

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102192983 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201110130141. 1

Immunoassay Tests. 《Lateral Flow

(22) 申请日 2011. 05. 19

Immunoassay》. 2008, 115-129.

(73) 专利权人 博阳生物科技(上海)有限公司
地址 201210 上海市浦东新区张江高科技园
蔡伦路 88 号二号楼五楼东

审查员 赵晓明

(72) 发明人 石晓强 马顺华 吴茜 王海蛟
赵卫国

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219
代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101750494 A, 2010. 06. 23,

CN 1818653 A, 2006. 08. 16,

CN 101382491 A, 2009. 03. 11,

US 2010/0136531 A1, 2010. 06. 03, 全文.

R. C. Wong, H. Y. Tse. FUSION 5:

A New Platform For Lateral Flow

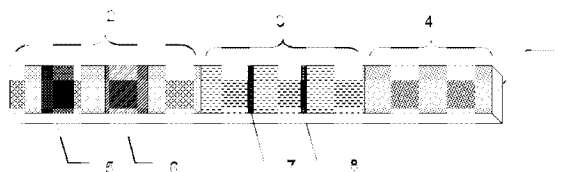
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条及其
制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种快速时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条及其制备方法和应用。该试纸条由 Fusion5 膜、硝酸纤维素膜和吸水纸三部分组成,通过双抗体夹心法或竞争法原理,利用时间分辨荧光微球作为免疫标记物,对待测抗原或抗体进行准确快速的定量检测。



1. 一种时间分辨荧光免疫定量检测试纸条,其特征在于,包括 Fusion5 膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸三部分,硝酸纤维素膜位于中间,Fusion5 膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端,Fusion5 膜上有加样区和微球区,微球区载有时间分辨荧光微球;硝酸纤维素膜上有检测线和质控线,检测线上包被抗体或抗原,质控线上包被亲和素或链霉亲和素;所述时间分辨荧光微球包括检测微球和质控微球,检测微球为表面包被有针对待测抗原的单抗或多抗的荧光微球,或者检测微球为表面包被有针对待测抗体的抗原的荧光微球;质控微球为表面包被有生物素标记蛋白的荧光微球;所述时间分辨荧光免疫定量检测试纸条采用如下步骤制备获得:

1) 质控微球制备:

a) 用生物素标记蛋白;

b) 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球;

2) 检测微球制备:采用针对待测抗原的单抗或多抗,或者采用针对待测抗体的抗原,包被醛基修饰的荧光微球;

3) 空白大卡粘贴:将硝酸纤维素膜粘贴在塑料底板中间,Fusion5 膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端;

4) 喷膜:将质控微球和检测微球采用释放缓冲液混合稀释到一定浓度,喷到 Fusion5 膜的微球区;T 线溶液和 C 线溶液稀释,分别喷到硝酸纤维素膜的 T 线和 C 线;释放缓冲液组成为 10~40% 蔗糖、3~10% 海藻糖、0.5~1%N,0-双三甲硅基乙酰胺、0.2~0.5% 庆大霉素;

5) 干燥及切条。

2. 如权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于,所述时间分辨荧光微球的粒径范围为 100~1000nm。

3. 如权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于,所述检测线上包被抗体为针对待测抗原的单抗或多抗,或者为针对待测抗体的抗原的单抗或多抗;检测线上包被抗原为待测抗原的竞争性抗原。

4. 一种如权利要求 1 所述的试纸条的制备方法,其制备步骤如下:

(1) 质控微球制备:

a) 用生物素标记蛋白;

b) 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球;

(2) 检测微球制备:采用针对待测抗原的单抗或多抗,或者采用针对待测抗体的抗原,包被醛基修饰的荧光微球;

(3) 空白大卡粘贴:将硝酸纤维素膜粘贴在塑料底板中间,Fusion5 膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端;

(4) 喷膜:将质控微球和检测微球采用释放缓冲液混合稀释到一定浓度,喷到 Fusion5 膜的微球区;T 线溶液和 C 线溶液稀释,分别喷到硝酸纤维素膜的 T 线和 C 线;

(5) 干燥及切条。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,步骤(4) 稀释后检测微球终浓度为 0.5~2mg/ml,质控微球终浓度 0.05~0.2mg/ml;T 线抗原或抗体终浓度 0.5~2mg/ml,亲和素或链霉亲和素终浓度 0.5~2mg/ml;C、T 线喷膜液量为 0.5~2 μ l/cm,微球喷膜量

为 $2 \sim 8 \mu\text{l}/\text{cm}$ 。

6. 如权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,步骤(5)中烘干条件为 37°C 烘干 $6 \sim 24$ 小时。

7. 如权利要求 1 所述的试纸条的应用,其特征在于,该试纸条用于采用双抗体夹心法模式或竞争法模式的免疫层析的定量检测。

时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种用于定量检测的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 目前的免疫层析 (lateral flow immunoassay, LFIA) 快速检测试纸条多以胶体金、彩色乳胶微球或者荧光素作为标记物。基于胶体金标记技术开发的快速检测产品,存在灵敏度低,只能定性或者半定量,批间差异较大等问题;彩色乳胶微球虽然批间差有所改进,但灵敏度依然较低,也只能定性或半定量;基于荧光素标记技术的免疫层析灵敏度有了较大提高,也能进行定量检测,但是由于样本中含有较高的荧光本底信号,且 stock 位移较小,会对检测产生较大的影响。

