

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/548

G01N 33/532



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510049091.9

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1664585A

[22] 申请日 2005.2.7

[21] 申请号 200510049091.9

[71] 申请人 浙江省医学科学院

地址 310013 浙江省杭州市西湖区天目山路  
182 号

[72] 发明人 沈丽英 闻礼永 丁建祖 张剑锋  
陈军虎 俞丽玲

[74] 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公司  
代理人 林宝堂

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测  
试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及以可溶性日本血吸虫虫卵抗原为点  
样抗原,采用胶体金标记金色葡萄球菌 A 蛋白,检  
测家畜血吸虫抗体的试剂盒及制备方法。本发明将  
血吸虫病诊断与纳米金标记蛋白技术相结合,建立  
一种新型、高效快速检测家畜日本血吸虫病的方法—斑点金免疫渗滤法,依此方法所研制的家畜血  
吸虫病诊断试剂盒,其结果敏感性强,特异性高,  
判断快速、准确,操作简洁、方便,不需要特殊仪  
器设备仅用肉眼即可鉴别,便于基层单位和检疫部  
门使用。实验验证,该方法检测牛血吸虫病敏感性  
达 93.3%,特异性达 98.0%,约登指数 = 0.913。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒，含有渗滤测定装置，抗原点样膜，标记物，洗脱液，其特征在于：所述的抗原点样膜是点有日本血吸虫可溶性虫卵抗原的硝酸纤维素膜；所述的标记物为胶体金标记A蛋白结合物；所述的洗脱液是pH7.4 0.05M Tris-HCl缓冲液；在所述的抗原和标记物之间采用连接抗体搭桥。

2、根据权利要求1所述的家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒，其特征在于：所述的连接抗体是兔抗家畜血清球蛋白。

3、根据权利要求1所述的家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒，其特征在于：所述的胶体金标记A蛋白结合物为胶体金溶胶加一定量金色葡萄球菌A蛋白加体积比为1%的小牛血清白蛋白，并在每毫升标记物中加0.2-0.5mg聚乙二醇；优选为0.5mg聚乙二醇。

4、根据权利要求1所述的家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒，其特征在于：所述的洗脱液是pH7.4，克分子浓度为0.05M的Tris-HCl缓冲液，加Triton X-100，加叠氮钠。

5、一种家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒的制备方法，其特征在于：

A. 抗原点样膜制备

a. 日本血吸虫可溶性虫卵抗原的制备

健康家兔经肤人工感染日本血吸虫尾蚴，42天后，取兔肝经各目筛子净化虫卵，丙酮脱脂干燥后研成粉末，用生理盐水配制成质量体积比为1%溶液，然后反复冻融，超声处理，低温高速离心，取上清液；

b. 抗原膜制备

取孔径为0.45 $\mu$ m的硝酸纤维素膜，划成1cm $\times$ 1cm的小方格，在小方格中央点1 $\mu$ l质量体积比为1%的日本血吸虫可溶性虫卵抗原，室温凉干后密封，于4 $^{\circ}$ C保存备用；

## B. 连接抗体制备

### a. 健康家畜血清球蛋白提取

分别采用饱和硫酸铵盐析法提纯家畜血清中的 IgG;

### b. 高免兔抗家畜抗血清的制备

采用等量多点免疫法免疫家兔, 以健康家畜血清球蛋白作为抗原, 每次 2mg, 加等量福氏完全佐剂, 采用足垫内及皮内多点注射, 先后免疫三次, 当免疫血清双扩散试验效价达 1:32 以上时从免疫兔心脏采血, 分离血清, 低温保存;

## C. 胶体金标记 A 蛋白结合物的制备

### a. 胶体金溶胶的制备

采用鞣酸-枸橼酸钠还原法;

### b. 胶体金标记金色葡萄球菌 A 蛋白-SPA 探针的制备

用克分子浓度 0.1 M  $K_2CO_3$ , 将胶体金溶胶的 pH 值调至 9.0, 然后进行最适蛋白稳定量的测定, 标记时采用最小蛋白用量来达到与胶体金的充分结合, 然后加适量聚乙二醇高速离心, 取沉淀浓缩。

