

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910051816.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101551388A

[22] 申请日 2009.5.22

[21] 申请号 200910051816.6

[71] 申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路100号

[72] 发明人 赵露晶 沈鹤柏 周蕾 杨瑞馥

[74] 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司

代理人 何葆芳

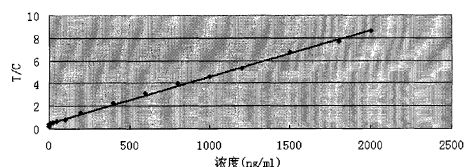
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

[54] 发明名称

一种基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸

[57] 摘要

本发明公开了一种基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸，该试纸是以表面经过氨基化修饰的上转换发光材料 - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒作为 AFP 抗体标记物的双抗夹心式免疫层析试纸。所述试纸的制备包括 UCP - 生物活性分子结合物的制备、样品垫的制备、结合垫的制备、分析膜的制备及免疫层析试纸条的组装共 5 个步骤。本发明首次实现了基于上转换发光技术的免疫层析技术在定量检测 AFP 浓度中的应用，使 AFP 的检测无本底干扰，定量检测限可达 2ng/ml ，线性范围宽，且线性较好，可多重分析，具有定量检测灵敏度高的突出有益效果，对原发性肝癌的早期诊断具有重要意义。



1. 一种基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸, 是以上转换发光材料作为生物标记物的双抗夹心式免疫层析试纸, 其特征在于: 作为生物标记物的上转换发光材料是表面经过氨基化修饰的, 以 NaYF_4 为基质、 Yb^{3+} 为敏化剂、Yb 和 Er 共掺杂的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒, 所标记的生物活性分子为 AFP 抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸, 其特征在于: 所述 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的直径为 100 ~ 400nm。

3. 一种权利要求 1 所述的基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸的制备方法, 包括: UCP-生物活性分子结合物的制备、样品垫的制备、结合垫的制备、分析膜的制备、免疫层析试纸条的组装共 5 个步骤, 其特征在于, 各步骤的具体操作如下:

a) UCP-生物活性分子结合物的制备

将表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒加入到 pH=7.2 的 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PB) 中, 配制成浓度为 1 ~ 2mg/ml 的悬浊液; 向其中加入 25% 的戊二醛, 于 15 ~ 30°C 下反应 2 ~ 4 小时, 戊二醛与表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为 (100 ~ 500): 1; 离心洗去多余的戊二醛, 然后分散在 0.03mol/L 的 PB 中, 配制成浓度为 1 ~ 2mg/ml 的悬浊液; 再向其中加入 AFP 抗体, 于 3 ~ 5°C 反应 2 ~ 4 小时, AFP 抗体与表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为 1: (200 ~ 1000); 在 3 ~ 5°C 离心洗涤数次, 即得 UCP-生物活性分子结合物, 保存于 0.03mol/L 的 PB (含 0.1%BSA, 0.1%Tween20) 中;

b) 样品垫的制备

选用纤维素膜作为样品垫材料, 剪成 1.5×30.0cm 规格的条带, 将其放入样品垫封闭液 (pH=7.2 的 0.03mol/L PB, 含有 5mg/mlBSA, 0.1%Triton X-100) 中浸泡 30min, 然后于 37°C 烘干备用;

c) 结合垫的制备

选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料, 将其剪成 1.0×30.0cm 规格的条带; 离心步骤 a) 制备的 UCP-生物活性分子结合物中的保存液, 然后向沉降物中加入

pH=7.2的0.03mol/L PB (含1%蔗糖及1%BSA), 充分混匀后加入该条带上, 于37°C烘干备用;

d) 分析膜的制备

将硝酸纤维膜 (NC 膜) 剪切成 2.5×30.0cm 规格的条带, 用点样仪在 NC 膜上不同位置分别喷点 AFP 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体, 作为检测带和质控带, 于 37°C 烘干备用;

e) 免疫层析试纸条的组装

将吸水纸、NC 膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上, 并切成 4cm 宽的试纸条即可。

4. 根据权利要求 3 所述的基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸条的制备方法, 其特征在于, 对所述 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒表面进行氨基化修饰的操作过程如下:

