



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102279259 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 14

(21) 申请号 201010197684. 0

(22) 申请日 2010. 06. 10

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 207 号

(72) 发明人 陈韶红 陈家旭 李浩 周晓农
张永年 郭俭

(74) 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司 31128

代理人 严新德

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/78 (2006. 01)

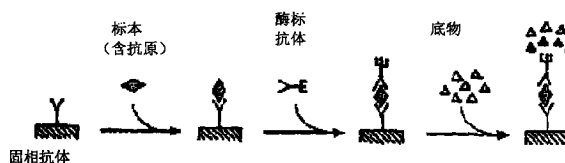
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒, 含有兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体、酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体、硝酸纤维薄膜、小牛血清白蛋白、PBST 洗涤液、底物显色液、阳性对照样本、阴性对照样本和聚乙烯反应板。本发明还提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的制备方法。本发明采用双抗体夹心法 Dot-ELISA 检测卫氏并殖吸虫循环抗原, 敏感性高、特异性强, 可实现并殖吸虫病的快速诊断和疗效考核。



1. 一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:含有兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体、酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体、硝酸纤维薄膜、小牛血清白蛋白的 PBST 溶液、PBST 洗涤液、底物显色液、阳性对照样本、阴性对照样本和聚乙烯反应板。

2. 如权利要求 1 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:所述的聚乙烯反应板采用 96 孔聚乙烯反应板。

3. 如权利要求 1 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:所述的小牛血清白蛋白的 PBST 溶液由小牛血清白蛋白和 PBST 洗涤液组成,所述的小牛血清白蛋白和 PBST 洗涤液的重量比为:1 : 99。

4. 如权利要求 1 或 3 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:所述的 PBST 洗涤液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl、吐温-20 和水组成,在配制 PBST 洗涤液的过程中,包括一个先配制基液的步骤,所述的基液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的氯化钠在所述的基液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,余量为水,配制好基液后,再加入吐温-20,每 100ml 中加入 0.5ml 吐温-20,所述的 PBST 洗涤液的 PH 值为 7.4。

5. 如权利要求 1 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:所述的试剂盒中的底物显色液由 A 液、B 液和 C 液组成,所述的 A 液由 3-3'-二氨基邻苯胺、氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的 3-3'-二氨基邻苯胺在 A 液中的重量百分比为 0.1%,所述的氯化钠在 A 液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在 A 液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在 A 液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在 A 液中的重量百分比为 0.02%,余量为 A 液中的水,所述的 B 液由 4-氯-1-萘酚、甲醇、氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的 4-氯-1-萘酚在 B 液中的重量百分比为 0.05%,所述的甲醇在 B 液中的重量百分比为 20%,所述的氯化钠在 B 液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在 B 液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在 B 液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在 B 液中的重量百分比为 0.02%,余量为 B 液中的水;所述的 C 液为过氧化氢的水溶液,所述的过氧化氢在水溶液中的重量百分比或者浓度为 30%。

6. 如权利要求 1 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:所述的阳性对照样本为并殖吸虫病人血清。

7. 如权利要求 1 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,其特征在于:所述的阴性对照样本为正常人血清。

8. 一种制备如权利要求 1 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的方法,其特征在于:所述的方法中包括了一个制备兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体的步骤、一个制备酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体的步骤和一个在试剂盒中放置硝酸纤维薄膜、小牛血清白蛋白、PBST 洗涤液、底物显色液、阳性对照样本、阴性对照样本、聚乙烯反应板的步骤。

9. 如权利要求 8 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:在所述的制备兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体的步骤中,首先从感染卫氏并殖吸虫囊蚴的家犬肺部分离取成虫,制备成虫可溶性抗原,免疫家兔,纯化兔抗卫氏并殖吸虫

成虫可溶性抗原的多克隆抗体。

10. 如权利要求 8 所述的检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:在所述的制备酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体的步骤中,采用双扩散法检测兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体的效价,收取兔血清,纯化抗体,提取 IgG,用过碘酸盐标记法标酶。

一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒及其制备方法

技术领域：

[0001] 本发明属于生物技术领域，尤其涉及一种试剂盒及其制备方法，具体来说是一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒及其制备方法。

