



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102116770 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 200910262783. X

(22) 申请日 2009. 12. 31

(73) 专利权人 北京热景生物技术有限公司

地址 100026 北京市大兴区经济技术开发区
科苑路 27 号院

专利权人 杨瑞馥 周蕾

(72) 发明人 林长青 杨瑞馥 周蕾 李华柏

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101551388 A, 2009. 10. 07,

US 2005/0136486 A1, 2005. 06. 12,

CN 1690711 A, 2005. 11. 02,

孙企达. 超细粉体的分散性. 《冷冻干燥超

细粉体技术及应用》. 2006,

伍祥武. 纳米铋掺杂氧化锡防团聚方法综

述. 《企业科技与发展》. 2009, (第 12 期),

赵永凯. 基于上转换发光技术的生物传感器
及其应用. 《光学学报》. 2006, 第 25 卷 (第 6 期),
第 841-847 页.

Zhongqiang Yan. Rapid quantitative
detection of Yersinia pestis by
lateral- β 4258

ow immunoassay and up-converting
phosphor technology-based biosensor.

《sensors and actuators B》. 2006, 第 656-663
页.

审查员 刘迎鸣

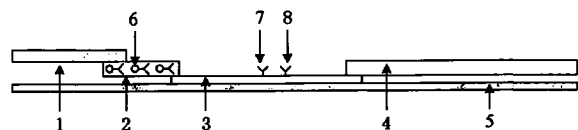
权利要求书1页 说明书17页 附图4页

(54) 发明名称

一种免疫层析快速试剂盒及其生产制备

(57) 摘要

本发明涉及了一种免疫层析试纸条的生产方法及应用这种生产方法而制备的甲胎蛋白快速定量免疫层析试纸条和 C 反应蛋白快速定量免疫层析试纸条。该层析试纸条采用上转发光材料即 UCP 作为生物标记物。其结构主要包括：样品垫、结合垫或结合物稀释垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和塑料卡组成。本发明涉及了产业化生产这种上转发光法免疫层析试纸条的方法、使用方法。应用该上转发光检测免疫层析试纸条可快速、简便、定量的测定被检测物的含量，准确的对疾病进行，为疾病的预防、诊断、治疗提供支持。



1. 一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于含有上转换发光材料(UCP)-生物分子颗粒的结合垫或结合物稀释垫是经冻干的。

2. 权利要求1所述的免疫层析试纸条,其中所述结合垫或结合物稀释垫是使用UCP保存液和冻干液处理后的上转换发光材料(UCP)-生物分子颗粒冻干而成。

3. 权利要求1所述的免疫层析试纸条,其中所述试纸条包括一外壳,所述外壳上包括加样孔、结果判读窗口和终点指示窗口。

4. 权利要求3所述的免疫层析试纸条,其中通过所述加样孔,将生物样品添加到样品垫上;结果判读窗口对应于分析膜上的检测带和质控带;终点指示窗口对应于吸水垫上的终点指示带。

5. 权利要求1-4任一项所述的免疫层析试纸条,其中所述生物分子选自AFP抗体、CRP抗体、肌钙蛋白I CTN-I抗体、脑钠肽BNP抗体、N端前体脑钠肽N-pro-BNP抗体、盐酸克伦特罗抗体、盐酸莱克多巴胺抗体、丙型肝炎病毒HCV抗原、流感病毒A型Flu-A抗体、乙肝表面抗原抗体和髓过氧化物酶MPO抗体。

6. 一种制备权利要求1-4任一项所述的免疫层析试纸条的方法,其中在制备结合垫或结合物稀释垫的过程中,所述结合垫或结合物稀释垫是经冻干的。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述制备结合垫或结合物稀释垫的过程包括:

- a) 将UCP-生物分子悬浊液离心并弃上清;
- b) 向a)步骤得到的UCP-生物分子沉淀物中加入UCP保存液,吹打混匀;
- c) 向b)步骤得到的UCP-生物分子悬浊液中加入冻干液;
- d) 将c)步骤得到的UCP-生物分子悬浊液中加于玻璃纤维上;
- e) 将玻璃纤维放于-80℃下,预冻时间0.5小时,真空冻干2小时;

其中所述UCP保存液为pH7.2的0.15M的磷酸缓冲液,含有2wt%BSA和0.05wt%NaN₃,所述冻干液为pH7.2的0.15M的磷酸缓冲液,含有4.2wt%BSA、5.6wt%海藻糖和1.5wt%甘氨酸。

8. 一种基于上转换发光技术的免疫层析快速试剂盒,其特征在于包括权利要求1-4任一项所述的免疫层析试纸条。

9. 权利要求8所述的试剂盒,其中所述免疫层析试纸条中的生物分子选自AFP抗体、CRP抗体、肌钙蛋白I CTN-I抗体、脑钠肽BNP抗体、N端前体脑钠肽N-pro-BNP抗体、盐酸克伦特罗抗体、盐酸莱克多巴胺抗体、丙型肝炎病毒HCV抗原、流感病毒A型Flu-A抗体、乙肝表面抗原抗体和髓过氧化物酶MPO抗体。

一种免疫层析快速试剂盒及其生产制备

技术领域

[0001] 本发明涉及了一种免疫层析试纸条、其制备方法及含有所述试纸条的试剂盒。具体而言,本发明涉及一种基于上转发光技术的免疫层析试纸条,采用冻干法生产所述免疫层析试纸条的生产方法,以及包含所述免疫层析试纸条的检测试剂盒。本发明还涉及了应用上述生产方法生产的用于检测甲胎蛋白、C 反应蛋白的免疫层析试纸条及其试剂盒。

背景技术

[0002] 中国专利申请 200410034104.0 中记载了一种被称为上转发光材料 (UCP) 的物质以及应用该材料作为标记物的免疫层析试纸条。

[0003] 虽然上转发光材料具有高灵敏性、高稳定性、高简易性、高灵活性和高安全性等诸多优点,使其在作为生物标记物方面具有广泛的应用前景。但是至今仍然没有一种商品化的上转发光法定量检测试纸可以供临床使用,原因是在于现有的基于上转发光法的免疫层析试纸条无法满足对定量检测试纸的生产质量要求。如中国专利申请 200410034104.0 所述,以往 UPT(上转发光技术,Up-Convertng Phosphor Technology) 快速试纸的制备方法中结合垫或结合物释放垫是采用烘干方法。由于 UCP 颗粒容易团聚,导致烘干结合垫后裁剪的变异过大,批内精密度低,变异系数 (CV) 大于 15%。变异系数 CV 常被用于表示精密度,包括批内和批间变异系数两种(分别对应于批内精确度和批间精确度),CV 越小精密度越高。批间精密度的 CV 值一般大于批内,低含量标本的 CV 值一般大于高含量标本。最常见的精密度评价是对稳定的样品作多次测定,求这些重复测定值的均值和标准差 s ,以及变异系数 CV。重复次数一般要求 10-20 次。若在一批内的重复测定,这是批内精密度;卫生部发的《临床化学体外诊断试剂盒质量检验总则》WS/T124-1999 中有这方面的检测和计算方法的规定。一般临床免疫试剂的批内和批间 CV 均应该 $\leq 15\%$ 。

[0004] 医院实验室对病人标本检测时,由于该行业的沿袭特点,一直是对每份标本只作一次检测发出报告。因此国际上将精密度性能列为实验方法、仪器或试剂盒分析性能的第一位。检测结果必须具重现性,也即具有良好的精密度。因此急需开发出具有较高精密度的基于上转发光法技术的免疫层析试纸条。

