



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 108535472 B

(45) 授权公告日 2021.09.24

(21) 申请号 201810160749.0

(22) 申请日 2018.02.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108535472 A

(43) 申请公布日 2018.09.14

(73) 专利权人 上海艾瑞德生物科技有限公司

地址 201114 上海市闵行区新骏环路188号
5号楼301室

(72) 发明人 李秋萍 王佩瑞 叶一 肖琨

倪晓涛 陆亮 朱轩仪 杨茜茹

操凤文 李欢

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 徐迅 崔佳佳

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101166974 A, 2008.04.23

CN 102236022 A, 2011.11.09

CN 1786710 A, 2006.06.14

CN 106706916 A, 2017.05.24

CN 104215758 A, 2014.12.17

Rivas, L 等. Improving sensitivity of gold nanoparticle-based lateral flow assays by using wax-printed pillars as delay barriers of microfluidics.《LAB ON A CHIP》.2014,第14卷(第22期),第4406-4414页.

审查员 刘莉丹

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种显著提高侧向流免疫层析的检测试条

(57) 摘要

本发明提供一种显著提高侧向流免疫层析检测试条检测信号强度的方法,且提高检测信号强度的方法包括步骤:(a)样品与标记在荧光微球上的抗体体外混合后加入到层析试纸的样品垫上;(b)样品中的待分析物与标记在荧光微球上的抗体结合后形成待测复合物,并且待测复合物随层析流逐步扩散至硝酸纤维素膜;(c)在硝酸纤维素膜上划分检测线和质控线;(d)在样品垫和检测线之间的硝酸纤维素膜上进行打孔修饰,并得到1-10排修饰孔形成的修饰区。本发明能够达到增加待检测复合物被捕获的机率、减少体外混匀的时间、提升测试灵敏度、降低测量极限值、和/或提高检测信号的目的。

1. 一种侧向流免疫层析检测试条,其特征在于,所述检测试剂条包括基片区和位于所述基片区上方的免疫检测区;沿所述基片区近端至远端方向排列的所述免疫检测区包括:

(a) 混合区:所述混合区具有样品垫;其中,样品与标记在荧光微球上的抗体体外混合后加入到所述样品垫上;

(b) 流经修饰区:所述流经修饰区是具有修饰孔的硝酸纤维素膜;

(c) 反应区:所述反应区是具有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;以及

(d) 吸收区:所述吸收区具有吸收垫;

其中,所述的基片区是聚氯乙烯底板;

其中,所述的流经修饰区的修饰孔为激光切割机辐射打孔形成的激光孔;

所述的流经修饰区是面积为: 3mm^2 - 25mm^2 的长方形,且所述流经修饰区的宽为 2.0mm - 10.0mm ;

所述的修饰孔的深度为 0.01mm - 0.30mm 、所述修饰孔孔径为 0.01mm - 0.25mm 、所述修饰孔的间距为 0.1mm - 1.0mm ;且

所述修饰孔的排列为间或排列。

2. 如权利要求1所述的检测试条,其特征在于,所述的检测试条具有以下特征:

(i) 所述硝酸纤维素膜预先包被与标记抗体的识别位点不同的检测抗体以及质控线抗体;

(ii) 待测复合物和所述的检测抗体与质控线抗体结合后,在硝酸纤维素膜上形成颜色深浅不同的检测区反应带,靠近样品垫的反应带是检测线、远离样品垫的反应带是质控线;

(iii) 所述的流经修饰区位于所述样品垫和所述检测线之间。

3. 如权利要求1所述的检测试条,其特征在于,所述的修饰孔的深度为 0.015mm - 0.25mm 、所述修饰孔孔径为 0.15mm - 0.25mm 且所述修饰孔的间距为 0.15mm - 1.0mm 。

4. 一种使用如权利要求1-3任意一项所述的检测试条检测免疫信号强度的方法,其特征在于,所述方法包括步骤:

① 在所述免疫检测中,使用如权利要求1-3任意一项所述的侧向流免疫层析检测试条,将样品与标记抗体的荧光微球体外混匀30秒后滴加到样品垫,平放静置900秒;

② 利用检测器的探头从样品垫方向移动至吸收垫,读取包括检测线和质控线在内的150-200个点;

③ 分别对检测线和质控线的峰面积进行积分,峰面积分别记为检测A(TA)、质控A(CA);

④ 计算检测AP(TAP)的值以校准颗粒量不同引起的误差,

且 $TAP=TA/(TA+CA)$ 。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述的样品是液态样品。

一种显著提高侧向流免疫层析的检测试条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析检测试条,具体地涉及能够显著提高侧向流免疫层析的侧向流免疫层析检测试条。

