



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110780065 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201911023786.8

(22)申请日 2019.10.25

(71)申请人 王永彬

地址 261400 山东省烟台市莱州市府前街
79号

(72)发明人 王永彬

(74)专利代理机构 北京冠和权律师事务所
11399

代理人 朱健 陈国军

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

一种化学发光免疫检测试纸条及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供了一种化学发光免疫检测试纸条及其制备方法与应用,试纸条的制备方法为:将羧基活化的富勒烯与检测抗体、酶偶联,得到抗体-富勒烯-酶复合材料,喷在载体上制成标记片;羧基活化的碳纳米管与检测抗体偶联,喷在载体上制成捕捉片;将玻璃纤维素膜、捕捉片、标记片、样品片、吸水片贴在PVC塑料底板上,并喷涂羊抗鼠多克隆抗体溶液作为质控线。本发明利用羧基化富勒烯将酶与抗体偶联,使二者牢固结合,并且不浪费抗体的结合位点,未结合的抗体和酶通过洗涤即可分离,同时,检测抗体偶联在羧基化碳纳米管上,再通过碳纳米管与纤维素膜的作用,将检测抗体固定在试纸条上,不会造成待测抗原的流失,降低检测误差。



1. 一种化学发光免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 标记片制备:将羧基化富勒烯进行羧基活化,羧基活化的富勒烯与检测抗体、酶混合,进行偶联反应,得到抗体-富勒烯-酶复合材料;抗体-富勒烯-酶复合材料喷涂在标记材料载体上制成标记片备用;

(2) 捕捉片制备:将羧基化碳纳米管进行羧基活化,羧基活化的碳纳米管与检测抗体混合,进行偶联反应,得到捕捉材料;捕捉材料喷涂在捕捉材料载体上制成捕捉片备用;

(3) 试纸条的组装:取PVC塑料底板(6),依次将玻璃纤维素膜、捕捉片、标记片、样品片、吸水片贴在PVC塑料底板上,在PVC塑料底板上的从左到右位置顺序依次为:样品片(1)、标记片(2)、捕捉片(3)、玻璃纤维素膜(4)、吸水片(5),并在玻璃纤维素膜上、捕捉片与吸水片之间的位置喷涂羊抗鼠多克隆抗体溶液作为质控线(7)。

2. 根据权利要求1所述的化学发光免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述羧基化富勒烯包括表面接枝C1-C3的一元有机羧酸的羧基化富勒烯、表面接枝C2-C6的二元有机羧酸的羧基化富勒烯中的一种或几种;所述C1-C3的一元有机羧酸即碳链中碳原子数为1-3个的只带有一个羧基的羧酸;所述C2-C6的二元羧酸即碳链中碳原子数为2-6个的带有两个羧基的羧酸。

3. 根据权利要求1所述的化学发光免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述捕捉材料载体为硝酸纤维素膜,捕捉材料分散液以4-4.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的用量喷涂在硝酸纤维素膜上,干燥后得到捕捉片。

4. 根据权利要求1所述的化学发光免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,在试纸条吸水片一端的PVC塑料底板上喷涂含氟聚氨酯,静置干燥成膜,形成保护带(8)。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的化学发光免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(1)得到抗体-富勒烯-酶复合材料溶液后,向溶液中加入羧基活化的荧光微球,室温下搅拌发生偶联反应,离心去上清,用PBS缓冲液重悬,用封闭液封闭,用PBS缓冲液洗涤后再用PBS缓冲液分散,制成荧光微球-抗体-富勒烯-酶复合材料分散液,荧光微球-抗体-富勒烯-酶复合材料喷涂在标记材料载体上制成标记片备用。

6. 一种权利要求1-4任一项所述制备方法制备的化学发光免疫检测试纸条。

7. 一种权利要求5所述制备方法制备的化学发光免疫检测试纸条。

8. 一种权利要求6所述化学发光免疫检测试纸条在免疫监测中的应用,其特征在于,将待测抗原浓度梯度溶液分别滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,制作化学发光百分发光率-待测抗原浓度半对数线性回归标准曲线;将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,化学发光强度和酶分子的量成正相关,而酶分子的和待测抗原的量成正相关,通过化学发光百分发光率代入标准曲线计算得到待测样品液中待测抗原浓度。

9. 一种权利要求7所述化学发光免疫检测试纸条在免疫监测中的应用,其特征在于,当进行快速定性检测时,将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min;用紫光灯照射捕捉片区域,若有荧光,则表示待测样品液中含有待测抗原,若无

荧光,则表示待测样品液中不含有待测抗原;

当进行定化学发光定量检测时,将待测抗原浓度梯度溶液分别滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,制作化学发光百分发光率-待测抗原浓度半对数线性回归标准曲线;将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,化学发光强度和酶分子的量成正相关,而酶分子的量和待测抗原的量成正相关,通过化学发光百分发光率代入标准曲线计算得到待测样品液中待测抗原浓度;

当进行荧光定量检测时,将待测抗原浓度梯度溶液分别滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,检测捕捉区及质控线的荧光强度,制作捕捉区荧光强度/质控线荧光强度-标准溶液中待测抗原浓度线性回归标准曲线;将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,检测捕捉区及质控线的荧光强度,将捕捉区荧光强度/质控线荧光强度代入标准曲线方程,计算得到待测样品液中待测抗原浓度。

10. 根据权利要求8或9所述的化学发光免疫检测试纸条在免疫监测中的应用,其特征在于,在进行定化学发光定量检测时还需要对所述化学发光定量检测的结果进行结果检验,当所述结果检验不合格时,采用荧光定量检测重新检测,其中所述结果检验包括如下步骤:

步骤A1、获取所述待测样品液滴历史检验时的标准差,并确实所述待检测样品的重复检测次数;

$$N = \left(\frac{Car * t_{\frac{a}{2}}}{Ts} + \left(\frac{Car * \left(Z_{\frac{a}{2}} + Z_B \right)}{Ts} \right)^2 \right) * \frac{1}{2}$$

