



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107941742 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711057474.X

(22)申请日 2017.11.01

(71)申请人 上海凯创生物技术有限公司

地址 201317 上海市浦东新区航头镇工业
园区鹤立路

(72)发明人 丁晓辉

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通
合伙) 31219

代理人 李艳 许亦琳

(51)Int.Cl.

G01N 21/359(2014.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡、试剂盒及其用途

(57)摘要

本发明涉及荧光免疫层析领域,具体涉及一种 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,包括依次排列的加样垫片、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫片;其中,所述玻璃纤维素膜上含有荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原;所述硝酸纤维素膜上依次设置有第一测试线、第二测试线和控制线;所述第一测试线包被了第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体;所述第二测试线包被了 β 人绒毛膜促性腺激素抗原;所述控制线包被了所述测试抗原的抗体。

1. 一种 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,其特征在于,包括依次排列的加样垫片、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫片;其中,

所述玻璃纤维素膜上含有荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原;

所述硝酸纤维素膜上依次设置有第一测试线、第二测试线和控制线;

所述第一测试线包被了第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体;

所述第二测试线包被了 β 人绒毛膜促性腺激素抗原;

所述控制线包被了所述测试抗原的抗体。

2. 根据权利要求1所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,其特征在于,所述测试抗原为兔IgG;所述测试抗原的抗体为羊抗兔IgG。

3. 根据权利要求1所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,其特征在于,所述第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和/或所述第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体为单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,其特征在于,所述荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体中的荧光探针和所述荧光探针-测试抗原中的荧光探针为荧光蛋白。

5. 根据权利要求4所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,其特征在于,所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白。

6. 如权利要求1-5任一项所述 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的制备方法,包括如下步骤:

1) 在玻璃纤维素膜上喷点荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原的混合溶液;

2) 使用第一预处理液对将要喷点的T1线所对应的硝酸纤维素膜进行第一预处理,并在第一预处理后的硝酸纤维素膜喷点第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体溶液;

3) 使用第二预处理液对将要喷点的T2线所对应的硝酸纤维素膜进行第二预处理,并在第二预处理后的硝酸纤维素膜喷点 β 人绒毛膜促性腺激素抗原溶液;

4) 在预设位置的硝酸纤维素膜上喷点测试抗原的抗体溶液。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,还包括以下特征中的任一项或多项:所述第一预处理液为含有1.5-2g/L精氨酸、1.2-1.5g/L邻苯二甲酸氢钾、0.3-0.5g/L氢氧化钠、2-2.5g/L柠檬酸的水溶液;所述第二预处理液为含有2-2.5g/L天冬酰胺、0.5-0.7g/L磷酸氢二钠、3-4g/L鼠李糖、3-3.5g/L甘氨酸的水溶液。

8. 如权利要求1-6任一项所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡在制备 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒中的用途。

9. 根据权利要求8所述用途,其特征在于,所述用途具体为使用所述 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒对样品中的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测。

10. 一种 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求1-6任一项所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡。

β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡、试剂盒及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光免疫层析领域,具体涉及β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡、试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] β人绒毛膜促性腺激素(β-HCG)是由胎盘的滋养层细胞分泌的一种糖蛋白,为人绒毛膜促性腺激素β亚单位。正常人β-HCG的含量约为0-3mIU/mL。血β-HCG比值可作为宫内妊娠、异位妊娠和妊娠失败的判断指标,β-HCG比值<0.81患者妊娠失败的可能性大,比值超过1.68的患者宫内妊娠的可能性较大。

[0003] 因此,β人绒毛膜促性腺激素(β-HCG)的检测具有重要意义。

[0004] 现有技术中的免疫诊断试剂,无论是定性还是定量试剂,都是以免疫反应为基础原理,即以抗原和抗体在一定条件下发生特异性结合而产生抗原-抗体复合物,用示踪物标记抗原或抗体,来最终实现对反应产物的检测分析。

[0005] 现有技术中,免疫诊断试剂卡,设置一条测试线,根据测试线的颜色来确定样本中是否含有目标抗原。通过一条测试线的颜色进行判断,容易受到环境光亮度和色彩的影响,并且也受用户主观判断的影响,产生较大误差,使得检测结果,特别是定量检测结果准确度较低,为疾病的诊断带来障碍。

