



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109085334 A

(43)申请公布日 2018.12.25

(21)申请号 201810649580.5

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2018.06.22

(71)申请人 东南大学

地址 211102 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72)发明人 丁收年 左家莹 焦永军 武锡锦
梁秀丽 朱红允 温雪飞 姬艺洪

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 王艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

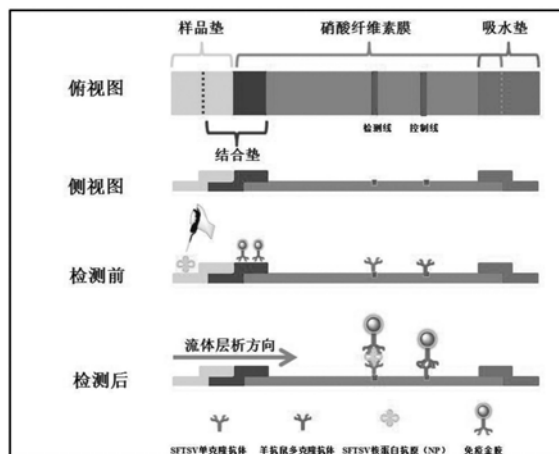
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条,所述试纸条包括依次连接的样品垫、结合垫、包被有检测T线与控制C线的硝酸纤维素膜、吸水垫,且所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫均粘贴在底板上,所述结合垫上修饰有SFTSV单克隆抗体金胶复合物,所述硝酸纤维素膜T线上包被有SFTSV单克隆抗体,所述控制C线包被有羊抗鼠多克隆抗体。本发明还公开了该试纸条的制备方法和应用。本发明具有简便快速、特异性强、灵敏度高、准确可靠、成本低廉、安全、易保存、稳定性好且操作非常简便,无需借助专业分析仪器进行分析,节约综合成本,可肉眼直接读取结果,对病毒和疾病的现场快速检验(point-of-care testing, POCT)具有重要意义。



1. 一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条, 其特征在于, 所述试纸条包括依次连接的样品垫、结合垫、包被有检测T线与控制C线的硝酸纤维素膜、吸水垫, 且所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫均粘贴在底板上, 所述结合垫上修饰有SFTSV单克隆抗体金胶复合物, 所述硝酸纤维素膜检测T线上包被有SFTSV单克隆抗体, 所述控制C线含有羊抗鼠多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条, 其特征在于, 所述SFTSV单克隆抗体金胶复合物的制备方法如下: 将制备好的20~25nm的胶体金溶液置于离心管中, 用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至8.0~9.0, 混合均匀, 加入1.2 μ g~1.6 μ g SFTSV单克隆抗体, 用振荡器将溶液混匀, 反应10min后, 加入BSA溶液封闭后得到SFTSV单克隆抗体金胶复合物。

3. 权利要求1所述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 胶体金溶液的制备;

2) SFTSV单克隆抗体金胶复合物的制备及离心纯化;

3) 将SFTSV单克隆抗体金胶复合物溶液滴涂到已经处理好的结合垫上制备成免疫胶体金垫, 备用;

4) 制备包被有特异性抗体的检测T线和包被有羊抗鼠抗体的控制C线的硝酸纤维素膜, 干燥, 封袋备用, 将稀释好的SFTSV单克隆抗体均匀地划在硝酸纤维素膜上, 得到检测T线; 将稀释好羊抗鼠多克隆抗体均匀地划在硝酸纤维素膜上, 得到控制C线, 包被, 备用;

5) 用封闭液处理样品垫, 烘干, 备用, 将底板、硝酸纤维素膜、样品垫、胶体金垫和吸水垫组合, 底板上硝酸纤维素膜的一端粘贴吸水垫, 硝酸纤维素膜与吸水垫之间相互重叠1~2mm, 在硝酸纤维素膜的另一端依次粘贴样品垫和结合垫, 硝酸纤维素膜和结合垫之间以及免疫胶体金垫与样品垫之间相互交叠1~2mm, 即得所述SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条。

4. 根据权利要求3述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述步骤2)的SFTSV单克隆抗体金胶复合物的制备方法如下: 将制备好的20nm~25nm的胶体金溶液置于离心管中, 用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至8.0~9.0, 混合均匀, 加入1.2 μ g~1.6 μ g SFTSV单克隆抗体, 用振荡器将溶液混匀, 反应10min后, 加入BSA溶液得到金胶复合物。

5. 根据权利要求4述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述BSA溶液的浓度为3%~5%。

6. 根据权利要求3述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述步骤2)的离心纯化步骤为: 将所述的SFTSV单克隆抗体金胶复合物在1400~1500r离心20min, 弃去离心管底部的沉淀, 然后在13500~15000r离心20~30min, 移走上清液, 沉淀物用10mM pH7.4磷酸盐缓冲溶液重新分散至100~150 μ L体积, 4 $^{\circ}$ C保存, 备用。

7. 根据权利要求3述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述步骤4)中的检测T线中的SFTSV单克隆抗体含量为0.04~0.07mg/cm²。

8. 根据权利要求3述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 所述步骤4)中的控制C线中的羊抗鼠抗体含量为0.04~0.07mg/cm²。

9. 权利要求1或2所述的胶体金快速检测试纸条在制备SFTSV核蛋白抗原检测的产品中

的应用。

一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条及其制备方法 和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及涉及生物化学分析检测技术领域,具体涉及一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus,SFTSV)是我国2009年发现的一种新型布尼亚病毒,为布尼亚病毒科白岭病毒属。感染SFTSV主要症状为严重发热,血小板减少,白细胞减少及多器官功能损伤,可以在人与人之间通过血液进行传播,致使在国内的死亡率较高。

