



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106932598 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201710181716.X

(22)申请日 2017.03.24

(71)申请人 南通伊仕生物技术股份有限公司  
地址 226000 江苏省南通市经济技术开发区星湖大道1692号15号厂房A座

(72)发明人 欧卫军 孙一品 邵志燕 徐秋楠

(74)专利代理机构 南京正联知识产权代理有限公司 32243

代理人 钱靓

(51) Int. Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

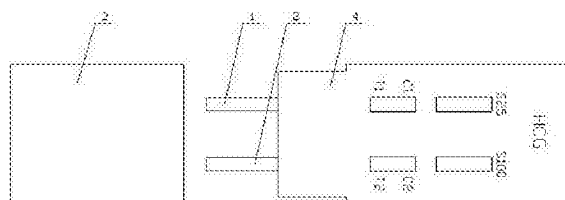
权利要求书3页 说明书9页 附图2页

## (54)发明名称

HCG周期检测试剂盒及其制备方法

## (57)摘要

本发明公开了一种HCG周期检测试剂盒,包括上盖和卡壳,卡壳内设有两个平行设置的凹槽,其中一个凹槽中安装有T1检测试纸,另一个凹槽中安装有T2检测试纸;其制备方法的步骤包括:硝酸纤维素膜的制备;胶体金垫的标记及固相;组装及裁切。本发明应用双抗体夹心法及免疫层析法的原理定性检测孕龄妇女尿液中的人绒毛膜促性腺激素(hCG),检测步骤较为简单,5分钟内就可以观察到结果,一般使用者可以自己进行检测,检测结果较为精确。本发明通过第一检测线和第二检测线颜色深浅,从而可估算怀孕周数,推测受孕时间。



1. 一种HCG周期检测试剂盒,其特征在于:包括上盖(3)和卡壳(4),所述卡壳(4)内设有两个平行设置的凹槽,其中一个所述凹槽中安装有T1检测试纸(1),另一个所述凹槽中安装有T2检测试纸(2);

所述T1检测试纸(1)包括第一塑料基片(1-1),所述第一塑料基片(1-1)上设有第一上样垫(1-2)和第一吸水垫(1-3),所述第一上样垫(1-2)和所述第一吸水垫(1-3)上均设有第一保护膜(1-4),所述第一上样垫(1-2)和所述第一吸水垫(1-3)之间下方设有第一硝酸纤维素膜(1-5),所述第一上样垫(1-2)的连接端设有固相化胶体金T1线(1-6),所述固相化胶体金T1线(1-6)的一端与所述第一硝酸纤维素膜(1-5)的一端搭接在一起,所述第一硝酸纤维素膜(1-5)上依次包被有第一检测线(T1)和第一质控线(C1),所述固相化胶体金T1线(1-6)为抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体;第一检测线(T1)包被抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体和第一质控线(C1)包被抗鼠IgG多克隆抗体;

所述T2检测试纸(2)包括第二塑料基片(2-1),所述第二塑料基片(2-1)上设有第二上样垫(2-2)和第二吸水垫(2-3),所述第二上样垫(2-2)和所述第二吸水垫(2-3)上均设有第二保护膜(2-4),所述第二上样垫(2-2)和所述第二吸水垫(2-3)之间下方设有第二硝酸纤维素膜(2-5),所述第二上样垫(2-2)的连接端设有固相化胶体金T2线(2-6),所述固相化胶体金T2线(2-6)的一端与所述第二硝酸纤维素膜(2-5)的一端搭接在一起,所述第二硝酸纤维素膜(2-5)上依次包被有第二检测线(T2)和第二质控线(C2),所述固相化胶体金T2线(2-6)为抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体+游离 $\beta$ 抗体;第二检测线(T2)包被抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体和第二质控线(C2)包被抗鼠IgG多克隆抗体;

一种HCG周期检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

A、硝酸纤维素膜的制备:

a、选择3 $\mu$ m~10 $\mu$ m孔径的硝酸纤维素膜,根据需要将膜分切成宽度为大于等于2.0cm,长度为30.5cm的规格备;

b、用0.1M磷酸盐缓冲液配制供检测线包被使用的抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体1.3mg/ml及用质量百分含量0.85%的氯化钠缓冲液配制质控线包被使用的抗鼠IgG多克隆抗体2.0mg/ml;

c、选择硝酸纤维素膜的抗体包被面并作标记,将需包被的检测线和质控线平行均匀的包被在膜片上,且检测线与质控线的间距控制在距离0.5cm,硝酸纤维素膜在4 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C的恒温条件下干燥备用;

d、配置封闭处理浸泡液,向配液罐加入实际生产量的纯化水;用电子分析天平称量0.1Mol/l缓冲液、质量百分含量0.5%的糖份、质量百分含量1%的封闭蛋白、质量百分含量0.05%的防腐剂,直接加入到配液罐中搅拌,搅拌直至完全溶解,加纯化水定容至所需体积,充分搅拌均匀,搅拌时间不少于10分钟,备用;

e、将包被膜放于处理槽中,加入配好的温度在36 $^{\circ}$ C 0.01M的PBS缓冲液,确保每条膜完全浸没在0.01M的PBS缓冲液中5分钟,并保证膜不移动、不重叠,5分钟后将膜从处理槽中取出,将0.01M的PBS缓冲液倒掉;再将第一次用0.01M的PBS缓冲液浸泡过5分钟的膜放入处理槽中,加入配好的0.01M的PBS缓冲液,确保每条膜完全浸没在0.01M的PBS缓冲液中30分钟,并保证膜不移动、不重叠,30分钟后将膜从处理槽中取出,将0.01M的PBS缓冲液倒掉;然后将用0.01M的PBS缓冲液浸泡过两次的膜放于处理槽中,用配好的封闭处理浸泡液浸泡,确保每条膜完全浸没在处理液中15分钟,并保证膜不移动、不重叠,15分钟后将膜从处理槽中

