



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102980997 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201210213375. 7

(22) 申请日 2012. 06. 23

(73) 专利权人 北京新兴四寰生物技术有限公司
地址 100000 北京市大兴区大兴经济开发区
科苑路 18 号

(72) 发明人 吕传臣 罗威 张宁 姜欣 周逸

(74) 专利代理机构 北京风雅颂专利代理有限公司 11403
代理人 李翔 田欣欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102384976 A, 2012. 03. 21,

CN 101078726 A, 2007. 11. 28,

CN 201464479 U, 2010. 05. 12, 权利要求 1,
说明书 0026 段, 图 1.

CN 101949932 A, 2011. 01. 19,

CN 101031798 A, 2007. 09. 05, 说明书第 14
页 7 行 -16 页 15 行、第 28 页 10-18 行, 图 2-10.

CN 102109519 A, 2011. 06. 29, 全文.

CN 102174109 A, 2011. 09. 07, 全文.

EP 1327885 A1, 2003. 07. 16, 全文.

WO 9534812 A1, 1995. 12. 21, 全文.

US 2003134345 A1, 2003. 07. 17, 全文.

黄志严等. 新生儿脐血抗巨细胞病毒 IgM 抗体的检测. 《中南大学学报 (医学版)》. 1988, 第 13 卷 (第 4 期), 341-343.

Li-Rong Lin et al.. Evaluation of a colloidal gold immunochromatography assay in the detection of Treponema pallidum specific IgM antibody in syphilis serofast reaction patients: a serologic marker for the relapse and infection of syphilis. 《Diagnostic Microbiology and Infectious Disease》. 2011, 第 70 卷 10-16.

审查员 刘彦宁

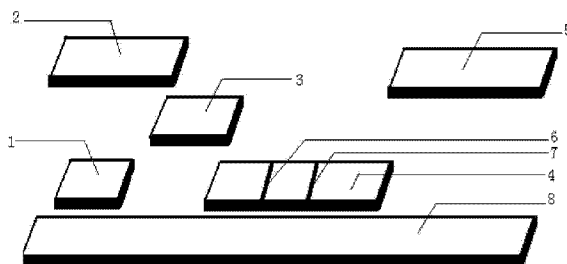
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体胶体金法检测试剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体胶体金法检测试剂及其制备方法。该试剂包括金结合物垫 (3)、硝酸纤维素反应膜 (4)、样品垫 (2)、风湿因子处理垫 (1)、吸水纸 (5) 和 PVC 背衬 (8); 风湿因子处理垫约为样品垫长度的 1/2, 样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸依次相互叠压粘附于 PVC 背衬上, 金结合物垫上包被了抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金的结合物, 硝酸纤维素反应膜质控区 (7) 和检测区 (6) 位置上分别包被了羊抗鼠 IgG 抗体或兔抗鼠 IgG 抗体和特异性的基因重组 EB 病毒衣壳抗原。本发明产品的生产过程简单易控制, 在 25 分钟内即可得到检测结果, 且只要按照说明书操作即可实现自我检测, 检测结果不受风湿因子的影响, 灵敏度高、特异性好, 结果准确可靠。



CN 102980997 B

1. 一种 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体胶体金法检测试剂的制备方法,其特征在于,该试剂包括金结合物垫 (3)、硝酸纤维素反应膜 (4)、样品垫 (2)、类风湿因子处理垫 (1)、吸水纸 (5) 和 PVC 背衬 (8);金结合物垫上包被了抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金的结合物,硝酸纤维素反应膜质控区 (7) 和检测区 (6) 位置上分别包被了羊抗鼠 IgG 抗体或兔抗鼠 IgG 抗体和特异性的基因重组 EB 病毒衣壳抗原;所述的类风湿因子处理垫是包被了类风湿因子抗体的硝酸纤维素膜;所述检测区包被的 EB 病毒衣壳抗原为纯化的特异性基因重组抗原;所述制备方法包括以下步骤:

A:制备抗人 IgM 单克隆抗体:取多份正常人血清,混合,经透析、离心、纯化制得纯度达 95% 的 IgM 抗体,以人 IgM 作为抗原,经脾内注射免疫 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,取小鼠的免疫脾细胞与骨髓瘤细胞融合,选择性培养、筛选及克隆化获得杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞接种于 BALB/c 小鼠腹腔制备腹水,以亲和层析法提纯鼠抗人 IgM 单克隆抗体;

B:制备多克隆抗体:以步骤 A 所制备的鼠抗人 IgM 单克隆抗体免疫山羊或兔,取血清纯化后提取到羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体或兔抗小鼠 IgG 多克隆抗体;

C:制备胶体金:采用柠檬酸三钠还原法制得粒径 20 ~ 40nm 的胶体金颗粒;

D:制备鼠抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金溶液 pH 值至最佳标记 pH 值,按照 0.010 ~ 0.030mg 蛋白/mL 胶体金的比例加入鼠抗人 IgM 单克隆抗体,混匀静置,高速离心,弃上清,所得沉淀以十分之一初始胶体金体积的金结合物保存液溶解,制得鼠抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物;其中,金结合物保存液为含 2 ~ 5% 的牛血清白蛋白的 pH 值为 8.0 ~ 8.2 的 0.01 ~ 0.02M Tris-HCl 缓冲液,并含 1 ~ 4% 的蔗糖、0.5% ~ 1% 的酪蛋白钠、1 ~ 2% 的 Tween-20 和万分之五的叠氮钠;

E:制备类风湿因子处理垫:将抗类风湿因子抗体以稀释液稀释至 0.5mg ~ 2mg/mL,均匀喷涂在硝酸纤维素膜上,充分干燥,其中,稀释液为含 1 ~ 2% 海藻糖的 pH 值为 7.2 ~ 7.6 的 0.02 ~ 0.05M PBS 溶液,并含 1 ~ 2% 的牛血清白蛋白;

F:制备金结合物垫:将步骤 D 所制备的鼠抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物均匀包被到玻璃纤维膜上,充分干燥;

G:制备硝酸纤维素膜反应膜:将羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体或兔抗小鼠 IgG 多克隆抗体和重组 EB 衣壳抗原分别包被在硝酸纤维素膜的质控区和检测区位置,充分干燥;

H:将类风湿因子处理垫、样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸粘附于 PVC 背衬上,类风湿因子处理垫约为样品垫长度的 1/2 并粘附于 PVC 背衬上,粘附位置为其中心位置与待粘附的样品垫的中心位置重合;样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸顺次相互叠压粘附于 PVC 背衬上;样品垫覆盖类风湿因子处理垫粘附于 PVC 背衬上,并叠压金结合物垫 2-3mm,金结合物垫叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm 并与类风湿因子处理垫间隔 2-5mm,吸水纸叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm,得到试纸板,将试纸板按照需求切割成不同宽度的试纸条。

EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体胶体金法检测试剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,特别是涉及一种用胶体金免疫层析法检测 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体的试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 是一种嗜人类淋巴细胞的疱疹病毒,主要通过人类唾液传播,也可经输血传染,是疱疹病毒科 γ 亚科中唯一能够引起人类感染的淋巴滤泡病毒。EB 病毒与包括传染性单核细胞增多症、伯基特淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌、霍奇金淋巴瘤等有密切的关系,引发了全球癌症的 1%,并占有所有感染性癌症的 5.6%,根据国际癌症研究署对致癌因子的分类标准,EB 病毒被列入第一组致癌因子。

[0003] 人体感染 EB 病毒后能诱生抗核抗原 (EBna)、早期抗原 (EA)、衣壳抗原 (VCA)、膜抗原 (MA) 及淋巴细胞识别膜抗原 (lydma) 等抗原的相应抗体 (IgG、IgA、IgM 等抗体)。其中,IgM/VCA 抗体出现最早,90 ~ 94% 的 EB 病毒感染者在感染初期能够被检测到,是 EB 病毒急性感染,也是复发感染的重要标志,是 EB 病毒感染的早期诊断不可缺少的重要指标。

