

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/543

G01N 33/536



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03112265.5

[43] 公开日 2003 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 1453587A

[22] 申请日 2003.5.23 [21] 申请号 03112265.5

[71] 申请人 苏冬梅

地址 266071 山东省青岛市湛山四路 2 号警官接待站

[72] 发明人 苏冬梅

[74] 专利代理机构 青岛海昊专利事务所

代理人 韩振东

权利要求书 3 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 诊断衣原体免疫检测试剂

[57] 摘要

本发明公开了一种诊断衣原体免疫检测试剂，其由 Hela 细胞株经组织培养法和物化方法相结合而制成衣原体属特异性抗原(LPS)；以多部位注射法进行免疫动物，获得衣原体属特异性抗体；再对该抗体试剂进行吸收纯化，经检测吸收实验成功后，该抗原和抗体，既可共同构成诊断衣原体免疫检测试剂。本检测试剂具有特异性强，敏感性高，操作简单，使用方便，易观察结果，假阳性率低，无需特殊仪器，检测费用低廉，非特异性因素少，检测快速的优点，应用广泛，能够满足基层的需要，并适用于流行病学的调查。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种诊断衣原体免疫检测试剂，其是由 Hela 细胞株传代经单层细胞培养后，再接种标准衣原体，再经组织培养法培养而成的扩增的衣原体培养物，按以下制备方法制成，其特征在于：

(一) 制备衣原体属特异性抗原：

(1)冻融处理：取扩增的衣原体培养物在 -20°C 下冷冻 2 天，之后在 37°C 恒温下融化，再将彻底融化的该衣原体培养物在 -20°C 下冷冻 2 天，之后在 37°C 恒温下融化，如此反复冻融 20 次；

(2)超声波处理：将上述冻融的衣原体培养物经超声波处理 10 秒；

(3)加热处理：再经 100°C 加热处理 30 分钟；

(4)离心处理：将上述(3)处理的衣原体培养物，在 10000rpm 离心机中，离心处理 20 分钟，取上清液；

(5)将上述上清液采用低压层析纯化仪纯化处理，即得衣原体属特异性抗原试剂，并于 4°C 下保存备用；

(二) 制备衣原体属特异性抗体：

挑选健康雄性 1 公斤重的家兔作为免疫实验动物，将定量的上述（一）制备的衣原体属特异性抗原试剂加入适量的弗氏完全佐剂制成免疫注射剂，并对免疫动物进行静脉、皮下和肌肉注射的多部位注射法进行免疫，再停止注射 5—7 天；抽心内血 2ml 测效价，当效价达到 1: 1600 以上时，即可自心脏放血，取血清，即制得衣原体属特异性抗体准试剂；

(三) 吸收纯化衣原体属特异性抗体：

取适量的上述（二）制备的衣原体属特异性抗体准试剂，再分别加入 0.2ml 的含 90 亿/ml 的伤寒杆菌 Re 菌液和 1×10^8 个/ml 的 Hela 细胞悬液，不断摇匀；置于 4°C 下静置 48 小时，每隔 8 小时摇匀 3-4 次；取出在 4000rps 下离心 20 分钟，取上清液，即制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂；

该吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂再经检测吸收实验成功；

至此，于 4°C 下保存备用的衣原体属特异性抗原试剂和上述（三）制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂，既可共同构成诊断衣原体免疫检测试剂。

2、根据权利要求 1 所述诊断衣原体免疫检测试剂，其特征在于：所述的（二）中对免疫实验动物进行静脉注射，皮下注射和肌肉注射的多部位注射法是：每隔 4 天静脉注射六次，静脉注射量如下：0.1ml, 0.2ml, 0.5ml, 0.5ml, 1ml, 1ml；与此同时还按每隔 2 天皮下注射 12 次，皮下注射量如下：0.1ml, 0.2ml, 0.3ml, 0.4ml, 0.5ml, 0.6ml, 0.7ml, 0.8ml, 0.9ml, 1ml, 1.2ml, 1.5ml；从第 13 天起再加按每隔三天肌肉注射四次的，肌肉注射量为：0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml；在第 24 天（最后一次）静脉注射量：1ml，皮下注射量：1.5ml，肌肉注射量：2ml；再停止注射 5—7 天后，抽心内血 2ml 测效价，在效价达到 1: 1600 以上时，自免疫实验家兔的心脏放血，取血清，即制得衣原体属特异性抗体准试剂。

