

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[21] 申请号 200710053053.X

[43] 公开日 2009年3月4日

[11] 公开号 CN 101377493A

[22] 申请日 2007.8.28

[21] 申请号 200710053053.X

[71] 申请人 华中科技大学同济医学院附属协和医院

地址 430022 湖北省武汉市汉口江汉区解放大道1277号

[72] 发明人 胡丽华 王琳 熊莉娟 苏凤菊
蔡开琳 朱函坪 罗端德 揭盛华
曾令兰 肖菁

[74] 专利代理机构 北京市德权律师事务所
代理人 吴涛

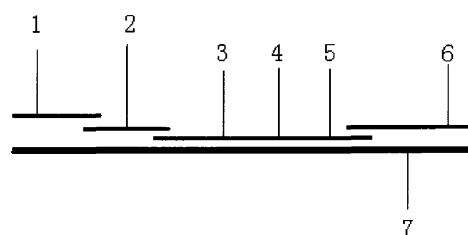
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

[54] 发明名称

肾综合征出血热诊断试纸条、制备方法及检测试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种肾综合征出血热诊断试纸条、制备方法及检测试剂盒。该试纸条是在PVC底板(7)上顺次相互搭接地粘贴样品吸收垫(1)、胶体金结合垫(2)、硝酸纤维素薄膜(5)、吸水垫(6)而形成的胶体金免疫层析试纸条,其特征就在于,胶体金结合垫(2)由含有胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体免疫金复合物的玻璃纤维素膜构成,硝酸纤维素薄膜(5)上设置有检测区(3)和质控区(4),在检测区(3)位置包被有汉坦病毒核衣壳蛋白抗原,在控制区(4)的位置包被有兔抗羊IgG抗体;该诊断试纸条有较好的特异性和敏感性,且重复性好,能够实现HFRS的早期快速诊断,该试纸条易于携带,操作简单,成本低廉,反应迅速,易于在基层



1. 一种肾综合征出血热诊断试纸条，该试纸条是在 PVC 底板(7)上顺次相互搭接地粘贴样品吸收垫(1)、胶体金结合垫(2)、硝酸纤维素薄膜(5)、吸水垫(6)而形成的胶体金免疫层析试纸条，其特征在于，胶体金结合垫(2)由含有胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体免疫金复合物的玻璃纤维素膜构成，硝酸纤维素薄膜(5)上设置有检测区(3)和质控区(4)，在检测区(3)位置包被有汉坦病毒核衣壳蛋白抗原，在控制区(4)的位置包被有兔抗羊 IgG 抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的肾综合征出血热诊断试纸条，其特征在于，所说的汉坦病毒核衣壳蛋白抗原为汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 HVrNP。

3. 一种用于诊断肾综合征出血热的检测试剂盒，其特征在于，它包括权利要求 1 所述的肾综合征出血热诊断试纸条、稀释液 0.01%吐温-20 的 PBS 溶液和使用说明。

4. 一种肾综合征出血热诊断试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1)制备 40 nm 胶体金溶液，用 40 nm 胶体金标记羊抗人 μ 链抗体，制得胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体免疫金复合物溶液；用金稀释液将该免疫金复合物溶液稀释至 42 μ g/ml，其 PH 为 8.2，以 10 μ l/cm 喷于 0.5 cm \times 31 cm 玻璃纤维素膜上，制得胶体金结合垫(2)，干燥后密封保存；

(2)制备汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 HVrNP，并将其纯化；将纯化后的 HVrNP 抗原用 PH 为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 稀释成 0.4mg/ml 工作浓度，包被于硝酸纤维素薄膜(5)的检测区(3)；在距离检测区(3)5 mm 处的地方，包被工作浓度为 2.5 mg/m 的兔抗羊 IgG 抗体作为质控区(4)，37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时，4 $^{\circ}$ C 密封保存；

(3)将作为样品吸收垫(1)的玻璃纤维膜浸入 0.1%BSA 封闭剂溶液中，然后室温干燥保存备用；

(4)将上述制备好的胶体金结合垫(2)、包被了检测区和质控区的硝酸纤维素薄膜(5)、经 0.1%BSA 封闭剂溶液处理过的样品吸收垫(1)，以及吸水垫(6)组装到 PVC 底板(7)上，切条后装入塑料外壳中，即制成本发明肾综合征出血热诊断试纸条。

