



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102227631 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 23

(21) 申请号 200880132189. 2

(22) 申请日 2008. 11. 28

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2011. 05. 27

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/KR2008/007049 2008. 11. 28

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02010/061992 EN 2010. 06. 03

(73) 专利权人 英佛皮亚有限公司  
地址 韩国京畿道

(72) 发明人 裴柄宇 李星东 金珉坤 慎容范  
张晋姬 申志勋

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

G01N 30/90(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(续)

(56) 对比文件

US 5968839 A, 1999. 10. 19,

EP 1020726 A1, 2000. 07. 19,

WO 2008073222 A2, 2008. 06. 19,

US 2005112780 A1, 2005. 05. 26,

WO 0246472 A2, 2002. 06. 13,

EP 1933142 A1, 2008. 06. 18,

CN 1500212 A, 2004. 05. 26,

Guodong Liu, et al.. Nanoamterial labels  
in electrochemical immunosensors and  
immunoassays. 《Talanta》. 2007, 第 74 卷 (第 3  
(续)

审查员 张绚

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

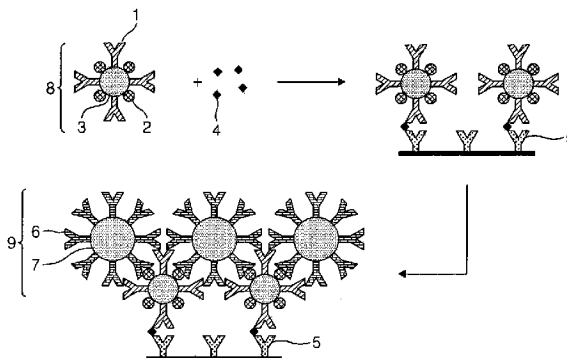
(54) 发明名称

免疫层析测试中信号放大的方法以及使用该方法的免疫层析试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及用于分析物的高灵敏度检测的免疫层析测试中放大信号的方法和使用该方法的免疫层析试剂盒,该方法通过区分第一指示剂的大小和第二指示剂的大小来控制流速实现放大信号。本发明的一个方面提出了在免疫层析测试中放大信号的方法,包括:将具有能特异性结合分析物第一表位的第一抗体、连接体、和与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体与分析物结合;将结合在第一偶联体上的分析物与能特异性结合分析物第二表位的固定的第二抗体相结合;将具有能特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体,和连接第三抗体的第二指示剂的第二偶联体与第一偶联体的连接体结合,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体比第一偶联体更晚到达固定的第二抗体。根据本发明的另一个方面,一种免疫层析试剂盒包括:样品垫,含有分析物的液体样品施加到

垫上;偶联物垫,包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、连接体、与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且第二指示剂大于第一指示剂,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体;膜,包括检测位点,其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位,和用于检测偏差的对照位点;和吸收垫,通过毛细管现象吸收液体样品。因此,本发明可以实现信号放大而无需另外的机械控制或人工逐步反应。



[ 转续页 ]

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*G01N 33/48* (2006.01)

*G01N 33/487* (2006.01)

(56) 对比文件

期), 308-317.

SEYDACK, et al.. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2005, 第 20 卷 (第 12 期), 2454-2469.

1. 一种在免疫层析测试中放大信号的方法,包括:

将具有能特异性结合分析物第一表位的第一抗体、连接体、和与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体与分析物结合;

在夹心反应中将结合在第一偶联体上的分析物与能特异性结合分析物第二表位的固定的第二抗体相结合;

在夹心反应后将第二偶联体与第一偶联体的连接体结合,所述第二偶联体具有能特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体、和连接第三抗体的第二指示剂,

其中,第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且所述第一指示剂的颗粒大小是约 10nm 到约 20nm,而第二指示剂的颗粒大小是约 20nm 到约 60nm,其中第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体比第一偶联体更晚到达固定的第二抗体。

2. 一种在免疫层析测试中放大信号的方法,包括:

将具有能特异性结合分析物第一表位的第一抗体、和与第一抗体结合的第一指示剂的第一偶联体与分析物结合;

将结合在第一偶联体上的分析物与能特异性结合分析物第二表位的固定的第二抗体相结合;

将具有能特异性结合第一偶联体的第一抗体的第三抗体、和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体与第一偶联体的第一抗体结合,

其中,第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且所述第一指示剂的颗粒大小是约 10nm 到约 20nm,而第二指示剂的颗粒大小是约 20nm 到约 60nm,其中第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述连接体选自下组:牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、生物素和亲和素,并且不和分析物结合。

4. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述第三抗体识别第一抗体为抗原,与第一抗体结合。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述指示剂是胶体金或者量子点。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述分析物选自下组:抗原蛋白质、脱氧核糖核酸(DNA)、环境激素、病原性毒物和食物中毒细菌。

7. 一种免疫层析试剂盒,其包括:

样品垫,含有分析物的液体样品施加到垫上;

偶联物垫,包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、连接体、和与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且所述第一指示剂的颗粒大小是约 10nm 到约 20nm,而第二指示剂的颗粒大小是约 20nm 到约 60nm,其中第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体;

膜,包括检测位点,其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位,和用于检测偏差的对照位点;和

吸收垫,通过毛细管现象吸收液体样品。

8. 一种免疫层析试剂盒,其包括:

样品垫,含有分析物的液体样品施加到垫上;

偶联物垫,包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、和与第一抗体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的第一抗体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且所述第一指示剂的颗粒大小是约 10nm 到约 20nm,而第二指示剂的颗粒大小是约 20nm 到约 60nm,其中第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体;

