



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101782577 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 201010030226.8

C07K 14/435(2006.01)

(22) 申请日 2010.01.21

(71) 申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市大学路 40 号郑州大学医学院人体寄生虫学教研室

(72) 发明人 崔晶 王中全 侯小君 姜鹏
王烨 王来 王睿 逯丽 秦银霞

(74) 专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

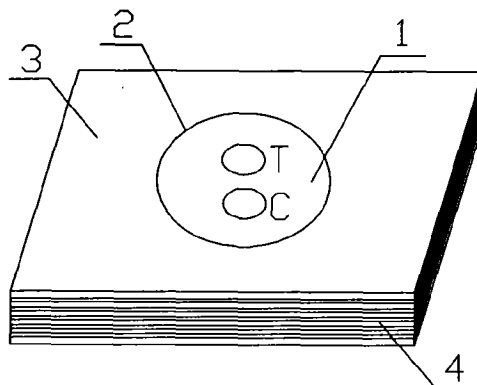
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒,它采用金标-SPA 为抗体标记标签,通过异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导 pMAL-c2X-Ts21/TB1 重组菌、表达并纯化了旋毛虫 Ts21 基因编码蛋白(Ts21 抗原基因,ORF17.20, GenBank 登陆号 U88239),在硝酸纤维素膜(NCM)上以纯化后 Ts21 重组蛋白包被检测点 T,以人 IgG 包被质控点 C,建立了 Ts21 重组蛋白-斑点免疫金渗滤法(Ts21-DIGFA),并组装成旋毛虫 Ts21 重组蛋白斑点免疫金渗滤法快速诊断试剂盒。本发明操作简单,有高度的敏感性和特异性,稳定性和重复性良好;加样后 1min 内即可观察判断检测结果,诊断结果准确明了,不会出现误判现象;适用于快速诊断及现场血清流行病学调查,易于大范围推广应用。



1. 一种旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒,其特征在于:它包括下述制备步骤:

第一步:制备 Ts21 重组蛋白

根据 GenBank 核酸数据库中 *Trichinella spiralis* Hypothetical ORF 17.20 的基因序列,利用生物信息学软件 Primer5.0 设计引物,通过 RT-PCR 获取旋毛虫 Ts-21 基因,构建表达载体 pAML-c2X-Ts21,转化大肠埃希菌 TB1,获得阳性克隆 pAML-c2X-Ts21/TB1;挑取 pAML-c2X-Ts21/TB1 单菌落至 5mL 含氨苄青霉素 100 μ g/mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} \cong 0.6$,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度 0.25mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 小时,离心收集菌体,超声破碎菌体,4 $^{\circ}$ C,4320g 离心 10 分钟后收集上清液;经 Amylose 树脂预装柱亲和层析纯化和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鉴定,得到纯化的 Ts21 重组蛋白;测定蛋白浓度、分装,-80 $^{\circ}$ C 保存备用;

第二步:制备胶体金标记物

采用枸橼酸三钠还原氯金酸法制备颗粒直径为 15nm 的胶体金溶液;调节胶体金溶液 pH 至 5.8~6.0 后过滤;将浓度为 1mg/ml 的待标记蛋白质溶液缓慢搅拌并分次加入胶体金溶液中,混合均匀,加 1% 聚乙二醇,使其终浓度为 0.05%,然后离心纯化,得 10% 浓缩的胶体金标记物,4 $^{\circ}$ C 保存备用;

第三步:制备试剂盒

将硝酸纤维素膜 (1) 浸入 1 \times PBST 溶液 30min~1h,取出室温晾干,在膜 (1) 上压出 2 个排列设置的圆圈,用移液器将人 IgG 包被在其中一个圆圈的圆心处,记为质控点 C;在另一个圆圈的圆心处包被第一步所得的 Ts21 重组蛋白,记为检测点 T;包被完毕室温晾干后,将硝酸纤维素膜 (1) 浸泡于含 1% 牛血清白蛋白的封闭液中,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,次日取出,经洗涤、室温干燥,再放入烘箱内完全干燥后密封于塑料袋中,4 $^{\circ}$ C 保存备用;取上盖开设有观测窗口 (2) 的箱体 (3),在箱体 (3) 底部垫入吸水滤纸 (4),最上层放置上述包被有抗原的硝酸纤维素膜 (1),盖上上盖后,膜 (1) 上的质控点 C 和监测点 T 从上盖的观测窗口 (2) 露出,然后将其密封后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术,尤其是涉及一种以旋毛虫 Ts21 重组抗原检测血清中抗旋毛虫抗体的斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒。

