

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103235131 A

(43) 申请公布日 2013.08.07

(21) 申请号 201310141809.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013.04.23

G01N 33/577(2006.01)

(66) 本国优先权数据

G01N 33/569(2006.01)

201310095209.6 2013.03.22 CN

G01N 33/531(2006.01)

(71) 申请人 深圳国际旅行卫生保健中心

地址 518033 广东省深圳市福田区皇岗口岸  
生活区口岸医院办公室

(72) 发明人 史蕾 马岚 顾大勇 吴峰

向军俭 徐云庆 赵纯中 冬冰  
何建安 徐华 刘春晓

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 关畅 任凤华

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法。本发明提供的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品,包括相互连接的样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间,其特征在于:所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体,所述检测线包被有黄热病毒包被抗体,所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体特异结合的第二抗体;所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体为将待标记黄热病毒抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。本发明的实验证明,用本发明提供的产品检测黄热病毒,灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。

1. 检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品,包括相互连接的样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间,其特征在于:所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体,所述检测线包被有黄热病毒包被抗体,所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体特异结合的第二抗体;

所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体为将待标记黄热病毒抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。

2. 根据权利要求1所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于:所述待标记黄热病毒抗体的亲和常数为 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$ 或 $10^7 \sim 10^8 M^{-1}$ ;所述黄热病毒包被抗体的亲和常数为 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$ 或 $10^7 \sim 10^8 M^{-1}$ ;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的平均直径为100nm、80-200nm或60-300nm;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的直径变异系数为15%、10%-20%或10%-30%;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度为40emu/g。

3. 根据权利要求1或2所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于:所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体按照包括如下步骤的方法制备:将所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记黄热病毒抗体以50:3的质量比进行反应得到以肽键共价结合形成的磁性纳米粒子与黄热病毒抗体的偶联物。

4. 根据权利要求3所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于:所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺进行活化;所述活化中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化所用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺的浓度分别为5mM和10mM;所述活化的温度为37°C,时间为0.5h。

5. 根据权利要求3或4所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于:所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中,所述将羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记黄热病毒抗体以50:3的质量比进行反应是在37°C在浓度为50mM pH为8.5的硼砂缓冲液中反应3.5小时。

6. 根据权利要求3、4或5所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于:所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中还包括将所述磁性纳米粒子与黄热病毒抗体的偶联物用BSA溶液封闭后得到所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的步骤,所述BSA溶液的浓度为5% (质量百分浓度),所述封闭的温度为37°C,时间为0.5h。

7. 根据权利要求1-6中任一所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于:所述侧向流免疫层析测定产品按照权利要求8-10中任一所述的方法制备。

8. 制备权利要求1-6中任一所述的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品的方法,包括:

I、分别制备权利要求1-6中任一所述的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品中所述样品垫和所述包被膜;

II、将步骤I得到的所述样品垫、所述包被膜和吸水垫相互连接,得到所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述包被膜的制作方法包括:将所述黄热病毒包被抗体以为2mg/ml的浓度包被于硝酸纤维素膜得到所述检测线,将权利要求1-6中

任一所述的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品中所述第二抗体以 1mg/ml 的浓度包被于所述硝酸纤维素膜上与所述检测线相互分离的区域,得到所述质控线,具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜即为所述包被膜。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于:所述样品垫的制作方法包括:将权利要求 1-6 中任一所述的磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体以 0.5mg/ml 的浓度包被于玻璃纤维素膜得到所述样品垫。

## 检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 侧向流免疫层析测定 (LFIA, Lateral flow immunoassay) 是 20 世纪末期出现的新型免疫检测方法, 具有简便快速的特点, 在多种病毒检测如 HIV、乙肝病毒以及激素检测方面有广泛应用。其通过结合免疫标记技术和膜层析技术, 在极短时间内, 无需特殊条件, 即可做出结果判断, 已经成为一种重要的便捷免疫检测方法。黄热病 (Yellow fever, YF) 是黄热病毒 (Yellow fever virus, YFV) 引起的急性虫媒传染病, 主要流行于非洲和南美洲, 是旧版国际卫生条例规定监控的三种检疫传染病之一, 新版国际卫生条例即《IHR (2005)》则将其纳入构成国际关注的突发公共卫生事件的疾病清单。该病经蚊媒传播, 人类对黄热病毒普遍敏感, 且不分年龄、性别和种族。该病一般为散发, 但如果媒介蚊虫大量繁殖, 可在人群中引起爆发流行, 危害极大。其临床表现轻重不一, 主要包括发热、剧烈头痛、黄疸、出血及蛋白尿等, 重症患者病死率高达 50% 以上。

