

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200920096903.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 2 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 201413329Y

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200920096903.9

[73] 专利权人 天津中新科炬生物制药有限公司

地址 300150 天津市开发区第六大街 65 号

[72] 发明人 李 洲 杨发青

[74] 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司

代理人 关永琴

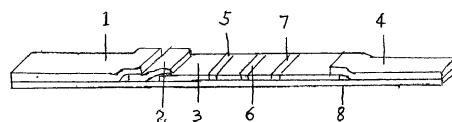
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称

爱泼斯坦 - 巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联合检测试纸

[57] 摘要

本实用新型是涉及一种爱泼斯坦 - 巴尔 EB 病毒衣壳抗原 VCA 和胸苷激酶 TK 蛋白免疫球蛋白 A IgA 抗体联合快速检测试纸。在塑料支撑板一端设置上样垫，在上样垫一端连接标记有鼠抗人 IgA 抗体的胶体金垫，在胶体金垫一端连接硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜的另一端连接吸样垫，硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测线和质控线，检测线为分开包被重组表达的 EB 病毒 VCA 和 TK 蛋白抗原或抗原片段，质控线为包被在 NC 膜上的抗鼠免疫球蛋白 G (IgG) 构成。检测时将被检样品加在试纸条卡上样垫上，然后直接观察免疫反应结果，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。



1、一种爱泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联合检测试纸，其特征是在塑料支撑板（8）一端上设置上样垫（1），在上样垫（1）一端连接标记有鼠抗人 IgA 抗体的胶体金垫（2），在胶体金垫（2）一端连接硝酸纤维素膜（3），在硝酸纤维素膜（3）的另一端连接吸样垫（4），硝酸纤维素膜（3）包被有相互分离的检测线（5）、（6）和质控线（7），检测线（5）、（6）为分开包被重组表达的 EB 病毒 VCA 和 TK 蛋白抗原或抗原片段，质控线 7 为包被在 NC 膜上的抗鼠免疫球蛋白 G(IgG) 构成。

2、根据权利要求 1 所述的爱泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联合检测试纸，其特征在于所述的上样垫（1）为玻璃纤维膜或无纺布，吸样垫（4）为吸水滤纸，所述的抗鼠免疫球蛋白 G (IgG)，是羊抗鼠或兔抗 IgG 构成。

爱泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联合检测试纸

技术领域

本实用新型是涉及生物应用技术领域，特别是涉及一种以胶体金免疫层析法快速检测爱泼斯坦-巴尔 EB 病毒衣壳抗原 VCA 和胸苷激酶 TK 蛋白免疫球蛋白 AIgA 抗体联合快速检测试纸。

背景技术

EB 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV) 是一种感染人类并引起重要疾病的 DNA 病毒。流行病学、血清学和分子生物学资料证实，与 EBV 感染有关的疾病很多，特别是与鼻咽癌 nasopharyngeal carcinoma, NPC 的发生有密切关系。1997 年世界卫生组织的国际抗癌联盟年会上把 EBV 归类为第一类致癌物。血清 EB 病毒-衣壳抗原-免疫球蛋白 AEBV-VCA-IgA，EB 病毒-早期抗原-免疫球蛋白 A (EBV-EA-IgA) 检测目前已用于 NPC 的临床辅助诊断。衣壳抗原-免疫球蛋白 A VCA-IgA 检测通常用于筛查以排除 NPC 的诊断，灵敏度高于 90%，但有报道表明其特异性有时会低于 70%；相反，早期抗原-免疫球蛋白 A EA-IgA 检测目前被用于鼻咽癌的确定性检测，特异性高于 90%而灵敏度低于 80%，两者在鼻咽癌可疑病例诊断时有互补作用。对于鼻咽癌 疑似病人, VCA-IgA 其阴性预测率达 98%,可作为排除鼻咽癌的指标，仅有低于 10%的假阴性率；VCA-IgA 阳性结果由于有时会产生高达 30%的假阳性率，故检测阳性不作为的 NPC 阳性确认结果。

