



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101726596 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910236870.8

G01N 33/52(2006.01)

(22) 申请日 2009.11.04

C09K 11/02(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

(71) 申请人 无锡中德伯尔生物技术有限公司

地址 214174 江苏省无锡市惠山区惠山大道  
1608 号

(72) 发明人 熊勇华 徐波 魏华 史爱武  
陈雪岚 赖卫华

(74) 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理  
有限责任公司 11138

代理人 江崇玉

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

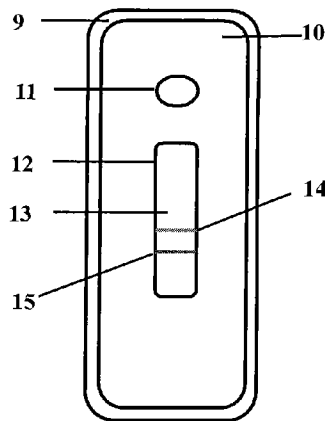
权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 3 页

## (54) 发明名称

检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

## (57) 摘要

本发明公开了检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法,包括乙肝表面抗原检测试纸条,乙肝 e 抗原检测试纸条,乙肝表面抗体检测试纸条,乙肝 e 抗体检测试纸条、乙肝核心抗体检测试纸条。每张试纸条的构成是在底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球的玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸,硝酸纤维素膜上包被有抗原作为检测区和包被有抗兔抗体作为质控区;检测过程中,发射出的荧光经滤光片后,用 CCD 扫描技术,将发射光谱收集、聚集和倍增后,转换成数值信号,乘以校正系数,校正后的荧光强度代入荧光分析仪中的标准曲线,可自动计算出样本中乙肝五项的浓度。本发明对乙肝病毒的检测具有特异、灵敏、简便和定量准确的特性。



1. 检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡,其特征在于:包括用于检测 HBsAg 的试纸条 A、用于检测 HBeAg 的试纸条 B、用于检测抗-HBs 的试纸条 C、用于检测抗-HBe 的试纸条 D 和用于检测抗-HBc 的试纸条 E;

所述试纸条 A、试纸条 B、试纸条 C、试纸条 D 和试纸条 E 均包括在底板上依次搭接地粘贴的滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球垫,所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区;

所述试纸条 A 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记抗-HBs 单抗和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂另一种抗-HBs 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

所述试纸条 B 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记抗-HBe 单抗和兔抗,硝酸纤维素膜上的检测区喷涂另一种抗-HBe 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

所述试纸条 C 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 HBsAg 和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂 HBsAg,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

所述试纸条 D 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 HBeAg 和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂抗-HBe 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

所述试纸条 E 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 HBcAg 和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂抗-HBc 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG。

2. 根据权利要求 1 所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡,其特征在于:所述的荧光微球是一种二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子,作为荧光物质的有机染料位于内核,所述的荧光微球直径为 30-150nm。

3. 根据权利要求 2 所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡,其特征在于:所述的荧光微球的制备方法为:将 60ml 无水乙醇、2~15ml 氨水、3~12ml 正硅酸乙酯、1~4ml 超纯水、0.1~20mg 荧光物质混合在一起,30~80℃ 恒温水浴反应 6~24 小时后,加入 Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 封闭微球,Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 的终浓度为 2%~10%,通过加入盐酸调节溶液 pH 值来控制荧光微球大小,再用表面活性基团修饰荧光微球。

4. 根据权利要求 3 所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡,其特征在于:所述的活性基团为 -CHO、-COOH、-OH、-NH<sub>2</sub> 或 -SH;所述的荧光物质为菲咯啉联钌有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、1,8-萘二酰亚胺、7-羟基香豆素有机荧光染料或其掺杂物以及量子点。

5. 根据权利要求 1 所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于,免疫层析试纸条制备步骤包括:

(a) HBsAg 检测试纸条 A 的制备:

用荧光微球标记抗-HBs 单抗和兔抗,并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的 HBsAg 检测试纸条的荧光微球垫;将另一种抗-HBs 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区;

(b) HBeAg 检测试纸条 B 的制备:

用荧光微球标记抗-HBe 单抗和兔抗,并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的

HBeAg 检测试纸条的荧光微球垫 ; 将另一种抗 -HBe 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区 , 将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区 ;

(c) 抗 -HBs 检测试纸条 C 的制备 :

用荧光微球标记 HBsAg 和兔抗 , 并将其喷涂在玻璃纤维膜上 , 即为制备好的抗 -HBs 检测试纸条的荧光微球垫 ; 将 HBsAg 包被到硝酸纤维素膜上制成检测区 , 将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被硝酸纤维素膜上制成质控区 ;

(d) 抗 -HBe 检测试纸条 D 的制备 :

用荧光微球标记 HBeAg 和兔抗 , 并将其喷涂在玻璃纤维膜上 , 即为制备好的抗 -HBe 检测试纸条的荧光微球垫 ; 将抗 -HBe 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区 , 将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区 ;

(e) 抗 -HBc 检测试纸条 E 的制备 :

用荧光微球标记 HBcAg 和兔抗 , 并将其喷涂在玻璃纤维膜上 , 即为制备好的抗 -HBc 检测试纸条的荧光微球垫 ; 将抗 -HBc 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区 , 将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区 ;

组装和剪切 : 分别在粘性底板上依次搭接地粘贴 : 滤纸、样本垫、荧光微球垫、硝酸纤维素膜以及吸水纸 , 并剪切成适当宽度即成为 5 张免疫层析试纸条。

6. 根据权利要求 5 所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法 , 其特征在于 : 所述检测区和质控区的制备方法如下 :

用喷膜仪将抗原或抗体包被到硝酸纤维素膜上 : 分别用 0.01 ~ 0.1M pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节包被物浓度为 0.5 ~ 8.0mg/mL , 喷膜量为 0.5 ~ 1.0  $\mu$ L/cm , 检测区喷涂抗原或抗体 , 质控区喷涂抗体 , 两区相隔 4 ~ 8mm , 37 $^{\circ}$ C 烘干过夜后 , 室温干燥环境下保存备用。

7. 根据权利要求 5 所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法 , 其特征在于 :

分别将 5 张免疫层析试纸条固定在 5 张底卡上 , 或将 5 张试纸条并排固定在同一张底卡上 , 试纸条表面用面卡压紧 , 所述面卡上预留加样孔和观察窗 , 加样孔的位置与试纸条的样本垫对应 , 观察窗的位置与试纸条的硝酸纤维素膜对应。

8. 用权利要求 1、2、3 或 4 所述的检测卡定量检测乙肝五项指标的方法 , 其特征在于 , 包括以下步骤 :

(1) 绘制标准曲线 : 配制一系列浓度的乙肝五项指标的标准品溶液 , 用同一批次的数张免疫层析检测卡分别检测其荧光强度 , 以荧光强度为纵坐标 , 标准品溶液浓度或浓度的对数为横坐标 , 分别绘制标准曲线 , 并存入荧光分析仪中 ;

(2) 免疫层析检测卡的加样孔中加入待检样本 , 反应 5 ~ 15min 后 , 将检测卡放入检测窗口 ;

(3) 截留在检测区和质控区的荧光微球在灯源激发下 , 发出稳定特定波长的荧光 ;

(4) 发射的荧光经滤除杂光后 , 通过聚焦系统将采集的光学信号送入光电倍增管 , 使光信号得到增强 , 再经过信号转换元件的转换 , 获得检测区与质控区的荧光强度 ;

