



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102879559 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201110194963. 6

GB 2004892 A, 1979. 04. 11,

(22) 申请日 2011. 07. 12

JP S5530654 A, 1980. 03. 04,

(73) 专利权人 上海执诚生物科技股份有限公司
地址 上海市浦东新区莲溪路 1210 号 2 幢底
层

US 2004043507 A1, 2004. 03. 04,

Hongyan Shen 等. Poly(ethylene glycol)

Carbodiimide Coupling Reagents for the
Biological and Chemical Functionalization
of Water-Soluble Nanoparticles. 《ACS
Nano》. 2009, 第 3 卷 (第 4 期),

(72) 发明人 李小燕 丁国荣

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

审查员 黄晓丽

代理人 祝莲君 雷芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101187665 A, 2008. 05. 28,

CN 1645146 A, 2005. 07. 27,

CN 1818653 A, 2006. 08. 16,

EP 2026072 A1, 2009. 02. 18,

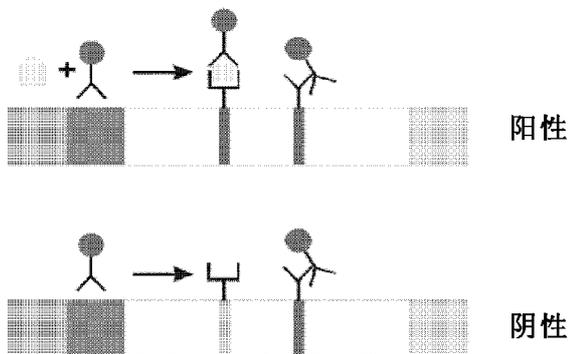
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂和方法

(57) 摘要

本发明提供了一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂和方法。本发明提供了凝胶包裹的含镧系元素的乳胶微粒、及其与偶联于乳胶微粒抗体形成的抗体复合物、含所述抗体复合物的测试条和试剂盒及用途。本发明的乳胶微粒、抗体复合物和试剂盒,可大幅度消除非特异性的结合,使检测信号的信噪比显著提高,且乳胶微粒通过凝胶包裹,稳定性得到改善。本发明的检测方法具有快速、高灵敏度、高特异性等优点。



1. 一种乳胶微粒,其特征在于,所述乳胶微粒内部含镧系元素,外表面覆有凝胶层,所述凝胶层为氨基葡萄糖凝胶层。

2. 如权利要求 1 所述的乳胶微粒,其特征在于,所述氨基葡萄糖的分子量为 10,000-2,000,000。

3. 如权利要求 2 所述的乳胶微粒,其特征在于,所述氨基葡萄糖的分子量为 50,000-800,000。

4. 如权利要求 1 所述的乳胶微粒,其特征在于,所述镧系元素包括钐、铈、镨、或其螯合物。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的乳胶微粒,其特征在于,所述乳胶微粒的直径为 100-300nm。

6. 如权利要求 5 所述的乳胶微粒,其特征在于,所述乳胶微粒的直径为 150-200nm。

7. 一种抗体复合物,其特征在于,所述复合物包括权利要求 1~6 任一项所述的乳胶微粒以及偶联于所述乳胶微粒的抗体。

8. 如权利要求 7 所述的抗体复合物,其特征在于,所述抗体与所述乳胶微粒的重量比例为 1:2 ~ 1:50。

9. 如权利要求 8 所述的抗体复合物,其特征在于,所述抗体与所述乳胶微粒的重量比例为 1:5 ~ 1:25。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的抗体复合物,其特征在于,所述抗体与所述乳胶微粒的重量比例为 1:8 ~ 12。

11. 一种免疫层析测试条,其特征在于,所述测试条含有权利要求 7-10 中任一项所述的抗体复合物或权利要求 1-6 中任一项所述的乳胶微粒。

12. 如权利要求 11 所述的测试条,其特征在于,所述测试条包括以下组件:样品垫、结合物释放垫、检测线、反应膜、对照线、吸收垫、和背衬。

13. 一种试剂盒,其特征在于,包括:

(a) 权利要求 11 或 12 所述的测试条;和

(b) 使用说明书。

14. 如权利要求 7-10 中任一项所述的抗体复合物或权利要求 11 或 12 所述的测试条的用途,其特征在于,用于制备检测全血、血浆、血清、尿液、或唾液的试剂盒。

15. 一种检测特定抗原的方法,其特征在于,包括步骤:用权利要求 11 或 12 所述的测试条或权利要求 13 所述的试剂盒进行时间分辨免疫层析检测。

一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测领域。具体地,本发明涉及一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂和方法。

背景技术

[0002] 免疫荧光技术 (Immunofluorescence technique) 又称荧光抗体技术,是标记免疫技术中发展最早的一种。它是在免疫学、生物化学和显微镜技术的基础上建立起来的一项技术。将抗体分子与一些示踪物质如荧光素结合,抗原抗体反应后,利用荧光显微镜判定结果。该技术的主要特点特异性强,但淬灭率高,不稳定,不易保存。