背景技术

[0002] 侧向流层析具有成本低、操作简单、快捷、方便携带等优点,是医疗诊断领域重要的一部分。

[0003] 目前市面上常见的侧向流免疫层析法主要是双抗体夹心法,又称三明治检测法,其由聚氯乙烯底板、硝酸纤维素膜、样品垫、吸收垫组成。一般的,侧向流免疫荧光层析法中,人或动物的体液样品与荧光颗粒标记抗体在体外混合,形成抗原-抗体复合物,将其加到样品垫上,随着层析作用复合物扩散至检测区。检测区一般由包被检测抗体的检测线、包被质控抗体的质控线组成,当待测复合物流经检测线,样品中的待测的抗原-抗体复合物会被检测线的另一检测抗体捕获,剩下的未结合抗原的抗体会被质控线抗体捕获,通过对检测线、质控线的荧光信号值进行定量检测从而测得样品中目标抗原的含量。

[0004] 体外混匀步骤需要人工操作或机器操作,较麻烦且混合并不充分,对于低浓度的目标检测物无法很好的区分。对于侧向流层析低值检测而言,由于本身待测物较少,捕获物与待测物的不充分结合导致低含量的待测物无法被检测区分开。本发明通过对膜的修饰使得抗原抗体的结合机率增加,对于提高低值区的检测灵敏度和信号的强度具有一定的帮助,也可以减短体外混合时间。

[0005] 综上所述,本领域尚缺乏一种兼具检测灵敏度高、体外混合时间短、检测限低的免疫层析检测试条。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种兼具检测灵敏度高、体外混合时间短、检测限低免疫层析检测试条的制备方法。

[0007] 本发明的第一方面提供一种侧向流免疫层析检测试条,具体地,所述检测试剂条包括基片区和位于所述基片区上方的免疫检测区;沿所述基片区近端至远端方向排列的所述免疫检测区包括:

[0008] (a) 混合区:所述混合区具有样品垫;

[0009] (b) 流经修饰区:所述流经修饰区是具有修饰孔的硝酸纤维素膜;

[0010] (c) 反应区:所述反应区是具有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;以及

[0011] (d) 吸收区:所述吸收区具有吸收垫;

[0012] 其中,所述基片区是聚氯乙烯底板。

[0013] 在另一优选例中,所述的检测试条具有以下特征:

[0014] (i) 所述硝酸纤维素膜预先包被与标记抗体的识别位点不同的检测抗体以及质控线抗体;

[0015] (ii) 待测复合物和所述的检测抗体与质控线抗体结合后,在硝酸纤维素膜上形成颜色深浅不同的检测区反应带,靠近样品垫的反应带是检测线、远离样品垫的反应带是质控线;

[0016] (iii) 所述的流径修饰区位于所述样品垫和所述检测线之间。

[0017] 在另一优选例中,所述的流径修饰区具有修饰孔,且所述修饰孔选自:疏水性油墨印刷的印刷孔、激光切割机辐射的激光孔、打孔机按压的下落孔或其组合。

[0018] 在另一优选例中,所述修饰孔的排列选自对齐排列、间或排列、无规格排列或其组合。

[0019] 在另一优选例中,所述的流径修饰区是面积为: 3mm^2 - 25mm^2 的长方形,且所述流径修饰区的宽为 2.0mm - 10.0mm 。

[0020] 在另一优选例中,所述的修饰孔的深度为 0.01mm - 0.30mm 、所述修饰孔孔径为 0.01mm - 0.25mm 、所述修饰孔的间距为 0.1mm - 1.0mm 。

[0021] 在另一优选例中,所述的修饰孔的深度为 0.015mm - 0.25mm 、所述修饰孔孔径为 0.15mm - 0.25mm 、所述修饰孔的间距为 0.15mm - 1.0mm 。

[0022] 在另一优选例中,所述的修饰孔间距多少以及孔径大小的修饰标准是:修饰孔不阻塞液体流过修饰区且液体在修饰区的流速适中。

[0023] 在另一优选例中,所述的修饰区能够让液体形成漩涡流,增加标记抗体和待侧复合物接触的几率,提高抗原和抗体的结合,进而达到增加待检测复合物被捕获的机率、减少体外混匀的时间、提升测量灵敏度、降低测量极限值、和/或提高检测信号的目的。

[0024] 本发明的第二方面提供一种检测试条的制备方法,具体地,所述的方法包括步骤:

[0025] (I) 样品与标记在荧光微球上的抗体体外混合后加入到样品垫;

[0026] (II) 样品中的待分析物与标记在荧光微球上的抗体结合后形成待测复合物,并且待测复合物随层析流逐步扩散至硝酸纤维素膜;

[0027] (III) 在硝酸纤维素膜上划分检测线(T线)和质控线(C线);

