



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102072956 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 25

(21) 申请号 201010595328. 4

(22) 申请日 2010. 12. 20

(71) 申请人 重庆市科学技术研究院

地址 401121 重庆市渝北区北部新区黄山大道杨柳路 2 号

(72) 发明人 魏启明

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所  
50211

代理人 郭云

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

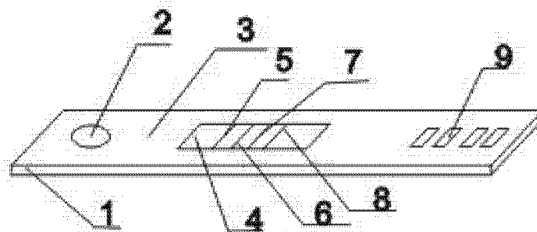
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种纳米流感病毒检测试纸

## (57) 摘要

本发明公开了一种纳米流感病毒检测试纸, 包括 PVC 底板, 在 PVC 底板上表面铺有结合垫, 在结合垫的左边设置加样孔, 右边依次粘贴硝酸纤维素膜和吸水垫, 所述硝酸纤维素膜上从左到右依次设有线状或带状的三条抗体检测线和  $\beta$ -肌动蛋白检测抗体控制线, 所述结合垫由玻璃纤维膜组成, 在玻璃纤维膜上均匀附着有黑色、蓝色和橙色的纳米胶体金复合微粒, 所述纳米胶体金复合微粒的粒径为 20-80nm, 其中黑色纳米胶体金复合微粒上分别偶联三种抗目的物检测抗体, 蓝色纳米胶体金复合微粒上偶联 AMACR 抗原, 橙色纳米胶体金复合微粒上偶联抗  $\beta$ -肌动蛋白抗体作为内参。



1. 一种纳米流感病毒检测试纸,包括PVC底板(1),在PVC底板(1)上表面铺有结合垫(3),在结合垫(3)的左边设置加样孔(2),右边依次粘贴硝酸纤维膜(4)和吸水垫(9),其特征在于:所述硝酸纤维膜(4)上从左到右依次设有线状或带状的三条检测抗体检测线和 $\beta$ -肌动蛋白检测抗体控制线(8),所述结合垫(3)由玻璃纤维膜组成,在玻璃纤维膜上均匀附着有黑色、蓝色和橙色的纳米胶体金复合微粒,所述纳米胶体金复合微粒的粒径为20-80nm,其中黑色纳米胶体金复合微粒上分别偶联三种抗目的物检测抗体,蓝色纳米胶体金复合微粒上偶联AMACR抗原,橙色纳米胶体金复合微粒上偶联抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体作为内参。

2. 根据权利要求1所述的一种纳米流感病毒检测试纸,其特征在于:所述三条检测抗体检测线为普通流感病毒检测抗体检测线(5)、禽流感病毒检测抗体检测线(6)、甲型流感病毒检测抗体检测线(7)以及 $\beta$ -肌动蛋白检测抗体控制线(8),所述三种抗目的物抗体为普通流感病毒检测抗体、禽流感病毒检测抗体和甲型流感病毒检测抗体。

3. 根据权利要求2所述的一种纳米流感病毒检测试纸,其特征在于:所述PVC底板(1)为长为10cm、宽为4cm的矩形聚乙烯塑料片,所述硝酸纤维膜(4)为长为8cm、宽为3cm、厚度为0.1mm、平均孔径为5 $\mu$ m的微多孔硝酸纤维素膜片。

4. 根据权利要求2所述的一种纳米流感病毒检测试纸,其特征在于:用磷酸盐缓冲液分别稀释3种流感病毒的多克隆抗体,即普通流感病毒多克隆抗体、禽流感病毒多克隆抗体和甲型流感病毒多克隆抗体,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为0.05-0.3mg/ml,制得普通流感病毒多克隆抗体溶液、禽流感病毒多克隆抗体溶液和甲型流感病毒多克隆抗体溶液;然后用点膜器将上述普通流感病毒多克隆抗体溶液、禽流感病毒多克隆抗体溶液和甲型流感病毒多克隆抗体溶液以3 $\mu$ L/cm分别在硝酸纤维膜(4)上依次点成线状或带状的普通流感病毒检测抗体检测线(5)、禽流感病毒检测抗体检测线(6)和甲型流感病毒检测抗体检测线(7)。

