



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108663509 A

(43)申请公布日 2018.10.16

(21)申请号 201710477921.0

(22)申请日 2017.06.16

(71)申请人 江苏诺磊生物科技有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城口
泰路东侧、新阳路北侧G47幢三层办公
区

(72)发明人 何丹

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

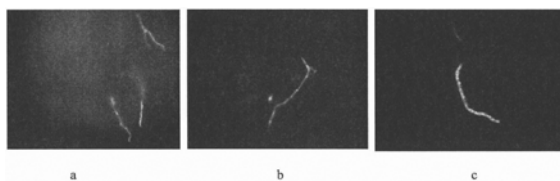
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种标记真菌的免疫显色试剂

(57)摘要

本发明公开了一种能够标记真菌的免疫显色试剂,包括水、盐、结合蛋白、特异性抗体,荧光素、促溶剂以及背景复染剂。本发明产品通过优化配方,能够实现一步法快速染色,并且缩短了染色时间,临床使用更加方便、快捷,大大提高真菌的检测效率。



1. 一种标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於包括水、盐、结合蛋白、特异性抗体、荧光素、促溶剂以及背景复染剂。所述盐为无机盐,所述结合蛋白为有特异结合能力的蛋白,所述抗体为羊抗兔多克隆抗体,所述荧光素为二苯乙烯类型荧光增白剂,所述促溶剂为水溶性有机溶剂。

2. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述荧光素为双三嗪氨基二苯乙烯类型荧光增白剂。

3. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述盐为氯化钾或氯化钠。

4. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述结合蛋白为 β -D-葡聚糖结合蛋白。

5. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述抗体为抗 β -D-葡聚糖结合蛋白的多克隆抗体。

6. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述背景复染剂选自溴酚蓝、百里酚蓝,溴甲酚蓝、溴百里酚蓝、台酚蓝、伊文思蓝中的一种或几种。

7. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述促溶剂为二甲基亚砷。

8. 如权利要求1所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於包括水、 β -D-葡聚糖结合蛋白、羊抗兔多克隆抗体、氯化钾、荧光素、伊文思蓝和二甲基亚砷。

9. 如权利要求1-6任一项所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於还包括保湿剂。

10. 如权利要求7所述的标记真菌的免疫显色试剂,其特征在於所述保湿剂选自甘油,丙二醇,丁二醇中的一种或几种。

一种标记真菌的免疫显色试剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学诊断技术领域,具体涉及一种标记真菌的免疫显色试剂。

背景技术

[0002] 真菌广泛分布于自然界,绝大多数对人类无害甚至有益,但其中400余种可引起人类疾病,亦即为我们所称致病性真菌。致病真菌可分为皮肤癣菌、酵母菌和霉菌。真菌引起的疾病称为真菌病,临床上真菌病可分为浅部真菌病和深部真菌病或系统性真菌病。浅部真菌病由只侵犯人体皮肤、毛发和甲等浅表组织的真菌引起。在我国90%以上的真菌病属于浅部真菌病。引起系统性真菌病的病原真菌包括组织胞浆菌、芽生菌、球孢子菌和副球孢子菌,这些都是双相真菌,在自然界中以霉菌形态菌如隐球菌属、念珠菌属、曲霉属等均可致严重的系统感染。

[0003] 随着器官移植的大量开展及免疫抑制剂、肿瘤患者化疗药物的广泛使用,糖皮质激素类固醇激素的长期使用,体腔内有创检查的大量开展,人口老龄化和糖尿病等慢性疾病患者的增多,真菌病的发病率和死亡率在逐年增加,对人类健康的危害日趋严重。然而,作为条件致病真菌及大自然中原本认为不致病的真菌种类,近年发现在逐年上升,由于对很多真菌感染的微生物学特性了解甚少,因而出现临床诊治的困难,加之真菌感染的临床表现多种多样,故通常会出现临床的误诊漏诊,导致患者病情迁延甚至危及生命。面对这种现状,如何真菌病的诊断水平已成为国内外临床工作者们共同关心的热点问题,解决这一问题的关键在于提高实验室的真菌鉴定水平。尽管分子生物学等非培养技术的迅猛发展,目前仍缺乏早期快速的诊断方法,这些都给真菌病的预防和诊治带来挑战。因此,逐步开展临床致病真菌检测的研究对于临床上致病真菌的快速诊断及早期针对性的用药具有深刻的指导意义。