[0028] (IV) 在样品垫和检测线之间的硝酸纤维素膜上进行流径修饰,形成流径修饰区。

[0029] 在另一优选例中,所述的样品是液态样品。

[0030] 在另一优选例中,所述的样品包括:生物样品、环境样品、食品或其组合。

[0031] 在另一优选例中,所述的样品是生物液体或衍生自生物液体。

[0032] 在另一优选例中,所述的样品包括:血液、血清、血浆、口腔液、汗液、尿液、脊髓液、食物、水、土壤或其组合。

[0033] 本发明的第三方面提供一种利用检测试条检测免疫信号强度的方法,具体地,所述方法包括步骤:

[0034] ①在所述免疫检测中,使用本发明所述的侧向流免疫层析检测试条,将标准品与标记抗体的荧光微球体外混匀30秒后滴加到样品垫,平放静置900秒;

[0035] ②利用检测器的探头从样品垫方向移动至吸收垫,读取包括检测线和质控线在内的150-200个点;

[0036] ③分别对检测线和质控线的峰面积进行积分,峰面积分别记为检测A(TA)、质控A(CA);

[0037] ④计算检测AP(TAP)的值以校准颗粒量不同引起的误差,

[0038] 且 $TAP=TA/(TA+CA)$ 。

[0039] 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

[0040] 图1显示免疫层析检测试条修饰膜示意图和实物图;

[0041] 图2显示免疫层析检测试条中,打孔修饰工作原理,且箭头表示样品流过的路径方向;

[0042] 图3显示免疫层析检测试条中,硝酸纤维素膜上的打孔示意图;

[0043] 图4显示检测信号示意图;

[0044] 图5显示免疫层析检测试条的硝酸纤维素膜打孔前后质控检测cTnI测量结果图;

[0045] 图6a显示检测线捕获被荧光微球标记抗体捕获的抗原;

[0046] 图6b显示检测线捕获抗原,但是抗原与荧光微球标记的抗体未充分结合。

具体实施方式

[0047] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次开发了兼具检测灵敏度高、体外混合时间短、检测限低的免疫层析检测试条,本发明的免疫层析检测试条由聚氯乙烯底板、硝酸纤维素膜、样品垫、吸收垫组成,且在免疫层析检测试条的样垫与检测线之间的硝酸纤维素膜中进行打孔,因此,本发明的侧向流免疫层析检测试条具有灵敏度高、体外混合时间短、检测限低的特点,不仅可以大幅提高免疫层析检测的灵敏度,而且可以显著降低检测所需的时间。在此基础上完成了本发明。

[0048] 术语:

[0049] 除非另有定义,否则本文中所用的全部技术与科学术语均如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0050] 本文所使用的“侧向流免疫层析”包括现有的各种侧向流动快速检测技术,尤其是指竞争型测流式检测技术和三明治型侧流式检测技术。

[0051] 本文所使用的“样品”通常是疑似含有目标物的物质。

[0052] 如图1所述的侧向流免疫层析检测试条,其包括:样品垫、硝酸纤维素膜、吸收垫和聚氯乙烯底板。且典型地,所述硝酸纤维素膜预先包被与标记抗体的识别位点不同的检测抗体以及质控线抗体。

[0053] 当所述的检测抗体、质控线抗体和待测复合物结合后,在硝酸纤维素膜上形成颜色深浅或荧光强度不同的检测区反应带,靠近样品垫的反应带是检测线、远离样品垫的反应带是质控线。

[0054] 本发明的显著提高侧向流免疫层析检测试条检测信号强度的方法,所述的提高检测信号强度的方法包括步骤:

[0055] (a) 样品与标记在荧光微球上的抗体体外混合后加入到层析试纸的样品垫上;

[0056] (b) 样品中的待分析物与标记在荧光微球上的抗体结合后形成待测复合物,并且待测复合物随层析流逐步扩散至硝酸纤维素膜;

