



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771123 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611150735.8

(22)申请日 2016.12.14

(71)申请人 苏州万木春生物技术有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新技术产业
开发区锦峰路8号(科技城)

(72)发明人 丁锦勤 黄政 马军

(74)专利代理机构 苏州广正知识产权代理有限
公司 32234

代理人 马云玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备
方法

(57)摘要

本发明公开了一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,包括步骤为:通过点膜喷金设备用登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金对玻璃纤维素膜喷金得到金垫,用抗人IgM(抗 μ 链)抗体检测线包被液、抗人IgG抗体检测线包被液和对照线包被液分别在粘有硝酸纤维素膜的聚氯乙烯底板上划线,得到点膜的聚氯乙烯底板;将样品垫、金垫、点膜的聚氯乙烯底板和吸水纸组装在一起,切割成检测试纸。通过上述方式,本发明得到的检测试纸基于免疫侧向流层析技术,能够通过手工操作、肉眼读取判断血液样本中是否含有登革病毒IgM/IgG抗体,诊断快速且结果准确,不会对受检者身体造成伤害。

1. 一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,包括步骤为:

(1) 将三羟甲基氨基甲烷、蔗糖、海藻糖和牛血清白蛋白溶于水并定容,调节pH值至8-9,得到重悬液,将海藻糖溶于pH值为7-8的磷酸盐缓冲溶液中得到包被基液;

(2) 胶体金中加入碳酸钾后调节pH,再依次加入登革病毒抗原、牛血清白蛋白溶液,离心得到第一沉淀,所述第一沉淀用步骤(1)得到的重悬液重悬得到登革病毒抗原免疫金;胶体金中加入碳酸钾后调节pH,再依次加入鼠IgG、牛血清白蛋白溶液,离心得到第二沉淀,所述第二沉淀用步骤(1)得到的重悬液重悬得到鼠IgG免疫金;

(3) 往登革病毒抗原免疫金中加入鼠IgG免疫金,再用步骤(1)得到的重悬液重悬,得到登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金;

(4) 用步骤(1)得到的包被基液和无水乙醇稀释抗人IgM抗体得到抗人IgM抗体检测线包被液;用步骤(1)得到的包被基液和无水乙醇稀释抗人IgG抗体得到抗人IgG抗体检测线包被液;用步骤(1)得到的包被基液和无水乙醇稀释羊抗鼠IgG多抗得到对照线包被液;

(5) 用步骤(3)得到的所述登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金对金垫喷金得到免疫金垫,用步骤(4)得到的所述抗人IgM抗体检测线包被液、所述抗人IgG抗体检测线包被液、对照线包被液分别在硝酸纤维素膜上划线,得到反应膜;

(6) 将步骤(5)得到的反应膜放置,再放入膜封闭液中浸泡后取出沥干粘贴于聚氯乙烯底板上干燥得到贴膜的聚氯乙烯底板,其中膜封闭液是将聚乙二醇20000、三羟甲基氨基甲烷、曲拉通100溶于水中得到;

(7) 将样品垫、免疫金垫、贴膜的聚氯乙烯底板和吸水纸组装在一起得到登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸。

2. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述三羟甲基氨基甲烷、所述蔗糖、所述海藻糖、所述牛血清白蛋白、所述定容后的总体积的比例为0.24g:10g:5g:1g:100mL。

3. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述重悬液的pH值采用1M盐酸调节pH值至8.4;所述磷酸盐缓冲溶液的pH值为7.4;所述磷酸盐缓冲溶液为0.01M。

4. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(2)的具体步骤是:往搅拌的胶体金中加入0.2M碳酸钾,调节pH并搅拌10min,加入登革病毒抗原或鼠IgG并搅拌15min,再加入10%牛血清白蛋白溶液,搅拌15min,在4℃、转速为10000r/min的条件下离心20分钟得到第一沉淀或第二沉淀,所述第一沉淀或第二沉淀用所述重悬液重悬至离心前总体积的1/20,其中搅拌过程是置于磁力搅拌器上实现的。

5. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述碳酸钾为0.2M,所述0.2M碳酸钾和所述登革病毒抗原的比例为8uL/mL:4μg/mL,所述0.2M碳酸钾和所述鼠IgG的比例为6uL/mL:11μg/mL;所述10%牛血清白蛋白溶液的加入体积为所述胶体金体积的1/10。

6. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(3)中所述鼠IgG免疫金的加入体积为所述登革病毒抗原免疫金体积的14%;所述重悬液的体积为步骤(2)中标记登革病毒抗原时使用的胶体金体积的1/10减去步骤(3)中登革病毒抗原免疫金体积和鼠IgG免疫金体积。

7. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(4)中所述抗人IgM抗体检测线包被液中所述抗人IgM抗体的浓度为0.15mg/mL;所述抗人IgG抗体检测线包被液中所述抗人IgG抗体的浓度为0.5mg/mL;所述对照线包被液中所述羊抗鼠IgG多抗的浓度为1.0mg/mL;所述无水乙醇的加入体积为所述抗人IgM抗体检测线包被液、所述抗人IgG抗体检测线包被液或所述对照线包被液总体积的2.5%。

8. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(5)中所述喷金过程通过点膜喷金设备实现;所述金垫采用玻璃纤维膜。

9. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(6)中所述反应膜的放置是在2-8℃下放置4h;所述浸泡时间为30min;所述膜封闭液是将比例为2g:1.21g:0.1mL的聚乙二醇20000、三羟甲基氨基甲烷、曲拉通100溶于水中并定容至100 mL,再稀释10倍后用于浸泡所述反应膜;所述膜封闭液的pH值调节至8.0。

10. 根据权利要求1所述的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,其特征在于,步骤(7)中所述样品垫采用玻璃纤维膜,在使用前用样品垫处理液对所述样品垫浸泡10min后干燥,其中所述样品垫处理液是将比例为0.1g:1.21g:0.5mL:10mg的酪蛋白、三羟甲基氨基甲烷、吐温80和鼠抗人红细胞抗体溶于水中定容至100 mL,pH值调节至8.0;所述登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸是组装后切割得到的。

一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物应用技术领域,特别是涉及一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 登革热是由1~4型登革病毒引起、经伊蚊传播的急性传染病,按照《中华人民共和国传染病防治法》的规定为乙类传染病。亚洲、大洋洲、美洲和非洲均有本病发生,是热带、亚热带地区的一个非常严重的公共卫生问题。

[0003] 目前,世界上约有25亿人受到登革病毒感染的威胁,每年发生登革病毒感染患者超过1亿人,并且有50万人发展成为登革出血热或登革休克综合征,造成大约25000人死亡。在我国,20世纪初本病就已经传入我国,20世纪20年代和40年代曾造成上海、杭州、广州、汉口等地的广泛流行。1978年5月本病在广东省佛山市发生流行,以后的十年中,疫情迅速在广东、广西、海南省流行。20世纪80年代云南边境局部地区曾发生过登革热散发流行,并从白纹伊蚊分离到登革病毒4型。20世纪90年代以来,本病主要在广东、福建流行,多为小规模流行或散发。1999年和2004年因输入性病例导致福建和浙江等地发生暴发流行,其它省区近年来也常有输入性病例的发生。但是,由于登革热传播迅猛、发病率高,特别是近些年由于人员流动频繁和国际旅游的迅猛发展,使登革病毒的流行范围及其传播媒介埃及伊蚊和白纹伊蚊的分布范围也在相应扩大。登革病毒有四个血清型,在一个地区往往存在不同血清型病毒的交替流行,这更增加了登革出血热和登革休克综合征发生的可能性。登革出血热和登革休克综合征的病死率较高,不仅严重影响人民的身体健康,而且严重影响当地经济、贸易和旅游事业的发展,故早期诊断极为重要。