[0003] SFTSV基因组为单负链RNA病毒,由L、M、S三个片段组成,分别编码病毒结构蛋白和非结构蛋白。L和M片段分别编码RNA多聚酶编码和具有血凝活性并可诱导产生中和抗体的包膜糖蛋白(Gn、Gc),S片段编码核蛋白(NP)和非结构蛋白NSs,NP与病毒基因组RNA结合后保护RNA不被降解,同时NP在病毒复制中也发挥关键作用。

[0004] 目前,目前该病毒序列已经阐明,但是对尚无有效手段进行治疗和疫苗预防。SFTSV疫苗研制过程中,能与病毒基因组RNA结合同时病毒复制中发挥关键作用的核蛋白抗原含量检测是重要的质量控制指标。常用的方法不能快速得到检测结果,或是检测敏感度不够。

发明内容

[0005] 发明目的:鉴于便携免疫层析快速检测技术在分析检测病毒中的优点、重要地位和胶体金纳米粒子稳定的性质,本发明所要解决的第一个技术问题是基于现有的SFTSV病毒检测技术不符合快速、简便、高灵敏度的要求,本发明目的是提供一种灵敏度高、特异性强、简单快速、成本低廉、无需借助精密复杂的检测仪器可检测SFTSV核蛋白抗原(NP)的胶体金快速检测试纸条。

[0006] 本发明旨在建立SFTSV核蛋白抗原(NP)双抗体夹心免疫层析快速检测试纸条的方法并进行验证,为SFTSV疫苗的研制及快速检测产品的工艺开发奠定基础。目前金胶因具有优异的性质已经被广泛应用于示踪、成像以及标记等方面,且免疫层析试纸条检测则因为它的简单迅速、价格低廉、可以随时随地等优点在检测领域处于特殊重要的地位,本发明建立一种快速、可靠的,适合基层单位和现场应用的病毒检测技术。因此,研究SFTSV核蛋白抗原(NP)胶体金快速检测试纸条,将其应用到产品中,制备一种便携快速检测的产品具有重大的意义。

[0007] 本发明要解决的第二个技术问题是提供了SFTSV核蛋白抗原(NP)的胶体金快速检测试纸条的制备方法。

[0008] 本发明要解决的第三个技术问题是提供了该检测试纸条的应用。

[0009] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种SFTSV核蛋白

抗原的胶体金快速检测试纸条,所述试纸条包括依次连接的样品垫、结合垫、包被有检测T线与控制C线的硝酸纤维素膜、吸水垫,且所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫均粘贴在底板上,所述结合垫上修饰有SFTSV单克隆抗体金胶复合物,所述硝酸纤维素膜检测T线上包被有SFTSV单克隆抗体,所述控制C线含有羊抗鼠多克隆抗体。

[0010] 其中,所述SFTSV单克隆抗体金胶复合物的制备方法如下:将制备好的20~25nm的胶体金溶液置于离心管中,用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至8.0~9.0,混合均匀,加入1.2~1.6 μ g SFTSV单克隆抗体,用振荡器将溶液混匀,反应10min后,加入BSA溶液得到金胶复合物。

[0011] 本发明内容还包括所述的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 胶体金溶液的制备;

[0013] 2) SFTSV单克隆抗体金胶复合物的制备及离心纯化;

[0014] 3) 将SFTSV单克隆抗体金胶复合物溶液滴涂到已经处理好的结合垫上制备成胶体金垫,备用;

[0015] 4) 制备包被有特异性抗体的检测T线和包被有羊抗鼠抗体的控制C线的硝酸纤维素膜,干燥,封袋备用,将稀释好的SFTSV单克隆抗体均匀地划在硝酸纤维素膜上,得到检测T线;将稀释好羊抗鼠抗体均匀地划在硝酸纤维素膜上,得到控制C线,包被,备用;

[0016] 5) 将样品垫在封闭液中浸泡,烘干,备用,将底板、硝酸纤维素膜、样品垫、胶体金垫和吸水垫组合,底板上硝酸纤维素膜的一端粘贴吸水垫,硝酸纤维素膜与吸水垫之间相互重叠1~2mm,在硝酸纤维素膜的另一端依次粘贴样品垫和结合垫,硝酸纤维素膜和结合垫之间以及免疫胶体金垫与样品垫之间相互交叠1~2mm,即得所述SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条。

[0017] 进一步地,所述步骤1)的胶体金溶液的制备如下:玻璃容器表面的杂质对胶体金颗粒的合成具有很大的干扰作用,因而实验过程中所有的容器应经过王水酸洗,过夜浸泡,用二次水清洗3次,烘箱中干燥备用;取0.2%的氯金酸水溶液5mL加入95mL超纯水中置于圆底烧瓶中,冷凝管回流,油浴锅中加热至120℃沸腾,沸腾后在剧烈搅拌下使用移液枪迅速准确地加入新鲜配制的1%的柠檬酸三钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)水溶液2mL,几分钟后可看到溶液的颜色由黑色→紫色→深蓝→酒红色,当溶液的颜色完全变为透明的酒红色时,继续煮沸15min,即制得所需的胶体金。从油浴中取出烧瓶,常温下继续搅拌冷却至室温,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存,备用。

