(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103018444 A
(43)申请公布日 2013.04.03

(21)申请号 201210578311.7

(22)申请日 2012.12.27

(71)申请人 珠海市银科医学工程有限公司
地址 519090 广东省珠海市金湾区红旗工业园虹晖二路 20 号

(72)发明人 孙宜峰 郭华燕 曾冰冰

(74)专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司 44214
代理人 王贤义

(51)Int.Cl.
G01N 33/571(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

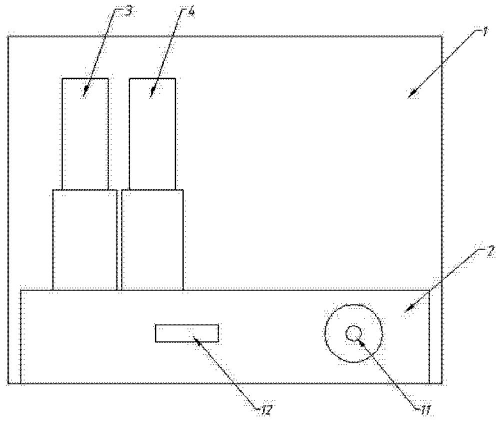
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54)发明名称

淋球菌抗原检测方法及检测试剂盒和该试剂盒的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种淋球菌抗原检测方法，还公开了一种用于检测淋球菌抗原的检测试剂盒及制备该检测试剂盒的方法。所述淋球菌抗原检测方法包括以下步骤：a、将胶体金标记的淋球菌抗体载于玻璃纤维载体上；b、取裂解后的待测标本滴于胶体金标记的淋球菌抗体的载体上。所述检测试剂盒包括盒体（1）及淋球菌抗原金标检测卡（2），所述盒体（1）内存放有裂解液 A（3）和裂解液 B（4），所述盒体（1）上设置有与所述淋球菌抗原金标检测卡（2）相适配的加样孔（11）和观察孔（12）。制备该检测试剂盒的方法是先制成所述淋球菌抗原金标检测卡（2），然后再进行组装。本发明应用于医学领域。



CN 103018444 A

1. 一种淋球菌抗原检测方法，其特征在于：其包括以下步骤：

a、将胶体金标记的淋球菌抗体载于玻璃纤维载体上，并在与所述淋球菌抗体的载体相连的检测载体上包被有由所述淋球菌抗体制成的检测线和由免疫球蛋白 G 形成的控制线；

b、取待测标本，所述待测标本裂解后滴于胶体金标记的淋球菌抗体的载体上，如有淋球菌抗体在所述检测载体上形成所述检测线和所述控制线，则为阳性，否则为阴性。

2. 根据权利要求 1 所述的淋球菌抗原检测方法，其特征在于：所述淋球菌抗体为淋球菌单抗，或者为淋球菌多抗，或者为所述淋球菌单抗和所述淋球菌多抗的混合物。

3. 一种用于如权利要求 1 所述的淋球菌抗原检测方法的检测试剂盒，其特征在于：所述检测试剂盒包括盒体（1）及设置在所述盒体（1）上的淋球菌抗原金标检测卡 (2)，所述盒体（1）内存放有裂解液 A （3）和裂解液 B （4），所述盒体（1）上设置有与所述淋球菌抗原金标检测卡 (2) 相适配的加样孔（11）和观察孔（12），将样本滴于所述加样孔（11），然后从所述观察孔（12）即可观察检测结果。

4. 根据权利要求 3 所述的检测试剂盒，其特征在于：所述淋球菌抗原金标检测卡 (2) 包括衬板 (21)，在所述衬板 (21) 上从一个方向上依次设置有加样端吸水纸 (22)、检测层 (23) 和吸水端吸水层 (24)，在所述检测层 (23) 与所述加样端吸水纸 (22) 之间搭接有淋球菌金标抗体层 (25)，所述淋球菌金标抗体层 (25) 一端夹在所述加样端吸水纸 (22) 内，在所述检测层 (23) 上包被有检测线 (231) 和控制线 (232)。

