

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910304169.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月17日

[11] 公开号 CN 101650367A

[22] 申请日 2009.7.9

[21] 申请号 200910304169.5

[71] 申请人 北京现代高达生物技术有限责任公司

地址 100000 北京市经济技术开发区宏达北路10号5123室

[72] 发明人 马运国 吕传臣 周 晟

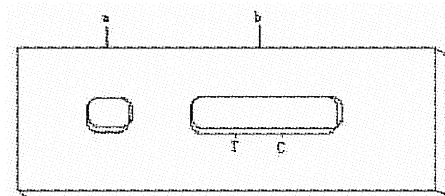
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称

戊型肝炎血清 IgM 抗体快速诊断试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明属于医学和生物学检验领域，涉及用胶体金免疫层析法制备的戊型肝炎血清 IgM 抗体快速诊断试剂盒。检测戊型肝炎血清 IgM 抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。该试纸条是由 PVC 底板(1)上的依次接合吸水垫(2)、特定包被的硝酸纤维膜(NC 膜)(3)、NC 膜上有检测线(4)和质控线(5)，喷涂胶体金标记戊型肝炎病毒基因重组 ORF2/ORF3 抗原的玻璃纤维胶体金结合垫(6)、样品垫(7)而组成的条形物。应用本发明所提供的试纸条检测人血清中弓形虫 IgM 抗体水平，具有操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作，具有良好的应用前景。



【权利要求1】

一种检测戊型肝炎血清IgM抗体的免疫胶体金层析试纸条，其特征在于：所述试纸条是由PVC底板（1）上的依次接合吸水垫（2）、特定包被的硝酸纤维膜（NC膜）（3）、NC膜上有检测线（4）和质控线（5），喷涂胶体金标记戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原的玻璃纤维胶体金结合垫（6）、样品垫（7）而组成的条形物。

1、所述试纸条，其特征在于：所述吸水垫（2）为一种滤纸，包括吸水纸和滤油纸；吸水垫贴在底板的末端。

2、所述试纸条，其特征在于：所述特定包被的NC膜（3）由一层滤膜和胶膜组成，NC膜上喷涂鼠抗人-IgM(μ 链)和兔抗戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原；NC膜贴在底板的中间，两端分别与结合垫和吸水垫连接。

3、所述试纸条，其特征在于：所述结合垫（6）为玻璃纤维纸，喷涂上胶体金标记的戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原，再37℃干燥，结合垫上与样品垫衔接，下与NC膜衔接。

4、所述试纸条，其特征在于：所述样品垫（7）为玻璃纤维纸，用硼酸缓冲液浸泡，缓冲液PH为7.2，浸泡处理后，37℃干燥过夜；样品垫位于结合垫上。

5、所述，在制备戊型肝炎血清IgM抗体诊断试纸条中的应用，其特征在于：诊断试纸条还包括标识条，此标识条为两个带有标识的不干胶纸，分别粘贴在试纸条的两端，带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上，由此端浸入待测样品，靠另一端的吸水垫的吸水作用，使样品经过NC膜。

6、所述，在制备戊型肝炎血清IgM抗体测试卡中的应用，其特征在于：测试卡还包括塑料卡，此塑料卡是一个用塑料特制的卡，由上下2片组成，上下片可嵌合在一起，下片主要有一个放试纸条的槽和与上片结合的卡齿，上片主要包括一个检测孔、一个样品孔以及与下片结合的卡齿，检测孔旁边分别印有T和C字样，T表示检测线的位置，C表示质控线的位置，检测孔是观察结果的窗口，样品孔是滴加样品的位置。

【权利要求2】

一种检测戊型肝炎血清IgM抗体的免疫胶体金层析试纸条的制备方法，包括如下步骤：

1、戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原：自制或购买，分子量：约52kDa，纯度：10ug上样SDS-PAGE一条带。

2、鼠抗人-IgM(μ 链)：自制或购买。

3、兔抗戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗体制备：通过免疫家兔戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原，提取兔抗血清，纯化后得到兔抗戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗体。

