



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104977409 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201410136325. 2

(22) 申请日 2014. 04. 08

(71) 申请人 刘宏飞

地址 212009 江苏省镇江市镇江新区纬五路
世纪名门小区 5 号楼 202

(72) 发明人 刘宏飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

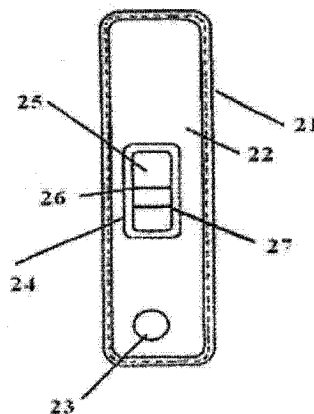
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种荧光微球免疫层析试纸条的制备及定量检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种荧光微球免疫层析试纸条的制备方法及其定量检测方法。本发明以无皂乳液聚合法制备的发光纳米粒子为标记,采用免疫层析技术,制备荧光微球免疫层析试纸条,然后制成构成包括样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸的检测卡,其中硝酸纤维素膜上固定有检测线和质控线。在检测过程中,采用荧光微球最佳激发光源进行激发,发射出的荧光经过滤光片后,用 CCD 扫描技术或光纤技术,将发射光谱收集、聚集和倍增后,转换成数值信号,再将测定的检测线荧光强度乘以校正系数,把校正后的荧光强度代入预先设置在荧光分析仪中的标准曲线,即可通过荧光分析仪自动计算获得样本中待测物的浓度。本发明灵敏度高、定量准确、操作方便。



1. 一种荧光微球免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 荧光微球垫的制备:称取 0.009g 过硫酸钾,0.004g NaHCO_3 溶于 7ml 去离子水中,将一定质量的荧光染料溶于 2ml 无水乙醇及 1ml 苯乙烯后,加入到水溶液中,摇匀,通氮气 5min,放入 70℃ 恒温水浴震荡 24h 后,取出,离心 (10000rpm \times 10min) 分离出的聚合物分别用乙醇、去离子水离心洗涤 3 次,即得到聚苯乙烯荧光微球。用制备的荧光微球来标记抗体、抗原或其它特异性结合物质,并将其喷涂在玻璃纤维膜上。

(2) 硝酸纤维素膜的制备:将抗体、抗原或其它特异性结合物质包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将另一种抗体或抗原包被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,并剪切成适当宽度即成为免疫层析试纸条。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光微球免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述荧光微球直径为 30-150nm。

3. 根据权利要求 1 所述的荧光微球免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述活性基团为 -CHO、-COOH、-OH、-NH 或 -SH。

4. 根据权利要求 1 所述的荧光微球免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述荧光物质为有机钌化合物、异硫氰酸荧光素、异硫氰酸罗丹明、6- 梭基荧光素酰胺酯、荧光烷衍生物类、1,8- 蔡二酞亚胺类、香豆素类有机荧光染料或其掺杂物以及量子点。

5. 用权利要求 1-4 任一项所述的荧光微球免疫层析试纸条制备荧光微球免疫层析检测卡的方法,其特征在于将一或多张免疫层析试纸条并排固定在底卡上,试纸表面用面卡压紧,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。

6. 根据权利要求 5 所述的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于:所述的底卡和面卡材质为塑料。

7. 用权利要求 5 所述的荧光微球免疫层析检测卡定量检测方法,包括以下步骤:

(1) 绘制标准曲线:配制一系列浓度的标准品溶液,用同一批次的数张免疫层析检测卡检测其荧光强度,以荧光强度为纵坐标,标准品溶液浓度为横坐标,绘制一条标准曲线,并存入荧光分析仪中。

