



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103941009 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 29

(21) 申请号 201410147731. 9

CN 101434998 A, 2009. 05. 20,

(22) 申请日 2014. 04. 14

WO 2004069860 A2, 2004. 08. 19,

(73) 专利权人 河北工程大学

WO 2008115478 A2, 2008. 09. 25,

地址 056038 河北省邯郸市光明南大街 199 号

EP 2383577 A1, 2011. 11. 02,

审查员 黄晓丽

(72) 发明人 杨凌 闫现喜 段保守 张乐颖 董瑞玲

(74) 专利代理机构 邯郸市久天专利事务所 13117

代理人 薛建铎

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102297966 A, 2011. 12. 28,

JP 2007106716 A, 2007. 04. 26,

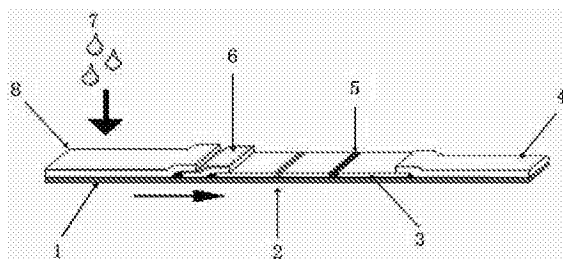
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

用于牛羊早期妊娠诊断的 ISG15 胶体金试纸条及其制作方法

(57) 摘要

公开了一种用于检测牛羊早期妊娠诊断的 ISG15 胶体金试纸条, 由含有金标 ISG15 抗体复合物的金标垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜样品垫和吸水垫组成, 含有金标 ISG15 抗体复合物的金标垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜样品垫和吸水垫粘贴在 PVC 底板上, 玻璃纤维膜样品垫和含有金标 ISG15 抗体的金标垫与硝酸纤维素膜首尾相接, 硝酸纤维素膜与吸水垫尾首相接; 在硝酸纤维素膜上有 ISG15 抗体检测线和羊抗鼠二抗对照线, ISG15 抗体检测线靠近含有金标 ISG15 抗体的金标垫一侧。本发明具有操作简单、检测时间短、结果清晰、可通过肉眼判定结果、无需复杂操作技巧和特殊设备、灵敏度高、无污染且携带方便等优点。



1. 用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条,由含有金标ISG15抗体复合物的金标垫(6)、硝酸纤维素膜(3)、玻璃纤维膜样品垫(8)和吸水垫(4)组成,其特征是,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫(6)、硝酸纤维素膜(3)、玻璃纤维膜样品垫(8)和吸水垫(4)粘贴在PVC底板(1)上,玻璃纤维膜样品垫(8)和含有金标ISG15抗体的金标垫(6)与硝酸纤维素膜(3)首尾相接,硝酸纤维素膜(3)与吸水垫(4)尾首相接;在硝酸纤维素膜(3)上有ISG15抗体检测线(2)和羊抗鼠二抗对照线(5),ISG15抗体检测线(2)靠近含有金标ISG15抗体的金标垫一侧;羊抗鼠二抗对照线(5)距吸水垫近端0.3-0.6cm,ISG15抗体检测线(2)与吸水垫近端相距0.8-1.3cm;羊抗鼠二抗对照线(5)的羊抗鼠二抗的喷涂浓度为0.2-2mg/mL,ISG15抗体检测线(2)的ISG15抗体的喷涂浓度为5-10 $\mu\text{g/mL}$;试纸条大小为6-8cm \times 0.3-0.6cm,吸水垫(4)长1.8-2.2cm、样品垫(8)长1.8-2.2cm、含有金标ISG15抗体复合物的金标垫(6)长0.6-1.0cm、硝酸纤维素膜长(3)2-3cm;硝酸纤维素膜(3)贴在底板上,硝酸纤维素膜(3)与底板吸水端边缘相距1.3-1.8cm;吸水垫(4)与硝酸纤维素膜(3)交叠贴于底板吸水端,样品垫(8)、含有金标ISG15抗体复合物的金标垫(6)与硝酸纤维素膜(3)由上而下依次交叠,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫(6)位于样品垫(8)和硝酸纤维素膜(3)之间,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫(6)与硝酸纤维素膜(3)的交叠长度为0.8-1.0mm。

