



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102944675 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 27

(21) 申请号 201210442992. 4

(22) 申请日 2012. 11. 07

(71) 申请人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市江干区石桥路
198 号

(72) 发明人 卢福庄 张雪娟 顾响 付媛
季敬余 冯尚连 俞国乔 杨玉焕
周煜 阳爱国 董国栋 郭莉
毛光琼 石团员

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务有限公
司 33214

代理人 沈伧伧

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

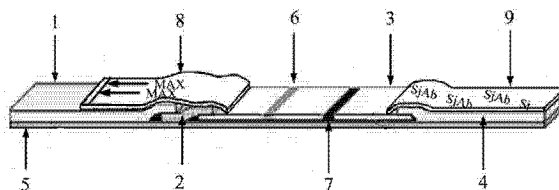
权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 1 页

(54) 发明名称

牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的制备及其
应用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种牛日本血吸虫病抗体检测
试纸条的制备及其应用方法,属于动物寄生虫病
诊断技术领域。试纸条由样品垫、免疫探针干片、
层析膜、吸水纸、PVC 基板及箭头标签胶膜与手柄
标签胶膜组合而成。免疫探针干片是以聚苯乙烯
乳胶微球的羧基与兔抗牛 IgG 抗体蛋白的胺基形
成共价键结合物后吸附于聚脂膜后制成;层析膜
是以锚固在硝酸纤维素膜上的血吸虫可溶性抗原
为检测线、羊抗兔 IgG 抗体为质控线制成;可快
速检测牛血清中的血吸虫抗体,操作简便,结果直
观、准确。可广泛用于牛血吸虫病的诊断、普查和
检疫。



1. 一种检测牛日本血吸虫病抗体的试纸条,其特征在于该试纸条由部件样品垫、免疫探针干片、层析膜、吸水纸、PVC 基板及箭头标签胶膜与手柄标签胶膜组合而成;其中,免疫探针干片是以红色或其它颜色羧基化聚苯乙烯乳胶微球的羧基,与兔抗黄牛 IgG 抗体蛋白的胺基形成共价键结合物后作为免疫探针的检测试剂液吸附于聚脂膜后制成;层析膜是以硝酸纤维素膜为膜基,用划膜喷金机将血吸虫卵可溶性抗原和羊抗兔 IgG 抗体分别在该膜上画出检测 T 线和质控 C 线而成;先将上述前四部件按头尾部分重叠粘合装配在 PVC 基板上,再将箭头标签胶膜粘贴在免疫探针干片上,另将手柄标签胶膜粘贴在吸水纸上后,用切条机按设定宽度裁切后即成牛日本血吸虫病抗体检测试纸条。

2. 一种制备权利要求 1 所述牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的方法,其特征在于按以下步骤进行:

(1) 免疫探针干片的制备:包括

1) 兔抗黄牛 IgG 的制备:

① 黄牛 IgG 的制备:采集健康黄牛、水牛血液,分别分离血清后取血清各 5ml 混合,加等量 0.85% NaCl,用 30% 硫酸铵沉淀法提取黄牛 IgG,沉淀的黄牛 IgG 用原血清体积 2 倍量的 0.85% NaCl 溶解,再用 35% 硫酸铵沉淀法重复提取 2 次,最后用 5ml 0.85% NaCl 溶解离心沉淀的黄牛 IgG,用透析法除去溶液中的 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 后,再用蒸馏水稀释或将透析袋放入 PEG 中浓缩的方法,调节蛋白浓度至 10mg/ml 后,于 -20°C 密封贮存备用;

② 黄牛 IgG 免疫兔:将黄牛 IgG 与弗氏完全佐剂按体积 3:7 比例制成油乳剂,按黄牛 IgG 6mg/只兔用量,对体重 2.5kg 的健康雄性家兔,在兔颈部皮下和兔双侧后足蹠垫皮下注射进行首次免疫;后除用弗氏不完全佐剂替代弗氏完全佐剂外,再按上述同样配比、方法,每隔两周进行一次加强免疫,共进行三次;第 4 次后 10 天,取耳静脉少量血分离血清,用琼脂扩散法测定免疫血清效价,当血清效价 $\geq 1:64$ 时,即可心脏大量采血、分离血清后,备用;

③ 兔抗黄牛 IgG 抗体的制备:取兔抗黄牛 IgG 血清 10ml,以 35% 硫酸铵沉淀法提取兔抗黄牛 IgG 抗体,以 2 倍于血清量的 0.85% NaCl 溶解沉淀的兔抗黄牛 IgG 抗体,如此反复提取 3 次后,将第 3 次硫酸铵沉淀的兔抗黄牛 IgG 抗体的离心沉淀物以 5ml 0.85% NaCl 溶解,用透析法除去溶液中的 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} ;在蛋白测定仪上测定兔抗黄牛 IgG 抗体蛋白含量后,用 pH7.20 0.1M 的硼酸缓冲液稀释或将透析袋放入 PEG 中浓缩的方法,将蛋白浓度调节至 4mg/ml 后,于 -20°C 密封贮存备用;

2) 乳胶微球的洗涤:将直径 200nm 红色或其它颜色的聚苯乙烯乳胶微球液,在 10000 rpm, 4°C 条件下离心 10min,去上清液,沉淀物用高纯水还原为原体积,用超声波分散沉淀的乳胶微球成为均匀悬浮液后,再用上述相同的方法重复离心、重悬浮 1~2 次;

3) 乳胶微球羧基的激活:将 pH6.5 0.1mol MES, 10% 带色乳胶微球的悬液, 20mg/mL 的 EDC·HCl 和 20mg/mL 的 NHS,按体积 9:2:1:0.75 的比例混合、反应 2hr;然后在 11000 rpm 4°C 条件下离心 25min,除去上清液,沉淀物以所用带色乳胶体积 5 倍量的 pH7.20 0.1M 的硼酸缓冲液重悬,以超声波击打还原成均匀的悬浮液;用垂直混合仪混合 15min,在 11000 rpm, 4°C 条件下离心 25min 除去上清液,沉淀物以所用带色乳胶体积 2.5 倍量的 pH7.20 0.1 M 的硼酸缓冲液重悬,以超声波击打还原成均匀的悬浮液,即为羧基活化的乳胶微球;

4) 乳胶微球标记兔抗黄牛 IgG 抗体:往装有羧基活化乳胶微球悬浮液的离心管中

加入等体积以 pH7.20 0.1M 的硼酸缓冲液稀释成蛋白浓度为 1 ~ 4mg/mL 的兔抗黄水牛 IgG 抗体,在垂直混合仪上混合反应 2hr 以上;再加入总体积十分之一量的 20%BSA 振荡反应 1hr,反应后的混合物以 11000 rpm 4℃离心 25min,除去上清液,沉淀物以含酪蛋白 0.2% ~ 0.5%、蔗糖 5% ~ 10%、 NaN_3 0.02% ~ 0.05% 的 pH7.2 0.05M Tris-HCl 缓冲液构成的封闭液原体积重悬,超声波击打还原成均匀的悬浮液,在垂直混合仪上混合 15min,再次以 11000rpm 4℃离心 25min,除去上清液,沉淀物以相当于乳胶微球悬浮液和兔抗黄水牛 IgG 抗体两者总体积 75% 的同上封闭液重悬,超声波击打还原成均匀的悬浮液,该液即为红色或其它颜色的免疫探针检测试剂液;

5) 免疫探针干片的制备:将上述的免疫探针检测试剂液用划膜喷金机以 2 ~ 5 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 的流速喷涂在已经过含酪蛋白 0.2% ~ 0.5%,蔗糖 5% ~ 10%, NaN_3 0.02% ~ 0.05%, Tween-20 0.2% ~ 0.5% 的 pH7.2 0.05M Tris-HCl 缓冲液构成的聚酯膜处理液预处理后的长 300mm × 宽 8.5mm 的聚酯膜上,经 37℃, 1hr 烘干,即为免疫探针干片;

(2) 层析膜的制备:

1) 血吸虫卵可溶性抗原的制备:按体重 2.5 ~ 3kg 的健康新西兰兔,每只接种血吸虫尾蚴 2000 条,实验感染兔于接种后 45 日屠宰取肝脏,分离和纯化血吸虫虫卵,经冷冻干燥后研磨破碎,用 0.85%NaCl 溶液配成 3% ~ 5% 悬浮液,2 ~ 8℃浸泡 3 日,再反复冻融 10 次,冰浴超声波破碎 30min,10000r/min 离心 1hr,取上清液,装透析袋,用 pH7.0 0.01M PB 透析 16 小时,每隔 4 小时换透析液 1 次,透析结束后,以 10000rp 离心 60min,上清液即为血吸虫卵可溶性抗原;检测其蛋白含量后,用 pH8.2 ~ 8.5 0.05M TBS 稀释至 1 ~ 7mg/mL 浓度,即可用于层析膜上检测 T 线的绘制;

2) 羊抗兔 IgG 的制备:

①兔 IgG 的制备:以心脏采血法采集健康新西兰兔的血液,分离血清,取兔血清 10ml,再加 10ml 0.85% NaCl 混匀,用 35% 硫酸铵沉淀法提取兔 IgG,反复沉淀提取 3 次,沉淀物用 5ml 0.85% NaCl 溶解后,用透析法除去硫酸铵,并在蛋白测定仪上测定兔 IgG 的蛋白含量;

②羊抗兔 IgG 抗体的制备:用弗氏佐剂将兔 IgG 溶液配制成 1mg/ml,用超声波制成乳浊液;按照每千克体重 2mg 的剂量皮下注射免疫羊,每间隔 2 周,再用弗氏不完全佐剂和兔 IgG 制备成相同浓度的乳浊液,以相同剂量与方法免疫羊,第 3 次免疫后 10d 颈静脉采血分离血清,以琼脂免疫扩散法测定血清中羊抗兔 IgG 抗体效价 $\geq 1:32$ 以上时,即可大量采集羊血并制取血清;

分离羊抗兔 IgG 抗体先用 30% 硫酸铵沉淀法提取粗羊抗兔 IgG 抗体一次,再用 45% 硫酸铵沉淀法提取 2 次,离心沉淀物用 5ml 0.85% NaCl 溶解,用透析法除去溶液中的 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} ,3000rpm 离心 30min,检测上清液蛋白含量后,用 pH8.2 ~ 8.5 0.05M TBS 将上清液稀释成 0.1 ~ 2mg/mL 的浓度,即可用于层析膜上质控 C 线的绘制;

3) 检测线和质控线的制作:将长 25mm × 宽 300mm 的硝酸纤维素膜放在划膜喷金机的操作平台上,在该机 1# 泵的试剂瓶中加入血吸虫卵可溶性抗原,2# 泵的试剂瓶中加入羊抗兔 IgG,以 1 ~ 3 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 的流速,在硝酸纤维素膜上划出检测 T 线和质控 C 线,两线相距 5 ~ 6mm,置室内晾干即为层析膜;

(3) 样品垫的制备:将 23mm × 300mm 玻璃纤维膜在由含酪蛋白 0.01% ~ 0.05%,蔗糖 5% ~ 10%、 NaN_3 0.02% ~ 0.05% 和 Tween-20 0.2% ~ 0.5% 的 pH7.2 0.04M Tris-HCl 缓冲

液构成的样品垫处理液中浸泡 1hr,取出,37℃烘干即成;

(4) 吸水纸的制备:CH37 吸水纸裁成长 300mm× 宽 28mm 的纸条,置 37℃烘干即成;

(5) PVC 基板的制备:PVC 板其结构为三层,第一层为保护纸,第二层为不干胶,第三层为 PVC 基板;在保护纸上刻有三条刻痕,分别位于距离一侧长边的 20mm、27mm 和 53mm 处;将 PVC 板按长 300mm× 宽 80mm 规格裁剪后备用;

