



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102608321 A

(43) 申请公布日 2012.07.25

(21) 申请号 201210051222.7

(22) 申请日 2012.02.29

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 刘凡 石松林 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 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

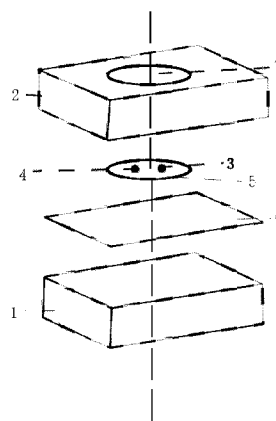
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒及制备方法

(57) 摘要

多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒及制备方法,涉及一种多房棘球绦虫循环抗原检测试剂。试剂盒设有检测板、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液,所述检测板设有载体介质、微孔滤膜、吸水介质、多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点。制备多房棘球绦虫循环抗原;制备抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体;制备胶体金;胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记;制备斑点金免疫渗滤试剂盒。可用于全血、血清、血浆等标本中多房棘球绦虫循环抗原的检测。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. 多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,其特征在于设有检测板、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液,所述检测板设有载体介质、微孔滤膜、吸水介质、多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点;所述多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点依次设在微孔滤膜上;在多房棘球绦虫循环抗原检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18,将点样的微孔滤膜固定于吸水介质上,然后放入载体介质内,所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜相对的通孔;所述载体介质包括底板和扣于底板上的盖板,盖板上开设有正对微孔滤膜的通孔。

2. 如权利要求 1 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,其特征在于所述载体介质采用 PVC 板;所述微孔滤膜可采用硝酸纤维膜,所述微孔滤膜的孔径可为 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$;所述吸水介质可采用以纤维素为主要成分 of 纸。

3. 如权利要求 1 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 制备多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18;

2) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 和 EM18 的单克隆抗体,具体方法如下:

(1) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 的单克隆抗体;

(2) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM18 的单克隆抗体;

(3) 将抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体混合;

3) 硝酸纤维素膜的点样

在多房棘球绦虫循环抗原检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18,烘干;

4) 制备胶体金

采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金,具体方法为: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;

5) 胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记;

6) 制备含 0.5% Tween20 的 10mmol/L pH7.4 磷酸缓冲盐溶液作为洗涤液;

7) 制备多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,具体方法如下:

多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点依次设在微孔滤膜上;在检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18;将点样的微孔滤膜固定于吸水介质上、然后放入载体介质内,所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜相对的通孔;装有微孔滤膜的载体介质为检测板;检测板、金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液共同组成多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒。

4. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述制备多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18 的具体方法为:采用基因克隆技术,PCR 扩增编码多房棘球绦虫抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得多房棘球绦虫重组抗原 EM2 和 EM18。

5. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其

特征在于在步骤 2) 第 (1) 部分中,所述制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 的单克隆抗体的具体方法是:将重组抗原 EM2 与等体积弗氏完全佐剂混合免疫小鼠,免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞经细胞融合,筛选分泌高滴度抗体的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存;采用有限稀释法克隆杂交瘤细胞,小鼠腹腔注射阳性杂交瘤细胞;待小鼠腹部明显隆起时,采集腹水,离心取上清,无菌过滤,亲和层析纯化腹水获 EM2 单克隆抗体。

6. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 2) 第 (2) 部分中,所述制备多房棘球绦虫重组抗原 EM18 的单克隆抗体的具体方法是:将重组抗原 EM18 与等体积弗氏完全佐剂混合免疫小鼠,免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞经细胞融合,筛选分泌高滴度抗体的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存;采用有限稀释法克隆杂交瘤细胞,小鼠腹腔注射阳性杂交瘤细胞;待小鼠腹部明显隆起时,采集腹水,离心取上清,无菌过滤,亲和层析纯化腹水获 EM18 单克隆抗体。

7. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 2) 第 (3) 部分中,所述抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体按体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合。

8. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 2) 第 (3) 部分中,所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的终浓度为 1 ~ 4mg/mL;两者点样量为 $1 \mu\text{L}/\text{mm}^3$;所述抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体浓度为 1 ~ 4mg/mL。

9. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 3) 中,所述烘干的温度为 37°C ;在步骤 4) 中,所述柠檬酸三钠的浓度可为 2%。

