



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102445536 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201110292092. 1

(22) 申请日 2011. 09. 29

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院
地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号

(72) 发明人 王静 孙时 杨宇 宋峰林
杨永莉 王旺

(74) 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理
有限责任公司 11003
代理人 尹振启

(51) Int. Cl.
G01N 33/569 (2006. 01)
G01N 33/558 (2006. 01)
G01N 33/531 (2006. 01)

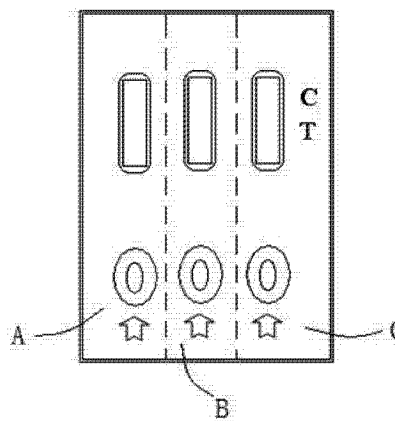
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条及其制备方法和应用,其可同时检测东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒抗体,及其可分别定量检测的金标免疫层析系统的制备方法和应用,包括金标免疫试纸条的制备、金标分析仪定量检测的应用。本发明结合了金标标记和免疫层析技术的技术原理,保证了检测方法的敏感性和特异性,具有操作简单,检测时间短,无需专业人员,适合快速现场筛检、并可达定量检测目的等优点。



1. 一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析系统,其特征在于,该金标免疫层析系统包括用于定量检测的金标免疫分析仪、用于检测东方马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 A、用于检测西方马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 B、用于检测委内瑞拉马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 C,三个试纸条均包括反应支撑物、紧密连接于反应支撑物上表面中部的硝酸纤维膜,硝酸纤维膜起始端的上表面与吸水垫部分重叠连接、硝酸纤维膜末端的上表面与金标抗体保护膜部分重叠连接,金标抗体保护膜的上表面部分重叠连接有样品垫;

其中,金标免疫试纸条 A 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组东方马脑炎病毒 E1C 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有东方马脑炎抗原包被的检测条带;

金标免疫试纸条 B 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组西方马脑炎病毒 E1C 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有西方马脑炎病毒抗原包被的检测条带;

金标免疫试纸条 C 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组委内瑞拉马脑炎病毒 E 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有委内瑞拉马脑炎病毒抗原包被的检测条带。

2. 如权利要求 1 所述的金标免疫层析系统,其特征在于,所述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 和金标免疫试纸条 C 并排一体制成。

3. 如权利要求 2 所述的金标免疫层析系统,其特征在于,所述反应支持物为 PVC 板,吸水垫为滤油纸;所述金标抗体保护膜为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维。

4. 如权利要求 2 所述的金标免疫层析系统,其特征在于,所述样品垫为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维。

5. 如权利要求 2 所述的金标免疫层析系统,其特征在于,所述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 和金标免疫试纸条 C 整体的外部各自包裹设置有外壳,该外壳上对应于所述样品垫处设置有样品孔,外壳上对应于所述质控条带、检测条带处设置有观察窗。

6. 一种如权利要求 1 所述金标免疫试纸条的制备方法,其特征在于,该制备方法具体为:

1) 制备胶体金;

2) 利用制得的胶体金分别标记相应的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组东方马脑炎病毒 E1C 抗原、金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组西方马脑炎病毒 E1C 抗原、金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组委内瑞拉马脑炎病毒 E 抗原;

3) 用隔流喷金划线机以设定喷膜速度分别将羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG 喷涂到硝酸纤维膜一的起始端以形成质控条带一、将羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG 喷涂到硝酸纤维膜二的起始端以形成质控条带二、将羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 喷涂到硝酸纤维膜三的起始端以形成质控条带三,将重组马脑炎蛋白喷涂到三个硝酸纤维膜的末端以形成相应的检测条带;

4) 将步骤 2) 中制得的胶体金标记的三种蛋白或抗原分别均匀涂布在三个玻璃纤维膜

上,并烘干或冷冻干燥,制成三个相应的金标抗体保护膜;

5) 在反应支撑物上表面中部设置步骤 3) 中的三个硝酸纤维膜,三个硝酸纤维膜起始端的上表面分别与相应的吸水垫部分重叠连接,三个硝酸纤维膜末端的上表面与相应的金标抗体保护膜部分重叠连接,金标抗体保护膜的上表面部分重叠连接相应的样品垫;

6) 将步骤 5) 中形成的包含三个试纸条的试纸切成规格大小的形状,进行干燥、装壳,以形成试纸条。

7. 如权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 1) 中制备胶体金的具体步骤为:

1) 制备 HAuCl_4 水溶液:磁力搅拌下加入 HAuCl_4 ,同时加入柠檬酸三钠水溶液,颜色稳定后继续加热,冷却至室温后加纯水补足至设定值,4 °C 避光保存;

2) 用 K_2CO_3 调 pH 值为 6.0-6.4;

