



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104330566 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 04

(21) 申请号 201310478624. X

(22) 申请日 2013. 10. 14

(71) 申请人 赵磊

地址 450000 河南省郑州市金水区国基路
168 号院罗曼维森二区 7 号楼 6 号

(72) 发明人 赵磊 席宇

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

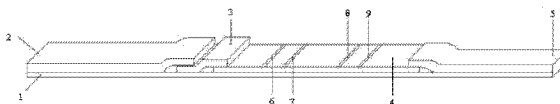
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其
制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫检测技术领域,特别涉及梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法。该梅毒试纸条包括底板 1,底板 1 依次设置有样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5;玻璃纤维素膜 3 上设置有胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原和胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法为:取心磷脂和磷脂结合蛋白混合,经第一温育,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体,取心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合,经第二温育、封闭,即得胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体。本发明提供的检测卡操作简单方便,灵敏度高,特异性强,假阳性率低,避免了既往感染对现症感染的干扰。



1. 一种梅毒试纸条,其特征在于,所述梅毒试纸条包括底板(1),所述底板(1)依次设置有样品垫(2)、玻璃纤维素膜(3)、硝酸纤维素膜(4)、吸水纸(5);

所述玻璃纤维素膜(3)上设置有胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原和胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;

所述胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法为:取心磷脂和磷脂结合蛋白混合,经第一温育,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体,取所述心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合,经第二温育、封闭,即得所述胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;

所述硝酸纤维素膜(4)上设置有第一检测区(6)、第二检测区(7)、第一质控区(8)和第二质控区(9);

所述第一检测区(6)设置有重组梅毒螺旋体抗原,所述第二检测区(7)设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体,所述第一质控区(8)设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体,所述第二质控区(9)设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体;

或者所述第一检测区(6)设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体,所述第二检测区(7)设置有重组梅毒螺旋体抗原,所述第一质控区(8)设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,所述第二质控区(9)设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的梅毒试纸条,其特征在于,所述第一温育为在 37°C 的条件下孵育 1~4h,再在 2~8°C 的条件下放置 8~12h。

3. 根据权利要求1所述的梅毒试纸条,其特征在于,所述胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法中,所述心磷脂与所述磷脂结合蛋白的质量比为(1~5):(1~5)。

4. 根据权利要求3所述的梅毒试纸条,其特征在于,所述心磷脂与所述磷脂结合蛋白的质量比为 1:1。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的梅毒试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 A:取心磷脂和磷脂结合蛋白混合,经第一温育,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体,取所述心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合,经第二温育、封闭,得到胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;

获得重组梅毒螺旋体抗原、鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体和胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原;

步骤 B:取所述胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和所述胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原包被于玻璃纤维素膜(3);

取所述重组梅毒螺旋体抗原包被于硝酸纤维素膜(4)的第一检测区(6),取所述鼠抗人 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜(4)的第二检测区(7),取所述鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜(4)的第一质控区(8),取所述兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜(4)的第二质控区(9);

或者取所述鼠抗人 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜(4)的第一检测区(6),取所述重组梅毒螺旋体抗原包被于硝酸纤维素膜(4)的第二检测区(7),取所述兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜(4)的第一质控区(8),取所述鼠抗梅毒螺旋体 IgG

单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜(4)的第二质控区(9)；

步骤C:取样品垫(2)、所述玻璃纤维素膜(3)、所述硝酸纤维素膜(4)、吸水纸(5)依序固定于底板(1)上,即得。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述第一温育为在37°C的条件下孵育1~4h,再在2~8°C的条件下放置8~12h。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,在所述胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法中,所述心磷脂与所述磷脂结合蛋白的质量比为(1~5):(1~5)。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述心磷脂与所述磷脂结合蛋白的质量比为1:1。

9. 一种梅毒检测卡,其特征在于,包括检测卡壳体和如权利要求1至4中任一项所述的梅毒试纸条；

所述检测卡壳体上设有加样区(10)和检测区(11)。

10. 如权利要求9所述的梅毒检测卡的制备方法,其特征在于,取检测卡壳体和如权利要求1至4中任一项所述的梅毒试纸条组装,即得。

梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域，特别涉及梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 梅毒是由梅毒螺旋体感染人体而发生的常见性传播疾病，已经问世数百年了，目前在世界范围均有分布，是十分重要的性传播疾病，根据传染来源分为获得性梅毒和先天性梅毒。其中，获得性梅毒是指成人通过性行为、输血、手术而被感染的梅毒，根据临床表现分为三期，主要症状包括侵犯皮肤粘膜和累及内脏器官，是一种较为严重的性传播疾病；先天性梅毒是由于患梅毒的孕妇未经及时治疗或治疗不当，梅毒螺旋体通过胎盘直接进入胎儿体内而引起的梅毒。

