



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103901194 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201210575141. 7

(22) 申请日 2012. 12. 26

(71) 申请人 深圳先进技术研究院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学
城学苑大道 1068 号

(72) 发明人 万晓春 任广慧 金言

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 生启 吴平

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

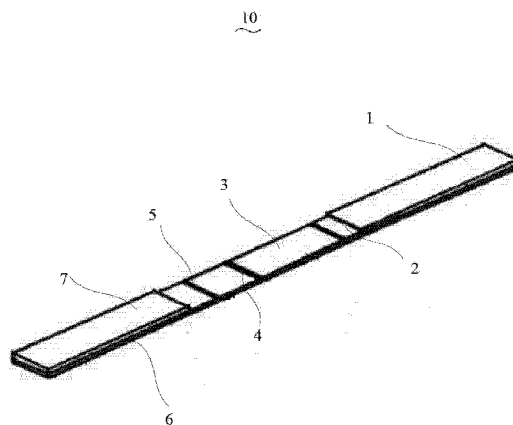
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

山羊弓形虫病检测免疫试纸及其制备方法

(57) 摘要

一种山羊弓形虫病检测免疫试纸,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫粘结在背衬上,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接,所述硝酸纤维素膜上设有相互间隔的检测线及质控线,所述结合垫上设有葡萄球菌A蛋白-荧光标记物,所述检测线由重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 构成,所述质控线由羊抗鼠 IgG 构成。上述山羊弓形虫病检测免疫试纸。本发明还提供一种山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法。



1. 一种山羊弓形虫病检测免疫试纸,其特征在于,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫粘结在背衬上,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接,所述硝酸纤维素膜上设有相互间隔的检测线及质控线,所述结合垫上设有葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物,所述检测线由重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 构成,所述质控线由羊抗鼠 IgG 构成。

2. 根据权利要求 1 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸,其特征在于,所述结合垫与所述样品垫搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

3. 根据权利要求 1 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸,其特征在于,所述结合垫与所述硝酸纤维素膜搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

4. 根据权利要求 1 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸,其特征在于,所述硝酸纤维素膜与所述吸水垫搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

5. 根据权利要求 1 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸,其特征在于,所述背衬的材料为聚氯乙烯。

6. 一种山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
将葡萄球菌 A 蛋白与荧光纳米颗粒混合制成葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物;
将葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物包被在结合垫上;
将重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 包被在硝酸纤维素膜上形成检测线;
将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上形成与所述检测线相间隔的质控线;
将样品垫、结合垫、包有葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物的结合垫以及具有检测线和质控线的硝酸纤维素膜依次粘贴在背衬上得到所述山羊弓形虫病检测免疫试纸,所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接,所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接。

7. 根据权利要求 6 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法,其特征在于,所述荧光纳米颗粒的粒径为 50nm。

8. 根据权利要求 6 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法,其特征在于,还包括步骤:将得到的山羊弓形虫病检测免疫试纸放置于两个平板之间压制 10 分钟。

9. 根据权利要求 6 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法,其特征在于,还包括步骤:将得到的山羊弓形虫病检测免疫试纸裁切成条状。

10. 根据权利要求 6 所述的山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法,其特征在于,所述背衬的材料为聚氯乙烯。

山羊弓形虫病检测免疫试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种山羊弓形虫病检测免疫试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 弓形虫病 (Toxoplasmosis) 是由刚地弓形虫 (*Toxoplasmosis gondii*) 引起的一种重要人畜共患寄生虫病。该病在世界范围内分布, 感染范围广, 对人畜安全构成了很大的威胁。目前该疫苗的研究尚处动物试验阶段, 其安全性和有效性还有待验证, 所以对弓形虫感染的准确、快速和特异性诊断的研究十分必要。目前弓形虫病的实验室诊断方法主要为病原学诊断、免疫学诊断和分子生物学诊断, 免疫胶体金检测技术作为免疫学诊断方法, 以其操作简单、敏感特异、稳定性强、不需要特殊设备和结果判断直观等优点, 被广泛应用于病原微生物、毒素、药物残留等方面的检测。

