



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103529222 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310524072. 1

(22) 申请日 2013. 10. 29

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

(72) 发明人 孟小笠 傅振芳 赵凌 周军

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限
公司 42104

代理人 徐绍新

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金
检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条,包括金标结合区和检测区,所述检测区上设有检测线和质控线,所述金标结合区包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒,所述检测线包被葡萄球菌白蛋白,所述质控线包被卵白蛋白抗体。本发明能降低检测成本,并能提高检测灵敏度,避免假阳性,实现了狂犬病病毒抗体的人畜共检。另外,本发明质控线有效解决了多抗或单抗作为质控线的不稳定问题,对于大批量样品检测,野外应用及免疫后人群自检有重要意义,具有很大的市场发展潜力。

1. 一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条,包括金标结合区和检测区,所述检测区上设有检测线和质控线,其特征在于:所述金标结合区包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒,所述检测线包被葡萄球菌白蛋白,所述质控线包被卵白蛋白抗体。

2. 一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 向 pH7.0-7.5 的胶体金的溶液中加入狂犬病病毒抗原和封闭剂,得到胶体金标记的狂犬病病毒抗原,再通过差速离心对其进行纯化;

向 pH5.5-6.5 的胶体金的溶液中加入卵白蛋白和封闭剂,得到胶体金标记的卵白蛋白,再通过差速离心对其进行纯化;

2) 将纯化后的胶体金标记的狂犬病病毒抗原和胶体金标记的卵白蛋白涂布于金标结合区的聚酯膜上,并进行干燥,得到包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒的金标结合区;

3) 分别用葡萄球菌白蛋白、卵白蛋白抗体在检测区的硝酸纤维素膜上划线,分别作为检测线与质控线,并进行孵育或干燥,制得检测区;

4) 将所述金标结合区、检测区以及吸水区、加样区粘贴到 PVC 底板上。

一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金检测试纸条,尤其是一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条,本发明还涉及该试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 狂犬病是由狂犬病病毒(RV)引起的人畜共患传染病,人和动物一旦发病,致死率将近 100%。狂犬病主要感染途径为人被病兽或带毒动物咬伤,在我国死亡人数最多的三大传染病中,狂犬病死亡人数仅次于艾滋病,超过结核病名列第二,可见狂犬病的预防控制工作十分重要。狂犬病疫苗可以有效的防范狂犬病毒的感染,是防治狂犬病的重要手段。而判断接种疫苗后是否已产生保护效力就要依托于对狂犬病病毒抗体滴度的检测。目前,虽然已有大量检测狂犬病抗体的方法,但各种检测方式都存在一定的弱点,如操作复杂、操作条件苛刻、成本昂贵等。免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法,具有快速简便、特异敏感、稳定性强、可保存实验结果、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等优点,很好地解决了其他检测方法的问题。

[0003] 中国专利公开号为 101930003A 和中国专利公开号为 101852803A 的专利申请中均提到利用葡萄球菌白蛋白(SPA)标记金颗粒,而狂犬病病毒蛋白包被检测线。实验中发现此方法中,对狂犬病病毒蛋白的浓度、纯度以及用量要求很高。同样达到检测下限,狂犬病病毒蛋白包被检测线所需量约是其标金所需量的 10-12 倍;相同量蛋白分别应用于标记金颗粒和包被检测线两种检测模式,所显示出的灵敏度差异巨大,如表格 1 所示。另外,由于狂犬病病毒蛋白纯化技术并不成熟,在提高蛋白浓度的同时会出现严重的假阳性;而利用狂犬病病毒蛋白标记金颗粒可以有效提高灵敏度,减少蛋白用量,避免假阳性的出现,从而很大程度上降低了狂犬病病毒蛋白的纯化难度及成本,更有利于市场推广。另外,本专利中采用的间接法另一特点在于质控线的设置。大多文献及专利中很少用抗原标记金颗粒的原因可能在于此方法在质控线的设置上存在困难。许多文献中以狂犬病病毒多抗作为质控线,实验过程中发现,若用抗原所对应的多抗包被质控线则与检测线存在竞争关系而可能导致质控线出线不稳定,如表格 2 所示。为避免质控线不稳定问题,并保证检测线的灵敏度及特异性,本专利采用双层金标法,引入卵白蛋白及卵白蛋白抗体分别进行标记金颗粒和包被质控线,两者成本低,纯化技术成熟,与 SPA 不存在交叉,可有效解决质控线问题。

[0004] 基于以上几个特点,本专利市场推广可行性较高,特别适合于广大基层单位、医院及野外作业人员使用,便于及时监测人或动物的健康状况,因此该技术具有巨大的发展潜力和应用前景。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种能够提高检测灵敏度和降低检测成本的用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条,本发明还提供该试纸条的制备方法。

[0006] 上述目的是通过以下技术方案实现的：

[0007] 一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条，包括金标结合区和检测区，所述检测区上设有检测线和质控线，所述金标结合区包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒，所述检测线包被葡萄球菌白蛋白，所述质控线包被卵白蛋白抗体。