4、胶体金的制备：

a 量取一定量的洗液于洁净的烧瓶中，煮沸5分钟；

b 量取一定量的超纯水于该烧瓶中，煮沸5分钟；

c 弃去超纯水，称取适量三蒸水于该烧瓶中，加热至沸腾，加入适量1%氯金酸，加热至沸腾；

d 搅拌下加入6~10毫升1%柠檬酸三钠，沸腾5-10分钟；

5、胶体金探针标记：取胶体金100毫升，调节胶体金溶液PH值8.0，搅拌加入1毫升戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原，再缓慢加入1毫升10%BSA充分混匀，搅拌，离心弃上清，加入工作液溶解；

6、制备检测弓形虫血清IgM抗体的胶体金免疫试纸条：用喷涂机将标记戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原的胶体金溶液喷涂在玻璃纤维膜上，37℃干燥；将制备好的试剂条板上NC膜用喷膜机分别喷上鼠抗人-IgM(μ 链)和质控抗体（兔抗戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗体），喷完后37℃干燥过夜；将吸水垫、已包被的硝酸纤维膜、玻璃纤维胶体金结合垫、样品垫依次粘于底板上，裁成细条，即成一种检测戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫试纸条。

第4项所述制备方法，其特征在于：4)步中所述三蒸水为200毫升，所述1%氯金酸为10毫升，所述柠檬酸三钠为7.5毫升。

戊型肝炎血清IgM抗体快速诊断试剂盒及其制备方法

发明领域

本发明属于医学和生物学检验领域，涉及用胶体金免疫层析法制备的戊型肝炎血清IgM抗体快速诊断试剂盒。

现有技术

戊型病毒性肝炎是发展中国家的一种主要急性散发型肝炎，全球分布，危害严重。其病原体戊型肝炎病毒（HEV）主要经消化道传播，是大小约27-34nm的单股正链无包膜的RNA病毒，基因组全长约7.5kb，含3个开放读码框架（ORF1、ORF2、ORF3），其中ORF2为编码660个氨基酸的多肽，是病毒的主要结构蛋白。

随着戊型肝炎病毒分子克隆技术的成功建立，HEV分子生物学的研究取得了极大进展，与之相关的HEV检测方法也正在不断完善。该方法包括两个方面，即采用基因工程重组抗原建立的抗体诊断方法和采用逆转录-聚合酶链反应建立的基因诊断方法，分别检测抗HEV抗体和HEV RNA。

利用体外表达的各种HEV重组蛋白，已建立了多种抗HEV检测方法，包括酶联免疫方法ELISA(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和蛋白印迹技术WB(western blotting, WB)等用于HEV感染的临床诊断和实验研究。

采用WB法检测血清抗HEV，其特异性要比ELISA法高，可用来作为戊型肝炎的确诊手段。该法是用HEV重组多肽电泳后转移到硝酸纤维素膜上，用于检测血清中的抗HEV抗体。但WB法操作技术相对较为复杂，检测所需时间较长，主要用于戊型肝炎的实验室研究。

早期的ELISA检测试剂只用了ORF3抗原，灵敏度低，不久被包被了ORF3、ORF2融合抗原的EIA试剂所取代，灵敏度和特异性均较好。该方法虽在一定程度上弥补了过去HEV血清抗体检测方法的缺陷，但仍存在一些出于该方法本身的缺陷而无法解决的问题，如检测时间长（2-3小时），步骤多（2-3步），需特殊仪器（酶联检测仪），须同时操作多人份血清，病人获得检测结果时间长等。

采用胶体金法，检测戊型肝炎结果直观（肉眼观察）、快速（10-20分钟出结果）、操作简便、无需专用仪器和设备、可用于床旁检验，复检极为方便。本发明旨在为临床诊断HEV感染以及HEV感染的流行病学调查提供一种快速、特异的诊断试剂盒。

发明内容

为克服现有戊型肝炎抗体检测技术的不足，本发明提供一种快速检测戊型肝炎血清IgM抗体的试纸条。不需要任何仪器设备辅助的快速检测试剂。本发明根据胶体金免疫层析技术特点和戊型肝炎ORF2/ORF3基因重组抗原系统特点，设计新的原材料，试剂和工艺流程，应用本发明提供的试纸条检测戊型肝炎血清IgM抗体水平，具有简单，快速，灵敏和特异性好等特点，30分钟以内出结果，并且价格低，适用于基层检测和临床初筛。