(6) 标签胶膜的制备:用不干胶贴纸印制而成;其中,

1) 箭头标签胶膜:其规格为长 300mm× 宽 18mm,在距一侧长边 1mm 处印有一条直线,在该直线的上方,每隔 1.3mm 印有一条“← MAX”字样,箭头与直线垂直;指示试纸条样品垫可浸入待测溶液的最大深度不得超过这条直线;

2) 手柄标签胶膜:其规格为长 303mm× 宽 30mm,绿底白字,与长边呈 15° 夹角印有 4 列“SjAb”字样,SjAb 为 *Schistosoma japonicum* Antibody 的缩写,表示该试纸条用于检测日本血吸虫抗体,该部位为试纸条拿取时的手柄部位;

(7) 试纸条各部件的组装、切条、包装和贮存:

1) 试纸条各部件的组装:试纸条以长 300mm× 宽 80mm 的 PVC 为基板,依次将 300mm× 23mm 的样品垫、300mm× 8.5mm 的免疫探针干片、300mm× 25mm 的层析膜及 300mm× 28mm 的吸水纸,按头尾各有 1~2mm 的重叠连接、粘贴在带不干胶面的 PVC 基板上;再在吸水垫的尾部与免疫探针干片上粘贴上箭头标签胶膜;另在样品垫上粘贴上手柄标签胶膜;各部件压平,粘贴牢固即成试纸条大卡;

2) 切条:将试纸条大卡放在切条机上,按 3mm 宽度连续切割,即成宽 3mm× 长 80mm 的试纸条;

3) 包装与贮存:试纸条抽检合格后,按包装规格要求装入铝箔袋中,放入 1 小包干燥剂后,封口,即成产品;在 2~8℃保存,有效期为 12 个月。

3. 应用权利要求 1 所述试纸条检测牛日本血吸虫病抗体的方法,其特征在于按以下步骤进行:

(1) 血清稀释液的配制:将 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 与蒸馏水按重量体积 0.199g : 0.082g : 1g : 200ml 比例混合,37~40℃水浴加热溶解、冷却后即成血清稀释液;

(2) 待检牛血清的稀释:将待检牛血清与血清稀释液按体积 1:1~2 比例混合稀释;

(3) 检测操作:吸取稀释的待检血清 0.05ml 滴在平放的试纸条的样品垫上,或将试纸条的样品垫端插入待检稀释血清中至箭头标签胶膜所印的直线条 15s 后,平放在操作台面上;

(4) 结果判定:5~15min 后观察结果,检测 T 线和质控 C 线均呈现红色或其它颜色的同色条带,则判为阳性;仅质控 C 线呈现 1 条红色或其它颜色的条带,则判为阴性;检测 T 线和质控 C 线均不呈现条带,则说明该试纸条已失效或试验操作有误。

牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的制备及其应用方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及家畜寄生虫病的诊断技术领域,具体涉及牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的制备及其应用方法。

【背景技术】

[0002] 血吸虫病是人畜共患的寄生虫病。当前我国尚有 7 省(自治区)100 多个县未达到血吸虫病的传播控制标准。牛是血吸虫病的重要传染源。由于受长江季节性洪水等自然因素及人畜流动频繁等社会因素的影响,近年来我国血吸虫病疫情又出现了反复,患病的人畜增加。我国一直来均将血吸虫病列为动物疫病监测及检疫的重要对象。因此,对调运家畜的血吸虫病的过境检疫、对现疫区家畜的血吸虫病普查及对历史上曾经发生过血吸虫病流行区的牲畜的监测是一项长期而艰巨的任务。因此,研究家畜血吸虫病快速检测的方法对防制和消灭血吸虫病具有重要意义。

[0003] 目前诊断家畜血吸虫病的方法主要有粪孵血吸虫毛蚴法、ELISA 法、IHA 法和金标免疫渗滤法。粪孵毛蚴法只有在动物感染血吸虫后 5 周以上才能粪孵出血吸虫毛蚴,并且粪便中的虫卵数量有波动,轻度感染的病畜尤易漏检,且用粪孵法检测一个样品需耗时 5 ~ 6 个小时,随着劳动力工资大幅上涨,该法在家畜血吸虫病的普查中已很少被采用。ELISA 方法操作繁琐、时间长、酶试剂难以保存、影响因素多,检测需专用仪器设备、试验中使用的某些材料易造成环境污染,对人健康有害。IHA 稳定性较差,敏感性不如 ELISA 法,实验所需时间也较长。ELISA 法和 IHA 法都不能满足现场检疫的要求。金标免疫渗滤法具有检测速度快、操作简便不需特殊仪器等特点,适合于血吸虫病的现场检疫、诊断和普查。但其诊断试剂为液体,稳定性较差,保存要求高(需 4℃ 冰箱保存),保存期短(仅 6 个月),试剂及反应板体积大,邮寄和航空运输受限,增加了保存、运输费用及运输所需的时间。金标免疫层析法可以克服金标免疫渗滤法的这些缺点。国内有数家单位对人血吸虫病金标免疫层析法进行过研究,但由于各种原因都没有批量生产和实践中推广开来。

[0004] 从理论上分析,胶体金与抗原或抗体的结合均是通过正负电荷的静电引力结合在一起的。这种结合的牢固程度容易受溶液 pH 值和其他离子强度的影响,因此其最适 pH 范围往往很小,检测的可重复性较差。胶体金与抗原或抗体的结合还可能被血液或试剂中加入的称作为稳定剂的其它蛋白与胶体金之间竞争性结合的影响,使试剂较快失效或者出现假阳性。可以说这是金标方法本身具有的局限性。

[0005] 从理论上说,通过共价键使分子之间结合的牢固程度要强于由静电引力结合的程度。乳球免疫层析技术正是继免疫胶体金技术后新近发展起来的一种以共价键结合为特点的免疫标记新技术。本发明的检测试剂为乳胶微球标记的兔抗黄牛 IgG 抗体,乳胶微球与兔抗黄牛 IgG 抗体之间以共价键结合,所以该复合物稳定性好,且乳胶微球的直径比胶体金大 10 ~ 20 倍,信号强度大,可提高试剂的灵敏度和阳性样本的检出率。

【发明内容】

[0006] 本发明目的是,针对牛日本血吸虫病 ELISA 和 IHA 诊断法存在操作步骤多、速度慢、不能满足现场检疫需求,和金标免疫渗滤法检测试剂系液体,保存期较短,不能空运或邮寄等缺陷,为牛日本血吸虫病的诊断、检疫和普查提供一种敏感、特异、安全、稳定性好、信号强度大,且为固体状态、没有污染的检测试纸条,及在 5 ~ 15 分钟内即可完成的快速、简便的检测方法。

[0007] 本发明的原理是:采用有机化学方法使红色或其它颜色的聚苯乙烯乳胶微球羧基化后,使兔抗黄水牛 IgG 抗体蛋白的胺基与乳胶微球的羧基形成共价键,使该染色乳胶微球标记的兔抗黄水牛 IgG 抗体的结合物作为检测试剂(免疫探针);再将该液状的乳胶微球-兔抗黄水牛 IgG 抗体结合物以喷雾法使之吸附在聚脂膜上,经烘干成固体状的免疫探针干片;另以硝酸纤维素膜作为层析膜,并用划膜喷金仪在该膜的不同位置上画出血吸虫卵可溶性抗原和羊抗兔 IgG 抗体两条直线,分别作为检测线(T线)和质控线(C线);然后按照样品垫、免疫探针干片、层析膜和吸水滤纸的顺序,以头尾部分重叠的形式装配在 PVC 基板上,再贴上箭头标签胶膜与手柄标签胶膜后,用切条机按设定宽度裁切后即成牛日本血吸虫病抗体检测试纸条。

[0008] 检测时,将待检稀释血清滴在试纸条的样品垫上(或将裸露的样品垫插入待检稀释血清中 10s),血清液通过毛细管作用流经免疫探针干片,将吸附在聚酯膜上的乳胶微球-兔抗黄水牛 IgG 抗体结合物溶解成游离状,如果血样中存在有牛抗血吸虫抗体(即阳性牛血样),则该血样中的抗体将会与部分游离状的乳胶微球-兔抗黄水牛 IgG 抗体结合物相结合,形成牛抗血吸虫抗体-兔抗黄水牛 IgG 抗体-乳胶微球的三联红色或其它颜色的复合物后,并沿着硝酸纤维素膜继续向前移行,当这种红色或其它颜色的复合物移行到预先锚固着血吸虫抗原的检测线(T线)上时,该血吸虫抗原将会与复合物中的牛抗血吸虫抗体相结合,而形成更大的四联复合物而使 T 线呈显红色或其它颜色的条带;而剩余的未与牛抗血吸虫抗体相结合的游离状乳胶微球-兔抗黄水牛 IgG 抗体结合物将继续往前移行,当与锚固在硝酸纤维素膜上的羊抗兔 IgG 抗体质控线(C线)相遇时,便形成羊抗兔 IgG 抗体-兔抗黄水牛 IgG 抗体-乳胶微球的三联红色复合物,使 C 线呈现红色条带;如果血样中不存在牛抗血吸虫抗体(即阴性牛血样),则就不能形成牛抗血吸虫抗体-兔抗黄水牛 IgG 抗体-乳胶微球的三联复合物,而单纯的乳胶微球-兔抗黄水牛 IgG 抗体结合物是不能与 T 线上的血吸虫抗原相结合的,所以检测线(T线)不能呈现红色或其它颜色的条带,而只有质控线(C线)仍呈显红色或其它颜色的条带;如果检测线与质控线均没有出现红色条带,则说明该试纸条已失效或者检测操作有误。

[0009] 本发明目的通过以下技术方案予以实现:

[0010] 1、一种检测牛日本血吸虫病抗体的试纸条,该试纸条由部件样品垫、免疫探针干片、层析膜、吸水纸、PVC 基板及箭头标签胶膜与手柄标签胶膜组合而成;其中,免疫探针干片是以红色或其它颜色羧基化聚苯乙烯乳胶微球的羧基,与兔抗黄水牛 IgG 抗体蛋白的胺基形成共价键结合物后作为免疫探针的检测试剂液吸附于聚脂膜后制成;层析膜是以硝酸纤维素膜为膜基,用划膜喷金机将血吸虫卵可溶性抗原和羊抗兔 IgG 抗体分别在该膜上画出检测 T 线和质控 C 线而成;先将上述前四部件按头尾部分重叠粘合装配在 PVC 基板上,再将箭头标签胶膜粘贴在免疫探针干片上,另将手柄标签胶膜粘贴在吸水纸上后,用切条机按设定宽度裁切后即成牛日本血吸虫病抗体检测试纸条。

[0011] 2、一种制备牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的方法,该方法按以下步骤进行:

[0012] (1) 免疫探针干片的制备:包括

[0013] 1) 兔抗黄水牛 IgG 的制备:

[0014] ①黄水牛 IgG 的制备:采集健康黄牛、水牛血液,分别分离血清后取血清各 5ml 混合,加等量 0.85%NaCl,用 30% 硫酸铵沉淀法提取黄水牛 IgG,沉淀的黄水牛 IgG 用原血清体积 2 倍量的 0.85%NaCl 溶解,再用 35% 硫酸铵沉淀法重复提取 2 次,最后用 5ml 0.85%NaCl 溶解离心沉淀的黄水牛 IgG,用透析法除去溶液中的 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 后,再用蒸馏水稀释或将透析袋放入 PEG 中浓缩的方法,调节蛋白浓度至 10mg/ml 后,于 -20°C 密封贮存备用;