[0003] 胶体金免疫层析 (GICA) 技术是 20 世纪 80 年代初在免疫渗滤技术基础上建立的一种简易快速的免疫学检测技术,是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术, GICA 是以 NC 膜为载体,利用微孔膜的毛细管作用,使滴加在膜条一端的液体慢慢向另一端渗移,如同层析一般。免疫金复合物干片粘连在近 NC 膜条下端,膜条测试区包有特异抗体,当试纸条下端进入液体标本样中,下端吸水材料吸取液体向上端移动,流经近 NC 膜条下端时,使干片上的免疫金复合物复溶,并带动其向膜条渗移,若标本有特异性抗原时,可与免疫金复合物的抗体结合,形成的金标抗原-抗体复合物流至测试区,被固相抗体所捕获,形成抗体-抗原-金标抗体复合物,在膜上测试区出现红色控制线。

[0004] 胶体金免疫层析技术已经用于检测血清、血浆、全血、组织液、尿液、唾液中的特定蛋白质,特异性强、简便快速,但由于样本中荧光物质和背景的干扰,易出现假阳性,直接影响检测结果的准确性。

[0005] 因此,本领域需要开发快速、准确、高效、简便地抗原检测方法及其试剂。

发明内容

[0006] 本发明的目的就是提供一种检测样本中特定的蛋白质成分的试剂和方法,快速、高效、简便、准确。

[0007] 在本发明的第一方面,提供了一种乳胶微粒,所述乳胶微粒内部含镧系元素,外表面覆有凝胶层。

[0008] 在另一优选例中,所述凝胶层为氨基葡萄糖凝胶层。

[0009] 在另一优选例中,所述氨基葡萄糖的分子量为 10,000-2,000,000,较佳地为 50,000-800,000。

[0010] 在另一优选例中,所述镧系元素包括钐、铈、铽、或其螯合物。

[0011] 在另一优选例中,所述乳胶微粒的直径为 100-300nm。

[0012] 在另一优选例中,所述乳胶微粒的直径为 150-200nm。

[0013] 在本发明的第二方面,提供了一种抗体复合物,所述复合物包括第一方面所述的乳胶微粒以及偶联于所述乳胶微粒的抗体。

[0014] 较佳地,所述抗体通过共价方式偶联于所述乳胶微粒。更佳地,所述抗体通过活化

的羟基或羧基共价偶联于所述乳胶微粒。

[0015] 在另一优选例中,所述抗体与所述乳胶微粒的重量比例为 1 : 2 ~ 1 : 50, 较佳地为 1 : 5 ~ 1 : 25。

[0016] 在另一优选例中,所述的抗体与所述乳胶微粒的重量比例为 1 : 8 ~ 12。

[0017] 在本发明的第三方面,提供了一种免疫层析测试条,所述测试条含有第二方面所述的抗体复合物或本发明第一方面所述的乳胶微粒。

[0018] 根据本发明,所述测试条包括以下组件:样品垫、结合物释放垫、检测线、反应膜、对照线、吸收垫、和背衬。

[0019] 在本发明的第四方面,提供了一种试剂盒,其特征在于,包括:

[0020] (a) 本发明的第三方面所述的测试条;和

[0021] (b) 使用说明书。

[0022] 在另一优选例中,所述测试条密封于一容器或包装中。

[0023] 在本发明的第五方面,提供第二方面所述的抗体复合物或第三方面所述的测试条的用途,用于制备检测全血、血浆、血清、尿液、或唾液的试剂盒。

[0024] 在本发明的第六方面,提供一种检测特定抗原的方法,包括步骤:

[0025] 用本发明第三方面所述的测试条或第四方面所述的试剂盒进行时间分辨免疫层析检测。

[0026] 本发明的乳胶微粒、抗体复合物和试剂盒,可大幅度消除非特异性的结合,使检测信号的信噪比显著提高,且乳胶微粒通过凝胶包裹,稳定性得到改善。本发明的检测方法具有快速、高灵敏度、高特异性等优点。

[0027] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0028] 图 1 为 Eu^{3+} 的荧光光谱曲线图。

[0029] 图 2 为时间分辨荧光测量的原理示意图。

[0030] 图 3 显示了本发明一种侧流免疫层析试纸条(板)的结构示意图,

[0031] 其中,各标识如下:1 为样品垫,2 为结合物释放垫,3 为检测线,4 为反应膜,5 为对照线,6 为吸收垫,7 为背衬。

[0032] 图 4 显示了本发明侧流免疫层析检测原理的示意图。

具体实施方式

[0033] 本发明人经过广泛而深入的研究,意外发现选用凝胶包裹的含镧等镧系金属的乳胶微粒标记特异性的抗体,结合时间分辨荧光免疫层析技术,能够即时快速定量检测特定蛋白。本发明将免疫荧光检测技术和快速层析检测技术相结合,建立了时间分辨荧光免疫层析检测的方法,再用双抗体夹心法,成功地检测出样本中特定的蛋白成分。与现有的胶体金以及普通的荧光的 POCT 方法相比,本发明方法的可以消除样本中的荧光物质、激发光和膜本身对检测的干扰,使检测的灵敏度和 / 或特异性均有显著提高。且本发明采用凝胶包

