



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 201637744 U

(45) 授权公告日 2010. 11. 17

(21) 申请号 201020142096. 2

(22) 申请日 2010. 03. 26

(73) 专利权人 天津中新科炬生物制药有限公司
地址 300457 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 12103

代理人 关永琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/544 (2006. 01)

(ESM) 同样的发明创造已同日申请发明专利

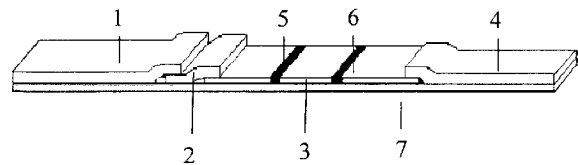
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 实用新型名称

甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸

(57) 摘要

本实用新型是涉及生物应用技术领域,特别是涉及一种甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,采用双抗原夹心法实现对总抗体的检测。采用胶体金标记甲型 H1N1 流感病毒抗原,包被甲型 H1N1 流感病毒抗原实现对血液中抗甲型 H1N1 流感病毒总抗体的检测。可同时检测 IgG 和 IgM。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。



1. 一种甲型H1N1流感病毒总抗体检测试纸,其特征在于塑料支撑板(7)一端连接上样垫(1),上样垫(1)的一端紧密压接含有标记H1N1特异性的血球凝集素Ha或H1N1特异性的血球凝集素Ha和神经氨酸酶Na抗原的胶体金垫(2),胶体金垫(2)一端紧密压接硝酸纤维素(NC)膜(3),硝酸纤维素(NC)膜(3)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膜上的的H1N1特异性的血球凝集素Ha或H1N1特异性的血球凝集素Ha和神经氨酸酶Na抗原,C线为包被在NC膜上的抗H1N1抗体,硝酸纤维素(NC)膜(3)的另一端连接吸样垫(4)形成试纸。

2. 根据权利要求1所述的甲型H1N1流感病毒总抗体检测试纸,其特征在于所述的上样垫(1)为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫由吸水滤纸构成(4)。

甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸

技术领域

[0001] 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甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸。

背景技术

[0002] 甲型 H1N1 流感病毒是一种新型的流感病毒,2009 年在世界范围内大流行,严重危害人类的健康。其“Ha”指的是血球凝集素 (Hemagglutinin)、“Na”指的是神经氨酸酶 (Neuraminidase),甲型流感病毒 H 有 1 ~ 15 型,有 1 ~ 9 型。H1N1 是甲型流感病毒的一种,也是危害最大的病毒之一。在历史上曾造成数次大流行。

[0003] 目前对甲型 H1N1 流感检测的主要方法是 PCR 基因扩增诊断方法,鼻咽试纸抗原诊断方法等。在抗体检测方面,有 ELISA 等检测方法,但用胶体金类免疫层析技术对甲型 H1N1 总抗体进行检测尚未有相关报道。对 H1N1 总抗体检测主要有已下作用:1:对 H1N1 流感进行辅助诊断。根据“甲型 H1N1 流感诊疗方案”第三版,甲型 H1N1 流感病原学检测方法之一为:动态检测双份血清甲型 H1N1 流感病毒特异性抗体水平呈 4 倍或 4 倍以上升高,是感染 H1N1 流感病毒的指标。2:对是否已感染 H1N1 进行鉴别,隐性感染或感染过该病毒的人体内抗 H1N1 病毒总抗体将长期存在。3:对免疫接种的效果进行评价,从数据上看,目前 H1N1 接种的有效率约为 90%,尚有 10%的人需要筛选出来重新接种或用其它方式进行该病的预防。考虑到感染和接种的人群巨大,运用一种快速、简便、有效的抗体检测方法非常必要。

[0004] 免疫层析胶体金技术是新型的诊断技术,在抗体检测方面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

[0005] 本实用新型的目的是提供一种甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,采用双抗原夹心法制备,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。

[0006] 本实用新型提供一种甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,其特征在于塑料支撑板 7 一端连接上样垫 1,上样垫 1 的一端紧密压接含有标记 H1N1 特异性的血球凝集素 Ha 或 H1N1 特异性的血球凝集素 Ha 和神经氨酸酶 Na 抗原的胶体金垫 2,胶体金垫 2 一端紧密压接硝酸纤维素 NC 膜 3,硝酸纤维素 NC 膜 3 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 H1N1 特异性的血球凝集素 Ha 或 H1N1 特异性的血球凝集素 Ha 和神经氨酸酶 Na 抗原,C 线为包被在 NC 膜上的抗 H1N1 抗体,硝酸纤维素 NC 膜 3 的另一端连接吸样垫 4 形成试纸。

[0007] 所述的甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,其特征在于所述的抗原为 H1N1 特异性的血球凝集素 (Ha) 和神经氨酸酶 (Na) 抗原,抗原可以从 H1N1 病毒中纯化提取或利用基因工程重组表达。

[0008] 所述的甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,其特征在于所述的上样垫 1 为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫由吸水滤纸构成 4。

