

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910047352.1

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101526534A

[22] 申请日 2009.3.10

[21] 申请号 200910047352.1

[71] 申请人 沈鹤柏

地址 200234 上海市南丹东路 106 号 2005 室

[72] 发明人 沈鹤柏 赵露晶 马经纬

[74] 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所
代理人 谢文凯 黄志达

权利要求书 4 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

一种荧光免疫层析试纸及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明涉及一种荧光免疫层析试纸，由依次在带有粘合剂的衬板上相互搭接的样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸组成，其中，所述的结合垫上涂有荧光材料-抗体 1 复合物，所述的荧光标记材料为荧光素颗粒或稀土上转荧光材料，所述的抗体承载膜为硝酸纤维素膜或尼龙膜，抗体承载膜上分别为连接有抗体 2 和二抗的 T 线和 C 线；荧光材料为荧光素颗粒或稀土上转荧光颗粒，其中荧光素颗粒选自异硫氰酸荧光素或四甲基异硫氰酸罗丹明或四乙基罗丹明，荧光标记材料的表面经氨基化并通过交联反应与抗体结合；利用荧光定量测量系统检测 T 线和 C 线区域的荧光强度，通过抗原浓度的标准曲线完成定量检测。适用于尿纤维连接蛋白等的肿瘤标志物免疫检测。

1. 一种荧光免疫层析试纸，由依次在带有粘合剂的衬板上相互搭接的样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸组成，其中，所述的结合垫上涂有荧光标记材料-抗体 1 复合物，所述的抗体承载膜为硝酸纤维素膜或尼龙膜，抗体承载膜上分别为连接有抗体 2 和第二抗体的 T 线和 C 线，其特征在于，所述的荧光标记材料的表面经硅化包裹和氨基化，并通过交联反应与抗体结合；所述的 T 线和 C 线区域的荧光强度在检测中分别与标准抗原浓度的标准曲线相对应，完成定量检测。
2. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸，其特征在于，所述的荧光标记材料为荧光素颗粒或者稀土上转荧光材料。
3. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸，其特征在于，所述的荧光素颗粒为异硫氰酸荧光素或四甲基异硫氰酸罗丹明或四乙基罗丹明。
4. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸，其特征在于，所述的稀土上转荧光颗粒为铈掺杂或铈掺杂或铈掺杂的碱土金属硫化物。
5. 根据权利要求 1-4 之一所述的荧光免疫层析试纸，其特征在于，所述的抗体 1 和抗体 2 均为甲胎蛋白或尿纤维连接蛋白的抗体。
6. 一种荧光免疫层析试纸的制备方法，依次包括如下步骤：
 - 1) 稀土上转荧光颗粒的表面硅化：取 5-50mg 稀土上转荧光颗粒，加入 300-800mL 35-70% 乙醇溶液，超声处理使反应体系混合均匀，在 15-50℃ 水浴中搅拌至平衡，再向其中加入 0.1-1mL 正硅酸乙酯，继续反应 3-10 小时，离心洗涤；

- 2) 稀土上转荧光颗粒的表面氨基化：取上述表面硅化的稀土上转荧光颗粒，加入 30~100mL 1:3~3:1 (V/V) 甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后向其中加入 10-1000 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温下搅拌 5~10 小时，用乙醇离心洗涤，干燥保存；
 - 3) 稀土上转荧光颗粒表面连接抗体：将表面连接氨基的稀土上转荧光颗粒分散在磷酸缓冲液中，加入一定量戊二醛，反应 2-5 小时，离心除去戊二醛，重新分散在磷酸缓冲液中，然后加入抗体 1，反应 1-5 小时，离心洗涤，最终保存在含 0.1% BSA 和 0.1% Tween 20 的磷酸缓冲液中；
 - 4) 荧光免疫层析试纸的组装：将稀土上转荧光颗粒-抗体 1 复合物涂覆在结合垫上，将抗体 2 和第二抗体分别以线状连接于抗体承载膜上形成 T 线和 C 线，并在带有粘合剂的衬板上相互搭接地粘合样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸。
7. 根据权利要求 6 所述的荧光免疫层析试纸的制备方法，其特征在于，所述的抗体 1 和抗体 2 均为甲胎蛋白或尿纤维连接蛋白的抗体。
8. 一种荧光免疫层析试纸的制备方法，依次包括如下步骤：
- 1) 荧光素颗粒的表面硅化：在乙醇体系中，分别加入 0.1-10mg 异硫氰酸荧光素或四甲基异硫氰酸罗丹明或四乙基罗丹明，和 0.1-10 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温搅拌 3~10 小时，再依次加入 0.1-10mL 水、0.1-10mL 15%wt 氨水、0.1-10mL

