

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01113129.2

[43]公开日 2002年2月13日

[11]公开号 CN 1335503A

[22]申请日 2001.6.27 [21]申请号 01113129.2
 [71]申请人 上海晶泰生物技术有限公司
 地址 200233 上海市桂平路69号25号楼6楼
 [72]发明人 张涛 李宾 龚丹
 周军 彭永济 任一萍

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
 代理人 常明

权利要求书1页 说明书5页 附图页数2页

[54]发明名称 免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒

[57]摘要

本发明涉及一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒,本双标记技术将目的蛋白的抗体或抗原标记一磁性粒子,形成一磁珠,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示物。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。本发明将免疫胶体金技术和免疫磁性粒子技术同时运用到快速检测试剂盒中,既能进行定性检测同时又能做定量测定,省时省力,节约了成本。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，其特征在于，本双标记技术将目的蛋白的抗体或抗原标记一磁性粒子，形成一磁珠，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示物；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。

2. 根据权利要求1所述的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，其特征在于，所形成的检测带是一可见或不可见的T带，可见T带为样本中有目的蛋白并且浓度很高使检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见，不可见T带为样本中无目的蛋白或者浓度很低使检测带上积聚的胶体金不能被肉眼看见。

3. 根据权利要求1所述的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，其特征在于，所述磁珠的制备是选用颗粒直径为50nm的磁性粒子，将其标记到目的抗体或抗原相应的抗原或抗体上，成为一磁珠。

4. 根据权利要求1所述的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，其特征在于，所述胶体金的制备是取四氯化金以柠檬酸三钠还原它成为胶体金。

5. 根据权利要求1所述的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，其特征在于，所述磁珠的胶体金标记和固相化是将胶体金标记到磁珠上，再以百德(Bio-Dot)仪的气压喷头喷到玻璃纤维素膜上，成为一胶体金垫，于37℃干燥待用。

6. 根据权利要求1所述的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，其特征在于，分别将检测目的物相应的另一个抗体或抗原以百德(Bio-Dot)仪的喷头喷到硝酸纤维素膜上形成检测带即T带，同时将二抗也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照线，以中性蛋白封闭，干燥。

说 明 书

免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒

本发明涉及生物医学领域，特别涉及一种在医学检验中应用的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒。

免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法，其发展十分迅速，在生物医学各研究领域，特别是在医学检验中得到了日益广泛的应用。胶体金已成为继荧光素、放射同位素和酶之后，在免疫标记技术中较为常用的一种非放射性标剂。

胶体金是由氯金酸在还原剂如鞣酸、柠檬酸三钠的作用下聚合形成特定大小的金颗粒，并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态，它具有高电子密度、能与多种生物大分子结合的特点。免疫金标记技术主要利用了金颗粒的这一特征，在金标蛋白结合处于显微镜下可见黑褐色颗粒，当这些标物在相应的配体处大量聚集时，肉眼可见红色或紫红色斑点，因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中。

由于胶体金检测试剂盒与放免、酶标试剂盒相比，具有操作使用安全(无放免物的污染)、简便(简单操作一步完成)、适于单人份检测(放免和酶标试剂盒不适于单人份或少量样品检测)和快速(10分钟左右即可有结果)等优点，因此近几年来金标诊断试剂盒正日益流行，在某些项目上已逐渐替代了放免、酶标试剂盒，如早早孕试剂条(HCG Test Strip)等。

免疫磁性粒子技术是近年来发展起来的新技术，多用于分离浓缩等试验中。磁性粒子能与蛋白质以共价方式结合而不影响其活性，所以常用来捕获特定蛋白或分离蛋白。其原理如下：将某抗体标记磁性粒子，放入含目的抗原的溶液中，经充分混合反应后，形成抗原抗体磁性粒子混合物，使溶液通过一磁性柱，由于磁性粒子被吸附而使目的抗原截留下来。同时它又能用作定量检测，可根据磁性强弱确定捕获抗体或抗原量的多少。

目前，免疫胶体金技术在金标检测试剂上运用具有下列缺点：

1. 单纯以显色深浅来判断结果的胶体金检测条，只能作半定量而不能作定量检测。

2. 现有的金标快速诊断试剂盒一般对检测样本只能进行定性检测，而无法进行定量检测，故此种试剂盒只适用于普查筛选。

3. 由于方法学的限制，只使用免疫胶体金技术建立的快速诊断试剂盒，其灵敏度较低。

4. 对于某些抗原或抗体含量极低的样本，如使用此种技术建立的快速检测试剂盒，由于灵敏度限制，会造成假阴性，因而检出率较低。

本发明的目的是提供一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，将免疫胶体金技术和免疫磁性粒子技术同时运用到快速检测试剂盒中，既能进行定性检测同时又能做定量测定，省时省力，节约了成本。

