



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212209 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811076255.0

(22)申请日 2018.09.14

(71)申请人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路201-209号

申请人 厦门市波生生物技术有限公司

(72)发明人 刘莉莉 杨天赐 童曼莉 林勇
朱晓桢 林丽蓉 张长弓

(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51)Int.Cl.

G01N 33/571(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/92(2006.01)

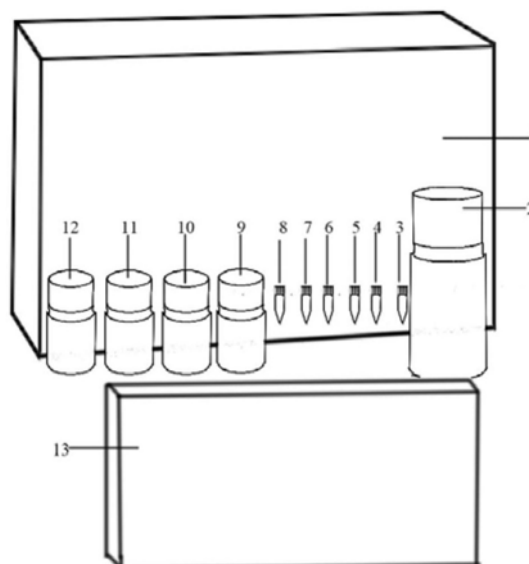
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法,涉及梅毒螺旋体。梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒设有心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒。1)提取梅毒螺旋体外膜;2)提取梅毒螺旋体心磷脂抗原;3)制备心磷脂抗原包被微孔板;4)制备抗人Ig单克隆抗体;5)标记抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶;6)提供校准品;7)提供显色液A;8)提供显色液B;9)制备浓缩洗涤液;10)制备反应终止液;11)制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒。采用梅毒螺旋体来源的心磷脂抗原,实现梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测。



1. 梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒, 其特征在于设有心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒; 所述辣根过氧化物酶标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液和校准品均装在相应的聚乙烯瓶中并与心磷脂抗原包被微孔板一起装在外包装盒内。

2. 如权利要求1所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

- 1) 提取梅毒螺旋体外膜;
- 2) 提取梅毒螺旋体心磷脂抗原;
- 3) 制备心磷脂抗原包被微孔板;
- 4) 制备抗人Ig单克隆抗体;
- 5) 标记抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶;
- 6) 提供校准品;
- 7) 提供显色液A;
- 8) 提供显色液B;
- 9) 制备浓缩洗涤液;
- 10) 制备反应终止液;
- 11) 制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒。

3. 如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于在步骤1) 中, 所述提取梅毒螺旋体外膜的具体方法为: 用超声裂解器充分裂解梅毒螺旋体, 8000r/min 4℃离心20min除去大的细菌碎片, 100 000g 4℃离心2h获得梅毒螺旋体外膜。

4. 如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于在步骤2) 中, 所述提取梅毒螺旋体心磷脂抗原的具体方法为: 取梅毒螺旋体外膜4mg, 加入1mL氯仿和0.5mL甲醇, 充分振荡, 并于37℃水浴20min, 再加入1.5mL甲醇, 振荡, 500g离心5min, 留取上清, 向上清液中加入3mL氯仿, 然后加入1.2mL溶液I, 500g离心5min, 溶液I分为2层, 用吸管吸走上层溶液, 然后沿管壁加入1.2mL溶液II, 旋转, 待分层后再将上层相吸走, 重复2次, 在微弱氮气流下将溶剂挥发, 获得梅毒螺旋体心磷脂抗原; 所述溶液I的组成可为1.80mmol/L CaCl_2 、1.79mmol/L MgCl_2 和49.57mmol/L NaCl 的水溶液; 所述溶液II的组成可为氯仿、甲醇和水, 所述氯仿、甲醇和水的体积比可为3:48:47。

5. 如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于在步骤3) 中, 所述制备心磷脂抗原包被微孔板的具体方法为: 将步骤3) 得到的梅毒螺旋体心磷脂抗原以质量体积浓度0.003%, 每孔25 μL 加入微孔板中, 4℃包被24h; 取出心磷脂抗原包被微孔板, 风干; 100 μL 用pH7.4磷酸盐缓冲液配制的胎牛血清溶液, 室温封闭1h, 取出后用磷酸盐缓冲液洗涤5次, 室温风干, 得心磷脂抗原包被微孔板, 密封备用。

