

[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 200910142348.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月11日

[11] 公开号 CN 101576562A

[22] 申请日 2009.6.1

[21] 申请号 200910142348.3

[71] 申请人 无锡中德伯尔生物技术有限公司

地址 214174 江苏省无锡市惠山区惠山大道  
1608 号

[72] 发明人 熊勇华 史爱武 赖卫华 徐波  
陈雪岚 魏华

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有  
限责任公司

代理人 江崇玉

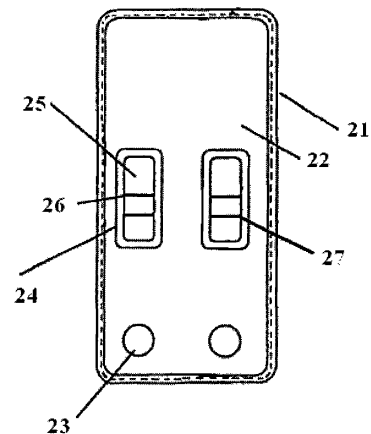
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 3 页

[54] 发明名称

检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡  
及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种定量检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。该检测卡构成包括 A、B 两张试纸条、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，其中硝酸纤维素膜上固定有检测线和质控线，实现对 HIV 抗体与 HIV p24 抗原的同时检测，本发明以二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子为标记，采用免疫层析技术实现艾滋病病毒定量的免疫分析。检测过程中，采用荧光微球激发光源进行激发，发射出的荧光经过滤光片装置后，用 CCD 扫描技术或光纤技术，把所有的发射光谱收集、聚集和倍增后，转换成数值信号，利用荧光分析仪中的内置分析软件，自动计算出待测物的浓度。本发明的优点是灵敏度高、定量准确、检测快速、操作方便、经济实用。



1. 一种检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：包括用于检测 HIV 抗体的试纸条 A 和用于检测 HIV p24 抗原的试纸条 B；所述试纸条 A 和试纸条 B 均包括在底板上依次搭接地粘贴的滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球垫，所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区；所述试纸条 A 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 gp41，gp36 重组抗原和荧光微球标记的兔多抗，硝酸纤维素膜上检测区喷涂 gp41，gp36 重组抗原；所述试纸条 B 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的抗 HIV p24 抗体和荧光微球标记的兔多抗，硝酸纤维素膜上的检测区喷涂有配对的抗 HIV p24 抗体；所述试纸条 A 和试纸条 B 的质控区都固定有抗兔抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述的荧光微球是采用有机硅掺杂，无机硅包覆相结合的方法制备的双结构二氧化硅复合荧光物质的发光纳米粒子，其直径为 30-150 nm。

3. 根据权利要求 2 所述的检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述的荧光微球的制备方法为：将 60 ml 无水乙醇、2~15 ml 氨水、1~6 ml 正硅酸乙酯、1~4 ml 超纯水、0.1~5 mg 荧光物质混合在一起，恒温水浴反应 6~24 小时后，加入  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  封闭微球， $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  的终浓度为 2%~10%，最后用活性基团修饰微球表面。

4. 根据权利要求 3 所述的检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述的活性基团为 -CHO、-COOH、-OH、-NH<sub>2</sub> 或 -SH；所述的荧光物质为菲咯啉联钉有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、1,8-萘二酰亚胺、7-羟基香豆素有机荧光染料或其掺杂物以及量子点。

5. 根据权利要求 1 所述的检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，免疫层析试纸条制备步骤包括：

(1) 荧光微球垫的制备：首先制备荧光微球，用荧光微球来标记 gp41，gp36 重组抗原或抗 HIV p24 抗体，并将其喷涂在玻璃纤维膜上；将荧光微球标记在兔多抗上并同时喷涂在玻璃纤维膜上；

(2) 检测区和质控区的制备：将 gp41，gp36 重组抗原或抗 HIV p24 配对抗体喷涂到硝酸纤维素膜上制成检测区，将抗兔抗体喷涂到硝酸纤维素膜上制成质控区；

(3) 组装和剪切：在粘性底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、荧光微球垫、硝酸纤维素膜以及吸水纸，并剪切成所需宽度即成为免疫层析试纸条；

按照上述步骤分别制得试纸条 A 和试纸条 B。

6. 根据权利要求 5 所述的定量检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，所述荧光微球垫的制备方法如下：

