



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102262153 A

(43) 申请公布日 2011.11.30

(21) 申请号 201110102969.6

(22) 申请日 2011.04.25

(71) 申请人 湖北大学

地址 430064 湖北省武汉市武昌区友谊大道
368 号

(72) 发明人 张金枝 柴仕淦 邹其超 陈照
贾钗 毛端平 程时远 闫翠娥

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限
公司 42104

代理人 马辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳
试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测日本血吸虫抗体的
高分子胶乳试剂盒的制备方法和检测日本血吸虫
抗体的方法。该高分子胶乳试剂盒负载一种高分
子胶乳，所述高分子胶乳上分别固载了日本血吸
虫病虫卵抗原 (SJ-SEA)，通过固载血吸虫病虫卵
抗原 (SJ-SEA) 于胶粒上，SJ-SEA 致敏胶乳在一定
滴度下对血吸虫病阴、阳性检出率均为 100%。本
发明的优点在于检测灵敏度高，检测下限低，检测
速度快，特异性好，检测所需试剂便于携带，价格
低廉，可重复性高，可以替代传统的病原学诊断和
免疫诊断方法。

1. 一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,它包括以下步骤:

(1)、将丙烯酸酯单体与苯乙烯、交联剂加入到去离子水、引发剂、pH 调节剂组成的混合乳液中,按照滴加法进行无皂乳液聚合,获得高分子乳液,将制得的乳液进行离心分离,倾去上层清液,加去离子水稀释后再离心分离,纯化后的胶乳用去离子水稀释至固含量为 1~3%,得到高分子胶乳备用;

(2)、将高分子胶乳离心分离后取下层沉淀物,加 NaCl 溶液洗涤分散,再加入乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐,在 4℃ 下反应 2 小时后,在 4℃、0.1mol·L⁻¹NaCl 溶液中透析,然后离心分离,在沉淀中加磷酸盐缓冲液重新分散沉淀物,加日本血吸虫病虫卵抗原和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐,室温放置 1~4 小时,然后离心分离,沉淀物用磷酸盐缓冲液洗涤干净,将沉淀物用磷酸盐缓冲液分散。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,其中步骤 (1) 的高分子胶乳的反应体系中,各组分的重量百分比含量如下:

引发剂 0.10 ~ 0.50%、交联剂 0.31 ~ 1.94%、苯乙烯 4 ~ 12%、丙烯酸酯单体 2 ~ 10%、丙烯酸 0.16 ~ 2.44%、pH 调节剂 0.17 ~ 0.87%、余量为水。

3. 根据权利要求 2 所述的一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,其中所述的丙烯酸酯单体为丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸正丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯、甲基丙烯酸正丁酯或甲基丙烯酸异丁酯中的一种或多种。

4. 根据权利要求 2 所述的一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,其中所述的引发剂为过硫酸铵、过硫酸钾、双氧水、硫酸亚铁中的一种或多种。

5. 根据权利要求 2 所述的一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,其中所述的苯乙烯为甲基苯乙烯或乙基苯乙烯。

6. 根据权利要求 2 所述的一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,其中所述的交联剂为二乙烯基苯、丙烯酸、丙烯酸-β-羟乙酯、甲基丙烯酸-β-羟乙酯、丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺中一种或多种。

7. 根据权利要求 2 所述的一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法,其中所述的 pH 调节剂为碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠-磷酸氢钠中的一种或多种。

8. 一种检测日本血吸虫抗体的方法,它包括以下步骤:

a、免疫反应:取培养板若干,每孔中加入 pH7.2 的 PBS 磷酸盐缓冲液 150~250 μL,取日本血吸虫病人血清等比稀释,然后加固载了日本血吸虫卵抗原的高分子胶乳试剂 10~20 μL,摇匀,并以 pH7.2 的 PBS、正常人血清作对照;

b、检测:以凝集出现快慢,凝集颗粒大小,边缘凝集厚度及中间清亮现象判断凝集程度,出现自凝现象即感染日本血吸虫。

9. 根据权利要求 8 所述的一种检测日本血吸虫抗体的方法,其中所述的高分子胶乳试剂由下述方法制备:

(1)、将丙烯酸酯单体与苯乙烯、交联剂加入到去离子水、引发剂、pH 调节剂组成的混合乳液中,按照滴加法进行无皂乳液聚合,获得高分子乳液,将制得的乳液进行离心分离,倾去上层清液,加去离子水稀释后再离心分离,纯化后的胶乳用去离子水稀释至固含量为 1~3%,得到高分子胶乳备用;其中高分子胶乳的反应体系中,各组分的重量百分比含量如

下：引发剂 0.10 ~ 0.50%、交联剂 0.31 ~ 1.94%、苯乙烯 4 ~ 12%、丙烯酸酯单体 2 ~ 10%、丙烯酸 0.16 ~ 2.44%、pH 调节剂 0.17 ~ 0.87%、余量为水；

(2) 将高分子胶乳离心分离后取下层沉淀物，加 NaCl 溶液洗涤分散，再加入乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐，在 4℃ 下反应 2 小时后，在 4℃、0.1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液中透析，然后离心分离，在沉淀中加磷酸盐缓冲液重新分散沉淀物，加日本血吸虫病虫卵抗原和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐，室温放置 1~4 小时，然后离心分离，沉淀物用磷酸盐缓冲液洗涤干净，将沉淀物用磷酸盐缓冲液分散。

10. 根据权利要求 9 所述的一种检测日本血吸虫抗体的方法，其中所述的丙烯酸酯单体为丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸正丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯、甲基丙烯酸正丁酯或甲基丙烯酸异丁酯中的一种或多种；所述的引发剂为过硫酸铵、过硫酸钾、双氧水、硫酸亚铁中的一种或多种；所述的苯乙烯为甲基苯乙烯或乙基苯乙烯；所述的交联剂为二乙烯基苯、丙烯酸、丙烯酸-β-羟乙酯、甲基丙烯酸-β-羟乙酯、丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺中一种或多种；所述的 pH 调节剂为碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠-磷酸氢钠中的一种或多种。

一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于寄生虫病免疫诊断技术领域，具体涉及一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 日本血吸虫病是一种由日本血吸虫引起的热带疾病。根据世界卫生组织 (WHO) 报道，每年有许多被感染上日本血吸虫病。由于我国日本血吸虫病流行区人口众多，故日本血吸虫病仍然是我国重点防治的寄生虫病之一。诊断是治疗疾病的一个关键环节。所以，快速、准确的诊断技术是一个有效控制疾病的先决条件。寻找简便、快速、价廉、便于推广应用、具有普查、临床实际诊断和疗效考察价值的检测方法，是当前迫切需要解决的问题。

[0003] 目前日本血吸虫病诊断主要有病原学诊断和免疫诊断两大类。病原学检查方法不易检出轻度感染病人和慢性病患者，而且多数病原学方法操作繁琐，已难以用于大规模筛选疾病。免疫诊断方法具有敏感性高、使用方便等优点，已逐渐成为临床和现场日本血吸虫病感染筛查的重要手段。现行的免疫诊断技术如酶联免疫吸附试验 (ELISA)、间接荧光试验 (IFA)、环卵沉淀试验 (COPT)、补体结合试验 (CF)、放射免疫试验 (RIA) 等方法，或是需要特殊的设备，或是检测时间太长，以及试剂需要特殊运输、储存条件等缺点，均不适宜在现场大规模应用。因此发明一种准确、简便、快速、低成本、不需要任何仪器设备的检测技术是当前日本血吸虫病诊断的迫切需要。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足，提供一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法。

[0005] 为解决上述技术问题，本发明采用以下技术方案：它包括以下步骤：

[0006] (1)、将丙烯酸酯单体与苯乙烯、交联剂加入到去离子水、引发剂、pH 调节剂组成的混合乳液中，按照滴加法进行无皂乳液聚合，获得高分子乳液，将制得的乳液进行离心分离，倾去上层清液，加去离子水稀释后再离心分离，纯化后的胶乳用去离子水稀释至固含量为 1-3%，得到高分子胶乳备用；