肾综合征出血热诊断试纸条、制备方法及检测试剂盒

技术领域

本发明涉及疾病的诊断技术，特别涉及肾综合征出血热（HFRS）的早期快速诊断技术。

背景技术

肾综合征出血热（HFRS）是由汉坦病毒引起的一种自然疫源性传染病。我国是 HFRS 的高发区，目前大陆 31 个省、市、自治区均有病例发生，而且新的疫区不断出现，并偶见爆发流行。该病的临床表现主要是发热、出血和肾脏损害，患者发病初期出现的发热、头痛、全身酸痛等非特异性症状，与一些常见的传染病如流感、钩端螺旋体病等难以鉴别，所以特异性的实验室诊断显得十分重要。

汉坦病毒（Hantavirus, HV）是布尼亚病毒科（Bunyaviridae）的一个属，该属的一些病毒株可引起严重的人类疾病。HV 基因组为分节断的单股负链 RNA，由 L、M、S 3 个基因片断组成，分别编码 RNA 聚合酶（RNA polymerase, RNAP）、囊膜糖蛋白（glycoprotein, GP）G1 和 G2、核衣壳蛋白（nucleocapsid protein, NP）。血清学研究表明，汉坦病毒 NP 具有很强的抗原性和免疫原性，可以与汉坦病毒内的多种血清型病毒的免疫血清产生交叉反应，表明汉坦病毒的 NP 具有共同的抗原决定簇，因而常用作汉坦病毒的诊断抗原。NP 在核苷酸序列上相对于包膜蛋白更保守，在不同血清型病毒中的同源性较高，整体同源性达到 50%，其中蛋白 C 端有 85% 的同源性。

HFRS 患者体内抗 NP 抗体出现最早，并且滴度高。此外，来自病毒感染的培养细胞裂解液作抗原，其稳定性、安全性不十分理想，而重组抗原和单克隆抗体的出现进一步提高了检测的敏感性和特异性，为缩短检测时间提供可能。我们采用的 NP 抗原来源于汉坦病毒株 Z10 核蛋白，Z10 是浙江省卫生防疫站出血热重点实验室于 80 年代分离的一个病毒株以其制成的 I 型疫苗，是我国最早被卫生部批准进行人体观察的疫苗，具有血凝滴度高、抗原性强等特点。姚苹苹等[参见：姚苹苹, 刘合宾, 朱函坪等. 汉坦病毒中国疫苗株 Z10 核蛋白免疫原性的研究. 中华流行病学杂志, 2001, 22 (5): 400.]以 Z10 株核衣壳蛋白基因插入到原核表达载体 pET28a, 高效表达了核衣壳蛋白, 经过 IPTG 诱导产生抗原性以及稳定性良好的蛋白, 进一步纯化后免疫家兔, 发现其血清中有较强的免疫

荧光抗体以及中和抗体。因此，该基因工程产物作为抗原在安全性、敏感性、特异性都得到保障。

目前，诊断肾综合征出血热常用的实验室检测方法有 IgM 抗体酶联免疫吸附试验 (MacELISA)、间接免疫荧光法 (IFA) 和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 等，由于操作复杂、需要特殊仪器等原因，使其在基层单位的应用受到条件和速度的限制。

发明内容

本发明的任务是提供一种肾综合征出血热诊断试纸条，使其具有简便、快速、特异好、灵敏度高、成本低廉、能在汉坦病毒感染的早期阶段提供特异性诊断依据、且适于推广应用等特点。

本发明的任务还在于提供一种包含本发明试纸条的用于诊断肾综合征出血热的检测试剂盒。

实现本发明的技术方案是：

本发明提供的这种肾综合征出血热诊断试纸条，是在 PVC 底板 7 上顺次相互搭接地粘贴样品吸收垫 1、胶体金结合垫 2、硝酸纤维素薄膜 (NC 膜) 5、吸水垫 6 而形成的胶体金免疫层析试纸条，其特征在于，胶体金结合垫 2 由含有胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体免疫金复合物的玻璃纤维素膜构成，硝酸纤维素薄膜 5 上设置有检测区 3 和质控区 4，在检测区 3 位置包被有汉坦病毒核衣壳蛋白抗原，该处使用的汉坦病毒核衣壳蛋白抗原为汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 HVrNP；在控制区 4 的位置包被有兔抗羊 IgG 抗体。

