



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109521207 A

(43)申请公布日 2019.03.26

(21)申请号 201811620115.5

(22)申请日 2018.12.28

(71)申请人 广州菲康生物技术有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城开源大道11号B4栋第四
层420-448房

(72)发明人 郭志程

(74)专利代理机构 广州瑞之凡知识产权代理事
务所(普通合伙) 44514

代理人 邹俊煊

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

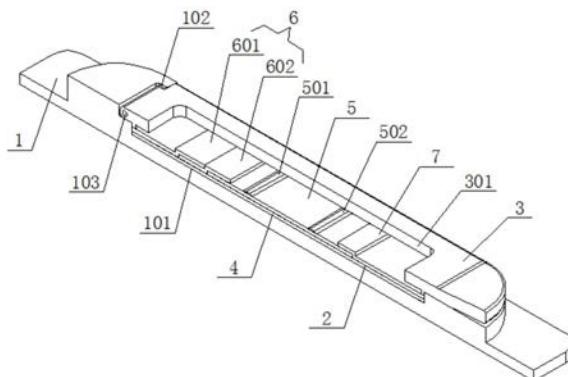
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，包括试纸条与试纸条外侧所设的检测卡壳体，所述试纸条由背衬底板，且背衬底板由硝酸纤维素膜、样品结合垫和吸水膜构成；本发明还公开了一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法，该制备方法包括以下步骤：S1：检测线(T线)与质控线(C线)制备；S2：结合垫的制备；S3：样品垫处理；S4：试纸条组装；S5：试纸条成品组装与检测；本发明采用具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物作为时间分辨荧光物质，避免了激发及发射光谱存在的重叠问题，并且镧系元素及其螯合物的荧光衰变时间长，排除激发光的干扰具有灵敏度高，特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点。



1. 一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，包括检测卡壳体(1)与检测卡壳体(1)内所设的试纸条(2)，其特征在于；所述试纸条(2)的主体由背衬底板(4)、背衬底板(4)上端所粘合的硝酸纤维素膜(5)、硝酸纤维素膜(5)左右两端所粘合的样品结合垫(6)与吸水膜(7)构成；

所述硝酸纤维素膜(5)上端的左右两侧分别设有有检测线(501)与质控线(502)；

所述样品结合垫(6)由层状结构的样品垫(601)与样品垫(601)侧下方所粘合的结合垫(602)构成。

2. 根据权利要求1所述的一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：所述结合垫(602)上包被有时间分辨荧光物质标记的第一单克隆抗体，且结合垫(602)由玻璃纤维素膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得，所述时间分辨荧光物质为镧系元素物质。

3. 根据权利要求1所述的一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：所述检测线(501)上包被有另一个单克隆抗体，所述质控线(502)上包被有第二抗体。

4. 根据权利要求2所述的一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：所述检测卡壳体(1)的上端设有与试纸条(2)相卡配的槽体结构的试纸槽(101)，所述试纸槽(101)的侧面设有槽体结构的铰接槽(102)，且在铰接槽(102)的槽体内固定插配有圆柱形结构的铰接轴(103)，所述铰接轴(103)的外圆上铰接有板状结构的压盖(3)。

5. 根据权利要求2所述的一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：所述压盖(3)的下端与试纸条(2)的上端面相压合，所述压盖(3)上端面的中间位置处设有框体结构的加样孔(301)。

6. 根据权利要求2所述的一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：所述样品垫(601)为玻璃纤维素膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得。

7. 一种如权利要求1-6任意一条所述的IGF-1时间分辨荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法，其特征在于：该制备方法包括以下步骤：

S1：检测线(T线)与质控线(C线)制备，首先将硝酸纤维素膜粘贴至背衬底板上，用15mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液将鼠抗人IGF-1单克隆抗体稀释至0.5mg/mL，用于制备T线；用15mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗体稀释至1mg/mL，用于制备C线；按1uL/cm划液量，用划膜仪将上述两种稀释后的抗体均匀的划至硝酸纤维素膜上制备T线和C线；将划好的硝酸纤维素膜放置于37℃干燥箱中干燥3-4h；