(5) 将获得的质控区荧光强度与荧光分析仪中内置的质控线荧光强度进行校正 , 得到本次待检样本测定时的校正系数 ;

(6) 将获得的检测区荧光数值乘以校正系数 , 并将所得数值代入已设置在荧光分析仪

---

中的标准曲线,即得到样本中乙肝五项中各项的浓度。

## 检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测领域,具体是涉及定量检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 作为传染性疾病的一种,乙型肝炎已成为大家谈之色变的一种传染病。由于我国医疗诊断条件简陋、饮食习惯不卫生和预防意识薄弱等原因,造成我国现有 1.2 亿多乙肝病毒携带者,约占人口的 10%,每年死于肝癌的人数高达 11 万。因此,我国的乙肝防治工作任务重而道远,而进行乙肝检测是做好乙肝防治工作的一个关键环节。在生物和医学检测中,经常用到免疫分析法,它包括放射免疫分析、酶联免疫分析及免疫层析等方法。放射免疫分析和酶联免疫分析法需要昂贵的设备、专业的操作人员和复杂的操作步骤,难以快速得到检测结果。免疫层析法因操作简单、快速和成本低,而常用于快速定性或半定量检测,如盐酸克伦特罗、黄曲霉毒素和促黄体激素等胶体金试纸条。基于免疫层析技术的产品因操作简便、快速和只需肉眼观察或简单仪器就能显示结果等优点,被广泛用于生物医学和食品安全等快速检测领域。

[0003] 免疫层析技术出现于 80 年代初,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异、高亲和性的免疫反应。层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测区),通过酶反应或可目测标记物(如胶体金)或荧光激发而获得测定结果。而游离标记物(即未与待测物结合的标记物)则越过检测区,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金、乳胶、胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。由于胶体金标记利用静电吸附,在液相中稳定性较差,已标记上的蛋白分子容易脱落;不同的材料基质效应明显,背景干扰大;只有当金颗粒达到一定量时,肉眼才能分辨出检测条带与背景差异,因而检测灵敏度不高,在实际检测中只能对检测物定性或半定量,无法准确定量。目前,通过免疫层析技术来检测乙肝五项或其中几项的公开的专利多采用胶体金或胶体硒等标记技术。如公开号为 CN101246171A 的专利公开了一种便携式乙肝两对半快速联检装置,此装置可一次通过肉眼观察联检乙肝五项指标,在避免病原体散播、医源性感染、和环保处理废弃物方面存在创新,但却不能进行定量。而以荧光纳米微粒为标记物进行免疫层析检测的相关专利也有报道,如公开号为 CN1645146A 的专利公开了一种用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条的制备,与胶体金相比,它提高了免疫层析检测的灵敏度,还可以进行定量。但此荧光纳米颗粒也存在一定的缺陷,如染料易泄露、抗溶液干扰能力差等,在很大程度上限制了其应用的范围。

### 发明内容

[0004] 针对现有技术的缺陷,本发明的目的是提供一种能够灵敏、特异、简便和快速的检

测乙肝五项指标的荧光微球免疫层析检测卡,并提供此检测卡的制备方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0006] 提供检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡,包括用于检测 HBsAg 的试纸条 A、用于检测 HBeAg 的试纸条 B、用于检测抗-HBs 的试纸条 C、用于检测抗-HBe 的试纸条 D 和用于检测抗-HBc 的试纸条 E;

[0007] 所述试纸条 A、试纸条 B、试纸条 C、试纸条 D 和试纸条 E 均包括在底板上依次搭接地粘贴的滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球垫,所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区;

[0008] 所述试纸条 A 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记抗-HBs 单抗和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂另一种抗-HBs 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

[0009] 所述试纸条 B 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记抗-HBe 单抗和兔抗,硝酸纤维素膜上的检测区喷涂另一种抗-HBe 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

[0010] 所述试纸条 C 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 HBsAg 和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂 HBsAg,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

[0011] 所述试纸条 D 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 HBeAg 和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂抗-HBe 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG;

[0012] 所述试纸条 E 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 HBcAg 和兔抗,硝酸纤维素膜上检测区喷涂抗-HBc 单抗,硝酸纤维素膜上质控区喷涂鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG。

[0013] 所述的荧光微球是一种二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子,作为荧光物质的有机染料位于内核,所述的荧光微球直径为 30-150nm。

[0014] 所述的荧光微球的制备方法为:将 60ml 无水乙醇、2~15ml 氨水、3~12ml 正硅酸乙酯、1~4ml 超纯水、0.1~20mg 荧光物质混合在一起,20~80℃ 恒温水浴反应 6~24 小时后,加入  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  封闭微球, $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  的终浓度为 2%~10%,通过加入盐酸调节溶液 pH 值来控制荧光微球大小,再用表面活性基团修饰荧光微球。

[0015] 所述的活性基团为 -CHO、-COOH、-OH、-NH<sub>2</sub> 或 -SH;所述的荧光物质为菲咯啉联苕有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、1,8-萘二酰亚胺、7-羟基香豆素有机荧光染料或其掺杂物以及量子点。

[0016] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测卡的制备方法,具体包括以下步骤:

[0017] 免疫层析试纸条制备步骤包括:

[0018] (a)HBsAg 检测试纸条 A 的制备:

[0019] 用荧光微球标记抗-HBs 单抗和兔抗并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的 HBsAg 检测试纸条的荧光微球垫;将另一种抗-HBs 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区;

[0020] (b)HBeAg 检测试纸条 B 的制备:

[0021] 用荧光微球标记抗-HBe 单抗和兔抗并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的 HBeAg 检测试纸条的荧光微球垫;将另一种抗-HBe 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区;

[0022] (c) 抗-HBs 检测试纸条 C 的制备:

[0023] 用荧光微球标记 HBsAg 和兔抗,并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的抗-HBs 检测试纸条的荧光微球垫;将 HBsAg 包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区;

[0024] (d) 抗-HBe 检测试纸条 D 的制备:

[0025] 用荧光微球标记 HBeAg 和兔抗并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的抗-HBe 检测试纸条的荧光微球垫;将抗-HBe 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区;

[0026] (e) 抗-HBc 检测试纸条 E 的制备:

[0027] 用荧光微球标记 HBcAg 和兔抗并将其喷涂在玻璃纤维膜上,即为制备好的抗-HBc 检测试纸条的荧光微球垫;将抗-HBc 单抗包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜上制成质控区;

[0028] 组装和剪切:分别在粘性底板上依次搭接地粘贴:滤纸、样本垫、荧光微球垫、硝酸纤维素膜以及吸水纸,并剪切成适当宽度即成为 5 张免疫层析试纸条。

[0029] 所述检测区和质控区的制备方法如下:

[0030] 用喷膜仪将抗原或抗体包被到硝酸纤维素膜上:分别用 0.01 ~ 0.1M pH 7.2 的磷酸盐缓冲液调节包被物浓度为 0.5 ~ 8.0mg/mL,喷膜量为 0.5 ~ 1.0  $\mu$ L/cm,检测区喷涂抗原或抗体,质控区喷涂抗体,两区相隔 4 ~ 8mm,37 $^{\circ}$ C 烘干过夜后,室温干燥环境下保存备用。

[0031] 所述检测卡的制备方法:

[0032] 分别将 5 张免疫层析试纸条固定在 5 张底卡上,或将 5 张试纸条并排固定在同一张底卡上,然后在试纸条表面用面卡压紧,即为检测乙肝五项的 5 个试纸检测卡或 5 张试纸条固定在一个底卡上的一个试纸检测卡,底卡和面卡一般都选用塑料卡,底卡能使试纸条上的样本垫、荧光微球垫、硝酸纤维素膜和吸水纸紧密结合,面卡可保护试纸,使其不受损坏。面卡上预留加样孔和观察窗,加样孔的位置与试纸条的样本垫对应,观察窗的位置与试纸条的硝酸纤维素膜(NC)膜对应。

[0033] 本发明还提供了用检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡定量检测乙肝五项指标的方法,包括以下步骤:

[0034] (1) 绘制标准曲线:分别配制一系列不同浓度的 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc 标准品溶液,每种溶液配置 6 个以上不同的浓度,分别用数张同一批次的检测卡检测标准品溶液,分别得到各试纸条的检测区荧光强度以及标准质控线荧光强度  $C_0$ ,以各标准品溶液的浓度或浓度的对数  $x$  为横坐标,检测区荧光强度  $y$  为纵坐标,分别绘制五条标准曲线  $y = ax + b$  (其中  $a$  为曲线的斜率, $b$  为曲线的截距,即标准品溶液的浓度为零时的检测区荧光强度),在荧光分析仪中分别保存五条标准曲线和各自对应的标准质控线荧光强度  $C_0$ 。

[0035] (2) 将待检样本加入荧光微球免疫层析检测卡的加样孔中,反应 5 ~ 20min 后,将

检测卡放入检测窗口；

[0036] (3) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源激发下，发出稳定特定波长的荧光；

[0037] (4) 发射的荧光经滤光片滤除杂光后，通过聚焦系统将采集的光学信号，送入光电倍增管，使光信号得到增强，再经过信号转换元件的转换，获得检测区与质控线的荧光强度；

[0038] (5) 将获得的质控线荧光强度与荧光分析仪中内置的质控线荧光强度进行校正，得到本次待检样本测定时的校正系数；

[0039] (6) 将获得的检测区荧光数值乘以校正系数，并将所得数值代入已设置在荧光分析仪中的标准曲线，即得到样本中乙肝五项中各项的浓度，以上过程都通过荧光分析仪及其内置分析软件来处理。

[0040] 本发明中所述的检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡上的免疫反应包括两种模式：夹心模式和竞争模式。HBsAg 和 HBeAg 的检测采用双抗体夹心法检测，抗-HBs 的检测采用双抗原夹心法检测，抗-HBe 和抗-HBc 的检测采用竞争法检测。

[0041] (a) 夹心模式：可用于检测样品中存在的病原体、微生物以及大分子抗体、抗原等；包括双抗体夹心和双抗原夹心，两者原理相同，现以双抗体夹心为例进行说明。

[0042] HBsAg 的检测是采用双抗体夹心方法。在 HBsAg 检测试纸条的制备过程中，首先将荧光微球标记的抗-HBs 单克隆抗体 A 和兔抗分别喷涂在玻璃纤维膜上制成荧光微球垫；然后将抗-HBs 单克隆抗体 B 固定于硝酸纤维素膜上作为检测区，将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 固定于硝酸纤维素膜上作为质控区。

[0043] 将样品加至 HBsAg 检测试纸条的加样孔，若样品中存在 HBsAg，则 HBsAg 和荧光微球垫上的荧光微球-抗体 A 相结合，形成免疫复合物（荧光微球-抗体 A-HBsAg）；然后在毛细作用下，免疫复合物、荧光微球-兔抗以及游离的荧光微球-抗体 A 跟随样品中的液体基质一起进入 NC 膜；当经过检测区时，检测区上的抗-HBs 抗体 B 将与免疫复合物中 HBsAg 上的 B 位点结合形成荧光微球-抗体 A-HBsAg-抗体 B 复合物，截留在检测区上，而荧光微球-兔抗和游离的荧光微球-抗体 A 不与抗体 B 结合，在毛细作用下继续流动，当经过质控区时，荧光微球-兔抗与鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 结合而被截留在质控区上。用荧光分析仪检测检测区与质控区的荧光强度，其中检测区上的荧光强度与样品中 HBsAg 浓度成正比。

[0044] (b) 竞争模式：常用于检测样品中存在的抗体和小分子抗原，也可检测其它抗原。下面以抗-HBe 的检测为例说明竞争模式。

[0045] 在抗-HBe 检测试纸条的制备过程中，将荧光微球与 HBeAg 及兔抗相结合，并喷涂在玻璃纤维膜上制成荧光微球垫；将抗-HBe 单抗固定于 NC 膜上作为检测区，将鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 固定于 NC 膜上作为质控区。

[0046] 将样品加至抗-HBe 检测试纸条的加样孔，若样品中存在抗-HBe，则抗-HBe 可和荧光微球垫上-HBeAg 结合，形成免疫复合物（荧光微球-HBeAg-抗-HBe）；在毛细作用下，抗-HBe、荧光微球-兔抗、免疫复合物以及游离的荧光微球-HBeAg 与样品中的液体基质一起进入 NC 膜；当经过检测区时，游离的荧光微球-HBeAg 抗-HBe 与检测区上的抗-HBe 单抗竞争结合荧光微球-HBeAg。荧光微球-HBeAg 与检测区上的抗-HBe 单抗结合形成免疫复合物，被截留于检测区上，而荧光微球-兔抗、免疫复合物荧光微球-HBeAg-抗-HBe 不与检测

区上的抗-HBe 单抗结合,在毛细作用下继续流动;当经过质控区时,荧光微球-兔抗与鼠抗兔 IgG 或羊抗兔 IgG 发生免疫反应,并把荧光微球-兔抗固定于质控区上。用荧光分析仪检测检测区与质控区的荧光强度,其中检测区的荧光强度与待测物样品中抗-HBe 浓度成反比。

[0047] 本发明的优点如下:

[0048] 1. 荧光物质被特定波长激发光激发后,发生斯托克斯位移效应,能在较大波长发射荧光,因此荧光不受来自激发光本底的干扰,灵敏度大大高于紫外-可见分光光度法,其灵敏度是用传统染料和有色标记物质检测方法的 10~1000 倍。荧光标记检测方法与这两种方法相比,还具有操作简便,检测快速,价格低廉等优点;

[0049] 2. 荧光微球是一种核壳双结构二氧化硅纳米粒子,有机染料位于内核,不受外界环境的影响,因而荧光稳定、强度高,为通过荧光进行定量检测提供了良好的条件,有力的克服了常规荧光微球的染料易泄露,抗溶液干扰能力差等缺点,增加了荧光稳定性和荧光寿命,扩大了可检测物的范围和种类;

[0050] 3. 荧光微球表面易修饰活性基团,可采用化学偶联方法标记抗体或抗原,形成抗体或抗原与微球的稳定结合;

[0051] 4. 通过 CCD 扫描技术或光纤技术将过滤后的发射光谱收集后,进行光电和模/数转换,再经过软件处理,最后以数字显示待测物浓度,从而实现乙肝五项指标的快速定量检测。

#### 附图说明

[0052] 图 1 是免疫层析试纸条的结构示意图;

[0053] 图 2 是荧光微球免疫层析检测卡的结构示意图;

[0054] 图 3 是用仪器定量检测样品中乙肝五项的流程图;

[0055] 图 4 是检测乙肝五项的荧光微球免疫层析单个检测卡示意图;

[0056] 图 5 是检测乙肝五项的荧光微球免疫层析五合一卡的检测卡示意图;

