

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[21] 申请号 200610040221.7

[43] 公开日 2006年11月22日

[11] 公开号 CN 1866019A

[22] 申请日 2006.4.29

[21] 申请号 200610040221.7

[71] 申请人 吴学记

地址 361005 福建省厦门市厦门大学海滨 52
- 202

[72] 发明人 吴学记

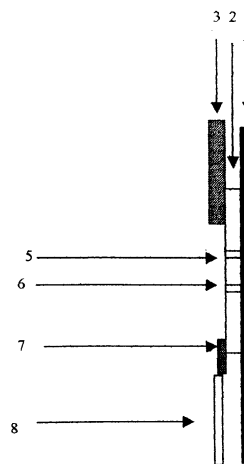
权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称

梅毒螺旋体抗原快速检测试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种梅毒螺旋体抗原快速检测试剂及其制备方法，该检测试剂包括快速检测试纸条，系采用纯化抗梅毒螺旋体单克隆抗体包被的硝酸纤维素膜和冻干的金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体制成，应用胶体金免疫层析技术，以双抗原夹心的方式特异性的检测人体液、分泌物、培养物中的梅毒螺旋体或其碎片。可用于早期诊断梅毒感染患者，以便得到及时治疗。本发明直接测定梅毒螺旋体，比现在广泛使用的间接测定梅毒螺旋体抗体的方法，更具临床意义。且检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低，应用广泛。并设计有试剂盒，携带和使用十分方便。



1、一种梅毒螺旋体抗原快速检测试剂，是由快速检测试纸条所组成，其特征在于，快速检测试纸条的结构包括载体板（1）、硝酸纤维素膜（2）、吸液（纸）条（3）、胶体金标记物（7）、对照线（5）、梅毒螺旋体抗原检测线（6）、加样垫（8），其中，载体板（1）上粘贴硝酸纤维素膜（2），该膜的上部粘贴一个吸液（纸）条（3），下部粘贴预包被了抗梅毒螺旋体抗体的胶体金标记物（7），硝酸纤维素膜（2）的中间段从上至下依次排列有对照线（5）、梅毒螺旋体抗原检测线（6），载体板（1）的最下端粘贴加样垫（8），加样垫（8）的前端粘贴在胶体金标记物（7）上。

2、根据权利要求1的梅毒螺旋体抗原快速检测试剂，其特征在于，包括如下试剂配方：0.5-1.5%金酸溶液、15-25%BSA溶液、1.5-2.5%柠檬酸三钠溶液、检测线溶液、对照线溶液、金标记物冻干基础液。

3、根据权利要求2的梅毒螺旋体抗原快速检测试剂，其特征在于，所述的试剂配方为：1%金酸溶液、20%BSA溶液、2%柠檬酸三钠溶液、检测线溶液、对照线溶液、金标记物冻干基础液。

4、一种梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的制备方法，其特征在于，包括如下工艺流程：

- （1）、用正辛酸法纯化包被用梅毒螺旋体单克隆抗体；
- （2）、制备胶体金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体；
- （3）、采用方阵滴定法选择最佳包被抗体的浓度，最佳金标记抗体的工作浓度；
- （4）、制备梅毒螺旋体抗原检测线、对照线；

- (5)、粘 贴 ；
- (6)、切 条 ；
- (7)、质 控 ；
- (8)、包 装 。

5、根据权利要求4的梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的制备方法，其特征在于，所述的用正辛酸法纯化包被用梅毒螺旋体单克隆抗体，是用PBS调单抗(SAS纯)浓度、加入10mM醋酸、按比例加入正辛酸混匀，经搅拌、放置、离心，上清液转移到透析袋中，对10mMKPBS PH7.4透析，将透析物加入饱和硫酸铵，继续经搅拌、离心、沉淀以少量10mMPBS复溶，对10mMPBS PH7.2透析，透析结束后测蛋白浓度。

