



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103558381 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201310547321. 9

(22) 申请日 2013. 11. 06

(71) 申请人 昆明云大生物技术有限公司
地址 650106 云南省昆明市高新区科高路
2199 号

(72) 发明人 马岚

(74) 专利代理机构 云南派特律师事务所 53110
代理人 张玺

(51) Int. Cl.
G01N 33/571 (2006. 01)
G01N 33/558 (2006. 01)
G01N 33/532 (2006. 01)

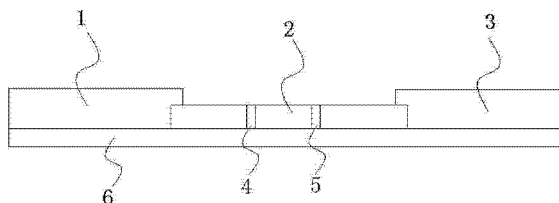
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸及其制备方法,属于人类艾滋病病毒抗体的检测试剂领域。它包括依次连接的样品垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述样品垫含有超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A;所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线含有人类艾滋病病毒重组抗原,所述质控线含有能与所述重组蛋白 A 特异结合的抗重组蛋白 A 抗体;所述人类艾滋病病毒为人类艾滋病病毒 1+2 型。本发明的有益效果是:灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。



1. 检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在于:包括依次连接的样品垫(1)、硝酸纤维膜(2)和吸水垫(3),所述样品垫(1)含有超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A;所述硝酸纤维膜(2) 包被有相互分离的检测线(4)和质控线(5),所述检测线(4)含有人类艾滋病病毒重组抗原,所述质控线(5)含有能与所述重组蛋白 A 特异结合的抗重组蛋白 A 抗体;所述人类艾滋病病毒为人类艾滋病病毒 1+2 型。

2. 根据权利要求 1 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:所述超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 是将重组蛋白 A 和超顺磁性复合粒子以肽键共价结合形成聚合物。

3. 根据权利要求 2 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:所述超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 的制备方法包括以下步骤:

a、活化磁性粒子的制备:按重量份数比,称取超顺磁性复合粒子 2~3 份、EDC0.5~1.5 份和 NHS1~3 份,混匀,在 35℃~40℃下反应 20~40 分钟,随后用缓冲液洗涤,得活化磁性粒子;

b、含有偶联后磁性粒子的反应液制备:按重量份数比,称取所述活化磁性粒子 2~3 份、重组蛋白 A0.1~0.2 份和硼砂缓冲液 0.5~1 份,混匀,在 35℃~40℃下反应 3~4 小时,得含有偶联后磁性粒子的反应液;

c、取所述含有偶联后磁性粒子的反应液,加入占整个所述反应液体积 0.5%~1.5% 的 BSA 溶液,混匀,在 35℃~40℃下反应 20~40 分钟,随后将反应得到的封闭后磁性粒子进行洗涤、悬浮,得到超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 成品。

4. 根据权利要求 3 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:所述超顺磁性复合粒子为超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子;所述超顺磁性复合粒子的粒径为 60nm~300nm,该粒径的偏差在 10%~30% 之间;所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度为 30emu/g~80emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 秒~100 秒。

5. 根据权利要求 2 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:在将所述重组蛋白 A 和超顺磁性复合粒子以肽键共价结合形成聚合物前,还包括将该超顺磁性复合粒子进行活化,使超顺磁性复合粒子表面带有官能团。

6. 根据权利要求 5 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:所述官能团为羧基或氨基中的一种;所述官能团的含量为 50~500 $\mu\text{mol/g}$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:在所述检测线(4)中含有人类艾滋病病毒重组抗原的浓度为 0.5~2mg/ml;在所述质控线(5)中含有抗重组蛋白 A 抗体的浓度为 0.5~2mg/ml。

8. 根据权利要求 1 所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,其特征在於:所述人类艾滋病病毒重组抗原为人类艾滋病病毒 1+2 型基因工程重组抗原;所述人类艾滋病病毒 1+2 型基因工程重组抗原为 gp36、gp41 或 gp120 中的一种。

9. 一种基于权利要求 1-8 中任一项所述的检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸的制备方法,其特征在於:包括以下步骤:将样品垫(1)、硝酸纤维膜(2)和吸水垫(3)依次连接,将含有人类艾滋病病毒重组抗原和含有能与所述重组蛋白 A 特异结合的抗重组蛋白 A 抗体分别喷涂于硝酸纤维膜(2)两端的区域,对应形成检测线(4)和质控线(5),得成品。