TK蛋白是EB病毒在DNA的合成调控中起重要作用的蛋白。Connolly 等 [Connolly Y, Littler E, Sun N, et al. Antibodies to Epstein Barr virus thymidine kinase: a characteristic marker for the serological detection of nasopharyngeal carcinoma [J]. Int. J Cancer, 2001, 15 :692-697]用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测人体血清中针对EB病毒TK蛋白的IgA抗体，证实此抗体是一个良好的鼻咽癌标志物，与EBV-VCA-IgA相比，具有较高的检测灵敏度和更高的特异性。近年来陆续也有相关报道支持这一观点。因而将TK-IgA用于临床辅助诊断应该会进一步提高鼻咽癌诊断的可靠性。以上所有的报道基本采用ELISA方法对IgA进行检测，没有用免疫层析胶体金技术检测 EBV-VCA-IgA和EB病毒-胸苷激酶-免疫球蛋白AEBV-TK-IgA的报道，特别

是制备成同一种试剂进行快速联合检测。运用免疫层析胶体金技术，研制新型的EB病毒抗体诊断试剂，将为鼻咽癌的诊断提供更多更好的方法。

运用免疫层析胶体金技术诊断时，标记鼠抗人 IgA 抗体，包被 VCA 和 TK 抗原，检测时在上样垫上加入 50—100ul 被检样品，样品中的 IgA 将和标记的鼠抗人 IgA 结合形成复合物，样品中若含有抗 VCA 或抗 TK-IgA 抗体，亦同样形成复合物，在样品的带动下扩散到 NC 膜上进一步层析，当遇到包被在 NC 膜上 T 线处 VCA 或 TK 抗原时，抗 VCA 或 TK-IgA-胶体金复合物将和 T 线上的抗体结合，被捕获在包被处，当被捕获的胶体金复合物达到一定数量时，则形成肉眼可见的 T 线；若血清中不含特异性抗体 IgA 抗体，则不能形成免疫复合物，亦不能形成 T 线，C 线作为试剂的质控标准，阳性和阴性样品检测时均会出现。根据 C、T 线的有无直接用肉眼判定结果，操作简单，整个反应在 20 分钟内完成。

发明内容

本发明的目的是提供一种爱泼斯坦-巴尔 EB 病毒衣壳抗原 VCA 和胸苷激酶 TK 蛋白免疫球蛋白 AIgA 抗体联合快速检测试纸，具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

本发明提供一种爱泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联合检测试纸，其特征是在塑料支撑板 8 一端上设置上样垫 1，在上样垫 1 一端连接标记有鼠抗人 IgA 抗体的胶体金垫 2，在胶体金垫 2 一端连接硝酸纤维素膜 3，在硝酸纤维素膜 3 的另一端连接吸样垫 4，硝酸纤维素膜 3 包被有相互分离的检测线 5、6 和质控线 7，检测线 5、6 为分开包被重组表达的 EB 病毒 VCA 和 TK 蛋白抗原或抗原片段，质控线 7 为包被在 NC 膜上的抗鼠免疫球蛋白 GIgG 构成。

所述的爱泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联合检测试纸，其特征在于所述的上样垫 1 为玻璃纤维膜或无纺布，吸样垫 4 由吸水滤纸，所述的抗鼠免疫球蛋白 GIgG，是羊抗鼠或兔抗 IgG 构成。

检测线为分开包被在 NC 膜上的重组表达的 EB 病毒 VCA 和 TK 蛋白抗原或抗原片段，质控线为包被在 NC 膜上的抗鼠 IgG，如羊抗鼠或兔抗 IgG。标记的胶体金蛋白为鼠抗人 IgA 抗体。单克隆或多克隆抗体。