本发明提供用于诊断肾综合征出血热的检测试剂盒，由本发明提供的肾综合征出血热诊断试纸条、稀释液和使用说明书组成，所使用的稀释液为 0.01% 吐温-20 的 PBS 溶液。

本发明提供的肾综合征出血热诊断试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 制备 40 nm 胶体金溶液，用 40 nm 胶体金标记羊抗人 μ 链抗体，制得胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体免疫金复合物溶液；用金稀释液将该免疫金复合物溶液稀释至 42 μ g/ml，其 PH 为 8.2，以 10 μ l/cm 喷于 0.5 cm \times 31 cm 玻璃纤维素膜上，制得胶体金结合垫 2，干燥后密封保存；

(2) 制备汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 HVrNP，并将其纯化；将纯化后的 HVrNP 抗原用 PH 为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 稀释成 0.4mg/ml 工作浓度，包被于硝酸纤维素薄膜 (NC 膜) 5 的检测区 3；在距离检测区 3 5 mm 处的地方，包被工作浓度为 2.5 mg/m 的兔抗羊 IgG 抗体作为质控区 4，37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时，4 $^{\circ}$ C 密封保存；

(3) 将作为样品吸收垫 1 的玻璃纤维膜浸入 0.1%BSA 封闭剂溶液中, 然后室温干燥保存备用;

(4) 将上述制备好的胶体金结合垫 2、包被了检测区和质控区的硝酸纤维素薄膜 5、经 0.1%BSA 封闭剂溶液处理过的样品吸收垫 1, 以及吸水垫 6 组装到 PVC 底板 7 上, 切条后装入塑料外壳中, 即制成本发明肾综合征出血热诊断试纸条。

本发明提供的肾综合征出血热诊断试纸条的制备方法和对比实验资料:

一、材料

离心机; 分光光度计; 漩涡混合器; 77.4 型磁力恒温搅拌器; BIO-DOT 型 XYZ-3000 三维喷点仪; LN-5000 切割机;

硝酸纤维素膜 Sartorius CN140、吸水膜、玻璃纤维膜、PVC 底板;

柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); Tween-20;

氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{Cl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 为国药集团化学试剂有限公司产品;

汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP), 按姚苹苹, 刘合宾, 朱函坪等在《中华流行病学杂志》2001, 22 (5): 400. 上发表的《汉坦病毒中国疫苗株 Z10 核蛋白免疫原性的研究》一文所述方制备 HVrNP 抗原, 用于 NC 膜的检测区既 T 线包被;

羊抗人 μ 链抗体, sigma 产品, 用于制备免疫复合金;

兔抗羊 IgG 抗体, sigma 产品, 用于 NC 膜的控制区既 C 线包被;

汉坦病毒 IgM 诊断试剂盒 (酶联免疫法): 购于上海钰森生物技术有限公司, 用于对比实验;

血清样本: 52 份肾综合征出血热病人样本, 30 份正常血清样本来自武汉协和医院门诊就医者 (排除 HFRS); 50 份肝炎患者血清样本。

二、本发明试纸条的制备方法

1. 免疫胶体金的制备

(1) 胶体金的制备 (40 nm):

量取去离子水 800 ml 于锥形瓶中, 加入 2%氯金酸溶液 8 ml 得到终浓度为 0.02 % 的氯金酸水溶液, 煮沸后准确加入 1%柠檬酸三钠 45 ml。继续加热煮沸, 溶液颜色由淡黄色变成黑色, 继续煮沸直至溶液逐渐稳定成红色。再加热 5 min 后冷却至室温, 用去离子水恢复至原体积 800 ml。

(2) 目测法确定胶体金与待标记羊抗人 μ 链抗体量的比例

用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调节金标溶液 PH 至 8.2, 取洁净试管分装胶体金 1 ml, 加

入不同稀释度的待标记羊抗人 μ 链抗体 (0.1 mg/ml), 并设立空白对照管。放置 5min 后加入 10%NaCl 0.1 ml, 混匀, 静置 2 h 以上观察结果: 未加抗体或者抗体量不足的试管中, 胶体金不稳定形成由红色变成蓝紫色的聚沉现象, 如果加入抗体的量到达或超过最低稳定量则试管中的溶液夜色保持红色不变。以此使胶体金红色不变而抗体含量最少的管作为稳定 1ml 胶体金所需要的蛋白量。在此基础上再加 50%的蛋白量即为最后标记的实际蛋白使用量。加入 PEG20000 使其在溶液终浓度达到 0.2%, 搅拌均匀后保存于 4℃。

