



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226466 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201711250475.6

(22)申请日 2017.12.01

(71)申请人 郑乐民

地址 350015 福建省福州市马尾区湖里路
27号1#楼2-33B室(自贸试验区内)

申请人 福建普立辰生物技术有限公司

(72)发明人 郑乐民 段学军 赵明明 刘昌杰
何萌萌 路美玲 彭明辉 李瑶

(74)专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理
事务所(普通合伙) 11447

代理人 耿超 王浩然

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

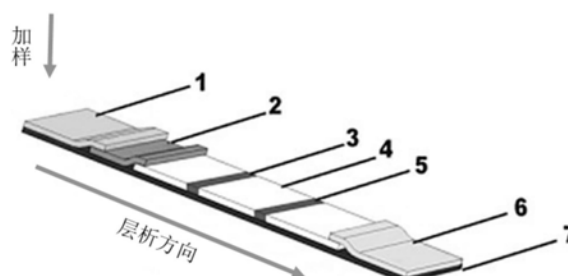
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种免疫层析试纸条及免疫层析检测方法

(57)摘要

本公开涉及一种免疫层析试纸条及免疫层析检测方法,该试纸条包括依次相连接的样品垫、标记垫、基膜和吸水垫;所述基膜上依次设置校准线C1线、校准线C2线和测试T线,所述C1线和C2线上分别包被浓度不同的校准物;所述标记垫上含有荧光标记的第一单克隆抗体;所述T线上包被有多克隆抗体;其中,所述C1线和C2线上分别包被不同浓度的校准物,所述校准物为能够捕获所述第一单克隆抗体的物质。本公开所提供的纸条和方法,通过利用两条校准线C1和C2,获得能够与检测信号定量比较的校准信号并建立校正方程,从而在每次检测中都对T线的检测结果进行校准,相比于仅有一条主校准线的普通免疫层析试纸,获得的定量数据更加准确可信。



1. 一种免疫层析试纸条, 该免疫层析试纸条包括依次相连接的样品垫、标记垫、基膜和吸水垫; 其特征在于, 所述基膜上依次设置校准线C1线、校准线C2线和测试T线, 所述C1线和C2线上分别包被浓度不同的校准物; 所述标记垫上含有荧光标记的第一单克隆抗体; 所述T线上包被有多克隆抗体; 其中, 所述校准物为能够捕获所述第一单克隆抗体的物质。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸条, 其中, C1线上包被的校准物是由浓度为10-40ng/mL的校准物溶液1以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在C1线上干燥后得到的, 所述C2线上包被的校准物是由浓度为50-100ng/mL的校准物溶液2以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在C2线上干燥后得到的。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫层析试纸条, 其中, 所述校准物为第一单克隆抗体的抗原或抗体。

4. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸条, 其中, 所述荧光标记的第一单克隆抗体是按照以下方法制备的:

将抗体与荧光微球按照1-4:300的质量比在pH为8.0-8.5的反应缓冲液中结合反应20-40min获得荧光标记的第一单克隆抗体;

其中, 所述荧光微球表面具有羟基官能团;

所述反应缓冲液是含有BSA和带氨基基团的烷基硅氧烷的硼酸盐缓冲液, 所述反应缓冲液中, 所述BSA的质量体积比浓度为9-11%, 所述带氨基基团的烷基硅氧烷的质量体积比浓度为0.8-1.2%。

5. 根据权利要求4所述的免疫层析试纸条, 其中, 所述带氨基基团的烷基硅氧烷为(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷、(3-氨基丙基)二甲基乙氧基硅烷和(3-氨基丙基)二甲基甲氧硅烷中的至少一种;

所述荧光微球为聚苯乙烯包埋镧系元素微球、聚乙烯包埋量子点微球或聚苯乙烯包埋有机荧光染料微球。

6. 根据权利要求4所述的免疫层析试纸条, 其中, 在所述反应缓冲液中, 抗体的用量按质量体积比计为1.5-2%。

7. 根据权利要求1-3和6中任意一项所述的免疫层析试纸条, 其中, 所述T线上包被的多克隆抗体是由浓度为0.2-2mg/mL的多克隆抗体溶液以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在T线上干燥后得到的。

8. 根据权利要求7所述的免疫层析试纸条, 其中, 所述待测样品为胰蛋白酶原2。

9. 一种免疫层析检测方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

主校准曲线的绘制: 将待检测物的标准品配制成梯度浓度的标准品溶液, 利用权利要求1-8中任意一项所述的免疫层析试纸条对标准品溶液进行检测, 收集免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值, 以T线的荧光曲线峰积分面积值作为纵坐标y, 以标准品溶液的浓度值做为横坐标x, 绘制主校准曲线并获得主校准方程 $y=f_1(x)$;