10. 如权利要求 3 所述的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 5) 中,所述胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记的具体方法如下:

(1) 取胶体金 10mL,用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4,加 100 μg 抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体,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 PBS 稀释至 1mL,得胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体;

(2) 取胶体金 10mL,用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4,加 100 μg 抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体,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 PBS 稀释至 1mL,得胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体;

(3) 将胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体混合,所述抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体混合以体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合。

多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多房棘球绦虫循环抗原检测试剂,尤其是涉及一种采用胶体金免疫渗滤技术 (immunofiltration) 进行的多房棘球绦虫循环抗原免疫渗滤检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 泡状棘球蚴病 (Alveolar echinococcosis, AE) 是由棘球绦虫属的多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em) 幼虫寄生所致的人畜共患寄生虫病,在我国主要分布于内蒙、新疆、西藏、甘肃、宁夏、青海和四川西部等广大牧区,是我国目前主要防治的寄生虫病之一。该病被认为是最致命的蠕虫感染病,是世界性最危险的“人畜共患病”之一。人因摄入棘球绦虫虫卵而被感染,继而幼虫在患者肝部呈多泡状、肿瘤样浸润迁移生长,迅速破坏肝实质细胞,最终导致肝功能不全或丧失,并伴有肺、脑等重要器官转移,确诊后 10 年内患者的死亡率高达 90% 以上 ([1]Filippou D., Tselepis D., Filippou G. and Papadopoulos V. *Advances in Liver Echinococcosis: Diagnosis and Treatment. Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2007, 5 (2) :152-159.)。该病的有效治疗目前仍然主要为外科手术,而术后复发率高是 AE 防治的一大难题。因而,在注重早期诊断和治疗的同时,加强对泡状棘球蚴病患者疗效的监测、病情转归消长的监测以及控制疾病的复发同样具有重要意义。

[0003] 目前主要使用影像学检查,以及酶联免疫吸附实验 (ELISA) 和蛋白质印迹 (Western blotting) 等免疫学试验对 AE 患者进行诊断和病情监测 ([2]Brunetti E, Kern P, Vuitton D A. *Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans*[J]. *Acta tropica*, 2010, 114 (1) :1-16)。影像学检查常使一些非典型和体积较小的病灶与肝癌和肝脓肿等相混淆 ([3] 张宽, 王会革, 黄山, 等. 肝泡状棘球蚴病的 CT 诊断 [J]. *实用放射学杂志*, 2011, 27 (7) :1117-1119), 而免疫学诊断具有快速、敏感、特异和价廉等优点,因此目前被广泛应用于该病的临床诊断和流行病学调查。但由于免疫学诊断所用抗原种类和质量等因素的影响,往往缺乏敏感性和特异性,与细粒棘球绦虫、猪囊尾蚴及其他寄生虫的抗原存在交叉反应,因此寻找高度敏感、特异的检测方法一直是 AE 诊断及防治的研究热点。目前运用于诊断的重组抗原多以检测多抗为主,然而基于多抗的免疫学检测方法的特异性和敏感性均有待提高 ([4]Carmena D, Benito A, Eraso E. *The immunodiagnosis of Echinococcus multilocularis infection. Clin. Microbiol. Infect.* 2007, 13 :460-475)。

[0004] 寄生虫循环抗原 (circulating antigen, CAg) 是指生活虫体排放到宿主体液内的大分子微粒,主要是排泄分泌物或脱落物中具有抗原特性,并且能被血清免疫学试验所检出的物质。由于循环抗体在患者治疗后仍能长期存在,故不能区别现症感染和既往感染,不宜作疗效考核之用。一般认为检测 CAg 能提示有活动性感染存在,可用于判断现症患者及评价疗效等,因此 CAg 成为一种诊断靶抗原。随着对寄生虫 CAg 研究的不断深入,认识到它

