



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103149355 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201310033072.1

(22) 申请日 2013.01.29

(71) 申请人 杭州迪恩科技有限公司

地址 310023 浙江省杭州市余杭区五常大道  
181号B3号楼2层

(72) 发明人 王旻子 张明洲 魏建良 程晔  
陈宗伦 吴海芬

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

### (54) 发明名称

一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡

### (57) 摘要

本发明公开了属于免疫检测技术领域的一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡。该所述检测试纸卡由外壳和其内部的试纸条构成,外壳由上板和下板构成,上板有检测窗和加样孔,试纸条由底板和在底板上依次粘贴的样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区构成,样品吸收垫正对加样孔,检测反应区正对检测窗。本发明还公开了应用上述试纸条检测牛布鲁氏菌抗体的方法。本发明的牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡灵敏度和重复率高,特异性强,稳定性能好,假阳率和假阴率低,使用方便,容易观察区别,适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

1. 一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述检测试纸卡由外壳(1)和其内部的试纸条(2)构成,外壳(1)由上板(3)和下板(4)构成,上板(3)有检测窗(5)和加样孔(6),试纸条(2)由底板(7)和在底板(7)上依次粘贴的样品吸收垫(8)、胶体金标记垫(9)、检测反应区(10)构成,样品吸收垫(8)正对加样孔(6),检测反应区(10)正对检测窗(5)。

2. 根据权利要求1所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述胶体金标记垫(9)包被有牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物。

3. 根据权利要求2所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物的制备方法为:

(1) 将牛布鲁氏菌抗原在0.005M/L pH7.0的NaCl溶液中4℃透析过夜,4℃,10000-12000rpm条件下离心1h;

(2) 将OD526的胶体金溶液的pH调节至4.0-9.0;

(3) 将步骤(1)离心得到的牛布鲁氏菌抗原用0.005M/L pH9.0的硼酸盐缓冲溶液稀释至 $5\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ ,取1ml稀释后的牛布鲁氏菌抗原加入到1ml胶体金溶液中,振荡混匀,静置5min,加入0.1ml10%的NaCl溶液,混匀后静置2h,离心纯化制得胶体金标记的牛布鲁氏菌抗原。

4. 根据权利要求1所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述检测反应区(10)由包被牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物的测试区(11)和包被牛布鲁氏菌抗体的质控区(12)组成。

5. 根据权利要求4所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物的制备方法为:

(1) 取5mg牛布鲁氏菌抗原和2.5mg载体蛋白溶解在250 $\mu\text{l}$  TE buffer中,充分震荡使其溶解,再取EDC·HCl79mg充分溶解于250 $\mu\text{l}$  TE buffer中;

(2) 将牛布鲁氏菌抗原和载体蛋白的混合溶液边震荡边逐滴加入EDC·HCl溶液,在37℃摇床中反应2h以上;

(3) 先用Sephadex柱分离步骤(2)反应后的偶联产物和未结合的牛布鲁氏菌抗原,再透析纯化,将0.5ml溶液在PBS中透析3d,每天换液两次,每次换液200ml,透析产物分装成20份,于-20℃保存,得到牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物。

6. 根据权利要求1所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白或鸡卵白蛋白。

7. 根据权利要求1所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述样品吸收垫含有植物凝集素或抗红细胞抗体。

8. 根据权利要求7所述一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述抗红细胞抗体为使用人红细胞免疫小鼠、羊或兔,常规制备的抗红细胞单克隆抗体。

9. 应用权利要求1所述检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡的检测方法,其特征在于,按照如下步骤进行:

(1) 血液样品处理:血液标本收集在洁净、干燥的容器内,将采集的新鲜血液加入浓度为2.5%抗凝剂;

(2) 取经过处理的血液样品 100  $\mu$  L, 滴入加样孔 ;

(3) 待血液样品流过测试区和质控区, 判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体, 判定规则如下 :

阴性 (-) : 仅质控区出现一条紫红色条带, 在测试区内无紫红色条带出现 ;

阳性 (+) : 两条紫红色条带出现, 一条位于测试区内, 另一条位于质控区内 ;

无效 : 当质控区不显示出紫红色条带, 则无论测试区显示出紫红色条带与否, 该试纸卡判为无效。

## 一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡。

### 背景技术

[0002] 布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是由布鲁氏菌引起的一种人畜共患全身传染病,在世界各地都广泛流行,被世界动物卫生组织 (OIE) 列为 B 类动物疫病,我国将其列为二类动物疫病,是国际贸易检验中必检的一种传染病。布鲁氏菌为革兰氏阴性短小杆菌,初次分离时多呈球状,球杆状和卵圆形,布鲁氏菌可感染包括人类在内的多种家畜和野生动物,主要通过消化道、皮肤黏膜、呼吸道等途径侵入机体,感染后引起相似的临床症状,如长期发热、流产与不育、虚弱、关节痛及肝脾肿大等。牛布鲁氏菌病为布鲁氏菌病中较为严重的一种。

