

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/532

G01N 33/569



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03112697.9

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1184481C

[22] 申请日 2003.1.14 [21] 申请号 03112697.9

[71] 专利权人 江苏省血吸虫病防治研究所
地址 214064 江苏省无锡市杨巷 117 号

[72] 发明人 朱荫昌 何 伟

审查员 倪晓红

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利事务所

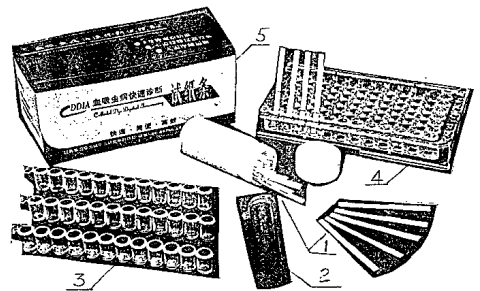
代理人 殷红梅 时旭丹

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用

[57] 摘要

血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用, 属于寄生虫病免疫诊断技术领域。本发明配制的试剂盒采用染料标记法, 以 2BLN 分散兰染料和日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) 以及 1% 叠氮钠 PBS 和牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液配制成染料标记抗原液, 以硝酸纤维作层析膜, 在层析膜上分别用羊抗人 IgG 划上检测线和用兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) IgG 划上对照线制作试纸条, 将待检血清和染料标记抗原液充分混匀后, 以试纸条进行测试。标记用 2BLN 国产染料, 用于免疫诊断为首创, 标记方法简便, 标记好的试纸条和抗原液质量稳定, 室温下有效期为 1 年以上, 检测方法简便, 一般人员按说明书即可操作。



ISSN 1008-4274

1. 一种血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒,其特征是由试纸条(1)、染料标记抗原液(2)、标板小杯(3)、标板托架(4)和盒体(5)所组成,试纸条密封于有盖塑料瓶内,试纸条用聚氯乙烯衬垫,中间贴硝酸纤维素层析膜,上端贴吸水垫,底端贴样品垫,吸水垫和样品垫必须与层析膜有交叠 0.1cm,在距底端 1cm 处的层析膜上用羊抗人 IgG 划上检测线,在距底端 2cm 处的层析膜上用兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原 IgG 划上对照线,染料标记抗原液密封于塑料管内,染料标记抗原液由日本血吸虫可溶性虫卵抗原、染料贮存液和磷酸盐缓冲液以及叠氮钠-磷酸盐缓冲液和牛血清白蛋白封闭液配制而成,染料采用 2BLN 分散兰染料,测试时标板小杯置于标板托架内,装有试纸条(1)的塑料瓶和装有染料标记抗原液(2)的塑料管和装有标板小杯(3)的标板托架(4)均安放在盒体(5)内。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征是试剂盒的组成包括 48 条试纸条, 3ml 染料标记抗原液, 48 个聚氯乙烯标板小杯。

3. 一种权利要求 1 所述的试剂盒的制备方法,其特征是

配制染料标记抗原液

(1) 配制染料贮存液

取 0.5g 2BLN 分散兰染料,加蒸馏水 10ml 洗涤,充分混悬后离心 15000g, 30 分钟,弃上清液,重复洗涤 4 次,共洗 5 次,洗毕,弃上清液,沉淀加蒸馏水 10 ml,充分混悬后离心 250g, 30 分钟,取上清液作为染料贮存液;

在染料贮存液中加 1%叠氮钠-磷酸盐缓冲液,使叠氮钠终浓度为 0.05%,保存于室温下备用;

测定染料贮存液的 A 值:取少量染料贮存液用蒸馏水稀释 100 倍,将分光光度计波长调至 630nm,以蒸馏水调零,读取吸光 OD 值, $A=OD_{630nm} \text{ 值} \times 100$;

(2) 配制染料标记抗原液

取抗原日本血吸虫可溶性虫卵抗原 1mg,染料贮存液 xml, $x=60/\text{染料贮存液 A 值}$,加 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液至 5ml,将上述材料置 10ml 离心管中,放入 37°C 温箱中来回摇 2 小时取出,加封闭液 5ml,继续于 37°C 温箱中来回摇 4 小时,取出离心 15000g, 30 分钟, 4°C, 弃上清液,沉淀加 10ml 封闭液,混匀后离心 15000g, 30 分钟, 4°C, 弃上清液,沉淀加封闭液 5ml,用吸管轻轻将沉淀吹打

