



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110146701 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910431793.5

(22)申请日 2019.05.22

(71)申请人 广州爱康生物技术有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区瑞和路
39号自编号G1座301-307

(72)发明人 刘灵辉 赖演媚 赖柔贝

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文 孙超

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒,试剂盒包括胶体金试纸卡,试纸卡包括胶板,胶板沿样品流动方向设有端头依次连接的样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫,金标垫吸附有胶体金标记的金标抗体,硝酸纤维膜沿样品流动方向设有检测T区和质控C区,检测T区包被有捕获抗体,质控C区包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体;金标抗体是用曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原偶联卵白蛋白免疫小鼠后收集的脾细胞经杂交制备的杂交瘤细胞所分泌;捕获抗体是通过曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原偶联卵白蛋白免疫动物后所得。本发明胶体金试纸卡及试剂盒能准确用于临床上曲霉菌的检测。

1. 一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡,其特征在于,所述试纸卡包括胶板,胶板沿样品流动方向设有端头依次连接的样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述金标垫吸附有胶体金标记的抗体,硝酸纤维膜沿样品流动方向依次设有检测T区和质控C区,所述检测T区包被有捕获抗体,所述质控C区包被有羊抗鼠多克隆抗体;

所述捕获抗体是通过以下方法进行制备:

S11) 培养曲霉菌至菌浓度达到对数后期,离心收集总菌体,重新悬浮并裂解菌体;

S12) 依次采用乙醇和CTAB沉淀曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原,再采用过碘酸钠法将曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原和卵白蛋白进行偶联,即得到曲霉菌抗原;

S13) 将曲霉菌抗原与弗氏佐剂进行混合,乳化后免疫新西兰兔;

S14) 从免疫后新西兰兔中取血,离心收集血清;对血清采用饱和硫酸铵盐析法沉淀抗曲霉菌抗体;

S14) 将抗曲霉菌抗体溶解于PBS缓冲液中,再进行透析和亲和层析,纯化后的抗曲霉菌抗体的效价比 $\geq 1:5000$;

所述金标抗体是通过以下方法进行制备:

S21) 将步骤S12制备的曲霉菌抗原与弗氏佐剂进行混合,乳化后免疫小鼠;

S22) 从免疫后小鼠中取脾细胞,并制成脾细胞悬液;

S23) 将脾细胞悬液和骨髓瘤细胞进行混合,诱导形成杂交瘤细胞;

S24) 筛选合格的杂交瘤细胞并进行克隆化培养,从杂交瘤细胞的培养液中收集上清并用于亲和层析,纯化后的抗曲霉菌单克隆抗体的纯度 $\geq 90\%$ 。

2. 如权利要求1所述的胶体金试纸卡,其特征在于,所述样品垫采用第一缓冲液进行浸泡、烘干预处理,所述第一缓冲液为甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,第一缓冲液的浓度为 $10\sim 100\text{mM}$,所述第一缓冲液还包含 $5\sim 100\text{g/L}$ 表面活性剂、 0.2g/L 氯化钠和 2g/L 甘氨酸,所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

3. 如权利要求1所述的胶体金试纸卡,其特征在于,所述金标垫采用第二缓冲液进行浸泡、烘干预处理,所述第二缓冲液为甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,所述第二缓冲液的浓度为 $10\sim 100\text{mM}$,所述第二缓冲液还包含 $5\sim 100\text{g/L}$ 表面活性剂、 0.2g/L 氯化钠和 2g/L 甘氨酸,所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

4. 如权利要求1所述的胶体金试纸卡,其特征在于,所述胶体金标记的金标抗体是通过以下方法进行制备:采用 0.04mg/mL 金标抗体包被胶体金,离心分离出游离的胶体金;再用第三缓冲液悬浮已经标记好的金标抗体,所述第三缓冲液为含 1mg/mL PEG6000、 5% (w/v) 蔗糖的 10mM 、 $\text{pH}7.2$ 磷酸缓冲液。

5. 如权利要求1所述的胶体金试纸卡,其特征在于,所述金标垫按 $4\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂 100mg/mL 胶体金标记的金标抗体溶液,所述检测T区按 $1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂 0.5mg/mL 捕获抗体溶液,所述质控C区按 $1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂 0.5mg/mL 羊抗鼠IgG多克隆抗体溶液。

