

江苏省科技项目 工作总结报告

项目计划类别：政策引导类计划（产学研合作）前瞻性联合研究项目

项 目 编 号：BY2016049-02

项 目 名 称：时间分辨荧光共振能量转移材料制备及相应试纸条的
研制

起 止 年 限：2016 年 7 月至 2018 年 6 月

项 目 负 责 人：田晶晶

申请总结单位：中国科学院苏州生物医学工程技术研究所（盖章）

目录

- 1 项目概况 1
- 2 项目实施情况..... 1
- 3 项目已经解决的关键技术问题 2
- 4 项目预期成果及完成情况..... 33
- 5 项目成功实施所取得的效益 35
- 6 总结与展望 36

1 项目概况

项目名称：时间分辨荧光共振能量转移材料制备及相应试纸条的研制

立项时间：2016 年 7 月

项目编号：BY2016049-02

项目负责人：田晶晶

承担单位 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

合作企业：苏州鼎实医疗科技有限公司

经费预算：145 万元

主要内容：

基于时间分辨荧光共振能量转移技术和固相合成技术，设计并制备用于试纸条的高发光率，动力稳定荧光供体 Eu^{3+} 。结合能量转移效率，分子尺寸等，筛选最佳供体/配体。同时，探讨底物浓度、反应温度等因素对抗体标记的影响，实现定量标记。研究缓冲体系、表面活性剂等对能量转移效率的影响，制备时间分辨荧光共振能量转移试纸条。综合考虑时间分辨荧光能量转移材料与免疫层析试纸条的特点，以 PCT 为目标检测物，建立待检物定量分析曲线，研制时间分辨荧光共振能量转移试纸条。

2 项目实施情况

本项目研制内容为时间分辨荧光共振能量转移材料制备以及以 PCT 检测目标物的时间分辨荧光试纸条的研制。通过本研究的实施，突破了时间分辨荧光材料合成技术，解决困扰试纸条发展的核心标记染料问题，结合抗体定量荧光标记、试剂多参数优化、试纸条中试放大以及大规模生产工艺等一系列关键技术，开发出具有自主知识产权的时间分辨荧光共振能量转移侧向流试纸条，使得试纸条定量检测限和灵敏度得到进一步提升，推动其在 POCT 行业的应用拓展，进而提升我国 IVD 行业的整体技术水平。以此技术为依托，打破国外对类似产品的技术垄断，设计并合成出较理想的镧系元素螯合物探针，将该技术国产化，有效降低

相关产品的价格。此外，将传统检测精度进一步提升，提高国内医疗检验行业的水平，缩短与进口产品之间的差距，促使我国生物医药产业从战略性新兴产业成长为国民支柱产业。而且该产品推向市场后，有助于快速确定感染性疾病的病因，提高医疗检测水准、减少医疗纠纷，建设和谐社会。

针对临床感染性疾病诊断需求，本研究将时间分辨荧光和荧光共振能量转移技术相结合，用于侧向流免疫层析产品的研制，实现 PCT 指标的定量检测，从抗体原料筛选，定量标记技术，缓冲体系建立等多个角度对试纸条进行优化，通过大量测试优化，极大提高检测灵敏度，本研究制备试纸条检测灵敏度可达 0.05ng/L，技术指标基本符合任务书要求。

最后，通过本研究的开展，突破了时间分辨荧光材料合成、侧向流免疫层析、抗体筛选与定量荧光标记、试剂稳定技术、试纸条中试放大以及大规模生产工艺等一系列关键技术，完成试纸条中试生产，形成批量制备工艺，同时，建立一只侧向流免疫层析试纸条的专业研发团队，能够完成胶体金类、荧光类（直接荧光染料、荧光微球、时间分辨荧光）试纸条的研发，其覆盖的检测浓度范围最高可达 mg/L，最低可达 pg/L，基本能够满足目前临床常规检测指标的检测要求，在单元技术积累方面取得了大量宝贵的经验，尤其是对于试纸条的规模化生产方面，更是获得了常规纵向项目无法得到的经验积累。在研究条件方面，一方面建立了试纸条研发以及小试、中试平台，可以满足试纸条的批量化制备要求；在软条件方面，通过自行分析软件和分析算法的建立，能够高效的完成定量检测试纸条的优化任务，将研发效率大大提高。基于该项目，培养了硕士研究生 1 名，围绕本研究，撰写专利 3 篇，发表论文 3 篇。

此外，经费完全按照预算执行，详见附件。

3 项目已经解决的关键技术问题

3.1 时间分辨荧光供体穴状配位物的设计与合成

时间分辨荧光（Homogeneous Time-Resolved Fluorescence，HTRF）检验技术是荧光共振能量转移（FRET）检测和均相时间分辨荧光检验两个重要荧光检测技术的有机结合。该技术是利用了具有穴状配体的镧系元素（通常是 Eu^{3+} 和

Tb³⁺) 螯合物为标记供体, 这些分子有非常长寿命的荧光; 与之形成供配体对的通常是个小分子荧光蛋白, 例如 XL665, 作为一个受体。这些镧系元素的螯合物的配体通常被设计成一个高效光能吸收基团, 有很高的摩尔吸收。收集的能量靠配体分子内的系间窜越, 从单线态转到三线态, 然后三线态配体激发能转换到稀土元素中心离子的发射能级, 最终导致了长寿命荧光的产生。

分子 1 和 2 (图 1) 是目前最常用的一类基于 Eu³⁺ 的激发能供体, 主要用于临床免疫检验。这一类配位化合物的合成是富于挑战性的。尤其是运用于荧光标记, 其光学纯度是通常合成方法和分离方法不易达到的。基于前期发展的固相反应的新技术, 即带衍生基团的二联吡啶首先被固定在王氏树脂上, 在金属离子的模板化螯合下, 溶液里的另外两个二联吡啶配体, 可与之反应, 高效地形成所需笼状配位化合物, 在通过酸催化解离, 可得到所需产品。

该方法是这类配位化合物的合成工业化生产的关键技术条件。进一步, 通过改变二联吡啶上的衍生基团, 例如利用增色团 Br- 和 CH₃O- 对 H- 的取代, 可开发出一系列 1 和 2 的类似物, 并筛选出理想能量供体。

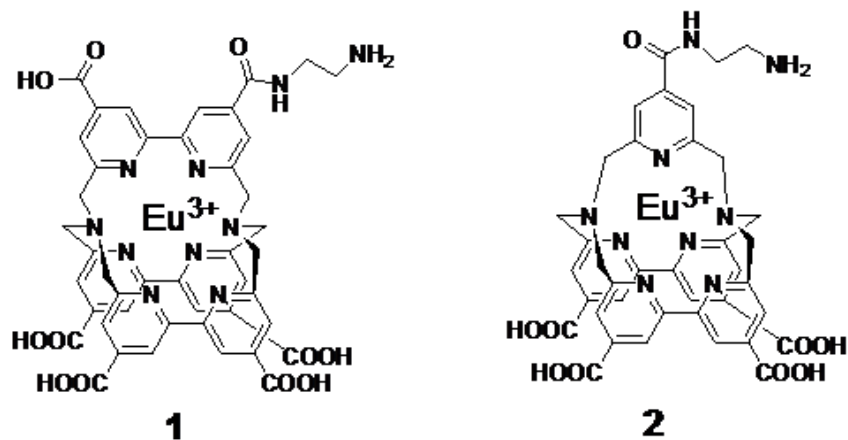


图 1 Eu³⁺ 供体结构

3.1.1 供体 Eu³⁺ 的合成与表征测试

本项目的目标设计合成系列可用于侧向流试纸条检测的、具有更高发光效率、摩尔吸收系数和较长荧光寿命和水溶性穴状配位物。根据课题设计方案, 先合成一个目标分子。该分子结构如下(图 2), 金属离子选择为 Eu³⁺。通过逆合成分析, 需要合成关键中间体 2, 而中间体 2 可以通过化合物 3 自身偶联得到。

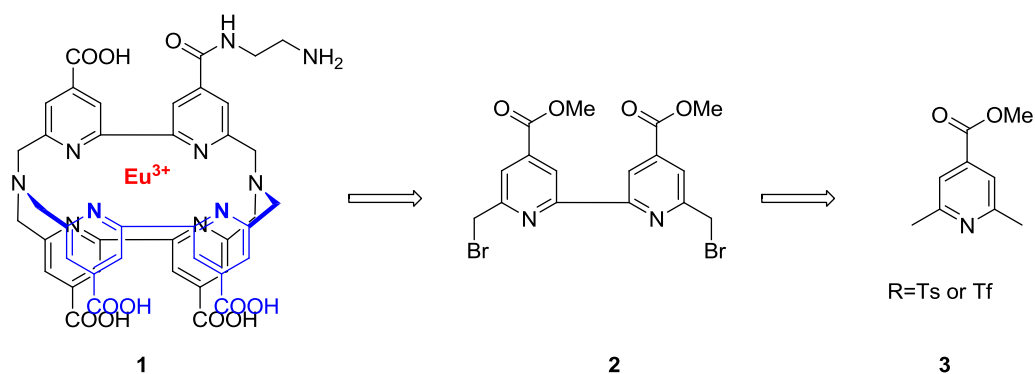


图 2Eu³⁺配合物及其逆合成分析

逆向分析以后根据相关文献进行合成中间体 2，该路线收率中等，所使用的原料便宜易得，各步反应后处理简单，不需要过柱纯化，打浆或者重结晶就可达到纯化的目的，容易为配合物的合成准备更多的原料。

关于配合物类似化合物的合成，本研究参考相关文献，设计了配合物 1 的合成路线，如图 3 所示。

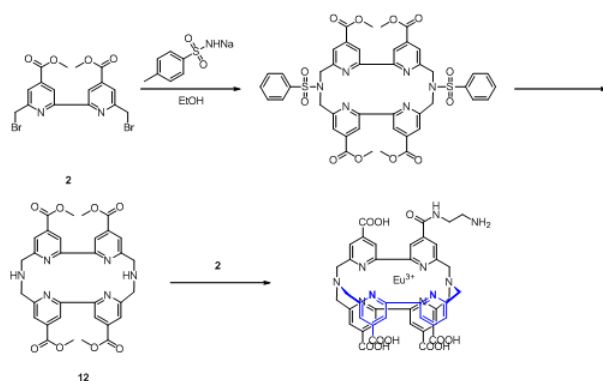


图 3 供体配位物的合成路线

在合成中，本研究对每个环节的中间体和最终产物都进行了测试表征，主要的表征手段有 HNMR、HPLC、LCMS、TOF-MS 等，如图 4, 5, 6, 7。各种测试确保了下一步实验的原料的可靠性以及最终产物的真实性，最终鉴定合成的化合物和设计的化合物一致。