5. 根据权利要求2所述的一种纳米流感病毒检测试纸,其特征在于:所述纳米胶体金复合微粒上必须含有可供偶联的免疫配基:羧基,羟基,氨基或醛基,先用无水吗啉乙磺酸对纳米胶体金复合微粒进行预处理,将少量的碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺加入到微球溶液中,在震荡器上震荡活化纳米胶体金复合微粒;用黑色纳米胶体金复合微粒分别偶联普通流感病毒检测抗体、禽流感病毒检测抗体和甲型流感病毒检测抗体,蓝色纳米胶体金复合微粒偶联AMACR抗原,用橙色纳米胶体金复合微粒偶联抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体作为内参;然后将三种免疫纳米胶体金复合微粒表面没有完全反应的活化基团进行封闭,以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附;再将微球重悬在保护液中,制成浓度为2mg/ml的微球溶液进行保存,保存液的配方为:pH9.0,含0.05%Tween-20,0.1%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和0.1%BSA的0.005M硼酸盐缓冲体系;最后将黑,蓝和橙三种彩色免疫纳米胶体金复合微粒等质量混合制成一种黑蓝橙三色混合免疫纳米胶体金复合微粒;用移液枪将10-40微升、浓度为2mg/ml的纳米胶体金复合微粒滴在玻璃纤维膜上,然后干燥,得到结合垫(3)。

## 一种纳米流感病毒检测试纸

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试纸,具体的说是一种纳米流感病毒检测试纸。

### 背景技术

[0002] 快速早期诊断各种病毒感染,对于早期预防和治疗急性传染病非常重要。目前国内外对于病毒感染的早期诊断还没有一种有效和快速的方法,用分子生物学的方法,包括 EILSA 方法,影像学诊断等等,均没有达到快速诊断的目的,所以现在国内和国际上急需开发出一种高效的和快速的方法诊断各种病毒感染。

[0003] 另外,目前的检测试纸主要由 PVC 底板、加样孔、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫组成,在硝酸纤维膜上仅点有带状或线状的 1 条目的物检测抗体,只能用于检测一种病毒,检测效率低,不适合快速检测多种病毒。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种纳米流感病毒检测试纸,可以同时检测三种流感病毒。

[0005] 本发明的技术方案如下:一种纳米流感病毒检测试纸,包括 PVC 底板,在 PVC 底板上表面铺有结合垫,在结合垫的左边设置加样孔,右边依次粘贴硝酸纤维膜和吸水垫,所述硝酸纤维膜上从左到右依次设有线状或带状的三条抗体检测线和  $\beta$ -肌动蛋白检测抗体控制线,所述结合垫由玻璃纤维膜组成,在玻璃纤维膜上均匀附着有黑色、蓝色、和橙色的纳米胶体金复合微粒,所述纳米胶体金复合微粒的粒径为 20-80nm,其中黑色纳米胶体金复合微粒上分别偶联三种抗目的物检测抗体,蓝色纳米胶体金复合微粒上偶联 AMACR 抗原,橙色纳米胶体金复合微粒上偶联抗  $\beta$ -肌动蛋白抗体作为内参。

[0006] 采用上述技术方案,使用纳米胶体金复合微粒为载体偶联不同抗体,可同时检测 3 种病毒,建立一个多价生物标志物分子检测系统,在灵敏度和特异性上都有很大的提高,利用纳米复合微粒将定位沉积部位进行显色加强,提高了反应灵敏、点样简便、试纸保存期长,适用于基层,实验室及现场检测,利用本发明检测流感病毒的灵敏度为 96.8% 以上,特异性为 95.6% 以上。

[0007] 在上述技术方案中:所述三条检测抗体检测线为普通流感病毒检测抗体检测线、禽流感病毒检测抗体检测线、甲型流感病毒检测抗体检测线以及  $\beta$ -肌动蛋白检测抗体控制线,所述三种抗目的物抗体为普通流感病毒检测抗体、禽流感病毒检测抗体和甲型流感病毒检测抗体。这样可以实现同时检测是否含有普通流感病毒或禽流感病毒或甲型流感病毒。