膜,包括检测位点,其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位,和用于检测偏差的对照位点;和

吸收垫,通过毛细管现象吸收液体样品。

9. 如权利要求 7 所述的免疫层析试剂盒,其特征在于,所述连接体是牛血清白蛋白(BSA)。

10. 如权利要求 8 所述的免疫层析试剂盒,其特征在于,所述第三抗体识别第一抗体为抗原,与第一抗体结合。

11. 如权利要求 8 或 9 所述的免疫层析试剂盒,其特征在于,所述偶联物垫包括含有第一偶联体的第一偶联物垫和含有第二偶联体的第二偶联物垫,并制造成第一偶联体和第二偶联体不相互接触。

12. 如权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于,所述指示剂是胶体金或者量子点。

13. 如权利要求 8 或 9 所述的免疫层析试剂盒,其特征在于,所述分析物选自下组:抗原蛋白质、脱氧核糖核酸(DNA)、环境激素、病原性毒物和食物中毒细菌。

## 免疫层析测试中信号放大的方法以及使用该方法的免疫层析试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于高灵敏度检测分析物的免疫层析测试中的信号放大的方法以及使用该方法的免疫层析试剂盒,更具体地,涉及用于高灵敏度检测分析物的免疫层析测试中的信号放大的方法以及使用该方法的免疫层析试剂盒,其中通过区分夹心实验方法中第一指示剂的大小与结合在第一指示剂上的第二指示剂的大小来控制指示剂流速实现信号的放大。

### 背景技术

[0002] 免疫层析测试是一种通过利用彼此特异性结合的生物学材料或化学材料的性质在短时间内对分析物进行定性和定量测试的方法。具体地,公知夹心型免疫测试方法是將特异性针对分析物(需测试其存在和浓度)的第一表位的第一抗体固定于固相载体上,并利用特异性针对该分析物的第二表位的第二抗体。

[0003] 免疫层析测试中通常使用的试剂盒是测试条或者免疫测试试剂盒,即将测试条装在外壳内的一种组件。当含有分析物的流体施加到多孔条的一面时,流体因毛细管现象而流动,测试目标与固定的抗体和包含指示剂的抗体结合,从而完成夹心型测试方法。

[0004] 通常,在免疫层析试剂盒中,抗体被固定在膜上,流体由于毛细管现象能在膜上流动,在膜的上游面设有样品垫或者偶联物垫,而膜的下游面连接有吸收垫。样品垫吸收包含分析物的流体样品并提供均匀流动,并且连接有能选择性结合分析物的抗体的指示剂在偶联物垫上干燥。选择性结合分析物的固定抗体和能够与指示剂上固定的抗体相结合的材料被固定在膜上的不同位置以分别形成检测位点和对照位点。固定在膜上的能够选择性结合分析物的抗体和固定在指示剂上的抗体可以用来以夹心型结合分析物。吸收垫由能够吸收液体样品的材料形成。在免疫层析试剂盒中,当含有分析物的液体样品滴加到样品垫上时,对分析物有选择性的指示剂-抗体和固定在膜上的抗体以夹心形式和分析物结合,从而在膜上固定了抗体的位置形成肉眼可见的条带。

[0005] 相关技术公开的免疫层析信号放大方法将第一偶联体与抗原结合,此外将第二偶联体与其结合,结合物最终与固定在膜上的抗体结合。然而,相关技术的免疫层析方法的检测由于灵敏度低,难以检测需要更高灵敏度的样品。

[0006] 因此,本发明人发现免疫层析中,当抗原和第一偶联体相互结合后与固定抗体在夹心反应中结合,然后将第二偶联体与其结合时,提高了信号放大的灵敏度这一事实,从而完成了本发明。具体地,本发明通过一次性样品注入,无需另外的机械控制或人工逐步反应,实现信号放大。

### 发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的一个方面提供了在免疫层析测试中放大信号的方法。

[0009] 本发明的另一方面提供了利用该信号放大方法提高了灵敏度的免疫层析试剂盒。

[0010] 技术方案

[0011] 本发明的一个方面提出了在免疫层析测试中放大信号的方法,包括将具有能特异性结合分析物第一表位的第一抗体、连接体、和与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体与分析物结合;将结合在第一偶联体上的分析物与能特异性结合分析物第二表位的固定的第二抗体相结合;将具有能特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体,和连接第三抗体的第二指示剂的第二偶联体与第一偶联体的连接体结合,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体。

[0012] 本发明的另一方面提出了在免疫层析测试中放大信号的方法,包括将具有能特异性结合分析物第一表位的第一抗体、和与第一抗体结合的第一指示剂的第一偶联体与分析物结合;将结合在第一偶联体上的分析物与能特异性结合分析物第二表位的固定的第二抗体相结合;将具有能特异性结合第一偶联体的第一抗体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体与第一偶联体的第一抗体结合,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体。

[0013] 根据本发明的另一个方面,提供了一种免疫层析试剂盒,其包括:样品垫,含有分析物的液体样品施加到垫上;偶联物垫,包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、连接体、与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且第二指示剂大于第一指示剂,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体;膜,包括检测位点,其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位,和用于检测偏差的对照位点;和吸收垫,通过毛细管现象吸收液体样品。

[0014] 根据本发明的另一个方面,提供了一种免疫层析试剂盒,其包括:样品垫,含有分析物的液体样品施加到垫上;偶联物垫,包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、和与第一抗体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的第一抗体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体,其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体,并且第二指示剂大于第一指示剂,使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体;膜,包括检测位点,其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位,和用于检测偏差的对照位点;和吸收垫,通过毛细管现象吸收液体样品。

[0015] 有益效果

[0016] 本发明的信号放大方法将第一偶联体和抗原一起固定于捕获抗体,并随后将第一偶联体与第二偶联体结合,从而给出了良好的信号放大效果。同样,该信号放大方法的使用使得可以制造出提高了灵敏度的免疫层析试剂盒。

