

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531

G01N 33/558

G01N 33/543



[12] 实用新型专利说明书

[21] ZL 专利号 03233158.4

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 2718581Y

[22] 申请日 2003.2.11 [21] 申请号 03233158.4

[73] 专利权人 云南大学

地址 650091 云南省昆明市翠湖北路 52 号

(云南大学生命科学院马岚收)

共同专利权人 昆明云大生物技术有限公司

马 岚

[72] 设计人 马 岚

[74] 专利代理机构 昆明正原专利代理有限责任公
司

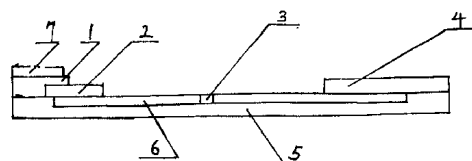
代理人 赛晓刚

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称 一种免疫层析质控标准试纸

[57] 摘要

本实用新型为保证用户能够尽可能得到可靠的测定结果,设计一种免疫层析质控标准试纸。本实用新型在常规免疫层析检测试纸的吸水垫中增加一层预先含有一定量的相应抗原或抗体物质的样品膜层(抗原膜或抗体膜),这样当该试纸吸水段浸入液体中时,抗原或抗体样品膜中的抗原或抗体便会随着水液上升,当上升到试纸膜上的检测线抗体或抗原区域时,便发生抗原-抗体的特异性结合,同时显色。使用这种试纸条作为检测试纸,使可能影响试纸质量和测定过程的多个因素同时得到控制,达到一举两得。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种免疫层析质控标准试纸，包括有底板（5）、吸样品垫（1）、硝酸纤维素膜层（6）、胶体金膜层（2）、吸水垫（4）和抗原或抗体样品膜层（7），在底板（5）上固定有一段吸水膜，构成吸水垫（4），其特征是硝酸纤维素膜层（6）中部喷有抗体 2 或抗原 2，构成检测相应抗原或抗体的检测线（3），在吸样品垫（1）与硝酸纤维素膜层（6）之间夹有胶体金膜层（2），胶体金膜层（2）中含有抗体 1 或抗原 1 与标记物制成的标记探针，在吸样品垫（1）上覆盖一层抗原膜或抗体样品膜层（7）。

2、根据权利要求 1 所述的一种免疫层析质控标准试纸，其特征在于检测线（3）位于试纸中部。

一种免疫层析质控标准试纸

技术领域：本实用新型为保证用户能够尽可能得到可靠的测定结果，发明一种免疫层析质控标准试纸。

背景技术：各种免疫层析检测试纸，如金标检测试纸在临床检验中具有广泛的应用。该类试纸利用免疫层析一步法原理和标记抗体或抗原进行制备，通过抗原--抗体的特异性反应，用于临床检测，成为临床检验中正在兴起的第三代产品。目前国际市场上用于临床检验的已有上百余种，国内也有十几种。由于免疫层析检测试纸具有直观、快速、操作简便、经济等特点，使之易于推广和使用。但由于免疫层析试纸主要采用生物原料和生物方法制备，较易受到外界因素的影响，由此影响到测定结果的准确性和有效性。目前世界上许多免疫层析试纸均是采用设立控制线（Control Line）的方法来进行试纸的质控。其原理是在样品检测试纸上同时喷一条可以识别与胶体金等标记物相偶连的抗体或者抗原并能与之结合的检测抗体作为控制线，测定中当该线不显色时则认为试纸失效或检测失败，但由于控制线上所采用的抗体是只识别与胶体金等标记物相偶连的抗体或抗原并能与之结合的抗体，因此该控制线只能检测胶体金等标记物的显色是否失效，而对检测抗原的抗体或检测抗体的抗原是否失效，以及检测中最为关键的抗原与抗体的结合情况则无法检测。

发明内容：本实用新型通过新的思想和新设计方式，发明一种既能够检测金标等标记颗粒、偶联抗体或抗原的质量，抗体或抗原与标记颗粒的偶联情况，又能测定检测抗原或抗体的好坏，以及抗原-抗体的结合情况，同时还可将质控标准试纸条的质控显色色带的颜色深浅作为定量的标准，即可通过将样品测试的色带颜色与之相互比较，就可以对测定样品中的抗原或者抗体量进行定量测定或进行定量判断一种免疫层析质控检测试纸条。使用这种试纸条作为检测试纸，使可能影响试纸质量和测定过程的多个因素同时得到控制，达到一举两得的一种免疫层析质控标准试纸