取出,用镊子将每框的膜重新拉一边,确保膜没有移到框子外面和没有膜重贴后,再将框子和膜放入处理液中继续浸泡20分钟,20分钟后将膜从处理槽中取出,用镊子将膜拉在纱布上晾稍干;

f、贴板干燥:撕去胶板双面胶上切割线中间的白纸,用镊子将膜正好放在胶板中央空白位置并使切角在右上方,且胶板右边与膜右边平齐,避免在生产过程中的误差,确保显色位置相对准确,贴板时全部顶C线一头贴,膜贴在胶板上后,隔着双面胶纸抹平膜面,避免有气泡,控制室内的温度18~28℃、相对湿度≤40%,并保证干燥间空气能循环流通且除湿机风不会直接吹到膜面上。

2. 干燥时间≥4小时,后备用;

B、聚酯纤维条的标记及固相:

a、胶体金复溶液的配制:向配液罐加入实际生产量的纯化水;用电子分析天平称量质量百分含量5%的海藻糖、质量百分含量2%的牛血清白蛋白、质量百分含量0.5%的柠檬酸三钠、质量百分含量0.05%的聚乙二醇、质量百分含量0.05%的 $\text{NaN}_3$ ,直接加入到配液罐中搅拌,搅拌直至完全溶解,加纯化水定容至所需体积,充分搅拌均匀,搅拌时间大于30分钟,备用;

b、用量筒量取需要标记量的胶体金,按PH6.5-7.0进行调节,即加入体积百分含量0.53%的0.2mol/L的碳酸钾溶液,于磁力搅拌器上搅拌15分钟后,取抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体按5ug/ml标记胶体金体积百分含量5%的双蒸水中稀释并混合均匀,加入胶体金中,于磁力搅拌器上搅拌30分钟后加入体积百分含量0.5%稳定剂后搅拌30分钟后离心,收集沉淀,用胶体金复溶液按体积百分含量3%复溶,于磁力搅拌器上搅拌至混合均匀,备用;

c、取上述b 体积百分含量3%复溶的胶体金,用胶体金复溶液按体积百分含量40%复溶,于磁力搅拌器上混合均匀,将混合均匀的胶体金溶液按照 $50\mu\text{I}/\text{cm}^2$ 进行浇制在准备好的胶体金吸附垫上,置于干燥室晾干≥4个小时,干燥室控制温度18-28℃,相对湿度≤40%,保证空气畅通且气流不能直接吹于胶体金吸附垫上,将干燥好的标记金放入到装有干燥剂的铝箔袋中,密封保存,做好标记为T1线,备用;

d、用量筒量取需要标记量的胶体金,按PH6.5-7.0进行调节,即加入体积百分含量0.53% 0.2mol/L的碳酸钾溶液,于磁力搅拌器上搅拌15分钟后,取抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体按5ug/ml标记胶体金,用体积百分含量5%的双蒸水稀释并混合均匀,加入胶体金中,于磁力搅拌器上搅拌30分钟后加入体积百分含量0.5%稳定剂后搅拌30分钟后离心,收集沉淀,用胶体金复溶液按体积百分含量3%复溶,于磁力搅拌器上搅拌至混合均匀,备用;

e、取上述d体积百分含量 3%复溶的胶体金,用胶体金复溶液按体积百分含量40%复溶,再按抗体标记量1:10加入游离 $\beta$ 抗体,于磁力搅拌器上混合均匀,将混合均匀的胶体金溶液按照 $50\mu\text{I}/\text{cm}^2$ 进行浇制在准备好的胶体金吸附垫上,置于干燥室晾干≥4个小时,干燥室控制温度18-28℃,相对湿度≤40%,保证空气畅通且气流不能直接吹于胶体金吸附垫上,将干燥好的标记金放入到装有干燥剂的铝箔袋中,密封保存,做好标记为T2线,备用;

C、组装及裁切:

a、取已粘贴硝酸纤维素膜的透明基片半成品,将固相了的固相化胶体金T1线按0.5cm宽度裁切成 $0.5\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的条状后粘贴在透明基片上,并保持与硝酸纤维素膜呈搭接1mm,将吸水纸复合在硝酸纤维素膜的透明基片膜上端并与膜搭接1mm,将吸样载体复合在固相

了的胶体金T1线下端并与其搭接1mm,做好标记,备用;

b、根据相应的反应装置,将已组装备用的基片,切割成条状试纸,做好标记T1检测试纸备用;

c、取已粘贴硝酸纤维素膜的透明基片半成品,将固相了的固相化胶体金T2线按0.5cm宽度裁切成0.5cm×30cm的条状后粘贴在透明基片上,并保持与硝酸纤维素膜呈搭接约1mm,将吸水纸复合在硝酸纤维素膜的透明基片膜上端并与膜搭接约1mm,将吸样载体复合在固相了的胶体金T2线下端并与其搭接约1mm,做好标记,备用;

d、根据相应的反应装置,将已组装备用的基片,切割成条状试纸,做好标记T2检测试纸备用;

e、将准备好合格的T1检测试纸装入合格卡壳的左侧凹槽中,手柄纸在上方,再将准备好合格的T2检测试纸装入卡壳的右侧凹槽中,盖上上盖,捏紧,上盖上的文字应与试纸对应。

3. 根据权利要求2所述一种人绒毛膜促性腺激素周期检测试纸的制备方法,其特征在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的缓冲液为磷酸盐。

4. 根据权利要求2所述一种人绒毛膜促性腺激素周期检测试纸的制备方法,其特征在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的糖份为蔗糖或海藻糖。

5. 根据权利要求2所述一种人绒毛膜促性腺激素周期检测试纸的制备方法,其特征在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的封闭蛋白为络蛋白或牛血清白蛋白。

6. 根据权利要求2所述一种人绒毛膜促性腺激素周期检测试纸的制备方法,其特征在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的防腐剂为NaN<sub>3</sub>或硫柳汞。