6. 如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于在步骤4) 中, 所述制备抗人Ig单克隆抗体的具体方法为: 以人Ig为抗原免疫Balb/c小鼠, 通过杂交瘤技术, 筛选获得稳定分泌抗人Ig单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 采用酶联免疫吸附法鉴定McAb效价在 $1:10^7$ 以上。

7. 如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于

在步骤5)中,所述标记抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记。

8.如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤6)中,所述校准品是将高值梅毒螺旋体心磷脂抗体用校准品稀释液稀释,用国家标准品重复标定3次得3次标定值,取均值作为标定的梅毒螺旋体心磷脂抗体浓度;所述校准品稀释液由0.05mmol/L的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.01mmol/L的氯化钠的3%牛血清白蛋白组成,pH值7.4;梅毒螺旋体心磷脂抗体标准品浓度系列100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L,分装成0.5mL/瓶,在2~8℃下存放12个月,在-20℃下存放4年,备用。

9.如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤9)中,所述制备浓缩洗涤液的具体方法为:溶有Tween-20的磷酸盐缓冲液,其中Tween-20的终浓度为0.05%,使用时用蒸馏水进行20倍稀释;

在步骤10)中,所述制备反应终止液可采用配制2mmol/L的硫酸作为反应终止液。

10.如权利要求2所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤11)中,所述制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的具体方法为:将心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒共同组成梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒;所述辣根过氧化物酶标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品均装在相应的聚乙烯瓶中并与心磷脂抗原包被微孔板一起装在外包装盒内;所述校准品可包括100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L共6个浓度。

梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及梅毒螺旋体,尤其是涉及可获得梅毒螺旋体来源的心磷脂抗原,采用定量检测方法的梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 梅毒是由梅毒螺旋体引起的性传播性疾病,近年来在国内的发病率逐年上升,梅毒的防控已列为我国公共卫生服务的主要任务之一。

[0003] 梅毒螺旋体尚不能在体外培养,而直接病原学,如暗视野显微镜检查和镀银染色阳性率不高。血清学实验是梅毒临床诊断和疗效监测的主要方法,实验包括非特异性抗体和特异性抗体检测,非特异性抗体(也称心磷脂抗体)主要包括性病研究试验室玻片实验(VDRL)、不加热血清反应素试验(USR)、快速血浆反应素环状卡片试验(RPR)和甲苯胺红不加热试验(TRUST)等。其原理基本相同,均采用牛的心磷脂为抗原,与卵磷脂和胆固醇按照一定的比例进行混合,组成抗原颗粒,当抗原颗粒与梅毒心磷脂抗体反应后出现凝集现象(童曼莉,刘莉莉,林丽蓉,张惠林,杨天赐.梅毒实验诊断程序研究进展[J].中华检验医学杂志,2017,40(11))。临床通常将样本进行倍比稀释进行梅毒心磷脂抗体的滴度检测,以监测梅毒的治疗效果。但不能进行定量检测,无法判断患者梅毒心磷脂抗体的消长规律,不能提供疾病的治疗效果和预后的客观指标。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供可获得梅毒螺旋体来源的心磷脂抗原,定量分析梅毒螺旋体心磷脂抗体,实现梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测,可作为梅毒治疗效果和预后客观指标的梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒设有心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒;所述辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液和校准品均装在相应的聚乙烯瓶中并与心磷脂抗原包被微孔板一起装在外包装盒内。

[0006] 所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0007] 1)提取梅毒螺旋体外膜;

[0008] 在步骤1)中,所述提取梅毒螺旋体外膜的具体方法可为:用超声裂解器充分裂解梅毒螺旋体,8000r/min 4℃离心20min除去大的细菌碎片,100 000g 4℃离心2h获得梅毒螺旋体外膜。

[0009] 2)提取梅毒螺旋体心磷脂抗原;

[0010] 在步骤2)中,所述提取梅毒螺旋体心磷脂抗原的具体方法可为:取梅毒螺旋体外膜4mg,加入1mL氯仿和0.5mL甲醇,充分振荡,并于37℃水浴20min,再加入1.5mL甲醇,振荡,500g离心5min,留取上清,向上清液中加入3mL氯仿,然后加入1.2mL溶液I,500g离心5min,