取荧光微球在  $1000\times g$  离心 10~15 min，收集沉淀，用 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $OD_{450}=0.2$ ，然后分别加入 20~100 mg/ml 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 100  $\mu$ l，2~20 mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺 100  $\mu$ l，再加入 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液，振荡混匀，室温孵育 10~30 min 后， $1000\times g$  离心 5~15 min，沉淀用 0.01 M pH 7~8 的硼酸盐缓冲液混匀，并调节微球浓度为  $OD_{450}$  在 0.2~1.0，在 0.1 ml 荧光微球中加入 1~10  $\mu$ g gp41，gp36 重组抗原、兔多抗或抗 HIV p24 抗体，充分混匀后，室温搅拌反应 1~4 h，超纯水离心洗涤 2~5 次，沉淀用 0.01 M pH 7.2 磷酸盐缓冲液复溶沉淀至起始体积后，用 BIODOT Dispensing System 喷涂至玻璃纤维膜上，25 $^{\circ}$ C 真空干燥 1~2 h，放于干燥环境备用。

7. 根据权利要求 5 所述的定量检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，所述硝酸纤维素膜的制备方法如下：

用 0.01M pH 7.4 磷酸盐缓冲液分别调节包被物的浓度为 0.5~8.0 mg/mL，喷膜量为 0.74  $\mu$ L/cm，检测区喷涂 gp41，gp36 重组抗原或配对的抗 HIV p24 抗体，质控区喷涂抗兔抗体，两区相隔 5 mm，质控区距离硝酸纤维素膜一端 2 mm，37 $^{\circ}$ C 烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用。

8. 根据权利要求 5 所述的定量检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，免疫层析检测卡的制备方法如下：

将试纸条 A 和试纸条 B 两张免疫层析试纸条并排固定在底卡上，试纸条表面用面卡压紧，所述面卡上预留加样孔和观察窗，加样孔的位置与试纸条的样本垫对应，观察窗的位置与试纸条的硝酸纤维素膜对应，所述底卡和面卡为塑料卡。

9. 用权利要求 1、2、3 或 4 所述的检测卡定性检测艾滋病病毒的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 在免疫层析检测卡的两个加样孔中分别加入待检样本，反应 3~20min 后，将检测卡放入简易荧光分析仪窗口检测；

(2) 荧光微球在激发灯源下，发出强烈的荧光条带；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，用肉眼观察是否有荧光信号；当样本中不含有被检测物质时，检测区和质控区均出现一条荧光条带，即检测样本为阴性；当样本中含有

过量被检测物质时，检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为阳性。

10. 用权利要求 1、2、3 或 4 所述的检测卡定量检测艾滋病病毒的方法，其特征在于，定量检测艾滋病病毒时，包括以下步骤：

(1) 免疫层析检测卡的两个加样孔中分别加入待检样本，反应 3~20min 后，将检测卡放入荧光分析仪检测窗口；

(2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在激发光源下，发出强烈的荧光条带；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，通过聚焦系统将采集的光学信号，送入光电倍增管，光信号得到增强，再经过信号转换元件，获得检测区与质控区的荧光强度；

(4) 通过荧光分析仪中内置分析软件对检测区的荧光数值进行校正，并把校正值代入内置标准曲线，自动计算出待检样本中 HIV 抗体与 HIV p24 抗原的浓度。

## 检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

### 技术领域

本发明属于医学检测领域，具体地说是涉及一种利用荧光微球免疫层析技术定量检测艾滋病病毒的检测卡及其制备方法。

### 背景技术

艾滋病是获得性免疫缺陷综合症（acquired immunodeficiency syndrome，简称 AIDS）的英文音译。它是由人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，简称 HIV，俗称艾滋病病毒）引起的一种病死率极高的恶性传染病。HIV 属于逆转录病毒，目前已发现 HIV-1、HIV-2 二型。AIDS 主要传播途径为血液传播、异性和同性间的性行为传播和母婴间垂直传播。

自 1981 年在美国洛杉矶首次发现艾滋病病例后，艾滋病正在全世界迅速流行。至今，全球已有六千多万人感染了 HIV，已造成 2500 万人死亡。我国在 1985 年发现第一例 AIDS 患者，历经了传入期、扩散期，在上世纪 90 年代进入了快速增长期。截止到 2007 年 10 月，我国累计报告 HIV 感染者 223501 例，其中 AIDS 患者 62838 例，已死亡 22205 例。专家估计，我国现已有约 70 万 HIV 感染者，如不及时采取严格的控制措施，到 2010 年有可能迅速达到 1000 万例。艾滋病的流行已引起各国政府的重视，但迄今为止，仍无特效的治疗药物及安全有效的抗 HIV 疫苗，因而早期诊断并及时发现感染病人，控制其进一步传播仍是艾滋病防治的重要手段之一。

