

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253198 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110188925. X

(22) 申请日 2011. 07. 07

(71) 申请人 贵州大学

地址 550025 贵州省贵阳市贵州大学花溪北  
校区科技处

(72) 发明人 刘忠伟 周碧君 程振涛 文明  
王开功 嵇辛勤 岳筠 汪德生

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所  
52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

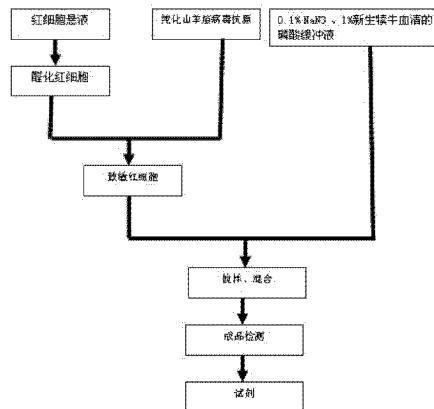
权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法及  
检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种能够检测山羊痘抗体的山羊痘正向间接血凝诊断试剂及其制备方法、检测方法。制备方法为：以戊二醛和绵羊红细胞混合制备红细胞悬液，与等量的纯化山羊痘病毒混合，经搅拌、离心、洗涤，用含 1% 新生犊牛血清的 PBS 配成 1% 致敏红细胞，即制成为山羊痘正向间接血凝诊断试剂。经优化的制备条件是：采用戊二醛单醛化法固定红细胞，致敏红细胞浓度 0.8% ~ 1.0%，抗原含量控制在  $20 \mu \text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 200 \mu \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间，可以达到较好的致敏效果；检测方法按常规正向间接血凝试验方法进行，反应温度 20 ~ 25°C，反应时间 50min。该方法具有较好的特异性、敏感性和可重复性，可用于兽医临幊上山羊痘抗体快速检测。



1. 一种山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

第一,无菌采集健康绵羊静脉血,加10倍量PBS,2 000 转 / 分离心 15 分钟,洗 5 遍,以 0.1M pH 7.4 ~ 7.8 磷酸缓冲液配成 2.5% 的红细胞悬液;

第二,将步骤一制得的红细胞悬液与 1% 戊二醛以 9:1 体积比混合,于室温下缓慢搅拌 1h,2000 转 / 分离心 15 分钟,用磷酸缓冲液洗 5 遍,制得醛化红细胞;

第三,将步骤二制得的上述醛化红细胞沉淀物溶于 10 倍量的磷酸缓冲液中,再与等量纯化山羊痘病毒混合,置于室温条件下搅拌 2 小时,2000 转 / 分离心 15 分钟,制得致敏红细胞;所使用的纯化山羊痘病毒抗原含量控制在 20  $\mu$  g/mL ~ 200  $\mu$  g/mL 之间;

第四,将步骤三制得的致敏红细胞沉淀物用含 0.1%  $\text{NaN}_3$  、1% 新生犊牛血清的磷酸缓冲液洗涤 5 次,并搅拌混合,配成 0.8% ~ 1% 致敏红细胞;

第五,分析检测合格即制得正向间接血凝诊断试剂。

2. 一种山羊痘正向间接血凝诊断试剂检测山羊痘抗体的方法,其特征在于:如权利要求 1 所述的山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法制备的山羊痘正向间接血凝诊断试剂,检测步骤按常规正向间接血凝试验方法进行,其步骤为:在 96 孔 V 形板中进行,每个样品为一组,每组 1 ~ 12 孔加入 PBS 50  $\mu$  L,然后在第一孔加入待检样品 50  $\mu$  L,用移液枪逐孔稀释至第 11 孔,弃 50  $\mu$  L,第 12 孔为 PBS 空白对照;最后每孔加入山羊痘正向间接血凝诊断试剂 50  $\mu$  L,振荡混合后,置室温作用 50min,判定结果;凡红细胞沉积于孔底,集中呈 1 个圆点的为不凝集;如红细胞凝集,则分布于孔底周围;根据红细胞凝集的程度判断阳性反应的强弱,以出现 50% 以上凝集现象的血清最高稀释度为检测抗体的效价;

所述试剂的检测反应条件为:反应温度 20 ~ 25°C,反应时间 50min。

## 山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法及检测方法。

### 背景技术

[0002] 山羊痘是由山羊痘病毒属山羊痘病毒(goat poxvirus, GTPV)引起的一种呈地方流行的高度接触性传染病。一年四季均可发生,春秋常见,不分性别、年龄、品种。世界动物卫生组织(OIE)将山羊痘列为A类重大传染病,1999年中华人民共和国农业部第96号公告将山羊痘列为国家一类动物疫病。近年来,我国二十多个省市相继报导山羊痘发生流行,给我国蓬勃兴起的山羊养殖业造成了极大经济损失,带来了严峻的威胁。常用的琼脂扩散试验检测方法,具有敏感性低、检测速度慢、特异性不强等缺点。为此,需要建立一种敏感、快速、准确、简便的方法来检测山羊痘抗体,以有效地开展山羊痘血清学监测和流行病学调查。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题在于,提供一种山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法及检测方法,该山羊痘正向间接血凝诊断试剂能够快速、准确的检测山羊痘抗体,试验敏感性高、检测速度快,用于兽医临幊上山羊痘抗体快速、大量检测,为山羊痘的临幊诊断与预防控制提供参考依据。