及其应用方法。

本实用新型免疫层析质控标准试纸结构组成和设计原理是：包括有底板、吸样品垫、硝酸纤维素膜层、胶体金膜、吸水垫和抗原或抗体样品膜层，在底版上固定有一段吸水膜，构成吸水垫的一种新型免疫层析质控标准试纸，其特征是在硝酸纤维素膜层中部喷涂有一段抗体 2 或抗原 2，构成检测相应抗原或抗体的检测线，在吸样品垫与硝酸纤维素膜层之间夹有胶体金膜层，胶体金膜层中含有抗体 1 或抗原 1 与标记物制成的标记探针，在吸样品垫上覆盖一层抗原膜或抗体样品膜层；试纸中部有一条检测线。当标记物-抗体 1 或标记物-抗原 1 出现偶联解开或者抗体 1 或抗原 1 失效或者检测线区域的抗体 2 或抗原 2 失效时，检测线不能显色；当抗原或抗体样品膜上所给予的抗原量或抗体量确定，检测时间确定时，如测定的结果有效，则其显色的颜色深浅可以作为定量的标准使用，在相同测定条件下，可将样品试纸测试的结果与质控标准试纸的显色色带进行颜色深浅的比较，就可以对测定样品中的抗原量或抗体量进行测定，临床检测中可通过控制抗原膜或抗体样品膜上所给予的抗原或抗体量及检测时间，将该检测线的显色控制在有意义的显色数值上，以判断阴性或阳性结果；通过在吸样品膜上增加一层抗原样品膜可制成用于通过抗体检测样品中抗原量的免疫层析试纸条的质控和测定，通过增加一层抗体样品膜可制成用于通过抗原检测样品中抗体量的免疫层析试纸条的质控和测定；所设计制造的免疫层析质控试纸不受标记物种类的限制，能在使用不同标记物标记制造的免疫层析检测试纸中应用；检测时所实用新型的质控试纸可采用干净水（蒸馏水或纯净水），或者配制的与检测样品所使用缓冲液相一致的液体来进行检测。

本实用新型试纸结构组成和设计原理：在常规免疫层析检测试纸的吸水垫中增加一层预先含有一定量的相应抗原或抗体物质的样品膜层（抗原膜或抗体膜），这样当该试纸吸水段浸入液体中时，抗原或抗体样品膜中的抗原或抗体便会随着水液上升，当上升到试纸膜上的检测线抗体或抗原区域时，便发生抗原-抗体的特异性结

合，同时显色。其设计原理：普通金标等标记免疫层析检测试纸在试纸上同时设定控制线（Control Line）用于试纸的质控，测定中当该线不显色时则认为试纸失效或检测失败。但由于控制线采用的抗体或抗原是只识别与胶体金等标记物相互偶连的抗体或抗原并与之结合，因此该控制线只能检测胶体金探针等标记物是否失效。经过改进后，质控标准纸条上采用的是识别检测抗原或抗体并与之特异性结合的抗体或抗原，当该新型免疫层析质控标准试纸插入液体样品时，由于毛细管作用，水液将沿试纸条向上移动，通过吸水垫中预先放置的抗原或抗体膜层时，水液将带着抗原或抗体一起先向前移动，先与金标等标记颗粒偶联的抗体或抗原结合，继续向前移动到检测区域时，抗原或抗体被检测区域的抗体或抗原识别，于是停留下来，形成三明治夹心结合，同时与之相互连接的金标等标记颗粒显色。