[0015] ②黄水牛 IgG 免疫兔:将黄水牛 IgG 与弗氏完全佐剂按体积 3:7 比例制成油乳剂,按黄水牛 IgG 6mg/ 只兔用量,对体重 2.5kg 的健康雄性家兔,在兔颈部皮下和兔双侧后足蹠垫皮下注射进行首次免疫;后除用弗氏不完全佐剂替代弗氏完全佐剂外,再按上述同样配比、方法,每隔两周进行一次加强免疫,共进行三次;第 4 次后 10 天,取耳静脉少量血分离血清,用琼脂扩散法测定免疫血清效价,当血清效价 $\geq 1:64$ 时,即可心脏大量采血、分离血清后,备用;

[0016] ③兔抗黄水牛 IgG 抗体的制备:取兔抗黄水牛 IgG 血清 10ml,以 35% 硫酸铵沉淀法提取兔抗黄水牛 IgG 抗体,以 2 倍于血清量的 0.85%NaCl 溶解沉淀的兔抗黄水牛 IgG 抗体,如此反复提取 3 次后,将第 3 次硫酸铵沉淀的兔抗黄水牛 IgG 抗体的离心沉淀物以 5ml 0.85%NaCl 溶解,用透析法除去溶液中的 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} ;在蛋白测定仪上测定兔抗黄水牛 IgG 抗体蛋白含量后,用 pH7.200.1M 的硼酸缓冲液稀释或将透析袋放入 PEG 中浓缩的方法,将蛋白浓度调节至 4mg/ml 后,于 -20°C 密封贮存备用;

[0017] 2) 乳胶微球的洗涤:将直径 200nm 红色或其它颜色的聚苯乙烯乳胶微球液,在 10000rpm, 4°C 条件下离心 10min,去上清液,沉淀物用高纯水还原为原体积,用超声波分散沉淀的乳胶微球成为均匀悬浮液后,再用上述相同的方法重复离心、重悬浮 1~2 次;

[0018] 3) 乳胶微球羧基的激活:将 pH6.50.1mol MES,10% 带色乳胶微球的悬液,20mg/mL 的 EDC·HCl 和 20mg/mL 的 NHS,按体积 9:2:1:0.75 的比例混合、反应 2hr;然后在 11000rpm 4°C 条件下离心 25min,除去上清液,沉淀物以所用带色乳胶体积 5 倍量的 pH7.200.1M 的硼酸缓冲液重悬,以超声波击打还原成均匀的悬浮液;用垂直混合仪混合 15min,在 11000rpm, 4°C 条件下离心 25min 除去上清液,沉淀物以所用带色乳胶体积 2.5 倍量的 pH7.200.1M 的硼酸缓冲液重悬,以超声波击打还原成均匀的悬浮液,即为羧基活化的乳胶微球;

[0019] 4) 乳胶微球标记兔抗黄水牛 IgG 抗体:往装有羧基活化乳胶微球悬浮液的离心管中加入等体积以 pH7.200.1M 的硼酸缓冲液稀释成蛋白浓度为 1~4mg/mL 的兔抗黄水牛 IgG 抗体,在垂直混合仪上混合反应 2hr 以上;再加入总体积十分之一量的 20%BSA 振荡反应 1hr,反应后的混合物以 11000rpm 4°C 离心 25min,除去上清液,沉淀物以含酪蛋白 0.2%~0.5%、蔗糖 5%~10%、 NaN_3 0.02%~0.05% 的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的封闭液原体积重悬,超声波击打还原成均匀的悬浮液,在垂直混合仪上混合 15min,再次以 11000rpm 4°C 离心 25min,除去上清液,沉淀物以相当于乳胶微球悬浮液和兔抗黄水牛 IgG 抗体两者总体积 75% 的同上封闭液重悬,超声波击打还原成均匀的悬浮液,该液即为红色或其它颜色的免疫探针检测试剂液;

[0020] 5) 免疫探针干片的制备:将上述的免疫探针检测试剂液用划膜喷金机以 $2 \sim 5 \mu\text{l}/\text{cm}$ 的流速喷涂在已经过含酪蛋白 0.2% ~ 0.5%, 蔗糖 5% ~ 10%, NaN_3 0.02% ~ 0.05%, Tween-20 0.2% ~ 0.5% 的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的聚酯膜处理液预处理后的长 300mm × 宽 8.5mm 的聚酯膜上,经 37°C, 1hr 烘干,即为免疫探针干片;

[0021] (2) 层析膜的制备:

[0022] 1) 血吸虫卵可溶性抗原的制备:按体重 2.5 ~ 3kg 的健康新西兰兔,每只接种血吸虫尾蚴 2000 条,实验感染兔于接种后 45 日屠宰取肝脏,分离和纯化血吸虫虫卵,经冷冻干燥后研磨破碎,用 0.85%NaCl 溶液配成 3% ~ 5% 悬浮液,2 ~ 8°C 浸泡 3 日,再反复冻融 10 次,冰浴超声波破碎 30min, 10000r/min 离心 1hr,取上清液,装透析袋,用 pH7.00.01M PB 透析 16 小时,每隔 4 小时换透析液 1 次,透析结束后,以 10000rp 离心 60min,上清液即为血吸虫卵可溶性抗原;检测其蛋白含量后,用 pH8.2 ~ 8.50.05M TBS 稀释至 1 ~ 7mg/mL 浓度,即可用于层析膜上检测 T 线的绘制;

[0023] 2) 羊抗兔 IgG 的制备:

[0024] ①兔 IgG 的制备:以心脏采血法采集健康新西兰兔的血液,分离血清,取兔血清 10ml,再加 10ml 0.85%NaCl 混匀,用 35% 硫酸铵沉淀法提取兔 IgG,反复沉淀提取 3 次,沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 溶解后,用透析法除去硫酸铵,并在蛋白测定仪上测定兔 IgG 的蛋白含量;

[0025] ②羊抗兔 IgG 抗体的制备:用弗氏佐剂将兔 IgG 溶液配制成 1mg/ml,用超声波制成乳浊液;按照每千克体重 2mg 的剂量皮下注射免疫羊,每间隔 2 周,再用弗氏不完全佐剂和兔 IgG 制备成相同浓度的乳浊液,以相同剂量与方法免疫羊,第 3 次免疫后 10d 颈静脉采血分离血清,以琼脂免疫扩散法测定血清中羊抗兔 IgG 抗体效价 $\geq 1:32$ 以上时,即可大量采集羊血并制取血清;

[0026] 分离羊抗兔 IgG 抗体先用 30% 硫酸铵沉淀法提取粗羊抗兔 IgG 抗体一次,再用 45% 硫酸铵沉淀法提取 2 次,离心沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 溶解,用透析法除去溶液中的 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} , 3000rpm 离心 30min,检测上清液蛋白含量后,用 pH8.2 ~ 8.50.05M TBS 将上清液稀释成 0.1 ~ 2mg/mL 的浓度,即可用于层析膜上质控 C 线的绘制;

[0027] 3) 检测线和质控线的制作:将长 25mm × 宽 300mm 的硝酸纤维素膜放在划膜喷金机的操作平台上,在该机 1# 泵的试剂瓶中加入血吸虫卵可溶性抗原,2# 泵的试剂瓶中加入羊抗兔 IgG,以 $1 \sim 3 \mu\text{l}/\text{cm}$ 的流速,在硝酸纤维素膜上划出检测 T 线和质控 C 线,两线相距 5 ~ 6mm,置室内晾干即为层析膜;

[0028] (3) 样品垫的制备:将 23mm × 300mm 玻璃纤维膜在由含酪蛋白 0.01% ~ 0.05%, 蔗糖 5% ~ 10%、 NaN_3 0.02% ~ 0.05% 和 Tween-20 0.2% ~ 0.5% 的 pH7.20.04MTris-HCl 缓冲液构成的样品垫处理液中浸泡 1hr,取出,37°C 烘干即成;

[0029] (4) 吸水纸的制备:CH37 吸水纸裁成长 300mm × 宽 28mm 的纸条,置 37°C 烘干即成;

[0030] (5) PVC 基板的制备:PVC 板其结构为三层,第一层为保护纸,第二层为不干胶,第三层为 PVC 基板;在保护纸上刻有三条刻痕,分别位于距离一侧长边的 20mm、27mm 和 53mm 处;将 PVC 板按长 300mm × 宽 80mm 规格裁剪后备用;

[0031] (6) 标签胶膜的制备:用不干胶贴纸印制而成;其中,

[0032] 1) 箭头标签胶膜:其规格为长 300mm × 宽 18mm,在距一侧长边 1mm 处印有一条直

线,在该直线的上方,每隔 1.3mm 印有一条“← MAX”字样,箭头与直线垂直;指示试纸条样品垫可浸入待测溶液的最大深度不得超过这条直线;

[0033] 2) 手柄标签胶膜:其规格为长 303mm×宽 30mm,绿底白字,与长边呈 15° 夹角印有 4 列“SjAb”字样,SjAb 为 Schistosoma japonicum Antibody 的缩写,表示该试纸条用于检测日本血吸虫抗体,该部位为试纸条拿取时的手柄部位;

[0034] (7) 试纸条各部件的组装、切条、包装和贮存:

[0035] 1) 试纸条各部件的组装:试纸条以长 300mm×宽 80mm 的 PVC 为基板,依次将 300mm×23mm 的样品垫、300mm×8.5mm 的免疫探针干片、300mm×25mm 的层析膜及 300mm×28mm 的吸水纸,按头尾各有 1~2mm 的重叠连接、粘贴在带不干胶面的 PVC 基板上;再在吸水垫的尾部与免疫探针干片上粘贴上箭头标签胶膜;另在样品垫上粘贴上手柄标签胶膜;各部件压平,粘贴牢固即成试纸条大卡;

[0036] 2) 切条:将试纸条大卡放在切条机上,按 3mm 宽度连续切割,即成宽 3mm×长 80mm 的试纸条;

[0037] 3) 包装与贮存:试纸条抽检合格后,按包装规格要求装入铝箔袋中,放入 1 小包干燥剂后,封口,即成产品;在 2~8℃ 保存,有效期为 12 个月。

[0038] 3、应用试纸条检测牛日本血吸虫病抗体的方法,该方法按以下步骤进行:

[0039] (1) 血清稀释液的配制:将 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 与蒸馏水按重量体积 0.199g : 0.082g : 1g : 200ml 比例混合,37~40℃ 水浴加热溶解、冷却后即成血清稀释液;

[0040] (2) 待检牛血清的稀释:将待检牛血清与血清稀释液按体积 1:1~2 比例混合稀释;

[0041] (3) 检测操作:吸取稀释的待检血清 0.05ml 滴在平放的试纸条的样品垫上,或将试纸条的样品垫端插入待检稀释血清中至箭头标签胶膜所印的直线 15s 后,平放在操作台面上;

[0042] (4) 结果判定:5~15min 后观察结果,检测 T 线和质控 C 线均呈现红色或其它颜色的同色条带,则判为阳性;仅质控 C 线呈现 1 条红色或其它颜色的条带,则判为阴性;检测 T 线和质控 C 线均不呈现条带,则说明该试纸条已失效或试验操作有误。

[0043] 本发明的有益效果是:

[0044] (1) 用本发明试纸条检测牛血吸虫病无需复杂仪器和专门知识技能,操作简便、快捷,5~15min 就可得出结果。

[0045] (2) 本发明试纸条体积小、重量轻、全固态,可方便邮寄或航空托运。

[0046] (3) 试纸条有效期可达 1 年以上,比免疫金标渗滤法检测试剂的保存期长。

[0047] (4) 本发明试纸条的检测特异性与 IHA 和 ELISA 方法相当,重复性好,适合于工厂化生产。

[0048] (5) 本发明用黄、水牛 IgG 免疫兔以制备兔抗黄牛 IgG 抗体,与单纯使用黄牛 IgG 免疫兔的方法相比,①产生的兔抗黄牛 IgG 抗体效价高 4 倍 (1:64vs 1:16),兔抗黄牛 IgG 抗体效价高可以相对减少用量,降低成本;②使用黄、水牛 IgG 免疫兔制备的兔抗黄牛 IgG 抗体可以提高血吸虫阳性水牛血清中抗体检测的敏感性。用兔抗黄牛 IgG 抗体制备的试纸条检测实验感染血吸虫尾蚴 49 天的 2 倍稀释水牛血清,呈现阳性反应,检测 3 倍稀

