



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103217524 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201210582686. 0

(22) 申请日 2012. 12. 28

(71) 申请人 新疆维吾尔自治区实验动物研究中心

地址 830002 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
碱泉一街 380 号

(72) 发明人 廖力夫 燕顺生 徐艺玫 徐兵

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务
所 65105

代理人 汤洁

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及人和动物泡型包虫病抗体检测技术领域,是一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法。本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原用于酶联免疫吸附试验双抗原夹心法检测泡型包虫病抗体,能有效提高检测试剂的质量,具有特异性强、敏感性高、性能稳定和用途广的特点,可检测人和各种动物的泡型包虫病抗体,便于比较不同种动物抗体含量;根据免疫学反应原理,本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原,还可用于制备胶体金免疫层析试剂等多种检测泡型包虫病抗体的快速检验试剂,为包虫病鉴别诊断、流行调查和疫情监测工作创造了有利条件。

1. 一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原,其特征在于按下述步骤得到:

第一步,采集绵羊囊型包虫病包囊液,在包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使包囊液中硫酸铵的浓度达到饱和浓度的30%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至pH 7.2,然后按调节pH后液体体积的30%至50%的量加入氯仿或石油醚,剧烈振荡成混悬液,混悬液静置至氯仿或石油醚与包囊液分层,再剧烈振荡并静置分层2次,然后4000g离心20min后,弃沉淀和氯仿或石油醚,收集处理后的包囊液;

第二步,在第一步处理后的包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使处理后的包囊液中硫酸铵浓度达到饱和浓度的50%至70%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至pH 7.2,在温度为4°C至10°C的冰箱中放置4h,然后4000g离心10min后收集沉淀物,弃上清液;

第三步,将第二步收集的沉淀物加入到20倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中,硫酸铵溶液的pH为7.2,硫酸铵的浓度为饱和浓度的50%至70%,振荡使其成为混悬液,然后4000g离心10min后,收集沉淀物,弃上清液;

第四步,将第三步收集到的沉淀物加入到20倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中,硫酸铵溶液的pH为7.2,硫酸铵的浓度为饱和浓度的50%至70%,振荡使其成为混悬液,然后4000g离心10min后收集沉淀,弃上清液,在收集到的沉淀物中加入10倍沉淀物体积量的蒸馏水,振荡使沉淀物溶解后,加入与沉淀物溶解后溶液等体积量的氯仿或石油醚,剧烈振荡成混悬液,静置至氯仿或石油醚与溶液分层,再剧烈振荡并静置分层2次,收集水溶液;

第五步,将第四步收集的水溶液装入透析袋中,将透析袋放入生理盐水中,生理盐水的体积为透析袋中水溶液体积的20倍,在温度为4°C至10°C的冰箱中进行透析12h至24h,其间换生理盐水3次,每次更换生理盐水体积为透析袋中水溶液体积20倍,透析完成后,透析袋中的溶液4000g离心20min,弃沉淀,收集上清液,上清液即为囊型包虫病囊液脱酯抗原。

2. 一种根据权利要求1或2所述的适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原的制备方法,其特征在于按下述步骤进行:

第一步,采集绵羊囊型包虫病包囊液,在包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使包囊液中硫酸铵的浓度达到饱和浓度的30%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至pH 7.2,然后按调节pH后液体体积的30%至50%的量加入氯仿或石油醚,剧烈振荡成混悬液,混悬液静置至氯仿或石油醚与包囊液分层,再剧烈振荡并静置分层2次,然后4000g离心20min后,弃沉淀和氯仿或石油醚,收集处理后的包囊液;

第二步,在第一步处理后的包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使处理后的包囊液中硫酸铵浓度达到饱和浓度的50%至70%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至pH 7.2,在温度为4°C至10°C的冰箱中放置4h,然后4000g离心10min后收集沉淀物,弃上清液;

第三步,将第二步收集的沉淀物加入到20倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中,硫酸铵溶液的pH为7.2,硫酸铵的浓度为饱和浓度的50%至70%,振荡使其成为混悬液,然后4000g离心10min后,收集沉淀物,弃上清液;

