



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541234 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811402527.1

(22)申请日 2018.11.23

(71)申请人 东莞东阳光科技发展有限公司

地址 523871 广东省东莞市长安镇振安中路368号

(72)发明人 郑兰花 熊亮 洪礼清 蒋奎胜
庾琼 刘仁源 刘勇娥 李建霖

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

(54)发明名称

一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明提供一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其中,结合垫的制备中,包括:
S1:裁切结合垫:将结合垫裁切成组装成成品时所需要的尺寸;S2:标记复合物的制备:在标记物标记上抗体或抗原后,置于保存液中存放;S3:配制标记复合物的浸泡液:将稀释液与上述含有标记复合物的保存液混合稀释成一定浓度的标记复合物的浸泡液;S4:浸润结合垫:将定标记复合物的浸泡液加入结合垫中,浸润;S5:结合垫平衡过程:将浸润的结合垫平铺于载体上,在恒温恒湿环境中静置;S6:干燥结合垫:将平衡完成的结合垫进行干燥。本发明的方法能有效提高试纸条精密度以用于精确定量检测,且制备方法简单,生产效率高,生产成本低,便于工业化生产。

1. 一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,包括步骤:硝酸纤维素膜的制备,样品垫的制备,结合垫的制备,试纸条的组装,其特征在于,所述结合垫的制备中,包括以下步骤:

S1:裁切结合垫:将结合垫裁切成组装成成品时所需要的尺寸;

S2:标记复合物的制备:在标记物标记上抗体或抗原后,置于保存液中存放;

S3:配制标记复合物的浸泡液:将稀释液与上述含有标记复合物的保存液混合稀释成一定浓度的标记复合物的浸泡液;

S4:浸润结合垫:将定量标记复合物的浸泡液加入结合垫中,浸润结合垫;

S5:结合垫平衡过程:将浸润的结合垫平铺于载体上,在恒温恒湿环境中静置;

S6:干燥结合垫:将平衡完成的结合垫进行干燥。

2. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S2中,所述标记物为时间分辨荧光微球、普通荧光微球、上转换发光微球、磁微球、胶体金、彩色乳胶微球、量子点、时间分辨荧光染料、普通荧光素、酶、生物素-亲和素与微球放大系统中的任意一种。

3. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S3中,所述稀释液包含缓冲对、蛋白、糖类、高聚物、防腐剂和表面活性剂。

4. 根据权利要求3所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述稀释液的缓冲对为摩尔浓度为0.015M-0.025M的Tris-HCL缓冲液、摩尔浓度为0.015M-0.025M的PB缓冲液、摩尔浓度为0.015M-0.025M HEPES缓冲液中的一种,所述蛋白为质量浓度为0.5%-2%的BSA,所述糖类为质量浓度为2.0%-15%的海藻糖、质量浓度为2.0%-15%的蔗糖和质量浓度为1.0%-3%的葡聚糖20000,所述高聚物为质量浓度为0.25%-3%的PVP,所述防腐剂为质量浓度为0.01%-0.1%的Proclin300或质量浓度为0.01%-0.1%的叠氮钠,所述表面活性剂为质量浓度为0.05%-2%的TW-20和质量浓度为0.05%-2%的PEG4000。

5. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S3中,标记复合物的保存液与稀释液体积比1:1000-20:1000。

6. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S4中,所述定量是指10 μ L-50 μ L。

7. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S4中,所述标记复合物的浸泡液加入结合垫中是将结合垫浸泡于标记复合物的浸泡液,或者采用取液设备将标记复合物的浸泡液均匀滴加于结合垫上。

8. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S5中,所述在恒温恒湿环境中静置,是指在温度20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C,湿度25%-60%环境下,静置35min-300min。

9. 根据权利要求8所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤S5中,所述在恒温恒湿环境中静置包括两阶段,第一阶段是指是指在温度20 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C,湿度40%-60%环境下,静置5min-60min;第二阶段是指是指在温度25 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C,湿度25%-40%环境下,静置30min-240min。

10. 根据权利要求1所述的精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步

骤S5中,所述载体为玻璃板、不锈钢板和塑料板中的任意一种,所述载体具有疏水表面。

一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,特别是涉及一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 试纸条技术是一种操作简单,无需专业培训,方便快捷,结果直观的免疫学检测技术。当前在疾病快速诊断、环境污染物分析及致病生物因子检定等领域得到广泛应用。其检测原理是将特异的抗体(或抗原)作为捕获试剂固定于硝酸纤维素膜的特定区域,加入待测样品后,在毛细作用力的推动下,待测样品沿着膜向前移动,当移动至固定有捕获试剂的区域时,样品中的抗原(或抗体)与捕获试剂发生特异性结合,标记试剂则显示出一定的颜色从而实现特异性检测的免疫分析方法。传统的胶体金试纸条通过金纳米颗粒显示出一定的颜色从而实现特异性检测的免疫分析,此方法虽然检测结果肉眼可见,但无法完成精准定量检测;荧光免疫层析试纸条检测技术是胶体金免疫层析试纸条技术后为实现定量检测兴起的新技术。

[0003] 目前,荧光免疫层析试纸条的结构由样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫组成,并依次搭接并粘贴于PVC底板上,其中含有标记抗体/标记抗原的复合物采用喷涂或浸泡后干燥固化在结合垫上,结合垫采用的材质通常为玻纤。在测试过程中待测样本直接加到样品垫上或加样孔中。其中结合垫的处理方法主要有喷涂法和浸泡法。

[0004] 采用喷涂方式处理结合垫目前常用的有两种方式,(1)整张未裁切的结合垫在喷涂仪器中往复喷涂,采用这种方式可以准确定量每一大张结合垫的标记物的量,但需要准确控制喷涂参数,特别是喷涂速度和喷涂流量;(2)是预先将结合垫裁切成合适的尺寸,只喷涂一次,采用这种方式可以准确定量每一张结合垫上标记物的量,喷涂过程中需要准确对位,否则标记复合物溶液容易喷出结合垫外留在喷涂台面上,需要经常擦拭喷涂台面,因此影响生产效率并且极易造成结合垫间相互污染。另外采用喷涂方式标记复合物通常只沉积在结合垫的一个表面,并且标记物在结合垫上分布不均匀,甚至团聚在结合垫上,导致标记物在测试样本过程中很难均匀释放,结合垫上标记物容易残留,导致产品测试精密度较差。这种处理方式对样品垫、结合垫、NC膜材质要求较高,而且不同检测项目所用的材质不同,另外这种方法为了降低CV通常需对结合垫进行预处理。

[0005] 采用浸泡方式处理结合垫通常应用于试纸条的定性检测,应用于准确定量检测较少,如需定量检测通常采用的也有两种方式,(1)采用将整张结合垫浸入含有标记物的溶液后取出快速冻干;(2)标记物定量倾倒在整张结合垫上,用压辊来回赶匀,烘箱快速烘干。浸泡法的优点是方法简单,生产效率比喷涂法高;但其缺点是采用这种方式容易造成结合垫上标记物分布不均匀,特别容易产生边缘效应(也就是说边缘的结合垫标记复合物和中间的结合垫标记复合物分布不同),导致产品测试精密度较差,CV较大,而且裁切过程中需要切除结合垫四周边缘部分,结合垫报废率高。