10. 根据权利要求 1 所述免疫层析试纸在制备人类艾滋病病毒 1+2 型抗体检测试纸中的应用。

检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于人类艾滋病病毒抗体的检测技术领域,具体涉及一种检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 艾滋病,即获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS),其病原为人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV),亦称艾滋病病毒,该病毒破坏人体的免疫能力,导致免疫系统失去抵抗力,而导致各种疾病及癌症得以在人体内存活,最后罹患艾滋病。目前,艾滋病不仅已成为严重威胁我国人民健康的公共卫生问题,且已影响到经济发展和社会稳定。人类免疫缺陷病毒(HIV)1+2型抗体的检测对于艾滋病的诊断和鉴别、流行病学的调查、献血员的筛选、预后判断及治疗效果的考察和药物的筛选具有重要的意义。

[0003] 超顺磁性复合粒子具有良好的磁学特性,由于其受背景干扰小,特别适宜于不含磁性物质的生物样品的检测。胶体金和荧光标记分子用于测流免疫层析检测时,只可在其检测区膜表面观测到约 10% 的信号分子强度,而用超顺磁性复合粒子作为标记材料,则可检测到检测区膜三维立体结构中的所有磁信号分子,可极大提高灵敏度,并可用对应的磁信号检测仪达到定量测定。因此,超顺磁性复合粒子是近年来在 LFIA 中受到关注的材料。

[0004] 然而,目前报道的生物检测用磁性纳米复合粒子多采用化学法如共沉淀法先制备得到有机相的磁性纳米粒子后,再采用硅(SiO_2)或聚苯乙烯、聚丙烯酸、明胶等高分子材料对其表面进行稳定化包覆修饰,以得到稳定的、水溶性的磁性标记材料。但这些制备修饰方法往往较为繁琐复杂,得到的超顺磁性复合粒子在尺寸大小、生物相容性、饱和磁强度、外磁场响应速度、稳定性和标记效率等方面不能同时满足 LFIA 的要求:其尺寸多大于 300nm,由于磁珠颗粒偏大,在试纸上的泳动时间较慢,显色时间较长;而太小的粒子又无法提供足够的磁共振信号;另外还有生物相容性不稳定、磁珠容易聚合等问题;这些不足限制了超顺磁性复合粒子在 LFIA 中的应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸。

[0006] 本发明的另一目的是提供上述免疫层析试纸的制备方法。

[0007] 本发明所采取的技术方案是检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸,包括依次连接的样品垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述样品垫含有超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A;所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线含有人类艾滋病病毒重组抗原,所述质控线含有能与所述重组蛋白 A 特异结合的抗重组蛋白 A 抗体;所述人类艾滋病病毒为人类艾滋病病毒 1+2 型。其中,吸水垫为样品在试纸上层析提供动力。

[0008] 作为优选,所述超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 是将重组蛋白 A 和超顺磁性复合粒子以肽键共价结合形成聚合体。

[0009] 作为优选,所述超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 的制备方法包括以下步骤:

[0010] a、活化磁性粒子的制备:按重量份数比,称取超顺磁性复合粒子 2~3 份、EDC0.5~1.5 份和 NHS1~3 份,混匀,在 35℃~40℃ 下反应 20~40 分钟,随后用缓冲液洗涤,得活化磁性粒子;

[0011] b、含有偶联后磁性粒子的反应液制备:按重量份数比,称取所述活化磁性粒子 2~3 份、重组蛋白 A0.1~0.2 份和硼砂缓冲液 0.5~1 份,混匀,在 35℃~40℃ 下反应 3~4 小时,得含有偶联后磁性粒子的反应液;

[0012] c、取所述含有偶联后磁性粒子的反应液,加入占整个所述反应液体积 0.5%~1.5% 的 BSA 溶液,混匀,在 35℃~40℃ 下反应 20~40 分钟,随后将反应得到的封闭后磁性粒子进行洗涤、悬浮,得到超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 成品。

[0013] 进一步地,所述超顺磁性复合粒子为超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0014] 由于超顺磁性复合粒子要由免疫层析试纸的样品垫泳动至硝酸纤维膜的测试区,实现抗原-抗体的特异结合和标记反应,其粒径 > 300nm 时,在免疫层析试纸上的泳动时间较长,显色时间慢;在偶联时较容易发生聚集,并容易产生非特异反应。若粒径太小,则磁强度又往往不够,泳动不了。因此所述超顺磁性复合粒子的粒径为 60nm~300nm。优选的,所述超顺磁性复合粒子的粒径为 80nm~200nm。特别优选的,所述超顺磁性复合粒子的粒径为 80nm。其所述超顺磁性复合粒子粒径的偏差在 10%~30% 之间。优选的,所述超顺磁性复合粒子粒径的偏差在 10%~20% 之间。特别优选的,所述超顺磁性复合粒子粒径的偏差为 15%。