- [0057] (c) 在硝酸纤维素膜上划分检测线和质控线;
- [0058] (d) 在样品垫和检测线之间的硝酸纤维素膜上进行打孔修饰,并得到1-10排修饰孔形成的修饰区。
- [0059] 具体地,所述的打孔修饰通过激光切割机或打孔机实现。
- [0060] 在另一优选例中,所述的打孔修饰可以通过在硝酸纤维素膜上喷加疏水性的油墨实现。
- [0061] 在另一优选例中,所述的修饰孔为对齐排列、间或排列或其组合。
- [0062] 在另一优选例中,所述的修饰孔优选为间或排列。
- [0063] 在另一优选例中,所述的修饰孔的深度为0.01mm-0.30mm、所述修饰孔孔径为0.01mm-0.25mm、所述修饰孔的间距为0.1mm-1.0mm。
- [0064] 在另一优选例中,所述的所述的修饰孔的深度为0.015mm-0.25mm、所述修饰孔孔径为0.15mm-0.25mm、所述修饰孔的间距为0.15mm-1.0mm。
- [0065] 本发明在样品垫与检测线之间的硝酸纤维素膜进行打孔,修饰孔形成的修饰区能够让液体形成漩涡流,通过提高内容物的碰撞几率和流经时间来增加标记抗体和待侧复合物接触结合的几率,进而达到待检测复合物被捕获的量的增加、减少体外混匀的时间、提升测量灵敏度、降低测量极限值、和/或提高检测信号的目的。
- [0066] 在另一优选例中,所述的修饰孔间距多少以及孔径大小的修饰标准是:修饰孔不阻塞液体流过修饰区且液体在修饰区的流速适中,且所述的修饰孔深度根据膜的厚度调整,且所述的修饰孔不会打穿底板。
- [0067] 为检测本发明能够显著提高检测信号强度,则检测信号强度的方法包括以下步骤:
- [0068] (I) 将标准品与标记抗体的荧光微球体外混匀30秒后滴加到样品垫,平放静置900秒;
- [0069] (II) 利用检测器的探头,从样品垫方向移动至吸收垫,读取包括检测线和质控线在内的150-200个点;
- [0070] (III) 分别对检测线和质控线的峰面积进行积分,分别记为检测A、质控A;
- [0071] (IV) 计算检测AP的值以校准颗粒量不同引起的误差,且 $TAP = TA / TA + CA$ 。
- [0072] 对本发明的侧向流免疫层析检测试条进行检测信号强度,使用的样品是液态样品。
- [0073] 在另一优选例中,所述的样品包括:生物样品、环境样品、食品或其组合。
- [0074] 在另一优选例中,所述的样品是生物液体或衍生自生物液体。
- [0075] 在另一优选例中,所述的样品包括:血液、血清、血浆、口腔液、汗液、尿液、脊髓液、食物、水、土壤或其组合。
- [0076] 本发明使用内部放置有层析试纸的免疫层析检测试条。样品与标记在荧光微球上的抗体体外混合后加入到层析试纸的样品垫上,样品中的待分析物与标记在荧光微球上的抗体结合形成待测复合物并且随层析流逐步扩散至检测区。检测区为硝酸纤维素膜,其上预先包被有另一种检测抗体(与标记抗体的识别位点不同)和定标带抗体。
- [0077] 包被的抗体和待测复合物结合后,会在相应区域内形成颜色深浅或荧光强度不同的检测区带反应线,分别成为检测线和质控线,仪器通过检测被检测线、质控线捕获的待物

分析物中的荧光微球的亮度来对待测物进行定量。

[0078] 本发明在样品垫与检测线之间的硝酸纤维素膜上进行了打孔修饰,如图1所示。其原理是在硝酸纤维素膜打出来的孔相当于增加了层析样品所要流过的路径,增加了液体流过该区域的时间,使得标记荧光微球的抗体和样品中的待测物有更多的时间结合。

[0079] 同时膜上的孔就像海里的礁石一样,在礁石附近的液体会形成涡旋流,流到孔附近的层析样品中的物质会得到更好的碰撞混合,从而增加待测物和抗体结合的机会。其原理图如图2。

[0080] 该打孔技术可通过激光切割机或打孔机完成,在样品垫与检测线之间可设置多排孔,每排孔之间可以是对齐排列,也可以是间或排列,较为推荐的是使用间或排列的方式,该方式理论上可以更好的混合液体。打孔示意图如图三。所打孔的排数从1到数排不等,孔径大小及间距以不阻塞液体流过该区域且流速适中为宜。如图三所示,修饰孔可以为对齐排列、间或排列及其组合。

[0081] 本发明的优点

[0082] (1) 通过硝酸纤维素膜的修饰,让液体流过修饰区域时形成漩涡流,增加标记抗体和待测物两者接触结合的几率,从而提高抗原和抗体的结合量,达到提高检测信号的目的。

[0083] (2) 通过对硝酸纤维素膜的修饰来降低检测限,减少或取代体外混合步骤。

[0084] (3) 待测物流过硝酸纤维素膜的修饰区的时间增加,并使得液体中的物质进行了充分的混合,增加了标记抗体与抗原结合的几率,从而降低检测限。

[0085] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,应理解,实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0086] 实施例1

[0087] 以测定肌钙蛋白cTnI标准品为例。

[0088] 用抗cTnI的鼠单抗标记荧光微球,用抗cTnI的羊多抗作为捕获抗体划在膜上作为检测线,以羊抗鼠多抗为质控线划膜抗体。将cTnI标准品与标记抗体的荧光微球体外混匀30秒后滴加到样品垫上,平放静置900秒后测定。检测器的探头从样品垫方向移动到吸收垫方向,共读取包括T线和C线在内的180个点。