[0003] 目前，梅毒的实验室检测方法主要包括暗视野显微镜检查、直接荧光抗体检查、血清学检查和脑脊液检查，最常见的检测方法为血清学检查。血清学检查又分为特异性抗体检测方法和非特异性抗体检测方法，特异性抗体检测方法主要包括酶联免疫吸附法(ELISA)和胶体金法；非特异性抗体检测方法主要包括快速血浆反应素卡片试验(RPR)和甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)。

[0004] 特异性抗体检测方法的优点是特异性强、灵敏度高，但存在两方面的缺陷，一方面由于其检测是 IgG 抗体，而人体感染梅毒螺旋体后，需要 2 周以上的时间才会产生 IgG 抗体，因此感染初期无法检测到梅毒；另一方面梅毒特异性 IgG 抗体产生后会终身携带，即使梅毒治疗好后人体还是会携带梅毒特异性 IgG 抗体，因此单纯检测梅毒特异性 IgG 抗体无法区分梅毒是现症感染还是既往感染，既往感染对现症感染将会产生一定的干扰，还需要进一步做非特异性抗体检测。

[0005] 非特异性抗体检测方法的优点是灵敏度高，但特异性较差，假阳性率较高。在一般人群中此类试验的假阳性率为 1% ~ 2%，然而在吸毒者中假阳性率可高达 10%，另外在结核病、结缔组织病及孕妇等特殊人群中假阳性率均有不同程度的升高，因此还需做特异抗体检测确诊。

[0006] 基于特异性抗体检测方法和非特异性抗体检测方法均存在一定的缺陷，因此提供一种灵敏度高、特异性强、不受既往感染干扰的梅毒检测卡，具有重要的现实意义。

发明内容

[0007] 有鉴于此，本发明提供了梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法。该梅毒试纸条通过将胶体金标记心磷脂，从而实现了将梅毒特异性抗体检测和梅毒非特异性抗体检测相结合的目的，既具有灵敏度高、特异性强、假阳性率低的优点，避免了既往感染对现症感染的干扰，且操作简单方便。

[0008] 为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

[0009] 本发明提供了一种梅毒试纸条，梅毒试纸条包括底板 1，底板 1 依次设置有样品垫

2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5；

[0010] 玻璃纤维素膜 3 上设置有胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原和胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体；

[0011] 胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法为：取心磷脂和磷脂结合蛋白混合，经第一温育，得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体，取心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合，经第二温育、封闭，即得胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体；

[0012] 硝酸纤维素膜 4 上设置有第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8 和第二质控区 9；

[0013] 第一检测区 6 设置有重组梅毒螺旋体抗原，第二检测区 7 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体，第一质控区 8 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体，第二质控区 9 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体；

[0014] 或者第一检测区 6 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体，第二检测区 7 设置有重组梅毒螺旋体抗原，第一质控区 8 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体，第二质控区 9 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体。

[0015] 目前，梅毒特异性抗体的检测采用胶体金免疫层析法进行检测，该方法的检测原理为：将特异性的抗原或抗体以条带状固定在膜上，胶体金标记试剂(抗体或单克隆抗体)吸附在结合垫上，当待检样本加到试纸条样本垫上后，通过毛细作用向前移动，溶解结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应，当移动至固定的抗原或抗体的区域时，待检物与金标试剂的结合物又与之发生特异性结合而被截留，聚集在检测带上，可通过肉眼观察到显色结果，使用十分方便。利用此方法制作试纸条时，胶体金标记的抗体一般为蛋白质等生物大分子，而梅毒非特异性抗体——心磷脂为疏水性的小分子，到目前为止还未有如何用胶体金标记心磷脂的报道，因此利用胶体金标记技术检测梅毒非特异性抗体的方法还没有实现。本发明通过磷脂结合蛋白的键桥作用，实现了心磷脂和胶体金的结合，达到了以胶体金标记技术检测梅毒非特异性抗体的目的。

[0016] 本发明将梅毒特异性抗体和梅毒非特异性抗体的检测整合到一个检测卡上，从而实现了梅毒特异性抗体和梅毒非特异性抗体的同步检测，使得检测结果更加准确，降低了假阳性率。

[0017] 在本发明中设置有两个检测区，包括第一检测区和第二检测区。在本发明提供的一些实施例中，第一检测区为包被有重组梅毒螺旋体抗原(可检测特异性抗体)，第二检测区包被有鼠抗人 IgG 单克隆抗体(可检测非特异性抗体)；在本发明提供的另一些实施例中，第一检测区为包被有鼠抗人 IgG 单克隆抗体，第二检测区包被有重组梅毒螺旋体抗原。梅毒特异性抗体和梅毒非特异性抗体的检测原理如下：

[0018] 梅毒特异性抗体的检测原理为：如果血清样本中含有梅毒特异性抗体，血清样本加于样品垫上，沿层析方向进入玻璃纤维素膜，血清样本中的梅毒特异性抗体与玻璃纤维素膜上的胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原结合，形成梅毒特异性抗体-胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原复合体；然后梅毒特异性抗体-胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原复合体继续沿层析方向进入硝酸纤维素膜，与检测区位置的重组梅毒螺旋体抗原结合，形成重组梅毒螺旋体抗原-梅毒特异性抗体-胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原复合体，在检测区位置显示红色，即为梅毒特异性抗体阳性，在检测区位置未显色，即为梅毒特