3) 将胶体金调至 pH 6.0-6.4,用 PB 稀释 SPA 至 0.2 mg/ml;

4) 保持胶体金稳定。

8. 如权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 3) 中,喷膜速度为 10-100mm/s;所述重组马脑炎蛋白的加入量为 0.1-5mg/ml,该重组抗原的稀释液可以为 PBS;羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 的浓度为 0.1-5 mg/ml。

9. 如权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于,将胶体金标记的蛋白或抗原的 pH 为 6.0-6.4;所述样品垫采用含有 NP 40 的磷酸盐缓冲液对玻璃纤维素膜进行预处理。

10. 一种如权利要 1 所述的金标免疫试纸条的应用,将所述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 和金标免疫试纸条 C 与金标分析仪有机整合成金标免疫层析定量检测系统,反应后的试纸条经金标免疫分析仪扫描,记录对应反射光强,以光密度检测值 T、质控值 C 和 T/C 表示,以正确判读该试纸条检测结果。

检测马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种可同时检测东方马脑炎病毒抗体、西方马脑炎病毒抗体、委内瑞拉马脑炎病毒抗体及其可分别定量检测的金标免疫试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 东方马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis Virus, EEEV)属 A 组虫媒病毒披膜病毒科甲病毒属,含单股正链 RNA,该病毒主要是通过蚊媒传播,而且可以经含有病毒的气溶胶通过呼吸道感染人类,其引起的脑膜脑炎,是一种急性、病毒性、人畜共患自然疫源性的传染性疾病。感染后发病率高,传染性强,致死率高,缺乏有效的预防方法,病愈后多留有后遗症,对人群危害性大,所以被国际社会列为防制生物恐怖的主要病种之一,备受世界各国关注。

[0003] 我国对东方马脑炎病毒生物战剂的侦检和医学防护等研究尚处于空白,更缺乏中、长期研究发展规划,针对东方马脑炎病毒的恐怖袭击尚无配套诊断试剂和有效免疫治疗和防护手段,所以发明快速、简便、能适合现场检测的检测东部马脑炎病毒的方法刻不容缓,对我国在国际社会上的形象和检测地位具有非常重要的意义。

[0004] 西方马脑炎(Western Equine Encephalitis,简称为 WEE)(以下简称为西马)是由西马病毒引起的能使人类和马等多种动物致死性的一种急性病毒性脑炎。西马病毒可经呼吸道传播感染,但主要是由蚊虫传播,西马病毒的抗原性是由囊膜糖蛋白 E1 和马脑炎病毒决定的。E1 含有一个中和抗原位点,感染西马病毒后会产生相应抗体,所以检测西马病毒 E1C 抗体即可得知是否有感染该病毒。1990 年何海怀等从新疆乌苏县采集的按蚊和博乐县的全沟硬蜱中分离出西马病毒。吕新军等在对我国人体血清调查中发现,西马病毒抗体阳性率为 2.71%。这些情况都证实了西马病毒在我国的存在,说明了西马病毒有可能成为我国感染性疾病的新病原之一。

[0005] 委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus,简称为 VEEV)(以下简称为委马病毒)是属于披膜病毒科、甲病毒属,基因组为单股正链 RNA 的可引起委内瑞拉马脑炎的烈性病毒。该病毒主要由蚊虫吸血传播,可引起马匹、人类或其他动物患病,研究表明,气溶胶也是一种较重要的传播途径。该病毒有较高的发病率和致死率,病愈后还会留有后遗症,已被美国疾病预防控制中心列为生物恐怖剂。虽然我国境内还未有发现委内瑞拉马脑炎病毒报道,但是随着国际旅游和贸易交往日益频繁,携带此病毒传入我国的风险系数以及潜在的生物恐怖袭击的危险日益增加,所以我国国内尤其是出入境口岸应提高警惕,加强对委马病毒的检测,防止该病毒在我国的暴发和流行。

[0006] 金标免疫层析法(GICA)是 20 世纪 90 年代以来在单克隆抗体技术、金标技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术。近年来发展迅速,在生物医学领域特别是医学检验中得到了广泛应用。该技术主要是将特异性的抗原或抗体以条带状固定在 NC

膜上,金标标记试剂吸附在结合垫上,当待测样品加到试纸条一端的样品垫上后,通过虹吸原理向前移动,溶解结合垫上的金标标记试剂后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,待测物和金标试剂的复合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,通过目测的金标标记物得到直观的显色结果。而流离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离的目的。由于快速简便、准确,具有高度特异性和高敏感性,结果直观可靠,而且试剂和样品用量极少,每个样品只需 1-2 μ l, 无需仪器设备,简化了烦琐的常规操作过程,同时也减小了因操作引起的误差,金标免疫层析技术是一种目前发展最快的复合型免疫层析技术。金标本身为红色,不需要加入显色试剂,对人体无毒害。目前该技术已经在临床医学检验广泛应用,被认为是微生物和传染病及寄生虫病诊断中最有前途的新技术之一。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种使用方便、检测快捷、定性、特异性和敏感性高、可同时检测东方马脑炎病毒抗体、西方马脑炎病毒抗体、委内瑞拉马脑炎病毒抗体的免疫层析试纸条及其分别定量检测的金标免疫层析系统,本发明的另一目的是提供一种上述试纸条的制备方法和应用。

