



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110058010 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910447681.9

(22)申请日 2019.05.27

(71)申请人 深圳真瑞生物科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾  
大道2076号高科大厦7层B701

(72)发明人 饶乐

(74)专利代理机构 北京久维律师事务所 11582

代理人 邢江峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

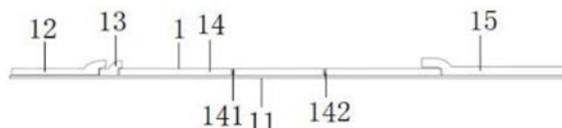
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及免疫胶体金层析分析领域,具体是一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,本试剂盒可以特异性的检测包虫自然感染抗体,同时与疫苗免疫抗体无交叉反应,包括胶体金试纸卡和样品稀释液,所述胶体金试纸卡包括封闭的盒体以及平铺在所述盒体内部的反应试纸条,所述盒体上分别开设有连通至所述反应试纸条的观察窗和加样孔;所述样品稀释液为包括0.01M PH7.2的PBS和1% tween-80的混合溶液。本发明提供了一种简便、快速、科学诊断包虫病感染的方法,能够快速的检测血液样品中是否含有动物包虫自然感染抗体。



1. 一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,包括胶体金试纸卡和样品稀释液,其特征在于,所述胶体金试纸卡包括封闭的盒体(2)以及平铺在所述盒体(2)内部的反应试纸条(1),所述盒体(2)上分别开设有连通至所述反应试纸条(1)的观察窗(3)和加样孔(4);所述样品稀释液为包括0.01M PH7.2的PBS和1% tween-80的混合溶液。

2. 根据权利要求1所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述盒体(2)包括有配合设置的上盒体和下盒体,所述观察窗(3)和加样孔(4)设置于盒体(2)的上盒体上。

3. 根据权利要求1所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液存放在5毫升滴瓶内。

4. 根据权利要求1或2所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述反应试纸条(1)包括底板(11)、沿所述底板(11)长度方向依次设置在其上且相接触的样品垫(12)、胶体金复合物垫(13)、硝酸纤维素膜(14)以及吸水垫(15);所述硝酸纤维素膜(14)包括有一条检测带(141)和一条对照带(142)。

5. 根据权利要求4所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述加样孔(4)对应设置在所述样品垫(12)上方;所述观察窗(3)对应设置在所述硝酸纤维素膜(14)上方。

6. 根据权利要求4所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述样品垫(12)上还喷涂有SPG纯化的包虫囊液抗原。

7. 根据权利要求6所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述胶体金复合物垫(13)上还固定有胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体。

8. 根据权利要求7所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体是识别包虫天然抗原91KD、66KD抗原蛋白同时不和Eg95抗原有交叉反应,同时不与牛带绦虫、猪带绦虫有交叉反应的特异性单克隆抗体。

9. 根据权利要求7所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述检测带(141)包被有5B12包虫单克隆抗体;所述对照带(142)包被有羊抗鼠多克隆抗体。

10. 根据权利要求9所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,其特征在于,所述检测带(141)包被的5B12包虫单克隆抗体是识别包虫天然抗原66KD抗原蛋白同时不和Eg95抗原有交叉反应,同时不与牛带绦虫、猪带绦虫有交叉反应的特异性单克隆抗体。

## 一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫胶体金层析分析领域,具体是一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,用于对动物全血或血清样本进行动物包虫自然感染抗体的检测。

### 背景技术

[0002] 由于包虫病是一种人兽共患寄生虫病,同时在家犬和家畜中的高感染率,使得要防治人包虫病就必须首先降低家犬和家畜的感染率,而对患病动物的诊断和甄别是第一步。

[0003] 传统的家畜包虫诊断方法主要是采用免疫学检测试剂盒检测感染动物血液中的抗包虫抗体。但由于我国羊包虫病基因工程疫苗于2012年正式批准上市,并开始大量广泛使用,而传统的抗体检测试剂无法区分疫苗免疫抗体和自然感染产生的抗体,这就为家畜包虫病的诊断带来了新的困难和问题。

[0004] 因此,针对以上现状,迫切需要开发一种快速且特异性检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,以克服当前实际应用中的不足。

### 发明内容

[0005] 本发明实施例的目的在于提供一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

[0007] 一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,包括胶体金试纸卡和样品稀释液,所述胶体金试纸卡包括封闭的盒体以及平铺在所述盒体内部的反应试纸条,所述盒体上分别开设有连通至所述反应试纸条的观察窗和加样孔;所述样品稀释液为包括0.01M PH7.2的PBS和1% tween-80的混合溶液。

[0008] 作为本发明进一步的方案:所述盒体包括有配合设置的上盒体和下盒体,所述观察窗和加样孔设置于盒体的上盒体上。

[0009] 作为本发明进一步的方案:所述样品稀释液存放在5毫升滴瓶内。

[0010] 作为本发明进一步的方案:所述反应试纸条包括底板、沿所述底板长度方向依次设置在其上且相接触的样品垫、胶体金复合物垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫;所述硝酸纤维素膜包括有一条检测带和一条对照带。

[0011] 作为本发明进一步的方案:所述加样孔对应设置在所述样品垫上方;所述观察窗对应设置在所述硝酸纤维素膜上方。

[0012] 作为本发明进一步的方案:所述样品垫上还喷涂有SPG纯化的包虫囊液抗原。

[0013] 作为本发明进一步的方案:所述胶体金复合物垫上还固定有胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体;所述胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体是识别包虫天然抗原91KD、66KD抗原蛋白同时不和Eg95抗原交叉反应,同时不与牛带绦虫、猪带绦虫交叉反应的特异性单克隆抗体。

[0014] 作为本发明进一步的方案:所述检测带包被有5B12包虫单克隆抗体;所述对照带包被有羊抗鼠多克隆抗体;所述检测带包被的5B12包虫单克隆抗体是识别包虫天然抗原66KD抗原蛋白同时不和Eg95抗原有交叉反应,同时不与牛带绦虫、猪带绦虫有交叉反应的特异性单克隆抗体。

[0015] 与现有技术相比,本发明实施例的有益效果是:

[0016] 本发明采用样本中的特异性包虫抗体来阻断胶体金标记的包虫单抗以及硝酸纤维素膜上单抗和抗原的结合,利用单克隆抗体的高特异性和均一性使得检测可以特异性的识别自然感染抗体,而与Eg95抗原疫苗产生的免疫抗体无交叉反应。

[0017] 该快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,能有选择的检测自然感染产生的抗体,而避免疫苗免疫抗体的干扰,能做到快速、简便、准确的鉴别诊断包虫病的感染,同时能做到一种检测试剂可检测牛、羊、人等多种属动物;解决了目前包虫防治工作中鉴别诊断的最大难题,为基层的包虫防治工作提供了简便、有效的工具,其意义深远,同时又市场价值巨大。

## 附图说明

[0018] 图1为本发明实施例中胶体金免疫层析试纸卡的俯视结构示意图。

[0019] 图2为本发明实施例中胶体金免疫层析试纸卡的主视结构示意图。

[0020] 图3为本发明实施例中胶体金免疫层析试纸卡的仰视结构示意图。

[0021] 图4为本发明实施例的结果判断示意图。

[0022] 图中:1-反应试纸条,11-底板,12-样品垫,13-胶体金复合物垫,14-硝酸纤维素膜,141-检测带,142-对照带,15-吸水垫,2-盒体,3-观察窗,4-加样孔。

## 具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施方式对本专利的技术方案作进一步详细地说明。

[0024] 下面详细描述本专利的实施例,所述实施例的示例在附图中示出,其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,仅用于解释本专利,而不能理解为对本专利的限制。

[0025] 在本专利的描述中,需要理解的是,术语“中心”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”、“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本专利和简化描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本专利的限制。对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语在本专利中的具体含义。

[0026] 实施例1

[0027] 请参阅图1-3,本发明实施例中,一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,包括胶体金试纸卡和样品稀释液,所述胶体金试纸卡包括封闭的盒体2以及平铺在所述盒体2内部的反应试纸条1,所述盒体2上分别开设有连通至所述反应试纸条1的观察窗3和加样孔4;所述样品稀释液为包括0.01M PH7.2的PBS和1% tween-80的混合溶液。

[0028] 进一步的,所述盒体2包括有配合设置的上盒体和下盒体,所述观察窗3和加样孔4设置于盒体2的上盒体上。

[0029] 进一步的,所述样品稀释液存放在5毫升滴瓶内。

[0030] 进一步的,所述反应试纸条1包括底板11、沿所述底板11长度方向依次设置在其上且相接触的样品垫12、胶体金复合物垫13、硝酸纤维素膜14以及吸水垫15;所述硝酸纤维素膜14包括有一条检测带141和一条对照带142。

[0031] 进一步的,所述加样孔4对应设置在所述样品垫12上方;所述观察窗3对应设置在所述硝酸纤维素膜14上方。

[0032] 进一步的,所述样品垫12上还喷涂有SPG纯化的包虫囊液抗原;所述胶体金复合物垫13上还固定有胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体;所述检测带141包被有5B12包虫单克隆抗体;所述对照带142包被有羊抗鼠多克隆抗体(羊抗鼠二抗)。

[0033] 所述检测带141包被的5B12包虫单克隆抗体是识别包虫66KD天然抗原同时不和Eg95抗原有交叉反应,同时不与牛带绦虫、猪带绦虫有交叉反应。

[0034] 所述胶体金复合物垫13是采用9A9包虫单克隆抗体识别包虫天然抗原91KD、66KD抗原同时不和Eg95抗原有交叉反应,同时不与牛带绦虫、猪带绦虫有交叉反应,与胶体金颗粒标记后干燥于玻璃纤维而制成。

[0035] 反应试纸条1或试剂盒在使用时,把待检样本加入到加样孔4后,样品先溶解样品垫12中的包虫病抗原,并且一起沿着反应试纸条1侧向流动,并在流经胶体金复合物垫13时同样溶解胶体金复合物垫13中的胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体,再一起沿着硝酸纤维素膜(NC膜)14流动。当样品中没有包虫病抗体或只有疫苗免疫产生的抗Eg95抗体时,样品垫12中的抗原先与胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体结合形成包虫病抗原-9A9包虫单克隆抗体-胶体金的复合物,当此复合物流经检测带141时,又被固定在NC膜上检测带(T线)处的5B12包虫单克隆抗体捕获,形成“5B12包虫单克隆抗体-包虫病抗原-胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体”的复合物结构,因为胶体金颗粒的富集而显示红色线条。当样品中含有包虫病自然感染抗体时,样品中的抗体先与样品垫12中的抗原相遇并结合,从而阻断了胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体与抗原的结合,这样也就造成了无法在检测带(T线)处形成“5B12包虫单克隆抗体-包虫病抗原-胶体金标记的9A9包虫单克隆抗体”的复合物结构,因而在检测带(T线)处就不会有胶体金颗粒的富集,无红色条带形成。

[0036] 实施例2

[0037] 请参阅图4,本发明实施例中,所述的快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒的应用方法如下:

[0038] 一、抗原纯化

[0039] 抗原的纯化先采用SPG凝胶层析柱去除其中的宿主抗体成分。然后,使用分子筛层析,将其按照分子大小的波峰分组,采用SDS-PAGE凝胶电泳各组蛋白,去掉Eg95抗原所在组。

[0040] 二、单抗制备与筛选

[0041] 核心关键技术在于特异性单克隆抗体的制备与筛选。采用纯化的包虫囊泡粗抗原来免疫BALB/C小鼠,摘取被免疫小鼠的脾脏,分散脾脏细胞,使其与骨髓瘤细胞融合,单分散培养,在杂交瘤细胞布满孔底1/10时,开始检测特异性抗体,先通过ELISA筛选出与免疫抗原有明显反应,同时不与Eg95抗原有交叉反应,与牛带绦虫、猪带绦虫无交叉反应的阳性克隆。再进行双体夹心配对筛选,筛选出一对单抗9A9和5B12,通过Western blotting鉴定,

9A9特异性识别包虫抗原中的91KD和66KD两条条带,5B12特异性识别66KD条带。然后,制备腹水,提纯单抗。

#### [0042] 三、胶体金制备

[0043] 1) 将制备专用烧瓶用重铬酸钾洗液浸泡过夜,用自来水冲洗干净,去离子水润洗后再用0.22 $\mu$ m过滤去离子水润洗三次,备用。其它玻璃器皿也都需清洁干净后再用0.22 $\mu$ m过滤去离子水润洗;

[0044] 2) 取一定量去离子水加入1%体积的1%氯金酸(用前0.22 $\mu$ m过滤)溶液到专用烧瓶中;装上搅拌器和冷凝管;

[0045] 3) 打开冷凝水和油域加热套,同时缓慢搅拌,加热至90 $^{\circ}$ C;

[0046] 4) 5min后按照1%柠檬酸钠:1/1000氯金酸=1.8:100的比例,一次性迅速加入相应量的1%柠檬酸钠溶液,同时加快搅拌速度至300rpm,30秒后降低搅拌速度至100rpm,再保持20min后关闭加热装置,水浴冷却;

[0047] 5) 分别在520nm、525nm、530nm测定其OD值,最大吸收峰应为525nm,且OD应在1.00-0.95之间。否则,弃用。

#### [0048] 四、单抗标记

[0049] 1) 用0.1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液的PH至7.2;

[0050] 2) 按照10 $\mu$ g/mL浓度,计算标记所需9A9单克隆抗体量,然后将9A9单克隆抗体用去离子水稀释至0.5mg/mL,搅拌下缓慢滴加入空白胶体金,室温保持搅拌20min;

[0051] 3) 搅拌下同样缓慢滴加入10%的BSA,使其BSA终浓度为1%,保持搅拌20min后再室温静置1小时;

[0052] 4) 4 $^{\circ}$ C下,12000rpm离心45min,去上清液;沉淀用0.01M PH7.2PB复溶至原1/40体积;

[0053] 5) 4 $^{\circ}$ C下,1500rpm离心10min,去沉淀后,完成标记。

#### [0054] 五、胶体金垫制备

[0055] 1) 用0.01M PH7.2PB将胶体金复合物稀释到批量生产指定浓度;加入50%海藻糖(用前0.22 $\mu$ m过滤),使其终浓度达到25%;

[0056] 2) 将玻纤用5mM PH7.2PB(含0.2%酪蛋白和0.3%Tween-20)浸泡2小时,后自然凉干备用;

[0057] 3) 将金标液加入BIODIT相应样品瓶;打开BIODOT仪和氮气瓶阀门,将玻璃纤维平铺于膜板上,开始喷涂;

[0058] 4) 喷涂完毕,玻纤在相对湿度40%以下,室温凉干(8小时以上);用专用裁刀裁去胶体金垫边缘至指定规格后,完成制备。

#### [0059] 六、喷膜

[0060] 用0.01M PH7.2PBS将5B12单克隆抗体和羊抗鼠二抗稀释至1毫克每毫升,10000rpm离心5min,去沉淀,同时加入1/1000叠氮钠;将合格NC膜裁切成300mm长,正面朝上平铺于膜板上,用磁条压定,开始画膜;在NC膜的相应位置进行标注,正面朝上,相对湿度35%以下,室温干燥2小时后,于干燥器中密封保存。

#### [0061] 七、样品垫制备

[0062] 将包虫囊液抗原用0.01M PBS稀释至1 $\mu$ g/mL,将玻纤浸泡其中30min后,捞出晾干,

并裁切成1.5cm\*30cm备用。

#### [0063] 八、纸条组装

[0064] 首先,揭去PVC板上NC膜粘贴位置的封胶纸,使其胶面暴露出来,将NC膜正面向上,端正、平整的贴于PVC板的标定位置;揭去PVC板上胶体金复合物垫粘贴位置的封胶纸,将裁切好的胶体金复合物垫一端对齐PVC板,贴于标定位置,用手轻压,使其粘和完全;将裁切好的样品垫贴于PVC板的标定位置,用手轻压,使其粘和完全;揭去PVC板上吸水垫粘贴位置的封胶纸,将吸水垫裁切为2cm宽,贴于PVC板的标定位置,用手轻压,使其粘和完全,完成装裱。然后,将PVC板正面朝上送入切条机裁切成4mm宽纸条后装入塑料卡盒内密封干燥保存。

[0065] 使用方法如下:

[0066] 1) 采血0.5-1mL,3000转/分,离心3-5分钟分离血清;也可4℃静置过夜,使血清自然析出;或采用全血直接检测;

[0067] 2) 取出检测卡(若冷藏保存,需恢复至室温再打开包装),开封后平放于桌面上;

[0068] 3) 取5μL(毛细管黑色刻度处)血清或全血加入加样孔,然后立刻用装有缓冲稀释液的滴瓶滴加一滴缓冲稀释液;

[0069] 4) 等待5分钟,再滴加两滴缓冲稀释液;

[0070] 5) 这时会看见有酒红色的液体流过观察窗;等待10-15分钟判断结果,15分钟后的结果无效。

[0071] 结果判定如下:

[0072] 1) 阴性:如图4-a所示,检测线(T线)和对照线(C线)都显示酒红色的反应;

[0073] 2) 阳性:如图4-b所示,检测线(T线)上没有颜色反应,只是在对照线(C线)上显示酒红色的反应;

[0074] 3) 失效:在观察孔内,如图4-c所示,对照线区(C)和检测线区(T)都不出现色线;如图4-d所示,或仅检测线区(T)出现色线。

[0075] 本发明要解决的技术问题是快速的检测血液样品中是否含有动物包虫自然感染抗体,从而提供一种简便、快速、科学诊断包虫病感染的方法。本发明采用样本中的特异性包虫抗体来阻断胶体金标记的包虫单抗以及硝酸纤维素膜上单抗和抗原的结合,利用单克隆抗体的高特异性和均一性使得检测可以特异性的识别自然感染抗体,而与Eg95抗原疫苗产生的免疫抗体无交叉反应。

[0076] 该快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒,能有选择的检测自然感染产生的抗体,而避免疫苗免疫抗体的干扰,能做到快速、简便、准确的鉴别诊断包虫病的感染,同时能做到一种检测试剂可检测牛、羊、人等多种属动物;解决了目前包虫防治工作中鉴别诊断的最大难题,为基层的包虫防治工作提供了简便、有效的工具,其意义深远,同时又市场价值巨大。

[0077] 以上的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以作出若干变形和改进,这些也应该视为本发明的保护范围,这些都不会影响本发明实施的效果和专利的实用性。

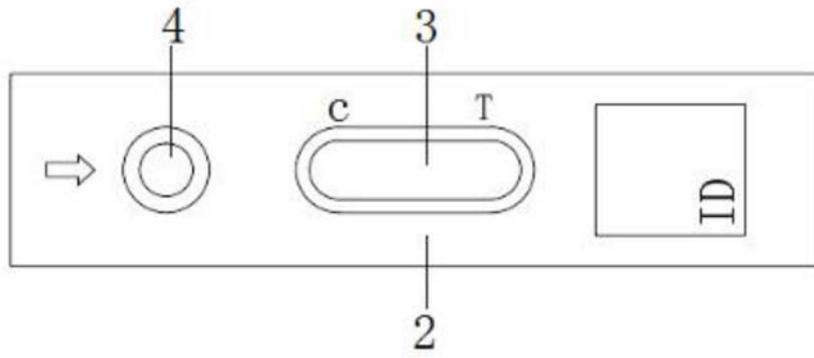


图1

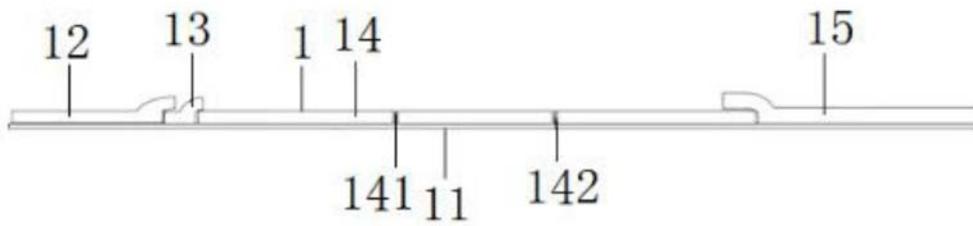


图2

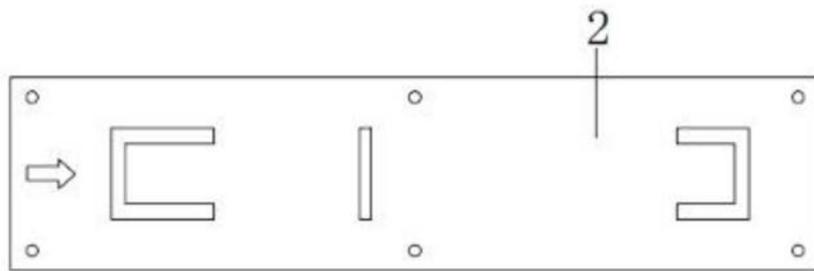


图3

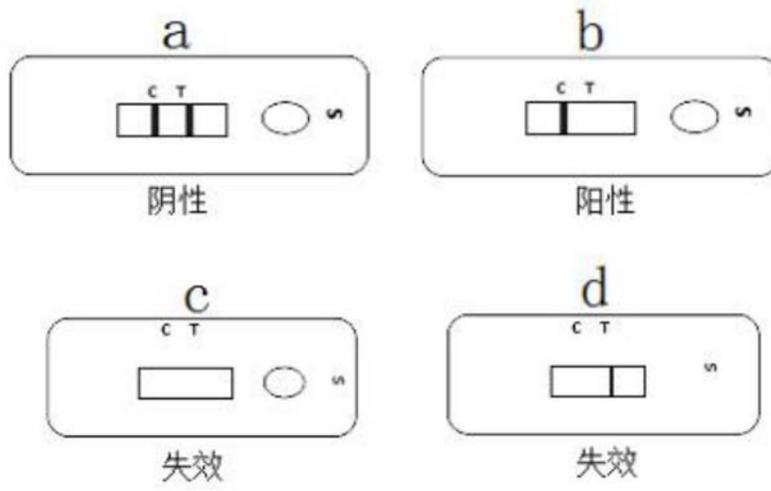


图4

专利名称(译)	一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110058010A</a>	公开(公告)日	2019-07-26
申请号	CN201910447681.9	申请日	2019-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	深圳真瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳真瑞生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳真瑞生物科技有限公司		
[标]发明人	饶乐		
发明人	饶乐		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5304		
代理人(译)	邢江峰		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及免疫胶体金层析分析领域，具体是一种快速检测动物包虫自然感染抗体的试剂盒，本试剂盒可以特异性的检测包虫自然感染抗体，同时与疫苗免疫抗体无交叉反应，包括胶体金试纸卡和样品稀释液，所述胶体金试纸卡包括封闭的盒体以及平铺在所述盒体内部的反应试纸条，所述盒体上分别开设有连通至所述反应试纸条的观察窗和加样孔；所述样品稀释液为包括0.01M PH7.2的PBS和1% tween-80的混合溶液。本发明提供了一种简便、快速、科学诊断包虫病感染的方法，能够快速检测血液样品中是否含有动物包虫自然感染抗体。

