



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03147860.3

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1218183C

[22] 申请日 2003.6.27 [21] 申请号 03147860.3  
 [71] 专利权人 江西中德生物工程有限公司  
 地址 330029 江西省南昌市高新一路建昌工  
 业园区海外大厦南 210  
 [72] 发明人 陈高明 李 林  
 审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有  
 限责任公司  
 代理人 何文彬

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 2 页

[54] 发明名称 一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法

### [57] 摘要

本发明涉及一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法。该方法的步骤包括：单元试纸的制作；参比免疫试纸制作；检测流程。本发明的详细方法见说明书。本发明用 2 张 - 10 张单元试纸条并排制成参比免疫层析试纸。在免疫层析试纸的单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，加入标准抗原与加入样本的单元试纸条数为任意比例，根据检测线出现颜色的时间，或一定时间内检测线的颜色差异来判断结果。本发明的优点是定量准确，可选用一个或数个标准品，也可同时检测一个或数个样本。本发明方法用于生物样本中抗原浓度的定量检测。

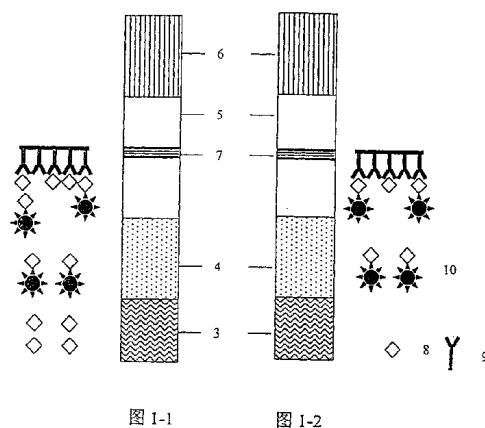


图 1-1

图 1-2

1. 一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法，包括按以下顺序进行的步骤：

(1) 单元试纸的制作,(2) 参比免疫层析试纸制作,(3) 检测流程，其特征在于：

(1) 单元试纸的制作中，层析膜上的检测线为 1-8 条；

(2) 参比免疫层析试纸制作方法是：把单元试纸条安装在底卡上，数张成排即成为参比免疫层析试纸，单元纸条的数量为 2-10 张；

(3) 检测流程是：在参比免疫层析试纸条的单元试纸条上分别加入标准抗原和样本。根据检测线出现的时间，或一定时间内检测线的颜色差异来判断结果。

2. 根据权利要求 1 所述的抗原浓度的检测方法，其特征在于层析膜上的检测线为 2-5 条。

3. 根据权利要求 1 所述的抗原浓度的检测方法，其特征在于检测流程为以下的一种：

(1) 参比免疫层析试纸条的单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，样本单元试纸条在相同位置出现检测线条带的时间比某标准单元试纸条出现的时间晚，则样本内抗原浓度大于某标准浓度；

(2) 参比免疫层析试纸条的单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，在相同时间内，样本单元试纸条在相同位置出现检测线条带的颜色比某标准单元试纸条出现的颜色浅，则样本内抗原浓度大于某标准浓度。

## 一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法

### 技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体地说是涉及一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法。

### 背景技术

用免疫学方法检测抗原浓度已有许多文献报道，其中最具有代表性的方法为放射免疫测定法、酶联免疫吸附试验（ELISA）和免疫层析法。

ELISA 定量检测抗原浓度的方法可分为夹心法和竞争法。双抗体夹心法的原理为通过包被特异抗体-抗原（检样）-酶标记特异抗体的模式检测抗原。竞争法是通过酶标记的抗原和抗原（检样）共同竞争包被抗体,或包被抗原和抗原（检样）共同竞争酶标记的抗体来检测抗原。放射免疫测定法和 ELISA 测定原理类似，只是标记物不同。由于放射免疫测定法需要用同位素标记，已有逐渐被 ELISA 取代的趋势。

免疫层析是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式，它通常以条状纤维层析材料为固相，通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动，并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异、高亲和性的免疫反应。层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域（检测线），通过酶反应、或直接利用可目测的标记物（如胶体金）所看到的直观的实验现象(如显色)而获得测定结果。而游离标记物（即未与待测物结合的标记物）则越过检测带，达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金、乳胶、胶体硒、明胶等，其中运用最成功的标记物为胶体金。

免疫层析一般用于抗原的定性检测，也可用于定量检测，主要通过以下途径来实现：

① 样本中的抗原和层析膜上的抗体/示踪粒子标记的抗体形成双抗体夹心的检测模式。例如市面上大量使用的早早孕胶体金试纸。

② 样本中的抗原/层析膜上的抗原共同竞争示踪粒子标记的限量抗体，通过检测条带出现与否判断结果。例如，我们先前公开的专利“一种免疫层析一步法检测 $\beta$ -肾上腺素激动剂类药物的方法及试纸的制备”（申请号，02131321.0）。