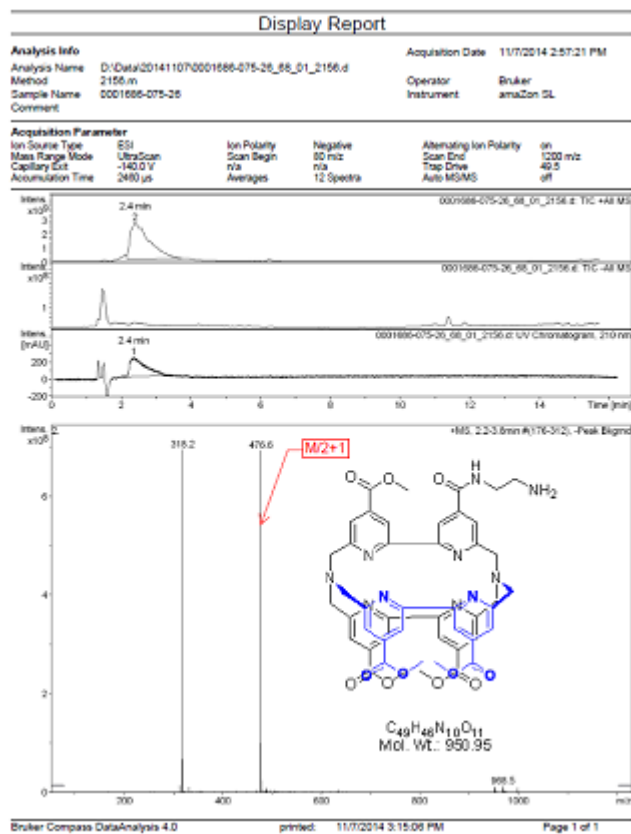


图 4 供体配位物的 LCMS 图谱

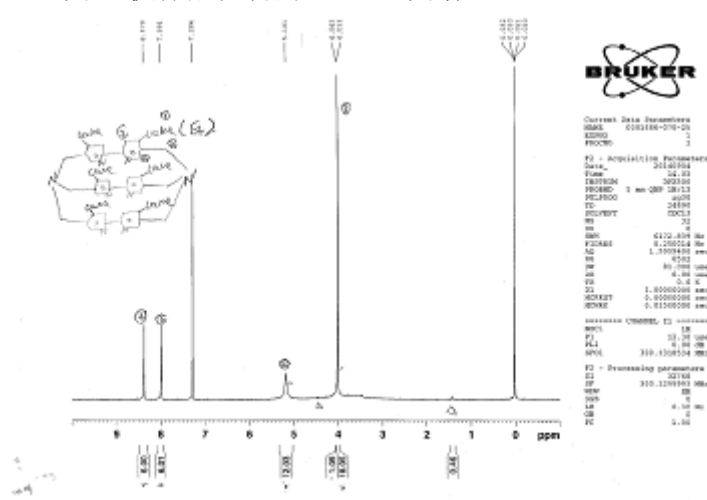


图 5 供体配位物的 ¹H NMR 图谱

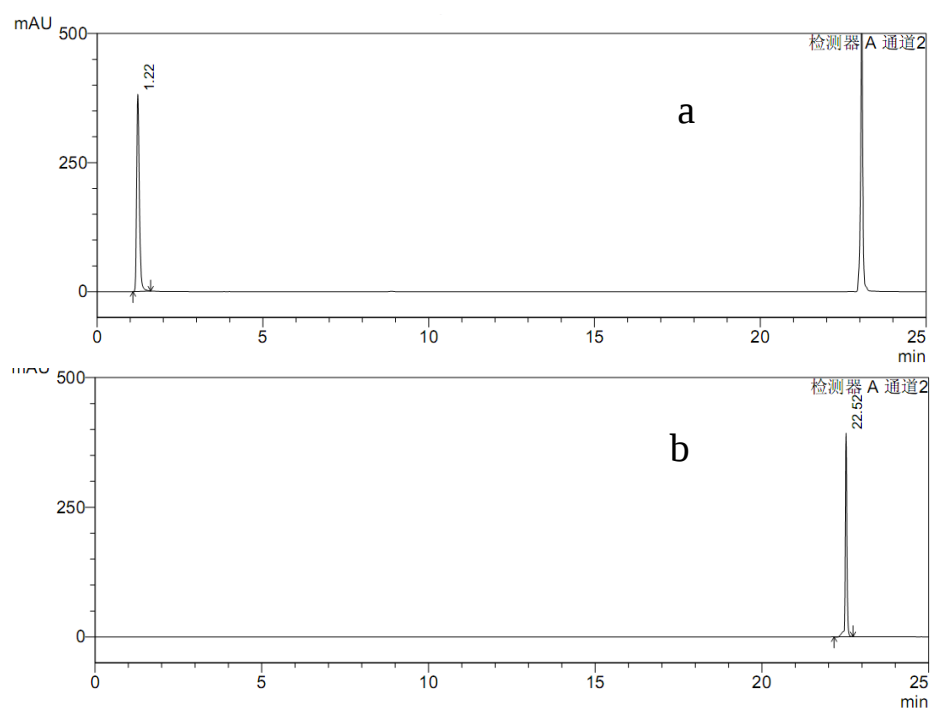


图 6 供体最终产物 HPLC 图谱 a 是产物，b 是空白

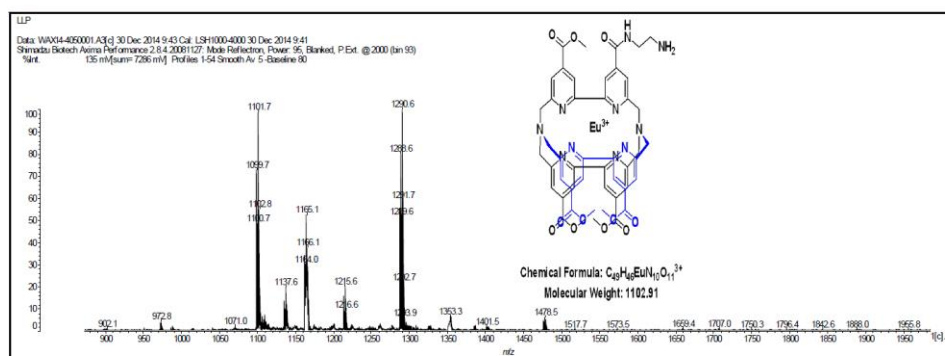


图 7 供体 Eu 最终产物 MS 图谱

为了保证后续抗体偶联标记效率，对供体 Eu 的穴状配位物进行了衍生化，如下图 8 所示。目前，本研究主要有研究了两种方式，一种是将前期的乙二醇更换为己二胺，延长标记链，期望达到提高偶联效率的目的。另外一种，改变配位试剂 Eu^{3+} 的阴离子，使用 $Eu(OTf)_3$ 作为螯合剂合成出新的配合物，提高配位物在水中的溶解性，提高标记利用率。

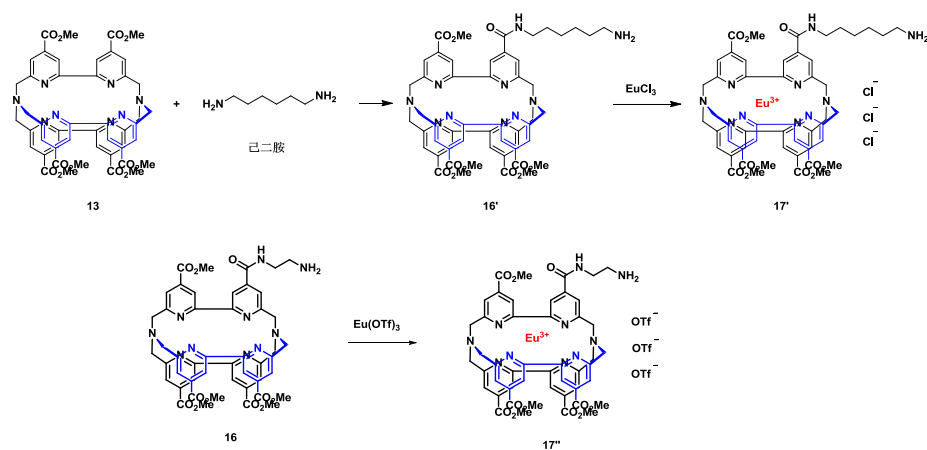
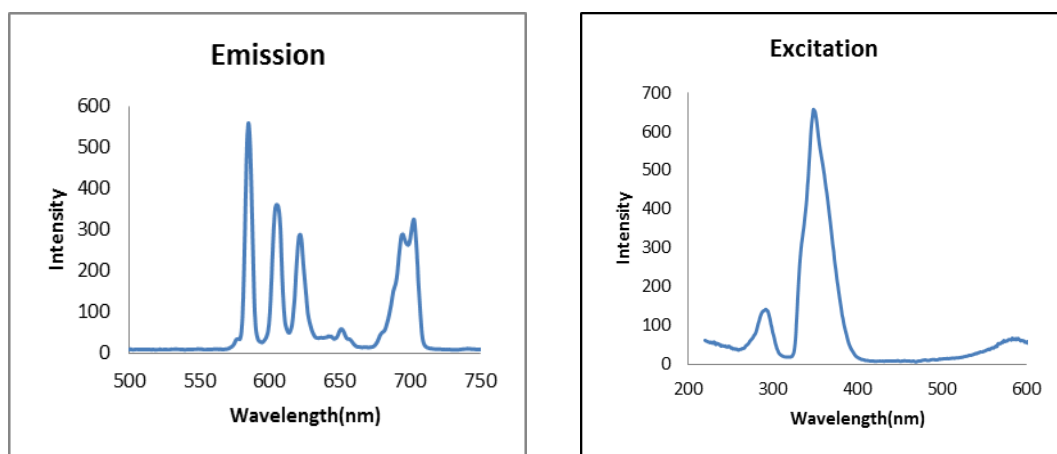


图 8 供体 Eu 配位物衍生化

3.1.2Eu 供体光谱分析

本研究使用岛津荧光分光光度计 RF-5301PC 对合成供体的发射光谱和激发光谱进行了测试分析，将合成的 Eu 供体溶解在 pH=7.0 的磷酸盐缓冲液中，室温下测试。

合成供体 Eu 的荧光发射图谱如图 9 (a) 所示，供体 550nm-720nm 范围有发射荧光，并有多峰，分别是在 585nm、604nm、620nm、694nm、702nm，这是典型的稀土元素 Eu 的荧光光谱。从发射光谱图中可以看出，在 630nm-670nm 供体的发射荧光强度最低，这为后期能量转移提供了检测窗口，供体和受体结合后，受体的发射光谱此区域不会受供体发射光谱的影响。供体的激发光谱如图 9 (b) 所示，最大激发波长在 340nm。供体在 340nm 激发，在 620nm 发射峰，stokes 位移达 280nm，符合时间分辨荧光材料的特性，优于普通荧光物质荧光光谱的 Stokes 位移。



