

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610027228.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/558 (2006.01)  
G01N 33/52 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月22日

[11] 公开号 CN 1866012A

[22] 申请日 2006.6.2

[21] 申请号 200610027228.5

[71] 申请人 上海新波生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江郭守敬路  
351号2号楼502室

共同申请人 苏州新波生物技术有限公司

[72] 发明人 吴冯波 唐晓燕

[74] 专利代理机构 上海浦东良风专利代理有限责任公司  
代理人 陈志良

权利要求书2页 说明书9页

[54] 发明名称

一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置

[57] 摘要

本发明为一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置，其特征在于：使用有机高分子荧光纳米微粒为标记，采用专用免疫层析装置，结合与标记相适应的荧光检测仪器，实现定量、快速的免疫检测；其步骤是：以有机高分子荧光纳米微粒标记抗体、抗原(半抗原)或其它特异性结合物质；以免疫层析方式使标记的抗体、抗原或其它特异性结合物质与受体分子结合，通过检测有机高分子荧光纳米微粒的荧光强度实现定量分析。本发明采用有机高分子荧光纳米微粒为示踪剂，利用荧光物质检测灵敏、测量范围宽的特点，检测灵敏度比目前常用的纳米金标记高10~100倍，具有更宽的检测范围，结合检测仪器可实现待测物的准确定量，使该方法同时具有操作简单、快速、定量的特点。

1. 一种定量、快速的免疫检测方法，其特征在于：方法包括以下步骤：
  - (a) 用有机高分子荧光纳米微粒标记抗体、抗原或半抗原；
  - (b) 采用免疫层析装置，使标记的抗体、抗原或半抗原与相应的抗原、抗体结合；
  - (c) 利用有机高分子荧光纳米微粒的高度可检测性，以荧光测量仪测量荧光强度，通过与校准品或参比品比对荧光强度实现待测物的定量分析。
2. 根据权利要求 1 所述的一种定量、快速的免疫检测方法，其特征在于：步骤 a) 所述的有机高分子荧光纳米微粒指由有机单体苯乙烯、丙烯酸通过高分子聚合反应制备而成的高分子微粒，通过包裹、浸入或吸附荧光物质而形成荧光纳米微粒；所述的荧光物质是指能发出荧光的 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ 螯合物。
3. 根据权利要求 1 所述的一种定量、快速的免疫检测方法，其特征在于：
  - (a) 使用荧光纳米微粒为标记，通过测量荧光实现定量免疫检测；
  - (b) 通过在层析膜上设立多个检测带或检测区，实现多个待测物的同时检测；
  - (c) 通过复合多个检测单元，实现多个待测物的同时检测；
  - (d) 通过对比检测带或检测区与校准带或校准区的荧光强度，实现定量分析；
  - (e) 结合方式 (d) 与条形码信息，实现定量分析。
4. 根据权利要求 1 所述的一种定量、快速的免疫检测方法，其特征在于：免疫层析检测的操作步骤主要包括：
  - (a) 在样品池中滴加样品；样品包括全血、血清或血浆、尿液或其他体液，或经稀释的上述样品；
  - (b) 样品溶解荧光纳米微粒标记的特异反应物质，通过毛细作用在纤维膜上向前泳动；同时样品中的待测物质与荧光纳米微粒标记的特异反应物质反应；
  - (c) 反应溶液经过检测带或检测区时，与检测带或检测区的反应物质反应，并富积在该检测带或检测区上；
  - (d) 装置上方的吸水膜或吸水基提供层析动力使层析持续进行，直到层析结束；
  - (e) 将层析装置置于荧光检测仪或其他检测仪器中，检测校准带或校准区与检测带或检测区的荧光，通过对比二者荧光强度得出样本浓度。
5. 一种由权利要求 1 所述的免疫检测方法采用的专用装置，其结构程序主要包括：