[0005] 甲胎蛋白 (α -Fetoprotein, AFP) 是 1956 年 Bergstrandh 和 Czar 在人胎儿血清中发现的一种专一性的甲种球蛋白,是胚胎早期的主要蛋白质,来源于胎儿肝脏和卵黄囊。胎儿的 AFP 浓度非常高,可达 1-10mg/ml,但在出生后迅速下降,生后 2 个月只有痕量 AFP 可检测到,并几乎完全被血清白蛋白所替代。甲胎蛋白是原发性肝细胞癌 (PHC) 较为特异的肿瘤标志物,70% 以上的患原发性肝细胞癌病人早期血清中 AFP 含量升高。同时在其它一些恶性肿瘤中也能发现 AFP 水平升高,如睾丸癌。对血清中 AFP 含量的检测可以用作肝癌高发区普查以及肝癌的早期临床诊断,同时也可以评定肝癌的治疗效果和判断预后。

[0006] C-反应蛋白 (CRP) 是参与炎症的主要时机反应蛋白,在各种急性炎症、组织损伤、心肌梗塞、手术创伤、放射性损伤等疾病发作后数小时迅速升高,并有成倍增长之势。病变好转时,又迅速降至正常,其升高幅度与感染的程度呈正相关。C-反应蛋白还可用于细菌和

病毒感染的鉴别诊断。一旦发生炎症, C- 反应蛋白水平即升高, 而病毒性感染 C- 反应蛋白大都正常。

[0007] 近年来发现 C- 反应蛋白浓度甚至在正常范围内的轻度升高都与心血管疾病发生的危险性增加有关, 可以推测以后心肌梗死事件发生的可能性。超敏 C- 反应蛋白是心脑血管疾病中的一项独立风险预测指标, 可以敏感地预测糖尿病合并心、脑血管事件的危险发生率。

[0008] AFP 和 CRP 都是常见的 POCT 检测指标。应用上转发光免疫分析技术开发 AFP 及 CRP 快速检测免疫层析试纸条应用于床旁快速检测 (POCT) 领域有临床应用价值, 但是批内精密度 (CV) 应不高于 15% 才能满足临床使用需要。因此需要具有可以应用于 POCT 检测的高精密度, 基于上转发光技术的成品 AFP 及 CRP 快速检测免疫层析试剂条及试剂盒。

发明内容

[0009] 为了克服上述现有技术中的不足, 本发明提供一种基于上转发光技术的采用经冻干法制备的结合垫或结合物释放垫的免疫层析试纸条, 具有精密度高即变异系数 $CV \leq 15\%$ 的特点。

[0010] 本发明的试纸条是检测原理是通过一系列表面修饰与活化, 上转换发光材料 UCP (Up-Convertng Phosphor, UCP) 颗粒可与生物活性分子相结合, 利用 UPT 生物传感器, 对在层析过程中通过特异免疫反应结合于特定区域 (检测带与质控带) 的 UCP 颗粒进行扫描分析, 从而利用由 UPT 快速定量检验系统实现精确定量或定性。

[0011] 具体地, 本发明提供了一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸条, 其特征在于含有上转换发光材料 (UCP) - 生物分子颗粒的结合垫或结合物稀释垫是经冻干的。

[0012] 在一个优选的实施方案中, 所述免疫层析试纸条的分析膜为硝酸纤维素膜。

[0013] 在另一个优选的实施方案中, 所述试纸条包括一外壳, 所述外壳上包括加样孔、结果判读窗口和终点指示窗口, 如图 2B 所示。

[0014] 在另一个优选的实施方案中, 通过所述加样孔, 将生物样品添加到样品垫上; 结果判读窗口对应于分析膜上的检测带和质控带; 终点指示窗口对应于吸水垫上的终点指示带, 如图 2B 所示。

[0015] 在另一个优选的实施方案中, 所述生物分子选自 AFP 抗体、CRP 抗体、肌钙蛋白 I CTN-I 抗体、脑钠肽 BNP 抗体、N 端前体脑钠肽 N-pro-BNP 抗体、盐酸克伦特罗 (瘦肉精) 抗体、盐酸莱克多巴胺抗体、丙型肝炎病毒 HCV 抗原、流感病毒 A 型 Flu-A 抗体、乙肝表面抗原抗体和髓过氧化物酶 MPO 抗体。优选地, 所述上述抗体均为单抗。

[0016] 本发明还提供了一种制备上述免疫层析试纸条的方法, 其中在制备结合垫或结合物稀释垫的过程中, 所述结合垫或结合物稀释垫是经冻干的。

[0017] 在一个优选的实施方案中, 所述制备结合垫或结合物稀释垫的过程包括:

[0018] a) 将 UCP- 生物分子悬浊液离心并弃上清;

[0019] b) 向 a) 步骤得到的 UCP- 生物分子沉淀物中加入 UCP 保存液, 吹打混匀;

[0020] c) 向 b) 步骤得到的 UCP- 生物分子悬浊液中加入冻干液;

[0021] d) 将 c) 步骤得到的 UCP- 生物分子悬浊液中加入于玻璃纤维上;

[0022] e) 将玻璃纤维放于 -80°C 下, 预冻时间 0.5 小时, 真空冻干 2 小时。

[0023] 在一个优选的实施方案中,所述 UCP 保存液为 pH7.2 的 0.15M 的磷酸缓冲液,含有 2wt% BSA 和 0.05wt% NaN₃,所述冻干液为 pH7.2 的 0.15M 的磷酸缓冲液,含有 4.2wt% BSA、5.6wt% 多糖和 1.5wt% 甘氨酸。

[0024] 本发明还提供了一种基于上转换发光技术的免疫层析快速试剂盒,包括本发明的上述免疫层析试纸条。

[0025] 在一个优选的实施方案中,上述试剂盒中试纸条的生物分子选自 AFP 抗体、CRP 抗体、肌钙蛋白 I CTN-I 抗体、脑钠肽 BNP 抗体、N 端前体脑钠肽 N-pro-BNP 抗体、盐酸克伦特罗(瘦肉精)抗体、盐酸莱克多巴胺抗体、丙型肝炎病毒 HCV 抗原、流感病毒 A 型 Flu-A 抗体、乙肝表面抗原抗体和髓过氧化物酶 MPO 抗体。优选地,所述上述抗体均为单抗。

[0026] 在一个实施方案中,本发明提供了一种含有上述 AFP-UPT 快速检测免疫层析试剂条的试剂盒。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种含有上述 CRP-UPT 快速检测免疫层析试剂条的试剂盒。

[0028] 本发明克服了以往烘干法生产上转发光免疫层析试纸条碰到的精密度低,变异系数 CV% 过大的问题,克服了上转发光法免疫层析试纸条产业化当中的极其重要的问题。使得上转发光法免疫层析试纸条可以应用于临床。

附图说明

[0029] 图 1 为两个光子激发 UCP 产生上转发光的过程。

[0030] 图 2 为附图为本发明冻干法上转发光免疫定量检测免疫层析试纸条免疫层析试纸条的剖面结构示意图。其中图 2A 中 1 为样品垫、2 为结合垫、3 为分析膜、4 为吸水垫、5 为粘性低衬、6 为 UCP 结合物、7 为检测带 T 线、8 为质控带 C 线。图 2B 中 9 为加样孔、10 为结果判读窗口、11 为终点指示窗口。

