



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102213717 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 201010140652. 7

(22) 申请日 2010. 04. 02

(71) 申请人 王立莉

地址 100049 北京市海淀区田村前街 139 号

(72) 发明人 王立莉

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 韩蕾

(51) Int. Cl.

G01N 33/538 (2006. 01)

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/78 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

免疫纳米粒子层析测定方法及实施该方法的装置

(57) 摘要

本发明提供了一种免疫纳米粒子层析测定方法,该方法包括步骤:提供一层析柱,该层析柱设置有上段加样区、中段活性区以及下段排液区,所述中段活性区内填充有助于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂;将待测样品从加样区加入所述层析柱,并流经所述活性区;然后将悬浮有纳米粒子的溶液从所述加样区加入层析柱,并流经所述活性区,其中所述纳米粒子披覆有能与所述待测物质相结合的物质。本发明还提供了用于实施所述方法的装置,该装置包括至少一所述的层析柱。应用本发明的技术操作便捷,灵敏度高,且可一次测定多项指标。

1. 一种免疫纳米粒子层析测定方法,该方法包括步骤:

提供一层析柱;该层析柱设置有上段加样区、中段活性区以及下段排液区,所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂;

将待测样品从加样区加入所述层析柱,并流经所述活性区;

然后将悬浮有纳米粒子的溶液从所述加样区加入层析柱,并流经所述活性区;其中所述纳米粒子披覆有能与所述待测物质相结合的物质。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述层析柱上段加样区到中段活性区通过缩径结构连接,所述中段活性区到下段排液区通过缩径结构连接,所述层析柱上段加样区内径6~10mm、高8~14mm,中段活性区内径2~4mm、高6~10mm,下段排液区内径1~2mm、高2~4mm,上段加样区过度到中段活性区的缩径结构部分高3~5mm,中段活性区过度到下段排液区的缩径结构部分高2~4mm。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述层析柱中段的上下两端嵌有与层析柱中段的上下两端端口内径大小一致的多孔圆片,用以固定活性区的免疫吸附剂。

4. 根据权利要求1或2或3所述的方法,其中,所述层析柱设有将该层析柱与另一层析柱叠加串接的结构;优选的,在所述层析柱上段柱体外侧设有外螺纹,该层析柱上段柱体的下端向下延伸出环绕在该层析柱本体外的筒体结构,且该延伸出的筒体结构设有内螺纹,该延伸出的筒体结构的内螺纹能与另一层析柱上段柱体外侧的外螺纹螺接而实现两个层析柱的串联,且串联后上面的层析柱的底端高于下面的层析柱的活性区的上端。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述层析柱中段活性区分为多个区带,分别填充有用于捕捉固定不同待测物质的免疫吸附剂,各区带之间设有无活性的隔离层。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述纳米粒子为非化学方法标记的发光纳米粒子或有色纳米粒子。

7. 根据权利要求1或6所述的方法,该方法还包括:

在将悬浮有纳米粒子的溶液从所述加样区加入层析柱并流经所述活性区后,根据层析柱活性区内颜色变化或荧光变化对样品中待测物质进行定性或定量分析。

8. 根据权利要求1或6所述的方法,该方法还包括:

增加流经所述活性区的待测样品量,或重复加入待测样品及悬浮有纳米粒子的溶液的步骤,根据层析柱活性区内颜色变化或荧光变化对样品中待测物质进行定性或定量分析。

9. 一种用于实施权利要求1~8任一项所述方法的装置,该装置包括至少一个所述的层析柱,所述层析柱设置有上段加样区、中段活性区以及下段排液区,所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂。

10. 根据权利要求9所述的装置,该装置为试剂盒,该试剂盒包括:

多个所述的层析柱;

阴性对照、阳性对照试剂和/或校准试剂;

纳米金溶液;以及

洗液。

免疫纳米粒子层析测定方法及实施该方法的装置

技术领域

[0001] 本发明是关于一种免疫分析方法及实施该方法的装置,具体是关于一种应用不用化学方法标记的纳米技术和免疫层析技术相结合的免疫纳米粒子层析测定方法,以及实施该方法的层析柱。

背景技术

[0002] 现在用于超微量的免疫分析方法有放射免疫分析、酶联免疫分析、荧光免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、化学发光免疫分析等,这些分析方法均需要将抗体或抗原通过化学方法标记上相应的产生特殊信号的物质(例如碘-125、辣根过氧化物酶、荧光素、稀土元素、化学发光物等)。该操作比较麻烦。而且,所述标记物在免疫分析过程中,既是免疫试剂而直接参与免疫反应,又携带产生特殊信号的物质,是超微量免疫测定中的关键物质,其质量一旦受到影响,就会给试剂盒的质量带来十分不利的效果,甚至导致失败,而在化学法标记过程中,通常要经过氧化、还原等化学反应的作用,有的还要受到辐射损伤(放射性同位素标记),这些过程会对抗体或抗原的免疫特性造成一定程度的损害,这必然会降低了检测试剂盒的质量。

[0003] 近年来发展起来的斑点免疫金渗滤测定法(金标免疫渗滤法, Dot Immunogold Filtration Assay, DIGFA)虽然简化了操作方法,缩短了反应时间,操作快速简便,但由于“斑点”量微的局限性,其检测灵敏度仍未达到理想水平。

[0004] 而且,上述的免疫分析方法一次实验均只能检测一个项目或指标。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的在于针对现有免疫分析方法所存在的不足,研究提供一种新的免疫分析方法,以在简化操作步骤的同时提高检测灵敏度。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种操作快速简便且检测灵敏度高的免疫分析方法,并实现通过一次实验检测多项指标。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种实施所述的免疫分析方法的装置。

[0008] 首先,本发明提供了一种免疫分析方法,其是一种将纳米技术和免疫层析技术相结合的超敏免疫分析方法,可称为免疫纳米粒子层析测定(Immunonanoparticles chromatographic assay, INCA)方法。

