

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 30/02 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510123585.7

[43] 公开日 2006年10月18日

[11] 公开号 CN 1847850A

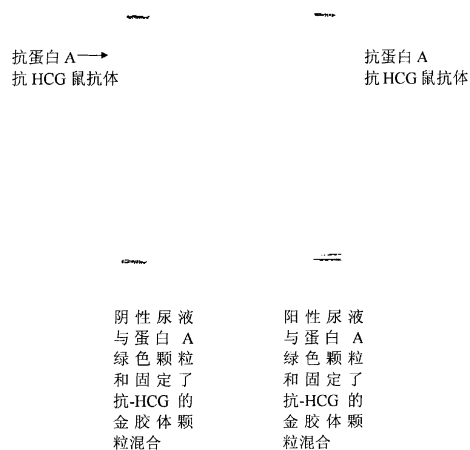
[22] 申请日 2005.11.21  
[21] 申请号 200510123585.7  
[30] 优先权  
    [32] 2004.11.19 [33] US [31] 60/628962  
[71] 申请人 挪威抗体公司  
    地址 挪威奥斯  
[72] 发明人 厄于斯泰因·拉森

[74] 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司  
    代理人 周建秋 王凤桐

权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称  
    诊断对照系统

[57] 摘要  
    提供了一种新的可用于免疫色谱分析的对照系统，其中该对照系统包括由抗原和抗体组成的结合对，其中该抗原为种特异性物质，并且前提是该抗原本身不是抗体。



1、一种用于免疫色谱系统的对照系统，该对照系统包括作为结合对的对照试剂和对照检测剂，该结合对由抗原和针对所述抗原的抗体组成，其中所述抗原与分析物来源于不同物种，并且前提是所述抗原本身不是抗体，其中所述抗原为蛋白 A 或血蓝蛋白。

2、根据权利要求 1 所述的对照系统，其中，所述结合对的抗原固定在有色微粒上。

3、根据权利要求 1 所述的对照系统，其中，所述结合对的抗体固定在有色微粒上。

4、根据权利要求 1 所述的对照系统，其中，所述对照试剂为蛋白 A 或蛋白 G，并且其中所述对照检测剂为抗蛋白 A 抗体或抗蛋白 G 抗体，优选为鸟类抗蛋白 A 抗体或鸟类抗蛋白 G 抗体。

5、根据权利要求 1 所述的对照系统，其中，所述抗原为软体动物血蓝蛋白。

6、根据权利要求 5 所述的对照系统，其中，所述软体动物血蓝蛋白组成对照试剂，并且其中所述对照检测剂为抗血蓝蛋白抗体，优选为鸟源抗血蓝蛋白抗体。

7、根据权利要求 5 所述的对照系统，其中，所述软体动物血蓝蛋白组成对照检测剂，并且其中所述对照试剂为抗血蓝蛋白抗体，优选为鸟源抗血蓝蛋白抗体。

8、根据权利要求 1-7 中任意一项所述的对照系统，其中，所述对照检测剂被标记，优选通过固定在微粒上进行标记，所述微粒优选为金胶体颗粒或有色乳胶颗粒。

9、根据权利要求 1-7 中任意一项所述的对照系统，其中，分析物检测剂和对照检测剂固定在微粒上，所述微粒优选为不同颜色的乳胶颗粒。

10、根据权利要求 1-9 中任意一项所述的对照系统，其中，蛋白 A 通过物理吸附或化学偶联固定在进行测试的多孔底物上。

11、一种确定色谱分析效能的方法，该方法包括以下步骤：

提供色谱分析系统；

提供具有如权利要求 1-10 中任意一项所述对照系统的所述系统，其中该对照系统包括至少一种作为抗原的对照组分；

将测试仪暴露到测试材料；

将测试材料迁移到测试仪中；以及

检查测试区域和对照区域的测试结果。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述色谱系统包括色谱带，其中对照线的位置邻近测试区域。

13、根据权利要求 11 所述的方法，其中，抗蛋白 A 抗体用有色微粒标记，所述有色微粒优选为与测试微粒颜色不同的微粒。

14、根据权利要求 11-13 中任意一项所述的方法，其中，色谱系统的效能是通过使对照试剂-对照检测剂复合物显色进行确定的。

15、一种免疫色谱测试仪，该免疫色谱测试仪包括如权利要求 1-10 中任意一项所述的对照系统。

16、根据权利要求 15 所述的免疫色谱测试仪，其中，所述测试仪还包括色谱带，并且蛋白 A 固定在对照线上，对照检测剂为抗蛋白 A 抗体。

17、根据权利要求 15 所述的免疫色谱测试仪，其中，所述测试仪还包括色谱带，并且血蓝蛋白固定在对照线上，对照检测剂为抗血蓝蛋白抗体。

18、根据权利要求 15 所述的免疫色谱测试仪，其中，所述测试仪还包括色谱带，并且抗血蓝蛋白抗体固定在对照线上，对照检测剂为血蓝蛋白。

19、根据权利要求 15-18 中任意一项所述的免疫色谱测试仪，其中，抗蛋白 A 抗体、血蓝蛋白、抗血蓝蛋白抗体被标记，优选用胶体金颗粒或蓝色乳胶颗粒标记。

20、根据权利要求 19 所述的免疫色谱测试仪，其中，所述色谱带由多孔亲水材料构成，优选由硝化纤维或其它合成的或生物来源的过滤材料、或者多孔玻璃基材或其组合构成。

21、根据权利要求 15-20 中任意一项所述的免疫色谱测试仪，其中，对照试剂通过物理吸附和化学偶联固定。

22、种特异性物质和抗所述物质的抗体在免疫色谱法和免疫色谱仪中作为对照系统的用途。

23、一种用于免疫色谱系统的对照系统，该对照系统包括结合对，其中，所述结合对的一个成员固定在有色微粒上，所述有色微粒的颜色不同于在免疫色谱系统用于使待测分析物显色的微粒的颜色，所述分析物用所述免疫色谱系统检测，并且所述结合对的成员分别为蛋白 A 和抗蛋白 A 抗体，或者血蓝蛋白和抗血蓝蛋白抗体。

---

## 诊断对照系统

### 技术领域

本发明是关于一种可用于体外免疫色谱分析的对照系统，该系统包括由抗原和针对所述抗原的抗体组成的结合对，其中所述抗原与分析物源自不同的物种，并且设定所述抗原本身不是抗体。

此外，本发明的另一方面还涉及一种用于免疫色谱系统的对照系统，该系统包括结合对，其中所述结合对的一个成员固定在有色微粒上，其中所述有色微粒的颜色与在所述免疫色谱系统中用于使待测分析物显色的微粒的颜色不同，所述分析物用所述免疫色谱系统检测。

### 背景技术

免疫色谱技术在过去几十年中一直用作许多体外诊断测试系统的主要原理。通常，这些测试系统是基于吸附到固体载体的特定化合物（结合剂）的使用，所述化合物能鉴别待测的特定分析物并与之结合。然后用各种方法使前述分析物-结合剂复合体显现出来。上述方法和装置也公开了用于说明测试系统合适功能的各种对照方法。这些免疫色谱分析系统和装置的主要原理也在 US 4855240、US 4855210、US 4703017、US 4376110、US 6537828、EP 291194 或 EP 810436 A1 中公开了。

