



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102288756 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201110188924. 5

(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 33/571 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

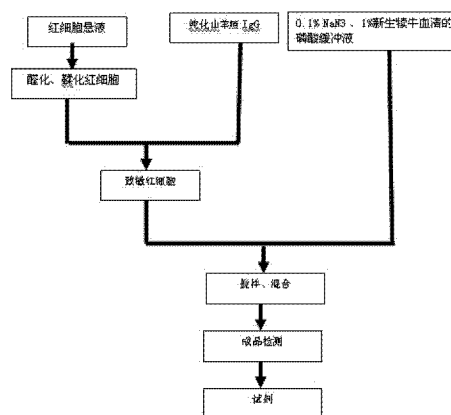
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

山羊痘反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原的山羊痘反向间接血凝诊断试剂的制备方法  
及检测方法。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 IgG 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，此即为山羊痘反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%，IgG 含量控制在 1. 5 ~ 1. 55mg. ml<sup>-1</sup>，  
可以达到较好的标记效果；该试剂用于检测山羊痘病毒抗原按常规反向间接血凝试  
验方法进行，反应温度 20 ~ 25℃，反应时间 50min。该方法具有较好的特异性、敏  
感性和可重复性，可用于兽医临床上山羊痘抗原快速检测。



1. 一种山羊痘反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 的磷酸缓冲液配成 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,重新制成 2.5% 的醛化红细胞悬浮液;

第三,将步骤二制得的醛化红细胞悬浮液与等量 1 / 200 000 新鲜鞣酸溶液混合,置于 37℃ 的水浴锅中 1 小时后取出,用磷酸缓冲液洗涤 3 次,2000 转 / 分离心 15 分钟,制成醛化、鞣化的沉淀红细胞;

第四,将步骤三制得的沉淀红细胞加入 10 倍量 0.1M— pH 3 ~ 4 的醋酸盐缓冲液中,再与等量纯化山羊痘 IgG 稀释液混合,置于 37℃ 2h,其间每隔 15min 吹吸混匀 1 次,制得 0.8% ~ 1% 致敏红细胞悬液;所使用的纯化山羊痘 IgG 含量控制在 1.5 ~ 1.55mg/mL;

第五,将步骤四制得的致敏红细胞 2000 转 / 分离心 15 分钟,取沉淀红细胞用含 0.1%  $\text{NaN}_3$ 、1% 新生小牛血清的磷酸缓冲液洗涤 5 次,最后配成浓度 0.8% ~ 1% 致敏红细胞悬液诊断试剂;

第六,分析检测合格即得反向间接血凝诊断试剂。

2. 一种山羊痘反向间接血凝诊断试剂检测山羊痘病毒抗原的方法,其特征在于:如权利要求 1 所述的山羊痘反向间接血凝诊断试剂的制备方法制备的山羊痘反向间接血凝诊断试剂,检测步骤按常规反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  $\mu\text{L}$ ,然后在第一孔加入待检样品 50  $\mu\text{L}$ ,用移液枪逐孔稀释至第 11 孔,弃 50  $\mu\text{L}$ ,第 12 孔为 PBS 空白对照;最后每孔加入山羊痘反向间接血凝诊断试剂 50  $\mu\text{L}$ ,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℃,反应时间 50min。

## 山羊痘反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反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。

[0003] 以往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。

[0004] 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病毒抗原,以用于山羊痘快速检测、诊断。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题在于,提供一种山羊痘反向间接血凝诊断试剂的制备方法及检测方法,该山羊痘反向间接血凝诊断试剂能够快速、准确的检测山羊痘抗原,反向间接血凝试验敏感性更高、检测速度更快,用于兽医临床上山羊痘病毒抗原快速检测,为山羊痘的临床诊断与预防控制提供参考依据,以克服现有技术存在的敏感性低、检测速度慢、特异性不强等不足。

[0006] 本发明的山羊痘反向间接血凝诊断试剂,其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的磷酸缓冲液配成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,重新制成2.5%的醛化红细胞悬浮液;

第三,将步骤二制得的醛化红细胞悬浮液与等量1/200000新鲜鞣酸溶液混合,置于37℃的水浴锅中1小时后取出,用磷酸缓冲液洗涤3次,2000转/分离心15分钟,制成醛化、鞣化的沉淀红细胞;

第四,将步骤三制得的沉淀红细胞加入10倍量0.1M pH 3~4的醋酸盐缓冲液中,再与等量纯化山羊痘IgG稀释液混合,置于37℃ 2h,其间每隔15min吹吸混匀1次,制得0.8%~1%致敏红细胞悬液;所使用的纯化山羊痘IgG含量控制在1.5~1.55mg/mL;

第五,将步骤四制得的致敏红细胞2000转/分离心15分钟,取沉淀红细胞用含0.1%NaN<sub>3</sub>、1%新生小牛血清的磷酸缓冲液洗涤5次,最后配成浓度0.8%~1%致敏红细胞悬液诊断试剂;

第六,分析检测合格即得反向间接血凝诊断试剂。

[0007] 山羊痘反向间接血凝诊断试剂检测山羊痘病毒抗原的方法,如上述所述的山羊痘

反向间接血凝诊断试剂的制备方法制备的山羊痘反向间接血凝诊断试剂,检测步骤按常规反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反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。