在寄生虫病发生发展和病理生理中的作用和地位,对 CAg 的研究内容已扩展到消长、转归等规律性探索,从而对其在免疫病理和免疫调节机制中的作用有所认识。早期的血清学方法使用多房棘球绦虫粗提物作为抗原,与其他病原体(如细粒棘球蚴)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,将重组抗原应用于多房棘球绦虫实验已经越来越多,目前研究比较多的多房棘球绦虫抗原有 EM2、EM4、EM10、EM13、EM16 等,采用重组 DNA 技术制备的重组抗原可以克服多房棘球绦虫粗提物的缺点,能快速、经济地制备无限量特异重组多房棘球绦虫抗原([5] 李文桂,陈雅棠. 多房棘球绦虫 em18 研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报 ISTIC, 2009, 25(1):56-57)。建立一种简便快捷的试剂来筛查,对 AE 患者 CAg 的检测不仅可以辅助循环抗原检测对疾病进行诊断,而且对疾病治疗的疗效考核和病情监测具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒及制备方法。

[0006] 所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒设有检测板、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液,所述检测板设有载体介质、微孔滤膜、吸水介质、多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点;所述多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点依次设在微孔滤膜上;在多房棘球绦虫循环抗原检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18,将点样的微孔滤膜固定于吸水介质上,然后放入载体介质内,所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜相对的通孔;所述载体介质包括底板和扣于底板上的盖板,盖板上开设有正对微孔滤膜的通孔,以便于加样。

[0007] 所述载体介质可采用 PVC 板等。

[0008] 所述微孔滤膜可采用硝酸纤维素膜等,所述微孔滤膜的孔径可为 0.1 ~ 0.5 μm 。

[0009] 所述吸水介质可采用以纤维素为主要成分的纸等。

[0010] 所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0011] 1) 制备多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18;

[0012] 2) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 和 EM18 的单克隆抗体,具体方法如下:

[0013] (1) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 的单克隆抗体;

[0014] (2) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM18 的单克隆抗体;

[0015] (3) 将抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体混合;

[0016] 3) 硝酸纤维素膜的点样

[0017] 在多房棘球绦虫循环抗原检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18,烘干;

[0018] 4) 制备胶体金

[0019] 采用柠檬酸三钠还原方法制备 25nm 胶体金,具体方法为: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;

- [0020] 5) 胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记；
- [0021] 6) 制备含 0.5% Tween20 的 10mmol/L pH7.4 磷酸缓冲盐溶液作为洗涤液；
- [0022] 7) 制备多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒, 具体方法如下：
- [0023] 多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点依次设在微孔滤膜上；在检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体, 在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18；将点样的微孔滤膜膜固定于吸水介质上、然后放入载体介质内, 所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜相对的通孔；装有微孔滤膜的载体介质为检测板；检测板、金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液共同组成多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒。
- [0024] 在步骤 1) 中, 所述制备多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18 的具体方法可为：采用基因克隆技术, PCR 扩增编码多房棘球绦虫抗原的 DNA, 并插入大肠杆菌中使其表达, 得多房棘球绦虫重组抗原 EM2 和 EM18。
- [0025] 在步骤 2) 第 (1) 部分中, 所述制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 的单克隆抗体的具体方法是：将重组抗原 EM2 与等体积弗氏完全佐剂混合免疫小鼠, 免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞经细胞融合, 筛选分泌高滴度抗体的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存；采用有限稀释法克隆杂交瘤细胞, 小鼠腹腔注射阳性杂交瘤细胞；待小鼠腹部明显隆起时, 采集腹水, 离心取上清, 无菌过滤, 亲和层析纯化腹水获 EM2 单克隆抗体；
- [0026] 在步骤 2) 第 (2) 部分中, 所述制备多房棘球绦虫重组抗原 EM18 的单克隆抗体的具体方法是：将重组抗原 EM18 与等体积弗氏完全佐剂混合免疫小鼠, 免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞经细胞融合, 筛选分泌高滴度抗体的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存；采用有限稀释法克隆杂交瘤细胞, 小鼠腹腔注射阳性杂交瘤细胞；待小鼠腹部明显隆起时, 采集腹水, 离心取上清, 无菌过滤, 亲和层析纯化腹水获 EM18 单克隆抗体；
- [0027] 在步骤 2) 第 (3) 部分中, 所述抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体可按体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合；所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的终浓度为 1 ~ 4mg/mL；两者点样量为 $1 \mu\text{L}/\text{mm}^2$ ；所述抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体浓度可为 1 ~ 4mg/mL。
- [0028] 在步骤 3) 中, 所述烘干的温度可为 37℃。
- [0029] 在步骤 4) 中, 所述柠檬酸三钠的浓度可为 2%。
- [0030] 在步骤 5) 中, 所述胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记的具体方法如下：
- [0031] (1) 取胶体金 10mL, 用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4, 加 100 μg 抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体, 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 PBS 稀释至 1mL, 得胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体；
- [0032] (2) 取胶体金 10mL, 用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4, 加 100 μg 抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体, 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 PBS 稀释至 1mL, 得胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体；
- [0033] (3) 将胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体混合, 所述抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘

球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体混合以体积比 1 : (0.2 ~ 5) 混合。

[0034] 本发明采用胶体金免疫渗滤技术建立多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,可用于全血、血清和血浆等标本中多房棘球绦虫循环抗原的检测。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。

附图说明

[0035] 图 1 为本发明所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒中检测板的组装示意图。

[0036] 图 2 为本发明所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒实施例的结构组成示意图。

[0037] 图 3 为实验结果模式示意图。在图 3 中,(1) 为使用前的示意图,(2) 为无效试验(产品质量问题),(3) 多房棘球绦虫循环抗原阴性,(4) 多房棘球绦虫循环抗原阳性。

具体实施方式

[0038] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0039] 本发明所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒设有载体介质、微孔滤膜、吸水介质、检测点、对照点、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液。

[0040] 参见图 1 和 2,所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒实施例设有检测板 8、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体 9 和洗涤液 10,所述检测板 8 设有载体介质(包括底板 1 和扣于底板上的盖板 2)、微孔滤膜 5、吸水介质 6、多房棘球绦虫循环抗原检测点 3 和对照点 4;所述多房棘球绦虫循环抗原检测点 3 和对照点 4 依次设在微孔滤膜 5 上;在多房棘球绦虫循环抗原检测点 3 处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点 4 处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18,将点样的微孔滤膜 5 固定于吸水介质 6 上,然后放入载体介质内,所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜 5 相对的通孔;所述载体介质包括底板 1 和扣于底板上的盖板 2,盖板 2 上开设有正对微孔滤膜 5 的通孔,以便于加样。检测板 8、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体 9 和洗涤液 10 共同构成多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒。

[0041] 所述载体介质可采用 PVC 板等。

[0042] 所述微孔滤膜可采用硝酸纤维膜等,所述微孔滤膜的孔径可为 0.1 ~ 0.5 μm 。

[0043] 所述吸水介质可采用以纤维素为主要成分的纸等。

[0044] 所述多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0045] 1) 制备多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18

[0046] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码多房棘球绦虫抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得多房棘球绦虫重组抗原 EM2 和 EM18。

[0047] 2) 制备多房棘球绦虫重组抗原 EM2 和 EM18 的单克隆抗体

[0048] 将重组抗原 EM2 与等体积弗氏完全佐剂混合免疫小鼠,免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞经细胞融合,筛选分泌高滴度抗体的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存。采用有限稀释法克隆杂交瘤细胞。小鼠腹腔注射阳性杂交瘤细胞。待小鼠腹部明显隆

起时,采集腹水,离心取上清,无菌过滤,亲和层析纯化腹水获 EM2 单克隆抗体。

[0049] 多房棘球绦虫重组抗原 EM18 的单克隆抗体的制备同以上方法。

[0050] 3) 硝酸纤维素膜的点样

[0051] 在检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18,晾干;

[0052] 4) 制备胶体金

[0053] 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;

[0054] 5) 胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记

[0055] 取胶体金 10mL,用 0.1mol/L NaOH 调至 pH5.4,加 100 μg 抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体,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 PBS 稀释至 1mL,得胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体;

[0056] 抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 的单克隆抗体的制备同以上方法;

[0057] 6) 洗涤液制备

[0058] 制备含 0.5% Tween20 的 10mmol/L pH7.4 磷酸缓冲盐溶液作为洗涤液;

[0059] 7) 制备多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒

[0060] 多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点依次设在微孔滤膜上;在检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在对照点处包被多房棘球绦虫抗原 EM2 和 EM18。将点样的微孔滤膜膜固定于吸水介质上、然后放入载体介质内,所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜相对的通孔;装有微孔滤膜的载体介质为检测板;检测板、金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液共同组成多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒。

