



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101387641 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 200710076976. 7

(22) 申请日 2007. 09. 11

(73) 专利权人 深圳市康百得生物科技有限公司  
地址 518054 广东省深圳市南山区南油天安  
工业区 8 栋 2D

(72) 发明人 胡绍良 饶乐

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事  
务所 44268  
代理人 刘文求

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1424585 A, 2003. 06. 18, 摘要, 权利要求  
4, 说明书第 3 页第 1 段到第 2 段, 实施例 1.

CN 2604688 Y, 2004. 02. 25, 摘要, 说明书第  
1 页第 2 段, 权利要求 1.

CN 1424585 A, 2003. 06. 18, 摘要, 权利要求

4, 说明书第 3 页第 1 段到第 2 段, 实施例 1.

CN 2604688 Y, 2004. 02. 25, 摘要, 说明书第  
1 页第 2 段, 权利要求 1.

谷宗藩等. 肝吸虫囊蚴在鱼体内分布及其在  
流行病学上的意义. 《昌潍医学院学报》. 1983, 35,  
36, 42.

刘健. 鲜鱼与肝吸虫病. 《医学文  
选》. 1990, 10.

胡绍良等. 华支睾吸虫病快速 ELISA 诊断试  
剂盒的建立. 《中国寄生虫病防治杂志》. 1995, 第  
8 卷(第 4 期), 295-296.

胡绍良等. 华支睾吸虫病快速 ELISA 诊断试  
剂盒的建立. 《中国寄生虫病防治杂志》. 1995, 第  
8 卷(第 4 期), 295-296.

审查员 廖文勇

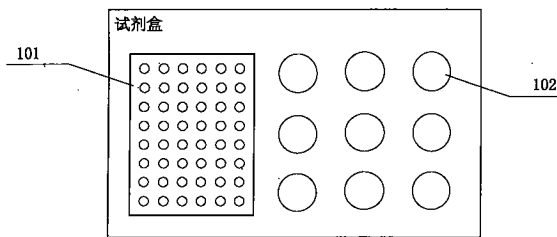
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒和  
检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫  
检测试剂盒和检测方法, 该试剂盒的盒体内设置  
酶联反应板、酶结合物、洗涤液、底物液、显色剂、  
稀释液、终止液; 酶联反应板为从肝吸虫中提取  
可溶性抗原并纯化, 然后包被可溶性抗原制得的  
酶联反应板; 酶结合物为辣根过氧化物酶标记抗鱼  
免疫球蛋白的酶结合物。通过利用快速免疫检  
测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性, 建  
立了淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测方法; 方便实  
用, 试剂盒为即开即用型, 用户不必另行配制或稀  
释, 操作简单易行; 不仅可以用仪器定量判断结  
果, 也可以肉眼直接判断, 适合于条件受限的现场  
检测; 安全环保, 采用无害的酶联免疫显色剂四  
甲基联苯胺, 避免了常规方法所带来的危害和污  
染。



1. 一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒,其盒体内设置酶联反应板、酶结合物、洗涤液、底物液、显色剂、稀释液、终止液;其特征在于,所述酶联反应板为从肝吸虫中提取可溶性抗原并纯化,然后包被所述可溶性抗原制得的酶联反应板;所述酶结合物为辣根过氧化酶标记抗鱼免疫球蛋白的酶结合物,所述可溶性抗原为可溶于水的肝吸虫成虫的抗原,分步通过辛酸法和 DEAE52 离子层析柱层析纯化制得精制所述可溶性抗原;

所述酶联反应板是在通用聚苯乙烯微孔板上包被可溶性抗原,然后在室温静置 12 ~ 24 小时之后,采用 0.1% ~ 5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,然后冷冻真空干燥后装袋封口制成;其中,所述可溶性抗原是从感染动物中获取肝吸虫成虫,并提取得到其可溶性抗原;包被液为含 0.01% ~ 1% 可溶性抗原的缓冲液,所述缓冲液是 0.01mol/L ~ 0.15mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5 ~ pH9.5;

所述酶结合物为采用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物,分离出抗鱼免疫球蛋白,经纯化后采用辣根过氧化酶进行免疫标记制成;

对淡水鱼免疫球蛋白的制备纯化鉴定标记包括步骤:

首先,采用盐析法初级提取鱼血清中的球蛋白;其次,采用层析法进一步纯化提取其免疫球蛋白;对纯化物进行分析鉴定,包括测定蛋白含量和进行电泳分析;. 抗鱼免疫球蛋白抗体的制备:用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物;分离纯化抗鱼免疫球蛋白;酶免疫标记,采用改良过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记,然后分离纯化并进行鉴定;改良过碘酸钠法,是取 5mgHRP 溶于 0.2mol/L pH5.6 的乙酸缓冲液 0.5ml,再加入 0.1mol/L0.25ml 的过碘酸钠混匀,加入抗鱼免疫球蛋白抗体约 5mg 混匀,调 pH 为 9.0,4°C 过夜,加入硼氢化钠 0.5mg 混匀,透析过夜,在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀,4°C 30min,离心,去上清,沉淀以少许 0.02mol/L pH7.4PBS 液溶解,装入透析袋,以同样液体在 4°C 透析除盐过夜;次日取出离心,以除去不溶物,即得酶-抗体结合物,以 0.02mol/L pH7.4PBS 液加至 5ml;效价测定合格后,加入等量优质甘油,分装小瓶,低温保存;

所述酶结合物是含 0.05% ~ 1% 的辣根过氧化物酶标记抗鱼免疫球蛋白的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液, pH7.0;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂,所述防腐剂是 0.01% ~ 0.1% 的硫柳汞;

所述的试剂盒还包括阴性对照品和阳性对照品;

所述洗涤液为包含有 0.1% ~ 1% 表面活性剂的 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;底物液为 0.1% ~ 0.5% 过氧化氢溶液;显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;稀释液为 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, pH7.0;终止液为 1mol/L ~ 2mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

2. 一种用于非诊断目的的用于权利要求 1 所述的试剂盒的检测方法,其包括步骤:

A1、酶联反应板每孔分别加稀释液 1 滴,加入待检的样本 50ul,混匀;其中,所述稀释液为 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;

设置阴性孔、阳性孔及空白对照孔,阴性孔、阳性孔分别加稀释液 1 滴,然后分别加入阴性对照品、阳性对照品各 50ul,空白对照孔加入稀释液 2 滴;

A2、充分反应后甩去孔内液体,每孔加洗涤液 1 滴后立即注满纯净水,静置 30 秒后甩去,再用纯净水洗涤至少一次,甩去,拍干;其中,所述洗涤液为包含有 0.1% ~ 1% 表面活性剂的 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;

A3、每孔加酶结合物 2 滴,充分反应后甩去孔内液体,每孔加洗涤液 1 滴后立即注满纯

净水,静置 30 秒后甩去,再用纯净水洗涤至少一次,甩去,拍干;

A4、加底物液和显色剂各 1 滴,混匀,充分显色反应后加终止液 1 滴,混匀,终止反应;其中,所述底物液为 0.1%~0.5%过氧化氢溶液;所述显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述终止液为 1mol/L~2mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

3. 根据权利要求 2 所述的检测方法,其特征在于,所述充分反应为 37℃避光反应 30 分钟,所述充分显色反应为 37℃避光反应 10 分钟。

## 一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及的是,一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒和检测方法。

### 背景技术

[0002] 肝吸虫是一种常见人体寄生虫,通过食入含有肝吸虫囊蚴的淡水鱼类而感染。肝吸虫成虫寄生于人体肝脏胆管内,导致肝吸虫病,引起一系列的肝胆损害,包括胆管炎症、结石、胆汁性肝硬化,最终可以诱发肝癌。

[0003] 目前对人体肝吸虫病的诊断方法很多,包括病原学方法检查粪便虫卵和免疫学方法检测病人血清中肝吸虫抗体。病原学方法准确可靠,但虫卵小,排卵不规律,容易漏诊,而且要采集病人粪便,用清水反复沉淀并淘洗多次,取沉渣,之后由专业技术人员用高倍显微镜检查,过程较长,一般需几个小时或更多,操作烦琐不便,耗费人工,难以推广普查;免疫学方法敏感特异,方便快捷,检测血清即可,因此,得到较为广泛的应用。

[0004] 在免疫学方法中,酶联免疫检测技术应用最为普遍,国内在 20 世纪 90 年代就成功开发了用于检测人体内肝吸虫的快速免疫检测试剂盒(胡绍良等,华支睾吸虫病快速 ELISA 诊断试剂盒的建立,中国寄生虫病防治杂志,1995 年 8 卷 4 期,起止页码:295-296),敏感性达到 92%以上,特异性达到 98%以上。

[0005] 然而,要真正切断肝吸虫流行,保障人民健康,必须从源头上对淡水鱼肉类进行安全监督,防止含有肝吸虫囊蚴的病鱼流入市场。但目前对淡水鱼肝吸虫检测还缺乏有效手段。传统的鱼类肝吸虫检查,是采用显微镜对鱼肉中的肝吸虫囊蚴进行观测,但这种方法要在一般重达 1000 克的鱼肉中,肉眼观察到不足 1 毫米的囊蚴是非常困难的,不仅效率低下,而且极易发生遗漏。因此,显微镜检查鱼肉,查肝吸虫,除了科学研究外,几乎没有在实际中得到应用,这也是造成淡水鱼肝吸虫缺乏安全监督的重要原因。而淡水鱼肝吸虫免疫检测方法迄今也未建立。

