



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109580946 A

(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201811512277.7

(22)申请日 2018.12.11

(71)申请人 深圳市亿立方生物技术有限公司  
地址 518057 广东省深圳市南山区高新区  
高新中一道生物孵化器大楼2-301

(72)发明人 胡涛 廖生赞 陈建东 张贵

(74)专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有限公司 44223

代理人 王震宇

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

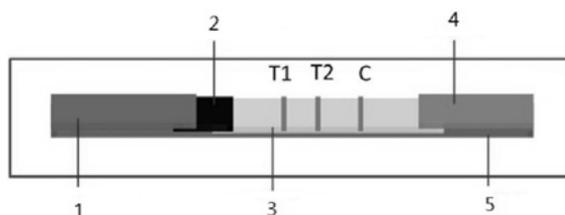
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种同时检测甲型和乙型流感病毒的试纸条及制备方法

(57)摘要

一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试纸条及制备方法,该试纸条包括底板以及依次黏贴在底板上的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,结合垫上包被有时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,反应膜包括平行设置且相互间隔的第一检测区、第二检测区和对照区,第一检测区靠近结合垫,对照区靠近吸水垫,第二检测区位于第一检测区和对照区中间,第一检测区、第二检测区和对照区分别包被有识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体。本发明的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试纸条灵敏度高,操作简单,成本低,检测时间短,其能够有效满足临床快速检验的需求。



1. 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于,包括底板以及依次黏贴在所述底板上的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,所述结合垫上包被有时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,所述反应膜包括平行设置且相互间隔的第一检测区、第二检测区和对照区,所述第一检测区靠近所述结合垫,所述对照区靠近所述吸水垫,所述第二检测区位于所述第一检测区和所述对照区之间,所述第一检测区、第二检测区分别包被有识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体,所述对照区包被羊抗鼠IgG抗体;优选地,所述反应膜为结合聚合物的硝酸纤维素膜,优选地,所述聚合物为在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有95%以上的透光率的材料;优选地,所述结合垫为玻璃纤维;优选地,所述底板为PVC底板。

2. 根据权利要求1所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于,所述时间分辨荧光微球载有镧系元素或其螯合物,优选地,所述镧系元素为钐、铈或铽。

3. 根据权利要求1或2所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于,所述时间分辨荧光微球的终浓度为1.0-1.5mg/ml,优选地,所述时间分辨荧光微球的直径为100nm-500nm。

4. 根据权利要求1或2所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于,所述识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体的终浓度分别为1-1.5mg/ml和0.5-1.0mg/ml,在所述反应膜上的包被量均为1-1.5 $\mu$ l/cm。

5. 根据权利要求1或2所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,其特征在于,优选地,所述样品垫与结合垫重合,重合部分长度约1-2mm;所述结合垫与反应膜有部分重合,重合部分长度约1-2mm;所述反应膜与吸水垫有部分重合,重合部分长度约1-2mm;所述检测线和对照线的长度约0.5-1.5mm;优选地,所述第一检测区和所述第二检测区的间隔为1-3mm,所述第二检测区和所述对照区间隔为3-5mm。

6. 一种制备如权利要求1-5任一项所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括下列步骤:

(1) 在反应膜上分别固定识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成第一检测区、第二检测区和对照区;

(2) 制备时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合并喷涂在结合垫上;

(3) 在底板上依次粘贴样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,得到所述时间分辨荧光免疫层析试纸条。

7. 根据权利要求6所述的检测流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(2)进一步包括如下步骤:

(2.1) 使用0.01-0.05mol/L的pH5.0-6.0的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),使EDC/NHS和微球终浓度分别为80-120mg/mL和1.0-1.5mg/mL,室温反应15-30分钟,充分洗涤微球,用0.02-0.05mol/L的pH8.0-8.5的硼酸缓冲液复溶;

(2.2) 按甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体与微球的质量比为1:5-10的比例,在复溶后的微球中分别加入甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,室温反应1-2小时,加入含有3%BSA的0.02mol/L的pH8.0-8.5的硼酸缓冲液,37℃反应1小时,洗涤,再用含有0.3%BSA,0.05%Tween-20的0.02mol/L的pH7.4-7.6的硼酸缓冲液复溶至原体积,于4℃避光保存;将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合,使用时用定量喷膜仪以1-4 $\mu$ l/cm的量喷涂于玻璃纤维膜上,放入烘箱,40~60℃避光烘干。

