

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/547

G01N 33/543

G01N 33/533

G01N 33/52

G01N 21/64

[21] 申请号 200510052292.4

[43] 公开日 2005年7月27日

[11] 公开号 CN 1645146A

[22] 申请日 2005.2.3

[21] 申请号 200510052292.4

[71] 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

[72] 发明人 李庆阁 许 晔

[74] 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

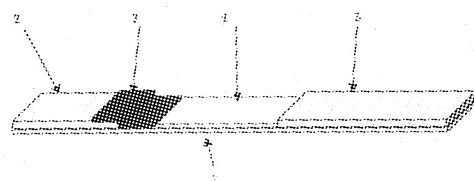
代理人 马应森

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条

[57] 摘要

用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条，涉及一种以荧光稀土络合物纳米颗粒为标记物的快速免疫层析检测方法及其检测试纸条。提供一种与常规固相免疫分析法相比，更简便、更快速；与常规胶体金免疫层析检测方法相比，更灵敏，适于定量的新型免疫层析检测方法及其检测试纸条。其步骤为将捕捉抗原或抗体通过物理吸附方式直接固定在层析膜上；在层析膜的样品垫一侧加入样品液和标记抗体，经免疫反应形成免疫复合物，对形成的检测带和控制带进行检测。在底衬上依次贴上层析膜、加样垫、标记垫和吸水垫，层析膜设于底衬上的中部，加样垫和吸水垫设于底衬两边，标记物设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫。



ISSN 1008-4274

1. 用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于其步骤为：

1) 将捕捉抗原或抗体通过物理吸附方式直接固定在层析膜上；

对不能直接固定在层析膜上的分子量较小的抗原，先将小分子抗原与载体蛋白交联，再通过物理吸附的方式固定于层析膜上；

2) 在层析膜的样品垫一侧加入样品液和标记抗体，经免疫反应形成免疫复合物，所说的标记抗体指的是用荧光稀土络合物纳米颗粒标记的与待测抗原结合的单克隆或多克隆抗体，所说的免疫复合物经免疫层析形成检测带和控制带；

3) 对形成的检测带和控制带进行检测。

2、如权利要求1所述的用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于荧光稀土络合物纳米颗粒指的是以二氧化硅纳米颗粒为载体的，通过共价或物理的方法掺杂有稀土络合物的荧光纳米粒子。

3、如权利要求1所述的用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于所说的载体蛋白优选牛血清白蛋白或酪蛋白。

4、如权利要求1所述的用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于所说的标记抗体或抗原是事先被滴加或浸泡到玻璃纤维膜上，经过冷冻干燥后，再装配到试纸条底衬上的；或者以溶液形式保存，在检测前滴加到样品垫靠近层析膜一端。

5、如权利要求1所述的用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于所说的层析膜为尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、聚酯膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜或硝酸纤维素与醋酸纤维素的混合膜中的一种。

6、如权利要求1所述的用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于所说的形成的检测带和控制带检测是指在紫外光下肉眼观察，或用数码相机进行辅助观察并记录结果，或通过专用的荧光测量仪进行检测。

7、如权利要求1所述的用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法，其特征在于其检测模式包括夹心模式和竞争模式，检测对象为单个组分或多个组分。

8、免疫层析检测试纸条，其特征在于在底衬上依次贴上层析膜、加样垫、标记垫和吸水垫，层析膜设于底衬上的中部，加样垫和吸水垫分别设于底衬上的两边，标记物设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫。

9、如权利要求8所述的免疫层析检测试纸条，其特征在于在层析膜上划有呈线状的与标记抗体或抗原对应的抗体。

用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条

技术领域

本发明涉及一种免疫层析检测方法，特别是一种以荧光稀土络合物纳米颗粒为标记物的快速免疫层析检测方法及其检测试纸条。所说的荧光稀土络合物纳米颗粒是掺杂或者键合荧光稀土络合物的硅纳米颗粒。

背景技术

免疫分析是用于抗体、抗原和半抗原检测的通用方法。免疫分析的检测模式有多种，其中，固相免疫分析法和免疫层析法均为临床常规方法。固相免疫分析法包括样品温育和冲洗步骤，该法具有灵敏度高、可进行半定量乃至定量检测的优点，尤其是96微孔板的检测模式便于大量样品的检测，是目前临床免疫诊断的主流检测方法。该方法的缺点是操作较为复杂，涉及加样、温浴、洗涤、显色、终止、检测等多个步骤，耗时1~2小时，对操作人员和环境也有一定的要求。虽然目前已经出现全自动仪器，但价格昂贵，普遍应用受限。

