



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101021532 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 09

(21) 申请号 200710064894. 0

(22) 申请日 2007. 03. 28

(73) 专利权人 北京英诺特生物技术有限公司  
地址 100070 北京市丰台区科兴路 7 号 601 室

(72) 发明人 王健 陈廷友 王志新 翟立伟  
孔祥菊 毕大伟 张秀杰

(74) 专利代理机构 北京中海智圣知识产权代理有限公司 11282

代理人 曾永珠

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1740794 A, 2006. 03. 01,

CN 1800854 A, 2006. 07. 12,

CN 1904615 A, 2007. 01. 31,

CN 1963515 A, 2007. 05. 16,

CN 1627073 A, 2005. 06. 15,

邓艳琴等. 应用快速免疫层析法检测恙虫病特异性 IgM、IgG 及总抗体. 《中国人兽共患病杂志》. 2003, 第 19 卷 (第 6 期),

季晓辉. 免疫金银染色检测 IgM 和 IgG 型抗核抗体及其组分的比较. 《中国皮肤性病杂志》. 1995, 第 9 卷 (第 1 期),

CHEW 等. Clinical Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for the Diagnosis of Dengue Virus Infection. 《CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY》. 1998, 第 5 卷 (第 3 期), 407 - 409.

赵珠英等. 胶体金免疫色谱测试法与血凝抑制试验检测登革热 IgM、IgG 抗体的比较. 《中国人兽共患病杂志》. 2001, 第 17 卷 (第 1 期),

审查员 寇飞

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种检测人巨细胞病毒 IgM 和 IgG 抗体的胶体金层析条的制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条及其制备技术。该层析条以胶体金作为标记物, 在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜, 另一端贴附有吸收垫; 所述复合物垫为涂覆有抗原—胶体金复合物的玻璃纤维素膜, 其特征在于: 所述硝基纤维素膜上包含三条包被线, 分别包被有抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。本发明的层析条采用免疫捕获法原理测定 IgM 抗体, 双抗原夹心法原理测定 IgG 抗体, 通过一次操作即可联合检测出特异性 IgM、IgG 抗体, 简化了操作过程, 且检测结果的总体符合率较高。

CN 101021532 B

1. 一种检测人巨细胞病毒 (HCMV) IgM 和 IgG 抗体的胶体金层析条的制备方法,其特征在于,制备过程包括:

(1) 采用基因重组法制备浓度为 3mg/ml 的 HCMV 抗原,动物免疫法制备浓度为 5mg/ml 的兔抗 HCMV 抗体,单克隆抗体法制备浓度为 2mg/ml 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体,备用;

(2) 制备抗原-胶体金的复合物:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中按照 80  $\mu$ g/ml 比例加入纯化的 HCMV 抗原,经封闭、离心处理后,取沉淀稀释至  $A_{530}$  值 2.0,备用;

(3) 包被鼠抗人 IgM 单克隆抗体、HCMV 抗原和兔抗 HCMV 抗体:取硝基纤维素膜贴于 PVC 背板中间,设定划膜机涂覆参数为 1  $\mu$ l/cm,取 5mg/ml 的兔抗 HCMV 抗体 1.5ml、3mg/ml 的 HCMV 抗原 1.5ml 和 2mg/ml 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体 1.5ml,分别接到划膜机的 A、B、C 管道接口,将贴有硝基纤维素膜的 PVC 背板置于划膜机的往复运动平台上,开启划膜机,在硝基纤维素膜上涂覆兔抗 HCMV 抗体、HCMV 抗原、鼠抗人 IgM 单克隆抗体,在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时,将背板置于 1% 聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟,晾干,37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时;

(4) 将抗原-胶体金的复合物涂覆在玻璃纤维素膜上:设定划膜机喷涂参数为 25.0  $\mu$ l/cm,将抗原-胶体金复合物连接到划膜机的 D 管道接口,取 30cm $\times$ 12cm 的玻璃纤维素膜放置往复运动平台上,开启划膜机,在玻璃纤维素膜上喷涂抗原-胶体金复合物制成复合物垫,37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时;