均匀，须打至无肉眼可见的粗颗粒，加 1%叠氮钠-磷酸盐缓冲液，使叠氮钠终浓度为 0.05%，此为染料标记贮存液，使用时用封闭液稀释 8 倍，含 0.05%叠氮钠，即为染料标记抗原液，贮存液和抗原液均可在室温保存；

试纸条制备：

将聚氯乙烯衬垫裁成 5cm 长，在中间贴上 2.5cm 硝酸纤维层析膜，在上端贴上 2.25cm 长的吸水垫，在底端贴上 0.5cm 长的样品垫，吸水垫和样品垫必须与硝酸纤维层析膜的两端交叠 0.1cm，在距底端 1 cm 处的层析膜上用羊抗人 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖，划上 0.05cm 宽的检测线，在距底端 2cm 处的层析膜上用兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原 IgG，用磷酸盐缓冲液稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖，划上 0.05cm 宽的对照线，置 37°C 2 小时，将加工好的膜切成 0.3cm 宽的条即为试纸条。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒的制备方法，其特征是封闭液的配制：取牛血清白蛋白 1g，加 0.01MpH7.4 磷酸盐缓冲液至 100ml。

5. 根据权利要求 3 所述的试剂盒的制备方法，其特征是 1%叠氮钠-磷酸盐缓冲液的配制：取叠氮钠 1g，加 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液至 100ml。

6. 根据权利要求 3 所述的试剂盒的制备方法，其特征是日本血吸虫可溶性虫卵抗原的制备以日本血吸虫尾蚴感染家兔，45 天后取兔肝分离虫卵，加生理盐水置冰浴上研磨 1 小时，离心 14000 rpm，1 小时，收集上清液即为日本血吸虫可溶性虫卵抗原。

7. 根据权利要求 3 所述的试剂盒的制备方法，其特征是羊抗人 IgG，使用时用磷酸盐缓冲液稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖。

8. 根据权利要求 3 所述的试剂盒的制备方法，其特征是兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原 IgG 的制备：用标准体外免疫法免疫家兔，以日本血吸虫可溶性虫卵抗原作抗原，每次 2mg，加福氏完全佐剂，采用皮内多点注射法免疫，共免疫 3 次，当免疫兔血清滴度达到 1:10240 以上时采集兔血，分离血清，再以 Protein A 蛋白质亲和层析法纯化收集 IgG，使用时用磷酸盐缓冲液稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖。

9. 根据权利要求 1 所述的试剂盒的检测应用，其特征是取标板小杯，加 50 μ l 染料标记抗原液和 10 μ l 待检血清，充分混匀 1 分钟，然后插入试纸条，将样品垫一端插入杯底，5-10 分钟后观察结果，结果判断：检测线与对照线都出现紫兰色为阳性反应，对照线出现紫兰色而检测线无紫兰色为阴性反应。

血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用，采用工业染料代替酶作标记物的所谓染料标记法，用于血吸虫病快速试纸条诊断，属于寄生虫病免疫诊断技术领域。

背景技术

目前，与本发明相近的血吸虫病试纸条诊断方法有如下两种：

1. 胶体金标记法：将四氯金酸通过还原（主要有白磷还原、硼氢化钠还原和鞣酸-枸橼酸三钠还原等）的方法配制成直径约为 5-10nm 胶体金颗粒溶液，它是一种红色溶液，由于胶体金表面带有负电荷而蛋白质带有正电荷，两者由于静电相吸而牢固结合，因此胶体金可作为蛋白质的标记物。其缺点是：(1)胶体金价格较贵，特别是成品胶体金价格尤其昂贵，常为进口产品，自制胶体金虽可降低成本，但很难获取较为满意的胶体金颗粒；(2)胶体金标记过程较为烦琐，条件不易掌握，而且需纯化后方可使用；(3)胶体金标记物需保存于 4℃，不利于运输携带。

2. 酶标记法：辣根过氧化物酶通过戊二醛胶联或过碘酸钠氧化方法与抗体蛋白结合。其缺点是：(1)酶的价格较贵；(2)标记方法较为麻烦，需纯化后方可使用；(3)酶容易失活，需保存于 4℃，不利于运输携带；(4)检测时花费时间较长，一般在 2 小时左右，不适于现场大规模普查使用。

发明内容

本发明的目的是提供一种血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用，开发一种新颖、简便的血吸虫病免疫诊断技术。