[0008] 所述试剂的检测反应条件为:反应温度 20~25 $^{\circ}$ C,反应时间 50min。

[0009] 本发明有益效果:本发明的诊断试剂及制备方法可用于兽医临床上山羊痘抗原的快速、大量检测,为山羊痘的临床诊断提供依据。与常用的琼脂扩散试验相比,反向间接血凝试验具有敏感性更高、检测速度更快、特异性更强的优点。

## 附图说明

[0010] 图 1 为本发明的山羊痘反向间接血凝诊断试剂的制备流程图。

## 具体实施方式

[0011] 本发明的实施例:本发明的山羊痘反向间接血凝诊断试剂的各组分为:磷酸缓冲液(0.1M,pH 7.4)、醋酸盐缓冲液(0.1M,pH 3~4)、戊二醛、鞣酸、绵羊红细胞、纯化山羊痘 IgG、新生犊牛血清、 $\text{NaN}_3$ 。

[0012] 如图 1 所示意,本发明的山羊痘反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,2 000 转/分离心 15 分钟,洗 5 遍,以磷酸缓冲液(0.1M,pH 7.4)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,重新制成 2.5%的悬浮液;

第三,将步骤二制得红细胞悬浮液与等量 1/200 000 新鲜鞣酸溶液混合,置于 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中 1 小时后取出,用磷酸缓冲液洗涤 3 次,2000 转/分离心 15 分钟;

第四,将步骤三制得的沉淀红细胞加入 10 倍量醋酸盐缓冲液(0.1M,pH 3~4)中,再与等量纯化 IgG 稀释液混合,置于 37 $^{\circ}$ C 2h,其间每隔 15min 吹吸混匀 1 次;所使用的纯化山羊痘 IgG 含量为 1.549mg/mL;

第五,将步骤四制得的致敏红细胞 2000 转/分离心 15 分钟,取沉淀红细胞用含 0.1%  $\text{NaN}_3$ 、1%新生小牛血清的磷酸缓冲液洗涤 5 次,最后配成 0.8%~1.0%致敏红细胞悬液诊断试剂;

第六,分析检测合格即制得反向间接血凝诊断试剂;

山羊痘反向间接血凝诊断试剂检测山羊痘病毒抗原的方法,检测步骤按常规反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反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。

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

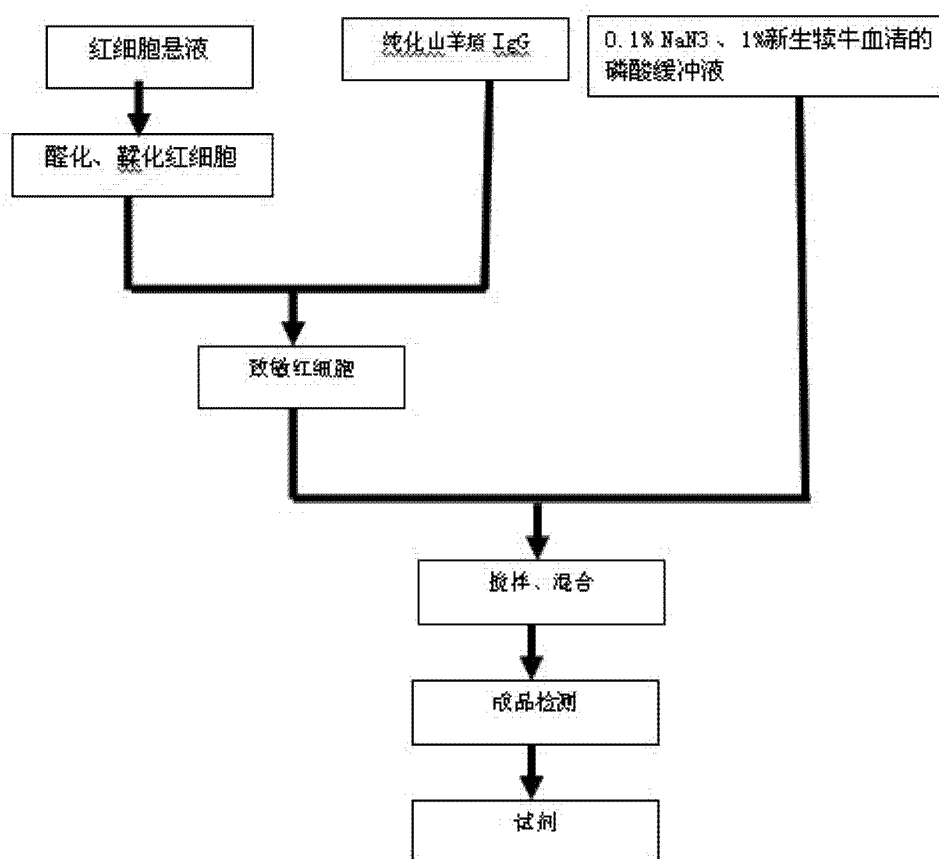


图 1

专利名称(译)	山羊痘反向间接血凝诊断试剂的制备方法及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102288756A</a>	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201110188924.5	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	G01N33/571 G01N33/531		
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原的山羊痘反向间接血凝诊断试剂的制备方法及其检测方法。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IgG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，此即为山羊痘反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%，IgG含量控制在1.5~1.55mg.ml<sup>-1</sup>，可以达到较好的标记效果；该试剂用于检测山羊痘病毒抗原按常规反向间接血凝试验方法进行，反应温度20~25℃，反应时间50min。该方法具有较好的特异性、敏感性和可重复性，可用于兽医临床上山羊痘抗原快速检测。