[0057] 图 6 是乙肝 HBsAg 检测标准工作曲线图。

#### 具体实施方式

[0058] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,但不作为对本发明的限定。

[0059] 如图 1 所示,该免疫层析试纸条的组成为:在粘性底板 8 上,依次搭接地粘贴滤纸 1、样本垫 2、喷涂有荧光微球标记的抗体或抗原的玻璃纤维膜 3、硝酸纤维素膜 4、和吸水纸 7,其中在硝酸纤维素膜 4 上有包被抗体或抗原的检测区 5 和包被有另一种抗体或抗原的质控区 6。

[0060] 如图 2 所示,该免疫层析检测卡是单卡型的,由一张免疫层析试纸条固定在底卡上而形成,具体构造包括底卡 9、面卡 10、加样孔 11、观察窗 12、NC 膜 13、质控区 14、检测区 15。

[0061] 如图 1、2 和 3 所示,将样品滴加到样本垫 2 上,样品溶液溶解玻璃纤维膜 3 上喷涂的荧光微球标记抗体或抗原,通过毛细作用在纤维膜上向前泳动,同时样品中的待测物质与荧光微球标记物反应;反应溶液经过检测区 5 时,与检测区的包被物结合,而富集于该

检测区。反应 3 ~ 30min 后,将试纸条放入试纸卡插槽 16,试纸检测卡 18 在最佳激发光源 17 激发下,发射的荧光 19 通过滤光片 20 滤过后,通过观察窗口 21 在检测区 5 能够观察到一条或两条清晰的荧光条带。同时滤过光经 CCD 扫描系统或光纤系统 22 汇聚后,经过光电聚集管 23,送入光电倍增管 24,光信号得到放大,再经过信号转换元件 25 以及软件处理 26 后,样品中待测物的浓度在数据输出 27 的显示屏上显示。

[0062] 如图 4 所示,检测乙肝五项的 5 个荧光微球免疫层析试纸条分别制作 5 张检测卡,针对不同的检测项目,使用不同的检测卡。

[0063] 如图 5 所示,检测乙肝五项的 5 张荧光微球免疫层析试纸条并排放置在一张检测卡上,这样检测时更方便。

[0064] 实施例 1 检测 HBsAg 的异硫氰酸荧光微球免疫层析试纸条 A 的制备和检测方法

[0065] (1)、异硫氰酸荧光素 - 二氧化硅壳核双结构荧光微球的制备:

[0066] 将 60ml 无水乙醇、2.5ml 氨水、4ml 正硅酸乙酯、1ml 超纯水、1mg 异硫氰酸荧光素混合在一起,80℃ 恒温水浴反应 6 小时后,加入  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  封闭微球, $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  的终浓度为 3%,通过加入盐酸调节溶液 pH 值来控制荧光微球大小,合成所需粒径大小的荧光微球,并在微球表面进行活性基团 (-COOH) 修饰。

[0067] (2)、荧光微球标记的抗 -HBs 单抗 S1 的制备 (EDC 法):

[0068] 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10 ~ 15min,收集沉淀,用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $\text{OD}_{450} = 0.2$ 。然后加入 90  $\mu\text{L}$  50mg/mL 对乙基 -N,N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),150  $\mu\text{L}$  5mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS),振荡混匀,室温孵育 10 ~ 30min 后, $1000 \times g$  离心 5 ~ 15min,沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}$  为 0.2 ~ 1。在 0.1mL 的该荧光微球中加入 1 ~ 10  $\mu\text{g}$  抗 -HBs 单抗 S1,充分混匀后,室温搅拌反应 6h,分别用超纯水洗涤离心 3 次后,沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光微球标记的抗 -HBs 单抗 S1。

[0069] (3)、荧光微球垫的制备:

[0070] 用喷膜仪将荧光微球标记的抗 -HBs 单抗 S1 和兔抗按照 4  $\mu\text{L}/\text{cm}$  的量喷涂至玻璃纤维膜 (30  $\times$  0.8cm) 上,25℃ 真空干燥 1 ~ 2h,放于干燥环境备用。

[0071] (4)、检测区和质控区的制备:

[0072] 用 0.01M pH 7.4PBS (磷酸盐缓冲液,其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节抗 -HBs 单抗 S2 的浓度为 0.5mg/mL,将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测区;用 0.01M pH 7.2PBS (磷酸盐缓冲液,其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节羊抗兔 IgG 的浓度为 0.5mg/mL,将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.74  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ,两区相隔 5mm,质控区距离 NC 膜一端 2mm,37℃ 烘干过夜后,于室温干燥环境下保存备用。

[0073] (5)、荧光微球免疫层析检测卡的制备:

[0074] 组装试纸条:在 PVC 底板上依次搭接地粘贴:(1) 滤纸和样本垫,样本垫为一种经过 5% Tween-20 处理的玻璃纤维膜;(2) 喷涂有荧光微球标记的抗 -HBs 单抗 S1 和兔抗的荧光微球垫;(3) 喷涂有抗 -HBs 单抗 S2 作为检测区和羊抗兔 IgG 作为质控区的硝酸纤维素膜;(4) 吸水纸,组装完成后剪切成 4mm 的宽度,即成为免疫层析试纸条。

[0075] 把一张免疫层析试纸条固定在塑料底卡上,试纸表面用面卡压紧,面卡在对应该

纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗。免疫层析检测卡组装好后装入铝箔袋中,加入干燥剂后封口保存,于室温干燥环境下至少可以保存一年。

[0076] (6)、荧光微球免疫层析检测卡定量检测人血清 HBsAg 浓度:

[0077] A、标准工作曲线的绘制:将 HBsAg 标准品配制成一系列浓度:0ng/ml,2ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,20ng/ml,40ng/ml,80ng/ml,160ng/ml,320ng/ml,分别加至同一批次的数张免疫层析检测卡上,重复 10 次,计算出检测区和质控区的荧光强度平均值,见表 1。

[0078] 表 1:乙肝 HBsAg 检测标准工作曲线

[0079]

标准品浓度 (ng/ml)	0	2	5	10	20	40	80	160	320
T 线	0.0186	0.1585	0.3255	0.58142	1.0826	1.9262	3.5789	7.5316	16.3456
C 线	0.9952	1.0986	1.0867	0.9985	1.0526	1.0625	1.1032	1.0836	1.0802

[0080] 以检测区的荧光强度 Y 为纵坐标,HBsAg 标准品溶液浓度 X 为横坐标,绘制一条标准曲线,标准曲线的公式为  $Y = 0.0503X - 0.0515$ ,则  $X = (Y + 0.0515) / 0.0503$ ,见附图 6。质控线的平均值为  $1.0623 \pm 0.0403$ 。将标准曲线和质控线荧光值保存在荧光分析仪中,此方法的检测限可至 1ng/ml。

[0081] B、样品的检测:

[0082] (a) 平放检测卡,待测血清平衡至室温后,取其 50  $\mu$ L 加入加样孔中,于室温下反应 20min,将检测卡放入检测卡插槽;

[0083] (b) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下,发出强烈的荧光;

[0084] (c) 发射的荧光经滤除杂光后,通过聚集系统将采集的光学信号送入光电倍增管,使光信号得到增强,再经过信号转换元件的转换,获得检测区与质控线的荧光强度值。

[0085] (d) 荧光分析仪中的内置分析软件对检测区荧光强度进行校正,并把校正值代入内置标准曲线,自动计算出待测血清中 HBsAg 的浓度。

[0086] 取 10 个待检血清样本,分别用本实施例所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测,将两种方法的检测结果进行比较,结果见表 2,单位为 ng/mL。