发明内容

[0006] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡、试剂盒及其用途,以降低检测误差,提高检测结果的准确度。

[0007] 第一方面,本发明提供了一种β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,包括依次排列的加样垫片、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫片;其中,所述玻璃纤维素膜上含有荧光探针-第一抗β人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原;所述硝酸纤维素膜上依次设置有第一测试线、第二测试线和控制线;所述第一测试线包被了第二抗β人绒毛膜促性腺激素抗体;所述第二测试线包被了β人绒毛膜促性腺激素抗原;所述控制线包被了所述测试抗原的抗体。

[0008] 于本发明的一个实施例中,所述测试抗原为兔IgG;所述测试抗原的抗体为羊抗兔IgG。

[0009] 于本发明的一个实施例中,所述第一抗β人绒毛膜促性腺激素抗体和/或所述第二抗β人绒毛膜促性腺激素抗体为单克隆抗体。

[0010] 于本发明的一个实施例中,所述荧光探针-第一抗β人绒毛膜促性腺激素抗体中的荧光探针和所述荧光探针-测试抗原中的荧光探针为荧光蛋白。

[0011] 于本发明的一个实施例中,所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白。

[0012] 第二方面,本发明提供了一种如第一方面所述的β人绒毛膜促性腺激素近红外荧

光检测试剂卡的制备方法,包括如下步骤:1)在玻璃纤维素膜上喷点荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原的混合溶液;2)使用第一预处理液对将要喷点的T1线所对应的硝酸纤维素膜进行第一预处理,并在第一预处理后的硝酸纤维素膜喷点第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体溶液;3)使用第二预处理液对将要喷点的T2线所对应的硝酸纤维素膜进行第二预处理,并在第二预处理后的硝酸纤维素膜喷点 β 人绒毛膜促性腺激素抗原溶液;4)在预设位置的硝酸纤维素膜上喷点测试抗原的抗体溶液。

[0013] 于本发明的一个实施例中,所述第一预处理液为含有1.5-2g/L精氨酸、1.2-1.5g/L邻苯二甲酸氢钾、0.3-0.5g/L氢氧化钠、2.0-2.5g/L柠檬酸的水溶液。所述第一预处理液的pH为6.0~6.5。

[0014] 于本发明的一个实施例中,所述第二预处理液为含有2-2.5g/L天冬酰胺、0.5-0.7g/L磷酸氢二钠、3-4g/L鼠李糖、3-3.5g/L甘氨酸的水溶液。所述第一预处理液的pH为7.6~8.0。

[0015] 第三方面,本发明提供了一种第一方面所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡在制备 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒中的用途。

[0016] 于本发明的一个实施例中,所述用途具体为使用所述 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒对样品中的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测。

[0017] 第四方面,本发明提供了一种 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒,包括第一方面所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:采用两条测试线的比值或测试线与控制线的比值来确定 β 人绒毛膜促性腺激素的量,可以有效的降低误差,提高了检测结果,特别是定量检测结果的准确度;并且避免了控制系统和测试系统之间的相互干扰;并且控制系统可以采用不干扰测试系统的抗原-抗体反应物,避免控制系统和测试系统之间的相互干扰,提高了检测的准确度和精密度。

附图说明

[0019] 图1为本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的结构示意图。

具体实施方式

[0020] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0021] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0022] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领

域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,CoId Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;AusubeI等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;WoIffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,VoI.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.WoIffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,VoI.119,Chromatin ProtocoIs(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0023] 本发明提供了一种 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡,其结构如图1所示。在该试剂卡上,加样垫片、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜、吸水垫片依次排列。

[0024] 所述玻璃纤维素膜上含有荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原。所述荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原可层析至所述硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜上依次设置有T1线、T2线和C线。T1线和T2线为测试线,C线为控制线。T1线包被了第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体;T2线包被了 β 人绒毛膜促性腺激素抗原;C线包被了所述测试抗原的抗体。

[0025] 所述荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体是指荧光探针标记的第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体。