[0015] 超顺磁性复合粒子的磁饱和强度及其外磁场响应速度直接决定了检测灵敏度及其精确性的高低,传统方法制备的超顺磁性复合粒子的磁饱和强度通常都小于 30emu/g,对应的外磁场响应速度超过 100 秒。为提高本发明免疫层析试纸的灵敏度及其精确性,所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度为 30emu/g~80emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 秒~100 秒。优选的,所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度为 35emu/g~70emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 秒~50 秒。特别优选的,所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度为 40emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 秒。

[0016] 为用于提高人类艾滋病病毒 1+2 型抗体的检测性能,在将所述重组蛋白 A 和超顺磁性复合粒子以肽键共价结合形成聚合物前,可将该超顺磁性复合粒子进行活化,使超顺磁性复合粒子表面带有易于与重组蛋白 A 偶联的官能团。作为优选,所述官能团为羧基或氨基中的一种;所述官能团的含量为 50~500 $\mu\text{mol/g}$ 。优选的,官能团为羧基,羧基的含量为 50~300 $\mu\text{mol/g}$ 。特别优选的,羧基的含量为 80 $\mu\text{mol/g}$ 。

[0017] 进一步地,在所述检测线中含有人类艾滋病病毒重组抗原的浓度为 0.5~2mg/ml;在所述质控线中含有抗重组蛋白 A 抗体的浓度为 0.5~2mg/ml。

[0018] 进一步地,所述人类艾滋病病毒重组抗原为人类艾滋病病毒 1+2 型基因工程重组抗原;所述人类艾滋病病毒 1+2 型基因工程重组抗原为 gp36、gp41 或 gp120 中的一种。

[0019] 一种检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸的制备方法,包括以下步骤:将样品垫、硝酸纤维膜和吸水垫依次连接,将含有人类艾滋病病毒重组抗原和含有能与所述重组蛋白 A 特异结合的抗重组蛋白 A 抗体分别喷涂于硝酸纤维膜两端的不同区域,对应形成检测线和质控线,得成品。

[0020] 样品垫的制备方法如下：将玻璃纤维纸置于 37℃ 的缓冲液中浸泡 1 小时，然后取出晾干，备用。再将超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 采用稀释液稀释 50 倍，然后喷到备用的玻璃纤维纸上，得样品垫成品。该制备方法中的缓冲液和稀释液为同一种溶液，由每 2ml TritonX100 中，添加 10g BSA、50g 蔗糖和 950ml 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液混合得到缓冲液，调 PH 到 7.4，并定容到 1000ml 制得。

[0021] 在制备免疫层析试纸时，在将样品垫、硝酸纤维膜和吸水垫依次连接前，可将样品垫和包被有检测线和质控线的硝酸纤维膜进行干燥。

[0022] 本发明涉及免疫层析试纸在制备人类艾滋病病毒 1+2 型抗体检测试纸中的应用。待检测的样品具体可为血清、血浆等。

[0023] 本发明的技术原理为：

[0024] HIV1+2 型抗体检测试剂与超顺磁性复合粒子标记的免疫层析检测技术相关，是采用超顺磁性复合粒子作为标记材料，进行快速免疫层析测定的一类方法，该技术整合了磁性纳米材料化学合成、标记技术、测流免疫层析技术等相关领域的研究。

[0025] 本发明免疫层析试纸之所以能检测人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体，在于采用了一种基于超顺磁性复合粒子标记的测流免疫层析检测的方法，即将人类艾滋病病毒(HIV)1+2 型重组抗原和抗重组蛋白 A 抗体分别喷涂于检测线和质控线处，样品垫上喷涂超顺磁性复合粒子标记的重组蛋白 A。基于测流免疫层析的原理，加入待测样品后，样品中的人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体与磁标记的重组蛋白 A 结合后层析到检测线处喷涂的人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型重组抗原，在检测线处形成包被抗原 - 抗体 - 磁标记重组蛋白 A 免疫复合物，多余的磁标重组蛋白 A 则在质控线处与抗重组蛋白 A 抗体形成磁标免疫复合物。用磁性试纸判读仪测定检测线处超顺磁性微球的磁强强度，通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果，质控线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0026] 其具体的技术步骤包括：

