



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110554182 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910804256.0

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所  
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

申请人 上海杰一生物技术有限公司

(72)发明人 朱传刚 沈元曦 纪荣毅 周志平  
冒丽 刘冀

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

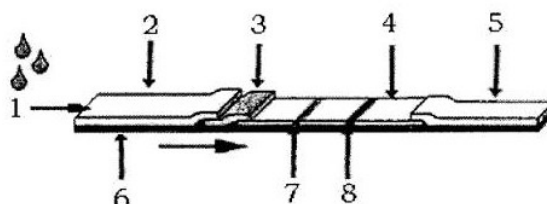
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种东毕吸虫病检测用虫卵抗原的制备及胶体金标记的检测试纸条

(57)摘要

本发明涉及一种东毕吸虫病检测用虫卵抗原的制备及胶体金标记的检测试纸条,所述的东毕吸虫抗体检测胶体金免疫试剂条设有样品吸垫、金标垫、NC膜、吸收垫、PVC底板、检测线(T线)、控制线(C线),所述胶体金标记的检测试纸条的硝酸纤维素膜上包被有上述的东毕吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质。本发明提供的这种检测试剂条检测效果准确可靠,操作简便易行,成本降低,更适用于东毕吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断,适于大规模推广应用。



1. 一种包含东毕吸虫虫卵抗原的胶体金免疫试纸条。

2. 如权利要求1所述的检测试纸条的制备方法,所述方法包括以下步骤:

检测用虫卵可溶性抗原的制备:

硝酸纤维素膜的点样:将东毕吸虫虫卵可溶性抗原稀释至0.5mg/ml,用于检测线(T线)的划线,将小鼠抗His标签单克隆抗体稀释至0.5mg/ml用于质控线(C线)的划线;将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线,划线量均为1 $\mu$ l/cm,划线后将底板放置于37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干2小时,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月;

制备胶体金:按照柠檬酸钠还原法烧制胶体金:烧制及贮存胶体金的所有玻璃器皿应洁净;取烘干后的三角烧瓶加入去离子水和终浓度为0.01%的氯金酸,加热至沸腾;快速加入1.5倍氯金酸体积的1%的柠檬酸三钠,观察颜色变化,可观察到溶液由淡黄色变成黑色、深紫色、最后逐渐稳定成稳定的红色,约3分钟后颜色趋于稳定;继续煮沸15分钟,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积;

胶体金与抗原的标记:重组链球菌蛋白G的胶体金标记:将制备的胶体金溶液用K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节至pH为5.0,逐滴加入重组链球菌蛋白G,使其终浓度为10 $\mu$ g/ml,室温震荡15分钟,静置15分钟;在溶液中加入封闭液,使其终浓度为1%,室温震荡15分钟,静置15分钟;11000r/min离心40分钟,弃上清,沉淀用复溶液复溶至原溶液体积的1/5,颜色应为均匀的酒红色;金标垫的制备:浸金法制备金标垫,将制备好的胶体金探针均匀滴加于金标垫上,使1.0cm<sup>2</sup>的金标垫中含有100 $\mu$ l胶体金探针;将金标垫放置于多功能冻干机中真空干燥,冻干完毕后,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月;

制备东毕吸虫检测试剂条:将包被膜、金标垫、样品垫、吸收垫、保护膜等依次贴于PVC底板上,置切条机上以0.3cm的宽度切条,连同干燥剂装入铝箔袋中密封,贴签,与说明书放入外包装盒内。

3. 如权利要求2所述的检测试纸条的制备方法,其中步骤(1)具体为:取东毕吸虫虫卵置于研磨器中,按照1:1-5的体积比加入生理盐水,研磨器内粉碎,镜检无完整虫卵;-40 $^{\circ}$ C至10 $^{\circ}$ C反复冻融3次,冰上超声,超声2秒间隔9秒,共0.5-2小时,超声后12000r/min离心5分钟,取可溶性上清,即为虫卵可溶性抗原粗提物,-20 $^{\circ}$ C冻存;生产前,将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟,上清BCA法测蛋白浓度。