背景技术

[0002] 旋毛虫病是一种严重的人兽共患疾病,主要因生食或半生食含有旋毛虫幼虫囊包的猪肉或其它动物肉类而感染,本病不仅对人类的健康构成严重威胁,而且给养猪业和肉类进出口贸易造成巨大经济损失。

[0003] 目前旋毛虫病的临床确诊主要靠肌肉活检,但轻度和早期感染者往往不易检出,即使晚期患者因取材局限活检阳性率也只有 50%左右,且不易被患者接受;国内外学者对旋毛虫病的血清学诊断方法进行了大量研究,如间接荧光抗体试验(IFAT)、免疫酶染色试验(IEST)、酶联免疫印渍技术(ELIB)及酶联免疫吸附试验(ELISA)等,但这些方法操作较复杂,常需 2~3h 才能得出检测结果;此外,由于所用的诊断抗原多为旋毛虫肌幼虫虫体抗原,因抗原成份较复杂,与其它寄生虫病患者血清常有交叉反应出现假阳性,且均存在成本高、操作繁琐、需要特殊仪器与专业检测人员等问题,这些问题都使其推广应用受到限制。因此,寻找适合旋毛虫病的快速诊断方法是当前旋毛虫病防治工作中亟待解决的问题之一。

[0004] 胶体金是一种常用的标记技术,有其独特的优点,近年来已在各种生物学研究中广泛使用,在临床使用的免疫印迹技术几乎都使用其标记。胶体金标记,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程,金标过程中无共价键形成,是一定离子浓度下的物理吸附,因此几乎所有的大分子物质都可被金标记,标记后大分子物质活性不发生改变,使用时不受组织、细胞中内源性酶的影响,结果可以长期保存,实验结果表明,胶体金的敏感性可达到 ELISA 的检测水平。免疫金标记技术主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性,在金标蛋白结合处,显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点,因而可用于定性或半定量的快速免疫检测方法中。

[0005] 基于胶体金标记技术的斑点免疫金渗滤法(Dot-immuogold filtration assay, DIGFA)是近年来建立的用于检测各种病毒、细菌、寄生虫病及自身免疫病的新方法,其基本原理仍是间接法或夹心法(间接法测抗体:固定于膜上的特异性抗原+标本中的相应抗体+金标记的抗体或金黄色葡萄蛋白 A(SPA)显色;夹心法测抗原:固定于膜上的多克隆抗体+标本中待测抗原+金标记的特异性单克隆抗体显色),斑点免疫金渗滤法检测速度快,结果观察一目了然,具有制作方便、价格低廉、容易操作、无放射性污染等优点,但目前尚未将此方法用于检测旋毛虫病。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种可广泛应用于人和动物特异性快速诊断的旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

[0008] 本发明所述的旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒,它包括下述制备步骤:

[0009] 第一步:制备 Ts21 重组蛋白

[0010] 根据 GenBank 核酸数据库中 *Trichinella spiralis* Hypothetical ORF17.20 的基因序列,利用生物信息学软件 Primer5.0 设计引物,通过 RT-PCR 获取旋毛虫 Ts-21 基因,构建表达载体 pAML-c2X-Ts21,转化大肠埃希菌 TB1,获得阳性克隆 pAML-c2X-Ts21/TB1;挑取 pAML-c2X-Ts21/TB1 单菌落至 5mL 含氨苄青霉素 100 μ g/mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} \cong 0.6$,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度 0.25mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 小时,离心收集菌体,超声破碎菌体,4 $^{\circ}$ C,4320g 离心 10 分钟后收集上清液;经 Amylose 树脂预装柱亲和层析纯化和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鉴定,得到纯化的 Ts21 重组蛋白;测定蛋白浓度、分装,-80 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0011] 第二步:制备胶体金标记物

