



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105823875 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610148335.7

(22)申请日 2016.03.15

(71)申请人 威尚生物技术(合肥)有限公司

地址 230031 安徽省合肥市高新区柏堰科
技园创新大道106号明珠产业园1#楼4
层A区E区

(72)发明人 程明

(74)专利代理机构 北京华仲龙腾专利代理事务
所(普通合伙) 11548

代理人 李静

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法,是将肺炎支原体抗原及胶体金标记肺炎支原体抗原,分别固定在硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜上,组成肺炎支原体抗体双抗原夹心法免疫胶体金检测试纸条。试纸条由样品垫、包被有胶体金标记肺炎支原体抗原胶体金垫、包被肺炎支原体抗原硝酸纤维素膜及PVC底板4个部分组成,样品垫用玻璃纤维素膜。在PVC底板中央贴上包被好的硝酸纤维素膜,以纯化肺炎支原体抗原在硝酸纤维素膜上划线作为测试线,以抗肺炎支原体单克隆抗体在硝酸纤维素膜上划线作为控制线。检测时取抗凝血或血清1滴,滴加在样品垫上,根据测试线和控制线是否出现色带来判断血清中是否存在肺炎支原体抗体。本发明建立了敏感快速的检测血清中肺炎支原体抗体的方法,主要供肺炎支原体流行病学调查使用。

1.肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)包被有肺炎支原体抗原的胶体金垫的制备:采用柠檬酸三钠还原法,制备30nm的胶体金。用0.2mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液调到pH8.0。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每100ml溶液加入1mg肺炎支原体抗原将蛋白缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌2h,再滴加入到终浓度为0.1%的PEG3000、1%蔗糖和1%的酪蛋白进行封闭60min,标记结束后以12000r/m离心,弃上清,沉淀物用0.01mol/L PBS溶液重悬,将沉淀重悬为原体积的1/10,再经2000r/min离心20min,取上清加至葡聚糖凝胶层析柱纯化,最终纯度达95%以上。然后将标记胶体金溶液加样于玻璃纤维素膜上,在温度20℃~25℃干燥4h,制成胶体金垫,干燥备用。

(2)肺炎支原体抗原包被硝酸纤维素膜:用生理盐水将肺炎支原体抗原稀释成1mg/ml,然后用喷膜仪将肺炎支原体抗原在硝酸纤维素膜上按1.2 μ l/cm进行划线包被,同时在硝酸纤维素膜上按1.2 μ l/cm包被鼠抗肺炎支原体单克隆抗体,用于产品的质控线,包被完成后将硝酸纤维素膜在干燥间室温干燥8h,备用。

(3)试纸条的组装:在干燥间内准备好吸水滤纸、样品垫、PVC底板,在PVC底板中央贴上包被好的肺炎支原体抗原硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸,硝酸纤维素膜下缘粘贴包被肺炎支原体抗原胶体金垫,胶体金垫下缘粘贴样品垫,完成后用裁切机将贴好的试纸板切成5mm宽的试纸条。再将试纸条密封于铝箔袋中,完成产品的组装。

肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肺炎支原体抗体的检测,具体是一种肺炎支原体抗体双抗原夹心法免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 肺炎支原体(M.Pneumonia)是人类支原体肺炎的病原体。支原体肺炎的病理改变以间质性肺炎为主,有时并发支气管肺炎,称为原发性非典型性肺炎。主要经飞沫传染,潜伏期2~3周,发病率以青少年最高。临床症状较轻,甚至根本无症状,若有也只是头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状,但也有个别死亡报道。一年四季均可发生,但多在秋冬时节。

[0003] 自肺炎支原体疫苗研制成功以后,极大地减少了儿童的发病率。然而,确定人群流行病学情况需要进行抗体的动态观察。因此研制肺炎支原体抗体检测试剂盒是客观急需的。胶体金免疫层析试纸条法因其检测时不需要特殊设备,结果出现快速、方法简便易掌握,可实现现场快速检测等特点,已成为目前传染病快速检测的研究热点。本试剂条的技术特殊之处是采用了双抗原夹心法,大大降低了非特异性反应,提高了对抗体检测的特异性和灵敏度。该检测结果与德国VIRION/SERION公司肺炎支原体IgG抗体检测试剂盒一致率高达96.5%。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种肺炎支原体抗体双抗原夹心法免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。

