

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/547

G01N 21/64

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410034104.0

[43] 公开日 2005 年 11 月 2 日

[11] 公开号 CN 1690711A

[22] 申请日 2004. 4. 23

[21] 申请号 200410034104.0

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物
流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号五所

[72] 发明人 周 蕾

[74] 专利代理机构 北京太兆天元知识产权代理有限
责任公司

代理人 张 韬

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 13 页

[54] 发明名称 基于上转换发光技术免疫层析试纸条

[57] 摘要

本发明公开了一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸，其采用上转换发光材料即 UCP 作为生物标记物，结果在红外光的照射下以可见光信号的形式表现出来，并可进行仪器判读，从而实现对目标被检物的定量检测。其结构主要包括：样品垫、结合垫或结合物释放垫、分析膜、吸水垫和塑料背板。本发明还公开了该试纸条的制备方法和在生物样品定量检测中的应用。依据其待测物质发生免疫反应方式的不同，将试纸条分为夹心模式、竞争模式和间接模式，各种模式可对样品中的不同待测物质进行快速、灵敏地定性和定量检测分析。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸，其特征在于，采用上转换发光材料即UCP作为生物标记物对目标被检物进行定量检测。

2、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，试纸条对目标被检物进行检测后，检测结果在红外光的照射下将以可见光信号的形式表现出来。

3、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，作为试纸条检测结果的可见光信号可用仪器进行判读。

4、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，包括：

a. 样品垫；

b. 结合垫或结合物释放垫，其上固定有UCP标记的生物活性分子，UCP所标记的生物活性分子选自抗原、抗体、葡萄球菌蛋白A、外源凝集素、多聚核苷酸、受体配体、药物、细胞；

c. 分析膜，其上有检测带和质控带；

d. 吸水垫，通过虹吸作用提供液体流过整个试纸条的动力，其上有一终点指示带；

e. 塑料背板，其中一面涂有粘胶；

上述样品垫、结合垫、膜、吸水垫通过粘胶固定于塑料背板上，各部分之间相互重叠。

5、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，该试纸条包括一外壳，外壳上包括加样孔，结果判读窗口和终点指示窗口。

6、如权利要求5所述的试纸条，其特征在于，该外壳的上下片合为一体用咬合齿钉压紧；六个挡板与三个倒钉可将试纸条牢固地卡在外壳内；将上下片盖紧后，压板的位置处于试纸条上样品垫与结合垫、结合垫与分析膜重叠处。

7、如权利要求5所述的试纸条，其特征在于，通过所述加样孔，将生物样品添加到样品垫上；结果判读窗口对应于分析膜上的检测带和质控带；终点指示窗口对应于吸水垫上的终点指示带。

8、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，结合垫上固定有UCP标记的第一特异性抗体，该特异性抗体可与待测物的一个位点相结合；分析膜的检测带上固定有与待测物的另一个位点相结合的第二特异性抗体，质控带上固定有可与第一特异性抗体发生特

异性结合的抗体。

9、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，结合垫上固定有UCP标记的抗原A；分析膜的检测带上固定有抗原B，抗原A与抗原B可以结合于目标被检抗体的不同位点；质控带上固定有可与抗原A发生特异性结合的抗体。

10、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，结合垫上固定有UCP标记的特异性抗体，该抗体可与待测物的一个位点相结合；

分析膜的检测带上固定有与待测物具有相同的上述位点的抗原，质控带上固定有可与上述特异性抗体发生特异性结合的抗体。

11、如权利要求1所述的试纸条，其特征在于，结合垫上固定有UCP标记的葡萄球菌蛋白A；分析膜的检测带上固定有待测物的表面抗原，质控带上固定有IgG。

12、如权利要求1-10所述试纸条的制备方法，其包括以下步骤：

1)UCP-生物活性分子的制备：

对UCP颗粒进行表面修饰，与生物活性分子进行连接，在UCP保存液中进行保存；取一定量的保存于UCP保存液中的UCP-生物活性分子，离心，并弃去上清液；在沉降的UCP生物活性分子中加入稀释液，并充分混匀，制备成悬浊液；

2)样品垫的制备：

选用纤维素膜作为样品垫固相材料，剪切成具有一定规格的条带；

将样品垫放入样品垫封闭液中浸泡；

然后将样品垫从封闭液中取出，并烘干，使样品垫充分干燥；

3)结合垫的制备：

选用玻璃纤维素膜作为样品垫固相材料，剪切成具有一定规格的条带；

在该条带上加上UCP-生物活性分子的悬浊液；

烘干该条带，使结合垫充分干燥；

4)分析膜的制备：

选用纤维素膜作为固相材料，剪切成具有一定规格的条带；

在条带上的不同位置喷点生物活性分子，制成检测带和质控带；

烘干该条带，使结合垫充分干燥；

5)装配该试纸条：

将处理过的分析膜粘贴于粘性底衬上，质控带向上，检测带向下；

将处理过的结合垫粘贴于粘性底衬上，上端压于分析膜的下端，并相互重叠；

将处理过的样品垫粘贴于粘性底衬上，下端与粘性底衬平齐，上端压于结合垫的下端，并与结合垫相重叠；

将吸水垫粘贴于粘性底衬上，上端与粘性底衬平齐，下端压于分析膜的上端，并与分析膜相互重叠；

将装配成形的条带剪切成一定规格的试纸条。

13、如权利要求 11 所述的试纸条的制备方法，其特征在于：所述 UCP 保存液为 pH=7.2 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液，含有 0.05%-0.3%BSA，0.01%-0.1%Tween20，0.01%-0.1%NaN₃；所述 UCP 生物活性分子的稀释液为 pH=7.2 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液，含有 0.5%-2%蔗糖，0.5%-3%BSA；所述样品垫封闭液为 pH=7.2 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液，含有 1%-10%BSA，0.05%-0.2%Tween 20。

14、如权利要求 11 所述的试纸条的制备方法，其特征在于：还包括将装配好的试纸条放入外壳中的步骤。

15、如权利要求 1-10 所述的试纸条在生物样品定量检测中的应用。

基于上转换发光技术免疫层析试纸条

技术领域

本发明涉及一种免疫层析试纸条，特别是涉及采用上转换发光材料即 UCP 作为生物标记物的免疫层析试纸条。该种试纸条的结果在红外光的照射下以可见光信号的形式表现出来，并可使用上换发光生物传感器进行判读，从而实现目标被检物快速、灵敏的定性定量检测。

背景技术

上转换发光材料(Up-Converting Phosphor, UCP)是一种可对能量进行上转的稀土金属合成物，即 UCP 可吸收低能量的(长波长)红外光，但却发射高能量的(短波长)可见光。UCP 是由几种稀土金属元素掺杂于某些晶体的晶格中构成的。在这种材料中有三种主要的成分：主基质(host matrix)、吸收子(absorber)和发射子(emitter)。作为主基质的晶体材料有：氧硫化物(如 Y_2O_3S 、 GdO_2S 、 La_2O_2S 等)、氟化物(如 YF_3 、 GdF_3 、 LaF_3 等)、镓酸盐(如 $YGaO_3$ 、 $Y_3Ga_5O_{12}$ 等)以及硅酸盐(如 YSi_2O_5 、 YSi_3O_7 等)等；常用作吸收子的稀土金属离子有：镱离子(Yb^{3+})、铒离子(Er^{3+})、钐离子(Sm^{3+})等；常用作发射子的稀土金属离子有：铒离子(Er^{3+})、钬离子(Ho^{3+})、铥离子(Tm^{3+})、铽离子(Tb^{3+})等。吸收子和发射子这一离子对在主基质晶格内适宜的空间取向和距离，是产生上转换发光的基础。

不同的吸收子、发射子、主基质结合可使 UCP 具有不同的光学性质。如：(1)主基质相同的情况下，一系列 UCP 采用相同的吸收子，不同的发射子，则它可由相同波长的红外光激发，产生不同波长的发射光(如：980nm 红外光激发 吸收子- Yb^{3+} -发射子- Er^{3+} 、吸收子- Yb^{3+} -发射子- Tm^{3+} ，分别发射 550nm 绿色可见光、475nm 蓝色可见光)；采用不同的吸收子，相同的发射子，则虽经由不同的激发光，但却可产生相同的发射光。(2)主基质不同的情况下，UCP 光谱特征也将改变(如：吸收子- Yb^{3+} -发射子- Er^{3+} ，在主基质 YF_3 、 GdF_3 中，分别发射红色和绿色的可见光)。组成的多样性决定了 UCP 光谱(激发光谱、发射光谱)的多样性，这成为其使用中灵活性的基础。本技术中所使用的 UCP 均由上海科炎光电技术有限公司提供。

UCP 作为一种完全惰性的无机材料经过一系列的表面修饰与活化，其中包括：UCP 表面硅化、UCP 表面氨基化、UCP 表面功能化、UCP 表面连接抗体，便能与免疫层析技术相

结合，在生物领域中充分的发挥其自身所具有的各种特性。

目前，免疫层析技术中所使用的标记物通常为酶、胶体金以及着色胶珠标记物，这几种标记物应用于免疫层析技术中有两个共同点：物理吸附交联法与通过颜色判断结果。其中物理吸附法（即通过疏水性以及静电吸附制备标记物）的脆弱性使得基于该种标记物的免疫层析对于反应的条件要求极为苛刻，从而一些有效的非特异去除试剂，如：吐温 20 (Tween 20)、吹通 100 (Triton 100)、十二烷基磺酸钠 (SDS) 等，由于对疏水性以及静电性的影响改变而只能在低浓度使用，由此便造成了基于该种标记物的免疫层析试纸假阳性率、假阴性率较高的必然结果；另外通过颜色判断结果在使用操作简便的同时必然受观察者主观影响大、灵敏度低，且只能停留在定性水平，而绝对无法实现精确定量。这些缺点大大的限制了免疫层析技术在生物检测中的应用范围。

附图 1 中描述了 UCP 颗粒在生物检测领域中应用的原理示意图。将上转换发光颗粒与生物活性分子通过共价键相连接制备标记物，该标记物在层析的过程中通过免疫反应固定于固相载体的表面，并在红外光的激发下发射出可见光。由此实现上转换发光材料与免疫层析技术相结合对生物样品中的目标被检物进行检测。

将上转换发光材料 UCP 与免疫层析技术相结合，为传统的免疫层析技术带来了突破性的变革：

A. UCP 发光标记物的特点，使得以其作为标记物的免疫层析试纸条可与仪器结合，对目标被检物进行灵敏度极高的精确定量检测；

B. UCP 所具有的多种特征光谱（激发光谱与发射光谱），使得基于上转换发光技术的免疫层析试纸可进行灵敏度极高的多重分析，即一次性的对生物样品中的多种目标被检物进行检测；

C. UCP 独特的上转换发光现象，使得以其作为标记物的检测过程排除了由于待检测生物样品自发荧光造成干扰的可能，提高信噪比，从而提高了检测的灵敏度与稳定性；

D. 通过共价方式交联生物活性分子，在保证检测灵敏度的前提下提高了系统的可靠性与稳定性。

发明内容

为了对生物样品进行快速、灵敏、定量地检测，本发明提供了一种免疫层析试纸条，其采用上转换发光材料即 UCP 作为生物标记物，结果在红外光的照射下以可见光信号的形式表现出来，并可使用上转换发光生物传感器进行判读。其结构包括：

- a. 样品垫；
- b. 结合垫或结合物释放垫，其上固定有 UCP 标记的生物活性分子；
- c. 分析膜，其上有检测带和质控带；
- d. 吸水垫，通过虹吸作用提供液体流过整个试纸条的动力；
- e. 塑料背板，其中一面涂有粘胶；

上述样品垫、结合垫、膜、吸水垫通过粘胶固定于塑料背板上。

上述各部分之间是相互重叠的，保证了液体在试纸条上流动的连续性。当进行检测时，将样品滴加到样品垫上，样品通过渗透与虹吸作用进入结合垫，使其中的 UCP 结合物重新溶解游离，并在吸水垫的虹吸作用下，离开结合垫进入膜，在其内部向吸水垫的方向流动。此过程中 UCP 结合物、目标被检物、检测带、质控带之间将特异地发生一定的免疫反应，并产生具有指示性的信号。依据在试纸条上所发生免疫反应方式的不同，可分为夹心模式、竞争模式与间接模式。

A. 夹心模式：

基于夹心模式的试纸条可用于检测样品中存在的病原体、微生物以及大分子抗原、抗体等。其中，对病原体、微生物以及大分子抗原进行检测的模式为双抗体夹心，对抗体进行检测为双抗原夹心。以下主要以双抗体夹心为例进行说明。

在试纸条的制备过程中，首先将 UCP 与被检物特异性抗体 A（即，可与被检物特异性结合的抗体，但其只可结合于被检物上的 A 位点）相结合，并固定于结合垫内；然后，将被检物特异性抗体 B（即，可与被检物特异性结合的抗体，但其只可结合于被检物上的 B 位点；注：此处所使用的抗体也可以为被检物特异性多克隆抗体。）固定于膜上作为检测带，将二抗（即，可与被检物特异性抗体 A 特异性结合的抗体）固定于膜上作为质控带，将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸贴于吸水垫上作为终点指示带。

附图 2 是生物样品中含有待测物，亦即阳性样品检测的示意图，样品中的被检物首先和结合垫中的 UCP-抗体 A 相结合，即 UCP-抗体 A 结合于被检物上的 A 位点。然后，二者形成的免疫复合物（UCP-抗体 A-被检物）以及游离的 UCP-抗体 A 结合物，与样品中的液体基质一起在吸水垫的带动下进入膜。当其流过检测带时，检测带上的抗体 B 将与免疫复合物（UCP-抗体 A-被检物）中被检物上的 B 位点相结合形成 UCP-抗体 A-被检物-抗体 B 复合物，并被固定于检测带上。而游离 UCP-抗体 A 不与抗体 B 结合，在吸水垫的带动下继续流动。当通过质控带时，与其上的二抗（即，可与抗体 A 特异性结合的抗体）

结合并被固定于质控带上。残余的液体基质继续向吸水垫流动，并与其上 pH 试纸内的指示剂发生反应，使其由黄色变为绿色。终点指示带发生颜色变化的试纸条便可以进行结果判读。使用上转换发光生物传感器（UPT 生物传感器）对试纸条进行结果判读，阳性检测中试纸条的检测带与质控带上均有可见磷光产生，其所对应的信号强度分别为 T 与 C。检测带上磷光光强 T 与质控带上磷光光强 C 的比值，即 T/C，与样品中含有的被检物浓度成正比。

附图 3 是生物样品中不含有待测物，亦即阴性样品检测时的示意图。由于样品中不含有被检物，因而重新溶解游离，并随样品的液体基质一起进入膜的只有 UCP-抗体 A。由此，只有在质控带上发生 UCP-抗体 A 与二抗的免疫反应，并将 UCP-抗体 A 固定其上。这样阴性检测中的试纸条在最终的 UPT 生物传感器判读下，只有质控带上有可见磷光产生。

将夹心模式系统中的抗体 A 与抗体 B 换为抗原 A 与抗原 B，既可以双抗原夹心对某种病原体感染所产生的抗体进行检测。反应原理、结果指征与以上的双抗体夹心检测抗原相同。

B. 竞争模式：

基于竞争模式的试纸条可用于检测样品中存在的小分子抗原。

在试纸条的制备过程中，首先将 UCP 与被检物特异性抗体 A 相结合，并固定于结合垫内；然后，将与被检物相同的抗原（均含有抗体 A 可特异性结合的 A 位点）固定于膜上作为检测带，将二抗（即，可与被检物特异性抗体 A 特异性结合的抗体）固定于膜上作为质控带，将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸贴于吸水垫上作为终点指示带。

当对阳性样品进行检测时，可以分为两种情况：被检物浓度高、被检物浓度较低。

附图 4 为被检物浓度高时的竞争免疫反应的示意图。当样品中被检物浓度高时，加样后样品中的被检物和结合垫中的 UCP-抗体 A 全部结合，即 UCP-抗体 A 结合于被检物上的 A 点。因而，在吸水垫的带动下，与样品中的液体基质一起进入膜的只有 UCP-抗体 A-被检物免疫复合物。当其流过检测带时，由于免疫复合物中 UCP 标记的抗体 A 已与被检物结合，所以不能与检测带上含有 A 位点的抗原结合。UCP-抗体 A-被检物免疫复合物继续流动，当流过质控带时发生免疫复合物中抗体 A 与二抗的免疫反应，并将 UCP-抗体 A-被检物免疫复合物固定其上。残余的液体基质继续向吸水垫流动，并与其上 pH 试纸内的指示剂发生反应，使其由黄色变为绿色。对变色后的试纸条进行传感器判读，在红外光

