



[12]发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89102117.5

[51] Int.Cl⁴

G01N 33 / 543

[43] 公开日 1989年11月8日

[22]申请日 89.2.11

[30]优先权

[32]88.2.11 [33]DK [31]704 / 88

[71]申请人 安克斯公司

地址 丹麦 DK-4560 维

[72]发明人 科斯马·弗朗希斯迪·苏萨

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 许 宾

说明书页数: 6 附图页数: 6

[54]发明名称 检测血液中抗体的方法及实施该方法
所用的膜带和膜片组

[57]摘要

用凝固血液样品在载体上,检测血液中抗体的方法,例在一片滤纸上的血斑,该滤纸与公知的洗脱和培养液及涂有与检测所需的抗体类型相应的抗原的膜带共同放入容器。培养和着色后进行阳性或阴性反应的检测。本发明也涉及用于该方法的膜带或膜片组以及洗脱和培养液,还有一种试验工具,包括完成试验时所必需的装置。

352

1. 用免疫吸收技术 (Western 吸印技术) 检测血液中抗体的方法, 使用涂有与被测抗体相应的筛选过的抗原膜片, 其特征在于当涂敷在载体上的血液样品凝固后, 将载体与涂有筛选过的抗原的膜带及洗脱和培养液一起放入容器中, 经预定的培养时间后, 去掉膜片, 用公知的试验方法进行试验。

2. 按照权利要求 1 所述的方法, 其特征在于使用由吸收过滤材料组成的载体如一片滤纸。

3. 按照权利要求 1 所述的方法, 其特征在于使用的膜带宽 1 至 1.8 毫米长 10 至 100 毫米。

4. 实施权利要求 1 至 3 之一所述的方法所用的膜带, 其特征在于涂有与被测抗体相应分子量筛选的抗原。

5. 实施权利要求 1 至 3 之一所述的方法所用的膜片组, 其特征在于由许多与常规载体带相连接的膜带组成, 每一膜带分别涂有一种对人体检查用的抗原。

检测血液中抗体的方法及实施

该方法所用的膜带和膜片组

本发明涉及一种使用涂有与被测抗体相应的已筛选过的抗原的膜片的免疫吸印技术 (Western 吸印技术) 检测血液中抗体存在的方法。本发明还涉及实施该方法所用的膜带和膜片组。

检测抗体和抗原的许多方法已为人们熟知。例如将抗原用凝胶电泳法分离和检测 [例如十二烷基硫酸钠 (SDS)] 用这种方法可能将几乎任何一种蛋白质混合物分解成各个组分。然而, 由于已分离的蛋白质组分比较难以达到所使用凝胶基质内部, 因此对它们作进一步分析受到了限制。

为了克服上述缺点, 用一膜片代替凝胶基质, 使蛋白质能固定在膜片上, 处在不能移动的状态。

所谓吸印技术的优点是在膜片表面不出现处在不能移动状态的抗原的集中, 因此易于对各个分离的抗原进行进一步的鉴定。

以免疫吸印技术为基础的分析方法能用于鉴定抗体和抗原二者。用这种方法检测抗体的例子包括所有种类的接种疫苗, 例如 HIV—I, HIV—II、HTLV—I 和 HTLV—II。其他的例子为疟疾、血吸虫病、丝虫病、非洲锥虫病和 leishmaniasis。还能检测过敏症产生的物质。

常规免疫吸印技术使用的血液试样是经处理后分离出的血清。被分离出的血清与一典型的宽 4—5 毫米长 120 毫米的带状膜片接触, 膜片涂有与被测抗体相应的已筛选过的抗原。在经过适宜的培养时间后去掉膜片, 然后进行阳性反应试验。试验可用任何已知方法, 例如

着色。

本发明是对已有的免疫吸印技术的进一步改进和简化，从而有效地缩短了分析时间。此外，分析是用整个血液来代替血清，例如是在已经转移至载体上且已凝固的血液样品上进行分析。

因此本发明涉及权利要求 1 前序部分描述的一种方法，其特征在于带有血液样品的载体即血液样品在涂敷以后已凝固在载体上，与涂有筛选过的抗原的带状膜片，与洗脱和培养液共同放入容器中，经予定的培养时间以后，去掉膜片，再用本领域已知的方法做试验。

