

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>  
G01N 33/53  
G01N 33/558



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01126919.7

[43] 公开日 2003 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 1409111A

[22] 申请日 2001.9.28 [21] 申请号 01126919.7  
[71] 申请人 上海数康生物科技有限公司  
地址 200233 上海市钦州北路 1089 号 51 号  
楼 4 楼  
[72] 发明人 胡赓熙

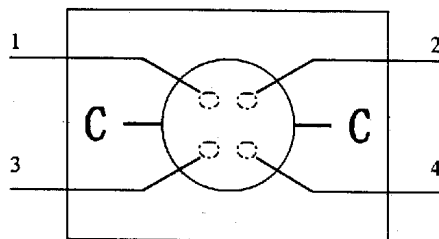
[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司  
代理人 孙跃虹

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 一种能同时检测多种与疾病有关的抗原、抗体的装置

### [57] 摘要

本发明涉及一种能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置。本发明公开的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置是由免疫渗滤金标法联检反应装置、胶体金标记物混合液和缓冲液组成；其中在免疫渗滤金标法联检反应装置的硝酸纤维素膜上，相隔一定距离点有 n 种与疾病相关的抗原或抗体，并至少点有一种质控物。本发明利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现对多种抗原和抗体的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，为多种疾病的同时检测提供了新思路。



ISSN 1008-4274

- 1、一种能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置，该装置是由免疫渗滤金标法联检反应装置、胶体金标记物混合液和缓冲液组成，其特征在于在其中的免疫渗滤金标法联检反应装置的硝酸纤维素膜上，相隔一定距离点有  $n$  种与疾病相关的抗原或抗体，并至少点有一种质控物。
- 2、一种如权利要求 1 所述的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置，其特征在于其中所述的点样种数  $n$  为大于等于 4 的正整数。
- 3、一种如权利要求 1 所述的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置，其特征在于其中所述的胶体金标记物混合液由硝酸纤维素膜上所点抗原或抗体相对应的胶体金标记物组成，其中至少有一种是鼠抗人 IgG 或鼠抗人 IgM。
- 4、一种如权利要求 1 所述的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置，其特征在于其中所述的多种疾病包括：甲型肝炎，乙型肝炎，丙型肝炎，丁型肝炎，戊型肝炎，伤寒，梅毒，爱滋病，出血热，登革热，腮腺炎，巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、弓型虫、丝虫和阿米巴虫。
- 5、一种如权利要求 1 所述的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置，其特征在于其中所述的质控物是指羊抗鼠 IgM 抗体，羊抗鼠 IgG 抗体，兔抗鼠 IgM 抗体、兔抗鼠 IgG 抗体以及二种或多种上述抗体的混合物。

一种能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置

## 技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置。

## 背景技术

传染病是由各种病原体所引起的一组具有传染性的疾病。病原体可通过某种方式在人群中传播，常造成传染病流行。目前，传染病仍是世界上儿童和年轻人生命健康的主要威胁，全球每年因传染病致死的人数约为 1300 万且大多数发生在贫困的发展中国家。人口的大规模流动也会加剧传染病的蔓延，如 1999 年科索沃战争导致大量难民逃亡从而引起传染病的大规模流行；同时，城市人口密度增大及卫生条件不良也导致了传染病的爆发流行。在中国，据 2000 年中国卫生部的全国卫生统计年报资料显示全国 26 种甲、乙类法定报告传染病的发病数高达 2,303,657 人次。给人民的生命健康和国家经济建设带来了极大的危害。

传染病的准确诊断对于传染病的预防、治疗和防止疾病传播都有重大意义。传染病的检测通常都可以利用监测免疫应答的实验来完成，大多数情况下都是用 ELISA 方法对各种疾病进行分别检测，这些实验一般较烦琐、耗时、费力、采血量较大，且易出现假阴性或假阳性。另外，由于传染病高发区往往在不发达地区，相对来说，那里缺乏高级的实验设备，这通常降低了实验的有效性，降低了诊断的可信度。

胶体金免疫渗滤方法是从酶联免疫结合方法(ELISA)的基础上发展起来的新一代诊断方法，它以硝酸纤维素膜为载体，利用微孔滤膜的可滤过性和毛细管作用，使抗原与抗体的反应、洗涤在一个特殊的渗滤装置上，以液体渗滤过膜的方式迅速完成，阳性反应在膜上出现着色斑点。