## HCG周期检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验试剂领域,涉及一种HCG周期检测试剂盒的制备方法。

### 背景技术

[0002] 在早孕期间,怀孕天数是从上一次月经结束后的第一天开始算起,这种计算方法较为不精确;一般的早孕检测试纸是采用双抗体夹心一步法进行检测的,以胶体金为指示标记,检测尿液中HCG浓度,只能用以判断是否怀孕,而不能检测出怀孕时间。人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)是妊娠期期间由胎盘滋养层细胞分泌生产的一种糖蛋白激素,由两个不同的亚基, $\alpha$ 、 $\beta$ 以非共价键连接组成。在激素的产生、分泌、代谢等过程中,hCG分子会发现断裂、离解等多种变化,从而在血、尿中以多种分子形式存在。HCG是唯一不随胎盘重量增加而分泌增多的胎盘激素,妊娠1周后血液HCG为5-50mmIU/mI,尿液HCG>25mIU/mI,第8-10周左右达到高峰,持续1-2周后迅速减低,以后逐渐下降并以1/5-1/10左右峰值水平维持至分娩。

[0003] 目前,通过抽血检验、超声检测、HCG检测与超声检测结合的方法来检测怀孕天数,但是这些方法需要专业人员经过较长时间的检测才能得到检测结果,操作较为复杂。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服以上的不足,提供一种检测方便、检测速度快、检测效率高的HCG周期检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案来实现:一种HCG周期检测试剂盒,包括上盖和卡壳,卡壳内设有两个平行设置的凹槽,其中一个凹槽中安装有T1检测试纸,另一个凹槽中安装有T2检测试纸;T1检测试纸包括第一塑料基片,第一塑料基片上设有第一上样垫和第一吸水垫,第一上样垫和第一吸水垫上均设有第一保护膜,第一上样垫和第一吸水垫之间下方设有第一硝酸纤维素膜,第一上样垫的连接端设有固相化胶体金T1线,固相化胶体金T1线的一端与第一硝酸纤维素膜的一端搭接在一起,第一硝酸纤维素膜上依次包被有第一检测线和第一质控线,固相化胶体金T1线为抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体;第一检测线包被抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体和第一质控线包被抗鼠IgG多克隆抗体;

T2检测试纸包括第二塑料基片,第二塑料基片上设有第二上样垫和第二吸水垫,第二上样垫和第二吸水垫上均设有第二保护膜,第二上样垫和第二吸水垫之间下方设有第二硝酸纤维素膜,第二上样垫的连接端设有固相化胶体金T2线,固相化胶体金T2线的一端与第二硝酸纤维素膜的一端搭接在一起,第二硝酸纤维素膜上依次包被有第二检测线和第二质控线,固相化胶体金T2线为抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体+游离 $\beta$ 抗体;第二检测线包被抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体和第二质控线包被抗鼠IgG多克隆抗体;

一种HCG周期检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

A、硝酸纤维素膜的制备:

a、选择3 $\mu$ m~10 $\mu$ m孔径的硝酸纤维素膜,根据需要将膜分切成宽度为大于等于2.0cm,

长度为30.5cm的规格备；

b、用0.1M磷酸盐缓冲液配制供测线包被使用的抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体1.3mg/ml及用质量百分含量0.85%的氯化钠缓冲液配制质控线包被使用的抗鼠IgG多克隆抗体2.0mg/ml；

c、选择硝酸纤维素膜的抗体包被面并作标记，将需包被的检测线和质控线平行均匀的包被在膜片上，且检测线与质控线的间距控制在距离0.5cm，硝酸纤维素膜在4℃~35℃的恒温条件下干燥备用；

d、配置封闭处理浸泡液，向配液罐加入实际生产量的纯化水；用电子分析天平称量0.1mol/l缓冲液、质量百分含量0.5%的糖份、质量百分含量1%的封闭蛋白、质量百分含量0.05%的防腐剂，直接加入到配液罐中搅拌，搅拌直至完全溶解，加纯化水定容至所需体积，充分搅拌均匀，搅拌时间不少于10分钟，备用；

e、将包被膜放于处理槽中，加入配好的温度在36℃0.01M的PBS缓冲液，确保每条膜完全浸没在0.01M的PBS缓冲液中5分钟，并保证膜不移动、不重叠，5分钟后将膜从处理槽中取出，将0.01M的PBS缓冲液倒掉；再将第一次用0.01M的PBS缓冲液浸泡过5分钟的膜放入处理槽中，加入配好的0.01M的PBS缓冲液，确保每条膜完全浸没在0.01M的PBS缓冲液中30分钟，并保证膜不移动、不重叠，30分钟后将膜从处理槽中取出，将0.01M的PBS缓冲液倒掉；然后将用0.01M的PBS缓冲液浸泡过两次的膜放于处理槽中，用配好的封闭处理浸泡液浸泡，确保每条膜完全浸没在处理液中15分钟，并保证膜不移动、不重叠，15分钟后将膜从处理槽中取出，用镊子将每框的膜重新拉一边，确保膜没有移到框子外面和没有膜重贴后，再将框子和膜放入处理液中继续浸泡20分钟，20分钟后将膜从处理槽中取出，用镊子将膜拉在纱布上晾稍干；

f、贴板干燥：撕去胶板双面胶上切割线中间的白纸，用镊子将膜正好放在胶板中央空白位置并使切角在右上方，且胶板右边与膜右边平齐，避免在生产过程中的误差，确保显色位置相对准确，贴板时全部顶C线一头贴，膜贴在胶板上后，隔着双面胶纸抹平膜面，避免有气泡，控制室内的温度18~28℃、相对湿度 $\leq 40\%$ ，并保证干燥间空气能循环流通且除湿机风不会直接吹到膜面上。干燥时间 $\geq 4$ 小时，后备用；

#### B、聚酯纤维条的标记及固相：

a、胶体金复溶液的配制：向配液罐加入实际生产量的纯化水；用电子分析天平称量质量百分含量5%的海藻糖、质量百分含量2%的牛血清白蛋白、质量百分含量0.5%的柠檬酸三钠、质量百分含量0.05%的聚乙二醇、质量百分含量0.05%的 $\text{NaN}_3$ ，直接加入到配液罐中搅拌，搅拌直至完全溶解，加纯化水定容至所需体积，充分搅拌均匀，搅拌时间大于30分钟，备用；

b、用量筒量取需要标记量的胶体金，按PH6.5-7.0进行调节，即加入体积百分含量0.53%的0.2mol/L的碳酸钾溶液，于磁力搅拌器上搅拌15分钟后，取抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体按5ug/ml标记胶体金体积百分含量5%的双蒸水中稀释并混合均匀，加入胶体金中，于磁力搅拌器上搅拌30分钟后加入体积百分含量0.5%稳定剂后搅拌30分钟后离心，收集沉淀，用胶体金复溶液按体积百分含量3%复溶，于磁力搅拌器上搅拌至混合均匀，备用；

c、取上述b 体积百分含量3%复溶的胶体金，用胶体金复溶液按体积百分含量40%复溶，于磁力搅拌器上混合均匀，将混合均匀的胶体金溶液按照 $50\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 进行浇制在准备好的胶体金吸附垫上，置于干燥室晾干 $\geq 4$ 个小时，干燥室控制温度18-28℃，相对湿度 $\leq 40\%$ ，保证