因而，基于免疫色谱的各种系统也在现有技术中公开了。从世界上最大的三家诊断公司中的两家以及它们的产品清单开始，我们看到定性薄层免疫色谱这种形式得到了广泛地应用。美国 Bayer 占领了 Clinitek hCG 尿检验和 Clinitek Microalbumin 尿检验的市场。美国 Abbott 实验室占领了事实妊娠测试(Fact Plus Pregnancy Test)、TestPack hCG 结合物(Combo)、TestPack 衣原体(Chlamydia)、TestPack.链锁状球菌(Strep)A、TestPack 轮状病毒(Rotavirus)

和 TestPack RSV 的市场。小但比较特别的公司可以提及美国 Nubenco Medical International 公司, 该公司占领了人绒毛膜促性腺激素(hCG)、 LH、查格斯氏病(Chagas)、衣原体(Chlamydia)、霍乱(Cholera)、肌酸激酶(CK)-MB、登革热(Dengue)、肌血球素(Myoglobin)、链锁状球菌 A、肝炎 B 抗原、肌钙蛋白(Troponin) I、大便血色素这些类型的测试的市场, 以及用于登革热抗体、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肝炎 B 抗体、单核细胞增多症抗体、用于苍白密螺旋体(*Treponoma pallidum*)和肺结核分枝杆菌(*Mycobacteria tuberculosis*)的抗体的抗体测试的市场, 以及用于肿瘤检测的  $\alpha$  胎蛋白、癌胚抗原(Carcinoembryonal antigen)和前列腺特异性抗原的市场。美国 Millipore 有限公司是过滤材料的专门生产商, 它占领了从 OEM 部门的所谓的 HiFlow 组装试剂盒的用于这些测试类型的全部硬件《组装试剂盒》的市场。英国 Pall Gelman 公司甚至已经发行了用于制备这些产品的指南, 即它们的小册子《免疫色谱, 侧流或测试带开发概念》, 该手册可以从该公司的网站上下载。美国 Acon 实验室有限公司不仅拥有它们自己的这些测试类型的批量生产和销售的市场, 尤其是中国市场, 而且也将这些测试分配给其它公司, 即所谓的 OEM, 标注用户商标进行再次销售。

用于测量这些类型或模式的密度的装置也已经构建, 但仍然很难设计具有足够精确度和准确结果的化学品和装置。已经开发了高尖端技术来克服这些局限性, 即典型的由 Polito 等人的 US 6136610 《Method and apparatus for performing a lateral flow assay》。从 US 6136610 可以明显看出, 需要更复杂和高级的方法和装置来使这种方法定量, 并且要获得工业再现的精度和准确度是非常复杂和高成本的, 直到现在, 实际上还没有商业可行的方法。

Roche 诊断学已经开发了许多这种色谱原理, 其中测试部分的颜色与提供信号的物质之间的密度用作用于测定尿中白蛋白的半定量测试。Diabetes care, 20 (11) 1642-1646 描述了上述测试。

基于免疫色谱的大多数诊断测试通常需要对照测试以确保测试在进行。这种对照系统也需要防止假阴性结果等的发生。因此，免疫色谱测试通常包括对照剂和检测剂，其中对照剂固定在与测试带的检测区相连的对照区上，其中，所述分析物结合物质存在于测试带。

色谱分析通常使用抗体作为对照剂。例如，体外固相化验中，例如现有技术中已知的诊断测试带包括固定抗体，如在对照线上的抗鼠IgG以及在测试线上固定的抗体。然后通过与作为检测剂的抗体结合来使抗鼠IgG呈现。在一些系统中，检测剂即抗体和分析物检测剂是相同的，例如为胶态抗分析物抗体。

然而，例如在对照线上使用抗IgG会引起各种问题，因为在测试样品中出现的抗体可能与在测试系统中出现的标记抗体结合和阻止结合。另一方面，如果测试样品含有饱和量的分析物（即待测化合物），可能引起所有的在测试中出现的标记抗分析物抗体与分析物结合。而且，这会引入所有在测试中存在的抗体与测试线中的试剂结合，使得剩下的非标记抗体与对照线的抗抗体结合。由此干扰对照线的信号，使得结果不可靠。

蛋白质A是由金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）制得的表面蛋白。蛋白质A与免疫球蛋白特别是来自各种物种的IgG的Fc部分结合的事实使得使用这种蛋白作为用于纯化和复性多克隆和单克隆抗体的方法成为可能。

而且，抗蛋白A抗体已经在各种固相分析中用作对照系统；Ampac提供了一种用于特种抗HCV抗体检测的侧流色谱免疫分析方法。该测试的对照线包括固定的兔抗蛋白A抗体。对照线的目的是包含在结合垫中的蛋白A胶体金结合体将与抗蛋白A抗体结合，并且由此显示测试进行顺利(cf. <http://www.ampacasiapacific.com/>)。

CFRD也提供了一种基于用于在血清和血液中肝炎C抗体的测试的诊断免疫色谱。(cf. [http://www.cfrd.org/en/hepatit\\_C.html](http://www.cfrd.org/en/hepatit_C.html))。而且，在这个测试中，抗蛋白A抗体被用作固定在对照线上的对照剂，并且其中蛋白质A用作检测剂。

固定在对照线上的抗蛋白A抗体的使用进一步用在了由West Wind Plus公司提供的用于人类免疫缺陷病毒类型1和类型2抗体检测的色谱免疫分析方法中。然而，在对照线中使用抗蛋白A产生很多问题。因为蛋白质A可以与各种抗体的Fc区结合，在测试中的带有标记的蛋白质A可能与在测试样品中的抗体结合。如果该测试样品包括饱和量的抗体，所有胶蛋白A可能在测试样品中与抗体结合，从而阻止了对照线上信号的产生。这就使得这个测试不可靠。而且，如果抗分析物抗体被固定在测试线上，例如抗HCG抗体，胶蛋白A可能与测试线Fc区的抗体结合，从而造成假阳性结果的产生。因此，在色谱分析的对照系统中使用蛋白质A作为对照检测剂根本不起作用。

US 5541059公开了一种具有蛋白质A内在对照的免疫测定仪，其中蛋白质A固定在测试带的对照区中，例如使用蛋白质A作为对照剂。然而，与本发明相反，在US 5547059中公开的系统在检测和使对照线显色时使用存在于测试样品中人类抗体。这样，在US 5547059中公开的对照系统使得蛋白质A能够与通常抗体的Fc部分结合。因此，根据所述专利所公开的系统的对照区的显色依靠测试样品中具有抗体。依靠在测试样品中具有抗体使得US 5547059所公开的系统由于可能出现对照线的假阴性结果而不太适合。如果测试样品包含过多的抗体，由于一些原因（例如是取自患有重蛋白尿症患者的血液样品），会阻止蛋白质A的结合，并且也可能不产生来自对照线的信号。而且US 5547059公开的对照系统也是一种更加复杂和昂贵的系统。

