

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102866251 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 09

(21) 申请号 201210203323. 1

G01N 33/569 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 19

(71) 申请人 深圳市艾瑞生物科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市宝安区西乡街道
臣田社区宝田三路宝田工业区 22 栋 5
楼西边

(72) 发明人 谢爱武

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/571 (2006. 01)

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/74 (2006. 01)

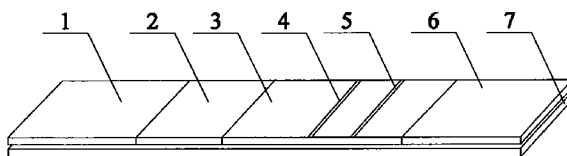
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 5 页

(54) 发明名称

基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用,试纸条采用磷光发光材料即铂/钷卟啉作为生物标记物,结果在绿色光照射下以红外光信号的形式表现出来,并可进行仪器判读,从而实现目标被检测物的定量检测。试纸条包括样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫和衬垫。结合物垫固定有磷光发光材料标记物,分析膜上固定有检测线和质控线。本发明还公开了该试纸条的制备方法和在生物样品定量检测中的应用。依据其待测物发生免疫反应方式的不同,将试纸条分为夹心法模式、竞争法模式、间接法模式和捕获法模式,依据检测对象的性质不同,可采用不同检测模式对样品中的不同待测物进行快速、灵敏地定性和定量检测分析。



1. 一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条,其特征在于,包括:样品垫、结合物垫、分析膜、检测线、质控线、吸水垫和衬垫,所述衬垫的一面涂覆有胶水或粘附双面胶,所述样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫依次粘附在涂覆有胶水或粘附双面胶的衬垫上,分析膜上面设有检测线和质控线。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述样品垫和结合物垫之间设有重叠区域,二者重叠1~2mm,重叠处样品垫在上,结合物垫在下。

3. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述结合物垫和分析膜之间设有重叠区域,二者重叠1~2mm,重叠处结合物垫在上,分析膜在下。

4. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述分析膜和吸水垫之间设有重叠区域,二者重叠1~2mm,重叠处吸水垫在上,分析膜在下。

5. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述检测线与质控线间隔5mm。

6. 一种权利要求1所述试纸条的制备方法,其特征在于,

①磷光材料标记物的制备:

将生物活性分子分别用缓冲液稀释,分别加入磷光材料溶解液,搅匀,室温反应至少1小时,用规格型号为G25的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记物,用磷酸盐缓冲液稀释混匀后保存;

②样品垫的制备:

用纤维素膜作为样品垫固相材料,裁切成条状,用0.01%~0.5%聚乙二醇、1%~5%牛血清白蛋白、0.01%~0.05%表面活性剂的0.01~0.3M磷酸盐缓冲液浸泡,缓冲液PH值为7.2~7.6,浸泡处理后,将样品垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

③结合物垫的制备:

用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料,裁切成条状,用含1%~5%牛血清白蛋白、0.1~2%聚乙二醇、0.5~2%蔗糖、0.01%~0.1%表面活性剂的0.01~0.1M pH7.2磷酸盐缓冲液稀释磷光材料标记物,制成悬液,用喷膜机喷涂在玻璃纤维素膜上,将结合物垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

④分析膜的制备:

用缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体至适合浓度,采用喷膜机分别喷涂在分析膜的检测线和质控线位置上,将喷膜后的分析膜放入真空干燥箱内,干燥后取出真空密封备用;

⑤吸水垫的制备:

选用1mm厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成25mmX300mm的条带,吸水垫在干燥环境保存备用;

⑥成品试纸条的制备:

按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠1~2mm;在分析膜下端粘附结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠1~2mm;再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠1~2mm;将衬垫以及上面粘贴的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫一同裁切成细条,即成一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条。

7. 根据权利要求6所述的试纸条的制备方法,其特征在于,所述生物活性分子为抗HBs

单克隆抗体 B、羊抗兔 IgG 抗体、HIV 抗原 B、兔抗吗啡单克隆抗体 B、鼠抗人 IgG 抗体或基因工程重组戊肝抗原。

8. 根据权利要求 6 所述的试纸条的制备方法,其特征在于,所述衬垫由聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成。

9. 根据权利要求 6 所述的试纸条的制备方法,其特征在于,所述磷光材料为金属卟啉系列荧光染料,所述金属卟啉为铂 / 钯卟啉,所述金属卟啉的激发光光谱范围为 390-420nm,发射光波长范围为 600-700nm。

10. 一种权利要求 6 所述制备方法制备的免疫荧光试纸条在检测生物样品中的应用,其特征在于,检测对象为全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、粪便以及前列腺液标本中抗原、抗体、药物、激素、毒品、抗生素、肿瘤标志物目标待测物,以及蔬菜、水果、食品、水源中农药、抗生素的残留检测。

基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用,属于免疫试纸技术领域。

背景技术

[0002] 免疫分析法是基于抗原与相应抗体间免疫结合反应,即利用抗体(或抗原)作为选择性试剂来测定抗原、半抗原(或抗体)的方法。抗体与抗原间反应有极高的特异性,从而对免疫分析样品不需或仅需简单的预处理。抗体-抗原复合物有较高的稳定性,其稳定常数一般为 10^9 ,甚至可达 10^{15} 。遗憾的是,虽然抗体-抗原结合可显示某种催化特性,但从分析测试的角度考虑,免疫反应缺乏使用高灵敏性试剂所具备的分析信号反差,难以直接检测。因此,免疫反应必须通过与放射性同位素示踪、荧光或化学发光标记等高灵敏的标记技术相结合,才能使其既具有极高的选择性,又具有极高的灵敏度。标记物的性质决定了信号检测的方法和其检测灵敏度,同时也影响和限制着测试方式的选择。根据标记物性质的不同,免疫分析法分为放射免疫分析法(RIA)、酶免疫分析法(EIA)、荧光免疫分析法(FIA)和化学发光免疫分析法(CLIA)等。由于荧光检测可以达到很高的灵敏度,又无放射性污染等环境问题,在免疫分析中占有十分重要的地位。为解决FIA受来自样品(特别是生物试样)较强且变化大的荧光背景,以及散射等因素的干扰问题,促进了长寿命、长波长荧光标记试剂(如镧系金属螯合物、卟啉类化合物)的合成和时间分辨荧光技术的发展,目前非同位素标记分析的灵敏度已达到或超过放射免疫分析方法。磷光分析法是荧光分析法的姊妹技术,相对于荧光,它又有其很多独特的优越性:(1) 有大的Stokes位移,磷光的波长比荧光的波长长,和激发光谱离得较远,不会和激发光谱重叠,不仅可减少或消除试样(特别是生物试样)本底荧光和入射激发光的干扰,自吸收现象也有减轻;(2) 由于 $T_1 \rightarrow S_0$ 自旋禁阻,磷光的寿命比荧光长,磷光的寿命约为 $10^{-3} \sim 10$ s,易于实现时间分辨测定;(3) 选择性更好。但到目前,磷光免疫分析并未得到应有的发展。究其原因,主要受到磷光发光材料的限制,尤其是水溶性高,生物相容性好的磷光发光材料的缺乏,故未开发一种既适合于免疫分析,又能显示磷光检测优势的磷光技术。

[0003] 尽管荧光免疫分析的研究和应用取得了广泛而深入的进展,但就磷光免疫分析而言,国内外尚都处于起步阶段。适于抗体(抗原)标记的、高发光效率磷光标记物的开发,是实现磷光免疫分析四个环节(抗体生产、标记试剂的选择、抗体(原)的标记、分析方式设计和分析信号检测)中最关键的环节。用于磷光免疫分析标记的试剂有三种:一是高发光量子产率的荧光试剂(如异硫氰酸荧光素FITC);二是镧系元素(Eu、Tb、Sm、Gd和Dy等)离子与某些配体(如4,7-二苯基-1,10-菲罗林二磺酸等)所形成的螯合物作为磷光标记物,发光波长处于长波,并有很长的发光寿命,能有效避开生物流体本底荧光的干扰,而且有很高的灵敏度。三是金属卟啉,特别是贵金属铂、钯的卟啉类化合物。金属卟啉是自然界中广泛存在的一类大环化合物,如血红素、叶绿素、VB12等,它们在生命体的新陈代谢以及很多基本生物过程中都起着不可忽视的作用。卟啉分子由四个吡咯环通过次甲基连结,形

成一四配位卟啉核。卟啉环非常稳定,可与直径为 3.7 埃的金属发生配位;它与过渡态金属形成的络合物尤其稳定,比如,Zn-四苯基卟啉(ZnTPP),其稳定常数为 10^{29} 。大部分金属都与卟啉形成 1 : 1 的络合物,只有 Na、K、Li 络合物的配合比为 2 : 1,两个金属原子分别位于卟啉环平面的上方和下方。如图 1 所示,描述了卟啉能量跃迁产生磷光的原理。卟啉的电子吸收光谱主要有 Soret 带(又称 B 带)和 Q 带。Soret 带位于 400 ~ 450nm 之间,摩尔吸光系数高($2 \sim 5 \times 10^5 \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)。而金属卟啉的 Soret 带吸收较弱,当环侧有亲电子基团时,Soret 带将向长波方向移动。卟啉的 Q 带一般在 450 ~ 650nm 之间,有四个相关峰;当吡咯环氮上的氢被金属离子取代形成金属卟啉后,四个相关峰减弱或消失。卟啉和金属卟啉由于具有 18 电子大 π 离域结构,所以,以其 B 带或 Q 带作为激发波长,均在 600 ~ 700nm 间(或更长的波长范围)有不同程度的荧光发射;一般情况下,金属卟啉的荧光强度要弱于卟啉。室温下,卟啉本身不发磷光,当与某些金属形成络合物并与有序介质(如表面活性剂、蛋白质和核酸等生物大分子)共存时才在近红外区发射磷光;但只有极少数的金属卟啉发磷光,最常见的为钯卟啉和铂卟啉。钯/铂卟啉具有极强的磷光,其特点是长寿命(ms),长波长(600 ~ 1000nm)。最常见的有水溶性 meso-四(4-磺酸苯基)卟啉($\text{H}_2\text{TSP}^{4-}$)和 meso-四(4-N-三甲氨基苯基)卟啉($\text{H}_2\text{TMAP}^{4+}$)的钯/铂络合物,以及非水溶性的八乙基卟啉(OEP)和四苯基-四苯并卟啉(Ph_4TBP)的钯/铂络合物等。600 ~ 1000nm 的近红外区是研究生物物质发光探针和光化学传感器的一个极为有用的区域。所以,具有特殊磷光特性的钯/铂卟啉便成为生物分析方面非常有效的探针分子,结合一些简单的检测仪器便可提供很高的灵敏度和选择性。

