



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101750498 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200910236334.8

(22) 申请日 2009.10.16

(71) 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司
地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号北科园6层

(72) 发明人 詹先发 应希堂 胡国茂 郑金来
唐宝军 于尚永

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

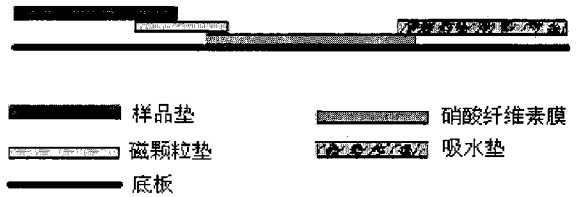
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测血液中乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法。本发明将磁性微粒子免疫层析技术引入到乙肝 e 抗原检测中，该试纸条是将包被膜、结合了乙肝 e 抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫依次相互交错地粘贴在底板上，然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成的。包被膜上预包被有乙肝 e 抗原检测线和质控线。本发明具有操作简便，灵敏度高，特异性好等优点。



1. 一种检测乙肝 e 抗原 (HBeAg) 的磁性免疫层析试纸条,其特征在于:该试纸条是将包被膜、结合了乙肝 e 抗体 (HBeAb) 的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫依次相互交错地粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成,其中所述的包被膜上预包被有乙肝 e 抗原检测线“T”和质控线“C”。

2. 根据权利要求 1 所述的包被膜,其特征在于:所述的膜为硝酸纤维素膜。

3. 根据权利要求 1 所述的包被膜,其特征在于:所包被的物质为 HBeAb 和二抗。

4. 根据权利要求 1 所述的磁颗粒垫,其特征在于:所采用的垫为玻璃纤维垫。

5. 根据权利要求 1 所述的磁颗粒垫,其特征在于:所采用的磁颗粒为超顺磁颗粒,该磁颗粒上偶联有 HBeAb。

6. 根据权利要求 6 中所述的 HBeAb 免疫磁颗粒,其特征在于:所述的 HBeAb 免疫磁颗粒制备是先将二抗偶联到磁颗粒上,再将 HBeAb 与磁颗粒标记二抗连接,形成磁颗粒-二抗-HBeAb 复合物。

7. 根据权利要求 3、5、6 所述的 HBeAb,其特征在于:所述的 HBeAb 可以是单克隆抗体、多克隆抗体。

8. 根据权利要求 3 中所述的二抗,其特征在于:所述的二抗应与连接于磁颗粒上的 HBeAb 抗体配对。

9. 根据权利要求 5、6 中所述的磁颗粒,其特征在于:所述的磁颗粒的粒径在 50-300nm。

一种检测乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,特别是涉及一种检测乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 乙型肝炎由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起,HBV 是一种包含部分双链环状 DNA 基因组的包膜病毒,属于肝 DNA 病毒科。当病毒在肝细胞中复制时,可以干扰肝脏的功能,随即免疫系统激活产生一系列特异的反应以对抗并根除传染性因素。作为一种病理性损伤的结果,肝脏发生炎症。持续的 HBV 感染导致的严重的病理学结果包括:慢性肝脏功能不全,肝硬化和肝细胞癌 (HCC)。

[0003] HBeAg 在乙型肝炎病毒感染后与乙肝表面抗原阳性同时或其后出现,HBsAg 在血内的高峰期亦是 HBeAg 的高峰期。HBeAg 阳性说明乙型肝炎病毒在体内复制活跃,传染性强,HBeAg 在 HBsAg 转阴前可先转阴。如果 HBeAg 持续阳性,则可发展为慢性持续性乙型肝炎病毒感染。

[0004] 目前的 HBeAg 病原学诊断技术主要包括酶联免疫试验 (ELISA)、化学发光 (CLIA)、免疫层析法 (胶体金或乳胶颗粒法),这些方法都有各自的特点和适用对象。

