

[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 200910016309.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月30日

[11] 公开号 CN 101614737A

[22] 申请日 2009.6.2

[21] 申请号 200910016309.9

[71] 申请人 青岛康地恩药业有限公司

地址 266061 山东省青岛市高科园苗岭路 29
号山东高速大厦 606 室

共同申请人 青岛宝依特生物制药有限公司

[72] 发明人 蒋贻海 崔尚金 凌红丽 高亚东
贾德强

[74] 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有限公司

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种胶体金试纸条及其制备方法和应用

[57] 摘要

一种胶体金试纸条及其制备方法和应用，该试纸条有一底衬、该底衬上面的中部粘帖一包被膜，该包被膜中部有一条包被猪流感 H1N1 病毒抗体的检测线和一条包被抗鼠 IgG 抗体的控制线，包被膜的上面左右分别粘帖一涂覆金标抗体的玻璃纤维膜和吸水纸；涂覆金标抗体的玻璃纤维膜上面粘帖一样品垫。本发明利用现代国际最先进的胶体金免疫层析技术，提供一种现地农户、基层自测等用的检测猪流感 H1N1 病毒的胶体金试纸条，该试纸条具有特异性强、灵敏度高、检测速度快等优点，且不需使用仪器设备，成本低廉，操作简便，能广泛应用于现地农户、基层及个人对于猪流感 H1N1 病毒的检测。



1、一种胶体金试纸条，其特征在于有一底衬（1）、该底衬（1）上面的中部粘帖一包被膜（4），该包被膜（4）中部有一条包被猪流感 H1N1 病毒抗体的检测线（6）和一条包被抗鼠 IgG 抗体的控制线（7），包被膜（4）的上面左右分别粘帖一涂覆金标抗体的玻璃纤维膜（3）和吸水纸（5）；涂覆金标抗体的玻璃纤维膜（3）上面粘帖一样品垫（2）。

2、根据权利要求 1 所述的胶体金试纸条，其特征在于所述的检测线（6）中包被的猪流感 H1N1 病毒的抗体为高纯度的抗单克隆抗体和/或多克隆抗体。

3、权利要求 1 所述的胶体金试纸条的制备方法，其特征在于先制备包被膜（4）：将用包被缓冲液稀释的猪流感 H1N1 病毒的单克隆抗体或抗猪流感 H1N1 病毒的多克隆抗体和抗鼠 IgG 抗体稀释，并将二者分别平行地喷于硝酸纤维膜中部上，渗入硝酸纤维膜后分别形成检测线（6）和控制线（7）；再制备涂敷金标抗体的玻璃纤维膜（3）；然后将包被膜（4）粘帖在底衬（1）上面的中部，在包被膜（4）的上面左右分别粘帖一涂覆金标抗体的玻璃纤维膜（3）和吸水纸（5）；涂覆金标抗体的玻璃纤维膜（3）上面粘帖一样品垫（2），做成大板，切割即得胶体金试纸条。

4、权利要求 1 所述的胶体金试纸条在检测猪流感 H1N1 病毒中的应用。

一种胶体金试纸条及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于预防兽医学检验领域，具体是涉及一种胶体金试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)属于正粘病毒科A型流感病毒属，能引起不同日龄、性别和品种的猪发生急性、热性和高度接触性呼吸道传染病，其临床上以突发、高热、咳嗽、呼吸困难、衰竭和死亡为特征。1918年美国首次报道了猪流感的暴发，1930年 Shope 从猪体中首次分离了 H1N1 亚型猪流感病毒。迄今为止，猪流感已遍布美、欧、亚、非等世界各地。目前，已经发现的 SIV 包括 H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H3N6、H4N6、H5N1 和 H9N2 等亚型，但以经典 H1N1、禽类 H1N1 和类人 H3N2 亚型毒株为主。我国猪流感于 1969 年由台湾首次报道，1991 年首次从猪群中分离到 H1N1 亚型猪流感病毒。郭元吉(1985)、倪汉忠(2000)、张苏华(2002)、李海燕(2003)等对我国不同地区做了血清学调查，结果表明，随年份的递增，我国猪流感阳性率增加。