技术方案

血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒由试纸条(1)、染料标记抗原液(2)、标板小杯(3)、标板托架(4)和盒体(5)所组成,试纸条密封于有盖塑料瓶内,试纸条用PVC衬垫,中间贴硝酸纤维层析膜,上端贴吸水垫,底端贴样品垫,吸水垫和样品垫必须与层析膜有交叠0.1cm,在距底端1cm处的层析膜上用羊抗人IgG划上检测线,在距底端2cm处的层析膜上用兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)IgG划上对照线,染料标记抗原液密封于塑料管内,染料标记抗原液由日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)、染料贮存液和磷酸盐缓冲液(PBS)以及叠氮钠PBS和牛血清白蛋白(BSA)封闭液配制而成,染料采用2BLN分散兰染料,测试时标板小杯置于标板托架内,装有试纸条(1)的塑料瓶和装有染料标记抗原液(2)的塑料管和装有标板小杯(3)的标板托架(4)均安放在盒体(5)内。

上述试剂盒的制备方法为:

一、材料

染料: 2BLN分散兰染料,为一种工业用国产染料,分子式: $C_{14}H_9N_2O_4Br$,分子量: 349。

硝酸纤维(NC)层析膜:美国Millipore公司生产,规格:Hi-Flow,渗透试验为 120 ± 35 秒。

吸水垫:美国Millipore公司生产,规格:AP22。

样品垫:美国Millipore公司生产,规格:AP22。

PVC衬垫。

标板小杯:直径0.6cm,高1cm聚氯乙烯塑料制品。

磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ MW=358.14)。

磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ MW=156.01)。

氯化钠 ($NaCl$ MW=58.44)。

叠氮钠 (NaN_3 MW=65.02)。

海藻糖 ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ MW=378.33)。

牛血清白蛋白 (BSA)。

磷酸盐缓冲液 (PBS)。

日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA)。

羊抗人 IgG。

兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) IgG。

二、设备

高速离心机 (20000× g)

分光光度计

摇摆式摇床

温箱

三、试剂配制

1. 0.01M PBS (pH7.4)

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.3 g

NaCl 8.0 g

加蒸馏水至 1000ml

2. 封闭液

BSA 1.0 g

加 0.01M PBS (pH 7.4) 至 100ml

3. 1% (W/V) 叠氮钠 PBS

叠氮钠 1.0 g

加 0.01M PBS (pH 7.4) 至 100ml

4. SEA 的制备

以日本血吸虫尾蚴感染家兔，45 天后取兔肝分离虫卵，加生理盐水置冰浴上研磨 1 h，离心 14000 rpm，1 h，收集上清液即为 SEA。

5. 羊抗人 IgG

亲和层析产品 (购自上海华美公司)，使用时用 PBS 稀释至 1mg/ml，

加海藻糖，使海藻糖终浓度为 0.15M，简写为含 0.15M 海藻糖。

6. 兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) IgG 的制备

用标准体外免疫法免疫家兔，以 SEA 作抗原，每次 2mg，加福氏完全佐剂，采用皮内多点注射法免疫，共免疫 3 次，当免疫兔血清滴度达到 1:10240 以上时采集兔血，分离血清，再以 Protein A 亲和层析法纯化收集 IgG，使用时用 PBS 稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖。

四、方法

1. 染料贮存液制备：

染料	0.5 g
蒸馏水	10 ml

充分混悬后离心 $15000\times g$ ，30 min，弃上清液，沉淀加蒸馏水 10ml，充分混悬后离心 $15000\times g$ ，30 min，重复 4 次（共洗 5 次），完毕后，弃上清液，沉淀加蒸馏水 10ml，充分混悬后离心 $250\times g$ ，30 min，取上清液作为染料贮存液。

测定染料贮存液的 A 值：取少量染料贮存液用蒸馏水稀释 100 倍，将分光光度计波长调至 630nm，以蒸馏水调零，读取吸光 (OD) 值， $A = OD_{630nm} \text{ 值} \times 100$ 。

在染料贮存液中加入 1%叠氮钠 PBS，使叠氮钠终浓度为 0.05%，保存于室温下备用。

2. 染料标记抗原液制备

SEA	1 mg
染料贮存液	x ml (x=60/染料贮存液 A 值)
PBS (0.01M pH7.4)	加至 5ml

将上述材料置 10ml 离心管中，放入 37℃温箱中来回摇 2h 取出，加封闭液 5ml，继续于 37℃温箱中来回摇 4h，取出离心 $15000\times g$ ，30min，4℃，弃上清液，沉淀加 10ml 封闭液，混匀后离心 $15000\times g$ ，30min，4℃，弃上清液，沉淀加封闭液 5ml，用吸管轻轻将沉淀吹打均匀，须打

