



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03153440.6

[43] 公开日 2004 年 4 月 21 日

[11] 公开号 CN 1490407A

[22] 申请日 2003.8.13 [21] 申请号 03153440.6

[71] 申请人 公安部第二研究所

地址 100038 北京市木樨地南里 17 楼

[72] 发明人 李兆隆 王 俭 张英兰 徐秀兰

王香菊 常彩琴 严 红 蒯应松

陈 艳

[74] 专利代理机构 中国商标专利事务所有限公司

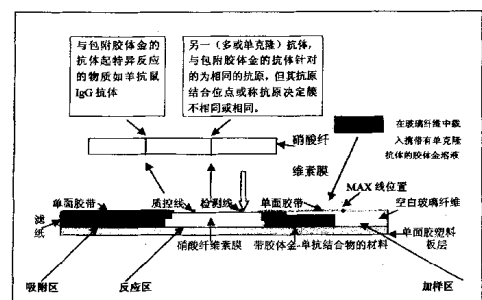
代理人 万学堂

权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 9 页

[54] 发明名称 抗人血红蛋白检测试剂条及其含有的单克隆抗体

[57] 摘要

本发明公开了具有保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9，由具有保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9 产生的抗人血红蛋白的单克隆抗体，和含有该抗人血红蛋白单克隆抗体的胶体金免疫层析检测试剂条及该试剂条的制备方法。本发明由保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9 产生的抗人血红蛋白单克隆抗体及其试剂条的灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但是特异性优于国外产品，完全符合法医学检验标准和要求，有利于迅速、准确地检验鉴定案件物证，快速破案，利国利民。



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

- 1、 具有保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9。
- 2、 抗人血红蛋白单克隆抗体,其可以从具有保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9 产生。
- 3、 抗人血红蛋白的胶体金免疫层析检测试剂条,其特征是:该试剂条中包含权利要求 2 所述的抗人血红蛋白单克隆抗体。
- 5 4、 如权利要求 3 所述的检测试剂条,其特征在于其包括:
加样区,其包括空白惰性材料区及包含包附胶体金的权利要求 2 所述抗人血红蛋白单克隆抗体区;
反应区,其包含检测线和质控线;
- 10 5、 如权利要求 4 所述的检测试剂条,其特征是:加样区包附胶体金的权利要求 2 所述抗人血红蛋白单克隆抗体加载在玻璃纤维中,加样区的空白惰性材料区是玻璃纤维。
- 6、 如权利要求 4 所述的检测试剂条,其特征是:检测线和质控线加载在硝酸纤维素膜上。
- 15 7、 如权利要求 4 或 6 所述的检测试剂条,其特征是:反应区的检测线是另一抗人血红蛋白多或单克隆抗体,其与包附胶体金的权利要求 2 所述抗人血红蛋白的抗体针对的是相同的抗原,但抗原结合位点或称抗原决定簇不相同或相同。
- 8、 如权利要求 7 所述的检测试剂条,其特征是:反应区的检测线喷涂的是含有 0.2—1%蔗糖的兔或羊抗人血红蛋白多克隆抗体。
- 20 9、 如权利要求 4 或 6 所述的检测试剂条,其特征是:反应区的质控线是与包附胶体金的权利要求 2 所述的抗人血红蛋白单克隆抗体起特异反应的物质。
- 10、 如权利要求 9 所述的检测试剂条,其特征是:反应区的质控线喷涂的是含有 0.2—1%蔗糖的羊抗鼠 IgG 抗体。
- 25 11、 如权利要求 4 所述的检测试剂条,其特征是吸附区是滤纸。
- 12、 制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法,包括以下步骤:
 - (1) 抗人血红蛋白单克隆抗体的制备:将保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9 按常规方法复苏并培养,注入小鼠腹腔内,处死小鼠,收集腹水;
 - 30 (2) 分离纯化本发明抗人血红蛋白单克隆抗体:以常规正辛酸加硫酸铵法或

者亲和层析法等进行；

(3) 胶体金的制备：将氯金酸 (HAuCl_4) 以还原剂加热制成胶体金溶液；

5 (4) 胶体金-抗人血红蛋白单克隆抗体结合物制备：将步骤(2)中制得的抗人血红蛋白单克隆抗体搅拌下加入胶体金溶液中，使抗体包附在胶体金颗粒表面上。

(5) 试剂条原材料的预处理：对与检测过程直接相关的材料玻璃纤维和硝酸纤维素膜进行预处理。

10 (6) 胶体金-抗人血红蛋白单克隆抗体结合物处理及载入玻璃纤维：用稀释液稀释步骤(4)制得的胶体金-抗人血红蛋白单克隆抗体结合物，然后用稀释后的该结合物饱和浸泡玻璃纤维，然后干燥；

(7) 在处理好的反应区硝酸纤维素膜上喷涂检测线和质控线；

15 (8) 组装试剂条：在单面胶塑料板层上粘贴固定有加样区的(5)处理过空白玻璃纤维区和步骤(6)制得的胶体金-抗人血红蛋白单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维，反应区的硝酸纤维素膜及吸收区的滤纸；加样区的空白玻璃纤维区一端与步骤(6)制得的胶体金-抗人血红蛋白单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维区一端有部分重叠；加样区带胶体金的玻璃纤维一端与反应区的硝酸纤维素膜的一端有部分重叠，反应区的硝酸纤维素膜的另一端与吸收区滤纸的一端有部分重叠；其中反应区的硝酸纤维素膜的一端部分与加样区的玻璃纤维上粘有单面胶带层，反应区的硝酸纤维素膜的另一端部分与滤纸上粘有单面胶带层；

20 (9) 将(8)所制成的母版试剂条裁剪成成品试剂条；

(10) 检测试剂条的性能，确定其是否合格。

25 13、如权利要求12所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其中步骤(5)是在 4°C ，用含0.5%吐温80的50mM Tris-HCl, pH8.0缓冲液浸泡玻璃纤维过夜，以无菌超纯水漂洗去盐，无菌高效过滤器下吹干；以含0.05%吐温20的20mM磷酸盐生理盐水缓冲液，pH7.4，浸泡硝酸纤维素膜1至2小时，再以无菌超纯水漂洗去盐，亦现用现泡并吹干，并且所有缓冲液均以 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌。

30 14、如权利要求12所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其中步骤(6)中的稀释液是：0.2~1.0%牛 IgG、0.1~0.5%PVP40 或 30、0.05~0.1%PEG20,000、0.5~2.0%BSA、0.02% NaN_3 的生理 PBS 缓冲液，pH7.4。

-
- 15、如权利要求 12 所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其特征是：反应区的检测线喷涂的是含有 0.2—1%蔗糖的兔或羊抗人血红蛋白多克隆抗体，反应区的质控线喷涂的是含有 0.2—1%蔗糖的羊抗鼠 IgG 抗体。

抗人血红蛋白检测试剂条及其含有的单克隆抗体

技术领域

5 本发明属于法医学与免疫学检验技术领域,可直接用于法医物证对人血的确证,更具体地,本发明涉及抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条,其含有的抗人血红蛋白单克隆抗体及产生该单克隆抗体的杂交瘤细胞株,本发明也涉及检测试剂条的制备方法。

