



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102095860 A

(43) 申请公布日 2011.06.15

(21) 申请号 201110027425.8

(22) 申请日 2011.01.25

(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 刘莉莉 张忠英 杨天赐 林丽蓉

(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 33/571(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

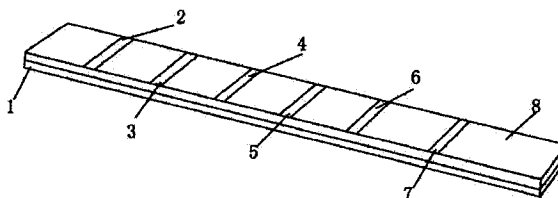
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法,涉及一种试剂盒。试剂盒设载体板、硝酸纤维膜、梅毒特异性 IgG 抗体检测线、对照线,检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被入 IgG 抗体;辣根过氧化物酶标记抗人 γ 链抗体。先制备梅毒特异性重组抗原,再硝酸纤维素膜的点样,然后制备抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体,标记抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的辣根过氧化物酶后制备免疫印迹试剂盒。可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgG 抗体的检测。所需标本量极小,不需特殊仪器,且检测简便快速,特异性强,灵敏度高,准确可靠,成本低。



1. 梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,其特征在于设有载体板、硝酸纤维膜、梅毒特异性 IgG 抗体检测线、对照线,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 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被人 IgG 抗体;辣根过氧化物酶标记抗人 γ 链抗体。

2. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,其特征在于所述梅毒特异性重组抗原为 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47。

3. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,其特征在于所述载体板采用 PVC 板。

4. 如权利要求 1 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 制备梅毒特异性重组抗原

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,得梅毒特异性重组抗原;

2) 硝酸纤维素膜的点样

在硝酸纤维素膜 IgG 检测线上包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被人 IgG 抗体,晾干;

3) 制备抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体

以人 IgG 特异性片段 γ 链为抗原免疫 Balb/c 小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

4) 抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的辣根过氧化物酶标记

采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记;

5) 制备免疫印迹试剂盒

将硝酸纤维膜粘贴在载体板上表面,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 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被人 IgG 抗体,用切条机切成条状,与酶标记的抗人 γ 链单克隆抗体及其底物共同组装成梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒。

5. 如权利要求 4 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 1)、2)、5) 中,所述梅毒特异性重组抗原为 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47。

6. 如权利要求 4 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述梅毒特异性重组抗原和人 IgG 抗体的浓度为 1~4mg/mL;点样量为 1 μ L/cm。

7. 如权利要求 4 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 3) 中,采用 ELISA 的方法鉴定 McAb 效价在 1 : 10⁷ 以上。

8. 如权利要求 4 所述的梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 4) 中,所述辣根过氧化物酶的底物由 0.03% (W/V) 的过氧化氢和 0.07% (W/V) 的二氨基联苯胺组成。

梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,尤其是涉及一种梅毒特异性 IgG 抗体检测免疫印迹试剂盒及其制备方法。

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 ([1] 林丽蓉,杨波,潘锡涛,等. 潜在的血源传播患者梅毒血清学检测方法的选择. 中华医院感染学杂志. 2010, 20(10) :1491-1494)。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 ([2] 林丽蓉,但冰,付左根,等. 潜在血源传播患者梅毒血清学 TRUST/TPPA 与 IgM 抗体联合检测. 中国皮肤性病学杂志. 2010, 152(05) :446-448); 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,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 ([3] 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 ([4] 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 ([5] 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 ([6]Li-Rong Lin,Zuo-Gen Fu,Bing Dan,et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect Immunoglobulin G Antibodies to Treponemal pallidum with TPN17 and TPN47. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 68 :193-200.)。

[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,这种方法存在花费大、获得的 TP 量少且不纯(混有宿主蛋白)、与其他病原体存在交叉反应等缺点,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 IgG 抗体检测方法包括梅毒螺旋体特异性抗体明胶凝集试验 (TPPA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、荧光密螺旋体抗体吸收试验 (FTA-ABS) 及免疫印迹技术 (Western-Blot) 等,其特异性均较高。一般地,TPPA,ELISA 作为临床初筛,当血清学阳性,或临床诊断有困难时,需要采用 FTA-ABS 及 Western-blot 作为确认试验。其中,FTA-ABS 需要荧光显微镜,而且其结果判断需要训练有素和较丰富经验的专业人员才能完成,因此,其应用推广受到一定的限制。采用 Western-blot 方法制成的试剂盒,一般常规实验室均可完成,不需要特殊设备,判读也简单明了。现市售的 Western-blot 试剂均为进口试剂,价格昂贵。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法。