校正方程: 将C1线上包被的校准物的浓度 X_{C1} 代入所述主校准方程得到 y_{C1} , 将C2线上包被的校准物的浓度 X_{C2} 代入所述主校准曲线得到 y_{C2} ;

分别收集C1线和C2线的荧光曲线峰积分面积值 Y_{C1} 和 Y_{C2} , 利用 Y_{C1} 和 Y_{C2} 与上述的 y_{C1} 和 y_{C2} 建立校正方程:

$$Y=f_2(x)=(Y_{C2}-Y_{C1}) \times y/(y_{C2}-y_{C1})+(Y_{C2} \times y_{C1}-Y_{C1} \times y_{C2})/(y_{C1}-y_{C2});$$

其中, Y为检测样本时T线的荧光曲线峰积分面积值,

样品的检测: 利用所述免疫层析试纸条对待测样品进行检测, 收集免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值, 将T线的荧光曲线峰积分面积值代入所述主校准方程获得待测样品中的待测物的未校正检测浓度;

将所述未校正检测浓度、C1线处的荧光曲线峰积分面积值、C2线处的荧光曲线峰积分面积值带入所述校正方程, 获得待测样本中待测物的校正浓度。

10. 根据权利要求9所述的检测方法, 其中, 所述待测物为胰蛋白酶原2。

一种免疫层析试纸条及免疫层析检测方法

技术领域

[0001] 本公开涉及医学检验领域,具体地,涉及一种免疫层析试纸条及免疫层析检测方法。

背景技术

[0002] 免疫试纸快速检测技术是基于免疫层析原理建立起来的一种适用于现场检测的技术,典型的免疫层析试纸包括样品垫、标记垫、包被膜和吸收垫。以微孔膜作为固相载体,经渗透和毛细管虹吸作用使待测样品中的抗体或抗原与膜上包被的抗原或抗体结合,通过标记垫上标记物来呈现反应结果。

[0003] 定量免疫层析技术,是在传统免疫层析技术基础上发展起来的一种新型的定量检测技术。该技术不但具有操作简便、检测快速和便携性强的优点,还能通过荧光信号的强弱实现检测结果的定量。而由于荧光信号的漂移、检测时间不固定等操作原因、试纸条批内不均一、主校准曲线漂移等因素的影响,检测结果常常发生测定偏差较大问题,从而不能准确真实的反应待测物质的含量,因此,如何提高检测的精确度及可信度是需要解决的问题。

发明内容

[0004] 本公开的目的是提供一种能够对待测样品进行准确定量的荧光免疫层析试纸条和检测方法。

[0005] 为达到上述目的,本公开的第一个方面提供了一种免疫层析试纸条,该免疫层析试纸条包括依次相连接的样品垫、标记垫、基膜和吸水垫;其中,所述基膜上依次设置校准线C1线、校准线C2线和测试T线,所述C1线和C2线上分别包被浓度不同的校准物;所述标记垫上含有荧光标记的第一单克隆抗体;所述T线上包被有多克隆抗体;其中,所述校准物为能够捕获所述第一单克隆抗体的物质。

[0006] 优选的,C1线上包被的校准物是由浓度为10-40ng/mL的校准物溶液1以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在C1线上干燥后得到的,所述C2线上包被的校准物是由浓度为50-100ng/mL的校准物溶液2以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在C2线上干燥后得到的。

[0007] 本公开所提供的免疫层析试纸条,通过利用校准线C1线和C2线,获得能够与检测信号定量比较的校准信号并建立校正方程,从而在每次检测中都对T线的检测结果进行校准,相比于仅有一条主校准线的普通免疫层析试纸,获得的定量数据更加准确可信。避免了由于检测时间不固定等操作原因以及试条批内不均一、主校准曲线漂移等技术原因所造成的测量误差较大的缺陷。

[0008] 而且,本公开所提供的试纸条使用了新的在荧光微球表面定向包被抗体的方法,使得抗体更倾向于以Fc区段去接近荧光微球表面的羟基官能团,抗体的Fab区段得以向外伸展。可以提高包被线上抗体的利用率,提高试纸在检测时的灵敏度;在试纸的制备过程

中省略了共价修饰抗体的步骤,从而减少了抗体活性的损失,能够有效控制试纸条的批间差;试纸条的制备过程较其他方法也更加简化和易操作。

[0009] 本公开的第二个方面提供一种免疫层析检测方法,其中,所述方法包括以下步骤:

[0010] 主校准曲线的绘制:将待检测物的标准品配制成梯度浓度的标准品溶液,利用本公开第一个方面所述的免疫层析试纸条对标准品溶液进行检测,收集免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值,以T线的荧光曲线峰积分面积值作为纵坐标y,以标准品溶液的浓度值做为横坐标x绘制主校准曲线并获得主校准方程 $y=f_1(x)$;