本发明的技术方案如下：

一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒，本双标记技术将目的蛋白的抗体或抗原标记一磁性粒子，形成一磁珠，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示物；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。

所形成的检测带是一可见或不可见的T带，可见T带为样本中有目的蛋白并且浓度很高使检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见，不可见T带为样本中无目的蛋白或者浓度很低使检测带上积聚的胶体金不能被肉眼看见。

所述磁珠的制备是选用颗粒直径为50nm的磁性粒子，将其标记到目的抗体或抗原相应的抗原或抗体上，成为一磁珠。

所述胶体金的制备是取四氯化金以柠檬酸三钠还原它成为胶体金。

所述磁珠的胶体金标记和固相化是将胶体金标记到磁珠上，再以百德(Bio-Dot)仪的气压喷头喷到玻璃纤维素膜上，成为一胶体金垫，于37℃干燥待用。

分别将检测目的物相应的另一个抗体或抗原以百德(Bio-Dot)仪的喷头喷到硝酸纤维素膜上形成检测带即T带，同时将二抗也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照线，以中性蛋白封闭，干燥。

本发明使用磁性粒子和免疫胶体金双标记技术建立诊断试剂盒，既能进行定性检测同时又能做定量测定。运用本发明技术建立的试剂盒与同类定量试剂盒相

比，操作简单方便，省时省力，节约了成本。在检测灵敏度要求较低的样本时，可先根据试条有无显色筛去阴性结果，再对结果为阳性的试条作进一步定量测定，免去了对所有标本都作定量测定的烦琐。

由于磁力检测仪对磁性粒子的检测很灵敏，所以运用本发明技术建立的试剂盒具有灵敏度高的优点，尤其能检测出浓度较低的目的蛋白。

使用本发明技术生产的检测板或检测条在检测时，可先根据T带的显色与否，以肉眼判断结果的阴阳性。接下来，根据需要以磁性测定仪对检测板或检测条作定量分析。在检测需高灵敏度的项目时，可对显色反应为阴性的试条作进一步分析，以避免可能的漏检。

使用本发明技术生产的检测板或检测条，具有高灵敏度和高检测率的特点。该检测板或检测条能用于一项多检的快速检测试剂盒；能检测全血、血清、血浆、唾液、尿液等样本；能用于疾病诊断、毒品检出、细菌检出等目的蛋白的检测或分离。

使用本发明技术制作的检测板或检测条可以使用双抗体夹心法、双抗原夹心法、间接法。

下面结合附图对本发明作详细说明。

图1是本发明的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记示意图。

图2是本发明的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒在运用产品为阳性情况a时的外观图。

图3是本发明的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒在运用产品为阳性情况b时的外观图。

图4是本发明的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒在运用产品为阴性情况时的外观图。

图5是本发明的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒在运用于一检多项的产品外观图。

图6是本发明的免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒运用检测原理图。

参看图1至图6，本发明的一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒采用本双标记技术，将目的蛋白的抗体或抗原标记一磁性粒子，形成一磁

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示物。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。然后以磁性测定仪对该检测带进行定量检测。

所形成的检测带是一可见或不可见的T带，可见T带为样本中有目的蛋白并且浓度很高使检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见，不可见T带为样本中无目的蛋白或者浓度很低使检测带上积聚的胶体金不能被肉眼看见。

图1中标记1是磁性粒子，2是胶体金，3是抗体，4是抗原。

图2为当阳性情况a时，阳性结果为：样品中抗体或抗原浓度可使胶体金在T带的积累可被肉眼看到。图中标记5是加样孔，6是检测窗口，61是检测带即T带，62是对照带即C带。

图3为当阳性情况b时，阳性结果为：但被捕获的抗体或抗原浓度较少使胶体金在T带的积累较少，未被肉眼看到，而被捕获在此的磁性粒子形成一条不可见的T带，能被磁性检测仪所测出。

