



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102435732 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 02

(21) 申请号 201110279314. 6

(22) 申请日 2011. 09. 19

(71) 申请人 厦门市仙岳医院

地址 361012 福建省厦门市思明区仙岳路  
399 号

(72) 发明人 郭永炼 章家新 吴统健 陈桂美  
曹凤玲 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 33/569 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

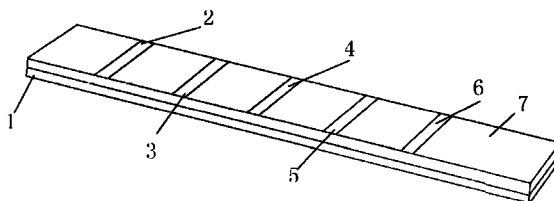
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法

## (57) 摘要

弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法, 涉及一种试剂盒。试剂盒设有载体板、硝酸纤维素膜、弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线; 所述弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维素膜上; 在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原, 在对照线处包被人 IgM 抗体; 辣根过氧化物酶标记抗人  $\mu$  链抗体。制备弓形虫重组抗原; 硝酸纤维素膜的点样; 制备抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  链单克隆抗体; 抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  链单克隆抗体的辣根过氧化物酶标记; 制备免疫印迹试剂盒。检测时, 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。



1. 弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒,其特征在于设有载体板、硝酸纤维膜、弓形虫 IgM 抗体检测线、对照线,弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原,在对照线处包被人 IgM 抗体;辣根过氧化物酶标记抗人  $\mu$  链抗体。

2. 如权利要求 1 所述的弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒,其特征在于所述弓形虫重组抗原为 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2、GRA7,但不限于以上抗原。

3. 如权利要求 1 所述的弓形虫 IgM 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 所述的弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征包括以下步骤:

1) 制备弓形虫重组抗原

采用基因克隆技术,PCR 扩增编码弓形虫螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得弓形虫重组抗原;

2) 硝酸纤维素膜的点样

在硝酸纤维素膜 IgM 检测线上包被弓形虫重组抗原,在对照线处包被人 IgM 抗体,晾干;

3) 制备抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  链单克隆抗体

以人 IgM 特异性片段  $\mu$  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 IgM 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

4) 抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  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,弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上,在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原,在对照线处包被人 IgM 抗体,用切条机切成条状,与酶标记的抗人  $\mu$  链单克隆抗体及其底物共同组装成弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒。

5. 如权利要求 4 所述的弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征是在在步骤 1) 中,所述弓形虫重组抗原为 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2、GRA7。

6. 如权利要求 4 所述的弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征是在在步骤 2) 中,所述弓形虫重组抗原和人 IgM 抗体的浓度为  $1 \sim 4\text{mg/mL}$ ;点样量为  $1 \mu\text{L/cm}$ 。

7. 如权利要求 4 所述的弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征是在在步骤 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 所述的弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,其特征是在在步骤 4) 中,所述辣根过氧化物酶的底物按质量 / 体积百分比由  $0.03\%$  的过氧化氢和  $0.07\%$  的二氨基联苯胺组成。

## 弓形虫 IgM 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,尤其是涉及一种弓形虫 IgM 抗体检测免疫印迹试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 弓形虫病 (Toxoplasmosis) 是刚地弓形虫 (Toxoplasma gondii) 引起的一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病,其病原体弓形虫可寄生在人及多种动物的有核细胞内,人群及动物普遍易感。该病广泛分布于世界各地,据统计全球约有 10 亿人被弓形虫感染 ([1] 奚琳琳,李威. 弓形虫致病机理,毒力及基因型研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(11):859-861)。弓形虫病在我国分布很广泛,全国各省、市、自治区均有弓形虫感染的报道,我国正常人群平均感染率在 4%~9% 左右 ([2] 刘敏,陈晓光. 中国人群弓形虫病的流行特征分析 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2010,17(3):131-134),特殊人群如肿瘤患者、精神病患者、先天缺陷婴幼儿、免疫抑制、免疫缺陷患者感染率更高。所幸的是绝大多数免疫功能正常的成人或儿童被弓形虫感染后常无症状或仅有轻微症状,且多能自愈并获永久免疫力。但先天感染的胎儿、儿童以及免疫缺陷者被感染后,则预后极为严重。是造成艾滋病患者死亡的一个重要并发症。人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染者约有 20%~80% 合并弓形虫感染,更重要的是它也是造成人类先天畸形、缺陷、智力低下、死胎、早产的重要病原体之一。