[0006] 因此,有必要开发一种简便的免疫层析试纸条的制备方法,以使制备所得的免疫

层析试纸条CV值小,可适用于精确定量检测。

发明内容

[0007] 为此,本发明所要解决的技术问题在于现有技术中免疫层析试纸测试精密度较差,不能用于精确定量检测的问题,进而提供一种免疫层析试纸条的制备方法,能有效提高试纸条精密度以用于精确定量检测,且制备方法简单,生产效率高,生产成本低,便于工业化生产。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,包括步骤:硝酸纤维素膜的制备,样品垫的制备,结合垫的制备,试纸条的组装;其中,所述结合垫的制备中,包括以下步骤:

[0009] S1:裁切结合垫:将结合垫裁切成组装成成品时所需要的尺寸;

[0010] S2:标记复合物的制备:在标记物标记上抗体或抗原后,置于保存液中存放;

[0011] S3:配制标记复合物的浸泡液:将稀释液与上述含有标记复合物的保存液混合稀释成一定浓度的标记复合物的浸泡液;

[0012] S4:浸润结合垫:将定标记复合物的浸泡液加入结合垫中,浸润结合垫;

[0013] S5:结合垫平衡过程:将浸润的结合垫平铺于载体上,在恒温恒湿环境中静置;

[0014] S6:干燥结合垫:将平衡完成的结合垫进行干燥。

[0015] 进一步的,步骤S2中,所述标记物为时间分辨荧光微球、普通荧光微球、上转换发光微球、磁微球、胶体金、彩色乳胶微球、量子点、时间分辨荧光染料、普通荧光素、酶、生物素-亲和素与微球放大系统中的任意一种。

[0016] 进一步的,步骤S3中,所述稀释液包含缓冲对、蛋白、糖类、高聚物、防腐剂和表面活性剂。

[0017] 进一步的,所述稀释液的缓冲对为摩尔浓度为0.015M-0.025M的Tris-HCL(三羟甲基氨基甲烷-盐酸)缓冲液、摩尔浓度为0.015M-0.025M的PB(磷酸盐)缓冲液、摩尔浓度为0.015M-0.025M HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)缓冲液中的一种,所述蛋白为质量浓度为0.5%-2%的BSA(牛血清白蛋白),所述糖类为质量浓度为2.0%-15%的海藻糖、质量浓度为2.0%-15%的蔗糖和质量浓度为1.0%-3%的葡聚糖20000,所述高聚物为质量浓度为0.25%-3%的PVP(聚乙烯吡咯烷酮),所述防腐剂为质量浓度为0.01%-0.1%的Proclin300或质量浓度为0.01%-0.1%的NaN₃(叠氮钠),所述表面活性剂为质量浓度为0.05%-2%的TW-20(吐温-20)和质量浓度为0.05%-2%的PEG4000(聚乙二醇4000)。

[0018] 进一步的,步骤S3中,混合时标记复合物的保存液与稀释液体积比1:1000-20:1000。

[0019] 进一步的,步骤S4中,所述定量是指10 μ L-50 μ L。

[0020] 进一步的,步骤S4中,所述标记复合物的浸泡液加入结合垫中是将结合垫浸泡于标记复合物的浸泡液,或者采用取液设备将标记复合物的浸泡液均匀滴加于结合垫上。

[0021] 进一步的,步骤S5中,所述在恒温恒湿环境中静置,是指在温度20℃-50℃,湿度25%-60%环境下,静置35min-300min。

[0022] 更进一步的,步骤S5中,所述在恒温恒湿环境中静置包括两阶段,第一阶段是指是指在温度20℃-37℃,湿度40%-60%环境下,静置5min-60min;第二阶段是指是指在温度25

℃-50℃,湿度25%-40%环境下,静置30min-240min。由此,可以更好的使浸泡液充分扩散于结合垫内,使标记复合物在结合垫内均匀分布。

[0023] 进一步的,步骤S5中,所述载体为玻璃板、不锈钢板和塑料板中的任意一种。

[0024] 进一步的,步骤S5中,所述载体具有疏水表面。

[0025] 本发明的有益效果在于:

[0026] 1、本发明的制备方法在结合垫浸润后还包括平衡过程,在恒温恒湿条件下放置于载体上,能保证放置于平整载体上的结合垫内标记复合物充分浸润扩散,干燥后标记复合物均匀分布于整个结合垫立体结构内,不需要用压辊来回赶匀和快速烘干。

[0027] 2、本发明的制备方法先将结合垫裁切成组装试纸条成品时结合垫需要的尺寸,再加入定量的浸泡液,由此,每一条固定尺寸的结合垫上标记复合物的量相同。

[0028] 3、本发明的制备方法结合垫的载体表面疏水,浸泡液只会在结合垫上流动,并且载体表面有一定的粗糙度,便于烘干后取下完整的结合垫,结合垫不易粘在结合垫载体上,并且疏水表面载体容易清洗便于重复利用。

[0029] 4、本发明的制备方法对于肉眼不可见的标记物,通过添加无毒带颜色的食用色素,可肉眼直接观察结合垫干燥后标记复合物分布情况。

[0030] 5、本发明的制备方法所得的免疫层析试纸条可用于精确定量检测,具有较低的不精密度,CV值小于5%。

[0031] 6、本发明的制备方法对大部分不同材质的结合垫都适用,即对材质要求不高,适合大部分免疫层析产品,且结合垫不需要预处理,干燥后的结合垫可在常温条件下保存和运输,有利于降低生产成本。

[0032] 7、本发明的制备方法操作步骤和设备简单,可大批量生产。

具体实施方式

[0033] 本发明提供了一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法,能有效提高紧密度以用于精确定量检测,且制备方法简单,生产效率高,生产成本低,便于工业化生产。包括步骤:硝酸纤维素膜的制备,样品垫的制备,结合垫的制备,试纸条的组装;其中,所述结合垫的制备中,包括以下步骤:

[0034] S1:裁切结合垫:将结合垫裁切成组装成成品时所需要的尺寸;

[0035] S2:标记复合物的制备:在标记物标记上抗体或抗原后,置于保存液中存放;

[0036] S3:配制标记复合物的浸泡液:将稀释液与上述含有标记复合物的保存液混合稀释成一定浓度的标记复合物的浸泡液;

[0037] S4:浸润结合垫:将定量标记复合物的浸泡液加入结合垫中,浸润结合垫;

[0038] S5:结合垫平衡过程:将浸润的结合垫平铺于载体上,在恒温恒湿环境中静置;

[0039] S6:干燥结合垫:将平衡完成的结合垫进行干燥。

[0040] 在一些具体实施例中,步骤S1中,所述结合垫的材质为玻璃纤维、聚酯膜、无纺布中的任意一种。

[0041] 在一些具体实施例中,步骤S1中,将结合垫裁切成组装成成品时所需要的尺寸是指将结合垫直接裁切成组装试纸条产品时结合垫所需的尺寸,因此在后续制备过程中,无需对结合垫进行二次裁切直接组装。

[0042] 在一些具体实施例中,步骤S2中,标记复合物的制备采用常规的标记方法,以使抗体或抗原偶联至标记物上。抗体或抗原是指可以产生特异性反应的物质,如可以是抗体与标记物偶联,用于检测抗原,也可以是抗原与标记物偶联,用于检测抗体,当然,也可以是其他可以产生特异性反应的物质。标记物是指可以产生可视觉感知或使用传感器感知的信号的物质,可通过标记物的固有特性,或通过外部刺激(例如荧光)来产生信号。标记复合物是指将抗原/抗体/多肽/蛋白进行标记共价结合成标记复合物,此标记复合物既保留免疫反应的特异性,能与待测物进行特异性反应形成多元复合物,又不影响标记物特征,这样在免疫反应后可通过标记物的特征对待测物进行鉴定和定量。

