



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044335 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510405625. 0

(22) 申请日 2015. 07. 10

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

地址 200025 上海市黄浦区瑞金二路 207 号

(72) 发明人 汪俊云 石锋 杨玥涛 高春花  
杨益 朱慧慧 陈颖丹

(74) 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司 31128

代理人 严新德

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

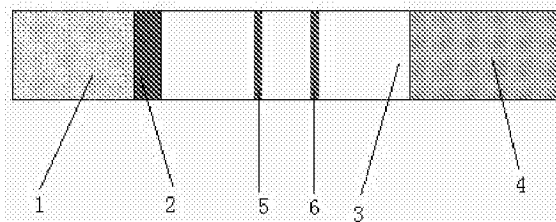
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条及其制备方法

(57) 摘要

本发明一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条,包括:样品垫、紧密连接于样品垫的含有胶体金标记探针的金标垫、与金标垫紧密连接的纤维素膜和紧密连接于纤维素膜另一端的吸水垫;纤维素膜上远离金标垫的一端设置质控线,在质控线和金标垫之间的纤维素膜上设置检测线,检测线由钩虫纯化虫体抗原组成,钩虫纯化虫体抗原为来源于美洲钩虫成虫虫体的可溶性抗原液;胶体金标记探针为金黄色葡萄球菌 A 蛋白或链球菌 G 蛋白;质控线由特异性结合胶体金标记探针的抗体组成。本发明还提供了上述的免疫层析试条的制备方法。本发明的免疫层析试条具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点,可以同时应用于人、畜及野生动物的临床和现场使用。



1. 一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条,其特征在於,包括:

样品垫、紧密连接于所述样品垫的含有胶体金标记探针的金标垫、与所述金标垫紧密连接的纤维素膜和紧密连接于所述纤维素膜另一端的吸水垫;所述纤维素膜上远离金标垫的一端设置质控线,在质控线和金标垫之间的纤维素膜上设置检测线,所述的检测线由钩虫纯化虫体抗原组成,所述的钩虫纯化虫体抗原为来源于美洲钩虫成虫虫体的可溶性抗原液;所述的胶体金标记探针为金黄色葡萄球菌 A 蛋白或链球菌 G 蛋白;所述的质控线由特异性结合胶体金标记探针的抗体组成。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条,其特征在於:所述的钩虫成虫虫体的可溶性抗原液蛋白浓度为 1 ~ 20mg/mL,喷涂量为 100 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>;胶体金标记探针浓度(以蛋白浓度计): 1 ~ 5mg/ 15 ~ 20mL;抗 SPA 抗体溶液浓度为 0.1 ~ 5mg/mL,喷涂量为 100 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。

3. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条,其特征在於:所述免疫层析试条背面可设置一个起支撑作用的背板,所述的带有背板的免疫层析试条装入一个盒体中,所述的盒体对应于滤血膜样品垫的部位设有检测孔,对应于检测线和质控线的部位设有观测窗,检测样品时将全血或血清加入检测孔中。

4. 一种制备权利要求 1 所述的快速检测钩虫病感染的免疫层析试条的方法,其特征在於,包括以下步骤:

1) 一个制备钩虫纯化虫体抗原溶液的步骤,收集美洲钩虫成虫 1000~2000 条,用磷酸缓冲液反复洗涤,将虫体置于预冷的研钵内,不断倒入液氮充分研磨,再加入虫体压积 15~25 倍体积的浸泡液浸泡冲洗虫体,所述的浸泡液由正辛基葡糖苷、苯甲基磺酰氟、甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮、乙二胺四乙酸、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸组成,在所述的浸泡液中,正辛基葡糖苷的质量百分比浓度为 1.5%,所述的苯甲基磺酰氟的浓度为 1mM、所述的甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮的浓度为 0.2mM,所述的乙二胺四乙酸的浓度为 1mM,所述的乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸的浓度为 1mM,然后在液氮和 30~40 $^{\circ}$ C 反复冻融 5~8 次,冰浴过夜,离心,上清液在磷酸缓冲液中透析 48~72 小时,透析完成后,在溶液中加入硫酸铵至 60~75% 的饱和度并产生沉淀,冰浴过夜,离心,弃上清,沉淀用磷酸缓冲液复溶,在磷酸缓冲液中透析 10~20 小时,回收透析液,离心,上清即是钩虫纯化虫体抗原可溶性抗原,将钩虫成虫虫体可溶性抗原液蛋白浓度调整到 1 ~ 20mg/mL;

