



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727855 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710923031.8

(22)申请日 2017.09.30

(71)申请人 广州万孚生物技术股份有限公司
地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城
荔枝山路8号

(72)发明人 张秋平 陈立 李高辉

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224
代理人 万志香

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书20页

(54)发明名称

用于检测尿液中HIV抗体的样品垫、样品垫
处理液及试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测尿液中HIV抗体的样品垫、样品垫处理液及试纸条,所述样品垫处理液包括pH为8~11的缓冲液、水性流变助剂和封闭剂,其中,相对于每100mL的所述缓冲液,所述水性流变助剂的添加量为0.05~10g,所述封闭剂的添加量为0.05~10g。本发明的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液通过选择合适pH的缓冲液以及合适浓度的水性流变助剂和封闭剂,可消除尿液对免疫金稳定性的影响,提高免疫金的溶解释放速度及膜面层析形态。

1. 一种用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述样品垫处理液包括pH为8~11的缓冲液、水性流变助剂和封闭剂,其中,相对于每100mL的所述缓冲液,所述水性流变助剂的添加量为0.05~10g,所述封闭剂的添加量为0.05~10g。

2. 根据权利要求1所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述缓冲液为10~200mM的Tris-HCL缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述样品垫处理液还包括0.01~1M的 Na_2CO_3 或 K_2CO_3 。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述样品垫处理液中还包括S9。

5. 根据权利要求4所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,相对于每100mL的所述缓冲液,所述S9的添加量为0.01~1g。

6. 根据权利要求1或2所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述水性流变助剂为羟丙基甲基纤维素、PAA、PEO中的至少一种。

7. 根据权利要求6所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述水性流变助剂为羟丙基甲基纤维素和PAA的混合物,所述羟丙基甲基纤维素占所述混合物总重量的45~70%。

8. 根据权利要求1或2所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,其特征在于,所述封闭剂为兔血清。

9. 一种样品垫,其特征在于,所述样品垫采用权利要求1~8任一项所述的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液进行处理。

10. 一种检测尿液中HIV抗体的试纸条,其特征在于,所述试纸条包括底板,以及设置于底板上的如权利要求9所述的样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述硝酸纤维素膜的两端分别搭接有样品垫和吸水纸,所述样品垫的近硝酸纤维素膜端喷涂有胶体金标记的HIV重组抗原和胶体金标记的鼠抗人IgG抗体,所述硝酸纤维素膜上设有包被HIV重组抗原的检测线、以及包被羊抗鼠IgG抗体的控制线。

用于检测尿液中HIV抗体的样品垫、样品垫处理液及试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,更具体地,本发明涉及一种用于检测尿液中HIV 抗体的样品垫、样品垫处理液及试纸条。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,HIV)是一种感染人类免疫系统细胞的病毒,通过破坏人体免疫细胞,导致免疫系统失去抵抗力,而导致各种疾病。国家疾控中心统计,自2007年起,艾滋病成为中国造成死亡人数最高的传染病并延续至今。值得注意的是,目前中国仍有32.1%感染者未被发现。确定一个人是否感染艾滋病毒的唯一办法是进行艾滋病毒检测。数据显示,2008-2015年间中国HIV检测量快速上升。据统计,仅2015年,全国约有超过1.43 亿人接受了HIV检测,占总人口的10%。

[0003] 如此大规模的HIV检测对人力、物力、财力、时间都是一个严峻的挑战,特别是随着艾滋的全球蔓延、医护人员被感染的风险事例对HIV检测技术的开发和创新提出了“精准、快速、无创”的要求。

[0004] 目前有关于艾滋诊断程序是初筛为阳性后再进行westernblot确诊。初筛的主要检测方法有两种:

[0005] 1、血液检测:主要方法有免疫层析法(胶体金法或胶乳法)、化学发光法、时间分辨荧光法,即采集患者血样,用于体外定性或定量检测人血清、血浆和全血中的人类免疫缺陷病毒(HIV-1/HIV-2)抗体。这些方法主要是通过检测可疑者血液的HIV抗体的有无判断是否感染。

[0006] 但是血液检测的方法是一种创伤性血液检测,而血液传播也是艾滋传播的3 大途径之一,其中,化学发光和时间分辨荧光需要大型设备,只有县级及以上的医院配备。其次,这2种方法耗时长,需要专门的操作人员和培训。三者的共同缺点是:

[0007] A、医护人员在抽血过程中被戳伤而感染的风险;

[0008] B、抽血后的各种医疗器械垃圾及处理(如:针头、针灸针、牙科器械、美容器械等)存在感染的风险;

[0009] C、采集的血样需要离心,难以进行患者自我检测从而保证患者的隐私。

[0010] 2、口腔粘膜渗出液检测:主要方法有免疫层析法(胶体金法或胶乳法)。即用口腔拭子在牙龈线不断擦拭后的渗出液,检测人口腔粘膜渗出液中的 HIV-1/2型人类免疫缺陷病毒抗体。

[0011] 该法是一种微创检测,相比血液传播的风险小很多,但仍存在传播的风险如艾滋接触人群的高危人群。

[0012] 尿液中存在HIV特异性的抗体已经被大量研究和证实。无/极弱传染性的尿液检测方法CFDA批准的目前只有酶联免疫法,但耗时长(3h),且只能定性检测。同样可进行定性检测的胶体金法由于其操作简便、耗时短而被青睐和考虑的首选,但由于尿液抗体含量很低存在灵敏度的问题,故现有市场还未发现检测尿液中HIV抗体的试纸条的同类产品,此外,