5. 根据权利要求 4 所述的检测试剂盒，其特征在于：所述的检测层 (23) 由硝酸纤维素膜、设在所述硝酸纤维素膜上的由所述淋球菌抗体构成的所述检测线 (231) 和由免疫球蛋白 G 形成的所述控制线 (232) 组成。

6. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的检测试剂盒，其特征在于：所述裂解液 A （3）为样品组织细胞分散剂溶液，所述裂解液 B （4）为淋球菌原生小体的胞液和胞质膜溶解液。

7. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的检测试剂盒，其特征在于：所述裂解液 A （3）为 PPA 或胆酸。

8. 根据权利要求 3 至 5 任一项所述的检测试剂盒，其特征在于：所述裂解液 B （4）为反应体系，其为 BSA，或者为 BSA-V，或者为 BSA 和 BSA-V 的组合。

9. 一种如权利要求 4 所述的检测试剂盒的制备方法，其特征在于：该方法为：首先制备所述金标抗体层 (25)、所述控制线 (232) 的包被及所述检测线 (231) 的包被，然后在所述衬板 (21) 上组合淋球菌抗原金标试纸条，制成所述淋球菌抗原金标检测卡 (2)，再将所述淋球菌抗原金标检测卡 (2) 装在所述盒体（1）上，并在所述盒体（1）内存放有裂解液 A （3）和裂解液 B （4）。

10. 根据权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于：所述金标抗体层 (25) 的制备方法包括下述步骤：

a、制备胶体金；

b、胶体金标记淋球菌抗体，在胶体金溶液中按 0.6 ～ 1.0mg/ml 加入淋球菌抗并搅拌；

c、经搅拌后再在溶液中加入胶体金稀释液和胶体金溶液的混合液；

d、将步骤 c 中的所述混合液经离心去掉上清液，得沉淀物；

e、将所述沉淀物按 4 ～ 10mg/ml 溶于缓冲液得金标抗体溶液，所述缓冲液中含有其重

量的 1%～10% 的动物血清白蛋白和 0.01%～0.06% 的叠氮钠；

f、用玻璃纤维或无纺布浸取所述金标抗体溶液，所述金标抗体溶液开始渗出为止，然后将所述玻璃纤维或所述无纺布进行干燥从而形成金标抗体层 (25)。

淋球菌抗原检测方法及检测试剂盒和该试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及淋球菌抗原检测方法，以及用于该方法的检测试剂盒和该试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 淋病是目前国内最为常见的性传播疾病之一，其病原体为淋球菌，它是一种严重的人体寄生菌，存在于急、慢性尿道炎的脓性分泌物及新生儿眼结膜分泌物中。在男性常表现为尿道炎，尿道口可出现黄色脓性分泌物，而女性感染者症状常常不明显，但可以从尿道、阴道扩散到输卵管，引起不育症，新生儿经产道感染引起的眼结膜炎逐渐可涉及全眼，导致失明。感染淋球菌后，若不进行治疗，可出现角膜穿孔导致失明，也可导致输卵管狭窄、增厚、粘连、阻塞，从而引不孕或宫外孕，甚至通过血行将淋球菌播散到全身，出现较严重的全身感染，如淋球菌性败血症、关节炎、心内膜炎、脑膜炎等。因此，对淋病的早期诊断与治疗十分重要。

[0003] 诊断男女病人淋病感染的方法，目前有几种不同的方法：1、培养法；2、免疫荧光法；3、合成酶链反应 LCR 检测方法；4、聚合酶链反应 PCR 检测方法。培养法是传统的诊断方法，取女性子宫颈分泌物或男性尿道的标本接种到培养板上，然后进行 48 ～ 72 个小时培养；对菌落进行染色，以观察菌落的形态和着色来判断。培养法虽然灵敏度高，特异性强，但方法工作量大，培养时间长，要求专门的设施和专业人员操作，而且对环境要求高，需要特殊仪器，在实际临床应用受到一定的限制。免疫荧光法和近来建立的合成酶链反应 LCR 和聚合酶链反应 PCR 检测方法均要求专门设施和掌握技巧的技术人员进行实验操作及判读结果，检测过程需要多步骤和数小时才能得出结果，而且需有相当大的测试标本数量才能达到可接受的成本效益比。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种检测速度快、操作简便，而且灵敏度高、特异性强的淋球菌抗原检测方法。

