



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596980 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611161198.7

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 威海纽普生物技术有限公司

地址 264200 山东省威海市高区火炬路
213-1号创新创业基地C座301-303室

(72)发明人 王有志 王文亮 刘衍亮 陈萍萍
宋璐琳 李红江

(74)专利代理机构 威海科星专利事务所 37202
代理人 初姣姣

(51) Int. Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体地说是一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒及制作方法,设有试纸卡,其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中结合垫上吸附有稀土 Eu^{3+} 荧光微球标记的 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为150nm,稀土荧光微球含稀土镧系元素 Eu^{3+} ,在基态下稳定,在337nm的激发光源作用下发射出波长615nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的 β -人绒毛膜促性腺激素抗原表位的单克隆抗体细胞株,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。

1. 一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒, 设有试纸卡, 其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体-微球偶联复合物, 所述稀土荧光微球的直径为100-250nm, 稀土荧光微球含稀土镧系元素中的一种或几种, 在基态下稳定, 在300-400nm的激发光源作用下发射出波长范围为550-650nm的荧光; 所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体, 来源于针对2-6个不同的 β -人绒毛膜促性腺激素抗原表位的单克隆抗体细胞株。

2. 根据权利要求1所述的一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒, 其特征在于所述结合垫的稀土荧光微球的直径是120-200nm; 结合垫上稀土荧光微球标记的抗体来源于针对2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株, 稀土荧光微球含稀土镧系元素 Eu^{3+} , 在基态下稳定, 在337nm的激发光源作用下发射出波长615nm的荧光。

3. 根据权利要求1所述的一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒, 其特征在于所述结合垫采用如下步骤制得: 将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCL处理液中(含1.0% Triton X-100, 2.5% BSA, pH7.4), 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡2小时, 然后取出37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干4小时, 备用, 将玻璃纤维膜放在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上, 用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土 Eu^{3+} 荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体偶联复合物喷到玻璃纤维膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干1小时后制得。

4. 根据权利要求1所述的一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒, 其特征在于结合垫上的所述稀土荧光微球标记的 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体采用如下步骤制得:

步骤1: 单克隆抗体细胞株的获得: 用 β -人绒毛膜促性腺激素纯品免疫小鼠, 采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株, 对所获得的单抗细胞株进行配对筛选, 根据配对结果和亲和力数据优选出用于试剂盒的单抗细胞株;

步骤2: 单克隆抗体的制备: 采用标准的腹水生产工艺制备并纯化 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体, 分装后保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用;

步骤3: 稀土荧光微球的醛基化: 取5mg稀土荧光微球, 用20mM, pH9.5的碳酸盐缓冲液, 采用离心法洗涤3遍, 离心速度为12000rpm, 时间为5分钟, 最后重悬于100 μl 的上述碳酸盐缓冲液中, 加入500 μl 醛基化的葡聚糖, 混匀, 室温下暗反应4小时, 采用同样的离心法洗涤和重悬到100 μl 的上述碳酸盐缓冲液中, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用;

步骤4: 稀土荧光微球标记的 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体的制备: 选取来自2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株的单克隆抗体, 按照质量比1:1将2mg β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜, 然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; 然后, 加入硼氢化钠至终浓度5mM, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应4小时; 再加入等体积的封闭液(50mM Tris-HCL, pH7.4, 含2% BSA, 5% 蔗糖), 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜; 然后用50mM Tris-HCL, pH7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍, 重悬于100 μl 的50mM Tris-HCL缓冲液中(含1.2% NaCl, 0.5% BSA, 0.1% Tween 20), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

5. 根据权利要求1所述的一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒, 其特征在于所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

步骤1: 采用与结合垫上所用 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体细胞株不同的细胞株, 采用标准的腹水生产工艺制备并纯化 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体, 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备

用；

步骤2:分别用包被稀释液将上述鼠源抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1mg/ml,膜液量为1 μ l/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为4mm,然后置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干2小时。

6.根据权利要求1所述的一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒,其特征在于所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0%Triton X-100,2.5%BSA,0.15M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4 $^{\circ}$ C浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干2小时。

β-人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒及制作方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，包括蛋白交联技术、膜层析技术、标记免疫分析技术等。具体地说是一种能够快速准确的对血清、血浆和全血等样品中β-人绒毛膜促性腺激素进行定量分析的β-人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒及制作方法。

