



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 206038685 U

(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 201620709049.9

(22)申请日 2016.07.06

(73)专利权人 北京康思润业生物技术有限公司

地址 101300 北京市顺义区仁和镇顺强路1号2幢4层西侧

(72)发明人 王龙

(74)专利代理机构 北京鼎佳达知识产权代理事

务所(普通合伙) 11348

代理人 王伟锋 刘铁生

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

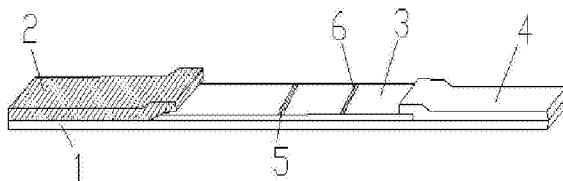
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)实用新型名称

免疫侧向层析检测系统

(57)摘要

本实用新型公开了一种免疫侧向层析检测系统,属于医学领域,所述的检测系统包括底板,其包括近样品端和远样品端;所述的底板上由近样品端到远样品端依次设置有样品垫,所述的样品垫上设置有加样孔,硝酸纤维素膜和吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上设置有质控带和检测带,所述的质控带设置在所述的检测带与样品垫之间;所述的质控带为生物素-亲和素体系或与鼠抗体不同种属的质控体系;所述的硝酸纤维素膜上设置有用来采集数据的观察窗。本实用新型的检测系统具有较高的灵敏度、精密度和准确度。



1. 一种免疫侧向层析检测系统,其特征在于,包括底板,其包括近样品端和远样品端;所述的底板上由近样品端到远样品端依次设置有样品垫,所述的样品垫上设置有加样孔,硝酸纤维素膜和吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上设置有质控带和检测带,所述的质控带设置在所述的检测带与样品垫之间;所述的质控带为生物素-亲和素体系或与鼠抗体不同种属的质控体系;所述的硝酸纤维素膜上设置有用来采集数据的观察窗。

2. 根据权利要求1所述的免疫侧向层析检测系统,其特征在于,所述的样品垫与硝酸纤维素膜之间设置有标记物垫。

3. 根据权利要求1所述的免疫侧向层析检测系统,其特征在于,所述的与鼠抗体不同种属的质控体系采用羊抗鸡IgY包被,鸡IgY标记。

4. 根据权利要求1所述的免疫侧向层析检测系统,其特征在于,所述的生物素-亲和素体系由亲和素或链霉亲和素包被到硝酸纤维素膜上得到。

免疫侧向层析检测系统

技术领域

[0001] 本实用新型涉及医学领域,具体涉及一种免疫侧向层析检测系统。

背景技术

[0002] 免疫侧向层析法其原理是将特异性的抗体(抗原)先固定于硝酸纤维膜的某一区带,当干燥的硝酸纤维膜一端浸入样品(尿液、血清、血浆、全血或其他样品)后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体(抗原)的区域时,样品中相应的抗原(抗体)即与该抗体(抗原)发生特异性结合,若用免疫胶体金可使该区域显示一定的颜色,肉眼观察或用相应的读数仪实现特异性的免疫诊断。若用荧光标记物,需要配套读数仪来完成数据采集,处理,验算得出相应的定量浓度值。

[0003] 然而随着社会的发展,目前的检测检测系统的灵敏度、精密度和准确度都已经不能达到现有的需要。

实用新型内容

[0004] 本实用新型实施例提供了一种免疫侧向层析检测系统,大大提高了检测的灵敏度、精密度和准确度。

[0005] 本实用新型实施例还提供了一种免疫侧向层析检测系统的制备方法。

[0006] 本实用新型实施例还提供了一种免疫侧向层析检测系统的应用。

[0007] 本实用新型实施例提供了一种免疫侧向层析检测系统,包括底板,其包括近样品端和远样品端;所述的底板上由近样品端到远样品端依次设置有样品垫,所述的样品垫上设置有加样孔,硝酸纤维素膜和吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上设置有质控带和检测带,所述的质控带设置在所述的检测带与样品垫之间;所述的质控带为生物素-亲和素体系或与鼠抗体不同种属的质控体系;所述的硝酸纤维素膜上设置有用来采集数据的观察窗。