(2) 免疫层析检测卡的加样孔中加入待检样本,反应 3-20min 后,将检测卡放入检测窗口。

(3) 截留在检测区和质控区的荧光微球在灯源激发下,发出强烈的荧光。

(4) 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。

(5) 将获得的质控线荧光强度与荧光分析仪中内置的质控线荧光强度进行校正,得到本次待检样本测定时的校正系数。

(6) 将获得的检测线荧光数值乘以校正系数,并将所得数值代入已设置在荧光分析仪中的标准曲线,即得到样本中待测物的浓度。

8. 根据权利要求 7 所述的定量检测方法,其特征在于:免疫反应模式为夹心模式或竞争模式。

一种荧光微球免疫层析试纸条的制备及定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学检测领域,具体是涉及一种荧光微球免疫层析试纸条的制备方法及其定量检测方法。

技术背景

[0002] 在生物和医学检测中,经常用到免疫分析法,它包括放射免疫分析、酶联免疫分析及免疫层析等方法。放射免疫分析和酶联免疫分析法需要昂贵的设备、专业的操作人员和复杂的操作步骤,难以快速得到检测结果。免疫层析法因操作简单、快速和成本低,而常用于快速定性或半定量检测,如盐酸克伦特罗、乙肝表面抗原、黄曲霉毒素和促黄体激素等胶体金试纸条。目前我国艾滋病、乙肝、丙肝、梅毒等常见传染性疾病的发病率不断上升,给社会和人民生活安全造成极大隐患。而基于免疫层析技术的产品因操作简便、快速和只需肉眼观察或简单仪器就能显示结果,可作为疾病或违禁添加物检测的初步筛选方法。因此,开发基于免疫层析技术的产品有利于缓解目前我国心血管疾病、艾滋病、乙肝、丙肝和梅毒等常见传染性疾病发病率日益上升的情况。

[0003] 免疫层析技术是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异、高亲和性的免疫反应。层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测带),通过酶反应或直接利用可目测的标记物(如胶体金)所看到的直观的实验现象(如显色)而获得测定结果。而游离标记物(即未与待测物结合的标记物)则越过检测带,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金、乳胶、胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但胶体金免疫层析技术尚存在以下不足:

[0004] (1) 胶体金标记过程是静电吸附过程,属于物理吸附,在液相中稳定性较差,已标记上的蛋白分子容易再次脱落。

[0005] (2) 只有当金颗粒达到一定量时,肉眼才能分辨出检测条带与背景差异,因而检测灵敏度不高。

[0006] (3) 不同的材料基质效应明显,背景干扰非常大。

[0007] (4) 胶体金免疫层析技术一般用于定性或半定量检测。

[0008] 胶体金免疫层析技术检测灵敏度较低,在实际检测中只能对检测物定性或半定量,无法准确定量。目前,已有相关专利报道了以荧光纳米微粒为标记物进行免疫层析检测,如公开号为 CN1645146A 的专利公开了一种用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条的制备。公开号为 CN1866012A 的专利公开了一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置,该方法将荧光物质螯合物 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 与有机高分子纳米微粒结合,制备成荧光微粒,通过荧光检测来进行定量。这些专利公开的方法都能提高免疫层析检测的灵敏度,但报道的荧光纳米颗粒存在一定的缺陷,如染料容易泄露、抗溶液干扰能力差等,从而应用范围在很大程度上受到了限制。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种灵敏度高、简便和快速的荧光微球免疫层析试纸条的制备方法 & 定量检测的方法。本发明使用的荧光微球不受外界环境的影响,因而荧光稳定,为通过荧光进行定量检测提供了良好的条件。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种荧光微球免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 荧光微球垫的制备:称取 0.009g 过硫酸钾,0.004g NaHCO_3 溶于 7ml 去离子水中,将一定质量的荧光染料溶于 2ml 无水乙醇及 1ml 苯乙烯后,加入到水溶液中,摇匀,通氮气 5min,放入 70℃ 恒温水浴震荡 24h 后,取出,离心 (10000rpm \times 10min) 分离出的聚合物分别用乙醇、去离子水离心洗涤 3 次,即得到聚苯乙烯荧光微球。用制备的荧光微球来标记抗体、抗原或其它特异性结合物质,并将其喷涂在玻璃纤维膜上。

