



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101995470 A

(43) 申请公布日 2011.03.30

---

(21) 申请号 200910169753.4

(22) 申请日 2009.08.31

(71) 申请人 万积成

地址 100088 北京市海淀区蓟门东里 2 号楼  
14-10

(72) 发明人 万积成

(51) Int. Cl.

*G01N 33/64* (2006.01)

*G01N 33/577* (2006.01)

*G01N 33/558* (2006.01)

*G01N 33/532* (2006.01)

*G01N 33/52* (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 4 页

---

### (54) 发明名称

一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置

### (57) 摘要

本发明涉及一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置，实现对猪孕情诊断，利用双抗夹心和竞争两种不同的免疫层析方法制成试纸，进一步制成检测装置，通过检测配种后母猪尿液中孕酮水平实现母猪早孕检测，也适用于母猪孕期任意时段检测，根据显色区的不同颜色变化来判断所测母猪是否怀孕。具有准确率高、操作简便、检测迅速、常温储存、携带方便、对母体和胎儿安全无害等特点。

1. 一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,包括孕酮配对单抗的建立、包含该单抗的检测试纸及检测装置,其特征是:孕酮配对单抗是同时针对孕酮特异的两种不同的单克隆抗体,采用不同的建立方法建立,即采用高低两种剂量孕酮人工免疫原免疫小鼠,高剂量为致死量的50%,即10-60ug进行免疫、低剂量为5ug以下,低剂量免疫容易诱导出高选择性和高亲合性的抗体,而高剂量则相反,通过对低剂量所产生的抗体、高剂量所产生的抗体配对筛选,获得配对单抗 I、II,该配对单抗可应用于检测试纸,利用胶体金法实现对猪孕情诊断,特别适用于母猪早孕诊断。

2. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于所述配对单克隆抗体由胶体金标记后应用于检测试纸,胶体金是颜色颗粒中金属胶体颗粒的一种。

3. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于本方法及装置除采用胶体金颗粒标记抗体,也可采用其它同类颜色颗粒标记,即可以是一种金属胶体颗粒、一种标记颗粒,包括但不限于胶体银颗粒、铁颗粒、磁性颗粒、染料颗粒、乳胶颗粒、荧光颗粒。

4. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于所述检测试纸利用胶体金免疫层析法制成,通过以下方法实现:

检测试纸是由底板、吸水板、硝酸纤维素膜、孕酮单克隆抗体金标垫、样品吸液层、Max线组成,底板中部为硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上有一条试验线和一条多克隆抗体控制线,底板一端端头为吸水板,另一端端头为样品吸液层,硝酸纤维素膜两端分别与吸水板和孕酮单克隆抗体金标垫相互交叠连接,在孕酮单克隆抗体金标垫上压有样品吸液层;

样品吸液层由三层材料叠加组成,第一层为一定规格无纺布层、第二层为玻璃纤维层、第三层为一定规格无纺布层,上述物质均需经过表面活性剂缓冲液浸泡处理,干燥后备用。

5. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于检测试纸可以利用双抗夹心法或免疫竞争法制成,利用双抗夹心原理,将孕酮配对单抗应用于检测试纸,抗体 I 用于包被试验线,另一株种抗体 II 用于胶体金标记。

6. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于利用免疫竞争法原理,将孕酮单抗 II 应用于检测试纸,试纸试验线由孕酮人工免疫原包被,抗体 II 用于胶体金标记。

7. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于所述的控制线是由羊抗鼠多克隆抗体包被而成,当样品移动至羊抗鼠多克隆抗体控制线时,控制线便显示彩带。

8. 根据权利要求1或5所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于所述的利用竞争法制成的检测试纸的试验线显示彩带,即显色区为两条线时为阴性,只有一控制线时为阳性,利用双抗夹心法制成的检测试纸的试验线显示彩带,即显色区为两条线时为阳性;只有一控制线时为阴性。

