



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104865381 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510193313. 8

(22) 申请日 2015. 04. 22

(71) 申请人 河南省康星药业股份有限公司

地址 451464 河南省郑州市中牟县白沙工业
园镇兴路康星药业有限公司

(72) 发明人 张国祖 王兴涛 马霞 王林
杨帅 刘梅

(74) 专利代理机构 北京众元弘策知识产权代理
事务所(普通合伙) 11462

代理人 安娜

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

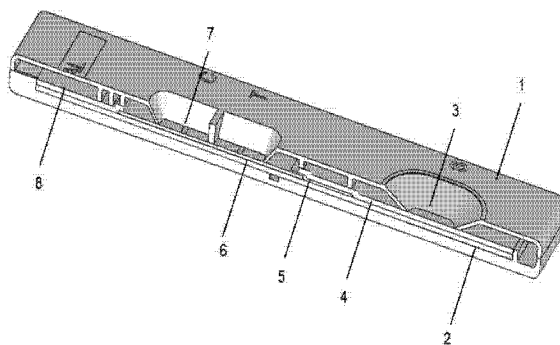
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测猪早孕因子胶体金检测试纸卡及其
制备方法

(57) 摘要

本发明的主要目的在于提供一种猪早孕因子胶体金检测试纸卡,快速检测母猪早孕因子,用于母猪早期妊娠的临床诊断。本发明的创新点在于利用基因克隆技术,人工合成具有天然早孕因子活性的猪早孕因子蛋白,在此基础上得到敏感性高、特性好的猪早孕因子单克隆抗体,经过试纸卡组装条件优化得到猪早孕因子胶体金检测试纸卡。该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测方便快速的优点,在整个检测过程中不需要使用专业仪器设备,多操作人员要求低,而且试纸卡成本低廉,操作方便,能广泛应用于猪早期妊娠的诊断,为了解母猪孕情和对母猪假孕进行诊断奠定了基础。



1. 猪早孕因子胶体金检测试纸卡,其特征在于:

所述的猪早孕因子胶体金检测试纸卡由胶体金试纸条和扣板式卡槽组成;扣板式卡槽具有一个容置胶体金试纸条的内置空腔,且扣板式卡槽上设置有观察区和加样区;胶体金试纸条主要由支持板、NC膜、金标单克隆抗体垫、样品垫和吸收垫组成;

所述的NC膜设置在支持板的中部,NC膜一侧的支持板上依次粘贴有含有金标单克隆抗体垫和样品垫,NC膜另一侧的支持板上粘贴有吸收垫;

所述NC膜的中部有一条含有猪早孕因子多克隆抗体的检测线和一条含有羊抗鼠二抗的质控线;

胶体金试纸条设置在卡槽的内置空腔内,卡槽的观察区对应胶体金试纸条的显色区,加样孔对应胶体金试纸条的样品垫;

所述载样垫中金标单克隆抗体为鼠源猪早孕因子单克隆抗体;

所述NC膜中猪早孕因子抗体为兔抗猪早孕因子多克隆抗体;所述NC膜中羊抗鼠二抗为羊抗鼠IgG抗体。

2. 如权利要求1所述的猪早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 制备NC膜

兔抗猪早孕因子多克隆抗体的制备:采用原核表达并纯化的猪早孕因子蛋白作为免疫原,提取IgG抗体,制备兔抗猪早孕因子多克隆抗体;

检测线的制备:采用三维喷膜仪,调整喷液量为45~50dots/mL/cm,用包被缓冲液稀释兔抗猪早孕因子多克隆抗体,浓度为45~50 μ g/mL,在NC膜中适当位置划线,即为检测线,晾干备用;所述的包被缓冲液为经过0.40~0.45 μ L滤膜过滤的0.05~0.07M、pH9.6的CBS缓冲液;

