



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102928589 A

(43) 申请公布日 2013.02.13

(21) 申请号 201210460541.3

(22) 申请日 2012.11.15

(71) 申请人 南京凯基生物科技发展有限公司

地址 210012 江苏省南京市雨花区长虹南路
439号15栋正庭健康园三楼

(72) 发明人 不公告发明人

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法。本发明的试纸条采用免疫捕获法原理测定 IgG 抗体,通过一次操作即可联合检测出呼吸道合胞病毒、腺病毒、流行性感冒病毒、肺炎支原体 IgG 抗体,简化了操作过程;用本发明所述的试纸条检测,简便、快速、准确,结果清晰易辨,适合大批量检测,适用于基层筛查和流行病学调查。

1. 一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,包括底板,在底板的一面顺次相互搭接地粘附有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其特征在于:所述样品垫上贴有全血滤血膜,所述金标垫为涂覆有兔抗人 IgG 抗体-胶体金复合物的玻璃纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上有四条检测线和一条质控线,所述四条检测线分别包被有呼吸道合疱病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感胃病毒重组抗原、肺炎支原体重组抗原,所述质控线上包被有羊抗兔抗体。

2. 根据权利要求 1 所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,其特征在于:重组兔抗人 IgG 抗体-胶体金复合物以浸泡的方式涂覆在玻璃纤维素膜上干燥而得,浸泡条件为室温浸泡 3 小时,干燥条件为 37°C 干燥 5 小时。

3. 根据权利要求 1 所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,其特征在于:所述呼吸道合疱病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感胃病毒重组抗原、肺炎支原体重组抗原、羊抗兔抗体,分别以 0.03 ~ 0.05mg/mL 的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥,干燥条件为 37°C 干燥 5 小时。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,其特征在于:样品垫一端压住金标垫一端 0.5 ~ 1mm,金标垫另一端压住硝酸纤维素膜一端 0.5 ~ 1mm,吸水垫的一端压住硝酸纤维素膜另一端 0.5 ~ 1mm。

5. 一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试剂盒,其特征在于:包含样本处理瓶和权利要求 1 所述的检测试纸条,所述样本处理瓶内装有样本处理液。

6. 根据权利要求 5 所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试剂盒,其特征在于:所述的样本处理液为 pH7.0±0.2 的磷酸盐缓冲液。

7. 一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试剂盒的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将呼吸道合疱病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感胃重组抗原、肺炎支原体重组抗原、羊抗兔抗体分别稀释到包被浓度 0.03 ~ 0.05mg/mL,将五种包被液分别划到硝酸纤维素膜上的指定位置,将已包被的硝酸纤维素膜 37°C 干燥 5 小时备用;

(2) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中按照 20 μg/mL ~ 40 μg/mL 比例缓慢加入兔抗人 IgG 抗体,充分反应后,以 8000rpm 离心 30 分钟,弃上清,稀释至原体积的 1/3,然后用混合液室温浸泡金标垫 3 小时,37°C 干燥 5 小时备用;

(3) 将全血滤血膜贴在样品垫上;

(4) 在底板的一面顺次相互搭接地粘附有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,确保样品垫一端压住金标垫一端 0.5 ~ 1mm,金标垫另一端压住硝酸纤维素膜一端 0.5 ~ 1mm,吸水垫的一端压住硝酸纤维素膜另一端 0.5 ~ 1mm,得试纸条;

(5) 将试纸条放入塑料板卡内,压实,装入铝箔袋中封口;

(6) 配制 pH7.0±0.2 的磷酸盐缓冲液,作为样本处理液装入样品处理瓶,1ml/瓶;

(7) 将试纸条和样品处理瓶按照 1:1 的配比组装制成试剂盒。

呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断试剂技术领域,涉及一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法,具体涉及一种可同时检测常见呼吸道病毒感染四项指标的一板四联 IgG 抗体胶体金快速检测试纸条、试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 是人或动物体内最重要的抗体之一。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,但 IgM 在人体内的半衰期很短,往往不利于检测与诊断。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,在临床检测中得实际意义不大,因而在临床检测中一般不予以区分。通过检测体内 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。若检测出特异性 IgG 抗体,表明有近期感染的发生。IgG 在体内半衰期长,且能够稳定表达,对于疾病检测与诊断,有非常重要的意义。

