



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104280549 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 14

(21) 申请号 201410472934. 5

(22) 申请日 2014. 09. 16

(71) 申请人 中山生物工程有限公司

地址 528400 广东省中山市火炬开发区国家  
健康基地生物谷大道 1 号

(72) 发明人 唐安洲 王胜岚 叶为民 张哲  
宋小冬 李峰

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理  
有限公司 11006

代理人 黄韧敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,至少包括一反应膜,所述反应膜上划有检测线和质控线,所述检测线含有鼠抗人 IgA 单克隆抗体;所述质控线含有生物素;一抗原垫,所述抗原垫含有由生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原;一金标垫,所述金标垫含有胶体金标记的亲合素复合物。本发明的检测试剂盒具有快速、简便、准确和灵敏度高的特点。

1. 一种 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,至少包括
  - 一反应膜,所述反应膜上划有检测线和质控线,所述检测线含有鼠抗人 IgA 单克隆抗体;所述质控线含有生物素;
  - 一抗原垫,所述抗原垫含有由生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原;
  - 一金标垫,所述金标垫含有胶体金标记的亲合素复合物。
2. 权利要求 1 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,其特征在于所述检测线以包被浓度为 1.4mg/ml 的鼠抗人 IgA 单克隆抗体划线,所述质控线以包被浓度为  $\geq 2.2$ mg/ml 的生物素划线,所述胶体金标记的亲合素复合物中亲合素的标记浓度为 25 ~ 40  $\mu$ g/ml,所述生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原中生物素的标记浓度为 25 ~ 30  $\mu$ g/ml。
3. 权利要求 1 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,其特征在于进一步包括一用于加载检测样品的样品垫。
4. 一种检测试剂盒,其包括权利要求 1 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂。
5. 制备权利要求 1 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂的方法,包括:
  - 1) 划线 NC 膜的制备:用包被浓度的鼠抗人 IgA 单克隆抗体在 NC 膜上划检测线;用包被浓度的生物素在 NC 膜上划质控线;
  - 2) 金标垫的制备:将标记浓度的亲合素与胶体金偶联制备胶体金标记的亲合素复合物,浸泡涂抹玻璃纤维素膜制备金标垫;
  - 3) 抗原垫的制备:将标记浓度的生物素与重组 EB 病毒 VCA 抗原进行偶联制得生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原复合物,浸泡涂抹玻璃纤维素膜制备抗原垫。
6. 权利要求 5 所述的方法,包括:
  - (1) 划线 NC 膜的制备:用磷酸盐缓冲液将鼠抗人 IgA 单克隆抗体稀释到包被浓度为 1.4mg/ml,将生物素稀释成包被浓度为  $\geq 2.2$ mg/ml,用金标划线机将两种包被液划到 NC 膜上,干燥后保存备用;
  - (2) 金标垫的制备:将标记浓度为 25 ~ 40  $\mu$ g/ml 的亲合素与胶体金进行偶联制得胶体金标记的亲合素复合物,以转速为 10000 转/分钟离心 30 分钟,弃上清,加入胶体金结合物稀释液至原体积的 80%,然后用稀释液按 60  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 浸泡涂抹玻璃纤维素膜制成金标垫,干燥后保存备用;
  - (3) 抗原垫的制备:将标记浓度为 25 ~ 30  $\mu$ g/ml 的生物素与重组 EB 病毒 VCA 抗原进行偶联制得生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原复合物,将混合液按 60  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 浸泡涂抹玻璃纤维素膜制成抗原垫,干燥后保存备用;
  - (4) 切割装配:将划线 NC 膜、金标垫、抗原垫、吸水纸、样品垫装配成反应板,再用切条机切成 4mm 的试纸条,装卡后,装入铝箔袋内制成检测试剂。
7. 权利要求 6 所述的方法,其中 NC 膜、金标垫和抗原垫的制备中干燥条件为 37 $^{\circ}$ C 干燥 3 小时。
8. 权利要求 5 所述的方法,其中步骤 1) 中,检测线的包被浓度为 1.4mg/ml,按 0.15  $\mu$ l/mm 的包被量包被 NC 膜检测线。
9. 权利要求 5 所述的方法,其中步骤 2) 中胶体金的制备方法包括:在 100ml 双蒸水中加入 1% 氯金酸溶液 1.0ml 煮沸,在搅拌条件下加入 1.4ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液,继续煮沸 5 分钟,自然冷却待用;胶体金标记亲合素的 pH 为 9.0 ~ 10.0,亲合素浓度为 25  $\mu$ g/ml,

胶体金标记亲和素稀释比例为 1:8, 金标垫的制备条件为稀释后的胶体金结合物按  $60 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  浸泡涂抹。

10. 权利要求 5 所述的方法, 其中步骤 3) 中, 生物素的标记量为  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 质控线生物素浓度为  $2.2\text{mg}/\text{ml}$ 。

## EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地涉及一种抗体检测试剂。

[0002] 本发明还涉及包含该检测试剂的试剂盒及制备方法。

### 背景技术

[0003] EB 病毒 (epstein-barr virus, EBv), 又称人类疱疹病毒 4 型 (Human herpesvirus 4 (HHV-4))。Epstein 和 Barr 于 1964 年首次成功地将 Burkitt 非洲儿童淋巴瘤细胞通过体外悬浮培养而建株,并在建株细胞涂片中用电镜观察到疱疹病毒颗粒,认为该病毒是多种恶性肿瘤(如鼻咽癌)的病因之一,它主要感染人类口咽部的上皮细胞和 B 淋巴细胞。在中国南方鼻咽癌患病人群中大多都检测到有 EB 病毒基因组存在。EB 病毒分布广泛,多呈散发性,亦可引起流行。EB 病毒与鼻咽癌关系十分密切,鼻咽癌病人血清中 EB 病毒 VCA-IgA 抗体水平明显升高。VCA-IgA 抗体与鼻咽癌的发生发展和预后均有密切关系。