[0003] 时间分辨荧光 (Time-resolved Fluorescence, TRF) 是一种非同位素荧光标记物,与普通荧光相比,具有 stock 位移大,荧光寿命长等特点,可以有效的避免样品中的本底荧光,以及激发光等杂散光的影响,因此相比普通荧光具有更高的灵敏度和抗干扰能力。

[0004] 本发明将时间分辨荧光乳胶微球标记和免疫层析两大技术结合,得到时间分辨荧光免疫层析法 (Time-resolved Fluorescence lateral flow immunoassay, TRF-LFIA), 开发出能够精确定量的快速免疫层析检测试纸条。

[0005] 同时,本发明对于传统的免疫层析膜组合方式进行了改进,将原有的四层甚至五层膜系统改变成三层膜系统。

[0006] 传统的免疫层析膜组合方式包括样品垫、滤血膜、结合垫、分离膜 (硝酸纤维素膜)、吸水垫等四到五层 (四层则没有滤血功能或者将滤血功能与样品垫功能组合)。GE 公司旗下 Whatman 开发了具有五合一功能的膜 Fusion5, 集合了上述五种膜的功能,但 Fusion5 由于孔径较大,抗体难以固定,需要制备特殊的 Stone 用于固定抗体,生产工艺较为复杂,仪器设备要求较高,开发的免疫层析试剂只能用于定性检测。

[0007] 本发明利用 Fusion5 替代传统的样品垫、滤血膜、结合垫,将原有的四层甚至五层膜系统简化,开发出只需要三层膜结构的快速定量免疫层析检测试纸,不仅使生产工艺得到了简化,而且有效的降低了产品的批内差和批间差,提高了检测灵敏度,极具实用价值。

发明内容

[0008] 本发明的目的是为了提供一种新型的、能快速定量检测的时间分辨荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法和应用。

[0009] 本发明一方面公开了一种时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条,该试纸条包括 Fusion5 膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸三部分。硝酸纤维素膜位于中间, Fusion5 膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端。其中, Fusion5 膜上设有加样区和微球区,微球区上载有时间分辨荧光微球;硝酸纤维素膜上设有检测线 (T 线) 和质控线 (C 线), T 线接上包

被抗体或抗原, C 线包被亲和素或链霉亲和素。

[0010] 所述时间分辨荧光微球, 包括检测微球和质控微球, 检测微球为表面包被有针对待测抗原的单抗或者多抗的荧光微球, 或者检测微球为表面包被有针对待测抗体的抗原的荧光微球; 质控微球为表面包被有生物素标记蛋白的荧光微球。

[0011] 所述荧光微球中填充了镧系元素化合物; 较优的, 该镧系元素螯合物为铕螯合物; 最优的, 该铕螯合物可为 $\text{Eu}(\text{TTA})_3/\text{TOPO}$ 或 $\text{Eu}(\text{TTA})_3/\text{Phen}$ 。

[0012] 所述生物素标记蛋白可以是任何一种不影响生物素 / 链霉生物素与亲和素的结合, 并可被生物素标记的蛋白。

[0013] 较优的, 所述蛋白可以是牛血清 γ -球蛋白 (BGG) 或小牛血清白蛋白 (BSA)。

[0014] 优选的, 所述时间分辨荧光微球粒径范围为 100 ~ 1000nm。

[0015] 硝酸纤维素膜上, T 线上包被的抗体为针对待测抗原的单抗或多抗, 或者为针对待测抗体的抗原的单抗或多抗; T 线上包被的抗原为待测抗原的竞争性抗原。

[0016] 优选的, 所述时间分辨荧光免疫定量检测试纸条底部设有塑料底板。

[0017] 本发明第二方面公开了一种时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条的制备方法, 包括以下步骤:

[0018] (1) 质控微球制备

[0019] 1) 用生物素标记蛋白;

[0020] 2) 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球。

[0021] (2) 检测微球制备

[0022] 采用针对待测抗原的单抗或多抗、或者采用针对待测抗体的抗原, 包被醛基修饰的荧光微球。

[0023] (3) 空白大卡粘贴

[0024] 在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式, 首先粘贴硝酸纤维素膜, 然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0025] (4) 喷膜

[0026] 将质控微球和检测微球采用释放缓冲液混合稀释到一定浓度, 喷到 Fusion5 膜的微球区; T 线溶液和 C 线溶液稀释, 分别喷到硝酸纤维素膜的 T 线和 C 线。

[0027] (5) 干燥及切条

[0028] 将上述喷好试剂的大卡烘干、切条。

[0029] 较优的, 步骤 (4) 中用到的释放缓冲液含有 10 ~ 40% 蔗糖、3 ~ 10% 海藻糖、0.5 ~ 1% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.2 ~ 0.5% 庆大霉素。

