



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106645681 B

(45)授权公告日 2018.12.18

(21)申请号 201610932785.5

(22)申请日 2016.10.31

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106645681 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(73)专利权人 广州科方生物技术股份有限公司  
地址 510000 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城开源大道11号C4栋六层

(72)发明人 孙子洪 何明深

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标  
事务所(普通合伙) 44288

代理人 罗晶

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 105334318 A,2016.02.17,说明书第  
[0011]-[0038]、[0045]-[0046]段.

CN 104977404 A,2015.10.14,说明书第  
[0004]-[0011]段.

CN 101432626 A,2009.05.13,全文.

US 4680274 A,1987.07.14,全文.

CN 105486859 A,2016.04.13,全文.

CN 1382257 A,2002.11.27,全文.

US 4791067 A,1988.12.13,全文.

WO 91/06856 A1,1991.05.16,全文.

审查员 许珊萍

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,所述阻断剂包括生物阻断剂和化学阻断剂,所述生物阻断剂和化学阻断剂分开设置于所述盒体中。本发明还公开了该阻断剂试剂盒的使用方法。本发明的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,充分发挥了生物阻断剂和化学阻断剂在不同浓度的内源干扰因素下的阻断作用,能有效预防、控制样本中内源干扰因素对免疫层析检测的影响,提高免疫层析定量检测结果的准确性,具有更好的适用性。

1. 一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,其特征在于,所述阻断剂包括生物阻断剂和化学阻断剂,所述生物阻断剂和化学阻断剂分开设置于所述盒体中;所述生物阻断剂包括如下组分:第一缓冲溶液5-200 mmol/L,NaCl 150-1500mmol/L,第一防腐剂0.05-0.1wt%,动物免疫蛋白100-500 mg/mL,小牛血清5-20vol%;所述化学阻断剂包括如下组分:第二缓冲溶液5-200 mmol/L,NaCl 150-1500mmol/L,第二防腐剂0.05-0.1wt%,PEG 0.05-10.0wt%,巯基试剂0.01-0.5 mol/L和蛋白变性剂0.05-1.0wt%,所述PEG的分子量为2000-25000;使用试剂盒时,化学阻断剂按照0.2-0.5vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中,生物阻断剂按照0.2-0.5vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中。

2. 如权利要求1所述的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,其特征在于,所述动物免疫蛋白为小鼠IgG、小鼠IgM、兔IgG、山羊IgG、牛IgG、马IgG中的至少一种;所述第一防腐剂为叠氮化钠或Proclin 300;所述第一缓冲溶液为三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液,磷酸盐缓冲溶液和3-(N-吗啉基)丙磺酸盐缓冲溶液中的一种。

3. 如权利要求1所述的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,其特征在于,所述PEG为PEG8000、PEG6000、PEG4000、PEG2000中的至少一种;所述巯基试剂为 $\beta$ -巯基乙醇或二硫苏糖醇;所述蛋白变性剂为十二烷基硫酸钠、尿素、盐酸胍中的至少一种。

4. 如权利要求1所述的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,其特征在于,所述第二防腐剂为叠氮化钠或Proclin 300;所述第二缓冲溶液为三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液,磷酸盐缓冲溶液和3-(N-吗啉基)丙磺酸盐缓冲溶液中的一种。

5. 一种如权利要求1-4任一项所述的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒的使用方法,其特征在于,选自下述方法中的一种;

方法一:将化学阻断剂加入到样本稀释液中,生物阻断剂加入到样本垫处理液中;

方法二:将化学阻断剂与生物阻断剂同时加入到样本稀释液中;

方法三:将化学阻断剂与生物阻断剂同时加入到样本垫处理液中;

方法四:将化学阻断剂加入到样本垫处理液中,生物阻断剂加入到样本稀释液中。

6. 如权利要求5所述的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒的使用方法,其特征在于,化学阻断剂按照0.25vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中,生物阻断剂按照0.5vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中。

7. 如权利要求6所述的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒的使用方法,其特征在于,生物阻断剂按照0.5vol%的比例加入到样本垫处理液中,化学阻断剂按照0.25vol%的比例加入到样本稀释液中。

## 一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种用于免疫层析定量检测的阻断剂试剂盒及其使用方法。

### 背景技术

[0002] 随着社会的进步,医学的发展,医院功能任务发生了重大的改变,由过去单纯的治疗型,转向集预防、保健、治疗和康复等多项功能于一体的综合型,为社会提供全方位的优质服务。医院工作也从单一的院内医疗扩展到院外社区,甚至是边远山区等更广范围。为了更好地实现医院的职能,由此需要准确,灵敏,便捷的即时检验测试(Point of care test, POCT)。

[0003] 免疫层析法(Immunochromatography)是八十年代初发展起来的一种新型的免疫诊断技术。其检测原理是借助毛细作用,样本在分析膜上沿特定方向流动,通过免疫标记技术,实现对样本中待测物的标记,并结合在特定检测线上,实现对标本的快速检测。免疫层析技术融合了传统的免疫分析技术、层析技术、单克隆抗体技术和免疫标记技术的优点,不仅具有良好的灵敏度和特异性,而且无需复杂的分离洗涤步骤和昂贵的检测仪器,操作简单,廉价易得。因此,近年来,免疫层析技术在即时检验方面得到了飞速的发展,并呈现出良好的发展前景。

[0004] 与传统的免疫分析技术一样,免疫层析检测也易于受到可能存在与测试样本的各种因素的干扰。而随着单克隆抗体技术的发展和免疫学检测技术的发展,免疫层析检测方法更加灵敏,因此溶血、黄疸和脂血的干扰显得微乎其微。相对而言,包括嗜异性抗体(HA)、人抗动物抗体(HAAA)、类风湿因子(RF)以及自身抗体等因素的内源干扰在免疫检验中带来的影响越发引人重视。据研究证实,在健康人群中,约有3%-15%的人体含有内源干扰因素。在饲养宠物的人群和接受过抗体治疗的人群中,其比例更加高。总而言之,内源干扰是造成医学免疫检验结果不确定性的一个重要因素之一。研究和降低、消除内源干扰的有效手段,是保证医学免疫检验结果可靠性、保障医患的利益的重要课题。

[0005] 针对消除免疫诊断中的内源干扰,目前市面上已有的商品化阻断剂主要有IIR、HBR、MAB33等。利用它们对样本进行预处理,通过阻断剂与干扰物的结合以达到减少或消除干扰。然而,研究发现,有些情况下,商品化免疫试剂中添加的这些阻断剂的阻断效果并不充分,无法完全预防内源因素对检测结果的干扰。这主要是因为检测样本中干扰因素的种类和浓度各不相同,而且这些干扰因素对不同的检测项目、不同的检测试剂的影响也不尽相同。

### 发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种用于免疫层析的阻断剂试剂盒,该阻断剂试剂盒充分发挥了生物阻断剂和化学阻断剂在不同浓度的内源干扰因素下的阻断作用,能有效预防、控制样本中内源干扰因素对免疫层析检测的影响,提高免疫层析

定量检测结果的准确性,具有更好的适用性。

[0007] 本发明的另一目的在于提供该阻断剂试剂盒的使用方法。

[0008] 本发明的目的采用以下技术方案实现:

[0009] 一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,所述阻断剂包括生物阻断剂和化学阻断剂,所述生物阻断剂和化学阻断剂分开设置于所述盒体中。

[0010] 优选的,所述生物阻断剂包括如下组分:第一缓冲溶液5-200mmol/L,NaCl 150-1500mmol/L,第一防腐剂0.05-0.1wt%,动物免疫蛋白100-500mg/mL,小牛血清5-20vol%。

[0011] 优选的,所述化学阻断剂包括如下组分:第二缓冲溶液5-200mmol/L,NaCl 150-1500mmol/L,第二防腐剂0.05-0.1wt%,PEG0.05-10.0wt%,巯基试剂0.01-0.5mol/L和蛋白变性剂0.05-1.0wt%,所述PEG的分子量为2000-25000。

[0012] 优选的,所述动物免疫蛋白为小鼠IgG、小鼠IgM、兔IgG、山羊IgG、牛IgG、马IgG中的至少一种。

[0013] 优选的,所述水溶性PEG为PEG8000、PEG6000、PEG4000、PEG2000、PEG1500中的至少一种。

[0014] 优选的,所述巯基试剂为 $\beta$ -巯基乙醇或二巯苏糖醇。

[0015] 优选的,所述蛋白变性剂为十二烷基硫酸钠、尿素、盐酸胍中的至少一种。

[0016] 优选的,所述第一防腐剂和第二防腐剂均为叠氮化钠和Proclin300中的一种。

[0017] 优选的,所述第一缓冲溶液和第二缓冲溶液为三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl),磷酸盐缓冲溶液(PBS)和3-(N-吗啉基)丙磺酸盐缓冲溶液(MOPS)中的一种,所述第一缓冲溶液和第二缓冲溶液的pH值均为7.4-7.6。

[0018] 本发明还公开了用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒的使用方法。使用试剂盒前,先配置好样本稀释液和样本垫处理液,然后按照下述任一方法使用该试剂盒:

[0019] 1)将化学阻断剂加入到样本稀释液中,而生物阻断剂加入到样本垫处理液中;

[0020] 2)将化学阻断剂与生物阻断剂同时加入到样本稀释液中;

[0021] 3)将化学阻断剂与生物阻断剂同时加入到样本垫处理液中;

[0022] 4)将化学阻断剂加入到样本垫处理液中,生物阻断剂加入到样本稀释液中。

[0023] 本方案中,化学阻断剂按照0.2-0.5vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中,生物阻断剂按照0.2-0.5vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中。

[0024] 优选的,化学阻断剂按照0.25vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中,生物阻断剂按照0.5vol%的比例加入到样本稀释液或样本垫处理液中。

[0025] 更优选的,生物阻断剂按照0.5vol%的比例加入到样本垫处理液中,化学阻断剂按照0.25vol%的比例加入到样本稀释液中。

[0026] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0027] 1.本发明的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,包括生物阻断剂和化学阻断剂两个部分,两部分分开有利于高浓度阻断试剂的长期稳定。使用时,通过把生物阻断剂和化学阻断剂按照特定的比例加入样本稀释液或样本垫处理液中使用,能有效预防、控制样本中内源干扰因素对免疫层析检测的影响,提高免疫层析定量检测结果的准确性。

[0028] 2.本发明的复合阻断剂中,化学阻断剂主要针对过高浓度的内源干扰因素,一方

面通过沉聚作用将过高浓度的内源干扰因素控制到一定范围,也就是生物阻断剂能充分阻断干扰的范围内,避免出现由于个别标本中内源干扰因素过高而导致阻断失效的情况。另一方面,内源干扰因素多为多重特异性抗体,相对于分析用单克隆抗体,其结合能力较弱。基于两者亲和力强弱的差异,通过在化学阻断剂中加入适量的蛋白变性剂,可以在保证试剂检测能力的前提下,减小内源干扰因素对免疫层析检测的影响。

[0029] 3. 本发明的复合阻断剂中,生物阻断剂包含了针对嗜异性抗体、抗动物抗体、类风湿因子等干扰的多种动物免疫蛋白物质,对常规含量的内源干扰因素具有良好的阻断效果,能有效减少由于内源干扰造成免疫层析检测的假性结果。

[0030] 4. 本发明复合阻断剂广泛适用于多种免疫层析检测试剂,包括肌红蛋白、肌酸激酶同工酶MB、心肌肌钙蛋白I、糖化血红蛋白、降钙素原、心型脂肪酸结合蛋白等项目的免疫层析检测试剂。

### 具体实施方式

[0031] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0032] 以下实施方式中,所述小牛血清购自gibco有限公司。

[0033] 实施例1-4

[0034] 一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,所述阻断剂包括生物阻断剂和化学阻断剂,所述生物阻断剂和化学阻断剂分开设置于所述盒体中。其中生物阻断剂和化学阻断剂中各成分的含量如表1所示。

[0035] 表1实施例1-4中复合阻断剂各组分的浓度表

[0036]

组分		实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
生物阻断剂	鼠 IgG (mg/mL)	100	150	300	150
	鼠 IgM (mg/mL)	4	5	6	5
	兔 IgG (mg/mL)	4	4	4	4
	羊 IgG (mg/mL)	4	4	4	4
	牛 IgG (mg/mL)	4	4	2	4
	小牛血清 (vol.%)	5.0	10.0	15.0	10.0
	PBS(mmol/L)	20	20	20	20