3、根据权利要求1所述诊断衣原体免疫检测试剂，其特征在于：所述的Hela细胞株传代的单层细胞培养以后，还要经过紫外线照射10—20分钟处理。

4、根据权利要求1所述诊断衣原体免疫检测试剂，其特征在于：所述的接种标准衣原体后，还要在震荡器上震荡30—50分钟之后，再进行组织培养法扩增衣原体。

5、根据权利要求1所述诊断衣原体免疫检测试剂，其特征在于：所述的检测吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的方法如下：

(1)将上述(三)吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂用无菌生理盐水按1:10, 1:20, ……1:1600, 1:3200……倍比稀释，再分别加入含9亿/ml的伤寒杆菌Re菌液，混合均匀，在37℃下过夜后观察，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功；

(2)用含9亿/ml的革兰氏阴性大肠杆菌的菌液，分别加入上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的无菌生理盐水按1:10, 1:20, ……1:1600, 1:3200……倍比稀释的实验管中，混合均匀，在37℃下过夜后观察，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功。

(3)用含9亿/ml的革兰氏阳性肺炎链球菌的菌液，分别加入上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的无菌生理盐水按1:10, 1:20, ……1:1600, 1:3200……倍比稀释的实验管中，混合均匀，在37℃下过夜后观察，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功。

6、根据权利要求1所述诊断衣原体免疫检测试剂的使用方法，其特征在于：采用液相试验法的步骤如下，

(1)将制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂分别加入到试验管、阳性对照管和空白对照管内；

(2)将试验标本，于4℃下保存备用的衣原体属特异性抗原试剂和生理盐水，沿管壁缓慢分别加入到上述试验管、阳性对照管和空白管内；

(3)将上述三管置于37℃下，10分钟后观察结果：

其中阳性对照管肉眼可见抗体与抗原界面有乳白色的结合环，该乳白色物质即为衣原体属特异性抗原抗体结合的免疫反应产物；空白管无；试验管若在界面有乳白色的结合环者为阳性反应，若在界面无色者为阴性反应。

7、根据权利要求1所述诊断衣原体免疫检测试剂的使用方法，其特征在于：采用固相试验法的步骤如下，

(1)将适当浓度的衣原体属特异性抗体试剂混于 $56\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的1.8%的琼脂凝胶中，待其在玻片上凝固后，分别打三个小孔；

(2)将试验标本，衣原体属特异性抗原试剂和生理盐水分别加入试验、对照和空白小孔中；

(3)将上述玻片置于37℃下，过夜后观察结果：

在玻片中肉眼可见在对照小孔周围有乳白色的沉淀环，该乳白色的沉淀环物质即为衣原体属特异性抗原抗体免疫反应产物；空白小孔中无此环；试验小孔若有乳白色的沉淀环为阳性反应，若无沉淀环者为阴性反应。

8、根据权利要求1所述诊断衣原体免疫检测试剂的使用方法，其特征在于：采用免疫电泳试验法的步骤如下，

(1)在2%的琼脂板上分别打孔间距为15mm的四个小孔；

将适当浓度的衣原体属特异性抗体试剂、试验标本、衣原体属特异性抗原试剂为阳性对照、革兰氏阳性菌的抗原为阴性对照和生理盐水为空白对照分别加入至相应的抗体试剂孔、试验孔、阳性对照孔、阴性对照孔和空白对照孔中；