(3) 免疫胶体金的制备

取制备好的胶体金溶液, 加入 0.2 mol/L K_2CO_3 41.6 ml, 搅拌 5 min。量取 110 ml 出来倒入新烧杯内搅拌, 准备标记。其余的胶体金封口, 4℃保存备以后标记用。搅拌状态下逐滴加入原浓度 4.7 mg/ml 的羊抗人 μ 链抗体 0.187 ml, 25℃搅拌 20 min, 静置 10min 后将胶体金溶液 13000 rpm 离心 30 min, 小心吸取上清弃掉, 用 GB-A 重新溶解沉淀 4℃保存。

2. 胶体金结合垫的制备

(1) 确定免疫金复合物即胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体的最佳工作浓度。

将上述步骤制得的免疫金复合物溶液作不同倍数稀释后, 均匀等量地浸于同样大小的玻璃纤维素膜, 测试血清标本, 达到敏感度要求的最适免疫金复合物的稀释度为最佳工作浓度。稀释胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体溶液至最佳工作浓度 42 μ g/ml, 其 PH 为 8.2, 均匀浸于玻璃纤维素膜作为胶体金结合垫, 干燥后密封保存。

(2) 制备胶体金结合垫

用金稀释液将上述制得的免疫金复合物溶液稀释至最佳工作浓度 42 μ g/ml, 用 BIODOT 划膜机喷头以 10 μ l/cm 喷于 0.5 cm \times 31 cm 玻璃纤维素膜上制备成胶体金结合垫, 相对湿度 40%以下, 干燥 4 小时后铝箔袋密封保存。所用的金稀释液为上海金标生物技术有限公司出产的金稀释液配方干粉, 按该产品所附说明书操作使用。

3. T 线和 C 线的包被

(1) 制备汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP)

按姚苹苹, 刘合宾, 朱函坪等在《中华流行病学杂志》2001, 22 (5): 400. 上发表的《汉坦病毒中国疫苗株 Z10 核蛋白免疫原性的研究》一文所述方制备汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP)。

(2) HVrNP 抗原的纯化

汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP) 采用 PBS (PH 7.2) 透析 96 小时后使用,

隔日更换 PBS 溶液，以免 PH、离子强度等因素影响蛋白与金粒的吸附。

(3) 采用 PBS (PH 7.2) 稀释纯化后的 HVrNP 抗原成 0.4mg/ml 工作浓度，经 BIO-D0 型 XYZ-3000 三维喷点仪包被于 NC 膜的检测区即 T 线。在距离 T 线 5 mm 处的地方包被兔抗羊 IgG 抗体作为质控区即 C 线，工作浓度为 2.5 mg/ml。37 °C 干燥 2 小时，4 °C 密封保存。

4. 样品吸收垫的处理

封闭剂采用 0.1%BSA，将作为样品垫的玻璃纤维膜浸入封闭剂溶液，然后室温干燥保存备用。

5. 本发明免疫层析试纸条的组装

按以下步骤先将 NC 膜、吸水垫、制备好的胶体金结合垫、处理过的样品吸收垫组装到 PVC 底板上，切条后装入塑料外壳中。

- A. 戴上手套，将 NC 膜组装到 PVC 底板上，小心抹平膜面；
- B. 将吸水垫组装到粘性底板上，并小心抹平；
- C. 将制备好的胶体金结合垫粘贴到底板上，并小心抹平；
- D. 将处理过的样品吸收垫组装到粘性底板上，并小心抹平；
- E. 用切条机切成 4.1 mm 宽的试纸条装入塑料外壳中并压好，分别与 2g 干燥剂一包放入铝箔包装袋内，封口机封口即制成本发明试纸条。

