

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-538489

(P2004-538489A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/576	GO 1 N 33/576	B
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/576	Z
GO 1 N 33/532	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/532	Z
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く

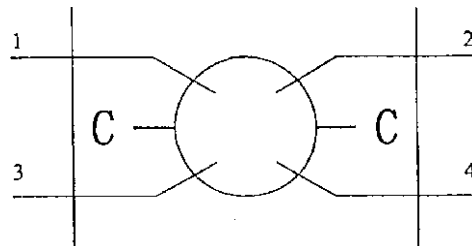
(21) 出願番号	特願2003-521370 (P2003-521370)	(71) 出願人	503160607 上海数康生物科技有限公司 中華人民共和国上海市欽州北路1089号 51号楼4楼
(86) (22) 出願日	平成13年10月30日 (2001.10.30)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月30日 (2003.4.30)	(74) 代理人	100096079 弁理士 大角 美佐子
(86) 国際出願番号	PCT/CN2001/001519	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 国際公開番号	W02003/016914	(72) 発明者	胡 ▲げん▼熙 中華人民共和国上海市欽州北路1089号 51号楼4楼
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		
(31) 優先権主張番号	01 1 26500.0		
(32) 優先日	平成13年8月17日 (2001.8.17)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数感染症の同時検出診断キットおよびその製造方法

(57) 【要約】

本発明は複数の感染症の同時検出診断キットおよびその製造方法に関する。このキットは金標識免疫ろ過試験装置、緩衝液と金コロイド標識物の混合液を含み、上記金標識免疫ろ過試験装置は、膜上にH B s A gモノクローナル抗体、H C V抗原、梅毒抗原、H I V抗原およびヒツジ抗 - マウス I g G抗体が添加されたニトロセルロース膜を含む。本発明はまた、上記診断キットの製造方法を開示する。本発明は金標識免疫ろ過試験に基づき、1つの担体上でB型肝炎、C型肝炎、梅毒およびA I D Sの同時検出を実現する。操作が簡単、迅速および正確であり、複数の疾患の検出、特に、大規模の血液予備検査に適している。これはまた、感染症の検査に新たな発想を提供するものである。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

金標識免疫ろ過試験装置、緩衝液、金コロイド標識物の混合液からなる、複数感染症の同時検出診断キットであって、

(1) 上記金標識免疫ろ過試験装置が、一定の距離を置いて、HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原、HIV抗原および品質管理の対照としてのヒツジ抗-マウスIgG抗体が膜上に分離して点在するニトロセルロース膜を含み；

(2) 金コロイド標識物の混合液が、HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原の金コロイド標識物を含む4種の金コロイド標識物を含み；金コロイド標識物を形成するために用いられるとき、HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原、およびHIV抗原の蛋白質濃度が、それぞれ、20~50 $\mu$ g/ml、90~120 $\mu$ g/ml、90~120 $\mu$ g/ml、および80~120 $\mu$ g/mlであり；また各金コロイド標識物の製造に用いる金コロイド粒子の直径が、20~30nmであり；これら4種の標識物が、1:1:1.2~2.5:1.2~2.5の容量比で混合されて、上記金コロイド標識物の混合液が形成されていることを特徴とするキット。

10

## 【請求項 2】

上記梅毒抗原が、単一の梅毒抗原または複数の梅毒抗原の混合物であり；上記HIV抗原が、HIV-1抗原、HIV-2抗原またはHIV-1抗原とHIV-2抗原の混合物である、請求項1記載の複数感染症の同時検出診断キット。

## 【請求項 3】

上記緩衝液が、0.03~0.05%ツイーン20を含むpH7.2~8.8のPBS緩衝液である、請求項1記載の複数感染症の同時検出診断キット。

20

## 【請求項 4】

請求項1に記載の複数感染症の同時検出診断キットの製造方法であって、上記方法が下記：

A. 金標識免疫ろ過試験の分析装置の製造であって、下記の工程を含む：

1) 膜上に点在させる標本の調製

HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原をそれぞれPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ；4で一夜透析し；透析した各蛋白質をそれぞれ、PBS(0.02M, pH8.0)で0.2~1.0mg/mlに希釈し；

30

2) 膜上に標本を塗布

上記HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原のそれぞれをピペットで採取し、注意深くそれらをニトロセルロース膜の特定の位置に、各蛋白質の点ごとに0.3~3 $\mu$ lの容量の点をつけ；同じニトロセルロース膜上の上記各点から離れた位置に、点、線または他の形態であってもよいが、ヒツジ抗-マウスIgG抗体をピペットで採取し目印の点をつけ；

3) 膜の後処理

このニトロセルロース膜を37のオーブンで30分間乾燥させ；20分間室温にて放置し；5~10分間室温にて洗浄液中で洗浄・振盪させ；上記洗浄工程を数回反復し；上記膜を空気乾燥させ；

40

4) 装置の集成

上記ニトロセルロース膜の下に2層の吸水ろ紙を敷き；ろ紙と膜を一緒にプラスチック反応装置中に入れ固定する；

B. 金コロイド標識物の混合液の調製

1) 金コロイド粒子の製造

0.01%クロロ金酸溶液を沸点まで加熱し；1%クエン酸ナトリウム溶液をすばやく添加し；煮沸を5分間続け、金コロイド粒子の大きさを20~30nmとし；

2) 金コロイド標識物の製造

2.1) HBsAgモノクローナル抗体の金コロイド標識物の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が20~50 $\mu$ g/mlにな

50

るように、HBsAgモノクローナル抗体を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2~1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.1~0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；0.45μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4℃で保存し；

#### 2.2) HCV抗原の金コロイド標識物の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が抗原90~120μg/mlになるように、HCV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；

室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；溶液を0.45μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4℃で保存し；

#### 2.3) 梅毒抗原の金コロイド標識物の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90~120μg/mlになるように、梅毒抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；溶液を0.45μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4℃で保存し；

#### 2.4) HIV抗原の金コロイド標識物の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が80~120μg/mlになるように、HIV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；溶液を0.45μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4℃で保存し；

#### 3) 金コロイド標識物の製造

上記で別々に製造した金コロイド標識物を、HBsAgモノクローナル抗体：HCV抗原：梅毒抗原：HIV抗原を、1：1：1.2~2.5：1.2~2.5の容量比で混合し；

#### C. 緩衝液の調製

PBS(pH7.2~8.8)中に、最終濃度が0.03~0.05%になるように Tween20を添加する

工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の複数感染症の同時検出診断キットの製造方法。

#### 【請求項5】

B型肝炎、C型肝炎、梅毒およびAIDSの同時検出のための請求項1に記載の複数感染症の同時検出診断キットの使用。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 発明の分野

本発明はバイオテクノロジー分野に関する。より具体的には、複数感染症の同時検出診断キットおよびその製造方法に関する。

#### 【0002】

#### 発明の背景

B型肝炎、C型肝炎、梅毒およびAIDSは4つとも世界的な感染症である。中国衛生部

10

20

30

40

50

の2000年統計年報によると、これらの4つの感染症は、感染症の総罹病率の約27.57%であり、社会と人民の生活にきわめて大きい危害を与えている。

【0003】

B型肝炎は薬物、毒物およびウイルスにより引き起こされる肝臓の炎症である。中国では人口総数の約10～15%がB型肝炎ウイルス(HBV)の感染者である。HBVは、輸血、血漿、血液製剤または注射針、注射筒および血液採取および血液透析用の器具に接触することによって感染する。中でも、輸血による感染経路は、高い罹病率、短い潜伏期間から特に重視されてきた。

