

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/543

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510057023.7

[43] 公开日 2005 年 11 月 23 日

[11] 公开号 CN 1700005A

[22] 申请日 2005.4.18

[21] 申请号 200510057023.7

[71] 申请人 重庆工学院

地址 400050 重庆市九龙坡区杨家坪兴胜路 4 号

[72] 发明人 蔡家利 姜 和 吴胜昔 王 健

权利要求书 3 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 禽流感免疫胶体金诊断试纸条和测试卡

[57] 摘要

本发明是一种快速检测禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 的新技术——胶体金免疫层析技术, 利用这种技术做成的快速诊断禽流感的试纸条和测试卡。本发明研制了禽流感病毒单克隆抗体 (Antibody 1, Ab 1) 和羊抗禽流感病毒多克隆抗体 (Antibody 2, Ab2) 以及兔抗 Balb/C 小鼠免疫球蛋白抗体 (Antibody 3, Ab3)。Ab1 标记胶体金作金标抗体, Ab2 作捕获抗体, Ab3 作质量控制抗体。利用抗体、硝酸纤维素膜 (NC 膜)、结合垫、样品垫、背衬、塑料卡等材料加工组装成试纸条和测试卡。这种试纸条和测试卡可以检测患病动物血液、粪便中的禽流感病毒。这种技术具有操作简单、快速、敏感和特异性好等特点。10 分钟左右出结果, 敏感性达 10ng/ml。可以用于人和动物禽流感的快速诊断。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1 一种快速检测禽流感病毒（AIV）的免疫胶体金层析诊断试剂条和测试卡，其特征是由经过处理的结合垫(1)、样品垫(2)、吸水垫(3)、背衬(4)、硝酸纤维素膜(5)、标识条(6)等组成试剂条；不含标识条纸的试剂条 5cm×0.5cm 放入一个特制的塑料卡中（7）组成测试卡。检测样品经过样品垫和结合垫再经层析作用在NC膜上出现捕获线和质控线（5），用肉眼判断结果。在NC膜上出现一条质控线为阴性，出现捕获线和质控线为阳性，不出现线条表示试纸条或测试卡失效。15分钟内出结果。

2 根据权利要求1所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡内容其特征（1）结合垫为玻璃纤维纸，由美国 Millipore 公司生产，用含聚乙烯醇（PVA）的硼酸缓冲液浸泡处理后，干燥，喷上胶体金标记的禽流感病毒(AIV)单克隆抗体，再干燥，AIV 单克隆抗体是针对所有禽流感病毒的抗原表位，结合垫上与样品垫衔接，下与NC膜衔接。

3 根据权利要求1所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡其内容特征（2）样品垫也为玻璃纤维纸，由 Millipore 公司生产，处理方式同结合垫，但缓冲液 pH 为 7.2，并且只浸泡和干燥处理，在试剂条和测试卡中起过滤样品的作用，位于结合垫上，贴在背衬上。

4 根据权利要求1所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡其内容特征（3）吸收垫为一种具有较好吸水能力的厚

滤纸，由 Millipore 公司生产的专用吸水纸和杭州滤纸厂生产的滤油纸，切成要求大小直接使用。贴在（4）背衬的末端，起吸水作用（层析作用）。

5 根据权利要求 1 所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡其内容特征（4）背衬是一个支撑样品垫、结合垫、NC 膜、吸收垫的胶版材料。背衬是用胶版上贴有不干胶纸，将不干胶纸切成试纸条需要的形状，撕下后可分别粘贴上结合垫、样品垫、NC 膜、吸水垫和标识纸等。

6 根据权利要求 1 所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡其内容特征（5）NC 膜，是一种专门用于胶体金试纸条的材料，由 Millipore 公司或 Waterman 公司生产。由一层滤膜和胶膜组成，成卷筒装（2cm×100m）。NC 膜上喷 2 条抗体线，一条捕获线（AIV 抗体），另一条线（质控线）为兔抗 Balb/C 小鼠免疫球蛋白抗体。NC 膜贴在背衬的中间，两端分别与结合垫和吸水垫连接。

7 根据权利要求 1 所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡其内容特征（6）标识条，是一个带有标识的不干胶纸，分别粘贴在试纸条的 2 端，带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上，由此端浸入待测样品。靠另一端的吸水垫的吸水作用使样品经过 NC 膜。

8 根据权利要求 1 所述一种快速检测 AIV 的免疫胶体金层析诊断试纸条和测试卡其特征（7）塑料卡是一个用塑料特制的卡，由上下 2 片组成，上下片可嵌合在一起。下片主要有一个放试纸条的槽和与上

片结合的卡齿。上片主要有一个检测孔(或称阅读窗)和一个样品孔以及
与下片结合的卡齿。检测孔旁边分别印有 T 和 C 字样, T 表示捕获
线的位置, C 表示质控线的位置。检测孔是观察结果的窗口, 样品孔
是滴加样品的位置。此塑料卡起保护试纸条的作用, 并且更美观, 减
少污染和保护操作者的安全。

