



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102109519 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 200910265471.4

(22) 申请日 2009.12.29

(71) 申请人 北京库尔科技有限公司
地址 102206 北京市昌平区生命园路29号C座100号

(72) 发明人 李峰 陈立柱 杨利

(51) Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)

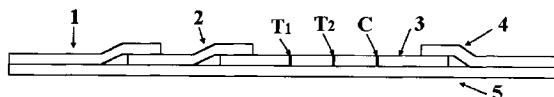
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒及其制备方法。试剂盒包括样品垫 (1)、胶体金垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3)、吸样垫 (4) 和底板 (5)。其中,所述胶体金垫为胶体金标记的风疹病毒抗原玻璃纤维(或无纺布);所述硝酸纤维素膜上依次包被有鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原、羊抗鼠 IgG,以鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原作为检测线,以羊抗鼠 IgG 作为质控线。本发明利用特异性的抗原抗体反应及胶体金免疫层析技术检测风疹病毒 IgG、IgM 抗体,通过一次操作即可联合检测出风疹病毒 IgG、IgM 抗体,简化了操作过程,具有操作简单、反应迅速、灵敏度高、经济实用等特点。



1. 一种利用特异性的抗原抗体反应及胶体金免疫层析技术制备的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在于由样品垫 (1)、胶体金垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3)、吸样垫 (4) 和底板 (5) 组成,底板上依次粘贴样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫,胶体金垫为胶体金标记的风疹病毒抗原玻璃纤维或无纺布,硝酸纤维素膜上依次包被有鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原、羊抗鼠 IgG,以鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原包被线作为检测线,以羊抗鼠 IgG 包被线作为质控线。

2. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,所述的底板为 PVC 板,样品垫为玻璃纤维或无纺布,吸样垫为吸水滤纸。

3. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,所述的胶体金是由氯金酸 (HAuCl_4) 在还原剂枸橼酸三钠作用下,聚合成为大小为 20-40nm 的胶体金颗粒。

4. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,所述的胶体金标记风疹病毒抗原的 pH 值为 8.0,胶体金与抗原的配比为 $10 \mu\text{g/ml}$ 胶体金。

5. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,所述的风疹病毒抗原的制备方法为:选用风疹病毒敏感细胞株,接种风疹病毒的标准毒株,经细胞培养,获取风疹病毒抗原。

6. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,所述的抗人 IgM 抗体的制备方法为:用人源性的 IgM 抗体免疫 BALB/C 小鼠,按常规方法进行细胞融合,克隆,收取腹水,提纯抗人 IgM 抗体。

7. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,所述的硝酸纤维素膜上三条包被线的划线方法为:用划膜仪在硝酸纤维素膜上以 $1 \mu\text{L/cm}$ 的参数进行划线,包被鼠抗人 IgM 抗体作为 T_1 检测线,风疹病毒抗原作为 T_2 检测线,包被羊抗鼠 IgG 作为 C 质控线,划线后将硝酸纤维素膜烘箱中,温度 38°C ,干燥 24 小时。

8. 一种如权利要求 1 所述的风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒,其特征在於,检测方法为:将被检血清或血浆或全血平衡至室温,将试纸条或检测卡平放,在上样垫中加入 2-3 滴样品,15 分钟内观察并记录 C、 T_1 、 T_2 线的显色情况,判断检测结果。

风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物应用技术领域,特别涉及一种风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 风疹病毒 (rubella virus, RV) 属节肢介体病毒中的披盖病毒 (Togavirus) 群,为风疹的病原病毒。由 T. H. Weller 与 F. A. Neva (1962) 及 P. D. Parkman 等 (1962) 自风疹患者的咽部洗涤液中分离到的。病毒粒子具有多形性,50-85nm,有包被。粒子中含有分子量为 $2.6-4.0 \times 10^6$ 的 RNA (感染性核酸)。风疹病毒对公众健康的最大威胁就是它的致畸性。母亲孕期原发感染可导致胎儿宫内感,其发病率和致畸率与感染时的胎龄密切相关,尤其是前 3 个月感染风疹病毒可通过胎盘感染胎儿,导致流产、死胎、或致使新生儿产生一系列的器官畸形,称为先天性风疹综合症 (CRS),先天性风疹患儿在生后数月内仍有病毒排出,具有传染性。因此,建立风疹病毒快速、准确的检测方法是预防的关键所在。

