

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/531

G01N 33/53

G01N 1/28



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410091168.4

[43] 公开日 2005 年 5 月 25 日

[11] 公开号 CN 1619307A

[22] 申请日 2004. 11. 23

[21] 申请号 200410091168.4

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100025 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号

[72] 发明人 胡孔新 王宝麟 王大宁 王静  
姚李四 李伟 陈维娜

[74] 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理有限公司

代理人 尹振启

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂

[57] 摘要

本发明公开了一种用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，该制剂包括基础缓冲液和 Nonidet P40，其中，该基础缓冲液的 pH 值在 5.5 - 10 之间，Nonidet P40 的体积比含量在 0.05% - 3.5% 之间。由于本发明的样品处理制剂中包括有非离子表面活性剂 Nonidet P40，因此可有效解离奶粉、动物组织、土壤等复杂样品中的颗粒性抗原成分，使之在经过简单的离心或过滤方法处理后适合于固相膜免疫分析，从而提高固相膜免疫分析方法检测复杂样品的能力并扩大检测复杂样本颗粒性抗原的应用范围；并且，优化 Nonidet P40 的浓度、样品液的 pH 值后，能够提高细菌样本检测敏感性 10 倍以上。

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

- 
- 1、一种用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，其特征在于：  
该制剂包括基础缓冲液和 Nonidet P40，其中，该基础缓冲液的 PH 值在  
5 5.5—10 之间， Nonidet P40 的体积比含量在 0.05%—3.5%之间。
  - 2、如权利要求1所述的用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，  
其特征在于：所述制剂还包括封闭剂。
  - 3、如权利要求2所述的用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，  
其特征在于：所述制剂还包括防腐剂。
  - 10 4、如权利要求3所述的用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，  
其特征在于：所述防腐剂可为叠氮钠或硫汞撒或庆大霉素。
  - 5、如权利要求4所述的用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，  
其特征在于：所述基础缓冲液为生物化学缓冲液或盐溶液。

## 用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂

### 5 技术领域

本发明涉及一种样品处理制剂，尤指一种用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂。

### 10 背景技术

随着全球生物安全战略的广泛实施，有关病原生物的快速诊断需求日益增强，同时快速诊断所要面对的检测对象也更加复杂，包括人、动植物样品、食品，甚至是“白色粉末”等。固相膜免疫分析试验  
15 (Membrane-based immunoassay)，尤其是免疫层析技术由于具有简便、快速、高效、廉价，而且适用于大规模现场应用等特点，近年来在病原检测方面获得了长足的发展，各种新的生物标记材料以及光学、电子检测系统研究也不断取得进展并得到迅速应用。然而，有关检测对象样品  
20 处理技术在固相膜免疫分析研究中并未得到同步发展，使得固相膜免疫分析技术在大颗粒抗原和复杂样本检测中面临困难。

固相膜免疫分析试验是以膜为固相载体的免疫快速诊断技术，该项技术以多孔性的微孔滤膜为固相载体，含水介质作为流动相通过膜孔的毛细管作用诱导反应物向固定在膜表面的结合对象传递，从而将未结合的反应物与液-固界面上形成的复合物分离开来，因此，固相膜免疫分析  
25 技术完成要依赖流动相作为载体运输检测对象。受固相膜孔径等因素的限制，携带样本的流动相的表面张力以及其中的颗粒成分大小将会直接影响检测结果。但是，目前国内外有关免疫分析的研究主要集中在提高检测系统的敏感性上，而作为载体流动相应用于免疫层析系统的样本制剂仅限于检测标本液体（如尿样）、普通缓冲液（溶解的固体对象如 PBS  
30 缓冲液、生理盐水等）或在普通缓冲液中添加作为封闭液使用的 Tween20、牛血清白蛋白（BSA）缓冲液等。

而在固相膜免疫分析技术应用于传染病检测时，其检测对象主要可分为抗原和抗体两大类。对于抗体检测，固相膜免疫分析检测对象特征相对固定；而对于抗原检测，免疫层析面临的检测对象则要复杂得多，  
35 少数可以是可溶性的病原微生物分泌蛋白分子，如细菌毒素，多数则是病毒、细菌、寄生虫等颗粒性抗原对象，其大小从纳米、微米到毫米级不等。由于免疫层析方法主要借助毛细作用，让样品在条状纤维制成的膜