[0007] (2)、将高分子胶乳离心分离后取下层沉淀物，加 NaCl 溶液洗涤分散，再加入乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC)，在 4℃ 下反应 2 小时后，在 4℃、0.1mol·L⁻¹NaCl 溶液中透析，然后离心分离，在沉淀中加磷酸盐缓冲液重新分散沉淀物，加日本血吸虫病虫卵抗原和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC)，室温放置 1-4 小时，然后离心分离，沉淀物用磷酸盐缓冲液洗涤干净，将沉淀物用磷酸盐缓冲液分散。

[0008] 其中步骤 (1) 的高分子胶乳的反应体系中，各组分的重量百分比含量如下：

[0009] 引发剂 0.10 ~ 0.50%、交联剂 0.31 ~ 1.94%、苯乙烯 4 ~ 12%、丙烯酸酯单体 2 ~ 10%、丙烯酸 0.16 ~ 2.44%、pH 调节剂 0.17 ~ 0.87%、余量为水。

[0010] 所述的丙烯酸酯单体为丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸正丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯、甲基丙烯酸正丁酯或甲基丙烯酸异丁酯中的一种或多种；所述的引发剂为过硫酸铵、过硫酸钾、双氧水、硫酸亚铁中的一种或多种；所述的苯乙烯为甲基苯乙烯或乙基苯乙烯；所述的交联剂为二乙烯基苯、丙烯酸、丙烯酸- β -羟乙酯、甲基丙烯酸- β -羟乙酯、丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺中一种或多种；所述的pH调节剂为碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠-磷酸氢钠中的一种或多种。进行离心分离时，离心时间为15分钟，转速为15000-20000rpm。

[0011] 一种检测日本血吸虫抗体的方法，它包括以下步骤：

[0012] a、免疫反应：取培养板若干，每孔中加入pH7.2的PBS磷酸盐缓冲液150-250 μ L，取日本血吸虫病人血清等比稀释，然后加固载了日本血吸虫卵抗原的高分子胶乳试剂10-20 μ L，摇匀，并以pH7.2的PBS、正常人血清作对照；

[0013] b、检测：以凝集出现快慢，凝集颗粒大小，边缘凝集厚度及中间清亮现象判断凝集程度，出现自凝现象即感染日本血吸虫。

[0014] 其中所述的高分子胶乳试剂由下述方法制备：

[0015] (1)、将丙烯酸酯单体与苯乙烯、交联剂加入到去离子水、引发剂、pH调节剂组成的混合乳液中，按照滴加法进行无皂乳液聚合，获得高分子乳液，将制得的乳液进行离心分离，倾去上层清液，加去离子水稀释后再离心分离，纯化后的胶乳用去离子水稀释至固含量为1-3%，得到高分子胶乳备用；其中高分子胶乳的反应体系中，各组分的重量百分比含量如下：引发剂0.10~0.50%、交联剂0.31~1.94%、苯乙烯4~12%、丙烯酸酯单体2~10%、丙烯酸0.16~2.44%、pH调节剂0.17~0.87%、余量为水；

[0016] (2)、将高分子胶乳离心分离后取下层沉淀物，加NaCl溶液洗涤分散，再加入乙基[3-(二甲胺基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)，在4℃下反应2小时后，在4℃、0.1mol·L⁻¹NaCl溶液中透析，然后离心分离，在沉淀中加磷酸盐缓冲液重新分散沉淀物，加日本血吸虫病虫卵抗原和EDC，室温放置1-4小时，然后离心分离，沉淀物用磷酸盐缓冲液洗涤干净，将沉淀物用磷酸盐缓冲液分散。

[0017] 所述的丙烯酸酯单体为丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸正丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯、甲基丙烯酸正丁酯或甲基丙烯酸异丁酯中的一种或多种；所述的引发剂为过硫酸铵、过硫酸钾、双氧水、硫酸亚铁中的一种或多种；所述的苯乙烯为甲基苯乙烯或乙基苯乙烯；所述的交联剂为二乙烯基苯、丙烯酸、丙烯酸- β -羟乙酯、甲基丙烯酸- β -羟乙酯、丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺中一种或多种；所述的pH调节剂为碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠-磷酸氢钠中的一种或多种。