[0043] 在一些具体实施例中,标记物为时间分辨荧光微球、普通荧光微球、上转换发光微球、磁微球、胶体金、彩色乳胶微球、量子点、时间分辨荧光染料、普通荧光素、酶、生物素-亲和素与微球放大系统中的任意一种。现有技术中免疫层析产品中使用的微球或标记物,都可作为本发明的标记物。

[0044] 在一些具体实施例中,步骤S3中,所述稀释液包含缓冲对、蛋白、糖类、高聚物、防腐剂和表面活性剂。

[0045] 在一些具体实施例中,所述稀释液缓冲对为摩尔浓度为0.015M-0.025M的Tris-HCL缓冲液、摩尔浓度为0.015M-0.025M的PB缓冲液、摩尔浓度为0.015M-0.025M HEPES缓冲液中的一个,所述蛋白为质量浓度为0.5%-2%的BSA,所述糖类为质量浓度为2.0%-15%的海藻糖、质量浓度为2.0%-15%的蔗糖和质量浓度为1.0%-3%的葡聚糖20000,所述高聚物为质量浓度为0.25%-3%的PVP,所述防腐剂为质量浓度为0.01%-0.1%的Proclin300或质量浓度为0.01%-0.1%的叠氮钠,所述表面活性剂为质量浓度为0.05%-2%的TW-20和质量浓度为0.05%-2%的PEG4000。

[0046] 优选的,在一些具体实施例中,所述稀释液配方为摩尔浓度为0.02M Tris-HCL,所述BSA质量浓度为0.5%-2%,所述海藻糖质量浓度为2.0%-5%,所述蔗糖质量浓度为2.0%-5%,所述葡聚糖20000质量浓度为1.0%-3%,所述PVP质量浓度为0.5%-2%,所述Proclin300质量浓度为0.01%-0.1%,所述TW-20质量浓度为0.1%-1%,所述PEG4000质量浓度为0.05%-1%。

[0047] 在一些具体实施例中,所述稀释液pH值为7.4-8.5,优选的,所述稀释液pH值为8.0-8.5。

[0048] 在一些具体实施例中,混合时标记复合物的保存液与稀释液体积比1:1000-20:1000。当稀释倍数过低,会导致检测信号偏低,对检测仪器要求较高,试纸条检测灵敏度降低;当稀释倍数过高,则会导致检测信号背景过高,待测时间过长,同时结合垫上标记物残留,导致CV偏大,另外标记复合物偏多,增加试纸条生产成本。

[0049] 在一些具体实施例中,所述稀释液还包括食用色素,优选的,所述食用色素的质量浓度为0.005%-0.01%。一般的,如标记物为肉眼不可见,则可在稀释液中添加食用色素,通过添加无毒带颜色的食用色素,可肉眼直接观察结合垫干燥后标记复合物分布情况,便于去除结合垫标记复合物分布不均匀部分。

[0050] 在一些具体实施例中,步骤S4中,所述定量是指10 μ L-50 μ L。由此,可使每一结合垫得到充分浸润,且每一结合垫上标记复合物的量相同,以提高检测时免疫层析试纸条的精确度,确保免疫层析试纸条能够应用于精准定量检测。

[0051] 在一些具体实施例中,步骤S4中,所述标记复合物的浸泡液加入结合垫中是将结合垫浸泡于标记复合物的浸泡液中,以使结合垫得到充分浸润。

[0052] 在一些具体实施例中,步骤S4中,所述标记复合物的浸泡液加入结合垫中是采用取液设备将标记复合物的浸泡液均匀滴加于结合垫上,以使结合垫得到充分浸润。

[0053] 在一些具体实施例中,步骤S5中,所述恒温恒湿环境是指包括两种恒温恒湿环境,第一恒温恒湿环境温度20℃-37℃,湿度40%-60%,所述静置的时间为5min-60min;第二恒温恒湿环境温度25℃-50℃,湿度25%-40%,所述静置的时间为30min-240min。由此,充分浸润的结合垫在第一恒温恒湿环境中,标记复合物会在结合垫中进一步分散,直至均匀分布;充分浸润的结合垫在第二恒温恒湿环境中,结合垫上的浸泡液挥发性物质均匀挥发,结合垫上的浸泡液中不易挥发物质缓慢均匀固化。

[0054] 在一些具体实施例中,步骤S5中,载体具有平整的表面,所述结合垫是在载体表面水平静置,由此,更好的是浸泡液在结合垫内充分扩散。

[0055] 在一些具体实施例中,步骤S5中,所述载体为玻璃板、不锈钢板和塑料板中的任意一种。

[0056] 在一些具体实施例中,步骤S5中,所述载体具有疏水表面。由此,浸泡液只会在结合垫上流动,而不会被载体吸收,更利于平衡过程中标记复合物在结合垫中进一步分散,直至均匀分布。

[0057] 在一些具体实施例中,步骤S5中,所述载体表面有一定的粗糙度,载体表面具有规则排列的微米级的凸起或凹陷,便于烘干后取下完整的结合垫,结合垫不易粘在结合垫载体上,并且疏水表面载体容易清洗便于重复利用。

[0058] 在一些具体实施例中,步骤S6中,所述烘干为在烘箱中烘干。

[0059] 在一些具体实施例中,步骤S6中,所述烘干为冷冻干燥。

[0060] 下面详细描述本发明的实施例,实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0061] 试剂与仪器:

[0062] 表1

[0063]

名称	厂家
Proclin 300	阿拉丁
PVP	阿拉丁
D-海藻糖	阿拉丁
葡聚糖	阿拉丁
蔗糖	成都市科龙化工
食用色素	品牌顶好
BSA	Roche
钕离子荧光微球	Bangs Labs
量子点纳米球	上海昆道生物技术

[0064]	绿色微球	辉质生物
	磁珠	Millipore
	甲胎蛋白 AFP 抗体	Roche
	糖类抗原 CA199 抗体	meridian
	降钙素原 PCT 抗体	BBI
	神经元特异性烯醇化酶 NSE 抗体	Fitzgerald
	细胞角蛋白 19 CYFRA21-1 抗体	biospecific
	肌红蛋白 MYO 抗体	博茵生物
	羊抗鼠抗体	洛阳市百泰科生物
	玻纤 奥斯龙 8950/奥斯龙 8951/ 奥斯龙 8980/奥斯龙 8964/奥斯 龙 6614/GL0194 聚酯膜 奥斯龙 6613 无纺布 FUSION 3	上海杰一
	玻纤 RB45/RB65/CB08/BT40 聚酯膜 VL78	上海金标
	硝酸纤维素膜 (NC 膜)	Sartorius
	塑料卡壳、吸水垫、PVC 底板	上海金标
	划膜仪、切条机	上海金标

[0065] 实施例1甲胎蛋白AFP荧光免疫层析试纸条及其制备方法

[0066] 在聚氯乙烯PVC底板上依次搭接上样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫,然后将PVC底板及贴附的材料切成宽度3.5mm的试纸条,并装入卡壳,卡壳上开有加样区和测试区。

[0067] 其中,所述样品垫为玻璃纤维膜CB08;所述结合垫上含有钬离子荧光微球标记AFP单克隆抗体的复合物,所述PVC底板材质为聚氯乙烯PVC板,所述NC膜材质UniSart 150带背衬,所述膜上包含:T线(检测线)包被能与待检AFP抗原特异性结合的另一株AFP单克隆抗体,C线(质控线)包被羊抗鼠IgG抗体,所述检测线与所述质控线平行,距离为3mm,所述钬离子荧光微球含有羧基粒径200nm。

[0068] 本发明试纸条可按照以下方法制备:

[0069] (1) NC膜制备

[0070] ①将NC膜固定粘贴在PVC底板的中间部位;