[0030] 较优的, 步骤 (4) 中检测微球终浓度 0.5 ~ 2mg/ml, 质控微球终浓度 0.05 ~ 0.2mg/ml; T 线抗原或则抗体终浓度 0.5 ~ 2mg/ml, 亲和素或链霉亲和终浓度 0.5 ~ 2mg/ml; C、T 线喷膜液量为 0.5 ~ 2 μ l/cm, 微球喷膜量为 2 ~ 8 μ l/cm。

[0031] 较优的, 步骤 (5) 中所述的烘干可在恒温烘箱或者烘房中, 37°C 烘干 6 ~ 24 小时。

[0032] 本发明第三方面公开了一种时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条的应用。

[0033] 本发明的试纸条可通过双抗体夹心法或竞争法原理测定生物分子, 适用于所有的采用双抗体夹心法模式或竞争法模式的免疫层析检测。

[0034] 双抗体夹心法: 待测样品通过层析作用与包被有抗体的时间分辨荧光纳米微球

(检测微球)结合,在毛细作用下,依次通过 Fusion5、硝酸纤维素膜,并与硝酸纤维素膜 T 线上固定的另一抗体结合,形成双抗体免疫夹心复合物。在层析过程中,质控微球(表面包被有生物素,混合在检测微球中)也随着样品的移动而前进,并在硝酸纤维素膜 C 线位置被固定的亲和素捕获,在缓冲液冲洗下,未反应的微球继续移动到吸水垫位置。T 线位置捕获的微球量与待测样品中的抗原浓度成正相关,而 C 线位置捕获的质控微球通常是固定的。通过时间分辨荧光读条仪对 T、C 线信号进行扫描,根据 T 线信号与待测抗原浓度成正相关,获得待测样品中待测抗原浓度。

[0035] 竞争法:待测样品中的抗原分子通过层析作用与过量的标记有抗体的时间分辨荧光纳米微球(检测微球)结合,在毛细作用下,依次通过 Fusion5、硝酸纤维素膜,未结合抗原的检测微球与硝酸纤维素膜 T 线上固定的竞争抗原结合,形成抗原抗体复合物。在层析过程中,质控微球(表面包被有生物素,混合在检测微球中)也随着样品的移动而前进,并在硝酸纤维素膜 C 线位置被固定的亲和素捕获,在缓冲液冲洗下,未反应的微球继续移动到吸水垫位置。T 线位置捕获的微球量与待测样品中的抗原浓度成负相关,而 C 线位置捕获的质控微球通常是固定的。通过时间分辨荧光读条仪对 T、C 线信号进行扫描,根据 T 线信号与待测抗原浓度成负相关,获得待测样品中待测抗原浓度。

[0036] 本发明的时间分辨荧光免疫层析试纸条灵敏度高,批内精密度可达 10%左右,批间精密度可达 15%,可同时检测全血、血清、血浆、尿液样本,250mg/dL 血红蛋白、500mg/dL 甘油三酯、10mg/dL 胆红素对本试纸条的检测无影响,远超过市场上大多数免疫层析快速诊断产品。

附图说明

[0037] 图 1:本发明试纸条结构示意图(1. 塑料底板 2. Fusion5 膜 3. 硝酸纤维素膜 4. 吸水纸 5. 加样区 6. 微球区 7. T 线区 8. C 线区)

[0038] 图 2:CRP 试纸条检测标准曲线

[0039] 图 3:新喋呤试纸条检测标准曲线

具体实施方式

[0040] 通过以下具体实施例对本发明进行进一步的阐述,以下实施例仅用于说明,而不适用于限制本发明的保护范围。

[0041] 实施例 1 生物素标记 γ -球蛋白(BGG)包被的质控微球的制备

[0042] (1) 生物素标记的 BGG 的制备

[0043] 用 0.1M NaCNBH₃ 将 BGG(购自 Pel-Freez Biological)配制成 10mg/ml 溶液,采用 DMSO(二甲基甲酰胺)配置 Biotin-X-X-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺修饰生物素,生产商:SIGMA,产品号:B3295)溶液至 16.172mg/ml,按照 1mg 抗体加入 5.4ul Biotin-X-X-NHS 的量将 Biotin-X-X-NHS 液加入到 BGG 溶液中,混合均匀并在 4℃下放置过夜。采用透析法除去游离未反应的生物素,透析液为生物素标记抗体透析缓冲液(0.1M Tris,0.3MNaCl,0.005MEDTA-Na-2H₂O, pH8.0)。透析完毕,BCA 法测定蛋白浓度。

[0044] (2) 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的发光微球

[0045] 向 10mg 醛基修饰的荧光微球[博阳生物科技(上海)有限公司]中加入

6.4 μ l 20%的 Tween-20 溶液、2mg 上述(1)中透析得到的生物素标记蛋白以及 16 μ l 的 NaCNBH₃(25mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制, 现配现用), 补加 0.1M pH6.0MES 至总体积为 400 μ l, 37° 避光孵育 48h。加入 40 μ l 的 Gly 溶液 (75mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制), 37° 避光旋转反应 2h。加 250 μ l N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (200mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制) 溶液。37° 避光旋转反应 16h。4°C 13000g 离心 30 分钟。弃上清, 用 1ml pH6.0 的 MES 缓冲液再洗两次。用 1ml 0.05M pH8.0 的 HEPES 缓冲液 (50mM HEPES, 300mM NaCl, 25mMEDTA-Na-2H₂O, 1.6% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.1% Dextran, 0.1% Tween-20, 0.3745% TritonX-405, 0.01% 庆大霉素, 0.05% Proclin) 悬浮 (其终浓度为 10mg/ml)。