[0018] 本发明的优点：

[0019] 1、耗材少。实验过程中，每个样品及所需试剂都是微升级。

[0020] 2、检测灵敏度高，检测下限低。传统的方法，在将血清稀释300多倍后就无法测出信号，而该方法能将稀释比率提高到1:1280，检测下限可达到1:5120。

[0021] 3、检测速度快。仅需几分钟到十五分钟。而目前在临床中诊断日本血吸虫病的间接红细胞凝集实验(IHA)需四十五分钟才能出现凝集。

[0022] 4、特异性好。

[0023] 5、检测不需要任何仪器设备，所需试剂便于携带，价格低廉。

[0024] 6、可重复性高。所选活性的胶乳在各种效价滴度时的凝聚强度和出现凝聚的时间测试重现性为 100%。

[0025] 7、准确率高。在一定滴度下对血吸虫病阴、阳性检出率均为 100%

附图说明

[0026] 图 1 为本发明固载 SJ-SEA 致敏胶粒凝聚透射电镜图片

[0027] (a) 正常人血清 ;(b) (c) 感染日本血吸虫病人血清。

具体实施方式

[0028] 下面通过实施例对本发明作进一步说明,其目的仅在于更好理解本发明的内容而非限制本发明的保护范围:

[0029] 实施例 1

[0030] 1、高分子胶乳制备 :在装有搅拌器、冷凝管、氮气导入管及温度计的四颈瓶中依次加入 8 份苯乙烯、2 份甲基丙烯酸甲酯、0.5 份二乙烯基苯、0.2 份碳酸氢钠和 68 份去离子水,通入氮气,在搅拌下升温至 50 ~ 60 °C 时,加入 0.1 份过硫酸铵,搅拌速度为 200rpm,于 84°C 反应 4 小时后滴加丙烯酸水溶液 (1 份丙烯酸与 20 份水的混合液),滴完后反应 4 小时,升温蒸去未反应的单体,将制得的乳液在 4000rpm 转速下离心 30min,倾去上层清液,加蒸馏过的去离子水稀释,再离心 - 倾析,反复 3 次,纯化胶乳用蒸馏过的去离子水稀释至固含量 2%,得到高分子胶乳备用;

[0031] 2、高分子胶乳固载日本血吸虫抗原 :取固含量为 2% 的高分子胶乳 0.5ml,在 15000rpm 下离心 15min,去掉上层清液,取下层沉淀物,加 NaCl 溶液 0.5ml 洗涤分散,加 2mg 乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC),在 4°C 下反应 2 小时后,在 4°C 0.1mol·L⁻¹NaCl 溶液中透析过夜,15000rpm 离心 15min,沉淀中加入 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.5ml 重新分散沉淀物,加日本血吸虫病虫卵抗原 200 μL 和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 2mg,室温放置 2 小时,然后 15000rpm 离心 15min,沉淀用 PBS 溶液洗涤三次 (离心法),然后将沉淀用 PBS 分散备用,并将此试剂命名为 1 号试剂;

[0032] 3、取培养板若干,每孔中加入 PBS 溶液 200 μL,取日本血吸虫病人血清等比稀释至不同浓度,然后加 1 号试剂 10 μL,摇匀,观察凝聚程度。检测结果如表 1。

[0033] 表 1、1 号试剂与不同血清及 PBS 溶液 (空白) 的凝聚程度

[0034]

1:2560	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1280	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
稀释 比例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	
	感染日本血吸虫病人血清										正常人血清					空白对照			

[0035] 注 :+ :凝聚 - :不凝聚

[0036] 在 15 例血清样品中,10 例病人血清的检测结果均为阳性,5 例正常人血清的检测结果均为阴性,说明该试剂盒可以对日本血吸虫感染的人血清样进行快速、准确的测定,特异性好。