[0027] (一) 超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 的制备

[0028] 采用适合的纳米超顺磁性复合粒子，活化其表面的羧基后，采用化学偶联的方式将重组蛋白 A 定向连接到该超顺磁性复合粒子表面。

[0029] (二) 测试区检测线和质控线处抗原 / 抗体的包被

[0030] 采用专门的喷膜仪器，于测试区的检测线处喷涂人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型重组抗原，于质控线处喷涂抗重组蛋白 A 抗体。

[0031] (三) 样品垫处标记探针的包被

[0032] 采用喷涂仪器，于样品垫特定位置处喷涂超顺磁性微球标记的重组蛋白 A。

[0033] (四) 免疫层析试纸的组装成型

[0034] 按照免疫层析试纸的结构示意图(见图 1) 要求，于塑料支撑背板中间粘贴作为测试区的硝酸纤维素(NC)膜，于 NC 膜的检测线端粘贴样品垫，质控线端粘贴吸水垫。在其上面粘贴透明保护膜。采用专门的试纸分切机，将整块免疫层析试纸分切为一定宽带的纸条，用装有干燥剂的专门的铝箔袋进行包装。

[0035] (五) 抗原 - 抗体磁标免疫复合物的形成

[0036] 于上述组装成型的免疫层析试纸的加样孔处加入待测样品，样品中的人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体与磁标记的重组蛋白 A 结合后层析到检测线处喷涂的人类艾滋病病

毒(HIV) 1+2 型重组抗原,在检测线处形成包被抗原-抗体-磁标记重组蛋白 A 免疫复合物,多余的磁标重组蛋白 A 则在质控线处与抗重组蛋白 A 抗体形成的磁标免疫复合物。

[0037] (六) 磁标免疫复合物磁场强度检测

[0038] 用磁性试纸判读仪测定检测线处超顺磁性微球的磁场强度,通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果,质控线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0039] 本发明采用的超顺磁性复合粒子是购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 MP-2 (聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的水溶性纳米晶 TEM 照片见图 2),所采用的制备方法是先用化学法制得的油溶性 Fe_3O_4 溶解在有机试剂中得到溶液 A,将双亲性齐聚物溶于 3 次蒸馏水中并调节 pH 为 8 ~ 10 得溶液 B,常温下将溶液 B 注入溶液 A 中,混合液进行充分搅拌并使有机溶剂挥发,进行离心分离,将离心分离的产物干燥后即可得水溶性的超顺磁性复合粒子。用该法制备获得的磁性复合粒子饱和磁强度高、磁响应快、磁珠尺寸均匀、单分散性好、稳定性强、涌动时间短,可很好地满足 LFIA 的检测要求。

[0040] 本发明中,磁标免疫复合物是指加入检测样品后,经免疫结合,在检测线处形成的人类艾滋病病毒(HIV)1+2 型包被抗原-抗体-磁标重组蛋白 A 免疫复合物,以及在质控线处形成的抗重组蛋白 A 抗体-磁标重组蛋白 A 免疫复合物。

[0041] 本发明中,磁标免疫复合物的磁场强度,是指在检测线和质控线处分别滞留的结合磁珠的数量用美国 Quantum Dot 的超顺磁共振检测仪 MAR 测定后所得到的数值。通过免疫层析反应研究发现,经大量测定不同人血清、血浆等的正常样本,可确定出各不同正常样本的测定均值,以此作为临界值(cutoff)来确定检测线检测样品的阳性或阴性结果。质控线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0042] 本发明的实验证明,通过对超顺磁性复合粒子、人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体和人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型重组抗原分子特性的研究,通过对多种超顺磁性复合粒子制备、包覆及表面修饰条件的优化,选择适合的超顺磁性复合粒子与特异性的抗体进行定向共价化学偶联,获得功能性的磁性标记探针,并通过优化免疫层析反应的各种条件,达到对人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体的客观检测,实现了对人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体的快速和高灵敏测定。

[0043] 本发明中,BSA 为牛血清白蛋白;EDC 为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺; NHS 为 N-羟基丁二酰亚胺。

[0044] 本发明中,重组蛋白 A 和能与重组蛋白 A 特异结合的抗重组蛋白 A 抗体均为市售的通用试剂。

[0045] 本发明的有益效果在于:灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。

附图说明

[0046] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的其中一个实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0047] 图 1 为本发明免疫层析试纸的结构示意图;

