



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110531062 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201910792329.9

(22)申请日 2019.08.26

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

(72)发明人 朱传刚 沈元曦 纪荣毅 林矫矫
洪炆

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A01K 67/033(2006.01)

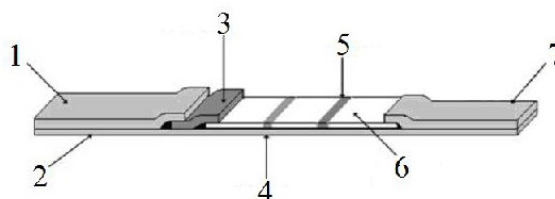
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

曼氏血吸虫虫卵的分离纯化方法及虫卵可溶性抗原及其胶体金免疫层析卡的制备

(57)摘要

本发明涉及曼氏血吸虫虫卵的分离纯化方法及虫卵可溶性抗原及其胶体金免疫层析卡的制备。所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡包括样品垫、PVC底板、胶体金垫、测试线、控制线、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水垫。应用本发明胶体金免疫层析卡检测,操作简单、方便、快速、简捷,不需特殊仪器设备,不需专业培训,结果清晰易辨,操作简单,易于推广,适合基层,适合于突发事件的大批量现场检测,适合流行病学调查。



1. 一种适合曼氏血吸虫虫卵分离纯化的方法,所述方法为:

- (1) 曼氏血吸虫尾蚴感染适宜宿主,宿主包括但不限于小鼠;
- (2) 取感染6至10周的宿主动物器官,用于虫卵的制备;
- (3) 分离及纯化曼氏血吸虫的虫卵。

2. 如权利要求1所述的适合曼氏血吸虫虫卵分离纯化的方法,具体为:

感染后60d解剖小鼠,取各鼠的胃、肝脏、脾脏、肠等内脏组织,仔细分离除去粘附于各组织的血管、肠系膜等外在组织;将肠根据功能细分成小肠、盲结肠、直肠三段,其中小肠再均等地细分成上、下二段,清空肠道内容物;

剖杀,取肝脏等生物材料,剔除血管等结缔组织后剪成1g左右的小块,每鼠肝脏等生物材料加5-15ml(最适10ml)生理盐水(pH值应为7.0~7.5),常温下采用搅碎机制成匀浆液,匀浆转速500-2000r/min,(最适2000r/min)匀浆时间1分钟,间歇3分钟,重复上述操作1-5次(最适合3次),获得含虫卵的肝脏等生物材料匀浆液;

上述肝脏等生物材料匀浆液按1:1-5比例(最适合1:1)加入45-60℃预热的10%NaOH溶液(最适合50℃,下同),混匀,置于45-60℃水浴振荡器内消化5-15分钟(最适合8分钟),震荡转速50-200r/min(最适合100r/min),消化结束后,迅速将消化的匀浆液插入2~8℃的冰水里降温,3000r/min离心1-5分钟,2~8℃操作,弃上清,加PBS(0.01M pH6.8)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次(最适合3次),加PBS(0.01M pH7.2)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次;最后用生理盐水(0.9%NaCl)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次,收集虫卵;

上述组织分别称重后放入离心管中,加适量的蒸馏水,定容后用高速匀浆机匀浆,用细胞计数板计数虫卵数,每样计数三次。

3. 一种曼氏血吸虫虫卵可溶性抗原的制备方法,所述方法为:

(1) 将洗涤后离心获得的虫卵沉淀加按照1:1-5的体积比加入生理盐水,研磨器内粉碎,镜检无完整虫卵;-40℃至10℃反复冻融3次,冰上超声,超声1秒间隔9秒,共0.5-1小时,超声后12000r/min离心5分钟,取可溶性上清,即为虫卵可溶性抗原粗提物,-20℃冻存;

生产前,将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟,上清即为检测用虫卵可溶性抗原;

(2) 对虫卵可溶性抗原的检验,其中上清性状应为清亮半透明的液体;浓度检测:通过Folin-酚试剂法测定抗原浓度应不低于1mg/ml。

4. 如权利要求3所述的一种曼氏血吸虫虫卵可溶性抗原的制备方法,所述方法的最优反应条件为:

将洗涤后离心获得的虫卵沉淀加按照1:3的体积比加入生理盐水,研磨器内粉碎,镜检无完整虫卵;-40℃至10℃反复冻融3次,冰上超声,超声强度500w,超声1秒间隔9秒,共0.5-1小时,超声后12000r/min离心5分钟,取可溶性上清,即为虫卵可溶性抗原粗提物,-20℃冻存;

生产前,将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟,上清即为检测用虫卵可溶性抗原。

5. 一种曼氏血吸虫虫卵纯化抗原,其特征在于,采用根据权利要求3或4所述的一种曼氏血吸虫虫卵可溶性抗原的制备方法制备而成。

6. 根据权利要求5所述的血吸虫虫卵纯化抗原在制备检测血吸虫抗体的检测产品中的应用。

7. 一种血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒, 其特征在于, 包括血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡, 所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有根据权利要求5所述的血吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质。

8. 如权利要求7所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡, 所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡包括样品垫、PVC底板、胶体金垫、测试线、控制线、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水垫。

9. 如权利要求8所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的制备方法, 所述方法为:

(1) 胶体金的烧制

将所有用于烧制、保存胶体金的玻璃器皿放在酸缸中浸泡24h, 取出后冲洗干净烘干备用; 取100mL去离子水与1mL1%氯金酸, 加热至沸腾; 逐滴加入1.5mL1%柠檬酸三钠, 直到颜色稳定成红色; 此后继续煮沸15min, 冷却至室温;

(2) 胶体金探针的制备

将制备好的胶体金溶液用0.2%K₂CO₃调节pH至5.0, 逐滴加入重组蛋白rSPG, 震荡15min, 静置15min; 加入10mL10%PEG20000稳定液, 室温震荡15min, 静置15min; 溶液进行2000rpm离心20min, 取上清再进行10000rpm离心30min, 取沉淀, 沉淀用20mLTBS重悬; 将此胶体金探针均匀覆盖在金标垫上, -20℃冷冻2h, -80℃冷冻2h后置于多功能冻干机中真空冻干;

(3) 试纸条组装

曼式血吸虫虫卵可溶性抗原和链球菌蛋白G (SPG) 以0.5mg/ml浓度, 4μl/cm的速度划线, 固定在硝酸纤维素膜(CN95), 作为检测线(T)和质控线(C); 与玻璃纤维素膜, PVC底板, 吸水纸和金标垫一同组装成血吸虫抗体检测试纸条。

曼氏血吸虫虫卵的分离纯化方法及虫卵可溶性抗原及其胶体金免疫层析卡的制备

技术领域

[0001] 本发明属于寄生虫学诊断领域,尤其是涉及曼氏血吸虫虫卵的分离纯化方法及虫卵可溶性抗原及其胶体金免疫层析卡的制备。

背景技术

[0002] 血吸虫亦称裂体吸虫或住血吸虫,隶属于吸虫纲、复殖目、裂体科、裂体属。寄生人体的血吸虫主要有6种,即曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*),日本血吸虫(*S. japonicum*),埃及血吸虫(*S. haematobium*),间插血吸虫(*S. intercalatum*),湄公血吸虫(*S. mekongi*)和马来血吸虫(*S. malayensis*),其中以曼氏血吸虫、日本血吸虫和埃及血吸虫所引起的血吸虫病流行范围最广,危害最大。其中曼氏血吸虫广泛流行于非洲(尼罗河三角洲,包括埃及、肯尼亚、坦桑尼亚等)、南美洲(巴西、加勒比海等国)、亚洲(阿拉伯半岛)。