溶液I分为2层,用吸管吸走上层溶液,然后沿管壁加入1.2mL溶液II,小心旋转,待分层后再将上层相吸走,重复2次,在微弱氮气流下将溶剂挥发,获得梅毒螺旋体心磷脂抗原;所述溶液I的组成可为1.80mmol/L CaCl_2 、1.79mmol/L MgCl_2 和49.57mmol/L NaCl 的水溶液;所述溶液II的组成可为氯仿、甲醇和水,所述氯仿、甲醇和水的体积比可为3:48:47。

[0011] 3) 制备心磷脂抗原包被微孔板;

[0012] 在步骤3)中,所述制备心磷脂抗原包被微孔板的具体方法可为:将步骤3)得到的梅毒螺旋体心磷脂抗原以质量体积浓度0.003%,每孔25 μL 加入微孔板中,4℃包被24h;取出心磷脂抗原包被微孔板,风干;100 μL 用pH7.4磷酸盐缓冲液配制的胎牛血清溶液,室温封闭1h,取出后用磷酸盐缓冲液洗涤5次,室温风干,得心磷脂抗原包被微孔板,密封备用。

[0013] 4) 制备抗人Ig单克隆抗体;

[0014] 在步骤4)中,所述制备抗人Ig单克隆抗体的具体方法可为:以人Ig为抗原免疫Balb/c小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳定分泌抗人Ig单克隆抗体的杂交瘤细胞株,采用酶联免疫吸附法鉴定McAb效价在 $1:10^7$ 以上。

[0015] 5) 标记抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶 (HRP);

[0016] 在步骤5)中,所述标记抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 可采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。

[0017] 6) 提供校准品;

[0018] 在步骤6)中,所述校准品可将高值梅毒螺旋体心磷脂抗体用校准品稀释液稀释,用国家标准品重复标定3次得3次标定值,取均值作为标定的梅毒螺旋体心磷脂抗体浓度;所述校准品稀释液由0.05mmol/L的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.01mmol/L的氯化钠的3%牛血清白蛋白组成,pH值7.4;梅毒螺旋体心磷脂抗体标准品浓度系列100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L,分装成0.5mL/瓶,在2~8℃下存放12个月,在-20℃下存放4年,备用;所述国家标准品可购自中国生物制品检定所。

[0019] 7) 提供显色液A;

[0020] 在步骤7)中,所述显色液A可采用市售品,所述市售品可采用厦门波生生物科技有限公司生产的市售品;

[0021] 8) 提供显色液B;

[0022] 在步骤8)中,所述显色液B可采用市售品;所述市售品可采用厦门波生生物科技有限公司生产的市售品;

[0023] 9) 制备浓缩洗涤液;

[0024] 在步骤9)中,所述制备浓缩洗涤液的具体方法可为:溶有Tween-20的磷酸盐缓冲液,其中Tween-20的终浓度为0.05%,使用时用蒸馏水进行20倍稀释。

[0025] 10) 制备反应终止液;

[0026] 在步骤10)中,所述制备反应终止液可采用配制2mmol/L的硫酸作为反应终止液。

[0027] 11) 制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒。

[0028] 在步骤11)中,所述制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的具体方法可为:将心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒共同组成梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒;所述辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗

涤液、反应终止液、校准品均装在相应的聚乙烯瓶中并与心磷脂抗原包被微孔板一起装在外包装盒内；所述校准品可包括100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L共6个浓度。

[0029] 本发明采用梅毒螺旋体来源的心磷脂抗原，实现梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测，可作为梅毒治疗效果和预后的客观指标。本发明的产品不仅可对梅毒患者体内的梅毒螺旋体心磷脂抗体进行定量，并且操作简单，结果准确，环保无污染，具有长远的好处。

附图说明

[0030] 图1为本发明所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒实施例的结构组成示意图。

[0031] 图2为本发明实施例的校准品检测结果示意图。

具体实施方式

[0032] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0033] 实施例1

[0034] 参见图1，所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒实施例设有心磷脂抗原包被微孔板13、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体9、显色液A 10、显色液B 11、浓缩洗涤液2、反应终止液12、校准品 (梅毒螺旋体心磷脂抗体100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L 6个浓度) 3~8和外包装盒1；所述辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体9、显色液A 10、显色液B 11、浓缩洗涤液2、反应终止液12和校准品3~8均装在相应的聚乙烯瓶中并与心磷脂抗原包被微孔板13一起装在外包装盒1内。