背景技术

10 在公安法医工作中,案件物证的尽快检验和鉴定,对于案件的及时侦破、抓捕犯罪分子或释放犯罪嫌疑人具有决定性的作用。胶体金免疫层析检测试剂条出现前,同类免疫学检验技术采用免疫电泳、免疫扩散、酶联免疫吸附分析(即ELISA)等方法进行,这些方法或实验步骤相对较多、操作复杂、对检验人员的技术要求程度高,或检验所用时间较长,而且全都必需在室内进行。因此,建立一新方法对上述
15 这些问题和缺点进行改进、加以克服是很有必要的。胶体金免疫层析检测试剂条的研制及使用使得案件物证在现场就能检验并做出鉴定、甚至可由此确定犯罪嫌疑人,因而能快速破案。但是目前国内外的有些检测人血红蛋白的胶体金免疫层析检测试剂条,由于抗人血红蛋白抗体特异性没有达到公安或司法的检验标准,时有出现检验错误的情况,如将动物的血鉴定成了人血。而众所周知,公安或司法的检验是不
20 允许出现错检的,因为这关系着某个人的前途或命运。因此研制只对人血红蛋白起反应、完全符合法医学检验标准和要求的抗人血红蛋白单克隆抗体及试剂条,非常迫切。

发明内容

25 本发明的目的是提供一种高度灵敏、特异的抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条,本发明也提供了该试剂条的制备方法。

本发明的另一目的是提供一种对人血红蛋白高度特异的抗人血红蛋白单克隆抗体。

本发明也提供一种产生上述抗人血红蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

为达上述目的，本发明的技术方案如下：

本发明使用的杂交瘤细胞株 B9 已经于 2003 年 7 月 1 日，在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏号为：CGMCC 0970。

5 本发明提供了抗人血红蛋白的单克隆抗体，可以用常规技术从具有保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9 产生。

本发明提供了抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条，该试剂条包含本发明所述 CGMCC 0970 杂交瘤细胞株 B9 产生的抗人血红蛋白单克隆抗体。

本发明提供了抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条，该试剂条依次包括：

10 加样区，其包括空白惰性材料区及包含包附胶体金的本发明所述抗人血红蛋白单克隆抗体区；

反应区，其包含检测线和质控线；

吸附区；

本发明检测试剂条，其特征是：加样区的空白惰性材料区一端与包含包附胶体金的本发明所述抗人血红蛋白单克隆抗体区一端有部分重叠。

15 本发明所述的检测试剂条，其特征是：加样区的一端与反应区的一端有部分重叠，反应区的另一端与吸附区的一端有部分重叠。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：加样区、反应区和吸附区固定在单面胶塑料垫板层上。

20 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的一端部分与加样区上粘有单面胶带层，反应区的另一端部分与吸附区上粘有单面胶带层，其中反应区的一端部分与加样区上粘有的单面胶带层上标有检测时液面可达最大高度的 MAX 线。

25 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的一端部分与加样区上粘有的单面胶带层可以顺延回折包覆加样区的一端，并粘附固定在单面胶塑料垫板层的背面，反应区的另一端部分与吸附区上粘有的单面胶带层可以顺延回折包覆吸附区另一端，并粘附固定在单面胶塑料垫板层的背面。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：加样区包附胶体金的本发明所述的抗人血红蛋白单克隆抗体加载在玻璃纤维中，加样区的空白惰性材料区是玻璃纤维。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：检测线和质控线加载在硝酸纤维素膜上。

30 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的检测线是另一抗人血红蛋白多或单克隆抗体，其与包附胶体金的本发明所述抗人血红蛋白的抗体针对的是相同的

抗原，但其抗原结合位点或称抗原决定簇不相同或相同。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的检测线喷涂的是含有 0.2—1% 蔗糖的兔或羊抗人血红蛋白多克隆抗体。

5 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的质控线是与包附胶体金的本发明所述的抗人血红蛋白单克隆抗体起特异反应的物质。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的质控线喷涂的是含有 0.2—1% 蔗糖的羊抗鼠 IgG 抗体。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：吸附区是滤纸，本发明所用的是特定规格的厚滤纸。

10 本发明的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法，包括以下步骤：

1) 人血红蛋白单克隆抗体的制备：将保藏号为 CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株 B9 按常规方法复苏并培养，注入小鼠腹腔内，处死小鼠，收集腹水；

2) 分离纯化本发明抗人血红蛋白单克隆抗体：以常规正辛酸加硫酸铵法或者亲和层析法等进行；

15 3) 胶体金的制备：将氯金酸 (HAuCl₄) 以还原剂加热制成胶体金溶液；

4) 胶体金—抗人血红蛋白单克隆抗体结合物制备：将步骤 2) 中制得的单克隆抗体搅拌下加入胶体金溶液中，使抗体包附在胶体金颗粒表面上；

5) 试剂条原材料的预处理：对与检测过程直接相关的材料玻璃纤维和硝酸纤维素膜进行预处理；

20 6) 胶体金—抗人血红蛋白单克隆抗体结合物处理及载入玻璃纤维：用稀释液稀释步骤 4) 制得的胶体金—抗人血红蛋白单克隆抗体结合物，然后用稀释后的该结合物饱和浸泡玻璃纤维，然后干燥；

7) 在处理好的反应区硝酸纤维素膜上喷涂检测线和质控线；

25 8) 组装试剂条：在单面胶塑料板层上粘贴固定有加样区的步骤 5) 处理过的空白玻璃纤维区及步骤 6) 制得的胶体金—抗人血红蛋白单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维，反应区的硝酸纤维素膜及吸收区的滤纸；加样区的空白玻璃纤维区一端与步骤 6) 制得的胶体金—抗人血红蛋白单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维区一端有部分重叠；加样区的玻璃纤维一端与反应区的硝酸纤维素膜的一端有部分重叠，反应区的硝酸纤维素膜的另一端与吸收区滤纸的一端有部分重叠；其中反应区的硝酸纤维素膜的一端部分与加

30

样区的玻璃纤维上粘有单面胶带层，反应区的硝酸纤维素膜的另一端部分与滤纸上粘有单面胶带层；

9) 8) 所制成的母版试剂条裁剪成成品试剂条；

10) 测试剂条的性能，确定其是否合格。

5 本发明所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法的一个特征是：其中步骤4) 搅拌后，以10%NaCl 鉴定其稳定情况，加BSA 和PEG 溶液，12,000 r/min 离心50 分钟，沉淀以保护液：1.0mmol/L 四硼酸钠-HCl, 0.1%BSA, 0.01%NaN₃, pH 7.4 重悬，置4°C 保存备用。

10 本发明所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法的一个特征是：其中步骤5) 是在4°C，用含0.5%吐温80 的50mM Tris-HCl, pH8.0 缓冲液浸泡玻璃纤维过夜，以无菌超纯水漂洗去盐，无菌高效过滤器下吹干；以含0.05%吐温20 的20mM 磷酸盐生理盐水缓冲液(pH7.4) 浸泡硝酸纤维素膜1 至2 小时，再以无菌超纯水漂洗去盐，亦用现泡并吹干，并且所有缓冲液均以0.45μm 滤器过滤除菌。