[0087] 表 2:ELISA 和试纸检测卡检测多个血清 HBsAg 的结果

[0088]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	2.1	3.3	5.1	8.5	9.1	13.6	22.5	26.8	31.9	36.8
免疫层析	2.5	3.5	6.9	9.2	9.5	14.8	20.3	27.5	35.3	38.1

[0089] 两组数据的相关系数  $r = 0.9944$ ,表明这两种方法的检测结果显著相关。本发明所述的荧光微球免疫层析检测卡可用来进行快速定量检测 HBsAg。

[0090] 实施例 2 检测 HBeAg 的四甲基异硫氰酸罗丹明荧光微球免疫层析试纸条 B 的制备和检测方法

[0091] (1)、四甲基异硫氰酸罗丹明荧光微球的制备

[0092] 将 10ml 环己烷, 12ml 正己醇和 5ml Triton X-100- 按 2 : 1.2 : 1 比例混合均匀, 加入适量的水作为分散相, 超声乳化后, 加入 0.5mg 的四甲基异硫氰酸罗丹明, 搅拌 20min, 加入一定量氨水至溶液澄清, 加入正硅酸乙酯 2.5ml 搅拌 2min 后, 加入氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷 (AEAPS) 2ml, 混合均匀, 搅拌 24h 后, 经多次洗涤、离心所得微粒即为制备好的异硫氰酸罗丹明荧光微球。

[0093] (2)、荧光微球标记的抗 -HBe 单抗的制备 (EDC 法) :

[0094] 取 1mg 包裹四甲基异硫氰酸罗丹明荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10 ~ 15min, 收集沉淀, 用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450} = 0.2$ , 然后加入  $90 \mu L$  50mg/mL 的对乙基 -N, N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),  $150 \mu L$  5mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育 10 ~ 30min 后,  $1000 \times g$  离心 5 ~ 15min, 沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $OD_{450}$  为 0.2 ~ 1。在 0.1mL 的该荧光微球中加入 1 ~  $10 \mu g$  抗 -HBe 单抗, 充分混匀后, 室温搅拌反应 6h, 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的抗 -HBe 单抗。

[0095] (3)、荧光微球标记的兔抗的制备 (EDC 法) :

[0096] 取 1mg 包裹四甲基异硫氰酸罗丹明荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10 ~ 15min, 收集沉淀, 用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450} = 0.2$ , 然后加入  $90 \mu L$  50mg/mL 的对乙基 -N, N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),  $150 \mu L$  5mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育 10 ~ 30min 后,  $1000 \times g$  离心 5 ~ 15min, 沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $OD_{450}$  为 0.2 ~ 1。在 0.1mL 的该荧光微球中加入 2 ~  $10 \mu g$  兔抗, 充分混匀后, 室温搅拌反应 6h, 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的兔抗。

[0097] (4)、荧光微球垫的制备 :

[0098] 用喷膜仪将标记抗 -HBe 单抗和兔抗的荧光微球按照  $4 \mu L/cm$  的量喷涂至玻璃纤维膜 ( $30 \times 0.8cm$ ) 上,  $25^{\circ}C$  真空干燥 1 ~ 2h, 放于干燥环境备用。

[0099] (5)、检测区和质控区的制备 :

[0100] 用 0.01M pH 7.4PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节抗 -HBe 单抗的浓度为 0.5mg/mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测区 ; 用 0.01M pH 7.2PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节鼠抗兔 IgG 的浓度为 0.5mg/mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为  $0.74 \mu L/cm$ , 两区相隔 5mm, 质控区距离 NC 膜一端 2mm,  $37^{\circ}C$  烘干过夜后, 于室温干燥环境下保存备用。

[0101] (6)、荧光微球免疫层析检测卡的制备如实施例 1。

[0102] (7)、检测卡定量检测人血清 HBeAg 浓度的方法如实施例 1 :

[0103] 取 8 个待检血清样本, 分别用本实施例所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测 HBeAg, 将两种方法的检测结果进行比较, 结果见表 3, 单位为 ng/mL。

[0104] 表 3 :用 ELISA 和免疫层析检测卡检测 8 个血清 HBeAg 的结果

[0105]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA	4.5	6.3	7.2	8.8	9.5	15.6	20.5	27.3
免疫层析	4.0	5.8	6.9	7.1	8.3	16.2	21.3	26.5

[0106] 两组数据的相关系数  $r = 0.9954$ , 表明这两种方法的检测结果显著相关。本发明所述的荧光微球免疫层析检测卡可用于快速定量检测 HBeAg。

[0107] 实施例 3 检测抗 -HBs 的异硫氰酸荧光微球免疫层析试纸条 C 的制备和检测方法

[0108] (1)、异硫氰酸荧光素 - 二氧化硅壳核双结构荧光微球的制备如实施例 1。

[0109] (2)、荧光微球标记的 HBsAg 的制备 (EDC 法) :

[0110] 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心  $10 \sim 15\text{min}$ , 收集沉淀, 用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450} = 0.2$ 。然后加入  $90 \mu\text{L}$   $50\text{mg/mL}$  对乙基 -N, N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),  $150 \mu\text{L}$   $5\text{mg/mL}$  氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育  $10 \sim 30\text{min}$  后,  $1000 \times g$  离心  $5 \sim 15\text{min}$ , 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $OD_{450}$  为  $0.2 \sim 1$ 。在  $0.1\text{mL}$  的该荧光微球中加入  $1 \sim 20 \mu\text{g}$  HBsAg, 充分混匀后, 室温搅拌反应  $8\text{h}$ , 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含  $5\%$  蔗糖和  $0.05\%$  Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的 HBsAg。

[0111] (3)、荧光微球标记的兔抗的制备 (EDC 法) :

[0112] 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心  $10 \sim 15\text{min}$ , 收集沉淀, 用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450} = 0.2$ 。然后加入  $90 \mu\text{L}$   $50\text{mg/mL}$  对乙基 -N, N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),  $150 \mu\text{L}$   $5\text{mg/mL}$  氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育  $10 \sim 30\text{min}$  后,  $1000 \times g$  离心  $5 \sim 15\text{min}$ , 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $OD_{450}$  为  $0.2 \sim 1$ 。在  $0.1\text{mL}$  的该荧光微球中加入  $2 \sim 10 \mu\text{g}$  兔抗, 充分混匀后, 室温搅拌反应  $8\text{h}$ , 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含  $5\%$  蔗糖和  $0.05\%$  Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的兔抗。

[0113] (4)、荧光微球垫的制备 :

[0114] 用喷膜仪将标记 HBsAg 和兔抗的荧光微球按照  $4 \mu\text{L/cm}$  的量喷涂至玻璃纤维膜 ( $30 \times 0.8\text{cm}$ ) 上,  $25^\circ\text{C}$  真空干燥  $1 \sim 2\text{h}$ , 放于干燥环境备用。

[0115] (5)、检测区和质控区的制备 :

[0116] 用  $0.01\text{M}$  pH 7.4 PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含  $5\%$  蔗糖和  $0.05\%$  Tween-20) 调节 HBsAg 的浓度为  $0.5\text{mg/mL}$ , 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测区 ; 用  $0.01\text{M}$  pH 7.2 PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含  $5\%$  蔗糖和  $0.05\%$  Tween-20) 调节羊抗兔 IgG 的浓度为  $0.5\text{mg/mL}$ , 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为  $0.74 \mu\text{L/cm}$ , 两区相隔  $5\text{mm}$ , 质控区距离 NC 膜一端  $2\text{mm}$ ,  $37^\circ\text{C}$  烘干过夜后, 于室温干燥环境下保存备用。