至无肉眼可见的粗颗粒，加 1%叠氮钠 PBS，使叠氮钠终浓度为 0.05%，此为染料标记贮存液，使用时用封闭液稀释 8 倍，补充加 1%叠氮钠 PBS，使叠氮钠终浓度为 0.05%，（简写为含 0.05%叠氮钠），即为染料标记抗原液，贮存液和抗原液均可在室温保存。

3. 试纸条制备

将 PVC 衬垫裁成 5cm 长，在中间贴上 2.5cm 硝酸纤维层析膜，在上端贴上 2.25cm 长的吸水垫，在底端贴上 0.5cm 长的样品垫，吸水垫和样品垫必须与硝酸纤维层析膜的两端交叠 0.1cm。在距底端 1 cm 处的层析膜上用羊抗人 IgG（用 PBS 稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖）划上 0.05cm 宽的检测线，在距底端 2cm 处的层析膜上用兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原（SEA）IgG（用 PBS 稀释至 1mg/ml，含 0.15M 海藻糖）划上 0.05cm 宽的对照线，置 37℃ 2 小时，将加工好的膜切成 0.3cm 宽的条即为试纸条。

上述试剂盒的检测应用：取标板小杯，加 50 μ l 染料标记抗原液和 10 μ l 待检血清，充分混匀 1min，然后插入试纸条，将样品垫一端插入杯底，5-10min 后观察结果。结果判断：检测线与对照线都出现紫兰色为阳性反应，对照线出现紫兰色而检测线无紫兰色为阴性反应。

注意事项：

1. 检测血清必须新鲜，否则会影响检测结果。
2. 取试纸条时，用手捏住吸水垫（较长的一端），严禁触摸检测膜。
3. 试纸条一定要插入杯底。
4. 该试纸条与肺吸虫病人和肝吸虫病人有部分交叉反应，检测时注意。

有益效果

1. 标记用 2BLN 染料是一种工业用国产染料，用于免疫诊断为首创，而且价格非常便宜。
2. 标记方法简便。

3. 标记好的试纸条及抗原液质量稳定,可在室温中运输,而且在室温中能保存1年以上。该项技术也为专有。

4. 测试方法简便,无需任何仪器设备。一般人员按照说明即可操作,勿需专门培训。

5. 测试方法快速,整个过程仅需10分钟左右即可完成检测。

附图说明

图1 试剂盒组成图。1、试纸条;2、标记染料抗原液;3、标板小杯;4、标板托架;5、箱体。

图2 为试纸条测试效果图:A 阳性反应:检测带和对照带都出现紫兰色带;B 阴性反应:对照带出现紫兰色带而检测带无紫兰色带。

图3 制备方法和应用的流程框图。

具体实施方法

实施例1:按说明书中记述的方法,配制的试剂盒的组成包括48条试纸条,3ml染料标记抗原液,48个PVC标板小杯。

实施例2:用血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒检测急性血吸虫病人血清30例、慢性血吸虫病人血清84例,其敏感性分别为96.7%和94.0%,检测健康人血清60例,其特异性为96.7%。Joden's 指数分别为 $0.967+0.967-1=0.934$; $0.94+0.967-1=0.907$ 。表明该法的敏感性高,特异性好。为一种高效的血吸虫病免疫诊断试剂盒。

——摘自《中国血吸虫病防治杂志》2000年第12卷第1期第18页至30页

实施例3:现场应用:2001年用血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒检测江西省波阳县粪检阳性的血吸虫病人血清121例,阳性率为96.69% (117/121),30例健康人均均为阴性,特异性为100%,Joden's 指数可达 $0.967+1.000-1=0.967$ 。表明该法的敏感性高,特异性好,适用于现场查病。

——摘自《中国寄生虫病防治杂志》2001年第14卷第1期第28页

至 30 页

实施例 4：现场应用：2001 年采用血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒检测江西省德兴市（血吸虫病已消灭 15 年）20000 例人群血清，阴性符合率达 99.3%（特异性），而对照的 30 例粪检阳性血清阳性符合率为 93.3%（28/30），30 例非流行区健康人中有 1 例为阳性，特异性为 96.7%（1/30）。表明该法的敏感性高，特异性好。