目前，对流感病毒的检测方法，主要有病毒分离、血清学诊断以及分子生物学方法，但病毒分离时间长，要求条件高，分离率低，而采集患者急性期与恢复期双份血清进行抗体测定来确认，又不能及时进行诊断，因此，使这两种方法在使用中受到很大的限制，而免疫金标法(Immunochromatography Assay)是九十年代初发展起来的，因其快速、操作简便、试剂稳定、可室温储运、不易污染的特点得到广泛的应用。它是免疫亲和技术、印记技术、免疫标记技术和层析技术的组合。将包被抗体、胶体金标记抗体固相化，与样本吸附材料等组合在一起，制备出免疫层析诊断试条，使用时只需要把该试条下插入样品溶液，数分钟就可以判断结果。与免疫渗滤法比较，稳定性好，操作更简便、快速，且由于为干试条形式，无需低温保存，储运也方便，但是目前关于猪流感 H1N1 病毒的检测未见有可用的装置或者其它的检测工具。

发明内容

本发明的目的是提供一种胶体金试纸条及其制备方法和应用，能满足现有技术的上述需求。

一种胶体金试纸条，其特征在于有一底衬、该底衬上面的中部粘帖一包被膜，该包被膜中部有一条包被猪流感 H1N1 病毒抗体的检测线和一条包被抗鼠 IgG 抗体的控制线，包被膜的上面左右分别粘帖一涂覆金标抗体的玻璃纤维膜和吸水纸；涂覆金标抗体的玻璃纤维膜上面粘帖一样品垫。

上述胶体金试纸条的制备方法，其特征在于先制备包被膜，将用包被缓冲液稀释的猪流感 H1N1 病毒的单克隆抗体或抗猪流感 H1N1 病毒的多克隆抗体和抗鼠 IgG 抗体稀释，并将二者分别喷于硝酸纤维膜

中部上, 分别形成检测线和控制线, 再制备涂敷金标抗体的玻璃纤维膜, 然后将包被膜粘贴在底衬上, 在包被膜的上面左右分别粘帖一涂覆金标抗体的玻璃纤维膜和吸水纸; 涂覆金标抗体的玻璃纤维膜上面粘帖一样品垫, 做成大板, 切割即得胶体金试纸条。

上述胶体金试纸条在检测猪流感 H1N1 病毒中的应用。

本发明利用现代国际最先进的胶体金免疫层析技术, 提供一种现地农户、基层自测等用的检测猪流感 H1N1 病毒的胶体金试纸条, 该试纸条具有特异性强、灵敏度高、检测速度快等优点, 且不需使用仪器设备, 成本低廉, 操作简便, 能广泛应用于现地农户、基层及个人对于猪流感 H1N1 病毒的检测。

附图说明

附图为本发明试纸条的纵剖结构示意图。

具体实施方式:

胶体金试纸条的制备

猪流感 H1N1 病毒的单克隆抗体细胞株的制备和检定:

慢慢搅动含有 H1N1 的鸡胚尿囊液, 并加入氯化钠, 使其终浓度为 0.5mol/L, 再加入 10% (重量百分数) 的聚乙二醇 6000 (PEG6000), 4°C 过夜, 8000r/min 离心 30 分钟, 收集病毒沉淀, 将病毒沉淀用磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解, 4°C 过夜, 10000r/min 离心 1 小时, 所得沉淀即为浓缩的病毒, 储存在 -20°C 低温冰箱中备用。

