



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101793895 A

(43) 申请公布日 2010.08.04

(21) 申请号 200910304120.X

(22) 申请日 2009.07.08

(71) 申请人 北京现代高达生物技术有限  
公司

地址 100167 北京市经济技术开发区宏达北  
路 10 号 5123 室

(72) 发明人 马运国 华艳 吕传臣

(51) Int. Cl.

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

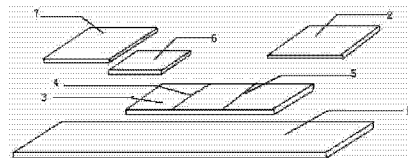
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

弓形虫 P35 血清 IgM 抗体免疫胶体金检测试  
纸条及其制备方法

### (57) 摘要

本发明属于医学和生物学检测领域,涉及一种检测弓形虫 P35 血清 IgM 抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。该试纸条是由 PVC 底板 (1) 上的依次接合吸水垫 (2)、特定包被的硝酸纤维素膜 (NC 膜) (3)、NC 膜上有检测线 (4) 和质控线 (5),喷涂胶体金标记弓形虫 P35 基因重组抗原的玻璃纤维胶体金结合垫 (6)、样品垫 (7) 而组成的条形物。应用本发明所提供的试纸条检测人血清中弓形虫 IgM 抗体水平,具有操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点,操作人员无需专业培训,按说明书即可完成操作,具有良好的应用前景。



1. 一种检测弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的免疫胶体金层析试纸条,其特征在于:所述试纸条是由 PVC 底板 (1) 上的依次接合吸水垫 (2)、特定包被的硝酸纤维膜 (NC 膜) (3)、NC 膜上有检测线 (4) 和质控线 (5),喷涂胶体金标记弓形虫 P35 基因重组抗原的玻璃纤维胶体金结合垫 (6)、样品垫 (7) 而组成的条形物。

所述试纸条其特征在于:所述吸水垫 (2) 为一种滤纸,包括吸水纸和滤油纸;吸水垫贴在底板的末端。

所述试纸条其特征在于:所述特定包被的 NC 膜 (3) 由一层滤膜和胶膜组成,NC 膜上喷涂鼠抗人 -IgM( $\mu$  链) 和兔抗 P35;NC 膜贴在底板的中间,两端分别与结合垫和吸水垫连接。

所述试纸条其特征在于:所述结合垫 (6) 为玻璃纤维纸,喷涂上胶体金标记的弓形虫 P35 基因重组抗原,再 37°C 干燥,结合垫上与样品垫衔接,下与 NC 膜衔接。

所述试纸条,其特征在于:所述样品垫 (7) 为玻璃纤维纸,用硼酸缓冲液浸泡,缓冲液 PH 为 7.2,浸泡处理后,37°C 干燥过夜;样品垫位于结合垫上。

所述的试纸条在制备弓形虫血清 IgM 抗体诊断试纸条中的应用,其特征在于:诊断试纸条还包括标识条,此标识条为两个带有标识的不干胶纸,分别粘贴在试纸条的两端,带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上,由此端浸入待测样品,靠另一端的吸水垫的吸水作用,使样品经过 NC 膜。

所述的试纸条在制备弓形虫血清 IgM 抗体测试卡中的应用,其特征在于:测试卡还包括塑料卡,此塑料卡是一个用塑料特制的卡,由上下 2 片组成,上下片可嵌合在一起,下片主要有一个放试纸条的槽和与上片结合的卡齿,上片主要包括一个检测孔、一个样品孔以及与下片结合的卡齿,检测孔旁边分别印有 T 和 C 字样,T 表示检测线的位置,C 表示质控线的位置,检测孔是观察结果的窗口,样品孔是滴加样品的位置。

