



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101769919 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 200910104908.6

(22) 申请日 2009.01.06

(71) 申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区南海大道  
3688 号

(72) 发明人 买制刚 林枫 李凌云 陈少娟  
卢海蓉 易俊波 雷明军 王晓红  
黄德新 姜丽华

(74) 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理  
有限公司 44217

代理人 张秋红

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

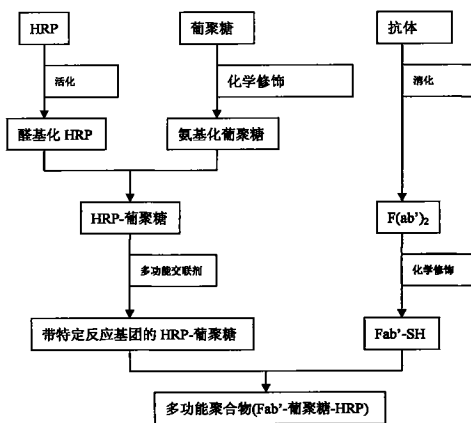
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

免疫层析检测装置及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫层析检测装置及其检测方法,装置包括膜基体,膜基体上依次设置有样品垫、承载由反应性物质和指示性物质组成的标记物的标记物垫、或被或化学交联有反应性物质的检测带、吸水垫,标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物,检测带为或被或化学交联在膜基体上的反应性物质或是有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。检测方法:样品在膜上泳动,待测物先通过标记物垫与其上的标记物反应,然后在毛细作用下泳动到检测带与反应性物质反应,显色或通过指示物质被检出;本发明提供一种高灵敏度、高特异性的免疫层析装置及一种高灵敏、快速可靠的免疫层析检测方法。



1. 一种免疫层析检测装置,包括膜基体,在膜基体上依次设置有样品垫、承载由反应性物质和指示性物质组成的标记物的标记物垫、包被或化学交联有反应性物质的检测带、吸水垫,其特征在于,所述标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物,所述检测带为包被或化学交联在膜基体上的反应性物质或是有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析检测装置,其特征在于,所述聚合物骨架为带有 $-CHO$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ 中至少一个官能团的聚合物。

3. 根据权利要求1所述的免疫层析检测装置,其特征在于,所述聚合物骨架为葡聚糖、多聚赖氨酸、聚乙烯或聚苯乙烯。

4. 免疫层析检测方法,其特征在于,样品在纤维或凝胶制成的膜上泳动,样品中的待测物首先通过标记物垫与其上的标记物反应,然后在毛细作用下泳动到检测带与反应性物质反应,显色或通过指示物质被检出;所述标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物,所述检测带为包被或化学交联在膜基体上反应性物质或是有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。

5. 根据权利要求4所述的免疫层析检测方法,其特征在于,所述聚合物骨架为带有 $-CHO$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ 中至少一个官能团的聚合物。

