

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/543

G01N 33/569



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03115138.8

[43] 公开日 2003 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 1431507A

[22] 申请日 2003.1.24 [21] 申请号 03115138.8

[71] 申请人 湖州瑞泽生物技术有限公司

地址 313000 浙江省湖州市龙溪路 208 号

[72] 发明人 张少恩

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 杜 军

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的  
免疫胶体金试剂及制备方法

### [57] 摘要

检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的免疫胶体金试剂及制备方法, 该试剂将 PVC 背衬一端依次粘附样品垫、包被了抗 u 链单克隆抗体和胶体金结合物的结合垫, 中间粘附包被了单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊(或兔)抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜, 另一端粘附吸水垫。该试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测, 全过程只需 30 分钟, 操作人员无需专业培训, 按说明书即可完成操作。

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

1、检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的免疫胶体金试剂及制备方法，该试剂包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬，PVC 背衬一端依次粘附样品垫、结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫，其特征在于结合垫包被了抗 u 链单克隆抗体—胶体金的结合物，硝酸纤维素膜上包被了单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊（或兔）抗鼠 IgG。

2、根据权利要求 1 所述的检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的免疫胶体金试剂及制备方法，其特征在于该试剂的制备方法包括以下步骤：  
(1) 制备单克隆抗体：取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代，用人源性的 u 链注射 BALB/C 小鼠腹腔，收取腹水，以亲和层析法提纯抗 u 链单克隆抗体；  
(2) 制备多克隆抗体：用人源性的 u 链多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊或家兔，纯化后得羊抗鼠 IgG 或兔抗鼠 IgG；  
(3) 制备胶体金：用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成 20nm~40nm 的胶体金颗粒；  
(4) 制备抗 u 链单克隆抗体胶体金标记物：将胶体金与单克隆抗体按 1: 0.005~0.015 (ml/mg) 比例混匀，使胶体金与抗体形成稳定的复合物，通过纯化浓缩形成抗 u 链单克隆抗体—胶体金标记物；  
(4) 将抗 u 链单克隆抗体胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将抗单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊（兔）抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区，充分干燥。

## 检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的免疫胶体金试剂及制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测抗体的免疫胶体金试剂，还涉及该试剂的制备方法。

### 背景技术

现有用于检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的方法主要有酶联免疫吸附、放射免疫试验、免疫胶体金渗滤法、免疫印迹试验 (WBA) 等。酶联免疫吸附 (EIA) 方法的缺陷是：需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用；检测操作人员需要经过专业培训；操作过程相对比较复杂，检测所需时间比较长；检测所需费用较高，不能实现单人份检测。免疫胶体金渗滤法的缺陷是：操作过程相对比较复杂，不能实现一步操作；试剂需要低温保存；检测所需费用较高；检测所需时间比胶体金免疫层析法要长。放射免疫试验的缺陷是：操作人员需要经过专业培训；操作过程复杂，要求高；试剂需要低温保存；由于试验涉及到放射性同位素，试验不是很安全，所以很少采用；检测费用较高；检测所需时间长。免疫印迹试验 (WBA) 的缺陷是：操作人员需要经过专业培训；操作过程复杂，要求高；试剂需要低温保存；目前尚无商品化的 HSV 血清抗体的蛋白印迹检测试剂盒面世，这种方法仅限于某些专业实验室中进行；检测费用高；检测所需时间长。

### 发明内容

本发明的目的是为了克服当前技术在推广使用中存在的缺陷，提供

一种不需要特定仪器设备辅助的检测试剂,并且能有效地降低检测成本,减轻需检测人员的负担。同时提供该试剂的制备方法。

检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的免疫胶体金试剂包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬, PVC 背衬一端依次粘附样品垫、结合垫,中间粘附硝酸纤维素膜,另一端粘附吸水垫,其特征在于结合垫包被了抗 u 链单克隆抗体—胶体金的结合物,硝酸纤维素膜上包被了单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊(或兔)抗鼠 IgG。

