

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/558 G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02160338.3

[43] 公开日 2004 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN1465980A

[22] 申请日 2002.12.26 [21] 申请号 02160338.3

[71] 申请人 林 怡

地址 310002 浙江省杭州劳动路 120 号东单元 201 室

[72] 发明人 林 怡

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 幽门螺杆菌纳米金免疫渗滤法快速诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种快速诊断试剂盒，试剂盒包含反应板、抗原固相膜、纳米金标探针、缓冲系统。其固相膜采用幽门螺杆菌抗原点样；金颗粒采用柠檬酸钠还原法制备；缓冲系统为 tris 与皂素混合液。幽门螺杆菌抗原采用全菌粗制抗原；金颗粒直径为 15 - 20 纳米，金标记物采用兔抗人免疫球蛋白，其球蛋白效价为双扩散试验在 1 : 64 以上；tris 与皂素混合液采用 pH8.2、0.02mol tris 盐酸缓冲液与 0.2 - 0.5 克/升皂素组成。本发明具有检测快速、方便、敏感、特异、准确，运送方便，性能稳定，适宜于基层医疗单位使用等特点。

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

1、一种幽门螺杆菌纳米金免疫渗滤法快速诊断试剂盒，包含反应板、抗原固相膜、纳米金标记探针、缓冲系统，其特征在于：

- a. 抗原固相膜采用幽门螺杆菌抗原点样；
- b. 金颗粒采用柠檬酸钠还原法制备；
- c. 缓冲系统为 tris 与皂素混合液。

2、根据权利要求 1 所述的幽门螺杆菌纳米金免疫渗滤法快速诊断试剂盒，其特征在于：

- a. 幽门螺杆菌抗原采用全菌粗制抗原；
- b. 金颗粒直径为 15-20 纳米，金标记物采用兔抗人免疫球蛋白，其球蛋白效价为双扩散试验在 1：64 以上；
- c. tris 与皂素混合液采用 PH8.2、0.02mol tris 盐酸缓冲液与 0.2-0.5 克/升皂素组成。

幽门螺杆菌纳米金免疫渗滤法快速诊断试剂盒

技术领域

本发明涉及一种快速诊断试剂盒，尤其是涉及一种采用免疫渗滤法检测幽门螺杆菌的试剂盒。

背景技术

许多资料证实，幽门螺杆菌（HP）与慢性胃炎及消化性溃疡密切相关，目前诊断幽门螺杆菌感染的常用方法有：胃粘膜活检涂片，组织学检查，细菌培养，尿素酶试验和¹⁴C呼吸试验等。前几种方法均需作内镜检查，采取活检标本，临床推广和多次重复有一定难度，后一种方法使用同位素，不仅价格较贵，病人排泄物中的同位素易污染环境，而且需要特殊设备，应用范围受到限制。血清学检测，方法简便、易行，又非创伤性，倍受人们关注。近年来国内外对此研究较多，但普采用酶联免疫吸附试验（ELISA）和斑点免疫吸附试验（Dot-ELISA），但因其操作比较繁琐，而且需要一定仪器，目前多在有条件的实验室中进行，尚不能推广至基层单位。

发明内容

本发明主要是解决现有检测方法所存在的操作比较繁琐，需要一定仪器，而且不能推广到基层等技术问题。

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：检测盒包含反应板、抗原固相膜、纳米金标探针、缓冲系统。其固相膜采用幽门螺杆菌抗原点样；金颗粒采用柠檬酸纳还原法制备；缓冲系统为 tris 与皂素混合液。

作为优选，幽门螺杆菌抗原采用全菌粗制抗原；金颗粒直径为 15-20

纳米，金标记物采用兔抗人免疫球蛋白，其球蛋白效价为双扩散试验在1:64以上；tris与皂素混合液采用PH8.2、0.02mol tris 盐酸缓冲液与0.2-0.5克/升皂素组成。