——摘自《中国血吸虫病防治杂志》2001 年第 13 卷第 5 期第 304 页

实施例 5：现场应用：2002 年在江苏省南京市郊区（血吸虫病低度流行区）应用血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒进行血吸虫病消灭达标考核，共查 2788 人，阳性率仅为 0.29%。与当地流行状况相符，而且费用较其他免疫诊断方法节省 23.76%。故该法也适用于血吸虫病达标考核。

——摘自《中国血吸虫病防治杂志》2002 年第 14 卷第 5 期第 374 页至 375 页

实施例 6：现场应用：2002 年在江苏省镇江市丹徒县（血吸虫病低度流行区）用血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒对 463 人（自然人群）的筛查中，18 例粪检阳性的血吸虫病人，检出 17 例阳性，阳性符合率为 94.4%。而环卵沉淀法（COPT）的阳性符合率则为 72.2%。表明该法适用于血吸虫病低度流行区筛查，较其他免疫诊断方法更为适用。

——摘自《中国血吸虫病防治杂志》2003 年第 15 卷第 1 期

实施例 7：现场应用：2002 年在江苏省南京市郊区（血吸虫病低度流行区）用血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒对 465 例自然人群筛查中，13 例粪检阳性的血吸虫病人，结果全为阳性，阳性符合率为 100%。表明该法适用于血吸虫病低度流行区筛查确定化疗对象。