①进行表面硅化

将NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒加入到含水10%~50%的乙醇溶剂中, 配制成浓度为0.01~5mg/ml的悬浊液, 在15~50°C水浴中搅拌均匀; 向其中加入正硅酸乙酯 (TEOS), 正硅酸乙酯与NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒的质量比为 (10~2): 1, 继续反应5~15小时, 结束反应, 离心洗涤备用;

②进行表面氨基化

将上述表面硅化的NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒, 加入甲醇与丙三醇按(0.2~2): 1体积比组成的混合溶剂中, 配制成浓度为0.01~5mg/ml的悬浊液, 超声分散; 向其中加入N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (AEAPS), AEAPS与NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒的质量比为 (10~500): 1, 于15~50°C下恒温搅拌5~10小时, 用乙醇离心洗涤, 干燥即可。

一种基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸

技术领域

本发明是涉及一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸，具体说，是涉及一种以上转换发光材料作为生物标记物的双抗夹心式免疫层析试纸，以用于定量检测血清中甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)浓度。

背景技术

上转换发光材料(Up-Converting Phosphor, UCP)是一种可对能量进行上转的稀土金属合成物，即UCP可吸收低能量的(长波长)红外光，但却发射高能量的(短波长)可见光。UCP是由几种稀土金属元素掺杂于某些晶体的晶格中构成的。在这种材料中有三种主要的成分：主基质、吸收子和发射子。作为主基质的晶体材料有：氧硫化物(如 Y_2O_2S 、 GdO_2S 、 La_2O_2S 等)、氟化物(如 YF_3 、 GdF_3 、 LaF_3 等)、镓酸盐(如 $YGaO_3$ 、 $Y_3Ga_5O_{12}$ 等)以及硅酸盐(如 YSi_2O_5 、 YSi_3O_7 等)等；常用作吸收子的稀土金属离子有：镱离子(Yb^{3+})、铒离子(Er^{3+})、钐离子(Sm^{3+})等；常用作发射子的稀土金属离子有：铒离子(Er^{3+})、钬离子(Ho^{3+})、铥离子(Tm^{3+})、铽离子(Tb^{3+})等。吸收子和发射子这一离子对在主基质晶格内适宜的空间取向和距离，是产生上转换发光的基础。

研究表明，将上转换发光材料UCP与免疫层析技术相结合，可为传统的免疫层析技术带来以下突破性的变革：

- 1、UCP发光标记物的特点，使得以其作为标记物的免疫层析试纸可与仪器结合，对目标被检物进行灵敏度极高的精确定量检测；
- 2、UCP所具有的多种特征光谱(激发光谱与发射光谱)，使得基于上转换发光技术的免疫层析试纸可进行灵敏度极高的多重分析，即一次性的对生物样品中的多种目标被检物进行检测；
- 3、UCP独特的上转换发光现象，使得以其作为标记物的检测过程排除了由于待检测生物样品自发荧光造成干扰的可能，提高信噪比，从而提高了检测的灵敏度与稳定性；

4、通过共价方式交联生物活性分子，在保证检测灵敏度的前提下提高了系统的可靠性与稳定性。

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一，近年来国内外原发性肝癌的发病率有不断升高的趋势，且其起病隐匿性强，早期症状不明显，一旦出现临床症状多属晚期。因此迫切需要一种快速准确诊断原发性肝癌的检测方法。甲胎蛋白(AFP)是一种分子量为 70kDa 的胚胎性糖蛋白，胚胎时期可能起着与蛋白相似的作用，常人血清中甲胎蛋白浓度很小，但原发性肝癌患者大约 90%患者的血清中 AFP 浓度较高，而且其浓度与疾病的变化密切相关。因此，血清 AFP 中浓度测定成为原发性肝癌诊断的重要指标。