[0048] 图 2 为超顺磁性复合粒子电镜图。

[0049] 图中：1- 样品垫，2- 硝酸纤维素膜，3- 吸水垫，4- 检测线，5- 质控线，6- 背板。

具体实施方式

[0050] 为使本领域技术人员详细了解本发明的生产工艺和技术效果，下面以具体的生产实例来进一步介绍本发明的应用和技术效果。

[0051] 实施例一：

[0052] (一) 超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 的制备

[0053] 采用粒径为 100nm、粒径偏差为 15%、磁饱和强度为 40emu/g，对应的外磁场响应速度为 20 秒、表面羧基含量为 80 $\mu\text{mol/g}$ 的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0054] 具体方法是：取 2.5mg 的上述超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子用浓度为 0.1mol、pH 为 4.7 的 MES 缓冲液洗涤，并用 0.4T 的磁架分离富集后，用 1 毫升上述 MES 缓冲液重悬，然后加入 0.96mg 的 EDC 和 2.17mg 的 NHS，混匀，在反应温度为 37°C 的条件下反应 0.5 小时，随后用浓度为 50mmol、pH 为 8.5 的硼砂缓冲液洗涤，得 2.5mg 活化磁性粒子。

[0055] 取 1.5mg 重组蛋白 A 和上述所得活化磁性粒子，置于浓度为 50mmol、pH 为 8.5 的硼砂缓冲液中充分混匀，在 37°C 下反应 3.5 小时，让蛋白和磁性粒子形成稳定的肽键共价结合，得含有偶联后磁性粒子的反应液。加入占整个该反应液体积 1% 的终浓度为 5% (重量百分比) 的 BSA 溶液，混匀，对剩余活性氨基位点进行封闭，在 37°C 下反应 0.5 小时。反应完成后，用浓度为 0.02 摩尔、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤封闭后得到的磁性粒子，悬浮，得超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 成品，置于 4°C 保存待用。

[0056] 其中，硼砂缓冲液的制备为：称取 1.9g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100ml 纯水，调 pH 至 8.5，即得。PBS 缓冲液的制备为：称取 2.3 克 Na_2HPO_4 、0.524 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8.77 克 NaCl 溶于 1L 纯水中，调 pH 至 7.4，即得。

[0057] (二) 免疫层析试纸的制备

[0058] 结合图 1 所示，取浓度为 4mg/ml 的 250ul 抗重组蛋白 A 抗体加入到 750ul 浓度为 0.02mol、pH 为 7.4 的 PB 缓冲液中，混匀，即得浓度为 1mg/ml 抗重组蛋白 A 抗体。再取浓度为 4mg/ml 的 250ul gp36 加入到 750ul 浓度为 0.02mol、pH 为 7.4 的 PB 缓冲液中，混匀，即得浓度为 1mg/ml 的 gp36。选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet 喷头将配制好后的抗重组蛋白 A 抗体喷至硝酸纤维素膜 2 上质控线 5 的位置，将配制好的 gp36 溶液喷至检测线 4 的位置，于相对湿度为 10% 以下的干燥车间内进行抽湿 4 小时后干燥待用。

[0059] 用含 0.2% TritonX100、1% BSA、1% 蔗糖的 0.02mol PBS (pH=7.4) 溶液浸泡玻璃纤维纸 1 小时，浸泡的温度为 37°C，于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后，用上述浸泡玻璃纤维的缓冲液按 50 倍重量稀释超顺磁性复合粒子标记的重组蛋白 A 后，采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet 喷头将此稀释磁标复合物喷涂至上述处理过的玻璃纤维膜上制备形成样品垫 1，于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的样品垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 依次通过背板 6 粘结起来，在样品垫 1 上设置加样孔后，再在样品垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 的表面粘贴保护膜，然后采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 5mm/ 条的宽度，装入检测用夹片待用，得到检测人类艾滋病病毒 1+2 型抗体的免疫层析试纸。

[0060] 实施例二：

[0061] (一) 超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 的制备

[0062] 采用粒径为 60nm、粒径偏差为 10%、磁饱和强度为 80emu/g, 对应的外磁场响应速度为 100 秒、表面羧基含量为 50 $\mu\text{mol/g}$ 的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0063] 具体方法是:取 2.5mg 的上述超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子用浓度为 0.1mol、pH 为 4.7 的 MES 缓冲液洗涤,并用 0.4T 的磁架分离富集后,用 1 毫升上述 MES 缓冲液重悬,然后加入 0.96mg 的 EDC 和 2.17mg 的 NHS,混匀,在反应温度为 35°C 的条件下反应 40 分钟,随后用浓度为 50mmol、pH 为 8.5 的硼砂缓冲液洗涤,得 2.5mg 的活化磁性粒子。

