



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727850 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710932403.3

(22)申请日 2017.10.10

(71)申请人 北京康华源科技发展有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地三街9号
C906

(72)发明人 刘凤鸣

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种侧向流层析检测反应启动控制方法

(57)摘要

本发明公开了一种侧向流层析检测反应启动控制方法,所述方法特征在于将加载液相的侧向流层析检测结构置于离心装置上,通过离心驱动液相进入固相检测膜并维持流动,进而启动侧向流层析检测反应,可用于胶体金属免疫层析检测方法、荧光免疫层析检测方法和化学发光免疫层析检测方法。本发明具有准确性高、重复性好、使用便捷、稳定性高、便于储存的特点。

1. 一种侧向流层析检测反应启动控制方法,特征在于将加载液相的侧向流层析检测结构置于离心装置上,通过离心驱动液相进入固相检测膜并维持流动,进而启动侧向流层析检测反应,具有如下特征:

1) 所述侧向流层析检测结构由包括液相承载结构、固相检测膜、支撑底片组成,其中液相承载结构和固相检测膜依次置于支撑底片上;

2) 所述液相承载结构与所述固相检测膜之间留有阻碍液相自然流动的间隙;

3) 使用时将侧向流层析检测结构置于离心装置上;

4) 所述液相位于液相承载结构内,且位于所述固相检测膜的近心侧;

5) 所述液相由所述离心装置离心驱动流经所述间隙,进入所述固相检测膜并维持流动。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述侧向流层析检测包括以胶体金属为指示剂的胶体金属免疫层析、以荧光素为指示剂的荧光免疫层析和化学发光物质和/或化学发光酶介导发光作为指示剂的化学发光免疫层析的至少一种。

3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述间隙为空气、过滤膜垫的至少一种。

4. 根据权利要求3所述方法,其特征在于:所述间隙宽度选择0.5-3mm,过滤膜垫的孔径选择0.1-5微米。

5. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述离心驱动的离心装置转速选择50-500转/分钟。

6. 根据权利要求2所述方法,其特征在于:所述胶体金属为胶体金、胶体硒和胶体金磁微粒中的至少一种;所述荧光素包括异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、藻红蛋白、多甲藻黄素叶绿素蛋白、碘化丙啶、别藻青蛋白和钨化合物中的至少一种;所述化学发光物质包括鲁米诺和异鲁米诺及其衍生物类、吖啶酯及吖啶酰胺类、(金钢烷)-1,2-二氧化乙烷及其衍生物和三联吡啶钌中的至少一种;所述化学发光酶包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和黄嘌呤氧化酶中的至少一种。

7. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述固相检测膜包括硝酸纤维素膜、PVDF膜、聚偏氟乙烯膜、尼龙膜、DEAE纤维素膜的一种或组合。

8. 根据权利要求1所述方法,其特征在于:所述液相承载结构为多聚酯纤维膜、玻璃纤维素膜、胶体金标记物专用样品垫、荧光标记物专用样品垫中的一种或组合。

9. 权利要求1-8中任一项所述方法在免疫检测技术产品开发中的应用。

一种侧向流层析检测反应启动控制方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种侧向流层析检测反应启动控制方法,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 免疫学检测技术是应用免疫学原理设计的测定抗原、抗体、免疫细胞及化学成分等的实验手段,广泛用于来源于人体和动物体可进行疾病诊断和健康检测的样品以及用于环境、药物分析、食品和工业分析的样品。常用的有免疫浊度技术、固相酶免疫测定技术、化学发光检测技术、免疫荧光标记技术、流式细胞术、胶体金技术等。免疫浊度技术,也称免疫浊度法是可溶性抗原、抗体在液相中特异结合,产生一定大小的复合物,形成光的折射或吸收,测定这种折射或吸收后的透射光或散射光作为计算单位,用于定量检测,但检测灵敏度低,不适合于微量检测。固相酶免疫测定技术基于抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记,结合在固相载体表面的抗原或抗体保持其免疫学活性,抗原或抗体的酶结合物既保留其免疫学活性,又保留酶的活性,在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应,具有灵敏度高、线性响应范围宽和易于实现自动化等显著优点,但检测反应时间长限制了其使用。免疫化学发光检测技术是一种高灵敏的微量及痕量分析技术,具有操作方便、灵敏度高、线性响应范围宽和易于实现自动化等显著优点,广泛地应用于环境、临床、药物分析、食品和工业分析中,也是基于抗原或抗体的固相分离手段及抗原或抗体的发光试剂标记技术,但检测反应时间长、检测试剂需要冷藏保存和运输及对检测设备的要求高影响其使用。免疫荧光标记技术、流式细胞术、胶体金技术也是常用的检测技术被广泛使用,但均有其相应的不足,检测反应时间长或灵敏度、准确性和稳定性欠缺是普遍存在的不足。高灵敏度、快速、便捷、小型化、全定量、自动化是目前临床免疫检测技术产品的发展趋势,但现有的都无法同时实现上述功能。侧向流层析检测的自动化控制是实现上述检测功能的重要环节,而如何人为控制反应启动是实现侧向流层析检测自动化的关键技术。侧向流检测的现有技术,在加载液体后检测反应就会立即启动,无法实现通过人为控制启动,这样严重限制了批量检测反应的自动化,因此,开发反应启动控制技术和方法具有重要意义。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种侧向流层析检测反应启动控制方法,所述方法特征在于将加载液相的侧向流层析检测结构置于离心装置上,通过离心驱动液相进入固相检测膜并维持流动,进而启动侧向流层析检测反应,具有如下特征:1)所述侧向流层析检测结构由包括液相承载结构、固相检测膜、支撑底片组成,其中液相承载结构和固相检测膜依次置于支撑底片上;2)所述液相承载结构与所述固相检测膜之间留有阻碍液相自然流动的间隙;3)使用时将侧向流层析检测结构置于离心装置上;4)所述液相位于液相承载结构内,且位于所述固相检测膜的近心侧;5)所述液相由所述离心装置离心驱动流经所述间隙,进入所述固相检测膜并维持流动。