S2：结合垫的制备，通过划膜仪将标记有时间分辨荧光物质乳胶微球的兔抗人IGF-1抗体按照6uL/cm的流量喷涂至宽为6-9mm的聚酯膜上，37℃干燥3-4h制备得到结合垫

S3：样品垫处理，样品垫用含有表面活性剂的缓冲液浸泡进行预封闭后，50℃干燥过夜，此处缓冲液为：100mM pH8.0Tris.HCl缓冲液，其中含有2%BSA、0.5%PEG 4000、0.1%吐温-20和5%蔗糖；

S4：试纸条组装，将前述步骤中制得的样品垫、结合垫固定叠压粘贴在硝酸纤维素膜的近T线端，并将吸水垫固定叠压粘贴在硝酸纤维素膜的另一端；

S5：试纸条成品组装与检测，首先进行试纸条成品组装，将柱状好的大板纸条用切条机按每条2.5-4mm的宽度进行裁剪，然后将剪裁后的试纸条装夹到测试卡壳体中；试纸条检测，将组装好的试纸条用双抗夹心法进行检测：取待测样品约100uL滴加到样品垫上，待测样品为血样与稀释液混合物，样品中的IGF-1与结合垫上所标记的单克隆抗体结合，形成抗

原-标记抗体复合物,待复合物层析至T线时与此处固相化的另一个抗体结合,继续层析至C线处与羊抗兔抗体形成复合物,在时间分辨荧光分析仪的激发光激发下,标记元素显现荧光,T线结合的标记抗体越多,荧光强度越高,T线荧光强度与样本中的IGF-1水平成正比。

一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及时间分辨荧光免疫层析技术领域,具体为一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒。

背景技术

[0002] 免疫分析法是利用抗原与抗体反应检测抗原或抗体的方法。现有技术中所采用的免疫分析法主要分为:放射免疫分析法、酶联免疫法、化学发光免疫分析法、色谱-质谱联用技术。其中,放射性免疫分析法:就是利用放射性核素标记抗原或抗体,然后与被测得抗体或抗原结合,形成抗原抗体复合物的原理来进行分析;酶联免疫法:具有较高的特异性和灵敏度,同时可应用于大量样本的检测,在临床检测中被广泛应用;化学发光免疫分析法:是将化学发光和免疫反应相结合的产物,是用化学发光剂直接标记抗体或抗原的一类免疫测定方法,化学发光免疫分析法具有灵敏度高、操作简单、分析速度快以及无放射性等优点;色谱-质谱连用技术:是一种集高效分离和多组分定性、定量于一体的方法,对高沸点、不挥发和热不稳定化合物的分离和鉴定具有独特优势。

[0003] 现有技术同样存在以下不足:

[0004] 1. 放射免疫分析法:重复性差,非特异性结合率高,所用试剂具有一定的放射性,如果人体长期接触会造成一定伤害;

[0005] 2. 酶联免疫法:难以同时分析多种成份,对某些结构类似物的分析检测仍会出现交叉反应影响检测结果,过度依赖试剂的选择,不能适用于基层的现场快速检测;

[0006] 3. 化学发光免疫分析法:在实际应用中仍存在不足,例如仪器体积过大、实际样品基质的干扰、小分子检测的精密度有限等;

[0007] 4. 色谱-串联质谱法:仪器方法可以精确地进行定量分析,但设备昂贵、操作复杂、对样品纯度要求高、检测成本高,无法现场操作,而且需要专业人员操作;

[0008] 为此,本发明提出一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法以提供一种操作简便、快速,成本低廉的检验方法。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法,以提供一种操作简便、快速,成本低廉的检验方法。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒,包括检测卡壳体与检测卡壳体内所设的试纸条,所述试纸条的主体由背衬底板、背衬底板上端所粘合的硝酸纤维素膜、硝酸纤维素膜左右两端所粘合的样品结合垫与吸水膜构成;

[0011] 所述硝酸纤维素膜上端的左右两侧分别设有有检测线与质控线;