③ 样本中的抗原/示踪粒子标记的抗原共同竞争层析膜上的限量抗体，通过检测条带出现与否判断结果。例如，公开的实用新型专利“盐酸克伦特罗快速检测试纸条（II）”（申请号，02228104.5）。

④ 样本中的抗原/示踪粒子标记的抗原共同竞争层析膜上的限量抗体，通过检测条带出现的条数判断结果。例如，公开的专利“半定量快速检测盐酸克伦特罗的胶体金试纸条及生产和使用方法”（申请号，02139704.X）。

ELISA 定量检测抗原浓度一般用于批量检测，免疫层析法一般用于单个样本检测。为了方便检测单个样本，许多生产 ELISA 的公司推出了双孔 ELISA 法，一个孔加入样本，另一个孔加入标准品，根据显色深浅来判断结果。和经典 ELISA 一样，双孔 ELISA 法需要加样本（标准品），加酶标记物，洗涤，显色和终止等数个步骤，检测时间至少 30 分钟以上。

上述 4 种免疫层析检测模式有一个共同的特点，就是用于定量时没有标准品作参照，必需通过检测体系中加入抗原/抗体的量或选择严格的检测材料，通过控制检测灵敏度的方法来定量。由此产生的缺点为：生产工艺复杂化，或定量的准确性随着保存时间的延长而发生变化。而双孔 ELISA 操作复杂，检测步骤多，需要的试剂多，不能常温保存。因此，迫切需要建立一种简单、快速、准确的适用于测定多个样品的检测抗原浓度的方法。

## 发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中存在的不足之处，而提供一种减少操作步骤、缩短检测时间、在并排的 2-10 张单元试纸条上分别加入样本和标准品的一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法。

本发明的目的通过以下的方案来实现：

一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法，包括按以下顺序进行的步骤：

- (1) 单元试纸的制作，其中层析膜上的检测线为 1-8 条；优选为 2-5 条。
- (2) 参比免疫层析试纸的制作，其方法是：把单元试纸条安装在底卡上，2-10 张成排即成为参比免疫层析试纸。

(3) 检测流程：在参比免疫层析试纸上的单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，根据检测线出现时间，或一定时间内检测线的颜色差异来判断结果。

单元试纸的制作包括以下步骤：

- (1) 层析膜检测线的制备，用以下的模式 1 或模式 2 制备检测线：

(1) 层析膜检测线的制备, 用以下的模式 1 或模式 2 制备检测线:

①模式 1: 用能与待测抗原特异性结合的抗体在层析膜上线状点样作为检测线。将硝酸纤维素膜(NC 膜)按 10-35mm 宽的尺寸剪裁。抗体溶液用缓冲液充分透析后, 将浓度调整为 0.01-5mg/ml, 在膜上分别线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 4-16mm, 两条检测线之间的距离为 2-12mm。

②模式 2: 用全抗原或人工抗原(半抗原-载体蛋白偶联物)在层析膜上线状点样作为检测线。将 NC 膜按 10-35mm 宽的尺寸剪裁。全抗原或人工抗原溶液用缓冲液充分透析后, 将浓度调整为 0.01-5mg/ml, 在膜上分别线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 4-16mm, 两条检测线之间的距离为 2-12 mm。

根据层析的原理, 层析的距离离加样孔越远, 层析的速度越慢, 分辨率越高。本发明利用了层析的原理, 采用多条层析膜检测线, 以提高分辨率。本发明采用的层析膜检测线为 1-8 条, 优选 2-5 条。

(2) 示踪粒子结合物垫的制备, 用以下的模式 3 或模式 4 制备示踪粒子结合物垫:

①模式 3: 用示踪粒子标记全抗原或人工抗原(半抗原-载体蛋白偶联物), 把标记好的示踪粒子-抗原结合物分散在玻璃纤维纸上, 作为示踪粒子结合物垫;

②模式 4: 用示踪粒子标记能与待测抗原特异性结合的抗体, 把标记好的示踪粒子-抗体结合物分散在玻璃纤维纸上, 作为示踪粒子结合物垫。

制备示踪粒子结合物垫的示踪粒子选自: 胶体金颗粒、胶体硒颗粒、乳胶颗粒, 其制备和标记方法如下:

① 胶体金颗粒:

胶体金溶胶制备: 取 0.01%四氯化金水溶液 200ml, 加热至沸腾, 加入 1-20ml1%柠檬酸钠水溶液, 煮沸 5min, 出现橙红色, 胶体金颗粒直径由电镜测定为 10-80nm;