裹乳胶微粒后,大幅度消除了非特异性的结合,检测信号的信噪比显著提高。且通过凝胶包裹,稳定性得到改善,30 天后基本没有衰减。

[0034] 免疫层析技术

[0035] 免疫层析技术 (immunochromatography) 是 20 世纪 80 年代末 90 年代初建立的一种快速检测技术。由于免疫层析技术不须进行结合标记物与自由标记物的分离,因而操作简单、快速,非常适合现场检测之用。

[0036] 时间分辨荧光免疫分析

[0037] 时间分辨荧光免疫分析 (time resolved fluoro immunoassay, TRFIA) 是 20 世纪 80 年代初在传统荧光免疫分析的基础上创立的一种新型非放射性标记免疫分析技术,是目前最灵敏的微量分析技术。

[0038] 测试条上检测区域的检测信号的获取,将测试条上的检测信号传递过来的光信号,通过光学聚光装置、分光装置,和光学光路整形等,得到 $615\text{nm} \pm 10\text{nm}$ 左右的荧光光斑,将此荧光光斑传递到光学传感器光电倍增管,获得测试条上检测区域的检测光信号。通过控制信号读取时间为 10 微秒到 400 微秒,得到一个扣除荧光本底的检测信号。通过光电信号转换,将光信号转换为电信号传送给计算控制部件处理,最终完成检测。

[0039] 与传统的荧光素标记不同,它所用的示踪物是具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物,可有效排除样品自然荧光的干扰,具有灵敏度高、特异性强、稳定性好和无放射性污染等特点,灵敏度高达 10^{19} ,较放射免疫分析 (RIA) 高出 3 个数量级。在临床免疫检验和科学研究中的应用越来越广泛。

[0040] 时间分辨荧光免疫层析技术

[0041] 时间分辨荧光免疫层析技术是基于免疫层析技术的时间分辨荧光分析技术,是在时间分辨荧光免疫分析仪的基础上,将时间分辨荧光免疫分析和免疫层析技术相结合,省去了繁琐的加样、洗涤步骤,试剂稳定性好,操作简单,检测速度快,灵敏度高,可广泛应用于现场定量检测,也可作为 POCT (Point of Care Test, 床边诊断或即时检测) 分析仪。

[0042] 镧系元素

[0043] 到目前为止,已有 5 种镧系元素被用于 TRFIA,其中常用的有 Eu、Tb 和 Sm,而 Eu (铕元素) 又是在标记抗原抗体中应用最广的元素。镧系元素在游离状态下,荧光信号很微弱,仅仅是分子间共振能级的能量传递,无辐射跃迁回基态发射荧光的机率很小,但其螯合物在紫外光源的激发下能发射荧光。与传统的荧光素标记物相比,镧系元素具有较宽的激发光谱带和较窄的发射光谱带,荧光持续时间长,且荧光光谱的 Stocks 位移较大,利用光谱分辨技术和时间分辨技术可有效排除激发光和非特异性荧光的干扰。

[0044] 图 1 为 Eu^{3+} 的荧光光谱曲线。从图中可见, Eu^{3+} 的峰值激发波长为 337nm, 峰值发射波长为 613nm, Stocks 位移达到 276nm。 Eu^{3+} 螯合物的荧光寿命较长,可达到数百微秒,而普通荧光免疫分析中荧光团的荧光衰变时间只有 $1 \sim 100 \mu\text{s}$, 样品中的一些蛋白质荧光衰变时间也很短,仅为 $1 \sim 10 \mu\text{s}$, 因此可适当延迟测量时间,待背景荧光完全衰减后测定,可消除蛋白质背景荧光的干扰。图 2 为时间分辨荧光测量的原理示意图,其中发射荧光在延时 $400 \mu\text{s}$ 后再测量,测量时间为 $400 \mu\text{s}$ 。

[0045] 乳胶微粒

[0046] 在本文中,术语“乳胶微粒”、“乳胶微球”可以互换使用;“荧光微球”、“荧光微粒”、

“荧光乳胶微粒”、“荧光乳胶微球”可以互换使用。

[0047] 在医学诊断领域,从最早的乳胶凝集试验发展到今天复杂的多元化检测。以乳胶微粒作为抗原抗体的标记物,主要是由于乳胶微粒本身的特性,它可以进行多种形式表面功能化修饰,密度改变和特殊属性的改变(比如:颜色改变、荧光或磁性等),使得乳胶成为检测中的一个重要部分。

[0048] 乳胶微球的直径一般为 100-300nm,最佳地为 150-200nm。

[0049] 在本发明中,优选的时间分辨荧光乳胶微粒是具有发射波长在 610-620nm 的荧光乳胶微粒,以便于检测。一种优选的乳胶微粒是含镧系元素的荧光乳胶微粒,较佳地,含有铈。可用于本发明的乳胶微球没有特别限制,可以选用市售的或用常规方法制备的乳胶微球。