【0004】

C型肝炎の伝染源は主として急性臨床患者と症状のない無症候性患者、慢性患者およびウイルス保有者である。ウイルスは疾患発病12日前に検出され、12年以上保有される。C型肝炎の伝染源は主として輸血によって引き起こされる。大多数の先進国で、C型肝炎は輸血後に感染する肝炎中の最もよくある種類の1つである。輸血によって引き起こされる肝炎の30～90%は外国ではC型肝炎であるが、中国では、輸血後に感染した肝炎中の3分の1はC型肝炎である。

【0005】

梅毒患者は、梅毒トレポネーマの感染が唯一の感染源である。梅毒の伝染の約95%は性的接触によるものである。輸血する場合、供血者が梅毒患者であると、受血者に梅毒が伝染する。献血者が梅毒にかかり、また梅毒トレポネーマ血症の段階にあると梅毒が伝播する。梅毒トレポネーマは体外での生存の能力は低く、4で48～72時間生存し、40で感染力はなく、100ですぐ死滅する。近年中国で性病が増加しているために、輸血による梅毒の感染の予防に細心の注意を払うべきである。

【0006】

HIVウイルスはAIDSの病原体であり、主として血液、精液、膣分泌液、母乳によって感染する。HIVを保有する血液が輸血されると、患者はHIVに感染する可能性が90%を超えるとみられている。これに対して、一度の性交によるリスクは1%以下である。さらに、輸血は大量のHIVウイルスを送り込む。3～5年(児童では約2年)の間に急速にAIDSが蔓延する。

【0007】

従って、輸血によって感染し得るHIV、梅毒、HBVおよびHCVを含む血液および血液製剤のウイルスを厳格に検査する必要がある。1998年に中国衛生部が発表した「献血者の健康検査の準則」に規定されている、検査されるべき9項目は、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)、C型肝炎抗体(HCV抗体)、AIDS抗体(HIV抗体)および梅毒抗体を含む。現在、梅毒の検出には、一般に迅速な血漿反応抗体試験(RPR法)または梅毒血清学試験(TRUST法)が採用されている。HIV、HBVとHCVの検査には、酵素標識免疫吸着試験法(ELISA法)が採用されている。この方法は一度の検査に、血清400μlが必要であり、1～2時間がかかる。現在、献血者の血液について迅速、完璧かつ同時に複数の疾患を検出する検査方法がないため、多くの人が輸血によって、肝炎、AIDSおよび梅毒など感染症に感染している。これが受血者の身心の健康と社会の安定に大きな影響を及ぼしている。

【0008】

金コロイド標識免疫過試験法は酵素標識免疫吸着試験法(ELISA)に基づいている。まず、複合物は酵素によってラベルされ、この試験法は酵素免疫過試験法と呼ばれている。90年代の初め、金コロイドが標識として採用され、この方法は金標識免疫過試験法(immunogoldfiltrationassay:IGFA)と称される。

【0009】

金標識免疫過試験法の原理は、ニトロセルロース膜を担体とし、微孔性濾膜の毛管現象と透過性を利用し、特殊なる過装置の上で、抗原と抗体を反応させて洗浄する。反応は膜を通過するろ液と同様に急速に完結する。

10

20

30

40

50

## 【0010】

この試験法は簡単で、迅速、試薬以外の器械設備も必要ではなく、結果が数分間で肉眼で観察し得るため、臨床的に広く用いられている。この方法は、免疫学の検査の殆どすべての方面に応用でき、特に、正常な体液中に存在しない抗原性物質、例えば感染症の抗原または抗体、および物質、例えば、その量が正常では低い特定の症状では異常に増加するHCG、アルファ-フェトプロテインの検査に用いられる。近年来、試剤の原料の精選と調製技術の改良によって、この方法の適用範囲はさらに広がっている。しかし、複数の感染症の抗原または抗体の同時検出のための金コロイド標識免疫ろ過試験法は未だ報告されていない。

## 【0011】

発明の要約

本発明の目的は、金コロイド標識免疫ろ過試験法技術を利用する複数の感染症の同時検出のための、感度が高く、正確で、迅速な、多目的診断キットの提供である。

## 【0012】

本発明によれば、複数の感染症の同時検出のための診断キットは、金標識免疫ろ過試験装置、緩衝液および金コロイド標識物の混合液からなり、上記金標識免疫ろ過試験装置が、一定の距離を置いて、HBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)、HCV抗原、梅毒抗原、HIV抗原および品質管理の対照としてのヒツジ抗-マウスIgG抗体がその膜上に点在するニトロセルロース膜を含み；各標本点の容量は0.3-3μlである。

## 【0013】

上記金コロイド標識物の混合液は、金コロイド標識HBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原を含む4種の金コロイド標識物を含み；金コロイド標識HBsAgモノクローナル抗体の濃度は20~50μg/mlであり、金コロイド標識HCV抗原の濃度は90~120μg/mlであり、金コロイド標識梅毒抗原の濃度は90~120μg/ml、および金コロイド標識HIV抗原の濃度は80~120μg/mlである。上記金コロイド粒子の直径は、20~30nmであり；これら4種の標識物は、1:1:1.2~2.5:1.2~2.5の容量比で混合される。

## 【0014】

この緩衝液は、0.03~0.05%ツイーン20およびのPBS緩衝液(pH7.2~8.8、これは、燐酸二水素カリウム、または燐酸二水素ナトリウムおよび燐酸水素二ナトリウムから調製される)を含む。

## 【0015】

本発明によれば、上記梅毒抗原は、単一の梅毒抗原または複数の梅毒抗原の混合物である。上記HIV抗原は、HIV-1(I型HIV)抗原、HIV-2(II型HIV)抗原、またはHIV-1抗原とHIV-2抗原の混合物である。

## 【0016】

本発明の他の目的は、上記診断キットの製造方法の提供である。

## 【0017】

本発明によれば、複数の感染症を同時検出する診断キットは下記の工程を含む：

## 【0018】

工程A)金標識免疫ろ過試験装置の製造であって、下記の工程を含む：

## 1)膜上に添加する標本の調製

HBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4で一夜透析する。ついで、HBsAgモノクローナル抗体をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2~2.0mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

## 【0019】

HCV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ；4で一夜透析する。ついで、HCV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2~2.0mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

10

20

30

40

50

## 【0020】

梅毒抗原をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、梅毒抗原をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2~2.0mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

## 【0021】

HIV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、HIV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2~2.0mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

## 【0022】

ヒツジ抗-マウスIgG抗体をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、ヒツジ抗-マウスIgG抗体を、PBS(0.02M, pH8.0)で0.2~2.0mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。 10

## 【0023】

2) 膜上に標本の点をつける

上記HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原のそれぞれをピペットで採取し、注意深くそれらをニトロセルロース膜の特定の位置に、各蛋白質の点ごとに0.3~3μlの容量の点をつける。

## 【0024】

さらに、ニトロセルロース膜上の上記各点から離れた位置に、ヒツジ抗-マウスIgG抗体をピペットで採取し、目印の点をつける。上記目印は点、線またはなんらかの他の形式であってもよい。 20

## 【0025】

3) 膜の後処理

上記ニトロセルロース(NC)膜を37 のオーブンで30分間乾燥させ、20分間室温にて放置する。37 にて20分間遮断液中に浸漬し、洗浄液中で5-10分間室温にて洗浄・振盪させる。洗浄液を換えた後、上記洗浄工程を数回反復する。ついで、膜を取り出し、室温にて空気乾燥させ、将来の使用のために、乾燥状態で4 にて保存する。

