



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110632297 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201910949006.6

(22)申请日 2019.10.08

(66)本国优先权数据

201811183342.6 2018.10.11 CN

(71)申请人 东莞东阳光医疗智能器件研发有限公司

地址 523871 广东省东莞市长安镇上沙社区振安中路368号3号楼3楼301室

(72)发明人 熊亮 郑兰花 洪礼清 蒋奎胜
庾琼 刘仁源 刘勇娥 李建霖

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

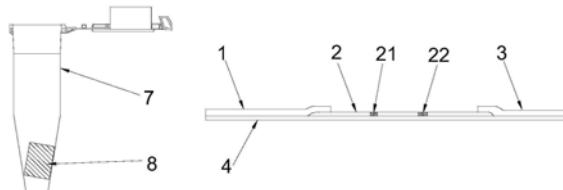
权利要求书2页 说明书22页 附图3页

(54)发明名称

一种免疫检测试剂盒及其测定方法和制备方法

(57)摘要

本发明提供一种免疫检测试剂盒，包括1)缀合物载体，包括配体、标记物和固相载体，所述配体用于与待测分析物发生特异性反应，所述标记物用于信号检测，所述配体与标记物相连接，所述固相载体用于承载配体和标记物；以及2)免疫层析试纸条；其中，所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分体式设置。本试剂盒具备既可在常温保存、运输，同时又能有良好精密度的特点，且操作方法简单快捷，适合即时检测使用。本试剂盒测定时先将样品溶液与缀合物载体混均匀后再加入免疫层析试纸条中进行检测，缀合物释放更为充分。本试剂盒制备方便、快捷、制造成本低廉，能与现有产线设备很好的兼容，可以不需要复杂的工艺及昂贵的设备。



1.一种免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:

1)缀合物载体,包括配体、标记物和固相载体,所述配体用于与待测分析物发生特异性反应,所述标记物用于信号检测,所述配体与标记物相连接,所述固相载体用于承载所述配体和标记物;以及,

2)免疫层析试纸条,包括第一样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,所述第一样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫沿液体层析方向依次排布置于所述底板上;

其中,所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分体式设置。

2.根据权利要求1所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述标记物为时间分辨荧光微球、普通荧光微球、磁微球、胶体金、彩色乳胶微球、量子点、时间分辨荧光染料、普通荧光素、酶、生物素-亲和素与微球放大系统中的任意一种。

3.根据权利要求1所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述固相载体为玻璃纤维、聚酯膜、无纺布中的任意一种。

4.根据权利要求1所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述免疫层析试纸条中还包括第二样品垫,所述第二样品垫设置在所述第一样品垫与硝酸纤维素膜之间。

5.根据权利要求1所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述缀合物载体于密封腔室中常温保存运输。

6.根据权利要求5所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述腔室为离心管、塑料管或微孔板中的任意一种。

7.一种免疫层析测定方法,使用权利要求1-6任一项所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,包括以下步骤:

溶解缀合物:将样品溶液加入缀合物载体中,缀合物溶解并与样品溶液充分反应,得到混合溶液;

滴加混合溶液:取上步骤中反应充分的混合溶液,滴在免疫层析试纸条中的第一样品垫上;

检测:使用免疫分析仪器采集T线和C线的信号,计算T/C信号值,从定标曲线中得出待分析物的浓度。

8.根据权利要求7所述的免疫层析测定方法,其特征在于,在步骤溶解缀合物前还包括:

获得定标曲线:取不同浓度的待分析物标准样品曲线,得出对应的T线和C线信号,建立待分析物浓度与T线和C线信号相对应的标准曲线,得到定标曲线,所述定标曲线储存于ID芯片中。

9.一种制备权利要求1-6任一项所述的免疫检测试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S100、制备缀合物载体;

S200、制备免疫层析试纸;

S300、封装免疫检测试剂盒;

在步骤S100、制备缀合物载体中包括:

S110、将配体和标记物相结合,得到缀合物;

S120、配置稀释液,将得到的缀合物分散于稀释液中;

S130、将上述稀释液通过喷涂或涂抹的方式固定于固相载体中，烘干，得到缀合物载体；

S140、将缀合物载体裁切成固定尺寸，分装于密封腔室。

10. 根据权利要求9所述的制备免疫检测试剂盒的方法，其特征在于，所述稀释液中缀合物的质量浓度为0.05‰-0.5‰；所述稀释液包含缓冲对、蛋白类、糖类、高聚物、阻断剂、防腐剂、表面活性剂。

一种免疫检测试剂盒及其测定方法和制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,尤其是涉及一种免疫检测试剂盒,及其测定方法和制备方法。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是一种能够使用抗原-抗体反应在短时间内定性和定量分析痕量分析物的方法,并且已被用于诊断或检测多种疾病以及多个领域,包括医药、农业、畜牧业、食品、军工和环境领域。

[0003] 通常使用包含反应物质的测定试纸条来进行免疫层析测定,反应物质可响应待检测的分析物而发生变化,或者使用包含安装于塑料箱体中的测定试纸条的测定装置来进行测定。常规测定试纸条包括:依次连接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,依次搭接组装在底板上,其中,样品垫用于接收液体样品即分析物;结合垫包含缀合物即检测试剂,分析物可以与缀合物相结合;硝酸纤维素膜上固定有检测部,检测部上固定化有抗体或抗原,即检测部可以和结合到缀合物的分析物发生特异性反应;吸水垫用于最终接收液体样品。在使用该测定试纸条进行的免疫层析测定中,当液体样品滴落于样品垫上时,其通过毛细管现象移动通过结合垫和硝酸纤维素膜,并最终被接收于吸水垫中。结合垫中的缀合物作为流动相还与液体样品一起移动,并且如果在液体样品中存在待检测的分析物,则缀合物将通过分析物与硝酸纤维素膜上抗原或抗体结合(一般称为“三明治反应”),或者缀合物和分析物竞争结合抗原或抗体(一般称为“竞争反应”),并因此,可视觉感知或通过传感器感知样品中分析物的存在。

[0004] 然而,该常规测定试纸条具有的问题在于,通过毛细管现象移动的液体样品并不一致地与固定于结合垫上的干燥缀合物结合,且结合垫中并不能完全释放缀合物,并因此,测定试纸条之间可能存在变化,这使得对样品的定量分析的精确性和再现性可能被降低。

[0005] 专利CN103314297A中提供了一种免疫层析测试条,可以由缀合物垫和不溶性膜载体构成,因为缀合物部是以线状形成的并且缀合物部和不溶性膜载体存在某种位置关系,以实现优异的缀合物从缀合物垫的释放性,在较短时间内完成反应,并且也实现优异的灵敏度。但本专利中仍然是通过毛细管现象移动的液体样品并与缀合物结合,从而不能保证缀合物的有效释放。

[0006] 专利CN104428675A中提供了用于即时检测性(POCT)免疫层析分析的冻干缀合物结构体、包含其的免疫检测试剂盒,以及使用该试剂盒进行分析的方法,因为样品是在外部一致地与根据本发明从外部单独制备的冻干缀合物结构体反应后接受免疫层析分析,所以与使用包含通过吸附缀合物制备的缀合物垫的免疫层析试纸条进行的常规测定方法相比,可以较高的重复性和取决于浓度的线性度来进行定量分析。但本专利中冻干缀合物结构体需要通过冻干方法得到,冻干方法的优点是保存周期长、均一性好、能最大程度保存标记物生物活性,缺点是成本高、生产周期长、而且冻干机需要专业人员操作,同时对标记物稀释液组分要求高。

[0007] 此外,还可以将结合有抗体/抗原的标记物采用液体试剂形式保存来改进样品分析的精确性和再现性,标记物用稀释液稀释后保存于离心管中。然而,当包含抗体和抗原的液体试剂被储存了长时间时,抗原-抗体反应的亲和力将降低,或者抗原和抗体将变性,液体试剂工艺配方复杂,保持好的稳定性难度较大,需要在2-8℃冷藏保存和运输才能保持其稳定性,增加生产、运输、保存等成本。

[0008] 基于上述情况,我们有必要设计一种能解决上述问题的免疫检测设备。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的在于提供一种免疫检测试剂盒,包括缀合物载体与免疫层析试纸条,具备既可在常温保存、运输,同时又能有良好精密度的特点,且操作方法简单快捷,适合即时检测使用,克服了常规测定试纸条中因缀合物在结合垫上滞留过多,释放量不足导致的结果不准确的问题。

[0010] 本发明的第二个目的在于提供一种免疫层析测定方法,本测定方法先将样品溶液与缀合物载体混均匀后再加入免疫层析试纸条中进行检测,缀合物释放更为充分。

[0011] 本发明的第三个目的在于提供一种免疫检测试剂盒的制备方法,其中缀合物载体制备方便、快捷、制造成本低廉,免疫层析试纸条保持原有的结构,能与现有产线设备很好的兼容,不需要复杂的工艺及昂贵的设备。

[0012] 为了实现以上目的,本发明第一方面提供了一种免疫检测试剂盒,包括:

[0013] 1) 缀合物载体,包括配体、标记物和固相载体,所述配体用于与待测分析物发生特异性反应,所述标记物用于信号检测,所述配体与标记物相连接,所述固相载体用于承载配体和标记物;

[0014] 2) 免疫层析试纸条,包括第一样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,所述第一样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫沿液体层析方向依次排布置于底板上;

[0015] 其中,所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分体式设置。

[0016] 具体的,所述配体与所述标记物通过化学力和/或物理力相连接。

[0017] 具体的,所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分体式设置,是指所述缀合物载体不包含在所述免疫层析试纸条上,例如,所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分开单独包装。在使用免疫检测试剂盒进行检测时,可以先将样品溶液在腔室中与缀合物载体混合,再将混合后的样品溶液加入免疫层析试纸条中得到检测结果,由此能提高缀合物的释放能力,以及提高待测分析物与配体反应的充分性,进一步提高检测结果的准确性。