[0004] 上述的方法中,所述侧向流层析检测包括以胶体金属为指示剂的胶体金属免疫层析、以荧光素为指示剂的荧光免疫层析和化学发光物质和/或化学发光酶介导发光作为指示剂的化学发光免疫层析的至少一种。

[0005] 上述的方法中,所述间隙为空气、过滤膜垫的至少一种。

[0006] 上述的方法中,所述间隙宽度选择0.5-3mm,过滤膜垫的孔径选择0.1-5微米。所述间隙宽度优选0.5-2mm,所述间隙宽度更优选0.5-1mm。过滤膜垫的孔径优选0.1-3微米,过滤膜垫的孔径更优选0.1-1微米。

[0007] 上述的方法中,所述离心驱动的离心装置转速选择50-500转/分钟,优选100-400转/分钟,更优选100-300转/分钟。

[0008] 上述的方法中,所述胶体金属为胶体金、胶体硒和胶体金磁微粒中的至少一种;所述荧光素包括异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、藻红蛋白、多甲藻黄素叶绿素蛋白、碘化丙啶、别藻青蛋白和钨化合物中的至少一种;所述化学发光物质包括鲁米诺和异鲁米诺及其衍生物类、吖啶酯及吖啶酰胺类、(金钢烷)-1,2-二氧化乙烷及其衍生物和三联吡啶钌中的至少一种;所述化学发光酶包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和黄嘌呤氧化酶中的至少一种。

[0009] 上述的方法中,所述固相检测膜包括硝酸纤维素膜、PVDF膜、聚偏氟乙烯膜、尼龙膜、DEAE纤维素膜的一种或组合。

[0010] 上述的方法中,所述液相承载结构为多聚酯纤维膜、玻璃纤维素膜、胶体金标记物专用样品垫、荧光标记物专用样品垫中的一种或组合。

[0011] 上述的方法中任一项所述方法在免疫检测技术产品开发中的应用。

[0012] 上述的方法中,所述辣根过氧化酶的化学发光底物常用鲁米诺和异鲁米诺及其衍生物类,如异鲁米诺、4-氨基己基-N-乙基异鲁米诺及 AHEI 和 ABEI 等,目前常用的产品有 PIERCE公司生产的West Pico化学发光检测底物、West Dura化学发光检测底物、West Femto化学发光检测底物。碱性磷酸酶的化学发光底物常用的有(金钢烷)-1,2-二氧化乙烷及其衍生物、AMPPD、CDP-STAR、Lumi-Phos 530。黄嘌呤氧化酶的化学发光底物有黄嘌呤、杨梅酮、槲皮素。

[0013] 上述的方法中,还包括非酶促化学发光底物,即直接化学发光物质,是用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法。常用于标记的化学发光物质有吖啶酯类化合物-acridinium ester (AE), 是有效的发光标记物,其通过启动发光试剂(NaOH、H₂O₂)作用而发光,主要有吖啶酯及吖啶酰胺类、三联吡啶钌等。

[0014] 上述的方法中,所述方法是以微粒作为所述指示剂的承载载体;所述承载载体承载所述指示剂的方式采用以所述指示剂直接标记的待检物特异性直接结合物或待检物特异性间接结合物标记所述微粒或以带有所述指示剂的所述微粒直接标记待检物特异性直接结合物或待检物特异性间接结合物;所述微粒为能够直接和/或通过化学交联方式与蛋白质和/或所述指示剂形成非特异性结合并维持稳定的颗粒,所述微粒的粒径选择1nm-1 μ m,具体可为10~800 nm、20~600 nm 或43~500 nm;所述特异性结合物包括抗原、抗体、亲和素、生物素及其衍生物。目前常用的微粒有胶体金微粒、胶体硒微粒、胶体金磁微粒、荧光微球、磁性微粒、金磁微粒、凝胶微粒、乳胶微粒、塑料微球、微球硅胶、琼脂糖微粒、聚苯乙烯微粒、二氧化硅微球、聚苯乙烯微球、羧基微球、氯甲基微球等。

[0015] 上述的方法中,所述液相包括含有待检物的液相、用所述指示剂标记的检测物的液相、用所述微粒标记的检测物的液相、非标记的检测物的液相、清洗液相的一种或组合;所述检测物为待检物特异性结合物及其二级或三级特异性结合物,所述特异性结合物包括抗原、抗体、亲和素、生物素及其衍生物。