US 5766961、US 5770460和EP 0566695公开的色谱免疫测定方法包括与生物素化的化合物联合使用抗生物素蛋白和链霉亲和素(streptavidin)以获得独立对照线的独立对照线系统。然而，引入生物素化的物质、抗生物素蛋白和链霉亲和素以及需要净化这些物质使得该系统的生产非常复杂，并且非常昂贵。

抗生物素蛋白是一种以前提出的用作免疫色谱分析中对照剂的蛋白质。在US 6537828中公开了在免疫色谱装置上固定抗生物素蛋白作为对照剂。对照线的显色依靠在测试剂中的生物素化的胶体颗粒与抗生物素蛋白的结合。然而，这是效率低、成本高的系统。

直到现在，所有的对照线的颜色与在侧流测试中的测试线颜色相同。例如，两条线均为红色或者蓝色。由于这些测试经常由在该领域内不具有专门技能的人们来进行，并且可能以前也没有做过任何的这种侧流测试，给这些测试的执行者讲解测试线与对照线是一种挑战。如果执行这种测试方法后可以看见两条线，这个结果将被解释为一种在测试样品中具有分析物质的实证，而且也是该测试正确执行的实证。然而，如果只显色一条线，这通常意味着在测试样品中没有分析物质(或低于临界值)，但是这个测试也是被正确执行的。然而，如果对照线没有显色，可看见的测试线可能会错误地理解为对照线，从而导致误读测试结果。因为所有测试的测试线颗粒和对照线颗粒具有相同的颜色，所以很难避开这个问题。一些测试生产者在对照线和测试线上试了不同的形式以克服这个问题。例如，在US 5,541,059的图1-7公开了不同形式的对照线和测试线。然而，这些方法要求必须具有用于制造对照区和测试区的更加复杂的生产线，而这是不太有利的。

无疑，需要更好更可靠的用于色谱免疫分析的对照系统。

## 发明内容

考虑到上述内容，本发明的目的是提供一种用于分析免疫色谱系统的可靠的对照系统。该目的通过应用结合对(binding pair)作为主要对照成分达到。其中，所述结合对包括与分析物/试样来源不同的抗原和抗体，前提是所述抗原本身不是抗体。此外本发明的主要优点是，所述对照系统使得在免疫色谱分析中对照区域的显色不依赖于试样中天然存在的抗体或其他组分。

因此，本发明提供了一种免疫色谱分析的对照系统，其中，检测的可靠性通过应用由对照试剂和对照检测剂构成的结合对来保证，并且其中所述结合对包括抗原和针对所述抗原的抗体，其中所述抗原是与分析物来源不同的种特异性抗原，并且前提是所述抗原本身不是抗体。

一方面，本发明所述对照试剂是固定的(immobilized)抗体，该抗体在结合作为与分析物/试样来源不同的抗原的对照检测剂后显色。

另一方面，所述对照试剂是抗原，结合作为抗体的检测试剂时显色。这样，根据本发明的对照系统与所述抗原是用作对照试剂还是用作对照检测剂无关。

此外，提供了一种色谱的对照系统，其中，对照区域和检测线在显色时，与分析物检测剂和检测带上的分析物结合形成的有色信号相比，当通过所述对照试剂检测时，对照区域内形成不同的有色信号。通过应用附着在检测试剂和分析物检测剂上的不同标记，根据本发明，所述对照系统可应用于具有对照线信号的色谱测试装置，所述对照线信号与检测线信号相比形成不同的颜色。更具体地，本发明提供了一种对照系统，其中，所述结合对成员之一固定在有色微粒上的，并且其中所述有色微粒所具有的颜色不同于所述免疫色谱系统里的微粒颜色，所述免疫色谱系统里的微粒应用于该系统待测分析物的显色。

此外，本发明还提供了一种新的固相免疫色谱装置，该装置包括本发明

所述的对照系统。

血蓝蛋白和蛋白 A 是抗原性很强的蛋白,因此在动物中免疫后高效诱导抗体,所产生的抗体应用于本发明。此外,血蓝蛋白和蛋白 A 价格便宜,因此有效应用于抗体的大规模抗原亲和层析。本发明的应用已经表明使用抗原亲和层析对抗体进行纯化能够得到好的结果。此外,竞争市场需要低成本的试剂,因此较昂贵的蛋白不予采用。避免将所有试剂成本提到过高的水平,因此较昂贵的蛋白既不能应用于硝化纤维显带,又不能固定在染色颗粒上,也不能为大规模抗原亲和层析纯化过程所必需。

本发明应用血蓝蛋白或蛋白 A 时得到了令人惊讶的有效结果。蛋白 A 或血蓝蛋白与能跟这两种蛋白之一反应的抗体,分别提供了非常高效的结合对,所述结合对非常有利于形成对照线。血蓝蛋白或蛋白 A 的应用提供了非常经济的高质量抗原亲和纯化的抗体、非常有效且经济的横向流动免疫色谱测试的对照线显带试剂、非常有效且经济的染色对照颗粒。综合结果得到意外地全都非常清晰、独立和经济的横向流动免疫色谱系统工业生产对照线系统。

所述系统较现有技术的测试系统具有突出的有益效果。本发明的对照系统防止产生假阳性结果和现有技术所述检测中会发生在对照线上的无信号生成的错误情况。

#### 附图说明

图 1 表示了在对照线上抗蛋白 A 抗体和固定在绿色乳胶颗粒上的蛋白 A 的应用;

图 2 表示了在对照线上抗血蓝蛋白抗体和固定在绿色乳胶颗粒上的血蓝蛋白的应用。

## 具体实施方式

本发明提供了用于免疫色谱分析和免疫色谱装置的对照系统，其中，通过应用结合对来确保可靠性，所述结合对包括 1) 与待测分析物来源不同的抗原，前提是所述抗原本身不是抗体，和 2) 抗所述抗原的抗体。

本发明的免疫色谱对照系统适用于多种普通免疫色谱分析系统，例如各种公知型号的定性薄层免疫色谱装置。

市场上色谱测试系统一般包括样品施加区。在施加怀疑含有分析物的样品时，试样溶液（如血样或尿样）通过毛细流动向检测区域移动。检测区域通常包括结合底物的分析物，通过结合所述分析物得以识别并且通过第二标记的分析物检测试剂显色。此外，所述检测系统通常包括对照区域，其中应用被固定的对照试剂。对照试剂的检测和显色，可以通过结合至少一个被标记的结合有底物的对照试剂完成。在一般的对照系统中，对照底物的检测常常依赖于试样中存在所述底物，如抗原或抗体。然后显色通过结合第二对照标记的对照检测剂完成。在其他公知的系统中，所述对照试剂是通过测试试剂中存在的另一被标记的抗体（第二抗体）检测出的抗体。对照区域/对照线显色的目的是表明测试是起作用的并且正确完成了。

根据本发明，对照试剂通过被标记的对照检测剂和对照试剂的继发直接结合显色。这样，根据本发明对照试剂的显色不依赖于试样中任何其他底物的存在，而且对由于诸如被分析试样中存在底物干扰而引起的假阳性信号不敏感。