[0012] 所述样品结合垫由层状结构的样品垫与样品垫侧下方所粘合的结合垫构成。

[0013] 优选的,所述结合垫上包被有时间分辨荧光物质标记的第一单克隆抗体,且结合

垫由玻璃纤维素膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得,所述时间分辨荧光物质为镧系元素物质。

[0014] 优选的,所述检测线上包被有另一个单克隆抗体,所述质控线上包被有第二抗体。

[0015] 优选的,所述检测卡壳体的上端设有与试纸条相卡配的槽体结构的试纸槽,所述试纸槽的侧面设有槽体结构的铰接槽,且在铰接槽的槽体内固定插配有圆柱形结构的铰接轴,所述铰接轴的外圆上铰接有板状结构的压盖。

[0016] 优选的,所述压盖的下端与试纸条的上端面相压合,所述压盖上端面的中间位置处设有框体结构的加样孔。

[0017] 优选的,所述样品垫为玻璃纤维素膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得。

[0018] 一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该制备方法包括以下步骤:

[0019] S1:检测线(T线)与质控线(C线)制备,首先将硝酸纤维素膜粘贴至背衬底板上,用15mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液将鼠抗人IGF-1单克隆抗体稀释至0.5mg/mL,用于制备T线;用15mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗体稀释至1mg/mL,用于制备C线;按1uL/cm划液量,用划膜仪将上述两种稀释后的抗体均匀的划至硝酸纤维素膜上制备T线和C线;将划好的硝酸纤维素膜放置于37℃干燥箱中干燥3-4h;

[0020] S2:结合垫的制备,通过划膜仪将标记有时间分辨荧光物质乳胶微球的兔抗人IGF-1抗体按照6uL/cm的流量喷涂至宽为6-9mm的聚酯膜上,37℃干燥3-4h制备得到结合垫

[0021] S3:样品垫处理,样品垫用含有表面活性剂的缓冲液浸泡进行预封闭后,50℃干燥过夜,此处缓冲液为:100mM pH8.0Tris.HCl缓冲液,其中含有2%BSA、0.5%PEG 4000、0.1%吐温-20和5%蔗糖;

[0022] S4:试纸条组装,将前述步骤中制得的样品垫、结合垫固定叠压粘贴在硝酸纤维素膜的近T线端,并将吸水垫固定叠压粘贴在硝酸纤维素膜的另一端;

[0023] S5:试纸条成品组装与检测,首先进行试纸条成品组装,将柱状好的大板纸条用切条机按每条2.5-4mm的宽度进行裁剪,然后将剪裁后的试纸条装夹到测试卡壳体中;试纸条检测,将组装好的试纸条用双抗夹心法进行检测:取待测样品约100uL滴加到样品垫上,待测样品为血样与稀释液混合物,样品中的IGF-1与结合垫上所标记的单克隆抗体结合,形成抗原-标记抗体复合物,待复合物层析至T线时与此处固相化的另一个抗体结合,继续层析至C线处与羊抗兔抗体形成复合物,在时间分辨荧光分析仪的激发光激发下,标记元素显现荧光,T线结合的标记抗体越多,荧光强度越高,T线荧光强度与样本中的IGF-1水平成正比。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0025] 1.与传统的荧光素标记不同,采用具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物作为时间分辨荧光物质,镧系元素激发光与发射光之间的Stokes位移较大,避免了激发及发射光谱存在的重叠问题,排除激发光的干扰,通过波长分辨方式使其明显的区别于背景荧光;

[0026] 2.且镧系元素激发光光谱较宽,可采用只允许发射荧光通过的滤光片,从而进一步将特异性荧光和背景荧光区分开,消除干扰;

[0027] 3.镧系离子螯合物的荧光衰变时间长,为传统荧光的 $10^3\sim 10^6$ 倍,通过测定时间差可以实现高信噪比;

[0028] 4.同时其可以反复接受激发,从而大大提高仪器探测到的信号值,有效排除样品自然荧光的干扰,具有灵敏度高,特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点。