[0005] 本发明还提供了一种用于检测淋球菌抗原的检测试剂盒。

[0006] 本发明还提供了一种用于制备所述检测试剂盒的方法。

[0007] 本发明所述淋球菌抗原检测方法所采用的技术方案是：该方法包括以下步骤：

a、将胶体金标记的淋球菌抗体载于玻璃纤维载体上，并在与所述淋球菌抗体的载体相连的检测载体上包被有由所述淋球菌抗体制成的检测线和由免疫球蛋白 G 形成的控制线；

b、取待测标本，所述待测标本裂解后滴于胶体金标记的淋球菌抗体的载体上，如有淋球菌抗体在所述检测载体上形成所述检测线和所述控制线，则为阳性，否则为阴性。

[0008] 所述淋球菌抗体为淋球菌单抗，或者为淋球菌多抗，或者为所述淋球菌单抗和所述淋球菌多抗的混合物。

[0009] 本发明所述检测试剂盒所采用的技术方案是：所述检测试剂盒包括盒体及设置在所述盒体上的淋球菌抗原金标检测卡，所述盒体内存放有裂解液 A 和裂解液 B，所述盒体上设置有与所述淋球菌抗原金标检测卡相适配的加样孔和观察孔，将样本滴于所述加样孔，然后从所述观察孔即可观察检测结果。

[0010] 所述淋球菌抗原金标检测卡包括衬板，在所述衬板上从一个方向上依次设置有加样端吸水纸、检测层和吸水端吸水层，在所述检测层与所述加样端吸水纸之间搭接有淋球菌金标抗体层，所述淋球菌金标抗体层一端夹在所述加样端吸水纸内，在所述检测层上包被有检测线和控制线。

[0011] 所述的检测层由硝酸纤维素膜、设在所述硝酸纤维素膜上的由所述淋球菌抗体构成的所述检测线和由免疫球蛋白 G 形成的所述控制线组成。

[0012] 所述裂解液 A 为样品组织细胞分散剂溶液，所述裂解液 B 为淋球菌原生小体的胞液和胞质膜溶解液。

[0013] 所述裂解液 A 为 PPA 或胆酸。

[0014] 所述裂解液 B 为反应体系，其为 BSA（牛血清白蛋白），或者为 BSA-V（牛血清白蛋白－第五组份），或者为 BSA 和 BSA-V 的组合。

[0015] 本发明用于制备所述检测试剂盒的方法所采用的技术方案是：首先制备所述金标抗体层、所述控制线的包被及所述检测线的包被，然后在所述衬板上组合淋球菌抗原金标试纸条，制成所述淋球菌抗原金标检测卡，再将所述淋球菌抗原金标检测卡装在所述盒体上，并在所述盒体内存放有裂解液 A 和裂解液 B。

[0016] 所述金标抗体层的制备方法包括下述步骤：

a、制备胶体金；

b、胶体金标记淋球菌抗体，在胶体金溶液中按 0.6 ～ 1.0mg/ml 加入淋球菌抗并搅拌；

c、经搅拌后再在溶液中加入胶体金稀释液和胶体金溶液的混合液；

d、将步骤 c 中的所述混合液经离心去掉上清液，得沉淀物；

e、将所述沉淀物按 4 ～ 10mg/ml 溶于缓冲液得金标抗体溶液，所述缓冲液中含有其重量的 1% ～ 10% 的动物血清白蛋白和 0.01% ～ 0.06% 的叠氮钠；

f、用玻璃纤维或无纺布浸取所述金标抗体溶液，所述金标抗体溶液开始渗出为止，然后将所述玻璃纤维或所述无纺布进行干燥从而形成金标抗体层。

[0017] 本发明的有益效果是：由于所述淋球菌抗原检测方法包括以下步骤： a、将胶体金标记的淋球菌抗体载于玻璃纤维载体上，并在与所述淋球菌抗体的载体相连的检测载体上包被有由所述淋球菌抗体制成的检测线和由免疫球蛋白 G 形成的控制线； b、取待测标本，所述待测标本裂解后滴于胶体金标记的淋球菌抗体的载体上，如有淋球菌抗体在所述检测载体上形成所述检测线和所述控制线，则为阳性，否则为阴性，因此，本发明的所述淋球菌抗原检测方法灵敏度高、特异性强，而且速度快、操作简便，无需专门设施，适用于临床检测或普查等多种场合。

