



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102004146 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 200910102207. 9

(22) 申请日 2009. 09. 03

(73) 专利权人 艾博生物医药(杭州)有限公司
地址 310018 浙江省杭州市经济技术开发区
12号大街(东)198号

(72) 发明人 高飞 吴银飞 陆维克

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100
代理人 徐关寿

Gold Fluorescent Microspheres: A New
Retrograde Marker Visualized by Light
and Electron Microscopy. 《EXPERIMENTAL
NEUROLOGY》. 1987, 第96卷

Vinayak Rastogi et al., .Development
and evaluation of realistic microbioassays
in freely suspended droplets on a chip.
《BIOMICROFLUIDICS》. 2007, 第1卷(第1期),

审查员 周露露

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0470192 B1, 1990. 04. 16,

CN 1335503 A, 2002. 02. 13,

JAMES J. QUATTROCHI, et al.. Colloidal

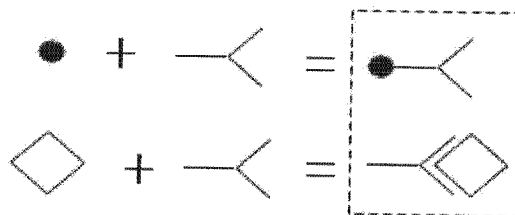
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种混合标记物质和标记方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种混合标记物质,包括标记物
和被标记物,标记物包括选自胶体金颗粒,乳胶颗
粒,水溶性标记物之中的至少两种。优选的,标记
物包括其中两种物质,如胶体金颗粒和乳胶颗粒。
本发明还涉及了一种标记混合标记物质的方法,
包括标记物和被标记物的结合。不同的标记物可
以和相同的被标记物共同标记,也可以和相同的
标记物分别标记再混合,不同的标记物还可以和
不同的被标记物分别标记。另外,本发明还涉及一
种检测试剂条,这种检测试剂条上包括如上所述
的混合标记物质。本发明取得的有益效果是:通
过混合标记物质在检测试剂条中的应用,可以有
效提高检测的灵敏度和特异性。



1. 一种混合标记物质,包括标记物和被标记物,其特征在于,所述的混合标记物质包括胶体金-被标记物结合物,以及乳胶-被标记物结合物。

2. 如权利要求1所述的混合标记物质,其特征在于,所述的被标记物包括至少一种抗体或抗原物质。

3. 一种带有混合标记物质的检测试剂条,其中混合标记物质包括标记物和被标记物,其特征在于,所述的混合标记物质包括胶体金-被标记物结合物,以及乳胶-被标记物结合物。

4. 如权利要求3所述的检测试剂条,其特征在于,所述的被标记物包括至少一种抗体或抗原物质。

5. 如权利要求3所述的检测试剂条,其特征在于,所述的检测试剂条包括标记区域和检测区域,所述的混合标记物质位于标记区域。

6. 一种标记混合标记物质的方法,包括标记物和被标记物的结合,其特征在于,包括以下步骤:胶体金颗粒和被标记物结合形成胶体金-被标记物结合物;乳胶颗粒和被标记物结合形成乳胶-被标记物结合物;将上述两种结合物混合在一起。

7. 如权利要求6所述的标记方法,其特征在于,所述的被标记物包括抗原或者抗体。

一种混合标记物质和标记方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种混合标记物质和标记混合标记物质的方法以及其应用,属于免疫领域中所用的标记物质,尤其是快速诊断领域中应用于检测样本中是否含有被分析物质的检测试剂条。

背景技术

[0002] 快速诊断领域内,用于检测样本中是否含有被分析物质的工具,常常首选检测试剂条。检测试剂条可以包括样本接受区域,标记区域,检测区域和吸收区域。一般来说,可以直观显示检测结果的带颜色颗粒会和特定的抗原或者抗体标记并固定在标记区域上。在检测过程中,这种标记结合物可以和样本中的物质结合(如果有),然后顺着样本到达检测区域,并和检测区域中的和特定的抗原或者抗体对应的抗体或者抗原结合,并且通过显示是否有颜色来判断样本中是否含有被分析物。