(a)

(b)

图 10 供体 Eu 的荧光发射光谱(a)和激发光谱(b)

3.2 抗体对筛选与分析

3.2.1 PCT 抗体筛选与验证

本研究使用的 3 种 PCT 抗体均为外购，通过将上述 3 种抗体分别配对，采用常规荧光染料 FIU647 分别标记，进行划膜检测分析，以确定适用于本研究的 PCT 配对抗体。

表 1 采购抗体的品牌及配对型号列表

厂 家	配对抗体型号
HYTEST	包被 PCT-1、标记 PCT-2
HYTEST	包被 PCT-2、标记 PCT-3
HYTEST	包被 PCT-1、标记 PCT-3

试验结果如下表 2，测试结果为峰面积。

表 2 抗体配对检测结果

	配对抗体		配对抗体		配对抗体	
	PCT-1	PCT-2	PCT-2	PCT-3	PCT-1	PCT-3
1	22.07		21.99		18.50	
2	18.76		22.33		21.33	
3	25.56		23.16		18.48	
4	21.00		21.61		20.12	
5	19.32		21.27		18.55	
6	17.88		23.05		18.44	
7	27.18		22.00		25.36	
8	18.54		22.27		21.57	
9	23.38		24.05		20.17	
10	18.32		22.08		20.76	

11	26.26	21.36	25.52
12	18.20	23.28	18.35
13	18.55	22.36	18.62
14	21.14	23.41	21.02
15	22.93	21.90	20.76
16	25.16	22.70	19.83
17	26.73	23.87	26.21
18	20.16	24.25	20.25
19	27.39	23.19	20.39
20	24.21	23.60	26.79
M	22.137	22.6865	21.051
SD	3.387152352	0.89734858	2.735880307
CV	15.30%	3.96%	13.00%

上述试验结果重复性检测，荧光检测图形如下图 11,12,13。

包被PCT-1，标记PCT-2

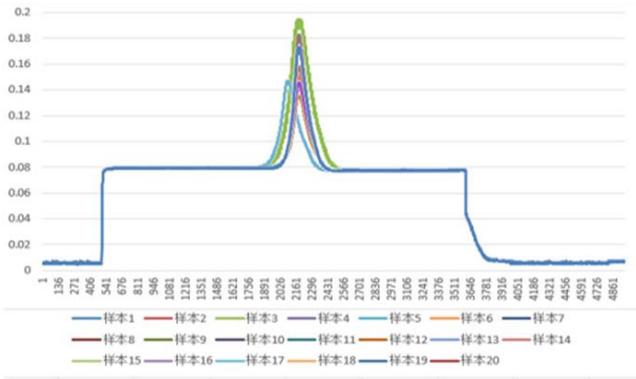


图 1 PCT 抗体 1 与 2 配对结果

包被PCT-2，标记PCT-3

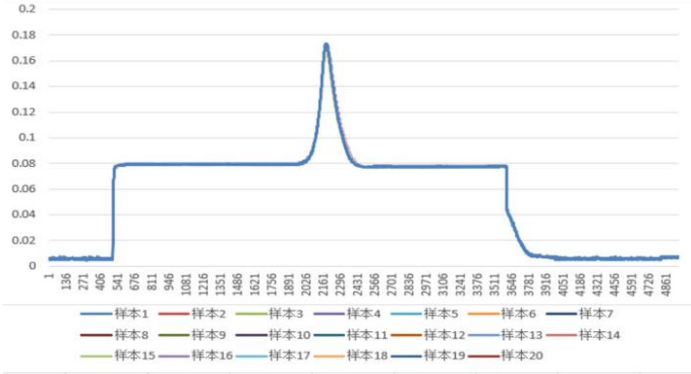


图 12PCT 抗体 2 与 3 配对结果

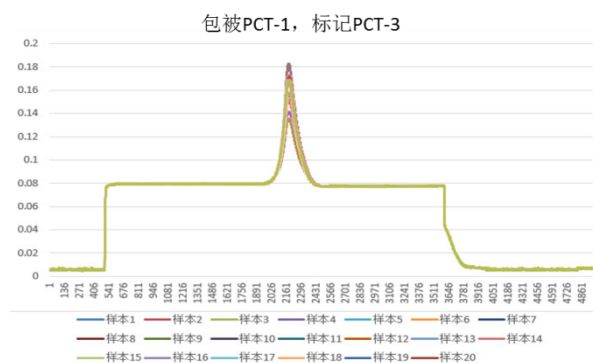


图 13PCT 抗体 1 与 3 配对结果

有结果可见，图 11 与图 13 检测峰峰形高低差别较大，经计算 CV 值分别为 15.30%与 13.00%；图 12 峰形值重复性一致，峰形高度相差无几，CV 值为 3.96%；综合峰形、CV 可知：配对 PCT 1/2 与 PCT 1/3 抗体稳定性、重复性较配对抗体 PCT 2/3 差；同一生产厂家不同型号的单克隆抗体包被标记性能不一致。

综合上述结果：PCT 配对抗体 PCT2/ 3 优于其他 2 组配对抗体，故本研究选用 HYTEST 提供的配对型号为 PCT2/ 3 的配对抗体，作为本研究的配对抗体。

3.2.2 内参抗体筛选与验证

本研究设计的试纸条包括检测、内参、质控三条线。内参抗体作为整个试剂盒中的重要组分，可以起到试剂内部质控的作用，是整个试剂的重要组成部分之一。

内参抗体选择的品牌和型号如下表 3，同样进行划膜检测分析，

表 3 内参抗体品牌与型号

厂家	内参配对抗体型号
武汉博士德生物工程有限公司	包被兔 IgG 及标记羊抗兔 IgG
长沙博优生物科技有限公司	包被兔 IgG 及标记羊抗兔 IgG
杭州启泰生物技术有限公司	包被兔 IgG 及标记羊抗兔 IgG

试验结果如下表 4，测试结果为峰面积。

表 4 内参抗体配对检测结果

	武汉博士德	长沙博优	杭州启泰
1	11.44	9.08	10.89
2	12.34	11.26	11.52

3	12.39	9.76	12.74
4	10.92	11.78	10.79
5	11.16	9.48	10.37
6	10.79	9.23	13.91
7	12.40	10.13	10.31
8	11.55	10.37	12.14
9	11.51	11.38	12.08
10	10.92	10.71	13.13
11	10.83	9.47	9.82
12	11.64	11.09	9.91
13	12.23	13.42	8.64
14	12.25	9.92	9.22
15	11.78	11.71	9.94
16	11.14	12.12	10.30
17	10.67	9.15	10.47
18	12.49	11.58	9.26
19	11.01	11.61	9.07
20	10.98	12.11	13.09
均值	11.52025	10.76525	10.87775
SD	0.630408128	1.216961785	1.517363082
CV	5.47%	11.30%	13.95%

上述试验结果重复性检测的荧光检测图谱如下图 14,15,16。

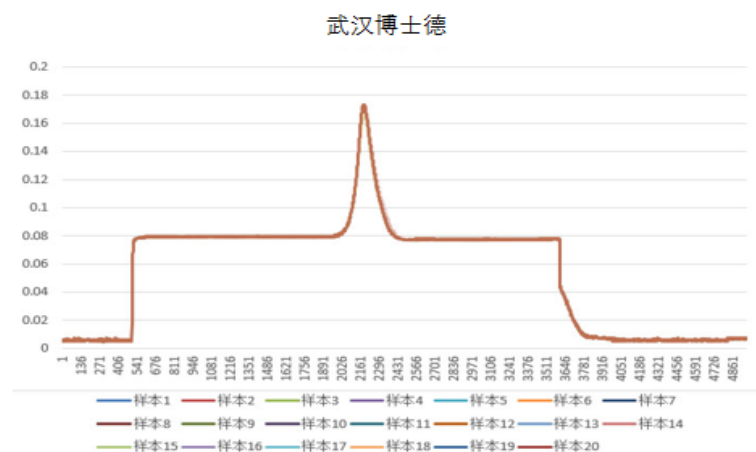


图 14 武汉博士德内参抗体配对检测图谱

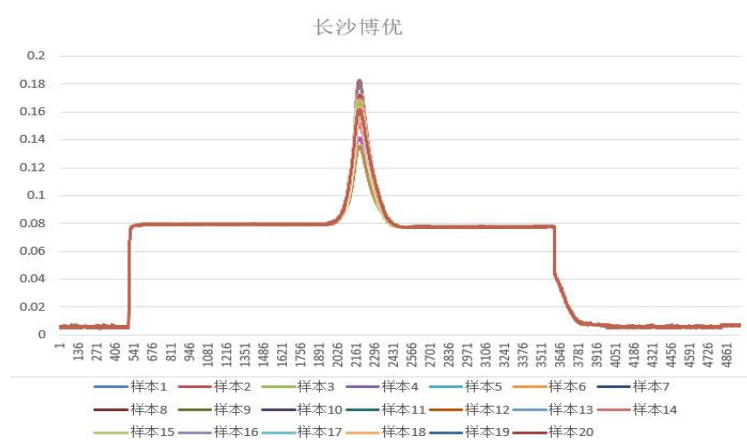


图 15 长沙博优内参抗体配对检测图谱

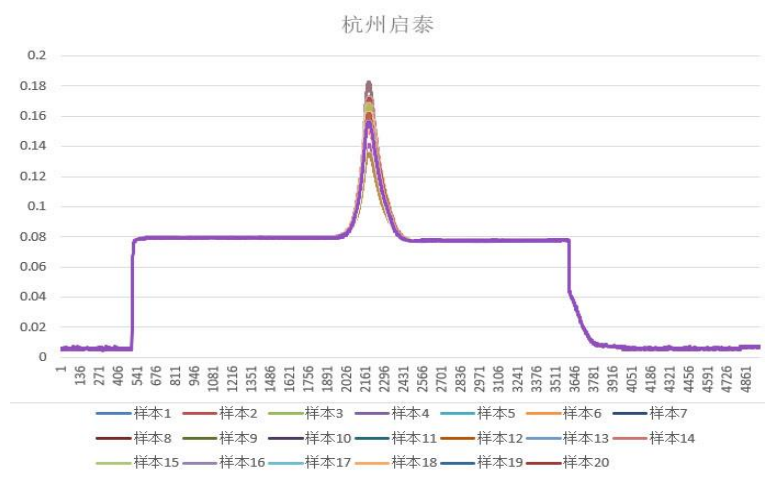


图 16 杭州启泰内参抗体配对检测图谱

由上述结果可见,图 15 与图 16 检测峰峰形高低差别较大,CV 值分别为 11.30% 与 13.95%; 图 14 峰形值重复性一致, 峰形高度相差无几, CV 值为 5.47%; 综合峰形、CV 可知: 长沙博优生物科技有限公司与杭州启泰生物技术有限公司提供的配对内参抗体稳定性、重复性较武汉博士德提供的内参对抗体差。

