



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105929155 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201610537749.9

(22)申请日 2016.07.08

(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

(74)专利代理机构 上海科律专利代理事务所

(特殊普通合伙) 31290

代理人 刘莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

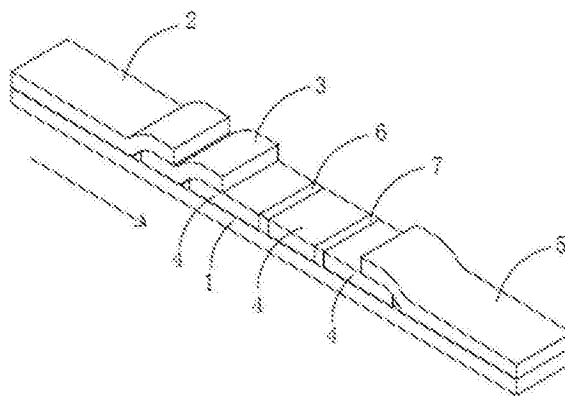
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

免疫层析试纸及其检测方法

(57)摘要

本发明公开一种免疫层析试纸,包括结合物垫、测试线和质控线;所述结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的长余辉发光纳米粒子。所述测试线包被有针对待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原;所述质控线包被有用于识别已标记在长余辉发光纳米粒子上的检测抗体的抗体或检测抗原的抗体。本发明的优点是利用长余辉发光材料独特的长余辉发光性能,用余辉光信号作为准确的定量读数检测结果;有效消除了干扰信号,极大提升了对检测物的检测灵敏度和定量准确性。



1. 一种免疫层析试纸,包括结合物垫、测试线和质控线;其特征在于:所述结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的长余辉发光纳米粒子。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述测试线包被有针对待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原;所述质控线包被有用于识别已标记在长余辉发光纳米粒子上的检测抗体的抗体或检测抗原的抗体。

3. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述免疫层析试纸还包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述底板上依次搭接样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述测试线和质控线设在所述硝酸纤维素膜上。

4. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述样品垫为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜;所述结合物垫为玻璃纤维膜;所述底板为聚氯乙烯胶板。

5. 根据权利要求3所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述免疫层析试纸还包括设置在外面的卡壳,所述卡壳上设有用于滴加检测样品的加样区和用于观察或读取信号的显色区;所述检测样品为血清、全血、尿液和组织液中的一种或多种。

6. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述长余辉发光纳米粒子的尺寸小于等于300纳米,且大于等于5纳米。

7. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸,其特征在于:所述长余辉发光纳米粒子的余辉时间不少于30秒。

8. 如权利要求1所述的免疫层析试纸的检测方法,步骤如下:

(1)向样品垫上滴入待检测样品;

(2)用激发光照射测试线和质控线;

(3)停止激发光照射后,再用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。

9. 根据权利要求8所述的免疫层析试纸的检测方法,其特征在于:所用激发光的波长是254nm至488nm,照射功率是50mW/cm²至300mW/cm²,照射时间是5秒至1分钟。

免疫层析试纸及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析试纸的技术领域,具体涉及一种免疫层析试纸及其检测方法。

背景技术

[0002] 对生物样品中待检测物的现场、快速、灵敏和定量检测是目前体外诊断(in vitro diagnosis, IVD)所追求的要害。近些年来,基于免疫层析试纸条的生物医学检测,因其具有快速、简便、成本低等优势越来越受到研究者和医疗工作者的青睐。免疫层析试纸技术是基于抗原-抗体特异性识别结合原理,在具有一定孔径的硝酸纤维素膜与毛细管作用下,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。

