



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101839916 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 201010201992.6

(22) 申请日 2010.06.17

(71) 申请人 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心

地址 830002 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
碱泉一街 380 号

(72) 发明人 雷刚 热娜·吐尔地 蒋卫
丁雄杰 徐兵 唐建国

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务
所 65105

代理人 汤洁

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及动物鼠疫疫情监测与鼠疫诊断技术领域,是一种检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒,其包括荧光素标记抗体 1 支,荧光抗体保存液 2ml×1 支,固定液 20ml×1 瓶,10× 稀释液 20ml×1 瓶,鼠疫菌阳性对照 2ml×1 支,鼠疫菌阴性对照 2ml×1 支,抑制用鼠疫 F1 抗体 5ml×1 支,1% 硫柳汞 5ml×1 支;所述荧光素标记抗体为异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体。本发明的有益效果:被测物经过氧乙醇固定,使检测过程安全;用荧光显微镜观察染色结果,程序简单,全程 60 分钟,最小检出量为 500 个鼠疫菌体 /ml;抑制试验可提高检测结果的准确性;为动物鼠疫监测和诊断提供了准确、稳定、快速、简便的检验器具。

1. 一种检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒,其特征在于包括冻干荧光素标记抗体 1 支,荧光抗体保存液 2ml×1 支,固定液 20ml×1 瓶,10× 稀释液 20ml×1 瓶,鼠疫菌阳性对照 2ml×1 支,鼠疫菌阴性对照 2ml×1 支,抑制用鼠疫 F1 抗体 5ml×1 支,1%硫柳汞 2ml×1 支;所述荧光素标记抗体为异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体即 FITC-F1Ab。

2. 根据权利要求 1 所述的检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒,其特征在于异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体按下述方法得到:

(1) 抗鼠疫 F1 抗原血清,用硫酸铵沉淀法提取鼠疫 F1 抗体;

(2) 含鼠疫 F1 抗体 20mg 的生理盐水溶液 27ml,加含异硫氰酸荧光素即 FITC2mg 的 0.5mol/LpH9.5 碳酸盐缓冲液 3ml,混匀;室温持续搅拌 2 小时;

(3) 边摇边缓慢加入饱和硫酸铵水溶液 30ml,4^oC 放置 1 小时,4000×g 离心 10 分钟,弃上清;沉淀用生理盐水 5ml 溶解,边摇边缓慢加入饱和硫酸铵水溶液 5ml,4^oC 放置 1 小时,4000×g 离心 10 分钟,弃上清,沉淀再用 50%饱和度硫酸铵洗涤沉淀 2 次,洗除游离的 FITC,沉淀用生理盐水 5ml 溶解,即为 FITC-F1Ab 溶液;

(4) 将 FITC-F1Ab 溶液装入透析袋,用 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS 在 4^oC 温度下透析,每 6 至 8 小时换 0.01mol/LpH7.2PBS 液 1 次;将 FITC-F1Ab 溶液移入试管;

(5) 测定 FITC-F1Ab 适用浓度,用浓度按容量 / 容量含 50%新生小牛血清 0.01mol/LpH7.2PBS 稀释,分装,冻干,-20^oC 保存;

在上述方法中:溶液浓度除注明外均为重量 / 容量。

检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及动物鼠疫疫情监测与鼠疫诊断技术领域,尤其是能通过荧光显微镜检查识别鼠疫菌,是一种检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒。

背景技术

[0002] 鼠疫是由鼠疫杆菌引起的一种自然疫源性烈性传染病,是我国《传染病防治法》规定的甲类传染病,啮齿类是鼠疫的主要宿主动物和传染源,可自然感染鼠疫动物近 200 种。我国已发现 12 个类型的鼠疫疫源地,分布于 19 个省区,面积 130 多万 km^2 。20 世纪 90 年代以来,一些静息多年的鼠疫自然疫源地动物间鼠疫持续处于活跃状态,人间鼠疫时有发生,远距离高速度传播的危险性增加。监测动物间鼠疫的流行状况,是预防控制人间鼠疫的重要工作内容。