[0003] 呼吸道病原体,习惯上是指一群能侵犯呼吸道的病原体。具有感染力强,传播快,发病急等特点。流行性感冒病毒是流行性感冒的病原体。经飞沫传播,侵入呼吸道粘膜柱状上皮细胞内增殖,引起细胞变性、坏死、脱落,局部粘膜充血水肿等。呼吸道合胞病毒是引起婴幼儿下呼吸道疾病最常见的病毒,大约有 60% 急性婴儿喘息性支气管炎和肺炎是由该病毒引起,在大龄儿童和成人主要引起上呼吸道感染。腺病毒是一群能在呼吸道、眼、消化道、尿道及膀胱等组织内增殖并引起疾病的病毒,腺病毒感染可常年流行,主要通过呼吸道、眼结膜或胃肠道传播,引起婴幼儿上呼吸道感染。肺炎支原体是引起原发性非典型性肺炎及其他呼吸道感染性疾病的常见病原微生物,直接借助呼吸道的飞沫传染,全年均可发病,以秋冬季节较多,主要见于儿童和青少年。一般呈散发,也可发生小流行。儿童支原体肺炎有一定的流行规律。除呼吸道外,肺炎支原体还能引起其他系统严重的并发症。

[0004] 呼吸道疾病的诊断方法主要依靠分离培养和血清学试验,包括病原体培养、冷凝聚试验、间接血凝抑制试验、补体结合试验、PCR 方法等。病原体培养、冷凝聚试验、间接血凝抑制试验、补体结合试验由于灵敏度低且特异性差大大限制了其在临床上的应用。PCR 法虽然灵敏度高特异性强,但是由于操作复杂,对操作人员的技术要求较高,也限制其临床的推广使用。目前,呼吸道疾病抗体检测是国内外公认的临床诊断呼吸道疾病感染较为可靠,但大多数只进行呼吸道疾病感染的单项指标检测。而通过联合检测呼吸道合胞病毒、腺病毒、流行性感冒、肺炎支原体这几种常见的病原微生物抗体,能够为临床快速诊断呼吸道疾病提供全面可靠的、准确的方法。

[0005] 目前联合检测呼吸道疾病感染 IgG 抗体的方法不多,还未有通过一次操作过程即可联合检测呼吸道疾病感染病原特异性 IgG 抗体的方法。虽然单独检测病原 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

[0006] 针对现有检测技术的不足,本发明的目的在于提供一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法。采用本发明的试纸条或试剂盒,可通过一次操作实现快速检测呼吸道合胞病毒、腺病毒、流行性感、肺炎支原体抗体,从而简化操作过程,实现快速检测的目的。

[0007] 本发明的第一个目的是这样实现的:

[0008] 一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,包括底板,在底板的一面顺次相互搭接地粘附有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫上贴有全血滤血膜,所述金标垫为涂覆有兔抗人 IgG 抗体-胶体金复合物的玻璃纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上有四条检测线和一条质控线,所述四条检测线分别包被有呼吸道合胞病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感、肺炎支原体重组抗原,所述质控线上包被有羊抗兔抗体。

[0009] 优选地,所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,其中的重组兔抗人 IgG 抗体-胶体金复合物以浸泡的方式涂覆在玻璃纤维素膜上干燥而得,浸泡条件为室温浸泡 3 小时,干燥条件为 37°C 干燥 5 小时。

[0010] 优选地,所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,其中所述呼吸道合胞病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感、肺炎支原体重组抗原、羊抗兔抗体,分别以 0.03 ~ 0.05mg/mL 的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥,干燥条件为 37°C 干燥 5 小时。

[0011] 进一步优选地,所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试纸条,其中样品垫一端压住金标垫一端 0.5 ~ 1mm,金标垫另一端压住硝酸纤维素膜一端 0.5 ~ 1mm,吸水垫的一端压住硝酸纤维素膜另一端 0.5 ~ 1mm。

[0012] 本发明的第二个目的是这样实现的:

[0013] 一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试剂盒,包括样本处理瓶和检测试纸条,所述样本处理瓶内装有样本处理液,所述的检测试纸条同实现本发明第一个目的所述的技术方案。

[0014] 优选地,所述呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试剂盒,其中所述的样本处理液为 pH7.0±0.2 的磷酸盐缓冲液。

