

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03142460.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年7月19日

[11] 授权公告号 CN 1265198C

[22] 申请日 2003.6.6 [21] 申请号 03142460.0

[71] 专利权人 卢氏实验公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 卢惟钊

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司

代理人 费开逵

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称

逆型胶体金免疫层析试剂条及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种逆型胶体金免疫层析试剂条，其特点是待测样品的加样点位于固相胶体金标记结合物的前沿，从而改变了传统金标免疫检测的反应步骤，大大降低了样品中非特异性 IgG/IgM 的干扰，提高了试剂条的检测灵敏度。该试剂条可有效地进行 TORCH 抗体的检测。

1、一种逆型胶体金免疫层析试剂条，其特征在于从该试剂条的一端起依次由缓冲液加入区、固相胶体金标记结合物、待测样品的加样点、测试区、对照区和吸水纸区组成。

2、根据权利要求1所述的逆型胶体金免疫层析试剂条，其特征在于该试剂条上的反应顺序为：首先将待测样品加于加样点使之向测试区层析移动，随后滴加一定的缓冲液溶解固相胶体金标记结合物，使之在硝基纤维素膜上向测试区发生移动，这样待测成分分子首先与固相于测试区的特异抗原/抗体形成复合物并被固定，然后再与胶体金所标记的特异抗原/抗体结合，形成最终的显色复合物。

3、权利要求1所述的逆型胶体金免疫层析试剂条在TORCH抗体检测中的应用。

4、权利要求1所述的逆型胶体金免疫层析试剂条在单一指标检测或多项指标同时测定中的应用。

5、权利要求1所述的逆型胶体金免疫层析试剂条在除TORCH以外的其它抗体的检测中的应用。

6、权利要求1所述的逆型胶体金免疫层析试剂条在抗原检测中的应用。

7、根据权利要求1所述的逆型胶体金免疫层析试剂条，其特征在于以有色乳胶颗粒、荧光或其它发光物质替代胶体金作为标记物，制成相应的逆型免疫层析试剂条。

逆型胶体金免疫层析试剂条及其应用

技术领域

本发明涉及免疫层析试剂条，具体指加样点位于固相胶体金标记结合物前沿的逆型胶体金免疫层析试剂条。

本发明还涉及上述试剂条的应用。

背景技术

金标免疫检测技术属于固相膜免疫测定技术。金标免疫检测技术包括金标免疫渗滤法（滴金免疫测定法）和金标免疫层析法。金标免疫渗滤法建立于20世纪90年代初，是以硝基纤维素膜为载体，利用微孔滤膜的可滤过性，使抗原抗体反应和洗涤在一特殊的渗滤装置上以液体渗滤过膜的方式迅速完成。金标免疫层析法是继金标免疫渗滤法之后发展起来的另一种膜固相免疫测定方法，目前已被广泛应用，其原理是以微孔滤膜（如硝基纤维素膜）为固相载体，并利用微孔滤膜的毛细管作用，使加于膜条一端的液体样品向另一端渗移，犹如层析一般。移动过程中被分析物与固定于膜上某一区域的受体（抗原或抗体）结合而被固相化，无关物则越过该区域而被分离，然后通过标记物（胶体金）的显色来判定检测结构。金标免疫层析法的特点是快速、简便，利用胶体金免疫层析试剂条可使抗体抗原“三明治”夹心反应于5-30分钟内快速进行。全部反应在一个试剂条上完成，将样品膜（玻璃纤维纸或其它纤维纸）、固相胶体金标记物（Conj）、硝基纤维素膜和吸水纸装配于带有双面粘胶的塑料薄板上。硝基纤维素膜上有两个反应区域，测试区（T区）固相一条特异抗原/抗体，对照区（C区），固相一条对照带。固相胶体金标记物是为与T区相对应的另一特异“抗原/抗体-金标记物”的干燥颗粒。经典试剂条的测试流程为：滴入尿液、血清、血浆、血液、唾液等待测液或样

