

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710113075.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月9日

[11] 公开号 CN 101158684A

[22] 申请日 2007.11.6

[21] 申请号 200710113075.0

[71] 申请人 山东省医药生物技术研究中心

地址 250062 山东省济南市历下区经十路 89 号

[72] 发明人 吴坚美 韩金祥 朱波 崔亚洲

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所

代理人 张勇

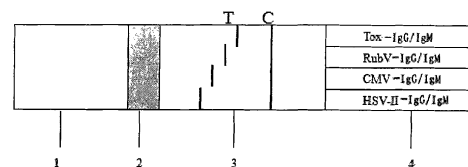
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称

同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸及制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸及制备方法。它包括基板，基板上粘接层析膜，在层析膜上包被固定至少两种特定抗原检测线，在层析膜下端依次粘有胶体金结合物垫、样品垫，在层析膜上端为吸收垫，所述检测线以交错排布在层析膜上，吸收垫上有与层析膜上的具体检测线相对应的标识区，本试纸条用来同时检测人是否有 ToRCH 特异性 IgM 或 IgG 感染。本试纸条既克服了单测试纸条一次只能检测一种病原体的缺点，又避免了在一个层析条上同时做几个项目的检测时前面检测线形成的复合物会影响后面的检测，在灵敏度上受到很大限制的缺陷，本试纸条具有操作简便、快速、灵敏、不需要特殊仪器设备、观察结果直观等显著优点，大大方便了临床检测和筛查工作。



1、一种同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸，它包括基板，基板上粘接层析膜，在层析膜上包被固定至少两种特定抗原检测线，在层析膜下端依次粘有胶体金结合物垫、样品垫，在层析膜上端为吸收垫，其特征是：所述检测线以交错排布在层析膜上，吸收垫上有与层析膜上的具体检测线相对应的标识区。

2、根据权利要求 1 所述的同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸，其特征是：所述检测线排布时按照阶梯式交错排布。

3、根据权利要求 1 所述的同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸，其特征是：所述检测线排布时以波浪式交错排布。

4、一种权利要求 1 所述同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸的制备方法，其特征是：它的步骤为，

1) 在层析膜上以交错排布方式包被固定至少两种特定检测线；

2) 制作胶体金结合物垫；

3) 将固相化的层析膜与胶体金结合物垫、样品垫、吸收垫按比例重叠在一起，装配成试纸条。

5、根据权利要求 4 所述的同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸的制备方法，其特征是：所述步骤 1) 中，层析膜上包被抗原的制备方法为：用 pH=7.6、0.01mol/L 磷酸盐缓冲液分别将多种检测抗原、胶体金标记抗体的抗抗体稀释到 1-2mg/ml 作为包被应用液；在硝酸纤维素膜上端用胶体金标记抗体的抗抗体包被应用液划线，做为质控线即 C 线，然后在质控线下方包被与给抗原相对应的检测线 Tn，各检测线 Tn 交错分布，将已包被好的 NC 膜室温放置干燥，供装配试纸用。

6、根据权利要求 4 所述的同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸的制备方法，其特征是：所述步骤 2) 中，胶体金结合物垫的制备方法为：

a、将氯金酸配制成 0.01% 水溶液，取 100ml 加热煮沸，搅拌下加入 1.5-2.0ml 的 1% 柠檬酸钠溶液，直到溶液颜色稳定成酒红色，即得到胶体金溶液；

b、用 0.2mol/L K_2CO_3 溶液将胶体金溶液调 pH 值至 7.6，搅拌下将抗人 IgM 或抗人 IgG 抗体 5 μ g/ml 用量加入胶体金溶液中混合，然后加入 10% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液 10ml，将此标记好的胶体金结合物 10000-14000r/min 离心 30-60 分钟，弃上清，将沉淀用含 1%BSA 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液悬浮，恢复原体积后再离心，如此洗涤 2~4 次，最后将沉淀悬浮于 1/10 体积含 1%BSA 的 PBS 缓冲液中，然后将此胶体金结合物溶液均匀涂在玻璃纤维上，冷冻干燥，密封备用。

同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸及制备方法

背景技术

本发明涉及一种层析试纸及其制备方法，尤其涉及一种同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸及制备方法。

