

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/53
G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01126586.8

[43] 公开日 2003 年 4 月 2 日

[11] 公开号 CN 1407340A

[22] 申请日 2001.8.29 [21] 申请号 01126586.8
[71] 申请人 上海数康生物科技有限公司
地址 200233 上海市钦州北路 1089 号 51 号
楼 4 楼
[72] 发明人 胡康熙

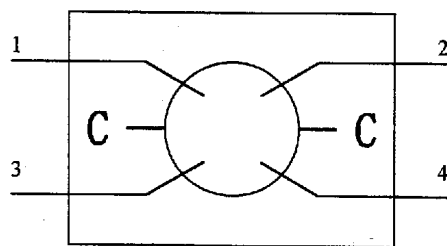
[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司
代理人 孙跃虹

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于同时检测四种致畸胎疾病的试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于同时检测四种致畸胎疾病 (ToRCH) 的试剂盒及其制备方法。该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成, 其中在免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上, 点制有 HCMV 基因工程抗原、HSV 基因工程抗原、RV 基因工程抗原和 TOX 基因工程抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠 IgM 抗体。本发明还公开了该检测试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理, 在同一载体上实现了四种致畸胎疾病的同时检测, 操作简便、迅速、准确。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种用于同时检测四种致畸胎疾病 ToRCH 的试剂盒，该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记液组成，其特征在于：

(1) 其中所述的免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，相距一定距离点制有 HCMV 基因工程抗原、HSV 基因工程抗原、RV 基因工程抗原和 TOX 基因工程抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠 IgM 抗体；

(2) 其中所述的胶体金标记液是鼠抗人 IgM 单抗的胶体金标记物。

2、一种如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于其中所述的胶体金标记液中鼠抗人 IgM 单抗被胶体金标记的蛋白浓度为 80—120 μ g/ml，其中所用的胶体金颗粒大小为 20—60nm。

3、一种如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于其中所述的 HSV 基因工程抗原可以是 HSV—I 型的抗原、HSV—II 型的抗原或 HSV—I 型抗原和 HSV—II 型抗原的混合物

4、一种如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于其中所述的缓冲液为含有体积浓度为 0.01—0.07% Tween20 的 PH7.2—8.8 的 PBS 缓冲液。

5、一种如权利要求 1 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于试剂盒的制备方法包括下列步骤：

(一) 免疫渗滤金标法联检反应装置的制备

(1) 膜上加样物的制备

将 HCMV 基因工程抗原、HSV 基因工程抗原、RV 基因工程抗原和 TOX 基因工程抗原分别置于 0.01M—0.05M, pH7.2—8.8 的 PBS 溶液，4℃透析过夜。透析后的各蛋白分别用 pH7.2—8.8 的 PBS 溶液稀释至 0.2—2.0mg/ml；

(2) 在膜上加样

分别吸取上述 HCMV 基因工程抗原、HSV 基因工程抗原、RV 基因工程抗原和 TOX 基因工程抗原，仔细地点于硝酸纤维素膜特定的位点上，每点 0.3—3 μ l；另吸取羊抗鼠 IgM 抗体，于同一硝酸纤维素膜上远离上述各点样位置的地方作一标记，此标记可为一点、一条线或其他符号；

(3) 膜的后处理

将此硝酸纤维素膜置于 37℃烘箱内 30 分钟，取出后室温放置 20 分钟以上，然后将其浸没于 37℃的封闭液中 20 分钟，取出后，在室

温下置于洗涤液中振荡洗涤 5—10 分钟，重复洗涤数次，室温晾干；

(4) 反应装置的装配

取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方，再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中；

(二) 制备胶体金标记物混合液

(1) 制备胶体金颗粒

取 0.01% 的氯金酸水溶液，加热煮沸，快速加入 1% 枸橼酸三钠溶液，继续煮沸 5 分钟，使得胶体金的大小为 20—60nm；

(2) 鼠抗人 IgM 胶体金标记物的制备

取颗粒大小为 20—60nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入鼠抗人 IgM 单抗，使其最终浓度为 20—80 μ g/ml，室温下搅拌 30 分钟，加入 10% BSA 溶液使其终浓度为 0.2—1.0%，室温下搅拌 5 分钟，加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.1—0.5%，室温下搅拌 5 分钟，12000—15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去，沉淀溶于保存液中，用 0.45 μ m 滤膜过滤，置 4℃ 保存备用；