[0037] 实施例 2

[0038] 1、高分子胶乳制备:在装有搅拌器、冷凝管、氮气导入管及温度计的四颈瓶中依次加入 10 份苯乙烯、5 份甲基丙烯酸甲酯、0.7 份二乙烯基苯、0.5 份碳酸氢钠和 63 份去离子水,通入氮气,在搅拌下升温至 50 ~ 60℃ 时,加入 0.14 份过硫酸铵,搅拌速度为 200rpm,于 84℃ 反应 4 小时后滴加丙烯酸水溶液(1.3 份丙烯酸与 20 份水的混合液),滴完后反应 4 小时,升温蒸去未反应的单体,将制得的乳液在 4000rpm 转速下离心 30min,倾去上层清液,加蒸馏过的去离子水稀释,再离心 - 倾析,反复 3 次,纯化胶乳用蒸馏过的去离子水稀释至固含量 2%,得到高分子胶乳备用;

[0039] 2、高分子胶乳固载日本血吸虫抗原:取固含量为 2% 的高分子胶乳 0.5ml,在 15000rpm 下离心 15min,去上层清液,取下层沉淀物,加 NaCl 溶液 0.5ml 洗涤分散,加 2mg 乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐,在 4℃ 下反应 2 小时后,在 4℃ 0.1mol·L⁻¹ NaCl 溶液中透析过夜,15000rpm 离心 15min,沉淀中加 pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)0.5ml 重新分散沉淀物,加日本血吸虫病虫卵抗原 200 μL 和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 2mg,室温放置 2 小时,然后 15000rpm 离心 15min,沉淀用 PBS 洗涤三次(离心法),然后将沉淀用 PBS 分散备用,并将此试剂命名为 2 号试剂;

[0040] 3、取培养板若干,每孔中加入 PBS 溶液 200 μL,取日本血吸虫病人血清等比稀释至 1 : 1280,然后加 2 号试剂 10 μL,摇匀观察凝集程度。检测结果如表 2。

[0041] 表 1、2 号试剂与不同血清及 PBS(空白)的凝集程度

[0042]

1:2560	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1280	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
稀释 比例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	
	感染日本血吸虫病人血清											正常人血清				空白对照			

[0043] 注 :+ :凝聚 - :不凝聚

[0044] 在 15 例血清样品中,10 例病人血清的检测结果均为阳性,5 例正常人血清的检测结果均为阴性,说明该试剂盒可以对日本血吸虫感染的人血清样进行快速、准确的测定,特异性好。

[0045] 为了更进一步证实以上的结论可靠性,我们将通过透射电镜 (TEM) 观察血清的凝聚现象如图 1 :

[0046] 图 1 固载 SJ-SEA 致敏胶粒凝聚透射电镜图片 (TEM) (a) 正常人血清 ;(b) (c) 感染日本血吸虫病人血清病例。

[0047] 图 1(a) 乳胶粒子界面清晰可见,正常人血清没有改变这一状态,无凝聚现象,而(b) (c) 乳胶粒固载感染日本血吸虫病人血清,可明显看到特异凝聚的网状结构,其结果与表 1、2 的测试结果完全吻合,进一步说明我们所利用高分子胶乳试剂快速检测日本血吸虫抗体这种方法是完全可信的。

[0048] 实施例 3

[0049] 1、高分子胶乳制备 :在装有搅拌器、冷凝管、氮气导入管及温度计的四颈瓶中依次加入重量百分比为甲基苯乙烯 4%、甲基丙烯酸甲酯 2%、甲基丙烯酸乙酯 2、甲基丙烯酸丙酯 2%、二乙烯基苯 0.31%、碳酸氢钠 0.1%、碳酸钠 0.07% 和去离子水,通入氮气,在搅拌下升温至 50 ~ 60°C 时,加入过硫酸铵 0.10%、过硫酸钾 0.10%,搅拌速度为 200rpm,于 84°C 反应 4 小时后滴加丙烯酸 0.16%,滴完后反应 4 小时,升温蒸去未反应的单体,将制得的乳液在 4000rpm 转速下离心 30min,倾去上层清液,加蒸馏过的去离子水稀释,再离心 - 倾析,反复 3 次,纯化胶乳用蒸馏过的去离子水稀释至固含量 3%,得到高分子胶乳;