6. 根据权利要求4所述的免疫层析检测方法,其特征在于,所述聚合物骨架为葡聚糖、多聚赖氨酸、聚乙烯或聚苯乙烯。

7. 根据权利要求5或6所述的免疫层析检测方法,其特征在于,反应性物质、指示性物质通过化学修饰或生物交联的方法偶联到聚合物骨架上。

8. 根据权利要求7所述的免疫层析检测方法,其特征在于,所述反应性聚合物为聚合物骨架上偶联至少一个反应性物质。

9. 根据权利要求7所述的免疫层析检测方法,其特征在于,所述多功能聚合物为聚合物骨架上偶联至少一个反应性物质和至少一个指示性物质。

## 免疫层析检测装置及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检测技术领域,涉及一种免疫层析检测装置及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 免疫层析 (Immunochromatography, IC) 是上世纪八十年代初发展起来的一种快速免疫分析技术。原理是借助毛细作用,样品在条状纤维膜上泳动,使其中的待测物质与膜上预置的相应配体结合,通过显色反应 (或荧光或直接使用着色标记物) 在短时间 (20min) 内得到直观的结果。免疫层析因使用标记物不同而名称各异,如酶免疫层析、乳胶微粒免疫层析、胶体金免疫层析、胶体硒免疫层析、胶体铁免疫层析等等。在当前应用最广且技术最为成熟的免疫层析技术是胶体金免疫层析。仅在国内市场上,就能轻易找到上百种的胶体金免疫层析试纸条,它们在早孕检测、传染疾病检测、毒品检测、食品卫生检测 (如兽药残留等) 以及基因检测等方面发挥着重要的作用。然而,胶体金免疫层析检测技术的最大局限性在于灵敏度和准确性都难以达到 ELISA 检测的水平,另外,胶体金容易产生凝聚,且形成的标记物不稳定,对于小分子标记差,标记特异性难把握,这一技术瓶颈极大地限制了免疫层析技术的进一步的发展和应用。

[0003] 在免疫层析检测中,待测物与其反应性物质 (抗体、核酸或受体等具有特异结合能力的物质) 的反应不是平衡反应,样本中的待测物都要通过由反应性物质组成的检测带区域而得到富集,使得膜层析反应的效率较高。但常用的胶体金指示物的灵敏度偏低,造成了目前免疫层析技术灵敏度偏低,这也是胶体金免疫层析技术迟迟不替代 ELISA 的最重要原因之一。因此,人们提高膜层析技术灵敏度的努力从来没有停止过,而标记物的推陈出新则是提高膜层析灵敏度的最重要途径,曾经使用的标记物有胶体金、胶体硒、胶体铁、乳胶颗粒以及近年来还使用了脂质体,其目的都是希望把层析检测的灵敏度提高到一个新的水平。最近,有研究者用顺磁粒子标记、量子点标记等技术,或是把免疫反应信号转化为电子信号模式来提高灵敏度也都取得了不错的效果。但是这些新技术对于设备和技术的要求颇高,距离实际应用还有很长的路要走。

### 发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题在于,针对现有技术中免疫检测设备灵敏度偏低、准确性不好、设备及其技术要求较高的问题,提供一种高灵敏度、高特异性的免疫层析装置。

[0005] 本发明进一步要解决的技术问题在于,针对现有技术中灵敏度偏低、准确性不好、设备及其技术要求较高的问题,提供一种高灵敏、快速可靠的免疫层析检测方法。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:一种免疫层析检测装置,包括膜基体,在膜基体上依次设置有样品垫、承载由反应性物质和指示性物质组成的标记物的标记物垫、包被或化学交联有反应性物质的检测带、吸水垫,所述标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物,所述检测带为包被或化学交联在膜基体上的反应性物质或是有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。

[0007] 所述聚合物骨架为带有 -CHO、-NH<sub>2</sub>、-OH、-COOH 中至少一个官能团的聚合物。

[0008] 所述聚合物骨架为葡聚糖、多聚赖氨酸、聚乙烯或聚苯乙烯。

[0009] 免疫层析检测方法为：样品在纤维或凝胶制成的膜上泳动，样品中的待测物首先通过标记物垫与其上的标记物反应，然后在毛细作用下泳动到检测带与反应性物质反应，显色或通过指示物质被检出；所述标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物，所述检测带为包被或化学交联在膜基体上反应性物质或是有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。