[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。但其在定量检测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] 近几年发展起来的基于荧光纳米粒子(如掺杂稀土发光化合物或有机荧光染料分子的聚苯乙烯纳米粒子和荧光量子点)作为指示剂的免疫层析试纸虽然在定量和灵敏检测上有所进步,但由于在定量读数检测过程中,必须保证激发光一直照射在试纸条区域上,由于在激发光照射过程中,试纸条上的硝酸纤维素膜和生物样品本身也会受激发出荧光,导致定量读数检测得到的发光量,不仅包含了作为检测目标的荧光纳米粒子的受激发光量,还包含了作为干扰信号的硝酸纤维素膜和生物样品本身的受激发光量,降低了荧光纳米粒子指示剂与背景信号的信噪比,从而削弱了对待检测物的检测灵敏度和定量准确性。尤其是对于检测灵敏度和准确性有较高要求的检测项目,如传染性疾痲、心肌损伤、感染类等疾痲,一般传统的免疫层析试纸很难满足检测要求。

[0005] 因此,市场上急需一种检测灵敏度高、定量准确的发光指示剂免疫层析试纸及定量检测方法。这是本申请需要着重改善的地方。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是要提供一种有效消除干扰发光信号,能够提升定量检测灵敏度和准确度的免疫层析试纸。

[0007] 本发明所要解决的另一技术问题是要提供能够提升定量检测灵敏度和准确度的免疫层析试纸的定量检测方法。

[0008] 为了解决本发明的第一个技术问题所采用的技术方案是:一种免疫层析试纸,包括结合物垫、测试线和质控线;所述结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的长余辉发光纳米粒子。

[0009] 上述方案中,所述测试线包被有针对待检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原;所述质控线包被有用于识别已标记在长余辉发光纳米粒子上的检测抗体的抗体或检测抗原的抗体。

[0010] 上述方案中,所述免疫层析试纸还包括底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述底板上依次搭接样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述测试线和质控线设在所述硝酸纤维素膜上。

[0011] 上述方案中,所述样品垫为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜;所述结合物垫为玻璃纤维膜;所述底板为聚氯乙烯胶板。

[0012] 上述方案中,所述免疫层析试纸还包括设置在外面的卡壳,所述卡壳上设有用于滴加检测样品的加样区和用于观察或读取信号的显色区;所述检测样品为血清、全血、尿液和组织液中的一种或多种。

[0013] 上述方案中,所述长余辉发光纳米粒子的尺寸小于等于300纳米,且大于等于5纳米。

[0014] 所述长余辉发光纳米粒子的余辉时间不少于30秒,优选是大于1分钟。

[0015] 所述长余辉发光纳米粒子优选采用以下几类:

[0016] (1)硫化物型长余辉材料,如 $\text{ZnS}:\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{CaS}:\text{Eu}^{2+}$ 、 $\text{SrGa}_2\text{S}_4:\text{Eu}^{2+}$ 或 $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ 。

[0017] (2)铝酸盐长余辉材料,尤其是 Eu^{2+} 激活的稀土铝酸盐系列长余辉材料,其中发绿光性能较好的有 $\text{SrAlO}_4:\text{Eu}^{2+}$, Dy^{3+} ,发蓝光性能较好的有 $\text{CaAlO}_4:\text{Eu}^{2+}$, Nd^{3+} 。

[0018] (3)硅酸盐长余辉材料,如 $\text{Ba}_5\text{Si}_8\text{O}_{21}:\text{Eu}^{2+}$, Dy^{3+} 。

[0019] (4)钛酸盐长余辉材料,如 $\text{CaTiO}_3:\text{Pr}^{3+}$,以及添加辅助掺杂元素或者电荷补偿剂的 $\text{CaTiO}_3:\text{Pr}^{3+}$ 。

[0020] (5)镓酸盐长余辉材料,如 $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}$,以及添加辅助掺杂元素或者电荷补偿剂的 $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}$ 。

[0021] 本发明利用长余辉发光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偶联的方法标记到长余辉发光纳米粒子上,然后将标记好抗体或抗原的长余辉发光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标记在长余辉发光纳米粒子上的抗体,或抗原的抗体。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。

[0022] 为了解决本发明的第二个技术问题所采用的技术方案是:所述免疫层析试纸的检测方法,步骤如下:

[0023] (1)向样品垫上滴入待检测样品;

[0024] (2)用激发光照射测试线和质控线;

[0025] (3)停止激发光照射后,再用发光读数仪读取测试线和质控线的发光信号。

[0026] 上述方案中,所用激发光的波长是254nm至488nm,照射功率是 $50\text{mW}/\text{cm}^2$ 至 $300\text{mW}/\text{cm}^2$,照射时间是5秒至1分钟。

[0027] 本发明的优越功效在于:本发明采用长余辉发光纳米粒子代替传统的荧光纳米粒子用于标记抗体或抗原,由于长余辉发光材料具有独特的长余辉发光性能,其事先吸收激

发光照的能量后,关闭激发光照射仍可长时间发射光子信号,发射时间可长达数小时;但是试纸条上的硝酸纤维素膜和生物样品本身不具有余辉性能,当激发光不再照射时将不再发光,即不会产生干扰的光信号;所以在激发光照射并关闭后,再利用光子读数仪读取长余辉发光纳米粒子的余辉光信号,得到的余辉光信号作为准确的定量读数检测结果;因此,本发明有效消除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。

附图说明

[0028] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0029] 图1为本发明的结构示意图;

[0030] 图中标号说明

[0031] 1—PVC底板; 2—样品垫;

[0032] 3—结合物垫; 4—硝酸纤维素膜;

[0033] 5—吸水垫; 6—测试线;

[0034] 7—质控线。

具体实施方式

[0035] 以下结合附图对本发明的实施例进行详细说明,但是本发明可以由权利要求限定和覆盖的多种不同方式实施。

[0036] 下面结合图1详细说明本发明的实施例。图1示出了本发明实施例的结构示意图。

[0037] 实施例1

[0038] 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,本发明提供一种免疫层析试纸,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。

[0039] 结合物垫3上设有已标记有检测抗体的长余辉发光纳米粒子。该检测抗体是能特异性检测甲胎蛋白(AFP)的抗体(anti-AFP antibody);

[0040] 测试线6上包被有能特异性捕获甲胎蛋白(AFP)的另一抗体;

[0041] 质控线7上包被有能特异性捕获长余辉发光纳米粒子上标记的抗体的抗体(二抗)。

[0042] 所用的长余辉发光纳米粒子的分子结构式是 $ZnGa_2O_4:Cr^{3+}$,其粒子尺寸为15纳米。该长余辉发光纳米粒子的制备方法如下:配置1.0M硝酸锌($Zn(NO_3)_2$)水溶液,1.0M硝酸镓($Ga(NO_3)_3$)水溶液和0.001M硝酸铬($Cr(NO_3)_3$)水溶液。按照上述浓度计算并量取1mmol硝酸锌,1mmol硝酸镓,0.002mmol硝酸铬,并用去离子水将体系溶液体积增加至16mL,搅拌混匀后,在搅拌过程中向上述体系溶液中快速加入氨水(28%,wt)使体系溶液pH为9.5,室温下继续搅拌半小时后转入容量为40mL的聚四氟乙烯内衬中,再将内衬放入到水热反应釜中,200℃进行水热反应12小时,自然冷却至室温,离心(12000g,15min)得到白色沉淀物,该沉淀物用0.02M盐酸水溶液分散,得到光学透明的溶液,再向该溶液中加入等体积的异丙醇,

离心(12000g, 20min)得到的沉淀物真空干燥后即为长余辉发光纳米粒子。利用透射电子显微镜观察该长余辉发光纳米粒子的尺寸为15nm, 所获得的长余辉发光纳米粒子经过405纳米LED光源激发照射30秒后(照射功率为100mW/cm²), 停止照射, 经光谱仪检测其长余辉发射时间可达15分钟, 发射波长为696纳米, 完全满足免疫层析试纸条读数仪的定量检测。