[0003] 1971年Faulk和Taytor将胶体金引入免疫化学,此后免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法,在生物医学各领域得到了日益广泛的应用。而今,胶体金是一种常用的标记技术,是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术,有其独特的优点。近年已在各种生物学研究中广泛使用。在临床使用的免疫印迹技术几乎都使用其标记。目前在医学检验中的应用主要是免疫层析法(immunochromatography)和快速免疫金渗滤法(Dot-immuogoldfiltration assay DIGFA),用于检测HBsAg、HCG和抗双链DNA抗体等,具有简单、快速、准确和无污染等优点。同样,乳胶标记也具有相类似的功能,不同的是,乳胶和抗原或抗体之间的结合是依靠偶联作用的共价键作用而非静电作用的。

发明内容

[0004] 本发明涉及一种混合标记物质,包括标记物和被标记物。优选的,标记物包括选自胶体金颗粒,乳胶颗粒,水溶性标记物之中的至少两种。优选的,标记物包括其中两种物质,如胶体金颗粒和乳胶颗粒。其中优选的,这两种标记物可以分别标记被标记物,然后按照比例混合在一起。这种形式的混合标记物,可以在检测中互不干扰,增加样本中被分析物质的结合位点,提高检测的特异性。另外优选的,这两种标记物可以先后标记同一种被标记物,形成胶体金-被标记物-乳胶这样的结合物。这种结合物,可以具有较高的灵敏度,既在弱阳性的情况下可以显示较强的信号,在弱阴性的情况下也可以显示阴性,因此在cut-off值附近具有较好的分辨作用。另外优选的,标记物还可以包括其中另外两种标记物或者三种标记物。

[0005] 本发明还涉及了一种标记混合标记物质的方法,包括标记物和被标记物的结合。优选的,标记物至少包括选自胶体金颗粒,乳胶颗粒,以及水溶性标记物的两种或者三种。不同的标记物可以和相同的被标记物共同标记,也可以和相同的标记物分别标记再混合,不同的标记物还可以和不同的被标记物分别标记。在具体的优选的实施例中,将胶体金颗粒和被标记物集合在一起形成胶体金-被标记物结合物;乳胶颗粒和被标记物结合在一起

形成乳胶-被标记物结合物;最后将这两种结合物混合在一起。在另外一个优选的实施例中,标记混合标记物质的方法包括,将胶体金颗粒和被标记物结合形成胶体金-被标记物结合物;将乳胶颗粒和胶体金-被标记物结合物结合形成胶体金-被标记物-乳胶结合物。另外,本发明还涉及一种检测试剂条,这种检测试剂条上包括如上所述的混合标记物质。

[0006] 本发明取得的有益效果是:通过混合标记物质在检测试剂条中的应用,可以有效提高检测的灵敏度和特异性。

附图说明

[0007] 图1是本发明一个实施例标记物和被标记物的结合示意图,其中,●表示一种标记物,◇表示另一种标记物,——<表示被标记物。

[0008] 图2是本发明另一个实施例标记物和被标记物的结合示意图。

[0009] 图3是本发明一个实施例的实验结果比较图。其中,C表示控制线,T表示测试线。I是将胶体金-strep A抗体置于标记垫上得到的结果;II是将乳胶-strep A抗体置于标记垫上得到的结果;III是将胶体金-strep A抗体和乳胶-strep A抗体共同置于标记垫上得到的结果;IV是将胶体金-strep A抗体-乳胶置于标记垫上得到的结果。

具体实施方式

[0010] 下面对混合标记物质涉及的概念或这些所使用的技术术语做进一步的说明。

[0011] 样本

[0012] 本发明所指的样本指那些可以用来检测、化验或诊断是否存在感兴趣的被分析物质的物质。样本可以是,例如,液体样本,液体样本可以包括血液、血浆、血清、尿液、唾液和各种分泌液,还可以包括固体样本和半固体样本经过预先处理后形成的液体溶液。收集来的样本可以用于免疫检测、化学检测、酶检测等方法来检测是否存在被分析物质。

