



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102890157 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201110203027. 7

(22) 申请日 2011. 07. 20

(71) 申请人 天津中新科炬生物制药有限公司  
地址 300457 天津市开发区第六大街 65 号

(72) 发明人 李洲 许俊艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/76 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

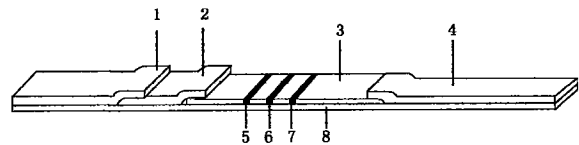
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速定量检测 HCG 的试纸条及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速定量检测 HCG 的试纸条及检测方法, 该试纸条包括上样垫、标记物垫、NC 膜、吸样垫和塑料板, 所述的上样垫、标记物垫、NC 膜和吸样垫依次粘附于塑料板, 标记物垫上包被有胶体金标记的鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体, NC 膜上分别包被有鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体构成的检测线 T 线和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线, 同时在 NC 膜上检测线 T 线靠近标记物垫一侧划有用于标示加样位置的加样指示线。本发明的试纸条通过膜上加样方式不但能够克服现有检测试剂因 HCG 含量过高而产生的钩状效应, 且通过配套的免疫层析判读仪能够对血液或尿液中的 HCG 定量监测。



1. 一种快速定量检测 HCG 的试纸条,包括上样垫 (1)、标记物垫 (2)、NC 膜 (3)、吸样垫 (4) 和塑料板 (8),其特征在于,所述试纸条与免疫层析判读仪配套使用进行 HCG 的定量检测,对待测样品进行稀释后定量检测范围为 10 ~ 15000mIU/ml。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于,所述的上样垫 (1)、标记物垫 (2)、NC 膜 (3) 和吸样垫 (4) 依次粘附于塑料板 (8),标记物垫 (2) 上包被有胶体金标记的鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体,NC 膜 (3) 上分别包被有鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体构成的检测线 T 线 (6) 和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线 (7),同时在 NC 膜 (3) 上检测线 T 线 (6) 靠近标记物垫 (2) 一侧划有用于标示加样位置的加样指示线 (5)。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂条,其特征在于,所述的试剂条通过以下的步骤进行制备:

(1) 胶体金标记鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体标记物垫的制备:用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液,制备完成后取三份胶体金溶液,分别用 0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液 pH 调到 pH7.5、pH8.5、pH9.5、然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每 100ml 溶液 0.5mg、1.0mg、1.5mg 鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌 1 小时,再加入终浓度为 0.2% BSA,0.1% 聚乙二醇 20000 进行封闭 30 分钟,12000 转离心 30 分钟,弃上清,用胶体金工作液复溶至 76.5ml,按 1ml 溶液铺 16cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺织物上,再置于温度 20 ~ 25°C、湿度小于 30% 的干燥间干燥 2 ~ 4 小时,制成标记物垫,备用;

(2) 鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体包被:用 0.01M pH7.2PBS 将鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体分别稀释成 1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml,然后用喷膜仪将鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体包被液在 NC 膜上按 1.3 $\mu$ l/cm 划线包被,构成检测线 T 线;同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线,同时在 NC 膜上检测线 T 线靠近标记物垫一侧划有用于标示加样位置的加样指示线,包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 3 ~ 4 小时,备用;

(3) 试纸条的装配:在温度 20 ~ 25°C、湿度小于 30% 的干燥室内,取塑料支撑板,将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴,在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫,在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫,在 NC 膜 C 线一侧距边缘搭接吸样垫;然后用裁剪机将贴好的塑料板切成适当宽度的试纸条。