[0064] 取 1.5mg 重组蛋白 A 和上述所得活化磁性粒子,置于浓度为 50mmol、pH 为 8.5 的硼砂缓冲液中充分混匀,在 40°C 下反应 3 小时,让蛋白和磁性粒子形成稳定的肽键共价结合,得含有偶联后磁性粒子的反应液。加入占整个该反应液体积 1.5% 的终浓度为 5% (重量百分比) 的 BSA 溶液,混匀,对剩余活性氨基位点进行封闭,在 38°C 下反应 20 分钟。反应完成后,用浓度为 0.02 摩尔、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤封闭后磁性粒子,悬浮,得超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 成品,置于 4°C 保存待用。

[0065] 其中,硼砂缓冲液的制备为:称取 1.9g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100ml 纯水,调 pH 至 8.5,即得。PBS 缓冲液的制备为:称取 2.3 克 Na_2HPO_4 、0.524 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8.77 克 NaCl 溶于 1L 纯水中,调 pH 至 7.4,即得。

[0066] (二) 免疫层析试纸的制备

[0067] 结合图 1 所示,采用浓度为 0.02mol、pH=7.4 的 PB 缓冲液,将抗重组蛋白 A 抗体配制为浓度 1.5mg/ml (配制方式如实施例一);将 gp41 的浓度配制为浓度 1.5mg/ml (配制方式如实施例一);选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet 喷头将配制好后的抗重组蛋白 A 抗体喷至硝酸纤维素膜 2 上质控线 5 的位置,将配制好的 gp41 喷至检测线 4 的位置,于相对湿度为 10% 以下的干燥车间内进行抽湿 4 小时后干燥待用。用含 0.2%TritonX100、1%BSA、1%蔗糖的 0.02mol、pH=7.4 的 PBS 溶液浸泡玻璃纤维纸 1 小时,浸泡的温度为 37°C,于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后,用上述玻璃纤维处理的缓冲液按 50 倍稀释超顺磁性复合粒子标记的重组蛋白 A 后,采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet 喷头将此稀释磁标复合物喷涂至上述处理过的玻璃纤维素膜上制备形成样品垫 1,于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的样品垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 依次通过背板 6 粘结起来,可在样品垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 的表面粘贴保护膜,然后采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 5mm/ 条的宽度,装入检测用夹片待用,得到检测人类艾滋病病毒 1+2 型抗体的免疫层析试纸。

[0068] 实施例三:

[0069] (一) 超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 的制备

[0070] 采用粒径为 300nm、粒径偏差为 20%、磁饱和强度为 30emu/g, 对应的外磁场响应速度为 100 秒、表面羧基含量为 300 $\mu\text{mol/g}$ 的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0071] 具体方法是:取 2.5mg 的上述超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子用浓度为 0.1mol、pH 为 4.7 的 MES 缓冲液洗涤,并用 0.4T 的磁架分离富集后,用 1 毫升上述 MES 缓冲液重悬,然后加入 0.96mg 的 EDC 和 2.17mg 的 NHS,混匀,在反应温度为 37°C 的条件下反应 20 分钟,随后用浓度为 50mmol、pH 为 8.5 的硼砂缓冲液洗涤,得 2.5mg 的活化磁性粒子。

[0072] 取 1.5mg 重组蛋白 A 和上述所得活化磁性粒子,置于浓度为 50mmol、pH 为 8.5 的

硼砂缓冲液中充分混匀,在 35℃下反应 4 小时,让蛋白和磁性粒子形成稳定的肽键共价结合,得含有偶联后磁性粒子的反应液。加入占整个该反应液体积 0.5% 的终浓度为 5%(重量百分比)的 BSA 溶液,混匀,对剩余活性氨基位点进行封闭,在 36℃下反应 20 分钟。反应完成后,用浓度为 0.02 摩尔、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤封闭后磁性粒子,悬浮,得超顺磁性复合粒子标记重组蛋白 A 成品,置于 4℃保存待用。

[0073] 其中,硼砂缓冲液的制备为:称取 1.9g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100ml 纯水,调 pH 至 8.5,即得。PBS 缓冲液的制备为:称取 2.3 克 Na_2HPO_4 、0.524 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8.77 克 NaCl 溶于 1L 纯水中,调 pH 至 7.4,即得。