背景技术

ToRCH 是弓形体 (*Toxoplasma gondii*, Tox)、风疹病毒 (*Rubella Virus*, RubV)、巨细胞病毒 (*Cytomegalovirus*, CMV)、单纯疱疹病毒 (*Herpes simplex Virus*, HSV) 的英文名称字头组合，是导致先天性宫内感染及围产期感染而引起围产儿畸形的病原体。

孕妇 ToRCH 感染多无临床症状，为隐型感染，诊断胎儿有无宫内感染应首先确定孕妇是否感染，孕妇 ToRCH 感染对优生优育与人口素质构成很大的威胁，因此对孕期进行 ToRCH 筛查是十分必要的。目前医院及计划生育服务部门确定孕早期或孕前妇女是否有 ToRCH 感染，需要同时检测这四项指标。临床上检测 ToRCH 感染常用的是 ELISA 法，其操作程序比较复杂，检测时间较长，不适应孕妇感染的快速诊断和怀孕人群的筛查。

层析试纸作为一种快速的检测工具，在早孕检测中得到了广泛的应用。受其启发，在一些其他的疾病检测中人们也采用了层析试纸，而且为了能同时进行多种疾病的检测，人们在一张层析试纸上依次设置了检测线，通过其变色反应检测疾病。但这种层析试纸它的胶体金结合物垫上涂的胶体金标记抗体结合物浓度是一定的。若结合物垫涂的过高，用其所装配的试纸条检测标本，层析膜上的本底颜色会深，并且易发生非特异性反应即检测标本会出现假阳性结果情况；若涂的过低，用其所装配的试纸条检测灵敏度会达不到要求，标本可能会出现漏检情况。当在层析膜上同时包被固定两种以上检测项目抗原，包被线长度相同，并间隔一定距离平行向后排布，固化的层析膜装配成试纸条。当用此试纸条检测含有两种以上病原体抗体血标本时，胶体金标记抗体结合物与第一条检测线形成复合物后，剩余的胶体金标记抗体结合物再与下一个检测线反应时，由于浓度下降检测灵敏度会降低，当它“流到”第三条检测线反应时，由于浓度更低，反应检测灵敏度会更低，标本会出现假阴性情况。

尤其当血标本与第一条检测线呈强阳性反应时，在第一条检测线处形成复合物会多，肉眼观察表现为检测线红色带更加明显，剩余的胶体金标记抗体浓度就会更少，那么在第二个检测线反应灵敏度就会更低，标本出现漏检情况就会更严重。

还有人提出将多张层析试纸集成到一个盒体进行检测，但其也存在一定问题，比如当加样量太少流不到检测区时，它需要在缓冲液加入区 (B) 处滴 2 滴缓冲液，该缓冲液在溶解固相胶体金标记抗人 IgG/IgM 抗体的同时“冲向”硝酸纤维素膜过程中同时稀释血清，并一起带入固化层析膜，进行抗原抗体反应。逆向胶体金检测 TORCH 免疫层析试纸条没有表现出想要得到的结果，且操作繁琐，需要两步加样。

发明内容

本发明的目的就是为了解决目前在一条试纸上进行多种病原体检测时其灵敏度不高等问题，提供一种具有结构简单，使用方便，灵敏度高等优点的同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸及制备方法。

为实现上述目的，本发明采用如下技术方案：

一种同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸，它包括基板，基板上粘接层析膜，在层析膜上包被固定至少两种特定检测线，在层析膜下端依次粘有胶体金结合物垫、样品垫，在层析膜上端为吸收垫，所述检测线以交错排布在层析膜上，吸收垫上有与层析膜上的具体检测线相对应的标识区，本试纸条用来同时检测人是否有特异性 IgG 或 IgM 感染。

所述检测线排布时按照阶梯式交错排布。

所述检测线排布时以波浪式交错排布。

一种同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸的制备方法，它的步骤为，

1) 在层析膜上以交错排布方式包被固定至少两种特定检测线；

2) 制作胶体金结合物垫;