综合上述结果：武汉博士德提供的内参配对抗体优于其他 2 组配对抗体；故选用武汉博士德提供的内参配对抗体。

3.2.3 质控抗体筛选与验证

质控抗体在整个反应体系中起到了衡量检测抗体是否有效的重要作用，可以用来衡量试剂是否失效。根据前述 PCT 抗体为鼠源抗体，因此质控抗体选择了羊抗鼠抗体。

本研究选择 3 家公司的抗体，具体品牌和型号如下，进行划膜检测分析，

表 5 质控抗体品牌及厂家

生产厂家	抗体来源
武汉博士德生物工程有限公司	羊抗鼠
长沙博优生物科技有限公司	羊抗鼠
北京万域美澜科技有限公司	羊抗鼠

试验结果如下表 6，测试结果为峰面积。

表 6 质控抗体品牌及厂家

	武汉博士德		长沙博优		北京万域美澜	
	标记羊抗兔 抗体	标记 PCT3 抗体	标记羊抗兔 抗体	标记 PCT3 抗体	标记羊抗兔 抗体	标记 PCT3 抗体
1	0.049	23.01	0.000	23.73	0.046	20.79
2	0.048	17.28	0.000	18.73	0.049	19.32
3	0.046	17.37	0.000	24.12	0.048	20.58
4	0.040	19.60	2.070	20.64	0.049	23.49
5	0.041	17.41	0.000	22.11	0.049	23.98
6	0.050	18.29	0.000	23.54	0.049	21.29
7	0.043	22.94	0.000	19.91	0.046	21.11
8	0.040	17.78	0.000	20.97	0.045	23.56
9	0.044	18.49	0.000	20.44	0.047	19.43
10	0.049	20.08	0.000	20.32	0.045	22.10
11	0.048	21.93	0.000	24.08	0.045	22.33

12	0.041	22.18	2.050	21.69	0.048	19.43
13	0.047	21.48	0.000	23.23	0.049	22.06
14	0.049	18.90	0.000	24.03	0.048	23.04
15	0.043	22.29	0.000	21.29	0.047	20.21
16	0.045	22.73	0.000	24.93	0.049	23.66
17	0.050	21.50	0.000	18.88	0.045	23.74
18	0.041	18.00	2.110	22.93	0.050	20.94
19	0.043	19.94	0.000	18.81	0.047	23.11
20	0.046	21.21	0.000	19.50	0.050	21.90
均值	0.045	20.12	0.312	21.69	0.047	21.80
SD	0.00349849 6	2.06509965 4	0.76084630 9	2.01829109 6	0.00173129 1	1.54796734 3
C V	7.75%	10.26%	244.25%	9.30%	3.64%	7.10%

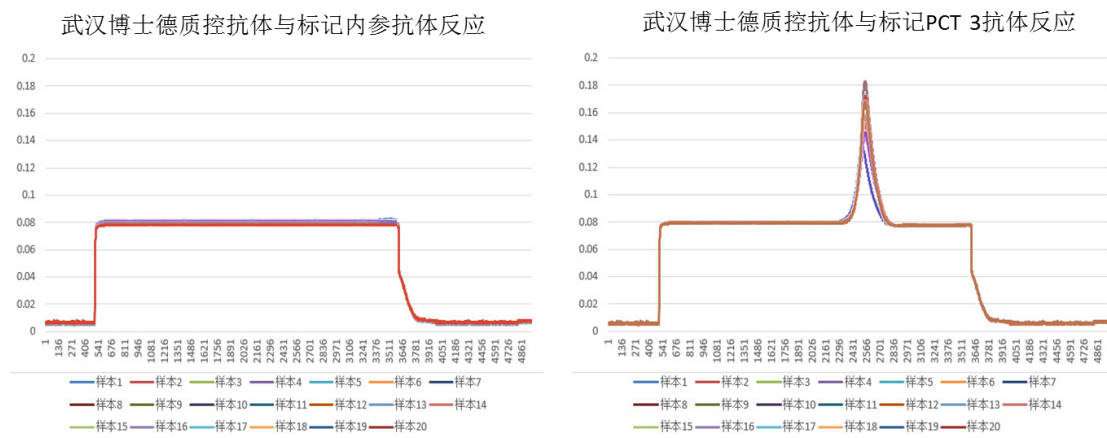


图 17 武汉博士德质控抗体交叉反应检测结果

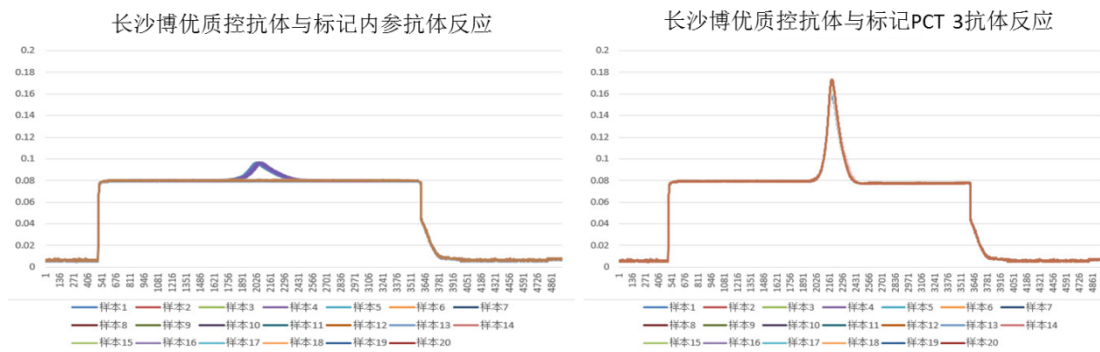


图 18 长沙博优质控抗体交叉反应检测结果

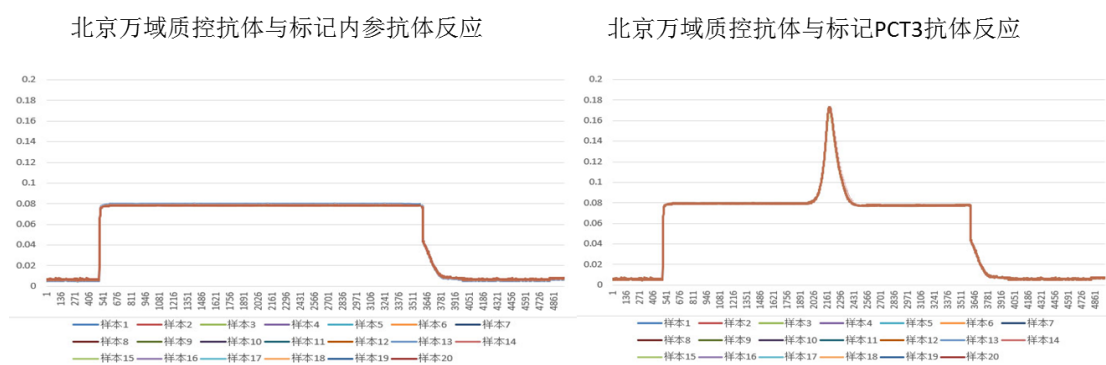


图 19 北京万域质控抗体交叉反应检测结果

由上述结果可见：

武汉博士德提供的羊抗鼠抗体与标记的羊抗兔联合测试时不产生交叉反应，与标记的 PCT3 抗体联合测试结果稳定性与北京万域美澜提供的羊抗鼠抗体测试结果相比较差；长沙博优提供的羊抗鼠抗体与标记的羊抗兔抗体测试时有部分交叉反应，稳定性测试结果不及北京万域美澜羊抗鼠抗体稳定；北京万域美澜提供的羊抗鼠抗体与标记的羊抗兔抗体无交叉反应且与标记的 PCT3 抗体测试稳定性较好。

综合上述结果，将选用北京万域美澜提供的羊抗鼠抗体作为本研究的质控抗体原材料。

3.3 抗体定量标记技术研究

在合成过程中，供体 Eu 最终经衍生化修饰了 NH₂ 基团，可以利用碳二亚胺法将染料标记到抗体上。即将 Eu 上的-NH₂ 与经 EDC/NHS 活化的抗体上的-COOH 进行偶联，同时控制反应过程中反应时间和反应物浓度，最终结合分段

截留过滤法实现对单克隆抗体的荧光标记。研究反应条件变换情况下抗体偶联比可控调节方法，进而实现批间抗体的一致性/定量标记。

3.3.1 供体 Eu 标记方法研究

本研究的标记体系在 pH8.0, 50mmol/L 磷酸盐缓冲液中进行。整个标记过程通过柱子选择、蛋白与供体摩尔比、洗脱体系等条件控制，最终达到控制偶联比的目的。

标记反应完成后，可按下述公式计算偶联比。

标记前蛋白摩尔浓度计算：

$$[protein]mol / L = \frac{OD_{280nm}}{\epsilon_{protein}}$$

其中, ϵ 是蛋白在 280nm 的消光系数, IgG 在 280nm 分子消光系数是 210000。

$$\text{供体 Eu 浓度测定: Dye concentration(M)} = \frac{OD_{318nm}}{\epsilon_{donor}}$$

标记后蛋白分子浓度

$$\text{Protein concentration(M)} = \frac{OD_{280nm} - (OD_{318nm} / \alpha)}{\epsilon_{protein}}$$

其中, OD280nm 是标记产物在 280nm 的吸光度值, OD318nm 是标记后产物在 318nm 的吸光度值, α 是校正系数, $\epsilon_{protein}$ 是蛋白的摩尔消光系数。

