



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 202676699 U

(45) 授权公告日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201220300843. X

(22) 申请日 2012. 06. 26

(73) 专利权人 南京基蛋生物科技有限公司

地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业
开发区博富路 9 号

(72) 发明人 苏恩本 黄力 涂策

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

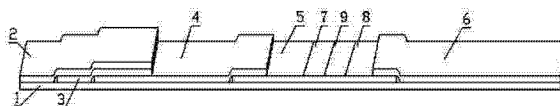
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 实用新型名称

一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条

(57) 摘要

本实用新型涉及一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条。该试纸条底衬上依次相互搭接的是两层样品垫、荧光抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，荧光抗体结合垫上包被有两种或两种以上抗抗原的荧光抗体，硝酸纤维素膜上设有两种或两种以上抗抗原的抗体一条或多条检测线，一条检测线包被一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体，硝酸纤维素膜上还设有兔抗鼠 IgG 抗体的质控线。本实用新型试纸条具有灵敏度高，能够实现两个或两个以上指标进行快速定量检测。



1. 一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,在其底衬上依次相互搭接的是两层样品垫、荧光抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,其特征在于所述荧光抗体结合垫上包被有两种或两种以上抗抗原的荧光抗体,所述硝酸纤维素膜上设有两种或两种以上抗抗原的抗体一条或多条检测线,所述一条检测线包被一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体,硝酸纤维素膜上还设有兔抗鼠 IgG 抗体的质控线。

2. 根据权利要求 1 所述的一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,其特征在于所述荧光抗体是一种荧光物质标记一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,其特征在于所述标记抗体的荧光物质为直接荧光染料或磁性纳米颗粒中的任意一种可产生荧光的物质。

4. 根据权利要求 1 所述的一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,其特征在于所述荧光抗体结合垫材质为聚酯膜或玻璃纤维素膜。

一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条

技术领域

[0001] 本实用新型属于临床医学检测领域,具体涉及一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条。

背景技术

[0002] 荧光免疫分析技术是在标记免疫技术中逐渐发展起来的一种基于抗原-抗体反应的分析技术。其诞生早期,一些研究者试图将抗体分子与一些示踪物质结合,利用抗抗原抗体反应进行组织或细胞内抗原物质定位。Coons 等于 1994 年首次将荧光素进行用于抗体的标记而获得成功。这种以荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术成为荧光抗体技术 (fluorescent antibody technique)。

[0003] 与传统酶联免疫吸附法和胶体金法相比,应用荧光免疫分析技术进行检测时,其信号特异性强、敏感度高、速度快,特别适合于体外快速诊断领域。目前市场上提供了免疫荧光试纸条一般只能用于一个指标的检测,不能满足同时检测多个指标的要求。实用新型中国专利 201020650783.5 提供了一种免疫荧光试纸条,由依次设置在外壳上相互搭接的样品垫、反应膜和吸水垫组成,所述反应膜上固定有一条内部质控带,至少一条的检测带和一条过量抗原检测带,其中内部质控带固定有定量的抗原或抗体物质,检测带固定有可与待测物质特异性结合的抗体,过量抗原检测带固定有二抗。该试纸条可以实现单一或多个项目联合检测。但是在具体实施例中,并没有举例说明该试纸条能够同时多个项目的联合检测。此外,该试纸条没有包被荧光抗体荧光抗体结合垫的结构,而是将荧光抗体配制成溶液,这样增加了操作和误差的可能性。

[0004] 虽然已经有多个指标联合检测的试纸条,如中国专利 01242327.0 提供了一种胶体金试纸条。胶体金试纸条存在显色后只能是单一的紫红色,而不能根据不同品种或不同要求变化颜色,以及不能准确定量检测等不足。

发明内容

[0005] 为了克服上述现有技术不足,本实用新型提供一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,使用本实用新型能够实现同时检测两个或两个以上指标的问题。

