



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109164265 A

(43)申请公布日 2019.01.08

(21)申请号 201811116305.3

(22)申请日 2018.09.25

(71)申请人 邱灵冰

地址 518000 广东省深圳市南山区高新南
四道10号

(72)发明人 邱灵冰

(74)专利代理机构 深圳大域知识产权代理有限
公司 44479

代理人 何园园

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

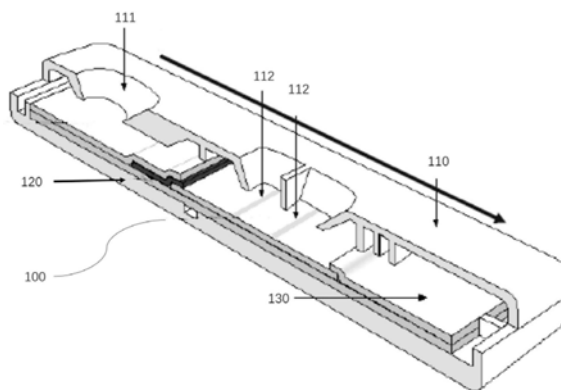
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

疫苗抗体检测卡及其制备方法

(57)摘要

本发明公开一种疫苗抗体检测卡及其制备方法。本发明的疫苗抗体检测卡包括卡盖、卡体和试剂条。卡盖设置有样品加样孔、观测窗和样品编号标示处,卡体设有放置试剂条的凹槽,试剂条设置有样品垫层、胶体金层、硝酸纤维素膜和吸水层,胶体金层包含结合疫苗特异性抗体的胶体金标记物,硝酸纤维素膜设置包被目标疫苗的抗原性检测线T线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线C线。本发明的疫苗抗体检测卡的样本用量少,具有提高的检测灵敏度,且使用方便、快速简易。



1. 一种疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 包括卡盖、卡体和试剂条, 所述卡盖设置有样品加样孔、观测窗和样品编号标示处, 所述卡体设有放置试剂条的凹槽, 所述试纸条设置有样品垫层、胶体金层、硝酸纤维素膜和吸水层, 所述胶体金层包含结合疫苗特异性抗体的胶体金标记物, 所述硝酸纤维素膜设置包被目标疫苗的抗原性检测线T线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线C线。

2. 根据权利要求1所述的疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 进一步包括第一过滤层和第二过滤层, 其中所述第一过滤层具有允许抗体分子通过但不能允许分子团聚物通过的第一孔径, 第二过滤层具有允许小分子通过但不能允许抗体分子通过的第二孔径, 且所述第一过滤层设置于所述样品垫层上方, 所述第二过滤层的至少一部分设置于所述胶体金层下方。

3. 根据权利要求2所述的疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 所述硝酸纤维素膜由纳米硝酸纤维素制成。

4. 根据权利要求3所述的疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 所述胶体金层包括玻璃纤维层。

5. 根据权利要求4所述的疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 所述试纸条进一步包括支承层, 且在支承层的同一侧上沿其长度方向依次以相互连接的方式设置所述样品垫层、所述胶体金层、所述硝酸纤维素膜和所述吸水层。

6. 根据权利要求5所述的疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 所述样品加样孔对应于所述样品垫层的位置设置, 所述观测窗对应于所述硝酸纤维素膜的位置设置。

7. 根据权利要求6所述的疫苗抗体检测卡, 其特征在于, 所述卡盖和所述卡体通过卡合形成闭合密封盒。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的疫苗抗体检测卡的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 胶体金的制备, 通过氯金酸在还原剂作用下形成所需尺寸的胶体金颗粒;

(2) 胶体金的标记, 在适于反应的条件下将步骤(1)中制备的胶体金溶液与鼠抗人免疫球蛋白抗体混合, 得到胶体金标记鼠抗人免疫球蛋白抗体;

(3) 胶体金固相化, 将胶体金标记鼠抗人免疫球蛋白抗体固定于胶体金层;

(4) 包被硝酸纤维素膜, 将各不同疫苗抗原喷于硝酸纤维素膜的第一位置上, 形成目标疫苗抗原检测线T线, 将羊抗鼠IgG抗体喷于硝酸纤维素膜的第二位置, 形成羊抗鼠IgG抗体质控线C线, 然后使硝酸纤维素膜干燥;