(5) 在 PVC 背板上一端顺次相互搭接地贴上复合物垫和样品垫,另一端贴上吸收垫,将 PVC 背板及其贴附的材料切成 4mm 宽层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在於:所述硝基纤维素膜在包被抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体后进行封闭处理。

## 一种检测人巨细胞病毒 IgM 和 IgG 抗体的胶体金层析条的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用免疫测定法检测特异性 IgM、IgG 抗体的层析条及其制备技术,具体地说,涉及一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应对特异性 IgM、IgG 抗体进行联合检测的层析条及其制备方法。

### [0002] 背景技术

[0003] 免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M, IgM) 和免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG) 是人或动物体内最重要的两种抗体。一种抗原(细菌或病毒等)进入机体后,最早出现的免疫球蛋白是 IgM 抗体,之后出现 IgG 抗体。尽管在某些情况下还可能出现 IgA 抗体,由于其临床意义同 IgG 基本相同,并且 IgA 含量很低,在临床检测中的实际意义不大,因而在临床检测中一般不予以区分。通过检测机体内 IgM、IgG 抗体的存在,可以诊断人或动物对特定抗原的免疫反应状态。血清内若检测出特异性 IgM 抗体,表明有近期感染的发生,但 IgM 抗体半衰期较短, IgM 的检测阴性并不能证明机体未受到感染,还需要检测半衰期较长,含量最高的 IgG 抗体,以明确诊断。

[0004] 目前单独检测特异性 IgM 或 IgG 抗体的方法很多,比如 ELISA 法、双抗原夹心法、胶体金免疫层析法等,但还未有通过一次操作过程即可联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的方法。虽然单独检测 IgM 和 IgG 抗体后,再综合分析检测结果对疾病的诊断并无影响,但操作过程繁琐,检测不够方便快捷。

### [0005] 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种胶体金层析条,通过一次操作过程即可联合检测特异性 IgM、IgG 抗体,从而简化操作过程,实现快速检测的目的。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一种联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条,所述层析条在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜,另一端贴附有吸收垫;所述复合物垫为涂覆有抗原—胶体金复合物的玻璃纤维素膜,其特征在于:所述硝基纤维素膜上包含三条包被线,分别包被有抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。

[0009] 本发明还提供了所述胶体金层析条的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 制备特异性抗原、与抗原相应的抗体、抗 IgM 抗体:采用常规制法制备特异性抗原、与已知抗原相应的动物抗体、抗 IgM 抗体,浓度分别为 1mg/ml ~ 4mg/ml、3mg/ml ~ 6mg/ml、0.5mg/ml ~ 4mg/ml;

[0011] (2) 制备抗原—胶体金复合物:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中按照 20  $\mu$ g/ml ~ 80  $\mu$ g/ml 比例加入纯化的已知抗原,经封闭、离心处理后,取沉淀稀释至  $A_{530}$  值为 0.5 ~ 3,备用;

[0012] (3) 取硝基纤维素膜贴在 PVC 背板中间,将抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体分开包被在硝基纤维素膜上;将抗原—胶体金复合物涂覆在玻璃纤维素膜上制备复合物垫;

[0013] (4) 在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜, 另一端贴附吸收垫;

[0014] (5) 将 PVC 背板及其贴附的材料切成适宜宽度的层析条。

[0015] 所制备的抗 IgM 抗体可以为单克隆或多克隆抗体。

[0016] 所述抗原—胶体金复合物可以喷涂、敷涂或浸泡的方式涂覆在玻璃纤维素膜上。

[0017] 所述硝基纤维素膜在包被抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体后可以进行封闭处理, 以减少非特异性反应。

[0018] 所述层析条在制备完成后可以装入塑料板卡内。

[0019] 本发明的胶体金层析条, 以胶体金作为标记物, 采用免疫捕获法原理测定 IgM 抗体, 双抗原夹心法原理测定 IgG 抗体, 通过一次操作即可联合检测出特异性 IgM、IgG 抗体, 简化了操作过程, 且检测结果的总体符合率较高。