的照射下只有质控带上有可见磷光产生。

附图 5 为被检物浓度低时的竞争免疫反应的示意图。当样品中被检物浓度较低时，加样后样品中的被检物首先和结合垫中的 UCP-抗体 A 相结合。然后，二者形成的免疫复合物（UCP-抗体 A-被检物）以及游离的 UCP-抗体 A 结合物，与样品中的液体基质一起在吸水垫的带动下进入膜。当其流过检测带时，由于免疫复合物中 UCP 标记的抗体 A 已与被检物结合，因而只有游离的 UCP-抗体 A 结合物可与检测带上含有 A 位点的抗原结合，并被固定。剩余的 UCP-抗体 A-被检物免疫复合物继续流动，当流过质控带时发生免疫复合物中抗体 A 与二抗的免疫反应，并将 UCP-抗体 A-被检物免疫复合物固定其上。这样试纸条在最终的红外光照射下，检测带与质控带上均有可见磷光产生，其所对应的信号强度分别为 T 与 C。检测带上磷光光强 T 与质控带上磷光光强 C 的比值，即 T/C，与样品中含有的被检物浓度成反比。

附图 6 为对阴性样品进行检测时的竞争免疫反应的示意图。由于样品中不含有被检物，因而重新溶解游离，并随样品的液体基质一起进入膜的只有 UCP-抗体 A。其与检测带上含有 A 位点的抗原，质控带上的二抗均可结合。这样试纸条在最终的红外光照射下，检测带与质控带上均有可见磷光产生。但此时的 T/C 值与阳性检测低浓度时相比达到最强。

C. 间接模式：

基于间接模式的试纸条可用于检测多种动物（包括人）受某种病原体感染后血清中的相应抗体。

在试纸条的制备过程中，首先将 UCP 与葡萄球菌蛋白 A（SPA）相结合，并固定于结合垫内；然后，将某种病原体的表面抗原固定于膜上作为检测带，将羊 IgG 固定于膜上作为质控带，将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸贴于吸水垫上作为终点指示带。

附图 7 为对阳性血清样品进行检测时的间接免疫反应示意图。加样后样品中的液体基质使 UCP-SPA 结合物重新溶解游离并与血清样品中存在的各种 IgG（免疫球蛋白 G，其中包括一部分病原体特异性抗体 IgG）相结合。在吸水垫的带动下，UCP-SPA-IgG 结合物与游离的 UCP-SPA 一起流动进入膜。当流过检测带时，UCP-SPA-IgG 结合物中的 UCP-SPA 病原体特异性抗体 IgG 通过病原体特异性抗体 IgG 与检测带上的病原体抗原发生特异的免疫结合反应，并结合于其上。游离的 UCP-SPA 和其它的一些 UCP-SPA-IgG 结合物（其中不含有 UCP-SPA-病原体特异性抗体 IgG）将继续流动，并在通过质控带时 UCP-SPA 与

其上的羊 IgG 相结合。残余的液体基质继续向吸水垫流动，并与其上 pH 试纸内的指示剂发生反应，使其由黄色变为绿色。对变色后的试纸条进行传感器判读，在红外光照射下质控带与检测带上均有可见磷光，其所对应的信号强度分别为 T 与 C。检测带上磷光光强 T 与质控带上磷光光强 C 的比值，即 T/C，与血清样品中病原体特异性抗体 IgG 的浓度成正比。（注：葡萄球菌蛋白 A，即 SPA，的特性是可以与多种动物的 IgG 发生结合。）

附图 8 为对阴性血清样品进行检测时的间接免疫反应示意图。由于样品中不含有病原体特异性抗体 IgG，因而重新溶解游离，并随样品的液体基质一起进入膜的只有 UCP-SPA 与其它的一些 UCP-SPA-IgG 结合物（其中不含有 UCP-SPA-病原体特异性抗体 IgG）。其中 UCP-SPA 与质控带上的羊 IgG 结合，而检测带上的病原体抗原未参加任何反应。这样试纸条在最终的红外光照射下，只有质控带上有可见磷光产生。

该试纸条结构中包括一外壳，所述外壳上包括加样孔，结果判读窗口和终点指示窗口。通过加样孔，将生物样品添加到样品垫上；结果判读窗口对应于分析膜上的检测带和质控带；终点指示窗口对应于吸水垫上的终点指示带。

UCP 所标记的生物活性分子，包括抗原、抗体、葡萄球菌蛋白 A、外源凝集素、多聚核苷酸、受体配体、药物、细胞等。

UCP 颗粒的直径为 200-300nm。并且，可以对 UCP 颗粒的表面进行了修饰。

当用于双抗体夹心免疫检测方法时，其中，结合垫上固定有 UCP 标记的第一特异性抗体，该特异性抗体可与待测物的一个位点相结合；分析膜的检测带上固定有与待测物的另一个位点相结合的第二特异性抗体，质控带上固定有可与第一特异性抗体发生特异性结合的抗体。

当用于双抗原夹心免疫检测方法时，其中，结合垫上固定有 UCP 标记的抗原 A；分析膜的检测带上固定有抗原 B，抗原 A 与抗原 B 可以结合于目标被检抗体的不同位点；质控带上固定有可与抗原 A 发生特异性结合的抗体。

当用于竞争免疫检测方法时，其中，结合垫上固定有 UCP 标记的特异性抗体，该抗体可与待测物的一个位点相结合；分析膜的检测带上固定有与待测物具有相同的上述位点的抗原，质控带上固定有可与上述特异性抗体发生特异性结合的抗体。

当用于间接免疫检测方法时，其中，结合垫上固定有 UCP 标记的葡萄球菌蛋白 A；分析膜的检测带上固定有某种病原体的表面抗原，质控带上固定有 IgG。

本发明的另一个方面还涉及到所述试纸条的制备方法，其包括以下步骤：

1)UCP—生物活性分子的制备

对 UCP 颗粒进行表面修饰，与生物活性分子进行连接，在 UCP 保存液中进行保存；
取一定量的保存于 UCP 保存液中的 UCP—生物活性分子结合物，离心，并弃去上清液；
在沉降的 UCP 生物活性分子结合物中加入稀释液，并充分混匀，制备成悬浊液；

2)样品垫的制备

选用纤维素膜作为样品垫固相材料，剪切成具有一定规格的条带；
将样品垫放入样品垫封闭液中浸泡；
然后将样品垫从封闭液中取出，并烘干，使样品垫充分干燥；

3)结合垫的制备

选用玻璃纤维素膜作为结合垫固相材料，剪切成具有一定规格的条带；
在该条带上加上 UCP—生物活性分子结合物的悬浊液；
烘干该条带，使结合垫充分干燥；

4)分析膜的制备

选用硝酸纤维素膜作为分析膜固相材料，剪切成具有一定规格的条带；
在条带上的不同位置喷点生物活性分子，制成检测带和质控带；
烘干该条带，使分析膜充分干燥；

5)装配该试纸条

将处理过的分析膜粘贴于塑料背板上，质控带向上，检测带向下；
将处理过的结合垫粘贴于塑料背板上，上端压于分析膜的下端，并相互重叠；
将处理过的样品垫粘贴于塑料背板上，下端与塑料背板平齐，上端压于结合垫的下端，并相互重叠；
将吸水垫粘贴于塑料背板上，上端与塑料背板平齐，下端压于分析膜的上端，并与分析膜相互重叠；

将装配成形的条带剪切成一定规格的试纸条。

由此制备成本发明的基于上转换发光技术免疫层析试纸条，该试纸条可以装入外壳中，在干燥条件下备用。该外壳可以是塑料的。

其中，所述 UCP 保存液为 pH=7.2 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)，含有 0.1% BSA，0.05%Tween20，0.02%NaN₃。

其中，所述 UCP 生物活性分子的稀释液为 pH=7.2 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)，

含有 1%蔗糖， 1%BSA。

其中,所述样品垫封闭液为 pH=7.2 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB),含有 5%BSA, 0.1 %Tween 20。

其中, 可将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸贴于吸水垫作为终点指示带。

本发明的另一个方面还涉及所述试纸条在检测生物样品中的应用。

以经过表面修饰与活化的上转换发光材料 UCP 作为生物标记物, 开发新型免疫层析试纸使其可以极高的稳定性、重现性及灵敏性应用于快速生物检测。最终实现对病原体、病原体感染所产生的抗体、违禁药品、重大疾病(肿瘤、癌症和糖尿病等)标志物等多种目标被检物的定性、定量及多重检测, 以满足生物恐怖剂检测、传染病和重大疾病的辅助诊断以及民用医疗保健的需求。

附图说明

附图 1: UCP 颗粒用于生物检测领域的原理示意图

附图 2: 夹心免疫反应为阳性的反应示意图

附图 3: 夹心免疫反应为阴性的反应示意图

附图 4: 竞争免疫反应为阳性时, 待测物为高浓度的反应示意图

附图 5: 竞争免疫反应为阳性时, 待测物为低浓度的反应示意图

附图 6: 竞争免疫反应为阴性的反应示意图

附图 7: 间接免疫反应为阳性的反应示意图

附图 8: 间接免疫反应为阴性的反应示意图

附图 9: UPT 生物传感器结果判读图(左为乙肝表面抗原阴性检测, 右为阳性检测)

附图 10: 乙肝病毒表面抗原检测标准工作曲线

附图 11: UPT 生物传感器结果判读图(左为 SARS 病毒阴性检测, 右为阳性检测)

附图 12: SARS 病毒检测标准工作曲线

附图 13: UPT 生物传感器结果判读图(左为鼠疫 FI-抗原阴性检测, 右为阳性检测)

附图 14: 鼠疫 FI-Ag 检测标准工作曲线

附图 15: UPT 生物传感器结果判读图(左为安非他命阴性检测, 右为阳性检测)

附图 16: 安非他命检测标准工作曲线图

附图 17: UPT 生物传感器结果判读图(左为鼠疫感染抗体阴性检测, 右为阳性检测)

附图 18: 鼠疫抗体检测标准工作曲线

附图 19: UPT 生物传感器结果判读图 (左为 SARS 病毒感染抗体阴性检测, 右为阳性检测)

附图 20: SARS 病毒抗体检测标准工作曲线

附图 21: 免疫层析试纸条的结构示意图

附图 22: 装配试纸条时, 各部分的粘贴示意图

附图 23: 试纸条的结构与尺寸

附图 24: 试纸条外壳的俯视图

附图 25: 试纸条外壳的内部结构, 分为上片和下片

附图 26: 上转换发光生物传感器的立体结构示意图

附图 27: 上转换发光生物传感器包含激发光路光轴、试纸条法线和磷光图像接收光路光轴的平面结构示意图

附图 28: 上转换发光材料的发射光谱曲线

附图 29: 滤光片的透过率曲线

实验例 1: 双抗体夹心模式检测乙肝表面抗原 HBs-Ag:

一、UPT 生物传感器结果判读:

附图 9: UPT 生物传感器结果判读图 (左为乙肝表面抗原阴性检测, 右为阳性检测)

二、标准工作曲线的绘制:

1. 将提纯的乙肝表面抗原 HBs-Ag 标准品用 1:10 稀释的正常人血清 (以 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液稀释) 作为稀释液配置系列浓度标准品, 浓度为: 0 pg/ml、50 pg/ml、100 pg/ml、150 pg/ml、200 pg/ml、250 pg/ml、300 pg/ml、400 pg/ml、500 pg/ml、600 pg/ml、700 pg/ml、800 pg/ml、900 pg/ml、1000 pg/ml、1100 pg/ml、1200 pg/ml、1300 pg/ml、1400 pg/ml、1500 pg/ml、1600 pg/ml 的 20 份样品;

2. 每个样品分别用 10 个 UPT 试纸条检测 10 次, 10 次检测中传感器判读得到的 T 值与 C 值分别取平均值, 最终根据二者的比值得出与每个浓度对应的 T/C 结果, 列于下表 1:

浓度 (pg/ml)	0	50	100	150	200	250	300
T 平均值	0.22259	0.24568	0.21078	0.36785	0.4199	0.4713	0.47517
C 平均值	1.28843	1.32237	0.94927	1.0361	0.80599	0.84555	0.80156
T/C	0.17276	0.18579	0.22204	0.35503	0.52097	0.55739	0.59281
浓度 (pg/ml)	400	500	600	700	800	900	1000
T 平均值	0.9892	1.16628	1.54263	1.50086	1.59532	2.03564	1.93305
C 平均值	1.17636	1.11031	0.85193	0.68688	0.6764	0.81724	0.63325
T/C	0.8409	1.05041	1.81075	2.18504	2.35855	2.49087	3.05259
浓度 (pg/ml)	1100	1200	1300	1400	1500	1600	
T 平均值	2.15422	4.80941	5.16321	3.57106	3.96671	2.62067	
C 平均值	0.62623	1.28657	1.14657	0.66165	0.73204	0.45822	
T/C	3.43998	3.73816	4.50318	5.3972	5.41871	5.71925	

表 1: 乙肝病毒表面抗原检测标准工作曲线

3. 以 T/C 值作为 X, 以乙肝表面抗原 HBs-Ag 浓度作为 Y 绘制标准工作曲线, 经统计拟和标准工作曲线的表达式为: $Y=268.73X+103.06$, 拟和系数的平方为: $R^2=0.975$; 结果见附图 10: 乙肝病毒表面抗原检测标准工作曲线。

4. 乙肝表面抗原浓度的计算公式为:

$$\text{血清样品中含有的乙肝表面抗原 HBs-Ag 浓度 (pg/ml)} = 10Y = 10 \times (268.73X + 103.06) \\ = 2687.3X + 1030.6$$

三、实际检测结果:

1. 检测准确性:

将 50 份购自生物制品鉴定所的乙肝病人血清盘 (其中含 13 份阳性, 37 份阴性) 同时用胶体金免疫层析试纸与本系统 (UPT 试纸条与传感器) 进行双盲检测:

胶体金免疫层析试纸法——11 份阳性, 39 份阴性 (即, 两份阳性漏检);

UPT 试纸条与传感器法——13 份阳性, 37 份阴性, 与实际结果完全吻合;

同时与胶体金免疫层析试纸的定性检测相对, UPT 试纸条与传感器法给出了每份样品的最终准确浓度。

2. 检测稳定性:

将一份乙肝病人血清用 $\text{pH}=7.2$ 0.03mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释, 用 UPT 试纸条与传感器重复检测 10 次, 结果列于下表 2:

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	0.40447	0.39211	0.37042	0.4091	0.42247
HBs-Ag 浓度 (pg/ml)	2117.532	2084.317	2026.03	2129.974	2165.904
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	0.42068	0.41614	0.42471	0.39527	0.36826
HBs-Ag 浓度 (pg/ml)	2161.093	2148.893	2171.923	2092.809	2020.225

同一份血清重复测量的变异系数 (CV) = 2.621%

表 2: 乙肝病毒表面抗原检测重复性

结论: 在乙肝表面抗原 HBs-Ag 检测中, UPT 试纸条与传感器法与胶体金免疫层析试纸法相比具有更高的灵敏度, 且在实现精确定量检测的同时具有很好的稳定性。

实验例 2: 双抗体夹心模式检测冠状病毒 (SARS 病毒):

一、UPT 生物传感器结果判读:

附图 11: UPT 生物传感器结果判读图 (左为 SARS 病毒阴性检测, 右为阳性检测)

二、标准工作曲线的绘制:

1. 将经过培养、记数并灭活的 SARS 病毒用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液作为稀释液配置系列浓度标准品, 浓度为: 0 org/ml、100 org/ml、200 org/ml、300 org/ml、400 org/ml、500 org/ml、600 org/ml、700 org/ml、800 org/ml、900 org/ml、1000 org/ml、1100 org/ml、1200 org/ml、1300 org/ml、1400 org/ml、1500 org/ml、1600 org/ml、1700 org/ml、1800 org/ml、1900 org/ml、2000 org/ml 的 21 份样品;