(5) 试纸条的制备, 在PVC板的中间位置粘贴所得硝酸纤维素膜, 在PVC板固定硝酸纤维素膜位置的一侧粘贴吸水层, 在PVC板固定硝酸纤维素膜位置的另一侧粘贴胶体金层和样品垫层;

(6) 将所得试纸条置于卡体的凹槽内, 将卡盖和卡体扣合, 得到疫苗抗体检测卡。

9. 根据权利要求8所述的制备方法, 其特征在于, 所述胶体金层覆盖硝酸纤维素膜的上方0.5-1.5毫米, 所述吸水层覆盖硝酸纤维素膜边沿的上方0.5-1.5毫米。

10. 根据权利要求8所述制备方法, 其特征在于, 所述样品垫层、胶体金层和硝酸纤维素膜依次相临连接, 且样品垫层与硝酸纤维素膜以及所述胶体金层与所述硝酸纤维素膜之间无重叠, 和在所述样品垫层上方设置第一过滤层, 在所述胶体金层下方设置第二过滤层。

疫苗抗体检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检验技术领域,具体涉及胶体金免疫层析法用于快速检测血液中疫苗抗体的试剂条及其检测卡。

背景技术

[0002] 疫苗是为了预防、控制传染病的发生、流行,用于人体预防接种的预防性生物制品。预防接种用的生物制品包括疫苗、菌苗和类毒素。其中,由病菌制成的为菌苗;由病毒、立克次体、螺旋体制成的为疫苗,统称为疫苗。疫苗是将病原微生物(如细菌、立克次氏体、病毒等)及其代谢产物,经过人工减毒、灭活或利用基因工程等方法制成的用于预防传染病的自动免疫制剂。当接种这种不具伤害力的病原菌后,免疫系统便会产生一定的保护物质,如免疫激素、活性生理物质、特殊抗体等;当机体再次接触到这种病原菌时,机体的免疫系统被迅速激活,产生特异性抗体以保护机体。

[0003] 因为个体体质差异或者疫苗本身及其他客观因素,疫苗注射后机体内是否产生了有效抗体,目前还没有合适的方便、简易、快捷的检测方法。其中疫苗引发机体免疫系统所产生的抗体,可以用胶体金免疫层析法来检测。

[0004] 胶体金免疫层析技术是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。优点:

[0005] 1、使用方便快速,不限场所,所有反应能在15分钟内完成;

[0006] 2、成本低,不需要特殊的仪器设备;

[0007] 3、应用范围广,可适应多种检测条件;

[0008] 4、可以进行多项检测,若样品比较难获得,多项检测可以节省样品,降低成本;

[0009] 5、标记物稳定,标记样品在4℃贮存两年年以上,无信号衰减现象;

[0010] 6、胶体金本身为红色,不需要加入发色试剂,省却了酶标的致癌性底物及终止液的步骤,对人体无毒害。

[0011] 目前,现有技术没有实现方便、简易、快捷且灵敏度高的检测抗体的方法。

发明内容

[0012] 本发明的目的之一在于提供一种疫苗抗体检测卡,其包括卡盖、卡体和试剂条,所述卡盖设置有样品加样孔、观测窗和样品编号标示处,所述卡体设有放置试剂条的凹槽,所述试剂条设置有样品垫层、胶体金层、硝酸纤维素膜和吸水层,所述胶体金层包含结合疫苗特异性抗体的胶体金标记物,所述硝酸纤维素膜设置包被目标疫苗的抗原性检测线T线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线C线。

[0013] 优选地,本发明的疫苗抗体检测卡进一步包括第一过滤层和第二过滤层,其中所述第一过滤层具有允许抗体分子通过但不能允许分子团聚物通过的第一孔径,第二过滤层具有允许小分子通过但不能允许抗体分子通过的第二孔径,且所述第一过滤层设置于所述样品垫层上方,所述第二过滤层设置于所述胶体金层下方。