15 本发明所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法的一个特征是：其中步骤6) 中的稀释液是：0.2~1.0%牛 IgG、0.1~0.5%PVP40 或30、0.05~0.1%PEG20,000、0.5~2.0%BSA、0.02%NaN₃ 的生理PBS 缓冲液(pH7.4)。

本发明所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其特征是：反应区的检测线喷涂的是含有0.2—1%蔗糖的兔或羊抗人血红蛋白多克隆抗体。

20 本发明所述的制备抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其特征是：反应区的质控线喷涂的是含有0.2—1%蔗糖的羊抗鼠IgG 抗体。

25 本发明保藏号为CGMCC 0970 的杂交瘤细胞株B9 产生的抗人血红蛋白单克隆抗体及制成的试剂条的灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但是特异性优于国外产品，完全符合法医学检验标准和要求，有利于迅速、准确地检验鉴定案件物证，快速破案，利国利民。

为了进一步理解本发明的实质，下面结合附图及具体实施方式对本发明做进一步说明。

附图说明

30 图1 是本发明实施例2 制得的抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度

和特异性的测试结果。

图 2 是本发明实施例 2 制得的抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条对猴血特异性的测试结果。

图 3 是美国 Pan Probe 公司抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

图 4 是加拿大 IND 公司抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

图 5 是美国 Medyl 公司抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

图 6 是美国 Acon 公司（杭州加工）抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

图 7 是保存不同年限（分别为 1963 年、1974 年、1980 年、1989 年的人血痕）的陈旧人血痕，用本发明实施例 2 制得的产品 (A)，同时与加拿大 IND 公司 (B)、美国 Acon (在杭州加工制作) (C)、Medyl (D)、Pan Probe (E) 公司的抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条进行测定的检验结果。

图 8 是从人血痕、常见十种动物（猪、羊、牛、马、驴、狗、兔、鸡、鸭、鹅）血痕及其混合血痕、空白检材、人精斑、人唾液斑、人初乳斑、阴道分泌物以及来自案件的人血痕等共 32 份中随机抽取 20 份，用本发明实施例 2 制得的产品检测的结果。

图 9 是本发明抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的最佳示意图。

具体实施方式

实施例 1 产生人血红蛋白单克隆抗体的 CGMCC 0970 杂交瘤细胞株 B9 的制备

① 免疫小鼠：对每只 BALB/C 小鼠，先以加完全福氏佐剂的 100 μ g 人血红蛋白（美国 Sigma 公司产品）进行四肢、皮下多点及腹腔内注射，4 周后加不完全佐剂同样剂量腹腔内注射，再过 4 周尾静脉注射，3 天后杀鼠取脾脏按常规方法与 SP2/0 细胞融合。

② 筛选与克隆化：融合细胞以 HAT 选择、倒置相差显微镜观察，挑选出活杂交细胞。以 3 μ g/ml 人血红蛋白溶液包被 96 孔酶标板（注：留出一孔以 5%牛血清白蛋白或 10%脱脂奶粉包被作阴性对照），间接 ELISA 法，即将包被人血红蛋白的酶标板 37 $^{\circ}$ C 温箱放 1hr，倒出孔中液体，再以 20mM 磷酸盐生理盐水缓冲液

- (pH7.4) 洗涤各孔 1~3 次, 于各孔中分别加入原液、5 倍稀释的杂交细胞培养上清, 37°C 温箱放 1hr, 以含 0.05% 吐温 20 的 20mM 磷酸盐生理盐水缓冲液 (pH7.4) 洗涤各孔 3~6 次, 而后各孔加入按说明书规定的适宜工作浓度的羊抗鼠 IgG, 反应 30 分钟后同样以含 0.05% 吐温 20 的 20mM 磷酸盐生理盐水缓冲液 (pH7.4) 洗涤各孔 3~6 次, 再于各孔中加入 DAB 或 ABTS, 观察各孔颜色变化情况, 筛选出人血红蛋白抗原阳性杂交细胞。抗原阳性细胞以滋养细胞和 HT 培养液进行 1 毫升稳定培养后, 以有限稀释法克隆化, 制备出人血红蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株。
- 5
- ③ 诱生腹水: 以分泌抗人血红蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株接种 BALB/C 小鼠腹腔, 10~15 天后收集产生的腹水。
- 10
- ④ 分泌特异人血红蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株的建立: 正辛酸结合硫酸铵法从腹水中纯化出人血红蛋白单克隆抗体, 分别以间接 ELISA、抑制 ELISA 和斑点 ELISA 法 (抗原均为 10% 的各种动物单独及混合血红蛋白溶液; 动物血痕、人不同体液或相应斑痕提取液) 检测对猪、狗、兔、羊、马、牛、驴、骡、小鼠、猴等动物血红蛋白溶液和猪、狗、鸡、火鸡、兔、羊、马、牛、驴、骡、小鼠、猴、猫、豚鼠、鱼 (甲鱼、鲤鱼、草鱼、鲫鱼、鳗鱼、黑鱼、黄鱼)、乌龟等动物血痕; 人精斑、唾液、阴道分泌物、血清、初乳、尿液等人体液及相应斑痕提取液的反应性。由此鉴定出只对人血红蛋白起反应的单克隆杂交瘤细胞株, 其中一株命名为 B₉, 于 2003 年 7 月 1 日, 在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏号为: CGMCC 0970。
- 15
- 20
- ⑤ 效价及抗体类型和亚类鉴定: 细胞培养上清倍比稀释; 腹水先 200 倍稀释、再倍比稀释, 间接 ELISA 法测效价, 结果 CGMCC 0970 杂交瘤细胞株 B₉ 为: 上清 512、腹水 1.28×10^5 倍; 浓缩 10 倍细胞培养上清以双向扩散法与抗小鼠 IgG (Fc 段)、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃ 和 IgM 抗体进行反应, 结果抗体为小鼠 IgG₁。
- 25

实施例 2 抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的制备

- ① 抗人血红蛋白单克隆抗体腹水制备: 从液氮中取出 CGMCC 0970 杂交瘤细胞株 B₉, 常规方法复苏并培养。将培养好的适当数量的培养细胞注入小鼠腹腔内, 7~10 天后或观察可以宰杀时处死小鼠、收集小鼠腹水。
- 30
- ② 分离纯化抗人血红蛋白单克隆抗体: 以常规正辛酸加硫酸铵法或者亲和层析法进