[0050] 通常,本发明优选的乳胶微球是表面带活化基团(如活化羧基)的乳胶微粒,可以为聚苯乙烯,聚丙烯或二氧化硅乳胶颗粒。

[0051] 采用内部含铈的乳胶微粒,即结合铈螯合物的荧光微粒。该结合铈螯合物的荧光微粒,在紫外光激发下,发出 620nm 的红色荧光,可以用来作为抗体标记。

[0052] 经检测发现,常规方法制备的乳胶微球在偶联抗体以后,存在灵敏度严重下降和非特异性显著增强的问题。主要原因是当铈螯合物和乳胶微粒反应后,乳胶微粒表面的化学性质发生了改变,因此,在偶联抗体的过程中,一部分抗体通过被动的吸附作用连接到乳胶表面,另一部分的抗体通过共价键与乳胶偶联,两种连接同时发生。在检测过程中,通过被动的吸附作用连接到乳胶表面的抗体容易从乳胶表面脱落,影响到检测的灵敏度,同时导致乳胶颗粒与其它物质的非特异性结合,检测背景增加。本发明在荧光乳胶微粒表面包裹一层水凝胶,得到凝胶包裹的乳胶微粒,有效避免抗体与乳胶的被动吸附作用。

[0053] 本发明采用氨基葡聚糖凝胶包裹,氨基葡聚糖的分子量为 10,000-2,000,000 道尔顿,较佳地为 50000-800,000 道尔顿。

[0054] 荧光微粒标记抗体(抗体复合物)

[0055] 在本发明中,提供经荧光乳胶微粒标记的抗体,所述抗体为单/多克隆抗体。优选的,所述荧光乳胶微粒经氨基葡聚糖凝胶包裹。

[0056] 经标记后,抗体被偶联于荧光乳胶微粒。当然,也可视为乳胶微粒被偶联有抗体。

[0057] 较佳地,抗体共价偶联于荧光乳胶微粒。

[0058] 更佳地,将抗体偶联于荧光乳胶微粒是将抗体通过荧光乳胶微粒表面活化的羧基或羟基而共价偶联于荧光乳胶微粒。

[0059] 其中,所述荧光乳胶微球的直径为 100-300nm,较佳地为 150-200nm。

[0060] 另外,所述抗体与所述乳胶微粒的重量比例为为 1 : 2 ~ 1 : 50,较佳地为 1 : 5 ~ 1 : 25。

[0061] 在一优选例中,所述抗体与所述乳胶微粒的重量比例为 1 : 8 ~ 12。

[0062] 免疫层析侧流片(或试纸条、或试纸片)

[0063] 在本发明的另一个方面,提供一种免疫层析试纸条。

[0064] 一种优选的试纸条是利用侧流原理的免疫层析侧流片或免疫层析试纸条。

[0065] 在本发明中,术语“测流片”、“试纸片”、“试纸条”、“试纸板”、“层析条”、“测试条”具有相同的含义,可以互换使用。

[0066] 本发明的免疫层析侧流片（或试纸条）的结构如图 3 所示，其中包括：1 样品垫，2 结合物释放垫，3 检测线，4 反应膜，5 对照线，6 吸收垫，和 7 背衬。

[0067] 在本发明中，所述侧流片的各组成元件（或组件）可选用本领域已有的材料制成。

[0068] 在本发明中，根据样本中的蛋白抗原可以被特异性抗体识别的原理，采用纯化的特异性抗体固相包被，同时用含铈的荧光乳胶颗粒标记的抗体，使用三明治双抗体夹心的方法，捕捉样本中的蛋白抗原，从而进行检测。

[0069] 检测过程中，样品溶液通过毛细作用在层析条上流动，同时样品中的待测物与检测线上针对待测物的抗体（优选地，该抗体标记有凝胶包裹的铈螯合物荧光乳胶微粒）发生高特异性和高亲和性的免疫反应，因而免疫复合物被富集或截留在层析材料的检测线上，而游离的标记物则会越过检测线。反应完成后，检测线上铈螯合物的含量与目标被检物的浓度有一定的对应关系。如果待测样品溶液中不含被检物，则检测线上就没有铈螯合物。通过测量免疫反应后试纸条检测线上铈螯合物的含量，参照标准浓度曲线就可以定量得到待测样品溶液的浓度。

[0070] 为了便于理解本发明，给出本发明免疫层析侧流片的检测原理。应理解，本发明的保护范围并不受该原理的影响或限制。

[0071] 如图 4 所示，如果样本中含有特定的蛋白抗原，抗原将与荧光乳胶标记的抗体 / 凝胶包裹的荧光乳胶标记的抗体结合，一起沿硝酸纤维素膜向前流动，到达检测线位置时，被固定在膜上的另一抗体捕获，通过紫外光的激发，在检测区形成红色的荧光条带，荧光量的计数可以准确地反应蛋白的含量，从而完成蛋白的定量检测。无论结果如何，乳胶标记的兔 IgG 将会与对照线上的羊抗兔 IgG 多抗结合，形成对照线，说明检测系统工作正常。