[0050] 2、高分子胶乳固载日本血吸虫抗原 :取固含量为 3% 的高分子胶乳 0.5ml,在 15000rpm 下离心 15min,去上层清液,取下层沉淀物,加 NaCl 溶液 0.5ml 洗涤分散,加 2mg 乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐,在 4°C 下反应 2 小时后,在 4°C 0.1mol·L⁻¹ NaCl 溶液中透析过夜,15000rpm 离心 15min,沉淀中加 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.5ml 重新分散沉淀物,加日本血吸虫病虫卵抗原 200 μL 和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 2mg,室温放置 2 小时,然后 15000rpm 离心 15min,沉淀用 PBS 洗涤三次 (离心法),然后将沉淀用 PBS 分散备用,并将此试剂命名为 3 号试剂;

[0051] 3、取培养板若干,每孔中加入 PBS 溶液 200 μL,取日本血吸虫病人血清等比稀释

至 1 : 1280, 然后加 3 号试剂 10 μ L, 摆匀观察凝集程度。检测结果出现自凝现象为阳性。不凝聚为阴性。

[0052] 实施例 4

[0053] 1、高分子胶乳制备 : 在装有搅拌器、冷凝管、氮气导入管及温度计的四颈瓶中依次加入重量百分比为乙基苯乙烯 12%、甲基丙烯酸甲酯 2%、甲基丙烯酸异丁酯 8%、二乙烯基苯 0.31%、丙烯酸 - β -羟乙酯 1.63%、碳酸钠 0.87% 和去离子水, 通入氮气, 在搅拌下升温至 50 ~ 60℃ 时, 加入双氧水 0.50%, 搅拌速度为 200rpm, 于 84℃ 反应 4 小时后滴加丙烯酸 2.44%, 滴完后反应 3 小时, 升温蒸去未反应的单体, 将制得的乳液在 4000rpm 转速下离心 30min, 倾去上层清液, 加蒸馏过的去离子水稀释, 再离心 - 倾析, 反复 3 次, 纯化胶乳用蒸馏过的去离子水稀释至固含量 1%, 得到高分子胶乳 ;

[0054] 2、高分子胶乳固载日本血吸虫抗原 : 取固含量为 1% 的高分子胶乳 0.5ml, 在 15000rpm 下离心 15min, 去上层清液, 取下层沉淀物, 加 NaCl 溶液 0.5ml 洗涤分散, 加 2mg 乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐, 在 4℃ 下反应 2 小时后, 在 4℃ 0.1mol·L⁻¹NaCl 溶液中透析过夜, 15000rpm 离心 15min, 沉淀中加 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.5ml 重新分散沉淀物, 加日本血吸虫病虫卵抗原 200 μ L 和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 2mg, 室温放置 2 小时, 然后 15000rpm 离心 15min, 沉淀用 PBS 洗涤三次 (离心法), 然后将沉淀用 PBS 分散备用, 并将此试剂命名为 4 号试剂 ;

[0055] 3、取培养板若干, 每孔中加入 PBS 溶液 200 μ L, 取日本血吸虫病人血清等比稀释至 1 : 2560, 然后加 4 号试剂 10 μ L, 摆匀观察凝集程度。检测结果出现自凝现象为阳性。不凝聚为阴性。