有报道,尿液检测相比于血液,唾液存在较高的假阳性问题。

[0013] 样品垫是检测尿液中HIV抗体的试纸条的一个重要组成部分,样品垫在使用前需要通过样品垫处理液进行处理。由于检测样本及项目的不同,使用现有的样品垫处理液应用于检测尿液中HIV抗体的试纸条时,均存在较大的问题,例如:HIV血液检测试纸条的样品垫处理液、HCV和HBV试纸条的样品垫处理液对于HIV阴性和阳性样本均无法实现显色,而HIV唾液检测试纸条的样品垫处理液对于阴性和阳性样本显色接近,故阴阳样本区分度很差。因此,有必要开发一种可用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液。

发明内容

[0014] 一方面,基于此,为了克服上述现有技术的缺陷,本发明提供了一种用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液。

[0015] 为了实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0016] 一种用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液,所述样品垫处理液包括pH为8~11的缓冲液、水性流变助剂和封闭剂,其中,相对于每100mL的所述缓冲液,所述水性流变助剂的添加量为0.05~10g,所述封闭剂的添加量为0.05~10g。

[0017] 发明人经大量的试验表明,缓冲液的pH为8~11时,可以消除假阳并保持强、中阳样本的检出,而当缓冲液的pH为酸性或中性时,则会出现金颗粒变色、无法流动或假阳消除效果差的问题。水性流变助剂的加入可减慢尿液中水分子的流动,为金颗粒的反应提供一个液体环境,同时在喷涂的金颗粒的过程中提供一个支架,稳定地固定生物原材料不发生漂移均匀分布,保证了生物原材料分布的均一性。

[0018] 在其中一些实施例中,所述缓冲液为10~200mM的Tris-HCL缓冲液。

[0019] 在其中一些实施例中,所述样品垫处理液还包括0.01~1M的Na₂CO₃或K₂CO₃。

[0020] 在其中一些实施例中,所述样品垫处理液中还包括S9。

[0021] 在其中一些实施例中,相对于每100mL的所述缓冲液,所述S9的添加量为0.01~1g。

[0022] 在其中一些实施例中,所述水性流变助剂为羟丙基甲基纤维素、PAA、PEO中的一种或几种。

[0023] 在其中一些实施例中,所述水性流变助剂为羟丙基甲基纤维素和PAA的混合物,所述羟丙基甲基纤维素占所述混合物总重量的45~70%。

[0024] 在其中一些实施例中,所述封闭剂为兔血清。

[0025] 另一方面,本发明还提供了一种样品垫,所述样品垫采用上述用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液进行处理。

[0026] 再一方面,本发明还提供了一种检测尿液中HIV抗体的试纸条,所述试纸条包括底板,以及设置于底板上的上述样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述硝酸纤维素膜的两端分别搭接有样品垫和吸水纸,所述样品垫的近硝酸纤维素膜端喷涂有胶体金标记的HIV重组抗原和胶体金标记的鼠抗人IgG抗体,所述硝酸纤维素膜上设有包被HIV重组抗原的检测线、以及包被羊抗鼠IgG抗体的控制线。

[0027] 在其中一些实施例中,所述胶体金标记的HIV重组抗原包括重组gp160;所述检测线上包被的HIV重组抗原包括重组gp41和gp160。

[0028] 在其中一些实施例中,所述胶体金标记的HIV重组抗原还包括重组gp36,所述检测线上包被的HIV重组抗原还包括重组gp36。

[0029] 在其中一些实施例中,所述胶体金标记重组gp160抗原的浓度为 1.5~3.5ug/ml;所述胶体金标记鼠抗人IgG的抗体的浓度为4.5~6.5ug/ml;所述胶体金标记重组gp36抗原的浓度为4.5~6.5ug/ml;胶体金标记原料的用量为 2~3.5u1/cm;所述HIV重组抗原gp41的包被浓度为0.5~2.0mg/ml,所述HIV重组抗原gp160的包被浓度为0.2~0.8mg/ml,所述HIV重组抗原gp36的包被浓度为0.5~1.0mg/ml;所述HIV重组抗原的用量均为0.12~0.15u1/mm,所述羊抗鼠IgG抗体的浓度为0.8~1.0mg/ml,所述羊抗鼠IgG抗体的用量为0.09~0.22u1/mm。

[0030] 本发明还提供了一种检测尿液中HIV抗体的试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0031] 1)、配制样品垫处理液,涂布于玻璃纤维素膜上,涂布浓度为40u1/cm²,烘干处理制得样品垫;

[0032] 2)、将检测HIV的抗体或抗原与胶体金颗粒结合形成胶体金标记检测HIV的抗体或抗原,用喷金仪均匀喷涂于样品垫上;晾干;

[0033] 3)、将HIV重组抗原用HIV包被稀释液进行稀释至工作浓度,划线于硝酸纤维素膜上形成检测线,将羊抗鼠抗体稀释至工作浓度,划线于硝酸纤维素膜上形成质控线,烘干处理;

[0034] 4)、将样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸搭接在底板上,即得。

[0035] 为了解决尿液检测HIV的灵敏度和特异性的问题,本发明的发明人实施了多种研究,经确定运用固相免疫层析原理,采用前期样品垫的敏感性处理及特异性抗原gp160、双抗夹心法间接法联用技术检测尿液中的HIV抗体,可以提高灵敏度和特异性。若尿液样品中含有HIV抗体,则HIV抗体与胶体金颗粒标记物结合,形成复合物,并扩散到硝酸纤维素膜上进一步层析,当遇到包被在硝酸纤维素膜上检测区(T线)处的配对抗原时,复合物则又和包被抗原结合,被捕获在包被处,当被捕获的复合物达到一定数量时,则形成肉眼可见的T线,说明样品中含有HIV抗体,若不出现,说明样品为阴性或含量低于试纸条的最低检测限。控制区(C线)作为试纸条的质控标准,阳性和阴性样品检测时均会出现。