质控线的制备:采用三维喷膜仪,调整喷液量为45~48dots/mL/cm,用包被缓冲液稀释羊抗鼠IgG抗体,浓度为1mg/mL,在NC膜上与检测线平行的位置划线,与检测线间隔4~5mm,即为质控线;所述的包被缓冲液为经过0.40~0.45 μ L滤膜过滤的0.03M、pH9.4的CBS缓冲液;

NC膜组装制备:晾干检测线和质控线,得到含有检测线和质控线的NC膜;用封闭工作液将制备的NC膜于室温72h晾干,封存备用;所述的封闭工作液为含质量百分比的2.5%BSA、2.5~3.0%脱脂奶粉和0.01M、pH7.0的CBS缓冲液混合后用0.45~0.48 μ L滤膜过滤得到的封闭工作液。

(2) 制备涂覆金标单克隆抗体垫

用20mM含质量百分比为1.5%BSA、0.1%Na₂CO₃和3%四硼酸钠稀释缓冲液将金标单克隆抗体稀释至终浓度0.05mg/mL;裁取规格为300 $\times$ 7mm的玻璃纤维棉,将金标单克隆抗体溶液用单向喷点仪,以5 μ L/cm的速度(大约20ng/条),均匀喷洒于玻璃纤维棉上,56 $^{\circ}$ C干燥1h,加入干燥剂真空密封后,室温保存备用。

(3) 组装猪早孕因子胶体金检测试纸卡

将涂有检测线和质控线的NC膜粘贴在支持板的中部,在NC膜的一侧依次粘贴含有金标单克隆抗体的玻璃纤维膜和样品垫,在NC膜的另一侧粘贴吸收垫,得到试纸板,将试纸板切割成不同宽度的试纸条,将试纸条安放于卡槽中即为猪早孕因子胶体金检测试纸卡。

(4) 猪早孕因子胶体金检测试纸卡使用及判定

猪早孕因子胶体金检测试纸卡在诊断猪早期妊娠中应用,分离血清,将所得的血清滴加在本试纸卡的样品垫中,样品顺吸水垫上移,当遇到金标单克隆抗体时猪早孕因子与金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体结合,抗原-抗体-金复合物向检测线和质控线移动,猪早孕因子与检测线上的兔抗猪早孕因子多克隆抗体结合,形成一条红色的检测线,阴性血清中无猪早孕因子不能结合金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体,所以无肉眼可见的检测线出现;质控线永远呈红色,如果无色的,表示试纸条失效。

3. 如权利要求 2 所述的猪早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法,其特征在于:步骤(1)中检测线和质控线的线宽为 1mm,两线相距 4mm,位于膜的中间,距 NC 膜的边距 6~7mm。

一种检测猪早孕因子胶体金检测试纸卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物医学免疫检测、诊断领域，具体是涉及一种检测猪早孕因子的胶体金试纸卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 运用早期妊娠诊断方法对提高母猪繁殖效率和养猪业生产效益的十分有帮助，母猪配种后，如果能够尽早的进行妊娠确诊，就能够减少母猪的空怀期或非繁殖天数，增加母猪的平均年产仔窝数，同时有利于对繁殖障碍母猪的及早治疗处理。而现在普遍采用的早期妊娠诊断方法中有的诊断准确率不稳定、有的操作方法步骤繁琐、有的使用仪器昂贵、有的对操作人员经验要求高，在众多检测方法中快速试纸检测能够具备操作简单、灵敏性高、特异性好、价格低廉等诸多优点而具备推广应用价值。

发明内容

[0003] 本发明的主要目的在于提供一种猪早孕因子胶体金检测试纸卡，快速检测母猪早孕因子，用于母猪早期妊娠的临床诊断。本发明创新点在于利用基因克隆技术，人工合成具有天然早孕因子活性的猪早孕因子蛋白，在此基础上得到敏感性高、特性好的鼠源猪早孕因子单克隆抗体，经过试纸卡组装得到猪早孕因子胶体金检测试纸卡。