[0071] ②用包被缓冲液(0.02M PB, pH7.4)稀释罗氏AFP单克隆抗体(克隆号TU11)和羊抗鼠抗体至1mg/ml,得到T线AFP抗体、C线羊抗鼠包被稀释液;

[0072] ③将步骤②得到的包被稀释液使用喷金划膜仪包被于NC膜上,喷涂参数2 μ L/cm, T线、C线之间间隔3mm;

[0073] ④将步骤③NC膜置于烘箱37 $^{\circ}$ C进行干燥4h,干燥后加干燥剂密封保存;

[0074] (2) 样品垫制备

[0075] ①样品垫缓冲液:0.02M Tris-HCL, 0.5% Tween-20, 2% BSA, 2% 蔗糖, 1.5% PVP, pH 8.5。

[0076] ②样品垫材质为CB08,室温浸泡在样品垫缓冲液中1h,37 $^{\circ}$ C烘干4h。

[0077] (3) AFP抗体标记

[0078] 清洗微球:取50μL钨离子荧光微球(固含量1%)于2mL离心管内,用1mL MES缓冲液(0.05M pH5.5),300W超声分散处理1min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤3次;

[0079] 共价活化:加入0.5mL MES缓冲液(0.05M pH5.5)超声重悬,依次加入Sulfo-NHS和EDC各40μg、20μg,漩涡混匀,37℃摇床孵育20min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次;

[0080] 标记抗体:加入0.5mL PB标记缓冲液(0.02M pH 7.4)300W超声分散处理1min,加入70μg罗氏AFP单克隆抗体(克隆号LJ738),37℃摇床反应2h;

[0081] 封闭微球:加入60uL BSA(质量分数10%,纯水稀释)微球封闭缓冲液,37℃摇床反应1h,15000rpm离心20min,弃上清;

[0082] 保存微球:加入0.5mL微球清洗缓冲液(0.025M Tris-HCL,0.9%NaCl(wt/wt),0.2%Tween-20(wt/wt)and 0.05%Proclin-300(wt/wt),pH8.0)超声重悬,12000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次,最后加入0.25ml微球保存液(0.025M Tris-HCl,1%BSA(wt/wt)),5%海藻糖(wt/wt)),20%蔗糖(wt/wt)),1%PVP(wt/wt)),0.05%Tween-20(wt/wt))and0.05%Proclin-300(wt/wt)),pH 8.5)超声重悬分散,4℃密封保存。微球固含量为0.2%。

[0083] (4) 结合垫制备

[0084] ①裁切结合垫:结合垫材质玻纤8951,将结合垫裁切成10mm*3.5mm;

[0085] ②配制标记抗体复合物的浸泡液,稀释液配方:0.015M Tris-HCL,BSA 0.5%(wt/wt),海藻糖2.0%(wt/wt),蔗糖15%(wt/wt),葡聚糖20000 1%(wt/wt),PVP 0.25%(wt/wt),Proclin300 0.01%(wt/wt),TW-20 0.05%(wt/wt),PEG4000 0.5%(wt/wt),pH8.5,食用色素(颜色为蓝色)0.005%(wt/wt)。

[0086] 稀释倍数:标记复合物的保存液与稀释液体积比1:1000,微球固含量0.002%。

[0087] 然后通过BG600Y15挪动泵灌装机分装浸泡液,每瓶20ml。

[0088] ③将750张10mm*3.5mm结合垫浸入20ml标记复合物浸泡液20min,然后取出后每条结合垫需平铺不重叠放置在表面平整塑料板上,塑料板上表面规则排列高度2mm直径2mm的圆柱形凸起,在温度20℃、湿度45%条件下水平静置15min后,连同塑料板一起水平放置于30℃、湿度40%的环境中自然干燥2h,再移到鼓风干燥箱37℃烘干4h。

[0089] ④用不锈钢镊子取出黏贴在塑料板上的结合垫,室温置于铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0090] (5) AFP试纸条组装

[0091] ①撕开中间粘贴有NC膜的PVC底板上缘吸水垫粘贴处的保护膜,将吸水垫粘贴于其上,吸水垫覆盖在NC膜上2mm,撕开PVC底板下缘样品垫粘贴处的保护膜,将样品垫粘贴于其上;

[0092] ②向步骤①得到的组装大板用切条设备切成3.5mm的试纸条;

[0093] ③撕开试纸条NC膜和样品垫中间结合垫粘贴处的保护膜,将结合垫粘贴于其上,结合垫覆盖在NC膜上2mm,样品垫覆盖在结合垫上2mm;

[0094] ④将步骤③中得到的宽度3.5mm试纸条装入塑料卡壳内构成一条检测卡,检测卡置铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0095] 本发明的层析试纸条的检测原理,具体如下:

[0096] 在加样区(样品垫)加入被检测样品后,通过毛细作用,标记膜上抗体-荧光微球的结合物与抗原结合后继续流动,流向NC膜上并向吸水一端的方向移动。如果被检测样品中含有AFP抗原,样品移动到NC膜上的T线即荧光微球标记的AFP抗体的包被线时,抗原-抗体-荧光微球的结合物被捕获,在T线处生成抗体-抗原-抗体-荧光微球的结合物;样品继续流动,流动到C线即羊抗鼠IgG抗体时,多余的未被AFP抗原结合的抗体-荧光微球的结合物被捕获,证明该试纸条的有效性。若检测的实际样品中不存在AFP抗原,不会形成免疫复合物,则在T线无荧光检测信号,仅在C线有荧光检测信号。如果C线无荧光检测信号,证明该试纸条无效,需要重新检测实际样品。

[0097] 实施例2糖类抗原CA199荧光免疫层析试纸条及其制备方法

[0098] 在聚氯乙烯PVC底板上依次搭接上样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫,然后将PVC底板及贴附的材料切成宽度4mm的试纸条,并装入卡壳,卡壳上开有加样区和测试区。

[0099] 其中,所述样品垫为玻璃纤维膜RB45;所述结合垫上含有量子点纳米球标记CA199单克隆抗体的复合物,所述PVC底板材质为聚氯乙烯PVC板,所述NC膜材质UniSart 140带背衬,所述膜上包含:T线(检测线)包被能与待检CA199抗原特异性结合的另一株CA199单克隆抗体,C线(质控线)包被羊抗鼠IgG抗体,所述检测线与所述质控线平行,距离为4mm,所述量子点纳米球含羧基粒径130nm。

[0100] 本发明试纸条可按照以下方法制备:

[0101] (1) NC膜制备

[0102] ①将NC膜固定粘贴在PVC底板的中间部位;

[0103] ②用包被缓冲液(0.02M PB,pH7.4)稀释meridian CA199单克隆抗体(货号M66106M)和羊抗鼠抗体至1mg/ml,得到T线CA199抗体、C线羊抗鼠包被稀释液;

[0104] ③将步骤②得到的包被稀释液使用喷金划膜仪包被于NC膜上,喷涂参数2 μ L/cm,T线、C线之间间隔4mm;

[0105] ④将步骤③NC膜置于烘箱37 $^{\circ}$ C进行干燥4h,干燥后加干燥剂密封保存;

[0106] (2) 样品垫制备

[0107] ①样品垫缓冲液:0.02M Tris-HCL,0.5%Tween-20,2%BSA,2%蔗糖,2.5%海藻糖,1.5%PVP,pH 8.5。

[0108] ②样品垫材质为RB45,室温浸泡在样品垫缓冲液中0.5h,37 $^{\circ}$ C烘干4h。

[0109] (3) CA199抗体标记

[0110] 清洗微球:取50 μ L量子点纳米球(固含量10mg/mL)于2mL离心管内,用1mL MES缓冲液(0.05M pH5.5),300W超声分散处理1min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤3次;