[0036] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0037] 1、本发明的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液通过选择合适pH的缓冲液以及合适浓度的水性流变助剂和封闭剂,可消除尿液对免疫金稳定性的影响,提高免疫金的溶解释放速度及膜面层析形态;

[0038] 2、本发明的用于检测尿液中HIV抗体的试纸条的样品垫处理液通过进一步添加K₂CO₃/Na₂CO₃,可为反应提供一个更为稳定良好的碱性环境,与Tris-HCL缓冲液共同维持加入尿样后的碱性环境,从而消除假阳性的影响,并且提高了免疫金的溶解释放速度及膜面层析形态,即便pH偏酸性的尿液(pH<7.0~7.5)金颗粒也能够有效释放,扩大了检测pH适用性;

[0039] 3、尿液中抗体主要是IgG型,通过在试纸条中加入抗人IgG的抗体可以快速富集各类抗体,起到一个浓缩作用,再通过HIV抗原的特异性从浓缩的富集的抗体中特异性结合HIV抗体,从而提高试纸条的灵敏度;

[0040] 4、本发明的检测尿液中HIV抗体的试纸条降低了HIV接触者(如医务工作人员、婚

前或孕妇检查等)由于采集样本被戳伤而被传染的风险,尿样不需要浓缩和预处理,存储、运输方便,泄漏风险低,无需更多处理设备,无需对医护人员再次进行专业的技能培训;同时,随着医疗的发展,越来越朝向OTC检测,大大释放了医院、医护人员的压力。此外还可进行个人式检测,操作简单,保护个人隐私,达到真正的POCT检测;

[0041] 5、本发明的检测尿液中HIV抗体的试纸条高灵敏度的尿检保证了数据的真实可靠性,可用于艾滋病大规模的初筛。

具体实施方式

[0042] 下面结合具体实施例进一步叙述本发明,本发明未述及之处适用于现有技术。下面给出本发明的具体实施例,但实施例仅是为了进一步详细叙述本说明,并不限制本发明的权利要求。以下实施例中所使用的试剂或原料,如无特殊说明,均来源于市售。

[0043] 实施例1用于检测尿液中HIV的试纸条的样品垫处理液

[0044] 本实施例的样品垫处理液包括pH为9、100mM的Tris-HCl缓冲液、HPMC、PAA、兔血清、S9和0.09MNa₂CO₃;

[0045] 其中,相对于每100mL的Tris-HCl缓冲液,HPMC的添加量为0.1g,PAA 的添加量为0.1g,兔血清的添加量为0.1g,S9的添加量为0.1g。

[0046] 该样品垫处理液的制备方法为:

[0047] 配制pH为9、100mM的Tris-HCl作为基础液,再添加HPMC和PAA、兔血清、S9,再添加Na₂CO₃,即得所述样品垫处理液。

[0048] 实施例2用于检测尿液中HIV的试纸条的样品垫处理液

[0049] 本实施例的样品垫处理液包括pH为10、10mM的Tris-HCl缓冲液、HPMC、PAA、兔血清、S9和0.5M Na₂CO₃;

[0050] 其中,相对于每100mL的Tris-HCl缓冲液,HPMC的添加量为0.7g,PAA 的添加量为0.3g,兔血清的添加量为1g,S9的添加量为1g。

[0051] 该样品垫处理液的制备方法为:

[0052] 配制pH为10、10mM的Tris-HCl作为基础液,再添加HPMC和PAA、兔血清、S9,再添加Na₂CO₃,即得所述样品垫处理液。

[0053] 实施例3用于检测尿液中HIV的试纸条的样品垫处理液

[0054] 本实施例的样品垫处理液包括pH为11、200mM的Tris-HCl缓冲液、HPMC、兔血清、S9和1MNa₂CO₃;

[0055] 其中,相对于每100mL的Tris-HCl缓冲液,HPMC的添加量为5g,兔血清的添加量为1g,S9的添加量为0.5g。

[0056] 该样品垫处理液的制备方法为:

[0057] 配制pH为11、200mM的Tris-HCl作为基础液,再添加HPMC、兔血清、S9,再添加1M的Na₂CO₃,即得所述样品垫处理液。

[0058] 实施例4用于检测尿液中HIV的试纸条的样品垫处理液

[0059] 本实施例的样品垫处理液包括pH为9、100mM的Tris-HCl缓冲液、HPMC、兔血清和0.01M Na₂CO₃;

[0060] 其中,相对于每100mL的Tris-HCl缓冲液,HPMC的添加量为0.05g,兔血清的添加量

为10g。

[0061] 该样品垫处理液的制备方法为：

[0062] 配制pH为9、100mM的Tris-HCl作为基础液，再添加HPMC、兔血清，再添加0.01M的Na₂CO₃，即得所述样品垫处理液。

[0063] 实施例5用于检测尿液中HIV的试纸条的样品垫处理液

[0064] 本实施例的样品垫处理液包括pH为9、100mM的Tris-HCl缓冲液、HPMC、兔血清和S9；

[0065] 其中，相对于每100mL的Tris-HCl缓冲液，HPMC的添加量为10g，兔血清的添加量为1g，S9的添加量为0.01g。

[0066] 该样品垫处理液的制备方法为：

[0067] 配制pH为9、100mM的Tris-HCl作为基础液，再添加HPMC、兔血清和 S9，即得所述样品垫处理液。

[0068] 实施例6检测尿液中HIV抗体的试纸条

[0069] 本实施例的一种检测尿液中HIV抗体的试纸条，所述试纸条包括底板，以及设置于底板上的样品垫和硝酸纤维素膜，所述样品垫采用实施例1的样品垫处理液进行处理，所述硝酸纤维素膜的两端分别搭接有样品垫和吸水纸，所述样品垫上喷涂有胶体金标记鼠抗人IgG的抗体，胶体金标记gp160抗原和胶体金标记 gp36抗原，所述硝酸纤维素膜上设有包被HIV重组抗原gp41和HIV重组抗原 gp160的检测线、包被HIV重组抗原gp36的检测线、以及包被羊抗鼠抗体的控制线。