- (a) 制备有机高分子荧光纳米微粒；
- (b) 在荧光纳米微粒引入可与抗体/抗原反应的活性官能团；如：-COOH；
- (c) 通过活性官能团以有机高分子荧光纳米微粒标记抗体、抗原或其它结合物质；  
荧光纳米微粒与抗体、抗原或其它结合物质的分子数之比为  $1/2 \sim 1/1000$ ；
- (d) 荧光纳米微粒标记的抗体、抗原或其它特异性结合物质分散在免疫层析装置的某一组件上，并干燥，使其与液体接触时能快速分散，具备良好的层析行为；
- (e) 在层析膜的检测带、校准带上固定特异性结合物质、在质量控制带固定质控物质；
- (f) 将 d)、e) 制备的组件，连同样品处理膜、吸水膜、外壳组装成专用免疫层析装置；

其特征在于：(1) 采用有机高分子荧光纳米微粒为标记；(2) 使用低荧光本底的纤维膜作为免疫层析载体；如：硝纤膜、尼龙膜、滤纸。

6. 根据权利要求 5 所述的专用装置，其特征在于：所述的荧光纳米微粒，在微粒中引入呈色物质使荧光纳米微粒带有颜色，使专用免疫层析装置既可用于定量分析，也能用于基于目测的定性检测。

## 一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置

### 一、技术领域：

本发明涉及体外免疫检测领域，特别是一种基于有机高分子荧光纳米微粒标记的定量、快速免疫检测方法。

### 二、背景技术：

如何在不依赖大型仪器设备的条件下通过简单的操作实现快速、准确地定量分析，一直是免疫诊断领域研究的课题。

目前，常规的免疫检测主要包括各种发光免疫分析（LIA）、放射免疫分析（RIA）和酶标免疫分析（EIA）。RIA 和 EIA 均为成熟、稳定的免疫检测方法，直到现在，RIA 和 EIA 仍在免疫诊断领域占有重要位置。但 RIA 所用标记物（常用  $^{125}\text{I}$ ）的可检测性有限，很难实现超灵敏分析；其基于衰变的放射性行为也使其难以建立均相免疫分析方法；更主要的是，其较短的半衰期使 RIA 试剂难以长时间保存，加上其涉及放射性废物处理、不易实现自动化等缺点，RIA 正逐渐被非放射免疫分析取代；EIA 作为一种重要的非放射性免疫分析方法目前仍在广泛使用；基于 OD 值检测的 EIA 具有测量范围窄、分析灵敏度较低的缺点；以酶为初始标记物、以化学发光或荧光物质为底物的酶放大发光免疫分析克服了以上缺点，但该方式需要一酶促反应；以化学发光物质为标记、以闪烁光检测为特点的 LIA，由于其对光信号的引发和收集有严格的要求，对检测仪器的要求很高，目前还没有国产的这类发光测定仪；由于上述原因，近年来时间分辨荧光免疫分析（TRFIA）发展迅速；TRFIA 具有很高的分析灵敏度、宽阔的测量范围、优良的分析精密性和对多个待测物同时检测的能力，成为方法学上颇具优势的非放射免疫分析技术之一。尽管如此，所有上述常规免疫检测体系均要求使用大型的仪器设备，操作步骤比较复杂，检测成本较高，不适合在家庭、社区、急诊实验室和其它现场使用。

随着生活水平的提高，人们越来越关注自身的健康状况，许多适合于自测的待测物指标具有很大的市场需求，如排卵监测、糖化血红蛋白的测定；另外，一些适合于急诊的指标，如心脏标志物浓度的测定，也需要采用定量、快速、随机、操作简单的免疫检测模式；此类检测同样也适合于探矿、军事、食品以及社区和小型医院使用，这类检测通常称之为 Point Of Care 测试。