6. 一种包含如权利要求1~5任一项所述的胶体试纸卡的试剂盒,所述试剂盒还包含卡

壳,卡壳包括背卡和上盖,背卡设有卡槽,所述胶体试纸卡镶嵌于所述卡槽内,所述上盖设有测试窗和加样孔,所述测试窗的位置与所述检测T区和质控C区的位置相配合,所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

7.如权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含样品稀释液,所述样品稀释液为甘氨酸液缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,所述样品稀释液的浓度为10~100mM;所述样品稀释液还包含50~300mM氯化钠、表面活性剂和0.1%~5%BSA (w/v) 或包含50~300mM氯化钠、表面活性剂和0.1%~5%酪蛋白(w/v),所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于临床医学免疫检测技术领域,尤其涉及一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒。

背景技术

[0002] 侵袭性曲霉菌病(IA)临床表现多样,死亡率居高不下,可达50.0%~90.0%。IA主要发生在免疫低下患者,如急性白血病、骨髓干细胞移植、实体器官移植、恶性肿瘤化疗等;其发病率在过去的几十年一直持续上升。

[0003] 日本研究资料显示,1993年以来曲霉菌已经成为血液肿瘤患者的首位致病真菌。意大利一项研究显示,IA在白血病患者中的致死率接近50%,而对于异基因造血干细胞移植患者中致死率接近90%。

[0004] 造成曲霉菌感染高死亡率和预后极差的原因之一是曲霉菌感染发病隐匿,临床表现无特异性、早期诊断困难,及时的诊断和治疗IA是提高患者生存率和改善患者预后的关键,并避免可能造成毒副作用的抗真菌药物的过度使用。但IA的早期准确诊断仍然是个急待解决的难题。

[0005] 目前曲霉菌感染的诊断方法主要有真菌显微镜检查和培养、组织病理学检查、影像学检查、血清学及分子生物学检查。然而这些诊断方法均有一些不足:

[0006] 1)传统的真菌培养和组织病理方法是确诊IA的金标准,但因培养所需时间长,阳性率低及活检有创伤,其已不能满足临床诊断的要求;另外,曲霉菌基本上不能从血培养中获得,尤其是该类患者的病情往往较严重,免疫系统受损时甚至还存在出血倾向;因此标本取材等侵入性诊断常常不能得到实施,部分免疫力低下及血小板减少的病人进行这种有创检查甚至会危及生命;

[0007] 2)在影像学检查不敏感且滞后,具有特征性的“halo”征存在时间短、特异性不足,不能有效区别曲霉菌和其他丝状真菌感染,其不能达到快速准确诊断IA的要求;

[0008] 3)近年来已有大量关于核酸分子诊断技术应用于IA的早期诊断研究中,并且已经取得了一定成果,但是由于目前缺乏标准化的方法,多种因素导致差异的产生,各个研究采用的方法存在差异,结果也不尽相同,使阳性结果不可重复或者间断阳性;准确解释IA核酸检测结果的意义还需进行大量临床实验,实际应用于临床为时尚早。

[0009] 近年来快速发展的血清学检验技术在曲霉菌诊断中得到广泛应用。半乳甘露聚糖(Galactomannan,简写GM)是曲霉菌细胞壁上特有的多糖成份,其是EORTC/MSG推荐的侵袭性曲霉菌病的真菌学检测标准之一。资料表明血清GM检测对临床曲霉菌感染患者诊断的敏感性为84.4%,特异性为90.1%。以GM阳性为起点对临床高危患者及时抗曲霉治疗,病死率可减少至13.7%。

[0010] 然而,目前国内少有此类曲霉菌GM胶体金检测试剂盒。

发明内容

[0011] 本发明目的在于克服现有技术存在的不足,而提供一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒,本发明胶体金试剂盒能准确检测曲霉菌。

[0012] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡,所述试纸卡包括胶板,胶板沿样品流动方向设有端头依次连接的样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述金标垫吸附有胶体金标记的金标抗体,硝酸纤维膜沿样品流动方向设有检测T区和质控C区,所述检测T区包被有捕获抗体,所述质控C区包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0013] 所述捕获抗体是通过以下方法进行制备:

[0014] S11) 培养曲霉菌至菌浓度达到对数后期,离心收集总菌体,重新悬浮并裂解菌体;

[0015] S12) 依次采用乙醇和CTAB沉淀曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原,再采用过碘酸钠法将曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原和卵白蛋白进行偶联,即得到曲霉菌抗原;

[0016] S13) 将曲霉菌抗原与弗氏佐剂进行混合,乳化后免疫新西兰兔;