在固相免疫检测中，为进一步提高灵敏度，已有将稀土荧光纳米颗粒用作标记物的报道，如 Lövgren 等 (Clin. Chem. 2001, 47(3): 561-568; Anal. Chem. 2001, 73: 2254-2260; Clin. Chem. 2001, 47(7): 1269-1278) 就描述了一种采用包裹 β -二酮体-Eu³⁺络合物的聚苯乙烯微粒作为标记物的高灵敏度的固相时间分辨荧光免疫分析 (TrFIA) 技术。Tan 等 (Chem. Mater. 2004, 16: 2494-2498) 描述了一种以二氧化硅包裹 Eu³⁺络合物的纳米颗粒作为标记物的固相 TrFIA 技术。公开号 CN1515909A 的专利申请公开了一种量子点纳米粒子标记的夹心免疫检测法及诊断试剂盒。这些报道或专利申请所采用的检测方法能够达到较高的灵敏度，可以实现定量或半定量检测。

免疫胶体金技术属径向层流技术 (又称免疫层析检测技术)，人们熟知的床边检测试纸条 (如早孕自检试纸条) 就是其代表。免疫层析技术由于广泛使用胶体金作为指示剂，所以又被称为胶体金检测法。该技术在操作时仅需要试纸条与样品接触，静待数分钟后即可肉眼判读结果，因此具有操作简便、快速的优点，一般病人自行在家中即可操作。目前，该法广泛应用于样品初筛。胶体金技术的缺点是检测灵敏度较低，难以进行定量检测，而且目视检测使检测结果不易记录和保存。

在免疫层析检测技术中，除了采用胶体金作为标记物外，已有采用其它标记物作为指示剂的报道。CN1156699C号专利公开了一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记技术，将目的蛋白的抗体或抗原标记于磁珠，再以此磁珠去标记胶体金，使该抗体或抗原上同时带有两个标记物。然后以此双标记了的抗体或抗原去结合目的抗原或抗体，最终被固定在膜上的相应抗体或抗原捕获，形成一检测带。然后在肉眼对检测带进行初步定性或半定量检测的基础上，以磁性测定仪对该检测带进行定量检测。Bruning等(J. Clin. Microbiol. 1999, 81(1-2): 143-154)描述了一种以蓝色乳胶颗粒作为标记物的免疫层析试纸条快速检测牛瘟病毒的方法。公开号CN1480391A的专利申请公开了一种在常温下制备胶体纳米硒颗粒的方法，并将该方法制得的标记物用于免疫层析检测，获得了高于胶体金方法的灵敏度。Ahn等(Clinica Chimica Acta, 2003, 332: 51-59)报道了使用荧光染料荧光素作为指示剂用于免疫层析，可以获得较高的灵敏度，而且可以实现定量检测；专利号为US5753517的专利公开了一种使用乳胶颗粒作为标记物的定量免疫层析方法和仪器。

发明内容

本发明的目的是提供一种与常规固相免疫分析法相比，更简便、更快速；与常规胶体金免疫层析检测方法相比，更灵敏，适于定量的新型免疫层析检测方法。

本发明的另一目的是提供了一种用荧光稀土络合物纳米颗粒标记物制作的免疫层析检测试纸条。

本发明采用的技术方案是以申请人已经发明的荧光稀土络合物纳米颗粒(CN 1400467A号专利申请)作为标记物，将高灵敏度的荧光稀土络合物纳米颗粒标记物与免疫层析技术相结合，利用抗原抗体的特异反应，应用于免疫层析检测。

本发明所说的用荧光稀土络合物纳米颗粒制作的快速检测试纸条方法的实施步骤如下：

1) 将捕捉抗体或抗原直接或间接固定在层析膜上：将捕捉抗原或抗体通过物理吸附方式直接固定在层析膜上，对不能直接固定在层析膜上的分子量较小的抗原，通过预先将小分子抗原与载体蛋白交联，再通过物理吸附的方式固定于层析膜上；

