



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 205538994 U

(45)授权公告日 2016.08.31

(21)申请号 201620357775.9

(22)申请日 2016.04.26

(73)专利权人 河南美凯生物科技有限公司

地址 462000 河南省漯河市沙澧产业集聚
区湘江西路与经五路交叉口

(72)发明人 赵焕朝

(74)专利代理机构 北京风雅颂专利代理有限公
司 11403

代理人 李阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

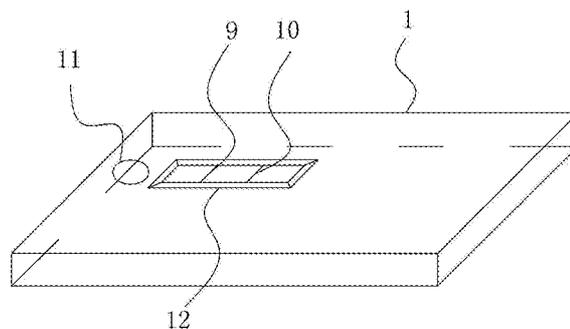
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)实用新型名称

一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置

(57)摘要

本实用新型涉及一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置,有效的解决了检测产品灵敏度低,批间差异较大的问题;其解决的技术方案是包括塑料卡壳、Fusion5膜、硝酸纤维膜以及吸水纸,塑料卡壳为矩形壳,塑料卡壳内设有PVC底板,PVC底板的中间设有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的左右两侧分别搭接高于硝酸纤维素膜的Fusion5膜和吸水纸,Fusion5膜上设有加样区和微球区,微球区上载有生物素标记的时间分辨荧光微球,硝酸纤维素膜上设有检测线(T)和质控线(C),检测线上设有包被抗体或抗原,质控线上设有包被抗体,塑料卡壳上设有置于加样区上的加样孔,塑料卡壳上设有检测线和质控线上的观测窗;本实用新型具有方便、快速、高灵敏度、高特异性等优点。



1. 一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置,包括塑料卡壳(1)、Fusion5膜(2)、硝酸纤维膜(3)以及吸水纸(4),其特征在于,塑料卡壳(1)为矩形壳,塑料卡壳(1)内设有PVC底板(5),PVC底板(5)的中间设有硝酸纤维素膜(3),硝酸纤维膜(3)的左右两侧分别搭接高于硝酸纤维素膜(3)的Fusion5膜(2)和吸水纸(4),Fusion5膜(2)上设有加样区(6)和微球区(7),微球区(7)上载有生物素标记的时间分辨荧光微球(8),硝酸纤维素膜(3)上设有检测线(T)(9)和质控线(C)(10),检测线(9)上设有包被抗体或抗原,质控线(10)上设有包被抗体,塑料卡壳(1)上设有置于加样区(6)上的加样孔(11),塑料卡壳(1)上设有检测线(9)和质控线(10)上的观测窗(12)。

2. 根据权利要求1所述的一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置,其特征在于,所述的时间分辨荧光微球(8)表面经生物素标记,粒径范围为20-500nm,荧光微球(8)中填充了镧系元素化合物。

3. 根据权利要求1所述的一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置,其特征在于,所述的检测线(9)上的包被抗体为针对待测抗原的单抗或多抗,或者为针对待测抗体的抗原的单抗或多抗,检测线(9)上的包被抗原为待测抗原的竞争性抗原。

4. 根据权利要求1所述的一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置,其特征在于,所述的质控线(10)上的包被抗体为针对亲和素标记抗体的二抗,或者为针对亲和素标记抗原的单抗或多抗。

一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置

技术领域

[0001] 本实用新型涉及生物技术领域,特别是一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置。

背景技术

[0002] 目前的免疫层析(lateral flow immunoassay,LFIA)快速检测试纸条多以胶体金或者荧光素作为标记物。基于胶体金标记技术开发的快速检测产品,存在灵敏度低,只能定性或者半定量,批间差异较大等问题;基于荧光素标记技术的免疫层析灵敏度有了较大提高,也能进行定量检测,但是由于样本中含有较高的荧光本底信号,且stock位移较小,会对检测产生较大的影响。

[0003] 所以本使用新型用一种高灵敏检测试剂装置来提高其灵敏度。

发明内容

[0004] 针对上述情况,为克服现有技术之缺陷,本实用新型之目的就是提供一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置,有效的解决了传统的检测产品灵敏度低,只能定性或者半定量,批间差异较大的问题。