禽流感免疫胶体金诊断试纸条和测试卡

一 技术领域

禽流感免疫胶体金层析试纸条和测试卡属于一种新的动物的诊断试剂，主要是用来诊断受禽流感病毒感染的动物，其次也可检测人是否感染禽流感病毒。该试纸条利用免疫学抗原抗体能特异结合原理，胶体金标记抗体（AIV 单克隆抗体）后与抗原（AIV）结合，这种抗原抗体结合物再与 AIV 抗体结合，形成的夹心抗原抗体结合物在 NC 膜上出现颜色反应，可以肉眼观察。所以该技术属于免疫学诊断技术领域，但其技术主要应用于畜牧兽医学领域和人类医学领域。产品主要应用于动物检疫和诊断领域。

二 背景技术

禽流感病毒检测目前主要采用的技术方法有：HA、HI、ELISA、琼脂扩散试验、免疫荧光技术、RT-PCR、荧光 RT-PCR 以及病毒的分离鉴定等。比较快速准确的技术是 ELISA 和荧光 RT-PCR，但这 2 种技术都需要特殊的仪器设备，并且检测时间都在 2 小时以上，检测价额较贵。所有这些技术方法都不能在基层生产场、检疫站和临床等现场使用，必须有专门的实验室；免疫胶体金层析技术虽然是一种较成熟的技术，但对不同的抗原抗体系统的应用有差异，包括原料来源、试剂配制、生产工艺等都不同，需进行新的设计和试验。所以目前国内尚无禽流感免疫胶体金层析快速诊断的试纸条和测试卡，包括文献报道和发明专利。

本项发明根据胶体金免疫层析技术特点和禽流感病毒抗原抗体系统特点，设计新的原材料、试剂配制和工艺流程等，发明一种新的禽流感病毒快速检测

技术，具有简单、快速、敏感和特异性好等特点。10 分钟左右出结果，能应用于基层和临床的禽流感的快速诊断和检疫。

三 发明内容

本项发明是一种新的快速检测禽流感病毒的技术方法，具有简单、快速、敏感和特异性好等特点。并且价额低廉，适用于基层或临床检测禽流感病毒。

该试剂条和测试卡发明主要涉及以下几个方面的内容：

1 禽流感病毒单克隆抗体 (AIV McAb)，利用杂交瘤技术通过细胞融合，克隆筛选建立的独特的禽流感病毒单克隆抗体，该抗体只针对禽流感病毒反应，是禽流感病毒共同抗原表位的 McAb。该抗体决定了试剂条的特异性。用此抗体标记胶体金，制成金标抗体，可与待检样品中的 AIV 特异结合，所以此抗体标记胶体金后喷在结合垫上。

2 兔抗 Balb/C 小鼠免疫球蛋白抗体 这种抗体是用 Balb/C 小鼠的免疫球蛋白作为抗原，免疫家兔，提取免疫兔血清中的抗体球蛋白制成的。用在 NC 膜上的质控线上，可与金标抗体结合，以此检验试剂条的有效性。

3 羊抗 AIV 抗体 这种抗体是用纯化 AIV 抗原免疫山羊后，提取免疫羊血清中的免疫球蛋白制成的。该抗体用在试剂条 NC 膜上的捕获线上，可与金标抗体—AIV 抗原抗体复合物结合，形成夹心抗原抗体复合物。用此检测样品中的 AIV，是该发明重要内容之一。

4 AIV 单克隆抗体的胶体金标记及纯化 AIV 单克隆抗体标记胶体金采用特殊配方标记，标记有胶体金的抗体经离心纯化，采用专有试剂将金标抗体悬浮保

存。悬浮后的金标抗体在室温或在试剂条中能保持一年以上。

5 样品垫和结合垫的特殊处理 样品垫经专有缓冲液浸泡后，37℃干燥 2h 后，切成特殊宽度，用于过滤样品中的有形成分，而又不能使 AIV 抗原变性。放在试剂条（卡）的最前端，在试剂卡样品孔的下端。结合垫处理方式与样品垫相同，但使用不同的缓冲液浸泡，干燥后喷金标抗体，置于样品垫下，并与 NC 膜 5 样品垫和结合垫的特殊处理 样品垫经专有缓冲液浸泡后，37℃干燥 2h 后，切成特殊宽度，用于过滤样品中的有形成分，而又不能使 AIV 抗原变性。放在试剂条（卡）的最前端，在试剂卡样品孔的下端。结合垫处理方式与样品垫相同，但使用不同的缓冲液浸泡，干燥后喷金标抗体，置于样品垫下，并与 NC 膜相连。结合垫是金标抗体与样品中 AIV 结合的地点，然后借助层析作用向 NC 膜移动。

6 测试卡盒的设计 测试卡盒由上下两块塑料板嵌合而成。下块有一个试剂条的槽，放置试剂条，上板有一个加样孔和一个阅读窗口。加样孔是加样品的位置，下方正对样品垫，阅读窗口是 NC 膜的位置，阅读窗口旁印有 T 和 C 字母，分别代表 NC 膜检测线的位置和质控线的位置。