[0111] 共价活化:加入0.5mL MES缓冲液(0.05M pH5.5)超声重悬,依次加入Sulfo-NHS和EDC各40 μ g、20 μ g,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C摇床孵育20min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次;

[0112] 标记抗体:加入0.5mL PB标记缓冲液(0.02M pH 7.4)300W超声分散处理1min,加入60 μ g meridian CA199单克隆抗体(货号M66108M),37 $^{\circ}$ C摇床反应3h;

[0113] 封闭微球:加入40 μ L BSA(质量分数10%,纯水稀释)微球封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C摇床反应1h,15000rpm离心20min,弃上清;

[0114] 保存微球:加入0.5mL微球清洗缓冲液(0.025M Tris-HCL,0.9%NaCl(wt/wt),0.2%Tween-20(wt/wt)and 0.05%Proclin-300(wt/wt),pH8.0)超声重悬,12000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次,最后加入0.25ml微球保存液(0.025M Tris-HCl,1%BSA(wt/wt),5%海藻糖(wt/wt),20%蔗糖(wt/wt),1%PVP(wt/wt),0.05%Tween-20(wt/wt)and0.05%Proclin-300(wt/wt),pH 8.5)超声重悬分散,4℃密封保存。微球固含量为0.2%。

[0115] (4) 结合垫制备

[0116] ①裁切结合垫:结合垫材质玻纤6614,将结合垫裁切成宽度6mm*4mm;

[0117] ②配制标记抗体复合物的浸泡液,稀释液配方:0.02M HEPES,BSA 2%(wt/wt),海藻糖10%(wt/wt),蔗糖2%(wt/wt),葡聚糖20000 1%(wt/wt),PVP 3%(wt/wt),Proclin300 0.1%(wt/wt),TW-20 2%(wt/wt),PEG4000 2%(wt/wt),pH8.0,食用色素(颜色为蓝色)0.01%(wt/wt)。

[0118] 稀释倍数:标记复合物保存液与稀释液体积比5:1000,微球固含量0.01%。

[0119] 然后通过BF600分装型蠕动泵分装浸泡液,每瓶50ml。

[0120] ③将1500张6mm*4mm结合垫浸入50ml标记复合物浸泡液30min,然后取出后每条结合垫需平铺不重叠放置在表面平整玻璃板上,玻璃板上表面规则排列高度1mm的宽度2mm的线状凸起,在温度25℃、湿度50%条件下水平静置30min后,连同塑料板一起水平放置于30℃、湿度30%的环境中自然干燥1h,再移到鼓风干燥箱37℃烘干4h。

[0121] ④用不锈钢镊子取出黏贴在塑料板上的结合垫,室温置于铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0122] (5) CA199试纸条组装

[0123] ①撕开中间粘贴有NC膜的PVC底板上缘吸水垫粘贴处的保护膜,将吸水垫粘贴于其上,吸水垫覆盖在NC膜上2mm,撕开PVC底板下缘样品垫粘贴处的保护膜,将样品垫粘贴于其上;

[0124] ②向步骤①得到的组装大板用切条设备切成4mm的试纸条;

[0125] ③撕开试纸条NC膜和样品垫中间结合垫粘贴处的保护膜,将结合垫粘贴于其上,结合垫覆盖在NC膜上2mm,样品垫覆盖在结合垫上1.5mm;

[0126] ④将步骤③中得到的宽度4mm试纸条装入塑料卡壳内构成一条检测卡,检测卡置铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0127] 实施例3降钙素原PCT荧光免疫层析试纸条及其制备方法

[0128] 在聚氯乙烯PVC底板上依次搭接上样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫,然后将PVC底板及贴附的材料切成宽度4mm的试纸条,并装入卡壳,卡壳上开有加样区和测试区。

[0129] 其中,所述样品垫为Whatman品牌的FUSION 5;所述结合垫上含有钨离子荧光微球标记PCT单克隆抗体的复合物,所述PVC底板材质为聚氯乙烯PVC板,所述NC膜材质UniSart 140带背衬,所述膜上包含:T线(检测线)包被能与待检PCT抗原特异性结合的另一株PCT单克隆抗体,C线(质控线)包被羊抗鼠IgG抗体,所述检测线与所述质控线平行,距离为4mm,所述钨离子荧光微球含有羧基粒径300nm。

[0130] 本发明试纸条可按照以下方法制备:

[0131] (1) NC膜制备

- [0132] ①将NC膜固定粘贴在PVC底板的中间部位;
- [0133] ②用包被缓冲液(0.02M PB,0.5%海藻糖,pH7.4)稀释BBI PCT单克隆抗体(货号BM448-M5C1)和羊抗鼠抗体至1.5mg/ml、1mg/ml,得到T线PCT抗体、C线羊抗鼠包被稀释液;
- [0134] ③将步骤②得到的包被稀释液使用喷金划膜仪包被于NC膜上,喷涂参数2 μ L/cm,T线、C线之间间隔4mm;
- [0135] ④将步骤③NC膜置于烘箱37℃进行干燥4h,干燥后加干燥剂密封保存;
- [0136] (2) 样品垫制备
- [0137] ①样品垫缓冲液:0.02M PB,0.5%Tween-20,2%BSA,2%蔗糖,1.5%PVP,pH 7.4。
- [0138] ②样品垫材质为FUSION 5,室温浸泡在样品垫缓冲液中1h,37℃烘干4h。
- [0139] (3) PCT抗体标记
- [0140] 清洗微球:取50 μ L钕离子荧光微球(固含量10mg/)于2mL离心管内,用1mL MES缓冲液(0.05M pH5.5),300W超声分散处理1min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤3次;
- [0141] 共价活化:加入0.5mL MES缓冲液(0.05M pH5.5)超声重悬,依次加入Sulfo-NHS和EDC各40 μ g、20 μ g,漩涡混匀,37℃摇床孵育20min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次;
- [0142] 标记抗体:加入0.5mL PB标记缓冲液(0.02M pH 7.4)300W超声分散处理1min,加入60 μ g BBI PCT单克隆抗体(货号BM448-H3D5),37℃摇床反应2h;
- [0143] 封闭微球:加入40 μ L BSA(质量分数10%,纯水稀释)微球封闭缓冲液,37℃摇床反应2h,15000rpm离心20min,弃上清;
- [0144] 保存微球:加入0.5mL微球清洗缓冲液(0.02M Tris-HCL,0.9%NaCl(wt/wt),0.2%Tween-20(wt/wt)and 0.05%Proclin-300(wt/wt),pH8.0)超声重悬,12000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次,最后加入0.25ml微球保存液(0.02M Tris-HCl,1%BSA(wt/wt),5%海藻糖(wt/wt),15%蔗糖(wt/wt),1%PVP(wt/wt),0.05%Tween-20(wt/wt)and0.05%Proclin-300(wt/wt),pH 8.5)超声重悬分散,4℃密封保存。微球固含量为0.2%。
- [0145] (4) 结合垫制备
- [0146] ①裁切结合垫:结合垫材质无纺布FUSION 3,将结合垫裁切成宽度7mm*4mm;
- [0147] ②配制标记抗体复合物的浸泡液,稀释液配方:0.025M PB,BSA 1.5%(wt/wt),海藻糖2.5%(wt/wt),蔗糖2.5%(wt/wt),葡聚糖20000 3%(wt/wt),PVP 2%(wt/wt),叠氮钠0.01%(wt/wt),TW-20 0.1%(wt/wt),PEG4000 1%(wt/wt),pH8.5,食用色素(颜色为红色)0.01%(wt/wt)。
- [0148] 稀释倍数:标记复合物的保存液与稀释液体积比20:1000,微球固含量0.04%。
- [0149] 然后通过10ml注射泵分装浸泡液,每瓶2ml。
- [0150] ③将80张7mm*4mm结合垫浸入2ml标记复合物浸泡液45min,然后取出后每条结合垫需平铺不重叠放置在表面平整玻璃板上,玻璃板上表面规则排列深度3mm倒三角凹陷,在温度37℃、湿度60%条件下水平静置30min后,连同塑料板一起水平放置于50℃、湿度25%的环境中自然干燥2h,再移到鼓风干燥箱37℃烘干4h。
- [0151] ④用不锈钢镊子取出黏贴在塑料板上的结合垫,室温置于铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0152] (5) PCT试纸条组装

