

# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103226143 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 31

(21) 申请号 201310117151. 0

(22) 申请日 2013. 04. 07

(71) 申请人 南京基蛋生物科技有限公司  
地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业  
开发区博富路 9 号

(72) 发明人 苏恩本 王勇 焦丽蓉

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

## (54) 发明名称

一种干式免疫检测试纸条及其制备方法与应用

## (57) 摘要

本发明涉及一种干式免疫检测试纸条及其制备方法与应用。该试纸条在塑料底衬上从左到右依次粘有样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,硝酸纤维素膜右端设有相互平行的质控线和检测线;硝酸纤维素膜左端设有示踪粒子标记抗体/抗原包被线和封闭蛋白线 I,封闭蛋白线 I 为封闭蛋白液 I 包被硝酸纤维素膜形成的线,抗体/抗原包被线为示踪粒子标记抗体/抗原喷到封闭蛋白线 II 上形成的线,其中,封闭蛋白线 II 为封闭蛋白液 II 包被硝酸纤维素膜形成的线。该试纸条应用于双抗夹心法或者竞争法原理的免疫检测,操作简单、层析迅速、特异性强、检测结果准确、稳定性强。



1. 一种干式免疫检测试纸条,其特征在于,在塑料底衬上从左到右依次粘有样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,硝酸纤维素膜右端设有相互平行的质控线和检测线;硝酸纤维素膜左端设有示踪粒子标记抗体/抗原包被线和封闭蛋白线 I,封闭蛋白线 I 为封闭蛋白液 I 包被硝酸纤维素膜形成的线,抗体/抗原包被线为示踪粒子标记抗体/抗原喷到封闭蛋白线 II 上形成的线,其中,封闭蛋白线 II 为封闭蛋白液 II 包被硝酸纤维素膜形成的线。

2. 根据权利要求 1 所述的一种干式免疫检测试纸条,其特征在于所述的示踪粒子为胶体金颗粒、荧光颗粒、胶乳颗粒、磁性颗粒中的任意一种。

3. 根据权利要求 1 所述的一种干式免疫检测试纸条,其特征在于所述的检测线上包被有抗体或抗原。

4. 一种干式免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)样品垫的制备:将样品垫用 100mmol/L PBS 缓冲液浸泡 2~4 小时,取出后 25℃干燥 8 小时;

(2)硝酸纤维素膜的处理:

A、检测线的制备:将待测物质相对应的抗原/抗体用 20mmol/L pH7.2 的 PB 缓冲液稀释到 2.0mg/ml 的浓度,0.8ul/cm 在离硝酸纤维素膜右端 4.0cm 处划线得到检测线;

B、质控线的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 4mg/ml 的浓度,0.8ul/cm 在硝酸纤维素膜右端 3.5cm 处划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔 5mm,然后在干燥箱内 20℃鼓风干燥 12h;

C、封闭蛋白线的制备:将封闭蛋白液 I 包被于硝酸纤维素膜左端 6mm 处,包被量为 1.5ul/cm;

D、示踪粒子标记抗体/抗原包被线的制备:采用封闭蛋白液 II 划线于硝酸纤维素膜左端 1.5mm 处,包被量为 1.3ul/cm,置于 25℃干燥 2h,然后用示踪粒子标记的抗体/抗原在封闭蛋白 II 的位置划线置于 25℃干燥 4h,密封干燥保存;

(3)吸水垫的制备:吸水纸裁剪成 30\*2.7cm 每条;

(4)组装:将上述硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫粘贴在塑料底衬上,将贴好的中间物用斩切机切成一定宽度的试纸条。

5. 根据权利要求 4 所述的一种干式免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于所述封闭蛋白液 I 与封闭蛋白液 II 均包含酪蛋白与 BSA。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的一种干式免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于所述的封闭蛋白液 I 的制备方法:用三蒸水溶解质量比为 1:5-2:1 的酪蛋白与 BSA,然后配置成浓度不高于 15% 的溶液。

7. 根据权利要求 4 或 5 所述的一种干式免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于所述的封闭蛋白液 II 的制备方法:用三蒸水溶解质量比为 1:5-1:1 的酪蛋白与 BSA,然后配置成浓度不高于 15% 的溶液。

8. 一种干式免疫检测试纸条应用于双抗夹心法或者竞争法原理的免疫定量检测。

## 一种干式免疫检测试纸条及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于临床医学诊断领域,具体涉及一种干式免疫检测检测试纸条及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 现如今干式免疫定量检测一般由体外免疫层析试剂条进行检测,试纸条主要是将亲和技术、印记技术、免疫标记和层析技术的组合,一般包括样品垫、滤血膜、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫等四层到五层(四层一般将滤血功能与样品垫组合),示踪粒子(胶体金、荧光等)标记的抗体包被在结合垫上。