[0026] 所述荧光探针-测试抗原是指荧光探针标记的测试抗原。

[0027] 所述测试抗原是指 β 人绒毛膜促性腺激素抗原以外的抗原,例如IgG。

[0028] 加样垫片上的荧光探针标记的测试抗原和C线包被的测试抗原的抗体用于验证检测试剂卡是否失效。

[0029] 本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡采用了荧光免疫层析技术以及双抗体夹心法原理。检测时,如果样品中有 β 人绒毛膜促性腺激素存在,会首先与荧光探针标记的第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体结合形成荧光免疫复合物,当该荧光免疫复合物层析至T1线时,被预先包被在T1线上的第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体捕获,荧光免疫复合物在T1线处富集,样本中 β 人绒毛膜促性腺激素浓度越高,荧光免疫复合物在T1线上的富集就越多,T1线颜色越深;如果样本中 β 人绒毛膜促性腺激素少于荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体,则剩余的荧光探针标记的第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体会层析至T2线,样本中 β 人绒毛膜促性腺激素浓度越低,T2线上的富集的荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体就越多,荧光信号就越强。可以使用干式荧光免疫分析仪对荧光信号进行检测。

[0030] 本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的检测结果由T1/T2的比值或T1/C的比值来表征。T1值、T2值、C值具体分别用T1线上富集的荧光探针的荧光信号值、T2线上富集的荧光探针的荧光信号值、C线上富集的荧光探针的荧光信号值来表示。可以使用干式荧光免疫分析仪对各线富集的荧光探针的荧光信号进行检测,以得出荧光信号值。

[0031] 利用发明实施例提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡进行 β 人绒

毛膜促性腺激素的检测,可能出现以下几种情形:

[0032] (1) 当样本中 β 人绒毛膜促性腺激素从无到有时, β 人绒毛膜促性腺激素和第一 β 人绒毛膜促性腺激素抗原抗体形成的免疫复合物越来越多,游离的第一 β 人绒毛膜促性腺激素抗原抗体越来越少,因此,T1线捕获的荧光探针越来越多,而T2线捕获的荧光探针越来越少。T1值从无到逐渐变强,T2从极强到减弱,C不变,则:T1/T2由极小到逐渐变大,T1/C由极小到逐渐变大。

[0033] (2) 当样本中 β 人绒毛膜促性腺激素在等价带内时, β 人绒毛膜促性腺激素和第一 β 人绒毛膜促性腺激素抗原抗体形成的荧光免疫复合物最多,游离的第一 β 人绒毛膜促性腺激素抗原抗体最少,此时T1值最大,T2值最小,C值不变。则:T1/T2由大变大极大,T1/C逐渐增强。

[0034] 因此,根据T1/T2的比值或T1/C的比值来获得样本中 β 人绒毛膜促性腺激素的含量。在实际应用中,可以利用标准品拟合T1/T2或T1/C比值的标定曲线,然后根据标准曲线计算样本中 β 人绒毛膜促性腺激素的含量。

[0035] 而现有技术中的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡只包被了一条测试线,在上述情形下的具体情况如下:

[0036] (1) 当样本中 β 人绒毛膜促性腺激素从无到有时:T1从无到逐渐变强,很快趋于常数;

[0037] (2) 当样本中 β 人绒毛膜促性腺激素在等价带内时,则T1为常数。

[0038] 只凭借一条测试线确定 β 人绒毛膜促性腺激素的量,误差较大,特别是对于 β 人绒毛膜促性腺激素的定量检测,准确度较低。

[0039] 而本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡采用两条测试线的比值或测试线与控制线的比值来确定 β 人绒毛膜促性腺激素的量,可以有效的降低误差,可以适用于 β 人绒毛膜促性腺激素的定量测定。

[0040] 测试抗原具体为不同于 β 人绒毛膜促性腺激素的抗原。如果该试剂卡具体用于检测人源 β 人绒毛膜促性腺激素,测试抗原选用非人源抗原,不会对人源性样本造成干扰。测试抗原和测试抗原抗体与测试线系统的抗原-抗体系统互不交叉干扰。使得系统方法学误差得到控制,提高了检测的准确度和精密度。

