

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/558

G01N 33/577

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00119792.4

[43]公开日 2002 年 3 月 20 日

[11]公开号 CN 1340710A

[22]申请日 2000.8.29 [21]申请号 00119792.4

[71]申请人 上海正源生命技术有限公司

地址 200030 上海市漕溪北路 18 号上海实业大厦
14 - A 座

[72]发明人 范培昌 石 锋

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 常 明

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 应用室温玻化技生产室温稳定的免疫层析试条

[57]摘要

本发明涉及一种应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条,其生产工艺包括第一步,检出区带的包被;第二步,质控区带的包被;第三步,封阻与玻化,把喷有检出区带和质控区带的硝酸纤维素膜,于室温干燥 1 小时后放入加有玻化液和防腐剂的封阻剂中封阻 3 小时,再置于室温玻化机内进行玻化;第四步,可动金标抗体区带群的喷涂;第五步,试条在局部去湿柜中的装配。本发明通过室温玻化技术使包被于试条上的抗体玻璃化,以保证试条能在室温下稳定。本发明的试条用于诊断检测,使用简便、灵敏、直观、快速且实用。

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

权 利 要 求 书

1. 一种应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条，其生产工艺包括下列步骤：

第一步，检出区带的包被：

把针对引发某种疾病，或因患某种疾病始产生或增或减的特有抗原的单克隆抗体，如针对引发疟疾的疟原虫富组蛋白 II 的单克隆抗体，或者针对因患肝癌而大量产生的甲胎蛋白的单克隆抗体，或者针对怀孕而增量的绒毛膜激素的单克隆抗体等，作为包被抗体；把包被抗体灌入点样机1号喷针所连容器；启动点样机，使包被抗体以区带形式喷于硝酸纤维素(NC)膜条上，作为检测其相关抗原的检出区带；

第二步，质控区带的包被：

把上述硝酸纤维素膜返回原点，并向上调距，启动点样机上已灌装有抗标记抗体(又名二抗)的2号喷针，使喷成又一区带，作为检测免疫层析试条成品有否发生因室温存放而导致试条上活性分子失活的质控区带；

其特征在于，采取第三步，封阻与玻化：

把第一、二步同时喷有检出区带和质控区带的硝酸纤维素膜，于室温干燥1小时后放入加有玻化液和防腐剂的封阻剂中封阻3小时，再换用只有玻化液和防腐剂的混合物漂洗硝酸纤维素膜两次以上，每次15分钟；置于室温玻化机内，于45℃玻化20分钟；

第四步，可动金标抗体区带群的喷涂：

把上述玻化好的硝酸纤维素膜再放在点样机平台上，并把硝酸纤维素膜调整在上述第一步的原有位置，再向下调距1cm，并在其后涂覆0.25cm宽的釉料，空气干燥；取具有针对同种抗原第二表位的单克隆抗体，经事先纯化和用金溶胶予以标记后，添加玻化液、防腐剂和输送加速液；经混匀后灌装于连接3号喷针的容器中；启动点样机，在釉料表面喷涂成区带；喷毕，把硝酸纤维素膜返回到原点，并向下调距0.05cm后，如前述喷涂成又一区带；如此重复共4次，使成区带间有0.05cm间距的4条金标抗体区带群；点毕，再把硝酸纤维素膜置于室温玻化机中，于45℃玻化20分钟；

