速度离心30min,去除上清液;

[0086] (6) 用pH值为8.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,8000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;

[0087] (7) 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片30上,喷涂量为25 μ L/cm,于37℃温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30。

[0088] 在本实施例中,所述荧光微球与所述活化剂的质量比为1:1,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为5:1。所述荧光微球为羧基荧光微球,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。

[0089] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法,包括如下步骤:

[0090] (1) 采集血样2~3ml,室温放置15min~120min,以3000r/min速度离心30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,即得待测样本;(2) 利用移液器准确吸取80 μ L待测样本,滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片40上;(3) 待测样本层析完全后,检测荧光试纸条的测试带60信号值和控制带70信号值,通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度,即可定量判定其质量浓度。

[0091] 实施例2

[0092] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,包括PVC衬板10、硝酸纤维素膜20、耦合物结合垫片30、样本垫片40及吸水垫片50,所述PVC衬板10上粘贴有硝酸纤维素膜20,所述硝酸纤维素膜20的一端粘贴有耦合物结合垫片30,另一端粘贴有吸水垫片50,所述耦合物结合垫片30上粘贴有样本垫片40;所述硝酸纤维素膜20上设置有测试带60和控制带70,所述测试带60内包被有鼠抗脂联素抗体,所述控制带70内包被有兔抗鼠抗体;所述耦合物结合垫片30包被有荧光标记脂联素抗体。

[0093] 其中,所述硝酸纤维素膜20按如下步骤制备:

[0094] (1) 抗体的纯化。分别将测试带60抗体原液和控制带70抗体原液在4℃下以10000r/min速度离心60min,吸取两种上清液;将两种上清液分别装入透析袋,用双蒸水透析去除盐分后,超滤浓缩后装瓶冷冻,得到测试带60抗体和控制带70抗体。

[0095] (2) 用pH值为6.6的磷酸盐缓冲液分别稀释两种抗体,得到0.8mg/ml测试带60包被液和0.8mg/ml控制带70包被液。所述磷酸盐缓冲液按重量计包括:Na₂HP0₄ 0.376份,KH₂P0₄ 1.109份,NaCl 6份,KC1 0.2份,蒸馏水1000份。

[0096] (3) 将所述测试带60包被液和所述控制带70包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜20对应的测试带60和控制带70位置,喷涂量为1 μ L/cm;再将包被好硝酸纤维素膜20置于37℃温度下烘烤4h,即可得到包被好的硝酸纤维素膜20。

[0097] 所述包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30按如下步骤制备:

[0098] (1) 用pH值为6.5的MES溶液洗涤荧光微球,14000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

[0099] (2) 用MES溶液重悬荧光微球,并加入活化剂EDC,活化30min;

[0100] (3) 用pH值为6.5的MES溶液洗涤活化的荧光微球,14000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

[0101] (4) 用pH值为9.0的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,加入脂联素鼠单克隆抗体,室

温下震荡混匀,14000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0102] (5)用质量分数为5%的BSA溶液重悬活化的荧光微球,室温下震荡反应1h,14000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0103] (6)用pH值为9.0的硼酸溶液重悬活化的荧光微球,14000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;

[0104] (7)用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片30上,喷涂量为25 μ L/cm,于37℃温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30。

[0105] 在本实施例中,所述荧光微球与所述活化剂的质量比为1:5,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为6:1。所述荧光微球为氨基微球,所述活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺。

[0106] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法,包括如下步骤:

[0107] (1)采集血样2~3ml,室温放置15min-120min,以3000r/min速度离心30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,即得待测样本;(2)利用移液器准确吸取80 μ L待测样本,滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片40上;(3)待测样本层析完全后,检测荧光试纸条的测试带60信号值和控制带70信号值,通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度,即可定量判定其质量浓度。

[0108] 实施例3

[0109] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条,包括PVC衬板10、硝酸纤维素膜20、耦合物结合垫片30、样本垫片40及吸水垫片50,所述PVC衬板10上粘贴有硝酸纤维素膜20,所述硝酸纤维素膜20的一端粘贴有耦合物结合垫片30,另一端粘贴有吸水垫片50,所述耦合物结合垫片30上粘贴有样本垫片40;所述硝酸纤维素膜20上设置有测试带60和控制带70,所述测试带60内包被有鼠抗脂联素抗体,所述控制带70内包被有兔抗鼠抗体;所述耦合物结合垫片30包被有荧光标记脂联素抗体。

[0110] 其中,所述硝酸纤维素膜20按如下步骤制备:

[0111] (1)抗体的纯化。分别将测试带60抗体原液和控制带70抗体原液在4℃下以13000r/min速度离心60min,吸取两种上清液;将两种上清液分别装入透析袋,用双蒸水透析去除盐分后,超滤浓缩后装瓶冷冻,得到测试带60抗体和控制带70抗体。