- 行, 后者具体是: 小鼠腹水中加入 1/10 体积的 1.0 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液, 而后再加入饱和硫酸铵溶液或固体硫酸铵至 50%饱和度, 放置 2hr 后, 离心, 沉淀以生理 PBS (20 mmol/L 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠, 0.1mol/L NaCl, pH 7.4) 缓冲液重溶并对该缓冲液充分透析。以透析缓冲液平衡 HiTrap™ Protein G HP 柱, 透析后蛋白溶液上柱, 而后先以平衡柱的缓冲液洗脱未结合的杂蛋白, 再以 0.1mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH2.7) 洗脱结合的蛋白, 测 A₂₈₀ 值, 合并该值在 0.1 以上的组份, 此即为纯化的本发明 CGMCC 0970 杂交瘤细胞株 B9 产生的抗人血红蛋白单克隆抗体, SDS-PAGE (即 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳) 测纯度, 对 5mM NaCl 溶液透析, 浓缩至适宜的浓度, 待用。
- 5
- 10 ③ 胶体金制备: 称取 Sigma 公司产氯金酸 (货号: G-4022) 并配成 1%浓度, 取适量加入超纯水中, 加热煮沸, 快速加入 1%的柠檬酸钠溶液, 煮至溶液变为紫红色。冷却, 以 0.2mol/L K₂CO₃ 调 pH 至 8.0~8.2, 0.45μm 过滤。取适量稀释 1 倍, 测 A₅₃₀ 值为 1.912。
- 15 ④ 胶体金-本发明抗人血红蛋白单克隆抗体结合物制备: 按 30μg/ml 将步骤②纯化的抗人血红蛋白单克隆抗体加入到胶体金溶液中, 搅拌 20~30 分钟, 以 10%NaCl 鉴定其稳定情况。加 BSA (牛血清白蛋白) 和 PEG (聚乙二醇) 溶液适量, 12,000 r/min 离心 50 分钟, 沉淀以保护液 (1.0mmol/L 四硼酸钠-HCl, 0.1%BSA, 0.01%NaN₃, pH 7.4) 重悬, 置 4°C 保存备用。
- 20 ⑤ 试剂条原材料处理: 为保证检验结果的准确性、特异性, 对与检测过程直接相关的材料要进行预处理。具体是: 以含 0.5%吐温 80 的 50mM Tris-HCl, pH8.0 缓冲液浸泡玻璃纤维过夜 (4°C), 以无菌超纯水漂洗去盐, 无菌高效过滤器下吹干; 以含 0.05%吐温 20 的 20mM 磷酸盐生理盐水缓冲液 (pH7.4) 浸泡硝酸纤维素膜 1 至 2 小时, 再以无菌超纯水漂洗去盐, 亦现用现泡并吹干。(注: 所有缓冲液均以 0.45μm 滤器过滤除菌)。
- 25 ⑥ 胶体金-抗人血红蛋白单克隆抗体结合物的处理和载入玻璃纤维: 以稀释液 (含 0.2%牛 IgG、0.5%PVP40 (或 30)、0.1%PEG20,000、0.5%BSA、0.02%NaN₃ 的生理 PBS 缓冲液, pH7.4) 将胶体金-单抗结合物稀释 6 倍, 均匀地加到处理过的玻璃纤维上 (宽约 15mm), 37°C 烘干。
- 30 ⑦ 在处理好的反应区硝酸纤维素膜上喷涂检测线和质控线: 将效价在 20,000 以上、特异性合乎法医学检验标准和要求的纯化 (以结合人血红蛋白的 CNBr 活化琼脂糖

凝胶制成的亲和柱进行)兔或羊抗人血红蛋白多克隆抗体(含量在3mg/ml以上)溶液(含0.2~1%蔗糖)1 μ l点在硝酸纤维素膜(宽约20mm)上,点距硝酸纤维素膜相近的宽度边约6~8mm;在距该点约4~5mm的地方点1 μ l的羊抗鼠IgG(含量1mg/ml,也含0.2~1%蔗糖);凉干后,膜置封闭液(PBS配制的1.0-10%脱脂奶粉)中,37 $^{\circ}$ C温育1小时,取出再以洗涤液(20mM磷酸缓冲液,pH7.0)洗两次,凉干。

(注:以机器点样时,两个点样点为约1mm宽喷涂而成的线,其中喷抗人血红蛋白的线称为检测线,而喷羊抗鼠IgG的线称为质控线。)

⑧ **组装试剂条:**在单面胶塑料垫板层(宽约80mm、厚约0.8mm)上,先粘贴⑦处理好的硝酸纤维素膜(注意不要粘贴有样品的一面),使其点或喷有抗人血红蛋白即检测线的一端距该垫板临近的宽度边约30mm,点或喷有羊抗鼠IgG即质控线的一端距垫板另一宽度边也约30mm,形成反应区;将⑥处理好的材料覆盖点或喷有抗人血红蛋白一端的硝酸纤维素膜约2mm,其余部分粘贴于垫板上,以⑤处理过的玻璃纤维(宽25mm)一端同垫板宽度边找齐并向上粘贴,其余部分覆盖已粘贴于垫板的按⑥处理好的材料,形成加样区;在已粘贴的硝酸纤维素膜的另一端,以Whatman 3M或浙江产新华厚滤纸(宽约30mm)也覆盖约2mm,其余部分粘贴于垫板上形成吸附区;以单面胶胶带(其上应标示有指示检测时液面可达的最大高度的MAX线,该线应距垫板临近宽度边约15mm)在粘有玻璃纤维的垫板一端覆盖约33-35mm再回折并粘贴于垫板背面,在粘有滤纸的垫板另一端以单面胶胶带(通常带不同颜色)覆盖约33mm再回折并粘贴于垫板背面,注意胶带与硝酸纤维素膜的两个相接端一定要粘贴结实。由此而制成母版胶体金试剂条,而后按3-4mm宽度沿垫板宽度方向裁切,所得即为成品抗人血红蛋白胶体金检测试剂条,如图9所示。

实验结果:

成品试剂条的检测

25 实验1 灵敏度测定

以2002年8月份新配制的6人份混合人血红蛋白溶液和SIGMA公司的标准人血红蛋白溶液(货号527-30)为检测所用抗原;用本发明实施例2制得的产品(A),同时与加拿大IND公司(B)、美国Acon(在杭州加工制作)(C)、Medy1(D)、Pan Probe(E)公司的抗人血红蛋白胶体金试剂条进行测定,结果见图1、图3至图6和表1。

30

表1 灵敏度及与国外类似产品比较

	抗原稀 释倍数	A		B		C		D		E	
		10	30	10	30	10	30	10	30	10	30
5	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	100000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200000	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	300000	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
抗原定量浓度(ng/ml)											
15	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	100	±	±	-	-	+	+	+	+	-	-

注:表中“+”代表阳性;“-”代表阴性;“±”似阴似阳;10和30单位为分钟,表示观察时间。

结论:本发明抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的灵敏度相当或优于国外同类产品。

实验2 准确性、特异性测试

以十种常见动物(牛、马、羊、驴、狗、兔、猪、鸡、鸭、鹅)血溶液(每种动物的抗凝血经冻融后离心上清液)为检测所用抗原,用本发明实施例2制得的产品(A),同时与加拿大IND公司(B)、美国Acon(在杭州加工制作)(C)、Medy1(D)、Pan Probe(E)公司的抗人血红蛋白胶体金试剂条进行测定,同时用本发明实施例2制得的产品(A)对猴血溶液进行了特异性测定,结果见图1至图6和表2。

