

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101995465 A

(43) 申请公布日 2011.03.30

(21) 申请号 200910109484.2

(22) 申请日 2009.08.21

(71) 申请人 深圳市三方圆生物科技有限公司

地址 518102 广东省深圳市宝安区西  
乡街道桃花源科技创新园 B 栋  
301-305,307-310

申请人 西藏出入境检验检疫局检验检疫技  
术中心

(72) 发明人 钟松清 刘忠清 谭攀

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

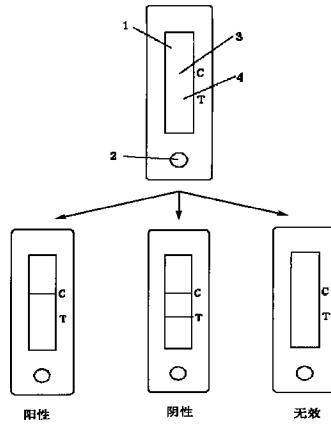
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡及其生产  
和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种小反刍病毒 IgG 抗体胶体金  
检测卡及其生产和使用方法，属于免疫学技术领  
域。该快速诊断卡包括外壳和试纸条，其特征在  
于：所述外壳壳体开有加样孔和观察窗，所述  
试纸条安放于外壳内，在 PVC 衬板的中部叠置  
硝酸纤维素膜，两端分别叠置吸水垫和样品垫，  
硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连，在样品  
区附置一段含有葡萄球菌 A 蛋白免疫胶体金复  
合物的膜，在硝酸纤维素膜上有一条含小反刍灭  
活病毒抗原的检测带和一条含羊抗兔 IgG 的质控  
带。本发明是一种快速、准确、灵敏的诊断卡，  
无需专门仪器，操作简单，能满足食品安全、屠  
宰、检测机构的检测要求。



1. 小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡,其特征在于:其包括试纸条和外壳两部分,试纸条置于外壳内。

2. 根据权利要求 1 所述的小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡,其特征在于:所述的试纸条用 PVB 作为背衬,在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜,两端分别叠置吸水垫和样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相接连,在样品区附置一段含有葡萄球菌 A 蛋白免疫胶体金复合物的膜,在硝酸纤维素膜上有一条含小反刍灭活病毒抗原的检测带和一条含羊抗兔 IgG 的质控带。

3. 根据权利要求 1 所述的小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡,其特征在于:所述的外壳壳体开有加样孔和观察窗。加样孔正对样品垫,观察窗正对硝酸纤维素膜。

4. 小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡的生产方法,其特征在于由下列过程与步骤组成:

(1) 胶体金颗粒的制备;

(2) 胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物的制备;

(3) 超速离心法纯化胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物;

(4) 样品垫的制备,该垫附置一段胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白的膜;

(5) 将小反刍疫病毒与液氮中反复冻融至失活,制备小反刍疫病毒灭活抗原的;

(6) 小反刍疫病毒配体固相硝酸纤维素膜的制备,该膜包被一条含小反刍灭活病毒抗原的检测带和一条包被羊抗兔 IgG 的质控带;

(7) 样品垫的处理:选择适当的封闭试剂、表面活性剂和(或)非离子型去污剂单独或以适当比例组合后均匀浸于玻璃纤维素膜,室温干燥备用;

(8) 组装小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测,该检测卡用 PVB 作为背衬,在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜,两端分别叠置吸水垫和样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相接连。

5. 小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡的使用方法,其特征在于在加样孔处先加入 6ul 血清,再加入 74ul 双蒸水,平置于室温,10-15 分钟观察结果。

## 小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡及其生产和使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡, 属于免疫学技术领域。

### 背景技术

[0002] 小反刍兽疫是由副黏病毒科麻疹病毒属小反刍兽疫病毒 (PPRV) 引起的, 以发热、口炎、腹泻、肺炎为特征的急性接触性传染病, 山羊和绵羊易感, 山羊发病率和病死率均较高。世界动物卫生组织 (OIE) 将其列为法定报告动物疫病, 我国将其列为一类动物疫病。本病 1942 年首先在非洲的科特迪瓦发生, 2003 年有 25 个国家报告发生小反刍兽疫, 主要分布在亚洲、非洲, 此外还有欧洲的土耳其。我国自 2007 年 7 月 25 日在西藏自治区日土县发生小反刍兽疫疫情后, 又相继发生了多起疫病流行。该疫情传播迅速, 严重威胁我国畜牧安全, 因此开展该疫情快速检测的研究具有重要意义。

