



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702893 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910918011.0

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 同济大学

地址 200092 上海市杨浦区四平路1239号

(72)发明人 张兵波 徐琰 杨维涛 曾维薇
刘凯

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 吴文滨

(51) Int. Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

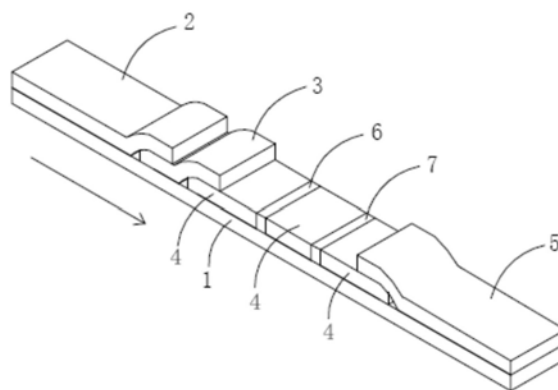
权利要求书1页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种AIE免疫层析试纸

(57)摘要

本发明涉及一种AIE免疫层析试纸,该试纸包括结合物垫、测试线及质控线,结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的AIE纳米粒子,测试线包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原,质控线包被有用于识别结合物垫上已标记在AIE纳米粒子上的检测抗体或检测抗原的抗体。与现有技术相比,本发明利用AIE材料独特聚集诱导发光性能,有效增强免疫层析试纸的发光效率,间接降低背景干扰信号,极大提升了对检测物的检测灵敏度和定量准确性。



1. 一种AIE免疫层析试纸,该试纸包括结合物垫(3),其特征在于,所述的结合物垫(3)上设有已标记检测抗体或检测抗原的AIE纳米粒子。

2. 根据权利要求1所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的试纸还包括测试线(6)及质控线(7),所述的测试线(6)包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原,所述的质控线(7)包被有用于识别结合物垫(3)上已标记在AIE纳米粒子上的检测抗体或检测抗原的抗体。

3. 根据权利要求2所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的试纸还包括底板(1)、样品垫(2)、硝酸纤维素膜(4)及吸水垫(5),所述的底板(1)上沿底板(1)长度方向依次搭接有样品垫(2)、结合物垫(3)、硝酸纤维素膜(4)及吸水垫(5),所述的测试线(6)及质控线(7)沿样品层析方向依次设置在硝酸纤维素膜(4)上。

4. 根据权利要求3所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的样品垫(5)为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜,所述的结合物垫(3)为玻璃纤维膜,所述的底板(1)为聚氯乙烯胶板。

5. 根据权利要求3所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的试纸的外部设有卡壳,所述的卡壳上设有用于滴加待检测样品的加样区及用于观察或读取信号的显色区,所述的待检测样品为血清、全血、尿液或组织液中的一种或多种。

6. 根据权利要求1所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的AIE纳米粒子的粒径为10-300nm。

7. 根据权利要求1所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的AIE纳米粒子由以下化合物中的一种或多种制备而成:四苯乙烯类AIE衍生物、噻咯类AIE衍生物、1,4-均二苯乙烯类AIE衍生物、五元杂环类AIE衍生物、有机硼类AIE衍生物。

8. 根据权利要求1所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的AIE纳米粒子的标记过程包括以下步骤:

1) 制备活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子或氨基化的AIE纳米粒子;

2) 将检测抗体或检测抗原标记在活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子或氨基化的AIE纳米粒子上。

9. 根据权利要求1所述的一种AIE免疫层析试纸,其特征在于,所述的AIE纳米粒子在激发光照射下发出光信号,所述的激发光的波长为254-530nm,照射功率是10-300mW/cm²。

一种AIE免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明属于免疫层析试纸技术领域,涉及一种AIE免疫层析试纸及其检测方法。

背景技术

[0002] 体外诊断(In Vitro Diagnosis,IVD)是指通过血液、体液、组织等生物样本进行检测而获取诊断信息,进而判断机体疾病或功能。对生物样本的快速、灵敏和定量检测是目前体外诊断发展的方向。基于免疫层析试纸条的生物医学检测,因其具有快速、简便、直观、成本低等优势在疾病的早期诊断、预防等方面产生巨大社会效益和经济效益。免疫层析试纸技术(Immunochromatographic Assay,ICA)是基于抗原-抗体特异免疫学反应和层析反应的原理,标记了抗体的指示剂会特异性识别与结合如尿样、血样或是唾液等生物样本中的特定待测物,且在试纸条检测区域滞留与显色,并可结合读数仪进行定量检测,达到快速、准确地检测待测物的目的。

[0003] 近些年来由于医疗事业的不断革新与进步,对所涉及到的免疫层析试纸条的定量检测要求也有所增加。基于胶体金作为指示剂的免疫层析试纸最早应用在早孕检测领域,目前已扩展到多个领域,如生物医学、食品安全、环境、农药残留等,取得了巨大的成功。但其在准确度和超灵敏检测上早也无能为力,其充其量只能定义为半定量常规检测。因此,基于社会的快速发展,急需一种或多种能快速灵敏定量检测的免疫层析试纸方法。

[0004] 基于有机染料分子的荧光纳米粒子作为指示剂的传统免疫层析试纸虽然在定量和灵敏检测上有所进步,但对于检测灵敏度和准确性有较高要求的检测项目,如传染性疾病、心肌损伤、感染类等疾病,一般传统的免疫层析试纸很难满足检测要求。究其原因是有有机染料在稀溶液状态下的荧光性能良好,但这些化合物在薄膜状态或者高浓度状态下,存在聚集诱导淬灭(Aggregation-Caused Quenching,ACQ)的缺陷。ACQ严重限制了有机染料在免疫层析试纸方面的应用,在使用过程中浓度过高会发生淬灭,但浓度过低又会导致荧光信号较弱、背景信号干扰严重等问题,因此不得不花费大量时间去找一个平衡值。

[0005] 随着聚集诱导发光(Aggregation-Induced Emission,AIE)材料的问世,根本地解决了传统荧光材料在实际应用中出现ACQ的弊端,使人们对有机发光材料的认识转向一个全新的高度。相对于传统有机荧光染料,AIE材料在荧光检测、生物成像等方面展现了一些显著优势:在聚集态下的高发光效率使其随着浓度升高而荧光强度逐渐增强,间接降低了背景信号的干扰,可实现高对比度的荧光检测;其光稳定性好,可有效解决光漂白;可修饰性强,可用于设计具有响应能力的荧光指示剂。