[0005] 其解决的技术方案是,包括塑料卡壳、Fusion5膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸,塑料卡壳为矩形壳,塑料卡壳内设有PVC底板,PVC底板的中间设有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的左右两侧分别搭接高于硝酸纤维素膜的Fusion5膜和吸水纸,Fusion5膜上设有加样区和微球区,微球区上载有生物素标记的时间分辨荧光微球,硝酸纤维素膜上设有检测线(T)和质控线(C),检测线上设有包被抗体或抗原,质控线上设有包被抗体,塑料卡壳上设有置于加样区上的加样孔,塑料卡壳上设有检测线和质控线上的观测窗。

[0006] 本实用新型的检测装置采用亲和素-生物素和抗原-抗体系统将检测信号放大,免稀释,具有方便、快速、高灵敏度、高特异性等优点。

附图说明

[0007] 图1为本实用新型塑料外壳立体图。

[0008] 图2为本实用新型检测卡内部示意图。

具体实施方式

[0009] 以下结合附图对本实用新型的具体实施方式作进一步详细说明。

[0010] 由图1至图2给出,本实用新型包括塑料卡壳1、Fusion5膜2、硝酸纤维素膜3以及吸水纸4,塑料卡壳1为矩形壳,塑料卡壳1内设有PVC底板5,PVC底板5的中间设有硝酸纤维素膜3,硝酸纤维素膜3的左右两侧分别搭接高于硝酸纤维素膜3的Fusion5膜2和吸水纸4,Fusion5膜2上设有加样区6和微球区7,微球区7上载有生物素标记的时间分辨荧光微球8,硝酸纤维素膜3上设有检测线(T)9和质控线(C)10,检测线9上设有包被抗体或抗原,质控线10上设有

包被抗体,塑料卡壳1上设有置于加样区6上的加样孔11,塑料卡壳1上设有检测线9和质控线10上的观测窗12。

[0011] 所述的时间分辨荧光微球8表面经生物素标记,粒径范围为20-500nm,荧光微球8中填充了镧系元素化合物。

[0012] 所述的检测线9上的包被抗体为针对待测抗原的单抗或多抗,或者为针对待测抗体的抗原的单抗或多抗,检测线9上的包被抗原为待测抗原的竞争性抗原。

[0013] 所述的质控线10上的包被抗体为针对亲和素标记抗体的二抗,或者为针对亲和素标记抗原的单抗或多抗。

[0014] 本实用新型使用时,

[0015] 反应溶剂包括亲和素标记的抗体或抗原溶液,亲和素标记的抗体可以是亲和素标记的抗体或链霉亲和素标记的抗体或亲和素活性亚基抗体。

[0016] 本实用新型检测试纸条的试剂方法的具体步骤为:

[0017] (1) 用亲和素标记抗体 ;普通标记方法;

[0018] (2) 用生物素标记荧光微球:普通标记方法;

[0019] (3) 空白大卡粘贴

[0020] 在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0021] (4) 喷膜

[0022] 将生物素标记的荧光微球缓冲液a混合稀释到一定浓度,喷到 Fusion5 膜的荧光微球区 ;T 线和 C 线用缓冲液b稀释,分别喷到硝酸纤维素膜的 T 线和 C 线。

[0023] (5) 干燥及切条

[0024] 将上述喷好试剂的大卡烘干、切条。

[0025] (6) 将试纸条装入塑料卡壳中,封袋。

[0026] (7)反应剂配制

[0027] 用稀释液把亲和素标记抗体稀释到工作浓度

[0028] (8)反应剂分装

[0029] 将反应剂按照使用量分装到每个孔中,并封膜。

[0030] 而在具体应用时可通过双抗体夹心法或竞争法原理测定生物分子,适用于所有的采用双抗体夹心法模式或竞争法模式的免疫层析检测。

[0031] 双抗体夹心法 :待测样品加入反应剂中,通过样品中的抗原与亲和素标记的抗体的特性结合,连接成亲和素-抗体-抗原复合物,将含有亲和素-抗体-抗原复合物和亲和素-抗体的混合物的液体加入到检测卡的检测区,通过层析作用亲和素-抗体-抗原复合物和亲和素-抗体与标记有生物素的时间分辨荧光纳米荧光微球结合,在毛细作用下,荧光微球-生物素-亲和素-抗体-抗原复合物、荧光微球-生物素-亲和素-抗体复合物和生物素标记荧光微球的混合物依次通过 Fusion5、硝酸纤维素膜,并与硝酸纤维素膜 T线上固定的另一抗体结合,形成荧光微球-生物素-亲和素-抗体-抗原-抗体夹心复合物。