### 具体实施方式

[0020] 实施例 1: 检测人巨细胞病毒 (HCMV) IgM、IgG 抗体的胶体金层析条的制备方法具体制备过程如下:

[0021] (1) 采用基因重组法制备浓度为 3mg/ml 的 HCMV 抗原, 动物免疫法制备浓度为 5mg/ml 的兔抗 HCMV 抗体, 单克隆抗体制备法制备浓度为 2mg/ml 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体, 备用。

[0022] (2) 制备抗原—胶体金的复合物: 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 在金溶胶中按照 80  $\mu$ g/ml 比例加入纯化的 HCMV 抗原, 经封闭、离心处理后, 取沉淀稀释至  $A_{530}$  值 2.0, 备用;

[0023] (3) 包被鼠抗人 IgM 单克隆抗体、HCMV 抗原、兔抗 HCMV 抗体: 取硝基纤维素膜贴于 PVC 背板中间, 设定划膜机涂覆参数为 1  $\mu$ l/cm。取 5mg/ml 的兔抗 HCMV 抗体 1.5ml、3mg/ml 的 HCMV 抗原 1.5ml、2mg/ml 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体 1.5ml, 分别接到划膜机的 A、B、C 管道接口。将贴有硝基纤维素膜的 PVC 背板置于划膜机的往复运动平台上。开启划膜机, 在硝基纤维素膜上涂覆兔抗 HCMV 抗体、HCMV 抗原、鼠抗人 IgM 单克隆抗体, 在 37°C 干燥 2 小时。将背板置于 1% 聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟, 晾干, 37°C 干燥 2 小时。

[0024] (4) 将抗原—胶体金的复合物涂覆在玻璃纤维素膜上: 设定划膜机喷涂参数为 25.0  $\mu$ l/cm, 将抗原—胶体金复合物连接到划膜机的 D 管道接口。取 30cm $\times$ 12cm 的玻璃纤维素膜放置往复运动平台上。开启划膜机, 在玻璃纤维素膜上喷涂抗原—胶体金复合物制成复合物垫, 37°C 干燥 2 小时。

[0025] (5) 在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴上复合物垫和样品垫, 另一端贴上吸收垫, 将 PVC 背板及其贴附的材料切成 4mm 宽层析条。将层析条放入塑料板卡内, 用压卡机压实。

[0026] 当加入被检测样品后, 通过层析作用, 样品和抗原—胶体金复合物向吸收垫—端移动。当样品通过鼠抗人 IgM 单克隆抗体包被线时, 其中的 IgM 抗体与鼠抗人 IgM 单克隆抗体结合, 如果 IgM 抗体中含有针对特异性抗原的 IgM 抗体, 则抗原—胶体金复合物与之结合, 在该处显示—条紫红色条带。如果被检测样品中含有针对特异性抗原的特异性 IgG 抗体时, 当其移动到特异性抗原包被线时, 抗体既与特异性抗原结合, 也与抗原—胶体金复合

物结合,在此处显示一条紫红色条带。抗原—胶体金复合物移动到与其相应抗体的包被线处,与抗体结合,显示一条紫红色条带。在抗 IgM 抗体包被处显示紫红色条带,表明被检测样品中含有针对特异性抗原的 IgM 抗体。在抗原包被处显示紫红色条带,表明被检测样品中含有针对特异性抗原的 IgG。在少数情况下可能含有 IgA,但其临床意义同 IgG 基本相同,在临床检测中可以不必区分 IgG 或 IgA。如果在抗原包被处和抗 IgM 抗体包被处同时显示紫红色条带,仅判定为被检测样品中含有针对特异性抗原的 IgM 抗体。如果在抗原包被处、抗 IgM 抗体包被处没有紫红色条带,判定为被检测样品中不含有特异性 IgG、IgM。在针对特异性抗原的抗体包被处显示紫红色条带,表明该检测系统的检测结果有效;如果该处没有显示紫红色条带,表明该检测系统失效,检测结果无效。

