



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110749739 A

(43)申请公布日 2020.02.04

(21)申请号 201911152768.X

(22)申请日 2019.11.22

(71)申请人 海卫特(广州)医疗科技有限公司
地址 510000 广东省广州市广州高新技术产业开发区新瑞路6号二栋B201

(72)发明人 黄晨珠 杨晶 邓艳珍 梁才弗
岑赞询 王伟

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 侯武娇

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

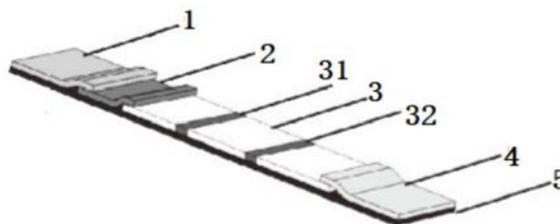
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

皮质醇检测免疫试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种皮质醇检测免疫试纸及其制备方法,该试纸包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬,结合垫上包被有抗体微球偶联复合物,抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物,检测线包被有皮质醇抗原,质控线包被有能够与第一质控抗体特异性结合的第二质控抗体。发明人通过大量研究发现,将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联在标记微球上形成抗体微球偶联复合物,能将反应体系的信号量放大的同时,还能有效解决抗体与标记微球结合不均匀的问题,从而大大提高了灵敏度、准确性和扩宽线性范围。



1. 一种皮质醇检测免疫试纸,其特征在于,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬,所述样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素膜及所述吸水垫设于所述背衬上,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接,所述硝酸纤维素膜上设有相互间隔的检测线及质控线,所述检测线较所述质控线更靠近所述结合垫,所述结合垫上包被有抗体微球偶联复合物,所述抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物,所述检测线包被有皮质醇抗原,所述质控线包被有能够与所述第一质控抗体特异性结合的第二质控抗体。

2. 如权利要求1所述的皮质醇检测免疫试纸,其特征在于,所述抗体微球偶联复合物中,所述皮质醇单克隆抗体与所述第一质控抗体的质量比为(1~2):1。

3. 如权利要求1所述的皮质醇检测免疫试纸,其特征在于,所述标记微球选自荧光胶乳微球、胶体金微球或磁珠微球。

4. 如权利要求1所述的皮质醇检测免疫试纸,其特征在于,所述第一质控抗体和所述第二质控抗体中一个选自羊抗兔IgG抗体,另一个选自兔抗鼠IgG抗体。

5. 如权利要求4所述的皮质醇检测免疫试纸,其特征在于,所述第一质控抗体选自羊抗兔IgG抗体,所述第二质控抗体选自兔抗鼠IgG抗体。

6. 如权利要求1~5任一项所述的皮质醇检测免疫试纸,其特征在于,所述皮质醇检测免疫试纸为犬猫皮质醇检测免疫试纸,所述皮质醇单克隆抗体为犬猫皮质醇单克隆抗体,所述皮质醇抗原为犬猫皮质醇抗原。

7. 一种皮质醇检测免疫试纸的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将抗体微球偶联复合物包被在结合垫上,所述抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物;

将皮质醇抗原包被在硝酸纤维素膜上形成检测线;

将第二质控抗体包被在所述硝酸纤维素膜上形成与所述检测线相间隔的质控线,所述第二质控抗体能够与所述第一质控抗体特异性结合;

将样品垫、吸水垫、包被有抗体微球偶联复合物的所述结合垫及具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜设于背衬上,得到所述皮质醇检测免疫试纸,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接,所述检测线较所述质控线更靠近所述结合垫。

8. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述将抗体微球偶联复合物包被在结合垫上的步骤包括:

将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体与标记微球混合制成含有所述抗体微球偶联复合物的标记溶液;

将所述标记溶液喷涂在所述结合垫上,干燥。

9. 如权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述含有抗体微球偶联复合物的标记溶液的制备包括如下步骤:

将标记微球制成标记微球溶液,然后与所述皮质醇单克隆抗体和所述第一质控抗体混合,分离取沉淀,采用PBS-TBN溶解,制成含有抗体微球偶联复合物的标记溶液。

10. 如权利要求9所述的制备方法,其特征在于,在所述标记微球溶液中,所述标记微球

的浓度为(800~1200) $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$;所述皮质醇单克隆抗体和所述第一质控抗体的总量与所述标记微球溶液的用量比为(5~20) $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ 。