[0006] 因此,设计制备一种以AIE纳米粒子为发光指示剂,具有高灵敏度和准确度、光稳定性好的免疫层析试纸及定量检测方法,具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的就是为了解决上述现有技术存在的缺陷而提供一种AIE免疫层析试纸,能够有效消除干扰发光信号,提升定量检测灵敏度和准确度。

[0008] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现：

[0009] 一种AIE免疫层析试纸，该试纸包括结合物垫，所述的结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的AIE纳米粒子。

[0010] 进一步地，所述的试纸还包括测试线及质控线，所述的测试线包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原，所述的质控线包被有用于识别结合物垫上已标记在AIE纳米粒子上的检测抗体或检测抗原的抗体。

[0011] 进一步地，所述的试纸还包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜及吸水垫，所述的底板上沿底板长度方向依次搭接有样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜及吸水垫，所述的测试线及质控线沿样品层析方向依次设置在硝酸纤维素膜上。

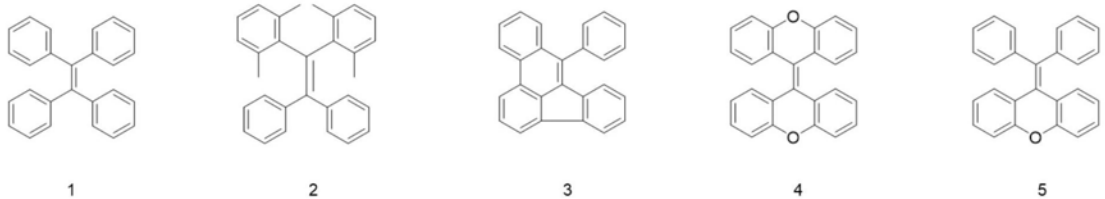
[0012] 进一步地，所述的样品垫为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜，所述的结合物垫为玻璃纤维膜，所述的底板为聚氯乙烯胶板。

[0013] 进一步地，所述的试纸的外部设有卡壳，所述的卡壳上设有用于滴加待检测样品的加样区及用于观察或读取信号的显色区，所述的待检测样品为血清、全血、尿液或组织液中的一种或多种。

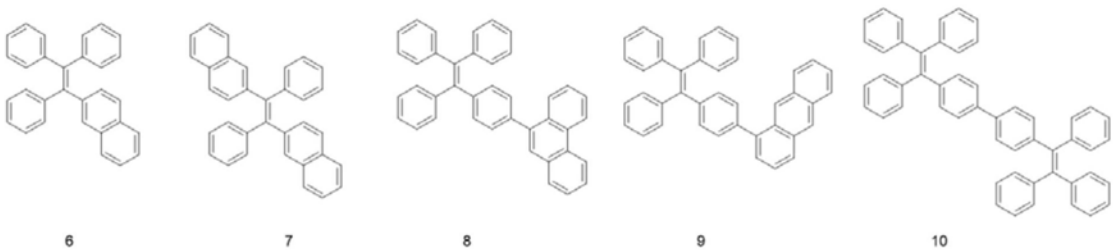
[0014] 进一步地，所述的AIE纳米粒子的粒径为10-300nm。

[0015] 进一步地，所述的AIE纳米粒子由以下化合物中的一种或多种制备而成：四苯乙烯类AIE衍生物、噻咯类AIE衍生物、1,4-均二苯乙烯类AIE衍生物、五元杂环类AIE衍生物、有机硼类AIE衍生物。

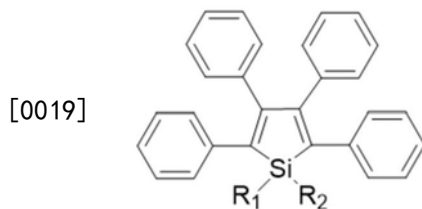
[0016] 四苯乙烯类AIE衍生物优选以下结构式中的一种：



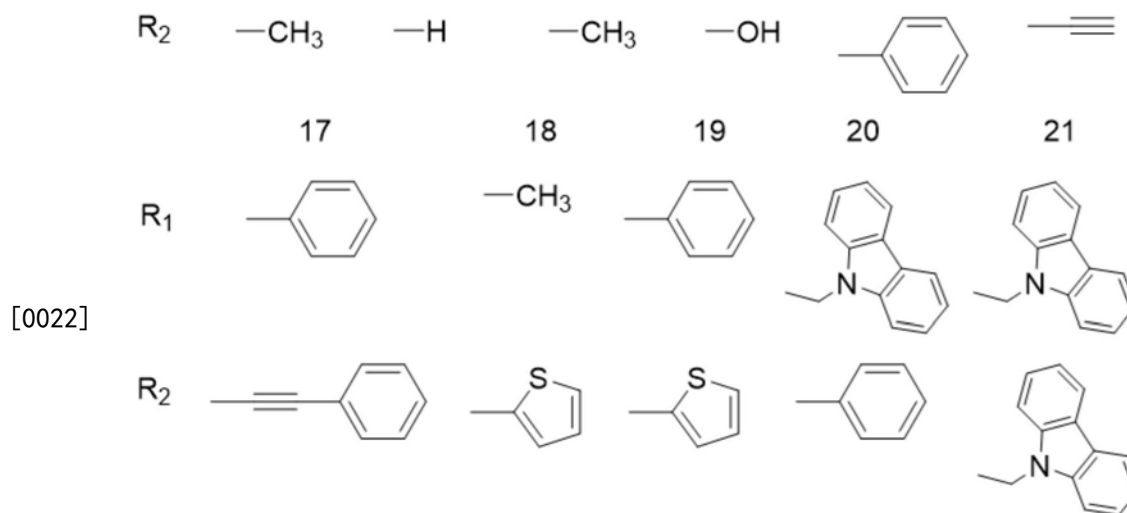
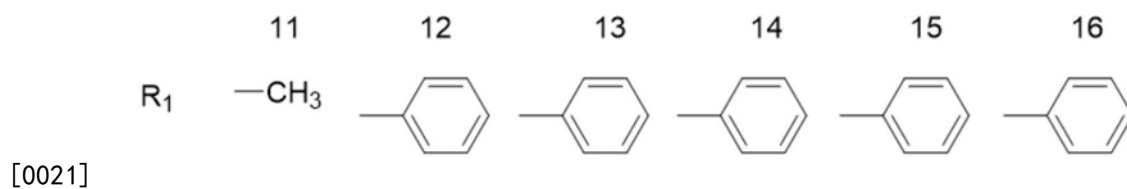
[0017]