- [0014] 优选地,本发明的疫苗抗体检测卡中,所述硝酸纤维素膜由纳米硝酸纤维素制成。
- [0015] 优选地,本发明的疫苗抗体检测卡中,所述胶体金层包括玻璃纤维层。
- [0016] 优选地,本发明的疫苗抗体检测卡中,所述试纸条进一步包括支承层,且在支承层的同一侧上沿其长度方向依次以相互连接的方式设置所述样品垫层、所述胶体金层、所述硝酸纤维素膜和所述吸水层。
- [0017] 优选地,本发明的疫苗抗体检测卡中,所述样品加样孔对应于所述样品垫层的位置设置,所述观测窗对应于所述硝酸纤维素膜的位置设置。
- [0018] 优选地,本发明的疫苗抗体检测卡中,所述卡盖和所述卡体通过卡合形成闭合密封盒。
- [0019] 本发明的第二目的在于提供一种疫苗抗体检测卡的制备方法,其包括以下步骤:
- [0020] (1) 胶体金的制备,通过氯金酸在还原剂作用下形成所需尺寸的胶体金颗粒;
- [0021] (2) 胶体金的标记,在适于反应的条件下将步骤(1)中制备的胶体金溶液与鼠抗人免疫球蛋白抗体混合,得到胶体金标记鼠抗人免疫球蛋白抗体;
- [0022] (3) 胶体金固相化,将胶体金标记鼠抗人免疫球蛋白抗体固定于胶体金层;
- [0023] (4) 包被硝酸纤维素膜,将各不同疫苗抗原喷于硝酸纤维素膜的第一位置上,形成目标疫苗抗原检测线,将羊抗鼠IgG抗体喷于硝酸纤维素膜的第二位置,形成羊抗鼠IgG抗体质控线,然后使硝酸纤维素膜干燥;
- [0024] (5) 试纸条的制备,在PVC板的中间位置粘贴所得硝酸纤维素膜,在PVC板固定硝酸纤维素膜位置的一侧粘贴吸水层,在PVC板固定硝酸纤维素膜位置的另一侧粘贴胶体金层和样品垫层;
- [0025] (6) 将所得试纸条置于卡体的凹槽内,将卡盖和卡体扣合,得到疫苗抗体检测卡。
- [0026] 优选地,本发明的制备方法中,吸水纸覆盖硝酸纤维素膜边沿的上方0.5-1.5毫米,所述胶体金层覆盖硝酸纤维素膜的上方0.5-1.5毫米。
- [0027] 优选地,本发明的制备方法中,所述样品垫层、胶体金层和硝酸纤维素膜依次相临连接,且在所述样品垫层上方设置第一过滤层,在所述胶体金层下方设置第二过滤层。
- [0028] 有益技术效果:
- [0029] 本发明利用胶体金免疫层析技术,可特异的检测出不同疫苗产生的特异性抗体。由于检测卡方便,样本用量少,仅需50 μ L血清、血浆或全血即可实现疫苗抗体的检测,并且操作简单,检测速度快,不限场地,适用于临床及社区推广。
- [0030] 优选地,本发明通过第一过滤层过滤分子团或大颗粒物等杂质,避免了杂质进入硝酸纤维素膜,从而避免了这些物质对于检测的影响。
- [0031] 还优选地,本发明通过第二过滤层过滤掉未结合抗体的胶体金颗粒及其他小分子等杂质,避免了这些杂质进入硝酸纤维素膜。在传统的方法中这些杂质能够填充硝酸纤维素膜的孔隙,从而不利于所要检测的抗原抗体结合物的移动,并且未结合抗体的胶体金颗粒影响检测线位置的反应强度。
- [0032] 还优选地,本发明采用纳米硝酸纤维素膜代替传统的一般硝酸纤维素膜,通过本发明的技术方案,纳米硝酸纤维素没有降低检测灵敏度,仍然具有优异的效果。这与本领域内的一般理解的不同。

附图说明

[0033] 图1本发明一种示例性疫苗抗体检测卡的立体图。

[0034] 图2本发明一种示例性疫苗抗体检测卡的试剂条的图。

[0035] 图3本发明另一种示例性疫苗抗体检测卡的试剂条的部分结构图。

[0036] 附图标记说明：

[0037] 疫苗抗体检测卡100,卡盖110,卡体120,试剂条130,样品加样孔111,观测窗112,样品垫层121、221,胶体金层122、222,硝酸纤维素膜123、223,吸水层124,支承层125、225,第一过滤层2211,第二过滤层2221。