异性抗体阴性。

[0019] 梅毒非特性抗体的检测原理为：如果血清样本中含有梅毒非特性抗体，血清样本加于样品垫上，沿层析方向进入玻璃纤维素膜，血清样本中的梅毒非特性抗体与玻璃纤维素膜上的胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体结合，形成梅毒非特性抗体-胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体；然后梅毒非特性抗体-胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体继续沿层析方向进入硝酸纤维素膜，与检测区位置的鼠抗人 IgG 单克隆抗体结合，形成鼠抗人 IgG 单克隆抗体-梅毒非特性抗体-胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体，在检测区位置显示红色，即为梅毒非特性抗体阳性，在检测区位置未显色，即为梅毒非特异性抗体阴性。

[0020] 使用本发明提供的检测卡检测血清样本时，结果判定方法为：检测梅毒特异性抗体的检测区和检测梅毒非特异性抗体的检测区均显示红色时，可判定为梅毒感染；检测梅毒特异性抗体的检测区显示红色，而检测梅毒非特异性抗体的检测区未显示红色时，可判定为梅毒既往感染；检测梅毒非特异性抗体的检测区显示红色，而检测梅毒特异性抗体的检测区未显示红色时，可判定为疑似梅毒感染，过一定时间（一周至一个月）后再复测；检测梅毒特异性抗体的检测区和检测梅毒非特异性抗体的检测区均未显示红色时，可判定为梅毒阴性。

[0021] 质控区是用来检测试纸条是否失效的区域，质控区显示红色则表明试纸条有效；质控区未显示红色，则表明试纸条已失效。在本发明中设置有两个质控区，包括第一质控区和第二质控区。在本发明提供的一些实施例中，第一质控区为包被有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体（即特异性抗体），第二质控区包被有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体（即非特异性抗体）；在本发明提供的另一些实施例中，第一质控区为包被有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体（即非特异性抗体），第二质控区包被有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体（即特异性抗体）。质控区检测原理如下：

[0022] 玻璃纤维素膜上的胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原随血清样本沿层析方法进入硝酸纤维素膜，与硝酸纤维素膜上固定有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体结合，在包被有特异性抗体的质控区位置显示红色或不显示红色；

[0023] 玻璃纤维素膜上的胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体随血清样本沿层析方法进入硝酸纤维素膜，与硝酸纤维素膜上固定有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体结合，在包被有非特异性抗体的质控区位置显示红色或不显示红色；

[0024] 当包被有特异性抗体的质控区位置和包被有非特异性抗体的质控区位置同时显示红色，则试纸条有效；

[0025] 当包被有特异性抗体的质控区位置显示红色，而包被有非特异性抗体的质控区位置未显示红色，则试纸条失效；

[0026] 当包被有非特异性抗体的质控区位置显示红色，而包被有特异性抗体的质控区位置未显示红色，则试纸条失效；

[0027] 在包被有特异性抗体的质控区位置和包被有非特异性抗体的质控区位置均未显示红色，则试纸条失效。

[0028] 在本发明提供的一些实施例中，第一检测区 6 设置有重组梅毒螺旋体抗原（用来检测梅毒特异性抗体），第二检测区 7 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体（用来检测梅毒非特异

性抗体),第一质控区 8 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体,第二质控区 9 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体时,梅毒检测结果如下:

[0029] (1)第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8、第二质控区 9 均显色,则判定为梅毒阳性,即感染梅毒;

[0030] (2)第一检测区 6、第一质控区 8、第二质控区 9 显色,第二检测区 7 未显色,则判定为梅毒既往感染;

[0031] (3)第二检测区 7、第一质控区 8、第二质控区 9 显色,第一检测区 6 未显色,则判定为疑似梅毒感染;

[0032] (4)第一检测区 6、第二检测区 7 未显色,第一质控区 8、第二质控区 9 显色,则判定为梅毒阴性,即未感染梅毒;

[0033] (5)第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8、第二质控区 9 均未显色,则试纸条失效。

[0034] 在本发明提供的另一些实施例中,第一检测区 6 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体(用来检测梅毒非特异性抗体),第二检测区 7 设置有重组梅毒螺旋体抗原(用来检测梅毒特异性抗体),第一质控区 8 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,第二质控区 9 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体时,梅毒检测结果如下:

[0035] (1)第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8、第二质控区 9 均显色,则判定为梅毒阳性,即感染梅毒;

[0036] (2)第一检测区 7、第一质控区 8、第二质控区 9 显色,第二检测区 7 未显色,则判定为梅毒既往感染;

[0037] (3)第二检测区 6、第一质控区 8、第二质控区 9 显色,第一检测区 6 未显色,则判定为疑似梅毒感染;