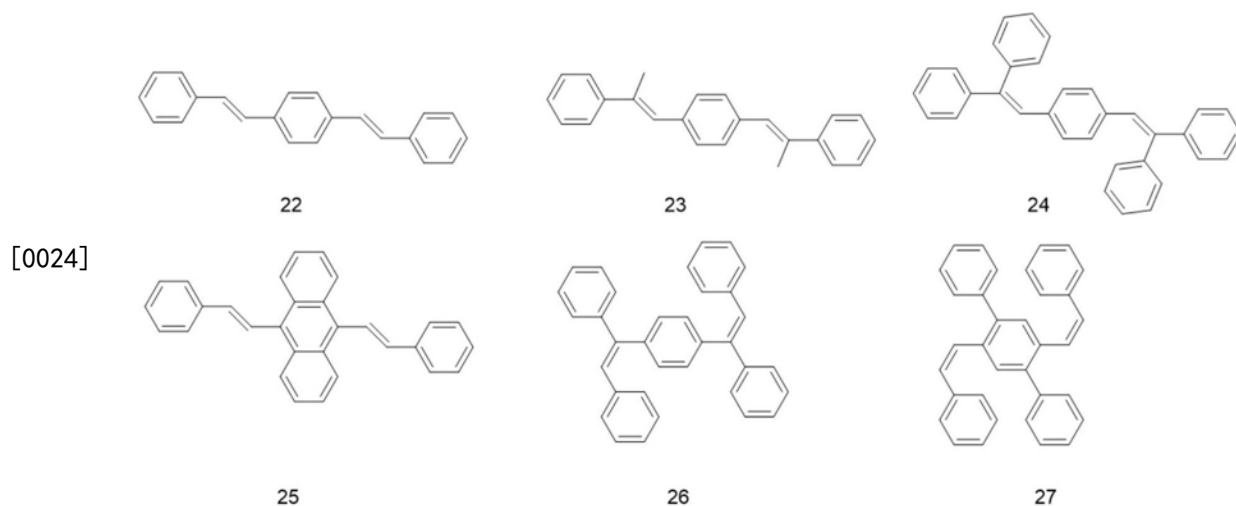
[0018] 噻咯类AIE衍生物优选如下：



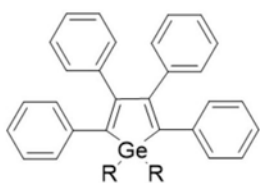
[0020] 上式中， R_1 、 R_2 优选以下基团组合中的一种：



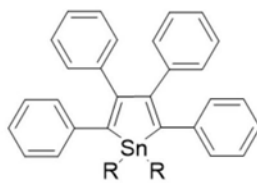
[0023] 1,4-均二苯乙烯类AIE衍生物优选以下结构式中的一种：



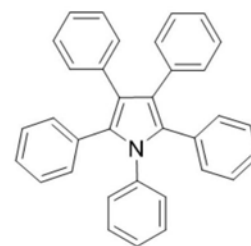
[0025] 五元杂环类AIE衍生物优选以下结构式中的一种：



R=Me (28)
R=Ph (29)

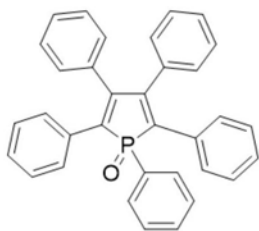


R=Me (30)
R=Ph (31)

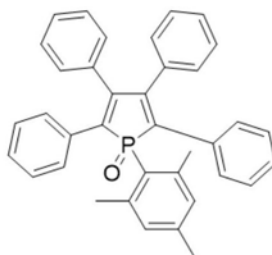


32

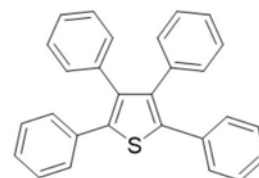
[0026]



33

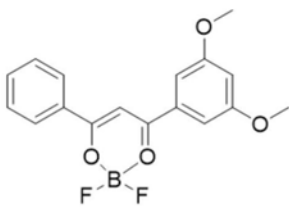


34

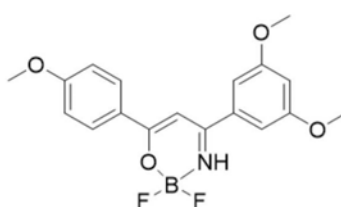


35

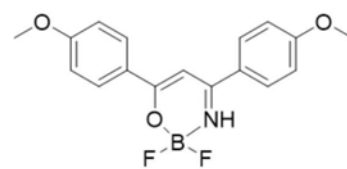
[0027] 有机硼类AIE衍生物优选以下结构式中的一种:



36

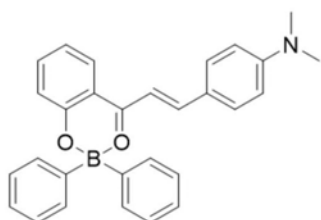


37

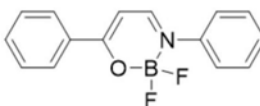


38

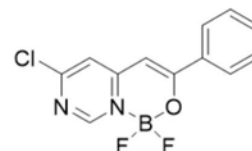
[0028]