根据本发明，已证明用一张滤纸作为载体，将血液样品吸收在滤纸上合适的。用滤纸吸收血液样品是已知的，然而根据已知方法，第一步必须从血液样品中洗脱血清，然后在后续步骤中试验血清中的抗体的含量。

由于用本发明能够洗脱和培养在一个步骤中完成，所以必然有效地简化了步骤和缩短分析时间。使用本发明的方法使分析时间缩短的另一个原因是使用尺寸特别小的带状膜片。膜带的最佳尺寸是宽 1.1 至 1.8 毫米和长 10 至 100 毫米。这就大大地降低了过程的费用，也大大地缩短了用于洗脱和将抗体转移到膜片上的时间，例如从 3 至 4 小时缩短到 1 至 1.5 小时。

实施本发明的方法所用的最佳膜带为聚偏氟乙烯箔，按指出的尺寸切割成膜带，即其最好的宽度为 1.1 至 1.8 毫米和长度为 10 至 100 毫米，例如 70 至 75 毫米，其他合适的膜片材料例如为硝化纤维或酰胺。每一膜带能标上识别码标记，如直接在膜带上贴上流水号标签或条型码。

为了实施该试验，可使用任何能盛膜片，带血液样品的载体以及

洗脱和培养液的容器。如果需要同时进行试验的数量大，可使用带有许多样品池的架，在其中能装入相应数量的膜片和带血液样品的载体。

这种带有许多样品池的试验架最佳实施例如图所示：

图 1 是本发明架的透视图；

图 2 是相同架的局部剖面图；

图 3 是架的两个盖之一的透视图；

图 4 是与图 2 相似的剖面图，其中已装入膜片，带血液样品的载体和洗脱及培养液；

图 5 是有 15 个涂有相同或不同抗体的膜带的膜片组；

图 6 是如图 5 所示相同型式的膜片组，但每一膜带分成三部分。

图 7 是图 6 膜片组的侧视图；

图 8 是适于装入如图 7 所示膜片组的带有许多样品室的试验架的局部剖面的侧视图；

图 9 是图 8 所示试验架的顶视图；

图 10 是图 8 中沿 a—b 向的试验架的样品室剖面图；

图 11 是适于装入如图 8 至 10 所示试验架样品室的具有许多片带有血液样品的滤纸载体条带。

试验架由耐高压蒸煮材料例如聚甲醛制造的板 1 组成。在板上钻有许多平行通孔 2，在孔中插入两端伸出板 1 的通孔管 3。在图示实施例中板 1 的厚度为 30 毫米。孔 2 的直径为 $\varnothing 10$ 毫米。80 毫米长的管已插入孔中，在板 1 两边伸出 25 毫米，以使管的开口 6 离开板的表面，在每个管端部设置有一个同心硅橡胶密封圈 9。开口 6 能用两个设置有与管开口相应的凹槽 7 的盖 4 和 5 密闭。

图 4 所示已装入一片带血液样品的滤纸 8 和膜带 10 的管的剖面

图。两管开口 6 a 和 6 b 用盖 4、5 密闭。

在下面将用检测爱滋病毒抗体来描述本发明，但该过程应理解为同样适合于许多其他抗体或抗原。

例 1

如图所示板块的每一孔中装入具有加强肋的聚偏氟乙烯膜片，膜片分别用公知的方法涂有筛选过的 HIV 抗原。膜带长 70 毫米，宽 1.6 毫米。使用的膜带用印刷有流水号的标签做上标记。然后将带有待试验人的血液样品滤纸片都切成尺寸为 5×5 毫米。这些滤纸片分别装入所示每一个管中，所有管的三分之二体积中都装有 pH 值为 7.2 的洗脱和培养缓冲剂以及盛有 PBS（丁二酸—1）、0.1% 非离子活性剂（Twen 20）、1%（w/w）兔子血清、0.05 当量浓度（N）的 NaN_3 。管的开口用盖 4、5 密闭，然后将整个膜片组放入旋转装置中，于是在每一样品池中的液体溅泼于带有筛选过的抗原的已装入的膜带上。洗脱和培养液约在一小时以后倒出，用蒸馏水清洗，再用 HRP（蕈菜根过氧化物酶的共轭免疫蛋白 G）培养 3/4 小时，随后在蒸馏水中清洗，用 TMB S/DONS 作用物着色，在完全着色后除去膜带，然后进行阳性或阴性反应检测。