[0013] 被标记物

[0014] 本发明中的被标记物是指免疫领域内可以和其他物质通过物理或者化学方式结合的蛋白质类,包括抗原和抗体,以及抗体片段等。

[0015] 抗原是指能够刺激机体产生(特异性)免疫应答,并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞结合,发生免疫效应的物质,如病原体、异种动物血清等。在快速诊断领域内,如测定丙肝病毒抗体(HCV),就可以采用双抗原夹心的方法,测定样本中抗HCV总抗体。

[0016] “抗体”是指免疫球蛋白,无论是天然的还是部分或者全部合成的。这个术语还包括其中保持结合能力的抗体的衍生物,也包括任何含有与免疫球蛋白的结合域同源的或者很大程度上同源的结合域的蛋白质。这些蛋白质可能是源自天然物质,也可能是部分或者全部合成的。一种抗体可能是单克隆的或者是多克隆的。一种抗体可能是任何免疫球蛋白类型中的一员,包括任何人类的免疫球蛋白类型:IgG, IgM, IgA, IgD, IgG和IgE。“抗体片段”是抗体的衍生物或者抗体的小于全长的一个部分。抗体片段能够保留至少一个全长抗体的结合能力的显著位点。在一个具体的流感检测的实施例中,通常可以采用双抗体夹心的方法,即被标记物为流感抗体,可以给合标记物,当样本中含有流感病毒时,流感抗体-标记物结合物可以很快将流感病毒抗原捕捉到,并在检测区域以阳性有线的方式直观显示出来。在另一个具体的实

施例中,被分析物质是 HCG,可以采用 HCG 抗体和标记物质的标记,来显示妇女的体液样本,如尿液或者血液中是否含有 HCG 抗体,可以判断妇女是否怀孕。

[0017] 标记物

[0018] 本发明中的标记物质可以是酶,非水溶性颗粒,例如金属胶体颗粒(胶体金颗粒),乳胶颗粒等等,或者一些水溶性标记物质,还可以荧光标记物质。

[0019] 混合标记物质

[0020] 本发明中的混合标记物质,是指标记物和被标记物之间通过物理或者化学结合产生的结合物。这种混合标记物质中的标记物质,优选的,在本发明中,至少包括两种标记物,以更加灵敏得捕捉信号。这两种或者两种以上的标记物,可以是选自以上所述的任意两种标记物。如选择荧光标记物质和胶体金颗粒作为标记物,形成的混合标记物质可以包括以下几种情况,一种是荧光物质-被标记物结合物和胶体金-被标记物结合物的混合物,另一种是荧光物质-被标记物-胶体金结合物。

[0021] 一个较佳的选择是选用胶体金颗粒和乳胶颗粒作为标记物胶体金具有很高的动力学稳定性,在稳定因素不受破坏时自身凝聚极慢,可放置数年不发生凝聚。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性。根据胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小比较均匀、形状及颜色(紫红色)反应,故是免疫反应的一种较佳标记物。同样,乳胶颗粒也是作为标记物质较优选择,这是因为,乳胶分子相对其他标记物质比较大,带有乳胶颗粒的特异结合被分析物质的分子在经过阻拦区域时,大颗粒的物质速度比小颗粒物质慢,这样可以让带有标记物质的特异结合被分析物质的分子在阻拦区域上作稍长停留与阻拦分子进行充分反应,有利于减少检测结果的“假阳性”。

[0022] 在一个优选的实施例中,混合标记物质包括胶体金-被标记物结合物,以及乳胶-被标记物结合物的混合物。具体的说,是将胶体金颗粒和乳胶颗粒分别和被标记物标记,然后根据一定的比例混合在一起。优选的,混合标记物质为胶体金-抗体结合物和乳胶-抗体结合物的混合物。另外优选的,混合标记物质为胶体金-抗原结合物和乳胶-抗原结合物的混合物。在具体的例子中,如流感检测中,如图 1 所示,可以将胶体金颗粒和流感抗体在一定条件下分别标记,然后将已得到的流感抗体乳胶结合物和流感抗体胶体金结合物共同处理到检测试剂条的标记区域上,并干燥,组装成相关产品进行试验。标记胶体金和乳胶的方法,在现有技术中均有述及,这里不多累赘。采用这样方式得到的混合标记物质,在技术上比较容易掌握,在试验过程中取得了相当显著的效果。这种方式发挥了胶体金标记和乳胶标记各自的优点,可以有效得提高产品的灵敏度和特异性,这在后面的实施例中将具体体现。