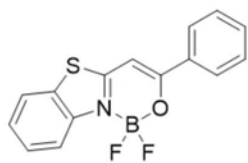
39



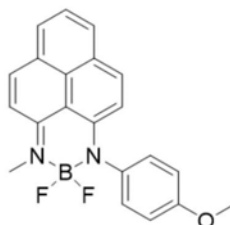
40



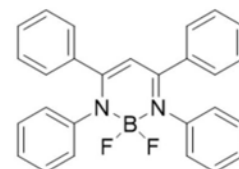
41



42

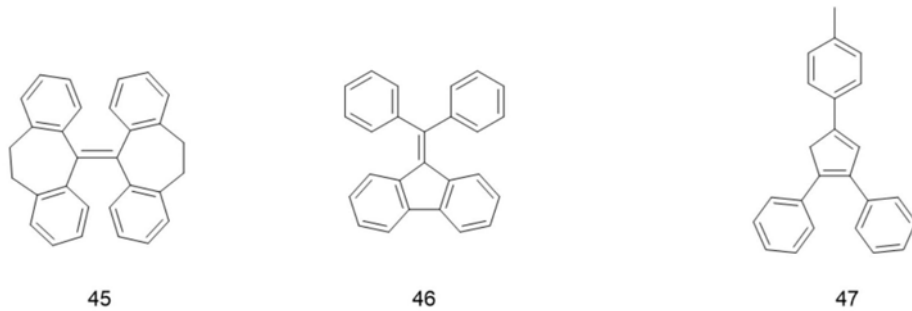


43

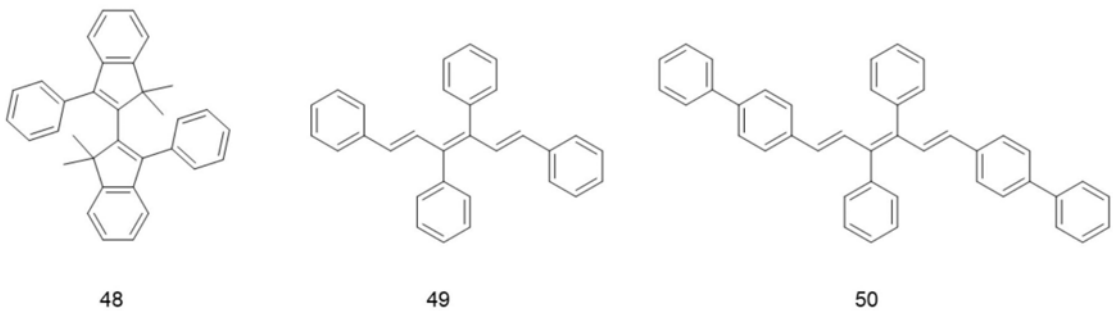


44

[0029] 制备AIE纳米粒子的化合物还可采用其他碳氢类AIE衍生物,例如:



[0030]



[0031] 进一步地,所述的AIE纳米粒子的标记过程包括以下步骤:

[0032] 1) 制备活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子或氨基化的AIE纳米粒子;

[0033] 2) 将检测抗体或检测抗原标记在活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子或氨基化的AIE纳米粒子上。

[0034] 进一步地,所述的AIE纳米粒子在激发光照射下发出光信号,所述的激发光的波长为254-530nm,照射功率是10-300mW/cm²。

[0035] AIE纳米粒子在层析试纸上的荧光强度远远强于稀溶液中荧光强度。

[0036] 本发明利用AIE纳米粒子作为指示剂,提供一种检测灵敏度和检测准确度高的AIE免疫层析试纸。具体方案是将检测目标物的抗体或抗原通过化学键连接到AIE纳米粒子上,然后将标记好抗体或抗原的AIE纳米粒子设在结合物垫上,用于检测待测样品中的目标物;硝酸纤维素膜上设立的测试线事先包被有针对目标物的捕获抗体或抗原;硝酸纤维素膜上设立的质控线事先包被有针对结合物垫上标记在AIE纳米粒子上检测抗体或检测抗原的抗体。上述结合物垫和包被有测试线和质控线的硝酸纤维素膜同其他样品垫、吸水垫、卡壳和底板按照传统试纸制作方法组装形成本发明的免疫层析试纸。

[0037] 利用本发明中免疫层析试纸的检测方法,步骤如下:

[0038] (1) 向样品垫上滴入待检测样品;

[0039] (2) 用激发光照射测试线和质控线;

[0040] (3) 用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。

[0041] 上述方案中,所用激发光的波长是254-530nm,照射功率是10-300mW/cm²。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有以下特点:

[0043] 本发明采用AIE纳米粒子代替传统的荧光纳米粒子用于标记抗体或抗原,由于AIE分子具有越聚集越发光、光稳定性优异的特点,涂有AIE纳米粒子的结合物垫在吸收激发光照射的能量后,发射光强度与传统荧光纳米粒相比明显增强,且远远强于试纸条上的硝酸纤维素膜和生物样品本身的荧光,这就降低了背景干扰;另外,由于材料本身具有很强抗光漂白能力,为测试样品的转移和存放带来极大地便利。因此,本发明有效增强了检测材料的

发光效率,间接降低了硝酸纤维素膜和生物样品本身的受激产生的干扰信号,极大提升了对待检测物的检测灵敏度和定量准确性,同时,为免疫层析试纸的便捷转移和存放提供了一个新途径。

附图说明

[0044] 图1为本发明中AIE免疫层析试纸的结构示意图;

[0045] 图中标记说明:

[0046] 1—底板、2—样品垫、3—结合物垫、4—硝酸纤维素膜、5—吸水垫、6—测试线、7—质控线。

具体实施方式

[0047] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。本实施例以本发明技术方案为前提进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0048] 实施例1:

[0049] 本实施例是一种用于定量检测甲胎蛋白(AFP)的免疫层析试纸,如图1所示的一种免疫层析试纸,包括PVC底板1,底板1上依次设有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;硝酸纤维素膜4上沿着从样品垫2到吸水垫5的方向,还依次设有测试线6和质控线7。层析方向如图1中箭头的指示方向。

[0050] 结合物垫3上设有已标记有检测抗体的AIE纳米粒子。该检测抗体是能特异性检测甲胎蛋白(AFP)的抗体(anti-AFP antibody);

[0051] 测试线6上包被有能特异性捕获甲胎蛋白(AFP)的另一抗体;

[0052] 质控线7上包被有能特异性捕获AIE纳米粒子上标记的抗体的抗体(二抗)。

[0053] 以制备四苯乙烯(tetraphenyl ethene, TPE)的纳米粒子及相应的抗体标记的AIE纳米粒子为例:

[0054] 方法一:

[0055] 将(10mg, 5 μ mol) DSPE-PEG-NHS (MW 2000) 和(2mg, 2.5 μ mol) 四苯乙烯溶于1mL四氢呋喃中,搅拌下缓慢滴加到10mL超纯水中,并超声1min,随后室温下搅拌16小时来自然挥发四氢呋喃;转入MW 2000的透析袋中透析24小时,中途换四次水,透析后液体真空干燥,得到活性酯NHS修饰的AIE纳米粒(NPs-TPE-NHS),装瓶储存。利用透射电子显微镜观察该AIE纳米粒子的尺寸为50nm,所获得的AIE纳米粒子经过365nm光源激发照射(照射功率为100mW/cm²),经光谱仪检测,发射波长为488nm,发出明亮蓝光,完全满足免疫层析试纸条读数仪的定量检测。

[0056] 活性酯修饰的AIE纳米粒(NPs-TPE-NHS)的抗体标记。选取甲胎蛋白(AFP)作为一种疾病模型加以阐述。标记方法如下:称取制备好的10mg的上述四苯乙烯AIE纳米粒和抗AFP抗体(anti-AFP antibody)各分散在5mL超纯水中,抗AFP抗体和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:2,4 $^{\circ}$ C搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到抗AFP抗体溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm, 10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯

AIE纳米粒酰胺键连接抗AFP抗体的复合物,该复合物的简要分子结构式为NPs-TPE-am-anti-AFP antibody。

[0057] 方法二:

[0058] 将(10mg, 5 μ mol) DSPE-PEG-NH₂ (MW2000) 和(2mg, 2.5 μ mol) 四苯乙烯溶于1mL四氢呋喃中,搅拌下缓慢滴加到10mL超纯水中,并超声1min,随后室温下搅拌16小时来自然挥发四氢呋喃;转入MW2000的透析袋中透析24小时,中途换四次水,将所得液体真空干燥,得到氨基化的AIE纳米粒(NPs-TPE-NH₂),装瓶储存。利用透射电子显微镜观察该AIE纳米粒子的尺寸为50nm,所获得的AIE纳米粒子经过365nm光源激发照射(照射功率为100mW/cm²),经光谱仪检测,发射波长为488nm,发出明亮蓝光,完全满足免疫层析试纸条读数仪的定量检测。

[0059] 氨基化AIE纳米粒子(NPs-TPE-NH₂)的抗体标记。本发明选取甲胎蛋白(AFP)作为一种疾病模型加以阐述。标记方法如下:称取制备好的10mg的氨基化四苯乙烯AIE纳米粒,分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M, pH 7.2),室温反应2小时;得到的醛基化AIE纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(10000rpm, 15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M, pH 7.2)溶液中,加入抗AFP抗体(anti-AFP antibody),抗AFP抗体和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:2,4 $^{\circ}$ C搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到抗AFP抗体溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm, 10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒酰胺键连接抗AFP抗体的复合物,该复合物的简要分子结构式为NPs-TPE-gl-anti-AFP antibody。

[0060] 本发明所涉及到的免疫层析试纸按照传统试纸制作方法,本发明中将传统免疫层析试纸中所用到的胶体金抗体复合物,或荧光纳米乳胶抗体复合物替换为本发明所制备的AIE纳米粒子抗体复合物,目的是通过增强荧光信号,降低背景信号干扰,极大地提高待检测物的检测灵敏度和检测准确性。基于AIE纳米粒子抗体复合物的免疫层析试纸制作简要叙述如下:将上述制备好的5.0mgAIE纳米粒子抗体复合物溶解分散在10mL特定稀释液(如硼酸盐缓冲液,50mM, pH 8.2)中,然后均匀涂覆于玻璃纤维素膜上,即可用作结合物垫3;将待检测物的另一抗体与二抗分别包被于硝酸纤维素膜4上形成测试线6(T线)和质控线7(C线);上述所涉及到的另一抗体和二抗划线浓度、T线与C线的宽度以及二者的间隔距离、烘干固定工艺参数均参考现有成熟技术。最后将上述划有另一抗体与二抗的硝酸纤维素膜、涂覆了AIE纳米粒子抗体复合物的玻璃纤维素膜4(结合物垫3)、玻璃纤维或聚酯膜样品垫2、吸水垫5按照图1的示意图粘贴组装在PVC底板1上,得到完整的基于AIE纳米粒子抗体复合物的免疫层析试纸。

[0061] 本实施例的定量检测方法如下:

[0062] (1) 向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0063] (2) 用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用365nm的UV光源照射C线与T线区域,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的AIE纳米粒子抗体复合物进行能量供给;

[0064] (3) 用发光读数仪读取测试线6和质控线7的发光信号。具体是利用发光读数仪,检测AIE纳米粒子抗体复合物的发射光信号。

[0065] 最后将测得的光信号数据代入事先已标定的“AFP已知浓度-光信号”的公式,得出本次所检测AFP的浓度。

[0066] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的AIE纳米材料的独特发光优势,有效增强了检测材料的发光效率,从而间接降低了信噪比,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0067] 通过与传统荧光免疫层析试纸对AFP的检测对比,发现基于本发明的AIE纳米粒子抗体复合物的免疫层析试纸在检测灵敏度上提高了18倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0068] 实施例2:

[0069] 本实施例是一种用于定量检测结核(TB)抗体的免疫层析试纸,如图1所示,本发明提供一种免疫层析试纸,包括PVC底板1,PVC底板1上依次设有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;硝酸纤维素膜4上沿着从样品垫2到吸水垫5的方向,还依次设有测试线6和质控线7。

[0070] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗原和兔IgG的AIE纳米粒子。该检测抗原是能特异性检测结核抗体的TB重组抗原(CTK公司TB融合抗原,TB antigen);

[0071] 所述测试线6上包被有能特异性捕获结核抗体的抗原;

[0072] 所述质控线7上包被有能特异性捕获AIE纳米粒子上标记的兔IgG的抗体。

[0073] 所用的AIE纳米粒子同实施例1。

[0074] 具体实施如下:

[0075] 方法一:将上述获得的活性酯修饰的AIE纳米粒(NPs-TPE-NHS)的抗体标记。标记方法如下:称取制备好的10mg的上述四苯乙烯AIE纳米粒、TB重组抗原和兔IgG各分散在5mL超纯水中,TB重组抗原、兔IgG和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到混合TB重组抗原的兔IgG溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗原复合物。

