



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109444413 B

(45)授权公告日 2019.08.27

(21)申请号 201811123774.8

(22)申请日 2018.09.26

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109444413 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(73)专利权人 深圳市疾病预防控制中心(深圳  
市卫生检验中心、深圳市预防医  
学研究所)  
地址 518055 广东省深圳市南山区龙苑路8  
号

(72)发明人 李金峰 柯跃斌 何洁 肖云军  
吕子全

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102  
代理人 廖苑滨

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 1892223 A,2007.01.10,权利要求1-4,  
说明书具体实施例一,附图.

CN 1892223 A,2007.01.10,权利要求1-4,  
说明书具体实施例一,附图.

CN 102520194 A,2012.06.27,说明书0039、  
0065-0066段,实施例1.

CN 102305854 A,2012.01.04,说明书0008  
段,实施例1.

CN 104820094 A,2015.08.05,说明书0011-  
0019、0026-0028段,实施例1,图2-4.

CN 102105795 A,2011.06.22,全文.

审查员 刘彦宁

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种检测装置

(57)摘要

本发明公开了一种检测装置,用于定量检测  
样本中的目标物质的含量。通过比较检测区信号  
强度和参比区信号强度可以对样本中的目标分  
子进行定量检测。该检测装置生产成本低,检测  
结果准确可靠。

1. 一种检测装置,其特征在于,该检测装置为免疫层析试纸条,其制备方法为:

(1) 纳米颗粒-检测抗体偶联物的制备:取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒于900 $\mu$ L、50mM、PH6.1的2-(N-吗啉)乙磺酸中,涡旋混匀;其中,所述稀土荧光纳米颗粒的粒径为300nm;加入20mg N-羟基琥珀酰亚胺、20mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入C反应蛋白检测抗体20 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用磷酸盐吐温缓冲液洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液重悬颗粒,备用;其中,所述颗粒重悬液包括10mM Tris-HCl缓冲液,1%牛血清白蛋白,和5%海藻糖;

(2) 纳米颗粒-参比抗体偶联物的制备:取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒于900 $\mu$ L、50mM、PH6.1的2-(N-吗啉)乙磺酸中,涡旋混匀;其中,所述稀土荧光纳米颗粒的粒径为300nm;加入20mg N-羟基琥珀酰亚胺、20mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入三聚氰胺单克隆抗体40 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液重悬颗粒,备用;其中,所述颗粒重悬液包括10mM Tris-HCl缓冲液,1%牛血清白蛋白,和5%海藻糖;

(3) 结合垫的制备:将结合垫预先置于重量体积比浓度为0.2%的卡波姆940凝胶中浸泡5min,取出置于65 $^{\circ}$ C烘干,将制备好的纳米颗粒-检测抗体偶联物和纳米颗粒-参比抗体偶联物按照等体积混匀,然后按照3 $\mu$ L/cm喷涂到结合垫上,置于37 $^{\circ}$ C烤箱烘干,备用;

(4) 试纸条的组装:将层析膜粘贴到PVC底板的中间位置;然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫、层析膜、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有1mm的搭接;最后裁成5.5mm宽的免疫层析试纸条;

(5) 免疫层析试纸条的处理:在层析膜的中间位置分别用2mg/ml CRP捕获抗体和2mg/ml三聚氰胺-牛血清白蛋白偶联物喷点,分别作为检测区和参比区,该检测区和参比区并排设置在垂直于所述免疫层析试纸条长边的一横向线,置于37 $^{\circ}$ C烘干,然后置于2-8 $^{\circ}$ C、干燥、避光处保存。

## 一种检测装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体涉及一种用于检测样本中成分的检测装置。

### 背景技术

[0002] 当前快速检测技术发展迅猛,已经广泛应用于临床、食品安全、法医、环境、军事等诸多领域。但是这些技术大部分应用于定性检测领域,很难进行定量检测。标记信号的均一性、反应时间、反应温湿度、反应速度等等诸多因素都会影响到反应结果,进而增大变异系数,制约了快速检测技术精密定量的发展,从而达不到定量检测的目标。以当前最为常用的免疫层析试纸条为例,低温会显著降低试纸条检测信号强度;反应时间过长和过短都将直接影响检测区和参比区之间的信号比值;不同的样本在层析膜上的层析速度会有所差异,同样会影响定量结果;层析膜材质的均一性也会影响检测区和参比区之间的信号比值。检测区与参比区的反应时间不一致也是引起免疫层析定量结果不稳定的一个重要原因。

### 发明内容

[0003] 本发明提供一种检测装置,使检测区和参比区在同样的时间、同样的条件下反应,以提高定量检测的准确性。

[0004] 本发明所要解决的技术问题通过以下技术方案予以实现:

[0005] 一种检测装置,该检测装置上设有相互独立的检测区和参比区,且检测区和参比区位于样本流动方向的同一横截面处。

[0006] 该检测装置可以是免疫层析试纸条,还可以是微流控芯片,或者其他通过样本流过检测区和参比区来实现检测的装置,所述检测装置通过测定相邻位置处的检测区和参比区的信号比值来确定样本中目标分子的含量。

[0007] 该检测装置在样本流动方向的同一横截面处有两个或两个以上的检测区,一个或一个以上的参比区。

[0008] 在本发明中,所述检测区和参比区按照“检测区、参比区、检测区、参比区……”的顺序排列于样本流动方向的同一横截面处。

[0009] 在本发明中,所述检测区和/或参比区的形状为规则图案、线的任一种,也可以是其他形状;其中,所述规则图案包括圆形、方形、矩形、椭圆、多边形、星形的至少一种。

[0010] 在本发明中,同一横截面处不同检测区所包被的捕获分子的浓度可以不一样。

[0011] 本发明具有如下有益效果:

[0012] 本发明提供的检测装置,使检测区和参比区同时参与反应,反应过程中的各种条件无限接近,定量结果更为准确。为了进一步提高定量的准确性,本发明还提供了多个检测区和参比区的检测装置。本发明所提供的检测方案除了检测结果准确外,还易于规模化生产,不会增加生产成本。