8. 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的检测卡,其特征在于,具有一个如权利要求1至5任一项所述的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条。

9. 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括外壳、安装在所述外壳中的如权利要求1~5任一项所述的试纸条、以及样本缓冲液,优选地,所述样本缓冲液为含有0.5%的BSA、0.05%的Tween-20、pH7.4的PBS缓冲液。

10. 根据权利要求9所述的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述外壳包括上壳和下壳,所述上壳将所述样品垫、所述结合垫、所述反应膜和所述吸水垫压紧在所述底板上,且所述上壳在对应所述样品垫和所述反应膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

## 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的试纸条及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术,特别是涉及一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试纸条及制备方法。

### 背景技术

[0002] 流行性感(简称流感)是流感病毒引起的急性呼吸道感染,是一种传染性强、传播速度快的疾病。其主要通过空气中的飞沫、人与人之间的接触或与被污染物品的接触传播。典型的临床症状是:急起高热、全身疼痛、显著乏力和轻度呼吸道症状。一般秋冬季节是其高发期,所引起的并发症和死亡现象非常严重。该病是由流感病毒引起,可分为甲、乙、丙三型,其中甲型所引起的流感流行最为广泛和严重,乙型常引起爆发,丙型则多引起小儿散发型。甲型病毒经常发生抗原变异,传染性大,传播迅速,极易发生大范围流行。感染后的症状主要表现为高热、咳嗽、流涕、肌痛等,多数伴有严重的肺炎,严重者心、肾等多种脏器衰竭导致死亡。甲型流感病毒中至今发现能直接感染人的禽流感病毒亚型有:H1N1、H5N1、H7N1、H7N2、H7N3、H7N7、H7N9、H9N2和H10N8,其中H1、H5、H7、H9为高致病性。乙型型流感病毒是一种传染性强、传播速度快的疾病。其主要通过空气中的飞沫、人与人之间的接触或与被污染物品的接触传播。典型的临床症状是:急起高热、全身疼痛、显著乏力和轻度呼吸道症状。一般秋冬季节是其高发期,可引起局部爆发流行,但不会引起世界性流感大流行。

[0003] 传统的甲型流感病毒和乙型流感病毒的检测方法主要有:

[0004] a、荧光PCR法---该方法对模板RNA质量要求高,检测灵敏度高,但是但需要专门实验室,检测仪器昂贵,检测时间也较长;,检测灵敏度高;

[0005] b、金标法---该法具有快速简便,易观察的特点,但是灵敏度不高;

[0006] c、病毒分离法---该方法准确,周期长,操作需要专门实验室;

[0007] d、酶联免疫法---该方法准确,灵敏度高,但是操作复杂,周期长。荧光免疫层析检测技术具有安全、费用低、操作简便、可实现床旁快速检测等优点,其中,时间分辨荧光免疫层析无放射性污染、无背景荧光干扰,其原理为:利用时间分辨荧光微球的荧光强度实现对待测物的定量检测。该方法作为POCT发展的新方向之一,其具备的检测结果准确度高、灵敏性好特点,能够满足临床床旁快速检测和基层社区医院的需要,成为目前的研究热点,在临床检测中具有广阔的发展前景。

[0008] POCT每一个测试单元都是独立的,因此无法保证每个测试单元质量都是一样。基于免疫层析试纸条和仪器都会因温度、湿度和pH值的不同,影响检测结果。部分POCT仪器方法的缺陷,灵敏性和重复性欠佳,线性范围窄,只是急诊或者急求时用于参考,必要时还需送到检验科进行复查。

### 发明内容

[0009] 本发明的主要目的在于克服现有技术的不足,提供一种灵敏度高、操作简单、成本低、检测时间短的甲型和乙型流感病毒时间分辨免疫荧光层析试纸条,使其能够满足临床

