

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710036068.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月26日

[11] 公开号 CN 101149382A

[22] 申请日 2007.11.7

[21] 申请号 200710036068.5

[71] 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市河西岳麓山湖南
大学化学化工学院

[72] 发明人 吴朝阳 沈国励 楚霞 俞汝勤

[74] 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所

代理人 田嘉嘉

权利要求书1页 说明书3页

[54] 发明名称

血吸虫压电免疫快速检测方法

[57] 摘要

本发明给出了一种血吸虫压电免疫快速检测方法，包括制备 PEG - AWA 复合物和单面封闭的石英晶体谐振器，利用石英晶体谐振器快速检测日本血吸虫病人血清；本发明为一种简单、灵敏、高通量、快速的便携式检测方法，且石英晶体谐振器可重复使用。

- 1、一种血吸虫压电免疫快速检测方法，包括以下步骤：
 - a、将适量的日本血吸虫成虫抗原 AWA 与聚乙二醇 PEG 溶液混合，形成 PEG-AWA 复合物；
 - b、将硅橡胶 O 形环和塑料薄片固定在石英晶振的一面封闭成一密闭空腔，制备得到单面封闭的压电石英晶体谐振器；
 - c、将上述单面封闭的压电石英晶体谐振器插于反应池中，吸取适量 PEG-AWA 复合物液注入反应池，待石英晶体谐振频率趋于稳定，将日本血吸虫抗体注射至反应池中，记录石英晶体谐振频率下降值，可快速判别日本血吸虫病人血清的阳性和阴性；
 - d、每次测量后用滤纸轻轻擦洗石英晶体谐振器电极表面，再用水冲洗，即可使石英晶体谐振器重复使用。
- 2、根据权利要求 1 所述的血吸虫压电免疫快速检测方法，其特征在于所述 PEG 最好用 pH 7.2 PBS 稀释。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的血吸虫压电免疫快速检测方法，其特征在于所述石英晶体谐振频率下降值与日本血吸虫抗体在 3.6~42.0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性相关。

血吸虫压电免疫快速检测方法

技术领域

本发明属于临床检测领域。

背景技术

血吸虫病是世界上分布最广的寄生虫病之一，目前用于血吸虫病抗体检测方法已有较多报道，常见方法主要有环卵沉淀试验（COPT）、间接红细胞凝集试验（IHA）、尾蚴膜反应（CHR）、对流免疫电泳（CIE）、免疫酶测定法（EIA）、间接荧光抗体试验（IFAT）、PEG 沉淀试验（PEGPT）、胶乳凝集试验（LA）、放射免疫测定法（RIA）以及一些其它改进方法。其中 EIA、CIE、RIA、IFAT 等方法虽灵敏度较高，但有些需有标记的抗原或二抗，费用较高，有些需固定抗原（抗体）和经多次温育、洗涤，操作繁琐费时。而 PEGPT、LA 等方法虽然简单快速，但灵敏度偏低且仅能对抗体进行定性或半定量测定，因此对血吸虫抗体的检测存在一定局限性。着手研制一些高灵敏度、简便、快速、易于自动化、便于携带的日本血吸虫免疫传感器，用于广大疫区分散的无血吸虫病史人群及低年龄组人群的过筛检查，仍是一件相当迫切的工作。

发明内容

本发明的目的在于克服现有血吸虫病抗体检测技术的不足，提供一种简单、灵敏、高通量、快速的便携式检测方法。

为解决上述技术问题，本发明采用以下技术方案：

一种血吸虫压电免疫快速检测方法，包括以下步骤：

1、PEG-AWA 复合物的制备：将适量的日本血吸虫成虫抗原(AWA)与聚乙二醇(PEG, MW 6000) 溶液混合，形成 PEG-AWA 复合物。

2、单面封闭的石英晶体谐振器的制备：采用与晶体大小相当的硅橡胶 O 形环和塑料薄片，用 705 硅橡胶将硅橡胶 O 形环固定在石英晶振的一面，再将塑料薄片粘在橡胶 O 形环上封闭成一密闭空腔，制备得到单面封闭的压电石英晶体谐振器。

3、将上述单面封闭的压电石英晶体谐振器插于反应池中，吸取适量 PEG-AWA 复合物液注入反应池，待石英晶体谐振频率趋于稳定 ($\Delta f \leq 1 \text{ Hz/min}$)，将日本血吸虫抗体注射至反应池中，记录石英晶体谐振频率下降值，本传感器方法可快速判别日本血吸虫病

人血清的阳性和阴性。

4、每次测量后用滤纸轻轻擦洗石英晶体谐振器电极表面，再用水冲洗，即可使石英晶体谐振器重复使用。

所述 PEG 最好用 pH 7.2 PBS 稀释；所述石英晶体谐振频率下降值与日本血吸虫抗体在 3.6~42.0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性相关。