[0010] 免疫层析检测方法中，所述聚合物骨架为带有 -CHO、-NH<sub>2</sub>、-OH、-COOH 中至少一个官能团的聚合物。

[0011] 免疫层析检测方法中，所述聚合物骨架还可以为葡聚糖、多聚赖氨酸、聚乙烯或聚苯乙烯。

[0012] 免疫层析检测方法中，反应性物质、指示性物质通过化学修饰或生物交联的方法偶联到聚合物骨架上。

[0013] 免疫层析检测方法中，所述反应性聚合物为聚合物骨架上偶联至少一个反应性物质。

[0014] 免疫层析检测方法中，所述多功能聚合物为聚合物骨架上偶联至少一个反应性物质和至少一个指示性物质。

[0015] 本发明以聚合物为骨架，通过化学修饰或生物交联，把相同功能或不同功能物质偶联到聚合物骨架的特定部位上，赋予其多重生物活性。这些连接到聚合物骨架上的物质按照功能可分成两种：一是反应性物质，二是指示性物质。反应性物质是指执行特异反应功能的物质如抗原、抗体、酶、配体、受体、核酸等。指示性物质是指肉眼可见或能被仪器检测到的信号物质如色素、荧光物质、酶量子点等。在膜层析检测中，把仅带有反应性物质的聚合物称为反应性聚合物，包被或通过化学交联到纤维素膜检测带位置；二是把既携带了反应性物质又有指示性物质的多功能聚合物作为标记物，加入到膜层析装置的标记物垫上。这样的多功能聚合物应用在膜层析检测时，样本中的待测物质经过标记物垫时就与相应的多功能聚合物反应生成复合物，到达预先包被有与这种待测物反应的检测带时，这个复合物就与检测带反应而被聚集，其聚集程度可通过酶促显色、荧光检测或颜色判断来反映结果。由于聚合物骨架对膜为惰性物质，同时采用降低非特异吸附的特殊处理过程，其余未反应的多功能聚合物不会吸附在膜上，继续泳动到吸水材料中。

[0016] 由于将反应性物质或指示性物质共价偶联到聚合物骨架上能改变反应性物质或指示性物质的表面性质和溶解性，对于溶解性不佳的物质参与各种水溶性液相反应具有极大的意义。而在检验分析方面，作为通用试剂起到放大免疫反应的作用。具体原理是：把抗原或抗体等反应性物质与色素、荧光物质、辣根过氧化物酶 (HRP) 等指示性物质通过化学修饰或生物交联的方式偶联到聚合物骨架上制备成复合物，这种复合物既有多重反应基团，又可以按不同需要添加大量的指示性物质，因此能增加了免疫层析反应的灵敏度和特异性，提高反应的准确性。同时又保留了膜层析技术的快速、便利、经济的优势，形成一种全新的集高灵敏度、高特异性、快速可靠于一体的免疫层析检测新技术。

[0017] 本发明以多功能聚合物替代胶体金作为标记物，取得了非常理想的结果，在不降低特异性的情况下，灵敏度得到大幅度提高。多功能聚合物不但能避免由于胶体金稳定性

差、难以标记小分子和标记特异性差的缺点,而且还能提高蛋白质(多肽)的稳定性,使得检测试剂的有效期更长,检测结果更为准确和可靠。很好地解决了现代检测技术中存在的快速检测与高灵敏度之间的矛盾,而且,通过多重标记,能同时进行多重项目的检测。符合现代实验检测技术的发展方向,具有突出的社会效益和经济效益。

### 附图说明

[0018] 下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明,附图中:

[0019] 图1是本发明实施例1多功能聚合物的制备工艺流程图。

[0020] 图2是本发明实施例2免疫检测装置的结构示意图。

### 具体实施方式

[0021] 实施例1,免疫层析检测方法为:样品在纤维制成的膜上泳动,样品中的待测物先与膜上的标记物反应,在毛细作用下泳动到检测带与反应性物质反应,显色;所述标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物,所述检测带包被或化学交联有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。

[0022] 一、多功能聚合物的制备:

[0023] 如图1所示是本发明实施例的多功能聚合物的制备工艺流程图,以抗体为反应性物质,以辣根过氧化物酶(HRP)为指示性物质举例说明。

[0024] 1、HRP-葡聚糖的制备:首先在中性条件下,使用过碘酸钠法将作为聚合物骨架的葡聚糖活化。称取10mg葡聚糖,溶于0.01mol/L pH7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)中,加入0.15mol/L的过碘酸钠溶液0.5ml,25°C反应60min。脱盐柱除去未反应的过碘酸钠后,再加入10mg的联氨(-NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-),25°C避光反应30min。对0.01mol/L的磷酸盐缓冲液充分透析,形成氨基化葡聚糖;同样采用过碘酸钠法活化HRP,称取10mg HRP溶于1.0ml新鲜配制的0.1mol/L的NaHCO<sub>3</sub>溶液中,加入0.15mol/L的过碘酸钠溶液0.5ml,25°C避光反应30min,脱盐柱除去未反应的过碘酸钠后,形成醛基化的HRP;将收集到的有颜色液体全部加入到上述氨基化的葡聚糖中,25°C避光反应120min,加入4.0mg/ml的硼氢化钠0.4ml,25°C避光反应60min,对0.01mol/L的磷酸盐缓冲液充分透析,就形成HRP-葡聚糖。

[0025] 由于葡聚糖分子量较大,活化的位点多,使之带上大量的氨基,并且由于葡聚糖分子为长链状,因此每个骨架分子能偶联上10个以上的辣根过氧化物酶(HRP),HRP-葡聚糖还可以偶联荧光物质或染料分子,可偶联100个以上的荧光物质或染料分子。偶联完成后使用乙醇胺对活性基团进行封闭。

[0026] 2、抗体使用蛋白酶消化及还原:取10mg抗体,用70mmol/L的醋酸盐缓冲液调整pH4.2左右,加入1.0mg的胃蛋白酶,37°C水浴反应16小时,用1.0mol/L的Tris缓冲液调整pH8.0左右,上预先使用0.01mol/L磷酸盐缓冲液平衡的Superdex 75分子筛柱,收集第一洗脱峰,浓缩到5mg/ml,即得到抗体片段F(ab')<sub>2</sub>;然后按照每毫升上述F(ab')<sub>2</sub>加入0.1mol/L的二巯基苏糖醇(DTT)0.01ml的比例混合F(ab')<sub>2</sub>和DTT,37°C水浴反应90min,脱盐柱脱盐后就形成含有巯基的抗体片段(Fab'-SH)。此过程还可使用交联剂法活化抗体片段,形成F(ab')<sub>2</sub>-SH。

[0027] 3、HRP-葡聚糖使用交联剂活化:把步骤1中制备的HRP-葡聚糖浓缩成约为5mg/

ml 的浓度,每毫升加入配制好的浓度为 10mg/ml 的异双功能交联剂 GMBS (N- $\gamma$ -Maleimidobutyryloxy-oxysuccinimide ester) 0.1ml, 25℃避光反应 120min, 脱盐柱脱盐后, 收集第一峰即为带有马来酰亚胺活性基团的 HRP- 葡聚糖。

[0028] 4、把步骤 2 的产物 Fab' -SH 和步骤 3 的产物带有马来酰亚胺活性基团的 HRP- 葡聚糖按照质量比 1 : 1 混合, 25℃避光反应 120min, 加入甘氨酸 50mg 25℃避光反应 60min 以封闭活性基团。最终完成反应性物质与聚合物的连接, 得到的多功能聚合物。

[0029] 这样制备的多功能聚合物外围带有反应性物质, 内侧带有指示性物质, 有利于多功能聚合物参与各种生物学反应。对于含有 -NH<sub>2</sub> 的聚合物骨架可直接使用双功能或三功能交联剂与指示性物质和反应性物质偶联, 形成多功能聚合物。

[0030] 二、反应性聚合物的制备:

[0031] 以抗体为反应性物质, 多聚赖氨酸为聚合物骨架, 采用交联剂法制备反应性聚合物。

[0032] 1、抗体的还原: 把抗体置于 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 中, 调整浓度为 10mg/ml, 加入终浓度 10mmol/L 的 EDTA; 每毫升抗体加入 6mg 的  $\beta$ -巯基乙胺, 搅拌溶解, 37℃保温 90min。过 Sephadex G-25 或类似的脱盐柱, 测定在 280nm 的吸收峰来确定抗体的位置, 收集的抗体即是带有 -SH 的抗体片段。

[0033] 2、多聚赖氨酸的活化: 把多聚赖氨酸配制成 10mg/ml 的浓度, 在每毫升这样的多聚赖氨酸中加入配制好的浓度为 10mg/ml 的异双功能交联剂 GMBS (N- $\gamma$ -Maleimidobutyryloxy-oxysuccinimide ester) 0.1ml, 25℃避光反应 120min, 脱盐柱脱盐后, 收集第一峰即为带有马来酰亚胺活性基团的多聚赖氨酸。

[0034] 3、反应性聚合物的生成: 把步骤 1 产生的带有 -SH 的抗体片段与步骤 2 的产物活化的多聚赖氨酸按照质量比 4 : 1 的比例混合, 25℃避光反应 120min, 过 Superdex 200 分子筛除去未结合的抗体, 收集第一洗脱峰即为反应性聚合物。

[0035] 名词说明

[0036] 过碘酸钠法: 是一种化学修饰方法, 把 -OH 氧化为 -CHO, 再在碱性条件下与 -NH<sub>2</sub> 反应并还原生成酰胺键的连接方法, 是传统的糖类与蛋白质连接技术, 在此不再赘述。

[0037] 交联剂法: 是一种化学修饰方法, 将交联剂作为桥链把不同物质相连接并生成长度不一的伸展臂。为现有技术, 在此不再赘述。

[0038] 生物交联主要是指通过基因工程等手段在细菌或细胞内把两类物质连接在一起的方法。生物交联为现有技术, 在此不再赘述。

[0039] 化学修饰或生物交联方法还包括 EDC 法, EDC 法是利用碳二亚胺 (EDC) 或其衍生物活化羧酸, 使能与 -NH<sub>2</sub> 反应, 为现有技术, 在此不再赘述。

[0040] 包被: 把具有反应性的蛋白质或核酸点样于检测带位置, 干燥后, 使用白蛋白或是酪蛋白溶液封闭未结合位点, 这个过程称之为包被。包被的原理一般是物理吸附过程, 也可使用化学交联方法。

[0041] 本发明免疫膜层析方法可以从两个层面来提高灵敏度, 首先聚合物骨架上偶联多个参与反应的反应性物质, 增加了反应性物质的相对浓度, 而膜层析能提高反应性物质接触的机会, 使得反应灵敏度增加, 另外, 每个聚合物骨架能带有 10 个以上的指示性物质 (酶、荧光物质或是更多的染料分子), 提高了检测的灵敏度。膜层析中的膜可保证多功能

聚合物能在其中正常泳动,而聚合物骨架(如葡聚糖)一般是层析惰性物质,不会吸附到膜上,保证了反应的特异性。用反应性聚合物进行包被增加了包被量,进一步增加了灵敏度。聚合物骨架上可以偶联上多种反应性物质和指示性物质,膜上可以包被多重反应带,执行多种反应,并在膜上不同位置进行定位显示,故可同时检测多种待测物。

[0042] 实施例 2,免疫层析装置:下面以丙型肝炎并 HCV 感染检测试剂盒为例。

[0043] 如图 2 所示,丙型肝炎并 HCV 感染检测试剂盒包括膜基体,膜基体由下部的聚酯膜 10 和上部的层析膜 11 组成,从膜基体的层析膜 11 一端依次设置有样品垫 1、承载由反应性物质和指示性物质组成的标记物的标记物垫 2、包被或化学交联有反应性物质的检测带 3、吸水垫 4。