[0076] 方法二:称取制备好的10mg的氨基化四苯乙烯AIE纳米粒,分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M,pH 7.2),室温反应2小时;得到的醛基化AIE纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(10000rpm,15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M,pH 7.2)溶液中,加入TB重组抗原和兔IgG混合液,TB重组抗原、兔IgG和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到混合TB重组抗原的兔IgG溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗原复合物

[0077] 所述免疫层析试纸的制作方法同实施例1。

[0078] 本实施例的定量检测方法如下:

[0079] (1) 向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0080] (2) 用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用365nm的UV光源照射C线与T线区域,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的AIE纳米粒子抗原复合物进行能量供给;

[0081] (3) 用发光读数仪读取测试线6和质控线7的发光信号。具体是利用发光读数仪,检测AIE纳米粒子抗体复合物的信号。

[0082] 最后将测得的光信号数据代入事先已标定的“TB抗体已知浓度-光信号”的公式,

得出本次所检测TB抗体的浓度。

[0083] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的AIE纳米材料的独特发光优势,有效增强了检测材料的发光效率,从而间接降低了信噪比,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0084] 通过与传统荧光免疫层析试纸对TB抗体的检测对比,发现基于本发明的AIE纳米粒子抗原复合物的免疫层析试纸在检测灵敏度上提高了10倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0085] 实施例3:

[0086] 本实施例是一种用于定量检测肌钙蛋白I (cTnI) 的免疫层析试纸,如图1所示,本发明提供一种免疫层析试纸,包括PVC底板1,PVC底板1上依次设有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;硝酸纤维素膜4上沿着从样品垫2到吸水垫5的方向,还依次设有测试线6和质控线7。

[0087] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗体的AIE纳米粒子。该检测抗体是能特异性检测肌钙蛋白I的抗体 (anti-cTnI antibody);

[0088] 所述测试线6上包被有能特异性捕获肌钙蛋白I (cTnI) 的另一抗体;

[0089] 所述质控线7上包被有能特异性捕获AIE纳米粒子上标记的抗体的抗体 (二抗)。

[0090] 所用的AIE纳米粒子同实施例1。

[0091] 本发明选取心肌损伤标志物中的肌钙蛋白I来作为一种疾病模型加以阐述。具体实施如下:

[0092] 方法一:将上述获得的活性酯修饰的AIE纳米粒 (NPs-TPE-NHS) 的抗体标记。标记方法如下:称取制备好的10mg的上述四苯乙烯AIE纳米粒和抗肌钙蛋白I抗体各分散在5mL超纯水中,抗肌钙蛋白I抗体和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到抗肌钙蛋白I抗体溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次 (4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗体复合物,该复合物的简要分子结构式为NPs-TPE-am-anti-cTnI antibody。

[0093] 方法二:称取制备好的10mg的氨基化四苯乙烯AIE纳米粒,分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中 (0.01M,pH 7.2),室温反应2小时;得到的醛基化AIE纳米粒子通过离心沉淀洗涤后 (10000rpm,15min),再分散在1.0mL PBS (0.01M,pH 7.2) 溶液中,加入抗肌钙蛋白I抗体和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到抗肌钙蛋白I抗体溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次 (4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗体复合物,该复合物的简要分子结构式为NPs-TPE-gl-anti-cTnI antibody。

[0094] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。

[0095] 本实施例的定量检测方法如下:

[0096] (1) 向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0097] (2) 用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用365nm的UV光源照射C线与T线区域,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的AIE纳米粒子抗体复合物进行能量供给;

[0098] (3)用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。具体是利用发光读数仪,检测AIE纳米粒子抗体复合物的信号。

[0099] 最后将测得的光信号数据代入事先已标定的“cTnI已知浓度-光信号”的公式,得出本次所检测cTnI的浓度。

[0100] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的AIE纳米材料的独特发光优势,有效增强了检测材料的发光效率,从而间接降低了信噪比,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0101] 通过与传统荧光免疫层析试纸对cTnI的检测对比,发现基于本发明的AIE纳米粒子抗原复合物的免疫层析试纸在检测灵敏度上提高了15倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0102] 实施例4:

[0103] 本实施例是一种用于定量检测血液中梅毒(TP)抗体的免疫层析试纸,如图1所示,本发明提供一种免疫层析试纸,包括PVC底板1,PVC底板1上依次设有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;硝酸纤维素膜4上沿着从样品垫2到吸水垫5的方向,还依次设有测试线6和质控线7。

[0104] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗原和兔IgG的AIE纳米粒子。该检测抗原是能特异性检测血液中梅毒(TP)抗体的重组抗原;

[0105] 所述测试线6上包被有能特异性捕获血液中梅毒(TP)抗体的抗原;

[0106] 所述质控线7上包被有能特异性捕获AIE纳米粒子上标记的兔IgG的抗体。

[0107] 所用的AIE纳米粒子同实施例1。

[0108] 本发明选取血液中梅毒抗体作为一种疾病模型加以阐述。具体实施如下:

[0109] 方法一:将上述获得的活性酯修饰的AIE纳米粒(NPs-TPE-NHS)的抗体标记。标记方法如下:称取制备好的10mg的上述四苯乙烯AIE纳米粒、TP重组抗原和兔IgG各分散在5mL超纯水中,TP重组抗原、兔IgG和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到混合TP重组抗原和兔IgG溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗原复合物。

[0110] 方法二:称取制备好的10mg的氨基化四苯乙烯AIE纳米粒,分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M,pH 7.2),室温反应2小时;得到的醛基化AIE纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(10000rpm,15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M,pH 7.2)溶液中,加入TP重组抗原、兔IgG和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到混合TP重组抗原和兔IgG溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗原复合物。

[0111] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。

[0112] 本实施例的定量检测方法如下:

[0113] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0114] (2)用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用365nm的UV光源照射C线与T线区域,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的AIE纳米粒子抗原复合物进行能量供给;

[0115] (3)用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。具体是利用发光读数仪,检测AIE纳米粒子抗体复合物的光信号。

[0116] 最后将测得的光信号数据代入事先已标定的“TP抗体已知浓度-光信号”的公式,得出本次所检测TP抗体的浓度。

[0117] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的AIE纳米材料的独特发光优势,有效增强了检测材料的发光效率,从而间接降低了信噪比,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0118] 通过与传统荧光免疫层析试纸对TP的检测对比,发现基于本发明的AIE纳米粒子抗原复合物的免疫层析试纸在检测灵敏度上提高了8倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0119] 实施例5:

[0120] 本实施例是一种用于定量检测血液中C反应蛋白(CRP)的免疫层析试纸,如图1所示,本发明提供一种免疫层析试纸,包括PVC底板1,PVC底板1上依次设有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;硝酸纤维素膜4上沿着从样品垫2到吸水垫5的方向,还依次设有测试线6和质控线7。

[0121] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗体的AIE纳米粒子。该检测抗体是能特异性检测血液中C反应蛋白(CRP)的抗体(anti-CRP antibody);

[0122] 所述测试线6上包被有能特异性捕获C反应蛋白(CRP)的另一抗体;

[0123] 所述质控线7上包被有能特异性捕获AIE纳米粒子上标记的抗体的抗体(二抗)。

[0124] 本实例选取血液中C反应蛋白作为一种疾病模型加以阐述。具体实施如下:

[0125] 方法一:将上述获得的活性酯修饰的AIE纳米粒(NPs-TPE-NHS)的抗体标记。标记方法如下:称取制备好的10mg的上述四苯乙烯AIE纳米粒和抗CRP抗体各分散在5mL超纯水中,抗CRP抗体和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到抗CRP抗体溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗体复合物,该复合物的简要分子结构式为NPs-TPE-am-anti-CRP antibody。

[0126] 方法二:称取制备好的10mg的氨基化四苯乙烯AIE纳米粒,分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M,pH 7.2),室温反应2小时;得到的醛基化AIE纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(10000rpm,15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M,pH 7.2)溶液中,加入抗CRP抗体和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到抗CRP抗体溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗体复合物,该复合物的简要分子结构式为NPs-TPE-gl-anti-CRP antibody。

[0127] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。

[0128] 本实施例的定量检测方法如下:

[0129] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0130] (2)用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用365nm的UV光源照射C线与T线区

域,照射功率为 $100\text{mW}/\text{cm}^2$,对C线与T线上结合的AIE纳米粒子抗体复合物进行能量供给;

[0131] (3)用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。具体是利用发光读数仪,检测AIE纳米粒子抗体复合物的光信号。

[0132] 最后将测得的光信号数据代入事先已标定的“CRP已知浓度-光信号”的公式,得出本次所检测CRP的浓度。

[0133] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的AIE纳米材料的独特发光优势,有效增强了检测材料的发光效率,从而间接降低了信噪比,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0134] 通过与传统荧光免疫层析试纸对CRP的检测对比,发现基于本发明的AIE纳米粒子抗原复合物的免疫层析试纸在检测灵敏度上提高了10倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0135] 实施例6:

[0136] 本实施例是一种用于定量检测人血液中HSP70抗体的免疫层析试纸,如图1所示,本发明提供一种免疫层析试纸,包括PVC底板1,PVC底板1上依次设有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5;硝酸纤维素膜4上沿着从样品垫2到吸水垫5的方向,还依次设有测试线6和质控线7。

[0137] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗原和兔IgG的AIE纳米粒子。该检测抗原是能特异性检测血液中HSP70抗体的抗原;

[0138] 所述测试线6上包被有能特异性捕获HSP70抗体的抗原;

[0139] 所述质控线7上包被有能特异性捕获AIE纳米粒子上标记的兔IgG的抗体。

[0140] 本实例选取血液中HSP70抗体作为一种疾病模型加以阐述。具体实施如下:

[0141] 方法一:将上述获得的活性酯修饰的AIE纳米粒(NPs-TPE-NHS)的抗体标记。标记方法如下:称取制备好的10mg的上述四苯乙烯AIE纳米粒、HSP70抗原和兔IgG各分散在5mL超纯水中,HSP70抗原、兔IgG和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到混合HSP70抗原和兔IgG溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗原复合物。

[0142] 方法二:称取制备好的10mg的氨基化四苯乙烯AIE纳米粒,分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M,pH 7.2),室温反应2小时;得到的醛基化AIE纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(10000rpm,15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M,pH 7.2)溶液中,加入HSP70抗原、兔IgG和四苯乙烯AIE纳米粒的摩尔比为1:1:2,4℃搅拌下将四苯乙烯AIE纳米粒缓慢滴加到混合HSP70抗原和兔IgG溶液中,2-3分钟滴完,反应2小时;加入四苯乙烯AIE纳米粒对应1当量的甘氨酸溶液终止反应,离心洗涤两次(4000rpm,10min),除去未反应的四苯乙烯AIE纳米粒后,离心得到的沉淀物即是四苯乙烯AIE纳米粒抗原复合物。

[0143] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。

[0144] 本实施例的定量检测方法如下:

[0145] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0146] (2)用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用365nm的UV光源照射C线与T线区域,照射功率为 $100\text{mW}/\text{cm}^2$,对C线与T线上结合的AIE纳米粒子抗原复合物进行能量供给;

[0147] (3)用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。具体是利用发光读数仪,检测AIE纳米粒子抗体复合物的光信号。

[0148] 最后将测得的光信号数据代入事先已标定的“HSP70抗体已知浓度-光信号”的公式,得出本次所检测HSP70抗体的浓度。

[0149] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的AIE纳米材料的独特发光优势,有效增强了检测材料的发光效率,从而间接降低了信噪比,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0150] 通过与传统荧光免疫层析试纸对HSP70抗体的检测对比,发现基于本发明的AIE纳米粒子抗原复合物的免疫层析试纸在检测灵敏度上提高了12倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0151] 实施例7:

[0152] 如图1所示的一种AIE免疫层析试纸,该试纸包括结合物垫3,结合物垫3上设有已标记检测抗体的AIE纳米粒子。试纸还包括测试线6及质控线7,测试线6包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗体,质控线7包被有用于识别结合物垫3上已标记在AIE纳米粒子上检测抗体的抗体。

[0153] 试纸还包括底板1、样品垫2、硝酸纤维素膜4及吸水垫5,底板1上沿底板1长度方向依次搭接有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4及吸水垫5,测试线6及质控线7沿样品层析方向依次设置在硝酸纤维素膜4上。