[0004] 目前检测 EB 病毒 VCA-IgA 的检测试剂主要是采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法、Real-time 定量 PCR 法等,但存在操作复杂、检测灵敏度较低、检测时间长的缺陷。

[0005] 胶体金是由氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下,可聚合成一定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,形成带负电的疏水胶溶液,故称胶体金。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性。胶体金除了与蛋白质结合以外,还可以与许多其它生物大分子结合,如 SPA、PHA、ConA 等。根据胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应,加上结合物的免疫和生物学特性,因而使胶体金广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等领域。

[0006] 免疫金标记技术 (Immunogold labelling technique) 主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性,在金标蛋白结合处,在显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点,因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中。

[0007] 胶体金法检测试剂将特异性的抗原或抗体以条带状固定在膜上,胶体金标记试剂(抗体或单克隆抗体)吸附在结合垫上,当待检样本加到试纸条一端的样本垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,待检物与金标试剂的结合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。该法现已发展成为诊断试纸条,使用十分方便。

[0008] 中国专利申请 CN101949932A 提供了一种胶体金法检测 EB 病毒 IgA 抗体的检测试剂,其采用 EB 病毒 NA1 抗原包被检测线,鼠抗人 IgA 单抗标记胶体金,用羊抗鼠 IgG 抗体包被质控线。中国专利申请 CN102539768A 提供了一种 EB 病毒 Zta IgA 抗体胶体金检测试剂,其采用 EB 病毒 Zta 抗原包被检测线,鼠抗人 IgA 单抗标记胶体金,用羊抗鼠 IgG 抗体包被质控线。

[0009] 以上两种胶体金法检测试剂均采用 EB 病毒抗原包被检测线,检测线的抗原可与

检测样本中的 EB 病毒 IgG、IgA、IgM 等所有抗体反应,由于 IgG 是血清中免疫球蛋白主成分,约占血清中免疫球蛋白总含量的 75%,是检测目标 IgA 抗体的 4 ~ 7 倍,可严重竞争干扰检测目标 IgA 与包被 EB 病毒抗原的结合,造成检测结果灵敏度与特异性降低。

## 发明内容

[0010] 本发明的一个目的在于提供一种 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,用鼠抗人 IgA 单克隆抗体划检测线,并引入生物素 - 亲和素系统,直接捕获检测样本中的全部 IgA 抗体,可以有效的避免 IgG、IgM 等抗体的干扰,提高检出的灵敏度与特异性。

[0011] 本发明的另一个目的在于提供一种 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂盒。

[0012] 本发明还提供所述检测试剂的制备方法。

[0013] 根据本发明的一方面,一种 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,至少包括

[0014] 一反应膜,所述反应膜上划有检测线和质控线,所述检测线含有鼠抗人 IgA 单克隆抗体;所述质控线含有生物素;

[0015] 一抗原垫,所述抗原垫含有由生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原;

[0016] 一金标垫,所述金标垫含有胶体金标记的亲和素复合物。

[0017] 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,其中优选地,所述检测线以包被浓度为 1.4mg/ml 的鼠抗人 IgA 单克隆抗体划线,所述质控线以包被浓度为  $\geq 2.2$ mg/ml 的生物素划线,所述胶体金标记的亲和素复合物中亲和素的标记浓度为 25 ~ 40  $\mu$ g/ml,所述生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原中生物素的标记浓度为 25 ~ 30  $\mu$ g/ml。最优选地,所述质控线以包被浓度为 2.2mg/ml 的生物素划线,所述胶体金标记的亲和素复合物中亲和素的标记浓度为 25  $\mu$ g/ml,所述生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原中生物素的标记浓度为 30  $\mu$ g/ml。

[0018] 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,进一步包括一用于加载检测样品的样品垫。

[0019] 根据本发明的另一方面,提供一种检测试剂盒,其包括所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂,以及与之同时提供的相关使用说明、辅助检测工具、试剂和 / 或商品销售信息。

[0020] 根据本发明的再一方面,提供制备权利要求 1 所述的 EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂的方法,包括:

[0021] 1) 划线 NC 膜的制备:用包被浓度的鼠抗人 IgA 单克隆抗体在 NC 膜上划检测线;用包被浓度的生物素在 NC 膜上划质控线;

[0022] 2) 金标垫的制备:将标记浓度的亲和素与胶体金偶联制备胶体金标记的亲和素复合物,浸泡涂抹玻璃纤维素膜制备金标垫;

[0023] 3) 抗原垫的制备:将标记浓度的生物素与重组 EB 病毒 VCA 抗原进行偶联制得生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原复合物,浸泡涂抹玻璃纤维素膜制备抗原垫。

[0024] 本发明所述的方法,优选地包括下述步骤:

[0025] (1) 划线 NC 膜的制备:用磷酸盐缓冲液将鼠抗人 IgA 单克隆抗体稀释到包被浓度为 1.4mg/ml,将生物素稀释成包被浓度为  $\geq 2.2$ mg/ml,用金标划线机将两种包被液划到 NC 膜上,干燥后保存备用;

[0026] (2) 金标垫的制备 :将标记浓度为  $25 \sim 40 \mu\text{g/ml}$  的亲合素与胶体金进行偶联制得胶体金标记的亲合素复合物,以转速为 10000 转 / 分钟离心 30 分钟,弃上清,加入胶体金结合物稀释液至原体积的 80%,然后用稀释液按  $60 \mu\text{l/cm}^2$  浸泡涂抹玻璃纤维素膜制成金标垫,干燥后保存备用 ;

[0027] (3) 抗原垫的制备 :将标记浓度为  $25 \sim 30 \mu\text{g/ml}$  的生物素与重组 EB 病毒 VCA 抗原进行偶联制得生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原复合物,将混合液按  $60 \mu\text{l/cm}^2$  浸泡涂抹玻璃纤维素膜制成抗原垫,干燥后保存备用 ;