[0008] 进一步的,所述的样品垫与硝酸纤维素膜之间设置有标记物垫。

[0009] 进一步的,所述的与鼠抗体不同种属的质控体系采用羊抗鸡IgY包被,鸡IgY标记。

[0010] 进一步的,所述的生物素-亲和素体系由亲和素或链霉亲和素包被到硝酸纤维素膜上得到。

[0011] 另一方面,本实用新型实施例还提供了一种免疫侧向层析检测系统的制备方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 将第一抗体或抗原包被到硝酸纤维素膜上;同时将对照试剂包被到硝酸纤维素膜上;

[0013] (2) 制备标记物:将第二抗体或抗原进行标记后喷点在测试管、小瓶、吸头、针筒内、卡塞混样槽、样品垫、标记物垫或硝酸纤维素膜得到所述的标记物;

[0014] (3) 制备样品垫;

[0015] (4) 组装所述的免疫侧向层析检测系统:在底板上依次固定样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上设置有质控带和检测带,所述的质控带设置在所述的检

测带与样品垫之间;所述的质控带为生物素-亲和素体系或与鼠抗体不同种属的质控体系;所述的确硝酸纤维素膜上设置有用来采集数据的观察窗。

[0016] 进一步的,所述的步骤(1)具体包括如下步骤:

[0017] 将所述的抗体或抗原用包被缓冲液稀释到0.1-5.0mg/ml,包被到所述硝酸纤维素膜上,干燥备用;所述的包被缓冲液为0.01-0.1M的磷酸缓冲液加1-10%(重量体积比,比如3%即3克溶质溶解于100ml溶剂内为3%)的蔗糖作为保护剂。

[0018] 进一步的,所述的样品垫与硝酸纤维素膜之间设置有标记物垫,其标记物为乳胶荧光、时间分辨荧光、上转移发光、量子点荧光、荧光染料或胶体金。

[0019] 进一步的,制备样品垫是用样品处理液浸泡或喷点所述的样品垫,干燥备用;所述的样品处理液中Tris-CL的摩尔浓度为10-100mMol/L,所述的样品处理液中按照质量百分数计包括如下组分:0.1-2%的Casein,0.1-5%的BSA,0.05-1%的Tween-20,0.05%-0.5%的PEG,0.05%-1%的Tween-80,0.05%-0.5%的PVP,0.1%-1%的二水合柠檬酸钠,1-10%的蔗糖。

[0020] 再一方面,本实用新型实施例还提供一种免疫侧向层析检测系统的应用,所述的免疫侧向层析检测系统为上述的方法制备的检测系统。

[0021] 进一步的,将待检测样品稀释后进行检测;所述的稀释选用的稀释液为生理盐水或样品稀释液,所述的样品稀释液中Tris-CL的摩尔浓度为10-100mMol/L,NaCl的质量浓度为0.8-1%,Tween-20的质量浓度为0.05-1%。

[0022] 与现有技术相比,本实用新型免疫侧向层析检测系统至少具有如下有益效果:

[0023] 质控带与检测带位置互换,在检测系统分总体长度不变的情况下,延长了加样孔和检测带之间的距离,延长反应时间,提高灵敏度。如有些对灵敏度要求不高,可在相同灵敏度下,检测系统做的更短、或者试剂用量减少,节省产品生产成本。同时,在粘稠样品的定量测试中,质控带的的数据更加准确和可控,从而提高产品的精密度和准确度。

[0024] 采用与传统质控带体系完全不同的体系,避免交叉反应。采用与鼠抗体种属远的鸡IgY作为产品质控带体系,羊抗鸡IgY包被,鸡IgY标记(或采用生物素-亲和素体系来作为质控带体系);从而避免了交叉阻断反应的情况发生。

附图说明

[0025] 图1为本实用新型中实施例1和2中的免疫侧向层析检测系统结构示意图;

[0026] 图2为本实用新型中实施例3中的免疫侧向层析检测系统结构示意图。

具体实施方式

[0027] 下面结合较佳实施例对本实用新型方案做进一步说明,应当理解,较佳实施例是为了方便本领域技术人员对本实用新型方案的理解,不作为本实用新型方案的限定。

[0028] 胶体金免疫侧向层析方法固然有他的优点如简便、快速等;不过由于胶体金本身的特点导致灵敏度无法达到某些项目的临床要求。进而衍生出免疫荧光法,其主要是在胶体金上述优点的情况下,很好的弥补了胶体金方法的缺点,得到很好的灵敏度,成为现在即时检验(POCT)领域的首选方法。

