



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106383228 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610741611.0

(22)申请日 2016.08.28

(71)申请人 张洪良

地址 262100 山东省潍坊市安丘市建安路
173号12号楼3单元505号

(72)发明人 张洪良

(74)专利代理机构 贵阳派腾阳光知识产权代理
事务所(普通合伙) 52110

代理人 管宝伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,所述检测试纸由样品吸收垫、包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次叠加粘贴在PVC底板上制成;所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原为纳米金标记的单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体。检测时将样品加在样品吸收垫区,通过观察试纸的颜色变化判定检测结果,操作简单、特异性强、灵敏度高,可对人类脊髓灰质炎病进行快速诊断,及早发现,及时治疗。

1. 一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其特征在于,所述检测试纸由样品吸收垫、包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次叠加粘贴在PVC底板上制成;所述髓灰质炎病毒特异性重组抗原为纳米金标记的单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其特征在于,所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的浓度为2.5mg/mL,所述抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体的浓度为2.5mg/mL,所述抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体的浓度为2.5mg/mL,所述鼠抗人IgM单克隆抗体的浓度为3mg/mL。

3. 如权利要求1所述的一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其特征在于,所述脊髓灰质炎病毒单克隆抗体的制备方法为:将病毒液用超滤膜进行过滤浓缩,再以氯化铯梯度离心纯化得到病毒,取雄性小鼠,以20 μ g/只的量对小鼠进行注射免疫,取免疫细胞用常规促融剂进行细胞融合,检测融合细胞得到阳性细胞株克隆化挑选得到分泌特异性单克隆抗体细胞株,再用所得细胞株诱生小鼠腹水并以正辛酸-硫酸铵钝化得到所需抗体。

4. 如权利要求1所述的一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其特征在于,所述的脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的制备方法为:配制0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1.5mL浓度为1%的枸橼酸三钠水溶液,一段时间后出现橙红色,得到直径为30nm的纳米金溶液;取脊髓灰质炎病毒单克隆抗体35 μ g加入制备好的纳米金溶液中,调节pH在6.5-7.5,震荡搅拌使其得以标记,再加入质量浓度为3.5%的胎牛血清,所得溶液4 $^{\circ}$ C下先低速离心15min,取上清液再高速离心40min处理,弃去上清液,将沉淀物用缓释剂溶解离心2次,所得离心沉淀物溶解于缓释液中,即得到所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原。

5. 如权利要求1-4所述的一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其特征在于,其制备方法为:

步骤一:金标垫的制备方法:

(1) 配制0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1.5mL浓度为1%的枸橼酸三钠水溶液,一段时间后出现橙红色,得到直径为30nm的纳米金溶液;取脊髓灰质炎病毒单克隆抗体35 μ g加入制备好的纳米金溶液中,调节pH在6.5-7.5,震荡搅拌使其得以标记,再加入质量浓度为3.5%的胎牛血清,所得溶液4 $^{\circ}$ C下先低速离心15min,取上清液再高速离心40min处理,弃去上清液,将沉淀物用缓释剂溶解离心2次,所得离心沉淀物溶解于缓释液中,即得到所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原;

(2) 将(1)中制备好的脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原均匀喷涂于玻璃纤维膜上,冷冻干燥,即为包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫;

步骤二:硝酸纤维素膜的包被方法:在硝酸纤维素膜上依次包被检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,包被浓度为2.5mg/mL,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,包被浓度为2.5mg/mL,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体,包被浓度为3mg/mL;

步骤三：试纸制备：将样品吸收垫在处理液中浸泡2h，干燥处理后，将样品垫、纳米金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次相互叠加粘贴在底板上，叠加厚度在2-3mm，包封储存，即为所述人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸。

一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及骨科疾病检测技术领域,具体涉及一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸。

背景技术

[0002] 脊髓灰质炎是一种由病毒引起、传播广泛且对儿童健康危害很大的急性传染病,又名小儿麻痹症,是由脊髓灰质炎病毒引起的一种急性传染病。临床表现主要有发热、咽痛和肢体疼痛,部分病人可发生弛缓性麻痹,流行时以隐匿感染和无瘫痪病例为多,儿童发病较成人为高,普种疫苗前尤以婴幼儿患病为多,其主要病变在脊髓灰质,损害严重者可有瘫痪后遗症。尽管近年来由于预防措施的积极推广其发病已明显减少,尤其是在城市及居民点集中部,但在边远及不发达地区仍可发现,包括既往患者残留的后遗症等,均需治疗。本病的病理改变部位主要位于脊髓灰质前角,少数病例可波及脑干及脑实质,病毒侵袭的结果主要是不显性的亚临床感染,大约只有1%的人受感染后有临床表现。其临床特点为出现不规则、不对称、无感觉障碍及无大小便失禁的弛缓性瘫痪,此时,腱反射减弱或消失。