[0003] 中国目前虽无该病流行,但近年来,随着与非洲建立并全面推进新型战略伙伴关系,人员的交流日益频繁,输入性曼氏血吸虫病患者时有发生,且中国南方部分地区已发现曼氏血吸虫中间宿主囊杆双脐螺,存在曼氏血吸虫病传播的潜在风险。但目前中国对于该类非洲输入性疾病及其相关宿主尚无系统的监测和检测体系,有关劳务派遣机构和出入境管理部门对于出入境人员的防病宣传不够重视,赴非人员缺乏防护意识,回国后无相应检疫监测体系,因此无法早期发现。而基层医疗和疾控机构在日常诊疗和防治过程中缺乏相关知识的培训,也无相应快速诊断试剂和方法,因此不了解疾病发病特点,不能鉴别确诊病原体,常常造成误诊、误治。同时,在防治过程中发现双脐螺分布面积广,不易消灭控制;鼠、猴和狒狒等保虫宿主多,同步化疗难度大;流行区人畜化疗后再感染率高;吡喹酮化疗对再次感染并没有保护作用,长期使用具有一定的毒副作用,且易产生抗药性,需要研究更有效的防治措施。

发明内容

[0004] 本发明的目的就是为了解决上述现有技术存在的缺陷而提供一种适合曼氏血吸虫虫卵分离纯化的方法,并以此为基础,建立了曼氏血吸虫的金标免疫试纸条诊断方法;该方法可以用于曼氏血吸虫病的诊断。

[0005] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

在本发明的第一方面,本发明提供一种适合曼氏血吸虫虫卵分离纯化的方法,所述方法为:

- (1) 曼氏血吸虫尾蚴感染适宜宿主,宿主包括但不限于BALB/c鼠;
- (2) 取感染6至10周的宿主动物肝脏,用于虫卵的制备
- (3) 分离及纯化曼氏血吸虫的虫卵。

[0006] 进一步的,本发明提供一种曼氏血吸虫虫卵纯化抗原的制备方法;

进一步的,本发明提供一种曼氏血吸虫虫卵纯化抗原在制备检测血吸虫抗体的检测产品中的应用;

进一步的,本发明提供一种血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,包括血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有血吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质;

进一步的,本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,其中,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有根据权利要求5所述的血吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质。

[0007] 进一步的,本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡包括样品垫、PVC底板、胶体金垫、测试线、控制线、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水垫。

附图说明

[0008] 图1小鼠不同组织沉积虫卵百分比(感染60d)

图2胶体金试纸条模式图,其中,1.样品垫;2.PVC底板;3.胶体金垫;4.测试线;5.控制线;6.硝酸纤维素膜(NC膜);7.吸水垫;

图3 曼氏血吸虫试纸条灵敏度检测,1-12:曼氏血吸虫阳性血清梯度稀释,分别为1:5、1:10、1:20、1:40、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1000、1:2000、1:5000、1:10000。

实施例

[0009] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0010] 实施例1 曼氏血吸虫的虫卵分布检测

1.1 曼氏血吸虫的小鼠模型建立

8周龄SPF级BALB/c小鼠,雄性,体重20~22g,购自上海杰思捷实验动物有限责任公司。采用25g左右的BALB/c小鼠作为感染用实验动物。将BALB/c小鼠模拟自然感染法置于含曼氏血吸虫尾蚴的水体中,以腹部接触法感染,每鼠感染量为50-150条,最适合的量为 80 ± 4 条曼氏血吸虫尾蚴,感染20分钟,感染后,正常饲养60~70日。

[0011] 1.2 曼氏血吸虫虫卵分布研究及虫卵制备

感染后60d解剖小鼠,取各鼠的胃、肝脏、脾脏、肠等内脏组织,仔细分离除去粘附于各组织的血管、肠系膜等外在组织;将肠根据功能细分成小肠、盲结肠、直肠三段,其中小肠再均等地细分成上、下二段,清空肠道内容物。

[0012] 上述组织分别称重后放入离心管中,加适量的蒸馏水,定容后用高速匀浆机匀浆,用细胞计数板计数虫卵数,每样计数三次。

[0013] 不同脏器组织中虫卵的沉积特性差别很大,如表1所示。各组织中虫卵分布的密度有显著差异($P < 0.01$):肝脏的虫卵密度最大,其次是小肠,胃部也有少量虫卵沉积,但密度最小;脾脏和肾脏未检测到虫卵。