组装后的本发明试纸条的层次结构见图 1。

三、对比实验

与 ELISA 试剂同步检测 HFRS 患者血清标本，同时用该试纸条检测临床正常人血清标本以及肝炎患者血清评价该试纸条的特异性与敏感性。

(一) 用本发明试纸条进行检测的实验技术参数、操作步骤及检测结果判读：

1. 实验技术参数：

- (1) 胶体金最佳标记羊抗人 μ 链抗体浓度最适稳定量为 42 μ g/ml，标记蛋白的 PH 为 8.2。
- (2) 免疫金最佳工作浓度是 1.8 OD。
- (3) T, C 线浓度分别为：0.4 mg/ml，和 2.5 mg/ml。
- (4) 血清最佳工作浓度：采用稀释液稀 500 倍。
- (5) 试纸条的组成及规格见表 1

表 1 试纸条的组成及规格

	样品垫	结合垫	NC膜	吸水垫	总长度
长 (mm)	12	5	23	15	55
宽 (mm)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1

2. 检测操作步骤:

(1) 测试前将未开封的检测卡和血清标本恢复至室温;

(2) 将血清标本用试剂盒配套稀释液按1: 499的比例进行稀释, (即500倍稀释) 备用;

(3) 从原包装铝箔袋中取出检测卡, 将检测卡平放, 用加样枪准确吸取80 μ l稀释好的血清标本或者使用一次性塑料吸管吸取2滴 (约80 μ l) 垂直滴加于加样孔。使用本发明试纸条进行检测时的加样操作示意图见图3;

(4) 反应15 min, 判定结果:

阳性: 可见质控线与检测线二条紫红色带;

阴性: 只有质控线有紫红色条带出现;

无效: 若质控线未见紫红色条带出现, 则均为无效, 应重新检测。

本发明试纸条检测结果示意图见图4, 本发明试纸条检测效果图见图2。

(二) ELISA 试剂检测步骤:

从4度冰箱拿出肾综合征出血热 IgM 诊断试剂盒, 在室温平衡 30min。

A. 以 1: 20 稀释浓缩洗涤液;

B. 加样: 1号孔为空白孔; 2号、3号孔分别是阴性、阳性对照各加 100 μ L 对照品; 第四孔后加入待测血清各 10 μ L;

C. 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 洗板五次;

D. 加 2 滴酶结合物 (空白对照孔除外), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min;

E. 加显色剂 1 滴, 37 $^{\circ}$ C 避光 10min, 加终止液 1 滴。

F. 酶标仪读数 波长 450nm, 空白调零然后读取各测定孔 OD 值;

G. 判断值 (OD 值) = 阴性对照孔平均 OD 值 \times 2.1 若样品 OD 值大于判断值则为阳性, 样品 OD 值小于判断值则为阴性; 阴性对照平均 OD 值小于 0.05 时按照 0.05 计算。

(三) 检测结果:

临床血清标本的检测

(1) HFRS 患者血清标本的检测

采用本发明胶体金免疫层析试纸条与 ELISA 试剂盒对比检测 52 例患者血清中的抗 HV-IgM, 结果见表 2。

表 2 GICA 与 ELISA 检测 HFRS 患者血清的结果比较

GICA	ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	0	50
阴性	0	2	2
合计	50	2	52

由表可见, GICA 检测 HFRS 的敏感度为 96%; 与 ELISA 试剂盒检测比较, 二种方法的总符合率为 100%。

- (2) 正常对照血清的检测 采用该试纸条检测 30 份健康人血清, 均为阴性。
- (3) 肝炎患者血清的检测 采用该试纸条检测 50 份肝炎患者血清, 均为阴性
- (4) 重复性实验 随机选取 HFRS 患者血清以及正常对照血清 5 份, 检测结果同上。

通过对临床确诊 HFRS 的患者血清标本以及正常对照标本的检测, 证实本发明提供的 HFRS 诊断试纸条有较好的特异性和敏感性, 且重复性好。

本发明提供的 HFRS 诊断试纸条, 能够实现 HFRS 的早期快速诊断, 该试纸条易于携带, 操作简单, 成本低廉, 需要的血清量少, 反应迅速, 通常在加入待检血清后 10-15min 内即可获得检测结果, 现场使用时不需要任何仪器设备, 结果判断容易, 能为基层医务人员所掌握, 能达到早期快速正确诊断 HFRS 的目的, 属于高新技术制备, 低技术应用, 易于在基层医疗单位推广使用, 特别适合在缺乏医疗卫生条件的 HFRS 易于流行的农村、林场、牧区等地基层医疗卫生单位使用。

附图说明

图 1 为胶体金试纸条组装示意图, 图中各部位名称是:

- 1--样品吸收垫
- 2--胶体金结合垫
- 3--检测线
- 4--质控线
- 5--硝酸纤维素薄膜 (NC 膜)

6—吸水垫

7—PVC 底板

图2为本发明试纸条检测效果图，位于下方的试纸条检测效果为阳性，可见质控线与检测线两条紫红色带；位于上方的试纸条检测效果为阴性，仅有质控线有紫红色条带出现。

图3为使用本发明试纸条进行检测时的加样操作示意图，示意加样操作：从铝箔包装袋中取出本发明试纸条，将本发明试纸条平放，用加样枪准确吸取80 μ l稀释好的血清标本或者使用一次性塑料吸管11吸取2滴约80 μ l垂直滴加于试纸条上的加样孔12中。图中标识11为加样用的吸管，标识12为塑料外壳上的加样孔，该孔对准样品吸收垫1。

图4为本发明试纸条检测结果示意图：

标号为8的试纸条的检测结果为阳性，其上可见质控线与检测线两条紫红色带；

标号为9的试纸条的检测结果为阴性，其上仅有质控线处有紫红色条带出现；

标号为10和标号为11的试纸条的检测结果均为无效，其质控线处未见紫红色条带出现，应重新检测。

具体实施方式

实施例1 制备本发明试纸条

1. 制备免疫胶体金

(1) 胶体金的制备 (40 nm)：

量取去离子水 800 ml 于锥形瓶中，加入 2% 氯金酸溶液 8 ml 得到终浓度为 0.02 % 的氯金酸水溶液，煮沸后准确加入 1% 柠檬酸三钠 45 ml。继续加热煮沸，溶液颜色由淡黄色变成黑色，继续煮沸直至溶液逐渐稳定成红色。再加热 5 min 后冷却至室温，用去离子水恢复至原体积 800 ml。

(2) 目测法确定胶体金与待标记羊抗人 μ 链抗体量的比例

用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调节金标溶液 PH 至 8.2，取洁净试管分装胶体金 1 ml，加入不同稀释度的待标记羊抗人 μ 链抗体 (0.1 mg/ml)，并设立空白对照管。放置 5min 后加入 10%NaCl 0.1 ml，混匀，静置 2 h 以上观察结果：未加抗体或者抗体量不足的试管中，胶体金不稳定形成由红色变成蓝紫色的聚沉现象，如果加入抗体的量到达或超过最低稳定量则试管中的溶液夜色保持红色不变。以此使胶体金红色不变而抗体含量最少的管作为稳定 1ml 胶体金所需要的蛋白量。在此基础上再加 50%的蛋白量即为最后标记的实际蛋白使用量。加入 PEG20000 使其在溶液终浓度达到 0.2%，搅拌均匀后保存于 4 $^{\circ}C$ 。

(3) 制备免疫胶体金

取制备好的胶体金溶液，加入 0.2 mol/L K_2CO_3 41.6 ml，搅拌 5 min。量取 110 ml 出来倒入新烧杯内搅拌，准备标记。其余的胶体金封口，4℃保存备以后标记用。搅拌状态下逐滴加入原浓度 4.7 mg/ml 的羊抗人 μ 链抗体 0.187 ml，25℃搅拌 20 min，静置 10min 后将胶体金溶液 13000 rpm 离心 30 min，小心吸取上清弃掉，用 GB-A 重新溶解沉淀 4℃保存。

2. 制备胶体金结合垫

用金稀释液将上述步骤制得的免疫金复合物即胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体溶液稀释至最佳工作浓度 42 μ g/ml，其 PH 为 8.2，用 BIODOT 划膜机喷头以 10 μ l/cm 喷于 0.5 cm \times 31 cm 玻璃纤维素膜上，制得胶体金结合垫(2)，相对湿度 40%以下，干燥后密封保存。所用的金稀释液为上海金标生物技术有限公司出产的金稀释液配方干粉，按该产品所附说明书操作使用。

3. T 线和 C 线的包被

(1) 制备汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP)

按姚苹苹, 刘合宾, 朱函坪等在《中华流行病学杂志》2001, 22 (5): 400. 上发表的《汉坦病毒中国疫苗株 Z10 核蛋白免疫原性的研究》一文所述方制备汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP)。

(2) HVrNP 抗原的纯化

汉坦病毒重组核衣壳蛋白抗原 (HVrNP) 采用 PBS (PH 7.2) 透析 96 小时后使用，隔日更换 PBS 溶液，以免 PH、离子强度等因素影响蛋白与金粒的吸附。