近年来，分子生物学技术飞速发展，HIV 抗体检测方法也随之不断更新。酶联免疫吸附法（ELISA）和免疫印迹法（Western-Blotting）相结合是 HIV 抗体检测的“金标准”方法。但这两种方法需要借助昂贵而复杂的仪器设备，成本高，需由专业人员进行操作，操作复杂，耗时长，不利于在基层推广和在现场进行快速筛查。近几年，HIV 抗体快速检测方法发展迅速，常用的快速检测方法有免疫斑点、免疫层析以及凝集试验，其中利用胶体金免疫层析技术检测 HIV 抗体已有很多文献和专利报道，但胶体金法一般情况下对艾滋病病毒只能进行定性分析。目前国内使用的快速检测试剂，其灵敏性和特异性都不是很理想，导致实际样品检测过程中会产生漏检现象。

HIV 感染后抗体的出现需要 2-8 周的时间，这一阶段为不能检出抗体的“窗口期”，是可能发生传播的危险期。而患者血液中只要有 HIV 病毒，即存在 p24 抗原，其通常在感染

2-3 周后可以检出，通过检测 HIV p24 抗原可以发现早期的 HIV 感染，缩短了 HIV 抗体检测的窗口期。HIV p24 抗原的变化情况几乎与 HIV 感染后的临床急性表现同步，在血液中的浓度不断变化着，p24 抗原的检测可以作为 HIV 抗体检测窗口期的辅助诊断。目前，研制出的第四代 HIV 抗体酶免检测试剂可以同时检测 HIV 1/2 抗体和 HIV p24 抗原，使窗口期缩短了一周多，但由于把抗原和抗体同时包被在酶标板上，存在着相互干扰，影响了免疫反应的特异性，另外，该试剂是采用 ELISA 方法，检测时操作复杂，比较耗时。

AIDS 之所以被称为“超级癌症”和“世纪杀手”，主要是因为 HIV 病毒复制具有失保真性，病毒很容易发生变异而产生耐药性，使原本有效的药物活性变低甚至失去作用。因此如何有效预防与控制 AIDS 的传播是一项刻不容缓、复杂而长期的艰巨任务。目前，国内外已研制出很多种 HIV 检测试剂，但能同时兼顾敏感性、特异性和操作简便快速的试剂很少。

#### 发明内容

本发明的一个目的是针对上述现有技术的不足之处，提供一种灵敏度高、操作简便检测快速、价格低廉的检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡。

本发明的另一个目的是提供上述检测卡的制备方法。

为了实现上述目的，本发明采取的一个技术方案是：

提供一种能同时检测 HIV 抗体与 HIV p24 抗原的荧光微球免疫层析检测卡，该检测卡为双卡型，由两张免疫层析试纸条、底卡以及面卡构成，一张试纸条 A 检测 HIV 抗体，另一张试纸条 B 检测 HIV p24 抗原；免疫层析试纸条是在底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、NC 膜和吸水纸而制成的，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球垫，所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区；所述试纸条 A 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记 gp41，gp36 重组抗原和荧光微球标记的兔多抗，硝酸纤维素膜上检测区喷涂 gp41，gp36 重组抗原；所述试纸条 B 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的抗 HIV p24 抗体和荧光微球标记的兔多抗，硝酸纤维素膜上的检测区喷涂有配对的抗 HIV p24 抗体；所述试纸条 A 和试纸条 B 的质控区都固定有抗兔抗体。

所述荧光微球是通过采用一种有机硅掺杂，无机硅包覆相结合的方法而制备的二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子，直径为 30-150nm，其表面有修饰的活性基团。

所述活性基团为 -CHO、-COOH、-OH、-NH<sub>2</sub> 或 -SH；所述的荧光物质为菲咯啉

联钉有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、1,8-萘二酰亚胺、7-羟基香豆素有机荧光染料或其掺杂物以及量子点。

本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，具体包括以下步骤：

### 1. 免疫层析试纸条的制备

#### (1) 荧光微球垫的制备

荧光微球的制备：将 60 ml 无水乙醇、2~15 ml 氨水、1~6 ml 正硅酸乙酯、1~4 ml 超纯水、0.1~5 mg 荧光物质混合在一起，恒温水浴反应 6~24 小时后，加入  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  封闭微球， $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  的终浓度为 2%~10%，通过加入盐酸调节溶液 pH 值来控制微球大小，最后用活性基团修饰微球表面。

用制备的荧光微球标记抗原或抗体，并将其喷涂在玻璃纤维膜上：

取微球在  $1000\times g$  离心 10~15 min，收集沉淀，用 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}=0.2$ ，然后分别加入 20~100 mg/ml 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC) 100  $\mu\text{l}$ ，2~20 mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 100  $\mu\text{l}$ ，再加入 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液，振荡混匀，室温孵育 10~30 min 后， $1000\times g$  离心 5~15 min，沉淀用 0.01 M pH 7~8 的硼酸盐缓冲液混匀，并调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}$  为 0.2~1.0。在 0.1 ml 荧光微球中加入 1~10  $\mu\text{g}$  的 gp41，gp36 重组抗原和兔多抗或抗 HIV p24 抗体和兔多抗，充分混匀后，室温搅拌反应 1~4 h，超纯水离心洗涤 2~5 次，用 0.01 M pH 7.2 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20）复溶沉淀至起始体积后，用 BIODOT Dispensing System（BIODOT 操作平台）喷涂至玻璃纤维膜上，25℃真空干燥 1~2 h，放于干燥环境备用。