[0003] 小反刍兽疫病毒属副黏病毒科麻疹病毒属。与牛瘟病毒有相似的物理化学及免疫学特性。病毒呈多形性, 通常为粗糙的球形。病毒颗粒较牛瘟病毒大, 核衣壳为螺旋中空杆状并有特征性的亚单位, 有囊膜。病毒可在胎绵羊肾、胎羊及新生羊的翠丸细胞、Vero 细胞上增殖, 并产生细胞病变 (CPE), 形成合胞体。PPRV 和其他麻疹病毒属的致病性相似, 具有趋淋巴和趋上皮性。因此, 它在动物体的淋巴组织和上皮组织中最容易复制, 对这些组织的伤害也最为严重。呼吸道可能是病毒进入机体的门户。病毒通过呼吸道进入机体后, 首先在咽喉、下颌淋巴结以及扁桃体复制, 2 ~ 3d 形成病毒血症, 随后的 2 ~ 3d 首次出现临床症状。病毒血症导致病毒到达全身的淋巴器官脾脏、骨髓和胃肠道及呼吸系统的黏膜继续增值。

[0004] 通常对于小反刍兽疫的检测方法主要有病毒分离实验、对流免疫电泳、酶联免疫分析、荧光定量 PCR 等。均需要一定的条件和技术, 或因为需要特殊仪器, 或因为费用昂贵等, 其现场检测推广及多次重复追踪复查受到限制。20 世纪 80 年代兴起的胶体金免疫层析检测, 基于血清学检测原理, 操作简单快捷、结果清晰易于判断、无需复杂的实验技能和特殊设备, 特别适于现场检测。而国内外尚无该技术监控小反刍兽疫的报道。

### 发明内容

[0005] 针对上诉问题, 本发明提供了一种小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡, 该快速诊断卡检测快速、准确、稳定。

[0006] 本发明的另一个目的是提供该快速诊断卡的应用。

[0007] 上述小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡的制备包括以下步骤:

[0008] (1) 胶体金颗粒的制备: 取 0.5% 氯金酸溶液 2ml, 加 98ml 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液, 加热沸腾后, 取 1% 柠檬酸三钠 2.1ml 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中, 继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色, 颜色稳定后继续加热 5min, 室温冷却, 补充失水至原体积。

[0009] (2) 胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物的制备: 将一定量的蛋白质溶液加入胶体

金溶液中 (pH 已调至 5.9 ~ 6.2) 进行交联反应。

[0010] (3) 胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物的纯化 : 超速离心法纯化免疫胶体金复合物。

[0011] (4) 样品垫的制备 : 保存液稀释胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物原液至工作浓度, 按比例均匀浸于玻璃纤维素膜, -20℃ 冻存, 冷冻真空干燥后, 密封保存。

[0012] (5) 小反刍病毒灭活抗原的制备 : 将小反刍病毒与液氮中反复冻融至失活。

[0013] (6) 小反刍病毒配体固相硝酸纤维素膜的制备 : 小反刍病毒灭活抗原包被于硝酸纤维素膜的观察结果的测试反应区, 定义为检测带 (T), 包被正常兔 IgG (2mg/ml) 于质控区, 定义为指控带 (C)。

[0014] (7) 样品垫的处理 : 选择适当的封闭试剂、表面活性剂和 (或) 非离子型去污剂单独或以适当比例组合后均匀浸于玻璃纤维素膜, 室温洁净条件真空干燥备用。

[0015] (8) 试纸条组装 : 用 PVB 作为背衬, 在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜, 两端分别叠置吸水垫和样品垫, 硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连。将组装好的试纸条安放于壳体开有加样孔和观察窗的外壳内。

[0016] 发明通过以下操作步骤进行小反刍病毒 IgG 抗体检测 :

[0017] (1) 在加样孔处先加入 6ul 血清, 再加入 74ul 双蒸水, 平置于室温 (现场检测可用滴管取一小滴血清先加入样品孔内, 再加入 2 ~ 3 滴双蒸水)。

[0018] (2) 10~15 分钟观察结果。

[0019] 与现有技术相比, 本发明具有如下有益效果 : 价格便宜, 检测费用低廉, 检测速度快, 整个检测过程只需要 15~20 分钟, 操作简单, 无需专门仪器, 肉眼观测结果, 结果稳定, 能满足食品安全、屠宰、检测机构的检测要求, 更方便于现场检测。