目前，血清中 AFP 浓度测定为免疫层析技术，其中所使用的标记物通常为酶、胶体金以及着色胶珠标记物，这几种标记物应用于免疫层析技术中有两个共同点：物理吸附交联法与通过颜色判断结果。其中物理吸附法(即通过疏水性以及静电吸附制备标记物)的脆弱性使得基于该种标记物的免疫层析对于反应的条件要求极为苛刻，从而一些有效的非特异去除试剂，如：吐温 20(Tween 20)、吹通 100(Triton 100)、十二烷基磺酸钠(SDS)等，由于对疏水性以及静电性的影响改变而只能在低浓度使用，由此便造成了基于该种标记物的免疫层析试纸假阳性率、假阴性率较高的必然结果；另外通过颜色判断结果在使用操作简便的同时必然受观察者主观影响大、灵敏度低，且只能停留在定性水平，而绝对无法实现精确定量。

由于基于上转换发光技术的免疫层析技术，其独特的上转换发光特性，使检测无本底干扰，就定性分析而言，灵敏度可达胶体金的 100 倍；同时其发光性能稳定，不易淬灭，可用于多重、定量分析。因此，研制基于上转换发光技术的免疫层析试纸，以用于定量检测血清中甲胎蛋白(AFP)浓度，对原发性肝癌的早期诊断具有重要意义，但至今未见相关技术报道。

发明内容

本发明针对上述现有技术所存在的缺陷和不足，旨在提供一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸，以用于定量检测血清中甲胎蛋白(AFP)浓度。

为实现上述发明目的，本发明采用的技术方案如下：

本发明提供的基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸，是以

上转换发光材料作为生物标记物的双抗夹心式免疫层析试纸，其特征在于：作为生物标记物的上转换发光材料是表面经过氨基化修饰的，以 NaYF_4 为基质、 Yb^{3+} 为敏化剂、Yb 和 Er 共掺杂的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒，所标记的生物活性分子为 AFP 抗体。

所述 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的直径优选 100 ~ 400nm。

本发明所述的基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸的制备方法，包括：UCP-生物活性分子结合物的制备、样品垫的制备、结合垫的制备、分析膜的制备、免疫层析试纸条的组装共 5 个步骤，各步骤的具体操作如下：

a) UCP-生物活性分子结合物的制备

将表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒加入到 pH=7.2 的 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PB) 中，配制成浓度为 1 ~ 2mg/ml 的悬浊液；向其中加入 25% 的戊二醛，于 15 ~ 30℃ 下反应 2 ~ 4 小时，戊二醛与表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为 (100 ~ 500) : 1；离心洗去多余的戊二醛，然后分散在 0.03mol/L 的 PB 中，配制成浓度为 1 ~ 2mg/ml 的悬浊液；再向其中加入 AFP 抗体，于 3 ~ 5℃ 反应 2 ~ 4 小时，AFP 抗体与表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为 1 : (200 ~ 1000)；在 3 ~ 5℃ 离心洗涤数次，即得 UCP-生物活性分子结合物，保存于 0.03mol/L 的 PB (含 0.1%BSA, 0.1%Tween20) 中；

b) 样品垫的制备

选用纤维素膜作为样品垫材料，剪成 1.5×30.0cm 规格的条带，将其放入样品垫封闭液 (pH=7.2 的 0.03mol/L PB, 含有 5mg/mlBSA, 0.1%Triton X-100) 中浸泡 30min，然后于 37℃ 烘干备用；

c) 结合垫的制备

选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料，将其剪成 1.0×30.0cm 规格的条带；离心步骤 a) 制备的 UCP-生物活性分子结合物中的保存液，然后向沉降物中加入 pH=7.2 的 0.03mol/L PB (含 1%蔗糖及 1%BSA)，充分混匀后加入该条带上，于 37℃ 烘干备用；

d) 分析膜的制备

将硝酸纤维膜 (NC 膜) 剪切成 2.5×30.0cm 规格的条带，用点样仪在 NC

膜上不同位置分别喷点 AFP 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体，作为检测带和质控带，于 37°C 烘干备用；

e) 免疫层析试纸条的组装

将吸水纸、NC 膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上，并切成 4cm 宽的试纸条即可。

对所述 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒表面进行氨基化修饰的操作过程如下：

① 进行表面硅化

将 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒加入到含水 10%~50% 的乙醇溶剂中，配制成浓度为 0.01~5mg/ml 的悬浊液，在 15~50°C 水浴中搅拌均匀；向其中加入正硅酸乙酯 (TEOS)，正硅酸乙酯与 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 (10~2):1，继续反应 5~15 小时，结束反应，离心洗涤备用；

