

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610016961.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月15日

[11] 公开号 CN 101017170A

[22] 申请日 2006.6.21

[21] 申请号 200610016961.7

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院军事
兽医研究所

地址 130062 吉林省长春市青龙路1068号

[72] 发明人 夏咸柱 黄耕 杨松涛 王承宇
高玉伟 侯小强 高明华 王铁成
薛琳

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责
任公司

代理人 陈宏伟

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸
条及制备工艺

[57] 摘要

本发明提供一种犬狂犬病病毒抗体的胶体金免疫层析试纸条及其制备工艺,根据抗原抗体能特异结合的免疫学基本原理,将羊抗犬免疫球蛋白(IgG)用胶体金标记,包被在玻璃纤维膜上作为结合垫,将纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原(酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原)和兔抗羊IgG分别包被在硝酸纤维素膜(NC膜)上作为检测线和质控线,当被检样品中含在狂犬病毒特异抗体时,可在检测线上形成抗原抗体结合物并在NC膜上出现紫红色条带,通过肉眼能够简易、快捷地检测犬狂犬病病毒抗体。

1. 一种犬狂犬病抗体胶体金免疫层析检测试纸条, 由经过处理的样品垫(1)、结合垫(2)、吸水垫(6)、背衬(7)、硝酸纤维素膜(5)部分组成, 其特征在于: 结合垫(2)中喷有胶体金标记的羊抗犬 IgG, 硝酸纤维素膜(5)上的质控线(4)为兔抗羊 IgG, 检测线(3)为狂犬病毒抗原。

2. 根据权利要求 1 所述犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条的制备方法, 其特征在于所述的结合垫上羊抗犬金标抗体的制备方法包括下述步骤:

(1) 胶体金的制备: 取浓度为 0.01% 氯金酸 HAuCl_4 溶液 100 mL 加热沸腾后迅速加入一定量的 1% 柠檬酸三钠水溶液, 再保持沸腾 10-15min, 可制得金颗粒大小为 20 纳米的胶体金溶液;

(2) 胶体金标记羊抗犬 IgG: 在胶体金溶液中用 0.1M 碳酸钾 K_2CO_3 溶液调 pH 值为 8.2, 按 2-18ug/ml 加入羊抗犬 IgG, 经混合搅拌后再向溶液中按 1g/100ml 加入牛血清白蛋白 BSA, 4°C 静置 2-4 小时; 将上述胶体金溶液经 2000r/min 离心 20 分钟, 去除沉淀物取上清; 再将上清液经 10000r/min 离心 40 分钟得沉淀物; 将沉淀物按 1/10 的比例用 10 mM pH 7.0 PBS +1% BSA+1%蔗糖缓冲液重悬浮得金标抗体溶液, 该缓冲液中含 0.01-0.06% 的叠氮钠;

(3) 将标记好的金标抗体溶液以最佳的结合量滴加于玻璃纤维膜而形成结合有金标抗体的结合垫。

3. 根据权利要求 1 所述犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条的制备方法，其特征在于 NC 膜上的检测线为纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的狂犬病毒抗原，其制备方法为：用狂犬病毒疫苗弱毒 ERA 株，感染单层非洲绿猴肾细胞 Vero 细胞，病变后收取上清液为一代毒，再以此毒感染单层 Vero 细胞，在 35℃ 条件下培养 24-48 小时，以不含血清的培养液洗 3 次后换无血清培养液，在 35℃ 条件下培养 4-5 天，收取培养毒液为二代毒，继而经过 5000r/min 离心 15min 处理，取上清液加入 1/10000 β 丙内酯灭活，经醋酸锌沉淀法和超滤浓缩法处理，采用 Seprose4FF 层析柱过滤，制得狂犬病毒抗原；或者利用酵母表达系统/哺乳动物细胞表达系统表达狂犬病毒糖蛋白或核蛋白抗原，进行纯化。

犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析 检测试纸条及制备工艺

技术领域:

本发明涉及一种犬体内特异狂犬病毒有效保护性抗体的快速检测试纸条,特别是提供了犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条及制备工艺,属于动物疫病检测技术领域。

背景技术:

狂犬病早在公元前四世纪即有记载,是由狂犬病毒引起的直接接触性、病毒性传染病,所有温血动物均易感,是目前危害人类健康的一种重要人畜共患病。据统计,现全世界每年死于狂犬病的病人达35000-50000例,1950-2005年我国狂犬病死亡总人数约102280例,总的发病和死亡人数仅次于印度,居世界第2位。患有狂犬病的犬、猫和某些野生动物是人畜感染的最主要传染来源。因此要从根本上控制和消灭狂犬病,必须对犬、猫和野生动物实行综合的预防控制措施。目前对于犬狂犬病的预防,采用注射狂犬病疫苗的方法,但疫苗接种后犬体内是否产生了有效的抗体,目前还没有简便、快速的检测方法和试剂。

胶体金免疫层析试纸条是新近发展起来的一种诊断方法,具有速度快、结果直观、灵敏度高等优点。

发明内容:

本发明的目的是要提供一种犬狂犬病病毒抗体的胶体金免疫层析试纸条及其制备工艺，能够简易、快捷地检测犬狂犬病病毒抗体。

本发明根据抗原抗体能特异结合的免疫学基本原理，将羊抗犬免疫球蛋白（IgG）用胶体金标记，包被在玻璃纤维膜上作为结合垫，将纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原（酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原）和兔抗羊 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜（NC 膜）上作为检测线和质控线，当被检样品中含有狂犬病毒特异抗体时，可在检测线上形成抗原抗体结合物并在 NC 膜上出现紫红色条带，通过肉眼进行观察判定。

本发明的解决方案是在 NC 膜上包被检测线和质控线，检测线侧贴有金标抗体玻璃纤维膜，质控线侧贴有吸水垫，其中检测线包被的是纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原（酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原），质控线包被的是兔抗羊 IgG。检测时，抽取被检测犬的少量血液，滴在该试纸条的样品垫上，对比检测线和质控线的颜色，确定犬体内是否产生了有效的保护性抗体。

此外，本发明也提供了一种狂犬病毒抗体胶体金免疫层析诊断试纸条的制备方法，特别是胶体金标记羊抗犬 IgG 及狂犬病毒抗原的制备方法。

本发明犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条制备方法主要涉及以下几个方面的内容：

1、羊抗犬 IgG 的制备：利用纯化的犬 IgG 作为抗原免疫羊而制成的羊抗犬 IgG，该抗体只针对犬的免疫球蛋白反应。用此抗体标记胶体金制成金标抗体，可与待检样品中的犬免疫球蛋白结合，所以用此抗体标记胶体金后喷在结合垫上。

2、兔抗羊 IgG 的制备：这种抗体是用羊的免疫球蛋白作为抗原免疫兔，提取免疫兔血清中的抗体球蛋白制成的。用在 NC 膜的质控线上，可与金标抗体结合，以此检测试纸条的有效性。

3、狂犬病毒抗原的制备：用狂犬病毒疫苗弱毒 ERA 株，感染单层非洲绿猴肾细胞（Vero）细胞，病变后收取上清液为一代毒，再以此毒感染单层 Vero 细胞，在 35℃ 条件下培养 24-48 小时，以不含血清的培养液洗 3 次后换无血清培养液，在 35℃ 条件下培养 4-5 天，收取培养毒液为二代毒，继而经过 5000r/min 离心 15min 处理，取上清液加入 1/10000 β 丙内酯灭活，经醋酸锌沉淀法和超滤浓缩法处理，采用 Seprose4FF 层析柱过滤，制得狂犬病毒抗原；或者利用酵母表达系统/哺乳动物细胞表达系统表达狂犬病毒糖蛋白或核蛋白抗原，并进行纯化，将该纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原（酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原）用在试纸条的检测线上，可与金标抗体-犬抗体复合物结合，形成夹心抗原抗体复合物。

