

[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 200910195150.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月10日

[11] 公开号 CN 101644707A

[22] 申请日 2009.9.4

[21] 申请号 200910195150.1

[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 沈鹤柏 赵露晶 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 张美娟

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制备方法及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种 AFP 免疫层析试纸的制作方法，具体为一种上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作方法，以及这种 AFP 免疫层析试纸的应用。

1) 上转荧光颗粒的表面硅化；2) 上转荧光颗粒的表面氨基化；3) 上转荧光颗粒表面连接抗体；4) 上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作；5) 样品检测及定量检测方法的建立。本发明通过上转荧光标记和双抗夹心免疫层析技术定量检测血清中 AFP 的含量。建立 AFP 上转荧光免疫层析技术，用于原发性肝癌的早期诊断，具有灵敏性高，准确性好，可实现定量分析等优势，将进一步拓展 AFP 免疫层析技术在生物医学领域中的应用。

1、一种上转荧光颗粒-抗体复合物的制备方法，其特征在于：具体步骤为：

(1) 上转荧光颗粒的表面硅化

取 5-50mg 上转荧光颗粒，加入到 300-800mL 乙醇与水的混合反应液，超声处理使反应体系混合均匀，在 15-50℃水浴中搅拌至平衡，再向其中加入 0.1-1mL 正硅酸乙酯 (TEOS)，继续反应 3-10h，离心洗涤；

(2) 上转荧光颗粒的表面氨基化

取上述表面硅化的上转荧光颗粒，加入 30~100mL 甲醇和丙三醇组成的混合溶液，超声分散，然后向其中加入 10-1000uLAEAPS，15-50℃恒温下搅拌 5~10h，用乙醇离心洗涤，干燥保存；

(3) 上转荧光颗粒表面连接抗体

向分散在磷酸缓冲液 (PB) 中的表面修饰氨基的上转荧光颗粒中加入一定量戊二醛，反应 2-5h，离心将多余的戊二醛洗去，重新分散在 PB 中，然后加入一定量的抗体，4℃过夜，离心洗涤，最终保存在 PB (含 0.1%BSA, 0.1%Tween20) 中。

2、根据权利要求 1 所述的一种上转荧光颗粒-抗体复合物的制备方法，其特征在于：步骤 (1) 中所述的乙醇为分析纯，乙醇与水的体积比为：10-1：1。

3、根据权利要求 1 所述的一种上转荧光颗粒-抗体复合物的制备

方法，其特征在于：步骤（2）中甲醇和丙三醇混合容液的配比为：

$$V_{\text{甲醇}}:V_{\text{丙三醇}}=1:1-50。$$

4、根据权利要求1所述的一种上转荧光颗粒-抗体复合物的制备方法，其特征在于：步骤（3）中，所述的加入戊二醛的量为 50-1000uL 25%。

5、根据权利要求1所述的一种上转荧光颗粒-抗体复合物的制备方法，其特征在于：步骤（3）中，加入的抗体为 10-500uL。

6、一种上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作方法，其特征在于：具体步骤为：将权利要求1所制得的上转荧光颗粒标记的抗体复合物喷涂在结合垫上，相应的另一抗体及二抗分别喷涂在硝酸纤维膜上形成 T 线和 C 线；根据免疫层析的基本原理，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，并用切刀切割成 4cm 的试纸条。

7、根据权利要求2的一种上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作方法，其特征在于：它应用于定量检测 AFP 抗原。

上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及了一种 AFP 免疫层析试纸的制作方法，具体为一种上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作方法，以及这种 AFP 免疫层析试纸的应用。

背景技术

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，成人血清中 AFP 含量甚微。大约 90%的原发性肝癌患者血清 AFP 含量升高，而且其含量与疾病的变化密切相关。因此，血清 AFP 含量测定成为原发性肝癌诊断的重要指标。

一直以来，国内外普遍采用 ELISA 法测定血清 AFP 含量，但该方法操作复杂，反应时间较长，且对操作人员和环境也有一定的要求，普遍应用受限。现有的胶体金免疫层析方法以其简便、快速的优势已经在临床医学检验中得到了广泛应用。它是以微孔膜为固相载体，包

被目标物抗原或抗体，加入待测样品后，经微孔膜的渗滤作用和毛细虹吸作用使样品中目标物与膜上的抗原或抗体结合，通过肉眼观察胶体金的颜色来标示反应结果的。但是胶体金技术也有其局限性，检测灵敏度较低，难以实现定量检测，而且目视检测使检测结果不易记录和保存。

上转荧光颗粒是由稀土金属元素掺杂于晶体的晶格中构成的纳米颗粒，在红外线激发下可发射不同波长的可见光。作为标记材料，上转荧光颗粒与胶体金相比拥有无法比拟的优势：其独特的上转荧光特性，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。

发明内容

本发明的目的是为了提供一种上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作方法，以解决现有的 ELISA 法测定血清 AFP 含量，操作复杂，反应时间长，且对操作人员和环境也有一定的要求，普遍应用受限等诸多问题。

本发明的另一目的是为了提供这种 AFP 免疫层析试纸的应用。

本发明的目的可以通过以下技术方案来实现。

一种上转荧光颗粒-抗体复合物的制备方法，具体步骤为：

(1) 上转荧光颗粒的表面硅化

取 5-50mg 上转荧光颗粒，加入到 300-800mL 乙醇与水的混合反应液（乙醇：分析纯，质量分数 $\geq 99.7\%$ ， $V_{乙醇}:V_{水}=10\sim 1:1$ ），超声