## 家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒及制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种寄生虫病快速免疫诊断试剂盒,尤其涉及以可溶性日本血吸虫虫卵抗原为点样抗原,采用胶体金标记金色葡萄球菌 A 蛋白检测家畜血吸虫抗体的试剂盒及制备方法。

### 背景技术

血吸虫病是发展中国家的主要寄生虫病,据世界卫生组织(WHO)1993年估算,全世界有31亿人口的74个国家和地区流行此病,流行区人口6亿,其中2亿人受感染,每年死于该病者达百万人之多。我国血吸虫病主要流行于长江流域及其以南的12个省、自治区、直辖市,流行地区多为农业生产的重要基地,人口密集,严重地危害着人民群众健康和经济发展。WHO血吸虫病专家委员会认为全球控制血吸虫病的总策略是减少疾病的危害,而不是消灭。我国目前实行大规模化疗和大规模灭螺的防治措施,因此血吸虫病诊断方法的改进和创新,对化疗对象的确立、减少浪费和耐药性的产生意义重大。相关流行病学资料表明,血吸虫病的保虫宿主除人外,尚有近40种哺乳动物,特别是以耕牛、羊、猪为主要传染源的家畜及其粪便,在江滩湖沼地区、山丘地区的血吸虫病流行中起着举足轻重的作用,因此针对家畜血吸虫病所采取的诊断和治疗措施显得十分必要。现有技术对家畜血吸虫病的查病方法,主要是病原学查病和血清学查病,病原学方法主要采用粪便毛蚴孵化法检查,其特异性高,可用于确诊牛、羊等家畜,但操作费时费工,敏感性低,漏检率高(可达81.8%),不适于中低度流行区的家畜诊断。血清学方法具有较高的敏感性和特异性,可减少漏检,弥补粪检不足之处,包括环卵沉淀试验(COPT)、间接血凝试验

(IHA)、胶乳凝集试验(COPS)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、单克隆抗体斑点酶联免疫吸附试验等,但上述方法操作较繁琐,费时较多,有的还需要一定仪器,使之在临床快速诊断、动物快速检疫和血吸虫病筛查方面应用受限,难以推广至基层单位。

### 发明内容

本发明的目的:主要是解决现有技术所存在的不足,从而提供一种具有高敏感性和特异性,无需借助仪器即可快速诊断牛血吸虫病的金标免疫快速检测试剂盒及制备方法。

本发明的上述技术问题主要是通过下述技术方案得以解决的:

家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒,

含有渗滤测定装置,抗原点样膜,标记物,洗脱液,其特征在于:所述的抗原点样膜是点有日本血吸虫可溶性虫卵抗原的硝酸纤维素膜;所述的标记物为胶体金标记 A 蛋白结合物;所述的洗脱液是 pH7.4 0.05M Tris-HCl 缓冲液;在所述的抗原和标记物之间采用连接抗体搭桥。

本发明的技术方案还可以进一步完善,作为优选,所述的连接抗体是兔抗家畜血清球蛋白。采用连接抗体,有利于提高牛、羊、猪等家畜血清与胶体金的亲和力。

作为优选,所述的胶体金标记 A 蛋白结合物为胶体金溶胶,加一定量金色葡萄球菌 A 蛋白,加体积比为 1%的小牛血清白蛋白,并在每毫升标记物中加 0.2-0.5mg 聚乙二醇;优选为 0.5mg 聚乙二醇。

作为优选,所述的洗脱液是 pH 7.4,克分子浓度为 0.05M 的 Tris-HCl 缓冲液,加体积比为 1.0%的 Triton X-100,加质量体积比为 0.1-0.5%的叠氮钠。所述的 Triton X-100 即聚乙二醇辛基苯基醚。