发明内容

[0004] 本发明主要解决的技术问题是提供一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,该制备方法得到的检测试纸诊断快速且结果准确。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,包括步骤为:

(1) 将三羟甲基氨基甲烷、蔗糖、海藻糖和牛血清白蛋白溶于水并定容,调节pH值至8-9,得到重悬液,将海藻糖溶于pH值为7-8的磷酸盐缓冲溶液中得到包被基液;

(2) 胶体金中加入碳酸钾后调节pH,再依次加入登革病毒抗原、牛血清白蛋白溶液,离心得到第一沉淀,所述第一沉淀用步骤(1)得到的重悬液重悬得到登革病毒抗原免疫金;胶体金中加入碳酸钾后调节pH,再依次加入鼠IgG、牛血清白蛋白溶液,离心得到第二沉淀,所述第二沉淀用步骤(1)得到的重悬液重悬得到鼠IgG免疫金;

(3) 往登革病毒抗原免疫金中加入鼠IgG免疫金,再用步骤(1)得到的重悬液重悬,得到登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金;

(4) 用步骤(1)得到的包被基液和无水乙醇稀释抗人IgM抗体得到抗人IgM抗体检测线

包被液；用步骤(1)得到的包被基液和无水乙醇稀释抗人IgG抗体得到抗人IgG抗体检测线包被液；用步骤(1)得到的包被基液和无水乙醇稀释羊抗鼠IgG多抗得到对照线包被液；

(5)用步骤(3)得到的所述登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金对金垫喷金得到免疫金垫，用步骤(4)得到的所述抗人IgM抗体检测线包被液、所述抗人IgG抗体检测线包被液、对照线包被液分别在硝酸纤维素膜上划线，得到反应膜；

(6)将步骤(5)得到的反应膜放置，再放入膜封闭液中浸泡后取出沥干粘贴于聚氯乙烯底板上干燥得到贴膜的聚氯乙烯底板，其中膜封闭液是将聚乙二醇20000、三羟甲基氨基甲烷、曲拉通100溶于水中得到；

(7)将样品垫、免疫金垫、贴膜的聚氯乙烯底板和吸水纸组装在一起得到登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸。

[0006] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(1)中所述三羟甲基氨基甲烷、所述蔗糖、所述海藻糖、所述牛血清白蛋白、所述定容后的总体积的比例为0.24g:10g:5g:1g:100mL。

[0007] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(1)中所述重悬液的pH值采用1M盐酸调节pH值至8.4；所述磷酸盐缓冲溶液的pH值为7.4；所述磷酸盐缓冲溶液为0.01M。

[0008] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(2)的具体步骤是：往搅拌的胶体金中加入0.2M碳酸钾，调节pH并搅拌10min，加入登革病毒抗原或鼠IgG并搅拌15min，再加入10%牛血清白蛋白溶液，搅拌15min，在4℃、转速为10000r/min的条件下离心20分钟得到第一沉淀或第二沉淀，所述第一沉淀或第二沉淀用所述重悬液重悬至离心前总体积的1/20，其中搅拌过程是置于磁力搅拌器上实现的。

[0009] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(2)中所述碳酸钾为0.2M，所述0.2M碳酸钾和所述登革病毒抗原的比例为8uL/mL:4μg/mL，所述0.2M碳酸钾和所述鼠IgG的比例为6uL/mL:11μg/mL；所述10%牛血清白蛋白溶液的加入体积为所述胶体金体积的1/10。

[0010] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(3)中所述鼠IgG免疫金的加入体积为所述登革病毒抗原免疫金体积的14%；所述重悬液的体积为步骤(2)中标记登革病毒抗原时使用的胶体金体积的1/10减去步骤(3)中登革病毒抗原免疫金体积和鼠IgG免疫金体积。