## 附图说明

[0013] 图1为本发明实施例1中方案A和实施例6免疫层析试纸条的层析膜部件的结构示意图(一个检测区,一个参比区);

[0014] 注:11.检测区;12.参比区;13.层析膜;箭头:液体流动方向。

[0015] 图2为本发明实施例1中方案B免疫层析试纸条的层析膜部件的结构示意图(一个检测区,一个参比参比区);

[0016] 注:14.检测区;15.参比参比区;13.层析膜;箭头:液体流动方向。

[0017] 图3为本发明实施例2中方案A免疫层析试纸条的层析膜部件的结构示意图(多个检测区、多个参比区);

[0018] 注:21.检测区;22.参比区;23.层析膜;箭头:液体流动方向。

[0019] 图4为本发明实施例2中方案B免疫层析试纸条的层析膜部件的结构示意图;

[0020] 注:24.检测区;25.参比区参比区;23.层析膜;箭头:液体流动方向。

[0021] 图5为本发明实施例3中方案A微流控芯片检测区和参比区相关的管道示意图;

[0022] 注:31.检测区;32.参比区;箭头:液体流动方向。

## 具体实施方式

[0023] 下面结合附图和实施例对本发明进行详细说明。

[0024] 实施例1免疫层析试纸条定量检测血清中甲胎蛋白(AFP)

[0025] A.本实施例方案:

[0026] 1.纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(2-(N-吗啉)乙磺酸,50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、20mg EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺),涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入AFP检测抗体20 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST(磷酸盐吐温缓冲液)洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl缓冲液,1%BSA(牛血清白蛋白),5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0027] 2.纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入三聚氰胺单克隆抗体40 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl,1%BSA,5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0028] 3.结合垫的制备:将制备好的纳米颗粒-检测抗体偶联物和纳米颗粒-参比抗体偶联物按照等体积混匀,然后按照3 $\mu$ L/cm喷涂到玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烤箱烘干,备用。

[0029] 4.试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜13)粘贴到PVC底板的中间位置。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫、层析膜13、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接;最后裁成5.5mm宽的免疫层析试纸条。

[0030] 5.试纸条的处理:在层析膜13的中间位置(距离样本垫端30mm处)分别用2mg/ml AFP捕获抗体和2mg/ml 三聚氰胺-BSA(牛血清白蛋白)偶联物喷点,分别作为检测区11和参

比区12,该检测区11和参比区12并排设置在垂直于所述试纸条长边的一横向线,便于检测区11和参比区12同时与待测样本接触及反应。置于37℃烘干,然后置于2-8℃、干燥、避光处保存。

[0031] 6. 定量检测血清中AFP:将试纸条平放于水平台面上,滴加180μL血清于样本垫上,静置15min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0032] B. 对比方案:现有免疫层析试纸条

[0033] 1. 纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物)的制备:参见本实施例“A. 本实施例方案”。

[0034] 2. 纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物)的制备:参见本实施例“A. 本实施例方案”。

[0035] 3. 结合垫的制备:参见本实施例“A. 本实施例方案”。

[0036] 4. 层析膜13的制备:按照0.8μL/cm的量往层析膜13上沿着层析方向依次喷涂浓度为2mg/mL的AFP捕获抗体(检测区14)、2mg/mL三聚氰胺-BSA(牛血清白蛋白)偶联物(参比区15),置于37℃干燥2h,备用。

[0037] 5. 试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜13)粘贴到PVC底板的中间位置(检测区14靠近样本垫端、参比区15靠近吸水纸端)。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫层析膜13、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接。最后裁成5.5mm宽的免疫层析试纸条,于2-8℃、干燥、避光处保存。

[0038] 6. 定量检测血清中AFP:将试纸条平放于水平台面上,滴加180μL血清于样本垫上,静置15min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0039] 结果评价:免疫层析试纸条(方案A)与现有技术(方案B)相比,检测稳定性明显提升,实验数据参见表1(同一浓度用两种方案重复测定10次进行统计分析)。

[0040] 表1本实施例方案(方案A)和现有免疫层析试纸条(方案B)检测AFP对比

[0041]

血清中 AFP 浓度	0ng/ml		25ng/ml		75ng/ml		225ng/ml	
	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B
1	0.005	0.006	15.921	14.369	36.569	59.156	191.697	287.654
2	0.003	0.007	15.354	17.354	38.456	53.148	195.634	259.352
3	0.007	0.004	15.352	13.569	37.589	48.365	198.159	275.369
4	0.009	0.009	16.864	17.264	36.259	47.354	206.157	245.235
5	0.011	0.007	15.304	17.967	34.654	43.312	193.854	304.354
6	0.005	0.007	15.365	13.647	38.357	49.654	209.327	294.614
7	0.005	0.009	15.947	18.947	36.967	55.364	207.789	259.643
8	0.004	0.006	15.487	14.321	34.397	58.641	202.865	316.365
9	0.007	0.007	16.274	15.364	37.897	57.987	191.654	223.254
10	0.008	0.003	15.099	17.365	39.351	42.645	196.354	265.964
平均值	0.006	0.007	15.697	16.017	37.050	51.563	199.349	273.180
标准差	0.002	0.002	0.549	1.977	1.620	6.193	6.680	28.305
变异系数	0.384	0.292	0.035	0.123	0.044	0.120	0.034	0.104

[0042] 注:变异系数(coefficient of variation),亦称离散系数(coefficient of dispersion)或相对偏差(rsd),是标准偏差sd与平均值mean之比,用百分数表示,计算公式为:  $cv = sd/mean \times 100\%$ 。变异系数越大,说明越不稳定。

[0043] 实施例2 免疫层析试纸条定量检测半乳糖凝集素-3

[0044] A. 本实施例方案:

[0045] 1. 纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入半乳糖凝集素-3检测抗体50 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl,1%BSA,5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0046] 2. 纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入三聚氰胺单克隆抗体40 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl,1%BSA,5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0047] 3. 结合垫的制备:将制备好的纳米颗粒-检测抗体偶联物和纳米颗粒-参比抗体偶联物按照等体积混匀,然后按照3 $\mu$ L/cm喷涂到玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烤箱烘干,备用。

