



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109507154 A

(43)申请公布日 2019.03.22

(21)申请号 201710834382.1

(22)申请日 2017.09.15

(71)申请人 上海鑫谱生物科技有限公司

地址 201199 上海市闵行区莘北路518号2  
号楼103室

(72)发明人 陈俊蕾 张唯 李久彤 陈亮  
周雪雷

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限  
公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

一种荧光分析方法和装置

(57)摘要

本发明涉及一种荧光分析方法和装置,具体地,涉及一种无样品垫(优选地可进一步无结合垫)、基于荧光猝灭免疫层析原理的测试片及检测方法。本发明对原有层析试纸条结构进行简化,去除样品垫,却意外地发现变异系数显著减小。本发明方法仅通过测量所述测试区的荧光强度的变化来测定待测物的数量,专属性强;能够检测极低浓度待测物的数量,可同时对待测物质进行定性与定量分析。本发明方法灵敏度更高、定量更准确、变异系数更低、稳定性高、操作简便快捷、成本低廉、适合于现场快速定性定量检测。

1. 一种无样品垫型测试片,其特征在于,所述测试片包括:
  - (i) 层析膜,所述层析膜上的近端含有样品接触区;
  - (ii) 位于层析膜远端并与层析膜相连或相接触的吸水垫,所述吸水垫为吸收区,用于使得待测物从样品接触区扩散至吸收区;和
  - (iii) 位于所述样品接触区和所述吸收区之间的测试区,所述测试区包含固定化的第一捕获剂,所述第一捕获剂用于捕获从样品接触区移动至测试区的含吸光物质的复合物,所述含吸光物质的复合物为至少一种被吸光物质标记的结合剂与待测物或其等同物结合形成的复合物,且所述测试区具有荧光;其中,当所述第一捕获剂捕获所述含吸光物质的复合物时,所述吸光物质降低所述测试区的荧光强度。
2. 如权利要求1所述的测试片,其特征在于,所述测试片无结合垫。
3. 如权利要求1所述的测试片,其特征在于,所述测试片还包括基片(背衬片),所述基片的长度不超过层析膜和吸水垫的总长度。
4. 如权利要求1所述的测试片,其特征在于,所述测试片还包括结合剂。
5. 如权利要求1所述的测试片,其特征在于,所述测试片还包括至少一个位于测试区和吸收区之间的对照区,所述对照区含有固定化的第二捕获剂,其中,所述第二捕获剂用于特异性结合(多余的)被吸光物质标记的结合剂。
6. 一种定量检测待测物的荧光分析方法,其特征在于,所述方法包括步骤:
  - (1) 提供一复合物溶液,所述复合物溶液中含有待测物样品和结合剂结合形成的含吸光物质的复合物;
  - (2) 将所述复合物溶液与权利要求1-5中任一所述的无样品垫型测试片的样品接触区接触;和
  - (3) 测量所述测试片的测试区的荧光强度,从而得到定量检测待测物结果。
7. 一种定量检测待测物的荧光分析方法,其特征在于,所述方法包括步骤:
  - (a) 提供一权利要求1-5中任一所述的无样品垫型测试片和一复合物溶液,所述复合物溶液中含有待测物样品和结合剂结合形成的含吸光物质的复合物;
  - (b) 将所述复合物溶液与所述测试片的样品接触区接触;
  - (c) 步骤(a)中所述的含吸光物质的复合物移动至测试区,与其中的第一捕获剂结合,从而形成固定于测试区的含有吸光物质的复合物;和
  - (d) 测量所述测试区的荧光强度,从而得到定量检测待测物结果。
8. 如权利要求6或7所述的荧光分析方法,其特征在于,所述测量包括:将测试区与对照区中间处的荧光强度F2与测试区的荧光强度F1的比值,和标准曲线或标准值进行比较,从而确定待测物的数量;或者  
将测试区的荧光强度F1和标准曲线或标准值进行比较,从而确定待测物的数量。
9. 一种检测试剂盒,所述试剂盒包括:一权利要求1所述的无样品垫型测试片;和使用说明书。
10. 一种定量检测待测物的荧光测量装置,所述的装置包括:
  - (a) 一权利要求1所述的无样品垫型测试片;
  - (b) 一用于检测荧光强度的检测器;和

(c) 描述使用方法的使用说明。

## 一种荧光分析方法和装置

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外检测技术领域,具体地涉及一种基于测量荧光强度的分析方法和装置。

### 背景技术

[0002] 在免疫检测领域中,常常需要对各类抗原或抗体进行定性或定量检测。现有技术中,以“和双抗夹心”为基础衍生出多种免疫反应分析方法,如:放射免疫法、酶联免疫法、化学发光法、时间分辨荧光法和荧光免疫法等,可用于确定病原微生物,对人体的特异性蛋白定量检测,从而对疾病进行辅助诊断或监测等等,用途非常广泛。这类免疫反应分析方法,通常将捕获抗体固定于固相载体,然后与抗原(目标蛋白)反应,洗涤后再与标记抗体反应,洗涤,最后检测放射性强度、溶液吸光度或光信号等,从而报告检测样本中目标蛋白的浓度。上述方法的自动化免去了人工洗涤的烦琐,但正因为自动化,使得仪器体积庞大价格昂贵,一般只在大型实验室使用。

[0003] 1990年,Beggs等综合胶体金和免疫分析技术,建立了胶体金免疫层析法(GICA),用于检测人尿和血清中的HCG(BEGGS M,NOVOTNY M,SAMPEDRO S.A selfperforming chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin(HCG) in urine and serum[J].Clin Chem,1990,36:1084-1085)。此后20年,人们在GICA的基础上,开发出了用于病原体(CN 03115143.4)、激素(CN 200610014168.3)、心脏标志物(CN 200410011165.5)、肿瘤标志物(CN 200510104796.6)、自身免疫病标志物(CN 200410027291.X)等的检测试剂;同时也应用到食品、环境(CN 03116692.X)和兽医(CN 02139704.X)领域。由于该方法只需肉眼观察即可,非专业人士也可操作,使急诊、基层医院、病人床边和现场等远离大型实验室的地方开展相关检测成为可能,所以应用范围相当广泛。