背景技术：

[0002] 并殖吸虫病（肺吸虫病）是一种危害人体健康的食源性寄生虫病。在中国发现已有 125 年的历史。首例是 Ringer 在台湾葡籍水兵肺中发现。目前世界上报告的虫种已有 50 余种，其中我国各地报告有 28 种之多，而且在我国的二十多个省（区）陆续发现有本病的报告。近年来，随着改革开放的深入，由于人口的流动，人们饮食结构的改变，并殖吸虫病人出现由农村向城市蔓延的趋势，并殖吸虫病成为我国主要的寄生虫病之一。但由于并殖吸虫病临床表现的多样性与复杂性，误诊、误治的情况时有发生。

[0003] 以往对于并殖吸虫引起的并殖吸虫病诊断主要是痰液或粪便中找到虫卵，但显微镜检查往往需要有经验的专门人员操作，且费时、耗力。尤其是有些并殖吸虫如斯氏并殖吸虫，异盘并殖吸虫等引起的肺外型并殖吸虫病则很少或不能查到虫卵，使传统的诊断方法受到了严峻的挑战。

[0004] 近几年来血清免疫学方法应用于并殖吸虫病的诊断取得了可喜的结果。目前临床上常用的并殖吸虫病血清学诊断方法主要是检测血清内特异性抗体，主要检测方法有：酶联免疫吸附试验（ELISA）；间接血凝试验（IHA），对流免疫电泳法（CIE）来检测并殖吸虫病患者血清内特异性抗体，但抗体检测方法经常发现会与肺部肿瘤及其他吸虫病有交叉假阳性反应。因此，研制开发并殖吸虫病循环抗原的检测（CAg）具有十分重要意义，并可用此法取代目前检测抗体无法进行早期诊断及临床疗效考核预后判定之弊端。

[0005] 冯笑川等应用抗卫氏并殖吸虫成虫 IgG 的双抗体夹心 ELISA 检测 58 例并殖吸虫病患者治疗前后的血清特异性循环抗原，转阴率达 100%，而检测抗体的转阴率仅 48%，证明检测循环抗原可考核疗效，优于检测抗体。

发明内容：

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒及其制备方法，所述的这种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒及其制备方法要解决现有技术中检测并殖吸虫病的方法费时、耗力而且不准确的技术问题。

[0007] 本发明提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒，含有兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体（兔抗-PW-IgG）、酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体（HRP-PW-IgG）、硝酸纤维薄膜、小牛血清白蛋白的 PBST 溶液、PBST 洗涤液、底物显色液（A 液、B 液、C 液）、阳性对照样本、阴性对照样本、聚乙烯反应板。

[0008] 进一步的，聚乙烯反应板采用 96 孔聚乙烯反应板。

[0009] 进一步的，所述的小牛血清白蛋白的 PBST 溶液由小牛血清白蛋白和 PBST 洗涤液组成，所述的小牛血清白蛋白和 PBST 洗涤液的重量比为：1：99。

[0010] 进一步的,所述的 PBST 洗涤液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl、吐温-20 和水组成,在配制 PBST 洗涤液的过程中,包括一个先配制基液的步骤,所述的基液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的氯化钠在所述的基液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,余量为水,基液配制完成后,再加入吐温-20,每 100ml 中加入 0.5ml 吐温-20,所述的 PBST 洗涤液的 pH 值为 7.4。

[0011] 进一步的,所述的试剂盒中的底物显色液由 A 液、B 液和 C 液组成,所述的 A 液由 3-3-二氨基邻苯胺、氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的 3-3-二氨基邻苯胺在 A 液中的重量百分比为 0.1%,所述的氯化钠在 A 液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在 A 液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在 A 液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在 A 液中的重量百分比为 0.02%,余量为所述的水;所述的 B 液由 4-氯-1-萘酚、甲醇、氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的 4-氯-1-萘酚在 B 液中的重量百分比为 0.05%,所述的甲醇在 B 液中的重量百分比为 20%,所述的氯化钠在 B 液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在 B 液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在 B 液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在 B 液中的重量百分比为 0.02%,余量为所述的水;所述的 C 液为过氧化氢的水溶液,所述的过氧化氢在水溶液中的重量百分比或者浓度为 30%。