例 2

使用如图 5 所示的膜片组，包括许多膜带 3，其连接端 4 与防水塑料组成的载体带 1 上的片状垂悬物 2 相连接。膜片带 3 涂有相同或不同的与被检测抗体相应的抗原。

将膜片组装入一具有相同数目孔或通孔的架中，膜带间有相同间隔距离且与如图 1 至 4 所示架中的排相对应。洗脱和培养液以及带有已干燥的待试验人的血液样品的滤纸片同时装入所述孔或通孔中。

试验做法与例 1 描述相同。

例 3

图 6 和 7 所示一膜片组包括带有若干片状垂悬物 1 2 的支座或肋 1 1，且在上述垂悬物 1 2 上配有相应数目的塑料膜带 1 3，例如聚偏氟乙烯。每个膜带分成三部分 1 3 a、1 3 b 和 1 3 c，每一部分涂有与另外两部分不同的抗原，但应与待检测抗体相对应。因此每一膜带可同时适用于检测同一个人的血液试样的三种不同抗原。肋 1 1 的形状成管形，以便借助于由一个能插入该管状肋中的细杆所组成的工具（图中未示出）方便地取出膜片组。

如图 8 至 10 所示使用了适于膜片组的试验架。膜片组包括一个具有许多两端为半园形的长槽样品室或样品池 2 2 的架 2 1，其顶部是敞开的。样品池 2 2 之间距离根据片状垂悬物 1 2 和带有抗原的膜带 1 3 之间距离来设计。架 2 1 设有一纵向槽 2 3，适合于容纳带片状垂悬物 1 2 的肋 1 1 以及膜片组的膜带。

此外，架 2 1 设有另一纵向槽 2 4，适于容纳供带血液样品滤纸用的支座上的肋 3 1，见图 11。

所述支座包括一个带有涂有血液样品的滤纸 3 3 的具有许多片状垂悬物 3 2 的肋 3 1。图 10 所示已插入供血液样品 3 1、3 2、3 3 用的支座和带膜带 1 1、1 2、1 3 用的支座的样品池 2 2 的剖面图。