[0018] 其中,所述步骤2)的SFTSV单克隆抗体金胶复合物的制备方法如下:将制备好的20~25nm的胶体金溶液置于离心管中,用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至8.0~9.0,混合均匀,加入1.2~1.6 μ g SFTSV单克隆抗体,用振荡器将溶液混匀,反应10min后,加入BSA溶液得到SFTSV单克隆抗体金胶复合物。

[0019] 其中,所述BSA溶液的浓度为3%~5%。进一步地,所述SFTSV单克隆抗体金胶复合物溶液中BSA最终浓度约为1%。

[0020] 其中,所述步骤2)的离心纯化步骤为:将所述的SFTSV单克隆抗体金胶复合物在1400~1500r离心20~30min,弃去离心管底部的沉淀,然后在13500~15000r离心20~30min,移走上清液,沉淀物用10mM pH7.4磷酸盐缓冲溶液重新分散至100~150 μ L体积,4℃保存,备用。

[0021] 其中,所述步骤3)中所述结合垫上滴涂离心后重新分散的SFTSV单克隆抗体金胶复合物溶液体积为10~20 μ L。

[0022] 其中,所述步骤4)中的检测T线中的SFTSV单克隆抗体含量为0.04~0.07mg/cm²。

[0023] 其中,所述步骤4)中的控制C线中的羊抗鼠抗体含量为0.04~0.07mg/cm²。

[0024] 进一步地,所述的检测SFTSV核蛋白抗原(NP)快速免疫诊断金胶层析试纸条的制备方法包括下述步骤:

[0025] (1)样品垫的制备:配制样品垫处理液,将剪裁好所需尺寸的玻璃纤维膜置于样品垫处理液中在室温下浸泡、烘干后,储存备用;

[0026] (2)结合垫的制备:配制结合垫处理液、免疫金胶体,将结合垫原料置于结合垫处理液中室温浸泡、烘干,将免疫金胶体与经处理后的结合垫结合、烘干,储存备用;

[0027] (3)硝酸纤维素膜的制备:包被配制包被缓冲液,用包被缓冲液分别稀释SFTSV单克隆抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体获得检测T线和控制C线;

[0028] (4)试纸的制备:在常温的干燥室内,取所述PVC底板,先将上述包被的所述硝酸纤维素膜贴合于所述PVC底板的中部,再在硝酸纤维素膜两侧分别粘贴所述样品垫、结合垫以及所述吸水垫,最后采用裁剪机器剪切所述PVC底板,即得所述检测SFTSV核蛋白抗原(NP)的胶体金快速检测试纸条,备用。

[0029] 本发明内容还包括所述的胶体金快速检测试纸条在制备SFTSV核蛋白抗原检测的产品中的应用。

[0030] 本发明的检测原理:检测过程中,待测SFTSV核蛋白抗原先与免疫胶体金形成复合物,然后继续层析,与硝酸纤维素膜上测试T线上的包被抗体反应,形成双抗体夹心复合物,并在此固定并积累出现肉眼可见的红色线,未反应的免疫金胶则仍继续层析前行,当到达点预先包被在控制C线上的羊抗鼠IgG多克隆单克隆抗体处时,免疫胶体金被其结合住,从而在控制C线也出现由胶体金颗粒固定并累积而显现出肉眼可见的红色线。结果:T线显示红色表示SFTSV病毒检测为阳性,T线不显示红色,表示SFTSV病毒为阴性,即检测样品中不含SFTSV病毒抗体或是SFTSV病毒抗体含量极低,C线显示红色,表示试纸有效。C线处不显示红色,无论T线结果如何也说明试纸无效,检测结果无效。通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断待测蛋白的有无。

[0031] 有益效果:相比于现有技术,本发明具备以下优点:本发明利用制备的胶体金快速检测试纸条,不仅具有简便快速、特异性强、灵敏度高、准确可靠、成本低等优点,还不需要特殊仪器,可肉眼直接读取结果,对该病毒的快速检测防治具有非常重大的意义。本发明流程简单,成本低廉,市场前景广泛,经济效益高。这种快速检测的试纸条产品能很好的用于偏远地区病人诊断及动物现场流行病学监测。

附图说明

[0032] 图1为试纸条结构示意图,从上之至下,依次为俯视图、侧视图、检测前、检测后的示意图;

[0033] 图2本发明制备的置于卡壳中的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条产品手机拍摄的照片;

[0034] 图3本发明制备的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的金胶紫外图;

[0035] 图4本发明制备的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的最佳pH和最小标记抗体量条件优化实验的手机拍摄的图片；

[0036] 图5本发明制备的不同BSA浓度对SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的干扰实验的手机拍摄的图片；

[0037] 图6本发明制备的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条检测不同浓度的待测蛋白实验的手机拍摄的图片；

[0038] 图7本发明制备的SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条检测不同浓度的待测蛋白实验的特异性实验手机拍摄的图片。

具体实施方式

[0039] 下面结合附图和实施例,对本发明的技术方案进行详细说明。

[0040] 本发明所用到的实施例中的主要原料如下:

[0041] 试剂:氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、SFTSV核蛋白抗原(NP)(江苏省疾病预防控制中心, NP)、SFTSV单克隆抗体(江苏省疾病预防控制中心, Mab0005)、羊抗鼠多克隆抗体IgG(上海杰一生物技术有限公司, JY-QT01)、 K_2CO_3 、BSA、蔗糖、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、Tween-20、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、NaCl、蒸馏水;