[0012] 具体的,采用试剂盒进行检测时,取 A 液+B 液等量混合后,每 100 毫升混合液中加 C 液 40 μ l 混合后使用。

[0013] 进一步的,所述的阳性对照样本为并殖吸虫病人血清。

[0014] 进一步的,所述的阴性对照样本为正常健康人血清。

[0015] 本发明还提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的制备方法,包括一个制备兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(兔抗-PW-IgG)的步骤、一个制备酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(HRP-PW-IgG)的步骤,还包括一个在试剂盒中放置硝酸纤维薄膜、1%小牛血清白蛋白(BSA)、PBST 洗涤液、底物显色液(A 液、B 液、C 液)、阳性对照样本、阴性对照样本、聚乙烯反应板的步骤。

[0016] 进一步的,一个制备兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(兔抗-PW-IgG)的步骤如下:

[0017] 从感染卫氏并殖吸虫囊蚴的家犬肺部分离取成虫,制备成虫可溶性抗原,测得蛋白含量为 18.8mg/ml,用卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原(PWA)50 μ g 与等体积的弗氏完全佐剂混合,充分乳化后对家兔进行部皮下多点免疫法免疫家兔,4 周后用 PWA 抗原与等体积弗氏不完全佐剂加强免疫一次,剂量同上。一共进行三次免疫,ELISA 法测得家兔免疫后的抗体水平为 1 : 400000。采用盐析法纯化多抗(兔抗-PW-IgG),ELISA 测得多抗的效价为 1 : 40000,用双扩散法检测抗体的效价为 1 : 64,收取兔血清。用并殖吸虫成虫可溶性抗原免疫家兔获取抗血清,经饱和硫酸铵提纯,用二乙氨基乙基纤维素(DEAE)纤维素离子交换柱层析纯化,得到兔抗卫氏并殖吸虫的多克隆抗体(PW-IgG)。

[0018] 进一步的,一个制备酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(HRP-PW-IgG)的步骤是采用双扩散法检测兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体的效价,收取兔血清,纯化抗体,提取 IgG,用过碘酸盐标记法标酶(HRP-兔抗-PW-IgG)。

[0019] 所述的标记物的标记酶为辣根过氧化物酶(horseradishperoxidase,HRP)。辣根

过氧化物酶 (HRP) 标记抗体的常用方法是过碘酸钠法。其原理是 HRP 的糖基用过碘酸钠氧化成醛基,加入抗体 IgG 后该醛基与 IgG 氨基结合,形成 Schiff 氏碱。为了防止 HRP 中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合,在用过碘酸钠氧化先用二硝基氟苯阻断氨基。氧化反应未了,用硼氢化钠稳定 Schiff 氏碱。

[0020] 本发明的工作原理是:将兔抗-PW-IgG 点于硝酸纤维薄膜上,即特异性抗体结合到固相载体(硝酸纤维薄膜)上形成固相抗体,加待检血清(含抗原),多抗与待检血清中的相应抗原结合形成免疫复合物,洗涤后加酶标记的抗卫氏并殖吸虫多克隆抗体(HRP-PW-IgG),与免疫复合物中抗原结合形成酶标抗体-抗原-固相抗体复合物,加底物显色,判断血清中是否有循环抗原。本发明采用双抗体夹心法 Dot-ELISA 检测卫氏并殖吸虫循环抗原(CAg),敏感性高、特异性强,可实现并殖吸虫病的快速诊断和疗效考核。

[0021] 本发明的诊断试剂盒采用多克隆抗体(PW-IgG)测定循环抗原具有以下优点:(1)在抗体出现前,已可测出抗原,有利于做出早期诊断。(2)循环抗原的含量与宿主体内寄生虫数量成正比,有助于预后的判定。(3)当体内虫体死亡后,循环抗原迅速消失,可用于疗效考核。

[0022] 本发明的试剂盒操作简便、快速;敏感性高、特异性强、重复性好、结果直观、无需专用设备、不受环境条件的干扰等优点,易于在广大群众中推广。

[0023] 本发明适合医院检验科、疾病防控中心、社康中心、私人诊所等部门用于卫氏并殖吸虫病(肺吸虫病)的临床辅助诊断、疗效考核和流行病学调查,具有很高的实用价值和可观的经济及社会效益。

