

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710055759.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007年11月21日

[11] 公开号 CN 101074959A

[22] 申请日 2007.6.13

[21] 申请号 200710055759.X

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院军事
兽医研究所

地址 130062 吉林省长春市青龙路1068号

[72] 发明人 夏咸柱 杨松涛 黄耕 王承宇
高玉伟 王铁成 侯小强 高明华
苏建青

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责
任公司

代理人 陈宏伟

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称

犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测
试纸及其制备技术

[57] 摘要

本发明涉及一种犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测试纸及其制备方法，将胶体金标记的鼠源RV、CDV、FPV和CPV等单抗混合包被在玻璃纤维素膜上，制成结合垫；分别将纯化的犬抗RV、CDV、FPV和CPV等的IgG包被在硝酸纤维素膜(NC)的检测线R、D、F、P处，将兔抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜的质控线C处，制成检测膜；当被检样品中含有相应病毒时，可先与相应金标鼠源单抗结合，然后在层析作用下与相应检测线上的二抗结合并富集，再经银染液加强染色后形成肉眼可见的色带，进而根据显色结果进行判定。本发明不需要借助其它仪器设备，并可同时对多种犬猫科动物重要疫病抗体进行检测，特别适用于现场检测和流行病学调查。

1、一种犬、猫科动物重要疫病抗原胶体金银联合检测测试纸，其特征在于：衬板 8 封套在塑料夹 1 内，塑料夹 1 的表面开设有加样孔 2 和观察孔 3，衬板 8 的表面上组装有经过处理的样品垫 4、结合垫 5、检测膜 6 和吸收垫 7。其中，结合垫 5 由玻璃纤维素膜制成，上包被有金标 RV、CDV、FPV 和 CPV 等鼠源单抗；检测膜 6 由硝酸纤维素膜制成，上喷点有多条检测线和 1 条质控线，R、D、F、P 等为检测线，分别包被有纯化犬抗 RV、CDV、FPV 和 CPV 等 IgG；C 为质控线，包被有兔抗鼠二抗；检测膜与吸收垫 7 连接。

2、根据权利要求 1 所述检测测试纸的制备方法，包括下述步骤：

1) RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原单抗和多抗 IgG 的制备：分别用 RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原接种各自敏感细胞，培养增殖各病毒，经浓缩提纯后分别免疫 Balb/c 小鼠和家犬，制备各病毒的单抗和多抗血清，并以此进一步制备其单抗与多抗 IgG，于-30℃保存备用；

2) RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原固相免疫吸附载体的制备：应用所制备的 RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原多抗 IgG 包被磁珠、乳胶颗粒等固相载体，分别制备上述病原的高效免疫吸附载体，并按适当比例混合，制成联合病原固相免疫吸附载体，加入防腐剂，于 4℃保存备用；在样品前处理时，取待检样品 3-5ml，加入适量固相免疫吸附载体，室温作用 20-30 分钟，离心或置于磁珠架沉淀磁珠，弃去上清，于所留免疫吸附载体中加 50-100ml 抗原抗体解离液用于检测；

3) 金标 RV、CDV、FPV 与 CPV 单抗 IgG 的制备：采用胶体金蛋白标记技术，分别用胶体金标记所制备的 RV、CDV、FPV 与 CPV 单抗 IgG，制得上述病毒的金标 IgG，制成抗原捕捉剂，加防腐剂，于 4℃ 保存备用；

4) 兔抗鼠 IgG 制备：以 Balb/c 小鼠 IgG 免疫家兔制备兔抗鼠血清，并从中提取 IgG，制备兔抗鼠 IgG，加防腐剂，于 -30℃ 保存备用；

5) 结合垫制备：将所制金标抗原捕捉剂喷涂于玻璃纤维素膜上，制成反应膜，干燥保存备用；

6) 检测膜制备：将所制备的 RV、CDV、FPV 与 CPV 多抗 IgG 和兔抗鼠 IgG，分别喷点于硝酸纤维素膜（NC）的检测线 R、D、F、P 处和质控线 C 处，制成检测膜，干燥保存备用；