本实用新型采用标记抗体测定抗原免疫层析检测试纸质控试纸测定原理。其中

▲：检测抗原；●：标记物颗粒。

●—抗体 1：标记物颗粒与抗体 1 相互偶联，其中抗体 1 可识别抗原“▲”并与之结合

抗体 2：该抗体喷在检测线区域，它可识别检测抗原“▲”的另一位点，并与之结合

●—抗体 1-▲-抗体 2：标记物颗粒-抗体 1、抗体 2 与抗原“▲”形成三明治结合，同时标记物颗粒聚集起来并显色

抗体 3：该抗体喷在检测试纸控制线区域，可识别抗体 1，并与之结合

●—抗体 1-抗体 3：抗体 3 可识别抗体 1 并与之结合，同时偶联在抗体 1 上的标记物颗粒聚集起来并显色

●—抗体 1-▲-抗体 3：抗体 3 识别抗体 1 并与之结合，同时偶联在抗体 1 上的标记物颗粒聚集起来并显色

A、 常规免疫检测试纸控制线的测定原理

常规免疫检测试纸控制线处所采用的抗体 3 可识别抗体 1，并与之结合而显色，但由于抗体 3 是针对抗体 1 来进行设计的，因此只能检测抗体 1 和标记物的质量，而不能检测到抗体 2 的质量。显色深浅(标记物颗粒聚集的多少)与样品中抗原“▲”的含量多少无关，因此其颜色深浅不能用于作为判断检测抗原量的标准。

●—抗体 1 + 抗体 3 → ●—抗体 1-抗体 3

B、 新实用新型的新型质控标准试纸的测定原理

▲ + ●—抗体 1 → ●—抗体 1-▲ (1)

● —抗体 1-▲ + 抗体 2 → ●—抗体 1-▲-抗体 2..... (2)

设计中不需要抗体 3，而能够直接检测到抗体 1、标记物、抗体 2 的质量，同时能够检测到它们的结合。显色深浅(胶体金颗粒聚集的多少)与所结合抗原“▲”的量有直接的线性关系，因此其颜色深浅可直接反应抗原的多少。

本实用新型采用标记抗原测定抗体免疫层析检测试纸质控试纸测定原理。其中

◆：检测抗体； ●： 标记物颗粒

●—抗原 1：标记物颗粒与抗原 1 相互偶联，抗原 1 可识别抗体“◆”并与之结合

抗原 2：该抗原喷在检测区域，它可识别抗体“◆”的另一位点并与之结合

●—抗原 1-◆-抗原 2：标记物颗粒-抗原 1、抗原 2 与抗体“◆”形成三明治结合，同时标记物颗粒聚集起来并显色

抗体 3：该抗体喷在控制线区域，它可识别抗原 1，并与之结合

● —抗原 1-抗体 3：抗原 3 可识别抗原 1 并与之结合，同时偶联在抗原 1 上的标记物颗粒聚集起来并显色

●—抗原 1-◆-抗体 3： 抗体 3 识别与抗体“◆”结合的抗原 1，并形成三明治结合，同时偶联在抗原 1 上的标记物颗粒聚集起来并显色

A、 常规免疫检测试纸控制线的测定原理

常规免疫检测试纸控制线处所采用的抗体 3 可识别抗原 1，并与之结合而显色，但由于抗体 3 是针对抗原 1 来进行设计的，因此只能检测抗原 1 和标记物的质量，而不能检测到抗原 2 的质量。显色深浅(标记物颗粒聚集的多少)与样品中抗体“▲”的含量多少无关，因此其颜色深浅不能用于作为判断检测抗原量的标准。

●—抗原 1 + 抗体 3 → ●—抗原 1-抗体 3

B、 新实用新型的新型质控标准试纸的测定原理

◆+ ●—抗原 1 → ●—抗原 1-◆ (1)

● —抗原 1-◆ + 抗原 2 → ●—抗原 1-◆-抗原 2..... (2)

设计中不需要抗体 3，而直接能够检测到抗原 1、标记物、抗原 2 的质量，同时能够检测到它们的结合。显色深浅(胶体金等标记颗粒聚集的多少)与所结合抗体“◆”的量有直接的线性关系，因此其颜色深浅可直接反应检测抗体量的多少。

附图说明：图 1 为本实用新型免疫层析质控标准试纸的纵向剖视图。

图 2 为使用本实用新型免疫层析质控标准试纸，测定结果无效时的示意图。

图 3 为使用本实用新型免疫层析质控标准试纸，测定结果有效时的示意图。

具体实施方式：1、采用标记抗体测定样品中抗原的质控试纸条的制备方法是：采用与制备同种常规层析检测试纸相同的制备方法和原料制备试纸条，不同的是，在制备质控检测试纸条时需要在样品垫覆盖一层预先经过处理，并含有一定量的与检测抗原相同的抗原，再行包装。