[0035] 所述梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒的制备方法包括以下步骤：

[0036] (1) 提取梅毒螺旋体外膜

[0037] 用超声裂解器充分裂解梅毒螺旋体，8000r/min 4℃离心20min除去大的细菌碎片，100000g 4℃离心2h获得梅毒螺旋体外膜。

[0038] (2) 提取梅毒螺旋体心磷脂抗原

[0039] 取梅毒螺旋体外膜4mg，加入1mL氯仿，0.5mL甲醇，充分振荡，并于37℃水浴20min。再加入1.5mL甲醇，振荡，500g离心5min，留取上清。向上清液中加入3mL氯仿，然后加入1.2mL溶液I。500g离心5min，溶液分为2层，用吸管吸走上层溶液，然后沿管壁缓慢加入1.2mL溶液II，小心旋转，待分层后再将上层相吸走，重复2次。在微弱氮气流下将溶剂挥发，获得梅毒螺旋体心磷脂抗原。所述溶液I的组成为含1.80mmol/L CaCl_2 、1.79mmol/L MgCl_2 和49.57mmol/L NaCl 的水溶液。所述溶液II的组成为氯仿、甲醇和水的体积比为3:48:47。

[0040] (3) 制备心磷脂抗原包被微孔板

[0041] 将步骤(2)得到的梅毒螺旋体心磷脂抗原以浓度0.003% (重量/体积)，每孔25μL加入微孔板中，4℃包被24h；取出抗原板，风干；100μL用pH7.4磷酸盐缓冲液配制的胎牛血清溶液，室温封闭1h，取出用磷酸盐缓冲液洗涤5次，风干，制备心磷脂抗原包被微孔板，密封备用。

[0042] (4) 制备抗人Ig单克隆抗体

[0043] 以人Ig为抗原免疫Balb/c小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳定分泌抗人Ig单克隆抗体的杂交瘤细胞株。采用酶联免疫吸附法鉴定McAb效价在 $1:10^7$ 以上。

[0044] (5) 抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记

[0045] 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。

[0046] (6) 校准品

[0047] 将高值梅毒螺旋体心磷脂抗体用校准品稀释液稀释,用国家标准品 (购自中国生物制品检定所) 重复标定3次得3次标定值,取均值作为标定的梅毒螺旋体心磷脂抗体浓度。所述的校准品稀释液由0.05mmol/L的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、0.01mmol/L的氯化钠的3%牛血清白蛋白组成,pH值7.4。梅毒螺旋体心磷脂抗体标准品浓度系列100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L,分装成0.5mL/瓶,2~8℃ (12个月) 或-20℃ (4年) 存放备用。

[0048] (7) 显色液A为市售品;为厦门波生生物科技有限公司生产;

[0049] (8) 显色液B为市售品;为厦门波生生物科技有限公司生产;

[0050] (9) 浓缩洗涤液

[0051] 浓缩洗涤液为溶有Tween-20的磷酸盐缓冲液,其中Tween-20的终浓度为0.05%,使用时用蒸馏水进行20倍稀释。

[0052] (10) 反应终止液

[0053] 配制2mmol/L的硫酸作为反应终止液;

[0054] (11) 制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒

[0055] 心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒共同组成的梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒。所述校准品包括100mmol/L、50mmol/L、20mmol/L、5mmol/L、2mmol/L、0mmol/L共6个浓度。所述辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品均装在相应的聚乙烯瓶中。

[0056] 实施例2

[0057] 以下给出采用梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒检测患者的临床标本中的梅毒螺旋体心磷脂抗体:

[0058] (1) 标本处理:血清:静脉血5mL,置37℃水浴30min,3000g离心10min,上清为检测样品备用。

[0059] (2) 加样:加100μL的标本于微孔板中,同时作空白和校准品。37℃孵育1h。

[0060] (3) 洗涤:37℃反应30min后,被测定的梅毒螺旋体心磷脂抗体与微孔板上包被的心磷脂抗原结合,洗涤分离未结合的游离成分;

[0061] (4) 加酶:在每孔中加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗人Ig单克隆抗体各100μL,置37℃孵育30min。