胶体金标记抗原/抗体: 取 50ml 胶体金, 用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH(可选择待标记抗原/抗体的等电点, 也可略为偏碱), 搅拌下将胶体金溶胶和抗原/抗体混合, 再加入聚乙二醇水溶液, 使其终浓度为 0.05%。将粗制品在 4,000-20,000×g 下离心 45min, 沉淀用生理盐水混悬至 1.5ml, 4℃保存。

② 胶体硒颗粒:

分钟。将亚硒酸 5-15g 溶解于 280ml 水中，室温搅拌下滴入反应混合液得到 50-250nm 红色硒溶胶。

胶体硒标记抗原/抗体：抗原/抗体用 20mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 可选择待标记抗原/抗体的等电点，也可略为偏碱）配成 1-8mg/ml 浓度溶液，取 25  $\mu$ l 加入 25ml 硒溶胶中，室温搅拌 10 分钟后加 1ml 1%的 PEG 8000，混匀，于 4°C 以 3,000-10,000rpm 离心 5 分钟，得到松软的红色沉淀，用含 0.05%NaN<sub>3</sub> 的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液。

### ③ 乳胶颗粒：

彩色乳胶颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。

乳胶颗粒标记抗原/抗体：用磷酸盐缓冲液将乳胶稀释到 1%浓度，搅拌下加入一定量的抗原/抗体溶液，室温搅拌 30 分钟后于 37°C 水浴保温 60 分钟，4°C 放置 4-5 小时。15,000rpm 离心 30 分钟，用适量磷酸盐缓冲液重悬。

(3) 单元试纸的组装，用以下的模式 5 或模式 6 组装单元试纸，其中的衬垫为涂布粘胶的塑料板或纸板：

①模式 5：在衬垫上先加上用模式 1 制备检测线的层析膜、然后向下依次加上用模式 3 制备的示踪粒子结合物垫、样品垫、最后在层析膜之上加上吸水垫；

②模式 6：在衬垫上先加上用模式 2 制备检测线的层析膜、然后向下依次加上用模式 4 制备的示踪粒子结合物垫、样品垫、最后在层析膜之上加上吸水垫。

(4) 单元试纸的剪切，试纸组装完成后剪切成适当宽度，即为单元试纸条。

参比免疫层析试纸制作的方法如下：

把单元试纸条安装在底卡上，2-10 张成排即成为参比免疫层析试纸。底卡一般为塑料卡，它能使衬垫上的层析膜、示踪粒子结合物垫、样品垫和吸水垫紧密结合。根据本发明的参比免疫层析试纸适用于非批量、多个样品测定的特征，选用 2-10 张单元试纸条为合适。

检测流程是在参比免疫层析试纸的 2-10 张单元条试纸上分别加入标准抗原和样本，根据检测线出现时间，或一定时间内检测线的颜色差异来判断结果。检测流程为以下的一种：

(1) 在参比免疫层析试纸的 2-10 张单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比某标准单元试纸条出现的时间晚，则样品内抗原浓度大于某标准浓度。

(1) 在参比免疫层析试纸的 2-10 张单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比某标准单元试纸条出现的时间晚，则样品内抗原浓度大于某标准浓度。

(2) 参比免疫层析试纸的 2-10 张单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，在相同时间内，样本单元试纸条在相同位置出现条带的颜色比某标准单元试纸条出现的颜色浅，则样本内抗原浓度大于某标准浓度。

加入标准抗原与加入样本的单元试纸条数的比例，以及标准抗原的浓度可以根据待测样本的特征而定。

本发明同以往定量检测抗原的方法，特别是 ELISA 相比有如下优点：

- ① 操作简便，只需一个操作步骤；
- ② 检测速度快，5-20 分钟即可得到结果；
- ③ 可单份测定也可数份同时测定、室温保存、保存时间长，并可随身携带。

本发明同以往定量检测抗原的方法，特别是免疫层析法相比有如下优点：

- ① 用标准单元试纸条作参照，不需要额外的质控线抗体（抗示踪粒子标记物抗体）；
- ② 定量的准确性随着保存时间的增长不会发生变化；
- ③ 检测方式灵活，可根据检测线出现时间或一定时间检测线的颜色差异来判断结果；
- ④ 可加入一个标准，也可同时作几个标准；
- ⑤ 可检测一个样本，也可同时检测数个样本。