[0070] 该试纸条可以用于检测HIV-1型和HIV-2型感染。

[0071] 在该实施例中，所述胶体金标记gp160抗原的浓度为2.5ug/ml；所述胶体金标记鼠抗人IgG的抗体的浓度为5.6ug/ml；所述胶体金标记gp36抗原的浓度为 5.6ug/ml。所述胶体金标记原料的用量为2.75ul/cm。

[0072] 在该实施例中，所述HIV重组抗原gp41的包被浓度为1.0mg/ml，所述HIV重组抗原gp160的包被浓度为0.6mg/ml，所述HIV重组抗原gp36的包被浓度为 0.6mg/ml，所述HIV重组抗原的用量均为0.12ul/mm。

[0073] 在该实施例中，所述羊抗鼠抗体的浓度为1.0mg/ml，所述羊抗鼠抗体的用量为0.1ul/mm。

[0074] 该实施例的检测尿液中HIV抗体的试纸条的制备方法如下：

[0075] 1)、配制样品垫处理液，涂布于玻璃纤维素膜上，涂布浓度为40ul/cm²，置于25℃，湿度10%~30%，烘干处理18-22h，制得样品垫；

[0076] 2)、将鼠IgG与胶体金颗粒结合形成胶体金标记鼠IgG抗体探针；gp160抗原与胶体金颗粒标记形成胶体金标记HIV特异性抗原探针（在gp160抗原与胶体金颗粒结合前，需要将gp160抗原溶解在HIV包被稀释液中，所述HIV包被稀释液包括pH为7.4、20mM的Tris-HCl缓冲液、S9和脲；其中，相对于每100mL的 Tris-HCl缓冲液，所述S9的添加量为0.1g，所述脲的添加量为5g）；gp36抗原与胶体金颗粒标记形成胶体金标记HIV特异性抗原探针。将上述3种金颗粒混匀，用喷金仪均匀喷涂于样品垫上，喷金宽度6mm，长度2.8cm，25℃晾干18-22h，湿度10%~30%，待用；

[0077] 3)、将HIV特异性抗原gp41和gp160用HIV包被稀释液（所述包被稀释液包括pH为

7.4、20mM的Tris-HCl缓冲液、S9和脲；其中，相对于每100mL的 Tris-HCl缓冲液，所述S9的添加量为0.1g，所述脲的添加量为5g) 进行稀释至工作浓度，用喷膜机进行划线于硝酸纤维素膜上形成T1检测线，将HIV特异性抗原gp36用pH为7.4、20mM的Tris-HCl缓冲液稀释至工作浓度，用喷膜机进行划线于硝酸纤维素膜上形成T2检测线，将羊抗鼠抗体稀释至工作浓度，用喷膜机进行划线于硝酸纤维素膜上形成C质控线，于25℃，湿度10~30%，烘干处理，18-22h；

[0078] 3)、将样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接在底板上，即得。

[0079] 试验例1样品垫处理液的助剂的选择试验

[0080] 添加一种或多种流变助剂可以调节液体的流变性，防止金颗粒干涸，本试验例根据尿液特点选择水性流变助剂，根据其纤维素类、聚氧乙烯类、聚苯烯酸类、天然胶及其改性物的分类分别选取了①、羟丙基甲基纤维素0.1%，1%，10%；②、PEO 0.1%，1%，10%；③、PAA0.1%，1%，10%；④、海藻酸钠0.1%，1%，10% (其中，羟丙基甲基纤维素0.1%是指每100mL的pH9.00.1M Tris-HCl 的缓冲液中溶解了0.1g羟丙基甲基纤维素，在溶剂相同的条件下，其余依次类推)，分别涂布于玻璃纤维素膜上，涂布浓度为40u1/cm²，置于25℃，湿度10%~30%，烘干处理，18-22h，制得样品垫。

[0081] 金颗粒的喷涂和硝酸纤维膜的制备方法同实施例6。

[0082] 试纸条的制备方法同实施例6。

[0083] 将本试验例制备得到的试纸条进行如下测试：

[0084] 选择健康人做对照，检测HIV阳性确诊的患者，以及用健康人阴性尿液与 HIV阳性患者尿液制成强阳、中阳、弱阳的内部参考品。用胶头滴管分别滴加2 滴(60-80u1) 样本到本试验例制得的试纸条的样品垫上，由于毛细管作用，样品将沿着试纸条向金颗粒和硝酸纤维素膜移动，待样品完全溶解金颗粒并向硝酸纤维素膜流动，结果开始显示；15分钟后观察显示结果(注：30分钟后显色无效)。测试结果如表1所示。

[0085] 表1不同水性流变助剂对样本的影响

[0086]

样品垫 样本	无助 剂 control	羟丙基甲基纤维素			PEO			PAA			海藻酸钠		
		0.1%	1%	10%	0.1%	1%	10%	0.1%	1%	10%	0.1%	1%	10%
N1	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8
N2	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8
N3	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8	C8
N4	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9
N5	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9	C9
P1	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5
P2	C7	C7+	C7+	C7+	C7	C7	C7+	C7	C7	C7+	C7	C7	C7
P3	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
P4	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
P5	C6	C6	C5	C5	C6	C6	C5	C6	C6	C5	C6	C6	C6
强阳参 考品	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
中阳参	C6	C6	C5	C5	C6	C6	C6	C6	C6	C6	C6	C6	C6