[0012] 采用枸橼酸三钠还原氯金酸法制备颗粒直径为 15nm 的胶体金溶液;调节胶体金溶液 pH 至 5.8~6.0 后过滤;将浓度为 1mg/ml 的待标记蛋白质溶液缓慢搅拌并分次加入胶体金溶液中,混合均匀,加 1% 聚乙二醇,使其终浓度为 0.05%,然后离心纯化,得 10% 浓缩的胶体金标记物,4 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0013] 第三步:制备试剂盒

[0014] 将硝酸纤维素膜浸入 1 \times PBST 溶液 30min~1h,取出室温晾干,在膜上压出 2 个排列设置的圆圈,用移液器将人 IgG 包被在其中一个圆圈的圆心处,记为质控点 C;在另一个圆圈的圆心处包被第一步所得的 Ts21 重组蛋白,记为检测点 T;包被完毕室温晾干后,将硝酸纤维素膜浸泡于含 1% 牛血清白蛋白的封闭液中,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,次日取出,经洗涤、室温干燥,再放入烘箱内完全干燥后密封于塑料袋中,4 $^{\circ}$ C 保存备用;取上盖开设有观测窗口的盒体,在盒体底部垫入吸水滤纸,最上层放置上述包被有抗原的硝酸纤维素膜,盖上上盖后,膜上的质控点 C 和监测点 T 从上盖的观测窗口露出,然后将其密封后 4 $^{\circ}$ C 保存即可。

[0015] 本发明的优点在于采用金标-SPA 为抗体标记标签,通过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导 pMAL-c2X-Ts21/TB1 重组菌、表达并纯化了旋毛虫 Ts21 基因编码蛋白(Ts21 抗原基因,ORF17.20,GenBank 登陆号 U88239),在硝酸纤维素膜(NCM)上以纯化后 Ts21 重组蛋白包被检测点 T,以人 IgG 包被质控点 C,建立了 Ts21 重组蛋白-斑点免疫金渗滤法(Ts21-DIGFA),并组装成旋毛虫 Ts21 重组蛋白斑点免疫金渗滤法快速诊断试剂盒,用于检测人及动物血清中抗旋毛虫抗体。

[0016] 本试剂盒的反应原理是用间接法测抗体:固定于 NCM 上的旋毛虫 Ts21 重组蛋白+待检血清中抗旋毛虫抗体+金标 SPA 显色。将待检血清加到 NCM 上后,待检血清带动其中抗旋毛虫抗体向 NCM 扩散,并最终渗入吸水垫料中,如待检血清中含抗旋毛虫抗体,在此扩散过程中待检血清中抗旋毛虫抗体与 NCM 上旋毛虫 Ts21 重组蛋白结合形成抗原抗体复合物,并与随后加入的金标-SPA 结合形成抗原-抗体-金标 SPA 复合物致使检测点 T 显红色,金标-SPA 与质控点 C 处的人 IgG 结合亦形成红色斑点,此时检测点 T、质控点 C 均显示红色斑点;如待检血清中不含抗旋毛虫抗体,则只有质控点 C 显示红色斑点(参见图 2)。

[0017] 本发明的有益效果主要体现在:

[0018] 1. 本试剂盒具有高度的敏感性和特异性,且稳定性和重复性良好。

[0019] 2. 本试剂盒以红色斑点显示检测结果,使诊断结果更加准确明了,且形象直观,结果保存时间长,易于判读,不会出现误判现象。

[0020] 3. 操作简单,无需其他任何特殊试剂、仪器,无需专门培训专业检测人员;加样后 1min 内即可观察判断检测结果,检测快速,大大缩短了诊断时间,可实现快速诊断及现场血清流行病学调查;成本低,适用于各级医疗卫生及兽医部门,易于大范围推广应用。

附图说明

[0021] 图 1 是本发明试剂盒的结构示意图。

[0022] 图 2 是本发明试剂盒的检测原理示意图。

[0023] 图 3-a、图 3-b、图 3-c 为本发明试剂盒的结果判读示意图。

具体实施方式

[0024] 本发明所述的旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒,它包括下述制备步骤:

[0025] 第一步:制备 Ts21 重组蛋白

[0026] 1. 1Ts21 原核表达质粒的构建:根据 GenBank 核酸数据库中 *Trichinella spiralis* Hypothetical ORF17.20 的基因序列,利用生物信息学软件 Primer5.0 设计引物,通过 RT-PCR 获取旋毛虫 Ts-21 基因,构建表达载体 pAML-c2X-Ts21,转化大肠埃希菌 TB1,获得阳性克隆 pAML-c2X-Ts21/TB1;