[0003] 专利 CN102192983A 对传统的免疫层析膜的结合方式进行了改变,变成三膜系统——GE 公司旗下 Whatman 开发的膜 Fusion5、硝酸纤维素膜、吸水纸,有效地提高了检测的灵敏度和特异性。然而,膜 Fusion5 孔径较大,抗体难以固定需要制备特殊的 STONE 用以固定抗体,工艺较为复杂,同时通过专利 CN102192983A 制备的试纸条层析的时间需要十分钟,检测时间长。

### 发明内容

[0004] 本发明针对现有技术的不足,提供了一种操作简单、层析迅速、特异性强、检测结果准确、稳定性强的干式免疫检测试纸条及其制备方法与应用。

[0005] 本发明通过以下技术方案实现:一种干式免疫检测试纸条,在塑料底衬上从左到右依次粘有样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,硝酸纤维素膜右端设有相互平行的质控线和检测线;硝酸纤维素膜左端设有示踪粒子标记抗体/抗原包被线和封闭蛋白线 I,封闭蛋白线 I 为封闭蛋白液 I 包被硝酸纤维素膜形成的线,抗体/抗原包被线为示踪粒子标记抗体/抗原喷到封闭蛋白线 II 上形成的线,其中,封闭蛋白线 II 为封闭蛋白液 II 包被硝酸纤维素膜形成的线。

[0006] 所述的检测线上包被有抗体或抗原,检测线上包被有抗体为针对待测抗原的单抗或多抗,或者为针对待测抗体的抗原的单抗或多抗;检测线上包被抗原为待测抗原的竞争性抗原。

[0007] 所述的示踪粒子为胶体金颗粒、荧光颗粒、胶乳颗粒、磁性颗粒中的任意一种。

[0008] 所述的荧光颗粒可以是荧光素(cy5、cy7)、羧基荧光素、2-甲氧基荧光素、罗丹明、藻红蛋白、量子点中的一种。

[0009] 所述封闭蛋白液 I 与封闭蛋白液 II 均包含酪蛋白与 BSA。

[0010] 所述的封闭蛋白液 I 的制备方法:用三蒸水溶解质量比为 1:5-2:1 的酪蛋白与 BSA,然后配置成浓度不高于 15% 的溶液。

[0011] 所述的封闭蛋白液 II 的制备方法:用三蒸水溶解质量比为 1:5-1:1 的酪蛋白与 BSA,然后配置成浓度不高于 15% 的溶液。

[0012] 本发明公开了一种干式免疫检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)样品垫的制备:将样品垫用 100mmol/L pH7.2 PBS 缓冲液浸泡 2 ~ 4 小时,取出后 25℃干燥 8 小时。

[0013] (2)硝酸纤维素膜的处理:

A、检测线的制备:将待测物质相对应的抗原 / 抗体用 20mmol/L pH7.2 的 PB 缓冲液稀释到 2.0mg/ml 的浓度,0.8ul/cm 在离硝酸纤维素膜右端 4.0cm 处划线得到检测线;

B、质控线的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 4mg/ml 的浓度,0.8ul/cm 在硝酸纤维素膜右端 3.5cm 处划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔 5mm,然后在干燥箱内 20℃鼓风干燥 12h;

C、封闭蛋白线的制备:将封闭蛋白液 I 包被于硝酸纤维素膜左端 6mm 处,包被量为 1.5ul/cm;

D、示踪粒子标记抗体 / 抗原包被线的制备:采用封闭蛋白液 II 划线于硝酸纤维素膜左端 1.5mm 处,包被量为 1.3ul/cm,置于 25℃干燥 2h,然后用示踪粒子标记的抗体 / 抗原在封闭蛋白 II 的位置划线置于 25℃干燥 4h,密封干燥保存。

[0014] (3)吸水垫的制备:吸水纸裁剪成 30\*2.7cm 每条。

[0015] (4)组装:塑料底衬,样品垫和吸水纸为本领域通用的部件。将上述硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫粘贴在塑料底衬上,将贴好的中间物用斩切机切成一定宽度的试纸条。

[0016] 本发明公开了一种干式免疫检测试纸条的应用,所述的干式免疫检测试纸条通过双抗夹心法或者竞争法原理定量测定待测物质,适用于所有的采用双抗夹心或竞争法模式的心肌类、肾脏类、肿瘤类、传染病类等疾病的诊断。

[0017] 本发明通过采用包被于硝酸纤维素膜上的示踪粒子标记抗体包被线,且采用封闭蛋白线的方式取代常用的包被示踪粒子标记抗体的结合垫,一方面层析时间只需 45s-60s,检测时间大大缩短、特异性与稳定性加强、检测结果更加准确,另一方面,还大大节约了材料,节省了成本。

## 附图说明

[0018] 图 1:本发明干式免疫检测试纸条结构示意图;

图 2:C 反应蛋白胶体金检测试纸条的标准曲线;

图 3:胱抑素 C 荧光检测试纸的标准曲线;

图 4:甲胎蛋白荧光检测试纸的标准曲线;