快速检验的需求。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0011] 一种检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,包括底板以及依次黏贴在所述底板上的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,所述结合垫上包被有时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,所述反应膜包括平行设置且相互间隔的第一检测区、第二检测区和对照区,所述第一检测区靠近所述结合垫,所述对照区靠近所述吸水垫,所述第二检测区位于所述第一检测区和所述对照区之间,所述第一检测区、第二检测区分别包被有识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体,所述对照区包被羊抗鼠IgG抗体;优选地,所述反应膜为结合聚合物的硝酸纤维素膜,优选地,所述聚合物为在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有95%以上的透光率的材料;优选地,所述结合垫为玻璃纤维;优选地,所述底板为PVC底板。

[0012] 进一步地:

[0013] 所述时间分辨荧光微球载有镧系元素或其螯合物,优选地,所述镧系元素为钐、铈或铽。

[0014] 所述时间分辨荧光微球的终浓度为1.0-1.5mg/ml,优选地,所述时间分辨荧光微球的直径为100nm-500nm。

[0015] 所述识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体的终浓度分别为1-1.5mg/ml和0.5-1.0mg/ml,在所述反应膜上的包被量均为1-1.5 $\mu$ l/cm。

[0016] 优选地,所述样品垫与结合垫重合,重合部分长度约1-2mm;所述结合垫与反应膜有部分重合,重合部分长度约1-2mm;所述反应膜与吸水垫有部分重合,重合部分长度约1-2mm;所述检测线和对照线的长度约0.5-1.5mm;优选地,所述第一检测区和所述第二检测区的间隔为1-3mm,所述第二检测区和所述对照区间隔为3-5mm。

[0017] 一种制备所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,包括下列步骤:

[0018] (1) 在反应膜上分别固定识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成第一检测区、第二检测区和对照区;

[0019] (2) 制备时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合并喷涂在结合垫上;

[0020] (3) 在底板上依次粘贴样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,得到所述时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0021] 进一步地:

[0022] 步骤(2)进一步包括如下步骤:

[0023] (2.1) 使用0.01-0.05mol/L的pH5.0-6.0的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),使EDC/NHS和微球终浓度分别为80-120mg/mL和1.0-1.5mg/mL,室温反应15-30分钟,充分洗涤微球,用0.02-0.05mol/L的pH8.0-8.5的硼酸缓冲液复溶;

[0024] (2.2) 按甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体与微球的质量比为1:5-10的比例,在复溶后的微球中分别加入甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,室温反应1-2小时,加入

含有3%BSA的0.02mol/L的pH8.0-8.5的硼酸缓冲液,37℃反应1小时,洗涤,再用含有0.3%BSA,0.05%Tween-20的0.02mol/L的pH7.4-7.6的硼酸缓冲液复溶至原体积,于4℃避光保存;将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合,使用时用定量喷膜仪以1-4 $\mu$ l/cm的量喷涂于玻璃纤维膜上,放入烘箱,40~60℃避光烘干。

[0025] 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的检测卡,具有一个所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条。

[0026] 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,所述试剂盒包括外壳、安装在所述外壳中的所述试纸条、以及样本缓冲液,优选地,所述样本缓冲液为含有0.5%的BSA、0.05%的Tween-20、pH7.4的PBS缓冲液。

[0027] 进一步地:

[0028] 所述外壳包括上壳和下壳,所述上壳将所述样品垫、所述结合垫、所述反应膜和所述吸水垫压紧在所述底板上,且所述上壳在对应所述样品垫和所述反应膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

[0029] 本发明的有益效果:

[0030] 本发明将时间分辨荧光免疫层析技术引入到甲型和乙型流感病毒的检测中,不仅大大的节约了检测时间,提升了检测的稳定性和灵敏度,而且操作简便,可用于现场检测;同时也具有成本低、性价比高的优点。

[0031] 与现有快速检测试纸条相比较,本发明具有以下优点:

[0032] 1) 将时间分辨荧光免疫层析技术引入甲型和乙型流感病毒的检测中,结合干式荧光免疫分析仪,实现了同时检测甲型和乙型流感病毒的检测,为临床使用提供了极大的便利。