[0012] (2) 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的制备:将抗体、抗原或其它特异性结合物质包被到硝酸纤维素膜上制成检测区,将另一种抗体或抗原包被到硝酸纤维素膜上制成质控区。

[0013] (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。

[0014] 所述荧光微球直径为 30-150nm

[0015] 所述活性基团为 -CHO、-COOH、-OH、-NH₂ 或 -SH

[0016] 所述荧光物质为有机钌化合物、异硫氰酸荧光素、异硫氰酸罗丹明、6- 羧基荧光素酰胺酯、荧光烷衍生物类、1,8- 萘二酞亚胺类、香豆素类有机荧光染料或其掺杂物以及量子点

[0017] 本发明的另一个技术方案提供了用荧光微球免疫层析试纸条制备荧光微球免疫层析检测卡的方法。

[0018] 将一或多张免疫层析试纸条并排固定在底卡上,然后在试纸条表面用面卡压紧,即成为免疫层析检测卡。底卡和面卡一般都选用为塑料卡,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,使其不受损坏。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 NC 膜对应。

[0019] 本发明还提供了一种利用荧光微球免疫层析检测卡定量检测方法,包括以下步骤:

[0020] (1) 绘制标准曲线:配制一系列不同浓度 (x) 的标准品溶液 (浓度 5 个以上),用同一批次的数张免疫检测卡检测标准品溶液,得到检测线荧光强度 (y) 以及标准质控线荧光强度 C_0 ,以标准品溶液的浓度为横坐标,检测线荧光强度为纵坐标,绘制一条标准曲线 $y=ax+b$,在荧光分析仪中记录此标准曲线和标准质控线荧光强度 C_0 。

[0021] (2) 免疫层析检测卡的加样孔中加入待检样本,反应 3-20min 后,将检测卡放入检测窗口。

[0022] (3) 截留在检测区和质控区的荧光微球在灯源激发下,发出强烈的荧光。

[0023] (4) 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。

[0024] (5) 将获得的质控线荧光强度与荧光分析仪中内置的质控线荧光强度进行校正,得到本次待检样本测定时的校正系数,消除检测样本中的基质干扰效应。

[0025] (6) 将获得的检测线荧光数值乘以校正系数,并将所得数值代入已设置在荧光分析仪中的标准曲线,即得到样本中待测物的浓度,以上过程通过荧光分析仪内置分析软件自动计算获得。

[0026] 本发明中所述的校正原理如下:

[0027] 绘制标准曲线时的质控线荧光强度为 C_0 , 而实际样本检测时的质控线荧光强度为 C , 检测线荧光强度为 T , 因质控线差异与待检物浓度无关, 只与检测条件有关, 因此可用于校正到绘制标准曲线时的检测线的荧光强度 T_0 。检测线的荧光强度 T_0 可通过下列公式计算出来:

$$[0028] \quad T_0 = \frac{C_0}{C} \times T$$

[0029] 将校正值 T_0 代入标准曲线 $y=x+b$, 即可得出样本中待测物的浓度, 以上过程通过分析仪内置分析软件自动计算获得。

[0030] 本发明中所述的免疫层析试纸条上的免疫反应包括两种模式: 夹心模式和竞争模式。

[0031] (a) 夹心模式: 可用于检测样品中存在的病原体、微生物以及大分子抗体、抗原等; 包括双抗体夹心和双抗原夹心, 两者原理相同, 现以双抗体夹心为例进行说明。