本发明提供了一种新的对照系统，其中，所述结合对组分之一是与分析物来源不同的种特异性抗原，并且其中所述抗原本身不是抗体。

这里用到的术语“对照组分”或“对照系统组分”指代如下文定义的免疫色谱分析的对照试剂和对照检测剂。所述对照试剂和所述对照检测剂构成

本发明对照系统的结合对。

这里用到的术语“抗原”指代源自与待测试样/分析物不同种的任何化合物，且其本身不是抗体。所述抗原因此是种特异性底物，如种特异性蛋白。所述“抗原”能源自各种有机体，如来自属于原口动物分类群的有机体，如来自属于软体动物门分类群的有机体，或源于后口动物各种分类群，如属于脊索或脊椎动物亚门的分类群如来自鸟类、爬行类或两栖类。所述“抗体”也可以来自其他分类群如植物界或真菌。非限制性的“抗原”实例包括蛋白和糖蛋白、脂类、肽、核酸，以及蛋白质、糖蛋白、脂类、肽和核酸的衍生物。

根据本发明一个优选实施方式，所述抗原选自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白——蛋白 A 或蛋白 G，或血蓝蛋白，优选软体动物血蓝蛋白。根据本发明的对照系统，其他适合抗原的非限制实例为抗生物素蛋白，优选为去糖基化的抗生物素蛋白或链霉亲和素 (streptavidin)。

基于本发明的说明书和描述，本领域技术人员能够了解解除这里明确说明的底物外其他底物可以用作本发明对照系统的底物。

此外，所述“抗原”也可以来自其天然来源，或可以应用本领域公知的方法制备出来。例如，在所述抗原为蛋白质的情况下，如细菌蛋白（如蛋白 A），所述蛋白可以从细胞培养物中分离并进一步纯化，所述培养物如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 培养物。所述抗原也可以通过重组技术制备出来，如根据本领域技术人员公知的方法，在合适的表达系统中表达蛋白 A 编码基因序列。如果所述抗原为蛋白，它还可以通过公知的肽合成方法来制备。

这里用到的术语“对照试剂”指代作为结合对一方的化合物，所述化合物被固定在所述免疫色谱分析装置的对照区域/对照线中。所述对照试剂可以

是上面定义的抗原，能通过检测试剂（如被标记的抗体）识别显色。反之，所述对照试剂也可以是抗体，被固定在对照区域/对照线上，结合为抗原的对照检测剂。

对照试剂可以根据本领域公知的方法诸如物理吸附或化学偶联，固定在免疫色谱装置的对照区域。

这里用到的术语“对照检测剂”包括任何识别、结合对照试剂，并与形成的对照试剂-对照检测剂复合物即抗体-抗原复合物显色相关的化合物。显色是标记上对照检测剂的结果。

此外，根据本发明的一个具体实施方式所述“对照检测剂”可以是上述定义的抗原。根据本发明的另一实施方式，所述检测剂还可以是包括结合被固定抗原（即对照试剂）的抗体。

因此关于所述对照试剂，所述对照检测剂可以是抗原或抗体，前提是对照检测剂与对照试剂相对应。更确切地说，如果对照试剂是种特异性抗原，那么对照检测剂可以是被标记的抗体，该抗体识别所述对照试剂。相反，如果所述对照检测剂是种特异性抗原，那么对照试剂是被标记的抗体。

这样，根据本发明对照系统与所述抗原是被施用在对照区域然后通过结合对照检测剂被识别显色；还是对照试剂是抗体，该抗体被识别并通过继发结合抗原组成的对照检测剂显色无关。此外，对照试剂的显色与化合物如试样中抗体的存在无关。

这里用到的术语“试样”是指被怀疑含有感兴趣分析物的物质。所述试样可以从来源中获得直接应用，或者通过制备方法改变试样的性质后应用。所述制备方法可以特别包括过滤、蒸馏、萃取和浓缩，钝化干扰组分，添加试剂等等。

试样可以源自任何生物来源，如体液，所述体液如血液、唾液、接目镜

液 (ocular lens fluid)、脑脊液、汗液、尿液、乳汁、腹水液、滑液、腹膜液 (peritoneal fluid)、羊水液、粪便等。

此外除生理液体之外的其他液体样品也可以应用如水，食品等，用于进行环境或食品生产化验。

所述待测分析物可以是任何感兴趣的底物如激素、各种代谢物、针对病原来源化合物的抗体，所述病原来源化合物如病毒抗原或抗-病毒-抗体、污染物等等。

根据本发明的对照系统，所述对照试剂或对照检测剂可以是识别固定在对照区域/对照线上抗原的抗体。这里用到的术语“抗体 (antibody)”或“抗体 (antibodies)”指多克隆和单克隆抗体，还包括嵌合抗体或单链抗体。根据本发明的一个优选实施方式，所述抗体是非哺乳动物抗体，优选鸟源抗体。使用鸟源抗体如鸡抗体的优点是出于其他原因，与传统哺乳动物中抗体的生产如从血液中纯化抗体相比，归因于从产卵雌鸡中有利低成本地生产抗体。当感兴趣的分析物是哺乳动物来源的，鸟源抗体进一步的优点是所述抗体来源于非-哺乳动物有机体。

所述检测试剂，不依赖作为所述底物来源或作为识别所述底物的化合物 (如抗体)，可以被标记以提供对照区域/对照线的显色。

这里用到的表达“标记 (label)”指任何附着于所述对照检测剂使所述对照试剂-检测试剂复合物可测有色的底物。因此所述标记能产生信号，该信号可以通过目测或仪器方式检测到。适合于本发明应用的各种标记已经公知，并且包括通过化学或物理方式产生信号的标记。所述标记能包括酶和底物、色原、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、放射性标记；直接可视的标记包括胶体金属颗粒如金胶体颗粒，胶体非金属颗粒如硒，染色或有色颗粒如有色的或可以有色有机聚合乳胶颗粒，和脂质体或其他含有直接可视

物质的小泡体等。

本发明选择具体的标记并不严格，但是所述标记优选能够通过其自身产生可测信号的标记，如视觉可测得有色有机聚合体乳胶颗粒。

此外，这里用到的“被标记的抗原”或“被标记的抗体”是指结合或固定了如上定义的标记的抗原或抗体。优选地，所述抗原或抗体被固定在微粒上，所述微粒如金属颗粒（如胶体金颗粒），或有色聚合体乳胶颗粒，优选蓝色或绿色乳胶颗粒。

所述标记目测试样中分析物存在的标记可以包括如上述定义的标记，与应用于所述检测对照试剂的标记相同或不同。

根据本发明的一个优选实施方式，标记目测试样中分析物存在的标记与应用于所述检测对照试剂的依靠形成不同有色区域的标记不同。更优选的，所述分析物检测剂是固定在微粒上，与分析物结合提供了有色检测线，对比对照检测剂与对照试剂结合在对照区域中形成的颜色，所述检测线可辨识出来。更加优选地，所述对照检测剂固定在绿色乳胶颗粒上并且所述分析物检测剂规定在蓝色乳胶颗粒上，或反之亦然。在对照区域/对照线和测试区域/测试线存在不同颜色的免疫色谱装置提供了简便可靠的读取结果。

