

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/569

G01N 33/571 G01N 33/576



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01126500.0

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1164949C

[22] 申请日 2001.8.17 [21] 申请号 01126500.0

[71] 专利权人 上海数康生物科技有限公司

地址 200233 上海市钦州北路 1089 号 51 号
楼 4 楼

[72] 发明人 胡赓熙

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

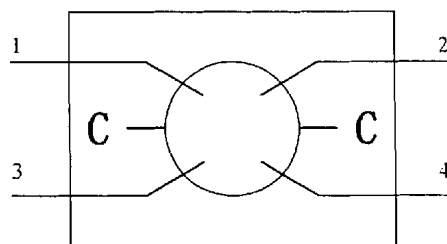
代理人 孙跃虹

权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法。该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成，其中在免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，点制有 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原四种蛋白和标记物羊抗鼠 IgG 抗体。本发明还公开了该检测试剂盒的制备方法。本发明试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现了对乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性疾病的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，特别适用于大规模血液检查，也为传染性疾病的检测提供了新思路。



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

1、一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，该试剂盒由斑点金免疫渗滤法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成，其特征在于：

(1)其中所述的斑点金免疫渗滤法联检反应装置是由硝酸纤维素膜和垫于膜下的两层吸水滤纸组成，在硝酸纤维素膜上，相距一定距离点制有 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠 IgG 抗体；

(2)其中所述的胶体金标记物混合液是四种胶体金标记物的混合溶液，包括 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原和 HIV 抗原的胶体金标记物，且胶体金标记液中 HBsAg 的单抗被胶体金标记的蛋白浓度为 20-50 μ g/ml，HCV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120 μ g/ml，梅毒抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120 μ g/ml，HIV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 80-120 μ g/ml，它们依次按体积比为 1: 1: 1.2-2.5: 1.2-2.5 的比例相混合；胶体金颗粒大小为 20—30nm。

2、一种如权利要求 1 或 2 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，其特征在于其中所述的梅毒抗原为单一的梅毒抗原或是多种梅毒抗原的混合物；HIV 抗原是 HIV-1 抗原、HIV-2 抗原或 HIV-1 抗原和 HIV-2 抗原的混合物。

3、一种如权利要求 1 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒，其特征在于其中所述的缓冲液为含有 0.03-0.05%Tween 20 的 PH7.2—8.8 的 PBS 缓冲液。

4、一种如权利要求 1 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒的制备方法，其特征在于试剂盒的制备方法包括下列步骤：

(一) 斑点金免疫渗滤法联检反应装置的制备

(1) 膜上加样物的制备

将 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原分别用 0.02M，pH8.0 的 PBS，4℃透析过夜；透析后的各蛋白分别用 0.02M，pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-1.0mg/ml；

(2) 在膜上加样

分别吸取上述 HBsAg 单抗、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原，点于硝酸纤维素膜特定的位点上，每点 0.3-3 μ l；另吸取羊抗鼠 IgG 抗体，于同一硝酸纤维素膜上远离上述各点样位置的地方作一标记，此标记可为一点、一条线或其他符号；

(3) 膜的后处理

将此硝酸纤维素膜置于 37℃烘箱内 30 分钟,取出后室温放置 20 分钟以上,然后将其浸没于 37℃的封闭液中 20 分钟,取出后,在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5-10 分钟,重复洗涤数次,室温晾干;

(4) 反应装置的装配

取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方,再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中;

(二) 制备胶体金标记物混合液

(1) 制备胶体金颗粒

取 0.01%的氯金酸水溶液,加热煮沸,快速加入 1%枸橼酸三钠溶液,继续煮沸 5 分钟,使得胶体金的大小为 20-30nm;

(2) 制备胶体金标记物

2.1. HBsAg 单抗的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HBsAg 单抗,使其最终浓度为 20-50 μ g/ml;室温下搅拌 30 分钟;加入 10%BSA 溶液使单抗终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使单抗终浓度为 0.1-0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,吸取上清液,弃去;沉淀溶于保存液中,用孔径为 0.45 μ m 滤膜过滤,置 4℃保存备用;

2.2. HCV 抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HCV 抗原,使其终浓度为 90-120 μ g/ml;室温下搅拌 30 分钟,加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.1-0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,吸取上清液,弃去;沉淀溶于保存液中,用孔径为 0.45 μ m 滤膜过滤,置 4℃保存备用;

2.3. 梅毒抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入梅毒抗原使抗原终浓度为 90-120 μ g/ml;室温下搅拌 30 分钟;加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.1--0.5%,室温下搅拌 5 分钟;12000-15000r/min 离心 60 分钟,吸取上清液,弃去;沉淀溶于保存液中,用 0.45 μ m 滤膜过滤,置 4℃保存备用;

2.4 HIV 抗原的胶体金标记物的制备

取 20-30nm 颗粒的胶体金溶液,在磁力搅拌下缓慢加入 HIV 抗原使抗原终浓度为 80-120 μ g/ml;室温下搅拌 30 分钟;加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.2-1.0%,室温下搅拌 5 分钟;加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.1--0.5%,室温下搅拌 5 分钟;

12000-15000r/min 离心 60 分钟, 吸取上清液, 弃去; 沉淀溶于保存液中, 用孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 置 4°C 保存备用;

(3) 制备胶体金标记液

将分别配制的胶体金标记物按体积比为 HBsAg 的单抗胶体金标记液: HCV 抗原胶体金标记液: 梅毒抗原胶体金标记液: HIV 抗原胶体金标记液 = 1: 1: 1.2-2.5: 1.2-2.5 的比例混合完全;

(三) 缓冲液的制备

在 pH7.2-8.8 的 PBS 中加入 Tween20, 使 Tween20 的浓度为 0.03-0.05%。

5、一种如权利要求 1 所述的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒在制备同时检测乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性疾病的试剂中的应用。

用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法。

背景技术

乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒和艾滋病是四种常见的传染性疾病。据 2000 年卫生部的统计年报资料显示，此四种疾病的发病数约占传染病总发病数的 27.57%，给社会和人民生活带来了极大的危害。

乙型肝炎是可能由药物、毒素和病毒等引起的炎症。在我国，约占人口总数 10%-15% 的人群为乙型肝炎病毒 (HBV) 的感染者。HBV 可通过输血、血浆、血制品或使用被病毒污染的注射器针头、针灸用针、采血用具和血液透析等发生感染。其中通过输血这一途径感染因其发病率高，发病时间短，受累人群广而受到了极大的关注。

丙型肝炎的传染源主要为急性临床型病人和无症状的亚临床病人，慢性病人和病毒携带者。一般病人发病前 12 天，其血液即有感染性，并可带毒 12 年以上。丙型肝炎的传染主要通过输血而引起，在大多数发达国家，丙型肝炎是输血后感染的肝炎中最常见的一种类型，国外 30-90% 输血后感染的肝炎为丙型肝炎，我国输血后感染的肝炎中丙型肝炎占 1/3。

梅毒病人是梅毒螺旋体唯一的传染源。性接触传染占 95%。输血时如供血者为梅毒患者可传染于受血者。献血者如患梅毒并处于梅毒螺旋体血症阶段，可以传播梅毒。梅毒螺旋体在体外生活能力低，4℃ 时生存 48-72 小时，40℃ 无感染力，100℃ 立即死亡，近年来我国性病增加，因此对预防输血传播梅毒应给予高度重视。

HIV 病毒是艾滋病的病原体，一般感染源以血液、精液、阴道分泌物、母乳等为主。如果被输入带 HIV 的血液，感染 HIV 的可能性估计超过 90% (相反，一次性交的风险为百分之几到小于 1%)，一次输血带入 HIV 病毒量是非常大的，通过这种方式感染后，很快就会发展为 AIDS，平均时间是 3-5 年 (儿童约为 2 年)。

可见，对血液和血液制品进行包括 HIV，梅毒，HBV，HCV 在内的所有能通过血液传播的病毒的严格检查是非常必要的。我国卫生部早在一九九八年发布的《献血者健康检查标准》就规定了 9 项必检

项目，其中包括乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）、丙型肝炎病毒抗体（HCV 抗体）、艾滋病病毒抗体（HIV 抗体）和梅毒抗体。目前，对于梅毒的检测，一般采用 RPR 法（快速血浆反应素试验）或 TRUST 法（梅毒血清学试验），而对于 HIV、HBV、HCV 的检测，一般采用 ELISA 方法（酶联免疫吸附分析），该方法一次检测需血清 400 μ l，耗时 1—2 小时。由于目前对于献血者所献血液没有一种快速、彻底、覆盖多种疾病的检验方法，导致很多人在接受输血时感染肝炎、艾滋病和梅毒等传染病，严重地影响了受血者的身心健康和社会的安定。

胶体金免疫渗滤方法是从酶联免疫结合方法(ELISA)的基础上发展起来的，最初应用的结合物是酶标记的，称为酶免疫渗滤试验。90 年代初发展了以胶体金为标记物的渗滤试验又称为金免疫渗滤试验(IGFA)。

胶体金免疫渗滤方法的原理是以硝酸纤维素膜为载体，利用微孔滤膜的可滤过性和毛细管作用，使抗原与抗体的反应、洗涤在一个特殊的渗滤装置上，以液体渗滤过膜的方式迅速完成。

由于此方法简单、快速、除商品试剂外不需任何仪器设备，几分钟即可用肉眼观察结果。目前已在临床检测中取得了广泛的应用。胶体金免疫渗滤方法可应用于免疫学检测的几乎所有方面，但主要用于检测正常体液中不存在的抗原性物质(例如诊断传染病中的抗原或抗体)，以及正常含量极低而特殊情况下异常升高的物质(如 HCG、甲胎蛋白等)。近年来由于试剂原料的精选和制备技术的改进，应用范围更加广阔。但目前尚未有将胶体金免疫渗滤法用于多种传染性相关抗原、抗体的同时检测。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是利用胶体金免疫渗滤原理同时对多种传染性疾病进行检测，提供一种反应灵敏、准确，迅速的多用途检测试剂盒。

本发明公开的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒由免疫渗滤金标法（斑点金免疫渗滤法）联检反应装置、缓冲液、胶体金标记物混合液组成；

其中所述的免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，相距一定距离点制有 HBsAg 单抗（鼠抗人）、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠 IgG 抗体，抗原的点样量为 0.3-3 μ l；

其中所述的胶体金标记物混合液是四种胶体金标记物的混合溶液，包括 HBsAg 单抗（鼠抗人）、HCV 抗原、梅毒抗原和 HIV 抗原的胶体金标记物；HBsAg 的单抗（鼠抗人）被胶体金标记的蛋白浓

度为 20-50 $\mu\text{g/ml}$, HCV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120 $\mu\text{g/ml}$, 梅毒抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 90-120 $\mu\text{g/ml}$, HIV 抗原被胶体金标记的蛋白浓度为 80-120 $\mu\text{g/ml}$, 它们依次按体积比为 1: 1.2-2.5: 1.2-2.5 的比例相混合; 胶体金颗粒大小为 20—30nm;

其中所述的缓冲液为含有 0.03-0.05% Tween 20 的 PH7.2—8.8 的 PBS (由磷酸二氢钾或磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制而成的缓冲液) 缓冲液。

本发明所述的梅毒抗原可以为单一的梅毒抗原, 也可以是多种梅毒抗原的混合物; HIV 抗原可以是 HIV-1 (1 型艾滋病病毒) 抗原、HIV-2 (2 型艾滋病病毒) 抗原或 HIV-1 抗原和 HIV-2 抗原的混合物。

本发明所要解决的另一技术问题是提供上述检测试剂盒的制备方法。

本发明公开的用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒的制备方法包括下列步骤:

一、制备免疫渗滤金标法联检反应装置

1. 膜上加样物的制备

将 HBsAg 单抗(鼠抗人)置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。透析后的鼠抗人 HBsAg 单抗用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将 HCV 抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。透析后的 HCV 抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将梅毒抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。透析后的梅毒抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将 HIV 抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。透析后的 HIV 抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将羊抗鼠 IgG 抗体置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。透析后的羊抗鼠 IgG 抗体用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.2-2.0mg/ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2. 在膜上加样

分别吸取上述 HBsAg 单抗(鼠抗人)、HCV 抗原、梅毒抗原、HIV 抗原, 仔细地点于硝酸纤维素膜的特定位置上, 点样体积为 0.3-3 μl 点。

另吸取羊抗鼠 IgG 抗体, 于同一硝酸纤维素膜上远离上述各点样位置的地方作一标记, 此标记可为一点、一条线或其他符号。

3. 膜的后处理

将上述硝酸纤维膜 (NC), 置 37°C 烘箱内 30 分钟。取出后室温放置 20 分钟以上。然后将其浸没于 37°C 的封闭液中 20 分钟。取出后, 在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5-10 分钟。更换洗涤液, 重复上述振荡洗涤过程。取出后, 室温下晾干。4°C 干燥环境中保存备用。

其中所述的封闭液为含有 0.01-0.03% Tween20 的 0.05M pH7.2-8.0 的 PBS 缓冲液; 其中所述的洗涤液为含有 0.03-0.05% Tween20 的 0.01M pH7.2-8.0 的 PBS 缓冲液。

4. 装置的装配

取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方, 再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

二、制备胶体金标记物混合液

1. 制备胶体金颗粒

取 0.01% 的氯金酸水溶液, 加热煮沸, 快速加入 1% 枸橼酸三钠溶液, 继续煮沸 5 分钟, 使得胶体金的大小为 20-30nm。

2. 制备胶体金标记物

2.1. HBsAg 单抗 (鼠抗人) 的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液, 在磁力搅拌下缓慢加入 HBsAg 单抗 (鼠抗人), 使其最终浓度为 20-50 μ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10% BSA 溶液使单抗终浓度为 0.2-1.0%, 室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使单抗终浓度为 0.1-0.5%, 室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟, 仔细吸取上清, 弃去。沉淀溶于保存液中, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 置 4°C 保存备用。

2.2. HCV 抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液, 在磁力搅拌下缓慢加入 HCV 抗原, 使其终浓度为 90-120 μ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10% BSA 溶液使抗原终浓度为 0.2-1.0%, 室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.1-0.5%, 室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟, 仔细吸取上清, 弃去。沉淀溶于保存液中, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 置 4°C 保存备用。

2.3. 梅毒抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20-30nm 的胶体金溶液, 在磁力搅拌下缓慢加入梅毒抗原使抗原终浓度为 90-120 μ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10% BSA 溶液使抗原终浓度为 0.2-1.0%, 室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.1-0.5%, 室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟, 仔细吸取上清, 弃去。沉淀溶于保存液中, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 置 4°C 保存备用。

当胶体金标记液中的梅毒抗原指多个梅毒抗原的混合物时, 各个梅毒抗原的胶体金标记物要分别制备, 混合, 保存备用。

2.4 HIV 抗原的胶体金标记物的制备

取 20-30nm 颗粒的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入 HIV 抗原使抗原终浓度为 80-120 μ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.2-1.0%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.1--0.5%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45 μ m 滤膜过滤，置 4℃ 保存备用。

当胶体金标记液中的 HIV 抗原指多个 HIV 抗原的混合物时，各个 HIV 抗原的胶体金标记物要分别制备，混合，保存备用。

3. 制备胶体金标记物混合液

将分别配制的胶体金标记物按体积比为 HBsAg 的单抗（鼠抗人）胶体金标记液：HCV 抗原胶体金标记液：梅毒抗原胶体金标记液：HIV 抗原胶体金标记液=1：1：1.2-2.5：1.2-2.5 的比例混合完全。

三、缓冲液的制备

在 pH7.2-8.8 的 PBS 中加入 Tween20，使 Tween20 的浓度为 0.03-0.05%。

本发明所要解决的再一技术问题是公开上述检测试剂盒在同时检测乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性中的应用。

本发明所述试剂盒的检测方法如下：

1. 取出免疫渗滤金标法联检反应装置，水平置于桌面；
2. 在免疫渗滤金标法联检反应装置孔内加入两滴缓冲液，湿润表面；
3. 加入待测血清 50ul，等其渗滤入膜内；
4. 加入三滴缓冲液，待其渗入后加入两滴胶体金标记液；
5. 加入三滴缓冲液；
6. 1 分钟后观察相应位置有无红色斑点，有则认为该位置对应的疾病病毒在体内呈阳性，没有则认为该位置对应的疾病病毒在体内呈阴性。

若待测血清中有 HBsAg、HCV 抗体、梅毒抗体、HIV 抗体中的一种或数种，当硝酸纤维素膜与血清接触时，膜上的抗原（或抗体）会与血清中的对应抗体（或抗原）发生反应，然后再与相应的胶体金标记物进行反应，从而显色。所以，从显色的情况可以判断出待测病人感染了何种病毒。由于羊抗鼠 IgG 抗体不会与人血清内的抗体发生反应，而在胶体金标记液中含有的 HBsAg 单抗（鼠抗人）可与羊抗鼠 IgG 抗体发生反应，对应于羊抗鼠 IgG 抗体的位置就会显色，被肉眼识别出；当试剂盒由于某组分的质量问题无法进行检测实验时，膜上对应于羊抗鼠 IgG 抗体的位置就不会显色，所以，通过羊抗鼠 IgG 抗体可对试剂盒进行质量控制。

本发明的检测试剂盒利用了胶体金免疫渗滤的原理，使多种传染性疾病的相关抗原、抗体在同一渗滤装置（硝酸纤维素膜）上进行反应、洗涤，通过肉眼观察各斑点的显色情况，对多种传染性疾病进行检测。

本发明试剂盒与传统的金标试剂盒、RPR 试剂盒、TRUST 试剂盒相比，其优点在于：

(1) 检测多疾病

在同一装置内同时进行四种传染性疾病的检测。

(2) 同时检测多个抗原和抗体

在同一装置内既可以检测多个抗体，也可以同时检测多个抗原，实现了多种蛋白检测条件的一体化。

本发明试剂盒与 ELISA 试剂盒相比，其优点在于：

(1) 检测多疾病

在同一装置内可进行四种传染性疾病的检测。

(2) 同时检测多个抗原和抗体

在同一装置内既可以检测多个抗体，也可以同时检测多个抗原，实现了多种蛋白检测条件的一体化。

(3) 反应时间短

整个实验可在 3 — 5 分钟内完成，适合大规模的快速血检。该试剂盒只有 2 步检测步骤，即加样、反应，均通过渗滤完成，检测全过程仅需数分钟，但敏感度却与需 1-2 小时完成的 ELISA 实验相仿。

(4) 采血量小

需要的血清量仅 50ul，只采集指血、耳血即可。而 ELISA 法测一个指标就需要 100ul 血清，则测试四项指标需要 400ul 左右的血清。所以本试剂盒对于儿童、新生儿的使用十分方便，而 ELISA 方法取样只能采静脉，对新生儿十分痛苦。

(5) 检测结果不受仪器的影响；不受反应环境的影响。

(6) 加入胶体金标记物即可显色，操作步骤简单，而且试剂可在室温长期保存。

本发明试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现对多种抗原和抗体的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，特别适用于大规模血液检查，也为传染性疾病的检测提供了新思路。

附图说明

图 1 硝酸纤维素膜上点样示意图；
其中 1、2、3、4 分别表示点样位置。“C”的两点之间为羊抗鼠

IgG 抗体点样位置。

图 2 1 号血清检测显示示意图, 检测结果均为阴性;

图 3 2 号血清检测显示示意图, 检测结果丙型肝炎病毒抗体为阳性;

图 4 3 号血清检测显示示意图, 检测结果梅毒抗体, 艾滋病 HIV-1&2 抗体为阳性;

图 5 4 号血清检测显示示意图, 检测结果梅毒抗体, 艾滋病 HIV-1&2 抗体, 乙型肝炎病毒表面抗原为阳性;

图 2-5 中 C—C 代表羊抗鼠 IgG 抗体的横线为阳性。

具体实施方式

一、试剂盒选用抗体及材料

在实施本发明的优选方法中, HBsAg 单抗(鼠抗人) S1、HBsAg 单抗(鼠抗人) S2 由倍尔乐生物科技有限公司提供; HCV 抗原、TP47 梅毒抗原、TP15 梅毒抗原、TP47/TP15 梅毒混合抗原、HIV-1 抗原、HIV-2 抗原、HIV-1/2 混合抗原由美国 BioDesign 公司提供; 硝酸纤维素膜由 S&S 公司提供; 被测血清由上海市疾病预防控制中心提供。

二、免疫渗滤金标法联检反应装置的制备方法如下:

(1) 将 HBsAg 单抗(鼠抗人) S2 置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的鼠抗人 HBsAg 单抗 S2 用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.5mg/ml, 4℃ 保存备用。

(2) 将 HCV 抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的 HCV 抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.4mg/ml, 4℃ 保存备用。

(3) 将 TP47/TP15 梅毒混合抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的 TP47/TP15 混合抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.5mg/ml, 4℃ 保存备用。

(4) 将 HIV-1/2 混合抗原置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的 HIV-1/2 混合抗原用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.6mg/ml, 4℃ 保存备用。

(5) 羊抗鼠 IgG 抗体置于 0.02M, pH8.0 的 PBS 中, 4℃ 透析过夜。透析后的羊抗鼠 IgG 抗体用 0.02M, pH8.0 的 PBS 稀释至 0.6mg/ml, 4℃ 保存备用。

(6) 如附图 1 所示, 在硝酸纤维素膜上的 1、2、3、4 位置处, 分别用微量加样器点上四种蛋白: TP47/TP15 梅毒混合抗原、HIV-1/2 混合抗原、HBsAg 单抗(鼠抗人) S2、HCV 抗原, 每点的点样体积为 1.0 μ l; 在硝酸纤维素膜上标有“C”的两点之间, 用 0.2mm 绘图

笔吸取羊抗鼠 IgG 抗体画一横线。

(7) 将此硝酸纤维素膜置于 37℃烘箱内 30 分钟，取出后室温放置 25 分钟。然后将其浸没于 37℃的封闭液中 20 分钟。取出后，在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5 分钟，重复洗涤数次。室温晾干。

(8) 取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方，再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

三、缓冲液是由 pH 为 7.8，0.10M 的 PBS 和 0.10% Tween20 等体积混合而成的溶液。

四、胶体金标记液由 HBsAg 单抗（鼠抗人）S1 的胶体金标记物、HCV 抗原的胶体金标记物、TP47/TP15 梅毒混合抗原的胶体金标记物、HIV-1/2 混合抗原的胶体金标记物按照体积比为 1: 1: 1.2-2.5: 1.2-2.5 的比例混合而成。各个胶体金标记物所用胶体金的颗粒大小均为 30nm。胶体金标记物的制备方法如下：

(1) HBsAg 单抗（鼠抗人）S1 的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入 HBsAg 单抗（鼠抗人）S1，使其最终浓度为 20 μg/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使单抗终浓度为 0.6%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使单抗终浓度为 0.2%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45 μm 滤膜过滤，置 4℃保存备用。

(2) 胶体金-HCV 抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入 HCV 抗原，使其终浓度为 90 μg/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.6%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.2%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45 μm 滤膜过滤，置 4℃保存备用。

(3) TP47/15 梅毒混合抗原的胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入 TP47 梅毒抗原使抗原终浓度为 90 μg/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.6%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.2%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45 μm 滤膜过滤，置 4℃保存备用。

TP15 抗原的胶体金标记物制备方法同 TP47。

将 TP47 抗原和 TP15 抗原的胶体金标记物等体积混合，4℃保存备用。

(4) HIV-1/2 抗原的胶体金标记物的制备

取 30nm 颗粒的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入 HIV-1 抗原使抗原终浓度为 100 μ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使抗原终浓度为 0.6%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使抗原终浓度为 0.2%，室温下搅拌 5 分钟。12000-15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45 μ m 滤膜过滤，置 4℃ 保存备用。

