



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613252 A

(43)申请公布日 2019. 04. 12

(21)申请号 201811230812.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2018.10.22

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 新疆医科大学第一附属医院

G01N 33/531(2006.01)

地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐
市新市区鲤鱼山南路137号

G01N 33/558(2006.01)

申请人 新疆医科大学
新疆维吾尔自治区包虫病临床研究
所

G01N 33/543(2006.01)

(72)发明人 巩月红 温浩 王建华 高晓黎

段新宇 滕亮 赵军 高惠静

杨剑锐 孙其 何丽平

(74)专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务
所 65105

代理人 汤建武 周星莹

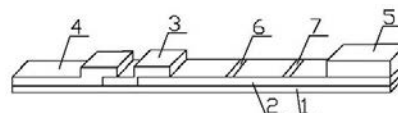
权利要求书3页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制
备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及卵黄抗体及其制备方法和应用技术领域,是一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制备方法和应用,该细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,按下述方法进行:棘球绦虫抗原蛋白的制备,免疫原的制备,蛋鸡饲养及免疫,细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备。本发明首次公开细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体及其在诊断包虫病方面的应用,采用本发明所述细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体制成的胶体金层析试纸条诊断包虫病时,所述胶体金层析试纸条具有很好的灵敏度、特异性、准确性和稳定性,为包虫病的诊断提供了一种更简单、成本更低的检测手段。



1. 一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备方法,其特征在于按下述方法进行:第一步,棘球绦虫抗原蛋白的制备:采用0.9%灭菌生理盐水或浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS洗涤棘球绦虫虫体,将洗涤后的棘球绦虫虫体在液氮和37℃下反复冻融3次至5次,将冻融后的棘球绦虫虫体粉碎,再每1mg粉碎后的棘球绦虫虫体加50μL蛋白裂解液裂解后得到裂解液,将裂解液离心,离心后取上清液,将上清液过滤除菌,将除菌后的上清液中的蛋白浓度调整至1mg/mL后得到棘球绦虫抗原蛋白;

第二步,免疫原的制备:将第一步得到的棘球绦虫抗原蛋白用浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS进行稀释后得到抗原蛋白稀释液,将抗原蛋白稀释液与弗氏完全佐剂等体积混合并乳化后得到油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原,将抗原蛋白稀释液与弗氏不完全佐剂混合并乳化后得到油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原;

第三步,蛋鸡饲养及免疫:选择15周至20周龄健康的蛋鸡,第一次喂阿维菌素,将阿维菌素拌入饲料中,7天至10天后再次喂阿维菌素一次,蛋鸡每次喂阿维菌素量为0.2mg/公斤,阿维菌素两次喂食后,再经过7天至10天后,对无异常反应的蛋鸡进行首次免疫,首次免疫后,间隔10天至14天进行第二次免疫,第二次免疫后,间隔10天至14天进行第三次免疫,首次免疫使用油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,非首次免疫使用油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,第三次免疫后,收集所得鸡蛋;

第四步,细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备:

4.1将第三步所得鸡蛋消毒,再打破蛋壳,分离蛋清与蛋黄,将蛋黄倾于滤纸上,并通过滤纸将蛋黄上的蛋清吸除干净后得到蛋黄,在得到蛋黄的过程中,卵黄膜不破裂,然后刺破卵黄膜,将蛋黄中的卵黄原液倾入容器中得到卵黄原液,从鸡蛋得到卵黄原液的操作为无菌操作;

4.2将卵黄原液用无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS以1:5至10的比例进行稀释,然后室温搅拌混匀,再静置后离心分层,取第一上清液,向第一上清液中加入1%正辛酸溶液搅拌后冷冻16h至24h,抽滤后得到IgY初提液;

4.3向IgY初提液中加入硫酸铵,使IgY初提液中的蛋白含量为20%,然后在-5℃至0℃下搅拌50min至80min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液一和沉淀一,向上清液一中加入硫酸铵,使上清液一中的蛋白含量为50%,然后在-5℃至0℃下搅拌30min至60min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液二和沉淀二,向上清液二中加入硫酸铵,使上清液二中的蛋白含量为80%,然后在-5℃至0℃下搅拌20min至40min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液三和沉淀三;

4.4将4.3步骤中得到的沉淀一、沉淀二和沉淀三混合得到一次沉淀,将一次沉淀用与蛋黄等体积的无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS溶解后得到溶解液,再用聚乙二醇6000沉淀溶解液中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到二次沉淀;

4.5将二次沉淀再用PBS重悬溶解后得到重悬溶解液一,然后在4℃条件下加入聚乙二醇6000沉淀重悬溶解液一中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到三次沉淀;

4.6将三次沉淀再用PBS重悬溶解得到重悬溶解液二,将重悬溶解液二以PBS作为透析液透析24h至48h后得到细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,其中,前10小时每2h至3h更换一次透析液,之后每5h至6h更换一次透析液。

2.一种根据权利要求1所述的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备方法得到的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体。

3.一种根据权利要求2所述的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用。

4.一种使用根据权利要求2所述的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体制备冻干高免卵黄抗体的方法,其特征在于按下述方法进行:

步骤一,用MEST缓冲液清洗磁珠3次,然后将1ml至2ml磁珠加入1ml至2ml活化剂中震荡混合均匀,活化剂包括10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺溶液,再在室温条件下避光、转速为150r/min的条件下反应15min至1h,反应结束后静置5min至10min,用磁力架将反应后的磁珠分离出来得到活化磁珠,并弃去反应液的上清液,保留反应液的下层物,

步骤二,将反应液的下层物用0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液溶解得到下层物溶解液,采用下层物溶解液清洗活化后的磁珠至少一次,然后将清洗后的活化磁珠分散在500 μ l至1000 μ l 0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液中后得到活化的磁珠悬浮液;

步骤三,将100 μ l至200 μ l含500 μ g至1mg棘球绦虫抗原蛋白的溶液加入到活化的磁珠悬浮液中混匀,在37 $^{\circ}$ C下振荡孵育1h至2h,然后静置5min至10min后磁分离,并弃上清液,除去磁珠上的反应液和未偶联棘球绦虫抗原蛋白后得到偶联抗原的磁珠;