[0087]

考品													
弱阳参 考品	C8	C8+	C8+	C8+	C8	C8	C8+	C8	C8	C8+	C8	C8	C8
流速	快	慢	较慢	很慢	中速	中 速	慢	中速	中 速	慢	快	快	快
金颗 粒	分离 严重	金颗粒与水 完全不分离			金颗粒与水 部分分离			金颗粒与水 部分分离			金颗粒与水分离		

[0088] 注：共10个显色梯度：C1~C9,B。其中B表示“blank”，无条带；C1~C9表示显色强度，其中数字越大表示显色越浅。C8+表示显色介于C8~C7，其他以此类推。

[0089] 从表1结果可知，不同类型的流变助剂效果在低浓度下依次是羟丙基甲基纤维素>PEO≈PAA>海藻酸钠。相对于其他的水性流变助剂，羟丙基甲基纤维素更为有效地减弱了水分的流动，同时给予金颗粒充足的液相反应环境，使得反应充分进行，提高了灵敏度。PEO与PAA在一定程度上锁住了水分的流动，但使用的浓度比羟丙基甲基纤维素要高一些。海藻酸钠效果最弱。故优选羟丙基甲基纤维素，备选聚氧乙烯类、聚苯烯酸类。此外，发明人

还意外地发现,当同时使用羟丙基甲基纤维素和PAA作为水性流变助剂且在合适的浓度范围时(也即羟丙基甲基纤维素占两者总重量的45~70%),两者起到协同增效的作用,可进一步提高灵敏度,且不会导致金颗粒与水分离。

[0090] 试验例2假阳性的消除试验

[0091] 尿液pH大部分偏酸性,pH对于尿液的检测十分敏感,在酸性条件下金颗粒容易发生沉积,而碳酸钠可以微调尿液中的酸性物质(尿酸、肌酸等)。其中的钠离子还可以维持抗原-抗体反应是所需要的离子状态,保证了抗原-抗体的特异性反应。

[0092] 将不同浓度梯度的 Na_2CO_3 (如表2所示)加入于pH9.0、0.1M Tris-HCL缓冲液中,然后涂布于玻璃纤维素膜上,涂布浓度为 $40\mu\text{l}/\text{cm}^2$,置于 25°C ,湿度10%~30%,烘干处理18-22h,制得样品垫。

[0093] 金颗粒的喷涂和硝酸纤维膜的制备方法同实施例6。

[0094] 试纸条的制备方法同实施例6。

[0095] 将本试验例制备得到的试纸条进行测试,测试方法同试验例1,测试结果如表2所示。

[0096] 表2 Na_2CO_3 的含量对样本的影响

样品垫 样本	尿液 pH (样本 pH)	Na ₂ CO ₃ 0M pH 9.0 control	Na ₂ CO ₃ 0.009M pH 9.0	Na ₂ CO ₃ 0.09M pH 9.0	Na ₂ CO ₃ 0.9M pH9.0
N1	5~6	C8	C9+	C9	C9
N2	6~7	C8	C9+	C9	C9
N3	5~6	C8	C9+	C9	C9
N4	7~8	C9	B+	B+	B+
N5	7~8	C9	B+	B+	B+
[0097] P1	7~8	C5	C6+	C6+	C6+
P2	7~8	C7	C8+	C8+	C8+
P3	5~6	C2	C3	C3	C3
P4	5~6	C3	C4+	C4	C4
P5	6~7	C6	C7+	C7	C7
强阳参考 品	6~7	C2	C3	C3	C3
中阳参考 品	6~7	C6	C7+	C7	C7
弱阳参考 品	5~6	C8	C9+	C9+	C9+

[0098] 注：共10个显色梯度：C1~C9,B。其中B表示“blank”，无条带；C1~C9表示显色强度，其中数字越大表示显色越浅。C8+表示显色介于C8~C7，其他以此类推。

[0099] 从表2可以看出，pH9.00.1M Tris-HCL的碱性缓冲体系存在的部分假阳性可以通过加入碳酸钠保证反应的特异性，同时引入一定的钠离子浓度维持了免疫层析过程中抗原-抗体反应需要的离子。

[0100] 试验例3样品垫处理液中蛋白的选择试验

[0101] 尿液中几乎不含蛋白质，加入些许封闭蛋白不仅可以避免发生非特异性结合，而且可以增加尿液分子总量稳定尿液反应中的环境。该封闭蛋白兔血清和常规BSA一样可以和样本中的蛋白非特异性位点进行结合，最大优点是可以封闭样本中内源性的Fc片段，阻断抗体与样本中的Fc受体结合，降低背景，减少假阳性。

[0102] 配制pH9.0、0.1M Tris-HCL缓冲液作为基础液，添加羟丙基甲基纤维素0.1%，

PAA0.1%，0.09MNa₂CO₃，然后涂布于玻璃纤维素膜上，涂布浓度为40u1/cm²，置于25℃，湿度10%~30%，烘干处理18-22h，制得样品垫。

[0103] 金颗粒的喷涂和硝酸纤维膜的制备方法同实施例6。

[0104] 试纸条的制备方法同实施例6。

[0105] 将本试验例制备得到的试纸条进行测试，测试方法同试验例1，测试结果如表3所示。

[0106] 表3兔血清、BSA对样本影响的比较

[0107]

封闭血清 样本	显色 control	兔血清			BSA		
		0.10%	1%	10%	0.10%	1%	10%
N1	C9	B+	B	B	C9	C9+	C9+
N2	C9	B+	B	B	C9	C9	C9
N3	C9	B+	B	B	C9	C9	C9

[0108]