[0062] (5) 洗涤:用洗涤缓冲液洗五次后扣干。

[0063] (6) 显色:于每反应孔中依次加入底物A、底物B各50μL,置37℃孵育15min。

[0064] (7) 测定:每孔中加入反应终止液50μL,然后在450nm处读取各孔的吸光度值。

[0065] (8) 结果判断:样品450nm处读取各孔的吸光度值与待测梅毒螺旋体心磷脂抗体浓

度正相关。样品中的待测物浓度依据由待测标准品浓度和对应的吸光度值建立的数学方程进行定量,图2所示为标准品检测曲线,其中横坐标为标准品浓度值,纵坐标为吸光度值,可以通过样品也相应的吸光度值,算出待测样本的梅毒螺旋体心磷脂抗体浓度。

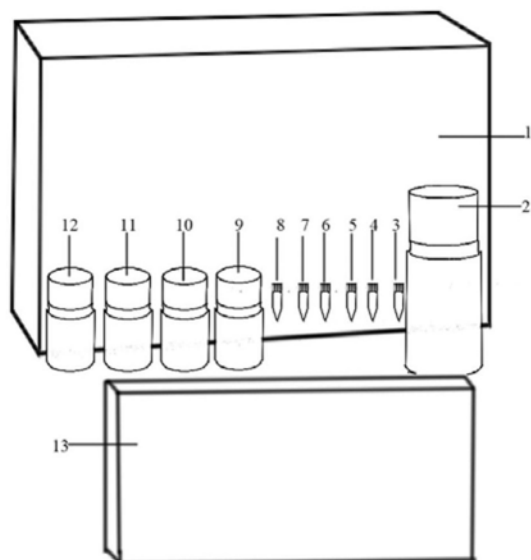


图1

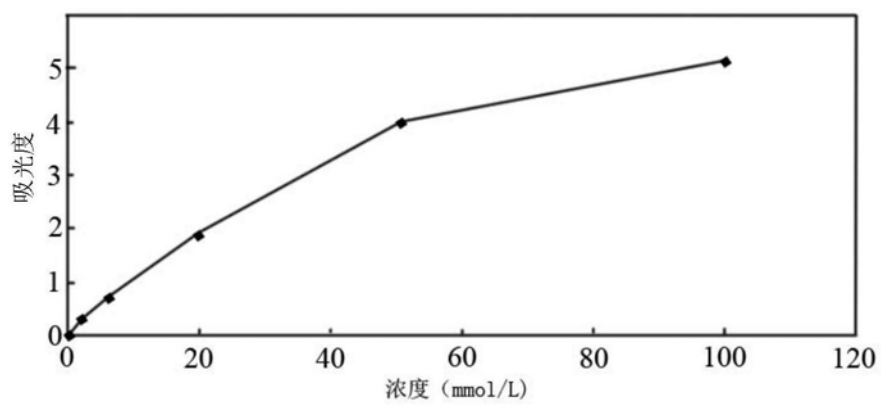


图2

专利名称(译)	梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109212209A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811076255.0	申请日	2018-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院 厦门市波生生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院 厦门市波生生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院 厦门市波生生物技术有限公司		
[标]发明人	刘莉莉 杨天赐 童曼莉 林勇 朱晓桢 林丽蓉 张长弓		
发明人	刘莉莉 杨天赐 童曼莉 林勇 朱晓桢 林丽蓉 张长弓		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/535 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/535 G01N33/571 G01N2800/26 G01N2800/52		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒及其制备方法，涉及梅毒螺旋体。梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒设有心磷脂抗原包被微孔板、辣根过氧化物酶标记的抗人Ig单克隆抗体、显色液A、显色液B、浓缩洗涤液、反应终止液、校准品和外包装盒。1)提取梅毒螺旋体外膜；2)提取梅毒螺旋体心磷脂抗原；3)制备心磷脂抗原包被微孔板；4)制备抗人Ig单克隆抗体；5)标记抗人Ig单克隆抗体的辣根过氧化物酶；6)提供校准品；7)提供显色液A；8)提供显色液B；9)制备浓缩洗涤液；10)制备反应终止液；11)制备梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测试剂盒。采用梅毒螺旋体来源的心磷脂抗原，实现梅毒螺旋体心磷脂抗体定量检测。