皮质醇检测免疫试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测技术领域,特别是涉及一种皮质醇检测免疫试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 皮质醇(Cortisol)也称氢化可的松,是从肾上腺皮质中提取出的是对糖类代谢具有最强作用的肾上腺皮质激素,即属于糖皮质激素的一种。Cortisol检测方法主要有酶联免疫法(ELISA)和化学发光法。其中,ELISA法定量准确性差,检测耗时长,自动化程度低,易出现错误;化学发光法特异性强,灵敏度高,但对技术要求高。因此开发操作简单、灵敏度高、特异性强、线性范围宽的Cortisol检测产品是亟待解决的问题。

发明内容

[0003] 基于此,有必要提供一种快捷方便、灵敏度较高、特异性较强、线性范围较宽的皮质醇检测免疫试纸及其制备方法。

[0004] 一种皮质醇检测免疫试纸,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬,所述样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素膜及所述吸水垫设于所述背衬上,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接,所述硝酸纤维素膜上设有相互间隔的检测线及质控线,所述检测线较所述质控线更靠近所述结合垫,所述结合垫上包被有抗体微球偶联复合物,所述抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物,所述检测线包被有皮质醇抗原,所述质控线包被有能够与所述第一质控抗体特异性结合的第二质控抗体。

[0005] 发明人通过大量研究发现,将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联在标记微球上形成抗体微球偶联复合物,然后将抗体微球偶联复合物包被在结合垫上,相比于标记微球分别标记皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体的工艺,该皮质醇检测免疫试纸的检测线与质控线共用同一标记微球,且皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体两个抗体共同偶联结合在标记微球,能将反应体系的信号量放大的同时,还能有效解决抗体与标记微球结合不均匀的问题,从而大大提高了灵敏度、准确性和扩宽线性范围。

[0006] 在其中一个实施例中,所述抗体微球偶联复合物中,所述皮质醇单克隆抗体与所述第一质控抗体的质量比为(1~2):1。

[0007] 在其中一个实施例中,所述标记微球选自荧光胶乳微球、胶体金微球或磁珠微球。

[0008] 在其中一个实施例中,所述第一质控抗体和所述第二质控抗体中一个选自羊抗兔IgG抗体,另一个选自兔抗鼠IgG抗体。

[0009] 在其中一个实施例中,所述第一质控抗体选自羊抗兔IgG抗体,所述第二质控抗体选自兔抗鼠IgG抗体。

[0010] 在其中一个实施例中,所述皮质醇检测免疫试纸为犬猫皮质醇检测免疫试纸,所

述皮质醇单克隆抗体为犬猫皮质醇单克隆抗体,所述皮质醇抗原为犬猫皮质醇抗原。

[0011] 一种皮质醇检测免疫试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 将抗体微球偶联复合物包被在结合垫上,所述抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物;

[0013] 将皮质醇抗原包被在硝酸纤维素膜上形成检测线;

[0014] 将第二质控抗体包被在所述硝酸纤维素膜上形成与所述检测线相间隔的质控线,所述第二质控抗体能够与所述第一质控抗体特异性结合;

[0015] 将样品垫、吸水垫、包被有抗体微球偶联复合物的所述结合垫及具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜设于背衬上,得到所述皮质醇检测免疫试纸,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接,所述检测线较所述质控线更靠近所述结合垫。

[0016] 在其中一个实施例中,所述将抗体微球偶联复合物包被在结合垫上的步骤包括:

[0017] 将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体与标记微球混合制成含有所述抗体微球偶联复合物的标记溶液;

[0018] 将所述标记溶液喷涂在所述结合垫上,干燥。

[0019] 在其中一个实施例中,所述含有抗体微球偶联复合物的标记溶液的制备包括如下步骤:

[0020] 将标记微球制成标记微球溶液,然后与所述皮质醇单克隆抗体和所述第一质控抗体混合,分离取沉淀,采用PBS-TBN溶解,制成含有抗体微球偶联复合物的标记溶液。

[0021] 在其中一个实施例中,在所述标记微球溶液中,所述标记微球的浓度为(800~1200) $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$;所述皮质醇单克隆抗体和所述第一质控抗体的总量与所述标记微球溶液的用量比为(5~20) $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ 。

附图说明

[0022] 图1为一实施例的皮质醇检测免疫试纸的结构示意图;

[0023] 图2为样品理论浓度和检测浓度的线性关系图;