[0018] 优选的,所述标记物为时间分辨荧光微球、普通荧光微球、磁微球、胶体金、彩色乳胶微球、量子点、时间分辨荧光染料、普通荧光素、酶、生物素-亲和素与微球放大系统中的任意一种。

[0019] 优选的,所述固相载体为玻璃纤维、聚酯膜、无纺布中的任意一种。

[0020] 优选的,所述免疫层析试纸条中还包括第二样品垫,所述第二样品垫设置在所述第一样品垫与硝酸纤维素膜之间。

[0021] 优选的,所述缀合物载体于密封腔室中常温保存运输。

[0022] 优选的,所述腔室为离心管、塑料管或微孔板中的任意一种。

[0023] 优选的,所述稀释液包含缓冲对、蛋白类、糖类、高聚物、阻断剂、防腐剂、表面活性

剂。

[0024] 本发明第二方面提供了一种免疫层析测定方法,使用上述的免疫检测试剂盒,包括以下步骤:

[0025] 溶解缀合物:将样品溶液加入缀合物载体中,缀合物溶解并与样品溶液充分反应,得到混合溶液;

[0026] 滴加混合溶液:取上步骤中反应充分的混合溶液,滴在免疫层析试纸条中的第一样品垫上;

[0027] 检测:使用免疫分析仪器采集T线和C线的信号,计算T/C信号值,从定标曲线中得出待分析物的浓度。

[0028] 优选的,在步骤溶解缀合物前还包括:

[0029] 获得定标曲线:取不同浓度的待分析物标准样品曲线,得出对应的T线和C线信号,建立待分析物浓度与T线和C线信号相对应的标准曲线,得到定标曲线,所述定标曲线储存于ID芯片中。

[0030] 本发明第三方面提供了一种免疫检测试剂盒的制备方法,使用上述的免疫检测试剂盒,包括以下步骤:

[0031] S100、制备缀合物载体;

[0032] S200、制备免疫层析试纸;

[0033] S300、封装免疫检测试剂盒

[0034] 在步骤S100、制备缀合物载体中包括:

[0035] S110、将配体和标记物相结合,得到缀合物;

[0036] S120、配置稀释液,将得到的缀合物分散于稀释液中;

[0037] S130、将上述稀释液通过喷涂或涂抹的方式固定于固相载体中,烘干,得到缀合物载体;

[0038] S140、将缀合物载体裁切成固定尺寸,分装于密封腔室。

[0039] 优选的,所述稀释液中缀合物的质量浓度为0.05%-0.5%;所述稀释液包含缓冲对、蛋白类、糖类、高聚物、阻断剂、防腐剂、表面活性剂。

[0040] 本发明的有益效果在于:

[0041] 1、通过使用合适的稀释液将缀合物进行处理,再分散于固相载体中,干燥后得到缀合物载体,缀合物载体制备方法简单且可在常温条件下长时间保存和运输,有利于降低成本;

[0042] 2、通过缀合物载体与免疫层析试纸条分体式设置,由此缀合物载体可以单独封装于密闭腔室中,可被简易储存而不发生污染,并且容易携带;

[0043] 3、缀合物可以快速、充分的溶解于样品溶液中,以充分与待测分析物反应,缀合物在复溶后不会发生非特异性聚集,通过样品溶液复溶缀合物能有效提高缀合物释放发能力,以及待测分析物与配体反应的充分性,从而进一步提高检测结果的准确性;

[0044] 4、与常规的将缀合物固化于结合垫上的免疫层析试纸相比,本发明的缀合物效价维持稳定,表现出更优的精密度;与将标记物液态形式或冻干形式保存的免疫层析试纸相比,本发明缀合物载体采用烘干,制备方便、快捷、制造成本低廉,且能在常温下长期保存;

[0045] 5、本发明的免疫检测试剂盒能保持原有的层析试纸条结构,能与现有产线设备很

好的兼容,可以不需要复杂的工艺及昂贵的设备。

附图说明

- [0046] 图1是现有技术中的免疫层析试纸条示意图;
- [0047] 图2是本发明的免疫检测试剂盒示意图;
- [0048] 图3是本发明的免疫检测试剂盒另一结构示意图;
- [0049] 图4是本发明的免疫检测试剂盒测定方法的流程图;
- [0050] 图5是本发明的免疫检测试剂盒制备方法的流程图;
- [0051] 图6是本发明的免疫检测试剂盒制备缀合物载体的流程图。
- [0052] 其中,图1中:1、样品垫;2、硝酸纤维素膜;21、检测线;22、质控线;3、吸水垫;4、底板;5、结合垫;
- [0053] 图2、图3中:1、第一样品垫;2、硝酸纤维素膜;21、检测线;22、质控线;3、吸水垫;4、底板;5、第二样品垫;7、腔室;8缀合物载体。

具体实施方式

- [0054] (常规免疫层析试纸条)
[0055] 如图1中所示,常规免疫层析试纸条包括:依次连接的样品垫1、结合垫5、硝酸纤维素膜2和吸水垫3,依次搭接组装在底板4上,结合垫5包含缀合物即检测试剂,分析物可以与缀合物相结合;硝酸纤维素膜上包被有检测线T线21和质控线C线22,T线21上包被有与待测分析物发生特异性结合的配体。
- [0056] (免疫检测试剂盒)
[0057] 本发明提供的免疫检测试剂盒,如图2中所示,包括:缀合物载体8和免疫层析试纸条,其中,所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分体式设置。
[0058] 1) 缀合物载体8,包括配体、标记物和固相载体,配体用于与待测样品发生特异性反应,标记物用于信号检测,配体与标记物通过化学力和/或物理力相连接,固相载体用于承载配体和标记物。
[0059] 标记物可以产生可视觉感知或使用传感器感知的信号,可通过标记物的固有特性(例如冷光),或通过外部刺激(例如荧光)来产生信号。
[0060] 本发明的一些实施例中,标记物为时间分辨荧光微球、普通荧光微球、磁微球、胶体金、彩色乳胶微球、量子点、时间分辨荧光染料、普通荧光素、酶、生物素-亲和素与微球放大系统中的任意一种。
- [0061] 配体可以与待分析物特异性结合,在本发明中可使用任何物质作为配体,只要其显示特异性结合特定受体特性即可。配体与标记物结合形成缀合物,标记物和配体可在物理上或化学上彼此连接。
[0062] 本发明的一些实施例中,配体为特异性结合抗原的抗体或特异性结合抗体的抗原。
[0063] 固相载体用于承载缀合物,固相载体不与缀合物发生反应,即不会对缀合物性能产生不利影响,通过将缀合物配制成预定组分和浓度的溶液,再分散于固相载体的表面,可实现常温下的长期保存且保持缀合物的特性。同时,固相载体也不与样品溶液或分析物发

生反应。

[0064] 本发明的一些实施例中，固相载体为玻璃纤维、聚酯膜、无纺布中的任意一种。

[0065] 本发明的一些实施例中，缀合物载体单独密封存放于腔室7中。

[0066] 腔室7为用于存放缀合物载体的空间，腔室7可以密封，以保证缀合物载体的存放过程不受外界不适当环境的污染而破坏缀合物的性能，使得缀合物具备较长的保质期。

[0067] 本发明的一些实施例中，腔室7为离心管、塑料管或微孔板中的任意一种。

[0068] 本发明的一些实施例中，腔室7包含盖子。当储存时，使用盖子密封腔室，缀合物载体在腔体内被密闭保存；当检测时，先将盖子打开，再将样品溶液加入腔室中，使缀合物溶解。

[0069] 本发明的一些实施例中，缀合物载体通过如下方式形成：将配体和标记物相结合，将结合有配体的标记物经稀释液稀释到一定的浓度，通过喷涂或浸泡等方式均匀分布于固相载体上，烘干后裁切成固定尺寸，分装于密封腔室中，即可常温保存。

[0070] 本发明的一些实施例中，稀释到一定的浓度是指缀合物在稀释液中的质量浓度为0.05‰-0.5‰。本发明的一些实施例中，缀合物在稀释液中的质量浓度为0.02%~0.1%。

[0071] 本发明的一些实施例中，稀释液包含缓冲对、蛋白类、糖类、高聚物、阻断剂、防腐剂、表面活性剂。

[0072] 稀释液中缓冲对为Tris-HCl或PB，浓度为0.01-0.05M；蛋白类为BSA或酪蛋白，浓度为0.5%-2%；糖类为蔗糖和/或海藻糖，浓度为5%-25%；高聚物为PVP、PVA或PEG中的任意一种或者其组合，浓度为0.5%-2%；阻断剂为罗氏MAK系列或Scantibodies HBR系列，浓度为1-5mg/mL；防腐剂为Proclin300或叠氮钠，浓度为0.05%-0.1%；表面活性剂为吐温-20、曲拉通-100或S9，浓度为0.1-1%。

[0073] 稀释液的pH值为7.0-9.0，优选的为9.0。

[0074] 2) 免疫层析试纸条，包括第一样品垫1、硝酸纤维素膜2、吸水垫3和底板4，第一样品垫1、硝酸纤维素膜2、吸水垫3沿液体层析方向依次排布置于底板4上。

[0075] 与常规的免疫层析试纸条不同，本发明中不设置结合垫，但保留了样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，其结构现有技术中已有公开，本文不在赘述。

[0076] 其中，硝酸纤维素膜上包被有检测线(T线)21和质控线(C线)22，T线21上包被有与待测分析物发生特异性结合的配体，通过观察T线21和C线22的变化即可判断检测的最终结果。进一步的，T线21上包被的配体可以与缀合物中的配体相同，也可以和与缀合物中的配体不同。