7) 检测试纸组装：按胶体金层析检测试纸制备要求，如图将上述所制备和选购的材料进行粘连、压制和裁切成检测试纸条，装入塑料夹内制成的检测卡，加干燥剂并分装、封闭于的塑料小袋，干燥保存；

8) 银加强法相应试剂的配制：

活化液的配制：以去离子水配制 0.05mol/L、PH3.8 的柠檬酸盐缓冲液；

银染液的配制：将乙酸银、对苯二酚、阿拉伯树胶溶于去离子水中，使其终浓度分别为 0.11%、0.35%-1.7%和 7%-10%；

定影液的配制：20%的硫代硫酸钠水溶液。

犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测试纸及其制备技术

技术领域：

本发明涉及一种犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测试纸及其制备方法，用于犬、猫科动物狂犬病、犬瘟热、猫瘟热和犬细小病毒病等重要疫病的快速检测、诊断，属于动物疫病检测技术领域。

背景技术：

犬狂犬病、犬瘟热、猫瘟热和犬细小病毒病等犬、猫科动物重要疫病不仅严重危害我国毛皮经济动物产业，而且严重威胁着虎、狮、狼等多种珍稀野生动物的健康，有的还可导致人的发病死亡。要从根本上控制这些疫病，首要的是对上述疫病的发生、流行作出及时、准确的监测。对于犬猫科动物重要疫病，目前国际上常用的病原检测方法有病毒分离、电镜观察、PCR或RT-PCR等方法，但这些方法都需要一定的仪器设备和较高的操作技术，影响了其在流行病学监测方面的应用。

胶体金是近年来发展起来的一种检测技术，由 Faulk 和 Taylor(1971)首先用于免疫电镜，现在成了荧光素、放射性同位素和酶标记以外的一大补充。胶体金试纸是利用抗原抗体反应及免疫层析原理，将抗原或抗体以胶体金标记，当待检样品中含有与抗原或抗体特异结合的抗体或抗原时，就会发生聚集而产生肉眼可见的色带，具有简便、快速，结果直观、准确等优点。

发明内容:

本发明提供了一种犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测试纸，能够简便、快速、准确地对犬、猫科动物体内含有的狂犬病病毒（RV）、犬瘟热病毒（CDV）、猫瘟热病毒（FPV）和犬细小病毒（CPV）等病原作出检测。

本发明还公开了上述检测试纸的制备工艺，适合于工业化生产。

本发明的解决方案是根据抗原抗体能特异结合的免疫学基本原理，利用胶体金免疫层析技术和银染加强技术，将胶体金标记的鼠源 RV、CDV、FPV 和 CPV 等单抗混合包被在玻璃纤维素膜上，制成结合垫；分别将纯化的犬抗 RV、CDV、FPV 和 CPV 等的 IgG 包被在硝酸纤维素膜（NC）的检测线 R、D、F、P 处，将兔抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的质控线 C 处，制成检测膜；当被检样品中含有相应病毒时，可先与相应金标鼠源单抗结合，然后在层析作用下与相应检测线上的二抗结合并富集，再经银染液加强染色后形成肉眼可见的色带，进而根据显色结果进行判定。

本发明的具体制备工艺如下：是按附图 1 所示位置分别将相应试剂与材料喷点或包被于玻璃纤维素膜和硝酸纤维素膜，组成犬、猫科动物重要疫病病原联合检测试纸。将由玻璃纤维素膜制成的样品垫置于加样孔下；样品垫连接由玻璃纤维素膜制成的结合垫，结合垫上包被有胶体金标记的鼠源抗 RV、CDV、FPV 和 CPV 等单克隆抗体；结合垫后连接由 NC 膜制成的检测膜，检测膜上可有根据需要设置多条检测线和 1 条质控线，其中检测线 R、D、F、P 等分别为纯化的犬抗 RV、CDV、FPV 和 CPV 等 IgG 包被而成，质控线（C）为兔抗鼠二抗；检测膜后面连接有吸收垫；最后再