[0072] 检测试剂盒和检测方法

[0073] 本发明还提供了可用于病人全血、血清、尿样等样本中特定蛋白抗原的检测试剂盒。所述试剂盒包括：一容器以及位于容器内的、本发明上述的带有荧光乳胶微粒标记的特异性抗体 / 带有凝胶包裹的荧光乳胶微粒标记的免疫层析侧流片。

[0074] 其中，所述特异性抗体采用含铈的荧光乳胶微粒标记。优选的，所述特异性抗体采用凝胶包裹的含铈的荧光乳胶微粒标记。

[0075] 本发明提供了采用双抗体夹心的层析方法来检测病人样本中的特定蛋白的方法。

[0076] 本发明的试剂盒和检测方法解决了胶体金层析定量不准，普通荧光层析检测背景过高的缺点，显著地提高了检测的灵敏度和特异性。降低了假阳性率。

[0077] 本发明的时间分辨荧光免疫层析检测特定蛋白的方法和试剂（或试剂盒），可用于多种蛋白（如 BNP、pro-NT-BNP、D-二聚体、肌钙蛋白 I，CRP 等）的临床检测等场合。本发明的主要优点包括：

[0078] (a) 采用凝胶包裹荧光微粒后，与普通荧光微球相比，大幅度消除了非特异性的结合，检测信号的信噪比显著提高；

[0079] (b) 通过包裹氨基葡聚糖，稳定性得到改善，内部的镧系元素不易泄漏，可以长时间保存，且 30 天后基本没有衰减；

[0080] (c) 与胶体金定量方法相比，消除了样本和背景的干扰，结果更为准确；

[0081] (d) 与目前使用较多的胶体金定量检测、或普通荧光定量相比，灵敏度有显著提高；

[0082] (e) 与目前使用较多的胶体金定量检测、或普通荧光定量相比,检测结果十分稳定;

[0083] (f) 进一步降低了假阳性率。

[0084] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0085] 实施例 1

[0086] 1.1 含铈的荧光乳胶微粒的制备

[0087] 10% 聚苯乙烯乳胶微粒(表面含活化羧基)(购自美国 Bangs Lab 公司)120 μ l, 加入到 500 μ l 无水乙醇中,95 $^{\circ}$ C 加热 40 分钟。将 2.5mg 铈螯合物 Eu₃(TTA)₃/TOPO (TTA:2-噻吩甲酰三氟丙酮,TOPO:三正辛基氧磷)溶于 264 μ l 无水乙醇中,混合后加热至 95 $^{\circ}$ C 直至完全溶解。将上述混合液加入到乳胶溶液中,继续 95 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟,移到室温冷却至 47 $^{\circ}$ C。离心 12000rpm/min,15 分钟,弃上清。用 6ml 乙醇清洗微球。离心后用 0.1M 硼酸缓冲液稀释乳胶至 50 μ g/ml。制备的乳胶颗粒于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0088] 1.2 凝胶(氨基葡聚糖)包裹荧光微粒的制备

[0089] 1ml (22mg/ml) 表面带羧基的荧光微球与 1ml 浓度为 20mg/ml 氨基葡聚糖 (MW 500K) 在 0.05M MES/pH 6.0 混合,加入 3.8mg/ml EDAC,室温下反应 16 小时。用 2ml 0.05M MES/pH 6.0 洗涤,再用 6ml 0.05M MES,1.0M NaCl/pH 6.0 洗涤,超声。最终重悬于 1ml 0.05M MES/pH 6.0 中。

[0090] 实施例 2

[0091] 凝胶包裹的荧光微粒标记的特异性的抗体的制备

[0092] 用 0.1M pH 为 6.1 的 MES 缓冲液稀释实施例 1.2 制备的含铈的凝胶包裹荧光乳胶微粒到重量百分比 1%。在 13000 转/分钟下离心 20 分钟。弃去上清液。用 0.1M pH 为 6.1 的 MES 缓冲液重悬乳胶颗粒。逐滴加入纯化的 D-二聚体单抗,总量为 1mg/ml,混匀。用纯水配制量是 1ml 的 15mg/ml EDC 溶液,按 1 μ l/ml 加入到乳胶溶液中。在室温下,避光,持续振荡混合过夜。加入 0.1M 乙醇胺溶液 30 μ l/ml 封闭,室温下旋转混合 30 分钟。在 13000 转/分钟下离心 20 分钟。弃去上清液。然后加入相同体积的用含 5% 的小牛血清白蛋白 (BSA)0.1M pH 8.5 硼砂缓冲液重悬乳胶微粒。在室温下混合 4 个小时。13000 转/分钟下离心 20 分钟。弃去上清液,再加入相同体积的含 0.5% 的小牛血清白蛋白 0.1M pH 8.5 硼砂缓冲液,保存于 4 $^{\circ}$ C。

[0093] 实施例 3 免疫层析检测试剂板的制备

[0094] (1) 凝胶包裹荧光微球标记的抗体玻璃纤维条的制备

[0095] 将实施例 2 制备的凝胶包裹荧光乳胶微粒标记的 D-二聚体单抗与含 0.5% Triton X-100 (购自 Sigma 公司) pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液,混合,配制成 0.5mg/ml 浓度的溶液,均匀地涂布在玻璃纤维素纸上,涂布量为 50 μ l/cm²,真空干燥。