由于此方法简单、快速、除商品试剂外不需任何仪器设备，几分钟即可用肉眼观察结果。目前已在临床检测中取得了广泛的应用。胶体金免疫渗滤方法可应用于免疫学检测的几乎所有方面，但主要用于检测正常体液中不存在的抗原性物质(例如与传染病相关的抗原或抗体)，以及正常含量极低而特殊情况下异常升高的物质(如 HCG、甲胎

蛋白等)。近年来由于试剂原料的精选和制备技术的改进,应用范围更加广阔。但目前,很少有人将胶体金免疫渗滤技术应用于多种传染性疾 病同时检测领域。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种能同时迅速、灵敏地对血清中多种与疾病相关抗原、抗体进行检测的装置。

本发明公开的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置是由免疫渗滤金标法联检反应装置、胶体金标记物混合液和缓冲液组成;其中在免疫渗滤金标法联检反应装置的硝酸纤维素膜上,相隔一定距离点有  $n$  种与疾病相关的抗原或抗体,并至少点有一种质控物;胶体金标记物混合液由硝酸纤维素膜上所点抗原或抗体相对应的胶体金标记物组成,其中至少有一种是鼠抗人 IgG 或鼠抗人 IgM。

本发明所述与疾病相关的抗原或抗体是指与各种传染病相关的抗原或抗体,传染病包括:甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎,丁型肝炎,戊型肝炎,伤寒,梅毒,爱滋病,出血热,登革热,腮腺炎,巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒等,以及细胞内寄生虫如弓型虫、丝虫、阿米巴虫等。

其中  $n$  为大于等于 4 的正整数,表示点样的种类。

本发明所述的质控物是指羊抗鼠 IgM 抗体,羊抗鼠 IgG 抗体,兔抗鼠 IgM 抗体,兔抗鼠 IgG 抗体以及二种或多种上述抗体的混合物。

本发明能同时检测多种疾病相关的抗原、抗体装置的制备方法包括下列步骤:

### 1. 制备免疫渗滤金标法联检反应装置

分别将病毒抗原或抗体用 PBS 液透析后点于硝酸纤维素膜上,另取质控物,于同一硝酸纤维素膜上远离各点样位置作一标记。将硝酸纤维素膜烘干后置于洗涤液中振荡洗涤晾干。

### 2. 制备胶体金标记物混合液

胶体金标记物混合液由各单蛋白的胶体金标记物按一定比例混合而成。

单一蛋白的胶体金标记物的制备方法如下:取 0.01% 的氯金酸水溶液,加热煮沸,快速加入 1% 枸橼酸三钠溶液;继续煮沸得胶体金溶液,使其中的胶体金颗粒大小为 20-60nm。

取胶体金溶液在搅拌下加入病毒抗原或抗体和 BSA 溶液,离心,吸取上清,弃去。沉淀溶于保存液中,用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤,置于  $4\ ^\circ\text{C}$  保存备用。

### 3. 缓冲液的制备

在0.01M—0.05M PBS 中加入 Tween20 使 Tween20 的浓度为 0.01—0.07% (v/v)。

本发明所述检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置的检测方法如下：

1. 取出免疫渗滤金标法联检反应装置，水平置于桌面；
2. 在免疫渗滤金标法联检反应装置孔内加入两滴缓冲液，湿润表面；
3. 加入待测血清 50ul， 等其渗滤入膜内；
4. 加入三滴缓冲液，待其渗入后加入两滴胶体金标记液；
5. 加入三滴缓冲液；
6. 1 分钟后观察相应位置有无红色斑点，有则认为该位置对应的疾病抗体在体内呈阳性，没有则认为该位置对应的疾病抗体在体内呈阴性。

若待测血清中有与硝酸纤维素膜上疾病相关蛋白相对应的抗体或抗原中的一种或数种，当硝酸纤维素膜与血清接触时，膜上的抗原或抗体会与血清中的对应的抗体或抗原发生反应，然后再与胶体金标记物混合液中对应蛋白的胶体金标记物进行反应，从而显色。所以，从显色的情况可以判断出待测病人感染了何种病毒。由于质控物本身不会与人血清内的抗体或抗原发生反应，而胶体金标记物混合液中含有的鼠抗人 IgM 或 IgG，可与质控物发生反应，对应于质控物的位置就会显色，被肉眼识别出；当试剂盒由于某组分的质量问题无法进行检测实验时，膜上对应于质控物的位置就不会显色。