从 -20°C 低温冰箱取出浓缩的病毒溶化后, 给 BALB/C 小鼠多点皮下注射 (0.5ml / 只), 间隔 15 天, 共免疫 3 次, 融合前 3 日, 在小鼠腹腔以上述浓缩的病毒 0.25 ml 的抗原量进行攻击。用含 10% 体积百分数小牛血清的 DMEM 培养 SP2/0 细胞和免疫的 BALB/C 鼠的淋巴细胞, 分别按 2×10^7 和 2×10^8 比例用聚乙二醇 1500 (PEG1500) 融合, 将融合孔上清液分别加在猪流感 H1N1 病毒抗原包被的聚乙烯 96 孔板上, 用 ELISA 法检测, 确定细胞阳性孔。将检测所得 9 个阳性株以有限稀释法进行亚克隆, 最后获得 4 株。将亚克隆所得的单抗细胞株于体外进行传代培养, 并进行反复液氮冻存和复苏, 产生猪流感 H1N1 病毒单克隆抗体阳性率 100%, 且保持稳定分泌抗体的能力, 其 ELISA 效价达到 1:1000 以上。在无菌条件下每只小鼠腹腔注射液体石蜡 0.5ml, 一周后每只小鼠腹腔注射扩大培养为 $1-3 \times 10^6$ / 0.2ml 的杂交瘤细胞。注射细胞株 7-10 天后, 或小鼠濒死前一次采集腹水, -20°C 下保存。采用硫酸铵沉淀法粗提, 进而用 HITraprProteinA 柱纯化, 经 SDS-PAGE 电泳检定, 仅显示单一蛋白带。采用 NaSCN 竞争 ELISA 实验, 测定其 ED_{50} 的下降值, 来间接反映其抗体亲合力的大小。选择其中亲和力较好的 3 株, 进行亚型检定, 用免疫扩散法对细胞培养上清液的单抗进行 Ig 亚类的检测, 上述 3 株单克隆抗体的亚类分别是: IgG1 有一株; IgG2a 有一株; IgG2b 有一株。用相加 ELISA 法对非 IgM 的 3 株单抗的抗原结合位

点进行检测。结果表明,这3株中,有三种不同的抗原结合位点,对于猪流感H1N1病毒多具有很好的特异性。

包被膜4的制备:

包被缓冲液的制备:将0.05M、pH9.6的碳酸盐缓冲液(PBS),用0.22 μ m膜过滤,置4℃备用,有效期7天。

封闭缓冲液的制备:将0.01M、pH7.0的PBS,用0.22 μ m膜滤过,置4℃备用,有效期7天。

配制封闭工作液:将含2%BSA、2%脱脂奶、0.01M、pH7.0的PBS,用0.22 μ m膜滤过,置4℃备用,有效期3天。

检测线6制备:调试喷膜机,喷液量为25微升/35厘米,用包被缓冲液稀释抗猪流感H1N1病毒的单克隆抗体,浓度为70 μ g/ml,在硝酸纤维膜中部上划线,室温晾干20分钟。

控制线7制备:调试喷膜机,喷液量为25微升/35厘米,用包被缓冲液稀释抗鼠IgG抗体,浓度为2mg/ml,在硝酸纤维膜上划线,该线与检测线平行,两线间隔5mm,应细致均匀,室温晾干20分钟。该两线用的液体分别渗入硝酸纤维膜中,即分别为检测线6和控制线7。

包被膜4制备:用上述封闭工作液将含有检测线6和控制线7的硝酸纤维膜37℃封闭60分钟,取出后置37℃烘干处理两小时,封袋备用。

涂覆金标抗体的玻璃纤维膜3的制造

氯金酸的配制:将10g氯金酸用1000ml双蒸水溶解配成1%溶液,置4℃备用,有效期3天。

柠檬酸三钠的配置:用双蒸水溶解柠檬酸三钠,配成1%溶液,置4℃备用,有效期3天。

0.1M碳酸钾的配制:将13.8g碳酸钾用1000ml双蒸水配制成0.1M碳酸钾溶液,0.22 μ m膜滤过,置4℃备用,有效期7天。

标记洗涤液的配制:将20gBSA用1000ml0.01M、pH7.0PBS配置成2%BSA溶液,0.22 μ m膜滤过,置4℃备用,有效期15天。

金标抗体保存液的配置:将10gBSA、5g脱脂奶粉、0.5gNa₂S₂O₃和1mlTween-20在1000ml0.01M、pH7.0PBS中溶解,用0.22 μ m膜滤过,置4℃备用,有效期15天。

胶体金的烧制:用双蒸水将1%氯金酸稀释成0.01%,置电炉煮沸,按每100毫升0.01%氯金酸加入4毫升1%柠檬酸三钠,继续煮沸,直到液体呈亮红色即停止加热,冷却至室温后补足失水。外观应纯净,透亮,无沉淀和漂浮物。

