



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101858915 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 13

(21) 申请号 201010179121. 9

(22) 申请日 2010. 05. 19

(71) 申请人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路
201-209 号

(72) 发明人 张忠英 杨天赐 林丽蓉 张长弓

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/571(2006. 01)

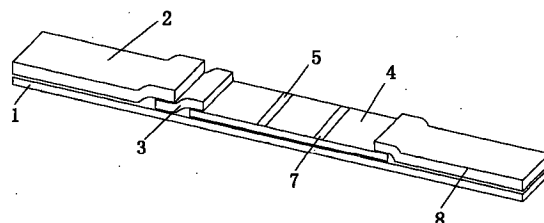
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法

(57) 摘要

梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法, 涉及一种梅毒特异性 IgG 抗体检测试剂。提供一种可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgG 抗体检测的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法。试剂条设有载体板、加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜、梅毒特异性 IgG 抗体检测线、对照线和吸收垫。制备梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47 硝酸纤维素膜的点样; 制备胶体金; 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记; 制备免疫层析检测条。检测所需标本量极小, 不需要特殊仪器, 肉眼直接判读结果, 且检测简便快速, 特异性强, 灵敏度较高, 准确可靠, 成本较低, 应用广泛。



1. 梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条,其特征在于设有载体板、加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜、梅毒特异性 IgG 抗体检测线、对照线和吸收垫;加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,加样垫的一端设在胶体金垫的一端上,胶体金垫的另一端设在硝酸纤维膜的一端上,吸收垫的一端设在硝酸纤维膜的另一端上,梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条,其特征在于所述载体板为 PVC 板。

3. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 制备梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47

采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47;

2) 硝酸纤维素膜的点样

在硝酸纤维素膜 IgG 检测线上包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体,晾干;

3) 制备胶体金

采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金,取 1% 氯金酸 1mL 加入到 100mL 去离子双蒸水中,得到的氯金酸浓度为 0.01%,置于带冷凝装置的烧瓶中加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中 4°C 冰箱保存备用;

4) 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记

胶体金与梅毒特异性抗原 TPN17 的标记:取胶体金 10ml,用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4,加 100 μ g TPN17,混匀,放置 5min,加入 5% BSA 1ml 混匀,4°C、10000r/min 离心 1h,弃上清,将沉淀用 TBS 缓冲液溶解至 10ml,4°C、10000r/min 离心 1h,弃上清,沉淀用 TBS 稀释至 1ml,得胶体金标记的 TPN17 抗原;

胶体金与梅毒特异性抗原 TPN47 的标记同上操作,得胶体金标记的 TPN47 抗原;

将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合后,均匀地涂于玻璃纤维膜上,烘干,制备成胶体金垫;

5) 制备免疫层析检测条

将加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,加样垫的一端设在胶体金垫的一端上,胶体金垫的另一端设在硝酸纤维膜的一端上,吸收垫的一端设在硝酸纤维膜的另一端上,梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体,用切条机切成条状,得梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条。

4. 如权利要求 3 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的浓度为 1 ~ 4mg/mL。

5. 如权利要求 3 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法, 其特征在于在步骤 2) 中, 所述羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1 : 1 混合, 其终浓度为 1 ~ 4mg/mL ; 三者点样量为 1 μ L/cm。

6. 如权利要求 3 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法, 其特征在于在步骤 3) 中, 所述柠檬酸三钠的浓度为 2%。

7. 如权利要求 3 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法, 其特征在于在步骤 4) 中, 所述将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合, 是胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原以体积比 1 : 0.2 ~ 5 混合。

8. 如权利要求 3 所述的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法, 其特征在于在步骤 4) 中, 所述烘干的温度为 37°C。

梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种梅毒特异性 IgG 抗体检测试剂,尤其是涉及一种采用胶体金免疫层析技术 (immunochromatography) 进行的梅毒特异性 IgG 抗体快速检测试剂条及其制备方法。

背景技术

[0002] 梅毒 (Syphilis) 是一种由梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*, TP) 引起的性传播性疾病,其病原体是梅毒螺旋体,属螺旋体科。梅毒螺旋体主要通过性接触、输血、创口或者胎盘等途径传播。梅毒螺旋体从感染区附近的淋巴结进入血液,播散全身,使机体几乎所有的组织及器官受累,临床表现为全身性,可分为不同临床阶段,包括一期、二期、三期和潜伏期。世界卫生组织 (WHO) 曾乐观地预言:“由于有高敏度检测方法和高效的治疗方案,梅毒是一种能够通过公共卫生措施得到成功控制的性传播性疾病”。遗憾的是,至今梅毒依然是世界范围的公共卫生问题,缺乏有效的行政控制措施,每年全球大约有 1200 万的患者,其中 60 万孕妇患者。(参见:Health Protection Agency Centre for Infections. International Encyclopedia of Public Health-Syphilis[M]. London, UK:Health Protection Agency Centre, 2008, 289-297.) 事实上,梅毒的感染现状可能要比想象中的更让人悲观。