9. 根据权利要求1或5所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,其特征在于可以将使用条形检测试纸进行检测,样品液不得超过试纸 Max 线,通过显色区颜色变化判断母猪孕情,还可以制成笔式、板式检测装置进行检测。

10. 根据权利要求1所述的一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,

其特征在于所述的检测装置包含检测试纸、盒盖和盒底,盒盖上至少包含一观察窗,观察窗对应检测试纸显色区,也可以包含一加样孔,加样孔对应检测试纸的样品吸液层,此形态称为板式结构,也可以不含加样孔,试纸的样品吸液层突出盒体之外,直接吸收待测样本,此形态称为笔式结构,检测装置外形包括但不限于长方形、圆形、不规则形状等。

## 一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置,利用胶体金免疫层析法实现对猪孕情诊断,特别适用于母猪早孕诊断。

### 背景技术

[0002] 早期妊娠诊断是提高母猪繁殖效率和养猪业生产效益的重要技术措施,母猪配种后,能尽早地进行妊娠诊断,对于减少空怀,提高受胎率都具有十分重要的意义。确定妊娠的母猪应加强各方面的管理,保持母猪的健康。若确定未妊娠应及时查出原因,以便进行改进或及时治疗。早期妊娠诊断技术是解决和克服目前在母猪繁殖方面存在的两个实际问题,即“假妊娠”和“乏情”。从而减少母猪的空怀,缩短其产仔间隔,提高母猪的繁殖力,以提高养猪业的经济效益。

[0003] 现有猪早期妊娠诊断技术有多种方法,如:观察法、血浆孕酮测定法、及酶联免疫测定法、超声波诊断法等,其中观察法是最常用的诊断方法,观察法观察猪行为体态和外阴的变化,用公猪试情,注射雌性激素等,虽然方法简单易行,但不够准确,过早使用雌性激素可引起猪体内内分泌紊乱致长期不发情;直肠检查法只适用于体型较大的母猪,有一定局限性,使用不多;激素测定法主要采用放射免疫法或酶联免疫法,准确性较高,但较繁琐,费用较高,一般用于科学研究;血浆孕酮测定法,由于采血困难也不利于大规模推广;超声波诊断法不仅一次性投入太大,而且还需要专业的技术人员。文献报道孕猪 30 天诊断符合率为 80%,孕猪 40 天诊断符合率才能达到 100%,要想在 19~30 天内提高孕猪确诊率,须有较高的检测技术。

[0004] 母猪体内孕酮 (Progesterone, P4) 是黄体和胎盘分泌的一种类固醇激素,母猪一个孕周期表现由低逐日上升,15 天达到高峰期其后下降,到 19 天降到低水平 0ng/ml,猪受孕后孕酮继续维持较高水平,26~30 天尿液孕酮达到 0.05ug/ml。本发明捕捉到孕酮周期性变化的规律,利用胶体金免疫层析法原理,以孕酮作为检测目标物,以孕酮水平判断是否妊娠。

### 发明内容

[0005] 本发明克服了现有技术中存在的缺点,提供了一种通过胶体金免疫层析法检测母猪尿液中孕酮水平从而快速诊断母猪是否妊娠的方法及装置。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明是通过以下技术手段实现的:

[0007] 本发明包括孕酮配对单抗的建立、包含该单抗的检测试纸及检测装置。

[0008] 建立孕酮配对单抗,建立孕酮配对单抗是同时针对孕酮特异的两种不同的单克隆抗体,采用不同的建立方法建立,即采用高低两种剂量孕酮人工免疫原免疫小鼠,高剂量为致死量的 50%,即 10-60ug 进行免疫、低剂量为 5ug 以下,低剂量免疫容易诱导出高选择性和高亲合性的抗体,而高剂量则相反,通过对低剂量所产生的抗体、高剂量所产生的抗体配对筛选,获得配对单抗 I、II,该配对单抗可应用于检测试纸,利用免疫层析法实现对猪早期

