



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108458996 A

(43)申请公布日 2018.08.28

---

(21)申请号 201710089149.5

(22)申请日 2017.02.20

(71)申请人 镇江华维检测技术有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十  
五路99号11幢

(72)发明人 洪霞 杜霞 刘静

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒及其用途。本发明提供一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒,包括位于背板上的试剂条,试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有LP抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所提供的检测试剂盒以患者的尿液或痰液作为检测样本,结合近红外荧光检测技术,可快速,准确的检测出患者标本中特异性、可溶性LP抗原。

1. 一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒,包括位于背板上的试剂条,试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有LP抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。

2. 如权利要求1所述的一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光探针为LP抗体包被的近红外荧光乳胶微球颗粒。

3. 如权利要求1-2任一权利要求所述的黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

1) 用磷酸盐缓冲液将荧光乳胶微粒离心清洗并将乳胶颗粒分散,在清洗好的乳胶颗粒中加入LP抗体;加入EDCA使抗体与颗粒偶联;再加入乙醇胺封闭乳胶颗粒上多余的基团,制备获得探针溶液;

2) 利用微量蛋白点膜系统将含有LP抗体的缓冲溶液喷加到硝酸纤维素膜上,烘干备用;

3) 用制备好的探针溶液浸润玻璃纤维薄膜,真空干燥机中干燥备用;

4) 将包被LP抗体的硝酸纤维素膜、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、样品垫、吸水纸及背板组装制备成黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒。

4. 如权利要求3所述的黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤1中,荧光乳胶微粒的直径为140-160nm。

5. 如权利要求3所述的黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤1中,乳胶颗粒、LP抗体、EDCA的重量比为9-11 :0.9-1.1:0.9-1.10。

6. 如权利要求3所述的黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤2中,LP抗体的喷加量为:1.8-2.2mg/ml的抗体溶液按0.9-1.1μL/cm的喷量制备免疫硝酸纤维素膜。

7. 如权利要求3所述的黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述LP抗体的制备方法如下:

1) 抗原的制备:将黄热病菌株接种在培养基上,培养后用生理盐水从平板上洗脱细菌,离心获取菌泥,菌泥加适量缓冲液超声破裂,过阴离子柱纯化,洗涤后洗脱,洗脱液装透析袋,用PEG包埋吸水浓缩,获取抗原;

2) 单克隆抗体的制备:

动物免疫:对小鼠进行免疫;

细胞融合:处死小鼠,无菌操作取出脾脏,制备B淋巴细胞悬浮液,将B淋巴细胞与准备好的处于对数生长期的同系SP2/0骨髓瘤细胞混合,制备杂交瘤细胞,并进行杂交瘤细胞筛选;

杂交瘤细胞的克隆化:克隆细胞生长的各个孔检测100%抗体阳性为止;

抗体的制备:将小鼠首先腹腔注射石蜡,1-2周后腹腔内接种杂交瘤细胞,1-2周后,用注射器抽取腹水,纯化后即可获得大量的单克隆抗体。

8. 如权利要求1-2任一权利要求所述的黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒在黄热病抗原检测领域的用途。

## 黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒及其用途。

### 背景技术

[0002] 黄热病 (yellow fever) 是一种以发热、黄疸、出血为主要表现的急性病毒性传染病。近代以来由于环境破坏、国际旅游增加以及黄热病疫情国家的疫苗覆盖率降低,1979年起,黄热病重新开始在非洲和南美洲的部分地区暴发流行,据估计全世界每年实际有200000患者,死亡人数达30 000,而只有一小部分得到确诊。虽然目前我国未见黄热病的大规模流行,但是在我国南方的某些地区地理条件与黄热病高发区域相似,并存在对黄热病毒敏感的宿主动物及埃及伊蚊等媒介,也存在发病的可能性,同时由于我国以前未曾发生过黄热病大规模流行,我国居民对其免疫力较低,一旦暴发必将造成恐慌。因此,探讨其快速诊断方法,对黄热病毒的疫情监控及流行病学调查,从而采取相应的防治措施具有重要意义。