[0023] 在另一个优选的实施例中,混合标记物质包括胶体金-被标记物-乳胶结合物。优选的,将被标记物和胶体金颗粒先标记,得到胶体金-被标记物结合物,然后,乳胶颗粒去标记胶体金-被标记物结合物,可以得到胶体金-被标记物-乳胶这样双重标记的结合物。另外优选的,将被标记物和乳胶颗粒先标记,得到乳胶-被标记物结合物,然后,用胶体金颗粒去标记乳胶-被标记物结合物,理论上也可以得到胶体金-被标记物-乳胶这样双重标记的结合物。这种混合标记物质包含了两种不同特性的标记物,相当于在检测过程中起到了双保险的作用,可以更加完全得参与免疫反应,因为,得到的结果是比较理想的,同样可以将产品的灵敏度和特异性提升一个层次。在一个具体的判断妇女是否怀孕的快

速诊断检测中,采用胶体金颗粒和 HCG 抗体在一定的 PH 等合适环境下进行标记,形成胶体金-HCGAb 结合物(胶体金-HCG 抗体结合物),然后,再用乳胶颗粒标记胶体金-HCGAb 结合物,得到胶体金-HCGAb-乳胶结合物。将这种混合标记物质应用于检测样本中是否含有 HCG 抗体的检测试剂条中,优选的,这种混合标记物(胶体金-HCGAb-乳胶结合物)被处理在检测试剂条的标记区域上。这种混合标记物质取得的效果由于带有更多的标记物质,而且发扬了不同标记物质的长处,规避了这些标记物质的不足之处,可以比较明显得改善检测的效果,如,不采用混合标记物质的检测试剂条在 cut-off 值附近出现的阳性或者阴性不确定的情况,在使用了带有混合标记物质的检测试剂条之后,情况得到了很好的改进,用 cut-off 阳性溶液实验得到较明显的阳性结果,而用 cut-off 阴性溶液实验得到明显的阴性结果,这说明检测的灵敏度大大提高。

[0024] 另外优选的,在一个具体的实施例中,混合标记物质还可以包括胶体金-被标记物结合物,以及水溶性标记物-被标记物结合物。在另一个具体的实施例中,混合标记物质包括胶体金-被标记物-水溶性标记物结合物。在另一个实施例中,混合标记物质包括乳胶-被标记物结合物,以及水溶性标记物-被标记物结合物。在另外的具体的实施例中,混合标记物质包括乳胶-被标记物-水溶性标记物结合物。在另外优选的方式中,混合标记物质还可以包括两种以上的标记物质,如选用乳胶颗粒,磁性颗粒以及胶体金颗粒进行标记。这种方式的混合标记物质,可以在应用到产品之后,除了免疫直观得得到定性的结果,还可以在精密仪器下得到定量的结果。更为优选的实施例中,混合标记物质的被标记物上标记了三种标记物,胶体金颗粒,乳胶颗粒和水溶性标记物共同被标记在同一种被标记物上。

[0025] 本发明还涉及了一种标记混合标记物质的方法,包括标记物和被标记物的结合。优选的,标记物至少包括胶体金颗粒和乳胶颗粒。在具体的优选的实施例中,将胶体金颗粒和被标记物集合在一起形成胶体金-被标记物结合物;乳胶颗粒和被标记物结合在一起形成乳胶-被标记物结合物;最后将这两种结合物混合在一起。在另外一个优选的实施例中,标记混合标记物质的方法包括,将胶体金颗粒和被标记物结合形成胶体金-被标记物结合物;将乳胶颗粒和胶体金-被标记物结合物结合形成胶体金-被标记物-乳胶结合物。此外优选的的实施例中,标记混合标记物质的方法包括:将被标记物和乳胶颗粒先标记,得到乳胶-被标记物结合物,然后,用胶体金颗粒去标记乳胶-被标记物结合物,理论上也可以得到胶体金-被标记物-乳胶这样双重标记的结合物。