[0011] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(4)中所述抗人IgM抗体检测线包被液中所述抗人IgM抗体的浓度为0.15mg/mL；所述抗人IgG抗体检测线包被液中所述抗人IgG抗体的浓度为0.5mg/mL；所述对照线包被液中所述羊抗鼠IgG多抗的浓度为1.0mg/mL；所述无水乙醇的加入体积为所述抗人IgM抗体检测线包被液、所述抗人IgG抗体检测线包被液或所述对照线包被液总体积的2.5%。

[0012] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(5)中所述喷金过程通过点膜喷金设备实现；所述金垫采用玻璃纤维膜。

[0013] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(6)中所述反应膜的放置是在2-8℃下放置4h；所述浸泡时间为30min；所述膜封闭液是将比例为2g:1.21g:0.1mL的聚乙二醇20000、三羟甲基氨基甲烷、曲拉通100溶于水中并定容至100 mL，再稀释10倍后用于浸泡所述反应膜；所述膜封闭液的pH值调节至8.0。

[0014] 在本发明一个较佳实施例中，步骤(7)中所述样品垫采用玻璃纤维膜，在使用前用样品垫处理液对所述样品垫浸泡10min后干燥，其中所述样品垫处理液是将比例为0.1g:1.21g:0.5mL:10mg的酪蛋白、三羟甲基氨基甲烷、吐温80和鼠抗人红细胞抗体溶于水中定

容至100 mL,pH值调节至8.0;所述登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸是组装后切割得到的。

[0015] 本发明的有益效果是:本发明的登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法,得到的检测试纸基于免疫侧向流层析技术,不需任何仪器设备,能够通过手工操作、肉眼读取判断血液样本中是否含有登革病毒IgM/IgG抗体,诊断快速且结果准确,不会对受检者身体造成伤害。所述试纸采用一份样本即能对IgM/IgG抗体同时检测,协助临床诊断人体是否受到登革病毒的感染,尽早隔离并治疗,对登革热疾病诊断治疗和疫情防控起到非常重大的作用。

具体实施方式

[0016] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0017] (一) 容器及材料

容器设备:烧杯、量筒、容量瓶、玻璃棒、磁力搅拌机、电子天平、移液枪、点膜喷金设备、裁切机、切条机、封口机、压壳机、pH计、鼓风干燥箱。

[0018] 试剂辅料:氯金酸、柠檬酸三钠、 K_2CO_3 、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、无水乙醇、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、HCl、BSA(牛血清白蛋白)、PEG20000(聚乙二醇20000)、TritonX-100(曲拉通)、酪蛋白、Tween-80(吐温80)、蔗糖、海藻糖、鼠抗人红细胞抗体。

[0019] 物料:玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、聚氯乙烯底板、吸水纸、塑料卡、干燥剂、一次性滴管、铝箔袋。

[0020] 环境:洁净、室温、干区相对湿度 $\leq 30\%$,湿区相对湿度45-65%,水质:高纯水。

[0021] (二) 制备过程

1、胶体金的制备:采用柠檬酸三钠还原法

50 mL 2%氯金酸溶液配制:取1g/瓶的氯金酸溶于高纯水中,容量瓶定容至50 mL,2-8 $^{\circ}C$ 保存备用。

[0022] 100 mL 5%柠檬酸三钠溶液配制:称取5.00g柠檬酸三钠溶于高纯水中,容量瓶定容至100 mL,用0.22 μm 滤头过滤,现配现用。

[0023] 胶体金制备方法:在洁净烧杯中加入高纯水,于磁力搅拌器上加热至煮沸,然后加入5%柠檬酸三钠溶液,充分混匀2min,加入2%氯金酸溶液,维持加热30min,冷却后加高纯水稀释,2-8 $^{\circ}C$ 保存备用。

[0024] 各组份加入体积:

胶体金最大吸收峰 (nm)	氯金酸(2%)加入量(mL)/600mL胶体金	柠檬酸三钠(5%)加入量(mL)/600mL胶体金	胶体金特呈色
529	6.315	2.95	深红

2、样品垫的预处理:

1L样品垫处理液配制:称取1g酪蛋白、12.1g Tris和0.1g鼠抗人红细胞抗体,量取5mL

Tween-80溶于高纯水中,容量瓶定容至1L,2-8℃密闭保存备用。

[0025] 将型号为RB65的玻璃纤维膜在样品垫处理液中浸润,浸泡10min,取出于相对湿度 $\leq 30\%$ 风干1h,裁去边缘防止边缘效应,装入铝箔袋中室温保存备用。

[0026] 3、重悬液、包被基液、膜封闭液溶液配制

100mL 1M盐酸配制:量取8.59 mL浓盐酸溶于高纯水中,容量瓶定容至100 mL,室温保存备用。

[0027] 100mL重悬液配制:称取0.24g Tris、10g蔗糖、5g海藻糖和1g BSA溶于高纯水,在100mL容量瓶中定容,用1M盐酸调pH为8.4,用0.22 μm 滤头过滤,2-8℃密闭保存备用。

[0028] 磷酸盐缓冲液(PBS)配制:称取2.84g磷酸氢二钠溶于高纯水,容量瓶定容至100 mL,即为0.2M磷酸氢二钠溶液;称取2.40g磷酸二氢钠溶于高纯水,容量瓶定容至100 mL,即为0.2M磷酸二氢钠溶液;用0.22 μm 滤头过滤,2-8℃保存备用。量取19 mL 0.2M磷酸二氢钠溶液,81 mL 0.2M磷酸氢二钠溶液,称取17.00g氯化钠,加入1900 mL高纯水,混匀,即为0.01M, pH=7.4的磷酸盐缓冲液(PBS), 2-8℃密闭保存备用。

[0029] 包被基液配制:称取1.00 g海藻糖溶于磷酸盐缓冲液(PBS),容量瓶定容至100 mL,2-8℃密闭保存备用。

[0030] 膜封闭液配制:称取2.00g PEG20000和1.21g Tris,量取0.1 mL TritonX-100溶于高纯水,在100mL容量瓶中定容,用1M盐酸调pH为8.0,2-8℃密闭保存备用。

[0031] 4、免疫金标记

100mL 0.2 M碳酸钾溶液配制:称取2.76 g碳酸钾溶于高纯水,容量瓶定容至100mL,用0.22 μm 滤头过滤,2-8℃密闭保存备用。

[0032] 100mL 10%BSA溶液配制:称取10 g BSA溶于高纯水中,容量瓶定容至100mL,0.22 μm 滤头过滤,2-8℃密闭保存备用。

[0033] 标记登革病毒抗原:取烧杯,加入胶体金,置磁力搅拌机上搅拌,加入8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的0.2M碳酸钾,调节pH并搅拌10min,缓慢加入4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的登革病毒抗原,搅拌15min,缓慢加入10% BSA保护剂,至终浓度1%,搅拌15min,在4℃下转速为10000r/min的条件下离心20min,弃去上清液,沉淀用重悬液重悬至原体积的1/20,得到登革病毒抗原免疫金,2-8℃保存备用。

标记鼠IgG:取烧杯,加入胶体金,置磁力搅拌机上搅拌,加入6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的0.2M碳酸钾,调节pH并搅拌10min,缓慢加入11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鼠IgG,搅拌15 min,缓慢加入10% BSA保护剂,至终浓度1%,搅拌15min,在4℃下转速为10000 r/min的条件下离心20min,弃去上清液,沉淀用重悬液重悬至原体积的1/20,得到鼠IgG免疫金,2-8℃保存备用。

[0034] 登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金制备:往登革病毒抗原免疫金中按其体积的14%加入鼠IgG免疫金,再用重悬液重悬至标记登革病毒抗原时使用的胶体金体积的1/10,得到登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金,2-8℃保存备用。

[0035] 5、点膜喷金操作

喷金:打开点膜喷金设备,将喷金模块压下去,划线模块抬上来,防止划线头碰触到板面,打开真空泵至0.5个大气压。

[0036] 按[运行]进入运行画面,选择[程序]转换到喷金工作模式。进入程序数据画面后选择好程序号,编辑好“长度”、“浓度”、“速度”、“原点X、Y、Z”等参数,修改好参数后,按[保