[0029] 但是即便使用更灵敏的荧光方法并配上相对应读数仪去提高灵敏度,仍然无法到

有些项目的要求。因为免疫侧向层析技术既要求反应时间不能太长,过长无法达到即时检验的目的;又要求在某些项目灵敏度很高。众所周知,免疫反应中起决定作用的是时间、温度和离子强度,在保证反应缓冲液充分优化的情况下,在室温或37度左右反应时,唯有反应时间可以优化,但是反应时间不能过长是即时检验的要求,同时过分延长反应时间也会导致样品回流、本底加大等不利因素。除了灵敏度以外如果样品是全血等粘稠的样品的话,也会导致侧向层析试剂条的样品随固相膜由毛细血管作用移动的速度过慢,引起在规定时间内样品和所含标记物和被测物的复合物无法充分释放,试剂反应无法完全充分,影响最后结果,特别是定值产品的结果。这样会导致精密度不好,以及由于质控带数据不准确而导致检测值不准,从而影响准确度、精密度。

[0030] 根据上述分析,可以发现选用合适的质控带体系就可以避免交叉反应,从而可以将质控带和检测带位置互换,从而实现了在保持现有检测系统长度的同时,延长了加样孔和检测带的距离,从而提高灵敏度、精准度和准确度。

[0031] 本实用新型方法的原理:本方法创造性的将质控带位置和检测带位置互换,使质控带位于检测带和加样孔之间;来换取检测带位置与加样孔之间的距离延长,距离延长可以延长反应时间,从而在产品总长度不变的情况下提高产品灵敏度。如有些对灵敏度要求不高,可在相同灵敏度下,试剂条做的更短、或者试剂用量减少,节省产品生产成本。

[0032] 原先无法将位置互换是由于质控带一般采用羊抗鼠,这个会和标记抗体形成反应,影响检测带读数值。或者采用种属相近的羊抗兔-兔抗体方法,此方法虽然一般情况下不会直接影响反应,但是由于种属过近,还是容易和一些鼠抗体或多或少的交叉反应,影响产品性能。

[0033] 下面是具体实施例:

[0034] 实施例1(无标记物垫,标记物在测试管内,有样本稀释液)

[0035] 包被抗体:将人心型脂肪酸结合蛋白(HFABP)检测抗体1用包被缓冲液稀释成固定浓度(2.0mg/ml),对照试剂1(羊抗鸡IgY)稀释成固定浓度(2.0mg/ml),采用BioDot公司的XYZ3060将上述两个液体包被到赛多利斯硝酸纤维素膜140(NC膜)上,其中质控带位于检测带和加样孔之间,37℃干燥箱干燥4小时,备用。包被缓冲液为0.01Mol/l的磷酸缓冲液(PBs)加3%的蔗糖作为保护剂。

[0036] 标记抗体:将人心型脂肪酸结合蛋白(HFABP)检测抗体2和对照试剂2(鸡IgY)用乳胶荧光标记,储存在储存液内,备用,(50mMol/l Tris,0.5%BSA,pH 7.8)。

[0037] 标记物准备:将上述标记抗体按所需浓度喷点5微升体积在测试管,进行干燥备用。

[0038] 样品垫制备:将样品处理液按所需浓度浸泡或喷点在样品垫内或上,干燥备用。处理液组成如下:50mMol/l Tris-CL,0.5%Casein,0.5%BSA,0.1%Tween-20,0.05%PEG,0.1%Tween-80,0.05%PVP,0.3%二水合柠檬酸钠,2%蔗糖。

[0039] 其中,BSA:牛血清白蛋白,Casein:酪蛋白,Tris-CL:三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液,PEG:聚乙二醇,Tween-20:吐温20,Tween-80:吐温80,PVP:聚乙烯吡咯烷酮,0.5%为重量体积比,即0.5克溶质溶解于100ml溶剂内。

[0040] 样品稀释液分装:将50mMol/l Tris-CL,0.9%NaCl,0.1%Tween-20,3.0%BSA,分装到大瓶(5ml-50ml)内,备用。