[0008] 为实现上述目的,本发明一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析系统,包括用于定量检测的金标免疫分析仪、用于检测东方马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 A、用于检测西方马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 B、用于检测委内瑞拉马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 C,三个试纸条均包括反应支撑物、紧密连接于反应支撑物上表面中部的硝酸纤维膜,硝酸纤维膜起始端的上表面与吸水垫部分重叠连接、硝酸纤维膜末端的上表面与金标抗体保护膜部分重叠连接,金标抗体保护膜的上表面部分重叠连接有样品垫;

其中,金标免疫试纸条 A 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组东方马脑炎病毒 E1C 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组东方马脑炎抗原包被的检测条带;

金标免疫试纸条 B 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组西方马脑炎病毒 E1C 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组西方马脑炎病毒抗原包被的检测条带;

金标免疫试纸条 C 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组委内瑞拉马脑炎病毒 E 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组委内瑞拉马脑炎病毒抗原包被的检测条带。

[0009] 进一步,所述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 和金标免疫试纸条 C 并排一体制成。

[0010] 进一步,所述反应支持物为 PVC 板,吸水垫为滤油纸;所述金标抗体保护膜为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维。

[0011] 进一步,所述样品垫为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维。

[0012] 进一步,所述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 和金标免疫试纸条 C 整体的外

部各自包裹设置有外壳,该外壳上对应于所述样品垫处设置有样品孔,外壳上对应于所述质控条带、检测条带处设置有观察窗。

[0013] 一种上述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 或金标免疫试纸条 C 的制备方法,具体为:

- 1) 制备胶体金;
- 2) 利用制得的胶体金分别标记相应的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组东方马脑炎病毒 E1C 抗原、金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组西方马脑炎病毒 E1C 抗原、金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组委内瑞拉马脑炎病毒 E 抗原;
- 3) 用隔流喷金划线机以设定喷膜速度分别将羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG 喷涂到硝酸纤维膜一的起始端以形成质控条带一、将羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG 喷涂到硝酸纤维膜二的起始端以形成质控条带二、将羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 喷涂到硝酸纤维膜三的起始端以形成质控条带三,将重组马脑炎蛋白喷涂到三个硝酸纤维膜的末端以形成相应的检测条带;
- 4) 将步骤 2) 中制得的胶体金标记的三种蛋白或抗原分别均匀涂布在三个玻璃纤维膜上,并烘干或冷冻干燥,制成三个相应的金标抗体保护膜;
- 5) 在反应支撑物上表面中部设置步骤 3) 中的三个硝酸纤维膜,三个硝酸纤维膜起始端的上表面分别与相应的吸水垫部分重叠连接,三个硝酸纤维膜末端的上表面与相应的金标抗体保护膜部分重叠连接,金标抗体保护膜的上表面部分重叠连接相应的样品垫;
- 6) 将步骤 5) 中形成的包含三个试纸条的试纸切成规格大小的形状,进行干燥、装壳,以形成试纸条。

[0014] 进一步,所述步骤 1) 中制备胶体金的具体步骤为:

- 1) 制备 HAuCl_4 水溶液:磁力搅拌下加入 HAuCl_4 ,同时加入柠檬酸三钠水溶液,颜色稳定后继续加热,冷却至室温后加纯水补足至设定值,4 °C 避光保存;
- 2) 用 K_2CO_3 调 pH 值为 6.0-6.4;
- 3) 将胶体金调至 pH 6.0-6.4,用 PB 稀释 SPA 至 0.2 mg/ml;
- 4) 保持胶体金稳定。

[0015] 进一步,所述步骤 3) 中,喷膜速度为 10-100mm/s;所述重组马脑炎蛋白的加入量为 0.1-5mg/ml,该重组抗原的稀释液可以为 PBS;羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 的浓度为 0.1-5 mg/ml。

[0016] 进一步,将胶体金标记的蛋白或抗原的 pH 为 6.0-6.4;所述样品垫采用含有 NP 40 的磷酸盐缓冲液对玻璃纤维膜进行预处理。

[0017] 一种上述金标免疫试纸条的应用,将所述金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 和金标免疫试纸条 C 与金标分析仪有机整合成金标免疫层析定量检测系统,反应后的试纸条经金标免疫分析仪扫描,记录对应反射光强,以光密度检测值 T、质控值 C 和 T/C 表示,以正确判读该试纸条检测结果。

[0018] 本发明基于 SPA 蛋白或重组马脑炎蛋白标记胶体金,构建间接法或双抗原夹心法检测抗体,并对该方法的敏感性、特异性、稳定性进行评价。通过对人为掺入兔抗重组马脑炎蛋白抗体的健康人血清模拟环境样品检测,评价该方法检测血清样品中马脑炎病毒抗体