[0005] 本发明的技术方案为:

[0006] 肺炎支原体抗体双抗原夹心法免疫胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

[0007] (1)包被有肺炎支原体抗原的胶体金垫的制备:采用柠檬酸三钠还原法,制备30nm的胶体金。用0.2mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液调到pH8.0。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每100ml溶液加入1mg肺炎支原体抗原将蛋白缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌2h,再滴加入到终浓度为0.1%的PEG3000、1%蔗糖和1%的酪蛋白进行封闭60min,标记结束后以12000r/m离心,弃上清,沉淀物用0.01mol/L PBS溶液重悬,将沉淀重悬为原体积的1/10,再经2000r/min离心20min,取上清加至葡聚糖凝胶层析柱纯化,最终纯度达95%以上。然后将标记胶体金溶液加样于玻璃纤维素膜上,在温度20℃~25℃干燥4h,制成胶体金垫,干燥备用。

[0008] (2)肺炎支原体抗原包被硝酸纤维素膜:用生理盐水将肺炎支原体抗原稀释成1mg/ml,然后用喷膜仪将肺炎支原体抗原在硝酸纤维素膜上按1.2 μ l/cm进行划线包被,同时在硝酸纤维素膜上按1.2 μ l/cm包被鼠抗肺炎支原体单克隆抗体,用于产品的质控线,包被完成后将硝酸纤维素膜在干燥间室温干燥8h,备用。

[0009] (3)试纸条的组装:在干燥间内准备好吸水滤纸、样品垫、PVC底板,在PVC底板中央贴上包被好的肺炎支原体抗原硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸,硝酸纤维素膜下缘粘贴包被肺炎支原体抗原胶体金垫,胶体金垫下缘粘贴样品垫,完成后用裁切机将贴好的试纸板切成5mm宽的试纸条。再将试纸条密封于铝箔袋中,完成产品的组装。

[0010] 本发明试剂盒的检测结果显示与德国VIRION/SERION公司肺炎支原体1gG抗体检测试剂盒一致率高达96.5%,表明本发明试剂盒灵敏度和特异性高。

具体实施方式

[0011] (1)本发明检测试纸条结构如下

[0012] 在PVC底板中央贴上包被好的肺炎支原体抗原硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸,硝酸纤维素膜下缘粘贴包被肺炎支原体抗原胶体金垫,胶体金垫下缘粘贴样品垫,完成后用裁切机将贴好的试纸板切成5mm宽的试纸条。

[0013] (2)肺炎支原体抗体双抗原夹心法免疫胶体金检测试纸条生产工艺

[0014] 肺炎支原体纯化膜蛋白抗原的胶体金标记:采用柠檬酸三钠还原法,制备30nm的胶体金。用0.2mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液调到pH8.0。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每100ml溶液加入1mg肺炎支原体抗原(购自Abcam公司,货号ab124007)将蛋白缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌2h,再滴加入到终浓度为0.1%的PEG3000、1%蔗糖和1%的酪蛋白进行封闭60min,标记结束后以12000r/m离心,弃上清,沉淀物用0.01mol/L PBS溶液重悬,将沉淀重悬为原体积的1/10,再经2000r/min离心20min,取上清加至葡聚糖凝胶层析柱纯化,最终纯度达95%以上。然后将标记胶体金溶液加样于玻璃纤维素膜上,在温度20℃~25℃干燥4h,制成胶体金垫,干燥备用。

[0015] 肺炎支原体抗原包被硝酸纤维素膜:用生理盐水将肺炎支原体抗原(购自Meridian Life Science公司,货号3H21715)稀释成1mg/ml,然后用喷膜仪将肺炎支原体抗原在硝酸纤维素膜上按1.2 μ l/cm进行划线包被,同时在硝酸纤维素膜上按1.2 μ l/cm包被鼠抗肺炎支原体单克隆抗体,用于产品的质控线,包被完成后将硝酸纤维素膜在干燥间室温干燥8h,备用。