步骤四,封闭:用PBST缓冲液洗涤偶联抗原的磁珠1mg,然后加入含2%鱼胶原蛋白、1%牛血清白蛋白的0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的PBS1ml进行封闭,再在37 $^{\circ}$ C下振荡孵育2h至2.5h,静置5min至10min后,磁分离并弃上清液,再用PBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到封闭孵育磁珠;

步骤五,偶联纯化抗体:将封闭孵育磁珠加入到80 μ g至110 μ g细粒棘球绦虫高免卵黄抗体中,37 $^{\circ}$ C振荡孵育1h;使封闭孵育磁珠呈均匀分布状态,在孵育过程中,封闭孵育磁珠与细粒棘球绦虫高免卵黄抗体结合,磁力架吸附封闭孵育磁珠,吸去未与棘球绦虫抗原蛋白结合的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,将孵育后的封闭孵育磁珠用PBST缓冲液洗涤3次,然后向洗涤后的封闭孵育磁珠中加入甘氨酸-HCl洗脱液,吹打1min,磁分离后得到免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;

步骤六,将免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体经过过滤除菌和冷冻干燥后得到冻干高免卵黄抗体。

5.一种根据权利要求4所述的冻干高免卵黄抗体的制备方法得到的冻干高免卵黄抗体。

6.一种根据权利要求5所述的冻干高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用。

7.一种胶体金层析试纸条,其特征在于包括PVC衬板、硝酸纤维素膜、胶体金结合物垫、样品垫及吸水垫,在PVC衬板的顶面自左而右依序固定有样品垫、胶体金结合物垫和硝酸纤维素膜,吸水垫固定在硝酸纤维素膜的右部顶面,在胶体金结合物垫与吸水垫之间的硝酸

纤维素膜顶面自左而右间隔设置有检测条带和质控条带;胶体金结合物垫包被有细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,检测条带内包被有棘球绦虫抗原蛋白,质控条带内包被有羊抗鸡抗体IgG。

8. 根据权利要求7所述的胶体金层析试纸条,其特征在于胶体金结合物垫包被有胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述方法得到:将胶体金溶液中加入四硼酸钠溶液混合均匀,将0.3ml至0.5ml浓度为1mg/ml的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体逐滴加入100ml胶体金溶液中混合并反应,然后在4℃下避光放置45min至1h,再逐滴加入含30%至50%蔗糖、5%至10%牛血清白蛋白或鱼胶蛋白的浓度为0.05mol/L至0.2mol/L的Tris-HCL缓冲液进行封闭,混匀,以孔径为0.22 μm的滤膜过滤,滤液即为胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;或/和,检测条带内包被棘球绦虫抗原蛋白按下述方法得到:将棘球绦虫抗原蛋白用pH值为7.2至7.4的磷酸盐缓冲液或pH值为8.0至8.2的Tris-HCL缓冲液稀释得到1.0mg/ml检测条带包被液,在4℃下以8000r/min至12000r/min速度离心60min后,检测条带包被液离心后的上清液为检测条带抗体,将检测条带抗体喷涂在硝酸纤维素膜对应的检测条带位置并烘干;或/和,质控条带内包被羊抗鸡抗体IgG按下述方法得到:将羊抗鸡抗体IgG用pH值为7.2至7.4的磷酸盐缓冲液或pH值为7.2至7.4的Tris-HCL缓冲液稀释得到1.0mg/ml质控条带包被液,在4℃下以8000r/min至12000r/min速度离心60min后,质控条带包被液离心后的上清液为质控条带抗体,将质控条带抗体喷涂在硝酸纤维素膜对应的质控条带位置并烘干;或/和,样本垫、胶体金结合物垫均为经过pH值为7.2至7.4的封闭液封闭处理,所述封闭液为含有1.0%吐温、0.5%至5.0%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;或/和,还包括壳体,壳体包裹在PVC衬板、硝酸纤维素膜、胶体金结合物垫、样品垫及吸水垫的外侧,壳体上设置有加样窗口和检测窗口,加样窗口位于所述样本垫处,检测窗口位于检测条带和质控条带处。

9. 根据权利要求8所述的胶体金层析试纸条,其特征在于胶体金结合物垫包被有胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述方法得到:将胶体金溶液中加入四硼酸钠溶液混合均匀,将0.3ml至0.5ml浓度为1mg/ml的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体逐滴加入100ml胶体金溶液中混合并反应,然后在4℃下避光放置45min至1h,再逐滴加入含30%至50%蔗糖、5%至10%牛血清白蛋白或鱼胶蛋白的浓度为0.05mol/L至0.2mol/L的Tris-HCL缓冲液进行封闭,混匀,以孔径为0.22 μm的滤膜过滤,滤液即为胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体。

10. 一种根据权利要求7或8或9所述的胶体金层析试纸条在制备诊断包虫病的试剂盒中的应用。

细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及卵黄抗体及其制备方法和应用技术领域,是一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制备方法和应用,其包括一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体及其制备方法和其在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用;还包括一种冻干高免卵黄抗体及其制备方法和其在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用;还包括一种胶体金层析试纸条及制备方法和其在制备诊断包虫病的试剂盒中的应用。发明名称中的试纸条代表胶体金层析试纸条。

背景技术

[0002] 包虫病又称棘球蚴病,为人畜共患寄生虫病,严重危害人群健康甚至生命,由于传染源难于控制及缺乏高效防控措施,我国西部七省区仍为高流行区,部分地区人群包虫病患病率高达8.93%至12.38%,并呈现农牧业区向城区扩散,西北地区向东部和南部蔓延的趋势,目前已被国家列为重点控制的传染病之一。包虫病常由寄生于犬科动物小肠的细粒棘球绦虫虫卵或孕节随粪便排出污染草、饮水等,被人及家畜误食引起。随着包虫病防治规划的实施,诊断监测犬粪细粒棘球绦虫,是控制其在人畜间传播和免疫驱虫后防污染的必要手段。现有的病原检查漏诊率不断升高,且病原学检查费时、费力,操作烦琐,不适于现场大规模普查和疫情监测。因此,有必要建立一种简单快速、灵敏度高、经济的免疫学诊断方法,为综合防控包虫病提供重要工具,也为包虫病诊断提供一个新的技术手段和途径。