[0008] 本发明所述梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒设有载体板、硝酸纤维素膜、梅毒特异性 IgG 抗体检测线、对照线,梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维素膜上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被 IgG 抗体;辣根过氧化物酶标记抗人 γ 链抗体。

[0009] 所述梅毒特异性重组抗原为 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47 梅毒特异性重组抗原。

[0010] 所述载体板可采用 PVC 板。

[0011] 所述梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 制备梅毒特异性重组抗原

[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,得梅毒特异性重组抗原;

[0014] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0015] 在硝酸纤维素膜 IgG 检测线上包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被 IgG 抗体,晾干;

[0016] 3) 制备抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体

[0017] 以人 IgG 特异性片段 γ 链为抗原免疫 Balb/c 小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳

定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

[0018] 4) 抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记

[0019] 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记；

[0020] 5) 制备免疫印迹试剂盒

[0021] 将硝酸纤维膜粘贴在载体板上表面,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 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原,在对照线处包被包被入 IgG 抗体,用切条机切成条状,与酶标记的抗人 γ 链单克隆抗体及其底物共同组装成梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒。

[0022] 在步骤 1)、2)、5) 中,所述梅毒特异性重组抗原可为 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47 梅毒特异性重组抗原等。

[0023] 在步骤 2) 中,所述梅毒特异性重组抗原和人 IgG 抗体的浓度可为 1 ~ 4mg/mL;点样量可为 1 μ L/cm。

[0024] 在步骤 3) 中,采用 ELISA 的方法鉴定 McAb 效价在 1 : 10⁷ 以上。

[0025] 在步骤 4) 中,所述辣根过氧化物酶的底物可由 0.03% (W/V) 的过氧化氢和 0.07% (W/V) 的二氨基联苯胺组成。

[0026] 本发明提供了一种采用免疫印迹技术建立梅毒特异性 IgG 抗体检测试剂条,可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性 IgG 抗体的检测。该检测方法所需的标本量极小,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,灵敏度高,准确可靠,成本低,应用广泛。

附图说明

[0027] 图 1 为本发明所述梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒中膜条实施例的结构组成示意图。

[0028] 图 2 为实验结果模式示意图。在图 2 中,I 为使用前的示意图,H 为无效试验 (产品质量问题),G 为阴性结果,A ~ F 为 TP-IgG 阳性结果;2 为梅毒特异性 TPN-15-IgG 抗体检测线,3 为梅毒特异性 TPN-17-IgG 抗体检测线,4 为梅毒特异性 TPN-37-IgG 抗体检测线,5 为梅毒特异性 TPN-44.5-IgG 抗体检测线,6 为梅毒特异性 TPN-47-IgG 抗体检测线,7 为对照线。

具体实施方式

[0029] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0030] 参见图 1,本发明所述梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒实施例设有载体板 1、梅毒特异性 IgG 抗体检测线 2 ~ 6,对照线 7 和硝酸纤维膜 (NC 膜) 8。

[0031] 硝酸纤维膜 8 粘贴在载体板 1 上表面,梅毒特异性 IgG 抗体检测线 2 ~ 6 和对照线 7 依次设在硝酸纤维膜 8 上;在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处分别包被梅毒特异性重组抗原 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5 和 TPN47,在对照线 7 处包被入 IgG 抗体。

[0032] 所述载体板采用 PVC 板。

[0033] 所述梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0034] 1) 制备 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5 和 TPN47 梅毒特异性重组抗原

[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 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44. 5 和 TPN47 梅毒特异性重组抗原。

[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 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44. 5、TPN47 梅毒特异性重组抗原, 在对照线处包被 IgG 抗体, 晾干。

[0038] 3) 制备抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体

[0039] 以人 IgG 特异性片段 γ 链为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 通过杂交瘤技术, 筛选获得稳定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。采用 ELISA 的方法鉴定 McAb 效价在 $1 : 10^7$ 以上。