[0004] 目前,鼻咽癌的诊断仍须依据内窥镜和活检组织病理检查,但这些方法具有一定的创伤性,在对广大人群进行筛查时会受到一定的限制。因此,临床上多采用实验室诊断方法。常规的 EB 病毒实验室诊断方法主要有病毒分离、检测病毒蛋白质及核酸、EBV 血清学实验检测抗体等几种方法。病毒分离法是采用咽漱液直接接种人脐带血淋巴细胞,根据转化淋巴细胞的效率来决定病毒的量。该方法耗时并且需要特殊的组织培养条件,故不适合作为常规临床检测使用;检测病毒蛋白质及核酸是,利用核酸杂交和 PCR 或 RT-PCR 方法,在病变组织内检测病毒基因组核酸和病毒基因组转录产物,在检测条件和技术等方面要求较高,故临床常规检测中不宜采用;血清学诊断主要通过酶联免疫法等方法检测血清中是否存在抗 VCA-IgM/IgA 抗体、抗核抗原 (EBNA) 抗体等特异性抗体,由于其具有灵敏度高、特异性好和易于操作等优点,是目前实验室最常用的方法之一,对疾病的诊断有一定的参考价值。目前,国内外对 EB-VCA-IgM 检测的方法主要有间接免疫荧光法、酶联免疫吸附法及金免疫渗滤法等。

[0005] 间接免疫荧光法有较高的灵敏度和特异性,被作为 EB 病毒诊断的“金标准”。但是该方法需要大量的专业技术知识,且细胞培养耗时多,需要用荧光显微镜这样昂贵的仪器,且受显微镜观察的主观影响较大,所以在实验室使用中受到限制。

[0006] 酶免疫法的灵敏度和特异性稍低于间接免疫荧光法,有学者研究,通过增大抗 IgM 抗体的包被量或可以提高检测的灵敏度。但是由于单位微孔内蛋白的载量有限,这一措施较难实现。

[0007] 金免疫渗滤法是采用硝酸纤维素膜作为载体、胶体金作为示踪物的一种检测方法,具有高特异性和高灵敏度,但该方法操作步骤繁琐,在临床试用过程中易出现混乱。

[0008] 此外,以上三种方法均受类风湿因子阳性血清标本的影响,易造成假阳性或漏检,需要预先通过超速离心或免疫吸附处理转阴后检测特异性 IgM 抗体,很难实现一次实验完

成检测。

[0009] 而同样使用胶体金作为示踪物的胶体金免疫层析法未见相应的试剂,该方法操作简便、快速、稳定性好,易于进行单份样本检测,且不需特殊仪器进行检测;与渗滤法相比,不需要繁琐的操作步骤,且由于示踪物为固相易于保存、稳定性好。

发明内容

[0010] 本发明的目的是为了克服当前检测 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体技术在推广使用中存在的缺陷,提供一种操作简便、不需要特定仪器设备辅助、不需要对检测人员进行特殊培训的快速检测试剂并且有效降低检测成本,同时提供该试剂的制备方法。

[0011] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体胶体金法检测试剂,该试剂包括金结合物垫(3)、硝酸纤维素反应膜(4)、样品垫(2)、类风湿因子处理垫(1)、吸水纸(5)和 PVC 背衬(8);将类风湿因子处理垫、样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸粘附于 PVC 背衬上,类风湿因子处理垫约为样品垫长度的 1/2 并粘附于 PVC 背衬上,粘附位置以其中心位置与待粘附的样品垫的中心位置重合为宜;样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸顺次相互叠压粘附于 PVC 背衬上;样品垫覆盖类风湿因子处理垫粘附于 PVC 背衬上,并叠压金结合物垫 2-3mm,金结合物垫叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm 并与类风湿因子处理垫间隔 2-5mm,吸水纸叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm;金结合物垫上包被了抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金的结合物,硝酸纤维素反应膜质控区(7)和检测区(6)位置上分别包被了羊抗鼠 IgG 抗体或兔抗鼠 IgG 抗体和特异性的基因重组 EB 病毒衣壳抗原。