2. 每个样品分别用 10 个 UPT 试纸条检测 10 次, 10 次检测中传感器判读得到的 T 值与 C 值分别取平均值, 最终根据二者的比值得出与每个浓度对应的 T/C 结果, 列于下表 3:

浓度 (org/ml)	0	100	200	300	400	500	600
T 平均值	0.35469	0.35455	0.46158	0.43979	0.61668	0.54227	0.63369
C 平均值	1.78049	1.40951	1.30636	0.96737	0.99995	0.8215	0.86849
T/C	0.19921	0.25154	0.35333	0.45462	0.61671	0.6601	0.72965
浓度 (org/ml)	700	800	900	1000	1100	1200	1300
T 平均值	0.77334	1.40432	1.63278	1.78659	1.78619	1.77043	2.09792
C 平均值	0.78131	1.11981	1.0004	0.84633	0.73392	0.64788	0.68762
T/C	0.9898	1.25407	1.63213	2.11098	2.43376	2.73265	3.05099
浓度 (org/ml)	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000
T 平均值	2.17253	2.09461	4.87004	4.84787	2.82163	3.90254	2.80012
C 平均值	0.63772	0.55493	1.24835	1.08773	0.58017	0.7367	0.49579
T/C	3.40671	3.77455	3.90118	4.45687	4.86345	5.29733	5.64779

表 3: SARS 病毒检测标准工作曲线

3. 以 T/C 值作为 X, 以 SARS 病毒浓度作为 Y 绘制标准工作曲线, 经统计拟和标准工

作曲线的表达式为： $Y=337.2X+216.12$ ，拟和系数的平方为： $R^2=0.9631$ ；结果见附图 12：SARS 病毒检测标准工作曲线。

4. SARS 病毒浓度的计算公式为：

样品中含有的 SARS 病毒浓度 (org/ml) = $10Y=10 \times (337.2X+216.12) = 3372X+2161.2$

三、实际检测结果：

1. 检测准确性：

将 30 份待检样品（其中含 6 份阳性，24 份阴性）用本系统（UPT 试纸条与传感器）进行双盲检测：

UPT 试纸条与传感器法——6 份阳性，24 份阴性，与实际结果完全吻合；

同时 UPT 试纸条与传感器法给出了每份样品的最终精确浓度。

2. 检测稳定性：

将一份待检样品用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释，用 UPT 试纸条与传感器检测 10 次，结果列于下表 4：

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	0.59887	0.57197	0.60519	0.5936	0.6024
SARS 病毒浓度 (org/ml)	4180.59	4089.883	4201.901	4162.819	4192.493
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	0.59913	0.5926	0.62355	0.60257	0.59749
SARS 病毒浓度 (org/ml)	4181.466	4159.447	4263.811	4193.066	4175.936

同一份待检样品重复测量的变异系数 (CV) = 1.03%

表 4：SARS 病毒检测重复性

结论：在 SARS 病毒检测中，UPT 试纸条与传感器法具有很好的灵敏度与稳定性，且实现了精确定量。

实验例 3：竞争模式检测鼠疫 FI-抗原（鼠疫 FI-Ag）：

一、UPT 生物传感器结果判读：

附图 13：UPT 生物传感器结果判读图（左为鼠疫 FI-抗原阴性检测，右为阳性检测）

二、标准工作曲线的绘制：

1. 将提纯的鼠疫 FI-Ag 标准品用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液作为稀释液配置系列浓度标准品，浓度为：0 pg/ml、100 pg/ml、200 pg/ml、300 pg/ml、400 pg/ml、500 pg/ml、600 pg/ml、700 ng/ml、800 pg/ml、900 pg/ml、1000 pg/ml、1100 pg/ml、1200 pg/ml、1300 pg/ml、1400 pg/ml、1500 pg/ml、1600 pg/ml、1700 pg/ml、1800 pg/ml、1900 pg/ml、

2000 pg/ml 的 21 份样品；

2. 每个样品分别用 10 个 UPT 试纸条检测 10 次，10 次检测中传感器判读得到的 T 值与 C 值分别取平均值，最终根据二者的比值得出与每个浓度对应的 T/C 结果，列于下表 5：

浓度 (pg/ml)	0	100	200	300	400	500	600
T 平均值	3.4065	3.97134	3.25825	6.11733	11.04111	5.0306	5.29534
C 平均值	0.54259	0.6675	0.56455	1.1223	2.12737	1.02515	1.19673
T/C	6.27823	5.94958	5.77141	5.45071	5.19003	4.90718	4.42484
浓度 (pg/ml)	700	800	900	1000	1100	1200	1300
T 平均值	5.18186	4.18439	4.57649	4.05474	4.30334	3.95632	3.51903
C 平均值	1.24416	1.08102	1.28164	1.25251	1.43797	1.5151	1.50269
T/C	4.16495	3.87078	3.57081	3.23729	2.99265	2.61126	2.34182
浓度 (pg/ml)	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000
T 平均值	3.2772	2.88279	2.07385	1.67005	1.63219	0.95272	0.54594
C 平均值	1.59014	1.69625	1.51203	1.60722	2.07268	1.90214	2.16068
T/C	2.06095	1.69951	1.37157	1.03909	0.78748	0.50087	0.25267

表 5：鼠疫 FI-Ag 检测标准工作曲线

3. 以 T/C 值作为 X，以鼠疫 FI-Ag 浓度作为 Y 绘制标准工作曲线，经统计拟和标准工作曲线的表达式为： $Y = -324.63X + 2058.5$ ，拟和系数的平方为： $R^2 = 0.9993$ ；结果见附图 14：鼠疫 FI-Ag 检测标准工作曲线。

4. 鼠疫 FI-Ag 浓度的计算公式为：

样品中含有的鼠疫 FI-Ag 浓度 (pg/ml) = $10Y = 10 \times (-324.63X + 2058.5) = -3246.3X + 20585$

三、实际检测结果：

1. 检测准确性：

将 32 份待检样品（其中含 19 份阳性，13 份阴性）用本系统（UPT 试纸条与传感器）进行双盲检测：

UPT 试纸条与传感器法——19 份阳性，13 份阴性，与实际结果完全吻合；

同时 UPT 试纸条与传感器法给出了每份样品的最终精确浓度。

2. 检测稳定性：

将一份待检样品用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释，用 UPT 试纸条与传感器检测 10 次，结果列于下表 6：

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	2.37458	2.3984	2.36769	2.38635	2.34121
鼠疫 FI-Ag 浓度 (pg/ml)	12876.4	12799.07	12898.77	12838.19	12984.73
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	2.28906	2.38734	2.32011	2.28347	2.33309
鼠疫 FI-Ag 浓度 (pg/ml)	13154.02	12834.98	13053.23	13172.17	13011.09

同一份待检样品重复测量的变异系数 (CV) = 1.034%

表 6: 鼠疫 FI-Ag 检测重复性

结论: 在鼠疫 FI-Ag 检测中, UPT 试纸条与传感器法具有很好的灵敏度与稳定性, 且实现了精确定量检测。

实验例 4: 竞争模式检测违禁药品 (以检测安非他命为例进行说明)

一、UPT 生物传感器结果判读:

附图 15: UPT 生物传感器结果判读图 (左为安非他命阴性检测, 右为阳性检测)

二、标准工作曲线的绘制:

1. 将纯品安非他命用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液作为稀释液配置系列浓度标准品, 浓度为: 0 pg/ml、10 pg/ml、20 pg/ml、30 pg/ml、40 pg/ml、50 pg/ml、70 pg/ml、90 ng/ml、110 pg/ml、130 pg/ml、150 pg/ml、170 pg/ml、190 pg/ml、210 pg/ml、230 pg/ml、250 pg/ml、270 pg/ml、290 pg/ml、310 pg/ml、330 pg/ml 的 20 份样品;

2. 每个样品分别用 10 个 UPT 试纸条检测 10 次, 10 次检测中传感器判读得到的 T 值与 C 值分别取平均值, 最终根据二者的比值得出与每个浓度对应的 T/C 结果, 列于下表 7:

浓度 (pg/ml)	0	10	20	30	40	50	70
T 平均值	3.25457	4.85874	3.85462	8.39048	5.46825	6.52519	6.30955
C 平均值	0.54112	0.83405	0.68053	1.55738	1.07889	1.36111	1.5213
T/C	6.0145	5.82548	5.66415	5.38756	5.0684	4.79402	4.14747
浓度 (pg/ml)	90	110	130	150	170	190	210
T 平均值	4.96756	4.44708	3.17447	4.08154	2.32299	1.88865	1.60525
C 平均值	1.40311	1.43919	1.18685	1.81695	1.28834	1.191	1.21215
T/C	3.54039	3.08999	2.6747	2.24637	1.80309	1.58577	1.3243
浓度 (pg/ml)	230	250	270	290	310	330	
T 平均值	2.05901	1.74944	1.1227	1.34347	0.86066	0.51467	
C 平均值	1.84633	1.79797	1.51804	2.25774	1.89995	1.94995	
T/C	1.11519	0.97301	0.73957	0.59505	0.45299	0.26394	

表 7: 安非他命检测标准工作曲线

3. 以 T/C 值作为 X, 以安非他命浓度作为 Y 绘制标准工作曲线, 经统计拟和标准工作曲线的表达式为: $Y = -51.985X + 296.45$, 拟和系数的平方为: $R^2 = 0.9529$; 结果见附图 16:

安非他命检测标准工作曲线。

4. 安非他命的浓度计算公式为：

样品中含有的安非他命浓度(pg/ml)= $10Y=10 \times (-51.985X+296.45)=-519.85X+2964.5$

三、实际检测结果：

1. 检测准确性：

将 44 份待检样品（其中含 23 份阳性，21 份阴性）用本系统（UPT 试纸条与传感器）进行双盲检测：

UPT 试纸条与传感器法——23 份阳性，21 份阴性，与实际结果完全吻合；

同时 UPT 试纸条与传感器法给出了每份样品的最终精确浓度。

2. 检测稳定性：

将一份待检样品用 $\text{pH}=7.2$ 0.03mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释，用 UPT 试纸条与传感器检测 10 次，结果列于下表 8：

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	1.18037	1.18783	1.16444	1.18792	1.16883
安非他命浓度 (pg/ml)	2350.885	2347.007	2359.166	2346.96	2356.884
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	1.2185	1.14839	1.18847	1.17538	1.19595
安非他命浓度 (pg/ml)	2331.063	2367.509	2346.674	2353.479	2342.785

同一份待检样品重复测量的变异系数 (CV) = 0.423%

表 8：安非他命检测重复性

结论：在安非他命检测中，UPT 试纸条与传感器法具有很好的灵敏度与稳定性，且实现了精确定量检测。

实验例 5：间接模式检测鼠疫感染抗体（以检测兔感染鼠疫产生抗体为例进行说明）

一、UPT 生物传感器结果判读：

附图 17：UPT 生物传感器结果判读图（左为鼠疫感染抗体阴性检测，右为阳性检测）

二、标准工作曲线的绘制：

1. 将提纯的兔抗鼠疫 IgG 标准品用 1:10 稀释的正常兔血清（以 $\text{pH}=7.2$ 0.03mol/L PB 缓冲液稀释）作为稀释液配置系列浓度标准品，浓度为：0 ng/ml 、2 ng/ml 、4 ng/ml 、6 ng/ml 、8 ng/ml 、10 ng/ml 、15 ng/ml 、20 ng/ml 、25 ng/ml 、30 ng/ml 、35 ng/ml 、40 ng/ml 、45 ng/ml 、50 ng/ml 、55 ng/ml 、60 ng/ml 、65 ng/ml 、70 ng/ml 、75 ng/ml 、80 ng/ml 的 20 份样品；

2. 每个样品分别用 10 个 UPT 试纸条检测 10 次，10 次检测中传感器判读得到的 T 值与 C 值分别取平均值，最终根据二者的比值得出与每个浓度对应的 T/C 结果，列于下表 9:

浓度 (ng/ml)	0	2	4	6	8	10	15
T 平均值	0.64465	0.78083	0.7329	0.75725	0.78867	0.86065	0.95173
C 平均值	1.65228	1.96276	1.41627	1.4487	1.18135	1.05232	0.88773
T/C	0.39016	0.39782	0.51749	0.52271	0.6676	0.81786	1.07209
浓度 (ng/ml)	20	25	30	35	40	45	50
T 平均值	1.14907	1.17353	1.72606	1.51789	1.70135	2.33072	2.13382
C 平均值	0.83361	0.78799	0.79857	0.67269	0.65686	0.71419	0.62598
T/C	1.37843	1.48927	2.16144	2.25645	2.59013	3.26345	3.40877
浓度 (ng/ml)	55	60	65	70	75	80	
T 平均值	2.04721	2.47774	2.88072	2.70869	3.18586	2.59155	
C 平均值	0.56959	0.64625	0.63839	0.48019	0.64757	0.41861	
T/C	3.59418	3.83403	4.51248	5.64087	4.91972	6.19085	

表 9: 鼠疫抗体检测标准工作曲线

3. 以 T/C 值作为 X，以鼠疫抗体浓度作为 Y 绘制标准工作曲线，经统计拟和标准工作曲线的表达式为： $Y=14.129X-0.3076$ ，拟和系数的平方为： $R^2=0.9749$ ；结果见附图 18：鼠疫抗体检测标准工作曲线。

4. 鼠疫抗体浓度的计算公式为：

$$\text{兔血清中含有的鼠疫抗体浓度 (ng/ml)} = 10Y = 10 \times (14.129X - 0.3076) = 141.29X - 3.076$$

三、实际检测结果：

1. 检测准确性：

将 100 份兔血清（其中含 31 份阳性，69 份阴性）同时用酶联免疫吸附法（ELISA）与本系统（UPT 试纸条与传感器）进行双盲检测：

ELISA 法——23 份阳性，77 份阴性；

UPT 试纸条与传感器法——31 份阳性（包括 ELISA 中的 23 份阴性，并从 ELISA 确定的 77 份阴性样品中又检出 8 份阳性），69 份阴性，与实际结果完全吻合；

同时与 ELISA 的定性检测相对，UPT 试纸条与传感器法给出了每份样品的最终精确浓度。

2. 检测稳定性：

将一份感染鼠疫家兔的血清用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释，用 UPT 试纸条与传感器检测 10 次，结果列于下表 10：

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	0.39897	0.39034	0.38739	0.38791	0.38983
鼠疫抗体浓度 (ng/ml)	53.29447	52.07514	51.65833	51.7318	52.00308
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	0.39754	0.40328	0.39182	0.39558	0.39116
鼠疫抗体浓度 (ng/ml)	53.09243	53.90343	52.28425	52.8155	52.191

同一份血清重复测量的变异系数 (CV) = 1.408%

表 10: 鼠疫抗体检测标准工作曲线

结论: 在鼠疫感染抗体检测中, UPT 试纸条与传感器法与 ELISA 法相比具有更高的灵敏度, 且在实现精确定量的同时具有很好的稳定性。

实验例 6: 间接模式检测 SARS 病毒感染抗体:

一、UPT 生物传感器结果判读:

附图 19: UPT 生物传感器结果判读图 (左为 SARS 病毒感染抗体阴性检测, 右为阳性检测)

二、标准工作曲线的绘制:

1. 将从 SARS 病人血清中提纯的人抗 SARS 病毒 IgG 标准品用 1:10 稀释的正常人血清 (以 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液稀释) 作为稀释液配置系列浓度标准品, 浓度为: 0ng/ml、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、8 ng/ml、10 ng/ml、12 ng/ml、14 ng/ml、16 ng/ml、18 ng/ml、20 ng/ml、22 ng/ml、24 ng/ml、26 ng/ml、28 ng/ml、30 ng/ml、32 ng/ml、34 ng/ml 的 21 份样品;

2. 每个样品分别用 10 个 UPT 试纸条检测 10 次, 10 次检测中传感器判读得到的 T 值与 C 值分别取平均值, 最终根据二者的比值得出与每个浓度对应的 T/C 结果, 列于下表 11:

浓度 (ng/ml)	0	1	2	3	4	5	6
T 平均值	0.69876	0.64241	0.57418	0.45505	0.61317	0.52559	0.58502
C 平均值	1.88067	1.57133	1.25642	0.92109	1.05531	0.77997	0.80162
T/C	0.37155	0.40883	0.457	0.49403	0.58103	0.67386	0.7298
浓度 (ng/ml)	8	10	12	14	16	18	20
T 平均值	0.77607	1.51038	2.08572	1.82193	1.77487	1.87806	2.28666
C 平均值	0.80191	1.101	1.16543	0.79298	0.68393	0.63044	0.73583
T/C	0.96778	1.37183	1.78966	2.29757	2.59511	2.97897	3.10759
浓度 (ng/ml)	22	24	26	28	30	32	34
T 平均值	2.25097	2.13682	6.16953	5.22465	3.57491	4.73442	2.72789
C 平均值	0.65485	0.57506	1.47597	1.10033	0.6907	0.82293	0.44401
T/C	3.43738	3.71582	4.17998	4.74826	5.17578	5.75312	6.14375

表 11: SARS 病毒抗体检测标准工作曲线

3. 以 T/C 值作为 X, 以 SARS 病毒抗体浓度作为 Y 绘制标准工作曲线, 经统计拟和标准工作曲线的表达式为: $Y=5.7365X+0.8012$, 拟和系数的平方为: $R^2=0.9841$; 结果见附图 20: SARS 病毒抗体检测标准工作曲线。

4. SARS 病毒抗体浓度的计算公式为:

$$\text{人血清中含有的 SARS 病毒抗体浓度 (ng/ml)} = 10Y = 10 \times (5.7365X + 0.8012) = 57.365X + 8.012$$

三、实际检测结果:

1. 检测准确性:

将 45 份可能感染 SARS 病毒的病人血清 (最终确诊其中含 17 份阳性, 28 份阴性) 同时用酶联免疫吸附法 (ELISA) 与本系统 (UP 试纸条与传感器) 进行双盲检测:

ELISA 法——17 份阳性, 28 份阴性, 与实际结果完全吻合, 检测历时 2 小时左右;

UPT 试纸条与传感器法——17 份阳性, 28 份阴性, 与实际结果完全吻合, 检测历时半个小时左右;

与 ELISA 法相比, UPT 试纸条与传感器法检测更为快速, 且在 ELISA 法定性检测的基础上定量地给出了每份样品的最终精确浓度。

2. 检测稳定性:

将一份 SARS 病人血清用 pH=7.2 0.03mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释, 用 UPT 试纸条与传感器检测 10 次, 结果列于下表 12:

重复检测序号	1	2	3	4	5
T/C	0.70227	0.69938	0.69776	0.70511	0.71272
SARS 病毒抗体浓度 (ng/ml)	48.29772	48.13193	48.039	48.46064	48.89718
重复检测序号	6	7	8	9	10
T/C	0.70485	0.70306	0.70199	0.72136	0.70459
SARS 病毒抗体浓度 (ng/ml)	48.44572	48.34304	48.28166	49.39282	48.43081

同一份血清重复测量的变异系数 (CV) = 0.819%

表 12: SARS 病毒抗体检测重复性

结论: 在 SARS 病毒感染抗体检测中, UPT 试纸条与传感器法与 ELISA 法相比更为快速、可实现精确定量检测, 且稳定性很好。

具体实施方式

以下结合附图和实施例对本发明进行详细解释。

附图 21 中显示了试纸条的一般结构包括: 样品垫 10 (Sample Pad), 结合垫 11

(Conjugate Pad 或结合物释放垫 Conjugate Release Pad), 分析膜 12 (Analytical Membrane), 吸水垫 13 (Wicking Pad)、塑料背板 14 (其中一面涂有粘胶) (Laminating Card)。样品垫 10、结合垫 11、分析膜 12、吸水垫 13 通过粘胶 15 固定于塑料背板 14 上。

a. 样品垫 10 是使用过程中滴加被检样品的部位;

b. 结合垫 11 中固定有 UCP-抗体、UCP-抗原等 UCP-生物活性分子结合物, 在加入检测样品后, 其可在试纸条上发生免疫反应;

c. 分析膜 12 是层析试纸的核心部分, 检测带 17、质控带 18 均固定于分析膜 12 的某一具体位置;

d. 吸水垫 13 在整个检测过程中, 通过虹吸作用提供液体流过整个试纸条的动力。

各个部分之间的重叠区域 16 保证了液体在试纸条上流动的连续性。当进行检测时, 将样品滴加到样品垫 10 上, 样品通过渗透与虹吸作用进入结合垫 11, 使其中的 UCP 结合物重新溶解游离, 并在吸水垫 13 的虹吸作用下, 离开结合垫 11 进入分析膜 12, 在其内部向吸水垫 13 的方向流动。此过程中 UCP 结合物、目标被检物、检测带 17、质控带 18 之间将特异地发生一定的免疫反应, 并产生具有指示性的信号。

本发明中试纸条的装配, 包括以下步骤:

A. 将塑料背板 14 剪切成 $7.4 \times 30\text{cm}$ 规格的条带;

B. 将处理过的分析膜 12 粘于塑料背板 14 上 21mm-46mm 的位置, 质控带 18 向上, 检测带 17 向下;

C. 将处理过的结合垫 11 粘于塑料背板 14 上 12mm 的位置, 上端压于分析膜 12 的下端, 重叠 1mm;

D. 将处理过的样品垫 10 粘于塑料背板 14 上, 下端与塑料背板 14 平齐, 上端压于结合垫 11 的下端, 重叠 3mm;

E. 将吸水垫 13 粘于塑料背板 14 上, 上端与塑料背板 14 平齐, 下端压于分析膜 12 的上端, 重叠 2mm;

F. 将装配成形的条带用切条机剪切成 4mm 宽的试纸条;

G. 将试纸条装入塑料外壳, 干燥器中保存备用。

附图 22 中为粘贴时各部分之间的重叠关系。

附图 23 为试纸条装配完毕后各部分的结构与尺寸, 其中样品垫 10 重叠后的净暴露

长度为 15mm，结合垫 11 重叠后的净暴露长度为 7mm，分析膜 12 重叠后的净暴露长度为 22mm，吸水垫 13 重叠后的净暴露长度为 30mm。装配完毕并经过剪切的试纸条便可以装入试纸条的外壳中。

试纸条的外壳参见附图 24，其包括加样孔 20、结果判读窗口 21 和终点指示窗口 22。其中，结果判读窗口 21 中对应检测带 17、质控带 18。所述终点指示窗口 22 中对应终点指示带 19。其中通过加样孔 20 将样品点加到试纸条上后，在吸水垫 13 的虹吸作用下液体样品依次经过检测带 17、质控带 18。当终点指示带 19 变为绿色后，用生物传感器对外壳上结果判读窗口 21 中的各条带进行判读，就可以得到结果。

试纸条外壳分为上片和下片，参见附图 25。23、24 为咬合齿钉，将二者压紧便可以使试纸条外壳的上下片合为一体；25 为挡板，26 为倒钉，六个挡板 25 与三个倒钉 26 可将试纸条牢固地卡在外壳内，防止移动；27 为压板，将上下片盖紧后，压板 27 的位置处于试纸条上样品垫 10 与结合垫 11、结合垫 11 与分析膜 12 重叠处，以此来增加试纸条各部分的连接，保证检测中液体流动的连续性。

如图 25 所示，将试纸条放入外壳的下片，将上片与下片盖紧，便成为可以用于检测的成品。

实施例 1：上转换发光生物传感器的结构

参阅图 26 和图 27。由图可知，本发明上转换发光生物传感器包括激发光路、磷光图像接收光路、图像处理系统，分别用于照明试纸条 3、接收试纸条 3 发出的磷光图像、对试纸条 3 发出的磷光图像进行分析与处理，上转换发光生物传感器中试纸条结构示意图参阅图 24。

在激发光路上，沿光轴依次设置红外激发光源 1、一维聚焦镜 2，其光轴为 010。在磷光图像接收光路上，沿光轴依次设置前镜组 5、滤光片 6、后镜组 7 和图像接收器 8，其光轴为 002。磷光图像接收光路的物面与试纸条 3 的上表面重合，磷光图像接收光路的像面与图像接收器 8 的敏感面重合。试纸条 3 安装于特制的外壳 4 中，其法线为 003。激发光路形成的焦线 AA 照明试纸条 3，焦线 AA 与试纸条 3 的长边平行，且与试纸条 3 的对称线重合。激发光路的光轴 010、试纸条 3 的法线 003 和磷光图像接收光路的光轴 002 位于同一个平面内，激发光路的光轴 010 与试纸条 3 的法线 003 的夹角为 B1，磷光图像接收光路的光轴 002 与试纸条 3 的法线 003 的夹角为 B2。

所说的激发光路由红外激发光源 1、一维聚焦镜 2 组成，其作用是产生一条强度为

0.15 瓦/平方厘米 (W/cm^2) 的细长红外光焦线 AA, 照明试纸条 3 的所有功能带。红外激发光源 1 通常是经过准直的半导体激光器, 发出平行光束, 其波长一般为 980nm 附近。一维聚焦镜 2 可以是柱面透镜、棱镜或其他可以产生焦线的光学元件。

所说的试纸条 3 上含有两个功能带, 即检测带 17、质控带 18。其中检测带 17 将根据不同的检测模式与待检测样品中目标被检物以及 UCP 标记物发生特异性的免疫反应, 其上结合 UCP 所产生的信号为 T; 质控带 18 通过免疫反应结合 UCP 所产生的信号为 C, T 与 C 的比值, 即 T/C 便是与不同浓度目标被检物对应的检测结果, 其将与待检测样品中目标被检物的浓度呈一定的线形关系, 同时 C 对于试纸条的生物学反应性能具有监控作用;

所说的磷光图像接收光路由前镜组 5、滤光片 6、后镜组 7 和图像接收器 8 组成; 磷光图像接收光路的物方孔径半角为 U_2 。前镜组 5 将试纸条 3 上各功能带发出的磷光准直成平行光。滤光片 6 滤除磷光信号中包含的杂光, 以提高信噪比; 它对磷光信号具有尽可能高的透过率 (大于 90%), 而对激发光具有尽可能低的透过率 (小于 10^{-5})。后镜组 7 将滤除杂光后的磷光信号聚焦成像于图像接收器 8 的敏感面上。图像接收器 8 可以是一个线阵 CCD 摄像机, 也可以是一个一维光电二极管阵列, 其敏感元件的排列方向与试纸条 3 的细长方向一致。所以图像接收器 8 可以对应地测量试纸条 3 上各功能带发出的磷光强度。

所说的激发光路光轴 010 与试纸条 3 法线 003 的夹角为 B_1 、以及磷光图像接收光路光轴 002 与试纸条 3 法线 003 的夹角为 B_2 , 且 $B_1 \neq B_2$, 通常 $B_1 > B_2 - U_2$, 或 $B_1 < B_2 - U_2$, U_2 为磷光图像接收光路的物方孔径半角。这种设计的目的是阻止照明光线的反射光进入磷光图像接收光路, 以减小杂光。

与在先技术相比, 本发明的特点在于: 激发光路产生高强度红外激光焦线 AA, 同时将试纸条 3 上的各功能带照明; 磷光图像接收光路对试纸条 3 上的各功能带同时成像; 夹角 B_1 与夹角 B_2 不等, 且满足 $B_1 > B_2 - U_2$, 或 $B_1 < B_2 - U_2$ 。

上述特点使本发明具有判读效率高、判读灵敏度高、可进行多重定量检测等优点。

本发明上转换发光生物传感器的工作过程是: 首先将安装于外壳 4 中的试纸条 3 放到判读位置。由红外激发光源 1 发出的平行光束经一维聚焦镜 2 形成焦线 AA, 焦线 AA 位于试纸条 3 的上表面, 且与试纸条 3 的细长方向平行, 这样将试纸条 3 上的各功能带全部照明。由试纸条 3 上各功能带发出的磷光信号经前镜组 5 准直后变成平行光, 经滤

光片 6 滤除杂光后被后镜组 7 聚焦成像于图像接收器 8 的敏感面上。图像处理系统 9 对图像接收器 8 输出的试纸条磷光图像进行分析与处理, 给出试纸条 3 上各功能带磷光信号的幅度, 进而给出被检生物分子的属性和含量。

图 26 和图 27 是本发明的最佳实施例, 其具体结构和参数叙述如下:

激发光路中的红外激发光源 1 发出的平行光束的截面尺寸为 $4\text{mm}\times 1\text{mm}$, 中心波长为 980nm , 功率为 30mW ; 一维聚焦镜 2 为平凸柱面透镜, 其焦距为 20mm 。焦线 AA 的尺寸为 $20\text{mm}\times 1\text{mm}$, 略小于试纸条 3 的结果判读窗口 21 尺寸。结果判读窗口 21 中试纸条 3 上的两条带分别为: 距终点指示窗一侧结果判读窗口 21 内沿 12.2mm 处为检测带 17、 7.2mm 处为质控带 18。研究中采用的上转换磷光材料是 $(\text{YbEr})\text{F}_3$ (氟化钇铒), 在红外光激发下发出的磷光光谱如图 28 所示, 其主峰值波长为 541.5nm 。磷光图像接收光路中的前镜组 5 的焦距为 40mm , 物方孔径半角 $U_2=20^\circ$; 滤光片 6 的光谱透过率曲线如图 29 所示, 在 541.5nm 波长处的透过率大于 90% , 而在 980nm 波长处的透过率小于 10^{-5} 。后镜组 7 的焦距为 40mm , 所以磷光图像接收光路的放大倍率为 -1 倍。图像接收器 8 是一个线阵 CCD 摄像机, 其敏感面长度为 22mm , 共含有 2200 个像素, 像素尺寸为 $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ 。所以图像接收器 8 对试纸条 3 的空间判读分辨率为 $10\mu\text{m}$ 。

最佳实施例对纯上转换磷光材料的判读灵敏度优于 $1\mu\text{g/L}$, 可同时检测 4 种以上的生物物质。

实施例 2: 双抗体夹心检测乙肝表面抗原 HBs-Ag:

(1) 免疫层析液相材料准备:

A. UCP-抗体结合物:

a. 利用已建立的表面修饰与活化方法对直径 $200\text{--}300\text{nm}$ 的 UCP 颗粒进行表面修饰, 并与抗乙肝表面抗原 HBs-Ag 单克隆抗体进行连接, 在 UCP 保存液 ($\text{pH}=7.2$ 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 0.1% BSA、 0.05% Tween20、 0.02% NaN_3) 中以浓度 1mg/mL , 4°C 保存备用;

b. 将保存于 UCP 保存液中的 1mg/mL UCP-抗体结合物 6 mL , 12000r/min , 4°C , 离心 30min , 尽量弃尽上清;

c. 向离心管中的 UCP-抗体结合物沉降, 加入 3 mL 结合物稀释液 ($\text{pH}=7.2$ 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 1% 蔗糖、 1% BSA) 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL UCP-抗体结合物)

d. 将悬浊液倒入试剂瓶中, 4°C 保存备用;

B. 样品垫封闭液:

- a. 用天平精确称量 BSA (牛血清白蛋白) 1g, 放入小烧杯中;
 - b. 烧杯中加入 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 20 mL, 玻璃棒搅拌充分混匀;
 - c. BAS 溶液中加入 Tween 20 (吐温 20) 20 μ L, 玻璃棒搅拌充分混匀 (终浓度: 5% BAS, 0.1% Tween 20);
 - d. 4 $^{\circ}$ C 保存备用;
- C. 检测带蛋白:
- a. 用天平精确称量纯化的兔抗 HBs-Ag 多克隆抗体 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;
 - b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);
 - c. 分装为 50 μ L 每管, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用;
- D. 质控带蛋白:
- a. 用天平精确称量纯化的羊抗鼠 IgG 抗体 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;
 - b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);
 - c. 分装为 50 μ L 每管, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用;
- (2) 免疫层析固相载体材料准备:
- A. 样品垫:
- a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为样品垫固相材料, 将其剪切成 1.5 \times 30.0cm 规格的条带;
 - b. 将样品垫放入长形平皿中, 样品垫封闭液加于其上, 常温浸泡 30min;
 - c. 将样品垫由封闭液中取出, 放于干净的平皿中;
 - d. 37 $^{\circ}$ C 烘干 3 小时, 使样品垫充分干燥;
 - e. 封闭后的样品垫在干燥的环境中保存备用;
- B. 结合垫:
- a. 选用玻璃纤维素膜 (Glass Fiber) 作为结合垫固相材料, 将其剪切成 1.0 \times 30.0cm 规格的条带;
 - b. 将 4 $^{\circ}$ C 保存备用的 2mg/mL UCP-抗体结合物 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 含 1% 蔗糖、1% BSA) 超声 10s;
 - c. 将结合垫放入长形平皿中, UCP-抗体结合物悬浊液加于其上;