处理使反应体系混合均匀，在 15-50℃水浴中搅拌至平衡，再向其中加入 0.1-1mL 正硅酸乙酯（TEOS），继续反应 3-10h，离心洗涤；

（2）上转荧光颗粒的表面氨基化

取上述表面硅化的上转荧光颗粒，加入 30~100mL 甲醇和丙三醇组成的混合溶液（ $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{丙三醇}}=1:1\sim 50$ ），超声分散，然后向其中加入 10-1000uLAEAPS（分析纯纯品），15-50℃恒温下搅拌 5~10h，用乙醇离心洗涤，干燥保存；

（3）上转荧光颗粒表面连接抗体

向分散在磷酸缓冲液（PB）中的表面修饰氨基的上转荧光颗粒中加入 50~1000uL25%的戊二醛，反应 2-5h，离心将多余的戊二醛洗去，重新分散在 PB 中，然后加入 10~500uL 的抗体，4℃过夜，离心洗涤，最终保存在 PB（含 0.1%BSA，0.1%Tween20）中。

一种上转荧光定量 AFP 免疫层析试纸的制作方法，具体步骤为：将上述上转荧光颗粒标记的抗体复合物喷涂在结合垫上，相应的另一抗体及二抗分别喷涂在硝酸纤维膜（NC 膜）上形成 T 线和 C 线；根据免疫层析的基本原理，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，并用切刀切割成 4cm 的试纸条。

本发明的样品检测及定量检测方法的建立：将试纸条的样品垫端插入待测样品液，10-30min 后取出，通过荧光测量仪判读结果。

阳性检测中试纸条的检测带和质控带上均有荧光产生，其所对应的信号强度分别为 T 和 C，检测带上荧光强度 T 与质控带上荧光强度 C 的比值，即 T/C 与样品中含有的被检测物浓度成正比。阴性样品检

测时，由于样品中不含有被检测物，因而重新溶解游离，随样品基质进入膜的只有上转荧光颗粒-抗体复合物，由此，只在质控带上发生该复合物与二抗的免疫反应，这样阴性检测中在荧光测量仪的检测下，只有质控带上产生荧光。

将抗原标准品配制成具有一定浓度梯度的系列标准品，分别进行免疫层析，通过荧光测量仪读出 T/C 值，绘制抗原浓度的标准曲线。待测抗原用上述的试纸进行免疫层析，由该标准曲线即可求得实际浓度。

本发明通过上转荧光标记和双抗夹心免疫层析技术定量检测血清中 AFP 的含量。建立 AFP 上转荧光免疫层析技术，用于原发性肝癌的早期诊断，具有灵敏性高，准确性好，可实现定量分析等优势，将进一步拓展 AFP 免疫层析技术在生物医学领域中的应用。

具体实施方式

下面结合具体实施例进一步阐述本发明的技术特点。

1、制备上转荧光颗粒-甲胎蛋白（AFP）抗体复合物：

利用已经过表面氨基化的上转荧光颗粒与 AFP 抗体进行连接，具体实施步骤如下：

取 5mg 氨基化的 UCP 加入到 3mL 0.03 mol/L 的 PB(PH=7.2)中，充分混匀。

向上述体系中加入 250uL 25%的戊二醛，室温下反应 3h。

离心洗去多余的戊二醛，重新分散在 5mL 0.03 mol/L PB 中。

再向其中加入 150 μ L AFP 抗体，4 $^{\circ}$ C 反应 3h。

4 $^{\circ}$ C 离心洗涤数次，保存于 0.03 mol/L PB（含 0.1%BSA，0.1%Tween20）中。

2、制备双抗体夹心 AFP 抗原检测试纸：

1) 样品垫的制备：选用纤维素膜作为样品垫材料，剪成 1.5 \times 30.0cm 规格的条带，将其放入样品垫封闭液（0.03mol/L PB（PH=7.2），含有 5mg/mlBSA，0.1%Triton X-100）中浸泡 30min，37 $^{\circ}$ C 烘干备用。

2) 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 \times 30.0cm 规格的条带，将实施例 1 中制备的 FITC- AFP 抗体复合物离心，在沉降物中加入 0.03mol/LPB（PH=7.2），含 1%蔗糖，1%BSA），充分混匀，加于该条带上，37 $^{\circ}$ C 烘干。

3) NC 的制备：将 NC 膜剪切成 2.5 \times 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，37 $^{\circ}$ C 烘干。

4) 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。

3、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，10 ng/ml，20 ng/ml，50 ng/ml，100 ng/ml，

200 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 700 ng/ml, 800 ng/ml, 900 ng/ml, 1000 ng/ml。

2) 将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), 绘制抗原浓度的标准曲线。

3) 利用上述标准曲线检测临床血清样品, 通过判读 T/C 值, 求得样品中抗原的浓度。

专利名称(译)	上转荧光定量AFP免疫层析试纸的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN101644707A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200910195150.1	申请日	2009-09-04
[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 杨瑞馥		
发明人	沈鹤柏 赵露晶 周蕾 杨瑞馥		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/574 G01N21/64		
代理人(译)	张美娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种AFP免疫层析试纸的制作方法，具体为一种上转荧光定量AFP免疫层析试纸的制作方法，以及这种AFP免疫层析试纸的应用。1)上转荧光颗粒的表面硅化；2)上转荧光颗粒的表面氨基化；3)上转荧光颗粒表面连接抗体；4)上转荧光定量AFP免疫层析试纸的制作；5)样品检测及定量检测方法的建立。本发明通过上转荧光标记和双抗夹心免疫层析技术定量检测血清中AFP的含量。建立AFP上转荧光免疫层析技术，用于原发性肝癌的早期诊断，具有灵敏性高，准确性好，可实现定量分析等优势，将进一步拓展AFP免疫层析技术在生物医学领域中的应用。