[0089] 示意图如图四,通过电脑计算得出TY、CY的值,将T线、C线的峰面积进行积分得到TA、CA的值,用 $TA/TA+CA$ 来计算TAP的值以校准由于颗粒量不同带来的误差。将使用打孔修饰的膜和正常的膜得到的数值进行比较。正常NC膜与本发明的打孔修饰膜数据比较如表1所示。

[0090] 表1TnI标准品测量值

cTnI浓度ng/ml	正常NC膜		打孔修饰膜	
	TA	TAP	TA	TAP
0. 1	108.41	42.93	168.69	71.14
	76.52	32.72	180.74	74.60
0. 05	42.72	16.70	102.01	42.05
	39.14	15.70	85.22	35.81
0. 01	24.72	9.90	54.86	21.32
	19.30	7.54	48.45	20.27
0	13.50	5.39	23.80	11.48
	19.91	7.79	19.91	8.59

[0092] 将TA和TAP的值取品均值后进行统计,结果如表2。

[0093] 表2:正常膜与打孔膜的cTnI测量结果比较

cTnI浓度 ng/ml	正常膜TA	打孔修饰膜TA	Rd	TAP	TAP	Rd
0.1	108.41	174.71	61.15%	37.82266	72.8672	92.65%
0. 05	42.72	93.61	119.11%	16..2039	38.929	140.24%
0. 01	24.72	51.65	108.95%	8.723076	20.79318	138.37%
0	13.50	21.86	61.86%	6.589543	10.032	52.24%

[0095] 打孔修饰的膜的TA、TAP值较正常的膜而言都有了显著上升,相较零值而言,其他浓度的值上升更多,这使得0值和其他的值的差距拉开了,可测量的极限值降低了,原来只能将0和0.05ng/ml的cTnI区分开,现在无论是TA还是TAP都可以很好的将0和0.01ng/ml的cTnI区分开来。从而达到了提升测量灵敏度的效果。

[0096] 将TAP的值绘制成下图五所示,可明显看到打孔修饰后的膜的信号值得到明显的增加,区分度更好了。

[0097] 目前侧向流层析广泛应用于医疗诊断领域,包括定性检测的HCG检测,和目前一些定量检测包括PCT、CRP等等。但是侧向流层析的检测灵敏度远低于化学发光等方法,且预混匀操作较为繁琐。本发明旨在通过对层析膜的修饰达到使得流经液体充分混匀,从而增加待测物被捕获的几率,降低检测限,或减少体外混匀的时间。

[0098] 本发明旨在通过对膜的打孔修饰,使得检测抗体与目标待测物的混合更加充分,增加结合机率,从而使得捕获被检测到的几率提升,达到提升信号值的效果,尤其对于目标待测物含量很低的情况较为适用,原先无法与0值区分开的浓度可通过此方法区分开,达到增加检测灵敏度的效果。该方法还可以取代或部分取代预混匀步骤,通过在膜上检测抗体

与目标待测物的混合来取代加样前的预混匀,达到省时省力的效果。该发明除了可以使用激光切割机、打孔机等对膜进行打孔外,还可以通过在膜上喷加疏水性的油墨等方式形成与打孔类似的效果。本发明可以应用于临床诊断、第三方实验室、科研等领域。