[0018] 由于所述检测试剂盒包括盒体及设置在所述盒体上的淋球菌抗原金标检测卡，所述盒体内存放有裂解液 A 和裂解液 B，所述盒体上设置有与所述淋球菌抗原金标检测卡相适配的加样孔和观察孔，将样本滴于所述加样孔，然后从所述观察孔即可观察检测结果，检测非常方便，因此，本发明的所述检测试剂盒是结构简单，而且一步就能实现检测的检测试

剂盒。

[0019] 由于制备所述检测试剂盒的方法为：首先制备所述金标抗体层、所述控制线的包被及所述检测线的包被，然后在所述衬板上组合淋球菌抗原金标试纸条，制成所述淋球菌抗原金标检测卡，再将所述淋球菌抗原金标检测卡装在所述盒体上，操作简单，并在所述盒体内存放有裂解液 A 和裂解液 B，因此，所述制备所述检测试剂盒的方法简单、重复性好，而且用该方法制备的检测试剂盒结构稳定，使用性能好。

附图说明

[0020] 图 1 是所述检测试剂盒的结构示意图；

图 2 是所述淋球菌抗原金标检测卡的结构示意图。

具体实施方式

[0021] 实施例一

在本实施例中，本发明所述淋球菌抗原检测方法包括以下步骤：

a、将胶体金标记的淋球菌抗体载于玻璃纤维载体上，并在与所述淋球菌抗体的载体相连的检测载体上包被有由所述淋球菌抗体制成的检测线和由免疫球蛋白 G 形成的控制线；

b、取待测标本，在本实施例中，所述待测标本为女性宫颈口分泌物和男性尿道标本，所述待测标本裂解后滴于胶体金标记的淋球菌抗体的载体上，如有淋球菌抗体在所述检测载体上形成所述检测线和所述控制线，则为阳性，否则为阴性。

[0022] 所述淋球菌抗体为淋球菌单抗，或者为淋球菌多抗，或者为所述淋球菌单抗和所述淋球菌多抗的混合物，在本实施例中，所述淋球菌多抗为兔或羊抗淋球菌抗体。

[0023] 所述淋球菌抗原检测方法为一步法，其具有高度的种特异性、很少出现困扰临床的假阴性、假阳性问题，具有高度的灵敏性，而且操作简便，无需专门设施。

[0024] 如图 1 和图 2 所示，本发明所述检测试剂盒所采用的技术方案是：所述检测试剂盒包括盒体 1 及设置在所述盒体 1 上的淋球菌抗原金标检测卡 2，所述盒体 1 内存放有裂解液 A3 和裂解液 B4，所述盒体 1 上设置有与所述淋球菌抗原金标检测卡 2 相适配的加样孔 11 和观察孔 12，将样本滴于所述加样孔 11，然后从所述观察孔 12 即可观察检测结果。

[0025] 所述淋球菌抗原金标检测卡 2 包括衬板 21，在所述衬板 21 上从一个方向上依次设置有加样端吸水纸 22、检测层 23 和吸水端吸水层 24，在所述检测层 23 与所述加样端吸水纸 22 之间搭接有淋球菌金标抗体层 25，所述淋球菌金标抗体层 25 一端夹在所述加样端吸水纸 22 内，在所述检测层 23 上包被有检测线 231 和控制线 232，所述加样端吸水纸 22 和所述吸水端吸水层 24 均由多层滤纸制成。