品提取液或它们的稀释液于样品膜(S)上面。有的检测项目需随后再于同一位置滴入“缓冲液”以达到更好的效果。如果样品中含有待测成分,该待测成份分子的一端将与胶体金标记物中特异抗原/抗体形成复合物,该复合物按毛细管原理上行于纤维膜上。在测试区(T),待测成分分子的另一端将于固相化的另一特异抗原/抗体起反应,并在T处被“固定”。由于胶体金颗粒是玫瑰色,于是在T区出现了一条玫瑰色线。该处颜色深浅与待测样品浓度高低成正比。金标免疫层析检测技术目前已得到广泛的应用,如进行人绒毛促性腺激素(HCG)、促黄体生成激素(LH)、促卵泡成熟激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)等激素的测定;衣原体(Chlamydia)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、梅毒(Syphilis)、乙肝病毒(HBV)、幽门螺旋杆菌(Hpy)等感染原的检测;吗啡、可卡因、鸦片等毒品的检测;以及心肌梗塞指标(如肌钙蛋白Tni、异激动酶CKMB、肌红蛋白Myoglobin)和肿瘤指标(如前列腺特异抗原PSA、胚癌蛋白CEA、甲胎蛋白a-FP)的检测等。

利用金标免疫层析法测定抗体时,一般采用胶体金标记抗人IgG/IgM,在硝基纤维素膜上固相一条特异性抗原。在检测中,按上述反应流程因样品中的特异性和非特异性IgG/IgM先与胶体金标记抗人IgG/IgM竞争结合,大大降低了检测的敏感度,因此上述流程的胶体金免疫层析试剂条并不能用于某些检测项目,尤其无法对TORCH抗体进行检测。将弓形体(*Toxoplasma gondii*)、巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)、风疹病毒(Rubella)、单纯疱疹(Hepes Smplex virus I & II)这几种抗原按第一字母组合,简称为TORCH,应用上述经典的胶体金免疫层析试剂条对TORCH抗体进行检测时,在T区见不到色带,即使在高浓度抗体的存在下,也极难见到T色带。

发明内容

本发明的目的在于提供一种逆型胶体金免疫层析试剂条,改换经典金标免疫检测的反应步骤,以获得高灵敏度的检测效果,从而拓宽经典胶体金免疫层析试剂条的应用范围。

本发明的另一目的在于提供上述逆型胶体金免疫层析试剂条的用途。

本发明逆型胶体金免疫层析试剂条，从一端起依次由缓冲液加入区、固相胶体金标记结合物、待测样品的加样点、测试区、对照区和吸水纸区组成。本发明将加样点由经典试剂条(组成结构见附图 1)的样品膜(S)处移至固相胶体金标记结合物的前沿，样品膜处仅用于滴加缓冲液。本发明试剂条的底板可采用双面胶塑料片，塑料片两端粘贴有吸水材料，其中一端为缓冲液加入区(B)，可采用材料包括玻璃纤维纸或其它纤维纸，另一端为吸水纸区(A)，材料以吸水性强的滤纸为佳。紧邻B区为干燥固相胶体金标记结合物(Conj)，加样点位于Conj的前沿。Conj与A的中间粘贴吸附有受体(抗原或抗体)的硝基纤维素膜，受体以直线的形式包被在膜上，自Conj向A方向，硝基纤维素膜上有两个反应区域，测试区(T区)固相一条特异抗原/抗体，对照区(C区)，固相一条对照带。本发明试剂条的反应特点在于首先将待测样品加于固相胶体金标记结合物之前使之向测试区层析移动，随后用一定的缓冲液溶解固相胶体金标记结合物，使之在硝基纤维素膜上向测试区发生移动，这样待测成分分子首先与固相于测试区的特异抗原/抗体形成复合物并被固定，然后再与胶体金所标记的特异抗原/抗体结合，形成最终的显色复合物(试剂条组成结构见附图 2)。这样对经典试剂条的反应顺序(即待测成分分子首先与胶体金所标记的特异抗原/抗体结合形成显色复合物，然后再与固相于测试区的特异抗原/抗体形成最终复合物并被固定)进行了逆向改变，从而在利用试剂条检测抗体时，大大降低了样品中大量非特异性IgG/IgM的干扰，从而避免了样品中特异性和非特异性IgG/IgM与胶体金标记抗人IgG/IgM的先行竞争结合，提高了试剂条的检测灵敏度。本发明拓宽了经典试剂条的检测范围，尤其可以有效地用于TORCH抗体检测。根据实际需要，本发明逆型胶体金免疫层析试剂条可制成测定单一指标的试剂条或同时测定多项指标的试剂条。本发明逆型试剂条可用于抗原或抗体的检测，应用本发明逆行试剂条，可根据其测试区所固相的抗体或抗原，检测相对应的抗原或抗体。以有色乳胶颗粒、荧光或其它发光物质等代替胶体金作为标记物，可将本发明试剂条制成相应的逆型免疫层析试剂条。