[0024] 图3为皮质醇校准品的浓度与采用制备实施例和对比例1制得的试纸测试对应的灵敏度的线性相关图。

具体实施方式

[0025] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述,并给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0026] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0027] 皮质醇为类固醇类小分子物质,有抗原性无免疫原性,因此在获得高特异性皮质醇抗体难度很大。在血液样本中通常存在很多与皮质醇结构类似的类固醇类小分子物质,

这些物质对皮质醇的检测会形成干扰,同时小分子物质在检测过程中容易受空间位阻和基质效应的影响。在小分子类物质的免疫层析检测中普遍存在灵敏度不高、线性范围窄、准确度不足的问题。

[0028] 针对上述问题,本发明一实施方式提供了一实施例的皮质醇检测免疫试纸及其制备方法。下面将结合皮质醇检测免疫试纸的制备方法对皮质醇检测免疫试纸的结构进行详细的介绍。

[0029] 请参阅图1,该皮质醇检测免疫试纸包括样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4和背衬5。样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3及吸水垫4设于背衬5上。结合垫2的两端分别与样品垫1及硝酸纤维素膜3搭接,硝酸纤维素膜3远离结合垫2的一端与吸水垫4搭接。硝酸纤维素膜3上设有相互间隔的检测线31及质控线32,检测线31较质控线32更靠近结合垫2。

[0030] 结合垫2上包被有抗体微球偶联复合物。抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物。检测线31包被有皮质醇抗原,质控线32包被有能够与第一质控抗体特异性结合的第二质控抗体。

[0031] 上述皮质醇检测免疫试纸工作时,待测样品与样品垫1接触,通过层析作用,依次层析至结合垫2和硝酸纤维素膜3。

[0032] 若待检测样品中含有皮质醇,则样品中的皮质醇及检测线31包被的皮质醇抗原竞争地与结合垫2上的抗体微球偶联复合物上的皮质醇单克隆抗体结合。样品中的皮质醇越多,其在结合垫2上先结合的抗体微球偶联复合物上的皮质醇单克隆抗体越多,则层析至检测线31时检测线31包被的皮质醇抗原可结合的抗体微球偶联复合物上的皮质醇单克隆抗体越少,此时检测线31不显色或显色淡。而样品中结合有皮质醇的抗体微球偶联复合物通过层析作用在质控线32,通过其中的第一质控抗体与质控线32中的第二质控抗体结合而大量聚集,进而显色。

[0033] 若待检测样品中不含有皮质醇,则结合垫2上的抗体微球偶联复合物上的皮质醇单克隆抗体随着样品层析至检测线31,先与检测线31包被的皮质醇抗原结合显色,剩余的抗体微球偶联复合物继续层析至质控线32,抗体微球偶联复合物中的第一质控抗体与质控线32中的第二质控抗体结合显色。

[0034] 若质控线32不显色,则说明皮质醇检测免疫试纸失效。

[0035] 发明人通过大量研究发现,将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联在标记微球上形成抗体微球偶联复合物,然后将抗体微球偶联复合物包被在结合垫2上,相比于标记微球分别标记皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体的工艺,该皮质醇检测免疫试纸的检测线31与质控线32共用同一标记微球,且皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体两个抗体共同偶联结合在标记微球,能将反应体系的信号量放大的同时,还能有效解决抗体与标记微球结合不均匀的问题,从而大大提高了灵敏度、准确性和扩宽线性范围。

[0036] 在一具体示例中,上述皮质醇检测免疫试纸为犬猫皮质醇检测免疫试纸。相应地,其中的皮质醇单克隆抗体为犬猫皮质醇单克隆抗体,其中的皮质醇抗原为犬猫皮质醇抗原。

[0037] 在一示例中,背衬5为PVC(聚氯乙烯)材质。

[0038] 在其中一些实施例中,样品垫1可采用如下方法制备:用缓冲液溶解蛋白,然后加

入少量表面活性剂,调节pH值至6~8,再加入阻断剂,得混合溶液,将此混合溶液喷于样品垫1上,喷涂量为(4~8) $\mu\text{L}/\text{cm}$,置于干燥箱内在50 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥24h即得。可理解,其中干燥的条件可以根据需要适当调整。