[0032] 在层析过程中,反应剂中荧光微球-生物素-亲和素-抗体和生物素标记荧光微球的混合物通过T线继续向前移动而前进,荧光微球-生物素-亲和素-抗体硝酸纤维素膜C线位置被固定的二抗捕获,在缓冲液冲洗下,未与亲和素反应的荧光微球继续移动到吸水垫

位置。

[0033] T 线位置捕获的荧光微球量与待测样品抗原浓度成正相关,C线位置捕获的荧光微球量与待测样品抗原浓度成正负相关,通过时间分辨荧光读条仪对T、C线信号进行扫描,根据T线信号与C线信号的比值进行计算,获得待测样品中待测抗原浓度。

[0034] 竞争法 :待测样品加入反应剂中,形成样品中的抗原与亲和素标记的抗体的混合物,将含有抗原与亲和素标记的抗体的混合物的液体加入到检测卡的检测区,通过层析作用亲和素-抗体与标记有生物素的时间分辨荧光纳米荧光微球结合,在毛细作用下,荧光微球-生物素-亲和素-抗体-复合物、游离抗原和生物素标记荧光微球的混合物依次通过 Fusion5、硝酸纤维素膜,样品中游离抗原与T 线上固定抗原竞争结合荧光微球-生物素-亲和素-抗体,与固定在T线的抗原形成荧光微球-生物素-亲和素-抗体-抗原复合物的被保留下来。

[0035] 在层析过程中,与样品中游离抗原形成的荧光微球-生物素-亲和素-抗体-游离抗原的复合物和生物素标记荧光微球继续前进,荧光微球-生物素-亲和素-抗体-游离抗原在硝酸纤维素膜 C 线位置被固定的二抗捕获,在缓冲液冲洗下,未反应生物素标记荧光微球继续移动到吸水垫位置。

[0036] T线位置捕获的荧光微球量与待测样品中的抗原浓度成负相关,而C线位置捕获的荧光微球与待测样品中的抗原浓度成正相关。通过时间分辨荧光读条仪对 T、C 线信号进行扫描,根据T线信号与C线信号的比值进行计算,获得待测样品中待测抗原浓度。

[0037] 为了更能表达本实用新型的具体制备和使用方式,本实用新型提供一种具体的实施例来详细阐述:

[0038] 1. 试纸条成分的制备 :

[0039] (1) 生物素标记的荧光微球的制备

[0040] 用 0.01M 的CB将荧光微球10mg/ml 溶液,采用 DMSO(二甲基甲酰胺) 配置 Biotin-X-X-NHS(N- 羟基琥珀酰亚胺修饰生物素) 溶液至 20mg/ml,按照1mg荧光微球加入 10ul Biotin-X-X-NHS 的量将 Biotin-X-X-NHS 液加入到荧光微球溶液中,混合均匀并在 4℃下放置过夜。采用透析法除去游离未反应的生物素,透析缓冲液 (0.01M PB, 0.138M的NaCl,0.0001MEDTA-Na-2H₂O,pH7.4)。

[0041] (2) 生物素标记的荧光微球溶液的配制

[0042] 用缓冲液 (含有 7%脱脂奶粉、5%海藻糖、0.5% N,0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.1%叠氮钠) 将生物素标记的荧光微球溶液,质终浓度为 0.83mg/ml。

[0043] (3) 检测线 (T 线) 溶液的配制

[0044] 用 10mM PB 溶液将 CRP 单克隆抗体稀释成 1mg/ml。

[0045] (4) 质控线 (C 线) 溶液的配制

[0046] 用 10mM PB 溶液将抗鼠抗体稀释成浓度0.5mg/ml。

[0047] 2. 反应剂成分的制备

[0048] 1. 用碳二亚胺法将另一株CRP抗体标记上链霉亲和素。

[0049] 2. 用稀释液(含0.2M的PBS、2%酪蛋白、2.5% N,0- 双三甲硅基乙酰胺 (BSA)、0.1%叠氮钠、0.01MEDTA-2K)将标记链霉亲和素的CRP抗体稀释至5μg/ml。

