



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105424933 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201610048897. 4

G01N 33/531(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 01. 26

(71) 申请人 姜竹泉

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
103 号甲 12 四楼

申请人 徐慰倬

(72) 发明人 徐慰倬 宋明 姜竹泉

(74) 专利代理机构 沈阳智龙专利事务所(普通
合伙) 21115

代理人 宋铁军

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

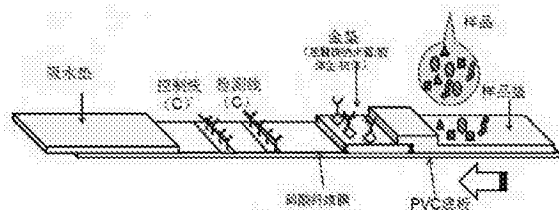
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明是一种检测肺炎支原体抗原的胶体金免疫层析试纸条,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫及 PVC 底板,所述样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素包被膜及所述吸水垫依次搭接在所述 PVC 底板上,所述结合垫包被设有肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金- 碳纳米管标记物;所述硝酸纤维素包被膜上设有检测线和质控线,所述检测线包被肺炎支原体抗体 MPh1,所述质控线包被有羊抗鼠 IgG;本发明同时包括上述胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括胶体金的制备、金标抗体的制备及纯化及试纸条的组装步骤。本发明的胶体金免疫层析试纸条具有特异性强、灵敏度高、操作简便,检测快速、准确并适合现场使用的特点。



1. 一种检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条,该试纸条包括依次搭接在 PVC 底板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫,其特征在于:所述结合垫包被设有肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金-碳纳米管标记物;所述硝酸纤维素包被膜上设有检测线和质控线;所述检测线包被有肺炎支原体抗体 MPh1,所述质控线包被有羊抗鼠 IgG。

2. 一种如权利要求 1 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:该制备方法包括以下步骤:

1) 胶体金的制备:于 250mL 烧杯中加入 99mL 纯水,于恒温磁力搅拌器上使用温度档 200℃ 对其进行加热,转速为 200r/min;加热至沸腾状态后,沸腾时的实际温度为 100℃,向烧杯中快速加入 1mL 1% 柠檬酸三钠溶液;1 分钟后快速加入 1% 氯金酸溶液 1mL,烧杯中的溶液变为红色后再加热 10min,直至溶液透亮,冷却至室温,100ml 容量瓶定容,即制得胶体金,于 4℃ 密封保存;

2) 肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金-碳纳米管标记物的制备及纯化:

取调节 pH 值至 8.5 的所述胶体金 1mL 于 10.0mL 烧杯中,向烧杯中加入 10 μg 的肺炎支原体抗体 MP-h2,盖上薄膜密封,用磁力搅拌器混匀 20min 后静置 10min;

向所述烧杯中加入 100 μL 5% BSA 溶液,用磁力搅拌器混匀 20min,静置 10min,制得金标抗体;

继续加入 5 μL 10% 碳纳米管,继续混匀 10min,即肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金-碳纳米管复合标记物;

将制得的复合标记物溶液于 4℃ 2500r/min,离心 10min,去除下层沉淀,将上清液转到另一离心管中,于 4℃ 9500r/min,离心 30min,去除上清液,将沉淀用胶体金稀释溶液,稀释至原浓度的 1/20,于 4℃ 保存备用;

3) 试纸条的组装:

(1) 将硝酸纤维素包被膜和吸水垫分别贴于 PVC 底板上,吸水垫压住硝酸纤维素包被膜上方 1-2mm;

(2) 将粘贴好硝酸纤维素包被膜和吸水垫的 PVC 底板在切条机上切割成 4mm 宽的试纸条;

(3) 将样品垫和结合垫切成 4mm 宽的条,同时将结合垫浸泡在肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金-碳纳米管标记物溶液中,并于 37℃ 烘干,制得金标垫;

(4) 烘干后的金标垫剪成 1cm 长的小块并贴于 PVC 底板上,金标垫压住硝酸纤维素包被膜下方 1-2mm,同时用样品垫压住金标垫下方 1-2mm,根据试纸条长度修剪样品垫;