[0006] 本实用新型的技术方案为:一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,在其底衬上依次相互搭接的是两层样品垫、荧光抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述荧光抗体结合垫上包被有两种或两种以上抗抗原的荧光抗体,所述硝酸纤维素膜上设有两种或两种以上抗抗原的抗体一条或多条检测线,所述一条检测线包被一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体,硝酸纤维素膜上还设有兔抗鼠 IgG 抗体的质控线。

[0007] 所述荧光抗体是一种荧光物质标记一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体。

[0008] 所述标记抗体的荧光物质为直接荧光染料或磁性纳米颗粒中的任意一种可产生荧光的物质。

[0009] 所述荧光抗体结合垫材质为聚酯膜或玻璃纤维素膜。

[0010] 本实用新型在检测试纸条时,可以使用激光、卤钨灯+单色器、多色器或高功率LED作为光源,激发试纸条上的荧光物质发出荧光。

[0011] 本实用新型荧光信号的读取装置可使用光电二极管、CCD或光电倍增管对信号进行读取。

[0012] 与现有技术相比,本实用新型采用荧光抗体结合垫上包被有两种或两种以上抗抗原的荧光抗体,同时在硝酸纤维素膜上设有一条或多条检测线,实现对两个或两个以上指标同时进行检测。进一步,一条检测线包被一种以上抗抗原的抗体,实现了在一条检测线上同时检测两个或两个以上指标。

附图说明

[0013] 图1 本实用新型试纸条结构示意图,一条检测线上含有两种抗抗原的抗体或两种以上抗抗原的抗体。

[0014] 图2 本实用新型试纸条结构示意图,每条检测线上含有一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体。

[0015] 其中,1、底衬;2、样品垫;3、样品垫;4、荧光抗体结合垫;5、硝酸纤维素膜;6、吸水纸;7、检测线;8、质控线;9、检测线。

具体实施方式

[0016] 下面结合附图和实施方式对本实用新型作进一步详细的说明。

[0017] 如图1所示,一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条,在其底衬1上依次相互搭接的是样品垫2、样品垫3、荧光抗体结合垫4、硝酸纤维素膜5和吸水纸6,所述荧光抗体结合垫4上包被有两种或两种以上抗抗原的荧光抗体,所述硝酸纤维素膜5上设有两种或两种以上抗抗原的抗体一条或多条检测线7、9,所述一条检测线7、9包被一种抗抗原抗体或一种以上抗抗原抗体,硝酸纤维素膜5上还设有兔抗鼠IgG抗体的质控线8。

[0018] 实施例1 心肌肌钙蛋白I(cTnI)和N-端脑利钠前体(NT-proBNP)的检测

[0019] 1) 试纸条制备

[0020] ① 硝酸纤维素膜5的制备

[0021] a) 包被缓冲液的制备:将0.025M、pH7.4的PBS,用0.22 μ m膜过滤,置于4 $^{\circ}$ C备用,有效期7天;

[0022] b) 封闭液的制备:将含1%BSA,1%蔗糖,0.025M、pH7.5的PBS,用0.22 μ m膜过滤,置于4 $^{\circ}$ C备用,有效期3天;

[0023] c) 检测线7制备:将羊抗NT-proBNP多克隆抗体按2mg/ml的浓度,蠕动泵授液量0.4ml/min,划线速度50m/20min,在检测线7上中部左半边划线;检测线7上中部右半边划有cTnI单克隆抗体4C2,方法同羊抗NT-proBNP多克隆抗体,只是cTnI单克隆抗体4C2浓度为4.5mg/ml,在干燥箱内20 $^{\circ}$ C鼓风干燥12小时;

[0024] d) 质控线8的制备:将兔抗鼠IgG抗体按8mg/ml的浓度,蠕动泵授液量0.4ml/min,划线速度50m/20min,在硝酸纤维素膜上划线,该线与检测线7平行,放入干燥箱内20 $^{\circ}$ C鼓风干燥12小时;

