



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104316681 A

(43) 申请公布日 2015.01.28

(21) 申请号 201410628360.6

G01N 21/76 (2006.01)

(22) 申请日 2014.11.10

(71) 申请人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路
201-209号

申请人 厦门市波生生物技术有限公司

(72) 发明人 刘莉莉 杨天赐 童曼莉 张惠林
林丽蓉 张长弓

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/571 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

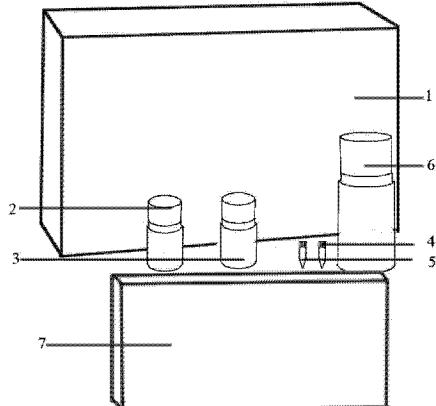
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒
及其制备方法

(57) 摘要

梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法，涉及梅毒螺旋体。试剂盒设有外包装盒、碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板。先制备梅毒螺旋体特异性重组抗原、重组抗原包被微孔板，标记重组抗原的碱性磷酸酶，再制备发光底物、洗涤液、对照品，最后组装梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒。可用于临床标本中梅毒特异性抗体的检测，采用特异固相，使得免疫及发光反应在较短的时间内快速完成，发光信号大大增强，灵敏度得以提高，检测时间由此可以缩短，精密性得以改善。



1. 梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒，其特征在于设有外包装盒、碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板；碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板设在外包装盒内；碱性磷酸酶标记重组抗原瓶内装有碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物瓶内装有发光底物、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶内装有梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶内装有梅毒螺旋体特异性阳性对照品、洗涤液瓶内装有洗涤液。

2. 如权利要求 1 所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

1) 制备梅毒螺旋体特异性重组抗原：

采用基因克隆技术，PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA，并插入大肠杆菌中使其表达，得梅毒螺旋体特异性抗原 TPN17 和 TPN47；

2) 制备重组抗原包被微孔板

将步骤 1) 中的梅毒螺旋重组抗原 TPN17 和 TPN47 用包被缓冲液稀释至 20 μg/mL，以每孔 0.1mL 加入微孔板中，4℃包被 24h；取出抗原板，风干；用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0% 脱脂奶粉，每孔 0.2mL，4℃封闭 24h，取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次，室温风干、消毒，制备重组抗原包被微孔板，密封备用；

3) 重组抗原的碱性磷酸酶标记

碱性磷酸酶经过碘酸钠活化，分别与步骤 1) 重组抗原分子的 -NH₂ 偶联，形成碱性磷酸酶标记重组抗原；

4) 发光底物制备

人工合成金刚烷胺类发光底物及其增强剂，均经无菌过滤，制备发光底物工作液；

5) 洗涤液制备

洗涤液为溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液，其中 Tween-20 的终浓度为 0.01%；

6) 对照品

梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品：由非梅毒感染的健康人群血清配制而成；

梅毒螺旋体特异性阳性对照品：梅毒患者的特异性抗体阳性血清配制而成；

7) 制备梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒

将碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物、洗涤液、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性抗体阳性对照品分别装入瓶内，再将碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板装入外包装盒，组成梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒。

3. 如权利要求 1 所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒的制备方法，其特征在于在步骤 7) 中，所述瓶采用聚乙烯瓶。

梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及梅毒螺旋体，尤其是涉及采用微孔反应板化学发光方法进行梅毒螺旋体特异性抗体检测的梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 梅毒是由梅毒螺旋体引起的性传播性疾病，近年来在国内的发病率逐年上升，梅毒的防控已列为我国公共卫生服务的主要任务之一。

