



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102183653 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(21) 申请号 201110067042.3

C12N 15/70 (2006.01)

(22) 申请日 2011.03.21

C07K 14/44 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

(71) 申请人 吉林大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号

(72) 发明人 宫鹏涛 张西臣 刁玉梅 李建华
张国才 杨举 张楠 李赫
邢沈阳

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C12N 15/30 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条及其制备方法,它包含硝酸纤维素膜及其两端的金标垫和吸收垫,金标垫上端为样品垫,金标垫包被有纯化的 CSpV-S 蛋白单克隆抗体胶体金偶联标记物,检测线包被有纯化的单克隆抗体,质控线包被有羊抗鼠 IgG 抗体,质控线侧贴有吸收垫。本研究将酶联免疫原理和胶体金层析技术结合,制备检测 *C. parvum* 的胶体金试纸条,并拟应用于临床,提高 *C. parvum* 的防治能力,具有操作简单快速、检测结果清楚易于判断、特异性强、敏感性高、无须仪器设备或只需简单的仪器等优点,因此非常适于发病现场、门诊以及实验条件不具备的场所等临床样品检测使用。

1. 一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条,包括样品垫、金标垫、吸收垫、硝酸纤维素膜组成,其特征在于:金标垫包被有 CSpV-S 蛋白单克隆抗体胶体金偶联标记物,检测线包被有纯化的单克隆抗体,质控线包被有羊抗鼠 IgG 抗体,质控线侧贴有吸收垫。

2. 权利要求 1 所述微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条的制备方法,包括下述步骤:

(1) CSpV-S 蛋白的原核表达与纯化:以 *C. parvum* 总 RNA 的 cDNA 为模板,扩增 CSpV-S 基因片段,构建重组表达质粒 pET-28a(+)-S,并在大肠杆菌中诱导表达,利用 Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化表达的蛋白;

(2) CSpV-S 蛋白单克隆抗体的制备:将纯化的 CSpV-S 蛋白分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂等比例混合乳化后作为免疫原,免疫 BALB/c 小鼠,待抗体效价达到 10^5 时,取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞融合,筛选出能稳定分泌抗 CSpV-S 蛋白抗体的杂交瘤阳性细胞株,并进行单克隆抗体的大量制备,利用 HiTrap Protein G HP 纯化单克隆抗体;

(3) 胶体金溶液及金标蛋白的制备:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,确定胶体金与 CSpV-S 蛋白单克隆抗体用量比例,制备金标 CSpV-S 蛋白的单克隆抗体偶联标记物,采用低温超速离心法纯化金标 CSpV-S 蛋白单克隆抗体;

(4) 试纸条的组装:将金标 CSpV-S 蛋白单克隆抗体用喷点仪喷点玻璃纤维素膜, CSpV-S 蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体分别喷涂于硝酸纤维素膜检测线和质控线上,将处理好的硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜、样品垫、吸水垫等材料按顺序进行粘贴、组装、切条、密封, 4°C 保存。

一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明提供一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条,用于人隐孢子虫及微小隐孢子虫的检测,本发明还公开了上述试纸条的制备方法,属于寄生虫检测技术领域。

背景技术

[0002] 隐孢子虫是普遍存在的胃肠道寄生性原虫,能引起人与家畜的群体腹泻。含有隐孢子虫卵囊的人、家畜、宠物和野生动物的粪便,直接威胁饮用水安全,导致隐孢子虫病呈水源性大规模暴发。分子流行病学研究结果显示,大多数人隐孢子虫病是由人隐孢子虫和微小隐孢子虫引起的。所有人隐孢子虫和微小隐孢子虫中均含有微小隐孢子虫病毒,呈球形,直径约 31 nm,为 dsRNA 病毒,含 larger dsRNA(L-dsRNA) 和 smaller dsRNA(S-dsRNA) 两种核酸,而隐孢子虫属其他种不含该病毒。其中 S-dsRNA 只有一个开放阅读框架,编码衣壳蛋白。S-dsRNA 核酸有望作为对人具有感染性的隐孢子虫(人隐孢子虫和微小隐孢子虫)与其他种类隐孢子虫鉴别的一个分子标记,和含病毒虫株的分离与鉴定的依据。