- d. 将结合垫取出放于干净的平皿中；
- e. 37℃烘干 2.5 小时，使结合垫充分干燥；
- f. 处理后的结合垫在干燥的环境中保存备用；

C. 分析膜：

a. 以孔径为 12 μm 的硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane) 作为固相材料，将其剪切成 2.5×30cm 规格的条带；；

b. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上，从下向上 1cm 处喷点 2mg/mL 兔抗 HBs-Ag 多克隆抗体，2 μL/cm，作为检测带；

c. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上，从下向上 1.5cm 处喷点 2mg/mL 羊抗鼠 IgG 抗体，2 μL/cm，作为质控带；

d. 37℃烘干 2 小时，使分析膜充分干燥；

e. 点样后的分析膜在干燥的环境中保存备用；

D. 吸水垫：

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为吸水垫固相材料，将其剪切成 3.0×30cm 规格的条带；

b. 将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸固定于吸水垫从下向上 2.0cm 处，作为终点指示带；

c. 吸水垫在干燥的环境中保存备用；

(3) 免疫层析试纸条检测

A. 将待检测血清样品用 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释；

B. 100 μL 稀释后的样品加于试纸条外壳上的加样孔中；

C. 待终点指示窗口中的终点指示带变为绿色后，便可以用传感器判读外壳上结果判读窗口中的检测带与质控带，以得出结果。

实施例 3：双抗体夹心检测冠状病毒 (SARS 病毒)：

(1) 免疫层析液相材料准备：

A. UCP-抗体结合物：

a. 利用已建立的表面修饰与活化方法对直径 200-300nm 的 UCP 颗粒进行表面修饰，并与纯化的兔抗 SARS 病毒抗体进行连接，在 UCP 保存液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中，含 0.1% BSA、0.05% Tween20、0.02% NaN₃) 中以浓度 1mg/mL，4℃保存备用；

b. 将保存于 UCP 保存液中的 1mg/mL UCP-抗体结合物 6 mL, 12000r/min, 4°C, 离心 30min, 尽量弃尽上清;

c. 向离心管中的 UCP-抗体结合物沉降, 加入 3 mL 结合物稀释液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 1%蔗糖、1% BSA) 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL UCP-抗体结合物)

d. 将悬浊液倒入试剂瓶中, 4°C 保存备用;

B. 样品垫封闭液:

a. 用天平精确称量 BSA (牛血清白蛋白) 1g, 放入小烧杯中;

b. 烧杯中加入 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 20 mL, 玻璃棒搅拌充分混匀;

c. BAS 溶液中加入 Tween 20 (吐温 20) 20 μ L, 玻璃棒搅拌充分混匀 (终浓度: 5% BAS, 0.1% Tween 20);

d. 4°C 保存备用;

C. 检测带蛋白:

a. 用天平精确称量纯化的羊抗 SARS 病毒抗体 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);

c. 分装为 50 μ L 每管, -20°C 冻存备用;

D. 质控带蛋白:

a. 用天平精确称量纯化的羊抗兔 IgG 抗体 2mg, 置于 1.5 mL 微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);

c. 分装为 50 μ L 每管, -20°C 冻存备用;

(2) 免疫层析固相载体材料准备:

A. 样品垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为样品垫固相材料, 将其剪切成 1.5×30.0cm 规格的条带;

b. 将样品垫放入长形平皿中, 样品垫封闭液加于其上, 常温浸泡 30min;

c. 将样品垫由封闭液中取出, 放于干净的平皿中;

d. 37°C 烘干 3 小时, 使样品垫充分干燥;

e. 封闭后的样品垫在干燥的环境中保存备用;

B. 结合垫:

a. 选用玻璃纤维素膜 (Glass Fiber) 作为结合垫固相材料, 将其剪切成 1.0×30.0 cm 规格的条带;

b. 将 4°C 保存备用的 2mg/mL UCP-抗体结合物 ($\text{pH}=7.2$ 0.03 mol/L PB 缓冲液, 含 1% 蔗糖、 1% BSA) 超声 10s ;

c. 将结合垫放入长形平皿中, UCP-抗体结合物悬浊液加于其上;

d. 将结合垫取出放于干净的平皿中;

e. 37°C 烘干 2.5 小时, 使结合垫充分干燥;

f. 处理后的结合垫在干燥的环境中保存备用;

C. 分析膜:

a. 以孔径为 $12\ \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane) 作为固相材料, 将其剪切成 $2.5 \times 30\text{cm}$ 规格的条带;;

b. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1cm 处喷点 2mg/mL 羊抗 SARS 病毒抗体, $2\ \mu\text{L/cm}$, 作为检测带;

c. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1.5cm 处喷点 2mg/mL 羊抗兔 IgG 抗体, $2\ \mu\text{L/cm}$, 作为质控带;

d. 37°C 烘干 2 小时, 使分析膜充分干燥;

e. 点样后的分析膜在干燥的环境中保存备用;

D. 吸水垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为吸水垫固相材料, 将其剪切成 $3.0 \times 30\text{cm}$ 规格的条带;

b. 将变色范围 $5.5-9.0$ 的精密 pH 试纸固定于吸水垫从下向上 2.0cm 处, 作为终点指示带;

c. 吸水垫在干燥的环境中保存备用;

(3) 免疫层析试纸条检测:

A. 将待检测血清样品用 $\text{pH}=7.2$ 0.03 mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释;

B. $100\ \mu\text{L}$ 稀释后的样品加于试纸条外壳上的加样孔中;

C. 待终点指示窗口中的终点指示带变为绿色后, 便可以用传感器判读外壳上结果判读窗口中的检测带与质控带, 以得出结果。

实施例 4: 鼠疫 FI-Ag (鼠疫 FI-抗原) 检测:**(1) 免疫层析液相材料准备:****A. UCP-抗体结合物:**

a. 利用已建立的表面修饰与活化方法对直径 200-300nm 的 UCP 颗粒进行表面修饰, 并与纯化的兔抗鼠疫抗体进行连接, 在 UCP 保存液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 0.1% BSA、0.05% Tween20、0.02% NaN_3) 中以浓度 1mg/mL, 4℃ 保存备用;

b. 将保存于 UCP 保存液中的 1mg/mL UCP-抗体结合物 6 mL, 12000r/min, 4℃, 离心 30min, 尽量弃尽上清;

c. 向离心管中的 UCP-抗体结合物沉降, 加入 3 mL 结合物稀释液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 1%蔗糖、1% BSA) 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL UCP-抗体结合物)

d. 将悬浊液倒入试剂瓶中, 4℃ 保存备用;

B. 样品垫封闭液:

a. 用天平精确称量 BSA (牛血清白蛋白) 1g, 放入小烧杯中;

b. 烧杯中加入 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 20 mL, 玻璃棒搅拌充分混匀;

c. BAS 溶液中加入 Tween 20 (吐温 20) 20 μL , 玻璃棒搅拌充分混匀 (终浓度: 5% BAS, 0.1% Tween 20);

d. 4℃ 保存备用;

C. 检测带蛋白:

a. 用天平精确称量鼠疫 FI-抗原 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);

c. 分装为 50 μL 每管, -20℃ 冻存备用;

D. 质控带蛋白:

a. 用天平精确称量纯化的羊抗兔 IgG 抗体 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);

c. 分装为 50 μL 每管, -20℃ 冻存备用;

(2) 免疫层析固相载体材料准备:

A. 样品垫:

- a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为样品垫固相材料, 将其剪切成 1.5×30.0 cm 规格的条带;
- b. 将样品垫放入长形平皿中, 样品垫封闭液加于其上, 常温浸泡 30min;
- c. 将样品垫由封闭液中取出, 放于干净的平皿中;
- d. 37°C 烘干 3 小时, 使样品垫充分干燥;
- e. 封闭后的样品垫在干燥的环境中保存备用;

B. 结合垫:

- a. 选用玻璃纤维素膜 (Glass Fiber) 作为结合垫固相材料, 将其剪切成 1.0×30.0 cm 规格的条带;
- b. 将 4°C 保存备用的 2mg/mL UCP-抗体结合物 ($\text{pH}=7.2$ 0.03 mol/L PB 缓冲液, 含 1% 蔗糖、1% BSA) 超声 10s;
- c. 将结合垫放入长形平皿中, UCP-抗体结合物悬浊液加于其上;
- d. 将结合垫取出放于干净的平皿中;
- e. 37°C 烘干 2.5 小时, 使结合垫充分干燥;
- f. 处理后的结合垫在干燥的环境中保存备用;

C. 分析膜:

- a. 以孔径为 $12\ \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane) 作为固相材料, 将其剪切成 2.5×30 cm 规格的条带;;
- b. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1cm 处喷点 2mg/mL 鼠疫 FI-抗原, $2\ \mu\text{L/cm}$, 作为检测带;
- c. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1.5cm 处喷点 2mg/mL 羊抗兔 IgG 抗体, $2\ \mu\text{L/cm}$, 作为质控带;
- d. 37°C 烘干 2 小时, 使膜充分干燥;
- e. 点样后的分析膜在干燥的环境中保存备用;

D. 吸水垫:

- a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为吸水垫固相材料, 将其剪切成 3.0×30 cm 规格的条带;
- b. 将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸固定于吸水垫从下向上 2.0cm 处, 作为终点指

示带:

d. 吸水垫在干燥的环境中保存备用;

(3) 免疫层析试纸条检测:

A. 将待检测样品用 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释;

B. 100 μ L 稀释后的样品加于试纸条外壳上的加样孔中;

C. 待终点指示窗口中的终点指示带变为绿色后, 便可以用传感器判读外壳上结果判读窗口中的检测带与质控带, 以得出结果。

实施例 5: 违禁药品检测

(1) 免疫层析液相材料准备:

A. UCP-抗体结合物:

a. 利用已建立的表面修饰与活化方法对直径 200-300nm 的 UCP 颗粒进行表面修饰, 并与纯化的兔抗违禁药品抗体或结合配基 (违禁药品包括: 安非他命、甲基安非他命、苯环己哌啶和鸦片酊等药物分子) 进行连接, 在 UCP 保存液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 0.1% BSA、0.05% Tween20、0.02% NaN_3) 中以浓度 1mg/mL, 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

b. 将保存于 UCP 保存液中的 1mg/mL UCP-抗体结合物 6 mL, 12000r/min, 4 $^{\circ}$ C, 离心 30min, 尽量弃尽上清;

c. 向离心管中的 UCP-抗体结合物沉降, 加入 3 mL 结合物稀释液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 1%蔗糖、1% BSA) 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL UCP-抗体结合物)

d. 将悬浊液倒入试剂瓶中, 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

B. 样品垫封闭液:

a. 用天平精确称量 BSA (牛血清白蛋白) 1g, 放入小烧杯中;

b. 烧杯中加入 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 20 mL, 玻璃棒搅拌充分混匀;

c. BAS 溶液中加入 Tween 20 (吐温 20) 20 μ L, 玻璃棒搅拌充分混匀 (终浓度: 5% BAS, 0.1% Tween 20);

d. 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

C. 检测带蛋白:

a. 用天平精确称量 BSA-违禁药品分子复合物 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);

- c. 分装为 50 μ L 每管, -20°C 冻存备用;
- D. 质控带蛋白:
- a. 用天平精确称量纯化的羊抗兔 IgG 抗体 2mg, 置于 1.5 mL 微离心管中;
- b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL);
- c. 分装为 50 μ L 每管, -20°C 冻存备用;
- (2) 免疫层析固相载体材料准备:
- A. 样品垫:
- a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为样品垫固相材料, 将其剪切成 1.5 \times 30.0cm 规格的条带;
- b. 将样品垫放入长形平皿中, 样品垫封闭液加于其上, 常温浸泡 30min;
- c. 将样品垫由封闭液中取出, 放于干净的平皿中;
- d. 37°C 烘干 3 小时, 使样品垫充分干燥;
- e. 封闭后的样品垫在干燥的环境中保存备用;
- B. 结合垫:
- a. 选用玻璃纤维素膜 (Glass Fiber) 作为结合垫固相材料, 将其剪切成 1.0 \times 30.0cm 规格的条带;
- b. 将 4°C 保存备用的 2mg/mL UCP-抗体结合物 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 含 1% 蔗糖、1% BSA) 超声 10s;
- c. 将结合垫放入长形平皿中, UCP-抗体结合物悬浊液加于其上;
- d. 将结合垫取出放于干净的平皿中;
- e. 37°C 烘干 2.5 小时, 使结合垫充分干燥;
- f. 处理后的结合垫在干燥的环境中保存备用;
- C. 分析膜:
- a. 以孔径为 12 μ m 的硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane) 作为固相材料, 将其剪切成 2.5 \times 30cm 规格的条带;;
- b. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1cm 处喷点 2mg/mL BSA-违禁药品分子复合物, 2 μ L/cm, 作为检测带;
- c. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1.5cm 处喷点 2mg/mL 羊抗兔 IgG 抗体,

2 μ L/cm, 作为质控带;

d. 37°C 烘干 2 小时, 使分析膜充分干燥;

e. 点样后的分析膜在干燥的环境中保存备用;

D. 吸水垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为吸水垫固相材料, 将其剪切成 3.0 \times 30cm 规格的条带;

b. 将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸固定于吸水垫从下向上 2.0cm 处, 作为终点指示带;

c. 吸水垫在干燥的环境中保存备用;

(3) 免疫层析试纸条检测:

A. 将待检测样品用 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释;

B. 100 μ L 稀释后的样品加于试纸条外壳上的加样孔中;

C. 待终点指示窗口中的终点指示带变为绿色后, 便可以用传感器判读外壳上结果判读窗口中的检测带与质控带, 以得出结果。

实施例 6: 鼠疫感染抗体检测:

(1) 免疫层析液相材料准备:

A. UCP-SPA 结合物:

a. 利用已建立的表面修饰与活化方法对直径 200-300nm 的 UCP 颗粒进行表面修饰, 并与 SPA (葡萄球菌蛋白 A) 进行连接, 在 UCP 保存液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 0.1% BSA、0.05% Tween20、0.02% NaN_3) 中以浓度 1mg/mL, 4°C 保存备用;

b. 将保存于 UCP 保存液中的 1mg/mL UCP-SPA 结合物 6 mL, 12000r/min, 4°C, 离心 30min, 尽量弃尽上清;

c. 向离心管中的 UCP-SPA 结合物沉降, 加入 3 mL 结合物稀释液 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液中, 含 1% 蔗糖、1% BSA) 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL UCP-SPA 结合物)

d. 将悬浊液倒入试剂瓶中, 4°C 保存备用;

B. 样品垫封闭液:

a. 用天平精确称量 BSA (牛血清白蛋白) 1g, 放入小烧杯中;

b. 烧杯中加入 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 20 mL, 玻璃棒搅拌充分混匀;

c. BAS 溶液中加入 Tween 20 (吐温 20) 20 μ L, 玻璃棒搅拌充分混匀 (终浓度: 5% BAS,

0.1% Tween 20);

d. 4℃保存备用;

C. 检测带蛋白:

a. 用天平精确称量鼠疫 F1-Ag (鼠疫 F1-Ag) 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL 鼠疫 F1-Ag);

c. 分装为 50 μL 每管, -20℃冻存备用;

D. 质控带蛋白:

a. 用天平精确称量羊 IgG 2mg, 置于 1 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL 羊 IgG);

c. 分装为 50 μL 每管, -20℃冻存备用;

(2) 免疫层析固相载体材料准备:

A. 样品垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为样品垫固相材料, 将其剪切成 1.5×30.0cm 规格的条带;

b. 将样品垫放入长形平皿中, 样品垫封闭液加于其上, 常温浸泡 30min;

c. 将样品垫由封闭液中取出, 放于干净的平皿中;

d. 37℃烘干 3 小时, 使样品垫充分干燥;

e. 封闭后的样品垫在干燥的环境中保存备用;

