



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103604922 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201310601571. 6

(22) 申请日 2013. 11. 20

(73) 专利权人 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)

(56) 对比文件

CA 2805547 A1, 2012. 01. 12,

CN 102253205 A, 2011. 11. 23,

CN 102928589 A, 2013. 02. 13,

CN 103048450 A, 2013. 04. 17,

CN 103048459 A, 2013. 04. 17,

WO 2011/020079 A1, 2011. 02. 17,

Allan Hornsleth 等. Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Secretions by a Biotin-Avidin ELISA More Sensitive Than the Fluorescent Antibody Technique. 《Journal of Medical Virology》. 1986, 第 18 卷 (第 2 期),

审查员 段晓露

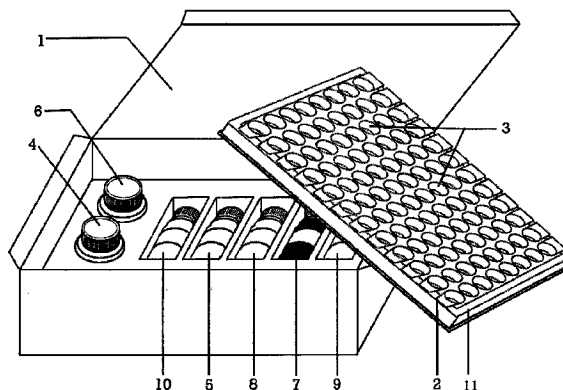
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

呼吸道合胞病毒检测试剂盒

(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,其特征在于有盒体(1),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)、酶标板(2)均安放在盒体(1)内,所述分泌物前处理液为含有 30mg/L 盐酸氨溴索磷酸盐缓冲液,所述酶标板由设有反应孔的板条与塑料托架(11)组成。

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)由塑料托架和各自分开的带孔穴的塑料条组成。

4. 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,其特征在于其检测方法为用咽拭子擦拭患儿咽部,加入到 2ml 含有 30mg/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 酶标板中,37℃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℃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℃水浴箱水浴 30min,洗涤 5 次;加入邻苯二胺 OPD 试剂和 H_2O_2 各 50 μ l,置 37℃水浴箱水浴 10min,加 1 滴硫酸溶液,酶标仪测定 A_{490nm} 值。

呼吸道合胞病毒检测试剂盒

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 30mg/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℃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℃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℃水浴箱水浴 30min,洗涤 5 次;加入试剂显色液各 50 μ l,至 37℃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。

[0010] 二、生物素化抗体的制备

[0011] 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 NaHB₄ 0.1ml 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。

[0012] 三、链霉亲和素偶联过氧化物酶标记物的制备

[0013] 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。

[0014] 四、磷酸盐缓冲液 (0.15M pH7.4 PBS) 配置 : 0.15M 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。

[0015] 五、A 试剂 前处理液的配置 : 在 1L 洗涤液中加入盐酸氨溴索 30mg, 即为前处理液。

[0016] 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

[0017] 图 1 呼吸道合胞病毒检测试剂盒示意图。

[0018] 图 2 酶标板示意图。

具体实施方式

[0019] 实施例 1

[0020] 1. 样品处理 用咽拭子擦拭患儿咽部, 加入到 2ml 含有 30mg/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。

[0021] 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℃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℃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℃水浴 30min,洗涤 5 次;加入试剂 E、F 各 50 μ l,至 37℃水浴 10min,加 1 滴终止液酶标仪测定 A_{490nm} 值。

[0022] 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。

[0023] 实施效果

[0024] 1. 两种检测呼吸道合胞病毒检测方法阳性率比较见表 1:

[0025] 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:

[0026]

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

[0027] 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。

[0028] 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

[0029]