[0077] 如图3中所示，本发明的一些实施例中，免疫层析试纸条还包括第二样品垫5，第二样品垫5设置在第一样品垫1与硝酸纤维素膜2之间。

[0078] 为了使样品溶液能从样品垫均匀迁移至硝酸纤维素膜，以及便于减少样本中干扰物质影响的目的，可以设置两层样品垫，在第一样品垫与硝酸纤维素膜之间设置有第二样品垫，第二样品垫的材质可以与第一样品垫相同，也可以与第一样品垫不相同。通过该设置，可控制样品溶液的迁移速度和均匀度，提升产品性能。

[0079] 本发明的一些实施例中，免疫检测试剂盒还包括壳体，壳体包括上壳体和下壳体，免疫层析试纸条安装于上壳体和下壳体之间，上壳体包括加样孔和观察口，加样孔与第一样品垫位置相对应，以便于样品溶液的加入，观察口与硝酸纤维素膜的T线和C线位置相对

应,以便于观察及获取检测结果。在使用免疫检测试剂盒进行检测时,从加样孔加入溶解有缀合物的样品溶液即可进行层析反应,一段时间后在观察口进行信号采集,具体的,先将样品溶液在腔室中与缀合物载体混合,再将混合后的样品溶液从加样孔加入,样品溶液随着毛细作用力向前泳动,经过第一样品垫、硝酸纤维素膜最终到达吸水垫,并通过硝酸纤维素膜的T线和C线的信号得出检测结果。

[0080] 常规的免疫层析试纸条的结合垫是用于固定缀合物,其中缀合物也是呈固态形式保存,当样品溶液通过毛细力从样品垫中迁移到结合垫时,固定的缀合物溶解于样品溶液中,而一般检测时滴入样品垫的样品溶液量少,同时,样品溶液随着毛细作用力泳动,不能确保所有结合垫中固定的缀合物完全释放,即检测结束后结合垫中的缀合物会有残余,从而影响最终的检测结果的准确性;同时,不同的免疫层析试纸条在检测结束后,其结合垫中缀合物的残余量不同,会导致不同的免疫层析试纸条的检测结果产生偏差。

[0081] 而本发明中,缀合物固定于缀合物载体中,缀合物载体的主要优点有二个方面,1) 缀合物经稀释后通过喷涂或浸泡等方式均匀分布于固相载体上,干燥后即可常温保存,长时间存放也能保持良好的稳定性能;2) 样品溶液先在腔室中与缀合物载体混合,能提高缀合物的释放能力,以及提高待测分析物与配体反应的充分性,进一步提高检测结果的准确性。

[0082] (免疫层析测定方法)

[0083] 本发明提供的免疫层析测定方法,如图4所示,使用上述的免疫检测试剂盒,包括以下步骤:

[0084] 溶解缀合物:将样品溶液加入缀合物载体中,缀合物溶解并与样品溶液充分反应,得到混合溶液;

[0085] 滴加混合溶液:取上步骤中反应充分的混合溶液,滴在免疫层析试纸条中的第一样品垫上;

[0086] 检测:使用免疫分析仪器采集T线和C线的信号,计算T/C信号值,从定标曲线中得出待分析物的浓度。

[0087] 本发明的一些实施例中,在步骤溶解缀合物前还包括:

[0088] 获得定标曲线:取不同浓度的待分析物标准样品曲线,得出对应的T线和C线信号,建立待分析物浓度与T线和C线信号相对应的标准曲线。

[0089] 本发明可以根据T线和C线的信号强度,得出定性检测结果和/或定量检测结果。

[0090] 具体的,当样品溶液中不存在待检测的分析物时,T线不会产生信号,当样品溶液中存在待检测的分析物时,T线产生信号,C线为质控线,无论样本中待测分析物是否存在,C线都将产生信号,C线信号是判断样本是否足够,层析过程是否正常的标准。由此,可以定性的得出检测结果。

[0091] 同时,因为T线产生的信号在一定范围内与待测分析物浓度呈正相关,根据T线产生的信号与待测分析物浓度的相关曲线,本发明还可以通过辅助的检测设备,对T线和C线会产生相应的信号进行强度分析,再通过一定的对应关系换算为待检测分析物的浓度,即可定量的得出检测结果。

[0092] 当然,如果辅助检测的免疫分析仪器已经有相应的定标曲线,或者已经获取了一次定标曲线,则后续检测过程中无需再重复获得定标曲线即可完成检测过程,获得定量的

检测结果。

[0093] 免疫层析测定方法,利用基于抗原-抗体反应的免疫反应原理与其中样品和试剂通过流动相沿着介质移动的免疫层析原理的组合。在一般含义中,免疫反应是指抗原-抗体反应,但是在本发明的广义含义中,其意为不仅包括抗原-抗体反应,还包括受体和与其特异性结合的配体之间的反应。此外,不限于此,其还包括特异性识别彼此的物质之间的反应,例如酶-底物反应。

[0094] 分析物,也称待测分析物,是指包括病毒和一般可以利用抗原-抗体反应测定的生理活性物质。

[0095] 本发明的一些实施例中,病毒包括流感病毒诸如甲型流感病毒、乙型流感病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒等。

[0096] 本发明的一些实施例中,生理活性物质包括人血红蛋白、乙型肝炎抗体、丙型肝炎抗体、人类免疫缺陷病毒抗体、肿瘤标志物(AFP/CEA/PSA/CA199)、感染因子(CRP/PCT/SAA/IL6)等。

[0097] 样品,也称样品溶液,是指可能含有分析物的样品,包括分离自哺乳动物优选人的所有生物学样品。

[0098] 本发明的一些实施例中,样品包括全血、血细胞、血清、血浆、骨髓脊髓液、汗液、尿液、泪液、唾液、皮肤、黏膜和毛发。优选的,样品可为全血、血清、血浆。

[0099] 本发明的一些实施例中,可以先将样品经过缓冲液处理后再与将处理后的样品溶液加入缀合物载体中充分反应,以充分溶解缀合物,确保缀合物的完全溶出,以及与分析物之间的完全反应。

[0100] 本发明的免疫检测方法可用于使用血清作为样品来分析血糖水平和诊断疾病。所述疾病的实例包括疟疾抗原(Ag)、AIDS、丙肝、乙肝、梅毒、引起胃溃疡的微生物、癌症标记物(AFP、PSA、CEA)、结核病、SAS、登革热和麻风。优选地,所述分析物可为癌症标记物(AFP、PSA、CEA),但不限于此。

[0101] (免疫检测试剂盒的制备方法)

[0102] 本发明提供的制备上述免疫检测试剂盒的方法,如图5所示,包括以下步骤:

[0103] S100、制备缀合物载体;

[0104] S200、制备免疫层析试纸;

[0105] S300、封装免疫检测试剂盒。

[0106] 其中,如图6所示,在步骤S100、制备缀合物载体中包括:

[0107] S110、将配体和标记物相结合,得到缀合物;

[0108] S120、配制稀释液,将得到的缀合物分散于稀释液中,使缀合物稀释到一定的浓度;

[0109] S130、将上述稀释液通过喷涂或涂抹的方式固定于固相载体中,烘干,得到缀合物载体;

[0110] S140、将缀合物载体裁切成固定尺寸,分装于密封腔室。

[0111] 其中,在步骤S200、制备免疫层析试纸中包括:

[0112] S210、配制样品垫缓冲液,分布将样品垫浸泡于样品垫缓冲液中,再取出,烘干;

[0113] S220、在硝酸纤维素膜上包被检测线T线和质检线C线,烘干;

- [0114] S230、将样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次排布于底板上；
- [0115] S240、将免疫层析试纸条卡入上壳和下壳之间，得到免疫层析试纸条。
- [0116] 本发明的一些实施例中，步骤S120中使缀合物稀释到一定的浓度是指缀合物在稀释液中的质量浓度为0.05‰-0.5‰。优选的，缀合物在稀释液中的质量浓度为0.02%~0.1%。
- [0117] 其中，在步骤S300、封装免疫检测试剂盒中包括：
- [0118] 将步骤S100中得到的装有缀合物载体的腔室、步骤S200中得到的免疫层析试纸条，以及干燥剂一起包装于铝箔袋中，热合封口，常温保存；或者
- [0119] 将步骤S100中得到的装有缀合物载体的腔室、步骤S200中得到的免疫层析试纸条分别包装，分别与干燥剂一起包装于铝箔袋中，热合封口，常温保存。
- [0120] 实施例
- [0121] 在下文中，将参照实施例更详细地描述本发明。但是应理解，这些实施例仅用于举例说明的目的，并不意图限制本发明的范围。
- [0122] 实施例1AFP荧光微球免疫检测试剂盒
- [0123] 1、AFP荧光微球免疫检测试剂盒结构：
- [0124] 包括免疫层析试纸条和缀合物固相载体，免疫层析试纸条包括底板，所述底板上依次衔接有第一样品垫、第二样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，硝酸纤维素膜T线位置包被有 AFP 抗体，C 线位置包被有羊抗鼠 IgG；缀合物固相载体中标记物为铕离子荧光微球，配体为 AFP 抗体，固相载体为玻璃纤维，缀合物固相载体放置于离心管内。
- [0125] 2、AFP荧光微球免疫检测试剂盒的制备：
- [0126] 试剂与耗材：
- [0127] 表1

名称	型号	厂家
1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)	/	阿拉丁
N-羟基硫代琥珀酰亚胺钠盐(Sulfo-NHS)	/	阿拉丁
吐温-20	/	阿拉丁
2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)	/	阿拉丁
Proclin 300	/	阿拉丁
PVP	/	阿拉丁
D-海藻糖	/	阿拉丁
蔗糖	/	成都市科龙化工
酪蛋白钠	/	SIGMA
tritonX-100	/	阿拉丁

