



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103604922 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201310601571. 6

(22) 申请日 2013. 11. 20

(71) 申请人 天津市宝坻区人民医院

地址 301800 天津市宝坻区广川路 8 号

(72) 发明人 徐向英 李立和 齐金龙 杨帅

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

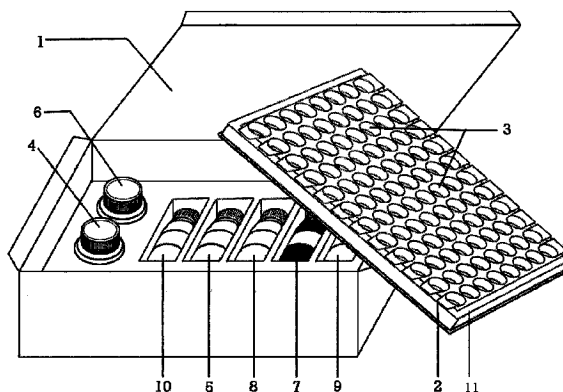
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

呼吸道合胞病毒检测试剂盒及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种呼吸道合胞病毒试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域,本发明试剂盒采用咽拭子擦拭患儿咽部,通过盐酸氨溴索药物使咽拭子鼻咽分泌物溶解,经高速离心后,沉淀物鼻咽上皮细胞加入到 2.0ml 含 1.0% (V/V) Triton X-100 的磷酸盐缓冲液中,静置 30min,剧烈震荡,使呼吸道合胞病毒从咽上皮细胞脱落出来,取溶解液加入到呼吸道合胞病毒检测酶标板上,采用酶联免疫吸附法检测呼吸道合胞病毒,经温浴、洗涤、加生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体,链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物,再加入底物液,读取结果。本发明操作简单、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法,适用于检测鼻咽部上皮细胞感染呼吸道合胞病毒,可以作为儿童感染呼吸道合胞病毒的重要检查指标。



1. 一种呼吸道合胞病毒酶免疫检测试剂盒,其特征在于由盒体(1),酶标板(2)中设有反应孔(3)的板条,A试剂瓶(分泌物前处理液)(4),B试剂瓶(生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体)(5),C试剂瓶(含Triton X-100的磷酸盐缓冲液)(6),D试剂瓶(链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物)(7),E试剂瓶(邻苯二胺OPD试剂)(8),F试剂瓶(H_2O_2)(9),G试剂瓶(硫酸溶液)(10),塑料托架(11)及酶标板(2)均安放在盒体(1)内。

2. 根据权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测试剂盒,其特征在于所述的塑料托架(11)上制有孔和凹槽。

3. 根据权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测试剂盒,其特征在于所述的酶标板(2)有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成均放在盒体(1)内。

4. 一种呼吸道合胞病毒酶免疫检测方法,其特征在于用咽拭子擦拭患儿咽部,加入到2ml含有30g/L盐酸氨溴索磷酸盐缓冲液中剧烈震荡,静至60min,高速离心(10000G,10min),取沉淀物加入到2.0ml含1.0%(V/V)Triton X-100的磷酸缓冲液盐中,静置30min,剧烈震荡,使呼吸道合胞病毒从咽上皮细胞脱落出来,取50 μ l上清液加入到呼吸道合胞病毒ELISA反应板中,37 $^{\circ}$ C水浴箱水浴30min,洗涤5次;加入50 μ l生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体,37 $^{\circ}$ C水浴箱水浴30min,洗涤5次;加入链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物,37 $^{\circ}$ C水浴箱水浴30min,洗涤5次;加入试剂E、F各50 μ l,至37 $^{\circ}$ C水浴箱水浴10min,加1滴终止液酶标仪测定 A_{490nm} 值。

5. 按照权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测方法,其特征在于所述的A试剂瓶(分泌物前处理液)为含有30mg/L盐酸氨溴索磷酸盐缓冲液。

6. 按照权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测方法,其特征在于所述的B试剂瓶,为生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体。

7. 按照权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测方法,其特征在于所述的C试剂瓶为含有1.0%(V/V)Triton X-100的磷酸盐缓冲液。