[0009] 根据本发明的具体实施方案,本发明提供的免疫纳米粒子层析测定方法包括步骤:

[0010] 提供一层析柱;该层析柱设置有上段加样区、中段活性区以及下段排液区,所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂;

[0011] 将待测样品从加样区加入所述层析柱,并流经所述活性区;

[0012] 然后将悬浮有纳米粒子的溶液从所述加样区加入层析柱,并流经所述活性区;其中所述纳米粒子披覆有能与所述待测物质相结合的物质。

[0013] 另一方面,本发明还提供了一种用于实施所述方法的装置,该装置包括至少一个层析柱,该层析柱设置有上段加样区、中段活性区以及下段排液区,所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂。

[0014] 本发明的免疫纳米粒子层析测定方法,是结合运用了纳米技术和免疫层析技术,该方法检测灵敏度高。

[0015] 本发明中,层析柱设计的结构特点是具有巨大的免疫浓缩(immunoconcentration)效应。根据本发明的具体实施方案,本发明的免疫纳米粒子层析测定方法中,所述层析柱上段加样区到中段活性区通过缩径结构连接,所述中段活性区到下段排液区通过缩径结构连接,所述层析柱上段加样区内径6~10mm、高8~14mm,中段内径2~4mm、高6~10mm,下段内径1~2mm、高2~4mm,上段加样区过度到中段活性区的缩径结构部分高3~5mm,中段活性区过度到下段排液区的缩径结构部分高2~4mm;中段细而长的填充有足够量的特定免疫吸附剂的活性区,可以有效地将待测样品中相应的抗体或抗原捕获、浓缩、集聚,而进行测定;下段主要是用于排出剩余物(废液),孔径细小有控制流速的作用。

[0016] 根据本发明的具体实施方案,本发明中,所述层析柱中段的上下两端还可设有与层析柱中段的上下两端端口内径大小一致的多孔圆片,用以固定活性区的免疫吸附剂,可以理解该多孔圆片在保证具有足够支撑强度的同时其厚度应越薄越好,最好不超过1.5mm,优选在1mm以下;另外,在层析柱上、下端均可设置有弹性胶质封口帽,便于密封和抽真空,利于保存。

[0017] 根据本发明的具体实施方案,本发明中,所述层析柱的活性区结构可有多种形式,只要具有浓缩、集聚效果并有足够容量即可,浓缩、集聚作用是把极稀的被测物集中在一起,足够容量是保障所捕获的被测物的量能被检测出来,例如可把活性区做成无封闭孔的多孔圆柱体、方形柱体、一定厚度的圆片或方片、圆球、椭圆体等或填充无封闭孔的多孔(塑料)海绵、微球、烧结的玻璃砂、纤维素(微晶、薄膜等)、葡聚糖、琼脂糖……等等,凡可用于物理或化学方法制备免疫吸附剂的材料均可用于加工层析柱的活性区。

[0018] 根据本发明的具体实施方案,本发明的免疫纳米粒子层析测定方法中,所述纳米粒子可以为发光纳米粒子,也可以是有色纳米粒子。

[0019] 根据本发明的具体实施方案,本发明的免疫纳米粒子层析测定方法还包括:在将悬浮有纳米粒子的溶液从所述加样区加入层析柱并流经所述活性区后,根据层析柱活性区内颜色变化或荧光变化对样品中待测物质进行定性或定量分析。

[0020] 根据本发明的具体实施方案,本发明的免疫纳米粒子层析测定方法还包括:增加流经所述活性区的待测样品量,根据层析柱活性区内颜色变化或荧光变化对样品中待测物质进行定性或定量分析。

[0021] 利用本发明的包含层析柱的装置进行免疫纳米粒子层析测定方法,测定原理主要可应用各种免疫法如夹心法、竞争法等。

[0022] 例如,根据本发明的一具体实施方案,是应用夹心法测定原理测定样品中的乙型肝炎病毒前S1抗原(HBV Pre S1Ag)。该实施方案中,是在层析柱的活性区填充足够量的包被有HBV Pre S1Ab(S1抗体)的免疫吸附剂,加入待测样品后,当待测样品流经活性区时,如果待测样品中含有HBV Pre S1Ag,该HBV Pre S1Ag会与活性区内的其抗体结合而被固定

下来 ;然后加入携带有发光纳米粒子 (如荧光纳米粒子) 的 Anti-HBs, 其流经活性区时会与固定在抗体上的 S1 抗原结合, 形成带有荧光的免疫复合物 ;没有结合的发光纳米粒子经洗液洗涤而分离, 通过测定荧光强度即可判定所测样品中是否存在 S1 抗原。显然, 样品中抗原含量与荧光强度呈正相关, 据此可以将所测结果与用已知浓度的校准品进行比较, 可定量测定样品中的 HBV Pre S1Ag 含量 ;也可以将校准品换成阴性、阳性对照品, 可做定性测定。

[0023] 再如, 根据本发明的另一具体实施方案, 是采用间接法即采用二抗的夹心法测定样品中的抗巨细胞病毒 IgG 抗体 (Anti-CMV[IgG])。该实施方案中, 是在活性区填充足够量的包被有 CMV 抗原的免疫吸附剂, 当待测样品加进层析柱后, 样品流过包被有抗原的活性区, 若样品中存在有 Anti-CMV(IgG), 其将会与其抗原结合而被固定下来 ;然后加入携带有发光纳米粒子 (如荧光纳米粒子) 的 Anti-IgG(人), 与固定在抗原上的 IgG 结合, 形成带有荧光的免疫复合物 ;没有结合的荧光粒子, 经洗涤而除去 ;测定荧光强度即可判定血清样品中是否存在相应抗体。显然, 样品中抗原含量与荧光强度呈正相关, 据此可以将所测结果与用已知浓度的校准品进行比较, 可定量测定样品中的抗体的含量 ;也可以将校准品换成阴性、阳性对照品, 可做定性测定。