[0112] (2)用pH值为6.5的Tris缓冲液分别稀释两种抗体,得到0.8mg/ml测试带60包被液和0.8mg/ml控制带70包被液。所述Tris缓冲液按重量计包括:三羟甲基氨基甲烷4.6份,KH₂PO₄2.0份,NaCl18份,KC10.4份,牛血清白蛋白9份,蒸馏水1200份。

[0113] (3)将所述测试带60包被液和所述控制带70包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜20对应的测试带60和控制带70位置,喷涂量为1 μ L/cm;再将包被好硝酸纤维素膜20置于37℃温度下烘烤4h,即可得到包被好的硝酸纤维素膜20。

[0114] 所述包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30按如下步骤制备:

[0115] (1)用pH值为6.6的MES溶液洗涤荧光微球,15000r/min速度离心30min,去除上清液,重复操作两次;

[0116] (2)用MES溶液重悬荧光微球,并加入活化剂,活化30min;

[0117] (3)用pH值为6.6的MES溶液洗涤活化的荧光微球,15000r/min速度离心30min,去

除上清液，重复操作两次；

[0118] (4) 用pH值为9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球，加入脂联素鼠单克隆抗体，室温下震荡混匀，15000r/min速度离心30min，去除上清液；

[0119] (5) 用质量分数为5%的BSA溶液重悬活化的荧光微球，室温下震荡反应1h，15000r/min速度离心30min，去除上清液；

[0120] (6) 用pH值为9.5的硼酸溶液重悬活化的荧光微球，15000r/min速度离心30min，去除上清液，即得荧光标记脂联素抗体；

[0121] (7) 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后，均匀地喷涂到耦合物结合垫片30上，喷涂量为25μL/cm，于37℃温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30。

[0122] 在本实施例中，所述荧光微球与所述活化剂的质量比为5:1，所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为4:1。所述活化剂为羟基微球，所述活化剂为BrCN。

[0123] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法，包括如下步骤：

[0124] (1) 采集血样2~3ml，室温放置15min~120min，以3000r/min速度离心30min，吸取上清液至样本稀释液中混匀，即得待测样本；(2) 利用移液器准确吸取80μL待测样本，滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片40上；(3) 待测样本层析完全后，检测荧光试纸条的测试带60信号值和控制带70信号值，通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度，即可定量判定其质量浓度。

[0125] 实施例4

[0126] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条，包括PVC衬板10、硝酸纤维素膜20、耦合物结合垫片30、样本垫片40及吸水垫片50，所述PVC衬板10上粘贴有硝酸纤维素膜20，所述硝酸纤维素膜20的一端粘贴有耦合物结合垫片30，另一端粘贴有吸水垫片50，所述耦合物结合垫片30上粘贴有样本垫片40；所述硝酸纤维素膜20上设置有测试带60和控制带70，所述测试带60内包被有鼠抗脂联素抗体，所述控制带70内包被有兔抗鼠抗体；所述耦合物结合垫片30包被有荧光标记脂联素抗体。

[0127] 其中，所述硝酸纤维素膜20按如下步骤制备：

[0128] (1) 抗体的纯化。分别将测试带60抗体原液和控制带70抗体原液在4℃下以13000r/min速度离心60min，吸取两种上清液；将两种上清液分别装入透析袋，用双蒸水透析去除盐分后，超滤浓缩后装瓶冷冻，得到测试带60抗体和控制带70抗体。

[0129] (2) 用pH值为6.5的Tris缓冲液分别稀释两种抗体，得到0.8mg/ml测试带60包被液和0.8mg/ml控制带70包被液。所述Tris缓冲液按重量计包括：三羟甲基氨基甲烷5.5份，KH₂PO₄3.0份，NaCl18份，KC10.4份，牛血清白蛋白9份，蒸馏水1200份。

[0130] (3) 将所述测试带60包被液和所述控制带70包被液分别喷涂在硝酸纤维素膜20对应的测试带60和控制带70位置，喷涂量为1μL/cm；再将包被好硝酸纤维素膜20置于37℃温度下烘烤4h，即可得到包被好的硝酸纤维素膜20。

[0131] 所述包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30按如下步骤制备：

[0132] (1) 用pH值为6.5的MES溶液洗涤荧光微球，10000r/min速度离心30min，去除上清液，重复操作两次；

[0133] (2) 用pH值为9.0的硼酸溶液重悬荧光微球，加入脂联素鼠单克隆抗体，室温下震

荡混匀,10000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0134] (3) 用质量分数为5%的BSA溶液重悬荧光微球,室温下震荡反应1h,8000~15000r/min速度离心30min,去除上清液;

[0135] (4) 用pH值为9.0的硼酸溶液重悬荧光微球,10000r/min速度离心30min,去除上清液,即得荧光标记脂联素抗体;