的可行性。利用本发明提供的试纸条进行检测,具有操作简单,检测时间短,无需专业人员,适合快速现场检测。并且,借助于相关设备,可做到定性和定量检测,从而大大提高了其推广和应用。

附图说明

- [0019] 图 1 为本发明免疫层析试纸条内部结构的正面示意图;
图 2 为本发明免疫层析试纸条内部结构的侧面结构示意图;
图 3 为本发明免疫层析试纸条的阳性检测结果示意图;
图 4 为本发明免疫层析试纸条的阴性检测结果示意图;
图 5 为本发明免疫层析试纸条的无效检测结果示意图;
图 6 为本发明中并排一体设置的 3 种金标免疫试纸条结构示意图。

具体实施方式

[0020] 下面,参考附图,对本发明进行更全面的说明,附图中示出了本发明的示例性实施例。然而,本发明可以体现为多种不同形式,并不应理解为局限于这里叙述的示例性实施例。而是,提供这些实施例,从而使本发明全面和完整,并将本发明的范围完全地传达给本领域的普通技术人员。

[0021] 为了易于说明,在这里可以使用诸如“上”、“下”“左”“右”等空间相对术语,用于说明图中示出的一个元件或特征相对于另一个元件或特征的关系。应该理解的是,除了图中示出的方位之外,空间术语意在于包括装置在使用或操作中的不同方位。例如,如果图中的装置被倒置,被叙述为位于其他元件或特征“下”的元件将定位在其他元件或特征“上”。因此,示例性术语“下”可以包含上和下方位两者。装置可以以其他方式定位(旋转 90 度或位于其他方位),这里所用的空间相对说明可相应地解释。

[0022] 图 1、图 2 中, 1:吸水垫;2:硝酸纤维膜,T:包被重组马脑炎病毒蛋白检测条带;C:包被羊抗兔 IgG 或羊抗重组马脑炎病毒蛋白 IgG 的质控条带;3:含有金标标记 SPA(金黄色葡萄球菌 A 蛋白,Staphylococcal Protein A,SPA)或重组马脑炎蛋白的金标抗体保护膜;4:样品垫;5:反应支持物。

[0023] 图 3、图 4、图 5 是本发明的检测结果示意图;出现 T、C 两条线为阳性;出现 C 一条线为阴性;不出现线条则试纸条无效。试纸条整体的外部包裹设置有外壳 6,外壳 6 上对应于样品垫处设置有样品孔 7,外壳上对应于质控条带、检测条带处设置有观察窗 8。

[0024] 图 6 是本发明中并排一体设置的可同时检测东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条结构示意图;其包括一体设置的金标免疫试纸条 A、金标免疫试纸条 B 或金标免疫试纸条 C,将 3 种金标免疫层析试纸条分别放置即可达到同时检测目的。

[0025] 本发明中用于检测东方马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 A、用于检测西方马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 B、用于检测委内瑞拉马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条 C,这三个试纸条的基本结构相同,其主要区别在于金标抗体保护膜:

金标免疫试纸条 A 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组东方马脑炎病毒 E1C 抗原涂层,硝酸纤维膜上靠近其起始端

处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗东方马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组东方马脑炎病毒抗原包被的检测条带；

金标免疫试纸条 B 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组西方马脑炎病毒 E1C 抗原涂层，硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗西方马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组西方马脑炎病毒抗原包被的检测条带；

金标免疫试纸条 C 中的金标抗体保护膜包括膜本体、及均匀涂布在其上的金标标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白或重组委内瑞拉马脑炎病毒 E 抗原涂层，硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗委内瑞拉马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组委内瑞拉马脑炎病毒抗原包被的检测条带。

[0026] 本发明一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸条，定性检测东方马脑炎病毒抗体灵敏度 60 ng/mL，检测西方马脑炎病毒抗体灵敏度达到 120 ng/mL，检测委内瑞拉马脑炎病毒抗体灵敏度达到 1/20000 倍的血清稀释液。

[0027] 本发明一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸条，其中包括将待测标本与样品稀释液混匀，再将样品混合液加入试纸样品孔处，样品中的液体依靠虹吸作用上行，10-15 分钟判读结果；所述免疫层析试纸条包括：

(1) 反应支持物；

(2) 吸水垫；

(3) 硝酸纤维膜，该膜包被有重组马脑炎病毒蛋白和质控抗体的检测条带和质控条带；

(4) 金标抗体保护膜，其中含有金标标记的 SPA(金黄色葡萄球菌 A 蛋白, Staphylococcal Protein A, SPA) 或重组马脑炎病毒蛋白；

(5) 样品垫；

其中反应支持物选用 PVC 板；吸水垫选用滤油纸；硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有羊抗兔 IgG 或兔抗重组马脑炎病毒 IgG 包被的质控条带、靠近其末端处设置有重组马脑炎病毒蛋白包被的检测条带。金标抗体保护膜的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维，其上含有金标标记的 SPA 或重组马脑炎病毒蛋白；样品垫材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