[0003] 调查发现,梅毒感染者已经较广泛地存在于普通人群中。

[0004] 梅毒螺旋体尚不能进行体外培养,梅毒诊断与流行病学调查主要依赖于血清学试验,包括特异性抗体和反应素检测两大类型。梅毒特异性抗体 IgM (TP-IgM) 和 IgG (TP-IgG) 抗体分别于 2 周和 4 周后产生,即使患者经过足够治疗,其仍能长期存在,甚至终身不消失(参见:Luis J F, Felipe U S, Santa G C, et al. Evaluation of a rapid strip and a particle agglutination tests for syphilis diagnosis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59:123-126); 而另一种抗体物质反应素产生较晚,一般在受感染后 5~7 周产生(参见:林月圆. TPPA 和 TRUST 在梅毒诊断中的价值与临床相关问题[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(3):295-297), 而且晚期梅毒、梅毒治疗后期以及潜伏梅毒可能阴性。因此梅毒特异性抗体的阳性率、敏感性显著高于反应素。TP-IgM 是梅毒感染后,机体最先出现的特异性抗体。只要有活的梅毒螺旋体存在,其 TP-IgM 将会维持在一定的水平。Martina H 等(参见:Martina H, Daan W N, Mart M, et al. Comparison of a *Treponema pallidum* IgM immunoblot with a 19S fluorescent treponemal antibody absorption test for the diagnosis of congenital syphilis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59:61-66.) 认为 TP-IgM 是梅毒早期感染并活动的一项血清学标志,李步荣等(参见:李步荣,贺军涛,张毅,等. 梅毒螺旋体 IgM 抗体检测的临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(16):1495-1497) 认为 TP-IgM 与 TP-DNA 一样,代表着梅毒传染性指标。在排除近期抗梅毒治疗的前提下,TP-IgM 若不转阴,提示体内可能残存梅毒

螺旋体或治疗不彻底。TP-IgM 阴转者随访时再转阳性,表明再次感染梅毒(参见:Rawstron SA, Mehta S, Bromberg K, et al. Evaluation of a Treponema pallidum specific IgM enzyme immunoassay and Treponema pallidum western blot antibody detection in the diagnosis of maternal and congenital syphilis[J]. Sex Transm Dis, 2004, 31(2): 123-126)。尽管 TP-IgM 阴性不能完全排除传染性,但 TP-IgM 阳性必定提示该患者具有传染性。TP-IgG 的出现要迟于 IgM,能长期存在,甚至终身不消失,因此,TP-IgG 是梅毒诊断和流行病学调查的一项重要指标。

[0005] 早期的血清学方法使用完整梅毒螺旋体作为抗原,研究和诊断用的 TP 是以 TP 感染兔睾丸获得,这种方法花费大、获得的 TP 量少、不纯(混有宿主蛋白),与其他病原体存在交叉反应,因此假阳性也时有发生。随着分子生物学技术的普及及梅毒螺旋体抗原的相继克隆,将重组抗原应用于梅毒实验已经越来越多。目前研究比较多的 TP 抗原有 TPN17、TPN47、TPN15、TPN44.5、TPN36、TP0453、TP0684 及 TPr 家族。采用重组 DNA 技术制备的重组抗原可以克服完整 TP 抗原的缺点,能快速、经济地制备无限量特异重组 TP 抗原。

[0006] 梅毒特异性抗体检测是梅毒确证试验,包括 TPHA, TPPA, ELISA, FTA-ABS 及 Western-blot 等,其特异性均较高。然而,面对严峻的防制形式,不但需要特异准确的检测手段,还需要一种更简便快捷的试剂来筛查,以便为临床和疾病防控提供对策。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgG 抗体检测的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法。

[0008] 本发明所述梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条设有载体板、加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜(NC膜)、梅毒特异性 IgG 抗体检测线、对照线和吸收垫。

[0009] 加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,加样垫的一端设在胶体金垫的一端上,胶体金垫的另一端设在硝酸纤维膜的一端上,吸收垫的一端设在硝酸纤维膜的另一端上,梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体。