[0154] 样品垫5为玻璃纤维膜,结合物垫3为玻璃纤维膜,底板1为聚氯乙烯胶板。

[0155] 试纸的外部设有卡壳,卡壳上设有用于滴加待检测样品的加样区及用于观察或读取信号的显色区,待检测样品为组织液。

[0156] AIE纳米粒子的粒径为10nm。

[0157] AIE纳米粒子由四苯乙烯类AIE衍生物或噻咯类AIE衍生物制备而成。

[0158] AIE纳米粒子的标记过程包括以下步骤:

[0159] 1) 制备活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子;

[0160] 2) 将检测抗体标记在活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子上。

[0161] AIE纳米粒子在激发光照射下发出光信号,激发光的波长为530nm,照射功率是10mW/cm²。

[0162] 实施例8:

[0163] 如图1所示的一种AIE免疫层析试纸,该试纸包括结合物垫3,结合物垫3上设有已标记检测抗原的AIE纳米粒子。试纸还包括测试线6及质控线7,测试线6包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗原,质控线7包被有用于识别结合物垫3上已标记在AIE纳米粒子上检测抗原的抗体。

[0164] 试纸还包括底板1、样品垫2、硝酸纤维素膜4及吸水垫5,底板1上沿底板1长度方向依次搭接有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4及吸水垫5,测试线6及质控线7沿样品层析方向依次设置在硝酸纤维素膜4上。

[0165] 样品垫5为聚酯纤维膜,结合物垫3为玻璃纤维膜,底板1为聚氯乙烯胶板。

[0166] 试纸的外部设有卡壳,卡壳上设有用于滴加待检测样品的加样区及用于观察或读取信号的显色区,待检测样品为尿液。

[0167] AIE纳米粒子的粒径为300nm。

[0168] AIE纳米粒子由1,4-均二苯乙烯类AIE衍生物或五元杂环类AIE衍生物制备而成。

[0169] AIE纳米粒子的标记过程包括以下步骤：

[0170] 1) 制备氨基化的AIE纳米粒子；

[0171] 2) 将检测抗原标记在氨基化的AIE纳米粒子上。

[0172] AIE纳米粒子在激发光照射下发出光信号，激发光的波长为254nm，照射功率是300mW/cm²。

[0173] 实施例9：

[0174] 如图1所示的一种AIE免疫层析试纸，该试纸包括结合物垫3，结合物垫3上设有已标记检测抗体的AIE纳米粒子。试纸还包括测试线6及质控线7，测试线6包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗体，质控线7包被有用于识别结合物垫3上已标记在AIE纳米粒子上检测抗体的抗体。

[0175] 试纸还包括底板1、样品垫2、硝酸纤维素膜4及吸水垫5，底板1上沿底板1长度方向依次搭接有样品垫2、结合物垫3、硝酸纤维素膜4及吸水垫5，测试线6及质控线7沿样品层析方向依次设置在硝酸纤维素膜4上。

[0176] 样品垫5为玻璃纤维膜，结合物垫3为玻璃纤维膜，底板1为聚氯乙烯胶板。

[0177] 试纸的外部设有卡壳，卡壳上设有用于滴加待检测样品的加样区及用于观察或读取信号的显色区，待检测样品为血清或全血。

[0178] AIE纳米粒子的粒径为100nm。

[0179] AIE纳米粒子由有机硼类AIE衍生物制备而成。

[0180] AIE纳米粒子的标记过程包括以下步骤：

[0181] 1) 制备活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子；

[0182] 2) 将检测抗体标记在活性酯NHS修饰的AIE纳米粒子上。

[0183] AIE纳米粒子在激发光照射下发出光信号，激发光的波长为351nm，照射功率是187mW/cm²。

[0184] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改，并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此，本发明不限于上述实施例，本领域技术人员根据本发明的揭示，不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

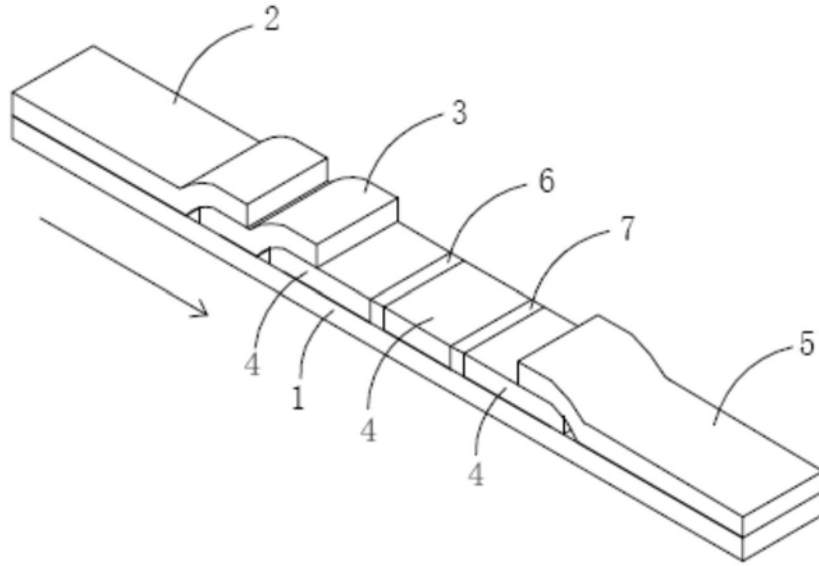


图1

专利名称(译)	一种AIE免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN110702893A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910918011.0	申请日	2019-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	同济大学		
申请(专利权)人(译)	同济大学		
当前申请(专利权)人(译)	同济大学		
[标]发明人	张兵波 徐琰 杨维涛 曾维薇 刘凯		
发明人	张兵波 徐琰 杨维涛 曾维薇 刘凯		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/533 G01N33/58 G01N33/539		
CPC分类号	G01N33/52 G01N33/533 G01N33/539 G01N33/582		
代理人(译)	吴文滨		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种AIE免疫层析试纸，该试纸包括结合物垫、测试线及质控线，结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的AIE纳米粒子，测试线包被有用于捕获待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原，质控线包被有用于识别结合物垫上已标记在AIE纳米粒子上的检测抗体或检测抗原的抗体。与现有技术相比，本发明利用AIE材料独特聚集诱导发光性能，有效增强免疫层析试纸的发光效率，间接降低背景干扰信号，极大提升了对检测物的检测灵敏度和定量准确性。