[0038] (4)第一检测区 6、第二检测区 7 未显色,第一质控区 8、第二质控区 9 显色,则判定为梅毒阴性,即未感染梅毒;

[0039] (5)第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8、第二质控区 9 均未显色,则试纸条失效。

[0040] 通过研究,心磷脂与磷脂结合蛋白的结合方式类似于抗原抗体的结合方式,即通过静电引力、范德华力、氢键或疏水作用力结合,为了保证心磷脂与磷脂结合蛋白充分的结合,结合反应需要在一定温度条件下温育。在本发明提供的一些实施例中,第一温育为在 37℃ 的条件下孵育 1 ~ 4h,再在 2 ~ 8℃ 的条件下放置 8 ~ 12h。

[0041] 在本发明提供的一些实施例中,胶体金标记的心磷脂 - 磷脂结合蛋白复合体的制备方法中,心磷脂与磷脂结合蛋白的质量比为 (1 ~ 5) : (1 ~ 5)。

[0042] 作为优选,心磷脂与磷脂结合蛋白的质量比为 1:1。

[0043] 在本发明提供的一些实施例中,制备胶体金标记的心磷脂 - 磷脂结合蛋白复合体时,先将心磷脂和磷脂结合蛋白分别制成心磷脂乙醇溶液和磷脂结合蛋白水溶液,再将心磷脂乙醇溶液和磷脂结合蛋白水溶液混合,进行第一温育。

[0044] 在本发明提供的一些实施例中,心磷脂乙醇溶液的制备方法为:将心磷脂溶解于无水乙醇中,即得。

[0045] 在本发明提供的一些实施例中,心磷脂乙醇溶液的质量体积浓度优选为 0.5 ~

5mg/mL。

[0046] 优选地,心磷脂乙醇溶液的质量体积浓度优选为 1mg/mL。

[0047] 在本发明提供的一些实施例中,磷脂结合蛋白水溶液的制备方法为:将磷脂结合蛋白溶解于水中,即得。

[0048] 在本发明提供的一些实施例中,磷脂结合蛋白水溶液的质量体积浓度优选为 0.5 ~ 5mg/mL。

[0049] 优选地,磷脂结合蛋白水溶液的质量体积浓度为 1mg/mL。

[0050] 为了保证胶体金颗粒充分与心磷脂-磷脂结合蛋白复合体结合,结合反应需要在一定温度条件下温育。在本发明提供的一些实施例中,在制备胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体过程中,第二温育为在 2 ~ 8°C 的条件下反应 2h。

[0051] 在本发明提供的一些实施例中,为了封闭多余的蛋白结合位点,本发明采用牛血清白蛋白溶液对胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体进行封闭。

[0052] 作为优选,牛血清白蛋白溶液的质量百分浓度为 1%。

[0053] 在本发明提供的一些实施例中,封闭的温度为 37°C。

[0054] 在本发明提供的一些实施例中,封闭的时间为 1h。

[0055] 在本发明提供的一些实施例中,兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体的制备方法为取磷脂结合蛋白免疫兔,即得。

[0056] 本发明还提供了本发明提供的梅毒试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0057] 步骤 A:取心磷脂和磷脂结合蛋白混合,经第一温育,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体,取心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合,经第二温育、封闭,得到胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;

[0058] 获得重组梅毒螺旋体抗原、鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体和胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原;

[0059] 步骤 B:取胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原包被于玻璃纤维素膜 3;

[0060] 取重组梅毒螺旋体抗原包被于硝酸纤维素膜 4 的第一检测区 6,取鼠抗人 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜 4 的第二检测区 7,取鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜 4 的第一质控区 8,取兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜 4 的第二质控区 9;

[0061] 或者取鼠抗人 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜 4 的第一检测区 6,取重组梅毒螺旋体抗原包被于硝酸纤维素膜 4 的第二检测区 7,取兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜 4 的第一质控区 8,取鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜 4 的第二质控区 9;

[0062] 步骤 C:取样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5 依序固定于底板 1 上,即得。

[0063] 在梅毒试纸条的制备方法中,作为优选,第一温育为在 37°C 的条件下孵育 1 ~ 4h,再在 2 ~ 8°C 的条件下放置 8 ~ 12h。

[0064] 在梅毒试纸条的制备方法中,在制备胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体时,心磷脂与磷脂结合蛋白的质量比为 (1 ~ 5) : (1 ~ 5)。

[0065] 作为优选,心磷脂与磷脂结合蛋白的质量比为 1:1。

[0066] 在制备胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体时,先将心磷脂和磷脂结合蛋白分别制成心磷脂乙醇溶液和磷脂结合蛋白水溶液,再将心磷脂乙醇溶液和磷脂结合蛋白水溶液混合,进行第一温育。