2) 免疫层析：在层析膜一侧的样品垫上加入样品液和标记抗体，发生的免疫反应经过层析形成免疫复合物带，所说的标记抗体指的是用荧光稀土络合物纳米颗粒标记的与待测抗原特异结合的单克隆或多克隆抗体，所说的免疫复合物带包括检测带和控制带；

3) 结果检测：对形成的检测带和控制带进行检测。

所说的荧光稀土络合物纳米颗粒指的是以二氧化硅纳米颗粒为载体的，通过共价或物

理的方法掺杂有稀土络合物的荧光纳米粒子，其荧光波长可根据所掺杂的稀土络合物的不同而改变（参见 CN 1400467A 号专利申请）。

荧光稀土络合物纳米颗粒的标记方法，是一种将抗体固定于纳米颗粒表面的方法。以表面带有氨基的荧光纳米颗粒为例，当标记抗体时，可以将抗体的 Fc 端氧化产生醛基，再与颗粒表面已经修饰的氨基交联。这样可以把抗体定向标记到颗粒表面，使其抗原结合端（N 端）朝向外侧。当然也可以通过其它双功能试剂进行交联。当标记抗原时，根据抗原所能提供的标记基团不同，可以采用戊二醛、碳二亚胺或其它双功能试剂进行交联。标记小分子物质时，可以在颗粒表面先交联一层铺垫蛋白（如牛血清白蛋白 BSA）。

所说的标记抗体或抗原是事先被滴加或浸泡到玻璃纤维膜上，经过冷冻干燥后，再装配到试纸条底衬上的；或者以溶液形式保存，在检测前滴加到样品垫靠近层析膜一端。

所说的抗体固定是指按照制作胶体金免疫检测试纸条的常规方法，通过点膜器将捕捉抗体或抗原呈线状划到层析膜上（一般通过机器自动完成）。某些小分子半抗原的固定，需要与预先载体蛋白（如 BSA）共价交联，然后再按与蛋白抗原的相同的方式固定到层析膜上。本发明还在检测带的下游，通过点膜器将与标记抗体或抗原对应的抗体（如兔抗鼠 IgG）呈线状或带状划到层析膜上，其作用是在检测时作为控制带。所说的载体蛋白优选牛血清白蛋白（BSA）或酪蛋白等。

所说的层析膜为尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、聚酯膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜或硝酸纤维素与醋酸纤维素的混合膜等中的一种。

所说的免疫反应包括夹心式和竞争式两种模式。在夹心模式中，待测抗原在点样区与荧光稀土络合物纳米颗粒标记抗体形成免疫复合物，该复合物在膜上移动与固定在膜另一端的特异抗体发生特异结合，形成固定化的免疫复合物，由于该免疫复合物携带由标记的荧光稀土络合物纳米颗粒，因此成为检测带。与此同时，部分游离的荧光稀土络合物纳米颗粒标记的抗体可以越过固定化抗体带，结合到远端的包被抗体，形成新的荧光稀土络合物纳米颗粒结合区，此为控制带，可以指示标记抗体的活性。在竞争模式中，待测抗原首先与加入的荧光稀土络合物纳米颗粒标记的抗体反应，游离的标记抗体则与检测带处的固定的抗原结合，部分游离的抗体可以越过固定化抗体带，结合到远端的所谓控制线（固定有抗体试剂），形成新的荧光稀土络合物纳米颗粒结合区，此为控制带。

所说的结果检测，是指对形成的检测带和控制带进行检测，检测方式可以是在紫外光下进行肉眼观察，也可用数码相机进行辅助观察并记录结果，也可以通过专用的荧光测量仪进行检测。检测带的荧光强度与待测样品存在定量关系，如果是夹心法检测模式中，检

测带处的荧光强度与待测样品含量成正比。如果是竞争法模式，检测带处的荧光强度与待测样品含量成反比。

本发明所说的免疫层析检测试纸条由底衬、加样垫、标记物垫、层析膜和吸水垫组成，在底衬上依次贴上层析膜、加样垫、标记垫和吸水垫，层析膜设于底衬上的中部，加样垫和吸水垫分别设于底衬上的两边，标记物设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫。底衬可采用聚氯乙烯材料底衬。