(三) 缓冲液的制备

在 pH7.2—8.8 的 PBS 中加入 Tween20，使 Tween20 的体积浓度为 0.01—0.07%。

6、一种如权利要求 1 所述的试剂盒在同时检测巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒和弓形虫感染导致的四种致畸胎疾病中的应用。

用于同时检测四种致畸胎疾病的试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种用于同时检测四种致畸胎疾病的试剂盒及其制备方法。

背景技术

近年来经济发展迅猛，人民生活水平逐年提高，加上国内计划生育工作逐步走向深化，独生子女比例比较高，人们对下一代的健康愈来愈重视。如何提高新生儿质量，改善人类遗传素质，即优生优育已显得非常重要。避免有严重遗传性疾病及先天性疾病个体出生是优生优育最基本的内容。从临床优生学角度分析，具体工作包括在母亲妊娠期间对母亲及胎儿进行遗传学检查，尽量排除常见的遗传性疾病个体的出生；以及在妊娠期间检查母亲是否患有某些易引起胎儿畸形的传染性疾病。

ToRCH 是四种人类致病微生物英文名称字头的组合包括：巨细胞病毒（HCMV）、单纯疱疹病毒（HSV）、风疹病毒（RV）和弓形虫（TOX）。它们是四种最可能导致畸胎的传染病的病原体，孕妇如患有这四种传染病中的一种，就能引起胎儿畸形，因此，对这四种病原体的检查已成为孕妇身体检查的必检项目。

巨细胞病毒属疱疹病毒群，此病毒普遍存在于人体中，其传染源是患者和无症状的隐性感染者。从怀孕早期到后期，孕妇都可以被此病毒感染。受感染后，临床症状不明显，或有轻微类似上呼吸道感染症状，如发烧不适、皮疹、淋巴结肿大等。一般来说，早期感染易引起流产、死胎，后期感染主要引起小头畸形、智力发育障碍，亦有报道可引起先天性心脏病、脐疝、足畸形和肝脾肿大等。

单纯疱疹是由单纯疱疹病毒所致的传染性疾病。人类 HSV 系 DNA 类病毒，根据其原性质的不同分为两型：即 HSV—I 和 HSV—II。人是单纯病毒唯一的自然宿主，病毒经过口腔、呼吸道、生殖器以及皮肤破损处侵入体内，潜居于人体粘膜、血液、唾液、神经组织及多数器官内。若孕妇感染单纯疱疹，妊娠早期可引起死胎、流产、小头畸形、小眼畸形、脑内钙化等神经系统畸形，其症状与巨细胞病毒相似。

风疹病毒是传染性最强的致畸因子，亦是致畸作用最明显的一种

病毒。孕妇被风疹病毒感染后可有风疹症状或症状比较轻微，因此往往易被忽略。感染越早，胎儿发生畸形率越高、越严重。风疹病毒诱发先天性畸形除白内障外，还有心脏畸形（动脉导管未闭、心房和心室间隔缺损）、耳聋、青光眼、小眼、小头、智能发育不全和牙釉质缺损等。最近发现风疹病毒还可以引起胎儿生长迟缓，心肌损害。患风疹发生先天性畸形可达40%以上。

弓形虫是专一性的细胞内寄生虫，它破坏人体除红细胞以外的所有有核细胞。弓形虫主要寄生在人的大脑，其次是眼睛和心脏，以致病态与寄生态交替出现，对人类的威胁极大。孕妇感染弓形虫，还可通过胎盘感染胎儿，造成早产、死产或胎儿畸形或其它先天性疾病，尤其是造成智力低下，带来严重后果。在我国，每年出生100多万与弓形虫感染有关的畸形儿和先天性残疾儿。