2) 一个制备胶体金标记探针的步骤,将 1 ~ 5mg 金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)或链球菌 G 蛋白加入 100mL 胶体金溶液中,离心取沉淀,复溶到 4 ~ 25 mg/mL;

3) 一个制备与胶体金标记探针特异结合的抗体的步骤,所述的胶体金标记探针特异结合的抗体特异性的结合金黄色葡萄球菌 A 蛋白或链球菌 G 蛋白,将与胶体金标记探针特异结合的抗体的溶液浓度调整到 0.1 ~ 5mg/mL;

4) 将钩虫纯化虫体抗原溶液喷到纤维素膜上形成检测线,将能与胶体金标记探针特异结合的抗体溶液喷到所述纤维素膜的另一区域形成质控线;

5) 将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入胶体金标记探针溶液,制备金标垫;

6) 将吸水垫粘贴在所述纤维素膜的远离检测线的一端,将金标垫粘贴在纤维素膜的靠近检测线的一端,将样品垫粘贴于金标垫上与所述纤维素膜相对的一端。

5. 根据权利要求 4 所述的一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条的制备方法,其特

征在于：上述纤维素膜在喷有检测线、质控线后，先在 25~40℃ 下干燥 0.5 ~ 2 小时，再粘贴吸水垫。

6. 根据权利要求 4 所述的一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条的制备方法，其特征在于：向胶体金标记探针溶液中添加质量百分比浓度为 5% ~ 20% 的蔗糖，将金标垫在 25~40℃ 下干燥 0.5 ~ 1 小时，再与纤维素膜粘贴。

7. 一组用于免疫学方法检测钩虫病的试剂，其特征在于包括：(1) 钩虫纯化抗原，(2) 金黄色葡萄球菌 A 蛋白或链球菌 G 蛋白标记物；所述的钩虫纯化虫体抗原按如下方法制备：收集美洲钩虫成虫 1000~2000 条，用磷酸缓冲液反复洗涤，将虫体置于预冷的研钵内，不断倒入液氮充分研磨，再加入虫体压积 15~25 倍体积的浸泡液浸泡冲洗虫体，所述的浸泡液由正辛基葡糖苷、苯甲基磺酰氟、甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮、乙二胺四乙酸、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸组成，在所述的浸泡液中，正辛基葡糖苷的质量百分比浓度为 1.5%，所述的苯甲基磺酰氟的浓度为 1mM、所述的甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮的浓度为 0.2mM，所述的乙二胺四乙酸的浓度为 1mM，所述的乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸的浓度为 1mM，然后在液氮和 30~40℃ 反复冻融 5~8 次，冰浴过夜，离心，上清液在磷酸缓冲液中透析 48~72 小时，透析完成后，在溶液中加入硫酸铵至 60~75% 的饱和度并产生沉淀，冰浴过夜，离心，弃上清，沉淀用磷酸缓冲液复溶，在磷酸缓冲液中透析 10~20 小时，回收透析液，离心，上清即是钩虫纯化虫体抗原可溶性抗原。

## 一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,尤其涉及一种钩虫病,具体来说是一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 钩虫病 (Ancylostomiasis) 包括十二指肠钩虫病和美洲钩虫病,分别由十二指肠钩口线虫 (*Ancylostoma Duodenale*) 和美洲板口线虫 (*Necator Americanus*) 寄生于人体所引起。钩虫病在临床上可分为钩蚴皮肤(粘膜)侵入期、钩蚴肺部移行期和成虫肠道寄生期。钩虫感染不仅可导致儿童营养不良、贫血、生长迟缓、智力受损等,从而严重危害儿童生长发育,亦可引发成人尤其是孕妇贫血、营养不良、胃肠功能紊乱、劳动能力下降,严重时致发育障碍或心功能不全。