[0033] 2) 实现在一张检测卡上检测甲型和乙型流感病毒,大大方便了临床诊断。

[0034] 本发明操作简便,适合大规模生产,检测所需的便携式设备也已经上市,因此能广泛用于医院、农村和基层诊所等。

## 附图说明

[0035] 图1为本发明实施例的时间分辨荧光免疫层析法检测甲型和乙型流感病毒的试纸条结构示意图;

[0036] 图2为本发明实施例的检测卡壳结构图。

## 具体实施方式

[0037] 以下对本发明的实施方式作详细说明。应该强调的是,下述说明仅仅是示例性的,而不是为了限制本发明的范围及其应用。

[0038] 参阅图1,在一种实施例中,一种检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条,包括底板5以及依次黏贴在所述底板5上的样品垫1、结合垫2、反应膜3和吸水垫4,所述结合垫2上包被有时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,所述反应膜3包括平行设置且相互间隔的第一检测区T1、第二检测区T2和对照区C,所述第一检测区T1靠近所述结合垫2,所述对照区C靠近所述吸水垫4,所述第二检测区T2位于所述第一

检测区T1和所述对照区C之间,所述第一检测区、第二检测区T1、T2分别包被有识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体,对照区C包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0039] 在优选实施例中,所述反应膜3为结合聚合物的硝酸纤维膜。更优选地,所述聚合物为在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有95%以上的透光率的材料。

[0040] 在优选实施例中,所述结合垫2为玻璃纤维。

[0041] 在优选实施例中,所述底板5为PVC底板5。

[0042] 在优选实施例中,所述时间分辨荧光微球载有镧系元素或其螯合物,更优选地,所述镧系元素为钐、铕或铽。

[0043] 在优选实施例中,所述时间分辨荧光微球的终浓度为1.0-1.5mg/ml,更优选地,所述时间分辨荧光微球的直径为100nm-500nm。

[0044] 在优选实施例中,所述识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体的终浓度分别为1-1.5mg/ml和0.5-1.0mg/ml,在所述反应膜3上的包被量均为1-1.5 $\mu$ l/cm。

[0045] 在优选实施例中,,所述样本垫与结合垫重合,重合部分长度约1-2mm;所述结合垫与反应膜有部分重合,重合部分长度约1-2mm;所述反应膜与吸水垫有部分重合,重合部分长度约1-2mm;所述检测线和对照线的长度约0.5-1.5mm。

[0046] 在优选实施例中,所述第一检测区T1和所述第二检测区T2的间隔为1-3mm,所述第二检测区T2和所述对照区C间隔为3-5mm。

[0047] 一种制备所述的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法,包括下列步骤:

[0048] (1) 在反应膜3上分别固定识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成第一检测区、第二检测区和对照区;

[0049] (2) 制备时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合并喷涂在结合垫2上;

[0050] (3) 在底板5上依次粘贴样品垫1、结合垫2、反应膜3和吸水垫4,得到所述时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0051] 在优选实施例中,步骤(2)进一步包括如下步骤:

[0052] (2.1) 使用0.01-0.05mol/L的pH5.0-6.0的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),使EDC/NHS和微球终浓度分别为80-120mg/mL和0.5-1.0mg/mL,室温反应15-30分钟,充分洗涤微球,用0.02-0.05mol/L的pH8.0-8.5的硼酸缓冲液复溶;

[0053] (2.2) 按甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体与微球的质量比为1:5-10的比例,在复溶后的微球中分别加入甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,室温反应1-2小时,加入含有3%BSA的0.02mol/L的pH8.0-8.5的硼酸缓冲液,37 $^{\circ}$ C反应1小时,洗涤,再用含有0.3%BSA,0.05%Tween-20的0.02mol/L的pH7.4-7.6的硼酸缓冲液复溶至原体积,于4 $^{\circ}$ C避光保存;将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合,使用时用定量喷膜仪以1-4 $\mu$ l/cm的量喷涂于玻璃纤维膜上,放入烘箱,40~60 $^{\circ}$ C避

光烘干。

[0054] 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的检测卡,具有一个所述的同時检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条。

[0055] 一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,所述试剂盒包括外壳、安装在所述外壳中的所述试纸条、以及样本缓冲液,优选地,所述样本缓冲液为含有0.5%的BSA、0.05%的Tween-20、pH7.4的PBS缓冲液。