## 【0026】

上記遮断液は0.01~0.03%ツイーン20および0.05MPBS緩衝液(pH7.2~8.0)を含む。上記洗浄液は0.03~0.05%ツイーン20および0.01MPBS緩衝液(pH7.2~8.0)を含む。 30

## 【0027】

4) 装置の集成

上記ニトロセルロース膜の下に2層の吸水ろ紙を敷く。ろ紙と膜を一緒にプラスチック反応装置中に入れ固定する。

## 【0028】

工程B) 金コロイド標識物の混合液の調製

1) 金コロイド粒子の製造

0.01%クロロ金酸溶液を沸点まで加熱し、1%クエン酸ナトリウム溶液をすばやく添加する。溶液の煮沸を5分間続け、金コロイド粒子の大きさを20~30nmにする。 40

## 【0029】

2) 金コロイド標識物の製造

2.1) 金コロイド標識HBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が20~50μg/mlになるように、HBsAgモノクローナル抗体を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000rpm/minで60分間遠心分離する。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4 で保存する。 50

## 【0030】

## 2.2) 金コロイド標識HCV抗原の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、HCV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離する。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45 $\mu\text{m}$ のろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存する。

## 【0031】

## 2.3) 金コロイド標識梅毒抗原の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、梅毒抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離する。ついで、上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45 $\mu\text{m}$ のろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存する。

## 【0032】

金コロイド標識液中の梅毒抗原が複数の梅毒抗原の混合物であるとき、各金コロイド標識梅毒抗原は別々に製造しなければならない。ついで将来の使用のためにそれらを混合し保存する。

## 【0033】

## 2.4) 金コロイド標識HIV抗原の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が80~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、HIV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離する。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45 $\mu\text{m}$ のろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存する。

## 【0034】

## 3) 金コロイド標識物の製造

別々に製造した各金コロイド標識物を、HBsAgモノクローナル抗体：HCV抗原：梅毒抗原：HIV抗原を1：1：1.2~2.5：1.2~2.5の容量比で十分に混合する。

## 【0035】

## 工程C) 緩衝液の調製

PBS(pH7.2~8.8)中に、最終濃度が0.03~0.05%になるように Tween20を添加する。

## 【0036】

本発明のもう一つの目的は、B型肝炎、C型肝炎、梅毒およびAIDSの同時検出のために上記診断キットの使用である。

## 【0037】

本発明に述べたキットの検査方法は次のとおりである：

1. 金標識免疫ろ過試験装置をテーブル上に水平に置く；
2. 装置のサンプルウェルに緩衝液を2滴添加し、膜の表面をぬらす；
3. サンプルウェルに血清試料を50 $\mu\text{l}$ 添加し、それが完全に膜内に浸透するまで待つ；
4. 緩衝液を3滴添加し、それが完全に浸透するまで待ち、ついで金コロイド標識液を2

10

20

30

40

50

滴添加する；

5．緩衝液を3滴添加する；

6．1分間後、サンプルウェル内に赤い斑点が現れるかどうかを観察する。赤い斑点が現れると、対応するウイルスが陽性であるという結果を示し、赤い斑点がないと、対応するウイルスが陰性であることを示す。

【0038】

H B s A g、H C V抗体、梅毒抗体、H I V抗体からの1種または数種が含まれている血清試料が、ニトロセルロース膜と接触するとき、膜上の抗原（または抗体）は血清中の対応する抗体（または抗原）と反応する。ついで複合体が対応する金コロイド標識物と反応し、呈色する。したがって、呈色によって、患者がどんなウイルスに感染しているか判断することができる。ヒツジ抗 - マウス I g G抗体は、ヒト血清の抗体と反応しないが、金コロイド標識液中のH B s A gモノクローナル抗体（マウス抗 - ヒト）はヒツジ抗 - マウス I g G抗体と反応することができ、ヒツジ抗 - マウス I g G抗体の対応する位置が発色して肉眼で識別できる。したがってある種の構成要素の質的問題でキットを用いることができないとき、膜上にヒツジ抗 - マウス I g G抗体に対応する位置が発色しない。従って、ヒツジ抗 - マウス I g G抗体はキットについての品質管理の対照として役立つ。

10

【0039】

本発明の検査キットは、金コロイド標識免疫ろ過試験法の原理を利用し、複数の感染症に対応する抗原または抗体を同じろ過装置（ニトロセルロース膜）の上で反応させ、洗浄後肉眼で各点の発色を観察して検出する。

20

【0040】

従来の金標識キット、P R P診断キット、T R U S T診断キットと比較して、本発明のキットには下記の優れた利点がある。

(1) 複数の疾患を同時に検査する。

1つの装置で、同時に4種の感染症を検査できる。

(2) 複数の抗原および抗体を同時に検出する。

1つの装置で、複数の抗原または抗体を検出でき、異なる蛋白質の検出条件の統一を実現した。

【0041】

E L I S Aキットと比べたら、本発明のキットには下記の優れた利点がある。

30

(1) 複数の疾患を同時に検査する。

1つの装置で、同時に4種の感染症を検査する。

(2) 複数の抗原または抗体を同時に検出できる。

1つの装置で、複数の抗原および抗体を検出でき、異なる蛋白質の検出条件の統一を実現した。

(3) 反応時間が短い。

試験全体が2工程：試料の添加および反応からなり、全試験はろ過によって行われ、3～5分間しかかからない。大規模に迅速に血液検体を検出するのにふさわしい。検査のすべての工程は数分間しかかからない。しかし、感度は、反応に1～2時間かかるE L I S A試験と同じである。

40

(4) 採血量が少ない。

本発明のキットは50 $\mu$ lの血清しか必要でなく、指先または耳たぶから得られる。しかし、E L I S Aは1回の試験に100 $\mu$ l、4種類の試験には400 $\mu$ lの血清が必要である。従って、本発明のキットは子供または幼児に都合が良い。さらに、E L I S A法は、静脈から採血しなければならないので、乳児には困難である。

(5) 検査結果は器械または反応環境の影響を受けない。

(6) 金コロイド標識物を添加すると、すぐ発色し得る。操作は簡単であり、またキットは室温にて長期に保存できる。

【0042】

本発明のキットは金コロイド免疫ろ過試験法の原理を利用し、1つの担体上で複数の抗原

50

および抗体の同時検査を実現する。それは操作が簡単、迅速、正確かつ、種々の血液検体の複数の感染症の検査、特に大規模な血液検査に適している。それは感染症の検査に新しい構想を提供するものである。

【0043】

#### 実施例

##### A. 材料

本発明を実施するための好ましい方法では、マウス抗 - ヒト H B s A g モノクローナル抗体 ( M a b ) S 1 および S 2 は、 B e i e e r l e B i o t e c h C o . L t d . により提供された。H C V 抗原、T P 4 7 梅毒抗原、T P 1 5 梅毒抗原、T P 4 7 / T P 1 5 梅毒混合抗原、H I V - 1 抗原、H I V - 2 抗原、H I V - 1 / 2 混合抗原は、B i o d e s i g n ( S a c o , M a i n e U S A ) により提供された。ニトロセルロース膜が S c h l e i c h e r & S c h u e l l ( G e r m a n y ) により提供された。血清検体が上海市疾病控制中心により提供された。