4、该试纸条的生产工艺流程：

4.1 羊抗犬 IgG 金标抗体的制备 (1) 胶体金的制备：取浓度为 0.01% 氯金酸 (HAuCl_4) 溶液 100 mL 加热沸腾后迅速加入一定量的 1%

柠檬酸三钠水溶液，再保持沸腾 10-15min，可制得金颗粒大小为 20 纳米的胶体金溶液；(2)胶体金标记羊抗犬 IgG：在胶体金溶液中用 0.1M 碳酸钾 (K_2CO_3) 溶液调 pH 调为 8.2，按 2-18ug/ml 加入羊抗犬 IgG，经混合搅拌后再向溶液中按 1g/100ml 加入牛血清白蛋白(BSA)，4℃静置 2-4 小时。将上述胶体金溶液经 2000r/min 离心 20 分钟，去除沉淀物得上清。再将上清液经 10000r/min 离心 40 分钟得沉淀物。将沉淀物按 1/10 的比例用 10 mM pH 7.0 PBS +1% BSA+1%蔗糖缓冲液重悬浮得金标抗体溶液，该缓冲液中含 0.01-0.06%的叠氮钠；(3) 将标记好的金标抗体溶液以最佳的结合量滴加于玻璃纤维膜而形成结合有金标抗体结合垫。

4.2 结合垫的处理 将结合垫放入缓冲液中浸泡，干燥，结合垫喷标记好的金标羊抗犬 IgG，然后干燥。

4.3 试纸条板的制备 撕去背衬上的不粘胶，分别贴上 NC 膜、结合垫（已喷有金标抗体）、样品垫和吸水垫。

4.4 NC 膜的喷样 硝酸纤维素膜（NC 膜）上设有两条线：检测线和质控线。检测线为纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原（酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原），按 0.8-1.2mg/ml 用喷膜机在 NC 膜中段喷检测线，线宽 0.8mm。质控线为兔抗羊 IgG，按 1.0-1.5mg/ml 用喷膜机在 NC 膜中段距检测线 0.5cm 处喷质控线，线宽也为 0.8mm，37℃干燥 2 小时。再用 10mM pH7.0 含 5%BSA 的 PBS，在 37℃下封闭 30 分钟，10mM pH7.0 的 PBS 漂洗，37℃干燥。

4.5 试纸条板切条及测试盒的组装 将 NC 膜喷有抗体的试纸条板切成 6×0.4 cm 的试纸条,放入测试盒内,立即放入铝箔袋内封口。

用本发明的试纸条检测狂犬病毒抗体的敏感性与酶联法检测抗体比较,偏低一个滴度,但特异性好、稳定性高。用参比血清标准标定,血清含中和抗体达 0.5IU 值时,检测线出现紫红色的阳性条带,如检测线无此条带,即为阴性,表明血清中没有狂犬病抗体或抗体量不足,质控线不管血清中有没有狂犬病抗体均应出现紫红色的阳性条带,表明试纸条有效,如果质控线无反应,说明试纸条已失效。根据 WHO 规定标准,中和抗体达到 0.5IU 时,犬体才能达到保护力,否则应及时加强免疫。

本发明与现有的检测技术相比具有如下优点:

1、本发明检测狂犬病毒抗体的方法简单、快速、经济、易操作,灵敏度高、特异性强、重复性好、易于判读,不需要借助其它仪器设备,适合各级兽医检测机构进行临床检验、流行病学调查和现场检疫等。

2、本发明的诊断试剂盒的制备方法简便、稳定性高、重复性好。本发明具有简单、快速、敏感和特异性好等特点。并且价格低廉,无需专门设备,适用于临床检测、流行病学调查和现场检疫等多种场合。

附图说明

图 1 是犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条的纵剖面结构示意图:

1—样品垫(由普通滤纸制成)、2—结合垫(由玻璃纤维膜制成,

上喷有胶体金标记的羊抗犬 IgG)、3—检测线(为犬狂犬病毒抗原)、4—质控线(为兔抗羊 IgG)、5—NC 膜、6—吸水垫、7—背衬板

具体实施方式

通过以下实施例进一步举例描述本发明,并不以任何方式限制本发明,在不背离本发明的技术解决方案的前提下,对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

实施例 1

1、羊抗犬 IgG 的制备:利用纯化的犬免疫球蛋白作为抗原免疫羊而制成的羊抗犬 IgG,该抗体只针对犬的免疫球蛋白反应。用此抗体标记胶体金制成金标抗体,可与待检样品中的犬免疫球蛋白结合,所以用此抗体标记胶体金后喷在结合垫上。

2、兔抗羊 IgG 的制备:这种抗体是用羊的免疫球蛋白作为抗原免疫兔,提取免疫兔血清中的抗体球蛋白制成的。用在 NC 膜的质控线上,可与金标抗体结合,以此检测试纸条的有效性。

3、狂犬病毒抗原的制备:用狂犬病毒疫苗弱毒 ERA 株,感染单层 Vero 细胞,病变后收取上清液为一代毒,再以此毒感染单层 Vero 细胞,在 35℃条件下培养 24-48 小时,以不含血清的培养液洗 3 次后换无血清培养液,在 35℃条件下培养 4-5 天,收取培养毒液为二代毒,继而经过 5000r/min 离心 15min 处理,取上清液加入 1/10000 β 丙内酯灭活,经醋酸锌沉淀法和超滤浓缩法处理,采用 seprose4FF 层析柱过滤,制得狂犬病毒抗原;或者利用酵母表达系统/哺乳动物

细胞表达系统表达狂犬病毒糖蛋白或核蛋白抗原，并进行纯化，将该纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原（酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原）用在试纸条的检测线上，可与金标抗体-犬抗体复合物结合，形成夹心抗原抗体复合物。

实施例 2

试纸条的生产工艺流程：

1、羊抗犬 IgG 金标抗体的制备 (1) 胶体金的制备：取浓度为 0.01% 氯金酸 (HAuCl_4) 溶液 100 mL 加热沸腾后迅速加入一定量的 1% 柠檬酸三钠水溶液，再保持沸腾 10-15min，可制得金颗粒大小为 20 纳米的胶体金溶液；(2) 胶体金标记羊抗犬 IgG：在胶体金溶液中使用 0.1M 碳酸钾 (K_2CO_3) 溶液调 pH 调为 8.2，按 2-18ug/ml 加入羊抗犬 IgG，经混合搅拌后再向溶液中按 1g/100ml 加入牛血清白蛋白 (BSA)，4℃ 静置 2-4 小时。将上述胶体金溶液经 2000r/min 离心 20 分钟，去除沉淀物得上清。再将上清液经 10000r/min 离心 40 分钟得沉淀物。将沉淀物按 1/10 的比例用 10 mM pH 7.0 PBS +1% BSA+1% 蔗糖缓冲液重悬浮得金标抗体溶液，该缓冲液中含 0.01-0.06% 的叠氮钠；(3) 将标记好的金标抗体溶液以最佳的结合量滴加于玻璃纤维膜而形成结合有金标抗体的结合垫。

2、结合垫的处理 将结合垫放入缓冲液中浸泡，干燥，结合垫喷标记好的金标抗体，然后干燥。

3、试纸条板的制备 撕去背衬上的不粘胶，分别贴上 NC 膜、结合垫（已喷有金标抗体）、样品垫、吸水垫。

4、NC膜的喷样 硝酸纤维素膜（NC膜）上设有两条线：检测线和质控线。检测线为纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原（酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原），按0.8-1.2mg/ml用喷膜机在NC膜中段喷检测线，线宽0.8mm。质控线为兔抗羊兔IgG，按1.0-1.5mg/ml用喷膜机在NC膜中段距检测线0.5cm处喷质控线，线宽也为0.8mm，37℃干燥2小时。再用10mM pH7.0含5%BSA的PBS，在37℃下封闭30分钟，10mM pH7.0的PBS漂洗，37℃干燥。