[0010] 所述载体板可采用 PVC 板。

[0011] 所述梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 制备梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47

[0013] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47

[0014] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0015] 在硝酸纤维素膜 IgG 检测线上包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体,晾干;

[0016] 3) 制备胶体金

[0017] 采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金,取 1% 氯金酸 1mL 加入到 100mL 去离子双蒸水中,得到的氯金酸浓度为 0.01%,置于带冷凝装置的烧瓶中加热至沸腾,磁力加热

搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.0mL, 继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止, 冷却后置于棕色瓶中 4℃ 冰箱保存备用;

[0018] 4) 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记

[0019] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN17 的标记: 取胶体金 10ml, 用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4, 加 100 μg TPN17, 混匀, 放置 5min, 加入 5% BSA 1ml 混匀, 4℃、10000r/min 离心 1h, 弃上清, 将沉淀用 TBS 缓冲液溶解至 10ml, 4℃、10000r/min 离心 1h, 弃上清, 沉淀用 TBS 稀释至 1ml, 得胶体金标记的 TPN17 抗原;

[0020] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN47 的标记同上操作, 得胶体金标记的 TPN47 抗原;

[0021] 将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合后, 均匀地涂于玻璃纤维膜上, 烘干, 制备成胶体金垫;

[0022] 5) 制备免疫层析检测条

[0023] 将加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面, 加样垫的一端设在胶体金垫的一端上, 胶体金垫的另一端设在硝酸纤维膜的一端上, 吸收垫的一端设在硝酸纤维膜的另一端上, 梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上; 在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体, 在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体, 用切条机切成条状, 得梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条。

[0024] 在步骤 2) 中, 所述抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的浓度为 1~4mg/mL, 羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1:1 混合, 其终浓度为 1~4mg/mL; 三者点样量为 1 μL/cm。

[0025] 在步骤 3) 中, 所述柠檬酸三钠的浓度可为 2%。

[0026] 在步骤 4) 中, 所述将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合, 最好胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原以体积比 1:(0.2~5) 混合; 所述烘干的温度可为 37℃。

[0027] 本发明提供了一种可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgG 抗体检测的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法, 检测所需标本量极小, 不需要特殊仪器, 肉眼直接判读结果, 且检测简便快速, 特异性强, 灵敏度较高, 准确可靠, 成本较低, 应用广泛。

附图说明

[0028] 图 1 为本发明梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条实施例的结构组成示意图。

[0029] 图 2 为实验结果模式示意图。在图 2 中, A 为使用前的示意图, B 为无效试验 (产品质量问题), C 为阴性结果, D 为 TP-IgG 阳性结果; 5 为梅毒特异性 IgG 抗体检测线, 7 为对照线。

具体实施方式

[0030] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0031] 参见图 1, 本发明所述梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条实施例设

有载体板 1、加样垫 2、胶体金垫 3、硝酸纤维膜 (NC 膜) 4、梅毒特异性 IgG 抗体检测线 5、对照线 7 和吸收垫 8。加样垫 2、胶体金垫 3、硝酸纤维膜 4 和吸收垫 8 依次粘贴在载体板 1 上表面,加样垫 2 的一端设在胶体金垫 3 的一端上,胶体金垫 3 的另一端设在硝酸纤维膜 4 的一端上,吸收垫 8 的一端设在硝酸纤维膜 4 的另一端上,梅毒特异性 IgG 抗体检测线 5 和对照线 7 依次设在硝酸纤维膜 4 上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线 7 处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体。

[0032] 所述载体板 1 采用 PVC 板。

[0033] 所述梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的制备方法,包括以下步骤:

[0034] 1) 制备梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47

[0035] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47。

[0036] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0037] 在硝酸纤维素膜 IgG 检测线上包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处 (C) 包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体,晾干,所述抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的浓度为 1 ~ 4mg/mL,羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1 : 1 混合,其终浓度为 1 ~ 4mg/mL;三者点样量为 1 μ L/cm。

[0038] 3) 制备胶体金

[0039] 采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金,取 1% 氯金酸 1mL 加入到 100mL 去离子双蒸水中,得到的氯金酸浓度为 0.01%,置于带冷凝装置的烧瓶中加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中 4°C 冰箱保存备用,所述柠檬酸三钠的浓度可为 2%。