采用胶体金为标记的免疫层析是 Point of Care 测试的常用模式，目前此类产品多为

定性检测，但越来越多的检测需要准确测定样本中的待测物浓度，如心肌梗塞标志物 CTn-I、心脏功能评估标志物 BNP，等。福州大学的杜民、杨富文等通过分析影响金标记免疫层析定量的各种因素，如生化噪声、光噪声、电噪声等，建立了光谱峰曲线的数学表达模式，利用光电检测系统将纳米金免疫层析试条的色谱信号转换为光谱信号，实现了金标记免疫层析的定量检测[杜民，杨富文；基于光电检测与信息处理技术的纳米金免疫层析试条定量测试的研究，福州大学博士学位论文，2005/05]，但该方法检测的是纳米金产生的色谱信号，存在分析灵敏度较低、测量范围窄的缺点，该方法的测量范围一般小于二个数量级，而临床上有意义的待测物浓度范围往往在二个数量级以上，因此对于高浓度样本，使用该定量分析体系需要稀释样本，这不仅增加的操作步骤，还可能引入实验误差。此外，对于以纳米金为标记的定量/半定量免疫层析，已经报道的还有张慧、唐江萍等人发明的色带递减法免疫层析（中国专利公开号：CN1381729A），李文平、何湘蓉发明的半定量免疫层析（中国专利公开号：CN1403818A），和美国拜尔公司 R.G. 索马发明的定量免疫层析检测方法（中国专利公开号：CN1146557A）。

灵敏度低、测量范围窄是以纳米金为标记的定量/半定量免疫层析难以避免的弊端。以荧光纳米微粒为标记，通过检测荧光信号尤其是稀土离子螯合物的长寿命荧光信号，将大大改善免疫层析检测的分析灵敏度和测量范围，建立综合性能更优越的快速、定量 Point of Care 检测体系。

应用于生物分析领域的荧光纳米微粒包括无机高分子荧光纳米微粒和有机高分子荧光纳米微粒二类；其中，无机高分子荧光纳米微粒多以二氧化硅为载体，通过微乳液法或溶胶/凝胶法制备；基于此法制备的荧光纳米微粒已经用于临床检测、细胞或组织化学、显微成像等多个领域。公开号为 CN1566954A、CN1493647A、CN1707246A、CN1645146A、CN1400467A、CN1707244A 的中国专利均涉及到此类无机高分子荧光纳米微粒的制备与应用；公开号为 CN1566954A 的中国专利还叙述了这种无机二氧化硅荧光纳米微粒在免疫层析中的应用。

另一类荧光纳米微粒是以有机基质为骨架的有机高分子荧光纳米微粒（Härmä H, Soukka T and Lövgren T, *Clinical Chemistry*, 2001, 47, 561-568; T. Soukka, J. Paukkunen, H. Harma, et al. *Clinical Chemistry*, 2001; 47, 1269-1278）。有机高分子荧光纳米微粒一般通过乳液聚合、无皂聚合等方式制备。同无机高分子荧光纳米微粒相比，有机高分子荧光纳米微粒在体外免疫诊断（如：免疫层析）上具有多方面的优点：

1) 可通过共聚合方式（如：苯乙烯与丙烯酸共聚合）使微粒表面带有数量可调节

的羧基。这些羧基不仅可以用于标记，而且对纳米粒子胶状体系有很强的稳定作用，使纳米微粒能稳定地贮存于多种介质当中。而二氧化硅纳米微粒表面一般只带有少量-NH<sub>2</sub>、-OH或-SH，其较弱的离子化作用或较弱的极性对纳米微粒的稳定作用比较有限。

2) 有机高分子荧光纳米微粒有很好的透光性，对紫外激发光无明显吸收和屏蔽效应，有利于纳米微粒荧光的有效激发。而对于二氧化硅纳米微粒，硅胶基质对紫外激发光有明显吸收，使微粒内包裹的荧光物质的激发减弱，降低了纳米微粒的荧光量子产率（袁景利，叶志强，谭明乾，王桂兰。一种功能性纳米铽荧光探针及其应用，中国专利，公开日：2005年12月14日；公开号：CN1707246A）。