### 发明内容

[0003] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒及其用途,用于建立高效可行的黄热病抗原近红外荧光检测技术,解决现有技术中的问题。

[0004] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒,包括位于背板上的试剂条,试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有LP抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0005] 优选的,所述免疫荧光探针为LP抗体包被的近红外荧光乳胶微球颗粒。

[0006] 更优选的,所述荧光乳胶微球颗粒的直径为140-160nm。

[0007] 近红外光 (NIR),是介于可见光 (VIS) 和中红外光 (MIR) 之间的电磁波,ASTM定义NIR为波长在780nm-2526nm范围内的电磁波。在近红外光区,生物体自吸收或荧光强度很小,可避免背景干扰。同时由于散射光强度与波长的四次方呈反比,近红外区的散射干扰大为减少。

[0008] 本发明第二方面提供所述黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

1) 用磷酸盐缓冲液将荧光乳胶微粒离心清洗并将乳胶颗粒分散(将荧光乳胶微粒用PH7.3, 0.01mol/L的磷酸盐缓冲溶液清洗,10000rpm离心10min,离心后的沉淀物用磷酸盐缓冲液复溶,并用超声波细胞粉碎机将乳胶微粒分散,此步骤重复两次),在清洗好的乳胶颗粒中加入LP抗体;加入EDCA使抗体与颗粒偶联;再加入乙醇胺封闭乳胶颗粒上多余的基团,制备获得探针溶液;

2) 利用微量蛋白点膜系统将含有LP抗体的缓冲溶液喷加到硝酸纤维素膜上,烘干备

用；

- 3) 用制备好的探针溶液浸润玻璃纤维薄膜, 真空干燥机中干燥备用;
- 4) 将包被LP抗体的硝酸纤维素膜、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、样品垫、吸水纸及背板组装制备成黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒。

[0009] 优选的, 所述步骤1中, 磷酸盐缓冲液为0.009-0.011mol/L, PH7.25-7.35的磷酸盐缓冲液。

[0010] 优选的, 所述步骤1中, 荧光乳胶微粒的直径为140-160nm。

[0011] 优选的, 所述步骤1中, 乳胶颗粒、LP抗体、EDCA的重量比为9-11 :0.9-1. 1;0.9-1.1。

[0012] 在本发明一实施例中乳胶颗粒、LP抗体、EDCA的投料量分别为1mg, 100ug, 100ug。

[0013] 所述步骤1中乙醇胺的加入量为适量, 本领域技术人员可根据实际情况调整乙醇胺的用量。

[0014] 优选的, 所述步骤2中, 所述缓冲溶液为PBS缓冲液。

[0015] 本领域技术人员可选取适当浓度和pH的PBS缓冲液。

[0016] 优选的, 所述步骤2中, 含有LP抗体的缓冲溶液中LP抗体的浓度为1. 8-2.2mg/ml。

[0017] 优选的, 所述步骤2中, LP抗体的喷加量为0.9-1.1ul/cm。

[0018] 优选的, 所述步骤2中, 烘干的具体条件为36-38℃烘箱烘干。

[0019] 优选的, 所述LP抗体的制备方法如下:

1) 抗原的制备: 将黄热病菌株接种在培养基上, 培养后用生理盐水从平板上洗脱细菌, 离心获取菌泥(同时去除平板被洗脱的液体成分), 菌泥加适量PBS缓冲液超声破裂, 过阴离子柱纯化, 用NaCl水溶液洗涤, 再用NaCl水溶液洗脱, 洗脱液装透析袋, 用PEG包埋吸水浓缩, 获取抗原;

优选的, 所述黄热病菌株购自ATCC。

[0020] 优选的, 所述抗原的制备过程中的培养条件具体为: 37℃, 5% CO2的条件下培养, 3-5天后洗下菌苔。

- [0021] 优选的, 所述抗原的制备过程中的培养基为缓冲活性酵母琼脂培养基 (BCYE)。
- [0022] 优选的, 所述离心获取菌泥的条件为4500-5500rpm。
- [0023] 优选的, 所述用NaCl水溶液洗涤时, NaCl的溶液浓度为45-55mM。
- [0024] 优选的, 所述用NaCl水溶液洗脱时, NaCl的溶液浓度为135-165mM。
- [0025] 2) 单克隆抗体的制备:

动物免疫: 对小鼠进行免疫;

优选的, 所述对小鼠进行免疫具体包括如下步骤: 第一次免疫时抗原加等量的福氏完全佐剂充分乳化, 第二次及第三次抗原加等量福氏不完全佐剂充分乳化, 细胞融合前腹腔直接注射抗原加强免疫, 一免抗原加福氏完全佐剂, 皮下免疫, 抗原量为0.1mg/鼠, 15天后2免, 皮下免疫抗原加福氏不完全佐剂, 抗原量为0.2mg/鼠, 25天后三免抗原加福氏不完全佐剂, 皮下免疫, 抗原量为0.2mg/鼠, 10天后剪尾巴取血测ELISA效价, 选取效价大于10万倍的小鼠进行加强免疫, 水剂腹腔注射抗原1mg/鼠, 三天后取脾脏细胞融合;

细胞融合: 处死小鼠, 无菌操作取出脾脏, 制备B淋巴细胞悬浮液, 将B淋巴细胞与准备

好的处于对数生长期的同系SP2/0骨髓瘤细胞混合,制备杂交瘤细胞,并进行杂交瘤细胞筛选;

优选的所述单克隆抗体的制备过程中杂交瘤细胞筛选的具体方法为:用HAT培养基培养细胞,2周后即可筛选出骨髓瘤细胞与B淋巴细胞的杂交瘤细胞。

[0026] 杂交瘤细胞的克隆化:克隆细胞生长的各个孔检测100%抗体阳性为止;

优选的,所述克隆化的方法是有限稀释法。

[0027] 抗体的制备:将小鼠首先腹腔注射石蜡,1-2周后,腹腔内接种杂交瘤细胞,1-2周后,用注射器抽取腹水,纯化后即可获得大量的单克隆抗体。优选的,所述腹腔内接种杂交瘤细胞时,将杂交瘤细胞浓度调节到 $1\times 10^5$ 个/ml按每只小鼠腹腔注射1ml接种。

[0028] 优选的,所述单克隆抗体的制备过程中,小鼠为6-8周龄BALB/C小鼠。

[0029] 优选的,单克隆抗体的纯化:选择HiTrap Protein A FF 5ml预装色谱柱纯化抗体,收集纯化的抗体备用。

[0030] 本发明第三方面提供所述黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒在黄热病抗原检测领域的用途。

[0031] 所述用途具体为使用所述黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒对黄热病抗原进行检测。

[0032] 近红外光(NIR)是介于可见光(VIS)和中红外光(MIR)之间的电磁波,ASTM定义NIR为波长在780nm-2526nm范围内的电磁波。在近红外光区,生物体自吸收或荧光强度很小,可避免背景干扰。同时由于散射光强度与波长的四次方呈反比,近红外区的散射干扰大为减少。随着激光荧光、传感器、免疫检测装置的建立,近红外荧光分析仪在免疫测定领域中显示出极大的优越性。

[0033] 本发明所提供的检测试剂盒以患者的尿液或痰液作为检测样本,结合近红外荧光检测技术,可快速,准确的检测出患者标本中特异性、可溶性LP抗原。LP抗原近红外荧光检测法灵敏度高,特异性好,检测过程中样品收集及处理简单,可快速准确的获得结果,非常适合突发事件现场和基层使用。

[0034] 黄热病抗原近红外荧光检测技术灵敏度高,特异型好,可应用到临床检测中,为临床治疗提供定性依据。

## 具体实施方式

[0035] 细菌培养是LP感染检测的金标准,但LP的培养条件苛刻,耗时长,不适合临床检测及现场检测;因感染LP第3-6周后患者血清中抗体含量才能达到检测水平,达不到疾病早期诊断的要求,故血清抗体检测常用于LP感染的流行病学回顾性调查。LD患者在感染1-3天后即可由尿液排出具有热稳定性及抗胰蛋白酶活性的LP 0一多糖抗原,该抗原在尿液中的浓度比血清中高30-100倍。与EIA相比,近红外荧光检测法操作更简便,耗时更短,