表2 准确性、种属特异性及与国外同类产品比较

抗原及稀 释倍数	A		B		C		D		E		
	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30	
5 猪	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 羊	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 牛	100	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	500	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	1000	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	5000	-	-	-	-	-	±	±	-	-	
20 马	100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	500	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25 狗	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5000	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
30 兔	100	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	500	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	1000	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	5000	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
35 鸡	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5000	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
40 鸭	100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	500	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	1000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	5000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
40 鹅	100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	500	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	1000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	5000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
45 猴	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
生理盐水	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注:表中“+”代表阳性;“-”代表阴性;“±”似阴似阳;10 和 30 单位为分钟,表示观察时间。

结论:本发明抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条的准确性和特异性优于同类产品。

5

实验3 陈旧人血痕检验

保存不同年限(分别为1963年、1974年、1980年、1989年的人血痕)的陈旧人血痕,分别编为一、二、三、四号,用本发明实施例2制得的产品(A),同时与加拿大IND公司(B)、美国Acon(在杭州加工制作)(C)、Medy1(D)、Pan Probe(E)公司的抗人血红蛋白胶体金试剂条进行测定,实验结果见图7和表3。

10

表3 与国外同类产品对陈旧人血痕的检测比较

不同年代人血痕	A		B		C		D		E	
	5	30	5	30	10	30	10	30	10	30
一	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
二	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
三	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
四	+	+	+	+	-	±	-	-	-	-

15

注:表中“+”代表阳性;“-”代表阴性;“±”似阴似阳;5、10 和 30 单位为分钟,表示观察时间。

20

结论:本发明抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条在检测陈旧血痕方面性能相当或优于同类产品。

实验4 随机盲测

从人血痕、常见十种动物(猪、羊、牛、马、驴、狗、兔、鸡、鸭、鹅)血痕及其混合血痕、空白检材、人精斑、人唾液斑、人初乳斑、阴道分泌物以及来自案件的人血痕等共32份中随机抽取20份,用本发明实施例2制得的产品(A)检测,结果见图8和表4。

25

30

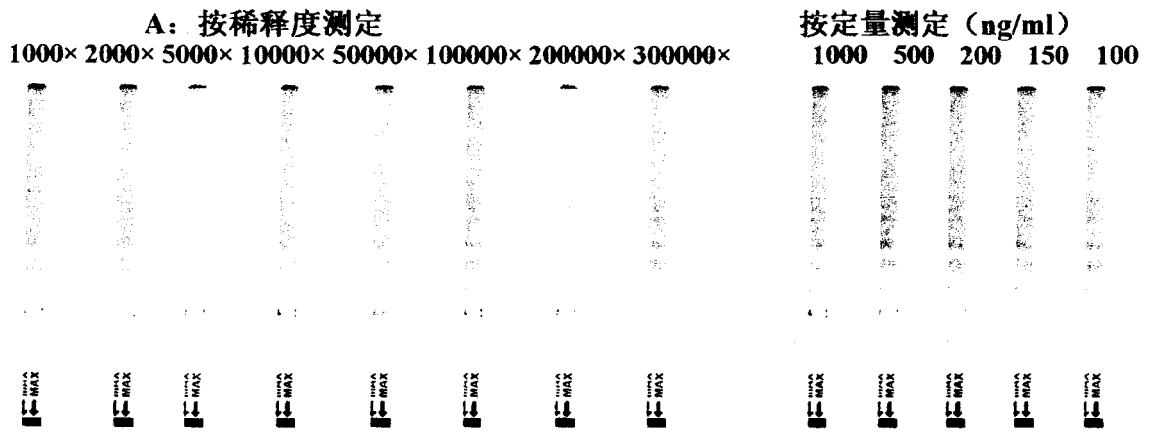
表4 盲测检验结果

编号	检材名称	结果	编号	检材名称	结果
1	人血斑	+	11	人精斑	-
2	唾液斑	-	12	狗血痕	-
5	3 阴道分泌物	-	13	鸡血痕	-
4	人精斑	-	14	人血斑	+
5	兔血痕	-	15	猪血痕	-
6	空白检材	-	16	王辉血样	+
7	人初乳	-	17	人精斑	-
10	8 常见十种动物混合血斑	-	18	羊血痕	-
9	死者贾继兵血样	+	19	阴道分泌物	-
10	10 人精斑	-	20	牛血痕	-

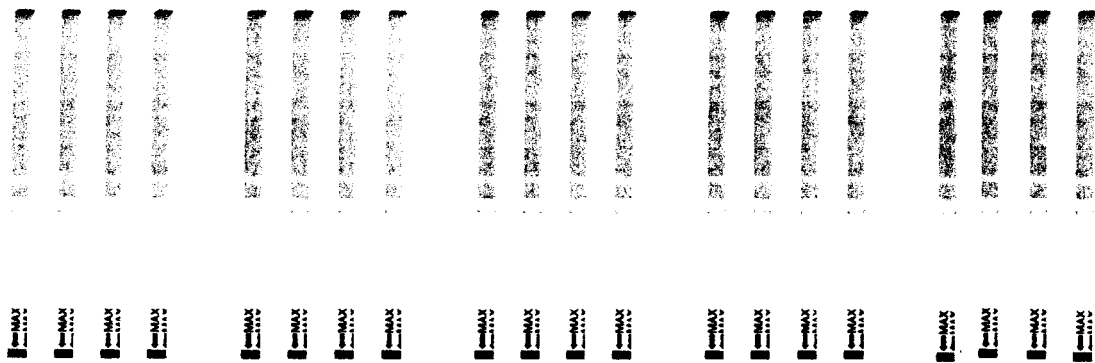
结论：本发明抗人血红蛋白胶体金免疫层析检测试剂条对盲测检材做出了准确检验。

- 15 实验结果表明，本发明所制备的抗人血红蛋白胶体金检测试剂条灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但特异性则优于国外产品，国外产品都或多或少存在非特异反应；而对陈旧人血痕的检验也说明其达到国际领先水平；对实际检材的盲测完全正确。证明了其在法医学上的独特价值。

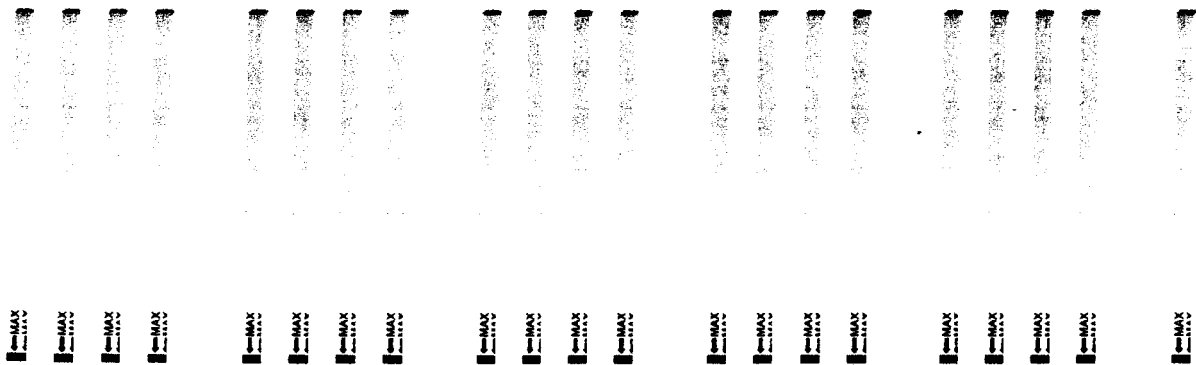
灵敏度测试



特异性测定



猪(100× 500× 1000× 5000×) 羊(100× 500× 1000× 5000×) 牛(100× 500× 1000× 5000×) 马(100× 500× 1000× 5000×) 驴(100× 500× 1000× 5000×)