[0016] 上述的方法中,所述离心装置包括由驱动电机驱动的离心转子和支撑底座,所述离心转子以所述支撑底座为支撑;所述进样部件不与离心转子直接连接,设于离心转子的上方、下方或外侧;所述进样部件包括液相储存装置、进样管和进样泵;所述液相储存装置与所述进样管相连通;所述进样泵驱动所述液相储存装置中的液体进入所述进样管;所述进样管直接或间接加载所述液相至所述固相检测膜的近心一侧上;所述固相检测膜被置于所述离心转子上离心。

[0017] 上述的方法中,含有检测器,包括胶体金定量检测器、荧光检测器、化学发光检测器的一种或组合,所述检测器的检测指标包括吸光度、荧光值、化学发光值和图像数字信号值中的任一种或组合。

[0018] 本发明由于采取以上技术方案,其具有以下优点:

1、本发明在侧向流层析检测膜片上设置了所述液相承载结构与所述固相检测膜之间留有阻碍液相自然流动的间隙结构,阻碍了液相向固相检测膜上的自然流动。但使用时将侧向流层析检测结构置于离心装置上,通过离心驱动使液相流经所述间隙,进入固相检测膜并维持流动,进而启动免疫检测反应。这样不仅保持了侧向流层析检测结构的检测特性,而且可以实现批量加载液相,启动离心,进而同时启动检测反应,有效地提高了层析检测的准确性、重复性和稳定性,实现批量自动化检测。

[0019] 2、本发明阻碍液相自然流动的间隙结构采用空气或过滤膜垫,使侧向流检测试剂条的制备更加简单、便捷和低成本,利于技术产品的工业化生产。

[0020] 3、本发明操作步骤简单,易于实现自动化操作,同时又具有检测快速、使用设备简单的检测方法;不仅使用方便、减少原料的浪费,同时也显著提高工作效率,应用于检测和分析、分离的诸多领域。

[0021]

附图说明

[0022] 图1为本发明含有启动控制间隙结构的侧向流层析检测结构示意图。

[0023] 图2为本发明离心分离检测装置的示意图。

具体实施方式

[0024] 下述实施例结合附图对本发明进行进一步说明,但本发明并不局限于以下实施例。

[0025] 实施例1、离心驱动控制液相流动的分离检测结构

如图1和图2所示,本发明启动控制检测结构、离心装置和检测器,其中启动控制检测结构为一种侧向流层析检测结构,包括液相承载结构1、间隙结构2、固相检测膜3、液体收集部件4和支撑底片5;离心装置包括离心转子6、驱动电机7、支撑底座8;检测器9为发光检测器、荧光检测器和胶体金定量检测器的至少一种。使用时将侧向流层析检测结构置于离心转子

6上,放置方位依次为液相承载结构1、间隙结构2、固相检测膜3、液体收集部件4并以支撑底片5作支撑,液相承载结构1位于离心转子的近心端;另有进样部件10设置于对应的液相承载结构1的近心端。

[0026] 在实际操作时,通过进样部件10将液相加载到液相承载结构1上,当处于静止状态时,由于液相承载结构1与固相检测膜3之间的阻碍液相自然流动的间隙结构2,阻碍了液相向固相检测膜3上的自然流动,液相承载结构1中的液相不能流动进入固相检测膜3,检测反应处于暂停状态。但当启动离心时,离心力驱动液相流经间隙结构2进入固相检测膜3并在膜内向前流动,启动侧向流层析检测反应。

[0027] 本发明的实验研究:下述实验说明本发明的检测方法及其效果,但不是对本发明的限定。下述实验中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实验中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0028] 实验一、本发明以胶体金为指示剂的比较检测实验

一、实验材料

抗人肌红蛋白多克隆抗体(美国Genagates公司),抗人肌红蛋白单克隆抗体(美国Genagates公司),分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司,752紫外可见分光光度计),人肌红蛋白(Sigma-Aldrich产品),BioFlow印膜仪(美国IMAGENE公司),Index切条机(美国A-point公司),DBF-900封口机(温州江南包装厂),ACBO除湿机(江苏无锡奥波除湿机公司),台式离心机(美国Eppendoff公司),牛血清白蛋白(简称BSA,SIGMA产品),硝酸纤维素膜片(AE 99,由美国Genagates公司提供),多聚酯纤维素膜(Reemay 2033,美国Alstrom公司产品),吸水纸膜垫(Grade 470,美国S&S公司产品),氯金酸(SIGMA产品),胶体金定量层析分析仪(挪威Skannex产品),水平离心机(常州博闻迪公司产品)。

[0029] 二、实验方法

人肌红蛋白溶液的配制:取已知浓度的人肌红蛋白溶液,用样品稀释缓冲液(1%BSA,100mM甘氨酸,50mM PBS,150mM NaCl,pH7.4)稀释配置3.125、6.25、12.5、25、50、100ng/ml的系列人肌红蛋白溶液。