[0048] 4. 试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜23)粘贴到PVC底板的中间位置。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫层析膜23、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接。最后裁成6.0mm的免疫层析试纸条。

[0049] 5. 试纸条的处理:如图3所示,在层析膜23的中间位置(距离样本垫端30mm处)分别用2mg/ml半乳糖凝集素-3捕获抗体和2mg/ml三聚氰胺-BSA偶联物喷点,作为检测区21和参比区22(按照“检测区21、参比区22、检测区21、参比区22、检测区21、参比区22”的顺序并排设置在垂直于所述试纸条长边的一横向线,便于检测区21和参比区22同时与待测样本接触及反应)。置于37 $^{\circ}$ C烘干,然后置于干燥处保存。

[0050] 6. 定量检测血清中半乳糖凝集素-3:将试纸条平放于水平台面上,滴加180 $\mu$ L血清于样本垫上,静置15min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0051] B. 对比方案:

[0052] 1. 纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物)的制备:参见本实施例“A. 本实施例方案”。

[0053] 2. 纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物)的制备:参见本实施例“A. 本实施例方案”。

[0054] 3. 结合垫的制备:参见本实施例“A. 本实施例方案”。

[0055] 4. 层析膜23的制备:如图4所示,按照0.8 $\mu$ L/cm的量往层析膜23上沿着层析方向依次喷涂浓度为2mg/mL的半乳糖凝集素-3捕获抗体(检测区24)、2mg/mL三聚氰胺-BSA(牛血清白蛋白)偶联物(参比区25),置于37 $^{\circ}$ C干燥2h,备用。

[0056] 5. 试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜23)粘贴到PVC底板的中间位置(检测区24靠近样本垫端、参比区25靠近吸水纸端)。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫层析膜23、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接。最后裁成5.5mm宽的免疫层析试纸条,于2-8 $^{\circ}$ C、干燥、避光处保存。

[0057] 6. 定量检测血清中半乳糖凝集素-3:将试纸条平放于水平台面上,滴加180 $\mu$ L血清

于样本垫上,静置15min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0058] 结果评价:免疫层析试纸条(方案A)与现有技术(方案B)相比,检测稳定性明显提升,实验数据参见表2(同一浓度用两种方案重复测定10次进行统计分析)。

[0059] 表2本实施例方案(方案A)和现有免疫层析试纸条(方案B)检测半乳糖凝集素-3对比

[0060]

血清中半乳糖凝集素-3 浓度	0ng/ml		8ng/ml		24ng/ml		72ng/ml	
	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B
1	0.006	0.003	13.356	18.365	41.451	67.351	221.365	307.158
2	0.012	0.008	13.355	13.458	42.365	57.324	224.000	259.145
3	0.006	0.006	13.341	15.684	40.968	55.652	223.549	312.654
4	0.008	0.004	13.365	15.248	39.687	52.142	219.654	359.142
5	0.009	0.006	13.399	13.687	39.954	50.247	231.087	299.456
6	0.007	0.007	13.299	19.259	40.125	51.468	225.752	257.658
7	0.004	0.009	13.654	12.651	41.069	57.642	228.751	239.758
8	0.003	0.006	13.254	13.297	40.564	59.324	225.421	300.124
9	0.007	0.006	13.365	19.542	41.259	55.004	223.652	319.647
10	0.009	0.007	13.654	17.648	40.569	57.214	220.198	277.469
平均值	0.007	0.006	13.404	15.884	40.801	56.337	224.343	293.221
标准差	0.003	0.002	0.138	2.632	0.796	4.880	3.610	35.331
变异系数	0.366	0.282	0.010	0.166	0.020	0.087	0.016	0.120

[0061] 实施例3 微流控芯片定量检测胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-7)

[0062] 该微流控芯片上的参比区32和检测区31位于液体流动的同一横截面处,或者位于液体同时流过的不同反应区域。虽然检测区31和反应区位于芯片的不同反应区域,但待检液体同时流过两个区域,以保证反应的同步进行。

[0063] 结果评价:表3中为使用参比区32和检测区31位于同一液体流动方向横截面处的微流控芯片(方案A,如图5所示)与现有技术(参比区和检测区31位于不同液体流动方向横截面处,方案B)检测血清中IGFBP-7的实验结果。可见方案A检测稳定性明显提升(同一浓度用两种方案重复测定10次进行统计分析)。

[0064] 表3 本实施例方案(A)和现有方案(B)检测IGFBP-7

[0065]

血清中 IGFBP-7 浓度	0ng/ml		8ng/ml		24ng/ml		72ng/ml	
	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B
1	0.004	0.003	123.625	152.368	357.965	438.365	521.652	652.398
2	0.009	0.005	125.354	151.324	352.989	412.524	502.357	643.456
3	0.005	0.004	128.364	142.369	349.635	387.654	532.847	607.354
4	0.011	0.007	124.698	147.654	356.369	379.658	526.369	611.423
5	0.010	0.008	125.365	138.654	355.546	399.621	524.361	697.641
6	0.009	0.007	124.364	187.654	352.145	425.657	528.470	699.112
7	0.007	0.009	124.365	168.365	357.751	432.847	539.453	607.965
8	0.006	0.006	124.658	167.698	356.421	481.354	534.758	539.654
9	0.004	0.006	125.674	154.654	349.657	359.640	540.124	655.458
10	0.005	0.009	126.369	161.523	362.854	386.546	529.999	562.547
平均值	0.007	0.006	125.284	157.226	355.133	410.387	528.039	627.701
标准差	0.003	0.002	1.334	14.531	4.104	35.405	10.880	52.372
变异系数	0.369	0.314	0.011	0.092	0.012	0.086	0.021	0.083

[0066] 实施例4 免疫层析检测定量检测血清中甲胎蛋白 (AFP)