[0024] 上述应用夹心法测定原理的方案在实际测定时, 如果待测样品中待测物质含量微小, 只需要几次加样, 即重复加被测样品、发光纳米粒子和洗液的步骤, 即可直接测量荧光信号, 省去了传统的温育和分离程序。

[0025] 根据本发明的另一具体实施方案, 是以测定样品中的游离甲状腺素 (FT4) 为例来说明本发明中应用竞争法测定原理的具体操作。该实施方案中, 是在活性区填充足够量的包被有 Anti-T4(鼠单克隆抗体) 的免疫吸附剂, 当待测样品加进层析柱后, 样品流过包被有抗体的活性区, 样品中的 FT4 将会与其抗体结合而被固定下来, 然后加入携带有足够量的发光纳米粒子 (如荧光纳米粒子) 的 Anti-IgG(鼠), 与免疫吸附剂上剩余的抗体结合, 形成带有荧光的免疫复合物 ;没有结合的荧光粒子, 经洗涤而除去 ;测定荧光强度即可判定样品中 FT4 的浓度。显然, 样品中 FT4 含量与荧光强度呈负相关, 据此与已知浓度的校准品比较, 可定量测知样品中 FT4 的含量。该方法在实际测定中也可设计成根据需要几次加样, 即重复加被测样品、发光纳米粒子和洗液的方案, 测量荧光信号。

[0026] 根据本发明的具体实施方案, 所述的发光纳米粒子可以用有色纳米粒子替代。用人眼观察层析柱活性区内颜色变化判定结果, 即可对样品中待测物质进行定性或定量分析。有色纳米粒子可根据需要或嗜好选择不同的颜色。例如, 根据人眼对光色彩的最敏感部位在 490nm 及 590nm 附近和色差分辨特性, 当用透明或半透明物做固相载体时, 通常选用 (草) 绿色、青色、橙黄色、红色等纳米粒子 (如纳米陶瓷、纳米氧化镍、纳米金等) 更敏感 ;当用白色物做固相载体时, 以黑色纳米粒子 (如纳米银、铜、铁等) 较佳 (色差分辨)。

[0027] 根据本发明的具体实施方案, 本发明的免疫纳米粒子层析测定方法, 可以一次实验检测多项指标。除了不能一次测定一种抗原及相对应的抗体之外, 都可以根据需要组合成多层达到一次测定多项指标的目的。

[0028] 应用本发明的方法一次实验检测多项指标时, 可以是将所述层析柱中段活性区分为多个区带, 分别填充有助于捕捉固定不同待测物质的免疫吸附剂, 各区带之间设有无活性的隔离层。以利用本发明的包含层析柱的装置一次实验检测 Torch5 项抗体指标为

例,该方案中,所述层析柱活性区分为 5 个区带,每个区带检测 1 个项目(1 项指标),由上往下依次为测定 Anti-CMV(IgG)、Anti-HSV-I(IgG)、Anti-HSV-II(IgG)、Anti-RV(IgG) 和 Anti-TOXO(IgG),第一区带的填充物包被有 CMV,第二区带的填充物包被有 HSV-I,第三区带的填充物包被有 HSV-II,第四区带的填充物包被有 RV,第五区带的填充物包被有 TOXO;各区带之间设有无活性的隔离层,以便观察结果。该方案中,可以根据检测需要适当加长整体活性区的长度。测定时各区带的抗原分别与相应的抗体结合。以采用间接法(采用二抗的夹心法为例,实际测定方法可分两步进行:加样品流过层析柱;洗涤后加粘附有纳米粒子的二抗流过层析柱,洗涤后观察层析柱各区带的颜色判定结果。具体地,当待测样品加进层析柱后,样品依次流过包被有抗原的 5 个区带,若样品中存在有相对应的抗体,将会与各自的抗原结合而被固定下来;然后加入携带有色纳米粒子(如纳米氧化镍粒子)的 Anti-IgG(人),与固定在抗原上的 IgG 结合,形成(草)绿色免疫复合物;没有结合的有色粒子,经洗涤而分离;用人眼观察各区带的颜色即可判定所测样品中是否存在相应抗体。显然,样品中的某种抗体越多,结合上的二抗就越多,因而结合上去的(草)绿色粒子就越多,即色带颜色越深、越长,也就是说,样品中抗体含量与形成的色带颜色的深度和长度呈正相关,据此与已知浓度的校准品进行比较,原则上也可用色谱扫描定量测知样品中抗体的含量。

[0029] 根据本发明的一个优选的具体实施方案,也可以是将所述层析柱下部设有将该层析柱与另一层析柱叠加串接的结构,通过多个串接的层析柱进行一次实验测定多个项目。所述的将一层析柱与另一层析柱叠加串接的结构可以是卡扣结构或者是螺接结构;例如,优选的,所述层析柱上段柱体的下端向下延伸出环绕在该层析柱本体外的筒体结构(可以参考图 1 所示,所述筒体结构环绕在上段加样区过度到中段活性区的缩径结构外),且该延伸出的筒体结构设有内螺纹,该延伸出的筒体结构的内螺纹能与另一层析柱上段柱体外表侧的外螺纹螺接而实现两个层析柱的串联,且串联后上面的层析柱的底端高于下面的层析柱的活性区的上端(即,保证按流体流向处于上游的层析柱的底端不接触到处于较下游层析柱的活性区)。其中,所述的螺接结构也可设置成相应的卡扣结构。

[0030] 根据本发明的具体实施方案,本发明的用于实施免疫纳米粒子层析测定方法的装置为一种试剂盒,该试剂盒包括:多个所述的层析柱;阴性对照、阳性对照试剂和/或校准试剂;纳米金;以及相应的洗液。