2. 用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法,其具体制备步骤如下:

第一步,制备胶体金:将0.01% HAuCl_4 水溶液100mL加热至沸腾,加入1%枸橼酸三钠水溶液1mL,加热至透明红色,制得胶体金颗粒大小40nm;

第二步,制备纯化ISG15单克隆抗体:重组牛ISG15免疫BaIb/c小鼠;骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合;采用阳性杂交瘤细胞制备腹水;ISG15单克隆抗体的提纯;

第三步,制备金标抗体:将抗体溶液去盐,胶体金pH值在9-9.5之间时与抗体吸附,采用离心法纯化;

第四步,胶体金试纸条的制备:将金标抗体灌注在已处理好的硝酸纤维素膜上,干燥;在硝酸纤维素膜上用点膜机将ISG15抗体和羊抗鼠二抗喷成2条线,分别为检测线和对照线,再真空干燥;将样品垫、金标垫与硝酸纤维素膜首尾相接粘贴在底板上,吸水垫贴在硝酸纤维素膜的另一侧,组装制成检测ISG15胶体金试纸条。

3. 按照权利要求2所述的用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法,其特征是:制备胶体金时,用微波炉加热0.01%的 HAuCl_4 溶液100mL,加热至沸腾,一次性加入1%的枸橼酸三钠水溶液1mL。

4. 按照权利要求2所述的用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法,其特征是:制备ISG15单克隆抗体时,采用重组牛ISG15免疫BaIb/c小鼠,骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合方法获得ISG15单克隆抗体,纯化后抗体浓度为1-3mg/mL。

用于牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条及其制作方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条及其制作方法。

背景技术

[0002] 提高牛羊的繁殖率,尽量缩短空怀期是牛羊饲养管理的目标之一。因此牛羊早期妊娠诊断是促进牛羊发展的重要措施。简便而有效的牛羊早期妊娠诊断方法,是牛羊生产者及畜牧工作者长期以来急待解决的问题。因为牛羊早期妊娠诊断是改善牛羊饲养管理,提高繁殖率的一项重要措施。如果牛羊配种后不能及时诊断是否妊娠,就可导致产犊(羔)间隔延长、繁殖率降低,饲养管理成本增高,大大影响经济效益。目前我国牛羊的第一情期受孕率仅40-60%,多数牛羊需配种(或人工授精)2-3次才能受孕,以延误1-2个发情周期计算,就相当于每头/只繁殖牛羊多饲养20-40多天,增加了饲养成本。可见,牛羊早期妊娠诊断技术的研究,对缩短空怀期,提高繁殖率,进一步促进牛羊业的发展具有重要的经济意义。

[0003] 目前在牛羊早期妊娠诊断中常用的几种方法有:直肠诊断法(牛),超声波诊断法(牛羊),孕酮的放射免疫法(牛羊)、孕酮的酶标免疫法(牛羊)和外部观察法(牛羊)。其中直肠诊断法要求操作者必须具有一定的临床经验,较为费时费力,有时还会引起疾病传染或流产,而且40多天以后才能检测出怀孕的征象,做出正确的诊断。超声波诊断法由于仪器昂贵和需专业技术人员操作,使其广泛应用受限,而且需要胎儿较大时,才能检测出来,不适合早期妊娠诊断。牛羊的外部观察法进行妊娠早期诊断极不准确,资料报道,羊在妊娠后,有30%会出现发情表现。孕酮的放射免疫法(牛羊)和孕酮的酶标免疫法(牛羊),可以直接检测牛羊血液或奶中的孕酮含量,但是需要在牛羊发情周期的发情期进行检测,由于牛羊发情周期不同(朱士恩,家畜繁殖学,2009),黄牛和奶牛平均21天(18-24),绵羊平均16-17天(14-19),山羊平均20天(18-22)。并且不同牛羊个体之间发情周期还存在差异。另外,由于持久黄体 and 黄体囊肿也会持续分泌孕酮。这样检测孕酮含量并不能非常准确确定牛羊妊娠与否。