[0096] (2) 荧光乳胶标记的兔 IgG 玻璃纤维条的制备

[0097] 将采用实施例 2 同样方法制备的凝胶包裹荧光乳胶标记的兔 IgG (购自 Sigma 公

司)与含 0.5% Triton X-100, pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液,混合,配制成 0.5mg/ml 浓度的溶液,均匀地涂布在玻璃纤维素纸上,涂布量为 $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$,真空干燥。

[0098] (3) 检测线和质控线

[0099] 检测线:将纯化的 D-二聚体单抗与 pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液混合配制成浓度为 0.5mg/ml 的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0100] 质控线(也称为对照线):将羊抗兔 IgG 多抗(购自 Sigma 公司)与 pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液混合配制成浓度为 0.8mg/ml 混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0101] 然后在 15 ~ 35°C 干燥。

[0102] (4) 样品垫的制备

[0103] 样品垫材质为玻璃纤维纸或聚酯膜,用配制好的样品垫处理液浸泡样品垫,样品处理液的量为 $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$,然后在 37°C 下晾干,样品垫的组成为:pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液,含 0.5% Triton X-100,1% PVP,0.2% EDTA 和 0.5% BSA

[0104] (5) 测试条组装

[0105] 用常规方法,将以下各组件按图 3 所示组装成检测试剂条:

[0106] 1. 样品垫

[0107] 2. 结合物释放垫:包被荧光微球标记的抗体和兔 IgG 的玻璃纤维纸

[0108] 3. 检测线:硝酸纤维素膜上包被纯化的抗体

[0109] 4. 反应膜

[0110] 5. 质控线:硝酸纤维素膜上包被羊抗兔 IgG 多抗

[0111] 6. 吸收垫:

[0112] 7. 背衬(PVC)

[0113] 实施例 4 ~ 12

[0114] 凝胶包裹的荧光乳胶微粒标记的特异性的抗体的制备

[0115] 实施例 4 ~ 12 的步骤与实施例 2 基本相同,不同之处仅在于分别以 D-二聚体多抗、BNP 单抗、BNP 多抗、pro-NT-BNP 单抗、pro-NT-BNP 多抗、肌钙蛋白 I 单抗、肌钙蛋白 I 多抗、CRP 单抗、CRP 多抗等多种抗体替换 D-二聚体单抗,获得多种凝胶包裹的荧光乳胶微粒标记的特异性的抗体。

[0116] 实施例 13 ~ 21

[0117] 免疫层析检测试剂板的制备

[0118] 实施例 13 ~ 21 的步骤与实施例 3 基本相同,不同之处仅在于采用实施例 4 ~ 12 制备的凝胶包裹的荧光乳胶微粒标记的各种特异性的抗体取代实施例 2 制备的凝胶包裹荧光乳胶微粒标记的 D-二聚体单抗。

[0119] 对照例 1

[0120] 含铕的荧光乳胶微粒标记的特异性的抗体的制备

[0121] 含铕的荧光乳胶微粒标记的特异性的抗体的制备方法与实施例 2 的方法基本相同,不同之处仅在于采用实施例 1.1 方法制备的含铕的荧光乳胶微粒取代实施例 1.2 制备的含铕的凝胶包裹的荧光乳胶微粒。

[0122] 对照例 2

[0123] 包含荧光乳胶微粒标记的特异性的抗体的测试条的制备

[0124] 制备方法与实施例 3 基本相同,不同之处在于采用对照例 1 制备的含铈的荧光乳胶微粒标记的 D-二聚体单抗取代实施例 2 制备的凝胶包裹荧光乳胶微粒标记的 D-二聚体单抗;采用荧光乳胶标记的兔 IgG 取代凝胶包裹的荧光乳胶标记的兔 IgG。

[0125] 实施例 5 试剂板检测

[0126] 取 20 μ l 被测血清,用 0.01M 磷酸缓冲液 180 μ l 稀释,缓慢滴三滴于检测板的加样孔中,等待 15 分钟后,将检测板插入到时间分辨荧光检测仪或普通荧光检测仪上,读取检测结果。由于样本中含有特定蛋白,特定蛋白与荧光乳胶标记的抗体或凝胶包裹的荧光乳胶标记的抗体结合,一起沿硝酸纤维膜向前流动,到达检测线位置时,被固定在膜上的抗体捕获,形成荧光的条带,可以进行定量检测。乳胶标记的兔 IgG 会与对照线上的羊抗兔 IgG 多抗结合,形成对照线,说明检测系统工作正常。

[0127] 采用凝胶包裹的荧光乳胶标记的抗体制备测试条,并采用普通荧光和时间分辨荧光 POCT 检测样本中的 CRP,结果如表 1 所示。

[0128] 表 1 普通荧光和时间分辨荧光检测结果比较

[0129]

指标	普通荧光	时间分辨荧光
灵敏度 (mg/L)	0.12	0.08
线性范围 (mg/L)	0.5-200mg/L	1-1000mg/L
精密度 (%)	CV 值 < 9.6%	CV 值 < 5.4%