本发明的检测装置利用了胶体金免疫渗滤的原理，使多种传染性疾病的相关抗原、抗体在同一渗滤装置（硝酸纤维素膜）上进行反应、洗涤，通过肉眼观察各斑点的显色情况，对多种病毒进行同时检测，实现了多种蛋白检测条件的一体化；且反应时间短，整个实验可在 3—5 分钟内完成，适合大规模的快速血检，但敏感度却与需 1—2 小时完成的 ELISA 实验相仿。所需的血清量仅 50ul，只采集指血、耳血即可；检测结果不受仪器的影响，不受反应环境的影响。加入胶体金标记物即可显色，操作步骤简单，而且试剂可在室温长期保存。

本发明的检测装置利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现对多种抗原和抗体的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，为多种疾病的同时检测提供了新思路。

### 附图说明

图 1 实施例 1 硝酸纤维素膜上点样示意图

图 2 实施例 1, 1 号血清检测显示示意图, 检测结果均为阴性;

图 3 实施例 1, 2 号血清检测显示示意图, 检测结果丙型肝炎病毒表面抗原为阳性;

图 4 实施例 1, 3 号血清检测显示示意图, 检测结果梅毒抗体, 艾滋病 HIV- 1&2 抗体为阳性;

图 5 实施例 1, 4 号血清检测显示示意图, 检测结果梅毒抗体, 艾滋病 HIV- 1&2 抗体, 乙型肝炎病毒抗体为阳性;

图 2-5 中 C—C 代表质控物羊抗鼠 IgG 抗体的横线为阳性。

图 6 实施例 2 硝酸纤维素膜上点样示意图

图 7 实施例 2, 1 号血清检测显示示意图, 检测结果弓形虫抗体为阳性;

图 8 实施例 2, 3 号血清检测显示示意图, 检测结果 CMV 抗体为阳性。

图 9 实施例 3 硝酸纤维素膜上点样示意图

其中 A1 为甲型肝炎对应的抗原, A2 为乙型肝炎对应的 HBsAg 单抗, A3 为丙型肝炎对应的抗原, B1 为丁型肝炎对应的抗原, B2 为戊型肝炎对应的抗原, B3 为伤寒对应的基因工程抗原, C1 为出血热对应的基因工程抗原, C2 为登革热对应的基因工程抗原, C3 为腮腺炎对应的基因工程抗原。

## 具体实施方式

实施例 1 同时检测爱滋病、梅毒、乙型肝炎、丙型肝炎病毒的装置一、所用原材料

1) 点制在膜上的蛋白:

HBsAg 单抗 (鼠抗人) S2、HCV 抗原、TP47/TP15 梅毒混合抗原和 HIV-1/2 混合抗原;

2) 上述蛋白对应的胶体金标记物

HBsAg 单抗 (鼠抗人) S1 的胶体金标记物、HCV 抗原的胶体金标记物、TP47/TP15 梅毒混合抗原的胶体金标记物、HIV-1/2 混合抗原的胶体金标记物。

3) 质控物: 羊抗鼠 IgG 抗体

4) 硝酸纤维素膜

5) 被测血清 (上海市疾病预防控制中心提供)

二、免疫渗滤金标法联检反应装置的制备方法如下:

(1) 将待点制的蛋白置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃透析过夜。透析后的蛋白用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.5mg/ml, 4℃保存备用。

按上述方法分别处理以下蛋白，包括 HBsAg 单抗（鼠抗人）、HCV 抗原、TP47/TP15 梅毒混合抗原、HIV-1/2 混合抗原、羊抗鼠 IgG 抗体。

(2) 如附图 1 所示，在硝酸纤维素膜上的 1、2、3、4 位置处，分别用微量加样器点上四种蛋白：TP47/TP15 梅毒混合抗原、HIV-1/2 混合抗原、HBsAg 单抗（鼠抗人）S2、HCV 抗原，每点的点样体积为  $1.0\ \mu\text{l}$ ；在硝酸纤维素膜上标有“C”的两点之间，用  $0.2\text{mm}$  绘图笔吸取羊抗鼠 IgG 抗体画一横线。