[0003] 当风疹病毒进入机体后,最早出现的的免疫球蛋白是 IgM 抗体,之后出现 IgG 抗体。仅对 IgG 检测,不能说明患者是现症感染或既往感染,而 IgM 检测阳性基本说明患者是现症感染。但是由于 IgM 抗体半衰期较短,所以 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。因此,为了更好的诊断机体对风疹病毒的免疫反应状态,需要同时检测风疹病毒的 IgG 和 IgM 抗体。目前较多使用的方法是经过分别对风疹病毒 IgG 和 IgM 抗体单独检测之后,再对检测结果进行综合分析,以确定最终的诊断结果。但是这种方法操作过程繁琐,不够简便快捷。因此,本发明提供一种能够用于同时检测机体内风疹病毒 IgG、IgM 抗体的试剂盒,简化了操作过程,检测方便、快捷。

[0004] 目前用于检测风疹病毒 IgG 抗体或 IgM 抗体的方法有很多,主要包括酶联免疫吸附法 (ELISA)、免疫胶体金渗滤法、乳胶凝集法、免疫荧光法 (IFA) 等。本发明采用胶体金免疫层析法 (Immunochromatography Assay),这种方法开始于上个世纪 90 年代中期,是在免疫渗滤法的基础上发展起来的,是免疫亲和技术、印刷技术、免疫标记技术和层析技术的结合。这种方法目前已得到较为广泛的运用,它的基本原理是:利用胶体金标记一种抗原或抗体,相应的配对抗原或抗体包被在硝酸纤维素膜上,检测样品时,胶体金标记物和样品中的配体相结合形成复合物,然后再通过层析作用向上移动,与包被抗原或抗体结合而凝聚显色,从而实现对样品检测结果的判定。此方法操作简单、反应快速、敏感性高、特异性强、稳定性好,经济实用,适合于现场检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种方便、快捷、用于同时检测风疹病毒 IgG、IgM 抗体的试剂盒,检测人类样本中风疹病毒 IgG, IgM 抗体,用于风疹病毒感染的辅助诊断和鉴别。

[0006] 本发明提供了一种风疹病毒 IgG, IgM 抗体联检试剂盒。包括样品垫 (1)、紧密连

接于样品垫一端的胶体金垫 (2), 与胶体金垫的另一端紧密相连的硝酸纤维素膜 (3) 和紧密连接于硝酸纤维素膜另一端的吸样垫 (4), 硝酸纤维素膜包被了三条线, 其中两条检测线 (T_1 , T_2 线), 一条质控线 (C 线)。样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫粘贴在底板 5 上形成试剂条, 试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。其特征在于检测线为分别包被在硝酸纤维素膜上的鼠抗人 IgM 抗体 (T_1 线)、风疹病毒抗原 (T_2 线); 所述胶体金垫为胶体金标记的风疹病毒抗原玻璃纤维 (或无纺布); 所述的底板为 PVC 板, 样品垫为玻璃纤维或无纺布, 吸样垫为吸水滤纸。

[0007] 本发明还提供了一种风疹病毒 IgG, IgM 抗体联检试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0008] (1) 制备风疹病毒抗原

[0009] 选用风疹病毒敏感细胞株, 接种风疹病毒的标准毒株, 经细胞培养, 获取抗原。

[0010] (2) 制备鼠抗人 IgM 单克隆抗体

[0011] 用人源性的 IgM 抗体免疫 BALB/C 小鼠, 按常规方法进行细胞融合, 克隆, 收取腹水, 提纯抗人 IgM 抗体。

[0012] (3) 制备胶体金颗粒

[0013] 取 0.01% 的氯金酸水溶液 100ml, 加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 1.0ml, 继续煮沸约 5min, 出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0014] (4) 制备胶体金垫