② 进行表面氨基化

将上述表面硅化的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒，加入甲醇与丙三醇按 (0.2~2):1 体积比组成的混合溶剂中，配制成浓度为 0.01~5mg/ml 的悬浊液，超声分散；向其中加入 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (AEAPS)，AEAPS 与 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 (10~500):1，于 15~50°C 下恒温搅拌 5~10 小时，用乙醇离心洗涤，干燥即可。

使用本发明所述的基于上转换发光技术定量检测 AFP 的免疫层析试纸进行定量检测 AFP 的操作如下：

1) 将 1mg/mL 的 AFP 抗原标准品用正常人血清作为稀释液配置系列浓度标准品：0ng/ml, 2ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml, 400ng/ml, 600ng/ml, 800ng/ml, 1000ng/ml, 1200ng/ml, 1500ng/ml, 1800ng/ml, 2000ng/ml；

2) 将所制备的试纸条的样品垫端分别插入上述浓度系列标准品中，15min 后取出，通过荧光测量仪检测 T 线和 C 线区域的荧光强度的比值（每个样品分别用 3 个试纸条检测 3 次，取平均值），绘制标准曲线；

3) 利用上述标准曲线检测临床血清样品，通过判读 T/C 值，即可计算得临床血清样品中 AFP 的浓度。

与现有技术相比，本发明首次实现了基于上转换发光技术的免疫层析技术在定量检测血清中甲胎蛋白 (AFP) 浓度中的应用，使 AFP 的检测无本底干扰，定量

检测限可达 2ng/ml, 线性范围宽 (从 2ng/ml ~ 2000ng/ml), 且线性较好 ($R^2=0.9978$); 可多重分析; 相对现有技术: 定量检测限一般为 10ng/ml, 线性范围只有 10 ~ 300ng/ml, $R^2=0.9631$ 而言, 本发明的免疫层析试纸具有定量检测灵敏度高的突出有益效果, 对原发性肝癌的早期诊断具有重要意义。

附图说明

图 1 为用本发明所述的免疫层析试纸定量检测 AFP 抗原标准品所得到的标准曲线图。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步说明, 其目的仅在于更好理解本发明的内容而非限制本发明的保护范围。实施例中所用的上转换发光材料—NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒是按照期刊文献《化工技术与开发》, 第 36 卷第 6 期, 2007 年 6 月, 第 1 ~ 2 页中所公开的制备工艺制得。

实施例 1

一、对上转换发光材料—NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒表面进行氨基化修饰

①进行表面硅化

将颗粒直径为 100 ~ 400nm 的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒加入到含水 10% 的乙醇溶剂中, 配制成浓度为 0.01mg/ml 的悬浊液, 在 50℃ 水浴中搅拌均匀; 向其中加入正硅酸乙酯 (TEOS), 正硅酸乙酯与 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 10: 1, 继续反应 5 小时, 结束反应, 离心洗涤备用;

②进行表面氨基化

将上述表面硅化的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒, 加入甲醇与丙三醇按 0.2: 1 体积比组成的混合溶剂中, 配制成浓度为 0.01mg/ml 的悬浊液, 超声分散; 向其中加入 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (AEAPS), AEAPS 与 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 10: 1, 于 50℃ 下恒温搅拌 5 小时, 用乙醇离心洗涤, 干燥即可。