10

【0044】

B. 金標識免疫ろ過試験装置の製造方法は次の通りである：

(1) マウス抗 - ヒト H B s A g モノクローナル抗体 S 2 ( マウス抗 - ヒト ) を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) に溶解し、4 で一夜透析した。透析した H B s A g モノクローナル抗体 S 2 ( マウス抗 - ヒト ) を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) で 0 . 5 m g / m l に希釈し、4 で保存した。

(2) H C V 抗原を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) に添加し、4 で一夜透析した。透析した H C V 抗原を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) で 0 . 4 m g / m l に希釈し、4 で保存した。

20

(3) T P 4 7 / T P 1 5 梅毒混合抗原を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) に添加し、4 で一夜透析した。透析した T P 4 7 / T P 1 5 混合抗原を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) で 0 . 5 m g / m l に希釈し、将来の使用のために 4 で保存した。

(4) H I V - 1 / 2 混合抗原を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) に溶解し、4 で一夜透析した。透析した H I V - 1 / 2 混合抗原を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) によって 0 . 6 m g / m l に希釈し、将来の使用のために 4 で保存した。

(5) ヒツジ抗 - マウス I g G 抗体を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) に溶解し、4 で一夜透析した。透析したヒツジ抗 - マウス I g G 抗体を P B S ( 0 . 0 2 M 、 p H 8 . 0 ) で 0 . 6 m g / m l に希釈し、将来の使用のために 4 で保存した。

30

(6) 図 1 に示すように、ニトロセルロース膜の上に、1、2、3 および 4 の位置にそれぞれ T P 4 7 / T P 1 5 梅毒混合抗原、H I V - 1 / 2 混合抗原、H B s A g モノクローナル抗体 ( マウス抗 - ヒト ) S 2 、H C V 抗原の 4 種の蛋白質をマイクロピペットを用いて塗布した。点ごとの容量は 1 . 0  $\mu$  l であった。ヒツジ抗 - マウス I g G 抗体を 0 . 2 m m 絵筆で吸い取り、ニトロセルロース膜の上の C で示される 2 点の間に横線を描いた。

(7) このニトロセルロース膜を 3 7 のオーブに 3 0 分間におき、取り出した後それを室温にて 2 5 分間放置した。ついで、それを 3 7 の遮断液に 2 0 分間浸漬し、ついで、それを洗浄液中で室温にて 5 分間、洗浄・振動させた。洗浄工程を数回繰り返した後、室温にて空気乾燥した。

40

(8) 上述ニトロセルロース膜の下に 2 層の吸水ろ紙を敷き、ろ紙と膜を一緒にプラスチック反応装置内に入れて固定した。

【0045】

C. 緩衝液は等容量の 0 . 1 0 M P B S ( p H 7 . 8 ) および 0 . 3 0 % ツイーン 2 0 を混合して得られた溶液であった。

【0046】

D. 金コロイド標識液は、金コロイド標識 H B s A g M a b S 1 ( マウス抗 - ヒト ) 、金コロイド標識 H C V 抗原、金コロイド標識 T P 4 7 / T P 1 5 梅毒混合抗原、および金コロイド標識 H I V - 1 / 2 混合抗原を容量比 1 : 1 : 1 . 2 ~ 2 . 5 : 1 . 2 ~ 2 . 5 で混合して調製した。各金コロイド標識物の製造に用いる金コロイドの平均粒径はおよそ

50

30nmであった。金コロイド標識物の製造方法は次の通りであった。

【0047】

(1) 金コロイド標識HBsAgMabS1(マウス抗-ヒト)の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が20 $\mu$ g/mlになるように、HBsAgMabS1(マウス抗-ヒト)を磁気攪拌下ゆっくりと添加した。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存した。

10

【0048】

(2) 金コロイド標識HCV抗原の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90 $\mu$ g/mlになるように、HCV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加した。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存した。

20

【0049】

(3) 金コロイド標識TP47/TP15梅毒抗原の混合物の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90 $\mu$ g/mlになるように、TP47梅毒抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加した。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存した。

【0050】

金コロイド標識TP15抗原の製造は、TP47標識物の製造と同じである。

30

【0051】

金コロイド標識TP47抗原を、同容量の金コロイド標識TP15抗原と混合し、将来の使用のために保存した。

【0052】

(4) 金コロイド標識HIV-1/2抗原の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が100 $\mu$ g/mlになるように、HIV-1抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存した。

40

【0053】

金コロイド標識HIV-2抗原の製造は、HIV-1標識物の製造と同じである。

【0054】

金コロイド標識HIV-1抗原を、同容量の金コロイド標識HIV-2抗原と混合し、将来の使用のために保存した。

【0055】

金コロイド標識液中のHIV抗原が、数種のHIV抗原の混合物であるとき、各金コロイド標識HIV抗原は別々に製造しなければならず、その後、ある一定の比率で希釈し、混

50

合し、将来の使用のために保存する。

【 0 0 5 6 】

上記の分析キットは種々の血清検査に用いられた。病院からの結果は下記のようなものであった。血清検体 No. 1 の提供者は上記 4 種類の感染症のいずれの感染症にもかかっていなかった。血清検体 No. 2 の提供者は C 型肝炎のみにかかっていた。血清検体 No. 3 の提供者は AIDS および梅毒にかかっていた。血清検体 No. 4 の提供者は B 型肝炎および梅毒にかかっていた。図 2、図 3、図 4 および図 5 にそれぞれ上記の検査結果を示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】ニトロセルロース膜上にスポットされた標本の概略図であり、1、2、3、4の符号は標本のそれぞれの位置を示す。2つのスポット(点)の間の" C "は、ヒツジ抗 - マウス I g G 抗体のための位置を示す。 10

【 図 2 】血清検体 No. 1 の検査結果を示す概略図であり、検査結果は全て陰性である。

【 図 3 】血清検体 No. 2 の検査結果を示す概略図であり、検査結果は C 型肝炎抗体が陽性である。

【 図 4 】血清検体 No. 3 の検査結果を示す概略図であり、検査結果は梅毒抗体、A I D S H I V - 1 および 2 抗体が陽性である。

【 図 5 】血清検体 No. 4 の検査結果を示す概略図であり、検査結果は梅毒抗体、A I D S H I V - 1 および 2 抗体、B 型肝炎表面抗原が陽性である。

図 2 ~ 5 における、横線 " C - C " は、ヒツジ抗 - マウス I g G 抗体が陽性である。 20

【国际公开パンフレット】

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



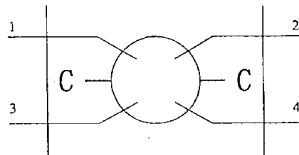
(43) 国际公布日:  
2003年2月27日(27.02.2003)

PCT

(10) 国际公布号:  
WO 03/016914 A1

- (51) 国际分类号: G01N 33/544, 33/571, 33/576
  - (21) 国际申请号: PCT/CN01/01519
  - (22) 国际申请日: 2001年10月30日(30.10.2001)
  - (25) 申请语言: 中文
  - (26) 公布语言: 中文
  - (30) 优先权:  
01126500.0 2001年8月17日(17.08.2001) CN
  - (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海敦康生物科技有限公司(SHANGHAI HEALTH DIGIT LIMITED) [CN/CN]; 中国上海市钦州北路1089号51号楼4楼, Shanghai 200233 (CN).
  - (72) 发明人: 及
  - (75) 发明人/申请人(仅对美国): 胡奕熙(HU, Gengxi) [CN/CN]; 中国上海市钦州北路1089号51号楼4楼, Shanghai 200233 (CN).
  - (74) 代理人: 隆天国际专利商标代理有限公司(LUNG TIN INT'L PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国北京市朝阳区慧忠路5号远大中心B座18层, Beijing 100101 (CN).
  - (81) 指定国(国家): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BK, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
  - (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CN, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 根据细则4.17的声明:  
— 发明人资格(细则4.17(v))仅对美国  
本国际公布:  
— 包括国际检索报告。  
所引用双字母代码和其它缩写字符, 请参看刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写字符简要说明”。