[0067] 具体方案参见实施例1中A和B。

[0068] 本实施例与实施例1不同之处在于:方案A中步骤5试纸条的处理改为:在层析膜的中间位置(距离样本垫端30mm处)分别用2mg/ml、1.2mg/ml、0.6mg/ml AFP捕获抗体和2mg/ml三聚氰胺-BSA(牛血清白蛋白)偶联物喷点,作为检测区和参比区(按照“检测区(2mg/ml AFP捕获抗体)、参比区(2mg/ml三聚氰胺-BSA)、检测区(1.2mg/ml AFP捕获抗体)、参比区(2mg/ml三聚氰胺-BSA)、检测区(0.6mg/ml AFP捕获抗体)”的顺序并排设置在垂直于所述试纸条长边的一横向线,便于检测区和参比区同时与待测样本接触及反应)。置于37℃烘干,然后置于2-8℃、干燥、避光处保存。

[0069] 结果评价:免疫层析试纸条(方案A)与现有技术(方案B)相比,检测稳定性明显提升,而且与实施例1中方案A相比,变异系数也明显降低。实验数据参见表4(同一浓度用两种方案重复测定10次进行统计分析)。

[0070] 表4本实施例方案(方案A)和现有免疫层析试纸条(方案B)检测AFP对比

[0071]

血清中 AFP 浓度	0ng/ml		25ng/ml		75ng/ml		225ng/ml	
	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B
1	0.005	0.006	15.321	14.369	38.569	59.156	201.697	287.654
2	0.003	0.007	15.354	17.354	38.456	53.148	205.634	259.352
3	0.007	0.004	15.352	13.569	37.589	48.365	208.159	275.369
4	0.009	0.009	15.864	17.264	36.259	47.354	206.157	245.235
5	0.011	0.007	15.304	17.967	39.654	43.312	203.854	304.354
6	0.005	0.007	15.365	13.647	38.357	49.654	209.327	294.614
7	0.005	0.009	15.347	18.947	37.967	55.364	203.789	259.643
8	0.004	0.006	15.487	14.321	38.397	58.641	202.865	316.365
9	0.007	0.007	15.274	15.364	37.897	57.987	201.654	223.254
10	0.008	0.003	15.099	17.365	38.351	42.645	206.354	265.964
平均值	0.006	0.007	15.377	16.017	38.150	51.563	204.949	273.180
标准差	0.002	0.002	0.197	1.977	0.860	6.193	2.618	28.305
变异系数	0.384	0.292	0.013	0.123	0.023	0.120	0.013	0.104

[0072] 实施例5 免疫层析试纸条定量检测氯霉素

[0073] A. 本实施例方案:

[0074] 1. 纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入氯霉素检测抗体15 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl, 1%BSA, 5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0075] 2. 纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入三聚氰胺单克隆抗体15 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl, 1%BSA, 5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0076] 3. 结合垫的制备:将制备好的纳米颗粒-检测抗体偶联物和纳米颗粒-参比抗体偶联物按照等体积混匀,然后按照2 $\mu$ L/cm喷涂到玻璃纤维素膜(宽度:6mm)上,置于37 $^{\circ}$ C烤箱烘干,备用。

[0077] 4. 试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜)粘贴到PVC底板的中间位置。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫层析膜、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接。最后裁成6.0mm的免疫层析试纸条。

[0078] 5. 试纸条的处理:如图1所示,在层析膜的中间位置(距离样本垫端30mm处)分别用2mg/ml氯霉素-BSA偶联物和2mg/ml三聚氰胺-BSA偶联物喷线,作为检测区和参比区。两条线彼此独立,没有搭接,且该检测区和参比区并排设置在垂直于所述试纸条长边的一横向线,便于检测区和参比区同时与待测样本接触及反应。置于37 $^{\circ}$ C烘干,然后置于干燥处保存。

[0079] 6. 定量检测牛奶中的氯霉素:将试纸条平放于水平台面上,滴加180 $\mu$ L牛奶于样本垫上,静置5min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0080] B.对比方案:

[0081] 1. 纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物)的制备:参见本实施例“A.本实施例方案”。

[0082] 2. 纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物)的制备:参见本实施例“A.本实施例方案”。

[0083] 3. 结合垫的制备:参见本实施例“A.本实施例方案”。

[0084] 4. 层析膜的制备:如图2所示,按照0.8 $\mu$ L/cm的量往层析膜上沿着层析方向依次喷涂浓度为2mg/mL的氯霉素-BSA偶联物(检测区)、2mg/mL三聚氰胺-BSA(牛血清白蛋白)偶联物(参比区),置于37 $^{\circ}$ C干燥2h,备用。

[0085] 5. 试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜)粘贴到PVC底板的中间位置(检测区靠近样本垫端、参比区靠近吸水纸端)。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫层析膜、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接。最后裁成5.5mm宽的免疫层析试纸条,于2-8 $^{\circ}$ C、干燥、避光处保存。

[0086] 6. 定量检测牛奶中的氯霉素残留:将试纸条平放于水平台面上,滴加180 $\mu$ L牛奶于样本垫上,静置5min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0087] 结果评价:免疫层析试纸条(方案A)与现有技术(方案B)相比,检测稳定性明显提升,实验数据参见表5(同一浓度用两种方案重复测定10次进行统计分析)。

[0088] 表5本实施例方案(方案A)和现有免疫层析试纸条(方案B)检测氯霉素对比

[0089]

牛奶中氯霉素浓度	0ng/ml		0.02ng/ml		0.06ng/ml		0.18ng/ml	
	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B
1	587.158	757.369	359.658	301.256	90.365	78.654	3.732	12.365
2	589.312	628.354	354.267	309.465	85.256	77.325	7.654	17.342
3	559.605	608.658	335.468	282.624	87.279	73.159	6.254	9.453
4	575.315	623.587	355.468	385.647	88.365	72.132	2.468	2.468
5	573.624	587.954	375.154	365.456	82.354	59.657	6.987	6.257
6	566.894	641.259	356.947	299.468	87.125	67.357	4.587	3.796
7	546.357	634.187	362.148	278.253	90.158	76.365	8.354	13.458
8	569.654	559.654	339.658	359.476	92.147	67.365	6.753	11.654
9	573.258	694.187	337.469	364.279	93.125	69.458	5.648	10.987
10	578.659	605.635	357.648	305.126	91.429	69.235	2.657	19.421
平均值	571.984	634.084	353.389	325.105	88.760	71.071	5.509	10.720
标准差	12.613	55.906	12.422	39.270	3.342	5.715	2.065	5.460
变异系数	0.022	0.088	0.035	0.121	0.038	0.080	0.375	0.509