按金标层析试纸制备要求，进行粘连、压制和裁切，制成该抗体联合检测试纸。

本发明与现有的技术相比较具有如下优点：检测试纸简便、适用、快速、经济、无污染、易操作和判读，不需要借助其它仪器设备，并可同时对多种犬、猫科动物重要疫病病原进行检测，特别适用于现场检测和流行病学调查等。本发明的制备方法科学、成本低、稳定性高、重复性好，易于制造、保存和运输。

附图说明

图 1 是本发明检测试纸的结构示意图：

图 2 是本发明检测试纸剖面图。

1—塑料夹、2—加样孔、3—观察孔、4—样品垫、5—结合垫(由玻璃纤维素膜制成，上包被有金标 RV、CDV、FPV 和 CPV 等鼠源单抗)、6—检测膜(由硝酸纤维素膜制成，上喷点有多条检测线和 1 条质控线，其中 R、D、F、P 等为检测线，分别包被有纯化犬抗 RV、CDV、FPV 和 CPV 等 IgG；C 为质控线，包被有兔抗鼠二抗)、7—吸收垫、8—衬板。

具体实施方式

通过以下实施例进一步举例描述本发明，并不以任何方式限制本发明，在不背离本发明的技术解决方案的前提下，对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

实施例 1

根据图 1 所示，本发明检测试纸结构如下：

衬板 8 封套在塑料夹 1 内，塑料夹 1 的表面开设有加样孔 2 和观察孔 3，

衬板 8 的表面上组装有经过处理的样品垫 4、结合垫 5、检测膜 6 和吸收垫 7。其中，结合垫 5 由玻璃纤维素膜制成，上包被有金标 RV、CDV、FPV 和 CPV 等鼠源单抗；检测膜 6 由硝酸纤维素膜制成，上喷点有多条检测线和 1 条质控线，R、D、F、P 等为检测线，分别包被有纯化犬抗 RV、CDV、FPV 和 CPV 等 IgG；C 为质控线，包被有兔抗鼠二抗；检测膜与吸收垫 7 连接。

实施例 2

1) RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原单抗和多抗 IgG 的制备：分别用 RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原接种各自敏感细胞，培养增殖各病毒，经浓缩提纯后分别免疫 Balb/c 小鼠和家犬，制备各病毒的单抗和多抗血清，并以此进一步制备其单抗与多抗 IgG，于-30℃保存备用。

2) RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原固相免疫吸附载体的制备：应用所制备的 RV、CDV、FPV 与 CPV 等病原多抗 IgG 包被磁珠、乳胶颗粒等固相载体，分别制备上述病原的高效免疫吸附载体，并按适当比例混合，制成联合病原固相免疫吸附载体，加入防腐剂，于 4℃保存备用。在样品前处理时，取待检样品 3-5ml，加入适量固相免疫吸附载体，室温作用 20-30 分钟，离心或置于磁珠架沉淀磁珠，弃去上清，于所留免疫吸附载体中加 50-100ml 抗原抗体解离液用于检测。

3) 金标 RV、CDV、FPV 与 CPV 单抗 IgG 的制备：采用胶体金蛋白标记技术，分别用胶体金标记所制备的 RV、CDV、FPV 与 CPV 单抗 IgG，制得上述病毒的金标 IgG，按一定比例混合，制成抗原捕捉剂，加防腐剂，于 4℃保存备用。

4) 兔抗鼠 IgG 制备：以 Balb/c 小鼠 IgG 免疫家兔制备兔抗鼠血清，并从中提取 IgG，制备兔抗鼠 IgG，加防腐剂，于-30℃保存备用。

5) 结合垫制备：将所制金标抗原捕捉剂喷涂于玻璃纤维素膜上，制成反应膜。4℃干燥保存备用。

6) 检测膜制备：将所制备的 RV、CDV、FPV 与 CPV 多抗 IgG 和兔抗鼠 IgG，分别喷点于硝酸纤维素膜（NC）的检测线 R、D、F、P 处和质控线 C 处，制成检测膜。4℃干燥保存备用。