(3)将上述琼脂板置于用纱布搭桥的缓冲液中，再在直流电场中，将抗体孔端接正极，抗原孔端接负极，通电2小时后观察结果：

其中阳性对照孔与衣原体属特异性抗体孔之间适当部位处肉眼可见抗体与抗原之间有乳白色的沉淀线，该乳白色的沉淀线即为衣原体属特异性抗原抗体免疫反应产物；其它空白对照孔，阴性对照孔附近无沉淀线；试验孔附近若在之间有乳白色的沉淀线为阳性反应，若无沉淀线者为阴性反应。

诊断衣原体免疫检测试剂

一、技术领域：

本发明涉及医学微生物中的衣原体检测技术。具体讲是一种诊断衣原体免疫检测试剂，其属于病原微生物的诊断技术领域。

二、背景技术：

现有技术中披露的病原微生物衣原体是大小介于病毒与细菌之间的微生物。现有发现的衣原体有三种类型：沙眼衣原体，肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体。最新医学微生物学记载：这三种衣原体的细胞壁中都含有脂多糖（LPS）成份，该成份也叫衣原体属特异性成份，其具有抗原性表位。该表位由 2, 8 和 2, 4 键上的 3--脱氧—D—甘露糖—辛酮糖酸一种 3 糖组成。其中还包括 D—葡萄糖，3—羟脂肪酸。仅在衣原体细胞壁上的脂多糖（LPS）成份中特有 2, 8 键上的 3 糖成份和 22—碳—3—羟脂肪酸。这些表位决定了衣原体属特异性存在的外部标志是衣原体带有一个属特异性的抗原决定簇价值的。目前在国内还没有见到从衣原体中提取衣原体属特异性抗原的报道。现有技术的 PCR、LCR、酶标、金标、荧光等方法要求有高精的仪器和熟练的技术，而且试剂价格昂贵，不太适合大面积普查。尽管有放大效应，但在灵敏度增高的同时，非特异性因素也在增加。这些方法均存在一定的假阳性率，其操作复杂，所需时间长和检测费用高等缺点。

三、技术内容：

本发明的目的是提供一种制备新的诊断衣原体免疫检测试剂。在诊断上寻求具有特异性高，敏感性高，操作简便且检测快速的寻找抗原等优点的诊断方法。这种试剂的制备方法要简单，要求操作方便，使用广泛，易观察结果，假阳性率低，无需特殊仪器，检测费用低廉。

本发明的目的是由以下技术方案实现的。研制了一种诊断衣原体免疫检测试剂，其是由 HeLa 细胞株传代经单层细胞培养后，再接种标准衣原体，再经组织培养法培养而成的扩增的衣原体培养物，按以下制备方法制成：

（一）制备衣原体属特异性抗原：

(1)冻融处理：取扩增的衣原体培养物在-20℃下冷冻 2 天，之后在 37℃恒温下融化，再将彻底融化的该衣原体培养物在-20℃下冷冻 2 天，之后在 37℃恒温下融化，如此反复冻融 20 次；

(2)超声波处理：将上述冻融的衣原体培养物经超声波处理 10 秒；

(3)加热处理：再经 100℃加热处理 30 分钟；

(4)离心处理：将上述(3)处理的衣原体培养物，在 10000rpm 离心机中，离心处理 20 分钟，取上清液；

(5)将上述上清液采用低压层析纯化仪纯化处理，即得衣原体属特异性抗原试剂，并于 4℃下保存备用；

（二）制备衣原体属特异性抗体：

挑选健康雄性 1 公斤重的家兔作为免疫实验动物，将定量的上述（一）制备的衣原体属特异性抗原试剂加入适量的弗氏完全佐剂制成免疫注射剂，并对免疫实验动物进行静脉注射、皮下注射和肌肉注射组成的多部位注射法，进行注射免疫，再停止注射 5 天；抽心内血 2ml 测效价，当效价达到 1:1600 以上时，即可自心脏放血，取血清，即制得衣原体属特异性抗体准试剂；