[0003] 钩虫病呈全球性分布,约 7.95 亿人感染。钩虫感染引起的育龄期妇女 DALYs 损失远超过淋巴丝虫病、日本脑炎和疟疾的总和。我国也是钩虫病流行较严重的国家。据 2004 年第二次全国人体重要寄生虫病现状调查显示,我国钩虫感染率为 6.12%,感染人数达 3930 万。因此,钩虫病是严重危害人们健康的重要公共卫生问题,精确、敏感、特异诊断对于钩虫病防治非常关键。病原学方法、分子生物学方法和免疫学方法在钩虫病的诊断中均有应用。

[0004] 钩虫病的病原学检查方法很多,包括虫卵检查、幼虫培养及成虫检验等,其中虫卵检查法应用最为普遍。直接涂片法是直接将粪便涂片镜检发现虫卵而确诊,此方法虽然简便,但检出率低,轻度感染者易漏检。目前最为普遍使用的技术是加藤厚涂片法检查患者粪便中的虫卵,因这一方法大量增加了涂片的粪便量,从而显著提高了检出率,并且可以进行虫卵计数,进行钩虫感染度的划分。此方法简便、成本低廉,特别适合大规模检查,但对专业人员要求高,且对低感染度的标本易漏检。

[0005] 利用实时荧光 PCR 技术等分子生物学方法可以应用于敏感、特异检测和鉴定不同类型的钩虫感染,但此方法对仪器设备、技术操作等有较高要求,不适用于钩虫病的快速诊断、大规模监测和流行病学调查。

[0006] 免疫学方法在钩虫病诊断上的应用越来越受到重视,最有效的免疫学诊断方法是应用纯化天然抗原或重组抗原检测钩虫病人特异抗体,常用检测方法有间接酶联免疫吸附法 (ELISA)、酶联免疫电转移印渍法 (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay ;EITBA), 以及金标免疫点印渍法 (Gold-labelled dot blotting ;GDB ;俗称膜法或渗滤法)。但这些方法或费时费力、或需要冷链系统保存试剂、或对仪器设备及操作人员的要求较高而不适合现场使用。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条及其制备方法,所述的这种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条及其制备方法要解决现有技术中的检测

钩虫病的方法对仪器设备及操作人员的要求较高、而且不适合现场使用的技术问题。

[0008] 本发明提供了一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条,包括:

[0009] 样品垫、紧密连接于所述样品垫的含有胶体金标记探针的金标垫、与所述金标垫紧密连接的纤维素膜和紧密连接于所述纤维素膜另一端的吸水垫;所述纤维素膜上远离金标垫的一端设置质控线,在质控线和金标垫之间的纤维素膜上设置检测线,所述的检测线由钩虫纯化虫体抗原组成,所述的钩虫纯化虫体抗原为来源于美洲钩虫成虫虫体的可溶性抗原液;所述的胶体金标记探针为金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 或链球菌 G 蛋白 (SPG);所述的质控线由特异性结合胶体金标记探针的抗体组成。

[0010] 进一步的,所述的胶体金标记探针为链球菌 G 蛋白 (SPG),所述的质控线上设置有抗链球菌 G 蛋白抗体。

[0011] 进一步的,所述的钩虫成虫虫体的可溶性抗原液蛋白浓度为 1 ~ 20mg/mL,喷涂量为 100  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>;胶体金标记探针浓度(以蛋白浓度计):1 ~ 5mg/15 ~ 20mL;抗 SPA 抗体溶液浓度为 0.1 ~ 5mg/mL,喷涂量为 100  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。

[0012] 进一步的,所述支持检测线和质控线的纤维素膜可为硝酸纤维素膜 (NC 膜) 或醋酸纤维素膜;所述支持胶体金标记探针的金标垫为玻璃纤维膜或聚脂膜;所述样品垫可以是滤血膜样品垫,所述的滤血膜是棉籽绒和纤维素的混合物或者玻璃纤维和纤维素的混合物,适合于全血样品和血清样品;所述样品垫也可以是玻璃纤维或吸水纸样品垫,适合于血清样品;所述吸水垫由吸水材料制备,如吸水纸。