[0039] 其中,包被有抗体微球偶联复合物的结合垫2是采用如下方法形成的:将抗体微球偶联复合物包被在结合垫2上。

[0040] 在其中一些实施例中,将抗体微球偶联复合物包被在结合垫2上的步骤包括:步骤S11、将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体与标记微球混合制成含有抗体微球偶联复合物的标记溶液;步骤S12、将标记溶液喷涂在结合垫2上,干燥。

[0041] 进一步地,步骤S11包括如下步骤:将标记微球制成标记微球溶液,然后与皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体混合,分离取沉淀,采用PBS-TBN溶解,制成含有抗体微球偶联复合物的标记溶液。其中PBS-TBN的主要组成为PBS,0.1%BSA,0.02%Tween-20,0.05%Azide,pH 7.4)。

[0042] 更进一步地,步骤S11中,在标记微球溶液中,标记微球的浓度为(800~1200) $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$;皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体的总量与标记微球溶液的用量比为(5~20) $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ 。其中,标记微球在使用前,还包括对标记微球活化的步骤。进一步地,步骤S11中,混合的条件为室温(25 $^{\circ}\text{C}$)混合1.5小时~3小时。进一步地,PBS-TBN的用量为调整含有抗体微球偶联复合物的标记溶液的体积与标记微球溶液的体积相同。

[0043] 进一步地,步骤S12中标记溶液喷涂在结合垫2上的喷涂量为(4~8) $\mu\text{L}/\text{cm}$,干燥的条件为置于干燥箱内50 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥24h可得。可理解,其中干燥的条件可以根据需要适当调整。

[0044] 进一步地,抗体微球偶联复合物或含有抗体微球偶联复合物的标记溶液的制备步骤中,皮质醇单克隆抗体与第一质控抗体的质量比为(1~2):1。优选地,抗体微球偶联复合物或含有抗体微球偶联复合物的标记溶液的制备步骤中,皮质醇单克隆抗体与第一质控抗体的质量比为1:1。

[0045] 在其中一些实施例中,标记微球选自荧光胶乳微球、胶体金微球或磁珠微球。进一步地,标记微球选自荧光胶乳微球,荧光胶乳微球的直径为0.1 μm ~1 μm ;荧光胶乳微球的发射波长为180nm~800nm。

[0046] 其中,具有检测线31和质控线32的硝酸纤维素膜3可采用如下方法制得:将皮质醇抗原包被在硝酸纤维素膜3上形成检测线31;将第二质控抗体包被在硝酸纤维素膜3上形成与检测线31相间隔的质控线32。

[0047] 在其中一些实施例中,第一质控抗体和第二质控抗体中一个选自羊抗兔IgG抗体,另一个选自兔抗鼠IgG抗体。

[0048] 进一步地,第一质控抗体选自羊抗兔IgG抗体,第二质控抗体选自兔抗鼠IgG抗体。

[0049] 在一具体示例中,检测线31的制备方法如下:将犬猫皮质醇抗原用pH值为6~8的Tris缓冲液稀释到(0.3~1.0) mg/mL ,按照喷涂量20 $\mu\text{L}/(27\sim35)\text{cm}^2$ 在硝酸纤维素膜3上划线,将硝酸纤维素膜3置于干燥箱内50 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥72h,得到检测线31。

[0050] 在一具体示例中,质控线32的制备方法如下:将兔抗鼠IgG抗体浓度稀释至0.5 mg/mL ~1.0 mg/mL ,按照喷涂量20 $\mu\text{L}/(27\sim35)\text{cm}^2$ 在硝酸纤维素膜3上划线,该线与检测线31平行,间隔5mm~10mm,干燥条件同检测线31,得到质控线32。即在一示例中,检测线31与质控

线32之间的间距为5mm~10mm。

[0051] 在其中一些实施例中,吸水垫4的制备:将吸水纸裁剪至每条的规格为30cm*2.5cm。

[0052] 在其中一些实施例中,将上述硝酸纤维素膜3、吸水垫4、样品垫1及结合垫2粘贴在背衬5上,组装形成皮质醇检测免疫试纸。

[0053] 以下为具体的应用实施例。

[0054] 试纸制备实施例

[0055] 上述如图1所示的皮质醇检测免疫试纸的制备方法如下。

[0056] 其中,样品垫可采用如下方法制备:用缓冲液溶解蛋白,然后加入少量表面活性剂,调节pH值至7,再加入阻断剂,得混合溶液,将此混合溶液喷于样品垫上,喷涂量为6 μ L/cm,置于干燥箱内在50 $^{\circ}$ C鼓风干燥24h即得。