[0037]

	NaCl(mmol/L)	300	300	300	300
	Proclin 300(wt%)	0.05	0.05	0.05	0.05
化学阻断剂	PEG 6000 (wt%)	5.0	5.0	3.0	0
	$\beta$ -巯基乙醇 (mol/L)	0.2	0.1	0.05	0
	尿素 (wt%)	0.05	0.05	0.05	0
	PBS(mmol/L)	20	20	20	20
	NaCl(mmol/L)	300	300	300	300
	Proclin 300(wt%)	0.05	0.05	0.05	0.05

[0038] 实施例5-7

[0039] 一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒,包括盒体和设置于盒体内的阻断剂,所述阻断剂包括生物阻断剂和化学阻断剂,所述生物阻断剂和化学阻断剂分开设置于所述盒体中。其中生物阻断剂和化学阻断剂中各成分的含量如表2所示。

[0040] 表2实施例5-7中复合阻断剂各组分的浓度表

[0041]

组分		实施例 5	实施例 6	实施例 7
生物阻断剂	鼠 IgG (mg/mL)	150	150	150
	鼠 IgM (mg/mL)	5	5	5
	兔 IgG (mg/mL)	4	4	4

[0042]

	羊 IgG (mg/mL)	4	4	4
	牛 IgG mg/mL)	4	4	4
	小牛血清 (vol.%)	10.0	10.0	10.0
	PBS(mmol/L)	20	20	20
	NaCl(mmol/L)	300	300	300
	Proclin 300(wt%)	0.05	0.05	0.05
化学阻断剂	PEG 6000 (wt%)	3.0	3.0	2.0
	二硫苏糖醇(mol/L)	0.02	0.02	0.01
	尿素 (wt%)	0.05	0.05	0.05
	PBS(mmol/L)	20	20	20
	NaCl(mmol/L)	300	300	300
	Proclin 300(wt%)	0.05	0.05	0.05

[0043] 实验例1:用于心肌肌钙蛋白I(cTnI)的荧光免疫层析定量测定

[0044] 选取8例已证实存在明显内源干扰的人血清标本(实验样本,标本号1-8)以及2例已证实无明显内源干扰的人血清样本(对照样本,标本号9-10)作为研究对象,按照“快速检测禽流感病毒及血清抗体的胶体金免疫层析法的建立”(冯娟,扬州大学,2006)中记载的方法制备样本垫处理液和样本稀释液,然后取实施例1-4配制的复合阻断剂,将生物阻断剂以0.5vol%的比例加入到样本垫处理液中,化学阻断剂以0.5vol%的比例加入到样本稀释液中,再按照YY/T1221-2013(心肌肌钙蛋白I诊断试剂)中规定的方法,对样本稀释液进行免疫层析测定,结果如表3所示:

[0045] 表3实施例1-4的复合阻断剂用于cTnI荧光免疫层析的检测结果

[0046]

标本号	cTnI 荧光免疫层析检测结果 (ng/mL)				
	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对照组
1	1.21	1.26	0.98	0.99	0.25
2	3.12	3.45	3.31	1.35	<0.03
3	0.88	0.75	0.73	0.69	0.11
4	0.63	0.65	0.58	0.64	0.22
5	0.21	0.12	< 0.03	0.24	0.89
6	0.51	0.52	0.43	0.55	5.24
7	0.21	< 0.03	< 0.03	3.77	20.03
8	0.33	0.26	0.28	0.30	3.17
9	0.13	0.11	< 0.03	0.13	0.15
10	0.71	0.74	0.68	0.79	0.77

[0047] 从表3可见,本发明复合阻断剂能有效减少或排除内源干扰对cTnI荧光免疫层析检测的不良影响,预防假阳性和假阴性检测结果的出现,保证了检测结果的准确性。通过对比上述方案的测试结果发现,虽然在一定范围内,提高阻断蛋白(即本发明中的动物免疫蛋白)的加入量有利于增强检测体系的抗内源干扰能力,但加入过多的阻断蛋白,即本发明的复合阻断剂中,生物阻断剂在cTnI检测体系中加入量过大,会影响检测过程中测试抗体与抗原的结合,尤其是对于低值标本的检测。由此可见,本发明中生物阻断剂和化学阻断剂的过量或不足都将影响复合阻断剂在免疫层析检测中的使用效果。