[0041] 在一个示例中,所述测试抗原为兔IgG;所述测试抗原的抗体为羊抗兔IgG。

[0042] 在一个示例中,所述第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和/或所述第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体为单克隆抗体。选用纯化的基因工程表达的单克隆抗体相比多克隆抗体特异性和靶向性更好,质量更稳定。进一步地,所述第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和所述第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体为不同的单克隆抗体,例如所述第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体可采用上海荣圣生物科技有限公司的鼠抗 β 人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体(货号RS-003-0102),所述第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体可采用广州万孚生物技术股份有限公司的鼠抗 β 人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体(货号M409-2)。

[0043] 在一个示例中,所述荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体中的荧光探针和所述荧光探针-测试抗原中的荧光探针为荧光蛋白。可以采用碳化二亚胺方法将荧光蛋白与第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体或测试抗原进行偶联,以进行荧光标记。荧光蛋白的生物相容性好,标记生物分子后不影响该生物分子的生物活性;发光强度高,易于检测;具有

较宽的激发波长(450~650nm),荧光亮度是荧光素的20~30倍,并且不易淬灭。

[0044] 在一个示例中,所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白。采用绿色荧光蛋白具有以下优点:

[0045] (1) 免疫荧光呈现绿色,可以直接观察结果,检测便捷;

[0046] (2) 在经过短时间的光照后,发出荧光持续时间长;

[0047] (3) 在移去光源后,仍然有荧光存在,受背景干扰小。

[0048] 本发明还提供了一种上文所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的制备方法,包括如下步骤:1) 在玻璃纤维素膜上喷点荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针测试抗原的混合溶液;2) 使用第一预处理液对将要喷点的T1线所对应的硝酸纤维素膜进行第一预处理,并在第一预处理后的硝酸纤维素膜喷点第二抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体溶液;3) 使用第二预处理液对将要喷点的T2线所对应的硝酸纤维素膜进行第二预处理,并在第二预处理后的硝酸纤维素膜喷点 β 人绒毛膜促性腺激素抗原溶液;4) 在预设位置的硝酸纤维素膜上喷点测试抗原的抗体溶液。

[0049] 在一个示例中,所述第一预处理液为含有1.5-2g/L精氨酸、1.2-1.5g/L邻苯二甲酸氢钾、0.3-0.5g/L氢氧化钠、2-2.5g/L柠檬酸的水溶液。

[0050] 在一个示例中,所述第二预处理液为含有2-2.5g/L天冬酰胺、0.5-0.7g/L磷酸氢二钠、3-4g/L鼠李糖、3-3.5g/L甘氨酸的水溶液。

[0051] 在制备时,使用第一预处理液对T1线所对应的硝酸纤维素膜进行预处理,并使用第二预处理液对T2线所对应的硝酸纤维素膜进行预处理,可以显著提高 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的检测灵敏度和准确度。

[0052] 本发明还提供了一种上文所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡在制备 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒中的用途。

[0053] 在一个示例中,所述用途具体为使用所述 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒对样品中的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测。

[0054] 本发明还提供了一种 β 人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒,包括上文所述的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡。

[0055] 在以下具体实施例以及对比例中,采用加标回收法对本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的检测效果进行举例说明。

[0056] 实施例1

[0057] 11、 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的制备,具体方法包括如下步骤:

[0058] 111、荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原的混合溶液的制备:

[0059] 在预设体积的0.05M的PBS中加入所需量的上海荣圣生物科技有限公司的鼠抗 β 人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体(货号RS-003-0102)及绿色荧光蛋白,然后加入EDC使上海荣圣生物科技有限公司的鼠抗 β 人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体(货号RS-003-0102)和绿色荧光蛋白偶联;经过离心、稀释等操作步骤除去EDC,获得的荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体溶液。在预设体积的0.05M的PBS中加入所需量的兔IgG及绿色荧光蛋白,然后加入EDC使兔IgG和绿色荧光蛋白偶联;经过离心、稀释等操作步骤除去EDC,获得的荧光探针-测试抗原溶液。将制备的荧光探针-第一抗 β 人绒毛膜促性腺激素抗体溶液和荧光探针-