家畜血吸虫抗体金标免疫快速检测试剂盒的制备方法

A 抗原膜制备

a. 日本血吸虫可溶性虫卵抗原的制备

健康家兔经肤人工感染日本血吸虫尾蚴，42 天后，取兔肝经各目筛子净化虫卵，丙酮脱脂干燥后研成粉末，用生理盐水配制成质量体积比为 1% 溶液，然后反复冻融，超声处理，低温高速离心，取上清液；

#### b. 抗原膜制备

取孔径为  $0.45\ \mu\text{m}$  的硝酸纤维素膜，划成  $1\text{cm}\times 1\text{cm}$  的小方格，在小方格中央点  $1\ \mu\text{l}$  质量体积比为 1% 的日本血吸虫可溶性虫卵抗原，室温凉干后密封，于  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用；

#### B 连接抗体制备

##### a. 健康家畜血清球蛋白提取

分别采用饱和硫酸铵盐析法提纯家畜血清中的 IgG；

##### b. 高免兔抗家畜抗血清的制备

采用等量多点免疫法免疫家兔，以健康家畜血清球蛋白作为抗原，每次 2mg，加等量福氏完全佐剂，采用足垫内及皮内多点注射，先后免疫三次，当免疫血清双扩散试验效价达 1 : 32 以上时从免疫兔心脏采血，分离血清，低温保存备用；

#### C. 胶体金标记 A 蛋白结合物的制备

##### 胶体金溶胶的制备

采用鞣酸-枸橼酸钠还原法；

##### a. 胶体金标记金色葡萄球菌 A 蛋白- SPA 探针的制备

用克分子浓度  $0.1\ \text{M}\ \text{K}_2\text{CO}_3$ ，将胶体金溶胶的 pH 值调至 9.0，然后进行最适蛋白稳定量的测定，标记时采用最小蛋白用量来达到与胶体金的充分结合，然后加 0.2-0.5mg 聚乙二醇，优选为 0.5mg，高速离心，取沉淀浓缩即成。

斑点金免疫渗滤法 (DIGFA) 采用胶体金代替沿用已久的辣根过氧化物酶标记技术，排除了诸多干扰抗原-抗体反应的客观因素，抗原、抗体通过固相膜的渗滤作用发生反应，以亲和层析原理为基础，利用胶体金颗

粒具有高电子密度特性，放大免疫反应系统，使其在相应配体处大量聚集而形成肉眼可见的红色斑点，从而达到简易、快速准确的目的；采用葡萄球菌 A 蛋白（SPA）代替羊或兔抗人 IgG，用于血吸虫抗体检测，有利于减少非特异性反应，稳定检测试剂的质量；用 Tris-HCl 加 Triton X-100 缓冲液代替 pH 7.4 含 1%BSA、0.5%Tween-20 的 PBS 缓冲液，完全能达到封闭、洗涤的效果，有利于节省小牛血清白蛋白；胶体金标记物性能稳定，在 25℃可保存 6 个月以上，便于运送；DIGFA 操作过程中省去底物反应步骤，不仅节省时间，而且胶体金对人体无害，操作安全；DIGFA 操作过程简便，基层工作人员无需专业培训即可操作。

本发明的有益效果是：本发明将血吸虫病诊断与胶体金标记蛋白技术相结合，建立一种新型、高效快速检测家畜日本血吸虫病的方法—斑点金免疫渗滤法，依此方法所研制的家畜血吸虫病诊断试剂盒，其结果敏感性高，特异性强，判断快速、准确，操作简洁、方便，不需要特殊仪器设备仅用肉眼即可鉴别，便于基层单位和检疫部门使用。

### 具体实施方式

下面对本发明的技术方案作进一步具体说明。

实施例：

胶体金溶胶制备

采用鞣酸-枸橼酸钠还原法，具体为：

1. 配置 A 液 1%枸橼酸钠溶液 1ml，加双蒸水 79 ml，混匀后置磁力加热搅拌器上预热至 60℃；

2. 配置 B 液 1%枸橼酸钠 4ml，加 1%鞣酸 0.7ml，加 0.1M 碳酸钾溶液 0.2ml，双蒸水 15.1 ml 混匀后放置水浴中预热至 60℃；