本发明可应用于免疫学检测的所有方面，但主要用于检测正常生物样本中不存在的抗原性物质(如诊断传染病的抗原，粮食、饮料或动物饲料中污染的真菌毒素，抗生素)；正常含量极低而在特殊情况下异常升高的物质(如 HCG、甲胎蛋白、C-反应蛋白等)；以及违禁添加的物质（如蔬菜、水果中的残留农药，牛奶中的抗生素，肉类食品中的兴奋剂类药）。本发明的试纸条的使用单位主要为医院、部队、公检法部门、运动员兴奋剂检测部门、防疫站等国家监测部门等，个人也可使用。

### 附图说明

图 1. 是参比免疫层析（模式 5）试纸的结构图。

参比免疫层析（模式 5）试纸由两条单独并排的单元试纸条，即检测单元试纸条 1-1 和参比单元试纸条 1-2 构成。单元试纸条由样品垫 3、示

踪粒子结合物垫 4、层析膜 5 和吸水垫 6 构成。示踪粒子结合物垫 4 上有示踪粒子标记抗原 8 所形成的结合物 10，层析膜 5 上有检测线 7，检测线 7 上有抗体 9。

图 2. 是参比免疫层析（模式 6）试纸的结构图。

参比免疫层析（模式 6）试纸由两条单独并排的单元试纸条，即检测单元试纸条 2-1 和参比单元试纸条 2-2 构成。单元试纸条由样品垫 3、示踪粒子结合物垫 4、层析膜 5 和吸水垫 6 构成。示踪粒子结合物垫 4 上有示踪粒子标记抗体 9 所形成的结合物 11，层析膜 5 上有检测线 7，检测线 7 上有抗原 8。

参照图 1，在样品垫 3 上滴加样本或标准品后，样本或标准品向吸水垫 6 端扩散，使示踪粒子结合物垫 4 上的示踪粒子结合物 10 进入样本或标准品的液相，并与其一起向吸水垫 6 端扩散，在层析膜 5 上，样本或标准品中的抗原与示踪粒子结合物中的抗原竞争，阻止示踪粒子结合物 10 和抗体 9 的反应。由于扩散速度较快，反应是动态且不完全的。在参比单元试纸条 1-2 的样品垫 3 上加入标准品后，标准品抗原和示踪粒子结合物 10 上的标记抗原比例是一定的，因此，标准品阻止示踪粒子结合物 10 和抗体 9 的反应的速率一定，检测线出现可见颜色所需的时间也就一定。在检测单元试纸条 1-1 的样品垫 3 上同时加入样本，如果样本中的抗原浓度大于标准，样本抗原阻止示踪粒子结合物 10 中的抗原和抗体 9 反应的速率增大，检测线 7 上的抗体 9 富集示踪粒子结合物 10 至可见颜色所需的时间也增加。或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的浅。反之，如果样本中的抗原浓度小于标准，检测线 7 上的抗体 9 富集示踪粒子结合物 10 至可见颜色所需的时间减少。或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的深。根据可见颜色出现的先后，或同一时间内出现的条带的颜色深浅便可判断样本中的抗原浓度大于或小于标准。

参照图 2，在样品垫 3 上滴加样本或标准品，样本或标准品向吸水垫 6 端扩散，使示踪粒子结合物垫 4 上的示踪粒子结合物 11 进入样本或标准品的液相，并与其一起向吸水垫 6 端扩散，在层析膜 5 上，样本或标准品中的抗原与检测线 7 上的抗原 8 竞争，阻止检测线 7 上的抗原 8 和示踪粒子结合物 11 的反应。由于扩散速度较快，反应是动态且不完全的。在参比单元试纸条 2-2 的样品垫 3 上加入标准品后，标准品中的抗原阻止检测线 7 中的抗原和示踪粒子结合物 11 反应的速率是一定的，检测线出现可见颜色所需的时间也就一定。在检测单元试纸条 2-1 的样品垫 3

上同时加入样本，如果样本中的抗原浓度大于标准，样本抗原阻止检测线 7 中的抗原和示踪粒子结合物 11 中的抗体反应的速率增大，检测线 7 上抗原 8 富集示踪粒子结合物 11 至可见颜色所需的时间增加。或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的浅。反之，如果样本中的抗原浓度小于标准，检测线 7 上抗原 8 富集示踪粒子结合物 11 至可见颜色所需的时间减少。或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的深。根据可见颜色出现的先后，或同一时间内出现的条带的颜色深浅便可判断样本中的抗原浓度大于或小于标准。

### 具体实施方式

以下实施例 1-5 均分为 3 部分：1. 单元试纸的制作；2. 参比免疫层析试纸制作；3. 检测流程。

实施例一：胶体金参比免疫层析检测血清甲胎球蛋白（AFP）浓度

#### 1. 单元试纸的制作

##### (1) 硝酸纤维素层析膜（NC 膜）检测线的制备：

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。抗 AFP 抗体的溶液用磷酸盐缓冲液充分透析后，将浓度调整为 1mg/ml，在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 8mm，检测线为 1 条。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min，再置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37℃保温 30min，置室温干燥处密封储藏。