6、根据权利要求4的梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的制备方法，其特征在于，所述的制备胶体金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体，包括胶体金颗粒的制备方法：取 HAuCl_4 溶液，加入到水中，加热至沸，再加入柠檬酸三钠，混合煮沸，冷却后加入碳酸钾溶液备用；取胶体金溶液，用 K_2CO_3 调pH值；用稀释纯化的梅毒螺旋体单克隆抗体，加入胶体金溶液中并经搅拌、静置，加入牛血清白蛋白、PEG20000，搅拌、静置、离心，吸去上清液，沉淀物溶于金标记物保护液，保存备用；胶体金标记后的抗体加入金标记物冻干基础液中，配制成适当浓度，加入适当保护剂喷涂于玻璃纤维表面，冻干后干燥条件下保存。

7、根据权利要求4的梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的制备方法，其特征在于，所述的采用方阵滴定法选择最佳包被抗体的浓度，最佳金标记抗体的工作浓度，是将玻璃纤维纸浸入金标梅毒螺旋体单克隆抗体包被液中，浸泡均匀后，冻干，组装试剂条，以阳性待测物加样比较不同包被浓度的灵敏度高低；金标梅毒螺旋体单克隆抗体稀释度达到1:20，阳性待测物质的检出时间。

8、根据权利要求4的梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的制备方法，其特征在于，所述的制备梅毒螺旋体抗原检测线、对照线，是在确定包被抗体的浓度后，配制适当浓度的纯化抗梅毒螺旋体单克隆抗体，在NC膜上制备检测线，室温干燥；配制适当浓度的羊抗鼠多克隆抗体，在NC膜上制备对照线，制备好的包被膜置室温干燥保存。

9、一种梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的试剂盒，其特征在于，是一种内装有快速检测试纸条的卡式试剂盒，在盒体（11）上具有加样孔（10）和观察窗口（9）。

梅毒螺旋体抗原快速检测试剂及其制备方法

技术领域

本发明属于微生物学和免疫学领域，涉及一种微生物检测组合物及其方法，特别是涉及一种梅毒螺旋体抗原快速检测试剂及其制备方法。

背景技术

引起梅毒病的病原体是梅毒螺旋体（*Treponemal Pallidum*），是 1905 年 Schandim 和 Hoffman 首先发现的。梅毒螺旋体长约 6~15 微米，宽 0.1~0.25 微米，呈螺旋形，在未受外界因素影响时，螺旋是规则的。这种病原体通过粘膜或有破损的皮肤进入人体后，在人体内可长期以横断分裂的方式，一分为二地进行繁殖。可经淋巴系统及血液循环播散到全身，几乎可以侵犯全身各脏器和组织。如果感染未在初期得到治疗，则大部分的患者会发展成梅毒的慢性阶段。到后期，细菌将损害心脏、眼睛、大脑、神经系统、骨骼、关节或身体的几乎任何部位。可引起严重的心脏异常、失明、精神紊乱、其它神经性问题等，甚至导致死亡。由于梅毒感染的后期具有如此严重的后果，因此对其早期进行诊断是十分必要的。然而，梅毒感染因其早期症状与很多其它疾病相似，所以，医生通常不会依据梅毒的征兆和症状识别，而是进行梅毒细菌的显微鉴定和血液检验。

梅毒螺旋体有吸附宿主蛋白的特性，此特性对于宿主—寄生物之间的相互作用是很重要的，特别是使螺旋体能持续存在于受感染的宿主中。在早期病人体内各处如血液、内脏以及病损处的分泌物，还有乳汁、唾液、尿和精液中均可找到它。但梅毒螺旋体因其透明不易染色，所以又称苍白螺旋体，采用一般

染色方法不易见到，要用暗视野显微镜或经嗜银染色或荧光抗体法才可见到。可是，所述暗视野显微镜检查等方法需要相当的经验 and 技巧并且容易产生错误判断。鉴于上述原因，大部分梅毒病例采用血清学诊断。然而，目前一般性的血液检验主要是检测梅毒抗体，不能区分既往感染和现症感染。即使检测到抗体的存在也不能说明病人是否携带梅毒病原体。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的检测试剂，直接特异性的快速准确检测人体液、分泌物、培养物中的梅毒螺旋体或其碎片，同时提供该试剂的具体制备方法和便于操作使用的试剂盒。