由此可见，要求孕妇做以上四种病原体的检测，对于优生优育具有重大意义。

目前，对于ToRCH的诊断，大都采用酶联免疫吸附法(ELISA)或免疫荧光法(IFA)进行。该方法涉及的试剂较多，操作复杂，反应时间长。

胶体金免疫渗滤方法是在酶联免疫吸附分析方法(ELISA)的基础上发展起来的一项技术，它以微孔滤膜为载体，利用微孔滤膜的可滤过性和毛细管作用，使抗原与抗体的反应、洗涤在一个特殊的渗滤装置上，以液体渗滤过膜的方式迅速完成。

由于此方法简单、快速、除试剂外不需任何仪器设备，几分钟即可用肉眼观察结果，目前已在临床检测中取得了广泛的应用。胶体金免疫渗滤方法可应用于免疫学检测的几乎所有方面，但主要用于检测正常体液中不存在的物质(如病原体的抗体)，以及正常含量极低而特殊情况下异常升高的物质(如 β -hCG)。近年来由于试剂原料的精选和制备技术的改进，应用范围更加广阔。但目前很少有人将胶体金免疫渗滤技术用于多种疾病相关抗原和抗体的同时检测。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是利用胶体金免疫渗滤原理同时对四种致畸胎的疾病ToRCH进行检测，提供一种灵敏、准确、迅速的孕妇血样检测的试剂盒。

本发明公开的用于同时检测四种致畸胎疾病的试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液、胶体金标记液组成，其中在免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，相距一定距离分别点

有：HCMV 基因工程抗原，HSV 基因工程抗原，RV 基因工程抗原，TOX 基因工程抗原和质控物羊抗鼠 IgM 抗体，抗原的点样体积为 0.3—3 μ l。

本发明所述胶体金标记液是鼠抗人 IgM 单抗的金标记物溶液，鼠抗人 IgM 单抗被胶体金标记的蛋白浓度为 80—120 μ g/ml，其中所用的胶体金颗粒大小为 20—60nm。

本发明所述的缓冲液为含有体积浓度为 0.01—0.07% Tween20 的 0.01—0.05M，PH7.2—8.8 的 PBS（由磷酸二氢钾或磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制而成的缓冲液）缓冲液。

本发明所述的 HSV 基因工程抗原可以是 HSV—I 型的抗原、HSV—II 型的抗原或 HSV—I 型抗原和 HSV—II 型抗原的混合物。

本发明所要解决的另一技术问题是提供上述检测试剂盒的制备方法。

本发明公开的用于同时检测四种致畸胎疾病的试剂盒的制备方法包括下列步骤：

一、制备免疫渗滤金标法联检反应装置

1. 膜上加样物的制备

将 HCMV 基因工程抗原置于 0.01M—0.05M，pH7.2—8.8 的 PBS 溶液中，4℃透析过夜。透析后的 HCMV 基因工程抗原用 pH7.2—8.8 的 PBS 溶液稀释至 0.2—2.0mg/ml，4℃保存备用。

将 HSV 基因工程抗原置于 0.01M—0.05M，pH7.2—8.8 的 PBS 溶液中，4℃透析过夜。透析后的 HSV 基因工程抗原用 pH7.2—8.8 的 PBS 溶液稀释至 0.2—2.0mg/ml，4℃保存备用。

将 RV 基因工程抗原置于 0.01M—0.05M，pH7.2—8.8 的 PBS 溶液中，4℃透析过夜。透析后的 RV 基因工程抗原用 pH7.2—8.8 的 PBS 溶液稀释至 0.2—2.0mg/ml，4℃保存备用。

将 TOX 基因工程抗原置于 0.01M—0.05M，pH7.2—8.8 的 PBS 溶液中，4℃透析过夜。透析后的 TOX 基因工程抗原用 pH7.2—8.8 的 PBS 溶液稀释至 0.2—2.0mg/ml，4℃保存备用。

将羊抗鼠 IgM 抗体置于 0.01M—0.05M，PH7.2—8.8 的 PBS 溶液中，4℃透析过夜。透析后的羊抗鼠 IgM 抗体用 0.01M—0.05M，pH7.2—8.8 的 PBS 溶液稀释至 0.2—2.0mg/ml，4℃保存备用。

2. 在膜上加样

分别吸取上述 HCMV 基因工程抗原、HSV 基因工程抗原、RV 基因工程抗原、TOX 基因工程抗原，仔细地点于硝酸纤维素膜的特定位点上，点样体积为 0.3—3 μ l/点。