狗(100× 500× 1000× 5000×) 兔(100× 500× 1000× 5000×) 鸡(100× 500× 1000× 5000×) 鸭(100× 500× 1000× 5000×) 鹅(100× 500× 1000× 5000×) 生理盐水

图 1

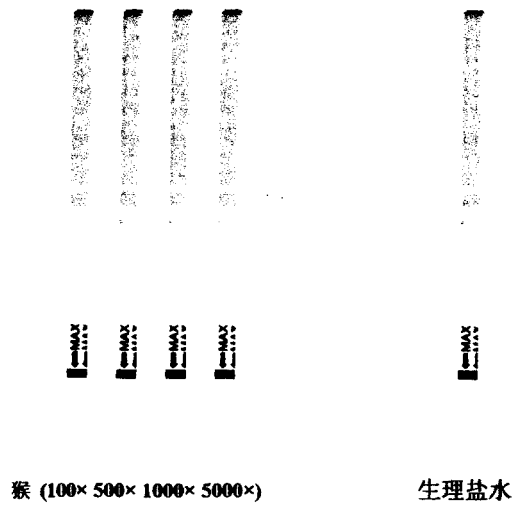


图 2

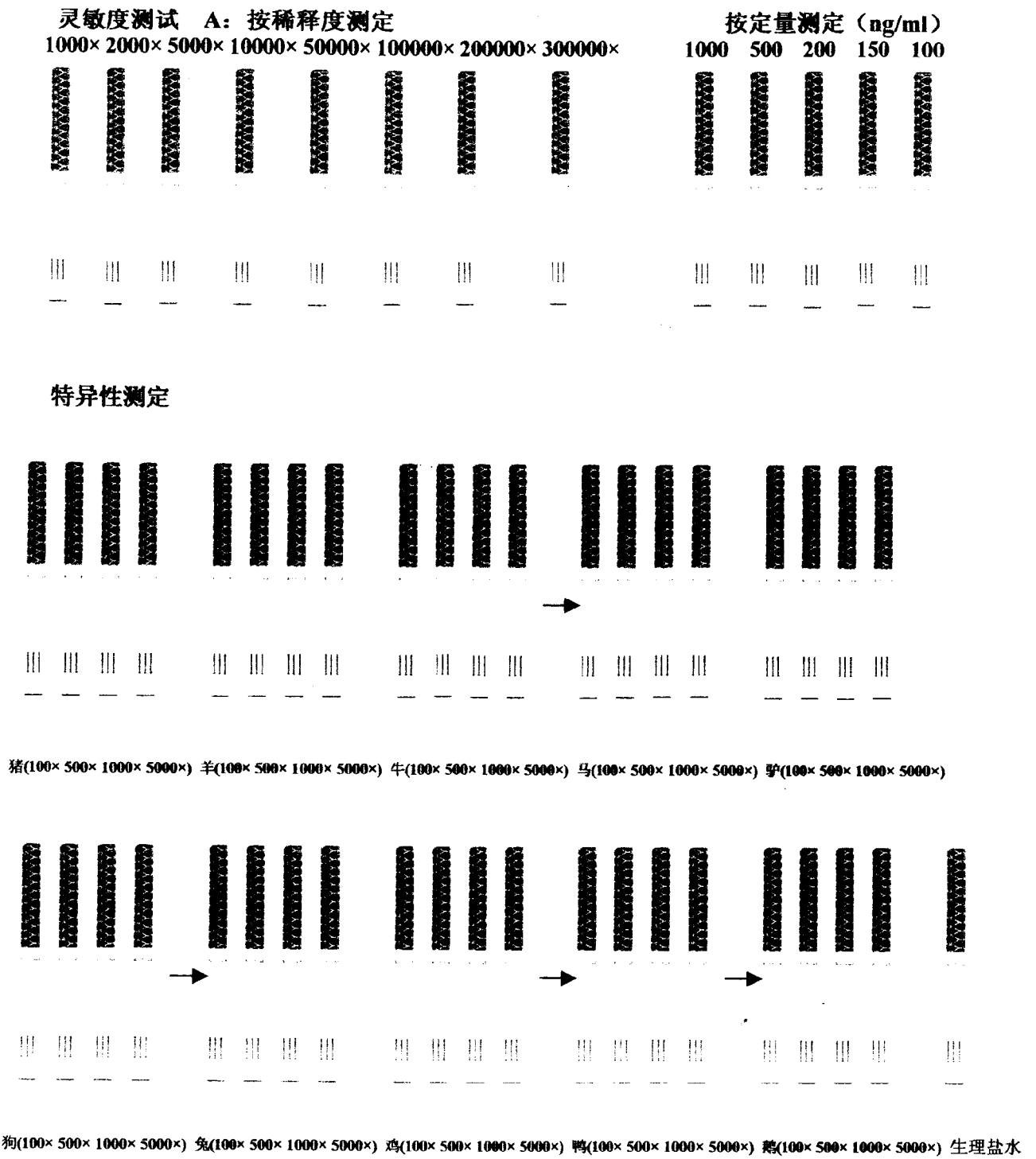
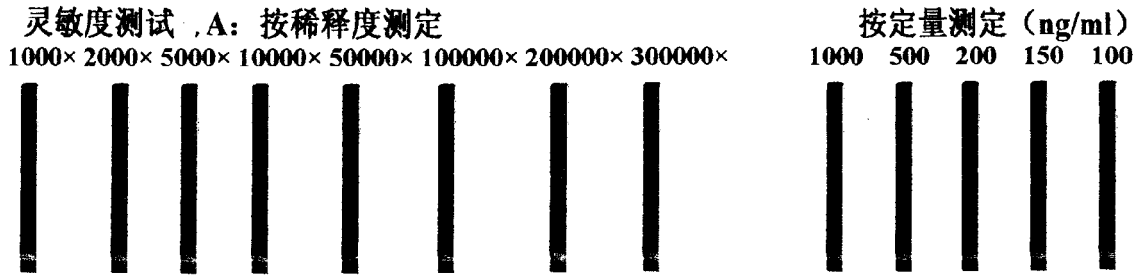
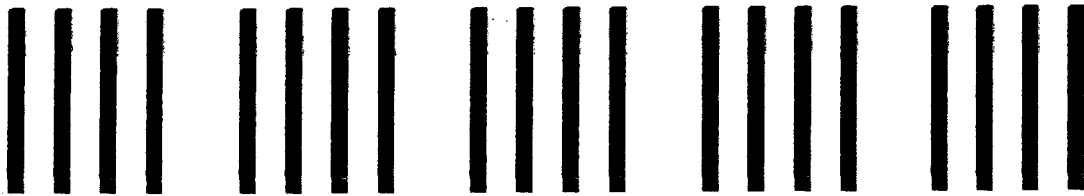