[0003] 现有的弓形虫病的诊断方法包括直接从脏器、血液、脑脊液等组织分离弓形虫进行病原学诊断,需要几天甚至几周时间,费时费力,在实际应用中价值不大。临床上常规检测主要是应用各种血清学方法,检测其特异 IgG 和 IgM ([3] 周彬,张珏,王柯,等. 弓形虫 IgG 和 IgM 抗体双标记时间分辨荧光免疫分析的建立及其初步临床应用 [J]. 中华检验医学杂志,2010,33(010):957-959。),血清学方法可以诊断先天性、急性和慢性弓形虫病,但由于大多数免疫缺陷的人或动物其抗弓形虫的 IgG 滴度不会上升或不会出现高的 IgM 滴度,所以不能有效地用血清学方法对患有免疫缺陷的人或动物诊断弓形虫病。另外,在抗原消失相当长时间后血清抗体滴度才会逐步下降,所以也不能应用于治疗效果评价。目前检测 IgG 抗体存在较高的假阳性,而 IgM 抗体检测普遍灵敏度差等问题 ([4] 韩靖云,刘倩,郭健. 弓形虫感染实验室诊断的技术进展 [J]. 检验医学,2009,24(5):393-395。)。因此,对疾病的早期诊断帮助不大,急需建立一种具有高度敏感性,且价廉、快速、操作简单、不需特殊设备,更适合于临床的早期诊断方法。

[0004] 弓形虫病的诊断与流行病学调查主要依赖于血清学试验,正常人体感染弓形虫多为隐性感染,当机体免疫力下降时,虫体大量繁殖,侵入除红细胞外的各组织细胞内寄生,造成各种组织的广泛炎症,从而出现临床症状。人类感染弓形虫后能诱导产生特异性抗体。感染早期 IgM 抗体增高,IgM 在感染 4 个月后逐渐消失,在感染 1 个月后出现高浓度 IgG 抗体 ([5] KASPER D C, PRUSA A R, HAYDE M, et al. Evaluation of the vitros eciq immunodiagnostic system for detection of anti-toxoplasma immunoglobulin g

and immunoglobulin m antibodies for confirmatory testing for acute toxoplasma gondii infection in pregnant women[J]. Journal of clinical microbiology, 2009, 47(1) :164-168.)。因此,弓形虫 IgG 抗体是弓形虫病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弓形虫循环抗原。研究和诊断用的弓形虫循环抗原是以弓形虫感染小鼠腹腔获得,这种方法花费大、获得的抗原量少且不纯(常混有宿主蛋白),因此假阳性也时有发生。随着分子生物学技术的普及及弓形虫抗原的相继克隆,将重组抗原应用于弓形虫实验已经越来越多。目前研究比较多的弓形虫的表面抗原(SAG1(P30)、SAG2(P22)、SAG3(P43)、SAG4(P18))、虫体棒状体抗原(ROP1、ROP2)、致密颗粒蛋白(GRA1、GRA7)等([6]熊美华,王秀珍,刘露霞,等.弓形虫速殖子抗原的提取及蛋白分析[J].中国寄生虫病防治杂志,2001,14(3):237-238.)。采用重组 DNA 技术制备的重组抗原可以克服完整弓形虫抗原的缺点,能快速、经济地制备无限量特异重组弓形虫抗原。

[0006] 现有的弓形虫抗体检测方法包括 ELISA、Western-blot 等,其特异性均较高。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。面对严峻的防制形式,不但需要特异准确的检测手段,还需要一种更经济实用的试剂来筛查,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弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法。

[0008] 所述弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒设有载体板、硝酸纤维素膜、弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线;所述弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维素膜上;在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原,在对照线处包被入 IgM 抗体;辣根过氧化物酶标记抗人  $\mu$  链抗体。