[0026] 在本实施例中，所述的检测层 23 由硝酸纤维素膜及设在所述硝酸纤维素膜上的由淋球菌单抗或兔、羊抗淋球菌抗体多抗构成的所述检测线 231 和由免疫球蛋白 G 形成的所述控制线 232 组成。所述的检测层 23 的制备方法是将浓度为 0.6 ～ 1.4mg/ml 的淋球菌抗体中加入 1% ～ 3% 的固定剂，再利用点膜机将所述淋球菌抗体点在硝酸纤维膜上，点膜后放入 37 ～ 39℃的环境中烘干，再用 0.01 摩尔 PH 值为 7.4 含 10% 小牛血清的 PBS 缓冲液，在 37℃下封闭 30 分钟烘干。在本实施例中，取淋球菌单抗，调蛋白浓度至 1mg/ml，加入划

膜稀释液，用喷膜机在硝酸纤维膜中段喷所述检测线 231；再取兔或羊抗鼠 IgG 抗体调蛋白浓度至 1mg/ml，加入划膜稀释液，用喷膜机在硝酸纤维膜的中段，距检测线一段距离处喷所述控制线 232，按 0.036ul/10cm 设置喷膜量，抗体包被的膜烘干，醋酸纤维素膜可以替换所述硝酸纤维素膜。

[0027] 所述裂解液 A3 为样品组织细胞分散剂溶液，所述裂解液 B4 为淋球菌原生小体的胞液和胞质膜溶解液，在本实施例中，所述裂解液 A3 为 PPA 或胆酸。

[0028] 所述裂解液 B4 为反应体系，其为 BSA 牛血清白蛋白，或者为 BSA-V 牛血清白蛋白－第五组份，或者为 BSA 和 BSA-V 的组合。

[0029] 所述检测试剂盒检测灵敏度高、检测迅速、快捷、方便，很少出现假阴性和假阳性的问题，适于临床或普查。

[0030] 本发明用于制备所述检测试剂盒的方法所采用的技术方案是：首先制备所述金标抗体层 25、所述控制线 232 的包被及所述检测线 231 的包被，然后在所述衬板 21 上组合淋球菌抗原金标试纸条，制成所述淋球菌抗原金标检测卡 2，再将所述淋球菌抗原金标检测卡 2 装在所述盒体 1 上，并在所述盒体 1 内存放有裂解液 A3 和裂解液 B4。

[0031] 在所述衬板 21 的两端分别粘贴加样端吸水层 22 和吸水端吸水层 24; 在其中段粘贴包被抗体的所述检测层 23，在所述加样端吸水层 22 与所述检测层 23 的交接部位，夹贴所述金标抗体层 25，所述金标抗体层 25 的 4/5 部分在所述加样端吸水层 22 中间，所述金标抗体层 25 的 1/5 部分压在硝酸纤维素膜的所述检测层 23 上，然后按 4.1±0.1 毫米的宽度规格切成条，再组装成所述检测卡 2，所述加样孔 11 正对所述加样端吸水层 22，所述观察孔 12 正对纤维素膜的所述检测层 23.

所述金标抗体层 25 的制备方法包括下述步骤：

a、制备胶体金，取 1g 氯金酸溶于 1000ml 双蒸水中，加入 15ml、浓度为 1% 的柠檬酸三钠，煮沸 15 分钟；

b、胶体金标记淋球菌抗体，取 100ml 胶体金溶液，用 0.1 摩尔的 Boarx 调 PH 值，使其 PH 值为 8.5，在 100ml 胶体金溶液中加入 4mg 的淋球菌抗体，搅拌 15 分钟；