临床常见的用于真菌检测的方法包括镜检法、培养法和组织病理学方法等。

[0004] 1.直接镜检法:直接涂片镜检是一种常用、简便而迅速的真菌检测方法,对真菌感染的诊断具有重要意义。直接涂片镜检是将所取标本直接置于玻片上,用染色或加10%KOH溶液,在光镜下检查。但是真菌与组织细胞之间的反差不大,鉴别真菌非常困难,还需要进一步培养鉴定。另外,直接镜检阴性也不能排除真菌感染的可能性。

[0005] 2.分离培养方法:从临床标本中对致病菌进行培养,目的在于从临床标本中分离真菌,以确定是否有真菌感染,特别是在直接镜检为阴性时。从疑似患者身上采集的标本可以直接接种在培养基上。一般培养超过2周仍无真菌生长,可报告阴性。培养法虽然检测结果准确性高,但由于真菌生长缓慢,培养常需要数天甚至数周才有结果,常会延误患者病情。

[0006] 3.组织病理学检查:真菌病的组织病理检查与直接镜检法和培养法同样具有相当重要的价值,尤其对于深部真菌病的诊断意义更大。通过病理组织的检查可确立感染的存在,排除真菌学检查中出现的污染等现象,PAS染色、嗜银染色、黏蛋白卡红染色及阿尔辛蓝染色等可有助于组织中真菌的检测。然而,组织病理学染色只能确定部分真菌种属,适用范

围受到限制。

[0007] 4. 化学发光法：通过使用化学荧光增白剂，与组织样品的 β -多糖物质相结合，如纤维素、几丁质等。在荧光显微镜的紫外激发光下呈现荧光。该方法操作简单，敏感度高，但特异性差，非真菌物质也能着色，如植物纤维等。且背景杂光多。

发明内容

[0008] 本发明针对现有技术不足，研发出一种单剂型的真菌免疫显色试剂。本发明产品稳定性好，只需一步操作即可完成染色，临床使用更加方便、快捷，大大提高真菌的检测效率。

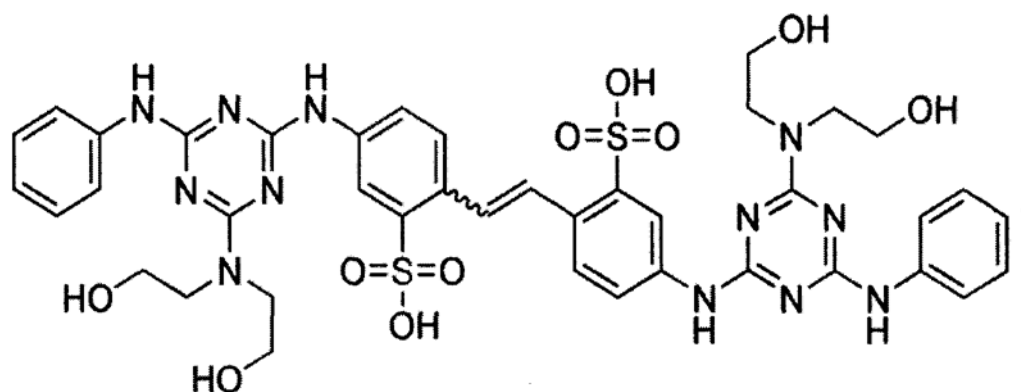
[0009] 本发明具体技术方案如下：

一种标记真菌的免疫显色试剂，包括水、盐、结合蛋白、抗体、荧光素、促溶剂以及背景复染剂。

[0010] 本发明所述标记真菌的免疫显色试剂还可以进一步包括保湿剂。

[0011] 本发明所述荧光增白剂选自二苯乙烯类型荧光增白剂，优选双三嗪氨基二苯乙烯类型荧光增白剂，更优选荧光增白剂28。优选荧光增白剂的浓度为0.1%–5% (W/V)。