[0008] 一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条的制备方法，包括如下步骤：

[0009] 1) 向 pH 值为 7-7.5 的胶体金的溶液中加入狂犬病病毒抗原和封闭剂，得到胶体金标记的狂犬病病毒抗原，再通过差速离心对其进行纯化；

[0010] 向 pH 值为 6.5-7 的胶体金的溶液中加入卵白蛋白和封闭剂，得到胶体金标记的卵白蛋白，再通过差速离心对其进行纯化；

[0011] 2) 将纯化后的胶体金标记的狂犬病病毒抗原和胶体金标记的卵白蛋白涂布于金标结合区的聚酯膜上，并进行干燥，得到包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒的金标结合区；

[0012] 3) 分别用葡萄球菌白蛋白、卵白蛋白抗体在检测区的硝酸纤维素膜上划线，分别作为检测线与质控线，并进行孵育或干燥，制得检测区；

[0013] 4) 将所述金标结合区、检测区以及吸水区、加样区粘贴到 PVC 底板上。

[0014] 本发明通过在检测线包被葡萄球菌白蛋白，质控线包被卵白蛋白抗体，在金标结合区包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒，从而有效降低对抗原蛋白的要求及用量，降低检测成本，并能提高检测灵敏度，避免假阳性，实现了狂犬病病毒抗体的人畜共检。另外，本发明质控线有效解决了多抗或单抗作为质控线的不稳定问题，对于大批量样品检测，野外应用及免疫后人群自检有重要意义，具有很大的市场发展潜力。

附图说明

[0015] 图 1 是本发明检测试纸条的平面结构示意图，其中 1 为吸水区，2 为检测区，3 为金标结合区，4 为加样区，5 为检测线，6 为质控线，7 为 PVC 底板。

具体实施方式

[0016] 下面结合实施例对本发明进行详细说明。

[0017] 实施例 1：狂犬病病毒抗体检测试纸条的结构及原理

[0018] 如图 1 所示，本发明所提供的狂犬病毒抗体检测试纸条，以 PVC 底板为载体，由左到右依次为加样区、金标结合区、检测区、吸水区。所述吸水区始端覆盖于检测区的末端；所述检测区的始端被金标结合区末端覆盖；所述金标结合区的始端被加样区的末端覆盖。所述检测区设有质控线和检测线，金标结合区包被有可与质控线和检测线在特定情况下特异性结合的金标结合物。

[0019] 吸水区的覆盖材料为吸水纸，检测区的覆盖材料为硝酸纤维素膜，金标结合区的覆盖材料为聚酯膜，加样区的覆盖材料为玻璃纤维素膜。

[0020] 本发明利用免疫层析式间接法原理，当样本中含有狂犬病病毒特异性抗体时，特异性抗体可与金标结合区上的狂犬病病毒抗原即狂犬病全病毒蛋白特异性结合形成金标

抗原抗体复合物,层析过程中,该复合物中的特异性抗体可与包被在检测线的葡萄球菌白蛋白结合形成红色沉淀条带,试验结果呈现阳性。而样品中若无狂犬病病毒特异性抗体,则无法形成金标抗原抗体复合物,检测线无法形成红色沉淀条带,从而呈现阴性结果。

[0021] 本发明在质控线的设置中选择另一对可特异性结合的抗原抗体,检测区的质控线包被卵白蛋白抗体,金标结合区还含有胶体金标记的卵白蛋白,且胶体金标记的卵白蛋白与检测线无交叉。无论样本中是否存在特异性抗体,只要有足够液体作为媒介,质控线都可结合胶体金标记的卵白蛋白,形成红色沉淀条带。质控线的意义在于判断样本量是否足够,层析过程是否正常以及试纸条是否因储存或运输等外在条件的影响而导致无效。

[0022] 实施例 2:狂犬病病毒抗体检测试纸条的制备

[0023] 1. 胶体金的烧制

[0024] 胶体金溶液采用柠檬酸三钠还原法制备。具体操作步骤为:将超纯水加入到硅化处理的蓝盖瓶中,然后加入氯金酸溶液,加热至沸腾,沸腾后迅速加入新鲜配制的柠檬酸三钠适量,并充分混匀,溶液颜色变为酒红色后继续煮沸 15-20 分钟,冷却至室温后于 2-8℃ 保存备用。

[0025] 2. 胶体金标记抗原的制备

[0026] 1) 胶体金标记狂犬病病毒抗原的制备:用碳酸钾将金溶液 PH 调整至 7.0-7.5,加入纯化后的狂犬病全病毒蛋白后,立即轻轻混匀,静置 5-10min 后加入聚乙烯醇至终浓度 0.1%-1%,离心法去除不稳定和未结合金颗粒后,5500rpm 离心 30min 得到稳定的金标结合物与试管底部,即金标 RV。

