

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53  
G01N 33/569



# [12] 实用新型专利说明书

[21] ZL 专利号 01252075.6

[45] 授权公告日 2003 年 1 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 2531391Y

[22] 申请日 2001.09.30 [21] 申请号 01252075.6

[73] 专利权人 王滔

地址 350001 福建省福州市鼓楼区湖前路 92  
号 4-403

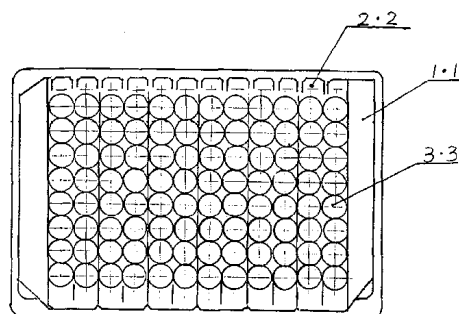
[72] 设计人 王滔

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 10 页

[54] 实用新型名称 一种联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒

## [57] 摘要

本实用新型涉及一种用于医学上联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒，它能方便、快捷、精确地联合检测 TORCH 5 种病原体的特异性的抗体。本实用新型是由外框支撑架及放置于其上的可拆酶标反应板条组成，在每个可拆酶标反应板条上设置有反应孔，在反应孔中涂布有已知的抗体或抗原，其特征在于：在外框支撑架上放置有 3 条以上的可拆酶标反应板条，每个可拆酶标反应板条上排列有 4~10 个反应孔，在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一、二或数层膜。



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

1 一种联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒，它是由外框支撑架及放置于其上的可拆酶标反应板条组成，在每个可拆酶标反应板条上设置有反应孔，在反应孔中涂布有已知的抗体或抗原，其特征在于：在外框支撑架上放置有 3 条以上的可拆酶标反应板条，每个可拆酶标反应板条上排列有 4~10 个反应孔，在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一、二或数层膜。

2 根据权利要求 1 所述的联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒，其特征在于：在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，其中一层膜由羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液与 PVLA 配制而成，或者含戊二醛，或者含链霉亲和素；且已涂布的抗原为 T 或 R 或 C 或 H1 或 H2。

3 根据权利要求 1 所述的联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒，其特征在于：在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，其中一层膜由羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液与 PVLA 配制而成，或者蛋白 A，或者链霉亲和素，或者为第二抗体，或者为戊二醛；且已涂布的抗体为抗人 IgG 或 IgM。

4 根据权利要求 1 所述的联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒，其特征在于：在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有二层膜，其中一层膜含多聚赖氨酸，另一层为活化葡聚糖；或者一层含 MMAC，另一层含己二胺；且已涂布的抗原为 T 或 R 或 C 或 H1 或 H2。

5 根据权利要求 1 所述的联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒，其特征在于：在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有二层膜，其中一层膜含多聚赖氨酸，另一层为活化葡聚糖；或者一层含 MMAC，另一层含己二胺；且已涂布的抗体为抗人 IgG 或 IgM。

## 一种联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒

### (一) 技术领域:

本实用新型涉及一种用于医学上联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒。

### (二) 背景技术:

TORCH 综合征是指弓形体、风疹、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒等感染性疾病。其中 T 指弓形体(*Toxoplasma*), O 指其它, R 指风疹病毒(*rubella virus*), C 指巨细胞病毒(*Cytomegalovirus*), H 指单纯疱疹病毒 1、2 型(*herpes simplex virus 1, 2*), 俗称优生五项, 因为这五项若在孕期感染, 只其中一项即可使胎儿造成严重缺陷。TORCH 感染也见于内科、儿科、神经科、风湿科、免疫科等, 因此, 开展该项检测有重要的临床意义。

TORCH 检查有 5 种病原体, 而每种都要检查该病原体特异性的 IgG、IgM, 共计 10 项。在目前的临床检测工作中, 只有分散独立的 10 种检测试剂盒, 它们是: 抗弓形体 IgG 检测试剂盒、抗弓形体 IgM 检测试剂盒、抗风疹病毒 IgG 检测试剂盒、抗风疹病毒 IgM 等。而在实际临床工作中, 医生常常要求将 TORCH 成套检测, 每做一套 TORCH 检测, 需使用 10 套试剂, 非常繁琐, 劳动强度大, 且容易出错, 导致实验误差。

另外, 在包被酶标反应板时, 多数厂家没有在反应孔的内表面预先包被(“涂膜”), 而直接将抗原或抗体包被在反应孔的内表面。该方法具有: ①被包被的蛋白质生物活性丧失、②效率低、③重复性低等缺陷。从而使实验误差较大, 难以达到理想的检测精度。

### (三) 发明内容:

本实用新型的目的在于提供能方便、快捷、精确地检测 TORCH 5 种病原体的特异性的抗体的一种联合检测 TORCH 特异性抗体的酶免疫试剂盒。

本实用新型目的通过如下技术方案实现: 它是由外框支撑架及放置于其上的可拆酶标反应板条组成, 在每个可拆酶标反应板条上设置有反应孔, 在反应孔中涂布有已知的抗体或抗原, 其特征在于: 在外框支撑架上放置有 3

条以上的可拆酶标反应板条，每个可拆酶标反应板条上排列有 4~10 个反应孔，在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一、二或数层膜。

本实用新型能联合检测 TORCH 5 种病原体的特异性的抗体，并且由于在酶标反应孔的内表面预先涂布了一、二或数层膜，从而提高了检测精度，降低了检测的劳动强度，实现方便、快捷、精确的检测目的。

#### （四）附图说明

图 1 为本实用新型的结构示意图。

图 2 为本实用新型实施例 1 的结构示意图，其中（a）为主视图，（b）为仰视图。

图 3 为本实用新型实施例 2 的结构示意图。

图 4 为本实用新型实施例 3 的结构示意图。

图 5 为本实用新型实施例 4 的结构示意图。

图 6 为本实用新型实施例 5 的结构示意图。

图 7 为本实用新型实施例 6 的结构示意图。

图 8 为本实用新型实施例 7 的结构示意图。

图 9 为本实用新型实施例 8 的结构示意图。

图 10 为本实用新型实施例 9 的结构示意图。

图 11 为本实用新型实施例 10 的结构示意图。

图 12 为本实用新型实施例 11 的结构示意图。

图 13 为本实用新型实施例 12 的结构示意图。

#### （五）具体实施方式：

如图 1 所示：本实用新型由外框支撑架 1·1 及放置于其上的可拆酶标反应板条 2·2 组成，在每个可拆酶标反应板条上设置有反应孔 3·3，在反应孔中涂布有已知的抗体或抗原，其特征在于：在外框支撑架上放置有 3 条以上的可拆酶标反应板条 2·2，每个可拆酶标反应板条 2·2 上排列有 4~10 个反应孔 3·3，在每个反应孔 3·3 的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一、二或数层膜。根据所检测的抗原或抗体的不同，所涂布的膜的成分也不同。