另吸取羊抗鼠 IgM 抗体，于同一硝酸纤维素膜上远离上述各点样位置的地方作一标记，此标记可为一点、一条线或其他符号。

3. 膜的后处理

将上述硝酸纤维素膜置 37℃烘箱内 30 分钟。取出后室温放置 20 分钟以上。然后将其浸没于 37℃的封闭液中 20 分钟。取出后，在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5—10 分钟。更换洗涤液，重复上述振荡洗涤过程。取出后，室温下晾干。4℃干燥环境中保存备用。

其中所述的封闭液为含有体积浓度为 0.01—0.07%Tween20 的 pH7.2—8.8 的 0.01M—0.05M PBS 缓冲液；其中所述的洗涤液为含有体积浓度为 0.01—0.07%Tween20 的 pH7.2—8.8 的 0.01M—0.05M PBS 缓冲液。

4. 装置的装配

取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方，再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

二、制备胶体金标记物混合液

1. 制备胶体金颗粒

取 0.01%的氯金酸水溶液，加热煮沸，快速加入 1%枸橼酸三钠溶液，继续煮沸 5 分钟，使得胶体金的大小为 20—60nm。

2. 制备胶体金标记液

取颗粒大小为 20—60nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入鼠抗人 IgM 单抗，使其最终浓度为 20—80 μ g/ml。室温下搅拌 30 分钟。加入 10%BSA 溶液使其终浓度为 0.2—1.0%，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.1—0.5%，室温下搅拌 5 分钟。12000—15000r/min 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 0.45 μ m 滤膜过滤，置 4℃保存备用。

三、缓冲液的制备

在 pH7.2—8.8 的 0.01M—0.05M PBS 中加入 Tween20，使 Tween20 的浓度为 0.01—0.07% (v/v)。

本发明所要解决的另一个技术问题，是公开上述检测试剂盒在同时检测巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒和弓形虫所感染的传染性疾病中的应用。

本发明所述试剂盒的检测方法如下：

1. 取出免疫渗滤金标法联检反应装置，水平置于桌面；
2. 在免疫渗滤金标法联检反应装置孔内加入两滴缓冲液，湿润表面；
3. 加入待测血清 50ul，等其渗滤入膜内；
4. 加入三滴缓冲液，待其渗入后加入两滴胶体金标记液；
5. 加入三滴缓冲液；
6. 1 分钟后观察相应位置有无红色斑点，有则认为该位置对应的疾病病毒在体内呈阳性，没有则认为该位置对应的疾病病毒在体内

呈阴性。

若待测血清中有 HCMV 抗体, HSV 抗体, RV 抗体和 TOX 抗体中的一种或数种, 当硝酸纤维素膜与血清接触时, 膜上的抗原会与血清中的对应抗体发生反应, 然后再与胶体金标记物进行反应, 从而显色。所以, 从显色的情况可以判断出待测病人感染了何种病毒。由于羊抗鼠 IgM 抗体不会与人血清内的抗体发生反应, 而在胶体金标记液中含有的鼠抗人 IgM, 可与羊抗鼠 IgM 抗体发生反应, 对应于羊抗鼠 IgM 抗体的位置就会显色, 被肉眼识别出; 当试剂盒由于某组分的质量问题无法进行检测实验时, 膜上对应于羊抗鼠 IgM 抗体的位置就不会显色, 所以, 通过羊抗鼠 IgM 抗体可对试剂盒进行质量控制。

本发明的检测试剂盒利用了胶体金免疫渗滤的原理, 使多种病毒疾病的相关抗原、抗体在同一渗滤装置(硝酸纤维素膜)上进行反应、洗涤, 通过肉眼观察各斑点的显色情况, 对多种致畸胎病毒进行检测。

本发明试剂盒与 ELISA 试剂盒相比, 其优点在于:

(1) 检测多疾病

在同一装置内可进行四种传染性疾病的检测。

(2) 同时检测多个抗原

在同一装置内可以检测多个抗原, 实现了多种蛋白检测条件的一体化。

(3) 反应时间短

整个实验可在 3—5 分钟内完成, 适合大规模的快速血检。该试剂盒只有 2 步检测步骤, 即加样、反应, 均通过渗滤完成, 检测全过程仅需数分钟, 但敏感度却与需 1—2 小时完成的 ELISA 实验相仿。