[0027] 1. 2Ts21 重组蛋白的诱导表达:(1)挑取 pAML-c2X-Ts21/TB1 单菌落至 5mL 含氨苄青霉素 100 μ g/mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;(2)按 1:50 比例扩大培养,至 OD₆₀₀ \cong 0.6,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度 0.25mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 小时,离心收集菌体;(3)加入 5ml 过柱缓冲液(20mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.5M EDTA 1ml, 20mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT),混匀洗涤,4 $^{\circ}$ C, 4320g 离心 10 分钟,弃上清。再加入 5ml 过柱缓冲液混匀,超声破碎:超声(400W)15s,间歇 10s,30 个循环,4 $^{\circ}$ C, 4320g 离心 10 分钟。取 40 μ L 上清加入 2 \times SDS 电泳上样缓冲液,5%浓缩胶及 10%的分离胶进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳结束后,考马斯亮蓝染色;

[0028] 1. 3Ts21 重组蛋白的纯化与 SDS-PAGE 分析用 Amylose 树脂预装柱(北京纽英伦生物技术有限公司)对所表达的 Ts21 重组蛋白进行亲和层析纯化,操作步骤按照 Amylose 树脂预装柱说明书进行,将超声破碎后收集的上清液加入到柱床内,控制流速 0.5~1ml/min;用 12 倍柱床体积的过柱缓冲液淋洗未结合的蛋白,每次用 6ml,共 4 次;用 4 倍柱床体积的洗脱缓冲液(过柱缓冲液+10mM 麦芽糖)洗脱与 Amylose 树脂结合的麦芽糖结合蛋白(Maltose Binding Protein, MBP)的融合蛋白,控制流速约 0.5~1ml/min;收集样品洗脱液(1ml/管),进行 SDS-PAGE 分析和紫外吸收光法测定重组的蛋白浓度。分装,-80 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0029] 第二步:制备胶体金标记物

[0030] (1)胶体金溶液的配制:氯金酸是一种高亲水性结晶,极易吸潮,将 1 克装氯金酸(AuCl₃·HCl·4H₂O)开瓶后,溶于 83ml 去离子水中,全部一次配成 1%水溶液,避光保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。采用枸橼酸三钠(Na₃C₆H₅·7H₂O)还原法制备胶体金:将 1%的氯金酸水溶液 1.0ml 加入 99ml 去离子水中,配成 0.01%的水溶液,加热至沸腾,搅拌下,一次快速加入 1.05%

的枸橼酸三钠溶液 4ml,可见溶液由浅黄色很快变兰色,继而变黑,继续加热并搅拌,又变紫色,7min 后溶液呈现稳定的酒红色,停止加热;冷却至室温后,补充去离子水至 100ml;用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;分光光度计测 OD_{530} ,一般在 1.0 左右;制得的胶体金溶液,颗粒直径约 15nm;

[0031] (2) 胶体金 pH 值的调整:在 pH 值接近蛋白质的等电点 (PI) 或略偏碱的条件时,蛋白质对胶体金呈最大吸附。在制备金-SPA 时,用 0.2mol/L K_2CO_3 调 pH 为 5.8 ~ 6.0 (100ml 胶体金溶液大约需 K_2CO_3 0.3ml),以使二者牢固结合;

[0032] (3) 待标记蛋白质的准备:本发明采用的金黄色葡萄蛋白 A (SPA) 为干粉状纯品,可直接用来标记:用去离子水溶解为 2mg/ml 的贮存液,分装 100 μl /支,保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$;标记时取贮存液 200 μl ,加入去离子水 200 μl ,稀释其浓度至 1mg/ml;


[0033] (4) 胶体金-SPA 的制备:将 100ml 制备好的胶体金溶液 pH 值调到 6.0,缓慢分次加入 SPA (浓度为 1mg/ml) 600 μg ,将二者在电磁力搅拌器上混合均匀,室温静置 10min,加 1% 聚乙二醇 5ml,使其终浓度为 0.05%,然后离心纯化:4 $^{\circ}\text{C}$,1500g,离心 15min,将上清吸入另外的离心管中,弃沉淀;4 $^{\circ}\text{C}$,12000g,离心 30min,小心吸弃上清液(切忌倾倒),将沉淀溶于 10ml 含 0.05% PEG 的 TBS (0.02mol/L, pH 6.0) 中,即为 10% 浓缩的胶体金标记物,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;