[0017] 附图简要说明

[0018] 图 1 显示了用本发明所述的方法测试抗原时信号放大的过程,其中参考编号 1 表示第一抗体、参考编号 2 表示连接体、参考编号 3 表示第一指示剂、参考编号 4 表示分析物、

参考编号 5 表示第二抗体、参考编号 6 表示第三抗体、参考编号 7 表示第二指示剂、参考编号 8 表示第一偶联体、参考编号 9 表示第二偶联体。

[0019] 图 2A 显示了本发明实施方式所述的免疫层析试剂盒,其中参考编号 10 表示样品垫、参考编号 11 表示偶联物垫、参考编号 12 表示膜、参考编号 13 表示检测位点、参考编号 14 表示对照位点、参考编号 15 表示吸收垫、参考编号 17 表示固定第二偶联体的位点、参考编号 18 表示固定第一偶联体的位点。

[0020] 图 2B 显示了本发明另一实施方式所述的具有两个偶联物垫的免疫层析试剂盒,其中参考编号 16 表示第二偶联物垫、参考编号 17 表示固定第二偶联体的位点、参考编号 19 表示全面添加有第一偶联体的第一偶联物垫。

[0021] 图 2C 显示了图 2B 所示免疫层析试剂盒的装配结构。

[0022] 图 3A 和 3B 图表显示了按第二偶联体所使用的纳米颗粒大小测试信号放大效应的结果,测试中使用肌钙蛋白 I 作为抗原。

[0023] 图 4A 显示了根据偶联物的分离得到的信号放大效应的实验结果,实验使用肌钙蛋白 I,图 4B 是其结果的图表显示。

[0024] 图 5A 显示了根据偶联体的分离得到的信号放大效应的实验结果,实验使用肌红蛋白,图 5B 是其结果的图表显示。

[0025] 本发明最佳实施方式

[0026] 下文将参考附图进一步说明本发明的示例实施方式。

[0027] 本说明书中,术语“连接体”表示通过抗原-抗体反应与第三抗体特异性结合使得第二偶联体能与第一偶联体结合的材料。本发明中,第一偶联体包含第一抗体、连接体和第一指示剂。然而,若第一抗体能与第二偶联体的第三抗体结合,则第一偶联体可以不含连接体。在此,当与抗原结合后流过测试条时,第一偶联体固定在捕获抗体上。本发明中,第二偶联体包含第二指示剂和特异于第一偶联体的连接体的第三抗体。在此,第三抗原特异性结合第一偶联体的连接体以放大信号。然而,若第三抗体可特异性结合第一抗体并且第一偶联体因此不含有连接体时,第三抗体与第一偶联体的第一抗体结合以放大信号。

[0028] 在本发明的信号放大方法中,包含第一抗体和第一指示剂的第一偶联体在免疫层析中与抗原结合,并随后与第二抗体(即固定的捕获抗体)在夹心反应中结合,随后包含第三抗体和第二指示剂的第二偶联体与第一偶联体结合以放大信号。具体地,本发明的信号放大方法通过控制第二偶联体的流速提高了信号放大的灵敏度,该流速通过控制第二偶联体的指示剂的大小比第一偶联体的指示剂更大而实现。

[0029] 图 1 显示了用本发明所述的方法测试抗原时信号放大的过程,其中包括连接体。在图 1 中,第一抗体 1 和连接体 2 与第一指示剂 3 结合形成第一偶联体 8、第三抗体 6 与第二指示剂 7 结合形成第二偶联体 9。第一偶联体 8 与分析物 4(即抗原)结合并与第二抗体 5(即固定的捕获抗体)结合,随后第二偶联体 9 与第一偶联体 8 结合。

[0030] 下面将结合附图对本发明的免疫层析信号放大方法进行详细描述。第一偶联体与分析物 4 结合,该第一偶联体 8 具有能特异性结合分析物 4 的第一表位的第一抗体 1、连接体 2、和结合第一抗体 1 和连接体 2 的第一指示剂 3;流经测试条时,结合在第一偶联体上的分析物 4 与固定的第二抗体 5 结合,第二抗体特异性结合到分析物 4 的第二表位上;随后第二偶联体 9 与第一偶联体 8 的连接体结合,第二偶联体具有能特异性结合第一偶联体 8 的

连接体 2 的第三抗体 6、和供第三抗体 6 结合的第二指示剂 7。在此，第一偶联体 8 比第二偶联体 9 更接近固定的第二抗体 5，并且第二指示剂 7 的颗粒大于第一指示剂 3 的颗粒。因此，第二偶联体 9 迟于第一偶联体 8 到达固定的第二抗体 5，从而放大了免疫层析信号。

[0031] 第一偶联体 8 所包括的连接体 2 可以是牛血清白蛋白 (BSA) 或人血清白蛋白 (HSA)，并且第三抗体 6 可以是抗 -BSA 或抗 -HSA。然而，连接体 2 和第三抗体不仅限于此。例如，连接体 2 和第三抗体 6 可以包含任何能相互选择性作用如肽 - 抗体结合和生物素 - 亲和素结合的物质，这些作用使第二偶联体 9 能与第一偶联体 8 结合而不和分析物 4 结合。例如，本发明中，血清白蛋白 (特别是 BSA) 可用作连接体 2，并且第二偶联体 9 可以用另一种未用于第一偶联体制备的血清白蛋白制备。然而，由于连接体 2 包含于第一偶联体 8 使第二偶联体 9 能与第一偶联体 8 结合，如果第三抗体 6 和第一抗体 1 可以相互特异性结合，那么不应包括连接体 2。第三抗体 6 和第一抗体 1 能相互特异性结合的情况包括第三抗体 6 识别第一抗体 1 作为抗原并与第一抗体结合的情况。如上所述，本发明可以包括任何使第二偶联体 9 能与第一偶联体 8 结合的结构。