	BSA	/	Proliant
[0129]	铕离子荧光微球	200nm	Bangs Labs
	甲胎蛋白(AFP)抗体	/	菲鹏生物股份有限公司
	羊抗鼠抗体	/	杭州启泰公司
	硝酸纤维素膜(NC膜)	HF13502S25	Millipore
	吸水垫	/	上海金标
	PVC底板	/	上海金标
	第一、第二样品垫玻纤	/	上海金标
	固相载体玻纤	奥斯龙 8964	上海杰一
	塑料卡壳	/	上海金标

[0130] 溶液配制：

[0131] 0.025M MES缓冲液：称取5.33gMES于900mL超纯水中，完全溶解后调节pH5.0，定容至1L，用于微球洗涤、活化；

[0132] EDC溶液：10mg/mL，溶于0.25M MES缓冲液中，pH5.0；

[0133] NHS溶液：10mg/mL，溶于0.25M MES缓冲液中，pH5.0；

[0134] 0.01M PBS缓冲液：称取0.24g KH₂PO₄，1.44gNa₂HPO₄，8gNaCl、0.2g KC1于900mL超纯水中，完全溶解后调节pH至所需pH值，然后用容量瓶定容至1L；

[0135] 0.02M PB缓冲液：先配制1L 0.2M Na₂HPO₄•12H₂O溶液和1L 0.2M NaH₂PO₄溶液，1L 0.2M Na₂HPO₄•12H₂O溶液：称取71.64g Na₂HPO₄•12H₂O，定容至1L，配制1L 0.2M NaH₂PO₄溶液：称取24g NaH₂PO₄，定容至1L；根据不同的pH值要求，分别取一定体积的两种溶液，再加入800mL超纯水，用HC1或NaOH微调至所需pH值，定容至1L；

[0136] 0.01M Tris-HCl缓冲液：称取1.21g于900mL超纯水中，完全溶解后调节到所需的pH值，然后定容至1L；

[0137] 0.025M Tris-HCl缓冲液：称取3.03g于900mL超纯水中，完全溶解后调节到所需的pH值，然后定容至1L；

[0138] 微球偶联缓冲液：0.02M PB，pH 7.0；

[0139] 微球封闭液：0.02M PB,5%BSA,pH 7.4；

[0140] 微球保存液：0.01M Tris-HCl,0.9%NaCl,0.2%Tween-20,0.05%Proclin-300,pH8.0；

[0141] 微球稀释液：0.025M Tris-HCl,1%BSA,0.5%吐温-20,0.5%PVP,10%D-海藻糖,15%蔗糖,0.05%Proclin-300,2mg/mL HBR-1阻断剂,pH 9.0。

[0142] 2.1、标记抗体固相载体的制备

[0143] ①标记抗体制备步骤

[0144] 清洗微球：取200μL荧光微球(固含量1%)于2mL离心管内，用1mL MES缓冲液洗涤三次，15000rpm离心20min；

[0145] 活化微球：加入1mL MES缓冲液超声重悬，加入EDC和NHS各10μL、20μL，室温反应30min，15000rpm离心20min，去上清；

[0146] 标记抗体：加入1mL微球偶联缓冲液超声重悬，加入200μg菲鹏生物2AFP-28抗体室温振荡反应2h，12000rpm离心20min，去上清；

[0147] 封闭微球：加入1mL微球封闭缓冲液超声重悬，室温振荡反应2h，15000rpm离心

20min,去上清;

[0148] 洗涤与保存微球:加入1mL微球保存缓冲液超声重悬,12000rpm离心20min,去上清,洗涤三次,最后加入10mL微球保存液超声重悬,4℃密封保存。

[0149] ②抗体标记物固化

[0150] 用稀释液将标记好的微球稀释到0.5‰(微球固含量W/V),使用上海金标HM3230划膜喷金仪按喷涂量4μL/cm喷涂到尺寸6mm×300mm奥斯龙8964玻璃纤维上,后放于37℃烘干4h,裁切成4mm×6mm方形小块,每一小块分装于离心管中。

[0151] 2.2、第一样品垫和第二样品垫的制备

[0152] ①第一样品垫处理液:0.2M PB,0.5%S9,2%BSA,1.5%PVP,pH 7.4;

[0153] 第二样品垫处理液为:0.2M PB,0.5%S9,2%BSA,1.5%PVP,2%蔗糖,30ug/mL阻断剂,pH 7.4。

[0154] ②样品垫材质为CB08,室温下分别将第一样品垫、第二样品垫浸泡在样品垫缓冲液中1h,37℃烘干4h。

[0155] 2.3、包被膜的制备

[0156] ①包被缓冲液:0.01M PBS,1.5%D-海藻糖,pH 7.4;

[0157] ②包被缓冲液稀释抗AFP抗体、羊抗鼠IgG至1mg/mL;

[0158] ③将硝酸纤维素膜粘贴于PVC底板上后,使用上海金标HM3230划膜喷金仪将菲鹏生物2AFP-27、羊抗鼠IgG抗体溶液包被于硝酸纤维素膜上T线、C线位置,喷涂量1μL/cm,T线、C线间距4mm,37℃烘干4h。

[0159] 2.4、AFP荧光微球免疫检测试剂盒组装:

[0160] 将第一样品垫、第二样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫沿液体层析方向由左至右依次排布,组成免疫层析试纸条,PVC底板置于上述第一样品垫、第二样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫的下方用于支撑它们。

[0161] (1)吸水垫的粘贴:将底板平铺与工作台面上;撕开底板上缘吸水垫粘贴处的保护膜,然后将吸水垫粘贴于其上,轻柔、均匀滚动式推进,吸水垫覆盖在硝酸纤维素膜上2mm。

[0162] (2)样品垫粘贴:将第一样品垫裁切成宽8mm长300mm,撕开硝酸纤维素膜下缘粘贴处的保护膜,将第一样品垫粘贴于其上,轻柔、均匀滚动式推进,第一样品垫覆盖在硝酸纤维素膜上2mm;将第二样品垫裁切成宽20mm长300mm,撕开硝酸纤维素膜下缘粘贴处的保护膜,将第二样品垫粘贴于第一样品垫下部,轻柔、均匀滚动式推进,第二样品垫覆盖在第一样品垫上2mm;

[0163] (3)试纸条切割与装卡:组成大板后使用上海金标ZQ2002切条机裁切成4mm试纸条,将每一条试纸条装入塑料卡壳内构成一条检测卡,也称免疫层析试纸条。

[0164] (4)密封保存:将每一检测卡和每一离心管置于铝箔包装袋中,并加入1g干燥剂1包,热合封口,室温保存,完成AFP荧光微球免疫层析试剂盒组装。

[0165] 2.5、AFP荧光微球免疫层析试剂盒标准曲线的制作

[0166] 使用组装好的AFP荧光微球免疫层析试剂盒,测试梯度浓度的AFP工作校准品,将得到的系列T/C信号比值与对应浓度建立T/C-浓度标准曲线,并将曲线存储于ID芯片中。

[0167] 3、AFP荧光微球免疫层析试剂盒的使用方法:

[0168] (1)检测仪器开机,插入与试剂同批号的芯片并读取芯片内标准曲线;

[0169] (2) 撕开试剂盒外包装,取出检测卡和装有微球固体载体的离心管,移液器精确吸取120 μ L血清/血浆,或全血样品,加入到离心管中,移液器轻微上下吹打数次,然后取70 μ L混匀后的样品溶液到检测盒的加样孔中。

[0170] (3) 待室温反应10min后,将检测卡放入仪器的卡槽中测试,使用免疫分析仪器通过采集检测线(T)和质控线(C)条带荧光信号,计算T/C信号值,并显示结果。

[0171] 将上述所得的试剂盒分别检测两份不同浓度的样品溶液(分别记为质控品1、质控品2),经10次测试,得不精密度测试结果,结果见表2;

[0172] 将上述所得的试剂盒经37℃加速稳定性,定期取一试剂盒分别检测两份不同浓度的样品溶液(分别记为质控品1、质控品2),得稳定性测试结果,结果见表3。

[0173] 为了证明本发明提供的技术方案的效果,进行实验对比,主要比较不精密度和稳定性。

[0174] 对比例1.1:将标记抗体按与实施例1相同参数喷涂到结合垫上,结合垫材料与实施例1中固相载体材料相同,37℃烘干4h。以常规结构制备免疫层析试纸,依次将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次安装于PVC底板上,测试时分别将两份70 μ L不同浓度的样品溶液(分别记为质控品1、质控品2)加到检测盒加样孔中进行测试,经10次测试,得不精密度结果,结果见表1。

[0175] 与实施例1相比,对比例1.1中不含有缀合物固相载体,而多了结合垫,其中,缀合物固相载体与结合垫制备方法相同,此外其余结构和步骤与实施例1相同。

[0176] 实施例1、对比例1.1的不精密度测试结果如表2所示:

[0177] 表2

序号	实施例 1		对比例 1.1		
	质控品1 (ng/mL)	质控品2 (ng/mL)	质控品1 (ng/mL)	质控品2 (ng/mL)	
[0178]	1	20.7	101.62	17.17	97.94
	2	19.52	99.38	21.95	104.83
	3	21.31	92.73	18.89	102.35
	4	20.82	96.58	23.27	115.83
	5	21.94	107.83	20.51	97.48
	6	21.77	101.64	20.44	86.33
	7	21.19	99.58	17.32	91.24
	8	21.92	107.36	17.66	96.53
	9	19.33	102.24	16.16	99.25
	10	20.3	97.54	23.33	108.83
平均值		21.14625	100.84	19.65125	99.06625
不精密度		4.49%	4.60%	13.30%	8.46%

[0179] 可以看出,本实施例1的不精密度与对比例1.1相比明显降低,表明采用本实施例1的方案检测结果更精确。

[0180] 对比例1.2:将缀合物即标记好的微球用稀释液稀释至十万分之二的浓度,采用离心管50 μ L每管分装,试纸条由第一样品垫、第二样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫组合而成,测试时先吸取两份50 μ L不同浓度的样品溶液(分别记为质控品1、质控品2)加入到含有缀合物