[0003] 实验室检验结果是制定实施鼠疫控制措施的重要依据,鼠疫传播速度快,防控鼠疫应急反应需要快速的检测鼠疫技术。分离培养鼠疫菌最快要 24 小时才能出结果;胶体金纸上色谱法、反相间接血凝试验等检测鼠疫菌及其抗原的免疫学方法,可在 3 小时内出结果,最小检出量在 10^5 个菌体 /ml,敏感性较低。显微镜检查鼠疫菌,美兰染色为两端浓染,革兰氏染色为革兰氏阴性杆菌,显微镜检查美兰染色、革兰氏染色的标本速度快,但鼠疫菌和肠杆菌科的细菌没有明显差异,没有鉴别意义。根据应急反应的需要,检查鼠疫菌的准确、稳定、快速、简便的检验鼠疫菌的方法的研究倍受关注。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种检查动物鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒,克服了现有动物鼠疫监测与诊断技术中存在的问题。本发明是通过应用荧光免疫染色法显示鼠疫菌荚膜中的 F1 抗原,检查各种动物血液、器官、脏器组织中的鼠疫菌,经多次改进,现已制成具体有效的检查鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒,可准确、稳定、快速、简便鉴定鼠疫菌,供鼠疫监测和诊断使用。

[0005] 本发明的技术方案是通过以下措施来实现的:一种检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒,其包括冻干荧光素标记抗体 1 支,荧光抗体保存液 $2\text{ml} \times 1$ 支,固定液 $20\text{ml} \times 1$ 瓶, $10 \times$ 稀释液 $20\text{ml} \times 1$ 瓶,鼠疫菌阳性对照 $2\text{ml} \times 1$ 支,鼠疫菌阴性对照 $2\text{ml} \times 1$ 支,抑制用鼠疫 F1 抗体 $5\text{ml} \times 1$ 支,1% 硫柳汞 $2\text{ml} \times 1$ 支;所述荧光素标记抗体为异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体即 FITC-F1Ab。

[0006] 对上述本发明的技术方案可进一步进行如下的选择或 / 和优化:

上述异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体按下述方法得到:

- (1) 抗鼠疫 F1 抗原血清,用硫酸铵沉淀法提取鼠疫 F1 抗体;
- (2) 含鼠疫 F1 抗体 20mg 的生理盐水溶液 27ml,加含异硫氰酸荧光素即 FITC2mg 的 0.5mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液 3ml,混匀;室温持续搅拌 2 小时;

(3) 边摇边缓慢加入饱和硫酸铵水溶液 30ml, 4°C 放置 1 小时, 4000×g 离心 10 分钟, 弃上清; 沉淀用生理盐水 5ml 溶解, 边摇边缓慢加入饱和硫酸铵水溶液 5ml, 4°C 放置 1 小时, 4000×g 离心 10 分钟, 弃上清, 再用 50% 饱和度硫酸铵洗涤沉淀 2 次, 洗除游离异硫氰酸荧光素即 FITC, 沉淀用生理盐水 5ml 溶解, 即为 FITC-F1Ab 溶液;

(4) 将 FITC-F1Ab 溶液装入透析袋, 用 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS 在 4°C 温度下透析, 每 6-8 小时换 0.01mol/LpH7.2PBS 液 1 次; 将 FITC-F1Ab 溶液移入试管;

(5) 测定 FITC-F1Ab 适用浓度, 用浓度按容量 / 容量含 50% 新生小牛血清的 0.01mol/LpH7.2PBS 稀释, 分装, 冻干, -20°C 保存;

在上述方法中: 溶液浓度除注明外均为重量 / 容量。

[0007] 本发明的有益效果: 被测物经过氧乙醇固定, 使检测过程安全; 突出特点是实验条件简单, 用荧光显微镜观察染色结果, 全程 60 分钟, 最小检出量为 500 个鼠疫菌体 /ml; 抑制试验可提高检测结果的准确性; 为动物鼠疫监测和诊断提供了准确、快速、简便的检验器具。

具体实施方式

[0008] 本发明不受下述实施例的限制, 可依据本发明的技术方案和实际情况来确定具体的实施方式。

[0009] 下述实施例中, 无特别说明均为常规方法; 溶液浓度除注明外均为重量 / 容量。

[0010] 实施例 1: 检查动物鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒制备:

一、检查动物鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒的组成:

1. 异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体 (FITC-F1Ab)	冻干	1 支
2. 荧光抗体保存液	2ml	1 支
3. 固定液	20ml	1 瓶
4. 10× 稀释液	20ml	1 瓶
5. 鼠疫菌阳性对照 (冻干剂)	2ml	1 支
6. 鼠疫菌阴性对照 (冻干剂)	2ml	1 支
7. 抑制用鼠疫 F1 抗体 (冻干剂)	5ml	1 支
8. 1% 硫柳汞	2ml	1 支

二、试剂盒各组分的制备方法:

1. 制备异硫氰酸荧光素标记鼠疫 F1 抗体 (FITC-F1Ab):

(1) 抗鼠疫 F1 抗原血清, 用硫酸铵沉淀法提取鼠疫 F1 抗体;

(2) 含鼠疫 F1 抗体 20mg 的生理盐水溶液 27ml, 加含异硫氰酸荧光素 (以下简称 FITC) 2mg 的 0.5mol/LpH9.5 碳酸盐缓冲液 3ml, 混匀; 室温持续搅拌 2 小时;

(3) 边摇边缓慢加入饱和硫酸铵水溶液 30ml, 4°C 放置 1h, 4000×g 离心 10 分钟, 弃上清; 沉淀用生理盐水 5ml 溶解, 边摇边缓慢加入饱和硫酸铵水溶液 5ml, 4°C 放置 1 小时, 4000×g 离心 10 分钟, 弃上清, 再用 50% 饱和度硫酸铵洗涤沉淀 2 次, 洗除游离 FITC, 沉淀用生理盐水 5ml 溶解, 即为 FITC-F1Ab 溶液;

(4) 将 FITC-F1Ab 溶液装入透析袋, 用 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液即 PBS, 4°C 透析, 每 6-8h 换液 1 次; 将 FITC-F1Ab 溶液移入试管;

(5) 测定 FITC-F1Ab 适用浓度,用含 50% (容量 / 容量) 新生小牛血清 0.01mol/LpH7.2PBS 稀释,分装,冻干, -20°C 保存。

[0011] 2. 荧光抗体保存液 :0.1mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液与等量丙三醇混合,分装,每支 2ml。

[0012] 3. 固定液 :75%(容量 / 容量) 乙醇 100ml,30%(容量 / 容量) H₂O₂ 5ml,分装,每支 20ml。

[0013] 4. 10× 稀释液制备 :0.1mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液 90ml,吐温 -205ml,新生小牛血清 10ml,硫柳汞 0.2g,混合溶解分装,每支 20ml。

[0014] 5. 鼠疫菌阳性对照制备 :鼠疫菌 EV 株用 0.01mol/LpH7.2PBS 配制成 5% (湿菌重量 / 容量) 菌液 1ml,与含 3% H₂O₂ 的 95% 酒精 5ml 混匀,20-37°C 室温放置 30 分钟,4000×g 离心 10 分钟,收集菌体,用含 30% 新生小牛血清 0.01mol/LpH7.2PBS50ml 制成混悬液,分装每支 0.1ml,冻干。

[0015] 6. 鼠疫菌阴性对照制备 :菌株为大肠杆菌,制备方法与鼠疫菌阳性对照相同。

[0016] 7. 抑制用鼠疫 F1 抗体 :0.01mol/LpH7.2PBS30ml,加硫柳汞 0.1g,新生小牛血清 10ml,加滴度为 1 :8000 的鼠疫 F1 抗体 10ml,混匀,分装,每支 0.2ml,冻干。

[0017] 8. 1% 硫柳汞 :硫柳汞 1g,NaCl1g,加蒸馏水至 100ml,分装,每支 2ml。

[0018] 上述制备好的各种试剂定量分装,装入检查动物鼠疫菌的荧光免疫染色的试剂盒。

[0019] 实施例 2 :检查动物鼠疫菌的荧光免疫染色的试剂盒的应用方法 :

一、检查动物鼠疫菌的荧光免疫染色的器材与试剂配制 :

1. 稀释液 :10× 稀释液用 0.85%NaCl 溶液稀释 10 倍。

[0020] 2. FITC-F1Ab 贮存液 :每支 FITC-F1 抗体(冻干剂)加荧光抗体保存液 2ml 溶解,混匀, -20°C 保存,有效期 6 个月。