[0046] (3) 质控微球工作液配制

[0047] 根据工作需要, 采用 0.05M pH8.0 的 HEPES 缓冲液将 (2) 中悬液稀释到相应浓度, 分装保存。

[0048] 实施例 2 生物素标记小牛血清白蛋白 (BSA) 包被的质控微球的制备

[0049] (1) 生物素标记小牛血清白蛋白 (BSA) 的制备

[0050] 用 0.1M NaCNBH₃ 将小牛血清白蛋白 (购自 EQUITECH-BIO INC) 配制成 10mg/ml 溶液, 采用 DMSO (二甲基甲酰胺) 配置 Biotin-X-X-NHS (N- 羟基琥珀酰亚胺修饰生物素, 生产商: SIGMA, 产品号: B3295) 溶液至 16.172mg/ml, 按照 1mg 抗体加入 13.5 μ l Biotin-X-X-NHS 的量将 Biotin-X-X-NHS 液加入到小牛血清白蛋白溶液中, 混合均匀并在 4°C 下放置过夜。采用透析法除去游离未反应的生物素, 透析液为生物素标记抗体透析缓冲液 (0.1M Tris, 0.3M NaCl, 0.005M EDTA-Na-2H₂O, pH 8.0)。透析完毕, BCA 法测定蛋白浓度。

[0051] (2) 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球

[0052] 包被方法与实例 1 中 (2) 同。

[0053] (3) 质控微球工作液配制

[0054] 配制方法与实例 1 中 (3) 同。

[0055] 同理, 还可以采用生物素标记的其他蛋白包被荧光微球来制备质控微球。

[0056] 实施例 3 C 反应蛋白 (CRP) 时间分辨荧光免疫试纸条

[0057] 1. 试纸条成分的制备:

[0058] (1) 质控微球的制备

[0059] 质控微球的制备方法参照实施例 1 或实施例 2。

[0060] (2) 检测微球的制备

[0061] 向 10mg 醛基修饰的荧光微球 (博阳生物科技 (上海) 有限公司) 中加入 6.4 μ l 20%的 Tween-20 溶液、2mg C 反应蛋白单克隆抗体 (博阳生物科技 (上海) 有限公司) 以及 16 μ l 的 NaCNBH₃(25mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制, 现配现用), 补加 0.1M pH6.0MES 至总体积为 400 μ l, 37° 避光孵育 48h。加入 40 μ l 的 Gly 溶液 (75mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制), 37° 避光旋转反应 2h。加 250 μ l N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (200mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制) 溶液。37° 避光旋转反应 16h。4°C 13000g 离心 30 分钟。弃上清, 用 1ml pH6.0 的 MES 缓冲液再洗两次。用 1ml 0.05M pH8.0 的 HEPES 缓冲液 (50mM HEPES, 300mMNaCl, 25mM EDTA-Na-2H₂O, 1.6% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.1% Dextran, 0.1% Tween-20, 0.3745% TritonX-405, 0.01% 庆大霉素, 0.05% Proclin)

悬浮（其终浓度为 10mg/ml）。

[0062] (3) 微球溶液的配制

[0063] 用释放缓冲液（含有 20%蔗糖、5%海藻糖、0.5% N,0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.3%庆大霉素）将质控微球和检测微球配制成微球混合液，质控微球终浓度为 0.2mg/ml，检测微球终浓度为 1mg/ml。

[0064] (4) 检测线（T 线）溶液的配制

[0065] 用 10mM PB 溶液将 CRP 单克隆抗体稀释成 1mg/ml。

[0066] (5) 质控线（C 线）溶液的配制

[0067] 用 10mM PB 溶液将亲和素稀释成 0.5mg/ml。

[0068] 2. 试纸条的制备

[0069] (1) 空白大卡粘贴

[0070] 按照附图 1 的膜组合方式，在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式，首先粘贴硝酸纤维素膜，然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0071] (2) 喷膜

[0072] 分别在图 1 中 T 线 7、C 线 8 位置喷上 T、C 线溶液，T、C 线喷膜液量为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ ；在图 1 中 6 位置喷上微球溶液，微球溶液喷膜量为 $4\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0073] (3) 烘干

[0074] 将步骤 (2) 中喷好试剂的大卡在恒温烘箱中 37°C 烘干 24 小时。

[0075] (4) 切条及装卡

[0076] 将烘干的 CRP 大卡切割成 4mm 宽度的纸条，装配到塑料壳中，形成 C 反应蛋白检测板。

[0077] 3. 试纸条的定量检测

[0078] (1) 标准曲线绘制

[0079] 在制备好的 CRP 试纸条（批号：20090323）加样区中加入不同浓度的 CRP 抗原标准品（取六个不同的浓度，分别为 0、1、10、20、100、200mg/L，每个浓度设 5 个重复），滴加上样缓冲液（PBS，含有 1.6% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)，0.1% Tween20，防腐剂），膜层析 10 分钟以后，仪器读取 C、T 线信号，实验结果及分析见表 1：