第四步,将第三步收集到的沉淀物加入到20倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中,硫酸铵溶液的pH为7.2,硫酸铵的浓度为饱和浓度的50%至70%,振荡使其成为混悬液,然后4000g离心10min后收集沉淀,弃上清液,在收集到的沉淀物中加入10倍沉淀物体积量的蒸馏水,振荡使沉淀物溶解后,加入与沉淀物溶解后溶液等体积量的氯仿或石油醚,剧烈振荡

成混悬液,静置至氯仿或石油醚与溶液分层,再剧烈振荡并静置分层 2 次,收集水溶液;

第五步,将第四步收集的水溶液装入透析袋中,将透析袋放入生理盐水中,生理盐水的体积为透析袋中水溶液体积的 20 倍,在温度为 4°C 至 10°C 的冰箱中进行透析 12h 至 24h,其间换生理盐水 3 次,每次更换生理盐水体积为透析袋中水溶液体积 20 倍,透析完成后,透析袋中的溶液 4000g 离心 20min,弃沉淀,收集上清液,上清液即为适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原。

适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人和动物泡型包虫病抗体检测技术领域,是一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法。

背景技术

[0002] 泡型包虫病 (Alveolar echinococcosis, AE) 是由多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em) 的幼虫寄生引起的人兽共患病,早期无明显症状,发现时病灶多已扩散,病灶呈渐进性浸润增长,超声波和 CT 检查等常规的诊断方法不易与肿瘤病灶区别,血清学检测有助于 AE 的确诊。检测包虫病抗体是诊断包虫病的重要指标,抗原是影响检测特异性和敏感性的关键试剂。盐析、离子层析、亲和层析、制备电泳等方法,包虫原头节、囊壁、囊液等材料,都曾用于提取和纯化检测包虫病抗体的抗原;近年来,基因工程技术和人工合成多肽也在制备抗原中应用,曾用于检测包虫病抗体研究的抗原种类繁多,均未能显著提高检测包虫病抗体的特异性和敏感性。囊型包虫病 (Cystic echinococcosis, CE) 是由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 的幼虫寄生引起的人兽共患病,检测 CE 抗体的方法,AE 抗体也出现阳性反应,提示 Em、Eg 的原头节或囊液中存在相同或相似反应性的抗原成分,CE 囊液中可能有适用于检测泡型包虫病抗体的抗原。常规方法提取 CE 囊液抗原,不仅程序复杂,收获量甚少,而且与多种寄生虫有交叉反应。酶联免疫吸附试验间接法一种酶标第二抗体只能检测一种动物的抗体,检测多种动物包虫病抗体,必需制备多种动物血清免疫球蛋白的酶标第二抗体,不仅工作量大,而且受酶标第二抗体效价差异的影响,很难用于比较不同种动物抗体含量,双抗原夹心法检测抗体,酶标记抗原替代第二抗体,可检测多种动物的抗体,为人兽共患病调查和疫情监测提供便利条件。

发明内容

[0003] 本发明提供了一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法,克服了上述现有技术之不足,其能提高检测泡型包虫病抗体的特异性、敏感性和稳定性,用途广。

[0004] 本发明的技术方案之一是通过以下措施来实现的:一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原,按下述步骤得到:

第一步,采集绵羊囊型包虫病包囊液,在包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使包囊液中硫酸铵的浓度达到饱和浓度的 30%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至 pH 7.2,然后按调节 pH 后液体体积的 30%至 50%的量加入氯仿或石油醚,剧烈振荡成混悬液,混悬液静置至氯仿或石油醚与包囊液分层,再剧烈振荡并静置分层 2 次,然后 4000g 离心 20min 后,弃沉淀和氯仿或石油醚,收集处理后的包囊液;

第二步,在第一步处理后的包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使处理后的包囊液中硫酸铵浓度达到饱和浓度的 50%至 70%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至 pH 7.2,在温度为 4⁰C

至 10°C 的冰箱中放置 4h, 然后 4000g 离心 10min 后收集沉淀物, 弃上清液;

第三步, 将第二步收集的沉淀物加入到 20 倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中, 硫酸铵溶液的 pH 为 7.2, 硫酸铵的浓度为饱和浓度的 50% 至 70%, 振荡使其成为混悬液, 然后 4000g 离心 10min 后, 收集沉淀物, 弃上清液;