[0011] 校对方程:将C1线上包被的校准物的浓度 X_{C1} 代入所述主校准方程得到 y_{C1} ,将C2线上包被的校准物的浓度 X_{C2} 代入所述主校准曲线得到 y_{C2} ;

[0012] 分别收集C1线和C2线的荧光曲线峰积分面积值 Y_{C1} 和 Y_{C2} ,利用 Y_{C1} 和 Y_{C2} 与上述的 y_{C1} 和 y_{C2} 建立校对方程:

[0013] $Y=f_2(x)=(Y_{C2}-Y_{C1}) \times y / (y_{C2}-y_{C1})+(Y_{C2} \times y_{C1}-Y_{C1} \times y_{C2}) / (y_{C1}-y_{C2})$;

[0014] 其中,Y为检测样本时T线的荧光曲线峰积分面积值,

[0015] 样品的检测:利用所述免疫层析试纸条对待测样品进行检测,收集免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值,将T线的荧光曲线峰积分面积值代入所述主校准方程获得待测样品中的待测物的未校正检测浓度;

[0016] 将所述未校正检测浓度、C1线处的荧光曲线峰积分面积值、C2线处的荧光曲线峰积分面积值带入所述校对方程,获得待测样本中待测物的校正浓度。

[0017] 优选的,所述待测物为胰蛋白酶原2。

[0018] 本公开所提供的方法利用试纸条校准线C1线和C2线,获得能够与检测信号定量比较的校准信号并建立校对方程,从而在每次检测中都对T线的检测结果进行校准,相比于使用仅有一条主校准线的普通免疫层析试纸,获得的定量数据更加准确可信。避免了由于检测时间不固定等操作原因以及试纸条批内不均一、主校准曲线漂移等技术原因所造成的测量误差较大的缺陷。

[0019] 本公开的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

[0020] 附图是用来提供对本公开的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本公开,但并不构成对本公开的限制。在附图中:

[0021] 图1是人胰蛋白酶原2荧光标记免疫层析试纸条阴性结果;箭头所指分别为加样的位置和层析方向。

[0022] 图2是人胰蛋白酶原2荧光标记免疫层析试纸条阳性结果;箭头所指分别为加样的位置和层析方向。

[0023] 附图标记说明

[0024]	1 样品垫	2 标记垫	3 C1线
[0025]	4 T线	5 C2线	6 吸水垫
[0026]	7 基板		

具体实施方式

[0027] 以下结合附图对本公开的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开，并不用于限制本公开。

[0028] 本公开的第一个方面提供了一种免疫层析试纸条，该免疫层析试纸条包括依次相连接的样品垫、标记垫、基膜和吸水垫；其中，所述基膜上依次设置校准线C1线、校准线C2线和测试T线，所述C1线和C2线上分别包被浓度不同的校准物；所述标记垫上含有荧光标记的第一单克隆抗体；所述T线上包被有多克隆抗体；其中，所述校准物为能够捕获所述第一单克隆抗体的物质。

[0029] 其中，所述样品垫、标记垫、基膜和吸水垫的长度比优选为(13-17)：(10-12)：(20-24)：(20-24)。

[0030] 本公开所提供的试纸条中，C1线、T线、C2线在所述试纸条的长度方向上平行排列且各线的宽度相等。C1线和C2线与T线的距离可以相同也可以不同，优选的情况下，为了提高两条校准线的校准效果，获得更加准确的定量检测数据，C1线与T线的距离和C2线与T线的距离可以为3-4mm，当试纸条中各线的距离为上述距离时，相较于其他的C1线、T线、C2线排布方式，所获得的定量检测数据的准确度可以提高0.2-20%。

[0031] 所述C1线上包被的校准物是由浓度为10-40ng/mL的校准物溶液1以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在C1线上干燥后得到的，所述C2线上包被的校准物是由浓度为50-100ng/mL的校准物溶液2以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在C2线上干燥后得到的。

[0032] 所述T线上包被的多克隆抗体是由浓度为0.2-2mg/mL的多克隆抗体溶液以0.2-4 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在T线上干燥后得到的。

[0033] 在本公开所提供的试纸中，所述校准物为能够与所述第一单克隆抗体发生特异性结合并捕获所述第一单克隆抗体的物质，具体的，可以为所述第一单克隆抗体所针对的抗原，也可以为所述第一单克隆抗体的抗体。

[0034] 在本公开的一种具体实施方式中，所述校准物是胰蛋白酶原2抗原，所述第一单克隆抗体为胰蛋白酶原2单克隆抗体。

[0035] 在本公开所提供的试纸条中，所述第一单克隆抗体和多克隆抗体分别能与待测抗原的不同抗原表位结合，从而形成“标记的第一单克隆抗体-待测抗原-多克隆抗体”复合体。