[0028] 本发明所涉及试纸中的吸水垫 1 选用滤纸，反应支持物 5 选用 PVC 板，金标抗体保护膜 3 的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维，其上均匀涂布有金标标记的抗体。

[0029] 本发明所涉及试纸中的金标抗体保护膜由将金标标记的 SPA 或重组马脑炎病毒蛋白均匀涂布在聚脂膜、玻璃纤维膜或滤纸纤维膜上来制成。

[0030] 本发明一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸条的结构为：反应支持物 5 位于底层，硝酸纤维膜 2 位于反应支持物 5 上的中部，硝酸纤维膜 2 的 T 处是重组马脑炎病毒蛋白包被的检测条带，C 处是羊抗兔 IgG 或兔抗重组马脑炎病毒蛋白 IgG 包被的质控条带；金标抗体保护膜 3 位于硝酸纤维膜 2 上部的一侧并与之部分重叠，该膜含有金标标记的重组马脑炎病毒抗体；吸水垫 1 位于硝酸纤维膜 2 上部的相对于金标抗体保护膜 3 而言的另一侧、并与硝酸纤维膜 2 部分重叠；样品垫 4 位于硝酸纤维膜 2 上与吸水垫 1 相反的一侧并与金标抗体保护膜 3 部分重叠。

[0031] 上述试纸中,吸水垫 1 一侧为起始端,金标抗体保护膜 3 一侧为末端,检测条带位于接近末端,质控条带接近于起始端。

[0032] 上述试纸中,重组马脑炎病毒蛋白的浓度为 0.1-5mg/ml,质控羊抗兔 IgG 的浓度为 0.2-5mg/ml。

[0033] 上述试纸中,羊抗兔 IgG 的浓度优选为 0.5-2.5 mg/ml。

[0034] 上述试纸中,SPA 标记 1ml 金标的量为 2-6 μ g。

[0035] 本发明检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸条的制备方法,该方法包括:

(1) 用隔流喷金划线机以一定喷膜速度在硝酸纤维膜上喷涂马脑炎病毒蛋白为检测条带和羊抗兔 IgG 或兔抗重组马脑炎病毒蛋白 IgG 为质控条带;

(2) 制备一种含有金标标记的 SPA 或重组马脑炎病毒蛋白的金标抗体保护膜,将金标标记的 SPA 或重组马脑炎病毒蛋白均匀涂布在玻璃纤维膜上,并烘干或冷冻干燥后,制成金标抗体保护膜。

[0036] 本发明所述的制备方法,其中所述喷涂包被膜的步骤中,喷膜速度是 10-100mm/s。

[0037] 本发明所述的制备方法,其中所述重组马脑炎病毒蛋白,其加入量为 0.1-5mg/ml,该蛋白的稀释液可以为 PB 溶液。

[0038] 本发明所述的制备方法,其中质控条带中羊抗兔 IgG 或兔抗重组马脑炎病毒蛋白 IgG 的浓度为 0.1-5 mg/ml。

[0039] 本发明所述的制备方法,其中将金标标记的 SPA 或重组马脑炎病毒蛋白均匀涂布在玻璃纤维膜上,其中 pH 为 6.0 - 6.4。

[0040] 本发明涉及所述试纸在检测马脑炎病毒抗体的应用,其中包括将待测标本与样品稀释液混匀,再将样品混合液加入试纸样品孔 7 处,样品中的液体依靠虹吸作用上行,10-15 分钟可判读结果。

[0041] 本发明涉及上述方法制备的检测马脑炎病毒抗体的免疫层析试纸。

[0042] 本发明中使用免疫层析测试条耗材,耗材例如是玻璃纤维的结合垫,硝酸纤维素膜(例如 NC 膜,SHF 1350225),样品垫及吸水垫、滤纸,可购自 Millipore 公司。

[0043] 本发明涉及的上述检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸,它还包含金标抗体保护膜。

[0044] 本发明涉及的上述检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸,其中反应支持物选用 PVC 板。

[0045] 本发明涉及的上述检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸,其中吸水垫选用滤纸。

[0046] 本发明涉及的上述检测马脑炎病毒抗体的金标免疫层析试纸,其中金标抗体保护膜选用聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

[0047] 本发明方法可达到定量检测的目的,其采用的实验仪器例如是金标免疫分析仪,可得自中国检验检疫科学研究院。定量检测结果及判定:用金标免疫层析试纸条检测待检样品,反应后的试纸条依次经金标免疫分析仪扫描,记录对应反射光强,以光密度检测值 T、质控值 C 和 T/C 表示。

[0048] (1) 确定判定值(Cut-off)