2. 一种检测弓形虫血清 IgM 抗体的免疫胶体金层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:1、弓形虫 P35 基因重组抗原:自制或购买,分子量:35kDa,纯度:10ug 上样 SDS-PAGE 一条带。2、鼠抗人 -IgM( $\mu$  链):自制或购买。3、兔抗 P35 制备方法:通过形虫 P35 基因重组抗原免疫家兔,提取兔血清,纯化后得到兔抗 P35。4、胶体金的制备:a) 量取一定量的洗液于洁净的烧瓶中,煮沸 5 分钟;b) 量取一定量的超纯水于该烧瓶中,煮沸 5 分钟;c) 弃去超纯水,称取适量三蒸水于该烧瓶中,加热至沸腾,加入适量 1% 氯金酸,加热至沸腾;d) 搅拌下加入 6~10 毫升 1% 柠檬酸三钠,沸腾 5-10 分钟;5、胶体金探针标记:取胶体金 100 毫升,调节胶体金溶液 PH 值 8.0,搅拌加入 1 毫升弓形虫 P35 基因重组抗原,再缓慢加入 1 毫升 10% BSA 充分混匀,搅拌,离心弃上清,加入工作液溶解;6、制备检测弓形虫血清 IgM 抗体的胶体金免疫试纸条:用喷涂机将标记弓形虫 P35 基因重组抗原的胶体金溶液喷涂在玻璃纤维膜上,37°C 干燥;将制备好的试剂条板上 NC 膜用喷膜机分别喷上鼠抗人 -IgM( $\mu$  链) 和质控抗体(兔抗 P35),喷完后 37°C 干燥过夜;将吸水垫、已包被的硝酸纤维膜、玻璃纤维胶体金结合垫、样品垫依次粘于底板上,裁成细条,即成一种检测弓形虫血清 IgM 抗体的胶体金免疫试纸条。

所述制备方法其特征在于:c) 步中所述三蒸水为 200 毫升,所述氯金酸为 10 毫升,d) 步中所述柠檬酸三钠为 7.5 毫升。

## 弓形虫 P35 血清 IgM 抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用胶体金免疫层析技术检测血液中弓形虫 IgM 抗体水平的试纸条及其制备方法,属于医学和生物学检验领域。

### 背景技术

[0002] 弓形虫是由一种弓形虫寄生引起的感染,世界各地的弓形虫感染非常普遍。1985-1990 年我国的 23 个省、市、自治区的调查,大都在 10% 以下。正常人感染弓形虫绝大多数没有症状,或者症状很轻,不知道是什么时候感染的,只有少数人初次感染(或称原发性感染)时有发热、淋巴结肿大、头痛、肌肉关节痛和腹痛,几天或数周后随着人体产生免疫力,症状小时,只是形成的包囊在身体里存在几个月、好几年或者更长时间,一般都是自愈。吃未煮熟的肉,特别是猪、羊。几乎所有哺乳动物和鸟类,如鼠类、猪、羊、牛、家兔和鸡、鸭、鹅等,都可以传染弓形虫,而且感染率很高。人的传染来源主要来自于这些动物的肉类,如涮肉的温度不够和时间过短,其中的弓形虫没有杀死,就有传染的危险。生肉或切肉案板的污染同样可以传染。污染的羊、牛奶也可以传染。

[0003] 现有检测弓形虫抗体的方法主要是通过酶联免疫吸附(EIA)来检测,该方法有不足之处。主要表现以下几方面:需要专门的仪器设备来配合使用;试剂要求低温保存;检测人员需要经过专业的培训;操作过程相对比较复杂,检测所需的时间较长;检测所需费用较高,不能实现单人份检测;不利于在基层单位及临床的推广使用。也有采用虫体抗原的胶体金诊断试剂,但由于抗原是多种蛋白的复合物,假阳性较多,采用基因重组抗原则可以有效克服以上缺陷。弓形虫表面抗原 P35 可以有效激发机体的免疫反应,可用来检测人血清中的抗 P35 抗体,用于弓形虫感染的诊断。

### 发明内容

[0004] 为克服现有弓形虫抗体检测技术的不足,本发明提供一种快速检测弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的试纸条。不需要任何仪器设备辅助的快速检测试剂。本发明根据胶体金免疫层析技术特点和弓形虫 P35 基因重组抗原系统特点,设计新的原材料,试剂和工艺流程,应用本发明提供的试纸条检测弓形虫 IgM 抗体水平,具有简单,快速,灵敏和特异性好等特点,30 分钟以内出结果,并且价格低,适用于基层检测和临床初筛。

[0005] 本发明所述试纸条是由 PVC 底板(1)上依次接合吸水垫(2)、特定包被的硝酸纤维素膜(3)、涂覆胶体金标记弓形虫 P35 基因重组抗原的玻璃纤维胶体金结合垫(6)、样品垫(7)而组成的条形物。检测样品经过样品垫和结合垫再经层析作用在 NC 膜上出现检测线和质控线,用肉眼判断结果。在 NC 膜上仅仅出现一条质控线,结果为阴性,在 NC 膜上同时出现检测线和质控线,结果为阳性,不出现线条表示试纸条或测试卡失效。30 分钟内出结果。

