



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102411055 A

(43) 申请公布日 2012.04.11

(21) 申请号 201110219629.1

(22) 申请日 2011.08.02

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30 号

(72) 发明人 方立超 郑峻松 程平 黄辉
蒋丽莉 李艳 邓均 贺娟

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有
限公司 11275

代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

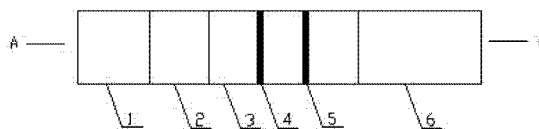
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的纳
米金试纸及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及用于检测沙眼衣原体感染的试
纸,由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸
收垫组成,硝酸纤维素膜上有检测线和质控线,所
述硝酸纤维素膜上的检测线由浓度大于或等于
1mg/mL 的沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原鼠抗人
单克隆蛋白抗体 IgG(抗体 II) 包被而成,质控线由
浓度大于或等于 1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗
体包被而成;所述结合垫由浓度 ≥ 6μg/mL 纳米金
标记的沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆蛋白
抗体 IgG(抗体 I) 包被而成;试纸检测沙眼衣原体
MOMP 的灵敏度为 0.1ng/mL,检测值范围 0-200ng/
mL,特异性为 98.5%;5 分钟内完成检测。



1. 用于检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的纳米金试纸,由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,硝酸纤维素膜上有检测线和质控线,其特征在于:所述硝酸纤维素膜上的检测线由浓度大于或等于 1mg/mL 的抗体 II 包被而成,质控线由浓度大于或等于 1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被而成;所述结合垫由浓度大于或等于 6 μ g/mL 抗体 I 包被而成,所述抗体 II 为沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG,所述抗体 I 为纳米金标记的沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG,所述抗体 I 和所述抗体 II 的效价均为 1:200000。

2. 权利要求 1 所述的纳米金试纸的制备方法,其特征在于:具体步骤为:

a 硝酸纤维素膜和结合垫的处理

将浓度大于或等于 1mg/mL 的抗体 II 喷点于硝酸纤维素膜上形成检测线,将浓度大于或等于 1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷点于硝酸纤维素膜上形成质控线,干燥后得含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;将玻璃纤维素膜浸于浓度大于或等于 6 μ g/mL 的抗体 I 中,干燥后得结合垫;

b 纳米金免疫层析试纸的组装

分别将样品垫、结合垫、含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸收垫依次粘在所述底板上,得用于检测沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原的纳米金试纸,所述硝酸纤维素膜上所述质控线靠近吸收垫端,所述检测线靠近结合垫端。

3. 根据权利要求 2 所述的纳米金试纸的制备方法,其特征在于:所述检测线与质控线的距离为 0.8 厘米,所述检测线与质控线距硝酸纤维素膜的边距分别为 0.85 厘米。

4. 根据权利要求 2 所述的纳米金试纸的制备方法,其特征在于:步骤 a 中,将浓度为 1mg/mL 的抗体 II 喷点于硝酸纤维素膜上形成检测线,将浓度为 1.5mg/mL 的羊抗鼠多克隆抗体喷点于硝酸纤维素膜上形成质控线,并在 37 $^{\circ}$ C 干燥 1 小时,得含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求 2 所述的纳米金试纸的制备方法,其特征在于:步骤 a 中,将玻璃纤维素膜浸于浓度大于或等于 6 μ g/mL 的抗体 I 中,并在 37 $^{\circ}$ C 干燥 4 小时得结合垫。

6. 权利要求 1 所述的纳米金试纸在检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原中的应用。

7. 抗体 I 和抗体 II 的配对在制备检测沙眼衣原体纳米金试纸的试剂中的应用,所述抗体 I 为纳米金标记的沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG,所述抗体 II 为沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG。

用于检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的纳米金试纸及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病的检测装置领域,特别涉及一种用于检测沙眼衣原体感染的试纸。

