



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102288752 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201010502395. 7

(22) 申请日 2010. 10. 09

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 207 号

(72) 发明人 陈韶红 陈家旭 张永年 周晓农
李浩 郭俭

(74) 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司 31128

代理人 严新德

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

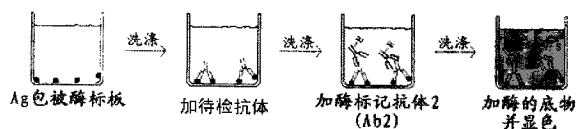
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒, 含有尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG、聚乙烯反应板、PBST 洗涤液、阳性和阴性对照样本、显色液、终止液。本发明的试剂盒是应用尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原检测患者血清中特异性抗体的酶联免疫吸附试验 (ELISA), 具有特异性高、敏感性好的优点, 可实现尖吻蝮蛇舌形虫病的快速诊断、药物筛选和疗效考核。



1. 一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于:含有尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原和辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。

2. 如权利要求 1 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于:还含有聚乙烯反应板、PBST 洗涤液、阳性和阴性对照样本、显色液、终止液。

3. 如权利要求 2 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于:所述的阳性对照样本为尖吻蝮蛇舌形虫病病人血清。

4. 如权利要求 2 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于:所述的阴性对照样本为正常人血清。

5. 如权利要求 1 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于:所述的终止液为 H_2SO_4 , H_2SO_4 的浓度在 1-3mol/L 之间。

6. 如权利要求 5 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒的制备方法,其特征在于:所述的 H_2SO_4 的浓度为 2mol/L,将纯硫酸与蒸馏水按体积比 1 : 17 的比例混合得到 2mol/L 硫酸溶液。

7. 如权利要求 1 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于:所述的显色液由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液为四甲基联苯胺溶液,所述的 B 液为 H_2O_2 溶液。

8. 如权利要求 1 所述的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒,其特征在于所述的尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原通过如下方法制备:首先从感染尖吻蝮蛇舌形虫虫卵的 3-5 个月的小鼠腹腔分离幼虫,然后制备幼虫可溶性抗原,利用凝胶电泳纯化抗原。

一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明属于生物检测领域，尤其涉及一种试剂盒及其制备方法，具体来说是一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒。

背景技术：

[0002] 舌形虫病是动物源性人兽共患病。全球已知舌形虫约 118 种，寄生人体的舌形虫主要有 6 个属 10 个种，分别为锯齿舌形虫 (*Linguatula serrata*)、腕带蛇舌状虫 (*Armillifer armillatus*)、尖吻蝮蛇舌状虫 (*A. agkistrodontis*)、串珠蛇舌状虫 (*A. moniliformis*)、大蛇舌状虫 (*A. grandis*)、蜥虎赖利舌虫 (*Raillietiella hemidactyli*)、辛辛那提莱佩舌虫 (*Leiperia cinnamalis*)、响尾蛇孔头舌虫 (*Porocephalus crotali*)、瑟皮舌虫 (*P. Sebekia*) 和台湾孔头舌虫 (*P. taiwana*) 等。我国记载寄生人体的舌形虫有锯齿舌形虫、尖吻蝮蛇舌状虫和台湾孔头舌虫。近年来，在我国台湾、浙江、广西都曾发现有多例尖吻蝮蛇舌状虫感染人体的报道。尽管舌形虫病例数较少，但由于有疫源地的存在，人们各异的进食习惯，为本病的感染建立了自然条件，人可成为尖吻蝮蛇舌状虫的中间宿主，主要是由于人们饮用了被感染性虫卵污染的水源或生饮蛇血、蛇胆而感染。表现为幼虫寄生人体肠系膜和肝、脾、肾等脏器，引起多脏器弥漫性损伤，特别是肝、脾等重要的脏器，危害十分重大。加上近 20 年来舌形虫病疫区的扩大，新致病种的发现和致命病例的增加，使舌形虫这一罕见寄生虫病的诊断提出了新的挑战。

发明内容：

[0003] 本发明的目的在于提供一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒，所述的这种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒要解决现有技术中无法检测尖吻蝮蛇舌形虫病的方法。

[0004] 本发明提供了一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒，含有尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原和辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。