[0013] 进一步的,所述纤维素膜宽度控制在 2.5 ~ 3.0mm;所述吸水垫的宽度为 20 ~ 40mm,厚度为 0.1 ~ 0.2mm;所述金标垫的宽度为 5 ~ 10mm;所述样品垫宽度为 20 ~ 40mm。

[0014] 进一步的,所述免疫层析试条背面可设置一个起支撑作用的背板,背板材料的选择是多种多样的,可以是塑料板,如聚氯乙烯板 (PVC) 等。

[0015] 进一步的,可将所述带有背板的免疫层析试条装入一个箱体中,该箱体对应于滤血膜样品垫的部位设有检测孔,对应于检测线和质控线的部位设有观测窗。检测样品时将全血或血清加入检测孔中。

[0016] 本发明还提供了一种制备上述检测钩虫病感染的免疫层析试条的方法,包括以下步骤:

[0017] (1) 一个制备钩虫纯化虫体抗原溶液的步骤,将来源于美洲钩虫成虫虫体可溶性抗原液蛋白浓度调整到 1 ~ 20mg/mL;

[0018] (2) 一个制备胶体金标记探针的步骤,将 1 ~ 5mg 金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 或链球菌 G 蛋白加入 100mL 胶体金溶液中,离心取沉淀,复溶到 15 ~ 20mL mg/mL;

[0019] (3) 一个制备与胶体金标记探针特异结合的抗体的步骤,所述的与胶体金标记探针特异结合的抗体特异性的结合金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 或链球菌 G 蛋白 (SPG),将与胶体金标记探针特异结合的抗体的溶液浓度调整到 0.1 ~ 5mg/mL;

[0020] (4) 将钩虫纯化虫体抗原溶液喷到纤维素膜上形成检测线,将能与胶体金标记探针特异结合的抗体溶液喷到所述纤维素膜的另一区域形成质控线;

[0021] (4) 将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入胶体金标记探针溶液,制备金标垫;

[0022] (3) 将吸水垫粘贴在所述纤维素膜的远离检测线的一端,将金标垫粘贴在纤维素膜的靠近检测线的一端,将样品垫粘贴于金标垫上与所述纤维素膜相对的一端。

[0023] 进一步的,上述纤维素膜在喷有检测线、质控线后,先在 25 ~ 40℃ 下干燥 0.5 ~ 2 小时,再粘贴吸水垫。

[0024] 进一步的,为使胶体金标记探针溶液与玻璃纤维膜或聚脂膜更好地结合,可向胶体金标记探针溶液中添加质量百分比浓度为 2% ~ 10% 的蔗糖;为使金标垫更易于纤维素膜粘贴,可将金标垫在 25 ~ 40℃ 下干燥 0.5 ~ 1 小时,再与纤维素膜粘贴。

[0025] 本发明还提供了一组用于免疫学方法检测钩虫病的试剂,包括:(1) 钩虫纯化抗原,(2) 金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 或链球菌 G 蛋白 (SPG) 标记物;所述的钩虫纯化虫体抗原按如下方法制备:收集美洲钩虫成虫 1000 ~ 2000 条,用磷酸缓冲液反复洗涤,将虫体置于预冷的研钵内,不断倒入液氮充分研磨,再加入虫体压积 15 ~ 25 倍体积的浸泡液浸泡冲洗虫体,所述的浸泡液由正辛基葡糖苷、苯甲基磺酰氟、甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮、乙二胺四乙酸、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸组成,在所述的浸泡液中,正辛基葡糖苷的质量百分比浓度为 1.5%,所述的苯甲基磺酰氟的浓度为 1mM、所述的甲苯磺酰赖氨酰氯甲酮的浓度为 0.2mM,所述的乙二胺四乙酸的浓度为 1mM,所述的乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸的浓度为 1mM,然后在液氮和 30 ~ 40℃ 反复冻融 5 ~ 8 次,冰浴过夜,离心,上清液在磷酸缓冲液中透析 48 ~ 72 小时,透析完成后,在溶液中加入硫酸铵至 60 ~ 75% 的饱和度并产生沉淀,离心,弃上清,沉淀用磷酸缓冲液复溶,在磷酸缓冲液中透析 10 ~ 20 小时,回收透析液,离心,上清即是钩虫纯化虫体抗原可溶性抗原,所述的标记包括酶标记、胶体金标记或者其他标记。