8. 按照权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测方法,其特征在于所述的D试剂瓶,为链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物。

9. 按照权利要求1所述的呼吸道合胞病毒酶免疫检测方法,其特征在于所述的酶底物液,E试剂瓶为邻苯二胺(OPD)试剂,F试剂瓶为 H_2O_2 。

呼吸道合胞病毒检测试剂盒及使用方法

技术领域

[0001] 一种呼吸道合胞病毒检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 目前国内检测呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染方法有电镜检测、培养鉴定法、聚合酶链反应 (PCR)、酶联免疫吸附试验、凝集法、荧光免疫特异性抗体检测法等,文献指出在各种方法中,抗原较抗体检测更敏感。临床实验室常用间接免疫荧光法检测 RSV,其次还有病毒分离培养法,PCR法,病毒细胞培养需要的时间长、费用高,有时甚至几周才能出结果,不适合临床检验,间接免疫荧光法操作简单,方便,适合于临床实验室检测 RSV,以德国欧蒙公司为代表的试剂盒应用最普遍,该方法为用 RSV 感染的细胞作为抗原,人体内产生的 RSV 抗体与受 RSV 感染的细胞反应,加入标记异硫氰酸荧光素的羊抗人 IgM,实验前需用驴抗人 IgG 抗体吸附抗呼吸道合胞病毒 IgG 抗体,此法的最大缺点是体内 IgG 抗体的非特异性结合,造成假阳性,结果不易判读。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种样品前处理简单,快速、灵敏、准确的检测呼吸道合胞病毒的方法。

[0004] 本发明试剂盒主要由盒体 (1),酶标板 (2) 中设有反应孔 (3) 的板条,A 试剂瓶 (分泌物前处理液) (4),B 试剂瓶 (生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体) (5),C 试剂瓶 (含 Triton X-100 的磷酸盐缓冲液) (6),D 试剂瓶 (链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物) (7),E 试剂瓶 (邻苯二胺 OPD 试剂) (8),F 试剂瓶 (H_2O_2) (9),G 试剂瓶 (硫酸溶液) (10),塑料托架 (11) 及酶标板 (2) 均安放在盒体 (1) 内。

[0005] 本发明用咽拭子擦拭患儿咽部,加入到 2ml 含有 30g/L 盐酸氨溴索磷酸盐缓冲液中剧烈震荡,静至 60min,高速离心 (10000G,10min),取沉淀物加入到 2.0ml 含 1.0% (V/V) Triton X-100 的磷酸盐缓冲液中,静置 30min,剧烈震荡,使呼吸道合胞病毒从咽上皮细胞脱落出来,取 50 μ l 上清液加入到呼吸道合胞病毒 ELISA 反应板中,37°C 水浴箱水浴 30min,洗涤 5 次;加入 50 μ l 生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体,37°C 水浴箱水浴 30min,洗涤 5 次;加入链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物,37°C 水浴箱水浴 30min,洗涤 5 次;加入试剂 E、F 各 50 μ l,至 37°C 水浴箱水浴 10min,加 1 滴终止液酶标仪测定 A_{490nm} 值。

[0006] 在本发明中,该试剂盒检测的标本是鼻咽分泌物中上皮细胞,其中,盐酸氨溴索药物为粘液溶解剂,临床上常用于呼吸科病人降低痰液的粘稠度而易于排出,本品的巯基 (-SH) 结构可使粘蛋白的双硫 (-S-S-) 结构断裂,降低痰粘度,在本发明中,经盐酸氨溴索作用使咽部上皮细胞从粘液中分离开。Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚) 是一种非离子型表面活性剂,分子量为 646.86 (分子式为 $C_{34}H_{62}O_{11}$),它能溶解脂质,增加对细胞膜的通透性,RSV 寄生于口腔咽部活体细胞内,Triton X-100 作用于细胞膜使 RSV 病毒从细胞中脱离出来,在链霉亲和素-生物素偶联 ELISA 法检测中,链霉亲和素-生物素系统是一种具