(3) 将纯化后的 HVrNP 抗原用 PH 为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 稀释成 0.4mg/ml 工作浓度，经 BIO-DO 型 XYZ-3000 三维喷点仪包被于 NC 膜的检测区即 T 线。在距离 T 线 5 mm 处的地方包被兔抗羊 IgG 抗体作为质控区即 C 线，兔抗羊 IgG 抗体工作浓度为 2.5 mg/ml，37℃干燥 2 小时，4℃密封保存。

4. 样品吸收垫的处理

封闭剂采用 0.1%BSA，将作为样品垫的玻璃纤维膜浸入封闭剂溶液，然后室温干燥保存备用。

5. 本发明免疫层析试纸条的组装

按以下步骤先将 NC 膜、吸水垫、制备好的胶体金结合垫、处理过的样品吸收垫组装到 PVC 底板上，切条后装入塑料外壳中。

- A. 戴上手套，将NC膜组装到PVC底板上，小心抹平膜面；
- B. 将吸水垫组装到粘性底板上，并小心抹平；
- C. 将制备好的胶体金结合垫粘贴到底板上，并小心抹平；
- D. 将处理过的样品吸收垫组装到粘性底板上，并小心抹平；

样品垫与胶体金结合垫之间有重叠，胶体金结合垫与硝酸纤维素膜重叠 1—2 mm，硝酸纤维素膜与吸水垫重叠 1.8—2.0 mm，样品垫用来吸收样品溶液。

E. 用切条机切成4.1 mm宽的试纸条装入塑料外壳中并压好，分别与2g干燥剂一包放入包装袋内，封口机封口后包装即完成组装，制成本发明试纸条。组装后的本发明试纸条的层次结构见图1。

实施例 2

本发明试纸条用于血清检测的使用说明

1. 检测原理

本发明诊断试纸条应用了间接捕获免疫层析的原理，患者血清中抗HFRS IgM抗体在流动的过程中与胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体结合，移行到NC膜检测线上与汉坦病毒核衣壳蛋白抗原形成复合物特异性结合而显色。

2. 试剂组成

HFRS诊断试纸条和稀释液0.01%吐温-20的PBS溶液。

3. 标本收集

患者血液经过离心去血清后，必须收集在洁净、干燥、不含有任何防腐剂的塑料管或玻璃容器内。若不能及时送检，2-8℃冷藏可保存24小时。长期保存需冷冻-20℃，忌反复冻融。

4. 检测操作步骤及结果判读

(1) 测试前将未开封的检测试纸条和血清标本恢复至室温；

(2) 将血清标本用试剂盒配套稀释液0.01%吐温-20的PBS溶液按1：499的比例进行稀释，即500倍稀释备测；

(3) 从原包装铝箔袋中取出本发明诊断试纸条，将试纸条平放，用加样枪准确吸取80 μ l稀释好的血清标本或者使用一次性塑料吸管吸取 2 滴约 80 μ l 垂直滴加于加样孔；