N4	B+	B	B	B	B+	B+	C9
N5	B+	B	B	B	B+	B+	C9
P1	C6+	C6	C6	C6	C6+	C6+	C7
P2	C8+	C8+	C8	C8	C8+	C8+	C8
P3	C3	C3	C4+	C3	C3	C3	C3
P4	C4	C4+	C4	C4	C4	C4	C4
P5	C7	C7	C8+	C8+	C7	C7	C7+
强阳参考品	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
中阳参考品	C7	C7	C8+	C8+	C7	C7	C7+
弱阳参考品	C9+	C9	C9	C9	C9+	C8	C8

[0109] 注：共10个显色梯度：C1~C9，B。其中B表示“blank”，无条带；C1~C9表示显色强度，其中数字越大表示显色越浅。C8+表示显色介于C8~C7，其他以此类推。此外，上表中的表征兔血清用量的%前面的数值代表相对于每100mL的缓冲液，兔血清的质量用量(g)；上表中的表征BSA用量的%前面的数值代表相对于每100mL的缓冲液，BSA的质量用量(g)。

[0110] 从表3可以看出，兔血清优于BSA。BSA作为封闭剂广泛应用于血液、血浆中作为封闭蛋白，也通常用于抗体制备中，而金颗粒中的抗体由于在表达的过程当中可能含有少量的抗BSA的抗体未去除，导致其与BSA进行反应造成上述的假阳。而金颗粒不存在抗兔的抗体，故兔血清能够很好地非特异性结合其他表位。

[0111] 试验例4样品垫处理液中增强剂的选择试验

[0112] 不同尿液的颜色千差万别,有的透明色,有的黄色,有的是蜂蜜色,而胶体金层析过程中本色是白色的硝酸纤维素膜,当有较深颜色的样本流过时会造成本底的颜色较深,故通过添加增色剂来消除本底的颜色,使得T/C线的背景更加清晰明了,一目了然,间接的增加了灵敏度。

[0113] 配制pH9.0、0.1M Tris-HCL缓冲液作为基础液,添加羟丙基甲基纤维素0.1%,PAA0.1%,0.09M Na₂CO₃,兔血清1%,不同浓度S9混匀,然后涂布于玻璃纤维素膜上,涂布浓度为40u1/cm²,置于25℃,湿度10%~30%,烘干处理18-22h,制得样品垫。

[0114] 其中,S9为一种表面活性剂,其商业名称为Tetronic 1307。相对于其他表面活性剂(例如S17等)会带来假阳性较高的负面影响,而S9相对较为温和,少量加入不会影响检测结果。

[0115] 金颗粒的喷涂和硝酸纤维素膜的制备方法同实施例6。

[0116] 试纸条的制备方法同实施例6。

[0117] 将本试验例制备得到的试纸条进行测试,测试方法同试验例1,测试结果如表4所示。

[0118] 表4增强剂对样本影响的比较

样本 增色剂	control 0%	S9		
		0.10%	1%	10%
N1	黄色 B	无色 B	无色 B	无色 B
N2	无色 B	无色 B	无色 B	无色 B
N3	无色 B	无色 B	无色 B	无色 B
N4	蜂蜜色 B	黄色 B	黄色 B	黄色 B
N5	蜂蜜色 B	黄色 B	黄色 B	黄色 B
P1	黄色 C6	无色 C6+	无色 C6+	无色 C6+

[0119]

[0120]	P2	蜂蜜色 C8	黄色 C8+	黄色 C8+	黄色 C8+
	P3	黄色 C4+	无色 C5	无色 C5	无色 C5
	P4	无色 C4	无色 C5	无色 C5	无色 C5
	P5	黄色 C8+	无色 C8	无色 C8	无色 C8
	强阳参考品	黄色 C3	无色 C3+	无色 C3+	无色 C3+
	中阳参考品	黄色 C8+	无色 C3+	无色 C3+	无色 C3+
	弱阳参考品	黄色 C9	无色 C8	无色 C8	无色 C8

[0121] 注：共10个显色梯度：C1~C9,B。其中B表示“blank”，无条带；C1~C9表示显色强度，其中数字越大表示显色越浅。C8+表示显色介于C8~C7，其他以此类推。此外，上表中的表征S9用量的%前面的数值代表相对于每100mL的缓冲液，S9的质量用量(g)。

[0122] 从表4可以看出，增色剂类似于“漂白”，将尿液本身的所带有的颜色消除成背景色，提高了颜色的清晰度，间接提高了显色梯度。并且低剂量效果和高剂量一样，故优选低剂量。

[0123] 综上，纤维素类作为众多助剂中的有效一类，而羟丙基甲基纤维素含有众多侧链，可以最大限度地吸收水分而“膨胀”，减缓了水的流动，为金颗粒的反应提供一个液体环境。其使用范围在0.05%~10%，在喷涂的过程中提供一个支架，稳定地固定生物原材料不发生漂移均匀分布，保证了生物原材料的均一性。K₂CO₃/Na₂CO₃提供一个良好的碱性环境，与Tris共同维持加入尿样后的碱性环境，从而消除假阳性的影响，并且提高了免疫金的溶解释放速度及膜面层析形态，即便pH偏酸性的尿液(pH<7.0~7.5)金颗粒也能够有效释放，扩大了检测 pH适用性。

[0124] 试验例5本发明的试纸条的灵敏度测试

[0125] 选择健康人做对照，HIV阳性确诊的患者进行市场上已经FDA注册的血液检测试纸条(对比试纸条1)、唾液检测试纸条(对比试纸条2)进行对照测试，比较本发明的试纸条的灵敏度和特异性。用胶头滴管分别滴加2滴(60~80uL)样本到试纸条的样品垫上，由于毛细管作用，样品将沿着试纸条向标记垫和硝酸纤维素膜移动，待样品完全溶解金颗粒以及向硝酸纤维素膜移动，结果开始显示；15分钟后观察显示结果(注：30分钟后显色无效)。