妊娠的诊断。

[0009] 配对单克隆抗体由胶体金标记后应用于检测试纸,胶体金是颜色颗粒中金属胶体颗粒的一种,本发明所涉及的方法及装置除采用胶体金颗粒标记抗体,也可采用其它同类颜色颗粒标记,即可以是一种金属胶体颗粒、一种标记颗粒,包括但不限于胶体银颗粒、铁颗粒、磁性颗粒、染料颗粒、乳胶颗粒、荧光颗粒。

[0010] 利用胶体金免疫层析法制成检测试纸,通过以下方法实现:检测试纸是由底板、吸水板、硝酸纤维素膜、孕酮单克隆抗体金标垫、样品吸液层、Max 线组成,底板中部为硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上有一条试验线和一条多克隆抗体控制线,底板一端端头为吸水板,另一端端头为样品吸液层,硝酸纤维素膜两端分别与吸水板和孕酮单克隆抗体金标垫相互交叠连接,在孕酮单克隆抗体金标垫上压有样品吸液层;样品吸液层由三层材料叠加组成,第一层为一定规格无纺布层、第二层为玻璃纤维层、第三层为一定规格无纺布层,上述物质均需经过表面活性剂缓冲液浸泡处理,干燥后备用。

[0011] 检测试纸可以利用双抗夹心法或免疫竞争法制成:利用双抗夹心原理,将孕酮配对单抗应用于检测试纸,抗体 I 用于包被试验线,另一株种抗体 II 用于胶体金标记;利用免疫竞争法原理,将孕酮单抗 II 应用于检测试纸,试纸试验线由孕酮人工免疫原包被,抗体 II 用于胶体金标记。

[0012] 控制线是由羊抗鼠多克隆抗体包被而成,当样品通过胶体金标记的孕酮单克隆抗体移动至羊抗鼠多克隆抗体控制线时,控制线便显示彩带。

[0013] 利用竞争法制成的检测试纸的试验线显示彩带,即显色区为两条线时为阴性,只有一控制线时为阳性。利用双抗夹心法制成的检测试纸的试验线显示彩带,即显色区为两条线时为阳性;只有一控制线时为阴性。

[0014] 可以将上述检测试纸样品吸液层端直接插入待测样品中检测(样品液不得超过试纸 Max 线),通过显色区颜色变化判断母猪孕情,还可以制成笔式、板式检测装置进行检测。

[0015] 检测装置包含检测试纸、盒盖和盒底,盒盖上至少包含一观察窗,观察窗对应检测试纸显色区,也可以包含一加样孔,加样孔对应检测试纸的样品吸液层,此形态称为板式结构;也可以不含加样孔,试纸的样品吸液层突出盒体之外,直接吸收待测样本,此形态称为笔式结构。检测装置外形包括但不限于长方形、圆形、不规则形状等。

[0016] 本检测试纸采用免疫层析技术,用于猪早期妊娠诊断,具有准确率高、操作简便、检测迅速、常温储存、携带方便、对母体和胎儿安全无害等特点。

[0017] 具体实施例一:孕酮合成免疫原制备

[0018] 将  $11\alpha$ -孕酮通过琥珀酸酐法活化,采用二环己基碳化二亚胺偶联法将孕酮- $11\alpha$ -半琥珀酸酯( $11-\alpha$  OH-P4-HS)与牛血清白蛋白(BSA)载体偶联,用  $0.1\text{mol/l}$  PH = 7.4 磷酸盐缓冲溶液进行透析,即得到孕酮合成免疫原。

[0019] 具体实施例二:抗孕酮单克隆抗体细胞株的建立

[0020] ①动物免疫:使用两种人工免疫原分别免疫小鼠,每组 3 只动物,孕酮合成免疫原免疫小鼠高剂量  $60\mu\text{g}$  进行免疫、低剂量为  $5\mu\text{g}$ ,经腹腔免疫,免疫前断尾取血,分离血清,保存在  $-20^\circ\text{C}$ ,作为正常对照小鼠的血清,基础免疫过程中,抗原和完全佐剂等量混合,加强免疫中抗原与不完全佐剂混合,抗原与佐剂经充分乳化合格后免疫小鼠,第三次加强免疫后