[0003] 为防控该病,各国学者建立了多种布鲁氏菌病诊断和检测技术,主要有:(1) 血象诊断:白细胞半数正常或轻度减少,淋巴细胞相对或绝对增多,分类可达 60% 以上,血沉在各期均增速,久病者有轻或中度贫血。(2) 细菌学检查:患者血液、骨髓、乳汁、子宫分泌物做细菌培养。(3) 免疫学检测:包括血清凝集、补体结合、抗人球蛋白检测、ELISA 等。(4) PCR。

[0004] 血象诊断只能作为初步的诊断方法,不能作为确诊病症的方法;细菌学检查方法耗时长,假阳性和假阴性的概率高,实验条件也不易控制;免疫学检测是一种快速检测的方法,但目前的检测方法都存在灵敏度低,有交叉反应的情况;PCR 为目前较常用的该疫病的诊断方法,但均存在样品前处理复杂、仪器设备昂贵、分析费时、要求熟练的专业技术人员才能完成等问题。这些方法均不适用于设备简单、技术人员缺少的基层单位对该病开展广泛检测。

[0005] 免疫胶体金技术自问世以来,得到了迅速发展。广泛应用于化学检测和免疫学检测领域,尤其是胶体金免疫层析技术具有操作简单、快速灵敏、结果清楚、易于判断和保存,且无需任何仪器设备等优点。更适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种敏感度高、特异性好、操作简单、低成本的利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡及其检测方法。

[0007] 一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,所述检测试纸卡由外壳 1 和其内部的试纸条 2 构成,外壳 1 由上板 3 和下板 4 构成,上板 3 有检测窗 5 和加样孔 6,试纸条 2 由底板 7 和在底板 7 上依次粘贴的样品吸收垫 8、胶体金标记垫 9、检测反应区 10 构成,样品吸收垫 8 正对加样孔 6,检测反应区 10 正对检测窗 5。

[0008] 所述胶体金标记垫 9 包被有牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物。

[0009] 所述牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物的制备方法为:

[0010] (1) 将牛布鲁氏菌抗原在 0.005M/L pH7.0 的 NaCl 溶液中 4℃ 透析过夜, 4℃, 10000-12000rpm 条件下离心 1h;

[0011] (2) 将 OD526 的胶体金溶液的 pH 调节至 4.0-9.0;

[0012] (3) 将步骤 (1) 离心得到的牛布鲁氏菌抗原用 0.005M/L pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液稀释至 5 μg/ml ~ 50 μg/ml, 取 1ml 稀释后的牛布鲁氏菌抗原加入到 1ml 胶体金溶液中, 振荡混匀, 静置 5min, 加入 0.1ml 10% 的 NaCl 溶液, 混匀后静置 2h, 离心纯化制得胶体金标记的牛布鲁氏菌抗原。

[0013] 所述检测反应区 10 由包被牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物的测试区 11 和包被牛布鲁氏菌抗体的质控区 12 组成。

[0014] 所述牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物的制备方法为:

[0015] (1) 取 5mg 牛布鲁氏菌抗原和 2.5mg 载体蛋白溶解在 250 μl TE buffer 中, 充分震荡使其溶解, 再取 EDC·HCl 179mg 充分溶解于 250 μl TE buffer 中;

[0016] (2) 将牛布鲁氏菌抗原和载体蛋白的混合溶液边震荡边逐滴加入 EDC·HCl 溶液, 在 37℃ 摇床中反应 2h 以上;

[0017] (3) 先用 Sephadex 柱分离步骤 (2) 反应后的偶联产物和未结合的牛布鲁氏菌抗原, 再透析纯化, 将 0.5ml 溶液在 PBS 中透析 3d, 每天换液两次, 每次换液 200ml, 透析产物分装成 20 份, 于 -20℃ 保存, 得到牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物。

[0018] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白或鸡卵白蛋白。

[0019] 所述样品吸收垫含有植物凝集素或抗红细胞抗体。

[0020] 所述抗红细胞抗体为使用人红细胞免疫小鼠、羊或兔, 常规制备的抗红细胞单克隆抗体。

[0021] 所述检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡的检测方法, 其特征在于, 按照如下步骤进行:

[0022] (1) 血液样品处理: 血液标本收集在洁净、干燥的容器内, 将采集的新鲜血液加入浓度为 2.5% 抗凝剂; 血液标本在 2℃ ~ 8℃ 冷藏可保存 48 小时;

[0023] (2) 取经过处理的血液样品 100 μL, 滴入加样孔;

[0024] (3) 待血液样品流过测试区和质控区, 判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体, 判定规则如下:

[0025] 阴性 (-): 仅质控区出现一条紫红色条带, 在测试区内无紫红色条带出现;

[0026] 阳性 (+): 两条紫红色条带出现, 一条位于测试区内, 另一条位于质控区内;

[0027] 无效: 当质控区不显示出紫红色条带, 则无论测试区显示出紫红色条带与否, 该试纸卡判为无效。

[0028] 本发明的检测原理: 当含有牛布鲁氏菌抗体的血液样品流经胶体金标记垫时, 胶体金标记垫上的牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物与牛布鲁氏菌抗体结合, 继续流经质控区时牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物与质控区的牛布鲁氏菌抗体结合显示紫红色条带, 流经测试区时牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物和牛布鲁氏菌抗体的结合物与牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物相结合, 显示紫红色条带, 若血液样品没有牛布鲁氏菌抗体, 这种结合则不能进行, 测试区不显示紫红色。

[0029] 本发明的有益效果: 本发明的牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡灵敏度和重复

率高,特异性强,稳定性能好,假阳率和假阴率控制在1%以下,吸收垫含有的植物凝集素或抗红细胞抗体能有效的凝集拦截红细胞,避免红细胞透过吸收垫,干扰后续的检测,该试纸卡检测反应容易观察区别,适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

### 附图说明

[0030] 图1为本发明试纸卡结构示意图;

[0031] 图2为本发明试纸条结构示意图;

[0032] 图中,1-外壳、2-试纸条、3-上板、4-下板、5-检测窗、6-加样孔、7-底板 8-样品吸收垫、9-胶体金标记垫、10-检测反应区、11-测试区、12-质控区。

### 具体实施方式

[0033] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。

[0034] 实施例1利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡结构

[0035] 利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,如图1和图2所示,所述检测试纸卡由外壳1和其内部的试纸条2构成,外壳1由上板3和下板4构成,上板3有检测窗5和加样孔6,试纸条2由底板7和在底板7上依次粘贴的样品吸收垫8、胶体金标记垫9、检测反应区10构成,样品吸收垫8正对加样孔6,检测反应区10正对检测窗5。胶体金标记垫9包被有布鲁氏菌抗原和胶体金标记物。检测反应区10由包被布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物的测试区11和包被布鲁氏菌抗体的质控区12组成。

[0036] 载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白或鸡卵白蛋白。

[0037] 样品吸收垫含有植物凝集素或抗红细胞抗体。

[0038] 抗红细胞抗体为使用人红细胞免疫小鼠、羊或兔,常规制备的抗红细胞单克隆抗体。

[0039] 实施例2检测牛布鲁氏菌抗体的方法

[0040] 1、牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物的制备

[0041] (1) 将牛布鲁氏菌抗原在0.005M/L pH7.0的NaCl溶液中4℃透析过夜,4℃,10000-12000rpm条件下离心1h;

[0042] (2) 将OD526的胶体金溶液的pH调节至4.0-9.0;

[0043] (3) 将步骤(1)离心得到的牛布鲁氏菌抗原用0.005M/L pH9.0的硼酸盐缓冲溶液稀释至5μg/ml~50μg/ml,取1ml稀释后的牛布鲁氏菌抗原加入到1ml胶体金溶液中,振荡混匀,静置5min,加入0.1ml10%的NaCl溶液,混匀后静置2h,离心纯化制得胶体金标记的牛布鲁氏菌抗原。

[0044] 2、牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物的制备

[0045] (1) 取5mg牛布鲁氏菌抗原和2.5mg载体蛋白溶解在250μl TE buffer中,充分震荡使其溶解,再取EDC·HCl179mg充分溶解于250μl TE buffer中;

[0046] (2) 将牛布鲁氏菌抗原和载体蛋白的混合溶液边震荡边逐滴加入EDC·HCl溶液,在37℃摇床中反应2h以上;

[0047] (3) 先用Sephadex柱分离步骤(2)反应后的偶联产物和未结合的牛布鲁氏菌抗原,再透析纯化,将0.5ml溶液在PBS中透析3d,每天换液两次,每次换液200ml,透析产物

分装成 20 份,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存,得到牛布鲁氏菌抗原-载体蛋白偶联物。