[0004] 虽然这种免疫分析技术已经超过20年的发展,但其基本的工作原理并未改变,这决定了到目前为止,它只用于定性或半定量检测(根据检测线灰度深浅定量),且灵敏度也不如前述的定量免疫分析方法,其进一步的应用遇到了瓶颈。

[0005] 传统的层析试纸条主要由4部分组成:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。其中样品垫用来承载样品溶液;硝酸纤维素膜(NC膜)用于承载捕获抗体且为免疫反应发生的重要区域;结合垫用于承载标记抗体;吸水垫用于提供层析的动力,使溶液通过层析作用向上流动。以上4部分在免疫层析试纸条反应的过程中都有可能因为材质、处理方法、承载量的不同等因素增加了测量结果的变异系数(CV)。一般样品垫要事先经过酪蛋白等处理后使用,此过程中会造成不同膜条样品垫之间的差异;结合垫则是由于承载的标记抗体量的不均匀等,导致膜条在测试时变异系数(CV)增大;这些皆能导致CV的大幅上升。

[0006] 在传统层析试纸条结构基础上,将结合剂固定于微孔中冻干或真空抽干,密闭保存,测试前样本溶液先复溶微孔中干化的结合剂,同时发生反应,再滴加于样品垫,沿NC膜层析涌动。该结构在一定程度上改善了CV,但在医学检验中,单纯改变结合垫的结构已经不

能满足日益严格的临床要求。

[0007] 因此,本领域急需对现有的免疫层析方法进行变革,开发一种灵敏度更高、定量更准确、变异系数更低、操作简便快捷、成本低廉的层析试纸条及检测方法,从而进一步扩展其应用领域。

### 发明内容

[0008] 本发明提供了一种无样品垫(优选地可进一步无结合垫)型测试片,用于定量检测样品中的待测物。

[0009] 本发明提供了一种定量检测待测物的检测方法,所述方法灵敏度高、定量准确、变异系数低、操作简便快捷、成本低廉。

[0010] 本发明还提供了一种定量检测待测物的检测装置。

[0011] 本发明的第一方面,提供了一种无样品垫型测试片,其特征在于,所述测试片包括:

[0012] (i) 层析膜,所述层析膜上的近端含有样品接触区;

[0013] (ii) 位于层析膜远端并与层析膜相连或相接触的吸水垫,所述吸水垫为吸收区,用于使得待测物从样品接触区扩散至吸收区;和

[0014] (iii) 位于所述样品接触区和所述吸收区之间的测试区,所述测试区包含固定化的第一捕获剂,所述第一捕获剂用于捕获从样品接触区移动至测试区的含吸光物质的复合物,所述含吸光物质的复合物为至少一种被吸光物质标记的结合剂与待测物或其等同物结合形成的复合物,且所述测试区具有荧光;

[0015] 其中,当所述第一捕获剂捕获所述含吸光物质的复合物时,所述吸光物质降低所述测试区的荧光强度。

[0016] 在另一优选例中,所述吸光物质为猝灭剂。

[0017] 在另一优选例中,所述测试片无结合垫。

[0018] 在另一优选例中,所述测试片还包括基片(背衬片),所述基片的长度不超过层析膜和吸水垫的总长度。

[0019] 在另一优选例中,所述测试片由层析膜、吸水垫和基片构成。

[0020] 在另一优选例中,所述测试片还包括将层析膜和吸水垫粘附于基片的粘附材料。

[0021] 在另一优选例中,所述层析膜上含有荧光层。

[0022] 在另一优选例中,所述测试片为成品。

[0023] 在另一优选例中,所述测试片还包括结合剂。

[0024] 在另一优选例中,所述测试片还包括含有结合剂的容器或固相载体,优选地包括含有干化结合剂的微孔。

[0025] 在另一优选例中,所述微孔内加入待测物样品,与所述微孔内的结合剂形成复合物溶液。

[0026] 在另一优选例中,所述复合物溶液与所述样品接触区接触。

[0027] 在另一优选例中,所述复合物溶液以水平(0°)至垂直角度(90°)中任一角度与所述样品接触区接触。

[0028] 在另一优选例中,所述复合物溶液以水平方向或垂直方向与所述样品接触区接

触。

[0029] 在另一优选例中,所述层析膜为硝酸纤维素膜(NC膜)。

[0030] 在另一优选例中,所述测试区的荧光为所述测试片的自有荧光。

[0031] 在另一优选例中,所述待测物为抗原或抗体。

[0032] 在另一优选例中,所述结合剂特异性结合待测物或其等同物;较佳地,所述结合剂为抗原、抗体或寡核苷酸。

[0033] 在另一优选例中,所述结合剂可以包含两种结合剂,其中,一种被吸光物质标记的结合剂,另一种被生物素标记的结合剂,所述两种结合剂同时与待测物结合,从而形成一种被生物素标记的含吸光物质的复合物。

[0034] 在另一优选例中,所述含吸光物质的复合物可以含有待测物,也可以含有待测物等同物。

[0035] 在另一优选例中,所述第一捕获剂特异性结合于所述含吸光物质的复合物。

[0036] 在另一优选例中,所述第一捕获剂为链亲和素、待测物或待测物的等同物的抗体。

[0037] 在另一优选例中,所述结合剂的数量大于所述待测物的数量;所述第一捕获剂的数量大于从样品接触区移动至测试区的所述含吸光物质的复合物的数量。

[0038] 在另一优选例中,所述的待测物包括:蛋白、核酸或小分子化合物。

[0039] 在另一优选例中,所述的待测物包括肿瘤标志物、心肌标志物等特异性的蛋白。

[0040] 在另一优选例中,所述的待测物是液相(溶液)、悬浮液。

[0041] 在另一优选例中,所述测试片自有荧光的激发或发射光谱与所述吸光物质的吸收光谱全部或部分重叠。

[0042] 在另一优选例中,所述的吸光物质的吸收光谱范围为300-1000nm。

[0043] 在另一优选例中,所述的吸光物质选自下组:胶体金、纳米金棒、纳米银棒、或其组合。

[0044] 在另一优选例中,所述的胶体金是平均粒径为10-70nm的胶体金颗粒,优选地20-40nm的胶体金颗粒。

[0045] 在另一优选例中,所述测试片还包括至少一个位于测试区和吸收区之间的对照区,所述对照区含有固定化的第二捕获剂,其中,所述第二捕获剂用于特异性结合(多余的)被吸光物质标记的结合剂。