[0057] 将抗体微球偶联复合物包被在结合垫上的步骤:活化荧光胶乳微球,制备成浓度为1000 μ g/100 μ L的活化荧光胶乳微球溶液。向活化荧光胶乳微球溶液中加入犬猫皮质醇单克隆抗体和羊抗兔IgG抗体,犬猫皮质醇单克隆抗体和羊抗兔IgG的加入量为:每100 μ L所述活化荧光胶乳微球的溶液中加入各5 μ g,室温混合2小时,离心,采用PBS-TBN溶解所得沉淀,调节所得溶液的体积与加入的活化荧光胶乳微球的溶液体积相等,获得标记溶液。将含有荧光胶乳微球标记的皮质醇单克隆抗体和羊抗兔IgG抗体的标记溶液均匀喷在结合垫上,喷涂量为6 μ L/cm,置于干燥箱内50 $^{\circ}$ C鼓风干燥24h可得。

[0058] 检测线的制备:将犬猫皮质醇抗原用pH值至6~8的Tris缓冲液稀释到1mg/mL,按照喷涂量20 μ L/30cm²在硝酸纤维素膜上划线,将硝酸纤维素膜置于干燥箱内50 $^{\circ}$ C鼓风干燥72h,得到检测线。

[0059] 质控线的制备:将兔抗鼠IgG抗体浓度稀释至1.0mg/mL,按照喷涂量20 μ L/30cm²在硝酸纤维素膜上划线,该线与检测线平行,间隔5mm~10mm,干燥条件同检测线,得到质控线。

[0060] 一、线性范围

[0061] 采用上述制备的皮质醇检测免疫试纸分别测试待测样品1~5。待测样品1~5为理论浓度分别为20、80、200、500、1000nmol/L的皮质醇校准品。然后采用皮质醇检测免疫试纸分别测试待测样品1~5,再通过荧光仪读取皮质醇检测免疫试纸上对应的皮质醇读数,得到的检测结果如表1所示。

[0062] 表1

	理论浓度 (nmol/L)	检测值 1 (nmol/L)	检测值 2 (nmol/L)	检测值 3 (nmol/L)	检测值均值 (nmol/L)
[0063]	20	20.132	21.624	19.233	20.330
	80	78.347	79.163	76.258	77.923
	200	199.312	211.367	206.022	205.567
	500	511.424	527.649	520.146	519.740
[0064]	1000	1020.612	1000.691	992.751	1004.685

[0065] 以表1中的理论浓度和检测值均值为横纵坐标(单位均为nmol/L),绘制如图2所示的表格,得到线性相关系数为 $R^2=0.9996$,可知该试纸的检测浓度的线性范围为20nmol/L-1000nmol/L。

[0066] 二、精密度

[0067] 采用上述制备的皮质醇检测免疫试纸测试低值质控品和高值质控品,每种质控品测试20次,计算20次测试的均值和变异系数,结果如表2所示。

[0068] 表2

[0069]

浓度(nmol/L)	80	500
1	82.127	525.461
2	83.642	512.377
3	80.226	498.245
4	78.519	485.146
5	83.121	536.852
6	77.364	502.475
7	79.621	510.095
8	80.255	516.334
9	82.315	486.215
10	86.428	491.018
11	79.686	500.485
12	81.761	517.788
13	78.155	508.554
14	77.617	541.147

[0070]	15	79.332	521.025
	16	84.185	517.126
	17	87.654	501.322
	18	81.176	475.981
	19	82.367	509.227
	20	78.139	535.289
	均值	81.185	509.608
	SD	2.855	17.636
	变异系数 (CV)	4%	3%

[0071] 三、相对偏差

[0072] 采用上述制备的皮质醇检测免疫试纸对浓度为80nmol/L、500nmol/L的皮质醇参考品进行测定,每个浓度各检测3次计算样本测定结果均值和相对偏差,结果如下表3。

[0073] 表3

[0074]	样本浓度 (nmol/L)	80	500
	1	81.652	510.297
	2	79.687	523.459
	3	83.266	521.083
	均值	81.535	518.27967
	Bias%	-2%	-4%

[0075] 四、最低检测限

[0076] 采用上述制备的皮质醇检测免疫试纸对零浓度的皮质醇参考品进行测定,重复测定20次,计算20次测量浓度值结果的平均值和标准差,计算最低检测限,结果如下表4。