背景技术：

[0002] 人绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) 是由胎盘滋养层细胞所分泌的一类糖蛋白类激素，由α、β两个亚基组成，含糖量为30%左右。α-亚基由92个氨基酸残基组成，分子量14.5KD，它与FSH、LH及TSH的α-亚基结构相似；β-亚基为特异性链，由145个氨基酸组成，分子量22KD。女性受精的卵子移动到子宫腔内着床后，形成胚胎，在发育成为胎儿的过程中，孕妇胎盘绒毛膜滋养层合体细胞合成，产生大量的hCG进入母体并通过孕妇的血液循环而排泄到尿中。当妊娠1-2周时血液和尿中的hCG水平即可迅速升高，第8-12周可达到高峰。直至孕期3个月降至中等水平，并一直维持到妊娠末期。检测β-hCG的重要意义可以了解胎儿发育的状况以及是否存有与妊娠相关的多种疾病，如流产、保胎成功与否、宫外孕、滋养层细胞肿瘤、葡萄胎等多种疾病的辅助诊断。

[0003] 正常发育的绒毛所分泌的HCG量很大，每天的滴度不断快速上升，每48小时上升66%以上。既如果β-HCG每两天增加的量大于66%，可以诊断为宫内妊娠；而如果增加的量小于66%，则宫外孕或宫内孕发育不良的可能性很大，对于宫外孕，由于输卵管肌层菲薄，血供不良，HCG分泌量很低，每天升值较小，48小时上升不到50%（但有一部分人最初的HCG上升正常）。如果用HCG难以确认，还可用血孕酮来做辅助性诊断，进一步还可以进行B超检查。如果HCG增加速度非常快，表明有葡萄胎的可能，必须紧密监测。当然也有可能是双胞胎。另外：HCG升高还有下列几种可能：正常怀孕双胞胎、葡萄胎或某些疾病或肿瘤。如在内分泌疾病中，如脑垂体疾病、甲状腺功能亢进、妇科疾病如卵巢囊肿、子宫癌等HCG也可增高。近年来发现恶性肿瘤如默契胎瘤、胰腺瘤、胃癌、肝癌、乳腺癌、肺癌等血中HCG也可升高。因此在肿瘤科，将HCG看作是癌标志物之一。但必须结合临床情况及其它检查结果，通过综合分析才能正确分析。产后9天或人工流产术后25天，血清HCG应恢复正常。如不符合这一情况，则应考虑有异常可能。建议流产手术后进行2次HCG定量检查，有下降趋势至<25mIU/mL可判断流产成功。

[0004] β-hCG水平的增长变化，不像人体其他激素那样的变化幅度很小，胚胎发育正常时，不同周数均有一定的正常范围；其次正常妊娠时β-hCG的增长速率是极快的，β-hCG的浓度每时每刻都在增加。因此可以通过对β-hCG的检测和增长速率的观察来辅助区分正常妊娠和许多异常的病理情况。

[0005] 免疫分析技术是利用微量抗原与相应的高特异性抗体之间的免疫反应，来检测如激素、药物、蛋白质、多肽、酶、肿瘤相关抗原、微生物素、病毒、细菌及金属元素等生物体内活性物质。免疫分析技术包括标记免疫分析、非标记免疫分析和仪器免疫分析。

[0006] 荧光免疫分析 (FIA) 和放射免疫分析 (RIA) 自问世以来，经历了几十年的发展，但

是人们越来越感觉到FIA因自然本地太高,干扰检测结果;RIA采用同位素标记,对人体有极大危害并给实验带来不便。酶免疫分析(EIA)也因酶本身不稳定,受其他影响因素较大,推广应用受到限制。80年代初,人们开始研究用稀土元素代替荧光物质和同位素标记蛋白质或抗体,将时间分辨技术引入到生物检测领域,建立了新型的超微量时间分辨荧光免疫分析技术(Time resolved Fluoroimmunoassay,简称TrFIA)。该技术采用多学科先进技术,集结了其他免疫分析的特点,在免疫学、分子生物学、细胞学和医学等领域,取得长足的发展和广泛应用。