[0046] 在另一优选例中,所述对照区用于揭示待测物的检测结果的有效性。

[0047] 在另一优选例中,所述测试区和对照区位于所述层析膜上。

[0048] 在另一优选例中,所述测试片还包括:位于样品接触区的近端和吸收区的远端的反应区,所述反应区具有荧光。

[0049] 在另一优选例中,所述反应区内设有检测线(测试区)和质控线(对照区)。

[0050] 在另一优选例中,所述测试区和对照区之间有一荧光区域,所述荧光物质的激发与发射光谱与所述吸光物质(如猝灭剂)的吸收光谱完全重叠或部分重叠。

[0051] 本发明的第二方面,提供了一种定量检测待测物的荧光分析方法,包括步骤:

[0052] (1) 提供一复合物溶液,所述复合物溶液中含有待测物样品和结合剂结合形成的含吸光物质的复合物;

[0053] (2) 将所述复合物溶液与本发明第一方面所述的测试片的样品接触区接触;和

[0054] (3) 测量所述测试片的测试区的荧光强度,从而得到定量检测待测物结果。

[0055] 在另一优选例中,所述复合物溶液为测物样品与结合剂混合后形成的溶液,其中结合剂的数量大于所述待测物的数量。

[0056] 本发明的第三方面,提供了一种定量检测待测物的荧光分析方法,包括步骤:

[0057] (a) 提供一本发明第一方面所述的测试片和一复合物溶液,所述复合物溶液中含有待测物样品和结合剂结合形成的含吸光物质的复合物;

[0058] (b) 将所述复合物溶液与所述的测试片的样品接触区接触;

[0059] (c) 步骤(a)中所述的含有吸光物质的复合物移动至测试区,与其中的第一捕获剂结合,从而形成固定于测试区的含有吸光物质的复合物;和

[0060] (d) 测量所述测试区的荧光强度,从而得到定量检测待测物结果。

[0061] 在另一优选例中,所述测量包括:将测试区与对照区中间处的荧光强度F2与测试区的荧光强度F1的比值,和标准曲线或标准值进行比较,从而确定待测物的数量;或者

[0062] 将测试区的荧光强度F1和标准曲线或标准值进行比较,从而确定待测物的数量。

[0063] 在另一优选例中,所述的方法还包括用已知浓度的待测物标准品进行测量,从而制作标准曲线的步骤。

[0064] 本发明的第四方面,提供了一种检测试剂盒,所述试剂盒包括:一本发明第一方面所述的测试片;和使用说明书。

[0065] 本发明的第五方面,提供了一种定量检测待测物的荧光测量装置,所述的装置包括:

[0066] (a) 一本发明第一方面所述的测试片;

[0067] (b) 一用于检测荧光强度的检测器;和

[0068] (c) 描述使用方法的使用说明。

[0069] 在另一优选例中,所述装置还包括光源和计算机。

[0070] 在另一优选例中,所述光源通过光导纤维照射到检测线处,激发出的荧光通过光导纤维进入检测器,由计算机进行数据处理和分析。

[0071] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0072] 图1显示了Ea测试片结构图。

[0073] 图2显示了Eb测试片结构图。

[0074] 图3是本发明Ec测试片示意图。

[0075] 图4是本发明检测装置示意图。

[0076] 图5是本发明Ec测试片的又一示意图,其中1-测试片;2-背衬片;3-测试区;4-对照区;5-吸收区;6-反应区;7-样品接触区。

## 具体实施方式

[0077] 本发明人通过长期而深入的研究,发现了一种无样品垫型(优选地可进一步无结

合垫)、基于荧光猝灭免疫层析原理的测试片及检测方法。本发明对原有层析试纸条结构进行简化,去除样品垫,发现变异系数显著减小。本发明检测方法仅通过测量所述测试区的荧光强度的变化来测定待测物的数量,专属性强;能够检测极低浓度待测物的数量,可同时对待测物质进行定性与定量分析。本发明方法灵敏度更高、定量更准确、变异系数更低、稳定性高、操作简便快捷、成本低廉、适合于现场快速定性定量检测。所述方法是基于本发明提供的测试片,通过一种含有光源和检测器的装置实现了对待测物的定量检测。在此基础上,发明人完成了本发明。

#### [0078] 测试片

[0079] 现在更详细地描述用于制造本发明测试片的方法和材料。应注意,测试片的具体构造可以变化,这取决于意图用测试片来进行的具体测试。在实施例之外制造测试片的变动方法,也落于本发明范围之内。

[0080] 如图5所示,测试片1可包括背衬片2,其长度与测试片相同。

[0081] 吸收区5位于测试片的一端,吸水滤纸位于吸收区

[0082] 层析膜样品接触区7位于测试片的吸收区对向。

[0083] 反应区6位于层析膜样品接触区和吸收区之间,在层析膜样品接触区的近端和吸收区的远端。

[0084] 测试区3(也称检测线或T线)位于层析膜样品接触区和吸收区之间。优选地,所述膜片上还设置有对照区4(也称质控线或C线),对照区位于测试区和吸收区之间,也可以位于测试区和反应区之间,并与测试区之间有适当的空间。