[0015] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液, 用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0, 按 100ml 胶体金溶液加入 1.0mg 风疹病毒抗原的比例混合均匀, 室温搅拌 30 分钟; 加入 10% 牛血清蛋白 (BSA) 溶液, 室温搅拌 5 分钟; 加入 10% 聚乙二醇 (PEG) 2000 溶液, 室温搅拌 5 分钟; 11000r/min 离心 60 分钟, 仔细吸取上清液, 弃去; 用胶体金复溶液复溶至 100ml, 按 1ml 溶液铺 28cm² 的比例均匀铺在玻璃纤维膜或无纺布上, 再置干燥间, 在温度 25℃, 湿度小于 30% 的条件下干燥 2 小时, 制成胶体金垫, 置 4℃ 备用。。

[0016] (5) 样品垫的处理

[0017] 将玻璃纤维或无纺布浸泡于含有 5ml 10% BSA, 2.5ml 10% Tween-20 的 0.01M pH 7.4 的磷酸缓冲溶液 50ml 中 30min, 于 38℃ 烘干, 真空封装, 置 4℃ 备用。

[0018] (6) 包被鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原, 羊抗鼠 IgG (或兔抗鼠 IgG)

[0019] 设定划膜仪涂覆参数 1 μ L/cm, 分别用微量进样器取 1ml 抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原、羊抗鼠 IgG, 按顺序接到划膜仪的 A、B、C 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上, 开启划膜仪, 在硝酸纤维素膜上涂覆抗人 IgM 抗体 (T_1 线)、风疹病毒抗原 (T_2 线)、羊抗鼠 IgG (C 线)。划线后将硝酸纤维素膜烘箱中, 温度 38℃, 干燥 24 小时, 封装备用。

[0020] (7) 试剂盒的组装

[0021] 将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫按图 1 所示的顺序依次粘贴在底板上, 切成 2.5mm 宽的小条, 制得试剂条, 也可以将试剂条装在塑料卡中形成检测卡。

[0022] 本发明所述试剂盒的检测方法为: 将被检血清或血浆或全血平衡至室温; 取出风疹病毒 IgG, IgM 抗体联检装置, 水平放置; 在样品垫中加入 2-3 滴样品, 15 分钟内观察并记录 C、 T_1 、 T_2 线的显色情况, 判断检测结果。

[0023] 本发明的检测试剂盒采用免疫层析胶体金技术测定 IgG、IgM 抗体,检测时,将被测样品加在试纸条(卡)上的样品垫上,可以直接观察到免疫反应的结果,完成样品检测。本发明可用于定性检测样本中可能存在的风疹病毒,达到快速筛检病人,及时控制疫情的目的。可通过一次操作即可联合检测出风疹病毒 IgG、IgM 抗体,简化了操作过程,且检测结果具有较高的总体符合率,具有操作简单、反应迅速、灵敏度高、经济实用等特点。

附图说明

[0024] 图 1 风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒结构示意图;

[0025] 附图符号说明:

[0026] 1:样品垫;

[0027] 2:含有标记风疹病毒抗原的胶体金垫;

[0028] 3:硝酸纤维素膜(T_1 和 T_2 :包被鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原的两条检测线,C:包被羊抗鼠 IgG 的质控线);

[0029] 4:吸样垫;

[0030] 5:底板。

[0031] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。

[0032] 自左至右依次为 T_1 、C 两条线阳性检测结果; T_2 、C 两条线阳性检测结果; T_1 、 T_2 、C 三条线阳性检测结果;C 一条线阴性检测结果;无效。

具体实施方式

[0033] 实施例 1:风疹病毒 IgG、IgM 抗体联检试剂盒的制备方法

[0034] 1. 制备风疹病毒抗原

[0035] 常规进行 BHK-21 细胞培养,待细胞生长旺盛后,在培养瓶中接种风疹病毒的标准毒株,风疹病毒毒株接种后 2-3 天,开始出现细胞病变,待细胞病变达到 85%以上,收集培养液和/或病变细胞,再用 PBS 洗 3 次,冻融 3 次后超声破碎,差速离心和甘油梯度离心纯化风疹病毒抗原。测定蛋白含量和包被工作浓度后,加 50%甘油 -20°C 保存备用。