[0031] 根据本发明的具体实施方案,实际应用中设计成各个单独的又可叠加(串联)的层析柱,可根据使用者需要任意组合成多项进行一次测定,测定更加方便。

[0032] 综上所述,本发明主要是应用特殊设计的免疫层析柱,将免疫层析技术和发光纳米技术结合,在测定过程中产生被测物的浓缩和集中,同时非化学标记的有色纳米粒子或发光纳米粒子取代化学方法的标记,大大提高了检测装置如试剂盒的技术指标,大大地提高了检测灵敏度,本发明的免疫纳米粒子层析测定方法为目前最敏感的免疫分析方法,操作快速简便,并且可一次测定多个项目指标,归纳本发明的主要有益效果优势包括:

[0033] 1. 本发明不用化学法标记免疫活性物质(如抗体、抗原等),免除了这些化学过程,完好的保存了参与免疫反应物质(抗体、抗原)的免疫反应结合活性。本发明中,纳米颗粒与抗体或抗原靠物理作用而形成结合物,不会破坏抗体或抗原原有的免疫结合活性,层析柱的检测质量不会受到损害,灵敏度和特异性均可得到最好的保护。

[0034] 2. 本发明的最大优势是极大地提高了检测灵敏度。在免疫测定中,灵敏度是重要技术指标,高灵敏度是至关重要的,尤其是对于传染性的病毒类感染的检测更是如此。如医疗用血源筛查就希望一个不漏地去除感染有致病物的血源,希望全部剔除感染有致病物的血源,以杜绝输血等感染。本发明的层析柱,设计成具有浓缩和集聚被测物质的功能。当样品液流经活性区带的时候,由于活性区带很细(狭窄)而长,无论样品中的被测物如何稀少,每一个经过的物体(如病毒抗原)都有机会与固定在固相载体上的活性成分(特异抗体)相接触,从而被捕获,由于层析柱的浓缩、集聚效应,使极度分散的被测物集中在一起而显现出来。若因被测物十分稀少而捕获的数量不足以观察到时,可以按需要适当增加样品量,直至被捕获的物质积累到能检出为止。这不仅有利于检出极低含量的物质,同时也可减少其他方法经常出现的难以判定的处于“灰区”的样品,用本法测定一旦出现“灰区”样品,即可用加大样品量来进一步确认。应用本发明的装置和方法,理论上可以无限制的提高检测灵敏度,比免疫芯片、ELISA 和斑点免疫金渗滤测定法要高出数十倍,可以与现有各种复杂的超敏免疫检测系统比美。

[0035] 3. 应用本发明的技术,可以将检测装置如试剂盒中的所用关键试剂(抗体、抗原等)制备成层析柱后,能保存试剂原来所处的环境,有利于保存,增加了稳定性。

[0036] 4. 本发明中,由于不需要制备标记物,省去了在试剂盒生产中最繁杂、最难以控制的工序,降低了检测装置的制备难度,这既避免了昂贵的原料的损耗,降低了生产成本,也减少了劳动和时间,更重要的是提高了检测装置如试剂盒的质量。

[0037] 5. 应用本发明的层析柱及免疫检测方法,只需要向层析柱里加样品和洗涤液,而且也不要求加液量十分准确,更无须操作复杂的仪器,比使用方便,且免疫测定中不用温育、分离过程而达到温育、分离效果。

[0038] 6. 本发明的层析柱可设计为可串接的式样,可一次实验测定多项指标,比预先把检测项目固定死的免疫检测芯片优越,一是灵敏度高,二是应用灵活,可以根据需要随意叠加组合层析柱进行一次多项测定。

[0039] 7. 本发明的层析柱通过免疫浓缩作用,使存在于样品中的被测物如某种抗原与固相载体上的对应抗体有零距离接触机会,大大缩短了抗原抗体结合反应的时间,检测快速,整个检测可在几分钟内完成。

[0040] 8. 本发明的检测装置如试剂盒比常规免疫检测试剂盒简单,省去了底物系统等试剂组分,检测时也不用检测仪器,也不消耗能源,堪称“绿色”试剂,既安全、环保又降低了检测成本。

附图说明

[0041] 图 1 为本发明的免疫纳米粒子层析柱的结构示意图。

具体实施方式

[0042] 下面通过具体实施例进一步详细说明本发明的技术方案,但本发明并不因此而受到任何限制。各实施例中所用试剂均可直接购买获得,例如所述的抗原、抗体(包括纳米金标记抗体)等可以购自洛阳的华美、军科院等公司,或者也可按照现有技术的记载自行制备获得。

[0043] 实施例 1、测定样品中 HBsAg 指标

[0044] 1. 试剂组成

[0045] 系列校准品,各 1 瓶;

[0046] 测定 HBsAg 层析柱,准备多支例如 50 支(根据需要也可以是 100 支等);每支层析柱的结构请参见图 1 所示,该层析柱设置有上段加样区 11、中段活性区 12(所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂)以及下段排液区 13 共三段圆筒状,所述上段加样区 11 到中段活性区 12 通过第一缩径结构 14 连接,所述中段活性区 12 到下段排液区 13 通过第二缩径结构 15 连接;上段内径约为 8mm,高约 8mm;中段内径 2mm,高 10mm,上段过度到中段的缩径部分高约 4mm,中段过度到下段的缩径部分高约 3mm;下段内径 1mm,高 2mm;中段的上下两端嵌有与对应处层析柱内径大小一致的多孔圆片 16、17(中段下端口的多孔圆片 17 直径可比上端口的多孔圆片 16 的直径略小),用以固定活性区的免疫吸附剂,层析柱上下端均可设有封口帽 18、19(用于密封保存之用,使用层析柱时应摘下封口帽);

[0047] 荧光纳米粒子(被覆有 Anti-HBs),1 瓶;

[0048] 浓缩洗液,1 瓶。

[0049] 2. 测定程序

[0050] (1). 取下层析柱上下封口帽,设校准品和样品层析柱;