[0080] 表 1 CRP 标准品检测结果

[0081]

CRP 标准品(mg/L)	0	1	10	20	100	200	
1	0.003	0.018	0.153	0.325	1.776	3.211	
样品信号	2	0.002	0.016	0.169	0.336	1.632	3.109
	3	0.001	0.019	0.166	0.357	1.581	3.254
	4	0.003	0.018	0.172	0.388	1.752	2.968

[0082]

	5	0.002	0.015	0.189	0.349	1.488	3.245
mean		0.002	0.017	0.170	0.351	1.646	3.157
SD		0.001	0.002	0.013	0.024	0.120	0.121

[0083] 以抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,标准曲线数据见表 2,标准曲线如图 2 所示。

[0084] 表 2 CRP 定量检测标准曲线数据

[0085]

CRP 标准品(mg/L)	0	1	10	20	100	200
读数	0.002	0.017	0.170	0.351	1.646	3.157

[0086] 由图 2 的标准曲线我们可以看到,该标线的相关系数 R^2 为 0.9996,线性较好,可以通过该标线对样品中所含 CRP 蛋白浓度进行定量分析。

[0087] (2) 样本检测

[0088] 在 CRP 试纸条(批号:20090323)的加样区依次加入待测样品,滴加上样缓冲液,膜层析 10 分钟以后,仪器读取 C、T 线信号。根据步骤(1)中的标准曲线计算待测样品中 CRP 抗原浓度。

[0089] 4. 试纸条性能测试

[0090] 测定 2 个浓度样本的 10 次批内差 CV,实验结果见表 3,实验结果表明,试纸条的批内精密度均小于 10%。

[0091] 表 3 试纸条批内差

[0092]

样本浓度 mg/L	mean	SD	CV (%)
10	9.90	0.86	8.70
100	101.28	7.80	7.70

[0093] 采用此方法制备的 CRP 快速定量检测试纸条检测范围可达到 0 ~ 200mg/L,灵敏度在 0.5mg/L 以下,批内精密度可达 10%左右,批间精密度可达 15%,可同时检测全血、血清、血浆样本,250mg/dL 血红蛋白、500mg/dL 甘油三酯、10mg/dL 胆红素对本检测无影响,远超过市场上大多数免疫层析快速诊断产品。

[0094] 本实施例采用的双抗体夹心法还可以适用于其他所有的采用双抗体夹心法模式的免疫层析检测,包括心肌钙蛋白 I(cTnI)、肌红蛋白(MYO)、甲胎蛋白(AFP)、乙肝表面抗原(HBsAg)等。

[0095] 实施例 4 新喋呤时间分辨荧光免疫试纸条

[0096] 1. 试纸条成分的准备:

[0097] (1) 质控微球的制备

[0098] 质控微球的制备方法参照实施例 1 或实施例 2。

[0099] (2) 检测微球的制备

[0100] 向 10mg 醛基修饰的荧光微球 [博阳生物科技(上海)有限公司] 中加入 6.4 μ l 20% 的 Tween-20 溶液、2mg 新喋呤单克隆抗体(博阳生物科技(上海)有限公司) 以及 16 μ l 的 NaCNBH₃ (25mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制, 现配现用), 补加 0.1M pH6.0MES 至总体积为 400 μ l, 37° 避光孵育 48h。加入 40 μ l 的 Gly 溶液 (75mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制), 37° 避光旋转反应 2h。加 250 μ l N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (200mg/ml, 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲液配制) 溶液。37° 避光旋转反应 16h。4°C 13000g 离心 30 分钟。弃上清, 用 1ml pH6.0 的 MES 缓冲液再洗两次。用 1ml 0.05M pH8.0 的 HEPES 缓冲液 (50mM HEPES, 300mM NaCl, 25mM EDTA-Na-2H₂O, 1.6% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.1% Dextran, 0.1% Tween-20, 0.3745% TritonX-405, 0.01% 庆大霉素, 0.05% Proclin) 悬浮 (其终浓度为 10mg/ml)。

[0101] (3) 微球溶液的配制

[0102] 用释放缓冲液 (含有 10% 蔗糖、3% 海藻糖、0.6% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.5% 庆大霉) 将质控微球和检测微球配制成微球混合液, 质控微球终浓度为 0.2mg/ml, 检测微球终浓度为 1mg/ml。

[0103] (4) 检测线 (T 线) 溶液的配制

[0104] 用 10mM PB 溶液将新喋呤抗原复合物 (博阳生物科技(上海)有限公司) 稀释成 0.5mg/ml。

[0105] (5) 质控线 (C 线) 溶液的配制

[0106] 用 10mM PB 溶液将链霉亲和素稀释成 0.5mg/ml。

[0107] 2. 试纸条的制备

[0108] (1) 空白大卡粘贴

[0109] 按照附图 1 的膜组合方式, 在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式, 首先粘贴硝酸纤维素膜, 然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0110] (2) 喷膜