## 附图说明

[0020] 图 1 小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡检测示意图

[0021] 其中 :

[0022] 1 为观测窗

[0023] 2 为加样孔

[0024] 3 为质控带

[0025] 4 为检测带

[0026] 图 2 小反刍病毒 IgG 抗体胶体金检测卡结构图

[0027] 其中

[0028] 5 为样品垫

[0029] 6 为胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白玻璃纤维膜

[0030] 7 为吸水膜

[0031] 8 为纤维素膜

## 具体实施方式

[0032] 实施例 1 胶体金颗粒的制备

[0033] 取 1% 氯金酸溶液 1ml, 加 99ml 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液, 加热沸腾

后,取 1% 柠檬酸三钠 1.6ml 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中,继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色,颜色稳定后继续加热 5min,室温冷却,补充失水至原体积。

[0034] 实施例 2 胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物的制备 :

[0035] 当蛋白质的最适稳定量及标记的最佳 pH 值被确定以后便可进行标记。具体步骤如下:按最低稳定量的 120% 计算出所需待标记蛋白质的总量。在磁力搅拌下,将蛋白质溶液加入胶体金溶液中 (pH 已调至 5.9 ~ 6.2),加入蛋白质时应逐滴加入,1mg 的蛋白质大约 5min 加完。分别取 1ml 胶体金 - 葡萄球菌 A 蛋白结合物液 (实验组) 和 1ml 胶体金原液 (对照组) 于试管中加 10% 氯化钠溶液 0.1ml,室温静置 1h,观察结果:如果对照组试管溶液由红色转为蓝色,甚至可以看到聚合物沉淀,而实验组溶液仍保持红色,无沉淀,方可继续下一步实验,否则需补加标记用蛋白葡萄球菌 A 蛋白。最后加入终浓度为 0.2% 的聚乙二醇 (PEG MW20000),继续搅拌 30min。

[0036] 实施例 3 胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物的纯化 :

[0037] 超速离心法纯化免疫胶体金复合物。先以 3500rpm 离心 20min (4℃),弃沉淀将上清以 13500rpm 离心 35min (4℃),弃上清,用保存液悬起较疏松的红色沉积物;再以 11000rpm 离心 35min (4℃),小心移弃上清后,用保存液悬起较疏松的红色沉积物至原体积 1/10,即为初步纯化的免疫胶体金复合物。

[0038] 实施例 4 样品垫的制备 :

[0039] 保存液稀释胶体金标记葡萄球菌 A 蛋白复合物原液至工作浓度,按比例均匀浸于玻璃纤维素膜, -20℃ 冻存,冷冻真空干燥后,密封保存。

[0040] 实施例 5 小反刍疫病毒灭活抗原的制备 :

[0041] 根据细胞冻存原理,采用慢冻缓融方法。每支细胞冻存管内样品 1ml。于 -70℃ 冰箱和液氮中反复冻融 10 次。冻融第 2、4、6、8、10 次时各取样 1 支,检测小反刍疫病毒抗原滴度和感染性滴度。并于光学显微镜下观察每次冻融粉碎后的细胞破碎情况及碎片大小。

[0042] 实施例 6 小反刍疫病毒配体固相硝酸纤维素膜的制备 :

[0043] 小反刍疫病毒抗原室温融化后,12000r/min 离心 10min,取上清 2mg/ml 用 0.01mol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.2) 以 250 μg/ml 间隔,经 BIO-DOT 型 XYZ3000 点样仪 dispenser 线形包被于硝酸纤维素膜的观察结果的测试反应区,定义为检测带,距离检测带 5mm 远的质控带用 dispenser 线形包被正常兔 IgG (2mg/ml)。37℃ 干燥 2h,4℃ 密封保存 (见图 2)。

[0044] 实施例 7 试纸条组装 :

[0045] 用 PVB 作为背衬,在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜,两端分别叠置吸水垫和样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相接连 (见图 2)。将组装好的试纸条安放于壳体开有加样孔和观察窗的外壳内 (见图 1)。