[0004] 本发明所采用的技术方案是：

[0005] 1、猪早孕因子胶体金检测试纸卡，其特征在于：

[0006] 所述的猪早孕因子胶体金检测试纸卡由胶体金试纸条和扣板式卡槽组成；扣板式卡槽具有一个容置胶体金试纸条的内置空腔，且扣板式卡槽上设置有观察区和加样区；胶体金试纸条主要由支持板、NC膜（硝酸纤维素膜）、金标单克隆抗体垫、样品垫和吸收垫组成；

[0007] 所述的NC膜设置在支持板的中部，NC膜一侧的支持板上依次粘贴有含有金标单克隆抗体垫和样品垫，NC膜另一侧的支持板上粘贴有吸收垫；

[0008] 所述NC膜的中部有一条含有猪早孕因子多克隆抗体的检测线和一条含有羊抗鼠二抗的质控线；

[0009] 胶体金试纸条设置在卡槽的内置空腔内，卡槽的观察区对应胶体金试纸条的显色区，加样孔对应胶体金试纸条的样品垫；

[0010] 所述载样垫中金标单克隆抗体为鼠源猪早孕因子单克隆抗体；所述NC膜中猪早孕因子抗体为兔抗猪早孕因子多克隆抗体；所述NC膜中羊抗鼠二抗为羊抗鼠IgG抗体。

[0011] 2、上述的猪早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法，其特征在于：包括以下步骤：

[0012] （1）制备NC膜

[0013] 兔抗猪早孕因子多克隆抗体的制备：采用原核表达并纯化的猪早孕因子蛋白作为免疫原，提取IgG抗体，制备多克隆抗体；

[0014] 检测线的制备：采用三维喷膜仪，调整喷液量为 45 ~ 50dots/mL/cm，用包被缓冲液稀释兔抗猪早孕因子多克隆抗体，浓度为 45 ~ 50 μ g/mL，在 NC 膜中适当位置划线，即为检测线，晾干备用；所述的包被缓冲液为经过 0.40 ~ 0.45 μ L 滤膜过滤的 0.05 ~ 0.07M、pH9.6 的 CBS 缓冲液（碳酸盐缓冲液）；

[0015] 质控线的制备：采用三维喷膜仪，调整喷液量为 45 ~ 48dots/mL/cm，用包被缓冲液稀释羊抗鼠 IgG 抗体，浓度为 1mg/mL，在 NC 膜上与检测线平行的位置划线，与检测线间隔 4 ~ 5mm，即为质控线；

[0016] NC 膜组装制备：晾干检测线和质控线，得到含有检测线和质控线的 NC 膜；用封闭工作液将制备的 NC 膜于室温 72h 晾干，封存备用；所述的封闭工作液为含质量百分比的 2.5% BSA、2.5 ~ 3.0% 脱脂奶粉和 0.01M、pH7.0 的 CBS 缓冲液混合后用 0.45 ~ 0.48 μ L 滤膜过滤得到的封闭工作液。

[0017] (2) 制备涂覆金标单克隆抗体垫

[0018] 用 20mM 含质量百分比为 1.5% BSA、0.1% NaN_3 和 3% 四硼酸钠稀释缓冲液（水溶液）将金标单克隆抗体稀释至终浓度 0.05mg/mL；裁取规格为 300 $\times$ 7mm 的玻璃纤维棉，将金标单克隆抗体溶液用单向喷点仪，以 5 μ L/cm 的速度（大约 20ng/条），均匀喷洒于玻璃纤维棉上，56 $^{\circ}$ C 干燥 1h，加入干燥剂真空密封后，室温保存备用。

[0019] (3) 组装猪早孕因子胶体金检测试纸卡

[0020] 将涂有检测线和质控线的 NC 膜粘贴在支持板的中部，在 NC 膜的一侧依次粘贴含有金标单克隆抗体的玻璃纤维膜和样品垫，在 NC 膜的另一侧粘贴吸收垫，得到试纸板，将试纸板切割成不同宽度的试纸条，将试纸条安放于卡槽中即为猪早孕因子胶体金检测试纸卡。