[0003] 梅毒螺旋体不能体外培养，而直接病原学暗视野显微镜检查阳性率不高，血清学实验包括心磷脂抗体和特异性抗体检测，心磷脂抗体的假阳性率高，灵敏度低。而梅毒特异性抗体检测方法包括梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验 (TPPA)、荧光梅毒螺旋体抗体吸收试验 (FTA-ABS) 及免疫印迹法 (Western-blot) 等方法进行检测，其特异性均较高。化学发光免疫分析是利用抗原抗体反应的高度特异性、高亲和力，以及酶促化学发光反应高效率而建立起来的一种超敏感性微量定量测定技术，可以大大提高操作的便捷性，可称之为当今最敏感、特异的抗体免疫定量测试方法，有着良好应用前景，目前多数化学发光方法采用磁珠作为反应固相，其反应的重复性受磁珠颗粒的大小和均匀的程度影响较大。

[0004] 中国专利CN101881772A公开一种基于流式微球载体技术的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒及其制备和检测方法，具体包括用 TP 重组抗原包被高聚分子微球，用牛血清白蛋白封闭空白结合点，制成特异性 TP 探针 - 高聚分子微球；与待测标本共培养捕获 TP 抗体，洗涤离心除去未结合的 TP 抗体，再加入荧光标记的抗人 IgG 或 IgM 抗体；使用流式细胞仪检测微球的荧光强度，对受测抗体进行定性或定量分析。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供采用微孔反应板化学发光方法进行梅毒螺旋体特异性抗体检测的梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法。为梅毒特异性抗体检测提供高灵敏度、高精密度的检测的技术手段。

[0006] 所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒设有外包装盒、碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板；碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板设在外包装盒内；碱性磷酸酶标记重组抗原瓶内装有碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物瓶内装有发光底物、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶内装有梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶内装有梅毒螺旋体特异性阳性对照品、洗涤液瓶内装有洗涤液。

[0007] 所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0008] 1) 制备梅毒螺旋体特异性重组抗原：

[0009] 采用基因克隆技术，PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA，并插入大肠杆菌中使其

表达,得梅毒螺旋体特异性抗原 TPN17 和 TPN47 ;

[0010] 2) 制备重组抗原包被微孔板

[0011] 将步骤 1) 中的梅毒螺旋重组抗原 TPN17 和 TPN47 用包被缓冲液稀释至 20 μg/mL, 以每孔 0.1mL 加入微孔板中, 4℃包被 24h ; 取出抗原板, 风干 ; 用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0% 脱脂奶粉, 每孔 0.2mL, 4℃封闭 24h, 取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次, 室温风干、消毒, 制备重组抗原包被微孔板, 密封备用 ;

[0012] 3) 重组抗原的碱性磷酸酶标记

[0013] 碱性磷酸酶经过碘酸钠活化, 分别与步骤 1) 重组抗原分子的 -NH2 偶联, 形成碱性磷酸酶标记重组抗原 ;

[0014] 4) 发光底物制备

[0015] 人工合成金刚烷胺类发光底物 (AMPPD) 及其增强剂, 均经无菌过滤, 制备发光底物工作液 ;

[0016] 5) 洗涤液制备

[0017] 洗涤液为溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 其中 Tween-20 的终浓度为 0.01% ;

[0018] 6) 对照品

[0019] 梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品 : 由非梅毒感染的健康人群血清配制而成 ;

[0020] 梅毒螺旋体特异性阳性对照品 : 梅毒患者的特异性抗体阳性血清配制而成 ;

[0021] 7) 制备梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒

[0022] 将碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物、洗涤液、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性抗体阳性对照品分别装入瓶内, 再将碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板装入外包装盒, 组成梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒。

[0023] 在步骤 7) 中, 所述瓶可采用聚乙烯瓶。

[0024] 本发明提供了一种梅毒螺旋体梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒, 可用于临床标本中梅毒特异性抗体的检测, 采用特异固相, 使得免疫及发光反应在较短的时间内快速完成, 发光信号大大增强, 灵敏度得以提高, 检测时间由此可以缩短, 精密性得以改善。

[0025] 本发明采用采用微孔反应板化学发光法进行梅毒螺旋体特异性抗体的检测, 采用特异固相, 使得免疫及发光反应在较短的时间内快速完成, 发光信号大大增强, 灵敏度得以提高, 检测时间由此可以缩短, 精密性得以改善。