根据本发明的另一个实施方式，根据本发明所述抗原是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的蛋白 A，其中所述蛋白 A 用作对照试剂并且其中被标记的抗蛋白 A 抗体用作检测试剂。可以理解这里用到的术语“蛋白 A”既包括从金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）中分离的天然发生的蛋白 A，也包括通过重组技术或化学合成制备的蛋白 A 或其片段或其类似物。蛋白 A 的片段或其类似物可以是缺失、取代或添加了一个或多个氨基酸残基的片段。

抗蛋白 A 抗体可以为如上所述的单克隆或多克隆抗体或者其片段，可以由本领域技术人员公知的方法制备。所述抗体可以为哺乳动物源或鸟源。所

述抗体优选为鸟源如鸡抗体，与常规的在哺乳动物中制备抗体比如从血液中纯化抗体相比，从产卵的母鸡制备抗体的成本很低。鸟抗体与哺乳动物抗体之间的区别还使得免疫色谱分析更加灵敏，并且本底更少。而且，蛋白 A 不能与鸡 IgY 的 Fc-部分结合。鸡蛋中抗体的制备方法已为本领域技术人员所公知。抗蛋白 A 抗体可以用检测剂进行标记，所述检测剂与蛋白 A 结合产生信号，用于对照 line 的显色。所述抗蛋白 A 抗体优选固定在微粒上，如金胶体颗粒或有色的乳胶颗粒。

来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的另一种蛋白，蛋白 G 可以用作依据本对照系统的结合对的抗原。蛋白 G 可以由本领域公知的方法得到，例如从葡萄球菌培养物中提取或者采用重组技术。对于蛋白 A，优选使用蛋白 G 作为对照试剂，固定在免疫分析带的测试区域。蛋白 G 用抗蛋白 G 抗体进行显色，优选为鸟源的抗蛋白 G 抗体。所述抗蛋白 G 抗体优选固定在微粒上，更优选固定在金胶体颗粒或有色的胶乳颗粒上。

蛋白 A 和蛋白 G 都可以商业获得，例如可以从美国 Sigma 公司购买 (<http://www.sigmaaldrich.com/>)。

血蓝蛋白为呼吸蛋白，使用铜结合部位来结合并输送各种节肢动物和软体动物血液中的氧。血蓝蛋白一般分子量较高并具有多个亚单位。来自 *Megathura crenulata* 的血蓝蛋白，尤其是钥孔血蓝蛋白 (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) 已经公知并广泛用作疫苗载体，改善疫苗的反应。血蓝蛋白可以商业获得，例如可以从美国 Sigma 公司购买 (<http://www.sigmaaldrich.com/>)。因此，依据本发明的另外一个实施方式，本对照系统中所用的抗原优选为血蓝蛋白，更优选为软体动物血蓝蛋白。此时，该系统的其它对照组分为抗血蓝蛋白抗体。

依据本发明，血蓝蛋白可以用作固定在免疫色谱测试带上的对照试剂或者用作标记的对照检测剂。当血蓝蛋白用作对照检测剂来结合固定在测试区

域或测试线上的抗血蓝蛋白抗体时，血蓝蛋白优选有色乳胶颗粒标记。

对于抗蛋白 A 抗体，抗血蓝蛋白抗体可以为如上所述的单克隆抗体或多克隆抗体或者其片段，还可以由本领域技术人员公知的方法制备。所述抗体可以为哺乳动物源或鸟源，优选为鸟源如鸡抗体。当所述抗体用作检测试剂时，抗血蓝蛋白抗体可以被标记，优选固定在微粒上，如金胶体颗粒或有色乳胶颗粒。

依据本发明的另一方面，本发明提供了一种固相免疫色谱测试仪，其中该测试仪包括依据本发明的对照系统。依据本发明的测试仪优选为固相色谱仪，如薄层免疫色谱仪。

依据本发明的固相色谱仪可以包括施加样品如尿或血的施加区。该施加区一般由样品垫组成，所述样品垫有助于测试样品在进一步的结合垫上均匀地并有控制地分配。当依据本发明的一个实施方式的样品进入到所述结合垫时，识别并结合到特定的待测分析物上的检测试剂如标记的抗蛋白 A 抗体以及选择性含有的试剂被溶解。然后，样品通过含有测试线和不同的对照线的膜，所述测试线含有固定的分析物结合物质，对照线含有固定的蛋白 A。

最后，依据本发明的测试仪可以在其顶部包括吸收垫。

各种普通的已为本领域技术人员所公知的材料均适用于制备样品垫、结合垫、吸收垫和膜。这些主题的全部教导可以见 Millipore publication "Lateral Flow Test Strips, Considerations for Product Development", Lit. No. TB500EN00。而且，瑞典专利 SE20020001738 和 20020607 记载了玻璃材料用于这些用途。

现在用实施例的方式来描述本发明。尽管这些实施例代表了本发明的具体实施方式，但不能理解为对本发明范围的限制。

## 实施例 1

### 具有固定的抗蛋白 A 鸡抗体的蓝乳胶

用已经在文献中详细记载并为本领域技术人员公知的常规的氯化铵沉淀法，从母鸡的卵中分离 IgY（或者用固定在凝胶柱中的蛋白 A 进行亲和纯化），该母鸡已经由含弗氏完全佐剂（ Freund's complete adjuvant）的悬浮体中的蛋白 A 免疫过。使用 pH = 9.3 的 15 mM NaCl 的 10 mM 硼酸盐缓冲液对 30 毫克该抗体进行 24 小时透析，相同缓冲液中体积均调节至 15 毫升。

从 Merck 购买平均直径为 0.117 的 Estapor Carboxylated 微球 PSI 90-21，其中每克乳胶颗粒的羧基部分当量为 164。用水将 90 毫克该颗粒进行 12 小时透析。加水将体积调至 4.5 毫升。

在 2°C 下将 5 毫克 1-乙基-3（3-二甲氨基丙基）磷二甲胺（缩写为 EDC）溶入到 3 毫升水中，然后在搅拌下与颗粒悬浮体混合。然后，立即在搅拌下加入上述抗体溶液。

搅拌过夜后，用离心法将颗粒悬浮体在 pH = 9.3 的 10 mM 硼酸盐缓冲液中洗涤两次，其中该缓冲液含有 15 mM NaCl、0.09 %叠氮化钠、0.1 % Tween 20 和 2 毫克/毫升鸡清蛋白，然后用相同的缓冲液洗涤两次，不同的是该缓冲液没有 Tween 20 并且 pH 为 8.5。

### 实施例 2 具有固定的抗蛋白 A 鸡抗体的金胶体

将含 1%氯化金的 10 毫升蒸馏水与 1 升沸腾的蒸馏水混合。加入 10 毫升 pH 调至 4.2 的 34 mM 柠檬酸钠溶液，并混合 20 分钟。形成胶体金。将悬浮体冷却至室温。加入 1 毫升 1% PEG(聚乙二醇) 20.000，将 pH 调至 7.2。通过使用常规的技术测定 540 纳米和 600 纳米的光学密度，测定金胶体颗粒的大小。可以调整该方法，使得到的平均粒径为 540 纳米-600 纳米。所使用的玻璃器具必须进行硅化处理。