本发明所说的免疫层析检测试纸条的制备步骤如下：

- 1) 制备荧光稀土络合物纳米颗粒。
- 2) 标记抗体或抗原的交联及固相化。
- 3) 在层析膜上固定捕捉抗体或抗原或控制线抗体。
- 4) 组装试纸条。

本发明与现有技术相比具有以下优点：

- 1) 将高灵敏的荧光稀土络合物纳米颗粒与免疫层析技术相结合，制备了检测试纸条，既能进行定性检测又能进行定量检测。
- 2) 使用该技术制备的试纸条操作简便，省时省力，一步法完成，5—30分钟给出结果。
- 3) 灵敏度高。以检测乙肝表面抗原（HBsAg）为例，在紫外光（310—360nm）激发下荧光成像的检测限为0.2ng/mL。如果配合时间分辨检测仪器，可望进一步提高灵敏度。
- 4) 既适合于单个样品的检测，又适用于大量样品的筛查。
- 5) 还能用于制备一项多检的快速检测试剂盒。
- 6) 能够检测全血、血清、血浆、唾液、尿液等样品。
- 7) 能够应用于疾病诊断、毒品检测、细菌检测和环境检测等领域。

本发明所采用的荧光稀土络合物纳米颗粒还具有荧光寿命长的特点，允许使用时间分辨检测仪器，获得比普通荧光检测更高的灵敏度。

由于稀土络合物具有 Stokes 位移大，激发光谱带较宽，发射光谱带窄的特点，选用不同的荧光稀土络合物纳米颗粒针对不同的待检抗原或抗体就可以同时检测同一样品中的不同待检目标。

本发明提供了一种新的指示剂用于免疫层析检测，建立在新指示剂基础上的免疫层析检测技术既保持了传统胶体金的简便快速优点，同时又克服了后者灵敏度低，无法定量的缺点，同时，与上述免疫层析检测中的胶体金替代指示剂相比，也具有独特的优点，包括了检测灵敏度更高，可以多色检测，稳定，检测方式灵活等。

附图说明

图 1 为标记颗粒示意图，分别表示了不同的标记策略。在此，以表面带有氨基的，直径为 50nm 的荧光稀土络合物纳米颗粒（FNP）为例。图 1a 为定向标记抗体的示意图。抗体的 Fc 端被氧化产生醛基，能够与颗粒表面的氨基交联，从而被定向固定到颗粒表面。定向标记的抗体的 Fab 端朝向颗粒外端，最大限度地减小了颗粒带来的空间位阻。图 1b 为颗粒标记大分子抗原示意图。根据抗原所能提供的标记用基团，选择戊二醛、碳二亚胺或其它双功能试剂。此标记策略适用于那些分子量较大，受空间位阻影响较小的抗原。图 1c 为颗粒标记小分子抗原示意图。因为小分子抗原受空间位阻影响较大，所有需要在颗粒表面先交联一层铺垫蛋白（如 BSA），以降低颗粒带来的空间位阻。在实际应用当中，可根据不同的标记对象选择不同的标记策略。

图 2 为用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析检测试纸条结构示意图。该试纸条结构与常规胶体金试纸条相似。分别由聚氯乙烯底衬 1、加样垫 2、标记物垫 3、层析膜 4 和吸水垫 5 组成。装配时，与胶体金试纸条相似，在底衬 1 上依次贴上层析膜 4、加样垫 2、标记物垫 3 和吸水垫 5，再由切割机切割成为适当宽度的试纸条。

图 3 为用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析检测试纸条检测结果示意图。该试纸条的检测结果须在紫外光激发下观察。当采用夹心法或间接法检测时，阳性结果呈现两条带，即检测带 6 和控制线 7，阴性结果只呈现一条控制线。当采用竞争法检测时，阴性结果呈现两条带，而阳性结果只呈现一条带。

图 4 为用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析检测试纸条一步多检示意图。在此，我们以 HBsAg 检测系统和生物素-亲核素系统模拟一步多检项目。第一检测带 8 的 HBsAg 检测系统以一对不同位点的单抗作为捕获抗体和标记抗体，其中将标记抗体与 Eu^{3+} 络合物纳米颗粒交联，以夹心法进行检测。第二检测带 9 的生物素-亲核素系统，则是将亲核素模拟捕获抗体，以生物素化的 Tb^{3+} 络合物纳米颗粒作为标记物，采用竞争法模拟检测生物素。以兔抗鼠 IgG 作为检测带捕获抗体。标记物垫中同时含有抗-HBsAg 单抗标记的 Eu^{3+} 络合物纳米颗粒和生物素标记的 Tb^{3+} 络合物纳米颗粒。当检测样品中同时含有 HBsAg 和生物素时，呈现两条红色的带；当检测样品中只含有 HBsAg 时，呈现两条红色以及一条绿色的带；当检测样品中只含有生物素时，只呈现一条红色的控制线带 10；当样品中不含有 HBsAg 和生物素时，呈现一条绿色和一条红色的控制线带。

