

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/544 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610104848.4

[43] 公开日 2008年4月30日

[11] 公开号 CN 101169413A

[22] 申请日 2006.10.29

[21] 申请号 200610104848.4

[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

弓形虫免疫金标快速检测试剂及制备方法

[57] 摘要

一种检测抗弓形虫抗体的免疫金标快速检测试剂及制备方法，在PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，其结合垫包被了带有弓形虫代谢分泌抗原的胶体金结合物，硝酸纤维素膜上以线形包被了弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体。通过制备弓形虫代谢分泌抗原、制备抗弓形虫抗体、制备胶体金、制备弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物工艺，最后将弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体以线形包被在检测区和滞控区制成本试剂。本发明特异性强、敏感性高、简易快速、价格低廉，适合现场检测，全过程只需20分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

1、一种弓形虫免疫金标快速检测试剂，该试剂包括样品垫、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，其特征在于上述结合垫包被了带有弓形虫代谢分泌抗原的胶体金结合物，上述硝酸纤维素膜上以线形包被了弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体。

2、根据权利要求1所述的弓形虫免疫金标快速检测试剂的制备方法，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、被毛粗乱等症状时，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、制备抗弓形虫抗体：用弓形虫抗原免疫羊，琼扩检测达1:32~64时，采集免疫羊血清，用饱和硫酸法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；

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、制备弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物：将胶体金与弓形虫代谢分泌抗原按1:0.02 (ml/mg)比例搅拌混匀，使之形成稳定的复合物，通过纯化浓缩形成弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物；

e、将弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体以线形包被在硝酸纤维素膜的检测区和滞控区，充分干燥。

弓形虫免疫金标快速检测试剂及制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测抗体的免疫胶体金试剂及该试剂的制备方法。

背景技术

现有检测弓形虫抗体的方法主要有酶联免疫吸附和间接血凝法，这两种方法都有缺陷和不足。酶联免疫吸附法的缺点是：需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用；试剂需要低温保存；检测操作人员需要经过专业培训；操作过程相对复杂，检测所需时间比较长；检测所需费用较高，不能实现单人（头、只）份检测；不利于在基层单位进行推广使用。间接血凝法除上述缺点外还存在的缺陷是灵敏度低，容易出现漏检的情况。中国发明专利申请 CN1431513A 和 CN1431514A 分别公开了一种“检测弓形虫抗体 IgM 免疫胶体金试剂及制备方法”和一种“检测弓形虫抗体 IgG 免疫胶体金试剂及制备方法”，它们都存在以下的不足：（1）弓形虫特异性表面膜抗原和单克隆抗体的制备工艺繁琐；（2）试剂检测范围受到限制，只能检测人的弓形虫病；（3）该试剂不能同时检测抗弓形虫 IgG 和 IgM。

发明内容

本发明的目的是为了克服当前技术在推广使用中存在的缺陷，提供一种不需要特定仪器设备辅助的检测试剂，同时可检测人和各种动物的弓形虫抗体 IgG 及 IgM，并且能有效地降低检测成本，减轻检测人员的负担。本发明同时提供该试剂的制备方法。

本发明采取以下技术方案解决其所要解决的技术问题：

检测抗弓形虫抗体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，其特征在于结合垫包被了带有弓形虫代谢分泌抗原的胶体金结合物，硝酸纤维素膜上以线形包被了弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体。

该试剂的制备方法如下：（1）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、被毛粗乱等症状时，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，收集上清液；将上清液在-15℃~-70℃放置 24~48 小时，冻融化开后再次以 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。(2) 制备抗弓形虫抗体：用弓形虫抗原免疫羊，琼扩检测达 1: 32~64 时采集免疫羊血清，用饱和硫酸法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；(3) 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；(4) 制备弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物：将胶体金与弓形虫代谢分泌抗原按 1: 0.02 (ml/mg) 比例搅拌混匀，使之形成稳定的复合物，通过纯化浓缩形成弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物；(5) 将弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体以线形包被在硝酸纤维膜的检测区和滞控区，充分干燥。

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 μ 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。

本发明的积极效果在于：(1) 应用范围广，可检测人和各种动物的弓形虫抗体；(2) 快捷迅速，全过程只需 30 分钟；(3) 灵敏准确，敏感性和准确性高于间接血凝试剂，与 ELISA 试剂结果相同，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，价格是 ELISA 试剂的三分之二；(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 弓形虫金标试纸条特异性试验

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,用同一批次金标试纸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,证实该试纸条特异性良好。

表 2 弓形虫金标试纸条敏感性试验

检测方法	血清份数	阳性检出数	阳性检出率(%)
试纸条	288	138	48
ELISA	288	138	48
IHA	288	114	39.6

从表 2 可以看出,用同一批次金标试纸条检测 288 份猪血清并以 ELISA、IHA 法进行平行检测。金标试纸条、ELISA、IHA 法阳性检出率分别为 48% (138 / 288)、48% (138 / 288) 39.6% (114 / 288)。证实试纸条的敏感性明显高于 IHA 法而和 ELISA 相同。

具体实施方式

实施例 1

(1) 制备弓形虫代谢分泌抗原: 2006 年 3 月 3 日以 1×10^6 弓形虫速殖子/只, 腹腔接种 20-25 克体重小鼠 20 只, 3 月 5 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°C 冰箱内, 3 月 7 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, 检测上清液蛋白含量为 21.37mg/ml, 上清液即为弓形虫代谢分泌抗原, 置 -15°C 冰箱内备用。

(2) 制备弓形虫抗体: 2006 年 3 月 23 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 1×10^6 /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 1×10^7 /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) 制备胶体金及弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物：2006年5月13日取 $\text{HAuCl}_4 \cdot 0.1\text{g}$ ，用 1000ml 三蒸馏水将 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 K_2CO_3 将金溶胶 pH 值调至 8.9 左右，将 1000ml 金溶胶加入弓形虫代谢分泌抗原 20mg 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弓形虫代谢分泌抗原结合物，冷藏备用。

(4) 将弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体以线形包被在硝酸纤维膜的检测区和滞控区，充分干燥：

2006年5月28日，取金标弓形虫代谢分泌抗原均匀浸透无纺布，37℃温箱烘干过夜；硝酸纤维膜分别用 0.01mol/L pH7.4 PBS 稀释成 2g/L 的弓形虫代谢分泌抗原和 3g/L 抗弓形虫抗体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 0.3×8cm 的试剂条，即制成检测抗弓形虫抗体免疫金标快速检测试剂。

实施例 2

(1) 制备弓形虫代谢分泌抗原：2006年4月13日以 1×10^5 弓形虫速殖子/只，腹腔接种 20-25 克体重小鼠 20 只，4月17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 2-3 毫升 PH7.2PBS 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，上清置-20℃冰箱内，4月18日从冰箱取出上清，融化后再以每分钟 3000 转的速度离心 2 次，每次离心 40 分钟，收集上清，检测上清蛋白含量为 18.26mg/ml。上清即为弓形虫代谢

分泌抗原。

(2) 制备弓形虫抗体：2006年5月3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 1×10^6 /只腹腔加强免疫，再经过7天后采集少量血清进行琼扩检测，效价为1:16，又用弓形虫速殖子 1×10^7 /只腹腔加强免疫，再经过7天后采集少量血清进行琼扩检测，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) 制备胶体金及弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物：2006年6月13日取 $\text{HAuCl}_4 \cdot 0.1\text{g}$ ，用1000ml三蒸馏水将 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1ml；继续煮沸5min，直至溶液变成葡萄酒红色，冷却后用0.2mol/L K_2CO_3 将金溶胶pH值调至8.9左右，将1000ml金溶胶加入弓形虫代谢分泌抗原20mg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金稀释液中形成弓形虫代谢分泌抗原胶体金结合物，冷藏备用。

(4) 将弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体以线形包被在硝酸纤维膜的检测区和滞控区，充分干燥：

2006年6月28日，取金标弓形虫代谢分泌抗原均匀浸透无纺布，37℃温箱烘干过夜；硝酸纤维膜分别用0.01mol/L pH7.4 PBS稀释成2g/L的弓形虫代谢分泌抗原和3g/L抗弓形虫抗体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0.3×8cm的试剂条，即制成检测抗弓形虫抗体免疫金标快速检测试剂。

专利名称(译)	弓形虫免疫金标快速检测试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN101169413A	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	CN200610104848.4	申请日	2006-10-29
[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	G01N33/544 G01N33/532		
代理人(译)	鲜林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测抗弓形虫抗体的免疫金标快速检测试剂及制备方法，在PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，其结合垫包被了带有弓形虫代谢分泌抗原的胶体金结合物，硝酸纤维素膜上以线形包被了弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体。通过制备弓形虫代谢分泌抗原、制备抗弓形虫抗体、制备胶体金、制备弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物工艺，最后将弓形虫代谢分泌抗原胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将弓形虫代谢分泌抗原和抗弓形虫抗体以线形包被在检测区和滞控区制成试剂。本发明特异性强、敏感性高、简易快速、价格低廉，适合现场检测，全过程只需20分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

表2 弓形虫金标试纸条敏感性试验

检测方法	血清份数	阳性检出数	阳性检出率(%)
试纸条	288	138	48
ELISA	288	138	48
IHA	288	114	39.6