图4为当阴性情况时，阴性结果为：样品中无目的抗体或抗原，T带处无条带出现。

图5是用于血清糖原磷酸化酶同工酶(GPBB)和肌红蛋白(Mb)联检项目，在检测窗口6内显示有GPBB检测带63、Mb检测带64和对照带62。

图6也是用于血清糖元磷酸化酶同工酶(GPBB)和肌红蛋白(Mb)联检项目，图中○表示胶体金，◎表示生物素，C为对照带，T1为检测带，T2为检测带，标号21为联结了胶体金的GPBB单抗 α 磁珠，22为联结了胶体金的Mb单抗 α 磁珠，23为包被在膜上GPBB单抗 β ，24为包被在膜上的Mb单抗 β ，25为包被在膜上的羊抗鼠二抗。

本发明的检测试剂盒的制作方法包括以下步骤：

- 1、磁珠的制备。
- 2、胶体金的制备。
- 3、磁珠的金标及固相化。
- 4、抗体或抗原或二抗包被到硝酸纤维素膜上及其封闭。
- 5、试剂盒的组装。

磁珠的制备是选用颗粒直径为50nm的磁性粒子，将其标记到目的抗体或抗原

相应的抗原或抗体上，成为一磁珠。

胶体金的制备是取四氯化金以柠檬酸三钠还原它成为胶体金。

磁珠的胶体金标记和固相化是将胶体金标记到磁珠上，再以百德(Bio-Dot)仪的气压喷头喷到玻璃纤维素膜上，成为一胶体金垫，于37℃干燥待用。

抗体或抗原或二抗包被到硝酸纤维素膜上及其封闭，是分别将检测目的物相应的另一个抗体或抗原以百德(Bio-Dot)仪的喷头，喷到硝酸纤维素膜上形成检测带即T带，同时将抗鼠二抗也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照线，以中性蛋白封闭，干燥。

试剂盒的组装是将各成份（底板、上端吸水纸、喷有抗原或抗体的膜、胶体金垫、下端吸水纸）组装、裁剪、包装。

使用本发明技术生产的检测板或检测条在如下检测时具有使用效果：

A、对于自身灵敏度要求不高的检测项目、金标方法学可达到其灵敏度的项目，如甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)等的检测，可先根据T带的显色与否，以肉眼判断结果的阴阳性，筛去不显色（阴性）的结果，再根据需要以磁性测定仪对显色结果（阳性）的检测板或检测条作进一步的定量分析。

B、对于灵敏度要求高的检测项目、金标方法学可能无法达到其灵敏度的项目，例如在采血流动车上的运用，对所献的血必须进行乙肝HBV、丙肝HCV、艾滋病HIV、梅毒TP的检测，只有结果均为阴性的血才能被接受。所以，先筛去T带有显色的阳性血清，由于HIV、HCV初期患者其血内的抗体水平极低，极可能被漏检，因此要对不显色的阴性结果作进一步磁性检测，借用磁性的高灵敏度避免可能的漏检，增加血液使用的安全性。