[0003] 传统的微小隐孢子虫检测方法如粪便浓集、改良抗酸染色和免疫荧光染色法等,步骤繁琐,敏感性低;动物感染试验可以检测隐孢子虫的活性,但试验周期长和过程繁琐;实时荧光定量 PCR,若引物的特异性不高,容易受其他 DNA 的干扰,重现性不高。ELISA 方法存在灵敏度低、操作程序复杂、费时等问题。因此,为了控制本病的流行与诊断,建立一种科学、快速、准确的检测和诊断方法是非常必要的。

[0004] 免疫胶体金技术自问世以来,得到了迅速发展。已广泛应用于免疫组织(或细胞)化学检测和免疫学检测领域,特别是胶体金免疫层析技术具有操作简单、检测快速灵敏、结果清楚,易于判断和保存,且无需特殊仪器设备等优点,适合于临床的快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

[0005] 经检索未见有公开的利用微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白制备免疫胶体金检测试纸条的文献报道。

发明内容

[0006] 本发明公开一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条,目的是解决当前人隐孢子虫和微小隐孢子虫检测特异性低,不准确、误差多、灵敏度低的缺点。

[0007] 本发明还提供了微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条的制备方法,适用于工业化生产。

[0008] 本发明的技术解决方案如下:用胶体金标记纯化的单克隆抗体技术制作金标垫,用纯化的单克隆抗体包被硝酸纤维膜作为检测线(T线);用羊抗鼠 IgG 作为质控线(C),即得检测试纸。

[0009] 本发明提供的微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条,包括样品垫、金标垫、吸收垫、硝酸纤维素膜组成,其特征在于:金标垫包被有 CSpV-S 蛋白单克隆抗体胶体金偶联标记物,检测线包被有纯化的单克隆抗体,质控线包被有羊抗鼠 IgG 抗体,质控线侧贴有吸收

垫。

[0010] 本发明微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条的制备方法的具体步骤包括：

(1) CSpV-S 蛋白的原核表达与纯化：以 *C. parvum* 总 RNA 的 cDNA 为模板，扩增 CSpV-S 基因片段，构建重组表达质粒 pET-28a(+)-S，并在大肠杆菌中诱导表达，利用 Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化表达的蛋白；

(2) CSpV-S 蛋白单克隆抗体的制备：将纯化的 CSpV-S 蛋白分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂等比例混合乳化后作为免疫原，免疫 BALB/c 小鼠，待抗体效价达到 10^5 时，取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞融合，筛选出能稳定分泌抗 CSpV-S 蛋白抗体的杂交瘤阳性细胞株，并进行单克隆抗体的大量制备，利用 HiTrap Protein G HP 纯化单克隆抗体；

(3) 胶体金溶液及金标蛋白的制备：采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，确定胶体金与 CSpV-S 蛋白单克隆抗体用量比例，制备金标 CSpV-S 蛋白的单克隆抗体偶联标记物，采用低温超速离心法纯化金标 CSpV-S 蛋白单克隆抗体；

(4) 试纸条的组装：将金标 CSpV-S 蛋白单克隆抗体用喷点仪喷点玻璃纤维素膜，CSpV-S 蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体分别喷涂于硝酸纤维膜检测线和质控线上，将处理好的硝酸纤维膜、玻璃纤维膜、样品垫、吸水垫等材料按顺序进行粘贴、组装、切条、密封，4℃ 保存。

[0011] 本发明的积极效果在于：将酶联免疫原理和胶体金层析技术结合，制备检测 *C. parvum* 的胶体金试纸条，并应用于临床，提高 *C. parvum* 的防治能力，具有操作简单快速、检测结果清楚易于判断、特异性强、敏感性高、无须仪器设备或只需简单的仪器等优点，因此非常适于发病现场、门诊以及实验条件不具备的场所等临床样品检测使用。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明 CSpV-S 蛋白纯化图；

其中，M 为低分子量蛋白标志物；1 为纯化的重组蛋白。

[0013] 图 2 为本发明 CSpV-S 蛋白单克隆抗体纯化图；

其中，M 为蛋白标志物(117, 90, 49, 34, 25, 19 KDa)；1 为纯化的腹水；2 为未纯化的腹水。

[0014] 图 3 为本发明胶体金溶液制备图。

[0015] 图 4 为本发明试纸条灵敏度测试图；

其中，1 为阴性对照；2 为微小隐孢子虫粪便研磨滤过液检测结果。

[0016] 图 5 为本发明试纸条初步应用图。

具体实施方式

[0017] 下列实施例旨在进一步举例说明，而不是限制本发明。本领域技术人员可以理解到，在不背离本发明的精神和原则的前提下，对本发明的任何平行改变和改动都将落入本发明的待批权利要求范围内。