上泳动, 其中的待测物与膜上一定区域的配体结合, 通过酶促显色反应或者其它标记物检测, 以便短时间得到直观的结果。因此, 颗粒性抗原的体积大小不仅会影响检测对象在膜上地流动, 而且其空间结构不可避免地会限制其与捕捉抗体地充分结合, 因而会降低待测样本的检测灵敏度。

5 而要提高检测灵敏度则需要通过有效的化学制剂将其从颗粒上最大限度地解离、溶解并且不影响其与相应抗体的后续结合, 而目前作为载体流动相应用于免疫层析系统的样本制剂无法满足这一要求。

另外, 如果检测对象是复杂样本中的病原微生物, 如食品、组织样本、土壤或白色粉末等, 如何从复杂样本中将颗粒性的待测抗原分离检测而不受或最大限度减少样本物质的影响是个非常棘手的问题, 目前作为载体流动相应用于免疫层析系统的样本制剂却无法满上述要求, 这也是当前固相膜免疫分析方法应用于病原微生物颗粒性抗原如细菌检测的难点所在, 严重限制了其在直接检测病原微生物方面的应用。

## 15 发明内容

针对上述问题, 本发明的目的在于提供一种可提高固相膜免疫分析方法检测复杂样品的能力及其检测敏感性、并可扩大检测复杂样本颗粒性抗原的应用范围、原料来源容易、配制方法简便的用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂。

为达到上述目的, 本发明的技术解决方案为:

一种用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂, 该制剂包括基础缓冲液和 Nonidet P40, 其中, 该基础缓冲液的 PH 值在 5.5—10 之间, Nonidet P40 的体积比含量在 0.05%—3.5%之间。

25 进一步, 所述制剂还包括封闭剂。

进一步, 所述制剂还包括防腐剂。

进一步, 所述防腐剂可为叠氮钠或硫汞撒或庆大霉素。

进一步, 所述基础缓冲液为生物化学缓冲液或盐溶液。

由于本发明的样品处理制剂中包括有非离子表面活性剂 Nonidet 30 P40, 因此可有效解离奶粉、动物组织、土壤等复杂样品中的颗粒性抗原成分, 使之在经过简单的离心或过滤方法处理后适合于固相膜免疫分析, 从而提高固相膜免疫分析方法检测复杂样品的能力并扩大检测复杂样本颗粒性抗原的应用范围; 另外, 优化了溶液中的非离子表面活性剂 Nonidet P40 的浓度、样品液的 PH 值后, 应用于颗粒性抗原的固相膜免疫 35 分析方法, 与现有常见流动相相比较, 同等条件下能够提高细菌样本检

测敏感性10倍以上,而且具有较低检测背景,使样品在膜上流动时无明显阻滞现象出现。另外,该样品制剂原料来源容易,配制方法简便,一个普通的技术人员在无特殊设备的条件下就可以完成配制工作。

## 5 具体实施方式:

下面结合实施例进一步说明本发明。

本发明用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂,其配方如下:

### 10 实施例 1

以 PBS 缓冲液作为本发明的溶液基质,将其 PH 值调整为 8.0,配制成含以下成分溶液:

Nonidet P40 3.5% (v/v)

上述样本处理制剂用于处理添加了鼠疫耶尔森氏菌的奶粉(每毫升样本制剂加入约 50mg 奶粉),混匀 5—10 分钟后,8000rpm 离心 15 秒,样本上清液用检测鼠疫菌的胶体金免疫层析方法和 UCP (上转磷光)免疫层析技术分别检测。结果显示,与用不同量的通用的 Tween20 溶液处理相比较,经本实施例的样品处理制剂作用后,对于胶体金试验检测敏感性可提高 5—10 倍,对于上转磷光标记的免疫测定则可提高灵敏度 10 倍以上。用于已建立的炭疽杆菌 UCP 免疫层析方法检测芽孢也可获得类似的比较结果。