[0021] (4) 猪早孕因子胶体金检测试纸卡使用及判定

[0022] 猪早孕因子胶体金检测试纸卡在诊断猪早期妊娠中应用，分离血清，将所得的血清滴加在本试纸卡的样品垫中，样品顺吸水垫上移，当遇到金标单克隆抗体时猪早孕因子与金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体结合，抗原-抗体-金复合物向检测线和质控线移动，猪早孕因子与检测线上的兔抗猪早孕因子多克隆抗体结合，形成一条红色的检测线，阴性血清中无猪早孕因子不能结合金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体，所以无肉眼可见的检测线出现；质控线永远呈红色，如果无色的，表示试纸条失效。

[0023] 进一步地，步骤 (1) 中检测线和质控线的线宽为 1mm，两线相距 4mm，位于膜的中间，距 NC 膜的边距 6 ~ 7mm。

[0024] 有益效果：

[0025] 本发明所述的胶体金试纸卡利用最新抗原表位筛选技术，人工合成具有天然早孕因子活性的猪早孕因子蛋白，在此基础上得到敏感性高、特性好的猪早孕因子单克隆抗体。然后根据现代国际最先进的胶体金免疫层析技术，优化试纸卡组装条件，通过试纸卡中 NC 膜上分别喷涂含兔抗猪早孕因子多克隆抗体的检测线和含羊抗鼠 IgG 抗体的质控线，能够临床检测猪早孕因子，为养猪企业提供一种临床诊断母猪早期妊娠的试纸卡。该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测方便快速的优点，在整个检测过程中不需要使用专业仪器设备，多操作人员要求低，而且试纸卡成本低廉，操作方便，能广泛应用于猪早期妊娠的诊断，为了解母猪孕情和对母猪假孕进行诊断奠定了基础。

附图说明

[0026] 图 1 是本发明的胶体金试纸卡的结构示意图；

[0027] 图中：1、扣板式卡槽 2、支持板，3、加样孔 4、样品垫 5、金标抗体垫 6、NC 膜 7、观察区 8、吸收垫

具体实施方式

[0028] 实施例 1

[0029] 猪早孕因子胶体金检测试纸卡由胶体金试纸条和扣板式卡槽组成；扣板式卡槽具有一个容置胶体金试纸条的内置空腔，且扣板式卡槽上设置有观察区和加样区；胶体金试纸条主要由支持板、NC 膜、金标单克隆抗体垫、样品垫和吸收垫组成；所述的 NC 膜设置在支持板的中部，NC 膜一侧的支持板上依次粘贴有含有金标单克隆抗体垫和样品垫，NC 膜另一侧的支持板上粘贴有吸收垫；所述 NC 膜的中部有一条含有猪早孕因子多克隆抗体的检测线和一条含有羊抗鼠二抗的质控线；胶体金试纸条设置在卡槽的内置空腔内，卡槽的观察区对应胶体金试纸条的显色区，加样孔对应胶体金试纸条的样品垫；所述载样垫中金标单克隆抗体为鼠源猪早孕因子单克隆抗体；所述 NC 膜中猪早孕因子抗体为兔抗猪早孕因子多克隆抗体；所述 NC 膜中羊抗鼠二抗为羊抗鼠 IgG 抗体。

[0030] 实施例 2

[0031] 猪早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法，包括以下步骤：

[0032] (1) 制备 NC 膜

[0033] 兔抗猪早孕因子多克隆抗体的制备：采用原核表达并纯化的猪早孕因子蛋白作为免疫原，提取 IgG 抗体，制备多克隆抗体；

[0034] 检测线的制备：采用三维喷膜仪，调整喷液量为 45 ~ 50 dots/mL/cm，用包被缓冲液稀释兔抗猪早孕因子多克隆抗体，浓度为 45 ~ 50 μ g/mL，在 NC 膜中适当位置划线，即为检测线，晾干备用；所述的包被缓冲液为经过 0.40 ~ 0.45 μ L 滤膜过滤的 0.05 ~ 0.07M、pH9.6 的 CBS 缓冲液；