[0111] 分别在图 1 中 7、8 位置喷上 T、C 线溶液, C、T 线喷膜液量为 1 μ l/cm; 在图 1 中 6 位置喷上微球溶液, 微球溶液喷膜量为 4 μ l/cm。

[0112] (3) 烘干

[0113] 将步骤 (2) 中喷好试剂的大卡在恒温烘箱中 37°C 烘干 6 小时。

[0114] (4) 切条及装卡

[0115] 将烘干的新喋呤大卡切割成 4mm 宽度的纸条, 装配到塑料壳中, 形成新喋呤检测板。

[0116] 3. 试纸条的定量检测

[0117] (1) 标准曲线绘制

[0118] 在制备好的新喋呤试纸条 (批号: 20100821) 加样区中加入不同浓度的新喋呤抗原标准品 (取五个不同的浓度, 分别为 0、1、5、10、50ng/ml, 每个浓度设 5 个重复), 滴加上样缓冲液 (PBS, 含有 1.6% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA), 0.1% Tween20, 防腐剂), 膜层析 10 分钟以后, 仪器读取 C、T 线信号, 实验结果及分析见表 4:

[0119] 表 4 新喋呤标准品检测结果

新喋呤标准品(ng/ml)		0	1	5	10	50	
[0120]	1	16.99	14.02	6.6	4.33	1.44	
	样品信号	2	16.75	13.73	6.54	3.35	1.41
		3	16.35	13.59	6.54	3.45	1.32
		4	17.18	14.33	6.37	4.21	1.57
		5	16.29	12.86	5.92	3.88	1.36
	mean		16.712	13.706	6.394	3.844	1.420
SD		0.348	0.494	0.249	0.393	0.086	

[0121] 以抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,采用四参数拟合方式,标准曲线数据见表 5,标准曲线如图 3 所示。

[0122] 表 5 新喋呤定量检测标准曲线数据

[0123]

新喋呤标准品(ng/ml)	0	1	5	10	50
读数	16.712	13.706	6.394	3.844	1.420

[0124] 图 3 标准曲线的 R^2 为 0.9999,线性较好,可以通过该标线对样品中所含新喋呤蛋白浓度进行定量分析。

[0125] (2) 样本检测

[0126] 在 CRP 检测板中依次加入待测样品,上样缓冲液,膜层析 10 分钟以后,仪器读取 C、T 线信号,根据步骤 (1) 中的标准曲线计算待测样品中新喋呤抗原浓度。

[0127] 4. 试纸条性能

[0128] 测定 2 个浓度样本的 10 次批内差 CV,实验结果见表 6,实验结果表明,试纸条的批内精密度均小于 12%。

[0129] 表 6 试纸条批内差

[0130]

样本浓度 ng/mL	mean	SD	CV (%)
1	0.96	0.11	11.41
5	4.71	0.36	7.60

[0131] 采用此方法制备的新喋呤快速定量检测试纸条检测范围可达到 0 ~ 100ng/mL,灵敏度在 0.5ng/mL 以下,批内精密度可达 10%左右,批间精密度可达 15%,可同时检测全血、

血清、血浆、尿液样本,250mg/dL 血红蛋白、500mg/dL 甘油三酯、10mg/dL 胆红素对本检测无影响,国外新喋呤诊断试剂目前仅有酶标或化学发光产品,还无免疫层析诊断产品,国内尚无此诊断产品。

[0132] 本实施例采用的竞争法还可以适用于其他所有的采用竞争法模式的免疫层析检测,包括三碘甲腺原氨酸 (T3)、四碘甲腺原氨酸 (T4)、血清游离三碘甲腺原氨酸 (FT3)、血清游离甲状腺素 (FT4)、瘦肉精,毒品等。

[0133] 实施例 5 C 反应蛋白 (CRP) 时间分辨荧光免疫试纸条

[0134] 1. 试纸条成分的准备:

[0135] (1) 质控微球的制备

[0136] 质控微球的制备方法参照实施例 1 或实施例 2。

[0137] (2) 检测微球的制备

[0138] 参照实施例 3。

[0139] (3) 微球溶液的配制

[0140] 用释放缓冲液 (含有 40% 蔗糖、7% 海藻糖、1% N, 0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.4% 庆大霉) 将质控微球和检测微球配制成微球混合液,质控微球终浓度为 0.1mg/ml,检测微球终浓度为 2mg/ml。

[0141] (4) 检测线 (T 线) 溶液的配制

[0142] 用 10mM PB 溶液将 CRP 单克隆抗体 (博阳生物科技 (上海) 有限公司) 稀释成 2mg/ml。

[0143] (5) 质控线 (C 线) 溶液的配制

[0144] 用 10mM PB 溶液将链霉亲和素稀释成 1mg/ml。

[0145] 2. 试纸条的制备

[0146] (1) 空白大卡粘贴

[0147] 按照附图 1 的膜组合方式,在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0148] (2) 喷膜