[0040] 4) 胶体金与 TPN17、TPN47 的标记

[0041] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN17 的标记:取胶体金 10ml,用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4,加 100 μ g TPN17,混匀,放置 5min,加入 5% BSA 1ml 混匀,4°C、10000r/min 离心 1h,弃上清,将沉淀用 TBS 缓冲液溶解至 10ml,4°C、10000r/min 离心 1h,弃上清,沉淀用 TBS 稀释至 1ml。

[0042] 胶体金与梅毒特异性抗原 TPN47 的标记同上操作,得胶体金标记的 TPN47 抗原。

[0043] 将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合后,均匀地涂于玻璃纤维膜上,烘干,制备成胶体金垫。所述将胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原混合,是胶体金标记的 TPN17 抗原和胶体金标记的 TPN47 抗原以体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合;所述烘干的温度为 37°C。

[0044] 5) 制备免疫层析检测条

[0045] 将加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,加样垫的一端设在胶体金垫的一端上,胶体金垫的另一端设在硝酸纤维膜的一端上,吸收垫的一端设在硝酸纤维膜的另一端上,梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 的 IgG 抗体,用切条机切成条状,得梅毒特异性 IgG 抗体胶

体金免疫层析检测试剂条。

[0046] 以下给出免疫层析法检测患者的临床标本：

[0047] 取待检标本（全血、血清、血浆、脑脊液）5～40 μL，加样于梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条样品处，滴加 100 μL 生理盐水，静置 20min 观察结果。只在检测条对照区有一紫红色条带出现，则判为阴性；在检测区及对照区均有一紫红色条带出现，则判为阳性；加样检测后，检测区和对照区均不出现紫红色条带，为无效结果（参见图 2）。

[0048] 以下给出梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条的性能检定：

[0049] 1) 外观检查：白色包被反应膜平整、干净无污染斑点、无裂缝，胶带无开胶，无切割现象。

[0050] 2) 阳性标本符合率：用 TP-IgG 阳性的不同滴度的阳性参比血清各 50 份采用梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条检定，计算阳性符合率。阳性参比血清的确定采用 FTA-ABS（德国欧蒙公司）法确定的临床标本。

[0051] 3) 阴性标本符合率：用 50 份阴性参比血清检定，计算阳性符合率。阴性参比血清的确定采用 TPPA（日本富士株式会社）法确定的临床标本。

[0052] 4) 灵敏度检测：用卫生部室内质控血清检测，最低检出限度应小于或等于 4NCU/mL，与 TPPA（日本富士株式会社）相当。

[0053] 5) 批内差异：同一批次梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条，用特征性血清检测，要求阳性血清检测结果显示色带的颜色深浅一致，阴性血清检测的结果阴性。

[0054] 6) 批间差异：不同批次梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条，用特征性血清检测，要求阳性血清检测结果显示色带的颜色深浅一致，阴性血清检测的结果阴性。

[0055] 7) 干扰试验：检测结果不受标本溶血（n = 50）、脂血（n = 50）和黄疸（n = 50）的干扰。血清（或血浆）来自本申请人临床标本。

[0056] 8) 交叉反应：采用本梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条，进行系统性红斑狼疮（n = 30）、类风湿病（n = 30）、免疫性肝炎（n = 30）等自身免疫系统疾病的检测，未发现交叉反应。自身免疫系统疾病的血清来自本申请人临床确诊患者。

[0057] 9) 稳定性检测：应用 Arrhenius 法则，将梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条放置 37℃ 20 天后检测，以上各项指标无显著变化，确保成品在室温干燥条件下保存，有效期为 18 个月。

[0058] 本发明的检测在一条梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条上进行，通过以下两种方式实现梅毒特异性 IgG 抗体的检测：

[0059] 方式一：利用胶体金免疫层析技术，在硝酸纤维素膜上 IgG 检测线和对照线处分别包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体和羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 IgG 抗体。将已纯化的金标记的梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47 以一定的比例混合后预包被在玻璃纤维纸上，干燥处理，制备成胶体金垫，再辅以恰当的加样垫，组合成梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条（组装方式参见图 1）。检测阳性样本时，样本中梅毒特异性 IgG 抗体与胶体金标记的重组抗原 TPN17 和 / 或 TPN47 结合形成免疫复合物。由于层析作用，复合物沿吸收垫的吸水纸方向向前移动。经过检测线时，① TP-IgG 类免疫复合物与预包被的抗人 IgG 单克隆抗体结合形成“Au-TPN17（和 / 或 TPN47）- 特异性抗梅毒 IgG 抗体 - 抗人 IgG 单克隆抗体 - 固相材料”夹心物而凝聚显色；② 游离金标抗原则在对照线处与羊抗梅毒