具体实施方式

[0038] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0039] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为具体公开了该范围的上限和下限以及它们之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0040] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的相同含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。除非另有说明,否则“%”为基于重量的百分数。

[0041] 实施例1

[0042] 本实施例为示例性疫苗抗体检测卡的制备方法,其包括以下步骤:

[0043] (1) 胶体金的制备

[0044] 根据目标需检测的不同类型疫苗可选取合适大小的胶体金颗粒,15nm、18nm-20nm、30nm或50nm胶体金颗粒的制备:取0.01%HAuCl₄水溶液100ml,加热煮沸。根据需要迅速加入1%枸橼酸三钠水溶液4ml、2.5ml、1ml或0.75ml,继续煮沸约5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒则分别为15nm、18-20nm、30nm和50nm。冷却备用;

[0045] (2) 胶体金的标记

[0046] 胶体金标记鼠抗人免疫球蛋白抗体:取步骤(1)中制备的胶体金溶液50mL,用0.1mol/L K₂CO₃调至pH8.9-9.2,随后加入4-6mL浓度为0.8-1.2mg/mL的鼠人免疫球蛋白抗体,搅拌2-5分钟,加入4-6mL质量分数为0.8-1.2%的PEG20000水溶液,于15000r/min离心35-45分钟,吸去上清液,将沉淀悬浮于浓度为0.4-0.6mg/mL PEG20000的水溶液中,以0.5mg/mL叠氮钠防腐,置3-5℃保存;

[0047] (3) 胶体金固相化

[0048] 将步骤(1)和(2)制得的胶体金标记物溶液等量混合,固相于胶体金层,得到玻璃纤维金标垫;

[0049] (4) 包被硝酸纤维素膜

[0050] 4.1T线包被抗原：用pH7.2-7.5的PBS缓冲液将各不同疫苗抗原稀释至0.8-1.2mg/mL，用喷膜机以泵速16mm/s、膜速320mm/s喷于硝酸纤维素膜上，形成目标疫苗抗原检测线；

[0051] 4.2C线包被羊抗鼠IgG抗体：用pH7.2-7.5的PBS缓冲液将羊抗鼠IgG抗体稀释至1.4-1.6mg/mL，用喷膜机以泵速16mm/s、膜速320mm/s喷于上述步骤4.1制得的硝酸纤维素膜上，形成羊抗鼠IgG抗体质控线；

[0052] 4.3将上述步骤4.2制得的硝酸纤维素膜置37℃烘箱中干燥1.5-2小时；

[0053] (5) 试纸条的制备

[0054] 5.1在PVC板的中间位置粘贴上述步骤4.3制备的硝酸纤维素膜；

[0055] 5.2在PVC板固定硝酸纤维素膜位置的上方，粘贴吸水纸，吸水纸覆盖硝酸纤维素膜边沿1.0毫米；

[0056] 5.3在PVC板固定硝酸纤维素膜位置的下方，粘贴步骤(3)制备的胶体金标记物的玻璃纤维金标垫及样品垫，玻璃纤维金标垫覆盖硝酸纤维素膜1.0毫米，

[0057] 5.4将上述步骤5.3得到的产品压平整后，切成5.0mm宽的试纸条；

[0058] (7) 取卡盖和卡体，将上述制备的试纸条置于卡体的凹槽内，将卡盖和卡体扣合，得到疫苗抗体检测卡。

[0059] 实施例2

[0060] 本实施例为一种示例性疫苗抗体检测卡100。如图1和图2所示，疫苗抗体检测卡100包括卡盖110、卡体120和试剂条130。

[0061] 卡盖10设置有样品加样孔111、观测窗112和样品编号标示处(未示出)，卡体120设有放置试剂条130的凹槽。卡盖110和卡体120通过卡合形成闭合密封盒。