[0004] 因此,研究一种使用简便的用于牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条及其制作方法,是目前需要解决的技术问题。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题提供一种用于牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条及该用于牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制作方法。

[0006] 本发明解决其技术问题的技术方案是:

[0007] 用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条,由含有金标ISG15抗体复合物的金标垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜样品垫和吸水垫组成,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜样品垫和吸水垫粘贴在PVC底板上,玻璃纤维膜样品垫和含有金标ISG15抗体的金标垫与硝酸纤维素膜首尾相接,硝酸纤维素膜与吸水垫尾首相

接;在硝酸纤维素膜上有ISG15抗体检测线和羊抗鼠二抗对照线,ISG15抗体检测线靠近含有金标ISG15抗体的金标垫一侧。

[0008] 作为本发明的一种优选方案,羊抗鼠二抗对照线距吸水垫近端0.3-0.6cm,ISG15抗体检测线与吸水垫近端相距0.8-1.3cm。

[0009] 作为本发明的一种优选方案,羊抗鼠二抗对照线的羊抗鼠二抗的喷涂浓度为0.2-2mg/mL,ISG15抗体检测线的ISG15抗体的喷涂浓度为5-10 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0010] 作为本发明的一种优选方案,试纸条大小为6-8cm \times 0.3-0.6cm,吸水垫长1.8-2.2cm、样品垫长1.8-2.2cm、含有金标ISG15抗体复合物的金标垫长0.6-1.0cm、硝酸纤维素膜长2-3cm;硝酸纤维素膜贴在底板上,硝酸纤维素膜与底板吸水端边缘相距1.3-1.8cm;吸水垫与硝酸纤维素膜(3)交叠贴于底板吸水端,样品垫、含有金标ISG15抗体复合物的金标垫与硝酸纤维素膜由上而下依次交叠,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫位于样品垫和硝酸纤维素膜之间,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫与硝酸纤维素膜的交叠长度为0.8-1.0mm。

[0011] 用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法,具体制备步骤如下:

[0012] 第一步,制备胶体金:将0.01% HAuCl_4 水溶液100mL加热至沸腾,加入1%枸橼酸三钠水溶液1mL,加热至透明红色,制得胶体金颗粒大小40nm;

[0013] 第二步,制备纯化ISG15单克隆抗体:重组牛ISG15免疫BaIb/c小鼠;骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合;采用阳性杂交瘤细胞制备腹水;ISG15单克隆抗体的提纯;

[0014] 第二步的具体操作为:

[0015] 1. 动物免疫:重组牛ISG15免疫BaIb/c小鼠,采用四次免疫的方法,第一次采用弗氏完全佐剂(FCA) 0.2mL+0.2mg重组牛ISG15,第二次采用弗氏不完全佐剂(FIA) 0.2mL + 0.2mg重组牛ISG15,第三次采用FIA 0.2mL +0.2mg重组牛ISG15,第四次单独采用重组牛ISG15,剂量加倍腹腔注射。

[0016] 2. 骨髓瘤细胞SP2/0 的准备和细胞融合:细胞融合前一周复苏冻存于液氮中的SP2/0,在含 20%胎牛血清和 1% HT的DMEM培养基中培养。准备好的骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合。

[0017] 3. 阳性杂交瘤细胞的筛选与腹水单克隆抗体的制备:采用间接 ELISA 方法对生长的杂交瘤细胞进行筛选,用6 $\mu\text{g/mL}$ 的重组牛ISG15进行包被。对检测为阳性的细胞采用有限稀释法进行 2 次亚克隆,取形态良好、生长旺盛的单克隆细胞进行扩大培养,用于制备腹水。

[0018] 4. 单克隆抗体的鉴定:用重组牛ISG15对制备的腹水单克隆抗体(1:10 000 稀释)进行免疫印迹分析,进行 DAB 显色和化学发光显色。同时进行ISG15在绵羊组织中的免疫印迹分析和免疫组织化学检测,进一步对单克隆抗体进行鉴定。

