



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102375055 A

(43) 申请公布日 2012.03.14

(21) 申请号 201010257719.5

(22) 申请日 2010.08.19

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号五所

(72) 发明人 周蕾 郭兆彪 杨瑞馥

(74) 专利代理机构 北京太兆天元知识产权代理有限公司 11108

代理人 张韬

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 10 页

(54) 发明名称

一种多重检测免疫层析芯片

(57) 摘要

本发明公开了一种多重检测免疫层析芯片,其可克服在先技术中,免疫层析技术无法高通量检测以及芯片技术操作复杂无法现场使用的缺点,通过将免疫层析反应模式与芯片检测矩阵设置有机融合,最终实现了以现场简便操作为前提的高通量检测,即一次加样实现多种目标被检物的同步检测。

1. 一种多重检测免疫层析芯片,其特征在于该免疫层析芯片的结构组成为:粘性底衬[1]、样品垫[2]、结合垫[3]、分析膜[4]和吸水垫[5]。

2. 如权利要求1所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的粘性底衬[1]是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC板。

3. 如权利要求1所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的样品垫[2]是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:吸水纸、纤维素膜、玻璃纤维、无纺布或滤血膜。

4. 如权利要求1所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的结合垫[3]是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:玻璃纤维、聚酯膜或无纺布;结合垫[3]中固定有若干种检测结合物[6]与一种质控结合物[7];检测结合物[6]由示踪物[8]和液相检测探针[9]连接而成,并与被检靶标[10]特异性的一一对应;质控结合物[7]由示踪物[8]和液相质控探针[11]连接而成,可质控层析过程正常与否。

5. 如权利要求1所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的分析膜[4]是微观结构均匀的物质:硝酸纤维素膜或尼龙膜;分析膜[4]上设置有一个检测矩阵单元[12];每个检测矩阵单元[12]包括一个检测区[13]与一个质控区[14];检测区[13]由多种固相检测探针[15]构成,质控区[14]由一种固相质控探针[16]构成;检测区[13]中的每种固相检测探针[15]位置明确固定对应于一种被检靶标[10]的特异性检测,而质控区[14]中的固相质控探针[16]位置明确固定用于质控整个层析流程是否正常。

6. 如权利要求1所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的吸水垫[5]是具有较大床体积的物质:吸水纸或纤维素膜。

7. 如权利要求4或5所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的每种被检靶标[10]对应两个检测探针,一个作为固相检测探针[15]固定于分析膜[4]上,一个作为液相检测探针[9]与示踪物[8]结合成为固定于结合垫[3]内的检测结合物[6]。

8. 如权利要求5所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的固相检测探针[15]在分析膜[4]上检测区[13]内的位置明确固定,对应于每种被检靶标[10]的特异性检测,与被检靶标[10]以及检测结合物[6]中的液相检测探针[9]之间可发生特异的免疫反应,通过免疫反应改变固相检测探针[15]所在明确固定位置处结合的示踪物[8]量,通过示踪物[8]量的改变揭示被检靶标[10]的有无以及浓度。

9. 如权利要求5所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于其中的固相质控探针[16]在分析膜[4]上质控区[14]内的位置明确固定,可与质控结合物[7]内的液相质控探针[11]直接结合,从而质控层析过程正常与否。

10. 如权利要求1所述的多重检测免疫层析芯片,其特征在于免疫层析芯片包括夹心模式免疫层析芯片、间接模式免疫层析芯片和竞争模式免疫层析芯片三种;其中夹心模式免疫层析芯片包括双抗体夹心模式检测抗原和双抗原夹心模式检测抗体两种;间接模式是对血清样品中的特定抗体进行检测,结合物为示踪物与被检抗体的二抗连接而成;竞争模式用于对只有一个抗原决定簇的半抗原等小分子物质进行检测。

11. 如权利要求1-10任一所述的多重检测免疫层析芯片的制备方法,其特征在于该方法包括如下步骤:

A. 结合垫[3]制备:将质控结合物[7]和检测结合物[6]混合得结合物混合液,将结合物混合液加于作为结合垫[3]的玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,烘干备用;

B. 分析膜 [4] 制备 : 将作为固相检测探针 [15] 与固相质控探针 [16] 的抗原、抗体以圆形斑点形式点在硝酸纤维素膜或尼龙膜上, 每种探针位置明确固定可以准确寻址, 分别形成检测区 [13] 与质控区 [14], 从而构成一个检测矩阵单元 [12]; 每个检测矩阵单元 [12] 中, 固相检测探针 [15] 及其明确固定位置与被检靶标 [10] 一一对应, 固相质控探针 [16] 只需一种且也具有明确固定位置; 在分析膜 [4] 上连续喷点若干个检测矩阵单元 [12], 烘干备用;

C. 本发明免疫层析芯片粘帖剪切成型 : 将样品垫 [2]、结合垫 [3]、分析膜 [4] 和吸水垫 [5] 依次粘帖于作为粘性底衬 [1] 的 PVC 板上, 确保相互之间的重叠关系; 自检测矩阵单元 [12] 之间的分割点 [17] 将本发明免疫层析芯片剪切为单独可用的成品, 得本发明免疫层析芯片; 成型的免疫层析芯片可直接使用或置入塑料外壳中使用。

12. 一种生物靶标检测的方法, 其特征在于检测过程中采用权利要求 1-10 任一所述的多重检测免疫层析芯片, 检测流程为:

A. 添加样品 : 将液体样品或经过预处理的液体样品滴加至权利要求 1-10 任一所述的免疫层析芯片的样品垫 [2] 上;

B. 层析反应 : 静置数分钟待层析反应完成; 层析的过程中, 检测结合物 [6]、被检靶标 [10] 和固相检测探针 [15] 之间发生特异性的免疫反应, 在分析膜 [4] 的明确固定位置发生示踪物 [8] 结合量的变化, 示踪物 [8] 的结合量直接反应了被检靶标 [10] 的有无或多少;

C. 结果判读 : 对于带有颜色的示踪物 [8] 可直接肉眼观察判定结果, 对于产生光、电或磁信号的示踪物 [8] 需仪器进行结果判读; 由于针对特定被检靶标 [10] 的固相检测探针 [15] 在分析膜 [4] 上的位置明确固定, 因而对明确固定位置上示踪物 [8] 的信号, 包括颜色、光、电或磁, 进行判读即可实现某种被检靶标 [10] 的定性定量检测。

一种多重检测免疫层析芯片

发明领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,涉及一种多重检测免疫层析芯片,将免疫层析技术与芯片技术有机融合,可以实现一份样品中多种目标被检物的同时检测。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是一种成熟的现场快速检测技术,其物理结构包括以下几个部分:粘性底衬、样品垫、结合垫、分析膜以及吸水垫,其中结合垫中固定有示踪物-生物活性分子的结合物,而分析膜上则固定有不同种类的生物分子作为检测带和质控带。样品垫、结合垫、分析膜以及吸水垫按照一定的重叠关系固定于粘性底衬,从而保证了液体在层析试纸内部流动的连续性。检测的过程中操作者只需将液体样品滴加于样品垫上,样品渗透入结合垫使其中固定的结合物重新溶解游离,并在吸水垫以及毛细作用的带动下,通过检测带与质控带向吸水垫的方向移动,在这一过程中将根据样品中目标被检物的有无,在检测带与质控带上发生特异的免疫反应,从而产生可检测的信号。由于所有检测所需的生物试剂已经全部固定于成品试纸,操作者只需完成滴加液体样品的过程,且整个检测流程只需10-15分钟,因而免疫层析是最为简便、快捷的现场检测手段,但其通常只能对一种靶标进行分析,高通量检测未能实现。

[0003] 芯片技术的产生便是顺应了生物分析对于靶标(核酸或蛋白)高通量检测的需求,其通过点样仪将作为检测探针的核酸或蛋白固定于玻璃片基的不同区域构成相对分离的检测矩阵,矩阵中的每个区域对应于一种靶标的检测。将样品直接滴加于芯片的检测矩阵区域,经过孵育(使核酸杂交或免疫反应得以发生)、清洗、示踪等步骤,在芯片上将根据靶标的有无从而在特定区域产生可检测的信号。与免疫层析的均相反应(homogeneous)只需的一步加样有所不同,芯片技术尤其是蛋白芯片技术属于异相反应(heterogeneous),其操作过程不可避免的需要反复的孵育、清洗等过程,且对操作的标准化以及操作的环境有极为严格的要求,无法实现现场甚至是一线实验室的检测需求。免疫层析技术和芯片技术的区别特征详见附图1所示:

[0004] 若能将免疫层析的快速便捷与芯片技术的高通量有机融合,研制可在现场以简便的操作实现高通量检测目的的新型技术,则可更好的满足疾控系统等现场检监测部门对于高通量快速筛查的需求。