[0056] 实施例 5

[0057] 1、高分子胶乳制备 : 在装有搅拌器、冷凝管、氮气导入管及温度计的四颈瓶中依次加入重量百分比为甲基苯乙烯 8%、甲基丙烯酸甲酯 2%、甲基丙烯酸正丁酯 3%、甲基丙烯酸 - β -羟乙酯 0.81%、碳酸钠 0.87% 和去离子水, 通入氮气, 在搅拌下升温至 50 ~ 60℃ 时, 加入双氧水 0.50%, 搅拌速度为 200rpm, 于 84℃ 反应 4 小时后滴加丙烯酸 1.22%, 滴完后反应 2 小时, 升温蒸去未反应的单体, 将制得的乳液在 4000rpm 转速下离心 30min, 倾去上层清液, 加蒸馏过的去离子水稀释, 再离心 - 倾析, 反复 3 次, 纯化胶乳用蒸馏过的去离子水稀释至固含量 3%, 得到高分子胶乳 ;

[0058] 2、高分子胶乳固载日本血吸虫抗原 : 取固含量为 3% 的高分子胶乳 0.5ml, 在 15000rpm 下离心 15min, 去上层清液, 取下层沉淀物, 加 NaCl 溶液 0.5ml 洗涤分散, 加 2mg 乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐, 在 4℃ 下反应 2 小时后, 在 4℃ 0.1mol·L⁻¹NaCl 溶液中透析过夜, 15000rpm 离心 15min, 沉淀中加 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.5ml 重新分散沉淀物, 加日本血吸虫病虫卵抗原 200 μ L 和乙基 [3-(二甲胺基)丙基] 碳二亚胺盐酸盐 2mg, 室温放置 2 小时, 然后 15000rpm 离心 15min, 沉淀用 PBS 洗涤三次 (离心法), 然后将沉淀用 PBS 分散备用, 并将此试剂命名为 5 号试剂 ;

[0059] 3、取培养板若干, 每孔中加入 PBS 溶液 200 μ L, 取日本血吸虫病人血清等比稀释至 1 : 320, 然后加 5 号试剂 10 μ L, 摆匀观察凝集程度。检测结果出现自凝现象为阳性。不凝聚为阴性。

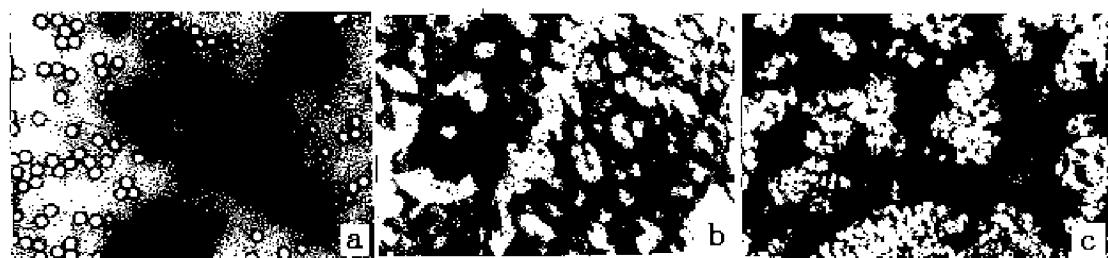


图 1

专利名称(译)	一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN102262153A	公开(公告)日	2011-11-30
申请号	CN201110102969.6	申请日	2011-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	湖北大学		
申请(专利权)人(译)	湖北大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖北大学		
[标]发明人	张金枝 柴仕淦 邹其超 陈照 贾钗 毛端平 程时远 闫翠娥		
发明人	张金枝 柴仕淦 邹其超 陈照 贾钗 毛端平 程时远 闫翠娥		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/96		
代理人(译)	马辉		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测日本血吸虫抗体的高分子胶乳试剂盒的制备方法和检测日本血吸虫抗体的方法。该高分子胶乳试剂盒负载一种高分子胶乳，所述高分子胶乳上分别固载了日本血吸虫病虫卵抗原(SJ-SEA)，通过固载血吸虫病虫卵抗原(SJ-SEA)于胶粒上，SJ-SEA致敏胶乳在一定滴度下对血吸虫病阴、阳性检出率均为100%。本发明的优点在于检测灵敏度高，检测下限低，检测速度快，特异性好，检测所需试剂便于携带，价格低廉，可重复性高，可以替代传统的病原学诊断和免疫诊断方法。

1:2560	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1280	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
稀释	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	
比例	感染日本血吸虫病人血清										正常人血清				空白对照				