#### (2) 检测区和质控区的制备

分别将 gp41，gp36 重组抗原，配对的抗 HIV p24 抗体和抗兔抗体喷涂到硝酸纤维素膜上，制成检测区和质控区。

用 0.01M pH 7.4 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）分别调节包被物的浓度为 0.5~8.0 mg/mL，喷膜量为 0.74  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ，检测区喷涂 gp41，gp36 重组抗原或配对的抗 HIV p24 抗体，质控区喷涂抗兔抗体，两区相隔 5 mm，质控区距离 NC 膜一端 2 mm，37℃烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用。

#### (3) 组装和剪切

在粘性底板上依次搭接地粘贴：滤纸、样本垫、荧光微球垫、硝酸纤维素膜以及吸

水纸，并剪切成适当宽度即成为免疫层析试纸条。按照上述步骤分别制得试纸条 A 和试纸条 B。

## 2. 免疫层析试纸条的组装

将按上述方法制备的检测 HIV 抗体的试纸条 A 和检测 HIV p24 抗原的试纸条 B 并排固定在底卡上，然后在试纸条表面用面卡压紧，即成为免疫层析检测卡。底卡和面卡一般都为塑料卡，底卡能使试纸条上的样本垫、荧光微球垫、硝酸纤维素膜和吸水纸紧密结合，面卡可保护试纸条，使其不受损坏。面卡上预留加样孔和观察窗各两个，加样孔的位置与每张试纸条的样本垫对应，观察窗的位置与每张试纸条的 NC 膜对应。

用上述的荧光微球免疫层析检测卡定量检测艾滋病病毒，包括以下步骤：

(1) 免疫层析检测卡的两个加样孔中分别加入待检样本，反应 3~20min 后，将检测卡放入检测窗口；样本包括全血、血清、血浆、体液等；

(2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源下，发出强烈的荧光条带；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，通过聚焦系统将采集的光学信号，送入光电倍增管，光信号得到增强，再经过信号转换元件，获得检测线与质控线的荧光强度；

(4) 通过荧光分析仪中内置分析软件对检测线的荧光数值进行校正，并把校正值代入内置标准曲线，自动计算出待检样本中 HIV 抗体与 HIV p24 抗原的浓度。

本发明中所述的免疫层析试纸条上的免疫反应方式为夹心模式，其中检测 HIV 抗体的试纸条上为双抗原夹心模式，检测 HIV p24 抗原的试纸条上为双抗体夹心模式。

本发明的优点如下：

1. 荧光物质被入射光激发后，返回基态时发射出荧光，可以在与激发光源垂直的方向进行检测，因此荧光不受来自激发光本底的干扰，灵敏度大大提高，其灵敏度是用传统染料和有色标记物质检测方法的 10~1000 倍。另外，荧光标记检测方法还具有操作简便，检测快速，定量准确，价格低廉等优点；

2. 荧光微球是核壳双结构，克服了常规荧光微球的染料泄露，抗溶液干扰能力差等缺点，增加了荧光微球的稳定性和荧光寿命；

3. 荧光微球表面修饰活性基团，采用化学偶联方法来标记抗体和抗原，形成抗体和抗原与微球的稳定结合；

4. 通过 CCD 扫描技术或光纤技术把过滤后的发射光谱收集后，再发送到荧光分析检测仪以及经过软件处理，把荧光信号数值化，从而实现定量检测；

5. 采用双卡型免疫层析检测卡，实现同时检测 HIV 抗体与 HIV p24 抗原，缩短了窗

口期，与现有的第四代 HIV 抗体诊断试剂相比，避免了 HIV 抗体与 HIV p24 抗原之间的相互干扰。

用上述方法制备的荧光微球免疫层析检测卡来分别测试 20 例 AIDS 患者和 20 例正常人血清，准确率均达到 100%。用第四代 HIV 抗体酶免检测试剂对这 40 个样品进行检测，所得数据与本发明提供的荧光微球免疫层析法相比，相关系数为  $r=0.9578$ ，表明这两种方法的检测结果显著相关。本发明提供的荧光微球免疫层析法定量准确，检测快速，操作简便，灵敏度高。