附图说明

[0026] 图 1 为本发明所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒实施例的结构组成示意图。

具体实施方式

[0027] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0028] 实施例 1

[0029] 参见图 1,所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒设有外包装盒 1、碱性磷酸酶标记重组抗原瓶 2、发光底物瓶 3、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶 4、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶 5、洗涤液瓶 6 和重组抗原包被微孔板 7 ;碱性磷酸酶标记重组抗原瓶 2、发光底物瓶 3、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶 4、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶 5、洗涤液瓶 6 和重组抗原包被微孔板 7 设在外包装盒 1 内 ;碱性磷酸酶标记重组抗原瓶 2 内装有碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物瓶 3 内装有发光底物、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶 4 内装有梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶 5 内装有梅毒螺旋体特异性阳性对照品、洗涤液瓶 6 内装有洗涤液。

[0030] 所述梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备,包括以下步骤 :

[0031] (1) 制备梅毒螺旋体特异性重组抗原 :

[0032] 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得梅毒螺旋体特异性抗原 TPN17 和 TPN47。

[0033] (2) 制备重组抗原包被微孔板

[0034] 将步骤 (1) 中的梅毒螺旋重组抗原 TPN17 和 TPN47 用包被缓冲液稀释至 20 μg/mL,以每孔 0.1mL 加入微孔板中,4℃包被 24h ;取出抗原板,风干;用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0% 脱脂奶粉,每孔 0.2mL,4℃封闭 24h,取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次,室温风干、消毒,制备重组抗原包被微孔板,密封备用。

[0035] (3) 重组抗原的碱性磷酸酶标记

[0036] 碱性磷酸酶经过碘酸钠活化,分别与步骤 (1) 重组抗原分子的 -NH₂ 偶联,形成碱性磷酸酶标记重组抗原。

[0037] (4) 发光底物制备

[0038] 人工合成金刚烷胺类发光底物 (AMPPD) 及其增强剂,均经无菌过滤,制备发光底物工作液。

[0039] (5) 洗涤液制备

[0040] 洗涤液为溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液,其中 Tween-20 的终浓度为 0.01%。

[0041] (6) 对照品

[0042] 梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品 :由非梅毒感染的健康人群血清配制而成;

[0043] 梅毒螺旋体特异性阳性对照品 :梅毒患者的特异性抗体阳性血清配制而成;

[0044] (7) 制备梅毒螺旋体抗体高通量检测试剂盒

[0045] 重组抗原包被微孔板、碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物、洗涤液、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性抗体阳性对照品和外包装盒共同组成的梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒。

[0046] 步骤 (7) 所述碱性磷酸酶标记重组抗原、发光底物、洗涤液、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品、梅毒螺旋体特异性抗体阳性对照品均装在相应的聚乙烯瓶中。

[0047] 实施例 2

[0048] 以下给出采用梅毒螺旋体抗体高通量检测试剂盒检测患者的临床标本中的梅毒螺旋体特异性抗体 :

[0049] 1、标本处理 :血清 :静脉血 5mL,置 37℃水浴 30min,3000g 离心 10min,上清为检测样品备用。

[0050] 2、加样：加 100 μ L 的标本于反应板中，同时作空白、阴性和阳性对照孔。37℃孵育 1h。

[0051] 3、洗涤：37℃反应 30min 后，被测定的梅毒特异性抗体与微孔板上包被的梅毒特异性重组抗原结合，洗涤分离未结合的游离成分；

[0052] 4、加入碱性磷酸酶标记重组抗原，再加入发光底物工作液，碱性磷酸酶催化底物脱磷酸基，并发出 463nm 的可见光。于第 10–20min 测定各加样品孔的相对发光强度单位 (relative light units, RLU)。样品的 RLU 与待测梅毒抗体浓度正相相关。