[0067] 在本发明提供的一些实施例中,心磷脂乙醇溶液的制备方法为:将心磷脂溶解于无水乙醇中,即得。

[0068] 在本发明提供的一些实施例中,心磷脂乙醇溶液的质量体积浓度优选为 0.5 ~ 5mg/mL。

[0069] 优选地,心磷脂乙醇溶液的质量体积浓度优选为 1mg/mL。

[0070] 在本发明提供的一些实施例中,磷脂结合蛋白水溶液的制备方法为:将磷脂结合蛋白溶解于水中,即得。

[0071] 在本发明提供的一些实施例中,磷脂结合蛋白水溶液的质量体积浓度优选为 0.5 ~ 5mg/mL。

[0072] 优选地,磷脂结合蛋白水溶液的质量体积浓度为 1mg/mL。

[0073] 在本发明提供的一些实施例中,在制备胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体过程中,第二温育为在 2 ~ 8°C 的条件下反应 2h。

[0074] 在本发明提供的一些实施例中,封闭采用的试剂为牛血清白蛋白溶液。

[0075] 作为优选,牛血清白蛋白溶液的质量百分浓度为 1%。

[0076] 在本发明提供的一些实施例中,封闭的温度为 37°C。

[0077] 在本发明提供的一些实施例中,封闭的时间为 1h。

[0078] 在梅毒试纸条的制备方法中,兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体的制备方法为取磷脂结合蛋白免疫兔,即得。

[0079] 本发明还提供了一种梅毒检测卡,包括检测卡壳体和本发明提供的梅毒试纸条;

[0080] 在该梅毒检测卡中,其中的梅毒试纸条包括底板 1,底板 1 依次设置有样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5;玻璃纤维素膜 3 上设置有胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原和胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法为:取心磷脂和磷脂结合蛋白混合,经第一温育,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体,取心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合,经第二温育、封闭,即得胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体;硝酸纤维素膜 4 上设置有第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8 和第二质控区 9;第一检测区 6 设置有重组梅毒螺旋体抗原,第二检测区 7 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体,第一质控区 8 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体,第二质控区 9 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体;或者第一检测区 6 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体,第二检测区 7 设置有重组梅毒螺旋体抗原,第一质控区 8 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,第二质控区 9 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体;心磷脂乙醇溶液的制备方法为:将心磷脂溶解于无水乙醇中,即得;心磷脂乙醇溶液的质量体积浓度优选为 0.5 ~ 5mg/mL;更优选地,心磷脂乙醇溶液的质量体积浓度优选为 1mg/mL;磷脂结合蛋白水溶液的制备方法为:将磷脂结合蛋白溶解于水中,即得;磷脂结合蛋白水溶液的质量体积浓度优选为 0.5 ~ 5mg/mL;更优选地,磷脂结合蛋白水溶液的质量体积浓度为 1mg/mL;第二温育为在 2 ~ 8°C 的条件下反应 2h;封闭采用的试剂为牛血清白

蛋白溶液；牛血清白蛋白溶液中牛血清白蛋白占牛血清白蛋白溶液的质量百分浓度为 1%；封闭的温度为 37℃；封闭的时间为 1h；兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体的制备方法为取磷脂结合蛋白免疫兔，即得。

[0081] 检测卡壳体上设有加样区 10 和检测区 11。

[0082] 本发明还提供了本发明提供的梅毒检测卡的制备方法，取检测卡壳体和本发明提供的梅毒试纸条组装，即得。

[0083] 本发明提供了梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法。该梅毒试纸条包括底板 1，底板 1 依次设置有样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5；玻璃纤维素膜 3 上设置有胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原和胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合物；胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合物的制备方法为：取心磷脂和磷脂结合蛋白混合，经第一温育，得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合物，取心磷脂-磷脂结合蛋白复合物和胶体金混合，经第二温育、封闭，即得胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合物；硝酸纤维素膜 4 上设置有第一检测区 6、第二检测区 7、第一质控区 8 和第二质控区 9；第一检测区 6 设置有重组梅毒螺旋体抗原，第二检测区 7 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体，第一质控区 8 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体，第二质控区 9 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体；或者第一检测区 6 设置有鼠抗人 IgG 单克隆抗体，第二检测区 7 设置有重组梅毒螺旋体抗原，第一质控区 8 设置有兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体，第二质控区 9 设置有鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体。通过对大量血清标本进行检测的试验结果可知，本发明提供的检测卡的灵敏度达 98.23%，特异性达 93.50%，假阳性率仅 6.50%，而采用 RPR 法进行检测的检测卡 A 的灵敏度为 93.11%，特异性为 89.25%，假阳性率为 10.75%，采用 TRUST 法进行检测的检测卡 B 的灵敏度为 94.29%，特异性为 90.78%，假阳性率为 9.22%。由此可见，本发明提供的检测卡灵敏度高，特异性强，假阳性率低，无既往感染的干扰，且操作简单方便。

附图说明

[0084] 图 1 示实施例 5 提供的试纸条的结构示意图；其中，1 示底板，2 示样品垫，3 示玻璃纤维素膜，4 示硝酸纤维素膜，5 示吸水纸，6 示第一检测区，7 示第二检测区，8 示第一质控区，9 示第二质控区；