[0051] (2). 各自层析柱中加校准品、样品 200 μ l,待样品液流过层析柱活性区带后,加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0052] (3). 各管加荧光纳米粒子 100 μ l,待样品液流过层析柱活性区带后,同上洗孔;

[0053] (4). 用专用荧光测定仪测量各柱的荧光强度。

[0054] 3. 结果判定

[0055] (1). 按 $\log(\text{dose}) \sim \log(B-B_0)$ 做出校准品的剂量-反应曲线,要求相关系数 $r > 0.9900$,实验可靠;

[0056] (2). 从剂量-反应曲线求出被测样品的 HBsAg 浓度;

[0057] (3). 正常值参考:正常人血清 $< 0.05 \text{ IU/ml}$ 。

[0058] 实施例 2、测定样品中 TSH 指标

[0059] 1. 试剂组成

[0060] 系列校准品,各 1 瓶;

[0061] 测定 TSH 层析柱(其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外,层析柱的具体结构同实施例 1),50 或 100 支;

[0062] 荧光纳米粒子(被覆有 Anti-TSH),1 瓶;

[0063] 浓缩洗液,1 瓶。

[0064] 2. 测定程序

[0065] (1). 取下层析柱上下封口帽,设校准品和样品层析柱;

[0066] (2). 各自层析柱中加校准品、样品 200 μ l,待样品液流过层析柱活性区带后,加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0067] (3). 各管加荧光纳米粒子 100 μ l,待样品液流过层析柱活性区带后,同上洗孔;

[0068] (4). 用专用荧光测定仪测量各柱的荧光强度。

[0069] 3. 结果判定

- [0070] (1). 按 $\log(\text{dose}) \sim \log(B-B_0)$ 做出校准品的剂量 - 反应曲线, 要求相关系数 $r > 0.9900$, 实验可靠;
- [0071] (2). 从剂量 - 反应曲线求出被测样品的 TSH 浓度;
- [0072] (3). 正常值参考: 正常人血清 $0.46 \sim 4.68 \text{ mIU/L}$ 。
- [0073] 实施例 3、测定样品中肿瘤标志物 AFP 指标
- [0074] 1. 试剂组成
- [0075] 系列校准品, 各 1 瓶;
- [0076] 测定 AFP 层析柱 (其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外, 层析柱的具体结构同实施例 1), 50 或 100 支;
- [0077] 荧光纳米粒子 (被覆有 Anti-AFP), 1 瓶;
- [0078] 浓缩洗液, 1 瓶。
- [0079] 2. 测定程序
- [0080] (1). 取下层析柱上下封口帽, 设校准品和样品层析柱;
- [0081] (2). 各自层析柱中加校准品、样品 $200 \mu\text{L}$, 待样品液流过层析柱活性区带后, 加稀释后的洗液 $500 \mu\text{L}$ 洗管;
- [0082] (3). 各管加荧光纳米粒子 $100 \mu\text{L}$, 待样品液流过层析柱活性区带后, 同上洗孔;
- [0083] (4). 用专用荧光测定仪测量各柱的荧光强度。
- [0084] 3. 结果判定
- [0085] (1). 按 $\log(\text{dose}) \sim \log(B-B_0)$ 做出校准品的剂量 - 反应曲线, 要求相关系数 $r > 0.9900$, 实验可靠;
- [0086] (2). 从剂量 - 反应曲线求出被测样品的 AFP 浓度;
- [0087] (3). 正常值参考: 正常人血清 $< 20 \text{ ng/ml}$ 。
- [0088] 实施例 4、测定样品中 FT4 指标
- [0089] 1. 试剂组成
- [0090] 系列校准品, 各 1 瓶;
- [0091] 测定 FT4 层析柱 (其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外, 层析柱的具体结构同实施例 1), 50 或 100 支;
- [0092] 荧光纳米粒子 (被覆有 T4), 1 瓶;
- [0093] 浓缩洗液, 1 瓶。
- [0094] 2. 测定程序
- [0095] (1). 取下层析柱上下封口帽, 设校准品和样品层析柱;
- [0096] (2). 各自层析柱中加校准品、样品 $200 \mu\text{L}$, 待样品液流过层析柱活性区带后, 加稀释后的洗液 $500 \mu\text{L}$ 洗管;
- [0097] (3). 各管加荧光纳米粒子 $100 \mu\text{L}$, 待样品液流过层析柱活性区带后, 同上洗孔;
- [0098] (4) 用专用荧光测定仪测量各柱的荧光强度。
- [0099] 3. 结果判定
- [0100] (1). 按 $\log(\text{dose}) \sim \text{logit}(B/B_0)$ 做出校准品的剂量 - 反应曲线, 要求相关系数 $|r| > 0.9900$, 实验可靠;
- [0101] (2). 从剂量 - 反应曲线求出被测样品的 FT4 浓度;

[0102] (3). 正常值参考 : 正常人血清 10 ~ 28. 2pmol/L。

[0103] 实施例 5、测定样品中 Anti-HIV 指标

[0104] 1. 试剂组成

[0105] 阴、阳性对照, 各 1 瓶 ;

[0106] 测定 Anti-HIV 层析柱 (其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外, 层析柱的具体结构同实施例 1), 50 或 100 支 ;

[0107] 荧光纳米粒子 (被覆有 HIV 抗原), 1 瓶 ;

[0108] 浓缩洗液, 1 瓶。

[0109] 2. 测定程序

[0110] (1). 取下层析柱上下封口帽, 设空白、对照和样品层析柱 ;

[0111] (2). 各自层析柱中加洗液、对照、样品 200 μ l, 待样品液流过层析柱活性区带后, 加稀释后的洗液 500 μ l 洗管 ;

[0112] (3). 各管加荧光纳米粒子 100 μ l, 待样品液流过层析柱活性区带后, 同上洗孔 ;

[0113] (4). 用专用荧光测定仪测量各柱的荧光强度。

[0114] 3. 结果判定

[0115] (1). 各柱的 RLU 值减去空白柱 RLU 值, 求出阴性对照柱的平均 RLU 值 ; $P/N > 5$ 时, 实验可靠 ;

