



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107144693 A

(43)申请公布日 2017.09.08

(21)申请号 201710301227.3

(22)申请日 2017.05.02

(71)申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市黄埔大道西601号

(72)发明人 唐勇 肖威 肖盟

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 苏运贞 陈燕娴

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

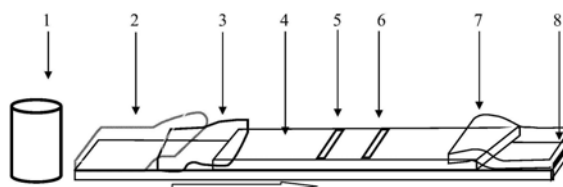
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒及其制备方法。该试剂盒包含样品处理管和试纸条；样品处理管含有全血样品处理液和信号物标记的CD4抗体；试纸条包括底板和在底板上附着有沿层析方向紧密相连的样品垫、滤血层、层析膜层和吸水垫；样品垫部分压在滤血层上，滤血层部分压在层析膜层上，吸水垫部分压在层析膜层上；在层析膜层上设置检测线和质控线，滤血层、检测线、质控线和吸水垫依次排列。本发明能快速检测人体血液中的免疫细胞数量有利于及时快速的对患者免疫功能做出评价，对于各类疾病的诊疗都具有重大意义。



1. 一种检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:包含样品处理管和试纸条;其中,样品处理管含有全血样品处理液和信号物标记的CD4抗体;试纸条包括底板和在底板上附着有沿层析方向紧密相连的样品垫、滤血层、层析膜层和吸水垫;样品垫部分压在滤血层上,滤血层部分压在层析膜层上,吸水垫部分压在层析膜层上;在层析膜层上设置检测线和质控线,滤血层、检测线、质控线和吸水垫依次排列;

所述的全血样品处理液的组成如下:0.02M、pH=7.3~7.4PB缓冲液中加入0.9% (w/v) NaCl、1% (w/v) BSA、1% (w/v) PEG-4000、20% (v/v) 饱和硫酸铵、0.1% (w/v) 肝素钠、0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>;

所述的检测线上设置有羊抗鼠二抗层;

所述的质控线上设置有信号物标记的兔IgG层;

所述的样品垫为通过全血样品垫处理液处理得到,具体步骤如下:每条长×宽=30cm×2cm的样品垫原材料加入5ml全血样品垫处理液,37℃干燥过夜,得到样品垫;其中全血样品垫处理液的组成如下:pH值=7.4、0.015M PBS缓冲液中加入0.5% (w/v) BSA、2% (w/v) 海藻糖、2% (w/v) PEG-4000、0.5% (w/v) Tween-20、0.1% (w/v) 肝素钠、0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>。

2. 根据权利要求1所述的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:还包括外壳,外壳设置于试纸条的外部;在外壳上设置有加样孔和观察孔,加样孔位于样品垫上,观察孔位于层析膜层上检测线和质控线区域。

3. 根据权利要求1所述的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:

所述的全血样品处理液在每支所述的样品处理管中的量为50μL;

所述的信号物标记的CD4抗体在每支所述的样品处理管中的量为1μL按CD4抗体抗体计算为0.01mg/mL的信号物标记的CD4抗体。

4. 根据权利要求1所述的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:

所述的信号物标记的CD4抗体为荧光微球标记的CD4抗体;

所述的信号物标记的兔IgG为荧光微球标记的兔IgG。

5. 根据权利要求4所述的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:

所述的荧光微球标记的CD4抗体通过如下步骤制备得到:在100μL 1% (w/v) 羧基化的荧光微球溶液中加入400μL双蒸水,然后加入20μL 1% (w/v) EDC和10μL 1% (w/v) NHS,混合反应30min,得到活化后的荧光微球溶液;在活化后荧光微球溶液中加入60μL浓度为1mg/mL的CD4抗体溶液,混合均匀,在搅拌的条件下反应2h;接着加入60μL浓度为10% (w/v) 的牛血清白蛋白溶液封闭,搅拌反应1h;离心,弃上清,加入60000μL复溶液重悬沉淀,获得荧光微球标记的CD4抗体;

所述的荧光微球标记的兔IgG,通过如下步骤制备得到:在100μL 1% (w/v) 羧基化的荧光微球溶液中加入400μL双蒸水,然后加入20μL (w/v) EDC和10μL (w/v) NHS,混合反应30min,得到活化后的荧光微球溶液;在活化后荧光微球溶液中加入30μL浓度为2mg/mL的兔IgG溶液,混合均匀,在搅拌的条件下反应2h;接着加入60μL浓度为10% (w/v) 的牛血清白蛋白溶液封闭,搅拌反应1h;离心,弃上清,加入1000μL复溶液重悬沉淀,获得荧光微球标记的兔IgG;

其中,复溶液是0.02M、pH=8.4的PB缓冲液中加入5% (w/v) 蔗糖、5% (w/v) 海藻糖、0.5% (w/v) BSA、0.5% (w/v) 表面活性剂S-17、0.5% (v/v) Tween-20、0.5% (w/v) PEG-4000

和0.01% (w/v)  $\text{NaN}_3$ 。

6. 根据权利要求4或5所述的检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:

所述的荧光微球溶液具有如下特点:荧光微球粒径约为130nm、固含量为1%、羧基含量约为 $75\mu\text{mol/g}$ 、激发波长为468nm、发射波长为508nm。

7. 根据权利要求1所述的检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:

所述的底板的材质为不透水物质;

所述的滤血层的材质为V-9型滤血膜;

所述的层析膜优选为硝酸纤维素膜;

所述的样品垫的材质为玻璃纤维;

所述的吸水垫的材质优选为加厚吸水纸。

8. 根据权利要求7所述的检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒,其特征在于:所述的滤血层由至少两层滤血膜叠加而成。

9. 权利要求1~8任一项所述的检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒的制备方法,其特征包括如下步骤:

(1) 制备样品处理管:

① 配制全血样品处理液:100mL 0.02M、pH值=7.3~7.4的PB缓冲液中加入100mg肝素钠、0.9g  $\text{NaCl}$ 、1g BSA、1g PEG-4000、20ml饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、20mg  $\text{NaN}_3$ ;

② 取一支200 $\mu\text{L}$ 无菌的EP管,加入50 $\mu\text{L}$ 全血样品处理液和1 $\mu\text{L}$ 信号物标记后的 $\text{CD4}$ 抗体,得到样品处理管;

(2) 制备试纸条:

① 用全血样品垫处理液处理样品垫,每条长 $\times$ 宽=30cm $\times$ 2cm的样品垫原材料加入5ml全血样品垫处理液,37 $^\circ\text{C}$ 干燥过夜;全血样品垫处理液的组成如下:100mL PH=7.4 0.015M PBS缓冲液中加入0.5g BSA、2g海藻糖、2g PEG-4000、0.5mL Tween-20、100mg肝素钠、20mg  $\text{NaN}_3$ ;