[0030] 胶体金标记抗人肌红蛋白单克隆抗体的制备:取10ml纯净水,加热搅拌,待水沸腾时加入500 μ l 10%氯金酸溶液,加热煮沸5分钟,加入500 μ l 12%柠檬酸三钠溶液,保持此溶液搅拌沸腾10分钟,自然降温至室温,即胶体金溶液。取胶体金溶液体积10ml,用10%碳酸钾调pH至8.3,迅速加入抗人肌红蛋白单克隆抗体100 μ g,至10 μ g/ml终浓度,晃动烧杯混匀,室温放置30分钟,迅速加入10%牛血清白蛋白溶液100 μ l,使终浓度为1%,同时摇动烧杯,室温放置30分钟,12000rpm离心20分钟,小心吸出上清液;再加入5ml 50mM磷酸盐(PBS)缓冲液,pH7.4,将沉淀悬浮,12000rpm离心20分钟,吸出上清液,将沉淀溶于1.0ml含有1%的牛血清白蛋白和3%蔗糖的磷酸缓冲液内,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0031] 胶体金标记吸附膜制备:配制含有0.5%PVA(即聚乙烯醇)、50mM PBS液、0.5%BSA、0.88% NaCl,pH 7.4的多聚酯纤维素膜预处理液,置待处理的多聚酯纤维素膜于预处理液内,室温浸泡1小时,将膜取出,置37 $^{\circ}$ C干燥后密封备用,也可直接作为分散膜使用。取胶体金标记抗体溶液,用胶体金缓冲液(1%BSA,3%蔗糖,50mM PBS,pH7.4)稀释至OD530为30,启动印膜仪,装载抗体,取多聚酯纤维素膜,开始印膜,设定印膜条件为:喷笔移动速度30mm/秒,液体推进速度3.0 μ l/cm,将印制后的膜放入干燥箱内,37 $^{\circ}$ C干燥6小时,然后置于含干

干燥剂的密封袋内保存使用。

[0032] 多克隆抗体印膜制备:取抗人肌红蛋白多克隆抗体溶液,用50mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至1mg/ml浓度。启动印膜仪,装载抗体,取贴有硝酸纤维素膜的PVC片(即聚氯乙烯片),开始印膜,设定印膜条件为:喷笔移动速度30mm/秒,液体推进速度0.5 μ l/cm。将印制好的膜放入37 $^{\circ}$ C干燥箱内,干燥6小时,然后将膜置于含干燥剂的干燥容器内保存使用。

[0033] 半成品组装方法:启动除湿机使操作室内的湿度降低至25%以下进行操作,以胶体金标记吸附膜作为液相承载结构,空气作为间隙结构,贴有硝酸纤维素膜的多克隆抗体印膜作为固相检测膜,吸水纸膜垫作为液体收集部件,PVC片作为支撑底片。取多克隆抗体印膜片,在硝酸纤维素膜的一端的PVC底片上粘贴胶体金标记吸附膜,胶体金标记吸附膜不与硝酸纤维素膜叠加,留有1mm的空隙,在硝酸纤维素膜的另一端的PVC底片上粘贴吸水纸膜垫,吸水纸膜垫与硝酸纤维素膜叠加1mm。置粘贴好的检测片于切条机上,切成3.5mm试纸条。将试纸条放入检测卡内,制成检测试剂卡,放入有干燥剂的铝珀密封袋内,在封口机上封口,加贴标签。对照检测试剂卡的制备采用胶体金标记吸附膜与硝酸纤维素膜叠加1mm粘贴,其它同上。

[0034] 检测方法:取10个上述制备的检测试剂卡,以胶体金标记吸附膜的一侧位于水平离心机离心机转子近心端的方向置于离心转子上,以30秒的间隔向胶体金标记吸附膜上滴加配制的不同浓度的人肌红蛋白溶液80 μ l,完成加样后,200转/分离心启动检测反应,持续5分钟,然后3000转/分离心1分钟清理检测膜,取出检测试剂卡,放置于胶体金定量层析分析仪(即检测器)上读取多克隆抗体印迹条带的数字图像,进行图像处理获得相应的色度数值。对照检测试剂卡也进行同样的加样和反应处理,读取相应的色度数值。

[0035] 制作标准曲线:取已知浓度的人肌红蛋白溶液3.125、6.25、12.5、25、50、100ng/ml人肌红蛋白溶液,分别采用本发明检测试剂卡和对照检测试剂卡检测并绘制标准曲线。本发明检测试剂卡采用批量检测法。对照检测试剂卡采用单一试剂卡逐一检测法,即在单一检测试剂卡进行单次加样后就进行离心,完成检测。

[0036] 检测所用样品为50ng/ml肌红蛋白,用样品稀释缓冲液配制。

[0037] 实验重复三次,结果取平均值。统计学计算不同检测试剂卡的检测值。

[0038] 三、实验结果

本发明检测试剂卡以胶体金为指示剂的检测方法测定结果显示本发明技术标准曲线样品检测的相关系数 r^2 为0.982,现有技术的对照检测试剂卡的相关系数 r^2 为0.966。实验结果如表1所示。本发明检测试剂卡进行10个为一个批量的重复性检测,均数为52.07ng/ml,标准差为4.27,CV值为8%;而对照检测试剂卡进行10个为一个批量的重复性检测,均数为69.07ng/ml,标准差为12.16,CV值为18%。对照检测试剂卡第一次点样的检测结果明显高于最后一次加样检测结果,相差38 ng/ml,而本发明检测试剂卡检测结果则没有明显的区别。两者比较,本发明方法在检测的准确性、重复性以及便捷性等多方面均明显优于现有技术。