其中,N为所述重复检测次数,Car为所述历史检验时的标准差, $t_{\frac{a}{2}}$ 为预设值a所对应的t检验值,Ts为预设容差率, $Z_{\frac{a}{2}}$ 为预设值a所对应的Z检验值, Z_B 为预设值2*B所对应的Z检验值;

步骤A2、对所述待测样品液滴进行N次重复检验,并将所述检验得到的待测样品液中待测抗原浓度保存为浓度向量X;

步骤A3、确定所述浓度向量X的波动频率;

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{\left(X_i - \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i \right)^2}{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i}} \frac{1}{N^2}$$

其中,S为所述波动频率, X_i 为对所述待测样品液滴进行第*i*次进行检验得到的待测样品液中待测抗原浓度, $i=1,2,3 \dots N$;

步骤A3、确定所述浓度向量X的合格率;

$$rt = \int \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i - S \left(\frac{1}{S\sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{y-1}{S} \right)^2} * S + N * S^2 \right) dy$$

其中,rt为所述合格率;

步骤A4、当所述合格率rt大于预设值时,所述浓度向量X的均值为所述待测抗原浓度,否则改用荧光定量检测对所述待测抗原浓度进行检测。

一种化学发光免疫检测试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析技术领域,具体涉及一种化学发光免疫检测试纸条及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 化学发光免疫测定试纸条,是通常采用酶标抗体结合待测抗原,用检测抗体捕捉结合后的产物,通过化学发光剂与酶反应后测定发光百分率,从而计算得到待测抗原浓度的方法,目前,主要使酶与抗体结合后,将酶标抗体附着在玻璃纤维素或硝酸纤维素膜上从而固定在试纸条上,然而这种方法会浪费抗体上的一个结合位点,并且酶与抗体结合不牢固,没有载体的情况下,也不易分离结合与未结合的抗体,造成检测误差。

[0003] 另外,目前检测抗体固定在试纸条上的方法通常也仅为包被,这种方法会导致试纸条包被的检测抗体密度较低,可能会造成检测误差,同时包被不牢固的检测抗体会随上述结合后的产物随着层析移动,同样会造成较大的检测误差。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供一种化学发光免疫检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0005] (1) 标记片制备:将羧基化富勒烯进行羧基活化,羧基活化的富勒烯与检测抗体、酶混合,进行偶联反应,得到抗体-富勒烯-酶复合材料;抗体-富勒烯-酶复合材料喷涂在标记材料载体上制成标记片备用;

[0006] (2) 捕捉片制备:将羧基化碳纳米管进行羧基活化,羧基活化的碳纳米管与检测抗体混合,进行偶联反应,得到捕捉材料;捕捉材料喷涂在捕捉材料载体上制成捕捉片备用;

[0007] (3) 试纸的组装:取PVC塑料底板6,依次将玻璃纤维素膜、捕捉片、标记片、样品片、吸水片贴在PVC塑料底板上,在PVC塑料底板上的从左到右位置顺序依次为:样品片1、标记片2、捕捉片3、玻璃纤维素膜4、吸水片5,并在玻璃纤维素膜上、捕捉片与吸水片之间的位置喷涂羊抗鼠多克隆抗体溶液作为质控线7。

[0008] 步骤(1)所述羧基化富勒烯包括表面接枝C1-C3的一元有机羧酸的羧基化富勒烯、表面接枝C2-C6的二元有机羧酸的羧基化富勒烯中的一种或几种。

[0009] 所述C1-C3的一元有机羧酸即碳链中碳原子数为1-3个的只带有一个羧基的羧酸;所述C2-C6的二元羧酸即碳链中碳原子数为2-6个的带有两个羧基的羧酸。

[0010] 所述羧基化富勒烯的羧基活化,具体为:将羧基化富勒烯溶于去离子水,加入EDC和NHS常温下搅拌反应,离心去上清,用PBS缓冲液洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用PBS缓冲液超声分散,得到羧基活化的富勒烯水溶液。

[0011] 所述羧基化富勒烯溶于去离子水,制成的溶液浓度为以富勒烯计1mg/mL,加入的EDC终浓度为20mg/mL、NHS终浓度为10mg/mL,反应温度为常温,时间为1h,所述PBS缓冲液规格为1.0mM、pH7.4;分散所得羧基活化的富勒烯水溶液浓度为以富勒烯计1mg/mL。

[0012] 所述羧基活化的富勒烯与检测抗体和酶的偶联反应,具体为:向所得羧基活化的富勒烯水溶液中加入检测抗体溶液和酶,搅拌发生偶联反应,离心去上清,然后用PBS缓冲液洗涤除去未反应的游离态检测抗体和酶,用PBS缓冲液重新分散,制成抗体-富勒烯-酶复合材料溶液。。

[0013] 所述检测抗体溶液浓度为 $4\mu\text{g/mL}$,羧基活化的富勒烯水溶液与检测抗体溶液和酶的体积比为100:15:1;偶联反应温度为 4°C ,时间为10-24h;所述PBS缓冲液规格为1.0mM、pH7.4;分散所得抗体-富勒烯-酶复合材料溶液浓度为以富勒烯计 1mg/mL 。

[0014] 优选地,步骤(1)得到抗体-富勒烯-酶复合材料溶液后,向溶液中加入羧基活化的荧光微球,室温下搅拌发生偶联反应,离心去上清,用PBS缓冲液重悬,用封闭液封闭,用PBS缓冲液洗涤后再用PBS缓冲液分散,制成荧光微球-抗体-富勒烯-酶复合材料分散液。