HIV-2 抗原的胶体金标记物制备方法同 HIV-1。

将 HIV-1 抗原和 HIV-2 抗原的胶体金标记物等体积混合，4℃ 保存备用。

当胶体金标记液中的 HIV 抗原指多个 HIV 抗原的混合物时，各个 HIV 抗原的胶体金标记物要分别制备，再按照一定倍数稀释、混合，保存备用。

用该试剂盒来测试不同的血清，医院提供的资料显示，1 号血清的提供者未患上四种传染性疾病中任一种；2 号血清的提供者仅患有丙型肝炎；3 号血清的提供者患有艾滋病和梅毒；4 号血清的提供者患有乙型肝炎、艾滋病和梅毒。检测结果依次见附图 2、附图 3、附图 4、附图 5。

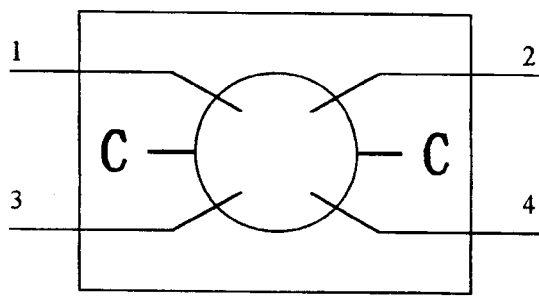


图 1

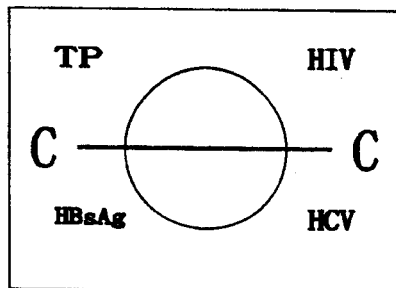


图 2

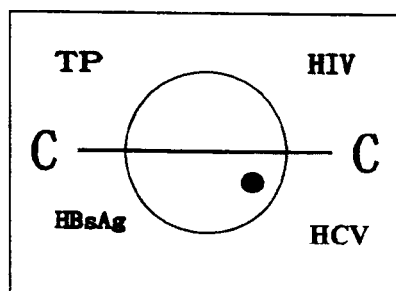


图 3

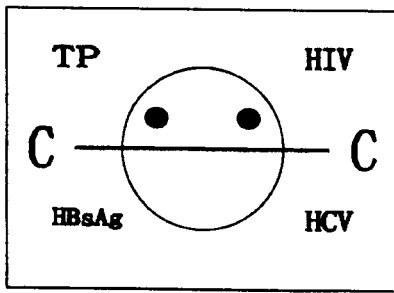


图 4

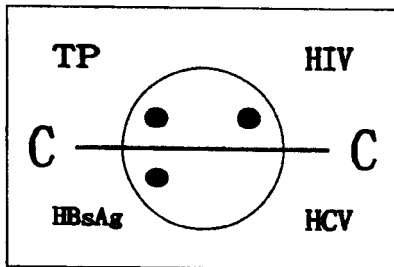


图 5

专利名称(译)	用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN1164949C	公开(公告)日	2004-09-01
申请号	CN01126500.0	申请日	2001-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
[标]发明人	胡赓熙		
发明人	胡赓熙		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/571 G01N33/5767 G01N33/5761		
其他公开文献	CN1405564A		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明涉及一种用于同时检测多种传染性疾病的试剂盒及其制备方法。该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成，其中在免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，点制有HBsAg单抗、HCV抗原、梅毒抗原、HIV抗原四种蛋白和标记物羊抗鼠IgG抗体。本发明还公开了该检测试剂盒的制备方法。本发明试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现了对乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病传染性疾病的同时检测，操作简便、迅速、准确，可适用于各种血样的多病种检测，特别适用于大规模血液检查，也为传染性疾病的检测提供了新思路。