使用 Slot 和 Geuze 在 *Eur. J. Cell. Biol.* 38: 87-93, 1985 中所描述的方法，用鸡抗蛋白 A 抗体将金胶体颗粒标记至依据该方法的饱和点。然后将标记的金胶体悬浮在 10mM N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) 缓冲液中，该缓冲液的 pH 为 7.1 并含有 0.3 M 甘露醇、0.05 % PEG 20000 和 0.1 % 卵清蛋白。

使用相同的方法制得其它金胶体，所述其它金胶体含有单克隆鼠抗 HCG，代替抗蛋白 A 抗体。

### 实施例 3 将蛋白 A 固定在对照线上

将从美国 Millipore 公司购买的 HighFlow 120 硝化纤维大致切成 4 毫米 × 70 毫米的片，并将用于吸收的纤维吸收垫贴在一端（下面称该端为 B 端，相反的一端称作 A 端）。

将水中的 10 mM 醋酸铵加入到 2 体积%的乙醇中。将从 Sigma 购买的细菌蛋白 A 以每毫升 2 毫克的量溶解到该溶液中。用注射器尖端穿过硝化纤维带以每厘米 7 微升施用该溶液，在 37°C 下静置干燥 2 小时。在一些片上，使用相同的方法施用具有抗人绒毛膜促性腺激素的鼠单克隆抗体的测试线，其中测试线位于对照线上游几毫米处。

然后，将片的 A 端浸入到封闭溶液中，该封闭溶液含有 25 mM TRIS 缓冲液、150 mM NaCl、2 毫克/毫升卵清蛋白和 100 微克/毫升不相关 IgY，该封闭溶液透过所述片迁移到吸收垫中。接着，将片在 37°C 下静置干燥。

所述封闭溶液选择性地含有 5 体积% 羊血清，这样封闭性更好。血清中的羊抗体没有封闭独立的蛋白 A 对照线。来自测试样品的哺乳动物抗体也没有被封闭（见下面描述）。这个原因在于当由蛋白 A 免疫的动物培养的抗体结合到蛋白 A 的其它抗原决定部位/结合部位时（不管这些抗体是单克隆来源还是多克隆来源），不相关的哺乳动物抗体将它们的固定链（Fc 链）结

合在蛋白 A 的特定结合部位上。优选为鸟类抗体，因为鸟类抗体的 Fc 链不会结合到蛋白 A 上，可以避免各种类型的干扰反应。

实施例 4 固定在对照线上的蛋白 A 和固定在着色乳胶和金胶体上的鸡抗蛋白 A 的作用的描述

将 50 微升尿样品与 200 微升缓冲液混合，其中一些尿样品含有 1000 单位/升人绒毛膜促性腺激素（HCG），另外一些则没有 HCG，所述缓冲液含有 25 mM TRIS 缓冲液、150 mM NaCl、2 毫克/毫升卵清蛋白和 50 微克/毫升不相关 IgY。

为了得到对照线，将 25 微升颗粒悬浮体与尿/缓冲液混合物混合，其中所述颗粒悬浮体含有具有固定的抗蛋白 A 抗体（如上描述）的金胶体或蓝色乳胶（如上描述）。

将如上处理的硝化纤维片插入到所得混合物中，该混合物穿过所述片并通过测试线（如果有的话）和具有固定的蛋白 A 的对照线，迁移到吸收垫中。A 对照线形成。如果有测试线，有色颗粒没有结合测试线。

在单个的实验中，将 25 微升具有固定的抗 HCG 抗体的金胶体颗粒与含有具有固定的抗蛋白 A 抗体的金胶体颗粒的所述混合物混合。将如上所述处理的具有如上所述测试线的硝化纤维片插入到所得混合物中，该混合物穿过所述片并通过测试线（如果有的话）和具有固定的蛋白 A 的对照线，迁移到吸收垫中。对照线和测试线都由金胶体颗粒形成红颜色。

在单个的实验中，将 20 微升羊血清加入到所述混合物中，以说明血浆蛋白向尿样品的渗漏结果（或者如果样品为血样品，则有血浆蛋白存在）。血浆蛋白的存在，包括哺乳动物抗体和羊血清，不影响对照线和测试线的形成。

这个原因在于当由蛋白 A 免疫的动物培养的抗体结合到蛋白 A 的其它

抗原决定部位/结合部位时（不管这些抗体是单克隆来源还是多克隆来源），不相关的哺乳动物抗体将它们的固定链（Fc 链）结合在蛋白 A 的特定结合部位上。优选为鸟类抗体，因为鸟类抗体的 Fc 链不会结合到蛋白 A 上，可以避免各种类型的干扰反应。

#### 实施例 5 偶联血蓝蛋白的蓝色颗粒的制备

将 154 毫克从法国 Merck 购买的平均直径为 185 纳米的羧基化的聚苯乙烯蓝色颗粒通过离心和重悬浮在含有 15 mM 氯化钠的 10 mM 硼酸盐缓冲液中洗涤三次。将颗粒悬浮在 5 毫升同样的缓冲液。

用所述硼酸盐缓冲液对 40 毫克从美国 Sigma 公司购买的 VIII 型血蓝蛋白进行透析。

在 4°C 下将 6 毫克 EDC 溶入到 1 毫升水中。在搅拌条件下，将碳化二亚胺（EDC）溶液加入到颗粒中，然后加入血蓝蛋白溶液。然后在室温下将该悬浮体搅拌过夜，接着通过离心和重悬浮用 25 毫升 pH 为 9.3 的 10 mM 硼酸盐缓冲液洗涤，该缓冲液中添加有 15 mM NaCl、0.09 % 叠氮化钠和 0.2 % Tween 20。

然后通过离心和重悬浮用 25 毫升 pH 为 8.7 的 10 mM 硼酸盐缓冲液洗涤，该缓冲液中添加有 15 mM NaCl、0.09 % 叠氮化钠和 0.2 % Tween 20。

#### 实施例 6 偶联血蓝蛋白的绿色颗粒的制备

将 282 毫克从法国 Merck Prolabo 购买的平均直径为 340 纳米的羧基化的聚苯乙烯蓝色颗粒通过离心和重悬浮在含有 15 mM 氯化钠的 10 mM 硼酸盐缓冲液中洗涤三次。将颗粒悬浮在 5 毫升同样的缓冲液。

用所述硼酸盐缓冲液对 40 毫克从美国 Sigma 公司购买的 VIII 型血蓝蛋白进行透析。

在 4℃ 下将 6 毫克 EDC 溶入到 1 毫升水中。在搅拌条件下，将 EDC 溶液加入到颗粒中，然后加入血蓝蛋白溶液。然后在室温下将该悬浮体搅拌过夜，接着通过离心和重悬浮用 25 毫升 pH 为 9.3 的 10 mM 硼酸盐缓冲液洗涤，该缓冲液中添加有 15 mM NaCl、0.09 % 叠氮化钠和 0.2 % Tween 20。