[0004] 如附图 14 所示,在外界激发下,铂卟啉在 650nm 发出强磷光,持续时间 100 微秒(吸收波范围 390-410nm),钯卟啉在 670nm 发出强磷光持续时间 500 微秒(吸收波范围 400-420nm)。这些卟啉粒子也有很大的 Stokes 位移(均为 280nm)。与其它发光材料相比较,钯/铂卟啉的优势在于极微的光漂白,使用便宜的强光源,如发光二极管就能有效激发。此外,生物样本和硝酸纤维素膜的背景荧光在 390-420nm 激发比在以铕离子为代表的时间分辨荧光的激发光波长 365nm 时都低。尽管 390-420nm 光透过硝酸纤维素膜也不尽理想,但优于 365nm 光,更适合于透射式测量。铂卟啉还可共价标记抗体,为检测各种样本提供了一个灵敏的快速检测技术。

[0005] 目前,免疫层析技术中所使用的标记物通常是酶、胶体金以及各种彩色微球标记物,这些标记物应用于免疫层析技术中有相同的特点:物理吸附方式标记和通过颜色判断检测结果。其中物理吸附方式标记(即疏水性和静电吸附原理)的特点使得其容易形成非特异性干扰,需要在生产工艺配方中添加非特异性干扰消除试剂,如吐温 20 等表面活性剂等,但使用这类试剂的同时,也容易造成基于这类标记物的假阳性或假阴性的结果。另外通过颜色判读结果在使用时必然受观察者主观影响大,尤其是弱阳性结果,且只能做出定性判断,而无法实现精确的定量判定。这些缺点大大限制了免疫层析技术在临床检测中的应用。

[0006] 公开号为 CN102087293A、公开日为 2011 年 6 月 8 日,名称为“一种全程定量检测肌钙蛋白 1 的免疫层析试纸条及其制备方法”的专利申请公开了一种荧光定量技术,但这类传统有机荧光材料没有解决其固有的光漂白问题;同时,生物样品自身荧光的干扰及有机荧光分子的光不稳定性等也降低了待测物的荧光信号,必将导致检测灵敏度偏低,检测线

性范围窄,难以满足临床检测的需求。

[0007] 公开号为 CN102192983A、公开日为 2011 年 9 月 21 日、名称为“时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条及其制备方法和应用”的专利申请则公开了其采用填充了镧系稀土元素及其螯合物的时间分辨荧光微球作为标记探针。但对现有稀土荧光生物标记探针来说,一个主要的缺点是几乎所有的镧系稀土荧光探针都需采用紫外光激发。到目前为止,已知的几种可见光激发镧系稀土元素配合物由于存在着水溶性差、极性配位溶剂中不稳定、荧光量子产率低或缺乏活性标记基团等问题而无法直接用于生物标记。这在很大程度上限制了这类探针在活体生物样品测定中的应用。

[0008] 中国专利号为 ZL200410034104.0、名称为“基于上转换发光技术免疫层析试纸条”的专利公开了一种免疫层析试纸条。其常用的上转换荧光材料主要以氟化物和氧化物为基质,掺杂 Yb 和 Er 等稀土元素。上转换纳米荧光材料的激发光为红外光,在此激发波长下生物样品具有极低的背景荧光,而检测波长在可见区,不存在复杂基质样品背景荧光干扰测定的问题。上转换纳米荧光材料的光学稳定性好,没有光漂白和褪色现象。目前阻碍上转换纳米荧光材料在生化分析中应用的主要问题是其较低的量子产率和大的粒径,一般很难得到粒径小于 50nm 的强荧光性上转换荧光材料。

[0009] 公开号为 CN1811449、公开日为 2006 年 8 月 2 日、名称为“量子点标记快速免疫层析试纸条的检测方法”和公开号为 CN101893623A、公开日为 2010 年 11 月 24 日、名称为“超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法”的专利申请均公开了基于量子点技术的免疫层析试纸。量子点纳米颗粒能够在光激发下发出荧光,作为一种新型的无机荧光纳米材料已被广泛地应用于生命科学领域,在生物医学研究中显示了很好的应用价值,使其成为生物传感和成像测定中重要的荧光探针。但作为荧光标记物使用时量子点仍然存在一些问题,如溶液中存在的聚集问题、生物标记后的稳定性问题、闪烁性荧光发光问题、复杂生物样品的背景荧光干扰问题、潜在的细胞毒性和对细胞生理过程的干扰问题等。

发明内容

[0010] 本发明的目的是为了解决上述背景技术提出的现有技术存在的问题,进而提供一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用。

[0011] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0012] 一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条,包括:样品垫、结合物垫、分析膜、检测线、质控线、吸水垫和衬垫,所述衬垫的一面涂覆有胶水或粘附双面胶,所述样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫依次粘附在涂覆有胶水或粘附双面胶的衬垫上,分析膜上面设有检测线和质控线。

[0013] 一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条的制备方法,

[0014] ①磷光材料标记物的制备:

[0015] 将生物活性分子分别用缓冲液稀释,分别加入磷光材料溶解液,搅匀,室温反应至少 1 小时,用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记物,用磷酸盐缓冲液稀释混匀后保存;

[0016] ②样品垫的制备:

[0017] 用纤维素膜作为样品垫固相材料,裁切成条状,用 0.01%~0.5% 聚乙二醇、

1%~5%牛血清白蛋白、0.01%~0.05%表面活性剂的 0.01~0.3M 磷酸盐缓冲液浸泡,缓冲液 PH 值为 7.2~7.6,浸泡处理后,将样品垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

[0018] ③结合物垫的制备:

[0019] 用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料,裁切成条状,用含 1%~5%牛血清白蛋白、0.1~2%聚乙二醇、0.5~2%蔗糖、0.01%~0.1%表面活性剂的 0.01~0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释磷光材料标记物,制成悬液,用喷膜机喷涂在玻璃纤维素膜上,将结合物垫放入真空干燥箱内干燥后取出,真空密封备用;

[0020] ④分析膜的制备:

[0021] 用缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体至适合浓度,采用喷膜机分别喷涂在分析膜的检测线和质控线位置上,将喷膜后的分析膜放入真空干燥箱内,干燥后取出真空密封备用;

[0022] ⑤吸水垫的制备:

[0023] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25mmX300mm 的条带,吸水垫在干燥环境保存备用;

[0024] ⑥成品试纸条的制备:

[0025] 按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠 1~2mm;在分析膜下端粘附结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠 1~2mm;再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠 1~2mm;将衬垫以及上面粘贴的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫一同裁切成细条,即成一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条。

[0026] 一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条在检测生物样品中的应用,检测对象为全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、粪便以及前列腺液标本中抗原、抗体、药物、激素、毒品、抗生素、肿瘤标志物目标待测物,以及蔬菜、水果、食品、水源中农药、抗生素的残留检测。

[0027] 本发明中,对于定量检测项目,通过建立待测物标准品与磷光信号强度标准曲线,来实现定量检测。对于定性检测项目,则通过建立待测物临界值 (Cut-off) 的方式,来实现结果的判定,检测结果 \geq Cut-off 值则为阳性,反之则为阴性结果。

[0028] 本发明具有以下优点:本发明采用磷光发光材料即铂/钷卟啉作为生物标记物,结果在绿色光照射下以红外光信号的形式表现出来,并可进行仪器判读,从而实现对目标被检测物的定量检测。本发明依据其待测物发生免疫反应方式的不同,将试纸条分为夹心法模式、竞争法模式、间接法模式和捕获法模式,依据检测对象的性质不同,可采用不同检测模式对样品中的不同待测物进行快速、灵敏地定性和定量检测分析。

附图说明

[0029] 图 1 为磷光产生原理示意图;

[0030] 图 2 为基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条的结构示意图;

[0031] 图 3 为夹心法模式反应示意图;

[0032] 图 4 为竞争法模式反应示意图;

- [0033] 图 5 为间接法模式反应示意图；
- [0034] 图 6 为捕获法模式反应示意图；
- [0035] 图 7 为装配试纸条时各部分的粘贴示意图；
- [0036] 图 8 为免疫层析试纸条的结构示意图；
- [0037] 图 9 为试纸条检测卡的外部俯视图；
- [0038] 图 10 为试纸条检测卡内部结构图（上为盖板，下位背板）；
- [0039] 图 11 为双抗体夹心法模式检测标准工作曲线图；
- [0040] 图 12 为竞争法模式检测标准工作曲线图；
- [0041] 图 13 为磷光材料的化学结构式示意图；
- [0042] 图 14 为磷光材料的激发和发射光谱曲线图。

具体实施方式

[0043] 下面将结合附图对本发明做进一步的详细说明：本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式，但本发明的保护范围不限于下述实施例。

[0044] 如图 2、图 7 和图 8 所示，本实施例所涉及的一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条，包括：样品垫 1、结合物垫 2、分析膜 3、检测线 4、质控线 5、吸水垫 6 和衬垫 7，所述衬垫 7 的一面涂覆有胶水或粘附双面胶，所述样品垫 1、结合物垫 2、分析膜 3 和吸水垫 6 依次粘附在涂覆有胶水或粘附双面胶的衬垫 7 上，分析膜 3 上面设有检测线 4 和质控线 5。