发明内容

[0005] 本发明目的在于公开一种多重检测免疫层析芯片,其可克服在先技术中,免疫层析技术无法高通量检测以及芯片技术操作复杂无法现场使用的缺点,通过将免疫层析反应模式与芯片检测矩阵设置有机融合,最终实现了以现场简便操作为前提的高通量检测,即一次加样实现多种目标被检物的同步检测。

[0006] 本发明的目的是通过如下方案实现的。

[0007] 本发明免疫层析芯片的结构组成为:

[0008] 粘性底衬 [1]、样品垫 [2]、结合垫 [3]、分析膜 [4] 和吸水垫 [5]。(如附图 2 所示)

[0009] 其中,粘性底衬 [1] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC 板。

[0010] 其中,样品垫 [2] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:吸水纸、纤维素膜、玻璃纤维、无纺布或滤血膜。

[0011] 其中,结合垫 [3] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:玻璃纤维、聚酯膜或无纺布;结合垫 [3] 中固定有若干种检测结合物 [6] 与一种质控结合物 [7];检测结合物 [6] 由示踪物 [8] 和液相检测探针 [9] 连接而成,并与被检靶标 [10] 特异性的一一对应;质控结合物 [7] 由示踪物 [8] 和液相质控探针 [11] 连接而成,可质控层析过程正常与否。

[0012] 其中,分析膜 [4] 是微观结构均匀的物质:硝酸纤维素膜或尼龙膜;分析膜 [4] 上设置有一个检测矩阵单元 [12];每个检测矩阵单元 [12] 包括一个检测区 [13] 与一个质控区 [14];检测区 [13] 由多种固相检测探针 [15] 构成,质控区 [14] 由一种固相质控探针 [16] 构成;检测区 [13] 中的每种固相检测探针 [15] 位置明确固定对应于一种被检靶标 [10] 的特异性检测,而质控区 [14] 中的固相质控探针 [16] 位置明确固定用于质控整个层析流程是否正常。

[0013] 其中,吸水垫 [5] 是具有较大床体积的物质:吸水纸或纤维素膜。

[0014] 其中,每种被检靶标 [10] 对应两个检测探针,一个作为固相检测探针 [15] 固定于分析膜 [4] 上,一个作为液相检测探针 [9] 与示踪物 [8] 结合成为固定于结合垫 [3] 内的检测结合物 [6]。

[0015] 其中,固相检测探针 [15] 在分析膜 [4] 上检测区 [13] 内的位置明确固定,对应于每种被检靶标 [10] 的特异性检测,与被检靶标 [10] 以及检测结合物 [6] 中的液相检测探针 [9] 之间可发生特异的免疫反应,通过免疫反应改变固相检测探针 [15] 所在明确固定位置处结合的示踪物 [8] 量,通过示踪物 [8] 量的改变揭示被检靶标 [10] 的有无以及浓度。

[0016] 其中,固相质控探针 [16] 在分析膜 [4] 上质控区 [14] 内的位置明确固定,可与质控结合物 [7] 内的液相质控探针 [11] 直接结合,从而质控层析过程正常与否。

[0017] 其中,本发明免疫层析芯片包括夹心模式免疫层析芯片、间接模式免疫层析芯片和竞争模式免疫层析芯片;其中夹心模式免疫层析芯片包括双抗体夹心模式检测抗原和双抗原夹心模式检测抗体两种;间接模式是对血清样品中的特定抗体进行检测,结合物为示踪物与被检抗体的二抗连接而成;竞争模式用于对只有一个抗原决定簇的半抗原等小分子物质进行检测。

[0018] 本发明免疫层析芯片的制备方法为:

[0019] A. 结合垫 [3] 制备:将质控结合物 [7] 和检测结合物 [6] 混合得结合物混合液,将结合物混合液加于作为结合垫 [3] 的玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,烘干备用;

[0020] B. 分析膜 [4] 制备:将作为固相检测探针 [15] 与固相质控探针 [16] 的抗原、抗体以圆形斑点形式点在硝酸纤维素膜或尼龙膜上,每种探针位置明确固定可以准确寻址,分别形成检测区 [13] 与质控区 [14],从而构成一个检测矩阵单元 [12];每个检测矩阵单元 [12] 中,固相检测探针 [15] 及其明确固定位置与被检靶标 [10] 一一对应,固相质控探针 [16] 只需一种且也具有明确固定位置;在分析膜 [4] 上连续喷点若干个检测矩阵单元 [12],烘干备用;(见附图 3)

[0021] C. 本发明免疫层析芯片粘帖剪切成型:将样品垫 [2]、结合垫 [3]、分析膜 [4] 和吸水垫 [5] 依次粘帖于作为粘性底衬 [1] 的 PVC 板上,确保相互之间的重叠关系;自检测矩阵单元 [12] 之间的分割点 [17] 将本发明免疫层析芯片剪切为单独可用的成品,得本发明免疫层析芯片;成型的免疫层析芯片可直接使用或置入塑料外壳中使用。(见附图 4)

[0022] 一种用本发明免疫层析芯片进行生物靶标检测的方法:

[0023] A. 添加样品:将液体样品或经过预处理的液体样品滴加至本发明免疫层析芯片的样品垫 [2] 上;

[0024] B. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;层析的过程中,检测结合物 [6]、被检靶标 [10] 和固相检测探针 [15] 之间发生特异性的免疫反应,在分析膜 [4] 的明确固定位置发生示踪物 [8] 结合量的变化,示踪物 [8] 的结合量直接反应了被检靶标 [10] 的有无或多少;

[0025] C. 结果判读:对于带有颜色的示踪物 [8] 可直接肉眼观察判定结果,对于产生光、电或磁信号的示踪物 [8] 需仪器进行结果判读;由于针对特定被检靶标 [10] 的固相检测探针 [15] 在分析膜 [4] 上的位置明确固定,因而对明确固定位置上示踪物 [8] 的信号,包括颜色、光、电或磁,进行判读即可实现某种被检靶标 [10] 的定性定量检测。

[0026] 本发明免疫层析芯片的检测原理为:如附图 5 所示,检测中将液体样品添加至样品垫 [2] 上后,液体样品自样品垫 [2] 渗透入结合垫 [3];在液体样品基质的作用下,结合垫 [3] 中固定的检测结合物 [6] 与质控结合物 [7] 将重新溶解游离,并同样品中的被检靶标 [10] 一同离开结合垫 [3] 进入分析膜 [4],在毛细作用下,通过检测区 [13] 与质控区 [14] 向吸水垫 [5] 的方向涌动;在这一过程中,检测结合物 [6] 与被检靶标 [10] 将按照免疫反应模式的不同与检测区 [13] 中位置明确固定的固相检测探针 [15] 发生特异的免疫反应,而质控结合物 [7] 将直接与质控区 [14] 的固相质控探针 [16] 结合;由此通过分析膜 [4] 上检测区 [13] 内位置明确固定的固相检测探针 [15]、被检靶标 [10]、检测结合物 [6] 上连接的液相检测探针 [9] 之间的特异性免疫反应,改变了分析膜 [4] 上检测区 [13] 内明确固定位置处结合示踪物 [8] 的量,最终明确固定位置处上示踪物 [8] 信号的有无以及强弱变化则代表了某种特定被检靶标 [10] 的有无以及浓度高低;而分析膜 [4] 上质控区 [14] 内位置明确固定的固相质控探针 [16] 与质控结合物 [7] 上连接的液相质控探针 [11] 之间的直接结合,使得分析膜 [4] 上质控区 [14] 内明确固定位置处有示踪物 [8] 结合,示踪物 [8] 的存在则指示了层析过程的正常进行。

[0027] 在传统技术中,免疫层析技术无法高通量检测,而芯片技术操作复杂无法现场使用。针对这些问题,在本发明中通过将免疫层析反应模式与芯片检测矩阵设置有机融合,设计了一种免疫层析芯片,最终实现了以现场简便操作为前提的高通量检测,即一次加样实现多种目标被检物的同步检测。

附图说明:

[0028] 图 1:免疫层析技术与芯片技术比较;

[0029] 图 2:免疫层析芯片结构组成图;

[0030] 图 3:分析膜制备示意图;

[0031] 图 4:免疫层析芯片粘帖剪切成型示意图;

- [0032] 图 5 :免疫层析芯片检测原理图 ;
- [0033] 图 6 :双抗原夹心模式免疫层析芯片结构组成图 ;
- [0034] 图 7 :双抗原夹心模式免疫层析芯片检测原理图 ;
- [0035] 图 8 :间接模式免疫层析芯片结构组成图 ;
- [0036] 图 9 :间接模式免疫层析芯片检测原理图 ;
- [0037] 图 10 :竞争模式免疫层析芯片结构组成图 ;
- [0038] 图 11 :竞争模式免疫层析芯片检测原理图。
- [0039] 下述实施例用于进一步说明但不限于本发明。