[0028] (4) 切割装配 :将划线 NC 膜、金标垫、抗原垫、吸水纸、样品垫装配成反应板,再用切条机切成 4mm 的试纸条,装卡后,装入铝箔袋内制成检测试剂。

[0029] 本发明所述的方法,其中 NC 膜、金标垫和抗原垫的制备中干燥条件为  $37^\circ\text{C}$  干燥 3 小时。

[0030] 本发明所述的方法,其中步骤 1) 中,检测线的包被浓度为  $1.4\text{mg/ml}$ ,按  $0.15 \mu\text{l/mm}$  的包被量包被 NC 膜检测线 ;步骤 2) 中胶体金的制备方法包括 :在 100ml 双蒸水中加入 1% 氯金酸溶液 1.0ml 煮沸,在搅拌条件下加入 1.4ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液,继续煮沸 5 分钟,自然冷却待用 ;胶体金标记亲合素的 pH 为  $9.0 \sim 10.0$ ,亲合素浓度为  $25 \mu\text{g/ml}$ ,胶体金标记亲合素稀释比例为 1:8,金标垫的制备条件为稀释后的胶体金结合物按  $60 \mu\text{l/cm}^2$  浸泡涂抹 ;步骤 3) 中,生物素的标记量为  $30 \mu\text{g/ml}$ ,质控线生物素浓度为  $2.2\text{mg/ml}$ 。

[0031] 本发明采用胶体金免疫层析法,将鼠抗人 IgA 单克隆抗体、生物素分别以条带状固定在 NC 膜上,金标记的亲合素吸附在金标垫上,生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原吸附在抗原垫上,含有 EB 病毒 VCA 抗体的待测样品加到试纸条的样品垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解抗原垫上的生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原和金标垫上的胶体金标记的亲合素后相互反应,再移动至固定在 NC 膜的鼠抗人 IgA 单克隆抗体区域反应形成金标记免疫复合物而被截留,聚集在检测带上。通过可目测的胶体金标记物检测人血清或血浆中的 EB 病毒 VCA IgA 抗体。

[0032] 本发明用鼠抗人 IgA 单克隆抗体划检测线,直接捕获检测样本中的全部 IgA 抗体,可以有效的避免 IgG、IgM 等抗体的干扰,提高检出的灵敏度与特异性。

[0033] 本发明引进生物素 - 亲合素系统 (BAS),这是一种新型生物反应放大系统。亲合素与生物素间的结合具有极高的亲和力,其反应呈高度专一性。亲合素结合生物素的亲和常数可为抗原 - 抗体反应的百万倍,二者结合形成复合物的解离常数很小,呈不可逆反应性 ;而且酸、碱、变性剂、蛋白溶解酶以及有机溶剂均不影响其结合。因此, BAS 在实际应用中,产物的稳定性高,从而可降低操作误差,提高测定的精确度。此外,每个亲合素分子有四个生物素结合部位,因此, BAS 具有多级放大作用,使其在应用时可极大地提高检测方法的灵敏度。

[0034] 本发明的有益效果为 :EB 病毒 VCA IgA 抗体检测试剂盒 (胶体金法) 具有快速、简便、准确和灵敏度高的特点,整个操作时间仅需 20 分钟就可判读结果,不需要辅助仪器,可直接肉眼观察结果,适用范围广,可单份检测,易于普及,对于 EB 病毒的检测和控制效果明显。

[0035] 附图简述

[0036] 图 1 为本发明检测试剂的生产工艺流程和检测原理图。

### 具体实施方式

[0037] 下面结合附图,通过对本发明具体实施方式的描述,详细说明但不限制本发明。

[0038] 材料来源:以下材料除非特别说明均由市售商购。

[0039] 实施例 1 检测试剂制备条件筛选

[0040] 1. 胶体金颗粒的选择

[0041] 1.1 原理:根据煮沸条件下氯金酸与柠檬酸三钠发生氧化还原反应制备胶体金。通过调节氯金酸和柠檬酸三钠的加入比例来改变和控制胶体金的颗粒大小。

[0042] 1.2 制备方法

[0043] 在 100ml 双蒸水中加入 1% 氯金酸溶液 1ml 煮沸,在搅拌条件下加入不同量的 1% 柠檬酸三钠溶液,继续煮沸 5 分钟以制备不同大小的胶体金颗粒,自然冷却待用。用不同大小的胶体金标记亲和素,以企业内部质控品为研究材料进行检测,结果详见表 1,表 2。

[0044] 表 1. 1% 柠檬酸三钠用量的选择实验——胶体金颗粒大小的选择 (1)

[0045]

液体加入顺序	单位	胶体金溶液编号			
		1	2	3	4

[0046]

双蒸水	ml	100	100	100	100
1% 氯金酸	ml	1.0	1.0	1.0	1.0
1% 柠檬酸三钠	ml	1.0	1.4	1.8	2.2
胶体金外观	颜色	紫色透亮	紫红透亮	鲜红透亮	橙红透亮
波峰范围	nm	555	540	533	521

[0047] 表 2. 内部质控品检测结果——胶体金颗粒大小的选择 (2)

[0048]

胶体金溶液编号	检测结果					
	P1	P2	P3	N1	N2	N3
1	+++	++	+	-	±	-
2	+++	++	+	-	-	-
3	++	+	-	-	-	-
4	++	±	-	-	-	-

[0049] 结果分析:表 1、表 2 可以看出,2 号胶体金溶液颜色紫红、透亮,无混浊及漂浮物,标记后的胶体金亲和素其敏感性、特异性最好,故选择制备胶体金的工艺条件为:在 100ml 双蒸水中加入 1% 氯金酸溶液 1.0ml 煮沸,在搅拌条件下加入 1.4ml 的 1% 柠檬酸三钠溶

液,继续煮沸 5 分钟,自然冷却待用。

[0050] 2. 胶体金标记亲和素工艺的优化

[0051] 2.1 原理:胶体金由于静电作用形成带负电的疏水胶溶液,胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与亲和素的正电荷基团形成牢固的结合,形成稳定的亲和素金标记物。