[0043] 为后续生物标记抗体(或抗原)应用, 该长余辉发光纳米粒子还需表面引入可供化学偶联的官能团。具体实施如下: 将上述获得的尺寸15纳米的长余辉发光纳米粒子(1.0g)借助水浴超声波分散(功率80w, 超声时间5min)分散于20mL无水乙醇中, 再加入0.025g 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES), 于室温搅拌反应48小时。离心分离(10000g, 15min)留取沉淀物, 利用无水乙醇分散后再次离心(10000g, 15min), 得到的沉淀物即是氨基化的长余辉发光纳米粒子, 简要分子结构式为ZnGa₂O₄:Cr³⁺-NH₂, -NH₂为长余辉发光纳米粒子表面上引入的氨基官能团, 可用于抗体标记。

[0044] 氨基化长余辉发光纳米粒子的抗体标记。该抗体标记方法为常用方法。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: 称取以上制备好的10mg尺寸15纳米的氨基化长余辉发光纳米粒子, 分散在1.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M, pH7.2), 室温反应2小时; 得到的醛基化长余辉发光纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(10000g, 15min), 再分散在1.0mL PBS(0.01M, pH7.2)溶液中, 加入0.05mg抗AFP抗体(anti-AFP antibody), 室温反应2小时; 通过离心洗涤(10000g, 15min), 除去未反应的游离抗体后, 离心得到的沉淀物即是长余辉发光纳米粒子抗体复合物, 该复合物的简要分子结构式为ZnGa₂O₄:Cr³⁺-anti-AFP antibody。

[0045] 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长余辉发光纳米粒子抗体复合物, 目的是通过消除背景荧光信号, 增强信噪比, 极大地提高待检测物的检测灵敏度和检测准确性。基于长余辉发光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5.0mg长余辉发光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, pH8.2))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、涂覆了长余辉发光纳米粒子抗体复合物的玻璃纤维素膜(结合物垫)、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, 得到完整的基于长余辉发光纳米粒子抗体复合物的免疫层析试纸。

[0046] 本实施例的定量检测方法如下:

[0047] (1)向结合物垫上滴入待检测样品;

[0048] (2)用激发光照射测试线6和质控线7; 具体是用405纳米的LED光源照射C线与T线区域30秒, 照射功率为100mW/cm², 对C线与T线上结合的长余辉发光纳米粒子抗体复合物进行能量供给;

[0049] (3)停止激发光照射后, 再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, 检测长余辉发光纳米粒子抗体复合物的余辉光信号。

[0050] 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。

[0051] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的长余辉纳米材料的独特发光优势,仅需要在读数前使用激发光激发,而在后续的读数过程中无需再次激发;该方法消除了背景荧光信号的干扰,可实现待测物的高灵敏定量检测。

[0052] 通过与传统荧光免疫层析试纸对AFP的检测对比,发现基于本发明的长余辉发光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12倍;但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0053] 实施例2

[0054] 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。

[0055] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗原和兔IgG的长余辉发光纳米粒子。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);

[0056] 所述测试线6上包被有能特异性捕获结核抗体的抗原;

[0057] 所述质控线7上包被有能特异性捕获长余辉发光纳米粒子上标记的兔IgG的抗体。

[0058] 所用的长余辉发光纳米粒子同实施例1。

[0059] 为后续生物标记抗原应用,该长余辉发光纳米粒子还需表面引入可供化学偶联的官能团。具体实施如下:将上述获得的尺寸15纳米的长余辉发光纳米粒子(1.0g)借助水浴超声波分散(功率80w,超声时间5min)分散于10mL牛血清白蛋白(BSA)水溶液(2.0%,wt)中,室温搅拌6小时后离心分离(10000g,25min),得到的沉淀物即是BSA表面修饰后的长余辉发光纳米粒子,简要分子结构式为 $ZnGa_2O_4:Cr^{3+}$ -BSA,-BSA为长余辉发光纳米粒子表面上引入的牛血清白蛋白,带有羧基官能团,可用于抗原和兔IgG标记。