[0007] TrFIA利用了具有独特荧光特性的3价稀土离子及螯合物为示踪物代替荧光物质、酶、同位素、化学发光物质,标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞,待反应体系(如抗原抗体反应、核酸探针杂交、生物素亲和素反应以及靶细胞对效应细胞的杀伤效应等)发生后,用TrFIA检测仪测定反应产物中的荧光强度。根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,判断反应体系中分析物的浓度,从而达到定量分析。在通常的荧光测定中,由于测试样品中含有多种荧光成分,背景荧光(来自样品中的胶体颗粒和溶剂分子引起的散射光以及血清中蛋白质和其他化合物发出的非特异性荧光)强度大、干扰强,成为荧光分析法大范围推广的瓶颈。TrFIA之所以能够成为继EIA、RIA之后一种新的灵敏的检测方法,主要取决于镧系元素独特的荧光特点、检测中采用的波长分辨和时间延迟技术以及解离-增强技术。

[0008] 镧系元素(lanthanide, Ln)属于稀土元素,共有17种,常用于TrFIA主要有铕(Eu)、钐(Sm)、铽(Tb)、镝(Dy)。镧系元素具有独特的荧光发光特点,与普通荧光相比,镧系离子螯合物荧光衰变时间长,为传统荧光的 10^3-10^6 倍。如镧系离子螯合物的荧光衰变时间在60-900 μ s,常用的Eu³⁺荧光衰变时间为714 μ s,普通荧光免疫分析中荧光团的荧光衰变时间只有1-100 μ s,样品中一些蛋白质的荧光衰变时间仅为1-10 μ s,因此利用时间分辨技术,延迟一定时间后测量,便可获得Eu³⁺特异性荧光信号。同时由于衰变时间长, Eu³⁺标记物在测量时间里可以反复被激发,每次激发后由激发态很快跃迁到基态,就有荧光发出,然后又可被重新激发,如此每秒可有1000次激发,使得TrFIA荧光标记物的相对比活性很高。镧系元素荧光光谱的最大特征是激发光与发射光之间的Stokes位移较大, Eu³⁺激发波长为337nm,发射波长为615nm, Stokes位移可达278nm;同时Eu³⁺被激发的荧光光带极窄,荧光的发射峰非常尖锐,可使仪器调整在极窄的波长范围内测定,这样就几乎完全消除了背景荧光的干扰,继而通过时间延迟和波长分辨,将强特异性荧光和背景荧光分开(故称为时间分辨),使干扰达到几乎为零。

[0009] 鉴于以上标记方法及检测技术的应用,本试剂盒具有良好的检测特异性、较高的灵敏度、操作的简便性以及稳定的荧光标记物保证了检测的准确性。

发明内容:

[0010] 本发明针对现有技术中存在的缺点和不足,提出了一种利用荧光免疫层析的灵敏性,结合荧光免疫层析分析仪实现的灵敏度高、快捷简便,可以准确定量的 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒及制作方法。

[0011] 本发明可以通过以下措施达到:

[0012] 一种 β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒,设有试纸卡,其特征在于所述试纸卡由

下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体-微球偶联复合物,所述稀土荧光微球的直径为100-250nm,稀土荧光微球含稀土镧系元素中的一种或几种,在基态下稳定,在300-400nm的激发光源作用下发射出波长范围为550-650nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的 β -人绒毛膜促性腺激素抗原表位的单克隆抗体细胞株。

[0013] 本发明所述结合垫的稀土荧光微球的直径优选是120-200nm;所述稀土荧光微球优选含有一种或几种稀土镧系元素;结合垫上稀土荧光微球标记的抗体优选来源于针对2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株。

[0014] 本发明所述结合垫采用如下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCL处理液中(含1.0% Triton X-100,2.5% BSA,pH7.4),4℃浸泡2小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用,将玻璃纤维膜放在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体偶联复合物喷到玻璃纤维膜,37℃烘干1小时后制得。

[0015] 本发明中结合垫上的所述稀土荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体采用如下步骤制得:

[0016] 步骤1:单克隆抗体细胞株的获得:用 β -人绒毛膜促性腺激素纯品免疫小鼠,采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株,对所获得的单抗细胞株进行配对筛选,根据配对结果和亲和力数据优选出用于试剂盒的单抗细胞株;

[0017] 步骤2:单克隆抗体的制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用;

