



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103175967 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 26

(21) 申请号 201310068826. 7

(22) 申请日 2013. 03. 05

(71) 申请人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市大学东  
路 100 号

(72) 发明人 陈汉忠 李晓栩 王华俊

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务所有  
限责任公司 45104

代理人 王素娥

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

### (54) 发明名称

一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联  
免疫吸附测定试剂盒及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种检测大片形吸虫抗原的双  
抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方  
法,由包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板、兔抗大  
片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体、辣根过氧化  
物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 和显色底物 3'.3'.5,  
5'-四甲基联苯胺组成。上述试剂盒的制备方法  
有以下工艺步骤:(1)制备包被有 7D1 单克隆抗  
体的多孔板;(2)制备兔抗大片形吸虫 ES 抗原多  
克隆抗体;(3)配备辣根过氧化物酶标记羊抗兔  
IgG+IgM 和显色底物 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺。

1. 一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在于,所述试剂盒由包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板、兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 和显色底物 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺组成,

其中:

所述多孔板每孔包被 7D1 单克隆抗体浓度为 8.0-24.0  $\mu$ g/mL;

所述兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体,用大片吸虫分泌排泄抗原免疫家兔,免疫剂量为 1mg/只,间隔 2 周免疫一次,共免疫 4 次,最后一次免疫后第 15 天,经耳静脉采血并分离血清,用间接酶联免疫吸附测定法检测抗体效价,效价达到 1:10000 以上时,通过心脏采血,分离血清,用辛酸-硫酸铵法粗提多克隆抗体,于 -80℃ 保存备用。

2. 一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒制备方法,其特征在于,操作步骤如下:

(1) 制备包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板

用碳酸盐缓冲液即包被液将 7D1 单克隆抗体稀释为浓度 12.0  $\mu$ g/mL 的稀释液,然后将所述 7D1 单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,加入量为 100  $\mu$ L/孔,置于 4℃ 条件下包被至少 12 小时,包被时间届满后,将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液加入多孔板的各孔内,加入量为 100  $\mu$ L/孔,并在 37℃ 条件下进行封闭反应,封闭反应时间至少 1 小时以上,封闭反应结束后,用磷酸盐缓冲液洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板,其保存温度为 4℃;其中,所述包被液为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93g,加双蒸水定容至 1000mL,在 4℃ 条件下保存备用;所述磷酸盐缓冲液为  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{KCl}$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.58g, Tween-20 0.5mL,加双蒸水定容至 1000mL;

所述多孔板为市售酶标专用多孔板商品,可直接从市场购买;

(2) 制备兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体

用大片吸虫分泌排泄抗原免疫家兔,免疫剂量为 1mg/只,间隔 2 周免疫一次,共免疫 4 次,最后一次免疫后第 15 天,经耳静脉采血并分离血清,用间接酶联免疫吸附测定法检测抗体效价,效价达到 1:10000 以上时,通过心脏采血,分离血清,用辛酸-硫酸铵法粗提多克隆抗体,于 -80℃ 保存备用,使用时,用磷酸盐缓冲液作 1:10000 倍稀释;

(3) 配备辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 和显色底物 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺。

## 一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定 试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于寄生虫病免疫诊断、检测技术的测定试剂盒及制备方法,具体是一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 病是一种人畜共患寄生虫病,主要流行于我国南方地区以及东南亚广大地区,每年都给人畜带来严重的危害,尤其给水牛等家畜造成巨大损失;2011 年我国云南宾川爆发人群大片吸虫病,由于缺乏有效的诊断监测方法,造成重大疫情,共有 20 多人感染发病。目前该病的检测、诊断方法主要有:(1)传统的粪便虫卵检查法,该法简便、不需要昂贵仪器设备,但检出率低,且不能进行早期诊断;(2)分子生物学检测方法,如聚合酶链反应(PCR)法,该法灵敏度高,但需要特殊昂贵的仪器,操作复杂、容易出现假阳性结果;(3)免疫学检测方法,免疫学的检测方面很多,有检抗体的,也有检抗原的,检抗体的如间接酶联免疫吸附试验,这种方法只能检测到循环抗体,但不能区分现症感染和既往感染,因此不能对疫病做出准确的诊断;也有一些检抗原的方法,但其包被的往往是多抗,其制备复杂、稳定性、特异性差。本发明建立的检测方法利用我们制备和筛选鉴定的大片形吸虫的特异 7D1 单克隆抗体,其抗体可大量的制备、单抗质量容易控制,因此可进一步提高检测方法的稳定性、灵敏度和特异性。本法可用于大片形吸虫病检测、诊断,早期诊断和药物治疗评价等。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,为临床提供一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法,可进一步提供大片形吸虫病检测的敏感度、特异性和准确性。