[0003] 目前试纸条检测弓形虫病的检测方法较为麻烦。

发明内容

[0004] 基于此, 有必要提供一种检测较为简便的山羊弓形虫病检测免疫试纸及其制备方法。

[0005] 一种山羊弓形虫病检测免疫试纸, 包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬, 所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫粘结在背衬上, 所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接, 所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接, 所述硝酸纤维素膜上设有相互间隔的检测线及质控线, 所述结合垫上设有葡萄球菌 A 蛋白 - 荧光标记物, 所述检测线由重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 构成, 所述质控线由羊抗鼠 IgG 构成。

[0006] 在其中一个实施例中, 所述结合垫与所述样品垫搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0007] 在其中一个实施例中, 所述结合垫与所述硝酸纤维素膜搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0008] 在其中一个实施例中, 所述硝酸纤维素膜与所述吸水垫搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0009] 在其中一个实施例中, 所述背衬的材料为聚氯乙烯。

[0010] 一种山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法, 包括以下步骤:

[0011] 将葡萄球菌 A 蛋白与荧光纳米颗粒混合制成葡萄球菌 A 蛋白 - 荧光标记物;

[0012] 将葡萄球菌 A 蛋白 - 荧光标记物包被在结合垫上;

[0013] 将重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 包被在硝酸纤维素膜上形成检测线;

[0014] 将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上形成与所述检测线相间隔的质控线;

[0015] 将样品垫、结合垫、包有葡萄球菌 A 蛋白 - 荧光标记物的结合垫以及具有检测线和质控线的硝酸纤维素膜依次粘贴在背衬上得到所述山羊弓形虫病检测免疫试纸, 所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接, 所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫

的一端与所述吸水垫搭接。

[0016] 在其中一个实施例中,所述荧光纳米颗粒的粒径为 50nm。

[0017] 在其中一个实施例中,将得到的山羊弓形虫病检测免疫试纸放置于两个平板之间压制 10 分钟。

[0018] 在其中一个实施例中,将得到的山羊弓形虫病检测免疫试纸裁切成条状。

[0019] 在其中一个实施例中,所述背衬的材料为聚氯乙烯。

[0020] 上述山羊弓形虫病检测免疫试纸使用时,将样品滴加在样品垫上,阳性结果呈现两条线,即质控线和检测线,阴性结果只出现一条质控线,检测快速简便;山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法较为简单。

附图说明

[0021] 图 1 为一实施方式的山羊弓形虫病检测免疫试纸的结构示意图;

[0022] 图 2 为一实施方式的山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法的流程图。

具体实施方式

[0023] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的首选实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容更加透彻全面。

[0024] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“及/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0025] 请同时参阅图 1,一实施方式的山羊弓形虫病检测免疫试纸 10 包括样品垫 1、结合垫 2、硝酸纤维素膜 3、背衬 6 和吸水垫 7。样品垫 1、结合垫 2、硝酸纤维素膜 3 及吸水垫 7 依次粘结在背衬 6 上。结合垫 2 的两端分别与样品垫 1 及硝酸纤维素膜 3 搭接,硝酸纤维素膜 3 远离结合垫 2 的一端与吸水垫 7 搭接。

[0026] 样品垫 1 是山羊弓形虫病检测免疫试纸 10 检测时直接与样品溶液互相接触的部分,起到了过滤样品溶液中的非可溶性杂质成分的作用。

[0027] 结合垫 2 上设有葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物。结合垫 2 上的葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物可与目标蛋白发生抗原-抗体特异性结合。

[0028] 硝酸纤维素膜 3 上设有相互间隔的检测线 4 及质控线 5。检测线 4 由重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 构成。质控线 5 由羊抗鼠 IgG 构成。本实施方式中,羊抗鼠 IgG 购买于 Jackson 公司。需要说明的是,羊抗鼠 IgG 不限于从上述公司购买,也可从其他公司购买。

[0029] 优选的,葡萄球菌 A 蛋白与荧光纳米颗粒的质量比为 1:6 ~ 1:8。

[0030] 优选的,荧光纳米颗粒为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的金属氧化物,比如异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 Fe_3O_4 。

[0031] 优选的,样品垫 1 与结合垫 2 搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0032] 优选的,结合垫 2 与硝酸纤维素膜 3 搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