[0090] 实施例6 卡波姆940对于提高检测稳定性的影响

[0091] 1. 纳米颗粒标记检测抗体(纳米颗粒-检测抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(2-(N-吗啉)乙磺酸,50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、20mg EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺),涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入C反应蛋

白(CRP)检测抗体20 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST(磷酸盐吐温缓冲液)洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl缓冲液,1%BSA(牛血清白蛋白),5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0092] 2. 纳米颗粒标记参比抗体(纳米颗粒-参比抗体偶联物):取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于900 $\mu$ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入三聚氰胺单克隆抗体40 $\mu$ g,室温反应2~4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2~4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入2mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl,1%BSA,5%海藻糖)重悬颗粒,备用。

[0093] 3. 结合垫的制备:将结合垫(玻璃纤维)预先置于不同浓度的卡波姆940凝胶中浸泡5min,取出置于65 $^{\circ}$ C烘干,将制备好的纳米颗粒-检测抗体偶联物和纳米颗粒-参比抗体偶联物按照等体积混匀,然后按照3 $\mu$ L/cm喷涂到结合垫上,置于37 $^{\circ}$ C烤箱烘干,备用。

[0094] 4. 试纸条的组装:将硝酸纤维素膜(层析膜)粘贴到PVC底板的中间位置。然后,在相应的位置粘贴好结合垫、样本垫和吸水纸,使样本垫、结合垫、层析膜、吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上,两两之间有约1mm左右的搭接;最后裁成5.5mm宽的免疫层析试纸条。

[0095] 5. 试纸条的处理:在层析膜的中间位置(距离样本垫端30mm处)分别用2mg/ml CRP捕获抗体和2mg/ml三聚氰胺-BSA(牛血清白蛋白)偶联物喷点,分别作为检测区和参比区,该检测区和参比区并排设置在垂直于所述试纸条长边的一横向线,便于检测区和参比区同时与待测样本接触及反应(可参见图1)。置于37 $^{\circ}$ C烘干,然后置于2-8 $^{\circ}$ C、干燥、避光处保存。

[0096] 6. 定量检测血清中CRP:将试纸条平放于水平台面上,滴加180 $\mu$ L血清于样本垫上,静置15min,采用定量检测设备进行定量检测。

[0097] 7. 将制备好的试纸条置于37 $^{\circ}$ C不同时间,取出测定相同浓度的CRP样品,重复测定五次,取平均值。结果如表6所示。可见,添加适量(0.1%-0.2%)卡波姆940可以提高试纸条检测的稳定性。

[0098] 表6 不同浓度卡波姆940对于检测稳定性的影响

卡波姆940浓度(%,重量体积比)	0	0.1	0.2	0.3
测定平均值(mg/L)	12.95	13.42	14.88	10.27
实际值(mg/L)	15	15	15	15
偏离值(%)	-13.67	-10.53	-0.80	-31.53

[0099] 注:偏离值=(测定平均值-实际值)/实际值 $\times$ 100%。

[0100] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制,但凡采用等同替换或等效变换的形式所获得的技术方案,均应落在本发明的保护范围之内。