c、在步骤 b 中得到的溶液中按 10% 的比例加入牛血清白蛋白，继续搅拌 5 分钟；

d、将步骤 c 中得到的溶液加入浓度为 1% 的 NaCl 溶液，经 13000 转 / 分的转速离心 15 分钟，去掉上清液，得沉淀物；

e、将所述沉淀物按 4 ～ 10mg/ml 溶于缓冲液得金标抗体溶液，所述缓冲液中含有其重量的 10% 的牛血清白蛋白和 0.02% 叠氮钠；

f、用玻璃纤维或无纺布浸取所述金标抗体溶液，所述金标抗体溶液开始渗出为止，在 37℃的环境下放置 2 小时进行干燥而形成金标抗体层 25。

[0032] 制备所述检测试剂盒的方法简便、稳定性、重复性好。

[0033] 实施例二

本实施例与实施例一不同之处：在本实施例中，所述检测线 231 由羊抗淋球菌抗体构成的，所述控制线 232 由兔抗羊 IgG 抗体形成的组成。

[0034] 实施例三

本实施例与实施例一及实施例二不同之处：在本实施例中，所述检测线 231 由兔抗淋球菌抗体构成的，所述控制线 232 由羊抗兔 IgG 抗体形成的组成。

[0035] 本发明应用于淋球菌检测领域。

[0036] 需要注意的是，上述仅以优选实施例对本发明进行了说明，并不能就此局限本发明的权利范围，因此在不脱离本发明思想的情况下，凡运用本发明说明书和附图部分的内容所进行的等效变化，均理同包含在本发明的权利要求范围内。