将洗脱和培养液 1 4 装入样品池，再按例 1 提出的相同条件完成培养和后处理。在清洗和着色后，去掉膜片组，再读出试验结果。

当然，这些例子仅仅是作为实施例，普通技术人员能容易地理解该方法并作出不同的变化。如上所述，该方法不仅可用于检测血液中

的抗体，而且也可用于检测各种液体中的抗原。在后面这种情况下，可用带有筛选过的多系抗体或单系抗体的膜带。

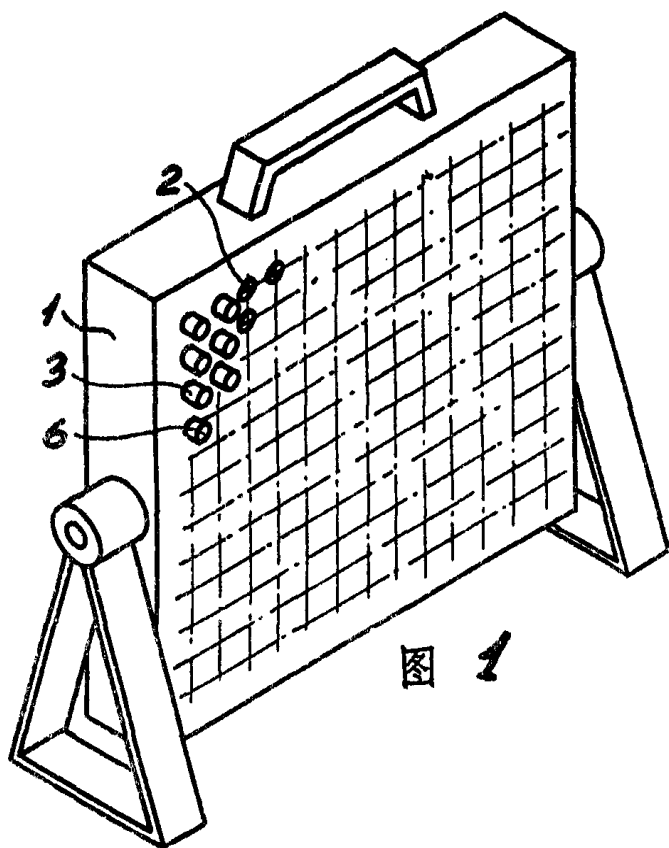


图 1