[0025] e) 用上述封闭液将含有检测线7和质控线8的硝酸纤维素膜5于37 $^{\circ}$ C封闭60分

钟,取出后置 37℃下烘干处理两个小时,封袋备用。

[0026] ② 包被荧光抗体荧光抗体结合垫 4 制备

[0027] 将 cTnI 单克隆抗体 M155 用 pH7.5 PBS 溶解至终浓度为 2mg/ml,取 1ml 抗体溶液,缓慢加入浓度为 1mg/ml 的荧光素 Cy5 100 μ l,4℃缓慢搅拌反应 3h,常温下继续反应 1h,待反应完全后,使用 pH 为 7.4 的 PBS 进行透析,除去未反应的荧光素 Cy5。开始时,每隔 3h 换一次透析液,更换 2 次以后每 12h 换一次透析液,透析完全后,回收偶联好的荧光抗体,测定偶联效率与抗体浓度后,避光保存。

[0028] 将 NT-proBNP 单克隆抗体 M907241 使用与 cTnI 单克隆抗体 M155 制备相同的方法,制备出标记 Cy5 的 NT-proBNP 单克隆抗体 M907241,避光保存备用。

[0029] 将上述 cTnI 荧光抗体与 NT-proBNP 荧光抗体混合均匀,铺在玻璃纤维素膜材质的荧光抗体结合垫 4 上,喷量为 2 μ l/cm³ 道,干燥,封袋,备用。

[0030] 以上抗体除了 NT-proBNP 多克隆抗体购自南京强欣生物技术有限公司,其它都是购自 Fitzgerald 公司。

[0031] ③ 试纸条组装

[0032] 在底衬 1 上顺次相互搭接地粘贴样品垫 2、样品垫 3、荧光抗体结合垫 4、硝酸纤维素膜 5 和吸水纸 6 得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0033] 2) 待测抗原检测

[0034] 取新鲜全血 100 μ l (或血清 50 μ l),加入到试纸条样品垫上进行免疫反应,时间 3-5min;反应结束后,将试纸条放于专门的荧光信号读取仪器中,读取荧光信号的大小,进行定量测定。

[0035] 实施例 2 心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和 N-端脑利钠前体(NT-proBNP) 的检测

[0036] 1) 试纸条制备

[0037] ① 硝酸纤维素膜 5 的制备

[0038] a)包被缓冲液的制备:将 0.025M、pH7.4 的 PBS,用 0.22 μ m 膜过滤,置于 4℃备用,有效期 7 天;

[0039] b)封闭液的制备:将含 1%BSA,1%蔗糖,0.025M、pH7.5 的 PBS,用 0.22 μ m 膜过滤,置于 4℃备用,有效期 3 天;

[0040] c) 检测线 7 制备:将羊抗 NT-proBNP 多克隆抗体按 2mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 0.4ml/min,划线速度 50m/20min,在检测线 7 上中部左半边划线;检测线 7 上中部右半边划有 cTnI 单克隆抗体 4C2,方法同羊抗 NT-proBNP 多克隆抗体,只是 cTnI 单克隆抗体 4C2 浓度为 4.5mg/ml,在干燥箱内 20℃鼓风干燥 12 小时;

[0041] d) 质控线 8 的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 8mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 0.4ml/min,划线速度 50m/20min,在硝酸纤维素膜 5 上划线,该线与检测线 7 平行,放入干燥箱内 20℃鼓风干燥 12 小时;

[0042] e) 用上述封闭液将含有检测线 7 与质控线 8 的硝酸纤维素膜 5 于 37℃封闭 60 分钟,取出后置 37℃下烘干处理两个小时,封袋备用。

[0043] ② 包被荧光抗体荧光抗体结合垫 4 制备

[0044] 将 cTnI 单克隆抗体 M155 用 pH7.5PBS 溶解至终浓度为 2mg/ml,取 1ml 抗体溶液,缓慢加入浓度为 1mg/ml 的荧光素 Cy5 100 μ l,4℃缓慢搅拌反应 3h,常温下继续反应 1h,