附图说明

- [0029] 图1本发明结构轴侧视图；
- [0030] 图2为本发明结构半剖视图；
- [0031] 图3为本发明样本测试结果与回归曲线对比图。
- [0032] 图中：1、检测卡壳体；2、试纸条；3、压盖；4、背衬底板；5、硝酸纤维素膜；6、样品结合垫；7、吸水膜；101、试纸槽；102、铰接槽；103、铰接轴；301、加样孔；501、检测线；502、质控线；601、样品垫；602、结合垫。

具体实施方式

[0033] 下面将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做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。

[0034] 请参阅图1至3，本发明提供一种技术方案：一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，包括检测卡壳体1与检测卡壳体1内所设的试纸条2，其特征在于：试纸条2的主体由背衬底板4、背衬底板4上端所粘合的硝酸纤维素膜5、硝酸纤维素膜5左右两端所粘合的样品结合垫6与吸水膜7构成；

[0035] 硝酸纤维素膜5上端的左右两侧分别设有有检测线501与质控线502；

[0036] 样品结合垫6由层状结构的样品垫601与样品垫601侧下方所粘合的结合垫602构成。

[0037] 进一步的，结合垫602上包被有时间分辨荧光物质标记的第一单克隆抗体，此处单克隆抗体为鼠抗IGF-1单克隆抗体，当待测样品与结合垫602接触时，样品中的IGF-1与结合垫602上所标记的单克隆抗体结合，形成抗原-标记抗体复合物，且结合垫602由玻璃纤维素膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得，此处结合垫602亦可由聚酯膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得，而玻璃纤维素膜与聚酯膜使样品垫和结合垫均具有良好的支撑强度、稳定的化学惰性与良好的滤透性，时间分辨荧光物质为镧系元素物质，此处镧系元素物质为镧系元素、镧系元素与乳胶的结合物、镧系元素的螯合物中的一种，镧系元素为铕，铽中的一种，镧系元素的荧光光谱有较大的Stokes位移，激发光谱和发射光谱间不会相互重叠，加上其发射的光谱信号峰很窄，荧光寿命长，可以避免本底荧光干扰，提高检测的精密度。

[0038] 进一步的，硝酸纤维素膜5上设有检测线501和质控线502，检测线501包被有另一单克隆抗体，质控线502包被有第二抗体，当待复合物层析至检测线501时与此处固相化的抗体结合，继续层析至质控线502处与羊抗兔抗体形成复合物。

[0039] 进一步的，检测卡壳体1的上端设有与试纸条2相卡配的槽体结构的试纸槽101，试纸槽101的侧面设有槽体结构的铰接槽102，且在铰接槽102的槽体内固定插配有圆柱形结构的铰接轴103，铰接轴103的外圆上铰接有板状结构的压盖3，这种结构方便试纸条2的固定与测试。

[0040] 进一步的，压盖3的下端与试纸条2的上端面相压合，压盖3上端面的中间位置处设有框体结构的加样孔301，通过压盖3使试纸条2被压劳在检测卡壳体1中，进而整个试纸条2

在测试或者移动的过程中保持平稳。

[0041] 进一步的，样品垫601为玻璃纤维素膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得，此处样品垫601亦可为聚酯膜经表面活性剂缓冲液浸泡处理后干燥而得，这种设置使样品与结合垫602接触时，提高样品中的IGF-1活性，使样品中的IGF-1可更充分的与样品垫601中的所标记的单克隆抗体结合。

[0042] 一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法，该制备方法包括以下步骤：

[0043] S1：检测线(T线)与质控线(C线)制备，首先将硝酸纤维素膜粘贴至背衬底板上，用15mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液将鼠抗人IGF-1单克隆抗体稀释至0.5mg/mL，用于制备T线；用15mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗体稀释至1mg/mL，用于制备C线；按1uL/cm划液量，用划膜仪将上述两种稀释后的抗体均匀的划至硝酸纤维素膜上制备T线和C线；将划好的硝酸纤维素膜放置于37℃干燥箱中干燥3-4h；