[0056] 如图2所示,在优选实施例中,所述外壳包括上壳和下壳,所述上壳将所述样品垫1、所述结合垫2、所述反应膜3和所述吸水垫4压紧在所述底板5上,且所述上壳在对应所述样品垫1和所述反应膜3的部分分别设有加样孔7和观察窗6。

[0057] 所述外壳优选为塑料外壳。

[0058] 如图1所示,本发明一种实施例提供了一种同时甲型和乙型流感病毒时间分辨荧光试纸条该试纸条,包括样品垫、结合垫、反应膜、吸水垫和PVC底板。反应膜位于中间,样品垫与吸水垫分别位于反应膜左右两端。其中,试纸条结合垫上载有时间分辨荧光微球标记的甲型流感病毒单克隆检测抗体和乙型流感病毒单克隆检测抗体,反应膜上设有检测线T1、T2和对照线C,检测线T1包被甲型流感病毒单克隆捕获抗体,检测线T2包被乙型流感病毒单克隆捕获抗体,C线包被兔抗鼠IgG抗体。按照常规免疫层析法的原理进行样本的检测,结合简便易行的干式荧光免疫分析仪进行检测,在实现高灵敏度检测的同时又能大大缩短检测的窗口期,可以避免前述几种检测方法的种种弊端,测量结果准确,测量仪器简单可靠,操作简便,方便实用。

[0059] 在本发明的一个具体实施例中,样本垫的长度为20mm,结合垫的长度为6mm;反应膜的长度为25mm;吸水垫的长度为20mm。

[0060] 在本发明的一些实施例中,所述荧光微球的直径为100~300nm。在本发明的一个更优选实施例中,所述荧光微球的直径为200nm。

[0061] 在本发明的一些实施例中,所述反应膜为硝酸纤维素膜。硝酸纤维素又称硝化纤维素、纤维素硝酸酯,为纤维素与硝酸酯化反应的产物。以棉纤维为原料的硝酸纤维素称为硝化棉。硝酸纤维素是一种白色纤维状聚合物,耐水、耐稀酸、耐弱碱和各种油类。尤其适于作为本发明抗体承载膜的基底膜材质。

[0062] 在其中一些实施例中,所述结合垫为玻璃纤维,其能够载有足量的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0063] 在本发明的一些实施例中,所述时间分辨荧光微球载有镧系元素或其螯合物,所述镧系元素优选为钐、铈或铽。微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素。在本发明的一个更优选实施例中,所述镧系元素为Eu<sup>3+</sup>元素。

[0064] 上述检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条的制备方法实施例,包括以下步骤:

[0065] 1、结合垫的制备:选用直径为200nm的荧光微球,使用碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)共价偶联的方式将甲型和乙型流感病毒抗体标记到荧光微球上;将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合使用定量喷液装置以1-4 $\mu$ L/cm的量喷涂于处理过的结合物垫上;

[0066] 2、结合垫的处理:用定量喷液装置将结合垫处理液以1-4 $\mu$ L/cm的量喷涂于结合垫

上后50℃烘干2小时；

[0067] 3、反应膜的制备：使用包被缓冲液分别将抗甲型和乙型流感病毒包被捕获抗体以及羊抗鼠IgG抗体分别稀释到1.5mg/mL和1.0mg/mL浓度，使用定量喷液装置分别将两者以2mm和4mm的间隔喷印于硝酸纤维素膜上，后于50℃烘干2小时，加入干燥剂封存备用；

[0068] 4、试纸条的组装：在PVC底板上依次相互交错2mm地贴上样品垫、结合垫、反应膜、吸水垫，即得到时间分辨荧光免疫层析试纸条。所述试纸条还包括外壳，所述外壳包括上壳和下壳，上壳将样品垫、反应膜和吸水垫压紧在PVC底板上，且上壳在对应样品垫和反应膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

[0069] 在其中一些实施例中，上述步骤1中所述荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体的制备方法包括如下步骤：