[0012] 所述的类风湿因子处理垫是包被了类风湿因子抗体的硝酸纤维素膜。

[0013] 所述检测区包被的 EB 病毒衣壳抗原为纯化的特异性基因重组抗原。

[0014] 该试剂的制备方法包括以下步骤:

[0015] A:制备抗人 IgM 单克隆抗体:取多份正常人血清,混合,经透析、离心、纯化制得纯度达 95% 的 IgM 抗体,以人 IgM 作为抗原,经脾内注射免疫 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,取小鼠的免疫脾细胞与骨髓瘤细胞融合,选择性培养、筛选及克隆化获得杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞接种于 BALB/c 小鼠腹腔制备腹水,以亲和层析法提纯鼠抗人 IgM 单克隆抗体;

[0016] B:制备多克隆抗体:以步骤 A 所制备的鼠抗人 IgM 单克隆抗体免疫山羊或兔,取血清纯化后提取到羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体或兔抗小鼠 IgG 多克隆抗体;

[0017] C:制备胶体金:采用柠檬酸三钠还原法制得粒径 20 ~ 40nm 的胶体金颗粒;

[0018] D:制备鼠抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物:用 0.1M 碳酸钾调节胶体金溶液 pH 值至最佳标记 pH 值,按照 0.010 ~ 0.030mg 蛋白/mL 胶体金的比例加入鼠抗人 IgM 单克隆抗体,混匀静置,高速离心,弃上清,所得沉淀以十分之一初始胶体金体积的金结合物保存液溶解,制得鼠抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物;其中,金结合物保存液为含 2 ~ 5% 的牛血清白蛋白的 pH 值为 8.0 ~ 8.2 的 0.01 ~ 0.02M Tris-HCl 缓冲液,并含 1 ~ 4% 的蔗糖、0.5% ~ 1% 的酪蛋白钠、1 ~ 2% 的 Tween-20 和万分之五的叠氮钠;

[0019] E:制备类风湿因子处理垫:将抗类风湿因子抗体以稀释液稀释至 0.5mg ~ 2mg/mL,均匀喷涂在硝酸纤维素膜上,充分干燥,其中,稀释液为含 1 ~ 2% 海藻糖的 pH 值为 7.2 ~ 7.6 的 0.02 ~ 0.05M PBS 溶液,并含 1 ~ 2% 的牛血清白蛋白;

[0020] F:制备金结合物垫:将步骤D所制备的鼠抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物均匀包被到玻璃纤维膜上,充分干燥;

[0021] G:制备硝酸纤维素膜反应膜:将羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体或兔抗小鼠 IgG 多克隆抗体和重组 EB 衣壳抗原分别包被在硝酸纤维素膜的质控区和检测区位置,充分干燥;

[0022] H:将类风湿因子处理垫、样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸粘附于 PVC 背衬上,类风湿因子处理垫约为样品垫长度的 1/2 并粘附于 PVC 背衬上,粘附位置以其中心位置与待粘附的样品垫的中心位置重合;样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸顺次相互叠压粘附于 PVC 背衬上;样品垫覆盖类风湿因子处理垫粘附于 PVC 背衬上,并叠压金结合物垫 2-3mm,金结合物垫叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm 并与类风湿因子处理垫间隔 2-5mm,吸水纸叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm,得到试纸板,将试纸板按照需求切割成不同宽度的试纸条。

[0023] 本发明的效果在于:

[0024] (1) 生产过程简单易控制;

[0025] (2) 检测速度快,在 25 分钟内即可得到检测结果,且不需要专业培训只要按照说明书操作即可实现自我检测;

[0026] (3) 由于加入了类风湿因子处理系统,检测结果不受类风湿因子的影响,检测的灵敏度高、特异性好,结果准确可靠;