[0027] 实施例 2:检测人巨细胞病毒 (HCMV) IgM、IgG 抗体的检测结果

[0028] 应用制备的胶体金层析条对临床诊断明确的抗 HCMV IgG 阳性血清 383 份和阴性血清 1979 份进行了检测,并与间接法 ELISA 试剂单独检测抗 HCMV IgG 的结果进行了对比,结果分别示于表 1 和表 2。

[0029] 表 1 胶体金层析条对抗 HCMV IgG 临床血清的检测结果

[0030]

临床诊断明确样品 胶体金检测结果		临床血清		合计
		+	-	
胶体金	+	362	2	364
	-	21	1977	1998
合计		383	1979	2362

[0031] 表 2 胶体金与 ELISA 检测抗 HCMV IgM 的结果比较

[0032]

ELISA 检测结果 胶体金检测结果		ELISA		合计
		+	-	
胶体金	+	362	2	364
	-	8	1990	1998
合计		370	1992	2362

[0033] 由表 1 数据可计算得到约登指数为  $362/(362+21)+1977/(2+1977)-1 = 0.94$ ,说明检测结果与样品真实情况的总体符合率很高。由表 2 数据可计算得到本发明检测结果与 ELISA 检测结果的总体符合率为:  $(362+1990)/2362 \times 100\% = 99.6\%$ ,这表明两种检测方法检测 IgG 具有高度一致性。

[0034] 应用制备的胶体金层析条对临床诊断明确的抗 HCMV IgM 阳性血清 176 份和阴性血清 2433 份进行了检测,并与捕获法 ELISA 试剂单独检测抗 HCMV IgM 抗体的结果进行了对比,结果分别示于表 3 和表 4。

[0035] 表 3 胶体金层析条对抗 HCMV IgM 临床血清的检测结果

[0036]

临床诊断明确样品 胶体金检测结果		临床血清		合计
		+	-	
胶体金	+	159	3	162
	-	17	2430	2447
合计		176	2433	2609

[0037] 表 4 胶体金与 ELISA 检测抗 HCMV IgM 的结果比较

[0038]

ELISA 检测结果 胶体金检测结果		ELISA		合计
		+	-	
胶体金	+	159	3	162
	-	7	2440	2447
合计		166	2443	2609

[0039] 由表 3 数据可计算得到约登指数为  $159/(159+17)+2430/(3+2430)-1 = 0.90$ , 说明检测结果与样品真实情况的总体符合率很高。由表 4 数据可计算得到本发明检测结果与 ELISA 检测结果的总体符合率为： $(159+2440)/2609 \times 100\% = 99.6\%$ , 这表明两种检测方法检测 IgM 具有高度一致性。

[0040] 以上分析结果表明, 本发明联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条与单独检测 IgG 或 IgM 抗体的 ELISA 试剂具有相似的检测结果, 本发明的检测结果能够符合临床检测工作的需要。

专利名称(译)	一种检测人巨细胞病毒IgM和IgG抗体的胶体金层析条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101021532B</a>	公开(公告)日	2012-05-09
申请号	CN200710064894.0	申请日	2007-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京英诺特生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京英诺特生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京英诺特生物技术有限公司		
[标]发明人	王健 陈廷友 王志新 翟立伟 孔祥菊 毕大伟 张秀杰		
发明人	王健 陈廷友 王志新 翟立伟 孔祥菊 毕大伟 张秀杰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/577		
审查员(译)	寇飞		
其他公开文献	CN101021532A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种联合检测特异性IgM、IgG抗体的胶体金层析条及其制备技术。该层析条以胶体金作为标记物，在PVC背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附有吸收垫；所述复合物垫为涂覆有抗原—胶体金复合物的玻璃纤维素膜，其特征在于：所述硝基纤维素膜上包含三条包被线，分别包被有抗IgM抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。本发明的层析条采用免疫捕获法原理测定IgM抗体，双抗原夹心法原理测定IgG抗体，通过一次操作即可联合检测出特异性IgM、IgG抗体，简化了操作过程，且检测结果的总体符合率较高。

		临床诊断明确样品		临床血清		合计
		+	-	+	-	
胶体金检测结果	+	362	2	364		
	-	21	1977	1998		
合计		383	1979	2362		