[0052] 2.2 胶体金标记最适 PH 值的选择

[0053] 取若干个 1.5ml 离心管,分别加入 1.0ml 胶体金,用 5.0mol/L 的 HCl 和 0.1mol/L 的  $K_2CO_3$  将 pH 分别调整为 3,4,5,6,7,8,9,10。每管加入 50  $\mu$ g 的亲和素,混匀,室温放置 10 分钟。每管加入 100  $\mu$ l 10% NaCl 溶液,混匀,室温放置 2 小时,观察胶体金颜色变化,记录胶体金颜色保持不变的最低 pH(X)。调整 pH 为 X-0.8、X-0.4、X、X+0.4、X+0.8,重复以上步骤,胶体金颜色保持不变的最低 pH 值即为标记的最适 pH 值。结果详见表 3、表 4。

[0054] 表 3. 胶体金标记最适 PH 值的选择 (1)

[0055]

pH 值	5mol/LHCl 调整				0.1mol/L $K_2CO_3$ 调整			
	3	4	5	6	7	8	9	10
结果	变蓝	变蓝	变蓝	变蓝	略变蓝	微变色	不变色	不变色

[0056] 表 4. 胶体金标记最适 PH 值的选择 (2)

[0057]

pH 值	8.2	8.6	9.0	9.4	9.8
0.1mol/L $K_2CO_3$	19 $\mu$ l/ml	22 $\mu$ l/ml	27 $\mu$ l/ml	36 $\mu$ l/ml	48 $\mu$ l/ml
结果	微变色	微变色	不变色	不变色	不变色

[0058] 结果分析:从表 3、表 4 可以看出,当 pH 值为 9.0 ~ 10.0 时,金标记亲和素的稳定性好,选定胶体金标记的最适 pH 值为 9.0,即加入 0.1mol/L 的  $K_2CO_3$  27  $\mu$ l/ml。

[0059] 2.3 亲和素最适标记量的选择

[0060] 取若干个 1.5ml 离心管,分别加入 1ml 胶体金,用 0.1mol/L 的  $K_2CO_3$  将 pH 分别调整为 9.0。每管依次分别按 5  $\mu$ g、10  $\mu$ g、15  $\mu$ g、20  $\mu$ g、25  $\mu$ g、30  $\mu$ g、35  $\mu$ g、40  $\mu$ g 加入亲和素,混匀,室温放置 10 分钟。每管加入 100  $\mu$ l 10% NaCl 溶液,混匀,室温放置 2 小时,观察胶体金颜色变化,记录胶体金颜色保持不变的最低亲和素加入量,胶体金颜色保持不变的最低亲和素加入量即为标记的亲和素最适标记量。结果详见表 5。

[0061] 表 5. 亲和素最适标记量的选择

[0062]



## 亲和素

5 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml	30 $\mu$ g/ml	35 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ g/ml
变蓝	变蓝	略变蓝	微变色	不变色	不变色	不变色	不变色

[0063] 结果分析:从表 5 可以看出,当亲和素浓度为 25 ~ 40  $\mu$ g/ml,金标记亲和素不变色,最低亲和素浓度为 25  $\mu$ g/ml,故选定亲和素最适标记量为 25  $\mu$ g/ml。

[0064] 3. 检测线包被浓度和胶体金标记亲和素稀释比例的选择

[0065] 按照上述确定好的金标记工艺标记亲和素,将其体积浓缩至原体积的 1/10,再以不同的稀释比例稀释浓缩液,用稀释液按 60  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 涂金标垫,干燥备用;向原倍的重组 EB 病毒 VCA 抗原中按 25  $\mu$ g/ml 的浓度加入生物素,混匀,将混合液按 60  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 涂抗原垫,干燥备用。以不同检测线包被浓度按 0.15  $\mu$ l/mm 的包被量包被硝酸纤维素膜(NC 膜)检测线。将金标垫、抗原垫和划线 NC 膜配对,检测内部质控血清,实验方案如表 6,实验结果如表 7、表 8。

[0066] 表 6. 试验设计方案

[0067]

检测线包被浓度	金标记物稀释比例			
	1:4	1:8	1:12	1:16
0.8mg/ml	A1	A2	A3	A4
1.0mg/ml	B1	B2	B3	B4
1.2mg/ml	C1	C2	C3	C4
1.4mg/ml	D1	D2	D3	D4
1.6mg/ml	E1	E2	E3	E4

[0068] 表 7. 10 份阳性内部质控品和最低检出限质控品检测结果

[0069]

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	L2
A1	+	+	±	±	±	+	±	+	+	+	±
A2	+	+	±	±	±	+	±	+	+	+	±
A3	+	+	±	-	±	+	±	+	+	+	-
A4	+	+	-	-	±	+	-	±	+	+	-
B1	++	++	±	±	+	++	+	++	++	++	+
B2	+	++	±	±	±	+	+	++	+	++	±
B3	+	+	±	±	±	+	+	+	+	+	±
B4	+	+	-	±	±	+	+	±	+	+	-
C1	++	++	+	±	+	++	+	++	++	+++	+

[0070]

C2	++	++	+	+	+	++	±	++	++	++	+
C3	+	++	±	+	+	+	±	++	+	++	±
C4	+	+	±	+	+	+	±	++	+	++	±
D1	+++	++	+	+	++	+++	++	+++	++	+++	+
D2	++	++	+	+	+	++	+	++	++	+++	+
D3	++	++	+	+	+	++	+	++	++	++	±
D4	++	++	±	+	+	++	+	++	++	++	±
E1	+++	+++	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
E2	+++	+++	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
E3	+++	++	+	±	++	+++	++	+++	+++	+++	+
E4	++	++	+	±	++	+++	+	++	+++	+++	+

[0071] 表 8.10 份阴性内部质控品检测结果

[0072]

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	-	±	-	-	±	-	-	-	±	-
C2	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
C3	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1	-	±	-	-	+	-	-	-	±	-
D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
D4	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
E1	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-