2、采用标记抗原测定样品中抗体的质控试纸条的制备方法是：采用与制备同种常规层析检测试纸相同的制备方法和原料制备试纸条，不同的是，在制备质控检测试纸条时需要在样品垫覆盖一层预先经过处理，并含有一定量的与检测抗体相同的抗体，再行包装。

实施例：1、早早孕（HCG）金标检测质控试纸

(1)、制造方法：选用与制造早早孕（HCG）金标检测试纸相同的两种抗 HCG

(绒毛膜促性腺激素) 抗体 1 和抗体 2; 将抗体 1 与标记物颗粒——胶体金相互偶联, 制备抗体 1-胶体金标记探针, 并预先将一定量的抗体 2 喷在硝酸纤维素膜的一定区域, 形成一条检测线; 选取长 100 毫米、宽 80 毫米、厚 1 毫米的 PVC 塑料为底版, 通过双面胶先在中间贴长为 100 毫米、宽 30 毫米的已喷有一条检测线的硝酸纤维素膜, 再在硝酸纤维素膜的上部贴长为 100 毫米、宽为 30 毫米的吸水物(如滤纸等), 构成吸水层; 在硝酸纤维素膜的另一端粘贴胶体金的膜层, 其中含有制备的抗体 1-胶体金标记偶联探针; 在胶体金膜层上粘贴吸样品膜, 然后再在吸样品膜上粘贴含有一定量 HCG 的抗原膜; 粘贴完毕后, 将其切成 80 毫米长, 2.5 毫米宽的试纸条, 包装即可。

(2)、应用实施例: a、在试管或烧杯中放入少量蒸馏水或纯净水, 或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液。将用上述方法制造的早早孕(HCG)金标检测试制质控试纸条的吸样品端插入上述蒸馏水或纯净水中, 保持 15 秒后取出平放, 10 分钟后观察结果, 检测线处有正常色带显现, 说明检测试纸质量可靠, 试纸检测结果有效。将用同样方法检测样品液后的检测试纸的检测线与上述试纸的检测先作对比: (1)、检测试纸的检测线色带深于质控试纸条的色带, 检测结果为阳性; (2)、检测试纸的检测线色带浅于质控试纸条的色带, 检测结果为阴性;

b、试管或烧杯中放入少量蒸馏水或纯净水, 或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液。将用上述方法制造的早早孕(HCG)金标检测试制质控试纸条的吸样品端插入上述蒸馏水或纯净水中, 保持 15 秒后取出平放, 10 分钟后观察结果, 检测线处无正常色带显现, 说明试纸质量有问题, 样品检测试纸检测的结果无效。

c、取少量蒸馏水或纯净水, 或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液, 将以上液体直接滴在用上述方法制造的早早孕(HCG)金标检测试制质控试纸条的吸样品端后平放, 15 分钟后观察结果, 检测线处有正常色带显现, 说明检测试纸质量可靠, 试纸检测结果有效。将用同样方法检测样品液后的检测试纸的检测线与上述试纸的

检测先作对比：(1)、检测试纸的检测线色带深于质控试纸条的色带，检测结果为阳性；(2)、检测试纸的检测线色带浅于质控试纸条的色带，检测结果为阴性。

d、取量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液，将以上液体直接滴在用上述方法制造的早早孕（HCG）金标检测试制质控试纸条的吸样品端后平放，15 分钟后观察结果，检测线处无正常色带显现，说明试纸质量有问题，样品检测试纸检测的结果无效。

实施例：2、排卵（LH）金标检测质控试纸

(1)、制造方法：选用与制造排卵（LH）金标检测试纸相同的两种抗 LH（促黄体生成素）抗体 1 和抗体 2；将抗体 1 与标记物颗粒——胶体金相互偶联，制备抗体 1-胶体金标记探针，并预先将一定量的抗体 2 喷在硝酸纤维素膜的一定区域，形成一条检测线；选取长 100 毫米、宽 80 毫米、厚 1 毫米的 PVC 塑料为底版，通过双面胶先在中间贴长为 100 毫米、宽 30 毫米的已喷有一条检测线的硝酸纤维素膜，再在硝酸纤维素膜的上部贴长为 100 毫米、宽为 30 毫米的吸水膜（如滤纸等），构成吸水垫；在硝酸纤维素膜的另一端粘贴胶体金的膜层，其中含有制备的抗体 1-胶体金标记偶联探针；在胶体金膜层上粘贴吸样品垫，然后再在吸样品垫上粘贴含有一定量 LH 抗原的样品膜；粘贴完毕后，将其切成 80 毫米长，2.5 毫米宽的试纸条，包装即可。