[0099] 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。

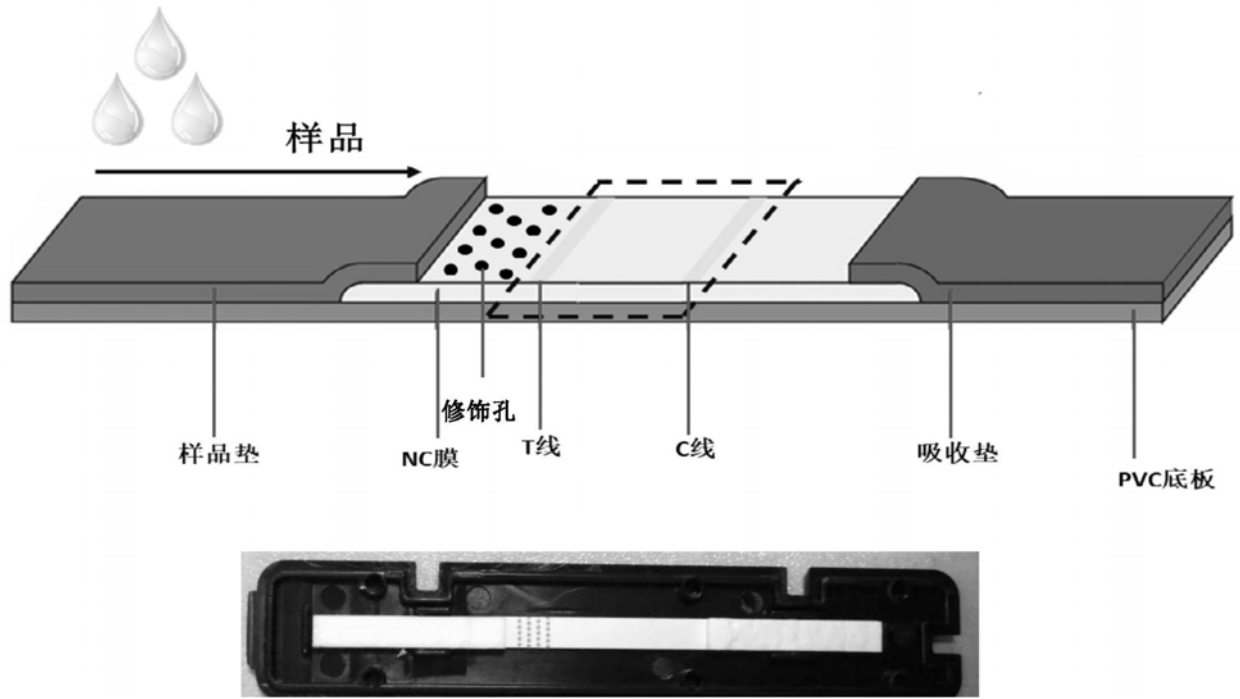


图1

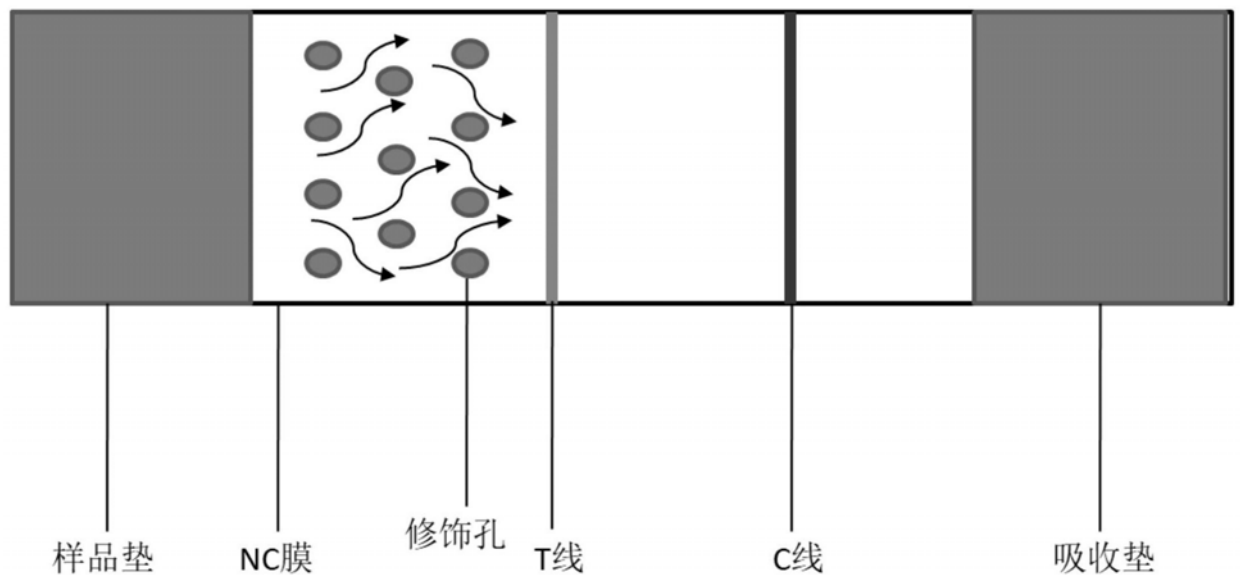