### 20 实施例 2

以 PBS 缓冲盐溶液作为本发明的溶液基质,将其 PH 值调整为 7.5,配制成含以下成分溶液:

25 Nonidet P40 1.0% (v/v)

NaN<sub>3</sub> (叠氮钠) 0.05% (w/v)

将上述样本处理制剂处理鼠疫耶尔森氏菌,与通用的用同浓度的 Tween20 (v/v)、SDS (w/v)、去氧胆酸盐 (w/v)、Triton X-100 (v/v) 溶液来处理作比较,混匀 5—10 分钟后,用以检测鼠疫菌的 UCP (上转磷光)免疫层析技术检测。比较结果显示:对于上转磷光标记的免疫测定,用本实施例的样品制剂,具有更高的阳性检测值,可提高检测灵敏度最低 10 倍以上。而且,在溶液基质中加入重量含量为 0.05% 的 NaN<sub>3</sub>,还可起到防腐的作用,使配制好的溶液不会变质。

### 30 实施例 3

35 以 PBS 缓冲盐溶液作为本发明的溶液基质,将其 PH 值调整为 5.5,配制成含以下成分溶液:

Nonidet P40 0.5% (v/v)

NaN<sub>3</sub> (叠氮钠) 0.05%(w/v)

BSA 1.0% (w/v)

上述样本处理制剂可用于现有的免疫层析方法或免疫渗滤试验, 检测处理如土壤、奶粉、肉骨粉、动物组织、肉汤、血液等待检样品。加入该  
5 样品处理制剂混匀 5—10 分钟后, 静置或短暂离心或粗滤处理, 以现有固相膜免疫分析试验检测条插入, 或取上清液或滤过物加样适量, 观察检测结果。检测对象可依据试验目的不同而有所区别, 可以是细菌、病毒、寄生虫或其它有意义的检测配体成分; 用该制剂进行免疫层析或免疫渗滤检验, 可提高灵敏度 10 倍以上。而且, 在溶液基质中加入 0.05%  
10 的 NaN<sub>3</sub>, 还可起到防腐的作用, 使配制好的溶液不会变质, 并且加入封闭剂 1.0% 的 BSA 更可增强试剂的封闭性, 提高检测灵敏度。

#### 实施例 4

以 PBS 缓冲液作为本发明的溶液基质, 将其 PH 值调整为 8.5, 配制成分以下成分的溶液:

15 Nonidet P40 0.05% (v/v)

Tween20 1.5%(v/v)

将上述样本处理制剂用于处理添加了鼠疫耶尔森氏菌的淀粉(每毫升样本制剂加入约 50mg 奶粉), 混匀 5—10 分钟后, 8000rpm 离心 15 秒, 将样本上清液以检测鼠疫菌的胶体金免疫层析方法和 UCP (上转磷光) 免疫  
20 层析技术分别检测。结果显示, 与用不同量的通用的 Tween20 溶液处理相比较, 经该样品处理制剂作用后, 胶体金试验检测敏感性可提高 5—10 倍, 对于上转磷光标记的免疫测定则可提高灵敏度 10 倍以上。以 Tween20 代替 BSA 同样可增强试剂的封闭性, 提高检测灵敏度。

#### 实施例 5

25 以 TBS 缓冲溶液作为本发明的溶液基质, 将其 PH 值调整为 10, 配制成分以下成分的溶液:

Nonidet P40 0.5% (v/v)

NaN<sub>3</sub> (叠氮钠) 0.05%(w/v)

BSA 1.0% (w/v)

30 将上述样本处理制剂处理添加了鼠疫耶尔森氏菌的奶粉, 混匀 5—10 分钟后, 8000rpm 离心 15 秒, 分别以胶体金免疫层析方法和 UCP (上转磷光) 免疫层析技术检测条插入样本上清液检测, 检测结果表明, 与用同浓度的通用的 Tween20 溶液处理相比较, 对于胶体金试验检测敏感性可提高 5—10 倍, 对于上转磷光标记的免疫测定则可提高灵敏度 10 倍以上。  
35 对以面粉、土壤和肉末模拟添加鼠疫菌进行处理可获得同样的结果。并且, 配制好的溶液不会变质, 还可增强试剂的封闭性, 提高检测灵敏度。