的离心管中,测混匀后分别取两份70 μ L混匀后的样品溶液加到检测盒加样孔中进行测试。并经37℃加速稳定性,定期进行测试,得稳定性结果,结果见表2。

[0181] 与实施例1相比,对比例1.2中缀合物经过稀释后不喷涂于固相载体中,而是液体状态保持于离心管中,此外其余结构和步骤与实施例1相同。

[0182] 实施例1、对比例1.2的稳定性测试结果如表3所示:

[0183] 表3 单位:ng/mL

测试时间	序号	实施例 1		对比例 1.2	
		质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)	质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)
第 1 天	1	19.67	104.99	25.93	141.12
	2	19.79	97.88	22.54	144.92
	3	20.84	97.59	27.79	137.11
	均值	20.10	100.15	25.42	141.05
第 7 天	1	19.75	100.11	27.25	133.38
	2	20.99	96.42	23.66	109.53
	3	20.54	95.17	21.21	145.30
	均值	20.43	97.23	24.04	129.40
第 14 天	1	20.64	94.57	23.13	133.98
	2	19.67	95.73	24.86	108.03
	3	20.65	99.48	22.53	103.86
	均值	20.32	96.59	23.50	115.29
第 21 天	1	19.99	102.44	15.63	107.44
	2	19.44	95.54	18.66	101.31
	3	20.03	106.79	14.16	113.19
	均值	19.82	101.59	16.15	107.32
第 28 天	1	19.52	98.24	12.12	98.95
	2	20.80	94.12	11.56	96.27
	3	20.67	102.80	13.24	106.54
	均值	20.33	98.38	12.31	100.59

[0185] 可以看出,经过不同时间后,实施例1的结果基本保持稳定,而对比例1.2的检测结果偏差较为明显,说明实施例1的试剂盒在长期保存时能保持稳定的性能。

[0186] 实施例2 CEA量子点荧光微球免疫检测试剂盒

[0187] 1、CEA量子点荧光微球免疫检测试剂盒结构:

[0188] 包括免疫层析试纸条和缀合物固相载体,免疫层析试纸条包括底板,所述底板上依次衔接有第一样品垫、第二样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜T线位置包被有CEA抗体,C线位置包被有羊抗鼠IgG;缀合物固相载体中标记物为量子点荧光微球,配体为CEA抗体,固相载体为玻璃纤维,缀合物固相载体放置于塑料管内。

[0189] 2、CEA量子点荧光微球免疫检测试剂盒制备:

[0190] 试剂与耗材:

[0191] 表4

名称	型号	厂家
1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)	/	阿拉丁
N-羟基硫代琥珀酰亚胺钠盐(Sulfo-NHS)	/	阿拉丁
吐温-20	/	阿拉丁
2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)	/	阿拉丁
4-羟乙基哌嗪乙磺酸	/	阿拉丁
Proclin 300	/	阿拉丁
PVP	/	阿拉丁
D-海藻糖	/	阿拉丁
蔗糖	/	成都市科龙化工
酪蛋白钠	/	SIGMA
tritonX-100	/	阿拉丁
BSA	/	Proliant
量子点纳米球	90nm	上海昆道生物
癌胚抗原(CEA)抗体	/	Fitzgerald
羊抗鼠抗体	/	杭州启泰公司
硝酸纤维素膜(NC膜)	HF13502S25	Millipore
吸水垫	/	上海金标
PVC底板	/	上海金标
第一、第二样品垫玻纤	/	上海金标
固相载体玻纤	奥斯龙 8964	上海杰一
塑料卡壳	/	上海金标

[0192] [0193] 溶液配制:

[0194] 0.025M HEPES缓冲液:称取5.96g HEPES于900mL超纯水中,完全溶解后调节到所需的pH值,然后定容至1L,作为微球偶联缓冲液。

[0195] 0.025M MES缓冲液:称取5.33gMES于900mL超纯水中,完全溶解后调节pH5.0,定容至1L;用于微球洗涤、活化。

[0196] EDC溶液:10mg/mL,溶于0.25M MES缓冲液中,pH5.0;

[0197] NHS溶液:10mg/mL,溶于0.25M MES缓冲液中,pH5.0;

[0198] 0.01M PBS缓冲液:称取0.24g KH₂PO₄,1.44gNa₂HPO₄,8gNaCl、0.2g KC1于900mL超纯水中,完全溶解后调节pH至所需pH值,然后用容量瓶定容至1L。

[0199] 0.02M PB缓冲液:先配制1L 0.2M Na₂HP0₄•12H₂O溶液和1L 0.2M NaH₂PO₄溶液,1L 0.2M Na₂HP0₄•12H₂O溶液:称取71.64g Na₂HP0₄•12H₂O,定容至1L,配制1L 0.2M NaH₂PO₄溶液:称取24g NaH₂PO₄,定容至1L;根据不同的pH值要求,分别取一定体积的两种溶液,再加入800mL超纯水,用HC1或NaOH微调至所需pH值,定容至1L。

[0200] 0.01M Tris-HCl缓冲液:称取1.21g于900mL超纯水中,完全溶解后调节到所需的pH值,然后定容至1L。

[0201] 0.025M Tris-HCl缓冲液:称取3.03g于900mL超纯水中,完全溶解后调节到所需的pH值,然后定容至1L。

[0202] 微球封闭液:0.02M PB,5%BSA,pH 7.4;

[0203] 微球保存液:0.01M Tris-HCl,0.9%NaCl,0.2%Tween-20,0.05%Proclin-300,pH8.0;

[0204] 微球稀释液:0.025M Tris-HCl,1%BSA,0.5%吐温-20,0.5%PVP,10%D-海藻糖,15%蔗糖,0.05%Proclin-300,2mg/mL HBR-1阻断剂,pH 9.0。

[0205] 2.1、标记抗体固相载体的制备

[0206] ①微球标记抗体制备步骤

[0207] 微球标记过程与实施例1基本相同,其中不同点在偶联时使用的缓冲液为HEPES缓冲液,偶联抗体为CEA标记抗体。

[0208] ②抗体标记物固化

[0209] 用稀释液将标记好的微球稀释到0.04%(微球固含量W/V),将奥斯龙6614聚酯膜室温浸泡在稀释液后微球溶液中1h,后放于37℃烘干4h,裁切成3mm×3mm正方形小块,每小块分装于塑料管内。

[0210] 2.2、第一样品垫和第二样品垫的制备

[0211] 操作过程同实施例1。

[0212] 2.3、包被膜的制备

[0213] ①包被缓冲液:0.01M PBS,1.5%D-海藻糖,pH 7.4;

[0214] ②包被缓冲液稀释抗CEA抗体、羊抗鼠IgG至1.2mg/mL;

[0215] ③将硝酸纤维素膜粘贴于PVC底板上后,使用上海金标HM3230划膜喷金仪将CEA包被抗体、羊抗鼠IgG抗体溶液包被于硝酸纤维素膜上T线、C线位置,喷涂量1μL/cm,T线、C线间距4mm,37℃烘干4h。

[0216] 2.4、CEA量子点荧光微球免疫层析试剂盒组装

[0217] 操作过程同实施例1。

[0218] 2.5、CEA量子点荧光微球免疫层析试剂盒标准曲线的制作

[0219] 定标过程与实施例1基本相同,不同点在与定标使用的工作校准品为CEA工作校准品。

[0220] 3、CEA量子点荧光微球免疫层析试剂盒的具体使用方法:

[0221] 操作过程同实施例1。

[0222] 为了证明本发明提供的技术方案的效果,进行实验对比,主要比较不精密度和稳定性。

[0223] 对比例2.1:

[0224] 操作方法同对比例1.1。

[0225] 与实施例2相比,对比例2.1中不含有缀合物固相载体,而多了结合垫,其中,缀合物固相载体与结合垫制备方法相同,此外其余结构和步骤与实施例2相同。

[0226] 实施例2、对比例2.1的不精密度测试结果如表5所示:

[0227] 表5

[0228]	序号	实施例 2		对比例 2.1	
		质控品1	质控品2	质控品1	质控品2

	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
[0229]	1 4.45	51.10	4.59	59.34
	2 4.95	49.09	4.38	59.16
	3 5.18	51.29	4.99	43.27
	4 5.02	48.47	4.90	48.07
	5 4.86	52.91	4.42	52.08
	6 4.57	53.18	4.19	46.79
	7 5.19	46.75	5.05	44.30
	8 4.51	47.43	4.81	51.71
	9 5.13	46.66	5.23	47.43
	10 4.47	50.14	5.78	50.29
平均值		4.83	49.70	4.83
不精密度		6.3%	4.8%	9.8%
				11.0%

[0230] 可以看出,本实施例2的不精密度与对比例2.1相比明显降低,表明采用本实施例2的方案检测结果更精确。

[0231] 对比例2.2:

[0232] 操作方法同对比例1.2.