#### 附图说明

图 1 是免疫层析试纸条的结构示意图；

图 2 是免疫层析检测卡的结构示意图；

图 3 是荧光微球免疫层析检测卡检测原理图；

图 4 是一种简易荧光检测仪的检测原理及其结构示意图。

如图 1 所示，该免疫层析试纸条的构成为：在粘性底板 18 上，依次搭接地粘贴滤纸 11、样本垫 12、喷涂有荧光微球标记的兔多抗和 gp41，gp36 重组抗原或荧光微球标记的兔多抗抗 HIV p24 抗体的玻璃纤维膜 13、包被有 gp41，gp36 重组抗原或配对的抗 HIV p24 抗体的检测区 15 和包被有抗兔抗体的质控区 16 的硝酸纤维素膜 14 和吸水纸 17。如图 2 所示，该免疫层析检测卡是双卡型的，由分别检测 HIV 抗体和 HIV p24 抗原的两张免疫层析试纸条固定在底卡上而形成，具体构造包括底卡 21、面卡 22、加样孔 23、观察窗 24、NC 膜 25、质控区 26、检测区 27。

如图 1、2 和 3 所示，检测原理如下：在检测卡的两个加样孔 23 中加入待检样本，样本溶解玻璃纤维膜 13 上喷涂的荧光微球标记的兔多抗和 gp41，gp36 重组抗原以及荧光微球标记的抗 HIV p24 抗体，通过毛细作用在纤维膜上向前泳动，同时样本中 HIV 抗体、HIV p24 抗原与相应的荧光微球标记物反应；反应液经过检测区 15 时，与检测区的包被物反应，并富集在检测区；而兔多抗则继续向前泳动，在质控区 16 被抗兔抗体截留。将检测卡放入检测窗口 31，荧光微球 33 在光源 32 激发下，发射的荧光 34 通过单色滤光片 35 过滤后，通过观察窗口 36 在检测区 15 能够观察到一条清晰的荧光条带，质控区不管样本是阴性还是阳性都会出现荧光条带。检测区 15 无荧光条带，样本是阳性，检测区 15 有荧光条带，样本是阴性。

如图 4 所示，荧光微球免疫层析定量检测艾滋病病毒的检测步骤如下：

(1) 在检测卡的两个加样孔中滴加待检样本，反应 3~20min 后，将其放入检测窗口

41;

(2) 检测区和质控区被截留的荧光微球 43 在最佳激发光源 42 激发下, 发出强烈的荧光条带;

(3) 发射的荧光 44 经 CCD 扫描系统或光纤系统 45 汇聚后, 经过光电聚集管 46, 送入光电倍增管 47, 光信号得到增强, 再经过信号转换元件 48 以及软件分析 49 后, 样本中 HIV 抗体与 HIV p24 抗原的浓度在数据输出 410 的显示器上显示出来。

## 具体实施方式

### 实施例一

#### 1、异硫氰酸荧光素-二氧化硅壳核双结构荧光微球的制备

将 1mg FITC 与 APS 按摩尔比 1:10 加入 4ml 无水乙醇, 避光常温 200rpm 搅拌 8 小时后加入 60ml 无水乙醇, 2ml 氨水, 3ml 正硅酸乙酯和 1ml 超纯水混合搅拌 8 小时, 再加入  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  封闭微球,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  的终浓度为 3%, 封闭 8 小时, 离心洗涤微球三遍, 然后用 10ml 无水乙醇将微球超声分散。在三口烧瓶中加入 60ml 无水乙醇、1ml 氨水、1ml 超纯水, 50ul MPS, 加入超声处理后的微球, 25℃, 300rpm 搅拌 8 小时。将 0.07g SDBS, 0.05g  $\text{NaHCO}_3$ , 溶解于 100ml 超纯水中, 加入微球, 通氮, 70℃, 300rpm 搅拌, 然后向三口烧瓶中加 500ul 苯乙烯和 100ul 丙烯酸, 0.03g 过硫酸钾, 1ml 超纯水, 300rpm 搅拌 7 小时, 即为制备好的表面修饰活性基团(-COOH)的异硫氰酸荧光素-二氧化硅壳核双结构荧光微球。

#### 2、荧光微球标记物的制备 (EDC 法)

荧光微球标记的市售的 gp36, gp41 重组抗原的制备: 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10min, 收集沉淀, 用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}=0.2$ , 然后加入 90  $\mu\text{L}$  50 mg/mL 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC), 150  $\mu\text{L}$  5 mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺(NHS), 振荡混匀, 室温孵育 20min 后,  $1000 \times g$  离心 5 min, 沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}$  为 0.5。在 0.1mL 荧光微球中加入 1 $\mu\text{g}$  gp36, gp41 重组抗原, 充分混匀后, 室温搅拌反应 3h, 用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS (其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶至起始体积后, 即为制备好的荧光微球标记的 gp36, gp41 重组抗原。