[0062] 试纸条130设置有样品垫层121、胶体金层122、硝酸纤维素膜123和吸水层124，且样品垫层121、胶体金层122、硝酸纤维素膜123和吸水层124分别设置于作为支承层125的PVC板的同一侧，沿支承层125的长度方向依次以相互连接的方式设置样品垫层121、胶体金层122、硝酸纤维素膜123和吸水层124。硝酸纤维素膜123的一端上方粘贴吸水层124，且吸水层124覆盖硝酸纤维素膜123边沿的上方1.0毫米，即吸水层124与硝酸纤维素膜123重叠1.0毫米。在硝酸纤维素膜123的另一端上方粘贴胶体金层122，且胶体金层122覆盖硝酸纤维素膜123的边沿的上方1.0毫米，即胶体金层122与硝酸纤维素膜123重量1.0毫米。样品垫层与胶体金层的另一端重叠约1.0毫米。胶体金层包含直径为50nm的胶体金颗粒。

[0063] 胶体金层122为玻璃纤维层，其包含结合疫苗特异性抗体的胶体金标记物。本实施例中胶体金标记物为疫苗特异性抗体的抗抗体与胶体金标记物的结合物。硝酸纤维素膜123设置包被目标疫苗的抗原性检测线T线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线C线。

[0064] 本实施例中疫苗抗体检测卡100的样品加样孔111对应于样品垫层121的位置设置，观测窗112对应于硝酸纤维素膜123的位置设置。

[0065] 实施例3

[0066] 本实施例为另一种示例性疫苗抗体检测卡。本实施例中，除了硝酸纤维素膜为纳米硝酸纤维素膜，胶体金层包含直径为15nm的胶体金颗粒，以及具有图3所示的结构外，其余结构与实施例2相同。

[0067] 如图3所示，本实施例的试纸条设置有样品垫层221、胶体金层222、硝酸纤维素膜223，且样品垫层221、胶体金层222、硝酸纤维素膜223依次平行设置，且任意两者之间无间

隙,也不存在上下重叠部分。

[0068] 另外,在样品垫层221的上方设置有第一过滤层2211。在胶体金层222的下方设置第二过滤层2221。图3A示出了第二过滤层2221具有与胶体金层222相同的大小,且支承层225具有与第二过滤层2221相同大小的凹槽,用于固定或安装第二过滤层2221。图3B示出了第二过滤层2221具有与样品垫层221和胶体金层222两者之和相同的大小,且第二过滤层2221位于样品垫层221和胶体金层222的下方。图3C示出了在支承层225上方设置第二过滤层2221,且第二过滤层2221的大小与支承层225的大小相同。

[0069] 本实施例中,第一过滤层的平均孔径为250-500nm,第二过滤层2221的平均孔径为50-70nm。优选地,第二过滤层2221为吸水性较强的材料制成。更优选地,胶体金层222与第二过滤层2221层之间的界面高于支承层225与硝酸纤维素膜之间的界面。

[0070] 由于第二过滤层2221可过滤去除大部分未结合抗体的胶体金颗粒,有利于抗原抗体结合分子在硝酸纤维素膜中移动,并且除去的未结合抗体的胶体不会出现在检测线,从而大大提高检测的准确性。