本发明的优点：

1. 基于液相凝集的压电免疫传感器检测方法，无需抗原抗体分子固定化，方法简单、快速。

2. 检测所需的压电仪器价格低廉、易于自动化、数字化。

3. 本发明应用了压电石英晶振的液相作为检测手段，不仅可以响应晶体表面的质量负载，即由日本血吸虫抗原抗体特异性免疫反应引起的石英晶振表面吸附量的增加，还可以响应由于免疫反应凝集产生的溶液密度、粘度等多种参数的变化，从而使石英晶振的传感响应大大的提高，明显地放大了检测信号，提高了传感器的灵敏度。

4. 本发明压电石英晶振再生十分简单，每次测量后用滤纸轻轻擦洗石英晶体谐振器电极表面，再用水冲洗，即可使石英晶体谐振器即可重复使用。

5. 这种快速检测技术无须昂贵的仪器设备、酶或者放射性标记物，方法简单快速，价廉，易于自动化，便于携带，可望成为一种日本血吸虫病新的诊断方法，适合用于广大疫区分散的无血吸虫病史人群及低年龄组人群的过筛检查。

具体实施方式

实施例 1：检测日本血吸虫抗体

1、将 20 μl AWA 与 3 ml 3.5% (m/m) 的 PEG 溶液（用 pH 7.2 的 10 mmol PBS 稀释）混合，在搅拌下复合 1 h，得到 PEG-AWA 复合物；不用时，将 PEG-AWA 复合物试液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用；PEG-AWA 复合物试液中 AWA 的最终浓度为 13.3 $\mu\text{g/ml}$ 。

2、制备单面封闭的石英晶体谐振器：石英晶体谐振器为北京晨星无线电器材厂产品，AT-切型（JA5 型），9MHz，两面镀金电极，晶片直径 12 mm，电极直径 6 mm。采用与晶体大小相当的硅橡胶 O 形环和塑料薄片（0.5 mm 左右），用 705 硅橡胶将硅橡胶 O 形环固定在石英晶振的一面，再将塑料薄片粘在橡胶 O 形环上封闭成一密闭空腔，制备得到单面封闭的石英晶体谐振器。

3、日本血吸虫抗体测试：将单面封闭的压电石英晶体谐振器插于圆柱形 PVC 反应池中（容积为 4.5 ml），吸取 3mL 制备得到的 PEG-AWA 复合物液注入反应池中，待石英

晶体谐振频率趋于稳定 ($\Delta f \leq 1 \text{ Hz/min}$), 将一系列不同浓度的日本血吸虫抗体注射至反应池中, 用 CN3165 型高分辨计数器 (石家庄无线电四厂) 记录石英晶体谐振频率下降值。传感器的频率下降值与日本血吸虫抗体在 $3.6 \sim 42.0 \mu\text{g/ml}$ 范围内线性相关, 可定量患者血样中的日本血吸虫特异抗体的含量。

4、每次测量后用滤纸轻轻擦洗石英晶体谐振器电极表面, 再用水冲洗, 即可使石英晶体谐振器重复使用。

实施例 2: 2 例日本血吸虫感染者的血浆样品和 2 例正常人血液样品检测

1、同实施例 1 中步骤 1。

2、同实施例 1 中步骤 2。

3、将单面封闭的压电石英晶体谐振器插于反应池中, 吸取 3mL 由制备得到的 PEG-AWA 复合物液注入反应池中, 待石英晶体谐振频率趋于稳定 ($\Delta f \leq 1 \text{ Hz/min}$), 将 $30\mu\text{l}$ 血浆样品注射至反应池中, 记录石英晶体谐振频率变化。2 例正常人血浆样品所引起的频率响应分为 80 和 82 Hz, 而日本血吸虫感染者的血浆样品的响应频率为分别为 330 和 389Hz。结果表明, 感染者的血浆样品和正常人血液样品的频率响应存在显著性差异, 可快速判别日本血吸虫病人血清的阳性和阴性。

4、同实施例 1 中步骤 4。

专利名称(译)	血吸虫压电免疫快速检测方法		
公开(公告)号	CN101149382A	公开(公告)日	2008-03-26
申请号	CN200710036068.5	申请日	2007-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	吴朝阳 沈国励 楚霞 俞汝勤		
发明人	吴朝阳 沈国励 楚霞 俞汝勤		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/561 G01N33/543 G01N33/531 G01N27/414		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明给出了一种血吸虫压电免疫快速检测方法，包括制备PEG - AWA复合物和单面封闭的石英晶体谐振器，利用石英晶体谐振器快速检测日本血吸虫病人血清；本发明为一种简单、灵敏、高通量、快速的便携式检测方法，且石英晶体谐振器可重复使用。