[0073]

E2	-	±	-	-	+	-	-	-	±	-
E3	-	±	-	-	±	-	-	-	±	-
E4	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-

[0074] 结果分析:通过表 7、表 8 结果可以看出 D2 组合的灵敏度高,特异性好,故将检测线的包被浓度定为 1.4mg/ml,按 0.15  $\mu$ l/mm 的包被量包被 NC 膜检测线;将胶体金标记亲和素稀释比例定为 1:8,即胶体金结合物稀释液加入至原体积的 80%,原体积以胶体金体积计算。金标垫的制备条件为稀释后的胶体金结合物按 60  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 浸泡涂抹。

[0075] 4. 生物素标记重组 EB 病毒 VCA 抗原最适标记量的选择

[0076] 取若干个 1.5ml 离心管,分别加入 1ml 重组 EB 病毒 VCA 抗原。每管依次分别按 5  $\mu$ g、10  $\mu$ g、15  $\mu$ g、20  $\mu$ g、25  $\mu$ g、30  $\mu$ g、35  $\mu$ g、40  $\mu$ g 加入生物素,混匀,将混合液按 60  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 涂抗原垫,干燥备用。按照上述确定好的金标垫制作工艺、检测线包被工艺制作金标垫和划线 NC 膜,将金标垫、抗原垫和划线 NC 膜配对,检测内部质控血清。结果见表 9、表 10。

[0077] 表 9. 10 份阳性内部质控品和最低检出限质控品检测结果

[0078]

	5 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml	30 $\mu$ g/ml	35 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ g/ml
P1	+	+	+	+	++	++	+++	+++
P2	+	+	+	+	+	++	+++	+++
P3	±	±	+	±	+	++	++	+++
P4	-	-	-	±	±	+	++	+++
P5	±	±	+	+	++	++	+++	+++
P6	+	+	+	+	++	+++	+++	+++
P7	-	±	±	+	+	++	+++	+++
P8	±	±	+	±	+	++	++	+++
P9	±	+	+	+	++	+++	+++	+++
P10	+	+	+	+	++	+++	+++	+++
L2	-	-	±	±	±	++	++	+++

[0079] 表 10. 10 份阴性内部质控品检测结果

[0080]

	5 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml	30 $\mu$ g/ml	35 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ g/ml
N1	-	-	-	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	-	-	-	±	±
N3	-	-	-	-	-	-	-	-
N4	-	-	-	-	-	-	-	-
N5	-	-	-	-	-	-	±	±
N6	-	-	-	-	-	-	-	±
N7	-	-	-	-	-	-	-	-
N8	-	-	-	-	-	-	-	-
N9	-	-	-	-	-	-	-	±
N10	-	-	-	-	-	-	-	±

[0081] 结果分析:通过表 9、表 10 结果可以看出,当加入的生物素浓度为 25 ~ 30  $\mu$ g/ml 时,抗原垫的灵敏度高,特异性好,选定生物素最适标记量为 30  $\mu$ g/ml。

[0082] 5 质控线包被浓度的选择

[0083] 将生物素配成不同浓度,与鼠抗人 IgA 单克隆抗体 1.4mg/ml,以 0.15  $\mu$ l/mm 的包

被量分别包被在 NC 膜的检测线和质控线位置上,干燥后与制备好的金标垫配套使用,用内部质控品进行检测,结果详见表 11。

[0084] 表 11 质控线检测结果

[0085]

生物素浓度 (mg/ml)	1.0	1.4	1.8	2.2	2.6	3.0 <sub>10</sub>
P1	+	++	++	+++	+++	+++
P2	+	++	++	+++	+++	+++
P3	+	++	++	+++	+++	+++
N1	+	++	++	+++	+++	+++
N2	+	++	++	+++	+++	+++
N3	+	++	++	+++	+++	+++ <sub>15</sub>

[0086] 结果分析:从表 11 可以看出,当 C 线抗体浓度  $\geq 2.2\text{mg/ml}$  时,反应到达最大值,所以选择质控线生物素浓度为  $2.2\text{mg/ml}$ 。

[0087] 综上所述,NC 膜最终包被条件为:

[0088] 包被量为  $0.15\mu\text{l/mm}$ ;

[0089] 检测线包被浓度:鼠抗人 IgA 单克隆抗体为  $1.4\text{mg/ml}$ ;

[0090] 质控线包被浓度:生物素为  $2.2\text{mg/ml}$ 。

[0091] 6. 划线 NC 膜和金标垫干燥条件的选择

[0092] 适宜的干燥条件,不仅影响试剂盒的灵敏度,而且关系到试剂盒的稳定性。结果表明,在干燥环境为  $37^\circ\text{C}$  条件下,干燥 3 小时制备的试纸条,其敏感性,稳定性均较好,故选择  $37^\circ\text{C}$  条件下干燥 3 小时为划线 NC 膜和金标垫生产的干燥条件。

[0093] 实施例 2. 试剂配制

[0094] 1. 原料要求

[0095] 1.1 重组 EB 病毒 VCA 抗原

[0096] 生产商:香港神农有限公司

[0097] 商品名:重组 EB 病毒 VCA 抗原、重组 EB 病毒 NA1 抗原

[0098] 批号:20131224E

[0099] 外观:无色透明液体;

[0100] 浓度及纯度要求:浓度大于  $2.0\text{mg/ml}$ ,用 SDS-PAGE 测定,上样量在 10 微升条件下仅存一条带。

[0101] 1.2 鼠抗人 IgA 抗体

[0102] 生产商:杭州隆基生物技术有限公司

[0103] 商品名:鼠抗人 IgA 抗体

[0104] 批号:20131105

[0105] 外观:无色透明液体;

[0106] 浓度及纯度要求:浓度大于 2.0mg/ml,用 SDS-PAGE 测定,上样量在 10 微升条件下存两条带。

[0107] 2. 液体配制

[0108] 2.1 0.05M PBS 缓冲液的配制:

[0109] (1) 标准配方:按照 100ml 量计。

[0110]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.450g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.148g

NaCl 0.850g

纯化水 80.0ml

纯化水定容至 100.0ml

[0111] (2) 配制方法

[0112] 按照标准配方内容准确称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl 加纯化水 80.00mL,搅拌使充分溶解后,使用 pH 计测量液体 pH 值应在 7.30 ~ 7.50 范围内,用纯化水两倍稀释检测所配溶液的电导率应在  $9000 \mu\text{s}/\text{cm}$  ~  $13000 \mu\text{s}/\text{cm}$ ,用纯化水定容至 100.00mL,混合均匀。2 ~ 8°C 保存备用,有效期 14 天。

[0113] 2.2 1% 氯金酸溶液的配制:

[0114] (1) 标准配方:按照 100mL 量计。

[0115]

氯金酸 1.0g

纯化水定容至 100mL

[0116] (2) 配制方法:

[0117] 取一支 1g/ 支的氯金酸,打开瓶子;量取 2mL 纯化水倒入容器内;取纯化水把氯金酸溶解并且将盛放氯金酸的试剂瓶清洗干净,将清洗瓶倒入容器内,再加纯化水至 100mL;盖紧瓶盖,充分摇晃 15 分钟,混合均匀,用铝箔包好,2 ~ 8°C 保存备用,有效期 12 个月。

[0118] 2.3 0.1M 碳酸钾溶液配制:

[0119] (1) 标准配方:按照 20mL 量计。

[0120]  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0.276g

[0121] 纯化水 20.0mL

[0122] (2) 配制方法:

[0123] 量取待配液体积 80% 的纯化水于试剂瓶中,按照标准配方中内容准确称取  $\text{K}_2\text{CO}_3$  加入试剂瓶中,加纯化水至 20mL,使充分溶解。2 ~ 8°C 保存备用,有效期 14 天。

[0124] 2.4 10% 牛血清白蛋白溶液的配制:

[0125] (1) 标准配方:按照 20mL 量计。

[0126] 牛血清白蛋白 2.00g

[0127] 纯化水 20.00mL

[0128] (2) 配制方法:

[0129] 量取待配液体积 80% 的纯化水于试剂瓶中,按照标准配方内容准确称取牛血清白蛋白加入试剂瓶中,待完全溶解,加纯化水至 20.0mL,使充分溶解,即用即配。

[0130] 2.5 胶体金结合物稀释液的配制:

[0131] (1) 标准配方:按照 100mL 量计。

[0132]

三羟甲基氨基甲烷	0.1211g
盐酸	适量
蔗糖	2.00g
PVP-10	1.00g
牛血清白蛋白	2.00g
吐温-20	0.5mL
纯化水	80.0mL

以纯化水定容至 100.0mL

[0133] (2) 配制方法:

[0134] 按照标准配方内容准确称取三羟甲基氨基甲烷于容器中,加纯化水 80mL,搅拌使充分溶解后,然后滴加盐酸使其 pH 调制到 9.0,再将称量好的其他配方组分依次加入上述溶液中,充分搅拌溶解后,根据配方用加样器量取吐温-20 加入试剂瓶中,使用纯化水定容至 100.0mL,使用 pH 计测量液体的 pH 值为 8.60 ~ 8.80。2 ~ 8℃ 保存备用,有效期 14 天。

[0135] 2.6 样本稀释液的配制:

[0136] (1) 标准配方:按照 100.0mL 量计。

[0137]

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.58g
氯化钠	0.85g
纯化水	80mL

[0138]

以纯化水定容至 100.0mL

[0139] (2) 配制方法

[0140] 按照标准配方准确称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 加纯化水 80.0mL,搅拌使充分溶解后加入 0.85g 氯化钠,充分混匀,定容至 100mL,使用 pH 计测量液体的 pH 值为 7.30 ~ 7.50,4 ~ 30℃ 保存,有效期 14 个月。

[0141] 2.7 胶体金的制备:

[0142] (1) 标准配方:按照 100.0mL 量计。

[0143]

1%氯金酸溶液	1.0mL
1%柠檬酸三钠溶液	1.8mL
纯化水	99.0mL

以纯化水定容至 100.0mL

[0144] (2) 制备方法

[0145] 按照标准配方内容准确量取 1% 氯金酸溶液 1mL, 加入到 99mL 纯化水中, 边加热边搅拌至沸腾; 5 分钟后, 准确量取 1.4mL 的 1% 柠檬酸三钠, 迅速、一次性加入到容器中, 继续加热煮沸 5min。冷却至室温后加入纯化水恢复至原来体积。2 ~ 8℃ 保存备用, 有效期 14 天。

[0146] 2.8 检测线包被液体的配制:

[0147] (1) 标准配方: 按 10mL 量计。

[0148]

0.05M PBS 缓冲液	适量
鼠抗人 IgA 单克隆抗体	12mg

以 0.05M PBS 缓冲液定容至 10.0mL

[0149] 2) 制备方法:

[0150] 按照标准配方内容准确量取鼠抗人 IgA 单克隆抗体 12mg, 加入到相应体积的 0.05M PBS 缓冲液中。充分混匀 15min, 即用即配。

[0151] 2.9 质控线包被液的配制:

[0152] (1) 标准配方: 按照 10mL 量计

[0153]

0.05M PBS 缓冲液	适量
生物素	22mg

0.05M PBS 缓冲液定容至终体积 10mL

[0154] (2) 制备方法:

[0155] 按照标准配方内容准确量取生物素 20mg, 加入到相应体积的 0.05M PBS 缓冲液中, 充分混匀 15min, 用 0.05M PBS 缓冲液定容至终体积 10mL, 使生物素的终浓度为 2.2mg/mL, 即用即配。

[0156] 2.10 胶体金标记亲和素的制备:

[0157] (1) 相关实际标准用量: 按照 80mL 量计。

[0158]