待反应完全后,使用 pH 为 7.4 的 PBS 进行透析,除去未反应的荧光素 Cy5。开始时,每隔 3h 换一次透析液,更换 2 次以后每 12h 换一次透析液,透析完全后,回收偶联好的荧光抗体,测定偶联效率与抗体浓度后,避光保存。

[0045] 将 NT-proBNP 单克隆抗体 M907241 用 pH7.5PBS 溶解至终浓度为 2mg/ml,取 1ml 抗体溶液,缓慢加入 0.02mg FITC 粉末,4℃并不停地搅拌,避免将 FITC 粘于三角烧瓶壁或搅拌玻璃棒上,在大约 5-10min 内加完。然后继续搅拌 12-18h。待反应完全后,将上述 NT-proBNP 单克隆抗体 M907241 溶液离心除去其中少量的沉淀物;4℃条件下再用 pH8.0 的 PBS 进行透析过夜,透析完全后,再过葡萄糖凝胶 G-25,收集偶联好的荧光抗体,测定偶联效率与抗体浓度后,避光保存。

[0046] 将上述 cTnI 荧光抗体与 NT-proBNP 荧光抗体混合均匀,铺在聚酯膜材质的荧光抗体结合垫 4 上,喷量为 $2\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 道,干燥,封袋,备用。

[0047] ③ 试纸条组装

[0048] 在底衬 1 上顺次相互搭接地粘贴样品垫 2、样品垫 3、荧光抗体结合垫 4、硝酸纤维素膜 5 和吸水纸 6 得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0049] 2) 待测抗原检测

[0050] 取新鲜全血 $100\mu\text{l}$ (或血清 $50\mu\text{l}$),加入到试纸条样品垫上进行免疫反应,时间 3-5min;反应结束后,将试纸条放于专门的荧光信号读取仪器中,读取荧光信号的大小,进行定量测定。

[0051] 实施例 3 心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和 N-端脑利钠前体(NT-proBNP) 的检测

[0052] 1) 试纸条制备

[0053] ① 硝酸纤维素膜 5 的制备

[0054] a) 包被缓冲液的制备:将 0.025M、pH7.4 的 PBS,用 $0.22\mu\text{m}$ 膜过滤,置于 4℃ 备用,有效期 7 天;

[0055] b) 封闭液的制备:将含 1%BSA,1% 蔗糖,0.025M、pH7.5 的 PBS,用 $0.22\mu\text{m}$ 膜过滤,置于 4℃ 备用,有效期 3 天;

[0056] c) 检测线 7 制备:将羊抗 NT-proBNP 多克隆抗体按 2mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 $0.4\text{ml}/\text{min}$,划线速度 $50\text{m}/20\text{min}$,在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时;

[0057] d) 检测线 9 制备:将 cTnI 单克隆抗体 4C2 按 4.5mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 $0.4\text{ml}/\text{min}$,划线速度 $50\text{m}/20\text{min}$,在硝酸纤维素膜 5 中部上划线,该线与检测线 7 平行,两线相隔 4mm,细致均匀在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时;

[0058] e) 质控线 8 的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 8mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 $0.4\text{ml}/\text{min}$,划线速度 $50\text{m}/20\text{min}$,在硝酸纤维素膜 5 上划线,该线与检测线 7 和 9 平行,放入干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12 小时;

[0059] f) 用上述封闭液将含有检测线 7 和 9 与质控线 8 的硝酸纤维素膜 5 于 37℃ 封闭 60 分钟,取出后置 37℃ 下烘干处理两个小时,封袋备用。