## 一种东毕吸虫病检测用虫卵抗原的制备及胶体金标记的检测试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白纯化和检测技术领域,特别涉及一种东毕吸虫病检测用虫卵抗原纯化和抗体检测技术领域,具体是指一种东毕吸虫虫卵粗抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金试纸条。

### 背景技术

[0002] 东毕吸虫病是由东毕吸虫寄生于宿主的门静脉和肠系膜静脉引起的一种血吸虫病。呈世界性分布。亚洲的印度、蒙古、伊拉克、哈萨克斯坦和欧洲的俄罗斯、法国等国都有此病的发生。在我国,东毕吸虫病主要分布在甘肃、新疆、四川、贵州、内蒙、黑龙江等广大地区。

[0003] 东毕吸虫细分为彭式东毕吸虫、程式东毕吸虫、土耳其斯坦东毕吸虫和土耳其斯坦东毕吸虫结节变种。东毕吸虫发育过程需要经过两个宿主:终宿主和中间宿主。东毕吸虫尾蚴钻入终宿主牛、羊等家畜皮肤后,经过移行,最终发育成合抱的成虫,并在宿主血管内产卵;虫卵由血管进入肠道,随着粪便排出体外,在水中孵化出毛蚴;毛蚴进入中间宿主耳萝卜螺体内进行无性繁殖,产生大量的尾蚴;成熟的尾蚴释放到水中,遇到适宜宿主即可钻入宿主皮肤,完成东毕吸虫的生活史循环。

[0004] 家畜一旦感染东毕吸虫,由于东毕吸虫幼虫在体内移行,常造成宿主组织的机械性损伤;在成虫期和产卵过程中不仅争夺营养物质还产生毒素,影响牲畜的正常身体机能。羔羊表现严重营养不良,食欲不振,精神萎靡,发育滞缓,下肢水肿无力,排出稀便或血便,逐渐消瘦最终倒地不起;母羊还会不孕或流产、死胎。家畜东毕吸虫病不仅严重损害牧民的经济利益,而且尾蚴也能感染人类,产生尾蚴性皮炎,危害人类的身体健康,因此,东毕吸虫病是一种重要的人畜共患寄生虫病。

[0005] 传统的东毕吸虫病诊断为病原学诊断,主要是依据尸体剖检和虫卵检查,包括粪便水洗沉淀法,虫卵毛蚴孵化法等。然而病原检查耗时较长且检出率低,造成一定的漏检率,影响对该病的控制。

### 发明内容

[0006] 本发明主要解决的技术问题是提供一种东毕吸虫虫卵及虫卵抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金免疫试纸条,该东毕吸虫虫卵抗原纯化方法设计巧妙,操作简便,由此得到的纯化抗原作为东毕吸虫抗体检测抗原,可以减少血清用量,增加检测灵敏度,降低交叉反应率,扩大应用范围,检测效果准确可靠,操作简便易行,成本降低,更适用于东毕吸虫流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断,适于大规模推广应用。

[0007] 为了实现上述目的,在本发明的第一方面,提供了东毕吸虫虫卵收集方法,其特点是,采用粪孵法判断是东毕吸虫感染羊后,对羊进行解剖获得小肠进行虫卵收集。

[0008] 优选的,利用NaOH消蚀法提高虫卵收集效率。

[0009] 进一步的,本发明提供了东毕吸虫虫卵可溶性抗原的提取方法。

[0010] 较佳地,东毕吸虫虫卵置于研磨器中,按照1:1-5的体积比加入生理盐水,研磨器内粉碎,镜检无完整虫卵;-40℃至10℃反复冻融3次,冰上超声,超声2秒间隔9秒,共0.5-2小时,超声后12000r/min离心5分钟,取可溶性上清,即为虫卵可溶性抗原粗提物,-20℃冻存。生产前,将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟,上清BCA法测蛋白浓度。