[0035] 质控线的制备：采用三维喷膜仪，调整喷液量为 45 ~ 48 dots/mL/cm，用包被缓冲液稀释羊抗鼠 IgG 抗体，浓度为 1mg/mL，在 NC 膜上与检测线平行的位置划线，与检测线间隔 4 ~ 5mm，即为质控线；

[0036] NC 膜组装制备：晾干检测线和质控线，得到含有检测线和质控线的 NC 膜；用封闭工作液将制备的 NC 膜于室温 72h 晾干，封存备用；所述的封闭工作液为含质量百分比的 2.5% BSA、2.5 ~ 3.0% 脱脂奶粉和 0.01M、pH7.0 的 CBS 缓冲液混合后用 0.45 ~ 0.48 μ L 滤膜过滤得到的封闭工作液。

[0037] (2) 制备涂覆金标单克隆抗体垫

[0038] 用 20mM 含质量百分比为 1.5% BSA、0.1% NaN_3 和 3% 四硼酸钠稀释缓冲液将金标单克隆抗体稀释至终浓度 0.05mg/mL；裁取规格为 300 $\times$ 7mm 的玻璃纤维棉，将金标单克隆抗体溶液用单向喷点仪，以 5 μ L/cm 的速度（大约 20ng/条），均匀喷洒于玻璃纤维棉上，56 $^{\circ}$ C 干燥 1h，加入干燥剂真空密封后，室温保存备用。

[0039] (3) 组装猪早孕因子胶体金检测试纸卡

[0040] 将涂有检测线和质控线的 NC 膜粘贴在支持板的中部,在 NC 膜的一侧依次粘贴含有金标单克隆抗体的玻璃纤维膜和样品垫,在 NC 膜的另一侧粘贴吸收垫,得到试纸板,将试纸板切割成不同宽度的试纸条,将试纸条安放于卡槽中即为猪早孕因子胶体金检测试纸卡。

[0041] (4) 猪早孕因子胶体金检测试纸卡使用及判定

[0042] 猪早孕因子胶体金检测试纸卡在诊断猪早期妊娠中应用,分离血清,将所得的血清滴加在本试纸卡的样品垫中,样品顺吸水垫上移,当遇到金标单克隆抗体时猪早孕因子与金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体结合,抗原-抗体-金复合物向检测线和质控线移动,猪早孕因子与检测线上的兔抗猪早孕因子多克隆抗体结合,形成一条红色的检测线,阴性血清中无猪早孕因子不能结合金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体,所以无肉眼可见的检测线出现;质控线永远呈红色,如果无色的,表示试纸条失效。

[0043] 其中,步骤(1)中检测线和质控线的线宽为 1mm,两线相距 4mm,位于膜的中间,距 NC 膜的边距 6~7mm。

[0044] 实施例 3

[0045] 1 制备鼠抗猪早孕因子单克隆抗体、兔抗猪早孕因子多克隆抗体

[0046] 1.1 鼠抗猪早孕因子基因单克隆抗体的制备

[0047] 根据 GenBank 中猪 EPF(猪早孕因子)基因核苷酸序列以及国际最新研究 EPF 的空间构象及表位预测,利用 Primer Premier 5.0 软件设计出 EPF 上游引物 5'-CGGGATCCATGGCAGGACAAGCTTTTAG-3'下游引物 5'-CCG CTCGAGGGATCCTCTTGGAACCAAGTCGACGTACTTTCCAA GA-3'。以猪骨骼肌卫星细胞为材料,利用经典 TRIzol 法提取总 RNA,RT-PCR 获得 DNA。利用设计好引物 PCR 方法得到大小为 341bp 的 EPF 基因片段。获得基因片段送去上海生工测序结果显示与猪 EPF 同源性为 99.9%未发生变异。