(4) 反应15 min，判定检测结果：

阳性：可见质控线与检测线二条紫红色带；

阴性：只有质控线有紫红色条带出现；

无效：若质控线未见紫红色条带出现，则均为无效，应重新检测。

5. 储存及有效期：原包装在4-30 °C阴凉避光干燥处储存，有效期为12个月。

6. 注意事项：本发明诊断试纸条在室温下一次性检测使用，检测时避免阳光直射和电风扇直吹。

实施例3 用于诊断肾综合征出血热的检测试剂盒

该肾综合征出血热检测试剂盒包括本发明提供的肾综合征出血热诊断试纸条、稀释液和使用说明，该稀释液为0.01%吐温-20的PBS溶液，该使用说明内容同实施例2。

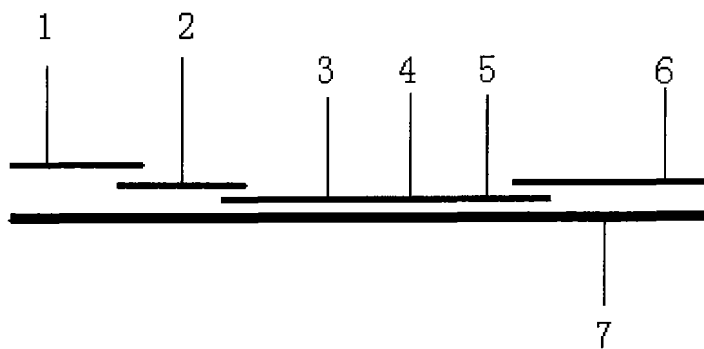


图 1

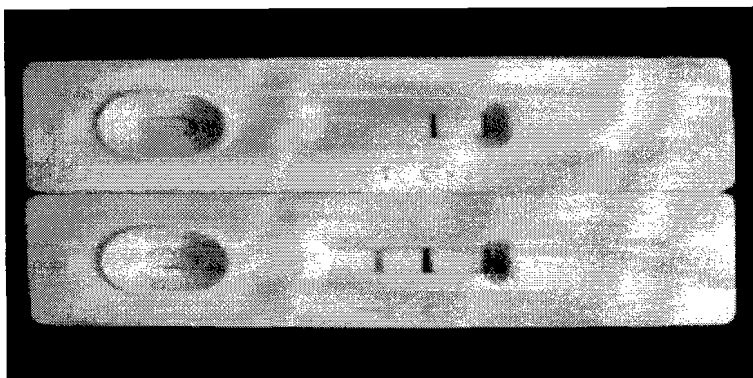


图 2

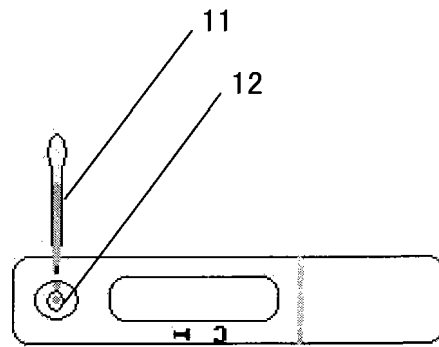


图 3

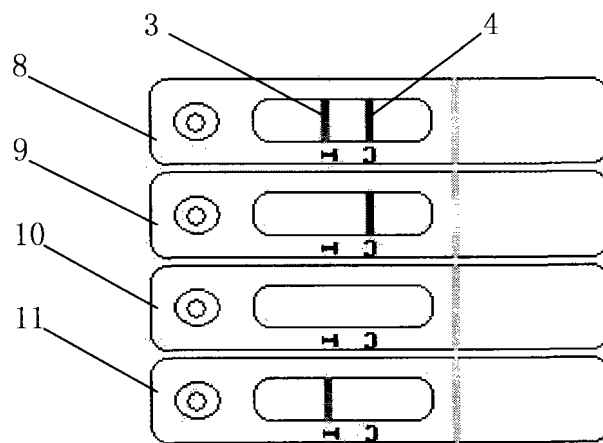


图 4

专利名称(译)	肾综合征出血热诊断试纸条、制备方法及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101377493A	公开(公告)日	2009-03-04
申请号	CN200710053053.X	申请日	2007-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属协和医院		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属协和医院		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属协和医院		
[标]发明人	胡丽华 王琳 熊莉娟 苏凤菊 蔡开琳 朱函坪 罗端德 揭盛华 曾令兰 肖菁		
发明人	胡丽华 王琳 熊莉娟 苏凤菊 蔡开琳 朱函坪 罗端德 揭盛华 曾令兰 肖菁		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/532 G01N33/52		
代理人(译)	吴涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种肾综合征出血热诊断试纸条、制备方法及检测试剂盒。该试纸条是在PVC底板(7)上顺次相互搭接地粘贴样品吸收垫(1)、胶体金结合垫(2)、硝酸纤维素薄膜(5)、吸水垫(6)而形成的胶体金免疫层析试纸条，其特征在于，胶体金结合垫(2)由含有胶体金标记的羊抗人 μ 链抗体免疫金复合物的玻璃纤维素膜构成，硝酸纤维素薄膜(5)上设置有检测区(3)和质控区(4)，在检测区(3)位置包被有汉坦病毒核衣壳蛋白抗原，在控制区(4)的位置包被有兔抗羊IgG抗体；该诊断试纸条有较好的特异性和敏感性，且重复性好，能够实现对HFRS的早期快速诊断，该试纸条易于携带，操作简单，成本低廉，反应迅速，易于在基层医疗单位推广使用。