本发明的目的是通过以下技术方案实现的。

本发明是用胶体金免疫层析检测技术，直接特异性的检测人体液、分泌物、培养物中的梅毒螺旋体或其碎片。其中

梅毒螺旋体抗原快速检测试剂，是由快速检测试纸条所组成，快速检测试纸条的结构包括载体板、硝酸纤维素膜、吸液（纸）条、胶体金标记物、对照线、梅毒螺旋体抗原检测线、加样垫。其中，载体板上粘贴硝酸纤维素膜，该膜的上部粘贴一个吸液（纸）条，下部粘贴预包被了抗梅毒螺旋体抗体的胶体金标记物。硝酸纤维素膜的中间段从上至下依次排列有对照线、梅毒螺旋体抗原检测线。载体板的最下端粘贴加样垫，加样垫的前端粘贴在胶体金标记物上。其中梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的配方为：0.5-1.5%金酸溶液、15-25%BSA溶液、1.5-2.5%柠檬酸三钠溶液、检测线溶液、对照线溶液、金标记物冻干基础液。

其制备方法包括：

- 1、用正辛酸法纯化包被用梅毒螺旋体单克隆抗体；
- 2、制备胶体金标记抗

梅毒螺旋体单克隆抗体；3、采用方阵滴定法选择最佳包被抗体的浓度、最佳金标记抗体的工作浓度；4、制备梅毒螺旋体抗原检测线、对照线；5、粘贴；6、切条；7、质控；8、包装。

本发明所述的试剂盒，是内装快速检测试纸条的卡式试剂盒，在盒体上设置有加样孔和观察窗口。

本发明直接测定梅毒螺旋体，比起现在广泛使用的间接测定梅毒螺旋体抗体的方法，更具临床意义。而且检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低，应用广泛。

附图说明

图1 为快速检测试纸条结构示意图之一

图2 为快速检测试纸条结构示意图之二

图3 为卡式试剂盒结构示意图

其中：1 载体板（PVC 底板） 2 硝酸纤维素膜（NC 膜） 3 吸液（纸）条（吸收垫） 5 对照线（C 带） 6 梅毒抗原检测线（T 带） 7 胶体金标记物（胶体金垫） 8 加样垫（样品吸收垫） 9 观察窗口 10 加样孔 11 盒体

具体实施方式

以下结合附图和实施例对本发明作进一步详细阐述。

快速诊断试纸条技术是 20 世纪九十年代以来在单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术。近年来该技术发展迅速，在生物医学领域特别是医学检验中对疾病的早期诊断和早期发现中的广泛应用。本发明系采用纯化抗梅毒螺旋体单克隆抗体包被的硝酸纤维素膜和冻干的胶体金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体制成，应用胶体金免疫层析技术，以双抗原夹心的方式特异性的检测人体液、分泌物、培养物中的梅毒螺旋体或

其碎片。

参照图 1、图 2，本发明的试剂是由快速检测试纸条所组成，快速检测试纸条的结构包括载体板 1（又称 PVC 底板）、硝酸纤维素膜 2（又称 NC 膜）、吸液（纸）条 3（又称吸收垫）、胶体金标记物 7（又称胶体金垫）、对照线 5（又称 C 带）、梅毒螺旋体抗原检测线 6（又称 T 带）、加样垫 8（又称样品吸收垫）。其中，载体板 1 上粘贴硝酸纤维素膜 2，该膜的上部粘贴一个吸液（纸）条 3，下部粘贴预包被了抗梅毒螺旋体抗体的胶体金标记物 7。硝酸纤维素膜 2 的中间段从上至下依次排列有对照线 5、梅毒螺旋体抗原检测线 6。载体板 1 的最下端粘贴加样垫 8，加样垫 8 的前端粘贴在胶体金标记物 7 上。载体板 1 通常由高分子（如聚氯乙烯，PVC）材料制成。硝酸纤维素膜 2 的上端的吸液（纸）条 3，用于吸收反应液体。最下端的加样垫 8 一般由玻璃纤维构成，玻璃纤维的作用是用于承载待测样本。待测样本溶解预先包埋在玻璃纤维前端的胶体金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体，待测样本及溶解后的金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体，在毛细作用下，通过硝酸纤维素膜，到达吸液（纸）条，并在硝酸纤维素膜上完成反应。