[0085] 图 2 示实施例 8 提供的检测卡壳体的结构示意图；其中，10 示加样区，11 示检测区。

具体实施方式

[0086] 本发明公开了梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0087] 本发明提供的梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法中所用试剂和耗材均可由市场购得。其中，弗氏完全佐剂、弗式不完全佐剂、心磷脂和磷脂结合蛋白均购

自美国 SIGMA 公司,胶体金溶液、鼠抗人 IgG 抗体、胶体金标记的梅毒特异性抗原、梅毒重组抗原、鼠抗梅毒 IgG 抗体均购自广州万孚公司。

[0088] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0089] 实施例 1 胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备

[0090] 取 1g 心磷脂溶于 500mL 无水乙醇中,再定容至 1L,配制成 1mg/mL 的心磷脂乙醇溶液;取 1g 磷脂结合蛋白溶于 500mL 水中,再定容至 1L,配制成 1mg/mL 的磷脂结合蛋白水溶液。

[0091] 取 100mL 心磷脂乙醇溶液与 100mL 磷脂结合蛋白水溶液混合,37℃ 2h 后再 4℃ 放置 10h,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液;取 50mL 5mg/mL 的胶体金溶液,在磁力搅拌器上缓慢搅拌,再缓慢加入上述心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液,4℃ 下搅拌 2h,再加入 50mL 1% 牛血清白蛋白溶液,在 37℃ 下封闭 1h,12000rpm 离心 30min,用 50mL 50mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液复溶后置于 2~8℃ 的条件下待用。

[0092] 实施例 2 胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备

[0093] 取 0.5g 心磷脂溶于 500mL 无水乙醇中,再定容至 1L,配制成 0.5mg/mL 的心磷脂乙醇溶液;取 5g 磷脂结合蛋白溶于 500mL 水中,再定容至 1L,配制成 5mg/mL 的磷脂结合蛋白水溶液。

[0094] 取 200mL 心磷脂乙醇溶液与 100mL 磷脂结合蛋白水溶液混合,37℃ 1h 后再 2℃ 放置 12h,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液;取 50mL 5mg/mL 的胶体金溶液,在磁力搅拌器上缓慢搅拌,再缓慢加入上述心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液,2℃ 下搅拌 2h,再加入 70mL 1% 牛血清白蛋白溶液,在 37℃ 下封闭 1h,12000rpm 离心 30min,用 50mL 50mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液复溶后置于 2~8℃ 的条件下待用。

[0095] 实施例 3 胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备

[0096] 取 5g 心磷脂溶于 500mL 无水乙醇中,再定容至 1L,配制成 5mg/mL 的心磷脂乙醇溶液;取 0.5g 磷脂结合蛋白溶于 500mL 水中,再定容至 1L,配制成 0.5mg/mL 的磷脂结合蛋白水溶液。

[0097] 取 100mL 心磷脂乙醇溶液与 200mL 磷脂结合蛋白水溶液混合,37℃ 4h 后再 8℃ 放置 8h,得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液;取 50mL 5mg/mL 的胶体金溶液,在磁力搅拌器上缓慢搅拌,再缓慢加入上述心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液,8℃ 下搅拌 2h,再加入 70mL 1% 牛血清白蛋白溶液,在 37℃ 下封闭 1h,12000rpm 离心 30min,用 50mL 50mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液复溶后置于 2~8℃ 的条件下待用。

[0098] 实施例 4 兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体的制备

[0099] 将磷脂结合蛋白用生理盐水溶解,配制成 0.5mg/mL 的磷脂结合蛋白溶液,将 10mL 磷脂结合蛋白溶液与等剂量的弗氏完全佐剂混合,充分混匀后制得第一混合液。取健康成年新西兰大耳白家兔,用注射器将 5mL 上述第一混合液注射入两只后足垫,完成首次免疫。

[0100] 将磷脂结合蛋白用生理盐水溶解,配制成 0.5mg/mL 的磷脂结合蛋白溶液,将 10mL 磷脂结合蛋白溶液与等剂量的弗氏不完全佐剂混合,充分混匀后制得第二混合液。于首次免疫后 10-14 天,用注射器将上述第二混合液注射入兔背部皮下,完成第二次免疫。

[0101] 于第二次免疫后 10-14 天,采用第二次免疫的剂量和方法进行第三次免疫。

[0102] 于第三次免疫后 5-7 天,兔心脏采血,分离血清,采用硫酸铵沉淀法分离纯化兔抗

磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,透析后加等量甘油冻存待用。

[0103] 实施例 5 梅毒试纸条的制备

[0104] 将 100mg 胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原用 100mL50mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,配制成 1mg/mL 的胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原溶液。在玻璃纤维素膜上喷涂实施例 1 制得的胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液和上述胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原溶液,喷涂量为 8.5 μ L/cm,37 $^{\circ}$ C 下干燥 2h。

