



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101881772 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 10

(21) 申请号 201010215044. 8

(22) 申请日 2010. 07. 01

(71) 申请人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市新模范马路 5 号
南京工业大学

(72) 发明人 林远 王月华

(51) Int. Cl.

G01N 33/571 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

梅毒螺旋体 (TP) 抗体检验试剂盒及其制备和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检验试剂盒及其制备和检测方法,属于免疫分析医学诊断技术领域。具体包括用 TP 重组抗原包被高聚分子微球,用牛血清白蛋白封闭空白结合点,制成特异性 TP 探针-高聚分子微球;与待测标本共培养捕获 TP 抗体,洗涤离心除去未结合的 TP 抗体,再加入荧光标记的抗人 IgG 或 IgM 抗体;使用流式细胞仪检测微球的荧光强度,对受测抗体进行定性或定量分析。本方法具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点,并可对标本进行微量、多价分析。

1. 一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检验试剂盒,其特征在于试剂盒的组分包括:重组 TP 抗原包被的微球载体、阴性对照血清、阳性对照血清、荧光标记抗体和浓缩样本稀释液。

2. 权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于微球载体是一种高聚分子微球,材质是乳胶、硅、树脂,或可塑性聚合材料,直径 2-20 微米,并且以共价键欧联重组 TP 抗原。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于荧光标记抗体是荧光标记的羊、兔、鼠抗人免疫球蛋白中的一种或是几种。

4. 一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检验试剂盒的制备方法,其特征在于:

1) 微球载体的制备:重组 TP 抗原与活化的高聚分子微球按比例混合,2-8℃温育 4 小时以上,用 PBS 缓冲液洗涤、离心、弃上清液,加入一定浓度的牛血清白蛋白封闭液,温育 30 分钟,完成流式微球载体的制备;

2) 其它组分的制备:阴性对照血清是健康人的血清,阳性对照血清为经确诊的 TP 抗体阳性血清,荧光标记抗体为羊、兔和鼠抗人免疫球蛋白抗体,样本稀释液中含有 PBS、小牛血清白蛋白、叠氮钠。

5. 一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体抗体检验试剂盒的检测,其特征在于借助流式细胞仪检测对 TP 抗体定性或定量检验,以及包括 TP 抗体在内的多价检测。

6. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在于定性检测是用阴性、阳性对照血清为参照,根据待测样品的荧光强度来定性,强度大于或等于阴性检测值的 2.1 倍时为阳性,小于时为阴性。

7. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在于定量检测是使用一组已知浓度的阳性对照血清,以此制作标准曲线,用以对受测样本的定量分析。

8. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在于包括 TP 抗体在内指标作多价检测,涉及使用不同直径微球载体和不同内置荧光的混合物,每种微球载体包被一种探针,用该混合物与血清等样本在同一试管共培养,每种微球载体捕获一种特异性配体,最后使用流式细胞仪分析将其区分。

9. 权利要求 5 所述的试剂盒的检测,其特征在于借助流式细胞仪检测。

梅毒螺旋体 (TP) 抗体检验试剂盒及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*; TP) 抗体检验试剂盒及其制备和检测方法,属于免疫分析医学诊断技术领域。

背景技术

[0002] 梅毒近年来在我国的发病率呈逐年增加的趋势。2010 年 4 月份卫生部公布,在全国 27 种法定报告的甲、乙类传染病中发病数居前五位 of 病种依次为病毒性肝炎、肺结核、痢疾、梅毒和甲型 H1N1 流感,其中梅毒排第三位,2009 年为第四位,2005 年为第五位。

[0003] 梅毒是人体感染苍白螺旋体后发生的不仅仅局限于皮肤或生殖系统的慢性全身性传染病,主要经性接触、母婴、血液传播。目前,检测感染者血清梅毒螺旋体抗体是诊断梅毒螺旋体感染的主要办法,分非特异性反应素抗体方法和检测特异性抗体方法两大类。甲苯胺红不加热血清试验 (TRUST) 和快速血浆反应素试验 (RPR) 试验是目前国内采供血机构筛查献血者及医院初步诊断可以患者的梅毒血清学方法。TPPA 法为确诊试验,特异性高,但是成本较高、操作繁琐、结果易受主观判断影响及不适于批量标本检测。研究新的快速、简便、敏感且特异的诊断方法,对梅毒早期发现、治疗和防止扩散有重要意义。