[0085] 测试区和对照区之间(含检测线及质控线)有一荧光区域,该荧光物质的激发与发射光谱与猝灭剂的吸收光谱完全重叠或部分重叠。

[0086] 测试片制造方法,优选地,如图3所示,分别将膜片、吸水垫、荧光层通过粘合剂粘贴于背衬板上,即得所述测试片。

[0087] 背衬片可以用任何稳定的、无孔的材料制成,其强度应足以支承材料和粘于其的测试片。因为许多测定用水作为扩散介质,因此背衬片较佳地是基本上不透水的。在一个优选例中,背衬片是用聚合物膜制成的,更佳地是用聚氯乙烯膜制成的(如PVC胶板)。

[0088] 膜片可以用任何材料制成,只要该材料有足够孔隙度从而允许在表面和内部发生流体的毛细管作用。膜片应有足够的孔隙度,从而允许涂有抗体或抗原的颗粒移动。膜片还可被含待检测分析物的样品中所用的液体润湿(例如,对于水性液体具有亲水性,对于有机溶剂具有疏水性)。通过例如在美国专利No. 4,340,482或No. 4,618,533中所述的方法(这些方法描述了将疏水表面转变成亲水表面),可以改变其疏水性从而使其具有亲水性以便用于水性液体。可用于制造结合垫片或膜片的材料例子包括:聚脂膜、纤维素、硝酸纤维素、乙酸纤维素、玻璃纤维、尼龙、聚电解质离子交换膜、丙烯共聚物/尼龙、和聚醚砜(polyethersulfone)。在一个优选例中,膜片是用硝酸纤维素制成的。

[0089] 吸水垫(也称吸收垫),可以用任何能吸收作为样品和缓冲液的液体的材料制成。吸水垫的吸收能力应足够大,以便吸收添加至测试片的液体。适用于吸水垫的材料例子包括纤维素和玻璃纤维。

#### [0090] 检测方法

[0091] 本发明测试片可用于大量不同的侧流分析方法,而这些分析方法涉及使用一种或

多种可流动的结合剂和固定化的捕获剂,以及利用测试区自有的荧光强度的变化。

[0092] 优选地,所述方法包括步骤:

[0093] (1) 将待测物样品加至与本测试片配套的含有干化结合剂的微孔内;

[0094] (2) 使微孔内复合物溶液与本发明所述的测试片吸水垫的对向NC膜末端(样品接触区)接触;

[0095] (3) 层析适宜的时间;

[0096] (4) 测量所述测试片的测试区的荧光强度,从而换算为待测物的数量。

[0097] 将待测样本与微孔内干化的结合剂(如针对抗原的猝灭剂标记抗体、生物素(biotin)标记的抗体)完全复溶,形成“猝灭剂标记抗体-抗原-biotin抗体”的3元复合物或“猝灭剂标记抗体-抗原”的2元复合物。将微孔内的溶液与测试片的层析膜样品接触区接触,溶液内剩余的含吸光物质的结合剂和形成的含吸光物质的复合物移动至测试区,所述含吸光物质的复合物与其中的第一捕获剂在捕获抗体处(T线)结合,从而形成富集有猝灭剂的测试区。猝灭程度与样本中抗原直接相关。

[0098] 具体地,当所述富集在测试区的猝灭剂影响(部分猝灭或全部猝灭)所述的测试区荧光强度(测试片自有荧光)时,本发明的检测方法即可通过检测测试区、测试区与对照区之间荧光区域的荧光强度比值来测定待测物的数量。

[0099] 待测物或其等同物

[0100] 如本文所用,术语“待测物”、“其等同物”或“分析物”指待用测试片检测以及可任选地被定量测定的、样品中的任何组份,待测物或其等同物或分析物的例子包括:蛋白质,如激素或其他分泌蛋白质、酶和细胞表面蛋白;糖蛋白;肽;小分子;多糖;抗体(包括单克隆抗体或多克隆抗体及其片段);核酸;药物(包括地高辛等强心甙类药物);毒素;毒品;病毒或病毒颗粒;细胞壁组份;或其他具有表位的化合物。

[0101] 优选地,所述的待测物包括肿瘤标志物、心肌标志物等特异性的蛋白,所述肿瘤标志物选自下组:甲胎蛋白(AFP)、C-反应蛋白(CRP)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原125(CA125)、糖抗原19-9(CA19-9)、总前列腺特异性抗原(PSA)、游离前列腺特异性抗原(f-PSA)、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、糖链抗原(CA242)、癌抗原(CA15-3)、或人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -HCG)。

[0102] 结合剂

[0103] 本发明所用的结合剂可以是任何能够结合于待测物或其等同物的物质。具体地,为特异性结合待测物或其等同物的物质。所述结合剂中至少一种是被吸光物质(如猝灭剂)标记,所述结合剂能与待测物或其等同物结合形成含吸光物质(如猝灭剂)的复合物;

[0104] 有各种不同类型的分子可用作分析物结合剂,其中包括例如:寡核苷酸、抗体、工程化蛋白、肽、半抗原、或含有抗原(该抗原具有分析物结合位点)的异源混合物的裂解物。P.Holliger等人,Trends in Biotechnology 13:7-9(1995);S.M.Chamow等人,Trends in Biotechnology 14:52-60(1996)。如果待检测分析物是配体,那么可使用结合于该配体的受体,反之亦然。

[0105] 优选地,所述的待测物或其等同物是抗原,且所述的结合剂是可结合于所述抗原的抗体;或者所述的待测物或其等同物是抗体,且所述的结合剂是可结合于所述抗体的抗原或所述抗体的抗体(抗抗体)。

[0106] 含吸光物质的复合物

[0107] 如本文所用,“含吸光物质的复合物”指所述待测物与结合剂(如针对抗原的猝灭剂标记抗体、生物素(biotin)标记的抗体)结合后形成的复合物,如“猝灭剂标记抗体-抗原-biotin抗体”3元复合物或“猝灭剂标记抗体-抗原”2元复合物,所述复合物含有吸光物质。