[0036] 2. 制备抗人 IgM 单克隆抗体

[0037] 用纯化的高浓度人 IgM 免疫 BALB/C 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,抗体阳性孔细胞经 3 次克隆,扩增后注入 BALB/C 小鼠腹腔制备腹水,经正辛酸方法提纯单克隆抗体。保存在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

[0038] 3. 制备胶体金颗粒

[0039] 取 0.01%的氯金酸水溶液 100ml,加热煮沸。根据需要迅速加入 1%枸橼酸三钠水溶液 1.0ml,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0040] 4. 胶体金垫的制备

[0041] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0 左右,按 100ml 胶体金溶液加入 1.0mg 风疹病毒抗原的比例混合均匀,室温搅拌 30 分钟;加入 10%牛血清蛋白(BSA)溶液,室温搅拌 5 分钟;加入 10%聚乙二醇(PEG)2000 溶液,室温搅拌 5 分钟;11000r/min 离心 60 分钟,仔细吸取上清液,弃去;用胶体金复溶液复溶至 100ml,按 1ml 溶液铺 28cm^2 的比例均匀铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置干燥间,在温

度 25℃,湿度小于 30%的条件下干燥 2 小时,制成胶体金垫,置 4℃备用。

[0042] 5. 样品垫的处理

[0043] 将玻璃纤维或无纺布浸泡于含有 5ml 10% BSA, 2.5ml 10% Tween-20 的 0.01M pH 7.4 的磷酸缓冲溶液 50ml 中 30min,于 38℃烘干,真空封装,置 4℃备用。

[0044] 6. 包被鼠抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原,羊抗鼠 IgG(或兔抗鼠 IgG)

[0045] 设定划膜仪涂覆参数 $1\mu\text{L}/\text{cm}$,分别用微量进样器取 1ml 抗人 IgM 抗体、风疹病毒抗原、羊抗鼠 IgG(或兔抗鼠 IgG),按顺序接到划膜仪的 A、B、C 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上分别涂覆浓度为 0.8mg/ml 的抗人 IgM 抗体 (T_1 线)、浓度为 1.0mg/ml 的风疹病毒抗原 (T_2 线)、浓度为 0.8mg/ml 的羊抗鼠 IgG(或兔抗鼠 IgG) (C 线)。划线后将硝酸纤维素膜烘箱中,温度 38℃,干燥 24 小时,封装备用。

[0046] 7. 试剂盒的组装

[0047] 将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫按图 1 所示的顺序依次粘贴在底板上,切成 2.5mm 宽的小条,制得试剂条,也可以将试剂条装在塑料卡中形成检测卡。

[0048] 将被检血清或血浆或全血平衡至室温;取出风疹病毒 IgG, IgM 抗体联检装置,水平放置;在样品垫中加入 2 滴样品,15 分钟内观察并记录 C、 T_1 、 T_2 线的显色情况,判断检测结果。