[0034] 第三步:制备试剂盒

[0035] (1) 硝酸纤维素膜的预处理:将硝酸纤维素膜 1 切成 27cm \times 2cm 的长条,泡入 1 \times PBST 溶液 30min ~ 1h,取出室温晾干,在膜上压出 2 个上下排列、位置相距 0.5cm 的直径 0.5cm 的圆圈,每个圆圈即为一个抗原包被单位;

[0036] (2) 抗原的包被:用微量移液器(每个膜片加样 1 μl) 将人 IgG (2mg/ml) 包被在下面圆圈的圆心处,记为质控点 C;在上面圆圈的圆心处包被第一步中制备的旋毛虫 Ts21 重组蛋白 (1.5mg/ml),记为检测点 T;包被完毕,室温晾干;

[0037] (3) 将完全干燥的硝酸纤维素膜 1 浸泡于含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的封闭液中 (pH 7.4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,次日取出洗涤液洗涤 3min \times 3 次,将洗涤后的硝酸纤维素膜 1 悬挂于室温中干燥 1h 以上,再放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内干燥 30min,完全干燥后密封于塑料袋中,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用;

[0038] (4) 试剂盒的组装:将包被过的硝酸纤维素膜 1 裁剪成为边长 1cm 的正方形膜,恰好使质控点 C 和检测点 T 位于正方形膜的中部。采用白色塑料盒体 3 作为支撑物,盒上盖中央开设有一圆形孔 2,在支撑塑料盒 3 底部垫入 7 层吸水滤纸 4,滤纸 4 最上层放上包被抗原的正方形硝酸纤维素膜 1,将其固定于中央,使得包被的诊断印迹“”完全暴露于圆形孔 2 中,此圆形孔 2 即为该试剂盒的加样孔和结果观察区,组装完成后注明生产日期和批次,密封后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0039] 本发明所述试剂盒的检测步骤及结果判读

[0040] 首先制备待测样品溶液:对待检人或动物静脉采血 2ml,分离血清,以 1 : 4 ~ 1 : 8 的血清稀释度作为待检样品效果最佳。

[0041] (1) 用微量移液器吸取 20 μl 待测血清样本加入本发明试剂盒中央的加样孔,待膜渗干;

[0042] (2) 加入 60 μl PBS 洗涤液 (0.01mol/L, pH7.4) 洗去未结合血清;

[0043] (3) 匀速吸取 20 μ l 胶体金-SPA,再次加入圆孔,待膜渗干,30s 左右;

[0044] (4) 加入 20 μ l PBS 洗涤液,1min 内观察结果;

[0045] (5) 1min 后,根据检测点 T 和质控点 C 的显色情况即可判读检测结果:如待检血清为阳性,此时检测点 T、质控点 C 均显示红色斑点,如图 3-a 所示;如待检血清为阴性,则只有质控点 C 显示红色斑点,如图 3-b 所示;如果硝酸纤维素膜上没有红色斑点出现,即质控点 C 和检测点 T 均未显示红色斑点,则说明该试剂盒失效,如图 3-c 所述示,须停止使用并报废。

[0046] 本发明试剂盒用于诊断人旋毛虫病:该试剂盒和 ELISA 法分别检测旋毛虫病及其他寄生虫病患者血清共 88 份,以 Ts21-ELISA 作为血清学检测方法金标准,其中试剂盒与 ELISA 一致率为 95.45%,吻合系数为 $\kappa = 0.889$,说明两种方法在诊断旋毛虫病方面一致率和吻合度较强。试剂盒检测临床确诊旋毛虫病人的抗体阳性率为 94.74% (18/19),ELISA 检测上述旋毛虫病人的抗体阳性率亦为 94.74% (18/19),试剂盒和 ELISA 的敏感性和特异性的差异相比无统计学意义 ($\chi^2 = 0.00, P > 0.05$),说明试剂盒的敏感性和特异性和 ELISA 相当,但是本发明试剂盒与 ELISA 相比具有操作简单、快速和结果更易判读等等优点,具有推广价值。