3) 将固相化的层析膜与胶体金结合物垫、样品垫、吸收垫按比例重叠在一起, 装配成试纸条。

所述步骤 1) 中, 层析膜上包被抗原的制备方法为: 用 pH=7.6、0.01mol/L 磷酸盐缓冲液分别将多种检测抗原、胶体金标记抗体的抗抗体稀释到 1-2mg/ml 作为包被应用液; 在硝酸纤维素膜上端用胶体金标记抗体的抗抗体包被应用液划线, 做为质控线即 C 线, 然后在质控线下方包被与给抗原相对应的检测线 Tn, 各检测线 Tn 交错分布, 将已包被好的 NC 膜放置室温干燥, 供装配试纸用。

所述步骤 2) 中, 胶体金结合物垫的制备方法为:

a、将氯金酸配制成 0.01% 水溶液, 取 100ml 加热煮沸, 搅拌下加入 1.5-2.0ml 的 1% 柠檬酸钠溶液, 直到溶液颜色稳定成酒红色, 即得到胶体金溶液;

b、用 0.2mol/L K_2CO_3 溶液将胶体金溶液调 pH 值至 7.6, 搅拌下将抗人 IgM 或抗人 IgG 抗体 5ug/ml 用量加入胶体金溶液中混合, 然后加入 10%BSA 溶液 10ml, 将标记好的胶体金结合物 10000-14000r/min 离心 30-60 分钟, 弃上清, 将沉淀用含 1%BSA 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液悬浮, 恢复原体积后再离心, 如此洗涤 2~4 次。最后将沉淀悬浮于 1/10 体积分含 1%BSA 的 PBS 缓冲液中, 然后将此胶体金结合物溶液均匀涂在玻璃纤维上, 冷冻干燥, 密封备用。

本发明的试纸条具有一次检测, 即可知是否有 ToRCH 四种病原体感染, 在围产期检查中具有很大的应用价值。本试纸条提供的这种同时检测 ToRCH 感染的免疫层析试纸, 其方法是将弓形虫抗原、风疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒抗原分别在硝酸纤维素膜上的不同位置交错包被成线, 通过胶体金标记抗人 IgM 或抗人 IgG 显色, 来同时检测人血清中针对抗原的特异性 IgM 或 IgG 抗体。本试纸条既克服了单测试纸条一次只能检测一种病原体的缺点, 又避免了在一个层析条上同时做几个项目的检测时前面检测线形成的复合物会影响后面的检测, 在灵敏度上受到很大限制的缺陷。

本发明的有益效果是: 它在层析膜上对同时包被至少两种特定检测线, 是以交错排布形式来完成的, 避免了上述的缺陷, 又克服了单测试纸条一次只能检测一种病原体抗体的缺点, 本试纸条具有操作方法简便、快速、灵敏、不需要特殊仪器设备、观察结果直观等显著优点。

附图说明

图 1 为本发明第一实施例结构示意图;

图 2 为本发明第二实施例结构示意图;

图 3 为本发明第三实施例结构示意图。

其中, 1、样品垫, 2、胶体金结合物垫, 3、固相化层析垫, 4、吸收垫。

具体实施方式

下面结合附图与实施例对本发明作进一步说明。

实施例 1:

层析试纸条整体外观形式: 在一个 12*80mm 的 PVC 板上粘着一张 12*25mm 的层析膜, 层析膜上包被固定有弓形虫抗原、风疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒 II 型抗原、胶体金标记抗体的抗抗体, 形成固相化的层析膜 3, 其上的检测线呈阶梯状交错分布, 层析膜的下端依次粘有胶体金结合物垫 2、样品垫 1 (玻璃纤维), 层析膜的上端粘有吸收垫 4 (棉浆板), 吸收垫 4 上有与层析膜上包被的具体抗原相对应的标识区, 如图 1 所示。

实施例 2:

层析试纸条整体外观形式: 在一个 12*80mm 的 PVC 板上粘着一张 12*25mm 的层析膜, 层析膜上包被固定有弓形虫抗原、风疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒 II 型抗原、胶体金标记抗体的抗抗体, 形成固相化的层析膜 3, 其上的检测线呈波浪形交错分布, 层析膜的下端依次粘有胶体金结合物垫 2、样品垫 1 (玻璃纤维), 层析膜的上端粘有吸收垫 4 (棉浆板), 吸收垫 4 对应的抗原区域标明具体的检测抗体名称, 如图 2 所示。