染料与蛋白的偶联比 moles of per mole of molecule

$$MRF = \frac{\text{Dye concentration(M)}}{\text{Protein concentration(M)}}$$

蛋白标记供体后，采用 UV-Vis 分光光度计测试标记后的样品，测试结果如图 20 所示，根据上述公式结算可以得到偶联比。

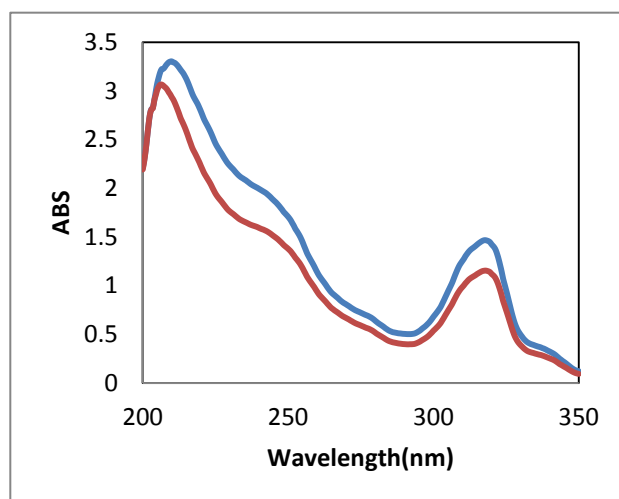


图 20 供体 Eu 标记结果测试

为便于标记流程规范化，本研究对供体 Eu 标记抗体进行了优化，建立了供体 Eu 标记蛋白的标准方法，并制备了供体 Eu 标记试剂盒。标记试剂盒包括供体 Eu 试剂、分离柱、浓缩洗脱液。在标记抗体时，按照规定的流程标记，即可快速准确的获得标记有供体的抗体，便于后期的检测。目前，设计的标记体系可以为 100 μ l 和 200 μ l 体系，抗体浓度为 1mg/mL，缓冲体系为磷酸盐缓冲液。

3.3.2 供体 Eu 标记试剂盒效果测试

为了验证试剂盒的稳定性和重复性，本研究用供体试剂盒进行多次标记测试，测试结果如表 7 所示，1，2，3，4 是不同的 4 次标记实验，5 和 6 是分别将 4 稀释一倍和两倍后测试的结果。从测试结果来看，每次标记偶联比在 7.0 左右，试剂盒标记非常稳定，重复性也很好。

表 7 供体标记试剂盒稳定性测试

samples	280nm	318nm	MPF	C(protein)mg/ml
1	0.947	2.185	6.921336	0.473535714
2	0.932	2.201	7.156394	0.461335714
3	0.978	2.342	7.302016	0.4811
4	1.165	2.757	7.177996	0.576135714
5	0.539	1.315	7.503057	0.262892857
6	0.281	0.681	7.430249	0.137478571

3.3.3 PCT 抗体标记性能检测

按上述方法，本研究采用供体 Eu 染料对 PCT 3 抗体进行了定量标记，通过

线性范围和检测限作为衡量手段，初步测试了标记完成的 PCT 抗体对，分析结果如下图 21。

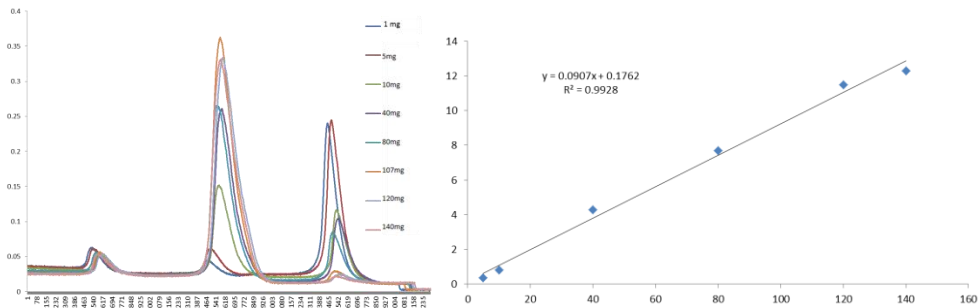


图 21Eu 标记抗体性能验证

通过线性范围及检测限结果说明 Eu 标记反应过程未影响抗体品质，PCT 抗体对能够满足检测需求。本研究制备 Eu 标记抗体可用于下步试纸条制备分析。

3.4 PCT 试纸条制备与参数研究

本报告研发的时间分辨荧光免疫层析试纸条将干式技术与荧光标记检测技术相结合，进而实现目标物的快速检测。其具体组成以及检测原理如下图 22。

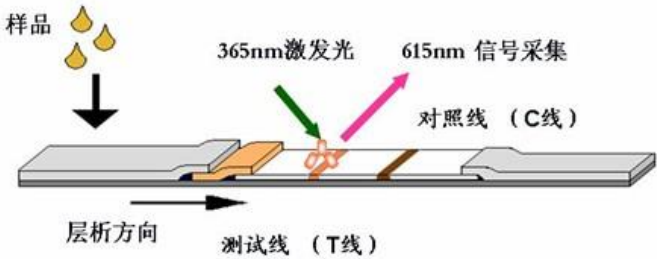


图 22 时间分辨荧光免疫层析试纸条示意图

本报告研发的试纸条由两个大部分组成，分别为试纸条和检测缓冲液。其中试纸条采用干式技术制备，四个辅料组分互相接搭而成。包含支撑底板、用于承载样品的样品垫（加样板）、包被有检测抗体的 NC 膜和用于给整个检测过程提供扩散动力的吸收垫（吸收板）。检测缓冲液部分包含稳定剂、分散剂和荧光物质等。下面分别对这两部分进行详述。

3.4.1 试纸条结构及制备

本研究制备的 PCT 试纸条包括：在硝酸纤维膜上包被有高纯度的 PCT 抗体、

兔 IgG 抗体和羊抗鼠抗体。当加入待分析样本后，膜上包被有抗体的位置将用于捕获分析物，进行形成可检测的荧光条带。

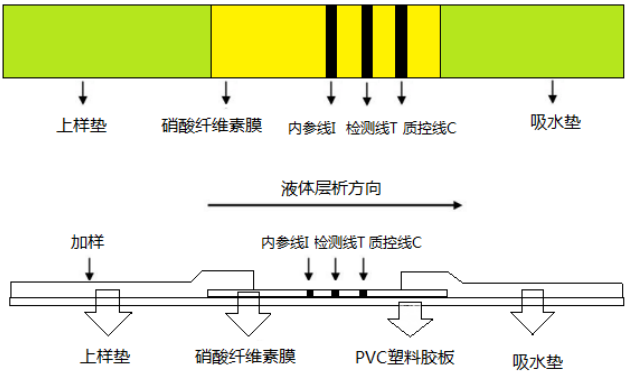


图 23 时间分辨荧光免疫层析试纸条结构图

其中硝酸纤维素膜是抗体承载的介质，同时也是抗原抗体发生特异性结合的膜上反应区，其材料组分将对系统检测时间等产生重要影响，是试纸条的核心材料之一，故本研究开展相应实验，对最佳的反应膜材料进行筛选。

本报告分别购置 3 种不同型号产品，如下表 8 所示，分别采用两种方法进行试验，包括液体移行速度的测算及液体划膜线条的均匀性研究。

表 8 所筛选的硝酸纤维素膜品牌及型号

厂家	型号	规格（s）
Millipore	HF135	135
sartorius	CN140	140
Millipore	HF180	180

三种膜载体的试验数据如下：

表 9 筛选试验数据

厂家	Millipore		Sartorius		Millipore	
型号	135		140		180	
液体移行速度	① 80mm/min	②82mm/min	①75mm/min	②74mm/min	①45mm/min	① 44mm/min
	③79mm/min	④84mm/min	③73mm/min	④76mm/min	③41mm/min	② 42mm/min
	⑤76mm/min	⑥80mm/min	⑤74mm/min	⑥75mm/min	⑤43mm/min	⑥46mm/min
	⑦78mm/min	⑧80mm/min	⑦78mm/min	⑧78mm/min	⑦40mm/min	⑧39mm/min
	⑨79mm/min	⑩81mm/min	⑨77mm/min	⑩79mm/min	⑨42mm/min	⑩43mm/min
线条的	① ☒ 是 ☐ 否	② ☐ 是 ☒ 否	① ☒ 是 ☐ 否	② ☒ 是 ☐ 否	① ☒ 是 ☐ 否	① ☒ 是 ☐ 否

均一性	② ☒ 是 ☐ 否	④ ☐ 是 ☒ 否	③ ☒ 是 ☐ 否	④ ☒ 是 ☐ 否	③ ☒ 是 ☐ 否	③ ☒ 是 ☐ 否
	④ ☒ 是 ☐ 否	⑥ ☒ 是 ☐ 否	⑤ ☒ 是 ☐ 否	⑥ ☒ 是 ☐ 否	⑤ ☒ 是 ☐ 否	⑤ ☒ 是 ☐ 否
	⑦ ☐ 是 ☒ 否	⑧ ☒ 是 ☐ 否	⑦ ☒ 是 ☐ 否	⑧ ☒ 是 ☐ 否	⑦ ☒ 是 ☐ 否	⑧ ☒ 是 ☐ 否
	⑨ ☒ 是 ☐ 否	⑩ ☒ 是 ☐ 否	⑨ ☒ 是 ☐ 否	⑩ ☒ 是 ☐ 否	⑨ ☒ 是 ☐ 否	⑩ ☒ 是 ☐ 否
备注	线条粗细均匀无扩散：是打√、否打 X					

由上检测结果可知：硝酸纤维膜同一生产厂家、不同型号其液体移行速度、线条的均匀性都不同；其中 140 型号的硝酸纤维膜其液体移行速度、线条的均匀性较其他 2 规格好；故选用 Sartorius 公司 140 型号的硝酸纤维膜作为本试剂盒反应膜材料。

3.4.2 抗体包被缓冲体系优化

依据试纸条结构设计，分别研究了兔 IgG 包被缓冲液，PCT 抗体包被缓冲液，抗鼠抗体包被缓冲液。

分别用 0.05M pH 8.4 硼酸缓冲液、0.01M pH 7.4 磷酸盐缓冲液、工艺用水稀释兔 IgG 抗体在硝酸纤维素膜上进行包被后，使用标记的羊抗兔抗体进行检测，由结果可知，0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液作为兔 IgG 抗体包被缓冲液峰值稳定结果最好。故选择 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液作为兔 IgG 抗体包被液。

分别用 0.05M pH 8.4 硼酸缓冲液、0.01M pH 7.4 磷酸盐缓冲液、工艺用水稀释 PCT 抗体在硝酸纤维素膜上进行包被后用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，由结果可知，0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液作为 PCT 抗体包被缓冲液峰值稳定结果最好。故选择 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液作为 PCT 抗体包被液。

分别用 0.05M pH 8.4 硼酸缓冲液、0.01M pH 7.4 磷酸盐缓冲液、工艺用水稀释羊抗鼠抗体在硝酸纤维素膜上进行包被后进行检测，由结果可知，0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液作为羊抗鼠抗体包被缓冲液峰值稳定结果最好。故选择 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液作为羊抗鼠抗体包被液。

3.4.3 抗体包被浓度优化

依据试纸条检测、内参、质控要求，分别对包被兔 IgG 抗体、PCT 抗体、羊抗鼠抗体的最佳浓度进行了优化。

检测方法如下，将三种不同浓度的兔 IgG 抗体用 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液稀释后在硝酸纤维素膜上进行包被，然后用羊抗兔抗体进行检测，由结果可知，兔 IgG 抗体浓度低，荧光信号稳定性较差，兔 IgG 抗体浓度高，稳定性较好，综合比较，故本报告选择兔 IgG 抗体浓度在 1:6 时作为划膜的最佳使用浓度。