[0008] 在上述技术方案中:所述 PVC 底板为长为 10cm、宽为 4cm 的矩形聚乙烯塑料片,所述硝酸纤维膜长为 8cm、宽为 3cm、厚度为 0.1mm、平均孔径为 5 $\mu$ m 的微多孔硝酸纤维素膜片。

[0009] 在上述技术方案中,用磷酸盐缓冲液分别稀释 3 种流感病毒的多克隆抗体,即普

通流感病毒多克隆抗体、禽流感病毒多克隆抗体和甲型流感病毒多克隆抗体,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 0.05-0.3mg/ml,制得普通流感病毒多克隆抗体溶液、禽流感病毒多克隆抗体溶液和甲型流感病毒多克隆抗体溶液;然后用点膜器将上述普通流感病毒多克隆抗体溶液、禽流感病毒多克隆抗体溶液和甲型流感病毒多克隆抗体溶液以 3  $\mu$  L/cm 分别在硝酸纤维膜上依次点成线状或带状的普通流感病毒检测抗体检测线、禽流感病毒检测抗体检测线和甲型流感病毒检测抗体检测线。

[0010] 在上述技术方案中:所述纳米胶体金复合微粒上必须含有可供偶联的免疫配基:羧基,羟基,氨基或醛基,先用无水吗啉乙磺酸对纳米胶体金复合微粒进行预处理,将少量的碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺加入到微球溶液中,在震荡器上震荡活化纳米胶体金复合微粒;用黑色纳米胶体金复合微粒分别偶联普通流感病毒检测抗体、禽流感病毒检测抗体和甲型流感病毒检测抗体,蓝色纳米胶体金复合微粒偶联 AMACR 抗原,用橙色纳米胶体金复合微粒偶联抗  $\beta$ -肌动蛋白抗体作为内参;然后将三种免疫纳米胶体金复合微粒表面没有完全反应的活化基团进行封闭,以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附;再将微球重悬在保护液中,制成浓度为 2mg/ml 的微球溶液进行保存,保存液的配方为:pH9.0,含 0.05%Tween-20,0.1%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和 0.1%BSA 的 0.005M 硼酸盐缓冲体系;最后将黑,蓝和橙三种彩色免疫纳米胶体金复合微粒等质量混合制成一种黑蓝橙三色混合免疫纳米胶体金复合微粒;用移液枪将 10-40 微升,浓度为 2mg/ml 的纳米胶体金复合微粒滴在玻璃纤维膜上,然后干燥得到结合垫。

[0011] 有益效果:本产品具有高效,快速,便宜,便利,容易使用,便于运输及保存,无毒性,可在同一个试纸上同时快速诊断三种病毒等优点,因此具有较强的竞争优势。与现有的技术相比,这种新型纳米快速诊断试纸的灵敏度和特异性在 90% 以上。

#### 附图说明

[0012] 图 1 为本发明的结构示意图。

#### 具体实施方式

[0013] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明:

本发明中:BSA 为 bovine serum albumin 的缩写,即牛血清白蛋白。

[0014] AMACR 抗原为  $\alpha$ -甲基酰基辅酶 A 消旋酶抗原的缩写。

[0015] Tween 为吐温溶液。

[0016] PVC 为聚氯乙烯的缩写。

[0017] 如图 1 所示,本发明由 PVC 底板 1、加样孔 2、结合垫 3、硝酸纤维膜 4 和吸水垫 9 组成,在 PVC 底板 1 上铺有结合垫 3,在结合垫 3 的左边设置加样孔 2,右边依次粘贴硝酸纤维膜 4 和吸水垫 9;所述 PVC 底板 1 为长为 10cm、宽为 4cm 的矩形聚乙烯塑料片,所述硝酸纤维膜 4 为长为 8cm、宽为 3cm、厚度为 0.1mm、平均孔径为 5 $\mu$ m 的微多孔硝酸纤维素膜片;

用磷酸盐缓冲液分别稀释 3 种流感病毒的多克隆抗体,即普通流感病毒多克隆抗体、禽流感病毒多克隆抗体和甲型流感病毒多克隆抗体,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 0.05-0.3mg/ml,制得普通流感病毒多克隆抗体溶液、禽流感病毒多克隆抗体溶液和甲型流感病毒多克隆抗体溶液;然后用点膜器将上述普通流感病毒多克隆抗体溶液、禽流感病毒