实施例 3:

层析试纸条整体外观形式：在一个 15*80mm 的 PVC 板上粘着一张 15*25mm 的层析膜，层析膜上包被固定有弓形虫抗原、风疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒 I 型抗原、单纯疱疹病毒 II 型抗原、胶体金标记抗体的抗抗体，形成固相化的层析膜 3，其上的检测线呈阶梯状交错分布，层析膜的下端依次粘有胶体金结合物垫 2、样品垫 1（玻璃纤维），层析膜的上端粘有吸收垫 4（棉浆板），吸收垫 4 对应的抗原区域标明具体的检测抗体名称，如图 3 所示。

本发明试纸条的制备方法为：

（一）层析膜包被抗原的制备：

用 pH=7.6 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液分别将弓形虫抗原、风疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒 I 型抗原、单纯疱疹病毒 II 型抗原、胶体金标记抗体的抗抗体稀释到 1-2mg/ml 作为包被应用液。

在距离硝酸纤维素膜(NC 膜)上端 6mm 处将胶体金标记抗体的抗抗体包被应用液划一条 15mm 长的线，做为质控线（C 线），然后在质控线向下 4mm 处包被一条 3mm 长的检测线 1（T1）为弓形虫抗原，在 T1 横线终止处垂直向下间距 2mm 处再包被一条 3mm 长的检测线 2(T2)为风疹病毒抗原，在 T2 横线终止处垂直向下间距 2mm 处包被一条 3mm 长的检测线 3(T3)为巨细胞病毒抗原，T3 横线终止处垂直向下间距 2mm 处包被一条 3mm 长的检测线 4（T4）为单纯疱疹病毒 I 型抗原，T4 横线终止处垂直向下间距 2mm 处包被一条 3mm 长的检测线 5（T5）为单纯疱疹病毒 II 型抗原。将已包被好的 NC 膜室温放置干燥，供装配试纸条用。

（二）胶体金结合物垫的制备：

1、将氯金酸（HAuCl₄）配制成 0.01%水溶液，取 100ml 加热煮沸，搅拌下加入 1.5-2.0ml 的 1%柠檬酸钠溶液，直到溶液颜色稳定成酒红色，即得到胶体金溶液。

2、用 0.2mol/L K₂CO₃ 溶液将胶体金溶液调 pH 值至 7.6，搅拌下将抗人 IgM 抗体或抗人 IgG 抗体 5ug/ml 用量加入胶体金溶液中混合，然后加入 10%BSA 溶液 10ml。将标记好的胶体金结合物 10000-14000r/min 离心 30-60 分钟，弃上清，将沉淀用含 1%BSA 的磷酸盐（PBS）缓冲液悬浮，恢复原体积后再离心。如此洗涤 2~4 次。最后将沉淀悬浮于 1/10 体积分含 1%BSA 的 PBS 缓冲液中，然后将此胶体金结合物溶液均匀涂在玻璃纤维上，冷冻干燥，密封备用。

（三）免疫层析检测条的制备：

按第一步骤（试纸条整体外观形式）方法将固相化的层析膜与胶体金结合物垫、样品垫、吸收垫等按一定比例重叠在一起，装配成试纸条。

二、免疫层析检测条的结果判断：

1、取人血清标本 200ul 加在层析检测条的样品垫上，静置 10-20 分钟观察结果，若只有一条红色质控线（C 线）出现，则判为阴性；若有一条红色质控线（C 线）出现，同时在包被有 Tox、RubV、CMV、HSV-I、HSV-II 抗原特定位置出现红色带，则判为阳性，哪个特定位置出现红色带则判定是什么病原体抗体阳性；若无任何红色带出现则判定本试纸条失效。