[0011] 进一步的,本发明提供了一种东毕吸虫虫卵纯化抗原,其特点是,采用上述的东毕吸虫虫卵粗抗原纯化方法制备而成。

[0012] 进一步的,本发明提供了上述的东毕吸虫虫卵纯化抗原在制备检测血吸虫抗体的检测产品中的应用。

[0013] 进一步的,本发明提供了一种东毕吸虫抗体检测胶体金免疫试剂条,其特点是,包括东毕吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,所述东毕吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的确硝酸纤维素膜上包被有上述的东毕吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质。

[0014] 进一步的,所述的东毕吸虫抗体检测胶体金免疫试剂条设有样品吸垫、金标垫、NC膜、吸收垫、PVC底板、检测线(T线)、控制线(C线)。所述样品吸垫、金标垫、NC膜、吸收垫依次粘贴在PVC底板上表面,样品吸垫的一端设在金标垫的一端上,金标垫的另一端设在NC膜的一端上,吸收垫的一端设在NC膜的另一端上,检测线、质控线依次设在NC膜上;在检测线处包被东毕吸虫虫卵可溶性抗原,在质控线处包被选用链球菌重组蛋白(rSPG)。

[0015] 有益效果

通过研究东毕吸虫虫卵作为诊断抗原的可行性,并通过研究获得东毕吸虫虫卵的分布规律,本发明采用化学消蚀法通过严格控制消蚀液浓度、温度以及作用时间,并通过缓冲液平衡虫卵的PH至中性状态,获得了难以获得的虫卵,且虫卵纯度高;采用该方法制备的虫卵,进一步获得东毕吸虫的虫卵可溶性抗原;通过变性方法除去抗原里的无用成分,最终获得了可用于检测羊东毕吸虫抗体的抗原;该抗原可以通过试纸条等方案实现对羊体内东毕吸虫抗体的检测。

## 附图说明

[0016] 图1 胶体金标记的检测试纸条结构示意图,其中,1为待检样品,2为样品吸垫,3为金标垫,4为NC膜,5为吸收垫,6为PVC底板,7为检测线(T线),8为控制线(C线)。

## 具体实施方式

[0017] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0018] 实施例1东毕吸虫的虫体和虫卵的获取

在西藏东毕吸虫病流行区,通过粪检获得东毕吸虫感染的阳性羊。检测方法以张世英改良粪孵法进行,具体为:取羊粪20克,加水调成稀状,顺序过筛,第一层40孔/英寸“铜筛”,第二层260孔/英寸“尼龙筛”,再将尼龙筛于水中淘洗3-5次(一桶水可以淘洗粪数十份),将筛中粪渣加入III型烧瓶中(250ML容量)加清水至瓶口处,于瓶颈中加入棉花一团,倒去

棉花上面混水,加入清水在20℃-30℃培养箱中培养,隔一小时观察毛蚴孵化情况,共观察三次,见有毛蚴判为阳性。

[0019] 取经粪检鉴定确定为阳性的山羊,破开胸腔,经灌流法收集东毕吸虫成虫,用PBS反复清洗数次,液氮保存虫体备用。

[0020] 由于藏山羊大约有80%的虫卵分布在小肠部位。取阳性羊的十二指肠至小肠末端,剖开,清洗。用竹片刮取小肠内壁的肠壁黏膜,收集肠壁黏膜组织,弃去肠壁的肌肉组织、结缔组织等坚韧的组织。按照每ml黏膜组织加1-15ml(最适5ml)生理盐水,常温下采用搅碎机制成匀浆液,匀浆转速100-2000r/min,(最适500r/min)匀浆时间1分钟,间歇3分钟,重复上述操作1-5次(最适合3次),获得含虫卵的匀浆液。上述肝脏匀浆液按1:1-1:5比例(最适合1:1)加入45-60℃预热的10%NaOH溶液(最适合55℃,下同),混匀,置于45-60℃水浴振荡器内消化5-15分钟(最适合55℃,最适合8分钟),震荡转速50-200r/min(最适合100r/min),消化结束后,迅速将消化的匀浆液插入2~8℃的冰水里降温,同时加入等体积预冷的2~8℃重蒸水,3000r/min离心1-5分钟,2~8℃操作,弃上清,加PBS(0.01M pH6.8)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次(最适合3次),加PBS(0.01M pH7.2)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次;最后用生理盐水(0.9%NaCl)重悬沉淀后,重复上述操作离心洗涤1-3次,收集虫卵。