[0044] S2：结合垫的制备，通过划膜仪将标记有时间分辨荧光物质乳胶微球的兔抗人IGF-1抗体按照6uL/cm的流量喷涂至宽为6-9mm的玻璃纤维素膜或聚酯膜上，37℃干燥3-4h制备得到结合垫；时间分辨荧光物质乳胶微球为含铕乳胶微球，即时间分辨荧光物质为镧系元素铕与乳胶的结合物；根据需要，时间分辨荧光物质可以调整为镧系元素、镧系元素与乳胶的结合物、镧系元素的螯合物中的一种；镧系元素可以为铕、铽中的一种。

[0045] S3：样品垫处理，样品垫用含有表面活性剂的缓冲液浸泡进行预封闭后，50℃干燥过夜，此处缓冲液为：100mM pH8.0Tris.HCl缓冲液，其中含有2% BSA、0.5% PEG 4000、0.1% 吐温-20和5% 蔗糖；

[0046] S4：试纸条组装，将前述步骤中制得的样品垫、结合垫固定叠压在硝酸纤维素膜的近T线端，并将吸水垫固定叠压在硝酸纤维素膜的另一端；

[0047] S5：试纸条检测与成品组装，首先进行试纸条成品组装，将柱状好的大板纸条用切条机按每条2.5-4mm的宽度进行裁剪，然后将剪裁后的试纸条装夹到测试卡壳体中；试纸条检测，将组装好的试纸条用双抗夹心法进行检测：取待测样品约100uL滴加到样品垫上，待测样品为血样与稀释液混合物，样品中的IGF-1与结合垫上所标记的单克隆抗体结合，形成抗原-标记抗体复合物，待复合物层析至T线时与此处固相化的另一个抗体结合，继续层析至C线处与羊抗兔抗体形成复合物，在时间分辨荧光分析仪的激发光激发下，标记元素显现荧光，T线结合的标记抗体越多，荧光强度越高，T线荧光强度与样本中的IGF-1水平成正比。

[0048] 样本检测，标准曲线制作：取IGF-1校准品一套。取各个校准品各100uL，加到检测卡壳体1上的加样孔301中，10分钟之后，用时间分辨荧光定量分析仪检测发光值。具体值见下表。

[0049]

编号	1	2	3	4	5	6
浓度 nmol/L	0.4	1.6	6.5	25.6	78.4	242.1
T/C	0.011	0.070	0.180	0.360	0.460	0.563

[0050] 根据检测结果,以T/C值为X轴,以浓度值为Y轴进行回归分析,得到回归方程 $y = 0.5843e^{10.793x}$,拟合优度 $R^2 = 0.98$,所得结果与回归曲线对比图如图3所示。