[0005] ELISA 和 CLIA 方法是目前临床免疫分析中普遍使用检测技术,但反应时间相对较长,而且都需要酶标仪或发光仪和洗板机以及温箱等复杂设备,无法满足临床急诊术前检测,抢救前指导用药的要求,也限制了在一些基层医疗单位的应用。胶体金或乳胶颗粒为代表的快速检测试纸条,缺点是结果需要肉眼观察,容易受观察者主观判断的影响,且灵敏度较低。

[0006] 磁性免疫层析 (Magnetic ImmunoChromatographic Test, MICT) 是近年来出现的一种单人份快速定量检测技术。它是以超顺磁性颗粒 (superPMPs) 代替传统的标记物 (胶体金,乳胶颗粒等) 来进行免疫层析,通过检测测量磁场强度来示踪待测样品的含量。该技术与传统技术相比具有下述优势:a. 所用磁性检测仪器采用固相元件,微型化设计自成一体,独立运行,体积小,操作简便;b. 灵敏度比各类目测快速诊断法高 10-100 倍;c. 读数快速,可在 15 秒内测量到多达 6 个分析位点的数据;d. 线性范围可达 4 个浓度数量级的范围内呈线性;e. 超顺磁性纳米微粒由聚合物包被,不会随时间而衰变。该技术继承了传统免疫层析法 (胶体金,乳胶颗粒等) 简便快速,单人份操作的优点,又弥补了传统免疫层析技术灵敏度低,只能定性,不能定量的缺点,是当今即时检验 (Point of Care Test, POCT) 技术发展的先进代表。

[0007] 目前常用的标记磁颗粒为超顺磁颗粒 (superPMPs),没有外加磁场的情况下不具有任何磁性,只有在外加磁场作用下才会表现出磁性,商品化超顺磁颗粒都经过表面修饰,大大方便了标记过程,标记简便,重复性好。

发明内容

[0008] 本发明的目的即是将磁性免疫层析技术应用在 HBeAg 免疫分析中。将 HBeAb 共价偶联于超顺磁颗粒上,将 HBeAb 包被于硝酸纤维素膜上制成检测线作为捕获固相,按照常规免疫层析法的原理进行标本的检测,结合简便易行的磁性检测仪进行检测,可以实现快速灵敏地检测,本技术既可以单人份检测,也可以批量检测,并且可以即时给出定量结果,测量仪器简单可靠,操作简便,方便实用。

[0009] 为达到上述的目的,本发明的技术方案如下:将包被膜、结合 HBeAb 的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫、依次相互交错 2mm 地粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜而制成,其中所述的包被膜上预包被有 HBeAb 检测线,以及预包被了二抗的质控线。

[0010] 选用的底板为透明塑料底板,包被膜为 35mm 宽度的硝酸纤维素膜,选用的吸水垫为纤维素膜,磁颗粒垫为玻璃纤维垫,样品垫为经过样品垫处理液预处理的纤维素膜。所述的样品垫处理液是含有 1% -5% 酪蛋白(casein) 和 0.1% -1% 的聚乙烯醇(PVP),以及 0.01-0.2% 吐温-20(Tween-20) 的 0.02M, pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)。

[0011] 检测乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0012] A、磁颗粒的制备:选用直径为 50-300nm 的超顺磁颗粒,使用碳二亚胺(EDC) 和琥珀酰亚胺(NHS) 共价偶联的方式将二抗标记到磁颗粒上,将 HBeAb 以 1 : 3-1 : 10 的比例(体积比)与二抗标记磁颗粒混合;

[0013] B、将制备好的磁颗粒使用定量喷液装置以 25 μ l/cm-50 μ l/cm 的量喷涂于磁颗粒垫上;

[0014] C、包被膜的制备:使用包被缓冲液分别将 HBeAb 以及二抗稀释到 0.5-2mg/m 的浓度,使用定量喷液装置分别将二者以 0.5-1.0cm 的间隔于硝酸纤维素膜上,晾干后于封闭液中浸泡 10 分钟后于 25-35 $^{\circ}$ C 烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用;

[0015] D、样品垫的处理:将样品垫放入样品垫处理溶液中浸泡处理 1 小时后取出 25-35 $^{\circ}$ C 烘干 8 小时;