胶体金	100mL
0.1M 碳酸钾溶液	2.5.0mL
胶体金结合物稀释液	80.0mL
亲和素	3.0mg
<u>10%牛血清白蛋白溶液</u>	<u>10.0mL</u>
胶体金结合稀释液浓缩至终体积 160.0mL	

[0159] (2) 制备方法：

[0160] 按照试剂标准用量量取主配方规定量的胶体金于三角瓶中，准确加入主配方规定量的 0.1M 碳酸钾溶液，混匀，静置 10min。准确量取主配方规定量的亲和素，快速搅拌下，将亲和素逐滴加入到三角瓶中，室温静置 40min。准确量取主配方规定量的 10% 牛血清白蛋白溶液，快速搅拌下逐滴加入到三角瓶中，室温静置 15min。10000rpm, 4℃ 离心 30min，小心弃去上清液，加入胶体金结合物稀释液至原体积的 80%，2 ~ 8℃ 保存备用，有效期 14 天。

[0161] 实施例 3. EB 病毒 VCA-IgA 抗体检测试剂盒（胶体金法）制备

[0162] EB 病毒 VCA IgA 抗体检测试剂盒（胶体金法），包括 NC 膜检测线包被的鼠抗人 IgA 单克隆抗体、质控线上包被的生物素、抗原垫上包被的由生物素标记的重组 EB 病毒 VCA 抗原和金标垫上包被的由胶体金标记的亲和素。鼠抗人 IgA 单克隆抗体为无色透明液体，浓度大于 2.0mg/ml，用 SDS-PAGE 测定，上样量在 10 μ l 条件下存在二条带，包被浓度为 1.4mg/ml；亲和素为无色透明液体，浓度大于 2.0mg/ml，用 SDS-PAGE 测定，上样量在 10 μ l 条件下仅存一条带，标记浓度为 25 μ g/ml；生物素为无色透明液体，浓度大于 2.0mg/ml，标记浓度为 30 μ g/ml。

[0163] EB 病毒 VCA IgA 抗体检测试剂盒（胶体金法）的制备方法包括以下步骤：(1) 划线 NC 膜的制备：用磷酸盐缓冲液将鼠抗人 IgA 单克隆抗体稀释到包被浓度为 1.4mg/ml，将生物素稀释成包被浓度为 2.2mg/ml，用金标划线机将两种包被液划到 NC 膜上，干燥后保存备用。

[0164] (2) 金标垫的制备：将标记浓度为 25 μ g/ml 的亲和素与胶体金进行偶联制得胶体金标记的亲和素复合物，以转速为 10000 转 / 分钟离心 30 分钟，弃上清，加入胶体金结合物稀释液至原体积的 80%，然后用稀释液按 60 μ l/cm<sup>2</sup> 浸泡涂抹玻璃纤维素膜制成金标垫，干燥后保存备用。

[0165] (3) 抗原垫的制备：将标记浓度为 30 μ g/ml 的生物素与重组 EB 病毒 VCA 抗原进行偶联制得生物素标记的组 EB 病毒 VCA 抗原复合物，将混合液按 60 μ l/cm<sup>2</sup> 浸泡涂抹玻璃纤维素膜制成抗原垫，干燥后保存备用。

[0166] (4) 切割装配：将划线 NC 膜、金标垫、抗原垫、吸水纸、样品垫装配成反应板，再用切条机切成 4mm 的试纸条，装卡后，装入铝箔袋内制成产品。

[0167] NC 膜、金标垫和抗原垫生产的干燥条件为 37℃ 条件下干燥 3 小时。

[0168] 实施例 4. 样品检测

[0169] 1. 检测样本的要求

[0170] 血清样本按常规方法由静脉采集。血浆样本可以采用肝素、柠檬酸钠、EDTA 进行

处理。5 天内测定的样本可放置 4℃ 保存。样本放在 -20℃ 至少可以保存 3 个月。样本避免溶血或者反复冻融。混浊或者有沉淀的样本要经过离心或者过滤后澄清后再检测。

### [0171] 2. 检验方法

[0172] 从原包装铝箔袋中取出试剂卡,放在水平工作台上平置并做好样本标记。用加样器取 10 μl 血清或者血浆样品,直接加入到加样孔中,再滴加样本稀释液 2 滴。15-25 分钟内判读结果,25 分钟后检验结果无效。

### [0173] 3. 检验结果

[0174] (1)、阳性:在质控区及检测区均出现紫红色条带。

[0175] (2)、阴性:只在质控区出现一条紫红色条带。

[0176] (3)、无效:质控区 (C) 未出现紫红色条带,表明不正确的操作过程或试剂已变质损坏,实验无效

[0177] 本产品阴阳性符合率、精密性、灵敏度等均符合质量标准要求,效期内产品质量稳定。类风湿因子、乙型肝炎病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、人类免疫缺陷病毒抗体、巨细胞病毒抗体、单纯疱疹病毒抗体阳性标本不会对本品检测结果造成干扰。

### [0178] 实施例 5. 反应时间和加样量的选择

[0179] 生产 EB 病毒 VCA IgA 抗体检测试剂盒 (胶体金法),对其反应时间和加样量进行确定。结果见表 12:

[0180] 表 12. 加样量和判读时间的选择实验结果

[0181]