[0003] 目前,对脊髓灰质炎的诊断检查包括血常规检查,少数患者白细胞数轻度增加,(10~15)×10⁹/L,中性粒细胞也略见增高,部分患者血沉增快,也可行脑脊液检查,病毒分离及免疫学检查,血清查特异性IgM、IgG抗体胶体金标记可提高检测的灵敏性和特异性,为疾病的确诊治疗提供重要的依据。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题就是提供一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸。

[0005] 本发明的技术方案为:一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,所述检测试纸由样品吸收垫、包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次叠加粘贴在PVC底板上制成;所述髓灰质炎病毒特异性重组抗原为纳米金标记的单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体。

[0006] 进一步的,所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的浓度为2.5mg/mL,所述抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体的浓度为2.5mg/mL,所述抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体的浓度为2.5mg/mL,所述鼠抗人IgM单克隆抗体的浓度为3mg/mL。

[0007] 进一步的,所述脊髓灰质炎病毒单克隆抗体的制备方法为:将病毒液用超滤膜进行过滤浓缩,再以氯化铯梯度离心纯化得到病毒,取雄性小鼠,以20μg/只的量对小鼠进行注射免疫,取免疫细胞用常规促融剂进行细胞融合,检测融合细胞得到阳性细胞株克隆化挑选得到分泌特异性单克隆抗体细胞株,再用所得细胞株诱生小鼠腹水并以正辛酸-硫酸

铵钝化得到所需抗体。

[0008] 进一步的,所述的脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的制备方法为:配制0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1.5mL浓度为1%的枸橼酸三钠水溶液,一段时间后出现橙红色,得到直径为30nm的纳米金溶液;取脊髓灰质炎病毒单克隆抗体35 μ g加入制备好的纳米金溶液中,用0.2mol/L的氯化钠溶液调节pH在6.5-7.5,震荡搅拌使其得以标记,再加入质量浓度为3.5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为1%,所得溶液4 $^{\circ}$ C下先低速离心15min,取上清液再高速离心40min处理,弃去上清液,将沉淀物用与原体积相等的缓释剂0.01mPBS溶解离心2次,所得离心沉淀物溶解于原体积8%的缓释剂中,即得到所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原。

[0009] 一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其制备方法为:

[0010] 步骤一:金标垫的制备方法:

[0011] (1) 配制0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1.5mL浓度为1%的枸橼酸三钠水溶液,一段时间后出现橙红色,得到直径为30nm的纳米金溶液;取脊髓灰质炎病毒单克隆抗体35 μ g加入制备好的纳米金溶液中,用0.2mol/L的氯化钠溶液调节pH在6.5-7.5,震荡搅拌使其得以标记,再加入质量浓度为3.5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为1%,所得溶液4 $^{\circ}$ C下先低速离心15min,取上清液再高速离心40min处理,弃去上清液,将沉淀物用与原体积相等的缓释剂0.01mPBS溶解离心2次,所得离心沉淀物溶解于原体积8%的缓释剂中,即得到所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原;

[0012] (2) 将(1)中制备好的脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原均匀喷涂于玻璃纤维膜上,冷冻干燥,即为包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫;

[0013] 步骤二:硝酸纤维素膜的包被方法:在硝酸纤维素膜上依次包被检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,包被浓度为2.5mg/mL,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,包被浓度为2.5mg/mL,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体,包被浓度为3mg/mL;

[0014] 步骤三:试纸制备:将样品吸收垫在处理液中浸泡2h,可促进层析作用发生,干燥处理后,将样品垫、纳米金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次相互叠加粘贴在底板上,叠加厚度在2-3mm,包封储存,即为所述人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸。

[0015] 本发明试纸的工作原理为:采用纳米金免疫层析技术,当待检样品中含有脊髓灰质炎病毒抗体IgM和IgG时,在吸水垫的牵引下抗体和玻璃纤维膜上胶体金标记的特异性重组抗原结合形成复合物,复合物可通过层析作用向前移动到检测线时,形成抗体-金标重组抗原-抗体复合物,在检测线上富集,因有金颗粒在此沉积,可通过肉眼观察到显色反应。

[0016] 本发明的试纸使用方法:按临床检验常规取血分离得到血清,用吸管吸取150-200 μ L血清滴加到制备的试纸的样品吸收垫上,10分钟左右判读结果:如果检测线1和质控线均有红色显示则判定为阳性,反之为阴性,且为感染初期;如果检测线2、检测线2和质控线均有红色显示则判定为阳性,反之为阴性,且判定为已感染一定的时间;如果质控线未见显色反应,则判断检测无效。