二、制备免疫层析试纸

a) 制备 UCP-生物活性分子结合物

将表面经过氨基化修饰的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒加入到 pH=7.2 的

0.03mol/L的磷酸盐缓冲液(PB)中,配制成浓度为1.5mg/ml的悬浊液;向其中加入25%的戊二醛,于室温下反应3小时,戊二醛与表面经过氨基化修饰的NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒的质量比为100:1;离心洗去多余的戊二醛,然后分散在0.03mol/L的PB中,配制成浓度为1.5mg/ml的悬浊液;再向其中加入AFP抗体,于4℃反应3小时,AFP抗体与表面经过氨基化修饰的NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒的质量比为1:1000;在4℃离心洗涤数次,即得UCP-生物活性分子结合物,保存于0.03mol/L的PB(含0.1%BSA,0.1%Tween20)中;

b) 样品垫的制备

选用纤维素膜作为样品垫材料,剪成1.5×30.0cm规格的条带,将其放入样品垫封闭液(pH=7.2的0.03mol/L PB,含有5mg/mlBSA,0.1%Triton X-100)中浸泡30min,然后于37℃烘干备用;

c) 结合垫的制备

选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料,将其剪成1.0×30.0cm规格的条带;离心步骤a)制备的UCP-生物活性分子结合物中的保存液,然后向沉降物中加入pH=7.2的0.03mol/L PB(含1%蔗糖及1%BSA),充分混匀后加入该条带上,于37℃烘干备用;

d) 分析膜的制备

将硝酸纤维膜(NC膜)剪切成2.5×30.0cm规格的条带,用点样仪在NC膜上不同位置分别喷点AFP单抗和羊抗鼠IgG抗体,作为检测带和质控带,于37℃烘干备用;

e) 免疫层析试纸条的组装

将吸水纸、NC膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上,并切成4cm宽的试纸条,即得:以上转换发光材料—表面经过氨基化修饰的,以NaYF₄为基质、Yb³⁺为敏化剂、Yb和Er共掺杂的NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒作为AFP抗体标记物的双抗夹心式免疫层析试纸。

实施例 2

一、对上转换发光材料—NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒表面进行氨基化修饰

①进行表面硅化

将颗粒直径为100~400nm的NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒加入到含水50%的乙醇溶剂中,配制成浓度为5mg/ml的悬浊液,在15℃水浴中搅拌均匀;向其中加入

正硅酸乙酯 (TEOS), 正硅酸乙酯与 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为2: 1, 继续反应15小时, 结束反应, 离心洗涤备用;

②进行表面氨基化

将上述表面硅化的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒, 加入甲醇与丙三醇按2: 1体积比组成的混合溶剂中, 配制成浓度为5mg/ml的悬浊液, 超声分散; 向其中加入N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷(AEAPS), AEAPS与 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为500: 1, 于15℃下恒温搅拌15小时, 用乙醇离心洗涤, 干燥即可。

二、制备免疫层析试纸

a) 制备UCP-生物活性分子结合物

将表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒加入到pH=7.2的0.03mol/L的磷酸盐缓冲液(PB)中, 配制成浓度为1.5mg/ml的悬浊液; 向其中加入25%的戊二醛, 于室温下反应3小时, 戊二醛与表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为500: 1; 离心洗去多余的戊二醛, 然后分散在0.03mol/L的PB中, 配制成浓度为1.5mg/ml的悬浊液; 再向其中加入AFP抗体, 于4℃反应3小时, AFP抗体与表面经过氨基化修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ 纳米颗粒的质量比为1: 200; 在4℃离心洗涤数次, 即得UCP-生物活性分子结合物, 保存于0.03mol/L的PB(含0.1%BSA, 0.1%Tween20)中;

b) 样品垫的制备

选用纤维素膜作为样品垫材料, 剪成1.5×30.0cm规格的条带, 将其放入样品垫封闭液(pH=7.2的0.03mol/L PB, 含有5mg/mlBSA, 0.1%Triton X-100)中浸泡30min, 然后于37℃烘干备用;

c) 结合垫的制备

选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料, 将其剪成1.0×30.0cm规格的条带; 离心步骤a)制备的UCP-生物活性分子结合物中的保存液, 然后向沉降物中加入pH=7.2的0.03mol/L PB(含1%蔗糖及1%BSA), 充分混匀后加入该条带上, 于37℃烘干备用;

d) 分析膜的制备

将硝酸纤维膜(NC膜)剪切成2.5×30.0cm规格的条带, 用点样仪在NC膜上不同位置分别喷点AFP单抗和羊抗鼠IgG抗体, 作为检测带和质控带,

于 37℃ 烘干备用；

e) 免疫层析试纸条的组装

将吸水纸、NC膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上，并切成 4cm 宽的试纸条，即得：以上转换发光材料一表面经过氨基化修饰的，以 NaYF₄ 为基质、Yb³⁺ 为敏化剂、Yb 和 Er 共掺杂的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒作为 AFP 抗体标记物的双抗夹心式免疫层析试纸。