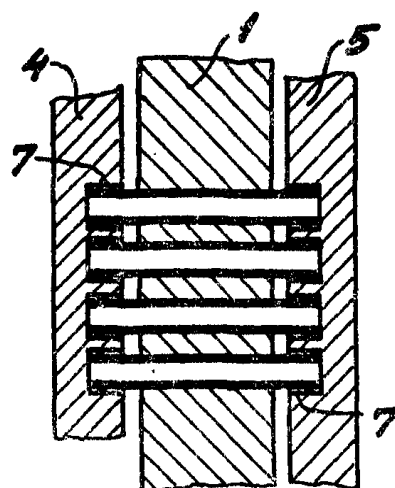


图 2

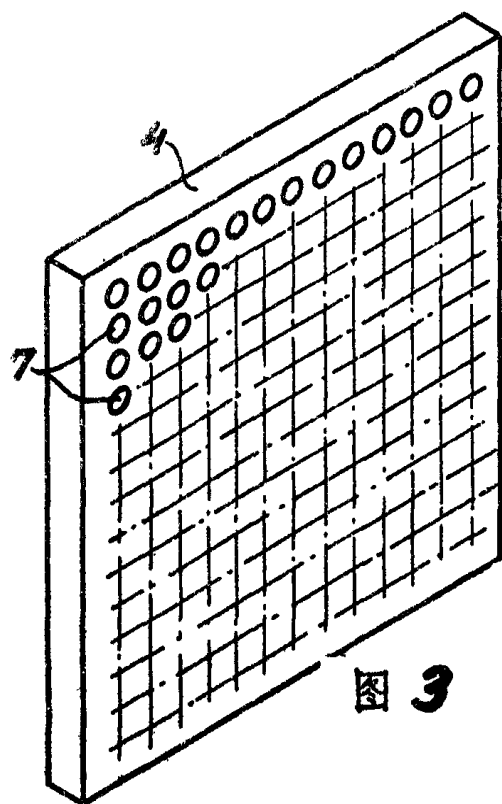


图 3

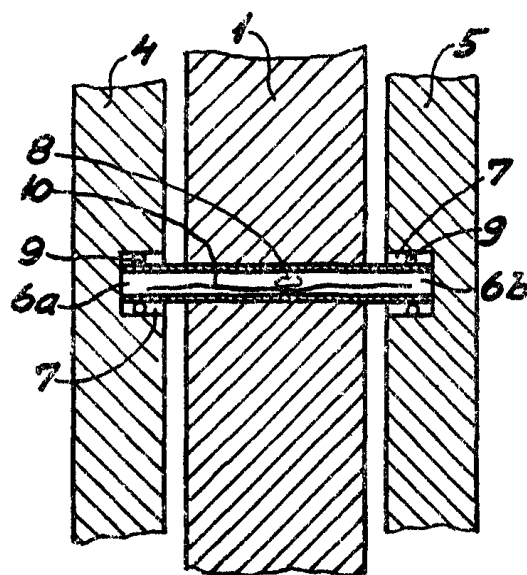
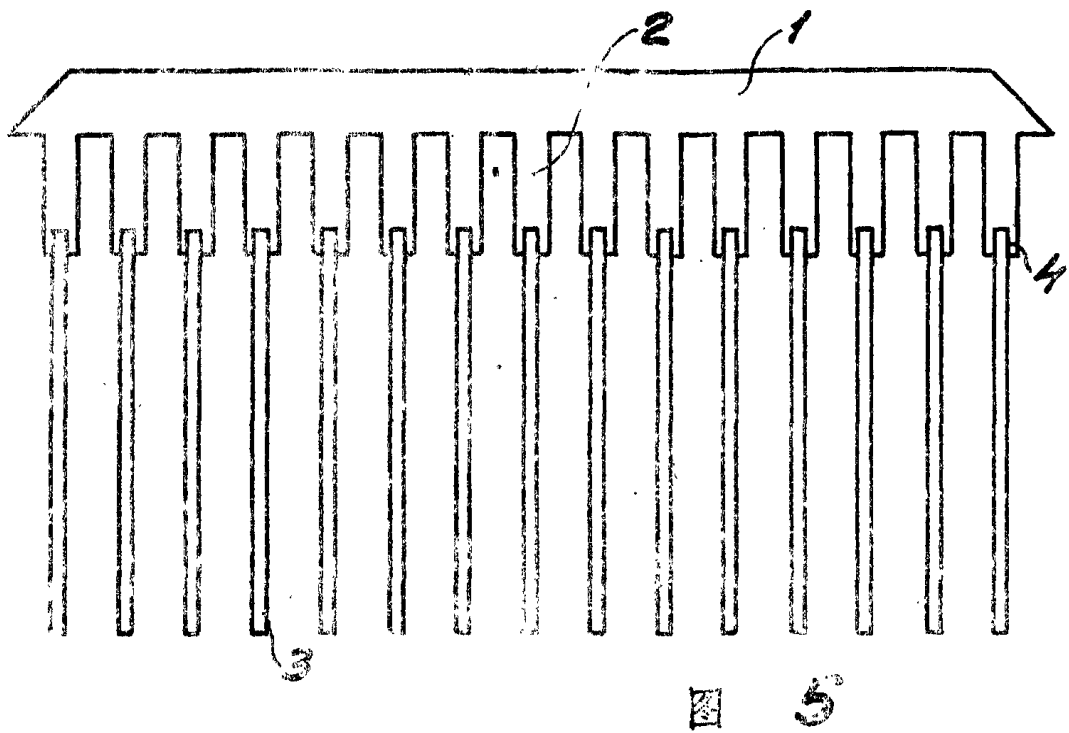
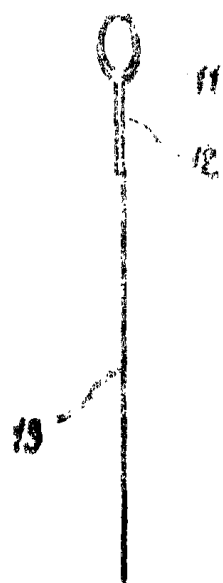
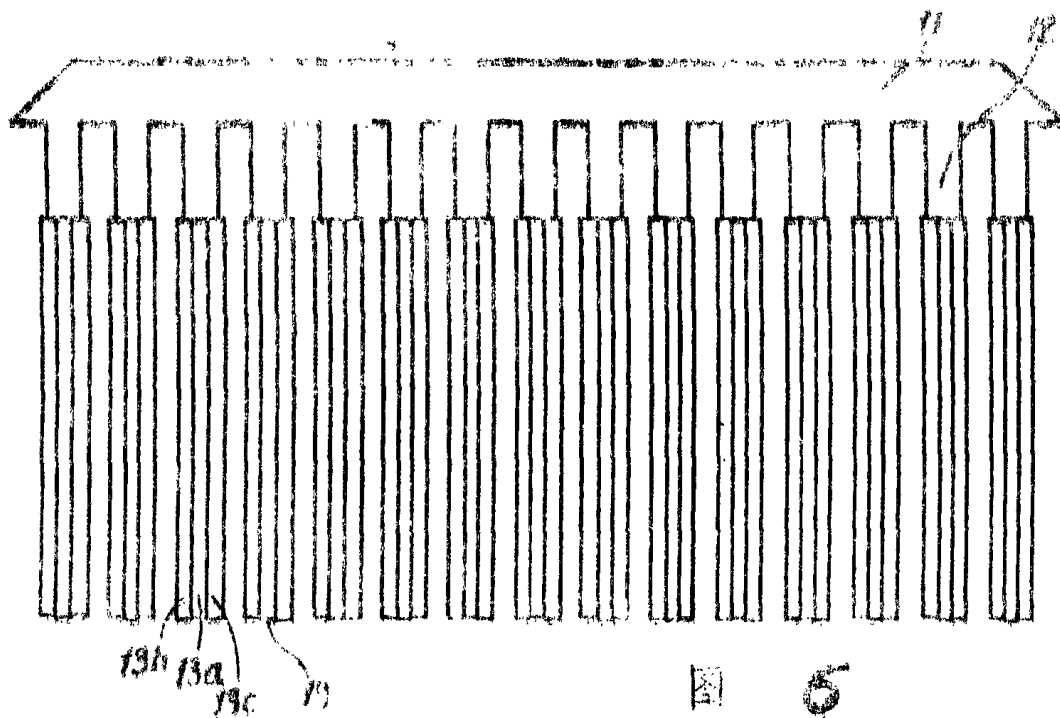