2、若胶体金结合物垫中涂的是胶体金标记抗人 IgG，那么装配的试纸条是用于检测人血清中的 ToRCH-IgG 抗体。

若胶体金结合物垫中涂的是胶体金标记抗人 IgM，那么装配的试纸条是用于检测人血清中的 ToRCH-IgM 抗体。

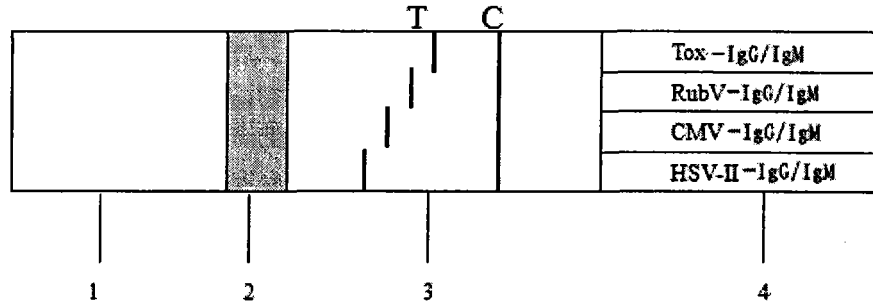


图 1

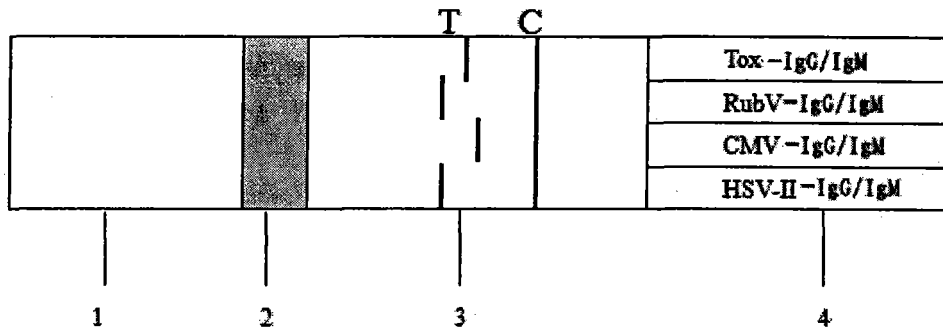


图 2

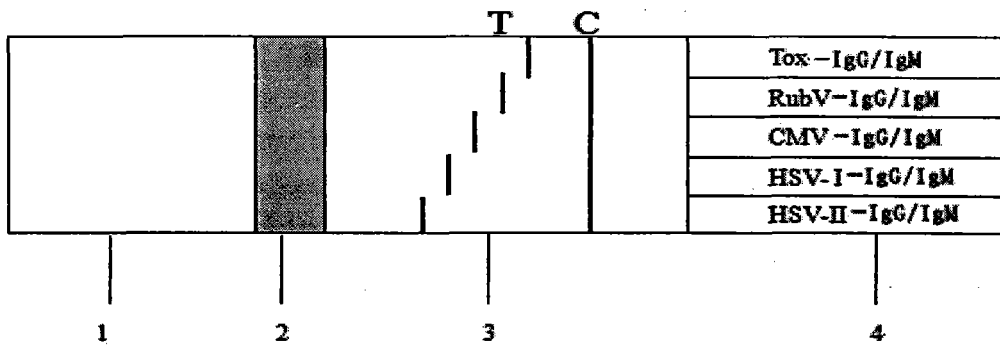


图 3

专利名称(译)	同时检测ToRCH感染的免疫层析试纸及制备方法		
公开(公告)号	CN101158684A	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200710113075.0	申请日	2007-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
[标]发明人	吴坚美 韩金祥 朱波 崔亚洲		
发明人	吴坚美 韩金祥 朱波 崔亚洲		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/52		
代理人(译)	张勇		
其他公开文献	CN101158684B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种同时检测ToRCH感染的免疫层析试纸及制备方法。它包括基板，基板上粘接层析膜，在层析膜上包被固定至少两种特定抗原检测线，在层析膜下端依次粘有胶体金结合物垫、样品垫，在层析膜上端为吸收垫，所述检测线以交错排布在层析膜上，吸收垫上有与层析膜上的具体检测线相对应的标识区，本试纸条用来同时检测人是否有ToRCH特异性IgM或IgG感染。本试纸条既克服了单测试纸条一次只能检测一种病原体的缺点，又避免了在一个层析条上同时做几个项目的检测时前面检测线形成的复合物会影响后面的检测，在灵敏度上受到很大限制的缺陷，本试纸条具有操作简便、快速、灵敏、不需要特殊仪器设备、观察结果直观等显著优点，大大方便了临床检测和筛查工作。