(4) 采血量小

需要的血清量仅 50ul, 只采集指血、耳血即可。而 ELISA 法测一个指标就需要 100ul 血清, 则测试四项指标需要 400ul 左右的血清。所以本试剂盒对于儿童、新生儿的使用十分方便, 而 ELISA 方法取样只能采静脉, 对新生儿十分痛苦。

(5) 检测结果不受仪器的影响; 不受反应环境的影响。

(6) 加入胶体金标记物即可显色, 操作步骤简单, 而且试剂可在室温长期保存。

本发明试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理, 在同一载体上实现对多种抗原和抗体的同时检测, 操作简便、迅速、准确, 可适用于各种血样的多病种检测, 为传染性疾病的检测提供了新思路。

附图说明

图1 硝酸纤维素膜上点样示意图；

其中1、2、3、4分别表示点样位置。“C”的两点之间为羊抗鼠IgG抗体点样位置。

图2 1号血清检测显示示意图，检测结果均为阴性；

图3 2号血清检测显示示意图，检测结果表明受检人被弓形虫感染；

图4 3号血清检测显示示意图，检测结果表明受检人被CMV病毒感染。

图5 4号血清检测显示示意图，检测结果表明受检人被CMV病毒和HSV病毒同时感染

图2—5中C—C代表羊抗鼠IgM抗体的横线为阳性。

具体实施方式

一、试剂盒选用抗体及材料

硝酸纤维素膜由S&S公司提供；被测血清由上海市疾病控制中心提供。

二、免疫渗滤金标法联检反应装置的制备方法如下：

(1) 将HCMV基因工程抗原置于0.02M, pH8.0的PBS溶液中，4℃透析过夜。透析后的HCMV基因工程抗原用pH8.0的PBS溶液稀释至1.0mg/ml，4℃保存备用。

(2) 将HSV基因工程抗原置于0.02M, pH8.0的PBS溶液中，4℃透析过夜。透析后的HSV基因工程抗原用pH7.2—8.8的PBS溶液稀释至1.0mg/ml，4℃保存备用。

(3) 将RV基因工程抗原置于0.02M, pH8.0的PBS溶液中，4℃透析过夜。透析后的RV基因工程抗原用pH7.2—8.8的PBS溶液稀释至1.0mg/ml，4℃保存备用。

(4) 将TOX基因工程抗原置于0.02M, pH8.0的PBS溶液中，4℃透析过夜。透析后的TOX基因工程抗原用pH7.2—8.8的PBS溶液稀释至1.0mg/ml，4℃保存备用。

(5) 将羊抗鼠IgM抗体置于0.02M, pH8.0的PBS溶液中，4℃透析过夜。透析后的羊抗鼠IgM抗体用0.02M, pH8.0的PBS溶液稀释至1.0mg/ml，4℃保存备用。

(6) 如附图1所示，在硝酸纤维素膜上的1、2、3、4位置处，分别用微量加样器点上四种蛋白：HCMV基因工程抗原、HSV基因

工程抗原、RV 基因工程抗原，TOX 基因工程抗原，每点的点样体积为 $1.0\mu\text{l}$ ；在硝酸纤维素膜上标有“C”的两点之间，用 0.2mm 绘图笔吸取羊抗鼠 IgM 抗体画一横线。

(7) 将此硝酸纤维素膜置于 37°C 烘箱内 30 分钟，取出后室温放置 25 分钟。然后将其浸没于 37°C 的封闭液中 20 分钟。取出后，在室温下置于洗涤液中振荡洗涤 5 分钟，重复洗涤数次。室温晾干。