具体实施方式

- [0040] 实施例 1 :双抗原夹心模式免疫层析芯片
- [0041] 双抗原夹心模式免疫层析芯片用于对血清样品中的特定抗体进行检测,检测结合物为示踪物与被检抗体的特异性抗原连接而成。
- [0042] 双抗原夹心模式免疫层析芯片的结构组成(附图 6)为:
- [0043] 双抗原夹心模式免疫层析芯片由粘性底衬 [A1]、样品垫 [A2]、结合垫 [A3]、分析膜 [A4] 以及吸水垫 [A5] 构成;
- [0044] 粘性底衬 [A1] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC板,其可使样品垫 [A2]、结合垫 [A3]、分析膜 [A4] 以及吸水垫 [A5] 按照适当的重叠关系粘帖固定,从而保证液体在双抗原夹心模式层析芯片内部流动的连续性;
- [0045] 样品垫 [A2] 是吸水纸,其为双抗原夹心模式免疫层析芯片使用过程中添加液体样品的位置;
- [0046] 结合垫 [A3] 是玻璃纤维;结合垫 [A3] 中固定有若干种检测结合物 [A6] 与一种质控结合物 [A7];检测结合物 [A6] 由示踪物 [A8] 以及液相检测抗原 [A9] 连接而成,并与被检抗体 [A10] 特异性的一一对应;质控结合物 [A7] 由示踪物 [A8] 以及液相质控抗原 [A11] 连接而成,可质控层析过程正常与否;
- [0047] 分析膜 [A4] 是硝酸纤维素膜;其中,分析膜 [A4] 上设置有一个检测矩阵单元 [A12];每个检测矩阵单元 [A12] 包括一个检测区 [A13] 与一个质控区 [A14];检测区 [A13] 由多种固相检测抗原 [A15] 构成,质控区 [A14] 由一种固相质控抗体 [A16] 构成;检测区 [A13] 中的每种固相检测抗原 [A15] 位置明确固定对应于一种被检抗体 [A10] 的特异性检测,而质控区 [A14] 中的固相质控抗体 [A16] 位置明确固定用于质控整个层析流程是否正常;
- [0048] 吸水垫 [A5] 是吸水纸。
- [0049] 双抗原夹心模式免疫层析芯片的制备方法为:
- [0050] A. 结合垫 [A3] 制备:将质控结合物 [A7] 和检测结合物 [A6] 混合得结合物混合液,将结合物混合液加于作为结合垫 [A3] 的玻璃纤维上,烘干备用;
- [0051] B. 分析膜 [A4] 制备:将固相检测抗原 [A15] 以及固相质控抗体 [A16] 以圆形斑点形式点在硝酸纤维素膜上,每种抗原和抗体的位置明确固定可以准确寻址,分别形成检测区 [A13] 与质控区 [A14],从而构成一个检测矩阵单元 [A12];每个检测矩阵单元 [A12] 中,固相检测抗原 [A15] 及其明确固定位置与被检抗体 [A10] 一一对应,固相质控抗体 [A16]

只需一种且也具有明确固定位置；在分析膜 [A4] 上连续喷点若干个检测矩阵单元 [A12]，烘干备用；

[0052] C. 本发明免疫层析芯片粘帖剪切成型：将样品垫 [A2]、结合垫 [A3]、分析膜 [A4] 和吸水垫 [A5] 依次粘帖于作为粘性底衬 [A1] 的 PVC 板上，确保相互之间的重叠关系；自检测矩阵单元 [A12] 之间的分割点 [17] 将本发明免疫层析芯片剪切为单独可用的成品，得本发明免疫层析芯片；成型的免疫层析芯片可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0053] 用上述本发明双抗原夹心模式免疫层析芯片进行生物靶标检测的方法：

[0054] A. 添加样品：将液体样品或经过预处理的液体样品滴加至本发明免疫层析芯片的样品垫 [A2] 上；

[0055] B. 层析反应：静置数分钟待层析反应完成；层析的过程中，检测结合物 [A6]、被检抗体 [A10] 和固相检测抗原 [A15] 之间发生特异性的免疫反应，在分析膜 [A4] 的明确固定位置发生示踪物 [A8] 结合量的变化，示踪物 [A8] 的结合量直接反应了被检抗体 [A10] 的有无或多少；

[0056] C. 结果判读：对于带有颜色的示踪物 [A8] 可直接肉眼观察判定结果，对于产生光、电或磁信号的示踪物 [A8] 需仪器进行结果判读；由于针对特定被检抗体 [A10] 的固相检测抗原 [A15] 在分析膜 [A4] 上的位置明确固定，因而对明确固定位置上示踪物 [A8] 的信号，包括颜色、光、电或磁，进行判读即可实现某种被检抗体 [A10] 的定性定量检测。

[0057] 本发明双抗原夹心模式免疫层析芯片的检测原理（附图 7）为：

[0058] 检测中将液体样品添加至样品垫 [A2] 上后，液体样品自样品垫 [A2] 渗透入结合垫 [A3]；在液体样品基质的作用下，结合垫 [A3] 中固定的检测结合物 [A6] 与质控结合物 [A7] 将重新溶解游离，并同样品中的被检抗体 [A10] 一同离开结合垫 [A3] 进入分析膜 [A4]，在毛细作用下，通过检测区 [A13] 与质控区 [A14] 向吸水垫 [A5] 的方向涌动；在这一过程中，检测结合物 [A6] 与被检抗体 [A10] 的一个位点特异性的结合，同时被检抗体 [A10] 的另一个位点则与检测区 [A13] 中位置明确固定的固相检测抗原 [A15] 特异性的结合，而质控结合物 [A7] 将直接与质控区 [A14] 的固相质控抗体 [A16] 结合；由此通过分析膜 [A4] 上检测区 [A13] 内位置明确固定的固相检测抗原 [A15]、被检抗体 [A10]、检测结合物 [A6] 上连接的液相检测抗原 [A9] 之间的特异性的双抗原夹心模式免疫反应，使得分析膜 [A4] 上检测区 [A13] 内明确固定位置处发生了示踪物 [A8] 的结合，最终明确固定位置处示踪物 [A8] 信号的有无以及强弱变化则代表了某种特定被检抗体 [A10] 的有无以及浓度高低，其中示踪物 [A8] 信号强度与被检抗体 [A10] 浓度呈正；而分析膜 [A4] 上质控区 [A14] 内位置明确固定的固相质控抗体 [A16] 与质控结合物 [A7] 上连接的液相质控抗原 [A11] 之间的直接结合，使得分析膜 [A4] 上质控区 [A14] 内明确固定位置处有示踪物 [A8] 结合，示踪物 [A8] 的存在则指示了层析过程的正常进行。

[0059] 实施例 2：间接模式免疫层析芯片

[0060] 间接模式免疫层析芯片用于对血清样品中的特定抗体进行检测，检测结合物为示踪物与被检抗体的二抗连接而成。在此以对人血清样品进行检测为例，进行说明。

[0061] 间接模式免疫层析芯片的结构组成（附图 8）为：

[0062] 间接模式免疫层析芯片由粘性底衬 [B1]、样品垫 [B2]、结合垫 [B3]、分析膜 [B4] 以及吸水垫 [B5] 构成；

[0063] 粘性底衬 [B1] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质 :PVC 板,其可使样品垫 [B2]、结合垫 [B3]、分析膜 [B4] 以及吸水垫 [B5] 按照适当的重叠关系粘帖固定,从而保证液体在间接模式层析芯片内部流动的连续性;

[0064] 样品垫 [B2] 是纤维素膜,其为间接模式免疫层析芯片使用过程中添加液体样品的位置;

[0065] 结合垫 [B3] 是聚酯膜;结合垫 [B3] 中固定有一种检测结合物 [B6] 与一种质控结合物 [B7];检测结合物 [B6] 由示踪物 [B8] 以及羊抗人 IgG[B9] 连接而成,可与被检人抗体 [B10] 特异性反应;质控结合物 [B7] 由示踪物 [B8] 以及羊抗兔 IgG[B11] 连接而成,可质控层析过程正常与否;

[0066] 分析膜 [B4] 是尼龙膜;其中,分析膜 [B4] 上设置有一个检测矩阵单元 [B12];每个检测矩阵单元 [B12] 包括一个检测区 [B13] 与一个质控区 [B14];检测区 [B13] 由多种固相检测抗原 [B15] 构成,质控区 [B14] 由一种固相质控抗体 [B16] 即兔 IgG 构成;检测区 [B13] 中的每种固相检测抗原 [B15] 位置明确固定对应于一种被检人抗体 [B10] 的特异性检测,而质控区 [B14] 中的固相质控抗体 [B16] 位置明确固定用于质控整个层析流程是否正常;

[0067] 吸水垫 [B5] 是纤维素膜。

[0068] 间接模式免疫层析芯片的制备方法为:

[0069] A. 结合垫 [B3] 制备:将质控结合物 [B7] 和检测结合物 [B6] 混合得结合物混合液,将结合物混合液加于作为结合垫 [B3] 的聚酯膜上,烘干备用;