其中梅毒螺旋体抗原快速检测试剂的配方为：1%金酸溶液（1、氯酸 1.0g 2、溶解于超纯水中，定容至 100 ml） 20%BSA 溶液（1、BSA 20g 2、叠氮钠 0.02g 3、溶解于 100ml 超纯水中） 2%柠檬酸三钠溶液（1、柠檬酸三钠 2g 2、溶解于 100ml 超纯水中 3、叠氮钠 0.02g） 检测线溶液（1、1mg/ml 抗梅毒螺旋体单克隆抗体 2、用 10mM 溶液 pH8.0 Tris-HCl 定容） 对照线溶液（1、羊抗鼠抗体 1mg/ml 2、用 10mM pH8.0 Tris-HCl 溶液定容） 金标记物冻干基础液（1、Trizma 1.21g 2、溶解于 100ml 超纯水中 3、PVP 0.25g 4、氯化钠 0.45g 5、叠氮钠 0.02g 6、蔗糖 2g 7、20%BSA 1ml）。

其制备方法包括:

1、辛酸法纯化包被用梅毒螺旋体单克隆抗体。

是用 PBS 调单抗 (SAS 纯) 浓度、加入 10mM 醋酸、按比例加入正辛酸混匀, 经搅拌、放置、离心, 上清液转移到透析袋中, 对 10mMKPBS PH7.4 透析, 将透析物加入饱和硫酸铵, 继续经搅拌、离心、沉淀, 以少量 10mMPBS 复溶, 对 10mMPBS PH7.2 透析, 透析结束后测蛋白浓度。具体方法是:

用 PBS 将单抗 (SAS 纯) 浓度调至 8~10mg/ml, 置搅拌器上搅拌迅速加入两倍体积的 10mM 醋酸。随即按每 ml 加入 0.025ml ml 正辛酸的比例加入正辛酸, 迅速混匀。中速搅拌, 置室温 20 分钟, 置 4℃30 分钟。10000 转, 0~4℃离心 15 分钟。离心结束, 上清迅速转移到透析袋中。立即对 10mMKPBS PH7.4 透析。1 小时后, 将透析袋取出, 用超纯水冲洗烧杯和透析袋三次。10mMKPBS PH7.4 透析过夜。10mMKPBS PH7.4 透析 2~4 小时。将透析物小心取出, 搅拌下逐滴加入饱和硫酸铵至 50%饱和度, 继续搅拌 30 分钟以上, 10000 转离心 15 分钟, 沉淀以少量 10mMPBS 复溶, 对 10mMPBS PH7.2 透析, 2~4 小时换液一次 (可过夜), 换液 5~6 次, 透析结束后测蛋白浓度。

2、制备胶体金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体。

制备胶体金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体, 包括胶体金颗粒的制备方法: 取 HAuCl_4 溶液, 加入到水中, 加热至沸, 再加入柠檬酸三钠, 混合煮沸, 冷却后加入碳酸钾溶液备用;

取胶体金溶液, 用 K_2CO_3 调 pH 值; 用超纯水稀释纯化的梅毒螺旋体单克隆抗体, 加入胶体金溶液中并经搅拌、静置, 加入牛血清白蛋白、PEG20000, 搅拌、静置、离心, 吸去上清液, 沉淀物溶于金标记物保护液, 保存备用;