利用 DJM-3 定量金标免疫分析仪检测 20 个阴性值,以 T/C 的比值计算确定判定值

(Cut-off), Cut-off= 均值 (Average)+3× 标准差 (Stdeva)。大于等于 Cut-off 为阳性。

[0049] (2) 拟合曲线建立

以待检目标物标准品几个不同浓度(包括阴性)为横坐标,以金标试纸条检测各浓度后用金标条分析仪测得的 T/C 比值为纵坐标,建立拟合曲线,并判定定量检测灵敏度。

[0050] (3) 定量检测

以待检样品经金标分析仪测得的 T/C 比值,代入拟合曲线,可计算出样品的浓度,从而得到样品的浓度,达到定量检测。

[0051] 一、金标免疫层析试纸条的制备

材料和方法

1、抗原及抗体

马脑炎病毒蛋白抗原、纯化的兔抗马脑炎病毒抗体由本研究室制备。

[0052] 2、免疫层析试纸条耗材

结合垫(玻璃纤维)、硝酸纤维素膜(NC膜,SHF 1350225)、样品垫及吸水垫、滤纸购自 Millipore 公司。

[0053] 3、金标免疫层析试纸条的制备

3.1 金标结合垫

将 pH 值 6.0-6.4、浓度 0.2mg/ml 的 SPA 或重组马脑炎病毒蛋白标记于柠檬酸钠法制备的 25nm 金标颗粒,37℃干燥。

[0054] 3.2 硝酸纤维素膜

检测带:重组马脑炎病毒蛋白 1 mg/ml;质控带:羊抗兔 IgG 或兔抗重组马脑炎病毒蛋白 IgG:1mg/ml, 37℃干燥。

[0055] 3.3 组装

将样品垫、结合垫、吸水垫依次贴在带有豁合剂的底衬卡,切成 0.4cm 的条,干燥,装壳,室温贮存备用。

[0056] 二、样品的检测

1、模拟样品的处理

采用人的血清样品进行检测,用样品处理液进行 100 倍稀释后作为待检样品;另外,把稀释后的人血清中加入兔抗马脑炎病毒抗体同时进行检测。

[0057] 2 样品检测

将处理后的样品和样品处理液(作为阴性样品)100 μl 加到制备好的层析条样品垫端,静置 15min,观察结果。检测带和质控带均出现红色判为阳性,仅质控带出现红色为阴性,检测带和质控带均不显色,则为试纸条失效。

[0058] 三、东方马脑炎病毒抗体灵敏度试验

1、直观检测灵敏度评价

按确定的最佳反应条件制备金标免疫层析试纸条,检测不同浓度的东部马脑炎病毒抗体。将东方马脑炎病毒抗体用样品处理液稀释成浓度依次为 15 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL、75 ng/mL、150 ng/mL、300 ng/mL、600 ng/mL、1200ng/mL, 同时进行检测。结果显示,直接目测的灵敏度 60 ng/mL。

[0059] 2、定量检测的灵敏度

检测不同浓度东部马脑炎病毒抗体,金标分析仪读值,经过计算判定值(Cut-off)为 0.012,浓度低于 60 ng/ml 的东方马脑炎病毒抗体的平均 T/C 比值为 0,0.006,低于 0.012,为阴性;60 ~ 1200ng/ml 的东方马脑炎病毒抗体的平均 T/C 比值分别为 0.067,0.079,0.111,0.221,1.32,1.331,均高于 0.012,为阳性;故定量检测灵敏度为 60ng/ml (表 1)。

[0060]

表 1 东方马脑炎病毒金标免疫层析试纸各浓度检测结果

东马病毒抗体浓度 (ng/mL)	检测值 T (V)	质控值 C (V)	T/C 值	结果
0	0	2.437	0	-
15	0.001	2.364	0	-
30	0.014	2.475	0.006	-
60	0.115	2.328	0.067	+
75	0.184	2.726	0.079	+
150	0.257	2.311	0.111	+
300	0.523	2.376	0.221	+
600	4.451	3.370	1.32	+
1200	4.392	3.298	1.331	+

3、样品实用性检测

将健康人血清用样品处理液 100 倍稀释后作为待检样品,把稀释后的健康人血清中加入不同浓度的东方马脑炎病毒抗体进行检测,结果显示,健康人血清为阴性,东方马脑炎病毒抗体的样品灵敏度为 60 ng/ml。

[0061] 四、西方马脑炎病毒抗体检测灵敏度试验

1、直观检测灵敏度评价

按确定的最佳反应条件制备胶体金免疫层析试纸条,检测不同浓度的西方马脑炎病毒抗体。将西方马脑炎病毒抗体用样品处理液稀释成浓度依次为 90 ng/mL、120 ng/mL、180ng/mL、300 ng/mL、450 ng/mL、600 ng/mL、900 ng/mL、1200 ng/mL,同时进行检测。

[0062] 结果显示,直接目测的灵敏度 120 ng/mL 显色更加清晰。

[0063] 2、定量检测的灵敏度

检测不同浓度西方马脑炎病毒抗体,经过计算判定值(Cut-off)为 0.011,浓度为 120ng/ml 的西方马脑炎病毒抗体的平均 T/C 比值分别为的值均高于 0.011 结果为阳性;当西方马脑炎病毒抗体浓度大于 120ng/ml 时,T/C 比值平均值大于 0.011,故定量检测灵敏度为 120ng/ml。