然后通过离心和重悬浮用 25 毫升 pH 为 8.7 的 10 mM 硼酸盐缓冲液洗涤，该缓冲液中添加有 15 mM NaCl、0.09 % 叠氮化钠和 0.2 % Tween 20。

#### 实施例 7 血蓝蛋白固定在对照线上

将从美国 Millipore 公司购买的 HighFlow 120 硝化纤维大致切成 4 毫米 × 70 毫米的片，并将用于吸收的纤维吸收垫贴在一端（下面称该端为 B 端，相反的一端称作 A 端）。

将水中的 10 mM 醋酸铵加入到 2 体积%的乙醇中。将从 Sigma 购买的 VIII 型血蓝蛋白以每毫升 2 毫克的量溶解到该溶液中。用注射器尖端穿过硝化纤维带以每厘米 7 微升施用该溶液，在 37℃ 下静置干燥 2 小时。在一些片上，使用相同的方法施用具有抗人绒毛膜促性腺激素的鼠单克隆抗体的测试线，其中测试线位于对照线上游几毫米处。

然后，将片的 A 端浸入到封闭溶液中，该封闭溶液含有 25 mM TRIS 缓冲液、150 mM NaCl、2 毫克/毫升卵清蛋白和 100 微克/毫升不相关 IgY，该封闭溶液透过所述片迁移到吸收垫中。接着，将片在 37℃ 下静置干燥。

所述封闭溶液选择性地含有 5 体积% 羊血清，这样封闭性更好。

#### 实施例 8 抗血蓝蛋白抗体固定在对照线上

将从美国 Millipore 公司购买的 HighFlow 120 硝化纤维大致切成 4 毫米 × 70 毫米的片，并将用于吸收的纤维吸收垫贴在一端（下面称该端为 B 端，相反的一端称作 A 端）。

用已经在文献中详细记载并为本领域技术人员公知的常规的氯化铵沉淀法，从母鸡的卵中分离 IgY（或者用固定在凝胶柱中的血蓝蛋白进行亲和纯化），该母鸡已经由含弗氏完全佐剂（ Freund's complete adjuvant）的悬浮体中的血蓝蛋白免疫过。使用 pH = 9.3 的含 15 mM NaCl 的 10 mM 硼酸盐缓冲液对 30 毫克该抗体进行 24 小时透析，相同缓冲液中体积均调节至 15 毫升。

用注射器尖端穿过硝化纤维带以每厘米 7 微升施用该溶液，在 37°C 下静置干燥 2 小时。在一些片上，使用相同的方法施用具有抗人绒毛膜促性腺激素的鼠单克隆抗体的测试线，其中测试线位于对照线上游几毫米处。

然后，将片的 A 端浸入到封闭溶液中，该封闭溶液含有 25 mM TRIS 缓冲液、150 mM NaCl、2 毫克/毫升卵清蛋白和 100 微克/毫升不相关 IgY，该封闭溶液透过所述片迁移到吸收垫中。接着，将片在 37°C 下静置干燥。

所述封闭溶液选择性地含有 5 体积% 羊血清，这样封闭性更好。

实施例 9 固定在对照线上的抗血蓝蛋白抗体和固定在绿色乳胶颗粒上的血蓝蛋白的作用的描述

将 50 微升尿样品与 200 微升缓冲液混合，其中一些尿样品含有 1000 单位/升人绒毛膜促性腺激素（HCG），另外一些则没有 HCG，所述缓冲液含有 25 mM TRIS 缓冲液、150 mM NaCl、2 毫克/毫升卵清蛋白和 50 微克/毫升不相关 IgY。

为了得到对照线，将 25 微升颗粒悬浮体与尿/缓冲液混合物混合，其中所述颗粒悬浮体含有具有固定的血蓝蛋白（如上描述）的绿色乳胶（如上描述）。

将如上处理的硝化纤维片插入到所得混合物中，该混合物穿过所述片并通过测试线（如果有的话）和具有固定的抗血蓝蛋白抗体的对照线，迁移到

吸收垫中。绿色对照线形成。如果有测试线，有色颗粒没有结合测试线。

在单个的实验中，将 25 微升具有固定的抗 HCG 抗体的金胶体颗粒与含有具有固定的抗血蓝蛋白抗体的绿色乳胶颗粒的所述混合物混合。将如上所述处理的具有如上所述测试线的硝化纤维片插入到所得混合物中，该混合物穿过所述片并通过测试线（如果有的话）和具有固定的抗血蓝蛋白抗体的对照线，迁移到吸收垫中。对照线形成绿颜色，测试线形成红颜色。

实施例 10 固定在对照线上的抗血蓝蛋白抗体和固定在蓝色乳胶颗粒上的血蓝蛋白的作用的描述

将 50 微升尿样品与 200 微升缓冲液混合，其中一些尿样品含有 1000 单位/升人绒毛膜促性腺激素（HCG），另外一些则没有 HCG，所述缓冲液含有 25 mM TRIS 缓冲液、150 mM NaCl、2 毫克/毫升卵清蛋白和 50 微克/毫升不相关 IgY。

为了得到对照线，将 25 微升颗粒悬浮体与尿/缓冲液混合物混合，其中所述颗粒悬浮体含有具有固定的血蓝蛋白（如上描述）的蓝色乳胶（如上描述）。

将如上处理的硝化纤维片插入到所得混合物中，该混合物穿过所述片并通过测试线（如果有的话）和具有固定的抗血蓝蛋白抗体的对照线，迁移到吸收垫中。蓝色对照线形成。如果有测试线，有色颗粒没有结合测试线。

在单个的实验中，将 25 微升具有固定的抗 HCG 抗体的金胶体颗粒与含有具有固定的抗血蓝蛋白抗体的蓝色乳胶颗粒的所述混合物混合。将如上所述处理的具有如上所述测试线的硝化纤维片插入到所得混合物中，该混合物穿过所述片并通过测试线（如果有的话）和具有固定的抗血蓝蛋白抗体的对照线，迁移到吸收垫中。对照线形成蓝颜色，测试线形成红颜色。