是更理想更有发展前景的检测手段。

[0036] 本发明所提供的黄热病抗原近红外荧光检测法,实验室考核结果显示,该法对LP1型抗原的最低检出量为10ng/ml,不与其他血清型抗原及多种细菌发生交叉反应,与细菌培养结果较一致,具有较高的敏感性和特异性。由于黄热病培养条件要求苛刻,可能导致阳性样品漏检。整体而言,近红外荧光法检测黄热病的可信度及各项性能均已达到临床定性检

测的要求,有望用于由黄热病引发的军团病的快速早期诊断。

[0037] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0038] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0039] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0040] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明。

本发明各实施例中试验菌种由军事医学科学院提供;交叉实验所用细菌由本实验室培养保存。近红外荧光检测仪,由上海凯创生物技术有限公司开发提供。

#### [0041] 实施例1

##### 1. 痰液采集及保存

患者在医务人员指导下,用力咳出呼吸道深部的痰液,吐至无菌广口瓶内,立即盖紧盖子保存备用,待处理的样本应置于4℃冰箱保存。

##### [0042] 2. 尿液采集及保存

患者在医务人员的指导下清洗并收集清晨第一次尿液,收集的尿液装在干净无菌的容器中保存备用。尿液样本在2-8℃条件下可以保存72小时,如需保存更长时间,则必须将样品保存在-20℃环境下。应避免反复冻融样品,否则会产生错误的实验结果。样品不可保存在自动除霜冰箱中。

##### [0043] 3. 抗原的制备:

从ATCC购买黄热病菌株接种在缓冲活性碳酵母琼脂培养基(BCYE)上,

37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,3-5天后用生理盐水从平板上洗脱细菌,5000rpm离心获取菌泥(同时去除平板被洗脱的液体成分),菌泥加适量PBS缓冲液超声破裂,过阴离子柱纯化,用50mM NaCl洗涤,再用150mM NaCl洗脱,洗脱液装透析袋,用PEG包埋吸水浓缩,获取抗原。

##### [0044] 4. LP单克隆抗体的制备:

动物免疫:选择6-8周龄BALE/C小鼠进行免疫,第一次免疫时抗原加等量的福氏完全佐剂充分乳化,第二次及第三次抗原加等量福氏不完全佐剂充分乳化,细胞融合前3天腹腔直接注射抗原加强免疫,一免抗原加福氏完全佐剂,皮下免疫,抗原量为0.1mg/鼠,15天后2

免,皮下免疫抗原加福氏不完全佐剂,抗原量为0.2mg/鼠,25天后三免抗原加福氏不完全佐剂,皮下免疫,抗原量为0.2mg/鼠,10天后剪尾巴取血测ELISA效价,选取效价大于10万倍的小鼠进行加强免疫,水剂腹腔注射抗原1mg/鼠,三天后取脾脏细胞融合;细胞融合:采用眼球摘除放血法处死小鼠,无菌操作取出脾脏,制备B淋巴细胞悬浮液,将B淋巴细胞与准备好的处于对数生长期的同系SP2/0骨髓瘤细胞混合,制备杂交瘤细胞;杂交瘤细胞筛选:用HAT培养基培养细胞,2周后即可筛选出骨髓瘤细胞与B淋巴细胞的杂交瘤细胞;杂交瘤细胞的克隆化:克隆化的方法是有限稀释法,按照实验室的常规方法进行,克隆化3-4次,直至克隆细胞生长的各个孔检测100%抗体阳性为止;抗体的制备:取BALB/C小鼠,首先腹腔注射石蜡,1-2周后,腹腔内接种杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞浓度调节到 $1 \times 10^5$ 个/ml按每只小鼠腹腔注射1ml接种。1-2周后,用注射器抽取腹水,即可获得大量的单克隆抗体。单克隆抗体的纯化:选择HiTrap Protein A FF 5ml预装色谱柱纯化抗体,收集纯化的抗体备用。