[0042] 耗材:硝酸纤维素膜膜(NC膜)、样品垫、结合垫、吸水垫、PVC底板、离心管、移液枪及枪头,直尺,签字笔及棉纤维粗笔头。

[0043] 实施例1胶体金溶液的制备

[0044] 1、制备前的准备

[0045] 玻璃容器表面的杂质对胶体金颗粒的合成具有很大的干扰作用,因而实验过程中所有的容器应经过王水酸洗,过夜浸泡,用蒸馏水清洗三次,烘箱中干燥备用。

[0046] 2、胶体金溶液的制备

[0047] 取0.2%的氯金酸水溶液5mL加入95mL超纯水中置于圆底烧瓶中,冷凝管水回流,在油浴锅中加热至120℃沸腾,沸腾后在剧烈搅拌下使用移液枪迅速准确地加入新鲜配制的1%的柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)水溶液2mL,几分钟后可看到溶液的颜色由黑色→紫色→深蓝→酒红色,当溶液的颜色完全变为透明的酒红色时,继续煮沸15min,即制得所需的胶体金。从油浴中取出烧瓶,常温下继续搅拌冷却至室温,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存,备用。

[0048] 实施例2 SFTSV核蛋白抗原单克隆抗体金胶复合物的制备之最佳pH的优化实验

[0049] 分别取200μL的胶体金溶液置于5个4mL离心管中,用0.1mol/L的 K_2CO_3 溶液将胶体金溶液的pH值分别调节到6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,各取200μL分别加入4μg SFTSV单克隆抗体,混合均匀,室温反应10min后,各管加入10%NaCl溶液45μL,静置2h,观察各管颜色变化。实验结果参见图4中的左图,pH小于7.0时,胶体金颜色变为了紫蓝色,pH等于7.0时,溶液为轻微的紫蓝色,而pH大于7时,胶体金的颜色保持不变,仍然为酒红色。电解质是影响胶体金稳定性的主要原因之一,少量的电解质可以稳定金纳米粒子的胶体状态,但过高浓度会使带电的胶体电荷发生变化导致聚沉。pH值影响胶体金对抗体的吸附作用,只有特定pH值能够形成结合最稳定的免疫金胶,在高浓度的电解质(如NaCl)作用下不会聚沉。这是因为抗体蛋白所带的净电荷取决于溶液的pH值,本实验采用目测法观察实验结果,pH大于7.0胶体

金的颜色保持不变,这是因为在制备免疫探针时,当pH接近或者高于抗体蛋白的等电位点的条件下标记是比较合适的,此条件下,金胶表面的抗体吸附量最大,同时为了减少加入 K_2CO_3 的量,实验过程中选择的最适pH为8.0~9.0。

[0050] 实施例3 SFTSV核蛋白抗原单克隆抗体金胶复合物的制备之最适标记抗体量条件的选择

[0051] 取10支离心管,将胶体金溶液的pH调节到pH=8.0~9.0,在10支试管中各加入200 μ L胶体金溶液,分别加入0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、3、4、5、6 μ g SFTSV单克隆抗体,反应10min后,各管加入10%NaCl溶液45 μ L,静置2h,观察各管颜色变化。实验结果参见图4的右图,当抗体的量为0.4 μ g时,溶液变成蓝色,发生聚沉,当抗体量大于0.8 μ g时,胶体金颜色未发现明显颜色变化,实验过程中考虑到如果制备免疫探针时加入过多的抗体,不仅会造成原料的浪费,而且更为严重的是过多的抗体会导致免疫探针发生凝聚,标记活性受到严重的影响,因为在检测抗原的过程中,溶液中未结合的抗体会优先免疫金胶与待测SFTSV核蛋白发生抗原抗体特异性反应,从而降低检测的灵敏度,造成试纸条的“假阳性”现象。此外,实验过程中所需抗体量应略大于最适标记抗体量,因而实验过程中加入抗体量选择为1.2~1.6 μ g。

[0052] 实施例4免疫金胶标记特异性SFTSV抗体的制备及离心纯化

[0053] 将实施例1制备好的20~25nm的胶体金溶液200 μ L置于离心管中,用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至8.0,混合均匀,加入1.2 μ g SFTSV单克隆抗体,用振荡器将溶液混匀,反应10min后,加入5%BSA。金标复合物在1500r离心20min,弃去离心管底部的沉淀,然后在15000r离心20min,移走上清液,沉淀物用10mM pH7.4磷酸盐缓冲溶液(含5%蔗糖,1%BSA)重新分散至100 μ L体积,4℃保存备用。

[0054] 实施例5免疫金胶标记特异性SFTSV抗体的制备及离心纯化

[0055] 将实施例1制备好的20~25nm的胶体金溶液200 μ L置于离心管中,用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至9.0,混合均匀,加入1.35 μ g SFTSV单克隆抗体,用振荡器将溶液混匀,反应10min后,加入3%BSA。金标复合物在1500r离心20min,弃去离心管底部的沉淀,然后在15000r离心20min,移走上清液,沉淀物用10mM pH7.4磷酸盐缓冲溶液(含5%蔗糖,1%BSA)重新分散至100 μ L体积,4℃保存备用。

[0056] 实施例6免疫金胶标记特异性SFTSV抗体的制备及离心纯化

[0057] 将实施例1制备好的20~25nm的胶体金溶液200 μ L置于离心管中,用0.1mol/L K_2CO_3 调pH至9.0,混合均匀,加入1.4 μ g SFTSV单克隆抗体,用振荡器将溶液混匀,反应10min后,加入4%BSA。金标复合物在1500r离心20min,弃去离心管底部的沉淀,然后在15000r离心20min,移走上清液,沉淀物用10mM pH7.4磷酸盐缓冲溶液(含5%蔗糖,1%BSA)重新分散至100 μ L体积,4℃保存备用。