将三种不同浓度的 PCT 抗体用 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液稀释后在硝酸纤维素膜上进行包被，然后用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，由结果可知，PCT 包被抗体浓度低，使用低浓度样本进行检测稳定性较好，但使用高浓度样本检测，稳定性较差。PCT 包被抗体浓度高，使用低浓度样本高浓度样本检测稳定性较好，综合比较，故本报告选择 PCT 包被浓度在 1:4 时作为划膜的最佳使用浓度。

将三种不同浓度的羊抗鼠抗体用 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液稀释后在硝酸纤维素膜上进行包被，然后用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，由结果可知，羊抗鼠抗体包被浓度低，使用低浓度样本进行检测稳定性较好，但使用高浓度样本检测，稳定性较差。羊抗鼠抗体包被浓度高，使用低浓度样本高浓度样本检测稳定性较好，但低浓度样本与高浓度样本无太大差异。故本报告选择羊抗鼠抗体包被浓度在 1:4 时作为划膜的最佳使用浓度。

最后，将上述选定的最佳比例（兔 IgG 抗体 1: 6、PCT 抗体 1:4、羊抗鼠抗体 1:4）用 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液稀释后在硝酸纤维素膜上进行包被，然后用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、中浓度：9.97 mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，检测结果如下：

表 100 三种抗体最佳浓度的质控品检测结果（荧光信号值）

	质控品								
	兔 IgG 抗体 1: 6			PCT 抗体 1:4			羊抗鼠抗体 1:4		
	兔 IgG 抗体	PCT 抗体	羊抗鼠抗体	兔 IgG 抗体	PCT 抗体	羊抗鼠抗体	兔 IgG 抗体	PCT 抗体	羊抗鼠抗体

1	20.11	54.18	9.84	18.73	15.80	37.36	21.30	0.90	46.66
2	19.12	60.75	9.19	21.13	17.53	37.52	21.96	1.04	42.38
3	19.16	55.33	9.44	21.37	18.97	33.21	18.08	0.91	46.96
4	21.61	59.73	9.46	19.64	17.10	39.61	20.56	1.05	46.19
5	20.69	58.10	9.06	18.58	16.52	33.91	20.19	0.95	44.06
6	19.81	54.48	10.07	18.39	15.67	33.93	19.87	0.96	45.55
7	20.67	61.65	10.13	21.74	16.82	37.32	20.75	0.96	45.42
8	19.27	54.82	9.88	19.51	15.95	39.91	21.35	1.07	43.09
9	18.87	58.77	10.36	19.59	15.54	38.66	21.94	0.92	46.03
10	19.73	61.71	9.92	21.94	17.94	38.76	19.73	1.08	42.51
11	21.13	54.03	10.45	20.59	18.60	33.20	20.33	0.95	43.71
12	20.00	54.72	9.20	19.16	15.49	34.41	20.87	1.06	45.77
13	21.84	54.10	9.09	20.70	15.95	38.79	20.56	0.93	46.16
14	18.58	60.27	10.96	19.48	16.20	36.23	19.95	1.09	42.67
15	19.23	59.51	9.35	21.55	17.34	34.21	20.45	0.91	46.61
16	19.94	56.71	10.57	18.56	15.12	33.12	21.25	0.98	45.89
17	21.17	61.16	10.11	18.46	16.59	39.57	20.89	0.93	46.65
18	21.07	60.05	10.98	20.36	18.93	35.61	20.49	0.94	46.59
19	21.11	55.36	10.20	18.17	16.28	37.67	21.90	1.10	45.88
20	21.96	58.36	9.46	20.25	18.72	33.43	18.18	1.07	43.56
均值	20.25	57.69	9.88	19.90	16.85	36.32	20.53	0.99	45.12
CV	5.13%	4.91%	6.02%	6.18%	7.32%	6.78%	5.13%	7.04%	3.50%

由上述结果可知，三种包被抗体浓度的最佳浓度值配合测试，测试高、中、低三个浓度的质控品，三个内参峰信号值比较稳定，检测峰信号值有明显的差别且稳定性较好，包被羊抗鼠抗体荧光信号值与包被 PCT 抗体荧光信号值呈负相关且稳定性较好，符合检测的要求，故三种抗体最佳包被浓度的综合试验可用于试剂盒的下一步研究。

3.4.4 荧光染料标记抗体的制备与优化

3.4.4.1 标记 PCT 抗体荧光染料最佳配比的研究

标记 PCT 抗体荧光染料最佳用量的研究。取 1000 μ l 2.0 mg/mL（原始浓度：4.0mg/mL）PCT 标记抗体分别放入西林瓶内，然后分别加入不同量的荧光染料，标记纯化后用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，检测结果见下表：

表 11 标记 PCT 抗体荧光染料最佳量的结果(荧光信号值)

	荧光染料用量					
	80 μ g		100 μ g		120 μ g	
	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度
1	25.50	5.35	52.23	5.60	54.45	4.75
2	24.50	4.60	50.19	5.65	47.82	4.60
3	23.00	5.05	51.57	5.50	53.86	4.85
4	24.50	5.20	51.03	5.00	50.56	4.35
5	30.00	5.20	54.37	5.75	51.69	4.50
6	26.75	5.10	52.74	4.55	52.92	4.70
7	27.50	5.60	54.42	4.80	51.47	4.25
8	23.50	6.00	50.59	4.95	52.22	4.55
9	23.25	5.05	50.52	4.80	52.26	5.00
10	26.25	4.90	49.35	4.80	50.44	4.80
11	27.25	5.15	53.90	5.85	48.16	5.65
12	28.25	4.75	53.21	5.70	47.31	4.60
13	29.00	5.45	49.28	5.15	51.61	5.30
14	23.50	5.80	47.00	5.50	54.16	4.35
15	26.00	5.75	47.16	4.65	48.46	4.25
16	28.75	5.10	50.28	5.20	49.83	4.25
17	22.75	5.55	54.46	5.20	51.88	5.35

18	25.50	5.45	48.58	5.20	47.07	5.00
19	27.25	5.60	51.31	5.30	53.63	4.65
20	25.25	5.05	52.71	5.15	49.07	4.45
均值	25.91	5.29	51.25	5.22	50.94	4.71
CV	8.34%	6.85%	4.45%	7.41%	4.61%	8.29%

由上述结果可知，加入荧光染料少时，测试低浓度与高浓度样本荧光信号稳定，但是高浓度信号值偏低。加入荧光染料多时，样本稳定性较好，综合考虑，故我们选择 100 μ g 荧光染料标记 2mg PCT 抗体作为标记的最佳配比。

标记 PCT 抗体最佳浓度的研究。取 2mg PCT 标记抗体分别放入西林瓶内，三个瓶中浓度分别为：1.0mg/mL、2.0mg/mL、3.0mg/mL，然后分别加入 100 μ g 的荧光染料标记，标记纯化后 PCT 荧光标记抗体浓度约为 2.0mg/mL，用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，检测结果见下表：

表 12 荧光染料标记 PCT 抗体最佳浓度的研究(荧光信号值)

	PCT 标记抗体					
	1.0mg/mL		2.0mg/mL		3.0mg/mL	
	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度
1	49.80	5.10	48.50	5.20	28.25	4.75
2	43.82	4.30	51.77	4.75	25.50	4.60
3	53.09	4.85	47.85	5.30	29.00	4.85
4	53.58	4.25	47.97	5.20	26.00	4.35
5	44.56	4.40	47.91	4.75	27.50	4.50
6	45.37	4.40	52.23	4.85	27.75	4.70
7	57.12	5.40	47.84	5.70	24.50	4.25
8	44.11	5.05	51.30	5.00	23.75	4.55
9	46.08	4.85	54.12	5.50	25.75	5.00
10	49.37	4.45	49.27	5.60	26.25	4.80
11	51.81	5.10	48.09	5.35	23.25	5.65
12	57.69	4.85	53.87	4.80	26.00	4.60

13	58.44	5.75	47.78	5.50	23.75	5.30
14	44.54	5.60	49.36	4.90	26.25	4.35
15	56.40	5.75	52.07	5.70	24.00	4.25
16	43.93	5.35	54.46	5.70	26.50	4.25
17	58.14	5.55	53.28	5.25	28.50	5.35
18	57.95	5.25	48.73	5.45	27.50	5.00
19	48.61	5.55	49.77	5.75	22.75	4.65
20	56.38	4.30	47.60	4.85	25.25	4.45
均值	51.04	5.01	50.19	5.26	25.90	4.71
CV	11.05%	10.34%	4.86%	6.72%	7.05%	8.29%

由上述结果可知，加入荧光染料少时，测试低浓度与高浓度样本荧光信号稳定较差。加入荧光染料多时，样本稳定性较好，但是高浓度信号值偏低，说明部分 PCT 抗体为标记，故选择 100 μ g 荧光染料标记 2mg PCT 抗体（2.0mg/mL）作为标记的最佳配比。

PCT 标记抗体与缓冲液最佳配比的研究。将上述已标记的 PCT 抗体，与缓冲液分别 1:40、1:50、1:60 稀释测试，然后用高、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，检测结果如下：

表 13PCT 标记抗体与缓冲液最佳配比的研究(荧光信号值)

	PCT 标记抗体与缓冲液					
	1:40		1:50		1:60	
	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度
1	58.53	5.10	53.48	5.25	31.11	4.75
2	45.83	4.30	51.01	4.75	32.87	4.60
3	47.45	4.85	54.27	5.45	34.97	4.85
4	44.52	4.25	49.53	5.25	32.93	4.35
5	55.56	4.40	49.39	4.65	30.21	4.50
6	49.41	4.40	53.01	5.25	36.03	4.70
7	46.14	5.40	52.03	5.40	39.16	4.25
8	45.43	5.05	50.44	5.75	38.45	4.55

9	43.16	4.85	54.03	5.35	35.96	5.00
10	54.31	4.45	51.56	5.60	33.69	4.80
11	53.58	5.10	47.13	5.45	37.17	5.65
12	51.51	4.85	53.84	5.65	35.52	4.60
13	55.81	5.75	52.26	4.85	34.11	5.30
14	46.69	5.60	47.09	5.50	28.89	4.35
15	51.62	5.75	54.43	4.70	36.75	4.25
16	56.17	5.35	54.35	5.30	31.43	4.25
17	57.87	5.55	51.95	5.60	38.23	5.35
18	54.87	5.25	49.91	4.50	32.33	5.00
19	57.19	5.55	49.51	5.50	35.02	4.65
20	58.86	4.30	54.41	5.50	35.93	4.45
均值	51.73	5.01	51.68	5.26	34.54	4.71
CV	10.07%	10.34%	4.57%	7.02%	8.21%	8.29%