——文章待发表

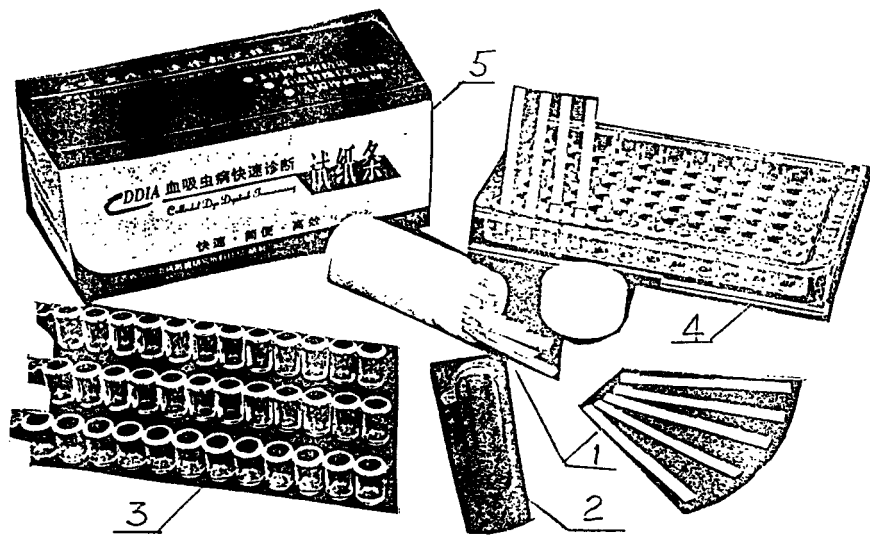


图 1

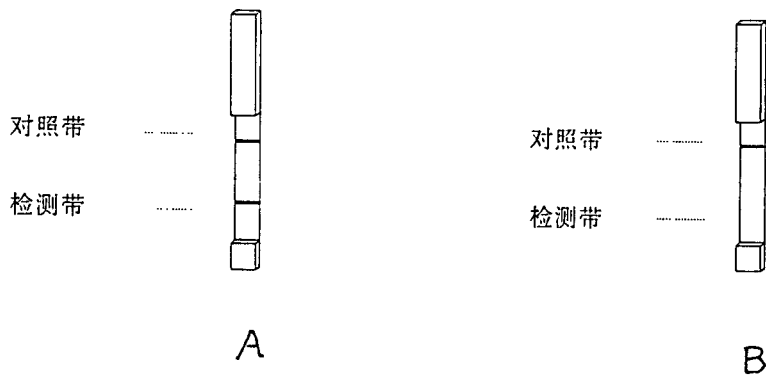


图 2

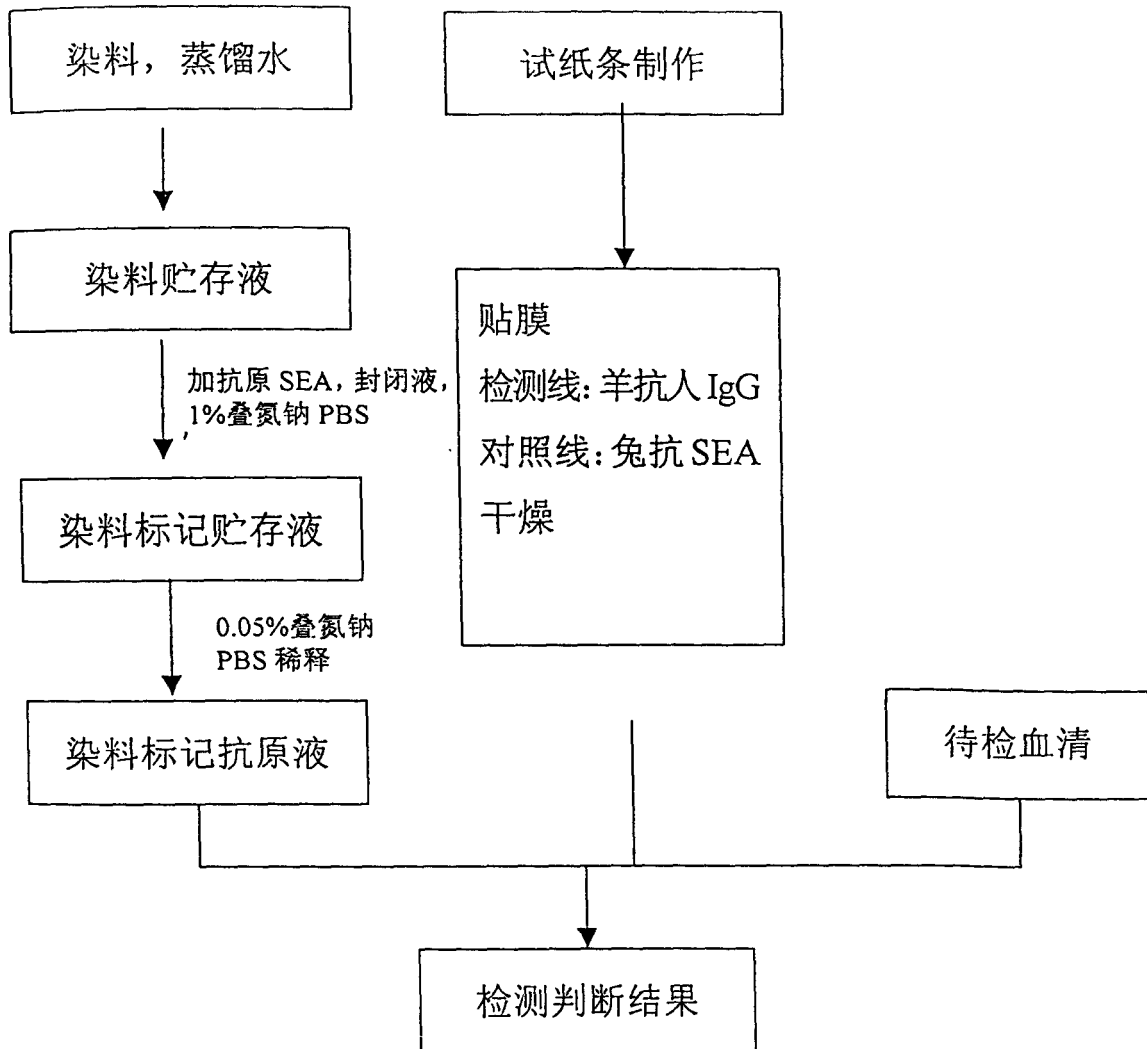


图 3

专利名称(译)	血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN1184481C	公开(公告)日	2005-01-12
申请号	CN03112697.9	申请日	2003-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省血吸虫病防治研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省血吸虫病防治研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省血吸虫病防治研究所		
[标]发明人	朱荫昌 何伟		
发明人	朱荫昌 何伟		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/569		
代理人(译)	殷红梅		
其他公开文献	CN1425918A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

血吸虫病快速试纸条诊断试剂盒及其制备方法和应用，属于寄生虫病免疫诊断技术领域。本发明配制的试剂盒采用染料标记法，以2BLN分散兰染料和日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)以及1%叠氮钠PBS和牛血清白蛋白(BSA)封闭液配制成染料标记抗原液，以硝酸纤维作层析膜，在层析膜上分别用羊抗人1gG划上检测线和用兔抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)1gG划上对照线制作试纸条，将待检血清和染料标记抗原液充分混匀后，以试纸条进行测试。标记用2BLN国产染料，用于免疫诊断为首创，标记方法简便，标记好的试纸条和抗原液质量稳定，室温下有效期为1年以上，检测方法简便，一般人员按说明书即可操作。