[0040] 4) 抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记

[0041] 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。

[0042] 5) 制备免疫印迹试剂盒

[0043] 将硝酸纤维素膜粘贴在载体板上表面, 梅毒特异性 IgG 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维素膜上; 在梅毒特异性 IgG 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44. 5、TPN47, 在对照线处包被 IgG 抗体, 用切条机切成条状, 和酶标记的抗人 γ 链单克隆抗体及其底物共同组装成梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒。

[0044] 以下给出采用梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒检测患者的临床标本:

[0045] 1) 标本采用 0.01mol/L PBS 缓冲液进行 $1 : 50$ 稀释。

[0046] 2) 封闭: 采用 5% 脱脂奶粉 (0.01mol/L PBST 缓冲液配制) 作为封闭液, 于室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 30min 。

[0047] 3) 血清温育: 取出所需的膜条, 将其放入温育槽内, 并编号。在温育槽中分别加入 1.5ml 已稀释样本。于室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 30min 。

[0048] 4) 清洗: 吸去槽内液体, 在摇摆摇床上用 1.5ml 0.01mol/L PBS 缓冲液清洗膜条 3 次, 每次 5min 。

[0049] 5) 加酶结合物: 在温育槽中加入 1.5ml 已稀释的酶结合物 (采用辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体为检测抗体), 于室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 30min 。

[0050] 6) 清洗: 吸去槽内液体, 在摇摆摇床上用 1.5ml 0.01mol/L PBS 缓冲液清洗膜条 3 次, 每次 5min 。

[0051] 7) 底物温育: 在温育槽中分别加入 1.5ml 底物液 (DAB), 于室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 10min 。

[0052] 8) 终止: 吸去槽内液体, 用蒸馏水清洗膜条 3 次, 每次 1min 。

[0053] 结果判断: 将检测膜条放置在结果判定模板中, 风干后判断结果。任何蛋白靶标出现的特异性条带, 均可判断为阳性, 确诊为梅毒 (见图 2)。

[0054] 以下给出梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒的性能检定:

[0055] 1) 外观检查: 试剂盒无破损, 包被反应膜平整、干净无污染斑点、无裂缝, 胶带无开胶, 无切斜现象。

[0056] 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 抗体免疫印迹试剂盒检定, 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。

[0057] 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。

[0058] 4) 批内差异:同一批次梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,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。

[0059] 5) 批间差异:不同批次梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,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。

[0060] 6) 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。

[0061] 7) 交叉反应:采用本梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,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。

[0062] 8) 稳定性检测:应用 Arrhenius 法则,将梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒放置 37°C 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。

[0063] 以下给出具体实施例。

[0064] 实施例 1

[0065] 将硝酸纤维膜粘贴在载体板上表面,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 抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47,在对照线处包被人 IgG 抗体,用切条机切成条状,和酶标记的抗人 γ 链单克隆抗体及其底物共同组装成梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒。

[0066] 1) 标本采用 0.01mol/L PBS 缓冲液进行 1 : 50 稀释。

[0067] 2) 封闭:采用 5% 脱脂奶粉 (0.01mol/L PBST 缓冲液配制) 作为封闭液,于室温 ($18 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 30min。

[0068] 3) 血清温育:取出所需的膜条,将其放入温育槽内,并编号。在温育槽中分别加入 1.5ml 已稀释样本。于室温 ($18 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 30min。

[0069] 4) 清洗:吸去槽内液体,在摇摆摇床上用 1.5ml 0.01mol/L PBS 缓冲液清洗膜条 3 次,每次 5min。

[0070] 5) 加酶结合物:在温育槽中加入 1.5ml 已稀释的酶结合物(采用辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 特异性片段 γ 链单克隆抗体为检测抗体),于室温 ($18 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 30min。

[0071] 6) 清洗:吸去槽内液体,在摇摆摇床上用 1.5ml 0.01mol/L PBS 缓冲液清洗膜条 3 次,每次 5min。

[0072] 7) 底物温育:在温育槽中分别加入 1.5ml 底物液 (DAB),于室温 ($18 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 在摇摆摇床上温育 10min。