7) 检测试纸组装：按胶体金层析检测试纸制备要求，如图将上述所制备和选购的材料进行粘连、压制和裁切成检测试纸条，装入塑料夹内制成的检测卡，加干燥剂并分装、封闭于的塑料小袋，4℃干燥保存。

8) 银加强法相应试剂的配制：

活化液的配制：以去离子水配制 0.05mol/L、PH3.8 的柠檬酸盐缓冲液。

银染液的配制：将乙酸银、对苯二酚、阿拉伯树胶溶于去离子水中，使其终浓度分别为 0.11%、0.35%-1.7%和 7%-10%。

定影液的配制：20%的硫代硫酸钠水溶液。

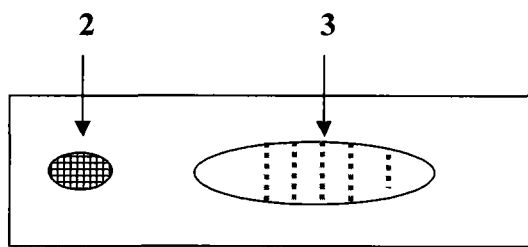


图 1

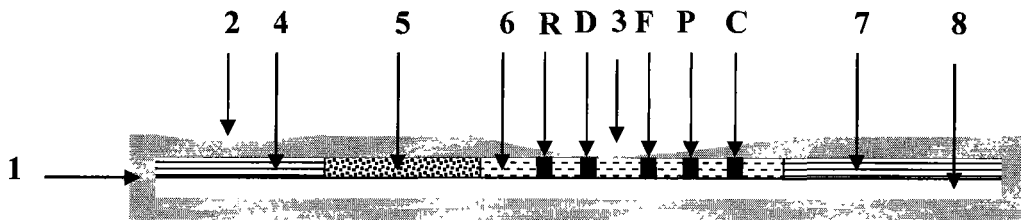


图 2

专利名称(译)	犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测试纸及其制备技术		
公开(公告)号	CN101074959A	公开(公告)日	2007-11-21
申请号	CN200710055759.X	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
[标]发明人	夏咸柱 杨松涛 黄耕 王承宇 高玉伟 王铁成 侯小强 高明华 苏建青		
发明人	夏咸柱 杨松涛 黄耕 王承宇 高玉伟 王铁成 侯小强 高明华 苏建青		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种犬、猫科动物重要疫病病原胶体金银联合检测试纸及其制备方法，将胶体金标记的鼠源RV、CDV、FPV和CPV等单抗混合包被在玻璃纤维素膜上，制成结合垫；分别将纯化的犬抗RV、CDV、FPV和CPV等的IgG包被在硝酸纤维素膜(NC)的检测线R、D、F、P处，将兔抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜的质控线C处，制成检测膜；当被检样品中含有相应病毒时，可先与相应金标鼠源单抗结合，然后在层析作用下与相应检测线上的二抗结合并富集，再经银染液加强染色后形成肉眼可见的色带，进而根据显色结果进行判定。本发明不需要借助其它仪器设备，并可同时对多种犬猫科动物重要疫病抗体进行检测，特别适用于现场检测和流行病学调查。

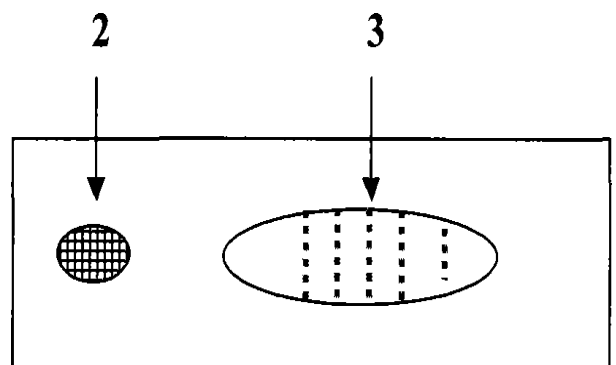


图 1