[0051] 由上述结果可以观测出,本发明中的试剂盒具有灵敏度高、稳定性好和无放射性污染等特点。

[0052] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

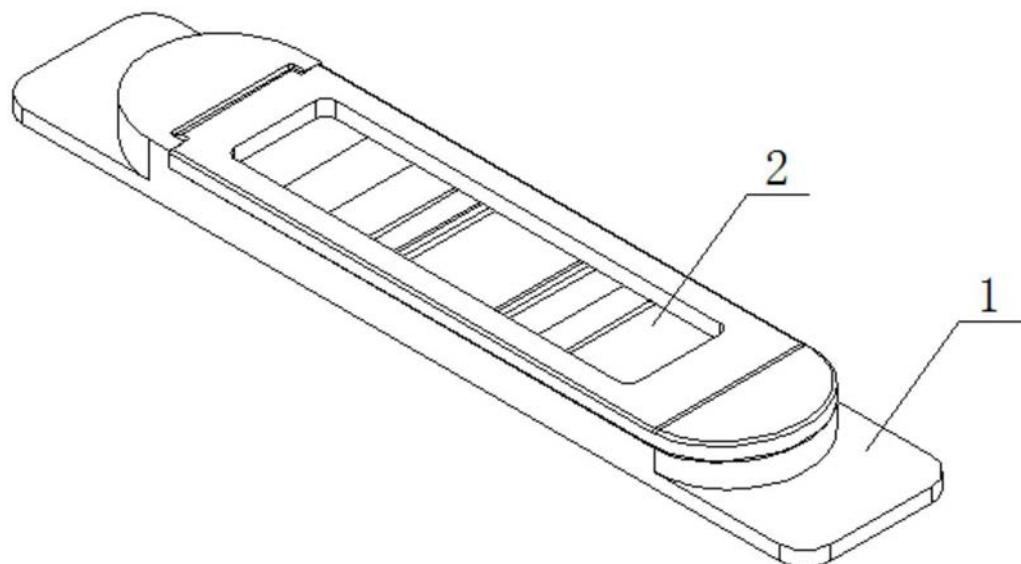


图1

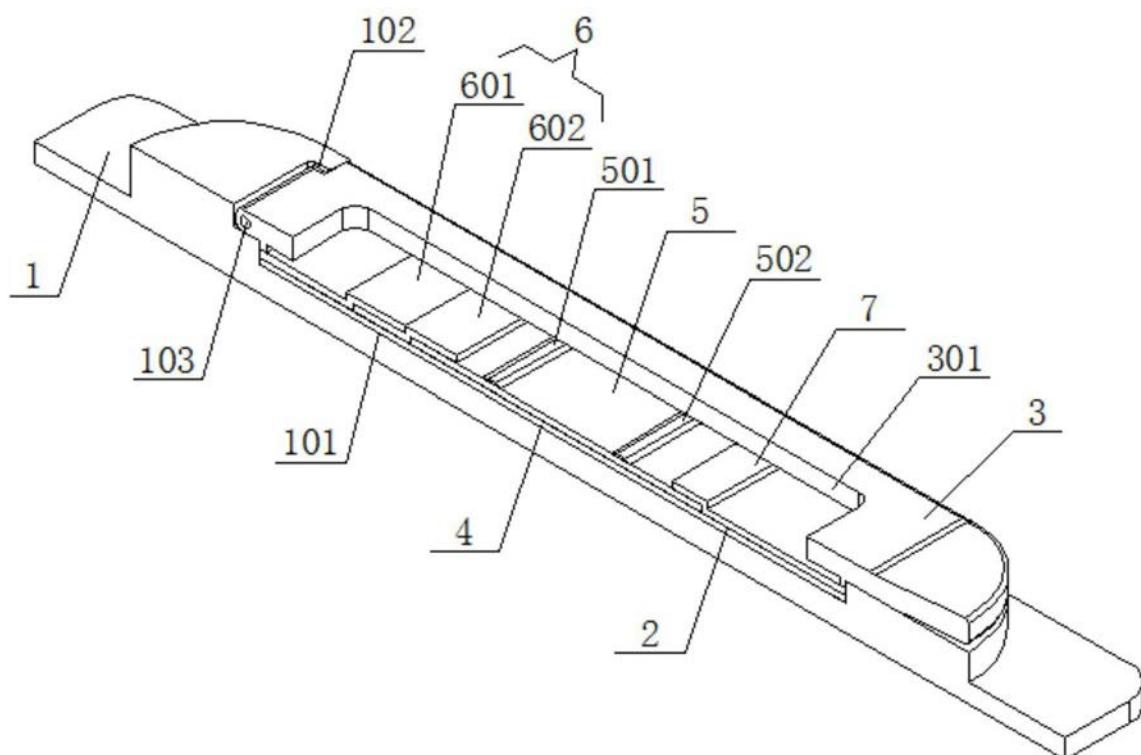


图2

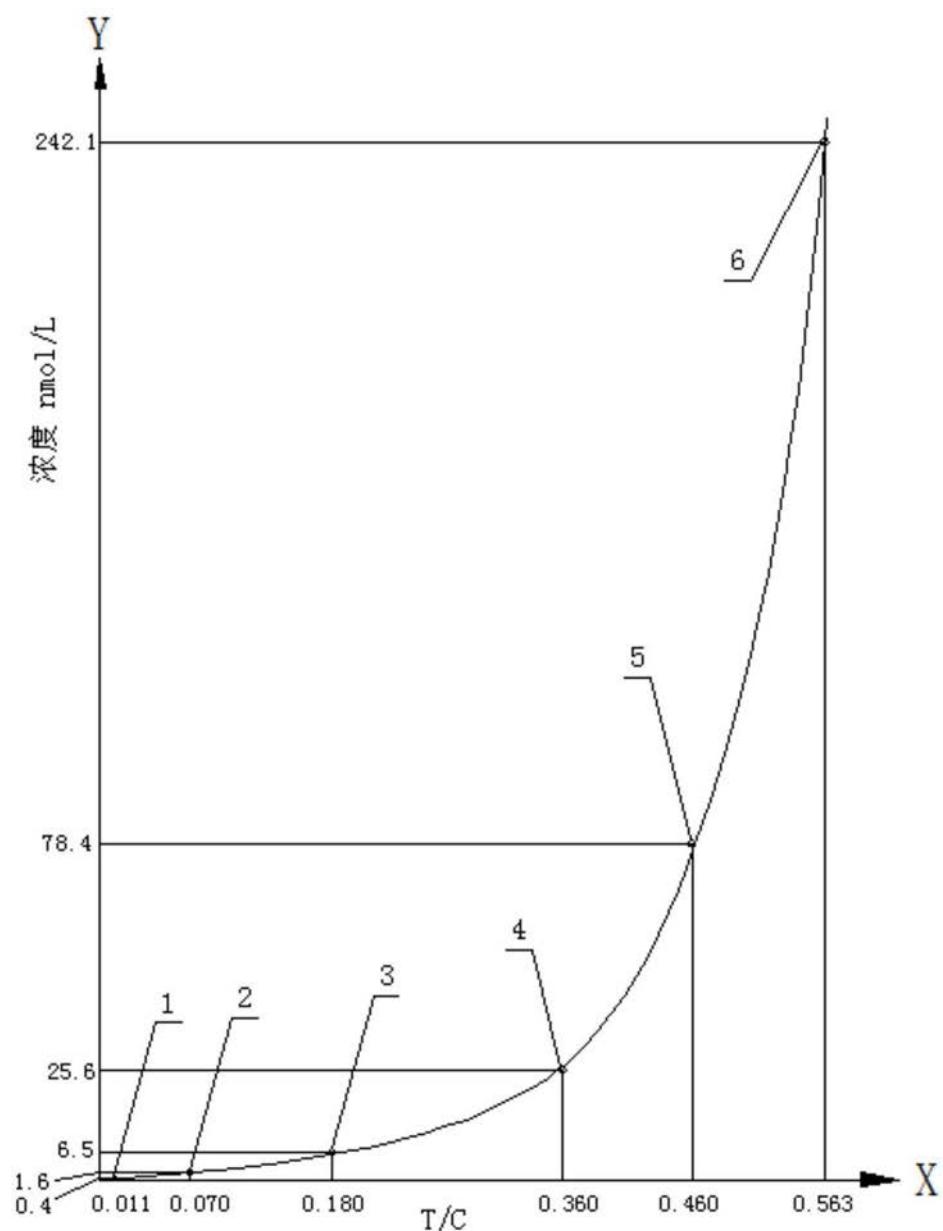


图3

专利名称(译)	一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109521207A	公开(公告)日	2019-03-26
申请号	CN201811620115.5	申请日	2018-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州菲康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州菲康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州菲康生物技术有限公司		
[标]发明人	郭志程		
发明人	郭志程		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/74 G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒，包括试纸条与试纸条外侧所设的检测卡壳体，所述试纸条由背衬底板，且背衬底板由硝酸纤维素膜、样品结合垫和吸水膜构成；本发明还公开了一种IGF-1荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法，该制备方法包括以下步骤：S1：检测线(T线)与质控线(C线)制备；S2：结合垫的制备；S3：样品垫处理；S4：试纸条组装；S5：试纸条成品组装与检测；本发明采用具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物作为时间分辨荧光物质，避免了激发及发射光谱存在的重叠问题，并且镧系元素及其螯合物的荧光衰变时间长，排除激发光的干扰具有灵敏度高，特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点。