[0053] 实施例 3

[0054] 以下给出梅毒螺旋体抗体高通量检测试剂盒的性能检定。

[0055] (1) 阳性标本符合率

[0056] 用梅毒特异性抗体阳性参比血清 50 份检定，计算阳性符合率。

[0057] (2) 阴性标本符合率

[0058] 用梅毒特异性抗体阴性参比血清 50 份检定，计算阴性符合率。

[0059] (3) 批内差异

[0060] 同一批次试剂盒，用特征性血清检测，要求 $CV \leq 10\%$ 。

[0061] (4) 批间差异

[0062] 不同批次试剂盒，用特征性血清检测，要求 $CV \leq 12\%$ 。

[0063] (5) 干扰试验

[0064] 用溶血、脂血和黄疸标本各 50 例进行的干扰实验检测。

[0065] (6) 交叉反应

[0066] 采用本试剂盒，进行系统性红斑狼疮 ($n = 50$)、类风湿病 ($n = 50$)、免疫性肝炎 ($n = 50$) 等自身免疫系统疾病的检测，观察交叉反应。

[0067] (7) 稳定性检测

[0068] 应用 Arrhenius 法则，将试剂盒放置 37℃ 20 天后检测，以上各项指标无显著变化，确保成品在室温干燥条件下保存，有效期为 18 个月。

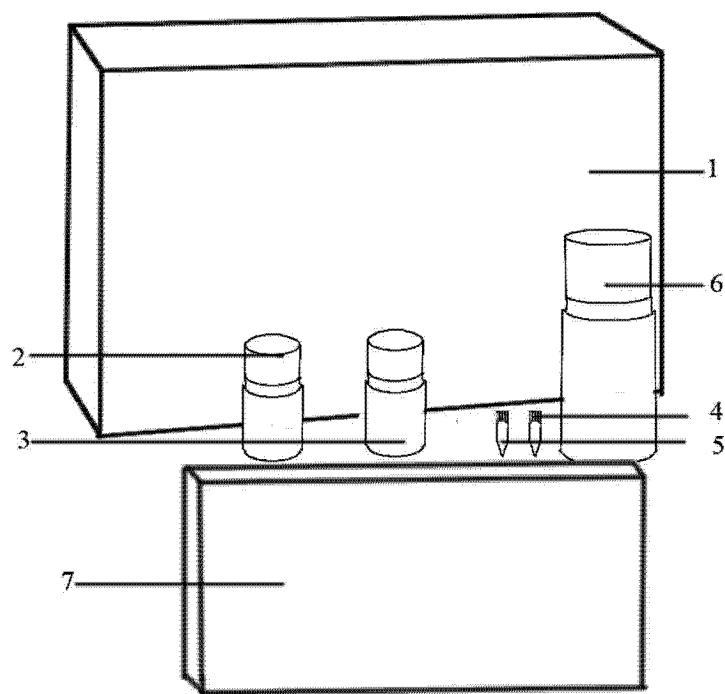


图 1

专利名称(译)	梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104316681A	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201410628360.6	申请日	2014-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院 厦门市波生生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院 厦门市波生生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院 厦门市波生生物技术有限公司		
[标]发明人	刘莉莉 杨天赐 童曼莉 张惠林 林丽蓉 张长弓		
发明人	刘莉莉 杨天赐 童曼莉 张惠林 林丽蓉 张长弓		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/571 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒及其制备方法，涉及梅毒螺旋体。试剂盒设有外包装盒、碱性磷酸酶标记重组抗原瓶、发光底物瓶、梅毒螺旋体特异性抗体阴性对照品瓶、梅毒螺旋体特异性阳性对照品瓶、洗涤液瓶和重组抗原包被微孔板。先制备梅毒螺旋体特异性重组抗原、重组抗原包被微孔板，标记重组抗原的碱性磷酸酶，再制备发光底物、洗涤液、对照品，最后组装梅毒螺旋体特异性抗体化学发光检测试剂盒。可用于临床标本中梅毒特异性抗体的检测，采用特异固相，使得免疫及发光反应在较短的时间内快速完成，发光信号大大增强，灵敏度得以提高，检测时间由此可以缩短，精密性得以改善。