[0004] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0005] 1. 一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,所述试剂盒由包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板、兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 和显色底物 3',3',5,5'-四甲基联苯胺组成。

[0006] 其中:

[0007] 所述多孔板每孔包被 7D1 单克隆抗体浓度为 8.0-24.0  $\mu$ g/mL。

[0008] 所述兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体,用大片吸虫分泌排泄抗原免疫家兔,免疫剂量为 1mg/只,间隔 2 周免疫一次,共免疫 4 次,最后一次免疫后第 15 天,经耳静脉采血并分离血清,用间接酶联免疫吸附测定法检测抗体效价。效价达到 1:10000 以上时,通过心脏采血,分离血清,用辛酸-硫酸铵法粗提多克隆抗体,于 -80℃ 保存备用。

[0009] 2. 一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒制备方法,操作步骤如下:

[0010] (1) 制备包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板

[0011] 用碳酸盐缓冲液即包被液将 7D1 单克隆抗体稀释为浓度  $12.0 \mu\text{g/mL}$  的稀释液,然后将所述 7D1 单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,加入量为  $100 \mu\text{L/孔}$ ,置于  $4^\circ\text{C}$  条件下包被至少 12 小时,包被时间届满后,将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液加入多孔板的各孔内,加入量为  $100 \mu\text{L/孔}$ ,并在  $37^\circ\text{C}$  条件下进行封闭反应,封闭反应时间至少 1 小时以上,封闭反应结束后,用磷酸盐缓冲液洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板,其保存温度为  $4^\circ\text{C}$ 。其中,所述包被液为  $\text{Na}_2\text{CO}_3 1.59\text{g}$ ,  $\text{NaHCO}_3 2.93\text{g}$ ,加双蒸水定容至  $1000\text{mL}$ ,在  $4^\circ\text{C}$  条件下保存备用;所述磷酸盐缓冲液为  $\text{NaCl} 8.0\text{g}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.2\text{g}$ ,  $\text{KCl} 0.2\text{g}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} 3.58\text{g}$ , Tween-20  $0.5\text{mL}$ ,加双蒸水定容至  $1000\text{mL}$ 。

[0012] 所述多孔板为市售酶标专用多孔板商品,可直接从市场购买。

[0013] (2) 制备兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体

[0014] 用大片吸虫分泌排泄抗原免疫家兔,免疫剂量为  $1\text{mg/只}$ ,间隔 2 周免疫一次,共免疫 4 次,最后一次免疫后第 15 天,经耳静脉采血并分离血清,用间接酶联免疫吸附测定法检测抗体效价。效价达到  $1:10000$  以上时,通过心脏采血,分离血清,用辛酸-硫酸铵法粗提多克隆抗体,于  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。使用时,用磷酸盐缓冲液作  $1:10000$  倍稀释;

[0015] (3) 配备辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 和显色底物  $3',3',5,5'$ -四甲基联苯胺。

[0016] 所述辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 和显色底物  $3',3',5,5'$ -四甲基联苯胺均为市售商品,可直接从市场购买。