第五步，试条在局部去湿柜中的装配：

把第四步玻化好的硝酸纤维素膜，放入设置于10万级净化室(相对湿度为45%)中的局部去湿柜内，其相对湿度已预先自动恒定；然后在该局部去湿柜内进行操作，此时，工作人员实际上是处于相对湿度为45%的净化室中，只有已喷有润肤消毒液并戴有手套的双手插放在相对湿度只有25%的局部去湿柜中；操作时，先用双面胶把硝酸纤维素膜粘贴于长20cm、宽7cm的塑料衬垫中央，在硝酸纤维素膜的上、下两端分别覆上一片强吸水滤纸，并务使两片滤纸皆有0.3cm平整地重叠在硝酸纤维素膜的两端；然后，将上、下二片滤纸表面再分别覆盖一片略大于滤纸的彩色单面胶纸，位于下端的彩色单面胶纸印有此试条插入试样的深度线，用条状压实器压实，务使彩色单面胶纸长出部分平整地粘贴于硝酸纤维素膜表面；最后，把装配好的免疫层析片放入斩切机中斩切成宽0.4cm条，装入附有干燥剂袋的铝箔袋后，用铝箔封口机封口即为成品。

2. 根据权利要求1所述的应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条，其特征在于，所述第四步中涂覆的釉料主成份含40%蔗糖。

说明书

应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条

本发明涉及生物化学和电子自动控湿技术，特别涉及一种应用室温玻化技术生产室温稳定的能快速筛选寄生虫病的免疫层析试条。

当代临床诊断学界，把按免疫层析原理制造的、能在3~5分钟内获得结果的、非专业人员亦能操作的、可实现家庭自测的各种免疫层析法诊断试条，视为继酶联免疫吸附测定法(ELISA)、点印渍法(俗称渗滤法或膜法)之后的第三代产品。从理论上讲，目前上市的数百种第一、二代产品都能改进为第三代产品。为此，世界各国正在竞相研制。迄今为止，国外有30余种免疫层析诊断试条产品已经上市销售。在我国虽有不少相关论文报道，但已获药证、准予上市的仅为数种。究其原因，正如该领域著名的秦晓光教授最近撰文所述，此在于生产条件和制造工艺不合理所造成的试条不稳定性所致(详见中华医学检验杂志，1999，22(6)：325-326)。

组成免疫层析诊断试条的主要成分是抗体，属蛋白质类。通常认为，蛋白质是生物活性物质，需存于冰箱始能保持其活性。为使蛋白质类产品能在室温下稳定，发明人范培昌教授于1997年发明了被上海市科委鉴定为“国际先进、国内首创”的蛋白质类室温玻化技术(鉴定证书号为：沪科鉴：(98)ZR 4277)，并同时申请了“室温玻化机”发明专利(中国发明专利公开号：CN 1216677A)。

在我国，现已把各种免疫层析诊断试条的研制均归属于生物高科技重点发展项目，并规定必须具有10万级以上净化室的生产条件始准生产。发明人范培昌教授在预备实验中发现，净化室内无菌、无尘的环境对试条的质量稳定性固然重要，但净化室内的相对湿度也是影响试条稳定性的重要因素，最好能控制在25%~30%。然而，纵观国内外现在使用的净化室，大多只能把净化室的相对湿度控制在45%~50%以内。少数使用大功率去湿机组的净化室，虽说能把净化室的相对湿度控制到30%，但此湿度对于在室内的工作人员而言已感不适，因此迫使厂方采取每2小时换班一次的非常措施。

鉴于如此，本发明的目的是提供一种应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条，它通过室温玻化技术使包被于试条上的抗体玻璃化，以保证试条能在室温下稳定。

本发明的技术方案如下：

一种应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条，其生产工艺包括下列步骤：

第一步，检出区带的包被：

把针对引发某种疾病，或因患某种疾病始产生或增或减的特有抗原的单克隆抗体，如针对引发疟疾的疟原虫富组蛋白II的单克隆抗体，或者针对因患肝癌而大量产生的甲胎蛋白的单克隆抗体，或者针对怀孕而增量的绒毛膜激素的单克隆抗体等，作为包被抗体；把包被抗体灌入点样机1号喷针所连容器；启动点样机，使包被抗体以区带形式喷于硝酸纤维素(NC)膜条上，作为检测其相关抗原的检出区带；