[0006] 因此,现有技术没有检测淡水鱼类肝吸虫的有效工具。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒和检测方法,从而提供一种检测淡水鱼类肝吸虫的检测工具和方法。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒,其盒体内设置酶联反应板、酶结合物、洗涤液、底物液、显色剂、稀释液、终止液;其中,所述酶联反应板为从肝吸虫中提取可溶性抗原并纯化,然后包被所述可溶性抗原制得的酶联反应板;所述酶结合物为辣根过氧化酶标记抗鱼免疫球蛋白的酶结合物。

[0010] 所述的试剂盒,其中,所述酶联反应板是在通用聚苯乙烯微孔板上包被可溶性抗原,然后在室温静置 12 ~ 24 小时,冷冻真空干燥后装袋封口制成;其中,所述可溶性抗原

是从感染动物中获取肝吸虫成虫,并提取得到其可溶性抗原;包被液为含 0.01%~1%可溶性抗原的缓冲液,所述缓冲液是 0.01mol/L~0.15mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5~pH9.5。

[0011] 所述的试剂盒,其中,所述酶结合物为采用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物,分离出抗鱼免疫球蛋白,经纯化后采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成。

[0012] 所述的试剂盒,其中,所述酶结合物是含 0.05%~1%的辣根过氧化物酶标记抗鱼免疫球蛋白的 0.01mol/L~0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。

[0013] 所述的试剂盒,其中,其还至少包括阴性对照品、阳性对照品其中之一。

[0014] 所述的试剂盒,其中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1%表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;底物液为 0.1%~0.5%过氧化氢溶液;显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;稀释液为 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;终止液为 1mol/L~2mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

[0015] 一种用于权利要求 1 所述的试剂盒的检测方法,其包括步骤:

[0016] A1、从感染动物中获取肝吸虫成虫,并提取得到其可溶性抗原,在通用聚苯乙烯微孔板上包被所述可溶性抗原,然后在室温静置 12~24 小时,冷冻真空干燥后制成酶联反应板,并装袋封口保存;其中,包被液是含有 0.01%~1%所述可溶性抗原的缓冲液,所述缓冲液是 pH7.5~pH9.5 的 0.01mol/L~0.15mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液;

[0017] A2、采用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物,分离出抗鱼免疫球蛋白,经纯化后采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成酶结合物;

[0018] A3、所述酶联反应板每孔分别加稀释液 1 滴,加入待检的样本 50ul,混匀;其中,所述稀释液为 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;

[0019] A4、充分反应后甩去孔内液体,每孔加洗涤液 1 滴后立即注满纯净水,静置 30 秒后甩去,再用纯净水洗涤至少一次,甩去,拍干;其中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1%表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;

[0020] A5、每孔加酶结合物 2 滴,充分反应后甩去孔内液体,每孔加洗涤液 1 滴后立即注满纯净水,静置 30 秒后甩去,再用纯净水洗涤至少一次,甩去,拍干;

[0021] A6、加底物液和显色剂各 1 滴,混匀,充分显色反应后加终止液 1 滴,混匀,终止反应;其中,所述底物液为 0.1%~0.5%过氧化氢溶液;所述显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述终止液为 1mol/L~2mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

[0022] 所述的检测方法,其中,步骤 A3 中,还包括步骤:设置阴性孔、阳性孔及空白对照孔,阴性孔、阳性孔分别加稀释液 1 滴,然后分别加入阴性对照品、阳性对照品各 50ul,空白对照孔加入稀释液 2 滴。

[0023] 所述的检测方法,其中,所述充分反应为 37℃避光反应 30 分钟,所述充分显色反应为 37℃避光反应 10 分钟。

[0024] 所述的检测方法,其中,步骤 A1 中,在室温静置 12~24 小时之后,还包括步骤:采用 0.1%~5%卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,经冷冻真空干燥后制成所述酶联反应板。

[0025] 采用上述方案,本发明通过利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、

经济性,建立了淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测方法,同时适用于活鱼和死鱼;方便实用,试剂盒为即开即用型,用户不必另行配制或稀释,操作简单易行;不仅可以用仪器定量判断结果,也可以肉眼直接判断,尤适合于条件受限的现场检测;安全环保,采用了无害的酶联免疫显色剂四甲基联苯胺,避免了常规方法所带来的危害和污染。

#### 附图说明

[0026] 图 1 是本发明产品的结构示意图;