[0048] 1.2 PET-28 α -EPF/BL21 表达载体的构建及蛋白表达

[0049] 以 PMD-19T-EPF 为底物进行 PCR 扩增目的片段,胶回收后 XhoI、BamHI 双酶切、T4 连接、转入 DH5 α 、菌落 PCR 验证阳性菌落,标记为 PET28 α -EPF/DH5 α 提取质粒 PET28 α -EPF,双酶切验证。对双酶切验证正确的质粒进行测序。将质粒 PET28 α -EPF 转入表达菌 BL21,菌落 PCR 证实成功构建表达载体 PET-28 α -EPF/BL21。以表达载体 PET-28 α -EPF/BL21 为材料,按 0.1%量添加 IPTG,在 LB 培养基中进行原核表达,表达产物经超声波处理后得到与预期蛋白大小 16Kb 目的条带一致产物,目的蛋白在沉淀和上清中均有大量表达。

[0050] 1.3 PET-28 α -EPF/BL21 表达蛋白的纯化。采用 NI-NTA 作为填料进行镍柱纯化,结果显示纯化效果良好,目的蛋白纯度较高,经蛋白浓度检测试剂盒得目的蛋白浓度为 450ug/ml。

[0051] 1.4 兔抗 PET-28 α -EPF/BL21 蛋白多克隆血清抗体的制备

[0052] 纯化后 EPF 蛋白经透析处理后,收集血清,-20℃保存。

[0053] 1.5 鼠抗猪早孕因子单克隆抗体的制备

[0054] 取小鼠脾脏淋巴细胞和用含 10%犊牛血清的 DMEM 培养基培养的 SP2/0 细胞按 10:1 比例加聚乙二醇 2000 进行融合,将融合孔中的上清液用 ELISA 方法进行检测,确定阳性孔。将检测到的阳性孔中的杂交瘤细胞采用有限稀释法进行亚克隆,直至杂交瘤细胞上

清液的阳性率达到 100%，建立杂交瘤细胞系。将建系的杂交瘤细胞扩大培养，提取并浓缩上清液中的抗体，即得单克隆抗体。

[0055] 2 制备 NC 膜

[0056] 2.1 检测线试剂的准备

[0057] 将兔抗猪早孕因子多克隆抗体从 -80°C 冰箱中取出，室温平衡 20min，用灭菌生理盐水将其配制成 1.0mg/ml ，用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤备用。

[0058] 2.2 质控线试剂的准备

[0059] 购买商品化的羊抗鼠 IgG 二抗， -80°C 冰箱保存。使用前用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

[0060] 2.3 检测线和质控线的制备

[0061] 将 NC 膜放于三维喷膜仪平台上，放上压条将其固定；将浓度为 1.0mg/ml 的兔抗猪早孕因子多克隆抗体放于特定容器，浓度为 0.54mg/ml 的羊抗鼠 IgG 二抗放于另一容器；打开三维喷膜仪电源，启动机器，将兔抗猪早孕因子多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 二抗分别点射于膜上，约 50dots/ml/cm ，形成两条线，分别为检测线（T 线）和质控线（C 线），线宽约 1mm ，两线相距 4mm ，位于膜的中间，距膜的边距约 7mm 。室温自然干燥 72h 后，加入干燥剂密封，室温保存备用。

[0062] 3 制备金标单克隆抗体垫

[0063] 3.1 鼠抗猪早孕因子单克隆抗体的制备

[0064] 采用原核表达并纯化的猪早孕因子蛋白作为免疫原，取脾脏细胞与 SP2/0 瘤细胞进行融合后获得单克隆抗体；用生理盐水调整至 0.54mg/ml ，用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤， -20°C 保存备用。

[0065] 3.2 金标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体的制备

[0066] 3.2.1 标记前处理：将待标鼠抗猪早孕因子单克隆抗体溶液装入透析袋中，用生理盐水做透析液，在 4°C 数控层析冷柜中，磁力搅拌器搅拌透析 $48\sim 72\text{h}$ ，每间隔 6h 更换 1 次透析液，取出透析后的鼠抗猪早孕因子单克隆抗体溶液， 10000r/min 离心 20min，除去杂质，生理盐水调整浓度至 1.0mg/ml ， -20°C 冻存备用。胶体金用 0.1mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 至 7.5，室温保存备用。