[0032] 能由本发明所述方法检测的分析物 4 可以是任何能通过免疫反应与第一抗体 1 和第二抗体 5 结合 (即，抗原 - 抗体反应形成夹心型免疫复合物) 的分析物。分析物 4 的示例包括蛋白质、脱氧核糖核酸 (DNA)、环境污染物包括环境激素、疾病因子如病毒和食物中毒细菌、和病原性毒物。

[0033] 本发明中，抗体和抗原可以是能够通过抗原 - 抗体反应特异性结合分析物 4 的任何物质。若分析物 4 是抗体，与该抗体特异性结合的物质可以用作抗原。根据分析物 4，抗原和抗体可以是任何公知的抗原和抗体。

[0034] 本发明中，可产生“指示剂”信号的色素物质的示例包括成色剂、荧光染料、和有色乳胶颗粒。例如，色素物质可以是胶体金或者量子点。第一偶联体 8 的第一指示剂 3 和第二偶联体 9 的第二指示剂 7 可以相互不同。然而，考虑到制造中的问题，第一指示剂 3 和第二指示剂 7 可以是彼此相同的。

[0035] 如实施方式 3 和图 3 所示，第一指示剂 3 的颗粒大小可以是约 10nm 到约 20nm，而第二指示剂 7 的颗粒大小可以是约 20nm 到约 60nm。在本发明中，第二指示剂 7 的颗粒大小大于第一指示剂 3 的颗粒大小，使得第二偶联体 9 在测试条上的展开比第一偶联体 8 慢。因此，第一偶联体 8 与抗原先到达第二抗体 5 并与第二抗体 5 结合，随后第二偶联体 9 与第一偶联体 8 结合。

[0036] 本发明所述的免疫层析试剂盒使用上述信号放大方法。本发明的免疫层析试剂盒包括：样品垫，含有分析物的液体样品施加到垫上；偶联物垫，包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、连接体、与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体，其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体，并且第二指示剂大于第一指示剂，使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体；膜，包括检测位点，其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位，和用于检测偏差的对照位点；和吸收垫，通过毛细管现象吸收液体样品。

[0037] 图 2A 显示了本发明实施方式所述的免疫层析试剂盒，其中参考编号 10 表示样品垫、参考编号 11 表示偶联物垫、参考编号 12 表示膜、参考编号 13 表示检测位点、参考编号

14 表示对照位点、参考编号 15 表示吸收垫、参考编号 17 表示固定第二偶联体的位点、参考编号 18 表示固定第一偶联体的位点。图 2B 显示了本发明另一实施方式所述的具有两个偶联物垫的免疫层析试剂盒,其中参考编号 16 表示第二偶联物垫、参考编号 17 表示固定第二偶联体的位点、参考编号 19 表示全面添加有第一偶联体的第一偶联物垫。图 2C 显示了图 2B 所示免疫层析试剂盒的装配结构。

[0038] 用于制造本发明的免疫层析试剂盒的垫可由任何天然多孔材料或任何合成多孔材料形成。例如,垫可以由硝酸纤维素形成。

[0039] 样品垫 10 是一部分,该部分首先吸收含有分析物的液体样品的垫。膜 12 的一端可用作样品垫 10,或者可以用另外的膜作为样品垫 10。样品垫 10 吸收含有分析物的样品,并通过毛细管现象将分析物移至偶联物垫 11。

[0040] 偶联物垫 11 具有干燥状态的第二偶联体和第一偶联体。当偶联物垫吸收含有分析物的液体样品时,第二偶联体和第一偶联体称为流体移动入膜 12。第一偶联体位于比第二偶联体更靠近固定的第二抗体的位置,并且制得的第二指示剂颗粒大于第一指示剂的可以,使得测试条上第二偶联体的展开比第一偶联体慢。

[0041] 如实施方式 3 和图 3 所示,第二指示剂 7 的颗粒大小可以是约 20nm 到约 60nm,而第一指示剂 3 的颗粒大小可以是约 10nm 到约 20nm。因此,通过控制偶联物的排列和偶联物中指示剂的颗粒大小,第一偶联体和第二偶联体不会相互接触,并且结合了抗原的第一偶联体到达捕获抗原,随后第二偶联体再与之结合。

[0042] 如图 2A 所示,第一偶联体和第二偶联体可以在单个偶联物垫上位于不同的区域。或者,如图 2B 所示,第一偶联体可以包括在第一偶联物垫上,而第二偶联体包括在与第一偶联物垫分开的第二偶联物垫上。图 2B 中测试条的组装形成图 2C 所示结构。优选第一偶联体和第二偶联体以时间间隔依次移动。因此,优选偶联物垫制造成当液体样品在测试条上移动的时候第一偶联体和第二偶联体不相互接触,并且第一偶联体和第二偶联体因此不相互混合。

[0043] 由实施方式 4 可见,当通过两个独立的偶联物垫的方式分隔第一偶联体和第二偶联体,进一步控制第一偶联体和第二偶联体之间的接触时,信号放大效应得到增强。结果就是,通过两个独立偶联物垫的方式(见图 4 和 5)分隔第一偶联物垫和第二偶联物垫时,信号放大效果良好。第一偶联物垫可以是孔径为约 20  $\mu\text{m}$  或更大的垫,其适于处理如聚乙烯醇(PVA)这样的物质而不会延缓溶剂和抗原的流动,并且平稳地保持金纳米颗粒偶联体的展开。例如,第一偶联物垫可以是玻璃纤维偶联(GFC)垫。第二偶联物垫可以是具有过滤 2  $\mu\text{m}$  或更大的颗粒珠和生物颗粒的效果的垫,因此在处理血液样品时具有分离和过滤血浆的功能;并且具有良好的液体吸收能力并因此适于展开金纳米颗粒偶联体。例如,第二偶联物垫可以是 Fusion 5 垫。偶联物垫不限于此,而可以是任何其它合适的具有上述性质的偶联物垫。