[0045] 所述样品垫 1 和结合物垫 2 之间设有重叠区域，二者重叠 1 ~ 2mm，重叠处样品垫 1 在上，结合物垫 2 在下。

[0046] 所述结合物垫 2 和分析膜 3 之间设有重叠区域，二者重叠 1 ~ 2mm，重叠处结合物垫 2 在上，分析膜 3 在下。

[0047] 所述分析膜 3 和吸水垫 6 之间设有重叠区域，二者重叠 1 ~ 2mm，重叠处吸水垫 6 在上，分析膜 3 在下。

[0048] 所述检测线 4 与质控线 5 间隔 5mm。

[0049] 样品垫 1 是试纸条在使用过程中滴加待测样品的部位。结合物垫 2 中固定有磷光材料标记抗原或磷光材料标记抗体等活性分子结合物，在加入待测样品后，在此开始发生抗原-抗体免疫反应。分析膜 3 是层析试纸的核心部分，在其表面上分别固定有检测线 4 和质控线 5；检测线 4 含有与待测样品发生免疫反应的抗原或抗体，质控线 5 含有与磷光材料标记物产生免疫反应的抗体。吸水垫 6 在整个检测过程中，通过虹吸作用提供液体流过整个试纸条的动力。各部分之间有重叠区域，以保证液体在试纸条上流动的连续性。当进行检测时，样品滴加在样品垫 1 上，样品通过渗透和虹吸作用进入结合物垫 2，使其中的磷光材料标记物溶解释放，在吸水垫 6 的虹吸作用下，液体进入分析膜 3，依次流经检测线 4 和质控线 5，并发生特异性免疫反应，产生具有指示性的磷光信号。

[0050] 一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条的制备方法，

[0051] ①磷光材料标记物的制备：

[0052] 将生物活性分子分别用缓冲液稀释，分别加入磷光材料溶解液，搅匀，室温反应至少 1 小时，用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化，收集标记物，用磷酸盐缓冲液稀释混匀后保存；

[0053] ②样品垫的制备：

[0054] 用纤维素膜作为样品垫固相材料，裁切成条状，用 0.01%～0.5% 聚乙二醇、1%～5% 牛血清白蛋白、0.01%～0.05% 表面活性剂的 0.01～0.3M 磷酸盐缓冲液浸泡，缓冲液 PH 值为 7.2～7.6，浸泡处理后，将样品垫放入干燥箱内干燥后取出，真空密封备用；

[0055] ③结合物垫的制备：

[0056] 用玻璃纤维素膜作为结合物垫固相材料，裁切成条状，用含 1%～5% 牛血清白蛋白、0.1～2% 聚乙二醇、0.5～2% 蔗糖、0.01%～0.1% 表面活性剂的 0.01～0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释磷光材料标记物，制成悬液，用喷膜机喷涂在玻璃纤维素膜上，将结合物垫放入干燥箱内干燥后取出，真空密封备用；

[0057] ④分析膜的制备：

[0058] 用缓冲液稀释检测线和质控线所使用的抗体至适合浓度，采用喷膜机分别喷涂在分析膜的检测线和质控线位置上，将喷膜后的分析膜放入干燥箱内，干燥后取出真空密封备用；

[0059] ⑤吸水垫的制备：

[0060] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料，将其裁切成 25mmX300mm 的条带，吸水垫在干燥环境保存备用；

[0061] ⑥成品试纸条的制备：

[0062] 按照反应顺序，先将分析膜粘附在衬垫中间位置上，在分析膜上端粘附吸水垫，吸水垫在分析膜上方，二者重叠 1～2mm；在分析膜下端粘附结合物垫，结合物垫在分析膜上方，二者重叠 1～2mm；再在结合物垫下端粘贴样品垫，样品垫在结合物垫上方，二者重叠 1～2mm；将衬垫以及上面粘贴的样品垫、结合物垫、分析膜和吸水垫一同裁切成细条，即成一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条。

[0063] 如图 9 和图 10 所示，将试纸条装配于塑料卡内，样品垫正对加样孔，分析膜正对检测窗，即成为一种快速定量检测的免疫层析检测卡。

[0064] 所述生物活性分子为抗 HBs 单克隆抗体 B、羊抗兔 IgG 抗体、HIV 抗原 B、兔抗吗啡单克隆抗体 B、鼠抗人 IgG 抗体或基因工程重组戊肝抗原 (HEV-Ag)。

[0065] 所述衬垫 7 由聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制成。

[0066] 如图 14 所示，所述磷光材料为金属卟啉系列荧光染料，所述金属卟啉为铂 / 钿卟啉，所述金属卟啉的激发光光谱范围为 390-420nm，发射光波长范围为 600-700nm。

[0067] 一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条在检测生物样品中的应用，检测对象为全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、粪便以及前列腺液标本中抗原、抗体、药物、激素、毒品、抗生素、肿瘤标志物目标待测物，以及蔬菜、水果、食品、水源中农药、抗生素的残留检测。

[0068] 本发明中，对于定量检测项目，通过建立待测物标准品与磷光信号强度标准曲线，来实现定量检测。对于定性检测项目，则通过建立待测物临界值 (Cut-off) 的方式，来实现结果的判定，检测结果 \geq Cut-off 值则为阳性，反之则为阴性结果。

[0069] 当进行样品检测时，将样品滴加在样品垫上，样品通过渗透和虹吸作用进入结合物垫，使其中的磷光材料标记的结合物重新溶解，并在吸水垫的虹吸作用下，从结合物垫释

放并进入分析膜,向吸水垫方向流动。在分析膜中移动过程中,磷光标记物、目标待测物、检测线、质控线之间将发生特异性的免疫反应,并在检测线和质控线产生具有指示性的光信号。依据在试纸条上检测线所发生免疫学反应方式的不同,可将试纸条分为夹心法模式、竞争法模式、间接法模式和捕获法模式。

[0070] 夹心法模式试纸条主要用于检测样品中的大分子蛋白,如病原体微生物感染产生的抗原抗体等。对抗原进行检测的方法为双抗体夹心法,对抗体进行检测的方法为双抗原夹心法。附图 3 即为夹心法模式试纸条示意图。在双抗体夹心法试纸条制备过程中,首先将磷光材料标记目标待测物特异性抗体 A8(即仅能与目标待测物 A 抗原表位反应),并固定在结合物垫内;将待测物特异性抗体 B10(即仅能与目标待测物 B 抗原表位反应)固定在分析膜检测线;将能与特异性抗体 A 反应的二抗 11 固定在分析膜的质控线。在检测过程中,当检测线和质控线同时都产生磷光信号,是为阳性反应结果,说明检测样品中含有目标待测物 9;当检测线没有产生磷光信号而质控线产生磷光信号,是为阴性反应结果,说明检测样品中不含有目标待测物 9。在夹心法模式中,检测线磷光信号强度的高低与样品中目标待测物 9 浓度成正比关系,即目标待测物 9 浓度越高,磷光信号强度越高。

[0071] 将上述抗体 A 与抗体 B 更换成抗原 A 和抗原 B,即建立双抗原夹心法试纸条,可对病原体微生物感染产生的抗体进行检测。检测过程、结果判断与双抗体夹心法检测抗原相同。

[0072] 竞争法模式试纸条主要用于检测样品中的小分子抗原、半抗原。如乙肝病毒 e 抗体和核心抗体、小分子激素、药物、毒品以及食品中残留的农药及抗生素等成分。附图 4 即为竞争法模式试纸条示意图。在竞争法试纸条制备过程中,首先将磷光材料标记目标待测物特异性抗体 A12(即仅能与目标待测物 A 抗原表位反应),并固定在结合物垫内;然后将目标待测物抗原 13(含有抗体 A 特异性反应抗原表位 A)固定在分析膜检测线;将能与特异性抗体 A 反应的二抗 15 固定在分析膜的质控线。当样品中目标待测物 13 浓度高时,检测线不产生磷光信号而质控线产生磷光信号,是为阳性反应结果,说明检测样品中含有超过一定浓度的目标待测物 13;当检测线和质控线都产生磷光信号,是为阴性反应结果,说明检测样品中目标待测物 13 低于一定浓度甚至浓度为零。在竞争法模式中,检测线磷光信号强度的高低与样品中目标待测物 13 浓度成反比关系,即目标待测物 13 浓度越高,磷光信号强度越低。

[0073] 间接法模式试纸条主要用于检测病原体微生物感染后产生的 IgG 抗体。附图 5 即为间接法模式试纸条示意图。在间接法试纸条制备过程中,首先将磷光材料标记抗抗体 16(主要是抗人免疫球蛋白 IgG 抗体),并固定在结合物垫内;然后将某种抗原 17 固定于分析膜检测线;将 IgG19 固定于分析膜质控线。在检测过程中,当检测线和质控线同时都产生磷光信号,是为阳性反应结果,说明检测样品中含有目标待测物 18;当检测线没有产生磷光信号而质控线产生磷光信号,是为阴性反应结果,说明检测样品中不含有目标待测物 18。在间接法模式中,检测线磷光信号强度的高低与样品中目标待测物 18 浓度成正比关系,即目标待测物 18 浓度越高,磷光信号强度越高。间接法的优点在于只要变换检测线抗原就可利用同一磷光标记抗抗体建立检测相应抗体的方法。以葡萄球菌蛋白 A 替代抗人免疫球蛋白 IgG 抗体,可实现对多种动物的 IgG 抗体的检测。间接法模式一般仅适用于检测总抗体或 IgG 抗体。如用间接法直接测定 IgM 抗体,因标本中一般同时存在较高浓度的 IgG 抗体,

后者将竞争结合固相抗原而使一部份 IgM 抗体不能结合到分析膜检测线上,从而影响检测灵敏度。同时,类风湿因子会干扰 IgM 的检测,导致特异性变差。

[0074] 捕获法模式试纸条主要用于检测病原体微生物感染后产生的 IgM 抗体。附图 6 即为捕获法模式试纸条示意图。在捕获法试纸条制备过程中,首先将磷光材料标记某种抗原 20,并固定在结合物垫内;然后将抗抗体 22(主要是抗人免疫球蛋白 IgM 抗体)固定于分析膜检测线;将能与抗原反应的特异性抗体 23 固定于分析膜质控线。在检测过程中,当检测线和质控线同时都产生磷光信号,是为阳性反应结果,说明检测样品中含有目标待测物 21;当检测线没有产生磷光信号而质控线产生磷光信号,是为阴性反应结果,说明检测样品中不含有目标待测物 21。在捕获法模式中,检测线磷光信号强度的高低与样品中目标待测物 21 浓度成正比关系,即目标待测物 21 浓度越高,磷光信号强度越高。