② 将羊抗鼠二抗和信号物标记后的兔IgG呈直线型包被在层析膜上,分别形成检测线和质控线;

④ 先将步骤②得到的层析膜贴附在底板上,得到层析膜层;接着在靠近层析膜层质控线的一端贴上吸水纸,得到吸水垫,吸水垫的部分在层析膜层上;在远离层析膜层质控线的一端贴上滤血膜,得到滤血层,滤血层的部分位于层析膜层上;再贴上样品垫,样品垫的部分位于滤血层上,得到试纸条;

(3) 将样品处理管和试纸条搭配在一起,得到检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒。

10. 根据权利要求1所述的检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒的制备方法,其特征在于:

步骤(2)中所述的羊抗鼠二抗通过喷金划膜仪包被到层析膜上,羊抗鼠二抗的浓度为1mg/mL时,按1 $\mu\text{l/cm}$ 制备检测线;

步骤(2)中所述的信号物标记的兔IgG通过喷金划膜仪包被到层析膜上,信号物标记的兔IgG稀释14倍后按1 $\mu\text{l/cm}$ 制备质控线。

## 检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检测免疫分析技术领域,特别涉及一种检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 自1981年世界第一例艾滋病病毒感染者发现至今,短短30多年间,艾滋病在全球肆虐流行,已成为重大的公共卫生问题和社会问题,引起世界卫生组织及各国政府的高度重视。

[0003] T淋巴细胞是一类具有抗感染和肿瘤免疫的细胞,它主要分为CD4<sup>+</sup>T细胞与CD8<sup>+</sup>T细胞。CD4<sup>+</sup>T细胞主要起辅助体液免疫和细胞免疫激活的作用。CD4<sup>+</sup>T细胞表面的CD4分子是艾滋病病毒的受体,当HIV病毒进入人体后,它感染并损坏CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞,导致机体体液免疫和细胞免疫被抑制,致使整个人体免疫功能遭到破坏,最终丧失对各种疾病的抵抗能力而导致死亡。因此可通过CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞记数能够直接反映HIV感染患者免疫系统损害状况。

[0004] 正常成人的CD4<sup>+</sup>T细胞为每微升的血液中含有500~1600个,艾滋病病毒感染者的CD4<sup>+</sup>T细胞可能会出现进行性或不规则性下降,提示感染者的免疫系统受到了严重损害,当每微升血液中CD4<sup>+</sup>T细胞小于200个时就可能会发生多种严重的机会性感染或肿瘤。目前最新规定每微升血液中HIV感染者的CD4<sup>+</sup>T细胞数量水平低于350个就应该开始进行治疗。

[0005] 目前检查艾滋病的主要方法包括:(1) 机体免疫功能检查,主要包括CD4<sup>+</sup>T细胞数量检测和CD4<sup>+</sup>T细胞与CD8<sup>+</sup>T细胞比值检测;(2) PCR技术检测HIV病毒核酸;(3) HIV抗体和抗原检测,采用酶联免疫吸附法、免疫荧光检测法、免疫印迹检测法、侧向层析试纸法、明胶颗粒凝集试验、放射免疫沉淀法等。CD4<sup>+</sup>T细胞数量检测相比于病毒核酸检测和病毒抗体检测,能更加直观的反应出患者的免疫状态,为患者提供合适的治疗时机和治疗方式,从而达到精准治疗、精确用药的目的,对于艾滋病的治疗防控具有重要意义。而目前针对CD4<sup>+</sup>T细胞数量检测主要方法包括流式细胞术法、微流控芯片计数法以及显微镜人功计数法。流式细胞术法和微流控芯片计数法,具有检测样本量大和检测准确率高等优势。但需要昂贵的流式细胞仪或者微流控操控平台、专业的实验技术人员和特定的实验环境等条件。这些条件不利于艾滋病的实时防控,也不利于艾滋病的精准诊疗在资源匮乏的国家和地区的普及。显微镜人功计数法,相比流式细胞术检测成本更低,仪器要求更低,适合普通检测实验室,但同样需要专业的技术人员在实验室检测、操作繁琐、人为误差大,不适合快速检测和现场检测。

[0006] 综合上所述:已上方法都普遍存在如下几个问题:第一,需要昂贵的仪器设备;第二,需要专业的检测实验室和专业的技术人员;第三,大部分仪器成本和检测成本昂贵难以普及。侧向层析试纸条在诊断领域的应用具有如下优点:第一,无需大型仪器设备;第二,操作简单,无需专业技术人员可用于现场检测;第三,检测成本低,检测速度快,适合推广应用。但目前市面上的侧向层析试纸用于检测诊断领域主要的检测对象是血清或血浆中的蛋白分子或核酸分子,而对于全血的检测,特别是针对血液中细胞数量检测侧向层析技术还

是一片空白。

### 发明内容

[0007] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒。

[0008] 本发明的另一目的在于提供上述侧向层析试剂盒的制备方法。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,包含样品处理管和试纸条;其中,样品处理管含有全血样品处理液和信号物标记的CD4抗体(信标CD4抗体);试纸条包括底板和在底板上附着有沿层析方向紧密相连的样品垫、滤血层、层析膜层和吸水垫;样品垫部分压在滤血层上,滤血层部分压在层析膜层上,吸水垫部分压在层析膜层上;在层析膜层上设置检测线(T线)和质控线(C线),滤血层、检测线、质控线和吸水垫依次排列。

[0010] 所述的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒,还包括外壳,外壳设置于试纸条的外部;在外壳上设置有加样孔和观察孔,加样孔位于样品垫上,观察孔位于层析膜层上检测线和质控线区域。塑料外壳的作用是防止试纸条受到污染以及便携易用。

[0011] 所述的全血样品处理液的组成如下:0.02M、pH=7.3~7.4PB缓冲液中加入0.9% (w/v) NaCl、1% (w/v) BSA、1% (w/v) PEG-4000、20% (v/v) 饱和硫酸铵(22±3℃)、0.1% (w/v) 肝素钠、0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>。