空气畅通且气流不能直接吹于胶体金吸附垫上,将干燥好的标记金放入到装有干燥剂的铝箔袋中,密封保存,做好标记为T1线,备用;

注:胶体金为浇制,是因为浇制的胶体金可以自由的裁切宽度,从而方便调节产品的深浅显色。

[0006] d、用量筒量取需要标记量的胶体金,按PH6.5-7.0进行调节,即加入体积百分含量0.53% 0.2mol/L的碳酸钾溶液,于磁力搅拌器上搅拌15分钟后,取抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体按5ug/ml标记胶体金,用体积百分含量5%的双蒸水稀释并混合均匀,加入胶体金中,于磁力搅拌器上搅拌30分钟后加入体积百分含量0.5%稳定剂后搅拌30分钟后离心,收集沉淀,用胶体金复溶液按体积百分含量3%复溶,于磁力搅拌器上搅拌至混合均匀,备用;

e、取上述d体积百分含量 3%复溶的胶体金,用胶体金复溶液按体积百分含量40%复溶,再按抗体标记量1:10加入游离 $\beta$ 抗体,于磁力搅拌器上混合均匀,将混合均匀的胶体金溶液按照 $50\mu\text{I}/\text{cm}^2$ 进行浇制在准备好的胶体金吸附垫上,置于干燥室晾干 $\geq 4$ 个小时,干燥室控制温度18-28 $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 $\leq 40\%$ ,保证空气畅通且气流不能直接吹于胶体金吸附垫上,将干燥好的标记金放入到装有干燥剂的铝箔袋中,密封保存,做好标记为T2线,备用;

注:胶体金为浇制,是因为浇制的胶体金可以自由的裁切宽度,从而方便调节产品的深浅显色。

[0007] C、组装及裁切:

a、取已粘贴硝酸纤维素膜的透明基片半成品,将固相了的固相化胶体金T1线按0.5cm宽度裁切成0.5cm $\times$ 30cm的条状后粘贴在透明基片上,并保持与硝酸纤维素膜呈搭接约1mm,将吸水纸复合在硝酸纤维素膜的透明基片膜上端并与膜搭接约1mm,将吸样载体复合在固相了的胶体金T1线下端并与其搭接约1mm,做好标记,备用;

b、根据相应的反应装置,将已组装备用的基片,切割成条状试纸,做好标记T1检测试纸备用。

[0008] c、取已粘贴硝酸纤维素膜的透明基片半成品,将固相了的固相化胶体金T2线按0.5cm宽度裁切成0.5cm $\times$ 30cm的条状后粘贴在透明基片上,并保持与硝酸纤维素膜呈搭接约1mm,将吸水纸复合在硝酸纤维素膜的透明基片膜上端并与膜搭接约1mm,将吸样载体复合在固相了的胶体金T2线下端并与其搭接约1mm,做好标记,备用;

d、根据相应的反应装置,将已组装备用的基片,切割成条状试纸,做好标记T2检测试纸备用。

[0009] e、将准备好合格的T1检测试纸装入合格卡壳的左侧凹槽中,手柄纸在上方,再将准备好合格的T2检测试纸装入卡壳的右侧凹槽中,盖上上盖,捏紧,上盖上的文字应与试纸对应。

[0010] 本发明的进一步改进在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的缓冲液为磷酸盐。

[0011] 本发明的进一步改进在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的糖份为蔗糖或海藻糖。

[0012] 本发明的进一步改进在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液含有的封闭蛋白为络蛋白或牛血清白蛋白。

[0013] 本发明的进一步改进在于:硝酸纤维素膜制备d步骤和e步骤中的封闭处理浸泡液

含有的防腐剂为NaN<sub>3</sub>或硫柳汞。

[0014] 本发明与现有技术相比具有以下优点:本发明应用双抗体夹心法及免疫层析法的原理定性检测孕龄妇女尿液中的人绒毛膜促性腺激素(hCG),提示孕周期,检测步骤较为简单,5分钟内就可以观察到结果,一般使用者可以自己进行检测,检测结果较为精确。本发明通过T1检测线和T2检测线颜色深浅,从而可估算怀孕周数,推测受孕时间。

[0015] 附图说明:

图1为本发明的结构示意图;

图2为本发明的T1检测试纸结构示意图;

图3为本发明的T2检测试纸结构示意图;

图中标号:1-T1检测试纸、2-T2检测试纸、3-上盖、4-卡壳、1-1-第一塑料基片、1-2-第一上样垫、1-3-第一吸水垫、1-4-第一保护膜、1-5-第一硝酸纤维素膜、1-6-第一固相化胶体金T1线、T1-第一检测线、C1-第一质控线、2-1-第二塑料基片、2-2-第二上样垫、2-3-第二吸水垫、2-4-第二保护膜、2-5-第二硝酸纤维素膜、2-6-第二固相化胶体金T2线、T2-第二检测线、C2-第二质控线。

[0016] 具体实施方式:

为了加深对本发明的理解,下面将结合实施例和附图对本发明作进一步详述,该实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明保护范围的限定。

[0017] 如图1至图3示出了本发明一种早孕提示孕周期检测试纸的一种实施方式,包括上盖3和卡壳4,卡壳4内设有两个平行设置的凹槽,其中一个所述凹槽中安装有T1检测试纸1,另一个所述凹槽中安装有T2检测试纸2;