- [0033] 优选的,硝酸纤维素膜 3 与吸水垫 7 搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。
- [0034] 优选的,背衬 6 的材料为聚氯乙烯(PVC)。
- [0035] 优选的,检测线 4 和质控线 5 之间的间距为 1cm ~ 1.5cm。
- [0036] 上述山羊弓形虫病检测免疫试纸 10 使用时,将样品滴加在样品垫 1 上,若样品中含有目标蛋白,则目标蛋白与结合垫中的含标记有免疫荧光标记的抗体结合,通过层析作用先与 NC 膜上的 SAG2 蛋白结合形成可见的检测线,未结合完的荧光标记抗体继续层析与羊抗鼠 IgG 结合形成可见的质控线,即阳性结果呈现两条线,即质控线 5 和检测线 4,阴性结果只出现一条质控线 5,检测快速简便;免疫荧光技术具有快速简便、准确直观等优点,结合单克隆抗体技术又具有良好的特异性和敏感性。
- [0037] 上述山羊弓形虫病检测免疫试纸 10 的检测需要使用凝胶成像系统、专用的荧光检测仪,或其他仪器进行辅助观察并记录实验结果。
- [0038] 请同时参阅图 1 及图 2,上述山羊弓形虫病检测免疫试纸 10 的制备方法,包括以下步骤:
- [0039] 步骤 S110、将葡萄球菌 A 蛋白(SPA)与荧光纳米颗粒混合制成葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物。
- [0040] 本实施方式中,葡萄球菌 A 蛋白购买于本元正阳基因技术有限公司。需要说明的是,葡萄球菌 A 蛋白不限于从上述公司购买,也可从其他公司购买。
- [0041] 优选的,荧光纳米颗粒为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的金属氧化物。
- [0042] 优选的,取纯化的 SPA 200 μ L (0.5mg/mL),用 pH 9.5 的 0.025mol/L 的碳酸盐缓冲液透析 12h;然后加入 100 μ L 悬浮于碳酸盐缓冲液中的荧光纳米颗粒(8mg/mL),4 $^{\circ}$ C 过夜;加入 NaBH₃CN,NaBH₃CN 的终浓度为 5mM,反应 1.5h;再加等体积封闭液(10mM Tris7.8 含 5% 脱脂奶粉的 PBS),最后用 10mM Tris7.8 洗涤标记好的抗体 3 遍,每遍 20min,后用 10mM Tris7.8 悬浮,4 $^{\circ}$ C 保存得到葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物溶液。当然,葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物溶液也可以采用其他业内常用的方法制备或直接购买葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物溶液。
- [0043] 优选的,葡萄球菌 A 蛋白与荧光纳米颗粒的质量比为 1:6 ~ 1:8。
- [0044] 优选的,荧光纳米颗粒的粒径为 50nm。
- [0045] 步骤 S120、将葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物包被在结合垫 2 上。
- [0046] 优选的,将步骤 S110 制备的葡萄球菌 A 蛋白-荧光标记物溶液稀释 100 倍均匀滴在结合垫 2 上,每试纸条滴加 4 μ L,37 $^{\circ}$ C 温箱中烘烤 1h。
- [0047] 步骤 S130、将重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 包被在硝酸纤维素膜 3 上形成检测线 4。
- [0048] 优选的,用三维点膜仪在将 0.4mg/mL 重组弓形虫速殖子膜表面蛋白 SAG2 喷在硝酸纤维素膜 3 上作为检测线 4
- [0049] 步骤 S140、将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜 3 上形成与检测线 4 相间隔的质控线 5。
- [0050] 优选的,用三维点膜仪在将 0.5mg/mL 羊抗鼠 IgG 喷在硝酸纤维素膜 3 上作为质控线 5。
- [0051] 优选的,检测线 4 和质控线 5 之间的间距为 1 ~ 1.5cm。

[0052] 步骤 S150、将样品垫 1、结合垫 2、包有葡萄球菌 A 蛋白 - 荧光标记物的结合垫 2 以及设有检测线 4 和质控线 5 的硝酸纤维素膜 3 依次粘贴在背衬 6 上得到山羊弓形虫病检测免疫试纸,且结合垫 2 的两端分别与样品垫 1 及硝酸纤维素膜 3 搭接,硝酸纤维素膜 3 远离结合垫 2 的一端与吸水垫 7 搭接。