[0050] 3. 试纸条的制备

[0051] (1) 空白大卡粘贴

[0052] 按照附图 1 的膜组合方式,在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和 Fusion5 膜。

[0053] (2) 喷膜

[0054] 分别在图 1 中 T 线 7、C 线 8 位置喷上 T、C 线溶液,T、C 线喷膜液量为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$;在图 1 中 6 位置喷上生物素标记的荧光微球溶液,荧光微球溶液喷膜量为 $4\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0055] (3) 烘干

[0056] 将步骤 (2) 中喷好试剂的大卡在恒温烘箱中 37°C 烘干 24 小时。

[0057] (4) 切条及装卡

[0058] 将烘干的 CRP 大卡切割成 4mm 宽度的纸条,装配到塑料壳中,形成 C 反应蛋白检测板。

[0059] 4. 反应剂制备

[0060] 将稀释好的反应剂加入到反应剂槽中,并封膜。

[0061] 在试剂槽中分别加入不同浓度的 CRP 抗原标准品 (取六个不同的浓度混匀,浓度分别为 0、2.5、10、25、50、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$,每个浓度设 5 个重复),然后按顺序将试剂槽内的试剂加入手机卡,膜层析 10 分钟以后,仪器读取 C、T 线信号。

[0062] 时间分辨荧光(Time-resolved Fluorescence,TRF)是与普通荧光相比,具有 stock 位移大,荧光寿命长等特点,可以有效的避免样品中的本底荧光,以及激发光等杂散光的影响,因此相比普通荧光具有更高的灵敏度和抗干扰能力。

[0063] 亲和素-生物素系统具有级联放大效应,增强荧光信号,降低了本底荧光背景的干扰,灵敏度更高,检测结果更准确。

[0064] 喷膜时统一使用生物素标记的荧光微球喷到Fusion5膜上,不同的产品全部使用生物素标记的荧光微球喷膜,可大批量生产,供不同的产品使用,即减少了不同产品的批次,使产品更稳定,又与以往不同产品需要调试不同的标记微球喷膜相比降低了成本节省原材料和能耗。

[0065] 反应剂为液态单人份装,只需将待测样本加入其中,轻轻混匀,然后按照指定剂量加到检测卡样本孔中,简便易操作。

[0066] 反应剂含有抗凝剂,全血加入其中被稀释不会凝固,提高了Fusion5 膜的滤血效果,降低全血时血细胞对试剂的检测影响,另外传统定量免疫层析试纸条大部分项目,检测前需要稀释样本避免出现“HOOK”现象,液体反应剂也替代了稀释液的作用,只需调整加样方式就可以达到不同产品的稀释效果,减少了稀释步骤,方便、可操作性强。

[0067] 本实用新型的时间分辨荧光免疫层析试纸条灵敏度高能检测,能够检测浓度极低的样本,可同时检测全血、血清、血浆、尿液样本或其它体液样本, $300\text{mg}/\text{dL}$ 血红蛋白、 $700\text{mg}/\text{dL}$ 甘油三酯、 $15\text{mg}/\text{dL}$ 胆红素对本试纸条的检测无影响。

[0068] 时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置通过双抗体夹心法或竞争法原理,利用时间分辨荧光微球作为免疫标记物,对待测抗原或抗体进行准确快速的定量检测,本实用新型的检测方法采用亲和素-生物素和抗原-抗体系统将检测信号放大,免稀释,具有方便、快速、高灵敏度、高特异性等优点。