[0041] 组装试剂条：将包被好所需试剂的硝酸纤维素膜和已处理好的样品垫以及吸水垫按照模具黏贴在一起，并切成所需宽度试剂条，一般为4mm宽度。剪切好的试剂条组装到相应的卡塞(Cassette)内，卡塞在样品垫上方有加样孔，卡塞在硝酸纤维素膜上方有观察窗，用于数据采集。用普通吸头吸取样品稀释液(样品稀释液为多人份混合，即一盒产品一大瓶样品稀释液)到已经点好荧光物质的测试管内，再加样品，反复吹打数次，溶解荧光物质，并与样品中被测物之间免疫反应。再加入到卡塞加样孔内，15分钟读取数据。或者先加样品到已经点好荧光物质的测试管内，再加样品稀释液，反复吹打数次，溶解荧光物质，并与样品中被测物之间免疫反应。再加入到卡塞加样孔内，由于毛细血管作用向前侧向层析，15分钟时读取数据。

[0042] 表1为本实施例中本方法与对照组的检测结果数据对比。

[0043] 表1

[0044]

HFABP 校准品 ng/ml	检测带数值		质控带数值		荧光值	
	本方法	对照	本方法	对照	本方法	对照
0	125	141	105177	96587	59	73
	194	124	104457	94287	93	66
3.3	767	398	104914	96296	366	207
	756	439	107165	96561	353	227
10	2130	1811	104028	96456	1024	939
	1947	1808	98427	98188	989	921
100	19464	17923	97574	98633	9974	9086

[0045]

	20667	18976	98270	97631	10515	9718
--	-------	-------	-------	-------	-------	------

[0046] 由表1可以看出，在做人心型脂肪酸结合蛋白(HFABP)项目时，由于位置调整，灵敏度明显的提高(无论是检测带数值还是荧光值，在浓度3.3ng/ml和0ng/ml之间比值都差1.5倍，即本方法灵敏度可以调高至少1.5倍)。

[0047] 实施例2(无标记物垫，标记物在吸头内，有样本稀释液)

[0048] 包被抗体:将C反应蛋白(CRP)检测抗体1用包被缓冲液稀释成固定浓度(0.5mg/ml),对照试剂1(羊抗鸡IgY)稀释成固定浓度(2.0mg/ml),采用BioDot公司的XYZ3060将上述两个液体包被到赛多利斯硝酸纤维素膜(NC)上,其中质控带位于检测带和加样孔之间,37℃干燥箱干燥4小时,备用。包被缓冲液为0.01Mol/l的磷酸缓冲液(PBs)加3%的蔗糖作为保护剂。

[0049] 标记抗体:将C反应蛋白(CRP)检测抗体2和对照试剂2(鸡IgY)用乳胶荧光标记,储存在储存液内,备用,(50mMol/l Tris,0.5%BSA,pH 7.8)。

[0050] 标记物准备:将上述标记抗体按所需浓度喷点5微升体积到吸头内壁内,进行干燥备用。

[0051] 样品垫制备:将样品处理液按所需浓度浸泡或喷点在样品垫内或上,干燥备用。处理液组成如下:50mMol/l Tris-CL,0.5%Casein,0.5%BSA,0.1%Tween-20,0.05%PEG,0.1%Tween-80,0.05%PVP,0.3%二水合柠檬酸酸钠,2%蔗糖。

[0052] 其中:BSA:牛血清白蛋白,Casein:酪蛋白,Tris-CL:三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液,PEG:聚乙二醇,Tween-20:吐温20,Tween-80:吐温80,PVP:聚乙烯吡咯烷酮,0.5%为重量体积比,即0.5克溶质溶解于100ml溶剂内。

[0053] 样品稀释液分装:将50mMol/l Tris-CL,0.9%NaCl,0.1%Tween-20,3%BSA,分装反应缓冲液小瓶内(0.2ml-3ml),备用。

[0054] 组装试剂条:将包被好所需试剂的硝酸纤维素膜和已处理好的样品垫以及吸水垫按照模具黏贴在一起,并切成所需宽度试剂条,一般为4mm宽度。剪切好的试剂条组装到相应的卡塞(Cassette)内,卡塞在样品垫上方有加样孔,卡塞在硝酸纤维素膜上方有观察窗,用于数据采集。用具有标记物荧光物质的吸头吸取样品到反应缓冲液小瓶内,反复吹打数次,溶解荧光物质,并与样品中被测物之间免疫反应。再加入到卡塞加样孔内,由于毛细血管作用向前侧向层析,