第二步，质控区带的包被：

把上述硝酸纤维素膜返回原点，并向上调距，启动点样机上已灌装有抗标记抗体(又名二抗)的2号喷针，使喷成又一区带，作为检测免疫层析试条成品有否发生因室温存放而导致试条上活性分子失活的质控区带；

第三步，封阻与玻化：

把第一、二步同时喷有检出区带和质控区带的硝酸纤维素膜，于室温干燥1小时后放入加有玻化液和防腐剂的封阻剂中封阻3小时，再换用只有玻化液和防腐剂的混合物漂洗硝酸纤维素膜两次以上，每次15分钟；置于室温玻化机内，于45℃玻化20分钟；

第四步，可动金标抗体区带群的喷涂：

把上述玻化好的硝酸纤维素膜再放在点样机平台上，并把硝酸纤维素膜调整在上述第一步的原有位置，再向下调距1cm，并在其后涂覆0.25cm宽的釉料，空气干燥；取具有针对同种抗原第二表位的单克隆抗体，经事先纯化和用金溶胶予以标记后，添加玻化液、防腐剂和输送加速液；经混匀后灌装于连接3号喷针的容器中；启动点样机，在釉料表面喷涂成区带；喷毕，把硝酸纤维素膜返回到原点，并向下调距0.05cm后，如前述喷涂成又一区带；如此

重复共4次，使成区带间有0.05cm间距的4条金标抗体区带群；点毕，再把硝酸纤维素膜置于室温玻化机中，于45℃玻化20分钟；

第五步，试条在局部去湿柜中的装配：

把第四步玻化好的硝酸纤维素膜，放入设置于10万级净化室(相对湿度为45%)中的局部去湿柜内，其相对湿度已预先自动恒定；然后在该局部去湿柜内进行操作，此时，工作人员实际上是处于相对湿度为45%的净化室中，只有已喷有润肤消毒液并戴有手套的双手插放在相对湿度只有25%的局部去湿柜中；操作时，先用双面胶把硝酸纤维素膜粘贴于长20cm、宽7cm的塑料衬垫中央，在硝酸纤维素膜的上、下两端分别覆上一片强吸水滤纸，并务使两片滤纸皆有0.3cm平整地重叠在硝酸纤维素膜的两端；然后，将上、下二片滤纸表面再分别覆盖一片略大于滤纸的彩色单面胶纸，位于下端的彩色单面胶纸印有此试条插入试样的深度线，用条状压实器压实，务使彩色单面胶纸长出部分平整地粘贴于硝酸纤维素膜表面；最后，把装配好的免疫层析片放入斩切机中斩切成宽0.4cm条；装入附有干燥剂袋的铝箔袋后，用铝箔封口机封口即为成品。

本发明解决了免疫层析试条在室温存储下稳定性差的问题，通过室温玻化技术使包被于试条上的抗体玻璃化，以保证试条能在室温下稳定。本发明的免疫层析试条用于诊断检测，使用简便、灵敏、直观、快速且实用，其特点可归纳为：

- 1、方法简易，非专业人员亦可操作，适于家庭自测。
- 2、只需微量血样，如指血。
- 3、用肉眼即可直观结果，无需仪器设备，适于野外或现场大规模普查。
- 4、全过程仅需3分钟，确属快速诊断法。

下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

附图是一种应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条的结构示意图。

参看附图，本发明的免疫层析试条上设有检出区带1和质控区带2，在免疫层析试条的下端喷涂有金标抗体区带群3。

本发明应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条，其生产工艺包

括下列步骤：

第一步，检出区带的包被：

把针对引发某种疾病，或因患某种疾病始产生或增、减的特有抗原的单克隆抗体，例如，针对引发疟疾的疟原虫富组蛋白II的单克隆抗体；针对因患肝癌而大量产生的甲胎蛋白的单克隆抗体；针对怀孕而增量的绒毛膜激素的单克隆抗体等等，作为包被抗体。把包被抗体灌入XYZ 3000型点样机(购自美国Bio-Dot公司)1号喷针所连容器内。启动点样机，使包被抗体以区带形式喷于长25cm、宽3cm的硝酸纤维素(NC)膜条距底部2 cm处， 喷量为 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 。此即后述免疫层析试条成品上作为检测其相关抗原的检出区带。