[0032] 在免疫层析试纸条的制备过程中, 首先将荧光微球标记的待测物特异性抗体 A (特异性结合于待测物 A 位点的抗体) 喷涂在玻璃纤维膜上制成荧光微球垫; 然后将待测物特异性抗体 B (特异性结合于待测物 B 位点) 固定于硝酸纤维素膜上作为检测带, 将二抗 (可与抗体 A 特异性结合的抗体) 固定于硝酸纤维素膜上作为质控带。

[0033] 当样品垫上加入样品时, 待测物首先和荧光微球垫上的荧光微球-抗体 A 相结合, 形成免疫复合物 (荧光微球-抗体 A-待测物); 然后在毛细作用下, 免疫复合物以及游离的荧光微球-抗体 A 跟随样品中的液体基质一起进入 NC 膜; 当经过检测带时, 检测带上的抗体 B 将与免疫复合物中待测物上的 B 位点结合形成荧光微球-抗体 A-待测物-抗体 B 复合物, 并且固定在检测带上, 而游离的荧光微球-抗体 A 不与抗体 B 结合, 在毛细作用下继续流动, 当经过质控带时, 与二抗结合并固定于质控带上。用荧光分析仪检测检测带与质控带的荧光强度, 其中检测带上的荧光强度与待测物浓度成正比。

[0034] (b) 竞争模式: 可用于检测样品中存在的小分子抗原

[0035] 在免疫层析试纸条的制备过程中, 将荧光微球与待测物特异性抗体 A 相结合, 并喷涂在玻璃纤维膜上制成荧光微球垫; 将与待测物相同的抗原 (均含有抗体 A 可特异性结合的 A 位点) 固定于 NC 膜上作为检测带, 将二抗 (可与待测物特异性抗体 A 特异性结合的抗体) 固定于 NC 膜上作为质控带。当样品垫上加入样品时, 样品中的待测物与荧光微球-抗体 A 结合, 形成复合物荧光微球-抗体 A-待测物; 在毛细作用下, 复合物以及游离的荧光微球-抗体 A 与样品中的液体基质一起进入 NC 膜; 当经过检测带时, 游离的荧光微球-抗体 A 与检测带上的抗原结合形成免疫复合物并且固定于检测带上, 而复合物荧光微球-抗体 A-待测物不与检测带上的抗原结合, 在毛细作用下继续流动; 当经过质控带时, 抗体 A 与二抗发生免疫反应, 并把荧光微球-抗体 A-待测物固定于质控带上。用荧光分析仪

检测检测带与质控带的荧光强度,其中检测带的荧光强度与待测物浓度成反比。

[0036] 本发明的优点如下:

[0037] 1. 荧光物质被特定波长激发激发后,发生斯托克斯位移效应,能在较大波长发射光,因此荧光不受来自激发光本底的干扰,灵敏度大大高于紫外-可见分光光度法,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。荧光标记检测方法与这两种方法相比,还具有操作简便,检测快速,价格低廉等优点。

[0038] 2. 荧光微球是一种核壳双结构二氧化硅纳米粒子,有机染料位于内核,不受外界环境的影响,因而荧光稳定,为通过荧光进行定量检测提供了良好的条件,有力的克服了常规荧光微球的染料易泄露,抗溶液干扰能力差等缺点,增加了荧光稳定性和荧光寿命,扩大了可检测物的范围和种类。

[0039] 3. 荧光微球表面易修饰活性基团,可采用化学偶联方法标记一记抗体或抗原,形成抗体或抗原与微球的稳定结合。

[0040] 4. 通过 CCD 扫描技术或光纤技术将过滤后的发射光谱收集后,进行光电和模/数转换,再经过软件处理,最后以数字显示待测物浓度,从而实现定量检测。

附图说明

[0041] 图1是免疫层析试纸条的结构示意图

[0042] 图2是免疫层析检测卡的结构示意图

[0043] 图3是荧光微球免疫层析试纸检测原理图

[0044] 图4是一种简易荧光检测仪的检测原理及其结构示意图

[0045] 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抗体或抗原的玻璃纤维膜13、硝酸纤维素膜14、和吸水纸17,其中在硝酸纤维素膜14上有包被抗体或抗原的检测区15和包被有另一种抗体或抗原的质控区16。