[0058] 实施例7 SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的制备

[0059] 1、样品垫的制备

[0060] 配制样品垫预处理液:用pH=8.0的PBS缓冲液配制0.1% (v/v) Tween-20和0.5% PVP溶液。将样品垫剪裁成宽4mm长10mm的长条后玻璃纤维素膜样品垫放入上述溶液中室温浸泡,干燥皿中保存备用。

[0061] 2、免疫胶体金结合垫的制备

[0062] 免疫金胶的制备:分别按照实施例4~6制备的免疫金胶标记特异性SFTSV抗体的制备及离心纯化方法即得到标记好胶体金的抗体溶液。

[0063] 配制结合垫预处理液:用pH=7.4的PBS缓冲液配制0.1% (v/v) Tween-20、2% (w/v) BSA和4% (w/v) 蔗糖溶液。将样品垫剪裁成宽4mm长4mm的长条后玻璃纤维素膜样品垫放入上述溶液中室温浸泡,干燥皿中保存备用。将上述标记好胶体金的抗体溶液取10~20 μ L滴涂到已经处理好的结合垫上,37 $^{\circ}$ C干燥,制备成胶体金结合垫,备用。

[0064] 3、硝酸纤维素膜(NC膜)的制备

[0065] 制备包被有特异性抗体的检测T线和包被有羊抗鼠抗体的控制C线的硝酸纤维素膜,37 $^{\circ}$ C干燥,封袋备用。将SFTSV单克隆抗体稀释成2.5mg/mL,将羊抗鼠多克隆抗体IgG稀释成2.5mg/mL;将稀释好的SFTSV单克隆抗体均匀地划在纤维素膜上,得到检测T线,抗体含量为0.05mg/cm²;将稀释好羊抗鼠抗体均匀地划在纤维素膜上,得到控制C线,抗体含量为0.05mg/cm²,37 $^{\circ}$ C包被,备用。

[0066] 配制NC膜处理液:用pH=7.4的PBS缓冲液配制BSA溶液对制备好的NC膜进行非特异性封闭,干燥后将NC膜剪裁成宽4mm长25mm的长条后,备用。

[0067] 4、免疫胶体金快速检测试纸条的组装

[0068] 将底板、硝酸纤维素膜、样品垫、结合垫和吸水垫组合,底板上硝酸纤维素膜的上方粘贴吸水垫。硝酸纤维素膜与吸水垫之间相互重叠1~2mm,在硝酸纤维素膜的下方依次粘贴结合垫和样品垫,硝酸纤维素膜和结合垫之间以及结合垫与样品垫之间相互交叠1~2mm,即得所述SFTSV免疫胶体金快速检测试纸条。

[0069] 实施例8 SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条的应用

[0070] 1、试纸条测试

[0071] 将实施例7制备的试纸条平放在台面上,在样品垫上加入50 μ L待测SFTSV核蛋白抗原,在毛细管作用下,流体开始向前层析,10~15min后读取结果。

[0072] 2、结果判断

[0073] 检测过程中,待测SFTSV核蛋白抗原先与免疫胶体金形成缀合物,然后与硝酸纤维素膜上对应的T线抗体反应,形成特异性双抗体夹心复合物,并在此固定并积累出现肉眼可见的红色线,未反应的免疫金胶则仍继续层析前行,当到达点预先包被在控制C线上的羊抗鼠IgG多克隆单克隆抗体处时,免疫胶体金被其结合住,从而在C线也出现由胶体金颗粒固定并累积而显现出肉眼可见的红色线。结果:T线显示红色表示SFTSV病毒检测为阳性,T线不显示红色,表示SFTSV病毒检测为阴性,即检测样品中不含SFTSV病毒抗体或是SFTSV病毒抗体含量极低,C线显示红色,表示试纸有效。C线处不显示红色,无论T线结果如何也说明试纸无效,检测结果无效。

[0074] 实施例9不同BSA浓度封闭硝基纤维素膜对SFTSV核蛋白抗原(NP)快速免疫诊断层析试纸的干扰测试

[0075] (1) 不同浓度抗原溶液的配制:用pH=7.4的PBS缓冲液配制0ng/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL的SFTSV抗原溶液。

[0076] (2) 不同浓度BSA溶液的配制:用pH=7.4的PBS缓冲液配制0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1%、3%、5%的BSA封闭溶液。

[0077] (3) 将实施例7的方法制备的同一批号试纸条平放在台面上,在样品垫上加入待测

SFTSV核蛋白抗原,在毛细管作用下,流体开始向前层析,10~15min后读取结果。观察结果,每个检测浓度各重复3次,各溶液3次检测结果均为阳性才可判为此浓度的结果为阳性。实验结果参见图5,封闭液BSA的浓度对检测T线和控制C线的出现影响不大,并且线的深浅差别不大,检测过程中,BSA对包被有抗体的硝酸纤维素膜的特异性封闭作用是必要的,BSA浓度过低会使非特异性位点得不到充分的封闭,且实验中发现BSA的浓度越大,粘度越大,待测蛋白的流体溶液在BSA封闭液处理过NC膜上的流动速度较慢,所需的检测时间较长,所以实验过程选择0.4%~0.6%。