[0012] 所述的全血样品处理液在每支所述的样品处理管中的量优选为50μL。

[0013] 所述的信号物标记的CD4抗体在每支所述的样品处理管中的量优选为1μL按CD4抗体计算为0.01mg/mL的信号物标记的CD4抗体。

[0014] 所述的信号物标记的CD4抗体优选为荧光微球标记的CD4抗体。

[0015] 所述的荧光微球标记的CD4抗体,优选为通过如下步骤制备得到:在100μL 1% (w/v) 羧基化的荧光微球溶液中加入400μL双蒸水,然后加入20μL 1‰ (w/v) EDC(碳二亚胺)和10μL 1‰ (w/v) NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),混合反应30min,得到活化后的荧光微球溶液;在活化后荧光微球溶液中加入60μL浓度为1mg/mL的CD4抗体溶液,混合均匀,在搅拌的条件下反应2h;接着加入60μL浓度为10% (w/v) 的牛血清白蛋白溶液封闭,搅拌反应1h;离心,弃上清,加入60000μL复溶液重悬沉淀,获得荧光微球标记的CD4抗体;其中,复溶液是0.02M、pH=8.4的PB缓冲液中加入5% (w/v) 蔗糖、5% (w/v) 海藻糖、0.5% (w/v) BSA、0.5% (w/v) 表面活性剂(S-17)、0.5% (v/v) Tween-20、0.5% (w/v) PEG-4000和0.01% (w/v) NaN<sub>3</sub>。

[0016] 所述的荧光微球溶液优选为为度生物的黄绿色荧光微球溶液,荧光微球粒径约为130nm、固含量为1% (即1mL的溶液中含有10mg微球颗粒)、羧基含量约为75μmol/g、激发波长为468nm、发射波长为508nm。

[0017] 所述的离心的条件优选为12000rpm离心15min。

[0018] 所述的底板的材质为不透水物质,优选为塑料,更优选为聚氯乙烯(PVC)。

[0019] 所述的滤血层的材质优选为V-9型滤血膜。

[0020] 所述的滤血层由至少两层滤血膜叠加而成;优选由三层滤血膜叠加而成;更优选为长度为1.25cm的滤膜、长度为1cm的滤膜和长度为0.75cm的滤膜从上到下依次叠加,其中挨着层析膜层的滤血层一端是平整的。滤血层的主要功能是过滤血液中的血细胞。检测的

血液样本量一般为50-100 $\mu$ l,如果采用单层膜过滤,膜长度已经超出了试纸条的底板长度。通过实验研究,发现如果采用三层滤血膜,在达到实验效果的同时也节约直线长度。

[0021] 所述的层析膜优选为硝酸纤维素膜。

[0022] 所述的检测线(T)上设置有羊抗鼠二抗层。羊抗鼠二抗用来识别信号物标记的鼠源CD4<sup>+</sup>抗体。由于CD4抗原市场价格昂贵且不稳定,如果使用其作为T线包被抗原,将造成检测成本过高,不适合产品推广。通过实验验证,羊抗鼠二抗对鼠源的CD4<sup>+</sup>抗体具有优秀的捕获能力,可以满足实验要求,并且制作成本下降了将近100倍。

[0023] 所述的质控线(C)上设置有信号物标记的兔IgG层。质控线在整个系统中主要有两个作用:第一作为产品的质量控制,直接判断产品是否有效;第二作为比色指标,可以通过T线和C线的比值反应检测信号强度,消除误差干扰。

[0024] 所述的信号物标记的兔IgG优选为荧光微球标记的兔IgG。

[0025] 所述的荧光微球标记的兔IgG,优选为通过如下步骤制备得到:在100 $\mu$ L 1% (w/v) 羧基化的荧光微球溶液中加入400 $\mu$ L双蒸水,然后加入20 $\mu$ L (w/v) EDC(碳二亚胺)和10 $\mu$ L (w/v) NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),混合反应30min,得到活化后的荧光微球溶液;在活化后荧光微球溶液中加入30 $\mu$ L浓度为2mg/mL的兔IgG溶液,混合均匀,在搅拌的条件下反应2h;接着加入60 $\mu$ L浓度为10% (w/v)的牛血清白蛋白溶液封闭,搅拌反应1h;离心,弃上清,加入1000 $\mu$ L复溶液重悬沉淀,获得荧光微球标记的兔IgG;其中,复溶液是0.02M、pH=8.4的PB缓冲液中加入5% (w/v)蔗糖、5% (w/v)海藻糖、0.5% (w/v)BSA、0.5% (w/v)表面活性剂(S-17)、0.5% (v/v)Tween-20、0.5% (w/v)PEG-4000和0.01% (w/v)NaN<sub>3</sub>。

[0026] 所述的荧光微球溶液优选为为度生物的黄绿色荧光微球溶液,荧光微球粒径约为130nm、固含量为1% (1mL的溶液中含有10mg微球颗粒)、羧基含量约为75 $\mu$ mol/g、激发波长为468nm、发射波长为508nm。

[0027] 所述的离心的条件优选为12000rpm离心15min。

[0028] 所述的样品垫的材质优选为玻璃纤维。

[0029] 所述的样品垫为通过全血样品垫处理液处理得到,具体步骤如下:每条长 $\times$ 宽=30cm $\times$ 2cm的样品垫原材料加入5ml全血样品垫处理液,37 $^{\circ}$ C干燥过夜,湿度低于30%、常温保存;其中全血样品垫处理液的组成如下:pH值=7.4、0.015M PBS缓冲液中加入0.5% (w/v)BSA、2% (w/v)海藻糖、2% (w/v)PEG-4000、0.5% (v/v)Tween-20、0.1% (w/v)肝素钠、0.02% (w/v)NaN<sub>3</sub>。

[0030] 所述的吸水垫的材质优选为加厚吸水纸。

[0031] 所述的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0032] (1)制备样品处理管:

[0033] ①配制全血样品处理液:100mL 0.02M、pH值=7.3~7.4的PB缓冲液中加入100mg肝素钠、0.9g NaCl、1g BSA、1g PEG-4000、20mL饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(22 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)、20mg NaN<sub>3</sub>;

[0034] ②取一支200 $\mu$ L EP管(无菌),加入50 $\mu$ L全血样品处理液和1 $\mu$ L信号物标记后的CD4抗体,得到样品处理管;该样品处理管在23 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C可保存1周,4 $^{\circ}$ C可保存1个月,-20 $^{\circ}$ C可保存3~6个月;

[0035] (2)制备试纸条:

[0036] ①用全血样品垫处理液处理样品垫,每条长 $\times$ 宽=30cm $\times$ 2cm的样品垫原材料加

入5ml全血样品垫处理液,37℃干燥过夜,湿度低于30%、常温保存;全血样品垫处理液的组成如下:pH值=7.4、0.015M PBS缓冲液中加入0.5% (w/v) BSA、2% (w/v) 海藻糖、2% (w/v) PEG-4000、0.5% (v/v) Tween-20、0.1% (w/v) 肝素钠、0.02% (w/v)  $\text{NaN}_3$ ;

[0037] ②将羊抗鼠二抗和信号物标记后的兔IgG呈直线型包被在层析膜上,分别形成检测线和质控线;