第四步, 将第三步收集到的沉淀物加入到 20 倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中, 硫酸铵溶液的 pH 为 7.2, 硫酸铵的浓度为饱和浓度的 50% 至 70%, 振荡使其成为混悬液, 然后 4000g 离心 10min 后收集沉淀, 弃上清液, 在收集到的沉淀物中加入 10 倍沉淀物体积量的蒸馏水, 振荡使沉淀物溶解后, 加入与沉淀物溶解后溶液等体积量的氯仿或石油醚, 剧烈振荡成混悬液, 静置至氯仿或石油醚与溶液分层, 再剧烈振荡并静置分层 2 次, 收集水溶液;

第五步, 将第四步收集的水溶液装入透析袋中, 将透析袋放入生理盐水中, 生理盐水的体积为透析袋中水溶液体积的 20 倍, 在温度为 4°C 至 10°C 的冰箱中进行透析 12h 至 24h, 其间换生理盐水 3 次, 每次更换生理盐水体积为透析袋中水溶液体积 20 倍, 透析完成后, 透析袋中的溶液 4000g 离心 20min, 弃沉淀, 收集上清液, 上清液即为适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原。

[0005] 本发明的技术方案之二是通过以下措施来实现的: 一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原的制备方法, 按下述步骤进行:

第一步, 采集绵羊囊型包虫病包囊液, 在包囊液中加入固体硫酸铵溶解, 使包囊液中硫酸铵的浓度达到饱和浓度的 30%, 用氢氧化钠或氢氧化铵调节至 pH 7.2, 然后按调节 pH 后液体体积的 30% 至 50% 的量加入氯仿或石油醚, 剧烈振荡成混悬液, 混悬液静置至氯仿或石油醚与包囊液分层, 再剧烈振荡并静置分层 2 次, 然后 4000g 离心 20min 后, 弃沉淀和氯仿或石油醚, 收集处理后的包囊液;

第二步, 在第一步处理后的包囊液中加入固体硫酸铵溶解, 使处理后的包囊液中硫酸铵浓度达到饱和浓度的 50% 至 70%, 用氢氧化钠或氢氧化铵调节至 pH 7.2, 在温度为 4°C 至 10°C 的冰箱中放置 4h, 然后 4000g 离心 10min 后收集沉淀物, 弃上清液;

第三步, 将第二步收集的沉淀物加入到 20 倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中, 硫酸铵溶液的 pH 为 7.2, 硫酸铵的浓度为饱和浓度的 50% 至 70%, 振荡使其成为混悬液, 然后 4000g 离心 10min 后, 收集沉淀物, 弃上清液;

第四步, 将第三步收集到的沉淀物加入到 20 倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中, 硫酸铵溶液的 pH 为 7.2, 硫酸铵的浓度为饱和浓度的 50% 至 70%, 振荡使其成为混悬液, 然后 4000g 离心 10min 后收集沉淀, 弃上清液, 在收集到的沉淀物中加入 10 倍沉淀物体积量的蒸馏水, 振荡使沉淀物溶解后, 加入与沉淀物溶解后溶液等体积量的氯仿或石油醚, 剧烈振荡成混悬液, 静置至氯仿或石油醚与溶液分层, 再剧烈振荡并静置分层 2 次, 收集水溶液;

第五步, 将第四步收集的水溶液装入透析袋中, 将透析袋放入生理盐水中, 生理盐水的体积为透析袋中水溶液体积的 20 倍, 在温度为 4°C 至 10°C 的冰箱中进行透析 12h 至 24h, 其间换生理盐水 3 次, 每次更换生理盐水体积为透析袋中水溶液体积 20 倍, 透析完成后, 透析袋中的溶液 4000g 离心 20min, 弃沉淀, 收集上清液, 上清液即为适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原。

[0006] 本发明所得的适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原用于酶联免疫吸附试验双抗原夹心法检测泡型包虫病抗体, 能有效提高检测试剂的特异性和敏感