[0153] PCT试纸条组装同实施例2组装方式。

[0154] 实施例4神经元特异性烯醇化酶NSE荧光免疫层析试纸条及其制备方法

[0155] 在聚氯乙烯PVC底板上依次搭接上样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫,然后将PVC底板及贴附的材料切成宽度3.5mm的试纸条,并装入卡壳,卡壳上开有加样区和测试区。

[0156] 其中,所述样品垫为玻纤BT40;所述结合垫上含有绿色微球标记NSE单克隆抗体的复合物,所述PVC底板材质为聚氯乙烯PVC板,所述NC膜材质UniSart 150带背衬,所述膜上包含:T线(检测线)包被能与待检NSE抗原特异性结合的另一株NSE单克隆抗体,C线(质控线)包被羊抗鼠IgG抗体,所述检测线与所述质控线平行,距离为4mm,所述绿色微球含有羧基粒径150nm。

[0157] 本发明试纸条可按照以下方法制备:

[0158] (1) NC膜制备

[0159] ①将NC膜固定粘贴在PVC底板的中间部位;

[0160] ②用包被缓冲液(0.02M PB,pH7.4)稀释Fitzgerald NSE单克隆抗体(货号10-7936)和羊抗鼠抗体至1.5mg/ml,得到T线PCT抗体、C线羊抗鼠包被稀释液;

[0161] ③将步骤②得到的包被稀释液使用喷金划膜仪包被于NC膜上,喷涂参数1 μ L/cm,T线、C线之间间隔3mm;

[0162] ④将步骤③NC膜置于烘箱37 $^{\circ}$ C进行干燥4h,干燥后加干燥剂密封保存;

[0163] (2) 样品垫制备

[0164] ①样品垫缓冲液:0.02M Tris-HCL,0.5%Tween-20,2%BSA,2%蔗糖,1.5%PVP,pH 8.5。

[0165] ②样品垫材质为玻纤BT40,室温浸泡在样品垫缓冲液中1h,37 $^{\circ}$ C烘干4h。

[0166] (3) NSE抗体标记

[0167] 清洗微球:取50 μ L绿色荧光微球(固含量4%)于2mL离心管内,用1mL MES缓冲液(0.05M pH5.5),300W超声分散处理1min,18000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤3次;

[0168] 共价活化:加入0.5mL MES缓冲液(0.05M pH5.5)超声重悬,依次加入Sulfo-NHS和EDC各40 μ g、20 μ g,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C摇床孵育20min,18000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次;

[0169] 标记抗体:加入0.5mL PB标记缓冲液(0.02M pH 7.4)300W超声分散处理1min,加入30 μ g Fitzgerald NSE单克隆抗体(货号10-7937),37 $^{\circ}$ C摇床反应2h;

[0170] 封闭微球:加入30 μ L BSA(质量分数10%,纯水稀释)微球封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C摇床反应2h,18000rpm离心20min,弃上清;

[0171] 保存微球:加入0.5mL微球清洗缓冲液(0.02M Tris-HCL,0.9%NaCl(wt/wt),0.5%Tween-20(wt/wt)and 0.05%Proclin-300(wt/wt),pH8.0)超声重悬,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次,最后加入0.25ml微球保存液(0.02M Tris-HCl,2%BSA(wt/wt),5%海藻糖(wt/wt),20%蔗糖(wt/wt),1.5%PVP(wt/wt),0.05%Tween-20(wt/wt)and0.05%Proclin-300(wt/wt),pH 8.5)超声重悬分散,4 $^{\circ}$ C密封保存。微球固含量为0.8%。

[0172] (4) 结合垫制备

- [0173] ①裁切结合垫:结合垫材质聚酯膜6613,将结合垫裁切成宽度10mm*4mm;
- [0174] ②配制标记抗体复合物的浸泡液,稀释液配方:0.02M Tris-HCL,BSA 1% (wt/wt),海藻糖5% (wt/wt),蔗糖5% (wt/wt),葡聚糖20000 2% (wt/wt),PVP 1% (wt/wt),Proclin300 0.05% (wt/wt),TW-20 0.5% (wt/wt),PEG4000 1.5% (wt/wt),pH8.5。
- [0175] 稀释倍数:标记复合物的保存液与稀释液体积比1:1000,微球固含量0.008%。
- [0176] ③将每张10mm*4mm结合垫需平铺不重叠放置在表面平整玻璃板上,玻璃板上表面规则排列高度0.5mm正三角形凸起,用注射泵定量缓慢匀速滴加标记复合物在每张结合垫上10 μ L,在温度25℃、湿度45%条件下水平静置30min后,连同304不锈钢板一起水平放置于50℃、湿度40%的环境中自然干燥1h,再移到鼓风干燥箱37℃烘干4h。
- [0177] ④用不锈钢镊子取出黏贴在不锈钢板上的结合垫,室温置于铝箔袋中加干燥剂密封保存。
- [0178] (5)NSE试纸条组装
- [0179] NSE试纸条组装同实施例1组装方式。
- [0180] 实施例5细胞角蛋白19CYFRA21-1荧光免疫层析试纸条及其制备方法
- [0181] 在聚氯乙烯PVC底板上依次搭接上样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫,然后将PVC底板及贴附的材料切成宽度4.5mm的试纸条,并装入卡壳,卡壳上开有加样区和测试区。
- [0182] 其中,所述样品垫为玻纤奥斯龙6614;所述结合垫上含有钨离子荧光微球标记CYFRA21-1单克隆抗体的复合物,所述PVC底板材质为聚氯乙烯PVC板,所述NC膜材质UniSart 140带背衬,所述膜上包含:T线(检测线)包被能与待检CYFRA21-1抗原特异性结合的另一株CYFRA21-1单克隆抗体,C线(质控线)包被羊抗鼠IgG抗体,所述检测线与所述质控线平行,距离为3.5mm,所述钨离子荧光微球含有羧基粒径200nm。
- [0183] 本发明试纸条可按照以下方法制备:
- [0184] (1)NC膜制备
- [0185] ①将NC膜固定粘贴在PVC底板的中间部位;
- [0186] ②用包被缓冲液(0.02M PB,pH7.4)稀释biospecific CYFRA21-1抗体单克隆抗体(货号A82260)和羊抗鼠抗体至1.5mg/ml,得到T线PCT抗体、C线羊抗鼠包被稀释液;
- [0187] ③将步骤②得到的包被稀释液使用喷金划膜仪包被于NC膜上,喷涂参数1 μ L/cm,T线、C线之间间隔4mm;
- [0188] ④将步骤③NC膜置于烘箱37℃进行干燥4h,干燥后加干燥剂密封保存;
- [0189] (2)样品垫制备
- [0190] ①样品垫缓冲液:0.02M Tris-HCL,0.5%Tween-20,2%BSA,2%蔗糖,1.5%PVP,pH 8.5。
- [0191] ②样品垫材质为玻纤6614,室温浸泡在样品垫缓冲液中1h,37℃烘干4h。
- [0192] (3)CYFRA21-1抗体标记
- [0193] 清洗微球:取50 μ L钨离子荧光微球(固含量1%)于1.5mL离心管内,用1mL MES缓冲液(0.05M pH5.5),300W超声分散处理1min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤3次;
- [0194] 共价活化:加入0.5mL MES缓冲液(0.05M pH5.5)超声重悬,依次加入Sulfo-NHS和EDC各40 μ g、20 μ g,漩涡混匀,37℃摇床孵育20min,16000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次;