胶体金标记后的抗体加入金标记物冻干基础液中, 配制成适当浓度, 加入

适当保护剂喷涂于玻璃纤维表面，冻干后干燥条件下保存。具体方法：

可根据 Frens 于 1973 介绍的胶体金颗粒的制备方法：取 4ml 1% HAuCl₄ 溶液，加入到 96ml 水中，加热至沸，再加入 0.5~4ml 2%柠檬酸三钠，混合煮沸 15 分钟，直到颜色变为橙红。冷却后加入 1ml 1M 碳酸钾溶液备用。

量取胶体金溶液 100ml，用 0.2 M K₂CO₃ 调至 pH 8.2；用 20ml 超纯水稀释纯化的梅毒螺旋体单克隆抗体 4mg（事先用 10mM pH 7.4 Tris-HCl 充分透析）。快速搅拌下加入胶体金溶液中并继续搅拌 30 分钟。静置 1 小时。加入 20%牛血清白蛋白 2.5 ml，20%PEG20000 1 ml。搅拌 30 分钟。静置 2 小时。以 9 000 r/min 离心 8 分钟。小心吸去上清液，沉淀物即为初步纯化的金-梅毒抗体结合物。沉淀物溶于 10ml 金标记物保护液，-20℃ 保存备用。

胶体金标记后的抗体加入金标记物冻干基础液中，配制成适当浓度，加入适当保护剂喷涂于玻璃纤维表面，冻干后干燥条件下保存。

3、采用方阵滴定法选择最佳包被抗体的浓度，最佳金标记抗体的工作浓度。固定浸泡时间，调整金标梅毒螺旋体单克隆抗体的浓度，将玻璃纤维纸浸入金标梅毒螺旋体单克隆抗体包被液中，浸泡均匀后，冻干，按正常生产工艺组装试剂条，以阳性待测物加样比较不同包被浓度的灵敏度高低。

金标梅毒螺旋体单克隆抗体稀释度达到 1:20，阳性待测物质的检出时间即已符合设计要求。

4、制备梅毒螺旋体抗原检测线、对照线。

用于包被和金标记的梅毒螺旋体单克隆抗体 ELISA 效价应不低于 1:10000 倍稀释。在确定包被抗体的浓度后，配制适当浓度的纯化抗梅毒螺旋体单克隆抗体，在 NC 膜上制备检测线，室温干燥；配制适当浓度的羊抗鼠多克隆抗体，在 NC 膜上制备对照线。制备好的包被膜置室温干燥保存。

5、粘 贴 — 将各组分包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸按序粘贴在底板上。

6、切 条 — 将底板切成一定宽度如 3 - 4mm 的试纸条。

7、质 控 — 用标准品和检测仪测试试纸条的质量。

8、包 装 — 将试纸条密封入铝箔袋或装入塑料外壳后再密封。

本发明是基于已知的胶体金免疫层析技术而设计的。其主要特征是，在所说的胶体金表面上，预包被抗梅毒螺旋体抗体。金包被物在适当条件下干燥并附着在玻璃纤维上。硝酸纤维素膜上对照线处包被可特异性结合包被在胶体金表面上的抗体或抗原的蛋白质（即所谓的捕获蛋白）。梅毒螺旋体抗原检测线处包被抗梅毒螺旋体单克隆抗体。

参照图 3，可将图 1、图 2 所示的快速检测试纸条置于一个箱体 11 内，箱体 11 可用塑料材料制成，即构成（正面）外观如图 3 所示的卡式试剂盒。由图 3 可以看出，箱体 11 上有加样孔 10 和观察窗口 9。由观察窗口 9 向内可以看到自上至下依次排列的如图 1 所示的对照线 5 和梅毒螺旋体抗原检测线 6。

这样的盒式结构可以更便于携带和使用，并且可以更大限度地防止污染。本试剂盒可用于正常人的健康普查、可疑病人的临床检验、疫区人群和献血人员的筛选等，而且简便快速 -- 一步法操作，不需任何附加设备，3 至 15 分钟即可出结果。准确可靠 -- 特异性强，灵敏度高。经济高效 -- 低成本高效益，保存方便，适用于医院、卫生防疫、诊所、家庭等。由于本试剂盒结构简单并且使用方便，所以可大大的节省检验所投入的人力和物力，从而有利于梅毒的防治。本方法直接测定梅毒螺旋体，比起现在广泛使用的间接测定梅毒螺旋体抗体的方法，更具临床意义。