存]保存数据,按[永久保存]将永久保存数据。

[0037] 按[手动]进入手动画面,将2号泵(喷金模式)样品管道插入高纯水试管中,管道末端准备接水的器皿。选择[清洗]使用高纯水清洗5遍。待拿走高纯水试管后,选择[排液]直至管道内无水分。此时将2号泵样品管道插入试管中,按[加液]直至管道内充满登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金。将金垫放在板面上的合适位置,按[运行]进入运行画面,按[开始]进行喷金。

[0038] 喷金完毕,将2号泵样品管道插入高纯水试管中,管道末端准备接水的器皿。选择[清洗]使用高纯水清洗5遍。按[主菜单]的[气操作]开气至气压为零。

[0039] 喷金处理后的金垫于相对湿度 $\leq 30\%$ 风干1h。干燥处理后的免疫金垫置于铝箔袋中,加干燥剂室温密封保存备用。

[0040] 配制检测线包被液:用包被基液、无水乙醇稀释抗人IgM抗体至终浓度为0.15mg/mL,得到检测线包被液即T线(M)工作液;用包被基液、无水乙醇稀释抗人IgG抗体至终浓度为0.5mg/mL,得到检测线包被液即T线(G)工作液,分别将两种T线工作液2-8℃保存备用。

[0041] 配制对照线包被液:用包被基液、无水乙醇将羊抗鼠IgG多抗稀释至终浓度为1.0mg/mL,得到对照线包被液即C线工作液,2-8℃保存备用。

[0042] 点膜:将划线模块压下去,将喷金模块抬上来,形成一定的落差,防止喷金头触碰板面。

[0043] 按[运行]进入运行画面,选择[程序]转换到划线工作模式。进入程序数据画面后选择好程序号,编辑好“长度”、“浓度”、“速度”、“原点X、Y、Z”等参数,其中“速度”不可太快,为80mm/s,修改好参数后,按[保存]保存数据,按[永久保存]将永久保存数据。

[0044] 按[手动]进入手动画面,将1、3号泵(划线模式)样品管道插入高纯水试管中,管道末端准备接水的器皿。选择[清洗]使用高纯水清洗5遍。待拿走高纯水试管后,选择[排液]直至管道内无水分。此时将1号泵(划线模式)样品管道插入C线工作液中,将3号泵(划线模式)样品管道插入T线(M)工作液中,按[加液]直至管道内充满包被液。将准备好的硝酸纤维素膜放在板面上的合适位置,按[运行]进入运行画面,按[开始]进行划线。

[0045] 划线操作完毕,将1、3号泵样品管道插入高纯水试管中,管道末端准备接水的器皿。选择[清洗]使用高纯水清洗5遍。待拿走高纯水试管后,选择[排液]直至管道内无水分。关闭1号泵。将3号泵(划线模式)样品管道插入T线(G)工作液中,按[加液]直至管道内充满包被液。将准备好的硝酸纤维素膜放在板面上的合适位置,按[运行]进入运行画面,按[开始]进行划线。划线操作完毕,将3号泵样品管道插入高纯水试管中,管道末端准备接水的器皿。选择[清洗]使用高纯水清洗5遍。关闭点膜喷金仪。划线完成后的硝酸纤维素膜即反应膜于2-8℃保存,4h后备用。

[0046] 将反应膜放入10倍稀释后的膜封闭液中浸泡30min,取出贴于聚氯乙烯底板的相应位置,将粘有反应膜的聚氯乙烯底板置于干燥箱中,60℃ \pm 3℃,相对湿度 $\leq 30\%$,烘干2h至完全干燥。干燥完成后将所述聚氯乙烯底板置于铝箔袋中,加干燥剂室温密封保存备用。