[0036] 在本公开所提供的试纸条的制备过程中，将荧光标记的第一单克隆抗体或胶体金标记的第一单克隆抗体以2-3mg/mL的浓度溶于喷涂缓冲液中，并使用3-5 μ L/cm的喷涂速度通过喷金点膜机喷涂在标记垫上干燥；

[0037] 其中，所述喷涂缓冲液为含有质量体积比为0.3-0.7%的BSA和质量体积比为0.2-0.3%的Tween-20的浓度为0.01-0.03M的磷酸盐缓冲液，所述喷涂缓冲液的pH值为7.2-7.6。

[0038] 在本公开的一种优选的实施方式中，所述荧光标记的第一单克隆抗体是按照以下方法制备的：

[0039] 将抗体与荧光微球按照1-4:300的质量比在pH为8.0-8.5的反应缓冲液中结合反

应20-40min获得荧光标记的第一单克隆抗体；

[0040] 其中,所述荧光微球表面具有羟基官能团；

[0041] 所述反应缓冲液是含有BSA和带氨基基团的烷基硅氧烷的硼酸盐缓冲液,所述反应缓冲液中,所述BSA的质量体积比浓度为9-11%,所述带氨基基团的烷基硅氧烷的质量体积比浓度为0.8-1.2%。

[0042] 在本公开的一种优选的实施方式中,为了进一步提高抗体的利用率,抗体与荧光微球的质量比优选为1.5-3.5:300。

[0043] 其中,在进行结合反应前,可以先用pH为8.0-8.5的硼酸盐缓冲液对抗体透析16-24小时。所述透析过程可以按照本领域常规的抗体透析方法进行,可选的,透析的温度为3-5℃;透析结束后可以将含有抗体的溶液调整浓度后备用。

[0044] 可选的,本公开所述的试纸条的制备方法可以包括先用磷酸盐缓冲液或硼酸盐缓冲液将荧光微球进行复溶后再将荧光微球溶液与抗体溶液混合。

[0045] 本公开中,若无特殊说明,所述的硼酸盐缓冲液的浓度为0.03-0.07M, pH为8.0-8.5,磷酸盐缓冲液的浓度为0.01-0.03M, pH为7.2-7.6。

[0046] 其中,所述带氨基基团的烷基硅氧烷为(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷、(3-氨基丙基)二甲基乙氧基硅烷和(3-氨基丙基)二甲基甲氧基硅烷中的至少一种,特别优选的,所述带氨基基团的烷基硅氧烷为(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)。

[0047] 其中,所述荧光微球为聚苯乙烯包埋镧系元素微球、聚乙烯包埋量子点微球或聚苯乙烯包埋有机荧光染料微球。

[0048] 其中,所述荧光微球的尺寸优选为50-300nm。

[0049] 其中,在所述反应缓冲液中,抗体的用量按质量体积比计为1.5-2%。特别优选的,为了进一步提高烷基硅氧烷对荧光微球的包被效果、提高抗体的利用率、以及使得抗体在荧光微球表面能够更好的吸附,所述反应缓冲液中抗体的用量按质量体积比计为1.6-1.8%。其中,在本公开第一个方面的一种具体实施方式中,所述抗体为胰蛋白酶原2的单克隆抗体、胰蛋白酶原2多克隆抗体或载脂蛋白A1单克隆抗体。

[0050] 本公开的第二个方面提供一种免疫层析检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0051] 主校准曲线的绘制:将待检测物的标准品配制成梯度浓度的标准品溶液,利用本公开第一个方面所述的免疫层析试纸条对标准品溶液进行检测,收集免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值,以T线的荧光曲线峰积分面积值作为纵坐标y,以标准品溶液的浓度值做为横坐标x绘制主校准曲线并获得主校准方程 $y=f_1(x)$;

[0052] 校对方程:将C1线上包被的校准物的浓度 X_{C1} 代入所述主校准方程得到 y_{C1} ,将C2线上包被的校准物的浓度 X_{C2} 代入所述主校准方程得到 y_{C2} ;

[0053] 分别收集C1线和C2线的荧光曲线峰积分面积值 Y_{C1} 和 Y_{C2} ,利用 Y_{C1} 和 Y_{C2} 与上述的 y_{C1} 和 y_{C2} 建立校对方程:

[0054] $Y=f_2(x)=(Y_{C2}-Y_{C1}) \times y/(y_{C2}-y_{C1})+(Y_{C2} \times y_{C1}-Y_{C1} \times y_{C2})/(y_{C1}-y_{C2})$;

