

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710036064.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月26日

[11] 公开号 CN 101149380A

[22] 申请日 2007.11.7

[21] 申请号 200710036064.7

[71] 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市河西岳麓山湖南
大学化学化工学院

[72] 发明人 沈国励 楚霞 吴朝阳 俞汝勤
蒋健晖 金雪芳

[74] 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所

代理人 田嘉嘉

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜及制备
方法和应用

[57] 摘要

本发明涉及一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜，所述硝酸纤维素膜上吸附了血吸虫抗原，少量的聚乙烯吡咯烷酮、明胶和 Tween20。本发明的优点在于所用方法通量高，非常适合疫区大规模样品的筛查，能够实现对血吸虫抗体的快速、定量检测。

1、一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜，其特征在于所述硝酸纤维素膜上吸附了血吸虫抗原，少量的聚乙烯吡咯烷酮、明胶和 Tween 20。

2、一种制备权利要求 1 所述用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜的方法，包括以下步骤：

a、预湿：将硝酸纤维素膜浸入预湿液中，所述预湿液为含甲醇的磷酸盐缓冲液，室温反应完毕后，再于室温下在真空干燥器中干燥；

b、加血吸虫抗原：将血吸虫抗原滴加到上述已预湿的硝酸纤维素膜上，室温反应完毕后，再于室温下在真空干燥器中干燥，再重复一次；

c、封闭：将吸附了血吸虫抗原的硝酸纤维素膜浸入封闭液中，所述封闭液为含聚乙烯吡咯烷酮、明胶和 Tween 20 的磷酸盐缓冲液，室温反应完成后，再于室温下在真空干燥器中干燥过夜；

d、保存：将制成的硝酸纤维素膜保存在 4℃ 的冰箱中备用。

3、根据权利要求 2 所述的制备用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜的方法，其特征在于所述磷酸盐缓冲液含有 10 mM NaH_2PO_4 、10 mM Na_2HPO_4 和 100 mM NaCl 。

4、一种利用权利要求 1 所述的用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜检测血吸虫抗体的方法，包括以下步骤：

a、免疫反应：将血吸虫抗体和纳米金标记的二抗以相同的体积比混合，将所述用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜浸入此混合溶液中；

b、清洗：充分反应后，将上述结合了血吸虫抗体和纳米金标记的二抗的硝酸纤维素膜先用 NaCl 清洗，再用二次水清洗；

c、银染：将清洗后的硝酸纤维素膜浸泡在新鲜配制的银染溶液中，所述银染溶液为含 AgNO_3 ，对苯二酚的柠檬酸盐缓冲液，放置暗处，反应后将硝酸纤维素膜用二次蒸馏水清洗干净；

d、检测：将硝酸纤维素膜置于血吸虫光学诊断仪上，用 CCD 摄像头摄像，将数据采集输送至电脑中，读取灰度值，即相应的血吸虫抗体浓度值，灰度值与血吸虫抗体在 10ng/mL~10 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内成线性关系。

一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜及制备方法和应用

技术领域

本发明属于生物分析领域。

背景技术

日本血吸虫病是由日本血吸虫寄生在人或脊椎动物门脉-肠系静脉系统所引起的一种人兽共患寄生虫病，主要分布在中国、菲律宾及印度尼西亚等西太平洋地区的一些国家。估计目前有 6.52 亿人口受威胁，1.93 亿感染者，有症状病例 1.2 亿。至 2003 年底，我国有血吸虫病病人 84.3 万人，晚期血吸虫病病人 2.4 万人，近几年报告病人数呈上升趋势。由于我国血吸虫病流行区人口众多，故血吸虫病仍然是我国重点防治的寄生虫病之一。

20世纪80年代中期，血吸虫病防治策略由消灭媒介螺蛳转向以化疗为主的综合性防治措施，因此，血吸虫病的诊断工作显得尤为重要。寻找简便、快速、价廉、便于在疫区推广应用、具有普查、临床实际诊断和疗效考核价值的检测方法，是当前迫切需要解决的问题。对血吸虫病的诊断，早期常采用病原学方法，但由于日本血吸虫在终宿主体内的寄生有着特殊的生物学关系，导致在慢性病患者和低度感染者的粪便中难以查见病原体，而且多数病原学方法操作繁琐，必须以更敏感和更简便的方法来替代或补充病原学方法的不足，因此血吸虫病血清学诊断方法得到迅速发展，先后建立了皮内试验（ID）、环卵沉淀试验（COPT）、间接红细胞凝集试验（IHA）、酶联免疫吸附试验（ELISA）、斑点金免疫渗滤试验（DIGFA）等方法。