[0053] 优选的,背衬 6 的材料为聚氯乙烯。

[0054] 优选的,结合垫 2 与样品垫 1 搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0055] 优选的,结合垫 2 与硝酸纤维素膜 3 搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0056] 优选的,硝酸纤维素膜 3 与吸水垫 7 搭接的长度为 1.5mm ~ 2.5mm。

[0057] 步骤 S160、将得到的山羊弓形虫病检测免疫试纸放置于两个平板之间压制 10 分钟。

[0058] 步骤 S170、将得到的山羊弓形虫病检测免疫试纸裁切成条状。

[0059] 上述山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法较为简单。

[0060] 可以理解,步骤 S160 及步骤 S170 可以省略。

[0061] 需要说明的是,上述山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法中的步骤无须按照列出的顺序执行,比如步骤 S110 ~ 步骤 S140 之间的顺序可以根据实际操作调整,比如步骤 S130、步骤 S140 与步骤 S110 或 S120 同步执行。

[0062] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

10

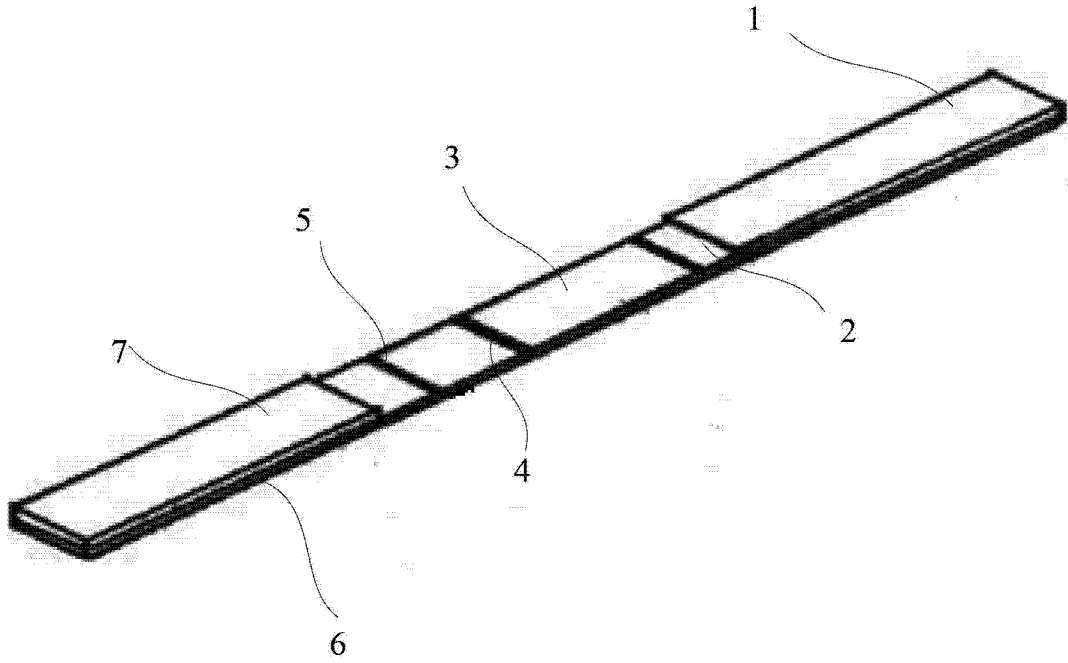


图 1

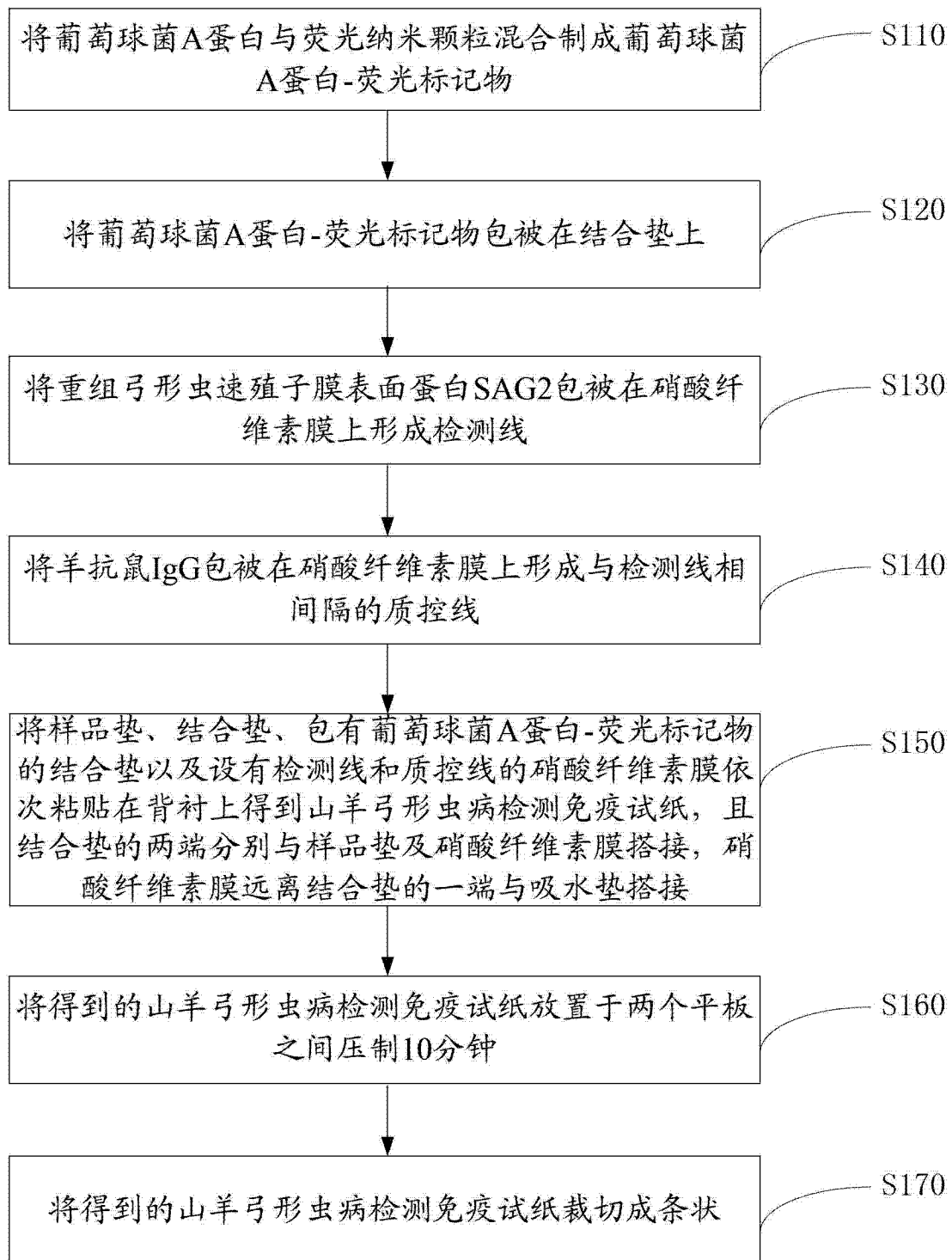


图2

专利名称(译)	山羊弓形虫病检测免疫试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN103901194A	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201210575141.7	申请日	2012-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
[标]发明人	万晓春 任广慧 金言		
发明人	万晓春 任广慧 金言		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56905 G01N33/533 G01N33/558 G01N2333/45		
代理人(译)	吴平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种山羊弓形虫病检测免疫试纸，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背衬，所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫粘结在背衬上，所述结合垫的两端分别与所述样品垫及所述硝酸纤维素膜搭接，所述硝酸纤维素膜远离所述结合垫的一端与所述吸水垫搭接，所述硝酸纤维素膜上设有相互间隔的检测线及质控线，所述结合垫上设有葡萄球菌A蛋白-荧光标记物，所述检测线由重组弓形虫速殖子膜表面蛋白SAG2构成，所述质控线由羊抗鼠IgG构成。上述山羊弓形虫病检测免疫试纸。本发明还提供一种山羊弓形虫病检测免疫试纸的制备方法。