[0016] E、试纸条的组装:在透明塑料底板上依次相互交错 2mm 贴上包被膜、磁颗粒垫、样品垫、吸水垫,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,得到试纸板,根据要求宽度切割即得到试纸条。

[0017] 所述的步骤 A 中 HBeAb- 磁颗粒的制备:使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH4.5-5.0 的醋酸钠缓冲液洗涤磁颗粒,加入 EDC 和 NHS 使二者终浓度均为 20mmol, 室温反应 1 小时,使用含有 0.1% Tween-20 的 50mM, pH4.5-5.0 的醋酸钠缓冲液充分洗涤磁颗粒后加入二抗,使二抗与磁颗粒的分子比例为 5 : 1(摩尔比),室温反应 3 小时,加入含有 0.5% BSA 的 0.02M, pH7.0-7.6 的 PBS 室温封闭 30 分钟;洗涤磁颗粒,使用含有 1% PVP, 1% Casein, 0.5% Tween-20, 5% 蔗糖的 50mM pH8.2-9.0 的硼酸保存缓冲液复溶磁颗粒,将 HBeAb 以 1 : 3-1 : 10 的比例(体积比)与二抗标记磁颗粒混合,4 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0018] 所述的步骤 B 中,磁颗粒的喷涂方法是:将制备好的磁颗粒使用定量喷膜装置以 50 μ l/cm 的量均匀喷涂于玻璃纤维上,冷冻干燥后加入干燥剂封存备用。

[0019] 所述的步骤 C 中,包被膜的制备方法是:用包被缓冲液(0.02M PB, pH7.0-7.6) 将 HBeAb 稀释为 0.5mg/ml,二抗稀释为 1mg/ml,使用定量喷膜装置以 1 μ l/cm 的量将二者以 0.6cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上,室温晾干 30 分钟后于封闭液中浸泡 10 分钟后于

25-35℃烘干 8 小时,加入干燥剂封存备用。

[0020] 与传统的快速检测试纸条相比较,本发明具有以下优点:

[0021] 1) 通过在磁颗粒上引入二抗系统,使得试纸条的制备过程大大简化,适合大规模生产。

[0022] 2) 运用磁性检测仪来进行结果的判读,依据检测线与质控线的磁性检测值比值进行阴阳性判断,避免了主观性,结果准确、可靠。

[0023] 本发明操作简便,适合大规模生产,检测所需的便携式设备也已经上市,因此能广泛用于医院、血站、防疫站、体检等大批量使用单位以及一些采血现场、农村和基层诊所等小批量或单人份使用单位。

附图说明

[0024] 图 1 为本发明检测乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条结构示意图。

[0025] 为进一步说明本发明检测乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法,特举以下的实施例进行说明,该实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明。

具体实施方式

[0026] 本发明所述的检测血液中乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条,如图 1 所示,该试纸条是在底板上依次相互交错 2mm 地粘贴上包被膜、结合了 HBeAb 的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫,并在上层覆盖透明塑料密封膜,组装而成的试纸条。

[0027] 在具体实施例中,所采用 HBeAb 为商品化抗体。利用双抗体夹心法原理检测 HBeAg 的标本,当待测标本中含有 HBeAg 时,抗原会先和磁颗粒上结合的 HBeAb 结合,随着层析作用的进行,结合物向前移动到达 HBeAb 包被线 T 处,抗原会再次和包被抗体结合形成双抗体夹心复合物而聚集在 T 处,另外,未结合 HBeAb-磁颗粒会继续前行到达质控线 C 时,包被膜上二抗会与磁颗粒上的 HBeAb 结合从而在 C 线处同样出现磁颗粒聚集。整个反应在 30 分钟内进行完全,一般反应十五分钟后即可使用磁性免疫层析仪器读卡,T 线以及 C 线都会产生相应的磁性信号值,计算 T/C 的比值,根据预设的界限比值即可判定结果的阴阳性。整个读卡、计算、与预设界限值比对的过程已经完全程序化,磁性检测仪会直接给出阴阳性结果。