[0044] 标记物为使用 HCV 抗原片段或是 HCV 核心抗体作为反应性物质,以辣根过氧化物酶作为指示性物质,偶联在聚合物骨架—葡聚糖上形成的多功能聚合物,所述的检测带为多条,分别包被有不同片段的 HCV 抗原或 HCV 核心抗体。

[0045] 那么根据检测带显示的结果就可以得出样本中含有抗体所针对的片段类型或是否含有核心抗原。通过对多功能聚合物免疫层析法同步检测 HCV 抗原抗体试剂盒技术指标的检测,并与 ELISA 和胶体金试剂作比较,结果见下表 1:

[0046] 表 1:多功能聚合物免疫层析法同步检测 HCV 抗原抗体与 ELISA 和胶体金的比较

[0047]

		ELISA 检测法	胶体金检测法	本发明
灵敏度	抗原检测	10pg	100pg	10pg
	抗体检测	2.0ncu	2.0ncu	2.0ncu
特异性	抗原检测	100%	100%	100%
	抗体检测	100%	100%	100%
临床符合率(120 份)	抗原检测	110/120	95/120	119/120
	抗体检测	102/120	98/120	120/120
抗原抗体同步分别检测		否	否	能

[0048]

抗体分片断检测	否	能	能
检测时间	60~120min	15min	15min
操作	繁琐	简便	简便

[0049] 表 1 中,本发明同步检测 HCV 抗原抗体试剂盒的抗原检测灵敏度为 10pg,达到 ELISA 的水平,远高于胶体金的检测水平,抗体检测灵敏度由于要求不高,三种试剂盒都为 2.0ncu;特异性方面,本发明同步检测 HCV 抗原抗体试剂盒也都达到 100%;对于临床标本的检测,与进口试剂盒(抗体检测使用美国 Chiron 公司的 RIBA 试剂盒,抗原检测为美国 Ortho 公司的核心抗原检测试剂盒)比较,此法的符合率分别高达 99.2%和 100%;高于 ELISA 试剂盒(抗原检测为 91.7%,抗体检测为 85%)和胶体金试剂盒(抗原检测为

79.2%，抗体检测为 81.7%，)。同时，ELISA 试剂盒在一个测试中只能进行单一检测抗原或抗体，即使同时检测也不能分片断检测，而胶体金虽然能进行分片断检测，但不能同步检测。另外在检测时间和操作简便性方面，本发明同步检测 HCV 抗原抗体试剂盒也具有明显的技术优势。

[0050] 此外，本发明还能进行不同病毒感染的联合快速检测，如乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、爱滋病毒 (HIV)、梅毒等输血检测项目的联合快速检测，只需要分别把 HBV 表面抗体、HCV 核心抗原、HIV 抗原、梅毒抗原分别偶联在不同的聚合物骨架上，并且在层析膜上不同区域内包被上与标记物抗体（原）配对的 HBV 表面抗体、HCV 核心抗原、HIV 抗原、梅毒抗原等形成不同的检测带，当样本中含有待检物质时就会在相应的检测带检测出来。