[0070] (1)、使用0.01-0.05mol/L的pH6.0的MES活化缓冲液洗涤微球，加入EDC和NHS，使EDC/NHS和微球终浓度分别为100mg/mL和1.0-1.5mg/mL，室温反应15-30分钟，充分洗涤微球，用0.02-0.05mol/L的pH7.8-8.0的硼酸缓冲液复溶；

[0071] (2)、按甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体与微球的质量比为1:5-10的比例，在复溶后的微球中分别加入甲型和乙型单克隆检测抗体，室温反应1-2小时，加入含有3% BSA 0.02mol/L的pH7.8-8.0的硼酸缓冲液，室温反应1-2小时，洗涤，再用含有0.3% BSA，0.05% Tween-20的0.02mol/L的pH7.4-7.6的硼酸缓冲液复溶至原体积，将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合，使用定量喷膜仪以1-4 $\mu$ l/cm的量喷涂于玻璃纤维膜上，避光，烘干即得。

[0072] 本发明还提供了一种检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒，所述试剂盒包括塑料卡壳、上述的试纸条、以及样本缓冲液。

[0073] 在其中一些实施例中，所述样本缓冲液为含有0.5%的BSA、0.05%的ween-20的PBS pH7.4缓冲液。

[0074] 本发明的检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒在使用时，将待测咽拭子样品加到样本缓冲液中，在样品垫上分别滴加40-60 $\mu$ L样本稀释液，通过毛细管作用将样本输送到结合垫。当咽拭子样本中含有甲型和乙型流感病毒时，分别与荧光微球上的单克隆抗体形成抗原-抗体复合物，随着层析作用，复合物向前移动，到达包被识别单一抗原表位的甲型和乙型单克隆捕获抗体的第一检测区T1、第二检测区T2处，形成抗体-抗原-抗体夹心复合物，聚集在第一检测区、第二检测区处。未结合甲型和乙型单克隆抗体的标记微球(Eu<sup>3+</sup>镧系元素)继续前行，到达对照区时，羊抗鼠IgG抗体与标记微球上的兔抗鼠IgG抗体结合，在对照线C处出现标记微球的聚集。整个反应在10-15分钟内完成，并进行上机读卡。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比，当光源照射到试纸条的第一检测区、第二检测区和对照区时，激发附着的荧光物质，发射光收集并转化为电信号，电信号的强弱和荧光分子数量相关，检测仪计算样品中待测物的含量。

[0075] 实施例1同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条。

[0076] 本实施例的一种检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试纸条，包括底板、以及依次设在所述底板上的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫，所述结合垫上包被有等同数量荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体，所述反应膜包括平行设置、且相互间隔2mm及4mm的第一检测区T1、第二检测区T2和对照区，所述第一检测区T1、第二检

测区T2靠近所述结合垫,所述对照区靠近所述吸水垫,所述第一检测区T1、第二检测区T2分别包被有识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体,所述对照区包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0077] 本实施例中,所述反应膜为化学交联聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈(聚合物)的硝酸纤维素膜,所述聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈聚合物在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有95%以上的透光率。这种材料可以允许绝大多数的可见光透过,光检测器能够捕捉多层多孔膜表面和内部的荧光信号,使检测结果更准确。

[0078] 本实施例中,所述结合垫为玻璃纤维膜,其能够载有足量的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0079] 本实施例中,所述荧光微球选用本领域公知的用于标记抗体的Eu<sup>3+</sup>镧系元素荧光微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素。所述荧光微球的直径为200nm。

[0080] 本实施例的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0081] (1)、在反应膜上分别固定识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成第一检测区T1、第二检测区T2和对照区C。具体方法为:使用含有0.05%Tween-20的0.02mol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲液,分别将识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体稀释到1.5mg/ml,羊抗鼠IgG抗体稀释到1.0mg/ml的浓度,使用定量喷膜仪以1 $\mu$ l/cm的量将甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体以2mm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,将羊抗鼠IgG抗体喷于硝酸纤维素膜上(与乙型流感病毒单克隆捕获抗体间隔4mm),50 $^{\circ}$ C烘干2h,加入干燥剂封存备用;

[0082] (2)、制备荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,按照1:1比例混合并喷涂在结合垫上,具体方法包括:

[0083] (a)、使用0.02mol/L的pH6.0的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),使EDC/NHS和微球终浓度分别为100mg/mL和1.0mg/mL,室温反应15分钟,充分洗涤微球,用0.02mol/L的pH8.0的硼酸缓冲液复溶;(b)、按甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体与微球的质量比为1:10的比例,在复溶后的微球中分别加入甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体,室温反应2小时,加入含有3%BSA的0.02mol/L的pH7.4的硼酸缓冲液,室温反应1小时,洗涤,再用含有0.3%BSA,0.05%Tween-20的0.02mol/L的pH7.4的硼酸缓冲液复溶至原体积,将制备好的时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体按照1:1比例混合,使用定量喷膜仪以4 $\mu$ l/cm的量喷涂于玻璃纤维膜上,避光,在50 $^{\circ}$ C烘干2小时,加入干燥剂封存备用。

[0084] (3)、在底板上依次粘贴样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫,切割成宽度为3.5mm大小,即得试纸条。

[0085] 同时检测甲型和乙型流感病毒的试纸条组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳上设有加样孔7和观察窗6,加样孔对应于甲型和乙型流感病毒检测试纸条的样品垫,结果观察窗对应于甲型和乙型流感病毒检测试纸条的检测线T1、T2和对照线C。

[0086] 实施例2同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨免疫层析试剂盒。

[0087] 本实施例的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,所述试剂盒包括:实施例1所述的试纸条、塑料卡壳、样本缓冲液。

[0088] 在本实施例中,所述样本缓冲液含有0.5%的BSA、0.05%的Tween-20的PBS pH7.4缓冲液溶。

[0089] 本发明的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试剂盒在使用时将待测将咽拭子样品加到样本缓冲中,在样品垫上滴加50 $\mu$ L样本稀释液,通过毛细管作用将样本输送到结合垫。当咽拭子样本中含有甲型和乙型流感病毒时,与荧光微球上的单克隆抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达包被识别单一抗原表位的甲型和乙型单克隆捕获抗体的第一检测区T1、第二检测区T2处,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在第一检测区、第二检测区处。未结合甲型和乙型单克隆抗体的标记微球(Eu3+镧系元素)继续前行,到达对照区C时,羊抗鼠IgG抗体与标记微球上的兔抗鼠IgG抗体结合,在对照线处出现标记微球的聚集。整个反应在15分钟内完成,并进行上机读卡。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比,当光源照射到试纸条的检测区和对照区时,激发附着的荧光物质,发射光收集并转化为电信号,电信号的强弱和荧光分子数量相关,检测仪计算样品中待测物的含量。

[0090] 实施例2的试剂盒的性能测定

[0091] 对试剂盒进行了性能方面的测定,包括最低检测限、精密度、灵敏度、特异性等。

[0092] 1、最低检测限:取同一批号的时间分辨免疫层析试剂盒分别对甲型H1N1、甲型H5N1、B/Victoria和B/Yamagata国家参考品的八个浓度(0ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL,每个浓度做3个平行样)进行检测。

[0093] 其检测结果表1所示,从表中可以看出甲型H1N1、甲型H5N1的最低检测限为10ng/mL;B/Victoria和B/Yamagata的最低检测限为1ng/mL。

[0094] 表1

样品	浓度 (ng/mL)							
	0	0.5	1	5	10	50	100	200
H1N1	阴	阴	阴	阴	阳	阳	阳	阳
H5N1	阴	阴	阴	阴	阳	阳	阳	阳
B/Victoria	阴	阴	阳	阳	阳	阳	阳	阳
B/Yamagata	阴	阴	阳	阳	阳	阳	阳	阳

[0096] 2、批内精密度:随机抽取同一批号的时间分辨免疫层析试剂盒10份,分别对同一浓度的甲型和乙型流感病毒参考品进行检测,其变异系数CV(%)值 $\leq$ 10%。

[0097] 3、批间精密度:随机抽取连续三个批号的时间分辨免疫层析试剂盒,每个批号取3份分别对同一浓度的甲型和乙型流感病毒参考品进行检测,其变异系数CV(%)值 $\leq$ 10%。