下面以抗体抗原“三明治”夹心法测定 TORCH 抗体为例，说明逆型胶体金免疫层析试剂条的操作步骤和原理：首先加入待测液血清、血浆于胶体金标记结合物 Conj 的前沿，随后立即于 B 处滴入 2 滴缓冲液，该缓冲液在溶解固相胶体金标记抗人 IgG/IgM 抗体的同时“冲向”硝基纤维素膜，将待测液成份先带入 T 区。如样品中含有待测成分，即 TORCH 抗体，该抗体将被在 T 区的固相 TORCH 抗原所捕获并形成抗原抗体复合物。而样品中所含的大量非特异性人免疫球蛋白 IgG/IgM，将通过 T 区继续前进而被排除。在 T 区形成的足够量“抗原抗体”复合物与随之而来的胶体金标记抗人 IgG/IgM 抗体形成“TORCH 抗原-人体 TORCH 抗体-抗人 IgG/IgM 抗体-胶体金颗粒”复合物。因而在 T 区产生玫瑰色色带，其颜色深浅与 TORCH 抗体含量成正比例。如样品中不含有待测成分，或 TORCH 抗体的含量低于检测灵敏度。则在 T 区不形成可见的玫瑰色带，即为阴性结果。如需检测 IgG 型 TORCH 抗体，则使用抗人 IgG 抗体胶体金标记物。如需检测 IgM 型 TORCH 抗体，则用抗人 IgM 抗体胶体金标记物。T 区可固相化一种或多种 TORCH 抗原，胶体金标记结合物可采用胶体金标记的羊或兔或其它动物品种抗人的免疫球蛋白 IgG/IgM。

附图说明

图 1 为经典型胶体金免疫层析试剂条的组成结构图，其中 S 指样品膜；Conj 指固相胶体金标记结合物；T 指测试区；C 指对照区；Abs 指吸水纸区

图 2 为本发明逆型胶体金免疫层析试剂条的组成结构图，其中 B 指缓冲液加入区；S 指样品加入点；Conj 指固相胶体金标记结合物；T 指测试区；C 指对照区；Abs 指吸水纸区

图 3 五合一逆型胶体金免疫层析板检测盒的结构图，其中 I 指用于检测 Toxo 抗体的试剂条；II 指用于检测 CMV 抗体的试剂条；III 指用于检测 Rubella 抗体的试剂条；IV 指用于检测 HSV-I 抗体的试剂条；V 指用于检测 HSV-II 抗体的试剂条；B 指缓冲液加入区；Conj 指固相胶体金标记结合物；S 指样品加入点；T 指测试区；C 指对照区。

图 4 为四合一逆型胶体金免疫层析板检测盒的结构图，其中 B 指缓冲液

加入区; Conj 指固相胶体金标记结合物; S 指样品加入点; Toxo 指固相化 Toxo 抗原; CMV 指固相化 CMV 抗原; Rubella 指固相化 Rubella 抗原; HSV-I/II 指固相化 HSV-I/II 抗原; C 指对照区。

有益效果:

1、本发明提供了一种新颖的逆型胶体金免疫层析试剂条, 逆向改变了经典金标免疫检测的反应步骤, 大大降低了样品中大量非特异性 IgG/IgM 的干扰, 从而大大降低了样品中特异性和非特异性 IgG/IgM 与胶体金标记抗人 IgG/IgM 的竞争结合, 提高了试剂条的检测灵敏度。

2、本发明拓宽了胶体金免疫层析试剂条的应用范围, 利用本发明逆型胶体金免疫层析试剂条可有效地进行 TORCH 抗体的检测。

具体实施方式:

下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述, 但不限制本发明。

实施例 1 五合一逆型胶体金免疫层析板检测盒

如图 3 所示, 本检测盒由检测单项 TORCH 抗体的逆型胶体金免疫层析试剂条组合而成, 该检测盒由 5 个试剂条组合而成, 其中试剂条 I 用于检测人抗弓形体 (Toxo) 抗体; 试剂条 II 用于检测人抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体; 试剂条 III 用于检测人抗风疹病毒 (Rubella) 抗体; 试剂条 IV 用于检测人抗单纯疱疹 I (HSV-I) 抗体; 试剂条 V 用于检测人抗单纯疱疹 II (HSV-II) 抗体。每个试剂条均包括缓冲液加入区 (B)、固相胶体金标记结合物 (Conj)、样品加入点 (S)、测试区 (T)、对照区 (C) 和吸水纸区 (Abs)。其中各试剂条的 T 区分别包被固定有相应的 TORCH 抗原。

制备本检测盒所需的材料如下:

1、美国司泰普公司 (STAPLES, SAN DIEGO, CA) 生产的 10mil PVC 塑料板, 涂以双面粘胶

2、美国渥特明公司 (WHATMAN, FAIRFIELD, NJ) 生产的硝基纤维素膜

- 3、美国渥特明公司 (WHATMAN, FAIRFIELD, NJ) 生产的吸水纸片
- 4、美国泊乐-吉乐明公司 (PALL-GELMAN, ANN ARBOR, MI) 生产的玻璃纤维纸
- 5、美国西格玛公司 (SIGMA, ST. LOUIS, MO) 生产的金胶
- 6、购自美国罗斯南方实验室 (ROSS SOUTHERN LAB, UT) 的 TORCH 抗原
- 7、美国百敖柏西非克公司 (Biopacific, CA) 生产的羊抗人 IgG/IgM 抗体及鼠抗羊抗人 IgG/IgM 抗体

本检测盒的制备方法为: 用 ISOFLOW 喷雾机(Imagine 公司产品)将五种 TORCH 抗原分别以 2mg/ml 的浓度喷涂在 25mm * 300mm 的硝基纤维素膜上制成测试区。同时将浓度为 2mg/ml 的相应鼠抗羊抗人 IgG/IgM 抗体喷涂在硝基纤维素膜上制成对照区。以 25 μ g 羊抗人 IgG (或 IgM) 抗体, 标记 10ml 金胶, 在 12,000rpm 速度下对金胶溶液进行离心, 以分离金胶颗粒, 用磷酸缓冲液溶解沉淀物 (胶体金-羊抗人 IgG/IgM 抗体复合物), 浸入玻璃纤维纸, 真空干燥后切成 6 * 60mm 的小条。(胶体金标记羊抗人 IgG/IgM 抗体的方法及纯化方法参见中国专利 98122892.5)

按图 2 所示的结构, 将玻璃纤维纸、标记有羊抗人 IgG/IgM 抗体的金标纸、包被有 TORCH 抗原及鼠抗羊抗人 IgG/IgM 抗体的硝基纤维素膜、吸水纸组装成检测板。再将各试剂条装置于塑料盒中即制成本检测盒。

实施例 2 四合一逆型胶体金免疫层析板检测盒

如图 4 所示, 该检测盒可同时测定样品中的人抗弓形体 (Toxo) 抗体、人抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体、人抗风疹病毒 (Rubella) 抗体和人抗单纯疱疹 I/II (HSV-I/II) 抗体。试剂条包括缓冲液加入区 (B)、固相胶体金标记结合物 (Conj)、样品加入点 (S)、测试区 (T)、对照区 (C) 和吸水区 (Abs)。其中 T 区依次包被固定有 Toxo 抗原、CMV 抗原、Rubella 抗原和 HSV-I/II 抗原。

制备该检测盒的所需的材料和基本方法与实施例 1 相同，只是在同一条硝基纤维素膜上依次喷涂不同抗原溶液。依金标部位向上，分别喷涂 Toxo 抗原、CMV 抗原、Rubella 抗原、HSV-I/II 抗原（1:1 混合物），各抗原的喷涂浓度皆为 2mg/ml。