释血清只呈现弱阳性反应(+),但用兔抗黄水牛 IgG 抗体制备的试纸条检测同样 3 倍稀释血清,却呈现强阳性反应(+++).所以用本发明的兔抗黄水牛 IgG 抗体制备免疫探针试剂液比使用通常的兔抗黄牛 IgG 抗体更具优势。

【附图说明】

[0049] 图 1 贴标签胶膜前试纸条的结构示意图

[0050] 图 2 贴标签胶膜后试纸条的结构示意图

[0051] 其中,1 样品垫、2 免疫探针干片、3 层析膜、4 吸水纸、5PVC 基板、6 检测 T 线、7 质控 C 线、8 箭头标签胶膜、9 手柄标签胶膜

[0052] 本发明以图 2 作为摘要附图。

【实施方式】

[0054] 通过以下实施例和试验例并结合附图对本发明作进一步的详细描述,但本发明的内容并不局限于此。

[0055] 实施例 1:(检测牛日本血吸虫病抗体试纸条的制备 1)

[0056] 1 试纸条的制备

[0057] 1.1 免疫探针干片制备

[0058] 1.1.1 兔抗黄水牛 IgG 的制备

[0059] (1)黄水牛 IgG 的提取

[0060] ①无菌操作采集健康黄牛及水牛血液,分别分离血清。

[0061] ②取黄牛及水牛血清各 5ml 混合,再加 10ml 0.85%NaCl 混匀,逐滴加入饱和硫酸铵(SAS)8.6ml 使之达到 30% 饱和度,边加边搅拌,并用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃ 过夜,取出室温平衡 1hr,以 3000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀物加入 20ml 0.85%NaCl 溶解。再逐滴加入 SAS 10.8ml 使之达到 35% 饱和度,边加边搅拌,用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃ 3hr 后取出,室温平衡 1hr,以 3000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀物加入 20ml 0.85%NaCl 溶解。用 35% 饱和度硫酸铵再重复提取一次。离心后沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 溶解后,装入直径 2cm 的透析袋透析内密封。

[0062] ③在 4℃ 条件下进行透析,开始先用蒸馏水透析 8 小时,换液 4 次,再用 0.01mol pH7.0 磷酸盐缓冲液(PB)透析 6 小时,换液 2 次,以除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 。透析后的黄水牛 IgG 即可达到免疫兔的纯度要求。

[0063] ④用紫外分光光度法测得黄水牛 IgG 蛋白质浓度为 5.3mg/ml, PEG 浓缩调整为 10mg/ml。

[0064] (2)黄水牛 IgG 免疫兔

[0065] ①试验动物选体重 2.5kg 健康雄性家兔 2 只。

[0066] ②黄水牛 IgG 的乳化首免的油乳剂由黄水牛 IgG 与弗氏完全佐剂按 3:7 比例混合,超声波击打使之乳化,直至将黄水牛 IgG 油乳剂滴于冷水表面,能较长时间保持完整而不分散,即可应用。2-4 免的油乳剂由黄水牛 IgG 与弗氏不完全佐剂按 3:7 比例制成。

[0067] ③免疫首次免疫在兔头颈部皮下、兔双侧后足蹠垫皮下各注射黄水牛 Ig 乳剂 4ml(黄水牛 IgG 的蛋白总量为 12mg),两周后,每周用黄水牛 IgG 加强免疫 1 次,免疫黄水牛 IgG 的蛋白总量为 12mg。如次重复 3 次,末次免疫 10 天后,耳静脉取少量血,分离出血清,

用琼脂扩散法测定免疫血清的效价,待血清效价达 1:64 或以上时即心脏采血,分离血清。

[0068] (3)兔抗黄水牛 IgG 抗体的提取

[0069] ①取兔抗黄水牛 IgG 血清 10ml,加入等量的 0.85%NaCl 混匀,逐滴加入 SAS 10.8ml 使之达到 35%饱和度,边加边搅拌,并用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃过夜后取出,室温平衡 1 小时,以 3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀物加入 20ml 0.85%NaCl 溶解。置 4℃ 3hr 后取出,室温平衡 1hr,逐滴加入 SAS10.8ml 使之达到 35%饱和度,边加边搅拌,用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃ 3hr 后取出,室温平衡 1 小时,以 35%饱和度硫酸铵再重复提取一次,离心后沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 溶解后,装入直径 2cm 的透析袋内。

[0070] (4)透析提纯透析在 4℃下进行,开始先用蒸馏水透析 8 小时,换液 4 次,再用 0.01mol pH7.0 磷酸盐缓冲液 (PB) 透析 6 小时,换液 2 次,以除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 。

[0071] (5)蛋白含量测定用紫外分光光度法测得兔抗黄水牛 IgG 的蛋白质浓度为 5.0mg/ml,用 pH7.20.1M 硼酸缓冲液稀释成含蛋白 4mg/ml, -20℃贮存备用。

[0072] 1.1.2 试剂配制

[0073] (1) 1N NaOH 称取 NaOH 2.000g, 蒸馏水定容至 50ml。

[0074] (2) pH6.50.1mol MES 称取 MES 0.4881g, 蒸馏水定容至 25ml, 滴加 1N NaOH 使溶液 pH 达到 6.5。

[0075] (3) 20mg/ml NHS 称取 NHS 0.050g, 加蒸馏水 2.5ml 溶解。

[0076] (4) 20mg/ml EDC·HCl 称取 EDC·HCl 0.050g, 加蒸馏水 2.5ml 溶解

[0077] (5) 0.1M 硼酸溶液称取硼酸 0.6183g, 用蒸馏水定容至 100ml。

[0078] (6) 0.025M 硼砂溶液称取硼砂 0.4767g, 用蒸馏水定容至 50ml。

[0079] (7) pH7.20.1M 硼酸缓冲液取 0.1mol 硼酸溶液 95ml 加 0.025mol 硼砂溶液 5ml 混合。

[0080] (8) 0.2M Tris 称取 Tris 12.114g, 用蒸馏水定容至 500ml。

[0081] (9) 0.1N HCl 吸取 12N 浓盐酸 4.167ml, 放入容量瓶, 用蒸馏水定容至 500ml

[0082] (10) 0.05M Tris-HCl 缓冲液

[0083] ① pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液取 0.2M Tris 25ml 加 0.1N HCl 45ml 混合, 再加蒸馏水至 100ml。

[0084] ② pH8.20.05M Tris-HCl 缓冲液取 0.2M Tris 25ml 加 0.1N HCl 22.5ml 混合, 再加蒸馏水至 100ml。

[0085] (1) pH7.2 封闭液称取酪蛋白 0.500g、蔗糖 5.00g、 NaN_3 0.020g 全部放入 100ml pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液中, 37 ~ 40℃水浴加热至完全溶解。即成含酪蛋白 0.5%, 蔗糖 5%, NaN_3 0.02% 的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的封闭液。

[0086] (2) 2.0mg/ml 兔抗黄水牛 IgG 抗体吸取兔抗黄水牛 IgG (5mg/ml) 8ml 加入到 12ml pH7.20.05mol 硼酸缓冲液中混合均匀。

[0087] (3) 20%BSA 溶液称取进口 BSA 2.000g, 用 10ml 蒸馏水溶解。

[0088] 1.1.3 乳胶微球标记兔抗黄水牛 IgG 结合物的制备

[0089] (1) 乳胶微球的洗涤红色乳胶微球, 直径 300nm, 在 10000rpm, 4℃条件下离心 10min, 去上清液, 沉淀用适量的高纯水还原为原体积, 用超声波分散沉淀的乳胶微球, 使之成为均匀的悬浮液, 再用上述相同的参数重复洗涤 (即离心及重悬浮) 1 ~ 2 次。

[0090] (2)取 1.5ml 塑料离心管 24 支,往每支离心管中加入 0.9ml pH6.50.1molMES,0.2ml 红色乳胶微球,混合均匀。再加入 0.1ml EDC·HCl(20mg/ml)和 0.075mlNHS(20mg/ml)混合均匀。

[0091] (3)在垂直混合仪上振荡混合 2hr。

[0092] (4)10000rpm,4℃,离心 10min,去上清,每支离心管的沉淀用 1ml pH7.20.1M 硼酸缓冲液重悬,超声波(2s×5次)匀质。在垂直混合仪上振荡混合 15min。

[0093] (5)重复(4)的操作,只是每支离心管的沉淀用 0.5ml 硼酸缓冲液重悬。

[0094] (6)往每支离心管中加入蛋白含量 1mg/ml 的兔抗黄水牛 IgG0.5ml,在垂直混合仪上振荡混合 2hr。

[0095] (7)往每支离心管中加入 20%BSA 0.1ml,在垂直混合仪上振荡混合 1hr。

[0096] (8)11000rpm,4℃,离心 25min,去上清,每支离心管的沉淀用 1ml 封闭液重悬,超声波(2s×5次)匀质。在垂直混合仪上振荡混合 15min。

[0097] (9)重复(7)的操作,只是每支离心管的沉淀用 0.75ml pH7.2 封闭液重悬。超声波(2s×5次)匀质。最后得到的不透明红色悬浮液即为乳胶微球标记的兔抗黄水牛 IgG 结合物,即免疫探针检测试剂液。

[0098] 1.1.4 免疫探针干片的制备

[0099] 1.1.4.1 聚酯膜处理液的配制 0.2M Tris 125ml,0.1N HCl 225ml,酪蛋白 2.5g,蔗糖 25g,NaN₃0.1g 混合,37℃水浴溶解,再加入吐温-201.0ml 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀,即成含酪蛋白 0.5%,蔗糖 5%,NaN₃0.02%,吐温-200.2%的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的聚酯膜处理液。

[0100] 1.1.4.2 聚酯膜的预处理将聚酯膜切成 300mm×17mm 的小条,放入聚酯膜处理液中浸泡 4hr,取出平放在搪瓷盆中,37℃烘干,装入封口塑料袋中,置 4~8℃冰箱中冷藏保存备用。

[0101] 1.1.4.3 免疫探针干片制作用划膜喷金机将乳胶微球标记兔抗黄水牛 IgG 结合物以 5μl/cm 的流速喷涂在已处理过的聚酯膜上,每条聚酯膜(300mm×17mm)以纵向中心线为轴,对称地喷 2 条乳胶微球标记兔抗黄水牛 IgG 结合物条带,37℃烘干,切成 300mm×8.5mm 的小条,则成免疫探针干片。将免疫探针干片密封在塑料袋中,置 4~8℃冰箱中冷藏保存,备用。

[0102] 1.2 层析膜的制备

[0103] 1.2.1 血吸虫抗原的制备

[0104] 1.2.1.1 血吸虫虫卵的制备

[0105] 1.2.1.1.1 血吸虫尾蚴接种兔将保存在 4℃冰箱中的日本血吸虫阳性钉螺,用前取出 200 个,置 25℃室温 1~2hr 后,放在装有脱氯水的 100ml 烧杯内逸放尾蚴。兔腹部剃毛,使皮肤裸露。用接种环小心在液面挑取液体,置于载玻片上,在显微镜下对尾蚴计数后,将有尾蚴的载玻片贴于兔(体重 2.5~3kg 的健康新西兰兔)腹部皮肤暴露处 5~10min,完成感染,每只兔感染尾蚴约 2000 条。1.2.1.1.2 血吸虫虫卵的分离将感染 45d 的兔取出肝脏,除去胆囊、胆管、血管及结缔组织,用 4℃预冷的 1%NaCl 洗净血污,将肝脏剪成碎块,加 1%NaCl,一并倒入捣碎机内快速捣碎(8000rpm)捣碎过程分 4 次,间隔进行,每次捣 2min,停 2min。捣碎的肝脏加 1%NaCl 稀释,用 60、80、100 和 120 目的标准筛过滤。滤液再用 260