其中,图 1:1、样品垫;2、吸水垫;3、硝酸纤维素膜;4、检测线;5、质控线;6、包被线;7、封闭蛋白线 I。

## 具体实施方式

[0019] 通过以下具体实施例对本发明作进一步阐述,以下实施例仅用于说明,而不用用于限制本发明的保护范围。

[0020] 实施例 1 C 反应蛋白胶体金检测试纸的制备与使用

1、C 反应蛋白胶体金检测试纸的制备

(1)胶体金-抗体复合物的制备

a、制备生物素化 C 反应蛋白(CRP)单克隆抗体复合物:先用 6-氨基己糖与生物素连接

制得长臂生物素,按照每毫升鼠抗人CRP单克隆抗体加80 $\mu$ g生物素加入进行反应1h,生成长臂生物素N-羟基丁二酰胺酯,即为生物素化CRP单克隆抗体复合物,通过1%BSA pH7.5透析出去游离生物素;

b、制备胶体金标记亲和素:用1%碳酸钾溶液调节胶体金pH值至7.5,按照10 $\mu$ g链亲和素/ml胶体金的量加入链亲和素溶液充分混匀,置于25 $^{\circ}$ C水浴反应30分钟后再加入5%BSA,封闭20分钟后,离心取沉淀,用BSA恢复其终浓度为1%,4 $^{\circ}$ C保存备用;

c、胶体金-抗体复合物的制备:按50 $\mu$ g CRP单抗-生物素/ml胶体金的量将抗体-生物素加入胶体金中,37 $^{\circ}$ C搅拌反应40分钟,加入5%BSA,封闭搅拌20分钟,6000r/min离心20分钟,弃上清,沉淀以金标抗体保存液恢复体积,4 $^{\circ}$ C保存。

#### [0021] (2) 封闭蛋白液的制备

封闭蛋白液I的制备方法:用三蒸水溶解质量比为1:5的酪蛋白与BSA,然后配置成浓度3%的溶液。

[0022] 封闭蛋白液II的制备方法:用三蒸水溶解质量比为1:1的酪蛋白与BSA,然后配置成浓度5%的溶液。

#### [0023] (3) 免疫层析试纸条的组装

##### a、硝酸纤维素膜的处理

检测线的制备:将鼠抗人C反应蛋白单克隆抗体用20mmol/L pH7.2的PB缓冲液稀释到2.0mg/ml的浓度,0.8 $\mu$ l/cm在离硝酸纤维素膜右端4.0cm处划线得到检测线。

[0024] 质控线的制备:将兔抗鼠IgG抗体按4mg/ml的浓度,0.8 $\mu$ l/cm在硝酸纤维素膜右端3.5cm处划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔5mm,然后在干燥箱内20 $^{\circ}$ C鼓风干燥12h。

[0025] 封闭蛋白液:将封闭蛋白液I包被于硝酸纤维素膜左端6mm处,包被量为1.5 $\mu$ l/cm。

[0026] 胶体金抗体包被线:采用封闭蛋白液II包被上述处理的硝酸纤维素膜,包被于膜左端1.5mm处,包被量为1.3 $\mu$ l/cm,置于25 $^{\circ}$ C干燥2h,然后用胶体金-抗体复合物在封闭蛋白II的位置划线置于25 $^{\circ}$ C干燥4h,密封干燥保存。

##### [0027] b、样品垫的制备

将样品垫用100mmol/L PBS缓冲液浸泡2~4小时,取出后25 $^{\circ}$ C干燥8小时。

##### [0028] c、吸水垫的制备

吸水纸裁剪成30\*2.7cm每条。

##### [0029] d、组装

塑料底衬、样品垫和吸水纸为本领域通用的部件。将上述硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫粘贴在塑料底衬上(如附图1)。将贴好的中间物用斩切机切成5.6cm宽一条的试纸条。

#### [0030] 2、CRP胶体金检测试纸条的使用

##### (1) 定性检测

把待检样品滴加在本试纸条的样品垫上,45s-60s后即可出现定性结果:若在试纸的质控线和检测线的位置处分别出现一条紫红色的条带,表明待检液中含有相应的抗原即为阳性样品;若仅在试纸的质控线位置处出现紫红色的条带,表明待检液中含有相应的抗原在检测下限以下即为阴性样品;若在试纸的质控线和检测线的位置处都无紫红色的条带出

现,表明该检测结果为无效结果。

[0031] (2) 定量检测

a、标准曲线的绘制

制备好的 CRP 胶体金检测试纸条样品垫上加入不同浓度 CRP 抗原标准品(取六个不同浓度,分别为 0.5、1、3、10、100、200mg/L,每个浓度设 3 个重复),60 s 后,通过南京基蛋生物科技有限公司的 FIA8100 系列免疫定量分析仪读取信号,实验结果及分析见表 1:

表 1 CRP 标准品检测结果

CRP 标准品 (mg/L)		0.5	1	3	10	100	200
样品 信号	1	66	115	292	400	1448	2279
	2	63	116	295	401	1445	2279
	3	68	119	293	406	1442	2284
Mean		65.67	116.67	293.33	402.33	1445	2280.67
SD		2.51	2.08	1.52	3.21	3	2.88