[0031] 图 3 为对比烘干法和冻干法方法差别。

[0032] 图 4 为烘干法和冻干法制备的免疫层析试纸条的测量变异对比。

[0033] 图 5 为本发明 AFP-UPT 试剂盒的对 AFP 定量标准品线性检测结果。

[0034] 图 6 为本发明 AFP-UPT 上转发光检测试剂盒和 AFP 电化学发光免疫试剂盒测定 AFP 临床样本比较。

[0035] 图 7 本发明 CRP-UPT 试剂盒对 CRP 定量标准品的线性检测结果。

[0036] 图 8 为为本发明 CRP-UPT 上转发光检测试剂盒和免疫比浊法贝克曼 CRP 试剂盒测定 CRP 临床样本比较。

具体实施方式

[0037] 下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是,本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的具体改进都属于本发明要求保护的范围。

[0038] 实施例 1:基于上转发光法技术的免疫层析试纸条制备过程中采用烘干法和采用冻干法时的差别及其对 CV 的影响:

[0039] A) 对比烘干法和冻干法方法差别(如图 3 所示)

[0040] 冻干结合垫的制备:UCP 颗粒采购自上海科润光电技术有限公司,玻璃纤维、纤维素膜采购自 Millipore 公司、塑料卡和吸水垫购买自上海金标生物科技有限公司,塑料卡购买自深圳市金灿华实业有限公司。

[0041] a) 将 50ml UCP 标记物 (UCP-生物分子) 悬浊液,以 12000rpm 在 4℃ 下离心 30min,弃去上清液;

[0042] b) 在 UCP 沉淀物中加入 5ml 的保存液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液,含 2wt% BSA 和 0.05wt% NaN_3),吹打混匀;

[0043] c) 加入 45ml 的冻干液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液,含 4.2wt% BSA、5.6wt% 海藻糖和 1.5wt% 甘氨酸);

[0044] d) 将 UCP 标记物悬浊液按 12.5ml/cm² 加于玻璃纤维上;

[0045] e) 将玻璃纤维在 -80℃ 下,预冻 0.5h;真空冻干 2h;

[0046] f) 裁剪玻璃纤维,装塑料卡

[0047] 烘干法制备结合垫的步骤:

[0048] a) ~ d):与冻干结合垫的制备相同,

[0049] e):将玻璃纤维在 37℃ 的鼓风干燥箱中 2 小时。

[0050] f) 裁剪玻璃纤维,装塑料卡

[0051] B) 两种生产方法的成品 (C 反应蛋白 CRP 上转发光法免疫层析试纸条) 进行 CV 检测对比:

[0052] 取高、低浓度血清各一份,用两种方法制备的试纸条测量,同一份血清用每种试纸条各测 10 次,计算 10 次测量结果的变异系数 (CV)。结果如图 4 及表 1 和表 2 所示

[0053] 表 1 高浓度血清测量结果 (单位:ng/ml)

[0054]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CV
烘干法	376.40	278.54	434.52	408.14	516.91	528.11	526.22	347.85	398.84	347.17	20.49%
冻干法	378.74	402.11	421.26	425.24	426.20	417.39	411.79	394.23	426.83	400.96	3.92%

[0055] 表 2 低浓度血清测量结果 (单位:ng/ml)

[0056]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CV
烘干法	23.80	14.91	13.73	13.56	18.23	25.32	17.61	25.12	17.36	23.99	24.55%
冻干法	21.27	19.28	19.08	21.48	20.34	19.48	21.18	20.11	18.59	20.62	5.00%

[0057] 结果可见,冻干法制备的免疫层析试纸条测量结果的变异系数(CV)明显小于烘干法制备的免疫层析试纸条。

[0058] 实施例2:AFP-UPT免疫层析试纸条的原理及采用冻干法工艺制备AFP-UPT免疫层析试纸条的方法

[0059] 该试纸条的原理:AFP-UPT快速检测试纸条采用双抗体夹心免疫层析方法定量检

测样品中甲胎蛋白含量。分析膜上测试区 (T) 预包被抗甲胎蛋白单抗, 质控区 (C) 预包被羊抗鼠 IgG, 结合垫上有 UCP 颗粒标记的另一株抗甲胎蛋白单抗。反应时样品中甲胎蛋白与两株抗体反应结合, 在 T 区形成抗甲胎蛋白抗体-甲胎蛋白抗原-UCP 标记的抗甲胎蛋白抗体复合物, UCP 颗粒在红外光激发下发射可见光, 发射光的强度与样品中甲胎蛋白的浓度成正比。无论样品中是否存在甲胎蛋白, 在 C 区都会形成羊抗鼠-UCP 标记的抗甲胎蛋白抗体复合物。

[0060] 所述经冻干法制备的基于上转发光法技术的 AFP-UPT 免疫层析试纸条 (简称 AFP-UPT 试纸条) 所采用的标记单抗为北京热景生物技术公司出售, 克隆号为 2G5, 包被用的 AFP 单抗也为该公司出售, 克隆号 3B11。

[0061] 采用冻干法方法生产 AFP-UPT 免疫层析试纸条所用的辅助试剂——UCP-生物分子的稀释液同时作为结合垫的冻干液, 其组分如下: 该稀释液的组分为以下成分组成: pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 4.2wt% BSA、5.6wt% 海藻糖和 1.5wt% 甘氨酸

[0062] (1) 包被: 将 AFP 单抗 3B11 稀释到 2mg/ml, 作为检测带 T 线包被液, 将羊抗鼠 IgG (北京热景生物技术公司出售, 产品编号 YL031) 稀释到 2mg/ml, 作为质控带 C 线包被液。通过喷膜机, 将检测带 T 线包被液和质控带 C 线包被液包被到硝酸纤维素膜上。晾干, 即获得单克隆抗体包被膜条。

[0063] (2) 样品垫的制备: 将玻璃纤维 (上海金标生物技术有限公司) 裁成 1.5cm 长 X2mm 宽条带作为样品垫

[0064] (3) UCP 标记单抗: 本试剂盒中的 UCP 标记单克隆抗体 (即 UCP-生物分子) 是用以下步骤获得, 步骤如下:

[0065] a) 称取 10mg UCP 颗粒置于锥形瓶中;

[0066] b) 加入 10ml pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液;

[0067] c) 向 UCP 颗粒悬浊液中加入 0.5mg AFP 单抗 2G5, 搅拌过夜;

[0068] d) 以 12000rpm 在 4°C 下离心 30min, 弃去上清液;

[0069] e) UCP 沉淀物中加入 10ml pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 吹打混匀;

[0070] f) 以 12000rpm 在 4°C 下离心 30min, 弃去上清液;

[0071] g) 向 UCP 沉淀物中加入 10ml 封闭液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 2wt% BSA), 吹打混匀;

[0072] h) 将上述 UCP 悬浊液倒入锥形瓶中, 搅拌 1h;

[0073] i) 以 12000rpm 在 4°C 下离心 30min, 弃去上清液;

[0074] j) UCP 沉淀物中加入 10ml 保存液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 2wt% BSA 和 0.05wt% NaN_3), 吹打混匀;

[0075] (4) 冻干结合垫的制备:

[0076] a) 将 50ml UCP 标记物悬浊液, 12000rpm, 4°C, 离心 30min, 弃上清;

[0077] b) UCP 沉淀物中加入 5ml 的保存液 (pH = 7.20.15M 磷酸缓冲液, 含 2wt% BSA, 0.05wt% NaN_3), 吹打混匀;

[0078] c) 加入 45ml 的冻干液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 4.2wt% BSA、5.6wt% 海藻糖和 1.5wt% 甘氨酸);

[0079] d) 将 UCP 标记物悬浊液按 12.5ml/cm² 加于玻璃纤维上;