有高亲和力、灵敏度高、特异性强和稳定性好等优点的信号放大标记技术,研究证明链霉亲和素-生物素依靠接触表面均一的多层膜来维持其稳定的结合,链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物形成时,一个标记了生物素的抗体可通过其生物素连接多个链霉亲和素分子,一个链霉亲和素分子又可桥联多个酶分子,由于此法能结合更多酶标记物,放大了检测信号,使检测灵敏度放大 1000 倍,因此,能检测病毒载量低的咽部上皮细胞,特别适合呼吸道合胞病毒早期感染。

[0007] 本文采用将生物素-链霉亲和素系统引入 ELISA 检测系统,经特殊处理咽部上皮细胞,利用该系统的放大效应和链霉亲和素-酶复合物具有高灵敏度、高特异性、高稳定性和适用性强等特点,提高了检测灵敏度,特别适合早期感染的诊治,具有重要临床价值,并可应用该技术平台检测 SARS 病毒, H7N9 病毒等其它病毒检测,具有重要意义。

具体实施方式

[0008] 一、呼吸道合胞病毒酶标板的制备

[0009] 将抗呼吸道合胞病毒抗体用包被液稀释成 1 : 200 倍,加入 100 μ l 包被微孔反应板的微孔,加入含 1% 小牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液 350 μ l/ 每孔,室温封闭 2 小时,4 $^{\circ}$ C 过夜。甩尽孔内液体后,用洗涤液洗 3 次,每次 3 分钟。二、生物素化抗体的制备

[0010] 生物素化抗体的制备用 0.1mmol/L NaHCO₃ 溶液将羊抗人 IgM 呼吸道合胞病毒抗体稀释成 1mg/L,每毫升抗体溶液中加入二甲基甲酰胺溶解的生物素 N 羟基丁二酰亚胺酯,加入 NaHB₄0.1ml 混匀,4 $^{\circ}$ C 2 小时后对 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C 过夜。加入适量中性甘油后小量分装。

[0011] 三、链霉亲和素偶联过氧化物酶标记物的制备

[0012] 链霉亲和素偶联过氧化物酶标记物辣根过氧化物酶 5mg 溶于蒸馏水 0.5ml 中,加入 60mmol/L NaOI₄ 0.5ml,置 4 $^{\circ}$ C 20min 后加入 0.16mol/L 乙二醇 0.5ml,再置 4 $^{\circ}$ C 30 分钟。加入链霉亲和素 5mg,用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C 过夜,加 KBH₄(5mg/ml)0.3ml,置 4 $^{\circ}$ C 3 小时,加等容积饱和磷酸铵,4 $^{\circ}$ C 30 分钟后 4000r/min 离心 15min。沉淀物用 pH7.4 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5ml 溶解,用磷酸盐缓冲液透析除铵。

[0013] 四、磷酸盐缓冲液 (0.15M pH7.4 PBS) 配置 :KH₂PO₄ 0.2 克, Na₂HPO₄ • 12H₂O 2.9 克, NaCl 8.0 克, KCl 0.2 克, Tween-20 0.5ml,加蒸馏水至 1000ml。

[0014] 五、A 试剂前处理液的配置 :在 1L 洗涤液中加入盐酸氨溴索 30g,即为前处理液。

[0015] 六、C 试剂在 1L 洗涤液中加入 10ml Triton X-100,即为 C 试剂。

附图说明

[0016] 图 1 呼吸道合胞病毒检测试剂盒示意图。

[0017] 图 2 酶标板示意图。

具体实施方式

[0018] 实施例 1

[0019] 1. 样品处理用咽拭子擦拭患儿咽部,加入到 2ml 含有 30g/L 盐酸氨溴索磷酸盐缓冲液中剧烈震荡,静至 60min,高速离心 (10000G,10min),取沉淀物加入到 2.0ml 磷酸

盐-吐温缓冲液(含1.0%(V/V)Triton X-100)中,静置30min。

[0020] 2. 检测方法取50 μ l上清液加入到呼吸道合胞病毒ELISA反应板中,37 $^{\circ}$ C水浴箱水浴30min,洗涤5次;加入50 μ l生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体,37 $^{\circ}$ C水浴30min,洗涤5次;加入链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物,37 $^{\circ}$ C水浴30min,洗涤5次;加入试剂E、F各50 μ l,至37 $^{\circ}$ C水浴10min,加1滴终止液酶标仪测定 A_{490nm} 值。