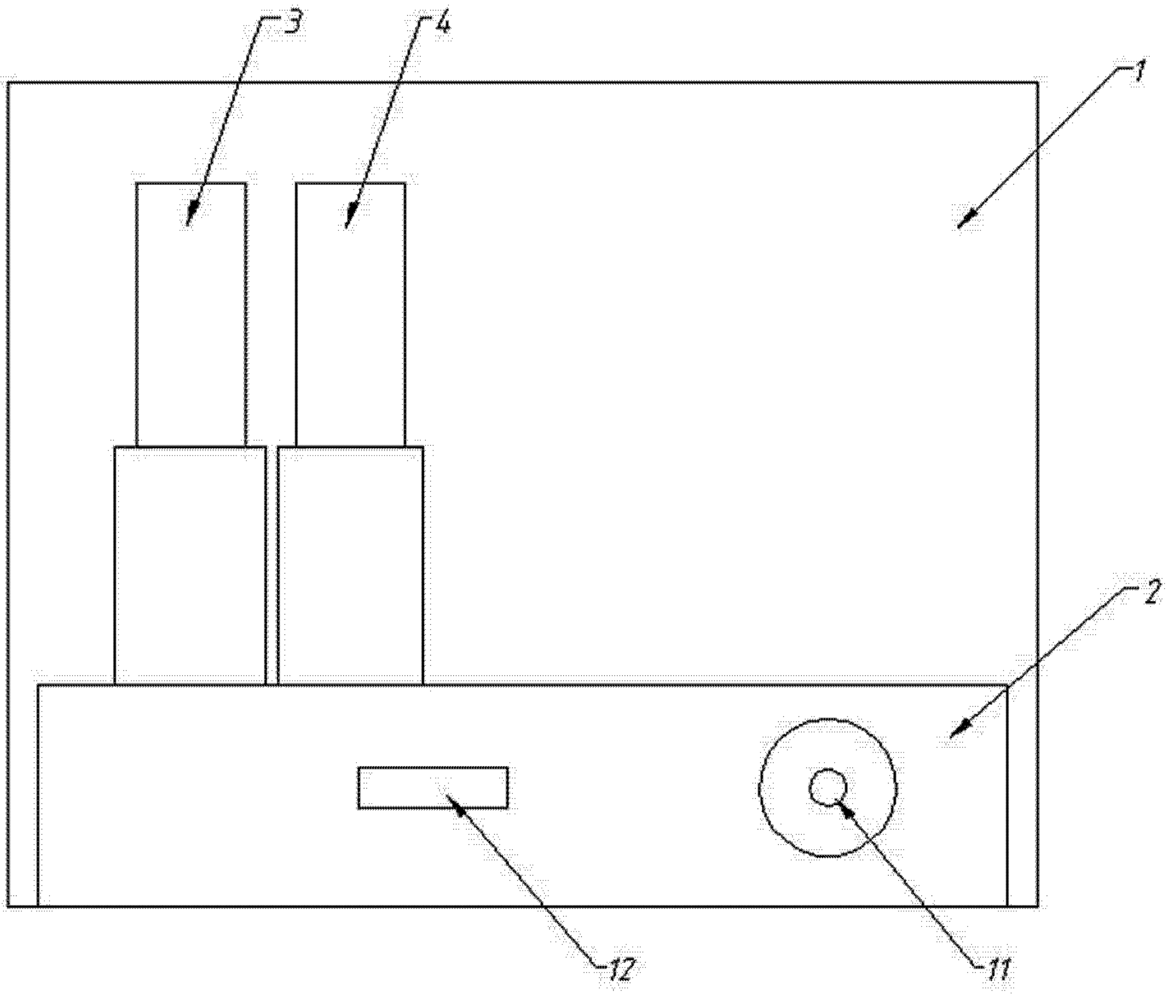


图 1

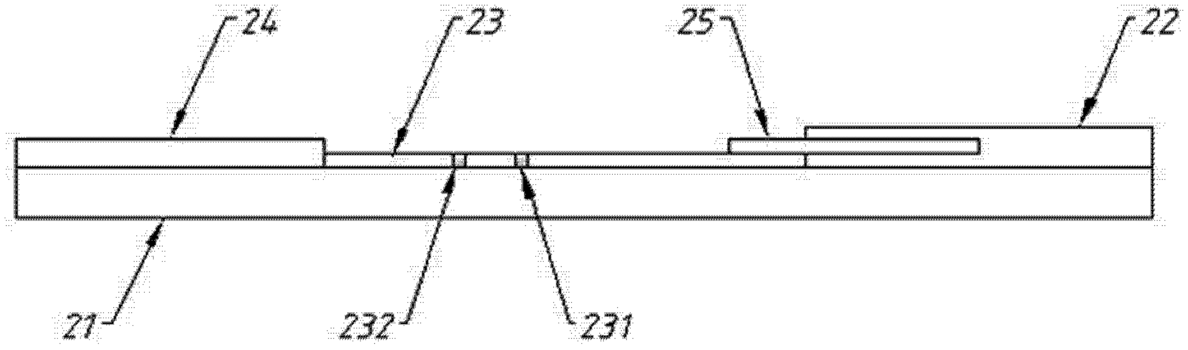
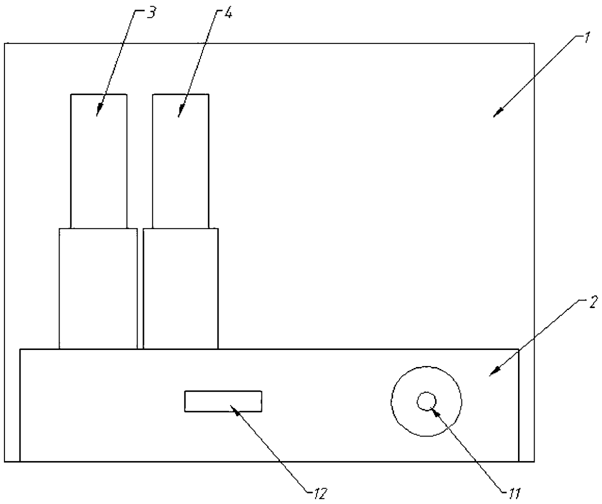


图 2

专利名称(译)	淋球菌抗原检测方法及检测试剂盒和该试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN103018444A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210578311.7	申请日	2012-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	珠海市银科医学工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	珠海市银科医学工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	珠海市银科医学工程股份有限公司		
[标]发明人	孙宜峰 郭华燕 曾冰冰		
发明人	孙宜峰 郭华燕 曾冰冰		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/531		
代理人(译)	王贤义		
其他公开文献	CN103018444B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种淋球菌抗原检测方法，还公开了一种用于检测淋球菌抗原的检测试剂盒及制备该检测试剂盒的方法。所述淋球菌抗原检测方法包括以下步骤：a、将胶体金标记的淋球菌抗体载于玻璃纤维载体上；b、取裂解后的待测标本滴于胶体金标记的淋球菌抗体的载体上。所述检测试剂盒包括盒体（1）及淋球菌抗原金标检测卡(2)，所述盒体（1）内存放有裂解液A（3）和裂解液B（4），所述盒体（1）上设置有与所述淋球菌抗原金标检测卡(2)相适配的加样孔（11）和观察孔（12）。制备该检测试剂盒的方法是先制成所述淋球菌抗原金标检测卡(2)，然后再进行组装。本发明应用于医学领域。