[0012] 荧光增白剂28结构如下所示：



[0013] 本发明所述盐为无机盐，优选氯化钾或氯化钠。优选碱的浓度为0.5%–1.0% (W/V)，更优选0.9% (W/V)。

[0014] 本发明所述结合蛋白为特异性结合蛋白，优选 β -D-葡聚糖结合蛋白，优选浓度为0.01%–0.08% (W/V)。

[0015] 本发明所述抗体为抗 β -D-葡聚糖结合蛋白的抗体，优选羊抗兔多克隆抗体，优选浓度为0.01%–0.1% (W/V)。

[0016] 本发明所述背景复染剂为实验室常规使用的染料，优选酚蓝类染料或蓝色偶氮类染料，更优选溴酚蓝、百里酚蓝、溴甲酚蓝、溴百里酚蓝、台酚蓝、伊文思蓝中的一种或几种，优选背景染料的浓度为0.1%–3% (W/V)。

[0017] 本发明所述促溶剂选自水溶性有机溶剂，优选二甲基亚砜。促溶剂的作用是染料的溶解度和稳定性。优选促溶剂的浓度为25–30% (V/V)。

[0018] 本发明所述保湿剂选自甘油，丙二醇，丁二醇中的一种或几种，优选甘油。保护剂的作用是增加免疫显色试剂溶液整体保湿度以及折光度，提高反差，从而使得染色更为清晰。优选保护剂的浓度为10–20% (V/V)。

[0019] 本发明将盐、结合蛋白、荧光素、促溶剂以及背景复染剂混合配制，通过添加促溶

剂、保湿剂,使得染色溶液能够长期稳定放置,使原本需要多步操作的检测方法能够实现快速一步染色,并且缩短了染色时间。临床使用更加方便、快捷,大大提高真菌的检测效率。

附图说明

[0020] 图1为本发明试剂1、试剂2、试剂3的皮屑标本的染色结果(a为试剂1的染色结果,b为试剂2的染色结果,c为试剂3的染色结果)。

[0021] 图2为本发明试剂1、试剂2、试剂3的白带标本的染色结果(a为试剂1的染色结果,b为试剂2的染色结果,c为试剂3的染色结果)。

[0022] 图3为本发明试剂1、试剂2、试剂3的组织切片的染色结果(a为试剂1的染色结果,b为试剂2的染色结果,c为试剂3的染色结果)。

具体实施方案

[0023] 以下通过实施例说明本发明的具体步骤,但不受实施例限制。

[0024] 在本发明中所使用的术语,除非另有说明,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0025] 下面结合具体实施例并参照数据进一步详细描述本发明。应理解这些实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0026] 在以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0027] 实施例1 真菌免疫显色试剂的配制

试剂1:将荧光增白剂28溶于浓度为1.0% (W/V) 氯化钾的溶液中,溶解充分,使荧光增白剂染料的浓度为0.2% (W/V),加入伊文思蓝染料和二甲基亚砷,伊文思蓝染料的浓度为0.2% (W/V),二甲基亚砷浓度为20% (V/V)。

[0028] 试剂2:

将荧光增白剂28溶于浓度为1.0% (W/V) 氯化钾的溶液中,溶解充分,使荧光增白剂28的浓度为0.2% (W/V),加入伊文思蓝染料、二甲基亚砷和甘油,使伊文思蓝染料的浓度为1% (W/V),二甲基亚砷浓度为20% (V/V),甘油浓度为25% (V/V)。

[0029] 试剂3:

将荧光增白剂28溶于浓度为1.0% (W/V) 氯化钾的溶液中,溶解充分,使荧光增白剂28的浓度为0.2% (W/V),加入伊文思蓝染料、二甲基亚砷、甘油和 β -D-葡聚糖结合蛋白,羊抗兔多克隆抗体,使伊文思蓝染料的浓度为1% (W/V),二甲基亚砷浓度为20% (V/V),甘油浓度为25% (V/V), β -D-葡聚糖结合蛋白浓度为0.05% (W/V),羊抗兔多克隆抗体的浓度为0.01% (W/V)。

[0030] 实施例2 皮屑标本的染色

选取3份真菌感染的皮屑标本,分别放置于载玻片上,分别用试剂1,2,3进行染色染色2分钟,加上盖玻片,将多余的染料用纸吸掉,而后在荧光显微镜下观察。用340nm-380nm的紫外光激活,真菌将显示出蓝色或蓝绿色。结果显示所有的试剂都能将皮屑标本中的真菌染色。但试剂1效果最差,且显色时间短,而试剂3效果最好,且显色时间长。