##### (2) 胶体金结合物垫的制备：

① 胶体金溶胶制备：取 0.01%四氯化金水溶液 200ml，加热至沸腾，加入 5ml 1%柠檬酸钠水溶液，煮沸 5min，出现橙红色，胶体金颗粒直径为 18-20nm；

② 胶体金标记 AFP：取 50ml 胶体金，用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 到 7.5，搅拌下加入亲和纯化的 AFP 5ml，再加入聚乙二醇水溶液，使终浓度为 0.05%。将粗制品在 12000×g 下离心 45min，沉淀用生理盐水混悬至 1.5ml 并稀释到 OD<sub>520</sub> 为 4，4℃保存；

③ 将胶体金标记的 AFP 分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

##### (3) 单元试纸的组装：

在衬垫上先加上有 AFP 抗体检测线的 NC 膜、然后向下依次加上胶体金结合物垫、样品垫、最后在 NC 膜之上加上吸水垫。

(4) 单元试纸条的剪切:

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 的宽度, 即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把单元试纸条安装在塑料底卡上, 2 张成排即成为参比免疫层析试纸。

3. 检测流程

在一张单元试纸条加入样本, 另一张单元试纸条同时加入  $20 \mu\text{g/L}$  的 AFP 标准抗原。如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比标准单元试纸条出现的时间晚, 或在 10min 时条带颜色比标准单元试纸条的浅, 则样本内抗原浓度大于  $20 \mu\text{g/L}$ 。

实施例二: 胶体硒参比免疫层析检测血清甲胎球蛋白浓度

1. 单元试纸的制作

(1) NC 层析膜检测线的制备:

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。亲和纯化的 AFP 溶液用磷酸盐缓冲液充分透析后, 将浓度调整为  $0.5\text{mg/ml}$ , 在膜上线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 6mm, 检测线为 4 条, 两条检测线之间的距离为 2mm。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min, 再置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min, 取出吸干水分, 于  $37^\circ\text{C}$  保温 30min, 置室温干燥处密封储藏。

(2) 示踪粒子结合物垫的制备:

① 胶体硒溶胶制备: 在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550ml 和聚丙烯酸 10g, 通氮室温搅拌并加入水合肼 69.5ml, 继续搅拌 20 分钟。将 9.63g 亚硒酸溶解于 280ml 水中, 室温搅拌下滴入反应混合液内, 得到颗粒直为 120nm 的红色硒溶胶;

② 胶体硒标记抗 AFP 抗体: AFP IgG 型抗体用  $20\text{mmol/L}$  pH7.3 磷酸盐缓冲液配成浓度为  $4.6\text{mg/ml}$  的溶液, 取  $25 \mu\text{l}$  加入 pH7.3 的 25ml 硒溶胶中, 室温搅拌 10 分钟后加 1% PEG 8000 1ml, 混匀, 于  $4^\circ\text{C}$  下, 以 5,000rpm 离心 5 分钟, 得到松软的红色沉淀, 用含 0.05%  $\text{NaN}_3$  的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液;

③ 将胶体硒标记的抗 AFP 抗体分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上, 冻干密封干燥保存。

(3) 单元试纸的组装:

在衬垫上先加上有 AFP 抗原检测线的 NC 膜、然后向下依次加上胶体金结合物垫、样品垫, 最后在 NC 膜之上加上吸水垫。

(4) 单元试纸条的剪切:

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 宽度, 即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把单元试纸条安装在塑料底卡上, 4 张成排即成为参比免疫层析试纸。

3. 检测流程

在 2 张单元试纸条加入样本, 另 2 张单元试纸条同时分别加入 200  $\mu$ g/L 和 400  $\mu$ g/L 的 AFP 标准抗原。一种判断方式为, 如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比 200  $\mu$ g/L 的标准单元试纸条出现的时间早, 则样本内抗原浓度小于 200  $\mu$ g/L; 如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间在 200  $\mu$ g/L 和 400  $\mu$ g/L 标准单元试纸条之间, 则样本内抗原浓度在 200  $\mu$ g/L 和 400  $\mu$ g/L 之间; 如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比 400  $\mu$ g/L 的标准单元试纸条出现的时间晚, 则样本内抗原浓度大于 400  $\mu$ g/L。另一种判断方式为, 在 10min 时如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的颜色比 200  $\mu$ g/L 标准单元试纸条深, 则样本内抗原浓度小于 200  $\mu$ g/L; 如果样本单元试纸条在相同位置出现条带颜色在 200  $\mu$ g/L 和 400  $\mu$ g/L 标准单元试纸条之间, 则样本内抗原浓度在 200  $\mu$ g/L 和 400  $\mu$ g/L 之间; 如果样本单元试纸条在相同位置出现条带颜色比 400  $\mu$ g/L 标准单元试纸条浅, 则样本内抗原浓度大于 400  $\mu$ g/L。