#### [0048] 3、血液样品的处理

[0049] 取 100 份经过牛布鲁氏菌抗原免疫的牛血液样品,血液标本收集在洁净、干燥的容器内,将采集的新鲜血液加入浓度为 2.5% 抗凝剂;血液标本在  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$  冷藏可保存 48 小时。

#### [0050] 4、检测步骤

[0051] (1) 将 100 份经过处理的血液样品各  $100\ \mu\text{L}$ ,标准牛布鲁氏菌抗体  $100\ \mu\text{L}$  (浓度为  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ),去离子水  $100\ \mu\text{L}$ ,滴入加样孔;

[0052] (2) 待血液样品、标准牛布鲁氏菌抗体、去离子水流过各自试纸条的测试区和质控区,判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体,判定规则如下:

[0053] 阴性 (-):仅质控区出现一条紫红色条带,在测试区内无紫红色条带出现;

[0054] 阳性 (+):两条紫红色条带出现,一条位于测试区内,另一条位于质控区内;

[0055] 无效:当质控区不显示出紫红色条带,则无论测试区显示出紫红色条带与否,该试纸卡判为无效。

[0056] 判定结果为:牛血液样品 98 份呈阳性,1 份呈阴性,1 份无效,灵敏度为 99%。

#### [0057] 实施例 3 检测牛布鲁氏菌抗体的试纸条假阳性率和假阴性测试实验

##### [0058] 1、假阳性测试

[0059] (1) 取 100 份普通牛血液样品,采用血液前处理装置对血液样品进行处理;

[0060] (2) 将经过处理的 100 份普通牛血液样品各  $100\ \mu\text{L}$ ,去离子水  $100\ \mu\text{L}$ ,滴入加样孔;

[0061] (2) 待血液样品、去离子水流过各自试纸条的测试区和质控区,判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体,判定规则如下:

[0062] 阴性 (-):仅质控区出现一条紫红色条带,在测试区内无紫红色条带出现;

[0063] 阳性 (+):两条紫红色条带出现,一条位于测试区内,另一条位于质控区内;

[0064] 无效:当质控区不显示出紫红色条带,则无论测试区显示出紫红色条带与否,该试纸卡判为无效。

[0065] 判定结果为:牛血液样品 1 份呈阳性,99 份呈阴性,全部有效,假阳性率为 1%。

##### [0066] 2、假阴性测试

[0067] (1) 取 100 份标准牛布鲁氏菌抗体 (浓度为  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 各  $100\ \mu\text{L}$ ,去离子水  $100\ \mu\text{L}$ ,滴入加样孔;

[0068] (2) 待标准牛布鲁氏菌抗体、去离子水流过各自试纸条的测试区和质控区,判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体,判定规则如下:

[0069] 阴性 (-):仅质控区出现一条紫红色条带,在测试区内无紫红色条带出现;

[0070] 阳性 (+):两条紫红色条带出现,一条位于测试区内,另一条位于质控区内;

[0071] 无效:当质控区不显示出紫红色条带,则无论测试区显示出紫红色条带与否,该试纸卡判为无效。

[0072] 判定结果为:牛血液样品 99 份呈阳性,1 份呈阴性,全部有效,假阴性率为 1%。

#### [0073] 实施例 4 检测牛布鲁氏菌抗体的试纸条其他性能的测定

[0074] (1) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的特异性测定

[0075] 应用制备的布鲁氏菌抗体试纸卡检测与布鲁氏菌种系较近的 3 种细菌全血,其结果均为阴性,表明其特异性好,无交叉。

[0076] (2) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的敏感性

[0077] 取外购牛布鲁氏菌阳性血清,用 ELISA 检测其平均效价约为 1 : 8000,虎红平板凝集抗原在血液稀释度低于 50 倍时检测为阳性;布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡测到的阳性结果的血液效价为 1 : 6000,血液稀释度  $\geq 6000$  倍时,试纸卡检测线显色不清晰或无显色。故布鲁氏菌抗体现场快速检测实在卡的灵敏度明显高于虎红平板凝集试验,但其灵敏度仍低于 ELISA。

[0078] (3) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的重复性

[0079] 进行平行检测 5 个试纸卡,其检测结果一致,说明该检测方法具有可重复性。

[0080] (4) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的稳定性

[0081] 4℃放置布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡,定期检测标准阳性血清,结果显示其稳定性可保存 1 年,1 年后金释放速度减慢,层析速度减慢等现象。产品的稳定性为 4℃环境为 1 年。