[0003] 尽管目前我国尚无黄热病流行及病例报告, 但必须认识到伴随着全球经济一体化进程加快和我国对外交流日益频繁, 切不能忽视黄热病毒及其传播媒介传入国内的危险性。我国南方地区如福建、广东、广西、海南广泛存在可传播黄热病毒的埃及伊蚊, 且黄热病常与登革热和疟疾等蚊媒病共存, 临床上有时难以区别, 因此必须加强疾病监测。早期快速准确检测黄热病毒不仅对于及时控制患者病情提高治愈率有关键作用, 同时对于口岸卫生检疫机构及时甄别和隔离病人、严防疫情传入国内至关重要。

[0004] 目前国内外黄热病检测方法种类繁多。按检测靶标来主要可分为: 核酸分子检测、病毒分离鉴定、抗体检测以及抗原检测等四大类。但大部分由于需要较高的技术和条件以及检测速度相对较慢, 限制了在口岸检疫中的现场使用。为满足口岸卫生检疫需要, 研制灵敏可靠、结果便于保存及量化分析、操作简便快速的检测产品对于疫情监控和防范具有重要意义。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法。

[0006] 本发明所提供的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品, 包括相互连接的样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜, 所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间, 其特征在于: 所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体, 所述检测线包被有黄热病毒包被抗体, 所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体特异结合的第二抗体;

[0007] 所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体为将待标记黄热病毒抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。

[0008] 上述侧向流免疫层析测定产品中,所述检测线与所述样品垫的距离大于所述质控线与所述样品垫的距离。所述黄热病毒包被抗体可为黄热病毒单克隆抗体或黄热病毒多克隆抗体;所述待标记黄热病毒抗体可为黄热病毒单克隆抗体或黄热病毒多克隆抗体。

[0009] 上述侧向流免疫层析测定产品中,所述待标记黄热病毒抗体的亲和常数为  $10^8 M^{-1}$ 、 $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$  或  $10^7 \sim 10^8 M^{-1}$ ;所述黄热病毒包被抗体的亲和常数为  $10^8 M^{-1}$ 、 $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$  或  $10^7 \sim 10^8 M^{-1}$ ;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的平均直径为 100nm、80-200nm 或 60-300nm;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的直径变异系数(CV)可为 15%、10%-20% 或 10%-30%;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度可为 40emu/g。

[0010] 其中,所述待标记黄热病毒抗体的亲和常数具体可为  $10^8 M^{-1}$ ,所述黄热病毒包被抗体的亲和常数具体可为  $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$ ,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的平均直径可为 100nm,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的直径变异系数(CV)可为 15%,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度可为 40emu/g。

[0011] 所述羧基修饰的磁性纳米粒子具体可为羧基修饰的磁性  $Fe_3O_4$  纳米粒子。

[0012] 在本发明的一个实施例中,所述待标记黄热病毒抗体是购自 abcam 公司的编号为 ab22839 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体。该待标记黄热病毒抗体的亲和常数为  $10^8 M^{-1}$ 。所述黄热病毒包被抗体是购自 abcam 公司的编号为 ab36055 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体。所述黄热病毒包被抗体的亲和常数为  $10^8 M^{-1}$ 。所述磁性纳米粒子是购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 MP-2 的聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的磁性  $Fe_3O_4$  水溶性纳米晶,所述磁性纳米粒子为羧基修饰的磁性纳米粒子,所述羧基修饰的磁性纳米粒子平均直径为 100nm,直径变异系数(CV)为 15%,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度为 40emu/g。与所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体特异结合的第二抗体为羊抗鼠 IgG 抗体。