荧光微球标记的抗 HIV p24 抗体的制备: 取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在  $1000 \times g$  离心 10min, 收集沉淀, 用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为  $\text{OD}_{450}=0.2$ , 然后加入 80  $\mu\text{l}$  50 mg/ml 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC), 100  $\mu\text{l}$  10 mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育 30min 后,  $1000 \times g$  离心 5 min, 沉淀用 0.01M

pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解，并调节微球浓度为 OD<sub>450</sub> 为 0.8。在 0.1ml 荧光微球中加入 2 $\mu$ g 抗 HIV p24 抗体，充分混匀后，室温搅拌反应 3h，用超纯水洗涤离心 3 次后，沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS（其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20）复溶至起始体积后，即为制备好的荧光微球标记的抗 HIV p24 抗体。

荧光微球标记的兔多抗的制备：取 1mg 包裹异硫氰酸荧光素的荧光微球在 1000 $\times$ g 离心 10min，收集沉淀，用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 OD<sub>450</sub>=0.2，然后加入 80  $\mu$ l 50 mg/ml 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺（EDC），100  $\mu$ l 10 mg/mL 氮羟基琥珀酰亚胺（NHS），振荡混匀，室温孵育 30min 后，1000 $\times$ g 离心 5 min，沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解，并调节微球浓度为 OD<sub>450</sub> 为 0.8。在 0.1ml 荧光微球中加入 2 $\mu$ g 兔多抗，充分混匀后，室温搅拌反应 3h，用超纯水洗涤离心 3 次后，沉淀用 0.01M pH 7.2 的 PBS（其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20）复溶至起始体积后，即为制备好的荧光微球标记的兔多抗。

### 3、荧光微球垫的制备

用 BIODOT Dispensing System，将荧光微球标记的 gp36，gp41 重组抗原和兔多抗喷涂至玻璃纤维膜（A）上，将荧光微球标记的抗 HIV p24 抗体和兔多抗喷涂至玻璃纤维膜（B）上，喷膜量均为 4  $\mu$ l/cm，玻璃纤维膜大小为 30 $\times$ 0.8 cm，25 $^{\circ}$ C 真空干燥 1~2h，放于干燥环境备用。

### 4、检测区和质控区的制备

gp36，gp41 重组抗原和抗兔抗体包被到硝酸纤维素膜 A 上：用 0.01M pH 7.4 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）调节 gp36，gp41 重组抗原的浓度为 1mg/ml，将所得溶液喷涂在 NC 膜 A 上形成检测区；用 0.01M pH 7.2 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）调节抗兔抗体的浓度为 1mg/ml，将所得溶液喷涂在 NC 膜（A）上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.74  $\mu$ l/cm，两区相隔 5mm，质控区距离 NC 膜一端 2mm，37 $^{\circ}$ C 烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用。

抗 HIV p24 抗体和抗兔抗体包被到硝酸纤维素膜（B）上：用 0.01M pH 7.4 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）调节抗 HIV p24 抗体的浓度为 0.5mg/ml，将所得溶液喷涂在 NC 膜（B）上形成检测区；用 0.01M pH 7.2 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）调节抗兔抗体的浓度为 0.5mg/ml，将所得溶液喷涂在 NC 膜（B）上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.74  $\mu$ l/cm，两区相隔 5mm，质控区距离 NC 膜一端 2mm，37 $^{\circ}$ C 烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用。

#### 5、荧光微球免疫层析检测卡的制备：

组装试纸条 A：在 PVC 底板上依次搭接地粘贴：（1）滤纸和样本垫，样本垫为一种经过 5% Tween-20 浸泡 1 小时的玻璃纤维膜；（2）喷涂有荧光微球标记的兔多抗和 gp36, gp41 重组抗原的玻璃纤维膜 A；（3）包被有 gp36, gp41 重组抗原作为检测区和抗兔抗体作为质控区的硝酸纤维素膜 A；（4）吸水纸，组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即成为免疫层析试纸条 A。

组装试纸条 B：在 PVC 底板上一次搭接地粘贴：（1）滤纸和样本垫，样本垫为一种经过 5% Tween-20 处理的玻璃纤维膜；（2）喷涂有荧光微球标记的兔多抗和抗 HIV p24 抗体的玻璃纤维膜 B；（3）包被有配对的抗 HIV p24 抗体作为检测区和抗兔抗体作为质控区的硝酸纤维素膜 B；（4）吸水纸，组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即成为免疫层析试纸条 B。

把免疫层析试纸条 A 和免疫层析试纸条 B 并排固定在塑料底卡上，试纸条表面用面卡压紧，面卡在对应每张试纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗，制成的免疫层析检测卡可用来同时检测 HIV 抗体与 HIV p24 抗原。该检测卡组装好后装入铝箔袋中，加入干燥剂后封口保存，于室温干燥环境下至少可以保存一年。