目尼龙网过滤。将尼龙网上虫卵粗提物用 1%NaCl 洗脱。

[0106] 将洗脱液倒入 50ml 的消毒离心管内,以 3500rpm 离心 1min,弃去上、中层,下层金黄色虫卵反复用 1%NaCl 洗涤,离心,直至看不到灰褐色的肝组织为止。将获得的虫卵再用尼龙绢(140、260 目)重叠过滤,除去残留的肝组织细胞,260 孔尼龙绢上物,经离心沉淀反复除去白褐色絮状物,即得纯净的血吸虫卵。将纯净虫卵分装于 1.5ml Eppendorf 管中,12000r/min 离心 30s,以进一步去除虫卵中的水分。

[0107] 1.2.1.1.2 血吸虫虫卵的干燥和保存将虫卵置平皿中,用冷冻干燥机冻干。密封,置 -20℃保存。

[0108] 1.2.1.2 血吸虫抗原的提取

[0109] (1)取血吸虫虫卵 1g 先用玻璃匀浆器研磨 30min,再加少量 0.85%NaCl 研磨 30min,然后配成 3% 悬液,置 4℃冰箱浸泡 3d, -20℃反复冻融 10 次,冰浴超声裂解 30min(400W),13000rpm 离心 1hr,取上清即成未透析血吸虫可溶性抗原 1。-20℃保存,或者直接进行下一步处理。

[0110] (2)将(1)步骤离心沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 重悬,冰浴超声裂解 10min(400W),垂直混合仪上作用 15min,10000rpm 离心 1hr,取上清即为未透析血吸虫可溶性抗原 2。

[0111] (3)取血吸虫虫卵 1g 先用玻璃匀浆器研磨 30min,再加少量 0.85%NaCl 研磨 30min,然后配成 3% 悬液,置 4℃冰箱浸泡 3d, -20℃反复冻融 10 次,冰浴超声裂解 30min(400W),10000r/min 离心 1hr,取上清即成未透析血吸虫可溶性抗原 3。

[0112] 1.2.1.3 血吸虫抗原的透析

[0113] 取血吸虫抗原适量,装入透析袋,用 pH7.00.01M PB 透析 16hr,每隔 4hr 换透析液 1 次,透析结束后,以 10000r/min 离心 60min,上清液即为已透析血吸虫抗原。测蛋白含量后,或按体积定量分装,放 -20℃保存,或按蛋白量定量分装,冻干, -20℃保存备用,或直接配制生产用抗原。

[0114] 1.2.1.4 抗原蛋白含量测定(蛋白测定仪的测定原理相同,已实现程序化和微量测定)

[0115] 随机取已透析血吸虫抗原 3 瓶,用 pH7.00.01molPB 作为稀释液和空白对照,于紫外分光光度计测定吸收值(A_{280} 及 A_{260})。按公式:蛋白含量(mg/ml) = $(1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}) \times$ 稀释倍数,计算每 1ml 抗原的蛋白含量,取平均值。

[0116] 1.2.1.5 生产用血吸虫抗原的配制

[0117] 1.2.1.5.1 抗原稀释液的配制

[0118] (1)0.2mol Tris 溶液配制称取 Tris 2.4228g,蒸馏水定容至 100ml,即为 0.2M Tris 溶液。

[0119] (2)0.1N HCl 溶液配制吸取分析纯浓盐酸 4.167ml,蒸馏水定容至 500ml。

[0120] (3)pH8.20.05M TBS 缓冲液配制 0.2M Tris 溶液 25ml 和 0.1N HCl 22.5ml 混合,加入 NaCl 0.85g,溶解,再用蒸馏水加至 100ml 即成。

[0121] 1.2.1.5.2 生产用血吸虫抗原的配制

[0122] 根据透析处理后抗原蛋白的含量,用 pH8.20.05M TBS 缓冲液将已透析的抗原稀释成含蛋白 1mg/ml 的生产用抗原。

[0123] 1.2.2 羊抗兔 IgG 的制备

[0124] 1.2.2.1 兔 IgG 的制备

[0125] (1)兔血清的制备按无菌操作要求,用心脏采血法采集健康新西兰肉兔的血液,分离血清。

[0126] (2)兔 IgG 的提取取兔血清 10ml,再加 10ml 0.85%NaCl 混匀,逐滴加入 SAS 10.8ml 使之达到 35% 饱和度,边加边搅拌,并用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃ 过夜后取出,室温平衡 1 小时,以 3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀物加入 20ml 0.85%NaCl 溶解。再用 35% 饱和度硫酸铵同法沉淀 2 次。只是 4℃ 静置时间改为 3hr。第 3 次离心后沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 溶解后,装入直径 2cm 的透析袋透析内。

[0127] (3)透析提纯透析于 4℃ 条件下进行,开始先用蒸馏水透析 8 小时,换液 4 次,再用 pH7.00.01M 磷酸盐缓冲液 (PB) 透析 6 小时,换液 2 次,以除去以除去 NH_4^+ 及 SO_4^{2-} 。

[0128] (4)蛋白浓度测定用蛋白测定仪测得兔 IgG 蛋白质浓度为 7.7mg/ml,用 PEG 浓缩后调整为 10mg/ml。-20℃ 保存备用。

[0129] 1.2.2.2 兔 IgG 免疫羊

[0130] (1)实验动物选健康雄性波尔山羊 2 只,体重 20kg/ 只。

[0131] (2)兔 IgG 的乳化首免兔 IgG 油乳剂由兔 IgG 与弗氏完全佐剂按 3:7 比例乳化,冰浴超声波击打至将兔 IgG 油乳剂滴于冷水表面,较长时间保持完整而不分散,即可应用。2-4 免的 IgG 油乳剂由兔 IgG 与弗氏不完全佐剂按 3:7 比例制备。

[0132] (3)免疫首次免疫在羊头颈部皮下、羊双侧后足蹠垫皮下各注射兔 IgG 油乳剂 6.4ml (兔 IgG 的蛋白含量为 19.2mg),两周后,每 2 周用兔 IgG 加强免疫 1 次,免疫兔 IgG 的蛋白总量为 19.2mg。如此重复 3 次,末次免疫 8 天后,耳静脉取少量血,分离出血清,用琼脂扩散法测定免疫血清的效价,待血清效价达 1:32 时即可采血,分离血清。即为含羊抗兔 IgG 的血清。

[0133] 1.2.2.3 羊抗兔 IgG 的提取

[0134] (1)羊抗兔 IgG 提取取羊抗兔 IgG 血清 10ml,再加 10ml 0.85%NaCl 混匀,逐滴加入 SAS 8.6ml 使之达到 30% 饱和度,边加边搅拌,并用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃ 过夜后取出,室温平衡 1 小时,以 3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀物加入 20ml 0.85%NaCl 溶解。再逐滴加入 SAS16.4ml 使之达到 45% 饱和度,边加边搅拌,用浓氨水调节 pH 值至 7.0,置 4℃ 3hr 后取出,室温平衡 1hr,以 3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀物加入 20ml 0.85%NaCl 溶解。再用 45% 饱和度硫酸铵提取一次,离心后沉淀物用 5ml 0.85%NaCl 溶解后,装入直径 2cm 的透析袋透析内。

[0135] (2)透析提纯透析于 4℃ 条件下进行,开始先用蒸馏水透析 8hr,换水 4 次,再用 pH7.00.01M 磷酸盐缓冲液 (PB) 透析 6hr,换液 2 次。透析液 3000rpm 离心 30min 取上清液。即为羊抗兔 IgG 抗体溶液。

[0136] (3)蛋白浓度测定用紫外分光光度法测得羊抗兔 IgG 抗体的蛋白质浓度为 10mg/ml, -20℃ 贮存备用。

[0137] 1.2.2.4 生产用羊抗兔 IgG 的配制

[0138] (1)羊抗兔 IgG 稀释液的配制羊抗兔 IgG 稀释液与抗原稀释液相同,配制方法见 1.2.1.5.1。

[0139] (2)生产用羊抗兔 IgG 的配制

[0140] 0.5mg/ml 羊抗兔 IgG 的配制蛋白含量 10mg/ml 的羊抗兔 IgG 0.5ml 与 pH8.20.05M TBS 缓冲液 9.5ml 混合即成。

[0141] 1.2.3 硝酸纤维素膜的裁剪和贴片

[0142] 选用的硝酸纤维素膜为伊能膜业有限公司的 YN120BLF 膜,先将膜裁剪成 300mm×25mm 的小段,取 PVC 底板 (300mm×80mm),揭去中间一条保护纸,露出不干胶层,将硝酸纤维素膜有塑料膜背衬的一面粘贴在 PVC 底板上。

[0143] 1.2.4 在硝酸纤维素膜上划出 T 线和 C 线

[0144] 将稀释后的血吸虫抗原和羊抗兔 IgG 抗体用划膜喷金机以 3 μ l/cm 的流速,在已粘贴在 PVC 底板上的硝酸纤维素膜中间划检测 T 线和质控 C 线,其中血吸虫抗原划在靠近将来粘贴免疫探针干片一侧,羊抗兔 IgG 抗体划在靠近粘贴吸水纸一侧,两条线相距 5 ~ 6mm。

[0145] 1.2.5 烘膜与保存

[0146] 将已划好 T 线和 C 线的硝酸纤维素膜连同底板置室内晾干,装入密封塑料袋中置 4 ~ 8℃ 冰箱中保存备用。

[0147] 1.3 样品垫的制作

[0148] 1.3.1 样品垫处理液的配制

[0149] 1.3.1.1 pH7.2 样品垫处理液 0.2M Tris 100ml, 0.1N HCl 180ml, 酪蛋白 0.250g, 蔗糖 25.000g, Na₂CO₃ 0.100g 混合, 37℃ 水浴溶解, 再加入 1.0ml 吐温 -20 搅拌均匀, 加蒸馏水至 500ml 混合均匀, 即成含酪蛋白 0.5%, 蔗糖 5%, Na₂CO₃ 0.02%, 吐温 -20 0.2% 的 pH7.20.04M Tris-HCl 缓冲液构成的样品垫处理液。

[0150] 1.3.2 样品垫的制作将玻璃纤维素膜切成 23mm×300mm 小条,用样品垫处理液浸泡 1hr,取出,在 37℃ 烘箱中烘干,即成样品垫。

[0151] 1.4 吸水纸的制作

[0152] 将吸水纸 (型号:CH37) 裁剪成 28mm×300mm 的小条,在 37℃ 烘箱中烘干即成。

[0153] 1.5 标签胶膜的制作

[0154] 1.5.1 箭头标签胶膜的制作

[0155] 箭头标签胶膜是一种 300mm×18mm 的不干胶粘贴纸,在距一条长边 1mm 处有一条直线,紧挨着这条直线,每隔 1.3mm 印有“← MAX”字样,箭头与直线垂直。其作用,一方面是指示试纸条插入待检样品液的最大深度;另一方面是保护免疫探针干片不被污染。

[0156] 1.5.2 手柄标签胶膜的制作

[0157] 绿色标签保护贴纸由 300mm×30mm 的不干胶粘贴纸印制,与短边呈 15° 角,印有 4 排绿底白字的“SjAb”字样,表示用于检测血吸虫抗体,并保护吸水纸在手拿取时免受污染。

[0158] 1.6 试纸条大卡的组装

[0159] 1.6.1 取 2.2 步骤已粘贴好层析膜的 PVC 底板,揭掉 PVC 板边上宽度最大的一块保护纸,露出不干胶层,将吸水纸粘贴上去,使之与层析膜重叠约 1 ~ 2mm。