[0027] 图 2 是本发明方法的流程图示意图。

#### 具体实施方式

[0028] 以下对本发明的较佳实施例加以详细说明。

[0029] 如图 1 所示,本发明提供了一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒,其盒体内设置酶联反应板 101 和各种试剂 102,各种试剂具体包括酶结合物、洗涤液、底物液、显色剂、稀释液、终止液等等;其中,所述酶联反应板为从肝吸虫中提取可溶性抗原并纯化,然后包被所述可溶性抗原制得的酶联反应板;所述酶结合物为辣根过氧化酶标记抗鱼免疫球蛋白的酶结合物。

[0030] 以下对本发明试剂盒的酶联反应板和各种试剂进行详细说明。

[0031] 所述酶联反应板是在通用聚苯乙烯微孔板上包被可溶性抗原,然后在室温静置 12 ~ 24 小时,冷冻真空干燥后装袋封口制成。在室温静置 12 ~ 24 小时之后,还可以采用 0.1% ~ 5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,然后再冷冻真空干燥后装袋封口制成所述酶联反应板。其中,通用聚苯乙烯微孔板,可以是 48 孔板或 96 孔板,或其他板;所述可溶性抗原是从感染动物中获取肝吸虫成虫,并提取得到其可溶性抗原,即可溶于水的肝吸虫成虫的抗原;包被液为含 0.01% ~ 1% 可溶性抗原的缓冲液,所述缓冲液是 0.01mol/L ~ 0.15mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5 ~ pH9.5。

[0032] 所述酶结合物为采用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物,分离出抗鱼免疫球蛋白,经纯化后采用辣根过氧化酶进行免疫标记制成。例如,所述酶结合物是 pH6 ~ 8 的 0.01mol/L ~ 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液,其中含有 0.05% ~ 1% 的经过辣根过氧化物酶标记的抗鱼免疫球蛋白,即抗体;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。例如,所述防腐剂是 0.01% ~ 0.1% 的硫柳汞 (Thimerosal, 也称柳硫汞、水杨乙汞)。本发明对防腐剂的种类和用量没有额外的限制,只要能够抑制细菌生长即可。其中,磷酸盐缓冲液最好为 0.05mol/L, pH7.0。

[0033] 所述的试剂盒还可以包括阴性对照品 (negative control) 和 / 或阳性对照品 (positive control), 为便于用户使用,最好是同时具备阴性对照品和阳性对照品。所述阴性对照品为正常鱼血清标本,所述阳性对照品为含有肝吸虫抗体的鱼血清标本。一般来说,阳性对照品和阴性对照品是检验试验有效性的控制品,同时也作为判断结果的对照,因此对照品,特别是阳性对照品的基本组成应尽量与检测标本的组成相一致。阴性对照品须先行检测,确定其中不含待测物质。阳性对照品多以含蛋白保护剂的缓冲液为基质,其中加入一定量的待检物质,此量最好在试剂说明书中标明;加入的量应与试剂的敏感度相称,在测定中得到的吸光值与受检标本吸光值比较,可对标本中受检物质的量有一个粗略的估计。

在对照品中一般加入抗生素和防腐剂,以利保存。

[0034] 所述试剂盒中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1%表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液,pH6~8;底物液为 0.1%~0.5%过氧化氢溶液;显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;稀释液为 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液,pH6~8;终止液为 1mol/L~2mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

[0035] 并且,如图 2 所示,本发明还提出了一种用于淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒的检测方法,其包括以下步骤。

[0036] A1、从感染动物中获取肝吸虫成虫,并提取得到其可溶性抗原,在通用聚苯乙烯微孔板上包被所述可溶性抗原,然后在室温静置 12~24 小时,冷冻真空干燥后制成酶联反应板,并装袋封口保存;其中,包被液是含有 0.01%~1%所述可溶性抗原的缓冲液,所述缓冲液是 pH7.5~pH9.5 的 0.01mol/L~0.15mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液。

[0037] 在室温静置 12~24 小时之后,还可以包括步骤:采用 0.1%~5%卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,经冷冻真空干燥后制成所述酶联反应板。

[0038] A2、采用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物,分离出抗鱼免疫球蛋白,经纯化后采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成酶结合物。一般地,所述酶结合物是含 0.05%~1%的辣根过氧化物酶标记抗鱼免疫球蛋白的 0.01mol/L~0.05mol/L 磷酸盐缓冲液,pH6~8;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。例如,所述防腐剂是 0.01%的硫柳汞。

[0039] A3、所述酶联反应板每孔分别加稀释液 1 滴,加入待检的样本 50ul,混匀;其中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1%表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液,pH6~8;更好的是,所述稀释液为 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,pH7.0。