[0060] BSA修饰的长余辉发光纳米粒子的抗原和兔IgG标记。该标记方法为常用方法。本实例选取结核抗体作为一种疾病模型加以阐述。标记方法如下:称取以上制备好的10mg尺寸15纳米的BSA修饰的长余辉发光纳米粒子分散在1.0mL PBS(0.01M,pH7.2)溶液中,再加入0.05mg TB重组抗原和0.05mg兔IgG,混匀后向上述体系加入新鲜配置的8.0mg/mL碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)水溶液20 μ L,室温反应2小时后,通过离心洗涤(10000g,25min),除去未反应的游离蛋白后,离心得到的沉淀物即是长余辉发光纳米粒子抗原复合物。

[0061] 所述免疫层析试纸的制作方法同实施例1。

[0062] 本实施例的定量检测方法如下:

[0063] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0064] (2)用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用405纳米的LED光源照射C线与T线区域25秒,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的长余辉发光纳米粒子抗原复合物进行能量供给;

[0065] (3)停止激发光照射后,再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,检测长余辉发光纳米粒子抗体复合物的余辉光信号。

[0066] 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。

[0067] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的长余辉纳米材料的独特发光优势,仅需要在读数前使用激发光激发,而在后续的读数过程中无需再次激发;该方法消除了背景荧光信号的干扰,实现待测物的高灵敏定量检测。

[0068] 通过与传统荧光免疫层析试纸对TB抗体的检测对比,发现基于本发明的长余辉发光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。

[0069] 实施例3

[0070] 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。

[0071] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗体的长余辉发光纳米粒子。该检测抗体是能特异性检测肌钙蛋白I的抗体(anti-cTnI antibody);

[0072] 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;

[0073] 所述质控线7上包被有能特异性捕获长余辉发光纳米粒子上标记的抗体的抗体(二抗)。

[0074] 所用的长余辉发光纳米粒子的分子结构式是 $\text{CaTiO}_3:\text{Pr}^{3+}@\text{IpSiO}_2$,其粒子尺寸为250纳米。 IpSiO_2 为大孔二氧化硅纳米粒子。该长余辉发光纳米粒子的制备方法如下:(1)称取0.1克聚苯乙烯-b-聚丙烯酸双亲性嵌段共聚物PS(20000)-b-PAA(900),涉及到的分子量为数均分子量,作为致孔剂溶解在30mL的四氢呋喃中,搅拌至充分溶解后加入60mL去离子水,继续搅拌2小时后利用加入氨水将上述体系溶液pH调节至11.5,再加入0.2克TEOS,室温反应24小时,离心分离(8000g,15min)后留取沉淀物,用无水乙醇分散,再次离心分离(8000g,15min)后留取沉淀物,80摄氏度干燥,600摄氏度下煅烧除去致孔剂,利用高分辨投射电子显微镜得知所获得尺寸为250纳米的大孔二氧化硅纳米粒子,利用BET比表面分析和 N_2 吸附-脱吸附方法得知产品的比表面积达到 $450\text{m}^2/\text{g}$,孔道容积为 $3.2\text{cm}^3/\text{g}$,大孔孔道尺寸约22.2nm,利用小角x射线散射(SAXS)表征和小角x射线衍射表征得知所获得的大孔二氧化硅纳米粒子的大孔具有六方的孔道结构,与投射电子显微镜所观测的结果一致。所获得大孔通道作为微反应器用于长余辉材料的合成。(2)称取1.18g四水合硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),0.008g硝酸镨($\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$),1.05g柠檬酸,0.5g聚乙二醇PEG(分子量为一万)和2.2mL钛酸四丁酯,将上述称取物溶入30mL去离子水中,搅拌至完全溶解状态,用0.5M的硝酸溶液将上述混合溶液的pH调节至4.0后,再加入2.0g上述制备好的大孔二氧化硅纳米粒子,借助水浴超声波分散(功率80w,超声时间5min),于室温搅拌6小时,以致大孔二氧化硅纳米粒子吸附金属离子,然后离心分离(8000g,15min)获得填充了金属离子的大孔纳米级别二氧化硅粒子。离心得到的沉淀物80摄氏度干燥2小时后置于含有1%~12%还原性氢气的氩气气氛中,于650℃煅烧2小时,即得到250nm左右单分散性的长余辉二氧化硅纳米粒子。所获得纳米粒子经过405nm LED光源激发照射60s后(照射功率为 $100\text{mW}/\text{cm}^2$),停止照射,经光谱仪检测其长余辉发射时间可达1.5小时,发射波长为615nm,完全满足读数仪定量检测。其简要分子结构式为 $\text{CaTiO}_3:\text{Pr}^{3+}@\text{IpSiO}_2$,其中Ip为大孔(Large pore)的首字母缩写。