[0015] 本发明的第三个目的是这样实现的:

[0016] 一种呼吸道疾病 IgG 抗体的胶体金法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0017] (1) 将呼吸道合胞病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感、肺炎支原体重组抗原、羊抗兔抗体分别稀释到包被浓度 0.03 ~ 0.05mg/mL,将五种包被液分别划到硝酸纤维素膜上的指定位置,将已包被的硝酸纤维素膜 37°C 干燥 5 小时备用;

[0018] (2) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中按照 20 μg/mL ~ 40 μg/mL 比例缓慢加入兔抗人 IgG 抗体,充分反应后,以 8000rpm 离心 30 分钟,弃上清,稀释至原体积的 1/3,然后用混合液室温浸泡金标垫 3 小时,37°C 干燥 5 小时备用;

[0019] (3) 将全血滤血膜贴在样品垫上;

[0020] (4) 在底板的一面顺次相互搭接地粘附有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,确保样品垫一端压住金标垫一端 0.5 ~ 1mm,金标垫另一端压住硝酸纤维素膜一端

0.5 ~ 1mm,吸水垫的一端压住硝酸纤维素膜另一端 0.5 ~ 1mm,得试纸条;

[0021] (5) 将试纸条放入塑料板卡内,压实,装入铝箔袋中封口;

[0022] (6) 配制 pH7.0±0.2 的磷酸盐缓冲液,作为样本处理液装入样品处理瓶,1mL/瓶;

[0023] (7) 将试纸条和样品处理瓶按照 1:1 的配比组装制成试剂盒。

[0024] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和显著的进步:呼吸道疾病 IgG 抗体联合检测试剂盒(胶体金法)采用免疫捕获法原理测定 IgG 抗体,通过一次操作即可联合检测出常见四项呼吸道疾病特异性抗 IgG 抗体,简化了操作过程;所用病原抗原为多表位的重组抗原,特异性好,灵敏度高;本发明所述试剂盒检测简便、快速、准确、易于普及,特别适用于基层筛查和流行病学调查,对常见呼吸道疾病感染起到辅助诊断作用。

具体实施方式

[0025] 以下是本发明的具体实施例,对本发明的技术方案做进一步作描述,但是本发明的保护范围并不限于这些实施例。凡是不背离本发明构思的改变或等同替代均包括在本发明的保护范围之内。

[0026] 实施例 1:呼吸道疾病 IgG 抗体联合检测试剂盒(胶体金法)的构成

[0027] 1. 样品处理瓶:样品处理瓶(购自杭州北域)装有 1mL 样品处理液(磷酸缓冲液,主要原料购自国药集团)。

[0028] 2. 试纸条:60*5mm 底板(购自上海杰一公司);吸水垫为 15*5mm 的粗纤维滤纸(购自上海杰一公司);25*5mm 硝酸纤维素膜(购自 Millipore 公司)依次包被呼吸道合胞病毒重组抗原(购自 meridian 公司)、腺病毒重组抗原(购自 meridian 公司)、流行性感病毒重组抗原(购自 meridian 公司)、肺炎支原体重组抗原(购自 meridian 公司)、羊抗兔抗体(购自 abcam 公司);样品垫(购自上海杰一公司)上贴附有全血滤血膜(购自上海杰一公司);金标垫(购自上海杰一公司)上包被有兔抗人 IgG 抗体-胶体金复合物(购自 ABCAM 公司)。

[0029] 实施例 2:试剂盒的制备

[0030] 1. 样品处理液制备:制备样本处理液:配制磷酸盐缓冲液(pH7.0±0.2),分装至样品处理瓶中,1mL/瓶。

[0031] 2. 试纸条制备:

[0032] 2.1. 将呼吸道合胞病毒重组抗原、腺病毒重组抗原、流行性感重组抗原、肺炎支原体重组抗原、羊抗兔抗体抗体稀释到包被浓度 0.03 ~ 0.05mg/mL,将五种包被液分别划到硝酸纤维素膜上指定位置,将已包被的硝酸纤维素膜干燥后保存,干燥条件为 37°C 4 小时。