[0073] 8) 终止:吸去槽内液体,用蒸馏水清洗膜条 3 次,每次 1min。

[0074] 结果判断:将检测膜条放置在结果判定模板中,风干后判断结果。任何蛋白靶标出现的特异性条带,均可判断为阳性,确诊为梅毒(见图 2)。

[0075] 实施例 2

[0076] 与实施例 1 相似,其区别在于硝酸纤维膜检测线仅由 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5 梅毒特异性重组抗原组成,不含有 TPN47 梅毒特异性重组抗原。结果判断与实施例 1 相同。

[0077] 实施例 3

[0078] 与实施例 1 相似,其区别在于硝酸纤维膜检测线仅由 TPN15、TPN17、TPN37、TPN47 梅毒特异性重组抗原组成,不含有 TPN44.5 梅毒特异性重组抗原。结果判断与实施例 1 相同。

[0079] 实施例 4

[0080] 与实施例 1 相似,其区别在于硝酸纤维膜检测线仅由 TPN15、TPN17、TPN44.5、TPN47 梅毒特异性重组抗原组成,不含有 TPN37 梅毒特异性重组抗原。结果判断与实施例 1 相同。

[0081] 实施例 5

[0082] 与实施例 1 相似,其区别在于硝酸纤维膜检测线仅由 TPN15、TPN37、TPN44.5、TPN47 梅毒特异性重组抗原组成,不含有 TPN17 梅毒特异性重组抗原。结果判断与实施例 1 相同。

[0083] 实施例 6

[0084] 与实施例 1 相似,其区别在于硝酸纤维膜检测线仅由梅毒特异性重组抗原 TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47 组成,不含有梅毒特异性重组抗原 TPN15。结果判断与实施例 1 相同。

[0085] 实施例 7

[0086] 与实施例 1 相似,其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。

[0087] 实施例 8

[0088] 性能验证试验:按实施例 1 的方案制备梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,然后进行性能验证。

[0089] 1) 外观检查:试剂盒无破损,包被反应膜平整、干净无污染斑点、无裂缝,胶带无开胶,无切斜现象。

[0090] 2) 阳性标本符合率:用 TP-IgG 阳性的不同滴度的阳性参比标本各 50 份采用梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒检定,计算阳性符合率。阳性参比标本的确定采用 FTA-ABS(德国欧蒙公司)法确定的临床标本。

[0091] 3) 阴性标本符合率:用 50 份阴性参比标本检定,计算阳性符合率。阴性参比标本的确定采用 TPPA(日本富士株式会社)法确定的临床标本。

[0092] 4) 批内差异:同一批次梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,用特征性标本检测,要求阳性标本检测结果显示色带的颜色深浅一致,阴性标本检测的结果阴性。

[0093] 5) 批间差异:不同批次梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,用特征性标本检测,要求阳性标本检测结果显示色带的颜色深浅一致,阴性标本检测的结果阴性。

[0094] 6) 交叉反应:采用本梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒,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。