判读时间	加样量											
	10 $\mu$ l 血清+90 $\mu$ l 稀释液				30 $\mu$ l 血清+70 $\mu$ l 稀释液				50 $\mu$ l 血清+50 $\mu$ l 稀释液			
5 分钟	P1	+	N1	-	P1	+	N1	-	P1	++	N1	-
	P2	±	N2	-	P2	±	N2	-	P2	+	N2	-
	P3	-	N3	-	P3	-	N3	-	P3	±	N3	-
10 分钟	P1	++	N1	-	P1	+++	N1	-	P1	+++	N1	-
	P2	+	N2	-	P2	+	N2	-	P2	++	N2	-
	P3	-	N3	-	P3	±	N3	-	P3	+	N3	-
15 分钟	P1	++	N1	-	P1	+++	N1	-	P1	+++	N1	-
	P2	++	N2	-	P2	++	N2	-	P2	++	N2	±
	P3	±	N3	-	P3	+	N3	-	P3	++	N3	-
20 分钟	P1	+++	N1	-	P1	+++	N1	-	P1	+++	N1	±
	P2	++	N2	-	P2	++	N2	±	P2	+++	N2	±
	P3	+	N3	-	P3	+	N3	-	P3	++	N3	-
25 分钟	P1	+++	N1	-	P1	+++	N1	±	P1	+++	N1	±
	P2	++	N2	-	P2	+++	N2	±	P2	+++	N2	+
	P3	++	N3	-	P3	++	N3	-	P3	++	N3	±
30 分钟	P1	+++	N1	-	P1	++	N1	±	P1	+	N1	+
	P2	+++	N2	±	P2	++	N2	+	P2	++	N2	+
	P3	+	N3	-	P3	++	N3	-	P3	+++	N3	±

[0182] 结果分析：从表 10 实验结果可以看出，加样量的多少会影响试纸条产生正确的反应结果，加样量低会出现漏检，加样量高时容易产生假阳性。通过以上实验结果，考虑到检测结果的稳定性和操作的方便性，选择加样量为 10  $\mu$  l 血清再加入 90  $\mu$  l 样本稀释液，15-25 分钟判读为加样判读条件。

#### [0183] 实施例 6 血清及血浆不同抗凝剂标本对比验证试验

[0184] 采集血清用不同抗凝剂肝素、柠檬酸钠、EDTA 处理血液样本和制备血清，用上述确定的生产条件制备的试纸条检测处理后的样本，结果显示：抗凝剂肝素、柠檬酸钠、EDTA 处理血液样本对检测结果无影响，与血清检测结果一致。因此，本试剂盒可用于血清和血浆样本的检测。

[0185] 以上所述仅为本发明的优选实施例，并不用于限制本发明，尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对本领域的技术人员来说，其依然可以对前述各实施例所记

载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换,这些修改和替换均应属于本发明的范围。

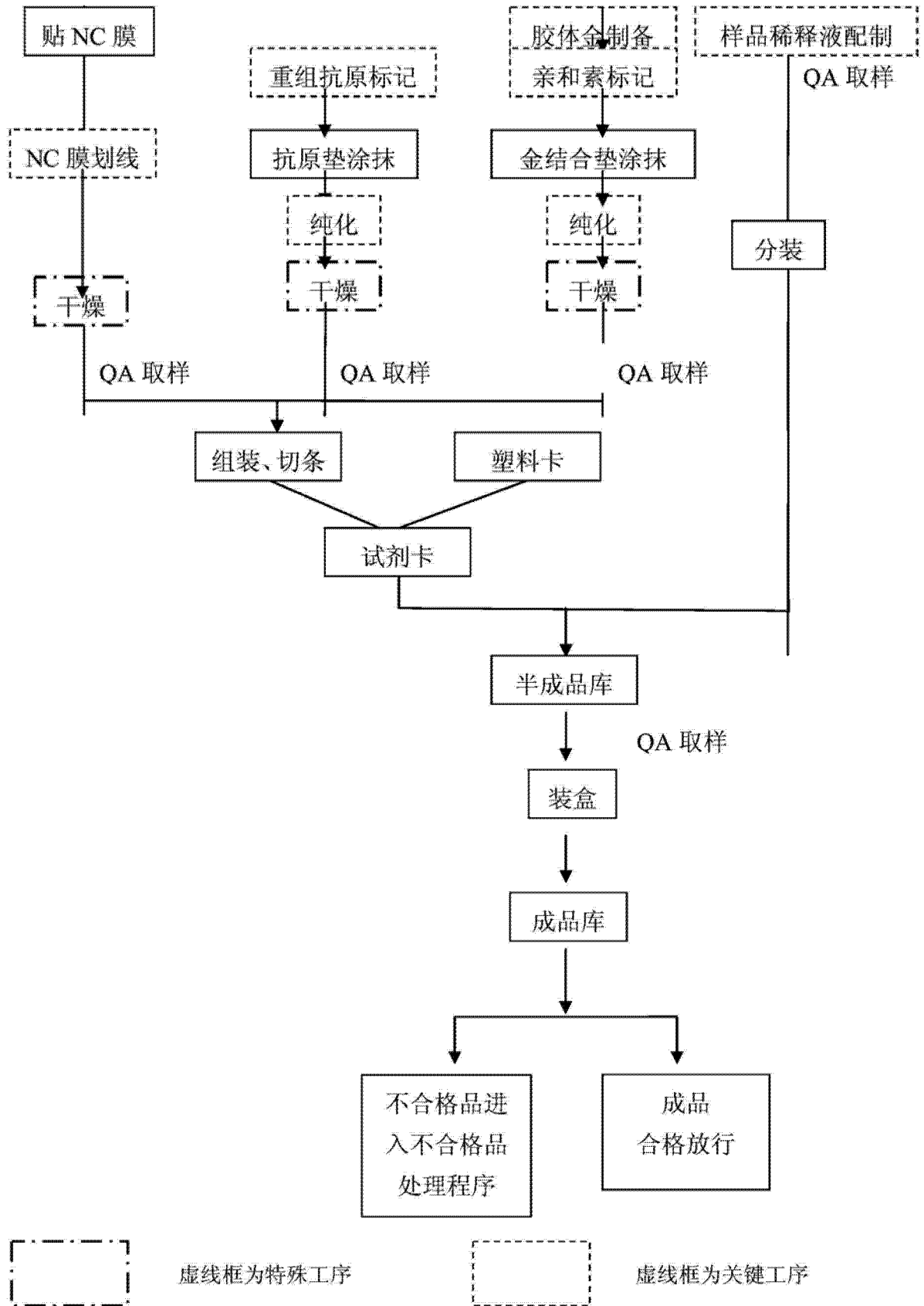


图 1