[0046] 如图2所示,该免疫层析检测卡是单卡型的,由一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、质控线26、检测线27。

[0047] 如图1、2和3所示,检测原理如下:在样本垫12上滴加样品,样品溶解玻璃纤维膜13上喷涂的荧光微球标记抗体或抗原,通过毛细作用在纤维膜上向前泳动,同时样品中的待测物质与荧光微球标记物反应;反应溶液经过检测区15时,与检测区的包被物结合,而富集于该检测区;将试纸条放入检测窗口41,荧光微球43在光源42激发下,发射的荧光44通过单色光滤光片35滤过后,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。

[0048] 如图4所示,荧光微球免疫层析检测卡定量检测的检测步骤如下:

[0049] (1) 在检测卡的加样孔23中加入待检样品,反应10min后,将其放入检测窗口41。

[0050] (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。

[0051] (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处理后,样品

中待测物的浓度在数据输出 410 的显示屏上显示。

具体实施方式

[0052] 具体实施方式：

[0053] 1、罗丹明 B 正辛酯 - 聚苯乙烯荧光微球的制备

[0054] 称取 0.009g 过硫酸钾, 0.004gNaHCO₃ 溶于 7ml 去离子水中, 将 1mg 罗丹明 B 正辛酯溶于 2ml 无水乙醇及 1ml 苯乙烯后, 加入到水溶液中, 摇匀, 通氮气 5min, 放入 70℃ 恒温水浴震荡 24h 后, 取出, 离心 (10000rpm×10min) 分离出的聚合物分别用乙醇、去离子水离心洗涤 3 次, 即得到罗丹明 B 正辛酯 - 聚苯乙烯荧光微球。

[0055] 2、标记 CRP 单抗 S1 的荧光微球的制备 (EDC 法)

[0056] 取 1mg 包裹罗丹明 B 正辛酯荧光素的荧光微球在 1000×g 离心 10-15min, 收集沉淀, 用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 OD₄₅₀=0.2。然后加入 90 μL 50mg / mL 对乙基 -N,N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC), 150 μL 5mg / mL 氮经基嘧啶拍酞亚胺 (NHS), 振荡混匀, 室温孵育 10-30min 后, 1000×g 离心 5-15min, 沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解, 并调节微球浓度为 OD₄₅₀ 为 0.2-1。将 0.1mL 荧光微球中加入 1-10 μL CRP 单抗 C₁, 充分混匀后, 室温搅拌反应 3h, 分别用超纯水洗涤离心 3 次后, 沉淀用 0.01M pH7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 即为制备好的标记 CRP 单抗 C₁ 的荧光微球。

[0057] 3、荧光微球垫的制备

[0058] 用 BIODOT Dispensing System, 将标记 CRP 单抗 C₁ 的荧光微球按照 4 μL/cm 的量喷涂至玻璃纤维膜 (30×0.8cm) 上, 25℃ 真空干燥 1-2h, 放于干燥环境备用。

[0059] 4、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的制备

[0060] 用 0.01M pH7.4PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节 CRP 单抗 C₂ 的浓度为 0.5mg / mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测线; 用 0.01M pH7.2PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 调节抗鼠抗体的浓度为 0.5mg/mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.74 μL / cm, 两区相隔 5mm, 质控区距离 NC 膜一端 2mm, 37℃ 烘干过夜后, 于室温干燥环境下保存备用。

[0061] 5、荧光微球免疫层析检测卡的制备：

[0062] 组装试纸条：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 处理的玻璃纤维膜；(2) 喷涂有荧光微球标记的 CRP 单抗 C₁ 的荧光微球垫；(3) 有喷涂 CRP 单抗 C₂ 作为检测区和抗鼠抗体作为质控区的硝酸纤维素膜；(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。