T1检测试纸1包括第一塑料基片1-1,第一塑料基片1-1上设有第一上样垫1-2和第一吸水垫1-3,第一上样垫1-2和第一吸水垫1-3上均设有第一保护膜1-4,第一上样垫1-2和第一吸水垫1-3之间下方设有第一硝酸纤维素膜1-5,第一上样垫1-2的连接端设有固相化胶体金T1线1-6,固相化胶体金T1线1-6的一端与第一硝酸纤维素膜1-5的一端搭接在一起,第一硝酸纤维素膜1-5上依次包被有第一检测线T1和第一质控线C1,固相化胶体金T1线1-6为抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体;第一检测线T1包被抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体和第一质控线C1包被抗鼠IgG多克隆抗体;

T2检测试纸2包括第二塑料基片2-1,第二塑料基片2-1上设有第二上样垫2-2和第二吸水垫2-3,第二上样垫2-2和第二吸水垫2-3上均设有第二保护膜2-4,第二上样垫2-2和第二吸水垫2-3之间下方设有第二硝酸纤维素膜2-5,第二上样垫2-2的连接端设有固相化胶体金T2线2-6,固相化胶体金T2线2-6的一端与第二硝酸纤维素膜2-5的一端搭接在一起,第二硝酸纤维素膜2-5上依次包被有第二检测线T2和第二质控线C2,固相化胶体金T2线2-6为抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体+游离 $\beta$ 抗体;第二检测线T2包被抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体和第二质控线C2包被抗鼠IgG多克隆抗体。

[0018] 一种HCG周期检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤::

A、硝酸纤维素膜的制备:

a、选择3 $\mu$ m~10 $\mu$ m孔径的硝酸纤维素膜,根据需要将膜分切成宽度为大于等于2.0cm,长度为30.5cm的规格备;

b、用0.1M磷酸盐缓冲液配制供测线包被使用的抗 $\alpha$ -HCG单克隆抗体1.3mg/ml及用质量

百分含量0.85%的氯化钠缓冲液配制质控线包被使用的抗鼠IgG多克隆抗体2.0mg/ml；

c、选择硝酸纤维素膜的抗体包被面并作标记，将需包被的检测线和质控线平行均匀的包被在膜片上，且检测线与质控线的间距控制在距离0.5cm，硝酸纤维素膜在4℃~35℃的恒温条件下干燥备用；

d、配置封闭处理浸泡液，向配液罐加入实际生产量的纯化水；用电子分析天平称量0.1mol/L缓冲液、质量百分含量0.5%的糖份、质量百分含量1%的封闭蛋白、质量百分含量0.05%的防腐剂，直接加入到配液罐中搅拌，搅拌直至完全溶解，加纯化水定容至所需体积，充分搅拌均匀，搅拌时间不少于10分钟，备用；

e、将包被膜放于处理槽中，加入配好的温度在36℃0.01M的PBS缓冲液，确保每条膜完全浸没在0.01M的PBS缓冲液中5分钟，并保证膜不移动、不重叠，5分钟后将膜从处理槽中取出，将0.01M的PBS缓冲液倒掉；再将第一次用0.01M的PBS缓冲液浸泡过5分钟的膜放入处理槽中，加入配好的0.01M的PBS缓冲液，确保每条膜完全浸没在0.01M的PBS缓冲液中30分钟，并保证膜不移动、不重叠，30分钟后将膜从处理槽中取出，将0.01M的PBS缓冲液倒掉；然后将用0.01M的PBS缓冲液浸泡过两次的膜放于处理槽中，用配好的封闭处理浸泡液浸泡，确保每条膜完全浸没在处理液中15分钟，并保证膜不移动、不重叠，15分钟后将膜从处理槽中取出，用镊子将每框的膜重新拉一边，确保膜没有移到框子外面和没有膜重贴后，再将框子和膜放入处理液中继续浸泡20分钟，20分钟后将膜从处理槽中取出，用镊子将膜拉在纱布上晾稍干；

f、贴板干燥：撕去胶板双面胶上切割线中间的白纸，用镊子将膜正好放在胶板中央空白位置并使切角在右上方，且胶板右边与膜右边平齐，避免在生产过程中的误差，确保显色位置相对准确，贴板时全部顶C线一头贴，膜贴在胶板上后，隔着双面胶纸抹平膜面，避免有气泡，控制室内的温度18~28℃、相对湿度≤40%，并保证干燥间空气能循环流通且除湿机风不会直接吹到膜面上。干燥时间≥4小时，后备用；

#### B、聚酯纤维条的标记及固相：

a、胶体金复溶液的配制：向配液罐加入实际生产量的纯化水；用电子分析天平称量质量百分含量5%的海藻糖、质量百分含量2%的牛血清白蛋白、质量百分含量0.5%的柠檬酸三钠、质量百分含量0.05%的聚乙二醇、质量百分含量0.05%的NaN<sub>3</sub>，直接加入到配液罐中搅拌，搅拌直至完全溶解，加纯化水定容至所需体积，充分搅拌均匀，搅拌时间大于30分钟，备用；

b、用量筒量取需要标记量的胶体金，按PH6.5-7.0进行调节，即加入体积百分含量0.53%的0.2mol/L的碳酸钾溶液，于磁力搅拌器上搅拌15分钟后，取抗β-HCG单克隆抗体按5ug/ml标记胶体金体积百分含量5%的双蒸水中稀释并混合均匀，加入胶体金中，于磁力搅拌器上搅拌30分钟后加入体积百分含量0.5%稳定剂后搅拌30分钟后离心，收集沉淀，用胶体金复溶液按体积百分含量3%复溶，于磁力搅拌器上搅拌至混合均匀，备用；

c、取上述b 体积百分含量3%复溶的胶体金，用胶体金复溶液按体积百分含量40%复溶，于磁力搅拌器上混合均匀，将混合均匀的胶体金溶液按照50μI/cm<sup>2</sup>进行浇制在准备好的胶体金吸附垫上，置于干燥室晾干≥4个小时，干燥室控制温度18-28℃，相对湿度≤40%，保证空气畅通且气流不能直接吹于胶体金吸附垫上，将干燥好的标记金放入到装有干燥剂的铝箔袋中，密封保存，做好标记为T1线，备用；