第二步，质控区带的包被：

在完成第一步后，把上述硝酸纤维素膜返回原点，并向上调距0.5cm，启动点样机上已灌装有抗标记抗体(又名二抗)的2号喷针，使喷成又一区带。此带即是后述免疫层析试条成品上作为检测免疫层析试条成品有否发生因室温存放而导致试条上活性分子失活的质控区带。

第三步，封阻与玻化：

把第一、二步同时喷有检出区带和质控区带的硝酸纤维素膜，于室温干燥1小时后放入加有玻化液和防腐剂的封阻剂中封阻3小时，再换用只有玻化液和防腐剂的混合物漂洗硝酸纤维素膜两次以上，每次5分钟。置于室温玻化机内，于 45°C 玻化20分钟。

第四步，可动金标抗体区带群的喷涂：

把上述玻化好的硝酸纤维素膜再放在点样机平台上，并把硝酸纤维素膜调整在上述第一步的原有位置，再向下调距1cm，并在其后涂覆0.25cm宽的釉料，空气干燥。取具有针对同种抗原第二表位的单克隆抗体，经事先纯化和用金溶胶予以标记后，添加玻化液、防腐剂和输送加速液。经混匀后灌装于连接3号喷针的容器中。启动点样机，在釉料表面喷涂成区带。喷毕，把硝酸纤维素膜返回到原点，并向下调距0.05cm后，如前述喷涂成又一区带。如此重复共4次，使成区带间有0.05cm间距的4条金标抗体区带群。点毕，再把硝酸纤维素膜置于室温玻化机中，于 45°C 玻化20分钟。

第五步，试条在局部去湿柜中的装配：

把第四步玻化好的硝酸纤维素膜，放入设置于10万级净化室(相对湿度为45%)中的局部去湿柜内，其相对湿度已预先自动恒定在25%。以下操作皆在该局部去湿柜内进行。此时，工作人员实际上是处于相对湿度为45%净化室中，只有已喷有润肤消毒液并戴有手套的双手插放在相对湿度只有25%的局部去湿柜中。局部去湿柜内设置有CM 4000型层析试条斩切机(购自美国Bio-Dot公司)、压实器和小型铝箔封口机。操作时，先用双面胶把硝酸纤维素膜粘贴在长20cm、宽7cm的塑料衬垫中央，在硝酸纤维素膜的上、下两端分别覆上一片强吸水滤纸，并务使两片滤纸皆有0.3cm平整地重叠在硝酸纤维素膜的两端。然后，将上、下二片滤纸表面再分别覆盖一片略大于滤纸的彩色单面胶纸。位于下端的彩色单面胶纸印有此试条插入试样的深度线，用条状压实器压实，务使彩色单面胶纸长出部分平整地粘于硝酸纤维素膜表面。最后，把装配好的免疫层析片放入斩切机中斩切成宽0.4cm条，装入附有干燥剂袋的铝箔袋后，用铝箔封口机封口即为成品。

本发明现以生产能快速筛选疟疾的免疫层析试条为例：

各单克隆抗体是采用针对恶性疟原虫特有抗原—富组蛋白II (Histidine Rich Protein II; HRP II)作为免疫原制取的。其中，用细胞株M2A10C9生产的单克隆抗体具有针对HRP II中30KD片段的表位，现作为包被抗体；用细胞株M1D7D4生产的单克隆抗体具有针对HRP II中18和30KD片段的两段表位，现作为金标抗体。因这两株单抗皆属IgG亚类，故二抗选用兔抗鼠IgG，以此作为质控区带。此外，经预备实验选取的各最适条件如下：