[0126] 结果如表5所示。

[0127] 表5试纸条的灵敏度测试

[0128]

样本类型	HIV 血液检测 测试纸条 对比试纸条 1	HIV 唾液检测 测试纸条 对比试纸条 2	本发明实施例 6 的试纸条
N1(尿液)	B	B	B
N2(尿液)	B	B	B
N3(尿液)	B	B	B
N4(尿液)	B	B	B
N5(尿液)	B	B	B
P1(血浆)	C3	C3	C4
P2(血浆)	C6	C5	C5
P3(血浆)	C1	C1	C2
P4(血浆)	C1	C1	C2
P5(血浆)	C5	C4	C4
P1(尿液)	B	B	C5

[0129]

P2(尿液)	B	B	C7
P3(尿液)	B	B	C2
P4(尿液)	B	B	C3
P5(尿液)	B	B	C6
企业参考品(BSA 未稀释)	C1	C1	C1
企业参考品(BSA 稀释 1:10)	C4	C4	C2
企业参考品(BSA 稀释 1:100)	C7	C7	C4
企业参考品(BSA 稀释 1:1000)	B	B	C7
企业参考品(BSA 稀释 1:10000)	B	B	C8
企业参考品(N1 尿液稀释)	C1	C1	C1
企业参考品(N1 尿液稀释 1:10)	C4	C4	C2
企业参考品(N1 尿液稀释 1:100)	C7	C7	C4
企业参考品(N1 尿液稀释 1:1000)	C9	C9	C7
企业参考品(N1 尿液稀释 1:10000)	B	B	C8

[0130] 注:共10个显色梯度:C1~C9,B。其中B表示“blank”,无条带;C1~C9表示显色强度,其中数字越大表示显色越浅。

[0131] 从表5可以看出,本发明的试纸条的测试范围(参考品稀释至10000倍)比唾液、血液检测试纸条(对比试纸条1和2,参考品稀释至100倍)要广,灵敏度高100倍以上。其次,唾液、血液检测试纸条对尿液样本敏感,所有的阳性尿液均无法检测,而本发明的HIV尿液试纸条可同时检测尿液和血液,说明了本发明的尿液检测试纸条在一定程度上可以代替血液检测试纸条。

[0132] 试验例6本发明的试纸条的国家参考盘测试

[0133] 采用本发明实施例6的试纸条测试中国药品生物制品检定所HIV尿液抗体参考品(尿液快速试剂),结果如表6所示。

[0134] 表6国家参考盘测试结果

[0135]

阳性符合率	阴性符合率	最低检测限	精密性
-------	-------	-------	-----

[0136]

HIV-1	HIV-2			10/10, +/+
18/18	2/2	≥18/20	≥3/5	显色均一, 半个
+/+	+/+	-/-		梯度范围内

[0137] 表6结果表明,使用实施例6的试剂条检测尿液HIV抗体的灵敏度为100%,特异性达到99.9%以上,符合中国药品生物制品检定所HIV抗体检测的标准。

[0138] 试验例7本发明的试纸条的临床样本测试

[0139] 从某省疾病预防控制中心中选出经westernblot确诊的HIV患者101例(确诊标准是:western blot阳性,样本编号为P1~P101),以广州万孚生物技术股份有限公司的健康人尿样(标准是:身体无任何临床症状,无传染病接触史、感染史,样本编号为WF-N1~WF-N100)100例做对照,使用本发明实施例6的试纸条进行测试,结果如表7和8所示。

[0140] 表7临床样本测试结果

[0141]

样本编号	确诊类型	测试结果	样本编号	确诊类型	测试结果
WF-N1	-	B	P1	+	C5
WF-N2	-	B	P2	+	C7
WF-N3	-	B	P3	+	C2
WF-N4	-	B	P4	+	C3
WF-N5	-	B	P5	+	C6
WF-N6	-	B	P6	+	C2
WF-N7	-	B	P7	+	C7
WF-N8	-	B	P8	+	C5
WF-N9	-	B	P9	+	C4
WF-N10	-	B	P10	+	C2
WF-N11	-	B	P11	+	C6
WF-N12	-	B	P12	+	C8
WF-N13	-	B	P13	+	C2

[0142]

WF-N14	-	B	P14	+	C3
WF-N15	-	B	P15	+	B
WF-N16	-	B	P16	+	C5
WF-N17	-	B	P17	+	C5
WF-N18	-	B	P18	+	C6
WF-N19	-	B	P19	+	C5
WF-N20	-	B	P20	+	C5
WF-N21	-	B	P21	+	C3
WF-N22	-	B	P22	+	C7
WF-N23	-	B	P23	+	C5
WF-N24	-	B	P24	+	C3
WF-N25	-	B	P25	+	C4
WF-N26	-	B	P26	+	C4
WF-N27	-	B	P27	+	C8
WF-N28	-	B	P28	+	C2
WF-N29	-	B	P29	+	C3
WF-N30	-	B	P30	+	C4
WF-N31	-	B	P31	+	C4
WF-N32	-	B	P32	+	C5
WF-N33	-	B	P33	+	C7
WF-N34	-	B	P34	+	C3
WF-N35	-	B	P35	+	C4
WF-N36	-	B	P36	+	C3
WF-N37	-	B	P37	+	C4
WF-N38	-	B	P38	+	C5
WF-N39	-	B	P39	+	C7
WF-N40	-	B	P40	+	C5
WF-N41	-	B	P41	+	C5
WF-N42	-	B	P42	+	C4