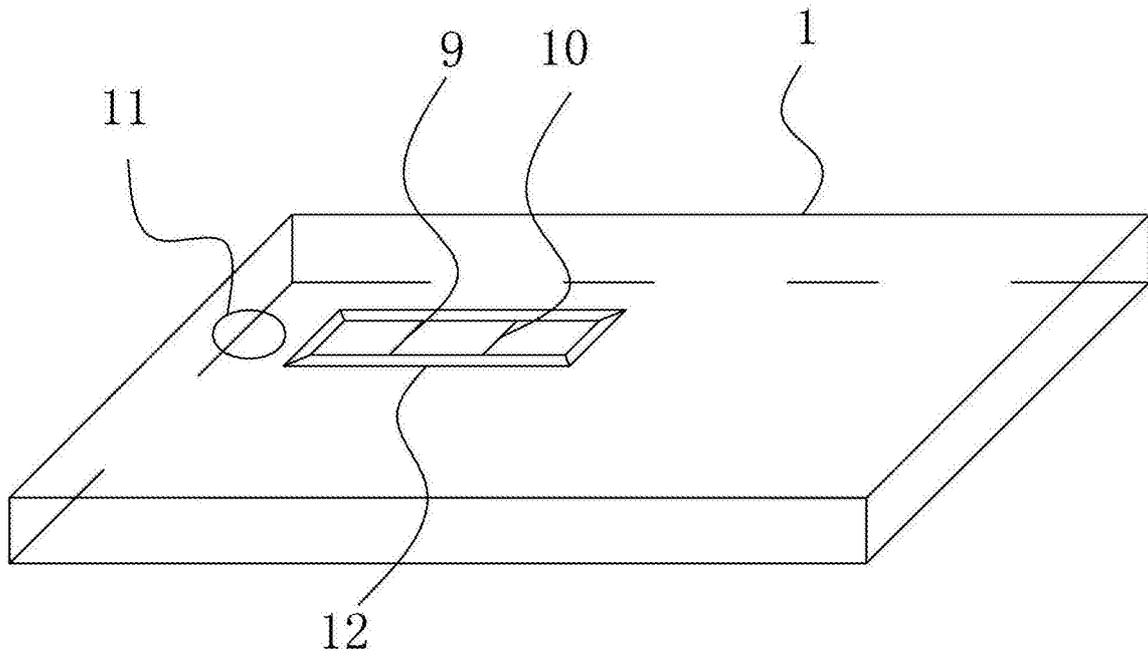


图1

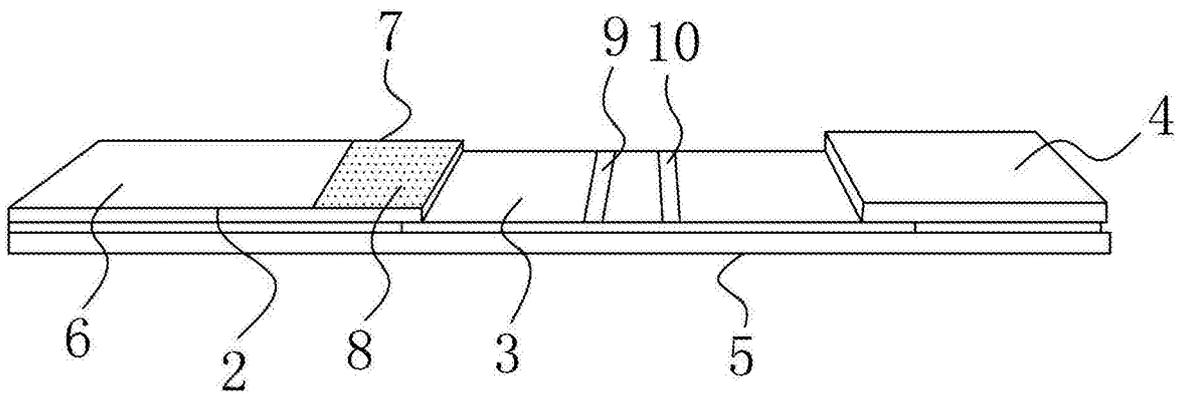


图2

专利名称(译)	一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置		
公开(公告)号	CN205538994U	公开(公告)日	2016-08-31
申请号	CN201620357775.9	申请日	2016-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	河南美凯生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	河南美凯生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南美凯生物科技有限公司		
[标]发明人	赵焕朝		
发明人	赵焕朝		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
代理人(译)	李阳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种高灵敏时间分辨荧光免疫层析检测试剂装置，有效的解决了检测产品灵敏度低，批间差异较大的问题；其解决的技术方案是包括塑料卡壳、Fusion5膜、硝酸纤维膜以及吸水纸，塑料卡壳为矩形壳，塑料卡壳内设有PVC底板，PVC底板的中间设有硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜的左右两侧分别搭接高于硝酸纤维素膜的Fusion5膜和吸水纸，Fusion5膜上设有加样区和微球区，微球区上载有生物素标记的时间分辨荧光微球，硝酸纤维素膜上设有检测线（T）和质控线（C），检测线上设有包被抗体或抗原，质控线上设有包被抗体，塑料卡壳上设有置于加样区上的加样孔，塑料卡壳上设有检测线和质控线上的观测窗；本实用新型具有方便、快速、高灵敏度、高特异性等优点。