在众多血清学诊断方法中，基于胶体金标记技术的免疫学诊断方法是近年来新兴的一种简便快速的检测方法，由于它具有高度的特异性和敏感性，结果直观可靠，而且试剂和样品用量少，无需专业的技术人员，简化了繁琐的操作过程，是目前发展最快的免疫技术之一。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的不足，提供一种简单、灵敏、快捷的用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜及制备方法和应用。

为解决上述技术问题，本发明采用以下技术方案：

一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜，包括硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上所吸附的血吸虫抗原和少量的聚乙烯吡咯烷酮、明胶和 Tween 20。

一种制备所述用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜的方法，包括以下步骤：

1、预湿：将硝酸纤维素膜浸入预湿液中，所述预湿液为含甲醇的磷酸盐缓冲液，室温反应完成后，再于室温下在真空干燥器中干燥；

2、加血吸虫抗原：用移液枪移取血吸虫抗原滴加到上述已预湿的硝酸纤维素膜上，室温反应完成后，再于室温下在真空干燥器中干燥，再重复一次；

3、封闭：将吸附了血吸虫抗原的硝酸纤维素膜浸入封闭液中，所述封闭液为含聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、明胶和 Tween 20 的磷酸盐缓冲液（pH 7.4），室温反应 1h，再于室温下在真空干燥器中干燥过夜；

4、保存：将制成的硝酸纤维素膜保存在 4℃ 的冰箱中备用。

所述磷酸盐缓冲液（PBS, pH 7.4）含有 10 mM NaH_2PO_4 ，10 mM Na_2HPO_4 和 100 mM NaCl 。

一种利用所述用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜检测血吸虫抗体的方法，包括以下步骤：

1、免疫反应：将血吸虫抗体和纳米金标记的二抗以相同的体积比混合，将上述用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜浸入此混合溶液中；

2、清洗：充分反应后，将上述结合了血吸虫抗体和纳米金标记的二抗的硝酸纤维素膜先用 0.5M 的 NaCl 清洗，再用二次水清洗；

3、银染：将清洗后的硝酸纤维素膜浸泡在新鲜配制的银染溶液中，所述银染溶液为含 AgNO_3 ，对苯二酚的柠檬酸盐缓冲液，所述柠檬酸盐缓冲液（pH 3.5）含有 0.243 M 柠檬酸（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ ），0.163 M 柠檬酸三钠（ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ），放置暗处于室温下温育，反应后将硝酸纤维素膜用二次蒸馏水清洗干净；

4、检测：将硝酸纤维素膜置于血吸虫光学诊断仪上，用 CCD 摄像头摄像，将数据采集输送至电脑中，读取灰度值，即相应的血吸虫抗体浓度值，灰度值与血吸虫抗体在 10ng/mL~10 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内成线性关系。

本技术利用纳米金标记第二抗体和银增强染色技术对血吸虫抗体进行快速免疫检测，人血清中的血吸虫抗体能被固定于硝酸纤维素膜上的血吸虫抗原迅速捕获，并同时夹心结合纳米金标记的第二抗体，洗去非特异性结合的蛋白质后，纳米金催化银离子还原成金属银而沉积于硝酸纤维素膜上，引起膜的灰度发生变化，采用光学测定技术对血

吸虫抗体浓度进行定量测定。

本发明的优点是：1.所发明的方法通量高，非常适合疫区大规模样品的筛查。由于硝酸纤维素膜的反应是在微孔板中进行，光学测定过程快速、简便，非常适于大量样品的平行分析。2.能够实现对血吸虫抗体的快速、定量检测。固定血吸虫抗原的硝酸纤维素膜可在检测前事先大批量的制备好，干燥保存于4℃冰箱中。检测时取出硝酸纤维素膜与检测者血清和纳米金标记二抗混合孵育，银增强后即可进行灰度测定，整个检测时间不超过1小时，可平行分析至少100个样品。结合血吸虫光学诊断仪测定膜的灰度值，可对血吸虫抗体含量进行准确的定量分析。3.检测所需的试剂与仪器便携且价格低廉。一台血吸虫光学诊断仪的价格仅为5000元左右。