图 5 为胶体金试纸条检测结果。此处以商品化胶体金 HBsAg 检测试纸条作为对照，检测时间为 30 分钟。从结果可见，其灵敏度在 1ng/mL 左右（由于扫描的缘故，图中的检测

带看的不是很清楚)。

图6为稀土络合物荧光纳米颗粒试纸条检测结果。在图6中,以HBsAg为检测对象,考察其检测灵敏度。检测时间为30分钟,检测结果以数码相机(Canon Powershot A80型)在荧光成像条件下辅助观察并记录结果。为了便于观察,照相结果进行了反相处理。从结果可见,该试纸条的检测灵敏度可达0.2ng/mL。

具体实施方式

以下实施例描述了本发明的特殊实施例子,以便对本发明作进一步的说明,这些实施例只是说明而不表示本发明所有的可能性。本发明并不局限于这些实施例中提到的材料、反应条件或参数,任何在相关领域具备经验的人,都可以按照本专利的原理,利用其它类似材料或反应条件实现本发明所描述的免疫层析技术或制备出检测试剂盒。这些并不脱离本发明描述的基本概念。因此,这些修改或者不同的应用都在本发明的覆盖范围之内。

实施例一: HBsAg 快速检测试纸条的制备

该实施例以HBsAg为检测对象,以表面带有氨基的直径50nm左右的键合型荧光稀土络合物纳米颗粒,硝酸纤维素层析膜为例,通过标记、包被以及各组成部分组装,制备出用荧光稀土络合物纳米颗粒作为标记物的免疫层析检测试纸条成品。

(1) 抗-HBsAg 单克隆抗体的标记

方法一: 定向标记

取亲和纯的抗-HBsAg单克隆抗体500 μ L(3.6mg/mL),对0.01M醋酸钠缓冲液(pH5.2)4 $^{\circ}$ C透析6h;然后加入NaIO₄,对抗体进行氧化。20min后,再次对0.01M pH5.2醋酸钠缓冲液透析;然后加入表面带有氨基的BHHCT-Eu颗粒500 μ L(18mg/mL),混匀,4 $^{\circ}$ C过夜;加入NaBH₄,终浓度为5mM,反应2h;再加入等体积的封闭液(50mM Tris 7.8,含2%BSA、4%蔗糖),封闭12h或4 $^{\circ}$ C过夜;最后用50mM tris 7.8洗涤标记好的抗体3遍,然后用500 μ L 50mM tris 7.8(含0.9% NaCl、0.2% BSA、0.1% NaN₃)悬浮备用。

方法二: 戊二醛交联

向500 μ L悬浮于超纯水中的表面带有氨基的BHHCT-Eu颗粒(18mg/mL)中加入125 μ L戊二醛(25%),室温搅拌2h;以超纯水洗涤颗粒3次;加入500 μ L抗-HBsAg单克隆抗体(3.6mg/mL),4 $^{\circ}$ C过夜;加入NaBH₄,终浓度为5mM,反应2h;再加入等体积的封闭液(50mM tris 7.8,含2%BSA、4%蔗糖),封闭12h或4 $^{\circ}$ C过夜;最后用50mM tris 7.8洗涤标记好的抗体3遍,然后用500 μ L 50mM tris 7.8(含0.9% NaCl、0.2% BSA、0.1% NaN₃)悬浮备用。

(2) 标记抗体的固相化

方法一：冻干法

将制备好的标记颗粒用以 10 mM Tris 7.8 缓冲液配制的 2% 的酪蛋白稀释液按 1 : 1000 稀释；然后将作为标记物垫的玻璃纤维浸入其中，以浸湿为准，然后冻干备用。