测试抗原溶液混合,2-8℃保存。

[0060] 112、将步骤111所得混合溶液用pH6.8-7.2、0.01-0.05M的PBS稀释,稀释至OD720=2.0~4.0,将所得溶液喷点到玻璃纤维素膜上,喷点量为2-5mg/mL,35-45℃烘干,即得含有荧光探针-第一抗β人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原的玻璃纤维素膜。

[0061] 113、C线溶液的配制:用0.01-0.05M、pH6.8-7.2的PBS配制羊抗兔IgG溶液,溶液的终浓度为1.0-2.0mg/mL。

[0062] 114、T1线溶液的配制:用0.01-0.05M、pH6.8-7.2的PBS配制第二抗β人绒毛膜促性腺激素抗体溶液,第二抗β人绒毛膜促性腺激素抗体采用广州万孚生物技术股份有限公司的鼠抗β人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体(货号M409-2),溶液的终浓度为1.0-2.0mg/mL。

[0063] 115、T2线溶液的配制:用0.01-0.05M、pH6.8-7.2的PBS配制β人绒毛膜促性腺激素抗原溶液,溶液的终浓度为1.0-2.0mg/mL。

[0064] 116、使用第一预处理液对将要喷点的T1线所对应的硝酸纤维素膜进行预处理,第一预处理液的配方为:精氨酸1.5g/L、邻苯二甲酸氢钾1.2g/L、氢氧化钠0.5g/L、柠檬酸2.0g/L,溶剂为水,pH值=6.5,预处理的具体步骤为:

[0065] 1161、往T1线上均匀滴加5μL第一预处理液,室温晾干;

[0066] 1162、重复步骤1161两次。

[0067] 117、使用第二预处理液对将要喷点的T2线所对应的硝酸纤维素膜进行预处理,第二预处理液的配方为:天冬酰胺2.5g/L、磷酸氢二钠0.5g/L、鼠李糖4g/L、甘氨酸3.5g/L,溶剂为水,pH值=7.6,预处理的具体步骤为:

[0068] 1171、往T2线均匀滴加5μL第二预处理缓冲液,室温晾干;

[0069] 1172、重复步骤1171两次。

[0070] 118、分别使用C线溶液、T1线溶液、T2线溶液在硝酸纤维素膜上喷点C线、T1线、T2线:用0.01M、pH7.2的PBS缓冲液将微量蛋白点膜系统清洗好,调试好喷膜仪各参数,连接好进出口管线,将C管线、T1管线、T2管线分别放入C线、T1线、T2线溶液中,调节系统的喷速和走膜速度,以使每1cm长度的膜带各能喷上1-3μL的C线溶液、T1线溶液、T2线溶液,硝酸纤维素膜上三条线的排布顺序为,从加样端开始依次为T1线、T2线和C线,将喷好的膜放入真空泵中抽真空干燥,即得依次设置有第一测试线、第二测试线和控制线且所述第一测试线包被了第二抗β人绒毛膜促性腺激素抗体、所述第二测试线包被了β人绒毛膜促性腺激素抗原、所述控制线包被了所述测试抗原的抗体的硝酸纤维素膜,备用。

[0071] 119、贴膜:在胶板上,从上到下,依次贴上上述已经制备好的加样垫片、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜、吸水垫片。制得试剂大板。

[0072] 1110、切裁:用切刀将试剂大板纵切成宽度为3-5mm的试纸条,每一条为1人份。

[0073] 1111、组装:将每1人份试纸条对应安装到每1张塑料卡中,即得试剂卡。

[0074] 12、使用本实施例提供的β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡对β人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测。

[0075] 121、制作定标曲线。

[0076] 分别将浓度为0mIU/mL、0.05mIU/mL、0.1mIU/mL、1.0mIU/mL、10mIU/mL、50mIU/mL、100mIU/mL、200mIU/mL、400mIU/mL、600mIU/mL、800mIU/mL、1000mIU/mL、2000mIU/mL、5000mIU/mL、10000mIU/mL、16000mIU/mL的β人绒毛膜促性腺激素抗原溶液滴加于加样垫片