[0077] 表4

[0078]

检测次数	检测值
1	11.215
2	12.584
3	9.215
4	10.258
5	8.147
6	11.266
7	9.335
8	7.168
9	8.551
10	7.145
11	8.114
12	6.287
13	8.332
14	9.157
15	8.417
16	8.308
17	9.151
18	10.822
19	11.541

[0079]	20	9.787
	均值	9.240
	SD	1.639
	最低检测限	12.518

[0080] 对比例1所采用的试纸条与上述制备实施例制得的试纸条的结构基本相同,不同之处在于:结合垫包被的不是抗体微球偶联复合物,而是标记微球分别标记皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体。具体地,对比例1的结合垫的制备方法如下:向两份活化荧光胶乳微球溶液中分别加入犬猫皮质醇单克隆抗体和羊抗兔IgG抗体,犬猫皮质醇单克隆抗体和羊抗兔IgG的加入量为:每100 μ L所述活化荧光胶乳微球的溶液中加入各5 μ g,分别室温混合2小时,离心,采用PBS-TBN溶解所得沉淀,调节所得溶液的体积与加入的活化荧光胶乳微球的溶液体积相等,获得两份标记溶液。将两份标记溶液依次均匀喷在结合垫上,喷涂量均为6 μ L/cm,置于干燥箱内50 $^{\circ}$ C鼓风干燥24h可得。

[0081] 采用上述制备的皮质醇检测免疫试纸和对比例1制得的试纸分别测试理论浓度分别为20、80、200nmol/L的皮质醇校准品。再通过荧光仪读取皮质醇检测免疫试纸上对应的皮质醇浓度读数,计算得到的灵敏度,如表5所示。相应地,得到皮质醇校准品的浓度与采用制备实施例和对比例1制得的试纸测试对应的灵敏度的线性相关图,如图3所示,其中横坐标为皮质醇校准品的浓度nmol/L,纵坐标为C/T(信号强度)。从表5和图3可知,上述制备的皮质醇检测免疫试纸的灵敏度优于对比例1制得的试纸的灵敏度。

[0082] 表5

[0083] 灵敏度	皮质醇校准品 (nmol/L)			
	0	20	80	200
[0084] 对比例 1 的试纸	0.042	0.049	0.104	0.227
制备实施例的试纸	0.056	0.109	0.265	0.581

[0085] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0086] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

