

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

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 03115140. X

[43] 公开日 2003 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 1431509A

[22] 申请日 2003.1.24 [21] 申请号 03115140. X

[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 检测风疹病毒抗体 IgM 的免疫胶体金试剂及制备方法

[57] 摘要

检测风疹病毒抗体 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, 中间粘附包被了风疹病毒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、检测风疹病毒抗体 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风疹病毒特异性表面膜抗原和羊（或兔）抗鼠 IgG。

2、根据权利要求 1 所述的检测风疹病毒抗体 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；（5）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，将抗风疹病毒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。

检测风疹病毒抗体 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

现有用于检测风疹病毒抗体 IgM 的方法主要有酶联免疫吸附、免疫胶体金渗滤法、乳胶凝集法等。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；检测所需时间较长。乳胶凝集法的缺陷是：检测操作人员需要经过专业培训；操作过程相对比较复杂，要求高，不能实现一步操作；试剂需要低温保存；灵敏度低。

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。

检测风疹病毒抗体 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风疹病毒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；（5）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，将抗风疹病毒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：快诊技术代表着临床检测的发展方向，可以实现自我检测；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；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，自己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，中间粘附包被了风疹病毒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 /LK₂CO₃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, 将风疹病毒特异性表面膜抗原和羊(或兔)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, 即制成检测风疹病毒抗体 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“风疹病毒抗体 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“风疹病毒抗体 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)	检测风疹病毒抗体IgM的免疫胶体金试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN1431509A	公开(公告)日	2003-07-23
申请号	CN03115140.X	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	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测风疹病毒抗体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，中间粘附包被了风疹病毒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。