[0003] 免疫胶体金技术是免疫诊断中体外诊断的主要类型之一,其利用抗原与抗体互相结合的特异性反应来进行定性或定量的诊断,目前已广泛应用于临床诊断,尤其是在医学、兽医学临床检验中已广泛应用,具有费用低、灵敏度高、速度快、使用便捷、操作简单和易于普及等特点。

[0004] 在免疫学领域把通过使用特定抗原免疫产蛋母鸡(禽类),使其淋巴细胞受免疫刺激后产生抗体IgY,而抗体IgY经血液选择性地转移到卵黄中并不断累积,称为卵黄免疫球蛋白(Immunoglobulin of Yolk, IgY),为卵黄中唯一存在的抗体,也为禽类的一种特异性抗体,最终通过对卵黄液提取纯化获得特异性多克隆抗体。主要应用于疾病的诊断检测和防治、兽医临床、食品添加剂及化妆品领域等。然而,目前未有关于卵黄免疫球蛋白(卵黄抗体)用于包虫病诊断方面的报道。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制备方法和应用,克服了上述现有技术之不足,本发明首次公开细粒棘球绦虫高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用,并且本发明的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体用于诊断包虫病时,具有很好的灵敏度、特异性和稳定性。

[0006] 本发明的技术方案之一是通过以下措施来实现的:一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备方法,按下述方法进行:第一步,棘球绦虫抗原蛋白的制备:采用0.9%灭菌生理盐

水或浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS洗涤棘球绦虫虫体,将洗涤后的棘球绦虫虫体在液氮和37℃下反复冻融3次至5次,将冻融后的棘球绦虫虫体粉碎,再每1mg粉碎后的棘球绦虫虫体加50μL蛋白裂解液裂解后得到裂解液,将裂解液离心,离心后取上清液,将上清液过滤除菌,将除菌后的上清液中的蛋白浓度调整至1mg/mL后得到棘球绦虫抗原蛋白;

[0007] 第二步,免疫原的制备:将第一步得到的棘球绦虫抗原蛋白用浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS进行稀释后得到抗原蛋白稀释液,将抗原蛋白稀释液与弗氏完全佐剂等体积混合并乳化后得到油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原,将抗原蛋白稀释液与弗氏不完全佐剂混合并乳化后得到油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原;

[0008] 第三步,蛋鸡饲养及免疫:选择15周至20周龄健康的蛋鸡,第一次喂阿维菌素,将阿维菌素拌入饲料中,7天至10天后再次喂阿维菌素一次,蛋鸡每次喂阿维菌素量为0.2mg/公斤,阿维菌素两次喂食后,再经过7天至10天后,对无异常反应的蛋鸡进行首次免疫,首次免疫后,间隔10天至14天进行第二次免疫,第二次免疫后,间隔10天至14天进行第三次免疫,首次免疫使用油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,非首次免疫使用油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,第三次免疫后,收集所得鸡蛋;

[0009] 第四步,细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备:

[0010] 4.1将第三步所得鸡蛋消毒,再打破蛋壳,分离蛋清与蛋黄,将蛋黄倾于滤纸上,并通过滤纸将蛋黄上的蛋清吸除干净后得到蛋黄,在得到蛋黄的过程中,卵黄膜不破裂,然后刺破卵黄膜,将蛋黄中的卵黄原液倾入容器中得到卵黄原液,从鸡蛋得到卵黄原液的操作作为无菌操作;

[0011] 4.2将卵黄原液用无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS以1:5至10的比例进行稀释,然后室温搅拌混匀,再静置后离心分层,取第一上清液,向第一上清液中加入1%正辛酸溶液搅拌后冷冻16h至24h,抽滤后得到IgY初提液;

[0012] 4.3向IgY初提液中加入硫酸铵,使IgY初提液中的蛋白含量为20%,然后在-5℃至0℃下搅拌50min至80min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液一和沉淀一,向上清液一中加入硫酸铵,使上清液一中的蛋白含量为50%,然后在-5℃至0℃下搅拌30min至60min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液二和沉淀二,向上清液二中加入硫酸铵,使上清液二中的蛋白含量为80%,然后在-5℃至0℃下搅拌20min至40min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液三和沉淀三;

[0013] 4.4将4.3步骤中得到的沉淀一、沉淀二和沉淀三混合得到一次沉淀,将一次沉淀用与蛋黄等体积的无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS溶解后得到溶解液,再用聚乙二醇6000沉淀溶解液中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到二次沉淀;

[0014] 4.5将二次沉淀再用PBS重悬溶解后得到重悬溶解液一,然后在4℃条件下加入聚乙二醇6000沉淀重悬溶解液一中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到三次沉淀;

[0015] 4.6将三次沉淀再用PBS重悬溶解得到重悬溶解液二,将重悬溶解液二以PBS作为透析液透析24h至48h后得到细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,其中,前10小时每2h至3h更换一次透析液,之后每5h至6h更换一次透析液。

[0016] 本发明的技术方案之二是通过以下措施来实现的:一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,按下述方法得到:第一步,棘球绦虫抗原蛋白的制备:采用0.9%灭菌生理盐水或浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS洗涤棘球绦虫虫体,将洗涤后的棘球绦虫虫体在液氮和37℃下反复冻融3次至5次,将冻融后的棘球绦虫虫体粉碎,再每1mg粉碎后的棘球绦虫虫体加50μL蛋白裂解液裂解后得到裂解液,将裂解液离心,离心后取上清液,将上清液过滤除菌,将除菌后的上清液中的蛋白浓度调整至1mg/mL后得到棘球绦虫抗原蛋白;