(54) Title: A KIT FOR THE SIMULTANEOUS DIAGNOSIS OF A PLURALITY OF INFECTIOUS DISEASES AND A METHOD FOR PREPARATION OF IT  
(54) 发明名称: 用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法



WO 03/016914 A1

(57) Abstract: The present invention relates to a kit for the simultaneous diagnosis of a plurality of infectious diseases and a method for preparation of it. The kit comprises a colloidal gold-labeled immunofiltration device, a buffer solution and a mixture of colloidal gold labels, wherein the HBsAg monoclonal antibody, the HCV antigen, the syphilis antigen the HIV antigen and the sheep anti-mouse IgM antibody label are immobilized in dots in the nitrocellulose membrane of the colloidal gold-labeled immunofiltration device. The present invention also relates to a method for preparation of said kit. The kit of the present invention carries out the simultaneous diagnosis of the infectious diseases comprising B hepatitis, C hepatitis, syphilis and AZT, bases on the principle of colloidal gold immunofiltration method, which is operated simply and rapidly and accurately, and is suitable for the detection of a plurality of diseases in various blood samples, in particularly is suitable for the detection of large-scale blood samples to provide a new approach for the detection of infectious diseases.

[见续页]

## (57) 摘要

本发明涉及一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法。该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成，其中在免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，点制有 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原四种蛋白和标记物羊抗鼠 IgG 抗体。本发明还公开了该检测试剂盒的制备方法。本发明试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现了对乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性疾病的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，特别适用于大规模血液检查，也为传染性疾病的检测提供了新思路。

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法。

背景技术

乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒和艾滋病是四种常见的传染性疾病。据2000年卫生部的统计年报资料显示，此四种疾病的发病数约占传染病总发病数的27.57%，给社会和人民生活带来了极大的危害。

乙型肝炎是可能由药物、毒素和病毒等引起的炎症。在我国，约占人口总数10%-15%的人群为乙型肝炎病毒（HBV）的感染者。HBV可通过输血、血浆、血制品或使用被病毒污染的注射器针头、针灸用针、采血用具和血液透析等发生感染。其中通过输血这一途径感染因其发病率高，发病时间短，受累人群广而受到了极大的关注。

丙型肝炎的传染源主要为急性临床型病人和无症状的亚临床病人，慢性病人和病毒携带者。一般病人发病前12天，其血液即有感染性，并可带毒12年以上。丙型肝炎的传染主要通过输血而引起，在大多数发达国家，丙型肝炎是输血后感染的肝炎中最常见的一种类型，国外30-90%输血后感染的肝炎为丙型肝炎，我国输血后感染的肝炎中丙型肝炎占1/3。

梅毒病人是梅毒螺旋体唯一的传染源。性接触传染占95%。输血时如供血者为梅毒患者可传染于受血者。献血者如患梅毒并处于梅毒螺旋体血症阶段，可以传播梅毒。梅毒螺旋体在体外生活能力低，4℃时生存48-72小时，40℃无感染力，100℃立即死亡，近年来我国性病增加，因此对预防输血传播梅毒应给予高度重视。

HIV病毒是艾滋病的病原体，一般感染源以血液、精液、阴道分

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

分泌物、母乳等为主。如果被输入带 HIV 的血液，感染 HIV 的可能性估计超过 90%（相反，一次性交的风险为百分之几到小于 1%），一次输血带入 HIV 病毒量是非常大的，通过这种方式感染后，很快就会发展为 AIDS，平均时间是 3-5 年（儿童约为 2 年）。

可见，对血液和血液制品进行包括 HIV，梅毒，HBV，HCV 在内的所有能通过血液传播的病毒的严格检查是非常必要的。我国卫生部早在一九九八年发布的《献血者健康检查标准》就规定了 9 项必检项目，其中包括乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）、丙型肝炎病毒抗体（HCV 抗体）、艾滋病病毒抗体（HIV 抗体）和梅毒抗体。目前，对于梅毒的检测，一般采用 RPR 法（快速血浆反应素试验）或 TRUST 法（梅毒血清学试验），而对于 HIV、HBV、HCV 的检测，一般采用 ELISA 方法（酶联免疫吸附分析），该方法一次检测需血清 400  $\mu$ l，耗时 1-2 小时。由于目前对于献血者所献血液没有一种快速、彻底、覆盖多种疾病的检验方法，导致很多人在接受输血时感染肝炎、艾滋病和梅毒等传染病，严重地影响了受血者的身心健康和社会的安定。

胶体金免疫渗滤方法是从酶联免疫结合方法（ELISA）的基础上发展起来的，最初应用的结合物是酶标记的，称为酶免疫渗滤试验。90 年代初发展了以胶体金为标记物的渗滤试验又称为金免疫渗滤试验（IGFA）。

胶体金免疫渗滤方法的原理是以硝酸纤维素膜为载体，利用微孔滤膜的可滤过性和毛细管作用，使抗原与抗体的反应、洗涤在一个特殊的渗滤装置上，以液体渗滤过膜的方式迅速完成。

由于此方法简单、快速、除商品试剂外不需任何仪器设备，几分钟即可用肉眼观察结果。目前已在临床检测中取得了广泛的应用。胶体金免疫渗滤方法可应用于免疫学检测的几乎所有方面，但主要用于检测正常体液中不存在的抗原性物质（例如诊断传染病中的抗原或抗体），以及正常含量极低而特殊情况下异常升高的物质（如 HCG、甲胎

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

蛋白等)。近年来由于试剂原料的精选和制备技术的改进,应用范围更加广阔。但目前尚未有将胶体金免疫渗滤法用于多种传染性疾病预防抗原、抗体的同时检测。

#### 发明的公开

本发明所要解决的技术问题是利用胶体金免疫渗滤原理同时对多种传染性疾病预防进行检测,提供一种反应灵敏、准确,迅速的多用途检测试剂盒。

本发明公开的用于同时检测多种传染性疾病预防的试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液、胶体金标记物混合液组成;

其中所述的免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上,相距一定距离点制有 HBsAg 单抗(鼠抗人)、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠 IgG 抗体,抗原的点样量为 0.3-3  $\mu$ l;

其中所述的胶体金标记物混合液是四种胶体金标记物的混合溶液,包括 HBsAg 单抗(鼠抗人)、HCV 抗原、梅毒抗原和 HIV 抗原的胶体金标记物;HBsAg 的单抗(鼠抗人)被胶体金标记的蛋白浓度为 20-50  $\mu$ g/ml, HCV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120  $\mu$ g/ml, 梅毒抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120  $\mu$ g/ml, HIV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 80-120  $\mu$ g/ml, 它们依次按体积比为 1:1:1.2-2.5:1.2-2.5 的比例相混合;胶体金颗粒大小为 20-30nm;