性,具有特异性强、敏感性高、稳定和用途广的特点,可检测人和各种动物泡型包虫病抗体,适用于比较不同种动物抗体含量;根据免疫学反应原理,本发明所得的适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原,还可用于制备胶体金免疫层析试剂等多种检测泡型包虫病抗体的快速检验试剂,为包虫病鉴别诊断、流行调查和疫情监测工作创造了便利条件。

具体实施方式

[0007] 本发明不受下述实施例的限制,可根据本发明的技术方案与实际情况来确定具体的实施方式。

[0008] 实施例 1,一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原,按下述步骤得到:

第一步,采集绵羊囊型包虫病包囊液,在包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使包囊液中硫酸铵的浓度达到饱和浓度的 30%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至 pH 7.2,然后按调节 pH 后液体体积的 30%至 50%的量加入氯仿或石油醚,剧烈振荡成混悬液,混悬液静置至氯仿或石油醚与包囊液分层,再剧烈振荡并静置分层 2 次,然后 4000g 离心 20min 后,弃沉淀和氯仿或石油醚,收集处理后的包囊液;

第二步,在第一步处理后的包囊液中加入固体硫酸铵溶解,使处理后的包囊液中硫酸铵浓度达到饱和浓度的 50%至 70%,用氢氧化钠或氢氧化铵调节至 pH 7.2,在温度为 4°C 至 10°C 的冰箱中放置 4h,然后 4000g 离心 10min 后收集沉淀物,弃上清液;

第三步,将第二步收集的沉淀物加入到 20 倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中,硫酸铵溶液的 pH 为 7.2,硫酸铵的浓度为饱和浓度的 50%至 70%,振荡使其成为混悬液,然后 4000g 离心 10min 后,收集沉淀物,弃上清液;

第四步,将第三步收集到的沉淀物加入到 20 倍沉淀物体积量的硫酸铵溶液中,硫酸铵溶液的 pH 为 7.2,硫酸铵的浓度为饱和浓度的 50%至 70%,振荡使其成为混悬液,然后 4000g 离心 10min 后收集沉淀,弃上清液,在收集到的沉淀物中加入 10 倍沉淀物体积量的蒸馏水,振荡使沉淀物溶解后,加入与沉淀物溶解后溶液等体积量的氯仿或石油醚,剧烈振荡成混悬液,静置至氯仿或石油醚与溶液分层,再剧烈振荡并静置分层 2 次,收集水溶液;

第五步,将第四步收集的水溶液装入透析袋中,将透析袋放入生理盐水中,生理盐水的体积为透析袋中水溶液体积的 20 倍,在温度为 4°C 至 10°C 的冰箱中进行透析 12h 至 24h,其间换生理盐水 3 次,每次更换生理盐水体积为透析袋中水溶液体积 20 倍,透析完成后,透析袋中的溶液 4000g 离心 20min,弃沉淀,收集上清液,上清液即为适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原。在本发明所得的适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原中加入硫柳汞,使硫柳汞在适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原中的质量百分比为 0.1%, -20°C 保存备用。

[0009] 实施例 2,上述实施例 1 所得的适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原在泡型包虫病抗体检测中的应用;其应用如下:

一、检测泡型包虫病抗体的酶联免疫夹心法试剂盒及其制备方法

检测泡型包虫病抗体的酶联免疫夹心法试剂盒,包括规格为 8 管 × 12 条的囊型包虫病囊液脱酯抗原包被板 1 块、辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原 10ml、标本稀释

液 10ml、20 倍浓缩冲洗液 50ml、泡型包虫病抗体阳性对照液 3ml、泡型包虫病抗体阴性对照液 3ml、抑制用囊型包虫病囊液脱酯抗原 6ml、显色液 A 液 6ml、显色液 B 液 6ml、显色终止液 6ml。

[0010] 囊型包虫病囊液脱酯抗原包被板按下述步骤得到：

包被用试剂,包被液:在 0.05mol/L pH 为 6.4 至 9.6 的磷酸盐或碳酸盐缓冲液中加入本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原得到包被液,本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原在包被液中的浓度为 0.1 μ g/ml 至 1 μ g/ml;