[0047] 本发明试剂盒用于诊断动物(小鼠、猪)旋毛虫病:本发明试剂盒与 ELISA 分别检测 71 份旋毛虫感染小鼠血清 (95.77%, 100%)、18 份猪血清 (94.44%, 100%)、45 份正常鼠 (2.22%, 0%) 和 45 份正常猪血清 (5%, 0%);以 ELISA 作为血清学检测方法金标准;其中本发明试剂盒与 ELISA 一致率为 98.05%,吻合系数为 $\kappa = 0.960$,说明两种方法在检测动物旋毛虫病方面一致率和吻合度较强;试剂盒和 ELISA 在敏感性和特异性上的差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 2.315, P > 0.05$),说明本发明的敏感性和特异性与动物旋毛虫病诊断方法 ELISA 相当,同时又具备操作简单、快速和结果易判读等 ELISA 不具备的优点,具有广泛推广空间,极具市场前景。

[0048] 本发明对感染旋毛虫后不同时间小鼠血清的检测:本发明和 ELISA 法检测感染 300 条旋毛虫小鼠第 2、3、5、6 周血清结果完全相同,阳性率均分别为 40%、90%、100%、100%,第 4 周检测结果阳性率是 90%;再次证明本发明的敏感性和特异性与现行检测方法 ELISA 相当。

[0049] 本发明检测旋毛虫轻度与早期感染小鼠血清:将本发明的检测结果与镜检法、消化法的结果进行比较。对于 5 条旋毛虫感染组和 10 条旋毛虫感染组,镜检法和消化法检出率分别为 80% (8/10)、90% (9/10) 和 100% (10/10)、100% (10/10);本发明检测感染 5 条与 10 条旋毛虫两组小鼠的血清抗体阳性率均为 100%;其中 5 条旋毛虫感染组 5 号小鼠每克肌肉幼虫数 (1pg) = 0.201,10 条旋毛虫感染组 5 号小鼠 1pg = 0.6,试剂盒检测结果均显示阳性,同时低剂量感染后 6 周血清抗体检出率均为 100%,说明本发明对旋毛虫轻度感染动物也有较大的诊断价值;此外,本发明检测小鼠感染 300 条旋毛虫实验组时,检测旋毛虫感染 2、3 周血清敏感性分别为 40%和 90%,第 4 周阳性率达 100%,结果表明本发明对旋毛虫病早期诊断也有一定价值;以上结果均提示本发明对轻度、早期感染的旋毛虫病亦有较大的诊断价值。

[0050] 试剂盒检测结果重复性实验:分别用 4 个不同批次的试剂盒检测经 ELISA 筛选后的 20 份旋毛虫感染小鼠阳性血清及 12 份正常小鼠阴性血清;4 个不同批次的试剂盒对 20

份阳性血清检测结果均为阴性,对 12 份阴性血清检测结果均为阴性,显示出本发明良好的灵敏性和特异性,且稳定性和重复性良好。

[0051] 试剂盒有效期的测定:将试剂盒置于 4℃ 保存,每隔 30d 分别检测小鼠阳性和阴性血清各 10 份,共检测 6 次,敏感性和特异性均为 100%,表明抗原包被后的 NCM 和金标 SPA 在 4℃ 至少可保存 6 个月,即本发明的有效期至少为 6 个月,证明本发明具有长期稳定的特点,实用性较强、容易保存、具有市场开发价值。

[0052] 试剂盒检测结果保存时间观察:检测后 NCM 分别保存于室温和 4℃,室温条件下检测结果 4 个月时可分辨清楚,4℃ 条件下检测结果 6 个月时依然清晰可见,说明本发明的检测结果保存时间为室温至少 4 个月和 4℃ 至少 6 个月,再次显示出本发明长期稳定的特点。