3) 有机高分子荧光纳米微粒的内部一般为疏水性环境，对荧光物质，尤其是荧光易被水分子淬灭的稀土离子螯合物，有显著的荧光保护作用，从而使处于微粒内部的荧光分子的荧光得以增强（Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91, 5426-5430）。而对于二氧化硅纳米微粒，硅胶基质与螯合物之间存在相互作用，这种相互作用可进一步降低纳米微粒的荧光量子产率，使荧光强度减弱（袁景利，叶志强，谭明乾，王桂兰。一种功能性纳米铽荧光探针及其应用，中国专利，公开日：2005年12月14日；公开号：CN1707246A）。

4) 由于性状相似，有机高分子荧光纳米微粒与有机螯合物荧光分子之间具有良好的相容性，通过简单的浸入方式即可制备稳定、强荧光的有机高分子荧光纳米微粒。而对于二氧化硅纳介质包裹的荧光物质，在某些情况下易出现泄漏现象（段菁华，王柯敏，谭蔚泓，等。高等学校化学学报，2003，24，255-259）。

5) 应用于免疫层析的有机高分子荧光纳米微粒（乳胶粒），其在免疫层析试条上的迁移能力更强，层析带前端平整，层析行为优于无机高分子荧光纳米微粒，如二氧化硅纳米微粒。

Härmä H, Ullman EF 等报道了有机高分子荧光纳米微粒在常规非均相免疫分析和均相免疫分析中的应用（Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91, 5426-5430; Härmä H, Soukka T and Lövgren T, Clinical Chemistry, 2001, 47, 561-568），但目前尚未见该类荧光纳米微粒应用于免疫层析装置报道。

### 三、发明内容：

本发明的目的是，以有机高分子荧光纳米微粒为标记建立一种定量、快速的免疫层析方法。本发明的另一目的是提供定量、快速的免疫检测方法采用的层析装置。本发明检测方法不仅克服了传统金标记免疫层析产品的局限，而且与无机高分子荧光纳米微粒为标记

的免疫层析相比，具有更强的荧光检测信号和更佳的免疫层析行为。该免疫层析检测方式同时具有定量、快速、操作简单、不需要大型仪器设备等特点，尤其适用于广大农村、县级医院、诊所、社区使用。

本发明是这样实现的：一种定量、快速的免疫检测方法，其特征在于：方法包括以下步骤：

- (a) 用有机高分子荧光纳米微粒标记抗体、抗原（半抗原）或其它特异结合物质；所述的其它特异结合物质是抗体、抗原、半抗原以外的特异结合物质，如链亲合素、生物素、蛋白A、蛋白G；
- (b) 采用免疫层析装置，使标记的抗体、抗原（半抗原）与相应的抗原、抗体结合；或标记的其它特异结合物质与相应配体的结合；所述的配体指与其它特异结合物质结合的物质，如生物素、链亲合素、IgG。
- (c) 利用有机高分子荧光纳米微粒的高度可检测性，以荧光测量仪测量荧光强度，通过与校准品或参比品比对荧光强度实现待测物的定量分析。

本发明所述的有机高分子荧光纳米微粒是指粒径在 10~300nm、激发后能发出荧光的高分子微粒，特指包裹或吸附有稀土离子螯合物（如： $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ 与多种配基形成的螯合物）的有机高分子微粒。

本发明所述的免疫层析是一种可实现快速检测的免疫分析方式，它往往以条状纤维层析材料为固相，通过毛细作用使溶液在层析条上泳动，同时样品中的待测物与层析材料上针对待测物的反应物质（如抗体或抗原）发生特异的结合反应，层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域（检测带），通过肉眼观察或仪器检测对样本中的待测物是否存在或存在多少进行判断。