[0018] 实施例 1

一、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白基因 S-dsRNA 的克隆、表达及蛋白的纯化

1、材料与amp;方法

(1) 菌株及质粒

pET-28a (+)载体由本室保存;大肠杆菌 DH5a 感受态和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态为天根生化科技(北京)有限公司产品;质粒 pMD18-T 为日本 TaKaRa 公司;微小隐孢子虫总 RNA 的 cDNA 由本室保存。

[0019] (2) 相关分子生物学操作

PCR 扩增、质粒重组和转化等操作按《分子克隆》所述方法进行;细菌质粒 DNA 的提取、DNA 的回收纯化按照试剂盒说明书进行;DNA 测序由生物工程公司完成。

[0020] 基因的扩增及克隆

根据 GenBank 中微小隐孢子虫病毒 S-dsRNA 基因序列(登录号为 EU183404),采用 Primer 5.0 软件设计特异性引物:

SF :5' -ctggatccATGATTACAAGTTTT GAATCAA,

SR :5' -aagtcgac CTAATGGGAGCGATCTGCGC TA,

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以微小隐孢子虫总 RNA 的 cDNA 为模板,进行 PCR。反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1min,共 41 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳回收。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接构建重组质粒 pMD18-T-S。

[0021] (4) 重组质粒 pET-28a(+)-S 的构建

将 pMD18-T-S 质粒和 pET-28a (+)质粒同时进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,回收目的片段与 pET-28a (+) 载体并连接,从而构成重组质粒 pET-28a (+)-S。

[0022] (5) 蛋白的 SDS-PAGE 分析及纯化

将鉴定正确的表达质粒 pET-28a(+)-S 转化至大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态,同时设 pET-28a (+) 空质粒作为阴性对照,挑取单个菌落接种于 LB 液体培养基,振荡培养过夜。按 1 % 的比例接种于 5 mL LB 培养基中,37 °C 振荡培养至菌液 OD_{600nm} 值为 0.4 ~ 0.6,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,继续培养 4 h,收集 1 mL 诱导、未诱导和阴性对照的菌液,进行 SDS-PAGE 分析。按照 Ni-NTA 说明书进行目的蛋白的纯化。用含有 8,6,4,2,0 mol/L 尿素,0.5 mol/L L-Arg 的 PBS 溶液进行梯度透析复性,用 BCA 蛋白含量分析试剂盒测定蛋白浓度。

[0023] 2、结果

纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 分析,可见在 37 KDa 处有一条单一的蛋白带,参见附图 1。

[0024] 二、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白单克隆抗体的制备

1、材料及方法

(1) 雌性 BALB/c 小鼠购自长春生物制品所;SP2/0 骨髓瘤细胞本室保存;单克隆抗体亚类鉴定试剂盒和液体石蜡均为美国 Sigma 公司产品;RPMI1640 细胞培养基为美国 Invitrogen Gibco 公司产品;胎牛血清为杭州四季青生物工程有限公司产品;细胞培养瓶与 96 孔细胞培养板均为美国 Corning 公司产品;BCA 蛋白含量分析试剂盒为美国 Thermo 公司产品。

[0025] (2) 免疫动物

以纯化的重组蛋白 S 为抗原腹腔免疫 3 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠(100 μg/只),免

疫三次,每次间隔两周。抗体效价达到 10^5 后便可用于细胞融合,然后于融合前三天加强免疫。融合前,摘除眼球采血,分离血清,作为阳性血清。

[0026] (3) 细胞融合

将免疫后的 BALB/c 健康小鼠摘除眼球放血,引颈处死后,放入 75% 酒精中消毒 5min, 带入生物安全柜。取出脾脏放在无菌平皿中,除去脂肪及结缔组织,用不完全 1640 培养基冲洗,放在无菌的 200 目铜网上,用无菌 5mL 注射器的活塞研磨,吸出上清,静置 5min, 1000 r/min 离心 5 min, 沉淀即为制备好的脾细胞。然后将 SP2/0 细胞吹起, 1000 r/min 离心 5 min。用不完全 1640 培养基重悬脾细胞和 SP2/0 细胞并混合, 1000 r/min 离心 5 min, 去上清。缓慢加入液体 PEG 1mL, 在 1min 内匀速加完。静置 2min, 再加入不完全 1640 培养基, 在第 1min 加完 2mL, 第 2min 加完 3mL, 第 3min 加完 4mL, 静置 5min。1000 r/min 离心 5 min, 去上清。用 HAT 选择培养基重悬细胞, 每孔加 2 滴细胞悬液至铺有饲养层细胞培养板, 最后置于细胞培养箱培养。次日每孔补加 1 滴 HAT 选择培养基, 之后每隔两天对细胞进行半数换液。