由上述结果可知，PCT 标记抗体与缓冲液 1:50 稀释，测试稳定性结果最好。故选择 PCT 标记抗体与缓冲液 1:50 稀释作为检测缓冲液的最佳浓度。

3.4.4.2 标记羊抗兔抗体荧光染料最佳配比的研究

标记羊抗兔抗体荧光染料最佳量的研究。取 3 支（1mg）羊抗兔抗体，各加 500 μ l 0.01M pH 7.4 PBS 溶解抗体，使抗体浓度为 2.0mg/mL，分别放至西林瓶中，然后分别加入不同量的荧光染料，标记纯化后使用膜条直接检测，检测结果见下表：

表 14 标记羊抗兔抗体荧光染料最佳配比的结果(荧光信号值)

	荧光染料用量			
	60 μ g	80 μ g	100 μ g	120 μ g
1	17.88	18.64	23.45	40.22
2	17.55	19.89	23.72	39.50
3	17.79	19.00	24.85	41.44
4	15.81	19.68	24.77	39.36
5	13.16	20.39	26.26	42.50

6	14.14	20.67	24.47	42.12
7	15.41	21.03	22.68	41.40
8	14.97	21.61	22.67	39.34
9	16.94	20.22	25.70	42.38
10	18.23	20.60	24.62	36.68
11	18.26	20.56	26.06	37.14
12	17.32	20.58	25.25	37.00
13	17.62	18.99	25.67	43.04
14	15.18	18.15	23.56	39.68
15	14.49	21.82	26.32	36.30
16	15.10	20.97	23.32	36.10
17	13.46	21.27	24.83	37.50
18	17.21	18.51	27.98	36.48
19	14.12	18.62	24.25	37.62
20	14.31	20.38	26.17	43.22
均值	15.95	20.08	24.83	39.45
CV	10.72%	5.45%	5.40%	6.28%

由上述结果可知，标记羊抗兔抗体加入荧光染料少，荧光信号稳定性较差，荧光染料加入量多，稳定性较好，综合比较，故本研究选择 80 μ g 荧光染料标记 2mg 羊抗兔抗体作为最佳配比。荧光染料标记羊抗兔抗体浓度同 PCT 标记抗体。

羊抗兔标记抗体与缓冲液最佳配比的研究。将上述已标记的羊抗兔抗体，与缓冲液分别 1:80、1:100、1:120 稀释测试，进行检测，检测结果如下：

表 15 标记羊抗兔抗体与缓冲液最佳配比结果(荧光信号值)

	羊抗兔标记抗体与缓冲液		
	1:80	1:100	1:120
1	25.28	20.27	18.45
2	25.69	20.56	13.58
3	25.76	18.91	18.72
4	27.44	19.24	13.70

5	23.93	21.40	16.02
6	27.85	20.74	17.97
7	27.27	18.87	13.35
8	27.18	18.22	18.58
9	26.88	18.26	19.24
10	27.00	19.93	17.88
11	26.75	19.66	14.04
12	28.44	21.13	15.23
13	28.26	21.02	17.71
14	25.65	18.37	15.82
15	26.78	22.53	15.09
16	27.74	19.39	16.20
17	24.96	21.43	17.77
18	23.85	20.94	14.81
19	27.80	21.74	13.39
20	28.17	21.54	18.82
均值	23.92	25.07	19.35
CV	5.77%	5.13%	10.72%

由上述结果可知，羊抗兔抗体浓度低，荧光信号稳定性较差，羊抗兔抗体浓度高，稳定性较好，综合比较，故我们选择羊抗兔标记抗体与缓冲液稀释 1:100 时作为检测缓冲液最佳使用浓度。

3.5 试纸条检测与多参数优化

3.5.1 试纸条最佳划膜间距的研究

为了确定最佳划膜间距，本研究用 Bio-dot XYZ3060 仪器划膜，包括质控线、检测线、内参线，划膜间距分别控制在 2mm、3mm、4mm，按要求组装成检测卡测试，检测高、中、低、空白质控品（高浓度：61.52mg/L、中浓度：9.97 mg/L、低浓度：0.96 mg/L），结果如下：

表 16 三种包被抗体划膜间距不同质控品检测结果（AT/AC）

	质控品								
	61.52mg/L			9.97 mg/L			0.96 mg/L		
	2mm	3mm	4mm	2mm	3mm	4mm	2mm	3mm	4mm
1	3.466	3.084	3.031	0.493	0.487	0.544	0.055	0.048	0.053
2	3.523	3.095	3.059	0.447	0.494	0.513	0.045	0.050	0.051
3	2.558	2.862	3.040	0.470	0.475	0.488	0.055	0.047	0.051
4	3.240	3.087	2.821	0.513	0.524	0.462	0.049	0.047	0.051
5	2.570	3.239	3.295	0.484	0.518	0.540	0.053	0.048	0.051
6	2.731	3.187	2.967	0.489	0.486	0.462	0.052	0.049	0.051
7	3.207	3.008	3.118	0.416	0.457	0.524	0.054	0.051	0.047
8	2.865	2.812	3.032	0.543	0.465	0.460	0.049	0.046	0.052
9	2.863	3.186	2.997	0.402	0.483	0.497	0.052	0.051	0.045
10	2.947	2.881	3.063	0.458	0.502	0.473	0.051	0.049	0.045
11	3.311	3.246	2.778	0.497	0.455	0.489	0.052	0.054	0.053
12	2.401	2.785	3.261	0.428	0.475	0.521	0.051	0.045	0.051
13	2.860	2.825	3.179	0.432	0.526	0.521	0.055	0.049	0.054
14	2.732	3.227	2.871	0.494	0.473	0.491	0.047	0.054	0.050
15	2.716	3.279	2.749	0.439	0.503	0.528	0.053	0.052	0.051
16	2.530	3.247	3.232	0.452	0.501	0.511	0.050	0.054	0.052
17	3.089	3.086	3.183	0.475	0.498	0.458	0.046	0.049	0.045
18	2.435	2.852	3.284	0.490	0.463	0.476	0.050	0.048	0.054
19	2.432	2.901	2.946	0.503	0.525	0.478	0.048	0.046	0.047
20	3.529	2.984	3.119	0.509	0.513	0.486	0.051	0.045	0.050
均值	2.900	3.044	3.051	0.472	0.491	0.496	0.051	0.049	0.050
CV	12.91%	5.58%	5.35%	7.74%	4.64%	5.55%	5.75%	5.84%	5.69%

由上述结果可知：在内参线、检测线、质控线间距分别为 2mm 时，低浓度测试结果稳定，中高浓度测试结果较紊乱，划线间距宽时，测试结果较稳定，三

者间距为 4mm 时，综合考虑检测卡窗口较小，故选择三者划线间距各位 3mm 的距离。

3.5.2 检测效果的最佳时间的研究

为了确定检测效果的最佳时间范围，我们做了这样的实验，取若干个检测卡，按照说明书操作，检测高、低质控品高浓度：61.52mg/L、低浓度：0.96 mg/L），加样完成后 2、3、4、5、6、7、8min 测试，结果（荧光信号 T/C）如下：

表 17 检测效果最佳时间的结果（AT/AC）

	质控品									
	61.52mg/L					0.96 mg/L				
	2min	3min	4min	5min	6min	2min	3min	4min	5min	6min
1	2.604	2.896	2.897	3.214	2.859	0.039	0.050	0.046	0.055	0.046
2	2.557	2.866	2.823	3.074	3.234	0.047	0.050	0.047	0.049	0.048
3	2.712	3.245	3.028	3.016	2.936	0.049	0.052	0.051	0.053	0.051
4	2.723	3.242	3.082	2.739	2.979	0.046	0.050	0.048	0.046	0.048
5	2.567	3.068	3.033	3.177	2.959	0.042	0.046	0.050	0.048	0.055
6	2.570	2.940	2.965	3.129	2.707	0.039	0.046	0.045	0.045	0.051
7	2.506	2.821	3.197	3.192	2.963	0.046	0.050	0.046	0.047	0.048
8	2.533	3.155	3.098	3.170	3.095	0.040	0.052	0.047	0.050	0.051
9	2.661	3.248	3.205	2.919	2.815	0.039	0.055	0.049	0.051	0.053
10	2.695	2.893	3.132	2.713	2.768	0.039	0.052	0.048	0.053	0.051
11	2.847	2.988	3.043	2.902	2.974	0.044	0.050	0.047	0.046	0.049
12	3.050	3.106	3.145	2.919	3.028	0.047	0.053	0.045	0.052	0.048
13	2.566	3.239	3.071	3.010	2.819	0.043	0.048	0.053	0.051	0.047
14	2.421	2.710	3.097	2.729	2.737	0.042	0.046	0.051	0.048	0.047
15	2.791	3.223	3.065	2.769	2.866	0.041	0.053	0.055	0.051	0.049
16	2.608	3.154	3.300	3.125	2.976	0.042	0.051	0.055	0.048	0.049
17	2.357	3.298	2.719	2.949	3.169	0.039	0.054	0.048	0.049	0.047

18	2.569	3.109	2.985	3.100	3.280	0.047	0.051	0.045	0.054	0.052
19	2.768	3.165	2.775	2.719	3.049	0.045	0.049	0.050	0.046	0.046
20	2.566	2.769	3.193	2.909	2.771	0.042	0.046	0.048	0.053	0.054
均值	2.634	3.057	3.043	2.974	2.949	0.043	0.053	0.055	0.049	0.052
CV	5.89%	5.95%	4.90%	5.81%	5.49%	7.52%	5.08%	5.30%	6.14%	4.98%

由上述结果可知：加样后 2min 测试时，信号值过小，且不稳定，加样反应时间长，测试结果较稳定，而在 3、4、5、6、7、8min 信号值稳定，故我们选择反应时间为 3min 作为检测效果的最佳时间。

3.5.3 综合试验

将上述选定的最佳比例（兔 IgG 抗体 1: 6、PCT 抗体 1:4、羊抗鼠抗体 1:4）用 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液稀释后在硝酸纤维素膜上进行包被；PCT 标记抗体 1:50 稀释、羊抗兔抗体 1:100 稀释混合为检测缓冲液，划膜间距为 3mm，反应时间 3min。然后用高、中、低浓度质控品（高浓度：61.52mg/L、中浓度：9.97 mg/L、低浓度：0.96 mg/L）进行检测，检测结果如下：