[0016] 试纸条的组装:在干燥间内准备好吸水滤纸、样品垫、PVC底板,在PVC底板中央贴上包被好的肺炎支原体抗原硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸,硝酸纤维素膜下缘粘贴包被肺炎支原体抗原胶体金垫,胶体金垫下缘粘贴样品垫,完成后用裁切机将贴好的试纸板切成5mm宽的试纸条。再将试纸条密封于铝箔袋中,完成产品的组装。

[0017] (3)利用上述试纸条检测血清中肺炎支原体抗体:

[0018] 取下单人份检测条包装,抓住未密封的一端,撕开铝泊包装,尽快检测。

[0019] 将检测条水平放置,准确滴加1滴(约50 μ l)血清或血浆样本在试纸条的样品垫。

[0020] 5分钟内读取结果。

[0021] 结果判断:

[0022] 阳性:控制线出现红色条带,测试线出现红色条带,为肺炎支原体抗体阳性;

[0023] 阴性:控制线出现红色条带,测试线不出现红色条带,为肺炎支原体抗体阴性。

[0024] 失效:控制线不出现红色条带,或控制线、测试线均不出现红色条带,为试剂条失效。

[0025] (4)肺炎支原体抗体检测试纸条特异性试验:

[0026] 以肺炎支原体标准1gG阳性血清、衣原体标准1gG阳性血清、腺病毒标准1gG阳性血清、呼吸道合胞病毒标准1gG阳性血清和肺炎支原体标准1gG阴性血清采用肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条检测,只有肺炎支原体标准1gG阳性血清检测结果为阳性,其它均为阴性,说明该试剂条特异性良好。

[0027] (5)肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条重复性试验:

[0028] 随机抽取20份肺炎支原体标准1gG阳性血清、阴性血清分别于不同的时间进行重复检测,变异系数均<5%,证明该试剂盒具有良好的稳定性和重复性。

[0029] (6)肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条临床标本检测:

[0030] 试纸条与德国VIRION/SERION公司试剂盒肺炎支原体1gG抗体检测试剂盒的比较:

[0031] 对228份标本用两种试剂盒检测比较阴性与阳结果,如表1所示:

[0032] 表1与VIRION/SERION试剂盒的比较结果

本试剂条	VIRION/SERION	
	+	-
[0033] +	126 例	6 例
-	2 例	94 例
合计	128 例	228 例

[0034] 对228份标本用两种试剂盒检测共有220例相符(96.5%),有8例不符(3.5%),这种差别不符,估计可能是与两种试剂盒原理不同有关,德国VIRION/SERION公司试剂盒是ELISA法,我们的试剂盒是胶体金免疫层析法。

专利名称(译)	肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN105823875A	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201610148335.7	申请日	2016-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	威尚生物技术(合肥)有限公司		
申请(专利权)人(译)	威尚生物技术(合肥)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威尚生物技术(合肥)有限公司		
[标]发明人	程明		
发明人	程明		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/56933 G01N33/532 G01N2333/30		
代理人(译)	李静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肺炎支原体抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法，是将肺炎支原体抗原及胶体金标记肺炎支原体抗原，分别固定在硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜上，组成肺炎支原体抗体双抗原夹心法免疫胶体金检测试纸条。试纸条由样品垫、包被有胶体金标记肺炎支原体抗原胶体金垫、包被肺炎支原体抗原硝酸纤维素膜及PVC底板4个部分组成，样品垫用玻璃纤维素膜。在PVC底板中央贴上包被好的硝酸纤维素膜，以纯化肺炎支原体抗原在硝酸纤维素膜上划线作为测试线，以抗肺炎支原体单克隆抗体在硝酸纤维素膜上划线作为控制线。检测时取抗凝血或血清1滴，滴加在样品垫上，根据测试线和控制线是否出现色带来判断血清中是否存在肺炎支原体抗体。本发明建立了敏感快速的检测血清中肺炎支原体抗体的方法，主要供肺炎支原体流行病学调查使用。

本试剂条	VIRION/SERION	
	+	-
+	126例	6例
-	2例	94例
合计	128例	228例