- [0080] e) 将玻璃纤维放 -80°C , 预冻 0.5h ;
- [0081] f) 真空冻干 2h ;
- [0082] (5) 裁剪结合垫 ;将冻干的结合垫裁剪成 1cm 宽的长条。
- [0083] (6) 分析膜的制备 :将 NC 膜 (采购自 Millipore 公司) 贴于 PVC 板上, 然后分检测带 T 线、质控带 C 线采用喷膜机划线。
- [0084] (7) 组装试纸条 ;依次将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴到底板 (即上述的带有分析膜的 PVC 板) 上, 切成 4.0mm 宽的纸条。
- [0085] (8) 装塑料卡 ;将 4.0mm 宽的试纸条装到塑料卡底壳中, 盖上塑料卡上壳, 压紧。
- [0086] 实施例 3. 采用冻干法方法生产的 AFP-UPT 试剂盒的组成 :
- [0087] 1、实施例 2 中制备的 AFP-UPT 免疫层析试纸条
- [0088] 2、样本稀释液
- [0089] 3、样品管
- [0090] 4、使用说明书
- [0091] 所述 AFP-UPT 试剂盒中的样本稀释液组成如下 :pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含有 1% v/v Tween 20。
- [0092] 实施例 4 :本发明的 AFP-UPT 试剂盒的质量检测
- [0093] 采用本发明提供的检测甲胎蛋白 AFP 的上转发光法检测试剂盒进行甲胎蛋白含量检测的步骤为 :
- [0094] a. 在测试前先完整阅读使用说明书,
- [0095] b. 将待测样本从储存环境中取出, 编号并且平衡至室温 ($20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$)。
- [0096] c. 将试纸条置于干净平整的平面上, 取 $40\ \mu\text{l}$ 血清或血浆样本加至 UPT 免疫层析试纸条的加样孔, 再加入 $100\ \mu\text{l}$ 稀释液, 同时开始计时。
- [0097] d. 放置 15min 后, 利用 UPT 生物传感器对试纸条进行扫描分析。
- [0098] e. UPT 生物传感器显示测量结果, Y 值为甲胎蛋白的浓度, 系统默认单位为 mg/L。
- [0099] 检测指标 :
- [0100] 1) 准确性 :采用试剂盒校准品与相应浓度的国家校准品 (来源于中国药品生物制品检定所) 同时进行分析测定, 用双对数 (或其它适当的) 数学模型拟合, 要求两条剂量 - 反应曲线不显著偏离平行 (t 检验), 以国家标准品为对照, 试剂盒校准品的测定浓度与理论浓度的比值即为试剂盒校准品的效价。测定结果应符合以下规定, 即试剂盒校准品的效价应在 0.900 ~ 1.100 范围内。
- [0101] 2) 精密度 :随机抽取 20 人份试纸条, 用同一份 AFP 阳性质控血清 (来源于解放军第 302 医院) 按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果, 求出均值、标准偏差 (SD) 和变异系数 CV。批内变异系数 (CV) 应不高于 15%。
- [0102] 具体检测方法如下 :
- [0103] a. 将试纸条、稀释液及待测样本平衡至室温 ($20 \sim 25^{\circ}\text{C}$)。
- [0104] b. 拆开试纸条的铝箔袋包装, 将试纸条放置在平整的表面上。
- [0105] c. 在试纸条外壳上写上待测样本的编号。
- [0106] d. 取 $50\ \mu\text{l}$ 样本, 加入加样孔中。
- [0107] e. 取 $70\ \mu\text{l}$ 稀释液, 加入加样孔中。

[0108] f. 室温放置 15 分钟。

[0109] g. 在上转发光免疫分析仪中输入该批试纸条的参数,进行测量。

[0110] h. 数据处理:与 AFP 定量测定试剂盒配套的上转发光免疫分析仪具有计算浓度功能。测量完成后仪器自动将 T/C 值 (TEST 线 /CONTROL 线的浓度比值) 经过计算得到的浓度值显示在屏幕上。

[0111] 3) 检测灵敏度:根据 AFP 标准品稀释测定结果,本试剂盒的检测灵敏度为 < 5ng/ml。

[0112] 测定 20 个 0ng/ml 点,计算平均值和标准差,以 (平均值 +2 倍标准差) 在标准曲线上对应的浓度为灵敏度。

[0113] 表 3 灵敏度检测数据

[0114]

0 ng/ml	0.177	0.167	0.243	0.177	0.262	0.180	0.170	0.248	0.214	0.211
	0.231	0.221	0.268	0.165	0.207	0.270	0.214	0.265	0.161	0.274
平均值	0.216		标准差	0.040		平均值 + 2 倍标准差			0.296	

[0115] 表 4 灵敏度检测结果

甲胎蛋白 AFP 标准品					灵敏度
5ng/ml	20ng/ml	100ng/ml	400ng/ml	1000ng/ml	
0.357	0.526	1.083	2.442	4.267	2.23ng/ml

[0117] 4) 特异性:与人血清白蛋白 (HSA)、癌胚抗原 (CEA) 无显著交叉反应。

[0118] 测定 200mg/ml 的人血清白蛋白 (HSA) 和 200ng/ml 的癌胚抗原 (CEA)。在标准曲线上计算 HSA 和 CEA 测得的浓度分别为 0.44ng/ml 和 0.59ng/ml (表 5、6)。

[0119] 表 5 与 BSA 和 CEA 的交叉反应检测结果

[0120]

甲胎蛋白 AFP 标准品						人血清白蛋白 HSA	癌胚抗原 CEA
0ng/ml	5ng/ml	20ng/ml	100ng/ml	400ng/ml	1000ng/ml	200mg/ml	200ng/ml
0.195	0.327	0.547	1.105	2.265	4.144	0.225	0.231

[0121] 表 6 与其它物质的交叉反应数据

[0122]

交叉原	浓度 (ng/ml)	相当于 AFP (ng/ml)
HSA	2×10^6	≤ 5.0
CEA	200	≤ 5.0

[0123] 检测结果:

[0124] A) 准确性检测的结果：

[0125] 国家标准品购买自中国药品生物制品检定所，为 5ng/ml ;20ng/ml ;100ng/ml ;400ng/ml ;1000ng/ml ;结果如图 5 及表 7 所示

[0126] 表 7 准确性检测的结果

[0127]

标准品含量	检测值 T/C	检测值
0ng/ml	0.045	0.005ng/ml
5ng/ml	0.365	5.2ng/ml
20ng/ml	0.547	21ng/ml
100ng/ml	1.102	99ng/ml
400ng/ml	2.265	405ng/ml
1000ng/ml	4.165	991ng/ml

[0128] B) 精密度检测结果：将浓度为 20ng/ml、400ng/ml 的标准品加入本发明的 AFP-UPT 免疫层析试纸条中，每个标准品采用试纸条检测 10 次，记录每次检测值然后计算精密度 $CV = SD / \text{平均值} \%$ 。

[0129] 表 8 精密度检测结果

[0130]

AFP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	SD	CV
20ng/ml	19.75	19.49	19.20	20.00	19.19	19.94	20.88	20.46	20.97	18.71	19.86ng/ml	0.75	3.76%
400ng/ml	384.57	427.72	405.10	409.48	387.61	422.80	404.87	392.60	411.88	401.91	404.85ng/ml	14.08	3.48%