[0075] 为后续生物标记抗体应用,该长余辉发光纳米粒子还需表面引入可供化学偶联的

官能团。具体实施如下：将上述获得的尺寸250纳米的长余辉发光纳米粒子(1.0g)借助水浴超声波分散(功率80w,超声时间5min)分散于20mL无水乙醇中,再加入0.05g 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),于室温搅拌反应48小时。离心分离(10000g,15min)留取沉淀物,利用无水乙醇分散后再次离心(10000g,15min),得到的沉淀物即是氨基化的长余辉发光纳米粒子,简要分子结构式为 $\text{CaTiO}_3:\text{Pr}^{3+}@\text{IpSiO}_2\text{-NH}_2$, -NH_2 为长余辉发光纳米粒子表面上引入的氨基官能团,可用于抗体标记。

[0076] 氨基化长余辉发光纳米粒子的抗体标记。该抗体标记方法为常用方法。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。标记方法如下：称取以上制备好的20mg尺寸250纳米的氨基化长余辉发光纳米粒子分散在2.0mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M,pH7.2),室温反应2小时;得到的醛基化长余辉发光纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(8000g,15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M,pH7.2)溶液中,加入0.2mg抗肌钙蛋白I抗体(anti-cTnI antibody),室温反应2小时;通过离心洗涤(8000g,15min),除去未反应的游离抗体后,离心得到的沉淀物即是长余辉发光纳米粒子抗体复合物,该复合物的简要分子结构式为 $\text{CaTiO}_3:\text{Pr}^{3+}@\text{IpSiO}_2\text{-anti-cTnI antibody}$ 。

[0077] 所述免疫层析试纸的制作同实施例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405纳米的LED光源照射C线与T线区域30秒,照射功率为 $100\text{mW}/\text{cm}^2$,对C线与T线上结合的长余辉发光纳米粒子抗体复合物进行能量供给；

[0081] (3)停止激发光照射后,再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,检测长余辉发光纳米粒子抗体复合物的余辉光信号。

[0082] 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。

[0083] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的长余辉纳米材料的独特发光优势,仅需要在读数前使用激发光激发,而在后续的读数过程中无需再次激发;该方法消除了背景荧光信号的干扰,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条对AFP的检测对比,发现基于本发明的长余辉发光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16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4

[0086] 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。

[0087] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗原和兔IgG的长余辉发光纳米粒子。该检测抗体是能特异性检测血液中梅毒(TP)抗体的重组抗原；

[0088] 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；

[0089] 所述质控线7上包被有能特异性捕获长余辉发光纳米粒子上标记的兔IgG的抗体。

[0090] 所用的长余辉发光纳米粒子和表面官能团化方法同实施例3。

[0091] 氨基化长余辉发光纳米粒子的抗原标记。该抗体标记方法为常用方法。本发明选取血液中梅毒抗体作为一种疾病模型加以阐述。标记方法如下：称取以上制备好的10mg尺寸250纳米的氨基化长余辉发光纳米粒子分散在1.5mL含有5%戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(0.01M,pH7.2),室温反应2小时;得到的醛基化长余辉发光纳米粒子通过离心沉淀洗涤后(8000g,15min),再分散在1.0mL PBS(0.01M,pH7.2)溶液中,加入0.15mg TP重组抗原和0.15mg兔IgG,室温反应2小时;通过离心洗涤(8000g,15min),除去未反应的游离抗原后,离心得到的沉淀物即是长余辉发光纳米粒子抗原复合物。