[0055] 3分钟时读取数据。表2为本实施例中本方法与现有技术的检测结果对比表。

[0056] 表2

[0057]

CRP 校准品 mg/L	检测带数值		质控带数值		荧光值	
	本方法	对照	本方法	对照	本方法	对照
0	213	218	30571	20156	348	541
	246	160	35562	23432	346	341
	305	189	30951	21061	493	449
	264	177	35792	21326	369	415
0.03125	399	151	35595	23664	560	319
	495	212	35053	26675	706	397
	429	204	34031	18925	630	539
	458	180	38139	21986	600	409
0.0625	433	230	29652	20676	730	556
	685	152	25809	19677	1327	386
	461	141	28625	23689	805	298
	436	551	28489	27004	765	1020

[0058] 由表2可以得出,在做C反应蛋白(CRP)项目时,由于位置调整,灵敏度明显的提高(解释:无论是检测带数值还是荧光值,在浓度0.0315mg/L和0mg/L之间比值都差1.5倍以上,即本方法灵敏度可以调高至少1.5倍)。

[0059] 实施例1和2制备的免疫侧向层析检测系统结构示意图如图1所示,其中,检测系统包括PVC胶板1,PVC胶板上由左到右依次设置有样品垫2,其上有加样孔(图中未示出);硝酸纤维素膜3,其上设置有质控带5、检测带6和观察窗(图中未示出);吸水垫4。

[0060] 实施例3.(有标记物垫,包被试剂为抗原,无样品稀释液)

[0061] 包被抗体:将HCV(丙型肝炎)检测抗原1用包被缓冲液稀释成固定浓度(3.0mg/ml),对照试剂1(链霉亲和素SA)稀释成固定浓度(2.0mg/ml),采用BioDot公司的XYZ3060将上述两个液体包被到硝酸纤维素膜(NC膜)上,其中质控带位于检测带和加样孔之间,37℃干燥箱干燥4小时。包被缓冲液为0.01Mol/l的磷酸缓冲液(PBs)加3%的蔗糖作为保护剂。

[0062] 标记抗体:将HCV(丙型肝炎)检测抗原2和对照抗体2(BSA-Biotin)用胶体金标记,储存在金标储存液内,(50mMol/l Tris,0.5%BSA,pH 7.8),

[0063] 标记物垫制备:将上述标记抗体按所需浓度浸泡或喷点在金标垫内或上,干燥,剪切备用。可用蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥。

[0064] 样品垫制备:将样品处理液按所需浓度浸泡或喷点在金标垫内或上,干燥备用。可用蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥。

[0065] 处理液组成如下:50mM Tris-CL,0.5%Casein,0.5%BSA,0.1%Tween-20,0.05%

PEG,0.1%Tween-80,0.05%PVP,0.3%二水合柠檬酸酸钠,2%蔗糖。

[0066] 缩写:BSA:牛血清白蛋白,Casein:酪蛋白,Tris-CL:三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液,PEG:聚乙二醇,Tween-20:吐温20,Tween-80:吐温80,PVP:聚乙烯吡咯烷酮,Biotin生物素,SA链霉亲和素。

[0067] 组装试剂条:将包被好所需抗体的硝酸纤维素膜(NC膜)、标记物垫、吸水垫以及样品垫按照模具黏贴在一起,并切成所需宽度试剂条,一般为4mm宽度。剪切好的试剂条组装到相应的卡塞(Cassette)内,卡塞在样品垫上方有加样孔,卡塞在硝酸纤维素膜上方有观察窗,用于数据采集。用普通吸头吸取120微升体积样品加到加样孔内,由于毛细血管作用向前侧向层析,15分钟内读取数据。

[0068] 15分钟时读取数据。表3为本实施例中本方法与现有技术的检测结果对比表。

[0069]

HCV-Ab	检测带
--------	-----

[0070]

校准品	本方法	对照
0	—	—
	—	—
	—	—
	—	—
1:256	+	—
	+	—
	+	—
	+	—
1:128	++	+
	++	+
	++	+
	++	+

[0071] 备注:胶体金结果目测,—:为阴性,+:为阳性,目测有浅浅的红线,++:为阳性,目测有明显的红线。

[0072] 由表3可以得出,在做丙型肝炎病毒(HCV)抗体诊断试剂(胶体金法)项目时,由于位置调整,灵敏度明显的提高(解释:校准品1:256稀释浓度时,对照方法为阴性,所以灵敏