[0009] 所述的甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,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 H1N1 特异性的血球凝集素 (Ha) 和 (或) 神经氨酸酶 (Na) 抗原配制成 0.5-2mg/ml 的溶液,用喷膜仪在 NC 膜下部以 1 μ l/cm 的参数进行划线,包被 T 线,同时在 NC 膜上部包被抗 H1N1 抗体作为 C 线,划线后将 NC 膜在干燥间,温度 20-25 $^{\circ}$ C,湿度小于 30%,干燥 2-5 小时。

[0010] 上述的甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,其特征在于,所述的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 0.5-2mg H1N1 血球凝集素 (Ha) 和神经氨酸酶 (Na) 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 PEG20000 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 22cm² 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 $^{\circ}$ C,湿度小于 30%,干燥 2-5 小时,制成胶体金垫。

[0011] 上述的甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,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 $^{\circ}$ C,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 2-5mm 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。

[0012] 所述的甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸,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 50-100 μ l 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 20 分钟内 C、T 线的出现情况,并判定检测结果。

[0013] 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甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸。采用双抗原夹心法实现对总抗体的检测。采用胶体金标记甲型 H1N1 流感病毒抗原,包被甲型 H1N1 流感病毒抗原实现对血液中抗甲型 H1N1 流感病毒总抗体的检测。可同时检测 IgG 和 IgM。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:

[0014] 图 1 甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸结构示意图。

[0015] 附图符号说明:

[0016] 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

[0017] 实施例：制备甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试纸

[0018] 1 主要材料

[0019] 1.1 特异性甲型 H1N1 流感病毒 Ha 抗原：Sino Biological Inc. 公司产品，为重组抗原，用于胶体金标记和 NC 膜 T 线包被；抗 Ha 抗体，用 Ha 免疫山羊自制，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 PEG20000，水解酪蛋白：Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0020] 1.2 临床血清由公司在相关医院获得，其中在近期接种 H1N1 疫苗样本 80 份，未接种疫苗样本 120 份。

[0021] 1.3 甲型 H1N1 流感病毒 IgG ELISA 试剂盒，Sino Biological Inc. 产品。

[0022] 2 方法

[0023] 2.1 甲型 H1N1 流感病毒 Ha 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 12000r/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 22cm² 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。

[0024] 2.2 H1N1 流感病毒 Ha 重组抗原的包被用 0.01M pH7.2PBS 将 H1N1 流感病毒 Ha 重组抗原分别稀释成 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml，然后用喷膜仪在 NC 膜下部按 1u1/cm 进行划线包被，同时在 NC 膜上部包被抗 Ha 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 2-5 小时。

[0025] 2.3 甲型 H1N1 流感病毒总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，形成甲型 H1N1 流感病毒总抗体检测试剂卡。

[0026] 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 50-100u1 被检样品，若样品中含抗甲型 H1N1 流感病毒总抗体，则和样品垫上的标记甲型 H1N1 流感病毒抗原的胶体金结合，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 H1N1 流感病毒 Ha 重组抗原时，复合物则又和包被抗抗原结合，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 5、10、15、20、30 和 45 分钟内 C、T 线的出现情况，并判定检测结果。

[0027] 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。

[0028] 2.6 临床血清检测用本试剂按检测方法对所有临床血清进行检测,同时用 Sino Biological Inc. 甲型 H1N1 ELISA 抗体检测试剂进行对照检测。

[0029] 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 H1N1 流感病毒 Ha 重组抗原包被浓度为 1mg/ml。检测结果的最佳判定时间为 5-20 分钟。但以上参数在制备不同批次产品时可能需要适当调整。

[0030] 3.2 临床血清检测以 ELISA 试剂为对照,80 份近期接种甲型 H1N1 流感病毒疫苗人员的样本中,检测出阳性 70 份,ELISA 检测出阳性血清 72 份,灵敏度 = $70/72 = 97.2\%$;本试剂对 120 份未接种 H1N1 疫苗人员样本中检出阴性为 110 份,ELISA 试剂的检测阴性为 112 分,相对特异性为 $110/112 = 98.2\%$ 。 $P > 0.05$ 。试剂性能和 ELISA 试剂相比无显著性差异,适合临床检测需要。

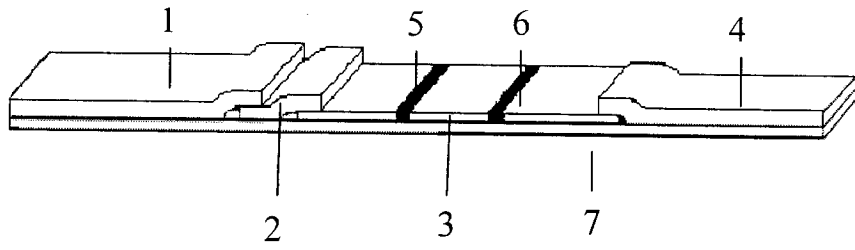


图 1