[0017] S14) 从免疫后新西兰兔中取血,离心收集血清;对血清采用饱和硫酸铵盐析法沉淀抗曲霉菌抗体;

[0018] S14) 将抗曲霉菌抗体溶解于PBS缓冲液中,再进行透析和亲和层析,纯化后的抗曲霉菌抗体的效价比 $\geq 1:5000$;

[0019] 所述金标抗体(单克隆抗体)是通过以下方法进行制备:

[0020] S21) 将步骤S12制备的曲霉菌抗原与弗氏佐剂进行混合,乳化后免疫小鼠;

[0021] S22) 从免疫后小鼠中取脾细胞,并制成脾细胞悬液;

[0022] S23) 将脾细胞悬液和骨髓瘤细胞进行混合,诱导形成杂交瘤细胞;

[0023] S24) 筛选合格的杂交瘤细胞进行克隆化培养,从杂交瘤细胞细胞培养液中收集上清并用于亲和层析,纯化后的抗曲霉菌单克隆抗体的纯度 $\geq 90\%$ 。

[0024] 作为上述技术方案的改进,所述样品垫采用第一缓冲液进行浸泡、烘干预处理,所述第一缓冲液为甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,第一缓冲液的浓度为 $10\sim 100\text{mM}$,所述第一缓冲液还包含 $5\sim 100\text{g/L}$ 表面活性剂、 0.2g/L 氯化钠、 2g/L 甘氨酸,所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

[0025] 作为上述技术方案的改进,所述的金标垫采用第二缓冲液进行浸泡、烘干预处理,所述第二缓冲液为甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,所述第二缓冲液的浓度为 $10\sim 100\text{mM}$,所述第二缓冲液还包含 $5\sim 100\text{g/L}$ 表面活性剂、 0.2g/L 氯化钠和 2g/L 甘氨酸,所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

[0026] 作为上述技术方案的改进,所述胶体金标记的金标抗体是通过以下方法进行制备:采用 0.04mg/mL 金标抗体包被胶体金,离心分离出游离的胶体金;再用第三缓冲液悬浮胶体金标记的金标抗体,所述第三缓冲液为含 1mg/mL PEG6000、 5% (W/V) 蔗糖的 10mM 、

pH7.2磷酸缓冲液。

[0027] 作为上述技术方案的改进,所述金标垫按 $4\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂 $100\text{mg}/\text{mL}$ 胶体金 标记的金标抗体溶液,所述检测T区按 $1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 捕获抗体溶液, 所述质控C区按 $1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 羊抗鼠IgG多克隆抗体溶液。

[0028] 另外,本发明还提供一种包含所述的胶体试纸卡的试剂盒,所述试剂盒还 包含卡壳,卡壳包括背卡和上盖,背卡设有卡槽,所述胶体试纸卡镶嵌于所述 卡槽内,所述上盖设有测试窗和加样孔,所述测试窗的位置与所述检测T区和 质控C区的位置相配合,所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

[0029] 作为上述技术方案的改进,所述试剂盒还包含样品稀释液,所述样品稀释 液为甘氨酸液缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓 冲液,所述样品稀 释液的浓度为 $10\sim 100\text{mM}$;所述样品稀释液还包含 $50\sim 300\text{mM}$ 氯化钠、表面活性剂和 $0.1\% \sim 5\%$ BSA(w/v)或包含 $50\sim 300\text{mM}$ 氯化钠、表面 活性剂和 $0.1\% \sim 5\%$ 酪蛋白(w/v),所述表 面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、 Tween-20、Tween-60、Tween-80 和SPAN-20中的一种。

[0030] 本发明有益效果:本发明公开了一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试 剂盒,试剂盒包括胶体金试纸卡,试纸卡包括胶板,胶板沿样品流动方向设有 端头依次连接的样 品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫,金标垫吸附有胶体金 标记的金标抗体,硝酸纤维膜沿 样品流动方向设有检测T区和质控C区,检测 T区包被有捕获抗体,质控C区包被有羊抗鼠 IgG多克隆抗体;捕获抗体是通 过曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原、卵白蛋白免疫所得,金标抗 体是通过曲霉菌半 乳甘露聚糖半抗原、卵白蛋白免疫后收集的脾细胞经杂交制备的杂交 瘤细胞所 分泌;本发明胶体金试纸卡及试剂盒能准确用于临床上曲霉菌的检测。