[0040] 并且,步骤 A3 中,还可以包括步骤:设置阴性孔、阳性孔及空白对照孔,阴性孔、阳性孔分别加稀释液 1 滴,然后分别加入阴性对照品、阳性对照品各 50ul,空白对照孔加入稀释液 2 滴。

[0041] A4、充分反应后甩去孔内液体,每孔加洗涤液 1 滴后立即注满纯净水,静置 30 秒后甩去,再用纯净水洗涤至少一次,甩去,拍干;其中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1%表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液,pH6~8。一般的,采用纯净水洗涤至少四次或以上,效果更好一些。其中,充分反应一般为 37℃避光反应 30 分钟。

[0042] A5、每孔加酶结合物 2 滴,充分反应后甩去孔内液体,每孔加洗涤液 1 滴后立即注满纯净水,静置 30 秒后甩去,再用纯净水洗涤至少一次,甩去,拍干。一般的,采用纯净水洗涤至少四次或以上,效果更好一些。其中,充分反应一般为 37℃避光反应 30 分钟。

[0043] A6、加底物液和显色剂各 1 滴,混匀,充分显色反应后加终止液 1 滴,混匀,终止反应;其中,所述底物液为 0.1%~0.5%过氧化氢溶液;所述显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述终止液为 1mol/L~2mol/L 的硫酸或氢氧化钠。例如,所述终止液为 1.5mol/L 的硫酸。所述充分显色反应一般为 37℃避光反应 10 分钟。

[0044] 然后,判断加入待检的样本的孔内液体是否显色。

[0045] 以下对本发明所述的试剂盒和检测方法进行具体说明。为达到上述目的,本发明采用了以下技术方案。

[0046] 一、肝吸虫抗原的制备纯化鉴定,具体包括:从感染动物获取肝吸虫成虫;提取肝吸虫成虫可溶性抗原;对抗原进行纯化,例如采用层析等方法对抗原进行纯化;鉴定纯化

的抗原。鉴定方法可以包括：测定蛋白含量；蛋白电泳观察抗原成份；ELISA 测定抗原活性。通过将纯化抗原包被反应板，与已知抗体含量肝吸虫免疫血清进行反应，观察反应强度是否达到原先水平，从而判断抗原活性。

[0047] 二、淡水鱼免疫球蛋白的制备纯化鉴定标记，具体包括以下步骤。

[0048] 2.1、鱼类对抗原刺激可以产生免疫应答，形成抗体。对硬骨鱼如鳗鱼、鲟鱼、鲤鱼等各种鱼类的研究表明，鱼免疫球蛋白主要是 19S 型，具有抗体的结构和性能。

[0049] 2.2、对鱼免疫球蛋白的提取与纯化。首先，采用盐析法初级提取鱼血清中的球蛋白；其次，采用层析法进一步纯化提取其免疫球蛋白。

[0050] 2.3、对纯化物进行分析鉴定。包括测定蛋白含量和进行电泳分析等，例如，采取 BRADFORD 微量蛋白测定法测定蛋白浓度；采取 SDS-PAGE 对纯化的鱼免疫球蛋白进行成分分析，纯化后的免疫球蛋白仅有 55KD 左右重链和 23KD 左右轻链两条带型，无明显其它杂带；

[0051] 2.4、抗鱼免疫球蛋白抗体的制备：用纯化的鱼免疫球蛋白免疫动物；分离纯化抗鱼免疫球蛋白；酶免疫标记，例如采用改良过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记，然后分离纯化并进行鉴定。改良过碘酸钠法，是取 5mgHRP 溶于 0.2mol/L pH5.6 的乙酸缓冲液 0.5ml，再加入 0.1mol/L 0.25ml 的过碘酸钠混匀。加入抗鱼免疫球蛋白抗体约 5mg 混匀，调 pH 为 9.0，4℃ 过夜，加入硼氢化钠 0.5mg 混匀，透析过夜。在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀，4℃ 30min，离心，去上清，沉淀以少许 0.02mol/L pH7.4 PBS 液溶解，装入透析袋，以同样液体在 4℃ 透析除盐过夜；次日取出离心，以除去不溶物，即得酶-抗体结合物，以 0.02mol/L pH7.4PBS 液加至 5ml；效价测定合格后，加入等量优质甘油，分装小瓶，低温保存。当然，也可以采用碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP)、葡萄糖氧化酶、β-D-半乳糖苷酶和脲酶等标记抗鱼免疫球蛋白抗体。本发明对具体的改良过碘酸钠法、辣根过氧化物酶标记方法等均无额外限制。

[0052] 三、建立淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒

[0053] 3.1、抗原包被板：采用快速包被工艺，预先在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗原。包被液为含适量抗原的 0.01-0.15mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液，pH7.5-9.5；室温静置 12-24 小时；用 0.1-5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时；冷冻真空干燥；真空装袋封口，并在板袋外标示。