（三）吸收纯化衣原体属特异性抗体：

取适量的上述（二）制备的衣原体属特异性抗体准试剂，再分别加入 0.2ml 的含 90 亿/ml 的伤寒杆菌 Re 菌液和 1×10^8 个/ml 的 HeLa 细胞悬液，不断摇匀；置于 4℃ 下静置 48 小时，每隔 8 小时摇匀 3-4 次；取出在 4000rps 下离心 20 分钟，取上清液，即制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂；

该吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂再经检测吸收实验成功；

至此，于 4℃ 下保存备用的衣原体属特异性抗原试剂和上述（三）制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂，既可共同构成诊断衣原体免疫检测试剂。

本诊断衣原体免疫检测试剂所述的（二）中对免疫实验动物进行静脉注射，皮下注射和肌肉注射的多部位注射法，其注射途径是：每隔 4 天静脉注射六次，静脉注射量如下：0.1ml, 0.2ml, 0.5ml, 0.5ml, 1ml, 1ml；与此同时还按每隔 2 天皮下注射 12 次，皮下注射量如下：0.1ml, 0.2ml, 0.3ml, 0.4ml, 0.5ml, 0.6ml, 0.7ml, 0.8ml, 0.9ml, 1ml, 1.2ml, 1.5ml；从第 13 天起再加按每隔三天肌肉注射四次的，肌肉注射量为：0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml；在第 24 天（最后一次）静脉注射量：1ml，皮下注射量：1.5ml，肌肉注射量：2ml。再停止注射 7 天后，抽心内血 2ml 测效价。在效价达到 1:1600 以上时，自免疫实验家兔的心脏放血，取血清，即制得衣原体属特异性抗体准试剂。

本诊断衣原体免疫检测试剂所述的 HeLa 细胞株传代的单层细胞培养以后，还要经过紫外线照射 10—20 分钟处理。

本诊断衣原体免疫检测试剂所述的接种标准衣原体后，还要在震荡器上震荡 30—50 分钟之后，再进行组织培养法扩增衣原体。

本诊断衣原体免疫检测试剂所述的检测吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的方法如下：

（1）将上述（三）吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂用无菌生理盐水按 1:10, 1:20, ……1:1600, 1:3200……倍比稀释，再分别加入含 9 亿/ml 的伤寒杆菌 Re 菌液，混合均匀，在 37℃ 下过夜后观察，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功；

（2）用含 9 亿/ml 的革兰氏阴性大肠杆菌的菌液，分别加入上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的无菌生理盐水按 1:10, 1:20, ……1:1600, 1:3200……倍比稀释的实验管中，混合均匀，在 37℃ 下过夜后观察，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功。

（3）用含 9 亿/ml 的革兰氏阳性肺炎链球菌的菌液，分别加入上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的无菌生理盐水按 1:10, 1:20, ……1:1600, 1:3200……倍比稀释的实验管中，混合均匀，在 37℃ 下过夜后观察，若与对照管相

同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功。

本诊断衣原体免疫检测试剂的使用方法，采用液相试验法的步骤如下，

(1)将制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂分别加入到试验管、阳性对照管和空白对照管内；

(2)将试验标本，于4℃下保存备用的衣原体属特异性抗原试剂和生理盐水，沿管壁缓慢分别加入到上述试验管、阳性对照管和空白管内；

(3)将上述三管置于37℃下，10分钟后观察结果：

其中阳性对照管肉眼可见抗体与抗原界面有乳白色的结合环，该乳白色物质即为衣原体属特异性抗原抗体结合的免疫反应产物；空白管无；试验管若在界面有乳白色的结合环者为阳性反应，若在界面无色者为阴性反应。

本诊断衣原体免疫检测试剂的使用方法，采用固相试验法的步骤如下，

(1)将适当浓度的衣原体属特异性抗体试剂混于56±2℃的1.8%的琼脂凝胶中，待其在玻片上凝固后，分别打三个小孔；

(2)将试验标本，衣原体属特异性抗原试剂和生理盐水分别加入试验、对照和空白小孔中；

(3)将上述玻片置于37℃下，过夜后观察结果：

在玻片中肉眼可见在对照小孔周围有乳白色的沉淀环，该乳白色的沉淀环物质即为衣原体属特异性抗原抗体免疫反应产物；空白小孔中无此环；试验小孔若有乳白色的沉淀环为阳性反应，若无沉淀环者为阴性反应。