[0130] 从以上的检测结果可以看出时间分辨荧光检测比普通荧光检测的灵敏度高,同时检测的线性范围要宽,由于时间分辨荧光的半衰期长,其检测的精密度要高于普通荧光。

[0131] 分别采用实施例 2 制备的凝胶包裹的荧光微球标记 D-二聚体单抗、对照例 1 制备的未包裹的荧光微球标记 D-二聚体单抗制成测试条,检测 D-二聚体,结果如表 2 所示。

[0132] 表 2 氨基葡聚糖凝胶包裹荧光微球对背景的影响

[0133]

D-二聚体浓度	荧光微球	荧光信号值	背景荧光值	信噪比
3600pg/ml	未包裹微球	5414	679	7.97
	凝胶包裹微球	5821	246	23.66
2400pg/ml	未包裹微球	4600	666	6.91
	凝胶包裹微球	4620	235	19.66
1200pg/ml	未包裹微球	2714	573	4.74
	凝胶包裹微球	2678	206	13.00
600pg/ml	未包裹微球	1924	550	3.50
	凝胶包裹微球	1800	218	8.26
300pg/ml	未包裹微球	1018	604	1.69
	凝胶包裹微球	1024	220	4.65

[0134] 由表 2 的结果可知,采用葡聚糖凝胶包裹荧光微粒后,大幅度消除了非特异性的结合,检测信号的信噪比显著提高。

[0135] 将凝胶包裹的荧光微球、未包裹的荧光微球在室温下存放 30 天后,再分别标记抗体,制备免疫层析检测试剂板,采用实施例 5 的方法检测 D-二聚体,与刚制备后即用于检测 D-二聚体的荧光信号相比较,结果如表 3 所示。

[0136] 表 3 氨基葡聚糖凝胶包裹荧光微球对稳定性的影响

[0137]

D-二聚体浓度	荧光微球	荧光信号值	室温30天荧光值	信号衰减
3600pg/ml	未包裹微球	5414	1679	68.99%
	凝胶包裹微球	5821	5804	0.29%
2400pg/ml	未包裹微球	4600	1350	70.65%
	凝胶包裹微球	4620	4630	-0.22%
1200pg/ml	未包裹微球	2714	950	65.00%
	凝胶包裹微球	2678	2670	0.30%
600pg/ml	未包裹微球	1924	769	60.03%
	凝胶包裹微球	1800	1793	0.39%
300pg/ml	未包裹微球	1018	458	55.01%
	凝胶包裹微球	1024	1020	0.39%

[0138] 以上结果显示,未包裹凝胶的荧光微粒在室温存放,检测的荧光值急剧下降,30 天后下降 50% 以上,而通过包裹氨基葡聚糖,稳定性得到改善,30 天后基本没有衰减。