[0009] 所述弓形虫重组抗原为 SAG1(P30)、SAG2(P22)、ROP2、GRA7 重组抗原。

[0010] 所述载体板可采用 PVC 板。

[0011] 所述弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 制备弓形虫重组抗原

[0013] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码弓形虫抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得弓形虫重组抗原;

[0014] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0015] 在硝酸纤维素膜 IgM 检测线上包被弓形虫重组抗原,在对照线处包被入 IgM 抗体,晾干;

[0016] 3) 制备抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  链单克隆抗体

[0017] 以人 IgM 特异性片段  $\mu$  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 IgM 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0018] 4) 抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  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,弓形虫 IgM 抗体检测线 and 对照线依次设在硝酸纤维膜上,在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原,在对照线处包被包被 IgM 抗体,用切条机切成条状,与酶标记的抗人  $\mu$  链单克隆抗体及其底物共同组装成弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒。

[0022] 在步骤 1)、2)、5) 中,所述弓形虫重组抗原为 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2、GRA7 等。

[0023] 在步骤 2) 中,所述弓形虫重组抗原和人 IgM 抗体的浓度可为 1 ~ 4mg/mL;点样量可为 1  $\mu$  L/cm。

[0024] 在步骤 3) 中,采用 ELISA 的方法鉴定 McAb 效价在 1 : 10<sup>7</sup> 以上。

[0025] 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。

[0026] 本发明提供了一种采用免疫印迹技术建立弓形虫 IgM 抗体检测试剂条,可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中弓形虫 IgM 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 为本发明所述弓形虫 IgM 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,H 为使用前的示意图,G 为无效试验 (产品质量问题),F 为阴性结果,A ~ E 为弓形虫 IgM 阳性结果;2 为弓形虫 SAG1 (P30)-IgM 抗体检测线,3 为弓形虫 SAG2 (P22)-IgM 抗体检测线,4 为弓形虫 ROP2-IgM 抗体检测线,5 为弓形虫 GRA7-IgM 抗体检测线,6 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,本发明所述弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒实施例设有载体板 1、弓形虫 IgM 抗体检测线 2 ~ 5,对照线 6 和硝酸纤维膜 (NC 膜) 7。

[0031] 硝酸纤维膜 7 粘贴在载体板 1 上表面,弓形虫 IgM 抗体检测线 2 ~ 5 和对照线 6 依次设在硝酸纤维膜 7 上;在弓形虫 IgM 抗体检测线处分别包被弓形虫重组抗原 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7,在对照线 6 处包被 IgM 抗体。

[0032] 所述载体板采用 PVC 板。

[0033] 所述弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0034] 1) 制备 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7 弓形虫重组抗原

[0035] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码弓形虫螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得弓形虫重组抗原 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7。

[0036] 2) 硝酸纤维素膜的点样

[0037] 在硝酸纤维素膜 IgM 检测线上包被 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7 弓形虫重组抗原,在对照线处包被 IgM 抗体,晾干。

[0038] 3) 制备抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  链单克隆抗体

[0039] 以人 IgM 特异性片段  $\mu$  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 IgM 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 IgM 特异性片段  $\mu$  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] 将硝酸纤维膜粘贴在载体板上表面,弓形虫 IgM 抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上;在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7,在对照线处包被人 IgM 抗体,用切条机切成条状,和酶标记的抗人  $\mu$  链单克隆抗体及其底物共同组装成弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒。

[0044] 以下给出采用弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒检测患者的临床标本:

[0045] 1) 标本采用  $0.01\text{mol/L}$  LPBS 缓冲液进行  $1 : 50$  稀释。

[0046] 2) 封闭:采用  $5\%$  脱脂奶粉 ( $0.01\text{mol/L}$  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  $30\text{min}$ 。

[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  $1.5\text{ml}$  已稀释样本。于室温 ( $18 \sim 25^\circ\text{C}$ ) 在摇摆摇床上温育  $30\text{min}$ 。

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

[0049] 5) 加酶结合物:在温育槽中加入  $1.5\text{ml}$  已稀释的酶结合物 (采用辣根过氧化物酶标记的抗人 IgM 特异性片段  $\mu$  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  $30\text{min}$ 。