本发明所述试纸条是由PVC底板（1）上依次接合吸水垫（2）、特定包被的硝酸纤维膜（3）、涂覆胶体金标记戊型肝炎ORF2/ORF3基因重组抗原的玻璃纤维胶体金结合垫（6）、样品垫（7）而组成的条形物。检测样品经过样品垫和结合垫再经层析作用在NC膜上出现检测线和质控线，用肉眼判断结果。在NC膜上仅仅出现一条质控线，结果为阴性，在NC膜上同时出现检测线和质控线，结果为阳性，不出现线条表示试纸条或测试卡失效。30分钟内出结果。

本发明所述试纸条吸水垫为一种滤纸，包括吸水纸和滤油纸，切成要求大小直接使用。贴在底板的末端，起吸水作用。

本发明所述试纸条上特定包被的NC膜是一种专门用于胶体金试纸条的材料，由一层滤膜和胶膜组成，成卷筒装，NC膜上喷2条线，分别为检测线和质控线，检测线喷涂的是鼠抗人-IgM(μ 链)，质控线喷涂的是兔抗戊型肝炎ORF2/ORF3抗体；NC膜贴在底板的中间，两端分别与结合垫和吸水垫连接。

本发明所述试纸条上结合垫为玻璃纤维纸，喷涂上胶体金标记戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原，再37℃干燥，结合垫上与样品垫衔接，下与NC膜衔接。

本发明所述试纸条样品垫为玻璃纤维纸，用硼酸缓冲液浸泡处理，缓冲液PH为7.2，浸泡处理后，37℃干燥过夜，在试剂条中起过滤样品的作用，位于结合垫上，贴在底板上。

本发明还提供上述试纸条在制备戊型肝炎血清IgM抗体诊断试纸条中的应用，诊断试纸条还包括标识条，此标识条为两个带有标识的不干胶纸，分别粘贴在试纸条的两端，带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上，由此端浸入待测样品，靠另一端的吸水垫的吸水作用，使样品经过NC膜。

本发明还提供上述试纸条在制备戊型肝炎ORF2/ORF3血清IgM抗体测试卡中的应用，测试卡还包括塑料卡，此塑料卡是一个用塑料特制的卡，由上下2片组成，上下片可嵌合在一起，下片主要有一个放试纸条的槽和与上片结合的卡齿，上片主要包括一个检测孔、一个样品孔以及与下片结合的卡齿，检测孔旁边分别印有T和C字样，T表示检测线的位置，C表示质控

线的位置，检测孔是观察结果的窗口，样品孔是滴加样品的位置。此塑料卡起保护试纸条的作用，并且更美观，减少污染和保护操作者的安全。

本发明所述试纸条的制备方法，包括如下步骤：

1) 戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原：自制或购买，分子量：35kDa，纯度：10ug上样SDS-PAGE一条带。

2) 鼠抗人-IgM(μ 链)：自制或购买。

3) 兔抗戊型肝炎ORF2/ORF3抗体：通过戊型肝炎ORF2/ORF3免疫家兔，提取、纯化兔血清制备。

4) 胶体金的制备：

a 量取一定量的洗液于洁净的烧瓶中，煮沸5分钟；

b 量取一定量的超纯水于该烧瓶中，煮沸5分钟；

c 弃去超纯水，称取适量三蒸水于该烧瓶中，加热至沸腾，加入适量1%氯金酸，加热至沸腾；

d 搅拌下加入6~10毫升1%柠檬酸三钠，沸腾5-10分钟；

4) 胶体金探针标记：

取胶体金100毫升，调节胶体金溶液PH值8.0，搅拌加入1毫升戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原，再缓慢加入1毫升10%BSA充分混匀，搅拌，离心弃上清，加入工作液溶解；