[0047] 6、组装切割、装配、包装

将样品垫、免疫金垫、粘有反应膜的聚氯乙烯底板和吸水纸组装在一起,使用自动斩切机切割成4mm试纸条。每张试纸条装配至塑料卡中,使用压壳机压紧。加入一个干燥剂、一个一次性滴管后装入铝箔袋中保存,即为成品。

[0048] 所述登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸在硝酸纤维素膜的检测区固定了抗人IgM抗体、抗人IgG抗体,在对照区固定了羊抗鼠IgG多抗,在玻璃纤维素膜上预包被登革病毒抗原和鼠IgG-胶体金。测试时,滴加5uL血清、血浆或全血,再滴加一滴(约50μL)缓冲液(PBS),水平放置。免疫金垫上的登革病毒抗原和鼠IgG-胶体金会溶解,如样本中含有登革病毒IgM抗体或登革病毒IgG抗体,登革病毒抗原-胶体金与样本中的登革病毒IgM抗体或登革病毒IgG抗体结合在一起,形成“抗体-抗原-金”复合物,复合物沿着试纸条向后方移动,首先到达包被了抗人IgM抗体的检测区(M)，“抗体-抗原-金”复合物将同抗人IgM抗体结合,并在检测线上滞留下来,形成一条红色的线,这表示阳性结果。线条颜色的深浅同样本中的抗体数量没有比例关系。该区里如果没有带颜色的线条表示样本中不含登革病毒IgM抗体或登革病毒IgM抗体低于本试纸最低检出限,游离的“抗体-抗原-金”复合物继续向试纸后方移动,到达包被了抗人IgG抗体的检测区(G),抗体-抗原-金”复合物将同抗人IgG抗体结合,并在检测线上滞留下来,形成一条红色的线,这表示阳性结果。线条颜色的深浅同样本中的抗体数量没有比例关系。该区里如果没有带颜色的线条表示样本中不含登革病毒IgG抗体或登革病毒IgG抗体浓度低于本试纸最低检出限。复合物继续移动,游离的“鼠IgG-金”复合物会同羊抗鼠IgG结合在一起而富集在对照区,形成一条红色的线。对照线的出现证明试纸条检测功能正常。无论样本中是否含有登革病毒IgM抗体或登革病毒IgG抗体,在有效试验中,试纸条的对照区都应当出现淡红至紫红色的对照线。样本继续移动,通过对照区进入吸收区。吸收区的作用是吸附剩余的复合物,使其在试纸条内移动,并消除本底的颜色。自试纸条加入稀释后的样本混合液起计时,15~20分钟内方可读取结果。

[0049] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其它相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

专利名称(译)	一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法		
公开(公告)号	CN106771123A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611150735.8	申请日	2016-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	苏州万木春生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州万木春生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州万木春生物技术有限公司		
[标]发明人	丁锦勤 黄政 马军		
发明人	丁锦勤 黄政 马军		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	Y02A50/53 G01N33/56983 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/6854		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种登革病毒IgM/IgG抗体检测试纸的制备方法，包括步骤为：通过点膜喷金设备用登革病毒IgM/IgG抗体检测免疫金对玻璃纤维素膜喷金得到金垫，用抗人IgM（抗μ链）抗体检测线包被液、抗人IgG抗体检测线包被液和对照线包被液分别在粘有硝酸纤维素膜的聚氯乙烯底板上划线，得到点膜的聚氯乙烯底板；将样品垫、金垫、点膜的聚氯乙烯底板和吸水纸组装在一起，切割成检测试纸。通过上述方式，本发明得到的检测试纸基于免疫侧向层析技术，能够通过手工操作、肉眼读取判断血液样本中是否含有登革病毒IgM/IgG抗体，诊断快速且结果准确，不会对受检者身体造成伤害。

胶体金 最大吸收峰 (nm)	氯金酸(2%)加 入量(mL)/600mL 胶体金	柠檬酸三钠(5%) 加入量(mL)/600mL 胶体金	胶体金特 呈色
529	6.315	2.95	深红