[0026] 钩虫病患者体内血液中含有能特异性结合所感染的钩虫成虫虫体抗原的抗钩虫抗体,检测受试者体内血液中是否含有钩虫虫体抗体,可作用受试者是否患有钩虫的指标。

[0027] 本发明的检测钩虫病感染的免疫层析试条适用于从钩虫病感染者(患畜)体内抽取的全血样品和血清样品。对于全血样品,本发明的检测钩虫病感染的免疫层析试条中的样品垫采用滤血膜样品垫;对于血清样品,本发明的检测钩虫病感染的免疫层析的免疫层析试条中的样品垫可采用玻璃纤维或吸水纸样品垫,也可采用滤血膜样品垫。

[0028] 将钩虫虫体可溶性抗原固定在纤维素膜等支持物上作为固相抗原,用以捕获受试者者血样中的抗钩虫抗体。本发明的一个优选的方案中,将美洲钩虫成虫可溶性抗原固定在纤维膜上形成检测线,该固相抗原可以捕获受试者血样中相应的钩虫抗体,在检测线位置形成抗原抗体复合物沉淀。

[0029] 钩虫病患者体内血液中含有的抗钩虫抗体的优势抗体类型为 IgG 抗体。本发明的一个优选的方案中采用胶体金标记的链球菌 G 蛋白作为检测探针,该胶体金标记探针附着于金标垫上。检测过程中,复溶的胶体金标记探针可与受试者血样中的人 IgG 抗体结合,从而当受试者血样中存在钩虫特异性抗体时在检测线位置形成色带。

[0030] 胶体金标记探针不限于链球菌 G 蛋白,也可采用金黄色葡萄球菌 A 蛋白,鼠抗人 IgG 的单抗或多抗,或者采用其他动物如兔抗人 IgG 抗体,同样能实现本发明的发明目的(若使用抗人的抗体则仅能对人体进行诊断),这是领域的一般技术人员都知晓的。

[0031] 将与胶体金标记探针特异性结合的抗体固定在纤维素膜上作为质控线。在本发明一个优选的方案中,胶体金标记探针是链球菌 G 蛋白 (SPG),相应的,质控线采用抗 SPG 的抗体。无论待检样品中是否含有钩虫抗体,本发明的检测钩虫病感染中质控线位置总能形成色带,该条色带是判定检测过程是否正常和免疫层析试条是否变质的标准。

[0032] 质控线不限于抗 SPG 的抗体,只要能与选定的胶体金标记抗体特异性结合,或者使用 SPG 能结合的任意 IgG 抗体,同样能实现本发明的发明目的,这是领域的一般技术人员都知晓的。

[0033] 本发明的免疫层析试条具有以下优点:(1) 敏感性 & 特异性高:实验室考核结果显示,本发明的免疫层析试条总的敏感性可达 95.3%,特异性为 98.6%;(2) 检测方法简单、快速:检测过程中标本处理简单,血清或全血都可以直接使用,无需处理,不需要专门仪器和人员培训,非专业技术人员按照说明书即可操作,并可迅速观察结果,标本中的抗体经 5 分钟左右的纸层析后,即可出现肉眼可见的沉淀线,从而为钩虫病人的治疗争取了时间,很适合现场和基层使用;(3) 本发明的免疫层析试条可以同时应用与人、畜和野生动物感染的现场检测,有助于寻找确定传染源,在疾病预防控制工作中有重要意义;(4) 制备方法简单,成本低廉,易于进行工业化生产。本发明将在检测钩虫病感染及其相关疾病的诊断和治疗中发挥重要作用,应用前景广阔。