- 正硅酸乙酯(TEOS)，继续反应 3-10 小时，洗涤获得表面硅化的荧光素颗粒；
- 2) 荧光素的表面氨基化：取上述表面硅化的荧光素颗粒，加入 10~50mL 1:3~3:1 (V/V) 甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后加入 10-500 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温搅拌 5~10 小时，用乙醇洗涤，干燥，获得表面氨基化的荧光素颗粒；
 - 3) 荧光素颗粒表面连接抗体：将上述表面氨基化的荧光素颗粒分散在磷酸缓冲液中，加入戊二醛反应 2-5 小时，离心除去戊二醛，将荧光素颗粒重新分散在磷酸缓冲液中，加入抗体 1，反应 1-5 小时，洗涤后获得荧光素颗粒-抗体 1 复合物，保存在含 0.1% BSA 和 0.1% Tween 20 的磷酸缓冲液中；
 - 4) 荧光免疫层析试纸的组装：将荧光素颗粒-抗体 1 复合物涂覆在结合垫上，将抗体 2 和第二抗体分别以线状连接于抗体承载膜上形成 T 线和 C 线，并在带有粘合剂的衬板上相互搭接地粘合样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸。
9. 一种利用权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸定量检测抗原的方法，依次包括如下步骤：
- i. 将抗原标准品配制成 2~10 倍梯度的浓度系列标准品；
 - ii. 将上述浓度系列标准品分别用权利要求 1 所述的试纸进行免疫层析，利用荧光定量光谱仪分别检测 T 线和 C 线区域的荧光强度，制作抗原浓度的标准曲线；

-
- iii. 待测抗原用权利要求 1 所述的试纸进行免疫层析,利用上述的标准曲线求得抗原浓度。
10. 根据权利要求 9 所述的荧光免疫层析试纸定量检测抗原的方法,其特征在于,所述的抗原为甲胎蛋白或尿纤维连接蛋白。

一种荧光免疫层析试纸及其制备方法和应用

技术领域

本发明属医学检验领域，特别是涉及一种荧光免疫层析检测试纸。

背景技术

肿瘤是威胁人类健康的高发病率和高死亡率性疾病，大量研究和防治资料证实，早期诊断和早期治疗是防治肿瘤与降低死亡率的最有效办法。为此，人们设想了多种措施和途径，对早期无症状肿瘤患者，肿瘤标记物常常作为能早期诊断肿瘤的方法之一。因此，不断寻求新的肿瘤标记物及其检测方法已经成为学术界研究的热点。

目前，临床上主要还是通过免疫分析技术对肿瘤标记物进行检测，如酶联免疫法（ELISA）、放射免疫法（RIA）、化学发光法（CLIA）等，但是传统的免疫分析方法需要特殊的仪器设备，费用较贵。免疫层析试纸技术的发展一定程度上弥补了这一不足，它操作简单，准确直观，为个人、家庭常规快速诊断检测提供了可能。其以微孔膜作为发生免疫反应的固相载体，经渗透和毛细虹吸作用使待测样品中的抗体或抗原与膜上包被的抗原或抗体结合，通过标记物示踪反应结果。当前常见的标记材料主要包括放射性同位素、酶、胶体金以及发光标记材料，其中发光标记材料又包括荧光、化学发光、生物发光材料等。但是上述材料都有其局限性：放射性同位素易衰变，存在放射污染；酶自身性质不稳定，易受生物样品的干扰；胶体金难以进行多重、定量分析；化学发光为瞬时发光，检测仪器昂贵；荧光材料则存在淬灭现象，

使得时间分辨检测无法进行。

因此，改进或寻找新的标记材料现已成为人们关注的焦点。常用的荧光染料存在光漂白现象，导致荧光信号不稳定，通过对其表面进行包裹不仅克服了它的淬灭现象，而且实现了荧光颗粒的表面功能化。 SiO_2 以稳定性高，成键能力强，表面易功能化等优势自然成为首选。本专利制备了 SiO_2 包裹的荧光素颗粒-抗体复合物和荧光免疫层析试纸，并将其应用于荧光免疫层析技术检测肿瘤标志物，比免疫金层析试纸的灵敏度提到了 10-100 倍，进一步拓展了它在生物医学领域中的应用。