B. 结合垫:

a. 选用玻璃纤维素膜 (Glass Fiber) 作为结合垫固相材料, 将其剪切成 1.0×30.0cm 规格的条带;

b. 将 4℃保存备用的 2mg/mL UCP-SPA (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 含 1% 蔗糖、1% BSA) 超声 10s;

c. 将结合垫放入长形平皿中, UCP-SPA 结合物悬浊液加于其上;

d. 将结合垫取出放于干净的平皿中;

e. 37℃烘干 2.5 小时, 使结合垫充分干燥;

f. 处理后的结合垫在干燥的环境中保存备用;

C. 分析膜:

a. 以孔径为 $12\ \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane) 作为固相材料, 将其剪切成 $2.5\times 30\text{cm}$ 规格的条带;;

b. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1cm 处喷点 2mg/mL 鼠疫 F1-Ag, $2\ \mu\text{L/cm}$, 作为检测带;

c. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1.5cm 处喷点 2mg/mL 羊 IgG, $2\ \mu\text{L/cm}$, 作为质控带;

d. 37°C 烘干 2 小时, 使分析膜充分干燥;

e. 点样后的分析膜在干燥的环境中保存备用;

D. 吸水垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为吸水垫固相材料, 将其剪切成 $3.0\times 30\text{cm}$ 规格的条带;

b. 将变色范围 $5.5-9.0$ 的精密 pH 试纸固定于吸水垫从下向上 2.0cm 处, 作为终点指示带;

c. 吸水垫在干燥的环境中保存备用;

(3) 免疫层析试纸条检测:

A. 待检测血清样品用 $\text{pH}=7.2$ $0.03\ \text{mol/L}$ PB 缓冲液 10 倍稀释;

B. $100\ \mu\text{L}$ 稀释后的样品加于试纸条外壳上的加样孔中;

C. 待终点指示窗口中的终点指示带变为绿色后, 便可以用传感器判读外壳上结果判读窗口中的检测带与质控带, 以得出结果。

实施例 7: SARS 病毒感染抗体检测:

(1) 免疫层析液相材料准备:

A. UCP-SPA 结合物:

a. 利用已建立的表面修饰与活化方法对直径 $200-300\text{nm}$ 的 UCP 颗粒进行表面修饰, 并与 SPA (葡萄球菌蛋白 A) 进行连接, 在 UCP 保存液 ($\text{pH}=7.2$ $0.03\ \text{mol/L}$ PB 缓冲液中, 含 0.1% BSA、 0.05% Tween20、 0.02% NaN_3) 中以浓度 1mg/mL , 4°C 保存备用;

b. 将保存于 UCP 保存液中的 1mg/mL UCP-SPA 结合物 $6\ \text{mL}$, 12000r/min , 4°C , 离心 30min , 尽量弃尽上清;

c. 向离心管中的 UCP-SPA 结合物沉降, 加入 $3\ \text{mL}$ 结合物稀释液 ($\text{pH}=7.2$ $0.03\ \text{mol/L}$ PB 缓冲液)。

PB 缓冲液中, 含 1%蔗糖、1% BSA) 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL UCP-SPA 结合物)

d. 将悬浊液倒入试剂瓶中, 4℃保存备用;

B. 样品垫封闭液:

a. 用天平精确称量 BSA (牛血清白蛋白) 1g, 放入小烧杯中;

b. 烧杯中加入 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 20 mL, 玻璃棒搅拌充分混匀;

c. BAS 溶液中加入 Tween 20 (吐温 20) 20 μL, 玻璃棒搅拌充分混匀 (终浓度: 5% BAS, 0.1% Tween 20);

d. 4℃保存备用;

C. 检测带蛋白:

a. 用天平精确称量纯化的 SARS 病毒表面 N 蛋白 2mg, 置于 1.5 mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL SARS 病毒表面 N 抗原);

c. 分装为 50 μL 每管, -20℃冻存备用;

D. 质控带蛋白:

a. 用天平精确称量纯化的羊 IgG 2mg, 置于 1mL 的微离心管中;

b. 微离心管中加入 1 mL pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 涡旋充分混匀 (终浓度: 2mg/mL 羊 IgG);

c. 分装为 50 μL 每管, -20℃冻存备用;

(2) 免疫层析固相载体材料准备:

A. 样品垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为样品垫固相材料, 将其剪切成 1.5×30.0cm 规格的条带;

b. 将样品垫放入长形平皿中, 样品垫封闭液加于其上, 常温浸泡 30min;

c. 将样品垫由封闭液中取出, 放于干净的平皿中;

d. 37℃烘干 3 小时, 使样品垫充分干燥;

e. 封闭后的样品垫在干燥的环境中保存备用;

B. 结合垫:

a. 选用玻璃纤维素膜 (Glass Fiber) 作为结合垫固相材料, 将其剪切成 1.0×30.0cm 规格的条带;

- b. 将 4℃保存备用的 2mg/mL UCP-SPA 结合物 (pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液, 含 1% 蔗糖、1% BSA) 超声 10s;
- c. 将结合垫放入长形平皿中, UCP-SPA 结合物悬浊液加于其上;
- d. 将结合垫取出放于干净的平皿中;
- e. 37℃烘干 2.5 小时, 使结合垫充分干燥;
- f. 处理后的结合垫在干燥的环境中保存备用;

C. 分析膜:

a. 以孔径为 12 μm 的硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane) 作为固相材料, 将其剪切成 2.5×30cm 规格的条带;

b. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1cm 处喷点 2mg/mL SARS 病毒表面 N 蛋白, 2 μL/cm, 作为检测带;

c. 用点样仪在 2.5cm 宽的分析膜上, 从下向上 1.5cm 处喷点 2mg/mL 羊 IgG, 2 μL/cm, 作为质控带;

d. 37℃烘干 2 小时, 使分析膜充分干燥;

e. 点样后的分析膜在干燥的环境中保存备用;

D. 吸水垫:

a. 选用纤维素膜 (Cellulose Membrane) 作为吸水垫固相材料, 将其剪切成 3.0×30cm 规格的条带;

b. 将变色范围 5.5-9.0 的精密 pH 试纸固定于吸水垫从下向上 2.0cm 处, 作为终点指示带;

c. 吸水垫在干燥的环境中保存备用;

(3) 免疫层析试纸条检测:

A. 将待检测血清样品用 pH=7.2 0.03 mol/L PB 缓冲液 10 倍稀释;

B. 100 μL 稀释后的样品加于试纸条外壳上的加样孔中;

C. 待终点指示窗口中的终点指示带变为绿色后, 便可以用传感器判读外壳上结果判读窗口中的检测带与质控带, 以得出结果。

上述实施例有助于理解本发明, 但是并不是对本发明的限制。本领域的普通技术人员可以根据上述实施例对本发明作出适当的修改和变动, 均属于本发明的保护范围。

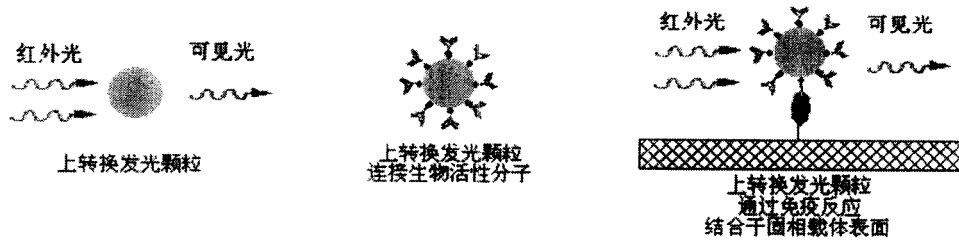


图 1

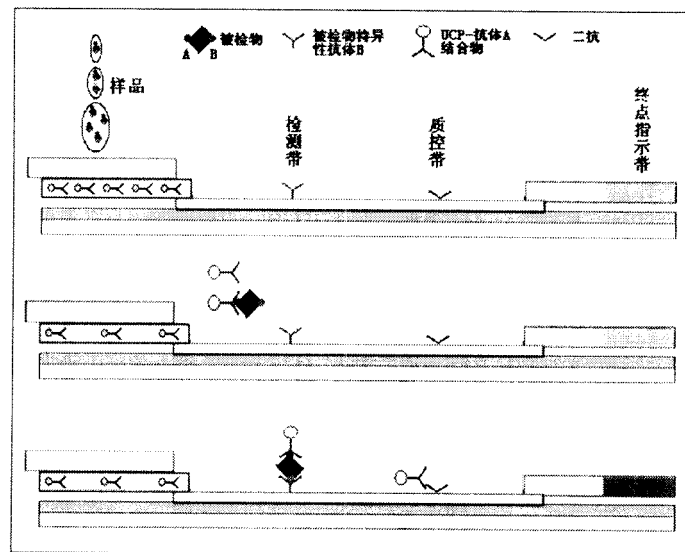
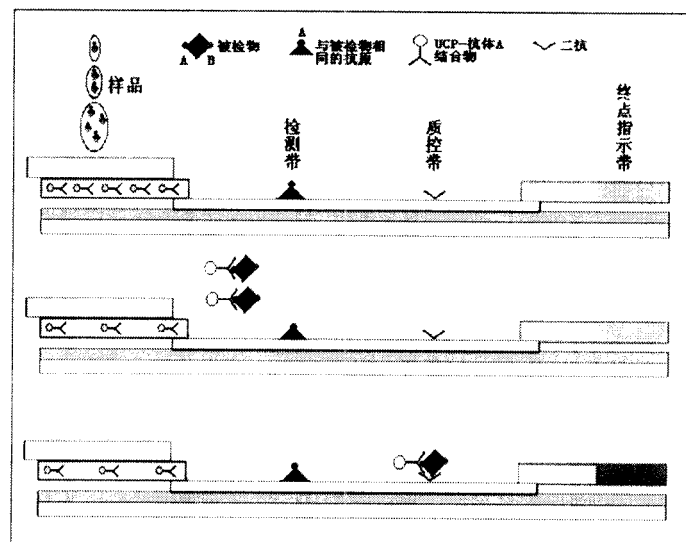
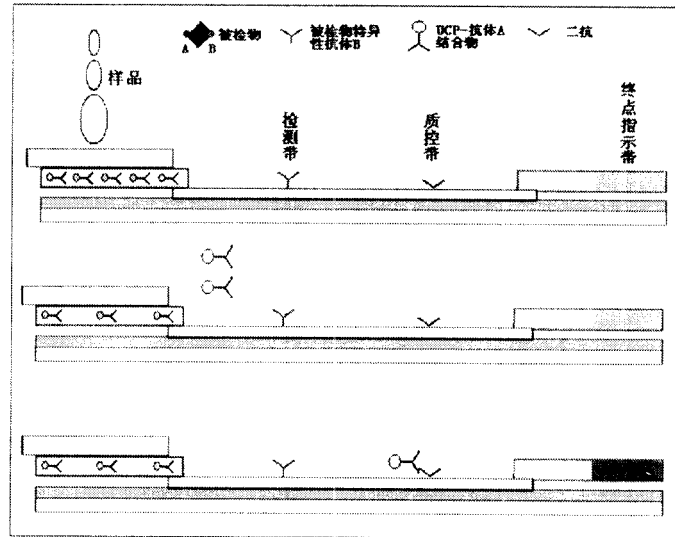
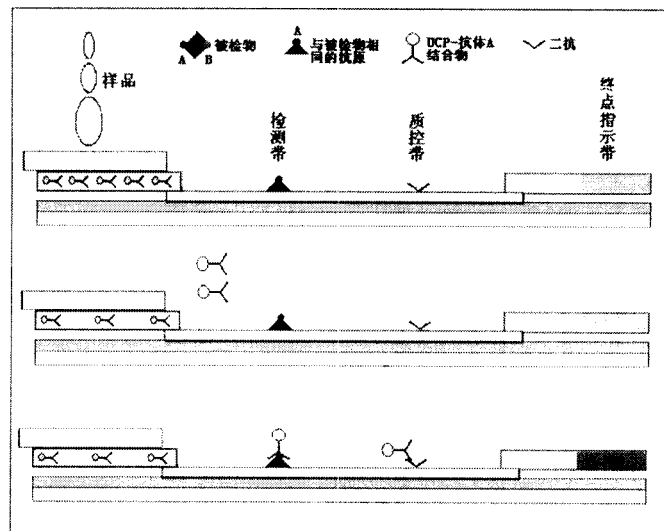
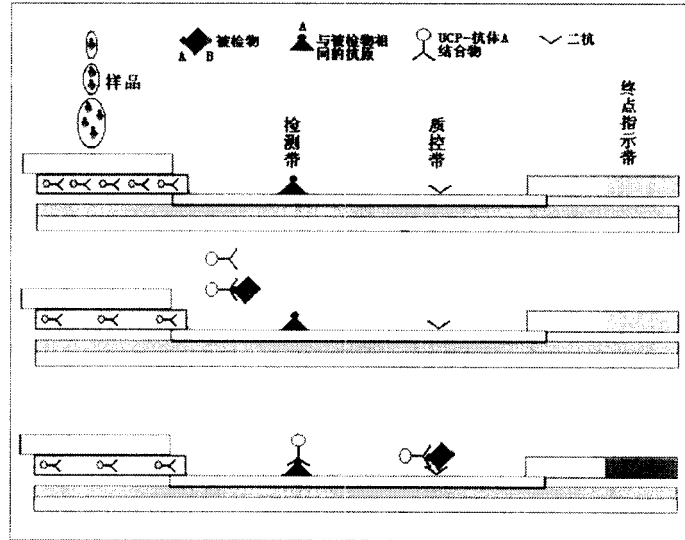