度提高约2倍)。

[0073] 实施例3制备的免疫侧向层析检测系统结构示意图如图2所示,其中,检测系统包括PVC胶板1,PVC胶板上由左到右依次设置有样品垫2,其上有加样孔(图中未示出);标记物垫7;硝酸纤维素膜3,其上设置有质控带5、检测带6和观察窗(图中未示出);吸水垫4。

[0074] 以上实施例标记物荧光物质的添加还可以采用以下方式:标记物质点到卡塞上面的混样槽内;标记物质点到吸头内壁上;标记物质点到测试管内;标记物质点或浸泡到样品垫。

[0075] 本实用新型申请未尽之处,本领域技术人员可以根据现有知识来进行常规选择,比如:干燥可采用蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥等。

[0076] 以上所述,仅为本实用新型的具体实施方式,但本实用新型的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本实用新型揭露的技术范围内,可轻易想到变化或替换,都应涵盖在本实用新型的保护范围之内。因此,本实用新型的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

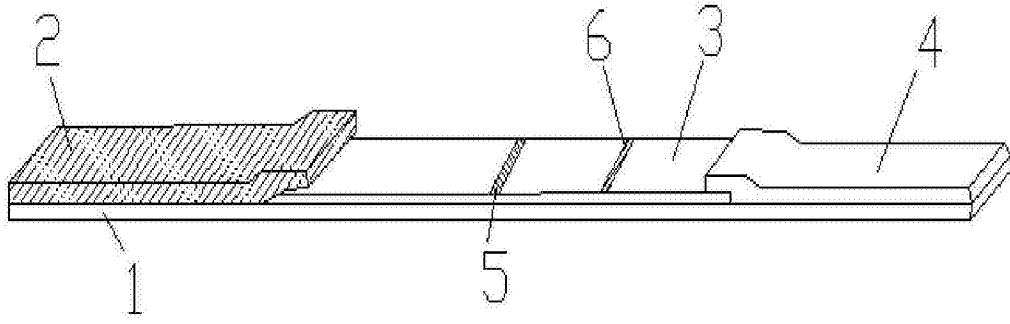


图1

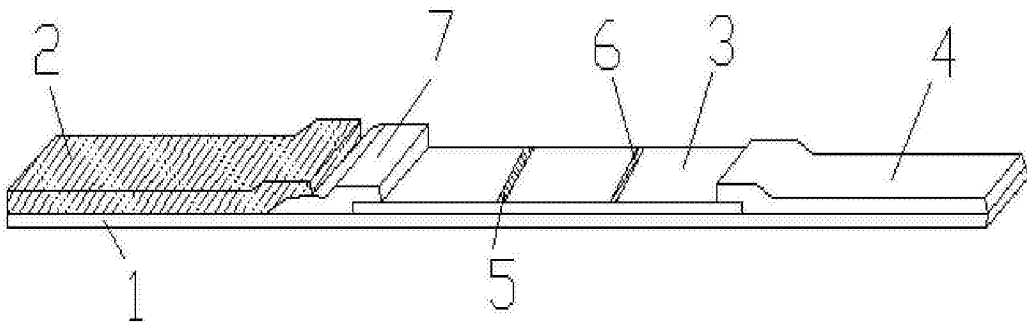


图2

专利名称(译)	免疫侧向层析检测系统		
公开(公告)号	CN206038685U	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201620709049.9	申请日	2016-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京康思润业生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京康思润业生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京康思润业生物技术有限公司		
[标]发明人	王龙		
发明人	王龙		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	王伟锋 刘铁生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种免疫侧向层析检测系统，属于医学领域，所述的检测系统包括底板，其包括近样品端和远样品端；所述的底板上由近样品端到远样品端依次设置有样品垫，所述的样品垫上设置有加样孔，硝酸纤维素膜和吸水垫；所述的硝酸纤维素膜上设置有质控带和检测带，所述的质控带设置在所述的检测带与样品垫之间；所述的质控带为生物素-亲和素体系或与鼠抗体不同种属的质控体系；所述的硝酸纤维素膜上设置有用来采集数据的观察窗。本实用新型的检测系统具有较高的灵敏度、精密度和准确度。