[0063] 把一张免疫层析试纸条固定在塑料底卡上, 试纸表面用面卡压紧, 面卡在对应该试纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗。免疫层析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。

[0064] 6、荧光微球免疫层析定量检测人血清 CRP 浓度：

[0065] 标准曲线的绘制：将 CRP 标准品配制成一系列浓度 (5 个以上), 用同一批次的数张免疫层析检测卡检测各浓度的标准品溶液。以检测线的荧光强度为纵坐标, CRP 标准品溶液浓度为横坐标, 绘制一条标准曲线。将标准曲线和对应的标准质控线荧光强度保存在

荧光分析仪中。

[0066] 样品的检测：

[0067] (1) 平放检测卡，待测血清平衡至室温后，取其 50 μ L 加入加样孔中，于室温下反应 10min，将检测卡放入检测窗口。

[0068] (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。

[0069] (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。

[0070] (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，自动计算出待测血清中 CRP 浓度为 3.02ng / mL。

[0071] 取 10 个待检血清样本，分别用本发明所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测，

[0072] 将两种方法的检测结果进行比较，结果如下：单位为 ng / mL

[0073]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	1.5	3.0	4.9	8.6	9.9	13.9	22.3	29.6	30.9	35.3
免疫层析	2.7	3.2	6.8	9.5	9.4	12.9	22.1	27.8	35.9	34.6

[0074] 两组数据的相关系数是 $r=0.9913$ ，表明这两种方法的检测结果显著相关。本发明所述的荧光微球免疫层析检测卡可用于来进行快速定量检测 CRP。

[0075] 实施例二

[0076] 1、罗丹明 B 甲酯 - 聚苯乙烯荧光微球的制备

[0077] 称取 0.009g 过硫酸钾，0.004g NaHCO_3 溶于 7ml 去离子水中，将 1mg 罗丹明 B 甲酯溶于 2ml 无水乙醇及 1ml 苯乙烯后，加入到水溶液中，摇匀，通氮气 5min，放入 70 $^{\circ}$ C 恒温水浴震荡 24h 后，取出，离心 (10000rpm \times 10min) 分离出的聚合物分别用乙醇、去离子水离心洗涤 3 次，即得到罗丹明 B 甲酯 - 聚苯乙烯荧光微球。

[0078] 2、标记 S100 单抗的荧光微球的制备：

[0079] 取 1mg 罗丹明 B 甲酯 - 聚苯乙烯荧光微球在 1000 \times g 离心 10-15min，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 μ L 50mg / mL 对乙基 -N,N- 二甲基丙基碳二亚胺 (EDC)，150 μ L 5mg / mL 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，振荡混匀，室温孵育 10-30min 后，1000 \times g 离心 5-15min，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_{450} 为 0.2-1。将 0.1mL 荧光微球中加入 1-20 μ g S100 单抗，充分混匀后，室温搅拌反应 6h，分别用超纯水洗涤离心 3 次后，沉淀用 0.01M pH7.2 的 PBS 溶液 (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后，即为制备好的 S100 单抗的荧光微球。

[0080] 3、荧光微球垫的制备：

[0081] 用 BloDoT Dispensing System，将标记 S100 单抗的荧光微球按照 4 μ L / cm 的量喷涂至玻璃纤维膜 (30 \times 0.8cm) 上，25 $^{\circ}$ C 真空干燥 1-2h，放于干燥环境备用。

[0082] 4、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的制备:

[0083] 用 0.01M pH7.4PBs (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20 调节 S100 的浓度为 0.8mg / mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测线; 用 0.01M pH7.2PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5% 蔗糖和 0.05% 吐温 -20) 调节抗鼠抗体的浓度为 0.5mg / mL, 将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.74 μ L / cm, 两区相隔 5mm, 质控区距离 NC 膜一端 2mm, 37°C 烘干过夜后, 于室温干燥环境下保存备用。