[0074] (二) 免疫层析试纸的制备

[0075] 结合图 1 所示,采用浓度为 0.02M、pH=7.4 的 PB 缓冲液,将抗重组蛋白 A 抗体配制为浓度 2mg/ml (配制方式如实施例一);将 gp120 的浓度配制为浓度 2mg/ml (配制方式如实施例一);选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet 喷头将配制好后的抗重组蛋白 A 抗体喷至硝酸纤维素膜 2 上质控线 5 的位置,将配制好的 gp120 喷至检测线 4 的位置,于相对湿度为 10% 以下的干燥车间内进行抽湿 4 小时后干燥待用。用含 0.2%TritonX100、1%BSA、1%蔗糖的 0.02M PBS (pH=7.4)溶液浸泡玻璃纤维纸 1 小时,浸泡的温度为 37℃,于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后,用上述玻璃纤维处理的缓冲液按 50 倍稀释超顺磁性复合粒子标记的重组蛋白 A 后,采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet 喷头将此稀释磁标复合物喷涂至上述处理过的硝酸纤维素膜上制备形成样品垫 1,于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的样品垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 依次通过背板 6 粘结起来,可在样品垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 的表面粘贴保护膜,然后采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 5mm/ 条的宽度,装入检测用夹片待用,得到检测人类艾滋病病毒 1+2 型抗体的免疫层析试纸。

[0076] 为验证本发明免疫层析试纸的效果,特对该免疫层析试纸的性能进行分析。试验如下:

[0077] 1、主要材料:

[0078] 1.1 人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体免疫层析试纸由实施例一获得;

[0079] 1.2 人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体国家参考品(ELISA):由中国药品生物制品检定所提供;

[0080] 1.3 临床血清:共选择临床样品 1064 例,其中 HIV 抗体阳性的 HIV-1 感染者样品 390 份(中检所保存的样品包括 187 份 HIV-1 抗体和核酸均为阳性,1 份核酸阳性但 HIV 抗体为阴性的 HIV-I 感染窗口期样品,其中 153 份样品成功完成基因分型,B 亚型占 33.33%、BC 重组型占 57.52%、AE 重组型占 9.15%),HIV 抗体阴性的 HIV-1 感染窗口期样品 1 份,来自中国药品生物制品检定所和解放军艾滋病检测确认实验室;HIV 阴性样品 673 份,其中 HBV 和 HCV 感染者样品各 100 份来自解放军 302 医院,473 份 HIV 阴性样品来自中国药品生物制品检定所和解放军艾滋病检测确认实验室。

[0081] 2、检测方法:检测前先将待检测样品恢复室温。将人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体免疫层析试纸取出并使加样孔朝外平放在实验台面上。使用精确移液器取待检测样品 50 μl 垂直缓慢滴入试纸条的加液口前端小孔,随即沿加液口后端小孔垂直缓慢滴入 100 μl 冲洗液。在室温孵育 20 分钟后用磁性试纸分析仪进行测试判定结果。其冲洗液为

含 2ml Tween20 的 0.02M、pH 为 7.4 PBS 缓冲液。

[0082] 3、检测结果：

[0083] 3.1 人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体国家参考品(ELISA)检测：对国家参考品血清盘进行检测，结果与预期一致，通过国家标准规定(见表 1)。

[0084] 表 1：HIV1+2 型抗体国家参考品(ELISA)检测结果

[0085]

检测项目	数量	标准规定	检测结果
HIV(+)	20	20/20	20/20
HIV(-)	20	≥ 18/20	20/20
最低检出限	6	≥ 3/6	3/6
CV	2	10/10+ / +	10/10+ / +, 检测结果一致

[0086] 3.2 临床血清检测：临床检测结果见表 2：

[0087] 表 2：临床血清检测结果

[0088]

临床血清	人类艾滋病病毒(HIV) 1+2 型抗体免疫层析试纸检测		总数
	+	-	
+	390	1	391
-	10	663	673
总数	400	664	1064

[0089] 390 份 HIV 抗体为阳性的 HIV-1 感染者样品经本试纸检测，结果均为阳性；1 份 HIV 抗体为阴性的 HIV-1 感染窗口期样品经本试纸检测，结果为阴性。故本试纸的敏感性为 99.74%。673 份 HIV 抗体阴性样品中，663 份样品本试纸检测为阴性，10 份样品本试纸检测为阳性。这 10 份样品来自中国药品生物制品检定所，经我国多家 HIV 抗体诊断试剂标化，均为 HIV 抗体阴性。由此，本试纸存在 10 份假阳性，特异性为 98.51%。本试纸和确认试剂结果一致的样品总共是 1054 份，总体符合率为 99.06%。