上样垫为玻璃纤维膜或无纺布，吸样垫由吸水滤纸构成，符合胶体金类检测试剂的一般要求。

抗原的包被方法为：以 0.01M pH 7.2—7.4 磷酸盐缓冲液（PBS）将包被抗原稀释成 0.2-2mg/ml 的溶液，优选为 0.5—1.0mg/ml，用喷膜仪在 NC 膜下部分别划线，包被 T1，T2 线，同时在 NC 膜上部包被抗鼠 IgG 抗体作为 C 线，然后干燥 NC 膜以固定抗原。

标记胶体金颗粒的方法为：以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 20—50nm 的胶体金溶液，优选为 30—40nm 胶体金溶液。制备完成后取 100ml 胶体金液放在烧杯内，用 0.2M K_2CO_3 调至 pH7.0—9.6，优选为 pH 8.6。按 100ml 胶体金溶液加入 0.5—2mg 鼠抗人 IgA，优选为 1mg 鼠抗人 IgA。室温搅拌 30-60min，再加入适量牛血清白蛋白 BSA，聚乙二醇 PEG20000 封闭，离心，弃上清，复溶至 100ml，铺在玻璃纤维膜或无纺布上，再置干燥间（温度 20-25℃，湿度小于 30%）干燥，切成适当宽度的小条，制成胶体金垫。

试纸的装配方法为：在干燥室内（温度 20-25℃，湿度小于 30%），取塑料支撑板，将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴，在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫粘贴，在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫；在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫；最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3mm 或 4mm 宽的试纸条，切好的试纸条可以再装入塑料卡内，形成检测卡。

试纸的检测方法为：将被检血清或血浆平衡至温室，将试纸条或试剂卡平放，在上样垫上加入 50—100ul 被检样品，样品溶解胶体金并在 NC 膜上层析，然后用肉眼直接观察在 5—20 分钟内 C、T 线的出现情况，判定检测结果。T1 线出现说明 VCA-IgA 阳性，T2 线出现说明 TK-IgA 阳性。

本发明的有益效果是：提供一种利用免疫层析胶体金技术检测 EB 病毒 VCA 和 TK 蛋白 IgA 抗体的联合快速检测试纸。同时检测两种抗原的 IgA，而现有的 ELISA 方法无法同时检测。VCA-IgA 倾向于诊断的高灵敏度，相对于早期抗原-免疫球蛋白 A，胸苷激酶-免疫球蛋白 A 同时倾向于诊断的高灵敏度和高特异性。两项检测同为阳性或同为阴性时，检测的准确性较单项检测更高，一项检测为阳性时作为怀疑对象作进一步的检测。同时本发明运用胶体金免疫层析技术检测方法，不同于 ELISA 方法，具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

附图说明：

图 1 泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体联

合检测试纸结构示意图。

附图符号说明：

- | | |
|-----------------|-----------|
| 1: 上样垫 | 2: 胶体金垫 |
| 3: 硝酸纤维素 (NC) 膜 | 4: 吸样垫 |
| 5: VCA 检测线 | 6: TK 检测线 |
| 7: 质控 (C) 线 | 8: 塑料支撑板 |

具体实施方式

实施例 1: 泼斯坦-巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白 A 抗体的联合快速检测试纸制备:

1 主要材料

1.1 EBV 的 VCA、TK 抗原: 利用基因工程重组表达, 由中国医学科学院提供, 用于硝酸纤维素 NC 膜的检测线的包被; 鼠抗人 IgA 单克隆抗体, 军事医学科学院产品, 用于胶体金的标记; 羊抗鼠 IgG: 军事医学科学院产品, 用于 NC 膜质控线的包被。氯金酸: Sigma 公司产品; NC 膜: Millipore 公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA), 聚乙二醇 PEG20000, 水解酪蛋白: Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