[0070] B. 分析膜 [B4] 制备:将固相检测抗原 [B15] 以及固相质控抗体 [B16] 以圆形斑点形式点在尼龙膜上,每种抗原和抗体的位置明确固定可以准确寻址,分别形成检测区 [B13] 与质控区 [B14],从而构成一个检测矩阵单元 [B12];每个检测矩阵单元 [B12] 中,固相检测抗原 [B15] 及其明确固定位置与被检人抗体 [B10] 一一对应,固相质控抗体 [B16] 只需一种且也具有明确固定位置;在分析膜 [B4] 上连续喷点若干个检测矩阵单元 [B12],烘干备用;

[0071] C. 本发明免疫层析芯片粘帖剪切成型:将样品垫 [B2]、结合垫 [B3]、分析膜 [B4] 和吸水垫 [B5] 依次粘帖于作为粘性底衬 [B1] 的 PVC 板上,确保相互之间的重叠关系;自检测矩阵单元 [B12] 之间的分割点 [17] 将本发明免疫层析芯片剪切为单独可用的成品,得本发明免疫层析芯片;成型的免疫层析芯片可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0072] 用上述本发明间接模式免疫层析芯片进行生物靶标检测的方法:

[0073] A. 添加样品:将液体样品或经过预处理的液体样品滴加至本发明免疫层析芯片的样品垫 [B2] 上;

[0074] B. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;层析的过程中,检测结合物 [B6]、被检人抗体 [B10] 和固相检测抗原 [B15] 之间发生特异性的免疫反应,在分析膜 [B4] 的明确固定位置发生示踪物 [B8] 结合量的变化,示踪物 [B8] 的结合量直接反应了被检人抗体 [B10] 的有无或多少;

[0075] C. 结果判读:对于带有颜色的示踪物 [B8] 可直接肉眼观察判定结果,对于产生光、电或磁信号的示踪物 [B8] 需仪器进行结果判读;由于针对特定被检人抗体 [B10] 的固相检测抗原 [B15] 在分析膜 [B4] 上的位置明确固定,因而对明确固定位置上示踪物 [B8]

的信号,包括颜色、光、电或磁,进行判读即可实现某种被检人抗体 [B10] 的定性定量检测。

[0076] 本发明间接模式免疫层析芯片的检测原理(附图 9)为:

[0077] 检测中将液体样品添加至样品垫 [B2] 上后,液体样品自样品垫 [B2] 渗透入结合垫 [B3];在液体样品基质的作用下,结合垫 [B3] 中固定的检测结合物 [B6] 与质控结合物 [B7] 将重新溶解游离,并同样品中的被检人抗体 [B10] 一同离开结合垫 [B3] 进入分析膜 [B4],在毛细作用下,通过检测区 [B13] 与质控区 [B14] 向吸水垫 [B5] 的方向涌动;在这一过程中,检测结合物 [B6] 与被检人抗体 [B10] 的一个位点特异性的结合,同时被检人抗体 [B10] 的另一个位点则与检测区 [B13] 中位置明确固定的固相检测抗原 [B15] 特异性的结合,而质控结合物 [B7] 将直接与质控区 [B14] 的固相质控抗体 [B16] 即兔 IgG 结合;由此通过分析膜 [B4] 上检测区 [B13] 内位置明确固定的固相检测抗原 [B15]、被检人抗体 [B10]、检测结合物 [B6] 上连接的羊抗人 IgG [B9] 之间的特异性的免疫反应,使得分析膜 [B4] 上检测区 [B13] 内明确固定位置处发生示踪物 [B8] 的结合,最终明确固定位置处示踪物 [B8] 信号的有无以及强弱变化则代表了某种特定被检人抗体 [B10] 的有无以及浓度高低,其中示踪物 [B8] 信号强度与被检人抗体 [B10] 浓度呈正比;而分析膜 [B4] 上质控区 [B14] 内位置明确固定的固相质控抗体 [B16] 即兔 IgG 与质控结合物 [B7] 上连接的羊抗兔 IgG [B11] 之间的直接结合,使得分析膜 [B4] 上质控区 [B14] 内明确固定位置处有示踪物 [B8] 结合,示踪物 [B8] 的存在则指示了层析过程的正常进行。

[0078] 实施例 3:竞争模式免疫层析芯片

[0079] 竞争模式免疫层析芯片用于对只有一个抗原决定簇的半抗原等小分子物质进行检测。

[0080] 竞争模式免疫层析芯片的结构组成(图 10)为:

[0081] 竞争模式免疫层析芯片由粘性底衬 [C1]、样品垫 [C2]、结合垫 [C3]、分析膜 [C4] 以及吸水垫 [C5] 构成;

[0082] 粘性底衬 [C1] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC 板,其可使样品垫 [C2]、结合垫 [C3]、分析膜 [C4] 以及吸水垫 [C5] 按照适当的重叠关系粘帖固定,从而保证液体在竞争模式层析芯片内部流动的连续性;

[0083] 样品垫 [C2] 是玻璃纤维,其为竞争模式免疫层析芯片使用过程中添加液体样品的位置;

[0084] 结合垫 [C3] 是无纺布;结合垫 [C3] 中固定有若干种检测结合物 [C6] 与一种质控结合物 [C7];检测结合物 [C6] 由示踪物 [C8] 以及液相检测抗原 [C9] 连接而成,并与被检抗原 [C10] 特异性的一一对应具有完全一致的抗原决定簇;质控结合物 [C7] 由示踪物 [C8] 以及地高辛 [C11] 连接而成,可质控层析过程正常与否;

[0085] 分析膜 [C4] 是硝酸纤维素膜;其中,分析膜 [C4] 上设置有一个检测矩阵单元 [C12];每个检测矩阵单元 [C12] 包括一个检测区 [C13] 与一个质控区 [C14];检测区 [C13] 由多种固相检测抗体 [C15] 构成,质控区 [C14] 由一种固相质控抗体 [C16] 构成;检测区 [C13] 中的每种固相检测抗体 [C15] 位置明确固定对应于一种被检抗原 [C10] 的特异性检测,而质控区 [C14] 中的固相质控抗体 [C16] 即兔抗地高辛位置明确固定用于质控整个层析流程是否正常;

[0086] 吸水垫 [C5] 是吸水纸。

[0087] 竞争模式免疫层析芯片的制备方法为：

[0088] A. 结合垫 [C3] 制备：将质控结合物 [C7] 和检测结合物 [C6] 混合得结合物混合液，将结合物混合液加于作为结合垫 [C3] 的无纺布上，烘干备用；

[0089] B. 分析膜 [C4] 制备：将固相检测抗体 [C15] 以及固相质控抗体 [C16] 以圆形斑点形式点在尼龙膜上，每种抗体的位置明确固定可以准确寻址，分别形成检测区 [C13] 与质控区 [C14]，从而构成一个检测矩阵单元 [C12]；每个检测矩阵单元 [C12] 中，固相检测抗体 [C15] 及其明确固定位置与被检抗原 [C10] 一一对应，固相质控抗体 [C16] 只需一种且也具有明确固定位置；在分析膜 [C4] 上连续喷点若干个检测矩阵单元 [C12]，烘干备用；

[0090] C. 本发明免疫层析芯片粘帖剪切成型：将样品垫 [C2]、结合垫 [C3]、分析膜 [C4] 和吸水垫 [C5] 依次粘帖于作为粘性底衬 [C1] 的 PVC 板上，确保相互之间的重叠关系；自检测矩阵单元 [C12] 之间的分割点 [17] 将本发明免疫层析芯片剪切为单独可用的成品，得本发明免疫层析芯片；成型的免疫层析芯片可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0091] 用上述本发明竞争模式免疫层析芯片进行生物靶标检测的方法：

[0092] A. 添加样品：将液体样品或经过预处理的液体样品滴加至本发明免疫层析芯片的样品垫 [C2] 上；

[0093] B. 层析反应：静置数分钟待层析反应完成；层析的过程中，检测结合物 [C6]、被检抗原 [C10] 和固相检测抗体 [C15] 之间发生特异性的免疫反应，在分析膜 [C4] 的明确固定位置发生示踪物 [C8] 结合量的变化，示踪物 [C8] 的结合量直接反应了被检抗原 [C10] 的有无或多少；

[0094] C. 结果判读：对于带有颜色的示踪物 [C8] 可直接肉眼观察判定结果，对于产生光、电或磁信号的示踪物 [C8] 需仪器进行结果判读；由于针对特定被检抗原 [C10] 的固相检测抗体 [C15] 在分析膜 [C4] 上的位置明确固定，因而对明确固定位置上示踪物 [C8] 的信号，包括颜色、光、电或磁，进行判读即可实现某种被检抗原 [C10] 的定性定量检测。