用上述荧光微球免疫层析检测卡定量检测艾滋病病毒包括以下步骤：

（1）平放检测卡，待测样品血样平衡至室温后，两个加样孔中各加入血样 50 $\mu$ L，于室温下反应 10min，将检测卡放入检测窗口；

（2）截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下，发出强烈的荧光；

（3）发射的荧光经滤除杂光后，通过聚集系统将采集的光学信号，送入光电倍增管，光信号得到增强，再经过信号转换元件，自动获得 HIV 抗体和 HIV p24 抗原检测卡的检测线与质控线的荧光数值；

（4）荧光分析仪中的内置分析软件通过对检测线的荧光值进行校正，并把校正值代入内置标准曲线，自动计算出待测样品中 HIV 抗体为 82U/ml，HIV p24 抗原浓度为 235pg/ml。

#### 实施例二

本实施例的制备方法与实施例一基本相同，不同点在于：

步骤 1 中制备的荧光微球为二氯三（1,10-邻二氮杂菲）钌荧光素-二氧化硅壳核双结构微球，其制备方法如下：

将 3mg 二氯三（1,10-邻二氮杂菲）钌荧光素，60ml 无水乙醇，4ml 氨水，2ml 正硅酸乙酯和 3ml 超纯水混合搅拌 8 小时，再加入 Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 封闭微球，Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 的终浓度为 3%，

封闭 8 小时，离心洗涤微球三遍，然后用 10ml 无水乙醇将微球超声分散。在三口烧瓶中加入 60ml 无水乙醇、1ml 氨水、1ml 超纯水，50ul MPS 以及超声处理后的微球，25℃，300rpm 搅拌 8 小时。将 0.07g SDBS，溶解于 100ml pH7.0 的 PB 中，加入微球，通氮，70℃，300rpm 搅拌，然后向三口烧瓶中加 500ul 苯乙烯和 50ul APS，0.03g 过硫酸钾，1ml 超纯水，300rpm 搅拌 8 小时，即为制备好的表面修饰活性基团(-NH<sub>2</sub>)的二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钌荧光素-二氧化硅壳核双结构荧光微球。

用上述荧光微球免疫层析检测卡定量检测艾滋病病毒包括以下步骤：

(1) 平放检测卡，待测样品血样平衡至室温后，两个加样孔中各加入血样 50μL，于室温下反应 10min，将检测卡放入检测窗口；

(2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下，发出强烈的荧光；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，通过聚集系统将采集的光学信号，送入光电倍增管，光信号得到增强，再经过信号转换元件，获得检测线与质控线的荧光数值；

(4) 荧光分析仪中的内置分析软件对检测线荧光强度进行校正，并把校正值代入内置标准曲线，自动计算出待测样品中 HIV 抗体为 53U/ml，HIV p24 抗原为 125pg/ml。