[0143]

WF-N43	-	B	P43	+	C1
WF-N44	-	B	P44	+	C5
WF-N45	-	B	P45	+	C3
WF-N46	-	B	P46	+	C4
WF-N47	-	B	P47	+	C3
WF-N48	-	B	P48	+	C5
WF-N49	-	B	P49	+	C5
WF-N50	-	B	P50	+	C3
WF-N51	-	B	P51	+	C5
WF-N52	-	B	P52	+	C3
WF-N53	-	B	P53	+	C2
WF-N54	-	B	P54	+	C5
WF-N55	-	B	P55	+	C4
WF-N56	-	B	P56	+	C5
WF-N57	-	B	P57	+	C3
WF-N58	-	B	P58	+	C2
WF-N59	-	B	P59	+	C5
WF-N60	-	B	P60	+	C5
WF-N61	-	B	P61	+	C6
WF-N62	-	B	P62	+	C8
WF-N63	-	B	P63	+	C6
WF-N64	-	B	P64	+	C1
WF-N65	-	B	P65	+	C2
WF-N66	-	B	P66	+	C3
WF-N67	-	B	P67	+	C5
WF-N68	-	B	P68	+	C6
WF-N69	-	B	P69	+	C7
WF-N70	-	B	P70	+	C6
WF-N71	-	B	P71	+	C3

	WF-N72	-	B	P72	+	C4
	WF-N73	-	B	P73	+	C7
	WF-N74	-	B	P74	+	C1
	WF-N75	-	B	P75	+	C4
	WF-N76	-	B	P76	+	C4
	WF-N77	-	B	P77	+	C4
	WF-N78	-	B	P78	+	C3
	WF-N79	-	B	P79	+	C7
	WF-N80	-	B	P80	+	C3
	WF-N81	-	B	P81	+	C5
	WF-N82	-	B	P82	+	C4
	WF-N83	-	B	P83	+	C8
	WF-N84	-	B	P84	+	C5
	WF-N85	-	B	P85	+	C5
[0144]	WF-N86	-	B	P86	+	C6
	WF-N87	-	B	P87	+	C7
	WF-N88	-	B	P88	+	C3
	WF-N89	-	B	P89	+	C2
	WF-N90	-	B	P90	+	C3
	WF-N91	-	B	P91	+	C5
	WF-N92	-	B	P92	+	C6
	WF-N93	-	B	P93	+	C4
	WF-N94	-	B	P94	+	C5
	WF-N95	-	B	P95	+	C4
	WF-N96	-	B	P96	+	C6
	WF-N97	-	B	P97	+	C5
	WF-N98	-	B	P98	+	C3
	WF-N99	-	B	P99	+	C3
	WF-N100	-	B	P100	+	C5
[0145]				P101	+	C8

[0146] 注:共10个显色梯度:C1~C9,B。其中B表示“blank”,无条带;C1~C9表示显色强度,其中数字越大表示显色越浅。“-”表示为阴性;“+”表示确诊为阳性。

[0147] 表8临床样本测试结果汇总表

[0148]

金标准 \ 本发明试纸条	阴性	阳性	总计
阴性	100	0	100
阳性	1	100	101
总计	101	100	201

[0149] 从表7和表8的结果中看出,小批量的临床样本测试显示:灵敏度 $\geq 99\%$,特异性 $\geq 99\%$,满足预期要求。

[0150] 试验例8本发明的试纸条的临床样本跟踪测试

[0151] 采用本发明实施例6的试纸条(简称试纸条1)以及对比试纸条(简称试纸条2)对5例HIV阳性患者的高危人群进行为期2个月的跟踪,比较窗口时间,结果如表9所示。对比试纸条的试剂配方和制备方法均与实施例6的试纸条相同,唯一不同之处在于:检测区仅包被有HIV特异性重组抗原gp41和gp36,没有包被HIV特异性重组抗原gp160。

[0152] 表9可疑患者的跟踪测试

[0153]

周数(W) 样本编号		1	2	3	4	5	6	7	8
		No.1	试纸条1	B	B+	C8	C7+	C7+	C6+
	试纸条2	B	B	C9	C7	C7	C6	C4	C4
No.2	试纸条1	B	B+	B+	C8	C7	C6+	C6+	C4
	试纸条2	B	B	B	C8	C7	C6	C6	C5
No.3	试纸条1	B+	B+	C9	C7+	C6	C5	C4+	C4+

[0154]

	试纸条2	B	B	B	C7	C6	C6	C4	C4
No.4	试纸条1	B+	C9	C8	C7+	C7+	C7+	C5	C5
	试纸条2	B	B+	C9	C7	C7	C7	C6	C6
No.5	试纸条1	C9	C8	C6	C6+	C4	C4	C3+	C3+
	试纸条2	B	B	C6	C6	C4	C4	C3	C3

[0155] 注:共10个显色梯度:C1~C9,B。其中B表示“blank”,无条带;C1~C9表示显色强

度,其中数字越大表示显色越浅。“-”表示为阴性;“+”表示确诊为阳性。

[0156] 从表9结果可以看出,gp160的加入使得部分患者的窗口时间缩短了一周左右的时间(可疑人员2,5),当这些样本对比试纸条测试为阴性时,本发明的试纸条却显示为隐约条带,可给予可疑人员一些提示或者预防措施来减少传播的危险;或者使得部分样本由普通的隐约条带显色为更加深色条带(可疑人员 1,3,4),从而使医护人员及早确诊或采取治疗。后期经“金标准”western blot确诊显示该5例样本gp160,gp41带出现条带,与本发明的试纸条相一致,该试验有力地说明了本发明的试纸条的灵敏度极佳。

[0157] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0158] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