[0033] 2.2. 金标垫的制备:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在金溶胶中按照 20 μg/mL ~ 40 μg/mL 比例缓慢加入兔抗人抗体,充分反应后,以 8000RPM 离心 30 分钟,弃上清,加入稀释液至原体积的 1/3,然后用混合液浸泡金标垫,室温浸泡 2 小时,干燥备用,干燥条件为 37°C 4 小时。

[0034] 2.3. 将全血滤血膜贴在样品垫上。

[0035] 2.4. 反应板的制备:在底板上一端顺次相互搭接地贴附有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜,另一端贴附吸水垫;确保金标垫的上部压住硝酸纤维素膜 0.5 ~ 1mm,确保样品垫的上部压住金标垫下部 0.5 ~ 1mm,确保吸水垫的上部压住硝酸纤维素膜 0.5 ~ 1mm,并

且用力压紧,避免留有空隙影响实验结果。

[0036] 2.5. 切割装配:将反应板切成 5mm 试纸条,将试纸条放入塑料板卡内,压实,装入铝箔袋中封口。

[0037] 3. 将试纸条和样品处理瓶按照 1:1 的配比组装制成试剂盒。

[0038] 实施例 3 检测方法

[0039] 1. 按临床常规检测样本,检测样本可以为血清、全血、痰液、咽试子。如果样品无法在三日内检测,可存放在 2 ~ 8℃,保存期不要超过 7 天。

[0040] 2. 取痰液、咽试子至样品处理瓶中,将标本充分摇匀,并静置 5 分钟。血清和全血样本无需进行此步骤。

[0041] 3. 取处理后样本或血清、全血样本 100-200u1 滴加至加样窗,如果全血较为粘稠,可在加样窗滴加 1 ~ 2 滴未使用的样本处理液。

[0042] 4. 10-15 分钟后判读结果:

[0043] 4.1. 如果样本中含有呼吸道合胞病毒 IgG 抗体、腺病毒 IgG 抗体、流行性感胃病毒 IgG 抗体、肺炎支原体 IgG 抗体,则其经过金标垫时,会与兔抗人 IgG 抗体胶体金复合物结合,进而被检测线处的对应抗原捕获,聚集而形成酒红色的检测线。

[0044] 4.2. 无论样本是否含有待检测的抗体,兔抗人抗体胶体金复合物都会被 C 线处的羊抗兔抗体捕获,聚集而形成酒红色的质控线。如此线不出现,表示该试剂盒失效,检测结果无效。

[0045] 实施例 4:临床患者呼吸道疾病 IgG 抗体检测

[0046] 应用制备的呼吸道疾病抗体联合检测试剂盒(胶体金法)对临床血清样本进行了检测,并与间接法 ELISA 试剂单独检测 IgG 的结果进行了对比,结果显示试剂盒与 ELISA 检测 IgG 抗体具备相似的灵敏度和特异性,结果分别示于表 1。用本试剂盒进行一个样本的检测用时 15 分钟左右,可同时得到 4 项指标的检测结果;用 ELISA 方法进行一个血清样本的检测,用时 3 小时才得到 4 项指标的检测结果;用本试剂盒进行检测大大减少了操作时间并节省了样本使用量。

[0047] 表 1. 呼吸道疾病 IgG 临床血清检测结果

检测类别	ELISA		试剂盒	
	阳性	阴性	阳性	阴性
[0048] 呼吸道和疱病毒	13	43	13	43
腺病毒	20	45	20	45
流行性感胃病毒	26	43	27	42
肺炎支原体	38	26	38	26

专利名称(译)	呼吸道疾病IgG抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102928589A	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201210460541.3	申请日	2012-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	南京凯基生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京凯基生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京凯基生物科技发展有限公司		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呼吸道疾病IgG抗体的胶体金法检测试纸条、试剂盒及其制备方法。本发明的试纸条采用免疫捕获法原理测定IgG抗体，通过一次操作即可联合检测出呼吸道合胞病毒、腺病毒、流行性感冒病毒、肺炎支原体IgG抗体，简化了操作过程；用本发明所述的试纸条检测，简便、快速、准确，结果清晰易辨，适合大批量检测，适用于基层筛查和流行病学调查。

检测类别	ELISA		试剂盒	
	阳性	阴性	阳性	阴性
呼吸道和疱病毒	13	43	13	43
腺病毒	20	45	20	45
流行性感冒病毒	26	43	27	42
肺炎支原体	38	26	38	26