[0105] 取重组梅毒螺旋体抗原、鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、实施例 4 制得的兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,分别溶解于 50mM、pH8.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液(Tris-HCl 缓冲液),配制成 1mg/mL 重组梅毒螺旋体抗原溶液、1mg/mL 鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体溶液、1mg/mL 鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液、1mg/mL 兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体溶液。

[0106] 在硝酸纤维素膜上,将重组梅毒螺旋体抗原溶液点膜于第一检测区 6,将鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第二检测区 7、将鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第一质控区 8、将兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第二质控区 9,于 37 $^{\circ}$ C 条件下干燥 2h。

[0107] 将样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5 依序固定于底板 1 上,即得。试纸条结构如图 1 所示。

[0108] 实施例 6 梅毒试纸条的制备

[0109] 将 100mg 胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原用 100mL50mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,配制成 1mg/mL 的胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原溶液。在玻璃纤维素膜上喷涂实施例 2 制得的胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液和上述胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原溶液,喷涂量为 8.5 μ L/cm,37 $^{\circ}$ C 下干燥 2h。

[0110] 取重组梅毒螺旋体抗原、鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、实施例 4 制得的兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,分别溶解于 50mM、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,配制成 1mg/mL 重组梅毒螺旋体抗原溶液、1mg/mL 鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体溶液、1mg/mL 鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液、1mg/mL 兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体溶液。

[0111] 在硝酸纤维素膜上,将鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第一检测区 6,将重组梅毒螺旋体抗原溶液点膜于第二检测区 7,将兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第一质控区 8,将鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第二质控区 9,在 37 $^{\circ}$ C 条件下干燥 2h。

[0112] 将样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5 固定于底板 1 上,即得。

[0113] 实施例 7 梅毒试纸条的制备

[0114] 将 100mg 胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原用 100mL50mM、pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,配制成 1mg/mL 的胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原溶液。在玻璃纤维素膜上喷涂实施例 3 制得的胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体溶液和上述胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原溶液,喷涂量为 8.5 μ L/cm,37 $^{\circ}$ C 下干燥 2h。

[0115] 取重组梅毒螺旋体抗原、鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、实施例 4 制得的兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体,分别溶解于 50mM、pH8.0 的

Tris-HCl 缓冲液,配制成 1mg/mL 重组梅毒螺旋体抗原溶液、1mg/mL 鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体溶液、1mg/mL 鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液、1mg/mL 兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体溶液。

[0116] 在硝酸纤维素膜上,将重组梅毒螺旋体抗原溶液点膜于第一检测区 6,将鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第二检测区 7,将鼠抗梅毒螺旋体 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第一质控区 8,将兔抗磷脂结合蛋白 IgG 单克隆抗体溶液点膜于第二质控区 9,在 37°C 条件下干燥 2h。

[0117] 将样品垫 2、玻璃纤维素膜 3、硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5 固定于底板 1 上,即得。

[0118] 实施例 8 梅毒检测卡的制备

[0119] 取实施例 5 提供的梅毒试纸条,组装于检测卡壳体内,即得。检测卡壳体的结构如图 2 所示。

[0120] 实施例 9 梅毒检测卡的制备

[0121] 取实施例 6 提供的梅毒试纸条,组装于检测卡壳体内,即得。

[0122] 实施例 10 梅毒检测卡的制备

[0123] 取实施例 7 提供的梅毒试纸条,组装于检测卡壳体内,即得。

[0124] 实施例 11 临床试验

[0125] 在河南省疾病预防控制中心和河南省血液中心获得血清标本共 5812 份,其中,确诊感染梅毒患者血清标本 372 份,既往感染梅毒患者血清标本 191 份,健康正常人血清标本 5249 份。利用本发明实施例 8 制得的梅毒检测卡、市售的检测卡 A (RPR 法)和市售的检测卡 B (TRUST 法)分别进行灵敏度、特异性和假阳性率检测。

[0126] 采用实施例 8 提供的检测卡对血清标本进行检测时,将检测卡平放,将 100 μ L 血清标本滴入加样区,10min 后观察结果。第一检测区、第二检测区、第一质控区和第二质控区处均出现红色条带,则判定血清标本为确诊感染梅毒患者血清标本;第一检测区、第一质控区和第二质控区处出现红色条带,第二检测区处不显示颜色,则判定血清标本为既往感染梅毒患者血清标本;第一质控区和第二质控区处出现红色条带,第一检测区和第二检测区处不显示颜色,则判定血清标本为健康正常人血清标本;第一质控区和第二质控区处出现红色条带,第一检测区处不显示颜色,第二检测区处出现红色条带,则判定血清标本为梅毒可疑标本。市售的检测卡 A 和检测卡 B 的操作和结果检测参照说明书执行。检测结果如表 1 所示。

[0127] 表 1 灵敏度、特异性和假阳性率检测结果

[0128]

组别	项目	灵敏度 (%)	特异性 (%)	假阳性率 (%)
试验组	实施例 8 提供的梅毒检测卡	98.23	93.50	6.50
对照组	检测卡 A	93.11	89.25	10.75
	检测卡 B	94.29	90.78	9.22