[0013] 本申请中,所述待标记黄热病毒抗体和所述黄热病毒包被抗体亲和常数均是指对黄热病毒的亲和常数。

[0014] 上述侧向流免疫层析测定产品中,所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体按照包括如下步骤的方法制备:将所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记黄热病毒抗体以 50 :3 的质量比进行反应得到以肽键共价结合形成的磁性纳米粒子与黄热病毒抗体的偶联物。

[0015] 所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羟基丁二酰亚胺进行活化;所述活化中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化所用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羟基丁二酰亚胺的浓度分别为 5mM 和 10mM;所述活化的温度为  $37^\circ C$ ,时间为 0.5h。

[0016] 在本发明的一个实施例中,按照如下方法对羧基修饰的磁性纳米粒子进行活化:将 2.5mg 的上述羧基修饰的磁性纳米粒子与 5mmol1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 10mmol NHS (N-羟基丁二酰亚胺)在 MES 缓冲液(0.1M、pH4.7)中在  $37^\circ C$  反应 0.5h,得到活化后羧基修饰的磁性纳米粒子。

[0017] 所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中,所述将羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记黄热病毒抗体以 50 :3 的质量比进行反应是在  $37^\circ C$  在浓度为 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液中反应 3.5 小时。所述 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液可按照如下方法配制:将 1.9g  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  溶于 100ml 水中,调 pH 至 8.5 得到 50mM pH 为 8.5 的硼砂

缓冲液。

[0018] 所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中还包括将所述磁性纳米粒子与黄热病毒抗体的偶联物用 BSA 溶液封闭后得到所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的步骤,所述 BSA 溶液的浓度为 5% (质量百分浓度),所述封闭的温度为 37℃,时间为 0.5h。

[0019] 所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备方法中,还包括将用 BSA 溶液封闭后得到的所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体用 0.02M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液进行洗涤和悬浮的步骤。

[0020] 所述检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品还可包括背板和 / 或保护膜,可以试纸、卡等形式存在。

[0021] 上述侧向流免疫层析测定产品可按照下述方法制备。

[0022] 本发明所提供的制备上述检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品的方法,包括:

[0023] I、分别制备上述检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品中所述样品垫和所述包被膜;

[0024] II、将步骤 I 得到的所述样品垫、所述包被膜和吸水垫相互连接,得到所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸。

[0025] 其中,所述包被膜的制作方法包括:将所述黄热病毒包被抗体以为 2mg/ml 的浓度包被于硝酸纤维素膜得到所述检测线,将所述检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品中所述第二抗体以 1mg/ml 的浓度包被于所述硝酸纤维素膜上与所述检测线相互分离的区域,得到所述质控线,具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜即为所述包被膜。

[0026] 上述包被膜的制作方法中,所述检测线和所述质控线的包被均是采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet Quanti3000 喷头将 2mg/ml 所述黄热病毒包被抗体溶液和 1mg/ml 所述第二抗体溶液喷涂至所述硝酸纤维素膜,完成所述检测线和所述质控线的包被。其中,2mg/ml 所述黄热病毒包被抗体溶液和 1mg/ml 所述第二抗体溶液的溶剂均可 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液。所述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液可按照如下方法配制:称取 2.3g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.524g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8.77g NaCl 溶于水,用水定容至 1L,调 pH 至 7.4,得到 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液。

[0027] 其中,所述样品垫的制作方法包括:将所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体以 0.5mg/ml 的浓度包被于玻璃纤维素膜得到所述样品垫。

[0028] 所述样品垫的制作方法中,所述玻璃纤维素膜在包被所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体前,进行如下预处理:将所述玻璃纤维素膜在膜处理缓冲液中在 37℃ 浸泡 1 小时,得到经过预处理的玻璃纤维素膜;所述膜处理缓冲液按照如下方法配制:将 Triton X-100、BSA、蔗糖溶于上述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液使 Triton X-100 的质量百分含量为 0.2%、BSA 的质量百分含量为 1%、蔗糖的质量百分含量为 1%,调 pH 至 7.4,得到膜处理缓冲液。所述将所述的磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体以 0.5mg/ml 的浓度包被于玻璃纤维素膜是将所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体用所述膜处理缓冲液配成所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体含量为 0.5mg/ml 的液体,将所述液体喷涂于将所述经过预处理的玻璃纤维素膜,经干燥后得到所述样品垫。其中,所述喷涂可采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet Quanti3000 喷头进行。