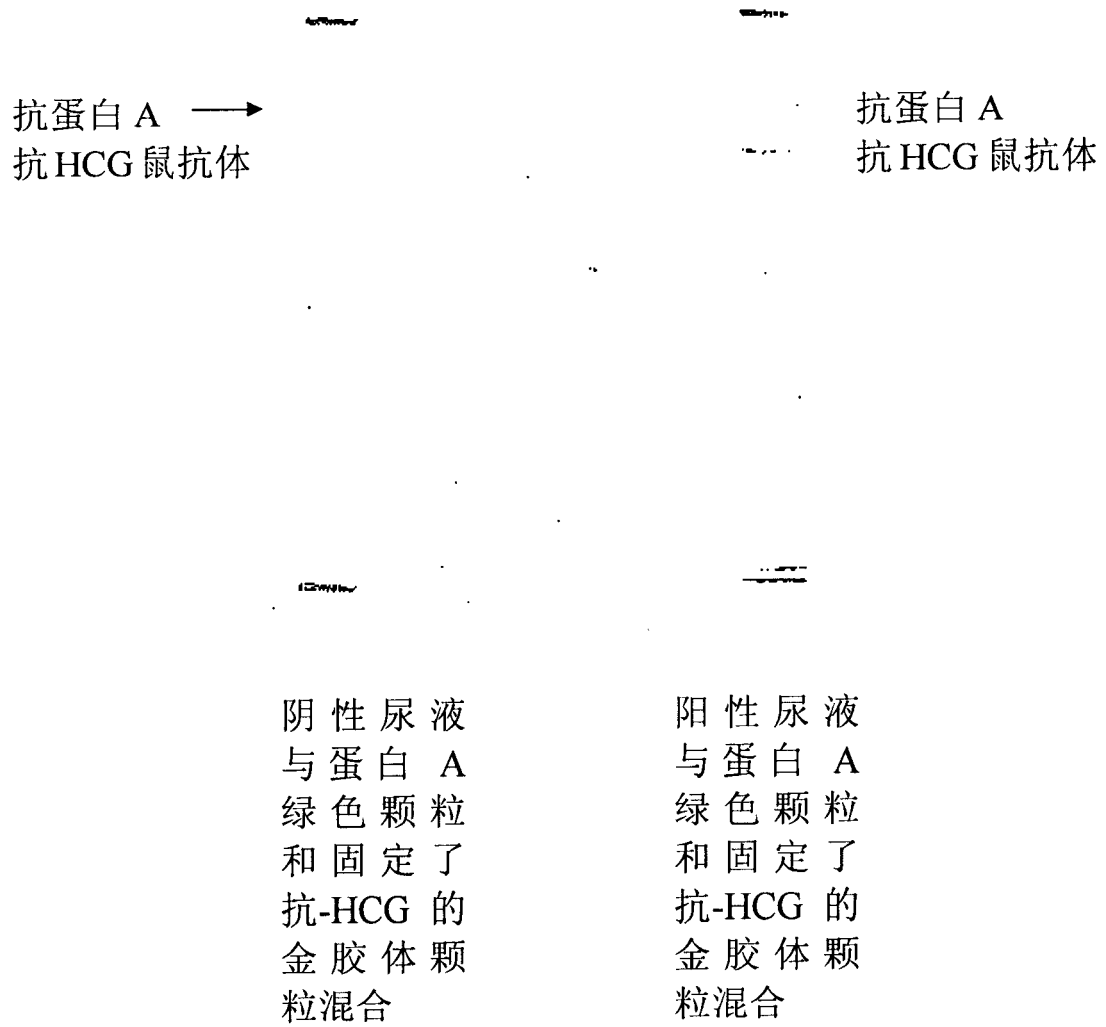


图 1

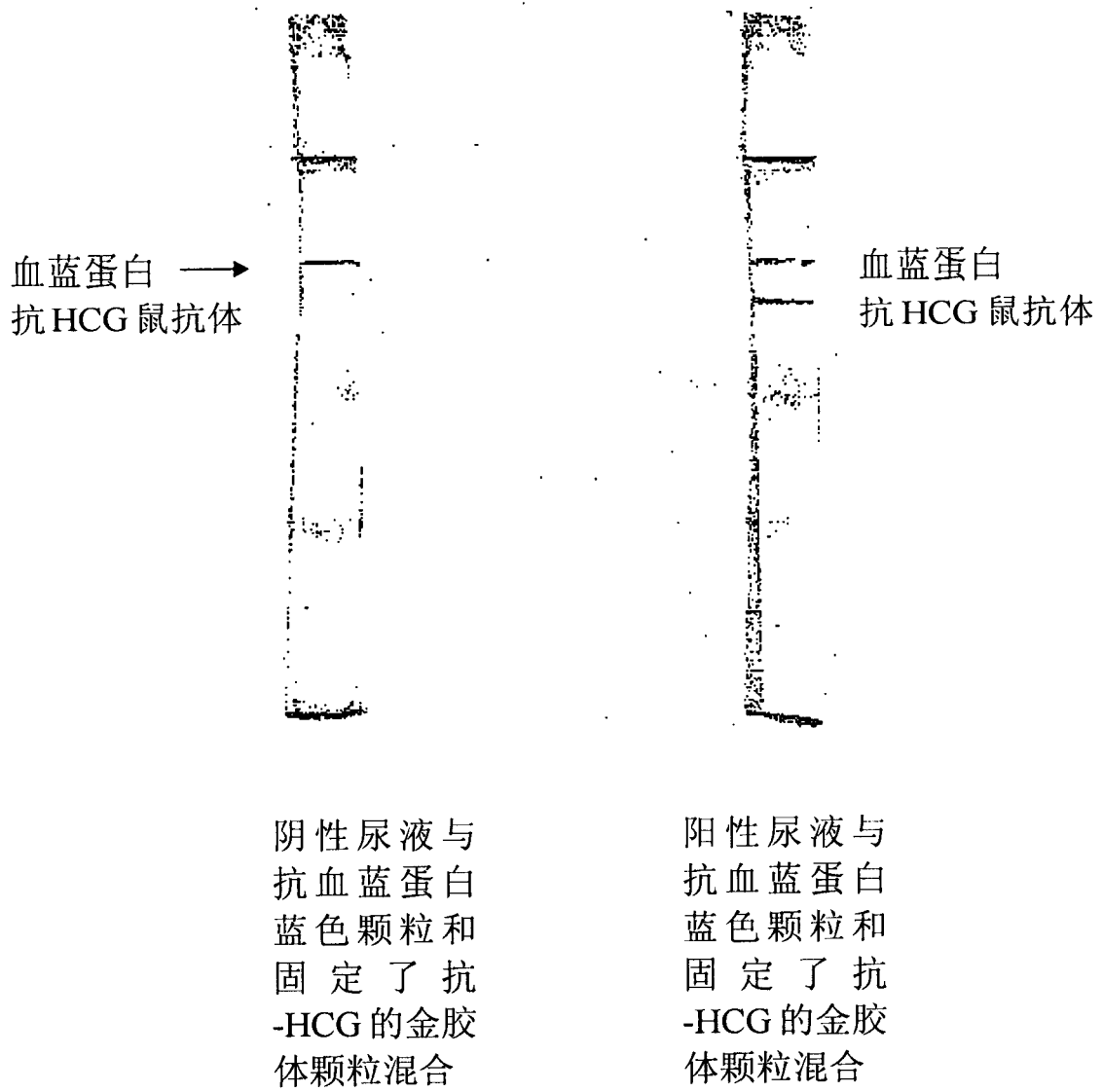


图 2

专利名称(译)	诊断对照系统		
公开(公告)号	<a href="#">CN1847850A</a>	公开(公告)日	2006-10-18
申请号	CN200510123585.7	申请日	2005-11-21
当前申请(专利权)人(译)	NORWEGIAN ANTIBODIES AS		
[标]发明人	厄于斯泰因拉森		
发明人	厄于斯泰因·拉森		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/02		
CPC分类号	G01N33/558		
代理人(译)	周建秋 王凤桐		
优先权	60/628962 2004-11-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供了一种新的可用于免疫色谱分析的对照系统，其中该对照系统包括由抗原和抗体组成的结合对，其中该抗原为种特异性物质，并且前提是该抗原本身不是抗体。