[0028] 本发明所述的检测血液中乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条的制备方法见以下实例:

[0029] 实施例 1

[0030] 检测血液中乙肝 e 抗原的磁性免疫层析试纸条及试纸盒的制备方法

[0031] 本实施例的试纸条及试纸盒的制备方法包括以下步骤:

[0032] A、抗体的制备:选用商品化的 HBeAb,对 20mM, pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS, 4℃透析过夜备用。

[0033] B、包被膜的制备:

[0034] 包被缓冲液的配制:0.02M pH 7.2 的磷酸缓冲液 (PBS) 为包被缓冲液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置 4℃保存备用,有效期两周。

[0035] 封闭液的配制:含 0.5% BSA 的 0.02M pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的磷酸盐缓冲液 (PBS),0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置 4℃保存备用,有效期一周。

[0036] 包被膜的制备:用包被缓冲液(0.02M pH7.2(pH7.0-7.6均适用)的PB)将HBeAb稀释为0.5mg/ml,二抗稀释为1mg/ml,使用定量喷膜装置以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 的量将二者以0.6cm的间隔均匀喷印于3.5cm宽度硝酸纤维素膜上,室温晾干30分钟后于封闭液(含有0.5%BSA的0.02M pH7.2(pH7.0-7.6均适用)的PBS,)中浸泡10分钟后于25-35°C烘干8小时,加入干燥剂封存备用。

[0037] C、磁颗粒的制备:

[0038] 醋酸钠缓冲液的配制:用双蒸水和醋酸钠及冰醋酸配制pH值为4.7(pH4.5-5.0均适用),浓度为50mM的醋酸缓冲液,加入Tween-20至终浓度为0.1%, $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后4°C保存备用,有效期两周。

[0039] 硼酸保存缓冲液的配制:用双蒸水,硼酸和硼砂配制pH为8.5(pH8.2-9.0均适用),终浓度为50mM的硼酸缓冲液,加入PVP,Casein,Tween-20,蔗糖,终浓度分别为1%,1%,0.5%,5%, $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后4°C保存备用,有效期一周。

[0040] HBeAb磁颗粒的制备:使用含有0.1% Tween-20的50mM pH4.7(pH4.5-5.0均适用)醋酸钠缓冲液洗涤磁颗粒,加入EDC和NHS使二者终浓度均为20mmol,室温反应1小时,充分洗涤磁颗粒后加入二抗,使二抗与磁颗粒的分子比例为5:1(摩尔比),室温反应3小时,加入含有0.5%BSA的0.02M pH7.2(pH7.0-7.6均适用)的PBS,室温封闭30分钟,洗涤磁颗粒,使用含有1%PVP,1%Casein,0.5% Tween-20,5%蔗糖的50mmolpH8.5(pH8.2-9.0均适用)的硼酸保存缓冲液复溶磁颗粒,将HBeAb以1:3-1:10的比例(体积比)与二抗标记磁颗粒混合,4°C保存备用。

[0041] D、磁颗粒的喷涂与冻干

[0042] 使用BioDot喷膜仪的专用喷头将处理好的磁颗粒以 $50\mu\text{l}/\text{cm}$ 的量均匀喷涂于0.8cm宽度玻璃纤维垫上,过夜冷冻干燥,加入干燥剂封存备用,

[0043] E、样品垫的处理

[0044] 将1.8cm宽度样品垫放入样品垫处理溶液中浸泡处理1小时后取出25-35°C烘干8小时。

[0045] 样品垫处理液是含有1%-5% Casein和0.1%-1%的PVA以及0.01-0.2% Tween-20的0.02M pH7.2(pH7.0-7.6均适用)的PBS溶液。

[0046] F、试纸条的组装及切割

[0047] 下述所有操作都必须在湿度小于20%,温度20-25°C的房间内进行。

[0048] 试纸板的组装:使用BioDot LM5000型组装仪按照要求将3.5cm宽的包被膜,2.5cm宽的吸水纸,0.8cm宽的磁颗粒垫,1.8cm宽的样品垫组装于9.8cm宽度透明塑料底板上,贴上上层透明塑料盖板,组装成试纸板。