[0017] 第二步,免疫原的制备:将第一步得到的棘球绦虫抗原蛋白用浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS进行稀释后得到抗原蛋白稀释液,将抗原蛋白稀释液与弗氏完全佐剂等体积混合并乳化后得到油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原,将抗原蛋白稀释液与弗氏不完全佐剂混合并乳化后得到油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原;

[0018] 第三步,蛋鸡饲养及免疫:选择15周至20周龄健康的蛋鸡,第一次喂阿维菌素,将阿维菌素拌入饲料中,7天至10天后再次喂阿维菌素一次,蛋鸡每次喂阿维菌素量为0.2mg/公斤,阿维菌素两次喂食后,再经过7天至10天后,对无异常反应的蛋鸡进行首次免疫,首次免疫后,间隔10天至14天进行第二次免疫,第二次免疫后,间隔10天至14天进行第三次免疫,首次免疫使用油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,非首次免疫使用油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,第三次免疫后,收集所得鸡蛋;

[0019] 第四步,细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备:

[0020] 4.1将第三步所得鸡蛋消毒,再打破蛋壳,分离蛋清与蛋黄,将蛋黄倾于滤纸上,并通过滤纸将蛋黄上的蛋清吸除干净后得到蛋黄,在得到蛋黄的过程中,卵黄膜不破裂,然后刺破卵黄膜,将蛋黄中的卵黄原液倾入容器中得到卵黄原液,从鸡蛋得到卵黄原液的操作作为无菌操作;

[0021] 4.2将卵黄原液用无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS以1:5至10的比例进行稀释,然后室温搅拌混匀,再静置后离心分层,取第一上清液,向第一上清液中加入1%正辛酸溶液搅拌后冷冻16h至24h,抽滤后得到IgY初提液;

[0022] 4.3向IgY初提液中加入硫酸铵,使IgY初提液中的蛋白含量为20%,然后在-5℃至0℃下搅拌50min至80min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液一和沉淀一,向上清液一中加入硫酸铵,使上清液一中的蛋白含量为50%,然后在-5℃至0℃下搅拌30min至60min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液二和沉淀二,向上清液二中加入硫酸铵,使上清液二中的蛋白含量为80%,然后在-5℃至0℃下搅拌20min至40min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液三和沉淀三;

[0023] 4.4将4.3步骤中得到的沉淀一、沉淀二和沉淀三混合得到一次沉淀,将一次沉淀用与蛋黄等体积的无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS溶解后得到溶解液,再用聚乙二醇6000沉淀溶解液中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到二次沉淀;

[0024] 4.5将二次沉淀再用PBS重悬溶解后得到重悬溶解液一,然后在4℃条件下加入聚乙二醇6000沉淀重悬溶解液一中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到三次沉淀;

[0025] 4.6将三次沉淀再用PBS重悬溶解得到重悬溶解液二,将重悬溶解液二以PBS作为透析液透析24h至48h后得到细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,其中,前10小时每2h至3h更换一次透析液,之后每5h至6h更换一次透析液。

[0026] 本发明的技术方案之三是通过以下措施来实现的:一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用。

[0027] 本发明的技术方案之四是通过以下措施来实现的:一种冻干高免卵黄抗体的制备方法,按下述方法进行:

[0028] 步骤一,用MEST缓冲液清洗磁珠3次,然后将1ml至2ml磁珠加入1ml至2ml活化剂中震荡混合均匀,活化剂包括10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺溶液,再在室温条件下避光、转速为150r/min的条件下反应15min至1h,反应结束后静置5min至10min,用磁力架将反应后的磁珠分离出来得到活化磁珠,并弃去反应液的上清液,保留反应液的下层物,

[0029] 步骤二,将反应液的下层物用0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液溶解得到下层物溶解液,采用下层物溶解液清洗活化后的磁珠至少一次,然后将清洗后的活化磁珠分散在500μl至1000μl 0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液中后得到活化的磁珠悬浮液;

[0030] 步骤三,将100μl至200μl含500μg至1mg棘球绦虫抗原蛋白的溶液加入到活化的磁珠悬浮液中混匀,在37℃下振荡孵育1h至2h,然后静置5min至10min后磁分离,并弃上清液,除去磁珠上的反应液和未偶联棘球绦虫抗原蛋白后得到偶联抗原的磁珠;

[0031] 步骤四,封闭:用PBST缓冲液洗涤偶联抗原的磁珠1mg,然后加入含2%鱼胶原蛋白、1%牛血清白蛋白的0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的PBS1ml进行封闭,再在37℃下振荡孵育2h至2.5h,静置5min至10min后,磁分离并弃上清液,再用PBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到封闭孵育磁珠;

[0032] 步骤五,偶联纯化抗体:将封闭孵育磁珠加入到80μg至110μg细粒棘球绦虫高免卵黄抗体中,37℃振荡孵育1h;使封闭孵育磁珠呈均匀分布状态,在孵育过程中,封闭孵育磁珠与细粒棘球绦虫高免卵黄抗体结合,磁力架吸附封闭孵育磁珠,吸去未与棘球绦虫抗原蛋白结合的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,将孵育后的封闭孵育磁珠用PBST缓冲液洗涤3次,然后向洗涤后的封闭孵育磁珠中加入甘氨酸-HCl洗脱液,吹打1min,磁分离后得到免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;

[0033] 步骤六,将免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体经过过滤除菌和冷冻干燥后得到冻干高免卵黄抗体。

[0034] 本发明的技术方案之五是通过以下措施来实现的:一种冻干高免卵黄抗体,按下述方法得到:

[0035] 步骤一,用MEST缓冲液清洗磁珠3次,然后将1ml至2ml磁珠加入1ml至2ml活化剂中震荡混合均匀,活化剂包括10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和

10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺溶液,再在室温条件下避光、转速为150r/min的条件下反应15min至1h,反应结束后静置5min至10min,用磁力架将反应后的磁珠分离出来得到活化磁珠,并弃去反应液的上清液,保留反应液的下层物,

[0036] 步骤二,将反应液的下层物用0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液溶解得到下层物溶解液,采用下层物溶解液清洗活化后的磁珠至少一次,然后将清洗后的活化磁珠分散在500 μ l至1000 μ l 0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液中后得到活化的磁珠悬浮液;