[0136] (5) 用PBS溶液将所述荧光标记脂联素抗体稀释10倍后,均匀地喷涂到耦合物结合垫片30上,喷涂量为25μL/cm,于37℃温度下烘干即得包被有荧光标记脂联素抗体的耦合物结合垫片30。

[0137] 在本实施例中,所述荧光微球为肼基微球,所述荧光微球与所述脂联素鼠单克隆抗体的质量比为5:1。

[0138] 一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的定量检测方法,包括如下步骤:(1)采集血样2~3ml,室温放置15min-120min,以3000r/min速度离心30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,即得待测样本;(2)利用移液器准确吸取80μL待测样本,滴加在检测脂联素的荧光免疫层析试纸条的样本垫片40上;(3)待测样本层析完全后,检测荧光试纸条的测试带60信号值和控制带70信号值,通过仪器结合定标卡信息计算待测样本的脂联素浓度,即可定量判定其质量浓度。

[0139] 以上所述仅为本发明的优选实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是在本发明的发明构思下,利用本发明说明书及附图内容所作的等效变换,或直接/间接运用在其他相关的技术领域均包括在本发明的专利保护范围内。

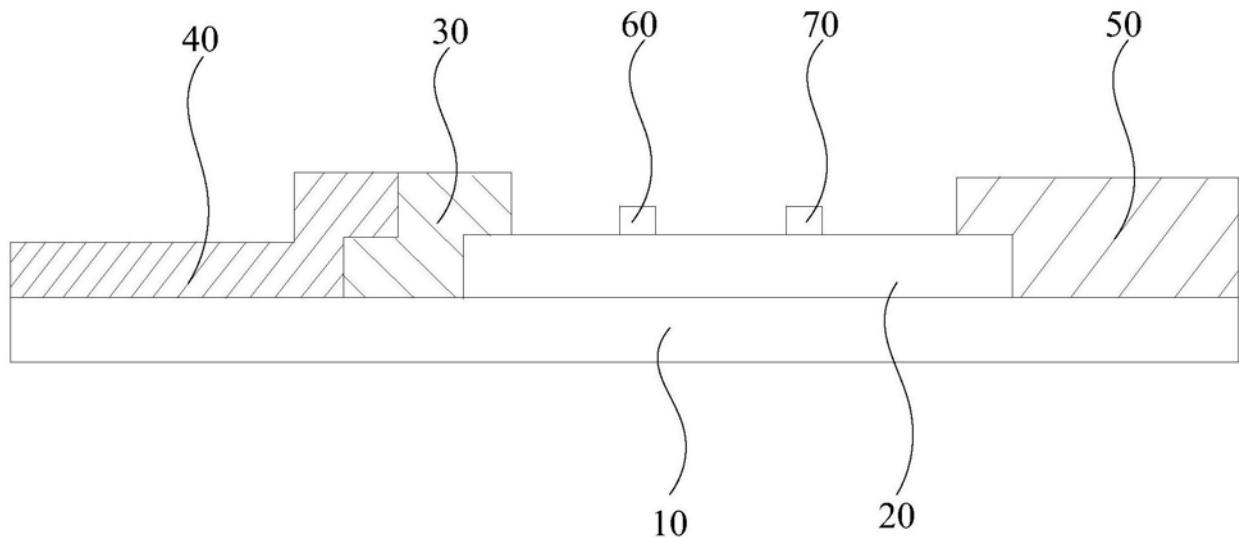


图1

专利名称(译)	一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及其定量检测方法		
公开(公告)号	CN108303549A	公开(公告)日	2018-07-20
申请号	CN201810140293.1	申请日	2018-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	广东优尼德生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东优尼德生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东优尼德生物科技有限公司		
[标]发明人	夏宣喜 赖华 孔浩杰 刘志文		
发明人	夏宣喜 赖华 孔浩杰 刘志文		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/531 G01N33/54313 G01N2800/50 G01N2800/52		
代理人(译)	胡海国		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开一种检测脂联素的荧光免疫层析试纸条及其定量检测方法，其中，所述检测脂联素的荧光免疫层析试纸条包括PVC衬板、硝酸纤维素膜、耦合物结合垫片、样本垫片及吸水垫片，所述PVC衬板上粘贴有硝酸纤维素膜，所述硝酸纤维素膜的一端粘贴有耦合物结合垫片，另一端粘贴有吸水垫片，所述耦合物结合垫片上粘贴有样本垫片；所述硝酸纤维素膜上设置有测试带和控制带，所述测试带内包被有鼠抗脂联素抗体，所述控制带内包被有兔抗鼠抗体；所述耦合物结合垫片包被有荧光标记脂联素抗体。本发明的检测脂联素的荧光免疫层析试纸条具有方便快捷，操作简单，灵敏度高，便于临床推广应用等优点。