[0049] 试纸条的裁切:使用BioDot CM4000型切条机将组装好的试纸板切成0.5cm宽的成品试纸条。

[0050] G、试纸卡的组装

[0051] 将本发明所述的切割好的单人份试纸条置于塑料底卡上的卡槽内,盖上上盖,使用压卡机将上下两片塑料卡压紧,确保整个试纸条处于绷紧状态。加入干燥剂室温封存备用。

[0052] H、确定该批次的二维码信息

[0053] 品名 :HBeAg 磁性检测卡

[0054] 批次 :试纸卡的组装日期,格式为 :年 / 月 / 日,XXXX/XX/XX

[0055] 阴阳性判读标准的确定 :取 100 份确认 HBeAg 标本 (强弱均有)、500 份随机标本使用该批次试纸卡检测,使用磁性检测仪检测结果,计算每个检测卡的 T1/C 值,T2/C 值,使用统计学方法计算均值和标准差,确定 : $T/C < 0.1$, $T/C > 0.2$ 为阳性,二者之间为灰区。

[0056] I、二维码的打印粘贴

[0057] 将上述二维码信息输入二维码打印机内并打印,将二维码粘贴于试纸卡的特定位置,使用二维码粘贴位置检测器随机抽检 2% 确保二维码粘贴无误。

[0058] J、成品包装

[0059] 将贴好二维码的单人份试纸卡与一包干燥剂密封于铝箔袋内,100 人份为一个包装置于一个包装盒内,一盒一份说明书和 1 瓶 10ml 装层析缓冲液,即制成试纸盒,该试纸盒于室温避光保存,保质期为 18 个月。层析缓冲液配方为 :1% Tween-20,0.5% Triton X-100,1% NP-40,0.05% NaN_3 ,20mmol pH7.2 (pH7.0-7.6 均适用) 的 PBS,。

[0060] 实施例 2

[0061] 本发明的检测卡的使用方法

[0062] 1、加样

[0063] 从包装盒中取出单人份的检测卡,撕开铝箔带包装,将试纸卡置于平整桌面上,用微量移液器取 $50 \mu\text{l}$ 样本血清加入卡上的加样孔内,再加入 $50 \mu\text{l}$ 层析缓冲液,等待反应进行 15 分钟。

[0064] 2、测量及结果输出

[0065] 将 MICT 检测仪预先开机,将检测卡插入检测仪的插卡口,运行仪器,仪器会自动读取卡上的二维码信息并进行测量,即时打印测量结果,阴阳性结果会在打印结果中显示。

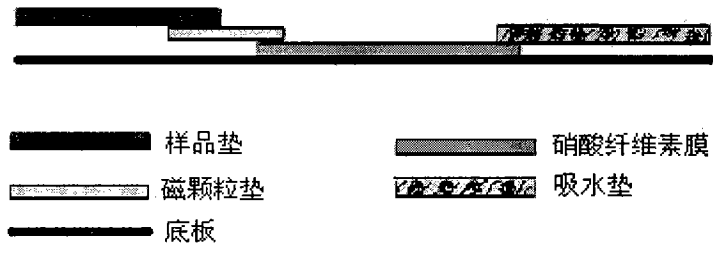


图 1

专利名称(译)	一种检测乙肝e抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101750498A	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	CN200910236334.8	申请日	2009-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	詹先发 应希堂 胡国茂 郑金来 唐宝军 于尚永		
发明人	詹先发 应希堂 胡国茂 郑金来 唐宝军 于尚永		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/576 G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测血液中乙肝e抗原的磁性免疫层析试纸条及其制备方法。本发明将磁性微粒子免疫层析技术引入到乙肝e抗原检测中，该试纸条是将包被膜、结合了乙肝e抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫依次相互交错地粘贴在底板上，然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成的。包被膜上预包被有乙肝e抗原检测线和质控线。本发明具有操作简便，灵敏度高，特异性好等优点。