[0084] 5、荧光微球免疫层析检测卡的制备:

[0085] 组装试纸条: 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% 吐温 20 处理的玻璃纤维膜; (2) 喷涂有荧光微球标记的 S100 单抗的荧光微球垫; (3) 有喷涂 S100 作为检测区和抗鼠抗体作为质控区的硝酸纤维素膜; (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。

[0086] 把一张免疫层析试纸条固定在塑料底卡上, 试纸表面用面卡压紧, 面卡在对应试纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗。免疫层析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。

[0087] 6、荧光微球免疫层析定量检测人血清 S100 浓度:

[0088] 标准曲线的绘制: 将 S100 标准品配制成一系列浓度 (5 个以上), 用同一批次的数张免疫层析检测卡检测各浓度的标准品溶液。以检测线的荧光强度为纵坐标, S100 标准品溶液浓度为横坐标, 绘制一条标准曲线。将标准曲线和对应的标准质控线荧光强度保存在荧光分析仪中。

[0089] 样品的检测:

[0090] (1) 平放检测卡, 待测血清平衡至室温后, 取其 50 μ L 加入加样孔中, 于室温下反应 10min 后, 将检测卡放入检测窗口。

[0091] (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。

[0092] (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。

[0093] (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, 自动计算出待测血清中 S100 浓度为 5.9ng / mL。

[0094] 取 10 个待检血清样本, 分别用本发明所述的荧光微球免疫层析检测卡和 ELISA 检测,

[0095] 将两种方法的检测结果进行比较, 结果如下: 单位为 ng/mL

[0096]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	1.6	3.0	5.5	8.6	10.6	13.5	21.2	28.5	30.6	35.6
免疫层析	2.8	3.6	7.7	9.6	10.2	13.8	18.3	22.5	33.6	38.1