注：胶体金为浇制，是因为浇制的胶体金可以自由的裁切宽度，从而方便调节产品的深浅显色。

[0019] d、用量筒量取需要标记量的胶体金，按PH6.5-7.0进行调节，即加入体积百分含量0.53% 0.2mol/L的碳酸钾溶液，于磁力搅拌器上搅拌15分钟后，取抗 $\beta$ -HCG单克隆抗体按5ug/ml标记胶体金，用体积百分含量5%的双蒸水稀释并混合均匀，加入胶体金中，于磁力搅拌器上搅拌30分钟后加入体积百分含量0.5%稳定剂后搅拌30分钟后离心，收集沉淀，用胶体金复溶液按体积百分含量3%复溶，于磁力搅拌器上搅拌至混合均匀，备用；

e、取上述d体积百分含量 3%复溶的胶体金，用胶体金复溶液按体积百分含量40%复溶，再按抗体标记量1:10加入游离 $\beta$ 抗体，于磁力搅拌器上混合均匀，将混合均匀的胶体金溶液按照 $50\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 进行浇制在准备好的胶体金吸附垫上，置于干燥室晾干 $\geq 4$ 个小时，干燥室控制温度18-28 $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $\leq 40\%$ ，保证空气畅通且气流不能直接吹于胶体金吸附垫上，将干燥好的标记金放入到装有干燥剂的铝箔袋中，密封保存，做好标记为T2线，备用；

注：胶体金为浇制，是因为浇制的胶体金可以自由的裁切宽度，从而方便调节产品的深浅显色。

[0020] C、组装及裁切：

a、取已粘贴硝酸纤维素膜的透明基片半成品，将固相了的固相化胶体金T1线按0.5cm宽度裁切成 $0.5\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的条状后粘贴在透明基片上，并保持与硝酸纤维素膜呈搭接约1mm，将吸水纸复合在硝酸纤维素膜的透明基片膜上端并与膜搭接约1mm，将吸样载体复合在固相了的胶体金T1线下端并与其搭接约1mm，做好标记，备用；

b、根据相应的反应装置，将已组装备用的基片，切割成条状试纸，做好标记T1检测试纸备用。

[0021] c、取已粘贴硝酸纤维素膜的透明基片半成品，将固相了的固相化胶体金T2线按0.5cm宽度裁切成 $0.5\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的条状后粘贴在透明基片上，并保持与硝酸纤维素膜呈搭接约1mm，将吸水纸复合在硝酸纤维素膜的透明基片膜上端并与膜搭接约1mm，将吸样载体复合在固相了的胶体金T2线下端并与其搭接约1mm，做好标记，备用；

d、根据相应的反应装置，将已组装备用的基片，切割成条状试纸，做好标记T2检测试纸备用。

[0022] e、将准备好合格的T1检测试纸装入合格卡壳的左侧凹槽中，手柄纸在上方，再将准备好合格的T2检测试纸装入卡壳的右侧凹槽中，盖上上盖，捏紧，上盖上的文字应与试纸对应。

[0023] 本发明的应用为：本产品系由在硝酸纤维素膜上检测线位置均包被抗人绒毛膜促性腺激素 $\alpha$ -hCG单克隆抗体，质控线位置包被抗鼠IgG多克隆抗体，及在T1检测线胶体金垫上吸附的胶体金-抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ -hCG单克隆抗体结合物组成和T2检测线胶体金垫上吸附的胶体金-抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ -hCG单克隆抗体和游离 $\beta$ 抗体组成，应用双抗体夹心法及免疫层析法的原理定性检测尿液中人绒毛膜促性腺激素。

[0024] 检测开始时间为月经应该来但没有来的当天。如果提前检测，请在预计的月经之日再次检测。如果月经推迟，请在3天后再次检测。如果经期不规律，检测前应以最近月份中最长的经期计算。如果完全不知道月经预计何时开始，建议至少在上次未采取保护措施同房19天后再进行检测。

[0025] 具体检测步骤为：(1)被检样品、试剂盒及其他所用器材均在室温平衡；(2)除去试剂盒外包装，在试纸卡上标明被检样品或对照品；(3)取下试纸卡卡套，将试纸卡样品端插入尿样中(试纸卡样品端需完全浸泡到尿液中)；(4)3-10秒后取出平放，5分钟内观察结果，观察T1检测线和T2检测线颜色的深浅，5分钟后结果无效。

[0026] 本发明通过T1检测线和T2检测线颜色深浅，从而可估算怀孕周数，推测受孕时间。检验结果如下：(1)阴性(-)：只有对照C线显色，检测线T1和T2均无显色，表明未怀孕；(2)阳性(+)：对照C线始终显色；T1、T2线显色情况见下表：

如何解读检测结果		
结果	受孕时间	医生确定的怀孕时间 (按照 28 天的经期)
检测线 T1 显色, 检测线 T2 无显色	检测结果为“怀孕”(+) 且约在 1~2 周前受孕。	3~4 周
检测线 T2 显色明显浅于检 测线 T1 显色	检测结果为“怀孕”(+) 且约在 2~3 周前受孕。	4~5 周
检测线 T2 显色浅于或接近 检测线 T1 显色	检测结果为“怀孕”(+) 且已受孕 3 周以上。	5 周以上

(3)无效：若试纸检测T区(T1和T2检测线)和对照C区(对照线)均无紫红色线出现，或者对照C区(对照线)无紫红色线出现，表示该试纸已经失效；

(4)根据所提示的怀孕时间，可以推算在何时受孕。但是，医生则是根据上次月经的第1天计算出怀孕时间。

[0027] 本发明应用双抗体夹心法及免疫层析法的原理定性检测尿液中人绒毛膜促性腺激素，提示孕周期。检测步骤较为简单，5分钟内就可以观察到结果，一般使用者可以自己进行检测，检测结果较为精确。本发明通过第一检测线和第二检测线颜色深浅，从而可估算怀孕周数，推测受孕时间。