[0017] 本发明所述试剂盒及制备方法中,7D1 单克隆抗体本质上为蛋白质,能特异识别大片形吸虫 ES (分泌排泄)抗原,所述 7D1 单克隆抗体的制备方法见:抗大片吸虫分泌排泄抗原单克隆抗体的制备及生物学活性的鉴定,南方农业学报 2012 年 43 卷第 9 期。

[0018] 本发明所述检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,检测标本为血清、胆汁、乳液、粪液,所需仪器为酶标仪,使用方法如下:

[0019] 在包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板的孔中加入待检样品, $37^\circ\text{C}$  反应 1 小时后,洗涤液洗涤 3 次除去未反应物,加入兔抗大片形吸虫 ES (分泌排泄)抗原多克隆抗体 (IgG) 稀释液, $37^\circ\text{C}$  作用 1 小时后洗涤除去未反应物,然后向所述多孔板的孔中加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 稀释液, $37^\circ\text{C}$  反应 45 分钟后,用  $3',3',5,5'$ -四甲基联苯胺显色,显色时间为 20 分钟,用酶标仪测所述多孔板各孔的  $\text{OD}_{450}$  值。

[0020] 本发明具有以下有益效果:

[0021] 1. 本发明使用的识别大片形吸虫抗原的单克隆抗体 7D1 是我们从制备的多个单克隆抗体中筛选鉴定出来的,因此使本发明所述试剂盒检测大片吸虫特异性效果更好。

[0022] 2. 使用本发明所述试剂盒进行大片吸虫检测,操作简单,一个样品的检测只需 5 个小时左右。与传统虫卵检测方法相比,使用本发明所述试剂盒可以进行早期诊断,而且具有更高的检测灵敏度。

[0023] 3. 与常用的间接酶联免疫吸附法相比,使用本发明所述试剂盒,能区分现症感染和既往感染,能做出是否感染大片形吸虫的直接判断,还可用于临床大片吸虫治疗效果的评价。

## 具体实施方式

[0024] 下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0025] 下述实施例中涉及的材料来源和制备方法如下：

[0026] 7D1 单克隆抗体的制备方法见：抗大片吸虫分泌排泄抗原单克隆抗体的制备及生物学活性的鉴定，南方农业学报 2012 年 43 卷第 9 期；

[0027] 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 购自北京中杉金桥生物技术有限公司产品；

[0028] 显色底物 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺、牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品；

[0029] 其余常规试剂为国产分析纯级产品；

[0030] 各种试液配制：

[0031] 包被缓冲液配制  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1.59g,  $\text{NaHCO}_3$ 2.93g, 加双蒸水定容至 1000mL, 4℃ 保存；

[0032] 洗涤缓冲液配制  $\text{NaCl}$ 18.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2g,  $\text{KCl}$ 0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58g, Tween-200.5mL, 加双蒸水定容至 1000mL。

[0033] 封闭液配制牛血清白蛋白 1.0g, 加洗涤液定容至 100mL。

[0034] 底物缓冲液配制  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68g, 柠檬酸 0.93g, 加双蒸水定容至 100mL。

[0035] 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺使用液配制 TMB10mg, 加入 5mL 无水乙醇溶解。

[0036] 显色液配制 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺使用液 0.5mL, 底物缓冲液 10mL, 0.75% $\text{H}_2\text{O}_2$ 32  $\mu\text{L}$ 。

[0037] 终止液配制浓硫酸 22.2mL, 蒸馏水 177.8mL。

[0038] 多孔板为市售 96 孔的多孔板。

[0039] 实施例 1

[0040] 本实施例中, 采用以下工艺步骤制备检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0041] (1) 制备包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板

[0042] 用碳酸缓冲液将 7D1 单克隆抗体稀释为浓度 12.0  $\mu\text{g/mL}$  的稀释液, 然后将所述 7D1 单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内, 在 4℃ 包被至少 12 小时; 包被时间届满后, 将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液加入多孔板上的各孔, 冰在 37℃ 进行封闭反应, 反应时间至少 1 小时; 封闭反应结束后, 用磷酸盐缓冲液洗涤多孔板, 当多孔板上的未反应物被去除后, 即获得包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板, 其保存温度为 4℃ (一般在 4℃ 冰箱保存备用)。