[0044] 膜 12 可以由涂布了硝酸纤维素颗粒的物质形成。膜 12 可以由任何能在约 180 秒/厘米的侧向流速下保持抗原和抗体之间的充分反应时间的物质形成,并因此能确保液体样品的流动性。膜 12 包括:检测位点,其上固定有第二抗体,该抗体特异性结合分析物的第二区域,所述分析物结合有第一偶联体;对照位点,作为其对照组检测偏差所致反应的存在。检测位点显示测试结果的确定。对照位点用来检测捕获抗体和金纳米颗粒偶联体的偏

差,并用于检测流动物质是否无偏差地与检测位点 / 对照位点反应。

[0045] 吸收垫 15 可以是任何能充分吸收反应后残液的垫。

[0046] 下文将参照实施方式更详细地描述本发明。这些实施方式只是示例,本发明不限于这些实施方式。

[0047] 本发明的实施方式

[0048] 实施方式 1 :纳米颗粒 - 抗体偶联体的组合物

[0049] 1. 第一偶联体的组成

[0050] 将 0.1mL 0.1M 硼酸盐缓冲剂 (pH 8.5) 加入到 1mL 胶体金纳米颗粒溶液 (BBInternational,10nm) 中,向其中加入 10uL 1mg/mL 第一抗体,并反应 30 分钟。反应后,向其中加入 0.1ml 溶解了 1% (w/v) 作为连接体的牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma) 的磷酸缓冲盐水 (PBS) (Gibco),并在常温下反应 15 分钟。反应后,4°C 下 10,000rpm 离心 20 分钟后分散入 1mL 溶解有 1mg/mL BSA (Sigma) 的 10mM PBS 溶液中。重复一次离心 / 分散过程,并再次离心后分散入 1mL PBS 中,从而制得第一偶联体。

[0051] 第一抗体可以是用于肌钙蛋白 I 免疫测试的 4T21,560 (HyTest),也可以是用于肌红蛋白免疫测试的 M012607 (Fitzgerald)。

[0052] 2. 第二偶联体的组成

[0053] 将 0.1mL 0.1M 硼酸盐缓冲剂 (pH 8.5) 加入到 1mL 胶体金纳米颗粒溶液 (BBInternational,10、20、40、60nm) 中,向其中加入 10uL 的 1mg/mL 的抗 -BSA 抗体 (Genetex) 作为第三抗体,并反应 30 分钟。反应后,向其中加入 0.1ml 溶解了 1% (w/v) 人血清白蛋白 (HSA) (Sigma) 的蒸馏水,并在常温下反应 15 分钟。反应后,4°C 下 10,000rpm 离心 20 分钟后分散入 1mL 溶解有 1mg/mL HSA 的 PBS 溶液中。重复两次离心 / 分散过程,从而制得第二偶联体。

[0054] 实施方式 2 :免疫层析的制造

[0055] 1. 免疫层析的制造方法

[0056] 将硝酸纤维素膜 (密理博公司 (Millipore),180 秒) 和吸收垫 (密理博公司) 粘合在塑料垫 (密理博公司) 上。然后,用分配系统 (Zeta Co.) 把溶解在 PBS 中的 1mg/mL 捕获抗体 (第二抗体) 溶液和作为对照组的溶解在 PBS 中的 1mg/mL 羊抗鼠 IgG 抗体 (Sigma, M8642) 以 6 厘米 / 秒的速度刻划到膜上,从而形成检测位点和控制线。待膜干后,用切割机以 3mm 的间隔切开。

[0057] 第二抗体,即捕获抗体可以是用于肌钙蛋白 I 免疫测试的肌钙蛋白捕获抗体 (HyTest),也可以是用于肌红蛋白免疫测试的肌红蛋白捕获抗体 M09983110 (Fitzgerald)。

[0058] 样品垫 (密理博公司, C068) 浸入含 0.5% 吐温 20 (Tween 20)、5% 蔗糖、0.05% 葡聚糖、5% 叠氮化钠的水溶液后,干燥并切成约 10x3mm。

[0059] 如图 2B 所示,偶联物垫和样品垫组装在塑料垫,即膜和吸收垫的组件上。与图 2B 不同的是第二偶联物垫的制造方法。下文将更详细地描述第二偶联物垫的制造方法。

[0060] 2. 制备偶联物垫的方法

[0061] 通过区分第一偶联物垫和第二偶联物垫来制造偶联物垫。对于第一和第二偶联物垫, GFC (密理博公司) 被切成 5x3mm,并在涂布 5  $\mu$  L 实施方式 1 中所述的第一偶联体和第二偶联体后被干燥。

[0062] 实施方式 3 :基于金纳米颗粒大小的信号放大效应

[0063] 第一偶联体使用直径为 10nm 或 20nm 的金纳米颗粒,而形成第二偶联体的金纳米颗粒是制成不同大小 (10、20、40、60nm) 的,并且观察到信号放大效应取决于金纳米颗粒的大小。

[0064] 免疫层析试剂盒浸入 96 孔板中,孔中浸有 70  $\mu$  L 溶解了预定浓度的肌钙蛋白 I 的血清 (线性化学品公司 (Linear chemicals), Cromatest), 并进行测量。第一偶联体具有直径 10nm 的纳米颗粒时的结果如表 1 和图 3A 所示, K/S 值取决于纳米颗粒的大小 (第一偶联体的纳米颗粒直径为 10nm)。第一偶联体具有直径 20nm 的纳米颗粒时的结果如表 2 和图 3B 所示, K/S 值取决于纳米颗粒的大小 (第一偶联体的纳米颗粒直径为 20nm)。