三天,断尾取血、检测,对免疫抗原的血清效价最高的小鼠最后一次免疫用溶于生理盐水的抗原免疫,免疫后3天,于无菌条件下取脾脏分离脾细胞,细胞悬浮在无血清DMEM完全培养液中以备细胞融合。

[0021] ②细胞融合:取末次免疫后无菌条件下分离的脾细胞与Sp2/0细胞以10:1的比例混合,用无血清DMEM培养液将混合细胞充分洗涤三次,将1ml 37℃预温的50%PEG缓慢地加入到细胞混悬液中,边加边轻轻地转动试管,使PEG与细胞充分混匀,静止1分钟后,再按操作流程缓慢地加入15ml无血清培养液,用无血清培养液将融合细胞洗涤两次,再将细胞悬浮在含15%胎牛血清的DMEM完全培养液中,调整细胞浓度,将细胞加入到细胞培养板中,同时在其中的一孔中加入Sp2/0细胞作为HAT筛选时的对照细胞。将细胞培养板放置培养在培养箱中。

[0022] ③杂交瘤细胞的筛选:于培养的第二天,在无菌条件下,在培养板的每孔中再加入0.1ml含2X HAT的15%胎牛血清的DMEM完全培养液,对杂交瘤进行筛选。在融合7天时可以见到杂交瘤的生长,镜检96孔细胞培养板,待培养孔中的杂交瘤细胞生长到约占1/3孔时,在无菌条件下吸取0.1ml培养液,用竞争法测定杂交瘤分泌免疫球蛋白的情况。

[0023] ④杂交瘤细胞的克隆:采用有限稀释法分别对这些与孕酮免疫原呈阳性反应的杂交瘤细胞株进行克隆,分别筛选出细胞株S<sub>3</sub>B2D<sub>4</sub>A<sub>6</sub>和S<sub>3</sub>B3E<sub>1</sub>G<sub>1</sub>。

[0024] ⑤杂交瘤细胞分泌抗体特性的鉴定:亚类鉴定表明S<sub>3</sub>B2D<sub>4</sub>A<sub>6</sub>和S<sub>3</sub>B3E<sub>1</sub>G<sub>1</sub>这两株抗体亚类均为IgG1,抗体特异性鉴定表明具有较好的特异性,抗体亲和力测定。

[0025] 具体实施例三:抗孕酮单克隆抗体I和抗孕酮单克隆抗体II的制备

[0026] 将扩增的S<sub>3</sub>B2D<sub>4</sub>A<sub>6</sub>和S<sub>3</sub>B3E<sub>1</sub>G<sub>1</sub>杂交瘤细胞接种于用降植烷处理过的BALB/C小鼠腹腔内,每只小鼠腹腔内注射 $0.5 \times 10^7$ 细胞/ml,取小鼠腹水离心,取中间层上清,预处理所收集的腹水后纯化,先用结合缓冲液平衡Protein A层析柱,然后加入混合有结合缓冲液的预处理抗体原液,经结合、洗涤和洗脱收集洗脱样品后,将样品放在PB缓冲液透析过夜,透析液再离心取上清即为纯化抗体,用SDS-PAGE、WESTERN-BLOTTING和ELISA的方法对纯化好的抗体进行鉴定,获得抗孕酮单克隆抗体I和抗孕酮单克隆抗体II。

[0027] 具体实施例四:羊抗鼠多克隆抗体的制备

[0028] 羊颌下两侧注射80mg/mL活卡浓度,每侧0.3~0.5mL,约2周待淋巴结肿大后,按每公斤25μg抗原加等量完全佐剂乳化注射颌下淋巴结内免疫,每只1mL,2周后,按每公斤25μg抗原皮下免疫,每只1mL,2周后,再次免疫,10天后,采颈动静脉血5mL,分离血清,用琼脂糖双扩散法测定效价达到1:32以上,采血,分离血清,纯化,抗体活性测定。