[0108] 复合物溶液

[0109] 如本文所用,“复合物溶液”指待测物样品与结合剂混合后形成的溶液(其中结合剂的数量大于所述待测物的数量),所述复合物溶液中含有待测物与结合剂结合形成的含吸光物质的复合物,还可含有多余的未与待测物结合的结合剂。所述复合物溶液中,待测物以结合于所述结合剂的形式存在(如“猝灭剂标记抗体-抗原-biotin抗体”3元复合物或“猝灭剂标记抗体-抗原”2元复合物)。

[0110] 捕获剂

[0111] 本发明所用的捕获剂可以是任何能结合含猝灭剂的复合物和/或结合剂的物质,包括例如:抗体、工程化蛋白、肽、半抗原、或含有抗原(该抗原具有分析物结合位点)的异源混合物的裂解物。

[0112] 所述捕获剂包括第一捕获剂和第二捕获剂(也称对照剂)。所述第一捕获剂是任何能结合含吸光物质(如猝灭剂)的复合物的物质,固定于测定区,其中所述含吸光物质的复合物为含吸光物质的结合剂与待测物或其等同物结合形成的复合物(如“猝灭剂标记抗体-抗原-biotin抗体”的3元复合物或“猝灭剂标记抗体-抗原”的2元复合物)。所述第二捕获剂是任何能结合含吸光物质的结合剂的物质,固定于对照区。

[0113] 所述捕获剂用于捕获从样品接触区移动至测试区的含吸光物质(如猝灭剂)的复合物,或捕获从样品接触区移动至对照区的剩余的被吸光物质标记的结合剂,从而使得吸光物质(如猝灭剂)富集在测试区或对照区。

[0114] 优选地,可以通过抗原和抗体的结合或寡核苷酸与互补核酸单链特异性结合的方式或通过生物素(biotin)和链亲和素(Streptavidin,SA)的结合方式,将捕获剂与含猝灭剂的复合物和/或剩余的被吸光物质标记的结合剂结合,从而将猝灭剂富集混合于测试区或对照区。

[0115] 所述捕获剂和含猝灭剂的复合物或剩余的被吸光物质标记的结合剂的结合为特异性结合。优选地,所述的捕获剂是链亲和素、待测物的抗体或待测物等同物。

[0116] 吸光物质的选择

[0117] 如本文所用,“吸光物质”、“猝灭剂”可互换使用,包括可吸收或降低测试片上的荧光的物质。用于本发明的猝灭剂应有较宽泛的紫外可见甚至红外吸收光谱,总的原则是其吸收光谱与测试片自有荧光的激发或发射光谱部分或完全重叠。

[0118] 最优的是完全重叠,如此会有较高的检测灵敏度。

[0119] 代表性的猝灭剂包括(但并不限于):胶体金、纳米金棒、纳米银棒等组合,它们的吸收光谱范围为300~1000nm不等,只要所选猝灭剂的吸收光谱与测试片自有荧光激发或发射光谱重叠即可。

[0120] 胶体金颗粒可用任何常规方法制造,例如总结于G.Frens,1973Nature Physical Science,241:20(1973)中的方法。其他方法描述于美国专利No.5,578,577、5,141,850、4,775,636、4,853,335、4,859,612、5,079,172、5,202,267、5,514,602、5,616,467、5,681,

775。

[0121] 如本文所用,术语“纳米金棒”指具有一定纵横比、且横轴和纵轴处于5-200纳米范围的金颗粒。

[0122] 一种特别优选的吸光物质是胶体金,尤其是粒径为20-40nm的胶体金。

[0123] 荧光猝灭原理

[0124] 含吸光物质(猝灭剂)标记的物质,被测试区的捕获试剂捕获后,含猝灭剂标记的物质会在测试区富集,当测试片自有荧光的激发或发射光谱与该猝灭剂的吸收光谱全部或部分重叠时,因共振能量转移,猝灭剂会对测试片自有荧光产生猝灭作用,即猝灭测试区的荧光强度。

[0125] 工作原理

[0126] 现结合图3和具体的实施方式说明本发明检测方法的工作原理:

[0127] 利用膜片荧光区域本身的自有荧光。检测线处固定能与包含结合剂的复合物结合的物质(即第一捕获剂)。所述结合剂位于配套的微孔内。所述结合剂被样品溶解后,在层析过程中与样品中的待测物或其等同物结合形成含猝灭剂的复合物,所述复合物流经检测线时被捕获,待测物越多,被捕获的所述复合物也就越多。具体地,当所述复合物(部分猝灭或全部猝灭)影响所述膜片检测线处的荧光强度时,即可通过检测荧光强度来测定待测物的数量。

[0128] 本发明在此提供了基于上述原理的如下优选方法:

[0129] 方法一:

[0130] (1.1) 样品加入到含有结合剂的微孔内,将结合剂完全复溶。样品中的待测物(如抗原)与结合剂(如针对抗原的猝灭剂标记抗体、biotin标记的抗体)形成猝灭剂标记抗体-抗原-biotin抗体”的3元复合物,使该3元复合物与本发明所述的测试片吸水垫的对向NC膜末端接触,通过层析作用被检测线处的捕获剂(如Streptavidin)捕获;

[0131] 3元复合物中的猝灭剂猝灭膜条检测线处的自有荧光。

[0132] (1.2) 多余的游离猝灭剂抗体继续前移,被固定在质控线处的对照剂(如抗猝灭剂抗体的抗体)捕获,呈现颜色,说明检测有效。

[0133] (1.3) 分别测定膜条检测线处的荧光强度F1及检测线与质控线中间处的荧光强度F2,计算F2/F1的值,值越大说明待测物浓度越高,反之则越低;如样本中无待测物时,不能形成3元复合物,则F2/F1 $\approx$ 1。

[0134] 方法二:

[0135] 将捕获剂(如针对待测物中抗原的捕获抗体)固定于检测线处。

[0136] (1.1) 样品加入到含有结合剂的微孔内,将结合剂完全复溶。样品中的待测物(如抗原)与结合剂(如针对抗原的猝灭剂标记抗体)形成猝灭剂标记抗体-抗原”的2元复合物,使该2元复合物与本发明所述的测试片吸水垫的对向NC膜末端接触,通过层析作用被检测线处的捕获剂捕获;

[0137] 2元复合物中的猝灭剂猝灭膜条检测线处的自有荧光。

[0138] (1.2) 多余的游离猝灭剂标记抗体继续前移,被固定在质控线处的对照剂(如抗金标抗体的抗体)捕获,呈现颜色,说明检测有效。

[0139] (1.3) 分别测定膜条检测线处的荧光强度F1及检测线与质控线中间处的荧光强度

F2,计算F2/F1的值,值越大说明待测物浓度越高,反之则越低;如样本中无待测物时,不能形成2元复合物,则F2/F1 $\approx$ 1。

[0140] 检测装置

[0141] 现结合图3说明本发明的检测装置:

[0142] 如图4所示,所述装置可以包括:测试片、检测器、光源、光导纤维和计算机。还可以包括一份检测方法的使用说明。其中测试片的工作原理如上所述,荧光强度的检测方法可以如下所述(但不仅限于此),任何可用于检测荧光强度的方法均可用于本发明的检测装置。

[0143] 荧光强度的检测

[0144] 光源通过光导纤维照射到检测线处,激发出的荧光通过光导纤维进入检测器,所得到的数据由计算机进行处理和分析。

[0145] 所述光导纤维可以是Y型的,分别连接于光源、检测线和检测器。

[0146] 本发明中,光源用于提供某一发射波长的光线,从而激发测试片发出荧光。可选用任何可以提供合适波长的光源,包括(但不限于):LED、氙灯、卤钨灯、激光等。

[0147] 一种优选的光源是激光光源,激光光源可用本领域常规的方法和设备(如激光器)产生。代表性的激光器包括(但并不限于):半导体激光器、氦氖激光器、氩离子激光器、还包括波长可选的激光器、多波长激光器和双波长激光器等。

[0148] 激光器产生的激光波长与激光介质有关,常见的激光波长见下表1:

[0149] 表1

激光种类	波长(纳米)
氩氟激光(紫外光)	193
氩氟激光(紫外光)	248
氩氯激光(紫外光)	308
氩激光(紫外光)	337
氩激光(蓝光)	488
氩激光(绿光)	514
氦氖激光(绿光)	543
氦氖激光(红光)	633
罗丹明6G染料(可调光)	570-650
红宝石(CrAlO <sub>3</sub> )(红光)	694
钕-钇铝石榴石(近红外光)	1064

[0150] 本发明中的检测器可以是(但不限于)光电倍增管、CCD或光电池等。

[0151] 标准曲线

[0152] 在本发明中,可以直接通过测定检测线处的荧光强度,从而确定所述待测物的数

量;也可以通过测定检测线处的荧光强度F1和检测线与质控线中间处的荧光强度F2,计算F2/F1或F1/F2的值,从而确定所述待测物的数量。

[0155] 在优选例中,可通过与标准曲线进行比较,从而获得定量结果。

[0156] 标准曲线可用以下方法获得:

[0157] 将已知的不同浓度(C)的待测物样品通过上述检测方法后,分别测量其在检测线处的荧光强度(F),将各浓度(C)和相应的荧光强度(F)作图,得到标准曲线;或者

[0158] 将已知的不同浓度(C)的待测物样品通过上述检测方法后,分别测量其在检测线处的荧光强度(F1),检测线与质控线中间处的荧光强度F2,计算F2/F1(或F1/F2)的值,将各浓度(C)和相应的荧光强度比值(F2/F1或F1/F2)作图,得到标准曲线。

[0159] 本发明的主要优点有:

[0160] (1) 本发明提供了一种无样品垫(优选地可进一步无结合垫)、基于荧光猝灭免疫层析原理的测试片及检测方法。本发明对原有层析试纸条结构进行简化,去除样品垫,却意外地发现变异系数显著减小。

[0161] (2) 本发明检测方法仅通过测量所述测试区的荧光强度的变化来测定待测物的数量,专属性强;能够检测极低浓度待测物的数量,可同时对待测物质进行定性与定量分析。

[0162] (3) 本发明方法灵敏度更高、定量更准确、变异系数更低、稳定性高、操作简便快捷、成本低廉、适合于现场快速定性定量检测。

[0163] (4) 本发明还提供了一种检测装置,所述装置基于上述检测方法,可广泛用于定量检测领域。

[0164] 下面结合具体实施,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0165] 试剂和设备:

[0166] 仪器:荧光猝灭免疫层析分析仪(上海鑫谱生物科技有限公司);电热恒温培养箱;电热真空干燥箱(D2F-6020ABF,天津市工兴电器厂);台式高速冷冻离心机(CT14RD,上海天美生化仪器设备工程有限公司);电子天平(FA1004,上海舜宇衡平科学仪器有限公司);雷磁恒温定时搅拌器(GB-3A,上海雷磁创益仪器仪表有限公司);雷磁台式PH计(PHS-25,上海雷磁创益仪器仪表有限公司)。

[0167] 试剂:CRP单克隆抗体;CRP抗原高值质控品;;小牛血清(Biological Industries);牛血清白蛋白(Genview);40nm的胶体金;Streptavidin(SA);碳酸钠;碳酸氢钠;磷酸氢二钠;磷酸二氢钠;吐温20;氯化钠;蔗糖;D-海藻糖(二水)。以上均为市售品。

[0168] 溶液的配制:

[0169] 1. 基质(3%BSA的PBS)溶液的配制

[0170] 分别准确称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 约14mg、36mg、8.5g,BSA约30g,加入蒸馏水950ml,用磁力搅拌器搅拌均匀,即得。