[0117] (6)、荧光微球免疫层析检测卡的制备如实施例 1。

[0118] (7)、荧光微球免疫层析检测卡定量检测人血清抗-HBs 浓度的方法如实施例 1。

[0119] 取 8 个待检血清样本,分别用本实施例所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测抗-HBs,结果见表 4,单位为 IU/mL

[0120] 表 4:免疫层析检测卡和 ELISA 检测 8 个血清抗-HBs 的结果

[0121]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA	30	0.21	51.2	60	0.2	45.4	34	32.2
抗-HBs	26.6	0.01	43.5	48.6	0.05	33.5	28.2	29.5

[0122] 两组数据的相关系数  $r = 0.9934$ ,两种检测方法显著相关。本发明所述的荧光微球免疫层析检测卡可用于快速定量检测抗-HBs。

[0123] 实施例 4 检测抗-HBe 的钆荧光微球免疫层析试纸条 D 的制备和检测方法

[0124] (1)、二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钆荧光素-二氧化硅壳核双结构荧光微球的制备:

[0125] 将 50ml 无水乙醇、2ml 氨水、3ml 正硅酸乙酯、4ml 超纯水、10mg 二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钆荧光素混合在一起,50℃ 恒温水浴反应 12 小时后,加入  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  封闭微球, $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  的终浓度为 6%,通过加入盐酸调节溶液 pH 值来控制荧光微球大小,在荧光微球表面进行活性基团( $-\text{NH}_2$ )修饰。

[0126] (2)、荧光微球标记的 HBeAg 的制备:

[0127] 取 1mg 包裹二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钆荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10 ~ 15min,收集沉淀,用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $\text{OD}_{450} = 0.2$ ,然后加入  $90 \mu\text{L}$  50mg/mL 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC), $150 \mu\text{L}$  5mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺(NHS),振荡混匀,室温孵育 10 ~ 30min 后, $1000 \times g$  离心 5 ~ 15min,沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}$  为 0.2 ~ 1。在 0.1mL 的该荧光微球中加入 1 ~ 20  $\mu\text{g}$  HBeAg,充分混匀后,室温搅拌反应 8h,分别用超纯水洗涤离心 3 次后,沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS 溶液(其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20)复溶沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光微球标记的 HBeAg。

[0128] (3)、荧光微球标记的兔抗的制备(EDC 法):

[0129] 取 1mg 包裹二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钆荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10 ~ 15min,收集沉淀,用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $\text{OD}_{450} = 0.2$ 。然后加入  $90 \mu\text{L}$  50mg/mL 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC), $150 \mu\text{L}$  5mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺(NHS),振荡混匀,室温孵育 10 ~ 30min 后, $1000 \times g$  离心 5 ~ 15min,沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}$  为 0.2 ~ 1。在 0.1mL 的该荧光微球中加入 2 ~ 10  $\mu\text{g}$  兔抗,充分混匀后,室温搅拌反应 8h,分别用超纯水洗涤离心 3 次后,沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS 溶液(其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20)复溶沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光微球标记的兔抗。

[0130] (4)、荧光微球垫的制备:

[0131] 用喷膜仪将标记 HBeAg 和兔抗的荧光微球按照  $4 \mu\text{L}/\text{cm}$  的量喷涂至玻璃纤维膜

(30×0.8cm) 上, 25℃真空干燥 1~2h, 放于干燥环境备用。

[0132] (5)、检测区和质控区的制备:

[0133] 用 0.01M pH 7.4PBS(磷酸盐缓冲液, 其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节抗-HBe 单抗 E1 的浓度为 0.8mg/mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测区; 用 0.01M pH 7.2PBS(磷酸盐缓冲液, 其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节羊抗兔 IgG 的浓度为 0.5mg/mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.74 μL/cm, 两区相隔 5mm, 质控区距离 NC 膜一端 2mm, 37℃烘干过夜后, 于室温干燥环境下保存备用。

[0134] (6)、荧光微球免疫层析检测卡的制备:

[0135] 组装试纸条: 在 PVC 底板上依次搭接地粘贴: (1) 滤纸和样本垫, 样本垫为一种经过 5% Tween-20 处理的玻璃纤维膜; (2) 喷涂有荧光微球标记的 HBeAg 和兔抗的荧光微球垫; (3) 有喷涂抗-HBe 单抗 E1 作为检测区和羊抗兔 IgG 作为质控区的硝酸纤维素膜; (4) 吸水纸, 组装完成后剪切成 4mm 的宽度, 即成为免疫层析试纸条。

[0136] 把一张免疫层析试纸条固定在塑料底卡上, 试纸表面用面卡压紧, 面卡在对应该试纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗。免疫层析检测卡组装好后装入铝箔袋中, 加入干燥剂后封口保存, 于室温干燥环境下至少可以保存一年。

[0137] (7)、荧光微球免疫层析试纸条定量检测人血清抗-HBe 浓度:

[0138] A、标准曲线的绘制: 将抗-HBe 标准品配制成一系列浓度 0ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 40ng/ml, 80ng/ml, 160ng/ml, 320ng/ml, 用同一批次的数张免疫层析检测卡检测各浓度的标准品溶液。以检测区的荧光强度 Y 为纵坐标, 抗-HBe 标准品溶液浓度的对数 X 为横坐标, 绘制一条标准曲线。将标准曲线和对应的标准质控线荧光强度保存在荧光分析仪中。

[0139] B、样品的检测:

[0140] (1) 平放检测卡, 待测血清平衡至室温后, 取其 50 μL 加入加样孔中, 于室温下反应 20min, 将检测卡放入检测卡插槽;

[0141] (2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下, 发出强烈的荧光;

[0142] (3) 发射的荧光经滤除杂光后, 通过聚集系统将采集的光学信号, 送入光电倍增管, 光信号得到增强, 再经过信号转换元件的转换, 获得检测区与质控线的荧光数值;

[0143] (4) 荧光分析仪中的内置分析软件对检测区荧光强度进行校正, 并把校正值代入内置标准曲线, 自动计算出待测血清中抗-HBe 的浓度。

[0144] 取 10 个待检血清样本, 分别用本实施例所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测, 将两种方法的检测结果进行比较, 结果见表 5, 单位为 IU/mL

[0145] 表 5: ELISA 和试纸检测卡检测多个血清抗-HBe 的结果

[0146]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	5.6	6.0	7.5	8.6	10.6	13.5	21.2	28.5	30.6	35.6

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
免疫层析	4.8	5.6	7.7	9.6	10.8	13.8	19.3	25.5	33.6	38.1

[0147] 两组数据的相关系数  $r = 0.9889$ , 表明这两种方法的检测结果显著相关。本实施例所述的荧光微球免疫层析检测卡可用于来进行快速定量检测抗-HBe。

[0148] 实施例 5 检测抗-HBc 的异硫氰酸荧光微球免疫层析试纸条 E 的制备和检测方法

[0149] (1)、异硫氰酸荧光素-二氧化硅壳核双结构荧光微球的制备如实施例 1。

[0150] (2)、荧光微球标记的 HBcAg 的制备 (EDC 法) :