4. 一种定量检测 HCG 的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 仪器内存标准曲线的绘制:以国家参考品为参比,将 HCG 标准品溶液用正常人尿液(阴性)或牛血清稀释成浓度为 0mIU/ml、10mIU/ml、50mIU/ml、250mIU/ml、1000mIU/ml、2500mIU/ml、5000mIU/ml、10000mIU/ml、15000mIU/ml 系列标准品,平衡至室温,将制备好的试剂条平放,在 NC 膜标示线上加入 3 ~ 5 $\mu$ l 待检标准品,然后向上样垫上加入 60 ~ 80ml 样本稀释液,静止 10 分钟后放入配套的免疫层析判读仪中进行读数,以测得 GOD 值 (X) 作为横坐标,以 HCG 含量 (y) 作为纵坐标,绘制仪器内存标准曲线。

(2) 按照步骤 (1) 的方法检测待测样品,并通过标准曲线获得所述待测样品的 HCG 浓度。

## 一种快速定量检测 HCG 的试纸条及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物应用技术领域,特别涉及一种快速定量检测 HCG 的试纸条及检测方法。

### 背景技术

[0002] 当受精卵植入子宫后,孕妇体内就会分泌一种新激素,称为人绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotrophin,简称 HCG)。HCG 于 1927 年被 Aschheim 和 Zondek 在孕妇尿中首次发现。HCG 是细胞滋养层及合体滋养层分泌的一种激素,它首先存在于胎盘中,通过血液循环而排泄到尿中。在胎盘、血液和尿中均存在 HCG 及其代谢产物。在受孕后 10 天左右,就可以在孕妇的晨尿中检测到 HCG。正常妊娠妇女血清中,HCG 浓度在黄体达到峰值后的 7 ~ 10 天或受精卵植入子宫后的 4 ~ 7 天后开始增加,并以指数形式增长,平均每 1.5 ~ 2 天浓度就翻倍,不过增加速率也因人而异。妊娠 7 ~ 10 周后 HCG 浓度就可达 20,000 ~ 100,000 IU/L,在妊娠 13 ~ 15 周时浓度有所降低,之后又开始缓慢增加直至妊娠 30 ~ 33 周,接着又缓慢降低直至妊娠结束。异位妊娠 HCG 上升则较缓慢,或怀孕的 3 ~ 6 周,HCG 不能持续翻倍增加,应考虑异位妊娠或先兆流产的可能。

[0003] HCG 是早期妊娠中的主要信号,特异性标志,已成为临床上诊断早期妊娠的常用指标。定量动态监测 HCG 量也作为异位妊娠的监控指标。

[0004] 早期检测妊娠的方法主要有三种:超声检测、基础体温测定和免疫层析检测。超声检测由于只能检测妊娠 6 周后子宫的情况,而通常被用于临床上胎儿的监测。基础体温测定虽然简单易行却又比较繁琐。免疫层析检测由于它的操作简便、具有直观、快速、检测效率高、方法简便、无污染、费用低廉、灵敏度高、特异性强等优点,被广泛应用于临床诊断、野外现场及家庭自我检测。

[0005] 免疫层析检测 HCG 的试剂运用双抗体夹心法。当测试液浸泡或滴入试纸条的样品垫后,通过吸水纤维的毛细作用,测试液迅速湿透金标结合垫,金标结合垫上的胶体金结合物被溶解,并随测试液一起沿层析材料向前移动。若测试液中存在待测抗原 Ag,则它就会和胶体金结合物中的抗体发生特异性免疫反应,形成胶体金结合物-待测抗原的免疫复合物。然后随测试液一起流经固定在 Nc 膜上 T 线的捕获试剂。T 线的捕获试剂捕获胶体金结合物-待测抗原免疫复合物,即与该免疫复合物发生特异性免疫反应,形成胶体金结合物-待测抗原-捕获试剂的免疫复合物,从而使胶体金结合物-待测抗原免疫复合物滞留在 T 线处。测试液继续前移,在流经 Nc 膜上固定有羊抗鼠 IgG 抗体的 C 线时,未与待测抗原 Ag 发生反应的胶体金结合物与 C 线上羊抗鼠抗体发生免疫反应,从而使得游离的胶体金结合物滞留在 C 线处。此时 T 线和 C 线处均有胶体金结合物滞留,即 T 线和 C 线处均能观察到颜色(红色或紫色),则表示检测结果为阳性结果,即测试液中有待测抗原;若仅 C 线处观察到颜色,而 T 线处未观察到颜色,则表示检测结果为阴性结果,即测试液中无待测抗原;待测液中 HCG 含量不同,所产生的 T 线颜色深浅也不相同,随着 HCG 含量的增加,T 线颜色就会越深。然而,在一些样品中高浓度 HCG 则可导致高水平的“钩状效应(hook effect)”,