此外，近年来一类新型标记物——纳米上转换发光材料（UCP）的出现为免疫层析技术的发展提供了新的可能。UCP 是由稀土金属元素掺杂于晶体的晶格中构成的纳米级颗粒。由于独特的结构，UCP 可由红外光激发而发射波长远短于激发光的可见光，即上转换发光。这种绝无仅有的性质使 UCP 作为标记物与传统标记物相比具有无本底干扰、无淬灭、使用安全、适合多重分析和定量分析等显著优势，确保了 UCP 在检测过程中高度的敏感性、稳定性、安全性和灵活性。中国食品卫生杂志 2007，19（1）：41-44 公开了一种利用上转换磷光免疫层析检测肠出血性大肠杆菌 O157 的方法，但是采用的 UCP 颗粒未进行包裹，易发生荧光淬灭现象，且该检测为定性检测，不能够用于定量。UCP 材料应用于尿纤维连接蛋白肿瘤标志物的检测未见报道。

发明内容

所要解决的技术问题

本发明所要解决的技术问题是提供一种荧光免疫层析检测试纸，以克服

现有技术采用的 UCP 颗粒未进行包裹，易发生荧光猝灭现象，且利用 UCP 颗粒的免疫检测为定性检测，不能够用于定量，且检测灵敏度低的缺陷。

技术方案

本发明的技术方案之一是提供一种荧光免疫层析试纸，由依次在带有粘合剂的衬板上相互搭接的样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸组成，其中，所述的结合垫上涂有荧光标记材料-抗体 1 复合物，所述的抗体承载膜为硝酸纤维素膜或尼龙膜，抗体承载膜上分别为连接有抗体 2 和第二抗体的 T 线和 C 线，其特征在于，所述的荧光标记材料的表面经硅化包裹和氨基化，并通过交联反应与抗体结合；所述的 T 线和 C 线区域的荧光强度在检测中分别与标准抗原浓度的标准曲线相对应，完成定量检测。

上述的荧光免疫层析试纸的优选方案之一为，所述的荧光标记材料为荧光素颗粒或者稀土上转荧光材料。

上述的荧光免疫层析试纸的优选方案之二为，所述的荧光素颗粒为异硫氰酸荧光素或四甲基异硫氰酸罗丹明或四乙基罗丹明。

上述的荧光免疫层析试纸的优选方案之三为，所述的稀土上转荧光颗粒为铈掺杂或铒掺杂或镱掺杂的碱土金属硫化物。

上述各荧光免疫层析试纸的优选方案为，所述的抗体 1 和抗体 2 均为甲胎蛋白或尿纤维连接蛋白的抗体。

本发明的技术方案之二是提供一种荧光免疫层析试纸的制备方法，依次包括如下步骤：

- 1) 稀土上转荧光颗粒的表面硅化：取 5-50mg 稀土上转荧光颗粒，加入 300-800mL 35-70% 乙醇溶液，超声处理使反应体系混合均匀，在 15-50℃水浴中搅拌至平衡，再向其中加入 0.1-1mL 正硅酸乙酯（TEOS），继续反应 3-10 小时，离心洗涤；
- 2) 稀土上转荧光颗粒的表面氨基化：取上述表面硅化的稀土上转荧光颗粒，加入 30~100mL 1:3~3:1 (V/V) 甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后向其中加入 10-1000 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50℃恒温下搅拌 5~10 小时，用乙醇离心洗涤，干燥保存；
- 3) 稀土上转荧光颗粒表面连接抗体：将表面连接氨基的稀土上转荧光颗粒分散在磷酸缓冲液（PB）中，加入一定量戊二醛，反应 2-5 小时，离心除去戊二醛，重新分散在磷酸缓冲液中，然后加入抗体 1，反应 1-5 小时，离心洗涤，最终保存在含 0.1% BSA 和 0.1% Tween 20 的磷酸缓冲液中；
- 4) 荧光免疫层析试纸的组装：将稀土上转荧光颗粒-抗体 1 复合物涂覆在结合垫上，将抗体 2 和第二抗体分别以线状连接于抗体承载膜上形成 T 线和 C 线，并在带有粘合剂的衬板上相互搭接地粘合样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸。

