

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510000165.X

[43] 公开日 2006年7月12日

[11] 公开号 CN 1800853A

[22] 申请日 2005.1.6

[21] 申请号 200510000165.X

[71] 申请人 台湾尖端先进生技医药股份有限公司
地址 台湾省台北县汐止市康宁街169巷25号12楼

[72] 发明人 张东玄 林乔柏 戴永德 雷逸智
郭宗甫

[74] 专利代理机构 北京中博世达专利商标代理有限公司
代理人 张岱

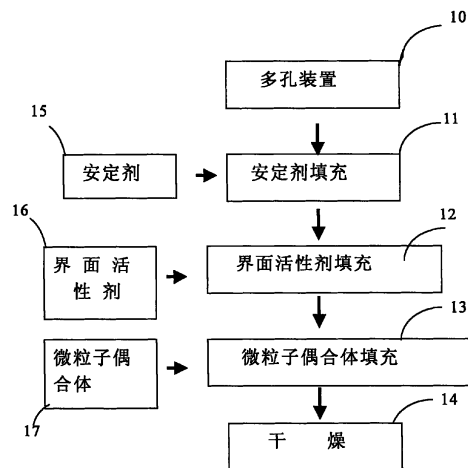
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

免疫层析装置及其制造方法

[57] 摘要

本发明涉及一种免疫检测装置及其制造方法，特别涉及免疫层析装置及其制造方法。本发明的目的是解决现有技术中免疫检测产品本身不良率较高且检测结果不稳定的问题，提供一种制造免疫层析装置的方法，及由上述方法所制造的干式免疫层析装置。本发明所述制造方法包含下列步骤：(a)将安定剂填充至多孔装置中；(b)将界面活性剂填充至多孔装置中；(c)将微粒子偶合体填充至多孔装置中；(d)将多孔装置干燥。由该方法制造的装置包括：一多孔装置；一安定剂，干燥于多孔装置中；一界面活性剂，干燥于多孔装置中；一微粒子偶合体，干燥于多孔装置中。本发明免疫层析装置的制造方法工艺简单。所制得的免疫层析装置灵敏度高，有效期较长。



- 1、一种免疫层析装置的制造方法，其特征在于包括下列步骤：
 - (a)将安定剂利用分注装置填充至多孔装置中；
 - (b)将界面活性剂利用分注装置填充至多孔装置中；
 - (c)将微粒子偶合体利用分注装置填充至多孔装置中；
 - (d)将多孔装置干燥。
- 2、按照权利要求1所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于步骤(a)中的多孔装置为微孔条、微孔盘或微孔板。
- 3、按照权利要求1所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于步骤(b)中的分注装置为分注器、微量分注器、自动分注系统或连续式分注系统。
- 4、按照权利要求1所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于步骤(a)中的安定剂为蛋白质、碳水化合物或PEG2000。
- 5、按照权利要求4所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于蛋白质安定剂为牛血清白蛋白(BSA)、血氰蛋白(KLH)、猪血清或酪蛋白。
- 6、按照权利要求4所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于碳水化合物安定剂为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖或漏芦糖。
- 7、按照权利要求1所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于步骤(b)中的界面活性剂为聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、Tween 20、AS-40、Triton X-100或SDS。
- 8、按照权利要求1所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于步骤(c)中的微粒子偶合体为蛋白质与载体形成的偶合体。
- 9、按照权利要求8所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于所述蛋白质为葡萄球菌A蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酵素、抗原、核酸、抗体、抗生素、激素或牛血清白蛋白多肽缀合物。
- 10、按照权利要求8所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于所述载体为乳胶、聚苯乙烯粒子、明胶子、炭末、胶体金、胶体硒或金属溶胶。
- 11、按照权利要求1所述的免疫层析装置的制造方法，其特征在于步骤(d)的干燥方式为吹风干燥、真空干燥、常温干燥、低温干燥或除湿干燥。