[0171] 2. Base溶液的配制

[0172] Base1溶液:称取Tris Base8.48g,蔗糖200g,海藻糖50g,牛血清白蛋白10g,叠氮

钠0.2g,溶于1000mL纯水中,搅拌均匀。

[0173] Base2溶液:称取Tris Base2.42g,PEG20000 1g,蔗糖2g,牛血清白蛋白20g,吐温20 3mL,叠氮钠0.2g,溶于1000mL纯水中,搅拌均匀,6mol/L盐酸调节PH至8.0。

[0174] 将Base1溶液和Base2溶液3:7混匀备用。

[0175] 实施例1:C-反应蛋白(CRP)项目Ea、Eb、Ec三种测试片的cv比较

[0176] 1.标准曲线的制备:

[0177] 1)Eb测试片:用基质溶液配制系列浓度CRP标准溶液1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL。取系列标准溶液70 $\mu$ L与金标抗体10 $\mu$ L(OD5)混匀,吸取60 $\mu$ L滴加至膜条样品垫处,层析15min测定,制备Eb测试片(图2)的标准曲线。

[0178] 2)Ec测试片:取上述系列标准溶液70 $\mu$ L与金标抗体10 $\mu$ L(OD5)混匀的复合物溶液,使该溶液与本发明所述的测试片吸水垫的对向NC膜末端接触进行层析,15min测定,制备Ec测试片(图3)本发明测试片标准曲线。

[0179] 3)Ea测试片:将真空抽干金(OD5/10 $\mu$ L)铺于高于测试片吸水垫的对向NC膜末端1mm处,再将样品垫贴于真空抽干金上距离边缘1mm处,取上述系列标准溶液60 $\mu$ L滴加至膜条样品垫处,层析15min测定,制备Ea测试片(图1)测试片标准曲线。

[0180] 2.分别选取高低两个浓度点按照上述三种操作,测定各个浓度点三种膜条的浓度cv大小,共平行测定4组,数据如下表1:

[0181] 表1:C-反应蛋白(CRP)项目Ea、Eb、Ec三种结构测试片的cv

[0182]

浓度ng/ml	Eb		Ec		Ea	
	均值 (n=10)	cv %	均值(n=10)	cv %	均值 (n=10)	cv %
第一组						
10ng/mL	9.725	9.17	7.515	5.45	10.78	16.9
30ng/mL	32.445	13.15	26.669	6.78	37.76	22.4
第二组	均值	cv %	均值	cv %	均值	cv %
10ng/mL	12.174	10.64	9.418	7.21	10.40	12.32
25ng/mL	29.136	8.26	25.703	4.82	20.47	11.47
第三组	均值	cv %	均值	cv %	均值	cv %
10ng/mL	8.914	8.91	8.552	5.52	11.58	15.48
25ng/mL	21.319	12.48	26.63	6.00	24.33	22.8
第四组	均值	cv %	均值	cv %	均值	cv %
10ng/mL	8.837	12.64	9.094	5.67	9.86	13.84
25ng/mL	25.77	15.04	19.11	9.62	26.78	16.23

[0183] 表1数据表明,Ec(图3,本发明)测试片的cv较Ea、Eb测试片的cv均有明显下降。因此可以看出本发明的测试片灵敏度更高、定量更准确、变异系数更低、稳定性更高。

[0184] 实施例2:SA系统数据

[0185] 1. 标准曲线的制备:用基质溶液配制系列浓度CRP标准溶液1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL。

[0186] a) 取系列浓度CRP标准溶液70 $\mu$ L与金标抗体10 $\mu$ L (OD5) 混匀,再加入bintin-CRP混匀,吸取60 $\mu$ L滴加至膜条样品垫处,层析15min测定,制备Eb测试片的标准曲线。

[0187] b) 取系列浓度CRP标准溶液70 $\mu$ L与金标抗体10 $\mu$ L (OD5) 混匀,再加入bintin-CRP混匀,作为待测溶液,使该溶液与本发明所述的测试片吸水垫的对向NC膜末端接触进行层析,15min测定,制备Ec测试片(图3,本发明)的标准曲线。

[0188] 2. 选取5ng/mL按照上述操作,分别考察biotin-CRP加入量为2 $\mu$ L时,SA划膜浓度(2mg/ml、4mg/ml、6mg/ml)不同情况下测定浓度点有无样品垫的浓度cv大小,数据如下:

[0189] 表2:SA系统Eb、Ec测试片的cv

[0190]

浓度	5ng/mL			
样品垫	Eb测试片		Ec测试片(本发明)	
SA划膜浓度	均值(n=10)	cv %	均值(n=10)	cv %
2mg/mL	6.056	10.17	6.025	5.32
4mg/mL	7.689	13.49	6.38	5.20
6mg/mL	4.97	12.45	6.606	7.10

[0191] 由表2可知,本发明Ec测试片的cv较Eb测试片的cv下降明显。

[0192] 根据以上数据得出,CRP项目两种系统Ec测试片的cv较Eb测试片的cv有明显下降。因此本发明的测试片灵敏度更高、定量更准确、稳定性更高。

[0193] 讨论:

[0194] Eb测试片无结合垫,待测物与结合剂混合形成的复合物溶液加入到样品垫,吸水垫用于提供层析的动力,使复合物溶液在NC膜上进行免疫层析。

[0195] 本发明所述方法仅通过测量猝灭物质对测试区中覆盖的荧光层与测试线荧光强度的比值的变化的测定待测物的数量,专属性强;该方法基于抗原抗体免疫反应,具有同时实现待测物质的定性与定量分析的能力,定量准确、稳定性高。该方法能够检测极低浓度待测物的数量,检测灵敏度高。本发明所述方法对原有层析试纸条结构进行的变革,去了除样品垫、结合垫,简化了层析试纸条的结构进而明显减小了变异系数。本发明所述方法操作简便快捷、成本低、适合于现场快速定性定量检测。