[0054] 包被量一般为缓冲液的 0.01%~1%，在实际测定条件下一般进行“滴配”，以选择能达到高敏感度的最大稀释度作为试剂盒中的工作浓度。例如，在实际选择中，可以用方阵滴定法来测定最适包被量；即将抗原用包被缓冲液进行一系列稀释，如 1：100，1：200，1：400.....1：25600，与一定浓度的酶结合物反应，选择 OD (Optical Density, 光密度，也称吸光度) 值在 1.2 左右的稀释度为包被最适浓度。

[0055] 3.2、酶结合物液：磷酸盐缓冲液，pH7.0，0.05mol/L，加含量足以抑制细菌生长的适量防腐剂，如重量百分比为 0.01% 的硫柳汞，以及重量百分比为 0.05%~1% 的抗鱼免疫球蛋白抗体-辣根过氧化物酶标记结合物。例如，如上所述，标记物采用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶对抗鱼免疫球蛋白抗体标记。

[0056] 3.3、洗涤剂：采用 0.5% TRITON-X100 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0)，还可以添加适量的防腐剂，例如 0.01%~1% 的柳硫汞。

[0057] 3.4、底物液及显色剂：底物液为过氧化氢溶液；显色剂为对人体无害的 TMB (3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺) 溶液, 也可以为 ABTS (2, 2' - 边氨基 - 双 (3- 乙基苯并噻吡咯啉 -6 磺酸)) 或邻苯二胺 (O-phenylenediamine, OPD) 等等。

[0058] 3.5、样本稀释液：磷酸盐缓冲液, pH7.0, 0.1mol/L。

[0059] 3.6、终止液：1.0-2mol/L 硫酸或氢氧化钠。

[0060] 3.7、以上组分包括了除纯净水之外的检测所需要的全部试剂, 其中液体组分均已调整到工作浓度并装入塑料滴瓶内, 无须稀释可以直接使用；阴阳对照放入带盖的塑料管内, 可以直接使用；包被板拆封后也可直接使用。

[0061] 本发明所述的淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒, 选用肝吸虫可溶性抗原, 分步通过辛酸法和 DEAE (Diethylaminoethyl, 二乙氨基乙醇) 52 离子层析柱层析纯化制得精制抗原。进行预试验, 测定并选择合适的抗原包被浓度。用碳酸盐缓冲液稀释抗原包被 96 孔聚苯乙烯微孔板, 100 微升 / 孔；室温过夜；甩去孔内液体, 用同样剂量含 1% 的卵清蛋白的磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 0.05mol/L) 室温封闭 2 小时；冷冻真空干燥；真空条件下装袋, 板袋上贴相应标示。

[0062] 然后用磷酸盐缓冲液稀释抗鱼免疫球蛋白辣根过氧化物酶标记结合物。配制含有 0.5% TRITON-X100 的洗涤液。配制过氧化氢作为底物, 配制 TMB 溶液作为显色剂。样本稀释液为磷酸盐缓冲液。终止液为 2mol/L 硫酸溶液。以上液体成分, 装入塑料滴瓶内。

[0063] 将肝吸虫抗原包被板与液体试剂瓶依次装入试剂盒内, 平行站立放置；检查后内容后, 封盖, 即为淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒。

[0064] 本发明所述试剂盒采用快速免疫检测技术检测淡水鱼类中肝吸虫。本试剂灵敏度高, 特异性强, 重复性好, 操作方便快捷, 可分多次使用。

[0065] 例如, 试剂盒的试剂组成如下：1. 预包被板, 48T/96T；2. 酶结合物 (1 号液) 1 支；3. 洗涤液 (2 号液) 1 支；4. 底物 (3 号液) 1 支；5. 显色剂 (4 号液) 1 支；6. 样本稀释液 (5 号液) 1 支；7. 终止液 (6 号液) 1 支；8. 阳性对照品 1 支；9. 阴性对照品 1 支；还可以包括 10. 使用说明书 1 份。

[0066] 操作程序具体说明如下：

[0067] 1. 加样反应：取出所需量的反应板条, 每孔加样本稀释液 (5 号液) 1 滴, 再分别加入待检的样本 50 $\mu$ l, 混匀。同时设阴性、阳性及空白对照各一孔, 阴性、阳性对照与待检样本同步处理, 空白对照孔仅加入样本稀释液 (5 号液) 2 滴。37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟后甩去孔内液体, 每孔加洗涤液 (2 号液) 1 滴, 立即用蒸馏水注满, 静置 30 秒后甩去, 再直接用蒸馏水洗涤四次, 甩去, 拍干。

[0068] 2. 加酶反应：除空白对照孔外其余每孔加酶结合物 (1 号液) 2 滴, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 分钟后甩去孔内液体, 如上洗涤, 拍干。