检测机理：当使用本试剂盒检测梅毒螺旋体抗原阳性样本时，取待测样本，

人体液、分泌物、培养物约 60ul, 通过加样孔 10 滴加于加样垫 8, 样本浸湿到玻璃纤维前端包被有胶体金标记的抗梅毒螺旋体单抗, 并使之发生溶解, 样本中的梅毒螺旋体抗原与胶体金标记的抗梅毒螺旋体单抗特异性结合, 形成复合物。由于吸液纸条的虹吸作用, 复合物沿着硝酸纤维素膜 2 向前(远端)移动, 一直到达硝酸纤维素膜 2 上部的吸液(纸)条 3。当复合物沿硝酸纤维素膜 2 移动, 途经梅毒螺旋体抗原检测线 6 时, 即与检测线 6 上预包被的抗梅毒螺旋体单克隆抗体结合形成“胶体金-抗梅毒螺旋体单克隆抗体-梅毒螺旋体抗原-抗梅毒螺旋体单克隆抗体-固相支持物 NC 膜”夹心结合物。由于胶体金微粒本身带有颜色, 且聚集在检测线 6 处, 使梅毒抗原检测线 6 呈现清晰可辨的有色线条。未结合的胶体金-抗梅毒螺旋体单克隆抗体标记物与对照线 5 处包被的捕获蛋白结合而富集在对照线处, 使对照线 5 呈现清晰可辨的有色线条, 被试的阴性样品只在对照线 5 处显色。