[0095] 本发明竞争模式免疫层析芯片的检测原理（图 11）为：

[0096] 检测中将液体样品添加至样品垫 [C2] 上后，液体样品自样品垫 [C2] 渗透入结合垫 [C3]；在液体样品基质的作用下，结合垫 [C3] 中固定的检测结合物 [C6] 与质控结合物 [C7] 将重新溶解游离，并同样品中的被检抗原 [C10] 一同离开结合垫 [C3] 进入分析膜 [C4]，在毛细作用下，通过检测区 [C13] 与质控区 [C14] 向吸水垫 [C5] 的方向涌动；在这一过程中，检测结合物 [C6] 与被检抗原 [C10] 以竞争方式与检测区 [C13] 中位置明确固定的固相检测抗体 [C15] 特异性的结合，而质控结合物 [C7] 直接与质控区 [C14] 的固相质控抗体 [C16] 即兔抗地高辛结合；由此通过被检抗原 [C10]、检测结合物 [C6] 上连接的液相检测抗原 [C9] 对分析膜 [C4] 上检测区 [C13] 内位置明确固定的固相检测抗体 [C15] 之间的特异性的竞争免疫反应，使得分析膜 [C4] 上检测区 [C13] 内明确固定位置处发生了示踪物 [C8] 结合量的改变，即被检抗原 [C10] 不存在时检测结合物 [C6] 占据了固相检测抗体 [C15] 全部的结合位点，从而产生最强的示踪物 [C8] 信号，而当被检抗原 [C10] 存在时其与检测结合物 [C6] 竞争固相检测抗体 [C15] 上的结合位点，从而导致示踪物 [C8] 信号的降低；最终明确固定位置处示踪物 [C8] 信号的有无以及强弱变化代表了某种特定被检抗原 [C10] 的有无以及浓度高低，其中示踪物 [C8] 信号强度与被检抗原 [C10] 浓度呈反比；而分析膜 [C4] 上质控区 [C14] 内位置明确固定的固相质控抗体 [C16] 即兔抗地高辛与质控

结合物 [C7] 上连接的地高辛 [C11] 之间的直接结合,使得分析膜 [C4] 上质控区 [C14] 内明确固定位置处有示踪物 [C8] 结合,示踪物 [C8] 的存在则指示了层析过程的正常进行。