[0065] 表 1

肌钙蛋白 I 浓度\ 纳米颗粒大小 (直径)	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
[0066] 0 ng/mL	0.1554	0.1101	0.1918	0.0694
1.0 ng/mL	0.4745	0.5004	0.9431	0.5004
10 ng/mL	0.5248	1.3889	1.9793	1.3889

[0067]  $K/S = (1-Rd)^2/2Rd$ ; Rd :相对漫反射系数, K :样品的吸收系数, S :散射系数

[0068] 表 2

肌钙蛋白 I 浓度\ 纳米颗粒大小 (直径)	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
[0069] 0 ng/mL	0.0897	0.1501	0.5311	0.0663
1.0 ng/mL	0.1092	1.0054	1.5717	0.4782
10 ng/mL	0.5338	1.4725	1.7231	1.3273

[0070] 根据 K/S 值 ( $= (1-Rd)^2/2Rd$ ; Rd :相对漫反射系数, K :样品的吸收系数, S :散射系数), 对 10 分钟后测量结果的检测结果为 :第一偶联体使用 10nm 的金纳米颗粒和第二偶联体使用 40nm 的金纳米颗粒的组的灵敏度与其它组的灵敏度相比, 提高最多, 并且与没有信号放大的情况相比灵敏度提高了两个或两个以上数量级 (约 100 倍)。

[0071] 实施方式 4 :基于偶联体分离的信号放大效应

[0072] (1) 制造偶联物垫

[0073] 为了观察当偶联物垫的制造使得第一偶联体与第二偶联体不相互接触时的信号放大效应, 用以下方式制造偶联物垫。制造无增强的免疫层析作为对照组。在此, 偶联物垫被切成 5x3mm 的 GFC 垫 (密理博公司), 用采用针对实施方式 1 中分析物的抗体制备的第一偶联体涂布, 随后干燥。

[0074] 1) 为制造第一偶联体和第二偶联体接触的偶联物垫, 将两片偶联物垫 (GFC, 密理博 GFC203000) 切成 5x3mm, 然后在分别涂布了如实施方式 1 中制得的第一偶联体和第二偶联体后被干燥。若偶联物垫被完全涂布, 那么有可能两片偶联物垫之间的重叠会相互接触从而在含有分析物的液体样品流入时第一偶联体和第二偶联体混合。

[0075] 2) 为制造第一偶联体和第二偶联体不接触的偶联物垫, 使用实施方式 1 中制得的第一偶联体和第二偶联体, 按实施方式 2 所述方法涂布 5  $\mu$  L 第一偶联体后干燥制得第一偶联物垫。使用 Fusion 5 垫 (沃特曼公司 (Whatman Co.)) 作为第二偶联物垫, 第二偶联体

形成线条以制造免疫层析,并进行实验。使用偶联物垫的免疫层析试剂盒的结构与图 2B 和 2C 所示相同。第一偶联体的纳米颗粒大小为 10nm,而第二偶联体的纳米颗粒大小为 40nm。若免疫层析试剂盒如上制得,第二偶联体在第二偶联物垫上形成线条使得能够避免接触第一偶联物垫浸有第一偶联体的部位。

#### [0076] (2) 肌钙蛋白 I 测试

[0077] 如此制得的免疫层析和对照组免疫层析浸入 96 孔板中,其中浸有 70  $\mu$  L 溶解了预定浓度的肌钙蛋白 I 抗原的血浆(线性化学品公司 (Linear chemicals), Cromatest),并进行测量。

[0078] 对 10 分钟后的测量结果的检测结果如图 4A 所示:与对照组相比,放大信号的情况下灵敏度提高,使用 Fusion 5 垫作为第二偶联物垫使得第一偶联体和第二偶联体不相互接触的情况中的信号灵敏度是最理想的。图 4B 是上述结果的图示。

#### [0079] (3) 肌红蛋白测试

[0080] 在上述方法中,测试了用肌红蛋白没有信号放大的情况和用肌红蛋白采用 Fusion 5 垫作为第二偶联物垫来放大信号的情况。第一偶联体的第一抗体和第二抗体,即捕获抗体为 Fitzgerald 公司的抗肌红蛋白抗原产品。

[0081] 对 10 分钟后的测量结果的检测结果如图 5A 所示:与没有放大信号的对照组相比,信号得到了放大。图 5B 是上述结果的图示。

[0082] 虽然已经结合示例性实施方式展示并描述了本发明,但是对本领域技术人员显而易见的是,在不背离所附权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改和变化。