本发明所述的可检测性是指某种标记物质被检出的能力，标记物质能被检出的最低浓度的数值越小，可检测性越强。

本发明所述的待测物包括各种蛋白质、核酸、糖类、小分子半抗原。

本发明所述的校准品是指已知浓度的、在组成、结构上与待测物一致的、用于校准待测物浓度的参考物质。

本发明所述的参比品是与待测物检测相关联、在组成、结构上可与待测物不一致的、用于校准待测物浓度的参考物质。

本发明上述步骤（b）中，免疫层析装置的特征在于：

- (1) 采用有机高分子荧光纳米微粒为标记；

(2) 使用具有较低荧光本底的纤维膜作为免疫层析或免疫渗滤载体；如：硝纤膜、尼龙膜、滤纸等。

本发明上述步骤(b)中，免疫层析装置的制作步骤包括：

(1) 制备有机高分子荧光纳米微粒；

(2) 在有机高分子荧光纳米微粒制备的同时引入可与抗体/抗原反应的活性官能团；如：-COOH；

(3) 通过活性官能团，以有机高分子荧光纳米微粒标记抗体、抗原或其它特异结合物质；有机高分子荧光纳米微粒与抗体、抗原或其它特异结合物质的分子数之比为1/2~1/1000；所述的其它特异结合物质是抗体、抗原、半抗原以外的特异性结合物质，如链亲合素、生物素、蛋白A、蛋白G；

(4) 将有机高分子荧光纳米微粒标记的抗体、抗原或其它特异性结合物质，并分散在免疫层析装置的某一组件上，并干燥，使其与液体接触时能快速分散，具备良好的层析行为；

(5) 在层析膜的检测带、校准带上固定特异性结合物质、在质量控制带固定质控物质；所述的质控物质是用于监测检测是否正常、检测结果是否可信的物质，通常是一种抗体、抗原、半抗原或其它特异性结合物质；

(6) 将(4)、(5)制备的组件，连同样品处理膜、吸水膜、外壳等组装成免疫层析装置。

本发明的免疫层析方式，其特征在于：

(1) 使用有机高分子荧光纳米微粒为标记，通过测量荧光实现定量免疫检测；

(2) 通过在层析膜上设立多个检测带或检测区，实现多个待测物的同时检测；

(3) 通过复合多个检测单元，实现多个待测物的同时检测；

(4) 通过对比检测带(区)和校准带(区)的荧光强度，实现定量分析；

(5) 结合方式(4)与条形码信息，实现定量分析。

所述步骤(c)中免疫层析检测的操作步骤是：

(1) 在样品池中滴加样品；样品包括全血、血清或血浆、尿液或其他体液；或经稀释的上述样品；

(2) 样品溶解荧光纳米微粒标记的特异反应物质，通过毛细作用在纤维膜上向前泳动；同时样品中的待测物质与荧光纳米微粒标记的特异反应物质反应；所述的特异反应物质指抗体、抗原、半抗原或抗体、抗原、半抗原以外的特异结合物质；

(3) 反应溶液经过检测带(区)时,与检测带(区)的另一种特异反应物质反应,并富积在该检测带上;所述的另一种特异反应物质是与特异反应物质配对使用的特异结合物质,如:在双抗体夹心法中与标记抗体配对的另一株吸附于检测带(区)的抗体;

(4) 装置上方的吸水膜或吸水基提供层析动力使层析持续进行,直到层析结束;

(5) 将层析装置置于荧光检测仪或其他检测仪器中,检测校准带(区)和检测带(区)的荧光,通过对比二者荧光强度得出样本浓度。

本发明的优点和效果如下:

(1) 本发明利用有机高分子荧光纳米微粒制备方法简单、贮存稳定、易于修饰、透光性好、荧光强度高、层析行为优良等特点,组装而成的免疫层析装置具有精密、灵敏的优点。

(2) 本发明利用荧光物质检测范围宽的特点,有效地拓宽了免疫层析检测的待测物浓度范围;

(3) 基于上述二特点,本发明形成的免疫层析产品比传统产品更适合于精密、准确的定量检测。

本发明形成的产品可广泛应用于农村、县市级医院、社区或急诊实验室,也适用于探矿、食品检测,或野战条件下病原体分布的调查、战伤感染的诊断等现场检测。该发明将变革目前广泛使用的以胶体金、胶体硒、带色乳胶粒、碳微粒等为标记的定性、半定量或定量检测,产生良好的社会效益和经济效益。