[0029] 本发明的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品可用于检测血清或血浆样品中是否含有黄热病毒。

[0030] 本发明的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品与磁性复合粒子标记的免疫层析检测技术相关,是采用磁性复合粒子作为标记材料,进行快速免疫层析测定的一类方法,该技术整合了磁性纳米材料化学合成、标记技术、测流免疫层析技术等相关领域的研究。本发明的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品基于侧流免疫层析的原理,加入待测样品后,样品中的黄热病毒与磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体结合后层析到检测线(T线)处,在T线处与喷涂的黄热病毒包被抗体形成包被抗体-抗原-磁标记抗体免疫复合物,多余的磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体则在质控线(C线)处与抗鼠 IgG 形成的磁标免疫复合物。用磁性试纸判读仪测定 T 线处磁性微球的磁强强度,通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果,C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0031] 本发明的实验证明,通过对磁性复合粒子、黄热病毒和黄热病毒抗体分子特性的研究,通过选择适合的磁性复合粒子与特异性的抗体进行定向共价化学偶联,获得功能性的磁性标记探针,并通过优化双抗体夹心免疫反应的各种条件,制备得到本发明的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸,实现了对黄热病毒的快速和高灵敏测定,具有如下优点:灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。本发明的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸对黄热病毒的灵敏度达 10U/ml。

#### 附图说明

[0032] 图 1 为检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸结构示意图。

[0033] 图 2 为磁性复合粒子电镜图。

[0034] 图 3 为检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸检测值与浓度标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0035] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0036] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0037] 下述实施例中所用的磁性纳米粒子是购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 MP-2 的聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  水溶性纳米晶(图 2),其核心为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒,固含量为 30mg/ml,为羧基修饰的磁性纳米粒子,该羧基修饰的磁性纳米粒子平均直径为 100nm,直径变异系数(CV)为 15%;该羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度为 40emu/g。

[0038] 下述实施例中所用的待标记黄热病毒抗体是购自 abcam 公司的编号为 ab22839 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体。该待标记黄热病毒抗体对黄热病毒的亲和常数为  $10^8\text{M}^{-1}$ 。

[0039] 下述实施例中的黄热病毒包被抗体是购自 abcam 公司的编号为 ab36055 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体。该黄热病毒包被抗体对黄热病毒的亲和常数为  $10^8\text{M}^{-1}$ 。

[0040] 下述实施例中用于制作样品垫的玻璃纤维素膜购自 Whatman 公司、商品目录号为 Standard17。

[0041] 下述实施例中用于制作包被膜的硝酸纤维素膜购自 Whatman 公司、商品目录号为

Immunopore® FP。

[0042] 下述实施例中的 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液按照如下方法配制：称取 2.3gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.524g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、8.77g NaCl 溶于纯水，用纯水定容至 1L，调 pH 至 7.4，得到 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液。

[0043] 下述实施例中的膜处理缓冲液按照如下方法配制：将 Triton X-100、BSA、蔗糖溶于上述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液使 Triton X-100 的质量百分含量为 0.2%、BSA 的质量百分含量为 1%、蔗糖的质量百分含量为 1%，调 pH 至 7.4，得到膜处理缓冲液。

[0044] 下述实施例中的 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液按照如下方法配制：称取 1.9gNa<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 溶于 100ml 纯水，调 pH 至 8.5 得到 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液。

[0045] 本发明的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品的制备方法包括以下步骤：

[0046] (一) 羧基修饰的磁性纳米粒子标记探针的制备

[0047] 采用适合的羧基修饰的磁性纳米粒子，活化其表面的羧基后，采用化学偶联的方式将黄热病毒抗体定向连接到该羧基修饰的磁性纳米粒子表面。

[0048] (二) 测试区 T 线和 C 线处抗原 / 抗体的包被

[0049] 采用喷膜仪器，于测试区的 T 线处喷涂黄热病毒包被抗体，于 C 线处喷涂抗鼠 IgG 抗体。

[0050] (三) 样品垫处标记探针的包被

[0051] 采用喷涂仪器，于样品垫特定位置处喷涂磁性微球标记的抗黄热病毒抗体(磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体)。