**[0045] 5. 免疫荧光LP抗体颗粒制备:**

用0.01mol/L, PH7.3±0.05的磷酸盐缓冲液将直径为150nm的荧光乳胶微粒离心清洗2遍并将乳胶颗粒分散在清洗好的乳胶颗粒中加入LP抗体;加入EDCA使抗体与颗粒偶联;加入乙醇胺封闭乳胶颗粒上多余的基团按每毫克微球乳胶100微克的待标记抗体,100微克的EDCA用量标记。每毫克的微球乳胶最后加20微克的乙醇胺进行封闭。

**[0046] 6. 试剂盒的制备:**

用0.01M pH7.2的PBS缓冲液稀释LP抗体至最适浓度2.0mg/ml,利用微量蛋白点膜系统将溶液喷加到适当孔径的硝酸纤维素膜上,按1ul/cm的量进行喷膜,37℃烘箱烘干备用。用制备的荧光乳胶微粒-抗体复合物浸润玻璃纤维薄膜,真空干燥机中干燥备用。将各包被LP抗体的硝酸纤维素膜、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、样品垫、吸水纸及背板组装制备成黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒。

**[0047] 实施例2**

**黄热病抗原近红外荧光检测法与痰液细菌培养对比实验:**

痰液细菌培养:将痰液进行预处理(采用1ug/ml胰酶溶液与玻璃碎片振荡相结合的方法对痰液进行前处理后再接种培养),预处理后的样品立即接种在GVPC选择性培养基上,对疑似黄热病的菌落进行革兰染色,并将革兰染色阴性的疑似菌落接种在BCYE-a和BCYE-Cys琼脂平板上,37℃温箱培养2d。凡是在BCYE-a培养基上生长而在BCYE-Cys培养基上不生长的菌落即可认为是黄热病。

**[0048] 试剂盒检测:**

待测样品为痰液稀释液,使用0.01M pH7.2的PBS缓冲液稀释,稀释比例为1:1。待测样品及试剂盒均平衡至室温开始检测,用滴管在每个试剂盒的加样孔内滴加3滴样本(约120-150ul)。15分钟时,用近红外荧光检测仪检测荧光信号,并用荧光仪器进行判断,分析仪的对荧光信号的检测范围是AD值0-10000,根据仪器的性能,CUTOFF值为50,检测AD值大于等于50为阳性结果。实验结果与细菌培养结果对比验证。用于细菌培养的痰液样本与尿液样本来自相同的患者。黄热病抗原近红外荧光检测法与痰液细菌培养结果如表1所示:

表1

		Positive	Negative	Row Total
LP 抗原近红外 荧光检测法	Positive	3	1	4
	Negative	0	26	26
	Row Total	3	27	30

Sensitivity=75%

Specificity=94. 11%

此外,以尿液为待测样品时,其检测结果与痰液细菌培养检测结果相符。

[0049] 由实施例2中的表1和实施例3中的表2可以看出,在共30份临床样本的检测中,经近红外荧光检测法检测LP阳性为4例,阴性为26例;痰液细菌培养LP阳性样本为3例,阴性样本为27例。本方法的灵敏度为75%,特异性为94.11%;不与其他细菌发生交叉反应;最低测出量为10ng/ml,稳定性及重复性良好。

[0050] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0051] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN108458996A</a>	公开(公告)日	2018-08-28
申请号	CN201710089149.5	申请日	2017-02-20
[标]发明人	洪霞 杜霞 刘静		
发明人	洪霞 杜霞 刘静		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/577 G01N2333/185		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

## 摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，特别是涉及一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒及其用途。本发明提供一种黄热病抗原近红外荧光检测试剂盒，包括位于背板上的试剂条，试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有LP抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所提供的检测试剂盒以患者的尿液或痰液作为检测样本，结合近红外荧光检测技术，可快速，准确的检测出患者标本中特异性、可溶性LP抗原。

		Positive	Negative	Row Total
LP抗原近红外 荧光检测法	Positive	3	1	4
	Negative	0	26	26
	Row Total	3	27	30