上述的荧光免疫层析试纸的制备方法的优选方案为，所述的抗体 1 和抗体 2 均为甲胎蛋白或尿纤维连接蛋白的抗体。

本发明的技术方案之三是提供另一种荧光免疫层析试纸的制备方法，依次包括如下步骤：

- 1) 荧光素颗粒的表面硅化：在乙醇体系中，分别加入 0.1-10mg 异硫氰酸荧光素或四甲基异硫氰酸罗丹明或四乙基罗丹明，和 0.1-10 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温搅拌 3~10 小时，再依次加入 0.1-10mL 水、0.1-10mL 15%wt 氨水、0.1-10mL 正硅酸乙酯(TEOS)，继续反应 3-10 小时，洗涤获得表面硅化的荧光素颗粒；
- 2) 荧光素的表面氨基化：取上述表面硅化的荧光素颗粒，加入 10~50mL 1:3~3:1 (V/V) 甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后加入 10-500 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温搅拌 5~10 小时，用乙醇洗涤，干燥，获得表面氨基化的荧光素颗粒；
- 3) 荧光素颗粒表面连接抗体：将上述表面氨基化的荧光素颗粒分散在磷酸缓冲液中，加入戊二醛反应 2-5 小时，离心除去戊二醛，将荧光素颗粒重新分散在磷酸缓冲液中，加入抗体 1，反应 1-5 小时，洗涤后获得荧光素颗粒-抗体 1 复合物，保存在含 0.1% BSA 和 0.1% Tween 20 的磷酸缓冲液中；
- 4) 荧光免疫层析试纸的组装：将荧光素颗粒-抗体 1 复合物涂覆在结合垫上，将抗体 2 和第二抗体分别以线状连接于抗体承载膜上形成 T 线和 C 线，并在带有粘合剂的衬板上相互搭接地粘合样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸。

本发明的技术方案之四是提供一种利用上述的荧光免疫层析试纸定量检测抗原的方法，依次包括如下步骤：

- i. 将抗原标准品配制成 2~10 倍梯度的浓度系列标准品；

- ii. 将上述浓度系列标准品分别用上述的试纸进行免疫层析,利用荧光定量光谱仪分别检测 T 线和 C 线区域的荧光强度,制作抗原浓度的标准曲线;
- iii. 待测抗原用上述的试纸进行免疫层析,利用上述的标准曲线求得抗原浓度。

上述的荧光免疫层析试纸定量检测抗原的方法的优选方案为,所述的抗原为甲胎蛋白或尿纤维连接蛋白。

上述的荧光免疫层析试纸也可以用于抗原定性检测,方法如下:

将试纸条的样品垫端插入待测样品液,10-30min 后取出,在紫外或红外光的激发下观察结果。如果检测带与质控带处都有荧光,说明待测样品中含有目标物,为阳性结果,检测带上荧光越强目标物含量越高;如果只有质控带有荧光,说明待测样品中没有目标物,为阴性结果;如果检测带与质控带处都没有荧光,说明检测无效。

有益效果

本发明通过制备表面进行硅化包裹的荧光标记材料-抗体复合物进而制备了荧光免疫层析试纸。对稀土上转换发光材料和荧光素颗粒表面进行硅化包裹,克服了荧光素容易淬灭的缺陷。应用荧光免疫层析技术定量检测肿瘤标志物,克服了金标试纸不能定量测定的缺点,而且该免疫层析试纸的灵敏度达 1-1.5ng/mL,较金标试纸提高了 10-100 倍。

本研究通过荧光素颗粒或上转换发光材料标记与双抗夹心免疫层析技术相结合,检测肿瘤标记物的含量,具有灵敏性高,准确性好,可实现定量分

析等优势。并且，填补了对尿纤维连接蛋白（Fn）定量免疫检测的技术空白。对于肿瘤的早期诊断、预后判断以及治疗过程的监控都具有深远的影响。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如：分子克隆操作手册，或按照制造厂商所建议的条件。所有无机化学试剂和有机溶剂购自上海化学试剂厂，FITC 和 AEAPS 购自上海浩然生物技术有限公司，红外上转换荧光粉（UCP）购自上海科炎光电技术有限公司、上海华明高纳稀土新材料有限公司和上海科润光电材料有限公司，小鼠抗 AFP 单克隆抗体和小鼠抗 FN 单克隆抗体购自上海我武生物科技有限公司，羊抗鼠 IgG 抗体为上海史瑞可生物科技有限公司产品。

实施例 1：制备核壳型 FITC-甲胎蛋白（AFP）抗体复合物

荧光素颗粒的表面硅化：在乙醇体系中，分别加入 0.1-10mg 异硫氰酸荧光素 FITC 和 0.1-10 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温搅拌 3~10 小时，再依次加入 0.1-10mL 水、0.1-10mL 15%wt 氨水、0.1-10mL 正硅酸乙酯(TEOS)，继续反应 3-10 小时，洗涤获得表面硅化的荧光素颗粒。