[0043] (2) 制备兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体

[0044] 用大片吸虫分泌排泄抗原免疫家兔, 免疫剂量为 1mg/只, 间隔 2 周免疫一次, 共免疫 4 次, 最后一次免疫后第 15 天, 经耳静脉采血并分离血清, 用间接酶联免疫吸附测定法检测抗体效价。效价达到 1 : 10000 以上时, 通过心脏采血, 分离血清, 用辛酸-硫酸铵法粗提多克隆抗体, 于 -80℃ 保存备用。使用时, 用磷酸盐缓冲液作 1 : 10000 倍稀释。

[0045] (3) 用磷酸缓冲液配备 1:8000 的辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM20000  $\mu\text{L}$ 。

[0046] (4) 用底物缓冲液配制 3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺底物显色液 20000  $\mu\text{L}$ 。

[0047] 用本实施例制备的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒对大片

形吸虫抗原和阴性血清进行检测,操作如下:

[0048] 将大片形吸虫抗原和阴性血清用磷酸盐缓冲液稀释成表 1 中的稀释倍数;用碳酸缓冲液将 7D1 单克隆抗体稀释为浓度  $12.0 \mu\text{g/mL}$  的稀释液;将兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体,用磷酸盐缓冲液作 1 : 10000 倍稀释;将辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 用磷酸盐缓冲液按 1:8000 稀释。空白对照为磷酸盐缓冲液。

[0049] 向包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入不同稀释倍数的大片吸虫抗原、血清和对照磷酸盐缓冲液(PBS)。加入量为每孔  $100 \mu\text{L}$ 。在  $37^\circ\text{C}$  反应 1 小时后,用洗涤液洗涤 3 次除去未反应物,加入兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体稀释液,  $37^\circ\text{C}$  作用 1. 小时后洗涤除去未反应物, 然后向所述多孔板的孔中加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG+IgM 稀释液,  $37^\circ\text{C}$  反应 45 分钟后,再洗涤 3 次,加入新鲜配制的 TMB 底物,显色,  $37^\circ\text{C}$  显色时间为 20 分钟,加入终止液  $50 \mu\text{L}$ /孔终止反应,用酶标仪测所述多孔板各孔的  $\text{OD}_{450}$  值。

[0050] 表 1 检测结果

[0051]

大片吸虫抗原 稀释倍数	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	PBS 空 白值 对照
大片吸虫抗原	1.067	1.022	1.040	0.337	0.135	0.118	0.117	0.114	$0.096 \pm$
$\text{OD}_{450}$ 值	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	0.001
	0.028	0.034	0.037	0.027	0.006	0.009	0.011	0.004	
阴性血清	0.093	0.094	0.088	0.092	0.097	0.087	0.093	0.097	$0.074 \pm$
$\text{OD}_{450}$ 值	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	0.001
	0.007	0.005	0.011	0.006	0.002	0.007	0.010	0.004	

[0052] 从表 1 的检测结果可以看出随着检测标本中大片吸虫抗原浓度的降低,  $\text{OD}_{450}$  值也随之降低。

[0053] 实施例 2

[0054] 判断检测样本中大片吸虫抗原阴阳临界值 ( $\text{OD}_{450}$  平均值) 的确定。按照实施例 1 所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测操作方法,向包被有 7D1 单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入阴性血清、阳性对照血清和空白对照(PBS, 同上)检测样品,检测 10 份阴性血清样本,以及阳性对照血清和空白对照,每份重复 3 孔,结果见表 2,计算其  $\text{OD}_{450}$  的平均值及标准方差。阴阳性临界值 = 阴性样本  $\text{OD}_{450}$  平均值 +  $3 \times$  标准方差。经计算阴性血清  $\text{OD}_{450}$  平均值 ( $\bar{X}$ ) = 0.08427, 标准方差 ( $S$ ) = 0.015252。所以,阴阳性临界值 =  $0.08427 + 3 \times 0.015252 = 0.130$  因此把判断检测样本中大片吸虫抗原阴阳临界值定为 0.130。用所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测样本时,在阴阳对照成立的情况下,  $\text{OD}_{450}$  大于 0.130 就可以判定为大片吸虫抗原阳性,否则,判为阴性。