[0116] (2). cutoff 值 = 阴性对照柱的平均 RLU 值 $\times 2.1$;

[0117] (3). 正常人血清 $RLU < \text{cutoff}$ 值。

[0118] 实施例 6、一次实验测定样品中 HBsAg 和 HBeAg 两项指标

[0119] 1. 试剂盒组成

[0120] 1. 1. 阴、阳性对照, 各 1 瓶 ;

[0121] 1. 2. 测定 HBsAg 和 HBeAg 层析柱, 各 50 或 100 支 ;

[0122] 1. 3. 纳米金 (分别被覆有 Anti-HBs 和 Anti-HBe), 各 1 瓶 ;

[0123] 1. 4. 浓缩洗液, 1 瓶。

[0124] 2. 试剂盒制备

[0125] 2. 1. 层析柱的制备

[0126] 2. 1. 1. 层析柱的基本结构

[0127] 每支层析柱的结构请参见图 1 所示, 该层析柱设置有上段加样区 11、中段活性区 12 (所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂) 以及下段排液区 13, 所述上段加样区 11 到中段活性区 12 通过第一缩径结构 14 连接, 所述中段活性区 12 到下段排液区 13 通过第二缩径结构 15 连接 ; 上段内径约为 10mm, 高约 12mm ; 中段内径 4mm, 高 6mm, 第一缩径部分高约 4mm, 第二缩径部分高约 3mm ; 下段内径 1mm, 高 2mm ; 中段的上下两端设有与对应处层析柱内径大小一致的多孔圆片 16、17, 用以固定活性区的免疫吸附剂, 层析柱上下端均可设有封口帽 18、19 ; 所述层析柱上段柱体 11 的下端向下延伸出环绕在所述第一缩径结构 14 外的筒体结构 20, 且该筒体结构 20 设有内螺纹, 该层析柱的所述筒体结构 20 的内螺纹能与另一层析柱上段柱体外表侧的外螺纹螺接而实现两个层析柱的串联, 且串联后上面的层析柱的底端高于下面的层析柱的活性区的上端。此外, 中段柱体与下段柱体也可设计成分别与其上过度段的缩径结构相互螺接的结构, 方便拆卸清洗。

[0128] 2.1.2. 制备免疫吸附剂 (immunoadsorbents)

[0129] 以透明无色的聚氯乙烯或尼龙微球或聚苯乙烯 ($\phi < 1\text{mm}$) 为载体, 用物理吸附法制备, 微球分别被覆 Anti-HBs 和 Anti-HBe, 除去包被液, 封闭后晾干备用。

[0130] 2.1.3. 装配层析柱

[0131] 将一多孔小圆片放进柱中段底部, 中段加满免疫吸附剂, 嵌入多孔小圆片 (固定牢固), 两端盖好封口帽 (无毒橡胶), 从上帽抽适度真空后, 在上段贴好标签。于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。

[0132] 2.2. 抗体纳米金

[0133] 2.2.1. Anti-HBs 纳米金 (也可商购获得)

[0134] 将 10ml 浓度为 0.1mg/ml 氯金酸溶液加热煮沸, 加入浓度为 10mg/ml 柠檬酸三钠 0.15ml , 用 0.1mol/L HCl 调 pH 至 6.0, 加入 Anti-HBs 0.1mg , 搅拌 10min, 3000r/min 离心 20min, 取上清, 12000r/min 离心 20min, 将沉淀悬于 100ml (调试) 含 1% BSA、 0.2mg/ml NaN₃ 的 PBS 中, 每瓶分装 10ml , 贴好标签后置 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。

[0135] 2.2.2. Anti-HBe 纳米金

[0136] 通 2.2.1 项制备。

[0137] 2.3. 对照品

[0138] 阳性对照含适量 HBsAg 和 HBeAg, 阴性对照为正常人血清和小牛血清混合而成。各按 1ml/瓶 分装。贴好标签后于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。

[0139] 2.4. 浓缩洗液

[0140] 同前。

[0141] 3. 试剂盒使用

[0142] 3.1. 测定程序

[0143] 3.1.1. 取下层析柱上下的封口帽, 每两个层析柱通过所设的螺纹结构串联叠加组成 2 层, 设对照和样品层析柱;

[0144] 3.1.2. 各自层析柱中加对照、样品 $200\mu\text{l}$, 待样品液流过下层层析柱活性区带后, 加稀释后的洗液 $500 \sim 1000\mu\text{l}$ 洗管;

[0145] 3.1.3. 各管加纳米金 4 滴 (约 $200\mu\text{l}$), 待样品液流过下层层析柱活性区带后, 同上洗孔;

[0146] 3.2. 结果判定

[0147] 3.2.1. 阳性对照管显 2 条红色带, 而阴性对照管基本无色, 实验可靠;

[0148] 3.2.2. 显红色带的样品管为阳性, 按区带判定是 HBsAg 和 HBeAg;

[0149] 3.2.3. 根据色带的深浅、长短可做大致定量判定, 色深而长的阳性强。

[0150] 实施例 7、一次实验测定样品中 Anti-HBs、Anti-HBe 和 Anti-HBc 三项指标

[0151] 1. 试剂组成

[0152] 阴、阳性对照, 各 1 瓶;

[0153] 测定 Anti-HBs、Anti-HBe 和 Anti-HBc 层析柱 (其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外, 层析柱的具体结构同实施例 6), 50 或 100 套 (每套为 3 个层析柱);

[0154] 纳米氧化镍 (被覆有二抗), 1 瓶;

[0155] 浓缩洗液,1 瓶。

[0156] 2. 测定程序

[0157] (1). 取下层析柱上下封口帽,每三个层析柱通过所设的螺纹结构叠加成 3 层的层析柱作为一套,设对照和样品层析柱;