[0037] 步骤三,将100 μ l至200 μ l含500 μ g至1mg棘球绦虫抗原蛋白的溶液加入到活化的磁珠悬浮液中混匀,在37℃下振荡孵育1h至2h,然后静置5min至10min后磁分离,并弃上清液,除去磁珠上的反应液和未偶联棘球绦虫抗原蛋白后得到偶联抗原的磁珠;

[0038] 步骤四,封闭:用PBST缓冲液洗涤偶联抗原的磁珠1mg,然后加入含2%鱼胶原蛋白、1%牛血清白蛋白的0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的PBS1ml进行封闭,再在37℃下振荡孵育2h至2.5h,静置5min至10min后,磁分离并弃上清液,再用PBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到封闭孵育磁珠;

[0039] 步骤五,偶联纯化抗体:将封闭孵育磁珠加入到80 μ g至110 μ g细粒棘球绦虫高免卵黄抗体中,37℃振荡孵育1h;使封闭孵育磁珠呈均匀分布状态,在孵育过程中,封闭孵育磁珠与细粒棘球绦虫高免卵黄抗体结合,磁力架吸附封闭孵育磁珠,吸去未与棘球绦虫抗原蛋白结合的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,将孵育后的封闭孵育磁珠用PBST缓冲液洗涤3次,然后向洗涤后的封闭孵育磁珠中加入甘氨酸-HCl洗脱液,吹打1min,磁分离后得到免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;

[0040] 步骤六,将免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体经过过滤除菌和冷冻干燥后得到冻干高免卵黄抗体。

[0041] 本发明的技术方案之六是通过以下措施来实现的:一种冻干高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用。

[0042] 本发明的技术方案之七是通过以下措施来实现的:一种胶体金层析试纸条,包括PVC衬板、硝酸纤维素膜、胶体金结合物垫、样品垫及吸水垫,在PVC衬板的顶面自左而右依序固定有样品垫、胶体金结合物垫和硝酸纤维素膜,吸水垫固定在硝酸纤维素膜的右部顶面,在胶体金结合物垫与吸水垫之间的硝酸纤维素膜顶面自左而右间隔设置有检测条带和质控条带;胶体金结合物垫包被有细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,检测条带内包被有棘球绦虫抗原蛋白,质控条带内包被有羊抗鸡抗体IgG。

[0043] 下面是对上述发明技术方案之七的进一步优化或/和改进:

[0044] 上述胶体金结合物垫包被有胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述方法得到:将胶体金溶液中加入四硼酸钠溶液混合均匀,将0.3ml至0.5ml浓度为1mg/ml的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体逐滴加入100ml胶体金溶液中混合并反应,然后在4℃下避光放置45min至1h,再逐滴加入含30%至50%蔗糖、5%至10%牛血清白蛋白或鱼胶原蛋白的浓度为0.05mol/L至0.2mol/L的Tris-HCL缓冲液进行封闭,混匀,以孔径为0.22 μ m的滤膜过滤,滤液即为胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;或/和,检测条带内包被棘球绦虫抗原蛋白按下述方法得到:将棘球绦虫抗原蛋白用pH值为7.2至7.4的磷酸盐缓冲液或pH值为7.2至7.4的Tris-HCL缓

冲液稀释得到1.0mg/ml检测条带包被液,在4℃下以8000r/min至12000r/min速度离心60min后,检测条带包被液离心后的上清液为检测条带抗体,将检测条带抗体喷涂在硝酸纤维素膜对应的检测条带位置并烘干;或/和,质控条带内包被羊抗鸡抗体IgG按下述方法得到:将羊抗鸡抗体IgG用pH值为7.2至7.4的磷酸盐缓冲液或pH值为8.0至8.2的Tris-HCL缓冲液稀释得到1.0mg/ml质控条带包被液,在4℃下以8000r/min至12000r/min速度离心60min后,质控条带包被液离心后的上清液为质控条带抗体,将质控条带抗体喷涂在硝酸纤维素膜对应的质控条带位置并烘干;或/和,样本垫、胶体金结合物垫均为经过pH值为7.2至7.4的封闭液封闭处理,所述封闭液为含有1.0%吐温、0.5%至5.0%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;或/和,还包括壳体,壳体包裹在PVC衬板、硝酸纤维素膜、胶体金结合物垫、样品垫及吸水垫的外侧,壳体上设置有加样窗口和检测窗口,加样窗口位于所述样本垫处,检测窗口位于检测条带和质控条带处。

[0045] 上述胶体金结合物垫包被有胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述方法得到:将胶体金溶液中加入四硼酸钠溶液混合均匀,将0.3ml至0.5ml浓度为1mg/ml的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体逐滴加入100ml胶体金溶液中混合并反应,然后在4℃下避光放置45min至1h,再逐滴加入含30%至50%蔗糖、5%至10%牛血清白蛋白或鱼胶蛋白的浓度为0.05mol/L至0.2mol/L的Tris-HCL缓冲液进行封闭,混匀,以孔径为0.22μm的滤膜过滤,滤液即为胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体。

[0046] 本发明的技术方案之八是通过以下措施来实现的:一种胶体金层析试纸条在制备诊断包虫病的试剂盒中的应用。

[0047] 本发明首次公开细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体及其在诊断包虫病方面的应用,采用本发明所述细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体制成的胶体金层析试纸条诊断包虫病时,所述胶体金层析试纸条具有很好的灵敏度、特异性、准确性和稳定性,为包虫病的诊断提供了一种更简单、成本更低的检测手段。

附图说明

[0048] 附图1为本发明所述胶体金层析试纸条的立体结构示意图。

[0049] 附图中的编码分别为:1为PVC衬板,2为硝酸纤维素膜,3为胶体金结合物垫,4为样品垫,5为吸水垫,6为检测条带,7为质控条带。

具体实施方式

[0050] 本发明不受下述实施例的限制,可根据本发明的技术方案与实际情况来确定具体的实施方式。本发明中所提到各种化学试剂和化学用品如无特殊说明,均为现有技术中公知公用的化学试剂和化学用品;本发明中的百分数如没有特殊说明,均为质量百分数;本发明中的溶液若没有特殊说明,均为溶剂为水的水溶液,例如,盐酸溶液即为盐酸水溶液;本发明中的常温、室温一般指15℃到25℃的温度,一般定义为25℃;本发明中的PBS为磷酸缓冲盐溶液。