以 CRP 抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,如图 2 所示。由图 2 的标准曲线可知,相关系数  $r$  为 0.9907,线性较好,通过该标准曲线可对样品中的所含的 CRP 蛋白的浓度进行定量分析。

[0032] b、重复性与准确性

配制 3.0mg/L 和 10 mg/L 的 CRP 标准品溶液,采用本 CRP 胶体金检测试纸条进行测定,各浓度分别重复测定 10 次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果(表 2)显示变异系数分别为 0.87% 和 1.10%;以  $(1 - \text{均值} / \text{标准值}) \times 100\%$  计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为 0.17% 和 0.27%。

[0033] 表 2 CRP 胶体金检测试纸条重复性和准确性实验

序号	标准值 3.0mg/L	标准值 10.0mg/L
1	2.98	9.89
2	3.01	10.04
3	3.02	9.96
4	2.96	9.92
5	2.96	10.10
6	3.01	10.08
7	3.04	9.95
8	3.00	9.89
9	2.99	10.12
10	2.98	9.78
平均值	2.995	9.973
标准差	0.0259	0.1097
变异系数 (%)	0.87%	1.10%
相对偏差 (%)	0.17%	0.27%

#### c、不同时间差异性测定

配制浓度点为 10mg/L 的样本,在加样后分别于 1min,3min,5min,10min,20min,30min 使用 FIA8100 系列免疫定量分析仪重复测定,比较不同时间检测浓度差异,计算相对偏差(不同时间点测得浓度值 / 第一时间测得浓度值),结果见表 3。结果显示试纸条,在 1-30min 内时间差异性较小,其稳定性较好。

[0034] 表 3 CRP 胶体金检测试纸条不同时间差异性

时间	1min	3min	5min	10min	20min	30min
浓度	9.8	9.9	9.8	9.8	10	9.9
相对偏差	0	1.02%	0	0	2.04%	1.02%

#### d、精密度

测定 2 个浓度样本的 10 次批内差 CV,试验结果见表 2,结果表明,试纸条 3.0mg/L、10.0mg/L 批内差 CV 分别为 0.87%、1.10%,因此批内精密度均小于 10%。

[0035] 采用本 CRP 胶体金检测试纸条检测范围为 0.5-200mg/L,批间精密度小于 15%,可同时检测全血、血清、血浆样本,而对血红蛋白、心肌肌钙蛋白、NGAL 蛋白无检测影响。

[0036] 本实施例采用的胶体金双抗夹心法还可以适用于其他所有的采用双抗夹心模式的免疫层析检测,包括心肌肌钙蛋白 I、肌红蛋白、NGAL、CEA、乙肝表面抗原等。

#### [0037] 实施例 2 胱抑素 C 荧光检测试纸条的制备与使用

##### 1、胱抑素 C (CysC) 荧光检测试纸的制备

##### (1) 荧光胶乳微球标记胱抑素 C 抗体

a、荧光胶乳微球的制备:用吸附缓冲液(50mmol/L、pH5.8 的柠檬酸盐缓冲液)稀释粒径为 400nm 胶乳微球至终浓度 30mg/ml,体积为 6ml,制得胶乳微球悬浮液;添加适量的红色荧光素罗丹明标记链霉亲和素(购自上海酶联生物科技有限公司)在吸附缓冲液里,终体

积为 6ml ;将上述胶乳微球悬浮液加入到上述含有红色荧光素罗丹明标记链霉亲和素的吸附缓冲液中,制得混合液;将所得混合液在室温下温浴 1-2 小时,并不断搅拌,然后离心,收集沉淀,沉淀用储存缓冲液(含有 0.06%BSA 的吸附缓冲液)溶解,放置 4℃保存,备用。

[0038] b、生物素化胱抑素 C 抗体的制备:将胱抑素 C 抗体用 0.1mol/L、pH8.0 碳酸氢钠缓冲液稀释至 1mg/ml,交互用 0.1mol/L、pH8.0 碳酸氢钠缓冲液对胱抑素 C 抗体充分透析;用 1ml DMSO 溶解 1mg 的 NHSB,得到 NHSB 溶液;向上述 1ml 胱抑素 C 加入 25 μl NHSB 溶液,室温搅拌 2-4 小时,继续室温搅拌 10 分钟,然后用 20mmol/L、pH7.2 PBS 缓冲液透析,即得生物素化胱抑素 C 抗体。