图 2





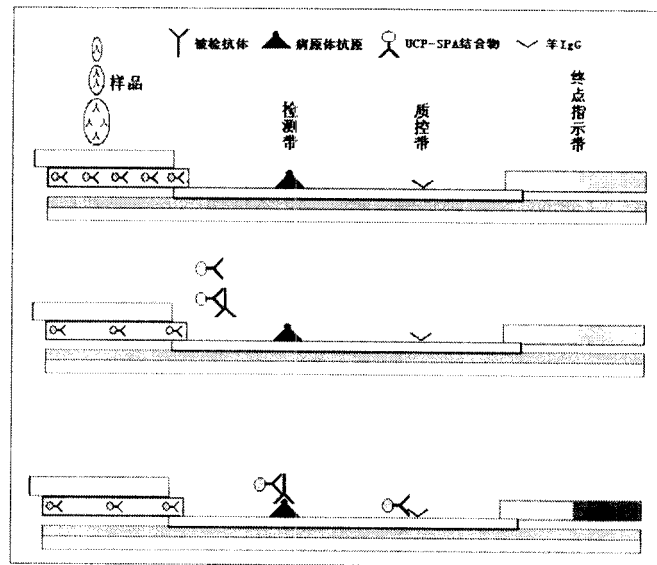


图 7

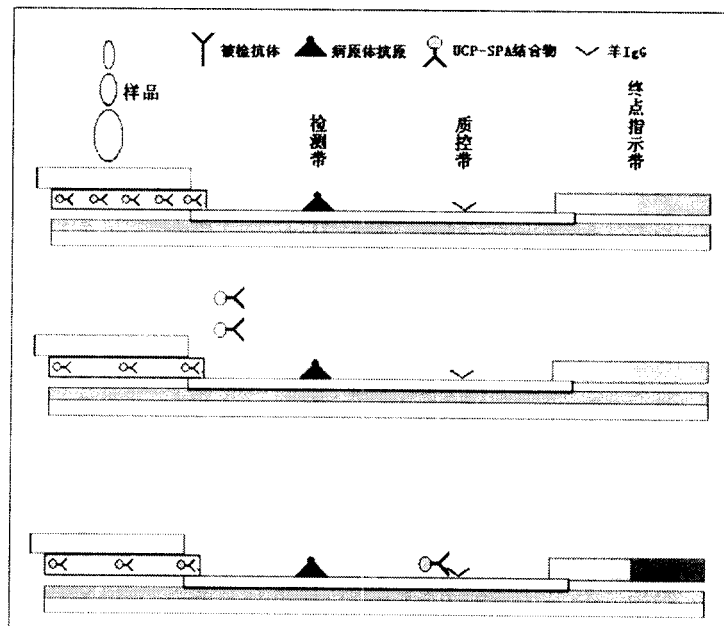


图 8

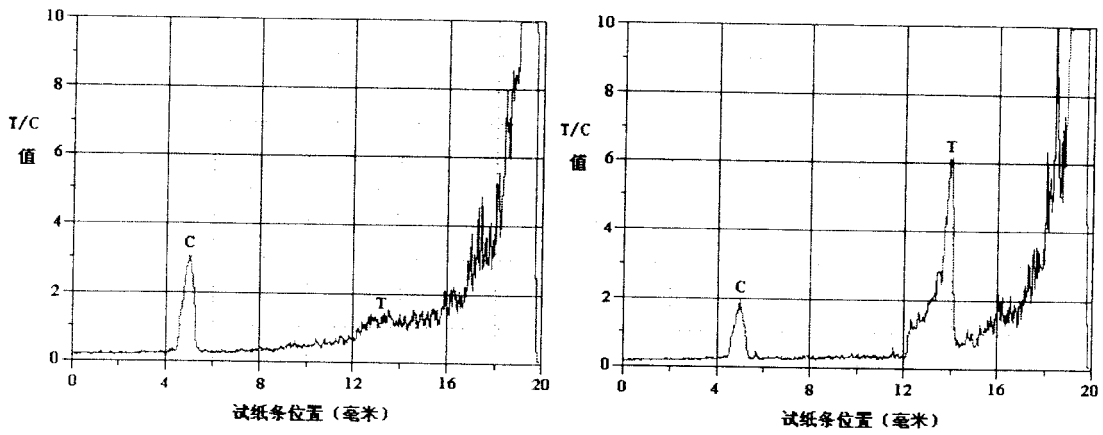


图 9

乙肝病毒表面抗原检测标准工作曲线

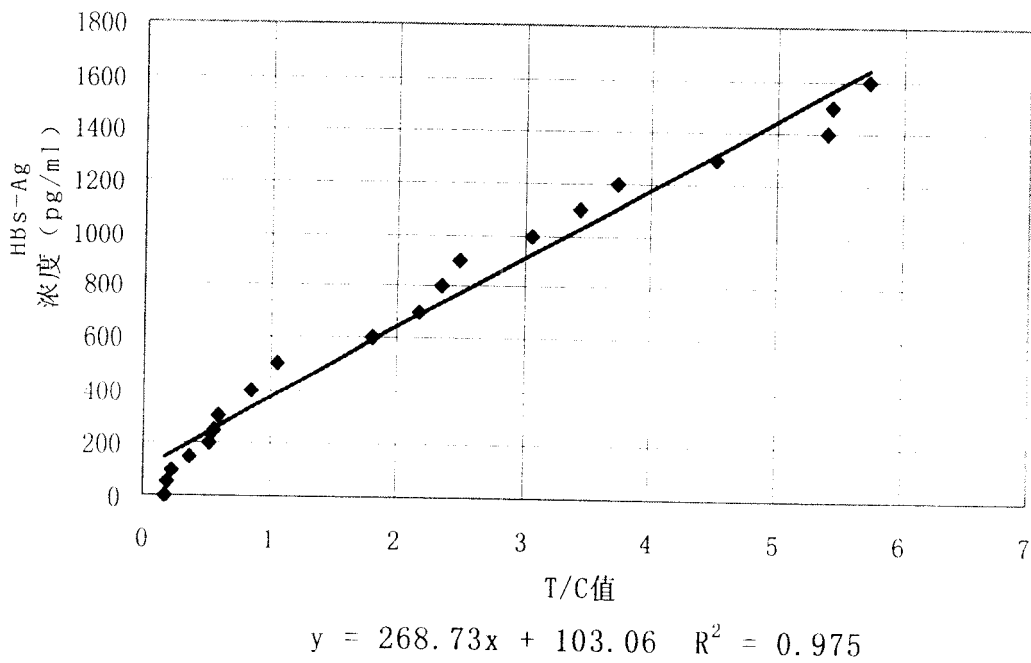


图 10

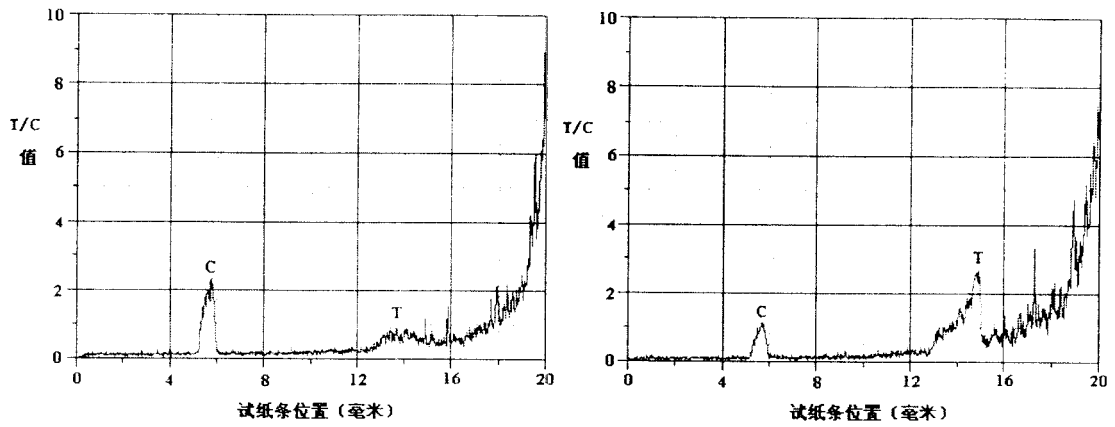


图 11

SARS病毒检测标准工作曲线

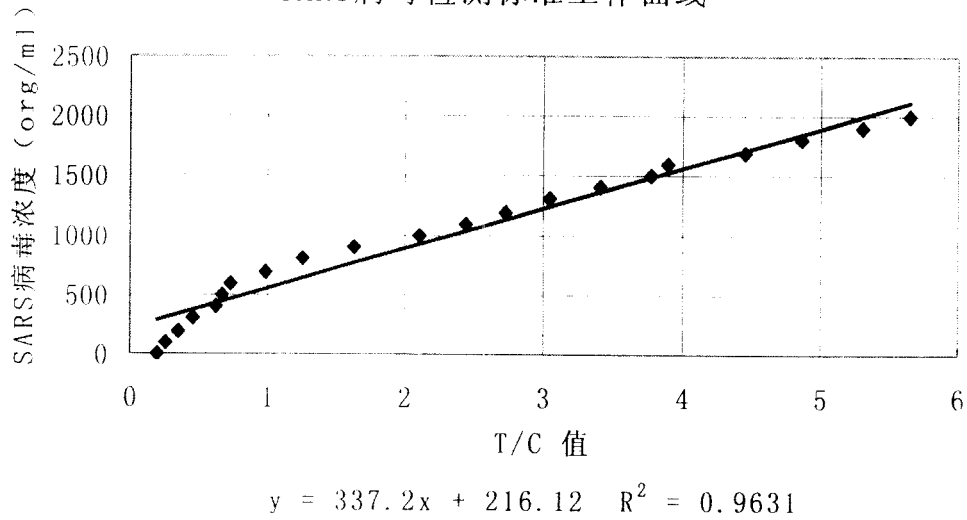


图 12

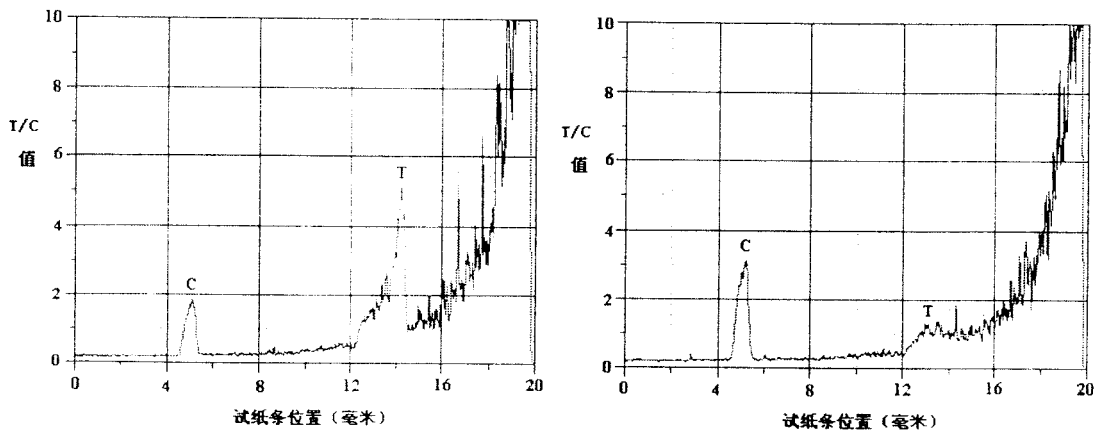


图 13

鼠疫FI-Ag检测标准工作曲线

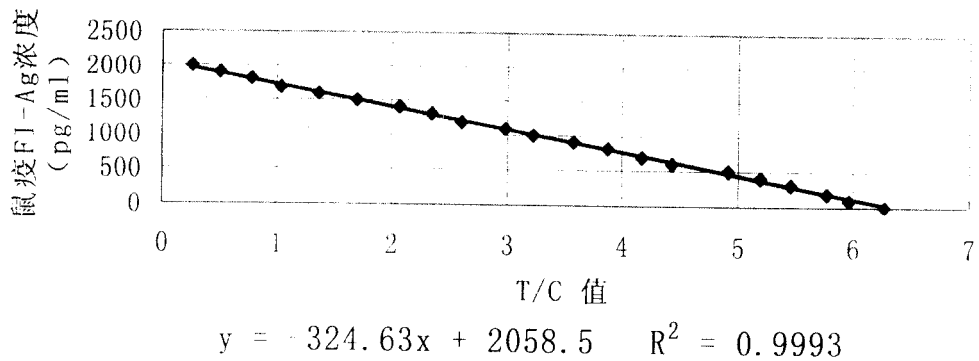


图 14

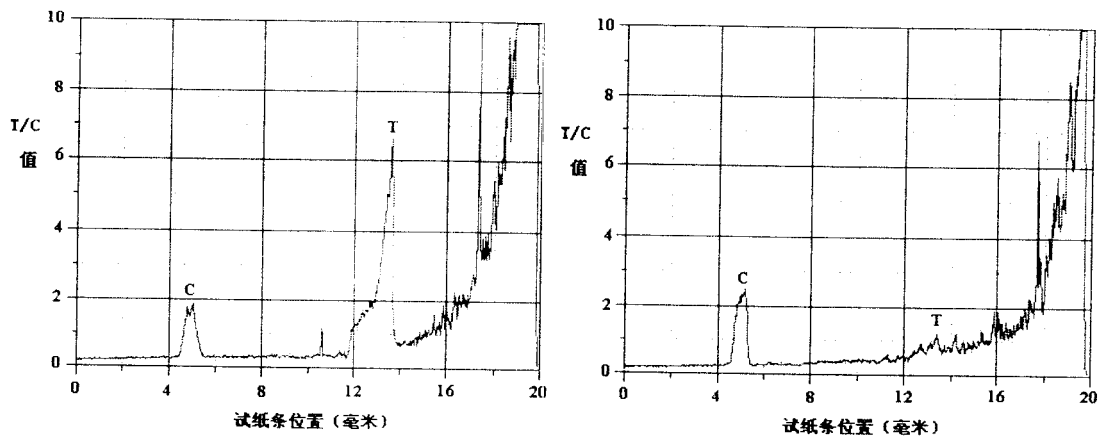


图 15

安非他命检测标准工作曲线

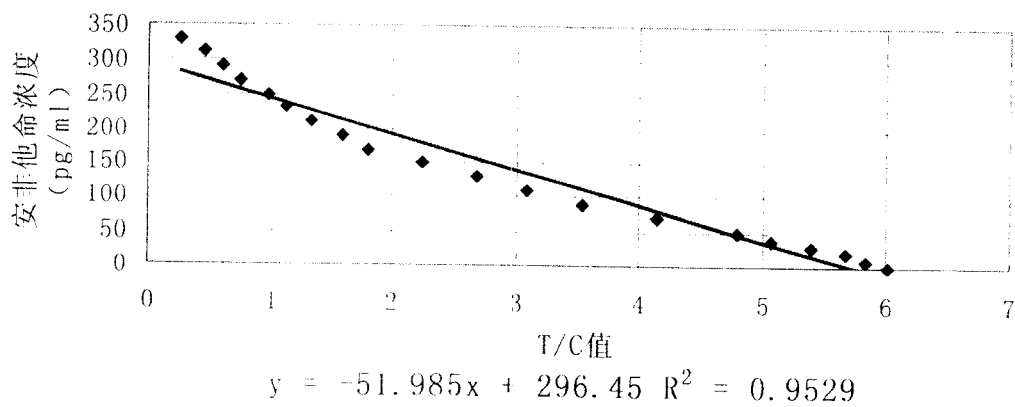


图 16

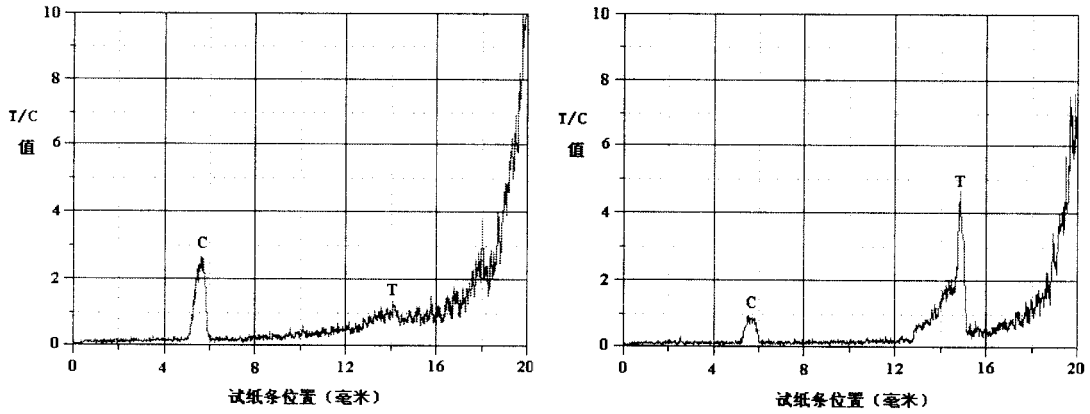


图 17

鼠疫抗体检测标准工作曲线

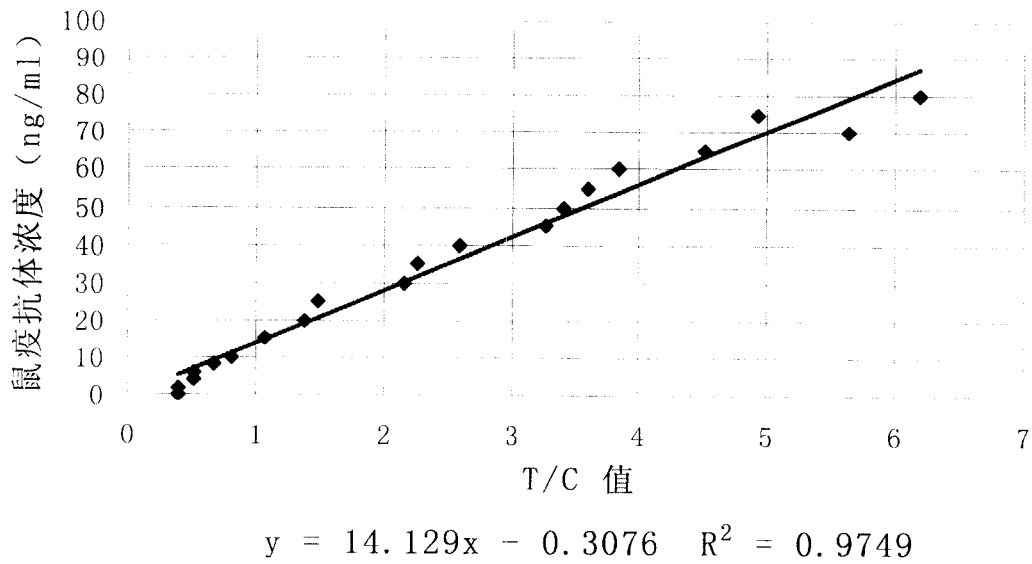


图 18

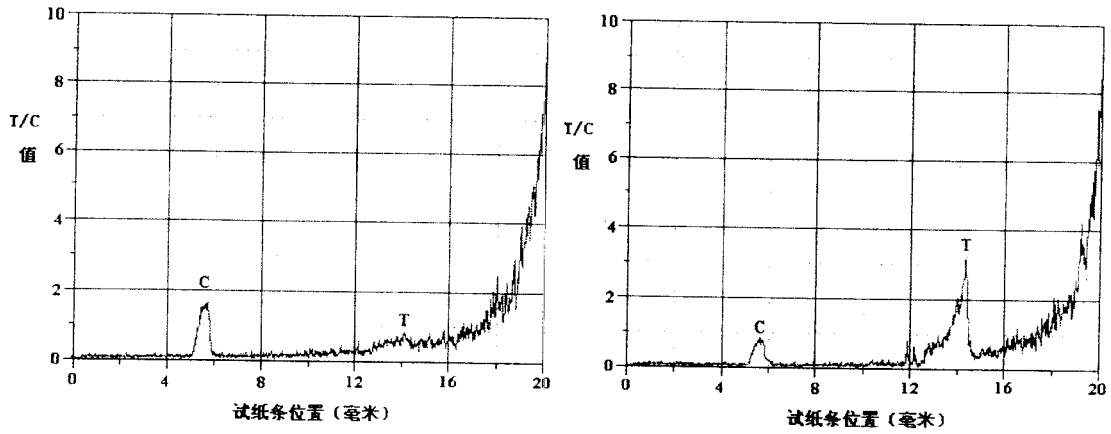


图 19

SARS病毒抗体检测标准工作曲线

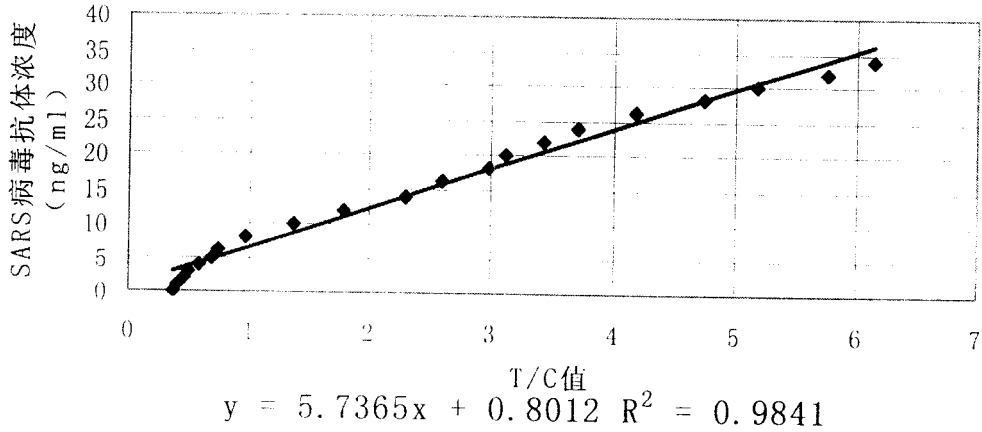


图 20

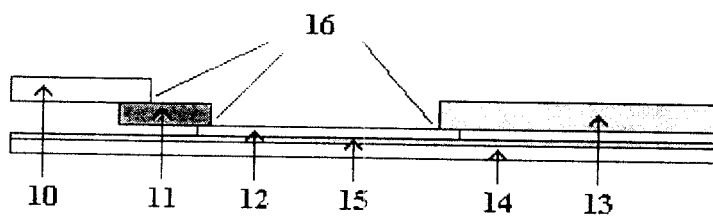


图 21

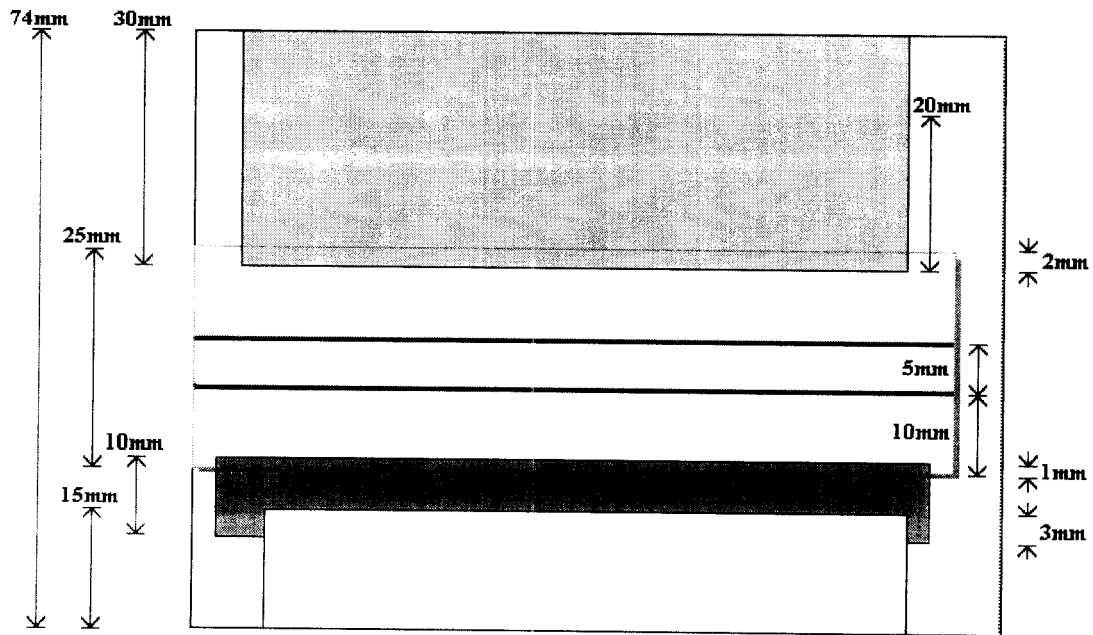


图 22