[0078] 实施例10 SFTSV核蛋白抗原(NP)快速免疫诊断层析试纸的灵敏度测试

[0079] (1) 不同浓度抗原溶液的配制:用pH=7.4的PBS缓冲液配制0ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、0.1μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mL、2μg/mL的SFTSV核蛋白抗原溶液。

[0080] (2) 将实施例7的方法制备的同一批号试纸条平放在台面上,在样品垫上加入待测SFTSV核蛋白抗原溶液,在毛细管作用下,流体开始向前层析,10~15min后读取结果。观察结果,每个检测浓度各重复3次,各溶液3次检测结果均为阳性才可判为此浓度的结果为阳性。参见图6的检测结果,0ng/mL的核蛋白抗原在出现明显的控制C线下并没有出现检测T线,说明试纸条的非特异性非常小,检测结果有效。图6中1μg/mL、2μg/mL的SFTSV核蛋白抗原在流动中在测试T线被捕捉,由于抗原浓度较大,所以T线捕捉的多,进而显示的胶体金的颜色较深。而0.1μg/mL、0.5μg/mL相对来说,抗原量较少,T线颜色较浅,接着,20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL的SFTSV核蛋白抗原浓度更低,颜色更浅,最后,1ng/mL、10ng/mL没有T线说明该浓度抗原已经超出检测范围,无法显示。肉眼可观察的最低核蛋白抗原浓度为20ng/mL。肉眼可观察的最佳核蛋白抗原浓度为1μg/mL,该浓度下颜色深易于观察。

[0081] 实施例11 SFTSV核蛋白抗原(NP)快速免疫诊断层析试纸的特异性测试

[0082] (1) 溶液的配制:用pH=7.4的PBS缓冲液配制0μg/mL PBS溶液、1μg/mL CEA溶液、1μg/mL AFP溶液、1μg/mL CA125溶液、1μg/mL HCG溶液、1μg/mL SFTSV核蛋白抗原溶液。

[0083] (2) 将实施例7的方法制备的同一批号试纸条平放在台面上,在样品垫上加入待测抗原,在毛细管作用下,流体开始向前层析,10~15min后读取结果。观察结果,每个检测浓度各重复3次,各溶液3次检测结果均为阳性才可判为此浓度的结果为阳性。当样品中含有SFTSV病毒抗原时,检测线呈阳性反应(红色),而当样品中含有上述其他抗原时,检测线呈阴性(无色),PBS缓冲液阴性对照,检测线也呈阴性反应。实验结果参见图7,0ng/mL的核蛋白抗原在出现明显的控制C线下并没有出现检测T线,说明试纸条的非特异性非常小,检测结果有效。1μg/mL CEA溶液、1μg/mL AFP溶液、1μg/mL CA125溶液、1μg/mL HCG溶液在试纸条的检测T线上均没有出现颜色,且1μg/mL SFTSV核蛋白抗原溶液在检测T线上出现非常明显的颜色,上述实验多次重复5次后结果相同,说明该方法具有高度的特异性,不会受到其它的抗原的干扰而出现“假阳性”。

[0084] 实施例12 SFTSV核蛋白抗原(NP)快速免疫诊断层析试纸的稳定性和重现性测试

[0085] 将本发明实施例7的方法制备的10批试纸放置一周、两周、三周后,用于测试用pH=7.4的PBS缓冲液配制0ng/mL、1μg/mL、2μg/mL的SFTSV核蛋白抗原溶液。

[0086] 测试结果表1显示,10批试纸条分别在一周、两周、三周测试0ng/mL、1μg/mL、2μg/mL的SFTSV核蛋白抗原溶液,实验结果为0ng/mL的核蛋白抗原均在出现明显的控制C线下并

没有出现检测T线,说明试纸条的非特异性非常小,检测结果有效。1 μ g/mL、2 μ g/mL的SFTSV核蛋白抗原溶液均出现非常明显的检测T线,因为抗原浓度较高,所以T线上显示的颜色非常深。此外,一周、两周、三周测试0ng/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL的SFTSV核蛋白抗原溶液试纸显示的结果相同,此结果表明具有很好的稳定性和重现性。

[0087] 表1

待测蛋白 (μ g/mL)	编号	检测 (T) 线	质控 (C) 线	检测 (T) 线	质控 (C) 线	检测 (T) 线	质控 (C) 线
		一周		二周		三周	
0	1	-	+++	-	+++	-	+++
	2	-	+++	-	+++	-	+++
	3	-	+++	-	+++	-	+++
	4	-	+++	-	+++	-	+++
	5	-	+++	-	+++	-	+++
	6	-	+++	-	+++	-	+++
	7	-	+++	-	+++	-	+++
	8	-	+++	-	+++	-	+++
	9	-	+++	-	+++	-	+++
	10	-	+++	-	+++	-	+++
1	1	++	+++	++	+++	++	+++
	2	++	+++	++	+++	++	+++
	3	++	+++	++	+++	++	+++
	4	++	+++	++	+++	++	+++
	5	++	+++	++	+++	++	+++
	6	++	+++	++	+++	++	+++
	7	++	+++	++	+++	++	+++
	8	++	+++	++	+++	++	+++
	9	++	+++	++	+++	++	+++
	10	++	+++	++	+++	++	+++
2	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	+++	+++	+++	+++	+++	+++