[0027] 2) 胶体金标记的卵白蛋白的制备:用碳酸钾将金溶液 PH 调整至 5.5-6.5,加入卵白蛋白后按上述同样的方法进行标记,得到金标 OVA。

[0028] 用加有 0.1%PEG20000,1% 蔗糖的硼酸缓冲液重悬,得到金标蛋白复溶液。

[0029] 3. 金标垫的制备

[0030] 用处理液处理聚酯膜,于 37℃ 烘箱中烘干后浸润在标记好的金标复溶液中,干燥备用。

[0031] 4. 检测区的包被

[0032] 检测线和质控线分别包被适宜工作浓度的葡萄球菌白蛋白和卵白蛋白抗体,线宽约 1-2mm,置于 37℃ 烘箱中干燥 6-8h。

[0033] 5. 试纸条的组装

[0034] 按常规方法组装。组装好的试纸条切成 4-6mm,置于塑料卡中。

[0035] 实施例 3:狂犬病病毒抗体检测试纸条的使用方法

[0036] 将检测卡从铝箔袋中取出,水平放于实验台上并做好标记。取血清样品 3 μ l 于 1ml 样品稀释液中,完全混匀后,从中取 70 μ l 稀释后样品加入到检测卡上的加样孔中,15-30min 内判读检测结果,30min 后结果无效。

[0037] 检测结果的判断:

[0038] 阴性:只有质控线(C)位置有红色沉淀条带;

[0039] 阳性:质控线(C),检测线(T)位置均有红色沉淀条带,即出现两条红色条带;

[0040] 无效:质控线(C)位置没有出现红色条带。

[0041] 取等量狂犬病病毒蛋白分别进行胶体金标记和包被检测线,将两种检测模式进行

对比比较灵敏度差异,检测不同稀释倍数的同一阳性样品,结果见表 1。

[0042] 表 1 狂犬病病毒蛋白分别进行胶体金标记和包被检测线的效果对比

[0043]

阳性血清稀释倍数 试纸条模式	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
金标 RV/SPA 包膜	+	+	+	+	+	+	+	-
金标 SPA/RV 包膜	+	-	-	-	-	-	-	-

[0044] 注:+:为阳性;-:为阴性。

[0045] 从上表结果可以看出,将狂犬病病毒蛋白进行胶体金标记的检测灵敏度显著高于将狂犬病病毒蛋白包被检测线,后者在稀释 200 倍以后就无法检出。为避免血清中大量非特异性抗体结合 SPA 对阳性信号造成的影响,样品需至少稀释 100 倍,以 300-400 倍稀释最佳。

[0046] 用同一批金颗粒标记卵白蛋白和狂犬病病毒蛋白,检测线包被葡萄球菌白蛋白,质控线分别包被卵白蛋白抗体和狂犬病病毒多抗,将试纸条用于检测不同抗体滴度的样品,结果见表 2。

[0047] 表 2 卵白蛋白抗体和狂犬病病毒多抗质控线的效果对比

[0048]

不同抗体滴度样品 不同质控线	0	0.2	0.8	1.14	2.26	10.29	17.77	20.05
卵白蛋白抗体	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
狂犬病病毒多抗	-/+	-/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-

[0049] 注:+/+:检测线与质控线同时出线;+/-:检测线出线而质控线不出线;-/+ :质控线出线而检测线不出线。

[0050] 从上表结果可以看出,用狂犬病病毒多抗作为质控线一组在抗体滴度达到 2.26 时质控线无法出线;而卵白蛋白抗体作为质控线一组,样品的抗体滴度不影响质控线出线,可保证质控线稳定出线。

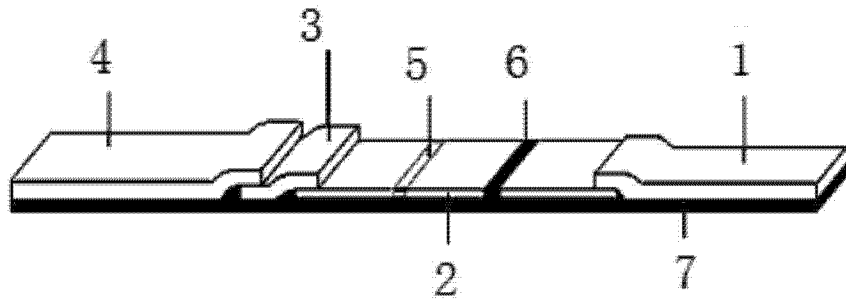


图 1

专利名称(译)	一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN103529222A	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	CN201310524072.1	申请日	2013-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	孟小筌 傅振芳 赵凌 周军		
发明人	孟小筌 傅振芳 赵凌 周军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/56983		
代理人(译)	徐绍新		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于人畜共检的狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条，包括金标结合区和检测区，所述检测区上设有检测线和质控线，所述金标结合区包被胶体金标记的狂犬病病毒抗原及卵白蛋白金颗粒，所述检测线包被葡萄球菌白蛋白，所述质控线包被卵白蛋白抗体。本发明能降低检测成本，并能提高检测灵敏度，避免假阳性，实现了狂犬病病毒抗体的人畜共检。另外，本发明质控线有效解决了多抗或单抗作为质控线的不稳定问题，对于大批量样品检测，野外应用及免疫后人群自检有重要意义，具有很大的市场发展潜力。

阳性血清稀释倍数	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
试纸条模式								
金标 RV/SPA 包膜	+	+	+	+	+	+	+	.
金标 SPA/RV 包膜	+