[0195] 标记抗体:加入0.5mL PB标记缓冲液(0.02M pH 7.4) 300W超声分散处理1min,加入30μg biospecific CYFRA21-1抗体单克隆抗体(货号A82261),37℃摇床反应4h;

[0196] 封闭微球:加入40uL BSA(质量分数10%,纯水稀释)微球封闭缓冲液,37℃摇床反应2h,15000rpm离心20min,弃上清;

[0197] 保存微球:加入0.5mL微球清洗缓冲液(0.025M Tris-HCL,0.9%NaCl(wt/wt),0.2%Tween-20(wt/wt)and 0.05%Proclin-300(wt/wt),pH8.5)超声重悬,12000rpm离心20min,弃上清,重复该步骤2次,最后加入0.25ml微球保存液(0.025M Tris-HCl,1%BSA(wt/wt),5%海藻糖(wt/wt),20%蔗糖(wt/wt),1%PVP(wt/wt),0.05%Tween-20(wt/wt)and0.05%Proclin-300(wt/wt),pH 8.5)超声重悬分散,4℃密封保存。微球固含量为0.2%。

[0198] (4) 结合垫制备

[0199] ①裁切结合垫:结合垫材质玻纤8980,将结合垫裁切成宽度8mm*4.5mm;

[0200] ②配制标记抗体复合物的浸泡液,稀释液配方:0.02M Tris-HCL,BSA 0.5%(wt/wt),海藻糖2.0%(wt/wt),蔗糖10%(wt/wt),葡聚糖20000 2.5%(wt/wt),PVP 0.5%(wt/wt),Proclin300 0.05%(wt/wt),TW-20 1%(wt/wt),PEG4000 1.5%(wt/wt),pH8.5。

[0201] 稀释倍数:标记复合物的保存液与稀释液体积比2:1000,微球固含量0.004%。

[0202] ③每条10mm*4mm结合垫需平铺不重叠放置在表面平整玻璃板上,玻璃板上表面规则排列深度1mm直线型划痕,用JT-D3210全自动点胶机缓慢匀速滴加标记复合物在每张结合垫上30μL,在温度30℃、湿度55%条件下水平静置30min后,连同玻璃板一起水平放置于30℃、湿度30%的环境中自然干燥2h,再移到鼓风干燥箱37℃烘干4h。

[0203] ④用不锈钢镊子取出黏贴在玻璃板上的结合垫,室温置于铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0204] (5) CYFRA21-1试纸条组装

[0205] ①撕开中间粘贴有NC膜的PVC底板上缘吸水垫粘贴处的保护膜,将吸水垫粘贴于其上,吸水垫覆盖在NC膜上1.5mm,撕开PVC底板下缘样品垫粘贴处的保护膜,将样品垫粘贴于其上;

[0206] ②向步骤①得到的组装大板用切条设备切成4.5mm的试纸条;

[0207] ③撕开试纸条NC膜和样品垫中间结合垫粘贴处的保护膜,将结合垫粘贴于其上,结合垫覆盖在NC膜上1.5mm,样品垫覆盖在结合垫上2mm;

[0208] ④将步骤③中得到的宽度4.5mm试纸条装入塑料卡壳内构成一条检测卡,检测卡置铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0209] 实施例6肌红蛋白MYO荧光免疫层析试纸条及其制备方法

[0210] 在聚氯乙烯PVC底板上依次搭接上样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫,然后将PVC底板及贴附的材料切成宽度4mm的试纸条,并装入卡壳,卡壳上开有加样区和测试区。

[0211] 其中,所述样品垫为玻纤RB65;所述结合垫上含有表面有羧基的磁珠标记MYO单克隆抗体的复合物,所述PVC底板材质为聚氯乙烯PVC板,所述NC膜材质UniSart 95带背衬,所述膜上包含:T线(检测线)包被能与待检PCT抗原特异性结合的另一株MYO单克隆抗体,C线(质控线)包被羊抗鼠IgG抗体,所述检测线与所述质控线平行,距离为3.5mm,所述磁珠粒径300nm。

[0212] 本发明试纸条可按照以下方法制备：

[0213] (1) NC膜制备

[0214] ①将NC膜固定粘贴在PVC底板的中间部位；

[0215] ②用包被缓冲液(0.02M PB, pH7.4) 稀释博茵生物MY0抗体单克隆抗体(货号M020603) 和羊抗鼠抗体至1mg/ml, 得到T线PCT抗体、C线羊抗鼠包被稀释液；

[0216] ③将步骤②得到的包被稀释液使用喷金划膜仪包被于NC膜上, 喷涂参数1 μ L/cm, T线、C线之间间隔4mm；

[0217] ④将步骤③NC膜置于烘箱37℃进行干燥4h, 干燥后加干燥剂密封保存；

[0218] (2) 样品垫制备

[0219] ①样品垫缓冲液: 0.02M Tris-HCL, 0.5% Tween-20, 2% BSA, 2% 蔗糖, 1.5% PVP, pH 8.5。

[0220] ②样品垫材质为玻纤RB65, 室温浸泡在样品垫缓冲液中1h, 37℃烘干4h。

[0221] (3) MY0抗体标记

[0222] 清洗微球: 取20 μ L表面有羧基的磁珠(固含量10%) 于2mL离心管内, 用1mL MES缓冲液(0.05M pH5.5), 漩涡振荡器重悬, 用磁分离器分离后, 弃上清, 再用MES缓冲液清洗2次；

[0223] 共价活化: 加入0.25mL MES缓冲液(0.05M pH5.5) 漩涡振荡器重悬, 依次加入 Sulfo-NHS和EDC各10 μ g、8 μ g, 漩涡混匀, 室温漩涡振荡器孵育20min, 用磁分离器分离后, 弃上清, 用MES缓冲液清洗2次后, 用0.25mL BST标记缓冲液(0.02M pH 7.4) 漩涡混匀清洗2遍；

[0224] 标记抗体: 加入0.25mL BST标记缓冲液混匀后, 加入15 μ g博茵生物MY0抗体单克隆抗体(货号M020603), 室温漩涡振荡器反应2h, 标记完成后, 磁分离器分离分离, 弃上清；

[0225] 封闭微球: 加入0.25mL的BST缓冲液漩涡混匀, 加入50 μ L BSA(质量分数10%, 纯水稀释), 漩涡振荡器混匀, 旋转封闭1h, 用磁分离器分离后, 弃上清；

[0226] 保存微球: 加入0.25mL磁珠BST保存液缓冲液(0.02M BST, 0.2% Tween-20 (wt/wt) and 0.05% Proclin-300 (wt/wt), 0.5% BSA (wt/wt)), 0.5% 海藻糖 (wt/wt)), pH8.0) 漩涡重悬, 用磁分离器分离后, 弃上清, 重复该步骤2次, 最后加入0.20mL BST保存液缓冲液(漩涡重悬分散, 4℃密封保存。磁珠微球固含量为1%)。

