

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710064894.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月22日

[11] 公开号 CN 101021532A

[22] 申请日 2007.3.28

[21] 申请号 200710064894.0

[71] 申请人 北京英诺特生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区科兴路7号601室

[72] 发明人 王健 陈廷友 王志新 翟立伟
孔祥菊 毕大伟 张秀杰

[74] 专利代理机构 北京中海智圣知识产权代理有限公司

代理人 曾永珠

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供一种联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条及其制备技术。该层析条以胶体金作为标记物，在 PVC 背板上端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附有吸收垫；所述复合物垫为涂覆有抗原-胶体金复合物的玻璃纤维素膜，其特征在于：所述硝基纤维素膜上包含三条包被线，分别包被有抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。本发明的层析条采用免疫捕获法原理测定 IgM 抗体，双抗原夹心法原理测定 IgG 抗体，通过一次操作即可联合检测出特异性 IgM、IgG 抗体，简化了操作过程，且检测结果的总体符合率较高。

1. 一种联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条，所述层析条在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附有吸收垫；所述复合物垫为涂覆有抗原—胶体金复合物的玻璃纤维素膜，其特征在于：所述硝基纤维素膜上包含三条包被线，分别包被有抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。

2. 一种制备权利要求 1 所述的联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条的方法，包括以下步骤：

(1) 制备特异性抗原、与抗原相应的抗体、抗 IgM 抗体：采用常规制法制备特异性抗原、与已知抗原相应的动物抗体、抗 IgM 抗体，浓度分别为 1mg/ml~4mg/ml、3mg/ml~6mg/ml、0.5mg/ml~4mg/ml；

(2) 制备抗原—胶体金复合物：采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，在金溶胶中按照 20 μ g/ml~80 μ g/ml 比例加入纯化的已知抗原，经封闭、离心处理后，取沉淀稀释至 A₅₃₀ 值为 0.5~3，备用；

(3) 取硝基纤维素膜贴在 PVC 背板中间，将抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体分开包被在硝基纤维素膜上；将抗原—胶体金复合物涂覆在玻璃纤维素膜上制备复合物垫；

(4) 在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附吸收垫；

(5) 将 PVC 背板及其贴附的材料切成适宜宽度的层析条。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于：所制备的抗 IgM 抗体为单克隆或多克隆抗体。

4. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于：所述抗原—胶体金复合物以喷涂、敷涂或浸泡的方式涂覆在玻璃纤维素膜上。

5. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于：所述硝基纤维素膜在包被抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体后还可以进行封闭处理。

6. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于：所述层析条在制备完成后装入塑料板卡内。

联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种利用免疫测定法检测特异性 IgM、IgG 抗体的层析条及其制备技术，具体地说，涉及一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应对特异性 IgM、IgG 抗体进行联合检测的层析条及其制备方法。

背景技术

免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 和免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 是人或动物体内最重要的两种抗体。一种抗原 (细菌或病毒等) 进入机体后，最早出现的免疫球蛋白是 IgM 抗体，之后出现 IgG 抗体。尽管在某些情况下还可能出现 IgA 抗体，由于其临床意义同 IgG 基本相同，并且 IgA 含量很低，在临床检测中的实际意义不大，因而在临床检测中一般不予以区分。通过检测机体内 IgM、IgG 抗体的存在，可以诊断人或动物对特定抗原的免疫反应状态。血清内若检测出特异性 IgM 抗体，表明有近期感染的发生，但 IgM 抗体半衰期较短，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。

目前单独检测特异性 IgM 或 IgG 抗体的方法很多，比如 ELISA 法、双抗原夹心法、胶体金免疫层析法等，但还未有通过一次操作过程即可联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的方法。虽然单独检测 IgM 和 IgG 抗体后，再综合分析检测结果对疾病的诊断并无影响，但操作过程繁琐，检测不够方便快捷。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种胶体金层析条，通过一次操作过程即可联合检测特异性 IgM、IgG 抗体，从而简化操作过程，实现快速检测的目的。

本发明的技术方案如下：

一种联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条，所述层析条在 PVC 背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附有吸收垫；所述复合物垫为涂覆有抗原—胶体金复合物的玻璃纤维素膜，其特征在于：所述硝基纤维素膜上包含三条包被线，分别包被有抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。

本发明还提供了所述胶体金层析条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 制备特异性抗原、与抗原相应的抗体、抗 IgM 抗体：采用常规制法制备特异性抗原、