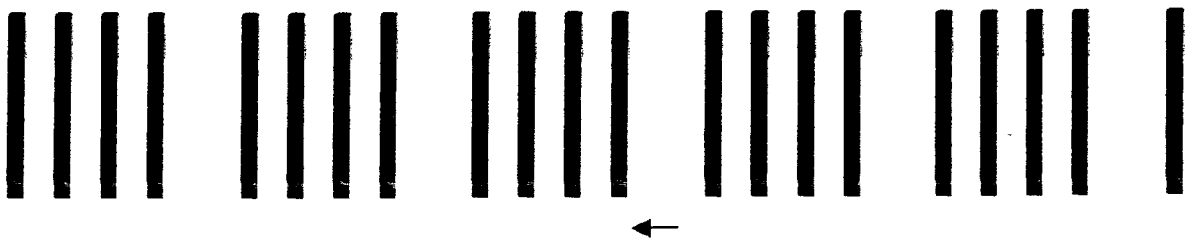
图 3



特异性测定



猪(100× 500× 1000× 5000×) 羊(100× 500× 1000× 5000×) 牛(100× 500× 1000× 5000×) 马(100× 500× 1000× 5000×) 驴(100× 500× 1000× 5000×)



狗(100× 500× 1000× 5000×) 兔(100× 500× 1000× 5000×) 鸡(100× 500× 1000× 5000×) 鸭(100× 500× 1000× 5000×) 鹅(100× 500× 1000× 5000×) 生理盐水

图 4

灵敏度测试 A: 按稀释度测定

1000× 2000× 5000× 10000× 50000× 100000× 200000× 300000×

按定量测定 (ng/ml)

1000 500 200 150 100



特异性测定



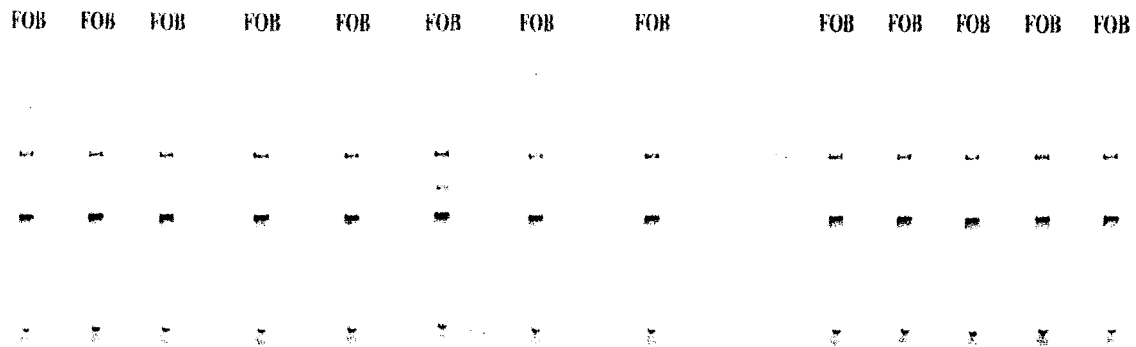
猪(100× 500× 1000× 5000×) 羊(100× 500× 1000× 5000×) 牛(100× 500× 1000× 5000×) 马(100× 500× 1000× 5000×) 驴(100× 500× 1000× 5000×)



狗(100× 500× 1000× 5000×) 兔(100× 500× 1000× 5000×) 鸡(100× 500× 1000× 5000×) 鸭(100× 500× 1000× 5000×) 鹅(100× 500× 1000× 5000×) 生理盐水

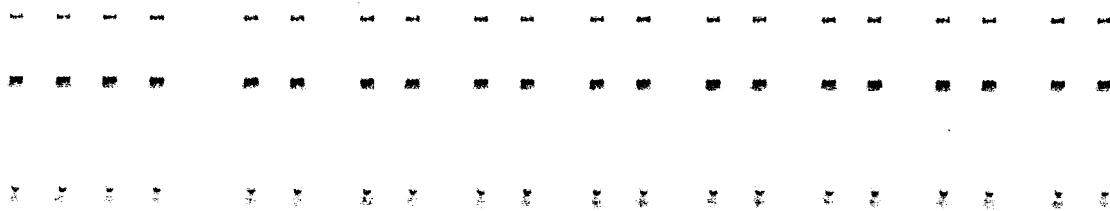
图 5

灵敏度测试 A: 按稀释度测定 **按定量测定 (ng/ml)**
 1000× 2000× 5000× 10000× 50000× 100000× 200000× 300000× 1000 500 200 150 100



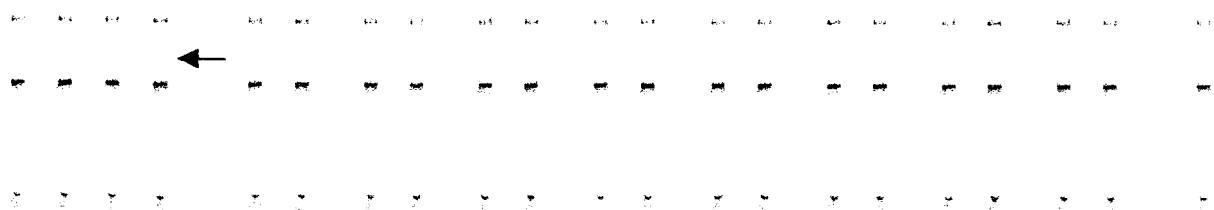
特异性测定

FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB



猪(100× 500× 1000× 5000×) 羊(100× 500× 1000× 5000×) 牛(100× 500× 1000× 5000×) 马(100× 500× 1000× 5000×) 驴(100× 500× 1000× 5000×)

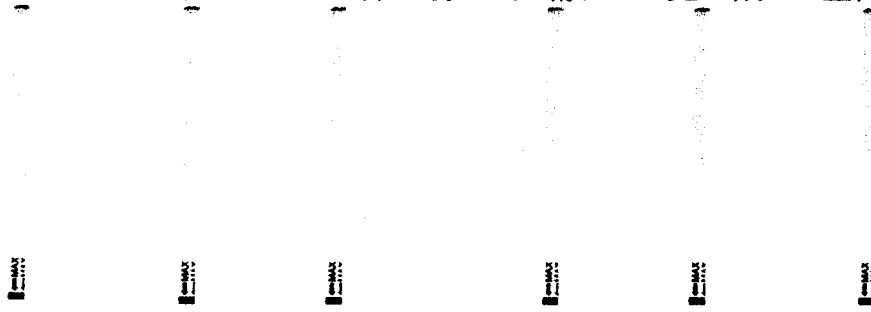
FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB FOB