背景技术

[0002] 沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct) 具有独特的发育周期,有原体(Elementary Body)和网状体(Reticulate Body)两种形式。其独特的生命周期是原体感染细胞发育为网状体,网状体再分裂为原体释放,进而再次感染细胞的循环过程。Ct 是一种在人体内长期生存并广泛传播的病原体,是我国性传播疾病(sexually transmitted diseases, STDs)的主要病原之一,它在一定条件下能引起异位妊娠、早产、流产及尿道感染等多种疾病。研究发现,Ct 感染尚与许多自身免疫疾病发病有关,如衣原体感染后可引起反应性关节炎、Reiter 综合征等。

[0003] A、B、C 或 Ba 抗原型 Ct 感染还可导致一种致盲性慢性传染性结膜角膜炎,即沙眼。发展中国家常见,多发于儿童及少年时期,潜伏期为 5 ~ 14 天。病情发展后出现流泪、畏光、痒涩感、异物感、烧灼感和干燥感等症状,分泌物粘稠、结膜充血显著、乳头增生、滤泡形成或瘢痕形成。严重者可引起诸多后遗症与并发症,如睑内翻及倒睫、睑球粘连、实质性角结膜干燥症、慢性泪囊炎和角膜溃疡等,导致视力受损,反复发作最终致盲。典型的沙眼在临床上容易诊断,轻型早期病例则较困难,易与其他结膜病相混淆,需要借助特殊仪器及多年临床经验才能正确的诊断。实验室检查有助于确立沙眼的诊断,如结膜刮片后行 Giemsa 染色可见沙眼包涵体,或用荧光抗体染色、酶联免疫测定、聚合酶链反应等方法检测到沙眼衣原体抗原等。但这些方法需要特殊仪器和专业人员,且操作复杂、耗时,费用昂贵,不能满足准确、灵敏、快速、经济的检查要求。

[0004] Ct 主要外膜蛋白(major outer membrane protein, MOMP)具有 5 个保守区和 4 个可变区。由于其保守结构和好的免疫原性,MOMP 是检测 Ct 的最理想的抗原之一。目前市面上只有检测 Ct MOMP 的 ELISA 试剂盒出售,未见有检测 Ct MOMP 的纳米金快速检测试纸报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一在于提供一种纳米金试纸,该试纸可用于检测沙眼衣原体 MOMP 抗原。

[0006] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,硝酸纤维素膜上有检测线和质控线,所述硝酸纤维素膜上的检测线由浓度大于或等于 1mg/mL 的抗体 II 包被而成,质控线由浓度大于或等于 1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被而成;所述结合垫由浓度大于或等于 6 μ g/mL 抗体 I 包被而成,所述抗体 II 为沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克

隆抗体 IgG, 所述抗体 I 为纳米金标记的沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG, 所述抗体 I 和所述抗体 II 的效价均为 1:200000。

[0007] 本发明的目的之二在于提供一种用于检测沙眼衣原体 MOMP 抗原的纳米金试纸的制备方法, 该方法操作简单, 适用于大规模应用。

[0008] 为实现上述目的, 本发明的技术方案为:

所述的纳米金试纸的制备方法, 具体步骤为:

a 硝酸纤维素膜和结合垫的处理

将浓度大于或等于 1mg/mL 的抗体 II 喷点于硝酸纤维素膜上形成检测线, 将浓度大于或等于 1.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷点于硝酸纤维素膜上形成质控线, 干燥后得含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜; 将玻璃纤维素膜浸于浓度大于或等于 6 μ g/mL 的抗体 I 中, 干燥后得结合垫;

b 纳米金免疫层析试纸的组装

分别将样品垫、结合垫、含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸收垫依次粘在所述底板上, 得用于检测沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原的纳米金试纸, 所述硝酸纤维素膜上所述质控线靠近吸收垫端, 所述检测线靠近结合垫端。

[0009] 所述的纳米金试纸的制备方法, 所述检测线与质控线的距离为 0.8 厘米, 所述检测线与质控线距硝酸纤维素膜的边距分别为 0.85 厘米。

[0010] 所述的纳米金试纸的制备方法, 步骤 a 中, 将浓度为 1mg/mL 的抗体 II 喷点于硝酸纤维素膜上形成检测线, 将浓度为 1.5mg/mL 的羊抗鼠多克隆抗体喷点于硝酸纤维素膜上形成质控线, 并在 37 $^{\circ}$ C 干燥 1 小时, 得含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜。