[0038] ④先将步骤②得到的层析膜贴附在底板上,得到层析膜层;接着在靠近层析膜层质控线的一端贴上吸水纸,得到吸水垫,吸水垫的部分在层析膜层上;在远离层析膜层质控线的一端贴上滤血膜,得到滤血层,滤血层的部分位于层析膜层上;再贴上样品垫,样品垫的部分位于滤血层上,得到试纸条;

[0039] (3) 将样品处理管和试纸条搭配在一起,得到检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒。

[0040] 步骤(2)中所述的羊抗鼠二抗优选通过喷金划膜仪包被到层析膜上,羊抗鼠二抗的浓度为1mg/mL时,按 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 制备检测线。

[0041] 步骤(2)中所述的信号物标记的兔IgG优选通过喷金划膜仪包被到层析膜上,信号物标记的兔IgG稀释14倍后按 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 制备质控线。

[0042] 本发明的是基于细胞阻断竞争法原理:向样品处理管中加入待测的全血样品,样品经全血样本处理液稀释和前处理,降低纤维蛋白等杂质的干扰,同时样品处理管中的信标CD4抗体对样本进行染色,形成信标CD4抗体和 $\text{CD4}^+$ T细胞复合物;然后,将反应后的混合物滴加到试纸条上,首先,经过样品垫处理,样品垫中含有蛋白质、缓冲物质、封闭剂、亲水性大分子物质、表面活性剂和抗凝剂等,这些物质使得样本的渗透率下降,调节溶液pH并为NC膜上的免疫反应提供一个最佳的反应环境;其次,样品中的全部细胞(包括信标CD4抗体和 $\text{CD4}^+$ T细胞复合物)会被阻隔在滤血层,而样品中的其他物质(包括血浆、样品处理液和余下的信标CD4抗体)通过滤血层到达NC膜;NC膜上的羊抗鼠二抗捕获信标CD4抗体形成检测信号。当检测样本中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量足够多,能够将样品处理管中的信标CD4抗体大部分或全部结合时,检测线上的羊抗鼠二抗无法捕获或只能少量捕获信标CD4抗体而没有颜色显示或颜色强度较弱,而质控线上的信号物标记的兔IgG作为固定的信号对比线,检测线通过与其对比而判读细胞数量,在检测线颜色强度低于质控线颜色强度的这种情况判读为阴性;当血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量较少时,不足以与样品处理管中信标CD4抗体完全结合,从而存在信标CD4抗体通过滤血层而被检测线上的羊抗鼠二抗捕获,检测线有颜色显示,并且颜色强度大于等于质控线颜色强度,这种情况判读为阳性。

[0043] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:本发明能快速检测人体血液中的免疫细胞数量有利于及时快速的对患者免疫功能做出评价,对于各类疾病的诊疗都具有重大意义。本发明提供的检测血液中 $\text{CD4}^+$ T细胞数量的侧向层析试剂盒是在目前传统的侧向层析试纸条结构基础上进行了重新的设计与改进,并加入了样品前处理环节,此技术突破了传统的免疫层析检测技术对检测样本对象的局限性,将免疫层析检测技术扩展到了一个全新的检测领域,及血液中细胞的数量检测领域,推动了侧向层析技术发展,建立了一种血液中细胞数量检测的新方法。本技术对原材料要求低,只需要单一的一种细胞膜表面特异抗体就能建立对应细胞的数量检测方法,具有检测目标的广泛性。本技术相对于传统的细胞检测技术具有操作简单、仪器便携、检测成本低等优点,此发明将弥补现如今市场上所缺

乏的一种可以在非专业实验室和非专业实验人员操作下,利用便携式设备进行的,能简便、高效的对艾滋病患者的免疫状态进行诊断和治疗预后的产品。此技术样品处理时间为15min,检测时间为15min,根据CD4抗体标记的信号物不同可以采用目测(胶体金)和仪器检测(荧光微球、量子点)两种结果读取方式,可以直接判读出阴阳性结果或者通过后期数据处理得到具体细胞数量。

### 附图说明

[0044] 图1是本发明提供的检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒的结构示意图;其中,1-反应管、2-样品垫、3-滤血层、4-层析膜层、5-检测线、6-质控线、7-吸水垫、8-底板;箭头表示层析液流动方向。

[0045] 图2是本发明提供的试纸条检测比例稀释的血液样本,并通过检测线上荧光强度和质控线上荧光强度的比值和样本稀释比例得到的曲线图;其中,不规则曲线为检测值得到的曲线,斜直线为拟合曲线。

[0046] 图3是本发明提供的试纸条检测通过比例稀释得到的CD4细胞数量梯度样本,并通过检测线上荧光强度和质控线上荧光强度的比值和细胞数量得到的曲线图;其中,内嵌不规则曲线图为检测得到的曲线,外部斜直线图为以50个细胞/ $\mu\text{L}$ ~500个细胞/ $\mu\text{L}$ 细胞梯度的检测荧光强度的比值得到的拟合曲线。

[0047] 图4是本发明全血样品垫处理液配方优化结果图;其中图a为四种样品垫的测试结果图;图b为全血样品垫4处理液中肝素钠含量优化结果图;图c为全血样品垫4处理液中PEG-400含量优化结果图;图d为全血样品垫4处理液中BSA含量优化结果图;图e为全血样品垫4处理液中Tween-20含量优化结果图;图f为全血样品垫4处理液中海藻糖含量优化结果图。

### 具体实施方式

[0048] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0049] 实施例1

[0050] 检测血液中CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试剂盒的制备方法及应用:

[0051] 1、主要试剂材料,如表1所示:

[0052] 表1

[0053]

试剂名称	生产商
鼠源的 CD4 抗体(OKT4)	天津三箭生物科技有限公司
羊抗鼠 IgG (Whole)	Sigma-Aldrich
黄绿色荧光微球 (Fluorescent Nanoparticles, FNPs)	江苏为度生物科技有限公司
兔 IgG	索莱宝
BD Trucount™ Tubes	BD
CD3CD4CD45 荧光抗体	BD
混合染色液	
FACS 溶血素	BD
柠檬酸三钠	Sigma-Aldrich
氯金酸 (HAuCl <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
牛血清白蛋白 (BSA)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
S17	Sigma-Aldrich
海藻糖	Merck
蔗糖	天津永大化学试剂公司
PVP 40000	Amresco
PEG-4000	Merck

[0054]

碳二亚胺 (EDC)	Sigma-Aldrich
N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)	Sigma-Aldrich
氯化钠 (NaCl)	广州化学试剂厂
硫酸铵 ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	广州化学试剂厂
磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	广州化学试剂厂
氯化钾 (KCl)	广州化学试剂厂
二水合磷酸二氢钠 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	广州化学试剂厂
十二水合磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	广州化学试剂厂
硝酸纤维素膜	Milliproc
滤血膜	上海捷宁生物技术
聚酯纤维膜 (结合垫)	上海捷宁生物技术
玻璃纤维膜 (样品垫)	上海捷宁生物技术
PVC 背板	上海捷宁生物技术
吸水纸	上海捷宁生物技术