[0039] c、荧光胶乳微球标记胱抑素 C 抗体的制备

将上述步骤 a 制得的荧光胶乳微球和步骤 b 制得的生物素化胱抑素 C 抗体混合均匀,反应 30 分钟后离心,沉淀用储存缓冲液溶解,恢复至原体积。

[0040] (2) 封闭蛋白液的制备

封闭蛋白液 I 的制备方法:用三蒸水溶解质量比为 2:1 的酪蛋白与 BSA,然后配置成浓度 2% 的溶液。

[0041] 封闭蛋白液 II 的制备方法:用三蒸水溶解质量比为 1:5 的酪蛋白与 BSA,然后配置成浓度 6% 的溶液。

[0042] (3) 免疫层析试纸条的组装

a、硝酸纤维素膜的处理

检测线的制备:将胱抑素 C 单克隆抗体用 20mmol/L pH7.2 的 PB 缓冲液稀释到 2.0mg/ml 的浓度,0.8ul/cm 在离硝酸纤维素膜右端 4.0cm 处划线得到检测线。

[0043] 质控线的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 4mg/ml 的浓度,0.8ul/cm 在硝酸纤维素膜右端 3.5cm 处划质控线,该线与检测线平行,与检测线间隔 5mm,然后在干燥箱内 20℃鼓风干燥 12h,密封干燥保存。

[0044] 封闭蛋白液:将封闭蛋白液 I 包被于硝酸纤维素膜左端 6mm 处,包被量为 1.5ul/cm。

[0045] 荧光胶乳微球标记胱抑素 C 抗体包被线:采用封闭蛋白液 II 包被于硝酸纤维素膜左端 1.5mm 处,包被量为 1.3ul/cm,置于 25℃干燥 2h,然后用荧光胶乳微球标记胱抑素 C 抗体按 2 μl/cm<sup>3</sup> 的用量喷在封闭蛋白 II 的位置,置于 25℃干燥 4h,备用。

[0046] b、样品垫的制备

将样品垫用 100mmol/L PBS 缓冲液浸泡 2~4 小时,取出后 25℃干燥 8 小时。

[0047] c、吸水垫的制备

吸水纸裁剪成 30\*2.7cm 每条。

[0048] d、组装

塑料底衬、样品垫和吸水纸为本领域通用的部件。将上述硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫粘贴在塑料底衬上(如附图 1)。将贴好的中间物用斩切机切成 5.6cm 宽一条的试纸条。

[0049] 2、胱抑素 C 荧光检测试纸条的使用

(1) a、标准曲线的绘制

制备好的胱抑素 C 荧光检测试纸条样品垫上加入不同浓度胱抑素 C 抗原标准品(取五个不同浓度,分别为 0.5、1、2、5、10mg/L,每个浓度设 3 个重复),60 s 后,通过南京基蛋生

物科技有限公司的荧光免疫定量分析仪 Getein1100 读取信号,实验结果及分析见表 4:

表 4 CysC 标准品检测结果

CysC 标准品 (mg/L)		0.5	1	2	5	10
样品 信号	1	50	192	552	1196	2428
	2	50	191	550	1201	2429
	3	49	192	552	1199	2434
Mean		49.67	191.67	551.33	1198.67	2430.33
SD		0.58	0.58	1.15	2.51	3.21

以胱抑素 C 抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,如图 3 所示。由图 3 的标准曲线可知,相关系数  $r$  为 0.9986,线性较好,通过该标准曲线可对样品中的所含的胱抑素 C 蛋白的浓度进行定量分析。

[0050] b、重复性与准确性

配制 1.0mg/L 和 5.0mg/L 的胱抑素 C 标准品溶液,采用本胱抑素 C 荧光检测试纸条进行测定,各浓度分别重复测定 10 次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果(表 5)显示变异系数分别为 2.40% 和 2.05%;以  $(1 - \text{均值} / \text{标准值}) \times 100\%$  计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为 0.9% 和 0.28%。

[0051] 表 5 胱抑素 C 荧光检测试纸重复性和准确性实验

序号	标准值 1.0mg/L	标准值 5.0mg/L
1	0.96	4.98
2	0.98	5.12
3	1.01	4.96
4	1.00	4.95
5	0.99	5.19
6	0.98	4.95
平均值	0.991	5.014
标准差	0.0238	0.1030
变异系数 (%)	2.40%	2.05%
相对偏差 (%)	0.9%	0.28%

c、不同时间差异性测定

配制浓度为 5.0mg/L 的样本,在加样后分别于 1min,3min,5min,10min,20min,30min 使用荧光免疫定量分析仪 Getein1100 重复测定,比较不同时间检测浓度差异,计算相对偏差(不同时间点测得浓度值 / 第一时间测得浓度值)。由表 6 可知,试纸条在 1-30min 检测的结果变化不大,时间差异性较小。

[0052] 表 6 胱抑素 C 荧光检测试纸不同时间差异性

时间	1min	3min	5min	10min	20min	30min
浓度	4.9	5.1	4.8	4.8	5.0	5.1
相对偏差	0	4.08%	2.04%	2.04%	2.04%	4.08%

#### d、精密度

测定 2 个浓度样本的 10 次批内差 CV, 试验结果见表 5, 结果表明, 试纸条 1.0mg/L、5.0mg/L 批内差 CV 分别为 2.40%、2.05%。