[0158] (2). 各自层析柱中加对照、样品 300 μ l,待样品液流过下层层析柱活性区带后,加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0159] (3). 各管加纳米氧化镍 4 滴(约 200 μ l),待样品液流过下层层析柱活性区带后,同上洗孔(洗管);

[0160] 3. 结果判定

[0161] (1). 阳性对照管显 3 条草绿色带,而阴性对照管基本无色,实验可靠;

[0162] (2). 显草绿色带的样品管为阳性,按区带判定是哪种抗体阳性;

[0163] (3). 根据色带的深浅、长短可做大致定量判定,色深而长的阳性强。

[0164] 实施例 8、一次实验测定样品中 Torch 5 项 IgM 抗体指标

[0165] 1. 试剂组成

[0166] 阴、阳性对照,各 1 瓶;

[0167] 测定 IgM Anti-CMV、Anti-HSV-I、Anti-HSV-II、Anti-RV 和 Anti-TOXO 层析柱(其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外,层析柱的具体结构同实施例 6),50 或 100 套;

[0168] 纳米金(被覆有抗人 IgM 抗体),1 瓶;

[0169] 浓缩洗液,1 瓶。

[0170] 2. 测定程序

[0171] (1). 取下层析柱上下封口帽,每 5 个层析柱通过所设的螺纹结构叠加成 5 层的层析柱作为一套,设对照和样品层析柱;

[0172] (2). 各自层析柱中加对照、样品 500 μ l,待样品液流过从上数第 4 层层析柱活性区带后,即可加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0173] (3). 各管加纳米金 6 滴(约 300 μ l),待样品液流过从上数第 4 层层析柱活性区带后,即可同上洗孔;

[0174] 3. 结果判定

[0175] (1). 阳性对照管显 5 条红色带,而阴性对照管基本无色,实验可靠;

[0176] (2). 显红色带的样品管为阳性,按区带判定是哪种抗体阳性;

[0177] (3). 根据色带的深浅、长短可做大致定量判定,色深而长的阳性强。

[0178] 实施例 9、一次实验测定样品中不孕 7 项 IgG 抗体指标

[0179] 1. 试剂组成

[0180] 阴、阳性对照,各 1 瓶;

[0181] 测定 ACA、AEA、AOA、ASA、ATA、AZP 和 HCG-Ab 层析柱(其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外,层析柱的具体结构同实施例 6),50 或 100 套;

[0182] 纳米陶瓷(被覆有抗人 IgG 抗体或 SPA),1 瓶;

[0183] 浓缩洗液,1 瓶。

[0184] 2. 测定程序

[0185] (1). 取下层析柱上下封口帽,每 7 个层析柱通过所设的螺纹结构叠加成 7 层的层析柱作为一套,设对照和样品层析柱;

[0186] (2). 各自层析柱中加对照、样品 500 μ l,待样品液流过从上游数第 5 层层析柱活性区带后,即可加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0187] (3). 各管加纳米陶瓷 8 滴(约 400 μ l),待样品液流过从上游数第 5 层层析柱活性区带后,即可同上洗孔;

[0188] 3. 结果判定

[0189] (1). 阳性对照管显 7 条绿色带,而阴性对照管基本无色,实验可靠;

[0190] (2). 显绿色带的样品管为阳性,按区带判定是哪种抗体阳性;

[0191] (3). 根据色带的深浅、长短可做大致定量判定,色深而长的阳性强。

[0192] 实施例 10、一次实验测定样品中性病相关的 6 项 IgG 抗体指标

[0193] 1. 试剂组成

[0194] 阴、阳性对照,各 1 瓶;

[0195] 测定 Anti-CP、Anti-CT、Anti-MG、Anti-MH、Anti-MP 和 Anti-UU 层析柱(其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外,层析柱的具体结构同实施例 6),50 或 100 套;

[0196] 纳米金(被覆有抗人 IgG 抗体或 SPA),1 瓶;

[0197] 浓缩洗液,1 瓶。

[0198] 2. 测定程序

[0199] (1). 取下层析柱上下封口帽,每 6 个层析柱通过所设的螺纹结构叠加成 6 层的层析柱作为一套,设对照和样品层析柱;

[0200] (2). 各自层析柱中加对照、样品 500 μ l,待样品液流过从上游数第 4 层层析柱活性区带后,即可加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0201] (3). 各管加纳米金 8 滴(约 400 μ l),待样品液流过从上游数第 4 层层析柱活性区带后,同上洗孔;

[0202] 3. 结果判定

[0203] (1). 阳性对照管显 6 条红色带,而阴性对照管基本无色,实验可靠;

[0204] (2). 显红色带的样品管为阳性,按区带判定是哪种抗体阳性;

[0205] (3). 根据色带的深浅、长短可做大致定量判定,色深而长的阳性强。

[0206] 实施例 11、一次实验测定样品中血源筛查相关的 4 项指标

[0207] 1. 试剂组成

[0208] 阴、阳性对照,各 1 瓶;

[0209] 测定 HBsAg、Anti-HCV、Anti-HIV 和 Anti-TP 层析柱(其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外,层析柱的具体结构同实施例 6),50 或 100 套;

[0210] 纳米金(被覆有 Anti-HBs 和抗人 IgG、IgM 抗体),1 瓶;

[0211] 浓缩洗液,1 瓶。

[0212] 2. 测定程序

[0213] (1). 取下层析柱上下封口帽,每 4 个层析柱通过所述的螺纹结构叠加成 4 层的层析柱作为一套,设对照和样品层析柱;

[0214] (2). 各自层析柱中加对照、样品 500 μ l, 待样品液流过从上游数第 3 层层析柱活性区带后, 即可加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0215] (3). 各管加纳米金 6 滴 (约 300 μ l), 待样品液流过从上游数第 3 层层析柱活性区带后, 同上洗孔;

[0216] 3. 结果判定

[0217] (1). 阳性对照管显 4 条红色带, 而阴性对照管基本无色, 实验可靠;