[0028] 实施例1：

从同一批中随机抽样，最低抽样量不得少于检测用量的3倍。

[0029] 取样后将待检品置于黄色待检区，能当天检验的当天检验，不能的情况下必须于第二天检验完毕。检验合格剩下的纸条可作为留样，暂置于合格品区，然后根据产量以及留样要求再从生产上抽取一定的数量进行成品的留样。

[0030] 1、所需试剂如下：0mIU/mI的样品液：含蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)即为0mIU/mI的HCG样品液。50mIU/mI, 25mIU/mI, 12.5mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素(HCG)样品液：将人绒毛膜促性腺激素(HCG)标准品用含蛋白的磷酸盐缓冲液(0.01M PBS)配制成相应浓度；400mIU/mI, 200mIU/mI, 100mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素(HCG)样品液：将人绒毛膜促性腺激素(HCG)标准品用含蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)配制成相应浓度；500mIU/mI人促黄体生成素(hLH)：将hLH标准品用含蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)复溶后，用0mIU/mI的HCG样品液将其配制成浓度为500mIU/mI，即为hLH A液；用25mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素样品液将其配制成浓度为500mIU/mI，即为hLH B液；用200mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素样品液将其配

制成浓度为500mIU/mI,即为hLH C液;1000mIU/mI人卵泡刺激素(hFSH):将hFSH标准品用含蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)复溶后,用0mIU/mI的HCG样品液将其配制成浓度为1000mIU/mI,即为hFSH A液;用25mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素样品液将其配制成浓度为1000mIU/mI,即为hFSH B液;用200mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素样品液将其配制成浓度为1000mIU/mI,即为hFSH C液;1000 $\mu$ IU/mI 人促甲状腺激素(hTSH):将hTSH标准品用含蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)复溶后,用0mIU/mI的HCG样品液将其配制成浓度为1000 $\mu$ IU/mI,即为hTSH A液;用25mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素样品液将其配制成浓度为1000 $\mu$ IU/mI,即为hTSH B液;用200mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素样品液将其配制成浓度为1000 $\mu$ IU/mI,即为hTSH C液。

[0031] 2、物理性状:检验外观性状:取出试纸条,用目力观察,纸条应整洁完整、无毛刺、无破损、无污染;材料附着牢固。如果是笔、卡或棒型的还要检查其装配是否正确。膜条宽度:取3人份纸条用量尺测量纸条上膜的宽度。液体移行速度:取3人份纸条按说明书进行操作,卡型和笔型的吸样端浸入生理盐水中3~10秒钟后水平放置,从试纸浸入样品液开始用秒表(精度为0.01s)计时,直至液体达到下图所示的E区与F区之间的交界线时停止计时,所用的时间记为(t),用游标卡尺(精密度0.02mm)测量(A区+B区+E区)的长度,记为(L),计算L/t即为移行速度,重复测量3条测试条,取平均值,结果应符合液体移行速度不低于10mm/min,层析状态:规则,胶金不与水分层,5分钟内本底基本清晰。

[0032] 3、检验最低检测限:用国家级人绒毛膜促性腺激素标准品检验,配成浓度分别12.5mIU/mI、25mIU/mI、50mIU/mI的标准液,抽取待检品3人份,进行检测,5分钟内观察结果,T1检测线最低检测限为25mIU/mI。用国家级规则人绒毛膜促性腺激素标准品检验,配成浓度分别为、100mIU/mI、200mIU/mI、400mIU/mI的标准液,抽取待检品3人份,进行检测,5分钟内观察结果,T2检测线最低检测限为100mIU/mI。

[0033] 4、特异性:阴性特异性:将浓度为500mIU/mI hLH A液、1000mIU/mI hFSH A液、1000 $\mu$ IU/mI hTSH A液分别进行检测,各重复3次,各溶液的3次结果T1检测线和T2检测线均为阴性才可判为此浓度的结果为阴性。阳性特异性:将浓度为500mIU/mI hLH B液、1000mIU/mI hFSH B液、1000 $\mu$ IU/mI hTSH B液分别进行检测,各重复3次,各溶液的3次结果T1检测线结果应均为阳性,T2检测线无显色,为阴性。将浓度为500mIU/mI hLH C液、1000mIU/mI hFSH C液、1000 $\mu$ IU/mI hTSH C液分别进行检测,各重复3次,各溶液的3次结果T1和T2检测线结果应均为阳性,且T2检测线显色明显浅于T1检测线。

[0034] 5、重复性:随机抽取同一批号的试纸10条,以浓度为25mIU/mI人绒毛膜促性腺激素标准品测定,10次结果应符合T1检测线全部为阳性显色,且显色强度一致,T2检测线无显色,为阴性。随机抽取同一批号的试纸10条,以浓度为200mIU/mI人绒毛膜促性腺激素标准品测定,10次结果应符合T1和T2检测线结果应均为阳性,且T2检测线显色明显浅于T1检测线。

[0035] 6、检验稳定性:将试纸于37 $^{\circ}$ C放置21天后,或者取产品有效期后一个月的产品进行检测,按照2项、3项、4项、5项的规定要求检验,结果应符合要求。

[0036] 7、检验批间差:取3个批号的试纸,用25mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素标准品进行检测,重复测定10次,T1检测线全部为阳性显色,且显色强度一致。T2检测线无显色,为阴性。取3个批号的试纸,用200mIU/mI的人绒毛膜促性腺激素标准品进行检测,每个批号各重复测定10次,T1和T2检测线结果应均为阳性,且T2检测线显色明显浅于T1检测线。

[0037] 用人绒毛促性腺激素周期检测试纸来定性检测孕龄妇女尿液中的人绒毛膜促性腺激素(hCG),提示孕周期。人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)是妊娠期期间由胎盘滋养层细胞分泌生产的一种糖蛋白激素,由两个不同的亚基, $\alpha$ 、 $\beta$ 以非共价键连接组成。在激素的产生、分泌、代谢等过程中,hCG分子会发现断裂、离解等多种变化,从而在血、尿中以多种分子形式存在。HCG是唯一不随胎盘重量增加而分泌增多的胎盘激素,妊娠1周后血液HCG为5-50mIU/mL,尿液HCG>25mIU/mL,第8-10周左右达到高峰,持续1-2周后迅速减低,以后逐渐下降并以1/5-1/10左右峰值水平维持至分娩。本发明应用双抗体夹心法及免疫层析法的原理定性检测孕龄妇女尿液中的人绒毛膜促性腺激素,检测步骤较为简单,5分钟内就可以观察到结果,一般使用者可以自己进行检测,检测结果较为精确。本发明通过第一检测线和第二检测线颜色深浅,从而可估算怀孕周数,推测受孕时间。