[0067] 3.2.3 最佳抗体（鼠抗猪早孕因子单克隆抗体）标记量的确定

[0068] 取酶标板 10 孔，每孔 $30\text{ }\mu\text{l}$ DDW 铺底，第一孔加入浓度为 1mg/ml 的鼠抗猪早孕因子单克隆抗体 $10\text{ }\mu\text{l}$ 补加 $20\text{ }\mu\text{l}$ DDW，之后进行倍比至第 9 孔，第 10 孔为空白对照；每孔加入 $125\text{ }\mu\text{l}$ pH 7.5 的胶体金溶液，室温反应 $5\sim 10\text{min}$ ，加入 100g/L NaCl 溶液 $125\text{ }\mu\text{l}$ ，室温反应 10min，观察显色情况，对照孔与鼠抗猪早孕因子单克隆抗体量不足以稳定金溶胶的各孔呈现由红变蓝的聚沉现象，而鼠抗猪早孕因子单克隆抗体量达到或超过最低稳定量的各管仍保持红色不变，选择颜色没有发生变化的最低鼠抗猪早孕因子单克隆抗体量的孔为最佳标金量，该孔中鼠抗猪早孕因子单克隆抗体的量乘以 8 即为 1mL 胶体金所需的鼠抗猪早孕因子单克隆抗体的量。

[0069] 3.2.4 胶体金标记鼠抗猪早孕因子单克隆抗体

[0070] 向 100mL pH 7.5 的胶体金溶液中缓慢地加入适量的鼠抗猪早孕因子单克隆抗体溶液，混匀后，RT 温育 40min；缓慢加入 10% BSA 至其终浓度为 1% (W/V)，混匀后，RT 孵育

15min;12000r/min,4℃,离心 25min,弃上清;沉淀用 2%的 BSA 重悬,12000r/min,4℃离心 25min,弃上清;沉淀用 TB 缓冲液调整金标抗体至 0.2mg/mL,充分吹打后,4℃保存备用。

[0071] 3.2.5 制备涂覆金标抗体垫

[0072] 用 20mM 含 1.5% BSA 和 0.1% Na₃B₄O₇ 四硼酸钠稀释缓冲液将金标抗体稀释至终浓度 0.05mg/ml;裁取规格为 300×7mm 的玻璃纤维棉,将金标抗体溶液用单向喷点仪,以 5ul/cm 的速度(大约 20ng/条),均匀喷洒于玻璃纤维棉上,56℃干燥 1h,加入干燥剂真空密封后,RT 保存备用。

[0073] 4 制备猪早孕因子胶体金检测试纸卡

[0074] 将含有检测线和质控线的 NC 膜粘贴在支持板的中部,在 NC 膜的一侧依次粘贴含有金标抗体的玻璃纤维膜和样品垫,在 NC 膜的另一侧粘贴吸收垫,得到试纸板将组装的半成品试纸放入切割机槽内进行切割成 4.08mm 宽的试纸条,将每根试纸分别装入塑料试纸卡中,压壳机将壳封闭,制备成成品检测试纸卡,试纸卡装入避光的铝箔袋中,封口机封口,打上生产时间和批次,室温保存备用。

[0075] 上述实施例为本发明的有效的实施方式,但本发明实施方式并不局限于上述实施方式的限制,根据每批次的生产实际情况,来调整具体的实施条件,整体没有特别大的改变。其他发明没有背离此发明基本原则和操作方法所作出的替代、组合、优化等均在本发明的有效保护范围内。