[0019] 第三步,制备金标抗体:将抗体溶液去盐,胶体金pH值在9-9.5之间时与抗体吸附,采用离心法纯化;

[0020] 第三步的具体操作为:

[0021] 1.取0.01%的 HAuCl_4 溶液100mL,加热至沸腾,根据需要迅速加入1%枸橼酸三钠

水溶液1mL,同时不断搅拌,待金黄色的HAuCl₄水溶液在2 min内变为红色,中速搅拌,煮沸5 min,直至颜色稳定不变,冷却后用超纯水恢复到原体积,加入0.02%的Na₂N₃,经0.22μm滤膜过滤除菌,装入洁净的经硅化的棕色瓶中4℃保存。

[0022] 2. 取所需量抗体在磁力搅拌下与胶体金溶液混合,缓慢逐滴加ISG15单克隆抗体,1 mg的抗体大约5min加完,标记30min;缓慢滴加5% BSA至终浓度为1%,作为稳定剂,制备金标抗体。抗体的最终浓度为1-10μg/mL。把抗体标记的胶体金液,吸附在纤维材料上,干燥后备用。

[0023] 第四步,胶体金试纸条的制备:将金标抗体灌注在已处理好的硝酸纤维素膜上,干燥;在硝酸纤维素膜上用点膜机将ISG15抗体和羊抗鼠二抗喷成2条线,分别为检测线和对照线,再真空干燥;将样品垫、金标垫与硝酸纤维素膜首尾相接粘贴在底板上,吸水垫贴在硝酸纤维素膜的另一侧,组装制成检测ISG15胶体金试纸条。

[0024] 第四步中的硝酸纤维素膜制备,使用制膜机制膜:采用硝酸纤维素膜制作免疫层析试纸,检测线应用ISG15抗体制作,硝酸纤维素膜对照线由羊抗鼠二抗制成。

[0025] 样品垫由三层材料叠加组成,第一层为一定规格无纺布层、第二层为玻璃纤维层、第三层为一定规格无纺布层,上述物质均需经过表面活性剂缓冲液浸泡处理,干燥后备用。

[0026] 作为用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法的优选方案,制备胶体金时,用微波炉加热0.01%的HAuCl₄溶液100mL,加热至沸腾,一次性加入1%的枸橼酸三钠水溶液1mL。

[0027] 作为用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法的优选方案,制备ISG15单克隆抗体时,采用重组牛ISG15免疫Ba1b/c小鼠,骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合方法获得ISG15单克隆抗体,纯化后抗体浓度为1-3mg/mL。

[0028] 本发明的原理:

[0029] 干扰素-tau是反刍动物胚胎向母体发出的最初妊娠信号,它是在胚胎附植前,由囊胚滋养层产生的一种I型干扰素,牛干扰素-tau的mRNA表达高峰出现在妊娠后第17天,在胚胎滋养层表达消失的时间是第25天(Roberts等,2008)。在绵羊上,干扰素-tau mRNA的表达高峰出现在妊娠后第16天(Godkin等,1982),表达消失的时间是第20天。在妊娠早期,来源于孕体的干扰素-tau,可诱导牛羊子宫内膜表达ISG15。近期研究发现,在牛羊妊娠早期,其它组织也表达ISG15。Oliveira等(2008)报道,在妊娠早期,来源于孕体的干扰素-tau,可诱导绵羊外周血液细胞和黄体表达ISG15。我们前期的研究也表明(Yang等,2010),在牛妊娠早期,黄体的ISG15蛋白也上调表达,这是由于牛外周血液细胞表达ISG15引起的。

[0030] 妊娠早期牛羊外周血液细胞表达ISG15也是一个非常重要的妊娠指标。由于牛羊在受到来自早期胎儿分泌的干扰素-tau的刺激后,外周血液细胞会表达ISG15。因此,检测外周血液细胞ISG15表达与否,可以十分准确地获悉妊娠与否。采集20-25天的牛羊外周血液,检测血细胞ISG15的表达情况,对牛羊早孕诊断是切实可行的。