[0029] 具体实施例五:胶体金的制备及金标抗孕酮抗体I溶液的制备

[0030] 胶体金溶液的制备:配制1%氯化金溶液、2%柠檬酸三钠溶液,加热去离子水到80℃,加入1%氯化金溶液30ml,进行加热搅拌,加入2%枸橼酸三钠18ml,观察由紫色到红色变化继续煮沸10min,冷却后转移到棕色瓶中4℃保存。

[0031] 金标抗孕酮抗体II溶液的制备:称量金液250ml加0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5ml搅拌5分钟,抗孕酮抗体II加入250ml金液中搅拌,加入2.5ml 1%PEG20000,离心、弃上清液,沉淀用PH8.1柠檬酸-Tris缓冲液稀释至50ml。

[0032] 把抗体标记的胶体金液,吸附纤维材料上,干燥后备用。

[0033] 具体实施例六:抗体标记硝酸纤维素膜的制备

[0034] 使用特制制膜机制膜,采用竞争法制作免疫层析试纸的硝酸纤维素膜试验线应用孕酮合成免疫原制作,采用夹心法制作免疫层析试纸的硝酸纤维素膜试验线应用孕酮单克隆抗体 I 制作,硝酸纤维素膜控制线由羊抗鼠多克隆抗体制成。

[0035] 具体实施例七:检测试纸及装置

[0036] 检测试纸是由底板、吸水板、硝酸纤维素膜、孕酮单克隆抗体金标垫、样品吸液层组成,底板中部为硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上有一条试验线和一条多克隆抗体控制线,底板一端端头为吸水板,另一端端头为样品吸液层,硝酸纤维素膜两端分别与吸水板和孕酮单克隆抗体金标垫相互交叠连接,在孕酮单克隆抗体金标垫上压有样品吸液层;样品吸液层由三层材料叠加组成,第一层为一定规格无纺布层、第二层为玻璃纤维层、第三层为一定规格无纺布层,上述物质均需经过表面活性剂缓冲液浸泡处理,干燥后备用。

[0037] 检测装置包含检测试纸、盒盖和盒底,盒盖上至少包含一观察窗,观察窗对应检测试纸显色区,样品吸液层突出盒体之外,也可以包含一加样孔,加样孔对应检测试纸的样品吸液层,检测装置外形包括但不限于长方形、圆形、不规则形状等。

[0038] 使用方法:猪孕情检测,特别是母猪早孕检测。取母猪尿液作为待测样本,最好选取晨尿作为检测样本,根据装置规格不同使用样品吸液层直接蘸取或加样至加样孔,在视窗中观察结果。

[0039] 结果判断:利用竞争法制成的检测试纸的试验线显示彩带,即显色区为两条线时为阴性,只有一控制线时为阳性;利用双抗夹心法制成的检测试纸的试验线显示彩带,即显色区为两条线时为阳性,只有一控制线时为阴性。

专利名称(译)	一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN101995470A</a>	公开(公告)日	2011-03-30
申请号	CN200910169753.4	申请日	2009-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	万积成		
申请(专利权)人(译)	万积成		
当前申请(专利权)人(译)	万积成		
[标]发明人	万积成		
发明人	万积成		
IPC分类号	G01N33/64 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/52		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种母猪早期妊娠胶体金免疫层析诊断及检测装置，实现对猪孕情诊断，利用双抗夹心和竞争两种不同的免疫层析方法制成试纸，进一步制成检测装置，通过检测配种后母猪尿液中孕酮水平实现母猪早孕检测，也适用于母猪孕期任意时段检测，根据显色区的不同颜色变化来判断所测母猪是否怀孕。具有准确率高、操作简便、检测迅速、常温储存、携带方便、对母体和胎儿安全无害等特点。