[0233] 与实施例2相比,对比例2.2中缀合物经过稀释后不喷涂于固相载体中,而是液体状态保持于离心管中,此外其余结构和步骤与实施例2相同。

[0234] 实施例2、对比例2.2的稳定性测试结果如表6所示:

[0235] 表6

测试时间	序号	实施例 2		对比例 2.2	
		质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)	质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)
[0236]	1	4.81	47.35	5.41	57.33
	2	5.35	52.22	5.95	55.13
	3	4.88	51.95	5.44	52.89
	均值	5.01	50.50	5.60	55.12
[0236]	1	5.23	47.76	5.46	48.64
	2	4.81	53.86	5.05	45.38
	3	5.21	46.12	4.58	52.04
	均值	5.08	49.25	5.03	48.69
[0236]	1	4.45	48.31	4.16	40.37
	2	5.29	52.73	4.42	47.92
	3	4.54	49.86	4.46	45.62
	均值	4.76	50.30	4.35	44.63
[0236]	1	4.92	52.17	4.04	38.10
	2	4.83	51.77	3.70	39.39
	3	4.63	51.61	4.06	42.25
	均值	4.79	51.85	3.93	39.91
[0236]	1	4.63	50.94	3.33	30.49
	2	5.23	47.12	3.86	33.35
	3	4.94	47.38	3.09	31.15
	均值	4.93	48.48	3.43	31.67

[0237] 可以看出, 经过不同时间后, 实施例2的结果基本保持稳定, 而对比例2.2的检测结果偏差较为明显, 说明实施例2的试剂盒在长期保存时能保持稳定的性能。

[0238] 实施例3PCT荧光微球免疫检测试剂盒

[0239] 1、PCT胶体金免疫检测试剂盒结构:

[0240] 包括免疫层析试纸条和缀合物固相载体, 免疫层析试纸条包括底板, 所述底板上依次衔接有第一样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 硝酸纤维素膜T线位置包被有PCT抗体,C线位置包被有兔抗鸡IgY抗体; 缀合物固相载体中标记物为绿色荧光微球, 配体为PCT抗体和鸡IgY, 固相载体为玻璃纤维, 缀合物固相载体放置于离心管内。

[0241] 2、PCT荧光微球免疫检测试剂盒制备:

[0242] 试剂与耗材:

[0243] 表7

名称	型号	厂家
1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)	/	阿拉丁
N-羟基硫代琥珀酰亚胺钠盐(Sulfo-NHS)	/	阿拉丁
吐温-20	/	阿拉丁
2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)	/	阿拉丁
Proclin 300	/	阿拉丁
PVP	/	阿拉丁
D-海藻糖	/	阿拉丁
蔗糖	/	成都市科龙化工
酪蛋白钠	/	SIGMA
tritonX-100	/	阿拉丁
BSA	/	Proliant
绿色荧光微球	200nm	苏州为度生物
鸡 IgY 抗体		Meridian
兔抗鸡 IgY 抗体		Meridian
降钙素原(PCT)抗体	/	菲鹏生物股份有限公司
羊抗鼠抗体	/	杭州启泰公司
硝酸纤维素膜(NC膜)	HF13502S25	Millipore
吸水垫	/	上海金标
PVC 底板	/	上海金标
第一样品垫玻纤	/	上海金标
固相载体玻纤	奥斯龙 8964	上海杰一
塑料卡壳	/	上海金标

[0244] 溶液配制：

[0245] 溶液配制与实施例2相同。

[0246] 2.1、标记抗体固相载体的制备

[0247] ①微球标记抗体制备步骤

[0248] 微球标记过程与实施例1基本相同，其中不同点在偶联时使用的缓冲液为HEPES缓冲液，另外偶联时分别进行PCT-mAb2抗体及鸡IgY与微球的偶联。

[0249] ②抗体标记物固化

[0250] 用微球稀释液将标记好的PCT-mAb2抗体-微球缀合物稀释到0.5‰(微球固含量W/V)，将标记好的鸡IgY-微球缀合物稀释到0.25‰(微球固含量W/V)，两者按1:1混合，使用上海金标HM3230划膜喷金仪按喷涂量2μL/cm喷涂到尺寸6mm*300mm玻璃纤维8964，后放于37℃烘干4h，裁切成6mm*4mm正方形小块，每一小块分装于离心管内。

[0251] 2.2、第一样品垫的制备

[0252] 第一样品垫处理液同实施例一，操作过程同实施例1。

[0253] 2.3、包被膜的制备

[0254] ①包被缓冲液：0.01M Na2HP0412H2O, 0.9%NaCl, 0.3%D-海藻糖, 0.1%叠氮钠，pH 7.4。

[0255] ②包被缓冲液稀释PCT mAb1抗体、兔抗鸡IgY抗体至1mg/mL。

[0257] ③将硝酸纤维素膜粘贴于PVC底板上后,使用上海金标HM3230划膜喷金仪将PCT mAb1抗体、兔抗鸡IgY抗体溶液包被于硝酸纤维素膜上T线、C线位置,喷涂量1.0 μ L/cm,T线、C线间距4mm,37℃烘干4h。

[0258] 2.4、PCT荧光微球免疫检测试剂盒组装

[0259] 组装过程与实施例1、实施例2基本相同,不同之处在于PCT试纸条只含第一样品垫,在黏贴时将第一样品垫黏贴于硝酸纤维素膜下方,搭接2mm。

[0260] 2.5、PCT荧光微球免疫检测试剂盒标准曲线的制作

[0261] 定标过程与实施例1、实施例2基本相同,不同点在与定标使用的工作校准品为CEA 工作校准品。

[0262] 3、PCT荧光微球免疫检测试剂盒的具体使用方法:

[0263] (1) 检测仪器开机,插入与试剂同批号的芯片;

[0264] (2) 撕开试剂盒外包装,取出检测卡和装有微球固体载体的塑料管,移液器精确吸取100 μ L样品溶液,加入到塑料管中,移液器轻微上下吹打混匀后取70 μ L混匀后的样品溶液到检测卡的加样孔中。

[0265] (3) 待室温反应10min后,将检测卡放入仪器的卡槽中测试,使用免疫分析仪器通过采集检测线(T)、质控线(C) 荧光信号,计算T/C信号值,并显示结果。

[0266] 为了证明本发明提供的技术方案的效果,进行实验对比,主要比较不精密度和稳定性。

[0267] 对比例3.1:

[0268] 操作方法同对比例1.1。

[0269] 与实施例3相比,对比例3.1中不含有缀合物固相载体,而多了结合垫,其中,缀合物固相载体与结合垫制备方法相同,此外其余结构和步骤与实施例3相同。

[0270] 实施例3、对比例3.1的不精密度测试结果如表8所示:

[0271] 表8

[0272]	序号	实施例3		对比例3.1	
		质控品1	质控品2	质控品1	质控品2

	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
1	1.82	9.89	1.92	9.41
2	2.05	9.88	1.70	11.83
3	1.98	9.55	2.28	8.97
4	1.95	9.52	2.08	8.62
5	2.07	10.34	2.32	11.81
6	1.95	10.86	2.34	11.34
7	2.04	9.72	1.94	10.09
8	2.19	10.67	1.84	8.22
9	2.04	9.36	1.81	10.18
10	2.15	10.48	1.72	9.29
平均值	2.02	10.03	1.99	9.98
不精密度	5.2%	5.2%	12.3%	13.1%

[0274] 可以看出,本实施例3的不精密度与对比例3.1相比明显降低,表明采用本实施例3

的方案检测结果更精确。

[0275] 对比例3.2:

[0276] 与对比例1.2的不同之处在于进行50℃加速稳定性比较,其他操作方法同对比例1.2.

[0277] 与实施例3相比,对比例3.2中缀合物经过稀释后不喷涂于固相载体中,而是液体状态保持于离心管中,此外其余结构和步骤与实施例1相同。

[0278] 实施例3、对比例3.2的稳定性测试结果如表9所示:

[0279] 表9

测试时间	序号	本发明方法		对比例 3.2	
		质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)	质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)
[0280]	1	1.85	9.38	1.62	8.24
	2	2.07	9.50	1.86	11.76
	3	2.10	9.11	2.30	11.69
	均值	2.01	9.33	1.93	10.56
	1	1.84	9.01	1.54	8.41
	2	1.84	9.24	1.85	7.87
	3	2.03	9.15	1.92	10.61
	均值	1.90	9.13	1.77	8.97
	1	2.08	9.66	1.51	8.89
	2	1.99	10.72	1.44	7.91
	3	2.11	9.59	1.62	9.76
	均值	2.06	9.99	1.53	8.86
	1	2.09	9.79	1.64	6.91
	2	1.90	9.87	1.26	6.30
	3	1.96	9.38	1.27	7.45
	均值	1.99	9.68	1.39	6.89
	1	1.95	9.74	1.47	6.08
	2	2.04	9.92	1.28	7.62
	3	1.92	10.73	1.37	6.94
	均值	1.97	10.13	1.37	6.88

[0281] 可以看出,经过不同时间后,实施例3的结果基本保持稳定,而对比例3.2的检测结果偏差较为明显,说明实施例3的试剂盒在长期保存时能保持稳定的性能。

[0282] 实施例4叶酸荧光免疫检测试剂盒

[0283] 1、叶酸荧光免疫检测试剂盒:

[0284] 包括免疫层析试纸条和缀合物固相载体,免疫层析试纸条包括底板,所述底板上依次衔接有第一样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜T线位置包被有叶酸-BSA蛋白复合物,C线位置包被有兔抗鸡IgY抗体;缀合物固相载体中标记物为铕离子荧光微球,配体为羊抗鼠IgG-鼠抗叶酸单克隆抗体的复合物和鸡IgY,其中单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的叶酸抗原表位的单克隆抗体细胞株,固相载体为玻璃纤维,缀合物固相载体放置于离心管内。

[0285] 2、叶酸荧光免疫检测试剂盒制备:

[0286] 试剂与耗材：

[0287] 表10

名称	型号	厂家
1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)	/	阿拉丁
N-羟基硫代琥珀酰亚胺钠盐(Sulfo-NHS)	/	阿拉丁
吐温-20	/	阿拉丁
2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)	/	阿拉丁
Proclin 300	/	阿拉丁
PVP	/	阿拉丁
D-海藻糖	/	阿拉丁
蔗糖	/	成都市科龙化工
酪蛋白钠	/	SIGMA
tritonX-100	/	阿拉丁
BSA	/	Proliant
铕离子荧光微球	200nm	BangsLab
鸡 IgY 抗体		Meridian
兔抗鸡 IgY 抗体		Meridian
降钙素原(PCT)抗体	/	菲鹏生物股份有限公司
羊抗鼠抗体	/	杭州启泰公司
硝酸纤维素膜(NC膜)	HF13502S25	Millipore
吸水垫	/	上海金标
PVC 底板	/	上海金标
第一样品垫玻纤	/	上海金标
固相载体玻纤	奥斯龙 8964	上海杰一
塑料卡壳	/	上海金标