[0014] 统计各器官沉积虫卵占总虫卵数的比例,如图1所示:感染60d的实验小鼠肝组织

虫卵占比最大,其次是小肠上段、小肠下段、直肠、盲肠和胃;脾脏、肾肾脏中未发现虫卵。按照各脏器统计沉积虫卵在虫卵总量中的比例,肝脏占沉积虫卵总数的53%,是虫卵沉积的主要器官,其次是小肠的小肠,小肠上下两端各沉积总虫卵数的17%和15%,即,小肠沉积虫卵占总数的32%。

[0015] 表1 感染60d沉积虫卵分布与孵化情况

	小 肠 上段	小 肠 下段	盲肠	直肠	肝脏	肾脏	脾脏	胃
平均重 (g)	1.221 ±0.18	1.42± 0.24	0.64± 0.42	0.74± 0.44	1.99± 0.28	0.39± 0.11	0.65± 0.13	0.254 ±0.11
每克沉积虫 卵数 (个)	5650. 91±4 247.7 5	6474 . 57 ±395 5.63	1827. 55±1 736.4 5	2880. 37±3 798.9 4	12584 .34±5 354.5 9	0	0	2089. 88±1 094.9 9
沉积虫卵总 数 (个)	11518	9986	3274	6083	35329	0	0	493
沉积虫卵百 分比 (%)	17.27	14.98	4.91	9.12	52.98	0	0	0.74

1.3 曼氏血吸虫虫卵制备

剖杀感染6-10周曼氏血吸虫尾蚴的BALA/c小鼠,最适是感染60d的实验小鼠。取肝脏,剔除血管等结缔组织后剪成1g左右的小块,每鼠肝脏加5-15ml(最适10ml)生理盐水,常温下采用搅碎机制成匀浆液,匀浆转速500-2000r/min,(最适2000r/min)匀浆时间1分钟,间歇3分钟,重复上述操作1-5次(最适合3次),获得含虫卵的肝脏等生物材料匀浆液。上述肝脏等生物材料匀浆液按1:1-5比例(最适合1:1)加入45-60℃预热的10%NaOH溶液(最适合50℃,下同),混匀,置于45-60℃水浴振荡器内消化5-15分钟(最适合8分钟),震荡转速50-200r/min(最适合100r/min),消化结束后,迅速将消化的匀浆液插入2~8℃的冰水里降温,3000r/min离心1-5分钟,2~8℃操作,弃上清,加PBS(0.01M pH6.8)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次(最适合3次),加PBS(0.01M pH7.2)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次;最后用生理盐水(0.9%NaC)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次,收集虫卵。

[0016] pH值 提取的虫卵加生理盐水后的pH值应为7.0~7.5。

[0017] 显微镜检查 吸取虫卵置显微镜下镜检,虫卵应呈椭圆形,淡黄色,卵壳完整、厚薄均匀,无卵盖,卵底部有细长刺,可见虫卵内毛蚴等组织成分;虫卵完整,无粘连的纤维组织碎片,溶液里无宿主肝脏碎片等杂质。

[0018] 实施例2 曼氏血吸虫的虫卵可溶性抗原和成虫可溶性抗原制备及其最佳条件筛选

虫卵可溶性抗原制备和最佳条件摸索

(1) 将洗涤后离心获得的虫卵沉淀加按照1:1-5的体积比加入生理盐水,研磨器内粉碎,镜检无完整虫卵;-40℃至10℃反复冻融3次,冰上超声(超声强度100-800w),超声1秒间隔9秒,共0.5-1小时,超声后12000r/min离心5分钟,取可溶性上清,即为虫卵可溶性抗原粗提物,-20℃冻存。生产前,将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟,上清即为检测用

虫卵可溶性抗原。

[0019] (2) 对虫卵可溶性抗原的检验, 其中上清性状应为清亮半透明的液体; 浓度检测: 通过Folin-酚试剂法测定抗原浓度应不低于1mg/ml。

[0020] (3) 最佳反应条件的筛选。利用响应面法对其中的参数进行筛选, 最终确定最优反应条件为:

将洗涤后离心获得的虫卵沉淀加按照1:3的体积比加入生理盐水, 研磨器内粉碎, 镜检无完整虫卵; -40℃至10℃反复冻融3次, 冰上超声, 超声强度500w, 超声1秒间隔9秒, 共0.5-1小时, 超声后12000r/min离心5分钟, 取可溶性上清, 即为虫卵可溶性抗原粗提物, -20℃冻存。生产前, 将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟, 上清即为检测用虫卵可溶性抗原。

[0021] 实施例3 血吸虫抗体检测试纸条的制备

(1) 胶体金的烧制

将所有用于烧制、保存胶体金的玻璃器皿放在酸缸中浸泡24h, 取出后冲洗干净烘干备用。取100mL去离子水与1mL1%氯金酸, 加热至沸腾。逐滴加入1.5mL 1%柠檬酸三钠, 直到颜色稳定成红色。此后继续煮沸15min, 冷却至室温。

[0022] (2) 胶体金探针的制备

将制备好的胶体金溶液用0.2%K₂CO₃调节pH至5.0, 逐滴加入重组蛋白rSPG, 震荡15min, 静置15min。加入10mL10%PEG20000稳定液, 室温震荡15min, 静置15min。溶液进行2000rpm离心20min, 取上清再进行10000rpm离心30min, 取沉淀, 沉淀用20mLTBS重悬。将此胶体金探针均匀覆盖在金标垫上, -20℃冷冻2h, -80℃冷冻2h后置于多功能冻干机中真空冻干。

[0023] (3) 试纸条组装

如实施例2所述制备曼式血吸虫虫卵可溶性抗原和链球菌蛋白G (SPG) 以0.5mg/ml浓度, 4μl/cm的速度划线, 固定在硝酸纤维素膜(CN95), 作为检测线(T) 和质控线(C)。与玻璃纤维素膜, PVC底板, 吸水纸和金标垫一同组装成血吸虫抗体检测试纸条。

[0024] 二, 试纸条效果检测分析

将标准鼠曼式血吸虫阴阳性血清进行梯度稀释, 稀释成100ul体系, 将稀释好的血清分别滴于样品垫上, 静置15min, 判定结果(图3), 从图中可见标准阳性血清稀释至1:5000时, 在检测仍为阳性。

[0025] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改, 并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此, 本发明不限于上述实施例, 本领域技术人员根据本发明的揭示, 不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