[0018] 步骤3:稀土荧光微球的醛基化:取5mg稀土荧光微球,用20mM,pH 9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100 μ l的上述碳酸盐缓冲液中,加入500 μ l醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100 μ l的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0019] 步骤4:稀土Eu³⁺荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体的制备:选取来自2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株的单克隆抗体,按照质量比1:1将2mg β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(50mM Tris-HCL,pH7.4,含2% BSA,5% 蔗糖),4℃封闭过夜;然后用50mM Tris-HCL,pH7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100 μ l的50mM Tris-HCL缓冲液中(含1.2% NaCl,0.5% BSA,0.1% Tween 20),4℃避光保存备用。

[0020] 本发明所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

[0021] 步骤1:采用与结合垫上所用抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体细胞株不同的细胞株,采用标准的腹水生产工艺制备并纯化抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体,保存于-20℃备用;

[0022] 步骤2:分别用包被稀释液将上述鼠源抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到0.5-3mg/ml,膜液量为0.5-3 μ l/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱

中,37℃烘干2小时。

[0023] 本发明所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0%Triton X-100,2.5%BSA,0.15M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0024] 本发明还提供了一种如上所述试剂盒实现的β-人绒毛膜促性腺激素制作方法,其特征在于包括以下步骤:

[0025] 步骤1:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0026] 步骤2:读卡:将IC卡放置在干式荧光免疫分析仪标注位置,读取相关信息,所述荧光免疫层析分析仪是一种光学检测系统,对β-人绒毛膜促性腺激素的测定范围为5-40000mIU/mL;

[0027] 步骤3:加样:血清/血浆:取100μL血清/血浆样本垂直滴加至测试卡加样处;其中全血,取150μL全血样本垂直滴加至测试卡加样处;取样时注意不要吸入气泡;

[0028] 步骤4:检测:可采用自动测试或即时测试两种模式进行检测,自动测试:将测试卡插入干式荧光免疫分析仪的承载器上,按测试键,仪器将自动对测试卡进行扫描分析检测;即时测试:测试卡室温放置15min后,插入干式荧光免疫分析仪的承载器上,点击即时测试。

[0029] 本发明提供一种利用稀土羧基乳胶微球标记的荧光免疫层析技术制备的β-人绒毛膜促性腺激素(β-HCG)测定试剂盒(荧光免疫层析法),同时适合血清、血浆和全血样本,并适合临床上单人份检测,相对于β-人绒毛膜促性腺激素定性胶体金试剂,能定量检测样本中的β-人绒毛膜促性腺激素含量,具有更明确的临床指导意义,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

附图说明:

[0030] 附图1是本发明中试纸卡的结构示意图。

[0031] 附图2是本发明中实施例2的准确度分析结果示意图。

[0032] 附图3是本发明中实施例2的准确度分析结果示意图。

[0033] 附图4是本发明中实施例2的准确度分析结果示意图。

[0034] 附图标记:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4、吸水垫5。

具体实施方式:

[0035] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明:

[0036] 如附图1所示,本发明首先提出了一种β-人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒,盒内设有试纸卡,所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5,其中结合垫上吸附有稀土Eu³⁺荧光微球标记的抗β-人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体-微球偶联复合物,所述稀土荧光微球的直径为150nm,稀土荧光微球含稀土镧系元素Eu³⁺,在基态下稳定,在337nm的激发光源作用下发射出波长615nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的β-人绒毛膜促性腺激素抗原表位的单克隆抗体细胞株。

[0037] 所述结合垫3的稀土荧光微球的直径优选是150nm;所述稀土荧光微球优选含有稀土镧系元素铕(Eu³⁺);结合垫上稀土荧光微球标记的抗体优选来源于针对2个不同抗原表位

的单克隆细胞细胞株。

[0038] 实施例1:

[0039] β -人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒中试纸卡的各组成部分可以通过以下措施制得:

[0040] 1、样品垫2的制备:

[0041] 将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% Triton X-100, 2.5% BSA, 0.15M Tris缓冲液, pH7.5的处理液中, 于4℃浸泡4个小时, 然后置于烘箱中, 37℃烘干2小时。

[0042] 2、吸附荧光微球标记抗体的结合垫3的制备:

[0043] 将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCL处理液中(含1.0% Triton X-100, 2.5% BSA, pH7.4), 4℃浸泡2小时, 然后取出37℃烘箱烘干4小时, 备用, 将玻璃纤维膜放在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上, 用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土Eu³⁺荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体偶联复合物喷到玻璃纤维膜, 37℃烘干1小时后制得。