表 18 三种包被抗体与标记抗体的质控品检测结果（AT/AC）

	质控品		
	61.52mg/L	9.97 mg/L	0.96 mg/L
1	2.953	0.641	0.053
2	3.087	0.615	0.057
3	3.213	0.641	0.058
4	2.853	0.551	0.061
5	3.077	0.670	0.057
6	2.994	0.613	0.054
7	2.987	0.578	0.055
8	3.226	0.641	0.053
9	3.368	0.638	0.059
10	2.904	0.670	0.060

11	2.758	0.589	0.062
12	3.103	0.641	0.055
13	3.180	0.562	0.054
14	3.192	0.610	0.057
15	2.832	0.591	0.051
16	2.931	0.672	0.051
17	3.121	0.646	0.055
18	3.052	0.621	0.056
19	3.360	0.607	0.058
20	3.097	0.634	0.052
均值	3.064	0.622	0.056
CV	5.42%	5.56%	5.57%

由上述结果可知，三种包被抗体浓度与标记羊抗兔抗体，标记 PCT 抗体配合测试，测试高、中、低三个浓度的质控品，在高中低浓度时检测与参考峰值 CV 值较稳定，三种抗体最佳包被浓度与标记羊抗兔抗体、标记 PCT 抗体的综合试验结果较好，故本报告选择兔 IgG 抗体 1: 6、PCT 抗体 1:4、羊抗鼠抗体 1:4、PCT 标记抗体 1:50、羊抗兔抗体 1:100 可用于试剂条制备。

3.5.4 PCT 试纸条性能检测

本研究通过抗体筛选及缓冲液研究等，成功构建免疫反应体系。免疫反应体系建立的主要工作包括抗体对的筛选、标准品质控品的选择、荧光染料的标记、荧光标记体系的确立、免疫反应体系的建立、缓冲体系的筛选及相对含量的优化等。

基于上述参数优化，采用 PCT 标准品进行测试，通过线性范围及检测限对本试纸条进行性能测试分析，同时，以抗原浓度为横坐标，荧光信号比值为纵坐标绘制标准曲线，结果如下：

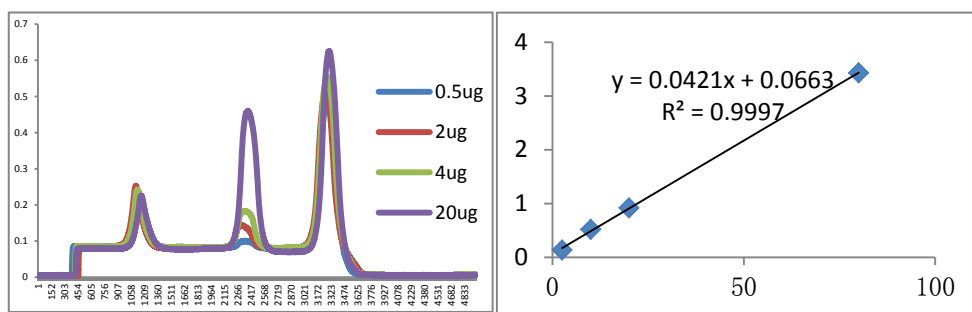


图 24PCT 标准品检测结果

进一步，采用全血样本进行测试，结果如下：

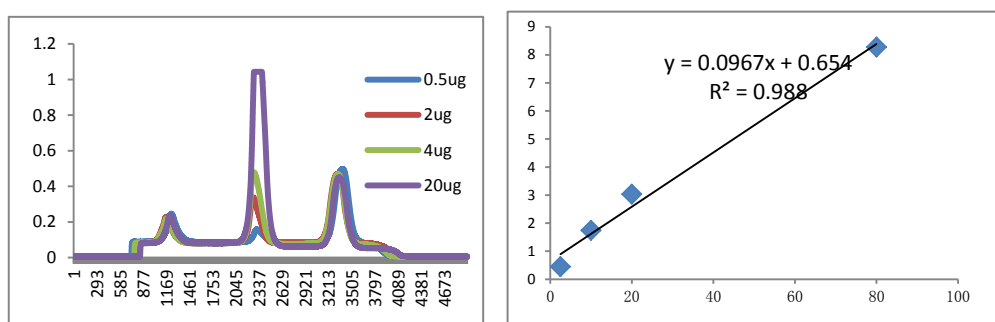


图 25 血液样本检测结果

通过上述测试分析，相对于 PCT 标准品检测，全血中存在干扰物质，导致相对标准曲线偏低，本报告研制的 PCT 时间分辨荧光免疫层析试纸条基本满足检测要求，最低检测限可低至 0.05 $\mu\text{g/L}$ 。结合临床检测需求，可进一步优化制备方法。

4 项目预期成果及完成情况

4.1 合同约定的考核指标

技术指标：

- 1) 合成时间分辨荧光染料，产量 $\geq 10\text{mg}$ ；
- 2) 检测项目：PCT（降钙素原）；
- 3) 检测限： $<0.05\text{ng/mL}$ 。
- 4) 灵敏度：阳性率 $>95\%$ 。

成果指标：

- 1) 申请专利 2 项;
- 2) 发表科研论文 2 篇;
- 3) 培养硕士研究生 1-2 名;
- 4) 建立侧向流免疫层析试纸条的专业研发团队, 培养专业人才。

4.2 项目指标的完成情况

技术指标完成情况:

- 1) 成功制备时间分辨荧光试纸条, 可检测血液 PCT 指标;
- 2) 运用固相合成技术, 成功合成时间分辨荧光供体 Eu^{3+} 。在 340nm 激发, 在 620nm 发射峰, stokes 位移达 280nm, 产量 $\geq 10\text{mg}$;
- 3) 经大量样本检测, 灵敏度阳性率 $>95\%$;
- 4) 本研究试纸条 PCT 检测限可达 0.05ng/mL ;

成果指标完成情况:

- 1) 申请专利 3 件;
- 2) 发表科研论文 3 篇;
- 3) 培养硕士研究生 1 名;
- 4) 试纸条已经实现小批量生产;
- 5) 已建立一支从事侧向流免疫层析试纸条的专业研发团队。

具体情况为: 发表论文 3 篇, 申请发明专利 3 项。具体成果如下:

专利:

- 1.田晶晶, 尹焕才.用于检测孢子丝菌病的试剂盒, 发明专利, 201710584439.7.
- 2.田晶晶, 尹焕才, 刘获.一种血液微生物的快速检测系统, 发明专利, 201711384818.8.
- 3.白鹏利, 殷建, 尹焕才, 陈名利, 胡军. 具有高寿命的荧光指示剂, 发明专利, 201510981005.1.

文章:

- 1.Jingjing Tian, Jia Hu, Mingli Chen, Huancai Yin, Peng Miao, Pengli Bai, Jian

Yin*.The use of mrp1-deficient (Danio rerio) zebrafish embryos to investigate the role of Mrp1 in the toxicity of cadmium chloride and benzo[a]pyrene, Aquatic Toxicology, 2017, 186: p123–133.

2.Huancai Yin, Jingjing Tian, Guangxing Liu, Pengli Bai, Di Liu, Lili Lv, Daxi Xiong*, Jun Hu1*.Development of Influenza H7N9 Virus Like Particle and Its Application in the Delivery of Fluorescent Quantum Dots. Nanoscience and Nanotechnology Letters.Accepted.

3.郭立泉，尹焕才，田晶晶。基于 LED 激发光源的荧光物质快速检测系统设计. 传感器与微系统. 2017, 36 (5): 106-108。

5 项目成功实施所取得的效益

5.1 技术效益

通过本项目的实施，突破了时间分辨荧光材料合成技术，合成了时间分辨荧光供体 Eu^{3+} ，解决困扰试纸条发展的核心标记染料问题。通过结合抗体定量荧光标记、试剂稳定、试纸条中试放大以及大规模生产工艺等一系列关键技术，开发出具有自主知识产权的时间分辨荧光共振能量转移侧向流试纸条，使得试纸条定量检测限和灵敏度得到进一步提升，推动其在 POCT 行业的应用拓展，进而提升我国 IVD 行业的整体技术水平。

5.2 经济效益

通过本项目的实施，研制出的基于时间分辨荧光免疫层析方法的 PCT 检测试纸条，打破了相关时间分辨荧光材料合成的技术垄断，解决了镧系元素螯合物探针规模合成问题，至少将现有此类产品的价格降至一半，可为医疗机构提供更具性价比的诊疗产品。同时通过项目的产业化工作，也将带动我市乃至全省免疫分析检测及相关产业的发展，为地方建立新的经济增长点。

5.3 社会效益

项目中通过对时间分辨荧光共振能量转移技术的研究,实现该技术的国产化,将传统检测精度进一步提升,提高国内医疗检验行业的水平,缩短与进口产品之间的差距,促使我国生物医药产业从战略性新兴产业成长为国民支柱产业。而且该产品推向市场后,有利于提高医疗机构使用试纸条类 POCT 产品对疾病的检测效率和准确度,有助于快速确定病因,提高医疗检测水准、减少医疗纠纷,建设和谐社会。

6 总结与展望

本报告按照项目合同要求完成时间分辨荧光共振能量转移材料制备及相应试纸条的研制。通过本研究的实施,突破了时间分辨荧光材料合成技术,解决困扰试纸条发展的核心标记染料问题,结合抗体定量荧光标记、试剂稳定、试纸条中试放大以及大规模生产工艺等一系列关键技术,开发出具有自主知识产权的时间分辨荧光共振能量转移侧向流试纸条,使得试纸条定量检测限和灵敏度得到进一步提升,推动其在 POCT 行业的应用拓展。

同时,打破国外对类似产品的技术垄断,设计并合成出较理想的镧系元素螯合物探针,将该技术国产化,有效降低相关产品的价格。此外,将传统检测精度进一步提升,提高国内医疗检验行业的水平,缩短与进口产品之间的差距,促使我国生物医药产业从战略性新兴产业成长为国民支柱产业。而且该产品推向市场后,有助于快速确定感染性疾病的病因,提高医疗检测水准、减少医疗纠纷,建设和谐社会。

本报告结合临床感染性疾病诊断需求,将时间分辨荧光和荧光共振能量转移技术相结合,用于侧向流免疫层析产品的研制,实现 PCT 指标的检查,从抗体原料筛选,定量标记技术,缓冲体系建立等多个角度对试纸条进行优化,通过大量测试,极大提高检测灵敏度,本研究制备试纸条技术指标基本符合任务书要求。

最后,本报告已经突破时间分辨荧光材料合成、侧向流免疫层析、抗体筛选与定量荧光标记、试剂稳定技术、试纸条中试放大以及大规模生产工艺等一系列关键技术,完成试纸条中试生产,形成批量制备工艺,同时通过本研究的开展,

建立一只侧向流免疫层析试纸条的专业研发团队，培养了硕士研究生 1 名，围绕本研究，撰写专利 3 篇，发表论文 3 篇。