[0005] 进一步的，所述的试剂盒中还含有聚乙烯反应板、PBST 洗涤液、阳性和阴性对照样本、显色液、终止液。

[0006] 进一步的，所述的阳性对照样本为尖吻蝮蛇舌形虫病病人血清。

[0007] 进一步的，所述的阴性对照样本为正常人血清。

[0008] 进一步的，所述的终止液为 H_2SO_4 ， H_2SO_4 的浓度在 1-3mol/L 之间。

[0009] 进一步的，所述的 H_2SO_4 的浓度为 2mol/L，将纯硫酸与蒸馏水按体积比 1 : 17 的比例混合得到 2mol/L 硫酸溶液。

[0010] 进一步的，所述的显色液由 A 液和 B 液组成，所述的 A 液为四甲基联苯胺溶液，所述的 B 液为 H_2O_2 溶液。

[0011] 进一步的，所述的尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原通过如下方法制备：首先从感染尖吻蝮蛇舌形虫虫卵的 3-5 个月的小鼠腹腔分离幼虫，然后制备幼虫可溶性抗原，利用凝

胶电泳纯化抗原。

[0012] 本发明在实验室应用尖吻蝮蛇舌形虫幼虫抗原检测人工感染的 100 只小鼠血清中特异性抗体,证明小鼠在感染第 8 周时抗体出现,12 周达到高峰,第 16 周开始下降并一直维持同一水平。同时,又用尖吻蝮蛇舌形虫幼虫抗原检测浙江富阳 6 例确诊病人血清中特异性抗体,都呈阳性反应,同时,20 例正常人全部阴性。

[0013] 本发明用纯化抗原检测检测感染尖吻蝮蛇舌形虫的病人 6 例,全部为阳性。与旋毛虫病、广州管圆线虫病的交叉反应为 5%;与血吸虫病、肺吸虫病、弓形虫病交叉反应为 7%;两种抗原与曼氏裂头蚴、囊虫、华支睾吸虫、肝片吸虫都没有交叉反应。30 例健康人都为阴性,特异性达到 100%。适合医院检验科、疾病防控中心、社康中心、私人诊所临床病人的抗体检测及流行病学调查。

[0014] 本发明的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒是应用尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原检测患者血清中特异性抗体的酶联免疫吸附试验 (ELISA),具有特异性高、敏感性好的优点,能作为疫区流行病学调查,可实现尖吻蝮蛇舌形虫病的快速诊断、药物筛选和疗效考核。

附图说明：

[0015] 图 1 是采用本发明的一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒检测尖吻蝮蛇舌形虫病的原理图。

具体实施方式：

[0016] 试剂和材料：辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (购自 Sigma 公司、产品编号 DJK-0297G、英文名称 Goat Anti-human IgG/HRP)

[0017] 实施例 1 一种尖吻蝮蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒

[0018] 本发明一种检测尖吻蝮蛇舌形虫特异性抗体试剂盒,包括①尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原、②酶标记的抗体 (HRP-羊抗人 IgG)、③ 96 孔聚乙烯反应板、④ PBST 洗涤液、⑤阳性和阴性对照样本、⑥显色液 (四甲基联苯胺溶液和 H_2O_2 溶液)、⑧终止液 ($2mol/L H_2SO_4$)。

[0019] 辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG (HRP-羊抗人 IgG) 是采用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体的常用方法是过碘酸钠法。其原理是 HRP 的糖基用过碘酸钠氧化成醛基,加入抗体 IgG 后该醛基与 IgG 氨基结合,形成 Schiff 氏碱。为了防止 HRP 中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合,在用过碘酸钠氧化先用二硝基氟苯阻断氨基。氧化反应末了,用硼氢化钠稳定 Schiff 氏碱。

[0020] 进一步的,所述的 PBST 洗涤液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl、吐温 -20 和水组成,在配制 PBST 洗涤液的过程中,包括一个先配制基液的步骤,所述的基液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的氯化钠在所述的基液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,余量为水,配制好基液后,再加入吐温 -20,每 100ml 中加入 0.5ml 吐温 -20,所述的 PBST 洗涤液的 PH 值为 7.4。

[0021] 进一步的,所述的显色液由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液为四甲基联苯胺溶液,所述的 B 液为 H_2O_2 溶液,在配制显示液的过程中,首先配制四甲基联苯胺溶液,显色液四甲基