荧光素的表面氨基化：取上述表面硅化的荧光素颗粒，加入 10~50mL 1:3~3:1(V/V) 甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后加入 10-500 μ L N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50 $^{\circ}$ C 恒温搅拌 5~10 小时，用乙醇洗涤，干燥，获得表面氨基化的荧光素颗粒。

利用已经过表面氨基化的核壳型 FITC 与 AFP 抗体进行连接：

- 1、取 2mg 氨基化的核壳型 FITC 加入到 2mL 0.03 mol/L 的 PB (pH=7.2) 中，充分混匀。
- 2、向上述体系中加入 500 μ L 25% 的戊二醛，室温下反应 3 小时。
- 3、离心洗去多余的戊二醛，重新分散在 5mL 0.03 mol/L PB 中。
- 4、再向其中加入 100 μ L 小鼠抗 AFP 单克隆抗体，4 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。
- 5、4 $^{\circ}$ C 离心洗涤数次，保存于 0.03 mol/L PB (含 0.1% BSA, 0.1% Tween20) 中。

实施例 2：制备双抗体夹心 AFP 抗原检测试纸

- 1、样品垫的制备：选用纤维素膜作为样品垫材料，剪成 1.5 \times 30.0cm 规格的条带，将其放入样品垫封闭液 (0.03mol/L PB (pH=7.2)，含有 5mg/mL BSA, 0.1% Triton X-100) 中浸泡 30min，37 $^{\circ}$ C 烘干备用。
- 2、结合垫的制备：选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料，将其剪成 1.0 \times 30.0cm 规格的条带，将实施例 1 中制备的核壳型 FITC- AFP 抗体复合物离心，在沉降物中加入 0.03mol/L PB (pH=7.2)，含 1% 蔗糖，1% BSA)，充分混匀，加于该条带上，37 $^{\circ}$ C 烘干。
- 3、NC 的制备：将 NC 膜剪切成 2.5 \times 30.0cm 规格的条带，用点样仪在

NC膜上不同位置分别喷点AFP单抗和羊抗鼠IgG抗体,作为检测带和质控带, 37℃烘干。

- 4、 免疫层析试纸条的组装: 将吸水纸、NC膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上, 并切成4cm宽的试纸条。

实施例3: 分别以四甲基异硫氰酸罗丹明TRITC和四乙基罗丹明RB200替代实施例1-2中的异硫氰酸荧光素FITC制备双抗体夹心AFP抗原检测试纸。

实施例4: 定量免疫检测AFP抗原

- 1、 利用实施例1-3制成的荧光免疫层析试纸条定量检测20份临床血清

AFP抗原样品:

- i. 将1mg/mL的AFP抗原标准品配制成10倍梯度的浓度系列标准品;
- ii. 将上述浓度系列标准品分别用试纸进行免疫层析, 利用荧光定量光谱仪分别检测T线和C线区域的荧光强度, 制作抗原浓度的标准曲线;
- iii. 将试纸条的样品垫端插入待测样品液, 15min后取出, 在紫外灯下观察结果, 获得样品的定性检测结果: 在20份样品血清中, 临床符合率为95%;
- iv. 用荧光检测仪检测20份样品血清的T线和C线区域的荧光强度, 利用上述的标准曲线求得抗原浓度, 定量检测结果: 在20份样品血清中, 临床符合率为100%。

2、利用AFP抗原标准品配制成10倍梯度的浓度系列，在免疫层析检测后用荧光检测仪分析本试纸监测系统的灵敏度，结果达1ng/mL。

实施例5：制备UCP-尿纤维连接蛋白（FN）抗体复合物

稀土上转荧光颗粒（钕掺杂的碱土金属硫化物或上海华明高纳稀土新材料有限公司的上转化荧光粉）的表面硅化：取 5-50mg 稀土上转荧光颗粒，加入 300-800mL 35-70% 乙醇溶液，超声处理使反应体系混合均匀，在 15-50℃ 水浴中搅拌至平衡，再向其中加入 0.1-1mL 正硅酸乙酯（TEOS），继续反应 3-10 小时，离心洗涤；

稀土上转荧光颗粒的表面氨基化：取上述表面硅化的稀土上转荧光颗粒，加入 30~100mL 1:3~3:1（V/V）甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后向其中加入 10-1000 μ L N-（2-氨基乙基）-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，15-50℃恒温下搅拌 5~10 小时，用乙醇离心洗涤，干燥保存；