[0021] 实施例2 虫卵可溶性抗原的提取:

取上述获得的虫卵置于研磨器中,按照1:1-5(最适合1:3)的体积比加入生理盐水,研磨器内粉碎,镜检无完整虫卵;-40℃至10℃反复冻融3次,冰上超声(超声强度100-1000w,最适合900w),超声2秒间隔9秒,共0.5-2小时(最适合1小时),超声后12000r/min离心5分钟,取可溶性上清,即为虫卵可溶性抗原粗提物,-20℃冻存。生产前,将虫卵可溶性抗原再次12000r/min离心5分钟,上清加热至100℃,保持5-30分钟,使部分蛋白变性,12000r/min离心5-30分钟,除去变性蛋白等沉淀物,获得的上清为东毕吸虫的虫卵可溶性抗原,BCA法测蛋白浓度。

[0022] 实施例3胶体金免疫试纸条的制备

1)检测用虫卵可溶性抗原的制备,如实施例2所述。

[0023] 2)硝酸纤维素膜的点样:将东毕吸虫虫卵可溶性抗原稀释至0.5mg/ml,用于检测线(T线)的划线,将小鼠抗His标签单克隆抗体稀释至0.5mg/ml用于质控线(C线)的划线。将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线,划线量均为1 $\mu$ l/cm,划线后将底板放置于37℃烘箱中烘干2小时,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月。

[0024] 3)制备胶体金:按照柠檬酸钠还原法烧制胶体金:烧制及贮存胶体金的所有玻璃器皿应洁净。取烘干后的三角烧瓶加入去离子水和终浓度为0.01%的氯金酸,加热至沸腾。快速加入1.5倍氯金酸体积的1%的柠檬酸三钠,观察颜色变化,可观察到溶液由淡黄色变成黑色、深紫色、最后逐渐稳定成稳定的红色,约3分钟后颜色趋于稳定。继续煮沸15分钟,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积。

[0025] 4)胶体金与抗原的标记:重组链球菌蛋白G的胶体金标记。将制备的胶体金溶液用K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节至pH为5.0,逐滴加入重组链球菌蛋白G,使其终浓度为10 $\mu$ g/ml,室温震荡15分钟,静置15分钟。在溶液中加入封闭液,使其终浓度为1%,室温震荡15分钟,静置15分钟。11000r/min离心40分钟,弃上清,沉淀用复溶液复溶至原溶液体积的1/5,颜色应为均匀的

酒红色。金标垫的制备。浸金法制备金标垫,将制备好的胶体金探针均匀滴加于金标垫上,使 $1.0\text{cm}^2$ 的金标垫中含有 $100\mu\text{l}$ 胶体金探针。将金标垫放置于多功能冻干机中真空干燥,冻干完毕后,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月。

[0026] 5) 制备东毕吸虫检测试剂条:将包被膜、金标垫、样品垫、吸收垫、保护膜等依次贴于PVC底板上,置切条机上以 $0.3\text{cm}$ 的宽度切条,连同干燥剂装入铝箔袋中密封,贴签,与说明书放入外包装盒内。结构示意图如图1所示。