与已知抗原相应的动物抗体、抗 IgM 抗体，浓度分别为 1mg/ml~4mg/ml、3mg/ml~6mg/ml、0.5mg/ml~4mg/ml；

(2) 制备抗原-胶体金复合物：采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，在金溶胶中按照 20 μ g/ml~80 μ g/ml 比例加入纯化的已知抗原，经封闭、离心处理后，取沉淀稀释至 A_{530} 值为 0.5~3，备用；

(3) 取硝基纤维素膜贴在 PVC 背板中间，将抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体分开包被在硝基纤维素膜上；将抗原-胶体金复合物涂覆在玻璃纤维素膜上制备复合物垫；

(4) 在 PVC 背板上端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附吸收垫；

(5) 将 PVC 背板及其贴附的材料切成适宜宽度的层析条。

所制备的抗 IgM 抗体可以为单克隆或多克隆抗体。

所述抗原-胶体金复合物可以喷涂、敷涂或浸泡的方式涂覆在玻璃纤维素膜上。

所述硝基纤维素膜在包被抗 IgM 抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体后可以进行封闭处理，以减少非特异性反应。

所述层析条在制备完成后可以装入塑料板卡内。

本发明的胶体金层析条，以胶体金作为标记物，采用免疫捕获法原理测定 IgM 抗体，双抗原夹心法原理测定 IgG 抗体，通过一次操作即可联合检测出特异性 IgM、IgG 抗体，简化了操作过程，且检测结果的总体符合率较高。

具体实施方式

实施例 1：检测人巨细胞病毒(HCMV) IgM、IgG 抗体的胶体金层析条的制备方法

具体制备过程如下：

(1) 采用基因重组法制备浓度为 3mg/ml 的 HCMV 抗原，动物免疫法制备浓度为 5mg/ml 的兔抗 HCMV 抗体，单克隆抗体制备法制备浓度为 2mg/ml 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体，备用。

(2) 制备抗原-胶体金的复合物：采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，在金溶胶中按照 80 μ g/ml 比例加入纯化的 HCMV 抗原，经封闭、离心处理后，取沉淀稀释至 A_{530} 值 2.0，备用；

(3) 包被鼠抗人 IgM 单克隆抗体、HCMV 抗原、兔抗 HCMV 抗体：取硝基纤维素膜贴于 PVC 背板中间，设定划膜机涂覆参数为 1 μ l/cm。取 5mg/ml 的兔抗 HCMV 抗体 1.5ml、3 mg/ml 的 HCMV 抗原 1.5ml、2mg/ml 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体 1.5ml，分别接到划膜机的 A、B、C 管道接口。将贴有硝基纤维素膜的 PVC 背板置于划膜机的往复运动平台上。开启划膜机，在硝基纤维素膜上涂覆兔抗 HCMV 抗体、HCMV 抗原、鼠抗人 IgM 单克隆抗体，在 37 $^{\circ}$ C 干燥

2 小时。将背板置于 1%聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟，晾干，37℃干燥 2 小时。

(4) 将抗原-胶体金的复合物涂覆在玻璃纤维素膜上：设定划膜机喷涂参数为 25.0 μ l/cm，将抗原-胶体金复合物连接到划膜机的 D 管道接口。取 30cm \times 12cm 的玻璃纤维素膜放置往复运动平台上。开启划膜机，在玻璃纤维素膜上喷涂抗原-胶体金复合物制成复合物垫，37℃干燥 2 小时。

(5) 在 PVC 背板上端顺次相互搭接地贴上复合物垫和样品垫，另一端贴上吸收垫，将 PVC 背板及其贴附的材料切成 4mm 宽层析条。将层析条放入塑料板卡内，用压卡机压实。

当加入被检测样品后，通过层析作用，样品和抗原-胶体金复合物向吸收垫一端移动。当样品通过鼠抗人 IgM 单克隆抗体包被线时，其中的 IgM 抗体与鼠抗人 IgM 单克隆抗体结合，如果 IgM 抗体中含有针对特异性抗原的 IgM 抗体，则抗原-胶体金复合物与之结合，在该处显示一条紫红色条带。如果被检测样品中含有针对特异性抗原的特异性 IgG 抗体时，当其移动到特异性抗原包被线时，抗体既与特异性抗原结合，也与抗原-胶体金复合物结合，在此处显示一条紫红色条带。抗原-胶体金复合物移动到与其相应抗体的包被线处，与抗体结合，显示一条紫红色条带。在抗 IgM 抗体包被处显示紫红色条带，表明被检测样品中含有针对特异性抗原的 IgM 抗体。在抗原包被处显示紫红色条带，表明被检测样品中含有针对特异性抗原的 IgG。在少数情况下可能含有 IgA，但其临床意义同 IgG 基本相同，在临床检测中可以不必区分 IgG 或 IgA。如果在抗原包被处和抗 IgM 抗体包被处同时显示紫红色条带，仅判定为被检测样品中含有针对特异性抗原的 IgM 抗体。如果在抗原包被处、抗 IgM 抗体包被处没有紫红色条带，判定为被检测样品中不含有特异性 IgG、IgM。在针对特异性抗原的抗体包被处显示紫红色条带，表明该检测系统的检测结果有效；如果该处没有显示紫红色条带，表明该检测系统失效，检测结果无效。