[0289] 溶液配制：

[0290] 溶液配制与实施例2、实施例3相同。

[0291] 2.1、标记抗体固相载体的制备

[0292] ①微球标记抗体制备步骤

[0293] 鸡IgY抗体标记物标记方法同实施例1。

[0294] 羊抗鼠IgG结合鼠抗叶酸单克隆抗体的复合物的标记方法步骤同实施例1,不同点在于标记过程中首先是微球和羊抗鼠IgG按质量比5:1进行反应,封闭微球反应2h后,再按微球和与鼠抗叶酸单克隆抗体质量比10:1的量加入入鼠抗叶酸单克隆抗体反应30min,形成荧光微球标记的羊抗鼠IgG结合鼠抗叶酸单克隆抗体的复合物。

[0295] ②抗体标记物固化

[0296] 用稀释液将标记好的鸡IgY标记物稀释到0.5‰(微球固含量W/V),羊抗鼠IgG结合鼠抗叶酸单克隆抗体的复合物的标记物稀释到1‰(微球固含量W/V),两者1:1混合,使用上海金标HM3230划膜喷金仪按喷涂量3μL/cm喷涂到尺寸6mm×300mm奥斯龙8950玻璃纤维上,后放于37℃烘干4h,裁切成4mm×6mm方形小块,每一小块分装于离心管中。

[0297] 2.2、第一样品垫的制备

- [0298] 第一样品垫处理液同实施例一,制备过程同实施例1。
- [0299] 2.3、包被膜的制备
- [0300] ①包被缓冲液:0.01M PB,1.5%D-海藻糖,pH7.4。
- [0301] ②包被缓冲液稀释叶酸-BSA蛋白复合物、兔抗鸡IgY抗体至1mg/mL。
- [0302] ③将硝酸纤维素膜粘贴于PVC底板上后,使用上海金标HM3230划膜喷金仪将叶酸-BSA蛋白复合物、兔抗鸡IgY抗体溶液包被于硝酸纤维素膜上T线、C线位置,喷涂量0.5 μ L/cm,T线、C线间距5mm,37℃烘干4h。
- [0303] 2.4、叶酸荧光免疫检测试剂盒组装
- [0304] 组装过程与实施例3相同。
- [0305] 2.5、叶酸荧光免疫检测试剂盒标准曲线的制作
- [0306] 定标过程与实施例1基本相同,不同点在与定标使用的工作校准品为叶酸工作校准品。
- [0307] 3、叶酸荧光检测试剂盒的具体使用方法:
- [0308] 操作过程同实施例1。
- [0309] 为了证明本发明提供的技术方案的效果,进行实验对比,主要比较不精密度和稳定性。
- [0310] 对比例4.1:
- [0311] 操作方法同对比例1.1。
- [0312] 与实施例4相比,对比例4.1中不含有缀合物固相载体,而多了结合垫,其中,缀合物固相载体与结合垫制备方法相同,此外其余结构和步骤与实施例4相同。
- [0313] 实施例4、对比例4.1的不精密度测试结果如表11所示:
- [0314] 表11

序号	实施例4		对比例4.1	
	质控品1 (ng/mL)	质控品2 (ng/mL)	质控品1 (ng/mL)	质控品2 (ng/mL)
1	2.59	16.03	2.92	12.67
2	2.42	15.44	2.38	15.99

3	2.67	15.84	2.52	12.50
4	2.69	15.35	2.37	16.35
5	2.60	13.86	2.70	13.48
6	2.44	15.17	2.42	16.61
7	2.61	14.77	2.04	17.66
8	2.55	14.87	2.89	16.19
9	2.57	15.50	2.84	12.40
10	2.64	15.92	2.14	13.78
平均值	2.58	15.28	2.52	14.76
不精密度	3.4%	4.3%	12.3%	13.5%

[0317] 可以看出,本实施例4的不精密度与对比例4.1相比明显降低,表明采用本实施例4的方案检测结果更精确。

[0318] 对比例4.2:

[0319] 操作方法同对比例1.2.

[0320] 与实施例4相比,对比例4.2中缀合物经过稀释后不喷涂于固相载体中,而是液体状态保持于离心管中,此外其余结构和步骤与实施例1相同。

[0321] 实施例4、对比例4.2的稳定性测试结果如表12所示:

[0322] 表12

		实施例 4		对比例 4.2	
		质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)	质控品 1 (ng/mL)	质控品 2 (ng/mL)
[0323] 第 1 天	1	2.31	14.35	2.14	15.81
	2	2.37	15.40	2.84	13.47
	3	2.52	13.87	2.98	16.34
	均值	2.40	14.54	2.65	15.21
第 7 天	1	2.50	16.32	2.59	11.86
	2	2.46	14.15	2.12	14.13
	3	2.50	15.27	2.30	12.31
	均值	2.49	15.25	2.34	12.77
第 14 天	1	2.38	15.04	1.87	10.58
	2	2.52	15.08	2.43	13.49
	3	2.43	13.76	2.52	13.10
	均值	2.44	14.63	2.28	12.39
第 21 天	1	2.34	16.49	1.84	10.07
	2	2.36	14.77	2.58	14.77
	3	2.39	16.15	1.70	12.69
	均值	2.36	15.80	2.04	12.51
第 28 天	1	2.43	14.23	1.87	12.54
	2	2.44	14.22	1.98	10.69
	3	2.37	14.42	1.80	10.05
	均值	2.41	14.29	1.88	11.09