[0218] (2). 显红色带的样品管为阳性, 按区带判定是哪种阳性;

[0219] (3). 根据色带的深浅、长短可做大致定量判定, 色深而长的阳性强。

[0220] 实施例 12、一次实验测定样品中肿瘤筛查相关的多项标志物 (如 AFP、CEA、PSA 等 3 项指标)

[0221] 1. 试剂组成

[0222] 阴、阳性对照, 各 1 瓶;

[0223] 测定 AFP、CEA、PSA 层析柱 (其中除所述中段活性区内填充的具体免疫吸附剂不同外, 层析柱的具体结构同实施例 6), 50 或 100 套;

[0224] 纳米金 (被覆有 Anti-AFP、Anti-CEA 和 Anti-PSA), 1 瓶;

[0225] 浓缩洗液, 1 瓶。

[0226] 2. 测定程序

[0227] (1). 取下层析柱上下封口帽, 每 3 个层析柱通过所述的螺纹结构串联叠加成 3 层的层析柱作为一套, 设对照和样品层析柱;

[0228] (2). 各自层析柱中加对照、样品 200 μ l, 待样品液流过第 2 层层析柱活性区带后, 即可加稀释后的洗液 500 μ l 洗管;

[0229] (3). 各管加纳米金 4 滴 (约 200 μ l), 待样品液流过第 2 层层析柱区带后, 同上洗孔;

[0230] 3. 结果判定

[0231] (1). 阳性对照管显 3 条红色带, 而阴性对照管基本无色, 实验可靠;

[0232] (2). 红色带比阳性对照管深或长的样品管为阳性, 按区带判定是哪种阳性;

[0233] (3). 色带深而长的阳性强。

[0234] 注: 阳性对照须严格控制, 其浓度值应为临界值; 加样品时, 对照品与样品的量应一样。

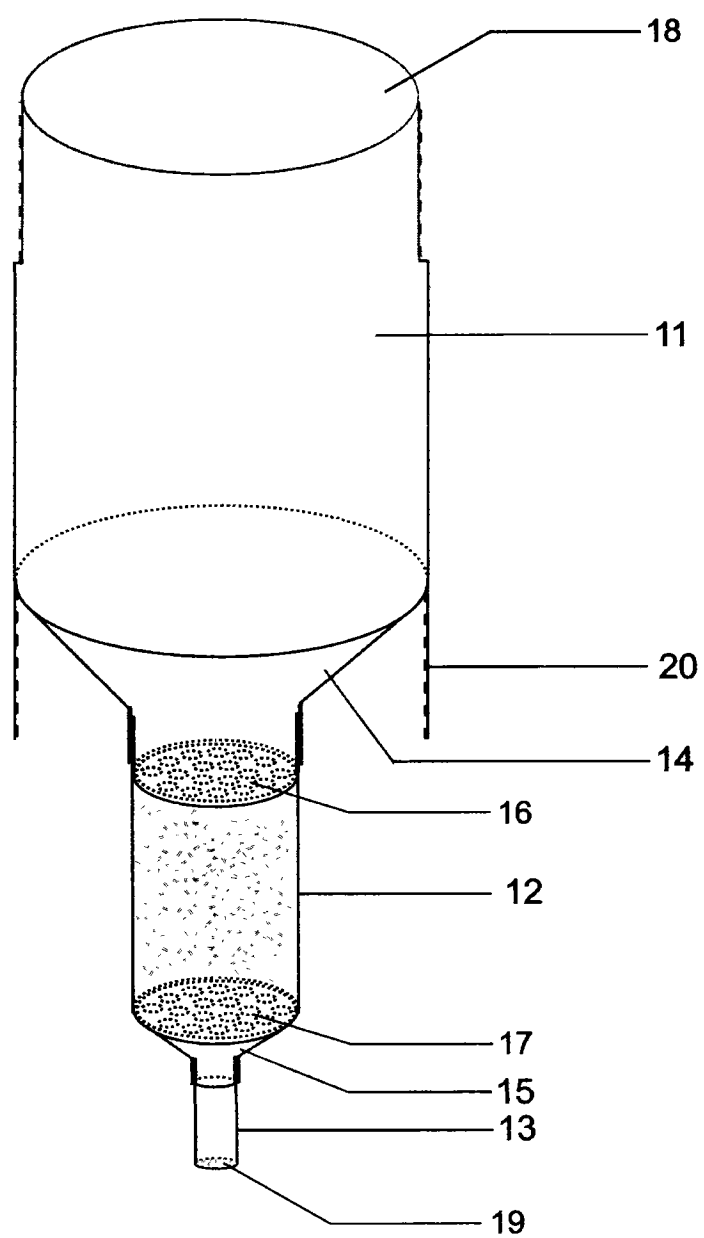


图 1

专利名称(译)	免疫纳米粒子层析测定方法及实施该方法的装置		
公开(公告)号	CN102213717A	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	CN201010140652.7	申请日	2010-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	王立莉		
申请(专利权)人(译)	王立莉		
当前申请(专利权)人(译)	王立莉		
[标]发明人	王立莉		
发明人	王立莉		
IPC分类号	G01N33/538 G01N33/576 G01N33/569 G01N33/78		
代理人(译)	韩蕾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫纳米粒子层析测定方法，该方法包括步骤：提供一层析柱，该层析柱设置上有段加样区、中段活性区以及下段排液区，所述中段活性区内填充有用于捕捉固定待测物质的免疫吸附剂；将待测样品从加样区加入所述层析柱，并流经所述活性区；然后将悬浮有纳米粒子的溶液从所述加样区加入层析柱，并流经所述活性区，其中所述纳米粒子披覆有能与所述待测物质相结合的物质。本发明还提供了用于实施所述方法的装置，该装置包括至少一所述的层析柱。应用本发明的技术操作便捷，灵敏度高，且可一次测定多项指标。