(2)、应用实施例：a、在试管或烧杯中放入少量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液。将用上述方法制造的排卵（LH）金标检测试纸质控试纸条的吸样品端插入上述蒸馏水或纯净水中，保持 15 秒后取出平放，10 分钟后观察结果，检测线处有正常色带显现，说明检测试纸质量可靠，试纸检测结果有效。将用同样方法检测样品液后的检测试纸的检测线与上述试纸的检测先作对比：(1)、检测试纸的检测线色带深于质控试纸条的色带，检测结果为阳性；(2)、检测试纸的检测线色带浅于质控试纸条的色带，检测结果为阴性。

b、在试管或烧杯中放入少量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液。将用上述方法制造的排卵（LH）金标检测试纸质控试纸条的吸样品端插入上述蒸馏水或纯净水中，保持 15 秒后取出平放，10 分钟后观察结果，检测线处无正常色带显现，说明试纸质量有问题，样品检测试纸检测的结果无效。

c、取少量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液，将以上液体直接滴在用上述方法制造的排卵（LH）金标检测试纸质控试纸条的吸样品端后平放，15 分钟后观察结果，检测线处有正常色带显现，说明检测试纸质量可靠，试纸检测结果有效。将用同样方法检测样品液后的检测试纸的检测线与上述试纸的检测先做对比：（1）、检测试纸的检测线色带深于质控试纸条的色带，检测结果为阳性；（2）、检测试纸的检测线色带浅于质控试纸条的色带，检测结果为阴性。

d、取量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液，将以上液体直接滴在用上述方法制造的排卵（LH）金标检测试纸质控试纸条的吸样品端后平放，15 分钟后观察结果，检测线处无正常色带显现，说明试纸质量有问题，样品检测试纸检测的结果无效。

实施例：3、乙肝表面抗体金标检测质控试纸

（1）、制造方法：选用与制造乙肝表面抗体金标检测试纸相同的两种抗乙肝表面抗体抗原 1 和抗原 2；将抗原 1 与标记物颗粒——胶体金相互偶联，制备抗原 1-胶体金标记探针，并预先将一定量的抗原 2 喷在硝酸纤维素膜的一定区域，形成一条检测线；选取长 100 毫米、宽 80 毫米、厚 1 毫米的 PVC 塑料为底版，通过双面胶先在中间贴长为 100 毫米、宽 30 毫米的已喷有一条检测线的硝酸纤维素膜，再在硝酸纤维素膜的上部贴长为 100 毫米、宽为 30 毫米的吸水物（如滤纸等），构成吸水层；在硝酸纤维素膜的另一端粘贴胶体金的膜层，其中含有制备的抗原 1-胶体金标记偶联探针；在胶体金膜层上粘贴吸样品膜，然后再在吸样品膜上粘贴含有一定量乙肝表面抗体的抗体膜；粘贴完毕后，将其切成 80 毫米长，2.5 毫米宽的试纸

条，包装即可。

(2)、应用实施例：a、在试管或烧杯中放入少量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液。将用上述方法制造的乙肝表面抗体金标检测试纸质控试纸条的吸样品端插入上述蒸馏水或纯净水中，保持 15 秒后取出平放，10 分钟后观察结果，检测线处有正常色带显现，说明检测试纸质量可靠，试纸检测结果有效。将用同样方法检测样品液后的检测试纸的检测线与上述试纸的检测先做对比：