[0075] 本发明提供的磷光标记的生物活性分子,包括抗原、抗体、抗抗体、葡萄球菌蛋白 A、受体配体、药物、细胞等。

[0076] 磷光材料为铂/钇卟啉化合物,结构式见附图 13,R1-R8 修饰基团,用来标记抗原、抗体等生物活性分子,基团可以是氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、巯基(-SH)、硫氰酸基(-NCS)等任何一个或几个的组合,以硫氰酸基(-NCS)为首选。如图 14 所示,铂卟啉的激发光波长为 380nm,发射波长为 648nm;钇卟啉的激发波长为 393nm,发射波长为 667nm。本发明传感器的透镜及其焦距等具体光学结构和参数据此来设计。

[0077] 实施例 1:双抗体夹心法模式检测乙型肝炎病毒表面抗原 HBsAg

[0078] 定量检测乙型肝炎病毒表面抗原免疫层析试纸条制备方法,包括如下步骤:

[0079] 1、磷光发光材料标记抗 HBs 的制备:

[0080] 将抗 HBs 单克隆抗体 B 和羊抗兔 IgG 抗体,分别用 0.1M pH9.6 碳酸氢钠-碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 30mg 磷光发光材料金属卟啉溶解液,搅匀,室温孵育 1 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的金属卟啉标记抗 HBs 抗体 B 和羊抗兔 IgG 抗体,用含 0.1% 聚乙二醇、2% 牛血清白蛋白、2% 蔗糖、0.05% 表面活性剂的 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释,用试剂瓶密封包装,于 2~8℃ 条件下保存。

[0081] 2、样品垫的制备:

[0082] 选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料,将其裁切成 5mm X300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容容器内,用含 0.2% 聚乙二醇 6000、2.5% 牛血清白蛋白、0.03% 表面活性剂的 0.05M pH7.4 磷酸盐缓冲液浸泡 30min。浸泡处理后,将样品垫取出,置于洁净的网状支架上,放入 60℃ 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封备用。

[0083] 3、结合物垫的制备:

[0084] 选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体,将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将 2~8℃ 保存备用的金属卟啉标记抗 HBs 抗体 B 和羊抗兔 IgG 抗体,用含 1%-5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 聚乙二醇、0.5-2% 蔗糖、0.01%-0.1% 表面活性剂的 0.01-0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释制成悬液。用喷膜机喷膜划线,膜液量为 10ul/mm,然后置于洁净的网状支架上,放入 37℃ 的干燥箱内干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0085] 4、分析膜的制备:

[0086] 检测线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、海藻糖 0.5%、

牛血清白蛋白 0.5%，稀释抗 HBs 多克隆抗体 A 至终浓度 2mg/ml。

[0087] 质控线包被液的制备：用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液，内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%，稀释兔 IgG 至终浓度 0.5mg/ml。

[0088] 选用硝酸纤维素膜作为固相载体，将其裁切成 25mmX300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上，从下往上 10mm 处喷膜划线，膜液量为 2u1/mm，作为检测线。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上，从下往上 15mm 处喷膜划线，膜液量为 1.5u1/mm，作为质控线。检测线与质控线间隔 5mm，划线细致均匀，将分析膜放置 37℃ 干燥箱处理 50 分钟，取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0089] 5、吸水垫的制备：

[0090] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料，将其裁切成 25mmX300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0091] 6、制备检测 HBsAg 的免疫层析试纸条：

[0092] 按照反应顺序，先将分析膜粘附在衬垫中间位置上，在分析膜上端粘附上吸水垫，吸水垫在分析膜上方，二者重叠 1-2mm；在分析膜下端粘附上结合物垫，结合物垫在分析膜上方，二者重叠 1-2mm。再在结合物垫下端粘贴样品垫，样品垫在结合物垫上方，二者重叠 1-2mm。将粘贴好样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫的衬垫裁切成一定规格的细条，即成一种快速定量检测的免疫层析试纸条。将试纸条装配于塑料卡内，样品垫正对加样孔，分析膜正对检测窗，即成为一种快速定量检测的免疫层析检测卡。

[0093] 7、HBsAg 免疫层析试纸的检测：

[0094] 将待检测血清样品 20u1 加于检测卡加样孔中，再加入 100u1 pH7.20.05M 磷酸盐缓冲液，待反应 10min 后，用磷光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线，以得出结果。

[0095] 8、标准工作曲线的绘制：

[0096] 首先，将提纯的 HBsAg 标准品用 1 : 10 稀释的正常人血清（采用 pH7.20.02M PB 缓冲液稀释）作为稀释液配制系列浓度标准品，浓度为：0ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml 的 6 份样品。其次，每个样品分别用 10 个 HBsAg 试纸条检测 10 次，10 次检测仪器判读的样品检测 T 值和对照 C 值分别取平均值，最终根据二者的比值得出每个浓度对应的 T/C 结果，列于下表。（表 1）

[0097]

浓度 (ng/ml)	0	10	25	50	100	200
T 平均值	0.227	210.974	447.395	879.403	1784.198	3770.301
C 平均值	13.833	12.983	13.766	13.264	12.873	13.037
T/C	0.02	16.25	32.5	66.30	138.61	289.2

[0098] 以 T/C 值作为 X 坐标，以 HBsAg 浓度作为 Y 坐标绘制标准工作曲线，经统计拟合标准工作曲线的表达式为： $Y = 0.6923X + 1.5243$ ，拟合系数的平方为 $R^2 = 0.9991$ 。结果见附图 11：HBsAg 检测标准工作曲线。

[0099] 9、实际检测结果

[0100] 对实施例 1 的试纸条进行性能方面的测定,最低检测限为 0.01ng/ml。同时对临床样品进行检测。将 58 例收集自医院的 HBsAg 临床样品(其中阳性 37 份,阴性 21 份)同时用胶体金免疫层析试纸与本系统进行双盲法检测:

[0101] 胶体金免疫层析试纸法——31 份阳性,27 份阴性(即 6 份阳性漏检);

[0102] 铂卟啉试纸与仪器法——37 份阳性,21 份阴性,与实际结果完全吻合。同时,与胶体金免疫层析试纸的定性检测相比,铂卟啉试纸与仪器法给出了每份样品的最终浓度。

[0103] 将此 58 例收集自医院的 HBsAg 临床样品,同时与美国罗氏(Roche)公司 HBsAg 电化学发光法试剂检测进行相关性分析,以电化学发光检测结果作为 X 坐标,铂卟啉试纸与仪器法结果作为 Y 坐标绘制相关性分析曲线,表达式为 $Y = 0.9993X - 2.6157$,相关性系数为 $r = 0.9988$ 。按照统计学分析, $r > 95\%$, $P < 0.01$,具有正相关关系。

[0104] 在批内精密度方面,利用实施例 1 的试纸条,对含量分别为高值、中值和低值的样品,连续进行至少 10 次检测,计算变异系数(CV)。对于 HBsAg 含量高值(100ng/ml)、中值(40ng/ml)、低值(5ng/ml)样品各一份分别测定 10 次,根据其测定的数据,采用 SPSS 统计方法分析,以测定结果均值 \pm 标准差表示,高值 98.3 ± 3.6 ng/ml, CV2.9%;中值 39.6 ± 1.8 ng/ml, CV5.6%;低值 4.7 ± 0.6 ng/ml, CV7.9%;检测结果 CV 值均小于 15%。

[0105] 在批间精密度方面,利用实施例 1 的试纸条,对一份 HBsAg 临床阳性样品用 pH7.20.02M PB 缓冲液稀释 10 倍,连续进行至少 10 次检测,结果列于下表。计算该份样品重复检测的变异系数(CV)为 4.73%。(表 2)

[0106]

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	36.73	35.46	37.82	36.89	38.13
HBsAg 浓度 (ng/ml)	30.2	29.7	31.3	30.3	31.7
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	35.48	38.24	37.63	34.77	34.82
HBsAg 浓度 (ng/ml)	29.7	31.8	31.2	29.1	29.2

[0107] 由上述检测可见,本发明检测方法具有更高的灵敏度,且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0108] 实施例 2:双抗原夹心法模式检测艾滋病病毒抗体

[0109] 定性检测艾滋病病毒抗体免疫层析试纸条制备方法,括如下步骤:

[0110] 1、磷光发光材料标记 HIV 抗原的制备:

[0111] 将 HIV 抗原 B 和羊抗兔 IgG 抗体,分别用 0.05M pH9.6 碳酸氢钠-碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 30mg 磷光发光材料金属卟啉溶解液,搅匀,室温条件下孵育 1 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的金属卟啉标记 HIV 抗原 B 和羊抗兔 IgG 抗体,用含 0.1%聚乙二醇、2%牛血清白蛋白、2%蔗糖、0.05%表面活性剂的 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释,用试剂瓶密封

包装,于 2 ~ 8℃条件下保存。

[0112] 2、样品垫的制备:

[0113] 选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料,将其裁切成 5mm X300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容器内,用含 0.2% 聚乙二醇 6000、2.5% 牛血清白蛋白、0.03% 表面活性剂的 0.05M pH7.4 磷酸盐缓冲液浸泡 30min。浸泡处理后,将样品垫取出,置于洁净的网状支架上,放入 60℃ 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0114] 3、结合物垫的制备:

[0115] 选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体,将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将 2 ~ 8℃ 保存备用的金属卟啉标记 HIV 抗原 B 和羊抗兔 IgG 抗体,用含 1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 聚乙二醇、0.5-2% 蔗糖、0.01% -0.1% 表面活性剂的 0.01-0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释制成悬液。用喷膜机喷膜划线,膜液量为 10u1/mm,然后置于洁净的网状支架上,放入 37℃ 的干燥箱内,干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存备用。

[0116] 4、分析膜的制备:

[0117] 检测线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、海藻糖 0.5%、牛血清白蛋白 0.5%,稀释 HIV 抗原 A 至终浓度 2mg/ml。

[0118] 质控线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%,稀释兔 IgG 至终浓度 0.5mg/ml。

[0119] 选用硝酸纤维素膜作为固相载体,将其裁切成 25mmX300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 10mm 处喷膜划线,膜液量为 2u1/mm,作为检测线。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 15mm 处喷膜划线,膜液量为 1.5u1/mm,作为质控线。检测线与质控线间隔 5mm,划线细致均匀,将分析膜放置 37℃ 干燥箱处理 50 分钟,取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0120] 5、吸水垫的制备:

[0121] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25mmX300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0122] 6、制备检测 HIV 抗体的免疫层析试纸条:

[0123] 按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附上吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠 1-2mm;在分析膜下端粘附上结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠 1-2mm。再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠 1-2mm。将粘贴好样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫的衬垫裁切成一定规格的细条,即成一种快速定量检测的免疫层析试纸条。将试纸条装配于塑料卡内,样品垫正对加样孔,分析膜正对检测窗,即成为一种快速定量检测的免疫层析检测卡。

[0124] 7、HIV 抗体免疫层析试纸的检测:

[0125] 将待检测血清样品 20u1 加于检测卡加样孔中,再加入 100u1 pH7.20.05M 磷酸盐缓冲液,待反应 10min 后,用磷光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线,以得出结果。

[0126] 8、临界值 (Cut-off) 的确定

[0127] 在测定大量正常人血清样本的同时,测定相当数量的阳性血清样本,如测定值为正态分布,则根据 μ 检验的特点,以单侧 99.5% 的可信限先分别确定阴性和阳性的

Cut-off 值 ;如为非正态分布,则百分位数法单侧 95%或 99%来确定 Cut-off 值。阴性和阳性人群的 Cut-off 值确定后,根据“灰区”的大小,综合平衡考虑假阳性和假阴性率的情况下确定 Cut-off 值。测定值 \geq Cut-off 值即为检测结果阳性,反之则为阴性结果。

[0128] 9、实际检测结果

[0129] 对实施例 2 的试纸条进行性能方面的测定,最低检测限为 0.1ng/ml。同时对临床样品进行检测。将 65 例收集自医院的 HIV 临床样品(其中阳性 39 份,阴性 26 份)同时用胶体金免疫层析试纸与本系统进行双盲法检测:

[0130] 胶体金免疫层析试纸法——36 份阳性,29 份阴性(即 3 份阳性漏检);

[0131] 铂卟啉试纸与仪器法——39 份阳性,26 份阴性,与实际结果完全吻合。同时,与胶体金免疫层析试纸的定性检测相比,铂卟啉试纸与仪器法给出了每份样品的最终浓度。

[0132] 在批内精密度方面,利用实施例 2 的试纸条,对含量分别为高值、中值和低值的样品,连续进行至少 10 次检测,计算变异系数(CV)。对于 HIV 抗体含量高值(40ng/ml)、中值(20ng/ml)、低值(5ng/ml)样品各一份分别测定 10 次,根据其测定的数据,采用 SPSS 统计方法分析,以测定结果均值 \pm 标准差表示,高值 38.3 ± 3.2 ng/ml, CV3.8%;中值 18.6 ± 2.3 ng/ml, CV6.3%;低值 4.3 ± 0.8 ng/ml, CV9.9%;检测结果 CV 值均小于 15%。

[0133] 在批间精密度方面,利用实施例 2 的试纸条,对一份 HIV 临床阳性样品用 pH7.20.02M PB 缓冲液稀释 10 倍,联系进行至少 10 次检测,结果列于下表。计算该份样品重复检测的变异系数(CV)为 6.26%。(表 3)

[0134]

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	21.80	20.86	19.10	21.76	20.28
HIV 抗体浓度 (ng/ml)	11.2	10.8	9.5	11.2	10.6
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	19.81	19.58	20.58	22.73	19.13
HIV 抗体浓度 (ng/ml)	9.6	9.5	10.7	11.7	9.2

[0135] 由上述检测可见,本发明检测方法具有更高的灵敏度,且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0136] 实施例 3 :竞争法模式检测吗啡

[0137] 定量检测吗啡免疫层析试纸条制备方法,包括如下步骤:

[0138] 1、磷光发光材料标记抗吗啡抗体的制备:

[0139] 将兔抗吗啡单克隆抗体 B 和羊抗兔 IgG 抗体,分别用 0.05M pH9.6 碳酸氢钠-碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 30mg 磷光发光材料金属卟啉溶解液,搅匀,室温条件下孵育 1 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的金属卟啉标记兔抗吗啡抗体 B 和羊抗兔 IgG 抗体,用含 0.1%聚乙二醇、2%牛血清白蛋白、2%蔗糖、0.05%表面活性剂的 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释,

用试剂瓶密封包装,于 2 ~ 8℃条件下保存。

[0140] 2、样品垫的制备:

[0141] 选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料,将其裁切成 5mm X300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容器内,用含 0.2% 聚乙二醇 6000、2.5% 牛血清白蛋白、0.03% 表面活性剂的 0.05M pH7.4 磷酸盐缓冲液浸泡 30min。浸泡处理后,将样品垫取出,置于洁净的网状支架上,放入 60℃ 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0142] 3、结合物垫的制备:

[0143] 选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体,将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将 2-8℃ 保存备用的金属卟啉标记兔抗吗啡抗体 B 和羊抗兔 IgG 抗体,用含 1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 聚乙二醇、0.5-2% 蔗糖、0.01% -0.1% 表面活性剂的 0.01-0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释制成悬液。用喷膜机喷膜划线,膜液量为 10u1/mm,然后置于洁净的网状支架上,放入 37℃ 的干燥箱内,干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存备用。

[0144] 4、分析膜的制备:

[0145] 检测线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、海藻糖 0.5%、牛血清白蛋白 0.5%,稀释 BSA-吗啡偶联复合物或 OVA-吗啡偶联复合物至终浓度 2mg/ml。

[0146] 质控线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%,稀释兔 IgG 至终浓度 0.5mg/ml。

[0147] 选用硝酸纤维素膜作为固相载体,将其裁切成 25mmX300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 10mm 处喷膜划线,膜液量为 2u1/mm,作为检测线。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 15mm 处喷膜划线,膜液量为 1.5u1/mm,作为质控线。检测线与质控线间隔 5mm,划线细致均匀,将分析膜放置 37℃ 真空干燥箱处理 50 分钟,取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0148] 5、吸水垫的制备:

[0149] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25mmX300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0150] 6、制备检测吗啡的免疫层析试纸条:

[0151] 按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附上吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠 1-2mm;在分析膜下端粘附上结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠 1-2mm。再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠 1-2mm。将粘贴好样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫的衬垫裁切成一定规格的细条,即成一种快速定量检测的免疫层析试纸条。将试纸条装配于塑料卡内,样品垫正对加样孔,分析膜正对检测窗,即成为一种快速定量检测的免疫层析检测卡。

[0152] 7、吗啡免疫层析试纸的检测:

[0153] 将待检测样品 20u1 加于检测卡加样孔中,再加入 100u1 pH7.20.05M 磷酸盐缓冲液,待反应 10min 后,用磷光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线,以得出结果。

[0154] 8、标准工作曲线的绘制:

[0155] 首先,将纯品吗啡标准品用 pH7.2 0.02M PB 缓冲液稀释配制系列浓度标准品,浓度为:0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml 的 6 份样品。其次,每个样品分别用 10 个吗啡试纸条检测 10 次,10 次检测仪器判读的样品检测 T 值和对照 C 值分

别取平均值,最终根据二者的比值得出每个浓度对应的 T/C 结果见下表。(表 4)

[0156]

浓度 (ng/ml)	0	50	100	200	400	800
T 平均值	1211.70	882.90	923.59	679.69	422.57	65.35
C 平均值	15.8	12.700	14.456	12.662	11.552	11.797
T/C	76.69	69.52	63.89	53.68	36.58	5.54

[0157] 以 T/C 值作为 X 坐标,以吗啡浓度作为 Y 坐标绘制标准工作曲线,经统计拟合标准工作曲线的表达式为: $Y = -11.406X + 839.83$, 拟合系数的平方为 $R^2 = 0.993$ 。结果见附图 12:吗啡检测标准工作曲线。

[0158] 9、实际检测结果

[0159] 对实施例 3 的试纸条进行性能方面的测定,最低检测限为 50ng/ml。同时对临床样品进行检测。将 55 例收集自戒毒所的吸毒病人临床样品(其中阳性 33 份,阴性 22 份)同时用胶体金免疫层析试纸与本系统进行双盲法检测:

[0160] 胶体金免疫层析试纸法——31 份阳性,24 份阴性(即 2 份阳性漏检);

[0161] 铂卟啉试纸与仪器法——33 份阳性,22 份阴性,与实际结果完全吻合。同时,与胶体金免疫层析试纸的定性检测相比,铂卟啉试纸与仪器法给出了每份样品的最终浓度。

[0162] 在批内精密度方面,利用实施例 3 的试纸条,对含量分别为高值、中值和低值的样品,连续进行至少 10 次检测,计算变异系数(CV)。对于吗啡含量高值(800ng/ml)、中值(400ng/ml)、低值(100ng/ml)样品各一份分别测定 10 次,根据其测定的数据,采用 SPSS 统计方法分析,以测定结果均值 ± 标准差表示,高值 786.8 ± 22.7 ng/ml, CV4.3%;中值 389.6 ± 13.3 ng/ml, CV6.2%;低值 102.1 ± 7.9 ng/ml, CV9.4%;检测结果 CV 值均小于 15%。

[0163] 在批间精密度方面,利用实施例 3 的试纸条,对一份吗啡临床阳性样品用 pH7.20.02M PB 缓冲液稀释 10 倍,联系进行至少 10 次检测,结果列于下表。计算该份样品重复检测的变异系数(CV)为 7.86%。(表 5)

[0164]

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	33.68	35.57	36.59	34.58	38.09
吗啡浓度 (ng/ml)	446.1	427.4	422.8	451.5	415.4
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	35.22	37.56	36.88	34.65	35.82
吗啡浓度 (ng/ml)	428.5	421.6	429.2	449.4	426.5

[0165] 由上述检测可见,本发明检测方法具有更高的灵敏度,且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0166] 实施例 4 :间接法模式检测丙型肝炎病毒 IgG 抗体

[0167] 定性检测丙型肝炎病毒 IgG 抗体免疫层析试纸条制备方法,包括如下步骤:

[0168] 1、磷光发光材料标记抗人 IgG 抗体的制备:

[0169] 将鼠抗人 IgG 抗体,用 0.05M pH9.6 碳酸氢钠-碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 30mg 磷光发光材料金属卟啉溶解液,搅匀,室温条件下孵育 1 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的金属卟啉标记鼠抗人 IgG 抗体,用含 0.1% 聚乙二醇、2% 牛血清白蛋白、2% 蔗糖、0.05% 表面活性剂的 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释,用试剂瓶密封包装,于 2~8℃ 条件下保存。

[0170] 2、样品垫的制备:

[0171] 选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料,将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容容器内,用含 0.2% 聚乙二醇 6000、2.5% 牛血清白蛋白、0.03% 表面活性剂的 0.05M pH7.4 磷酸盐缓冲液浸泡 30min。浸泡处理后,将样品垫取出,置于洁净的网状支架上,放入 60℃ 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0172] 3、结合物垫的制备:

[0173] 选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体,将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将 2-8℃ 保存备用的金属卟啉标记鼠抗人 IgG 抗体,用含 1%-5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 聚乙二醇、0.5-2% 蔗糖、0.01%-0.1% 表面活性剂的 0.01-0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释制成悬液。用喷膜机喷膜划线,膜液量为 10ul/mm,然后置于洁净的网状支架上,放入 37℃ 的干燥箱内,干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0174] 4、分析膜的制备:

[0175] 检测线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、海藻糖 0.5%、牛血清白蛋白 0.5%,稀释基因工程重组 HCV 抗原至终浓度 2mg/ml。

[0176] 质控线包被液的制备:用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液,内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%,稀释鼠 IgG 至终浓度 0.5mg/ml。

[0177] 选用硝酸纤维素膜作为固相载体,将其裁切成 25mmX300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 10mm 处喷膜划线,膜液量为 2ul/mm,作为检测线。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上,从下往上 15mm 处喷膜划线,膜液量为 1.5ul/mm,作为质控线。检测线与质控线间隔 5mm,划线细致均匀,将分析膜放置 37℃ 干燥箱处理 50 分钟,取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0178] 5、吸水垫的制备:

[0179] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料,将其裁切成 25mmX300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0180] 6、制备检测 HCV-IgG 抗体的免疫层析试纸条:

[0181] 按照反应顺序,先将分析膜粘附在衬垫中间位置上,在分析膜上端粘附上吸水垫,吸水垫在分析膜上方,二者重叠 1-2mm;在分析膜下端粘附上结合物垫,结合物垫在分析膜上方,二者重叠 1-2mm。再在结合物垫下端粘贴样品垫,样品垫在结合物垫上方,二者重叠 1-2mm。将粘贴好样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫的衬垫裁切成一定规格的细条,即成一种快速定量检测的免疫层析试纸条。将试纸条装配于塑料卡内,样品垫正对加样孔,分析膜正对检测窗,即成为一种快速定量检测的免疫层析检测卡。

[0182] 7、HCV-IgG 抗体免疫层析试纸的检测：

[0183] 将待检测样品 20u1 加于检测卡加样孔中，再加入 100u1 pH7.2 0.05M 磷酸盐缓冲液，待反应 10min 后，用磷光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线，以得出结果。

[0184] 8、临界值 (Cut-off) 的确定

[0185] 在测定大量正常人血清样本的同时，测定相当数量的阳性血清样本，如测定值为正态分布，则根据 μ 检验的特点，以单侧 99.5% 的可信限先分别确定阴性和阳性的 Cut-off 值；如为非正态分布，则百分位数法单侧 95% 或 99% 来确定 Cut-off 值。阴性和阳性人群的 Cut-off 值确定后，根据“灰区”的大小，综合平衡考虑假阳性和假阴性率的情况下确定 Cut-off 值。测定值 \geq Cut-off 值即为检测结果阳性，反之则为阴性结果。

[0186] 9、实际检测结果：

[0187] 对实施例 4 的试纸条进行性能方面的测定，最低检测限为 0.2ng/ml。同时对临床样品进行检测。将 63 例收集自医院的肝炎病人临床样品（其中 HCV-IgG 抗体阳性 37 份，HCV-IgG 抗体阴性 26 份）同时用胶体金免疫层析试纸与本系统进行双盲法检测：

[0188] 胶体金免疫层析试纸法——31 份阳性，32 份阴性（即 6 份阳性漏检）；

[0189] 铂卟啉试纸与仪器法——37 份阳性，26 份阴性，与实际结果完全吻合。同时，与胶体金免疫层析试纸的定性检测相比，铂卟啉试纸与仪器法给出了每份样品的最终浓度。

[0190] 在批内精密度方面，利用实施例 4 的试纸条，对含量分别为高值、中值和低值的样品，连续进行至少 10 次检测，计算变异系数 (CV)。对于 HCV-IgG 抗体含量高值 (40ng/ml)、中值 (20ng/ml)、低值 (5ng/ml) 样品各一份分别测定 10 次，根据其测定的数据，采用 SPSS 统计方法分析，以测定结果均值 \pm 标准差表示，高值 40.8 ± 3.7 ng/ml, CV3.5%；中值 19.6 ± 1.8 ng/ml, CV5.2%；低值 5.1 ± 0.7 ng/ml, CV8.7%；检测结果 CV 值均小于 15%。

[0191] 在批间精密度方面，利用实施例 4 的试纸条，对一份丙肝病人临床阳性样品用 pH7.20.02M PB 缓冲液稀释 10 倍，联系进行至少 10 次检测，结果列于下表。计算该份样品重复检测的变异系数 (CV) 为 7.57%。（表 6）

[0192]

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	36.22	34.07	38.06	35.46	38.51
HCV-IgG 浓度 (ng/ml)	10.7	9.5	11.6	10.1	12.1
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	34.58	37.59	38.26	34.56	37.88
HCV-IgG 浓度 (ng/ml)	9.8	11.1	11.8	9.8	11.3

[0193] 由上述检测可见，本发明检测方法具有更高的灵敏度，且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0194] 实施例 5：捕获法模式检测戊型肝炎病毒 IgM 抗体 (HEV-IgM)

[0195] 定性检测戊型肝炎病毒 IgM 抗体免疫层析试纸条制备方法，包括如下步骤：

[0196] 1、磷光发光材料标记戊肝抗原的制备：

[0197] 将基因工程重组戊肝抗原 (HEV-Ag) 和羊抗兔 IgG 抗体, 分别用 0.05M pH9.6 碳酸氢钠 - 碳酸钠溶液稀释至 1mg/ml, 各取 5ml 抗体溶液, 分别加入 30mg 磷光发光材料金属卟啉溶解液, 搅匀, 室温条件下孵育 1 小时, 每隔 15 分钟混匀一次。最后用规格型号为 G25 的凝胶柱过柱分离纯化, 收集标记好的金属卟啉标记 HEV-Ag 和羊抗兔 IgG 抗体, 用含 0.1% 聚乙二醇、2% 牛血清白蛋白、2% 蔗糖、0.05% 表面活性剂的 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释, 用试剂瓶密封包装, 于 2 ~ 8°C 条件下保存。

[0198] 2、样品垫的制备：

[0199] 选用纤维素膜作为样品垫的固相载体材料, 将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将样品垫至于长方形容容器内, 用含 0.2% 聚乙二醇 6000、2.5% 牛血清白蛋白、0.03% 表面活性剂的 0.05M pH7.4 磷酸盐缓冲液浸泡 30min。浸泡处理后, 将样品垫取出, 置于洁净的网状支架上, 放入 60°C 的干燥箱内干燥 80 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0200] 3、结合物垫的制备：

[0201] 选用玻璃纤维素膜作为结合物垫的固相载体, 将其裁切成 5mmX300mm 规格的条带。将 2 ~ 8°C 保存备用的金属卟啉标记 HEV-Ag 和羊抗兔 IgG 抗体, 用含 1% -5% 牛血清白蛋白、0.1-2% 聚乙二醇、0.5-2% 蔗糖、0.01% -0.1% 表面活性剂的 0.01-0.1M pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释制成悬液。用喷膜机喷膜划线, 膜液量为 10ul/mm, 然后置于洁净的网状支架上, 放入 37°C 的干燥箱内, 干燥 60 分钟后取出用铝箔袋抽真空密封保存。

[0202] 4、分析膜的制备：

[0203] 检测线包被液的制备: 用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液, 内含甲醇 1%、海藻糖 0.5%、牛血清白蛋白 0.5%, 稀释抗人 IgM 抗体至终浓度 2mg/ml。

[0204] 质控线包被液的制备: 用 50mM pH7.6 磷酸盐缓冲液, 内含甲醇 1%、牛血清白蛋白 0.8%, 稀释兔 IgG 至终浓度 0.5mg/ml。

[0205] 选用硝酸纤维素膜作为固相载体, 将其裁切成 25mmX300mm 规格的条带。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上, 从下往上 10mm 处喷膜划线, 膜液量为 2ul/mm, 作为检测线。用喷膜机在 25mm 宽的分析膜上, 从下往上 15mm 处喷膜划线, 膜液量为 1.5ul/mm, 作为质控线。检测线与质控线间隔 5mm, 划线细致均匀, 将分析膜放置 37°C 干燥箱处理 50 分钟, 取出后用铝箔袋抽真空装袋密封保存备用。

[0206] 5、吸水垫的制备：

[0207] 选用 1mm 厚的滤纸作为吸水垫固相材料, 将其裁切成 25mmX300mm 的条带。吸水垫在干燥环境保存备用。

[0208] 6、制备检测 HEV-IgM 抗体的免疫层析试纸条：

[0209] 按照反应顺序, 先将分析膜粘附在衬垫中间位置上, 在分析膜上端粘附上吸水垫, 吸水垫在分析膜上方, 二者重叠 1-2mm; 在分析膜下端粘附上结合物垫, 结合物垫在分析膜上方, 二者重叠 1-2mm。再在结合物垫下端粘贴样品垫, 样品垫在结合物垫上方, 二者重叠 1-2mm。将粘贴好样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫的衬垫裁切成一定规格的细条, 即成一种快速定量检测的免疫层析试纸条。将试纸条装配于塑料卡内, 样品垫正对加样孔, 分析膜正对检测窗, 即成为一种快速定量检测的免疫层析检测卡。