### 附图说明

[0034] 图 1 是本发明的快速检测钩虫病感染的免疫层析试条的俯视结构示意图。

[0035] 图 2 是本发明的快速检测钩虫病感染的免疫层析试条的纵截面结构示意图。

[0036] 其中:1 为样品垫;2 为金标垫;3 为纤维素膜;4 为吸水垫;5 为检测线;6 为质控线;7 为背板。

### 具体实施方式

[0037] 以下结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法;所述百分含量如无特别说明均为质量/体积百分含量或体积/体积百分含量。

[0038] 实施例 1、检测钩虫病感染的免疫层析试条的制备

[0039] 1、针对钩虫纯化抗原的制备

[0040] 收集美洲钩虫成虫 2000 条左右,用磷酸缓冲液反复洗涤,将虫体置于预冷的研钵内不断倒入液氮充分研磨。再加入虫体压积 20 倍体积的含 1.5% 正辛基葡糖苷、1mM 苯甲基磺酰氟、0.2mM 甲苯磺酰赖氨酸甲酮、1mM 乙二胺四乙酸、1mM 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸浸泡冲洗收集的虫体材料,在液氮和 37℃ 反复冻融 5 次,冰浴过夜。26000g、4℃ 离心 30 分钟,上清液对磷酸缓冲液透析 48 小时。在溶液中加入硫酸铵至 70% 的饱和度并产生沉淀,冰浴过夜。26000g、4℃ 离心 30 分钟,弃上清,沉淀用少量磷酸缓冲液复溶,对磷酸缓冲液透析 12 小时,回收透析液,1000g、4℃ 离心 10 分钟离心,上清即是钩虫纯化虫体抗原可溶性抗原。

[0041] 2、链球菌 G 蛋白 (SPG) 由上海业力生物科技有限公司购买获得。

[0042] 3、制备免疫胶体金探针及金标垫

[0043] 用下述方法制备链球菌 G 蛋白免疫胶体金探针及金标垫:

[0044] 1) 采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒,具体方法为:将  $\text{HAuCl}_4$  (沪试牌,购于上海国药集团化学试剂有限公司) 配制成 0.01% 水溶液,取 100mL 加热至沸腾,搅动下准确加入 1.6mL 的 1% 的柠檬酸三钠水溶液,待液体颜色稳定成葡萄酒红色,得到胶体金溶液。

[0045] 2) 确定胶体金偶联探针饱和浓度

[0046] 用 0.2M  $K_2CO_3$  调节步骤 1) 制备的胶体金溶液的 pH 值至 6.0, 准备 5 支洁净试管, 分别加入 1mL 胶体金溶液。将步骤 1) 制备的经纯化的链球菌 G 蛋白稀释为 1mg/mL, 分别向 4 支试管中加入 5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、30  $\mu$ L, 另一支为空白对照, 混匀后于室温下放置 5 分钟, 加入 10% NaCl 水溶液, 混匀, 静置 10-20 分钟后观察液体颜色。胶体金溶液颜色不变时所含最少量即为稳定 1mL 胶体金溶液所需蛋白的最适浓度, 以此为基础增加 20% 蛋白量即为胶体金探针饱和溶液。结果: 维持胶体金溶液颜色不变的蛋白量为 10  $\mu$ L, 即探针浓度为 10  $\mu$ g/mL。

[0047] 3) 链球菌 G 蛋白标记的免疫胶体金探针及金标垫的制备

[0048] 取 50mL 胶体金溶液, 用 0.2M  $K_2CO_3$  调节 pH 值为 6.0, 按 10  $\mu$ g/mL 加入已纯化的链球菌 G 蛋白, 得到含有浓度为 10  $\mu$ g/mL 链球菌 G 蛋白的免疫胶体金探针溶液 50mL, 搅拌 1 小时, 再加入终浓度为 0.05% PEG20000, 搅拌 1 小时, 10000rpm 离心 30 分钟, 弃上清, 用 20mM 硼酸缓冲液洗涤沉淀, 并将其保存于 10mL 含 15% 蔗糖的 20mM 硼酸缓冲液中, 得到链球菌 G 蛋白标记的胶体金探针溶液。取 5mL 链球菌 G 蛋白标记的胶体金探针溶液均匀加在玻璃纤维膜上, 37°C 下干燥 0.5 小时, 得到金标垫。