[0055] 其中,Y为检测样本时T线的荧光曲线峰积分面积值,

[0056] 样品的检测:利用所述免疫层析试纸条对待测样品进行检测,收集免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值,将T线的荧光曲线峰积分面积值代入所述主校准方程获得待测样品中的待测物的未校正检测浓度;

[0057] 将所述未校正检测浓度、C1线处的荧光曲线峰积分面积值、C2线处的 荧光曲线峰积分面积值带入所述校正方程,获得待测样本中待测物的校正浓 度。

[0058] 在本公开所述的方法中,可以利用本领域常规的收集荧光免疫层析试纸 条检测信号的仪器收集C1线、T线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值。例 如,可以使用干式荧光免疫检测仪。

[0059] 在本公开中,数据的收集、处理、计算以及储存可以利用按本公开的技 术方案所编程的计算机软件完成,从而实现检测结果的自动化输出,节省检 测的劳动量。

[0060] 在本公开的一种优选的实施方式中,所述待测物为胰蛋白酶原2。

[0061] 其中,免疫层析试纸条的检测原理可能包括:将待检样品滴入样品垫中, 若待测样品中有待测抗原,则待检样品中的待测抗原先和所述标记的第一单 克隆抗体结合形成复合体,由于毛细管作用,待测抗原和标记的第一单克隆 抗体形成的复合体沿基膜向前泳动,到达检测线(T线)时遇到包被在硝酸 纤维素基膜上的多克隆抗体,由于第一单克隆抗体和多克隆抗体分别能与待 测抗原的不同抗原表位结合,从而形成“标记的第一单克隆抗体-待测抗原- 多克隆抗体”复合体,在T线处形成特异性的层析线;没有和待测抗原结合的 所述标记的第一单克隆抗体则会直接通过T线,达到C1线和C2线后被 上面的胰蛋白酶原2捕获,从而在C1线和C2线上形成层析线,即判为阳 性结果;若样品中无待测抗原,由于无法在T线上形成“标记的第一单克隆 抗体-待测抗原-多克隆抗体”复合体,从而使得T线上不会产生层析线,没有 和待测抗原结合的标记的第一单克隆抗体则会直接通过T线,达到 C1线和 C2线后被抗IgG抗体捕获,从而富集在质控线上,即判为阴性结果。

[0062] 以下通过实施例进一步详细说明本公开:

[0063] 以下实施例中,除特别说明外硼酸盐缓冲液的浓度为0.03-0.07M,pH 为8.0-8.5, 磷酸盐缓冲液的浓度为0.01-0.03M,pH为7.2-7.6。

[0064] 胰蛋白酶原2抗原购自Medix公司;

[0065] 胰蛋白酶原2第一单克隆抗体购自Medix公司,多克隆抗体购自云克隆 公司。

[0066] 荧光信号利用福建普立辰生物技术公司的PL-FL-01型干式荧光免疫检 测仪进行检测。

[0067] 实施例1

[0068] 本实施例用于说明本公开所述的方法。

[0069] 1、免疫层析试纸条的制备

[0070] 制备胰蛋白酶原2抗体溶液:用硼酸盐缓冲液将胰蛋白酶原2抗体 (Medix公司)透 析得到胰蛋白酶原2抗体溶液,透析温度为4℃,透析时 间18h;将胰蛋白酶原2抗体溶液浓 度调整为1.6mg/mL。

[0071] 抗体的定向包被:用125μL缓冲液将2.4mg聚苯乙烯荧光微球(聚苯乙 烯包埋有机 荧光染料微球,尺寸为200nm)悬浮后,加10μL胰蛋白酶原2 抗体溶液到荧光微球悬浮液中, 使所述的胰蛋白酶原2抗体与荧光微球的质 量比约为1:150,加入工作浓度为1mg/mL的3- 氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)和工作浓度为10mg/mL的BSA形成反应缓冲液,室温反应 30min 后在15000rpm、4℃条件下离心收集得到荧光标记的第一单克隆抗体。

[0072] 用喷金点膜机分别将多克隆抗体和胰蛋白酶原2溶液喷于硝酸纤维素膜 上,形成 相互平行的检测T线和位于T线两侧的校准线C1线和C2线,然 后烘干;将荧光标记的第一单

克隆抗体以2.3mg/mL的浓度溶于喷涂缓冲液中,使用4μL/cm的喷涂速度均匀的喷涂在标记垫上,所述喷涂缓冲液为含有0.5%的BSA和0.2%的Tween-20浓度为0.02M磷酸盐缓冲液,pH值为7.2-7.6。