本诊断衣原体免疫检测试剂的使用方法，采用免疫电泳试验法的步骤如下，

(1)在2%的琼脂板上分别打孔间距为15mm的四个小孔；

(2)将适当浓度的衣原体属特异性抗体试剂、试验标本、衣原体属特异性抗原试剂为阳性对照、革兰氏阳性菌抗原为阴性对照和生理盐水为空白对照分别加入至相应的抗体试剂孔、试验孔、阳性对照孔、阴性对照孔和空白对照孔中；

(3)将上述琼脂板置于用纱布搭桥的缓冲液中，再在直流电场中，将抗体孔端接正极，抗原孔端接负极，通电2小时后观察结果：

其中阳性对照孔与衣原体属特异性抗体孔之间适当部位处肉眼可见抗体与抗原之间有乳白色的沉淀线，该乳白色的沉淀线即为衣原体属特异性抗原抗体免疫反应产物；其它空白对照孔，阴性对照孔附近无沉淀线；试验孔附近若有乳白色的沉淀线为阳性反应，若无沉淀线者为阴性反应。

本发明的衣原体诊断免疫检测试剂的优点在于：由购进的HeLa细胞株，经细胞传代培养先用紫外线照射10—20分钟后，接种于购进的衣原体标准株，之后进行振荡处理30—50分钟。传代培养的细胞用紫外线照射处理，其目的是：使细胞处于非分裂状态，并可以活化传代细胞的表面，增加衣原体对宿主HeLa细胞的感染力。接种于标准衣原体之后的振荡处理可以增加衣原体与HeLa细胞之间的碰撞机会，而使衣原体更易进入宿主HeLa细胞。用MEM培养基使接种的衣原体在宿主HeLa细胞内增殖。待镜检下观察到宿主HeLa细胞发生病变及有包涵体时，再按以下制备方法制备衣原体属特异性抗原：

(1)冻融处理：取扩增衣原体培养物在-20℃下冻融2天，之后在37℃恒

温下融化，再将彻底融化的该衣原体培养物在 -20°C 下冷冻2天，之后在 37°C 恒温下融化。如此反复冻融20次。其目的使宿主HeLa细胞的细胞壁在反复冻融中破裂，而使其中的衣原体游离出来。

(2) 超声波处理：把上述彻底融化的衣原体培养物经超声波处理10秒钟，其目的是用超声波使宿主HeLa细胞壁进一步破碎，使衣原体更多地释放出宿主HeLa细胞。

(3) 加热处理：将上述已通过冻融超声波处理的衣原体培养物再经加热 100°C 处理30分钟。其目的是使在HeLa细胞内的衣原体释放更完全，同时又使衣原体表面的Lps属特异性抗原决定簇充分地暴露出来。

(4) 离心处理：将上述处理的衣原体培养物，在10000rpm，离心处理20分钟，取上清液。其目的是去除杂质、变性蛋白及细胞碎片等而得到纯正的衣原体。

(5) 将上述上清液采用美国Biorad公司生产的低压层析纯化仪纯化该上清液，即得纯化的衣原体属特异性抗原试剂，并于 4°C 下保存备用。

本提取衣原体属特异性抗原的方法可以得到完全纯化的衣原体属特异性抗原，为下一步制备衣原体属特异性抗体打下基础。

由于在制备衣原体属特异性抗体过程中，挑选健康雄性1公斤重的家兔作为免疫实验动物，将定量的上述制备的衣原体属特异性抗原试剂加入适量的佛氏完全佐剂制成免疫注射剂，并对免疫实验动物进行了三种注射途径：静脉注射，皮下注射和肌肉注射多部位注射，以加强抗原免疫力，促使抗体有效应答。之后再停止注射7天，抽心内血2mL测效价，当效价达到1:1600以上时，即可自心脏放血，取血清，即制得具有特异性免疫反应的衣原体属特异性抗体准试剂。