[0090] 最后应说明的是，以上实施例仅用以说明而非限制本发明的技术方案，尽管参照上述实施例对本发明进行了详细说明，本领域技术人员应当理解，依然可以对本发明进行修改或者等同替换，而不脱离本发明的精神和范围的任何修改或局部替换，其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

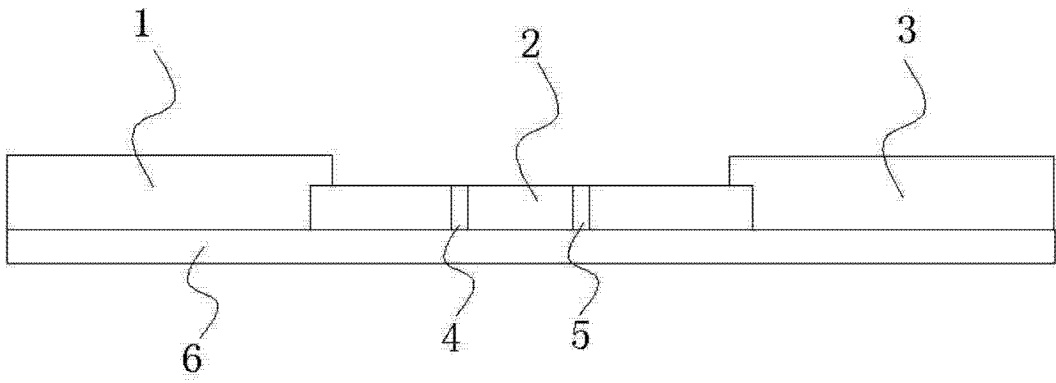


图 1

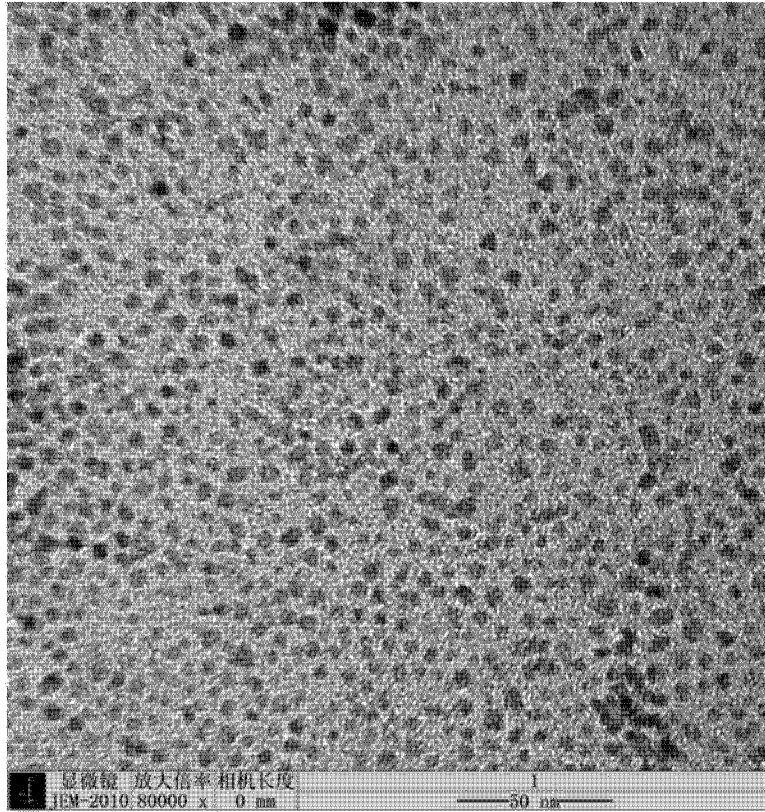


图 2

专利名称(译)	检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN103558381A	公开(公告)日	2014-02-05
申请号	CN201310547321.9	申请日	2013-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	昆明云大生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	昆明云大生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	昆明云大生物技术有限公司		
[标]发明人	马岚		
发明人	马岚		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N33/558 G01N33/56988 G01N2446/86		
代理人(译)	张玺		
其他公开文献	CN103558381B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测人类艾滋病病毒抗体的免疫层析试纸及其制备方法，属于人类艾滋病病毒抗体的检测试剂领域。它包括依次连接的样品垫、硝酸纤维膜和吸水垫，所述样品垫含有超顺磁性复合粒子标记重组蛋白A；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线含有人类艾滋病病毒重组抗原，所述质控线含有能与所述重组蛋白A特异结合的抗重组蛋白A抗体；所述人类艾滋病病毒为人类艾滋病病毒1+2型。本发明的有益效果是：灵敏度高、特异性强、快速、简便，可实现客观化测定。