[0073] 对于T线和C1线、C2线的喷涂,所使用的喷金点膜机的喷涂速度为1μL/cm,T线为浓度1mg/mL的多克隆抗体,C1线为浓度12ng/mL的胰蛋白酶原2溶液,C2线为浓度60ng/mL的胰蛋白酶原2溶液。

[0074] 然后将样品垫、标记垫、喷有T线、C1线和C2线的基膜(硝酸纤维素膜)和吸水纸依次连接组装,样品垫、标记垫、基膜和吸水垫的长度比为15:10:20:24。而后裁切包装备用,获得免疫层析试纸条1。

[0075] 2、检测待测样品

[0076] (1) 样品制备:

[0077] 将胰蛋白酶原2标准品进行梯度稀释,分别获得浓度为6.25ng/mL、12.5 ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL的一系列胰蛋白酶原2标准品溶液。

[0078] 配制已知浓度的胰蛋白酶原2溶液,作为待测样品。

[0079] (2) 标准曲线的绘制

[0080] 取试纸条,室温平衡10分钟,打开包装取出试纸条;取80μL胰蛋白酶原2标准品溶液加入到试纸条样品垫上,静置15分钟后,将试纸条按照箭头方向插入干式荧光免疫检测仪中判定结果,每个浓度的标准品溶液均进行检测。当试纸条C1线和C2线有荧光,检测线无荧光,判为阴性,记为“-”;当试纸条C1线和C2线有荧光,同时检测线有荧光,判为阳性,记为“+”;检测荧光强度与待检抗原量成正比,荧光越强说明待检抗原含量越高,C1线和C2线无荧光条带则判为试纸条失效。阴性和阳性结果示意图如图2所示,箭头所指分别为加样处和层析方向。

[0081] 收集检测各个标准品溶液的免疫层析试纸上T线、C1线和C2线处的荧光曲线峰积分面积值如表1所示,以T线的荧光曲线峰积分面积值作为纵坐标y,以标准品溶液的浓度值做为横坐标x计算得到主校准曲线,主校准方程为 $y=15.65x+195.24$ (式1);

[0082] 将校准物浓度 X_{C1} (12ng/mL)和 X_{C2} (60ng/mL)代入主校准曲线得到对应的 y_{C1} 和 y_{C2} ,分别为383.04和1134.24;

[0083] 校对方程:分别收集C1线和C2线的荧光曲线峰积分面积值 Y_{C1} 和 Y_{C2} ,与上述的 y_{C1} 和 y_{C2} 一起建立校对方程(式2):

[0084] $Y=f_2(x)=(Y_{C2}-Y_{C1}) \times y / (y_{C2}-y_{C1}) + (Y_{C2} \times y_{C1}-Y_{C1} \times y_{C2}) / (y_{C1}-y_{C2})$

[0085] 表1

标准品溶液浓度	荧光曲线峰积分面积值			校准物浓度 (ng/mL)	
	C1 线	T 线	C2 线	C1 线	C2 线
100 ng/mL	387	1712	1115	12.25	58.77
50 ng/mL	390	1121	1140	12.44	60.37
25 ng/mL	380	494	1090	11.81	57.17
12.5 ng/mL	374	384	1150	11.42	61.00
6.25 ng/mL	384	297	1121	12.06	59.15

[0086]

[0087] (3) 样品的检测

[0088] 分别用所述免疫层析试纸检测待测样品(浓度为5.9ng/mL、11.8ng/mL、22.0ng/mL、42.0ng/mL、82.0ng/mL的胰蛋白酶原2溶液),获得T线的荧光曲线峰积分面积值并利用(2)中获得的主校准曲线计算得出待测样品中的待测物的未校正检测浓度;

[0089] 分别收集C1线的荧光曲线峰积分面积值 Y_{C1} 和C2线的荧光曲线峰积分面积值 Y_{C2} ;通过(2)中获得的主校准方程和校正方程获得检测结果: $Y=f_2(x)=(Y_{C2}-Y_{C1}) \times y/(y_{C2}-y_{C1})+(Y_{C2} \times y_{C1}-Y_{C1} \times y_{C2})/(y_{C1}-y_{C2})$;

[0090] 获得检测浓度结果如表2所示。校正后的检测浓度比未校正的检测浓度更接近真实值。

[0091] 表2

[0092]

待测样品 实际浓度 (ng/mL)	荧光曲线峰积分面积值			未校正的检 测浓度 (ng/mL)	校正的检 测浓度 (ng/mL)	未校正的检测浓 度与实际浓度的 差异	校正的检测浓 度与实际浓度 的差异
	C1 线	T 线	C2 线				
5.9	365	265	1080	4.46	5.33	1.44	-0.59
11.8	375	340	1100	9.25	10.38	2.55	-1.42
22.0	388	546	1150	22.47	21.87	0.47	-0.13
42.0	375	796	1103	38.42	40.24	3.58	-1.76
82.0	385	1415	1125	78.00	79.79	-4.00	-2.21

