

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)



## [12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200820074597.4

[45] 授权公告日 2009 年 10 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 201331529Y

[22] 申请日 2008.4.30

[21] 申请号 200820074597.4

[73] 专利权人 天津中新科炬生物制药有限公司

地址 300150 天津市开发区第六大街 65 号

[72] 发明人 李 洲 杨发青

[74] 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司

代理人 关永琴

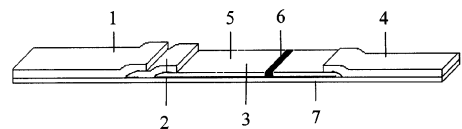
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

### [54] 实用新型名称

丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸

### [57] 摘要

本实用新型是涉及生物应用技术领域，特别涉及一种丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸。包括上样垫(1)、紧密连接于上样垫一端的含有标记 HCV 混合抗原的胶体金垫(2)、与胶体金垫的另一端紧密连接的硝酸纤维素(NC)膜(3)和紧密连接于 NC 膜另一端的吸样垫(4)。NC 膜包被有相互分离的检测(T)线(5)和质控(C)线(6)，T 线为包被在 NC 膜上的抗人 IgM 抗体，C 线为包被在 NC 膜上的抗 HCV 抗体。检测时将被检样品加在试纸条(卡)上样垫上，然后直接观察免疫反应结果，完成检测。具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。



1、一种丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸，包括上样垫(1)、紧密连接于上样垫一端的含有标记 HCV 混合抗原的胶体金垫(2)、与胶体金垫的另一端紧密连接的硝酸纤维素(NC)膜(3)和紧密连接于 NC 膜另一端的吸样垫(4)，NC 膜包被有相互分离的检测(T)线(5)和质控(C)线(6)，上样垫、胶体金垫、NC 膜和吸样垫粘贴到塑料支撑板(7)上形成试纸条，试纸条亦可以装入塑料卡中形成卡式包装，其特征在于 T 线为包被在 NC 膜上的抗人 IgM 抗体，C 线为包被在 NC 膜上的 HCV 混合抗原构成。

2、根据权利要求 1 所述的丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于所述的 HCV 混合抗原为重组表达 HCV 的核心抗原(Core)和非结构蛋白(NS)3 抗原，亦可选择性再加入 HCV 的 NS4、NS5、E1 和 E2 区抗原。

3、根据权利要求 1 所述的丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于所述的上样垫为玻璃纤维膜或无纺布，吸样垫由吸水滤纸构成。

## 丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸

### 技术领域

本实用新型是涉及生物应用技术领域，特别是涉及一种以胶体金免疫层析法快速检测丙型肝炎病毒 IgM 抗体快速检测试纸。

### 背景技术

HCV 是 1989 年由美国 Choo 等从受感染的黑猩猩血液标本中最初发现，主要由血液、体液传播，占输血后肝炎的 70%。据世界卫生组织统计，全球估计约 1.7 亿人感染 HCV。丙型肝炎慢性化率为 50%—85%，其中又有 20% 可发展为肝纤维化，危害十分严重。我国 HCV 抗体携带者达 4 千万左右。到目前为止丙型肝炎既无有效疫苗，亦无有效的治疗方法，预防感染是唯一有效的方法。HCV 抗体检查和乙肝表面抗原 (HBsAg)、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗体及梅毒 (TP) 抗体检查是我国法定的四个血源性筛查项目，意义十分重要。

目前 HCV 抗体检测试剂主要检测 HCV IgG。IgM 检测只有为数不多的研究报道，集中于用酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 进行检测。对 IgG 检测不能说明患者是现症感染或既往感染，虽然 IgM 的检出率为 IgG 的 50%—80%，但 IgM 检测阳性基本说明患者是现症感染。除此之外，IgM 抗体和体内病毒复制即 HCV RNA 检出率相关；和体内体内肝炎发展程度、肝细胞坏死相关；在对 HCV 病人治疗过程中，IgM 的变化亦提示治疗效果的好坏；另外 IgM 的出现和 HCV 的不同亚型感染相关，因而对 HCV IgM 检测具有积极的参考意义。

运用免疫层析胶体金技术检测 HCV IgM 尚无报道。免疫层析胶体金技术是新型的诊断技术，已得到较为广泛运用，基本原理如下：利用胶体金标记一种抗原或抗体，在试剂的 NC 膜上包被相应的配对抗原或抗体，检测时当样品中含相应的特异性抗体或抗原时，胶体金标记颗粒和样品中配体相结合形成复合物，然后在 NC 膜上层析，再被包被抗原或抗体捕获，形成肉眼可见的检测 (T) 线，通过检测线的有无实现对结果的判定。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

### 发明内容

本实用新型的目的是提供一种 HCV IgM 抗体快速检测试纸，具有操作

简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

本实用新型提供一种 HCV IgM 抗体快速检测试纸。包括上样垫(1)、紧密连接于上样垫一端的含有标记 HCV 混合抗原的胶体金垫(2)、与胶体金垫的另一端紧密连接的硝酸纤维素(NC)膜(3)和紧密连接于 NC 膜另一端的吸样垫(4)，NC 膜包被有相互分离的检测(T)线(5)和质控(C)线(6)，上样垫、胶体金垫、NC 膜和吸样垫粘贴到塑料支撑板(7)上形成试纸条，试纸条亦可以装入塑料卡中形成卡式包装，其特征在于 T 线为包被在 NC 膜上的抗人 IgM 抗体，胶体金垫为标记的 HCV 混合抗原构成。

所述的 HCV IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于所述的 HCV 混合抗原为重组表达 HCV 的核心抗原(Core)和非结构蛋白(NS)3 抗原，亦可选择性再加入 HCV 的 NS4、NS5、E1 和 E2 区抗原。

所述的 HCV IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于所述的上样垫为玻璃纤维膜或无纺布，吸样垫由吸水滤纸构成。

所述的 HCV IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于，所述的抗原的包被方法为：以 0.01M pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)将抗人 IgM 抗体配制成 1mg/ml 的溶液，用喷膜仪在 NC 膜下部以 1ul/cm 的参数进行划线，包被 T 线，同时在 NC 膜上部包被抗 HCV 抗体作为 C 线。划线后将 NC 膜在干燥间(温度 20-25℃，湿度小于 30%)干燥 8-10 小时。

所述的 HCV IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于，所述的混合抗原标记胶体金颗粒的方法为：以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 30-50nm 的胶体金溶液，制备完成后取 100ml 胶体金液放在烧杯内，用 0.2M  $K_2CO_3$  调至 pH8.0，按 100ml 胶体金溶液加入 1mg HCV 重组混合抗原，室温搅拌 2 小时，加入 1%牛血清白蛋白(BSA)，0.1%聚乙二醇(PEG)20000 封闭 20min，12000r/m 离心 30 分钟，弃上清，用胶体金工作液复溶至 100ml，按 1ml 溶液铺 22cm<sup>2</sup>的比例均匀地铺在玻璃纤维膜或无纺布上，再置干燥间(温度 20-25℃，湿度小于 30%)干燥 2-4 小时，制成胶体金垫。

所述的 HCV IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于所述的试纸的装配方法为：在干燥室内(温度 20-25℃，湿度小于 30%)，取塑料支撑板板，将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴，在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫(搭胶体金垫的 1/3)粘贴，在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫(搭胶

体金垫的 1/5)；在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫（搭吸样垫的 1/10）；最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3mm 或 4mm 宽的试纸条。切好的试纸条可以再装入塑料卡内，形成检测卡。

所述的 HCV IgM 抗体快速检测试纸，其特征在于，检测方法为：将被检血清或血浆平衡至温室，将试纸条或试剂卡平放，在上样垫上加入 50—100u1 被检样品，样品溶解胶体金并在 NC 膜上层析，然后用肉眼直接观察在 30 分钟内 C、T 线的出现情况，并判定检测结果

本实用新型的有益效果是：提供一种利用免疫层析胶体金技术检测 HCV IgM 的新型试纸。采用胶体金标记 HCV 抗原，包被抗人 IgM 实现对样品中 HCV IgM 的检测。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

附图说明：

图 1 HCV 抗体快速检测试纸结构示意图。

附图符号说明：

- |             |             |
|-------------|-------------|
| 1: 上样垫      | 2: 胶体金垫     |
| 3: NC 膜     | 4: 吸样垫      |
| 5: 检测 (T) 线 | 6: 质控 (C) 线 |
| 7: 塑料支撑板    |             |

具体实施方式

实施例：制备 HCV IgM 抗体快速检测试纸

## 1 主要材料

1.1 HCV 的 CORE、NS3 融合抗原：美国 Biotech Atlantic Inc(BAI.)产品，用于胶体金标记；鼠抗人 IgM，抗 HCV 抗体：军事医学科学院产品，用于 NC 膜包被；氯金酸：Sigma 公司产品；硝酸纤维素 (NC) 膜：Millipore 公司产品；牛血清白蛋白 (BSA)，聚乙二醇 (PEG) 20000，水解酪蛋白：Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

1.2 临床血清 由公司在相关医院或血站获得，HCV IgG 抗体阳性血清 80 份，HCV 抗体阴性血清 300 份。

1.3 HCV IgM 抗体检测 ELISA 试剂盒，美国 Abbott 产品。

## 2 方法

2.1 HCV 重组抗原的胶体金标记 氯金酸—柠檬酸三钠还原法制备

## 直径

为 40nm 的胶体金溶液，制备完成后取三份胶体金，分别用 0.2M  $K_2CO_3$  将溶液调到 pH7.0、pH8.0 和 pH9.0。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌，按每 100ml 溶液加入 0.5mg、1mg、1.5mg 将重组抗原将蛋白缓慢滴加到胶体金溶液中，继续搅拌 2 小时，再滴加入到终浓度为 0.1% 的 PEG2000 和 1% 的 BSA 进行封闭 20min，标记结束后以 12000 r/m 离心，弃上清，沉淀按原体积复溶至不同配比的胶体金工作液（硼酸盐缓冲液，pH8.0，含 BSA、羊血清，蔗糖和表面活性剂）中。然后将标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 22cm<sup>2</sup> 的比例加样于无纺布上，在温度 20-25℃，相对湿度在 <30% 的干燥间干燥 2-4 小时，制成胶体金垫。

2.2 鼠抗人 IgM 的包被 用 0.01M pH7.2 PBS 将鼠抗人 IgM 分别稀释成 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml，然后用喷膜仪在 NC 膜下部按 1ul/cm 进行划线包被，同时在 NC 膜上部包被抗 HCV 抗体，用于产品的质控，包被完成后将 NC 膜在在温度 20-25℃，相对湿度在 <30% 的干燥间干燥 8-10 小时。

2.3 HCV IgM 抗体快速检测试纸的组装 在干燥室内（温度 20-25℃，相对湿度 <30%）取塑料支撑板，将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴，在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫（搭胶体金垫的 1/3）粘贴，在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫（搭胶体金垫的 1/5）；在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫（搭吸样垫的 1/10）；然后用裁剪机将贴好塑料板切成 3mm 或 4mm 宽的试纸条。切好的试纸条可以再装入塑料卡内，形成 HCV IgM 抗体检测试剂卡。

2.4 检测方法 将被检血清或血浆平衡至温室，将制备好的试纸条或试剂卡平放，在上样垫上加入 50-100ul 被检样品，若样品中含抗 HCV IgM 抗体，则和样品垫上的标记 HCV 抗原的胶体金结合，形成复合物，并扩散到 NC 膜上进一步层析，当遇到包被在 NC 膜上 T 线处的鼠抗人 IgM 时，复合物则又和包被抗 IgM 抗体结合，被捕获在包被处，当被捕获的胶体金复合物达到一定数量时，则形成一条肉眼可见的 T 线；若血清中不含特异性抗体，则不能形成免疫复合物，亦不能形成 T 线，C 线作为试剂的质控标准，阳性和阴性样品检测时均会出现。用肉眼直接观察在 15、20、30 和 45 分钟内 C、T 线的出现情况，并判定检测结果。

2.5 试纸工艺参数调试 将浓度不同标记、包被的试剂进行组合配

对，制备小样，利用质控血清对试剂进行测试，发现最佳组合。

2.6 临床血清检测 用本试剂按检测方法对所有 HCV IgG 阳性血清、阴性血清进行检测，阳性血清同时用 Abbott IgM 抗体检测 ELISA 试剂进行对照检测。

### 3 结果

3.1 试纸参数确定 根据小样的检测结果，确定了试纸的最佳标记 pH 值为 8.0；重组混合抗原的最佳标记量为 1mg/100ml 胶体金溶液；最佳的胶体金工作液为 10mM 硼酸盐缓冲液，pH8.0，含 0.5%BSA、10%羊血清，2%蔗糖，0.2% Tween 20；最佳包鼠抗人 IgM 包被浓度为 1mg/ml。检测结果的最佳判定时间为 5-30 分钟。

3.2 临床血清检测 以 ELISA 试剂为对照，80 份 HCV IgG 阳性血清中 ELISA 检测出 IgM 阳性血清 54 份，本试剂检测出阳性为 52 份，灵敏度 =  $52/54=96.3\%$ ；本试剂对 300 份阴性血清检出假阳性 5 份，特异性 =  $295/300=98.3\%$ 。分析试剂性能和 ELISA 试剂相比无显著性差异。

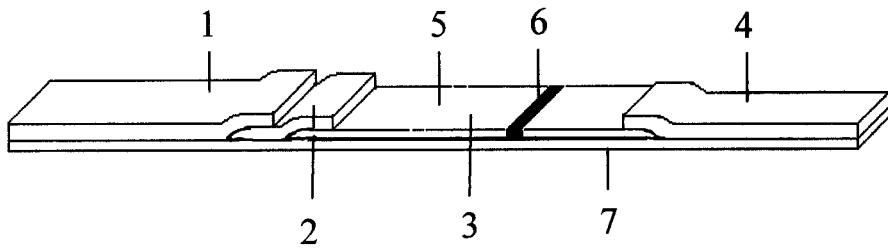


图 1

专利名称(译)	丙型肝炎病毒IgM抗体快速检测试纸		
公开(公告)号	<a href="#">CN201331529Y</a>	公开(公告)日	2009-10-21
申请号	CN200820074597.4	申请日	2008-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 杨发青		
发明人	李洲 杨发青		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">SIPO</a>	

摘要(译)

本实用新型是涉及生物应用技术领域，特别涉及一种丙型肝炎病毒IgM抗体快速检测试纸。包括上样垫(1)、紧密连接于上样垫一端的含有标记HCV混合抗原的胶体金垫(2)、与胶体金垫的另一端紧密连接的硝酸纤维素(NC)膜(3)和紧密连接于NC膜另一端的吸样垫(4)。NC膜包被有相互分离的检测(T)线(5)和质控(C)线(6)，T线为包被在NC膜上的抗人IgM抗体，C线为包被在NC膜上的抗HCV抗体。检测时将被检样品加在试纸条(卡)上样垫上，然后直接观察免疫反应结果，完成检测。具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