5、试纸条板切条及测试盒的组装 将NC膜喷有抗体的试纸条板切成6×0.4cm的试纸条，放入测试盒内，立即放入铝箔袋内封口。

实施例3

(1)结合垫为玻璃纤维膜，由美国Millipore公司生产，用10mM pH8.2 PBS +3% BSA+0.1%Triton X-100+1% PVP-40000 预处理液对结合垫进行处理，浸泡30分钟后37℃真空干燥，喷上胶体金标记的羊抗犬IgG后干燥，结合垫上与样品垫衔接，下与NC膜衔接；

(2)NC膜是一种专门用于制备胶体金试纸条的材料，由美国Millipore公司生产，NC膜上喷两条线，一条为检测线（纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原），另一条线为质控线（兔抗羊IgG），NC膜贴在背衬的中间，两端分别与结合垫和吸水垫连接；

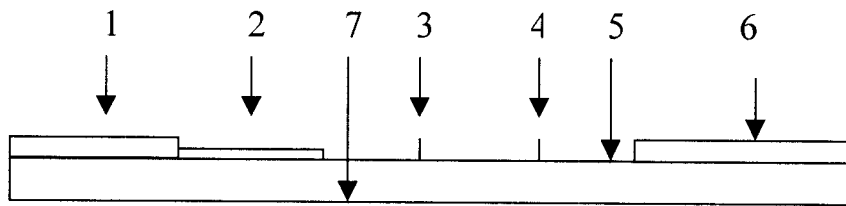
(3)样品垫为一种具有较好吸水能力的厚滤纸，由美国Millipore公司生产，在试纸条中起过滤血细胞等样品的作用，位于结合垫上，贴在背衬上；

(4) 吸水垫为厚滤纸，由美国 Millipore 公司生产，贴在背衬的末端，起吸水作用（层析作用）；

(5) 背衬是一个支撑样品垫、结合垫、NC 膜和吸水垫的胶版板材料。

实施例 4

根据图 1 所示，由样品垫 1、结合垫 2、吸水垫 6、背衬 7、硝酸纤维素膜 5 部分组成犬狂犬病抗体胶体金免疫层析检测试纸条，样品垫 1 由普通滤纸制成，结合垫 2 由玻璃纤维膜制成，上喷有胶体金标记的羊抗犬 IgG，硝酸纤维素膜 5 为 NC 膜，其上的质控线 4 为兔抗羊 IgG，检测线 3 为狂犬病毒抗原。



专利名称(译)	犬狂犬病病毒抗体胶体金免疫层析检测试纸条及制备工艺		
公开(公告)号	CN101017170A	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200610016961.7	申请日	2006-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
[标]发明人	夏咸柱 黄耕 杨松涛 王承宇 高玉伟 侯小强 高明华 王铁成 薛琳		
发明人	夏咸柱 黄耕 杨松涛 王承宇 高玉伟 侯小强 高明华 王铁成 薛琳		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种犬狂犬病病毒抗体的胶体金免疫层析试纸条及其制备工艺，根据抗原抗体能特异结合的免疫学基本原理，将羊抗犬免疫球蛋白(IgG)用胶体金标记，包被在玻璃纤维膜上作为结合垫，将纯化的狂犬病毒抗原或基因工程表达的抗原(酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统如小鼠瘤细胞表达的抗原)和兔抗羊IgG分别包被在硝酸纤维素膜(NC膜)上作为检测线和质控线，当被检样品中含在狂犬病毒特异抗体时，可在检测线上形成抗原抗体结合物并在NC膜上出现紫红色条带，通过肉眼能够简易、快捷地检测犬狂犬病病毒抗体。