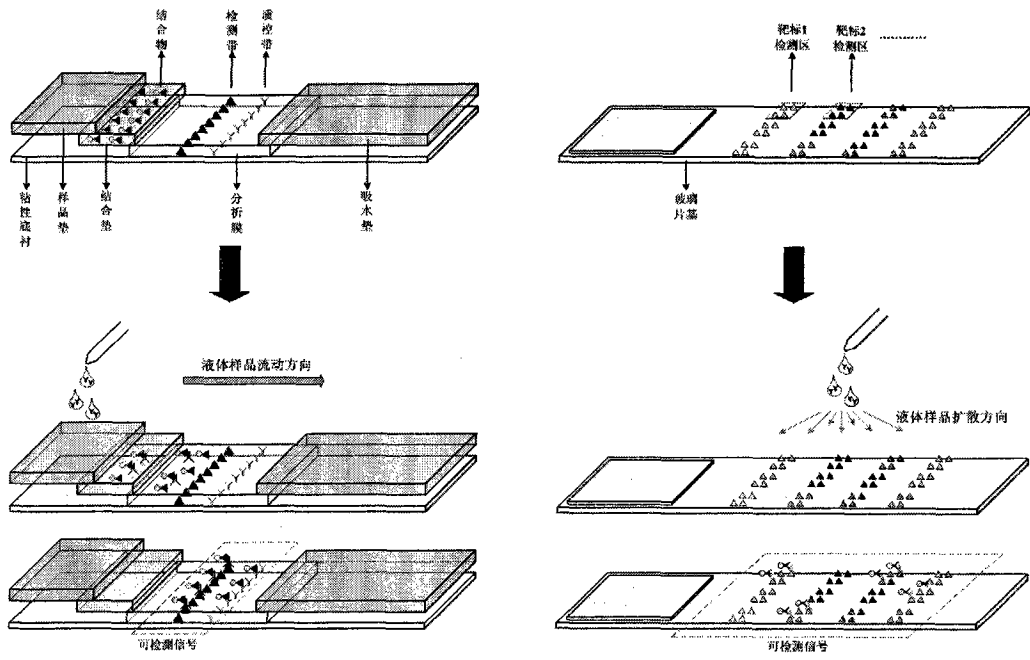


图 1

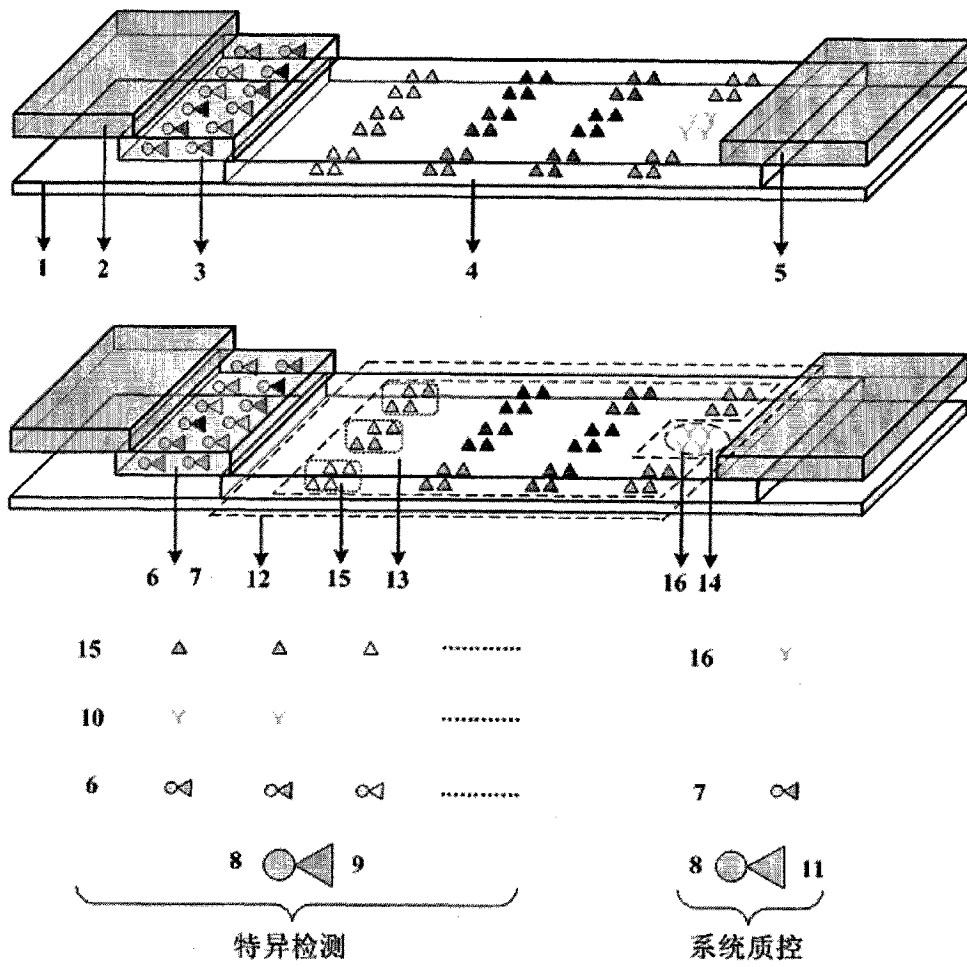


图 2

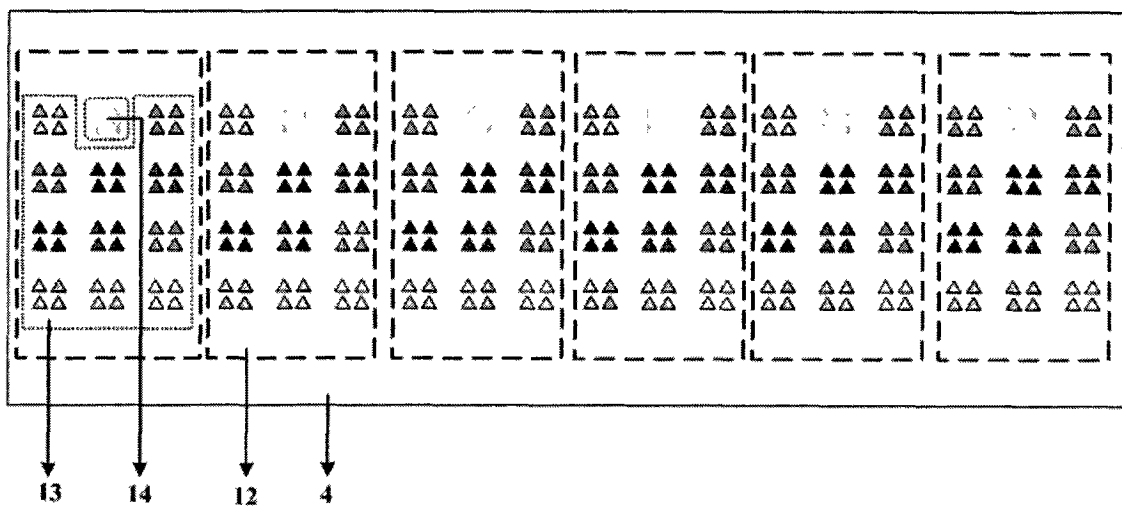


图 3

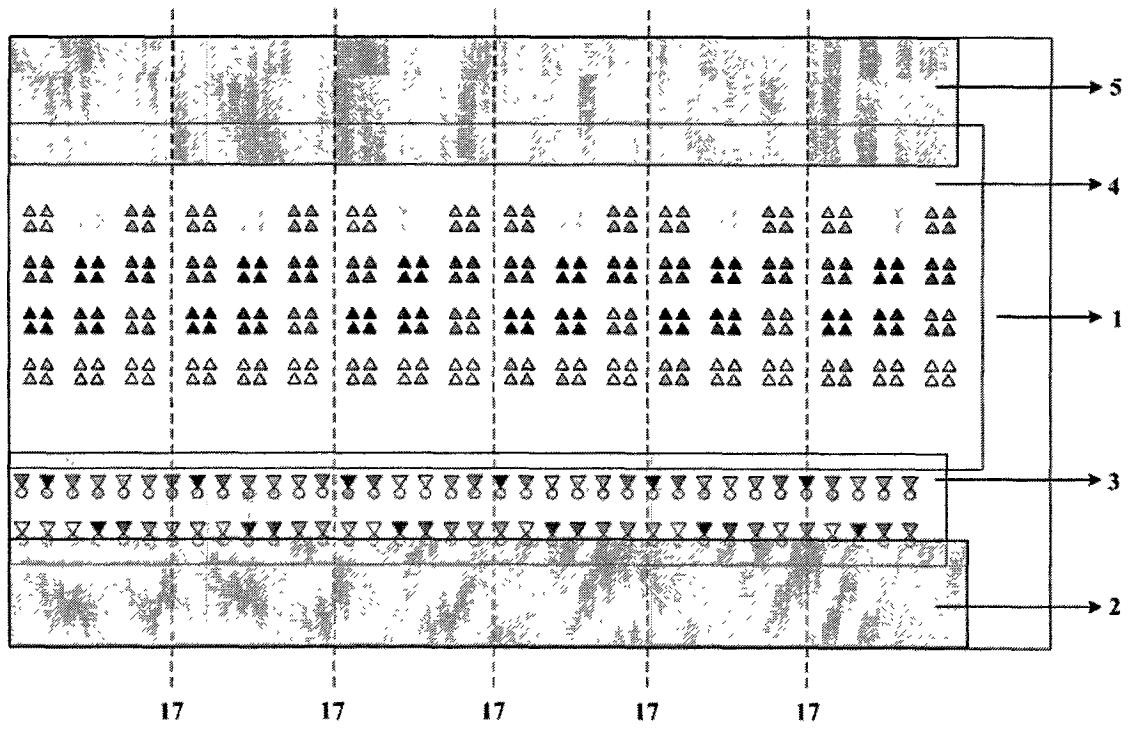


图 4

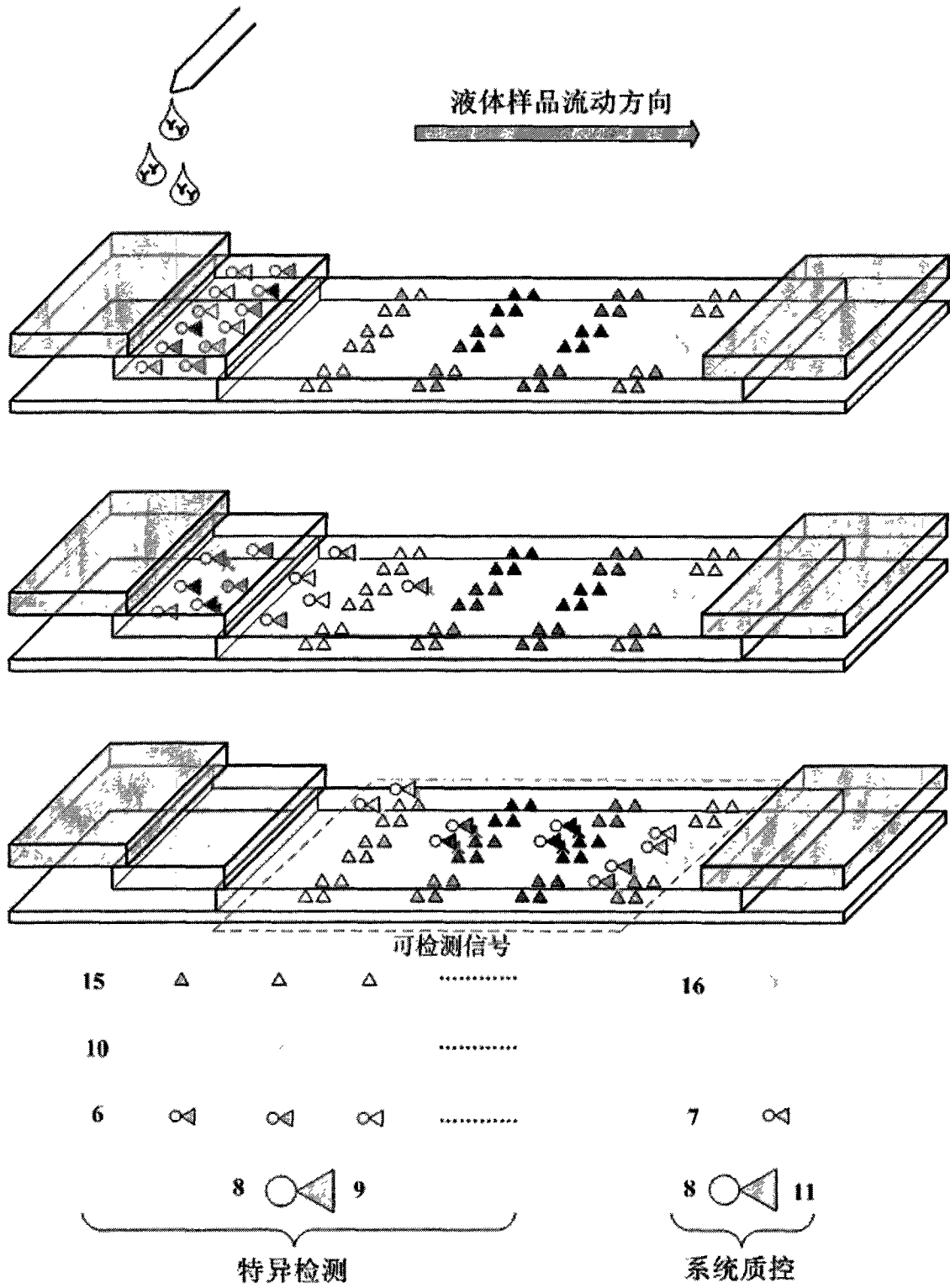


图 5

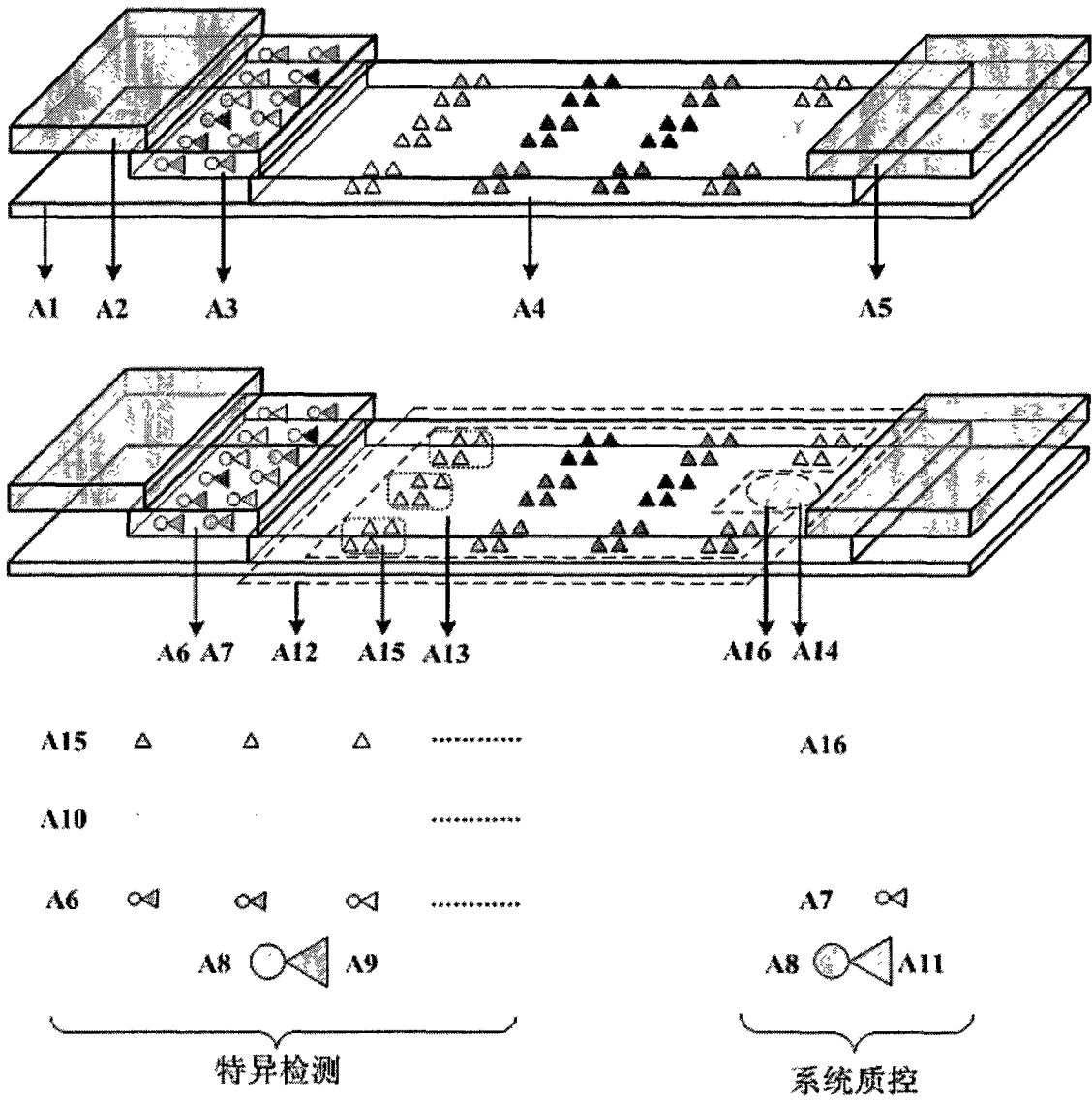


图 6

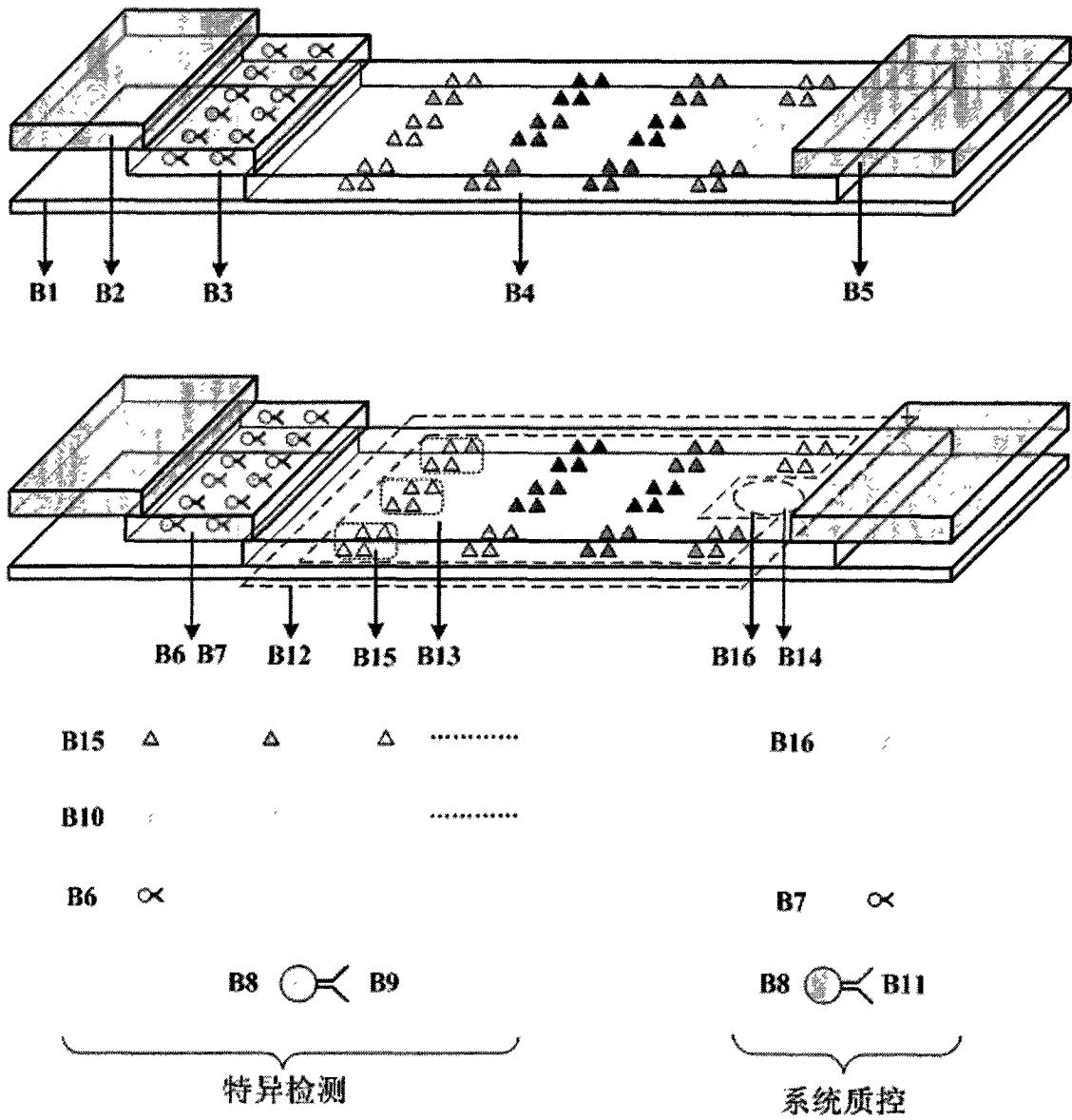