[0017] 本发明的有益效果体现在:本发明通过脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体作为双重指标来检测,感染后血清中最早出现特异型IgM,一段时间后出现IgG,通过其双重检测,不仅可以更准确判断人体是否感染脊髓灰质炎病毒,而且可以为感染的时间提供重要依

据,操作简单,灵敏度高,可用于临床推广。

具体实施方式

[0018] 实施例:一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,所述检测试纸由样品吸收垫、包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次叠加粘贴在PVC底板上制成;所述髓灰质炎病毒特异性重组抗原为纳米金标记的单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体。

[0019] 其中,所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的浓度为2.5mg/mL,所述抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体的浓度为2.5mg/mL,所述抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体的浓度为2.5mg/mL,所述鼠抗人IgM单克隆抗体的浓度为3mg/mL;所述脊髓灰质炎病毒单克隆抗体的制备方法为:将病毒液用超滤膜进行过滤浓缩,再以氯化铯梯度离心纯化得到病毒,取雄性小鼠,以20 μ g/只的量对小鼠进行注射免疫,取免疫细胞用常规促融剂进行细胞融合,检测融合细胞得到阳性细胞株克隆化挑选得到分泌特异性单克隆抗体细胞株,再用所得细胞株诱生小鼠腹水并以正辛酸-硫酸铵钝化得到所需抗体;所述的脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的制备方法为:配制0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1.5mL浓度为1%的枸橼酸三钠水溶液,一段时间后出现橙红色,得到直径为30nm的纳米金溶液;取脊髓灰质炎病毒单克隆抗体35 μ g加入制备好的纳米金溶液中,用0.2mol/L的氯化钠溶液调节pH在6.5-7.5,震荡搅拌使其得以标记,再加入质量浓度为3.5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为1%,所得溶液4 $^{\circ}$ C下先低速离心15min,取上清液再高速离心40min处理,弃去上清液,将沉淀物用与原体积相等的缓释剂0.01mPBS溶解离心2次,所得离心沉淀物溶解于原体积8%的缓释剂中,即得到所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原。

[0020] 一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸,其制备方法为:

[0021] 步骤一:金标垫的制备方法:

[0022] (1) 配制0.01%的氯金酸溶液100mL,加热至沸腾后迅速加入1.5mL浓度为1%的枸橼酸三钠水溶液,一段时间后出现橙红色,得到直径为30nm的纳米金溶液;取脊髓灰质炎病毒单克隆抗体35 μ g加入制备好的纳米金溶液中,用0.2mol/L的氯化钠溶液调节pH在6.5-7.5,震荡搅拌使其得以标记,再加入质量浓度为3.5%的胎牛血清,其加入量为使总溶液最终浓度为1%,所得溶液4 $^{\circ}$ C下先低速离心15min,取上清液再高速离心40min处理,弃去上清液,将沉淀物用与原体积相等的缓释剂0.01mPBS溶解离心2次,所得离心沉淀物溶解于原体积8%的缓释剂中,即得到所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原;

[0023] (2) 将(1)中制备好的脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原均匀喷涂于玻璃纤维膜上,冷冻干燥,即为包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫;

[0024] 步骤二:硝酸纤维素膜的包被方法:在硝酸纤维素膜上依次包被检测线1、检测线2和质控线,所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体,包被浓度为2.5mg/mL,所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体,包被浓度为2.5mg/mL,所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体,包被浓度为3mg/mL;

[0025] 步骤三：试纸制备：将样品吸收垫在处理液中浸泡2h，可促进层析作用发生，干燥处理后，将样品垫、纳米金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次相互叠加粘贴在底板上，叠加厚度在2-3mm，包封储存，即为所述人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸。

[0026] 最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明实施例技术方案的精神和范围。

专利名称(译)	一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN106383228A	公开(公告)日	2017-02-08
申请号	CN201610741611.0	申请日	2016-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	张洪良		
申请(专利权)人(译)	张洪良		
当前申请(专利权)人(译)	张洪良		
[标]发明人	张洪良		
发明人	张洪良		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/532 G01N33/558 G01N2333/105		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人类脊髓灰质炎病毒IgM抗体和IgG抗体检测试纸，所述检测试纸由样品吸收垫、包被有脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次叠加粘贴在PVC底板上制成；所述脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原为纳米金标记的单克隆抗体；所述硝酸纤维素膜上包被有检测线1、检测线2和质控线，所述检测线1包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgM抗体，所述检测线2包被有抗脊髓灰质炎病毒特异性重组抗原的IgG抗体，所述质控线包被有鼠抗人IgM单克隆抗体。检测时将样品加在样品吸收垫区，通过观察试纸的颜色变化判定检测结果，操作简单、特异性强、灵敏度高，可对人类脊髓灰质炎病进行快速诊断，及早发现，及时治疗。