[0006] 本发明所述试纸条吸水垫为一种滤纸,包括吸水纸和滤油纸,切成要求大小直接使用。贴在底板的末端,起吸水作用。

[0007] 本发明所述试纸条上特定包被的 NC 膜是一种专门用于胶体金试纸条的材料,由一层滤膜和胶膜组成,成卷筒装,NC 膜上喷 2 条线,分别为检测线和质控线,检测线喷涂的是鼠抗人 IgM( $\mu$  链),质控线喷涂的是兔抗 P35;NC 膜贴在底板的中间,两端分别与结合垫和吸水垫连接。

[0008] 本发明所述试纸条上结合垫为玻璃纤维纸,喷涂上胶体金标记弓形虫 P35 基因重组抗原,再 37℃干燥,结合垫上与样品垫衔接,下与 NC 膜衔接。

[0009] 本发明所述试纸条样品垫为玻璃纤维纸,用硼酸缓冲液浸泡处理,缓冲液 PH 为 7.2,浸泡处理后,37℃干燥过夜,在试剂条中起过滤样品的作用,位于结合垫上,贴在底板上。

[0010] 本发明还提供上述试纸条在制备弓形虫 P35 血清 IgM 抗体诊断试纸条中的应用,诊断试纸条还包括标识条,此标识条为两个带有标识的不干胶纸,分别粘贴在试纸条的两端,带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上,由此端浸入待测样品,靠另一端的吸水垫的吸水作用,使样品经过 NC 膜。

[0011] 本发明还提供上述试纸条在制备弓形虫 P35 血清 IgM 抗体测试卡中的应用,测试卡还包括塑料卡,此塑料卡是一个用塑料特制的卡,由上下 2 片组成,上下片可嵌合在一起,下片主要有一个放试纸条的槽和与上片结合的卡齿,上片主要包括一个检测孔、一个样品孔以及与下片结合的卡齿,检测孔旁边分别印有 T 和 C 字样,T 表示检测线的位置,C 表示质控线的位置,检测孔是观察结果的窗口,样品孔是滴加样品的位置。此塑料卡起保护试纸条的作用,并且更美观,减少污染和保护操作者的安全。

[0012] 本发明所述试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 弓形虫 P35 基因重组抗原,自制或购买,分子量:35kDa,纯度:10ug 上样 SDS-PAGE 一条带。

[0014] 2) 鼠抗人 -IgM( $\mu$  链),自制或购买。

[0015] 3) 兔抗 P35 制备方法:通过弓形虫 P35 基因重组抗原免疫家兔,提取兔血清,纯化后得到兔抗 P35。

[0016] 4) 胶体金的制备:

[0017] a 量取一定量的洗液于洁净的烧瓶中,煮沸 5 分钟;

[0018] b 量取一定量的超纯水于该烧瓶中,煮沸 5 分钟;

[0019] c 弃去超纯水,称取适量三蒸水于该烧瓶中,加热至沸腾,加入适量 1%氯金酸,加热至沸腾;

[0020] d 搅拌下加入 6 ~ 10 毫升 1%柠檬酸三钠,沸腾 5-10 分钟;

[0021] 5) 胶体金探针标记:

[0022] 取胶体金 100 毫升,调节胶体金溶液 PH 值 8.0,搅拌加入 1 毫升弓形虫 P35 基因重组抗原,再缓慢加入 1 毫升 10% BSA 充分混匀,搅拌,离心弃上清,加入工作液溶解;

[0023] 6) 制备检测弓形虫血清 IgM 抗体的胶体金免疫试纸条:

[0024] 用喷涂机将标记弓形虫 P35 基因重组抗原的胶体金溶液喷在玻璃纤维膜上,37℃干燥;将制备好的试剂条板上 NC 膜用喷膜机分别喷上鼠抗人 -IgM( $\mu$  链)和质控抗体(兔抗 P35),喷完后 37℃干燥过夜;将吸水垫、已包被的硝酸纤维膜、玻璃纤维胶体金结合垫、样品垫依次粘于底板上,裁成细条,即成一种检测弓形虫血清 IgM 抗体的胶体金免疫试纸