[0004] 本发明的山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法,它包括以下步骤:

第一,无菌采集健康绵羊静脉血,加10倍量PBS,2000转/分离心15分钟,洗5遍,以0.1M--pH 7.4~7.8磷酸缓冲液配成2.5%的红细胞悬液;

第二,将步骤一制得的红细胞悬液与1%戊二醛以9:1体积比混合,于室温下缓慢搅拌1h,2000转/分离心15分钟,用磷酸缓冲液洗5遍,制得醛化红细胞;

第三,将步骤二制得的上述醛化红细胞沉淀物溶于10倍量的磷酸缓冲液中,再与等量纯化山羊痘病毒混合,置于室温条件下搅拌2小时,2000转/分离心15分钟,制得致敏红细胞;所述的纯化山羊痘病毒抗原含量控制在20 μg/mL~200 μg/mL之间;

第四,将步骤三制得的致敏红细胞沉淀物用含0.1%NaN3、1%新生犊牛血清的磷酸缓冲液洗涤5次,并搅拌混合,配成0.8%~1%致敏红细胞;

第五,分析检测合格即制得正向间接血凝诊断试剂。

[0005] 山羊痘正向间接血凝诊断试剂检测山羊痘抗体的方法,如上述所述的山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法制备的山羊痘正向间接血凝诊断试剂,其检测步骤按常规正向间接血凝试验方法进行。其步骤为:在96孔V形板中进行,每个样品为一组,每组1~12孔加入PBS 50 μL,然后在第一孔加入待检样品50 μL,用移液枪逐孔稀释至第11孔,弃50 μL,第12孔为PBS空白对照。最后每孔加入山羊痘正向间接血凝诊断试剂50 μL,振荡混合后,置室温作用50min,判定结果。凡红细胞沉积于孔底,集中呈1个圆点的为不凝集;如红细胞凝集,则分布于孔底周围。根据红细胞凝集的程度判断阳性反应的强弱,以出现

50%以上凝集现象(++)的血清最高稀释度为检测抗体的效价。

[0006] 所述试剂的检测反应条件为:反应温度20~25℃,反应时间50min。

[0007] 本发明有益效果:本发明的试剂及方法适用于兽医临幊上快速、大量检测山羊痘抗体,为山羊痘的临幊诊断与预防控制提供参考依据。本发明与现有技术相比,具有以下的技术优势和积极效果:

(1) 速度快:与琼脂扩散试验相比,正向间接血凝试验检测速度更快,在试剂准备好的情况下,50分钟即可判定结果;

(2) 敏感性高:能检测出较低效价的抗体,敏感性较琼脂扩散试验高。

## 附图说明

[0008] 图1为本发明的山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备流程图。

## 具体实施方式

[0009] 本发明的实施例:本发明的山羊痘正向间接血凝诊断试剂各组分为:pH 7.4 磷酸缓冲液、戊二醛、绵羊红细胞、纯化山羊痘病毒抗原、新生犊牛血清、NaN<sub>3</sub>。

[0010] 如图1所示,本发明的山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法,包括以下步骤:

第一,无菌采集健康绵羊静脉血,加10倍量PBS,2000转/分离心15分钟,洗5遍,以0.1M--pH 7.4~7.8 磷酸缓冲液配成2.5%的红细胞悬液;

第二,将步骤一制得的红细胞悬液与1%戊二醛以9:1体积比混合,于室温下缓慢搅拌1h,2000转/分离心15分钟,用磷酸缓冲液洗5遍,制得醛化红细胞;

第三,将步骤二制得的上述醛化红细胞沉淀物溶于10倍量的磷酸缓冲液中,再与等量纯化山羊痘病毒混合,置于室温条件下搅拌2小时,2000转/分离心15分钟,制得致敏红细胞;所述的纯化山羊痘病毒抗原含量控制在20 μg/mL~200 μg/mL之间;

第四,将步骤三制得的致敏红细胞沉淀物用含0.1% NaN<sub>3</sub>、1%新生犊牛血清的磷酸缓冲液洗涤5次,并搅拌混合,配成0.8%~1%致敏红细胞;