[0131] 实施例 5：本发明 AFP-UPT 试剂盒和 AFP 电化学发光免疫试剂盒的性能对比：

[0132] 取本发明 AFP-UPT 试剂盒和罗氏公司的 AFP 电化学发光试剂盒进行了对比检测实验。

[0133] 采用北京地坛医院病毒研究室提供的标本进行对比检测：120 份已知原发性肝癌阳性标本，50 份体检健康血清，100 份肝炎，肝病标本均为 AFP 阳性标本。结果见表 9 及图 6。

[0134] 表 9 在不同标本中检出率比较

血清来源	例数	阳性数 (阳性比例)	
		AFP-UPT 试剂盒	AFP 电化学化学发光试剂盒
[0135] 120 份原发性肝癌阳性标本	120	120(100%)	120(100%)
50 份健康人	50	0(0%)	0(0%)
100 份肝炎	100	98(98%)	98(98%)

[0136] 结果表明,这 2 种方法线性关系没有差异,即本发明的 AFP-UPT 试剂盒与罗氏公司的 AFP 电化学化学发光免疫试剂盒的性能非常接近,没有差异。

[0137] 实施例 6:CRP-UPT 免疫层析试纸条的原理及采用冻干法方法制备 CRP-UPT 免疫层析试纸条的方法

[0138] CRP-UPT 免疫层析试纸条采用双抗体夹心免疫层析方法定量检测样品中 CRP 含量。分析膜上测试区 (T) 预包被抗 CRP 单抗,质控区 (C) 预包被羊抗鼠 IgG,结合垫上有 UCP 颗粒标记的另一株抗 CRP 单抗。反应时样品中 CRP 与两株抗体反应结合,在 T 区形成抗 CRP 抗体-CRP 抗原-UCP 标记的抗 CRP 抗体复合物,UCP 颗粒在红外光激发下发射可见光,发射光的强度与样品中 CRP 的浓度成正比。无论样品中是否存在 -CRP,在 C 区都会形成羊抗鼠-UCP 标记的抗 CRP 抗体复合物。

[0139] 所述冻干法制备的基于上转发光法的 CRP-UPT 免疫层析试纸条(简称 CRP-UPT 试纸条)所采用的标记单抗为北京热景生物技术公司出售,克隆号 3C8,包被用的 CRP 单抗也为该公司出售,克隆号为 3D7。该稀释液的组分为以下成分组成:pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液,含 4.2wt% BSA、5.6wt% 海藻糖和 1.5wt% 甘氨酸

[0140] (1) 包被:将 CRP 单抗 3D7 稀释到 2mg/ml,作为检测带 T 线包被液,将羊抗鼠 IgG(北京热景生物技术公司出售,产品编号 YL031) 稀释到 2mg/ml,作为质控带 C 线包被液。通过喷膜机,将检测带 T 线包被液和质控带 C 线包被液包被到硝酸纤维素膜上。晾干,即获得单克隆抗体包被膜条。

[0141] (2) 样品垫的制备:将玻璃纤维(上海金标生物技术有限公司)裁成 1.5cm 长 X2mm 宽条带作为样品垫

[0142] (3)UCP 标记单抗:本试剂盒中的 UCP 标记单克隆抗体(即 UCP-生物分子)是用以下步骤获得,步骤如下:

[0143] a) 称取 10mg UCP 颗粒置于锥形瓶中;

[0144] b) 加入 10ml pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液;

[0145] c) 向 UCP 颗粒悬浊液中加入 0.5mg CRP 单抗 3C8,搅拌过夜;

[0146] d) 以 12000rpm 在 4℃ 下离心 30min,弃去上清液;

[0147] e) 向 UCP 沉淀物中加入 10ml pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液,吹打混匀;

[0148] f) 以 12000rpm 在 4℃ 下离心 30min,弃去上清液;

[0149] g) 向 UCP 沉淀物中加入 10ml 封闭液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 2wt% BSA), 吹打混匀;

[0150] h) 将 UCP 悬浊液倒入锥形瓶中, 搅拌 1h;

[0151] i) 以 12000rpm 在 4℃ 下离心 30min, 弃去上清液;

[0152] j) UCP 沉淀物中加入 10ml 保存液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 2wt% BSA 和 0.05wt% NaN_3), 吹打混匀;

[0153] (4) 冻干结合垫的制备:

[0154] a) 将 50ml UCP 标记物悬浊液, 以 12000rpm 在 4℃ 下离心 30min, 弃去上清液;

[0155] b) 向 UCP 沉淀物中加入 5ml 的保存液 (pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含 2wt% BSA 和 0.05wt% NaN_3), 吹打混匀;

[0156] c) 加入 45ml 的稀释液;

[0157] d) 将 UCP 标记物悬浊液按 12.5ml/cm² 加于玻璃纤维上;

[0158] e) 将玻璃纤维放 -80℃, 预冻 0.5h;

[0159] f) 真空冻干 2h;

[0160] (5) 裁剪结合垫; 将冻干的结合垫裁剪成 1cm 宽的长条。

[0161] (6) 分析膜的制备: 将 NC 膜 (采购自密里博公司) 贴于 PVC 板上, 然后分检测带 T 线、质控带 C 线采用喷膜机划线。

[0162] (7) 组装试纸条; 依次将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴到底板上, 切成 4.0mm 宽的纸条。

[0163] (8) 装塑料卡; 将 4.0mm 宽的试纸条装到塑料卡底壳中, 盖上塑料卡上壳, 压紧。

[0164] 实施例 7. 采用冻干法方法生产的 CRP-UPT 试剂盒的组成:

[0165] 1. 实施例 8 中制备的 AFP-UPT 免疫层析试纸条

[0166] 2. 样本稀释液

[0167] 3. 样品管

[0168] 4. 使用说明书

[0169] 所述 CRP-UPT 试剂盒中的样本稀释液组成如下: pH = 7.2 的 0.15M 磷酸缓冲液, 含有 1% Tween 20。

[0170] 实施例 8. 本发明的 CRP-UPT 试剂盒的质量检测

[0171] 采用冻干法方法生产的 CRP-UPT 试剂盒的操作步骤是:

[0172] a. 在测试前先完整阅读使用说明书,

[0173] b. 将待测样本从储存环境中取出, 编号并且平衡至室温 (20℃ -30℃)。

[0174] c. 取出样品管, 每管加入 990 μ l 样本稀释液。如果为血清 / 血浆标本, 每管加入 10 μ l 样本; 如果为全血标本, 每管加入 15 μ l 样本。扣上样品管盖摇匀。

[0175] d. 将试纸条置于干净平整的平面上, 取 100 μ l 稀释好的待检样品加至 UPT 免疫层析试纸的加样孔, 同时开始计时。

[0176] e. 放置 15min 后, 利用 UPT 生物传感器对试纸条进行扫描分析。

[0177] f. UPT 生物传感器显示测量结果, Y 值为甲胎蛋白的浓度, 系统默认单位为 mg/L。

[0178] 1) 准确性: 采用试剂盒校准品与相应浓度的国际标准品 (来源于英国国家生物学标准和质控物研究所, NIBSC) 同时进行分析测定, 用双对数 (或其它适当的) 数学模型拟

合,要求两条剂量-反应曲线不显著偏离平行(t检验),以国际标准品为对照,试剂盒校准品的测定浓度与理论浓度的比值即为试剂盒校准品的效价。测定结果应符合以下规定,即试剂盒校准品的效价应在 0.900 ~ 1.100 范围内。

[0179] 检测结果:

[0180] 国际标准品购买自 NIBSC,为 0.5mg/L;2mg/L;5mg/L;20mg/L;150mg/L;结果如图 7 及表 10 所示

[0181] 表 10 准确性检测的结果

国际标准品		试剂盒校准品	
标准品含量	检测值 T/C	检测值 T/C	检测值
0 mg/L	0.075	0.066	/
0.5 mg/L	0.401	0.388	0.46mg/L
2 mg/L	0.707	0.692	1.86 mg/L
5 mg/L	1.108	1.114	5.42 mg/L
20 mg/L	1.975	1.974	18.7 mg/L
150 mg/L	5.345	5.279	149 mg/L

[0182] 2) 精密度:随机抽取 20 人份试纸条,用同一份 CRP 质控血清(来源于解放军第 302 医院)按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果,求出均值、标准偏差(SD)和变异系数 CV。批内变异系数(CV)应不高于 15%。

[0184] 具体检测方法如下:

[0185] a. 将试纸条、稀释液及待测样本平衡至室温(20 ~ 25℃)。

[0186] b. 拆开试纸条的铝箔袋包装,将试纸条放置在平整的表面上。

[0187] c. 在试纸条外壳上写上待测样本的编号。

[0188] d. 取出样品管,每管加入 990 μ l 样本稀释液。如果为血清/血浆标本,每管加入 10 μ l 样本;如果为全血标本,每管加入 15 μ l 样本。扣上样品管盖摇匀。

[0189] e. 将试纸条置于干净平整的平面上,取 100 μ l 稀释好的待检样品加至 UPT 免疫层析试纸的加样孔,同时开始计时。

[0190] f. 室温放置 15 分钟。

[0191] g. 在上转发光免疫分析仪中输入该批试纸条的参数,进行测量。

[0192] h. 数据处理:与 CRP 定量测定试剂盒配套的上转发光免疫分析仪具有计算浓度功能。测量完成后仪器自动将 T/C 值(TEST 线/CONTROL 线的浓度比值)经过计算得到的浓度值显示在屏幕上。

[0193] 精密度检测结果:将浓度为 2mg/L、50mg/L 的标准品加入本发明的 CRP-UPT 免疫层析试纸条中,每个标准品采用试纸条检测 10 次,记录每次检测值然后计算精密度 CV(CV = SD/平均值%)。

[0194] 表 11 精密度检测结果

[0195]

CRP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	SD	CV
2mg/L	2.00	2.16	2.15	1.91	2.05	1.89	1.99	1.92	1.95	2.12	2.01mg/L	0.10	5.03%
50mg/L	53.03	49.63	49.51	48.03	50.69	48.94	50.82	52.07	47.28	50.54	50.05mg/L	1.75	3.50%

[0196] 3) 检测灵敏度:根据 CRP 标准品稀释测定结果,本试剂盒的检测灵敏度为小于 0.5mg/L。

[0197] 测定 20 个 0mg/L 点,计算平均值和标准差,以(平均值+2 倍标准差)在标准曲线上对应的浓度为灵敏度。

[0198] 表 12 灵敏度检测数据

[0199]

0 mg/L	0.037	0.084	0.089	0.041	0.041	0.045	0.058	0.051	0.058	0.041
	0.100	0.088	0.095	0.037	0.089	0.053	0.097	0.084	0.098	0.053
平均值	0.067		标准差	0.024		平均值+2 倍标准差			0.115	

[0200] 表 13 灵敏度检测结果

CRP 校准品					灵敏度
0.5mg/L	2mg/L	5mg/L	20mg/L	100mg/L	
0.389	0.738	1.056	2.022	5.058	0.009mg/L

[0202] 4) 特异性:与人血清白蛋白(HSA)、胆红素无显著交叉反应。

[0203] 测定 200mg/ml 的人血清白蛋白(HSA)和 50mg/L 的胆红素。在标准曲线上计算 HSA 和胆红素测得的浓度分别为 0.11mg/L 和 0.09mg/L(表 14、15)。

[0204] 表 14 与 BSA 和胆红素的交叉反应检测结果

C-反应蛋白(CRP)校准品						人血清白蛋白 HSA	胆红素
0mg/L	0.5mg/L	2mg/L	5mg/L	20mg/L	150mg/L	200mg/ml	50mg/L
0.064	0.375	0.715	1.039	2.273	4.822	0.218	0.210

[0206] 表 15 与其它物质的交叉反应数据

[0207]

交叉原	浓度	相当于 CRP(mg/L)
HSA	200mg/ml	≤ 0.5
胆红素	50mg/L	≤ 0.5

[0208] 实施例 9. 本发明的 CRP-UPT 试剂盒对临床标本的检测分析:

[0209] 分别用本发明的 CRP-UPT 试剂盒和免疫比浊法贝克曼 CRP 试剂盒检测 90 份血样,血样来源于北京同仁医院。结果表明该 CRP-UPT 试剂盒检测结果与贝克曼 CRP 试剂盒检测

结果符合性好,符合率 $\geq 80\%$ 。结果如图 8 和表 16 所示。

[0210] 表 16CRP-UPT 试剂盒与免疫比浊法贝克曼 CRP 试剂盒的检测结果

[0211]

样本 编号	UPT 测 值	参比值 (mg/L)	样本 编号	UPT 测值	参比 值	样本 编号	UPT 测 值	参比 值	样本 编号	UPT 测值	参比 值
----------	------------	---------------	----------	-----------	---------	----------	------------	---------	----------	-----------	---------

[0212]

1	30.18	30.73	28	7.90	8.67	55	3.95	4.07	82	0.75	1.03
2	13.91	16.12	29	3.46	3.76	56	0.83	1.0	83	4.33	7.23
3	9.05	9.15	30	76.14	76.4	57	74.27	79.3	84	1.25	2.22
4	40.68	38.38	31	0.96	1.0	58	2.79	2.98	85	4.95	7.75
5	24.21	21.07	32	28.42	27	59	1.28	1.42	86	1.61	1.53
6	5.89	10.64	33	8.70	8.27	60	20.31	19	87	2.15	2.96
7	28.7	27.04	34	4.46	4.17	61	2.71	2.54	88	13.6	12.8
8	67.49	59.3	35	1.42	1.56	62	85.12	96.2	89	4.11	3.08
9	22.3	24.31	36	63.64	61.6	63	0.41	1.72	90	10.21	9.64
10	14.2	13.68	37	129.47	143	64	0.5	1.0	91	0.95	3.08
11	80.13	99.2	38	3.60	3.62	65	0.71	1.0	92	41.2	55.9
12	97.26	105	39	1.36	1.5	66	1.01	2.47	93	117.1	158
13	12.27	15.5	40	1.06	1.0	67	23.18	19.6	94	25.57	14.9
14	21.37	26.8	41	82.28	79.8	68	50.22	53.5	95	55.93	47.3

15	32.43	38.3	42	90.27	92.8	69	93.21	117	96	25.7	26.7
16	13.58	9.0	43	90.40	99.9	70	2.34	2.65	97	63.93	55.5
17	21.89	37.8	44	16.03	14.8	71	0.66	1.42	98	36.10	41.1
18	10.57	11.9	45	6.41	6.13	72	5.83	6.96	99	30.84	24.3
19	34.34	29.5	46	41.49	45.7	73	1.01	1.58	100	9.83	8.13
20	46.28	38.6	47	105.47	98.8	74	1.74	2.78	101	40.72	30.5
21	38.86	34.7	48	12.51	13.5	75	1.21	1.75	102	81.03	125
22	19.31	17	49	0.86	1.0	76	36.2	38	103	16.32	12.3
23	64.43	71.6	50	2.12	2.25	77	2.81	5.13	104	0.44	3.08
24	29.73	25.4	51	2.08	2.15	78	5.70	6.91	105	18.4	20.8
25	10.33	9.4	52	36.05	33.3	79	0.81	1.0	106	2.77	3.72
26	14.79	9.4	53	0.88	1.0	80	1.83	1.66	107	7.13	5.09
27	69.87	46.6	54	2.80	2.6	81	1.53	1.36	108	15.52	13.1