[0051] 然而,本发明并不受限于以下所公开的示范性实施例;可以通过不同形式来对其

加以实现。说明书的实质仅仅是帮助相关领域技术人员综合理解本发明的具体细节。

[0052] 下面结合实施例对本发明作进一步描述:

[0053] 实施例1:一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述制备方法进行:第一步,棘球绦虫抗原蛋白的制备:采用0.9%灭菌生理盐水或浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS洗涤棘球绦虫虫体,将洗涤后的棘球绦虫虫体在液氮和37℃下反复冻融3次至5次,将冻融后的棘球绦虫虫体粉碎,再每1mg粉碎后的棘球绦虫虫体加50μL蛋白裂解液裂解后得到裂解液,将裂解液离心,离心后取上清液,将上清液过滤除菌,将除菌后的上清液中的蛋白浓度调整至1mg/mL后得到棘球绦虫抗原蛋白;

[0054] 第二步,免疫原的制备:将第一步得到的棘球绦虫抗原蛋白用浓度为0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的灭菌PBS进行稀释后得到抗原蛋白稀释液,将抗原蛋白稀释液与弗氏完全佐剂等体积混合并乳化后得到油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原,将抗原蛋白稀释液与弗氏不完全佐剂混合并乳化后得到油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原;

[0055] 第三步,蛋鸡饲养及免疫:选择15周至20周龄健康的蛋鸡,第一次喂阿维菌素,将阿维菌素拌入饲料中,7天至10天后再次喂阿维菌素一次,蛋鸡每次喂阿维菌素量为0.2mg/公斤,阿维菌素两次喂食后,再经过7天至10天后,对无异常反应的蛋鸡进行首次免疫,首次免疫后,间隔10天至14天进行第二次免疫,第二次免疫后,间隔10天至14天进行第三次免疫,首次免疫使用油包水弗氏完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,非首次免疫使用油包水弗氏不完全佐剂棘球绦虫蛋白免疫原1mL,第三次免疫后,收集所得鸡蛋;

[0056] 第四步,细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备:

[0057] 4.1将第三步所得鸡蛋消毒,再打破蛋壳,分离蛋清与蛋黄,将蛋黄倾于滤纸上,并通过滤纸将蛋黄上的蛋清吸除干净后得到蛋黄,在得到蛋黄的过程中,卵黄膜不破裂,然后刺破卵黄膜,将蛋黄中的卵黄原液倾入容器中得到卵黄原液,从鸡蛋得到卵黄原液的操作作为无菌操作;

[0058] 4.2将卵黄原液用无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS以1:5至10的比例进行稀释,然后室温搅拌混匀,再静置后离心分层,取第一上清液,向第一上清液中加入1%正辛酸溶液搅拌后冷冻16h至24h,抽滤后得到IgY初提液;

[0059] 4.3向IgY初提液中加入硫酸铵,使IgY初提液中的蛋白含量为20%,然后在-5℃至0℃下搅拌50min至80min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液一和沉淀一,向上清液一中加入硫酸铵,使上清液一中的蛋白含量为50%,然后在-5℃至0℃下搅拌30min至60min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液二和沉淀二,向上清液二中加入硫酸铵,使上清液二中的蛋白含量为80%,然后在-5℃至0℃下搅拌20min至40min,再在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后再分层得到上清液三和沉淀三;

[0060] 4.4将4.3步骤中得到的沉淀一、沉淀二和沉淀三混合得到一次沉淀,将一次沉淀用与蛋黄等体积的无菌的浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS溶解后得到溶解液,再用聚乙二醇6000沉淀溶解液中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到二次沉淀;

[0061] 4.5将二次沉淀再用PBS重悬溶解后得到重悬溶解液一,然后在4℃条件下加入聚

乙二醇6000沉淀重悬溶解液一中的卵黄抗体,再在-5℃至0℃下搅拌10min至30min,然后在4℃至5℃下以8000rpm/min至12000rpm/min的转速离心10min至20min后离心得到三次沉淀;

[0062] 4.6将三次沉淀再用PBS重悬溶解得到重悬溶解液二,将重悬溶解液二以PBS作为透析液透析24h至48h后得到细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,其中,前10小时每2h至3h更换一次透析液,之后每5h至6h更换一次透析液。

[0063] 根据本实施例1得到细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的过程中,通过所述蛋清和蛋黄的分离方式,可以使蛋清和蛋黄分离的更加彻底,则使细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的提取纯度更高,并通过其后续的第三步和第四步,能够进一步提细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的提取纯度。

[0064] 并且根据本实施例1得到的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体特异性高,不激活补体:传统的抗体Fc段能特异性结合类风湿性因子,在免疫检测中,增加了假阳性的反应,而本发明的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体(IgY)不与风湿性因子结合,作为检测试剂,具有独特的优势。

[0065] 由于哺乳动物的血清中含有补体,进行相关试验时要进行灭活,而发明的IgY不含补体系统,可避免补体系统的干扰,减少假阴性的发生。本发明了以母鸡作为产生IgY抗体的母体,使其产生抗更多种类的抗原决定簇抗体和更高效价的稳定抗体(IgY)。

[0066] 另外,采用本发明得到的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体诊断包虫病时,其具有很好的灵敏度、特异性、准确性和稳定性。

[0067] 实施例2:一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用。

[0068] 实施例3:一种冻干高免卵黄抗体,按下述制备方法进行:

[0069] 步骤一,用MEST缓冲液清洗磁珠3次,然后将1ml至2ml磁珠加入1ml至2ml活化剂中震荡混合均匀,活化剂包括10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液和10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺溶液,再在室温条件下避光、转速为150r/min的条件下反应15min至1h,反应结束后静置5min至10min,用磁力架将反应后的磁珠分离出来得到活化磁珠,并弃去反应液的上清液,保留反应液的下层物,

[0070] 步骤二,将反应液的下层物用0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液溶解得到下层物溶解液,采用下层物溶解液清洗活化后的磁珠至少一次,然后将清洗后的活化磁珠分散在500 μ l至1000 μ l 0.01mol/L、pH值为5.0至7.2的PBST缓冲液中后得到活化的磁珠悬浮液;

[0071] 步骤三,将100 μ l至200 μ l含500 μ g至1mg棘球绦虫抗原蛋白的溶液加入到活化的磁珠悬浮液中混匀,在37℃下振荡孵育1h至2h,然后静置5min至10min后磁分离,并弃上清液,除去磁珠上的反应液和未偶联棘球绦虫抗原蛋白后得到偶联抗原的磁珠;

[0072] 步骤四,封闭:用PBST缓冲液洗涤偶联抗原的磁珠1mg,然后加入含2%鱼胶原蛋白、1%牛血清白蛋白的0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的PBS1ml进行封闭,再在37℃下振荡孵育2h至2.5h,静置5min至10min后,磁分离并弃上清液,再用PBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到封闭孵育磁珠;

[0073] 步骤五,偶联纯化抗体:将封闭孵育磁珠加入到80 μ g至110 μ g细粒棘球绦虫高免卵

黄抗体中,37℃振荡孵育1h;使封闭孵育磁珠呈均匀分布状态,在孵育过程中,封闭孵育磁珠与细粒棘球绦虫高免卵黄抗体结合,磁力架吸附封闭孵育磁珠,吸去未与棘球绦虫抗原蛋白结合的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,将孵育后的封闭孵育磁珠用PBST缓冲液洗涤3次,然后向洗涤后的封闭孵育磁珠中加入甘氨酸-HCl洗脱液,吹打1min,磁分离后得到免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;

[0074] 步骤六,将免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体经过过滤除菌和冷冻干燥后得到冻干高免卵黄抗体。

[0075] 采用本实施例3所述冻干高免卵黄抗体诊断包虫病时,其具有更好的灵敏度、特异性、准确性和稳定性。

[0076] 实施例4:一种冻干高免卵黄抗体在制备诊断包虫病的试剂或试剂条或药物中的应用。

[0077] 实施例5:如附图1所示,一种胶体金层析试纸条,包括PVC衬板1、硝酸纤维素膜2、胶体金结合物垫3、样品垫4及吸水垫5,在PVC衬板1的顶面自左而右依序固定有样品垫4、胶体金结合物垫3和硝酸纤维素膜2,吸水垫5固定在硝酸纤维素膜2的右部顶面,在胶体金结合物垫3与吸水垫5之间的硝酸纤维素膜2顶面自左而右间隔设置有检测条带6和质控条带7;胶体金结合物垫3包被有细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,检测条带6内包被有棘球绦虫抗原蛋白,质控条带7内包被有羊抗鸡抗体IgG。

[0078] 实施例6:作为上述实施例5的优化,胶体金结合物垫3包被有胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述方法得到:将胶体金溶液中加入四硼酸钠溶液混合均匀,将0.3ml至0.5ml浓度为1mg/ml的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体逐滴加入100ml胶体金溶液中混合并反应,然后在4℃下避光放置45min至1h,再逐滴加入含30%至50%蔗糖、5%至10%牛血清白蛋白或鱼胶蛋白的浓度为0.05mol/L至0.2mol/L的Tris-HCL缓冲液进行封闭,混匀,以孔径为0.22μm的滤膜过滤,滤液即为胶体金纳米颗粒标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体;或/和,检测条带6内包被棘球绦虫抗原蛋白按下述方法得到:将棘球绦虫抗原蛋白用pH值为7.2至7.4的磷酸盐缓冲液或pH值为7.2至7.4的Tris-HCL缓冲液稀释得到1.0mg/ml检测条带6包被液,在4℃下以8000r/min至12000r/min速度离心60min后,检测条带6包被液离心后的上清液为检测条带6抗体,将检测条带6抗体喷涂在硝酸纤维素膜2对应的检测条带6位置并烘干;或/和,质控条带7内包被羊抗鸡抗体IgG按下述方法得到:将羊抗鸡抗体IgG用pH值为7.2至7.4的磷酸盐缓冲液或pH值为8.0至8.2的Tris-HCL缓冲液稀释得到1.0mg/ml质控条带7包被液,在4℃下以8000r/min至12000r/min速度离心60min后,质控条带7包被液离心后的上清液为质控条带7抗体,将质控条带7抗体喷涂在硝酸纤维素膜2对应的质控条带7位置并烘干;或/和,样本垫、胶体金结合物垫3均为经过pH值为7.2至7.4的封闭液封闭处理,所述封闭液为含有1.0%吐温、0.5%至5.0%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;或/和,还包括壳体,壳体包裹在PVC衬板1、硝酸纤维素膜2、胶体金结合物垫3、样品垫4及吸水垫5的外侧,壳体上设置有加样窗口和检测窗口,加样窗口位于所述样本垫处,检测窗口位于检测条带6和质控条带7处。

[0079] 实施例7:作为上述实施例5至6的优化,胶体金结合物垫3包被有胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体,胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体按下述方法得到:将胶体金溶液中加入四硼酸钠溶液混合均

匀,将0.3ml至0.5ml浓度为1mg/ml的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体逐滴加入100ml胶体金溶液中混合并反应,然后在4℃下避光放置45min至1h,再逐滴加入含30%至50%蔗糖、5%至10%牛血清白蛋白或鱼胶蛋白的浓度为0.05mol/L至0.2mol/L的Tris-HCL缓冲液进行封闭,混匀,以孔径为0.22μm的滤膜过滤,滤液即为胶体金纳米颗粒标记的免疫磁珠纯化的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体。