利用已经过表面氨基化的 UCP 与 FN 抗体进行连接：

- 1、 取5mg氨基化的UCP加入到3mL 0.03 mol/L的PB（pH=7.2）中，充分混匀。
- 2、 向上述体系中加入250 μ L 25%的戊二醛，室温下反应3小时。
- 3、 离心洗去多余的戊二醛，重新分散在5mL 0.03 mol/L PB中。
- 4、 再向其中加入150 μ L 小鼠抗FN单克隆抗体，4℃反应3小时。
- 5、 4℃离心洗涤数次，保存于0.03 mol/L PB（含0.1%BSA，0.1%Tween20）中。

实施例6：制备双抗体夹心FN抗原检测试纸

- 1、 样品垫的制备：选用纤维素膜作为样品垫材料，剪成1.5×30.0cm规格的条带，将其放入样品垫封闭液（0.03mol/L PB（pH=7.2），含有5mg/mLBSA，0.1%Triton X-100）中浸泡30min，37℃烘干备用。
- 2、 结合垫的制备：选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料，将其剪成1.0×30.0cm规格的条带，将实施例3中制备的UCP- FN抗体复合物离心，在沉降物中加入0.03mol/LPB（pH=7.2），含1%蔗糖，1%BSA），充分混匀，加于该条带上，37℃烘干。
- 3、 NC 的制备：将 NC 膜剪切成 2.5×30.0cm 规格的条带，用点样仪在 NC 膜上不同位置分别喷点 FN 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体,作为检测带和质控带，37℃烘干。
- 4、 免疫层析试纸条的组装：将吸水纸、NC膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上，并切成4cm宽的试纸条。

实施例7：分别以铈掺杂或铈掺杂的碱土金属硫化物替代实施例5-6中的铈掺杂的碱土金属硫化物制备双抗体夹心FN抗原检测试纸。

实施例8：检测尿纤维连接蛋白（FN）抗体复合物

- 1、 利用实施例5-7制成的UCP荧光免疫层析试纸条定量检测16份临床血清FN抗原样品：
 - i. 将 200ng/mL 的 FN 抗原标准品配制成 2 倍梯度的浓度系列标准品；

- ii. 将上述浓度系列标准品分别用试纸进行免疫层析，利用荧光定量光谱仪分别检测 T 线和 C 线区域的荧光强度，制作抗原浓度的标准曲线；
 - iii. 将试纸条的样品垫端插入待测样品液，15min 后取出，在紫外灯下观察结果，获得样品的定性检测结果：在 16 份样品血清中，临床符合率为 94%；
 - iv. 用荧光检测仪检测 16 份样品血清的 T 线和 C 线区域的荧光强度，利用上述的标准曲线求得抗原浓度，定量检测结果：在 16 份样品血清中，临床符合率为 100%。
- 2、利用FN抗原标准品配制成2倍梯度的浓度系列，在免疫层析检测后用荧光检测仪分析本试纸监测系统的灵敏度，结果达1.5ng/mL。

专利名称(译)	一种荧光免疫层析试纸及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101526534A	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200910047352.1	申请日	2009-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	沉鹤柏		
申请(专利权)人(译)	沉鹤柏		
当前申请(专利权)人(译)	沉鹤柏		
[标]发明人	沈鹤柏 赵露晶 马经纬		
发明人	沈鹤柏 赵露晶 马经纬		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/52 G01N33/533		
代理人(译)	谢文凯 黄志达		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种荧光免疫层析试纸，由依次在带有粘合剂的衬板上相互搭接的样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水纸组成，其中，所述的结合垫上涂有荧光材料 - 抗体1复合物，所述的荧光标记材料为荧光素颗粒或稀土上转荧光材料，所述的抗体承载膜为硝酸纤维素膜或尼龙膜，抗体承载膜上分别为连接有抗体2和二抗的T线和C线；荧光材料为荧光素颗粒或稀土上转荧光颗粒，其中荧光素颗粒选自异硫氰酸荧光素或四甲基异硫氰酸罗丹明或四乙基罗丹明，荧光标记材料的表面经氨基化并通过交联反应与抗体结合；利用荧光定量测量系统检测T线和C线区域的荧光强度，通过抗原浓度的标准曲线完成定量检测。适用于尿纤维连接蛋白等的肿瘤标志物免疫检测。