[0027] (4) 可进行单人份检测,且产品稳定性好,不需特殊储存条件(常温保存)。

附图说明

[0028] 图 1 为本发明试剂的结构示意图。

具体实施方式

[0029] (1) 取 3~5 份正常人血清,混合,经冷双蒸水(4℃)透析,离心取沉淀,过 AcA3 柱纯化得到纯度达 95% 的 IgM 抗体;以所提取、纯化的人 IgM 作为抗原,经脾内注射免疫 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠;取小鼠的免疫脾细胞与骨髓瘤细胞融合,选择性培养、筛选及克隆化获得分泌抗人 IgM 单克隆抗体的杂交瘤细胞;将分泌抗 IgM 的杂交瘤细胞接种于 BALB/c 小鼠腹腔制备腹水,以亲和层析法提纯鼠抗人 IgM 单克隆抗体;

[0030] (2) 以鼠抗人 IgM 单克隆抗体,免疫山羊或新西兰兔,取血清以饱和硫酸铵法提取得到羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体或兔抗小鼠 IgG 多克隆抗体;

[0031] (3) 制备胶体金:将 100mL 的 0.01% 的氯金酸溶液边加热边搅拌至沸腾后加入 1.2mL~1.8mL 1% 的柠檬酸三钠溶液继续加热至溶液变成酒红色后再持续加热 5 分钟;停止加热后,继续搅拌,冷却至室温后加入纯化水还原到原来体积,4℃避光保存;制得胶体金颗粒经可见分光光度计测定吸收峰在 520~530nm,粒径大小约为 20~40nm;

[0032] (4) 制备鼠抗人 IgM 单克隆抗体胶体金标记物:用 0.1M 的碳酸钠(钾)溶液将胶体金溶液 pH 值调整至 8.0~8.5;边搅拌边按比例缓慢加入鼠抗人 IgM 单克隆抗体(每 1mL 胶体金加入 10~30 μg 鼠抗人 IgM 单克隆抗体),静置 15 分钟以上,边搅拌边加入一定比例的牛血清白蛋白(每 100mL 加入 10% 牛血清白蛋白溶液 10mL),混匀后静置 10 分钟;通过高速离心、弃上清,所得沉淀以十分之一初始胶体金体积的金结合物保存液溶解,制得鼠

抗人 IgM 单克隆抗体-胶体金结合物；金结合物保存液为含 2 ~ 5% 的牛血清白蛋白的 pH 值为 8.0 ~ 8.2 的 0.01 ~ 0.02M Tris-HCl 缓冲液，并含 1 ~ 4% 的蔗糖、0.5% ~ 1% 的酪蛋白钠、1 ~ 2% 的 Tween-20 和万分之五的叠氮钠；

[0033] (5) 制备类风湿因子处理垫：将抗类风湿因子抗体用 0.02 ~ 0.05M PBS (pH 7.2 ~ 7.6, 含 1 ~ 2% 海藻糖和 1 ~ 2% 的牛血清白蛋白) 稀释至 0.5 ~ 2.0mg/mL, 制得抗类风湿因子抗体包被液，将包被液用隔流喷金划线机喷至硝酸纤维素膜上，充分干燥；

[0034] (6) 制备硝酸纤维素反应膜：将羊抗（或兔抗）小鼠 IgG 多克隆抗体和重组 EB 衣壳抗原分别以 0.02 ~ 0.05M PBS (pH 7.2 ~ 7.6, 含 1 ~ 2% 海藻糖) 均稀释至一定浓度分别制得 C、T 线包被液；将包被液用隔流喷金划线机分别包被在硝酸纤维素膜的控制区和检测区位置，充分干燥；

[0035] (7) 制备金结合物垫：将步骤 (4) 所制得的鼠抗人 IgM 单克隆抗体胶体金标记物溶液用隔流喷金划线机均匀喷涂到金结合物垫上，充分干燥；

[0036] (8) 将类风湿因子处理垫、样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸粘附于 PVC 背衬上，类风湿因子处理垫约为样品垫长度的 1/2, 粘附于 PVC 背衬上，粘附位置以其中心位置与待粘附的样品垫的中心位置重合；样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸顺次相互叠压粘附于 PVC 背衬上；样品垫覆盖类风湿因子处理垫粘附于 PVC 背衬上，并叠压金结合物垫 2-3mm, 金结合物垫叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm 并与类风湿因子处理垫间隔 2-5mm, 吸水纸叠压硝酸纤维素反应膜 2-3mm, 得到试纸板；