[0044] 稀土荧光纳米微球的醛基化: 取5mg稀土荧光纳米微球, 用20mM, pH9.5的碳酸盐缓冲液, 采用离心法洗涤3遍, 离心速度为12000rpm, 时间为5分钟, 最后重悬于100 μ l的上述碳酸盐缓冲液中, 加入500 μ l醛基化的葡聚糖, 混匀, 室温下暗反应4小时, 采用同样的离心法洗涤和重悬到100 μ l的上述碳酸盐缓冲液中, 置于4℃备用;

[0045] 稀土Eu³⁺荧光微球标记的抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体的制备: 选取来自2个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株的单克隆抗体, 按照质量比1:1将2mg抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜, 然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合, 4℃反应过夜; 然后, 加入硼氢化钠至终浓度5mM, 4℃反应4小时; 再加入等体积的封闭液(50mM Tris-HCL, pH7.4, 含2% BSA, 5%蔗糖), 4℃封闭过夜; 然后用50mM Tris-HCL, pH7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍, 重悬于100 μ l的50mM Tris-HCL缓冲液中(含1.2% NaCl, 0.5% BSA, 0.1% Tween 20), 4℃避光保存备用。

[0046] 3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4的制备:

[0047] 采用与结合垫上所用抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体细胞株不同的细胞株, 采用标准的腹水生产工艺制备并纯化抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体, 保存于-20℃备用;

[0048] 分别用包被稀释液将上述鼠源抗 β -人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1.5mg/ml, 膜液量为1.5 μ l/cm, 将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被, 检测线和质控线间隔为4mm, 然后置于烘箱中, 37℃烘干2小时。

[0049] 试纸卡的组装: 在PVC板1上依次粘贴经过处理的样品垫2、吸附有稀土荧光标记的抗体的结合垫3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4和吸水垫5, 组装后得到试纸大板, 按照要求切割成4mm宽, 将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0050] 上述各步骤中选用的设备及原料优选以下原料:

[0051] β -人绒毛膜促性腺激素特异性配对抗体; β -人绒毛膜促性腺激素质控品: 英国朗道实验诊断有限公司; 稀土荧光微球: 上海甄准生物科技有限公司; 硝酸纤维素(NC)膜: Millipore公司产品; 牛血清白蛋白(BSA), 聚乙二醇PEG20000, 水解酪蛋白: Sigma产品, 其

它常用试剂均为分析纯试剂。

[0052] 实施例2:准确度试验

[0053] 选用上述试纸卡以及荧光免疫层析分析仪(型号:NEO-007),

[0054] 荧光免疫分析仪参数的设定:在荧光免疫分析仪上设定好试纸卡工艺参数后,取上述组装好的试纸卡,分别用5、500、1000、5000、10000、20000、40000mIU/mL的 β -人绒毛膜促性腺激素校准品,用试纸卡进行测定,得到各校准品的荧光强度值,将结果输入到分析仪的参数中,完成分析仪的参数的设定。

[0055] 主要检测材料:临床样本由相关医院获得,共300份胶乳增强免疫比浊法定值样本,其中血清样本100份,血浆样本100份,全血样本100份, β -人绒毛膜促性腺激素含量分布区间为5-40000mIU/mL之间。

[0056] 检测方法:

[0057] 步骤1:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0058] 步骤2:读卡:将IC卡放置在干式荧光免疫分析仪标注位置,读取相关信息;

[0059] 步骤3:加样:血清/血浆:取100 μ L血清/血浆样本垂直滴加至测试卡加样处;全血:取150 μ L全血样本垂直滴加至测试卡加样处;取样时注意不要吸入气泡;

[0060] 步骤4:检测,可采用自动测试或即时测试两种模式进行检测,自动测试:将测试卡插入干式荧光免疫分析仪的承载器上,按测试键,仪器将自动对测试卡进行扫描分析检测,即时测试:测试卡室温放置15min后,插入干式荧光免疫分析仪的承载器上,点击即时测试。

[0061] 试验结果分析:

[0062] 临床样本检测试剂制备完成后,按检测方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0063] 试验结果:

[0064] 如附图2-4所示,以实验系统的检测值为Y轴,以对照系统的测验值为X轴,绘制散点图,并进行相关性分析。临床样本检测对300份临床定值样本检测,样本平均偏差值小于10%,最大偏差小于20%, $R^2 > 0.98$,一致性系数 > 0.90 。检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测,满足不同客户不同检测场合的差异化需要。