[0060] ② 包被荧光抗体荧光抗体结合垫 4 制备

[0061] 将 cTnI 单克隆抗体 M155 用 pH7.5PBS 溶解至终浓度为 2mg/ml,取 1ml 抗体溶液,缓慢加入浓度为 1mg/ml 的荧光素 Cy5 $100\mu\text{l}$,4℃ 缓慢搅拌反应 3h,常温下继续反应 1h,待反应完全后,使用 pH 为 7.4 的 PBS 进行透析,除去未反应的荧光素 Cy5。开始时,每隔 3h

换一次透析液,更换 2 次以后每 12h 换一次透析液,透析完全后,回收偶联好的荧光抗体,测定偶联效率与抗体浓度后,避光保存。

[0062] 将 NT-proBNP 单克隆抗体 M907241 用 pH7.5 PBS 溶解至终浓度为 2mg/ml,取 1ml 抗体溶液,缓慢加入 0.02mg FITC 粉末,4℃并不停地搅拌,避免将 FITC 粘于三角烧瓶壁或搅拌玻璃棒上,在大约 5-10min 内加完。然后继续搅拌 12-18h。待反应完全后,将上述 NT-proBNP 单克隆抗体 M907241 溶液离心除去其中少量的沉淀物;4℃条件下再用 pH8.0 的 PBS 进行透析过夜,透析完全后,再过葡萄糖凝胶 G-25,收集偶联好的荧光抗体,测定偶联效率与抗体浓度后,避光保存。

[0063] 将上述 cTnI 荧光抗体与 NT-proBNP 荧光抗体混合均匀,铺在玻璃纤维素膜材质的荧光抗体结合垫 4 上,喷量为 $2\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 道,干燥,封袋,备用。

[0064] ③ 试纸条组装

[0065] 在底衬 1 上顺次相互搭接地粘贴样品垫 2、样品垫 3、荧光抗体结合垫 4、硝酸纤维素膜 5 和吸水纸 6 得到试纸板,按照要求切割成适当宽度的试纸条。

[0066] 2) 待测抗原检测

[0067] 取新鲜全血 $100\mu\text{l}$ (或血清 $50\mu\text{l}$),加入到试纸条样品垫上进行免疫反应,时间 3-5min;反应结束后,将试纸条放于专门的荧光信号读取仪器中,读取荧光信号的大小,进行定量测定。

[0068] 上述实施例只是为了说明本实用新型的技术构思及特点,其目的在于让本领域内的普通技术人员能够了解本实用新型的内容并据以实施,并不能以此限制本实用新型的保护范围。凡是根据本实用新型内容的实质所作出的等效变化或修饰,都应涵盖在本实用新型保护范围内。



图 1

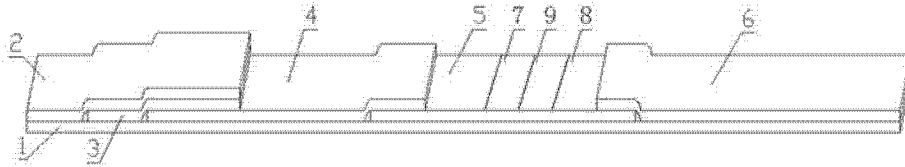


图 2

专利名称(译)	一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条		
公开(公告)号	CN202676699U	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201220300843.X	申请日	2012-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
[标]发明人	苏恩本 黄力 涂策		
发明人	苏恩本 黄力 涂策		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种特殊荧光标记免疫定量检测试纸条。该试纸条底衬上依次相互搭接的是两层样品垫、荧光抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，荧光抗体结合垫上包被有两种或两种以上抗抗原的荧光抗体，硝酸纤维素膜上设有两种或两种以上抗抗原的抗体一条或多条检测线，一条检测线包被一种抗抗原的抗体或一种以上抗抗原的抗体，硝酸纤维素膜上还设有兔抗鼠IgG抗体的质控线。本实用新型试纸条具有灵敏度高，能够实现两个或两个以上指标进行快速定量检测。