实施例三: 乳胶参比免疫层析检测尿液吗啡浓度

1. 单元试纸的制作

(1) NC 膜检测线的制备:

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。抗吗啡抗体溶液用磷酸盐缓冲液充分透析后, 将浓度调整为 0.5mg/ml, 在膜上线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 8mm, 检测线为 2 条, 两条检测线之间的距离为 4mm。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min, 再置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min, 取出吸干水分, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 置室温干燥处密封储藏。

(2) 乳胶结合物垫的制备:

① 乳胶标记吗啡-牛血清白蛋白偶联物: 彩色乳胶颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。取 100ml 用磷酸盐缓冲液稀释到浓度为 1%的乳胶, 搅拌下加入 500  $\mu$ g 的吗啡-牛血清白蛋白偶联物溶液, 室温搅拌 30 分钟后于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟, 4 $^{\circ}$ C 放置 4-5 小时。15,000rpm 离心 30 分钟,

用适量磷酸盐缓冲液重悬；

② 将乳胶标记的吗啡-牛血清白蛋白偶联物分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(3) 单元试纸的组装：

在衬垫上先加上有抗吗啡抗体检测线的层析膜、然后向下依次加上胶体金结合物垫、样品垫、最后在层析膜之上加上吸水垫。

(4) 单元试纸条的剪切：

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把单元试纸条安装在塑料底卡上，2 个成排成为参比免疫层析试纸。

3. 检测流程

在一张单元试纸条加入样本，另一张单元试纸条同时加入 300ng/ml 的吗啡标准抗原。如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比标准单元试纸条出现的时间晚，或在 15min 时条带颜色比标准单元试纸条浅，则样本内抗原浓度大于 300ng/ml。

实施例四：胶体金参比免疫层析检测尿液吗啡浓度

1. 单元试纸的制作

(1) 层析膜检测线的制备：

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。吗啡-牛血清白蛋白偶联物溶液用磷酸盐缓冲液充分透析后，将浓度调整为 0.7mg/ml，在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 8mm，检测线为 2 条，两条检测线之间的距离为 4mm。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min，再置于 1% 牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37℃ 保温 30min，置室温干燥处密封储藏。

(2) 示踪粒子结合物垫的制备：

① 胶体金溶胶制备：取 0.01% 四氯化金水溶液 200ml，加热至沸腾，加入 5ml 1% 柠檬酸钠水溶液，煮沸 5min，出现橙红色，胶体金颗粒直径为 18-20nm；

② 胶体金标记抗吗啡抗体：取 50ml 胶体金，用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 到 8.2，搅拌下加入亲和纯化的抗吗啡 IgG 型抗体 5ml，再加入聚乙二醇水溶液使其终浓度为 0.05%。将粗制品在 12000×g 下离心 45min，沉淀用生理盐水混悬至 1.5ml 并稀释到 OD<sub>520</sub> 为 2.5，4℃ 保存；

③ 将胶体金标记的抗吗啡抗体分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(3) 单元试纸的组装:

在衬垫上先加上有吗啡-牛血清白蛋白偶联物检测线的层析膜、然后向下依次加上胶体金结合物垫、样品垫、最后在层析膜之上加上吸水垫。

(4)单元试纸条的剪切:

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 的宽度, 即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把单元试纸条安装在塑料底卡上, 2 个成排成为参比免疫层析试纸。

3. 检测流程

在一张单元试纸条加入样本, 另一张单元试纸条同时加入 300ng/ml 的吗啡标准抗原。如果样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比标准单元试纸条出现的时间晚, 或在 15min 时条带颜色比标准单元试纸条的浅, 则样本内抗原浓度大于 300ng/ml。

实施例五: 胶体金参比免疫层析检测尿液白蛋白浓度

1. 单元试纸的制作

(1) NC 膜检测线的制备:

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。抗白蛋白单克隆抗体溶液用磷酸盐缓冲液充分透析后, 将浓度调整为 0.15mg/ml 在膜上线状点样作为检测线, 第一条检测线点样位置离膜底边 4mm, 检测线之间的距离为 2mm。检测线为 8 条。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min, 再置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min, 取出吸干水分, 于 37℃保温 30min, 置室温干燥处密封储藏。

(2) 胶体金结合物垫的制备:

① 胶体金溶胶制备: 取 0.01%四氯化金水溶液 200ml, 加热至沸腾, 加入 2ml1%柠檬酸钠水溶液, 煮沸 5min, 出现橙红色, 胶体金颗粒直径为 35-45nm;

② 胶体金标记白蛋白: 取 50ml 胶体金, 用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 到 6.5, 搅拌下加入亲和纯化的白蛋白 5ml, 再加入聚乙二醇水溶液, 使其终浓度为 0.05%。将粗制品在 12000×g 下离心 45min, 沉淀用生理盐水混悬至 1.5ml 并稀释到 OD<sub>520</sub> 为 3, 4℃保存;

③ 将胶体金标记的白蛋白分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上, 冻干密封干燥保存。

(3) 单元试纸条的组装:

在衬垫上先加上有白蛋白抗体检测线的 NC 膜, 然后向下依次加上胶体金结合物垫、样品垫, 最后在 NC 膜之上加上吸水垫。

(4) 单元试纸的剪切:

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 宽度, 即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把单元试纸条安装在塑料底卡上, 5 张成排即成为参比免疫层析试纸。

3. 检测流程

在 1 张单元试纸条上加入样本, 另 4 张单元试纸条上同时分别加入 5、10、15、20  $\mu\text{g/ml}$  的白蛋白标准抗原。判断条带为离加样孔第 5 至 8 条带, 根据检测情况, 如果第 5 条带差别不明显, 观察第 6 条带, 依次类推, 测试时间为 15 分钟。如果样本单元试纸条出现条带比 5  $\mu\text{g/ml}$  标准单元试纸条的颜色深, 则样本白蛋白浓度小于 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 如果样本单元试纸条出现条带比 20  $\mu\text{g/ml}$  标准单元试纸条颜色浅, 则样本白蛋白浓度大于 20  $\mu\text{g/ml}$ ; 如果样本单元试纸条出现条带颜色在 5、10、15、20  $\mu\text{g/ml}$  标准单元试纸条其中两者之间, 则样本白蛋白浓度在相应的标准之间。