[0093] 对比例1

[0094] 利用实施例1的方法制备免疫层析试纸条,区别仅在于,试纸条仅具有一条T线和一条C线,喷金点膜机的喷涂速度为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$,T线为浓度 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的多克隆抗体,C线为浓度 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的兔抗鼠IgG抗体。获得常规的仅有一条校准线的对比试纸条1。

[0095] 利用所述对比试纸条对胰蛋白酶原2标准溶液和配制的胰蛋白酶原2样本进行检测,使用福建普立辰生物技术公司的PL-FL-01型干式荧光免疫检测仪收集T线和C线的荧光曲线峰积分面积值检测结果,并将T线检测信号对C线检测信号的比值(T/C)作为纵坐标y,以标准品溶液的浓度值做为横坐标x,计算得到校准曲线。按照常规方法,利用该校准曲线计算胰蛋白酶原2样本的浓度,检测结果如表3所示。

[0096] 表3

[0097]

待测样品实际浓度 (ng/mL)	未校正的浓度 (ng/mL)	T/C 校正的检测浓度 (ng/mL)	检测浓度与实际浓度的差异
5.9	4.46	5.10	-0.8
11.8	9.25	14.00	2.2
22.0	22.47	24.10	2.10
42.0	38.42	39.0	-3.0
82.0	78.00	78.5	-3.5

[0098] 从表2和表3的结果可以看出,利用本公开所提供的试纸条和方法对待测样品进行检测所获得的检测数据的准确性显著高于仅含有一条C线的免疫层析试纸条。说明相比于传统的检测方法,利用两条校准线C1线和C2线对检测数据进行校准能够获得更加准确的检测数据。特别是当待检测物的浓度在5-40ng/ml时,相比于基于常规试纸条的传统检测方法,本公开所提供方法的优势特别显著。

[0099] 测试例1

[0100] 以PBS进行系列梯度稀释的人血清为待测样品,分别利用实施例1的试纸条和方法以及对比例1的试纸条和方法对其进行胰蛋白酶原2的定量检测,获得检测结果,并将检测结果与用ELISA方法的定量检测结果进行比较,结果如表4所示。

[0101] 表4

[0102]

人血清稀释倍数	ELISA方法 (ng/mL)	免疫层析试纸条1 (ng/mL)	对比试纸条1 (ng/mL)
2	48.2	48.8	47.9
4	24.9	25.1	23.1
8	12.2	12.6	11.6
16	5.8	5.7	5.3
32	2.88	2.85	2.65
64	1.47	1.46	1.26

[0103] 实施例2

[0104] 采用实施例1的方法制备免疫层析试纸条并进行待测样品的检测,区别仅在于,APTES的工作浓度为0.8mg/mL,BSA的工作浓度为9mg/mL,制备获得免疫层析试纸条2,计算检测浓度与实际浓度的差异,结果如表5所示。

[0105] 实施例3

[0106] 采用实施例1的方法制备免疫层析试纸条并进行待测样品的检测,区别仅在于,APTES的工作浓度为1.2mg/mL,BSA的工作浓度为11mg/mL,制备获得免疫层析试纸条3,计算检测浓度与实际浓度的差异,结果如表5所示。

[0107] 实施例4

[0108] 采用实施例1的方法制备免疫层析试纸条并进行待测样品的检测,区别仅在于,C1线为浓度10ng/mL的胰蛋白酶原2,C2线为浓度100ng/mL的胰蛋白酶原2。制备获得免疫层析试纸条4,计算检测浓度与实际浓度的差异,结果如表5所示。

[0109] 实施例5

[0110] 采用实施例1的方法制备免疫层析试纸条并进行待测样品的检测,区别 仅在于,C1线为浓度40ng/mL的胰蛋白酶原2,C2线为浓度50ng/mL的 胰蛋白酶原2。制备获得免疫层析试纸条5,计算检测浓度与实际浓度的差 异,结果如表5所示。

[0111] 表5

[0112]

待测样品实际浓度 (ng/mL)	检测浓度与实际浓度的差异				
	试纸条 1	试纸条 2	试纸条 3	试纸条 4	试纸条 5
5.9	-0.49	0.41	0.30	-0.60	-0.35
11.8	-1.70	0.01	0.80	-1.98	-1.50
22.0	-1.84	0.16	1.08	-2.84	-1.64
42.0	-1.69	0.31	1.24	-2.69	-2.88
82.0	-2.49	-0.49	1.33	-1.49	-3.49