[0055] 表 2 阴性血清、阳性对照血清  $\text{OD}_{450}$  值测定结果

[0056]

血清样品	平均值	血清样品	平均值
1	$0.085 \pm 0.004$	6	$0.092 \pm 0.016$
2	$0.092 \pm 0.004$	7	$0.110 \pm 0.001$
3	$0.085 \pm 0.011$	8	$0.049 \pm 0.004$
4	$0.074 \pm 0.001$	9	$0.084 \pm 0.002$
5	$0.085 \pm 0.006$	10	$0.086 \pm 0.001$
空白对照 Blank	$0.049 \pm 0.004$	阳性对照 Positive	$1.501 \pm 0.089$

[0057] 实施例 3

[0058] 对大片性吸虫抗原的特异性检测验证测定。按照实施例 1 所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测方法,检测大片吸虫 ES 抗原、胰阔盘吸虫分泌排泄抗原、前后盘吸虫分泌排泄抗原、伊氏锥虫表面糖蛋白抗原、弓形虫抗原、旋毛虫抗原和泰勒虫抗原,并用 SP2/0 细胞(骨髓瘤细胞)作阴性对照,进行特异性验证测定,结果见表 3。

[0059] 从表 3 的结果可以看出,几个稀释倍数的大片吸虫分泌排泄抗原的  $OD_{450}$  值都在 0.130 (阴阳临界值) 以上,而胰阔盘吸虫分泌排泄抗原、前后盘吸虫分泌排泄抗原、伊氏锥虫表面糖蛋白抗原、弓形虫抗原、旋毛虫抗原和泰勒虫抗原检测到的  $OD_{450}$  值都远低于阴阳临界值,证明用所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测胰阔盘吸虫分泌排泄抗原、前后盘吸虫分泌排泄抗原、伊氏锥虫表面糖蛋白抗原、弓形虫抗原、旋毛虫抗原和泰勒虫抗原时,不与这些抗原发生交叉反应,说明所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒具有良好的检测特异性。

[0060] 表 3 双抗体夹心 ELISA 特异性检测结果

[0061]

抗原稀释倍数	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$
大片吸虫 ES 抗	1.067±	1.040±	0.337±	0.135±
原 OD <sub>450</sub> 值	0.028	0.037	0.027	0.006
阴性对照 OD <sub>450</sub>	0.094±	0.090±	0.085±	0.083±
值	0.007	0.009	0.001	0.002
阔盘吸虫抗原	0.087±	0.085±	0.090±	0.089±
OD <sub>450</sub> 值	0.004	0.002	0.003	0.002
前后盘吸虫抗原	0.097±	0.087±	0.093±	0.093±
OD <sub>450</sub> 值	0.017	0.006	0.009	0.004
伊氏锥虫抗原	0.091±	0.087±	0.092±	0.099±
OD <sub>450</sub> 值	0.003	0.006	0.003	0.006
弓形虫抗原	0.115±	0.090±	0.085±	0.089±
OD <sub>450</sub> 值	0.034	0.009	0.005	0.006
泰勒虫抗原	0.082±	0.083±	0.082±	0.086±
OD <sub>450</sub> 值	0.008	0.005	0.003	0.006
旋毛虫抗原	0.090±	0.091±	0.092±	0.079±
OD <sub>450</sub> 值	0.004	0.003	0.082	0.003

[0062] 实施例 4

[0063] 采集 84 份广西南宁水牛、黄的牛血清,按照实施例 1 所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测方法检测这些临床血清样本,结果见表 4。