即 HCG 浓度远远大于胶体金试纸条的检测上限时, HCG 测得结果反而随浓度的增加而下降, T 线颜色反而变浅, 在临床诊断中造成 HCG 低水平的假象, 使诊断结果出现不真实的问题。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种快速定量检测 HCG 的试纸条及检测方法, 尤其是提供一种能快速定量检测尿液或血液中 HCG 的试纸条。

[0007] 实现本发明的技术方案为, 一种快速定量检测 HCG 的试纸条及检测方法, 包括上样垫、标记物垫、NC 膜、吸样垫和塑料板, 所述试纸条与免疫层析判读仪配套使用进行 HCG 的定量检测, 对待测样品进行稀释后定量检测范围为 10 ~ 15000mIU/ml。

[0008] 所述的上样垫 (1)、标记物垫 (2)、NC 膜 (3) 和吸样垫 (4) 依次粘附于塑料板 (8), 标记物垫 (2) 上包被有胶体金标记的鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体, NC 膜 (3) 上分别包被有鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体构成的检测线 T 线 (6) 和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线 (7), 同时在 NC 膜 (3) 上检测线 T 线 (6) 靠近标记物垫 (2) 一侧划有用于标示加样位置的加样指示线 (5)。

[0009] 所述的试剂条通过以下的步骤进行制备:

[0010] (1) 胶体金标记鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体标记物垫的制备: 用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液, 制备完成后取三份胶体金溶液, 分别用 0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液 pH 调到 pH7.5、pH8.5、pH9.5、然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌, 按每 100ml 溶液 0.5mg、1.0mg、1.5mg 鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体缓慢滴加到胶体金溶液中, 继续搅拌 1 小时, 再加入终浓度为 0.2% BSA, 0.1% 聚乙二醇 20000 进行封闭 30 分钟, 12000 转离心 30 分钟, 弃上清, 用胶体金工作液复溶至 76.5ml, 按 1ml 溶液铺 16cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺织布上, 再置于温度 20 ~ 25°C、湿度小于 30% 的干燥间干燥 2 ~ 4 小时, 制成标记物垫, 备用;

[0011] (2) 鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体包被: 用 0.01M pH7.2PBS 将鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体分别稀释成 1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml, 然后用喷膜仪将鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体包被液在 NC 膜上按 1.3 $\mu$ l/cm 划线包被, 构成检测线 T 线; 同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线, 同时在 NC 膜上检测线 T 线靠近标记物垫一侧划有用于标示加样位置的加样指示线, 包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 3 ~ 4 小时, 备用;

[0012] (3) 试纸条的装配: 在温度 20 ~ 25°C、湿度小于 30% 的干燥室内, 取塑料支撑板, 将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴, 在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫, 在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫, 在 NC 膜 C 线一侧距边缘搭接吸样垫; 然后用裁剪机将贴好的塑料板切成适当宽度的试纸条。

[0013] 一种定量检测 HCG 的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0014] (1) 仪器内存标准曲线的绘制: 以国家参考品为参比, 将 HCG 标准品溶液用正常人尿液 (阴性) 或牛血清稀释成浓度为 0mIU/ml、10mIU/ml、50mIU/ml、250mIU/ml、1000mIU/ml、2500mIU/ml、5000mIU/ml、10000mIU/ml、15000mIU/ml 系列标准品, 平衡至室温, 将制备好的试剂条平放, 在 NC 膜标示线上加入 3 ~ 5 $\mu$ l 待检标准品, 然后向上样垫上加入 60 ~ 80ml 样本稀释液, 静止 10 分钟后放入配套的免疫层析判读仪中进行读数, 以测得 GOD 值 (X) 作为横坐标, 以 HCG 含量 (y) 作为纵坐标, 绘制仪器内存标准曲线;