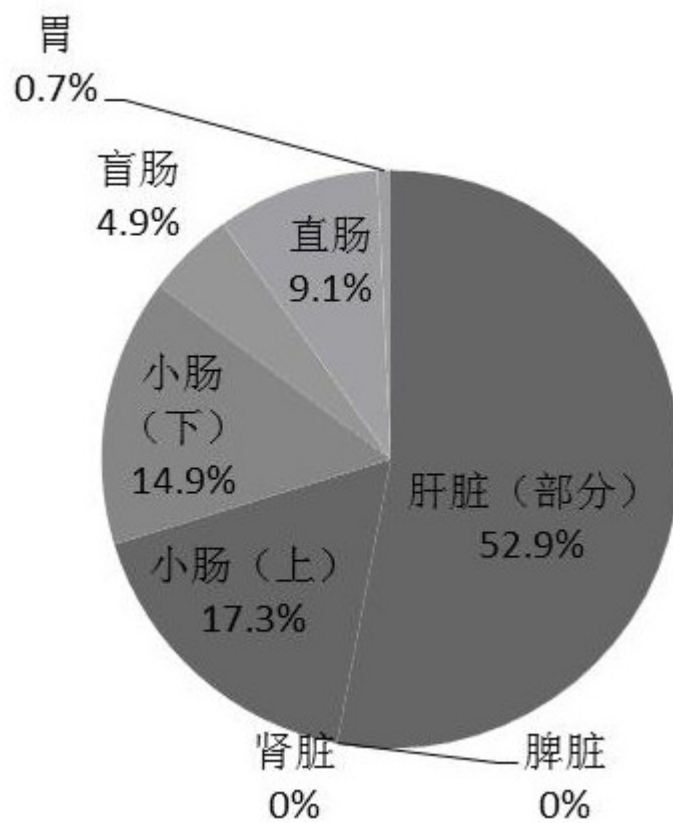


图1

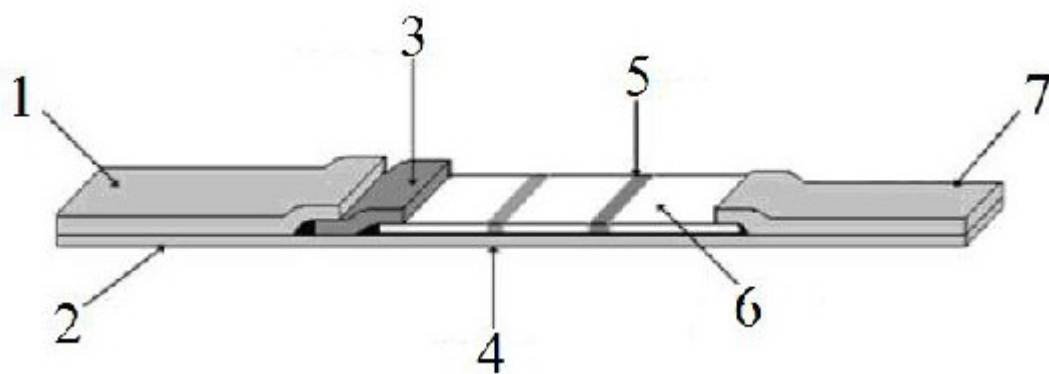


图2

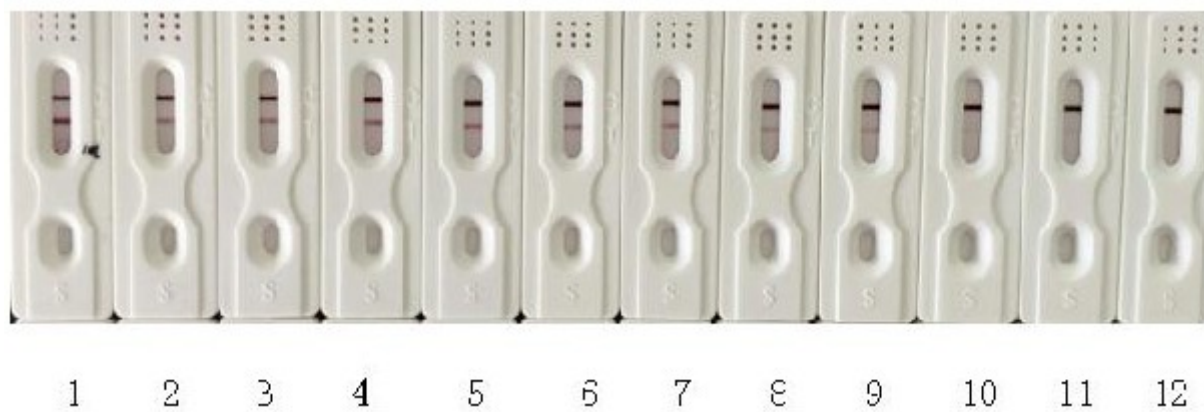


图3

专利名称(译)	曼氏血吸虫虫卵的分离纯化方法及虫卵可溶性抗原及其胶体金免疫层析卡的制备		
公开(公告)号	CN110531062A	公开(公告)日	2019-12-03
申请号	CN201910792329.9	申请日	2019-08-26
[标]发明人	朱传刚 沈元曦 林矫矫 洪炆		
发明人	朱传刚 沈元曦 纪荣毅 林矫矫 洪炆		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/53 A01K67/033		
CPC分类号	A01K67/033 G01N33/5308 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/585		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及曼氏血吸虫虫卵的分离纯化方法及虫卵可溶性抗原及其胶体金免疫层析卡的制备。所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡包括样品垫、PVC底板、胶体金垫、测试线、控制线、硝酸纤维素膜（NC膜）、吸水垫。应用本发明胶体金免疫层析卡检测，操作简单、方便、快速、简捷，不需特殊仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨，操作简单，易于推广，适合基层，适合于突发事件的大批量现场检测，适合流行病学调查。