[0055] 2、主要使用仪器,如表2所示:

[0056] 表2

	仪器名称	生产商
	BD Accuri® C6	BD, USA
	荧光读卡仪	广州蓝勃生物科技有限公司
	超纯水系统	Millipore, USA
	磁力搅拌器	鄞城现代试验仪器厂
	超声清洗仪	鄞城现代试验仪器厂
[0057]	低温高速离心机	Eppendorf, Germany
	喷金划膜仪	Biodot, USA
	切条机	杭州峰航科技
	电子天平	AND HR-120
	低温冰箱	西门子
	鼓风干燥箱	上海博远实业有限公司
	恒温恒湿储物柜	上海博远实业有限公司
[0058]	3、主要溶液的配制:	
[0059]	(1) 1% (m/v) 柠檬酸三钠溶液:称取1g柠檬酸三钠溶解于100mL超纯水;	
[0060]	(2) 1% (m/v) 氯金酸溶液:将1g氯金酸溶解于100mL超纯水;	
[0061]	(3) 0.25mol/L K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 溶液:称取3.45g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 溶解于100mL超纯水;	
[0062]	(4) 1‰ (m/v) EDC溶液:称取1mg EDC溶解于1mL超纯水;	
[0063]	(5) 1‰ (m/v) NHS:称取1mg NHS溶解于1mL超纯水;	
[0064]	(6) 10% (m/v) BSA溶液:称取10g BSA溶于100mL超纯水中;	
[0065]	(7) 0.15mol/L, PBS缓冲液 (10×), pH 7.4:NaCl 80g、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2g、KCl 2g、Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O 29g,加入1000mL双蒸水中溶解;	
[0066]	(8) 0.2mol/L, PB缓冲液 (10×), pH 7.4:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4g、Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O 29g,加入1000mL双蒸水中溶解,pH调节到7.4;	
[0067]	(9) 0.2mol/L, PB缓冲液 (10×), pH 8.4:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4g、Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O 29g,加入1000mL双蒸水中溶解,pH调节到8.4;	
[0068]	(10) 复溶液:	
	海藻糖	5 % 1g
	蔗糖	5 % 1g
[0069]	BSA	0.5 % 0.1 g
	PEG 4000	0.1 % 20 mg
	Tween-20	0.5% 100 μL
	S-17	0.5% 100 mg
[0070]	加入到20mL 0.02mol/L pH=8.4的pB缓冲液中溶解;	
[0071]	(10) 饱和硫酸铵:硫酸铵500g,用500mL双蒸水水浴60℃搅拌溶解,冷却到室温,瓶底有晶体析出即可。	
[0072]	(11) 全血样品垫1处理液:100mL pH=7.4、0.015M PBS缓冲液 (1×) 中加入1g BSA、1g海藻糖、1g PEG-4000、1mL Tween-20、20mg NaN <sub>3</sub> 。	

[0073] (12) 全血样品垫2处理液:100mL pH=7.4、0.015M PBS缓冲液(1×)中加入0.8g NaCl、1g酸水解酪素、1g海藻糖、1g PEG-4000、1g PVP-40K、20mg NaN<sub>3</sub>。

[0074] (13) 全血样品垫3处理液:100mL pH=7.4、0.015M PBS缓冲液(1×)中加入0.8g NaCl、1g BSA、1g海藻糖、1g PEG-4000、1mL Tween-20、100mg肝素钠、20mg NaN<sub>3</sub>。

[0075] (14) 全血样品垫4处理液:100mL pH=7.4、0.015M PBS缓冲液(1×)中加入1g BSA、1g海藻糖、1g PEG-4000、1mL Tween-20、100mg肝素钠、20mg NaN<sub>3</sub>。

[0076] (15) 优化后的全血样品垫处理液:pH值=7.4、0.015M PBS缓冲液中加入0.5% (w/v) BSA、2% (w/v) 海藻糖、2% (w/v) PEG-4000、0.5% (v/v) Tween-20、0.1% (w/v) 肝素钠、0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>。

[0077] (16) 全血样品处理液:100mL pH=7.4、0.02M PB缓冲液中加入0.9g NaCl、1g BSA、1g PEG-4000、20mL饱和硫酸铵(22±3℃)、100mg肝素钠、20mg NaN<sub>3</sub>。

[0078] 4、试剂盒的制备

[0079] 4.1 荧光微球

[0080] 购于为度生物有限公司,粒径130nm,固含量1mg/mL,激发波长468nm,发射波长508nm。

[0081] 4.2 荧光微球标记的兔IgG的制备

[0082] 100μL羧基化的荧光微球溶液中加入400μL ddH<sub>2</sub>O,然后加入20μL (w/v) EDC和10μL (w/v) NHS,混合反应30min;然后加入60μL兔IgG(1mg/mL)混合均匀,在搅拌的条件下反应2h;加入60μL 10%牛血清白蛋白封闭,搅拌反应1h;最后12000rpm离心15min弃上清,加入10000μL复溶液重悬沉淀,并用超声清洗仪高频和低频各清洗6min使溶液充分重悬,获得荧光微球标记的兔IgG(FNPs-兔IgG),4℃保存。

[0083] 4.3 荧光微球标记的CD4抗体的制备

[0084] 100μL羧基化的荧光微球溶液中加入400μL ddH<sub>2</sub>O,然后加入20μL (w/v) EDC和10μL (w/v) NHS,混合反应30min;然后加入60μL CD4抗体(1mg/mL)混合均匀,在搅拌的条件下反应2h;加入60μL 10%牛血清白蛋白封闭,搅拌反应1h;最后12000rpm离心15min弃上清,加入10000μL复溶液重悬沉淀,并用超声清洗仪高频和低频各清洗6min使溶液充分重悬,获得荧光微球标记的CD4抗体,4℃保存。

[0085] 4.4 样品垫的处理

[0086] 样品垫处理:每条长×宽=30cm×2cm的样品垫原材料加入5ml优化后的全血样品垫处理液,37℃干燥过夜,湿度低于30%、常温保存。

[0087] 5、基于荧光微球信号系统的检测人体血液中的CD4<sup>+</sup>T细胞数量的免疫层析试纸条的组装

[0088] 如图1所示,基于荧光微球信号系统的检测人体血液中的CD4<sup>+</sup>T细胞数量的侧向层析试纸条检测系统包括反应管1、样品垫2、滤血层3、层析膜4、检测线5、质控线6、吸水垫7、底板8。