[0069] 3. 显色反应：加底物 (3 号液) 和显色剂 (4 号液) 各 1 滴, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 下避光显色 10 分钟。加终止液 (6 号液) 1 滴, 混匀, 终止反应 (加终止液后蓝色会变为黄色)。TMB 溶液作为显色剂时, 可以无须避光显色反应, 一般显色反应的时间也可以稍微延长, 例如 10 ~ 30 分钟。

[0070] 然后, 通过肉眼或酶标仪来比较加入待检样本孔内液体与阴性对照品孔内液体的颜色深浅, 进行结果判断, 具体说明如下。

[0071] 1. 肉眼观察：阴性对照接近无色，阳性对照呈明显黄色，表示试验有效。待检孔接近无色表示该标本为阴性，待检孔呈明显黄色表示该标本为阳性；或者待检样本孔颜色明显深于阴性对照品孔，则待检样本为肝吸虫阳性。

[0072] 2. 仪器判断：以空白对照调零用酶标仪于 450nm(620nm 作参比波长) 读取 O.D 值，待检孔 O.D 值（吸光度）大于阴性对照 2.1 倍者（含 2.1 倍）为阳性。否则，待检样本为肝吸虫阴性。当阴性对照 O.D 值低于 0.05 时按 0.05 计算。

[0073] 需要注意的是，

[0074] 1. 试剂盒在 2-8℃ 下保存，每次取出时先平衡至室温后使用。滴瓶每次用后一定要将盖拧紧，各瓶盖之间切不可混用。各试剂盒之间不可混用。

[0075] 2. 如阴阳对照为冻干品时，请先按标示加入蒸馏水溶解后使用。

[0076] 3. 洗涤时将蒸馏水加满孔内，每次停放三十秒钟，甩去孔内液体。禁用自来水等其它水源。

[0077] 4. 为提高试验的可比性，建议使用仪器判读结果。

[0078] 5. 如有条件，最好使用水浴箱孵育。

[0079] 采用本发明的淡水鱼肝吸虫快速免疫检测盒，开辟淡水鱼肝吸虫检测的新途径，利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性，建立了淡水鱼肝吸虫快速免疫检测方法；实现了淡水鱼肝吸虫检测技术商品化，有力促进淡水鱼肝吸虫监测水平的全面提高，并为鱼类肉品的食品安全监管提供一个值得借鉴的思路，从而推动了肝吸虫防治工作。这不仅大大方便了用户操作，而且还提高了检测指标的一致性，实用性和可靠性均得到改善。

[0080] 本发明的试剂盒方便实用、安全环保，试剂盒不仅配备了检测所必须的试剂组分，而且均为即开即用型，用户不必另行配制或稀释，使操作简单易行。不仅可以用仪器定量判断结果，也可以肉眼直接判断，尤适合于条件受限的现场检测。本发明采用了无害的 TMB 试剂，避免了常规方法所带来的危害和污染。

[0081] 应当理解的是，对本领域普通技术人员来说，可以根据上述说明加以改进或变换，而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