金标抗体的制备:用0.1M碳酸钾调胶体金pH值至7.6,按10微克抗体/毫升胶体金加入抗猪流感H1N1病毒的单克隆抗体,混匀,静置30分钟,12000rpm离心30分钟,弃上清,沉淀用标记洗涤液洗

涤两次，最后一次弃去上清，将沉淀用十分之一初始胶体金体积的金标抗体保存液溶解，置4℃备用，有效期7天。

将标记好的胶体金均匀地铺在玻璃纤维膜上，每毫升溶液铺10平方厘米，干燥，封袋，置4℃备用。

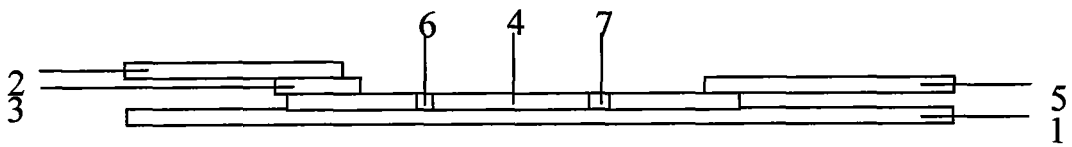
胶体金试纸条的制作

所述底衬1、样品垫2和吸水纸5是本领域通用的材料。将上述包被膜4、覆金标抗体的玻璃纤维膜3、底衬1、样品垫2和吸水纸5依次粘贴起来，得到试纸板，最后将该试纸板切割成不同宽度的试纸条即可。

上述的胶体金试纸条在检测猪流感H1N1病毒中的应用

用本胶体金试纸条检测血液样品中猪流感H1N1病毒时，如果检测血液样品中含有猪流感H1N1病毒，将该液体滴加在本试纸条的样品垫2上，该液体随后沿着试纸条进入试纸条上涂覆金标抗体的玻璃纤维膜3中时，血液样品中含有的猪流感H1N1病毒与本试纸条上涂覆金标抗体的玻璃纤维膜3中的猪流感H1N1病毒的单克隆抗体形成相应的复合物，前行与包被膜4上的猪流感H1N1病毒的单克隆抗体或抗猪流感H1N1病毒的多克隆抗体形成紫红色线条，即在检测线6处形成紫红色条带，继续前行与包被膜4中的抗鼠IgG抗体形成紫红色线条，即在控制线7处形成紫红色条带。如果控制线7不出现紫红色条带，则说明该试纸条失效。如果检测血液样品中不含有猪流感H1N1病毒，则检测线6处不会出现紫红色条带，而控制线7处必定仍出现紫红色条带；如果控制线7不出现紫红色条带，则说明该试纸条失效。

本试纸条也可以用来检测猪口腔或者肛门拭子中含有的液体样品，把口腔或者肛门拭子中的液体离心后，将所得的液体滴加在本试纸条的样品垫2上，出现的结果和上述过程相同。



专利名称(译)	一种胶体金试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101614737A	公开(公告)日	2009-12-30
申请号	CN200910016309.9	申请日	2009-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	青岛康地恩药业股份有限公司 青岛宝依特生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	青岛康地恩药业有限公司 青岛宝依特生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	青岛康地恩药业股份有限公司 青岛宝依特生物制药有限公司		
[标]发明人	蒋贻海 崔尚金 凌红丽 高亚东 贾德强		
发明人	蒋贻海 崔尚金 凌红丽 高亚东 贾德强		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/552 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/52		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种胶体金试纸条及其制备方法和应用，该试纸条有一底衬、该底衬上面的中部粘帖一包被膜，该包被膜中部有一条包被猪流感H1N1病毒抗体的检测线和一条包被抗鼠IgG抗体的控制线，包被膜的上面左右分别粘帖一涂覆金标抗体的玻璃纤维膜和吸水纸；涂覆金标抗体的玻璃纤维膜上面粘帖一样品垫。本发明利用现代国际最先进的胶体金免疫层析技术，提供一种现地农户、基层自测等用的检测猪流感H1N1病毒的胶体金试纸条，该试纸条具有特异性强、灵敏度高、检测速度快等优点，且不需使用仪器设备，成本低廉，操作简便，能广泛应用于现地农户、基层及个人对于猪流感H1N1病毒的检测。