联苯胺溶液的配制过程为：四甲基联苯胺 50mg，无水乙醇 5ml，0.1mol/L 的柠檬酸，0.1mol/L 的 EDTA 0.5ml，加蒸馏水至 100ml；显色液为过氧化氢的配制过程为：51.4ml 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 与 48.6ml 0.1mol/L 的柠檬酸混合并用 HCl 调 pH 至 5.1 ~ 5.4，最后加入 67 μl 30% 的 H_2O_2 ，

[0022] 进一步的，所述的终止液为 H_2SO_4 ， H_2SO_4 的浓度在 1-3mol/L 之间，优选为 2mol/L，将纯硫酸与蒸馏水按体积比 1 : 17 的比例混合得到 2mol/L 硫酸溶液。

[0023] 具体的，尖吻蝮蛇舌形虫幼虫纯化抗原的制备步骤为：从感染尖吻蝮蛇舌形虫虫卵 4 个月的小鼠腹腔分离幼虫，制备幼虫可溶性抗原，测得蛋白含量为 7.58mg/ml。十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PEAG-SDS) 纯化抗原，用 10% 分离胶 (3mol/L PH8.9 Tris-Hcl 缓冲液)，5% 浓缩胶 (0.5mol/L PH 6.7 Tris-Hcl 缓冲液)，10% 过硫酸铵，10% TEMED，30% Acr/bis 凝胶储液，PH8.3 Tris-Gly 电极缓冲液，0.05% 考马斯亮兰 R250，切胶收取 28KD 分子量的特异性蛋白条带，将特异性蛋白条块置 PH 6.8 的 PBS 液中，4℃ 过夜，离心收取上清纯化抗原，测得蛋白含量为 3.02mg/ml。

[0024] 本发明的一种检测尖吻蝮蛇舌形虫特异性抗体试剂盒的具体操作方法如下（原理如图 1 所示）：

[0025] a) 将已经纯化的抗原用 PH 9.6 PBS 1 : 300 稀释包被 96 孔聚乙烯反应板，抗原含量为 10 $\mu\text{g/ml}$ ，每孔 100 μl ，4℃ 过夜；

[0026] b) 被检血清 1 : 100 稀释，每孔 100 μl ，37℃ 1 小时，PBST 洗涤液洗涤 3 次；

[0027] c) 加 1 : 4000 稀释的酶标记的抗体 (HRP- 羊抗人 IgG)，每孔 100 μl ，37℃ 1 小时，PBST 洗涤液洗涤 3 次；

[0028] d) 加底物显色液（四甲基联苯胺和 H_2O_2 ），15 分钟，用 2mol/L H_2SO_4 用终止反应。492 波长测 OD 值，大于阴性对照 OD 值的 2.1 倍的，即判为阳性，其它均为阴性。（原理如图 1 所示）

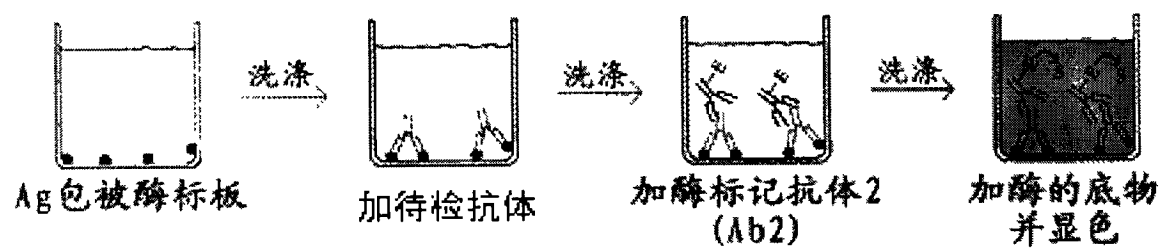


图 1

专利名称(译)	一种尖吻蝾蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒		
公开(公告)号	CN102288752A	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201010502395.7	申请日	2010-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
[标]发明人	陈韶红 陈家旭 张永年 周晓农 李浩 郭俭		
发明人	陈韶红 陈家旭 张永年 周晓农 李浩 郭俭		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种尖吻蝾蛇舌形虫纯化抗原检测特异性抗体的试剂盒，含有尖吻蝾蛇舌形虫幼虫纯化抗原、辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG、聚乙烯反应板、PBST洗涤液、阳性和阴性对照样本、显色液、终止液。本发明的试剂盒是应用尖吻蝾蛇舌形虫幼虫纯化抗原检测患者血清中特异性抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)，具有特异性高、敏感性好的优点，可实现尖吻蝾蛇舌形虫病的快速诊断、药物筛选和疗效考核。