实施例 3

一、对上转换发光材料—NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒表面进行氨基化修饰

① 进行表面硅化

将颗粒直径为 100 ~ 400nm 的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒加入到含水 30% 的乙醇溶剂中，配制成浓度为 1mg/ml 的悬浊液，在 25℃ 水浴中搅拌均匀；向其中加入正硅酸乙酯 (TEOS)，正硅酸乙酯与 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 6: 1，继续反应 10 小时，结束反应，离心洗涤备用；

② 进行表面氨基化

将上述表面硅化的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒，加入甲醇与丙三醇按 1: 1 体积比组成的混合溶剂中，配制成浓度为 1mg/ml 的悬浊液，超声分散；向其中加入 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (AEAPS)，AEAPS 与 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 250: 1，于 25℃ 下恒温搅拌 10 小时，用乙醇离心洗涤，干燥即可。

二、制备免疫层析试纸

a) 制备 UCP-生物活性分子结合物

将表面经过氨基化修饰的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒加入到 pH=7.2 的 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PB) 中，配制成浓度为 1.5mg/ml 的悬浊液；向其中加入 25% 的戊二醛，于室温下反应 3 小时，戊二醛与表面经过氨基化修饰的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 300: 1；离心洗去多余的戊二醛，然后分散在 0.03mol/L 的 PB 中，配制成浓度为 1.5mg/ml 的悬浊液；再向其中加入 AFP 抗体，于 4℃ 反应 3 小时，AFP 抗体与表面经过氨基化修饰的 NaYF₄:Yb:Er 纳米颗粒的质量比为 1: 600；在 4℃ 离心洗涤数次，即得 UCP-生物活性分子结合物，保存于 0.03mol/L 的 PB (含 0.1%BSA, 0.1%Tween20) 中；

b) 样品垫的制备

选用纤维素膜作为样品垫材料，剪成1.5×30.0cm规格的条带，将其放入样品垫封闭液（pH=7.2的0.03mol/L PB，含有5mg/mlBSA，0.1%Triton X-100）中浸泡30min，然后于37℃烘干备用；

c) 结合垫的制备

选用玻璃纤维素膜作为结合垫材料，将其剪成1.0×30.0cm规格的条带；离心步骤a)制备的UCP-生物活性分子结合物中的保存液，然后向沉降物中加入pH=7.2的0.03mol/L PB（含1%蔗糖及1%BSA），充分混匀后加入该条带上，于37℃烘干备用；

d) 分析膜的制备

将硝酸纤维膜（NC膜）剪切成2.5×30.0cm规格的条带，用点样仪在NC膜上不同位置分别喷点AFP单抗和羊抗鼠IgG抗体，作为检测带和质控带，于37℃烘干备用；

e) 免疫层析试纸条的组装

将吸水纸、NC膜、结合垫、样品垫依次贴在带有粘合剂的底板上，并切成4cm宽的试纸条，即得：以上转换发光材料一表面经过氨基化修饰的，以NaYF₄为基质、Yb³⁺为敏化剂、Yb和Er共掺杂的NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒作为AFP抗体标记物的双抗夹心式免疫层析试纸。

实施例 4

使用上述所制备的免疫层析试纸进行定量检测AFP抗原：

1) 将1mg/mL的AFP抗原标准品用正常人血清作为稀释液配置系列浓度标准品：0ng/ml，2ng/ml，5ng/ml，10ng/ml，20ng/ml，50ng/ml，100ng/ml，200ng/ml，400ng/ml，600ng/ml，800ng/ml，1000ng/ml，1200ng/ml，1500ng/ml，1800ng/ml，2000ng/ml；