方法二：悬浮态保存法

将制备好的标记颗粒用以 10 mM Tris 7.8 缓冲液配制的 2% 的酪蛋白稀释液按 1 : 100 稀释，并于容器中保存于 4℃。在检测前以 1 μL 的量滴加到样品垫靠近层析膜一端。

(3) 捕获抗体的包被

在硝酸纤维素薄膜上，用点膜器将 2mg/mL 单克隆抗-HBs 点成线状或带状，其包被体积为 1.2 μL/cm 作为检测带；在距检测带 0.5cm 的膜上，用 2mg/mL 的兔抗鼠 IgG 再划一条对照线。用 PBS 漂洗 2 次，再用 50mg/mL BSA 封闭 2h。取出后再加蛋白稳定剂处理 3min 凉干。

(4) 试纸条的装配

在一长方形聚氯乙烯底衬的中部贴上已包被单克隆抗-HBs 的硝酸纤维素薄膜，在膜的一侧贴上玻璃纤维，并在于膜交接的一端铺上标记物垫，在层析膜的另一端贴上吸水纸。然后切成 75mm×3mm 条形的 HBsAg 检测试纸条。

(5) 样品检测

在试纸条的样品垫上加 60 μL 的待测样品（如果标记颗粒以悬浮态保存，则在加样品前，在样品垫靠近层析膜一端滴加 1 μL 标记颗粒悬浮液），20min 后，在紫外光下观察结果或通过时间分辨荧光检测仪测量度数。如果样品中 HBsAg 含量较低，则需适当延长检测时间。阳性结果呈现两条红色的带，而阴性结果只呈现一条红色的带。层析反应 30min，在紫外光激发荧光成像的检测灵敏度为 0.2ng/mL。在本实施例中，我们以 Canon Powershot A-80 进行辅助观察并记录结果。该方法检测的结果还可以通过时间分辨荧光检测仪进行读数。

实施例二：以生物素-亲核素系统模拟竞争法检测生物素

该实施例将链霉亲核素模拟捕获抗体，以生物素化的 Tb³⁺络合物纳米颗粒作为标记物，采用竞争法模拟检测生物素。例中所用的颗粒直径在 50nm 左右。

(1) Tb³⁺络合物纳米颗粒的生物素化

方法一：

取待标记的表面带有氨基的 BPTA-Tb 颗粒 500 μL（悬浮于无水乙醇），加入少许 biotin-mPEG-SPA，溶解，混匀，室温反应 3h；然后，分别以无水乙醇和 50mM tris 7.8 缓冲液洗涤颗粒 3 遍，然后用 500 μL 50mM tris 7.8（含 0.9% NaCl、0.2% BSA、0.1% NaN₃）悬

浮备用。

方法二：

取待标记的表面带有氨基的 BPTA-Tb 颗粒 500 μ L (悬浮于超纯水)，用 5% 的戊二醛处理 2h，洗涤后，重悬浮于 1mL 10mM PBS 7.4 缓冲液中，然后加入 10mg BSA，室温反应 2h 后，以上述 PBS 缓冲液进行洗涤，然后加入 1mg NHS-LC-biotin，室温反应 3h；以 50mM tris 7.8 缓冲液洗涤颗粒 3 遍，然后用 500 μ L 50mM tris 7.8 (含 0.9% NaCl、0.2% BSA、0.1% NaN₃) 悬浮备用。

(2) 标记的颗粒的固相化

同实施例一。

(3) 捕获抗体的包被

在硝酸纤维素薄膜上，用点膜器将 1mg/mL 链霉亲核素点成线状或带状，其包被体积为 1.2 μ L/cm 作为检测带。因为是模拟实验，暂不设控制线。用 PBS 漂洗 2 次，再用 50mg/mL BSA 封闭 2h。取出后再加蛋白稳定剂处理 3min 凉干。

(4) 试纸条的装配

同实施例一。

(5) 样品检测

在试纸条的样品垫上加 60 μ L 的待测样品 (如果标记颗粒以悬浮态保存，则在加样品前，在样品垫靠近层析膜一端滴加 1 μ L 标记颗粒悬浮液)，20min 后，在紫外光下观察结果或通过时间分辨荧光检测仪测量度数。本实施例以 50ng/mL 作为阳性对照，0ng/mL 作为阴性对照。阳性对照不呈现检测带，而阴性对照呈现一条绿色的检测带。