[0071] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本申请说明书和实施例仅是示例性的。

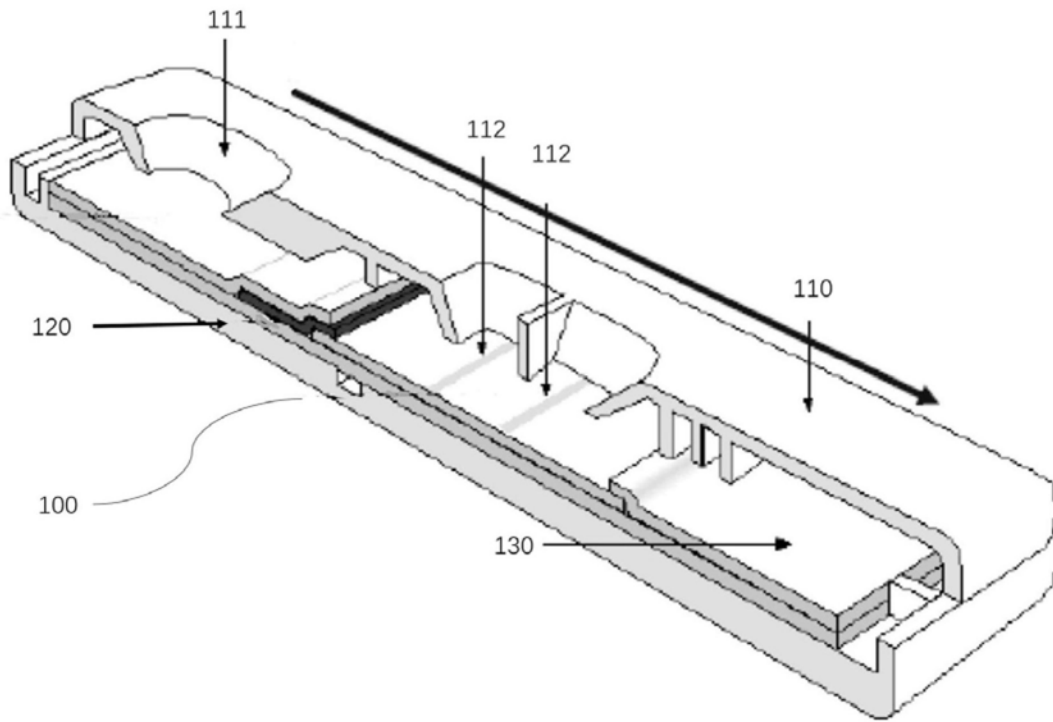


图1

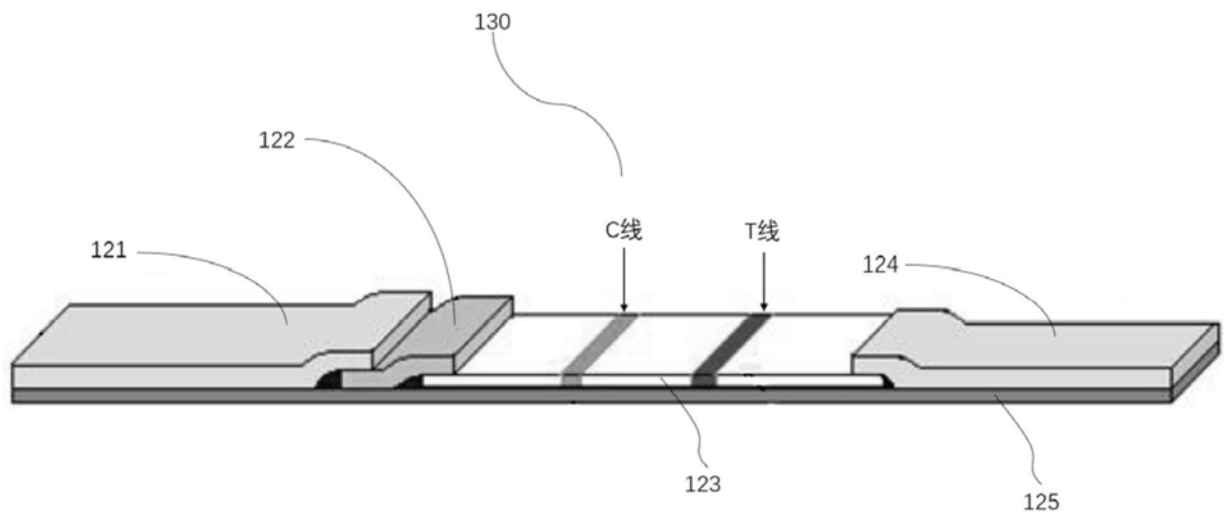


图2

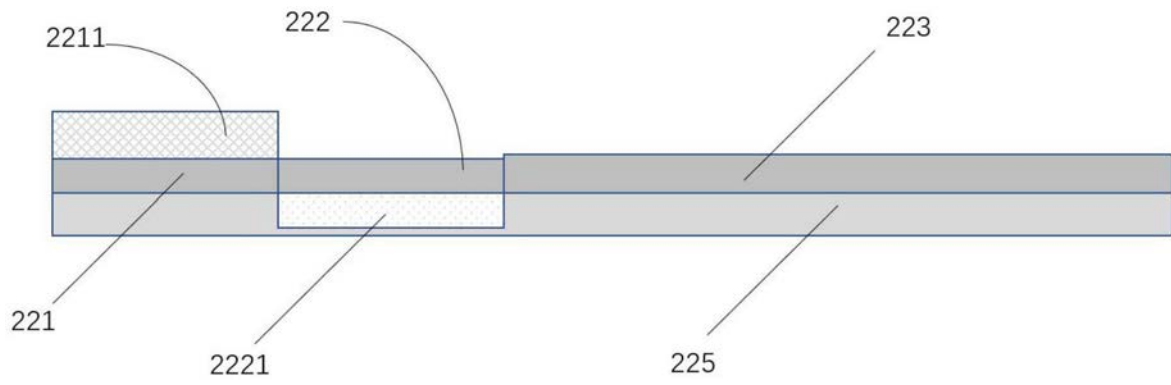


图3A

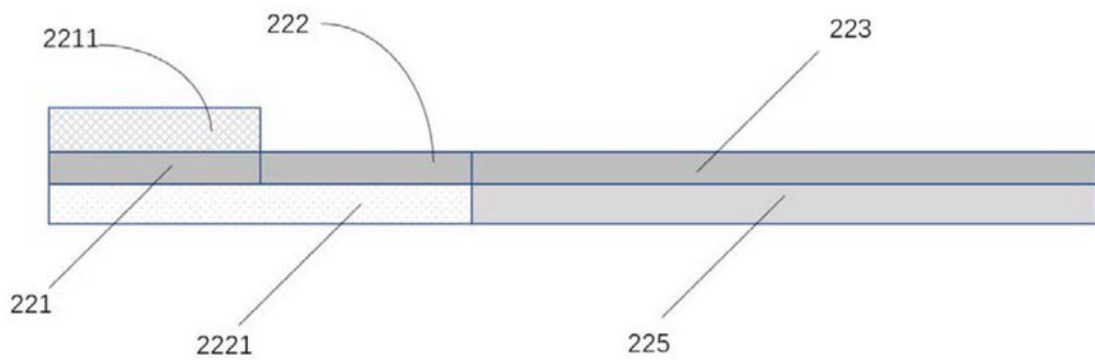


图3B

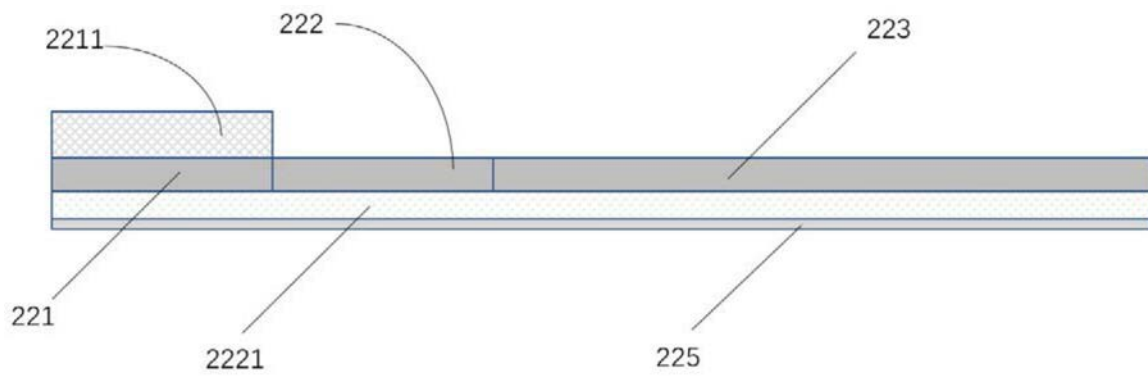


图3C

专利名称(译)	疫苗抗体检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN109164265A	公开(公告)日	2019-01-08
申请号	CN201811116305.3	申请日	2018-09-25
[标]发明人	邱灵冰		
发明人	邱灵冰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/532		
代理人(译)	何园园		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种疫苗抗体检测卡及其制备方法。本发明的疫苗抗体检测卡包括卡盖、卡体和试剂条。卡盖设置有样品加样孔、观测窗和样品编号标示处，卡体设有放置试剂条的凹槽，试纸条设置有样品垫层、胶体金层、硝酸纤维素膜和吸水层，胶体金层包含结合疫苗特异性抗体的胶体金标记物，硝酸纤维素膜设置包被目标疫苗的抗原性检测线T线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线C线。本发明的疫苗抗体检测卡的样本用量少，具有提高的检测灵敏度，且使用方便、快速简易。