[0039] 表1 本发明以胶体金为指示剂的检测结果的比较分析(单位:ng/ml)

	本发明检测试剂卡	对照检测试剂卡
1	55.6	85.3
2	44.3	82.4
3	52.3	76.5
4	53.2	74.2
5	46.7	77.1
6	55.0	66.3
7	49.5	62.8
8	54.8	63.5
9	51.1	55.4
10	58.2	47.2
均数	52.07	69.07
SD	4.27	12.16
CV	0.08	0.18

实验二、本发明以荧光素为指示剂的比较检测实验

一、实验材料

抗人肌红蛋白多克隆抗体(美国Genagates公司)、抗人肌红蛋白单克隆抗体(美国Genagates公司)、荧光微球(所用荧光素为钨化合物,上海杰一生物公司)、EDC (Pierce产品)、NHS(Pierce产品)、人肌红蛋白(Sigma-Aldrich产品)、荧光定量分析仪(上海巾帼生物公司,HG-98)、BioFlow印膜仪(美国IMAGENE公司),Index 切条机(美国A-point公司),D B F-900封口机(温州江南包装厂),ACBO除湿机(江苏无锡奥波除湿机公司),台式离心机(美国Eppendoff 公司),牛血清白蛋白(SIGMA产品),硝酸纤维素膜片(AE 99,由美国Genagates公司提供),多聚酯纤维素膜 (Reemay 2033,美国Alstrom公司产品),吸水纸膜垫(Grade 470,美国S&S公司产品),水平离心机(常州博闻迪公司产品)。

[0040] 二、实验方法

人肌红蛋白溶液的配制:同实验一。

[0041] 荧光微球标记:取0.5ml荧光微球,使用PH6.2的0.1M PB离心清洗4次,13000rpm离心,用pH6.2的0.1M PB复溶至1ml,加入150ug抗人肌红蛋白单克隆抗体,混匀,加入pH6.2的0.1M PB 至1.5ml,加入250ul的40mg/ml的EDC水溶液,加入250ul 40mg/ml的NHS水溶液,混匀,室温反应60分钟。加入20mg的BSA,混匀,室温反应60分钟。离心吸弃上清,使用0.05M Tris pH7.6离心清洗4次后,用1%BSA、0.05M Tris pH7.6复溶至10ml待用,4℃保存。

[0042] 荧光标记抗体吸附膜的制备:配制含有0.5%PVA、50mM PBS液、0.5%BSA、0.88% NaCl,pH 7.4的多聚酯纤维素膜预处理液,置待处理的多聚酯纤维素膜于预处理液内,室温浸泡1小时,将膜取出,置37℃干燥后密封备用。取荧光微球标记抗体溶液,用1%BSA、0.05M Tris pH7.6缓冲液稀释3倍,启动印膜仪,装载抗体,取多聚酯纤维素膜,开始印膜,设定印膜条件为:喷笔移动速度30mm/秒,液体推进速度 5.0μl/cm,将印制后的膜,放入干燥箱内,37℃干燥6小时,然后置于含干燥剂的密封袋内保存使用。

[0043] 多克隆抗体印膜制备:取抗人肌红蛋白多克隆抗体溶液,用50mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至1mg/ml浓度。启动印膜仪,装载抗体,取贴有硝酸纤维素膜的PVC片,开始印膜,设定印膜条件为:喷笔移动速度30mm/秒,液体推进速度0.5 μ l/cm,将印制好的膜放入37 $^{\circ}$ C干燥箱内,干燥6小时,然后将膜置于含干燥剂的干燥容器内保存使用。

[0044] 半成品组装方法:启动除湿机使操作室内的湿度降低至25%以下进行操作,以荧光标记抗体吸附膜作为液相承载结构,空气作为间隙结构,贴有硝酸纤维素膜的多克隆抗体印膜作为固相检测膜,吸水纸膜垫作为液体收集部件,PVC片作为支撑底片。取多克隆抗体印膜片,在硝酸纤维素膜的一侧的PVC底片上粘贴荧光标记抗体吸附膜,荧光标记抗体吸附膜不与硝酸纤维素膜叠加,留有1mm的空隙,在硝酸纤维素膜的另一侧的PVC底片上粘贴吸水纸膜垫,吸水纸膜垫与硝酸纤维素膜叠加1mm。置粘贴好的检测片于切条机上,切成3.5mm试纸条。将试纸条放入检测卡内,制成检测试剂卡,放入有干燥剂的铝珀密封袋内,在封口机上封口,加贴标签。对照检测试剂卡的制备采用荧光标记抗体吸附膜与硝酸纤维素膜叠加1mm粘贴,其它同上。