条。

[0025] 上述胶体金制备过程中,优选后的条件为:三蒸水 200 毫升,氯金酸 10 毫升,柠檬酸三钠 7.5 毫升。

[0026] 本发明的有益效果:应用本发明提供的试纸条检测人体内弓形虫 P35 血清 IgM 抗体水平,成本低廉,操作简单、快速、灵敏,且特异性好,不需要特殊检测仪器设备,因此可广泛应用于各级医疗检验场所,尤其是基层医疗机构,包括乡镇卫生院等均可开展。本发明有益于弓形虫 IgM 抗体筛查的普及,进而对于弓形虫事件发生的预防有极为重要的意义。

#### 附图说明

[0027] 图 1 为本发明的结构示意图

[0028] 1:PVC 底板;2:吸水垫;3:特定包被的硝酸纤维膜;4:检测线;5:质控线;6:结合垫;7:样品垫。

[0029] 图 2 为本发明的检测结果示意图

[0030] a:阳性;b:阴性;c:无效;4:检测线;5:质控线。

[0031] 图 3 为本发明的试纸条外观示意图

[0032] a:样本垫;b:结合垫;c:检测线;d:质控线;e:试纸条名称

[0033] 图 4 为本发明的测试卡外观示意图

[0034] a:样本孔;b:测试孔;T:检测线;C:质控线。

#### 具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明,凡依照本发明公开内容所作出的本领域等同替换,均属于本发明的保护范围。

[0036] 实施例 1:

[0037] 弓形虫 P35 血清 IgM 抗体胶体金免疫试纸条制备方法,它包括如下步骤:

[0038] 1、胶体金的制备:

[0039] 量取一定量的洗液于洁净的 250ml 三角烧瓶中,煮沸 5 分钟;量取一定量的超纯水于该烧瓶中,煮沸 5 分钟;弃去超纯水,称取 200ml 超纯水于该烧瓶中,加热至沸腾,加入 1%氯金酸 10ml,边煮边搅拌,加热至沸腾;搅拌下加入 1%柠檬酸三钠 10ml,沸水下快速搅拌,直到氯金酸溶液的颜色慢慢稳定,呈红色后,继续沸腾 5 分钟,制成小颗粒胶体金。

[0040] 2、制备检测弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的胶体金免疫试纸条:

[0041] 用喷涂机将标记弓形虫 P35 基因重组抗原的胶体金溶液喷涂在玻璃纤维膜上,37°C 干燥;将制备好的试剂条板上 NC 膜用喷膜机分别喷上鼠抗人-IgM( $\mu$  链)和质控抗体(兔抗 P35)。喷完后 37°C 干燥过夜。将吸水垫、已包被的硝酸纤维膜、玻璃纤维胶体金结合垫、样品垫依次粘于底板上,裁成细条,即成一种检测弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的胶体金免疫试纸条。

[0042] 实施例 2:

[0043] 弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的胶体金免疫诊断试纸条制备方法,它包括如下步骤:

[0044] 将两个带有标识的不干胶纸(标识条)分别粘贴在实施例 2 中所制备试纸条的两端,带有箭头端是贴在样品垫和结合垫上,由此端浸入待测样品,靠另一端的吸水垫的吸水

作用,使样品经过 NC 膜。即成一种检测弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的胶体金免疫诊断试纸条。

[0045] 见图 3。

[0046] 实施例 3 :

[0047] 弓形虫 P35 血清 IgM 抗体的胶体金免疫诊断测试卡制备方法,它包括如下步骤 :

[0048] 将实施例 2 中所制备试纸条放入塑料卡下片试纸条槽中,与上片嵌合,即成一种检测同型半胱氨酸的胶体金免疫诊断测试卡,见图 4。此塑料卡是一个用塑料特制的卡,由上下 2 片组成,上下片可嵌合在一起,下片主要有一个放试纸条的槽和与上片结合的卡齿,上片主要包括一个检测孔(见图 4b)、一个样品孔(见图 4a)以及与下片结合的卡齿,检测孔旁边分别印有 T 和 C 字样,T 表示检测线的位置,C 表示质控线的位置,检测孔是观察结果的窗口,样品孔是滴加样品的位置。

[0049] 实施例 4 :