附图说明:

[0024] 图 1 是采用本发明的试剂盒检测检测并殖吸虫病的原理图。

具体实施方式:

[0025] 实施例 1

[0026] 本发明提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒,含有兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(兔抗-PW-IgG)、酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(HRP-PW-IgG)、硝酸纤维薄膜、小牛血清白蛋白的 PBST 溶液、PBST 洗涤液、底物显色液(A 液、B 液、C 液)、阳性对照样本、阴性对照样本、聚乙烯反应板。

[0027] 进一步的,所述的小牛血清白蛋白的 PBST 溶液由小牛血清白蛋白和 PBST 洗涤液组成,所述的小牛血清白蛋白和 PBST 洗涤液的重量比为:1:99。

[0028] 进一步的,所述的 PBST 洗涤液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl、吐温-20 和水组成,在配制 PBST 洗涤液的过程中,包括一个先配制基液的步骤,所述的基液由氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的氯化钠在所述的基液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在所述的基液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在所述的基液中的重量百分比为 0.02%,余量为水,基液配制完成后,再加入吐温-20,每 100ml 中加入 0.5ml 吐温-20,所述的 PBST 洗涤液的 pH 值为 7.4。

[0029] 进一步的,聚乙烯反应板采用 96 孔聚乙烯反应板。

[0030] 进一步的,所述的试剂盒中的底物显色液由 A 液、B 液和 C 液组成,所述的 A 液由

3-3-二氨基邻苯胺、氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的 3-3-二氨基邻苯胺在 A 液中的重量百分比为 0.1%,所述的氯化钠在 A 液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在 A 液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在 A 液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在 A 液中的重量百分比为 0.02%,余量为所述的水;所述的 B 液由 4-氯-1-萘酚、甲醇、氯化钠、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl 和水组成,所述的 4-氯-1-萘酚在 B 液中的重量百分比为 0.05%,所述的甲醇在 B 液中的重量百分比为 20%,所述的氯化钠在 B 液中的重量百分比为 0.8%,所述的 KH_2PO_4 在 B 液中的重量百分比为 0.02%,所述的 Na_2HPO_4 在 B 液中的重量百分比为 0.29%,所述的 KCl 在 B 液中的重量百分比为 0.02%,余量为所述的水;所述的 C 液为过氧化氢的水溶液,所述的过氧化氢在水溶液中的重量百分比或者浓度为 30%。

[0031] 具体的,采用试剂盒进行检测时,取 A 液+B 液等量混合后,每 100 毫升混合液中加 C 液 40 μl 混合后使用。

[0032] 进一步的,所述的阳性对照样本为并殖吸虫病人血清。

[0033] 进一步的,所述的阴性对照样本为正常健康人血清。

[0034] 实施例 2

[0035] 本发明还提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的制备方法,包括一个制备兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(兔抗-PW-IgG)的步骤、一个制备酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(HRP-PW-IgG)的步骤,还包括一个在试剂盒中放置硝酸纤维薄膜、1%小牛血清白蛋白(BSA)、PBST 洗涤液、底物显色液、阳性对照样本、阴性对照样本、聚乙烯反应板的步骤。

[0036] 1. 制备兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(兔抗-PW-IgG)和酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体(HRP-PW-IgG)的步骤如下:

[0037] 从感染卫氏并殖吸虫囊蚴的家犬肺部分离取成虫,制备成虫可溶性抗原,测得蛋白含量为 18.8mg/ml,用卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原(PWA)50 μg 与等体积的弗氏完全佐剂混合,充分乳化后对家兔进行部皮下多点免疫法免疫家兔,4 周后用 PWA 抗原与等体积弗氏不完全佐剂加强免疫一次,剂量同上。一共进行三次免疫,ELISA 法测得家兔免疫后的抗体水平为 1 : 400000,采用盐析法纯化多抗(兔抗-PW-IgG),ELISA 测得多抗的效价为 1 : 40000,用双扩散法检测抗体的效价为 1 : 64,收取兔血清。用并殖吸虫成虫可溶性抗原免疫家兔获取抗血清,经饱和硫酸铵提纯,用二乙氨基乙基纤维素(DEAE)纤维素离子交换柱层析纯化,得到抗卫氏并殖吸虫的多克隆抗体(PW-IgG)。具体的操作步骤如下:

[0038] (1) 饱和硫酸铵溶液的配制:500g 硫酸铵加入 500ml 蒸馏水中,加热至完全溶解,室温过夜,析出的结晶任其留在瓶中。临用前取所需的量,用 2mol/L NaOH 调 pH 至 7.8。

[0039] (2) 盐析:吸取 10ml 兔血清(兔抗-PW-IgG)移入小烧杯中,在搅拌下,滴加饱和硫酸铵溶液 5.0ml;继续缓慢搅拌 30min;10000r/min 离心 15min;弃去上清液,沉淀物用 1/3 饱和度硫酸铵悬浮,搅拌作用 30min,同法离心;重复前一步 1 ~ 2 次;沉淀物溶于 1.5ml PBS(0.01mol/L pH7.2) 或 Tris-HCl 缓冲液中。

[0040] (3) 脱盐:将盐析样品过 Sephadex G-50 层析柱,以 PBS 或 Tris-HCl 缓冲液作为平衡液和洗脱液,流速 1ml/min。第一个蛋白峰即为脱盐的抗体溶液。透析法是将透析袋于 2% NaHCO_3 ,1mmol/L EDTA 溶液中煮 10min,用蒸馏水清洗透析袋内外表面,再用蒸馏水煮透析袋 10min,冷至室温即可使用(并可于 0.2mol/L EDTA 溶液中,4℃ 保存备用)。将盐

析样品装入透析袋中,对 50 ~ 100 倍体积的 PBS 或 Tris-HCl 缓冲液透析 (4℃) 12 ~ 24 小时,其间更换 5 次透析液,用萘氏试剂 (碘化汞 11.5g,碘化钾 8g,加蒸馏水 50ml,待溶解后,再加 20% NaOH 50ml) 检测,直至透析外液无黄色物形成为止。

[0041] (4) 蛋白质含量的测定: $(Pr) (mg/ml) = (1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}) \times \text{稀释倍数}$; 或 $(Pr) = OD_{280} \times \text{稀释倍数} / 3$

[0042] 2. 制备酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体 (HRP-PW-IgG) 的步骤如下:

[0043] 采用过碘酸盐标记法标酶 (HRP-兔抗-PW-IgG)。所述的标记物的标记酶为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体的常用方法是过碘酸钠法。其原理是 HRP 的糖基用过碘酸钠氧化成醛基,加入抗体 IgG 后该醛基与 IgG 氨基结合,形成 Schiff 氏碱。为了防止 HRP 中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合,在用过碘酸钠氧化先用二硝基氟苯阻断氨基。氧化反应末了,用硼氢化钠稳定 Schiff 氏碱。其操作步骤如下:

[0044] ①将 5mg HRP 溶于 0.5ml 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液中;加 0.5ml 10mmol/L NaIO₄ 溶液,混匀,盖紧瓶塞,室温避光作用 2 小时;

[0045] ②加 0.75ml 10.1mol/L Na₂CO₃ 混匀;

[0046] ③加入 0.75ml 兔血清 (多抗),混匀;

[0047] ④称取 Sephadex G25 干粉 0.3g,加入一支下口垫玻璃棉的 5ml 注射器外筒内;随后将上述交联物移入注射器外套;盖紧,室温作用 (避光) 3 小时或 4℃ 过夜;

[0048] ⑤用少许 PBS 将交联物全部洗出,收集洗出液,加 1/20V 体积新鲜配制的 5mg/ml NaBH₄ 溶液,混匀,室温作用 30min;再加入 3/20V NaBH₄ 溶液,混匀,室温作用 1 小时 (或 4℃ 过夜);

[0049] ⑥将交联物过 Sephadex G200 或 Sepharose 6B (2.5×50cm) 层析纯化,分管收集第一峰;

[0050] ⑦酶结合物质量鉴定:酶活性和抗体活性的测定,应用 ELISA 法、免疫扩散、DAB-H₂O₂ 显色反应测定酶结合物的酶活性,抗体活性及效价、特异性;