[0045] 检测方法:取10个上述制备的检测试剂卡,以荧光标记抗体吸附膜的一侧位于水平离心机离心转子近心端的方向置于离心转子上,以30秒的间隔向荧光标记抗体吸附膜上滴加配制的不同浓度的人肌红蛋白溶液80 μ l,完成加样后,200转/分离心启动检测反应,持续5分钟,然后3000转/分离心1分钟清理检测膜,取出检测试剂卡,放置于荧光定量分析仪(即检测器)上读取多克隆抗体印迹条带的荧光值。对照检测试剂卡也进行同样的加样和反应处理,读取相应的荧光值。

[0046] 制作标准曲线:取已知浓度的人肌红蛋白溶液3.125、6.25、12.5、25、50、100ng/ml人肌红蛋白溶液,分别采用本发明检测试剂卡和对照检测试剂卡检测并绘制标准曲线。本发明检测试剂卡采用批量检测法。对照检测试剂卡采用单一试剂卡逐一检测法,即在对单一检测试剂卡进行单次加样后就进行离心,完成检测。

[0047] 实验重复三次,结果取平均值。统计学计算不同检测试剂卡的检测值。

[0048] 三、实验结果

本发明检测试剂卡以荧光素为指示剂的检测方法测定结果显示本发明技术标准曲线样品检测的相关系数 r^2 为0.991,现有技术的对照检测试剂卡的相关系数 r^2 为0.978。实验结果如表2所示。本发明检测试剂卡进行10个为一个批量的重复性检测,均数为50.87ng/ml,标准差为3.44,CV值为7%;而对照检测试剂卡进行10个为一个批量的重复性检测,均数为70.1ng/ml,标准差为13.78,CV值为20%。对照检测试剂卡第一次点样的检测结果明显高于最后一次加样检测结果,相差40 ng/ml,而本发明检测试剂卡检测结果则没有明显的区别。两者比较,本发明方法在检测的准确性、重复性以及便捷性等多方面均明显优于现有技术。

[0049] 表1 本发明以胶体金为指示剂的检测结果的比较分析(单位:ng/ml)

	本发明检测试剂卡	对照检测试剂卡
1	509	92.5
2	526	83.1
3	449	82.9
4	523	78.4
5	561	71.2
6	478	65.4
7	512	63.2
8	552	59.1
9	479	53.1
10	498	52.1
均数	50.87	70.10
SD	3.44	13.78
CV	0.07	0.20

实验三、本发明采用化学发光指示剂的比较检测实验

一、实验材料

荧光微球(上海杰一生物),海藻糖(SIGMA),硝酸纤维素膜(Millipore 公司),EDC(PIERCE公司),NHS(PIERCE公司),辣根过氧化物酶标记抗人肌红蛋白单克隆抗体(美国Genagates公司),抗人肌红蛋白多克隆抗体(美国Genagates公司),分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司,752紫外可见分光光度计),人肌红蛋白(Sigma-Aldrich产品),BioFlow印膜仪(美国IMAGENE公司),Index 切条机(美国A-point公司),DBF-900封口机(温州江南包装厂),ACBO除湿机(江苏无锡奥波除湿机公司),台式离心机(美国Eppendoff公司),牛血清白蛋白(简称BSA,SIGMA产品),硝酸纤维素膜片(AE 99,由美国Genagates公司提供),多聚酯纤维素膜(Reemay 2033,美国Alstrom公司产品),吸水纸膜垫(Grade 470,美国S&S公司产品),化学发光检测仪(Promega, Glomax Multi JR Detection System),West Pico发光试剂(Thermo scientific),水平离心机(常州博闻迪公司产品)。

[0050] 二、实验方法

人肌红蛋白溶液的配制:同实验一。

[0051] 荧光微球标记:取0.5ml微球,使用pH6.2的0.1M 磷酸缓冲液离心清洗4次,13000rpm离心,用pH6.2的0.1M 磷酸缓冲液复溶至1ml,加入2mg辣根过氧化物酶标记抗人肌红蛋白单克隆抗体,混匀,加入250ul的40mg/ml的EDC溶液,加入250ul 40mg/ml的NHS溶液,混匀,室温反应60分钟,加入20mg的牛血清白蛋白,混匀,室温反应60分钟。离心吸弃上清,使用0.05M Tris pH7.6离心清洗4次后,用0.5%海藻糖、1%BSA、0.05M Tris pH7.6复溶至10ml,4℃避光保存待用。

[0052] 荧光微球标记吸附膜制备:取荧光微球标记抗体溶液,用复溶液稀释3倍,其它同实验一荧光标记抗体吸附膜制备中的印膜方法。

[0053] 多克隆抗体印膜制备:同实验一。

[0054] 半成品组装方法：启动除湿机使操作室内的湿度降低至25%以下进行操作，以荧光微球标记吸附膜作为液相承载结构，空气作为间隙结构，贴有硝酸纤维素膜的多克隆抗体印膜作为固相检测膜，吸水纸膜垫作为液体收集部件，PVC片作为支撑底片。取多克隆抗体印膜片，在硝酸纤维素膜的一侧的PVC底片上粘贴荧光微球标记吸附膜，荧光微球标记吸附膜不与硝酸纤维素膜叠加，留有1mm的空隙，在硝酸纤维素膜的另一侧的PVC底片上粘贴吸水纸膜垫，吸水纸膜垫与硝酸纤维素膜叠加1mm。置粘贴好的检测片于切条机上，切成3.5mm试纸条。将试纸条放入检测卡内，制成检测试剂卡，放入有干燥剂的铝珀密封袋内，在封口机上封口，加贴标签。对照检测试剂卡的制备采用荧光微球标记吸附膜与硝酸纤维素膜叠加1mm粘贴，其它同上。