[0113] 以上结果表明,利用本公开所提供的试纸条和检测方法,获得的检测结 果与待测样品中待测物的实际浓度的差异可以更好的缩小。特别是当所述带 氨基基团的烷基硅氧烷为APTES且工作浓度为0.8mg/mL时,获得的免疫层 析试纸条的定量检测结果更精确。

[0114] 此外,当喷金点膜机的喷涂速度为1 μ L/cm,C1线为浓度12ng/mL的胰 蛋白酶原2溶液,C2线为浓度60ng/mL的胰蛋白酶原2溶液,获得的免疫 层析试纸条的定量结果更准确,检测的结果与实际浓度的符合程度更高。

[0115] 以上结合附图详细描述了本公开的优选实施方式,但是,本公开并不限 于上述实施方式中的具体细节,在本公开的技术构思范围内,可以对本公开 的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本公开的保护范围。

[0116] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特 征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必 要的重复,本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0117] 此外,本公开的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其 不违背本公开的思想,其同样应当视为本公开所公开的内容。

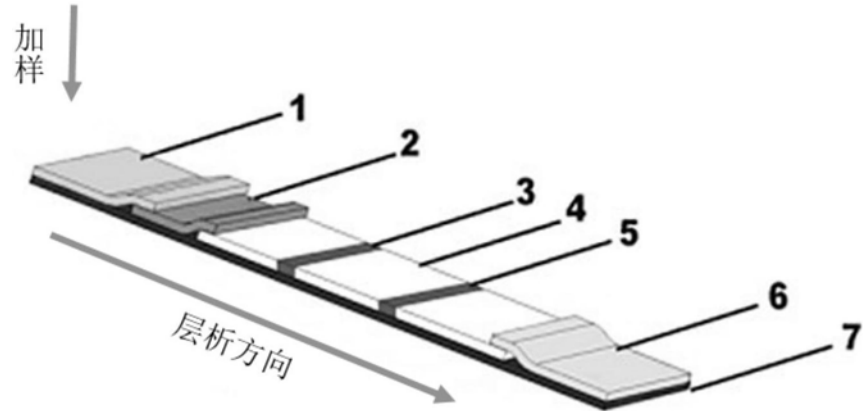


图1

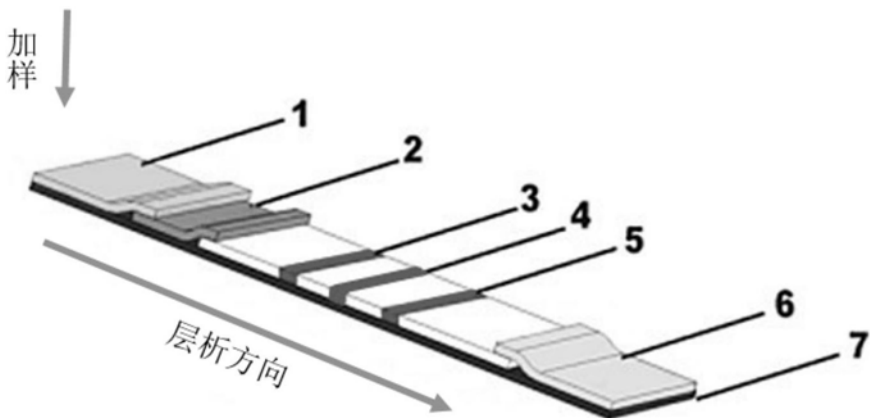


图2

专利名称(译)	一种免疫层析试纸条及免疫层析检测方法		
公开(公告)号	CN108226466A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201711250475.6	申请日	2017-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	郑乐民		
申请(专利权)人(译)	郑乐民		
当前申请(专利权)人(译)	郑乐民		
[标]发明人	郑乐民 段学军 赵明明 刘昌杰 何萌萌 路美玲 彭明辉 李瑶		
发明人	郑乐民 段学军 赵明明 刘昌杰 何萌萌 路美玲 彭明辉 李瑶		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	耿超 王浩然		
其他公开文献	CN108226466B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开涉及一种免疫层析试纸条及免疫层析检测方法，该试纸条包括依次相连接的样品垫、标记垫、基膜和吸水垫；所述基膜上依次设置校准线C1线、校准线C2线和测试T线，所述C1线和C2线上分别包被浓度不同的校准物；所述标记垫上含有荧光标记的第一单克隆抗体；所述T线上包被有多克隆抗体；其中，所述C1线和C2线上分别包被不同浓度的校准物，所述校准物为能够捕获所述第一单克隆抗体的物质。本公开所提供的纸条和方法，通过利用两条校准线C1和C2，获得能够与检测信号定量比较的校准信号并建立校正方程，从而在每次检测中都对T线的检测结果进行校准，相比于仅有一条主校准线的普通免疫层析试纸，获得的定量数据更加准确可信。