[0227] (4) 结合垫制备

[0228] ①裁切结合垫: 结合垫材质玻纤GL0194, 将结合垫裁切成宽度7mm*4mm；

[0229] ②配制标记抗体复合物的浸泡液, 稀释液配方: 0.02M Tris-HCL, BSA 1.5% (wt/wt), 海藻糖4.5% (wt/wt), 蔗糖5% (wt/wt), 葡聚糖20000 1.4% (wt/wt), PVP 1.5% (wt/wt), Proclin300 0.1% (wt/wt), TW-20 1.5% (wt/wt), PEG4000 0.5% (wt/wt), pH8.1。

[0230] 稀释倍数: 标记复合物的保存液与稀释液体积比8:1000, 磁珠微球固含量0.08%。

[0231] ③将每条10mm*4mm结合垫需平铺不重叠放置在不锈钢板上, 不锈钢板上表面规则排列深度1mm S型划痕, 用移液器缓慢滴加标记复合物浸泡液在结合垫上50 μ L, 在温度27℃、湿度54%条件下水平静置30min后, 连同塑料板一起水平放置于30℃、湿度30%的环境中自然干燥2h, 再移到鼓风干燥箱37℃烘干4h。

[0232] ④用不锈钢镊子取出黏贴在不锈钢板上的结合垫, 室温置于铝箔袋中加干燥剂密

封保存。

[0233] (5) MYO试纸条组装

[0234] ①撕开中间粘贴有NC膜的PVC底板上缘吸水垫粘贴处的保护膜,将吸水垫粘贴于其上,吸水垫覆盖在NC膜上2mm,撕开PVC底板下缘样品垫粘贴处的保护膜,将样品垫粘贴于其上;

[0235] ②向步骤①得到的组装大板用切条设备切成4mm的试纸条;

[0236] ③撕开试纸条NC膜和样品垫中间结合垫粘贴处的保护膜,将结合垫粘贴于其上,结合垫覆盖在NC膜上1mm,样品垫覆盖在结合垫上1mm;

[0237] ④将步骤③中得到的宽度4mm试纸条装入塑料卡壳内构成一条检测卡,检测卡置铝箔袋中加干燥剂密封保存。

[0238] 不精密度测试

[0239] 进一步,对实施例1-6的试纸条进行测试人血清样本作为研究对象研究其不精密度(CV值);对照组1的试纸条采用划膜仪喷涂结合垫,其余步骤与实施例1-6相同;对照组2的试纸条采用结合垫浸泡于溶液后取出室温条件下放置15min后放入烘箱37℃烘干4h,其余步骤与实施例1-6相同。对比其不精密度,如下表所示:

[0240] 表2

[0241]

样本号	实施例1 AFP	对照组1.1 (喷涂)	对照组1.2 (浸泡)	实施例2 CA199	对照组2.1 (喷涂)	对照组2.2 (浸泡)	实施例3 PCT	对照组3.1 (喷涂)	对照组3.2 (浸泡)
	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
1	20.647	19.834	20.349	50.148	50.944	46.712	0.466	0.538	0.483
2	21.409	19.821	15.019	51.311	51.088	50.009	0.516	0.518	0.479
3	20.582	18.757	20.016	49.915	53.311	50.277	0.474	0.527	0.572
4	19.156	20.128	17.583	47.475	50.840	50.605	0.524	0.433	0.575
5	20.815	19.699	19.596	51.132	47.976	44.954	0.523	0.443	0.573
6	19.497	20.114	15.945	50.421	46.857	48.758	0.477	0.518	0.535
7	20.011	18.165	18.120	51.039	48.807	49.666	0.487	0.470	0.528
8	20.332	21.625	19.869	50.413	52.849	51.994	0.521	0.518	0.471
9	21.573	18.276	20.104	48.861	53.580	51.765	0.520	0.538	0.580
10	21.993	19.623	15.004	47.640	47.303	47.116	0.509	0.579	0.485

[0242]

平均值	20.601	19.604	18.161	49.836	50.356	49.186	0.502	0.508	0.528
不精密度	4.38%	5.18%	11.91%	2.79%	4.96%	4.65%	4.63%	8.98%	8.60%
样本号	实施例4 NSE	对照组4.1 (喷涂)	对照组4.2 (浸泡)	实施例5 CYFRA21-1	对照组5.1 (喷涂)	对照组5.2 (浸泡)	实施例6 MYO	对照组6.1 (喷涂)	对照组6.2 (浸泡)
	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
1	34.409	32.997	30.921	57.338	58.707	51.766	218.978	199.121	223.469
2	36.235	43.790	31.551	59.970	54.263	58.850	202.106	205.686	178.437
3	38.872	33.764	32.995	56.593	65.830	58.742	207.937	195.239	207.076
4	37.073	37.123	38.621	55.414	59.554	53.120	202.710	196.553	189.464
5	37.823	35.606	37.591	61.829	59.504	54.231	195.173	212.993	224.005
6	38.286	40.973	37.737	60.298	61.754	56.795	205.124	190.657	210.167
7	38.604	30.668	39.279	60.162	55.523	56.494	182.631	207.000	180.163
8	34.266	40.743	34.425	61.129	62.571	55.998	213.419	198.404	207.975
9	34.901	32.143	32.168	56.439	53.309	56.335	217.412	196.900	201.386
10	35.925	40.835	35.230	58.365	60.307	50.920	204.645	175.169	182.762
平均值	36.639	36.864	35.052	58.754	59.132	55.325	205.013	197.772	200.490
不精密度	4.77%	12.22%	8.85%	3.78%	6.58%	4.94%	5.24%	5.20%	8.49%

[0243] 从表2可见,本发明的试纸条能有效降低CV,提高检测结果的准确性,在实施例1至实施例5中,本发明的方法CV值低于喷涂法,表明本发明的方法具有更优的精确测量的性能。

[0244] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

专利名称(译)	一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN109541234A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811402527.1	申请日	2018-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	东莞东阳光科研开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	东莞东阳光科研开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	东莞东阳光科研开发有限公司		
[标]发明人	郑兰花 熊亮 洪礼清 蒋奎胜 庾琼 刘仁源 刘勇娥 李建霖		
发明人	郑兰花 熊亮 洪礼清 蒋奎胜 庾琼 刘仁源 刘勇娥 李建霖		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种精确定量检测免疫层析试纸条的制备方法，其中，结合垫的制备中，包括：S1：裁切结合垫：将结合垫裁切成组装成成品时所需要的尺寸；S2：标记复合物的制备：在标记物标记上抗体或抗原后，置于保存液中存放；S3：配制标记复合物的浸泡液：将稀释液与上述含有标记复合物的保存液混合稀释成一定浓度的标记复合物的浸泡液；S4：浸润结合垫：将定标记复合物的浸泡液加入结合垫中，浸润；S5：结合垫平衡过程：将浸润的结合垫平铺于载体上，在恒温恒湿环境中静置；S6：干燥结合垫：将平衡完成的结合垫进行干燥。本发明的方法能有效提高试纸条精密密度以用于精确定量检测，且制备方法简单，生产效率高，生产成本低，便于工业化生产。

名称	厂家
Proclin 300	阿拉丁
PVP	阿拉丁
D-海藻糖	阿拉丁
葡聚糖	阿拉丁
蔗糖	成都市科龙化工
食用色素	品牌顶好
BSA	Roche
钪离子荧光微球	Bangs Labs
量子点纳米球	上海昆道生物技术