[0139] 本发明消除了样本和背景的干扰,结果更为准确,且灵敏度有显著提高,检测结果

十分稳定,可以长时间保存不发生变化,且进一步降低了假阳性率。

[0140] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

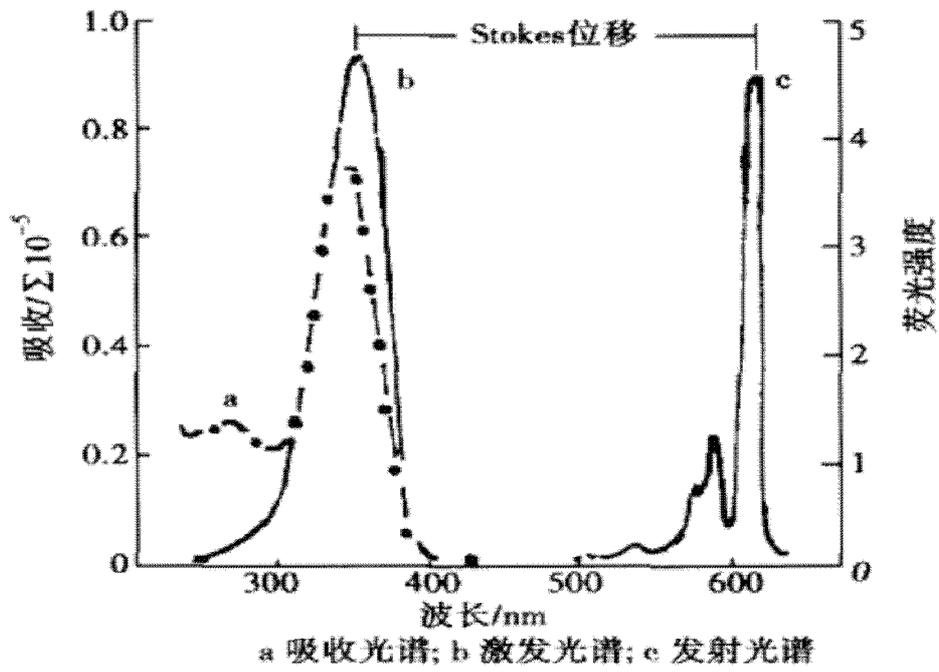


图 1

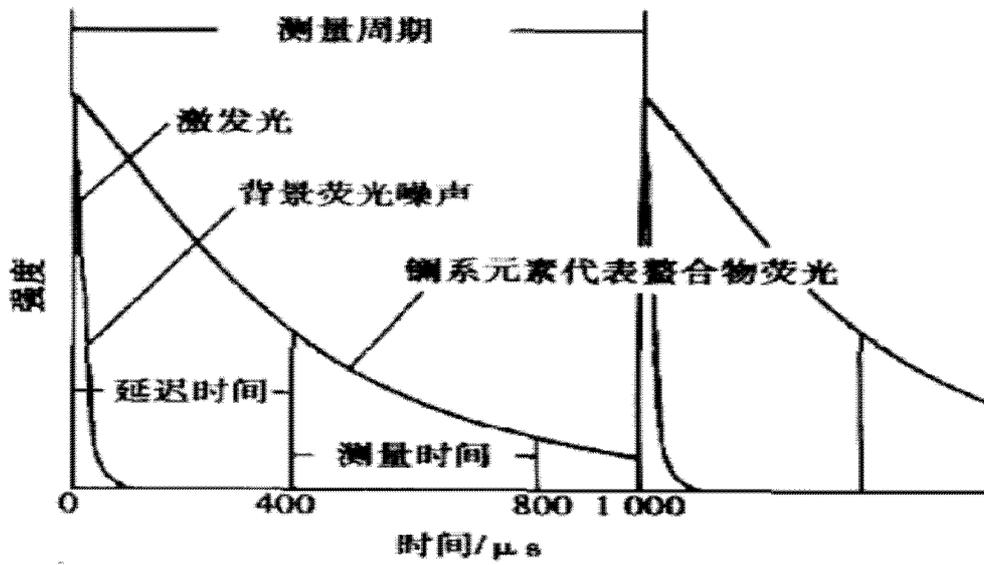


图 2

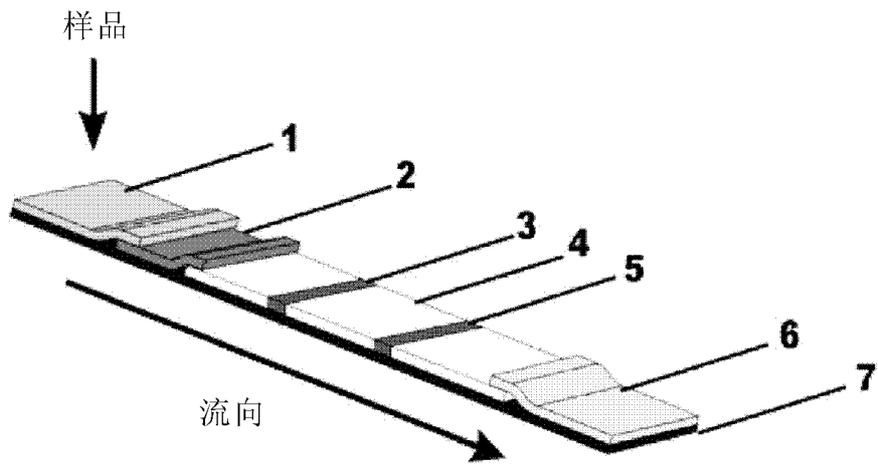


图 3

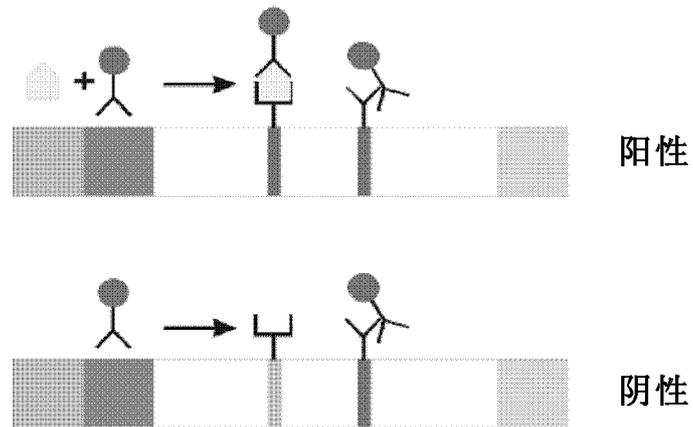


图 4

专利名称(译)	一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂和方法		
公开(公告)号	CN102879559B	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201110194963.6	申请日	2011-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	上海执诚生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海执诚生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海执诚生物科技股份有限公司		
[标]发明人	李小燕 丁国荣		
发明人	李小燕 丁国荣		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	雷芳		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102879559A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂和方法。本发明提供了凝胶包裹的含镧系元素的乳胶微粒、及其与偶联于乳胶微粒抗体形成的抗体复合物、含所述抗体复合物的测试条和试剂盒及用途。本发明的乳胶微粒、抗体复合物和试剂盒，可大幅度消除非特异性的结合，使检测信号的信噪比显著提高，且乳胶微粒通过凝胶包裹，稳定性得到改善。本发明的检测方法具有快速、高灵敏度、高特异性等优点。