[0052] (四) 反应板的组装成型

[0053] 按照反应板的结构图(见图 1) 要求，于塑料支撑背板中间粘贴作为测试区的硝酸纤维素(NC)膜，于 NC 膜的 T 线端粘贴样品垫，C 线端粘贴吸水垫。在其上面粘贴透明保护膜。采用试纸分切机，将整块反应板分切为一定宽带的纸条，用装有干燥剂的专门的铝箔袋进行包装。

[0054] (五) 抗原 - 抗体磁标免疫复合物的形成

[0055] 于上述组装成型的反应板的加样孔处加入待测样品，样品中的黄热病毒与磁标记的黄热病毒抗体(磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体)结合后层析到 T 线处喷涂的黄热病毒包被抗体，在 T 线处形成包被抗体 - 抗原 - 磁标记抗体免疫复合物，多余的磁标黄热病毒抗体(磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体)则在 C 线处与抗鼠 IgG 形成的磁标免疫复合物。

[0056] (六) 磁标免疫复合物磁场强度检测

[0057] 用磁性试纸判读仪测定 T 线处磁性微球的磁场强度，通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果，C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0058] 所述的磁标免疫复合物的磁场强度，是指在 T 线和 C 线处分别滞留的结合磁珠的数量用美国 Quantum Dot 的磁共振检测仪 MAR 测定后所得到的数值。通过双抗体夹心免疫反应的条件，研究发现，经大量测定不同临床血清样本可确定出各不同正常样本的测定均值，以此作为临界值(cutoff) 来确定 T 线检测样本的阳性或阴性结果。C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0059] 实施例 1、检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的制备

[0060] (一) 磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体的制备

[0061] 以饱和磁化强度为 40emu/g、平均直径为 100nm、直径变异系数(CV)为 15%的聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  水溶性纳米晶(购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 MP-2)作为羧基修饰的磁性纳米粒子,以对黄热病毒亲和常数为  $10^8\text{M}^{-1}$  的抗黄热病毒的鼠单克隆抗体(购自 abcam 公司,编号为 ab22839)作为待标记黄热病毒抗体,按照下述方法制备磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体:

[0062] 取 2.5mg 的上述羧基修饰的磁性纳米粒子用 MES 缓冲液(0.1M、pH4.7)洗涤并用 0.4T 的磁架分离富集后,用 1ml MES 缓冲液(0.1M、pH4.7)重悬,加入 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)至终浓度为 5mM、加入 NHS (N-羟基丁二酰亚胺)至终浓度为 10mM,在 37°C,反应半小时得到活化后羧基修饰的磁性纳米粒子。

[0063] 用 50mM pH8.5 的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的磁性纳米粒子,取 0.15mg 上述待标记黄热病毒抗体和 2.5mg 上述活化后羧基修饰的磁性纳米粒子混合到 50mM pH8.5 的硼砂缓冲液中充分混匀。37°C 下反应 3.5 小时,让抗体和磁性粒子形成稳定的肽键共价结合得到磁性纳米粒子与黄热病毒抗体的偶联物。反应结束后,加入终浓度为 5% (质量百分含量)的 BSA 溶液对磁性纳米粒子与黄热病毒抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,反应在 37°C 下进行 0.5 小时。完成后,用 pH7.4 的 0.02M PBS 缓冲液洗涤、重悬得到 25mg/ml 磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体液体,4°C 保存待用。

[0064] (二)检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的制备

[0065] 以对黄热病毒亲和常数为  $10^8\text{M}^{-1}$  的 abcam 公司的编号为 ab36055 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体,作为黄热病毒包被抗体,以羊抗鼠 IgG 抗体作为与上述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体特异结合的第二抗体制备包被膜,具体方法如下:

[0066] 采用 pH7.4 的 0.02M PBS 缓冲液,将羊抗鼠 IgG 抗体(长沙博优生物科技有限公司,ABGAM-0500)配制为浓度 1mg/ml 溶液,将黄热病毒包被抗体(abcam 公司,ab36055)的浓度配制为浓度 2mg/ml 溶液,选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet Quanti3000 喷头将羊抗鼠 IgG 抗体喷至硝酸纤维素膜(NC 膜)的质控线(Control Line, C 线)位置,将黄热病毒包被抗体喷至检测线(Test Line, T 线)位置,于相对湿度为 10% 以下的干燥车间进行抽湿 4 小时后干燥待用,得到具有检测线和质控线的包被膜。

[0067] 用上述膜处理缓冲液浸泡玻璃纤维纸 1 小时,浸泡的温度为 37°C,于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后,用上述膜处理缓冲液稀释步骤(一)磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体液体至磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体含量为 0.5mg/ml 后,采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet Quanti3000 喷头将其喷涂至上述处理过的玻璃纤维素膜上制备形成样品垫,于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的具有检测线和质控线的包被膜、上述样品垫、吸水纸(作为吸水垫)、背板和保护膜按图 1 所示进行搭配组装后,采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 5mm/ 条的宽度,得到检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸,装入检测用夹片待用。该试纸的结构示意图如图 1 所示。

[0068] 实施例 2、检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度检测

[0069] 以黄热病毒减毒活疫苗作为待测样品来测定实施例 1 的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度。

[0070] 将法国 SANOFI PASTEUR 公司黄热病毒减毒活疫苗用生理盐水配制成系列

浓度(0、5、10、25、50、100U/ml)的稀释液,分别加入由实施例1得到的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸中,并采用磁共振检测仪 MAR (Magna BioSciences, 8094-101-01&8094-101-02)读取 RMU (相对磁场强度)。检测步骤:检测前先将待检测样品恢复室温(25℃),用精确移液器取待检测样品 50  $\mu$  l 垂直缓慢滴入实施例1得到的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的样品垫,然后滴入 100  $\mu$  l 上述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液,20 分钟后用 MAR 进行测试。该黄热病毒减毒活疫苗中,U 的定义为国际单位。

[0071] 其检测结果如下表 1 所示。从检测结果中可以得出实施例 1 的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度为 10U/ml (cut-off 值 RMU 大于 30 为阳性值)。

[0072] 黄热病毒磁性试纸检测值与浓度曲线图如图 3 所示。

[0073] 表 1、黄热病毒减毒活疫苗不同浓度稀释液的磁性试纸检测值

[0074]

| 黄热病毒减毒活疫苗稀释液浓度 (U/ml) |      | 0 | 5   | 10   | 25    | 50    | 100    |
|-----------------------|------|---|-----|------|-------|-------|--------|
| 检测值 (RMU)             | 测试 1 | 0 | 7.1 | 37.4 | 85.6  | 152.7 | 331    |
|                       | 测试 2 | 0 | 8.7 | 35.2 | 90.3  | 146.7 | 318.9  |
|                       | 平均值  | 0 | 7.9 | 36.3 | 87.95 | 149.7 | 324.95 |

[0075] 实施例 3、检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的特异性检测

[0076] 选择登革病毒减毒活疫苗(由中国疾病预防控制中心提供)、乙型脑炎病毒减毒活疫苗(武汉生物制品研究所有限责任公司)作为交叉反应检测样品,由实施例 1 得到的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸进行检测均无交叉反应。具体方法和结果如下:将登革病毒减毒活疫苗、乙型脑炎病毒减毒活疫苗生理盐水溶解,分别加入由实施例 1 得到的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸中,并采用磁共振检测仪 MAR 读取 RMU。

[0077] 表 2、特异性检测结果

[0078]

| 样品          | 检测值(RMU) |
|-------------|----------|
| 登革病毒减毒活疫苗   | 0        |
| 乙型脑炎病毒减毒活疫苗 | 0        |

[0079]

[0080] 对比例、采用不同的磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体和黄热病毒包被抗体制备检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的检测效果

[0081] 按照实施例 1 的方法制备 20 种检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸,每种检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的制备方法中除黄热病毒包被抗体和待标记黄热病毒抗体如表 3 外,其它材料与制备方法与实施例 1 完全相同。将法国 SANOFIPASTEUR 公司黄热病毒减毒活疫苗用生理盐水配制成系列浓度(0、5、10、25、50、100U/ml)的稀释液,分别加入该 20 种检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸中,按照实施例 2 的方法进行检测。结果如表 3 所示,表明以 abcam 公司的编号为 ab22839 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体为待标记黄热病毒抗体,以 abcam 公司的编号为 ab36055 抗黄热病毒的鼠单克隆抗体为黄热病毒

包被抗体制备的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度最高,达 10U/ml。表 3 中,阳性样品是指 100U/ml 黄热病毒减毒活疫苗,表 3 中的所有抗体都购自 abcam 公司。

[0082] 表 3、20 种检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸检测黄热病减毒活疫苗的效果

[0083]

[0084]

| 检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定试纸编号 | 黄热病毒包被抗体 | 待标记黄热病毒抗体 | 结果                     |
|----------------------|----------|-----------|------------------------|
| 1                    | ab22839  | Ab-OG5    | 阳性样品无法测出               |
| 2                    | ab22839  | Ab-0510   | 阳性样品无法测出               |
| 3                    | ab22839  | ab36055   | 阳性样品无法测出               |
| 4                    | ab22839  | 兔抗黄热病血清   | 阳性样品无法测出               |
| 5                    | Ab-OG5   | ab22839   | 阳性样品无法测出               |
| 6                    | Ab-OG5   | Ab-0510   | 阳性样品无法测出               |
| 7                    | Ab-OG5   | ab36055   | 阳性样品无法测出               |
| 8                    | Ab-OG5   | 兔抗黄热病血清   | 阳性样品无法测出               |
| 9                    | Ab-0510  | Ab-OG5    | 阳性样品无法测出               |
| 10                   | Ab-0510  | ab22839   | 阳性样品无法测出               |
| 11                   | Ab-0510  | ab36055   | 阳性样品无法测出               |
| 12                   | Ab-0510  | 兔抗黄热病血清   | 阳性样品无法测出               |
| 13                   | ab36055  | Ab-OG5    | 阳性样品能检测出, 敏度为 100U/ml  |
| 14                   | ab36055  | ab22839   | 阳性样品能检测出, 灵敏度为 10U/ml  |
| 15                   | ab36055  | Ab-0510   | 阳性样品能检测出, 灵敏度为 100U/ml |
| 16                   | ab36055  | 兔抗黄热病血清   | 阳性样品无法测出               |
| 17                   | 兔抗黄热病血清  | Ab-OG5    | 阳性样品无法测出               |
| 18                   | 兔抗黄热病血清  | ab22839   | 阳性样品无法测出               |
| 19                   | 兔抗黄热病血清  | Ab-0510   | 阳性样品无法测出               |
| 20                   | 兔抗黄热病血清  | ab36055   | 阳性样品无法测出               |