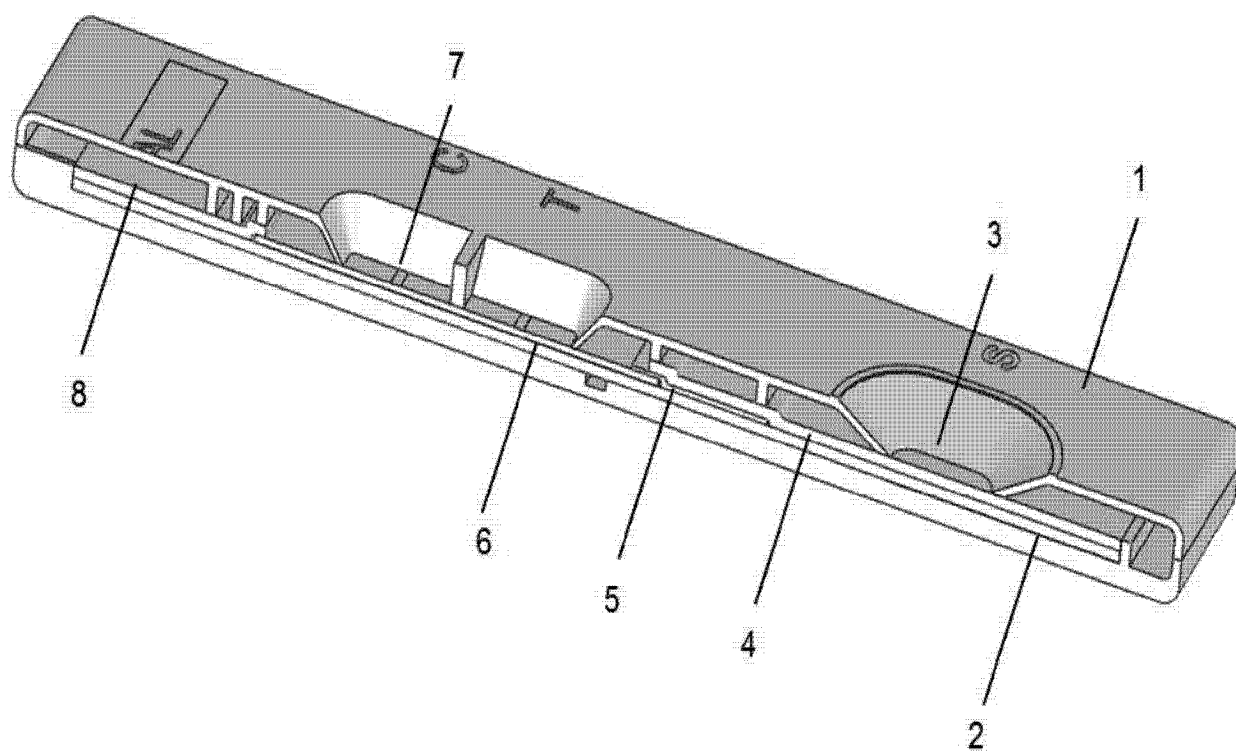


图 1

专利名称(译)	一种检测猪早孕因子胶体金检测试纸卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN104865381A	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201510193313.8	申请日	2015-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	河南省康星药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	河南省康星药业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南省康星药业股份有限公司		
[标]发明人	张国祖 王兴涛 马霞 王林 杨帅 刘梅		
发明人	张国祖 王兴涛 马霞 王林 杨帅 刘梅		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	安娜		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的主要目的在于提供一种猪早孕因子胶体金检测试纸卡，快速检测母猪早孕因子，用于母猪早期妊娠的临床诊断。本发明的创新点在于利用基因克隆技术，人工合成具有天然早孕因子活性的猪早孕因子蛋白，在此基础上得到敏感性高、特性好的猪早孕因子单克隆抗体，经过试纸卡组装条件优化得到猪早孕因子胶体金检测试纸卡。该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测方便快速的优点，在整个检测过程中不需要使用专业仪器设备，多操作人员要求低，而且试纸卡成本低廉，操作方便，能广泛应用于猪早期妊娠的诊断，为了解母猪孕情和对母猪假孕进行诊断奠定了基础。