抗原 TPN17 和 TPN47 抗体结合而富集显色。阴性标本则仅在对照线处显色。

[0060] 方式二：将方式一的包被抗原、抗体对调：在硝酸纤维素膜上 IgG 检测线和对照线处分别包被梅毒重组抗原 (TPN17/TPN47 组合) 和羊抗鼠 IgG 抗体, 将金标记的抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体预包被在玻璃纤维纸上。

[0061] 载体板采用 PVC 材料, 加样垫采用玻璃纤维材料, 吸收垫采用吸液纸。

[0062] 以下给出具体实施例。

[0063] 实施例 1

[0064] 在梅毒特异性 IgG 抗体检测线上包被抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体, 在对照线处包被羊抗梅毒抗原 TPN17 和 TPN47 抗体, 室温晾干, 密封室温保存备用。其中, 抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的浓度为 1mg/mL, 羊抗梅毒抗原 (TPN17 和 TPN47) IgG 抗体由抗 TPN17-IgG 抗体与抗 TPN47-IgG 抗体按体积比 1 : 1 混合, 其终浓度为 1mg/mL ; 二者点样量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0065] 将已纯化的金标记的梅毒重组抗原 TPN17 和 TPN47 以体积比 1 : 1 混合后, 均匀地涂于玻璃纤维纸上, 在 37°C 烘干, 制备成金结合物垫, 密封备用。将固相化的纤维膜与胶体金结合的玻璃纤维、吸水纸等按一定顺序, 通过 PVC 不干胶底板组合在一起, 用切条机切成一定宽度检测条。把检测条与干燥剂一起装入铝箔袋中, 机器封口, 密封保存。

[0066] 取待检标本血清 $10 \mu\text{L}$, 加样于梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条加样区, 同时滴加 $100 \mu\text{L}$ 生理盐水, 静置 20min 观察结果。只在梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条对照区有一紫红色条带出现, 则判为阴性 ; 在检测区及对照区均有一紫红色条带出现, 则判为阳性 ; 加样检测后, 检测区和对照区均不出现紫红色条带, 为无效结果 (参见图 2)。

[0067] 实施例 2

[0068] 与实施例 1 相似, 区别在于胶体金垫仅由 TPN17 组成, 不含有 TPN47。结果判断与实施例 1 相同。

[0069] 实施例 3

[0070] 与实施例 1 相似, 区别在于胶体金垫仅由 TPN47 组成, 不含有 TPN17。结果判断与实施例 1 相同。

[0071] 实施例 4

[0072] 与实施例 1 相似, 区别在于待检标本为脑脊液标本, 结果判断与实施例 1 相同。

[0073] 实施例 4

[0074] 性能验证试验 : 按实施例 1 的方案制备梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条, 然后进行性能验证。

[0075] 1) 外观检查 : 白色包被反应膜平整、干净无污染斑点、无裂缝, 胶带无开胶, 梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条宽度在 $3 \pm 0.1\text{mm}$, 无切斜现象。

[0076] 2) 阳性标本符合率 : 50 份经 FTA-ABS (德国欧蒙公司) 检测确定的 TP-IgG 阳性参比血清, 采用发明的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条检出 TP-IgG 阳性 49 份, 阳性标本符合率 98%。

[0077] 3) 阴性标本符合率 : 50 份梅毒螺旋体特异性抗体明胶凝集试验 (TPPA) (日本富士株式会社) 阴性参比血清, 采用发明的梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条检

测未检出阳性标本,阴性标本符合率 100%。

[0078] 4) 灵敏度检测:用卫生部室内质控血清检测,最低检出限度应小于或等于 4NCU/mL,与 TPPA(日本富士株式会社)相当。

[0079] 5) 批内差异:同一批次梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条,用特征性阳性血清(FTA-ABS(德国欧蒙公司)检测确定的临床标本阳性 TP-IgG 参比高、中、低血清)检测,相同滴度检测结果显示色带的颜色深浅一致,阴性血清检测的结果阴性。

[0080] 6) 批间差异:不同批次梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条,用特征性阳性血清(FTA-ABS(德国欧蒙公司)检测确定的临床标本阳性 TP-IgG 参比高、中、低血清)检测,相同滴度检测结果显示色带的颜色深浅一致,阴性血清检测的结果阴性。