[0064]

表 2 西方马脑炎病毒抗体金标免疫层析试纸各浓度检测结果

西马病毒抗体浓度 (ng/mL)	T/C 值	结果
0	0	-
90	0.002	-
120	0.014	+
180	0.025	+
300	0.042	+
450	0.054	+
600	0.074	+
900	0.114	+
1200	0.139	+

3、标准曲线

以西马病毒抗体浓度为横坐标 (X), 金标分析仪读值 T/C 比值 (Y) 为纵坐标, 建立胶体金检测标准曲线。当西马病毒抗体浓度为 120 ~ 1200 ng/ml 时, 抗体的浓度与金标分析仪读值 T/C 比值之间呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $Y = 0.0001X + 0.0025$, R^2 为 0.9947。

[0065] 五、委内瑞拉马脑炎病毒抗体检测灵敏度试验

1、直观检测灵敏度评价

按确定的最佳反应条件制备胶体金免疫层析试纸条, 检测不同浓度的委内瑞拉马脑炎病毒抗体。将委马病毒 E2 兔血清用样品处理液稀释成浓度依次为 1/700、1/1000、1/3000、1/7000、1/10000、1/20000、和 1/30000 倍稀释液同时进行检测。

[0066] 结果显示, 直接目测的灵敏度 1/20000 显色更加清晰。

[0067] 六、特异性试验

1、东方马脑炎病毒抗体金标免疫层析试纸

以制备好的金标免疫层析试纸条检测委内瑞拉马脑炎病毒 E2-19AA 兔血清、委内瑞拉马脑炎病毒 E2 兔血清、西部马脑炎病毒 E1C 抗体、登革病毒 Deng-E-3 兔血清、甲型 H1N1 流感病毒抗体和西尼罗病毒 NS1 兔血清, 检测结果均未出现阳性反应, 说明与这些抗体、血清均无交叉反应, 检测 5 份兔血清、15 份鼠血清、51 份健康人血清, 结果均为阴性, 表明该检测方法特异性良好。

[0068] 2、委内瑞拉马脑炎病毒抗体金标免疫层析试纸

按确定的最佳反应条件制备金标免疫层析试纸条, 以样品稀释液分别处理制备好的胶体金免疫层析试纸条检测马秋波 GP2 病毒兔血清、东部马脑炎病毒 E1C 兔血清、西方马脑炎病毒 E1C 兔血清、登革病毒 E2 兔血清、甲型 H1N1 流感病毒抗体、西尼罗病毒 NS1 兔血清。检测结果均未出现阳性反应, 证明与这些抗体均无交叉反应, 该检测方法特异性良好。

[0069] 3、西方马脑炎病毒抗体金标免疫层析试纸

按确定的最佳反应条件制备金标免疫层析试纸条, 以样品稀释液检测的兔抗马秋波 GP2 蛋白、天花 M1R 蛋白、禽流感 NP 蛋白、登革病毒 Deng-E-D3 蛋白、普氏立克次体 120N 蛋白抗体、63 份健康鼠血清和 105 份健康人血清。以制备好的金标免疫层析试纸条检测, 并与同样浓度的西方马脑炎病毒抗体样品对照, 同时检测空白对照。结果表明, 对西方马脑炎病毒抗体特异性检测效果良好, 将 63 份健康鼠血清用样品处理液 1:10 稀释后检测, 结果有 6 份检出阳性, 假阳性率为 9.52%; 对 105 份健康人血清进行检测, 结果有 7 份检出阳性, 假阳性率为 6.67%。该检测试纸条对于这些抗体均无非特异现象出现。