[0055] 检测方法：取10个上述制备的检测试剂卡，以荧光微球标记吸附膜的一侧位于水平离心机离心转子近心端的方向置于离心转子上，以30秒的间隔向荧光微球标记吸附膜上滴加配制的不同浓度的人肌红蛋白溶液80ul，完成加样后，200转/分离心启动检测反应，持续5分钟，以1000转/分离心1分钟，再向荧光微球标记吸附膜上滴加pH7.4的0.05%吐温-20、50mM PBS缓冲液80ul，3000转/分离心30秒清洗，清洗两次，取出试纸条，切取多克隆抗体印膜检测线，放置于透明试管内，加入PBS缓冲液200ul，超声破碎3秒。取10ul，加入Pico发光试剂，置于化学发光检测仪上，反应进行2分钟时记取发光量，发光量积分时间为6秒，实验重复三次，结果取平均值，然后绘制浓度-发光曲线，并计算相关系数。对照检测试剂卡也进行同样的加样和反应处理，读取相应的发光值。

[0056] 制作标准曲线：取已知浓度的人肌红蛋白溶液3.125、6.25、12.5、25、50、100ng/ml人肌红蛋白溶液，分别采用本发明检测试剂卡和对照检测试剂卡检测并绘制标准曲线。本发明检测试剂卡采用批量检测法。对照检测试剂卡采用单一试剂卡逐一检测法，即在对单一检测试剂卡进行单次加样后就进行离心，完成检测。

[0057] 实验重复三次，结果取平均值。统计学计算不同检测试剂卡的检测值。

[0058] 三、实验结果

本发明检测试剂卡以化学发光酶辣根过氧化物酶作为发光指示剂的检测方法测定结果显示本发明技术标准曲线样品检测的相关系数 r^2 为0.982，现有技术的对照检测试剂卡的相关系数 r^2 为0.986。实验结果如表3所示。本发明检测试剂卡进行10个为一个批量的重复性检测，均数为51.06ng/ml，标准差为4.16，CV值为8%；而对照检测试剂卡进行10个为一个批量的重复性检测，均数为71.52ng/ml，标准差为14.37，CV值为20%。对照检测试剂卡第一次点样的检测结果明显高于最后一次加样检测结果，相差42 ng/ml，而本发明检测试剂卡检测结果则没有明显的区别。两者比较，本发明方法在检测的准确性、重复性以及便捷性等多方面均明显优于现行技术。

[0059] 表3 本发明以化学发光酶催化的发光指示剂的检测结果的比较分析(单位：ng/ml)

	本发明检测试剂卡	对照检测试剂卡
1	53.2	91.3
2	55.4	88.8
3	46.5	83.4
4	55.8	81.2
5	47.6	72.3
6	46.9	69.8
7	52.1	62.1
8	48.2	61.3
9	47.6	55.2
10	57.3	49.8
均数	51.06	71.52
SD	4.16	14.37
CV	0.08	0.20

实验四、本发明以过滤膜垫作为间隙结构的比较检测实验

一、实验材料

微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂),其它同实验二。

[0060] 二、实验方法

人肌红蛋白溶液的配制:同实验一。

[0061] 荧光微球标记:同实验二。

[0062] 荧光标记抗体吸附膜的制备:同实验二。

[0063] 多克隆抗体印膜制备:同实验二。

[0064] 半成品组装方法:启动除湿机使操作室内的湿度降低至25%以下进行操作,以荧光标记抗体吸附膜作为液相承载结构,以0.22 μ m滤膜、0.45 μ m滤膜和空气作为间隙结构,贴有硝酸纤维素膜的多克隆抗体印膜作为固相检测膜,吸水纸膜垫作为液体收集部件,PVC片作为支撑底片。取多克隆抗体印膜片,在硝酸纤维素膜的一侧的PVC底片上粘贴荧光标记抗体吸附膜,荧光标记抗体吸附膜不与硝酸纤维素膜叠加,留有1mm的空隙,在硝酸纤维素膜的另一侧的PVC底片上粘贴吸水纸膜垫,吸水纸膜垫与硝酸纤维素膜叠加1mm。在空隙部位以纵向排列粘贴厚度1mm的滤膜或不加滤膜(空气)。置粘贴好的检测片于切条机上,切成3.5mm试纸条。将试纸条放入检测卡内,制成检测试剂卡,放入有干燥剂的铝珀密封袋内,在封口机上封口,加贴标签。