具体实施方式

[0031] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对 本发明 作进一步说明。

[0032] 本发明提供一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡,所述试纸卡包括胶板, 胶板沿 样品流动方向设有端头依次连接的样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水 垫,所述金标垫吸 附有胶体金标记的金标抗体,硝酸纤维膜沿样品流动方向设 有检测T区和质控C区,所述检 测T区包被有捕获抗体,所述质控C区包被有 羊抗鼠IgG多克隆抗体;

[0033] 所述捕获抗体是通过以下方法进行制备:

[0034] S11) 培养曲霉菌至菌浓度达到对数后期,离心收集总菌体,重新悬浮并裂 解菌 体;

[0035] S12) 依次采用乙醇和CTAB沉淀曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原,再采用过碘 酸钠法 将曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原和卵白蛋白进行偶联,即得到曲霉菌抗原;

[0036] S13) 将曲霉菌抗原与弗氏佐剂进行混合,乳化后免疫新西兰兔;

[0037] S14) 从免疫后新西兰兔中取血,离心收集血清;对血清采用饱和硫酸铵盐 析法沉 淀抗曲霉菌抗体(多抗);

[0038] S14) 将抗曲霉菌抗体溶解于PBS缓冲液中,再进行透析和亲和层析,纯化 后的抗 曲霉菌抗体的效价比 $\geq 1:5000$;

[0039] 所述金标抗体(单克隆抗体)是通过以下方法进行制备:

[0040] S21) 将步骤S12制备的曲霉菌抗原与弗氏佐剂进行混合,乳化后免疫小鼠;

[0041] S22) 从免疫后小鼠中取脾细胞,并制成脾细胞悬液;

[0042] S23) 将脾细胞悬液和骨髓瘤细胞进行混合,诱导形成杂交瘤细胞;

[0043] S24) 筛选合格的杂交瘤细胞进行克隆化培养,从杂交瘤细胞的培养液中收集上清并用于亲和层析,纯化后的抗曲霉菌单克隆抗体的纯度 $\geq 90\%$ 。

[0044] 优选地,所述样品垫采用第一缓冲液进行浸泡、烘干预处理,所述第一缓冲液为甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,第一缓冲液的浓度为10~100mM,所述第一缓冲液还包含5~100g/L表面活性剂、0.2g/L氯化钠和2g/L甘氨酸,所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80 和SPAN-20中的一种。

[0045] 优选地,所述的金标垫采用第二缓冲液进行浸泡、烘干预处理,所述第二缓冲液为甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,所述第二缓冲液的浓度为10~100mM,所述第二缓冲液还包含5~100g/L表面活性剂、0.2g/L氯化钠和2g/L甘氨酸,所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

[0046] 优选地,所述胶体金标记的金标抗体是通过以下方法进行制备:采用0.04 mg/mL金标抗体包被胶体金,离心分离出游离的胶体金;再用第三缓冲液悬浮胶体金标记的金标抗体,所述第三缓冲液为含1mg/mL PEG6000、5% (w/v) 蔗糖的10mM、pH7.2磷酸缓冲液。

[0047] 优选地,所述金标垫按 $4\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂100mg/mL胶体金标记的金标抗体溶液,所述检测T区按 $1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂0.5mg/mL捕获抗体溶液,所述质控C区按 $1\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 喷涂0.5mg/mL羊抗鼠IgG多克隆抗体溶液。

[0048] 另外,本发明还提供一种包含所述的胶体试纸卡的试剂盒,所述试剂盒包含卡壳,卡壳包括背卡和上盖,背卡设有卡槽,所述胶体试纸卡镶嵌于所述卡槽内,所述上盖设有测试窗和加样孔,所述测试窗的位置与所述检测T区和质控C区的位置相配合,所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

[0049] 优选地,所述试剂盒还包括样品稀释液,所述样品稀释液为甘氨酸液缓冲液、Tris-Cl缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲液或柠檬酸缓冲液,所述样品稀释液的浓度为10~100mM;所述样品稀释液还包含50~300mM氯化钠、表面活性剂和0.1%~5% BSA (w/v) 或包含50~300mM氯化钠、表面活性剂和0.1%~5% 酪蛋白 (w/v),所述表面活性剂至少为PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

[0050] 实施例1

[0051] 本实施例提供曲霉菌半抗原的制备方法,其包括以下步骤:

[0052] 1) 培养曲霉菌,至菌浓度达到对数后期;

[0053] 2) 将菌液离心收集总菌体,重新悬浮于裂解菌体;

[0054] 3) 乙醇法沉淀曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原(GM半抗原),CTAB法特异性沉淀GM半抗原;

[0055] 4) 过碘酸钠法偶联GM与OVA蛋白(卵白蛋白)并纯化,得到用于免疫动物的曲霉菌

抗原(GM抗原)。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例提供捕获抗体的制备方法,其包括以下步骤:

[0058] 1) 免疫动物:取实施例1制备的GM抗原混合弗氏佐剂并乳化,免疫SPF 级新西兰兔,皮下注射;分别于首次免疫后第21、35、49天进行3次加强免疫;

[0059] 2) 取已经免疫的新西兰兔,在末次免疫后第7天取血,检测多抗效价 $>1:10000$ (胶体金法);

[0060] 3) 3000rpm离心10min取血清;

[0061] 4) 饱和硫酸铵盐析法沉淀抗体,进行初步提纯:取血清和等体积生理盐水,搅拌均匀,缓慢滴加50%总体积饱和硫酸铵,搅拌均匀,4℃静置6h以上,结晶析出;离心去上清,结晶完全重新溶解于2/3原体积的生理盐水,缓慢滴加此次总体积2/5的饱和硫酸铵,混匀;4℃静置6h以上,结晶析出;12%PEG6000 可以析出抗体;离心去上清,加入适量PBS重新溶解,溶液再次透析;

[0062] 5) Protein A sepharose亲和层析法再次纯化;

[0063] 6) 效价测定:用间接胶体金法,包被原为GM,酶标二抗为辣根过氧化物酶 标记的羊抗鼠多克隆抗体;确定效价比在1:5000以上。

[0064] 实施例3

[0065] 本实施例提供金标抗体的制备方法,其包括以下步骤:

[0066] 1) 皮下注射每个注射点注射30~50μL混有弗氏佐剂的GM抗原,每只小鼠注射6-8个点;分别于首次免疫后第4、7、10、13周进行3次加强免疫和最后冲击免疫;在冲击免疫完成后96小时内完成细胞融合;

[0067] 2) 于融合前48~36小时,将骨髓细胞扩大培养,制备骨髓瘤细胞悬液,每毫升细胞数 0.5×10^5 ;

[0068] 3) 取已经免疫的BALB/c小鼠,在末次冲击免疫后第3~4天以拉颈或断头 处死小鼠,用75%酒精浸泡消毒小鼠毛皮;然后打开腹腔无菌取脾,去除脂肪 和结缔组织,用无血清的培养液冲洗,置100目不锈钢网筛上研磨脾脏,用洗液洗2~3次,经1000r/min离心5分钟,弃上清加入完全培养基,用吸管吹打 分散,收集上层悬液,制成脾细胞悬液;

[0069] 4) 制备饲养细胞:培养小鼠腹腔巨噬细胞,制备细胞悬液,使细胞浓度为 2×10^5 /ml,备用;

[0070] 5) 聚乙二醇(PEG) 诱导细胞融合并筛选:将前述步骤制备的按如下比例 混合: 1×10^8 脾细胞与 $2 \sim 5 \times 10^7$ 骨髓瘤细胞混合于一支50ml融合管中,补加 不完全培养基至30ml,充分混匀;1000r/min离心5~10分钟,将上清尽量吸净; 在手掌上轻击融合管底,使沉淀细胞松散均匀,置40℃水浴中预热;用1ml吸 管在45~60秒内滴加预热至40℃50%PEG (PH 8.0) 1ml,边加边轻轻搅拌; 用10ml吸管在90秒内加20~30ml预热至37℃不完全培养基;20~37℃静置10 分钟,1000r/min 5分钟,弃去上清;加入5ml HAT培养基,轻轻吹吸沉淀细胞, 使其悬浮并混匀,然后补加含腹腔巨噬细胞的HAT培养基至80~100ml;分装 96孔细胞培养板,每孔0.10~0.15ml;分装24孔板,每孔1.0~1.5ml;然后将 培养板置37℃、6%CO₂培养箱内培养;5天后用HAT培养基换出1/2培养基, 7~10天后用HT培养基换出HAT培养基;经常观察杂交瘤细胞生长情况,待其 长至孔底面积1/10以上时吸出上清进行抗体检测,筛

选出合格的细胞株；

[0071] 6) 将筛选出来的合格的杂交瘤细胞进行克隆化培养；

[0072] 7) 当细胞扩增到足够的数量,收集上清用于纯化;亲和层析法分离纯化抗 曲霉菌单克隆抗体,纯度90%以上。

[0073] 实施例4

[0074] 本实施例提供胶体金标记的金标抗体的制备方法,其包括以下步骤:

[0075] 1) 采用经典三氯金酸-柠檬酸三钠法制备胶体金,胶体金的粒径为50nm, 所测胶体金溶液的pH为7.5;

[0076] 2) 以金标抗体包被胶体金,金标抗体的浓度0.04mg/mL,离心分离出游离 的胶体金粒子;后以原体积1/5的10mM且pH7.2磷酸缓冲液重新悬浮,磷酸 缓冲液还包含1mg/mL PEG6000,5%蔗糖(w/v)。

[0077] 实施例5

[0078] 本实施例提供还提供用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡的制备方法,其包括 以下步骤:

[0079] 1) 使用第一缓冲液对金标垫进行预处理,将金标垫浸于第一缓冲液2小时, 取出置于37度烘干;第一缓冲液为10mM且pH7.2的磷酸缓冲液,第一缓冲 液还包含0.2g/L氯化钠、2g/L甘氨酸和5g/L PEG6000;

[0080] 2) 然后将实施例4制备的胶体金标记的金标抗体溶液喷涂至预处理的金标 垫,胶体金标记的金标抗体溶液的浓度为100mg/mL,喷涂量为4 μ L/cm²,制 备好金标垫;

[0081] 3) 在硝酸纤维素膜的检测T区和质控C区上分别喷涂0.5mg/mL的捕获抗 体溶液和羊抗鼠IgG抗体溶液,喷涂量为1 μ L/cm²;

[0082] 4) 使用第二缓冲液对样品垫进行预处理,将样品垫浸于第二缓冲液2小时, 取出置于37度烘干;第二缓冲液为10mM且pH7.2的磷酸缓冲液,第二缓冲 液还包含5g/L PEG6000、0.2g/L氯化钠和2g/L甘氨酸;

[0083] 5) 将样品垫、制备好的金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在PVC 底板上,切割制得3~5mm宽的试剂条;亦可将试剂条装入卡壳得到试剂卡。

[0084] 实施例6

[0085] 本实施例提供一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡,试纸卡包括PVC胶板, PVC胶板沿样品流动方向设有端头依次连接的样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和 吸水垫,金标垫吸附有胶体金标记的金标抗体,硝酸纤维膜沿样品流动的方向 设有检测T区和质控C区,检测 T区包被有捕获抗体,质控C区包被有羊抗鼠IgG 多克隆抗体。

[0086] 实施例7

[0087] 本实施例提供一种用于检测曲霉菌的胶体金试剂盒,试剂盒包括胶体金试 纸卡和卡壳,卡壳包括背卡和上盖,背卡设有卡槽,胶体试纸卡镶嵌于卡槽内, 上盖设有测试窗和加样孔,测试窗的位置与所述检测T区和质控C区的位置相 配合,加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合;试剂盒还包括样品稀释液, 所述样品稀释液为甘氨酸液缓冲液、Tris-C1缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸缓冲 液或柠檬酸缓冲液,所述样品稀释液的浓度为10~100mM;所述样品稀释液还 包含50~300mM氯化钠、表面活性剂和0.1%~5%BSA(w/v)或包 含50~300mM 氯化钠、表面活性剂和0.1%~5%酪蛋白(w/v),所述表面活性剂至少为

PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG20000、Triton X-100、Triton X-305、Tween-20、Tween-60、Tween-80和SPAN-20中的一种。

[0088] 最后所应当说明的是,以上实施例用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者同等替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

专利名称(译)	一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒		
公开(公告)号	CN110146701A	公开(公告)日	2019-08-20
申请号	CN201910431793.5	申请日	2019-05-22
[标]发明人	刘灵辉 赖演媚 赖柔贝		
发明人	刘灵辉 赖演媚 赖柔贝		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/56911		
代理人(译)	颜希文 孙超		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测曲霉菌的胶体金试纸卡及试剂盒，试剂盒包括胶体金试纸卡，试纸卡包括胶板，胶板沿样品流动方向设有端头依次连接的样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫，金标垫吸附有胶体金标记的金标抗体，硝酸纤维膜沿样品流动方向设有检测T区和质控C区，检测T区包被有捕获抗体，质控C区包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体；金标抗体是用曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原偶联卵白蛋白免疫小鼠后收集的脾细胞经杂交制备的杂交瘤细胞所分泌；捕获抗体是通过曲霉菌半乳甘露聚糖半抗原偶联卵白蛋白免疫动物后所得。本发明胶体金试纸卡及试剂盒能准确用于临床上曲霉菌的检测。