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

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

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

[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,可辅助诊断弓形虫病 (见图 2)。

[0054] 以下给出弓形虫 IgM 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:用弓形虫 IgM 阳性的不同滴度的阳性参比血清各 50 份采用弓形虫 IgM 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 ELISA (进口试剂) 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,计算阴性符合率。阴性参比血清的确定采用 ELISA (进口试剂) 法确定的临床标本。

[0058] 4) 批内差异:同一批次弓形虫 IgM 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:不同批次弓形虫 IgM 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:采用本弓形虫 IgM 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,将弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒放置  $37^{\circ}\text{C}$  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,弓形虫 IgM 抗体检测线 and 对照线依次设在硝酸纤维膜上;在弓形虫 IgM 抗体检测线处包被弓形虫重组抗原 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7,在对照线处包被人 IgM 抗体,用切条机切成条状,和酶标记的抗人  $\mu$  链单克隆抗体及其底物共同组装成弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒。

[0066] 1) 标本采用  $0.01\text{mol/L}$  LPBS 缓冲液进行 1 : 50 稀释。

[0067] 2) 封闭:采用 5% 脱脂奶粉 ( $0.01\text{mol/L}$  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  $0.01\text{mol/L}$  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 IgM 特异性片段  $\mu$  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  $0.01\text{mol/L}$  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,可辅助诊断弓形虫病 (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 SAG2 (P22)、ROP2 和 GRA7 弓形虫重组抗原组成,不含有 SAG1 (P30) 弓形虫重组抗原。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 SAG1 (P30)、ROP2 和 GRA7 弓形虫重组抗原组成,不含有 SAG2 (P22) 弓形虫重组抗原。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 SAG1 (P30)、SAG2 (P22) 和 GRA7 重组抗原组成,不含有 ROP2 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 SAG1 (P30)、SAG2 (P22) 和 ROP2 弓形虫重组抗原组成,不含有 GRA7 弓形虫重组抗原。结果判断与实施例 1 相同。

[0083] 实施例 6

[0084] 与实施例 1 相似,其区别在于待检标本为脑脊液标本,结果判断与实施例 1 相同。

[0085] 实施例 7

[0086] 性能验证试验:按实施例 1 方案制备弓形虫 IgM 抗体免疫印迹试剂盒,再进行性能验证。

[0087] 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。

[0088] 2) 阳性标本符合率:用弓形虫 IgM 阳性的不同滴度的阳性参比标本各 50 份采用弓形虫 IgM 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 ELISA(进品试剂)法确定的临床标本。

[0089] 3) 阴性标本符合率:用 50 份阴性参比标本检定,计算阴性符合率。阴性参比标本的确定采用 ELISA(进品试剂)法确定的临床标本。

[0090] 4) 批内差异:同一批次弓形虫 IgM 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。

[0091] 5) 批间差异:不同批次弓形虫 IgM 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。

[0092] 6) 交叉反应:采用本弓形虫 IgM 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。

[0093] 7) 稳定性检测:应用 Arrhenius 法则,将弓形虫 IgM 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。



专利名称(译)	弓形虫IgM抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102435732A</a>	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201110279314.6	申请日	2011-09-19
[标]发明人	郭永炼 章家新 吴统健 陈桂美 曹凤玲 张长弓		
发明人	郭永炼 章家新 吴统健 陈桂美 曹凤玲 张长弓		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

弓形虫IgM抗体免疫印迹试剂盒及其制备方法，涉及一种试剂盒。试剂盒设有载体板、硝酸纤维膜、弓形虫IgM抗体检测线和对照线；所述弓形虫IgM抗体检测线和对照线依次设在硝酸纤维膜上；在弓形虫IgM抗体检测线处包被弓形虫重组抗原，在对照线处包被入IgM抗体；辣根过氧化物酶标记抗人 $\mu$ 链抗体。制备弓形虫重组抗原；硝酸纤维素膜的点样；制备抗人IgM特异性片段 $\mu$ 链单克隆抗体；抗人IgM特异性片段 $\mu$ 链单克隆抗体的辣根过氧化物酶标记；制备免疫印迹试剂盒。检测时，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。