[0064] 从表 4 检测结果可知,按照实验确定的阴阳临界 OD<sub>450</sub> 值(见实施例 2)为 0.130,实验的阴阳对照和空白对照成立,在所检测的血清 84 份中,有 26 份的 OD<sub>450</sub> 值大于 0.130,因此判断为阳性。结果:临床样本血清抗原阳性检出率为 30.95%,检测数据结果见表 4。

[0065] 表 4 检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测临床血清样本结果

[0066]



血清样品	OD <sub>450</sub> 值	血清样品	OD <sub>450</sub> 值	血清样品	OD <sub>450</sub> 值	血清样品	OD <sub>450</sub> 值
阳性	1.378±0.072	22	<b>0.130±0.005</b>	46	<b>0.168±0.019</b>	70	0.100±0.008
阴性	0.083±0.006	23	0.087±0.007	47	0.090±0.009	71	<b>0.136±0.006</b>
空白	0.085±0.002	24	0.093±0.022	48	0.093±0.015	72	0.096±0.008
<b>1</b>	<b>0.144±0.013</b>	25	0.097±0.021	49	0.099±0.013	73	0.094±0.008
<b>2</b>	<b>0.136±0.006</b>	26	<b>0.146±0.007</b>	50	0.106±0.013	<b>74</b>	<b>0.139±0.008</b>
3	0.108±0.001	27	0.087±0.015	51	0.092±0.010	75	0.111±0.002
4	0.115±0.012	28	0.094±0.004	52	0.091±0.042	76	0.095±0.006
<b>5</b>	<b>0.138±0.010</b>	29	0.084±0.003	53	0.093±0.045	77	0.102±0.015
6	0.090±0.003	30	<b>0.160±0.016</b>	54	0.096±0.007	78	0.107±0.006
7	0.097±0.003	31	0.098±0.001	55	0.096±0.010	79	0.096±0.006
8	0.085±0.001	32	0.097±0.009	<b>56</b>	<b>0.139±0.010</b>	80	0.107±0.010
9	0.098±0.004	33	0.091±0.008	57	0.122±0.005	81	0.107±0.023
10	0.093±0.003	34	0.071±0.004	<b>58</b>	<b>0.136±0.009</b>	82	0.112±0.003
11	0.096±0.003	35	0.096±0.003	<b>59</b>	<b>0.136±0.009</b>	83	0.097±0.005
12	0.104±0.006	36	<b>0.193±0.023</b>	<b>60</b>	<b>0.172±0.015</b>	84	0.097±0.022
13	0.111±0.020	37	<b>0.132±0.010</b>	<b>61</b>	<b>0.173±0.011</b>		
14	0.091±0.010	38	<b>0.182±0.009</b>	<b>62</b>	<b>0.136±0.016</b>		
<b>15</b>	<b>0.133±0.010</b>	39	<b>0.153±0.028</b>	63	0.108±0.009		
16	0.087±0.011	40	0.088±0.002	64	0.103±0.016		
<b>17</b>	<b>0.149±0.022</b>	41	0.087±0.002	65	0.122±0.005		
18	0.096±0.003	42	<b>0.136±0.013</b>	<b>66</b>	<b>0.156±0.038</b>		
19	0.098±0.006	43	<b>0.200±0.014</b>	<b>67</b>	<b>0.140±0.007</b>		
20	0.089±0.008	44	0.091±0.005	68	0.121±0.003		
21	0.098±0.014	45	<b>0.160±0.042</b>	69	0.084±0.009		

专利名称(译)	一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103175967A</a>	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201310068826.7	申请日	2013-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学		
申请(专利权)人(译)	广西大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学		
[标]发明人	陈汉忠 李晓栩 王华俊		
发明人	陈汉忠 李晓栩 王华俊		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	王素娥		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法，由包被有7D1单克隆抗体的多孔板、兔抗大片形吸虫分泌排泄抗原多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG+IgM和显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺组成。上述试剂盒的制备方法有以下工艺步骤：（1）制备包被有7D1单克隆抗体的多孔板；（2）制备兔抗大片形吸虫ES抗原多克隆抗体；（3）配备辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG+IgM和显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺。