

[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 200810017946.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月24日

[11] 公开号 CN 101271109A

[22] 申请日 2008.3.29

[21] 申请号 200810017946.3

[71] 申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730046 甘肃省兰州市城关区徐家坪1号

[72] 发明人 张德林 王艳华 李学瑞 才学鹏

[74] 专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心

代理人 鲜林

权利要求书1页 说明书5页

[54] 发明名称

弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂及其制备方法

[57] 摘要

一种弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，结合垫包被带有抗弓形虫多克隆抗体的胶体金结合物，硝酸纤维素膜上以线形包被抗弓形虫多克隆抗体和弓形虫代谢分泌抗原。通过制备抗弓形虫多克隆抗体；制备弓形虫代谢分泌抗原；制备胶体金；制备抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物；将抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将抗弓形虫多克隆抗体和弓形虫代谢分泌抗原以线形包被在硝酸纤维素膜的检测区和滞控区，充分干燥等工序制成。本发明可检测人和各种动物的弓形虫循环抗原；灵敏准确，操作简单，安全稳定。

1、一种弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条，该试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，其特征在于所述结合垫包被了带有抗弓形虫多克隆抗体的胶体金结合物，所述硝酸纤维素膜上以线形包被抗弓形虫多克隆抗体作为检测线，包被弓形虫代谢分泌抗原作为滞控线。

2、一种制备如权利要求1所述弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条的方法，其特征在于按下述方法制备：

a、制备弓形虫代谢分泌抗原：20~25克体重小鼠每只按 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 弓形虫速殖子腹腔接种，经3~4日，小鼠出现精神沉郁、不食、被毛粗乱的症状时，脱颈致死小白鼠，浸泡于70~75%酒精内体表消毒；每只小鼠用2~3毫升PH7.2 0.15 mol/L PBS缓冲液洗腹收集虫体；将所收集的腹腔液以3000~4000rpm离心30~40分钟，收集上清液；将上清液在 $-15^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ 温度下放置24~48小时，冻融化开后再以3000~4000rpm离心30~40分钟，离心2~3次，收集上清液；上清液即为弓形虫代谢分泌抗原；

b、制备抗弓形虫多克隆抗体：用上述a步所得的弓形虫抗原免疫羊，再用弓形虫速殖子加强免疫，经琼扩检测达1:32~64时，采集免疫羊血清，用饱和硫酸铵粗提取羊抗弓形虫抗体，再用凝胶层析法纯化羊抗弓形虫抗体，获得抗弓形虫多克隆抗体；

c、制备胶体金：用柠檬酸三钠将氯金酸还原成40~60纳米的胶体金颗粒；

d、制备抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物：将上述c步所得胶体金与上述b步所得抗弓形虫多克隆抗体按1:0.04 (ml/mg)比例搅拌混匀，混合液中每1000ml加入牛血清白蛋白2400mg，最后加入100 g/L氯化钠水溶液100ml，使其终浓度为10g/L，形成稳定的复合物，通过纯化浓缩得到8%的浓缩液，即为抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物；

e、将上述d步所得抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将上述b步所得抗弓形虫多克隆抗体和上述a步所得弓形虫代谢分泌抗原以线形包被在硝酸纤维素膜上，形成一条检测线和一条滞控线，干燥后依次将样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸和不干胶保护层粘贴在PVC板上，在手持端粘贴彩色手柄纸，在进样端粘贴标有MAX线的塑料纸，用斩切机切成 $0.3 \times 8\text{cm}$ 的试剂条，即制成检测弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条。

## 弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂及其制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测弓形虫循环抗原的免疫胶体金试剂，具体说是一种弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条，本发明还包括该试剂的制备方法。

### 背景技术

现有检测弓形虫病的方法主要是检测弓形虫抗体，弓形虫抗体在人和动物感染弓形虫后体内出现比较晚，检测弓形虫抗体无法做到早期诊断；而且弓形虫抗体在人和动物体内存留的时间长，有的动物可终身存留，因此弓形虫抗体的检测难以对现症感染和既往感染进行区分。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种同时可检测人和各种动物的弓形虫循环抗原，能够早期诊断弓形虫病，对现症感染和既往感染进行区分的一种弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂及其制备方法，该方法操作简便，能有效降低检测成本，减轻检测人员的负担。

本发明的目的通过下述技术方案实现：

一种弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条，该试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，其特征在于所述结合垫包被了带有抗弓形虫多克隆抗体的胶体金结合物，所述硝酸纤维素膜上以线形包被抗弓形虫多克隆抗体作为检测线，包被弓形虫代谢分泌抗原作为滞控线。

上述弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条按下述方法制备：

a、制备弓形虫代谢分泌抗原：20~25克体重小鼠每只按 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 弓形虫速殖子腹腔接种，经3~4日，小鼠出现精神沉郁、不食、被毛粗乱的症状时，脱颈致死小白鼠，浸泡于70~75%酒精内体表消毒；每只小鼠用2~3毫升PH7.2 0.15 mol/L PBS 缓冲液洗腹收集虫体；将所收集的腹腔液以3000~4000rpm离心30~40分钟，收集上清液；将上清液在-20℃温度下放置24~48小时，冻融化开后再以3000~4000rpm离心30~40分钟，离心2~3次，收集上清液；上清液即为弓形虫代谢分泌抗原；

b、制备抗弓形虫多克隆抗体：用上述a步所得的弓形虫抗原免疫羊，再用

弓形虫速殖子加强免疫，经琼扩检测达 1:32~64 时，采集免疫羊血清，用饱和硫酸铵粗提取羊抗弓形虫抗体，再用凝胶层析法纯化羊抗弓形虫抗体，获得抗弓形虫多克隆抗体；

c、制备胶体金：用柠檬酸三钠将氯金酸还原成 40~60 纳米的胶体金颗粒；

d、制备抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物：将上述 c 步所得胶体金与上述 b 步所得抗弓形虫多克隆抗体按 1:0.04 (ml/mg) 比例搅拌混匀，混合液中每 1000ml 加入牛血清白蛋白 2400mg，最后加入 100 g/L 氯化钠水溶液 100ml，使其终浓度为 10g/L，形成稳定的复合物，通过纯化浓缩得到 8% 的浓缩液，即为抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物；

e、将上述 d 步所得抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将上述 b 步所得抗弓形虫多克隆抗体和上述 a 步所得弓形虫代谢分泌抗原以线形包被在硝酸纤维膜上，形成一条检测线和一条滞控线，干燥后依次将样品垫、金标结合垫、硝酸纤维膜、吸水滤纸和不干胶保护层粘贴在 PVC 板上，在手持端粘贴彩色手柄纸，在进样端粘贴标有 MAX 线的塑料纸，用斩切机切成 0.3×8cm 的试剂条，即制成检测弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂条。

本发明具有下述有益效果：(1) 应用范围广，可检测人和各种动物的弓形虫循环抗原；(2) 快捷迅速，全过程只需 30 分钟；(3) 灵敏准确，敏感性和准确性高，结果受外因影响较小，可在养殖场现场进行检测；(4) 操作简单，不需要任何特殊仪器和设备，检测人员无需专业培训，适合在基层推广应用；(5) 价格低廉，(6) 保存和运输方便，一般保存于 4℃ 冰箱即可；(7) 安全稳定，胶体金、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬均无毒性，绝对不会造成环境污染。

表 1 弓形虫抗原金标试剂条特异性试验

血清样本	血清份数	阳性检出数	阳性检出率 (%)
猪衣原体阳性血清	50	0	0
猪瘟阳性血清	46	0	0
猪传染性胸膜肺炎	38	0	0

从表 1 可以看出，用同一批次金标试剂条分别检测猪衣原体阳性血清、猪瘟阳性血清、猪传染性胸膜肺炎阳性血清各 50、46、38 份，结果全为阴性，无交叉反应，证实该试剂条特异性良好。

表 2 弓形虫抗原金标试剂条敏感性试验

检测方法	感染动物数	阳性出现的时间及检出数					
		24h	48h	72h	96h	120h	144h
抗原试纸条	8	2	6	8	8	8	8
抗体试纸条	8	0	0	2	5	8	8
ELISA	8	0	0	2	5	8	8
IHA	8	0	0	0	1	6	8

从表 2 可以看出,人工感染弓形虫后,弓形虫循环抗原检测试剂在 24h 后即可部分检出,72h 后感染动物全部为阳性,而其他试剂的检出时间明显迟于抗原金标检测试剂条,并且弓形虫循环抗原金标检测试剂条可以检出 10 个速殖子以内的抗原。

### 具体实施方式

#### 实施例 1

(1) 制备弓形虫代谢分泌抗原:2007 年 1 月 28 日以  $1 \times 10^6$  弓形虫速殖子/只,腹腔接种 20 克体重小鼠 20 只,1 月 31 日,小鼠出现了精神沉郁、被毛粗乱等症状,将小白鼠脱颈致死,浸泡于 75%酒精内进行体表消毒。每只小鼠用 2 毫升 PH7.2 0.15 mol/L PBS 缓冲液洗腹收集虫体,共收集腹腔液 45ml,将所收集的腹腔液以每分钟 3000 转的速度离心 40 分钟,收集上清液,上清液置-20℃冰箱内,2 月 1 日从冰箱取出上清,融化后再以每分钟 4000 转的速度离心 3 次,每次离心 30 分钟,收集上清液,上清液即为弓形虫代谢分泌抗原,置-20℃冰箱内备用。

(2) 制备抗弓形虫多克隆抗体:2007 年 2 月 18 日用弓形虫代谢分泌抗原皮下免疫羊,半个月后用弓形虫速殖子  $1 \times 10^6$ /只腹腔加强免疫,再经过 7 天后采集血清进行琼扩检测,效价为 1:16,又用弓形虫速殖子  $1 \times 10^7$ /只腹腔加强免疫,再经过 7 天后采集血清进行琼扩检测,效价为 1:64,采集免疫羊血 100ml,分离血清 40ml,血清分别用 50%、33%、33%的饱和硫酸铵提取羊抗弓形虫抗体,粗提的羊抗弓形虫抗体经 Sephacryl S-300HR 凝胶层析法纯化。纯化的羊抗弓形虫多克隆抗体用蛋白检测仪检测蛋白含量,蛋白含量为 15mg/ml。置-15℃冰箱内备用。

(3) 制备胶体金及抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物:2007 年 4 月 18 日

取  $\text{HAuCl}_4 \cdot 0.1\text{g}$ , 用 1000ml 三蒸馏水将  $\text{HAuCl}_4$  配成 0.1g/L 的溶液, 煮沸后加新配制的 10g/L 柠檬酸三钠 7.5ml; 继续煮沸 5min, 直至溶液变成葡萄酒红色, 冷却后用 0.2mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  将胶体金 pH 值调至 8.9 左右, 制成 40~60 纳米的胶体金颗粒; 将 1000ml 胶体金加入抗弓形虫多克隆抗体 40mg 混匀, 置超净台磁力搅拌 20min, 4℃ 静置 30min, 然后 1000ml 加入牛血清白蛋白 2400mg, 继续搅拌 5min, 最后加入 100 g/L 氯化钠水溶液 100ml, 使其终浓度为 10g/L; 混匀, 以 2000r/min, 4℃ 离心 10min, 弃沉淀, 10000r/min 重复离心 30~60min, 将沉淀复溶于 80ml 金稀释液中形成胶体金与抗弓形虫多克隆抗体结合物, 冷藏备用。

(4) 2007 年 4 月 30 日, 取金标抗弓形虫多克隆抗体均匀浸透无纺布, 37℃ 温箱烘干过夜; 硝酸纤维膜分别用 0.01mol/L pH7.4 PBS 稀释成 4g/L 抗弓形虫多克隆抗体和 2g/L 的弓形虫代谢分泌抗原包被成两条线即检测线和滞控线, 37℃ 温箱烘干过夜, 再用含 10g/L 小牛血清白蛋白的 PBS, 37℃ 封闭 30min, 再用 0.01mol/L pH7.4 PBS 漂洗 3 次, 干燥后依次将样品垫、金标结合垫、硝酸纤维膜、吸水滤纸和干胶保护层粘贴在 PVC 板上, 在手持端粘贴彩色手柄纸, 在进样端粘贴标有 MAX 线的塑料纸, 用斩切机切成 0.3×8cm 的试剂条, 即制成检测弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂。

检测时, 从铝箔袋中取出检测试剂条 (板), 按 MARK 线下箭头所示的方向将试剂条浸入样本溶液中, 液面不得超过 MARK 线, 15~20 秒后取出, 平放在操作台上; 如果是试剂板: 从铝箔袋中取出检测试剂板, 平放在操作台上, 往加样孔中滴加三滴 (约 100 $\mu$ l) 样品溶液 (血清); 3~15 分钟内即可判断结果, 30 分钟后判断的结果无效。

判断标准: 检测区、质控区均出现红色条带者为阳性结果; 检测区无条带、质控区出现红色条带者为阴性结果; 检测区、质控区均未出现红色条带出现, 则产品为无效。

## 实施例 2

(1) 制备弓形虫代谢分泌抗原: 2007 年 2 月 28 日以  $1 \times 10^5$  弓形虫速殖子 / 只, 腹腔接种 25 克体重小鼠 20 只, 3 月 4 日, 小鼠出现了精神沉郁、被毛粗乱等症状, 将小白鼠脱颈致死, 浸泡于 70% 酒精内进行体表消毒。每只小鼠用 3 毫升 PH7.2 0.15 mol/L PBS 缓冲液洗腹收集虫体, 共收集腹腔液 45ml, 将所收集的腹腔液以每分钟 4000 转的速度离心 30 分钟, 收集上清液, 上清液置 -15

℃冰箱内，3月6日从冰箱取出上清，融化后再以每分钟3000转的速度离心4次，每次离心40分钟，收集上清液，上清液即为弓形虫代谢分泌抗原，置-15℃冰箱内备用。

(2) 制备抗弓形虫多克隆抗体：2007年3月18日用弓形虫代谢分泌抗原疫苗皮下免疫羊，半个月后用弓形虫速殖子 $1 \times 10^6$ /只腹腔加强免疫，再经过7天后采集血清进行琼扩检测，效价为1:16，又用弓形虫速殖子 $1 \times 10^7$ /只腹腔加强免疫，再经过7天后采集血清进行琼扩检测，效价为1:32，采集免疫羊血100ml，分离血清40ml，血清分别用50%、33%、33%的饱和硫酸铵提取羊抗弓形虫抗体，粗提的羊抗弓形虫抗体经Sephacryl S-300HR凝胶层析法纯化。纯化的羊抗弓形虫抗体用蛋白检测仪检测蛋白含量，蛋白含量为15mg/ml。置-15℃冰箱内备用。

(3) 制备胶体金及抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物：2006年5月6日取 $\text{HAuCl}_4 \cdot 0.1\text{g}$ ，用1000ml三蒸馏水将 $\text{HAuCl}_4$ 配成0.1g/L的溶液，煮沸后加新配制的10g/L柠檬酸三钠7.5ml；继续煮沸5min，直至溶液变成葡萄酒红色，冷却后用0.2mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 将金溶胶pH值调至8.9左右，制成40~60纳米的胶体金颗粒；将1000ml金溶胶加入抗弓形虫多克隆抗体40mg混匀，置超净台磁力搅拌20min，4℃静置30min，然后1000ml加入牛血清白蛋白2400mg，继续搅拌5min，最后加入100g/L氯化钠水溶液100ml，使其终浓度为10g/L；混匀，以2000r/min，4℃离心10min，弃沉淀，10000r/min重复离心30~60min，将沉淀复溶于80ml金稀释液中形成胶体金与抗弓形虫多克隆抗体结合物，冷藏备用。

(4) 2007年5月22日，取金标抗弓形虫多克隆抗体均匀浸透无纺布，37℃温箱烘干过夜；硝酸纤维膜分别用0.01mol/L pH7.4 PBS稀释成4g/L抗弓形虫多克隆抗体和2g/L的弓形虫代谢分泌抗原包被成两条线即检测线和滞控线，37℃温箱烘干过夜，再用含10g/L小牛血清白蛋白的PBS，37℃封闭30min，再用0.01mol/L pH7.4 PBS漂洗3次，干燥后依次将样品垫、金标结合垫、硝酸纤维膜、吸水滤纸和不干胶保护层粘贴在PVC板上，在手持端粘贴彩色手柄纸，在进样端粘贴标有MAX线的塑料纸，用斩切机切成 $0.3 \times 8\text{cm}$ 的试剂条，即制成检测弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂。

检测方法及判断标准同实施例1。

专利名称(译)	弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101271109A</a>	公开(公告)日	2008-09-24
申请号	CN200810017946.3	申请日	2008-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	张德林 王艳华 李学瑞 才学鹏		
发明人	张德林 王艳华 李学瑞 才学鹏		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
代理人(译)	鲜林		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种弓形虫循环抗原免疫金标快速检测试剂，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，结合垫包被带有抗弓形虫多克隆抗体的胶体金结合物，硝酸纤维素膜上以线形包被抗弓形虫多克隆抗体和弓形虫代谢分泌抗原。通过制备抗弓形虫多克隆抗体；制备弓形虫代谢分泌抗原；制备胶体金；制备抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物；将抗弓形虫多克隆抗体胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将抗弓形虫多克隆抗体和弓形虫代谢分泌抗原以线形包被在硝酸纤维素膜的检测区和滞控区，充分干燥等工序制成。本发明可检测人和各种动物的弓形虫循环抗原；灵敏准确，操作简单，安全稳定。