[0092] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。

[0093] 本实施例的定量检测方法如下:

[0094] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0095] (2)用激发光照射测试线6和质控线7;具体是用405纳米的LED光源照射C线与T线区域40秒,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的长余辉发光纳米粒子抗原复合物进行能量供给;

[0096] (3)停止激发光照射后,再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,检测长余辉发光纳米粒子抗体复合物的余辉光信号。

[0097] 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。

[0098] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的长余辉发光纳米材料的独特发光优势,仅需要在读数前使用激发光激发,而在后续的读数过程中无需再次激发;该方法消除了背景荧光信号的干扰,实现待测物的高灵敏定量检测。

[0099] 通过与传统荧光免疫层析试纸对TP的检测对比,发现基于本发明的长余辉发光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。

[0100] 实施例5

[0101] 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。

[0102] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗体的长余辉发光纳米粒子。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);

[0103] 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;

[0104] 所述质控线7上包被有能特异性捕获长余辉发光纳米粒子上标记的抗体的抗体(二抗)。

[0105] 所用的长余辉发光纳米粒子的分子结构式是ZnGaGe₂O₄:Cr³⁺,其粒子尺寸为25纳米。该长余辉发光纳米粒子的制备方法如下:配置1.0M硝酸锌(Zn(NO₃)₂)水溶液,1.0M硝酸镓(Ga(NO₃)₃)水溶液,1.0M硝酸锗(Ge(NO₃)₂)水溶液,0.001M硝酸铬(Cr(NO₃)₃)水溶液。按照上述浓度计算并量取2mmol硝酸锌,3mmol硝酸镓,0.8mmol硝酸锗,0.002mmol硝酸铬,并用去离子水将体系溶液体积增加至20mL,搅拌混匀后,在搅拌过程中向上述体系溶液中快速

加入氨水(28%, wt)使体系溶液pH为9.0, 室温下继续搅拌半小时后转入容量为40mL的聚四氟乙烯内衬中, 再将内衬放入到水热反应釜中, 220℃进行水热反应10小时, 自然冷却至室温, 离心(10000g, 15min)得到白色沉淀物, 该沉淀物用0.01M盐酸水溶液分散, 得到光学透明的溶液, 再向该溶液中加入等体积的异丙醇, 离心(10000g, 20min)得到的沉淀物真空干燥后即为长余辉发光纳米粒子。利用透射电子显微镜观察该长余辉发光纳米粒子的尺寸为25纳米, 所获得的长余辉发光纳米粒子经过405nm LED光源激发照射40s后(照射功率为100mW/cm²), 停止照射, 经光谱仪检测其长余辉发射时间可达1小时, 发射波长为697nm, 完全满足免疫层析试纸读数仪定量检测。其简要分子结构式为ZnGaGe₂O₄:Cr³⁺。

[0106] 该长余辉发光纳米粒子的表面官能团化方法同实施例2。

[0107] BSA修饰的长余辉发光纳米粒子的抗体标记。该标记方法为常用方法。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。标记方法如下: 称取以上制备好的15mg尺寸25纳米的BSA修饰的长余辉发光纳米粒子分散在1.0mL PBS(0.01M, pH7.2)溶液中, 再加入0.08mg抗CRP抗体, 混匀后向上述体系加入新鲜配置的8.0mg/mL碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)水溶液20μL, 室温反应2小时后, 通过离心洗涤(10000g, 25min), 除去未反应的游离抗体后, 离心得到的沉淀物即是长余辉发光纳米粒子抗体复合物。

[0108] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。

[0109] 本实施例的定量检测方法如下:

[0110] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品;

[0111] (2)用激发光照射测试线6和质控线7; 具体是用405纳米的LED光源照射C线与T线区域30秒, 照射功率为100mW/cm², 对C线与T线上结合的长余辉发光纳米粒子抗体复合物进行能量供给;

[0112] (3)停止激发光照射后, 再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, 检测长余辉发光纳米粒子抗体复合物的余辉光信号。

[0113] 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。

[0114] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理, 结合所制备的长余辉发光纳米材料的独特发光优势, 仅需要在读数前使用激发光激发, 而在后续的读数过程中无需再次激发; 该方法消除了背景荧光信号的干扰, 实现待测物的高灵敏定量检测。

[0115] 通过与传统荧光免疫层析试纸对CRP的检测对比, 发现基于本发明的长余辉发光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15倍; 但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。

[0116] 实施例6

[0117] 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。

[0118] 所述结合物垫3上设有已标记有检测抗原和兔IgG的长余辉发光纳米粒子。该检测抗原是能特异性检测血液中HSP70抗体的抗原;

[0119] 所述测试线6上包被有能特异性捕获HSP70抗体的抗原;

- [0120] 所述质控线7上包被有能特异性捕获长余辉发光纳米粒子上标记的兔IgG的抗体。
- [0121] 所用的长余辉发光纳米粒子及其表面官能团化方法同实施例5。
- [0122] BSA修饰的长余辉发光纳米粒子的抗原标记。该标记方法为常用方法。本实例选取血液中HSP70抗体作为一种疾病模型加以阐述。标记方法如下：称取以上制备好的25mg尺寸25纳米的BSA修饰的长余辉发光纳米粒子分散在3.0mL PBS(0.01M, pH7.2)溶液中,再加入0.05mg HSP70抗原和0.04mg兔IgG,混匀后向上述体系加入新鲜配置的8.0mg/mL碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)水溶液25 μ L,室温反应2小时后,通过离心洗涤(10000g, 25min),除去未反应的游离抗原后,离心得到的沉淀物即是长余辉发光纳米粒子抗原复合物。
- [0123] 所述免疫层析试纸的制作同实施例1。
- [0124] 本实施例的定量检测方法如下：
- [0125] (1)向结合物垫3上滴入待检测样品；
- [0126] (2)用激发光照射测试线6和质控线7；具体是用405纳米的LED光源照射C线与T线区域45秒,照射功率为100mW/cm²,对C线与T线上结合的长余辉发光纳米粒子抗原复合物进行能量供给；
- [0127] (3)停止激发光照射后,再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,检测长余辉发光纳米粒子抗体复合物的余辉光信号。
- [0128] 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。
- [0129] 本实施例利用抗原-抗体特异性识别原理,结合所制备的长余辉发光纳米材料的独特发光优势,仅需要在读数前使用激发光激发,而在后续的读数过程中无需再次激发；该方法消除了背景荧光信号的干扰,实现待测物的高灵敏定量检测。
- [0130] 通过与传统荧光免疫层析试纸对HSP70抗体的检测对比,发现基于本发明的长余辉发光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9倍；但对检测样品处理要求和检测用时上没有明显变化。
- [0131] 以上所述仅为本发明的优先实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	免疫层析试纸及其检测方法		
公开(公告)号	CN105929155A	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	CN201610537749.9	申请日	2016-07-08
[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		
发明人	张兵波		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	刘莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种免疫层析试纸，包括结合物垫、测试线和质控线；所述结合物垫上设有已标记检测抗体或检测抗原的长余辉发光纳米粒子。所述测试线包被有针对检测样品中目标物的捕获抗体或捕获抗原；所述质控线包被有用于识别已标记在长余辉发光纳米粒子上的检测抗体的抗体或检测抗原的抗体。本发明的优点是利用长余辉发光材料独特的长余辉发光性能，用余辉光信号作为准确的定量读数检测结果；有效消除了干扰信号，极大提升了对检测物的检测灵敏度和定量准确性。