[0160] 1.6.2 取手柄标签胶膜,揭去保护纸,露出不干胶层,将它粘贴在吸水纸上。

[0161] 1.6.3 揭掉 PVC 板上层析膜边上一小条保护纸,露出不干胶层,将免疫探针干片 (300mm×8.5mm) 粘贴在 PVC 板的不干胶上,使免疫探针干片与层析膜重叠约 1mm。

[0162] 1.6.4 揭掉 PVC 板上在免疫探针干片边上的保护纸,露出不干胶层,将预处理过的

样品垫粘贴上去,使之与聚酯膜重叠约 1 ~ 2mm。

[0163] 1.6.5 取箭头标签胶膜粘贴在免疫探针干片和与之相邻的部分样品垫上,使保护膜的空白侧紧贴在层析膜边缘重叠约 1mm,箭头侧紧贴样品垫,免疫探针干片完全被标签胶膜覆盖,各部件压平压实即组成大卡。

[0164] 1.7 切条、包装和贮存

[0165] 1.7.1 切条

[0166] 将试纸条大卡用切条机切成 80mm×3mm 的试纸条,即为本发明的牛日本血吸虫病抗体检测试纸条。

[0167] 1.7.2 包装

[0168] 1.7.3 试纸条的包装

[0169] 80mm×3mm 的试纸条按 10 条 / 包、20 条 / 包或 50 条 / 包的规格,用铝箔袋密封包装。

[0170] 1.7.4 贮存

[0171] 试纸条在 2 ~ 8℃ 贮存,有效期为 12 个月。15 ~ 30℃ 室温贮存,有效期为 6 个月。

[0172] 实施例 2:(检测牛日本血吸虫病抗体试纸条的制备 2)

[0173] 1 试纸条的制作

[0174] (1)免疫探针干片制备同实施例 1 中 1.1,但有 5 处不同:

[0175] ①使用 300nm 蓝色乳胶微球。

[0176] ②在乳胶微球标记时所用兔抗黄水牛 IgG 蛋白含量为 2mg/ml。

[0177] ③封闭液配制称取酪蛋白 0.500g、蔗糖 10.000g、 NaN_3 0.020g 全部放入 100ml pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液中,37 ~ 40℃ 水浴加热至完全溶解。即配制成含酪蛋白 0.5%,蔗糖 10%, NaN_3 0.02% 的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的封闭液。

[0178] ④聚酯膜处理液配制 0.2M Tris 125ml,0.1N HCl 225ml,酪蛋白 2.500g,蔗糖 50.000g, NaN_3 0.100g 混合,37℃ 水浴溶解,再加入吐温 -201.5ml 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀。即配制成含酪蛋白 0.5%,蔗糖 10%, NaN_3 0.02%,吐温 -200.3% 的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的聚酯膜处理液。

[0179] ⑤将乳胶微球标记兔抗黄水牛 IgG 结合物喷涂在已处理过的聚酯膜上时,划膜喷金机设定的流速为 4 μ l/cm。

[0180] (2)层析膜的制备同实施例 1 中 1.2,但有数处不同:

[0181] ①稀释抗原和羊抗兔 IgG 抗体的缓冲液为 pH8.50.05M TBS 缓冲液,配制方法为:0.2mol Tris 溶液 25ml 和 0.1N HCl 15ml 混合,加入 NaCl 0.850g,溶解,再用蒸馏水加至 100ml 即成。

[0182] ②划线用血吸虫虫卵抗原的蛋白含量为 3mg/ml。

[0183] ③划线用羊抗兔 IgG 抗体的蛋白含量为 0.1mg/ml。

[0184] ④血吸虫虫卵抗原和羊抗兔 IgG 抗体的划膜流速均为 2 μ l/cm。

[0185] ⑤样品垫处理液的配制 0.2M Tris 100ml,0.1N HCl 180ml,酪蛋白 0.250g,蔗糖 50.000g, NaN_3 0.1g 混合,37℃ 水浴溶解,再加入 1.0ml 吐温 -20 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀。即配制成含酪蛋白 0.5%,蔗糖 10%, NaN_3 0.02%,吐温 -200.2% 的 pH7.20.04M Tris-HCl 缓冲液构成的样品垫处理液。

[0186] 其余如样品垫制备、吸水纸制备、试纸条大卡的组装和切条等制作步骤均与实施例 1 相同。

[0187] 实施例 3:(检测牛日本血吸虫病抗体试纸条的制备 3)

[0188] 1 试纸条的制作

[0189] (1)免疫探针干片制备同实施例 1 中 1.1,但有 4 处不同:

[0190] ①在乳胶微球标记时所用兔抗黄水牛 IgG 蛋白含量为 3mg/ml。

[0191] ②封闭液配制称取酪蛋白 0.300g、蔗糖 5.000g、 NaN_3 0.030g 全部放入 100ml pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液中,37~40℃水浴加热至完全溶解。即配制成含酪蛋白 0.3%,蔗糖 5%, NaN_3 0.03%的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的封闭液。

[0192] ③聚酯膜处理液配制 0.2M Tris.125ml,0.1N HCl 225ml,酪蛋白 1.500g,蔗糖 25.000g, NaN_3 0.150g 混合,37℃水浴溶解,再加入吐温 -202.0ml 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀。即配制成含酪蛋白 0.3%,蔗糖 5%, NaN_3 0.03%,吐温 -200.4%的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的聚酯膜处理液。

[0193] ④将乳胶微球标记兔抗黄水牛 IgG 结合物喷涂在已处理过的聚酯膜上时,划膜喷金机设定的流速为 $3\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0194] (2)层析膜的制备同实施例 1 中 1.2,但有数处不同:

[0195] ①稀释抗原和羊抗兔 IgG 抗体的缓冲液为 pH8.50.05M TBS 缓冲液,配制方法见实施例 2。

[0196] ②划线用血吸虫虫卵抗原的蛋白含量为 5mg/ml。

[0197] ③划线用羊抗兔 IgG 抗体的蛋白含量为 1mg/ml。

[0198] ④血吸虫虫卵抗原和羊抗兔 IgG 抗体的划膜流速均为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0199] ⑤样品垫处理液的配制 0.2M Tris 100ml,0.1N HCl 180ml,酪蛋白 0.150g,蔗糖 25.000g, NaN_3 0.250g 混合,37℃水浴溶解,再加入 2.0ml 吐温 -20 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀。即配制成含酪蛋白 0.03%,蔗糖 5%, NaN_3 0.05%,吐温 -200.4%的 pH7.20.04M Tris-HCl 缓冲液构成的样品垫处理液。

[0200] 其余如样品垫制备、吸水纸制备、试纸条大卡的组装和切条等制作步骤均与实施例 1 相同。

[0201] 实施例 4:(检测牛日本血吸虫病抗体试纸条的制备 4)

[0202] 1 试纸条的制作

[0203] (1)免疫探针干片制备同实施例 1 中 1.1,但有 5 处不同:

[0204] ①使用 200nm 蓝色乳胶微球。

[0205] ②在乳胶微球标记时所用兔抗黄水牛 IgG 蛋白含量为 4mg/ml。

[0206] ③封闭液配制称取酪蛋白 0.200g、蔗糖 10.000g、 NaN_3 0.050g 全部放入 100ml pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液中,37~40℃水浴加热至完全溶解。即配制成含酪蛋白 0.2%,蔗糖 10%, NaN_3 0.05%的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的封闭液。

[0207] ④聚酯膜处理液配制 0.2M Tris 125ml,0.1N HCl 225ml,酪蛋白 1.000g,蔗糖 50.000g, NaN_3 0.250g 混合,37℃水浴溶解,再加入吐温 -202.5ml 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀。即配制成含酪蛋白 0.2%,蔗糖 10%, NaN_3 0.05%,吐温 -200.5%的 pH7.20.05M Tris-HCl 缓冲液构成的聚酯膜处理液。。

[0208] ⑤将乳胶微球标记兔抗黄牛 IgG 结合物喷涂在已处理过的聚酯膜上时,划膜喷金机设定的流速为 $2 \mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0209] (2)层析膜的制备同实施例 1 中 1.2,但有数处不同:

[0210] ①稀释抗原和羊抗兔 IgG 抗体的缓冲液为 pH8.50.05M TBS 缓冲液,配制方法见实施例 2。

[0211] ②划线用血吸虫虫卵抗原的蛋白含量为 7mg/ml。

[0212] ③划线用羊抗兔 IgG 抗体的蛋白含量为 2mg/ml。

[0213] ④血吸虫虫卵抗原和羊抗兔 IgG 抗体的划膜流速均为 $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0214] ⑤样品垫处理液的配制 0.2M Tris 100ml,0.1N HCl 180ml,酪蛋白 0.050g,蔗糖 50.000g, NaN_3 0.250g 混合,37℃水浴溶解,再加入 2.5ml 吐温-20 搅拌均匀,加蒸馏水至 500ml 混合均匀。即配制成含酪蛋白 0.01%,蔗糖 10%, NaN_3 0.05%,吐温-200.5% 的 pH7.20.04M Tris-HCl 缓冲液构成的样品垫处理液。

[0215] 其余如样品垫制备、吸水纸制备、试纸条大卡的组装和切条等制作步骤均与实施例 1 相同。

[0216] 实施例 5:(应用试纸条检测牛日本血吸虫病抗体的方法)

[0217] 1 待检血清

[0218] 1.1 血吸虫阳性牛血清实验感染血吸虫尾蚴 1000 ~ 1500 条感染 35 ~ 49d 的 2 头牛血清 6 份,湖北自然感染血吸虫并经粪孵确诊的牛血清 4 份。

[0219] 1.2 血吸虫阴性牛血清采自血吸虫非疫区浙江金华健康牛血清 10 份,实验感染锥虫牛血清 5 份,自然感染肝片吸虫病牛血清 5 份。

[0220] 2 试纸条本试验所用试纸条为实施例 2 工艺参数制备的试纸条。

[0221] 3 检测步骤

[0222] 3.1 血清稀释液的配制将 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、NaCl 与蒸馏水按重量体积 0.199g : 0.082g : 1g : 200ml 比例混合,37 ~ 40℃水浴加热溶解、冷却后即成血清稀释液;

[0223] (2)待检牛血清的稀释:取 1.5ml 塑料离心管 60 支,编号,其中 30 支离心管每管加入血清稀释液 0.05ml,另 30 支管加入血清稀释液 0.1ml,每支离心管中再加入待检血清 0.05ml,将待检牛血清与血清稀释液分别按体积 1:1 和 1:2 比例混合稀释;

[0224] (3)检测操作:取试纸条 60 支,平放在操作台上,吸取稀释后的待检血清 0.05ml 滴在试纸条的样品垫上;

[0225] (4)结果判定:5 ~ 15min 后观察结果,无论是待检牛血清与血清稀释液按体积 1:1 或 1:2 比例稀释,6 份实验感染血吸虫病牛血清和 4 份自然感染牛血清,试纸条的检测 T 线和质控 C 线均呈现蓝色条带,判为阳性;而 10 份非疫区健康牛血清、5 份锥虫病牛血清和 5 份肝片吸虫病牛血清,仅在试纸条的质控 C 线位置呈现 1 条蓝色条带,故判为阴性。本试验测试的试纸条按照试纸条的使用方法检测和判断结果,能够正确地检测出血吸虫病阳性牛血清,未见与锥虫病、肝片吸虫病牛血清有交叉反应。

[0226] 试验例 1:(试纸条的敏感性试验)

[0227] 1 试纸条本试验所用试纸条为实施例 3 工艺参数制备的试纸条。

[0228] 2 待检血清样品用血吸虫尾蚴感染 10 头健康黄牛,每头感染尾蚴 500 ~ 1000 条,

于感染前 (0d) 和感染后不同时间采血, 制备血清。

[0229] 3 检测操作待检血清用血清稀释液 (配方见“应用试纸条检测牛日本血吸虫病抗体的方法”) 2 倍稀释, 吸取 0.05ml 稀释血清滴加到试纸条的样品垫上, 进行免疫层析反应。5 ~ 15min 根据 T 线和 C 线位置显现的颜色判定阴阳性, 2 条红线判阳性, 1 条红线判阴性。