[0149] 分别在图 1 中 T 线 7、C 线 8 位置喷上 T、C 线溶液,T、C 线喷膜液量为 $0.5 \mu\text{l}/\text{cm}$;在图 1 中 6 位置喷上微球溶液,微球溶液喷膜量为 $2 \mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0150] (3) 烘干

[0151] 将步骤 (2) 中喷好试剂的大卡在恒温烘箱中 37°C 烘干 24 小时。

[0152] (4) 切条及装卡

[0153] 将烘干的 CRP 大卡切割成 4mm 宽度的纸条,装配到塑料壳中,形成 CRP 检测板。

[0154] 采用此方法制备的 CRP 快速定量检测试纸条检测批内精密度可达 10% 左右,可同时检测全血、血清、血浆样本,250mg/dL 血红蛋白、500mg/dL 甘油三酯、10mg/dL 胆红素对本检测无影响。

[0155] 实施例 6 新喋呤时间分辨荧光免疫试纸条

[0156] 1. 试纸条成分的准备:

[0157] (1) 质控微球的制备

[0158] 质控微球的制备方法参照实施例 1 或实施例 2。

[0159] (2) 检测微球的制备

[0160] 参照实施例 4。

[0161] (3) 微球溶液的配制

[0162] 用释放缓冲液（含有 20% 蔗糖、10% 海藻糖、0.7% N, O- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.2% 庆大霉）将质控微球和检测微球配制成微球混合液，质控微球终浓度为 0.05mg/ml，检测微球终浓度为 0.5mg/ml。

[0163] (4) 检测线 (T 线) 溶液的配制

[0164] 用 10mMPB 溶液将新喋呤抗原复合物（博阳生物科技（上海）有限公司）稀释成 2mg/ml。

[0165] (5) 质控线 (C 线) 溶液的配制

[0166] 用 10mM PB 溶液将亲和素稀释成 2mg/ml。

[0167] 2. 试纸条的制备

[0168] (1) 空白大卡粘贴

[0169] 按照附图 1 的膜组合方式，在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式，首先粘贴硝酸纤维素膜，然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0170] (2) 喷膜

[0171] 分别在图 1 中 7、8 位置喷上 T、C 线溶液，C、T 线喷膜液量为 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ ；在图 1 中 6 位置喷上微球溶液，微球溶液喷膜量为 $8\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0172] (3) 烘干

[0173] 将步骤 (2) 中喷好试剂的新喋呤大卡在恒温烘箱中 37°C 烘干 6 小时。

[0174] (4) 切条及装卡

[0175] 将烘干的新喋呤大卡切割成 4mm 宽度的纸条，装配到塑料壳中，形成新喋呤检测板。

[0176] 采用此方法制备的新喋呤快速定量检测试纸条检测批内精密度可达 10% 左右，可同时检测全血、血清、血浆样本，250mg/dL 血红蛋白、500mg/dL 甘油三酯、10mg/dL 胆红素对本检测无影响。