- 1、单抗最适包被量为 $11.6\mu\text{g}$ 蛋白质/ $10\mu\text{l}$ /cm硝酸纤维素膜。
- 2、单抗结合的最佳缓冲系统为pH值7.5、0.2mol/L磷酸缓冲液。
- 3、封阻剂以采用上海保康公司出品的新型封阻剂为最有效。
- 4、所选硝酸纤维素膜，以平均孔径为 $8\mu\text{m}$ 、展层速度为2cm/min者最好。
- 5、所涂覆的釉料主成份含40%蔗糖。

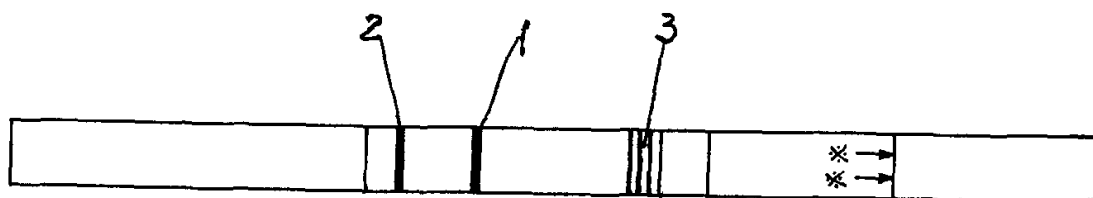
根据以上各实验参数，以及按照上述第一至五步骤操作，即可装配成用于检测疟疾的免疫层析试条成品。鉴于HRP II抗原存在于疟疾患者红细胞膜中，血样需先加入溶胞液后始插入试条。展层约3min即能显现红色区带。能

同时显现质控区带和检出区带者为阳性，只显现质控区带者为阴性。

最后步骤，质检：

为了验证本试条质量，特把采自云南的已用经典镜检法确证过的恶性疟 (*Plasmodium falciparum*) 患者血样 (PF) 57份、间日疟 (*Plasmodium vivax*) 患者血样 (PV) 5份，以及46位健康人滴血，共108人份，分别经随机编号后，用上述生产例子所得试条，在中国预防医学科学院上海寄生虫病研究所专家们监察下进行双盲法检测。其结果是：57份PF血样被检出53份，准确率为93%；5份PV血样被检出5份，准确率为100%。换言之，已用经典镜检法确证过的62名疟疾患者中，被本试条检出58名呈阳性，总准确率为93.54%。此外，用经典镜检法测得仅1个原虫/200镜检视野的血样(原编号：05-11)，试条也显阳性。由此证明，本试条的检出限至少可达1个原虫/200镜检视野，灵敏度极高。46份健康人血样中有8份呈阳性，可惜这些血样是滴血，编号时未记供血者姓名，因此难以追取同种血样镜检确证。尽管如此，就算把此8份计入出错值计算在内，试条特异性也达82.6%。此外，将此试条成品置于37℃恒温箱内达38天后，再测上述阳性血样，结果检出值未变，充分显示了本试条成品的高度稳定性。

说明书附图



专利名称(译)	应用室温玻化技生产室温稳定的免疫层析试条		
公开(公告)号	CN1340710A	公开(公告)日	2002-03-20
申请号	CN00119792.4	申请日	2000-08-29
[标]发明人	范培昌 石锋		
发明人	范培昌 石锋		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	常明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种应用室温玻化技术生产室温稳定的免疫层析试条,其生产工艺包括第一步,检出区带的包被;第二步,质控区带的包被;第三步,封阻与玻化,把喷有检出区带和质控区带的硝酸纤维素膜,于室温干燥1小时后放入加有玻化液和防腐剂的封阻剂中封阻3小时,再置于室温玻化机内进行玻化;第四步,可动金标抗体区带群的喷涂;第五步,试条在局部去湿柜中的装配。本发明通过室温玻化技术使包被于试条上的抗体玻璃化,以保证试条能在室温下稳定。本发明的试条用于诊断检测,使用简便、灵敏、直观、快速且实用。