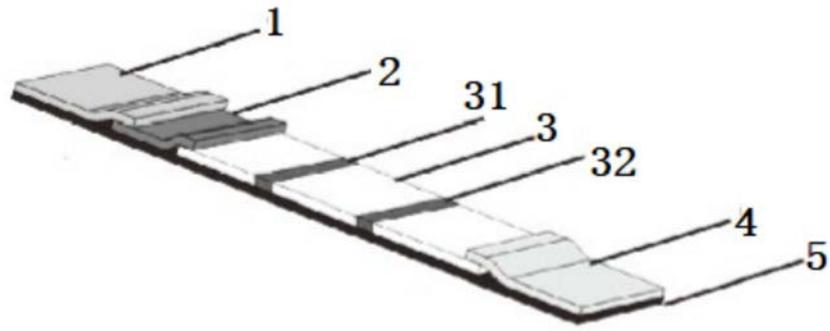


图1

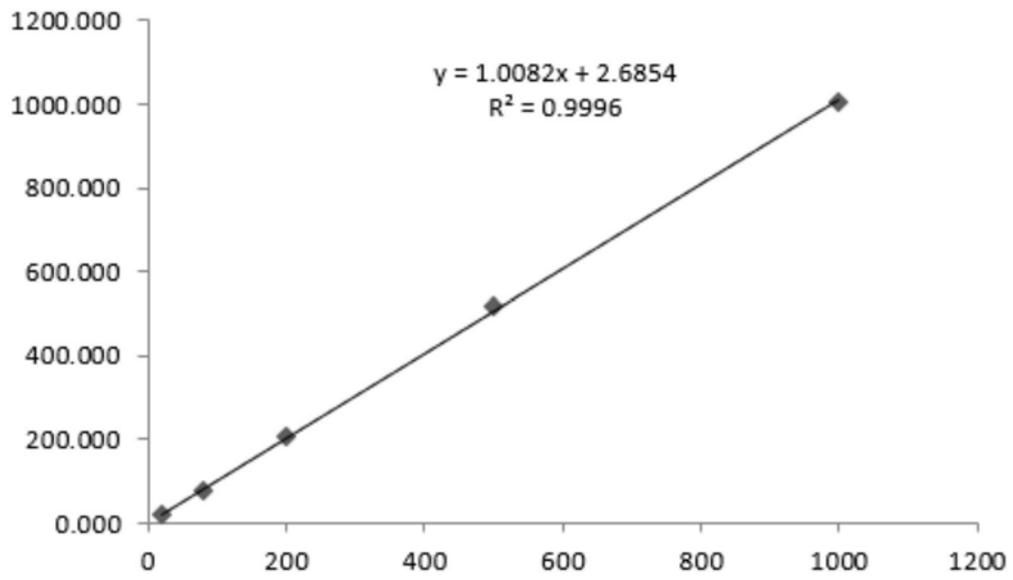


图2

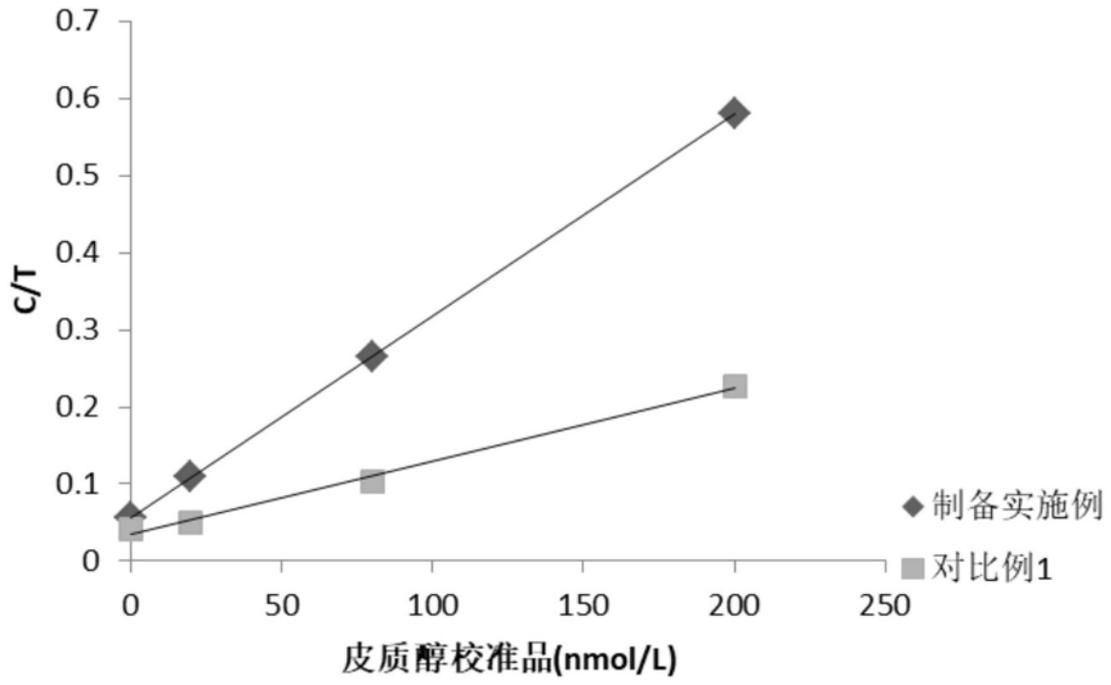


图3

专利名称(译)	皮质醇检测免疫试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN110749739A	公开(公告)日	2020-02-04
申请号	CN201911152768.X	申请日	2019-11-22
[标]发明人	杨晶 岑赞询 王伟		
发明人	黄晨珠 杨晶 邓艳珍 梁才弗 岑赞询 王伟		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/74		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种皮质醇检测免疫试纸及其制备方法，该试纸包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬，结合垫上包被有抗体微球偶联复合物，抗体微球偶联复合物是皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联于标记微球上的复合物，检测线包被有皮质醇抗原，质控线包被有能够与第一质控抗体特异性结合的第二质控抗体。发明人通过大量研究发现，将皮质醇单克隆抗体和第一质控抗体共同偶联在标记微球上形成抗体微球偶联复合物，能将反应体系的信号量放大的同时，还能有效解决抗体与标记微球结合不均匀的问题，从而大大提高了灵敏度、准确性和扩宽线性范围。