[0027] (4) 杂交瘤阳性细胞株的筛选及克隆

待单克隆细胞长满 $1/3 \sim 1/2$ 孔后, 用已建立的间接 ELISA 方法检测细胞上清中抗体分泌情况。选择两次 OD_{490nm} 值都较高的孔进行克隆, 一般采用有限稀释法克隆 3 次。将阳性杂交瘤细胞株克隆至所有克隆孔均为阳性为止, 同时将每次克隆阳性细胞孔进行扩大培养, 再进行冻存。

[0028] (5) 单克隆抗体的鉴定

单克隆抗体的鉴定包括杂交瘤阳性细胞株染色体数目分析, Western Blotting 鉴定, 单克隆抗体亚型鉴定和间接免疫荧光试验等。

[0029] (6) 单克隆抗体的大量制备及纯化

小鼠腹腔接种石蜡 0.5mL/ 只, 10 天后每只小鼠腹腔接种 $1 \times 10^6/0.2mL$ 杂交瘤细胞。间隔 7 天后, 每天观察小鼠腹部膨大情况。若见小鼠腹部明显增大, 即可用 20mL 注射器的针头采取腹水, 3500r/min 离心 10min, 去除细胞成分和其他的沉淀物, 取上清, 分装, $-80^\circ C$ 冻存备用。按照 HiTrap Protein G HP 说明书进行操作。SDS-PAGE 分析纯化抗体的纯度。将纯化的抗体加入透析袋, 用透析液 PBS $4^\circ C$ 透析 6h 以上, 最后用 BCA 蛋白含量分析试剂盒测定抗体浓度。

[0030] 2、结果

纯化后的腹水经 SDS-PAGE 分析, 可见清晰两条带, 一条为轻链, 另一条为重链; 未纯化的腹水杂蛋白条带较多, 说明该种抗体纯化方法纯化效果较好, 能得到较纯的单克隆抗体, 参见附图 2。

[0031] 三、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的胶体金免疫层析试纸的组装及测试

1、材料及方法

(1) 羊抗鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司; 2992、903、8964 型样品垫 (sample pad)、Ahlstrom 8964 型玻璃纤维膜 (conjugate release membrane)、Sartorius CN140、AE99 和 PRIMA60 型硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane)、470 和 2727 型吸水垫 (absorbent pad)、6cm \times 30cm、8cm \times 30cm 型 PVC 底板均为上海金标生物科技有限公司产品。

[0032] (2) 胶体金的制备

本发明采用柠檬酸三钠制备胶体金,取硅化过的 250mL 三角瓶一个,加 100mL 去离子及 1mL 1% 氯金酸,电炉加热沸腾;取不同体积的 1% 柠檬酸三钠迅速加入上述溶液中,混匀。持续加热可观察到溶液很快变成灰色,黑色,最后逐渐稳定成红色,继续煮沸 5 min,冷却后用去离子水补足体积至 100mL。电镜下观察胶体金颗粒的平均直径、分散程度及均匀度。

[0033] (3) 胶体金标记单克隆抗体的最适 pH 与最佳浓度的确定

分别取 1 mL 胶体金加至 1.5 mL 离心管,用 0.1mol/L K_2CO_3 结合精密 pH 试纸分别调节 pH 至 6.0,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0;再加入适量单克隆抗体至终浓度同为 50 μ g/mL,迅速混匀,振荡 20min,室温静止放置 10min;然后分别加入 100 μ L 10% NaCl 溶液,振荡混合 20 min 后,室温静止放置 10min;保持红色的最低 pH 值,即为最佳 pH 值。

[0034] 调节胶体金溶液至最适 pH 值,分别取 500 μ L 加至 1.5 mL 离心管,分别加入单克隆抗体至终浓度为 10 μ g/mL,15 μ g/mL,20 μ g/mL,25 μ g/mL,30 μ g/mL,35 μ g/mL,40 μ g/mL,迅速混匀,振荡 20min,室温静止放置 10min;然后分别加入 100 μ L 10% NaCl 溶液,振荡混合 20 min 后,室温静止放置 10min;保持红色的最低 pH 值,即为最佳 pH 值。