[0015] 所述加入的羧基活化的荧光微球,终浓度为 5.0mg/mL ,偶联反应温度为 $25-30^{\circ}\text{C}$,时间为2-3h,所述PBS缓冲液规格为1.0mM、pH7.4;分散所得荧光微球-抗体-富勒烯-酶复合材料分散液浓度为以富勒烯计 1mg/mL 。

[0016] 荧光微球-抗体-富勒烯-酶复合材料分散液以 $4-4.5\mu\text{g/cm}^2$ 的用量喷涂在标记材料载体上,干燥后得到标记片。

[0017] 所述羧基活化的荧光微球的制备方法为:取羧基荧光微球置于硼酸缓冲液中,并加入EDC和NHS搅拌反应,离心去上清,用PBS缓冲液洗涤除去未反应的EDC和NHS。

[0018] 所述硼酸缓冲液浓度为0.05M,加入的EDC终浓度为0.01M,NHS终浓度为0.02M,反应温度为室温,时间为1-1.5h;所述PBS缓冲液规格为1.0mM、pH7.4。

[0019] 以上所述标记材料载体为玻璃纤维素膜,抗体-富勒烯-酶复合材料溶液以 $1-1.5\mu\text{g/cm}^2$ 的用量喷涂在玻璃纤维素膜上,干燥后得到标记片。优选地,所述作为标记材料载体的玻璃纤维素膜用处理液A处理过:将玻璃纤维素膜浸泡在处理液A中2h, 37°C 恒温干燥2h。

[0020] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-HCl缓冲液,其中包括质量浓度20%的吐温20,质量浓度为0.5%-1%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的 NaN_3 。

[0021] 步骤(2)中羧基化碳纳米管的羧基活化,具体为:将羧基化碳纳米管分散于去离子水,加入EDC和NHS常温下搅拌反应,离心去上清,用PBS缓冲液洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用PBS缓冲液超声分散,得到羧基活化的碳纳米管分散液。

[0022] 所述羧基化碳纳米管分散于去离子水,制成的分散液浓度为以碳纳米管计 4mg/mL ,加入的EDC终浓度为 20mg/mL 、NHS终浓度为 10mg/mL ,反应温度为常温,时间为1h,所述PBS缓冲液规格为1.0mM、pH7.4;分散所得羧基活化的碳纳米管分散液浓度为以碳纳米管计 4mg/mL 。

[0023] 所述羧基活化的碳纳米管与检测抗体的偶联反应,具体为:向所得羧基活化的碳纳米管分散液中加入检测抗体溶液,搅拌发生偶联反应,离心去上清,然后用PBS缓冲液洗涤除去未反应的游离态检测抗体,用PBS缓冲液重新分散,制成捕捉材料分散液。

[0024] 其中检测抗体溶液浓度为 $4\mu\text{g/mL}$,羧基活化的碳纳米管分散液与检测抗体溶液的体积比为20:3;偶联反应温度为 4°C ,时间为10-24h;所述PBS缓冲液规格为1.0mM、pH7.4;分散所得捕捉材料分散液浓度为以碳纳米管计 4mg/mL 。

[0025] 所述捕捉材料载体为硝酸纤维素膜,捕捉材料分散液以 $4-4.5\mu\text{g/cm}^2$ 的用量喷涂在硝酸纤维素膜上,干燥后得到捕捉片。

[0026] 优选地,所述作为捕捉材料载体的硝酸纤维素膜用处理液A处理过:将硝酸纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37℃恒温干燥2h。

[0027] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-Hcl缓冲液,其中包括质量浓度20%的吐温20,质量浓度为0.5%-1%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃。

[0028] 步骤(3)所述标记片的左侧边沿延伸至样品片与PVC塑料底板之间,标记片被样品片覆盖的区域宽1-3mm,样品片的左侧延伸出标记片的左侧边沿之外;捕捉片的左侧边沿延伸至标记片与PVC塑料底板之间,捕捉片被标记片覆盖的区域宽1-3mm,标记片的左侧延伸出捕捉片的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的左侧边沿延伸至捕捉片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被捕捉片覆盖的区域宽2-4mm,捕捉片的左侧延伸出玻璃纤维素膜的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的右侧边沿延伸至吸水片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被吸水片覆盖的区域宽3-5mm,吸水片的右侧延伸出玻璃纤维素膜的右侧边沿之外;左右位置顺序不相邻的材料在垂直于PVC塑料底板的方向上没有重叠;所述羊抗鼠多克隆抗体溶液的浓度为1mg/mL,用0.02MpH7.2PBS缓冲液稀释。

[0029] 所述样品片的制备方法为:取玻璃纤维素膜在1.0mM、pH7.4的PBS溶液中浸泡1-3h,干燥。

[0030] 所述吸水片为吸水滤纸、吸水海绵片或吸水纤维。

[0031] 所述PVC塑料底板、玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片均裁剪为所需规格的矩形。其中PVC塑料底板按照试纸条所需形状和大小裁剪。

[0032] 优选地,步骤(3)中,在试纸条吸水片一端的PVC塑料底板上喷涂含氟聚氨酯,静置干燥成膜,形成保护带8。

[0033] 优选地,在进行定化学发光定量检测时还需要对所述化学发光定量检测的结果进行结果检验,当所述结果检验不合格时,使用荧光定量检测重新检测,其中所述结果检验包括如下步骤:

[0034] 步骤A1、获取所述待测样品液滴历史检验时的标准差,并确实所述待检测样品的重复检测次数;

$$[0035] \quad N = \left[\frac{Car * t_{\frac{a}{2}}}{Ts} + \left(\frac{Car * \left(Z_{\frac{a}{2}} + Z_B \right)}{Ts} \right)^2 \right] * \frac{1}{2}$$

[0036] 其中,N为所述重复检测次数,Car为所述历史检验时的标准差, $t_{\frac{a}{2}}$ 为预设值a所对应的t检验值,Ts为预设容差率, $Z_{\frac{a}{2}}$ 为预设值a所对应的Z检验值,ZB为预设值2*B所对应的Z检验值;