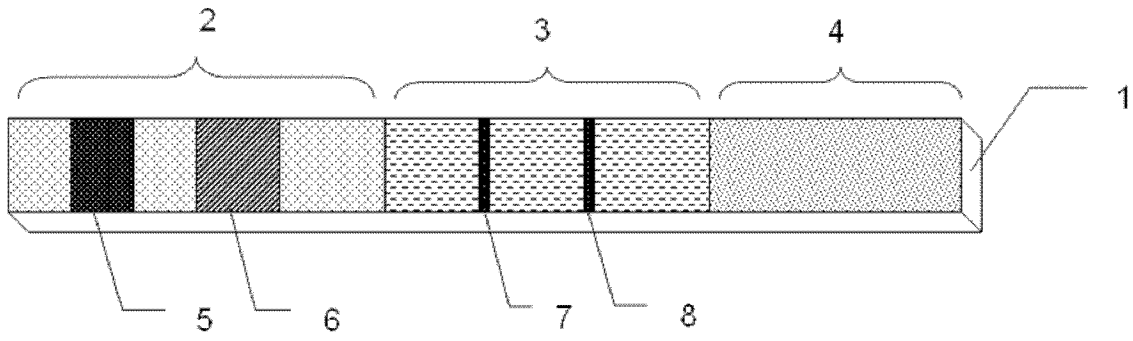


图 1

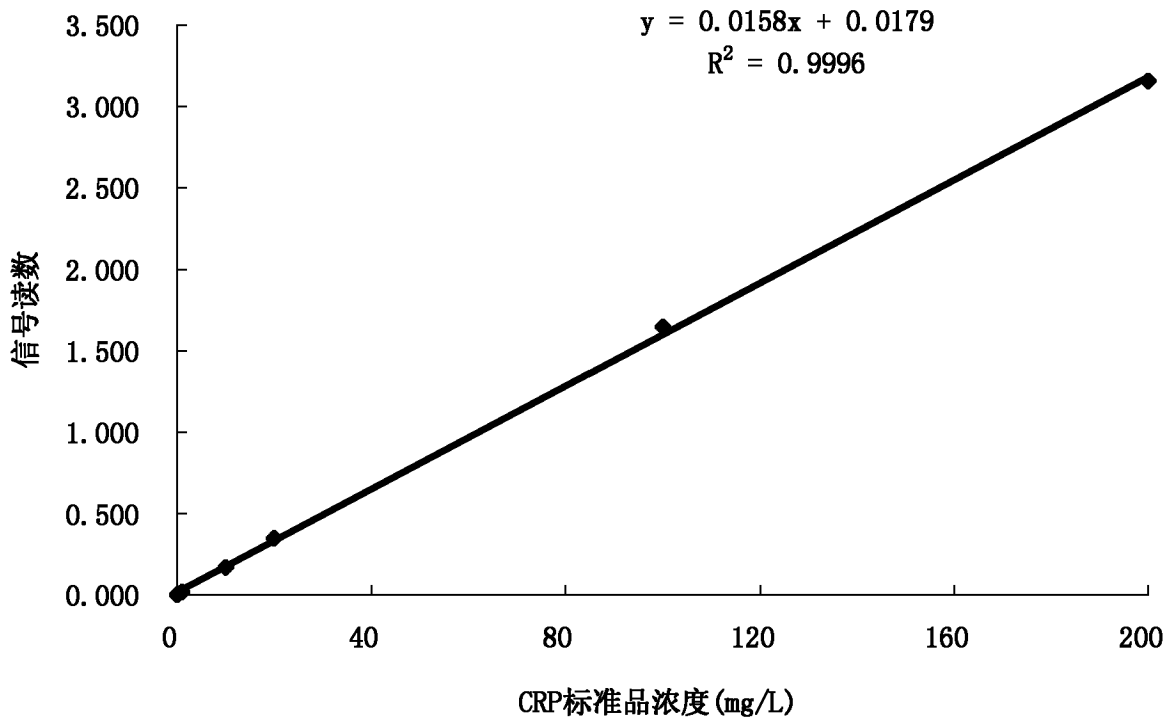


图 2

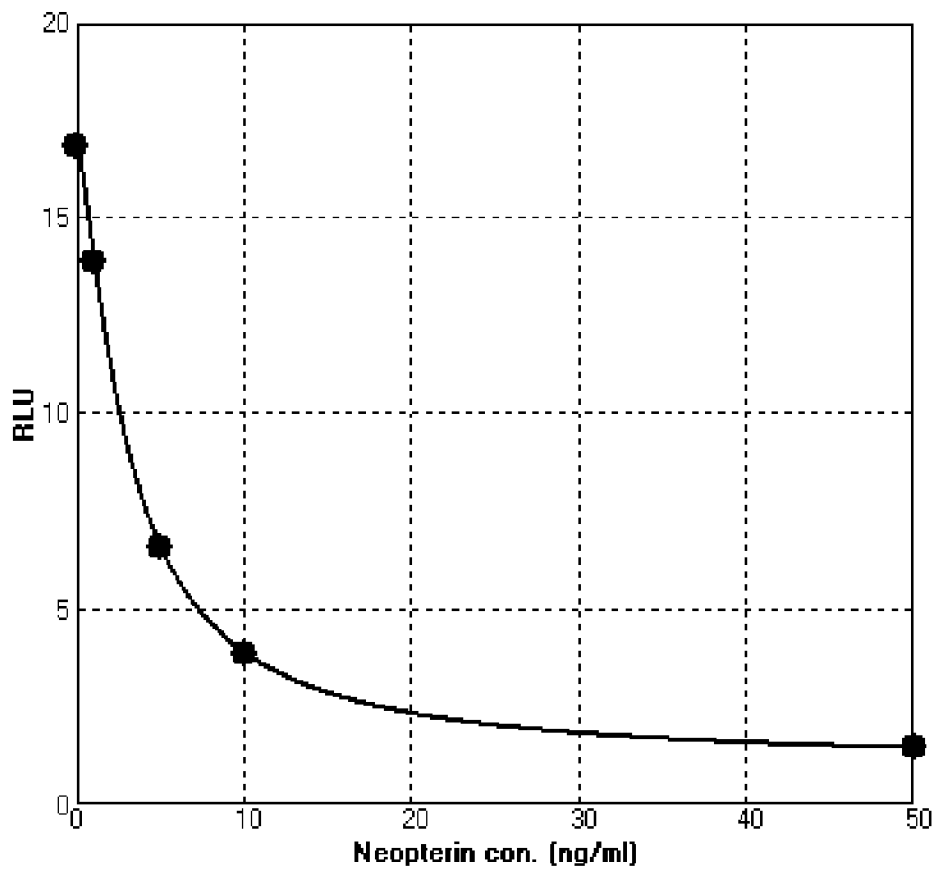


图 3

专利名称(译)	时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102192983B	公开(公告)日	2013-12-04
申请号	CN201110130141.1	申请日	2011-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	石晓强 马顺华 吴茜 王海蛟 赵卫国		
发明人	石晓强 马顺华 吴茜 王海蛟 赵卫国		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
代理人(译)	余明伟		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102192983A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条及其制备方法和应用。该试纸条由Fusion5膜、硝酸纤维素膜和吸水纸三部分组成，通过双抗体夹心法或竞争法原理，利用时间分辨荧光微球作为免疫标记物，对待测抗原或抗体进行准确快速的定量检测。