[0151] 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心  $10 \sim 15\text{min}$ , 收集沉淀, 用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450} = 0.2$ 。然后加入  $90 \mu\text{L}$   $50\text{mg/mL}$  的对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),  $150 \mu\text{L}$   $5\text{mg/mL}$  氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育  $10 \sim 30\text{min}$  后,  $1000 \times g$  离心  $5 \sim 15\text{min}$ , 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $OD_{450}$  为  $0.2 \sim 1$ 。在  $0.1\text{mL}$  的该荧光微球中加入  $1 \sim 20 \mu\text{g}$  HBcAg, 充分混匀后, 室温搅拌反应  $8\text{h}$ , 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的 HBcAg。

[0152] (3)、荧光微球标记的兔抗的制备 (EDC 法) :

[0153] 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心  $10 \sim 15\text{min}$ , 收集沉淀, 用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450} = 0.2$ 。然后加入  $90 \mu\text{L}$   $50\text{mg/mL}$  对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC),  $150 \mu\text{L}$   $5\text{mg/mL}$  氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育  $10 \sim 30\text{min}$  后,  $1000 \times g$  离心  $5 \sim 15\text{min}$ , 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $OD_{450}$  为  $0.2 \sim 1$ 。在  $0.1\text{mL}$  的该荧光微球中加入  $2 \sim 10 \mu\text{g}$  兔抗, 充分混匀后, 室温搅拌反应  $8\text{h}$ , 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用  $0.01\text{M}$  pH 7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的兔抗。

[0154] (3)、荧光微球垫的制备 :

[0155] 用喷膜仪将荧光微球标记的 HBcAg 和兔抗按照  $4 \mu\text{L/cm}$  的量喷涂至玻璃纤维膜 ( $30 \times 0.8\text{cm}$ ) 上,  $25^\circ\text{C}$  真空干燥  $1 \sim 2\text{h}$ , 放于干燥环境备用。

[0156] (4)、检测区和质控区的制备 :

[0157] 用  $0.01\text{M}$  pH 7.4 PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节抗-HBc 单抗的浓度为  $0.5\text{mg/mL}$ , 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测区; 用  $0.01\text{M}$  pH 7.2 PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节羊抗兔 IgG 的浓度为  $0.5\text{mg/mL}$ , 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为  $0.74 \mu\text{L/cm}$ , 两区相隔  $5\text{mm}$ , 质控区距离 NC 膜一端  $2\text{mm}$ ,  $37^\circ\text{C}$  烘干过夜后, 于室温干燥环境下保存备用。

[0158] (5)、荧光微球免疫层析检测卡的制备如实施例 1。

[0159] (6)、荧光微球免疫层析检测卡定量检测人血清抗-HBs 浓度的方法如实施例 1。

[0160] 取 8 个待检血清样本, 分别用本实施例所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测抗-HBc, 结果见表 6, 单位为 IU/mL

[0161] 表 6 :ELISA 和免疫层析检测卡检测 8 个血清抗 -HBc 的结果

[0162]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA	2.8	39	0.08	0.2	28	0.4	55	0.5
抗 -HBc	3.8	35.6	0.02	0.05	30.8	0.1	45	0.06