[0021] 3. 结果判定:可于白色背景上,直接用肉眼观察结果:反应孔内颜色越深,阳性程度越强,阴性反应为无色或极浅,也可测OD值,在ELISA检测仪上,于490nm处,以空白对照孔调零后测各孔OD值,若大于规定的阴性对照OD值的2.1倍,即为阳性。

[0022] 实施效果

[0023] 1. 两种检测呼吸道合胞病毒检测方法阳性率比较见表1:

[0024] 表1 本发明方法和间接免疫荧光法检测呼吸道合胞病毒的阳性率比较:

	检测方法	例数	阳性数	阴性数	阳性率(%)
[0025]	间接免疫荧光法	80	36	44	45.0
	本发明方法	80	34	46	42.5

[0026] 注:两组检测方法经卡方检验分析, $X^2 = 0.5079$, $P > 0.05$ 两组检测方法阳性率比较差异无统计学意义。

[0027] 2. 两种检测呼吸道合胞病毒检测方法敏感性、特异性比较见表2

	检测方法	例数	敏感性(%)	特异性(%)
[0028]	间接免疫荧光法	154	87.80	92.31
	本发明方法	154	89.47	94.4

[0029] 注:两组检测方法中,链霉亲和素-生物素偶联ELISA法其敏感性和特异性高于间接免疫荧光法。

[0030] 经比较两种方法阳性率无显著性差异,在灵敏度和特异性方面,本发明方法更优,更适合于临床早期感染诊断。

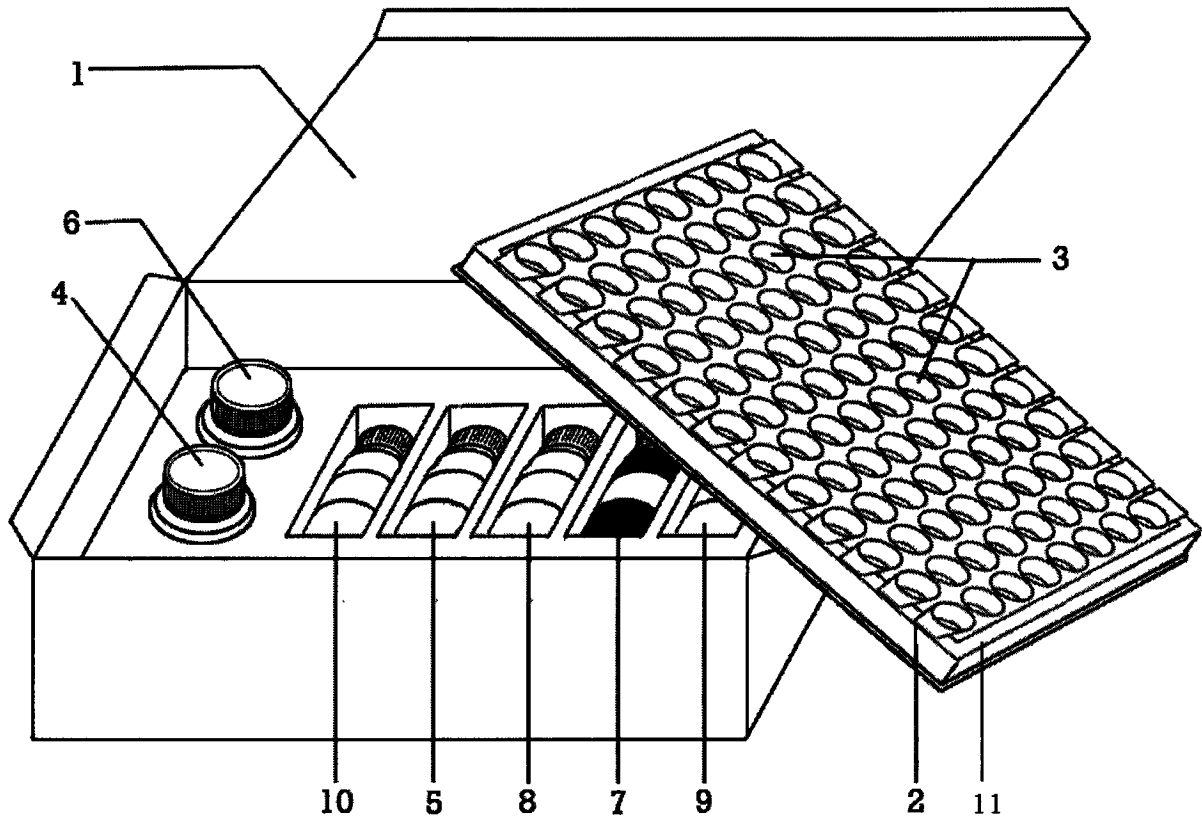


图 1

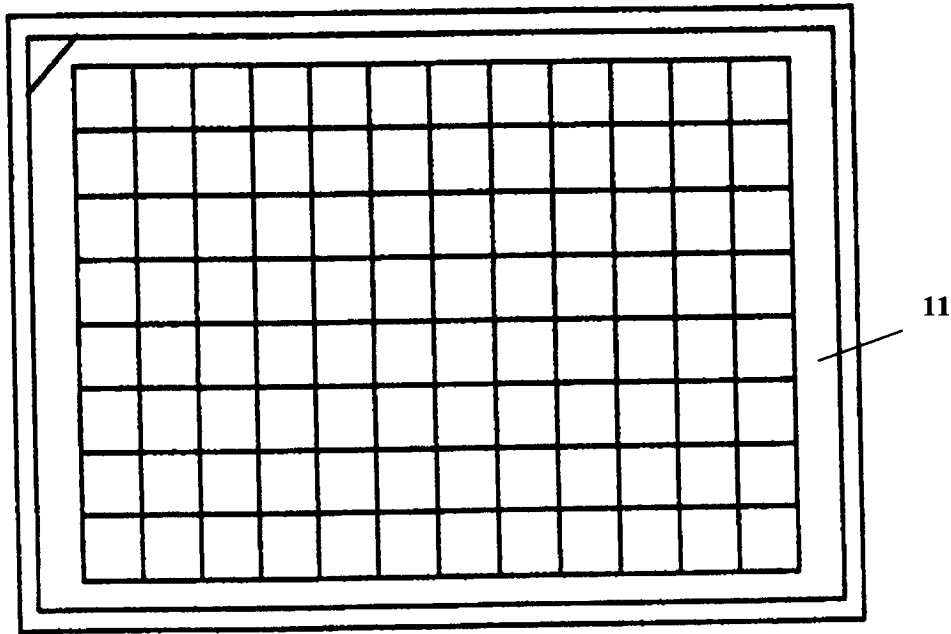


图 2

专利名称(译)	呼吸道合胞病毒检测试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN103604922A	公开(公告)日	2014-02-26