具体实施方式

实施例1：用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜的制备

1、预湿：先将硝酸纤维素膜裁剪成 $\phi 5$ mm的试纸条，再将剪好的硝酸纤维试纸条浸入预湿液(含10% (v%))甲醇的磷酸盐缓冲液(PBS: 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl , pH 7.4))中，室温反应20min，再于室温下在真空干燥器中干燥45min。

2、加血吸虫抗原：用移液枪移取30 μL 血吸虫抗原滴加到已预湿的硝酸纤维素膜上，使其完全均匀地被覆盖，室温反应25min，再于室温下在真空干燥器中干燥45min，再重复一次。

3、封闭：将吸附了血吸虫抗原的硝酸纤维素膜浸入封闭液(含2% (wt%) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，0.01% (wt%) 明胶以及0.002% (wt%) Tween 20的磷酸盐缓冲液(pH 7.4))中，室温反应1h，再于室温下在真空干燥器中干燥过夜；最后，将制成的硝酸纤维素膜保存在4℃的冰箱中。

实施例2：血吸虫感染兔血清样品的检测

将实施例1所制备的硝酸纤维素膜浸入血吸虫感染的兔血清样品和纳米金标记的羊抗兔二抗(体积比：1:1)的混合溶液中，在37℃反应30 min；将结合了血吸虫抗体和纳米金标记的羊抗兔二抗的硝酸纤维素膜先用0.5M的 NaCl 清洗两次，再用二次蒸馏水清洗三次，然后将清洗后的硝酸纤维素膜浸泡在新鲜配制的银染溶液(所述银染溶液为含2.0mM AgNO_3 ，0.004g/mL对苯二酚的柠檬酸盐缓冲液，所述柠檬酸盐缓冲液(pH 3.5)含有0.243 M柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$)，0.163 M柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$))中，放置暗处于室温下温育30min，反应完后将硝酸纤维素膜用二次蒸馏水清洗干净；将反应后

的硝酸纤维素膜置于血吸虫光学诊断仪上，用CCD摄像头摄像，将数据采集输送至电脑中，读取灰度值，即相应的血吸虫抗体浓度值，牛血清白蛋白等杂蛋白引起的背景干扰较小。结果表明，该光学检测技术可以对血吸虫感染兔血清样品进行快速检测，灰度值与血吸虫抗体在10 ng/mL~10 μg/mL的范围内成线性关系。

实施例 3：血吸虫感染人血清样品的检测

利用该光学检测技术对 20 例疫区可疑病人的血清样品进行检测。将固定有血吸虫抗原的硝酸纤维素膜与可疑病人的血清样品和纳米金标记的羊抗人二抗的混合溶液一起于 37℃ 孵育 30 min，再将其浸泡在新鲜配制的银染溶液中（所述银染溶液为含 2.0mMAgNO₃，0.004g/mL 对苯二酚的柠檬酸盐缓冲液，所述柠檬酸盐缓冲液（pH 3.5）含有 0.243 M 柠檬酸（C₆H₈O₇·H₂O），0.163 M 柠檬酸三钠（Na₃C₆H₅O₇·2H₂O）），放置暗处于室温下温育 30min，反应完后将硝酸纤维素膜用二次蒸馏水清洗干净。最后，在血吸虫光学诊断仪上检测反应后的硝酸纤维素膜的灰度值。20 例可疑病人的血清样品中，5 例为阴性，说明是血吸虫未感染血清，15 例为阳性，说明是血吸虫感染血清。结果表明，该光学检测技术可以对血吸虫感染的人血清样品进行快速、准确的测定。

专利名称(译)	一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101149380A	公开(公告)日	2008-03-26
申请号	CN200710036064.7	申请日	2007-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	沈国励 楚霞 吴朝阳 俞汝勤 蒋健晖 金雪芳		
发明人	沈国励 楚霞 吴朝阳 俞汝勤 蒋健晖 金雪芳		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测血吸虫的硝酸纤维素膜，所述硝酸纤维素膜上吸附了血吸虫抗原，少量的聚乙烯吡咯烷酮、明胶和Tween20。本发明的优点在于所用方法通量高，非常适合疫区大规模样品的筛查，能够实现对手吸虫抗体的快速、定量检测。