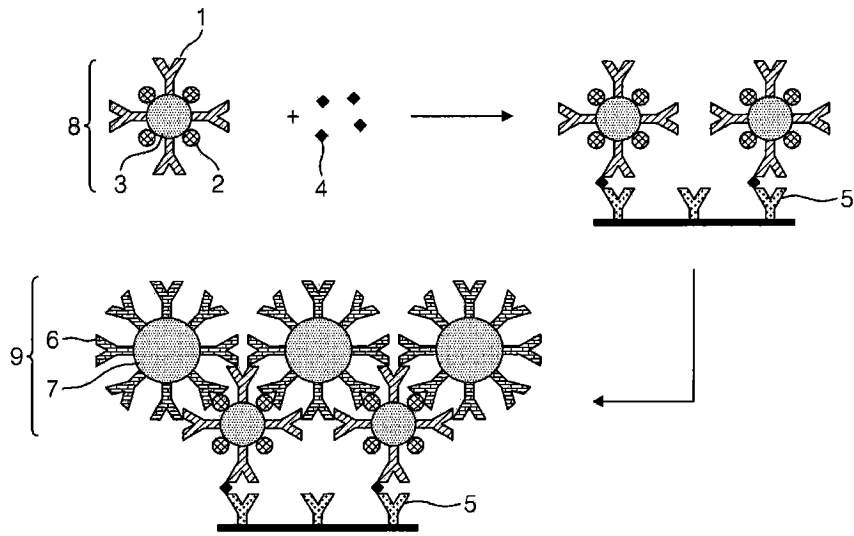


图 1

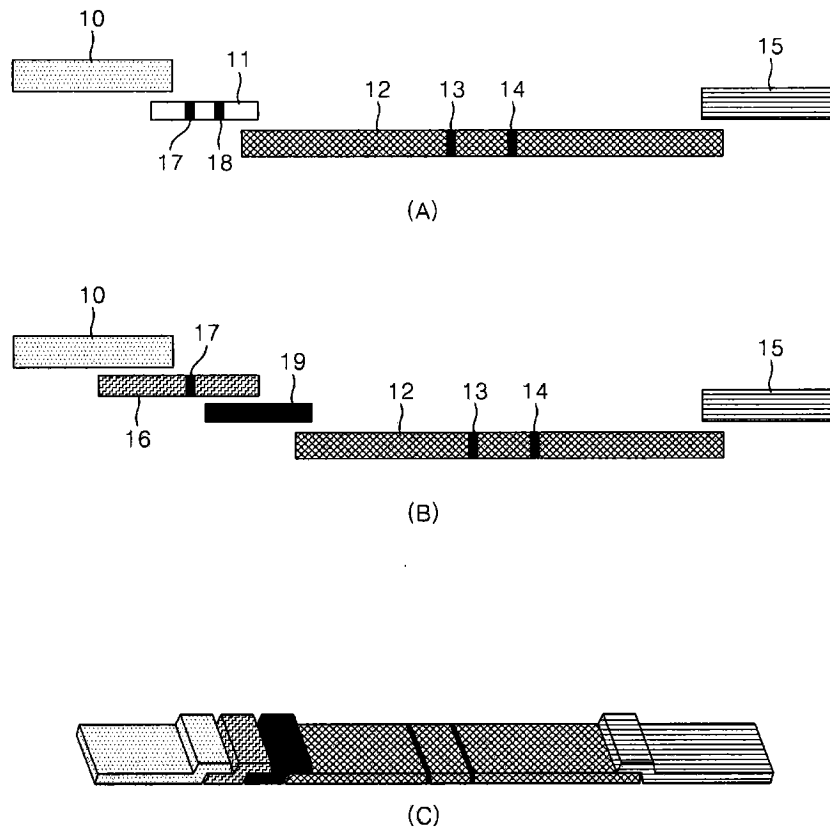
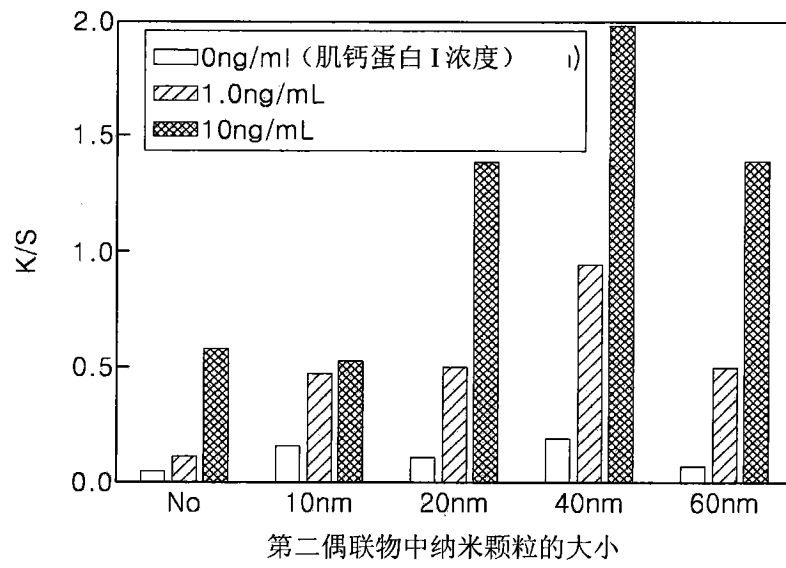
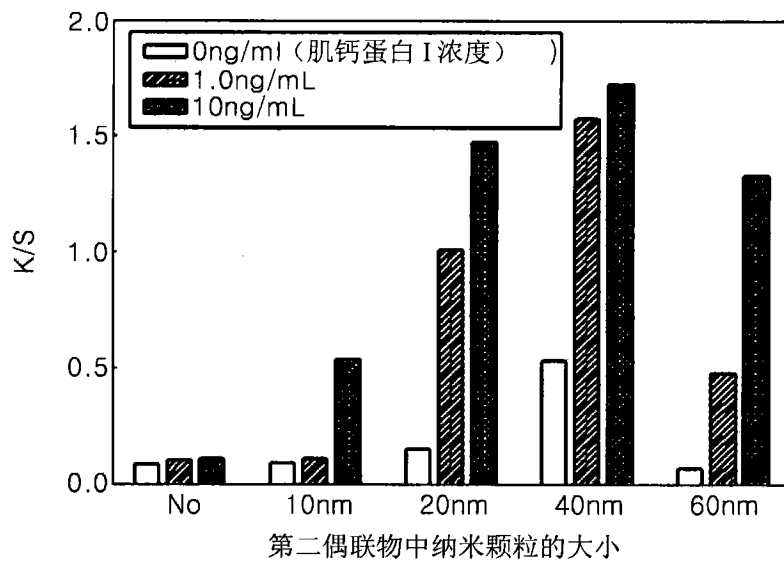