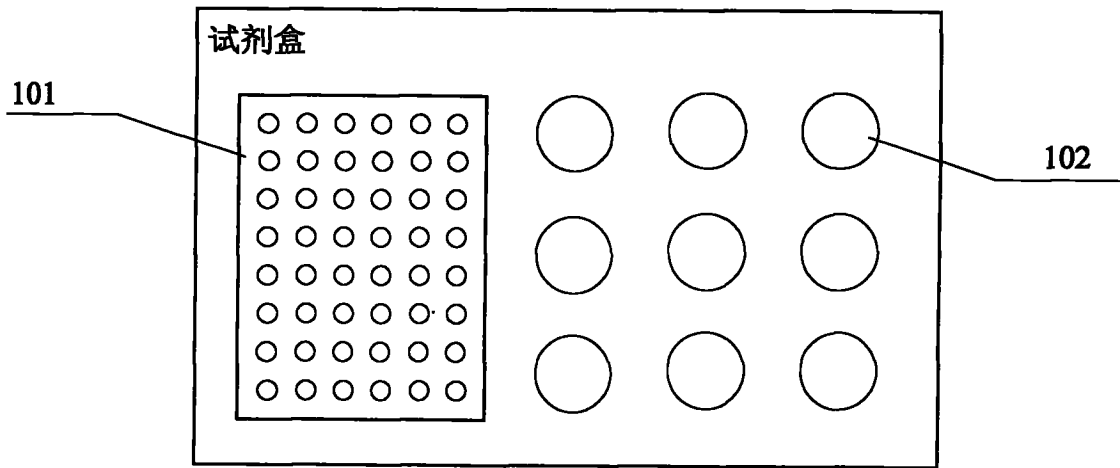


图 1

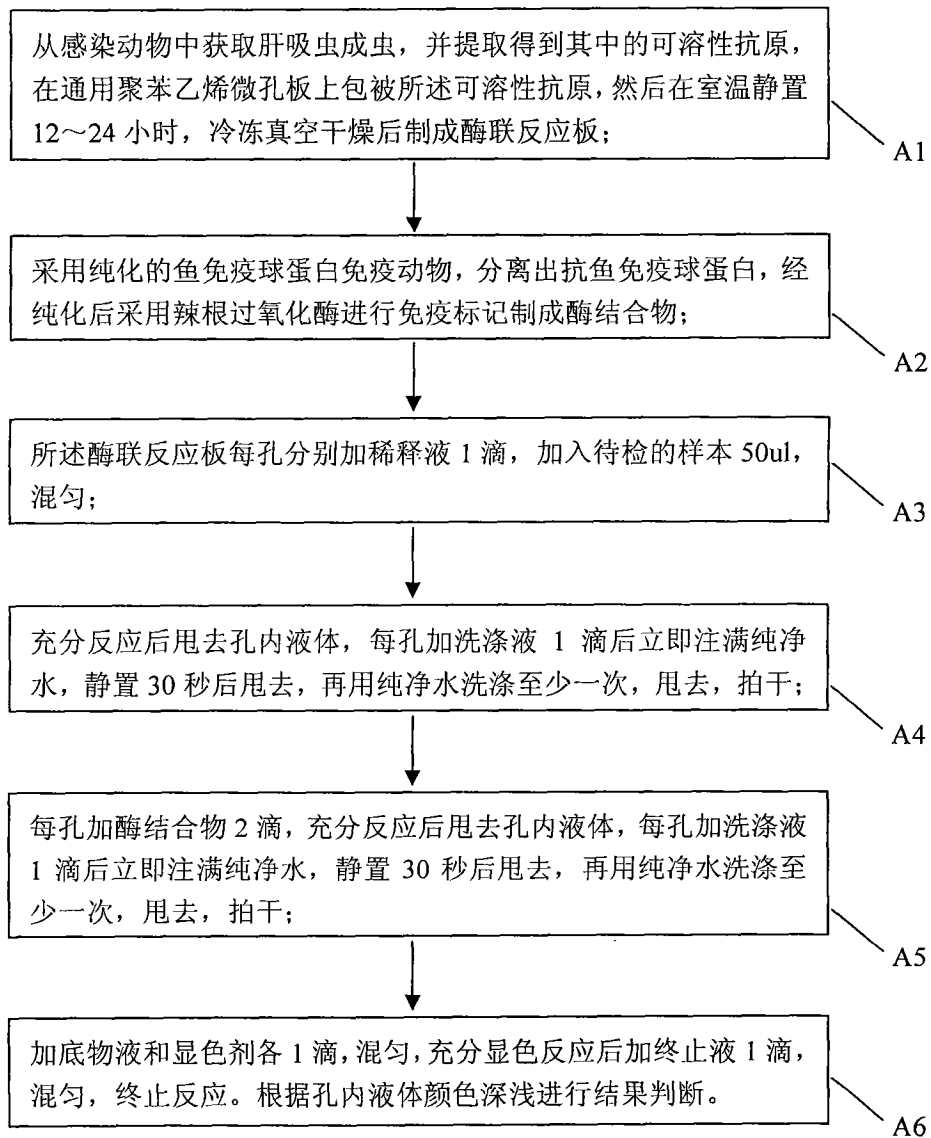


图 2

专利名称(译)	一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101387641B</a>	公开(公告)日	2013-11-27
申请号	CN200710076976.7	申请日	2007-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
[标]发明人	胡绍良 饶乐		
发明人	胡绍良 饶乐		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
审查员(译)	廖文勇		
其他公开文献	CN101387641A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测试剂盒和检测方法，该试剂盒的盒体内设置酶联反应板、酶结合物、洗涤液、底物液、显色剂、稀释液、终止液；酶联反应板为从肝吸虫中提取可溶性抗原并纯化，然后包被可溶性抗原制得的酶联反应板；酶结合物为辣根过氧化酶标记抗鱼免疫球蛋白的酶结合物。通过利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性，建立了淡水鱼类肝吸虫快速免疫检测方法；方便实用，试剂盒为即开即用型，用户不必另行配制或稀释，操作简单易行；不仅可以用仪器定量判断结果，也可以肉眼直接判断，适合于条件受限的现场检测；安全环保，采用无害的酶联免疫显色剂四甲基联苯胺，避免了常规方法所带来的危害和污染。