[0049] 4、检测钩虫病感染的免疫层析试条的制备

[0050] 该试条的制备方法包括以下步骤:

[0051] 1) NC 膜的包被

[0052] 钩虫虫体可溶性纯化抗原包被: 用 0.01M pH7.2 PBS 稀释实施例 1 制备的钩虫虫体可溶性纯化抗原液至终浓度为 5mg/mL, 用于包被检测线;

[0053] 质控抗体鸡抗链球菌 G 蛋白 IgY (购自捷宁生物公司) 的包被: 用 0.01M pH7.2 PBS 稀释鸡抗链球菌 G 蛋白 IgY 至终浓度为 0.5mg/mL, 用于包被质控线;

[0054] BIODOT 公司 XZ1000 喷膜机将分别喷于 300mm 长、25mm 宽的硝酸纤维素膜 (购自 Sartorius 公司) 上, 喷涂量均为 100  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>, 形成一条检测线和一条质控线, 37°C 下干燥 1 小时。

[0055] 2) 检测钩虫病感染的免疫层析试条的制备

[0056] 用一块单面涂了不干胶的 PVC 背板 7, 中间粘贴上处理好的 NC 膜 3; 硝酸纤维素膜 3 上设有检测线 5 和质控线 6; NC 膜 3 靠近质控线 6 的一端紧密粘贴吸水垫 4 (购于 MILLIPORE 公司); NC 膜 3 靠近质控线 6 的一端紧密粘贴金标垫 2; 金标垫 2 另一端紧密粘贴滤血膜样品垫 1 (购自 WHATMAN 公司)。

[0057] 测定时将样本血清或全血加在滤血膜样品垫 1 上, 10 秒后滴一滴 (约 50  $\mu$ L) 样本稀释液, 稀释液带动样品按样品垫 1、金标垫 2、硝酸纤维素膜 3、吸水垫 4 的方向移动, 流经金标垫 2 时使金标垫 2 上的胶体金标记探针复溶, 并带动其向硝酸纤维素膜 3、吸水垫 4 移动。胶体金标记探针 (本发明实施例为链球菌 G 蛋白) 可与样品中的抗体或抗体亚类结合, 形成免疫复合物。此免疫复合物流至检测线 5 时, 若标本中有待测抗体或抗体亚类 (抗钩虫虫体抗原的抗体), 即被检测线 5 的特异性固相抗原所捕获, 在硝酸纤维素膜 3 上的检测线 5 位置显出红色检测线条; 此免疫复合物流经质控线 6 时, 即被质控线 6 的固相抗体 (本发明实施例为抗 SPG 抗体) 所捕获, 在硝酸纤维素膜 3 上的质控线 6 位置显出红色质控线条。

[0058] 阳性标本既显示检测线,又显示质控线;阴性标本没有检测线,仅显示质控线。

[0059] 5、检测钩虫病感染的免疫层析试剂盒的制备

[0060] 为了方便使用,将步骤3制备的检测钩虫病感染的免疫层析的免疫层析试条装入试剂盒中,加干燥剂后密封保存。该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样孔,对应于检测线和质控线的部位设有观测窗。

[0061] 实施例2、检测钩虫病感染的免疫层析试条的制备

[0062] 用购买自上海业力生物科技有限公司的金黄色葡萄球菌A蛋白(SPA)制备胶体金标记检测探针,用购买自捷宁生物公司的鸡抗金黄色葡萄球菌A蛋白IgY包被质控线,其他步骤同实施例1。