图 4





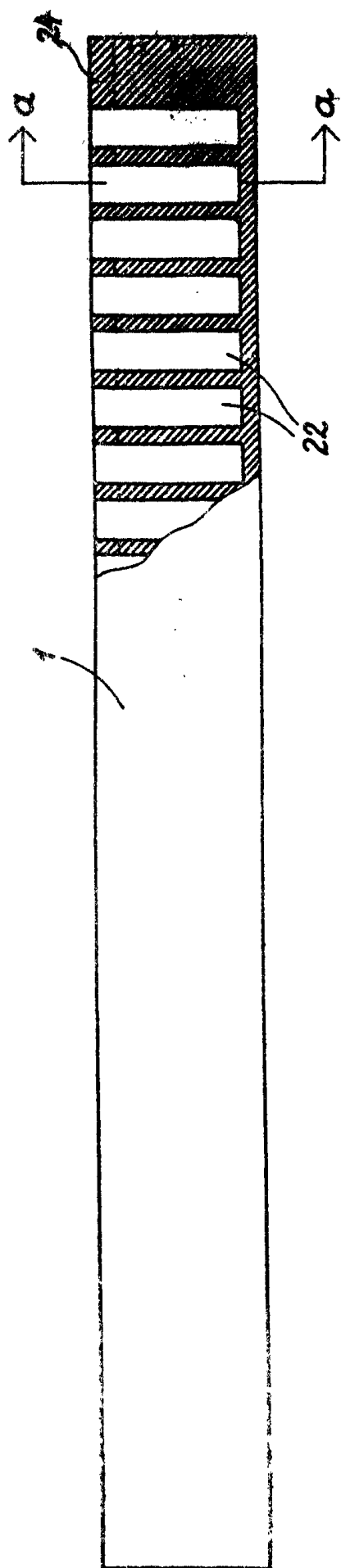
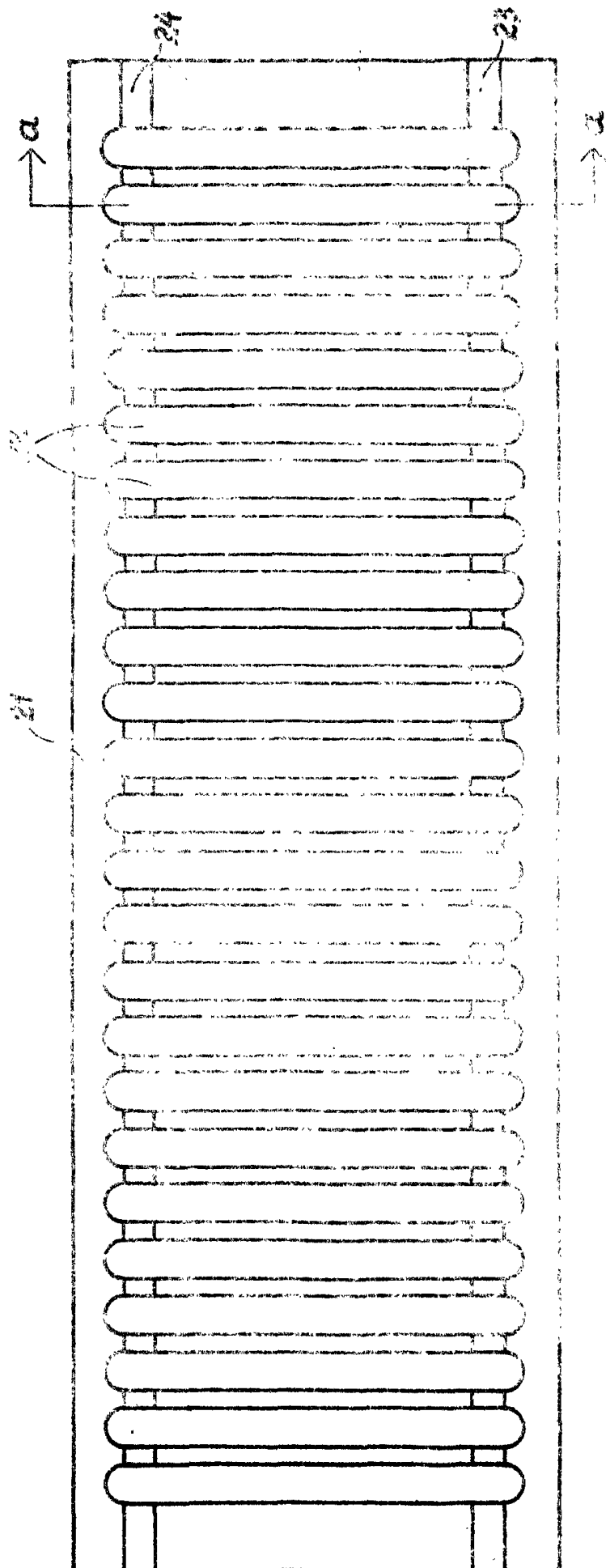
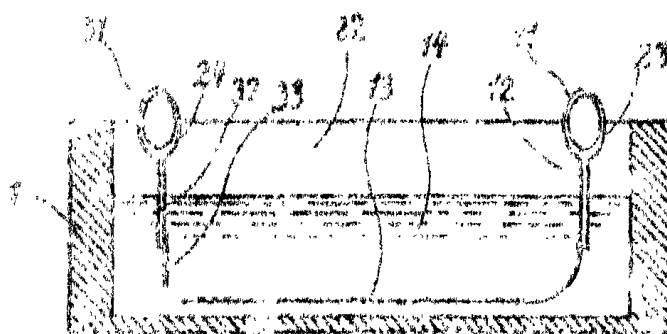