[0035] 然后按上述最适 pH 值和最佳浓度标记单克隆抗体制备胶体金探针。

[0036] (4) 金标垫的制备

将玻璃纤维素膜切割成 0.55cm 左右宽的长条,长度依需要而定,浸泡于胶体金探针溶液,4 $^{\circ}$ C 放置 4h,在低温条件下风干,即为金标垫,观察其色泽、均一性、稳定性。

(5) T 线及 C 线的点膜方法

将纯化的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 用最佳缓冲液分别稀释至最佳浓度。将稀释好的单克隆抗体溶液装入 BIODOT 划膜机喷头 2,固定在距硝酸纤维膜下边缘 1.1cm 的位置上,稀释好的羊抗鼠 IgG 装入 BIODOT 划膜机喷头 1,固定在距硝酸纤维膜下边缘 1.6cm 的位置上。检测线和质控线间的距离为 5.0mm,参数均为 1.0 μ L/cm 喷在硝酸纤维膜上。将已喷好的硝酸纤维膜 4 $^{\circ}$ C 放置待风干后备用。

[0037] (6) T 线及 C 线条件的优化

设置几组不同的抗体浓度对硝酸纤维膜的 T 线和 C 线进行优化,选出最优的一组包被于 T 线和 C 线,并对 T 线和 C 线喷膜量、喷膜速度等因素进行优化。

[0038] (7) 试纸条的组装

按照底板上划定的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水纸的尺寸,裁定符合要求的材料和制备相关的金标垫。将包被好的硝酸纤维膜粘到 PVC 底板上,小心抹平膜面。将金标垫紧靠硝酸纤维膜下边缘粘到 PVC 底板上。将样品垫一部分重叠在金标垫上一起粘到 PVC 底板上,并对齐抹平。将吸水纸紧一部分重叠在硝酸纤维膜下边缘粘到 PVC 底板上,并对齐抹平。用切条机切成 3.5mm 宽的试纸,在装配区将切好的试纸放入装有干燥剂的包装袋内。

[0039] 2、结果

(1) 胶体金溶液呈橙红色,透光性良好,参见附图 3。

[0040] (2) 取含有微小隐孢子虫的粪便 2 g,加入 5 mL 含 0.1% Tween-20 及 2 mmol/L EDTA 的 PBS 研磨后过滤,取 50 μ L 滤过液滴加在试纸条的加样区,样品开始在硝酸纤维素膜上扩散,待金标垫释放完全后,硝酸纤维素膜上出现了清晰的 T 线和 C 线,参见附图 4。

[0041] 实验例 1

胶体金免疫层析试纸条性能的测定及实践

1、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的胶体金免疫层析试纸的特异性

同法处理含安氏隐孢子虫, 蓝氏贾第虫, 柔嫩艾美尔球虫和微小隐孢子虫粪便, 各取 50μL 滤过液滴加在试纸条上进行检测, 结果显示, 该试纸条对安氏隐孢子虫, 蓝氏贾第虫和柔嫩艾美尔球虫检测呈阴性, 对微小隐孢子虫检测呈阳性, 说明特异性良好。