[0210] 7、HEV-IgM 抗体免疫层析试纸的检测：

[0211] 将待检测样品 20u1 加于检测卡加样孔中,再加入 100u1 pH7. 20. 05M 磷酸盐缓冲液,待反应 10min 后,用磷光生物传感器判读检测窗中的检测线和质控线,以得出结果。

[0212] 8、临界值 (Cut-off) 的确定

[0213] 在测定大量正常人血清样本的同时,测定相当数量的阳性血清样本,如测定值为正态分布,则根据 μ 检验的特点,以单侧 99.5% 的可信限先分别确定阴性和阳性的 Cut-off 值;如为非正态分布,则百分位数法单侧 95% 或 99% 来确定 Cut-off 值。阴性和阳性人群的 Cut-off 值确定后,根据“灰区”的大小,综合平衡考虑假阳性和假阴性率的情况下确定 Cut-off 值。测定值 \geq Cut-off 值即为检测结果阳性,反之则为阴性结果。

[0214] 9、实际检测结果

[0215] 对实施例 5 的试纸条进行性能方面的测定,最低检测限为 0.5ng/ml。同时对临床样品进行检测。将 58 例收集自医院的肝炎病人临床样品(其中 HEV-IgM 抗体阳性 35 份,HEV-IgM 抗体阴性 23 份)同时用胶体金免疫层析试纸与本系统进行双盲法检测:

[0216] 胶体金免疫层析试纸法——31 份阳性,27 份阴性(即 4 份阳性漏检);

[0217] 铂卟啉试纸与仪器法——37 份阳性,21 份阴性,与实际结果完全吻合。同时,与胶体金免疫层析试纸的定性检测相比,铂卟啉试纸与仪器法给出了每份样品的最终浓度。

[0218] 在批内精密度方面,利用实施例 5 的试纸条,对含量分别为高值、中值和低值的样品,连续进行至少 10 次检测,计算变异系数 (CV)。对于 HEV-IgM 抗体含量高值 (50ng/ml)、中值 (10ng/ml)、低值 (5ng/ml) 样品各一份分别测定 10 次,根据其测定的数据,采用 SPSS 统计方法分析,以测定结果均值 \pm 标准差表示,高值 50.8 ± 3.7 ng/ml, CV3.1%;中值 9.6 ± 1.3 ng/ml, CV5.8%;低值 4.6 ± 0.8 ng/ml, CV8.9%;检测结果 CV 值均小于 15%。

[0219] 在批间精密度方面,利用实施例 5 的试纸条,对一份戊肝病人临床阳性样品用 pH7. 20. 02M PB 缓冲液稀释 10 倍,联系进行至少 10 次检测,结果列于下表。计算该份样品重复检测的变异系数 (CV) 为 7.46%。(表 7)

[0220]

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	46.54	44.72	43.57	46.48	48.22
HEV-IgM 浓度 (ng/ml)	5.6	4.6	29.1	5.5	6.8
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	45.43	47.56	47.88	44.37	44.45
HEV-IgM 浓度 (ng/ml)	5.1	6.1	6.3	4.3	4.4

[0221]