实施例 3 酶联免疫试剂盒、逆型胶体金免疫层析检测盒及经典胶体金免疫层析检测盒测定 TORCH 抗体的效果比较实验

本实验采集临床病人的血清作为实验样品，其中用于 Toxo 抗体检测的血清样品 72 例（38 例检测 IgG 抗体，34 例检测 IgM 抗体）；用于 CMV 抗体检测的血清样品 81 例（42 例检测 IgG 抗体，39 例检测 IgM 抗体）；用于 Rubella 抗体检测的血清样品 68 例（36 例检测 IgG 抗体，32 例检测 IgM 抗体）；用于 HSV-1 抗体检测的血清样品 120 例（64 例检测 IgG 抗体，56 例检测 IgM 抗体）；用于 HSV-2 抗体检测的血清样品 123 例（70 例检测 IgG 抗体，53 例检测 IgM 抗体）。每例血清样品用市售酶联免疫试剂盒测定以确定阳性样品和阴性样品，然后分别用逆型胶体金免疫层析检测盒和经典胶体金免疫层析检测盒对阳性样品和阴性样品进行测定。

实验方法：按实施例 1 所述方法制备用于检测 TORCH 抗体的逆型胶体金免疫层析检测盒。其中试剂条的组成结构如图 2 所示，测定时在样品加入点（S）加入 5 微升血清，然后在缓冲液加入区（B）处加 2 滴缓冲液，测试时间为 15 分钟，若测试区（T）呈玫瑰色，则样品为阳性，否则为阴性。TORCH 经典胶体金免疫层析检测盒采用类似的制备方法，其中试剂条的组成结构如图 1 所示，测定时在样品膜（S）处加入 5 微升血清，并在同样部位加 2 滴缓冲液，测试时间为 15 分钟，若测试区（T）呈玫瑰色，则样品为阳性，否则为阴性。TORCH 酶联药盒购自 E&E LABS, CA，按常规酶联法检测血清样品（具体操作参照试剂盒说明书），若 $OD < 0.25$ ，则认定为阴性样品；若 $OD > 0.6$ ，则认定为阳性样品。

如表 1 所示：虽然逆型胶体金免疫层析试剂条及经典胶体金免疫层析试

剂条的测试区所固化的 TORCH 抗原的浓度相同，均为 2mg/ml，但逆型试剂条对阳性样品的测定结果与酶免的测定结果基本一致，相关性达到 94%以上，而经典试剂条对阳性样品的测定结果全部为阴性，由此可以看出，逆型试剂条对 TORCH 抗体的检测与酶免测定结果相当，可有效地检测 TORCH 抗体。而经典试剂条无法测定 TORCH 抗体。

表 1 酶联免疫试剂盒、逆型胶体金免疫层析检测盒及经典胶体金免疫层析检测盒测定 TORCH 抗体的效果比较

项目	酶联免疫试剂盒检测例	逆型检测盒检测例	经典检测盒检测例	酶联法与逆型法相关性
TOXO				
IgG 阴性	14	14	14	100%
阳性	24	23	0	96%
IgM 阴性	16	16	16	100%
阳性	18	17	0	94%
CMV				
IgG 阴性	18	18	18	100%
阳性	24	23	0	96%
IgM 阴性	22	22	22	100%
阳性	17	16	0	94%
Rubella				
IgG 阴性	12	12	12	100%
阳性	24	23	0	96%
IgM 阴性	11	11	11	100%
阳性	21	20	0	95%