[0050] 弓形虫 P35 血清 IgM 抗体免疫胶体金诊断层析试纸条使用方法 :

[0051] 如图 3 所示,将试纸条样品垫插入待测液中,浸润后取出,水平放置,约 30 分钟后,仅在质控线 C 处出现一条线,结果为阴性;在检测线 T 和质控线 C 处分别出现一条线,结果为阳性;不出现线条表示测试条失效。

[0052] 实施例 5 :

[0053] 弓形虫 P35 血清 IgM 抗体免疫胶体金诊断层析测试卡使用方法 :

[0054] 如图 4 所示,将样本加入样本孔 a,加样量 75 微升~80 微升,水平放置,约 30 分钟后,仅在测试孔 b 的质控线 C 处出现一条线,结果为阴性;在测试孔 b 的检测线 T 和质控线 C 处分别出现一条线,结果为阳性;不出现线条表示测试卡失效。

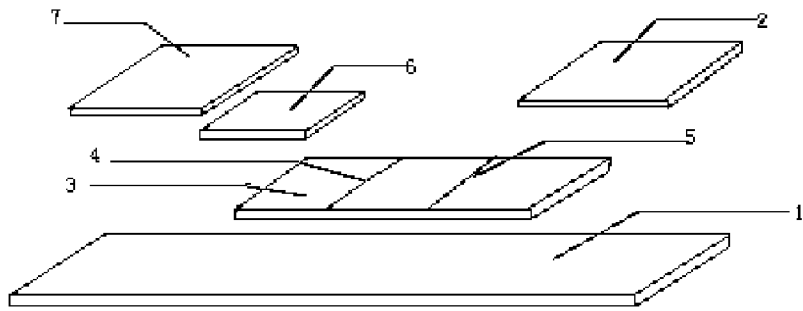


图 1

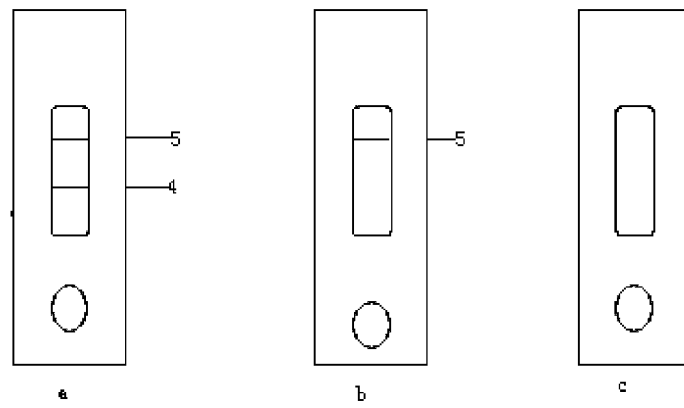


图 2

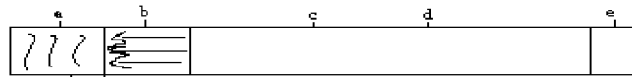


图 3

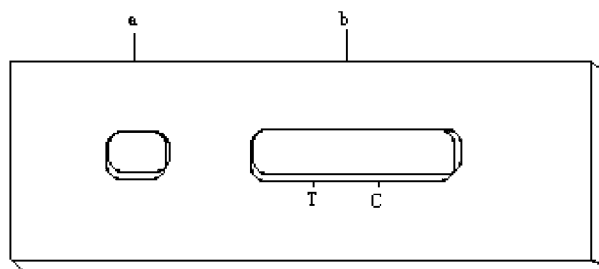


图 4

专利名称(译)	弓形虫P35血清IgM抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101793895A</a>	公开(公告)日	2010-08-04
申请号	CN200910304120.X	申请日	2009-07-08
[标]发明人	马运国 华艳 吕传臣		
发明人	马运国 华艳 吕传臣		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于医学和生物学检测领域，涉及一种检测弓形虫P35血清IgM抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。该试纸条是由PVC底板(1)上的依次接合吸水垫(2)、特定包被的硝酸纤维素膜(NC膜)(3)、NC膜上有检测线(4)和质控线(5)，喷涂胶体金标记弓形虫P35基因重组抗原的玻璃纤维素胶体金结合垫(6)、样品垫(7)而组成的条形物。应用本发明所提供的试纸条检测人血清中弓形虫IgM抗体水平，具有操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作，具有良好的应用前景。