#### 四、具体实施方式:

##### 实施例 1 通过聚合反应制备聚苯乙烯-丙烯酸纳米微粒

步骤如下:

(1) 在加有一粒搅拌子的圆底烧瓶内加入含 0.5mmol 十二烷基磺酸钠的 10ml 去离子水;

(2) 搅拌下加入 70mmol 苯乙烯和 10mmol 丙烯酸单体,室温下搅拌50min;

(3) 逐渐升高反应温度至 65℃,室温下搅拌50min;

(4) 加入过氧化二硫酸钾 0.02mmol,搅拌反应 15 小时 ;

(5) 将反应体系冷却至室温;

(6) 将产物置于纤维素透析袋中,对生理盐水透析 2 天;

(7) 用己烷提取二次,将水相贮存于 4℃。

##### 实施例 2 有机高分子荧光纳米微粒的制备

步骤如下:

- (1) 在 18ml 100mM 的碳酸氢钠缓冲液中 (pH9.0) 加入 4 $\mu$ mol EuCl<sub>3</sub>,12 $\mu$ mol 2-NTA, 12 $\mu$ mol TOPO, 0.9mL 聚苯乙稀-丙稀酸纳米微粒悬浮体;
- (2) 室温静置 24 小时;
- (3) 对去离子水透析 2 天。

实施例 3 以有机高分子荧光纳米微粒标记抗 AFP 单克隆抗体 MH1A (EDC法)

步骤如下:

- (1) 搅拌下将 5ml 有机高分子荧光纳米微粒对 pH6.2的PBS (0.1M) 缓冲液透析 24 小时, 取出置于洁净的玻璃小瓶中;
- (2) 加入 EDC 12mg, 搅拌溶解, 室温反应 10min;
- (3) 加入抗 AFP 单克隆抗体 MH1A 3mg, 搅拌均匀, 4 $^{\circ}$ C 反应 10min;
- (4) 将混合物上 2 $\times$ 50cm sephadex G200 柱, 以 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.8, 含0.9%NaCl) 洗涤, 收集第一个有机高分子荧光纳米微粒标记的抗体峰。

实施例 4 标记物组件的制备

步骤如下:

- (1) 取有机高分子荧光纳米微粒标记的抗 AFP 单克隆抗体 MH1A 加稀释液, 混匀配成工作浓度;
- (2) 将溶液加入 Biodot 喷涂机的 Airjet 喷头储存瓶中;
- (3) 设定压力为 16PSI, 玻璃纤维膜的移动速度为 50 mm/s; 每条喷 2 遍;
- (4) 37  $^{\circ}$ C 烘干 12 h, 放入铝薄袋中, 加入干燥剂, 热合封口, 4 $^{\circ}$ C 保存。

实施例 5 硝纤膜 (NC膜) 组件的制备

步骤如下:

- (1) NC 膜活化处理, 水洗, 干燥;
- (2) 将抗 AFP 单克隆抗体 MH2A以 0.1M 磷酸盐缓冲液稀释至 1.5mg/ml;
- (3) 取纯化的羊抗鼠 IgG 溶于 0.1M 磷酸盐缓冲液中, 浓度为 2.0 mg/ml;
- (4) 将抗 AFP 单克隆抗体 MH2A 和羊抗鼠 IgG 分别喷涂于检测带 (T 带) 与质控带 (C 带), 二者距离约 4~4.5 mm;
- (5) 完成包被后, 置 37  $^{\circ}$ C 干燥箱 24 h;
- (6) 用含 1%BSA、0.5% 酪蛋白、1% 表面活性剂的 0.1M 磷酸盐缓冲液封闭处理 30 min; 用洗液抽洗一次;