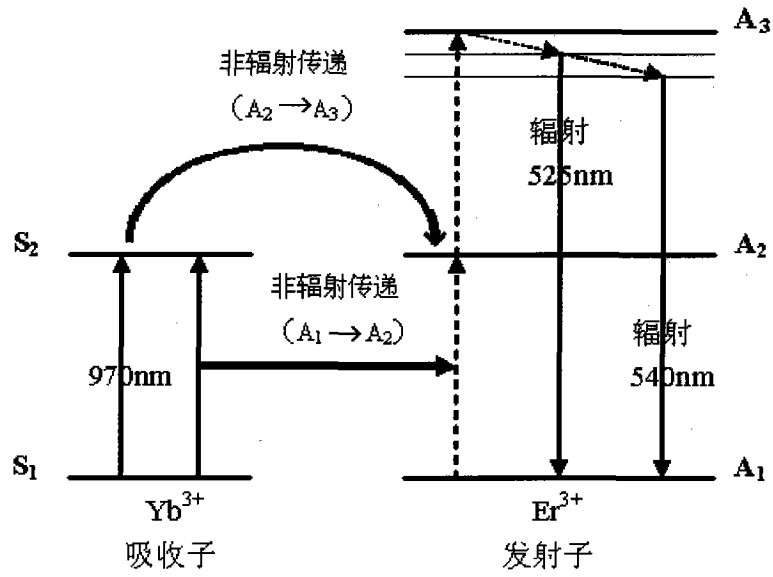


图 1

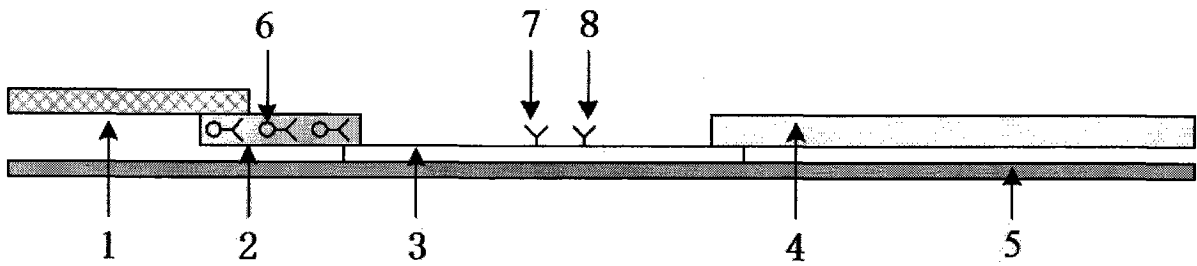


图 2A

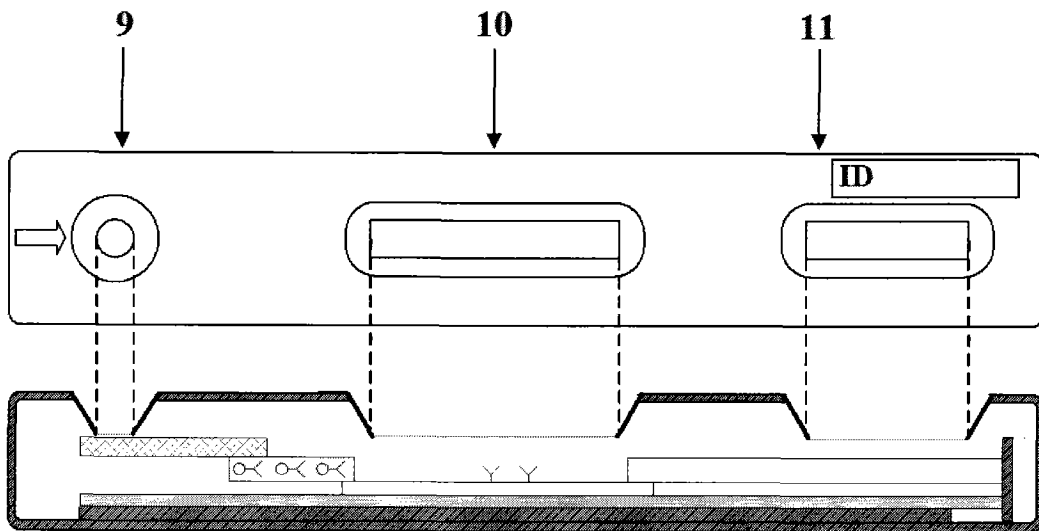


图 2B

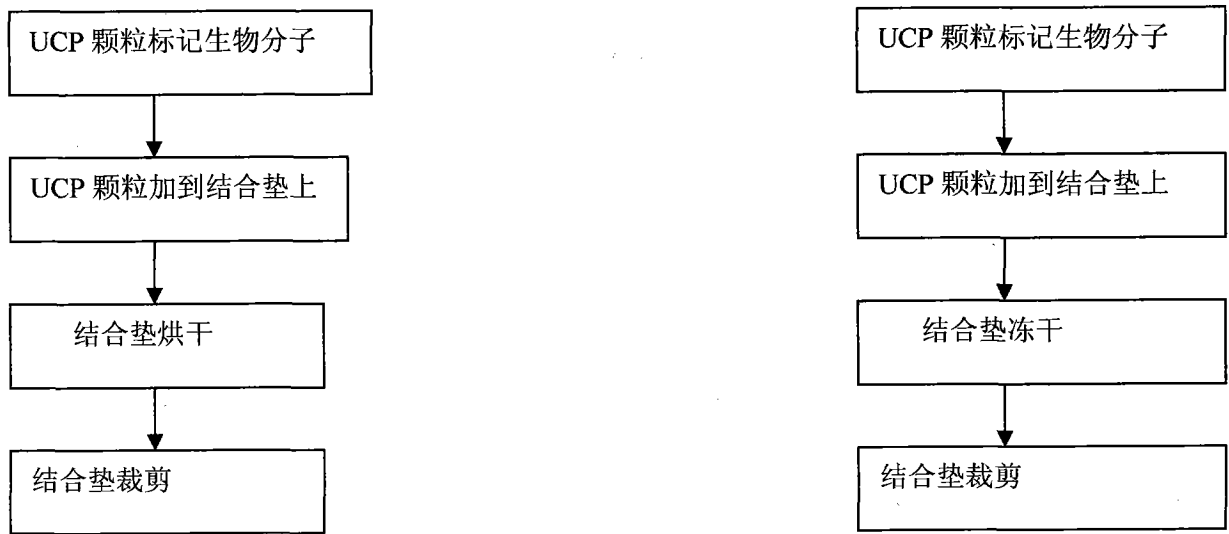


图 3

两种方法制备的试剂测量变异对比

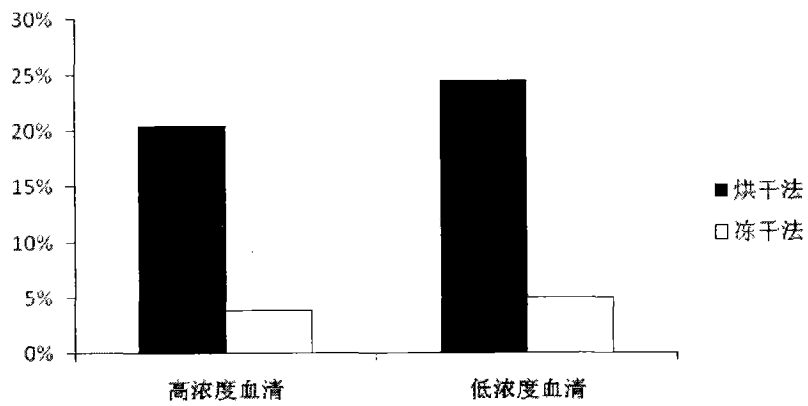


图 4

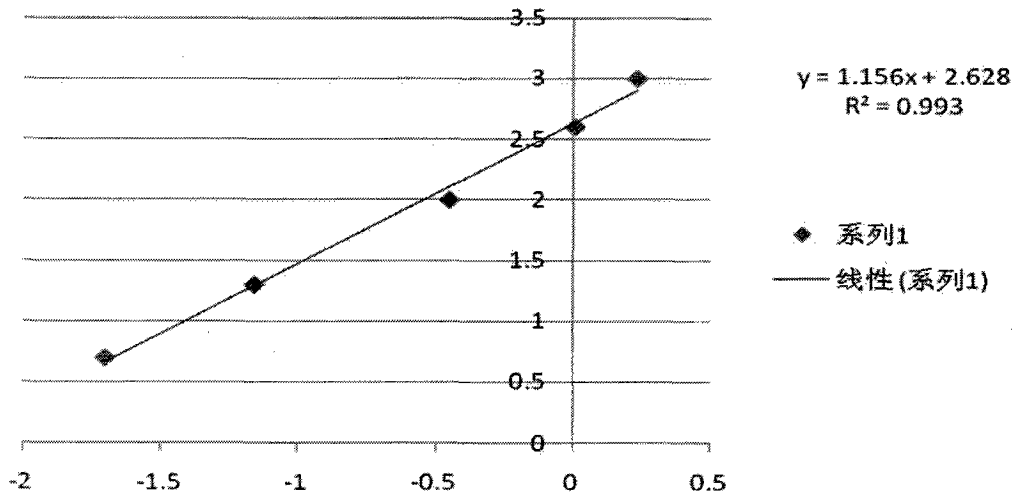


图 5

两种方法测定AFP临床样本比较

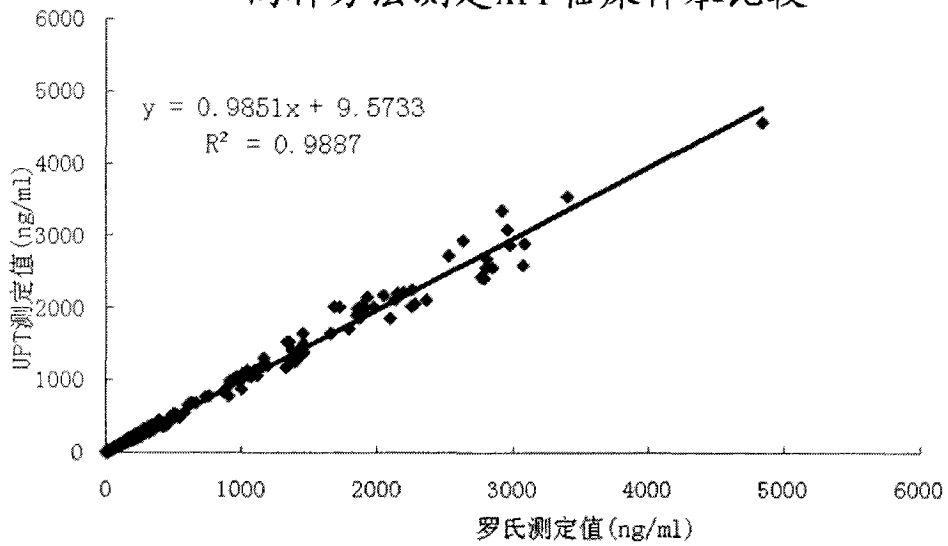


图 6

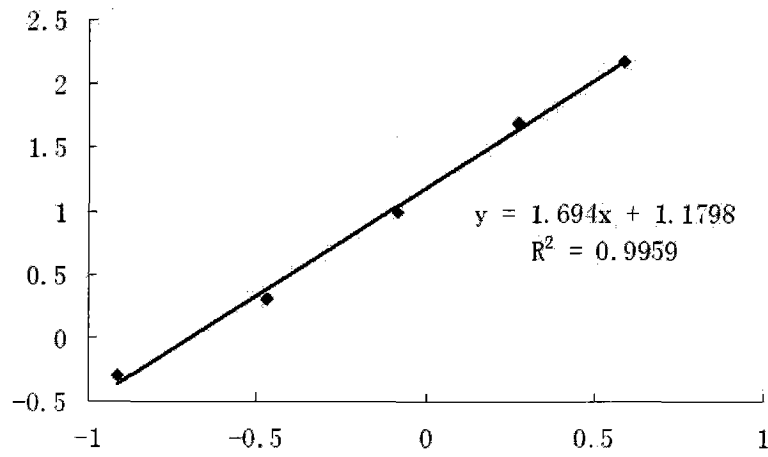


图 7

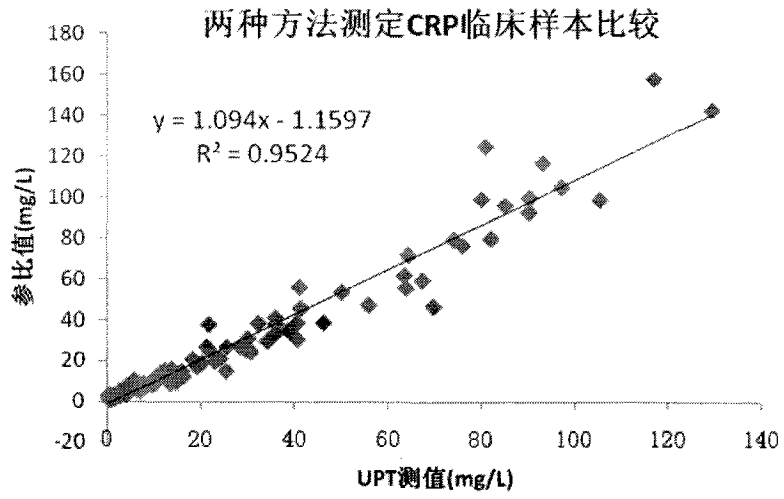


图 8

专利名称(译)	一种免疫层析快速试剂盒及其生产制备		
公开(公告)号	CN102116770B	公开(公告)日	2015-01-21
申请号	CN200910262783.X	申请日	2009-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司 杨瑞馥 周蕾		
申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司 杨瑞馥 周蕾		
当前申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司 杨瑞馥 周蕾		
[标]发明人	林长青 杨瑞馥 周蕾 李华柏		
发明人	林长青 杨瑞馥 周蕾 李华柏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/52 G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	姜建成		
其他公开文献	CN102116770A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种免疫层析纸条的生产方法及应用这种生产方法而制备的甲胎蛋白快速定量免疫层析试纸条和C反应蛋白快速定量免疫层析试纸条。该层析试纸条采用上转发光材料即UCP作为生物标记物。其结构主要包括：样品垫、结合垫或结合物稀释垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和塑料卡组成。本发明涉及了产业化生产这种上转发光法免疫层析试纸条的方法、使用方法。应用该上转发光检测免疫层析试纸条可快速、简便、定量的测定被检测物的含量，准确的对疾病进行，为疾病的预防、诊断、治疗提供支持。