[0021] FITC-F1Ab 应用液 :FITC-F1Ab 贮存液用稀释液 10 倍稀释,4°C 保存 10 天。

[0022] 3. 鼠疫菌阳性对照 :每支鼠疫菌阳性对照(冻干剂)用稀释液 2ml 溶解混匀。

[0023] 4. 鼠疫菌阴性对照 :每支鼠疫菌阴性对照(冻干剂)用稀释液 2ml 溶解混匀。

[0024] 5. 抑制用鼠疫 F1 抗体 :用稀释液 5ml 溶解混匀。

[0025] 二、标本准备 :

1. 印片 :用剪刀剪切待检标本,剪切面在吸水纸上轻按吸去过多血液,再将剪切面在玻片上印片,同步制阳性、阴性对照涂片,自然干燥,火焰固定。

[0026] 2. 涂片 :沾取待检菌液,涂片,同步制阳性、阴性对照涂片,自然干燥,火焰固定。

[0027] 3. 富集细菌标本涂片 :新鲜、腐败或干枯的脏器、肌肉组织块,放入乳钵内剪碎,研磨成糊状,按组织块重量的 2 倍加含杀菌剂的生理盐水,继续研磨制成混悬液。骨头 :用纱布包裹骨头,用剪刀或骨钳剪断骨头的两端,采取红色骨髓 ;如骨髓干枯,可剪断骨头的一端,用注射器注入少量含杀菌剂的生理盐水,浸泡 30 分钟,反复吹吸数次后吸出,或将另一端打开,直接冲入试管内 ;也可用纱布包裹骨头,砸碎骨头骨髓丰富的部位,在 2 倍容量的含消毒剂的生理盐水中浸泡 30 分钟,反复冲洗,收集混悬液。混悬液、心血混悬液 500×g 离心 3 分钟或静置 15 分钟,弃组织块和细胞沉淀,吸取上清液,4000×g 离心 5 分钟,沉淀用少量生理盐水混悬,按常规法涂片,同步制阳性、阴性对照涂片,自然干燥,火焰固定。

[0028] 三、检查鼠疫菌的荧光免疫染色：

1. 待检标本的涂片或印片 2 张与阳性对照、阴性对照同步进行。

[0029] 2. 用火焰固定，滴加固定液覆盖标本或浸泡于固定液中 5 分钟，标本面的背面流水冲洗 1 分钟。

[0030] 3. 荧光免疫染色：(1) 抑制试验标本片，用 F1 抗体应用液覆盖待检标本 5 分钟，流水冲洗标本面的背面 1 分钟；

(2) 荧光免疫染色片和抑制试验标本片，用 FITC-F1Ab 应用液覆盖玻片上的标本，置湿盒内 28-37°C 染色 20 分钟，流水冲洗标本面的背面 1 分钟。

[0031] 4. 观察记录结果：

荧光显微镜油镜 1000× 镜检，有鼠疫 F1 抗原的鼠疫菌菌体呈明亮的黄绿色；

阳性、阴性对照染色结果必须与已知阳性、阴性相符，抑制试验与阴性相同；

按镜检染色清晰的菌体量分级：未看到(-)，平均每视野有 1-5 个(+)，每视野 5 个以上(++)，每视野 50 个以上(+++)，满视野密布(++++)。

专利名称(译)	检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒		
公开(公告)号	CN101839916A	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	CN201010201992.6	申请日	2010-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心		
[标]发明人	雷刚 热娜吐尔地 蒋卫 丁雄杰 徐兵 唐建国		
发明人	雷刚 热娜.吐尔地 蒋卫 丁雄杰 徐兵 唐建国		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N33/52		
代理人(译)	汤洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及动物鼠疫疫情监测与鼠疫诊断技术领域，是一种检验鼠疫菌的荧光免疫染色试剂盒，其包括荧光素标记抗体1支，荧光抗体保存液2ml×1支，固定液20ml×1瓶，10×稀释液20ml×1瓶，鼠疫菌阳性对照2ml×1支，鼠疫菌阴性对照2ml×1支，抑制用鼠疫F1抗体5ml×1支，1%硫柳汞5ml×1支；所述荧光素标记抗体为异硫氰酸荧光素标记鼠疫F1抗体。本发明的有益效果：被测物经过氧乙醇固定，使检测过程安全；用荧光显微镜观察染色结果，程序简单，全程60分钟，最小检出量为500个鼠疫菌体/ml；抑制试验可提高检测结果的准确性；为动物鼠疫监测和诊断提供了准确、稳定、快速、简便的检验器具。