[0031] 表1

	试剂1	试剂2	试剂3
--	-----	-----	-----

染色效果	差	较差	好
显色时间	短	较长	长

[0032] 实施例3白带标本的染色

选取3份真菌感染的白带标本,用棉签分别涂于载玻片上,分别用试剂1,2,3进行染色2分钟,加上盖玻片,在荧光显微镜下观察。用340nm-380nm的紫外光激活,真菌将显示出蓝色或蓝绿色。结果显示所有的试剂都能将白带标本中的真菌染色。但试剂1效果最差,且显色时间短,而试剂3效果最好,且显色时间长。

[0033] 表2

	试剂1	试剂2	试剂3
染色效果	差	较差	好
显色时间	短	较长	长

[0034] 实施例4切片标本的染色

选取三份石蜡包埋的切片标本,脱蜡后分别用试剂1、2、3进行染色,室温放置2分钟,加上盖玻片,在荧光显微镜下观察。用340nm-380nm的紫外光激活,真菌将显示出蓝色或蓝绿色。结果显示所有的试剂都能将切片标本中的真菌染色。但试剂1效果最差,且显色时间短,而试剂3效果最好,且显色时间长。

[0035] 表3

	试剂1	试剂2	试剂3
染色效果	差	较差	好
显色时间	短	较长	长

[0036] 实施例5溶液稳定性考察

将试剂1的A液和B液的进行混合。将试剂1的混合液和试剂2,试剂3放置于室温6个月,然后对皮屑进行染色。从染色效果判断试剂的稳定性。结果如表3所示。

[0037] 表3

	试剂1	试剂2	试剂3
染色效果	差	较好	好
沉淀	无	无	无
外观颜色	不变	不变	不变

[0038] 结果表明,室温放置放置6个月后,试剂1、试剂2、试剂3外观颜色均不变,无沉淀结晶现象,试剂能保持稳定。试剂1染色效果最差,而试剂3效果最好。