饱和包被液:将新生小牛血清或牛血清白蛋白加入到 0.05mol/L pH 为 6.4 至 9.6 的磷酸盐或碳酸盐缓冲液中得到饱和包被液,新生小牛血清在饱和包被液中的体积百分比为 2%或牛血清白蛋白在饱和包被液中的质量百分比为 0.05%;

包被反应板:在反应板的每管中加入包被液 100 μ l,在温度为 28 $^{\circ}$ C 至 37 $^{\circ}$ C 下放置 3h 至 4h,然后在反应板的每管中加入饱和包被液 100 μ l,在温度为 28 $^{\circ}$ C 至 37 $^{\circ}$ C 下放置 3h,甩弃反应板的管内液体,用蒸馏水冲洗反应板 3 次后在吸水纸上拍去管中水珠,将 20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后得到浸洗液,浸洗液中含新生小牛血清体积比为 2%或牛血清白蛋白质量百分比为 0.05%,然后在反应板的每管中加入浸洗液 200 μ l 浸洗,在 28 $^{\circ}$ C 至 37 $^{\circ}$ C 的温度下放置 3h,甩弃反应板的管内液体,用蒸馏水冲洗反应板 5 次,在吸水纸上用力拍打反应板直到反应板的管内外无可见水珠;将处理后的反应板直立放入温度为 37 $^{\circ}$ C 的温箱,每 30min 鼓风或开门通风 1 次,干燥 8h 至 12h 后取出,得到囊型包虫病囊液脱酯抗原包被板(简称:抗原板),装入塑料袋内密封保存。

[0011] 辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原按下述步骤得到：

第一步,活化辣根过氧化物酶:称取辣根过氧化物酶(RZ \geq 3.0)5mg 装入试管,在试管中加入蒸馏水 1ml 使辣根过氧化物酶溶解,在试管中加入新鲜配制的质量百分比为 1.3%的过碘酸钠水溶液 0.5ml 混匀,在 4 $^{\circ}$ C 至 10 $^{\circ}$ C 的温度下放置 30 min,再在试管中加入体积百分比为 1%的乙二醇水溶液 0.5ml,在室温 20 $^{\circ}$ C 至 37 $^{\circ}$ C 放置 30min,得到活化的辣根过氧化物酶;

第二步,将含 5mg/ml 本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原的溶液 1ml 与第一步得到的活化的辣根过氧化物酶混匀,装入透析袋,用 0.05mol/L pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液 200ml 在温度为 4 $^{\circ}$ C 至 10 $^{\circ}$ C 下透析 12h 至 16h,透析后在透析袋的溶液中加入新鲜配制的质量百分比为 0.5%的硼氢化钠溶液 0.2ml,在温度为 4 $^{\circ}$ C 至 10 $^{\circ}$ C 的冰箱中放置 2h,用 200ml 的 0.01mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液透析 8h 至 12h,其间换磷酸盐缓冲液 3 次,每次 200ml,透析后透析袋中的溶液 4000g 离心 10min 取上清液,上清液即为辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原(简称:酶标记抗原);

第三步,测定辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原应用浓度:用含体积比 2%小牛血清和 2%甘油的 0.1mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液稀释辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原,按检测泡型包虫病抗体的酶联免疫夹心法程序操作,检测泡型包虫病抗体阳性对照 OD > 2.0、阴性对照 OD < 0.1 的辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原浓度为应用浓度,将辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原用含体积比 2%小牛血清和 50%甘油的 0.1mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液稀释到应用浓度分装。

[0012] 标本稀释液:含有体积百分比为 0.05%的吐温-20、体积百分比为 2%的新生小牛血清、质量百分比为 0.1%的硫柳汞的 0.01mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液。

[0013] 20 倍浓缩冲洗液:含有体积百分比为 1%的吐温-20、质量百分比为 17%的氯化钠的 0.1mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液。

[0014] 泡型包虫病抗体阳性对照液:含体积百分比为 2%的新生小牛血清、质量百分比为 0.05%的硫柳汞、2 μ g/ml 泡型包虫病抗体的 0.01 mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液。

[0015] 泡型包虫病抗体阴性对照液:含体积百分比为 2%的新生小牛血清、质量百分比为 0.05%的硫柳汞的 0.01 mol/L pH 为 7.2 磷酸盐缓冲液。