[0098] 4、准确性和特异性:利用腺病毒、巨细胞病毒、副流感病毒、麻疹病毒参考品为待测干扰物,待测样品滴入实施例1得到的检测试剂盒的加样端,15分钟后用荧光检测仪进行

测试。检测结果表2所示。

[0099] 表2

样本	检测结果	
	T1	T2
H1N1	阳	阴
B/Victoria	阴	阳
腺病毒	阴	阴
巨细胞病毒	阴	阴
副流感病毒	阴	阴
麻疹病毒参	阴	阴

[0101] 其结果表明本发明的甲型和乙型流感病毒时间分辨免疫层析试剂盒与对应的甲型流感病毒和B型流感病毒具有很强的特异性,与其他病原体间无交叉反应。

[0102] 以上内容是结合具体/优选的实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,其还可以对这些已描述的实施方式做出若干替代或变型,而这些替代或变型方式都应当视为属于本发明的保护范围。

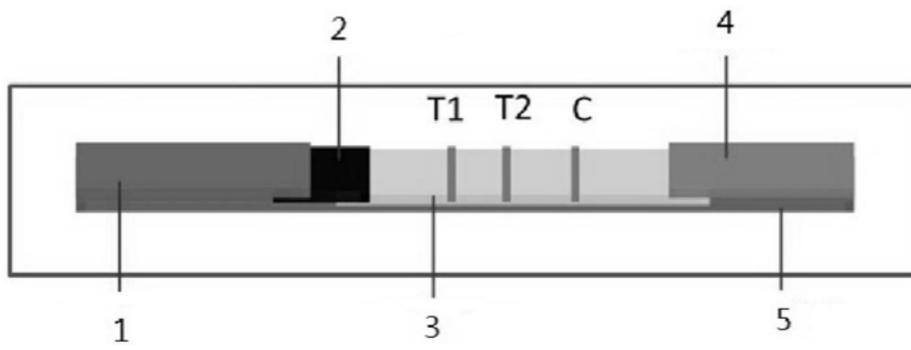


图1

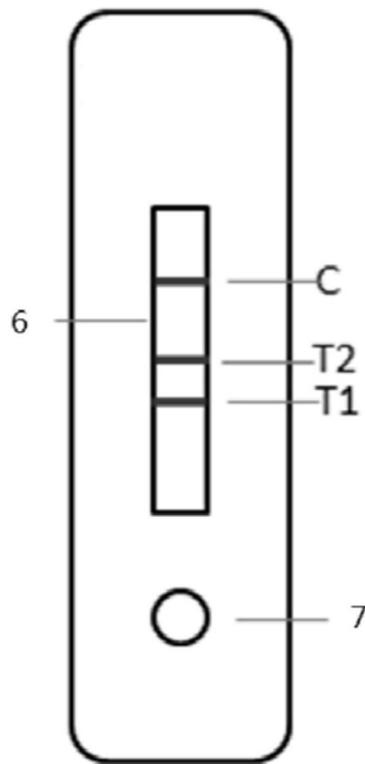


图2

专利名称(译)	一种同时检测甲型和乙型流感病毒的试纸条及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109580946A</a>	公开(公告)日	2019-04-05
申请号	CN201811512277.7	申请日	2018-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亿立方生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亿立方生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亿立方生物技术有限公司		
[标]发明人	胡涛 廖生赞 陈建东 张贵		
发明人	胡涛 廖生赞 陈建东 张贵		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	王震宇		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试纸条及制备方法，该试纸条包括底板以及依次黏贴在底板上的样品垫、结合垫、反应膜和吸水垫，结合垫上包被有时间分辨荧光微球标记的甲型和乙型流感病毒单克隆检测抗体，反应膜包括平行设置且相互间隔的第一检测区、第二检测区和对照区，第一检测区靠近结合垫，对照区靠近吸水垫，第二检测区位于第一检测区和对照区中间，第一检测区、第二检测区和对照区分别包被有识别单一抗原表位的甲型和乙型流感病毒单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体。本发明的同时检测甲型和乙型流感病毒的时间分辨荧光免疫层析试纸条灵敏度高，操作简单，成本低，检测时间短，其能够有效满足临床快速检验的需求。