[0015] (2) 按照步骤 (1) 的方法检测待测样品, 并通过标准曲线获得所述待测样品的 HCG 浓度。

[0016] 所述的免疫层析判读仪综合应用机械、电子、光学、微机以及心理物理学的原理和方法,达到智能人眼识别判读功能,对免疫层析试剂反应线的视觉信号自动定位,背景剔除,颜色分辨,量化处理,通过一个量化的 GOD 值表现出来。即在一定的范围内,线条颜色的深浅与被测物的浓度可以呈现出一定的关系,在测试反应过程中只要做一条标准曲线储存在仪器自带 IC 卡中,就能够对免疫层析试剂条进行定量测试。

[0017] 所述试纸条不但能够克服现有检测试剂因 HCG 含量过高而产生的钩状效应,而且能够对血液或尿液中的 HCG 定量监测,避免了样本稀释所带来的麻烦和误差。简便、准确、快速定量、灵敏度和特异性高、经济实用且与其它激素无交叉,可以更好的满足临床要求。

[0018] 与现有技术相比,本发明涉及快速定量检测 HCG 的试纸条具有如下优点和显著的进步:

[0019] (1) 多功能性:本发明既可定性,又可定量检测出尿液或血液中 HCG 的含量;

[0020] (2) 快速定量:配套的免疫层析判读记录仪将人肉眼观察到检测区反应显色的颜色深浅程度进行了量化,根据仪器内存标准曲线,在一定的范围内,反应线条颜色的深浅与被测物的浓度可以呈现出一定的关系,可准确对样本中 HCG 浓度进行定量;

[0021] (3) 克服了钩状效应:本发明不但能够克服现有检测试剂因 HCG 含量过高而产生的钩状效应,而且能够对血液或尿液中的 HCG 定量监测,具体为,检测时加样方式为先在 NC 膜上加入 3 ~ 5 $\mu$ l 被检样本,然后向上样垫上加入适量稀释液,既克服了现有检测试剂因 HCG 含量过高而产生的钩状效应,避免了由此产生的误判、假阴性结果,又提高了试剂的检测灵敏度,灵敏度可达 10mIU/ml;

[0022] (4) 可保存和追溯数据和图片:目前市场用于检测 HCG 的快速试剂由于本身的特点即在一定时间内显示的颜色有效,所以大多数都是看完结果后就把试剂卡扔弃了,本试剂配套的判读记录仪不仅能保存产品有效测试时间内判定结果的图像资料,也能保存原始的整个图像信息。

## 附图说明

[0023] 图 1 为快速检测 HCG 的胶体金试纸条结构示意图;

[0024] 1、上样垫;2、标记物垫;3、硝酸纤维素(NC)膜;4、吸样垫;5、加样指示线;6、检测线 T 线;7、质控线 C 线;8、塑料板。

## 具体实施方式

[0025] 以下是本发明涉及快速定量检测血液中毒品的方法的具体实施例,对本发明的技术方案做进一步作描述,但是本发明的保护范围并不限于这些实施例。凡是不背离本发明构思的改变或等同替代均包括在本发明的保护范围之内。

[0026] 实施例 1HCG 检测试纸条的制备及检测应用

[0027] (1) 胶体金标记鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体标记物垫的制备

[0028] 用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液,制备完成后取三份胶体金溶液,分别用 0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液 pH 调到 pH7.5、pH8.5、pH9.5,然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每 100ml 溶液 0.5mg、1.0mg、1.5mg 鼠抗 HCG- $\beta$  单克隆抗体缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌 1 小时,再加入终浓度为 0.2% BSA,0.1% 聚乙二醇 20000 进行

封闭 30 分钟,12000 转离心 30 分钟,弃上清,用胶体金工作液复溶至 76.5ml,按 1ml 溶液铺 16cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺布上,再置干燥间温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30%干燥 2 ~ 4 小时,制成标记物垫,备用。