[0031] 本发明的使用方法:牛羊孕情检测。取母牛或母羊外周血液5mL作为待测样本,经过离心处理,获得外周血液单个核细胞,采用细胞裂解液裂解细胞,提取细胞蛋白样品,使用样品垫直接蘸取或加样至样品垫,5min后,观察结果。

[0032] 结果判断:利用双抗夹心法制成的检测试纸的检测线和对照线显示为彩带,即显色区为两条线时为阳性,即妊娠;只有一条对照线显色时为阴性,即未妊娠。如果对照线也

不显色,即检测试纸失效。

[0033] 与现有技术相比,使用本发明检测牛羊早期妊娠,具有操作简单、检测时间短、结果清晰、可通过肉眼判定结果、无需复杂操作技巧和特殊设备、灵敏度高、无污染且携带方便等优点。

附图说明

[0034] 图1是本发明的结构示意图。

具体实施方式

[0035] 用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条,由含有金标ISG15抗体复合物的金标垫6、硝酸纤维素膜3、玻璃纤维膜样品垫8和吸水垫4组成,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫6、硝酸纤维素膜3、玻璃纤维膜样品垫8和吸水垫4粘贴在PVC底板1上,玻璃纤维膜样品垫8和含有金标ISG15抗体的金标垫6与硝酸纤维素膜3首尾相接,硝酸纤维素膜3与吸水垫4尾首相接;在硝酸纤维素膜3上有ISG15抗体检测线2和羊抗鼠二抗对照线5,ISG15抗体检测线2靠近含有金标ISG15抗体的金标垫一侧。

[0036] 羊抗鼠二抗对照线5距吸水垫近端0.3-0.6cm,ISG15抗体检测线2与吸水垫近端相距0.8-1.3cm。

[0037] 3. 按照权利要求1或2所述的用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条,其特征是,羊抗鼠二抗对照线5的羊抗鼠二抗的喷涂浓度为0.2-2mg/mL, ISG15抗体检测线2的ISG15抗体的喷涂浓度为5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0038] 试纸条大小为6-8cm \times 0.3-0.6cm,吸水垫4长1.8-2.2cm、样品垫8长1.8-2.2cm、含有金标ISG15抗体复合物的金标垫6长0.6-1.0cm、硝酸纤维素膜长2-3cm;硝酸纤维素膜3贴在底板上,硝酸纤维素膜3与底板吸水端边缘相距1.3-1.8cm;吸水垫4与硝酸纤维素膜3交叠贴于底板吸水端,样品垫8、含有金标ISG15抗体复合物的金标垫6与硝酸纤维素膜3由上而下依次交叠,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫6位于样品垫8和硝酸纤维素膜3之间,含有金标ISG15抗体复合物的金标垫6与硝酸纤维素膜3的交叠长度为0.8-1.0mm。

[0039] 用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条的制备方法,具体制备步骤如下:

[0040] 第一步,制备胶体金:将0.01% HAuCl₄水溶液100mL加热至沸腾,加入1%枸橼酸三钠水溶液1mL,加热至透明红色,制得胶体金颗粒大小40nm;

[0041] 第二步,制备纯化ISG15单克隆抗体:重组牛ISG15免疫BaIb/c小鼠;骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合;采用阳性杂交瘤细胞制备腹水;ISG15单克隆抗体的提纯;

[0042] 第三步,制备金标抗体:将抗体溶液去盐,胶体金pH值在9-9.5之间时与抗体吸附,采用离心法纯化;

[0043] 第四步,胶体金试纸条的制备:将金标抗体灌注在已处理好的硝酸纤维素膜上,干燥;在硝酸纤维素膜上用点膜机将ISG15抗体和羊抗鼠二抗喷成2条线,分别为检测线和对照线,再真空干燥;将样品垫、金标垫与硝酸纤维素膜首尾相接粘贴在底板上,吸水垫贴在硝酸纤维素膜的另一侧,组装制成检测ISG15胶体金试纸条。