[0089] 反应管1加入50μL全血样品处理液,然后用微量移液器量取1μL荧光微球标记的CD4抗体加入到反应管1中;把羊抗鼠IgG(1mg/mL)和稀释14倍的FNPs-兔IgG用喷金划膜仪以1μL/cm的量包被到层析膜(硝酸纤维素膜)4上,作为检测线5和质控线6,并且在37℃烘箱烘3h。在底板8上顺次相互搭接样品垫2、滤血层3、层析膜4和吸水垫7,得到的试纸板按要求

切割成3.51mm(宽度)的试纸条。再装进塑料卡壳(塑料卡壳开有加样孔和检测孔,加样孔的位置位于样品垫位置;检测孔的位置位于检测线所在区域)组成完整的基于荧光微球信号系统的CD4<sup>+</sup>T细胞数量检测的免疫层析试纸条。

[0090] 一个效果更佳的试纸条,是滤血层3为三层,长度为1.25cm的滤膜、长度为1cm的滤膜和长度为0.75cm的滤膜从上到下依次叠加,其中挨着层析膜层的滤血层一端是平整的。

[0091] 6、基于荧光试纸条检测CD4细胞数量

[0092] 6.1试纸条检测流程

[0093] 取50 $\mu$ L抗凝全血加入到样品处理管中,轻微吸打混匀,反应15min;从样品处理管中取75 $\mu$ L反应后的液体加入到试纸条的加样孔,15min用荧光读卡仪判读。

[0094] 6.2检测比例稀释的血液样本

[0095] 将正常人的全血样本进行比例稀释到不同百分浓度(0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%),相应细胞也会随此呈现出不同的浓度梯度,然后按照试纸检测流程操作。结果如图2所示:通过计算检测线上荧光强度和质控线上荧光强度的比值,绘制曲线,并拟合。本试纸条可以明显的区分不同比例稀释下的全血样本。

[0096] 6.3检测不同CD4细胞浓度数量的稀释样本

[0097] A:绝对计数:1)、用肝素钠真空抗凝管抽取正常人的静脉血样本;2)、用移液器吸取20 $\mu$ L荧光抗体混合染色液(流式绝对计数自带的流式抗体染色液CD<sub>3</sub>CD<sub>4</sub>CD<sub>45</sub>三色流式抗体)加到BD Trucount TMTubes上方,请勿接触到颗粒;3)、用移液器吸取50 $\mu$ L抗凝全血加到BD Trucount TMTubes上方,请勿接触到管壁;4)、盖上计数管盖,并轻轻地进行涡旋混合,在室温(20~30 $^{\circ}$ C)避光环境下孵育15min;5)、向计数管中添加450 $\mu$ L的1 $\times$ FACS溶血素,盖上计数管盖,并轻轻地进行涡旋混合,在室温避光反应15min;6)、将样本上流式细胞仪进行分析。

[0098] B:试纸条检测:1)、通过流式得到的数据进行分析计算,得到样本的细胞数为689个细胞/ $\mu$ L;2)、按照CD4细胞数量梯度(0个细胞/ $\mu$ L、50个细胞/ $\mu$ L、100个细胞/ $\mu$ L、200个细胞/ $\mu$ L、300个细胞/ $\mu$ L、400个细胞/ $\mu$ L、500个细胞/ $\mu$ L、600个细胞/ $\mu$ L)对样本进行稀释,制备得到不同的CD4细胞数量的全血样本;3)、按照试纸条检测流程进行检测。检测结果如图3所示:通过计算检测线上荧光强度和质控线上荧光强度的比值,绘制曲线,并得到相关标准曲线,相关性良好可用于全血中CD4细胞数量的定量分析。

[0099] 7、结果观察

[0100] 阳性结果为检测线和质控线出现荧光,阴性结果为只有质控线出现荧光;若质控线没有荧光,则该试纸条无效。胶体金试纸条的灵敏度太低无法满足检测要求,荧光试纸条在50~500个细胞/ $\mu$ L的范围内具有良好的相关性,满足检测要求。

[0101] 实施例2滤血膜的设计优化

[0102] 首先从市场上挑选了几种常见的滤血膜,进行了材料性价比的评价,最后选定上海捷宁生物科技有限公司的V-9型滤血膜。将V-9型滤血膜裁剪成不同长度(0.5cm、0.75cm、1.0cm、1.25cm、1.5cm、1.75cm、2.0cm),按实施例1进行试纸条组装,然后加入75 $\mu$ L全血样本,当滤血膜长度达到2.0cm能将75 $\mu$ L全血样本中的血细胞过滤干净,NC膜上不会出现血细胞的干扰免疫反应和信号发生。然而实验室的试纸条全长只有6.0cm,吸水垫长1.5cm、NC膜长2.5cm、前端(样品垫、滤血层)只剩2.0cm,这种试纸条结构无法满足要求。因此采用了一

种一端对齐的三层叠加结构(0.75cm、1.0cm、1.25cm),叠加后的滤血层长度为1.25cm,结构满足要求,同时能将75 $\mu$ L全血样本中的血细胞过滤干净,不会干扰免疫反应和信号发生

[0103] 实施例3对样品垫及全血样品垫处理液进行优化

[0104] (1) 样品垫的处理和组装

[0105] ①选择4种广泛使用得血液检测样品垫处理液配方配置样品垫处理液,用选用玻璃纤维膜(上海捷宁公司提供)作为样品垫原材,用全血样品垫1处理液、全血样品垫2处理液、全血样品垫3处理液和全血样品垫4处理液分别处理玻璃纤维膜,得到4种全血样品垫(样品垫1、2、3、4),同时设置空白组,即不用处理液处理的玻璃纤维膜。

[0106] 全血样品垫处理液处理玻璃纤维膜的步骤如下:玻璃纤维膜按照每条长 $\times$ 宽=30cm $\times$ 2cm的切割成空白样品垫,每条空白样品垫对应加入5mL全血样品垫处理液,37 $^{\circ}$ C干燥过夜,湿度低于30%、常温保存。

[0107] ②按实施例1组装成试纸条。

[0108] ③按实施例1中6.1试纸条检测流程,进行试纸条测试,检测血浆样本得到的荧光强度最强为最优。结果如图4a所示,4种样品垫处理后的样品垫的效果比较,样品垫4的效果最优,可见,全血样品垫4的处理液的效果较优。接着对全血样品垫4处理液的各组分进一步优化。