[0037] 步骤A2、对所述待测样品液滴进行N次重复检验,并将所述检验得到的待测样品液中待测抗原浓度保存为浓度向量X;

[0038] 步骤A3、确定所述浓度向量X的波动频率;

[0039]

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{\left(X_i - \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i \right)^2}{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i}} \frac{1}{N^2}$$

[0040] 其中,S为所述波动频率, X_i 为对所述待测样品液滴进行第i次进行检验得到的待测样品液中待测抗原浓度, $i=1,2,3\cdots N$;

[0041] 步骤A3、确定所述浓度向量X的合格率;

[0042]

$$rt = \int \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i - S \left(\frac{1}{S\sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{y-1}{S} \right)^2} * S + N * S^2 \right) dy$$

[0043] 其中,rt为所述合格率;

[0044] 步骤A4、当所述合格率rt大于预设值时,所述浓度向量X的均值为所述待测抗原浓度,否则改用荧光定量检测对所述待测抗原浓度进行检测。

[0045] 有益效果

[0046] 本发明提供的试纸条的制备方法,利用羧基化富勒烯将没和抗体偶联,使二者牢固结合,并且不浪费位点,未结合的抗体和酶通过洗涤即可分离,同时,检测抗体偶联在羧基化碳纳米管上,再通过碳纳米管与纤维素膜的作用,将检测抗体固定在试纸条上,不会造成待测抗原的流失,降低检测误差。

[0047] 本发明的其它特征和优点将在随后的说明书中阐述,并且,部分地从说明书中变得显而易见,或者通过实施本发明而了解。本发明的目的和其他优点可通过在所写的说明书、权利要求书、以及附图中所特别指出的结构和方法来实现和获得。

[0048] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0049] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0050] 图1为本发明实施例1、3制备的化学发光免疫检测试纸条的结构示意图,其中,1为样品片,2为标记片,3为捕捉片,4为玻璃纤维素膜,5为吸水片,6为PVC塑料底板,7为质控线;

[0051] 图2为本发明实施例2制备的化学发光免疫检测试纸条的结构示意图,其中,1为样品片,2为标记片,3为捕捉片,4为玻璃纤维素膜,5为吸水片,6为PVC塑料底板,7为质控线,8为保护带;

[0052] 图3为实施例4制作的标准曲线;

[0053] 图4为实施例6制作的标准曲线。

具体实施方式

[0054] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0055] 实施例1一种化学发光免疫检测试纸条的制备方法

[0056] 包括以下步骤:

[0057] (1) 标记片制备:将羧基化富勒烯溶于去离子水,制成1mg/mL的溶液(以富勒烯计),加入终浓度20mg/mL的EDC和终浓度10mg/mL的NHS,常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液超声分散,得到1mg/mL的羧基活化的富勒烯水溶液。向1.0mL所得羧基活化的富勒烯水溶液中加入150 μ L4 μ g/mL的检测抗体溶液和10 μ L酶,在4 $^{\circ}$ C下搅拌10h,离心去上清,然后用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液洗涤除去未反应的游离态检测抗体和酶,用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液重新分散,制成1.0mg/mL的抗体-富勒烯-酶复合材料溶液(以富勒烯计)。将所得抗体-富勒烯-酶复合材料溶液以1 μ g/cm²的用量喷涂在用处理液A处理过的玻璃纤维素膜上,干燥,得到标记片。

[0058] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-HCl缓冲液,其中包括质量浓度20%的吐温20,质量浓度为0.5%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃。所述处理:将玻璃纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37 $^{\circ}$ C恒温干燥2h。

[0059] (2) 捕捉片制备:将羧基化碳纳米管分散于去离子水,制成4mg/mL的分散液(以碳纳米管计),加入20mg/mL EDC和10mg/mL NHS常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用1.0mM pH7.4 PBS缓冲液超声分散,得到4mg/mL的羧基活化的碳纳米管分散液(以碳纳米管计)。往1.0mL上述羧基活化的碳纳米管分散液中加入150 μ L 4 μ g/mL的检测抗体溶液,在4 $^{\circ}$ C下搅拌10h,离心去上清,然后用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的游离态抗体,用1.0mM pH7.4 PBS溶液重新分散,制成4.0mg/mL的捕捉材料分散液(以碳纳米管计)。将所得捕捉材料分散液以4 μ g/cm²的用量喷涂在用处理液A处理的硝酸纤维素膜上,干燥。

[0060] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-HCl缓冲液,20%吐温20,质量浓度为0.5%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃组成。所述处理:将硝酸纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37 $^{\circ}$ C恒温干燥2h。

[0061] (3) 试纸条的组装:取PVC塑料底板,将玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片贴在PVC塑料底板上,在PVC塑料底板上的从左到右位置顺序依次为:样品片、标记片、捕捉片、玻璃纤维素膜、吸水片,其中标记片的左侧边沿延伸至样品片与PVC塑料底板之间,标记片被样品片覆盖的区域宽1mm,样品片的左侧延伸出标记片的左侧边沿之外;捕捉片的左侧边沿延伸至标记片与PVC塑料底板之间,捕捉片被标记片覆盖的区域宽1mm,标记片的

左侧延伸出捕捉片的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的左侧边沿延伸至捕捉片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被捕捉片覆盖的区域宽2mm,捕捉片的左侧延伸出玻璃纤维素膜的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的右侧边沿延伸至吸水片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被吸水片覆盖的区域宽3mm,吸水片的右侧延伸出玻璃纤维素膜的右侧边沿之外;

[0062] 左右位置顺序不相邻的材料在垂直于PVC塑料底板的方向上没有重叠;