[0029] (2) 鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体包被

[0030] 用 0.01M pH7.2PBS 将鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体分别稀释成 1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml,然后用喷膜仪将鼠抗 HCG- $\alpha$  抗体包被液在 NC 膜上按 1.3u1/cm 划线包被,构成检测线 T 线;同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线,同时在 NC 膜上检测线 T 线靠近标记物垫一侧划有用于标示加样位置的加样指示线。包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 3 ~ 4 小时,备用。

[0031] (3) 试纸条的装配

[0032] 在干燥室内温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30%,取塑料支撑板,将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴,在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫,在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫;在 NC 膜 C 线一侧距边缘搭接吸样垫。然后用裁剪机将贴好的塑料板切成适当宽度的试纸条。切好的试纸条也可以装入塑料卡内,形成检测试剂卡。

[0033] (4) 仪器内存标准曲线的绘制

[0034] 以国家参考品为参比,将 HCG 标准品溶液用正常人尿液(阴性)或牛血清稀释成浓度为 0mIU/ml、10mIU/ml、50mIU/ml、250mIU/ml、1000mIU/ml、2500mIU/ml、5000mIU/ml、10000mIU/ml、15000mIU/ml 系列标准品,平衡至室温,将制备好的试剂条平放,在 NC 膜标示线上加入 3 ~ 5u1 待检标准品,然后向上样垫上加入 60 ~ 80ml 样本稀释液,静止 10 分钟后放入配套的免疫层析判读仪中进行读数,以测得 GOD 值 (X) 作为横坐标,以 HCG 含量 (y) 作为纵坐标,绘制仪器内存标准曲线。

[0035] (5) 临床样本检测

[0036] 按照上述检测方法检测临床样本 30 份,以奥普 HCG 定量试剂为对照,结果表明本产品灵敏度达 10mIU/ml,特异性 100%,和奥普 HCG 定量试剂结果符合率为 98.1%。

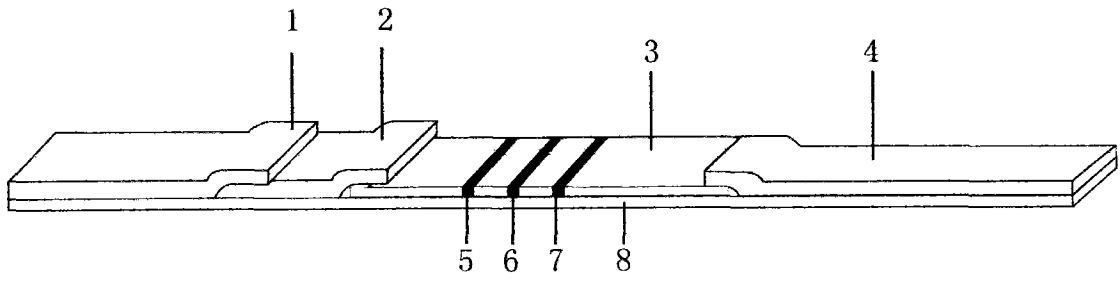


图 1

专利名称(译)	一种快速定量检测HCG的试纸条及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102890157A</a>	公开(公告)日	2013-01-23
申请号	CN201110203027.7	申请日	2011-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 许俊艳		
发明人	李洲 许俊艳		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种快速定量检测HCG的试纸条及检测方法，该试纸条包括上样垫、标记物垫、NC膜、吸样垫和塑料板，所述的上样垫、标记物垫、NC膜和吸样垫依次粘附于塑料板，标记物垫上包被有胶体金标记的鼠抗HCG-β单克隆抗体，NC膜上分别包被有鼠抗HCG-α抗体构成的检测线T线和羊抗鼠IgG抗体构成的质控线C线，同时在NC膜上检测线T线靠近标记物垫一侧划有用于标示加样位置的加样指示线。本发明的试纸条通过膜上加样方式不但能够克服现有检测试剂因HCG含量过高而产生的钩状效应，且通过配套的免疫层析判读仪能够对血液或尿液中的HCG定量监测。