[0080] 实施例8:一种胶体金层析试纸条在制备诊断包虫病的试剂盒中的应用。

[0081] 实施例9:胶体金层析试纸条的使用方法,包括如下步骤:采集犬粪样2ml至3ml,室温放置15min至120min,以3000r/min速度离心10min至30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,即得待测样本;利用移液器准确吸取100μL待测样本,滴加在胶体金层析试纸条的样本垫片上;蛋白抗体随样品液在虹吸作用下向吸水垫5一端流动,反应在5min内即可判断检测结果,且30min内,显色结果不会发生变化。待测样本层析完全后,观察胶体金层析试纸条的检测条带6和质控条带7;

[0082] 当待测物中有被测的抗原物质(即棘球绦虫)时,待测物中的抗原物质就会与胶体金结合物垫3上的胶体金标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体IgY形成Ag-Ab-Au复合物,复合物不与检测条带6上的棘球绦虫抗原蛋白结合,仅会在质控条带7处出现一条色带(C线),结果为阳性,说明被检测的样品中犬粪样已被棘球绦虫感染;

[0083] 当待测物质中没有被测的抗原物质时,胶体金标记的细粒棘球绦虫高免卵黄抗体IgY就会与检测条带6上的棘球绦虫抗原蛋白结合,形成Ag-Ab-Au复合物,此时检测条带6处可看到一条明显色带(T线),因此当检测试纸上可看到两条线(C线和T线)时,结果为阴性,说明被检测的样品中犬粪样未被棘球绦虫感染。

[0084] 实施例10:本发明所述胶体金层析试纸条性能检测

[0085] 1、灵敏度

[0086] 提取棘球绦虫成虫蛋白,测定棘球绦虫成虫蛋白浓度后,稀释为1mg/mL溶液备用,再用0.01mol/L、pH值为7.2至7.4的PBS缓冲液分别稀释为0、0.001、0.01、0.1、1、10、20μg/L的一系列阳性质控溶液,分别取90μL上述阳性质控溶液滴在试纸条的样品垫4上,3min后观察试纸条的显色情况。

[0087] 当棘球绦虫成虫蛋白浓度为0.01μg/L时,T线相对于0μg/L时的T线略显浅色,而当棘球绦虫成虫蛋白浓度为1μg/L时,T线显酒红色,说明胶体金试纸条的检测限为0.01μg/L,说明本发明所述胶体金层析试纸条具有很好的灵敏度。

[0088] 2、特异性

[0089] 选取3种常见的寄生于犬肠道得寄生虫(带绦虫、蛔虫、球虫),提取各虫体的总蛋白为蛋白母液,将蛋白母液分别用0.01mol/L、pH值为7.4的PBS稀释制备为1μg/L,分别取90μL滴加到试纸条的样品孔进行测试,观察试纸条显色效果。

[0090] 检测结果显示,本发明所述胶体金层析试纸条与带绦虫交叉反应率为33%、与蛔虫的交叉反应率为26%、与球虫不存在交叉反应,说明本发明所述胶体金层析试纸条具有很好的特异性。

[0091] 3、准确性

[0092] 随机选取22份经人工感染棘球绦虫的阳性犬粪样品及22份驱虫后的阴性犬粪样品,作为供试试样。取出样品加入样品稀释液室温放置15min至120min,以3000r/min速度离

心10min至30min,吸取上清液至样本稀释液中混匀,应用本发明所述胶体金层析试纸条进行检测,比较检测结果见表1。通过表1数据可以看出,本发明所述胶体金层析试纸条准确性高。

[0093] 4、稳定性

[0094] 同时做加速老化和冷冻试验,将本发明所述胶体金层析试纸条放在37℃、-20℃中7天,测定结果也表明试剂盒的各项指标正常。本试剂盒可以在2℃至8℃保存12个月。

[0095] 综上所述,本发明首次公开细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体及其在诊断包虫病方面的应用,采用本发明所述细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体制成的胶体金层析试纸条诊断包虫病时,所述胶体金层析试纸条具有很好的灵敏度、特异性、准确性和稳定性,为包虫病的诊断提供了一种更简单、成本更低的检测手段。

[0096] 以上技术特征构成了本发明的实施例,其具有较强的适应性和实施效果,可根据实际需要增减非必要的技术特征,来满足不同情况的需求。

[0097] 表1准确性测定结果

[0098]

样本	数量	阳性	阴性	重复率	不精密度
阳性	22	22	0	100%	0%
阴性	22	0	22	100%	0%

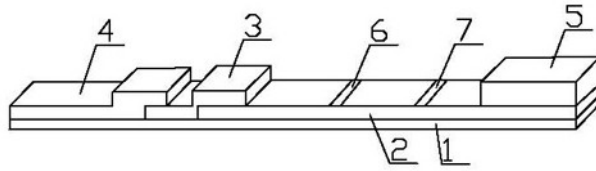


图1

专利名称(译)	细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109613252A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201811230812.X	申请日	2018-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	新疆医科大学第一附属医院 新疆医科大学		
申请(专利权)人(译)	新疆医科大学第一附属医院 新疆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	新疆医科大学第一附属医院 新疆医科大学		
[标]发明人	巩月红 温浩 王建华 高晓黎 段新宇 滕亮 赵军 高惠静 杨剑锐 孙其 何丽平		
发明人	巩月红 温浩 王建华 高晓黎 段新宇 滕亮 赵军 高惠静 杨剑锐 孙其 何丽平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/558 G01N2333/43543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及卵黄抗体及其制备方法和应用技术领域，是一种细粒棘球绦虫高免卵黄抗体和试纸条及制备方法和应用，该细粒棘球绦虫高免卵黄抗体，按下述方法进行：棘球绦虫抗原蛋白的制备，免疫原的制备，蛋鸡饲养及免疫，细粒棘球绦虫高免卵黄抗体的制备。本发明首次公开细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体及其在诊断包虫病方面的应用，采用本发明所述细粒棘球绦虫高免卵黄抗体、冻干高免卵黄抗体制成的胶体金层析试纸条诊断包虫病时，所述胶体金层析试纸条具有很好的灵敏度、特异性、准确性和稳定性，为包虫病的诊断提供了一种更简单、成本更低的检测手段。