[0011] 所述的纳米金试纸的制备方法, 步骤 a 中, 将玻璃纤维素膜浸于浓度大于或等于 6 μ g/mL 的抗体 I 中, 并在 37 $^{\circ}$ C 干燥 4 小时后得结合垫。

[0012] 本发明的目的之三在于提供一种所述的纳米金试纸的新应用, 该应用为检测沙眼衣原体 MOMP 抗原提供了新的途径。

[0013] 为实现上述目的, 本发明的技术方案为:

所述的纳米金试纸在检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原中的应用。

[0014] 本发明的目的之四在于提供沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆抗体 I 和抗体 II 的联合运用, 该运用为制备特异性和敏感性佳的检测试纸提供了新思路。

[0015] 抗体 I 和抗体 II 的配对在制备检测沙眼衣原体纳米金试纸的试剂中的应用, 所述抗体 I 为纳米金标记的沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG, 所述抗体 II 为沙眼衣原体检测沙眼衣原体抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG。

[0016] 本发明的有益效果在于: 用于检测沙眼衣原体 MOMP 抗原的纳米金试纸, 沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆抗体 I 和抗体 II 配对, 通过优化检测抗体

[纳米金标记条件及捕获抗体 I 的用量及试纸的干燥条件, 研制的试纸在 5 分钟内检测出结果, 特异性高、灵敏度好。与现有检测技术相比, 用于检测沙眼衣原体 MOMP 抗原的纳米金快速检测试纸具有无需特殊仪器和设施, 无创检测, 检测特异性强、灵敏度高、速度快, 操作简单方便, 检测条件无特殊要求, 显色稳定, 试纸易于长期保存, 以及成本低廉等优点, 适用于沙眼衣原体感染的临床诊断和普查、自查, 可为沙眼衣原体感染的及时对症治疗赢取宝贵

时间,并极大地减轻社会和患者的经济负担,有着良好的应用前景。试纸检测沙眼衣原体 MOMP 的灵敏度为 0.1ng/ml,检测值范围 0-200ng/ml,特异性为 98.5%;5 分钟内完成检测。

附图说明

[0017] 图 1 为本发明检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的纳米金试纸的结构示意图;
图 2 为图 1 沿 A-A 向剖视图。

具体实施方式

[0018] 1 试验材料的准备

沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG (抗体 II),货号 C55180M,由 Biodesign 公司生产,效价为 1:200000;羊抗鼠多克隆抗体(羊抗鼠多克隆抗体),货号 101-0301,天津生物科技有限公司生产;所述沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆抗体 IgG (抗体 I),货号 C55135M,效价为 1:200000,由 Biodesign 公司生产。

[0019] 2 纳米金试纸的制备方法

(1) 硝酸纤维素膜和结合垫的预处理

将浓度大于或等于 1mg/mL 的沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆抗体 II 用 XYZ-3000 三维喷点仪喷点于硝酸纤维素膜上形成检测线,将浓度大于或等于 1.5mg/mL 的羊抗鼠多克隆抗体(101-0301 蛋白抗体)用 XYZ-3000 三维喷点仪喷点于硝酸纤维素膜上形成质控线,喷涂了抗体的硝酸纤维素膜在 37°C 封闭、洗涤并干燥 1h,得复合硝酸纤维素膜;将玻璃纤维素膜浸于纳米金标记浓度大于或等于 6 μ g/mL 的沙眼衣原体 MOMP 抗原鼠抗人单克隆抗体 I 中,在 37°C 干燥 4h 后得复合结合垫;

(2) 纳米金免疫层析试纸的组装

分别将样品垫、复合结合垫、复合硝酸纤维素膜和吸收垫依次粘在所述底板上,得用于检测沙眼衣原体 MOMP 抗原的纳米金试纸,所述复合硝酸纤维素膜上所述质控线靠近吸收垫端,所述检测线靠近结合垫端。