实施例 2：检测人巨细胞病毒(HCMV) IgM、IgG 抗体的检测结果

应用制备的胶体金层析条对临床诊断明确的抗 HCMV IgG 阳性血清 383 份和阴性血清 1979 份进行了检测，并与间接法 ELISA 试剂单独检测抗 HCMV IgG 的结果进行了对比，结果分别示于表 1 和表 2。

表 1 胶体金层析条对抗 HCMV IgG 临床血清的检测结果

临床诊断明确样品 胶体金检测结果		临床血清		合计
		+	-	
胶体金	+	362	2	364
	-	21	1977	1998
合计		383	1979	2362

表 2 胶体金与 ELISA 检测抗 HCMV IgM 的结果比较

胶体金检测结果 \ ELISA 检测结果		ELISA		合计
		+	-	
胶体金	+	362	2	364
	-	8	1990	1998
合计		370	1992	2362

由表 1 数据可计算得到约登指数为 $362/(362+21)+1977/(2+1977)-1=0.94$ ，说明检测结果与样品真实情况的总体符合率很高。由表 2 数据可计算得到本发明检测结果与 ELISA 检测结果的总体符合率为： $(362+1990)/2362 \times 100\% = 99.6\%$ ，这表明两种检测方法检测 IgG 具有高度一致性。

应用制备的胶体金层析条对临床诊断明确的抗 HCMV IgM 阳性血清 176 份和阴性血清 2433 份进行了检测，并与捕获法 ELISA 试剂单独检测抗 HCMV IgM 抗体的结果进行了对比，结果分别示于表 3 和表 4。

表 3 胶体金层析条对抗 HCMV IgM 临床血清的检测结果

临床诊断明确样品 \ 胶体金检测结果		临床血清		合计
		+	-	
胶体金	+	159	3	162
	-	17	2430	2447
合计		176	2433	2609

表 4 胶体金与 ELISA 检测抗 HCMV IgM 的结果比较

胶体金检测结果 \ ELISA 检测结果		ELISA		合计
		+	-	
胶体金	+	159	3	162
	-	7	2440	2447
合计		166	2443	2609

由表 3 数据可计算得到约登指数为 $159/(159+17)+2430/(3+2430)-1=0.90$ ，说明检测结果与样品真实情况的总体符合率很高。由表 4 数据可计算得到本发明检测结果与 ELISA 检测结果的总体符合率为： $(159+2440)/2609 \times 100\% = 99.6\%$ ，这表明两种检测方法检测 IgM 具有高度一致性。

以上分析结果表明，本发明联合检测特异性 IgM、IgG 抗体的胶体金层析条与单独检测 IgG 或 IgM 抗体的 ELISA 试剂具有相似的检测结果，本发明的检测结果能够符合临床检测工作的需要。

专利名称(译)	联合检测特异性IgM、IgG抗体的胶体金层析条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101021532A	公开(公告)日	2007-08-22
申请号	CN200710064894.0	申请日	2007-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京英诺特生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京英诺特生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京英诺特生物技术有限公司		
[标]发明人	王健 陈廷友 王志新 翟立伟 孔祥菊 毕大伟 张秀杰		
发明人	王健 陈廷友 王志新 翟立伟 孔祥菊 毕大伟 张秀杰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/577		
其他公开文献	CN101021532B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种联合检测特异性IgM、IgG抗体的胶体金层析条及其制备方法。该层析条以胶体金作为标记物，在PVC背板上—端顺次相互搭接地贴附有样品垫、复合物垫、硝基纤维素膜，另一端贴附有吸收垫；所述复合物垫为涂覆有抗原-胶体金复合物的玻璃纤维素膜，其特征在于：所述硝基纤维素膜上包含三条包被线，分别包被有抗IgM抗体、特异性抗原、与抗原相应的抗体。本发明的层析条采用免疫捕获法原理测定IgM抗体，双抗原夹心法原理测定IgG抗体，通过一次操作即可联合检测出特异性IgM、IgG抗体，简化了操作过程，且检测结果的总体符合率较高。

		临床诊断明确样品		合计
		+	-	
胶体金检测结果	+	362	2	364
	-	21	1977	1998
合计		383	1979	2362