[0026] 本发明还涉及一种检测样本中是否含有被分析物质的检测试剂条。优选的,这种检测试剂条包括如上所述的混合标记物质。检测试剂条可以包括一些组件或部件,如顺次包括样本接受区域,标记区域和检测区域以及吸收区域,检测区域上通常可以有检测线。这些部件或者组件是现有技术领域内技术人员所公知的。优选的,混合标记物质位于检测试剂条的标记区域上。

[0027] “被分析物质”在本发明中包括一些半抗原物质,这些半抗原包括毒品(如滥用药物)。“滥用药物”(DOA)是指非医学目的地使用药品(通常起麻痹神经的作用)。药物滥用的例子包括可卡因;安非他明等。这些药品被人体吸收后会分解成不同的小分子物质,这些小分子物质存在于血液、尿液、唾液、汗水等体液中或部分体液存在上述小分子物质。被分析物质还可以是人绒毛膜促性腺激素(hCG),黄体生成素(LH),卵巢刺激素(FSH),丙肝病毒(HCV),乙肝病毒(HBV),乙肝表面抗原,艾滋病病毒和任何滥用的药物。被分析物能够

在任何的液体或者液化样本中检测到,例如尿液,唾液,口水,血液,血浆,或者血清。

[0028] 下面结合具体附图对本发明的实施例子来进行详细的说明。这些具体的实施例子仅仅是在不违背本发明精神下的有限列举,并不排除本领域的一般技术人员把现有技术和本发明结合而产生的其他具体的实施方案。

[0029] 实施例 1

[0030] 本实施例阐述了流感检测试剂条。在检测试剂条的标记区域,共同标记了乳胶-流感抗体结合物和胶体金(也称金标)-流感抗体结合物。下面是具体的标记过程和采用的物质,原理如图 1 所示。

[0031] 1. 乳胶标记:将流感 A 抗体如红色乳胶混合,加入 EDC 后进行反应,4 小时后,加入终止液,停止反应,10000rpm 离心去上清液,加入稀释液,并超声波破碎,得到流感抗体乳胶结合物,4℃ 保存。

[0032] 2. 金标标记:将 40nm 胶体金溶液 pH 调至 9.0,将流感 A 抗体用 0.1Mol/L K₂CO₃ 调 pH 至 9.0,两者混合,搅拌 10 分钟,加入一定量的 5% 胎牛血清和 1% 的聚乙二醇,加入的量:5% BSA 使溶液终浓度为 1%;1% 聚乙二醇加至总溶液的 1/10。继续搅拌 10 分钟。然后在 14000g,离心 1 小时。然后吸出上清,沉淀物用含 1% BSA 的 PBS 溶液将沉淀稀释为为原体积的 1/10,得到流感抗体胶体金结合物,4℃ 保存。

[0033] 3. 将已得的流感抗体乳胶结合物和金标结合物稀释到不同浓度,按一定处理到聚脂膜上,并干燥,组装成相关产品进行试验。抗体乳胶结合物加上抗体胶体金结合物的灵敏度比单独的抗体乳胶结合物或抗体胶体金结合物都高,特异性都良好。结果如表一:

[0034] 表一:不同浓度流感抗体乳胶结合物和流感抗体金标结合物检测结果比较表

[0035]

聚脂膜	使用浓度	阴性	弱阳性	阳性
抗体乳胶结合物	0.05%	-	+-	+
抗体乳胶结合物	0.1%	-	+	++
抗体乳胶结合物	0.15%	-	+	+++
抗体胶体金结合物	OD3	-	+-	+
抗体胶体金结合物	OD6	-	+	++
抗体胶体金结合物	OD10	-	+	+++
抗体乳胶结合物 + 抗体胶体金结合物	0.03% + OD5	-	+++	++++
抗体乳胶结合物 + 抗体胶体金结合物	0.05% + OD3	-	+++	++++

[0036] 实施例 2

[0037] 本实施例阐述了 Strep A 检测试剂条。在检测试剂条的标记区域,共同标记了乳胶 -Strep A 抗体 - 金标结合物。下面是具体的标记过程和采用的物质,原理如图 2 所示。