(5) 在结合垫和吸收垫之间的硝酸纤维素包被膜上依次包被肺炎支原体抗体 MP-h1 抗体和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和控制线,采用金标划膜仪进行包被划线,具体参数为平台移动速度 40mm/s,单位喷量:检测线为 0.8 μL/cm,质控线为 1.0 μL/cm,使得肺炎支原体抗体 MP-h1 包被浓度为 1.0mg/mL;羊抗鼠 IgG 包被浓度为 1.0mg/mL。

3. 根据权利要求 2 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述胶体金的检验标准为通过紫外分光光度计测量最大吸收波长为 525nm。

4. 根据权利要求 2 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:在所述试纸条的组装步骤中的(3)中,还包括对样品垫和金标垫进行前处理的步骤,即将样品垫与结合垫用切条机分别切成 4mm 宽的长条,用含有 5% 的蔗糖、5% BSA 和

终体积浓度为 0.1% 的 pH 为 8.5 的 0.01mol/L 的 PBS 溶液进行浸泡,浸泡后将溶液沥干,在 37℃ 条件下烘干 12h 备用。

5. 根据权利要求 2 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:该制备方法还包括对容器的清洗,具体为:首先将试验所用容器在重铬酸钾洗液中浸泡 24h,取出后用自来水进行若干次清洗,再用超纯水清洗 3 次;将清洗干净的容器于二氯甲硅烷含量为 5% 的氯仿中浸泡 1min 后进行硅化处理;将经过硅化处理过的容器放置于室温条件下干燥,待干燥完成后用超纯水清洗干净并于烘箱中 37℃ 进行干燥处理,备用。

检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肺炎支原体感染患者病原体检测的技术领域,尤其涉及一种检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)是全球各年龄段人类呼吸道感染的常见病原体。它是支原体中唯一可导致呼吸道感染的病原体,引起上呼吸道感染、气管炎、支气管炎、细支气管炎、社区获得性肺炎,并可加重支气管哮喘。MP 还可引起诸多肺外表现及全身性疾患,例如脑炎、格林巴利综合征、心包炎、关节炎、自身免疫性贫血、肾功能损害、哮喘和 Crohn's 病等。快速准确的判断患者是否感染了肺炎支原体,对进一步判断患者的病情和对症治疗具有极其重要的意义。

[0003] 目前临床上肺炎支原体的检查常用方法为分离培养法、PCR 检测法、ELISA 检测法、免疫层析法等。这些检测方法灵敏度高,检测结果可靠,常作为临床确诊辅助手段,但设备昂贵,样品前处理过程复杂,对操作人员要求高,耗时较长,不适合批量样品的快速检测。胶体金免疫层析技术是一种新型的免疫标记技术,是在免疫层析的基础上建立起来的,以胶体金为示踪物与抗原、抗体特异性反应相结合的一种检测技术。目前广泛应用 ELISA 检测法和免疫层析法全部是检测 IgG 或 IgM,由于人体产生抗体需要一定条件和时间,均具有一定的滞后性和不准确性,无法实现快速、准确检测的目的。检测结果不能满足临床诊断的需要。该检测方法结果判读简单,不需要专业的操作人员,检测时间短,携带方便,特别适合大批量、快速、床旁检查诊断。

发明内容

[0004] 发明目的:本发明的目的在于提供一种特异性强、操作简便,检测快速、准确并适合床旁使用的专门用于检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法,以便对肺炎支原体感染患者病原体进行高灵敏度、快速、早期的检测。

[0005] 技术方案:

为实现上述目的,本发明的技术方案是:

检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条,该试纸条包括依次搭接在 PVC 底板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫,其特征在于:所述结合垫包被设有肺炎支原体抗体 MPh2-胶体金-碳纳米管标记物;所述硝酸纤维素包被膜上设有检测线和质控线;所述检测线包被有肺炎支原体抗体 MPh1,所述质控线包被有羊抗鼠 IgG。

[0006] 检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:该制备方法包括以下步骤:

1) 胶体金的制备:于 250mL 烧杯中加入 99mL 纯水,于恒温磁力搅拌器上使用温度档 200℃对其进行加热,转速为 200r/min;加热至沸腾状态后,沸腾时的实际温度为 100℃,向烧杯中快速加入 1mL 1%柠檬酸三钠溶液;1 分钟后快速加入 1%氯金酸溶液 1mL,烧杯中的

溶液变为红色后再加热 10min,直至溶液透亮,冷却至室温,100ml 容量瓶定容,即制得胶体金,于 4℃密封保存;

2) 肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金 - 碳纳米管标记物的制备及纯化:

取调节 pH 值至 8.5 的所述胶体金 1mL 于 10.0mL 烧杯中,向烧杯中加入 10 μg 的肺炎支原体抗体 MP-h2,盖上薄膜密封,用磁力搅拌器混匀 20min 后静置 10min;

向所述烧杯中加入 100 μL 5% BSA 溶液,用磁力搅拌器混匀 20min,静置 10min,制得金标抗体;

继续加入 5 μL 10% 碳纳米管,继续混匀 10min,即肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金 - 碳纳米管复合标记物;

将制得的复合标记物溶液于 4℃ 2500r/min,离心 10min,去除下层沉淀,将上清液转到另一离心管中,于 4℃ 9500r/min,离心 30min,去除上清液,将沉淀用胶体金稀释溶液稀释至原浓度的 1/20,于 4℃保存备用;

3) 试纸条的组装:

(1) 将硝酸纤维素包被膜和吸水垫分别贴于 PVC 底板上,吸水垫压住硝酸纤维素包被膜上方 1-2mm;

(2) 将粘贴好硝酸纤维素包被膜和吸水垫的 PVC 底板在切条机上切割成 4mm 宽的试纸条;

(3) 将样品垫和结合垫切成 4mm 宽的条,同时将结合垫浸泡在肺炎支原体抗体 MPh2- 胶体金 - 碳纳米管标记物溶液中,并于 37℃烘干,制得金标垫;

(4) 烘干后的金标垫剪成 1cm 长的小块并贴于 PVC 底板上,金标垫压住硝酸纤维素包被膜下方 1-2mm,同时用样品垫压住金标垫下方 1-2mm,根据试纸条长度修剪样品垫;

(5) 在结合垫和吸收垫之间的硝酸纤维素包被膜上依次包被肺炎支原体抗体 MP-h1 抗体和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和控制线,采用金标划膜仪进行包被划线,具体参数为平台移动速度 40mm/s,单位喷量:检测线为 0.8 μL/cm,质控线为 1.0 μL/cm,使得肺炎支原体抗体 MP-h1 包被浓度为 1.0mg/mL;羊抗鼠 IgG 包被浓度为 1.0mg/mL。

[0007] 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述胶体金的检验标准为通过紫外分光光度计测量最大吸收波长为 525nm。

[0008] 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:在所述试纸条的组装步骤中的(3)中,还包括对样品垫和金标垫进行前处理的步骤,即将样品垫与结合垫用切条机分别切成 4mm 宽的长条,用含有 5%的蔗糖、5% BSA 和终体积浓度为 0.1%的 pH 为 8.5 的 0.01mol/L 的 PBS 溶液进行浸泡,浸泡后将溶液沥干,在 37℃条件下烘干 12h 备用。

[0009] 所述的检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:该制备方法还包括对容器的清洗,具体为:首先将试验所用容器在重铬酸钾洗液中浸泡 24h,取出后用自来水进行若干次清洗,再用超纯水清洗 3 次;将清洗干净的容器于二氯甲烷含量为 5%的氯仿中浸泡 1min 后进行硅化处理;将经过硅化处理过的容器放置于室温条件下干燥,待干燥完成后用超纯水清洗干净并于烘箱中 37℃进行干燥处理,备用。

[0010] 优点及效果:

本发明具有特异性强,灵敏度高,检测时间短等优点;并且可以不受机体抗体产生因素

的影响,实现感染早期诊断。

[0011] 附图说明:

图 1、图 2 为本发明胶体金免疫层析试纸条的结构示意图;

图 3 为本发明实施例 4 性能评价肺炎支原体纸条灵敏度测试结果图;其中,从左到右添加的肺炎支原体培养液的浓度依次为 0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 ;

图 4 为本发明实施例 6 性能评价肺炎支原体试纸条稳定性测试结果图;其中,样品添加的浓度依次为 0 、 10^1 、 10^2 。

[0012] 具体实施方式:

本发明一种检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条,该试纸条包括依次搭接在 PVC 底板上的样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫,其特征在于:所述结合垫包被设有肺炎支原体抗体 MPh2-胶体金-碳纳米管标记物;所述硝酸纤维素包被膜上设有检测线和质控线;所述检测线包被有肺炎支原体抗体 MPh1,所述质控线包被有羊抗鼠 IgG。本发明中使用了碳纳米管,提高了检测灵敏度。

[0013] 本发明通过以下几个步骤的方法进行制备:

1)胶体金的制备:取 1 个 250mL 烧杯,于 250mL 三角烧瓶中加入 99mL 纯水,于恒温磁力搅拌器上使用温度档 200°C 对其进行加热,转速为 $200\text{r}/\text{min}$;加热至沸腾状态后,沸腾时的实际温度为 100°C ,向烧杯中快速加入 1mL 1%柠檬酸三钠溶液;1 分钟后快速加入 1%氯金酸溶液 1mL,烧杯中的溶液变为红色后再加热 10min,直至溶液透亮,冷却至室温,100ml 容量瓶定容,即制得胶体金,于 4°C 密封保存;胶体金的检验标准为通过紫外分光光度计测量最大吸收波长为 525nm。

[0014] 2)肺炎支原体抗体 MPh2-胶体金-碳纳米管标记物的制备及纯化:

取调节 pH 值至 8.5 的所述胶体金 1mL 于 10.0mL 烧杯中,向烧杯中加入 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的肺炎支原体抗体 MP-h2,盖上薄膜密封,用磁力搅拌器混匀 20min 后静置 10min;

向所述烧杯中加入 $100\mu\text{L}$ 5% BSA 溶液,用磁力搅拌器混匀 20min,静置 10min,制得金标抗体;

继续加入 $5\mu\text{L}$ 10% 碳纳米管,继续混匀 10min,即肺炎支原体抗体 MPh2-胶体金-碳纳米管复合标记物;

将制得的复合标记物溶液于 4°C $2500\text{r}/\text{min}$,离心 10min,去除下层沉淀,将上清液转到另一离心管中,于 4°C $9500\text{r}/\text{min}$,离心 30min,去除上清液,将沉淀用胶体金稀释溶液稀释至原体积的 $1/20$,于 4°C 保存备用;

3)试纸条的组装:

(1)将硝酸纤维素包被膜和吸水垫分别贴于 PVC 底板上,吸水垫压住硝酸纤维素包被膜上方 1-2mm;

(2)将粘贴好硝酸纤维素包被膜和吸水垫的 PVC 底板在切条机上切割成 4mm 宽的试纸条;

(3)将样品垫和结合垫切成 4mm 宽的条,同时将结合垫浸泡在肺炎支原体抗体 MPh2-胶体金-碳纳米管标记物溶液中,并于 37°C 烘干,制得金标垫;

(4)烘干后的金标垫剪成 1cm 长的小块并贴于 PVC 底板上,金标垫压住硝酸纤维素包被膜下方 1-2mm,同时用样品垫压住金标垫下方 1-2mm,根据试纸条长度修剪样品垫;

(5) 在结合垫和吸收垫之间的硝酸纤维素包被膜上依次包被肺炎支原体抗体 MP-h1 抗体和羊抗鼠 IgG, 分别作为检测线和控制线, 采用金标划膜仪进行包被划线, 具体参数为平台移动速度 40mm/s, 单位喷量: 检测线为 $0.8 \mu\text{L}/\text{cm}$, 质控线为 $1.0 \mu\text{L}/\text{cm}$, 使得肺炎支原体抗体 MP-h1 包被浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$; 羊抗鼠 IgG 包被浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0015] 在该制备方法中, 还包括对样品垫和金标垫进行前处理的步骤, 即将样品垫与结合垫用切条机分别切成 4mm 宽的长条, 用含有 5% 的蔗糖、5% BSA 和终体积浓度为 0.1% 的 pH 为 8.5 的 $0.01\text{mol}/\text{L}$ 的 PBS 溶液进行浸泡, 浸泡后将溶液沥干, 在 37°C 条件下烘干 12h 备用, 这项前处理步骤可以使样品垫与金标垫具有优异的吸水能力及释放能力, 进而大大提高了检测能力。

[0016] 该制备方法还包括对容器的清洗, 具体为: 首先将试验所用容器在重铬酸钾洗液中浸泡 24h, 取出后用自来水进行若干次清洗, 再用超纯水清洗 3 次; 将清洗干净的容器于二氯甲硅烷含量为 5% 的氯仿中浸泡 1min 后进行硅化处理; 将经过硅化处理过的容器放置于室温条件下干燥, 待干燥完成后用超纯水清洗干净并于烘箱中 37°C 进行干燥处理, 备用。对容器的清洗可以提高金标抗体的稳定性。

[0017] 通过实施例来对本发明进行说明:

实施例 1 如图 1 所示, 本发明揭示了一种检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条, 包括样品垫、结合垫(金垫)、硝酸纤维素包被膜、吸水垫及 PVC 底板, 所述样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素包被膜及所述吸水垫依次搭接在所述 PVC 底板上: 所述结合垫包被设有 MP-h1 抗体 - 胶体金 - 碳纳米管标记物; 所述硝酸纤维素包被膜上设有检测线和质控线, 所述检测线包被有 MP-h1 抗体, 所述质控线包被有羊抗鼠 IgG。

[0018] 实施例 2 一种检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

步骤一、取 1 个 250mL 烧杯, 于 250mL 三角烧瓶中加入 99mL 纯水, 于恒温磁力搅拌器上使用温度档 200°C 对其进行加热, 转速为 200r/min, 加热至沸腾状态后, 沸腾时的实际温度为 100°C , 向烧杯中快速加入 1mL 1% 柠檬酸三钠溶液。快速按下计时器, 1 分钟后快速加入 1% 氯金酸溶液 1mL。烧杯中的溶液变为红色后再加热 10min, 直至溶液透亮, 冷却至室温, 100 容量瓶定容, 通过紫外分光光度计测量最大吸收波长是否为 525nm, 作为检验标准。即制得胶体金 4 $^\circ\text{C}$, 密封保存;

步骤二、金标抗体的制备及纯化: 取调好 pH 为 8.5 的所述胶体金 1mL 于 10.0mL 烧杯中, 向烧杯中加入 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的肺炎支原体抗体 MP-h2, 盖上薄膜密封, 用磁力搅拌器混匀 20min 后静置 10min; 向烧杯中中加入 $100 \mu\text{L}$ 5% BSA 溶液, 用磁力搅拌器混匀 20min, 静置 10min, 制得金标抗体, 继续加入 $5 \mu\text{L}$ 10% 碳纳米管, 继续混匀 10min, 即肺炎支原体抗体 - 胶体金 - 碳纳米管复合标记物; 同时, 将制得的金标抗体溶液于 4°C 2500r/min, 离心 10min, 去除下层沉淀, 将上清液转到另一离心管中, 于 4°C 9500r/min, 离心 30min, 去除上清液, 将沉淀用胶体金稀释溶液稀释至原体积的 1/20, 于 4°C 保存备用;

步骤三、试纸条的组装: (1) 将硝酸纤维素包被膜, 即 NC 膜, 和吸水垫分别贴于 PVC 底板上, 吸水垫压住 NC 膜上方 1-2mm; (2) 将粘贴好 NC 膜和吸水垫的 PVC 底板在切条机上切割成 4mm 宽的试纸条; (3) 将样品垫和结合垫切成 4mm 宽的条, 同时将结合垫浸泡金标抗体溶液中, 并于 37°C 烘干, 制得金标垫; (4) 烘干后的金标垫剪成 1cm 长的小块并贴

于 PVC 底板上,金标垫压住 NC 膜下方 1-2mm,同时用样品垫压住金标垫下方 1-2mm,根据试纸条长度修剪样品垫;(5) 在结合垫和吸收垫之间的 NC 膜上依次包被肺炎支原体抗体 MP-h1 抗体和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和控制线,采用上海金标划膜仪进行包被划线,具体参数为平台移动速度 40mm/s,单位喷量:检测线为 0.8 $\mu\text{L}/\text{cm}$,质控线为 1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$,使得肺炎支原体抗体 MP-h1 包被浓度为 1.0mg/mL;羊抗鼠 IgG 包被浓度为 1.0mg/mL。

[0019] 实施例 3 样品垫和金标垫的预处理

包括对样品垫和金标垫进行前处理的步骤,即将样品垫与金标结合垫用切条机分别切成 4mm 宽的长条,用含有 5% 的蔗糖、5% BSA 和终体积浓度为 0.1% 的 pH 为 7.4 的 0.01mol/L 的 PBS 溶液进行浸泡,浸泡后将溶液沥干,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 12h 备用。

[0020] 实施例 4 对试验所用容器的清洗

首先将试验所用容器在浓硫酸重铬酸钾洗液中浸泡 24h,取出后用自来水进行若干次清洗,再用超纯水清洗 3 次;将清洗干净的容器于二氯甲硅烷含量为 5% 的氯仿中浸泡 1min 后进行硅化处理;将经过硅化处理过的容器放置于室温条件下干燥,待干燥完成后用超纯水清洗干净并于烘箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行干燥处理,备用。

[0021] 实施例 5 胶体金标记抗体时最佳蛋白标记量的确定

氯化钠破坏法:用 pH = 9.0、0.01mol/L PBS 将肺炎支原体 MP-h2 抗体稀释至 1mg/mL。将胶体金溶液调制最佳 pH,取若干个小离心管,每管准确量取 1mL 胶体金溶液,分别

加入 0、2、4、6、8、10、12、14 μL 1mg/mL 肺炎支原体 MP-h2 抗体,振荡混匀 5min,室温静置 10min;然后再加入 100 μL 10% NaCl 于每管胶体金中,混匀、并静置 2h,观察颜色变化及聚沉情况。最适抗体浓度在最低稳定量的基础上再加 20%。

[0022] 探索胶体金标记抗体蛋白的最佳标记量,各离心管中的溶液发生反应后颜色发生了变化,其中,1、2、3 号管抗体蛋白的加入量不能够稳定胶体金体系,加入氯化钠后,产生的盐离子效应,破坏了胶体金的平衡,使溶液出现了由红色变蓝色或紫色的不同程度的聚沉现象,4 号管溶液有轻微变色,说明加入氯化钠后对溶液的影响较小,5 号管加入的抗体量可以稳定胶体金体系,所以加入氯化钠后对溶液没有影响,即最低抗体标记量为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0023] 实施例 6 试纸条的性能评价

5.1 试纸条的灵敏度

用生理盐水将肺炎支原体培养液 ($10^7\text{CFU}/\text{mL}$) 稀释成不同浓度的样品溶液:0 (阴性空白样液生理盐水作对照)、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 ,并用试纸条进行检测,10min 后观察结果。

[0024] 从图 2 可以看出,当添加的样品为阴性空白对照时,试纸条的颜色指示呈阴性,且颜色指示很明显与理论相符合;当添加不同浓度的肺炎支原体培养液时,试纸条的理论检测结果应该是全部呈阳性,但在实际的检测结果中,试纸条的灵敏度并未达到理论的要求,在培养液的浓度为 10^3 时,出现浅颜色阳性条带, 10^2 阳性条带明显, 10^4 几乎没有阳性条带,说明试纸条未能检测到 10^4 以下浓度的肺炎支原体培养液。但随着浓度的依次递增,试纸条的检测线颜色指示越来越深。综合考虑,认为本试纸条检测灵敏度为 10^2 ($10^5\text{CFU}/\text{mL}$)。

[0025] 5.2 试纸条的特异性

一般用交叉反应率来表示特异性,反应抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能

力。在最佳实验环境条件下,分别检测几种临床上可引起肺炎的细菌,分别用生理盐水稀释各种细菌培养液,用空白生理盐水溶液作阴性对照。观察不同类似物在试纸条上的颜色显色指示情况。

[0026] 由表 1 可知,对于各种细菌样本检测中,只有肺炎支原体显示出阳性结果;而对于其他细菌培养物,试纸条的检测线都无显色,说明该金标抗体与肺炎支原体可特异性结合,与其它引起肺炎的细菌结合率很小。所以该试纸条对肺炎支原体具有很好的特异性。

[0027] 表 1 肺炎支原体胶体金试纸条特异性检测 5.3 试纸条的稳定性

细菌	细菌空白和稀释样本			
	空白	稀释 0 倍 (10^0)	稀释 10 倍 (10^{-1})	稀释 100 倍 (10^{-2})
肺炎支原体	-	+	+	+
肺炎双球菌	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-
链球菌	-	-	-	-
溶血链球菌	-	-	-	-

(+表示检测线有颜色, -表示检测线基本无颜色)

取相同批次的试纸条,将它们装入带有干燥剂的铝箔袋中密封好,于室温仓库中,放置 3 个月。然后放入 37℃ 温箱中放置 15 天。观察试纸条的检测线(T 线)、质控线(C 线)的显色情况。

[0028] 结果显示,经过放置后的试纸条依然可以呈现正确的检验结果(如图 3 所示)。

[0029] 5.4 试纸条的重复性

试纸条的研制有很多影响因素,相同条件下制备的不同批次的试纸条在显色效果上都会有细微的差别。在室温密封保存条件下(贮存的时间也相同),随机抽取不同批次和相同批次的试纸条,对试纸条的重复性进行测试,并观察试纸条的显色情况。

[0030] 由表 2 可得,选取不同批次的试纸条进行检测,空白阴性测试检测结果都呈阴性,且试纸条显色清晰、效果不错;在不同浓度的阳性样本检测中,试纸条的显色指示结果均呈阳性,且颜色显色指示明了。理论结果与实际检测结果一致,由此说明在室温密封保存条件下,试纸条重复性良好。

[0031] 表 2 肺炎支原体胶体金试纸条重复性检测

肺炎支原体培养液					
批次	显色	空白	稀释 0 倍	稀释 10 倍	稀释 100 倍
			(10 ⁰)	(10 ⁻¹)	(10 ⁻²)
1	T 线	-	+	+	+
	C 线	+	+	+	+
2	T 线	-	+	+	+
	C 线	+	+	+	+
3	T 线	-	+	+	+
	C 线	+	+	+	+