[0051] ⑧ HRP 抗体结合物的保存:加入等量甘油后,小量分装 -20℃ 存放,防止反复冻融;或加入等量 60% 甘油 4℃ 保存;不宜加 NaN₃ 或酚防腐,否则会影响酶活性,必要时还可以冻干保存,以 BSA 或脱脂牛奶作保护剂。

[0052] 实施例 3

[0053] 采用本发明的试剂盒检测并殖吸虫病的操作步骤:

[0054] (1) 将兔抗-PW-IgG 稀释成 200 μg/ml,用点样器吸取 1 μl 抗体于硝酸纤维薄膜上,室温包被 10 分钟。

[0055] (2) 封闭:将包被好的膜片浸入 1% 小牛血清白蛋白的 PBST 溶液 (BSA), 37℃, 15 分钟。

[0056] (3) 洗涤:将封好的膜用洗涤液洗 3 次,每次 3 分钟晾干,即为“快诊膜”。

[0057] (4) 被检抗原:“快诊膜”按方格剪下,光面向上,放入 96 孔聚乙烯反应板孔内,每孔加被检血清 100 μl,同时设空白 (PBS)、阴性和阳性样品对照,37℃ 1h。

[0058] (5) 洗涤同 (3)

[0059] (6) 酶标记 HRP-PW-IgG :将酶标抗体 1 : 50 稀释后,每孔加 100 μ l, 37℃ 1h。

[0060] (7) 洗涤同 (3)

[0061] (8) 底物 :取 A 液 5ml, B 液 5ml, C 液 4ul, 混合后每个反应孔加 100ul, 室温避光 10min, 蒸馏水终止反应。

[0062] 判断标准 :根据显色反应有无或颜色深浅, 进行定性或半定量 ;斑点呈现黄兰色斑点判断为阳性, 不出现颜色则为阴性。

[0063] 1)+++ 斑点呈深黄兰色。

[0064] 2)++ 斑点呈黄兰色。

[0065] 3)+ 斑点呈淡黄兰色。

[0066] 4) 无可见斑点。

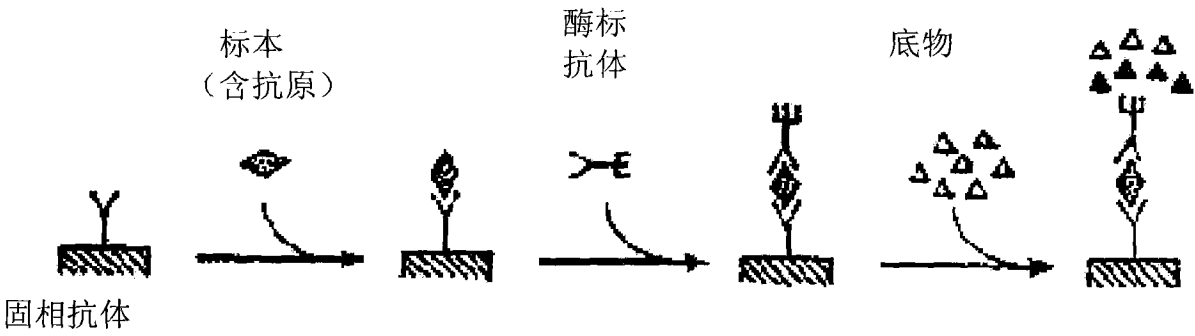


图 1

专利名称(译)	一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102279259A	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	CN201010197684.0	申请日	2010-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
[标]发明人	陈韶红 陈家旭 李浩 周晓农 张永年 郭俭		
发明人	陈韶红 陈家旭 李浩 周晓农 张永年 郭俭		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/78		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒，含有兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体、酶标记的兔抗卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的多克隆抗体、硝酸纤维薄膜、小牛血清白蛋白、PBST洗涤液、底物显色液、阳性对照样本、阴性对照样本和聚乙烯反应板。本发明还提供了一种检测并殖吸虫病的诊断试剂盒的制备方法。本发明采用双抗体夹心法Dot-ELISA检测卫氏并殖吸虫循环抗原，敏感性高、特异性强，可实现并殖吸虫病的快速诊断和疗效考核。