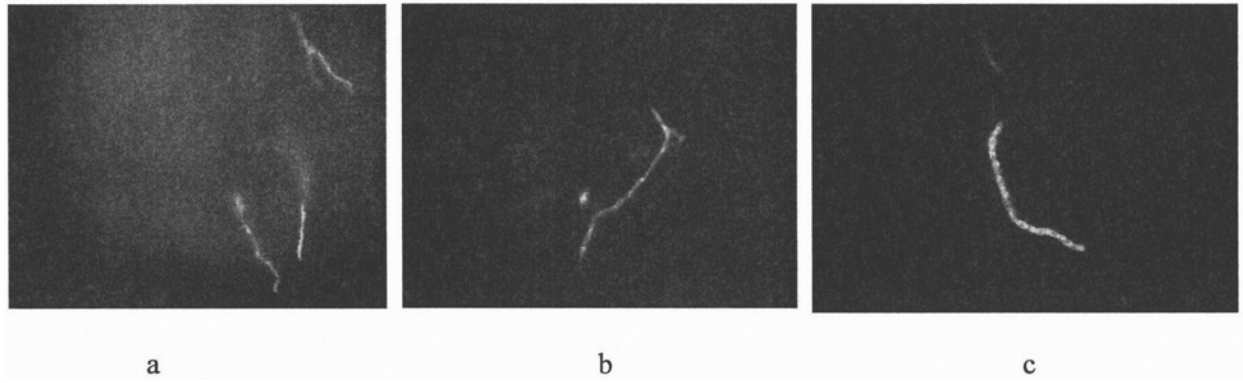


图1

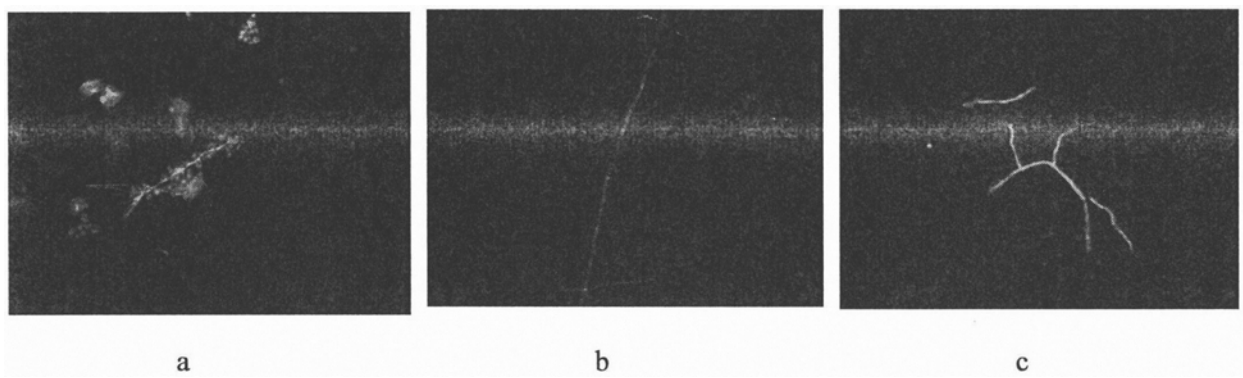


图2

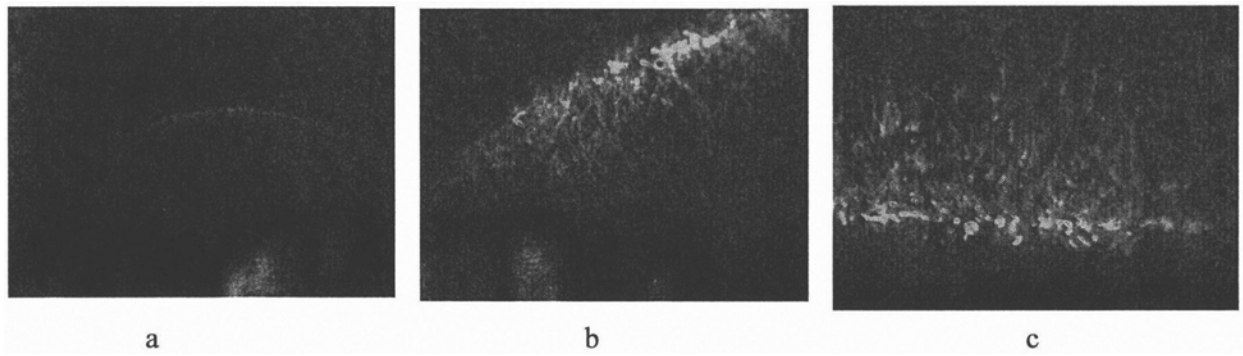


图3

专利名称(译)	一种标记真菌的免疫显色试剂		
公开(公告)号	CN108663509A	公开(公告)日	2018-10-16
申请号	CN2017110477921.0	申请日	2017-06-16
[标]发明人	何丹		
发明人	何丹		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种能够标记真菌的免疫显色试剂，包括水、盐、结合蛋白、特异性抗体，荧光素、促溶剂以及背景复染剂。本发明产品通过优化配方，能够实现一步法快速染色，并且缩短了染色时间，临床使用更加方便、快捷，大大提高真菌的检测效率。

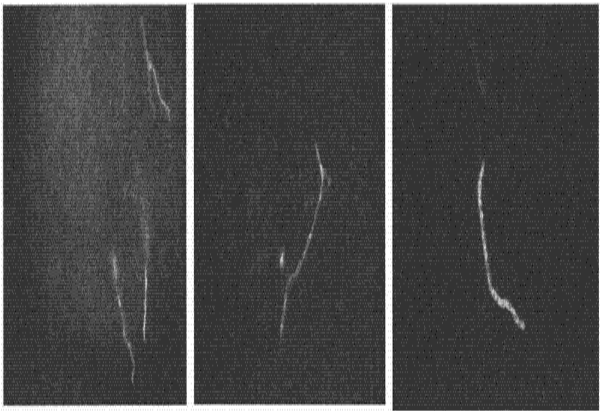


Figure 1: Fluorescence microscopy images of fungal structures stained with the immunofluorescent reagent. (a) shows a long, thin, curved structure. (b) shows a similar structure with more detail. (c) shows a shorter, thicker structure. All images show bright fluorescence against a dark background.