本领域的普通技术人员能从本发明公开内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

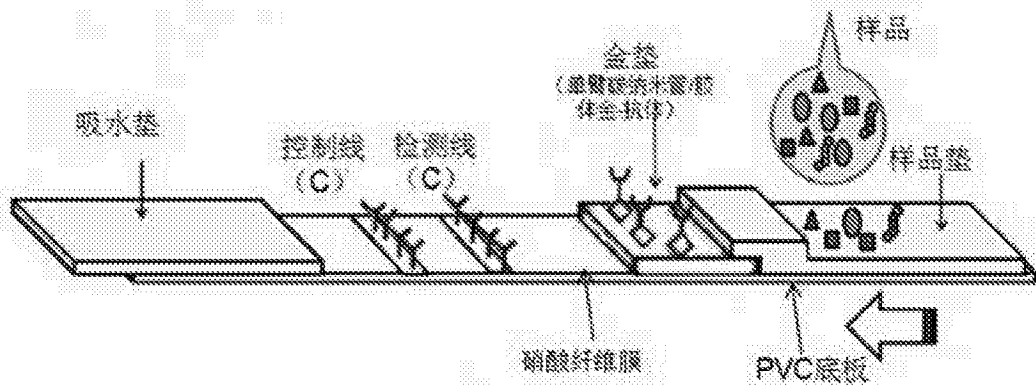


图 1

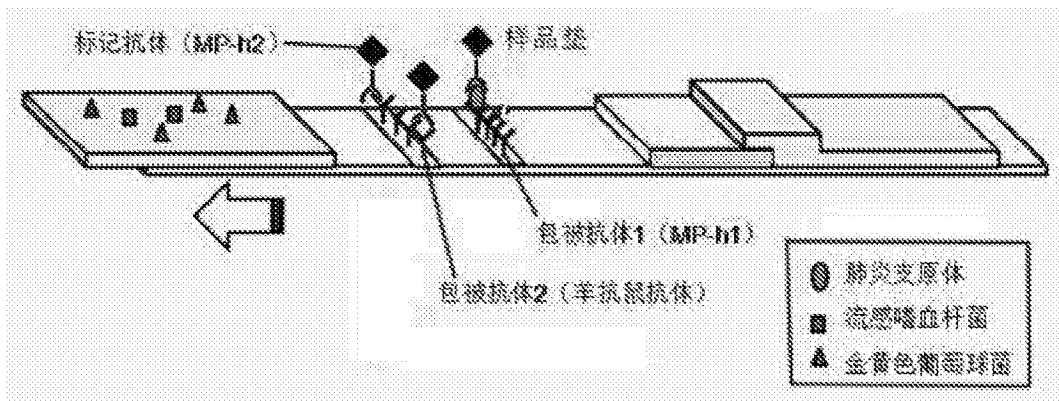


图 2

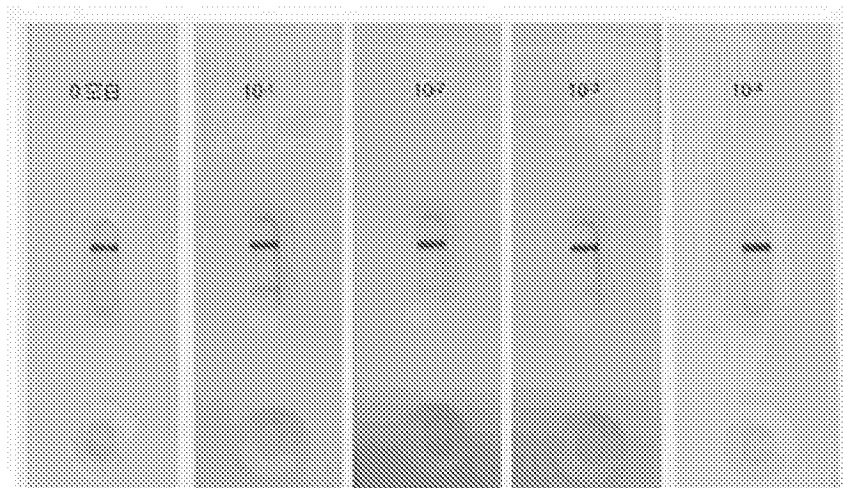


图 3

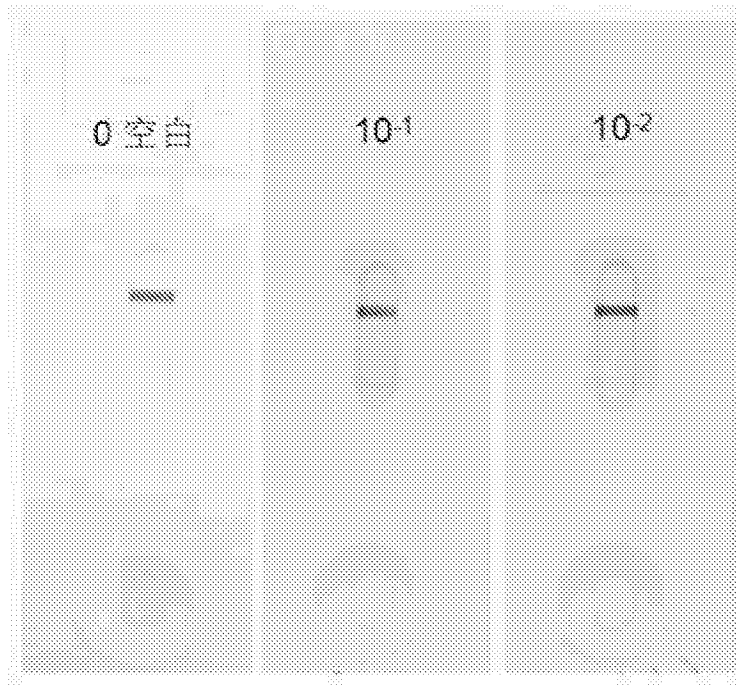


图 4

专利名称(译)	检测肺炎支原体的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN105424933A	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	CN201610048897.4	申请日	2016-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	姜竹泉 徐慰倬		
申请(专利权)人(译)	姜竹泉 徐慰倬		
当前申请(专利权)人(译)	姜竹泉 徐慰倬		
[标]发明人	徐慰倬 宋明 姜竹泉		
发明人	徐慰倬 宋明 姜竹泉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56933 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	宋铁军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种检测肺炎支原体抗原的胶体金免疫层析试纸条，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫及PVC底板，所述样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素包被膜及所述吸水垫依次搭接在所述PVC底板上，所述结合垫包被设有肺炎支原体抗体MPh2-胶体金-碳纳米管标记物；所述硝酸纤维素包被膜上设有检测线和质控线，所述检测线包被肺炎支原体抗体MPh1，所述质控线包被有羊抗鼠IgG；本发明同时包括上述胶体金免疫层析试纸条的制备方法，包括胶体金的制备、金标抗体的制备及纯化及试纸条的组装步骤。本发明的胶体金免疫层析试纸条具有特异性强、灵敏度高、操作简便，检测快速、准确并适合现场使用的特点。