[0061] 以下给出斑点金免疫渗滤法检测患者的临床标本:

[0062] 1) 平衡:向反应孔中滴加 1 滴洗涤液以平衡检测膜;

[0063] 2) 加样:取待测样本加入反应孔,以使待测样本中的抗原与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体结合,并等待液体向下渗滤并被吸水纸吸收;

[0064] 3) 洗涤:向反应孔中滴加 4 滴洗涤液,以清晰薄膜,并等待液体向下渗滤并被吸水纸吸收;

[0065] 4) 加金标抗体:向反应孔中滴加 1 滴金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,使其上的标记物识别抗原,并等待液体向下渗滤并被吸水纸吸收;

[0066] 5) 洗涤:向反应孔中滴加 4 滴洗涤液,以清晰薄膜,并等待液体向下渗滤并被吸水纸吸收;

[0067] 结果判断:参见图 3,通过目测读取试验结果,只在多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒检测板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。

[0068] 以下给出多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒的性能检定:

[0069] 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。

[0070] 2) 阳性标本符合率:用多房棘球绦虫阳性的不同滴度的阳性参比血清各 50 份采用多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒检定,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。

[0071] 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。

[0072] 4) 批内差异:同一批次多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,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。

[0073] 5) 批间差异:不同批次多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,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。

[0074] 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。

[0075] 7) 交叉反应:采用本多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒,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。

[0076] 8) 稳定性检测:应用 Arrhenius 法则,将多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒放置 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。

[0077] 以下给出具体实施例。

[0078] 实施例 1

[0079] 在硝酸纤维膜检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,在检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,将点样的微孔滤膜膜固定于吸水介质上、然后放入载体介质内组装成检测板,所述载体介质的一侧开有与微孔滤膜相对的通孔,制备成的胶体金免疫渗滤检测板,密封室温保存备用。其中,抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体浓度为 1mg/mL ,是将抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体以体积比 1 : 1 混合;羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的终浓度为 1mg/mL ;两者点样量为 $1\mu\text{L}/\text{mm}^3$;

[0080] 将胶体金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体和抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体浓度为 1mg/mL ,以体积比 1 : 1 混合后,制备成金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体,装瓶备用。

[0081] 制备含 0.5% Tween20 的 10mmol/L pH7.4 磷酸缓冲盐溶液作为洗涤液,装瓶备用。

[0082] 胶体金免疫渗滤检测板、金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液共合组成多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒。

[0083] 向反应孔中滴加 1 滴洗涤液以平衡检测膜;取待检标本血清 $50\mu\text{L}$ 加样于多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤检测板加样区;待液体吸收后,滴加 4 滴洗涤液;待液体吸收后,向反应孔中滴加 1 滴金标记的抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体;最后再滴加 4 滴洗涤液后观察结果。只在多房棘球绦虫循环抗原检测板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。

[0084] 实施例 2

[0085] 与实施例 1 相似，区别在于硝酸纤维膜检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体仅由抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体组成，不含有抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体。结果判断与实施例 1 相同。

[0086] 实施例 3

[0087] 与实施例 1 相似，区别在于硝酸纤维膜检测点处包被抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体仅由抗多房棘球绦虫循环抗原 EM18 单克隆抗体组成，不含有抗多房棘球绦虫循环抗原 EM2 单克隆抗体。结果判断与实施例 1 相同。

[0088] 实施例 4

[0089] 性能验证试验：按实施例 1 的方案制备多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒，然后进行性能验证。

[0090] 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。

[0091] 2) 阳性标本符合率：用多房棘球绦虫阳性的不同滴度的阳性参比血清各 50 份采用多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒检定，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。

[0092] 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。

[0093] 4) 批内差异：同一批次多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒，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。

[0094] 5) 批间差异：不同批次多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒，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。

[0095] 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。

[0096] 7) 交叉反应：采用本多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒，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。

[0097] 8) 稳定性检测：应用 Arrhenius 法则，将多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒放置 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。

[0098] 本发明所制备的多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒，均可用于全血、血清和血浆等标本中多房棘球绦虫循环抗原的检测，标本用量微小，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。