上,每个浓度设5个重复(检测结果取5个重复的平均值),膜层析10分钟以后,使用干式荧光免疫分析仪采集T1线和T2线的荧光信号。干式荧光免疫分析仪对荧光信号的检测范围是AD值0-10000。根据干式荧光免疫分析仪的检测结果计算T1/T2的值。根据T1/T2线的值建立定标曲线,其中Y轴为T1/T2的值,X轴为标准品真实值。

[0077] 122、本实施例制备的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡对待测样品进行检测。

[0078] 制备 β 人绒毛膜促性腺激素抗原浓度分别为0.02mIU/mL、2.0mIU/mL、20mIU/mL、200mIU/mL、2000mIU/mL、10000mIU/mL的待测样品,以PBS缓冲液为对照。将待测样品滴加于加样垫片上,每个样品设5个重复(检测结果取5个重复的平均值),膜层析10分钟以后,将检测样品时获得的T1/T2值与标准曲线比较,获得检测值,将检测值和实际值进行比较,获得准确度影响偏差值。样品1-6所获得的检测的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原的含量数据分别为0.0205mIU/mL、2.001mIU/mL、20.003mIU/mL、200.002mIU/mL、2000.005mIU/mL、10000.015mIU/mL,空白对照中未检测到 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。

[0079] 上述结果表明,本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原检测抗原的准确度影响偏差值 $\leq 10\%$,可以准确检测浓度低至0.02mIU/mL的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。

[0080] 实施例2

[0081] 21、 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的制备

[0082] 具体制备方法参照实施例1中步骤111-1111所述,其中,不同之处在于,在本实施例中的第一预处理液配方为:精氨酸1.75g/L、邻苯二甲酸氢钾1.5g/L、氢氧化钠0.3g/L、柠檬酸2.5g/L,溶剂为水,pH值=6.0。第二预处理液配方为:天冬酰胺2.0g/L、磷酸氢二钠0.7g/L、鼠李糖3.5g/L、甘氨酸3.0g/L,溶剂为水,pH值=8.0。

[0083] 22、使用本实施例提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡对浓度分别为0.02mIU/mL、2.0mIU/mL、20mIU/mL、200mIU/mL、2000mIU/mL、10000mIU/mL的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测。检测过程参照实施例1中的步骤121和步骤122。检测结果为分别为浓度分别为0.0204mIU/mL、2.001mIU/mL、20.005mIU/mL、200.003mIU/mL、2000.002mIU/mL、10000.006mIU/mL的,空白对照中未检测到 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。

[0084] 上述结果表明,本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原检测抗原的准确度影响偏差值 $\leq 10\%$,可以准确检测浓度低至0.02mIU/mL的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。

[0085] 实施例3

[0086] 31、 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的制备

[0087] 具体制备方法参照实施例1中步骤111-1111所述,其中,不同之处在于,在本实施例中的第一预处理液配方为:精氨酸2.0g/L、邻苯二甲酸氢钾1.35g/L、氢氧化钠0.4g/L、柠檬酸2.25g/L,溶剂为水,pH值=6.3。第二预处理液配方为:天冬酰胺2.25g/L、磷酸氢二钠0.6g/L、鼠李糖3g/L、甘氨酸3.25g/L,溶剂为水,pH值=7.8。

[0088] 32、使用本实施例提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡对浓度分别为0.02mIU/mL、2.0mIU/mL、20mIU/mL、200mIU/mL、2000mIU/mL、10000mIU/mL的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测。检测过程参照实施例1中的步骤121和步骤122。检测结果为分别为0.026mIU/mL、2.005mIU/mL、20.004mIU/mL、200.003mIU/mL、2000.002mIU/mL、10000.001mIU/mL,空白对照中未检测到 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。

[0089] 上述结果表明,本发明提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡检测抗原的准确度影响偏差值 $\leq 10\%$,可以准确检测浓度低至 0.02mIU/mL 的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。

[0090] 对比例1

[0091] 41、对比 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的制备

[0092] 具体制备方法参照实施例1中步骤111-1111所述,其中,不同之处在于,在本实施例中的试剂盒中的硝酸纤维素膜上的T1线没有经过第一处理液预处理,T2线没有经过第二处理液预处理,其他方法与条件均与实施例1相同。