[0129] 由上述试验结果可知,本发明实施例 8 提供的梅毒检测卡的梅毒非特异性抗体项目的灵敏度为 98.23%,特异性为 93.50%,假阳性率为 6.50%,灵敏度和特异性明显优于市售的

检测卡 A 和检测卡 B,且假阳性率低,无既往感染的干扰。由此可见,本发明实施例 8 提供的梅毒检测卡灵敏度高,特异性强,假阳性率低,无既往感染的干扰。

[0130] 取实施例 9、实施例 10 提供的梅毒检测卡进行临床试验,结果与此相似,表明实施例 9、实施例 10 提供的梅毒检测卡灵敏度高,特异性强,假阳性率低,无既往感染的干扰。

[0131] 由此可见,本发明提供的梅毒检测卡灵敏度高,特异性强,假阳性率低,无既往感染的干扰,操作简单方便。

[0132] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

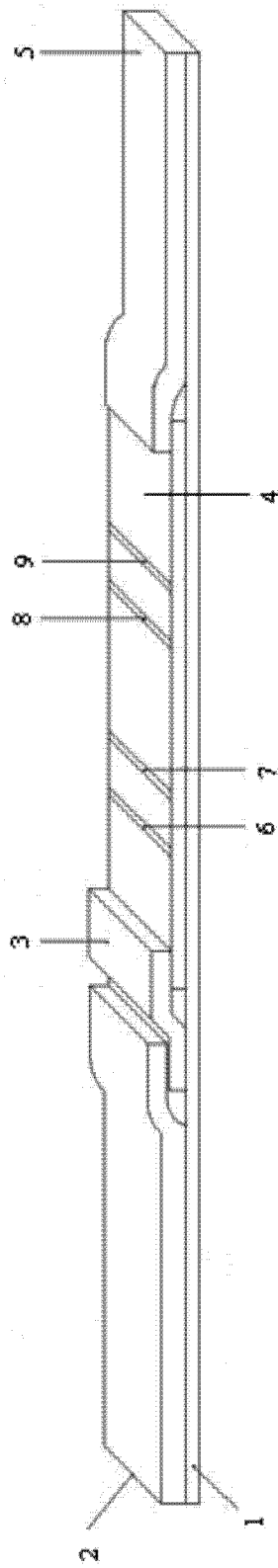


图 1

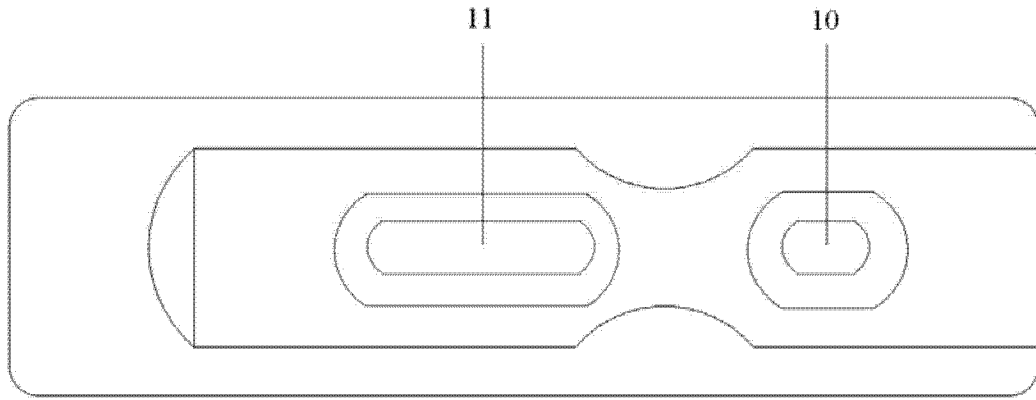


图 2

专利名称(译)	梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN104330566A	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	CN201310478624.X	申请日	2013-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	赵磊		
申请(专利权)人(译)	赵磊		
当前申请(专利权)人(译)	赵磊		
[标]发明人	赵磊 席宇		
发明人	赵磊 席宇		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/571		
其他公开文献	CN104330566B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测技术领域，特别涉及梅毒试纸条及其制备方法、梅毒检测卡及其制备方法。该梅毒试纸条包括底板1，底板1依次设置有样品垫2、玻璃纤维素膜3、硝酸纤维素膜4、吸水纸5；玻璃纤维素膜3上设置有胶体金标记的梅毒螺旋体特异性抗原和胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体；胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体的制备方法为：取心磷脂和磷脂结合蛋白混合，经第一温育，得到心磷脂-磷脂结合蛋白复合体，取心磷脂-磷脂结合蛋白复合体和胶体金混合，经第二温育、封闭，即得胶体金标记的心磷脂-磷脂结合蛋白复合体。本发明提供的检测卡操作简单方便，灵敏度高，特异性强，假阳性率低，避免了既往感染对现症感染的干扰。