[0324] 可以看出,经过不同时间后,实施例4的结果基本保持稳定,而对比例4.2的检测结果偏差较为明显,说明实施例4的试剂盒在长期保存时能保持稳定的性能。

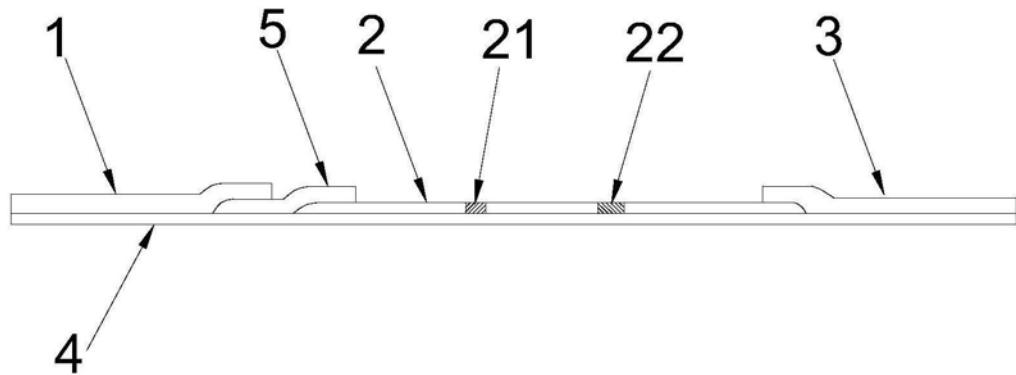


图1

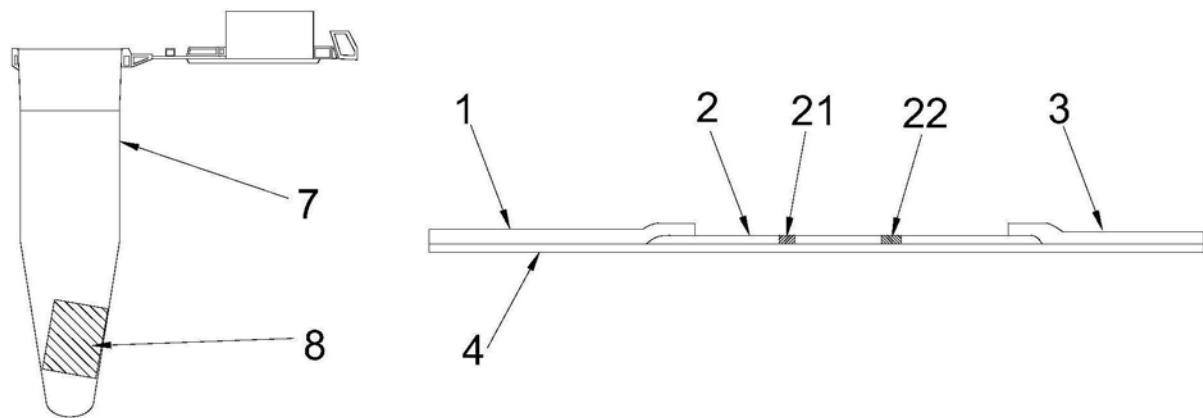


图2

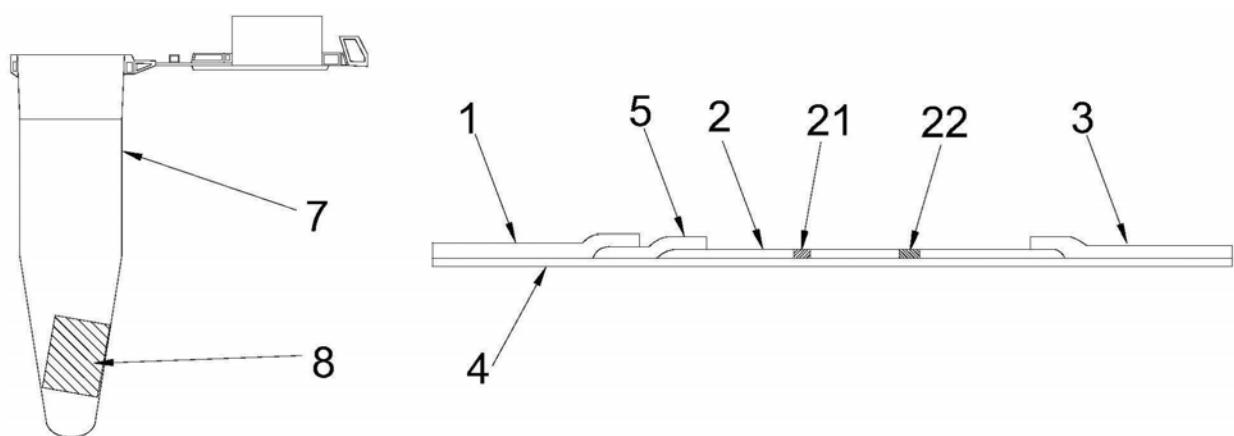


图3

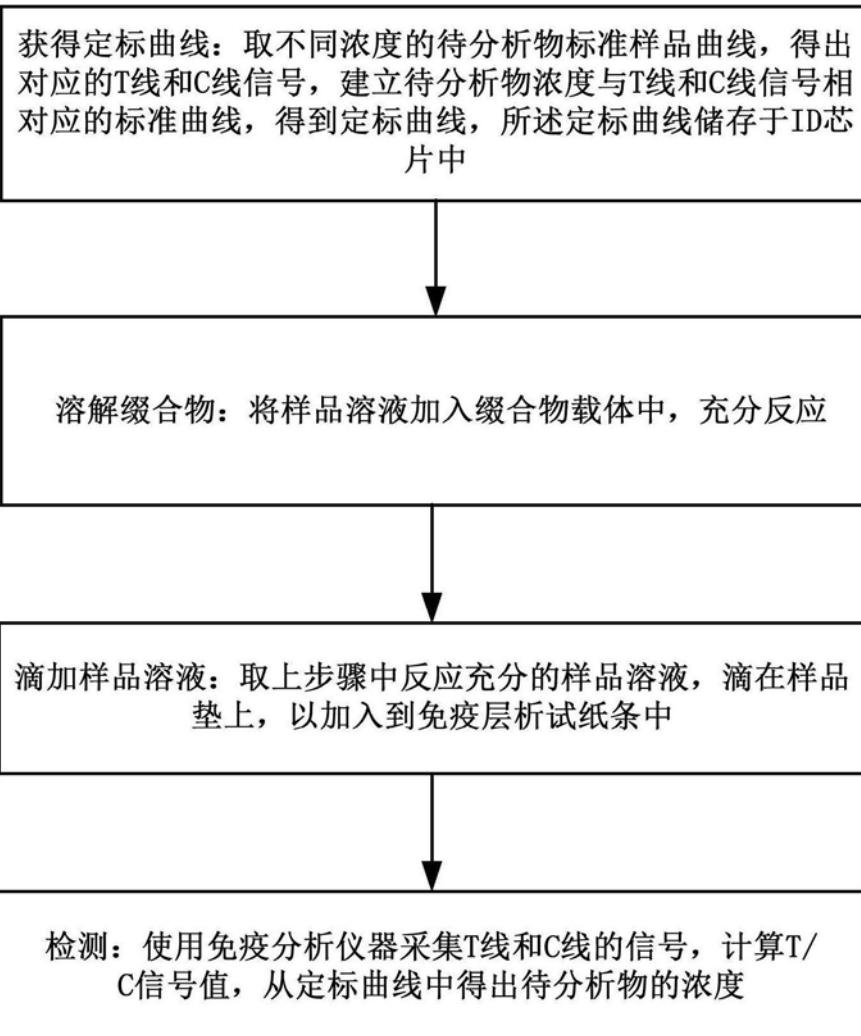


图4

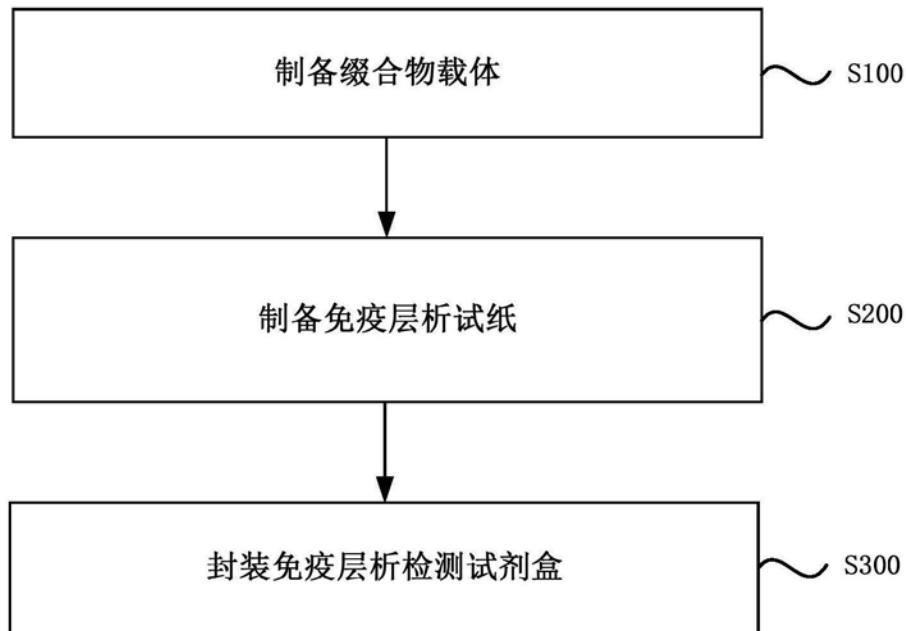


图5

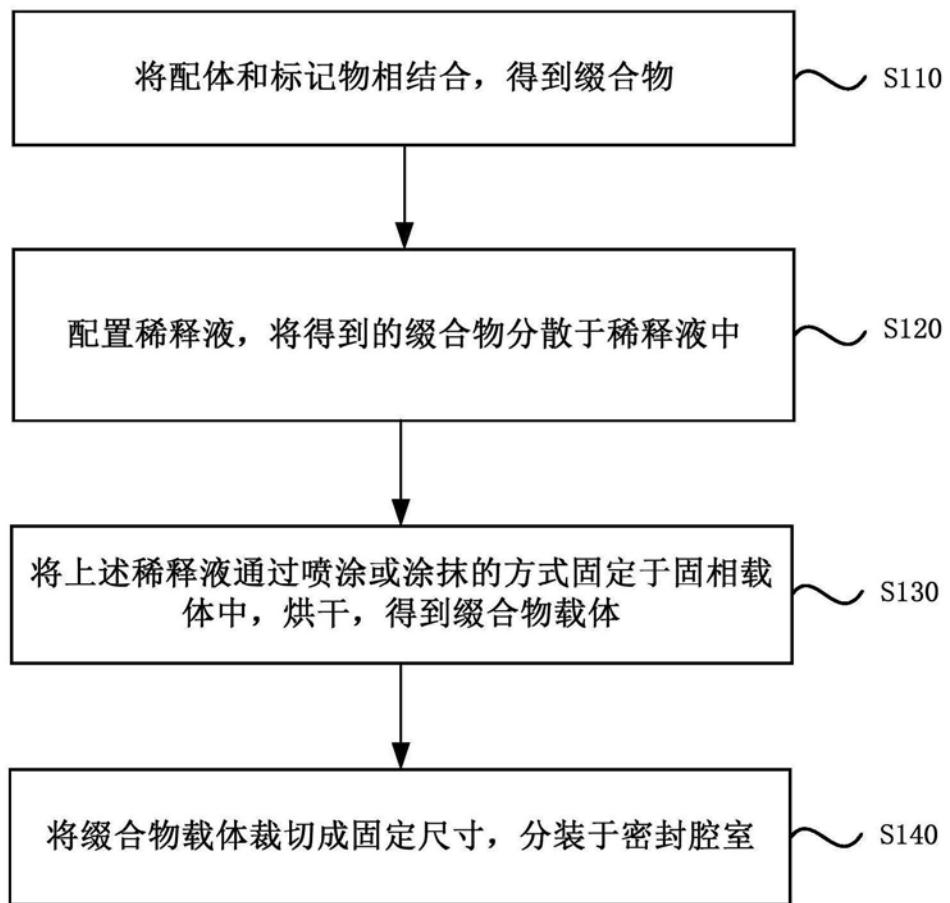


图6

专利名称(译)	一种免疫检测试剂盒及其测定方法和制备方法		
公开(公告)号	CN110632297A	公开(公告)日	2019-12-31
申请号	CN201910949006.6	申请日	2019-10-08
[标]发明人	熊亮 郑兰花 洪礼清 蒋奎胜 庾琼 刘仁源 刘勇娥 李建霖		
发明人	熊亮 郑兰花 洪礼清 蒋奎胜 庾琼 刘仁源 刘勇娥 李建霖		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577		
优先权	201811183342.6 2018-10-11 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种免疫检测试剂盒，包括1)缀合物载体，包括配体、标记物和固相载体，所述配体用于与待测分析物发生特异性反应，所述标记物用于信号检测，所述配体与标记物相连接，所述固相载体用于承载配体和标记物；以及2)免疫层析试纸条；其中，所述缀合物载体与所述免疫层析试纸条分体式设置。本试剂盒具备既可在常温保存、运输，同时又能有良好精密度的特点，且操作方法简单快捷，适合即时检测使用。本试剂盒测定时先将样品溶液与缀合物载体混均匀后再加入免疫层析试纸条中进行检测，缀合物释放更为充分。本试剂盒制备方便、快捷、制造成本低廉，能与现有产线设备很好的兼容，可以不需要复杂的工艺及昂贵的设备。