实施例三：一步多检检测

以 HBsAg 检测系统和生物素-亲核素系统模拟一步多检项目。第一检测带的 HBsAg 检测系统以一对不同位点的单抗作为捕获抗体和标记抗体，其中将标记抗体与 Eu³⁺络合物纳米颗粒交联，以夹心法进行检测。第二检测带的生物素-亲核素系统，则是将亲核素模拟捕获抗体，以生物素化的 Tb³⁺络合物纳米颗粒作为标记物，采用竞争法模拟检测生物素。以免抗鼠 IgG 作为检测带捕获抗体。标记物垫中同时含有抗-HBsAg 单抗标记的 Eu³⁺络合物纳米颗粒和生物素标记的 Tb³⁺络合物纳米颗粒。

(1) 抗-HBsAg 单克隆抗体的标记

同实施例一。

(2) Tb³⁺络合物纳米颗粒的生物素化

同实施例二。

(3) 标记颗粒的固相化

同实施例一，所不同的是，标记颗粒为 Eu 颗粒标记物和 Tb 颗粒标记物的混合物。

(4) 捕获抗体的包被

在硝酸纤维素薄膜上，用点膜器将 2mg/mL 单克隆抗-HBs 点成线状或带状，其包被体积为 1.2 μ L/cm 作为检测带 1；在检测带 1 下游 0.4cm 的膜上，用 1mg/mL 的链霉亲核素再划一条检测带 2；在检测带 2 下游 0.4cm 的膜上，用 2mg/mL 的兔抗鼠 IgG 再划一条对照线。用 PBS 漂洗 2 次，再用 50mg/mL BSA 封闭 2h。取出后再加蛋白稳定剂处理 3min 凉干。

(5) 试纸条的装配

同实施例一。

(6) 样品检测

在试纸条的样品垫上加 60 μ L 的待测样品（如果标记颗粒以悬浮态保存，则在加样品前，在样品垫靠近层析膜一端滴加 1 μ L 标记颗粒悬浮液），20min 后，在紫外光下观察结果或通过时间分辨荧光检测仪测量度数。当检测样品中同时为 HBsAg 和生物素阳性时，呈现两条红色的带；当检测样品中只有 HBsAg 阳性时，呈现两条红色以及一条绿色的带；当检测样品中只有生物素阳性时，只呈现一条红色的控制线带；当样品中的 HBsAg 和生物素均为阴性时，呈现一条绿色和一条红色的控制线带。