12、一种按照权利要求 1 所述的免疫层析装置的制造方法所制得的免疫层析装置，其特征在于包括：

- (a) 一多孔装置；
- (b) 一安定剂，干燥于多孔装置中；
- (c) 一界面活性剂，干燥于多孔装置中；
- (d) 一微粒子偶合体，干燥于多孔装置中。

免疫层析装置及其制造方法

技术领域：

本发明涉及一种免疫检测装置及其制造方法；特别涉及一种利用微孔制作干式免疫层析装置的制造方法及由此方法制造的免疫层析装置。

背景技术：

免疫层析装置是利用特定抗体与抗原的特异性反应，结合色层分析法发展出的一种快速、方便、简单且在短时间之内即可以肉眼判读出结果的检测装置，这种检测装置适用于一般大众，不需要经过特殊训练或具备特殊经验即可操作使用该装置。

一般常见的免疫检测装置有单一步骤检验试剂，湿式二阶段简易层析试剂。

单一步骤检验试剂是一种片状、条状或笔形的检验装置，其直接将抗体或抗原与有颜色的微粒子偶合体直接喷洒于试片上，由于其乳胶表面极容易让大分子物质与其表面官能基通过共价键结合形成乳胶-抗体结合体，操作容易。所以广泛应用于免疫测试上。然而，在该试片制造过程中容易发生单位面积试片上的微粒子偶合体层试药量喷制不均匀，造成产品不良率增加，从而提高生产成本；且由于这种试片一次的制作量固定，不容易因应客户需求而制造少量特殊性产品。

湿式二阶段简易层析试剂为一种液状试剂，其必须在待受试物加入试管或微孔容器之前或之后依照使用说明书把安定剂、界面活性剂、微粒子偶合体及缓冲液等试剂一一加入试管或微孔容器中，使试剂与受试物进行反应，然后对反应过的试片结果进行判断。然而，湿式层析装置中的试剂溶液容易由于人为操作不当，导致试管或微孔内试药量不一致，这不仅增加了检体被稀释的机会，还会增加试验样品检测结果的误差。另外，由于湿式试剂需要低温储存，因而增加储存及运输的费用，且一旦超过其保存温度会造成微粒子偶合体不稳定，因而缩短产品有效期，并导致检测产生误差。

上述产品本身不良率较高且检测结果不稳定的情形是目前亟待改善的问题。因此，需要开发一种可轻易控制微孔内试药量、操作误差减少、灵敏度提高且制作方法简单的免疫检测装置。当遇到测试结果有争议的

情况，这种有这些特性的免疫检测装置可降低产品本身受异议的可能性。
发明内容：

本发明的目的是解决现有技术中免疫检测产品本身不良率较高且检测结果不稳定的问题，提供一种制造免疫层析装置的方法，更特别地作为一种利用微孔制作干式免疫层析装置的方法；同时提供一种由上述方法所制造的干式免疫层析装置。

为达到上述目的，本发明采用如下技术方案：

具有本发明特征的免疫层析装置制造方法包含下列步骤：

- (a) 将安定剂利用分注装置填充至多孔装置中；
- (b) 将界面活性剂利用分注装置填充至多孔装置中；
- (c) 将微粒子偶合体利用分注装置填充至多孔装置中；
- (d) 将多孔装置干燥。

本发明的利用上述步骤制得的免疫层析装置，其为一种将抗原或抗体与有颜色的微粒子形成的偶合体干燥于微孔的免疫层析装置。该装置包括：

- (a) 一多孔装置；
- (b) 一安定剂，干燥于多孔装置中；
- (c) 一界面活性剂，干燥于多孔装置中；
- (d) 一微粒子偶合体，干燥于多孔装置中。

上述免疫层析装置制造方法中多孔装置系选择，举例但不限制任何特定装置，如微孔条，微孔盘或微孔板。

本发明免疫层析装置制造方法中利用分注装置填充试剂至多孔装置的步骤系选择，举例但不限制任何特定分注装置，如滴管，分注器，微量分注器或自动分注系统等装置完成填充动作。

本发明免疫层析装置制造方法中安定剂，举例但不限制于，蛋白质：牛血清白蛋白（BSA）、血氰蛋白（KLH）、猪血清或酪蛋白；碳水化合物：葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖或漏芦糖（trehalose）；或聚乙二醇 20000（PEG20000）。

本发明免疫层析装置制造方法中界面活性剂，举例但不限制于，聚乙烯醇（PVA）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、聚乙二醇、Tween 20、AS-40、Triton X-100 或 SDS。

本发明免疫层析装置制造方法中微粒子偶合体系为蛋白质与载体形成之偶合体，蛋白质选择，举例但不限制于，葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酵素、抗原、核酸、抗体、抗生素、激素或牛血清白蛋白多肽缀合物；载体选择，举例但不限制于，乳胶、聚苯乙烯粒子、明胶子、炭末、胶体金、胶体硒或金属溶胶等。

其中干燥多孔装置中试剂的步骤选择具物理干燥方式的设备进行干燥。本发明并不限定任何特定的方式。举例而言，干燥方式可为吹风干燥、真空干燥、常温干燥、低温干燥或除湿干燥等方式，以将多孔装置内所有的试剂干燥。

本发明提供了一种新颖的免疫层析装置的制造方法。本发明方法所制得的免疫检测装置可应用于，但不限制于，药品检测、残留物检测等方面。习于该项技艺人士必须了解，本发明不限于任何使用或用途。

本发明免疫层析装置的制造方法可轻易控制微孔内试药量、操作误差减少、从而降低了产品的不良率，提高了检测结果的稳定性，且工艺简单。本发明方法所制得的免疫层析装置灵敏度高，有效期较长。

附图说明：

图 1 本发明免疫层析装置制造方法流程图。

主要组件符号说明：

- 10 多孔装置
- 11 安定剂填充
- 12 界面活性剂填充
- 13 微粒子偶合体填充
- 14 干燥
- 15 安定剂
- 16 界面活性剂
- 17 微粒子偶合体

11 表示将安定剂填充入多孔装置 10 中。本发明所使用的多孔装置 10 可为微孔条，微孔盘或微孔板。填充试剂所用的分注装置可以是滴管，分注器，单爪/多爪微量分注器，数字分注器，喷射式分注器或多爪/连续式自动分注系统等装置。

安定剂 15 包括蛋白质、碳水化合物或其它安定剂。其中，蛋白质包括：牛血清白蛋白（BSA）、血氰蛋白（KLH）、猪血清或酪蛋白等；碳

水化合物包括：葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖或漏芦糖 (trehalose)；或聚乙二醇 20000 (PEG20000) 等。

12 表示将界面活性剂填充入多孔装置 10 中。本发明所使用的界面活性剂 16 是，举例但不限制于，聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚乙二醇、Tween 20、AS-40、Triton X-100 或 SDS。

13 表示将微粒子偶合体填充入多孔装置 10 中。本发明免疫层析装置制造方法中微粒子偶合体 17 是蛋白质与载体形成的偶合体。

本发明制造方法中微粒子偶合体中的蛋白质是，举例但不限制于，葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酵素、抗原、核酸、抗体、抗生素、激素或牛血清白蛋白多肽缀合物；载体是，举例但不限制于，乳胶、聚苯乙烯粒子、明胶子、炭末、胶体金、胶体硒或金属溶胶等。

14 为将多孔装置 10 干燥。本发明的干燥方法是，举例但不限制于，吹风干燥，真空干燥，常温干燥，低温干燥或除湿干燥等方式。本发明通过干燥来除去水分。

上述步骤 11 至 13 任意调换顺序皆在本发明的范围及精神内。

其中干燥多孔装置内试剂所使用的工具为(举例但不限制于)空气干燥室，电风扇，吹风机，送风器，端风机型干燥室，侧风机型干燥室，除湿机，除湿干燥室，真空干燥机或真空干燥器。

具体实施方式：

实施例 1：制作微粒子偶合体

取 100 ml 胶体金 (colloid gold, 40 nm, OD1, BBI) 与 3 ml 受体素抗体水溶液 (rabbit IgG, polyclone, 100 μ g/ml) 混合，搅拌 10 分钟后加入酪蛋白 (Casein) 溶液 (0.25%，溶于 20 mM，pH =7 的磷酸盐缓冲液) 20 ml 继续混合搅拌 20 分钟，最后加入 Trehalose 5 g 及界面活性剂 (10 % triton 溶液) 0.25 ml 充分混合均匀即为微粒子偶合体。

实施例 2：制作免疫检测装置反应孔

每一微孔 (F8, Nunc-Immuno Modules) 加入 30 μ l 受体素抗体-胶体金结合体 (微粒子偶合体)、10 μ l 猪血清蛋白与等体积饱和硫化铵的混合液及 Triton，并置于干燥室风干。

实施例 3：干式层析检验试剂 (TABP) 与市售快速测试试剂 (rapid test

one-step 试剂) 灵敏度比较

干式层析检验试剂 (TABP) 为本发明免疫层析装置所使用的检验试剂。

本发明以乙型受体素 (b-agonist, 俗称瘦肉精) 进行灵敏度比较: 依据台湾行政院卫生署公告修订「动物用药残留标准」, 克伦特罗于牛、马之肌肉、脂残留容许量为 0.2 ppb, 肝、肾残留容许量为 0.6 ppb, 于牛乳残留容许量为 0.05 ppb; 沙丁胺醇为不得检出项。一般作为初筛工具的 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) 及快速测试试剂, ELISA 的市售产品标准品灵敏度约 0.05 ppb, 但以快速测试试剂而言, 本发明干式层析检验试剂 (TABP) 确有市场独占性。

评估方法: 组装如 rapid tests 及干式层析检验试剂 (TABP) 结构, 分析 2—50 ppb Clenbuterol (CB, 克伦特罗) 及 0.5—5 ppb Salbutamol (SB, 沙丁胺醇), 并比较其灵敏度。结果如下:

	Clenbuterol (ppb)					Salbutamol (ppb)			
	2	5	10	20	50	0.5	1	2	5
Rapid test	×	×	×	✓	✓	×	×	✓	✓
TABP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

由测试结果显示, 多株抗体对 Salbutamol 的敏感度特别好, rapid test 可测到 2 ppb, 而 TABP 可测到 0.5 ppb, 相较于 rapid test, TABP 的灵敏度提升 4 倍。相对的, 此多株抗体对 Clenbuterol 的敏感度稍差, rapid test 仅测到 20 ppb, 而 TABP 可测到 2 ppb, 因此 TABP 的灵敏度较 rapid test 提升了 10 倍。

实施例 4: 干式与湿式 (市售) 抗体-金溶胶结合体的稳定性比较

本发明以二项产品的实施例进行比较:

(1) 乙型受体素 (b-agonist):

Clenbuterol (CB, 克伦特罗)

(2) 氟诺酮类抗生素 (fluoroquinolone):

Enrofloxacin (ENR, 恩氟奎琳羧酸)

干式表示于多孔条 (microtiter well strips) 内干燥的抗体-金溶胶结合体, 湿式表示用褐色瓶 (amber bottles) 包装的抗体-金溶胶结

合溶液，进行稳定性与加温老化测试。

评估方法：好的胶体金（红色）性能与不好的胶体金（紫色）性能。好的胶体金稳定性高、灵敏度高且特异性高；相反的，不好的胶体金稳定性差、灵敏度低及特异性低，这会导致产品质量、产品性能较差及发生检测结果不再现的情况。

测试结果如下：

37℃	Clenbuterol		Enrofloxacin	
	干式	湿式	干式 ^(a)	湿式 ^(b)
4周	红	淡红 浑浊	红	透明，紫黑色颗粒沉淀
8周	红	-	红	-
12周	红	-	红	-

结果显示，干式增加了微粒子偶合体的稳定性，使得胶体金维持红色状态，产品的稳定度、灵敏度及特异性得到良好的控制，因此延长了产品的有效期。

虽然前述较佳实施例进一步揭示了本发明，但其并非用以限定本发明，任何熟习此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，可以作各种变动与修改。如上述的解释，关于多孔装置，试剂选用，填充顺序及干燥等等都可以作各种的修饰与变化，而不会偏离本发明的精神及范围。

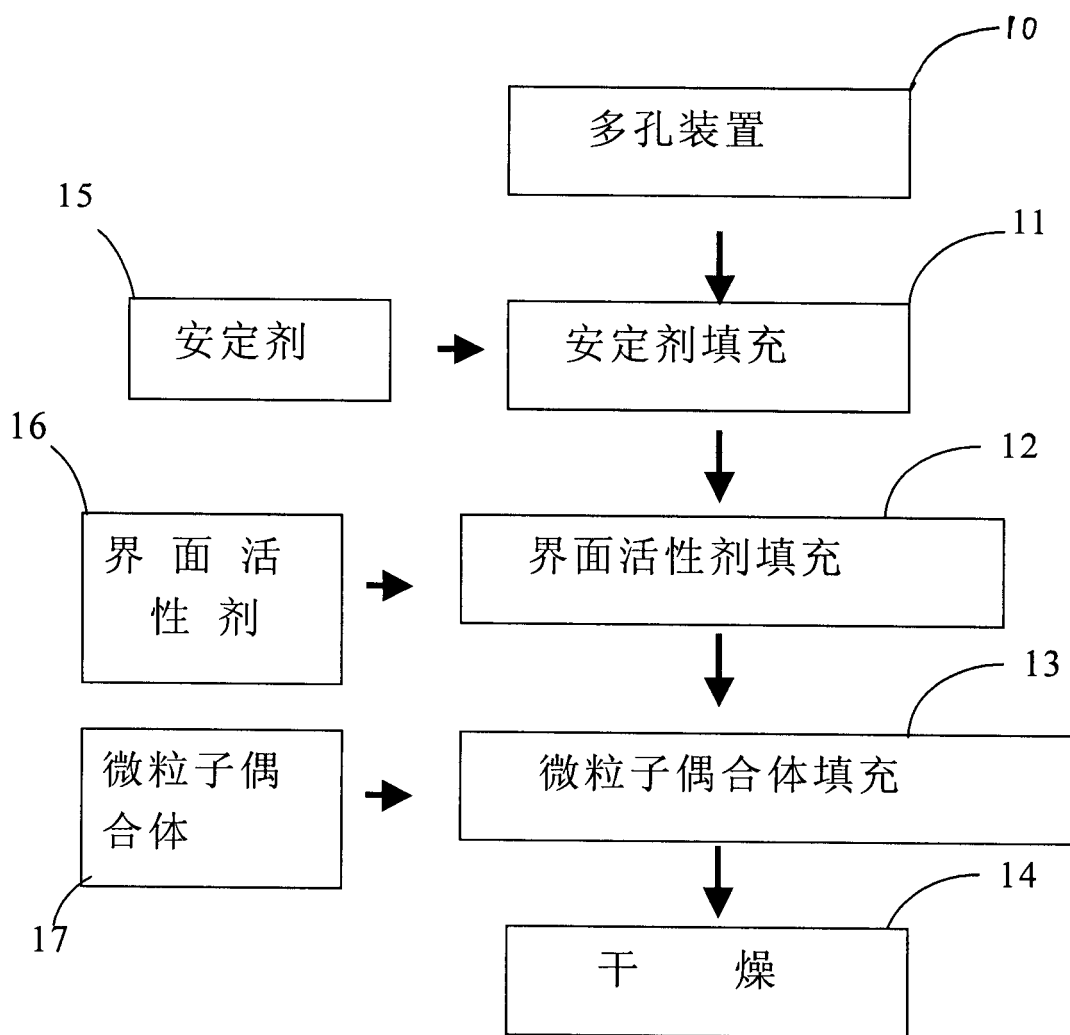


图 1

专利名称(译)	免疫层析装置及其制造方法		
公开(公告)号	CN1800853A	公开(公告)日	2006-07-12
申请号	CN200510000165.X	申请日	2005-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	台湾尖端先进生技医药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	台湾尖端先进生技医药股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	台湾尖端先进生技医药股份有限公司		
[标]发明人	张东玄 林乔柏 戴永德 雷逸智 郭宗甫		
发明人	张东玄 林乔柏 戴永德 雷逸智 郭宗甫		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	张岱		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫检测装置及其制造方法，特别涉及免疫层析装置及其制造方法。本发明的目的是解决现有技术中免疫检测产品本身不良率较高且检测结果不稳定的问题，提供一种制造免疫层析装置的方法，及由上述方法所制造的干式免疫层析装置。本发明所述制造方法包含下列步骤：(a)将安定剂填充至多孔装置中；(b)将界面活性剂填充至多孔装置中；(c)将微粒子偶合体填充至多孔装置中；(d)将多孔装置干燥。由该方法制造的装置包括：一多孔装置；一安定剂，干燥于多孔装置中；一界面活性剂，干燥于多孔装置中；一微粒子偶合体，干燥于多孔装置中。本发明免疫层析装置的制造方法工艺简单。所制得的免疫层析装置灵敏度高，有效期较长。