第五,分析检测合格即制得正向间接血凝诊断试剂。

[0011] 所述成分中致敏红细胞浓度0.8%~1.0%,纯化山羊痘病毒抗原含量控制在20 μg/mL~200 μg/mL之间为最佳制备条件。

[0012] 山羊痘正向间接血凝诊断试剂检测山羊痘抗体的方法,其检测步骤按常规正向间接血凝试验方法进行。其步骤为:在96孔V形板中进行,每个样品为一组,每组1~12孔加入PBS 50 μL,然后在第一孔加入待检样品50 μL,用移液枪逐孔稀释至第11孔,弃50 μL,第12孔为PBS空白对照。最后每孔加入山羊痘正向间接血凝诊断试剂50 μL,振荡混合后,置室温作用50min,判定结果。凡红细胞沉积于孔底,集中呈1个圆点的为不凝集;如红细胞凝集,则分布于孔底周围。根据红细胞凝集的程度判断阳性反应的强弱,以出现50%以上凝集现象(++)的血清最高稀释度为检测抗体的效价。

[0013] 所述试剂的检测反应条件为:反应温度20~25℃,反应时间50min。

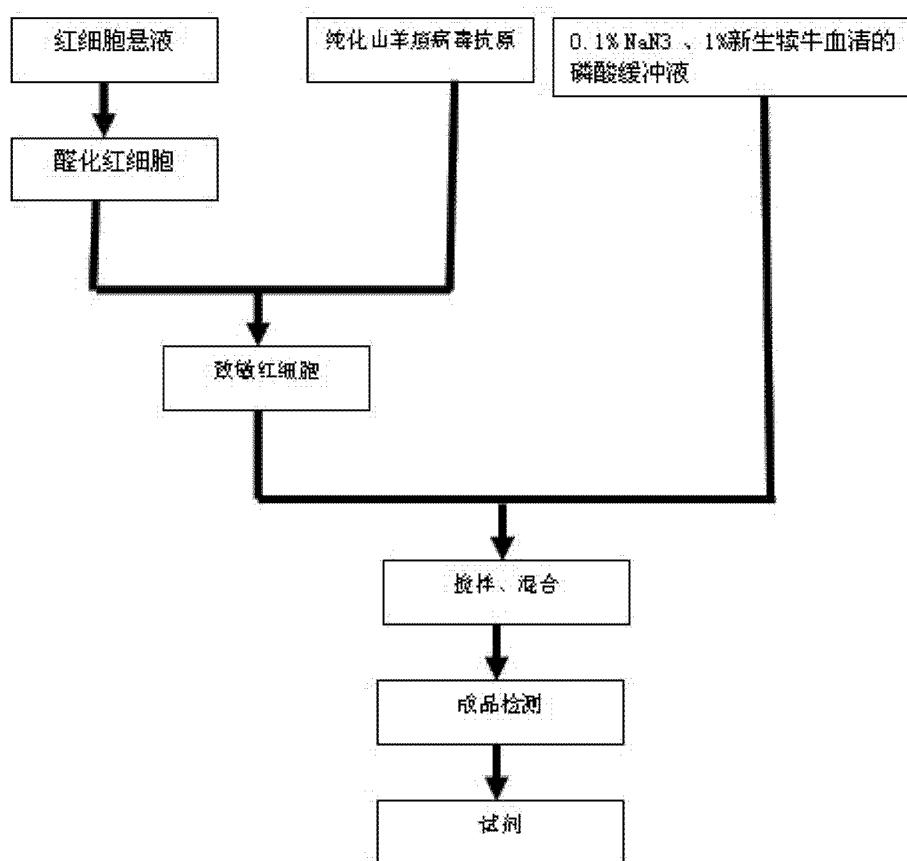


图 1

专利名称(译)	山羊痘正向间接血凝诊断试剂的制备方法及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102253198A</a>	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201110188925.X	申请日	2011-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	贵州大学		
申请(专利权)人(译)	贵州大学		
当前申请(专利权)人(译)	贵州大学		
[标]发明人	刘忠伟 周碧君 程振涛 文明 王开功 嵇辛勤 岳筠 汪德生		
发明人	刘忠伟 周碧君 程振涛 文明 王开功 嵇辛勤 岳筠 汪德生		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种能够检测山羊痘抗体的山羊痘正向间接血凝诊断试剂及其制备方法、检测方法。制备方法为：以戊二醛和绵羊红细胞混合制备红细胞悬液，与等量的纯化山羊痘病毒混合，经搅拌、离心、洗涤，用含1%新生犊牛血清的PBS配成1%致敏红细胞，即制成为山羊痘正向间接血凝诊断试剂。经优化的制备条件是：采用戊二醛单醛化法固定红细胞，致敏红细胞浓度0.8%~1.0%，抗原含量控制在20 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>~200 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>之间，可以达到较好的致敏效果；检测方法按常规正向间接血凝试验方法进行，反应温度20~25°C，反应时间50min。该方法具有较好的特异性、敏感性和可重复性，可用于兽医临幊上山羊痘抗体快速检测。