[0053] 采用本脘抑素 C 荧光检测试纸条检测范围为 0.5-10mg/L, 批内精密度小于 10%, 批间精密度小于 15%, 可同时检测全血、血清、血浆样本, 而对血红蛋白、心肌肌钙蛋白、NGAL 蛋白无检测影响。

#### [0054] 实施例 3 甲胎蛋白(AFP) 荧光检测试纸条的制备与使用

##### 1、甲胎蛋白荧光检测试纸的制备

##### (1) 荧光胶乳微球标记甲胎蛋白(AFP) 抗体

a、荧光胶乳微球的制备: 用吸附缓冲液(50mmol/L、pH5.8 的柠檬酸盐缓冲液) 稀释粒径为 200nm 胶乳微球至终浓度 30mg/ml, 体积为 6ml, 制得胶乳微球悬浮液; 添加适量的荧光素 Cy5 在吸附缓冲液里, 终体积为 6ml; 将上述胶乳微球悬浮液加入到上述含有荧光素 Cy5 标记链霉亲和素的吸附缓冲液中, 制得混合液; 将所得混合液在室温下温浴 1-2 小时, 并不断搅拌, 然后离心, 收集沉淀, 沉淀用储存缓冲液(含有 0.06%BSA 的吸附缓冲液) 溶解, 放置 4℃ 保存, 备用。

[0055] b、生物素化甲胎蛋白抗体的制备: 将抗甲胎蛋白抗体用 0.1mol/L、pH8.0 碳酸氢钠缓冲液稀释至 1mg/ml, 交互用 0.1mol/L、pH8.0 碳酸氢钠缓冲液对甲胎蛋白抗体充分透析; 用 1ml DMSO 溶解 1mg 的 NHSB, 得到 NHSB 溶液; 向上述 1ml 甲胎蛋白抗体加入 25  $\mu$ l NHSB 溶液, 室温搅拌 2-4 小时, 继续室温搅拌 10 分钟, 然后用 20mmol/L、pH7.2 PBS 缓冲液透析, 即得生物素化甲胎蛋白抗体。

##### [0056] c、荧光胶乳微球标记甲胎蛋白抗体的制备

将上述步骤 a 制得的荧光胶乳微球和步骤 b 制得的生物素化甲胎蛋白抗体混合在一起, 反应 30 分钟后离心, 沉淀用储存缓冲液溶解, 恢复至原体积。

##### [0057] (2) 封闭蛋白液的制备

封闭蛋白液 I 的制备方法: 用三蒸水溶解质量比为 1:1 的酪蛋白与 BSA, 然后配置成浓度 5% 的溶液。

[0058] 封闭蛋白液 II 的制备方法: 用三蒸水溶解质量比为 1:1 的酪蛋白与 BSA, 然后配置成浓度 5% 的溶液。

##### [0059] (3) 免疫层析试纸条的组装

##### a、硝酸纤维素膜的处理

检测线的制备: 将甲胎蛋白抗体单克隆抗体用 20mmol/L pH7.2 的 PB 缓冲液稀释到 2.0mg/ml 的浓度, 0.8  $\mu$ l/cm 在硝酸纤维素膜右端 4.0cm 处划线得到检测线。

[0060] 质控线的制备: 将兔抗鼠 IgG 抗体按 4mg/ml 的浓度, 0.8  $\mu$ l/cm 在硝酸纤维素膜右端 3.5cm 处划质控线, 该线与检测线平行, 与检测线间隔 5mm, 然后在干燥箱内 20℃ 鼓风干燥 12h, 密封干燥保存。

[0061] 封闭蛋白线 I :将封闭蛋白液 I 包被于硝酸纤维素膜左端 6mm 处,包被量为 1.5ul/cm。

[0062] 荧光胶乳微球抗体包被线 :采用封闭蛋白液 II 包被于硝酸纤维素膜左端 1.5mm 处,包被量为 1.3ul/cm,置于 25℃干燥 2h,然后用荧光胶乳微球标记的甲胎蛋白抗体按 2 $\mu$ l/cm<sup>3</sup> 的用量喷在封闭蛋白 II 的位置,置于 25℃干燥 4h,备用。

[0063] b、样品垫的制备

将样品垫用 100mmol/L PBS 缓冲液浸泡 2 ~ 4 小时,取出后 25℃干燥 8 小时。

[0064] c、吸水垫的制备

吸水纸裁剪成 30\*2.7cm 每条。

[0065] d、组装

塑料底衬、样品垫和吸水纸为本领域通用的部件。将上述硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫粘贴在塑料底衬上(如附图 1)。将贴好的中间物用斩切机切成 5.6cm 宽一条的试纸条。

[0066] 2、甲胎蛋白荧光检测试纸条的使用

(1) a、标准曲线的绘制

制备好的甲胎蛋白荧光检测试纸条样品垫上加入不同浓度甲胎蛋白抗原标准品(取五个不同浓度,分别为 30、60、120、240、480、960ng/ml,每个浓度设 3 个重复),60 s 后,通过南京基蛋生物科技有限公司的荧光免疫定量分析仪 Getein1100 读取信号,实验结果及分析见表 7:

表 7 AFP 标准品检测结果

AFP 标准品 (ng/ml)		30	60	120	240	480	960
样品 信号	1	51	125	202	522	1089	2415
	2	50	125	201	530	1096	2408
	3	53	125	202	522	1102	2418
Mean		51.33	125.67	201.67	524.67	1095.67	2413.67
SD		1.53	1.15	0.58	4.62	6.51	5.13

以甲胎蛋白抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,如图 4 所示。由图 4 的标准曲线可知,相关系数 r 为 0.9988,线性较好,通过该标准曲线可对样品中的所含的甲胎蛋白的浓度进行定量分析。

[0067] b、重复性与准确性

配制 120ng/ml 和 480ng/ml 的甲胎蛋白标准品溶液,采用本甲胎蛋白荧光检测试纸条进行测定,各浓度分别重复测定 10 次,分别计算测定均值和标准差。计算变异系数进行重复性考察,结果(表 8)显示变异系数分别为 2.11% 和 2.40%;以(1—均值 / 标准值)×100% 计算相对偏差进行准确度考察,相对偏差分别为 -0.68% 和 -0.15%。

[0068] 表 8 甲胎蛋白荧光检测试纸重复性和准确性实验

序号	标准值 120ng/ml	标准值 480ng/ml
1	119.58	460.26
2	123.15	486.54
3	118.86	492.52
4	116.95	487.28
5	121.04	488.15
6	124.24	485.58
7	123.69	483.02
8	117.65	489.14
9	122.41	462.25
10	120.58	472.66
平均值	120.82	480.74
标准差	2.5474	11.5271
变异系数 (%)	2.11	2.40
相对偏差 (%)	-0.68%	-0.15%

#### c、不同时间差异性测定

配制浓度点为 480ng/ml 的样本,在加样后分别于 1min,3min,5min,10min,20min,30min 使用荧光免疫定量分析仪 Getein1100 重复测定,比较不同时间检测浓度差异,计算相对偏差(不同时间点,测得浓度值/第一时间测得浓度值),由表 9 可知,试纸条在 1-30min 检测的结果变化不大,时间差异性较小。

[0069] 表 9 甲胎蛋白荧光检测试纸不同时间差异性

时间	1min	3min	5min	10min	20min	30min
浓度	478.58	479.63	477.96	480.14	480.19	479.01
相对偏差	0	0.22%	-0.35%	0.46%	0.01%	-0.25%

#### d、精密度

测定 2 个浓度样本的 10 次批内差 CV,试验结果见表 8,结果表明,试纸条 120ng/ml、480ng/ml 批内差 CV 分别为 2.11% 和 2.40%。

[0070] 采用本甲胎蛋白荧光检测试纸条检测范围为 30-960 ng/ml,批内精密度小于 10%,批间精密小于 15%,可同时检测全血、血清、血浆样本,而对血红蛋白、心肌肌钙蛋白、NGAL 蛋白无检测影响。

[0071] 本实施例 2 与实施例 3 均采用荧光法双抗夹心法,该方法还适用于其他所有的采用双抗夹心模式的免疫层析检测,包括 CRP、心肌肌钙蛋白 I、肌红蛋白、NGAL、CEA、乙肝表面抗原等。