[0081] 7) 干扰试验:检测结果不受标本溶血(n = 50)、脂血(n = 50)和黄疸(n = 50)的干扰。

[0082] 8) 交叉反应:采用本梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条,进行系统性红斑狼疮(n = 30)、类风湿病(n = 38)、免疫性肝炎(n = 40)等自身免疫系统疾病的检测,未发现交叉反应。

[0083] 9) 稳定性检测:将梅毒特异性 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试剂条放置 37℃ 20 天后检测,以上各项指标无显著变化。

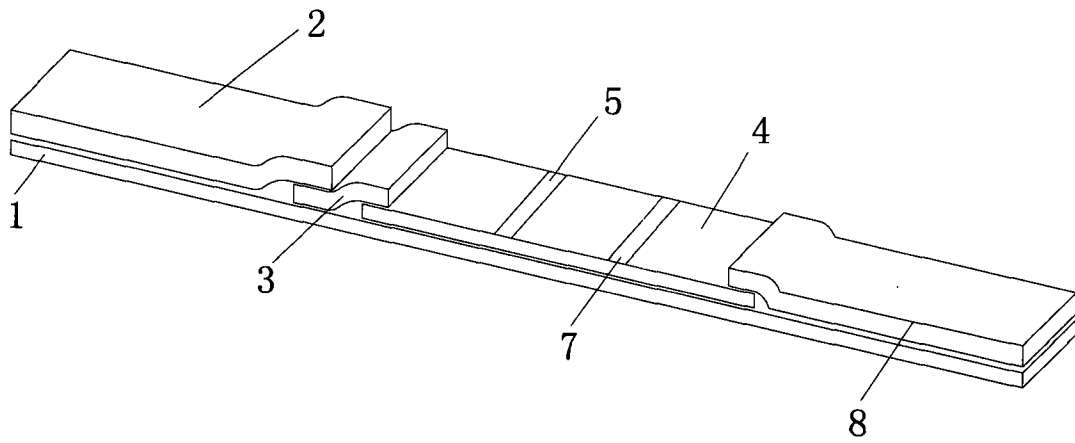


图 1

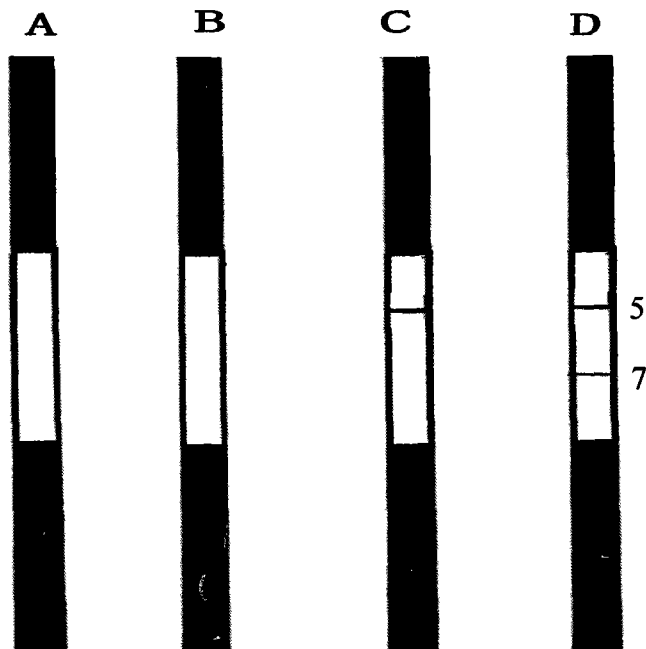


图 2

专利名称(译)	梅毒特异性IgG抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101858915A	公开(公告)日	2010-10-13
申请号	CN201010179121.9	申请日	2010-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
[标]发明人	张忠英 杨天赐 林丽蓉 张长弓		
发明人	张忠英 杨天赐 林丽蓉 张长弓		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/571		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

梅毒特异性IgG抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法，涉及一种梅毒特异性IgG抗体检测试剂。提供一种可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性IgG抗体检测的梅毒特异性IgG抗体胶体金免疫层析检测试剂条及其制备方法。试剂条设有载体板、加样垫、胶体金垫、硝酸纤维膜、梅毒特异性IgG抗体检测线、对照线和吸收垫。制备梅毒重组抗原TPN17和TPN47硝酸纤维素膜的点样；制备胶体金；胶体金与TPN17、TPN47的标记；制备免疫层析检测条。检测所需标本量极小，不需要特殊仪器，肉眼直接判读结果，且检测简便快速，特异性强，灵敏度较高，准确可靠，成本较低，应用广泛。