[0063] 实施例3、检测钩虫病感染的免疫层析试条的实验室考核

[0064] 1、检测方法

[0065] 于实施例1制备的免疫层析试条的滤血膜样品垫加入待测血清,1分钟后加入样本稀释液(PBS)1滴(约50 $\mu$ L),2分钟后开始观察结果,20分钟观察终止。结果判定:如果检测线5和质控线6均出现红色条带,即判为钩虫病,如果仅有质控线6出现红色条带,即判为阴性。

[0066] 2、实验结果

[0067] 用本发明实施例2制备的检测钩虫病感染的免疫层析的免疫层析试条进行实验室考核结果如表1所示。由表1可以看出本发明的免疫层析试纸的敏感性可达87.2%,特异性可达96.5%。上述检测结果表明本发明的免疫层析试条可用于钩虫病的快速检测。

[0068] 表1 本发明检测钩虫病感染的实验室考核结果

[0069]

血清来源	试验例数	阳性例数(P%)
钩虫病	86	82(95.3%)
健康人	143	2(1.4%)

[0070] 用本发明实施例3制备的检测钩虫病感染的免疫层析试条进行实验室考核,结果与表1所示结果没有统计学差异。

[0071] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。

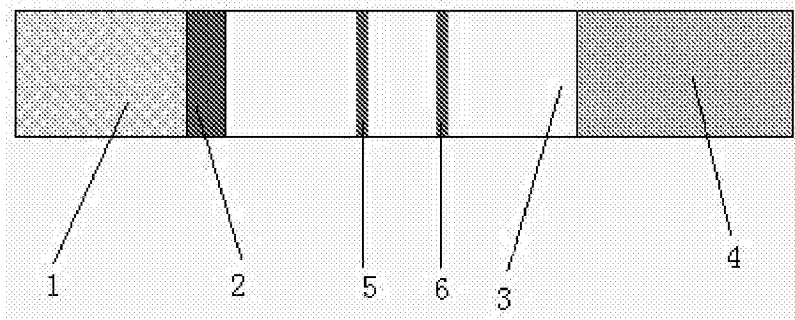


图 1

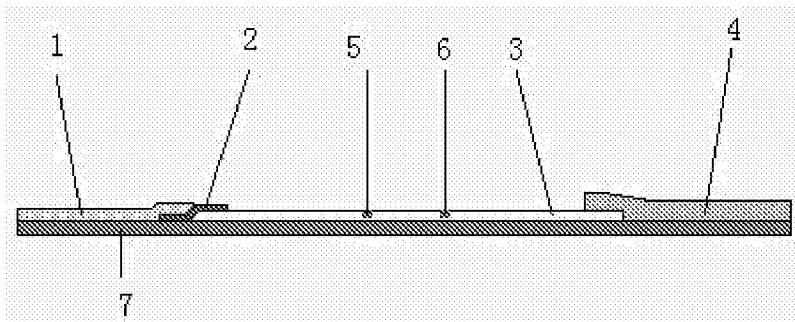


图 2

专利名称(译)	一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105044335A</a>	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510405625.0	申请日	2015-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
[标]发明人	汪俊云 石锋 杨玥涛 高春花 杨益 朱慧慧 陈颖丹		
发明人	汪俊云 石锋 杨玥涛 高春花 杨益 朱慧慧 陈颖丹		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N2333/43526		
其他公开文献	CN105044335B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明一种快速检测钩虫病感染的免疫层析试条，包括：样品垫、紧密连接于样品垫的含有胶体金标记探针的金标垫、与金标垫紧密连接的纤维素膜和紧密连接于纤维素膜另一端的吸水垫；纤维素膜上远离金标垫的一端设置质控线，在质控线和金标垫之间的纤维素膜上设置检测线，检测线由钩虫纯化虫体抗原组成，钩虫纯化虫体抗原为来源于美洲钩虫成虫虫体的可溶性抗原液；胶体金标记探针为金黄色葡萄球菌A蛋白或链球菌G蛋白；质控线由特异性结合胶体金标记探针的抗体组成。本发明还提供了上述的免疫层析试条的制备方法。本发明的免疫层析试条具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，可以同时应用于人、畜及野生动物的临床和现场使用。