[0070] 七、稳定性试验

将新制备的金标免疫层析试纸条于 37 °C 存放 2 周, 在室温下放置 4 周其特异性和敏感性与新制备的试纸条相比, 灵敏度没有明显下降, 且特异性良好。

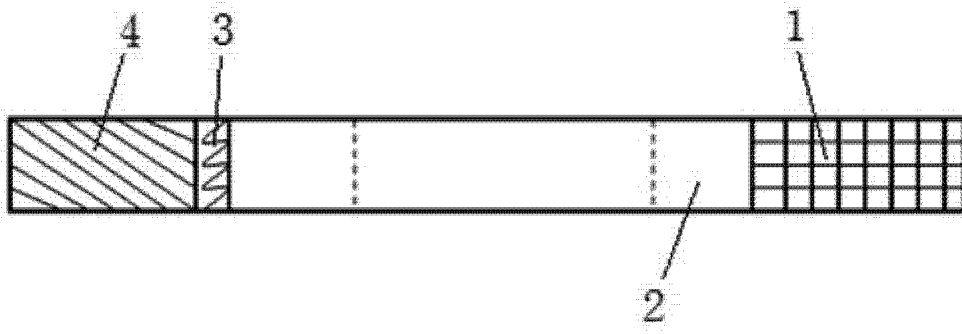


图 1

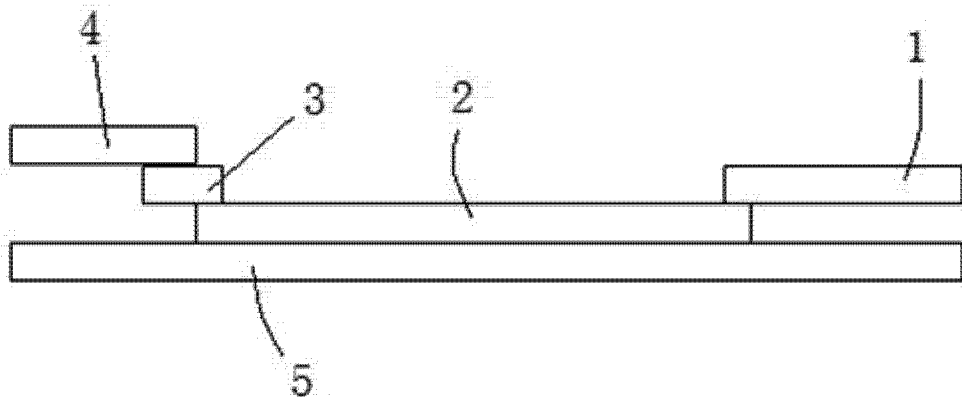


图 2

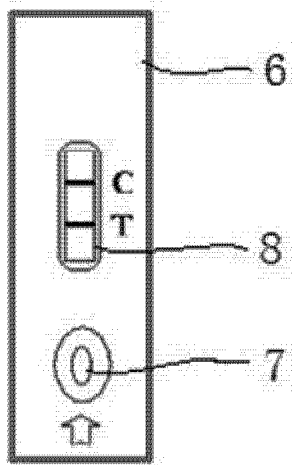


图 3

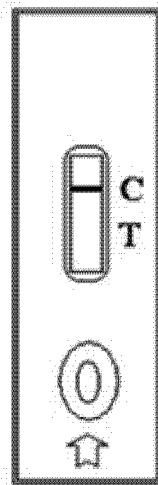


图 4

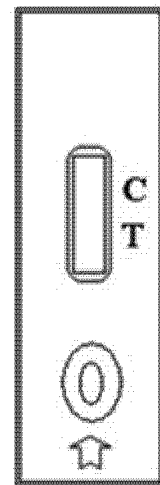


图 5

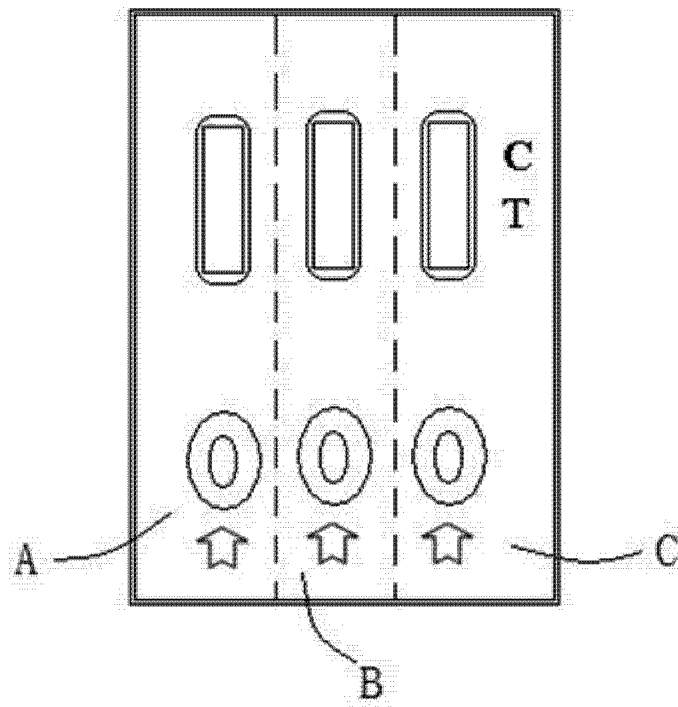


图 6

专利名称(译)	检测马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102445536A	公开(公告)日	2012-05-09
申请号	CN201110292092.1	申请日	2011-09-29
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	王静 孙时 杨宇 宋峰林 杨永莉 王旺		
发明人	王静 孙时 杨宇 宋峰林 杨永莉 王旺		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测马脑炎病毒抗体的金标免疫试纸条及其制备方法和应用，其可同时检测东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒抗体，及其可分别定量检测的金标免疫层析系统的制备方法和应用，包括金标免疫试纸条的制备、金标分析仪定量检测的应用。本发明结合了金标标记和免疫层析技术的原理，保证了检测方法的敏感性和特异性，具有操作简单，检测时间短，无需专业人员，适合快速现场筛检、并可达到定量检测目的等优点。