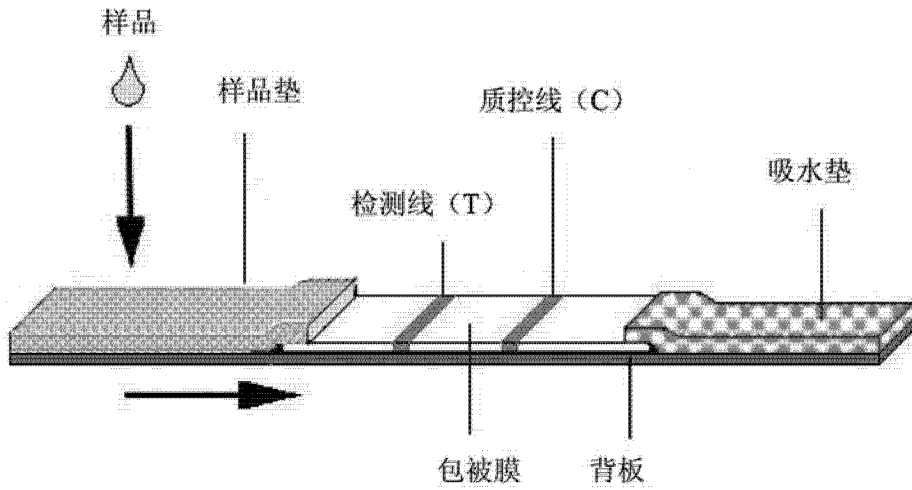


图 1

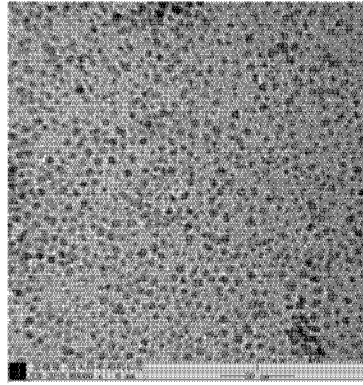


图 2

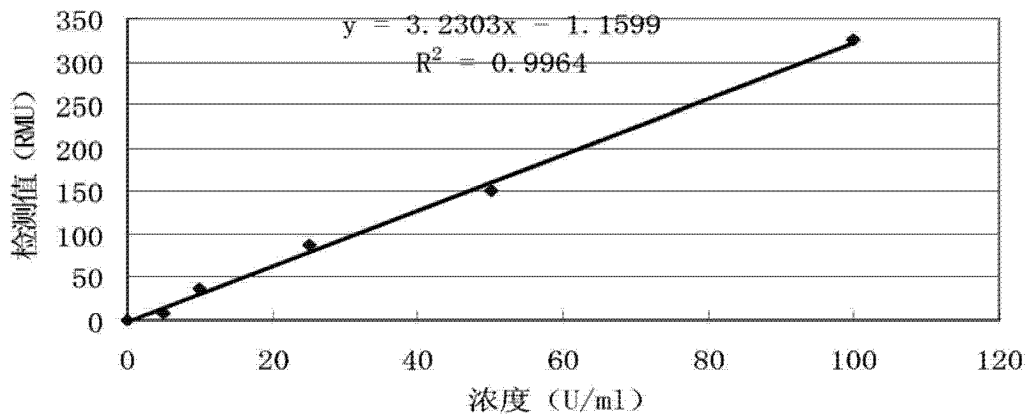


图 3

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN103235131A</a>   | 公开(公告)日 | 2013-08-07 |
| 申请号            | CN201310141809.1   | 申请日     | 2013-04-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳国际旅行卫生保健中心   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 深圳国际旅行卫生保健中心   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 深圳国际旅行卫生保健中心   |         |            |
| [标]发明人         | 史蕾<br>马岚<br>顾大勇<br>吴峰<br>向军俭<br>徐云庆<br>赵纯中<br>冬冰<br>何建安<br>徐华<br>刘春晓 |         |            |
| 发明人            | 史蕾<br>马岚<br>顾大勇<br>吴峰<br>向军俭<br>徐云庆<br>赵纯中<br>冬冰<br>何建安<br>徐华<br>刘春晓 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531                                     |         |            |
| CPC分类号         | Y02A50/60  |         |            |
| 代理人(译)         | 关畅   |         |            |
| 优先权            | 201310095209.6 2013-03-22 CN   |         |            |
| 其他公开文献         | CN103235131B   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                       |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品及其制备方法。本发明提供的检测黄热病毒的侧向流免疫层析测定产品，包括相互连接的样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜，所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间，其特征在于：所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体，所述检测线包被有黄热病毒包被抗体，所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体特异结合的第二抗体；所述磁性纳米粒子标记黄热病毒抗体为将待标记黄热病毒抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。本发明的实验证明，用本发明提供的产品检测黄热病毒，灵敏度高、特异性强、快速、简便，可实现客观化测定。

| 黄热病毒减毒活疫苗稀释液浓度 (U/ml) |      | 0 | 5   | 10   | 25    | 50    | 100    |
|-----------------------|------|---|-----|------|-------|-------|--------|
| 检测值 (RMU)             | 测试 1 | 0 | 7.1 | 37.4 | 85.6  | 152.7 | 331    |
|                       | 测试 2 | 0 | 8.7 | 35.2 | 90.3  | 146.7 | 318.9  |
|                       | 平均值  | 0 | 7.9 | 36.3 | 87.95 | 149.7 | 324.95 |