[0020] 用 LN-5000 切割机切割成 0.4cm 宽的试纸条,将其装入塑料盒中,密封包装,内置干燥剂,4°C 保存。

[0021] 如图 1 和图 2 所示,本实施例的用于检测沙眼衣原体 MOMP 抗原的纳米金试纸,包括背衬 7 和依次固定设置在背衬上的样品垫 1、结合垫 2、检测垫 3 和吸收垫 6;背衬 7 为一面涂有不干胶的聚氯乙烯(PVC)板,样品垫 1 和结合垫 2 为玻璃纤维素膜,检测垫 3 为硝酸纤维素膜,吸收垫 6 为吸水滤纸;检测垫 3 贴附于背衬 7 涂有不干胶的一面上,结合垫 2 位于检测垫 3 上部与其部分重叠,吸收垫 6 位于检测垫 3 上部与其部分重叠,样品垫 1 位于结合垫 2 上部与其部分重叠,采用此结构,可以使检测试纸具有较好的层析效果,确保检测结果准确、可靠,检测快速;检测垫 3 上横向设置有抗沙眼衣原体 MOMP 的单克隆抗体 II 检测线 4,检测垫 3 上位于吸收垫 6 侧与检测线 4 间隔并列设置有多克隆抗体质控线 5;结合垫 2 上设置有纳米金标记的抗沙眼衣原体 MOMP 的单克隆抗体 I 结合层 8。

[0022] 本实施例中,所述检测线与质控线的距离为 0.8 厘米,所述检测线与质控线距硝酸纤维素膜的边距分别为 0.85 厘米。当然,设置为其他距离同样可以实现。

[0023] 3 纳米金试纸的原理和结果判定

(1) 纳米金试纸的原理和测试方法

将抗体 II 包被于检测线,羊抗鼠多克隆抗体包被于质控线;玻璃纤维素膜浸于抗体 I 中,得结合垫。

[0024] 使用时,将检测试纸的样品垫端放入待检标本中,标本被样品垫吸收并通过毛细作用向检测试纸的吸收垫端层析,当上移到结合垫时,如果标本溶液中含有沙眼衣原体 MOMP 抗原,其可与纳米金标记的抗体 I 发生特异性结合,形成抗原-抗体复合物,该复合物继续上移,当到达检测垫上的检测线时,沙眼衣原体 MOMP 抗原的另一结合位点可与抗体 II 发生特异性结合,形成“抗体-抗原-抗体”双抗体夹心结构,从而使纳米金聚集在检测线上,使检测线显红色,多余的未与沙眼衣原体 MOMP 抗原结合的抗体 I 则继续上移,到达质控线时,与多克隆抗体结合,形成抗原-抗体复合物,从而使纳米金聚集在质控线上,使质控线显红色,因此,当检测试纸上的检测线与质控线均显红色时,判为阳性结果;反之,如果标本溶液中不含有沙眼衣原体 MOMP 抗原,则在检测线处,不能形成“抗体-抗原-抗体”双抗体夹心结构,检测线不显红色,而纳米金标记的抗沙眼衣原体 MOMP 的单克隆抗体 I 上移到质控线处,可形成抗原-抗体复合物,使质控线显红色,因此,当检测试纸上的检测线不显红色而质控线显红色时,判为阴性结果;当检测试纸的质控线不显红色时,不管检测线是否显红色,结果都判为操作失误或检测试纸失效,需重新检测。

[0025] (2) 抗体配对的筛选

根据上述“纳米金试纸的制备方法”及“纳米金试纸的原理和测试方法”,分别采用了 Biodesign 公司生产的货号为 C55135M (抗体 I)、C86818M 及 C55180M (抗体 II) 进行抗体配对,具体为:

A 抗体 C55135M 标记在纳米金上,抗体 C55180M 喷涂在硝酸纤维素膜上,两者配对的灵敏度和特异性好。

[0026] B 将 C55180M 标记在纳米金上,C55135M 喷涂在硝酸纤维素膜上,灵敏度较 A 降低 30%。

[0027] C 将抗体 C55135M 标记在纳米金上,抗体 C86818M 喷涂在硝酸纤维素膜上,或者反之均未配对成功。

[0028] D 将抗体 C55180M 标记在纳米金上,抗体 C86818M 喷涂在硝酸纤维素膜上,或者反之均未配对成功。

[0029] 另外,将 Biodesign 公司生产的上述 3 个抗体,分别与 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 公司生产的 sc-70854 配对均未成功。