其中所述的缓冲液为含有 0.03-0.05%Tween 20 的 PH7.2-8.8 的 PBS(由磷酸二氢钾或磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制而成的缓冲液)缓冲液。

本发明所述的梅毒抗原可以为单一的梅毒抗原,也可以是多种梅毒抗原的混合物;HIV 抗原可以是 HIV-1(1 型艾滋病病毒)抗原、HIV-2(2 型艾滋病病毒)抗原或 HIV-1 抗原和 HIV-2 抗原的混合物。

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

本发明所要解决的另一技术问题是提供上述检测试剂盒的制备方法。

本发明公开的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒的制备方法包括下列步骤：

一、制备免疫渗滤金标法联检反应装置

1. 膜上加样物的制备

将 HBsAg 单抗(鼠抗人)置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的鼠抗人 HBsAg 单抗用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4℃ 保存备用。

将 HCV 抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的 HCV 抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4℃ 保存备用。

将梅毒抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的梅毒抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4℃ 保存备用。

将 HIV 抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的 HIV 抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4℃ 保存备用。

将羊抗鼠 IgG 抗体置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的羊抗鼠 IgG 抗体用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4℃ 保存备用。

2. 在膜上加样

分别吸取上述 HBsAg 单抗(鼠抗人)、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原, 仔细地于硝酸纤维素膜的特定位置上, 点样体积为 0.3-3  $\mu$ l/点。

另吸取羊抗鼠 IgG 抗体, 于同一硝酸纤维素膜上远离上述各点样位置的地方作一标记, 此标记可为一点、一条线或其他符号。

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

### 3. 膜的后处理

将上述硝酸纤维膜 (NC) 置 37℃ 烘箱内 30 分钟。取出后室温放置 20 分钟以上。然后将其浸没于 37℃ 的封闭液中 20 分钟。取出后, 在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5-10 分钟。更换洗涤液, 重复上述振荡洗涤过程。取出后, 室温下晾干。4℃ 干燥环境中保存备用。

其中所述的封闭液为含有 0.01-0.03% Tween20 的 0.05M pH7.2-8.0 的 PBS 缓冲液; 其中所述的洗涤液为含有 0.03-0.05% Tween20 的 0.01M pH7.2-8.0 的 PBS 缓冲液。

### 4. 装置的装配

取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方, 再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

#### 二、制备胶体金标记物混合液

##### 1. 制备胶体金颗粒

取 0.01% 的氯金酸水溶液, 加热煮沸, 快速加入 1% 枸橼酸三钠溶液, 继续煮沸 5 分钟, 使得胶体金的大小为 20-30nm。

##### 2. 制备胶体金标记物

###### 2.1. HBsAg 单抗 (鼠抗人) 的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液, 在磁力搅拌下缓慢加入 HBsAg 单抗 (鼠抗人), 使其最终浓度为 20-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。室温下搅拌 30 分钟。加入 10% BSA 溶液使其终浓度为 0.2-1.0%, 室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.1-0.5%, 室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟, 仔细吸取上清, 弃去。沉淀溶于保存液中, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 置 4℃ 保存备用。

###### 2.2. HCV 抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液, 在磁力搅拌下缓慢加入 HCV 抗原, 使其终浓度为 90-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。室温下搅拌 30 分钟。加入 10% BSA

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

溶液使终浓度为 0.2-1.0%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.1-0.5%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤，置 4℃ 保存备用。

### 2.3. 梅毒抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入梅毒抗原使抗原终浓度为 90-120  $\mu$ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使终浓度为 0.2-1.0%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.1-0.5%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤，置 4℃ 保存备用。

当胶体金标记液中的梅毒抗原指多个梅毒抗原的混合物时，各个梅毒抗原的胶体金标记物要分别制备，混合，保存备用。

### 2.4 HIV 抗原的胶体金标记物的制备

取 20-30nm 颗粒的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入 HIV 抗原使抗体终浓度为 80-120  $\mu$ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使终浓度为 0.2-1.0%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.1-0.5%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤，置 4℃ 保存备用。

当胶体金标记液中的 HIV 抗原指多个 HIV 抗原的混合物时，各个 HIV 抗原的胶体金标记物要分别制备，混合，保存备用。

### 3. 制备胶体金标记物混合液

将分别配制的胶体金标记物按体积比为 HBsAg 的单抗（鼠抗人）胶体金标记液：HCV 抗原胶体金标记液：梅毒抗原胶体金标记液：HIV 抗原胶体金标记液 = 1 : 1 : 1.2-2.5 : 1.2-2.5 的比例混合完全。

### 三、缓冲液的制备

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

在 pH7.2-8.8 的 PBS 中加入 Tween20, 使 Tween20 的浓度为 0.03-0.05%。

本发明所要解决的再一技术问题是公开上述检测试剂盒在同时检测乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性疾病中的应用。

本发明所述试剂盒的检测方法如下:

1. 取出免疫渗滤金标法联检反应装置, 水平置于桌面;
2. 在免疫渗滤金标法联检反应装置孔内加入两滴缓冲液, 湿润表面;
3. 加入待测血清 50 $\mu$ l, 等其渗透入膜内;
4. 加入三滴缓冲液, 待其渗入后加入两滴胶体金标记液;
5. 加入三滴缓冲液;
6. 1 分钟后观察相应位置有无红色斑点, 有则认为该位置对应的疾病病毒在体内呈阳性, 没有则认为该位置对应的疾病病毒在体内呈阴性。

若待测血清中有 HBsAg、HCV 抗体、梅毒抗体、HIV 抗体中的一种或数种, 当硝酸纤维素膜与血清接触时, 膜上的抗原 (或抗体) 会与血清中的对应抗体 (或抗原) 发生反应, 然后再与相应的胶体金标记物进行反应, 从而显色。所以, 从显色的情况可以判断出待测病人感染了何种病毒。由于羊抗鼠 IgG 抗体不会与人血清内的抗体发生反应, 而在胶体金标记液中含有的 HBsAg 单抗 (鼠抗人) 可与羊抗鼠 IgG 抗体发生反应, 对应于羊抗鼠 IgG 抗体的位置就会显色, 被肉眼识别出; 当试剂盒由于某组分的质量问题无法进行检测实验时, 膜上对应于羊抗鼠 IgG 抗体的位置就不会显色, 所以, 通过羊抗鼠 IgG 抗体可对试剂盒进行质量控制。

本发明的检测试剂盒利用了胶体金免疫渗滤的原理, 使多种传染性疾病的相关抗原、抗体在同一渗滤装置 (硝酸纤维素膜) 上进行反应、洗涤, 通过肉眼观察各斑点的显色情况, 对多种传染性疾病进行

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

检测。

本发明试剂盒与传统的金标试剂盒、RPR 试剂盒、TRUST 试剂盒相比，其优点在于：

(1) 检测多疾病

在同一装置内同时进行四种传染性疾病的检测。

(2) 同时检测多个抗原和抗体

在同一装置内既可以检测多个抗体，也可以同时检测多个抗原，实现了多种蛋白检测条件的一体化。

本发明试剂盒与 ELISA 试剂盒相比，其优点在于：

(1) 检测多疾病

在同一装置内可进行四种传染性疾病的检测。

(2) 同时检测多个抗原和抗体

在同一装置内既可以检测多个抗体，也可以同时检测多个抗原，实现了多种蛋白检测条件的一体化。

(3) 反应时间短

整个实验可在 3 - 5 分钟内完成，适合大规模的快速血检。该试剂盒只有 2 步检测步骤，即加样、反应，均通过渗透完成，检测全过程仅需数分钟，但敏感度却与需 1-2 小时完成的 ELISA 实验相仿。