[0046] 实施例 8 检测卡的使用

[0047] 在加样孔处先加入 6ul 待测血清,再加入 74ul 双蒸水,平置于室温 (现场检测可用滴管取一小滴血清先加入样品孔内,再加入 2 ~ 3 滴双蒸水)。10-15 分钟观察结果。参看图 1,如质控线 (编号 3) 位置处出现红色条带,检测线 (编号 4) 位置处不显色则样品为阳性;如质控线和检测线均出现红色条带,则样品为阴性;如质控线不显色则检测结果无效。

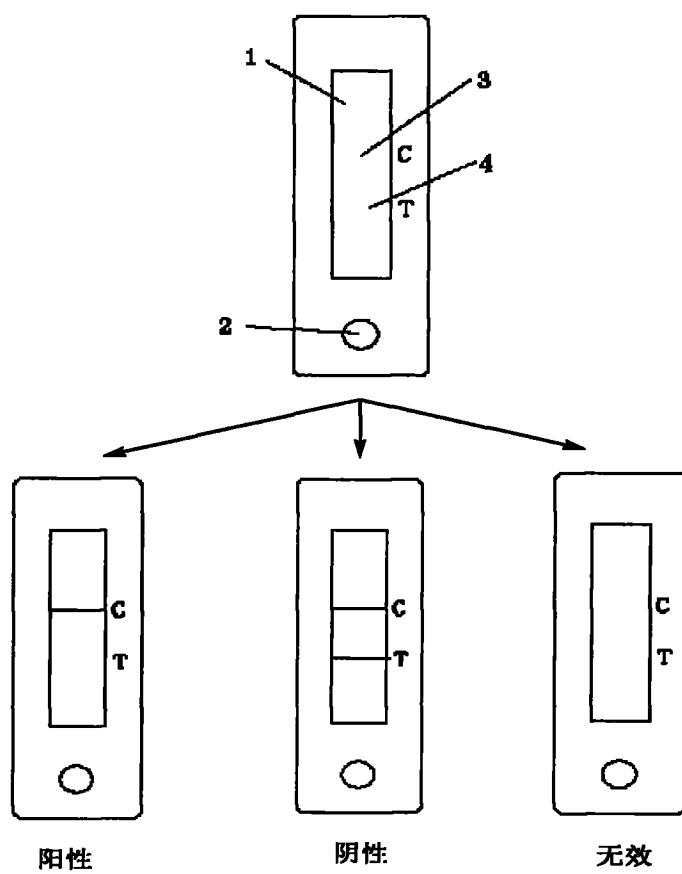


图 1

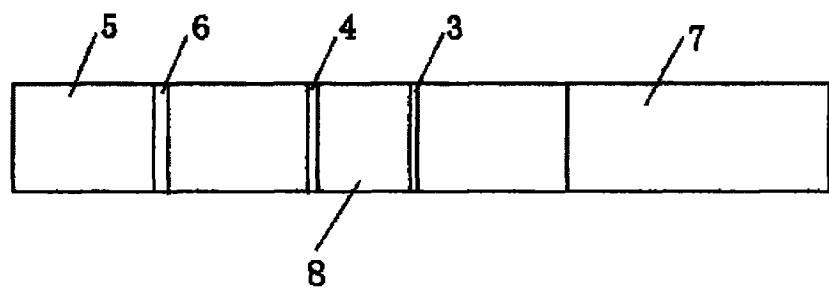


图 2

专利名称(译)	小反刍病毒IgG抗体胶体金检测卡及其生产和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101995465A</a>	公开(公告)日	2011-03-30
申请号	CN200910109484.2	申请日	2009-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
[标]发明人	钟松清 刘忠清 谭攀		
发明人	钟松清 刘忠清 谭攀		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明涉及一种小反刍病毒IgG抗体胶体金检测卡及其生产和使用方法，属于免疫学技术领域。该快速诊断卡包括外壳和试纸条，其特征在于：所述外壳壳体开有加样孔和观察窗，所述试纸条安放于外壳内，在PVC衬板的中部叠置硝酸纤维素膜，两端分别叠置吸水垫和样品垫，硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相接连，在样品区附置一段含有葡萄球菌A蛋白免疫胶体金复合物的膜，在硝酸纤维素膜上有一条含小反刍灭活病毒抗原的检测带和一条含羊抗兔IgG的质控带。本发明是一种快速、准确、灵敏的诊断卡，无需专门仪器，操作简单，能满足食品安全、屠宰、检测机构的检测要求。