该试剂的制备方法包括以下步骤:(1)制备单克隆抗体:取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代,用人源性的 u 链注射 BALB/C 小鼠腹腔,收取腹水,以亲和层析法提纯抗 u 链单克隆抗体;(2)制备多克隆抗体:用人源性的 u 链多次免疫小鼠,提取抗血清免疫山羊或家兔,纯化后得羊抗鼠 IgG 或兔抗鼠 IgG;(3)制备胶体金:用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成 20nm~40nm 的胶体金颗粒;(4)制备抗 u 链单克隆抗体胶体金标记物:将胶体金与单克隆抗体按 1:0.005~0.015 (ml/mg) 比例混匀,使胶体金与抗体形成稳定的复合物,通过纯化浓缩形成抗 u 链单克隆抗体—胶体金标记物;(4)将抗 u 链单克隆抗体胶体金标记物包被在胶体金结合垫上,将抗单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊(兔)抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区,充分干燥。

本发明的积极效果在于:价格低廉,生产流程简单,成本低,检测的费用比使用其它检测方法要便宜得多;检测速度快,全过程只需 30 分钟,可以实现自我检测;可以现场检测;特异性好、灵敏度高、重复性好;操作简便,快速定性,结果准确、快速,操作简便,无需

冲洗过程和标准对照，可分批或单个样品及时检测；易于推广使用，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

### 具体实施方式

将 PVC 背衬一端依次粘附样品垫、包被了抗 u 链单克隆抗体和胶体金结合物的结合垫，中间粘附包被了单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊（或兔）抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫。

按以下步骤制备：（1）制备单克隆抗体：取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代，用人源性的 u 链注射 BALB/C 小鼠腹腔，收取腹水，以亲和层析法提纯抗 u 链单克隆抗体；（2）制备多克隆抗体：用人源性的 u 链多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊或家兔，纯化后得羊抗鼠 IgG 或兔抗鼠 IgG；（3）制备胶体金：将 100ml 0.01%氯化金用 0.9ml 1%柠檬酸三钠还原成 40nm 大小的颗粒；（4）制备抗 u 链单克隆抗体胶体金标记物：用 0.1mol /LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将胶体金溶液的 pH 值调至 8.2 左右，将胶体金溶液与单克隆抗体按 100ml 胶体金溶液中加入 1mg 单克隆抗体的比例混合均匀，使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物，再通过多次离心、弃上清、清洗，通过纯化浓缩形成抗 u 链单克隆抗体—胶体金标记物，冷藏备用；（5）用 Biodot 点膜机将抗 u 链单克隆抗体胶体金标记物喷涂在胶体金结合垫上，将抗单纯疱疹病毒 II 型特异性表面膜抗原和羊（兔）抗鼠 IgG 喷涂在硝酸纤维素膜上，充分干燥；（6）将硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫等依次粘在 PVC 背衬上；（7）将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试剂条，即制成检测单纯疱疹病毒 II 型抗体 IgM 的免疫胶体金试剂。

在检测前先将样本和试剂条(板)放在室温条件下放置一段时间(10分钟),使其恢复至室温;从铝箔袋中取出检测试剂条,按 MARK 线下箭头所示的方向将试剂条浸入样本溶液中,液面不得超过 MARK 线,5秒~8秒后取出,平放在操作台上;如果是试剂板:从铝箔袋中取出检测试剂板,平放在操作台上,往加样孔中滴加3滴(约120ul)样品溶液(血清);3分钟~15分钟内即可判断结果,30分钟后判断的结果为无效。

**结果判断:**如果样品中有要检测的“单纯疱疹病毒 I 型抗体 IgM”存在,则检测线处出现红色条带,同时质控线上也出现红色条带,此时结果为阳性;如果样品中没有要检测的“单纯疱疹病毒 I 型抗体 IgM”存在,则检测线处无条带出现,但质控线上出现红色条带,此时结果为阴性。如果质控线上没有红色条带出现,则产品无效。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测单纯疱疹病毒II型抗体IgM的免疫胶体金试剂及制备方法                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1431507A</a>                     | 公开(公告)日 | 2003-07-23 |
| 申请号            | CN03115138.8                                   | 申请日     | 2003-01-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 湖州瑞泽生物技术有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 湖州瑞泽生物技术有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 湖州瑞泽生物技术有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 张少恩  |         |            |
| 发明人            | 张少恩  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569     |         |            |
| 代理人(译)         | 杜军   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

检测单纯疱疹病毒II型抗体IgM的免疫胶体金试剂及制备方法，该试剂将PVC背衬一端依次粘附样品垫、包被了抗u链单克隆抗体和胶体金结合物的结合垫，中间粘附包被了单纯疱疹病毒II型特异性表面膜抗原和羊(或兔)抗鼠IgG的硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫。该试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测，全过程只需30分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。