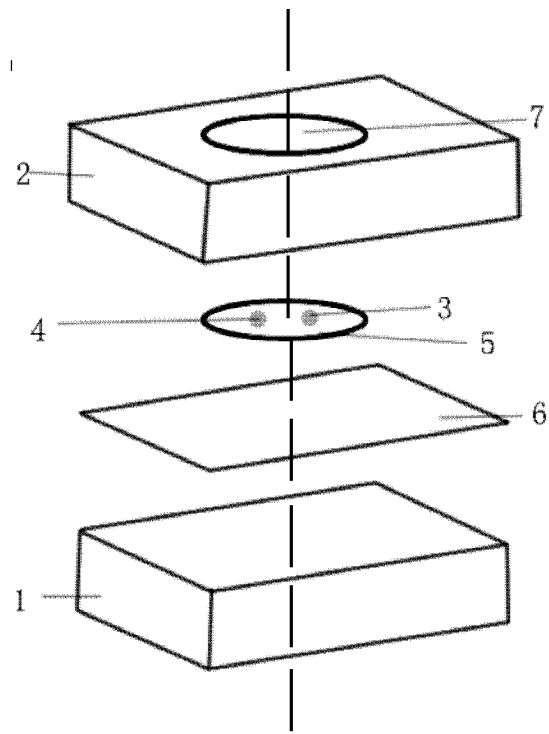


图 1

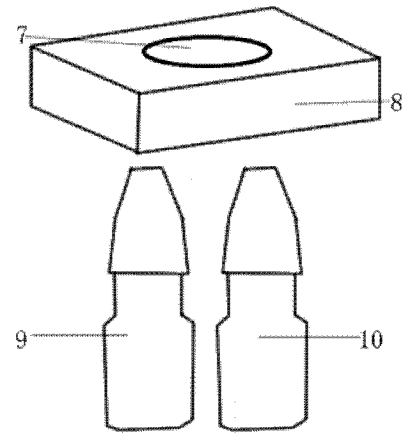


图 2

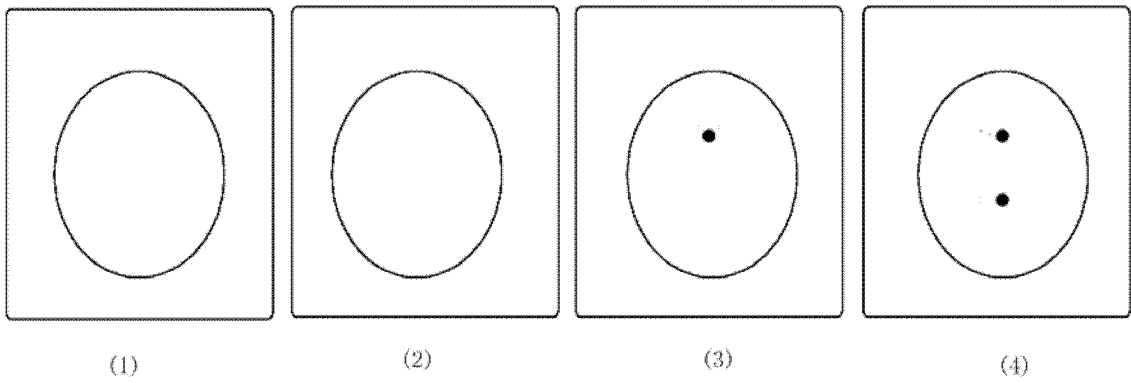


图 3

专利名称(译)	多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN102608321A	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201210051222.7	申请日	2012-02-29
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	刘凡 石松林 林丽蓉		
发明人	刘凡 石松林 林丽蓉		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532		
其他公开文献	CN102608321B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

多房棘球绦虫循环抗原斑点金免疫渗滤试剂盒及制备方法，涉及一种多房棘球绦虫循环抗原检测试剂。试剂盒设有检测板、金标记抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体和洗涤液，所述检测板设有载体介质、微孔滤膜、吸水介质、多房棘球绦虫循环抗原检测点和对照点。制备多房棘球绦虫循环抗原；制备抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体；制备胶体金；胶体金与抗多房棘球绦虫循环抗原的抗体的标记；制备斑点金免疫渗滤试剂盒。可用于全血、血清、血浆等标本中多房棘球绦虫循环抗原的检测。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。