(1)、检测试纸的检测线色带深于质控试纸条的色带，检测结果为阳性；(2)、检测试纸的检测线色带浅于质控试纸条的色带，检测结果为阴性；

b、在试管或烧杯中放入少量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液。将用上述方法制造的乙肝表面抗体金标检测试纸质控试纸条的吸样品端插入上述蒸馏水或纯净水中，保持 15 秒后取出平放，10 分钟后观察结果，检测线处无正常色带显现，说明试纸质量有问题，样品检测试纸检测的结果无效。

c、取少量蒸馏水或纯净水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液，将以上液体直接滴在用上述方法制造的乙肝表面抗体金标检测试纸质控试纸条的吸样品端后平放，15 分钟后观察结果，检测线处有正常色带显现，说明检测试纸质量可靠，试纸检测结果有效。将用同样方法检测样品液后的检测试纸的检测线与上述试纸的检测先做对比：(1)、检测试纸的检测线色带深于质控试纸条的色带，检测结果为阳性；(2)、检测试纸的检测线色带浅于质控试纸条的色带，检测结果为阴性。

d、取少量蒸馏水或纯水，或者少量 0.01M、PH7.4 的 PBS 缓冲液，将上述缓冲液直接滴在用上述方法制造的乙肝表面抗体金标检测质控试纸条的吸样品窗后平放，15 分钟后观察结果，检测线处无正常色带显现，说明试纸质量有问题，样品检测试纸检测的结果无效。

1—吸样品垫；2—胶体金膜层；3—检测线；4—吸水层；5—底板；6—硝酸纤维素膜层；7—样品膜层。

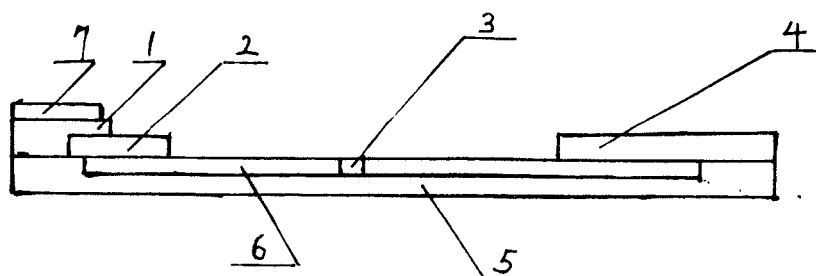


图 1

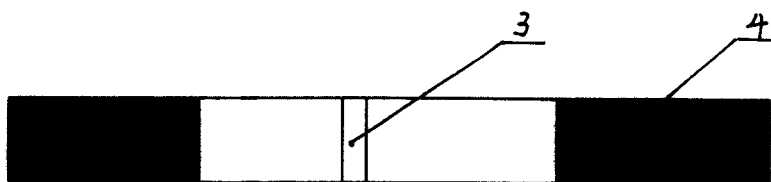


图 2

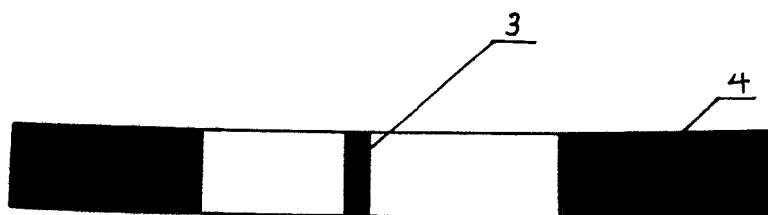


图 3

专利名称(译)	一种免疫层析质控标准试纸		
公开(公告)号	CN2718581Y	公开(公告)日	2005-08-17
申请号	CN03233158.4	申请日	2003-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	云南大学 昆明云大生物技术有限公司 马岚		
申请(专利权)人(译)	云南大学 昆明云大生物技术有限公司 马岚		
当前申请(专利权)人(译)	云南大学 昆明云大生物技术有限公司 马岚		
[标]发明人	马岚		
发明人	马岚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型为保证用户能够尽可能得到可靠的测定结果，设计一种免疫层析质控标准试纸。本实用新型在常规免疫层析检测试纸的吸水垫中增加一层预先含有一定量的相应抗原或抗体物质的样品膜层(抗原膜或抗体膜)，这样当该试纸吸水段浸入液体中时，抗原或抗体样品膜中的抗原或抗体便会随着水液上升，当上升到试纸膜上的检测线抗体或抗原区域时，便发生抗原 - 抗体的特异性结合，同时显色。使用这种试纸条作为检测试纸，使可能影响试纸质量和测定过程的多个因素同时得到控制，达到一举两得。