[0063] 0.02M pH7.2 PBS缓冲液稀释羊抗鼠多克隆抗体的浓度为1mg/mL,包被在玻璃纤维素膜不被任何膜覆盖的区域(捕捉垫与吸水片之间),形成质控线。

[0064] 所述样品片的制备方法为:取玻璃纤维素膜在1.0mM pH7.4 PBS溶液中浸泡1h,干燥后作为样品片备用。

[0065] 所述吸水片为吸水滤纸、吸水海绵片或吸水纤维。

[0066] 所述PVC塑料底板、玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片均裁剪为矩形。其中PVC塑料底板按照试纸条所需形状和大小裁剪。

[0067] 将标准品浓度梯度溶液分别滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,制作化学发光百分发光率-待测抗原浓度半对数线性回归标准曲线。

[0068] 试纸条工作时,将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min(与标准曲线层析反应时间相同),在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,化学发光强度和酶分子的量成正相关,而酶分子的量和待测抗原的量成正相关,通过化学发光百分发光率代入标准曲线方程,计算得到待测样品液中待测抗原定量浓度。

[0069] 本实施例使用的捕捉材料载体为硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜能够与蛋白结合,使得捕捉材料更固定,不易随层析移动,提高了后续定量检测的精确度。

[0070] 本实施例标记区使用的酶和抗体均偶联在羧基化富勒烯上,相较于胶体金等其他载体,富勒烯具有低成本,无毒的优点,其表面积大,能够结合更多的酶,并且其通过活化的羧基与抗体和酶结合更稳定。且羧基化富勒烯在各种溶剂中相容性好、稳定性好、使用寿命更长,且环保安全。

[0071] 本实施例捕捉区使用的抗体偶联在羧基化碳纳米管上,能够更稳定地捕捉抗原,并且碳纳米管表面积大并呈纤维状,能够与玻璃纤维素膜结合紧密,使捕捉材料不易随层析移动,增加后续定量检测的精确度。

[0072] 实施例2一种安全性高的化学发光及荧光免疫检测试纸的制备方法

[0073] 包括以下步骤:

[0074] (1) 标记片制备:将羧基化富勒烯溶于去离子水,制成1mg/mL的溶液(以富勒烯计),加入终浓度20mg/mL的EDC和终浓度10mg/mL的NHS,常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液超声分散,得到1mg/mL的羧基活化的富勒烯水溶液。向1.0mL所得羧基活化的富勒烯水溶液中加入150 μ L 4 μ g/mL的检测抗体溶液和10 μ L酶,在4 $^{\circ}$ C下搅拌24h,离心去上清,然后用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液洗涤除去未反应的游离态检测抗体和酶,用1.0mM、pH7.4的PBS缓冲液重新分散,制成1.0mg/mL的抗体-富勒烯-酶复合材料溶液(以富勒烯计)。将所得抗体-富勒烯-酶复合材料溶液以1.5 μ g/cm²的用量喷涂在用处理液A处理过的玻璃纤维素膜上,干燥,

得到标记片。

[0075] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-Hcl缓冲液,其中包括质量浓度20%的吐温20,质量浓度为1%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃。所述处理:将玻璃纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37℃恒温干燥2h。

[0076] (2) 捕捉片制备:将羧基化碳纳米管分散于去离子水,制成4mg/mL的分散液(以碳纳米管计),加入20mg/ml EDC和10mg/ml NHS常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用1.0mM pH7.4 PBS缓冲液超声分散,得到4mg/mL的羧基活化的碳纳米管分散液(以碳纳米管计)。往1.0mL上述羧基活化的碳纳米管分散液中加入150μL 4μg/mL的检测抗体溶液,在4℃下搅拌24h,离心去上清,然后用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的游离态抗体,用1.0mM pH7.4 PBS溶液重新分散,制成4.0mg/mL的捕捉材料分散液(以碳纳米管计)。将所得捕捉材料分散液以4.5μg/cm²的用量喷涂在用处理液A处理的硝酸纤维素膜上,干燥。

[0077] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-Hcl缓冲液,20%吐温20,质量浓度为1%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃组成。所述处理:将硝酸纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37℃恒温干燥2h。

[0078] (3) 试纸条的组装:取PVC塑料底板,将玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片贴在PVC塑料底板上,在试纸条吸水片一端的PVC塑料底板上喷涂含氟聚氨酯,静置干燥成膜,形成保护带,在PVC塑料底板上的从左到右位置顺序依次为:样品片、标记片、捕捉片、玻璃纤维素膜、吸水片、保护带,其中标记片的左侧边沿延伸至样品片与PVC塑料底板之间,标记片被样品片覆盖的区域宽3mm,样品片的左侧延伸出标记片的左侧边沿之外;捕捉片的左侧边沿延伸至标记片与PVC塑料底板之间,捕捉片被标记片覆盖的区域宽3mm,标记片的左侧延伸出捕捉片的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的左侧边沿延伸至捕捉片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被捕捉片覆盖的区域宽4mm,捕捉片的左侧延伸出玻璃纤维素膜的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的右侧边沿延伸至吸水片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被吸水片覆盖的区域宽5mm,吸水片的右侧延伸出玻璃纤维素膜的右侧边沿之外;保护带与玻璃纤维素膜之间不接触;

[0079] 左右位置顺序不相邻的材料在垂直于PVC塑料底板的方向上没有重叠;

[0080] 0.02MPH7.2PBS缓冲液稀释羊抗鼠多克隆抗体的浓度为1mg/mL,包被在玻璃纤维素膜不被任何膜覆盖的区域(捕捉垫与吸水片之间),形成质控线。

[0081] 所述样品片的制备方法为:取玻璃纤维素膜在1.0mMPH7.4 PBS溶液中浸泡3h,干燥后作为样品片备用。

[0082] 所述吸水片为吸水滤纸、吸水海绵片或吸水纤维。

[0083] 所述PVC塑料底板、玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片均裁剪为矩形。其中PVC塑料底板按照试纸条所需形状和大小裁剪。