1.2 鼻咽癌 (NPC) 阳性或阴性内控血清 由公司收集并配制。

2 方法

2.1 IgA 胶体金标记 氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液, 制备完成后取三份胶体金, 分别用 0.2M K_2CO_3 将溶液调到 pH7.0、pH8.6 和 pH9.6。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌, 按每 100ml 溶液加入 0.5mg、1mg、2.0mg 将鼠抗人 IgA 缓慢滴加到胶体金溶液中, 继续搅拌 30-60 分钟, 再加入终浓度为 0.1% 的 PEG 20000 和 1% 的 BSA 进行封闭, 标记结束后以 12000 r/m 离心, 弃上清, 沉淀按原体积复溶至不同配比的胶体金工作液硼酸盐缓冲液, pH8.0, 含 BSA、羊血清, 蔗糖和表面活性剂中。然后将标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 22cm² 的比例加样于无纺布上, 在温度 20-25℃, 相对湿度在 <30% 的干燥间干燥 2-4 小时, 制成胶体金垫。

2.2 VCA 和 TK 蛋白的包被 用 0.01M pH 7.2 PBS 将 VCA 和 TK 分别稀释成 0.2/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml, 然后用喷膜仪在 NC 膜下部按 1ul/cm 进行划线包被, 同时在 NC 膜上部包被抗鼠 IgG 抗体, 用于产品的质控, 包被完成后将 NC 膜在在温度 20-25℃, 相对湿度在 <30% 的干燥间干燥 8-10

小时。

2.3 联合快速检测试纸的组装 在干燥室内取塑料支撑板 8 一端上设置上样垫 1, 在上样垫 1 一端连接标记有鼠抗人 IgA 抗体的胶体金垫 2 (搭胶体金垫的 1/5), 在胶体金垫 2 一端连接硝酸纤维素膜 3, 在硝酸纤维素膜 3 的另一端连接吸样垫 4 (搭吸样垫的 1/10), 硝酸纤维素膜 3 包被有相互分离的检测线 5、6 和质控线 7, 检测线 5、6 为分开包被重组表达的 EB 病毒 VCA 和 TK 蛋白抗原或抗原片段, 质控线 7 为包被在 NC 膜上的抗鼠免疫球蛋白 GIgG 构成然后用裁剪机将贴好塑料板切成 3mm 或 4mm 宽的试纸条。切好的试纸条可以再装入塑料卡内, 形成抗体检测试剂卡。上样垫 1 为玻璃纤维膜或无纺布, 吸样垫 4 由吸水滤纸, 所述的抗鼠免疫球蛋白 GIgG, 是羊抗鼠或兔抗 IgG 构成。

2.4 检测方法 将被检血清或血浆平衡至温室, 将试纸条或试剂卡平放, 在上样垫上加入 50—100ul 被检样品, 样品溶解胶体金并在 NC 膜上层析, 然后用肉眼直接观察在 5—40 分钟内 C、T 线的出现情况, 判定检测结果。T1 线出现说明 VCA-IgA 阳性, T2 线出现说明 TK-IgA 阳性。

2.5 试纸工艺参数调试 将浓度不同标记、包被的试剂进行组合配对, 制备小样, 用标准的 NPC 阳性和阴性血清检测, 发现最佳组合。

2.6 性能分析 以优化的工艺对数制备小样, 按标准方法对试剂的分析灵敏度、分析特异性、不精密度和稳定性进行分析。

3 结果

3.1 试纸工艺参数的确定 根据小样的检测结果, 确定了胶体金标记 IgA 的最佳 pH 值为 8.6; 最佳标记浓度为 0.5-1mg 每 100ml 胶体金溶液; 最佳的胶体金工作液为 10mM 硼酸酸盐缓冲液, pH8.6, 含 0.5%BSA、10%羊血清, 2%蔗糖, 0.2% Tween 20; 最佳包被 VCA、TK 蛋白的包被浓度各为 0.5—1mg/ml。检测结果的最佳判定时间为 5-30 分钟。