[0048] 此外,通过比对分析实施例2与实施例4中cTnI荧光免疫层析检测结果,可见化学阻断剂的加入能有效预防由于测试标本内含有过高的内源干扰因素而导致阻断失效的情况,有效消除检测的假性结果。

[0049] 实验例2:用于肌红蛋白(MYO)的荧光免疫层析定量测定

[0050] 选取8例已证实存在明显内源干扰的人血清标本(实验样本,标本号1-8)以及2例已证实无明显内源干扰的人血清样本(对照样本,标本号9-10)作为研究对象,按照“快速检测禽流感病毒及血清抗体的胶体金免疫层析法的建立”(冯娟,扬州大学硕士学位论文,2006)中记载的方法制备样本垫处理液和样本稀释液;然后取实施例5-7的复合阻断剂,将实施例5的生物阻断剂和化学阻断剂按照0.25vol%的比例加入到样本稀释液中,将实施例6

的生物阻断剂按照0.5vol%的比例加入到样品垫处理液中,化学阻断剂按照0.25vol%的比例加入到样本稀释液中,实施例7的生物阻断剂和化学阻断剂按照0.5vol%的比例加入到样品垫处理液中;再按照“全血肌红蛋白快速免疫层析分析”(刘宏伟,张彬,《标记免疫分析与临床》,2001)中规定的方法,对样本稀释液进行免疫层析测定,结果如表4所示:

[0051] 表4实施例5-7的复合阻断剂用于MYO荧光免疫层析的检测结果

[0052]

MYO 荧光免疫层析的检测结果 (ng/mL)

[0053]

标本号	实施例 5	实施例 6	实施例 7	对照组
1	0.36	0.24	0.54	23.34
2	0.60	0.55	0.97	6.46
3	0.06	< 0.03	0.27	3.21
4	0.24	0.21	0.26	1.57
5	5.11	5.64	0.78	< 0.03
6	2.98	3.14	2.56	0.17
7	0.39	0.48	0.31	0.12
8	1.31	1.52	0.87	0.37
9	0.12	0.11	0.06	0.17
10	3.01	3.10	2.78	3.23

[0054] 根据表4的结果,本发明的复合阻断剂按照上述实施例5-7添加到MYO荧光免疫层析检测试剂中,均能有效减少或消除内源干扰对检测的影响。其中,分别把生物阻断剂和化学阻断剂添加到样品垫处理液和样本稀释液能达到最佳效果。由此可见,本发明的复合阻断剂能良好地配合不同免疫层析试剂的特点与需求,在各种免疫层析检测试剂中具有良好的适用性,这对荧光免疫层析试剂在POCT行业中的推广具有非常重要的帮助。

[0055] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

专利名称(译)	一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106645681B</a>	公开(公告)日	2018-12-18
申请号	CN201610932785.5	申请日	2016-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术股份有限公司		
[标]发明人	孙子洪 何明深		
发明人	孙子洪 何明深		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	罗晶		
其他公开文献	CN106645681A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒，包括盒体和设置于盒体内的阻断剂，所述阻断剂包括生物阻断剂和化学阻断剂，所述生物阻断剂和化学阻断剂分开设置于所述盒体中。本发明还公开了该阻断剂试剂盒的使用方法。本发明的用于免疫层析测定的阻断剂试剂盒，充分发挥了生物阻断剂和化学阻断剂在不同浓度的内源干扰因素下的阻断作用，能有效预防、控制样本中内源干扰因素对免疫层析检测的影响，提高免疫层析定量检测结果的准确性，具有更好的适用性。

组分		实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
生物阻断剂	鼠 IgG (mg/mL)	100	150	300	150
	鼠 IgM (mg/mL)	4	5	6	5
	兔 IgG (mg/mL)	4	4	4	4
	羊 IgG (mg/mL)	4	4	4	4
	牛 IgG (mg/mL)	4	4	2	4
	小牛血清 (vol.%)	5.0	10.0	15.0	10.0
	PBS(mmol/L)	20	20	20	20