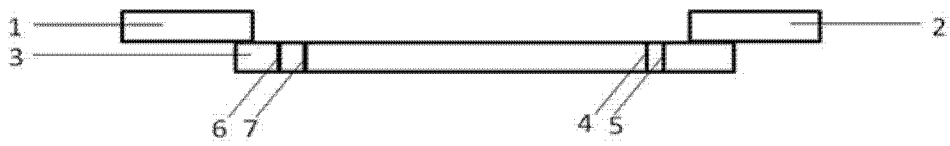


图 1

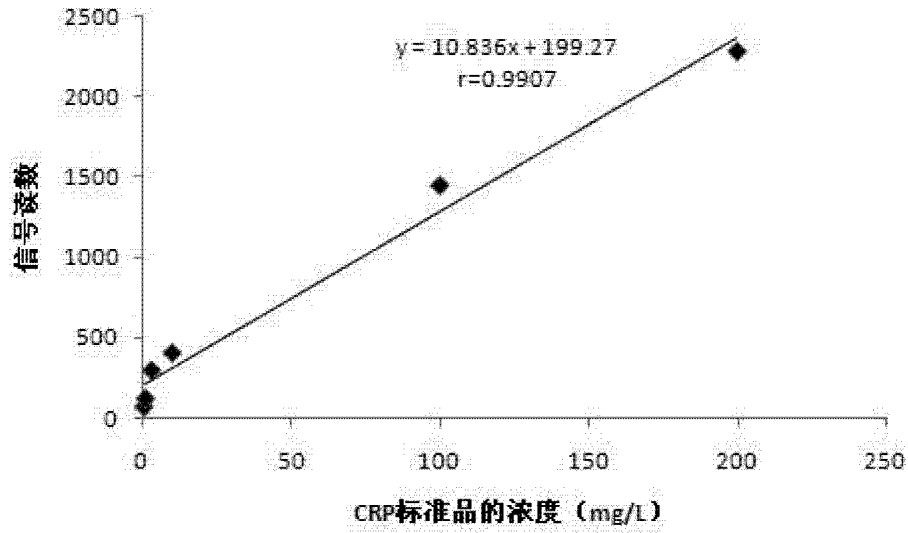


图 2

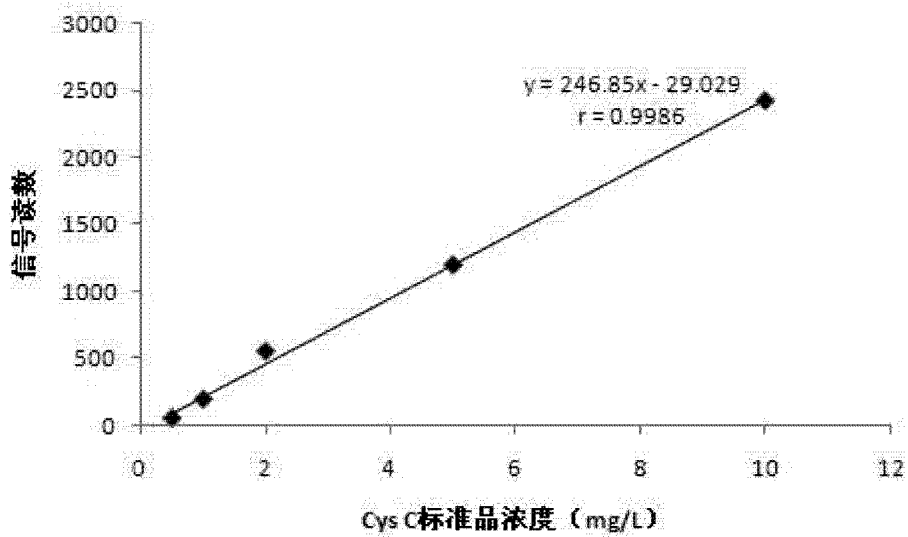


图 3

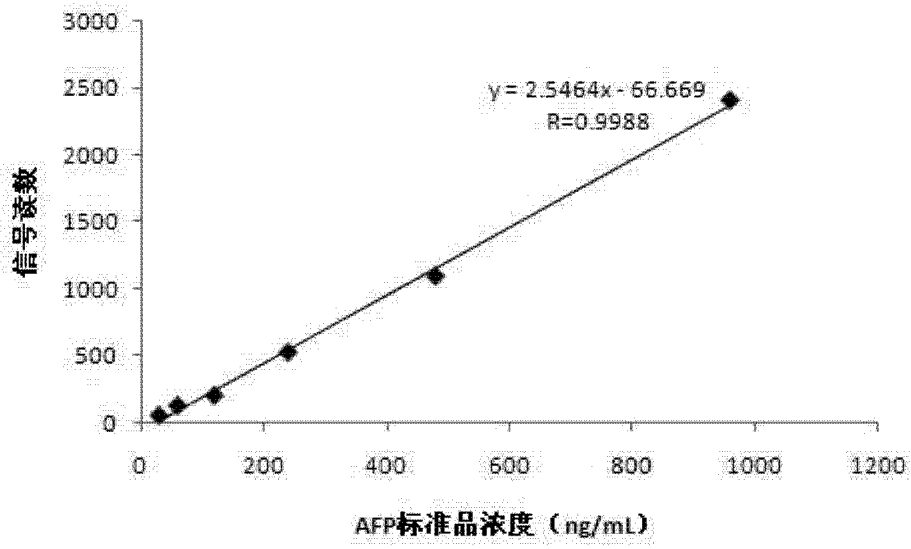


图 4

专利名称(译)	一种干式免疫检测试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103226143A</a>	公开(公告)日	2013-07-31
申请号	CN201310117151.0	申请日	2013-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
[标]发明人	苏恩本 王勇 焦丽蓉		
发明人	苏恩本 王勇 焦丽蓉		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种干式免疫检测试纸条及其制备方法与应用。该试纸条在塑料底衬上从左到右依次粘有样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，硝酸纤维素膜右端设有相互平行的质控线和检测线；硝酸纤维素膜左端设有示踪粒子标记抗体/抗原包被线和封闭蛋白线I，封闭蛋白线I为封闭蛋白液I包被硝酸纤维素膜形成的线，抗体/抗原包被线为示踪粒子标记抗体/抗原喷到封闭蛋白线II上形成的线，其中，封闭蛋白线II为封闭蛋白液II包被硝酸纤维素膜形成的线。该试纸条应用于双抗夹心法或者竞争法原理的免疫检测，操作简单、层析迅速、特异性强、检测结果准确、稳定性强。