图2

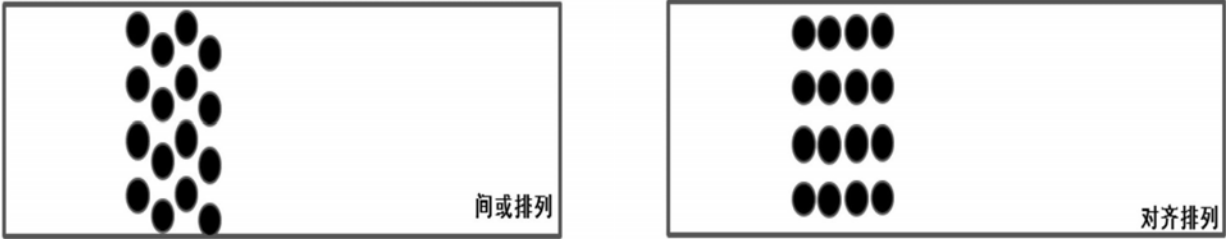


图3

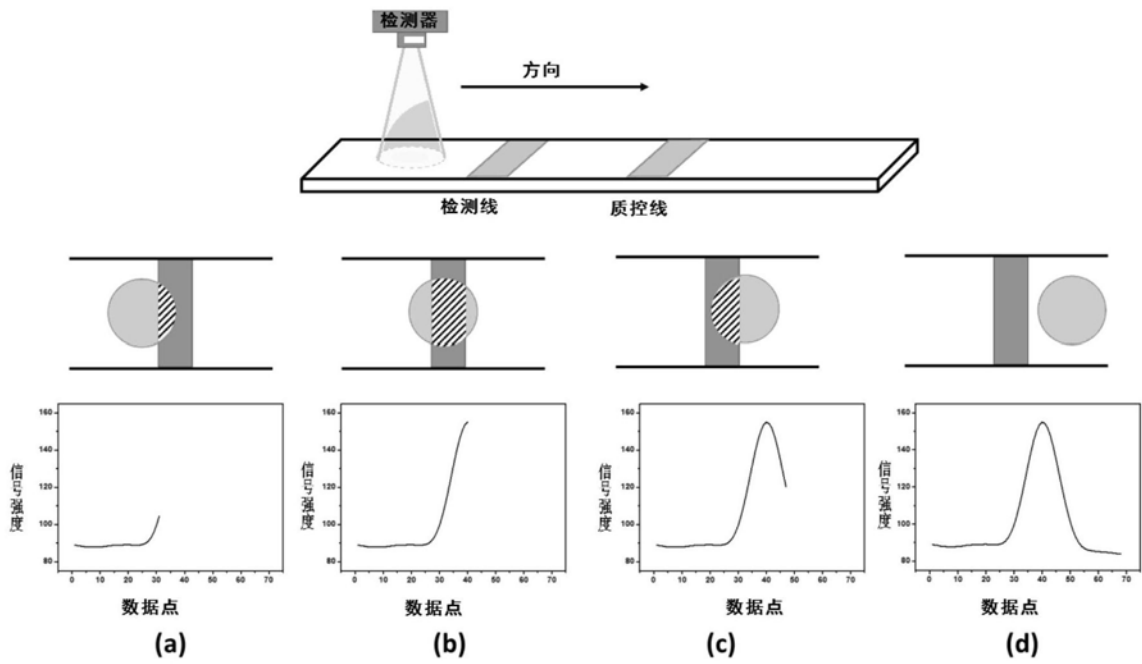


图4