[0084] 使用方法与实施例1制备的试纸条相同。

[0085] 传统试纸条仅在吸水片与样品之间做质控线,不能隔离样品中的全部有害物质,有害物质(包括过量其他免疫原性物质、酸性/碱性/腐蚀性物质)可随层析移动直到接触使用者。本实施例中用含氟聚氨酯制成保护带,由于含氟聚氨酯具有高疏水疏油,抗腐蚀的特性,可以阻隔液体向使用者握持试纸条处流动,隔离使用者与样品,保障使用者安全。

[0086] 实施例3一种两用的化学发光免疫检测试纸条的制备方法

[0087] 包括以下步骤:

[0088] (1) 标记片制备:将羧基化富勒烯溶于去离子水,制成1mg/mL的溶液(以富勒烯计),加入20mg/mL EDC和10mg/mL NHS常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用1.0mM pH7.4 PBS缓冲液超声分散,得到1mg/mL的羧基活化的富勒烯水溶液。往1.0mL所得羧基活化的富勒烯水溶液中加入150 μ L 4 μ g/mL的检测抗体溶液和10 μ L酶,在4 $^{\circ}$ C下搅拌24h,离心去上清,然后用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的游离态检测抗体和酶,用1.0mM pH7.4 PBS溶液重新分散,制成1.0mg/mL的抗体-富勒烯-酶复合材料溶液(以富勒烯计),向溶液中加入终浓度为5.0mg/mL的羧基活化的荧光微球,30 $^{\circ}$ C下反应3h,离心,得沉淀物,沉淀物1.0mM pH7.4 PBS溶液重悬,用封闭液封闭1h,用1.0mM pH7.4 PBS洗涤,用1.0mM pH7.4 PBS溶液重新分散,制成1.0mg/mL的荧光微球-抗体-富勒烯-酶复合材料溶液(以富勒烯计)。所述封闭液为质量浓度为10%的PEG20000。将所得抗体-富勒烯-酶复合材料溶液以4.5 μ g/cm²的用量喷涂在用处理液A处理的玻璃纤维素膜上,干燥。

[0089] 所述羧基活化的荧光微球制备方法为:取羧基荧光微球置于0.05M硼酸缓冲液中,并加入0.01MEDC和0.02MNHS常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的EDC和NHS。

[0090] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-Hcl缓冲液,20%吐温20,质量浓度为1%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃组成。所述处理:将玻璃纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37 $^{\circ}$ C恒温干燥2h。

[0091] (2) 捕捉片制备:将羧基化碳纳米管分散于去离子水,制成4mg/mL的分散液(以碳纳米管计),加入20mg/mL EDC和10mg/mL NHS常温下搅拌1h,离心去上清,用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的EDC和NHS,并用1.0mM pH7.4 PBS缓冲液超声分散,得到4mg/mL的羧基活化的碳纳米管分散液(以碳纳米管计)。往1.0mL上述羧基活化的碳纳米管分散液中加入150 μ L 4 μ g/mL的检测抗体溶液,在4 $^{\circ}$ C下搅拌24h,离心去上清,然后用1.0mM pH7.4 PBS洗涤除去未反应的游离态抗体,用1.0mM pH7.4 PBS溶液重新分散,制成4.0mg/mL的捕捉材料分散液(以碳纳米管计)。将所得捕捉材料分散液以4.5 μ g/cm²的用量喷涂在用处理液A处理的硝酸纤维素膜上,干燥。

[0092] 所述处理液A为0.1MPH8.0Tris-Hcl缓冲液,20%吐温20,质量浓度为1%的BSA,质量浓度为3%的蔗糖和质量浓度为0.05%的NaN₃组成。所述处理:将硝酸纤维素膜浸泡在处理液A中2h,37 $^{\circ}$ C恒温干燥2h。

[0093] (3) 试纸条的组装:取PVC塑料底板,将玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片贴在PVC塑料底板上,在PVC塑料底板上的从左到右位置顺序依次为:样品片、标记片、捕捉片、玻璃纤维素膜、吸水片,其中标记片的左侧边沿延伸至样品片与PVC塑料底板之间,标记片被样品片覆盖的区域宽2mm,样品片的左侧延伸出标记片的左侧边沿之外;捕捉片的左侧边沿延伸至标记片与PVC塑料底板之间,捕捉片被标记片覆盖的区域宽2mm,标记片的左侧延伸出捕捉片的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的左侧边沿延伸至捕捉片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被捕捉片覆盖的区域宽3mm,捕捉片的左侧延伸出玻璃纤维素膜的左侧边沿之外;玻璃纤维素膜的右侧边沿延伸至吸水片与PVC塑料底板之间,玻璃纤维素膜被吸

水片覆盖的区域宽4mm,吸水片的右侧延伸出玻璃纤维素膜的右侧边沿之外;

[0094] 左右位置顺序不相邻的材料在垂直于PVC塑料底板的方向上没有重叠;

[0095] 0.02MpH7.2PBS缓冲液稀释羊抗鼠多克隆抗体的浓度为1mg/mL,包被在玻璃纤维素膜不被任何膜覆盖的区域(捕捉垫与吸水片之间),形成质控线。

[0096] 所述样品片的制备方法为:取玻璃纤维素膜在1.0mM pH7.4 PBS溶液中浸泡3h,干燥后作为样品片备用。

[0097] 所述吸水片为吸水滤纸、吸水海绵片或吸水纤维。

[0098] 所述PVC塑料底板、玻璃纤维素膜、样品片、标记片、捕捉片、吸水片均裁剪为矩形。其中PVC塑料底板按照试纸条所需形状和大小裁剪。

[0099] 将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min。若仅做定性检测,用紫光灯照射捕捉片区域,若有荧光,则表示待测样品液中含有待测抗原,若无荧光,则表示待测样品液中不含有待测抗原。若做定量检测,可采用实施例1中所述的检测方法也可采用荧光定量检测方法,但是由于酶催化反应受温度、环境、试剂等条件影响,极不稳定,易造成较大误差,因此,若需要较为精确的定量检测,需要采用荧光定量检测:

[0100] 将标准品浓度梯度溶液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,检测捕捉区及质控线的荧光强度,制作捕捉区荧光强度/质控线荧光强度-标准溶液中待测抗原浓度线性回归标准曲线。

[0101] 试纸条工作时,将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min(与标准曲线层析反应时间相同),检测捕捉区及质控线荧光强度,荧光强度比代入到标准曲线方程,通过计算可得到待测样品液中待测抗原浓度。

[0102] 实施例4实施例1制备的化学发光免疫检测试纸条的应用

[0103] 将标准品浓度梯度溶液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,制作化学发光百分发光率-待测抗原浓度半对数线性回归标准曲线。

[0104] 试纸条工作时,将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min(与标准曲线层析反应时间相同),在捕捉区添加酶对应的化学发光底物,反应后用化学发光仪采集化学发光信号,化学发光强度和酶分子的量成正相关,而酶分子的量和待测抗原的量成正相关,因此,通过化学发光百分发光率代入标准曲线计算得到待测样品液中待测抗原浓度。

[0105] 本实施例配置所得标准曲线如图3所示,标准曲线方程为 $y = -37.636x + 37.522$, $R^2 = 0.999$ 。

[0106] 配置不同浓度的样品液检测计算其中的抗原浓度,相对偏差不超过0.1%。

[0107] 实施例5实施例2制备的化学发光免疫检测试纸条的应用

[0108] 取实施例2制备的试纸条若干,在样品片上分别滴加酸性、碱性水溶液,油性有机溶剂,静置或向右侧倾斜,滴加的液体未见超过保护带。

[0109] 实施例6实施例3制备的化学发光免疫检测试纸条的应用

[0110] 将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min。若仅做定性检测,用紫光灯照射捕捉片区域,若有荧光,则表示待测样品液中含有待测抗原,若无荧光,则表示待测样品液中不含有待测抗原。若做定量检测,可采用实施例1中所述的检

测方法。但是由于酶催化反应受温度、环境、试剂等条件影响,极不稳定,易造成较大误差,若需要较为精确的定量检测,可采用荧光定量检测:

[0111] 将待测抗原浓度梯度溶液分别滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min,检测捕捉区及质控线荧光强度,采用最小二乘拟合法得到捕捉区荧光强度/质控线荧光强度-标准溶液中待测抗原浓度线性回归标准曲线。

[0112] 试纸条工作时,将待测样品液滴加到样品片上,将试纸条水平放置,静置层析反应10-15min(与标准曲线层析反应时间相同),检测捕捉区和质控线荧光强度,捕捉区荧光强度/质控线荧光强度代入标准曲线方程,计算得到待测样品液中待测抗原浓度。

[0113] 本实施例配置的抗原浓度梯度溶液浓度分别为:0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2、100、200 (mg/mL),所得标准曲线如图4所示,标准曲线方程为 $y = 0.0159x + 0.0224$, $R^2 = 0.9991$ 。

[0114] 配置不同浓度的样品液检测计算其中的抗原浓度,相对偏差不超过0.1%。

[0115] 实施例7在进行定化学发光定量检测时还需要对所述化学发光定量检测的结果进行结果检验,当所述结果检验不合格时,采用荧光定量检测重新检测,其中所述结果检验包括如下步骤:

[0116] 步骤A1、获取所述待测样品液滴历史检验时的标准差,并确实所述待检测样品的重复检测次数;

$$[0117] \quad N = \left(\frac{Car * t_{\frac{a}{2}}}{Ts} + \left(\frac{Car * \left(Z_{\frac{a}{2}} + Z_B \right)}{Ts} \right)^2 \right) * \frac{1}{2}$$

[0118] 其中,N为所述重复检测次数,Car为所述历史检验时的标准差, $t_{\frac{a}{2}}$ 为预设值a所对应的t检验值,Ts为预设容差率, $Z_{\frac{a}{2}}$ 为预设值a所对应的Z检验值,ZB为预设值2*B所对应的Z检验值;

[0119] 其中,预设值a一般取值为0.05,预设值Ts一般取值为0.1,预设值2*B一般取值为0.2;

[0120] 步骤A2、对所述待测样品液滴进行N次重复检验,并将所述检验得到的待测样品液中待测抗原浓度保存为浓度向量X;

[0121] 步骤A3、确定所述浓度向量X的波动频率;

[0122]

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{\left(X_i - \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i \right)^2}{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i}} \frac{1}{N^2}$$

[0123] 其中,S为所述波动频率, X_i 为对所述待测样品液滴进行第*i*次进行检验得到的待测样品液中待测抗原浓度, $i=1,2,3\cdots N$;

[0124] 步骤A3、确定所述浓度向量X的合格率;

[0125]

$$rt = \int \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N X_i - S \left(\frac{1}{S\sqrt{2\pi}} * e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{y-1}{S} \right)^2} * S + N * S^2 \right) d y$$

[0126] 其中,rt为所述合格率;

[0127] 步骤A4、当所述合格率rt大于预设值时,所述浓度向量X的均值为所述待测抗原浓度,否则改用荧光定量检测对所述待测抗原浓度进行检测。

[0128] 一般合格率rt大于预设值中,所述预设值为0.8以上的数值,且所述值小于1。

[0129] 上述技术方案的有益效果是:利用上述技术可以对待测样品液滴进行检测,并判断通过化学发光定量检测方法进行检测的待测抗原浓度是否合格,从而在不合格时能够改用荧光定量检测,同时在判断通过化学发光定量检测方法进行检测的待测抗原浓度是否合格的过程中,进行N次重复检验,通过重复检验,从而能判断所述检验结果是否合格;