本发明方法用于生物样品中抗原浓度的定量检测。

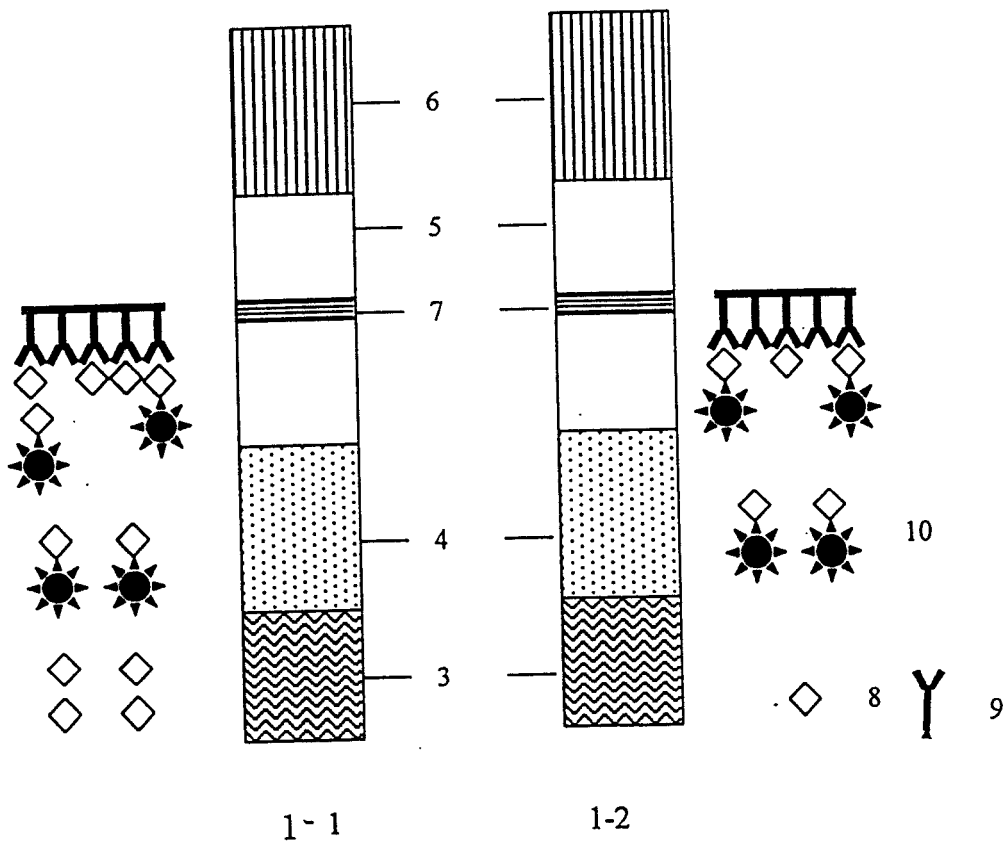


图 1

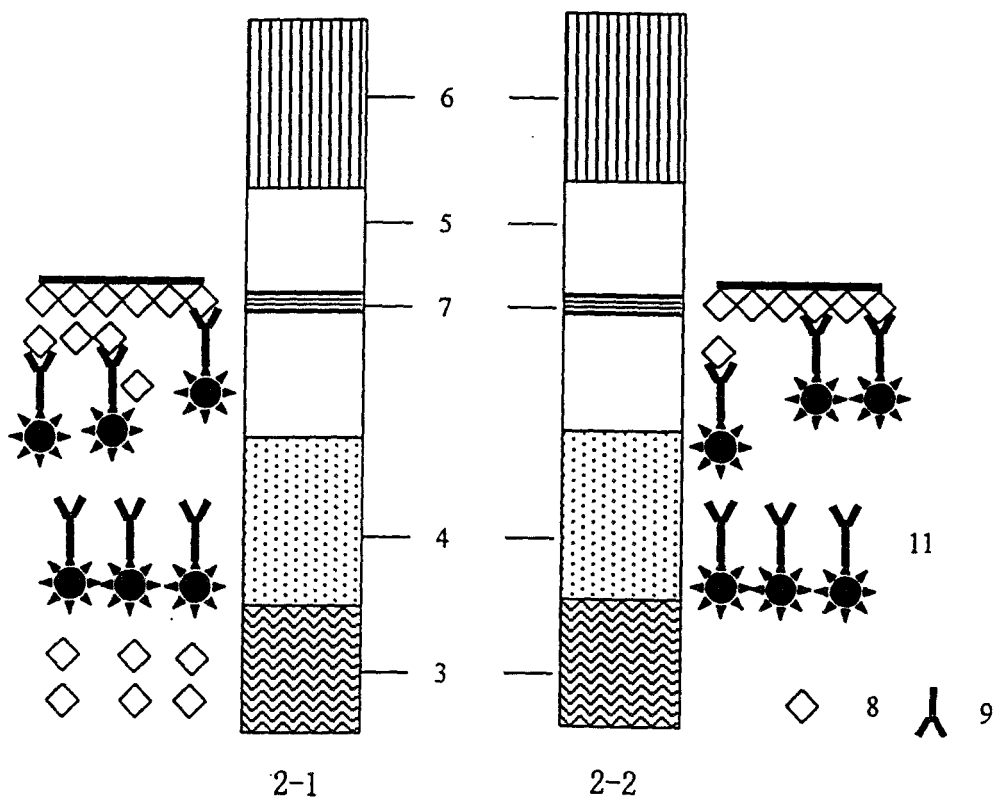


图 2

专利名称(译)	一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1218183C</a>	公开(公告)日	2005-09-07
申请号	CN03147860.3	申请日	2003-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
[标]发明人	陈高明 李林		
发明人	陈高明 李林		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	何文彬		
其他公开文献	CN1460858A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种参比免疫层析检测抗原浓度的方法。该方法的步骤包括：单元试纸的制作；参比免疫试纸制作；检测流程。本发明的详细方法见说明书。本发明用2张-10张单元试纸条并排制成参比免疫层析试纸。在免疫层析试纸的单元试纸条上分别加入标准抗原和样本，加入标准抗原与加入样本的单元试纸条数为任意比例，根据检测线出现颜色的时间，或一定时间内检测线的颜色差异来判断结果。本发明的优点是定量准确，可选用一个或数个标准品，也可同时检测一个或数个样本。本发明方法用于生物样本中抗原浓度的定量检测。

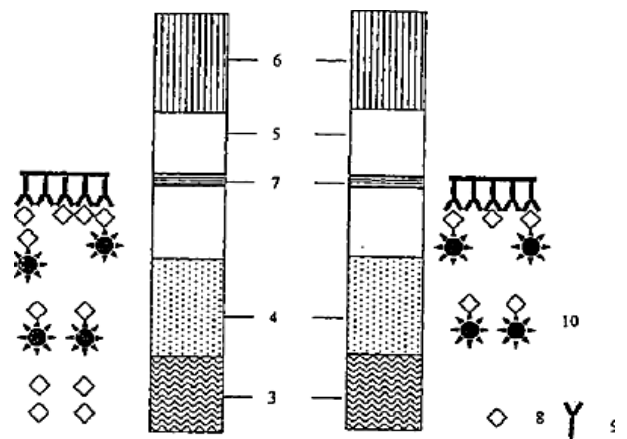


图 1-1

图 1-2