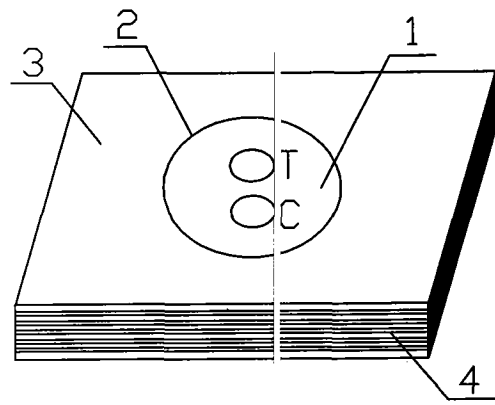


图 1

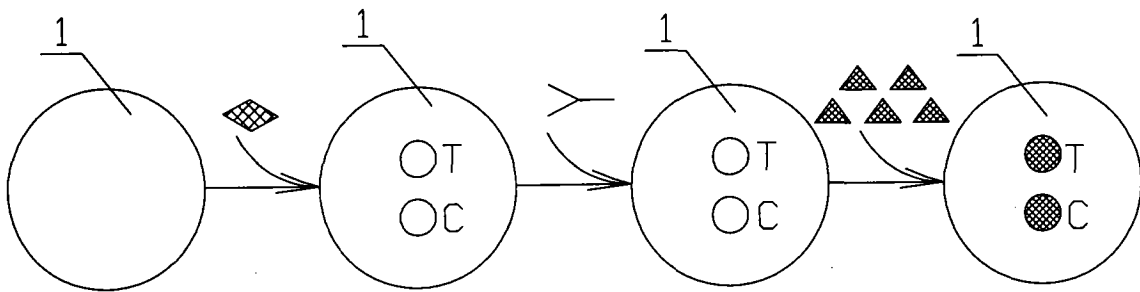


图 2

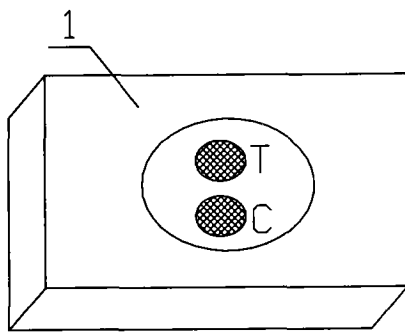


图 3-a

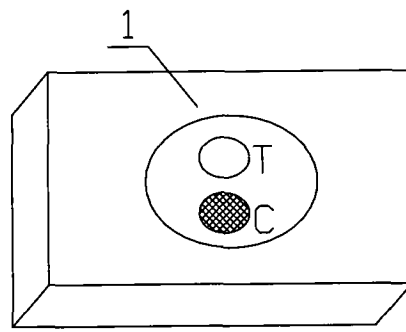


图 3-b

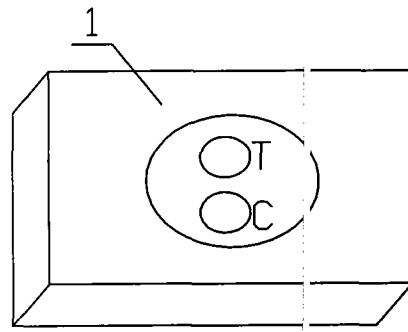


图 3-c

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN101782577A | 公开(公告)日 | 2010-07-21 |
| 申请号 | CN201010030226.8 | 申请日 | 2010-01-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 郑州大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 郑州大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 郑州大学 | | |
| [标]发明人 | 崔晶 王中全 侯小君 姜鹏 王焯 王来 王睿 遼丽 秦银霞 | | |
| 发明人 | 崔晶 王中全 侯小君 姜鹏 王焯 王来 王睿 遼丽 秦银霞 | | |
| IPC分类号 | G01N33/532 C12N15/12 C12N15/70 C07K14/435 | | |
| 代理人(译) | 王霞 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种旋毛虫病斑点免疫金渗滤法诊断试剂盒，它采用金标-SPA为抗体标记标签，通过异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导pMAL-c2X-Ts21/TB1重组菌、表达并纯化了旋毛虫Ts21基因编码蛋白(Ts21抗原基因，ORF17.20，GenBank登陆号U88239)，在硝酸纤维素膜(NCM)上以纯化后Ts21重组蛋白包被检测点T，以人IgG包被质控点C，建立了Ts21重组蛋白-斑点免疫金渗滤法(Ts21-DIGFA)，并组装成旋毛虫Ts21重组蛋白斑点免疫金渗滤法快速诊断试剂盒。本发明操作简单，有高度的敏感性和特异性，稳定性和重复性良好；加样后1min内即可观察判断检测结果，诊断结果准确明了，不会出现误判现象；适用于快速诊断及现场血清流行病学调查，易于大范围推广应用。