[0089] 注:“-”表示不可见,“++”表示可见,“+++”表示明显可见。

[0090] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和

原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

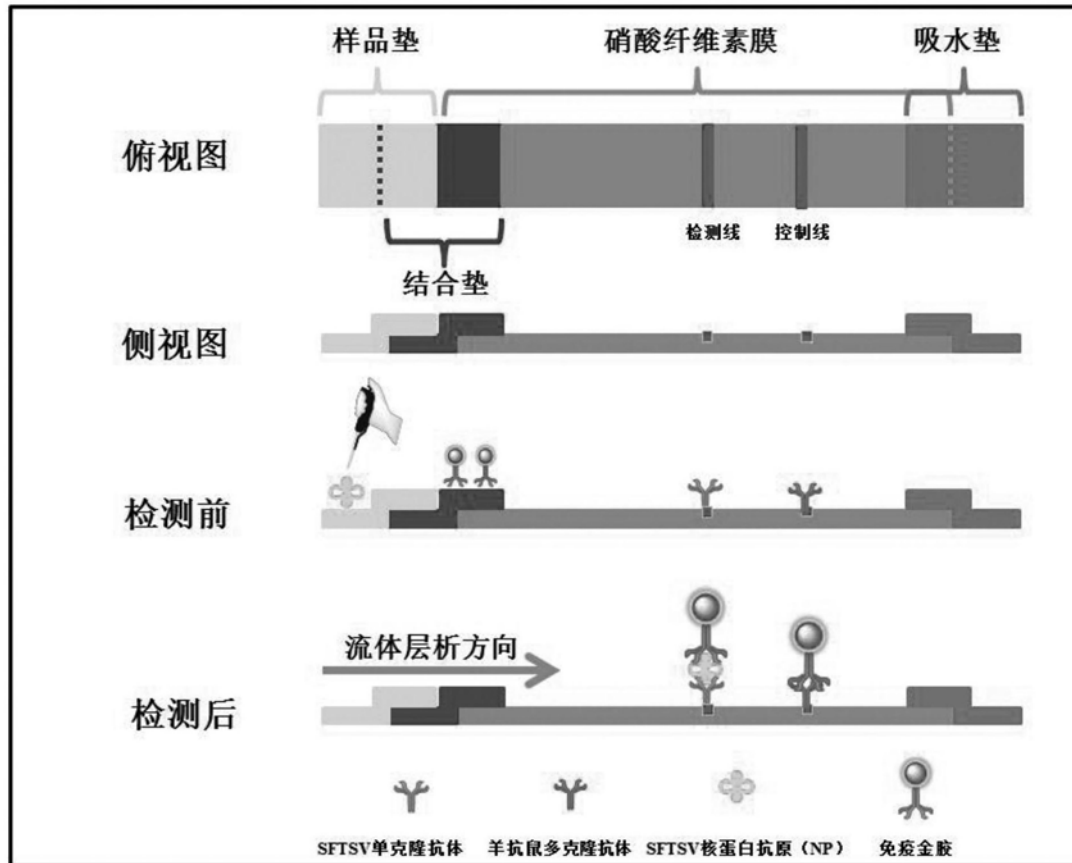


图1



图2

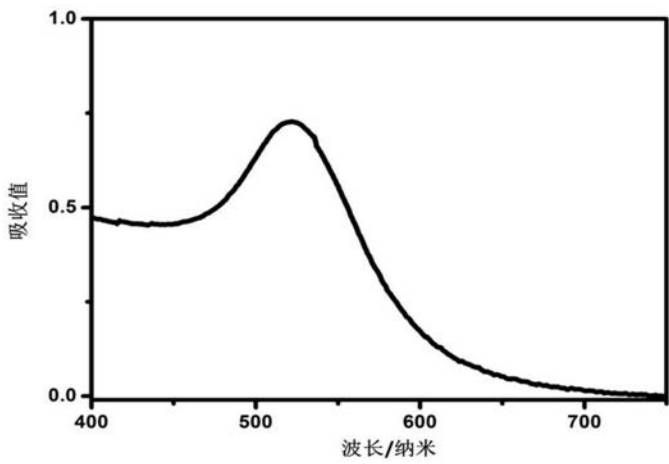


图3

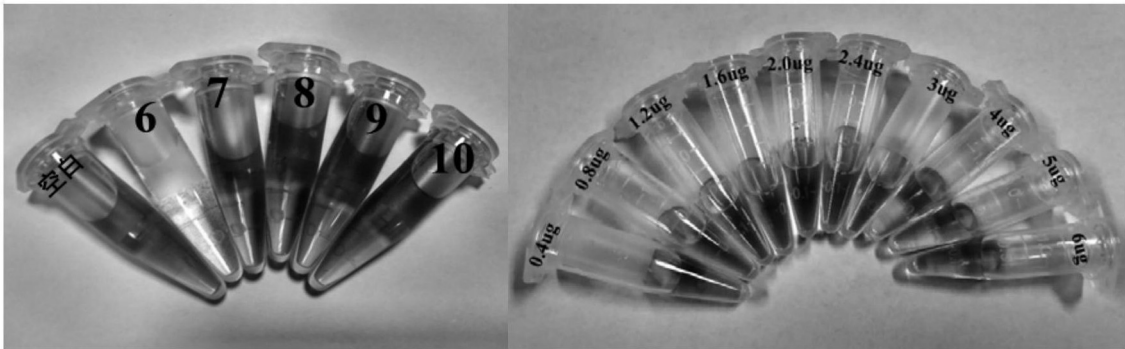


图4

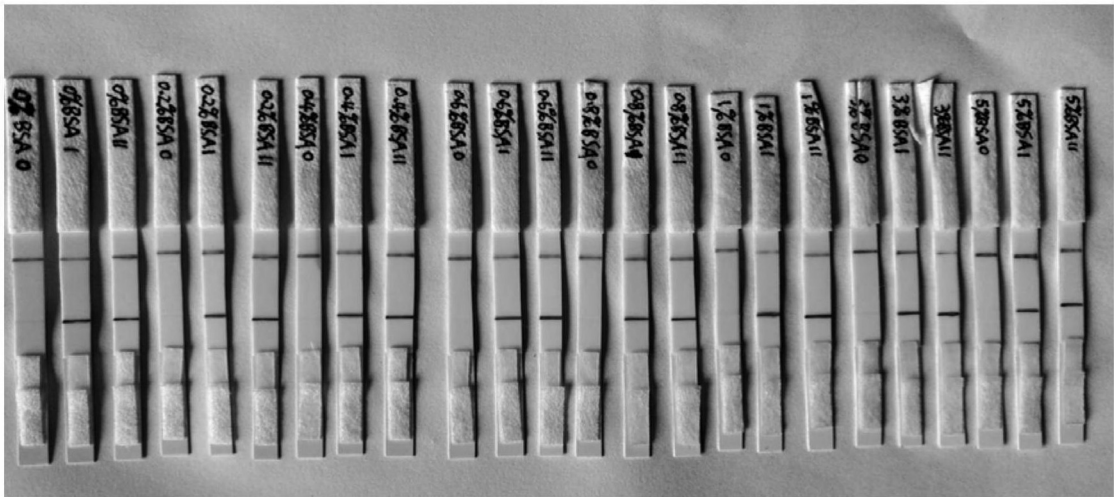


图5

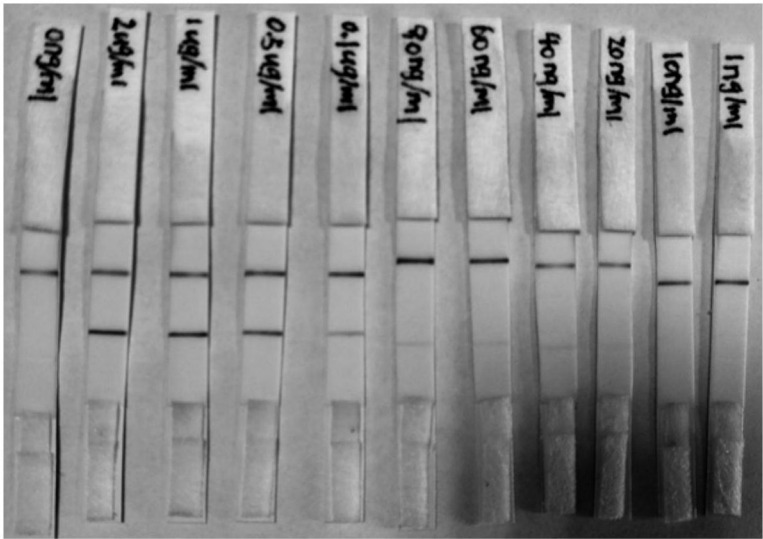


图6

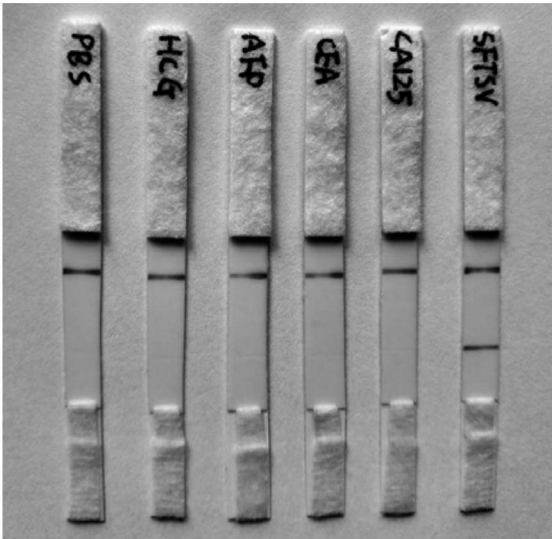


图7

专利名称(译)	一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109085334A	公开(公告)日	2018-12-25
申请号	CN201810649580.5	申请日	2018-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	丁收年 左家莹 焦永军 武锡锦 梁秀丽 朱红允 温雪飞 姬艺洪		
发明人	丁收年 左家莹 焦永军 武锡锦 梁秀丽 朱红允 温雪飞 姬艺洪		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/58 G01N33/68 G01N33/558 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/587 G01N33/6803 G01N2333/175		
代理人(译)	王艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种SFTSV核蛋白抗原的胶体金快速检测试纸条，所述试纸条包括依次连接的样品垫、结合垫、包被有检测T线与控制C线的硝酸纤维素膜、吸水垫，且所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫均粘贴在底板上，所述结合垫上修饰有SFTSV单克隆抗体金胶复合物，所述硝酸纤维素膜T线上包被有SFTSV单克隆抗体，所述控制C线包被有羊抗鼠多克隆抗体。本发明还公开了该试纸条的制备方法和应用。本发明具有简便快速、特异性强、灵敏度高、准确可靠、成本低廉、安全、易保存、稳定性好且操作非常简便，无需借助专业分析仪器进行分析，节约综合成本，可肉眼直接读取结果，对病毒和疾病的现场快速检验（point-of-care testing, POCT）具有非常重要意义。