5) 制备检测弓形虫血清IgM抗体的胶体金免疫试纸条：

用喷涂机将标记戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原的胶体金溶液喷在玻璃纤维膜上，37℃干燥；将制备好的试剂条板上NC膜用喷膜机分别喷上鼠抗人-IgM(μ 链)和质控抗体（兔抗戊型肝炎ORF2/ORF3抗体），喷完后37℃干燥过夜；将吸水垫、已包被的硝酸纤维膜、玻璃纤维胶体金结合垫、样品垫依次粘于底板上，裁成细条，即成一种检测戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫试纸条。

上述胶体金制备过程中，优选三蒸水200毫升，氯金酸10毫升，柠檬酸三钠7.5毫升。

本发明的有益效果：应用本发明提供的试纸条检测人体内戊型肝炎血清IgM抗体水平，成本低廉，操作简单、快速、灵敏，且特异性好，不需要特殊检测仪器设备，因此可广泛应用于各级医疗检验场所，尤其是基层医疗机构，包括乡镇卫生院等均可开展。本发明有益于戊型肝炎血清IgM抗体筛查的普及，对于戊型肝炎的预防和治疗有极为重要的意义。

附图说明

图1为本发明的结构示意图

1: PVC底板; 2: 吸水垫; 3: 特定包被的硝酸纤维膜; 4: 检测线; 5: 质控线; 6: 结合垫; 7: 样品垫。

图2为本发明的检测结果示意图

a: 阳性; b: 阴性; c: 无效; 4: 检测线; 5: 质控线。

图3为本发明的试纸条外观示意图

a: 样本垫; b: 结合垫; c: 检测线; d: 质控线; e: 试纸条名称

图4为本发明的测试卡外观示意图

a: 样本孔; b: 测试孔; T: 检测线; C: 质控线。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明, 凡依照本发明公开内容所作出的本领域等同替换, 均属于本发明的保护范围。

实施例1:

戊型肝炎血清IgM抗体胶体金免疫试纸条制备方法, 它包括如下步骤:

1、胶体金的制备:

量取一定量的洗液于洁净的250ml三角烧瓶中, 煮沸5分钟; 量取一定量的超纯水于该烧瓶中, 煮沸5分钟; 弃去超纯水, 称取200ml超纯水于该烧瓶中, 加热至沸腾, 加入1%氯金酸10ml, 边煮边搅拌, 加热至沸腾; 搅拌下加入1%柠檬酸三钠10ml, 沸水下快速搅拌, 直到氯金酸溶液的颜色慢慢稳定, 呈红色后, 继续沸腾5分钟, 制成小颗粒胶体金。

2、制备检测戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫试纸条:

用喷涂机将标记戊型肝炎基因重组ORF2/ORF3抗原的胶体金溶液喷涂在玻璃纤维膜上, 37°C干燥; 将制备好的试剂条板上NC膜用喷膜机分别喷上鼠抗人-IgM(μ 链)和质控抗体(兔抗戊型肝炎ORF2/ORF3抗体)。喷完后37°C干燥过夜。将吸水垫、已包被的硝酸纤维膜、玻璃纤维胶体金结合垫、样品垫依次粘于底板上, 裁成细条, 即成一种检测戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫试纸条。

实施例2:

戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫诊断试纸条制备方法, 它包括如下步骤:

将两个带有标识的不干胶纸（标识条）分别粘贴在实施例2中所制备试纸条的两端，带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上，由此端浸入待测样品，靠另一端的吸水垫的吸水作用，使样品经过NC膜。即成一种检测戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫诊断试纸条。

见图3。

实施例3:

戊型肝炎血清IgM抗体的胶体金免疫诊断测试卡制备方法，它包括如下步骤:

将实施例2中所制备试纸条放入塑料卡下片试纸条槽中，与上片嵌合，即成一种检测同型半胱氨酸的胶体金免疫诊断测试卡，见图4。此塑料卡是一个用塑料特制的卡，由上下2片组成，上下片可嵌合在一起，下片主要有一个放试纸条的槽和与上片结合的卡齿，上片主要包括一个检测孔（见图4b）、一个样品孔（见图4a）以及与下片结合的卡齿，检测孔旁边分别印有T和C字样，T表示检测线的位置，C表示质控线的位置，检测孔是观察结果的窗口，样品孔是滴加样品的位置。

实施例4:

戊型肝炎血清IgM抗体免疫胶体金诊断层析试纸条使用方法:

如图3所示，将试纸条样品垫插入待测液中，浸润后取出，水平放置，约30分钟后，仅在质控线C处出现一条线，结果为阴性；在检测线T和质控线C处分别出现一条线，结果为阳性；不出现线条表示测试条失效。

实施例5:

戊型肝炎血清IgM抗体免疫胶体金诊断层析测试卡使用方法:

如图4所示，将样本加入样本孔a，加样量75微升~80微升，水平放置，约30分钟后，仅在测试孔b的质控线C处出现一条线，结果为阴性；在测试孔b的检测线T和质控线C处分别出现一条线，结果为阳性；不出现线条表示测试卡失效。

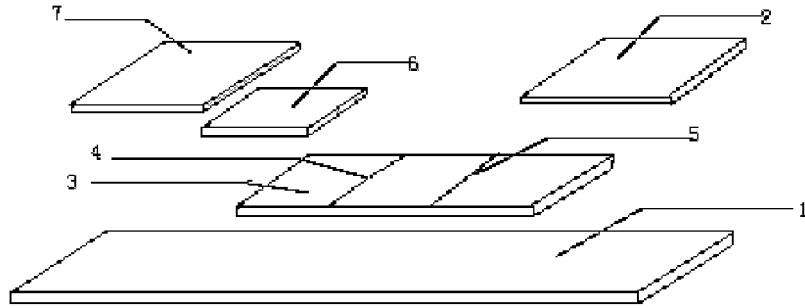


图1

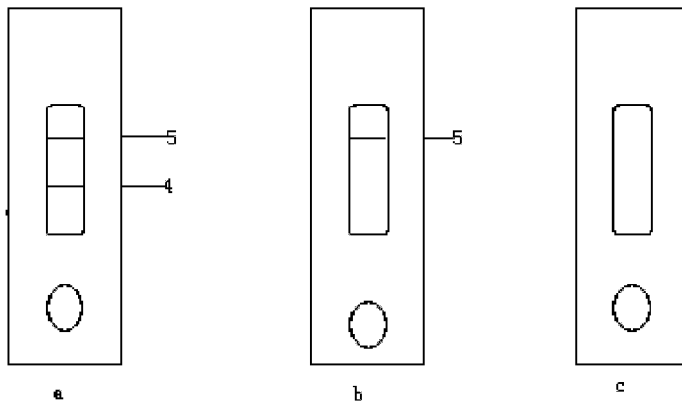


图2

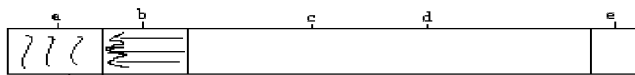


图3

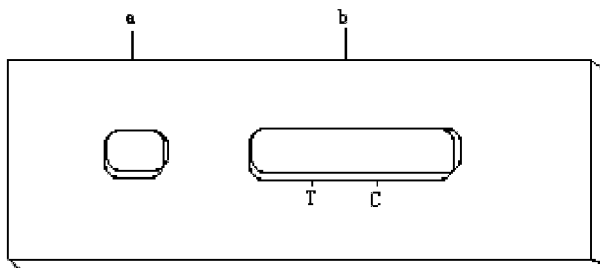


图4

专利名称(译)	戊型肝炎血清IgM抗体快速诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101650367A	公开(公告)日	2010-02-17
申请号	CN200910304169.5	申请日	2009-07-09
[标]发明人	马运国 吕传臣 周晟		
发明人	马运国 吕传臣 周晟		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于医学和生物学检验领域，涉及用胶体金免疫层析法制备的戊型肝炎血清IgM抗体快速诊断试剂盒。检测戊型肝炎血清IgM抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。该试纸条是由PVC底板(1)上的依次接合吸水垫(2)、特定包被的硝酸纤维素膜(NC膜)(3)、NC膜上有检测线(4)和质控线(5)，喷涂胶体金标记戊型肝炎病毒基因重组ORF2/ORF3抗原的玻璃纤维胶体金结合垫(6)、样品垫(7)而组成的条形物。应用本发明所提供的试纸条检测人血清中弓形虫IgM抗体水平，具有操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作，具有良好的应用前景。