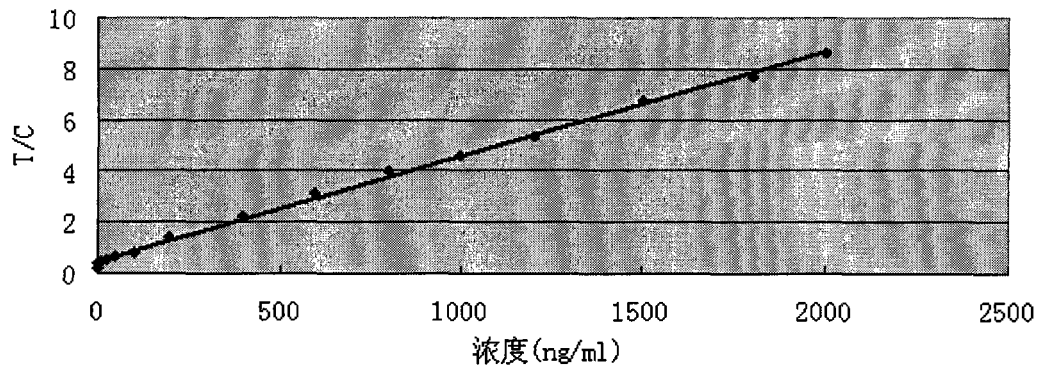
2) 将上述所制备的试纸条的样品垫端分别插入上述浓度系列标准品中，15min后取出，通过荧光测量仪检测T线和C线区域的荧光强度的比值（每个样品分别用上述3个实施例所制备的3个试纸条检测3次，取平均值），每个浓度标样的T/C检测数据见表1所示，绘制的标准曲线见图1所示；

3) 检测临床血清样品，通过判读T/C值，利用上述标准曲线即可计算得该临床血清样品中AFP的浓度。

表1 每个浓度标样的T/C检测数据

浓度(ng/ml)	T/C (平均值)
0	0.2
2	0.385
5	0.425
10	0.453
25	0.504
50	0.693
100	0.825
200	1.371
400	2.284
600	3.102
800	3.981
1200	5.358
1000	4.593
1500	6.732
1800	7.684
2000	8.569

根据表 1 中的数据绘制的标准工作曲线见图 1 所示,经统计拟合标准工作曲线的表达式为: $Y=0.0041X+0.4574$, 拟合系数的平方为: $R^2=0.9978$ 。由此可见:本发明的免疫层析试纸的定量检测限可达 2ng/ml, 线性范围宽(从 2ng/ml ~ 2000ng/ml), 且线性较好 ($R^2=0.9978$), 相对现有技术: 定量检测限一般为 10ng/ml, 线性范围只有 10 ~ 300ng/ml, $R^2=0.9631$ 而言, 本发明具有定量检测灵敏度高的突出有益效果, 对原发性肝癌的早期诊断具有重要意义。



专利名称(译)	一种基于上转换发光技术定量检测AFP的免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN101551388A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200910051816.6	申请日	2009-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	赵露晶 沈鹤柏 周蕾 杨瑞馥		
发明人	赵露晶 沈鹤柏 周蕾 杨瑞馥		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/552 G01N33/533 G01N21/64 G01N33/574		
代理人(译)	何葆芳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于上转换发光技术定量检测AFP的免疫层析试纸，该试纸是以表面经过氨基化修饰的上转换发光材料 - NaYF₄:Yb:Er纳米颗粒作为AFP抗体标记物的双抗夹心式免疫层析试纸。所述试纸的制备包括UCP - 生物活性分子结合物的制备、样品垫的制备、结合垫的制备、分析膜的制备及免疫层析试纸条的组装共5个步骤。本发明首次实现了基于上转换发光技术的免疫层析技术在定量检测AFP浓度中的应用，使AFP的检测无本底干扰，定量检测限可达2ng/ml，线性范围宽，且线性较好，可多重分析，具有定量检测灵敏度高的突出有益效果，对原发性肝癌的早期诊断具有重要意义。