[0065] 本发明提供一种利用稀土荧光免疫层析技术制备的 β -人绒毛膜促性腺激素快速定量免疫层析检测试剂盒,同时适合血清/血浆和全血样本,并适合临床上单人份检测,相对于 β -人绒毛膜促性腺激素定性胶体金试剂,能定量检测样本中的 β -人绒毛膜促性腺激素含量,具有更明确的临床指导意义,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

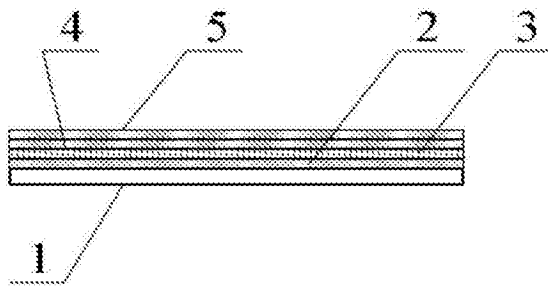


图1

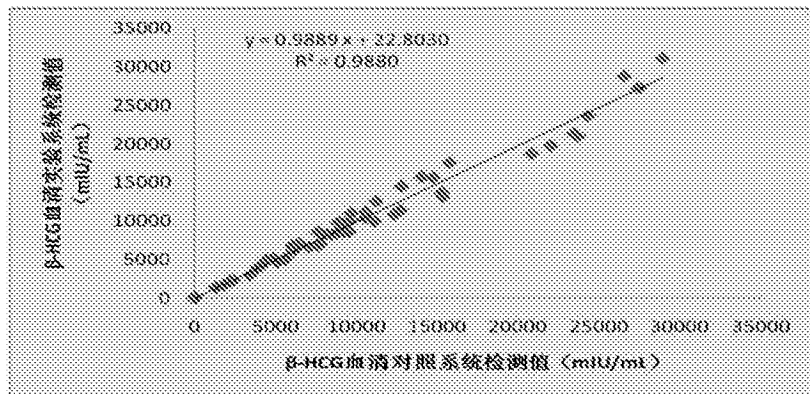


图2

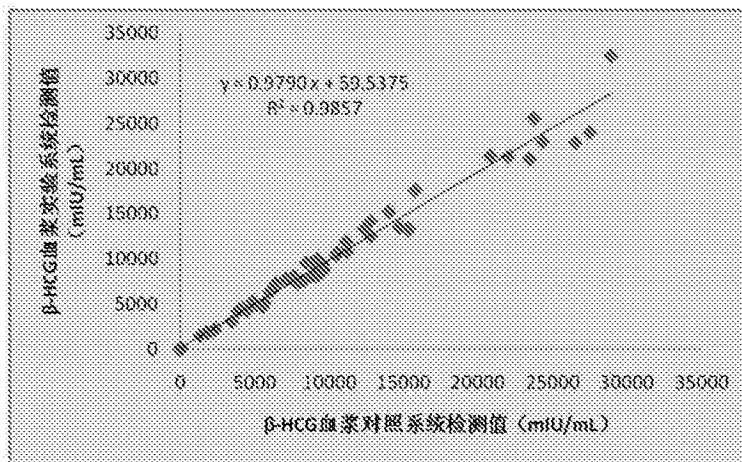


图3

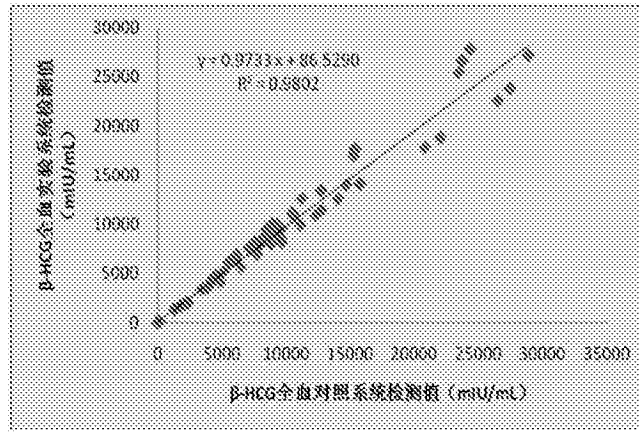


图4