[0065] 检测方法:各取10个上述制备的检测试剂卡,以荧光标记抗体吸附膜的一侧位于水平离心机离心转子近心端的方向置于离心转子上,以30秒的间隔向荧光标记抗体吸附膜上滴加配制的不同浓度的人肌红蛋白溶液80 μ l,完成加样后,200转/分离心启动检测反应,持续5分钟,然后3000转/分离心1分钟清理检测膜,取出检测试剂卡,放置于荧光定量分析仪(即检测器)上读取多克隆抗体印迹条带的荧光值。

[0066] 制作标准曲线:同实验二。

[0067] 实验重复三次,结果取平均值。统计学计算不同检测试剂卡的检测值。

[0068] 三、实验结果

本发明检测试剂卡以荧光素为指示剂的检测方法测定结果显示本发明采用0.22 μm 滤膜垫作为空隙结构的标准曲线样品检测的相关系数 r^2 为0.991,采用0.42 μm 滤膜垫作为空隙结构的标准曲线样品检测的相关系数 r^2 为0.979,采用空气作为空隙结构的检测试剂卡的相关系数 r^2 为0.978。实验结果如表4所示。本发明检测试剂卡采用0.22 μm 滤膜作为间隙结构进行10个为一个批量的重复性检测,均数为51.28ng/ml,标准差为5.18,CV值为10%;采用0.45 μm 滤膜作为间隙结构进行10个为一个批量的重复性检测,均数为51.13ng/ml,标准差为4.76,CV值为9%;采用空气作为间隙结构进行10个为一个批量的重复性检测,均数为51.07ng/ml,标准差为4.33,CV值为8%。三种间隙结构检测试剂卡检测结果比较没有明显的区别,均具有检测的准确性、重复性以及便捷性等多方面的特点。

[0069] 表4本发明以过滤膜垫作为间隙结构的比较检测实验(单位:ng/ml)

	0.22 μm 滤膜	0.45 μm 滤膜	空气
1	43.2	45.9	45.5
2	58.3	49.1	49.1
3	53.2	59.2	55.6
4	55.1	43.7	56.7
5	48.2	49.6	48.6
6	45.7	53.2	47.5
7	47.6	54.7	52.3
8	49.1	47.6	57.1
9	55.3	55.1	52.1
10	57.1	53.2	46.2
均数	51.28	51.13	51.07
SD	5.18	4.76	4.33
CV	0.10	0.09	0.08

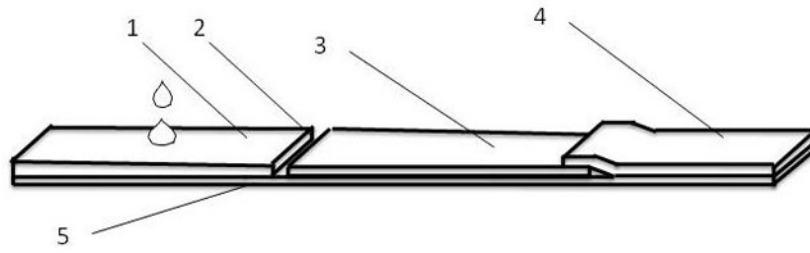


图 1

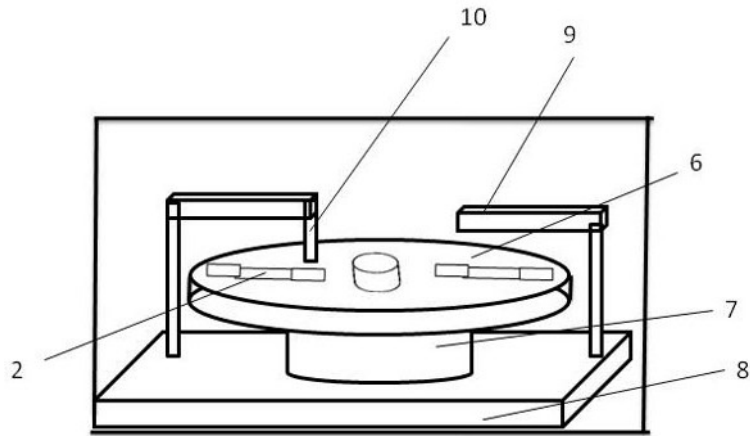


图 2

专利名称(译)	一种侧向流层析检测反应启动控制方法		
公开(公告)号	CN107727850A	公开(公告)日	2018-02-23
申请号	CN2017110932403.3	申请日	2017-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	北京康华源科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京康华源科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京康华源科技发展有限公司		
[标]发明人	刘凤鸣		
发明人	刘凤鸣		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/5302		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种侧向流层析检测反应启动控制方法，所述方法特征在于将加载液相的侧向流层析检测结构置于离心装置上，通过离心驱动液相进入固相检测膜并维持流动，进而启动侧向流层析检测反应，可用于胶体金属免疫层析检测方法、荧光免疫层析检测方法和化学发光免疫层析检测方法。本发明具有准确性高、重复性好、使用便捷、稳定性高、便于储存的特点。

	本发明检测试卡	对照检测试卡
1	55.6	85.3
2	44.3	82.4
3	52.3	76.5
4	53.2	74.2
5	46.7	77.1
6	55.0	66.3
7	49.5	62.8
8	54.8	63.5
9	51.1	55.4
10	58.2	47.2
均数	52.07	69.07
SD	4.27	12.16
CV	0.08	0.18