[0016] 抑制用囊型包虫病囊液脱酯抗原:含体积百分比为 0.05%的吐温-20、体积百分比为 2%的新生小牛血清、质量百分比为 0.05%的硫柳汞、5 μ g/ml 本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原的 0.01mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液。

[0017] TMB 显色液 A 液:将 0.2 mol/L NaH_2PO_4 与 0.1 mol/L 柠檬酸等体积混合,按混合后溶液体积的 0.05%加入体积百分比浓度为 30%的双氧水,即为 TMB 显色液 A 液。

[0018] TMB 显色液 B 液:将无水乙醇 10ml 和 N-甲基-2-吡咯烷酮 10ml 混合,加入 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺(TMB)50mg,至 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺完全溶解,然后加蒸馏水至 70ml,加入 0.1mol/L 的柠檬酸 10ml,加入 0.1mol/L 的 EDTA 1ml 混合后即为 TMB 显色液 B 液。

[0019] 显色终止液:体积百分比为 10%的硫酸溶液。

[0020] 上述试剂和抗原板装入检测泡型包虫病抗体的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒,4 $^{\circ}$ C 至 8 $^{\circ}$ C 保存,有效期 1 年。

[0021] 二、酶联免疫夹心法检测包虫病抗体初筛(定性)试验

1. 加标本稀释液:根据标本和阳性、阴性对照的数量,组装囊型包虫病囊液脱酯抗原包被板(以下简称:抗原板),抗原板每管加标本稀释液 50 μ l。

[0022] 2. 加标本:按登记编号位置在抗原板的每管中加 1 份标本 50 μ l,置于湿盒或塑料袋内,37 $^{\circ}$ C 静置反应 90min。

[0023] 3. 冲洗抗原板:20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后,用洗板机冲洗抗原板,反复冲洗 5 次;管口向下,在吸水纸上拍去抗原板管内外水珠。

[0024] 4. 加辣根过氧化物酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原(以下简称:酶标抗原):在抗原板的每管中加酶标抗原 100 μ l,加盖、置于湿盒或塑料袋内;37 $^{\circ}$ C 反应时间 45min,20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后,用洗板机冲洗抗原板,反复冲洗 5 次;管口向下,在吸水纸、滤纸上拍去抗原板管内外水珠。

[0025] 5. 显色:在抗原板的每管中加 TMB 显色液的 A 液和 B 液各 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 显色反应 15min,阳性反应呈兰色;阴性反应为无色或显色很淡。

[0026] 6. 终止显色:在抗原板的每管中加终止液 50 μ l,阳性显色液由兰色变为黄色,阴性仍为无色或颜色很淡。

[0027] 7. 观测记录试验结果:加终止液后 10min 内观测结果。

[0028] 目测:平持抗原板,距白色背景 10 cm 至 15cm,从正上方向下观察;

比色计比色:TMB 显色液(A 液和 B 液)用 450nm 和 630nm 双波长比色,阴性:(-)无色或颜色很淡,OD < 0.20;阳性:(+)颜色明显可见,OD 0.20 至 0.39;(++)浅黄色,OD 0.4

至 0.99 ;(+++) 与阳性对照颜色相同, OD 1.0 至 2.0 ;(++++) 深黄色比阳性对照深, OD > 2.0。

[0029] 三、验证试验

1. 检测反应滴度试验：

(1) 根据阳性标本数和初筛显色深浅, 阳性反应标本按(+)、(++)、(+++)、(++++) 分别排列 ;(+) 用 2 个小管, (++) 用 4 个小管, (+++) 用 6 至 8 个小管, (++++) 用 8 至 12 个小管, 在抗原板的每管中加标本稀释液 100u1。

[0030] (2) 在抗原板的每列首管中加 1 份待检标本 100u1, 吹吸 3 次, 移 100u1 到第 2 管中, 如此连续 2 倍稀释到最末管 ;阳性对照标本同步稀释 ;加盖、置于湿盒或塑料袋内, 37°C 反应时间 90min ;为能测出滴度终点, 可将(++++) 的标本稀释 16 倍至 64 倍后再检测滴度。