[0093] 42、对比 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的检测效果

[0094] 421、使用本实施例提供的对比 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡对 β 人绒毛膜促性腺激素抗原进行检测

[0095] 4211、制作定标曲线

[0096] 分别将浓度为 0mIU/mL 、 0.05mIU/mL 、 0.1mIU/mL 、 1.0mIU/mL 、 10mIU/mL 、 50mIU/mL 、 100mIU/mL 、 200mIU/mL 、 400mIU/mL 、 600mIU/mL 、 800mIU/mL 、 1000mIU/mL 、 2000mIU/mL 、 5000mIU/mL 、 10000mIU/mL 、 16000mIU/mL 的 β 人绒毛膜促性腺激素抗原溶液滴加于加样垫片上,每个浓度设5个重复(检测结果取5个重复的平均值),膜层析10分钟以后,使用干式荧光免疫分析仪采集T1线和T2线的荧光信号。干式荧光免疫分析仪对荧光信号的检测范围是AD值0-10000。根据干式荧光免疫分析仪的检测结果计算T1/T2的值。根据T1/T2线的值建立定标曲线,其中Y轴为T1/T2的值,X轴为标准品真实值。

[0097] 4212、对比例1提供的 β 人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡的检测结果

[0098] 制备 β 人绒毛膜促性腺激素抗原浓度分别为 0.02mIU/mL 、 2.0mIU/mL 、 20mIU/mL 、 200mIU/mL 、 2000mIU/mL 、 10000mIU/mL 的待测样品,以PBS缓冲液为对照。将待测样品滴加于加样垫片上,每个样品设5个重复(检测结果取5个重复的平均值),膜层析10分钟以后,将检测样品时获得的T值与标准曲线比较,获得检测值,将检测值和实际值进行比较,获得准确度影响偏差值。

[0099] 检测结果显示,从浓度为 0.02mIU/mL 以及空白对照中未检测出 β 人绒毛膜促性腺激素抗原。而实际浓度为 2.0mIU/mL 和 20mIU/mL 的待测样品的检测结果分别为 3.0mIU/mL 和 22mIU/mL 。

[0100] 综上所述,本发明所提供的检测试剂盒具有良好的灵敏度和准确度,有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0101] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

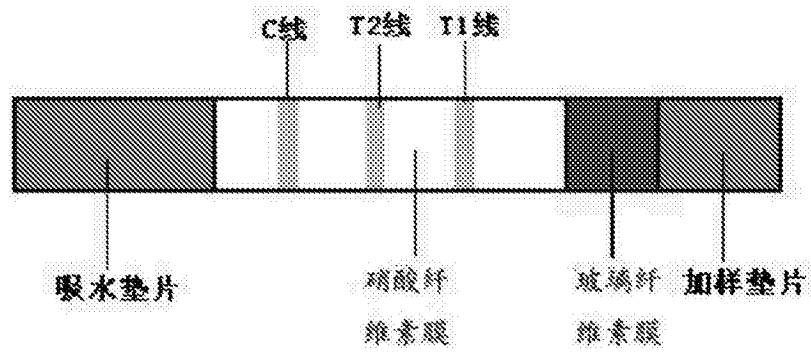


图1

专利名称(译)	β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡、试剂盒及其用途		
公开(公告)号	CN107941742A	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN2017111057474.X	申请日	2017-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	上海凯创生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海凯创生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海凯创生物技术有限公司		
[标]发明人	丁晓辉		
发明人	丁晓辉		
IPC分类号	G01N21/359 G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/359 G01N21/6428 G01N33/533		
代理人(译)	李艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及荧光免疫层析领域，具体涉及一种β人绒毛膜促性腺激素近红外荧光检测试剂卡，包括依次排列的加样垫片、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫片；其中，所述玻璃纤维素膜上含有荧光探针-第一抗β人绒毛膜促性腺激素抗体和荧光探针-测试抗原；所述硝酸纤维素膜上依次设置有第一测试线、第二测试线和控制线；所述第一测试线包被了第二抗β人绒毛膜促性腺激素抗体；所述第二测试线包被了β人绒毛膜促性腺激素抗原；所述控制线包被了所述测试抗原的抗体。