HSV-1

IgG 阴性	18	18	18	100%
阳性	46	45	0	98%
IgM 阴性	21	21	21	100%
阳性	35	34	0	97%

HSV-2

IgG 阴性	16	16	16	100%
阳性	54	53	0	98%
IgM 阴性	19	19	19	100%
阳性	34	33	0	97%

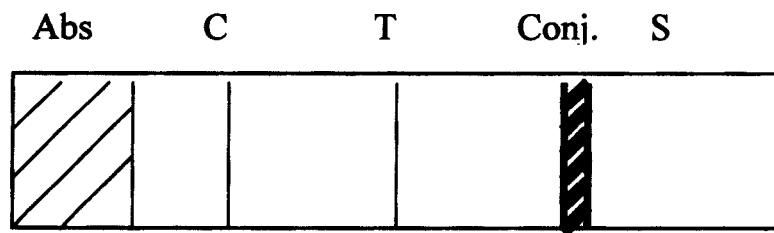


图 1

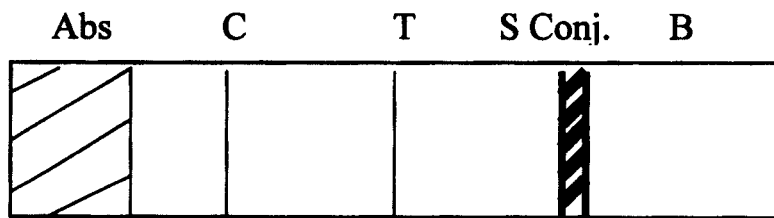


图 2

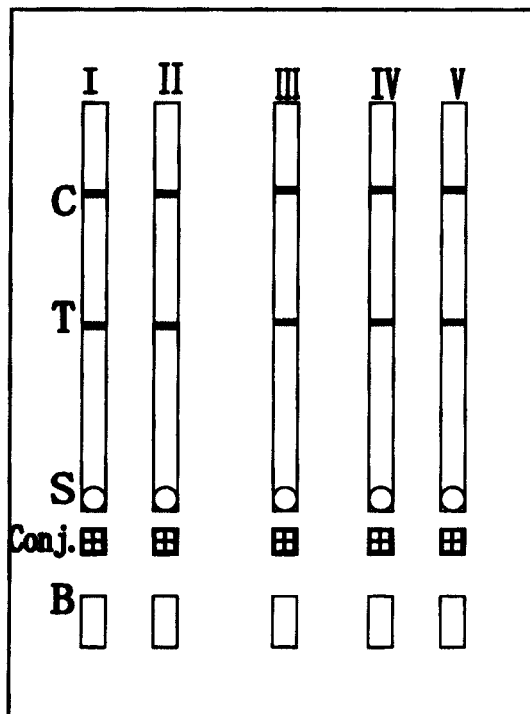


图 3

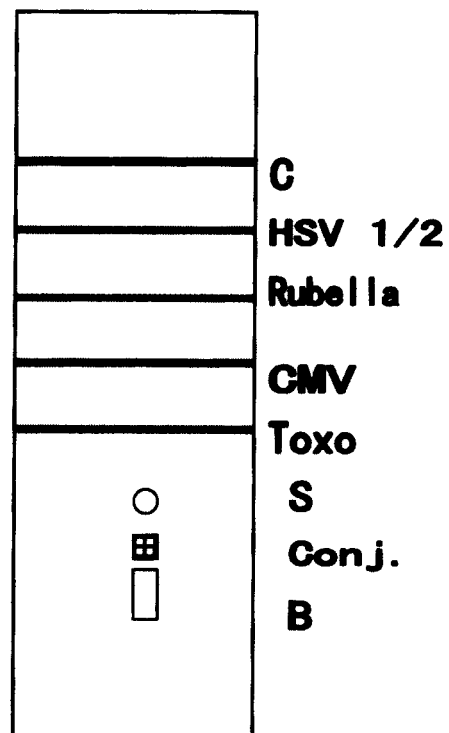


图 4

专利名称(译)	逆型胶体金免疫层析试剂条及其应用		
公开(公告)号	CN1265198C	公开(公告)日	2006-07-19
申请号	CN03142460.0	申请日	2003-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	卢氏实验公司		
申请(专利权)人(译)	卢氏实验公司		
当前申请(专利权)人(译)	卢氏实验公司		
[标]发明人	卢惟钊		
发明人	卢惟钊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
其他公开文献	CN1553193A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种逆型胶体金免疫层析试剂条，其特点是待测样品的加样点位于固相胶体金标记结合物的前沿，从而改变了传统金标免疫检测的反应步骤，大大降低了样品中非特异性IgG/IgM的干扰，提高了试剂条的检测灵敏度。该试剂条可有效地进行TORCH抗体的检测。