[0230] 4 检测结果见表 1。

[0231] 表 1 试纸条的敏感性检测情况表

[0232]

| 感染 日数 | 实验感染血吸虫病的牛编号 | | | | | | | | | |
|----------|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 35 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 42 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 49 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

[0233] 结果, 试纸条检测感染前 10 头牛血清, 全部为阴性反应。检验感染后 28d 牛血清, 有 2 头牛血清检出阳性反应。实验感染 35d ~ 49d 的 10 头牛血清全部检出血吸虫抗体 (检出率 100%)。据另外的试验, IHA 法能够检出实验感染血吸虫 35d 以及 35d 以上的血样。说明试纸条的敏感性与 IHA 法相似或略高。但 IHA 法检测一个样品约需 1 ~ 2hr, 而用试纸条检测, 操作更简单, 5 ~ 15 分钟就能得出结果。

[0234] 试验例 2: (试纸条的特异性试验)

[0235] 1 试纸条本试验所用试纸条为实施例 1 工艺参数制备的试纸条。

[0236] 2 待检血清样品非疫区健康牛血清 20 份; 血吸虫病阳性牛血清 40 份, 其中实验感染血吸虫尾蚴 35 ~ 49d 牛血清 20 份, 自然感染血吸虫并经粪孵毛蚴法证实阳性的牛血清 20 份; 自然感染东毕吸虫, 并经粪检确诊的牛血清 20 份; 自然感染肝片吸虫, 经粪检虫卵法证实的奶牛血清 15 份; 实验感染锥虫牛血清 15 份。

[0237] 3 检测操作与结果判定见“应用试纸条检测牛日本血吸虫病抗体的方法”。

[0238] 4 检测结果见表 2。

[0239] 表 2 试纸条的特异性检测情况表

[0240]

| 血吸虫病 牛血清 | | | 东毕吸虫病 牛血清 | | | 肝片吸虫病 牛血清 | | | 锥虫病牛血清 | | | 健康牛血清 | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 测定 数 (份) | 阳性 数 (份) | 阳性 率 (%) | 测定 数 (份) | 阳性 数 (份) | 阳性 率 (%) | 测定 数 (份) | 阳性 数 (份) | 阳性 率 (%) | 测定 数 (份) | 阳性 数 (份) | 阳性 率 (%) | 测定 数 (份) | 阳性 数 (份) | 阳性 率 (%) |
| 40 | 40 | 100 | 20 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |

[0241] 用试纸条检测实验感染和自然感染血吸虫病 40 头牛血清, 均为阳性反应。检测东毕吸虫、肝片吸虫、锥虫病牛和健康牛的血清, 均为阴性反应。说明该试纸条有较强的特异

性,在所检测的样品中未见与其他寄生虫病有交叉反应。试验例 3:(试纸条批内批间可重复性试验)

[0242] 1 试纸条本试验所用试纸条的批次为:20091103、20091105、20091109、20091111、20091113。按照实施例 2 工艺参数制备。只是制作 T 线的血吸虫抗原,前 2 批所用血吸虫可溶性抗原是由 5% 虫卵悬液开始制备,而后 3 批可溶性抗原是由 3% 虫卵悬液开始制备。用于划线时的浓度均稀释成含蛋白 3mg/ml。其他制备条件均相同。

[0243] 2 待检血清血吸虫病阳性血清 50 份(实验感染血吸虫尾蚴 500 ~ 1000 条 35 ~ 49d 的牛血清 30 份,湖北、四川等疫区自然感染血吸虫并经粪孵法证实的牛血清 20 份),血吸虫病阴性牛血清 80 份(浙江金华、衢州等地牛血清 60 份,采自浙江富阳屠宰场来自吉林、山东等省黄牛血清 20 份)。

[0244] 3 检测操作待检血清前 4 次重复用血清稀释液作 2 倍稀释,第 5 次重复血清稀释液作 3 倍稀释,加样量为 0.05ml。各批次的试纸条重复检测 5 次,比较检测结果,观察试纸条批内批间检测结果的可重复性。

[0245] 4 检测结果测定结果总结在表 3 中。

[0246] 表 3 试纸条的批间和批内的重复性测定结果情况表

[0247]

| 试纸条 | 血清 | 批间和批内的重复性测定结果(阳性反应份/测定份) | | | | |
|----------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 第 1 次 | 第 2 次 | 第 3 次 | 第 4 次 | 第 5 次 |
| 20091103 | 血吸虫病牛 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 |
| | 健康牛 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 |
| 20091105 | 血吸虫病牛 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 |
| | 健康牛 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 |
| 20091109 | 血吸虫病牛 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 |
| | 健康牛 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 |
| 20091111 | 血吸虫病牛 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 |
| | 健康牛 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 |
| 20091113 | 血吸虫病牛 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 |
| | 健康牛 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 | 0/80 |

[0248]

[0249] 每批次前后 5 次的测定结果均相同,各批次试纸条之间的测定结果也相同,说明制备虫卵抗原时虫卵悬液的初始浓度对试纸条的可重复性影响可以忽略,血清作 2 倍稀释与作 3 倍稀释对检测结果没有明显影响。该试纸条的批间和批内重复性均较好,适宜于批量标准化生产。

[0250] 试验例 4:(试纸条的保存期试验)

[0251] 1 试纸条 5 批次试纸条与试验例 3 所用的试纸条相同。在本试验例中,将每批次的试纸条分成两部分保存,一部分置 2 ~ 8℃冰箱保存,另一部分置 15 ~ 35℃室温保存。

[0252] 2 待检血清实验感染血吸虫病的阳性牛血清 20 份,健康牛血清 20 份。

[0253] 3 检测方法在保存期试验开始后的第 1 个月以及试验开始后每隔 3 个月,取以不同方法保存的试纸条对实验感染血吸虫病的阳性牛血清及健康牛血清各 20 份进行检测,检测操作的血清稀释与血清用量及结果判断均与试验例 3 相同。

[0254] 4 检测结果见表 4。试纸条置 4 ~ 8℃冰箱保存 15 个月的阳性检出率仍为 100%,保存 18 个月的试纸条阳性检出率为 80%。而试纸条置室温保存 6 个月阳性检出率仍为 100%,保存 9 个月就只有 70%了。因此,试纸条的保存条件为:4 ~ 8℃冰箱保存,有效期定为 12 个月应该没有问题。

[0255] 表 4 牛血吸虫病诊断试纸条不同温度条件下保存的测定结果表

[0256]

| 保存时间(月) | 试纸条批次 | 实验感染血吸虫病牛 阳性血清检出率(%) | | 健康牛血清阳性检出率 (%) | |
|---------|----------|-------------------------|--------------|-------------------|----------|
| | | 2~8℃保存 | 15~32℃保存 | 2~8℃保存 | 15~35℃保存 |
| 1 | 20101102 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| 3 | 20101102 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| 6 | 20101102 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101106 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101107 | 100.0(10/10) | 100.0(10/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| 9 | 20101102 | 100.0(10/10) | 70.0(7/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 100.0(10/10) | 70.0(7/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 100.0(10/10) | 70.0(7/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 100.0(10/10) | 70.0(7/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| 12 | 20101102 | 100.0(10/10) | 30.0(3/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 100.0(10/10) | 30.0(3/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 100.0(10/10) | 30.0(3/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 100.0(10/10) | 30.0(3/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |

[0257]

| | | | | | |
|----|----------|--------------|-----------|---------|---------|
| 15 | 20101102 | 100.0(10/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 100.0(10/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 100.0(10/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 100.0(10/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| 18 | 20101102 | 80.0(8/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101103 | 80.0(8/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101104 | 80.0(8/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |
| | 20101105 | 80.0(8/10) | 0.0(0/10) | 0(0/20) | 0(0/20) |

[0258] 试验例 5:(用试纸条检测治疗前后实验感染血吸虫病牛的血清抗体消长情况)

[0259] 1 试纸条本试验所用试纸条为实施例 4 工艺参数制备的试纸条。

[0260] 2 待检血清选用健康黄牛 5 头,在实验感染血吸虫尾蚴前,牛颈静脉采血,制备的血清作为 0w 血清。每头牛感染血吸虫尾蚴 1000 ~ 1500 条,牛从感染后第 1w 至第 10w,每周采血一次,分离血清,-20℃保存。牛感染后第 11w 用吡喹酮进行治疗,每隔 7d 治疗一次,连续治疗 3 次。治疗后第 1 ~ 3w 每周采血 1 次,治疗后第 4 ~ 24w 每两周采血 1 次,分离血清,-20℃保存待检。

[0261] 3 检测操作待检血清用血清稀释液作 2 倍稀释,吸取 0.05ml 稀释血清滴加到试纸条的样品垫上,进行免疫层析反应。5 ~ 15min 根据 T 线和 C 线位置显现的颜色判定阴阳性。T 线与 C 线均出现红色条带判为阳性。血清中的抗体水平越高,T 线颜色越深,根据 T 线颜色深浅可判为:呈现浓郁的红色条带为强阳性,以“+++”表示,呈现清晰可见的红色条带,为阳性,以“++”表示,呈现浅红色条带为弱阳性,以“+”表示。只有 C 线出现清晰可见红色条带判为阴性,以“-”表示。C 线出现一条颜色清晰可见的红色线,而 T 线出现一条颜色很浅,若隐若显的红色带判为可疑,以“±”表示。

[0262] 4 检测结果见表 5。

[0263] 表 5 治疗前后实验感染血吸虫病牛的血清抗体消长情况

[0264]

| 牛血清的采集时间 | 牛的编号 | | | | |
|----------|------|----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 感染 0d | - | - | - | - | - |
| 感染 1w | - | - | - | - | - |
| 感染 2w | - | - | - | - | - |
| 感染 3w | - | - | - | - | - |
| 感染 4w | + | ± | + | - | ± |
| 感染 5w | + | + | + | + | + |
| 感染 6w | + | + | + | + | + |
| 感染 7w | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 感染 8w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 感染 9w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 感染 10w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 治疗 1w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 治疗 2w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 治疗 3w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 治疗 4w | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 治疗 6w | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 治疗 8w | ++ | + | + | + | + |
| 治疗 10w | + | + | + | + | + |
| 治疗 12w | + | + | + | + | + |
| 治疗 14w | + | + | + | + | + |
| 治疗 16w | + | - | + | + | + |
| 治疗 18w | + | - | + | + | + |
| 治疗 20w | + | - | + | - | - |
| 治疗 22w | + | - | - | - | - |
| 治疗 24w | - | - | - | - | - |

[0265] 由上表可见,血吸虫感染后第 4~5w 的牛血清中检测到了抗体,在感染后第 8~10w 及治疗后第 1~4w 时,抗体水平达高峰,然后从治疗后第 6w 开始,抗体水平逐渐下降,1、2、3、4 和 5 号牛依次在治疗后第 24、16、22、20 和 20w 抗体转阴。其结果暗示本试纸条具有一定的早期诊断与疗效考核价值。

[0266] 试验例 6:(试纸条与粪孵毛蚴法、IHA 法和 DIFA 法的符合率试验)