#### 实施例 6

以 HEPES 缓冲溶液作为本发明的溶液基质，将其 PH 值调整为 10，配制含以下成分溶液：

Nonidet P40 0.5% (v/v)

硫汞撒 0.05% (w/v)

5 TritonX-100 1.0% (w/v)

将上述样本处理制剂处理添加了鼠疫耶尔森氏菌的奶粉，混匀 5—10 分钟后，8000rpm 离心 15 秒，分别以胶体金免疫层析方法和 UCP（上转磷光）免疫层析技术检测条插入样本上清液检测，检测结果表明，与用同浓度的通用的 Tween20 溶液处理相比较，对于胶体金试验检测敏感性可提高 5—10 倍，对于上转磷光标记的免疫测定则可提高灵敏度 10 倍以上。对以面粉、土壤和肉末模拟添加鼠疫菌进行处理可获得同样的结果。并且，加入防腐剂硫汞撒使配制好的溶液不会变质，而 1.0% 的 TritonX-100 还可增强试剂的封闭性，提高检测灵敏度。

实施例 7

15 以 HEPES 缓冲溶液作为本发明的溶液基质，将其 PH 值调整为 10，配制含以下成分溶液：

Nonidet P40 0.5% (v/v)

庆大霉素 0.05% (w/v)

TritonX-100 1.0% (w/v)

20 将上述样本处理制剂处理添加了鼠疫耶尔森氏菌的奶粉，混匀 5—10 分钟后，8000rpm 离心 15 秒，分别以胶体金免疫层析方法和 UCP（上转磷光）免疫层析技术检测条插入样本上清液检测，检测结果表明，与用同浓度的通用的 Tween20 溶液处理相比较，对于胶体金试验检测敏感性可提高 5—10 倍，对于上转磷光标记的免疫测定则可提高灵敏度 10 倍以上。对以面粉、土壤和肉末模拟添加鼠疫菌进行处理可获得同样的结果。并且，加入防腐剂硫汞撒同样使配制好的溶液不会变质，而 1.0% 的 TritonX-100 还可增强试剂的封闭性，提高检测灵敏度。

另外，本发明样本处理制剂中的基质缓冲液为生物化学中常用的缓冲液或盐溶液，可选自 Tris 缓冲液、HEPES 缓冲液、磷酸盐缓冲液、盐酸盐溶液、碳酸盐缓冲液、硫酸盐溶液、硼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液等其中的一种或几种的混合液；封闭剂可选自牛血清白蛋白（BSA）、Tween20、Triton X-100 或 PVA(15Kda)、PVP(33KDA)、PEG(20KDA)、Brij、凝胶、脱脂牛奶、免疫球蛋白（IgG）、酪蛋白（Casein）等。

专利名称(译)	用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN1619307A</a>	公开(公告)日	2005-05-25
申请号	CN200410091168.4	申请日	2004-11-23
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	胡孔新 王宝麟 王大宁 王静 姚李四 李伟 陈维娜		
发明人	胡孔新 王宝麟 王大宁 王静 姚李四 李伟 陈维娜		
IPC分类号	G01N1/28 G01N33/53 G01N33/531		
其他公开文献	CN1314952C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种用于固相膜免疫分析方法流动相的样本处理制剂，该制剂包括基础缓冲液和Nonidet P40，其中，该基础缓冲液的pH值在5.5 - 10之间，Nonidet P40的体积比含量在0.05% - 3.5%之间。由于本发明的样品处理制剂中包括有非离子表面活性剂Nonidet P40，因此可有效解离奶粉、动物组织、土壤等复杂样品中的颗粒性抗原成分，使之在经过简单的离心或过滤方法处理后适合于固相膜免疫分析，从而提高固相膜免疫分析方法检测复杂样品的能力并扩大检测复杂样本颗粒性抗原的应用范围；并且，优化Nonidet P40的浓度、样品液的pH值后，能够提高细菌样本检测敏感性10倍以上。