[0049] 检测样品(血清、血浆或全血)时,样品与胶体金标记风疹病毒抗原复合物在层析作用下沿纸条向上移动,当样品-胶体金标记风疹病毒抗原复合物移动到鼠抗人 IgM 单克隆抗体包被线 (T_1) 时,若样品中含有风疹病毒 IgM 抗体,则 IgM 抗体与包被线上的鼠抗人 IgM 单克隆抗体结合,形成胶体金-风疹病毒抗原-IgM 抗体-鼠抗人 IgM 单克隆抗体夹心物而凝聚显色,此时 T_1 包被线可观察到红色条带;当样品-胶体金标记风疹病毒复合物移动到风疹病毒抗原包被线 (T_2) 时,若样品中含有风疹病毒 IgG 抗体,则形成胶体金-风疹病毒抗原-IgG 抗体-风疹病毒抗原夹心物而凝聚显色,此时 T_2 包被线可观察到红色条带;当胶体金标记风疹病毒复合物移动到羊抗鼠 IgG 包被线 (C) 时,与羊抗鼠 IgG 结合而显色,此时 C 包被线可观察到红色条带。在 T_1 包被线观察到红色条带,判定为样品中含有风疹病毒 IgM 抗体;在 T_2 包被线可观察到红色条带,判定为样品中含有风疹病毒 IgG 抗体;若 T_1 、 T_2 包被线处同时可观察到红色条带,只能判定为被检测样品中含有风疹病毒 IgM 抗体;若 T_1 、 T_2 包被线处同时不能观察到红色条带,则判定为被检测样品中不含有风疹病毒 IgG, IgM 抗体;无论风疹病毒 IgG, IgM 抗体是否存在于样本中,一条红色条带都会出现在质控线 (C)。质控线 (C) 所显现的红色条带是判定是否有足够样本,层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准。

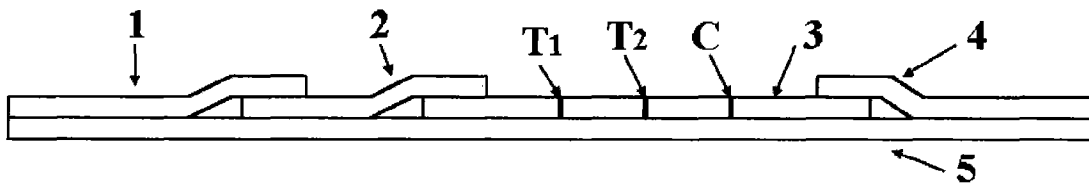


图 1

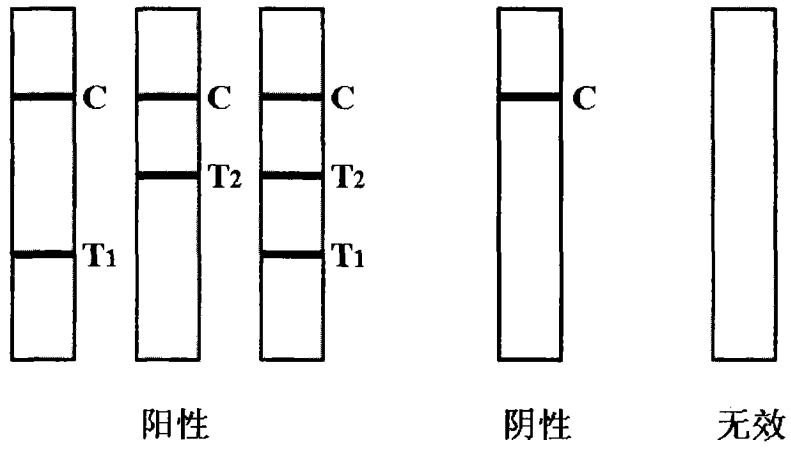


图 2

专利名称(译)	风疹病毒IgG、IgM抗体联检试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102109519A	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	CN200910265471.4	申请日	2009-12-29
[标]发明人	李峰 陈立柱 杨利		
发明人	李峰 陈立柱 杨利		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N21/78		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种风疹病毒IgG、IgM抗体联检试剂盒及其制备方法。试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和底板(5)。其中，所述胶体金垫为胶体金标记的风疹病毒抗原玻璃纤维(或无纺布)；所述硝酸纤维素膜上依次包被有鼠抗人IgM抗体、风疹病毒抗原、羊抗鼠IgG，以鼠抗人IgM抗体、风疹病毒抗原作为检测线，以羊抗鼠IgG作为质控线。本发明利用特异性的抗原抗体反应及胶体金免疫层析技术检测风疹病毒IgG、IgM抗体，通过一次操作即可联合检测出风疹病毒IgG、IgM抗体，简化了操作过程，具有操作简单、反应迅速、灵敏度高、经济实用等特点。