[0027] 6) 试纸条判定标准的建立东毕吸虫抗体检测试纸条采用胶体金免疫层析技术,当试纸条插入阳性样品后,样品中的IgG与金标垫上金标记的具有His标签的r-SPG蛋白结合形成复合物,复合物在包被膜迁移的过程中,样品中特异性的IgG与检测线(T)上的东毕吸虫卵可溶性抗原形成金标记His-r-SPG蛋白-IgG-抗原复合物,在检测线处显色,随后在质控线处富余的金标记His-r-SPG蛋白-IgG复合物与质控线处的小鼠抗His标签单克隆抗体形成小鼠抗His标签单克隆抗体-金标记His-r-SPG蛋白-IgG复合物,从而使质控线(C)显色,反之,阴性样品时,检测线(T)无抗原,就不能形成金标记His-r-SPG蛋白-IgG-抗原复合物,检测线(T)也就不显色,只能与质控线上的小鼠抗His标签单克隆抗体结合形成小鼠抗His标签单克隆抗体-金标记His-r-SPG蛋白复合物而显色。所以,我们制定了试纸条的结果判定标准为:阳性检测线处(T)和质控线处(C)各出现一条紫红色条带,判定为阳性;阴性仅在质控线处(C)出现一条紫红色条带,检测线(T)处未出现一条紫红色条带,判定为阴性。无效在质控线处(C)无明显条带出现,判定为无效。

[0028] 7) 试纸条敏感性检测。采用试制的3批东毕吸虫抗体检测试纸条对已知阴性样品、发病动物血清样品进行检测,结果显示,检测10份已知阴性血清样品,结果均为阴性;对20份已知发病动物血清样品检出率为 $100\%$ ( $20/20$ )。

[0029] 8) 试纸条特异性检测。采用3批东毕吸虫抗体检测试纸条对10份东毕吸虫阳性血清、36份东毕吸虫阴性血清、10份日本血吸虫阳性血清、10份羊捻转血矛线虫阳性血清、1份布氏菌病阳性血清及1份牛鼻气管炎阳性血清进行检测,结果显示,本研究对10份已知东毕吸虫阳性血清的阳性检出率为 $100\%$ ( $10/10$ );对36份已知东毕吸虫阴性血清的检测结果均为阴性( $36/36$ ),对10份羊日本血吸虫阳性血清检测有1份存在交叉反应,对10份羊捻转血矛线虫阳性血清检测不存在交叉反应,表明本试纸条特异性良好。

[0030] 应当理解,虽然上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明内容作了详尽的描述,但在本发明的基础上,可以对之进行一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

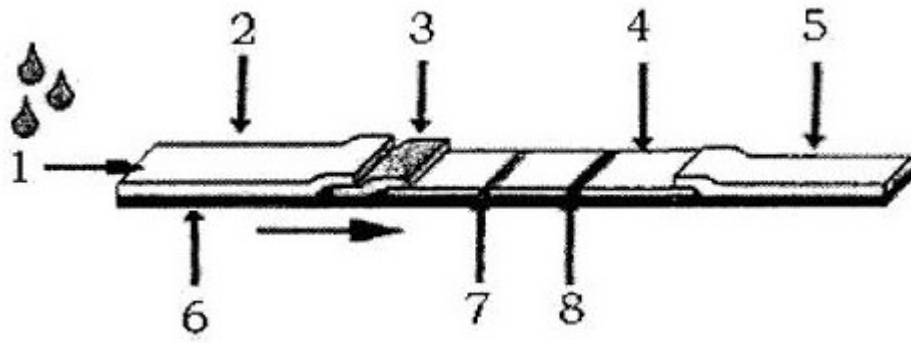


图1

专利名称(译)	一种东毕吸虫病检测用虫卵抗原的制备及胶体金标记的检测试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN110554182A</a>	公开(公告)日	2019-12-10
申请号	CN201910804256.0	申请日	2019-08-28
[标]发明人	朱传刚 沈元曦 周志平 刘冀		
发明人	朱传刚 沈元曦 纪荣毅 周志平 冒丽 刘冀		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/587 G01N33/6854		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种东毕吸虫病检测用虫卵抗原的制备及胶体金标记的检测试纸条，所述的东毕吸虫抗体检测胶体金免疫试剂条设有样品吸垫、金标垫、NC膜、吸收垫、PVC底板、检测线(T线)、控制线(C线)，所述胶体金标记的检测试纸条的硝酸纤维素膜上包被有上述的东毕吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质。本发明提供的这种检测试剂条检测效果准确可靠，操作简便易行，成本降低，更适用于东毕吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断，适于大规模推广应用。