在磁力搅拌下迅速将 B 液倒入 A 液中继续加热至 60℃，搅拌至溶液呈亮红色，用 0.1M 碳酸钾溶液调 pH 至 9.0 即可。

胶体金标记金色葡萄球菌 A 蛋白- SPA 探针的制备

1. 胶体金与蛋白结合的最适稳定量测定，具体方法如下表所示，测定时将 A 蛋白的浓度用 2mM pH 9.0，硼砂-盐酸缓冲液稀释至 1mg/ml。

试管编号	1	2	3	4	5	6
A 蛋白 1mg/ml		2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	6 $\mu$ l	8 $\mu$ l	10 $\mu$ l
胶金溶液	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
10%NaCl	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml

结果观察 蓝色 微蓝色 浅红 红 红 红

注：胶体金溶胶与 A 蛋白混溶后在 25℃ 静置 5 分钟表，与 10% NaCl 混合后静置 2 小时观察结果。

选择蛋白量达到或超过最低稳定量的一管，即保持红色不变这一管，上述第 4 管为稳定 1 毫升胶体金的最佳蛋白量，在此基础上再加 10% 即为标记时的实际蛋白用量。

## 2. 胶体金与蛋白质连接

按上述方法确定 A 蛋白含量与胶金溶液的比例后，根据需要制备一定量的胶体金标记物。

例如：上述第 4 管表明：使 1 毫升胶体金稳定需要 6  $\mu$  g 蛋白作为最佳比例，在此基础上再加 10%，即 6.6  $\mu$  g/1ml，假若需配制 10 ml 金标结合物，步骤如下：

取 10ml 金溶胶于三角烧瓶中，在磁力搅拌下，加入 66  $\mu$  g 蛋白，10 分钟后，加 5% BSA 溶液 2ml，使其最终 BSA 浓度为 1%，然后高速离心 30 分钟，去上清，取沉淀，至 10 倍浓缩即成。

洗脱液的制备：

Tris 12.1g, NaCl 17.5g, 双蒸水 1500ml, 混匀溶解后用浓盐酸调至 pH7.4, 再加双蒸水至 2000ml, 加体积比为 1.0% 的 Triton X-100, 加质

量体积比为 0.01-0.05% 的叠氮钠。

本发明的试剂盒，有盒盖和盒底二部分，盒盖中央有一圆形小孔，下面四角各有一个小柱，与盒底上相对应处的凹孔扣合连接，盒底放置吸水填料，在吸水填料上面、与盒盖中央小孔相对应的位置上，覆盖点有可溶性日本血吸虫虫卵抗原的硝酸纤维素膜。具体测试方法是：取反应盒 1 个，加洗脱液 100  $\mu$  l 待渗入，加待检血清 25  $\mu$  l 待渗入，再加洗脱液 100  $\mu$  l 待渗入，加连接抗体 25  $\mu$  l 待渗入，加金标 SPA 探针 50  $\mu$  l 待渗入，最后加洗脱液 100  $\mu$  l，洗去非特异性结合物，2 分钟后肉眼观察结果，结果判断在硝酸纤维素膜中央显示红色斑点为阳性反应，仅留白色背景为阴性反应。

#### 敏感性、特异性试验

用本试剂盒检测粪检虫卵阳性牛血清 30 份，结果血吸虫抗体呈阳性反应的 28 例，阳性检测率为 93.3%，50 份健康牛血清经测试，有 49 例呈阴性反应，阴性符合率达 98%。

#### 重复性试验

取 10 例血吸虫病病牛血清和 10 例健康牛血清，用本法反复检测 10 次，结果阳性病牛血清均呈阳性反应，而 10 例阴性血清全部呈阴性反应。

#### 稳定性试验

将本试剂盒存放于 4℃ 冰箱中，每隔 1 个月取出检测一次，连续检测一年，结果阳性病牛血清呈阳性反应，健康牛血清全部呈阴性反应。

本试剂盒经反复实验验证，其敏感性为 93.3%，特异性达 98.0%，约登指数=0.913。