对于 IgG 和 IgM 的检测目前国内主要采用 ELISA 方法，而该方法依据检测原理不同又可分为间接法和直接法。两种方法在实施时有所不同，故列举

实施例分述如下：

### 一. 间接 ELISA 方法

间接 ELISA 方法检测病原特异性抗体的原理是：将已知抗原包被于微孔板上，加入待测血清(含待测未知抗体)，孵育后洗板，洗去未结合的抗体；加入一定浓度酶标记抗人 IgG 或 IgM，孵育后洗板，洗去未结合的抗体；加入酶反应底物，显色，根据颜色浓度，评定结果。

#### 实例 1：氨基内酯聚苯乙烯(PVLA)法

如图 2 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，其中，该层膜 1 由羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液与 PVLA 配制而成，膜 2、3、4、5、6 为已涂布的抗原，它们分别含弓形体 (T)，风疹病毒(R)，巨细胞病毒(C)，单纯疱疹病毒 1、2 型 (H1、H2)。

本实施例的试剂盒的具体使用方法如下：

1. 加入待测血清：将待测血清用适当样本稀释液按 1/100 比例稀释，各取 100  $\mu$ l 加入反应孔内。置 37 $^{\circ}$ C，半小时。用 0.05%吐温 20 的 PBS(磷酸盐缓冲液)洗板。洗板三次，甩干。

注意：本试剂盒每一列即一个微孔板条为一个单元，检测一份标本或对照。本试剂盒设阴性、阳性和 CUT-OFF 三种对照，加样时，按抗原包被的顺序(也就是 T、R、C、H1、H2 顺序)依次加入相应病原体的对照血清。

2. 适当浓度辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG，每孔加入 100  $\mu$ l，置 37 $^{\circ}$ C，半小时。同前洗板，甩干。

3. 显色：每孔加入 100  $\mu$ l TMB 底物溶液。室温反应 15 分钟后，加入 50  $\mu$ l 2N 硫酸终止反应。

4 结果判定：以酶联仪 492nm 波长测定各孔 OD 值(减去空白孔 OD 值后计算)。

临界值=CUT-OFF 孔的 OD 值，标本 OD 值小于临界值为阴性，标本 OD 值 $\geq$ 临界值为阳性。或者 P/N>2 为阳性，P 为待测样品 OD 值，N 为阴性对照 OD 值。

注意本试剂盒结果判定的特点是纵向联合检测，横向联合比较。第 N 列检测一个标本的 5 种病原体的 IgG，它的弓形体 IgG 结果，要根据该列的 T 反应孔的 OD 值与阴性对照或 CUT-OFF 列的 T 反应孔的 OD 值按上述方法比

较而得出。以此类推。

以上是以检测 TORCH 特异的人 IgG 作的说明。当需检测 IgM 时，第 1 步的样本稀释液应含一定浓度的吸附剂，以去除 IgG 的干扰，可采用蛋白 G、蛋白 A 等，样本稀释比率不变，对照改为病原体特异的 IgM 血清即可，反应条件不变；第 2 步将适当浓度辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 改为适当浓度辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM，反应条件不变；第 3 步和第 4 步不变。

为避免类风湿因子等的干扰，在第 2 步中也可采用辣根过氧化物酶标记的鸡抗人 IgM 来代替上述哺乳动物如羊、鼠等抗人 IgM。其余不变。

#### 实例 2：“水包被”方法

如图 3 所示：在反应板条 2·2 上在反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有二层膜，其中，一层膜 7 含多聚赖氨酸，另一层膜 8 含活化葡聚糖，膜 9、10、11、12、13 为已涂布的抗原，它们分别为 T、R、C、H1、H2。

以上操作完成对抗原的包被，以下步骤与实例 1 同，但是，辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 或 IgM 的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

#### 实例 3：链霉亲合素---- 生物素化抗原间接吸附法。

如图 4 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，该层膜 15 含链霉亲合素，膜 16、17、18、19、20 为已涂布的抗原，它们分别为 T、R、C、H1、H2。

该反应条的使用方法与实例 1 同，但是，辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 或 IgM 的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

#### 实例 4：甲基乙烯醚--顺丁烯二酸酐共聚体法（MMAC）

如图 5 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有二层膜，一层膜 21 含 MMAC，另一层膜 22 含己二胺，膜 23、24、25、26、27 为已涂布的抗原，它们分别为 T、R、C、H1、H2。

该反应条的使用方法与实例 1 同，但是，辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 或 IgM 的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

#### 实例 5：戊二醛方法

如图 6 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗

原之间涂布有一层膜，该层膜 28 含戊二醛，膜 29、30、31、32、33 为已涂布的抗原，它们分别为 T、R、C、H1、H2。

该反应条的使用方法与实例一同，但是，辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 或 IgM 的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

## 二.捕获 ELISA 方法

捕获 ELISA 方法检测病原特异性抗体的原理是：(以检测 IgM 作说明)将抗人 IgM( $\mu$  链)的抗体包被于微孔板上，加入待测血清(含待测未知抗体)，孵育后洗板，洗去未结合的抗体；加入一定浓度已知的酶标记抗原，孵育后洗板，洗去未结合的抗原；加入酶反应底物，显色，根据颜色浓度，评定结果。IgG 检测原理同 IgM。

### 实例 6：氨基内酯聚苯乙烯(PVLA)法

如图 7 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，该层膜 34 由羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液与 PVLA 配制而成，膜 35 为已涂布的抗体，为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

本实施例的试剂盒的反应条的具体使用方法如下：

1. 加入待测血清：将待测血清用适当样本稀释液按 1/100 比例稀释，各取 100  $\mu$ l 加入反应孔内。置 37 $^{\circ}$ C，半小时。同前洗板，甩干。

注意：本试剂盒每一列即一个微孔板条为一个检测单元，检测一份标本(或对照)。本试剂盒设阴性、阳性或 CUT-OFF 三种对照，加样时，按顺序(也就是 T、R、C、H1、H2 顺序)依次加入相应病原体的对照血清。

2. 分别取适当浓度辣根过氧化物酶标记的 5 种病原体的抗原按顺序(也就是 T、R、C、H1、H2 顺序)依次加入，每孔加入 100  $\mu$ l，置 37 $^{\circ}$ C，半小时。同前洗板，甩干。

3. 显色：每孔加入 100  $\mu$ l TMB 底物溶液。室温反应 15 分钟后，加入 50  $\mu$ l 2N 硫酸终止反应。

### 4. 结果判定

以酶联仪 492nm 波长测定各孔 OD 值(减去空白孔 OD 值后计算)。

临界值=CUT-OFF 孔的 OD 值，标本 OD 值 < 临界值为阴性,标本 OD 值  $\geq$  临界值为阳性。

或者  $P/N > 2$  为阳性，P 为待测样品 OD 值，N 为阴性对照 OD 值。

注意本试剂盒结果判定的特点是纵向联合检测，横向联合比较。第 N 列检测一个标本的 5 种病原体的 IgM，它的弓形体 IgM 结果，要根据该列的 T 反应孔的 OD 值与阴性对照或 CUT-OFF 列的 T 反应孔的 OD 值按上述方法比较而得出。以此类推。

以上是以检测 TORCH 特异的人 IgM 作的说明。当需检测 IgG 时，第 1 步包被抗体改为羊抗人 IgG 即可，其余的检测方法不变。

#### 实例 7：“水包被”方法

如图 8 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与或抗原之间涂布有二层膜，一层膜 36 多聚赖氨酸，另一层膜 37 含有活化葡萄糖，膜 38 为已涂布的抗体，为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

本实施例的试剂盒的反应条的具体使用方法与实施例 6 同；但是，辣根过氧化物酶标记的抗原的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

#### 实例 8：蛋白 A 方法

如图 9 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与或抗原之间涂布有一层膜，该层膜 39 蛋白 A，膜 40 为已涂布的抗体，为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

本实施例的试剂盒的反应条的具体使用方法与实施例 6 同；但是，辣根过氧化物酶标记的抗原的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

#### 实例 9：链霉亲和素---- 生物素化抗体间接吸附法。

如图 10 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，该层膜 41 含链霉亲和素，膜 42 为已涂布的抗体，为生物素标记的羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

本实施例的试剂盒的反应条的具体使用方法与实施例 6 同，但是，辣根过氧化物酶标记的抗原的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

#### 实例 10：第二抗体法

如图 11 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，该层膜 43 含第二抗体，为抗第一抗体的抗体。第一抗体

也就是已涂布的抗体，如第一抗体为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体，第二抗体则为鼠抗羊 IgG 抗体。膜 44 为已涂布的抗体，为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

#### 实例 11：甲基乙烯醚--顺丁烯二酸酐共聚体 (MMAC)法

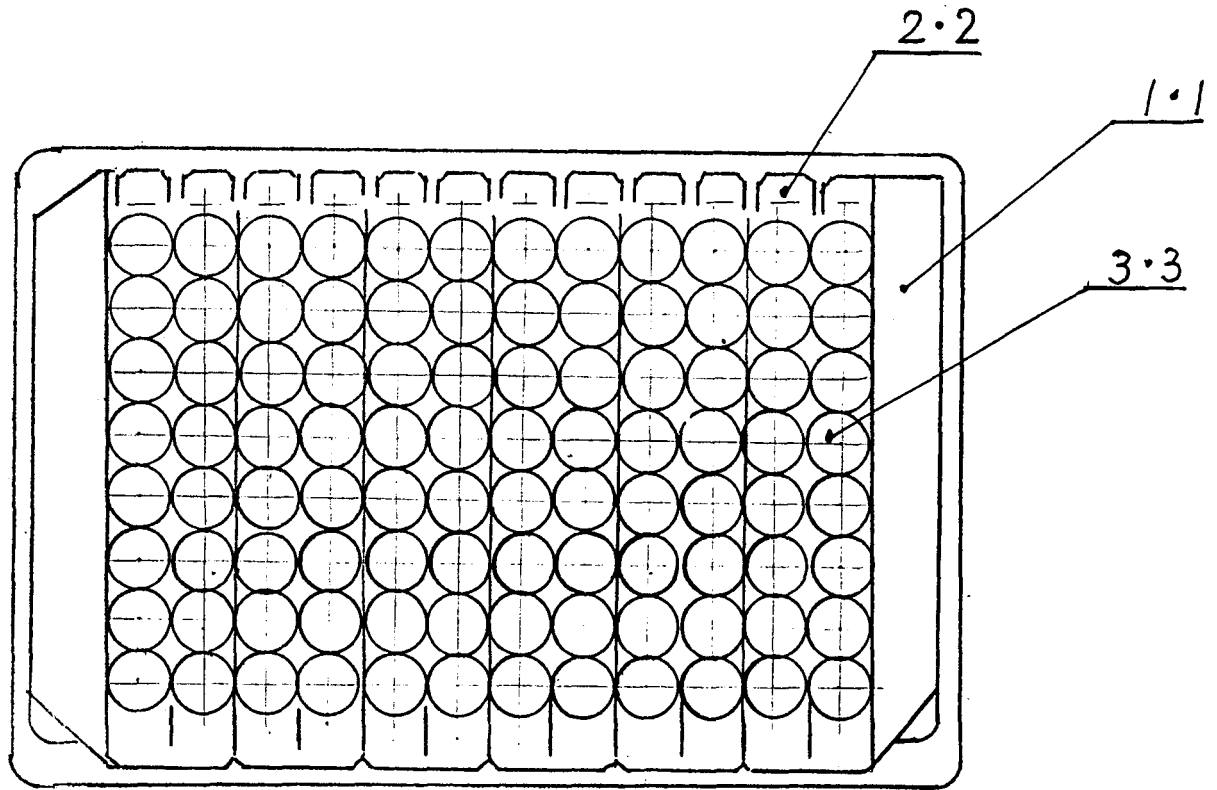
如图 12 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有二层膜，一层膜 45 含甲基乙烯醚--顺丁烯二酸酐共聚体，另一层膜 46 含己二胺，膜 47 为已涂布的抗体，为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

本实施例的试剂盒的反应条的具体使用方法与实施例 6 同；但是，辣根过氧化物酶标记的抗原的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。

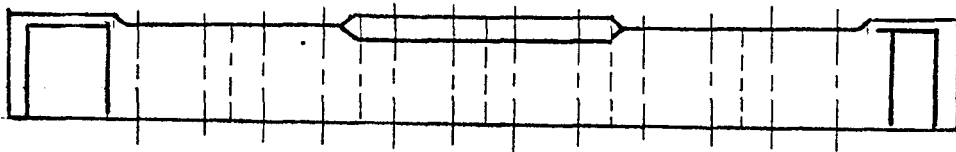
#### 实例 12：戊二醛方法

如图 13 所示：在反应板条 2·2 上的反应孔 3·3 内与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一层膜，该层膜 48 含戊二醛，膜 49 为已涂布的抗体，为羊（或其它种属）抗人 IgM 或 IgG 抗体。

本实施例的试剂盒的反应条的具体使用方法与实施例 6 同；但是，辣根过氧化物酶标记的抗原的稀释度同样可能需作一些调整，应作棋盘点阵实验，进行优化。



(a)



(b)

图 1

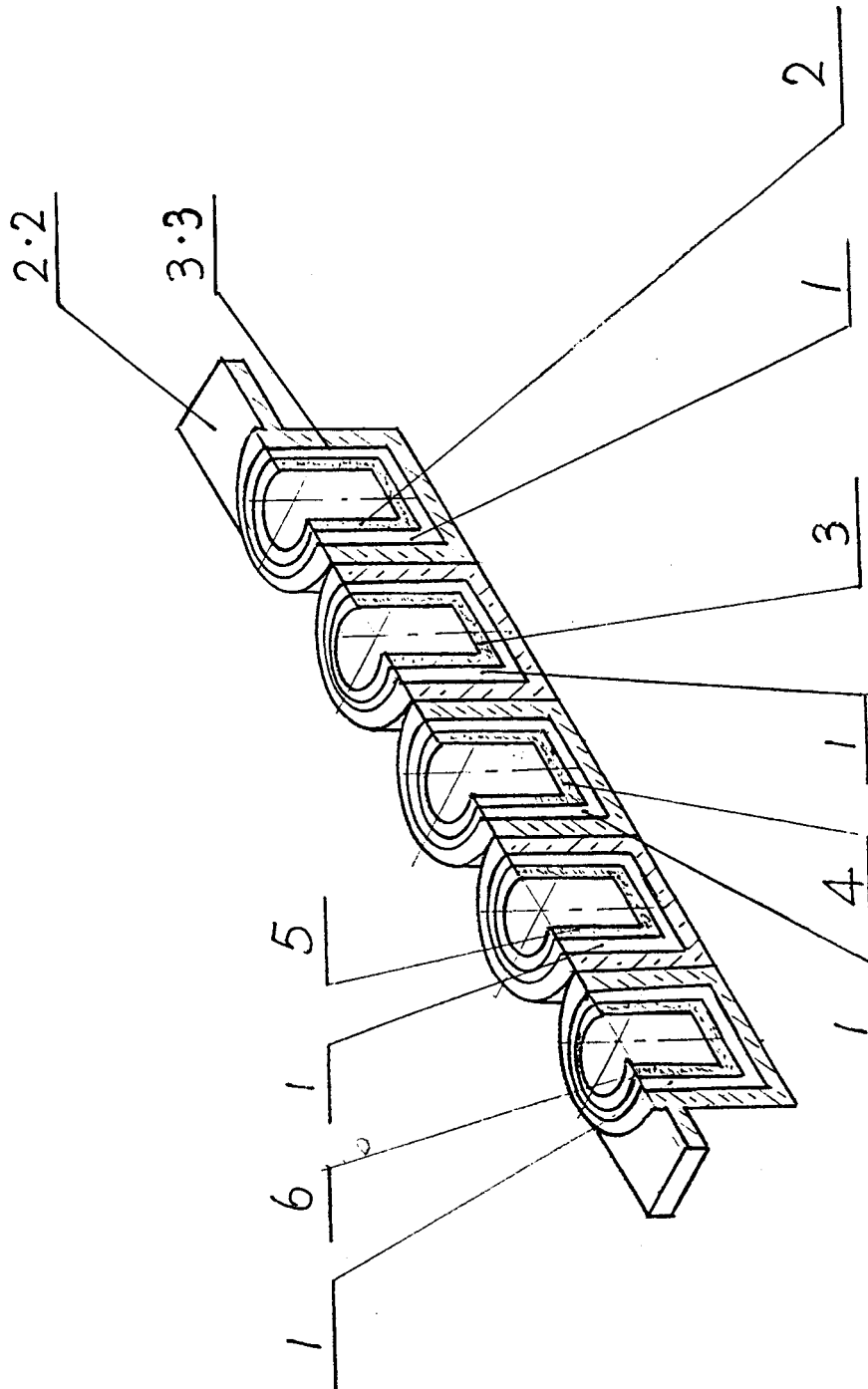


图 2

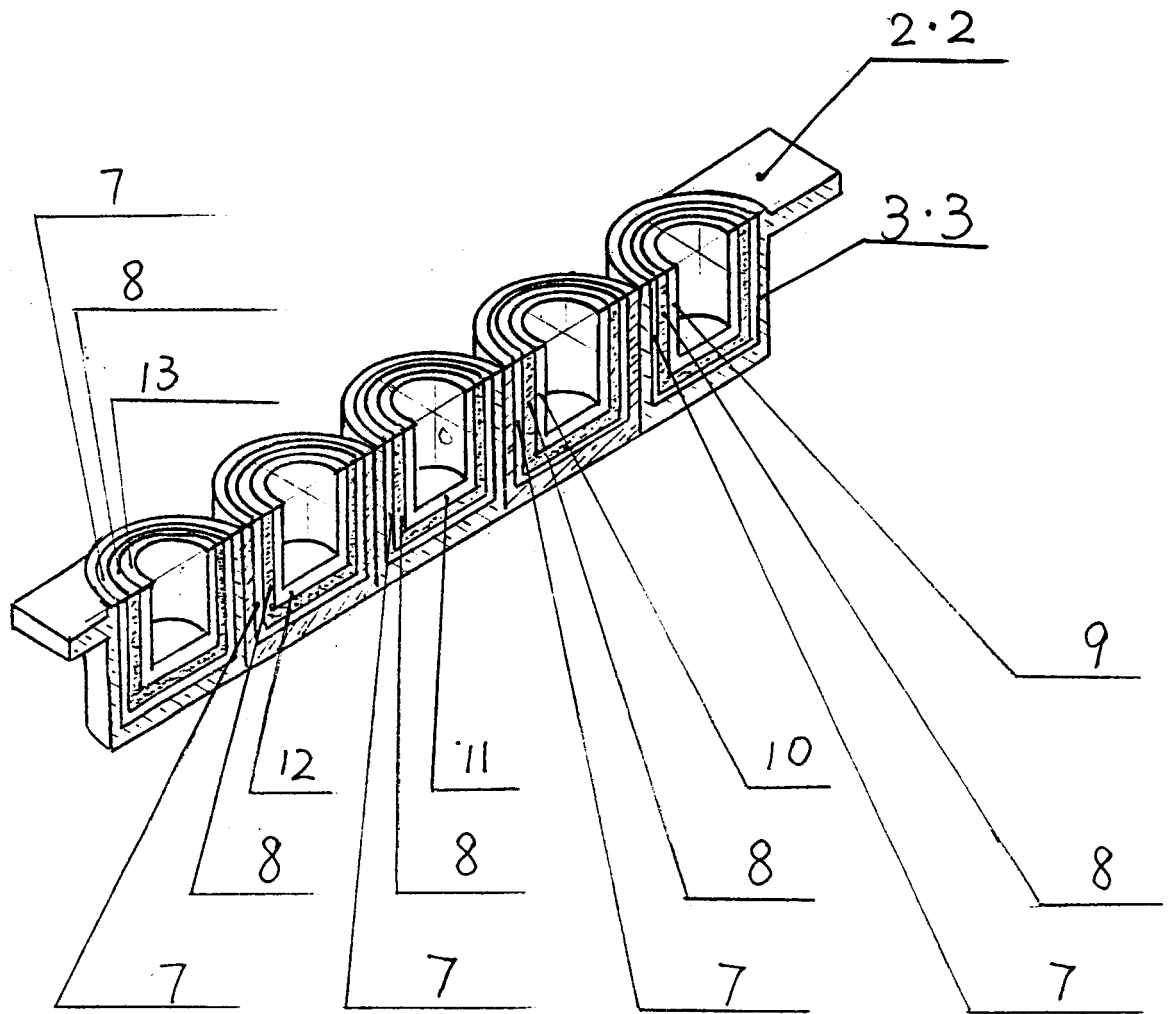


图 3

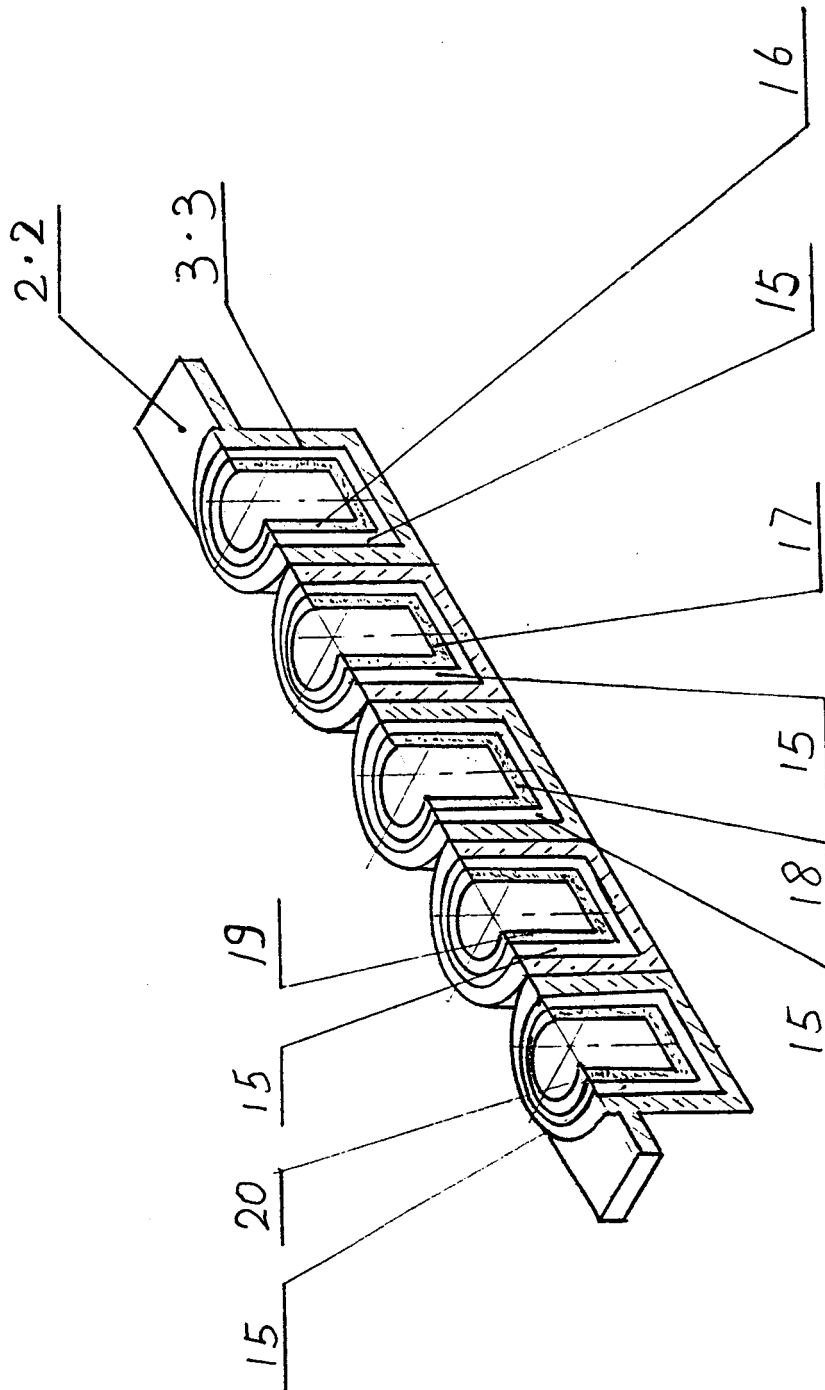


图 4

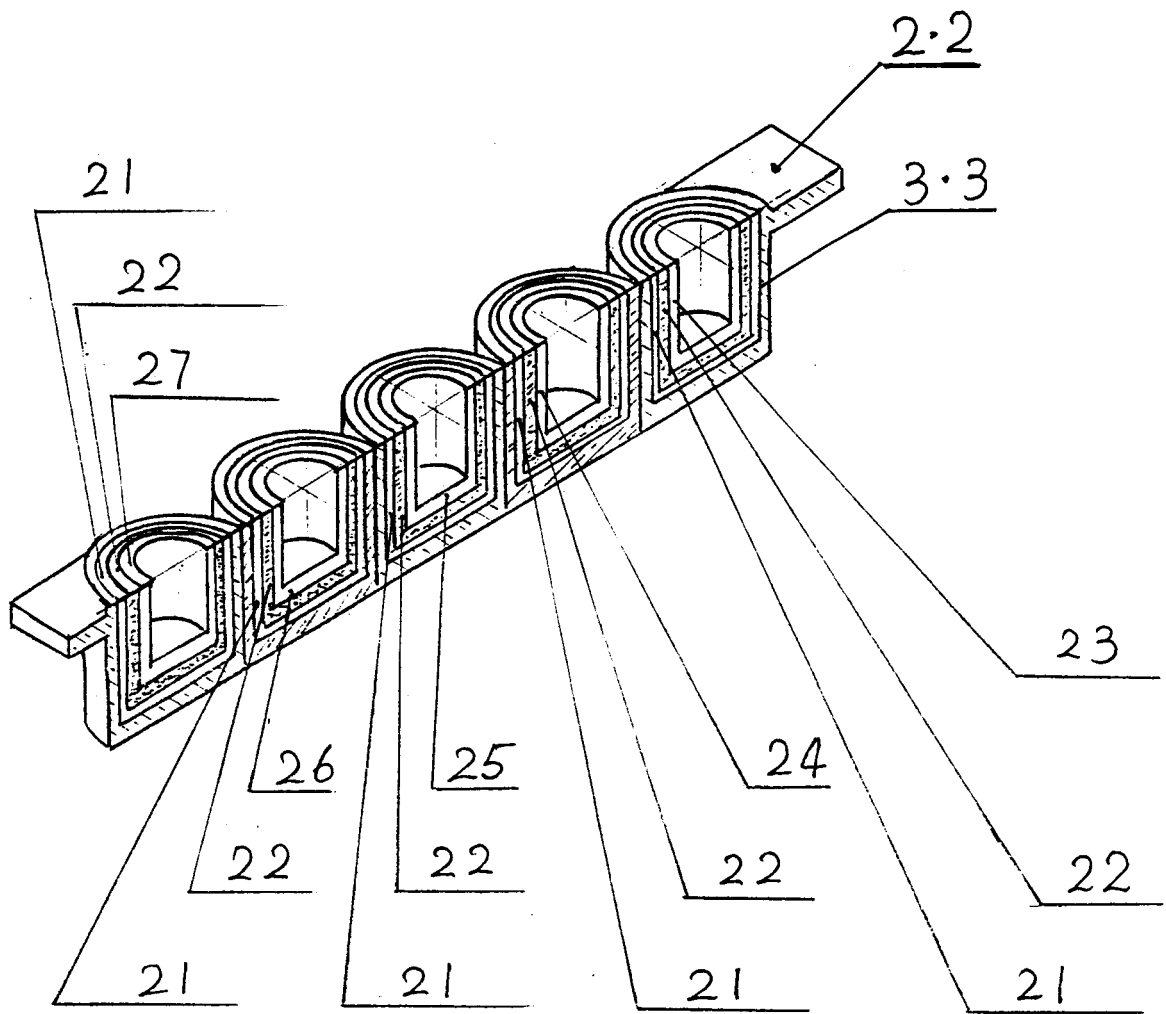


图 5

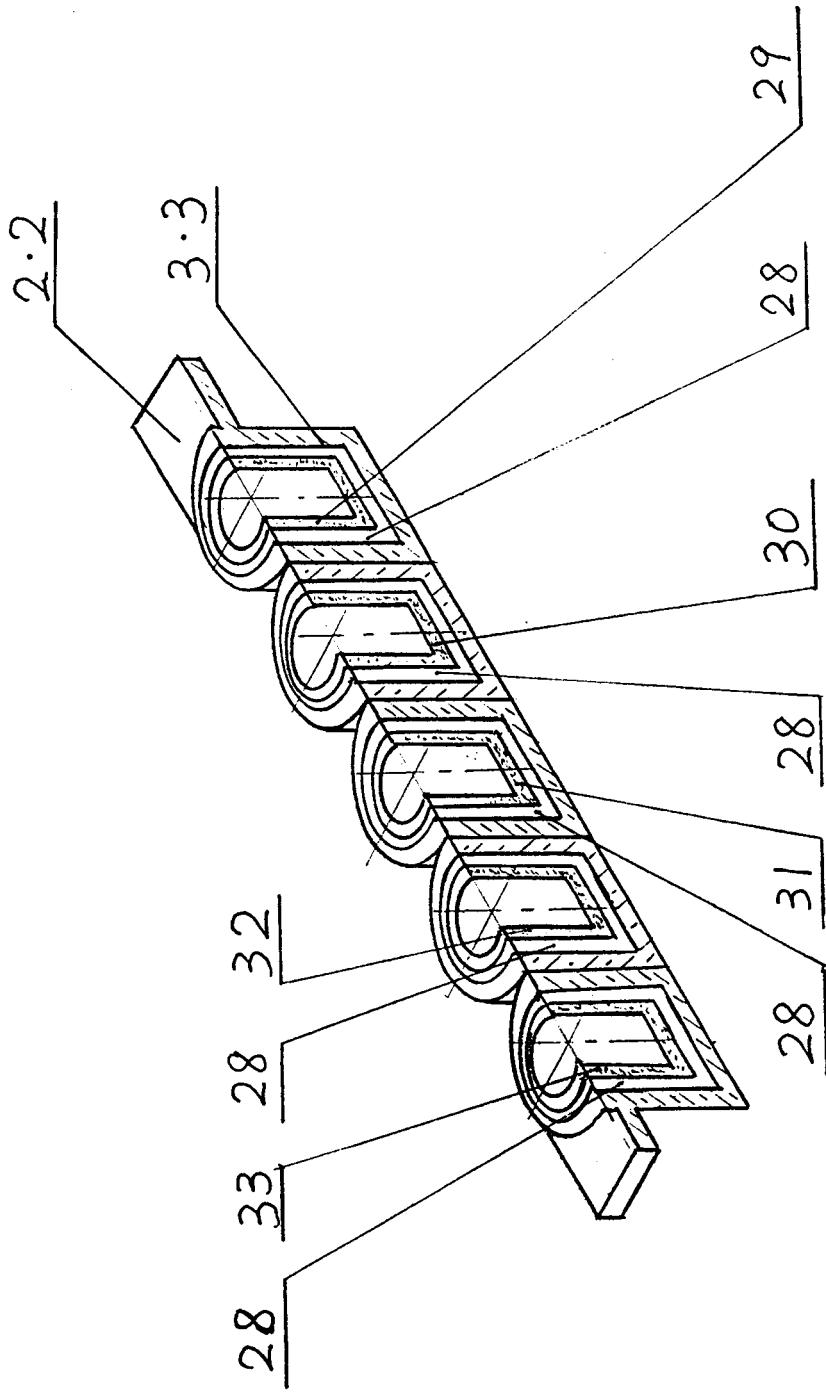


图 6

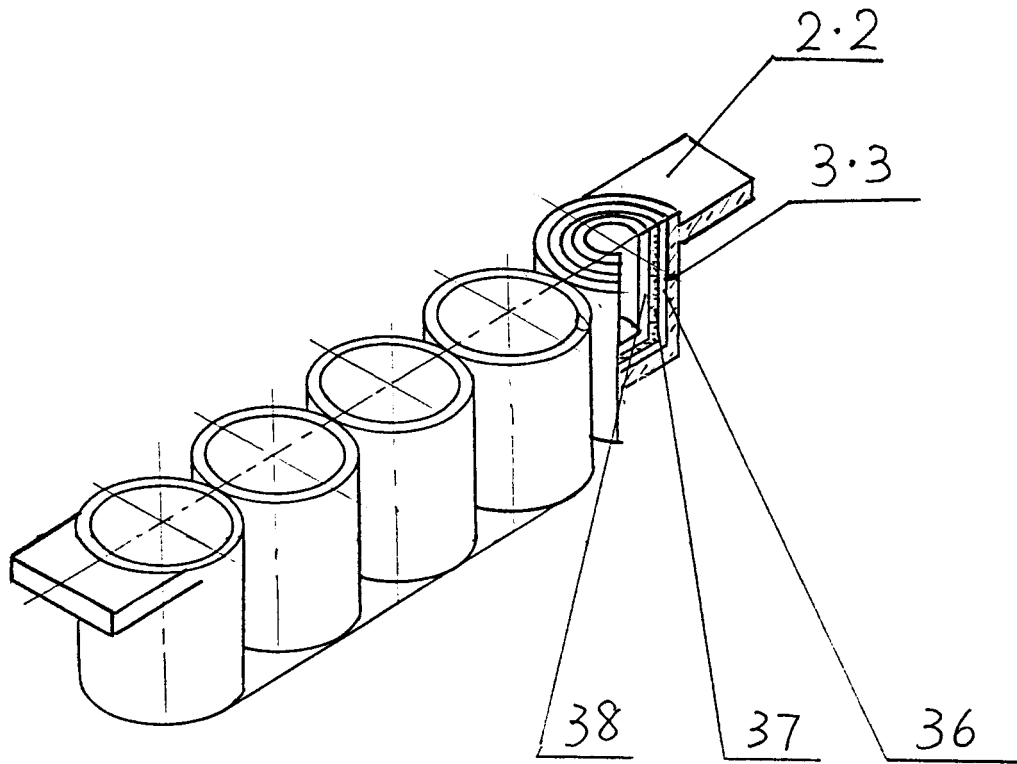


图 8

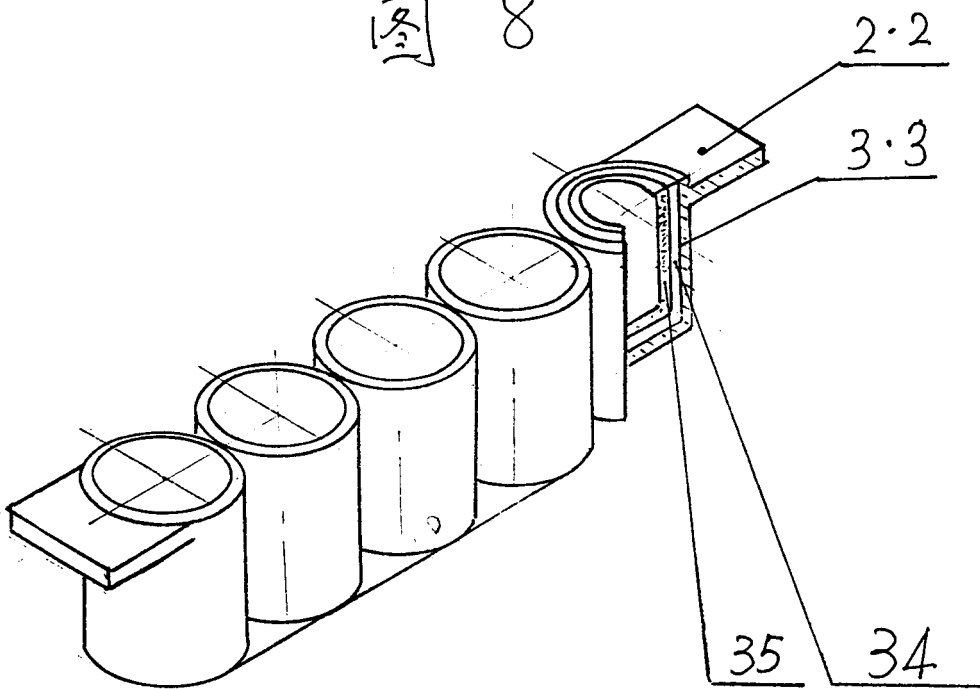


图 7

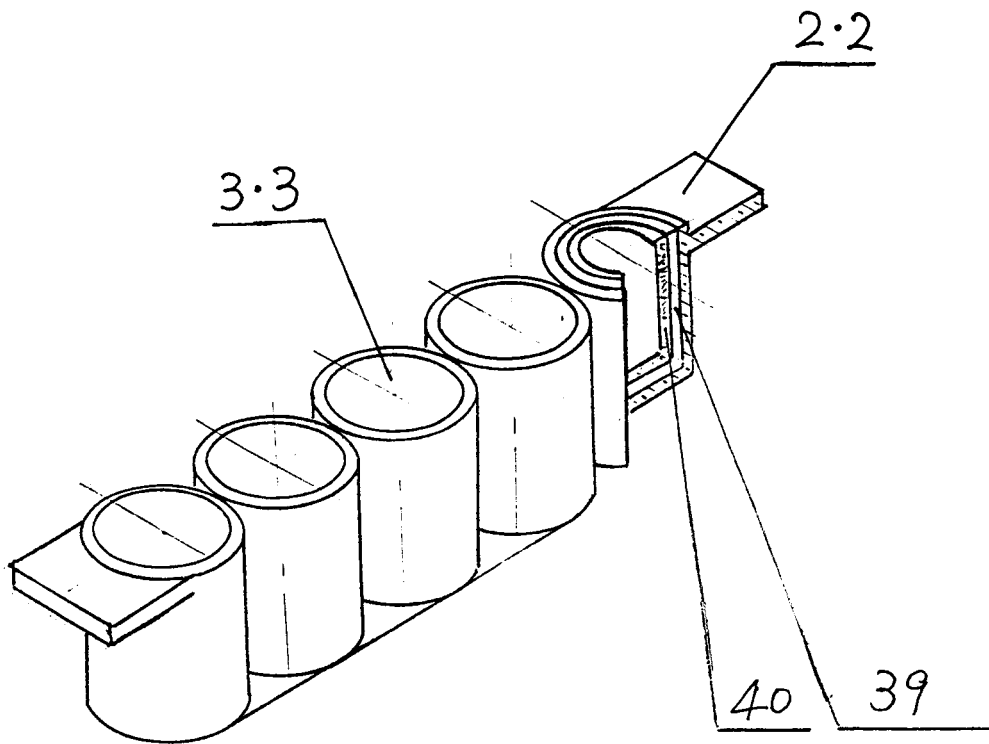


图 9

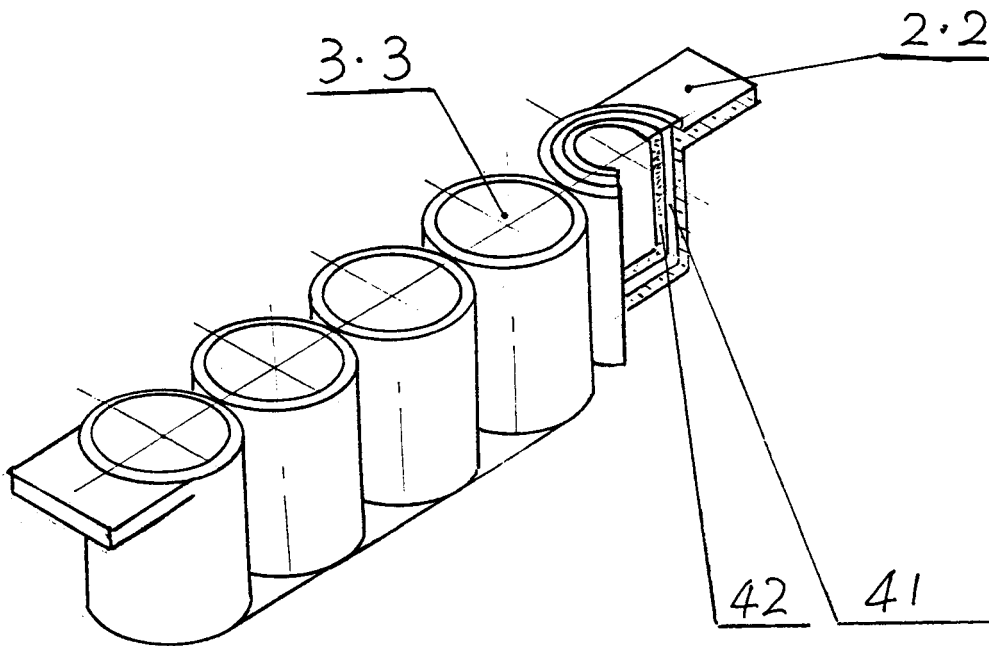


图 10

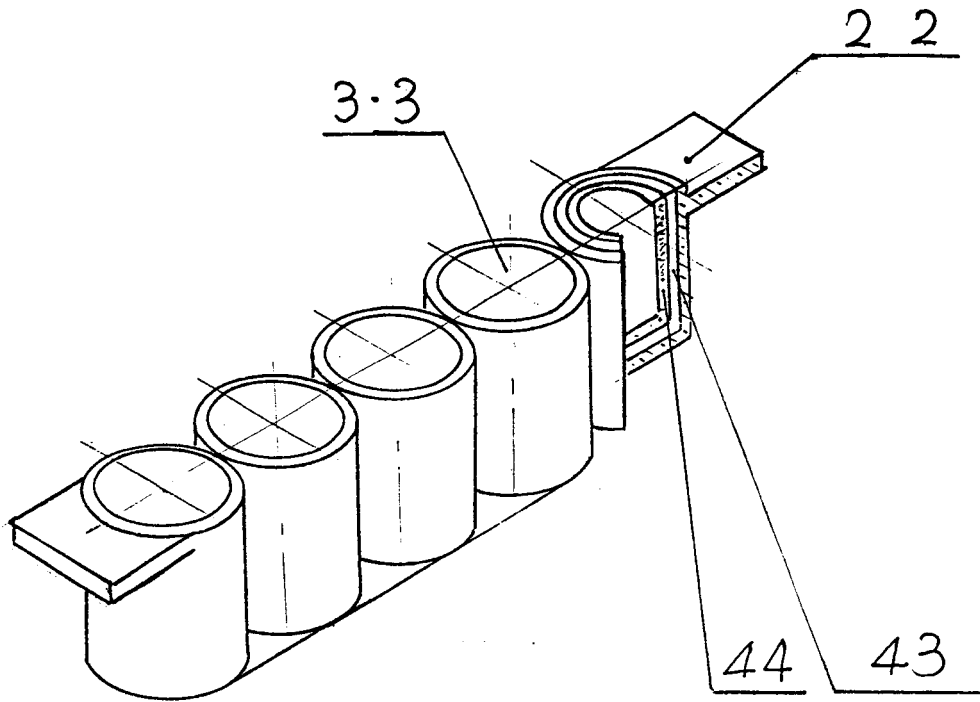


图 11

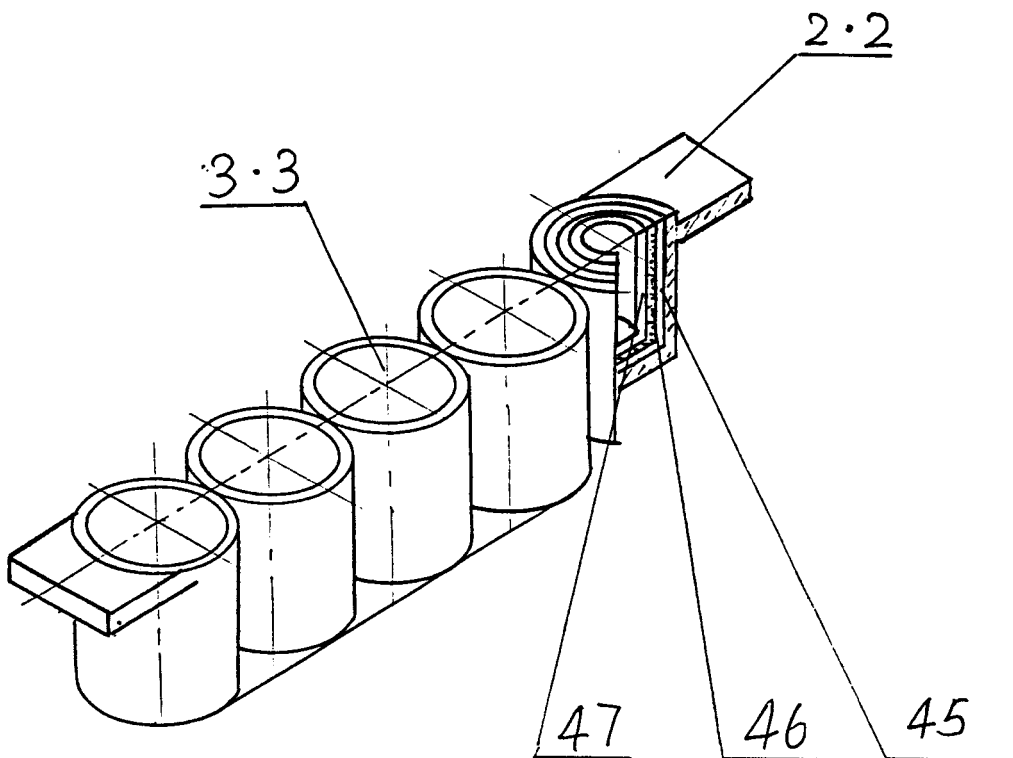


图 12

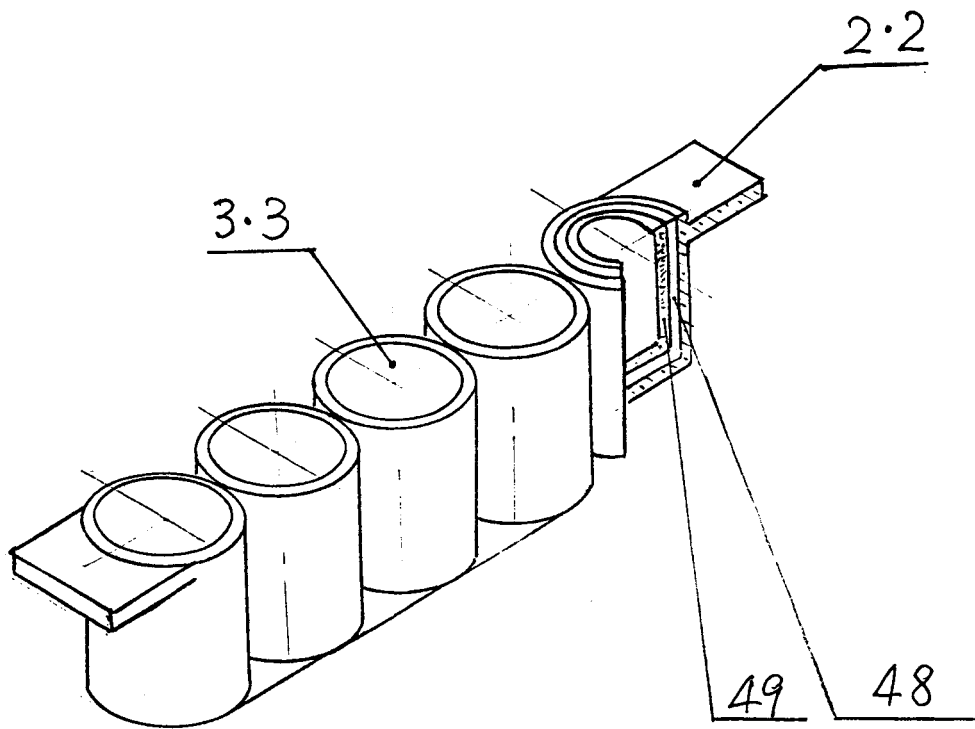


图 13

专利名称(译)	一种联合检测TORCH特异性抗体的酶免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN2531391Y</a>	公开(公告)日	2003-01-15
申请号	CN01252075.6	申请日	2001-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	王滔		
申请(专利权)人(译)	王滔		
当前申请(专利权)人(译)	王滔		
[标]发明人	王滔		
发明人	王滔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本实用新型涉及一种用于医学上联合检测TORCH特异性抗体的酶免疫试剂盒，它能方便、快捷、精确地联合检测TORCH 5种病原体的特异性的抗体。本实用新型是由外框支撑架及放置于其上的可拆酶标反应板条组成，在每个可拆酶标反应板条上设置有反应孔，在反应孔中涂布有已知的抗体或抗原，其特征在于：在外框支撑架上放置有3条以上的可拆酶标反应板条，每个可拆酶标反应板条上排列有4~10个反应孔，在每个反应孔的内表面与已涂布的抗体或抗原之间涂布有一、二或数层膜。