[0267] 迄今我国还没有被批准上市的血吸虫病诊断试剂。目前常用的检测方法有粪孵毛

蚴法、IHA 法和 DIFA 法。

[0268] 1 检测试剂

[0269] 1.1 试纸条本试验用的试纸条为实施例 3 工艺参数制备的试纸条,批号为:20091115。

[0270] 1.2 血吸虫间凝抗原诊断试剂 IHA 法所用血吸虫间凝抗原诊断试剂由江西省寄生虫病防治研究所生产,批号为:20091023。

[0271] 1.3 斑点金标免疫渗滤法试剂 DIFA 法所用斑点金标免疫渗滤法试剂由浙江省农科院畜牧兽医研究所试制,批号为:20091015。

[0272] 2 待检血清在湖北和四川的重疫区,用粪孵法检测阳性牛中分别采制 50 头和 70 头牛血清。从粪孵阴性的牛中采集 200 头和 300 头牛的血清。从血吸虫非疫区浙江金华等地采集 500 头牛血清。实验感染血吸虫尾蚴 28d、35d、42d 的牛血清各 5 份。

[0273] 2 检测方法

[0274] 2.1 试纸条法(免疫层析法)待检血清用血清稀释液作 2 倍稀释,吸取 0.05ml 待检稀释血清滴加在试纸条的样品垫上。5~15min 判定结果:出现 2 条蓝线判为阳性,仅出现 1 条蓝线判为阴性。

[0275] 2.2 IHA 法每支抗原加蒸馏水 1ml 溶解,混匀使用。使用 U 型血凝反应板,用定量滴管(或 25 μ l 移液器)滴加 0.85%NaCl 于血凝反应板第一排第一孔内 4 滴第二孔加 1 滴。用定量滴管(或 25 μ l 移液器)吸待检血清 1 滴加入第一排第一孔内,经充分混匀后吸出 1 滴加入到第二孔内,混匀后弃去 1 滴,使血清稀释度为 1:10。用定量滴管(或 25 μ l 移液器)吸取混匀抗原液 1 滴加入到第二孔内,立即旋转振摇约 1min 钟(或振荡器摇匀约 0.5min)。室温下静置 1hr 观察结果。红细胞全部沉入孔底,肉眼见边缘光滑、致密的小圆点为阴性。红细胞形成薄层凝集,边缘呈现不规则的皱褶,判为“++++”阳性;红细胞形成薄层凝集,充满整个孔底,判为“+++”阳性;红细胞形成薄层凝集,面积较“+++”小者,判为“++”阳性;红细胞大部分沉集于孔底,形成一圆点,肉眼见周边模糊或中间出现较为明显的空白点,判为“+”阳性。

[0276] 2.3 DIFA 法使用斑点金标免疫渗滤法试剂盒。待检血清先用 0.85%NaCl 溶液作 80 倍稀释。从反应板左边第一孔开始点样,用玻璃毛细管蘸取稀释血清,在反应板小孔的硝酸纤维素膜上轻贴 0.5s,每孔点 2 个样品,每块反应板点 10 个样品,一次边连续点样 5 块反应板。点样后 3min 钟,从最早点样的反应板第一孔滴加甲液 0.05ml,间隔 5~7s 再滴第二孔,依此类推。待甲液渗进反应板中,每孔滴加乙液 0.05ml,待乙液渗入后,每孔滴加丙液 0.05ml。点样处显现红色斑点,判为阳性,黄色斑点或无色判为阴性。

[0277] 2.4 粪孵法粪便孵化血吸虫毛蚴法采用一粪三检的快速粪便毛蚴孵化方法。每一次粪检取新鲜牛粪 50g,直接投入 260 目尼龙筛兜内淘洗至水清,将粪渣放入 500ml 烧瓶中,于 25~26 $^{\circ}$ C 下进行孵化。孵化后的 1、3、5 小时观察毛蚴一次,每次观察时间不少于 1 分钟。如果观察到毛蚴就判为阳性。没有观察到毛蚴判为阴性。同时要注意在前两次观察以后,应将烧瓶搅拌或振摇数次,以便让积压在粪渣底部的少数虫卵孵出毛蚴。

[0278] 4 结果

[0279] 4.1 试纸条与粪孵毛蚴法的符合率

[0280] 在湖北和四川的重疫区,用粪孵法检测已确诊的阳性牛血清 50 份和 70 份,阴性牛

血清 200 份和 300 份,血吸虫非疫区浙江采集的粪孵阴性牛血清 500 份。用试纸条进行检测。比较试纸条法与粪孵毛蚴法的符合率。结果(见表 6)对于粪孵阳性牛血清,试验条法与粪孵法的阳性符合率为 100%,对粪孵阴性牛血清,试验条法与粪孵法的阴性符合率为 99.6%。

[0281] 表 6 试纸条与粪孵确诊为阴阳性的符合率的检验

[0282]

| 省份 | 粪孵确诊 | | 试纸条检测 | | 试纸条与粪孵确诊符合率(%) | |
|----|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|
| | 阳性(头) | 阴性(头) | 阳性(头) | 阴性(头) | 阳性 | 阴性 |
| 湖北 | 50 | 200 | 50 | 199 | 100.00 | 99.50 |
| 四川 | 70 | 300 | 70 | 298 | 100.00 | 99.33 |
| 浙江 | 0 | 500 | 1 | 499 | - | 99.80 |
| 合计 | 120 | 1000 | 120 | 497 | 100.00 | 99.60 |

[0283] 粪孵法操作繁琐,需要近 1 天的时间才出结果,在虫卵密度低的情况下容易漏检。但阳性结果可靠是其优点。在考察血吸虫病诊断方法可靠性时常被用于对照。试纸条法能够全部检出粪孵阳性牛的血清抗体,说明试纸条检测方法有较高的可靠性。

[0284] 4.2 试纸条与 IHA 法和 DIFA 法的符合率

[0285] 用试纸条、IHA 法和 DIFA 法分别检测实验感染血吸虫尾蚴 28d、35d、42d 牛血清各 5 份,粪卵法确诊自然感染血吸虫病牛血清 60 份,非疫区健康牛血清 60 份。检测结果见表 7。

[0286] 表 7 试纸条检测方法与 IHA 法和 DIFA 法的符合率

[0287]

| 血清 | 份数 | 检出阳性份数 | | | 阳性或阴性符合率(%) | |
|----------|----|--------|-------|--------|-------------|-----------|
| | | 试纸条 | IHA 法 | DIFA 法 | 试纸与 IHA | 试纸条与 DIFA |
| 实验感染 28d | 5 | 2 | 0 | 5 | 100 | 0 |
| 实验感染 35d | 5 | 5 | 5 | 5 | 100 | 100 |
| 实验感染 42d | 5 | 5 | 5 | 5 | 100 | 100 |
| 自然感染阳性牛 | 60 | 60 | 60 | 60 | 100 | 100 |
| 健康牛 | 60 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 |

[0288]

[0289] 由上表可见,实验感染 28d 的牛血清,只有 DIFA 法可以全部检测出来,除实验感染 28d 的牛血清之外,对于其余血清,试纸条、IHA 和 DIFA 三种方法的检测结果完全一致。试

纸条与两种常用的血清学方法符合率均为 100%。但 IHA 法操作步骤较多,检测速度较慢,完成一次检测需要 1 ~ 2 小时。DIFA 法检测速度较快,只需 5 分钟可测 40 ~ 50 个样品。但其试剂制作影响因素多,较难实现程序化、工厂化生产。其试剂为液体,不能通过航空和邮局邮寄。试纸条法操作最简单,只需加样 1 步,5 ~ 15 分钟出结果。试纸条为固体,邮寄不受限制。每条试纸条测试一个样品,使用非常灵活。其制备工艺也适于批量化生产。

[0290] 从以上实施例和试验例可见,本发明的牛血吸虫病诊断试纸条具有与 IHA 法相当的敏感性,较优秀的特异性和可重复性,使用简便灵活,保存期长达 1 年以上,适于批量工厂化生产。可广泛用于牛血吸虫病的诊断、普查、检疫和治疗药物的疗效考核,具有良好的应用前景。

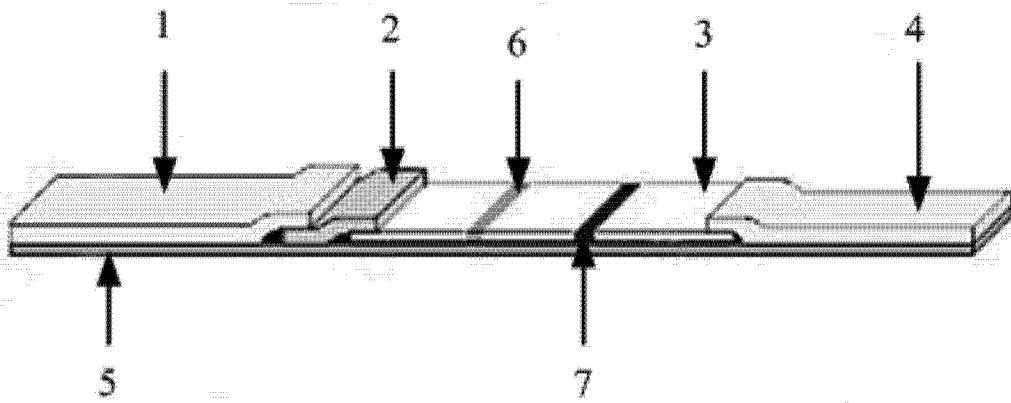


图 1

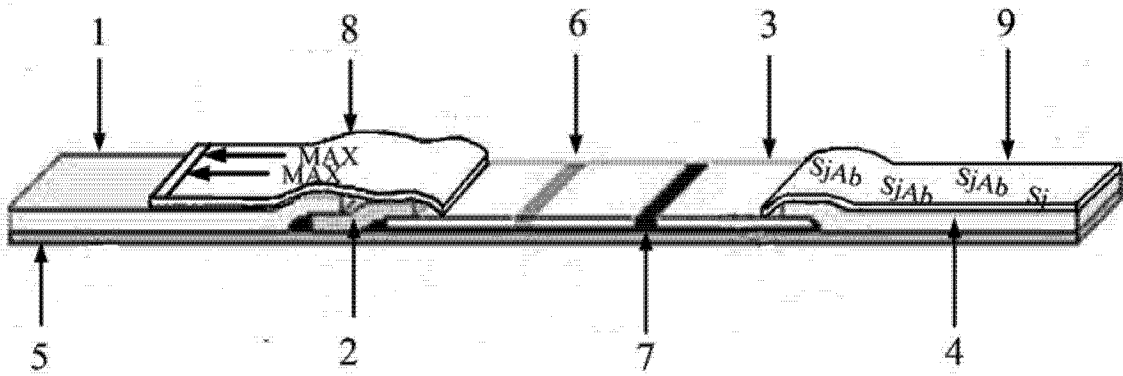


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的制备及其应用方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN102944675A | 公开(公告)日 | 2013-02-27 |
| 申请号 | CN201210442992.4 | 申请日 | 2012-11-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 浙江省农业科学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 浙江省农业科学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 浙江省农业科学院 | | |
| [标]发明人 | 卢福庄 张雪娟 顾昀 付媛 季敬余 冯尚连 俞国乔 杨玉焕 周煜 阳爱国 董国栋 郭莉 毛光琼 石团员 | | |
| 发明人 | 卢福庄 张雪娟 顾昀 付媛 季敬余 冯尚连 俞国乔 杨玉焕 周煜 阳爱国 董国栋 郭莉 毛光琼 石团员 | | |
| IPC分类号 | G01N33/558 G01N33/531 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种牛日本血吸虫病抗体检测试纸条的制备及其应用方法，属于动物寄生虫病诊断技术领域。试纸条由样品垫、免疫探针干片、层析膜、吸水纸、PVC基板及箭头标签胶膜与手柄标签胶膜组合而成。免疫探针干片是以聚苯乙烯乳胶微球的羧基与兔抗牛IgG抗体蛋白的胺基形成共价键结合物后吸附于聚脂膜后制成；层析膜是以锚固在硝酸纤维素膜上的血吸虫可溶性抗原为检测线、羊抗兔IgG抗体为质控线制成；可快速检测牛血清中的血吸虫抗体，操作简便，结果直观、准确。可广泛用于牛血吸虫病的诊断、普查和检疫。