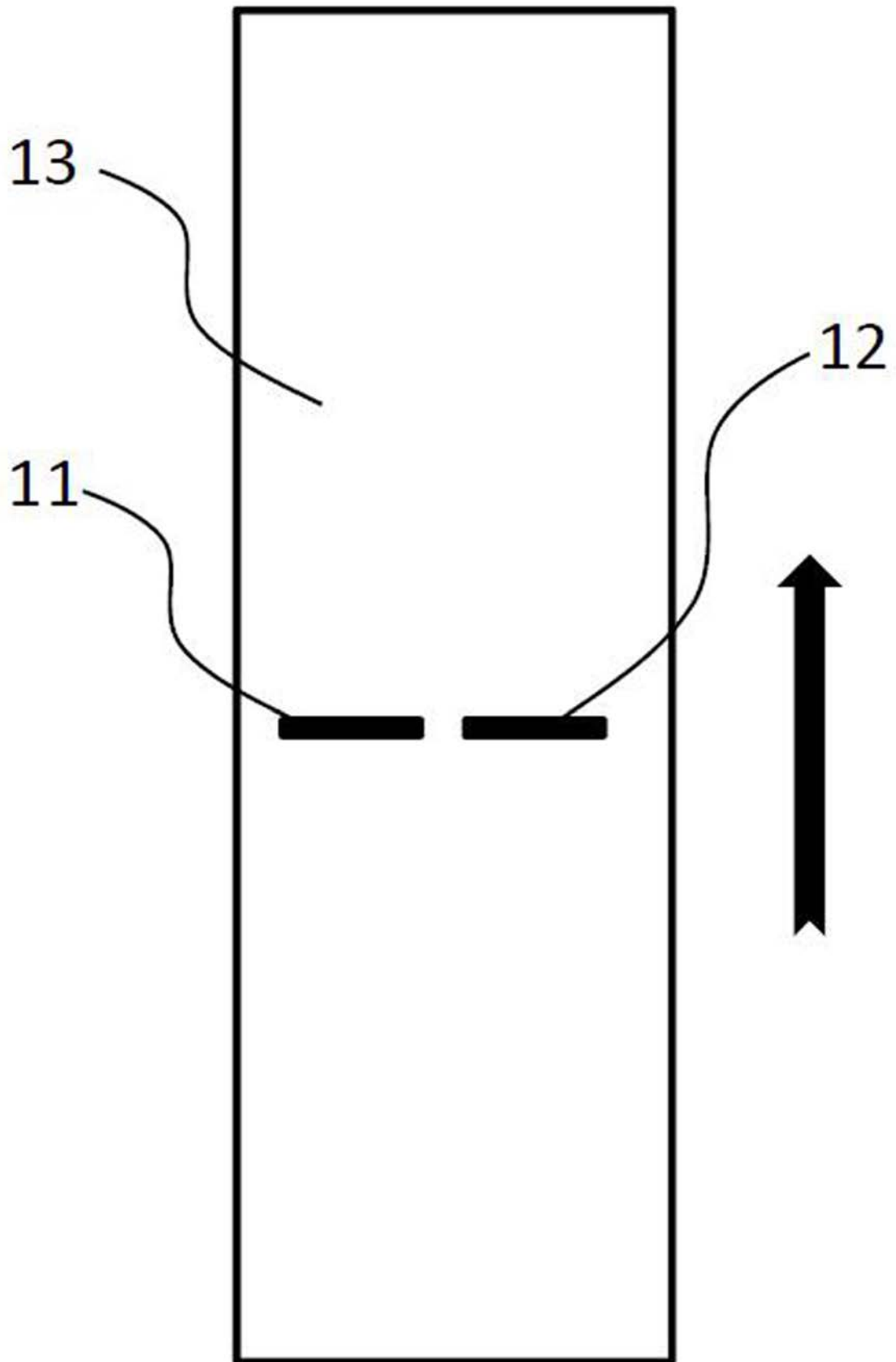


图1

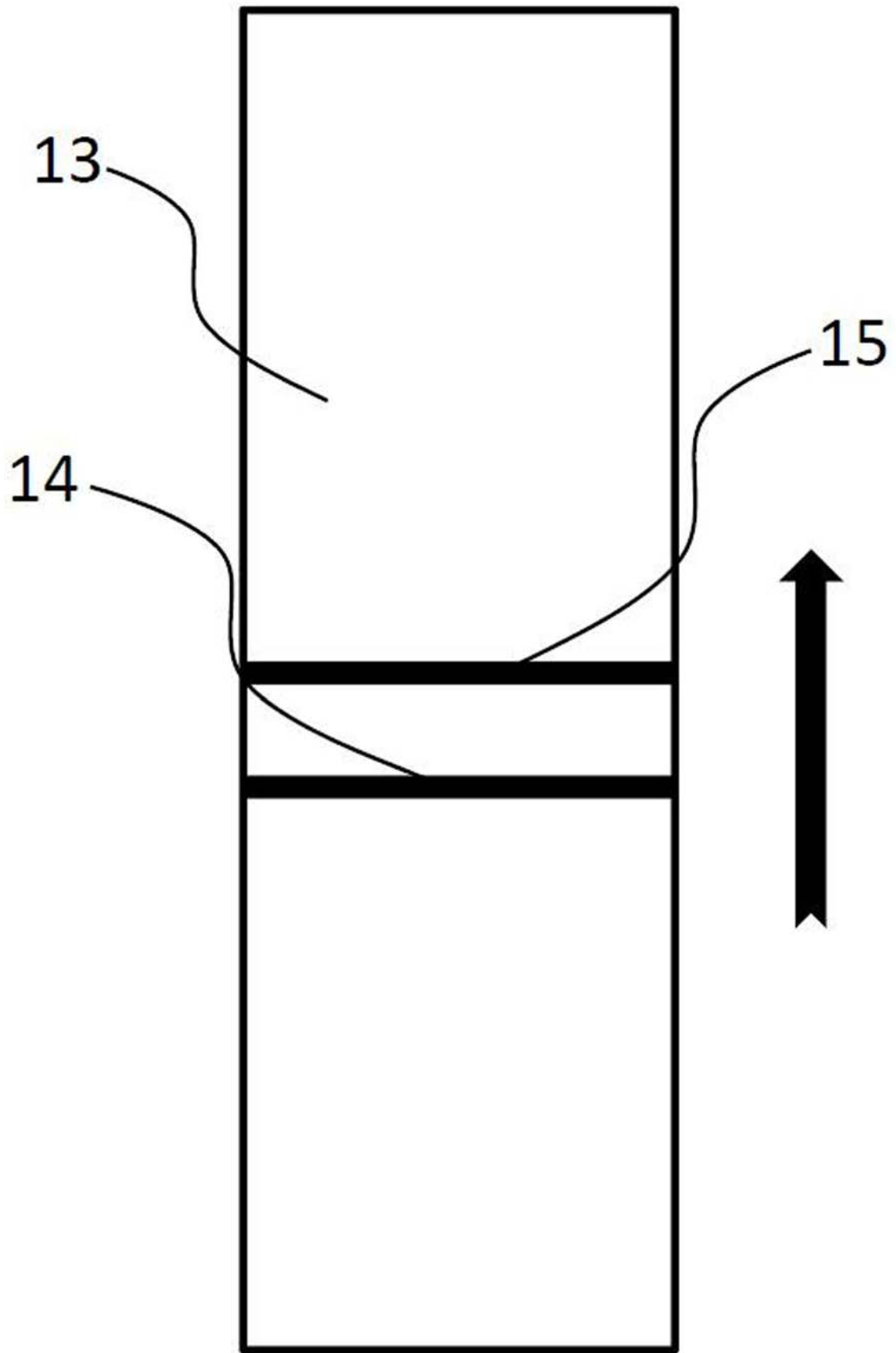


图2

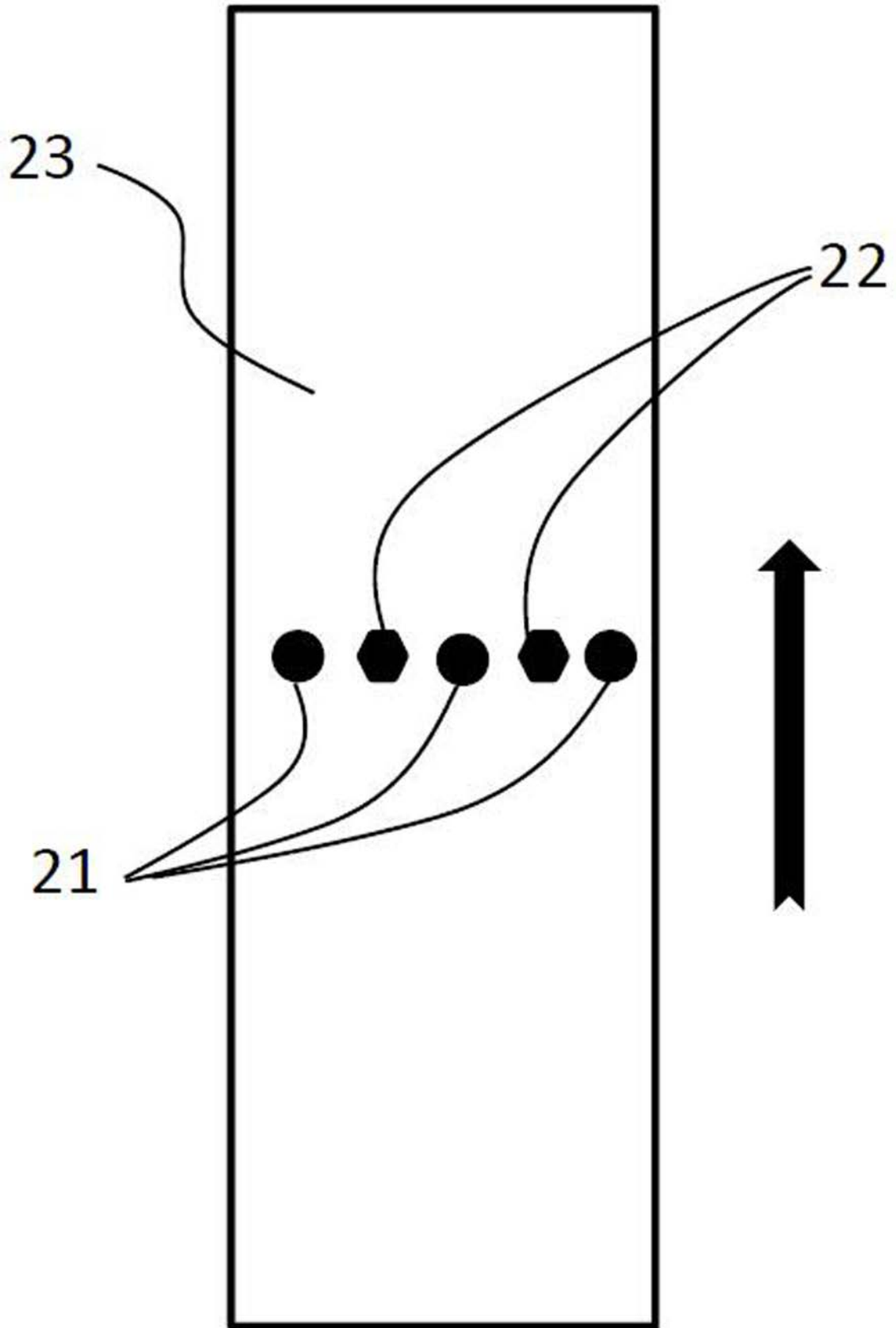


图3

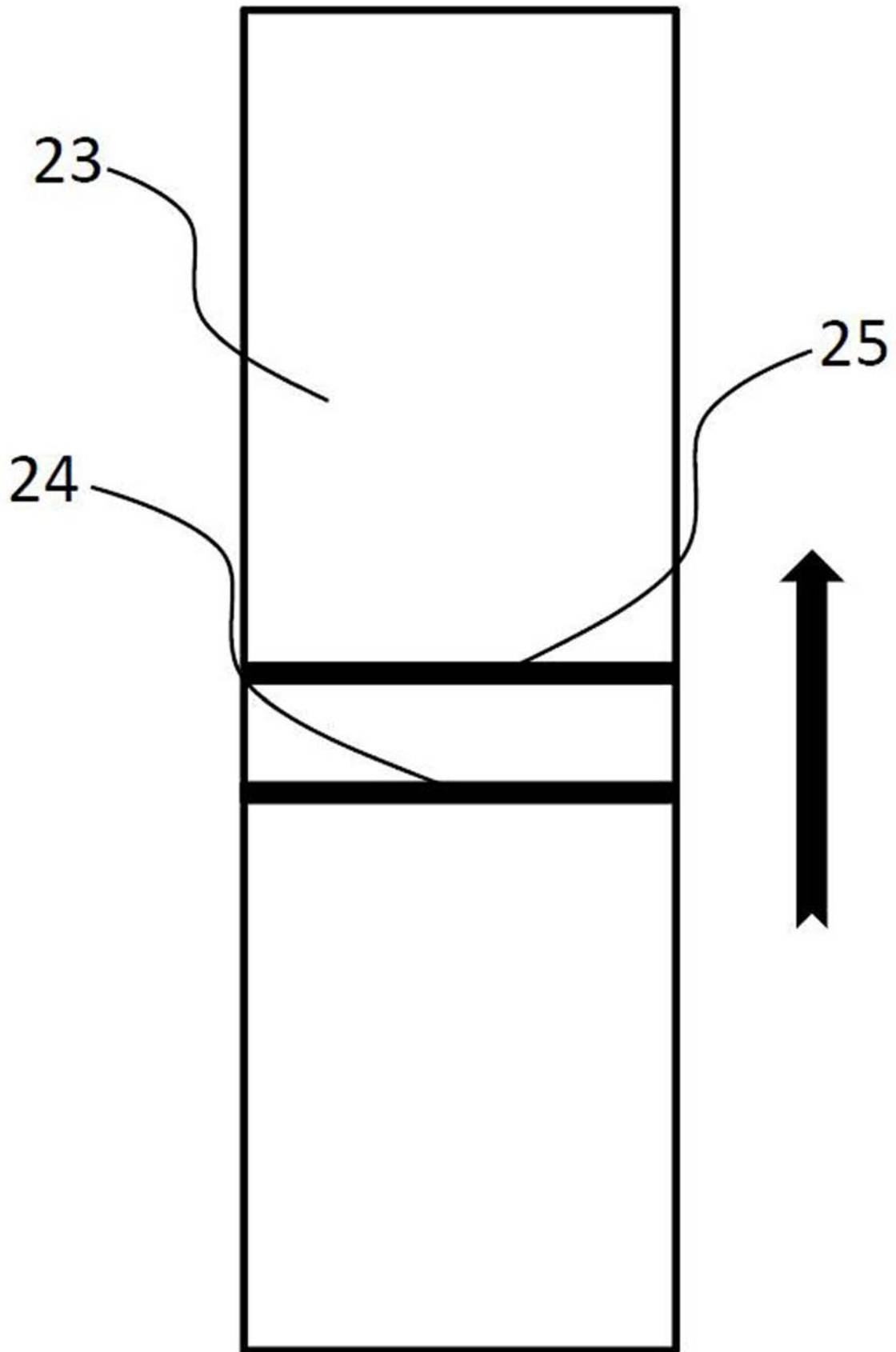


图4

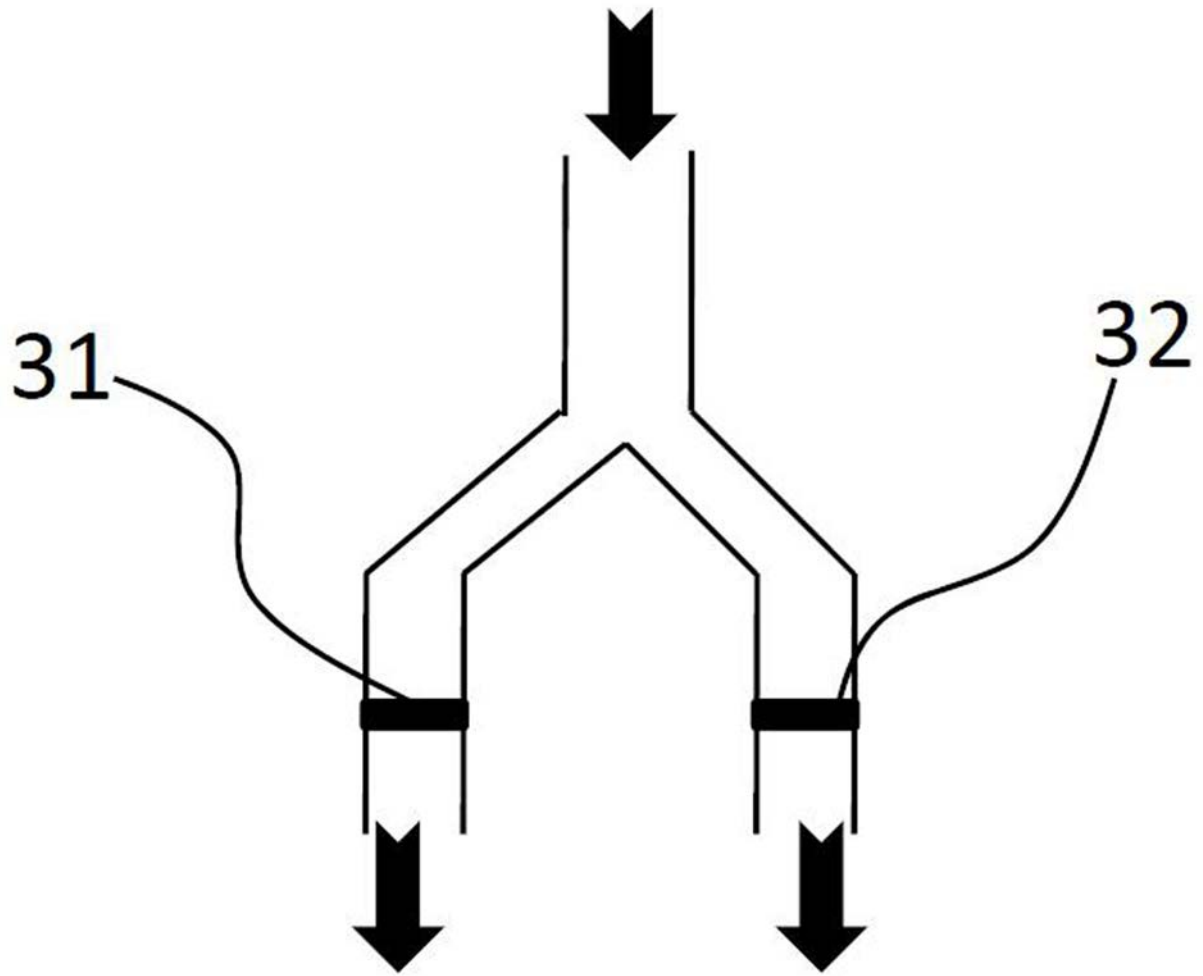


图5

专利名称(译)	一种检测装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN109444413B</a>	公开(公告)日	2019-08-27
申请号	CN201811123774.8	申请日	2018-09-26
[标]发明人	李金峰 柯跃斌 何洁 肖云军 吕子全		
发明人	李金峰 柯跃斌 何洁 肖云军 吕子全		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54306 G01N33/54346 G01N33/558		