[0037] (9) 将粘贴好的 PVC 板裁切成一定宽度 (2.5 ~ 4mm) 的条，即制得 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体胶体金法检测试剂。

[0038] 在检测前，首先将样本和检测试剂平衡至室温，从铝箔袋中取出检测试剂，在样品垫处加入 5 ~ 15 μ L 待检样本（血清），再加入 10 ~ 30 μ L 生理盐水或样本稀释液使样本充分铺开；5 分钟后加入 50 μ L 生理盐水或样本稀释液，15 ~ 20 分钟即可判读结果；20 分钟后判读无效。

[0039] 结果判断：如果样本中存在 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体，则质控线、检测线处均出现红色条带，结果为阳性；如果样本中不存在 EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体，则仅质控线处出现一条红色条带；如质控线处未见条带，则试剂无效。

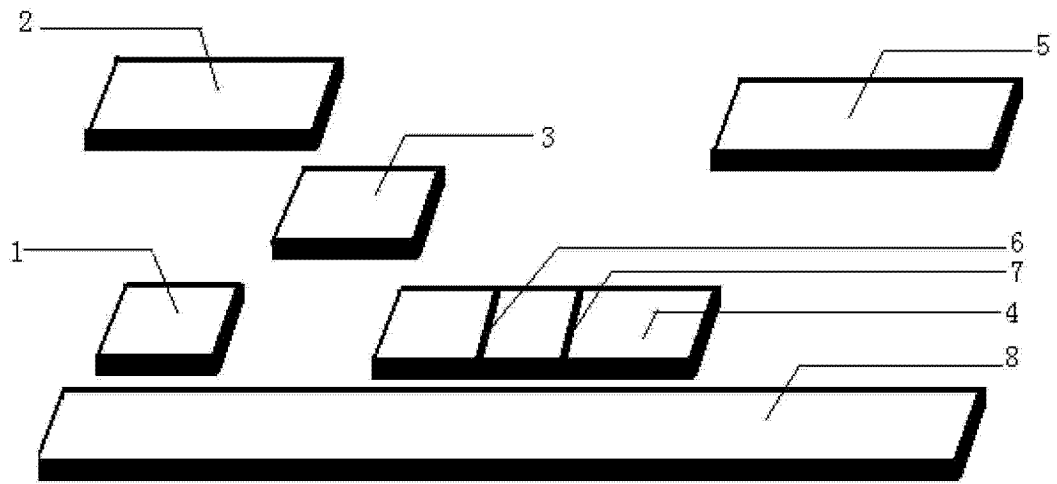


图 1

专利名称(译)	EB病毒衣壳抗原IgM抗体胶体金法检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN102980997B	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201210213375.7	申请日	2012-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京新兴四寰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京新兴四寰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京新兴四寰生物技术有限公司		
[标]发明人	吕传臣 罗威 张宁 姜欣 周逸		
发明人	吕传臣 罗威 张宁 姜欣 周逸		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
代理人(译)	李翔 田欣欣		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN102980997A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种EB病毒衣壳抗原IgM抗体胶体金法检测试剂及其制备方法。该试剂包括金结合物垫(3)、硝酸纤维素反应膜(4)、样品垫(2)、风湿因子处理垫(1)、吸水纸(5)和PVC背衬(8)；风湿因子处理垫约为样品垫长度的1/2，样品垫、金结合物垫、硝酸纤维素反应膜和吸水纸顺次相互叠压粘附于PVC背衬上，金结合物垫上包被了抗人IgM单克隆抗体-胶体金的结合物，硝酸纤维素反应膜质控区(7)和检测区(6)位置上分别包被了羊抗鼠IgG抗体或兔抗鼠IgG抗体和特异性的基因重组EB病毒衣壳抗原。本发明产品的生产过程简单易控制，在25分钟内即可得到检测结果，且只要按照说明书操作即可实现自我检测，检测结果不受风湿因子的影响，灵敏度高、特异性好，结果准确可靠。