[0031] (3) 冲洗抗原板 :20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后, 用洗板机冲洗抗原板, 反复冲洗 5 次 ;管口向下, 在吸水纸、滤纸上拍去抗原板管内外水珠。

[0032] (4) 加标记抗原 :在抗原板的每管中加酶标记抗原 100μ1, 加盖、置于湿盒或塑料袋内 ;37°C 反应时间 45min, 20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后, 用洗板机冲洗抗原板, 反复冲洗 5 次 ;管口向下, 在吸水纸、滤纸上拍去抗原板管内外水珠。

[0033] (5) 显色 :在抗原板的每管中加 TMB 显色液的 A 液和 B 液各 50μ1, 37°C 显色反应 15min, 阳性反应呈兰色 ;阴性反应为无色或显色很淡。

[0034] (6) 终止显色 :在抗原板的每管中加终止液 50μ1, 显色液由兰色变为黄色, 阴性仍为无色或颜色很淡。

[0035] (7) 观测记录试验结果 :加终止液后 10min 内观测结果。

[0036] 目测 :平持抗原板, 距白色背景 10 Cm 至 15Cm, 从正上方向下观察 ;

比色计比色 :TMB 显色液 (A 液和 B 液) 用 450nm 和 630nm 双波长比色, 阴性 :(-) 无色或颜色很淡, OD < 0.20 ;阳性 :(+) 颜色明显可见, OD 0.20 至 0.39 ;(++) 浅黄色, OD 0.4 至 0.99 ;(+++) 与阳性对照颜色相同, OD 1.0 至 2.0 ;(++++) 深黄色比阳性对照深, OD > 2.0。

[0037] 2. 抑制试验：

(1) 抑制试验和检测反应滴度的试验同步进行。抑制试验与检测反应滴度试验不同之处为用抑制用抗原液代替标本稀释液稀释标本, 每管加抑制用抗原液 100u1。

[0038] (2) 在抗原板的每列首管中加 1 份待检标本 100u1, 吹吸 3 次, 移 100u1 到第 2 管中, 如此连续 2 倍稀释到最末管 ;阳性对照标本同步稀释 ;加盖、置于湿盒或塑料袋内反应, 37°C 反应时间 90min。为能测出滴度终点, 可将(++++) 的标本稀释 16 倍至 64 倍后再检测滴度。

[0039] (3) 冲洗抗原板 :20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后, 用洗板机冲洗抗原板, 反复冲洗 5 次 ;管口向下, 在吸水纸、滤纸上拍去抗原板管内外水珠。

[0040] (4) 加酶标记抗原 :在抗原板的每管中加酶标记抗原 100μ1, 加盖、置于湿盒或塑料袋内 ;37°C 反应时间 45min, 20 倍浓缩冲洗液用蒸馏水稀释 20 倍后, 用洗板机冲洗抗原板, 反复冲洗 5 次 ;管口向下, 在吸水纸、滤纸上拍去抗原板管内外水珠。

[0041] (5) 显色 :在抗原板的每管中加 TMB 显色液的 A 液和 B 液各 50μ1, 37°C 显色反应 15min, 阳性反应呈兰色 ;阴性反应为无色或显色很淡。

[0042] (6) 终止显色 :在抗原板的每管中加终止液 50 μ l, 显色液由兰色变为黄色, 阴性仍为无色或颜色很淡。

[0043] (7) 观测记录试验结果 :加终止液后 10min 内观测结果。

[0044] 目测 :平持抗原板, 距白色背景 10 cm 至 15cm, 从正上方向下观察 ;

比色计比色 :TMB 显色液 (A 液和 B 液) 用 450nm 和 630nm 双波长比色, 阴性 :(-) 无色或颜色很淡, OD < 0.20 ;阳性 :(+) 颜色明显可见, OD 0.20 至 0.39 ;(++) 浅黄色, OD 0.4 至 0.99 ;(+++) 与阳性对照颜色相同, OD 1.0 至 2.0 ;(++++) 深黄色比阳性对照深, OD > 2.0。