[0163] 两种检测方法相关系数  $r = 0.9903$ , 两种检测方法显著相关。此免疫层析检测卡可用于抗 -HBc 的定量分析。

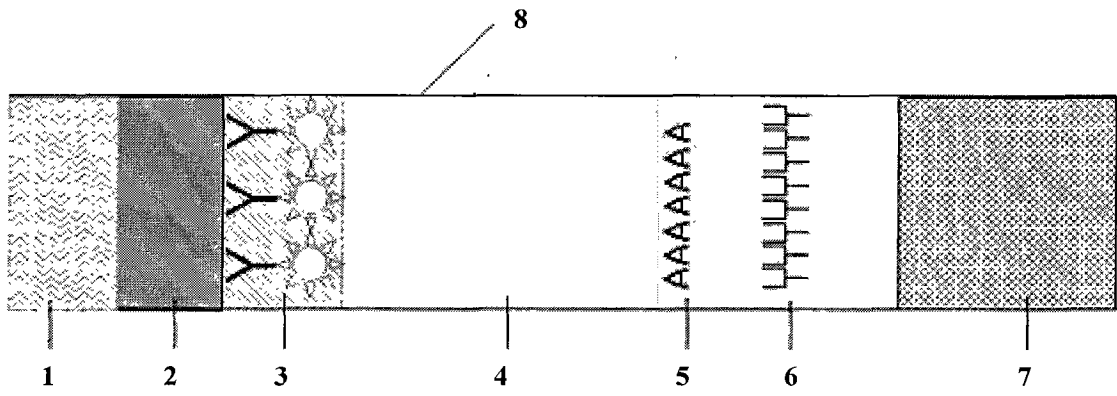


图 1

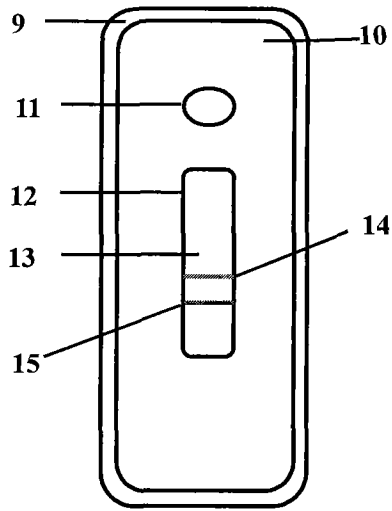


图 2

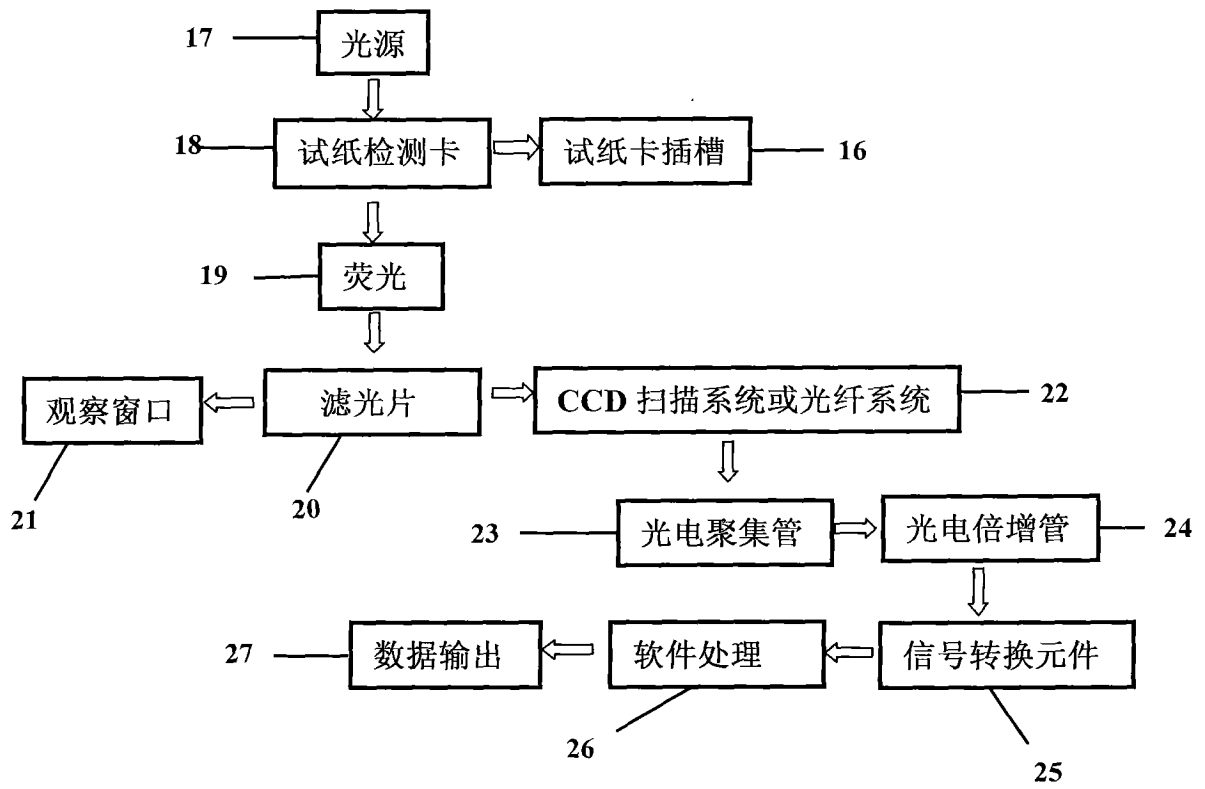


图 3

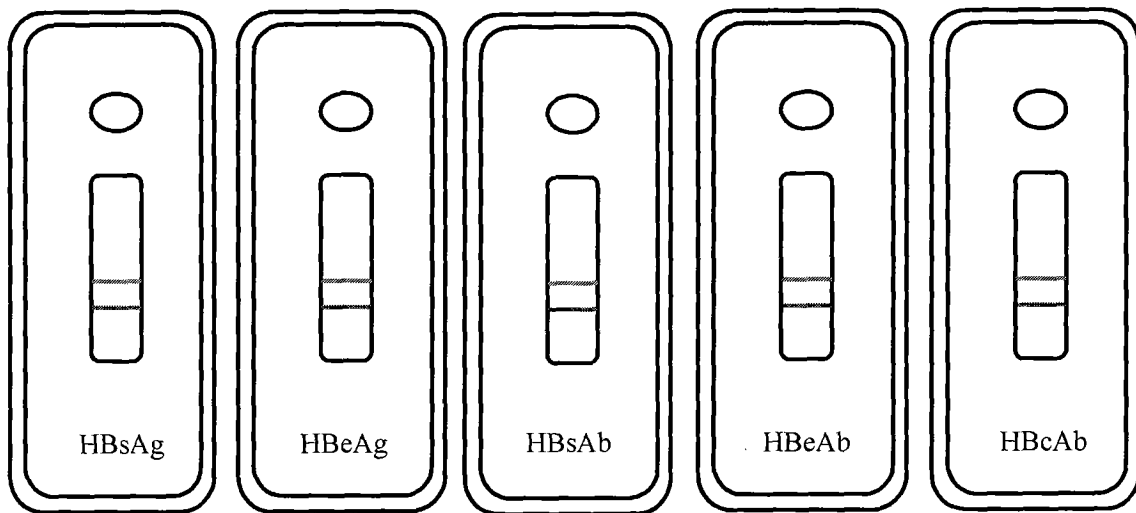


图 4

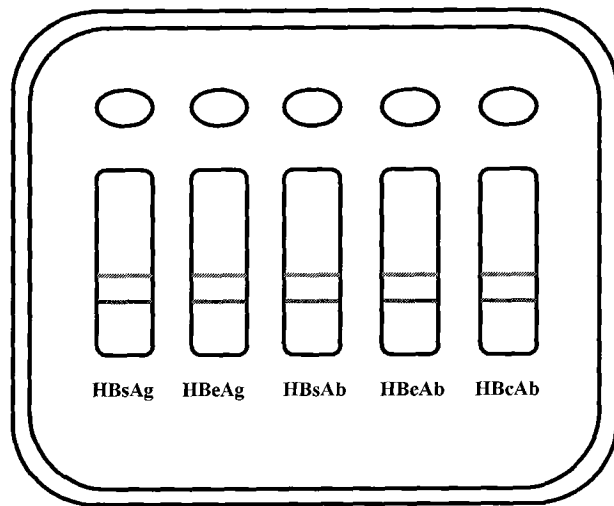


图 5

### 乙肝HBsAg检测标准工作曲线

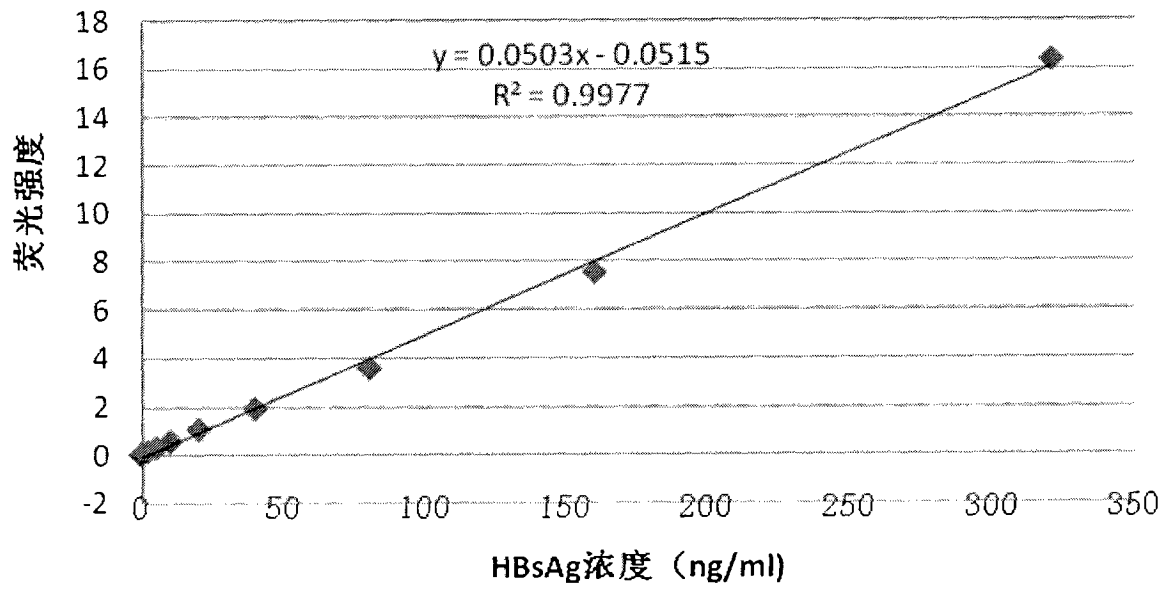


图 6

专利名称(译)	检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101726596A</a>	公开(公告)日	2010-06-09
申请号	CN200910236870.8	申请日	2009-11-04
[标]发明人	熊勇华 徐波 魏华 史爱武 陈雪岚 赖卫华		
发明人	熊勇华 徐波 魏华 史爱武 陈雪岚 赖卫华		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/52 C09K11/02 C09K11/06		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了检测乙肝五项的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法，包括乙肝表面抗原检测试纸条，乙肝e抗原检测试纸条，乙肝表面抗体检测试纸条，乙肝e抗体检测试纸条、乙肝核心抗体检测试纸条。每张试纸条的构成是在底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球的玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，硝酸纤维素膜上包被有抗原作为检测区和包被有抗免疫抗体作为质控区；检测过程中，发射出的荧光经滤光片后，用CCD扫描技术，将发射光谱收集、聚集和倍增后，转换成数值信号，乘以校正系数，校正后的荧光强度代入荧光分析仪中的标准曲线，可自动计算出样本中乙肝五项的浓度。本发明对乙肝病毒的检测具有特异、灵敏、简便和定量准确的特性。