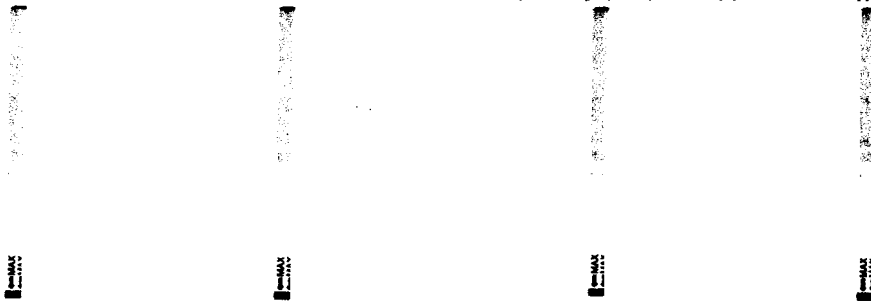
狗(100× 500× 1000× 5000×) 兔(100× 500× 1000× 5000×) 鸡(100× 500× 1000× 5000×) 鸭(100× 500× 1000× 5000×) 鹅(100× 500× 1000× 5000×) 生理盐水

图 6

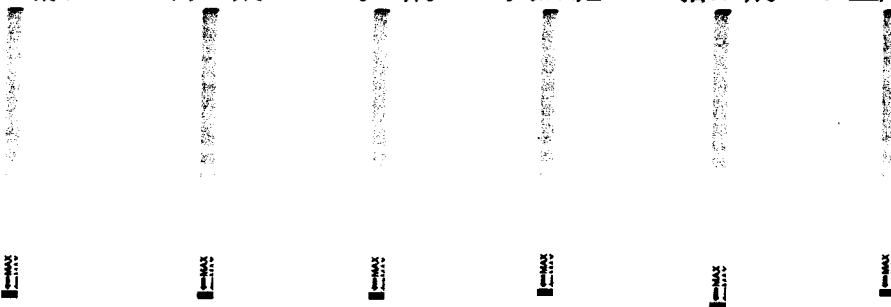
检材 1. 人血斑 2. 唾液斑 3. 阴道分泌物 4. 人精斑 5. 兔血痕 6. 空白检材



检材 7. 人初乳 8. 常见十种动物混合血斑 9. 死者贾继兵血样 10. 人精斑



检材 11. 人精斑 12. 狗血痕 13. 鸡血痕 14. 人血斑 15. 猪血痕 16. 王辉血样



检材 17. 人精斑 18. 羊血痕 19. 阴道分泌物 20. 牛血痕

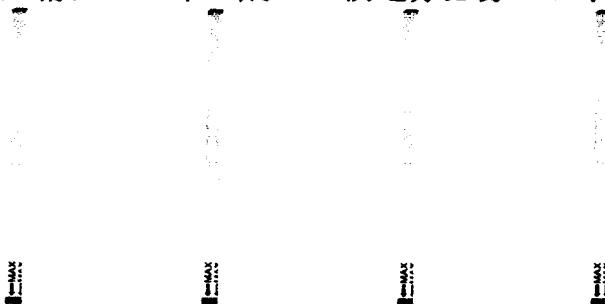


图 8

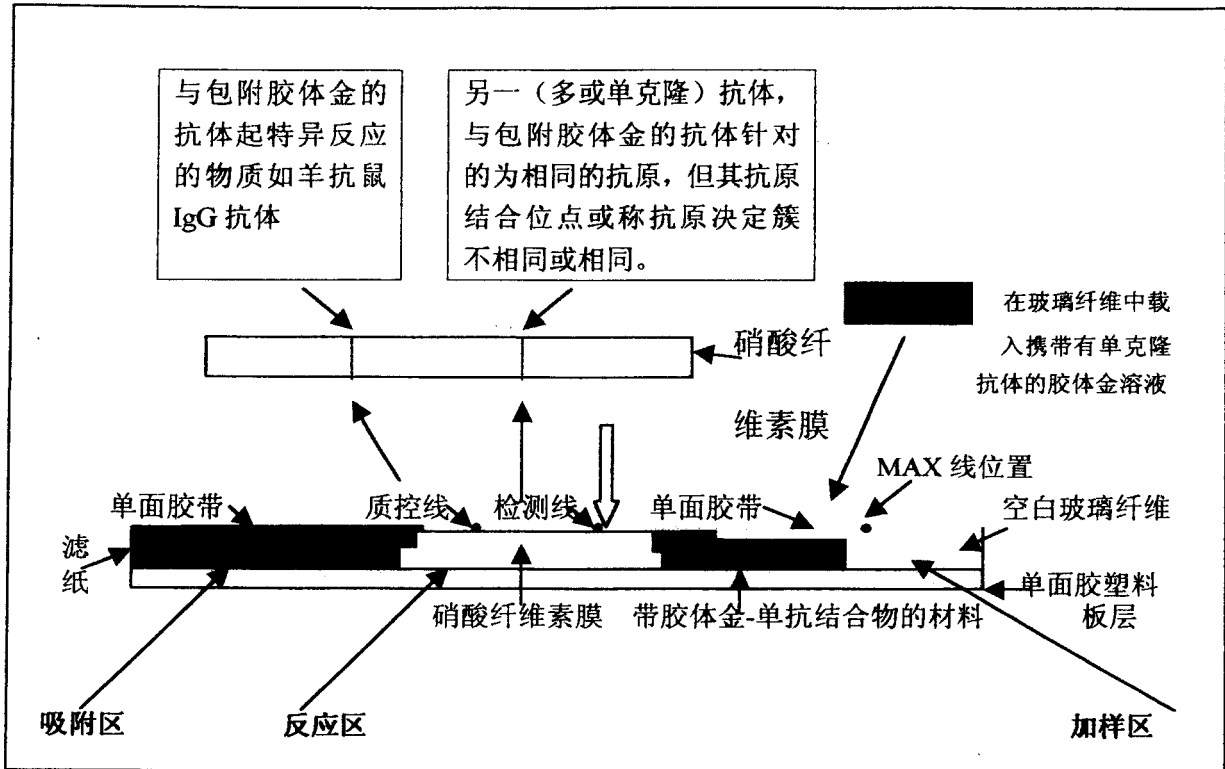


图 9

专利名称(译)	抗人血红蛋白检测试剂条及其含有的单克隆抗体		
公开(公告)号	CN1490407A	公开(公告)日	2004-04-21
申请号	CN03153440.6	申请日	2003-08-13
[标]发明人	李兆隆 王俭 张英兰 徐秀兰 王香菊 常彩琴 严红 蒯应松 陈艳		
发明人	李兆隆 王俭 张英兰 徐秀兰 王香菊 常彩琴 严红 蒯应松 陈艳		
IPC分类号	C07K16/00 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
其他公开文献	CN1233828C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了具有保藏号为CGMCC 0970的杂交瘤细胞株B9，由具有保藏号为CGMCC 0970的杂交瘤细胞株B9产生的抗人血红蛋白的单克隆抗体，和含有该抗人血红蛋白单克隆抗体的胶体金免疫层析检测试剂条及该试剂条的制备方法。本发明由保藏号为CGMCC 0970的杂交瘤细胞株B9产生的抗人血红蛋白单克隆抗体及其试剂条的灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但是特异性优于国外产品，完全符合法医学检验标准和要求，有利于迅速、准确地检验鉴定案件物证，快速破案，利国利民。