申请号	CN201310601571.6	申请日	2013-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津市宝坻区人民医院		
申请(专利权)人(译)	天津市宝坻区人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	天津市宝坻区人民医院		
[标]发明人	徐向英 李立和 齐金龙 杨帅		
发明人	徐向英 李立和 齐金龙 杨帅		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N2333/135		
其他公开文献	CN103604922B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呼吸道合胞病毒试剂盒及其检测方法，属于酶免疫分析技术领域，本发明试剂盒采用咽拭子擦拭患儿咽部，通过盐酸氨溴索药物使咽拭子鼻咽分泌物溶解，经高速离心后，沉淀物鼻咽上皮细胞加入到2.0ml含1.0%(V/V)Triton X-100的磷酸盐缓冲液中，静置30min，剧烈震荡，使呼吸道合胞病毒从咽上皮细胞脱落出来，取溶解液加入到呼吸道合胞病毒检测酶标板上，采用酶联免疫吸附法检测呼吸道合胞病毒，经温浴、洗涤、加生物素化抗呼吸道合胞病毒抗体，链霉亲和素偶联过氧化物酶复合物，再加入底物液，读取结果。本发明操作简单、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法，适用于检测鼻咽部上皮细胞感染呼吸道合胞病毒，可以作为儿童感染呼吸道合胞病毒的重要检查指标。