图 8

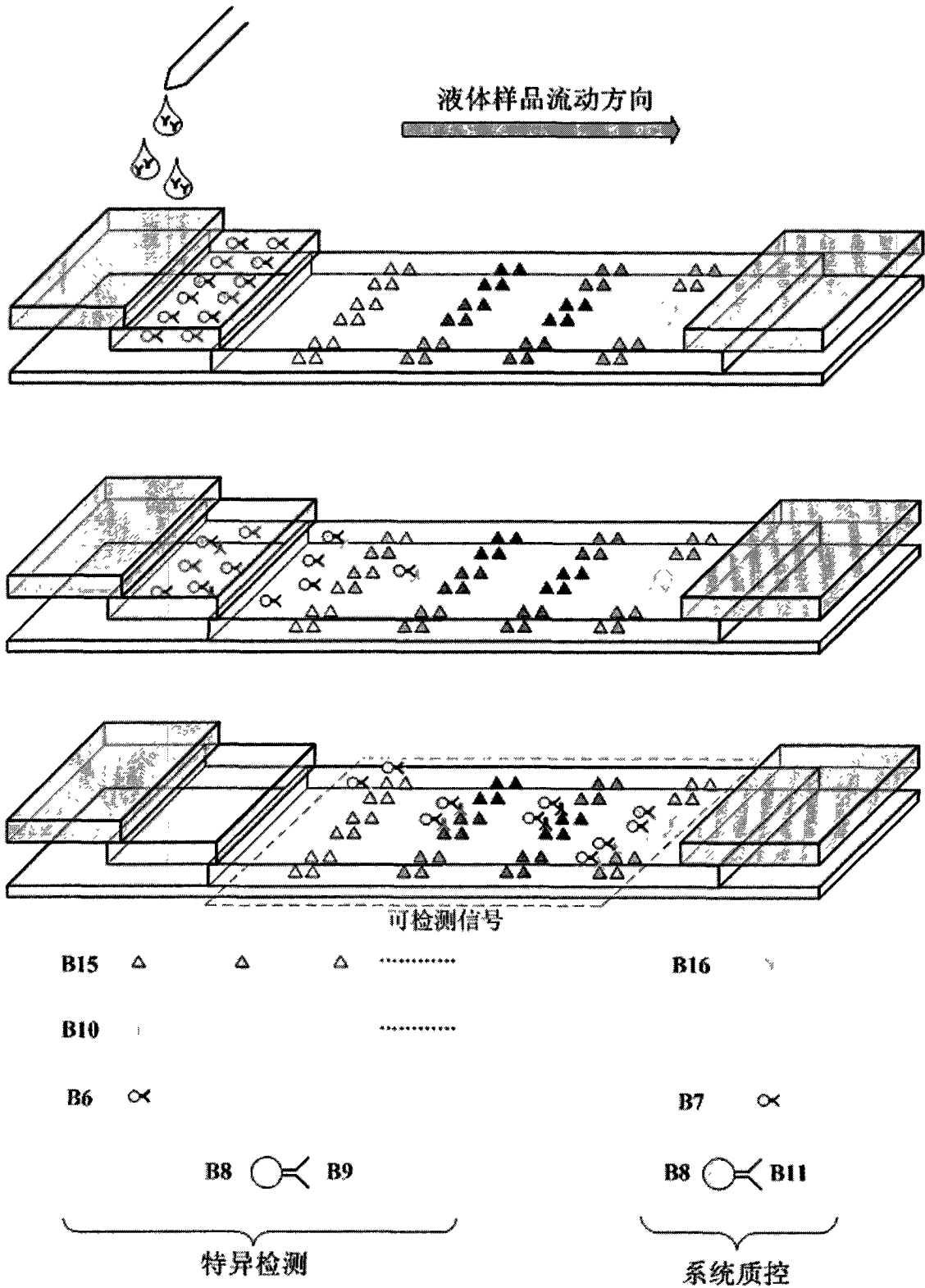


图 9

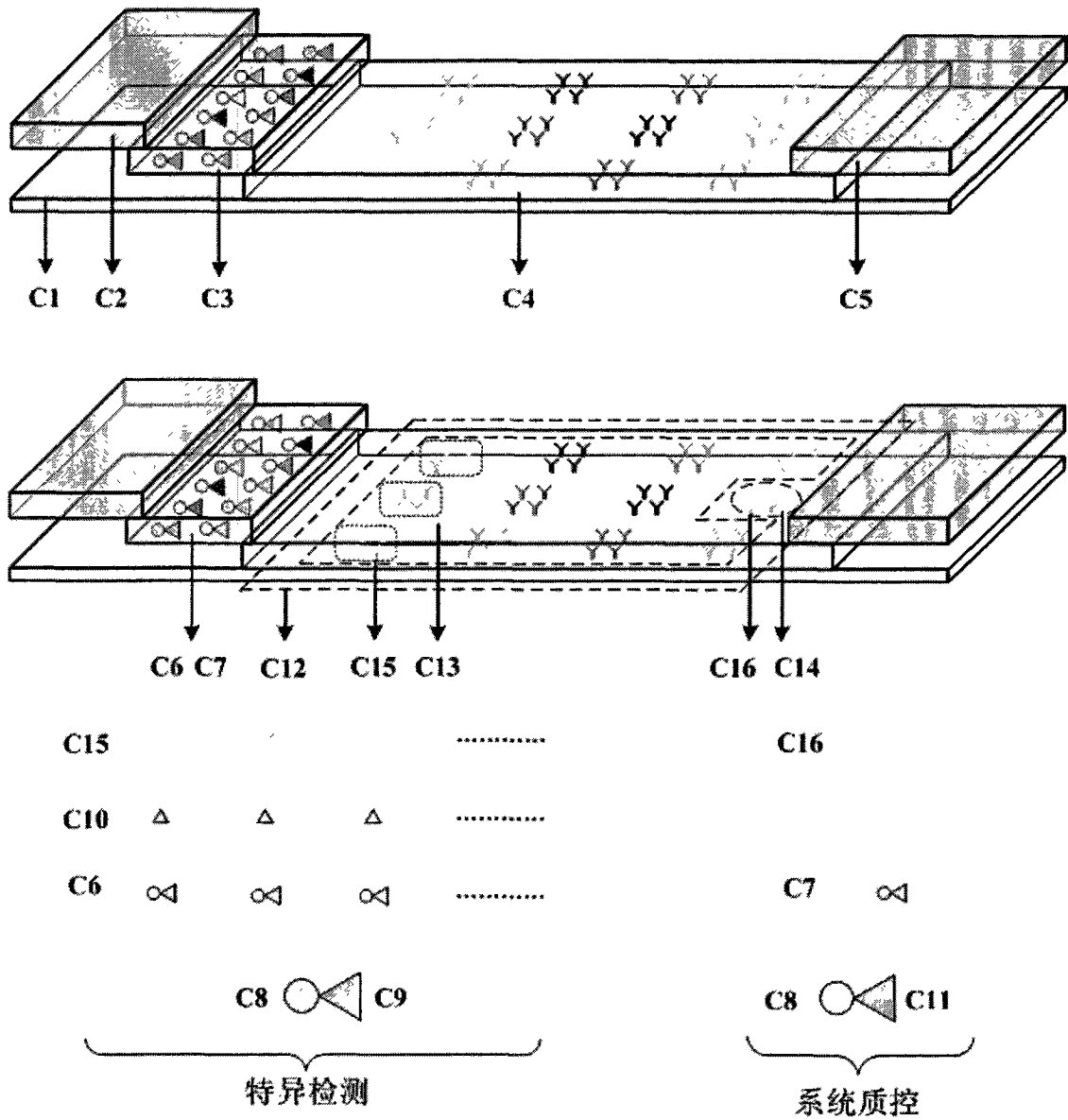


图 10

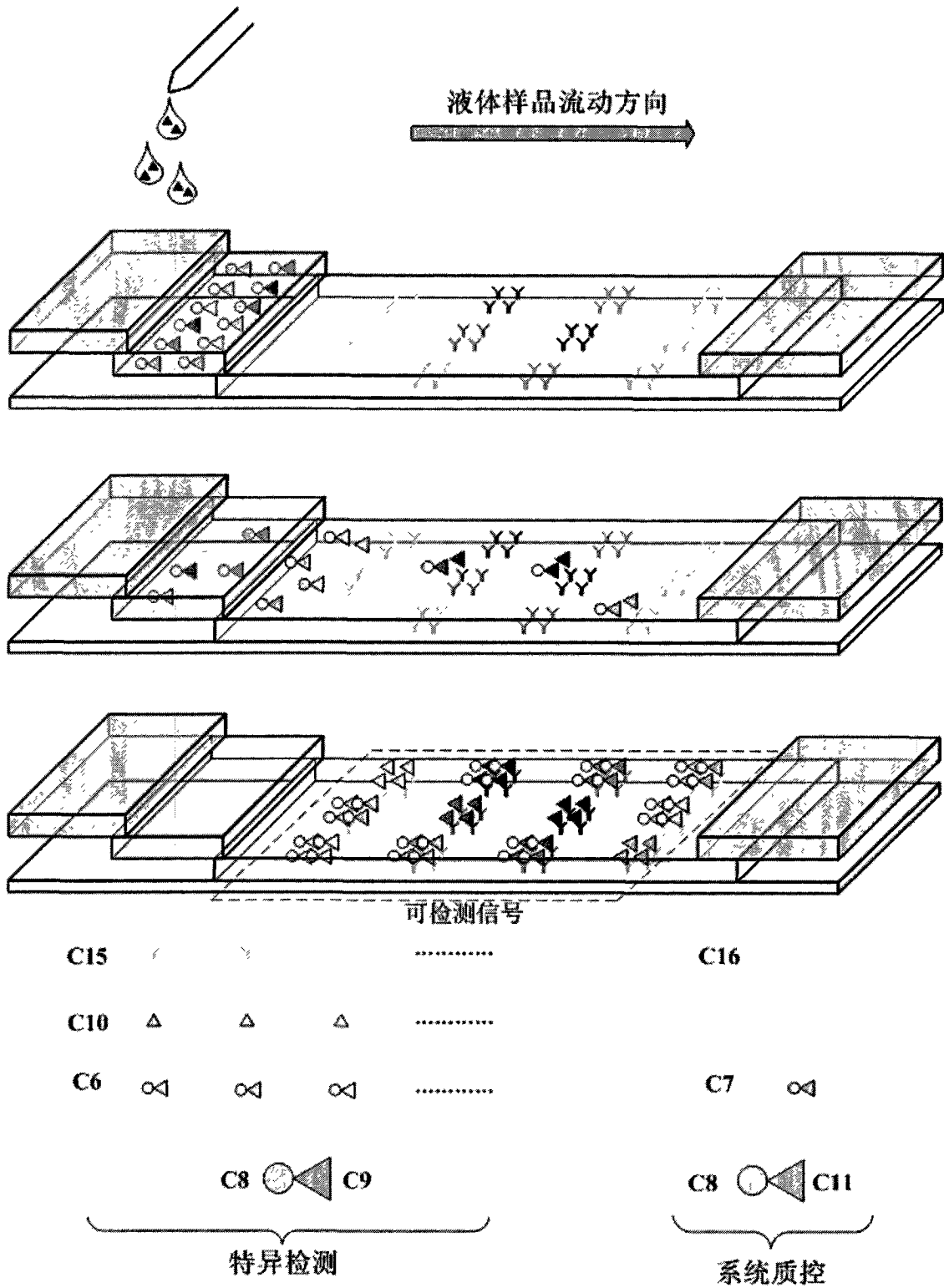


图 11

专利名称(译)	一种多重检测免疫层析芯片		
公开(公告)号	CN102375055A	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	CN201010257719.5	申请日	2010-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	周蕾 郭兆彪 杨瑞馥		
发明人	周蕾 郭兆彪 杨瑞馥		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N33/558 Y10T156/1052		
代理人(译)	张韬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多重检测免疫层析芯片，其可克服在先技术中，免疫层析技术无法高通量检测以及芯片技术操作复杂无法现场使用的缺点，通过将免疫层析反应模式与芯片检测矩阵设置有机融合，最终实现了以现场简便操作为前提的高通量检测，即一次加样实现多种目标被检物的同步检测。