7 该试剂条的生产工艺流程 主要由以下几个步骤组成：

7.1 AIV 金标抗体的制备 用氯金酸制备胶体金颗粒。颗粒大小 40nm。然后将 AIV 单克隆抗体与胶体金颗粒按比例混合进行标记，标记完后用牛血清白蛋白 (BSA) 进行封闭。标记好的金标抗体用高速离心法进行纯化，祛除游离抗体和蛋白及其它小分子物质。

7.2 结合垫和样品垫的处理，将结合垫和样品垫放入不同的缓冲液中浸泡，干

燥，结合垫喷标记好的金标抗体，然后干燥。将结合垫切成 50mm 的宽度，样品垫切成 40mm 宽度。

7.3 试剂条板的制备 撕去背衬上的不干胶纸，分别贴上 NC 膜、结合垫（已喷有金标抗体）、样品垫、吸水垫纸。

7.4 NC 膜的喷样 将制备好的试剂条板上的 NC 膜分别喷上捕获抗体（羊抗 AIV 抗体）和质控抗体（兔抗 Balb/C 球蛋白抗体）。线宽 0.8mm。喷完后 37℃干燥。

7.5 试剂条板切条和测试卡的组装 将 NC 膜喷有抗体的试剂条板切成 50×10mm 的试剂条，立即放入有干燥剂的铝箔袋内，封口。或将试剂板切成 30×10mm 的试剂条放入测试卡盒内，立即放入铝箔袋内封口。

7.6 试剂条的检验 按每批 1%抽样检验，包括外观、试剂条的敏感性、特异性和保存期加速试验等，验证试剂条的可靠性。

四 具体实施例

以下实例只是证明该发明的科学性和可操作性以及证明该诊断试纸具有的敏感性和特异性，不能囊括发明的所有内容，具体使用会超出此范围。

实施例 1 将灭活的禽流感病毒标准抗原用正常未免疫小鸡血清按 1:10-1:10000 稀释，用组装好的 AIV 免疫胶体金试纸条进行检测，出现阳性，可以检测到的最大稀释度为 1:8000，HA 试验只能检测到 1:100。同时用小鸡血清稀释鸡新城疫病毒（NDV）弱点疫苗，试纸条检测含 NDV 的鸡血清和正常鸡血清，都为阴性。说明 AIV 免疫胶体金试剂条具有较好的特异性和敏感性。

实施例 2 将灭活的禽流感病毒抗原用正常未免疫小鸡血清按 1:10-1:10000 稀

释，用组装好的 AIV 免疫胶体金测试卡进行检测，出现阳性，可以检测到的最大稀释度为 1:8000, HA 试验只能检测到 1:100。同时用小鸡血清稀释鸡新城疫病毒 (NDV) 弱点疫苗，测试卡检测含 NDV 的鸡血清和正常鸡血清，都为阴性。说明 AIV 免疫胶体金测试卡具有较好的特异性和敏感性。

实施例 3 将 AIV 灭活抗原纯化后，用紫外分光光度计测定蛋白浓度，然后用正常未免疫小鸡血清 10 倍递增稀释成 100ug/ml、10ug/ml、1ug/ml、100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml，同时将 NDV 作同样稀释。用 AIV 免疫胶体金试剂条和测试卡分别进行检测。结果试剂条和测试卡能够检测到 AIV 的浓度为 10ng/ml，而 NDV 和正常血清检测都为阴性。从而证明该诊断试剂条和测试卡的敏感性和特异性。

实施例 4 采集感染鸡的血液，用研制的禽流感诊断试纸条和测试卡检测，出现阳性（测试卡和试纸条都出现两条红色线条）。将其样品经 RT-PCR 检测证实感染 AIV。

专利名称(译)	禽流感免疫胶体金诊断试纸条和测试卡		
公开(公告)号	CN1700005A	公开(公告)日	2005-11-23
申请号	CN200510057023.7	申请日	2005-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	重庆工学院		
申请(专利权)人(译)	重庆工学院		
当前申请(专利权)人(译)	重庆工学院		
[标]发明人	蔡家利 姜和 吴胜昔 王健		
发明人	蔡家利 姜和 吴胜昔 王健		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种快速检测禽流感病毒(Avianinfluenze virus, AIV)的新技术——胶体金免疫层析技术, 利用这种技术做成的快速诊断禽流感的试纸条和测试卡。本发明研制了禽流感病毒单克隆抗体(Antibody 1, Ab 1)和羊抗禽流感病毒多克隆抗体(Antibody 2, Ab2)以及兔抗Balb/C小鼠免疫球蛋白抗体(Antibody 3, Ab3)。Ab1标记胶体金作金标抗体, Ab2作捕获抗体, Ab3作质量控制抗体。利用抗体、硝酸纤维膜(NC膜)、结合垫、样品垫、背衬、塑料卡等材料加工组装成试纸条和测试卡。这种试纸条和测试卡可以检测患病动物血液、粪便中的禽流感病毒。这种技术具有操作简单、快速、敏感和特异性好等特点。10分钟左右出结果, 敏感性达10ng/ml。可以用于人和动物禽流感的快速诊断。