因此，本发明具有检测快速、方便、敏感、特异、准确，运送方便，性能稳定，适宜于基层医疗单位使用等特点。

具体实施方式

下面通过实施例，对本发明的技术方案作进一步具体的说明。

试剂盒包括：反应板、金标探针（A液）、tris 盐酸缓冲液加皂素（B液）。反应板包括：小盒，吸水填料和硝酸纤维膜；A液，按柠檬酸还原法制备，包括胶体金颗粒的制备和金标免疫球蛋白结合物的制备。胶体金颗粒的制备：取0.01%氯金酸（ HauCl_4 ）水溶液加到100ml水中，加热至沸腾，剧烈搅拌后加入1%柠檬酸三钠溶液即成；金标免疫球蛋白结合物的制备：首先确定1ml胶体金溶液所需最小球蛋白用量，蛋白浓度一般不能低于5mg/ml，PH值8.2左右，按胶体金总容积计算所需球蛋白用量，两者按比例混合，高速离心即成。B液为PH8.2，0.02mol/L tris 加0.2-0.5g/L皂素混合而成。

本发明的幽门螺杆菌抗原采用全菌粗制抗原，其优点是来源容易，制作简便，无需昂贵仪器，而且敏感性、特异性与幽门螺杆菌纯化尿素酶抗原无明显差异。

纳米金免疫渗滤法检测是通过将含有靶物质的人血清加于固相膜上来进行的，然后借助于血清在膜上的渗透现象，使膜上的抗原和血清中的抗体起反应，该反应结果通过金免疫标记物显色，阳性反应显示红色斑点，阴性结果仅留粉色背景。所以背景清晰度对判断结果至关重要，因为人血清中除了有靶物质，尚有其它非特异性成份常常造成背景颜色较深，为确保背景与斑点呈鲜明对比色，有利于结果判断，发明者进行了多种探索性试验，结果发现在缓冲液中加入皂素能提高斑点色泽清晰度，其试验结果见下表：

缓冲液中皂素含量与斑点色泽清晰度比较

皂素含量 (g/l)	背 景 颜 色	评 分
0.1	呈红色	0
0.2	呈微红色	1
0.3	呈淡粉色	2
0.4	呈淡粉色	2
0.5	呈白色	3
0.6	呈淡粉色	2

金颗粒大小与金标记物保存时间密切相关,发明者分别用直径 10-15 纳米、20-25 纳米、30-35 纳米的颗粒标记免疫球蛋白探针,将幽门螺杆菌抗原和金标记物配对置于 4℃冰箱保存,然后取 10 份临床证实为 HP 阳性的血清和 10 份 HP 阴性血清进行检测,每隔一个月取出每组配对物检测一次,其中 10-15 纳米组从第 1 个月开始到 12 个月止,10 份阳性血清全部阳性,10 份阴性血清全部阴性;20-25 纳米组从第 1 个月开始到第 6 个月,10 份阳性血清全部阳性,10 份阴性血清全部阴性,但从第 7 个月开始,10 份阳性血清 50%以上呈阴性,至 12 个月全部呈阴性;30-35 纳米组从 3 个月开始,阳性检出率逐渐减低。由此说明 10-15 纳米金标记探针可在 4℃环境下保存一年时间,故本发明采用直径 10-15 纳米颗粒标记免疫球蛋白探针。

专利名称(译)	幽门螺杆菌纳米金免疫渗滤法快速诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN1465980A	公开(公告)日	2004-01-07
申请号	CN02160338.3	申请日	2002-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	林怡		
申请(专利权)人(译)	林怡		
当前申请(专利权)人(译)	林怡		
[标]发明人	林怡		
发明人	林怡		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558 G01N33/569		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速诊断试剂盒，试剂盒包含反应板、抗原固相膜、纳米金标探针、缓冲系统。其固相膜采用幽门螺杆菌抗原点样；金颗粒采用柠檬酸钠还原法制备；缓冲系统为tris与皂素混合液。幽门螺杆菌抗原采用全菌粗制抗原；金颗粒直径为15 - 20纳米，金标记物采用兔抗人免疫球蛋白，其球蛋白效价为双扩散试验在1:64以上；tris与皂素混合液采用pH8.2、0.02mol tris盐酸缓冲液与0.2 - 0.5克/升皂素组成。本发明具有检测快速、方便、敏感、特异、准确，运送方便，性能稳定，适宜于基层医疗单位使用等特点。

皂素含量 (g/l)	背景颜色	评 分
0.1	呈红色	0
0.2	呈微红色	1
0.3	呈淡粉色	2
0.4	呈淡粉色	2
0.5	呈白色	3
0.6	呈淡粉色	2