



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655836 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310607244. 1

(22) 申请日 2013. 11. 25

(71) 申请人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11 号

(72) 发明人 蒋兴宇 曹丰晶 张伟

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

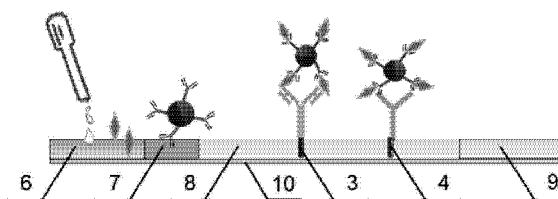
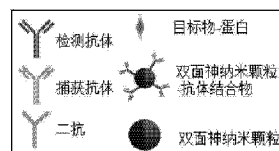
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种免疫层析试纸条、检测方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫层析试纸条、使用其的检测方法及应用,该免疫层析试纸条包括结合物垫、测试线和质控线,所述结合物垫上涂覆有检测抗体标记的双面神纳米颗粒,所述测试线包被捕获抗体或抗原,所述质控线包被所述检测抗体的抗体。本发明的免疫层析试纸条基于双面神纳米颗粒,能够实现目标物的可视化读出和荧光读出的双功能,相比传统的胶体金免疫层析试纸条,能够实现定量检测,并获得更高的检测灵敏度。



1. 一种免疫层析试纸条,包括结合物垫、测试线和质控线,所述结合物垫上涂覆有检测抗体标记的双面神纳米颗粒,所述测试线包被捕获抗体或抗原,所述质控线包被所述检测抗体的抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸条,其特征在于,还包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述底板上顺次搭接样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述测试线和质控线设在所述硝酸纤维素膜上。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述双面神纳米颗粒包括两部分,其中一部分为金纳米颗粒、磁性纳米颗粒或胶体碳颗粒,优选为金纳米颗粒;另一部分为量子点、荧光分子或稀土元素,优选为量子点;

优选地,所述量子点为 CdTe、CdSe、CdS、CdS/ZnS、CdSe/ZnS 或 CdSe/CdS 量子点。

4. 根据权利要求2或3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测抗体为大分子的抗体;所述测试线为捕获抗体,所述捕获抗体为所述大分子的抗体;

优选地,所述大分子为蛋白质。

5. 根据权利要求2或3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测抗体为小分子的抗体;所述测试线为捕获抗原,所述捕获抗原为小分子抗原。

6. 根据权利要求2或3所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述检测抗体为重金属离子的抗体;所述测试线为捕获抗原,所述捕获抗原为重金属离子抗原。

7. 根据权利要求2-6任一项所述的免疫层析试纸条,其特征在于,所述样品垫为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜;

优选地,所述结合物垫为玻璃纤维膜;

优选地,所述底板为聚氯乙烯胶板。

8. 根据权利要求2-7任一项所述的免疫层析试纸条,其特征在于,还包括设置在外面的卡壳,所述卡壳上设有用于滴加检测样品的加样区和用于观察或读取信号的显色区;

优选地,所述检测样品为血清、全血、尿液和组织液中的一种或多种。

9. 一种使用如权利要求1-8任一项所述的免疫层析试纸条检测样品的方法,包括:

(1) 将样品滴加在样品垫上,静置10-15分钟;

(2) 通过肉眼观察读取结果,或者通过荧光仪器读取信号。

10. 如权利要求1-8任一项所述的免疫层析试纸条在检测大分子、小分子或重金属离子中的应用;

优选地,所述大分子为蛋白质。

一种免疫层析试纸条、检测方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,尤其涉及一种免疫层析试纸条、使用其的检测方法及应用。

背景技术

[0002] 胶体金的免疫层析试纸条,由于其简单、方便、快捷、便宜及不需要大型仪器和专业人员的操作而在疾病诊断、食品检测、环境监测等领域得到了广泛的应用。但是,基于胶体金的免疫层析试纸条仍然存在一些不足,比如,很难实现定量的检测和较高的灵敏度(比如,甲胎蛋白 AFP 等)等,限制了其在某些目标物检测方面的应用。

[0003] 双面神颗粒即 Janus 颗粒,是一种形貌或者性质上不对称粒子,由于物理化学性质的差异性,使得这种粒子具有附加的定向作用力,借助这一定向作用力,可以实现粒子在空间上的控制性自组装,使得这类材料受到人们的极大关注,并在诸如功能表面活性剂、自主装和分子识别、光电生物传感器、多功能磁性非对称材料、电子器件、光子晶体及催化剂等领域表现出广阔的应用前景。目前,Janus 颗粒的制备方法可以分为两类:去对称方法和一步合成方法,前者是以对称性粒子前驱体,经过一系列物理化学处理,改变前驱体的表面对称性,后者是在适当的物理或者化学条件下,直接合成 Janus 颗粒。

[0004] 而免疫层析试纸条,一般是以胶体金或磁珠等作为示踪标记物,进行肉眼可视化的检测,但是这种方法灵敏度差,并且只能定性或者半定量的检测,不能满足某些目标物高灵敏度和定量检测的需求。

[0005] 因此,本领域需要将 Janus 颗粒用于免疫层析试纸条的技术,以解决传统的胶体金免疫层析试纸条灵敏度差和不能定量的缺陷。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种免疫层析试纸条、检测方法及应用,该免疫层析试纸条基于双面神纳米颗粒,能够实现目标物的可视化读出和荧光读出的双功能,相比传统的胶体金免疫层析试纸条,能够实现定量检测,并获得更高的检测灵敏度。

[0007] 为实现本发明的目的,采用以下技术方案:

[0008] 在第一方面,本发明提供一种免疫层析试纸条,包括结合物垫、测试线和质控线,所述结合物垫上涂覆有检测抗体标记的双面神纳米颗粒,所述测试线包被捕获抗体或抗原,所述质控线包被所述检测抗体的抗体。

[0009] 优选地,还包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述底板上顺次搭接样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述测试线和质控线设在所述硝酸纤维素膜上。

[0010] 优选地,所述双面神纳米颗粒包括两部分,其中一部分为金纳米颗粒、磁性纳米颗粒或胶体碳颗粒,优选为金纳米颗粒;另一部分为量子点、荧光分子或稀土元素,优选为量子点。

[0011] 优选地,所述量子点为 CdTe、CdSe、CdS、CdS/ZnS、CdSe/ZnS 或 CdSe/CdS 量子点。

[0012] 作为本发明的一种方案,所述检测抗体为大分子的抗体;所述测试线为捕获抗体,所述捕获抗体为所述大分子的抗体。

[0013] 优选地,所述大分子为蛋白质或核酸。所述蛋白质比如血清中的抗原或抗体,如乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗体(HBeAb)、乙肝核心抗体(HBcAb)、HIV-1P24 抗原、HIV 抗体、肺炎支原体抗体、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 125(CA125)、糖类抗原 15-3(CA15-3)、糖类抗原(19-9)、前列腺特异抗原(PSA)及其它肿瘤标记物;所述核酸比如脱氧核糖核酸等。

[0014] 作为本发明的另一种方案,所述检测抗体为小分子的抗体。所述测试线为捕获抗原,所述捕获抗原为小分子抗原。小分子通常指分子量小于 1000 或者 500 以下的分子,比如被称为“瘦肉精”的沙丁胺醇、莱克多巴胺和克伦特罗,牛奶中添加的三聚氰胺及蔬菜、水果中的农药残留等。

[0015] 作为本发明的再一种方案,所述检测抗体为重金属离子的抗体。所述测试线为捕获抗原,所述捕获抗原为重金属离子抗原。重金属离子可以是指 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 或 Mn^{2+} 等。

[0016] 优选地,所述样品垫为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜。

[0017] 优选地,所述结合物垫为玻璃纤维膜。

[0018] 优选地,所述底板为聚氯乙烯胶板。

[0019] 优选地,还包括设置在外面的卡壳,所述卡壳上设有用于滴加检测样品的加样区和用于观察或读取信号的显色区。

[0020] 优选地,所述检测样品为血清、全血、尿液和组织液中的一种或多种。

[0021] 在第二方面,本发明提供一种使用如第一方面所述的免疫层析试纸条检测样品的方法,包括:

[0022] (1) 将样品滴加在样品垫上,静置 10-15 分钟;

[0023] (2) 通过肉眼观察读取结果,或者通过荧光仪器读取信号。

[0024] 在第三方面,本发明提供如第一方面所述的免疫层析试纸条在检测大分子、小分子或重金属离子中的应用。

[0025] 优选地,所述大分子为蛋白质。

[0026] 本发明的有益效果为:本发明的免疫层析试纸条基于双面神纳米颗粒,能够实现目标物的可视化读出和荧光读出的双功能,相比传统的胶体金免疫层析试纸条,能够实现定量检测,并获得更高的检测灵敏度。

[0027] 此外,本发明的免疫层析试纸条具有特异性强、价格低廉、读取结果快捷而直观的优点,不需要特殊仪器设备,也不需要专业人员操作,检测结果的总体符合率较高,适合于各种目标物的现场检测。

附图说明

[0028] 图 1 为双面神(Janus)纳米颗粒结构示意图,左半球为金纳米颗粒、磁性纳米颗粒或胶体碳颗粒,右半球为量子点、荧光分子或稀土元素。

[0029] 图 2 为免疫层析试纸条的结构示意图。

- [0030] 图 3 为免疫层析试纸条检测蛋白类大分子目标物的阳性结果示意图。
- [0031] 图 4 为免疫层析试纸条检测蛋白类大分子目标物的阴性结果示意图。
- [0032] 图 5 为免疫层析试纸条检测蛋白类大分子目标物的无效结果示意图。
- [0033] 图 6 为免疫层析试纸条检测小分子目标物的阳性结果示意图。
- [0034] 图 7 为免疫层析试纸条检测小分子目标物的阴性结果示意图。
- [0035] 图 8 为免疫层析试纸条检测小分子目标物的无效结果示意图。
- [0036] 图 9 为免疫层析试纸条检测重金属离子目标物的阳性结果示意图。
- [0037] 图 10 为免疫层析试纸条检测重金属离子目标物的阴性结果示意图。
- [0038] 图 11 为免疫层析试纸条检测重金属离子目标物的无效结果示意图。
- [0039] 图 12 为实施例 1 中不同浓度的 AFP 抗原与荧光条带吸收峰的关系图。
- [0040] 附图标记:1 表示加样区,2 表示观测区或显色区,3 表示测试线,4 表示质控线,5 表示卡壳,6 表示样品垫,7 表示结合物垫,8 表示硝酸纤维素膜,9 表示吸水纸,10 表示 PVC 底板。

具体实施方式

[0041] 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,以下实施例仅为本发明的优选实施例,以便于更好地理解本发明,因而不应视为限定本发明的范围。对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所用的实验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂厂商购买得到的。

[0042] 本发明中,双面神(Janus)纳米颗粒结构示意图如图 1 所示,其中左半球为金纳米颗粒、磁性纳米颗粒或胶体碳颗粒,右半球为量子点、荧光分子或稀土元素。本发明优选金纳米颗粒-量子点形式的 Janus 纳米颗粒。当选用磁性纳米颗粒时,优选采用四氧化三铁(Fe_3O_4)磁性纳米颗粒。制备本发明 Janus 纳米颗粒的方法是本领域公知的,Janus 纳米颗粒的制备已有很多报道,比如 Janus colloidal particles:preparation, properties and biomedical application, Chariya Kaewsaneha, Prauman Tangboriboonrat et al, ACS, Applied materials and interfaces, 2013, 5, 1857-1869; Hybrid, silica-coated, janus-like plasmonic-magnetic nanoparticles, Georgios A. Sotiriou, Ann M. Hirt, Pierre-Yves Lozach, et al. Chemistry of Materials. 2011, 23, 1985-1992; Chemotactic behavior of catalytical motors in microfluidic channels, Larisa Baraban, Stefan M. Harazim, Samuel Sanchez, and Oliver G. Schmidt. Angewandte communications. 2013, 52, 5552-5556; Organized self-assembly of janus micromotors with hydrophobic hemispheres, Wei Gao, Allen Pei, Xiaomiao Feng, Camille Hennesy and Joseph Wang, Journal of Americal Chemical Society, 2013, 135, 998-1001; Janus particles:synthesis, self-assembly, physical properties and applications, Andreas Walther and Axel H. E. Müller, Chemical reviews, 2013, 113, 5194-5261, 等等。上述现有技术均可用于本发明制备 Janus 纳米颗粒。并且根据需要可以制备出包含 CdTe、CdSe、CdS、CdS/ZnS、CdSe/ZnS 或 CdSe/CdS 量子点的 Janus 纳米颗粒。

[0043] 本发明基于 Janus 纳米颗粒的免疫层析试纸条的结构示意图如图 2 所示, 本发明免疫层析试纸条检测蛋白类大分子、小分子或重金属离子目标物的结果示意图如图 3 至图 11 所示。

[0044] 具体地, 在聚氯乙烯(PVC)底板 10 (为了便于粘贴, 可以在 PVC 底板 10 表面涂布单层高聚物压敏胶, 所述 PVC 底板 10 的厚度可以是 0.4mm、0.5mm 或 0.6mm 等) 上的一端顺次相互搭接地贴上样品垫 6、结合物垫 7、硝酸纤维素膜 8 和吸水纸 9。然后将 PVC 底板 10 及贴附的材料切成试纸条(宽度比如可以是 4mm、5mm 或 6mm 等任意适合宽度), 并装入卡壳 5 内, 卡壳 5 上有加样区 1 和显色区 2 两个窗口, 加样区 1 用于滴加检测样品, 显色区 2 可以观察读出信号。

[0045] 其中, 所述样品垫 6 可以是玻璃纤维膜或聚酯纤维膜(可购自上海金标生物技术有限公司), 具体可以根据实际被检测的样品性质(比如血清、全血、尿液或组织液等)来决定试纸条中所用样品垫 6 的材料, 上海金标生物技术有限公司的 SB08 和 SB06 具有良好的亲水性, 可用作普通的尿液或血清的检测, BT40、BT50 和 BT100 采用直径为 0.6 到 3 微米的微细玻纤, 亲水性良好, 处理后适合做全血的检测。

[0046] 所述结合物垫 7 上涂覆有检测抗体标记的 Janus 纳米颗粒, 所述硝酸纤维素膜 8 上包被测试线(T 线) 3 和质控线(C 线) 4, 其中, 测试线 3 为捕获抗体或抗原, 质控线 4 为检测抗体的抗体(即二抗), 分别产生阴阳性结果和质控信号。

[0047] 如图 3 至图 5 所示, 在检测大分子类蛋白的目标检测物时, 结合物垫 7 上涂覆蛋白类大分子目标检测物的检测抗体标记的 Janus 纳米颗粒; T 线 3 由蛋白类大分子的捕获抗体构成; 质控线 4 由蛋白类大分子目标检测物的检测抗体的抗体构成。在加样区 1 加入被检测样品, 通过毛细管的作用力, 样品会向吸水纸 9 方向移动, 当经过结合物垫 7 时, 样品会将涂覆在结合物垫 7 上的抗体标记的 Janus 纳米颗粒结合物溶解并释放出来, 并随着样品向前移动, 若样品为阳性, 则其中的目标检测物(analyte)会与 Janus 纳米颗粒上的检测抗体(Janus-detection antibody)发生特异性的反应, 并形成目标检测物-检测抗体-Janus 纳米颗粒(analyte-detection antibody-Janus)的复合物, 当该复合物经过 T 线 3 时, 包被在该处的捕获抗体(capture antibody)会与目标检测物发生特异性反应(双抗体夹心法), 并将其捕获, 形成捕获抗体-目标检测物-检测抗体-Janus 纳米颗粒(capture antibody-analyte-detection antibody-Janus)的复合物, 此时会在 T 线 3 处肉眼观察到颜色条带和检测到荧光信号, 当未被捕获的目标检测物-检测抗体-Janus 纳米颗粒复合物继续向前移动到 C 线 4 处, 检测抗体则与 C 线 4 处的检测抗体的抗体(即二抗)发生特异性的反应, 会产生颜色信号和荧光信号(图 3); 当被检测的样品为阴性时, 则在 T 线 3 处不会形成颜色条带和荧光信号条带, 而在 C 线 4 处会产生颜色条带和荧光信号条带(图 4); 只要 C 线 4 处不形成颜色条带和荧光信号条带, 则证明该试纸条无效(图 5)。

[0048] 如图 6 至图 8 所示, 在检测小分子目标检测物时, 结合物垫 7 上涂覆小分子类目标检测物的检测抗体标记的 Janus 纳米颗粒; T 线 3 包被小分子类的捕获抗原; 质控线 4 包被小分子类的目标检测物的检测抗体的抗体。在加样区 1 加入被检测样品, 通过毛细管的作用力, 样品会向吸水纸 9 方向移动, 当经过结合物垫 7 时, 样品会将涂覆在结合物垫 7 上的抗体标记的 Janus 纳米颗粒结合物溶解并释放出来, 并随着样品向前移动, 若样品为阳性, 则样品中的小分子类目标检测物(analyte)会与 Janus 纳米颗粒上标记的检测抗体

(Janus-detection antibody)发生特异性的反应,并形成目标检测物-检测抗体-Janus 纳米颗粒(analyte-detection antibody-Janus)的复合物,当该复合物经过 T 线 3 时,如果目标检测物和检测抗体反应完全,则没有多余的检测抗体-Janus 纳米颗粒与 T 线 3 处的捕获抗原发生特异性反应,因此在 T 线 3 处不会形成颜色条带和产生荧光信号条带,当样品继续移动到 C 线 4 时,检测抗体则与 C 线 4 处的二抗发生特异性的反应,形成颜色信号和荧光信号(图 6);若样品为阴性时,样品中没有目标检测物与 Janus 纳米颗粒上标记的检测抗体发生特异性反应(免疫竞争反应),因此,会在 T 线 3 处和 C 线 4 处形成颜色条带和荧光信号条带(图 7);只要 C 线 4 处未观察到颜色条带和荧光信号条带,则证明该试纸条无效(图 8)。

[0049] 如图 9 至图 11 所示,在检测重金属离子目标检测物时,结合物垫 7 上涂覆重金属离子类目标检测物的检测抗体标记的 Janus 纳米颗粒;T 线 3 包被重金属离子类的捕获抗原;质控线 4 包被重金属离子类的目标检测物的检测抗体的抗体。在加样区 1 加入被检测样品,通过毛细管的作用力,样品会向吸水纸 9 方向移动,当经过结合物垫 7 时,样品会将涂覆在结合物垫 7 上的抗体标记的 Janus 纳米颗粒结合物溶解并释放出来,并随着样品向前移动,若样品为阳性,则样品中的重金属离子类目标检测物(analyte)会与 Janus 纳米颗粒上标记的检测抗体(Janus-detection antibody)发生特异性的反应,并形成目标检测物-检测抗体-Janus 纳米颗粒(analyte-detection antibody-Janus)的复合物,当该复合物经过 T 线 3 时,如果目标检测物和检测抗体反应完全,则没有多余的检测抗体-Janus 纳米颗粒与 T 线 3 处的捕获抗原发生特异性反应,因此在 T 线 3 处不会形成颜色条带和产生荧光信号条带,当样品继续移动到 C 线 4 时,检测抗体则与 C 线 4 处的二抗发生特异性的反应,形成颜色信号和荧光信号(图 9);若样品为阴性时,样品中没有目标检测物与 Janus 纳米颗粒上标记的检测抗体发生特异性反应(免疫竞争反应),因此,会在 T 线 3 处和 C 线 4 处形成颜色条带和荧光信号条带(图 10);只要 C 线 4 处未观察到颜色条带和荧光信号条带,则证明该试纸条无效(图 11)。

[0050] 下面通过实施例来说明本发明的免疫层析试纸条、其使用方法及检测结果。

[0051] 下面实施例中所用的试剂、仪器设备的来源:AFP 的检测抗体(Z111D1)、包被抗体(Z111C1)和抗原购自科跃中楷生物技术有限公司;羊抗兔抗体(bs-0295G)、羊抗鼠抗体(bs-0296G)购自北京博奥森生物技术有限公司;三维平面划膜仪和三维平面喷金仪购自上海金标生物科技有限公司;冷冻干燥机购自北京博医康实验仪器有限公司;切条机购自上海金标生物科技有限公司;硝酸纤维素膜购自默克密理博;PVC 胶板、吸水纸、玻璃纤维膜和卡壳购自上海金标生物科技有限公司。

[0052] 实施例 1:甲胎蛋白的检测

[0053] 我们以甲胎蛋白(AFP)作为大分子检测的实施例。

[0054] 1、免疫层析试纸条的制备:

[0055] 实验中所用到的 Janus 纳米颗粒为金纳米颗粒-CdTe 量子点(其中金纳米颗粒(AuNPs)用于肉眼可视化检测,CdTe 量子点用于荧光定量检测),将金纳米颗粒和 CdTe 量子点分别用链霉亲和素(Streptavidin, SA)、生物素(Biotin)进行修饰,然后通过链霉亲和素与生物素的特异性反应,最终成功地将金纳米颗粒和 CdTe 量子点进行连接,最终生成金纳米颗粒-CdTe 量子点的 Janus 纳米颗粒(参考 Sensitivity improved plasmonic gold nanoholes array biosensor by coupling quantum-dot for the detection of

specific biomolecular interactions, Lihong Niu, Ke Cheng, Zuliang Du, Biosensors and, 2013, 50, 137-142)。

[0056] (1)取 100 μ g AFP 的检测抗体置于透析袋中对 5mM Tris-HCl 进行透析 24h, 在此过程中, 每隔 2h 换一次透析液, 透析完成后, 将所述检测抗体取出置于离心管中, 加入三蒸水至 2mL, 离心后弃去沉淀杂质;

[0057] (2)制备结合物垫:用浓度为 0.01M 的 K_2CO_3 溶液调节 Janus 颗粒溶液的 pH, 搅拌均匀, 然后加入离心好的抗体, 搅拌 20min 左右, 然后加入 2mL10% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液, 10000rpm, 离心 40min, 然后弃去上清液, 再加入 1% 的 BSA 的溶液(含有 1mM 的 pH8.6 的缓冲溶液)继续离心, 弃去上清液, 将沉淀物进行恢复(恢复液的成分为:150mM 的 NaCl、1% 的 BSA、0.5% 的蔗糖和 0.5% 的酪蛋白钠), 将其涂覆在 200 平方厘米大小的玻璃纤维膜上面, $-45^\circ C$ 冷冻后, 作为结合物垫, 冻干后室温避光保存备用;

[0058] (3)在 PVC 胶板上一端顺次相互搭接地贴附样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜, 另一端贴附有吸水纸;

[0059] (4)通过三维平面划膜仪在硝酸纤维素膜上包被 T 线和 C 线(T 线与 C 线之间的间隔为 4mm, 设定参数都为 1 微升/厘米), C 线为检测抗体的二抗, 浓度为 0.2mg/mL; T 线为 AFP 的包被抗体, 浓度为 0.2mg/mL;

[0060] (5)将 PVC 胶板及贴附的材料切成 4mm 宽度的试纸条;

[0061] (6)将步骤(5)中的试纸条装入卡壳内, 卡壳上开有显色区和加样区, 加样区对准样品垫位置, 显色区对准 T 线和 C 线所在区域;

[0062] (7)将试纸条装在铝箔袋中, 内装一个干燥剂和滴管, 进行密封室温保存。

[0063] 2、标准曲线绘制及实际样品检测

[0064] (1)标准曲线绘制:打开铝箔袋, 取出试纸条, 平放在检测台面上, 然后在不同的试纸条的加样区相对的样品垫上, 滴加含有不同浓度 AFP 的样品 100 μ L, 10 到 15 分钟左右观察结果, 20 分钟以后检测结果视为无效, 应重新进行检测;将不同浓度 AFP 的检测试纸条置于化学荧光仪器中进行读数, 并将所得到的数据及其对应的浓度进行标准曲线的绘制, 得到图 12 所示的曲线。

[0065] (2)实际样品检测:开始检测, 打开铝箔袋, 取出试纸条, 平放在检测台面上, 然后滴加样品 100 μ L 于加样区相对的样品垫上, 10 到 15 分钟左右观察结果, 20 分钟以后检测结果视为无效, 应重新进行检测, 根据观察结果, 如看到两条红色条带, 证明该样品为阳性, 采用化学荧光仪器读取荧光信号, 进一步定量分析。

[0066] (3)根据化学荧光仪器读取的荧光信号结合图 12 所示的曲线图判定 AFP 的定量浓度。

[0067] 实施例 2 :沙丁胺醇的检测

[0068] 我们以沙丁胺醇作为小分子检测的实施例, 实验设计方法如下:

[0069] 1、免疫层析试纸条的制备:

[0070] (1)取 100 μ g 沙丁胺醇的检测抗体置于透析袋中对 5mM Tris-HCl 进行透析 24h, 在此过程中, 每隔 2h 换一次透析液, 透析完成后, 将所述检测抗体取出置于离心管中, 加入三蒸水至 2mL, 离心后弃去沉淀杂质;

[0071] (2)制备结合物垫:用浓度为 0.01M 的 K_2CO_3 溶液调节 Janus 颗粒溶液的 pH, 搅拌

均匀,然后加入离心好的抗体,搅拌 20min 左右,然后加入 2mL10% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液,10000rpm,离心 40min,然后弃去上清液,再加入 1% 的 BSA 的溶液(含有 1mM 的 pH8.6 的缓冲溶液)继续离心,弃去上清液,将沉淀物进行恢复(恢复液的成分为:150mM 的 NaCl、1% 的 BSA、0.5% 的蔗糖和 0.5% 的酪蛋白钠),将其涂覆在 200 平方厘米大小的玻璃纤维膜上面,-45℃冷冻后,作为结合物垫,冻干后室温避光保存备用;

[0072] (3) 在 PVC 胶板上一端顺次相互搭接地贴附样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜,另一端贴附有吸水纸;

[0073] (4) 通过三维平面划膜仪在硝酸纤维素膜上包被 T 线和 C 线(T 线与 C 线之间的间隔为 4mm,设定参数都为 1 微升/厘米),C 线为检测抗体的二抗,浓度为 0.2mg/mL;T 线为沙丁胺醇的抗原,浓度为 0.2mg/mL;

[0074] (5) 将 PVC 胶板及贴附的材料切成 4mm 宽度的试纸条;

[0075] (6) 将步骤(5)中的试纸条装入卡壳内,卡壳上开有显色区和加样区,加样区对准样品垫位置,显色区对准 T 线和 C 线所在区域;

[0076] (7) 将试纸条装在铝箔袋中,内装一个干燥剂和滴管,进行密封室温保存。

[0077] 2、标准曲线绘制及实际样品检测

[0078] (1) 标准曲线绘制:打开铝箔袋,取出试纸条,平放在检测台面上,然后在不同的试纸条的加样区相对的样品垫上,滴加不同浓度的沙丁胺醇标准品的样品各 100 μ L,10 到 15 分钟左右观察结果,20 分钟以后检测结果视为无效,应重新进行检测;将不同浓度沙丁胺醇的检测试纸条置于化学荧光仪器中进行读数,并将所得到的数据及其对应的浓度进行标准曲线的绘制,绘制标准曲线的方法与 AFP 检测的方法一样,以沙丁胺醇的浓度为横坐标,以荧光信号的强度为纵坐标,绘制标准曲线。

[0079] (2) 实际样品检测:开始检测,打开铝箔袋,取出试纸条,平放在检测台面上,然后滴加样品 100 μ L 于加样区相对的样品垫上,10 到 15 分钟左右观察结果,20 分钟以后检测结果视为无效,应重新进行检测,根据观察结果,若看到两条红色条带,证明该样品为阴性,若看到一条红色条带,证明该样品为阳性,若看到 T 线处的红色条带比 C 线处的红色条带淡,判定为阳性,采用化学荧光仪器读取荧光信号,可以进一步的实施定量分析。

[0080] (3) 根据化学荧光仪器读取的荧光信号结合所示的曲线图判定沙丁胺醇的定量浓度。

[0081] 实施案例 3 :Cd²⁺ 的检测

[0082] 我们以 Cd²⁺ 作为重金属离子检测的实施例,实验设计方法如下:

[0083] 1、免疫层析试纸条的制备:

[0084] (1) 取 100 μ g Cd²⁺ 的检测抗体置于透析袋中对 5mM Tris-HCl 进行透析 24h,在此过程中,每隔 2h 换一次透析液,透析完成后,将所述检测抗体取出置于离心管中,加入三蒸水至 2mL,离心后弃去沉淀杂质;

[0085] (2) 制备结合物垫:用浓度为 0.01M 的 K₂CO₃ 溶液调节 Janus 颗粒溶液的 pH,搅拌均匀,然后加入离心好的抗体,搅拌 20min 左右,然后加入 2mL10% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液,10000rpm,离心 40min,然后弃去上清液,再加入 1% 的 BSA 的溶液(含有 1mM 的 pH8.6 的缓冲溶液)继续离心,弃去上清液,将沉淀物进行恢复(恢复液的成分为:150mM 的 NaCl、1% 的 BSA、0.5% 的蔗糖和 0.5% 的酪蛋白钠),将其涂覆在 200 平方厘米大小的玻璃纤维膜上

面, -45°C 冷冻后, 作为结合物垫, 冻干后室温避光保存备用;

[0086] (3) 在 PVC 胶板上一端顺次相互搭接地贴附样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜, 另一端贴附有吸水纸;

[0087] (4) 通过三维平面划膜仪在硝酸纤维素膜上包被 T 线和 C 线 (T 线与 C 线之间的间隔为 4mm, 设定参数都为 1 微升 / 厘米), C 线为检测抗体的二抗, 浓度为 0.2mg/mL; T 线为 Cd^{2+} 的完全抗原 (Cd-EDTA-BSA), 浓度为 0.2mg/mL;

[0088] (5) 将 PVC 胶板及贴附的材料切成 4mm 宽度的试纸条;

[0089] (6) 将步骤 (5) 中的试纸条装入卡壳内, 卡壳上开有显色区和加样区, 加样区对准样品垫位置, 显色区对准 T 线和 C 线所在区域;

[0090] (7) 将试纸条装在铝箔袋中, 内装一个干燥剂和滴管, 进行密封室温保存。

[0091] 2、标准曲线绘制及实际样品检测

[0092] (1) 标准曲线绘制: 打开铝箔袋, 取出试纸条, 平放在检测台面上, 然后在不同的试纸条的加样区相对的样品垫上, 滴加不同浓度的 Cd^{2+} 标准品的样品 100 μL , 10 到 15 分钟左右观察结果, 20 分钟以后检测结果视为无效, 应重新进行检测; 将不同浓度 Cd^{2+} 的测试纸条置于化学荧光仪器中进行读数, 并将所得到的数据及其对应的浓度进行标准曲线的绘制, 绘制标准曲线的方法与 AFP 检测的方法一样, 以 Cd^{2+} 的浓度为横坐标, 以荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。

[0093] (2) 实际样品检测: 开始检测, 打开铝箔袋, 取出试纸条, 平放在检测台面上, 然后滴加样品 100 μL 于加样区相对的样品垫上, 10 到 15 分钟左右观察结果, 20 分钟以后检测结果视为无效, 应重新进行检测, 根据观察结果, 如看到两条红色条带, 证明该样品为阴性, 若看到一条红色条带, 证明该样品为阳性, 若看到 T 线处的红色条带比 C 线处的红色条带淡, 判定为阳性, 采用化学荧光仪器读取荧光信号, 可以进一步的实施定量分析。

[0094] (3) 根据化学荧光仪器读取的荧光信号结合所示的曲线图判定 Cd^{2+} 的定量浓度。

[0095] 申请人声明, 本发明通过上述实施例来说明本发明的详细特征以及详细方法, 但本发明并不局限于上述详细特征以及详细方法, 即不意味着本发明必须依赖上述详细特征以及详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了, 对本发明的任何改进, 对本发明选用组分的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等, 均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

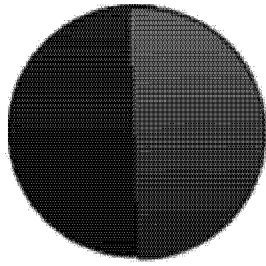


图 1

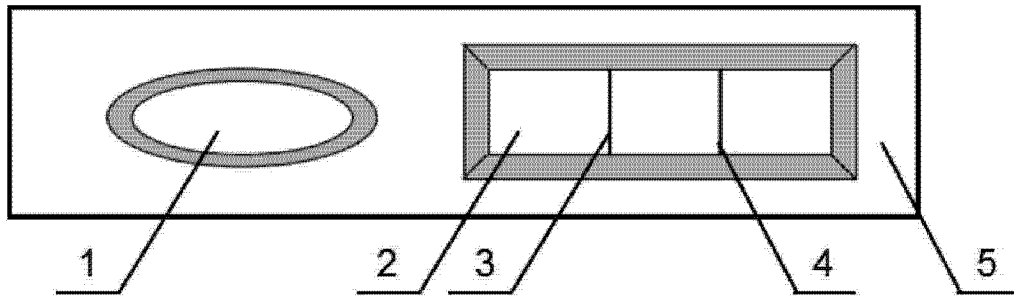


图 2

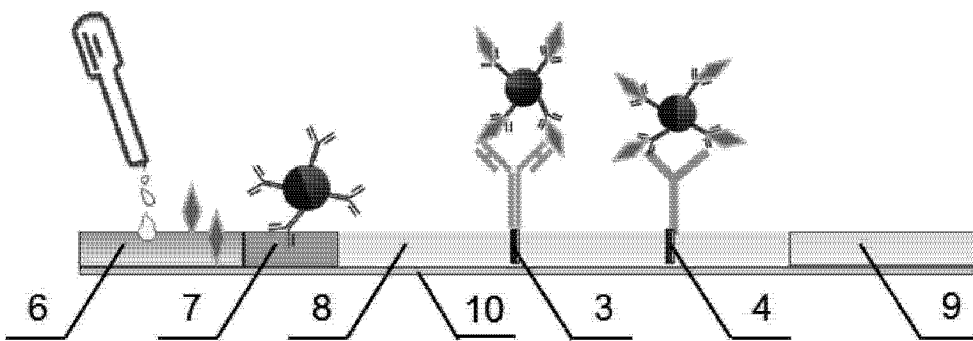
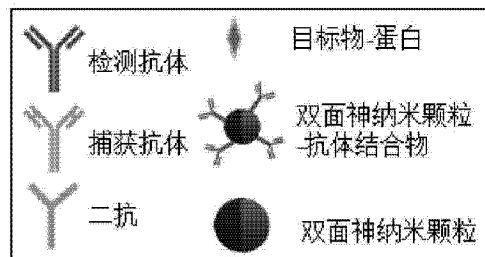


图 3

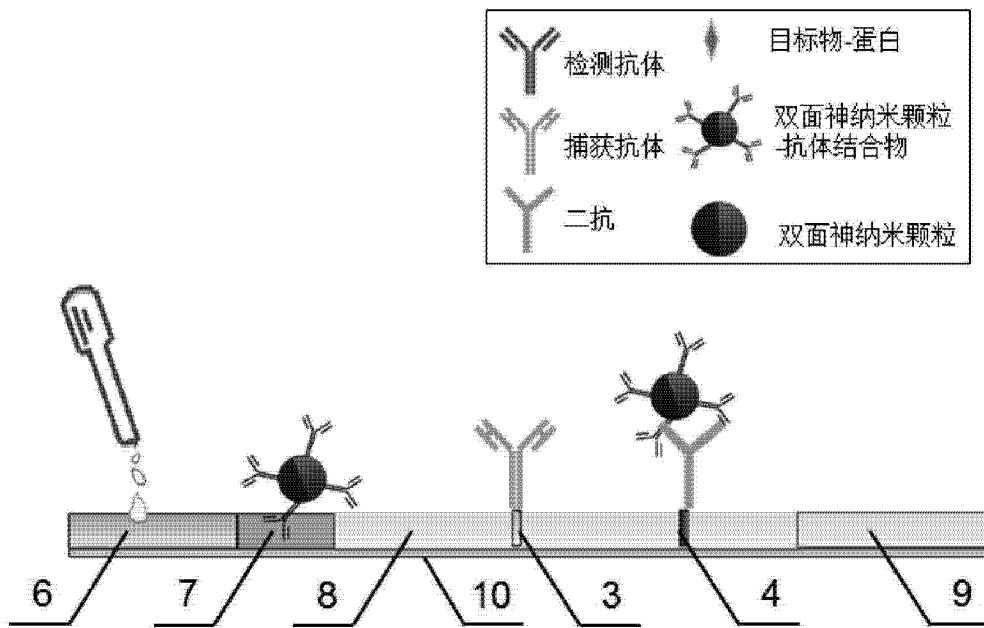


图 4

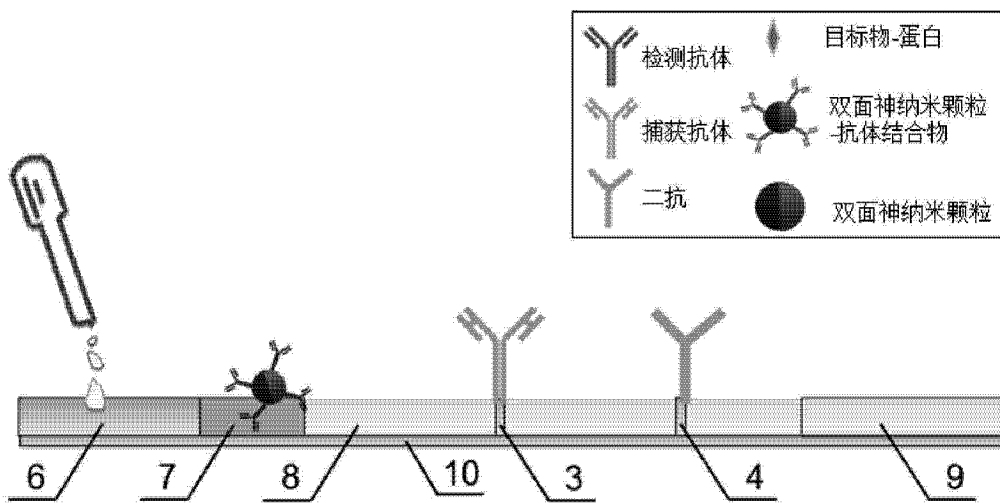


图 5

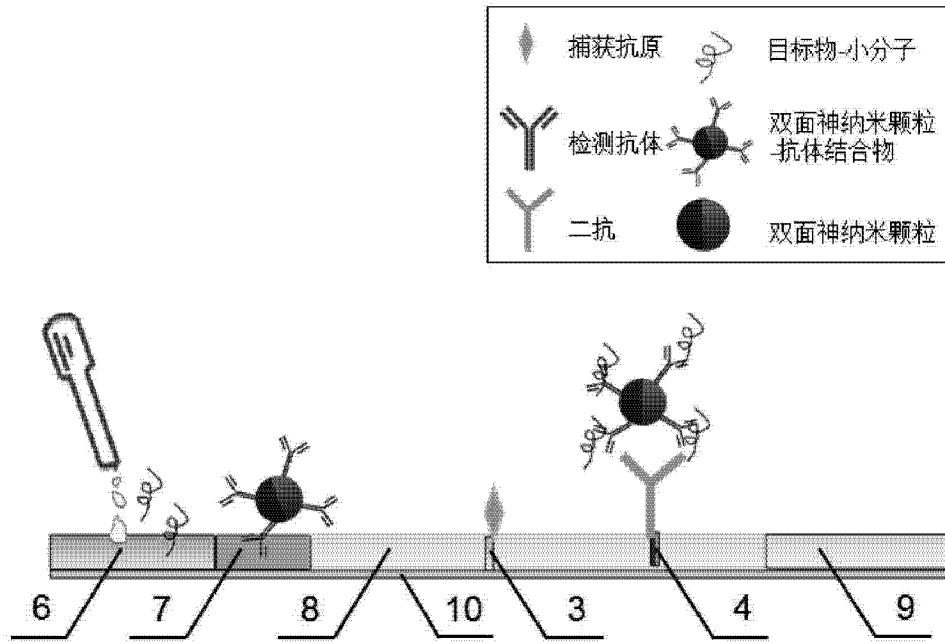


图 6

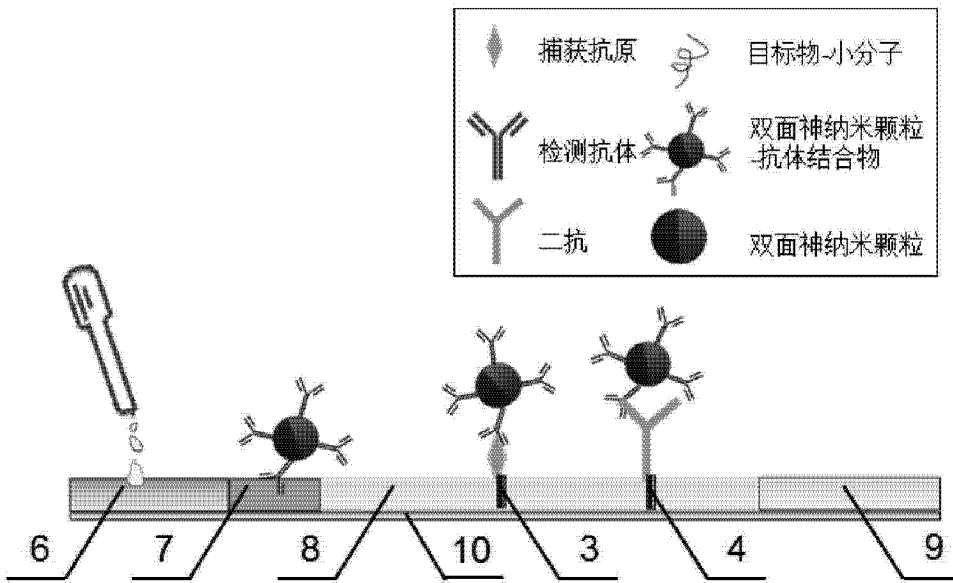


图 7

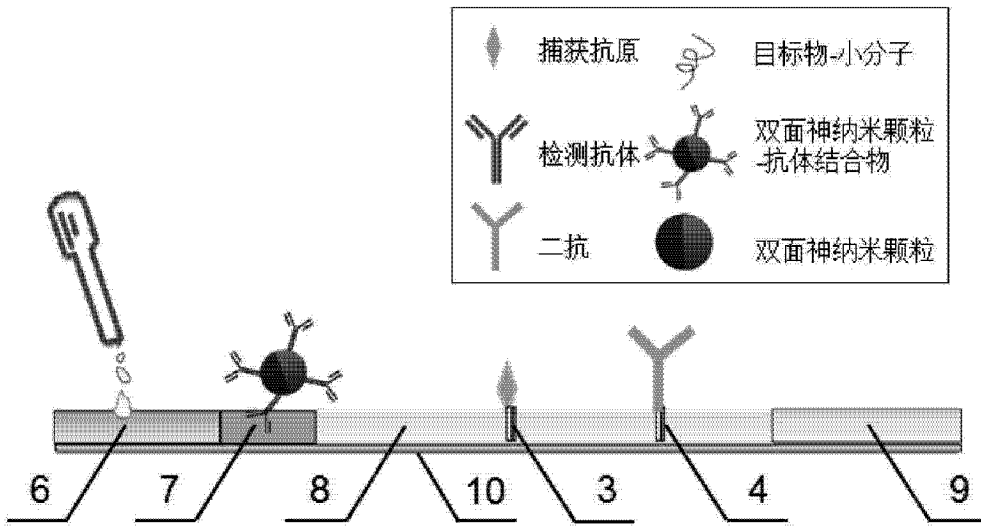


图 8

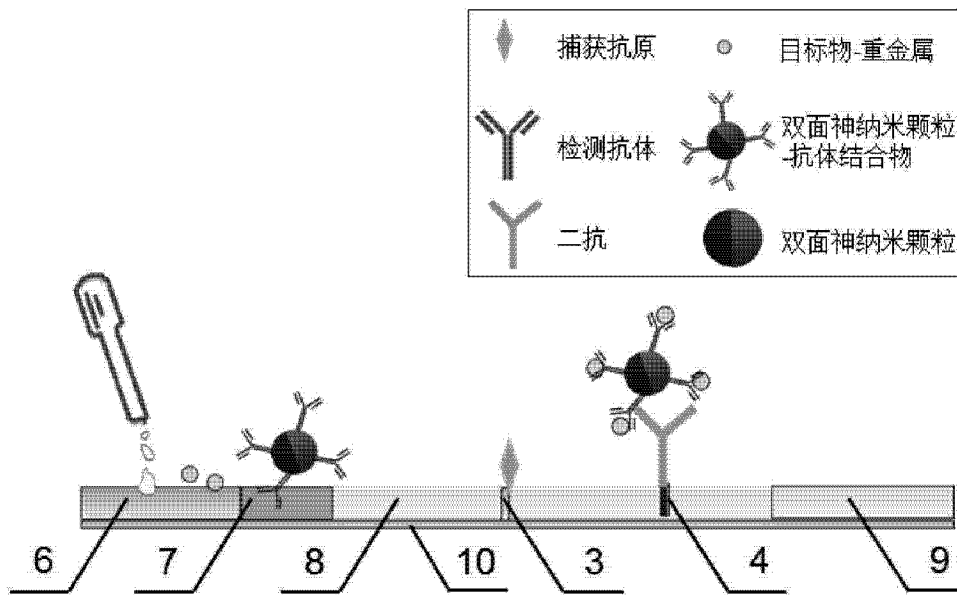


图 9

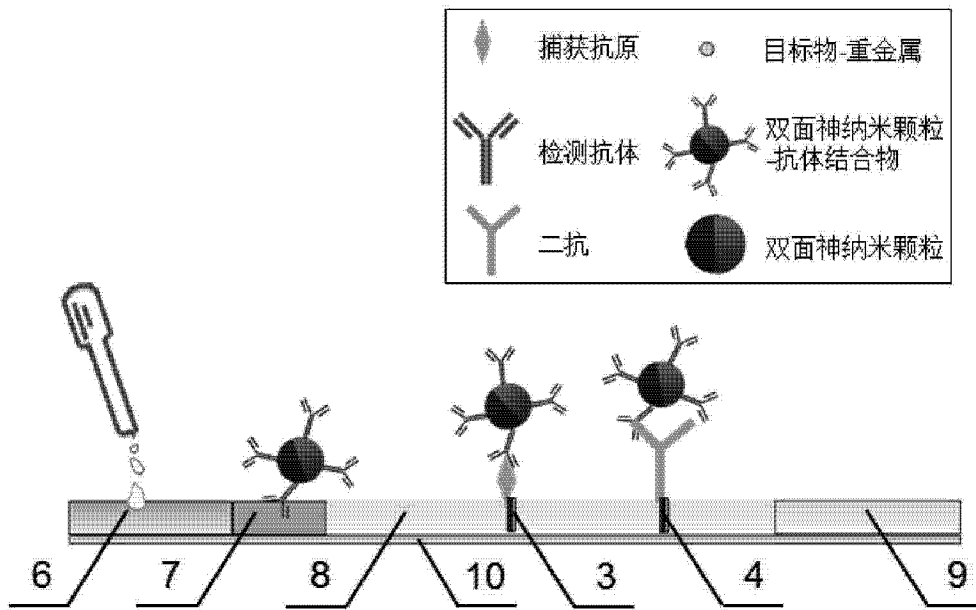


图 10

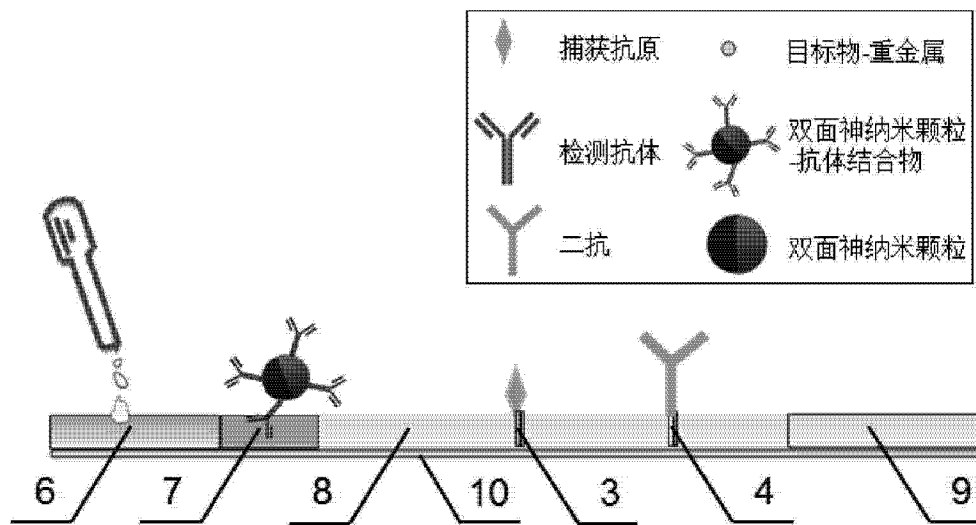


图 11

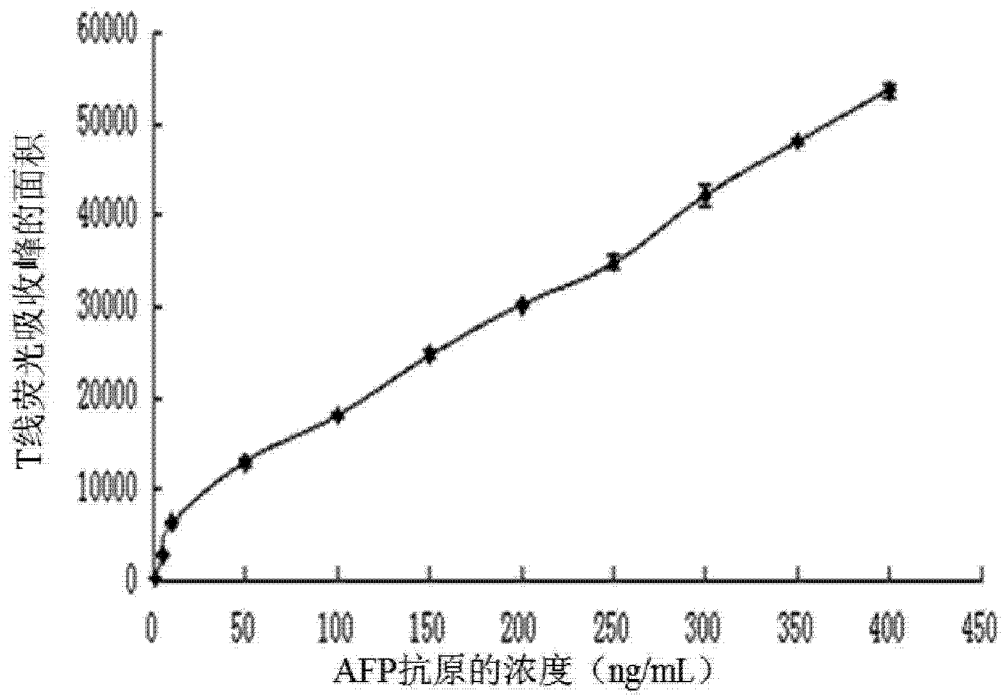


图 12

专利名称(译)	一种免疫层析试纸条、检测方法及应用		
公开(公告)号	CN104655836A	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201310607244.1	申请日	2013-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	蒋兴宇 曹丰晶 张伟		
发明人	蒋兴宇 曹丰晶 张伟		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558		
其他公开文献	CN104655836B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫层析试纸条、使用其的检测方法及应用，该免疫层析试纸条包括结合物垫、测试线和质控线，所述结合物垫上涂覆有检测抗体标记的双面神纳米颗粒，所述测试线包被捕获抗体或抗原，所述质控线包被所述检测抗体的抗体。本发明的免疫层析试纸条基于双面神纳米颗粒，能够实现目标物的可视化读出和荧光读出的双功能，相比传统的胶体金免疫层析试纸条，能够实现定量检测，并获得更高的检测灵敏度。

