

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/558 G01N 33/543

G01N 33/532 G01N 33/533

[21] 申请号 03114888.3

[43] 公开日 2004 年 8 月 4 日

[11] 公开号 CN 1517709A

[22] 申请日 2003.1.14 [21] 申请号 03114888.3

[71] 申请人 周中人

地址 201204 上海市浦东新区牡丹路 225 弄 6
号 602

[72] 发明人 周中人

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 新型竞争法微孔膜介质免疫层析反
应检测抗原

[57] 摘要

新型竞争法免疫层析中，标记抗体的量远大于结合完样品中抗原所需要的抗体量，而且包被的抗原的量也远大于结合完全部游离标记抗体的量。在检测位置的光学信号直接来源于样品中的抗原结合的标记物，其强弱直接反映出抗原的含量。因此该方法可以检测到极低含量的抗原。

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

1. 一种新型的由光学信号检测抗原的竞争法微孔膜介质免疫层析反应，其特征是过量的标记抗体结合了样品溶液中的抗原后，游离的标记抗体被微孔膜介质过量包被的抗原捕获，由样品溶液中抗原与标记抗体产生的光学信号来分析抗原。
2. 权利要求 1 中的样品可以是尿，血液，唾液，血清各类溶液。
3. 权利要求 1 中标记抗体可以被所有能在检测位置直接或间接呈现光学信号的物质标记，如胶体金颗粒，乳胶颗粒，辣根过氧化物酶，化学发光或荧光分子。
4. 权利要求 1 中微孔膜介质中的膜可以是硝酸纤维素，醋酸纤维素，尼龙，玻璃纤维，滤纸，及其他高分子聚合物等充满微孔的材料制成，并可能经过处理以获得特定性能，微孔膜介质可由单种或多种以上微孔膜组合在一起。
5. 权利要求 1 中的过量的标记抗体是相对于样品中可能最高含量的抗原被结合完的量。
6. 权利要求 1 中的过量包被的抗原是相对与所有标记抗体被结合完需要的量，该抗原可以是单纯的抗原，或与其他生物大分子的结合物，但保留与标记抗体的免疫结合位点。
7. 权利要求 1 中的光学信号可以被眼睛直接观察，也可以用其他光学检测仪器进行测定。
8. 权利要求要求保护依据本方法设计的其他生物分析检测装置或仪器。

新型竞争法微孔膜介质免疫层析反应检测抗原

免疫诊断方法中，借助微孔膜介质，可使样品溶液从一端向另一端迁移层析进行免疫反应，建立快速简单的检测方法。目前利用胶体金颗粒标记技术生产的早早孕快速检测试条就是这种方法生产的。很多毒品的快速检测也建立了一种竞争免疫层析反应的方法。胶体金标记技术是其中的一种方法。目前在胶体金检测技术中，比较成熟应用的方法有三种：夹心法层析免疫反应检测抗原；间接法层析免疫反应检测抗体；常规竞争法层析免疫反应检测抗原。以上提到的常规竞争法免疫反映检测抗原方法的要点是先设定样品中的最低要求检出的抗原含量，然后使包被的标记抗体量少于需要结合完该含量抗原所需要的抗体量。如果抗原的要求检出值很低，标记抗体量也就必须很少，就很难在检测位置产生必要的颜色。所以常规竞争法免疫层析反应很难检测出样品中痕量的抗原

本申请的新型竞争法微孔膜介质免疫层析反应的光学信号检测抗原方法克服了以上方法中的缺点，能检测出极低含量的抗原。现结合以下图示说明如下：



位置 A 至位置 E 的一段是微孔状膜介质，微孔状膜可以是硝酸纤维素，醋酸纤维素，尼龙，玻璃纤维，滤纸，及其他高分子聚合物等材料制成的充满微孔的膜，该介质可以由单种或多种膜组合在一起，样品可以直接施放到微孔状膜介质上。

位置 A 是样品释放点，样品可以是各类可能含有被检测抗原的溶液，如尿，血液，血清，唾液等。抗原是所有与被标记的抗体构成固定结合位点的物质。

位置 B 处固定包被有过量的被标记的抗体，即抗体的数量远多于样品中可能最大量的抗原需要的结合量。该抗体被标记的物质可以是胶体金颗粒，乳胶颗粒，某种酶，化学发光或荧光分子等中的任何一种。

位置 C 处固定包被着过量的与抗体有固定结合位点的抗原，即抗原的数量远多于全部标记抗体被抗原结合完需要的量。该抗原可以是单纯的抗原，或与其他生物大分子结合但保留与标记抗体的固定结合位点。

位置 D 处固定包被有过量的能结合标记抗体与抗原结合物生物大分子。

当在位置 A 释放含抗原的样品溶液，溶液携带着抗原朝位置 B 移动，位置 B 处的过量标记抗体一部分被抗原结合，一部分标记抗体则游离在溶液中，都继续朝位置 C 迁移运动。在位置 C 处，游离的标记抗体被过量的固定包被的抗原全部结合，不再朝前迁移，并直接或间接显现出光学信号。而在位置 B 处被样品中抗原结合的标记抗体则因为结合位点饱和，则继续越过位置 C，朝位置 D 迁移。然后被位置 D 处的其他生物大分子捕获，直接或间接显现出光学信号。当样品溶液中没有抗原时，位置 C 处的颜色信号几乎不受影响，而位置 D 处则没有信号。因此位置 D 处的信号强弱直接反映出抗原的含量。

现举尿液中吗啡的竞争法免疫层析检测为实施例说明如下：膜介质由德国 S&S 公司 33 型玻璃纤维膜，德国 S&S 公司 AE99 型硝酸纤维素膜，德国 S&S 公司 470 型吸水滤纸组成。33 型玻璃纤维膜上包被有胶体金颗粒标记的吗啡抗体。AE99 硝酸纤维素膜上固定包被有吗啡与 BSA 的交联结合物，其后再包被有羊抗鼠 IgG 多抗，整片硝酸纤维素膜用 BSA 溶液进行封闭处理并干燥。在室温为 25 度，相对湿度在 30% 的洁净环境里，将以上三种材料依次搭连着粘贴在美国 G&L 公司生物诊断型 PET 背胶底板上。

直接以尿液样品释放在 33 型玻璃纤维膜上，吗啡及其他生物大分子向前迁移运动，到达硝酸纤维素膜上后，吗啡与其中包被的部分胶体金标记抗体组成结合物。结合物与其他游离的胶体金标记抗体一起继续朝前迁移运动，到包被有吗啡与 BSA 交联结合物的位置时，所有的游离胶体金标记抗体全部被结合固定住，显现出红色信号。而吗啡与胶体金标记抗体的结合物则继续朝前迁移，被固定包被的羊抗鼠 IgG 多抗捕获，显现红色信号。该红色信号直接与样品中吗啡含量成正比。其他生物大分子则继续迁移运动，最后被 470 型吸水滤纸吸收。

专利名称(译)	新型竞争法微孔膜介质免疫层析反应检测抗原		
公开(公告)号	CN1517709A	公开(公告)日	2004-08-04
申请号	CN03114888.3	申请日	2003-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	周中人		
申请(专利权)人(译)	周中人		
当前申请(专利权)人(译)	周中人		
[标]发明人	周中人		
发明人	周中人		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

新型竞争法免疫层析中，标记抗体的量远大于结合完样品中抗原所需要的抗体量，而且包被的抗原的量也远大于结合完全部游离标记抗体的量。在检测位置的光学信号直接来源于样品中的抗原结合的标记物，其强弱直接反映出抗原的含量。因此该方法可以检测到极低含量的抗原。