[0044] 制备胶体金时,用微波炉加热0.01%的 HAuCl_4 溶液100mL,加热至沸腾,一次性加入1%的枸橼酸三钠水溶液1mL。

[0045] 制备ISG15单克隆抗体时,采用重组牛ISG15免疫Ba1b/c小鼠,骨髓瘤细胞SP2/0与免疫小鼠的脾脏细胞进行融合方法获得ISG15单克隆抗体,纯化后抗体浓度为1-3mg/mL。

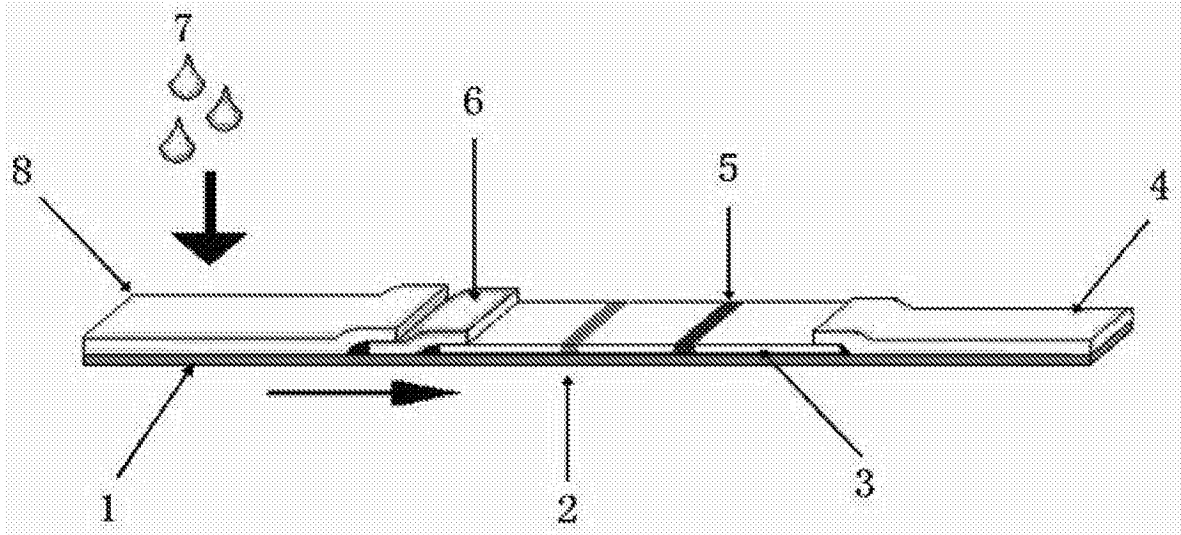


图1

专利名称(译)	用于牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条及其制作方法		
公开(公告)号	CN103941009B	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201410147731.9	申请日	2014-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	河北工程大学		
申请(专利权)人(译)	河北工程大学		
当前申请(专利权)人(译)	河北工程大学		
[标]发明人	杨凌 闫现喜 段保宁 张乐颖 董瑞玲		
发明人	杨凌 闫现喜 段保宁 张乐颖 董瑞玲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/689		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN103941009A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种用于检测牛羊早期妊娠诊断的ISG15胶体金试纸条，由含有金标ISG15抗体复合物的金标垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜样品垫和吸水垫组成，含有金标ISG15抗体复合物的金标垫、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜样品垫和吸水垫粘贴在PVC底板上，玻璃纤维膜样品垫和含有金标ISG15抗体的金标垫与硝酸纤维素膜首尾相接，硝酸纤维素膜与吸水垫尾首相接；在硝酸纤维素膜上有ISG15抗体检测线和羊抗鼠二抗对照线，ISG15抗体检测线靠近含有金标ISG15抗体的金标垫一侧。本发明具有操作简单、检测时间短、结果清晰、可通过肉眼判定结果、无需复杂操作技巧和特殊设备、灵敏度高、无污染且携带方便等优点。