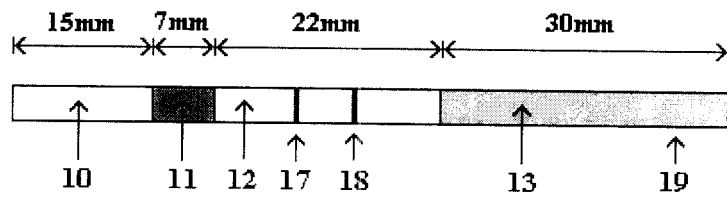


图 23

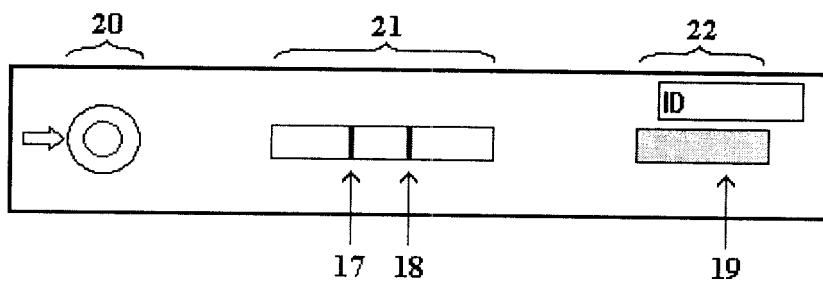


图 24

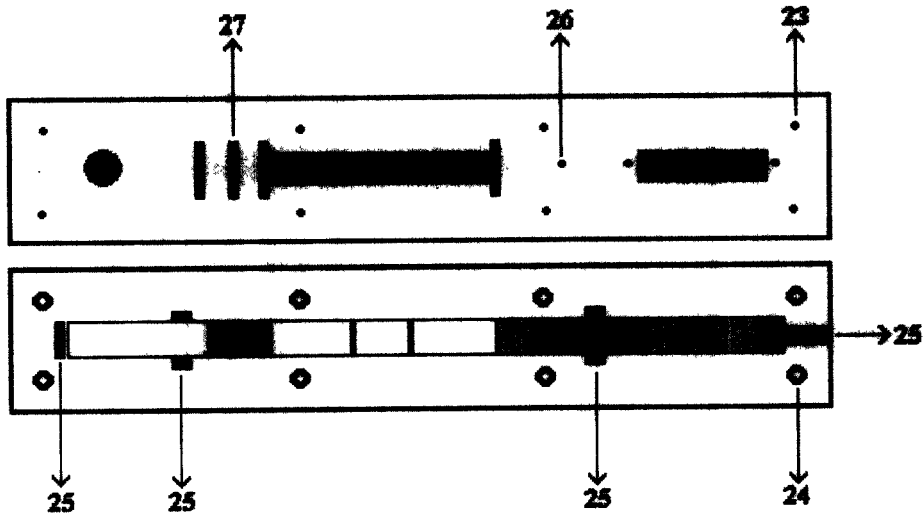


图 25

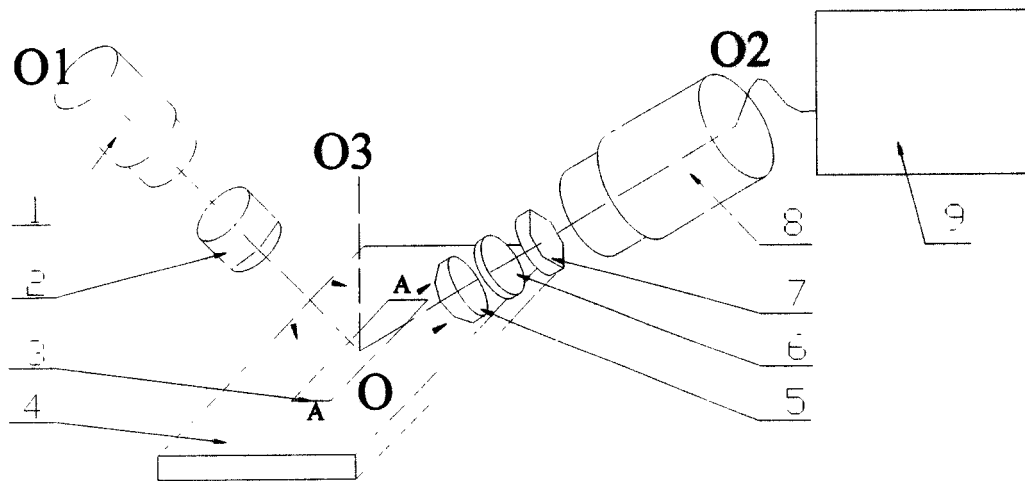


图 26

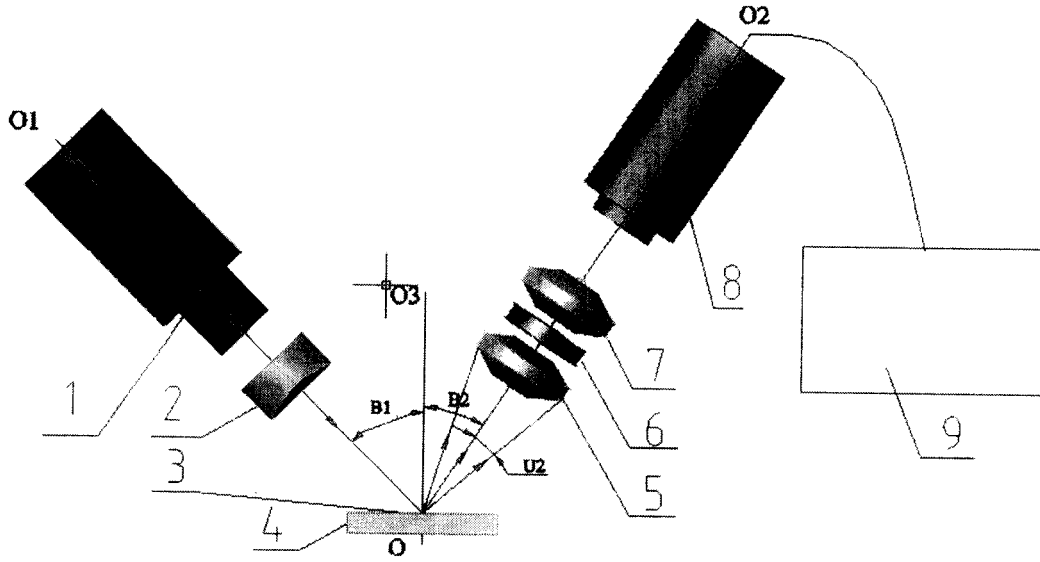


图 27

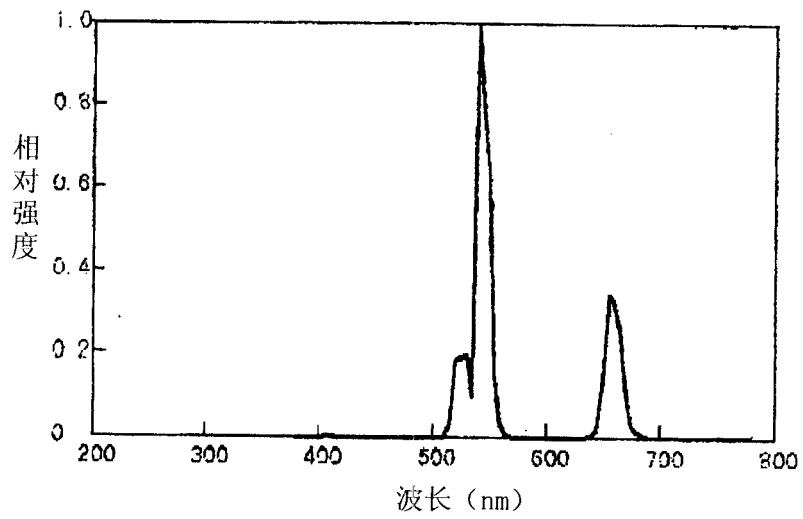


图 28

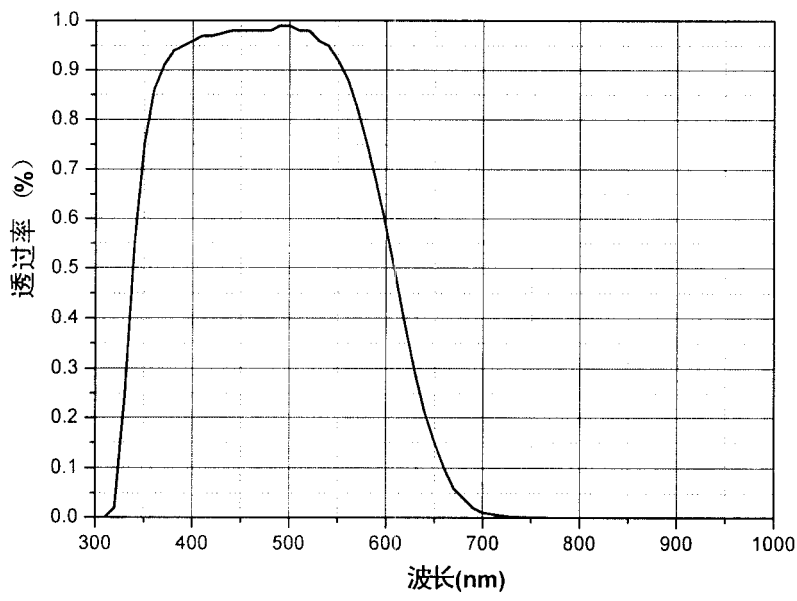


图 29

专利名称(译)	基于上转换发光技术免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN1690711A	公开(公告)日	2005-11-02
申请号	CN200410034104.0	申请日	2004-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	周蕾		
发明人	周蕾		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/547 G01N21/64 G01N33/531		
代理人(译)	张韬		
其他公开文献	CN1690711B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸，其采用上转换发光材料即UCP作为生物标记物，结果在红外光的照射下以可见光光信号的形式表现出来，并可进行仪器判读，从而实现对目标被检物的定量检测。其结构主要包括：样品垫、结合垫或结合物释放垫、分析膜、吸水垫和塑料背板。本发明还公开了该试纸条的制备方法和在生物样品定量检测中的应用。依据其待测物质发生免疫反应方式的不同，将试纸条分为夹心模式、竞争模式和间接模式，各种模式可对样品中的不同待测物质进行快速、灵敏地定性和定量检测分析。