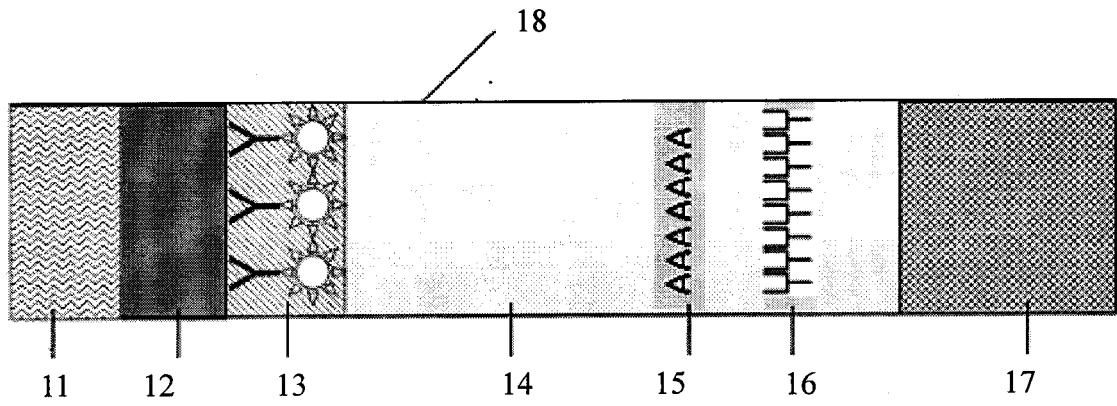


图 1

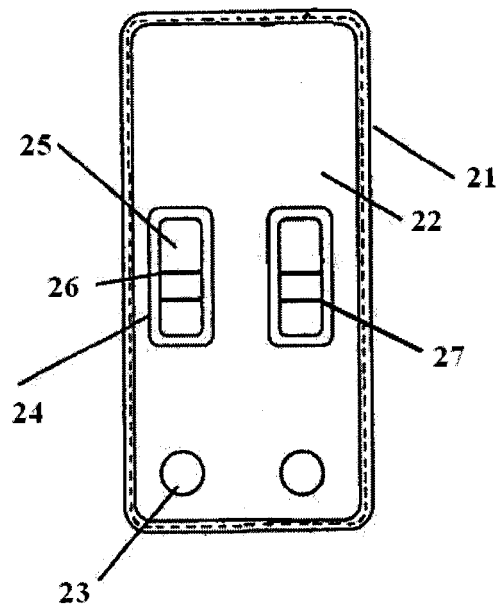


图 2

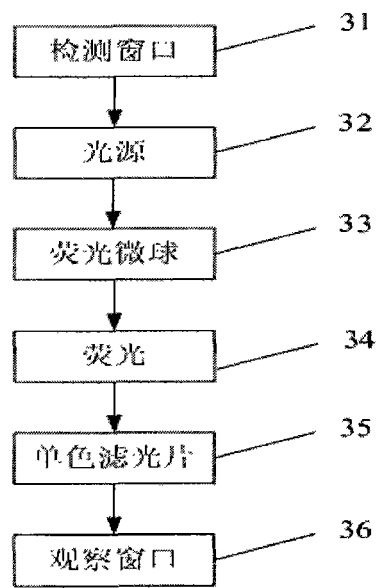


图 3

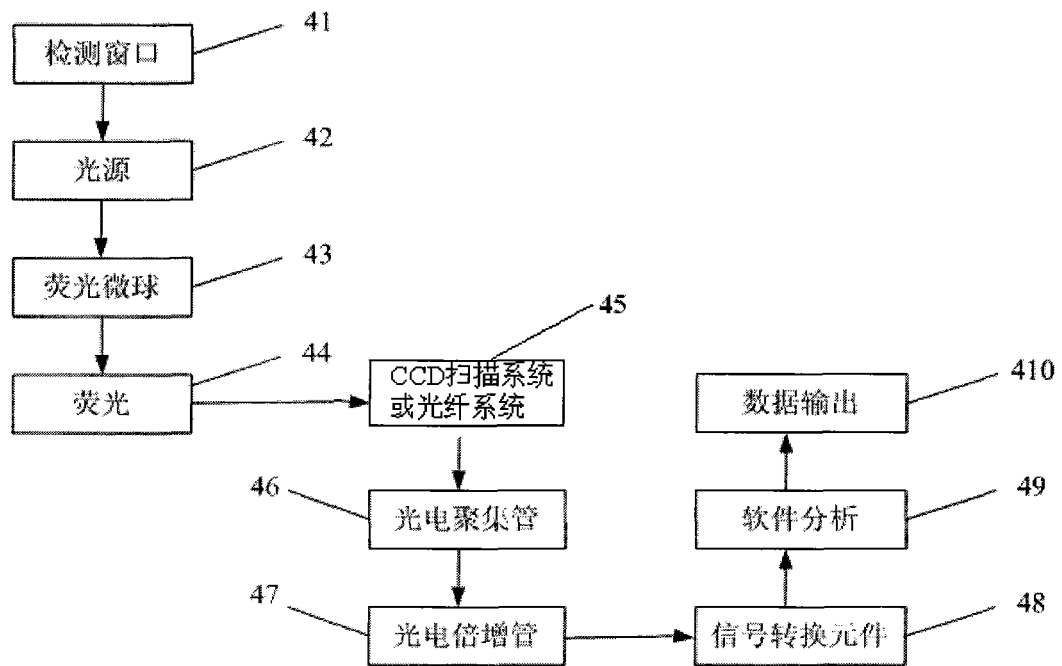


图 4

专利名称(译)	检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101576562A</a>	公开(公告)日	2009-11-11
申请号	CN200910142348.3	申请日	2009-06-01
[标]发明人	熊勇华 史爱武 赖卫华 徐波 陈雪岚 魏华		
发明人	熊勇华 史爱武 赖卫华 徐波 陈雪岚 魏华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/52 G01N33/551 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测艾滋病病毒的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。该检测卡构成包括A、B两张试纸条、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，其中硝酸纤维素膜上固定有检测线和质控线，实现对HIV抗体与HIV p24抗原的同时检测，本发明以二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子为标记，采用免疫层析技术实现艾滋病病毒定量的免疫分析。检测过程中，采用荧光微球激发光源进行激发，发射出的荧光经过滤光片装置后，用CCD扫描技术或光纤技术，把所有的发射光谱收集、聚集和倍增后，转换成数值信号，利用荧光分析仪中的内置分析软件，自动计算出待测物的浓度。本发明的优点是灵敏度高、定量准确、检测快速、操作方便、经济实用。