(4) 采血量小

需要的血清量仅 50u1，只采集指血、耳血即可。而 ELISA 法测一个指标就需要 100u1 血清，则测试四项指标需要 400u1 左右的血清。所以本试剂盒对于儿童、新生儿的使用十分方便，而 ELISA 方法取样只能采静脉，对新生儿十分痛苦。

(5) 检测结果不受仪器的影响；不受反应环境的影响。

(6) 加入胶体金标记物即可显色，操作步骤简单，而且试剂可在室温长期保存。

本发明试剂盒利用胶体金免疫渗透方法的原理，在同一载体上实

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

现对多种抗原和抗体的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，特别适用于大规模血液检查，也为传染性疾病的检测提供了新思路。

#### 附图的简要说明

图1是硝酸纤维素膜上点样示意图；

其中1、2、3、4分别表示点样位置。“C”的两点之间为羊抗鼠IgG抗体点样位置。

图2是1号血清检测显示示意图，检测结果均为阴性；

图3是2号血清检测显示示意图，检测结果乙型肝炎病毒表面抗原为阳性；

图4是3号血清检测显示示意图，检测结果梅毒抗体，艾滋病HIV-1&2抗体为阳性；

图5是4号血清检测显示示意图，检测结果梅毒抗体，艾滋病HIV-1&2抗体，丙型肝炎病毒抗体为阳性；

图2-5中C-C代表羊抗鼠IgG抗体的横线为阳性。

#### 具体实施方式

##### 一、试剂盒选用抗体及材料

在实施本发明的优选方法中，HBsAg单抗（鼠抗人）S1、HBsAg单抗（鼠抗人）S2由倍尔乐生物科技有限公司提供；HCV抗原、TP47梅毒抗原、TP15梅毒抗原、TP47/TP15梅毒混合抗原、HIV-1抗原、HIV-2抗原、HIV-1/2混合抗原由美国BioDesign公司提供；硝酸纤维素膜由S&S公司提供；被测血清由上海市疾病预防控制中心提供。

##### 二、免疫渗滤金标法联检反应装置的制备方法如下：

(1) 将HBsAg单抗(鼠抗人)S2置于0.02M, pH8.0的PBS中，4℃透析过夜。透析后的鼠抗人HBsAg单抗S2用0.02M, pH8.0的PBS

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

稀释至 0.5mg/ml, 4℃保存备用。

(2) 将 HCV 抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃透析过夜。透析后的 HCV 抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.4mg/ml, 4℃保存备用。

(3) 将 TP47/TP15 梅毒混合抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃透析过夜。透析后的 TP47/TP15 混合抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.5mg/ml, 4℃保存备用。

(4) 将 HIV-1/2 混合抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃透析过夜。透析后的 HIV-1/2 混合抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.6mg/ml, 4℃保存备用。

(5) 羊抗鼠 IgG 抗体置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃透析过夜。透析后的 HIV-1/2 混合抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.6mg/ml, 4℃保存备用。

(6) 如附图 1 所示, 在硝酸纤维素膜上的 1、2、3、4 位置处, 分别用微量加样器点上四种蛋白: TP47/TP15 梅毒混合抗原、HIV-1/2 混合抗原、HBsAg 单抗 (鼠抗人) S2、HCV 抗原, 每点的点样体积为 1.0  $\mu$ l; 在硝酸纤维素膜上标有“C”的两点之间, 用 0.2mm 绘图笔吸取羊抗鼠 IgG 抗体画一横线。

(7) 将此硝酸纤维素膜置于 37℃烘箱内 30 分钟, 取出后室温放置 25 分钟。然后将其浸没于 37℃的封闭液中 20 分钟。取出后, 在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5 分钟, 重复洗涤数次。室温晾干。

(8) 取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方, 再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

三、缓冲液是由 pH 为 7.8, 0.10M 的 PBS 和 0.30% Tween20 等体积混合而成的溶液。

四、胶体金标记液由 HBsAg 单抗 (鼠抗人) S1 的胶体金标记物、HCV 抗原的胶体金标记物、TP47/TP15 梅毒混合抗原的胶体金标记物、

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

HIV-1/2 混合抗原的胶体金标记物按照体积比为 1:1:1.2-2.5:1.2-2.5 的比例混合而成。各个胶体金标记物所用胶体金的颗粒大小均为 30nm。胶体金标记物的制备方法如下:

- (1) HBsAg 单抗 (鼠抗人) S1 的胶体金标记物的制备
- (2) 结合物的制备

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HBsAg 单抗 (鼠抗人) S1,使其最终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使其终浓度为 0.6%,室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.2%,室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去。沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

- (3) 胶体金-HCV 抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HCV 抗原,使其终浓度为 90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使其终浓度为 0.6%,室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.2%,室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去。沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

- (4) TP47/15 梅毒混合抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 TP47 梅毒抗原使抗原终浓度为 90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使其终浓度为 0.6%,室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.2%,室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去。沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

TP15 抗原的胶体金标记物制备方法同 TP47。

将 TP47 抗原和 TP15 抗原的胶体金标记物等体积混合,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

用。

(5) HIV-1/2 抗原的胶体金标记物的制备

取 30nm 颗粒的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HIV-1 抗原使抗体终浓度为 100  $\mu$ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使终浓度为 0.6%,室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.2%,室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去。沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

HIV-2 抗原的胶体金标记物制备方法同 HIV-1。

将 HIV-1 抗原和 HIV-2 抗原的胶体金标记物等体积混合,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

当胶体金标记液中的 HIV 抗原指多个 HIV 抗原的混合物时,各个 HIV 抗原的胶体金标记物要分别制备,再按照一定倍数稀释、混合,保存备用。

用该试剂盒来测试不同的血清,医院提供的资料显示,1 号血清的提供者未患上列四种传染性疾病中任一种;2 号血清的提供者仅患有丙型肝炎;3 号血清的提供者患有艾滋病和梅毒;4 号血清的提供者患有乙型肝炎和梅毒。检测结果依次见附图 2、附图 3、附图 4、附图 5。

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

权利要求

1、一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成，

其特征在于：

(1)其中所述的免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，相距一定距离点制有 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠 IgG 抗体；

(2)其中所述的胶体金标记物混合液是四种胶体金标记物的混合溶液，包括 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原和 HIV 抗原的胶体金标记物。

2、一种如权利要求 1 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，

其特征在于其中所述的胶体金标记液中 HBsAg 的单抗被胶体金标记的蛋白浓度为 20-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，HCV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，梅毒抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，HIV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 80-120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，它们依次按体积比为 1:1:1.2-2.5:1.2-2.5 的比例相混合；胶体金颗粒大小为 20-30nm。

3、一种如权利要求 1 或 2 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，

其特征在于其中所述的梅毒抗原为单一的梅毒抗原或是多种梅毒抗原的混合物；HIV 抗原是 HIV-1 抗原、HIV-2 抗原或 HIV-1 抗原和 HIV-2 抗原的混合物。

4、一种如权利要求 1 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，

其特征在于其中所述的缓冲液为含有 0.03-0.05%Tween 20 的 PH7.2-8.8 的 PBS 缓冲液。

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

5、一种如权利要求1所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒的制备方法，

其特征在于试剂盒的制备方法包括下列步骤：

(一) 免疫渗滤金标法联检反应装置的制备

(1) 膜上加样物的制备

将HBsAg单抗、HCV抗原、梅毒抗原、HIV抗原分别对0.02M, pH8.0的PBS, 4℃透析过夜。透析后的各蛋白分别用0.02M, pH8.0的PBS稀释至0.2-1.0mg/ml；