[0095] 7) 稳定性检测:应用 Arrhenius 法则,将梅毒特异性 IgG 抗体免疫印迹试剂盒放

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。

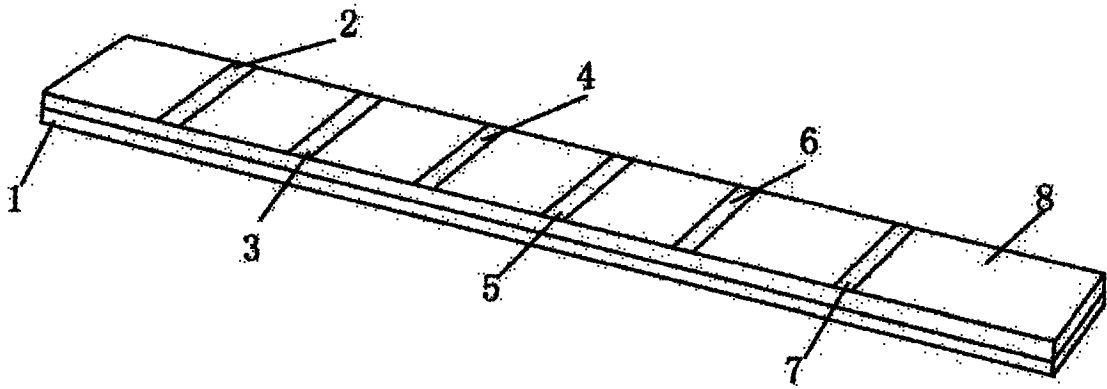


图 1

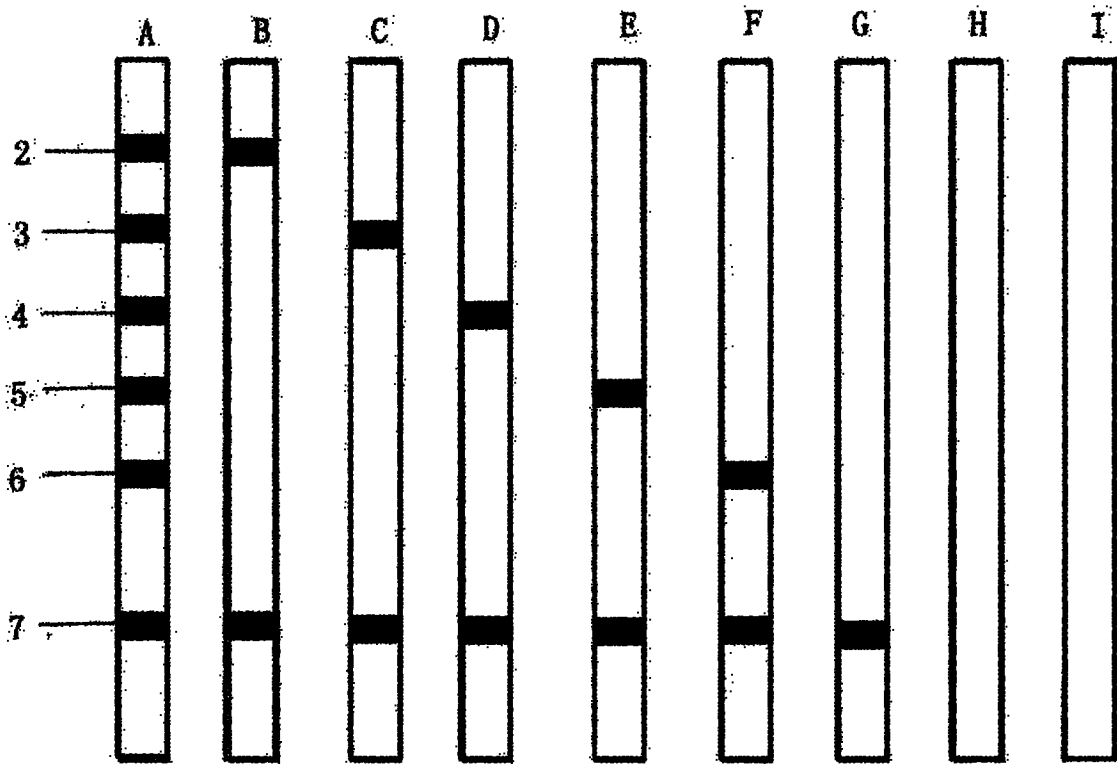


图 2

专利名称(译)	梅毒特异性IgG抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102095860A	公开(公告)日	2011-06-15
申请号	CN201110027425.8	申请日	2011-01-25
[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	刘莉莉 张忠英 杨天赐 林丽蓉		
发明人	刘莉莉 张忠英 杨天赐 林丽蓉		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/571 G01N33/558 G01N33/535		
其他公开文献	CN102095860B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

梅毒特异性IgG抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法，涉及一种试剂盒。试剂盒设载体板、硝酸纤维素膜、梅毒特异性IgG抗体检测线、对照线，检测线和对照线依次设在硝酸纤维素膜上；在梅毒特异性IgG抗体检测线处包被梅毒特异性重组抗原，在对照线处包被入IgG抗体；辣根过氧化物酶标记抗人γ链抗体。先制备梅毒特异性重组抗原，再硝酸纤维素膜的点样，然后制备抗人IgG特异性片段γ链单克隆抗体，标记抗人IgG特异性片段γ链单克隆抗体的辣根过氧化物酶后制备免疫印迹试剂盒。可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中梅毒特异性IgG抗体的检测。所需标本量极小，不需特殊仪器，且检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低。