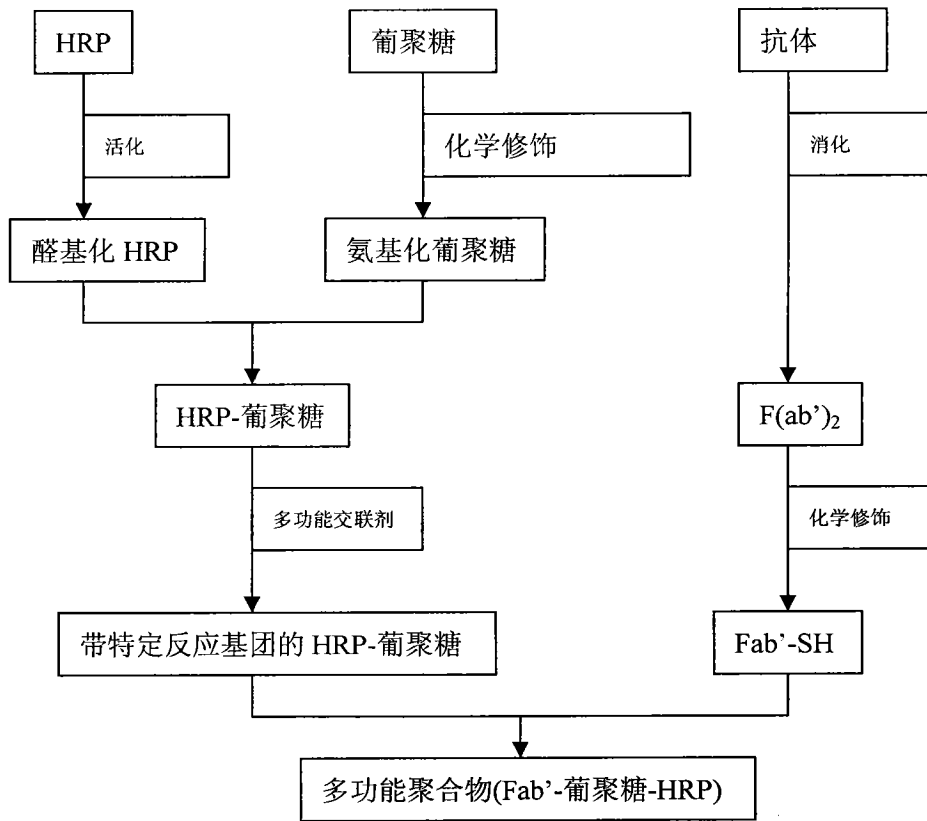


图 1

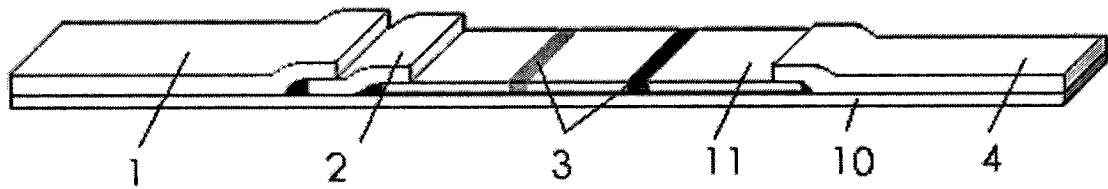


图 2

专利名称(译)	免疫层析检测装置及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101769919A</a>	公开(公告)日	2010-07-07
申请号	CN200910104908.6	申请日	2009-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	深圳大学		
申请(专利权)人(译)	深圳大学		
当前申请(专利权)人(译)	深圳大学		
[标]发明人	买制刚 林枫 李凌云 陈少娟 卢海蓉 易俊波 雷明军 王晓红 黄德新 姜丽华		
发明人	买制刚 林枫 李凌云 陈少娟 卢海蓉 易俊波 雷明军 王晓红 黄德新 姜丽华		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/53		
代理人(译)	张秋红		
其他公开文献	CN101769919B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种免疫层析检测装置及其检测方法，装置包括膜基体，膜基体上依次设置有样品垫、承载由反应性物质和指示性物质组成的标记物的标记物垫、包被或化学交联有反应性物质的检测带、吸水垫，标记物为反应性物质和指示性物质偶联在聚合物骨架上形成的多功能聚合物，检测带为包被或化学交联在膜基体上的反应性物质或是有反应性物质偶联在聚合物骨架上形成的反应性聚合物。检测方法：样品在膜上泳动，待测物先通过标记物垫与其上的标记物反应，然后在毛细作用下泳动到检测带与反应性物质反应，显色或通过指示物质被检出；本发明提供一种高灵敏度、高特异性的免疫层析装置及一种高灵敏、快速可靠的免疫层析检测方法。