毒多克隆抗体溶液和甲型流感病毒多克隆抗体溶液以  $3\mu\text{L}/\text{cm}$  分别在硝酸纤维膜 4 依次点成线状或带状的普通流感病毒检测抗体检测线 5、流感病毒检测抗体检测线 6 和甲型流感病毒检测抗体检测线 7；然后再点上  $\beta$ -肌动蛋白检测抗体控制线 8。

[0018] 本发明选择的载体为粒径为 20-80nm 的纳米胶体金复合微粒(如多聚合物, 脂质体等), 分为黑色、蓝色和橙色三种, 该纳米胶体金复合微粒上必须含有可供偶联的免疫配基: 羧基, 羟基, 氨基或醛基, 先用无水吗啉乙磺酸对纳米胶体金复合微粒进行预处理, 将少量的碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺加入到微球溶液中, 在震荡器上震荡活化纳米胶体金复合微粒; 用黑色纳米胶体金复合微粒分别偶联普通流感病毒检测抗体、禽流感病毒检测抗体和甲型流感病毒检测抗体, 蓝色纳米胶体金复合微粒偶联 AMACR 抗原( $\alpha$ -甲基酰基辅酶 A 消旋酶抗原), 用橙色纳米胶体金复合微粒偶联抗  $\beta$ -肌动蛋白抗体作为内参; 然后将三种免疫纳米胶体金复合微粒表面没有完全反应的活化基团进行封闭, 以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附; 再将微球重悬在保护液中, 制成浓度为 2mg/ml 的微球溶液进行保存, 保存液的配方为: pH9.0, 含 0.05%Tween-20, 0.1%NaN<sub>3</sub> 和 0.1%BSA 的 0.005M 硼酸盐缓冲体系; 最后将黑, 蓝和橙三种彩色免疫纳米胶体金复合微粒等质量混合制成一种黑蓝橙三色混合免疫纳米胶体金复合微粒; 用移液枪将 10-40 微升, 浓度为 2mg/ml 的纳米胶体金复合微粒滴在玻璃纤维膜上, 然后干燥得到结合垫 3。

[0019] 其中纳米胶体金复合微粒的封闭: 加入 1%-5% 的牛血清白蛋白(BSA), BSA 事先溶解在硼酸盐吐温缓冲溶液中, 对纳米胶体金复合微粒表面没有完全反应的活化基团进行封闭, 并通过 BSA 的物理吸附, 封闭其他的空间位点, 以降低以后实验中可能发生的非特异性吸附, 室温下封闭反应 30min。

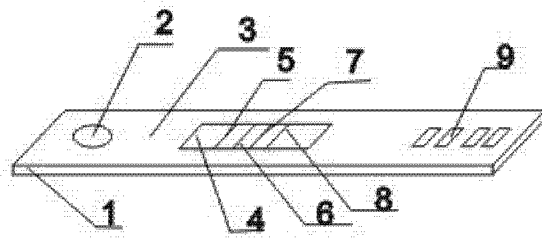


图 1

专利名称(译)	一种纳米流感病毒检测试纸		
公开(公告)号	<a href="#">CN102072956A</a>	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	CN201010595328.4	申请日	2010-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
[标]发明人	魏启明		
发明人	魏启明		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532		
代理人(译)	郭云		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种纳米流感病毒检测试纸，包括PVC底板，在PVC底板上表面铺有结合垫，在结合垫的左边设置加样孔，右边依次粘贴硝酸纤维素膜和吸水垫，所述硝酸纤维素膜上从左到右依次设有线状或带状的三条抗体检测线和β-肌动蛋白检测抗体控制线，所述结合垫由玻璃纤维膜组成，在玻璃纤维膜上均匀附着有黑色、蓝色和橙色的纳米胶体金复合微粒，所述纳米胶体金复合微粒的粒径为20-80nm，其中黑色纳米胶体金复合微粒上分别偶联三种抗体的检测抗体，蓝色纳米胶体金复合微粒上偶联AMACR抗原，橙色纳米胶体金复合微粒上偶联抗β-肌动蛋白抗体作为内参。