[0045] 三、观测登记检验结果

目测 :阳性 (+) 颜色明显可见的最高稀释度为反应滴度终点。比色计比色 :阴性对照管调 0, 标本 OD > 0.20 的最高稀释度为反应滴度终点。反应滴度用 1 :2ⁿ 表示, n 为阳性反应的管数。抑制试验比检测滴度试验的滴度低 2 个或 2 个以上滴度为抑制试验阳性 ;抑制试验阳性, 才可判定检测泡型包虫病抗体试验阳性。

[0046] 实验结果表明, 将本发明所得的适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原用于酶联免疫吸附试验双抗原夹心法检测泡型包虫病抗体, 能有效提高检测试剂的特异性和敏感性。特异性强 :检测无包虫病症状的人和动物标本 416 份, 全部阴性, 其中非泡型包虫病疫区无泡型包虫病征状的人血清 180 份, 宰杀解剖证实无包虫病绵羊血清 86 份, 未接种多房棘球蚴灰仓鼠血清 150 份 ;囊型包虫病的人和动物标本 36 份, 全部阴性, 其中 B 超诊断囊型包病人血清 7 份, 有囊型包虫病包囊直径 5cm 至 15cm 的锦羊血清 4 份, 实验接种囊型棘球蚴头节且出现囊型包虫病包囊的子午沙鼠血清 25 份, 血清 1 :8 稀释 OD 值均低于 0.2 ;敏感性高 :实验接种泡型棘球蚴头节且出现泡型包虫病包囊的灰仓鼠, 从接种第 15 天开始出现阳性反应, 到第 22 天, 阳性率达到 60% 以上, 第 80 天阳性率达到 100%, 反应滴度和阳性率与感染时间及包囊体积呈正相关 ;稳定 :本发明所得的囊型包虫病囊液脱酯抗原建立的检测的酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒稳定, 在 4 $^{\circ}$ C 至 8 $^{\circ}$ C 保存 1 年, 不影响检测结果 ;用途广 :本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原用于酶联免疫吸附试验夹心法试剂盒, 可检测检测人和各种动物泡型包虫病抗体, 适用于比较不同种动物抗体含量, 为包虫病鉴别诊断、流行调查和疫情监测工作创造了便利条件 ;根据免疫学反应原理, 本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原, 还可用于制备胶体金免疫层析试剂等多种检测泡型包虫病抗体的快速检验试剂。

[0047] 通过本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原建立的酶联免疫吸附试验夹心法检测人和动物的血清、脏器和组织浸液标本中的泡型包虫病抗体 ;被测抗体经包被抗原和酶标抗原两次特异性选择结合, 提高了检测的特异性 ;增加了抑制试验程序, 提高了检测结果的准确性 ;本发明的生产及使用无安全隐患, 操作简便快捷, 在应用本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原建立的方法中具有良好的敏感性和稳定性, 酶标记囊型包虫病囊液脱酯抗原替代酶标记第二抗体, 一种酶标记物可以检测各种动物的抗体 ;酶标仪检测 OD 值具有定量的意义, 目测判定结果, 可在无电源的野外现场应用, 特别适用于泡型包虫病监测和疫源动物调查。

专利名称(译)	适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法		
公开(公告)号	CN103217524A	公开(公告)日	2013-07-24
申请号	CN201210582686.0	申请日	2012-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区实验动物研究中心		
申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区实验动物研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区实验动物研究中心		
[标]发明人	廖力夫 燕顺生 徐艺玫 徐兵		
发明人	廖力夫 燕顺生 徐艺玫 徐兵		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	汤洁		
其他公开文献	CN103217524B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及人和动物泡型包虫病抗体检测技术领域，是一种适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原及其制备方法。本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原用于酶联免疫吸附试验双抗原夹心法检测泡型包虫病抗体,能有效提高检测试剂的质量，具有特异性强、敏感性高、性能稳定和用途广的特点，可检测人和各种动物的泡型包虫病抗体，便于比较不同种动物抗体含量；根据免疫学反应原理，本发明所得适用于检测泡型包虫病抗体的囊型包虫病囊液脱酯抗原，还可用于制备胶体金免疫层析试剂等多种检测泡型包虫病抗体的快速检验试剂，为包虫病鉴别诊断、流行调查和疫情监测工作创造了有利条件。