[0004] 流式微球载体技术是使用流式细胞术和高聚分子微球载体检测生物分子的新技术。该技术在微载体表面进行免疫吸附反应,通过流式细胞仪测量示踪物的荧光强度,具有高灵敏度、分辨率和稳定性的优点。另外,使用不同直径和内置荧光的微球载体,可在同一试管进行多价分析,形成高效检测模式。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于流式微载体技术的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒及其制备和检测方法,可进行包括 TP 在内多价抗体检测。在检测方法上有别于以往的固定态的凝集、吸附,而是对流动的单个微球逐一高速检测,具有高灵敏度、特异性和稳定性高的特点,适用于梅毒螺旋体筛查和辅助诊断。

[0006] 本发明的技术方案:一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检验试剂盒,其特征在于试剂盒的组分包括:探针包被的微球载体、阴性对照血清、阳性对照血清、荧光标记抗体和样本稀释液。

[0007] 其中所述的微球载体是一种高聚分子微球,材质是乳胶、硅、树脂,或可塑性聚合材料,直径 2-20 微米,在其表面以共价键欧联包被重组 TP 抗原。荧光标记抗体为连接荧光物质的抗人免疫球蛋白抗体,包括(但不限于)羊、兔、鼠、鸡抗人免疫球蛋白。

[0008] 一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体抗体检验试剂盒的制备方法,在于:

[0009] 1) 微球载体的制备:重组 TP 抗原与活化的高聚分子微球按比例混合,2-8℃ 孵育 4 小时以上,用 PBS 缓冲液洗涤离心后,加入一定浓度的牛血清白蛋白封闭,孵育 30 分钟,完成流式微球载体的制备。

[0010] 2) 其它组分的制备:阴性对照血清是非 TP 患者 (5-10 例) 的混合血清,阳性对照

血清为经确诊的 TP 抗体阳性血清, 样本稀释液为含有小牛血清白蛋白 (1%) 的磷酸缓冲液 (PBS)。

[0011] 一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体抗体检验试剂盒的检测, 在于借助流式细胞仪检测对 TP 抗体定性和定量检验, 以及包括 TP 抗体在内的多价检测。

[0012] 其中定性检测是用阴性、阳性对照血清为参照, 根据待测样品的荧光强度判断感染与否, 强度大于或等于阴性检测值的 2.1 倍时为阳性, 小于时为阴性。

[0013] 定量检测是使用一组已知浓度的阳性对照血清, 以此制作标准曲线, 用以对受测样本的定量分析。

[0014] 包括 TP 抗体在内指标作多价检测, 涉及使用不同直径和不同内置荧光的微球载体的混合。每种微球载体包被一种探针, 可捕获一种特异性配体, 最后使用流式细胞仪分析将其区分。

[0015] 上述所有检测均借助流式细胞仪。

[0016] 有益效果: 本发明的试剂盒可进行包括 TP 在内的多价抗体检测, 既可定性检测又可定量检测, 借助流式细胞仪及计算机技术间接检测待测抗体。其在灵敏度、特异性和稳定性是现有技术所不及的。

[0017] 本发明经 53 例具有代表性的血清检验结果见表 1、2, 以健康体检者为对照, FCMA 检测抗 TP-IgG 和 TP-IgM 灵敏度为 100% 和 75.00%, 特异度分别为 100% 和 94.74%。

[0018] 表 1. FCMA 检测血清 TP-IgG 抗体阳性率

Group	n	TP-IgG	
		Positive (%)	Negative (%)
[0019] TP	20	20 (100)	0 (0)
TP 诊断判愈	14	14 (100)	0 (0)
健康	19	0 (0)	19 (100)

[0020] 表 2. FCMA 检测血清 TP-IgM 抗体阳性率

Group	n	TP-IgM	
		Positive (%)	Negative (%)
[0021] TP	20	15 (75.00)	5 (25.00)
TP 诊断判愈	14	8 (57.14)	6 (42.86)
健康	19	1 (5.26)	18 (94.74)

具体实施方式

[0022] 1. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法梅毒螺旋体抗体检测试剂盒组分实施例:

[0023] (1) 基因工程重组 TP 抗原包被的高聚分子球微载体

[0024] (2) 荧光标记抗人免疫球蛋白抗体

[0025] (3) 阴性对照血清

[0026] (4) 阳性对照血清

[0027] (5) 样本稀释液

[0028] 2. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒制备实施例:

[0029] (1) 基因工程重组 TP 抗原包被的高聚分子球微载体:

[0030] 微球载体的材质是乳胶、硅、树脂、苯乙烯、溴苯乙烯,或丙烯酸,丙烯酸胺、甲基丙烯酸盐、氯化乙烯、氯化苯乙烯、乙烯醋酸盐制成的聚亚胺脂和聚合性单体。用基因工程重组 TP 抗原包被聚苯乙烯微球,2-8℃卵育 4 小时以上,PBS 洗涤、离心除去未结合的包被抗原,再用牛血清封闭白蛋白微球上的空白点,制成 TP 抗原特异性微球载体。

[0031] (2) 荧光标记抗人免疫球蛋白抗体

[0032] 荧光标记抗体,包括(但不限于)荧光标记的羊、兔、鼠抗人 IgG、IgM、IgA。荧光染料包括(但不限于)荧光素异硫氰酸 (FITC)、四甲基若丹明、藻红素蛋白 (PE)、Cy-色素、硫氰酸、叶绿素蛋白、羧基荧光素、碘化物、纳米硅及其它生物或化学荧光染料。

[0033] (3) 阴性对照血清

[0034] 阴性对照血清是健康者的混合血清,可以稀释一定倍数,例如 50、100、500 倍。

[0035] (4) 阳性对照血清

[0036] 阳性对照血清为经确诊的梅毒抗体阳性血清,可以稀释一定倍数,例如 50、100、500 倍。荧光强度大于临界值,稀释倍数与阴性对照血清一致。

[0037] (5) 样本稀释液:磷酸盐缓冲液 (PBS),pH7.2±0.2;1%牛血清蛋白;0.5%叠氮钠 (NaN₃)。

[0038] 3. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法梅毒螺旋体抗体定性、定量及多价检测。

[0039] 定性检测实施例:临界值 (cut-off 值) 计算:临界值 = 阴性对照荧光强度值 × 2.1。测定样本荧光强度值 ≥ 临界值,抗-TP 抗体阳性;测定样本荧光强度值 < 临界值时,抗-TP 抗体阴性。

[0040] 定量检测实施例:方法是在试剂盒中配置 4-5 个不同浓度的阳性标准血清,例如 10、100、500、1000、2000ng/mL,用流式细胞仪制作浓度-强度标准曲线,横坐标为荧光强度,纵坐标为血清浓度,以此计算受测样本中的 TP 抗体含量。

[0041] 多价检测实施例:将不同直径微米的微球载体,分别包被上特异性抗原,然后将它们按比例混合,在同一试管同步检测不同配体。例如,同时测定梅毒、HIV、衣原体和支原体。

[0042] 4. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒检测实施例:①设定空白对照管(只加微球载体)、0 标准管(加微球载体和标记抗体)、阴性对照管(加阴性对照血清)、阳性对照管(加阳性对照血清)和若干待测样本管(加待测样本);②给所有管加样本稀释液 90 微升,微球载体 10 微升。③给阴性对照管和阳性对照管分别加阴性和阳性对照血清 2 μl (1:50 稀释),给待测样本管加待测血清 2 μl (1:50 稀释),4℃培养 30min。④给以上各管加磷酸缓冲液 4 毫升,离心 (3500r/min,5min) 2 次,倒弃上清液。⑤给以上各管(除空白对照管)加羊抗人 IgG-FITC(或羊抗人 IgM-FITC) 10 μl,4℃培养 30min。⑥重复④一次。⑦给各管加 PBS0.5 毫升,上流式细胞仪检测。

专利名称(译)	梅毒螺旋体(TP)抗体检验试剂盒及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN101881772A	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	CN201010215044.8	申请日	2010-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	林远 王月华		
发明人	林远 王月华		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体(TP)抗体检验试剂盒及其制备和检测方法,属于免疫分析医学诊断技术领域。具体包括用TP重组抗原包被高聚分子微球,用牛血清白蛋白封闭空白结合点,制成特异性TP探针-高聚分子微球;与待测标本共培养捕获TP抗体,洗涤离心除去未结合的TP抗体,再加入荧光标记的抗人IgG或IgM抗体;使用流式细胞仪检测微球的荧光强度,对受测抗体进行定性或定量分析。本方法具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点,并可对标本进行微量、多价分析。

Group	n	TP-IgG	
		Positive(%)	Negative(%)
TP	20	20 (100)	0 (0)
TP 诊断判愈	14	14 (100)	0 (0)
健康	19	0 (0)	19 (100)