由于本发明设计了吸收纯化衣原体属特异性抗体的方法：取适量的上述制备的衣原体属特异性抗体准试剂，再分别加入0.2mL的含90亿/mL的伤寒杆菌Re菌液、 1×10^8 个/mL浓度的HeLa细胞悬液，不断摇匀，置于 4°C 下静置48小时，每隔8小时摇匀3—4次，取出在4000rps下离心20分钟，取上清液，即制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂。

该吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂再经检测吸收实验检测，如果吸收实验成功。至此，可以将于 4°C 下保存备用的衣原体属特异性抗原试剂和上述制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂共同作为诊断衣原体免疫检测试剂。

本诊断衣原体免疫检测试剂的三种使用方法具有操作简单，使用方便，易观察结果的优点。本发明制备的诊断衣原体免疫检测试剂是具有特异性和敏感性均高，操作简单，使用方便，易观察结果，假阳性率低，无需特殊仪器，检测费用低廉，非特异性因素少，检测快速等优点的检测方法。本试剂不但能诊断人类感染性衣原体疾病，而且对动物间衣原体传染性疾病也具有诊断意义，能够满足基层的需要，并适用于流行病学的调查。

四、实施例

本发明的实施例不仅局限于本发明的权利要求的范围内。

本发明的诊断衣原体免疫检测试剂，是由从北京协和病毒研究所购进的Hela细胞株在MEM培养基中培养成单层细胞；经15分钟紫外线照射细胞，之后再加入

从北京协和病毒研究所购进的淋巴肉芽肿衣原体标准株在震荡器中进行振荡 45 分钟，这样可以增加衣原体和细胞的碰撞性，使衣原体更容易进入细胞内。再在 37℃ 下培养，此间要每天观察细胞生长情况，直至细胞发生病变并有包涵体出现时为止，即可收集经该细胞培养法扩增的衣原体培养物。再按以下制备方法制成：

1、制备衣原体属特异性抗原：

(1)冻融处理：取扩增的衣原体培养物在 -20℃ 下冷冻 2 天，之后在 37℃ 恒温下融化，再将完全融化的该衣原体培养物放在 -20℃ 下冷冻 2 天，之后在 37℃ 恒温下融化，如此反复冻融 20 次，使细胞破裂，衣原体得到释放；

(2)超声处理：上述融化的衣原体培养物经超声波处理 10 秒，使衣原体进一步释放出来；

(3)加热处理：再经 100℃ 加热处理 30 分钟，使衣原体完全得到释放，并使衣原体脂多糖（LPS）抗原决定簇得到充分暴露；

(4)离心处理：将上述处理的衣原体培养物，在 10000rpm 离心机中，离心处理 20 分钟，取上清液，以去除杂质收取衣原体；

(5)将上述上清液采用美国 Bio Rad 公司生产低压层析纯化仪纯化该上清液。具体步骤是：①装柱，用 SephadexG200 凝胶垂直缓慢加入到玻璃柱中，再加入洗脱液（pH7.6 PBS），至少保持在床面上方有 2-3cm 高的洗脱液，平衡过夜；②加样，将上述上清液全部注入①中的凝胶柱后，再加洗脱液，调节流速在 4ml/cm²/hr；③收集纯化的上述上清液，当见到低压层析纯化仪出现峰始时开始接收样品，直至峰落时为止。收集纯化的上述上清液即是纯化的衣原体属特异性抗原试剂，并于 4℃ 下保存备用。