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

[0030] 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。

[0031] 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。

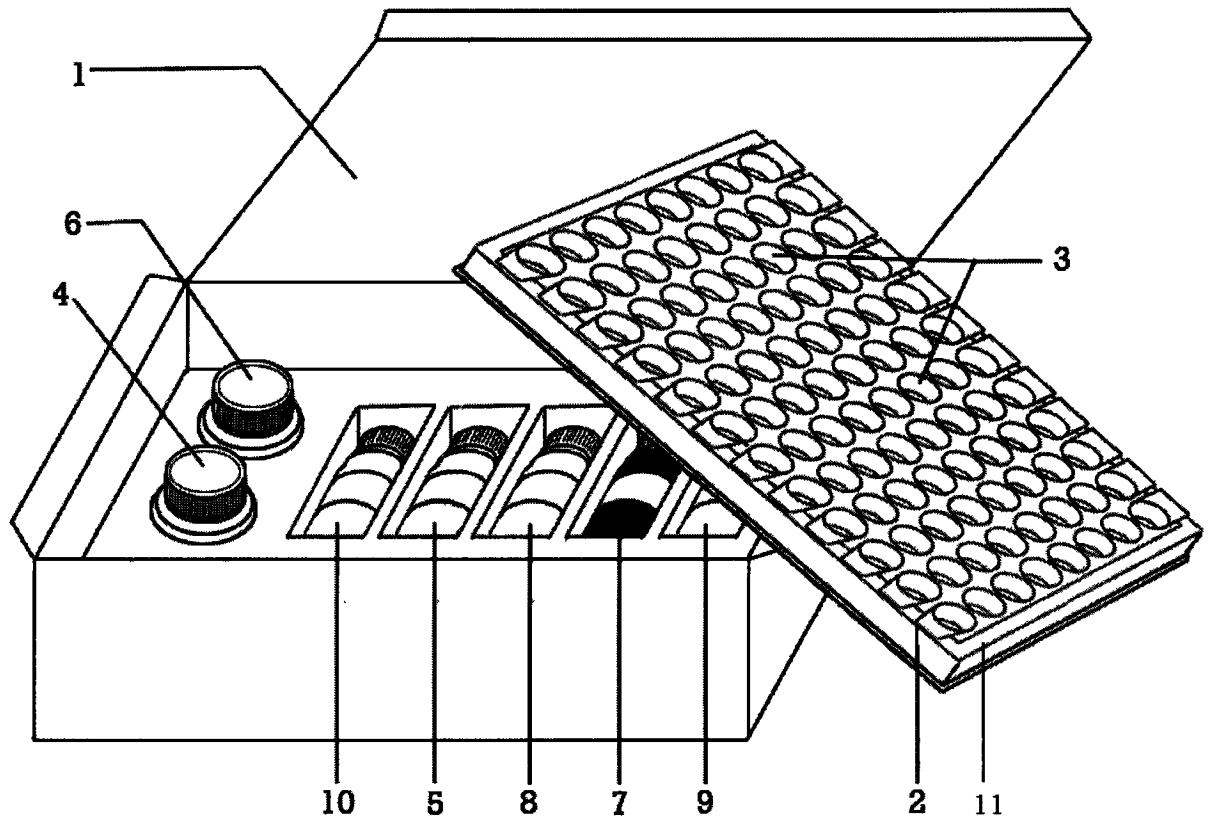


图 1

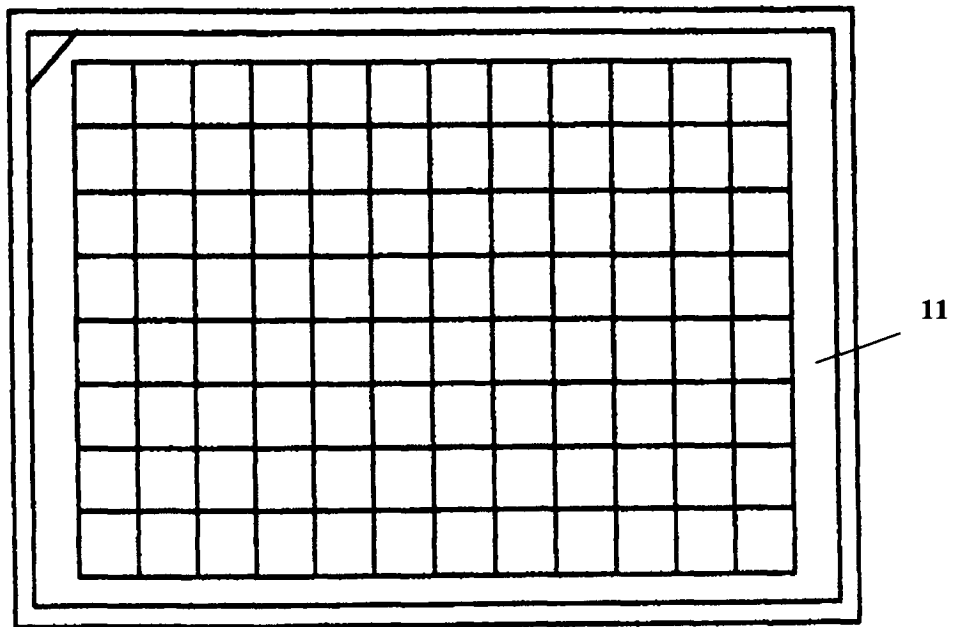


图 2

专利名称(译)	呼吸道合胞病毒检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103604922B	公开(公告)日	2015-11-25
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		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN103604922A		
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。