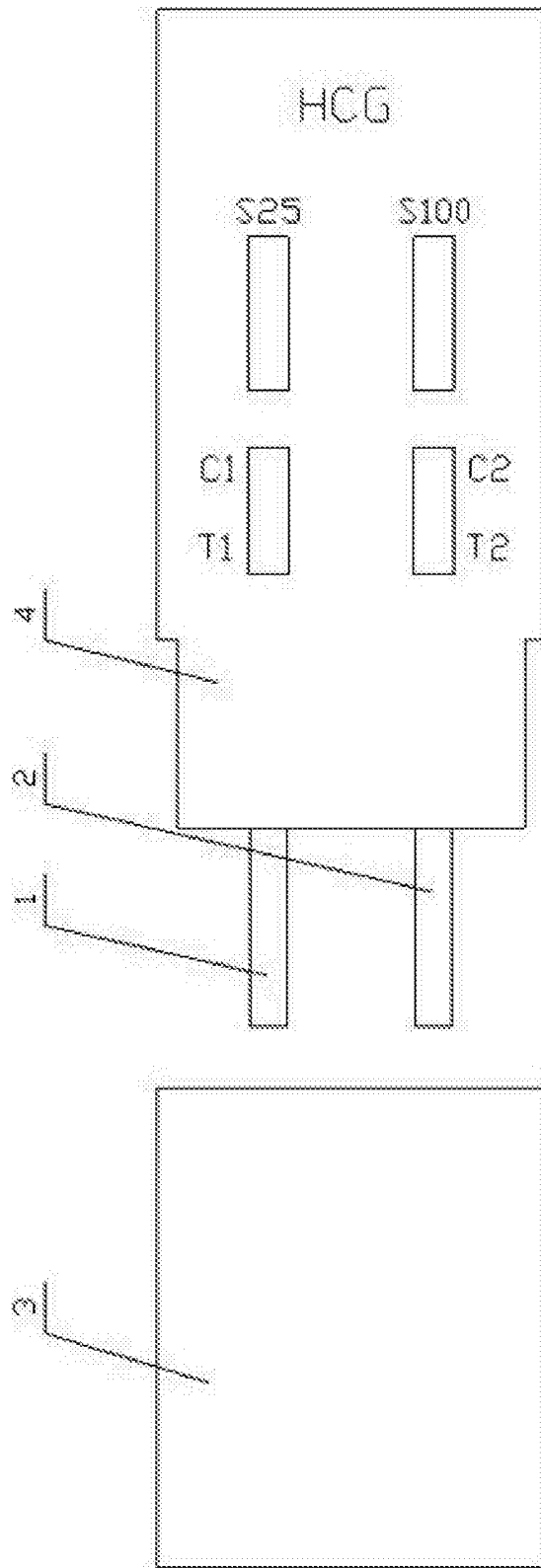


图1

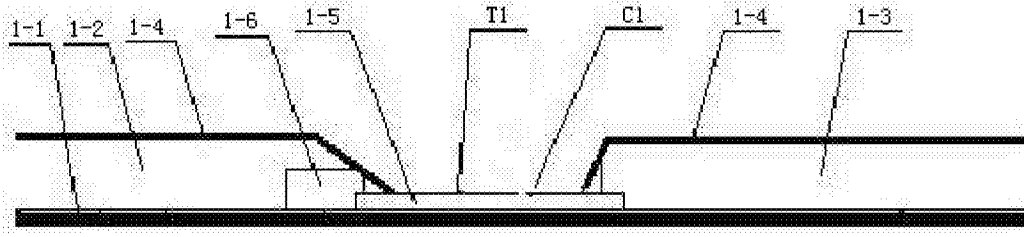


图2

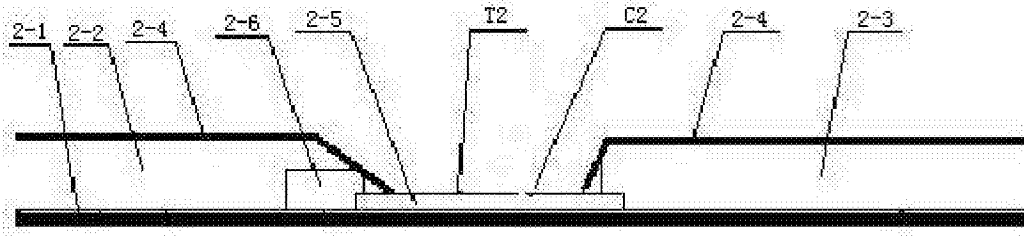


图3

专利名称(译)	HCG周期检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106932598A</a>	公开(公告)日	2017-07-07
申请号	CN201710181716.X	申请日	2017-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	南通伊仕生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	南通伊仕生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南通伊仕生物技术股份有限公司		
[标]发明人	欧卫军 孙一品 邵志燕 徐秋楠		
发明人	欧卫军 孙一品 邵志燕 徐秋楠		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/76 G01N33/54386 G01N2333/59		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种HCG周期检测试剂盒，包括上盖和卡壳，卡壳内设有两个平行设置的凹槽，其中一个凹槽中安装有T1检测试纸，另一个凹槽中安装有T2检测试纸；其制备方法的步骤包括：硝酸纤维素膜的制备；胶体金垫的标记及固相；组装及裁切。本发明应用双抗体夹心法及免疫层析法的原理定性检测孕龄妇女尿液中的人绒毛膜促性腺激素（hCG），检测步骤较为简单，5分钟内就可以观察到结果，一般使用者可以自己进行检测，检测结果较为精确。本发明通过第一检测线和第二检测线颜色深浅，从而可估算怀孕周数，推测受孕时间。