2、制备衣原体属特异性抗体：

挑选健康雄性 1 公斤重的家兔作为免疫实验动物，将定量的上述制备的衣原体属特异性抗原试剂加入适量的弗氏完全佐剂制成免疫注射剂，并对实验动物进行静脉注射，皮下注射和肌肉注射的多部位注射法，其注射途径是：每隔 4 天静脉注射六次，静脉注射量如下：0.1ml, 0.2ml, 0.5ml, 0.5ml, 1ml, 1ml；与此同时还按每隔 2 天皮下注射 12 次，皮下注射量如下：0.1ml, 0.2ml, 0.3ml, 0.4ml, 0.5ml, 0.6ml, 0.7ml, 0.8ml, 0.9ml, 1ml, 1.2ml, 1.5ml；从第 13 天起再加按每隔三天肌肉注射四次的，肌肉注射量为：0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml；在第 24 天（最后一次）静脉注射量：1ml，皮下注射量：1.5ml，肌肉注射量：2ml。再停止注射 5 天后，抽心内血 2ml 测效价。在效价达到 1：1600 以上时，自免疫实验家兔的心脏放血，取血清，即制得衣原体属特异性抗体准试剂。

3、吸收纯化衣原体属特异性抗体：

取适量的上述衣原体属特异性抗体准试剂，再分别加入 0.2ml 的含伤寒杆菌 Re 菌液和 90 亿/ml 的大肠杆菌菌液和 1×10⁸ 个/ml 的 HeLa 细胞悬液（用 Try 消化下来的 HeLa 单层培养细胞，用 PH7.4 PBS 洗 3 遍，再计数 1×10⁸ 个/ml 细胞数加入衣原体属特异性抗体中）；不断摇匀，置于 4℃ 下静置 48 小时，每隔 4 小时摇匀一次；取出在 4000rpm 离心 20 分钟，取上清液，即得纯化的衣原体属特异性抗体试剂。

本诊断衣原体免疫检测试剂所述的吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂，其检测实验方法如下：

(1) 将上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂用无菌生理盐水按 1: 10, 1: 20, ……1: 1600, 1: 3200……倍比稀释，再分别加入含 9 亿/ml 的伤寒杆菌 Re 菌液，混匀，在 37℃ 下过夜后观察结果，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功；

(2) 再用含 9 亿/ml 的革兰氏阴性大肠肝菌的菌液，分别加入上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的无菌生理盐水按 1: 10, 1: 20, ……1: 1600, 1: 3200……倍比稀释，再分别加入含 9 亿/ml 的伤寒杆菌 Re 菌液，混匀，在 37℃ 下过夜后观察结果，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功；

(3) 再用含 9 亿/ml 的革兰氏阳性肺炎链球菌的菌液，分别加入上述吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂的无菌生理盐水按 1: 10, 1: 20, ……1: 1600, 1: 3200……倍比稀释，再分别加入含 9 亿/ml 的伤寒杆菌 Re 菌液，混匀，在 37℃ 下过夜后观察结果，若与对照管相同均不发生凝集现象，即为吸收实验成功。

该吸收纯化的衣原体属特异性抗体试剂经上述检测吸收实验共同检测而获得成功。至此，于 4℃ 下保存备用的衣原体属特异性抗原试剂和制得纯化的衣原体属特异性抗体试剂，既可共同构成诊断衣原体免疫检测试剂。

专利名称(译)	诊断衣原体免疫检测试剂		
公开(公告)号	CN1453587A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	CN03112265.5	申请日	2003-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	苏冬梅		
申请(专利权)人(译)	苏冬梅		
当前申请(专利权)人(译)	苏冬梅		
[标]发明人	苏冬梅		
发明人	苏冬梅		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/543		
代理人(译)	韩振东		
其他公开文献	CN1243980C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种诊断衣原体免疫检测试剂，其由Hela细胞株经组织培养法和物化方法相结合而制成衣原体属特异性抗原(LPS)；以多部位注射法进行免疫动物，获得衣原体属特异性抗体；再对该抗体试剂进行吸收纯化，经检测吸收实验成功后，该抗原和抗体，既可共同构成诊断衣原体免疫检测试剂。本检测试剂具有特异性强，敏感性高，操作简单，使用方便，易观察结果，假阳性率低，无需特殊仪器，检测费用低廉，非特异性因素少，检测快速的优点，应用广泛，能够满足基层的需要，并适用于流行病学的调查。