3.2 性能分析 分析性能表明试剂具有良好的灵敏度, 对内控阳性血清最高的检测滴度到 1: 128, 和 ELISA 试剂接近。对一般性血清干扰物如高血脂、溶血、黄疸无非特异性反应, 对艾滋病病毒 (HIV)、乙肝表面抗原 (HBSAG)、丙型肝炎病毒 (HCV)、梅毒 (TP) 等传染病血清样本无非特异性反应, 对甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、前列腺素特异性抗原 (PSA) 等其它肿瘤标志物无非特异性反应。对肝素、乙二铵四乙酸二钠

(EDTA) 和枸橼酸钠等抗凝剂亦无非特异性反应。

实施例 2：联合快速检测试纸临床样本试验

1 材料

1.1 EBV VCA 和 TK 蛋白 IgA 抗体的联合快速检测试纸, 由公司按优化的参数制备。

1.2 NPC 临床血清: NPC 阳性血清, 包括 NPC 1、2、3 和 4 期血清, 共 420 份; NPC 阴性血清: 400 份。由公司在相关医院获得。

2 方法

按优化的方法进行。对临床样本的检测结果进行分析统计。

3 结果

样本的检测结果如下:

表 1 联合快速检测试纸对临床样本的检测结果

临床样本	数量	VCA 阳性	TK 阳性	VCA&TK 阳性	VCA&TK 阴性
NPC 阴性	400	34	11	5	358
NPC I 期	38	38	38	38	0
NPC II 期	47	47	47	47	0
NPC III 期	105	101	98	98	4
NPC IV 期	230	216	212	212	12

从检测结果可以看出, 联合检测试纸对鼻咽癌阳性样本检测时全为阳性的检出率为 $395/420=94\%$, 只较单独 VCA 阳性 95.7% 稍有下降, 但不明显。而在阴性样本的检测方面, 全为阳性的假阳性为 1.25% , 较 VCA 阳性 8.5% 有明显下降。全为阴性的特异性为 89.5% , 较单独的 VCA 特异性 91.5% 略有上升, 但多数是一个阳性的可疑检测结果, TK 检测的特异性达到 97.3% 。可以看出联合检测的试纸条提供了更多的检测信息, 综合检测判定结果更为准确, 可靠。

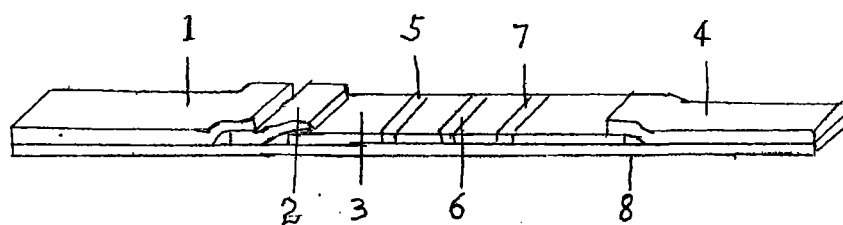


图 1

专利名称(译)	爱泼斯坦 - 巴尔病毒衣壳抗原和胸苷激酶蛋白免疫球蛋白A抗体联合检测试纸		
公开(公告)号	CN201413329Y	公开(公告)日	2010-02-24
申请号	CN200920096903.9	申请日	2009-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 杨发青		
发明人	李洲 杨发青		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/551 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型是涉及一种爱泼斯坦 - 巴尔EB病毒衣壳抗原VCA和胸苷激酶TK蛋白免疫球蛋白A抗体联合快速检测试纸。在塑料支撑板一端上设置上样垫，在上样垫一端连接标记有鼠抗人IgA抗体的胶体金垫，在胶体金垫一端连接硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜的另一端连接吸样垫，硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测线和质控线，检测线为分开包被重组表达的EB病毒VCA和TK蛋白抗原或抗原片段，质控线为包被在NC膜上的抗鼠免疫球蛋白G(IgG)构成。检测时将被检样品加在试纸条卡上样垫上，然后直接观察免疫反应结果，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