(3) 将此硝酸纤维素膜置于  $37^\circ\text{C}$  烘箱内 30 分钟，取出后室温放置 25 分钟。然后将其浸没于  $37^\circ\text{C}$  的封闭液中 20 分钟。取出后，在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5 分钟，重复洗涤数次。室温晾干。

(4) 取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方，再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

三、缓冲液是由 pH 为 7.8，0.10M 的 PBS 和 0.30% Tween20 等体积混合而成的溶液。

四、胶体金标记液由 HBsAg 单抗（鼠抗人）S1 的胶体金标记物、HCV 抗原的胶体金标记物、TP47/TP15 梅毒混合抗原的胶体金标记物、HIV-1/2 混合抗原的胶体金标记物按照体积比为 2: 2: 3: 3 的比例混合而成。各个胶体金标记物所用胶体金的颗粒大小均为 30nm。胶体金标记物的制备方法如下：

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入待制备的蛋白，室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使其终浓度为 0.6%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.2%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤，置  $4^\circ\text{C}$  保存备用。

五、用上述试剂盒来测试不同的血清，医院提供的资料显示，1 号血清的提供者未患上述四种传染性疾病中任一种；2 号血清的提供者仅患有丙型肝炎；3 号血清的提供者患有艾滋病和梅毒；4 号血清的提供者患有乙型肝炎、梅毒和艾滋病。检测结果依次见附图 2、附图 3、附图 4、附图 5。

## 实施例 2 ToRCH 疾病的诊断装置

### 1) 点制在膜上的蛋白

HCMV 基因工程抗原，HSV 基因工程抗原，RV 基因工程抗原，TOX 基因工程抗原

### 2) 对应的胶体金标记物

鼠抗人 IgM 单抗的金标记物

- 3) 质控物: 羊抗鼠 IgM 抗体
- 4) 硝酸纤维素膜;
- 5) 被测血清 (上海市疾病控制中心提供)。

免疫渗滤金标法联检反应装置的制备方法和胶体金标记物的制备方法同实施方式 1。其中硝酸纤维素膜上的点样如图 6, 试剂盒的使用方法同实施方式 1, 检测结果依次见附图 7、附图 8。

### 实施例 3 传染性疾病的诊断装置

- 1) 点制在膜上的蛋白

甲型肝炎, 丙型肝炎, 丁型肝炎, 戊型肝炎, 伤寒, 出血热, 登革热, 腮腺炎对应的基因工程抗原和乙型肝炎 HBsAg 单抗。

- 2) 对应的胶体金标记物

对应的基因工程抗原胶体金标记物

- 3) 质控物: 羊抗鼠 IgG 抗体
- 4) 硝酸纤维素膜;
- 5) 被测血清 (上海市疾病控制中心提供)。

免疫渗滤金标法联检反应装置的制备方法和胶体金标记物的制备方法同实施方式 1。其中硝酸纤维素膜上的点样如图 9, 其中 A1 为甲型肝炎对应的抗原, A2 为乙型肝炎对应的 HBsAg 单抗, A3 为丙型肝炎对应的抗原, B1 为丁型肝炎对应的抗原, B2 为戊型肝炎对应的抗原, B3 为伤寒对应的基因工程抗原, C1 为出血热对应的基因工程抗原, C2 为登革热对应的基因工程抗原, C3 为腮腺炎对应的基因工程抗原。