(2) 在膜上加样

分别吸取上述HBsAg单抗、HCV抗原、梅毒抗原、HIV抗原，仔细地于硝酸纤维素膜特定的位点上，每点0.3-3 $\mu$ l；另吸取羊抗鼠IgG抗体，于同一硝酸纤维素膜上远离上述各点样位置的地方作一标记，此标记可为一点、一条线或其他符号；

(3) 膜的后处理

将此硝酸纤维素膜置于37℃烘箱内30分钟，取出后室温放置20分钟以上。然后将其浸没于37℃的封闭液中20分钟。取出后，在室温下置于洗涤液中振荡洗涤5-10分钟，重复洗涤数次。室温晾干；

(4) 反应装置的装配

取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方，再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中；

(二) 制备胶体金标记物混合液

(1) 制备胶体金颗粒

取0.01%的氯金酸水溶液，加热煮沸，快速加入1%枸橼酸三钠溶液，继续煮沸5分钟，使得胶体金的大小为20-30nm；

(2) 制备胶体金标记物

2.1. HBsAg单抗的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为20-30nm的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

HBsAg 单抗,使其最终浓度为 20-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;室温下搅拌 30 分钟;加入 10%BSA 溶液使其终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.1-0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去。沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;

#### 2.2. HCV 抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HCV 抗原,使其终浓度为 90-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;室温下搅拌 30 分钟,加入 10%BSA 溶液使终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.1-0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去;沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;

#### 2.3. 梅毒抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入梅毒抗原使抗原终浓度为 90-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;室温下搅拌 30 分钟;加入 10%BSA 溶液使终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.1-0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去;沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;

#### 2.4 HIV 抗原的胶体金标记物的制备

取 20-30nm 颗粒的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HIV 抗原使抗体终浓度为 80-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;室温下搅拌 30 分钟;加入 10%BSA 溶液使终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使终浓度为 0.1-0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清,弃去;沉淀溶于保存液中,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;

#### (3) 制备胶体金标记液

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

将分别配制的胶体金标记物按体积比为 HBsAg 的单抗胶体金标记液：HCV 抗原胶体金标记液：梅毒抗原胶体金标记液：HIV 抗原胶体金标记液 = 1：1：1.2-2.5：1.2-2.5 的比例混合完全；

(三) 缓冲液的制备

在 pH7.2-8.8 的 PBS 中加入 Tween20，使 Tween20 的浓度为 0.03-0.05%。

6、一种如权利要求 1 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒在同时检测乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性疾病中的应用。

WO 03/016914

PCT/CN01/01519

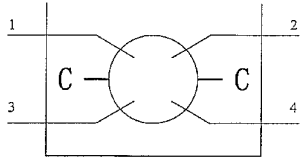


图 1

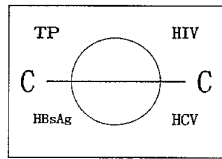


图 2

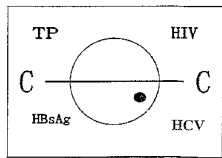


图 3

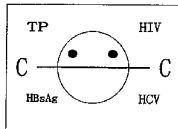


图 4

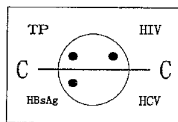


图 5

## 【 国际调查报告 】


INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN01/01519
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC <sup>7</sup> G01N33/544, G01N33/571, G01N33/576 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC <sup>7</sup> G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Chinese Patent Document (1985~) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPOCOD, PAJ, CNPAT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN, A, 1140258(PLA Forth Medical University) 15. January 1997(15.01.97), entire document	1-6
X	CN, A, 1307238(KUNMING GUANGBO Technologies Inc.) 08. August 2001(08.08.01), entire document	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12.March 2002(12.03.02)	Date of mailing of the international search report <b>21.MAR.2002 (21.03.02)</b>	
Name and mailing address of the ISA/CN 5 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Wang, Yi Telephone No. 86-10-62093916 	
Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 1998)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN01/01519
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 5,637,508(Geo-Centers, Inc.), 10. June 1997(10.06.97), entire document	1-6
A	JP, A, 200097942( Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.) 07. April 2000(07.04.00), entire document	1-6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN01/01519

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member (s)	Publication Data
CN, A, 1146258	15.01.97	None	
CN, A, 1307238	08.08.01	None	
US, A, 5,637,508	10.06.97	US, A, 5,384,265	24.01.95
JP, A, 200097942	07.04.00	None	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN01/01519
<b>A. 主题的分类</b> IPC <sup>7</sup> G01N33/544, G01N33/571, G01N33/576 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类体系分类号) IPC <sup>7</sup> G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 中国专利文献(1985~) 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词) WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
X	CN, A, 1140258(中国人民解放军第四军医大学) 15.1月 1997(15.01.97), 全文	1-6
X	CN, A, 1307238(昆明广博科技有限公司) 08.8月 2001(08.08.01), 全文	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: "A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布在先的专利或专利 "L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解释构成发明基础的理论或原理 "X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件相结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性 "&" 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 12.3月 2002(12.03.02)		国际检索报告邮寄日期 21.3月 2002(21.03.02)
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路6号(100088) 传真号: 86-10-62019451		授权官员 王奕 电话号码: 86-10-62093916 

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN01/01519
C(续). 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	US, A, 5,637,508(Geo-Centers, Inc.) 10.6月1997(10.06.97), 全文	1-6
A	JP, A, 200097942(松下电器产业株式会社) 07.4月2000(07.04.00), 全文	1-6

国际检索报告 关于同族专利成员的简报		国际申请号 PCT/CN01/01519	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN, A, 1140258	15.01.97	无	
CN, A, 1307238	08.08.01	无	
US, A, 5,637,508	10.06.97	US, A, 5,384,265	95.01.24
JP, A, 200097942	07.04.00	无	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(1998年7月)

---

 フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/571	G 0 1 N 33/569	H
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/571	
	G 0 1 N 33/577	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

专利名称(译)	用于多种传染病的同时检测诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004538489A</a>	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2003521370	申请日	2001-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
[标]发明人	胡げん熙		
发明人	胡 ▲げん▼熙		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/5767 G01N33/571 G01N33/5761		
FI分类号	G01N33/576.B G01N33/576.Z G01N33/531.B G01N33/532.Z G01N33/543.541.Z G01N33/569.H G01N33/571 G01N33/577.B		
代理人(译)	田中，三夫 品川EiSatoshi		
优先权	01126500.0 2001-08-17 CN		
其他公开文献	JP3853317B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于同时检测和诊断多种传染病的试剂盒及其制备方法。所述试剂盒金标记的免疫过滤试验装置，包括的缓冲溶液和胶体金标记物的混合物，金标记的免疫过滤试验装置，在该膜的HBsAg单克隆抗体，HCV抗原，梅毒性抗原，HIV抗原和山羊抗 - 包括添加了小鼠IgG抗体的硝酸纤维素膜。本发明还公开了一种制备诊断试剂盒的方法。本发明实现了基于金标记免疫过滤试验在一种载体上同时检测乙型肝炎，丙型肝炎，梅毒和艾滋病。操作简便，快速准确，适用于多种疾病的检测，特别是大规模的血液初步检查。它还为传染病的检查提供了新的思路。