图 2



(A)



(B)

图 3

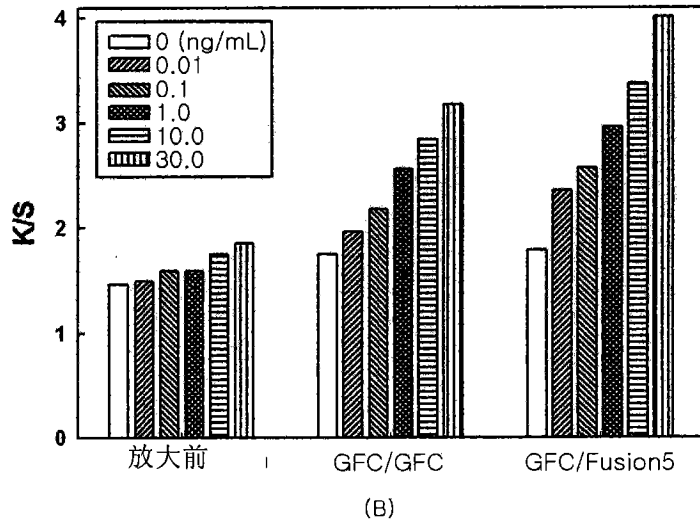
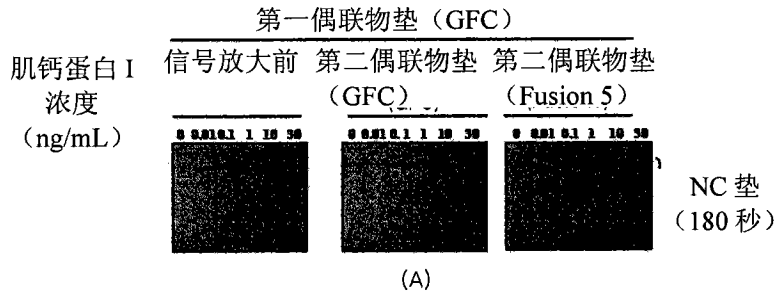


图 4

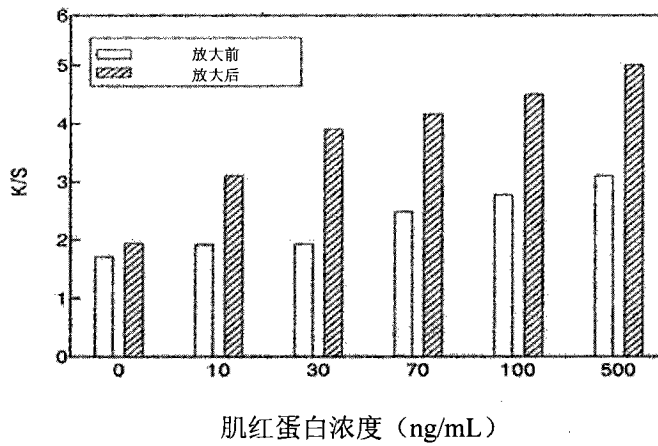
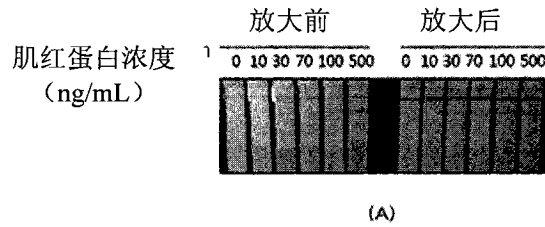


图 5

专利名称(译)	免疫层析测试中信号放大的方法以及使用该方法的免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102227631B</a>	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	CN200880132189.2	申请日	2008-11-28
[标]发明人	裴柄宇 李星东 金珉坤 慎容范 张晋姬 申志勋		
发明人	裴柄宇 李星东 金珉坤 慎容范 张晋姬 申志勋		
IPC分类号	G01N30/90 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/487		
CPC分类号	G01N33/585 G01N33/558		
代理人(译)	余颖		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN102227631A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于分析物的高灵敏度检测的免疫层析测试中放大信号的方法和使用该方法的免疫层析试剂盒，该方法通过区分第一指示剂的大小和第二指示剂的大小来控制流速实现放大信号。本发明的一个方面提出了在免疫层析测试中放大信号的方法，包括：将具有能特异性结合分析物第一表位的第一抗体、连接体、和与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体与分析物结合；将结合在第一偶联体上的分析物与能特异性结合分析物第二表位的固定的第二抗体相结合；将具有能特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体，和连接第三抗体的第二指示剂的第二偶联体与第一偶联体的连接体结合，其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体，并且第二指示剂的颗粒大于第一指示剂的颗粒，使得第二偶联体比第一偶联体更晚到达固定的第二抗体。根据本发明的另一个方面，一种免疫层析试剂盒包括：样品垫，含有分析物的液体样品施加到垫上；偶联物垫，包括具有特异性结合分析物的第一表位的第一抗体、连接体、与第一抗体和连接体结合的第一指示剂的第一偶联体、和具有特异性结合第一偶联体的连接体的第三抗体和与第三抗体结合的第二指示剂的第二偶联体，其中第一偶联体比第二偶联体更接近固定的第二抗体，并且第二指示剂大于第一指示剂，使得第二偶联体迟于第一偶联体到达固定的第二抗体；膜，包括检测位点，其上固定的第二抗体能特异性结合与第一偶联体结合的分析物的第二表位，和用于检测偏差的对照位点；和吸收垫，通过毛细管现象吸收液体样品。因此，本发明可以实现信号放大而无需另外的机械控制或人工逐步反应。