[0196] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

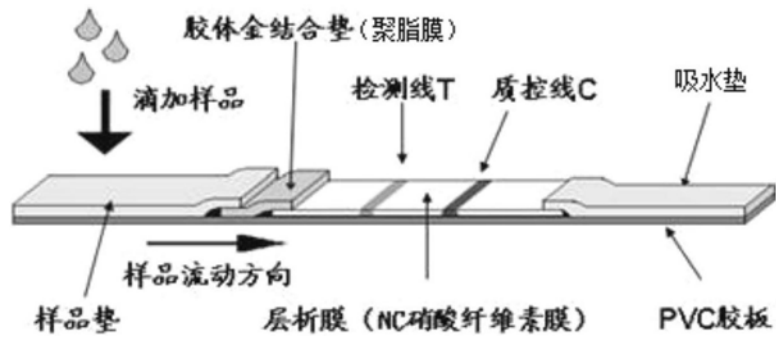


图1

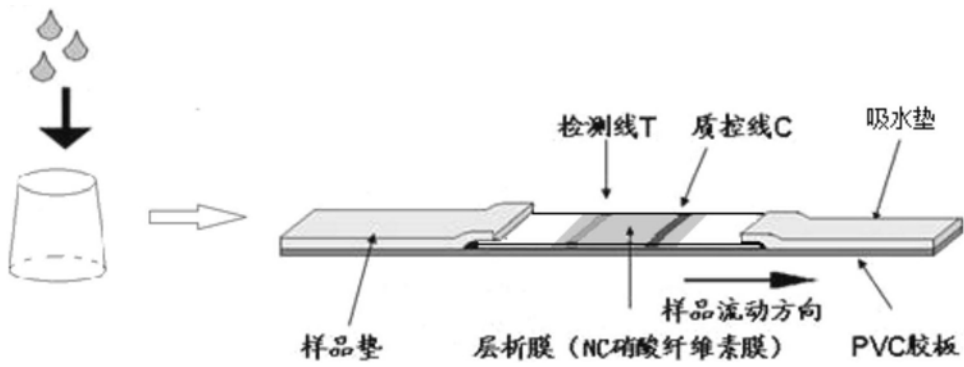


图2

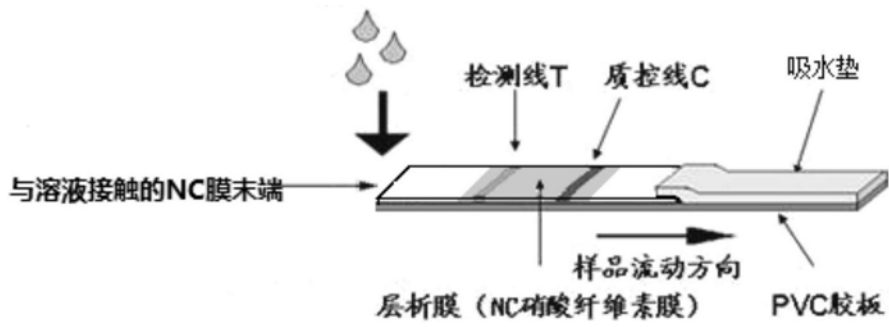


图3

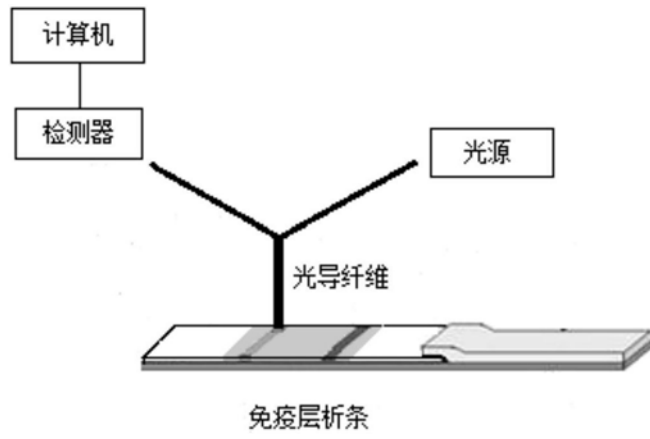


图4

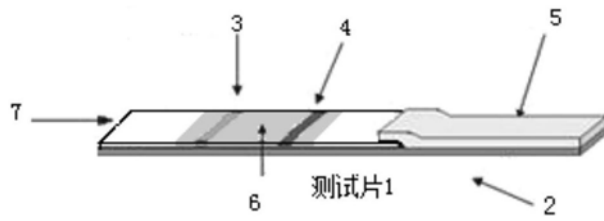


图5

专利名称(译)	一种荧光分析方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN109507154A</a>	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	CN2017110834382.1	申请日	2017-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	上海鑫谱生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海鑫谱生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海鑫谱生物科技有限公司		
[标]发明人	陈俊蕾 张唯 李久彤 陈亮 周雪雷		
发明人	陈俊蕾 张唯 李久彤 陈亮 周雪雷		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N2021/6432		
代理人(译)	崔佳佳 马莉华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种荧光分析方法和装置，具体地，涉及一种无样品垫(优选地可进一步无结合垫)、基于荧光猝灭免疫层析原理的测试片及检测方法。本发明对原有层析试纸条结构进行简化，去除样品垫，却意外地发现变异系数显著减小。本发明方法仅通过测量所述测试区的荧光强度的变化来测定待测物的数量，专属性强；能够检测极低浓度待测物的数量，可同时对待测物质进行定性与定量分析。本发明方法灵敏度更高、定量更准确、变异系数更低、稳定性高、操作简便快捷、成本低廉、适合于现场快速定性定量检测。

激光种类	波长(纳米)
氩氟激光(紫外光)	193
氩氟激光(紫外光)	248
氙氟激光(紫外光)	308
氮激光(紫外光)	337
氩激光(蓝光)	488
氩激光(绿光)	514
氦氟激光(绿光)	543
氦氟激光(红光)	633
罗丹明6G染料(可调光)	570-650