[0130] 且在上述过程中,进行重复检验的次数N,采用动态次数,根据实际情况确定重复检验的次数N,使得所述检验结果更加靠谱,误差更小,准确率更高。

[0131] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

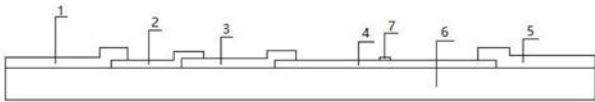


图1

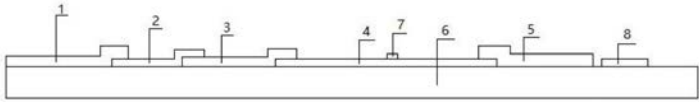


图2

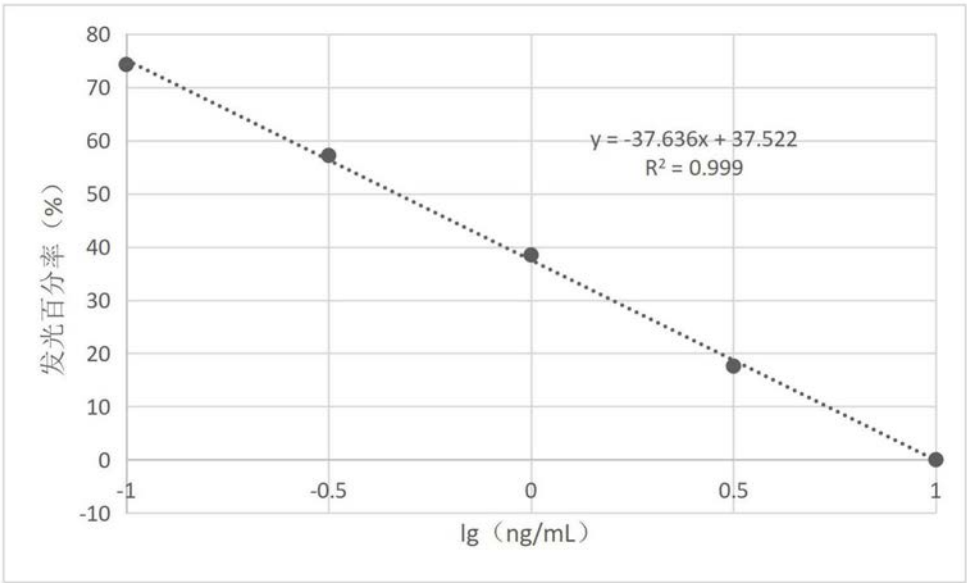


图3

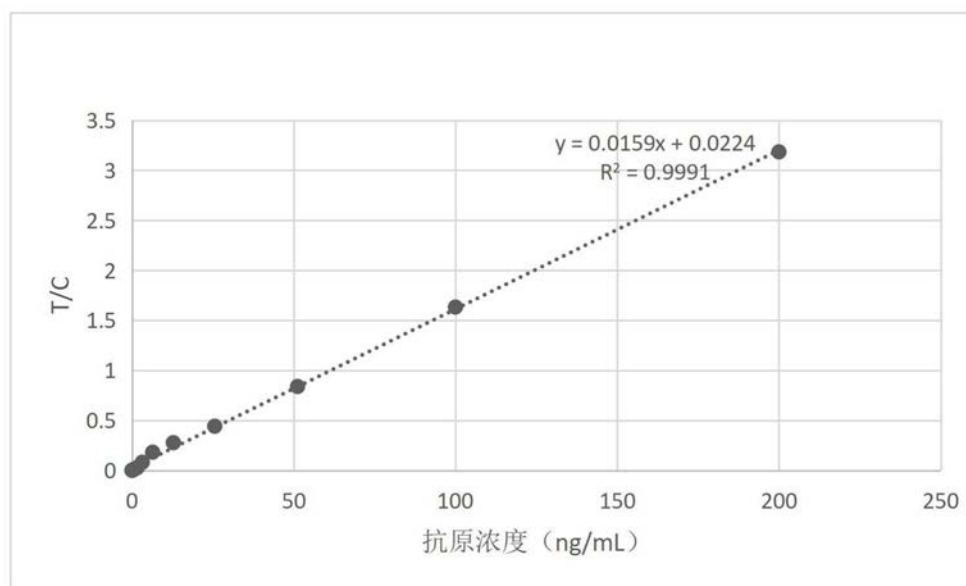


图4

专利名称(译)	一种化学发光免疫检测试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110780065A	公开(公告)日	2020-02-11
申请号	CN201911023786.8	申请日	2019-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	王永彬		
申请(专利权)人(译)	王永彬		
当前申请(专利权)人(译)	王永彬		
[标]发明人	王永彬		
发明人	王永彬		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/558		
代理人(译)	朱健 陈国军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种化学发光免疫检测试纸条及其制备方法与应用，试纸条的制备方法为：将羧基活化的富勒烯与检测抗体、酶偶联，得到抗体-富勒烯-酶复合材料，喷在载体上制成标记片；羧基活化的碳纳米管与检测抗体偶联，喷在载体上制成捕捉片；将玻璃纤维素膜、捕捉片、标记片、样品片、吸水片贴在PVC塑料底板上，并喷涂羊抗鼠多克隆抗体溶液作为质控线。本发明利用羧基化富勒烯将酶与抗体偶联，使二者牢固结合，并且不浪费抗体的结合位点，未结合的抗体和酶通过洗涤即可分离，同时，检测抗体偶联在羧基化碳纳米管上，再通过碳纳米管与纤维素膜的作用，将检测抗体固定在试纸条上，不会造成待测抗原的流失，降低检测误差。