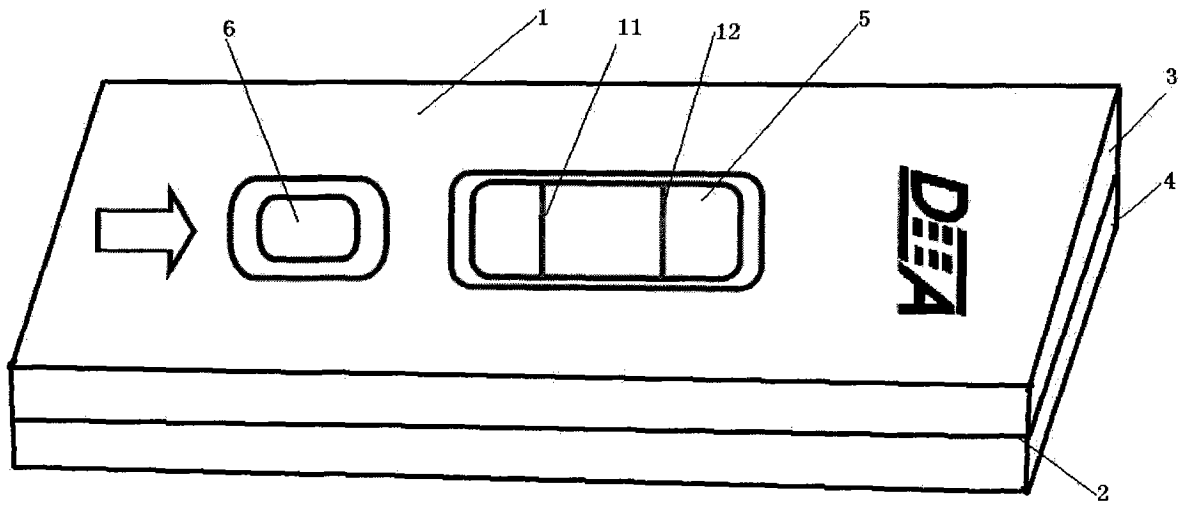


图 1

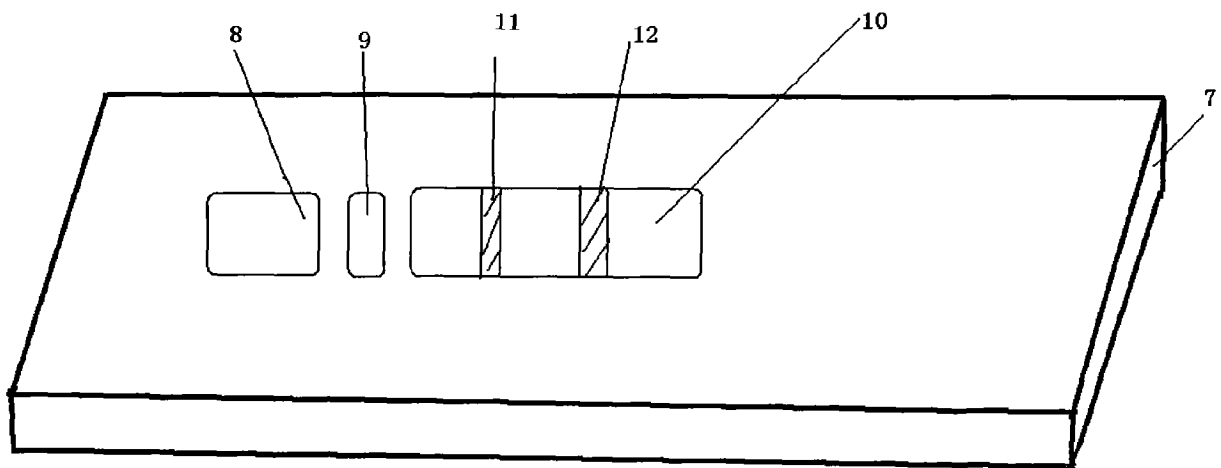


图 2

专利名称(译)	一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡		
公开(公告)号	<a href="#">CN103149355A</a>	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201310033072.1	申请日	2013-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江迪恩生物科技股份有限公司		
[标]发明人	王旻子 张明洲 魏建良 程晔 陈宗伦 吴海芬		
发明人	王旻子 张明洲 魏建良 程晔 陈宗伦 吴海芬		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/532		
其他公开文献	CN103149355B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了属于免疫检测技术领域的一种利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡。该所述检测试纸卡由外壳和其内部的试纸条构成，外壳由上板和下板构成，上板有检测窗和加样孔，试纸条由底板和在底板上依次粘贴的样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区构成，样品吸收垫正对加样孔，检测反应区正对检测窗。本发明还公开了应用上述试纸条检测牛布鲁氏菌抗体的方法。本发明的牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡灵敏度和重复率高，特异性强，稳定性能好，假阳率和假阴率低，使用方便，容易观察区别，适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