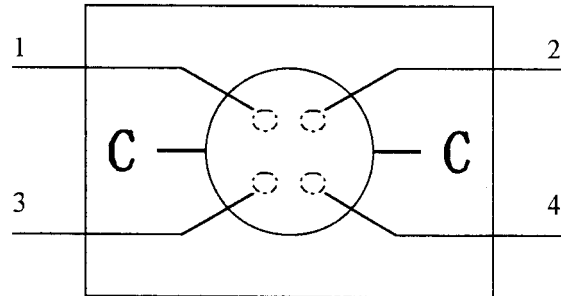


图 1

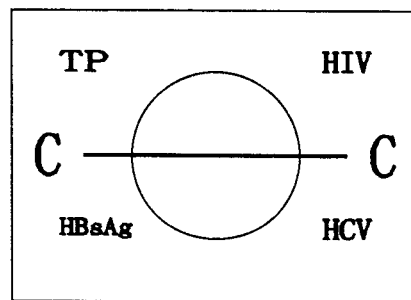


图 2

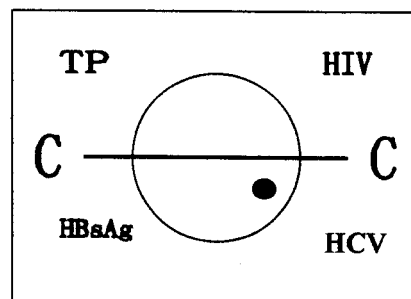


图 3

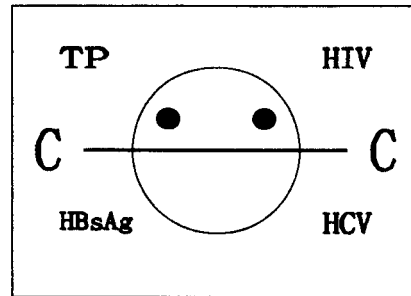


图 4

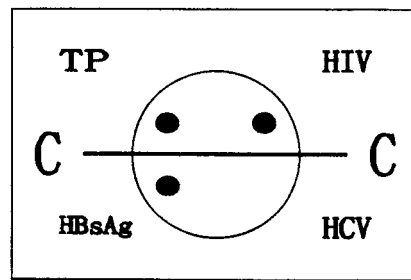


图 5

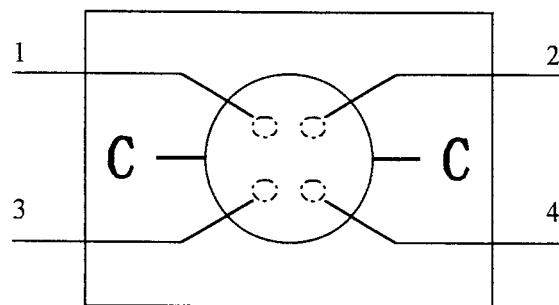


图 6

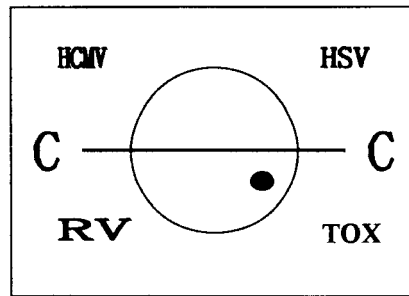


图 7

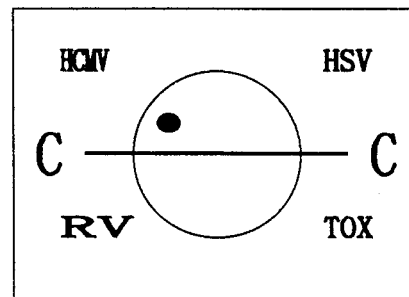


图 8

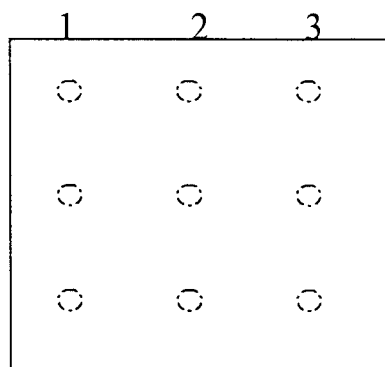


图 9

专利名称(译)	一种能同时检测多种与疾病有关的抗原、抗体的装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN1409111A</a>	公开(公告)日	2003-04-09
申请号	CN01126919.7	申请日	2001-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
[标]发明人	胡赓熙		
发明人	胡赓熙		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置。本发明公开的能同时检测多种与疾病相关的抗原、抗体的装置是由免疫渗滤金标法联检反应装置、胶体金标记物混合液和缓冲液组成；其中在免疫渗滤金标法联检反应装置的硝酸纤维素膜上，相隔一定距离点有n种与疾病相关的抗原或抗体，并至少点有一种质控物。本发明利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现对多种抗原和抗体的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，为多种疾病的同时检测提供了新思路。