(8) 取两层吸水滤纸垫于上述硝酸纤维素膜下方，再将滤纸与膜一齐装入并固定于塑料反应装置盒中。

三、缓冲液是由 pH 为 7.8， 0.01M 的 PBS 和 0.03% (v/v) Tween20 等体积混合而成的溶液。

四、胶体金标记液的制备方法

胶体金标记物所用胶体金的颗粒大小均为 30nm 。胶体金标记物的制备方法如下：取颗粒大小为 30nm 的胶体金溶液，在磁力搅拌下缓慢加入鼠抗人 IgM 单抗，使其最终浓度为 $30\mu\text{g/ml}$ 。室温下搅拌 30 分钟。加入 10% BSA 溶液使其终浓度为 0.5% ，室温下搅拌 5 分钟。加入 10% PEG20000 溶液使其终浓度为 0.3% ，室温下搅拌 5 分钟。 $12000\text{--}15000\text{r/min}$ 离心 60 分钟，仔细吸取上清，弃去。沉淀溶于保存液中，用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤，置 4°C 保存备用。

用该试剂盒来测试不同的血清，医院提供的资料显示，1 号血清的提供者未患上述四种病毒性疾病中任一种；2 号血清的提供者被弓形虫感染；3 号血清的提供者被巨细胞病毒感染；4 号血清的提供者被巨细胞病毒和单纯疱疹感染。检测结果依次见附图 2、附图 3、附图 4、附图 5。

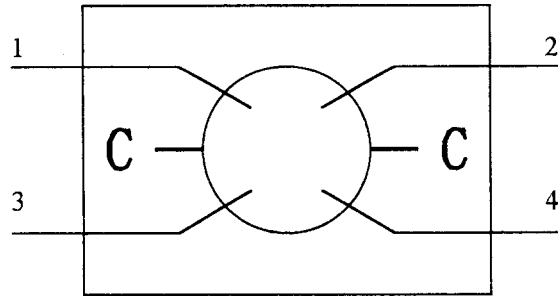


图 1

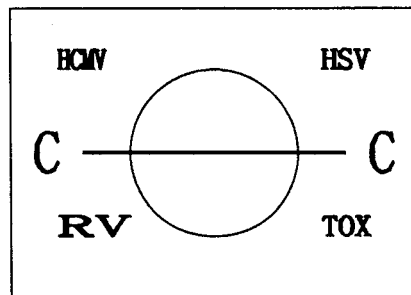


图 2

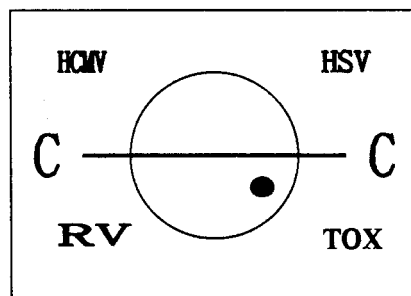


图 3

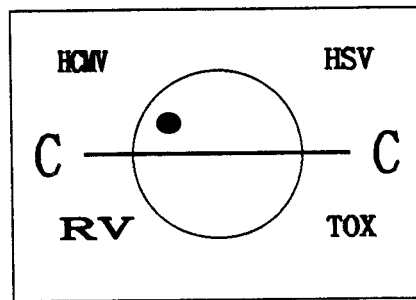


图 4

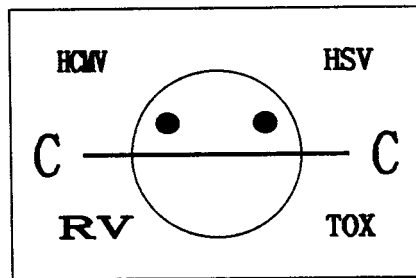


图 5

专利名称(译)	用于同时检测四种致畸胎疾病的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN1407340A	公开(公告)日	2003-04-02
申请号	CN01126586.8	申请日	2001-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
[标]发明人	胡赓熙		
发明人	胡赓熙		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/54386 G01N33/569		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于同时检测四种致畸胎疾病(ToRCH)的试剂盒及其制备方法。该试剂盒由免疫渗滤金标法联检反应装置、缓冲液和胶体金标记物混合液组成，其中在免疫渗滤金标法联检反应装置中的硝酸纤维素膜上，点制有HCMV基因工程抗原、HSV基因工程抗原、RV基因工程抗原和TOX基因工程抗原四种蛋白和质控物羊抗鼠IgM抗体。本发明还公开了该检测试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒利用胶体金免疫渗滤方法的原理，在同一载体上实现了四种致畸胎疾病的同时检测，操作简便、迅速、准确。