[0030] 4 效果评定

(1) 敏感性试验

将阳性标本作梯度稀释,用上述“纳米金试纸的原理和测试方法”进行检测。

[0031] 结果当阳性标本中的沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的浓度为 0.1ng/ml 时和 200ng/ml 均可见两条清晰的红色条带;当阳性标本中的沙眼衣原体 MOMP 抗原的浓度小于 0.1ng/ml 或大于 200ng/ml 时,仅可见 C 线出现清晰的红色条带。表明此方法能够检出 MOMP 抗原的浓度为 0.1ng/ml 时的阳性标本,检测值范围 0-200ng/ml,具有较强的敏感性。

[0032] (2) 特异性试验

用上述“纳米金试纸的原理和测试方法”进行检测,分别检测单纯疱疹病毒 (HSV)、人乳

头瘤病毒 (HPV)、生殖道支原体 (GU)、奈瑟淋病双球菌 (NG) 阳性血清,结果显示仅沙眼衣原体阳性血清可见两条清晰的红色条带,其它血清均仅在 C 线处出现一条清晰的红色条带,表明本试纸具有很好的特异性,其特异性为 98.5%。

[0033] (3) 干燥时间和温度对检测时间的影响

硝酸纤维素膜在 4℃ 冷冻干燥 1h 和 37℃ 干燥 1h 检测时间无显著差异,5min 内出检测结果。

[0034] 结合垫在 4℃ 冷冻干燥 4h,与 37℃ 干燥 4h,金的释放程度和速度前者较后者好,但无显著差异,5min 内出检测结果。从降低成本角度考虑,选择 37℃ 作为硝酸纤维素膜和结合垫干燥时间。

[0035] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过参照本发明的优选实施例已经对本发明进行了描述,但本领域的普通技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围。

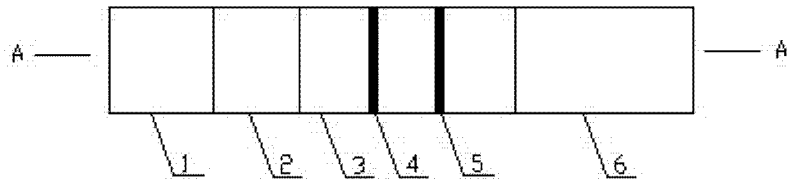


图 1

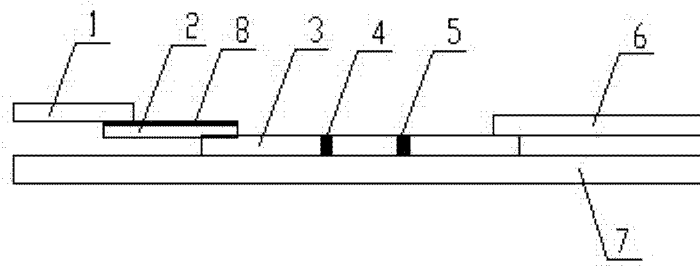


图 2

专利名称(译)	用于检测沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的纳米金试纸及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN102411055A	公开(公告)日	2012-04-11
申请号	CN201110219629.1	申请日	2011-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	方立超 郑峻松 程平 黄辉 蒋丽莉 李艳 邓均 贺娟		
发明人	方立超 郑峻松 程平 黄辉 蒋丽莉 李艳 邓均 贺娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测沙眼衣原体感染的试纸，由底板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成，硝酸纤维素膜上有检测线和质控线，所述硝酸纤维素膜上的检测线由浓度大于或等于1mg/mL的沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原鼠抗人单克隆蛋白抗体IgG（抗体II）包被而成，质控线由浓度大于或等于1.5mg/mL的羊抗鼠IgG多克隆抗体包被而成；所述结合垫由浓度≥6μg/mL纳米金标记的沙眼衣原体MOMP抗原鼠抗人单克隆蛋白抗体IgG（抗体I）包被而成；试纸检测沙眼衣原体MOMP的灵敏度为0.1ng/ml，检测值范围0-200ng/ml，特异性为98.5%；5分钟内完成检测。