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN109444413A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测装置，用于定量检测样本中的目标物质的含量。通过比较检测区信号强度和参比区信号强度可以对样本中的目标分子进行定量检测。该检测装置生产成本低，检测结果准确可靠。

血清中 IGFBP-7 浓度	0ng/ml		8ng/ml		24ng/ml		72ng/ml	
	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B	方案 A	方案 B
1	0.004	0.003	123.625	152.368	357.965	438.365	521.652	652.398
2	0.009	0.005	125.354	151.324	352.989	412.524	502.357	643.456
3	0.005	0.004	128.364	142.369	349.635	387.654	532.847	607.354
4	0.011	0.007	124.698	147.654	356.369	379.658	526.369	611.423
5	0.010	0.008	125.365	138.654	355.546	399.621	524.361	697.641
6	0.009	0.007	124.364	187.654	352.145	425.657	528.470	699.112
7	0.007	0.009	124.365	168.365	357.751	432.847	539.453	607.965
8	0.006	0.006	124.658	167.698	356.421	481.354	534.758	539.654
9	0.004	0.006	125.674	154.654	349.657	359.640	540.124	655.458
10	0.005	0.009	126.369	161.523	362.854	386.546	529.999	562.547
平均值	0.007	0.006	125.284	157.226	355.133	410.387	528.039	627.701
标准差	0.003	0.002	1.334	14.531	4.104	35.405	10.880	52.372
变异系数	0.369	0.314	0.011	0.092	0.012	0.086	0.021	0.083