[0222] 由上述检测可见,本发明检测方法具有更高的灵敏度,且在实现批内、批间精确定量检测的同时具有很好的重复性。

[0223] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,这些具体实施方式都是基于本发明

整体构思下的不同实现方式,而且本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

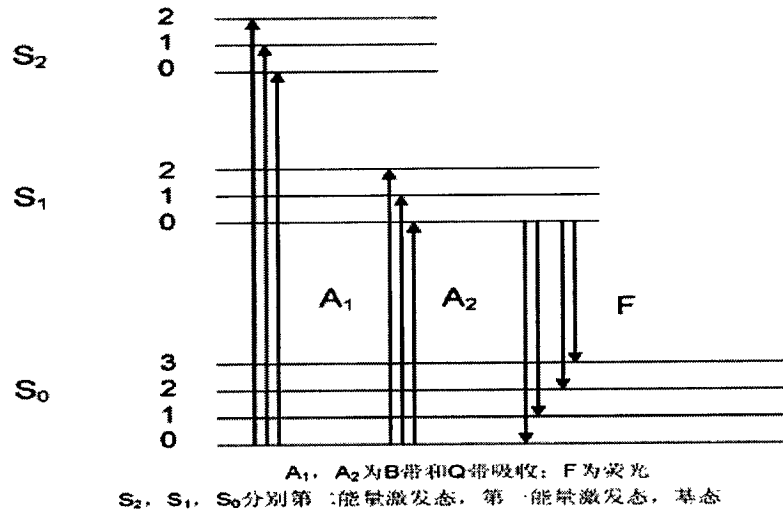


图 1

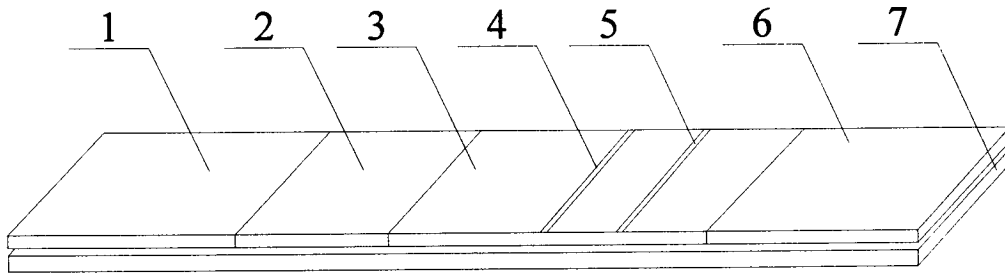


图 2

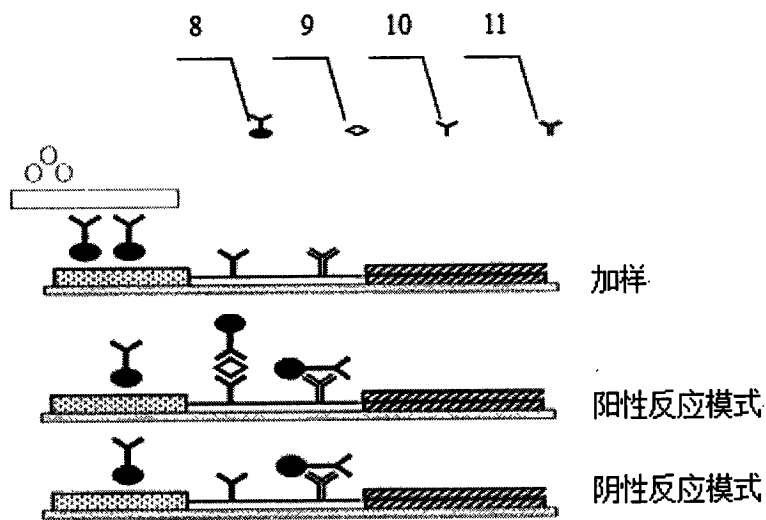


图 3

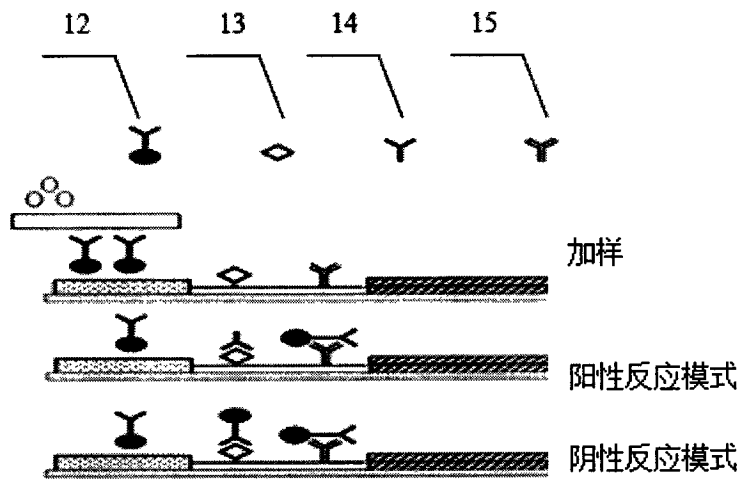


图 4

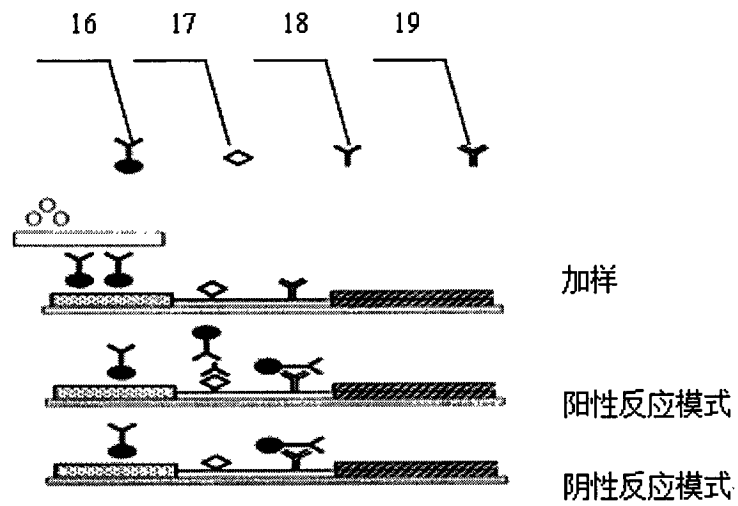


图 5

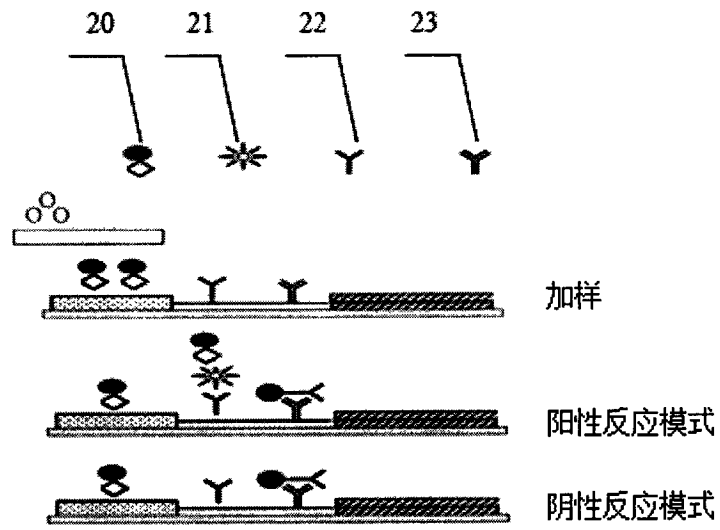


图 6

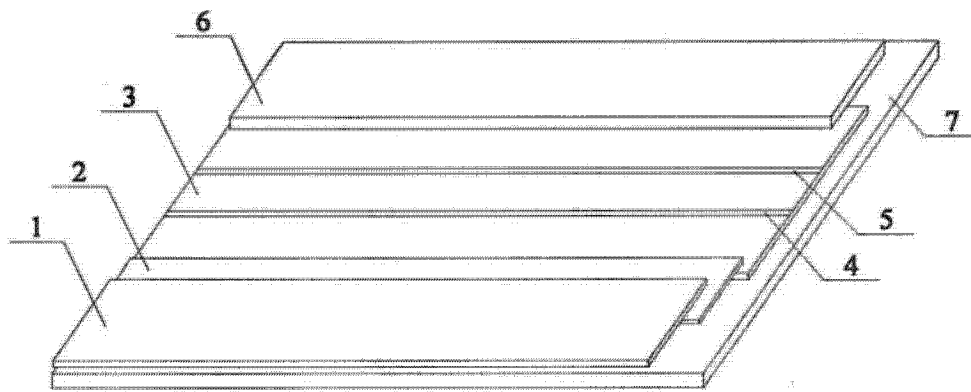


图 7

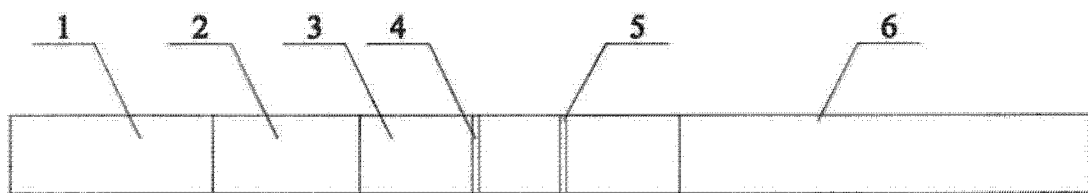


图 8

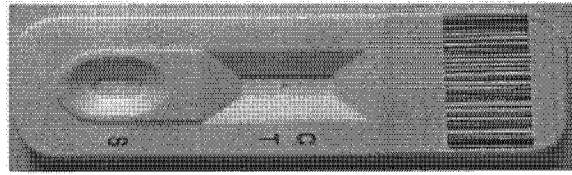


图 9

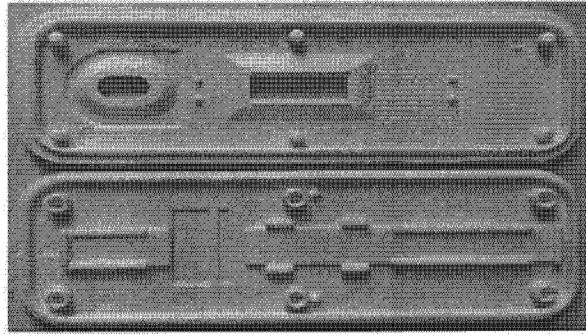


图 10

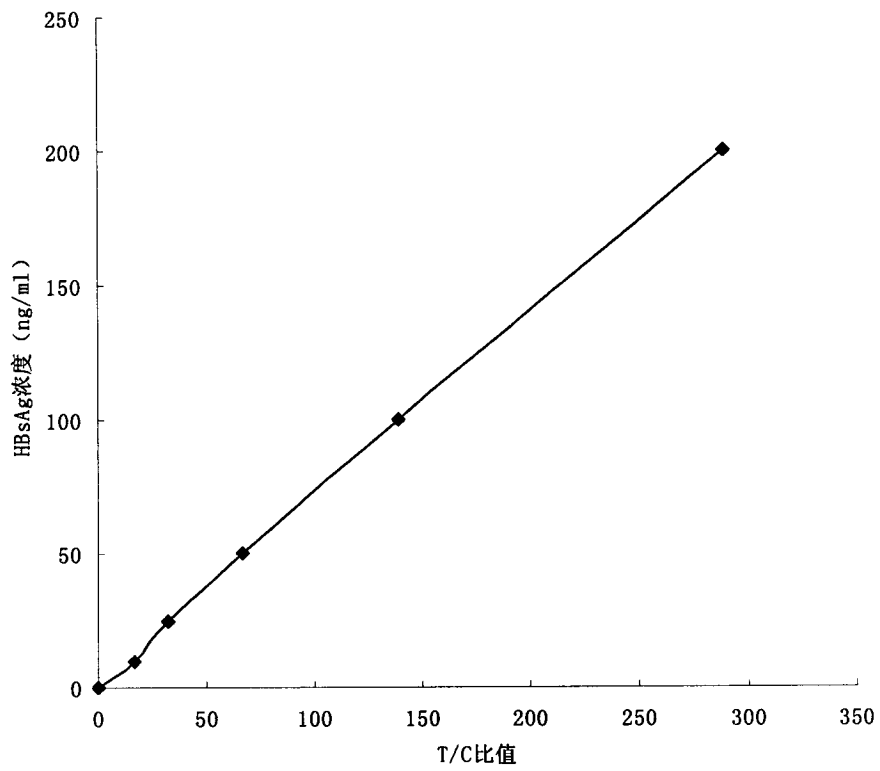


图 11

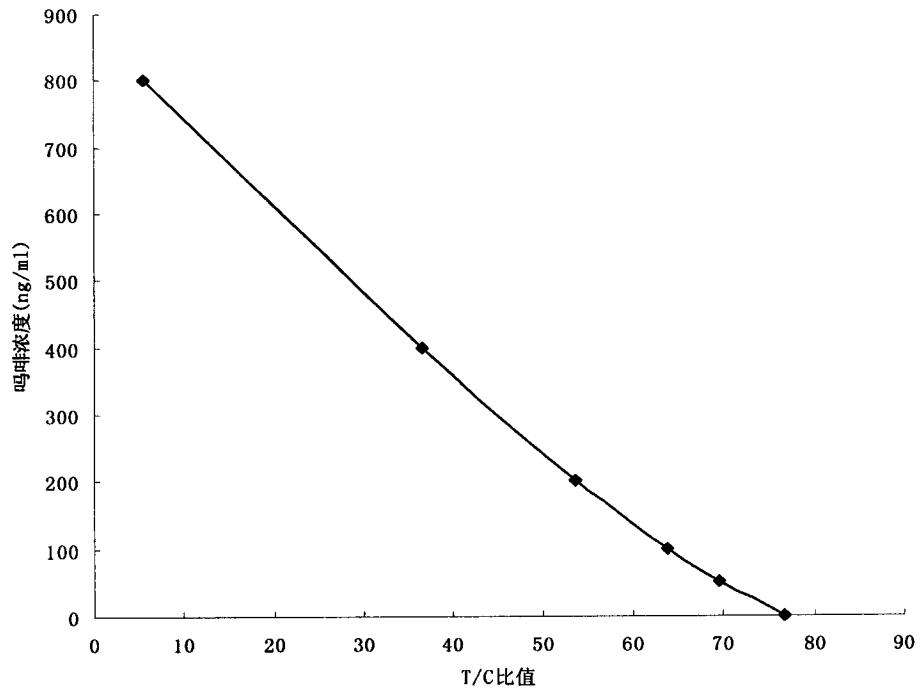


图 12

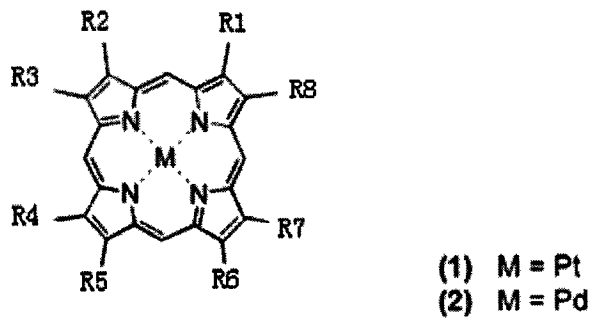


图 13

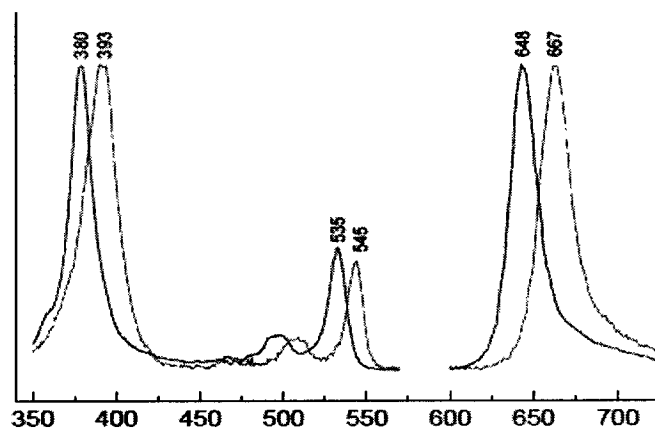


图 14

专利名称(译)	基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102866251A	公开(公告)日	2013-01-09
申请号	CN201210203323.1	申请日	2012-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
[标]发明人	谢爱武		
发明人	谢爱武		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/571 G01N33/576 G01N33/74 G01N33/569		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于磷光发光技术的免疫荧光试纸条及其制备方法和应用，试纸条采用磷光发光材料即铂/钷卟啉作为生物标记物，结果在绿色光照射下以红外光信号的形式表现出来，并可进行仪器判读，从而实现目标被检测物的定量检测。试纸条包括样品垫、结合物垫、分析膜、吸水垫和衬垫。结合物垫固定有磷光发光材料标记物，分析膜上固定有检测线和质控线。本发明还公开了该试纸条的制备方法和在生物样品定量检测中的应用。依据其待测物发生免疫反应方式的不同，将试纸条分为夹心法模式、竞争法模式、间接法模式和捕获法模式，依据检测对象的性质不同，可采用不同检测模式对样品中的不同待测物进行快速、灵敏地定性和定量检测分析。