[0042] 2、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的胶体金免疫层析试纸的敏感性

将滤过液稀释 40 倍, 胶体金试纸条检测呈阳性结果, 滤过液稀释度超过 80 倍时, 试纸条检测呈阴性。胶体金试纸条的敏感性符合本发明的要求。

[0043] 3、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的胶体金免疫层析试纸的重复性

试纸条批内、批间检测微小隐孢子虫的结果没有明显差别, 且检测线和质控线条带清晰, 说明重复性良好。

[0044] 4、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的胶体金免疫层析试纸的稳定性

应用 4℃ 保存的胶体金免疫层析试纸定期检测标准阳性样本, 结果显示, 4℃ 保存 60 天后试纸条仍均呈稳定的阳性反应, 达到本发明的目的。

[0045] 5、微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的胶体金免疫层析试纸的初步应用

模拟样品试验: 取 10 个人工感染隐孢子虫小鼠样品进行检测结果均为阳性, 参见附图 5。

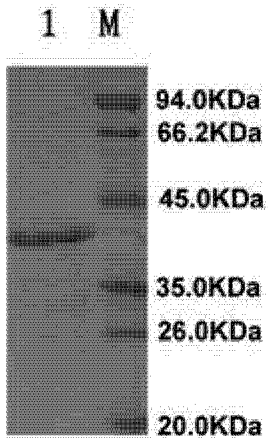


图 1

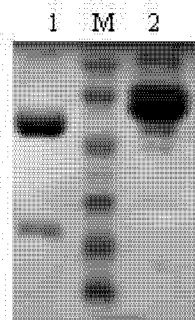


图 2

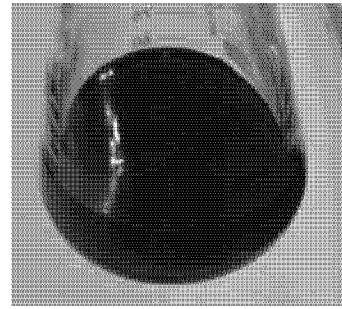


图 3

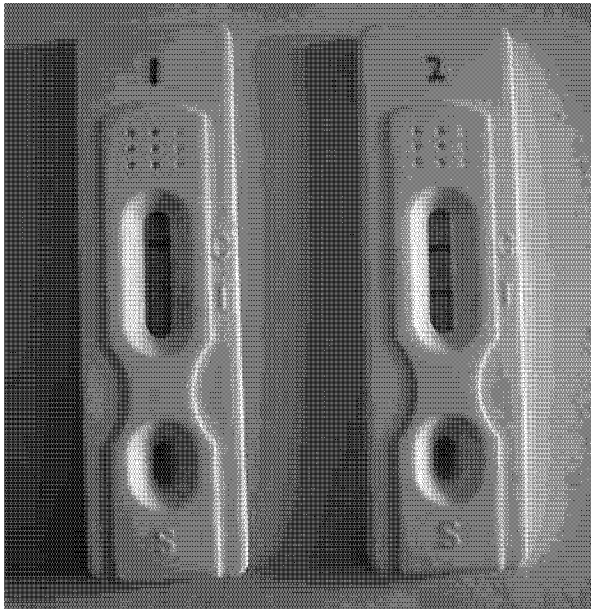


图 4

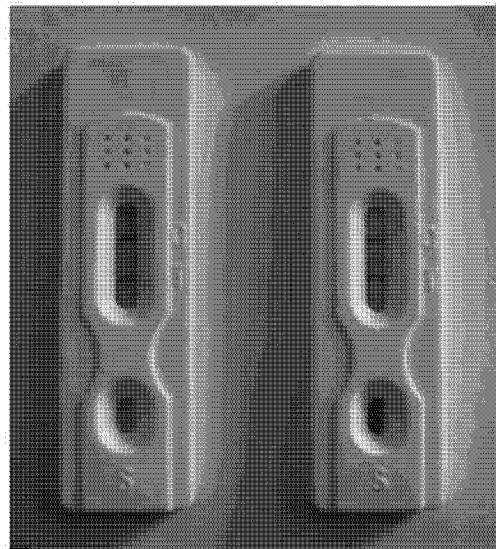


图 5

专利名称(译)	一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN102183653A	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN201110067042.3	申请日	2011-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	宫鹏涛 张西臣 刁玉梅 李建华 张国才 杨举 张楠 李赫 邢沈阳		
发明人	宫鹏涛 张西臣 刁玉梅 李建华 张国才 杨举 张楠 李赫 邢沈阳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 C12N15/30 C12N15/70 C07K14/44 C07K16/20		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种微小隐孢子虫免疫胶体金检测试纸条及其制备方法，它包含硝酸纤维素膜及其两端的金标垫和吸收垫，金标垫上端为样品垫，金标垫包被有纯化的CSpV-S蛋白单克隆抗体胶体金偶联标记物，检测线包被有纯化的单克隆抗体，质控线包被有羊抗鼠IgG抗体，质控线侧贴有吸收垫。本研究将酶联免疫原理和胶体金层析技术结合，制备检测C. parvum的胶体金试纸条，并拟应用于临床，提高C.parvum的防治能力，具有操作简单快速、检测结果清楚易于判断、特异性强、敏感性高、无须仪器设备或只需简单的仪器等优点，因此非常适于发病现场、门诊以及实验条件不具备的场所等临床样品检测使用。