[0109] (2) 全血样品垫4处理液的优化

[0110] 对全血样品垫4处理液的配方进行优化,第一组是肝素钠的浓度分别设置为0、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%,其他成分和浓度同全血样品垫4处理液;第二组是PEG-4000的浓度分别设置为0、0.5%、1%、1.5%、2%,其他成分和浓度同全血样品垫4处理液;第三组是BSA的浓度分别设置为0、0.5%、1%、1.5%、2%,其他成分和浓度同全血样品垫4处理液;第四组是Tween-20的浓度分别设置为0、0.5%、1%、1.5%、2%,其他成分和浓度同全血样品垫4处理液;第五组是海藻糖的浓度分别设置为0、0.5%、1%、1.5%、2%,其他成分和浓度同全血样品垫4处理液。结果如图4b~f所示,得到了优化后的全血样品垫处理液:0.015M、pH=7.4的PBS缓冲液中加入0.5% (w/v) BSA、2% (w/v) 海藻糖、2% (w/v) PEG-4000、0.5% (w/v) Tween-20、0.1% (w/v) 肝素钠、0.02% (w/v)  $\text{NaN}_3$ 。

[0111] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

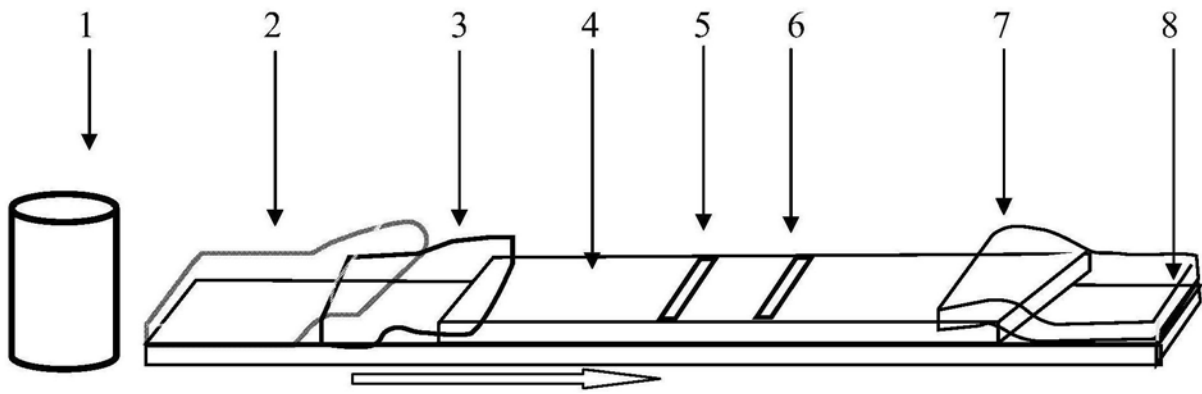


图1

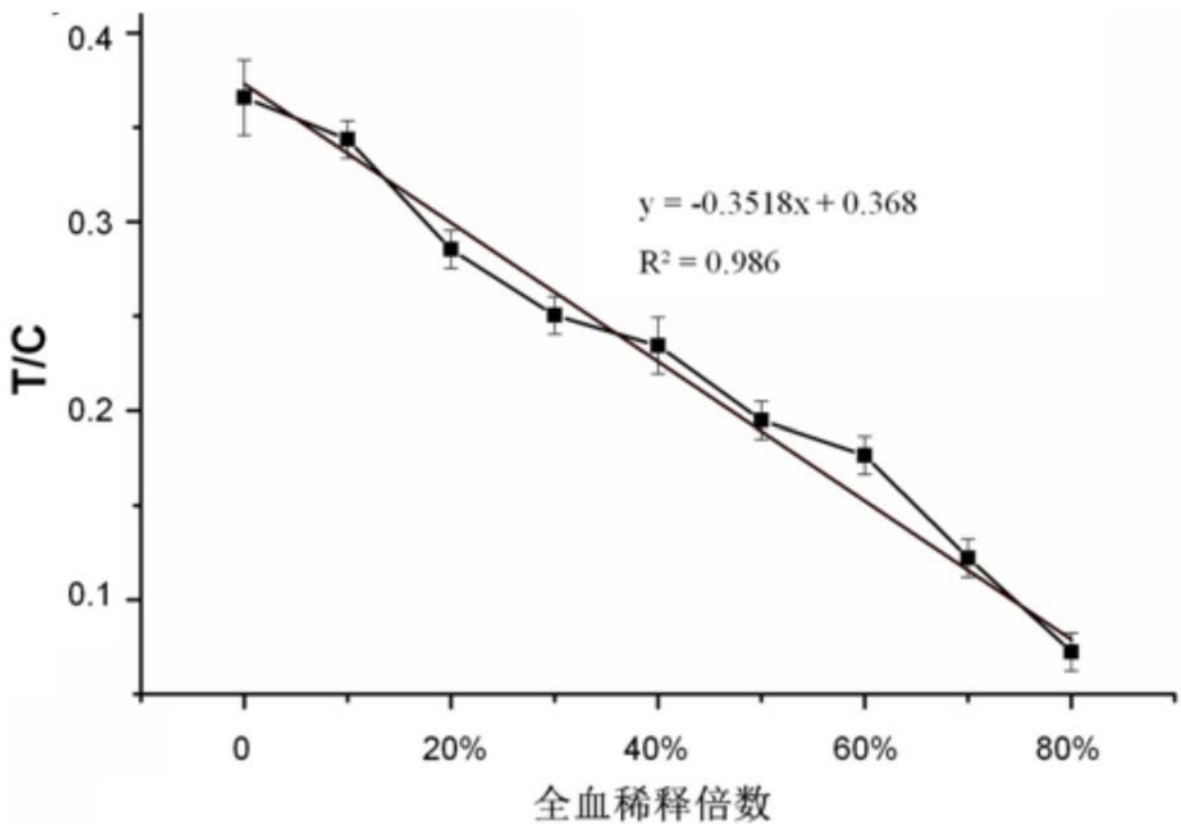


图2