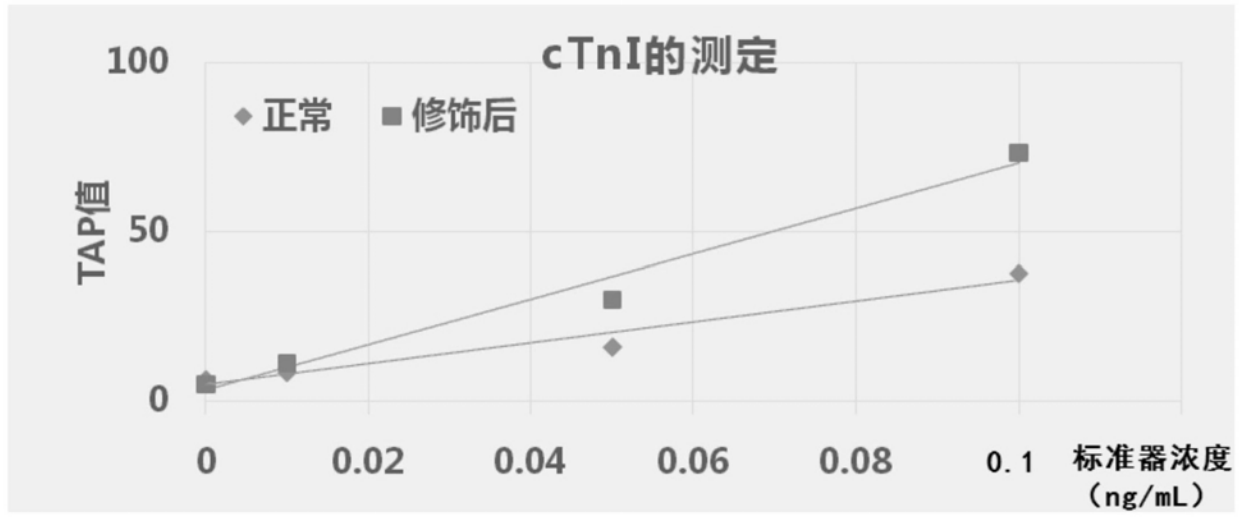


图5

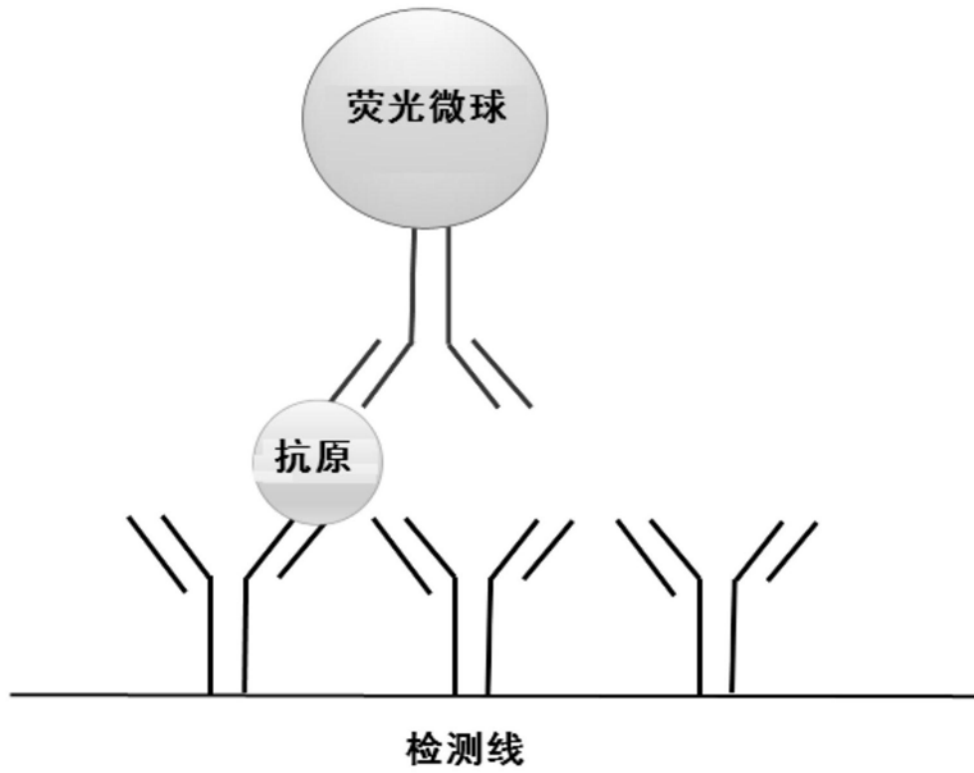


图6a

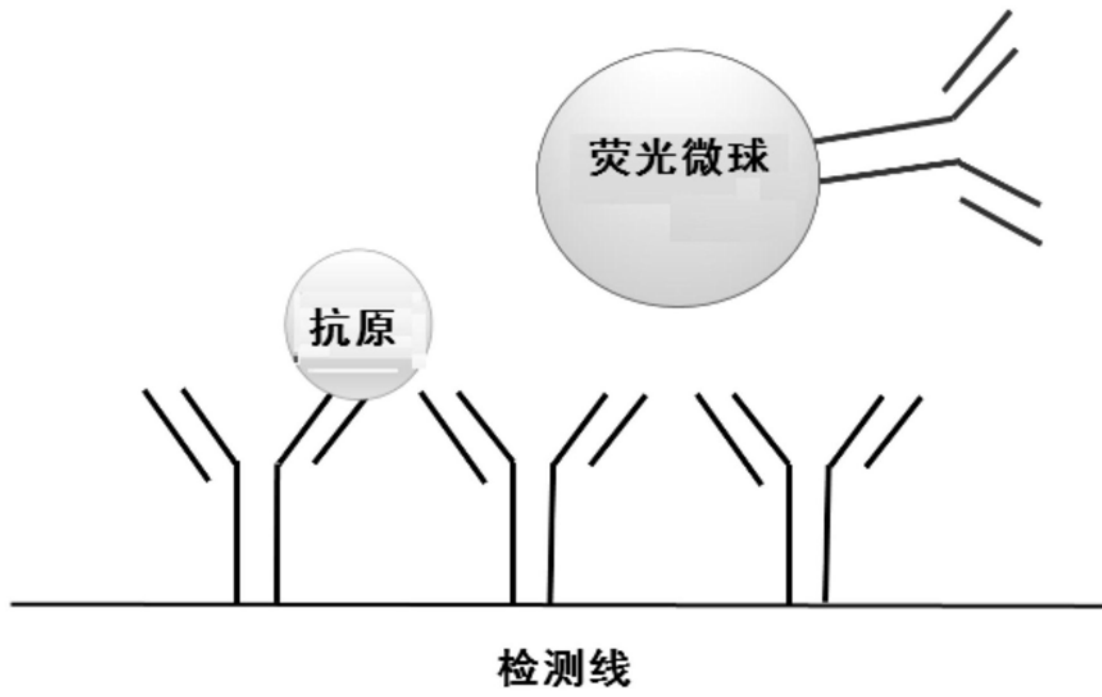


图6b