[0038] 1. 将 Strep A 抗体在 0.005Mol/L pH7.0NaCl 溶液中 4℃透析过夜,以除去多余的盐离子,然后 5000rpm 离心 30 分钟,去除杂质。

[0039] 2. 将 40nm 胶体金溶液 pH 调至 8.9,将 Strep A 抗体用 0.1Mol/LK₂CO₃ 调 pH 至 8.9,两者混合,搅拌 15 分钟,加入一定量的 5% 胎牛血清和 1% 的聚乙二醇,加入的量:5% BSA 使溶液终浓度为 1%;1% 聚乙二醇加至总溶液的 1/10。继续搅拌 15 分钟。然后在 13000g,离心 30 分钟。然后吸出上清,沉淀物用含 1% BSA 的 PBS(含 0.02% NaN₃),溶液将沉淀稀释为为原体积的 1/10,得到 Strep A 抗体胶体金结合物。

[0040] 3. 在已得的 Strep A 抗体胶体金结合物中加入红色乳胶颗粒,室温搅拌 10 分钟,再加入 EDC 后,室温下反应 3 小时。加入终止液,停止反应,11000rpm 离心去上清液,加入 1% BSA,搅拌 10 分钟,11000rpm 离心去上清液,加入稀释液,并超声波破碎,得到 Strep A 抗体胶体金乳胶结合物,4℃保存。

[0041] 将得到的 Strep A 抗体胶体金乳胶结合物点在试剂条的标记区域,同时,选取另外几种标记物作为比较,用 cut-off 阳性溶液作为样本用于检测,得到如图 3 所示结果。其中,C 表示控制线,T 表示测试线。I 是将胶体金 -strep A 抗体置于标记垫上得到的结果,可以看到微弱的 T 线阳性线条;II 是将乳胶 -strep A 抗体置于标记垫上得到的结果,可以看到不明显的 T 线阳性线条;III 是将胶体金 -strep A 抗体和乳胶 -strep A 抗体共同置于标记垫上得到的结果,可以看到比较好的阳性结果;IV 是将胶体金 -strep A 抗体 - 乳胶置于标记垫上得到的结果,可以看到比较好的阳性结果。结果表明,利用混合标记技术,大大改善了产品的灵敏度。

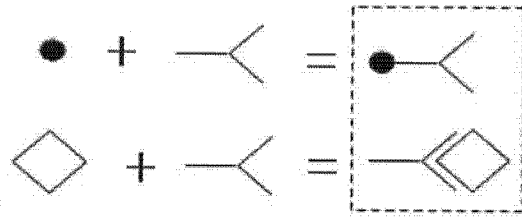


图 1

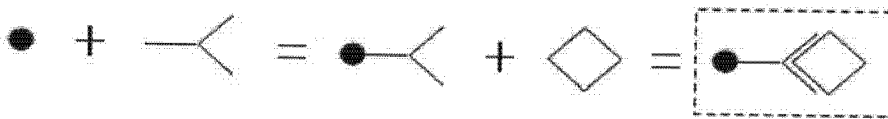


图 2

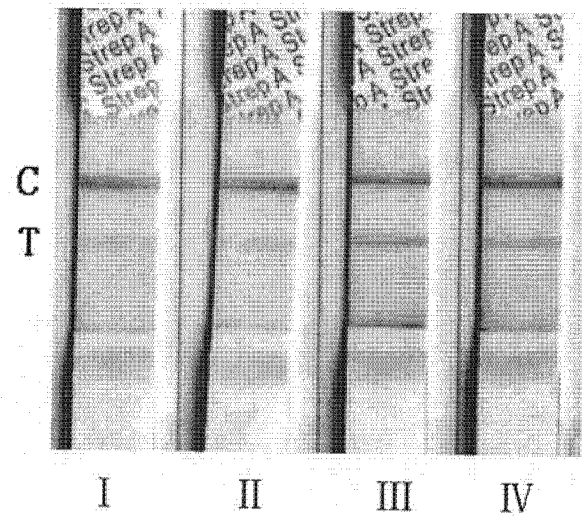


图 3