[0097] 两组数据的相关系数是 $r = 0.9750$, 表明这两种方法的检测结果显著相关。本发明所述

[0098] 的荧光微球免疫层析检测卡可用于来进行快速定量检测 S100。

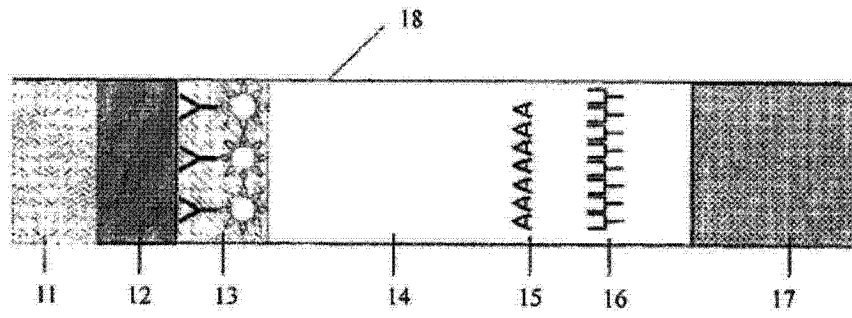


图 1

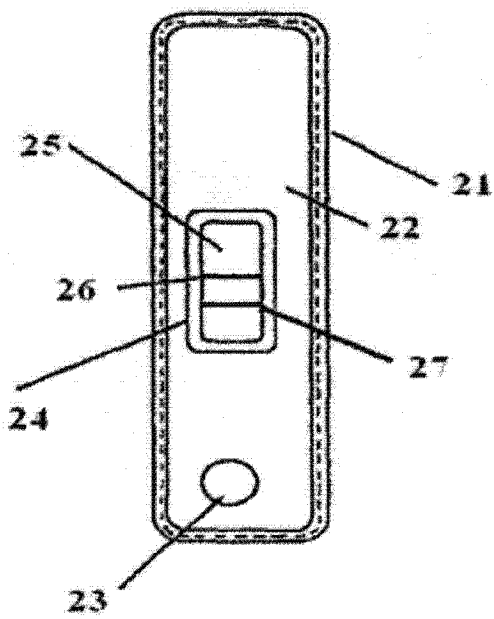


图 2

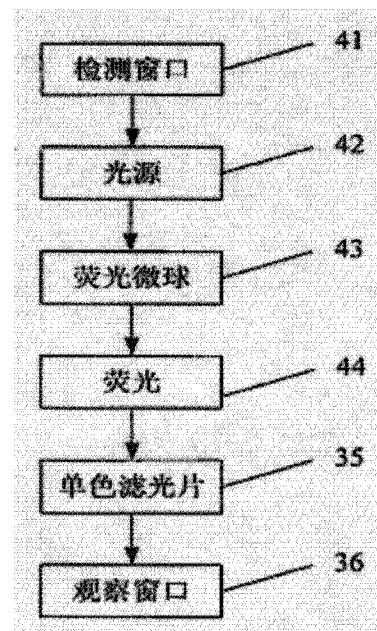


图 3

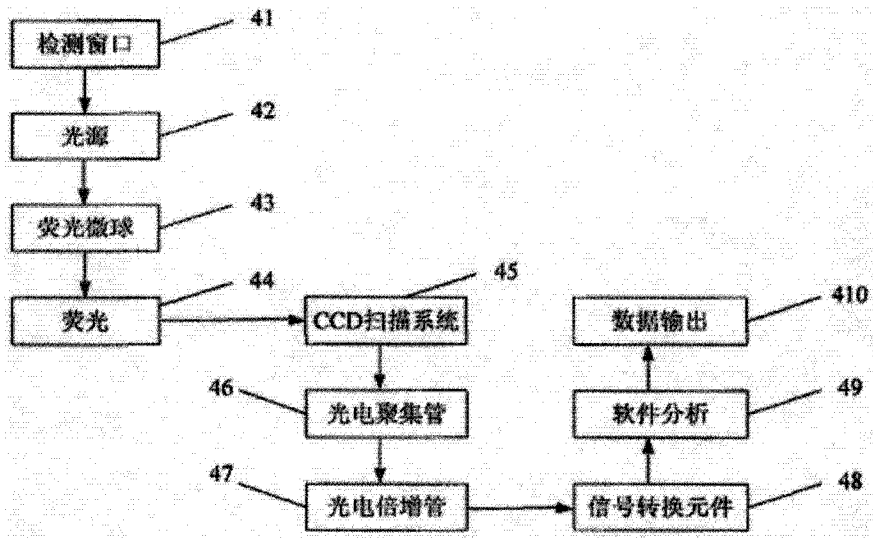


图 4

专利名称(译)	一种荧光微球免疫层析试纸条的制备及定量检测方法		
公开(公告)号	CN104977409A	公开(公告)日	2015-10-14
申请号	CN201410136325.2	申请日	2014-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	刘宏飞		
申请(专利权)人(译)	刘宏飞		
当前申请(专利权)人(译)	刘宏飞		
[标]发明人	刘宏飞		
发明人	刘宏飞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种荧光微球免疫层析试纸条的制备方法及定量检测方法。本发明以无皂乳液聚合法制备的发光纳米粒子为标记，采用免疫层析技术，制备荧光微球免疫层析试纸条，然后制成构成包括样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸的检测卡，其中硝酸纤维素膜上固定有检测线和质控线。在检测过程中，采用荧光微球最佳激发光源进行激发，发射出的荧光经过滤光片后，用CCD扫描技术或光纤技术，将发射光谱收集、聚集和倍增后，转换成数值信号，再将测定的检测线荧光强度乘以校正系数，把校正后的荧光强度代入预先设置在荧光分析仪中的标准曲线，即可通过荧光分析仪自动计算获得样本中待测物的浓度。本发明灵敏度高、定量准确、操作方便。