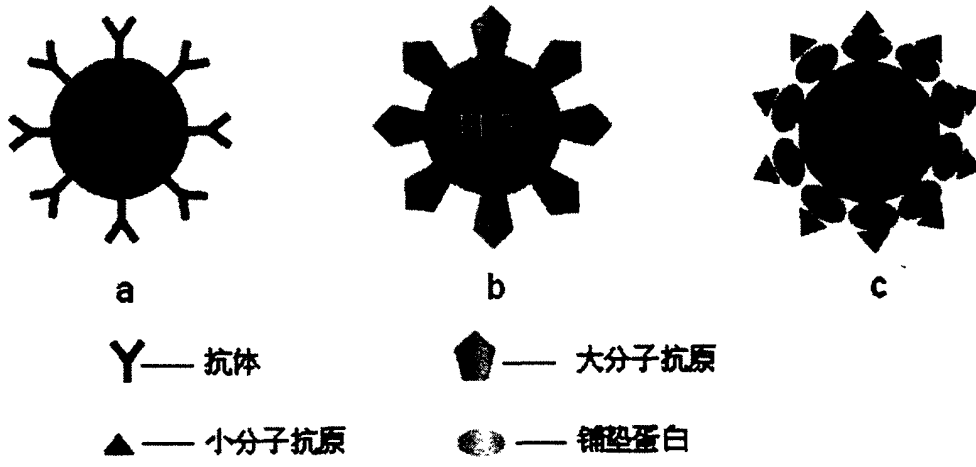


图 1

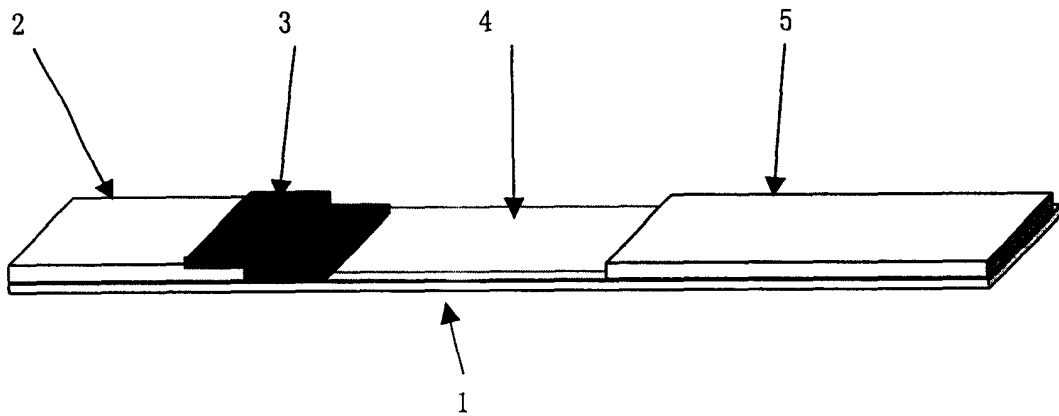


图 2

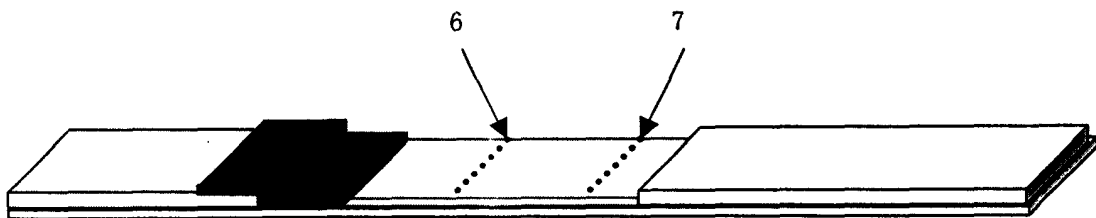


图 3

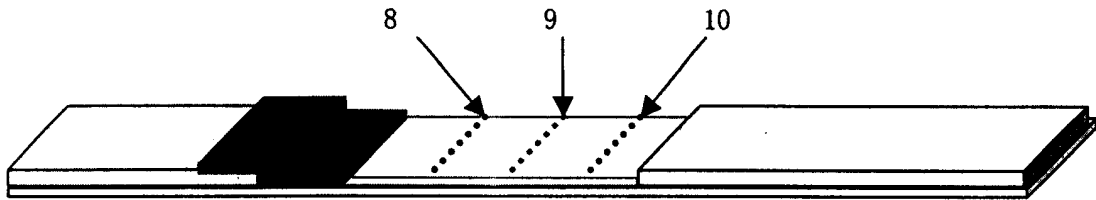


图 4

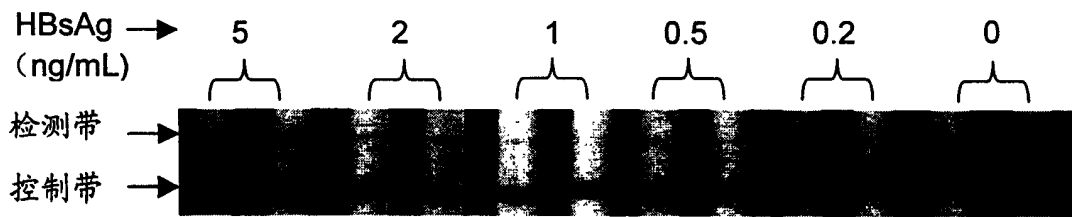


图 5

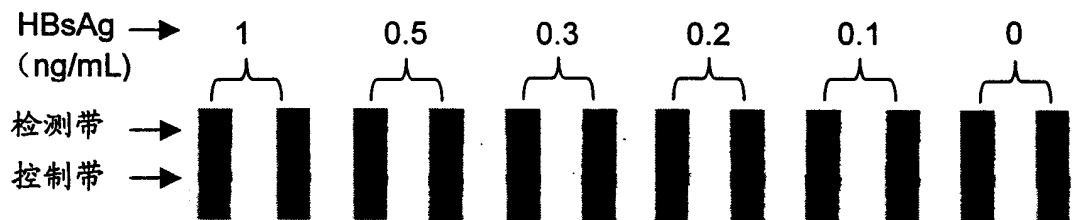


图 6