C、如果样品中无目的抗原或抗体，则T带处无条带出现，即为无可见色带，也无磁性条带。

说 明 书 附 图



图 1

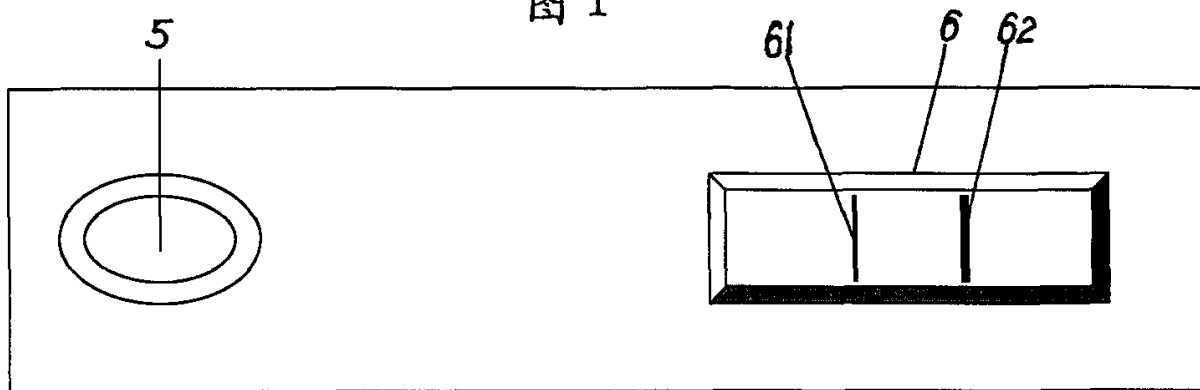


图 2

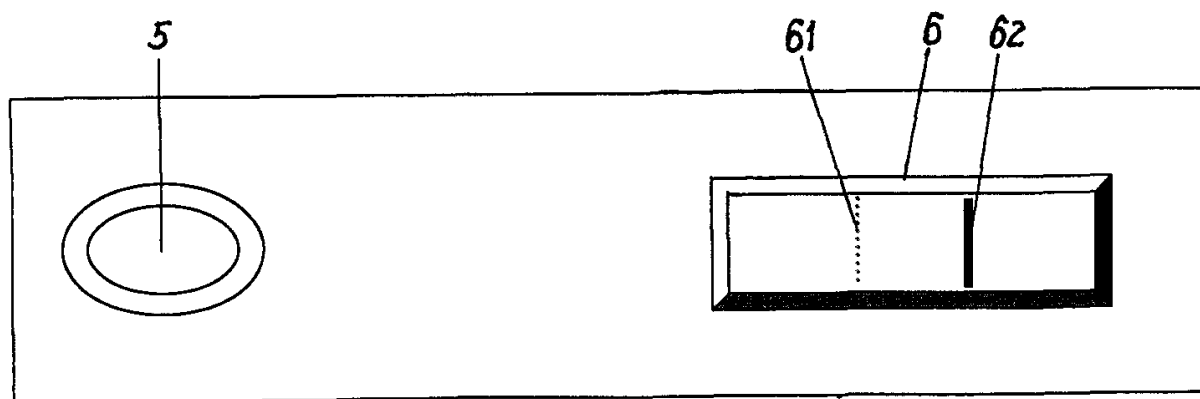


图 3

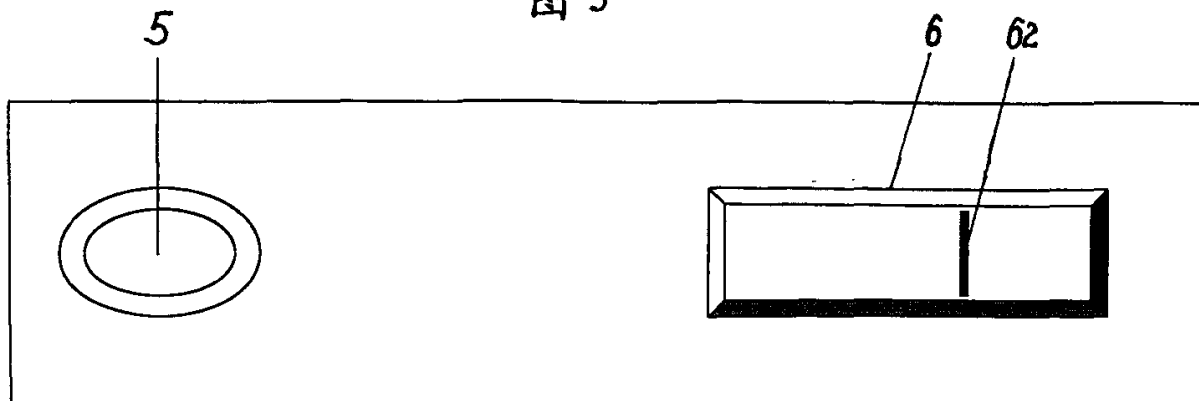


图 4

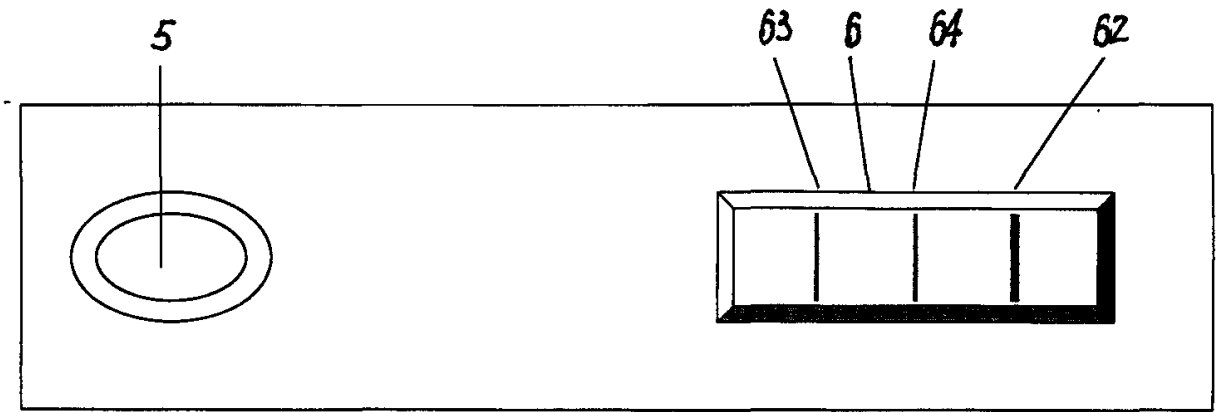


图 5

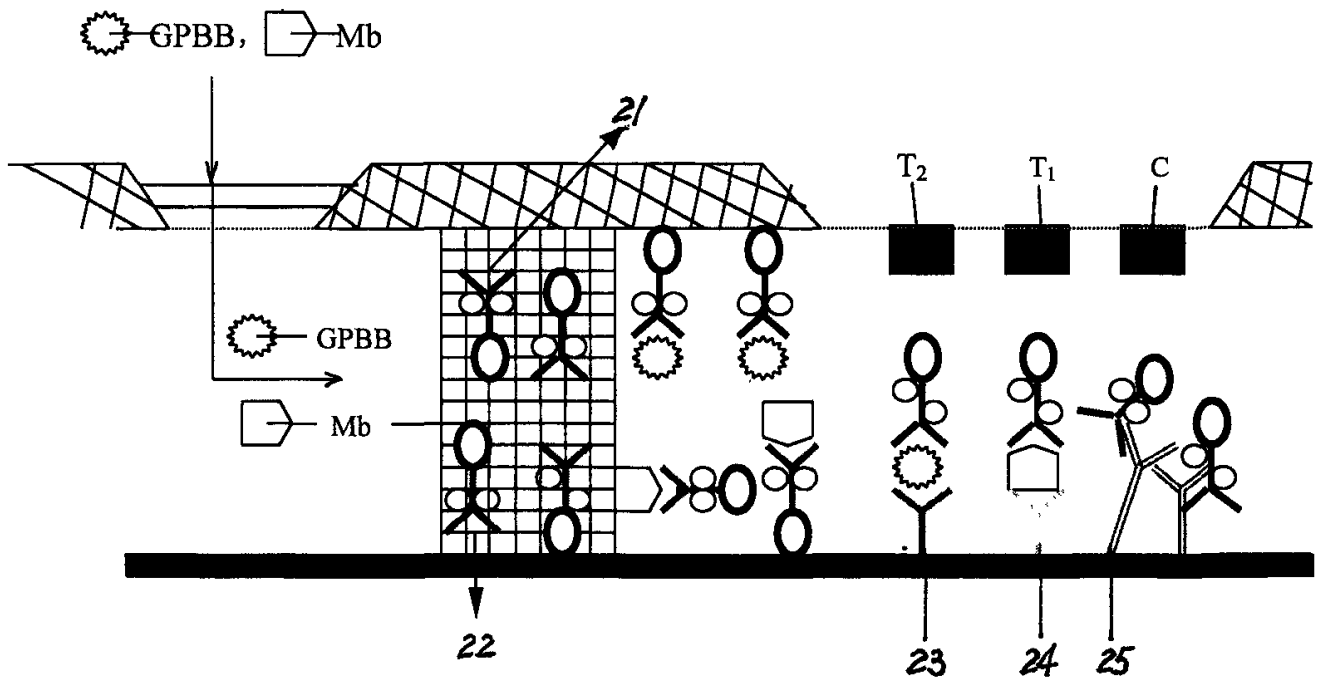


图 6

专利名称(译)	免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN1335503A	公开(公告)日	2002-02-13
申请号	CN01113129.2	申请日	2001-06-27
申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
[标]发明人	张涛 李宾 龚丹 周军 彭永济 任一萍		
发明人	张涛 李宾 龚丹 周军 彭永济 任一萍		
IPC分类号	G01N13/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	常明		
其他公开文献	CN1156699C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒,本双标记技术将目的蛋白的抗体或抗原标记一磁性粒子,形成一磁珠,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示物。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。本发明将免疫胶体金技术和免疫磁性粒子技术同时运用到快速检测试剂盒中,既能进行定性检测同时又能做定量测定,省时省力,节约了成本。