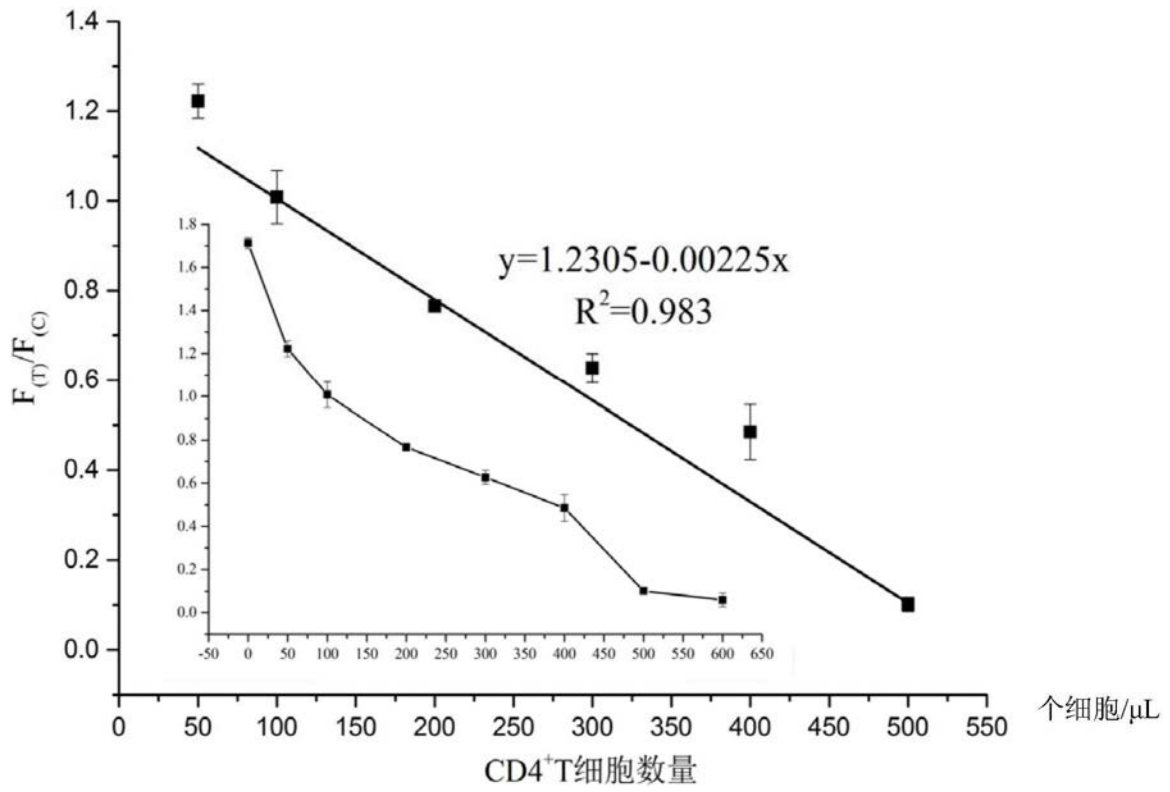


图3

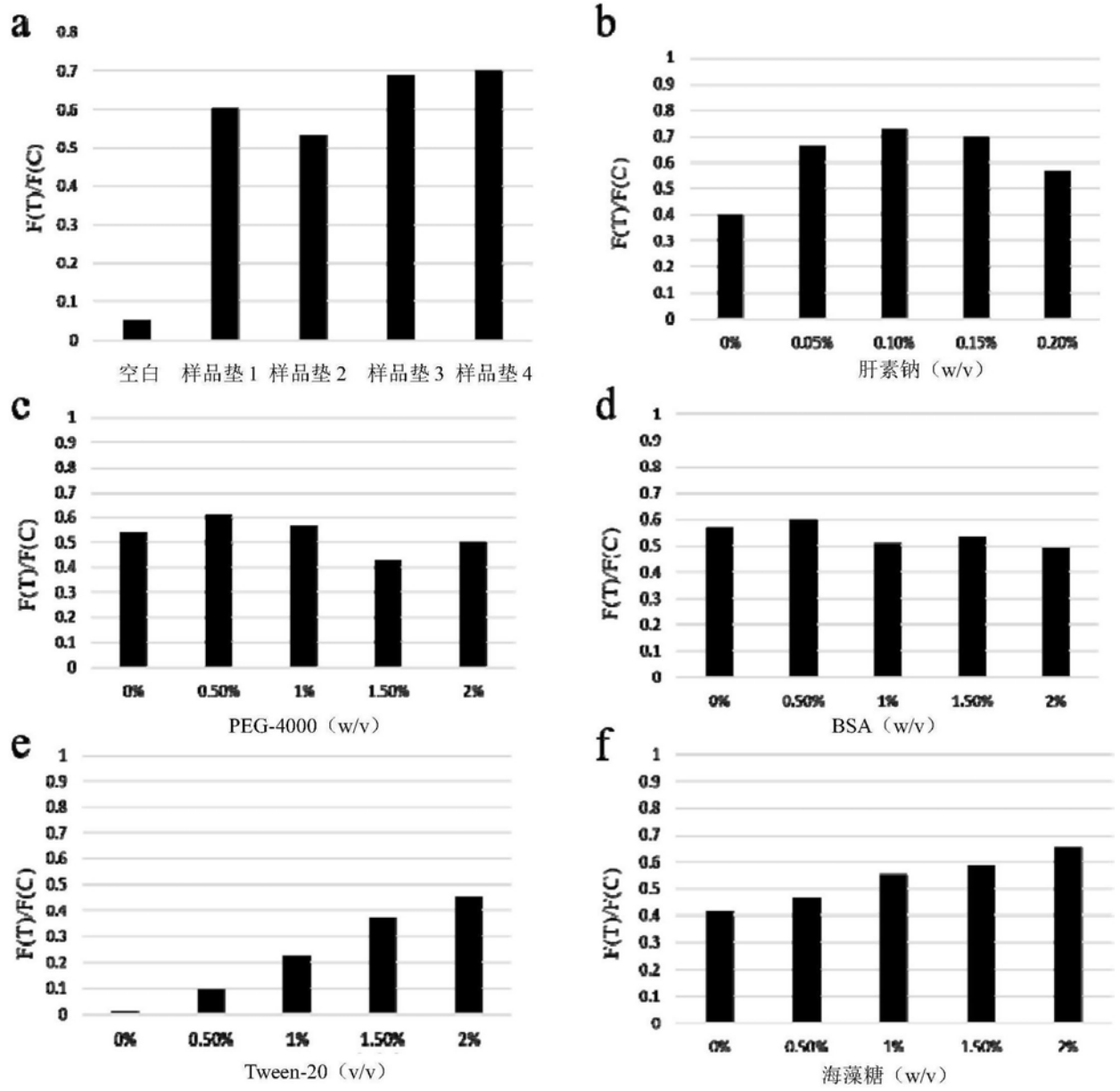


图4

专利名称(译)	检测血液中CD4+T细胞数量的侧向层析试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107144693A</a>	公开(公告)日	2017-09-08
申请号	CN201710301227.3	申请日	2017-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南大学		
[标]发明人	唐勇 肖威 肖盟		
发明人	唐勇 肖威 肖盟		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/558		
其他公开文献	CN107144693B		
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血液中CD4+T细胞数量的侧向层析试剂盒及其制备方法。该试剂盒包含样品处理管和试纸条；样品处理管含有全血样品处理液和信号物标记的CD4抗体；试纸条包括底板和在底板上附着有沿层析方向紧密相连的样品垫、滤血层、层析膜层和吸水垫；样品垫部分压在滤血层上，滤血层部分压在层析膜层上，吸水垫部分压在层析膜层上；在层析膜层上设置检测线和质控线，滤血层、检测线、质控线和吸水垫依次排列。本发明能快速检测人体血液中的免疫细胞数量有利于及时快速的对患者免疫功能做出评价，对于各类疾病的诊疗都具有重大意义。