图 8





cut a-a

61 70

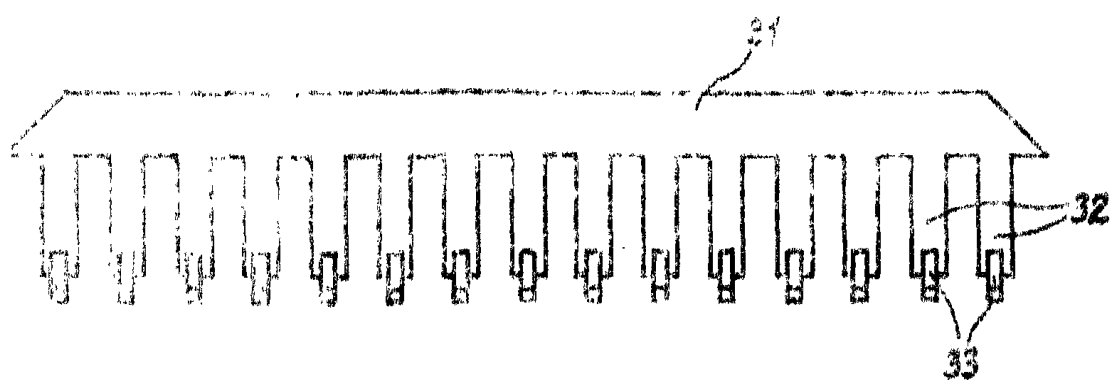


图 11