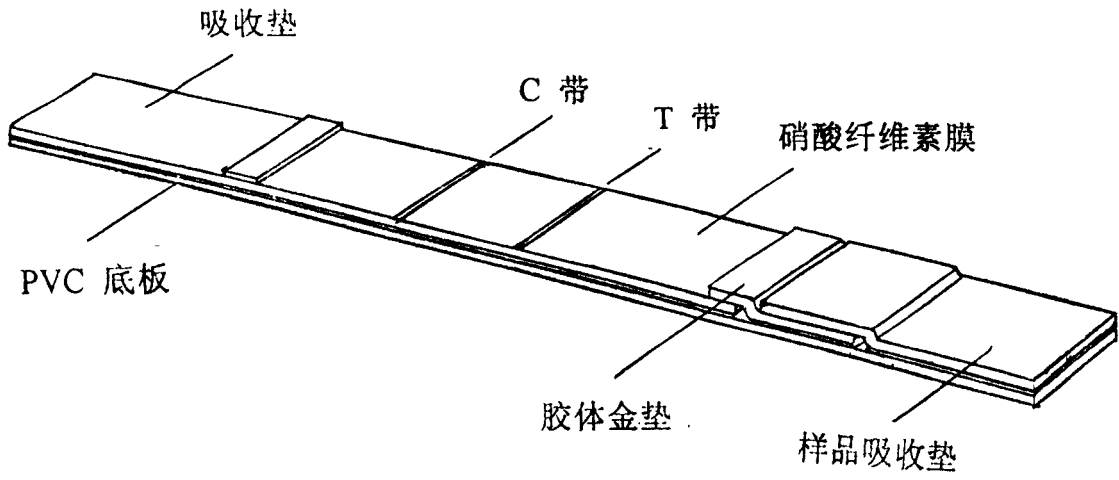


图 1

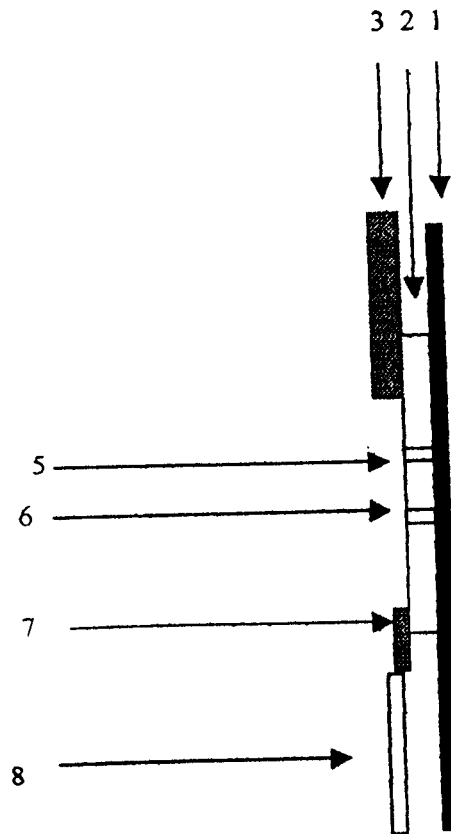


图 2

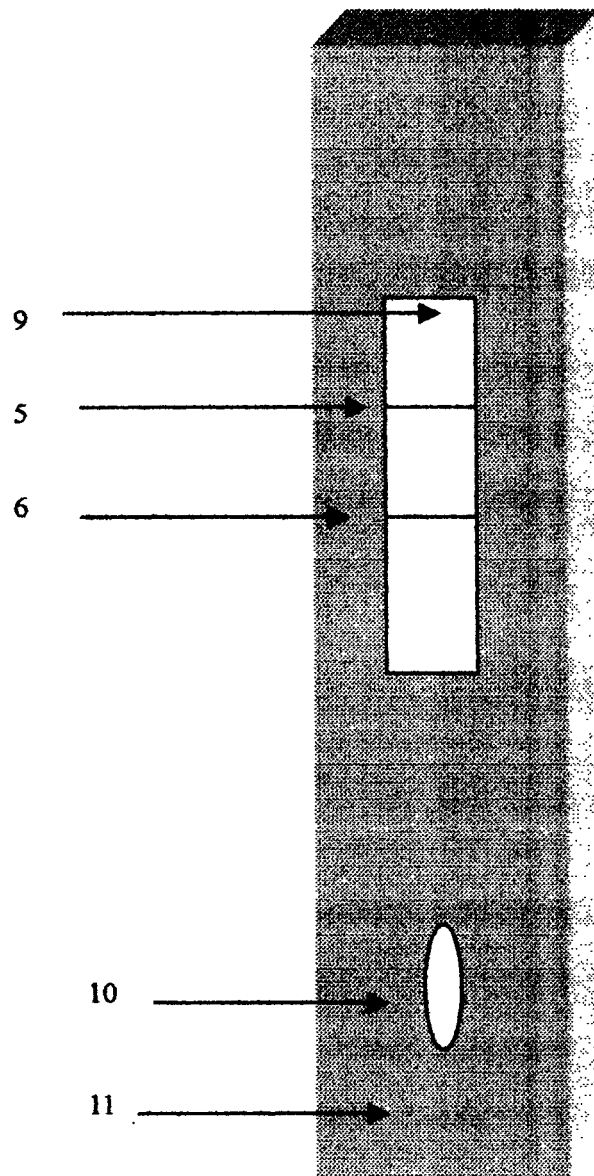


图 3

专利名称(译)	梅毒螺旋体抗原快速检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN1866019A	公开(公告)日	2006-11-22
申请号	CN200610040221.7	申请日	2006-04-29
[标]发明人	吴学记		
发明人	吴学记		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种梅毒螺旋体抗原快速检测试剂及其制备方法，该检测试剂包括快速检测试纸条，系采用纯化抗梅毒螺旋体单克隆抗体包被的硝酸纤维素膜和冻干的金标记抗梅毒螺旋体单克隆抗体制成，应用胶体金免疫层析技术，以双抗原夹心的方式特异性的检测人体液、分泌物、培养物中的梅毒螺旋体或其碎片。可用于早期诊断梅毒感染患者，以便得到及时治疗。本发明直接测定梅毒螺旋体，比现在广泛使用的间接测定梅毒螺旋体抗体的方法，更具临床意义。且检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低，应用广泛。并设计有试剂盒，携带和使用十分方便。