(7) 37 °C干燥箱干燥备用。

### 实施例 6 免疫层析定量检测人血清 AFP 浓度

步骤如下：

(1) 平放层析条，在二条层析条样品区分别滴入 50 $\mu$ l 已知 AFP 浓度的校准品 A、B；

校准品 A、B 的 AFP 浓度分别为 0、50 ng/mL。

(2) 静置 15min ；

(3) 将层析条置于时间分辨荧光测量仪测量荧光；1000 个循环/秒，延迟 200 $\mu$ S，收集 200~800 $\mu$ S 荧光；

(4) 仪器记录上述二个校准点的 AFP 浓度和相应荧光强度，生成并贮存 AFP 检测校准曲线于仪器中，用于样本 AFP 浓度评估；

(5) 以人血清标本（17 份）代替上述 AFP 准品测量标本荧光强度，仪器通过校准曲线得出样本 AFP 浓度值；

对比实验 1：将上述样本以 ROCHE 电化学发光免疫分析（ECLIA）检测，将所得浓度与定量免疫层析作相关性分析；结果如下：

样本	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
ROCHE ECLIA	3.5	4.7	4.7	6.9	8.1	15.3	22.5	23.6	32.6	36.4
定量免 疫层析	5.2	5.5	4.3	6.8	6.9	18.7	19.6	22.5	28.5	33.2

样本	11#	12#	13#	14#	15#	16#	17#
ROCHE ECLIA	37.3	56.5	105.0	159.2	166.7	189.1	203.5
定量免 疫层析	41.5	50.6	113.8	149.3	171.2	203.5	218.5

上表表明，以有机高分子荧光纳米微粒为标记的定量免疫层析方法对AFP的检测值与 ROCHE 电化学发光免疫分析（ECLIA）检测值显著相关。以Origin 5.0软件分析，相关系数 $r=0.98$ 。

对比实验 2：以小牛血清倍比稀释一份 AFP 浓度为 128.8ng/mL (ROCHE ECLIA) 的样本，稀释后分别以 ROCHE 电化学发光免疫分析、定量免疫层析方法和市售的胶体金标记 AFP 免疫层析条检测（定性）；结果如下：

样本	原倍血清	1/5稀释	1/10稀释	1/20稀释	1/40稀释	1/80稀释
ROCHE ECLIA (ng/mL)	128.8	26.6	13.0	6.5	3.1	1.7
定量免疫 层析(ng/mL)	117.1	25.9	15.5	6.3	2.7	1.6
金标定性 免疫层析	+	+	-	-	-	-

通过上述对比实验数据可看出：本发明采用有机高分子荧光纳米微粒为标记建立的免疫层析方法，可以实现定量、快速、准确的免疫检测。

专利名称(译)	一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN1866012A</a>	公开(公告)日	2006-11-22
申请号	CN200610027228.5	申请日	2006-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司 苏州新波生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司 苏州新波生物技术有限公司		
[标]发明人	吴冯波 唐晓燕		
发明人	吴冯波 唐晓燕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N33/52 G01N33/558		
代理人(译)	陈志良		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明为一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置，其特征在于：使用有机高分子荧光纳米微粒为标记，采用专用免疫层析装置，结合与标记相适应的荧光检测仪器，实现定量、快速的免疫检测；其步骤是：以有机高分子荧光纳米微粒标记抗体、抗原(半抗原)或其它特异性结合物质；以免疫层析方式使标记的抗体、抗原或其它特异性结合物质与受体分子结合，通过检测有机高分子荧光纳米微粒的荧光强度实现定量分析。本发明采用有机高分子荧光纳米微粒为示踪剂，利用荧光物质检测灵敏、测量范围宽的特点，检测灵敏度比目前常用的纳米金标记高10~100倍，具有更宽的检测范围，结合检测仪器可实现待测物的准确定量，使该方法同时具有操作简单、快速、定量的特点。

样本	11#	12#	13#	14#	15#	16#	17#
ROCHE ECLIA	37.3	56.5	105.0	159.2	166.7	189.1	203.5
定量免 疫层析	41.5	50.6	113.8	149.3	171.2	203.5	218.5