



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152515 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711431534.X

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2017.12.26

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 公安部南昌警犬基地

地址 330100 江西省南昌市长堍镇新建区  
兴国路518号

(72)发明人 熊前 李川武 潘彩霞 陈松昌  
陈文瑶 吴衍 叶俊华 杨前勇  
李红 王春亮 余盼 李强  
戴宗浩

(74)专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有  
限公司 36115

代理人 刘华

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法,该技术方案基于胶体金免疫层析技术,采用竞争法,将改良的孕酮抗原组合物、羊(兔)抗鼠IgG以条带状固定在硝酸纤维素膜(NC)上,抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物固定在结合垫上,当待检样本加至试纸条加样孔,通过毛细管作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记物后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域,待检物与胶体金标记物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。本发明检测简单快速、无需复杂操作技巧和特殊设备,而且携带方便,此外,本发明可对孕酮实现半定量分析,结果灵敏、准确,以其评价母犬发情状况更加客观有效。



1. 一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,其特征在于包括样本垫,结合垫,检测线T,质控线C,硝酸纤维素膜,吸水纸和PVC背衬,其中硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,所述硝酸纤维素膜的一端黏附有样本垫和结合垫,另一端黏附有吸水纸,检测线T和质控线C位于所述硝酸纤维素膜的表面上,所述样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸五者在硝酸纤维素膜上的分布位置依次为样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸,所述检测线T与质控线C的间距为0.7cm;

所述样本垫上同时固定有浓度为15mg/mL的肝素、浓度为22mg/mL的枸杞酸钠、浓度为400mg/mL的硫酸铵;

所述结合垫上固定有浓度为6 $\mu$ g/mL的抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物;

所述检测线T含有浓度为4mg/mL的孕酮全抗原、浓度为12mg/mL的透明质酸钠以及浓度为7mg/mL的1,2-戊二醇;

所述质控线C是浓度为0.4mg/mL的羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG。

2. 根据权利要求1所述的一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,其特征不在于所述抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物是通过以下方法制备的:

1) 用还原剂将氯金酸还原成粒径为25~35nm的胶体金颗粒溶液;

2) 将所述胶体金颗粒溶液与抗孕酮单克隆抗体按1:0.001 (mL:g)的比例混合,得到胶体金复合物,经封闭和浓缩得到孕酮单克隆抗体-胶体金标记物。

3. 根据权利要求2所述的一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,其特征不在于所述还原剂为柠檬酸三钠。

4. 根据权利要求3所述的一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,其特征不在于步骤1)具体包括以下操作:取100mL浓度为0.01% (w/v)的氯金酸水溶液加热至沸腾,向其中加入1.45mL浓度为1% (w/v)柠檬酸三钠水溶液并不断搅拌,待溶液颜色变成紫红色后,继续加热两分钟后停止加热,冷却至室温。

5. 根据权利要求4所述的一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,其特征不在于步骤1)所得的胶体金颗粒溶液在525nm波长条件下具有最高吸收峰。

6. 根据权利要求3所述的一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,其特征不在于步骤2)具体包括以下操作:调节所述胶体金颗粒溶液的pH值至6,以胶体金颗粒溶液与抗孕酮单克隆抗体1:0.001 (mL:g)的比例,在搅拌条件下将抗孕酮单克隆抗体逐滴加入至所述胶体金颗粒溶液中,搅拌60min,而后向其中加入胶体金颗粒溶液用量0.1倍体积的、浓度为1% (w/v)的PEG20000水溶液,继续搅拌30min后向其中加入胶体金颗粒溶液用量0.1倍体积的、浓度为10% (w/v)的BSA水溶液,封闭30min,而后以8000rpm的转速在4 $^{\circ}$ C条件下离心30min,取固相,用重悬液重悬至浓度为6 $\mu$ g/mL,即得到孕酮单克隆抗体-胶体金标记物;

所述重悬液是含有1%BSA、2%蔗糖、0.05%PEG20000、0.1%NaN<sub>3</sub>的、浓度为0.02mol/L的磷酸盐缓冲溶液;所述磷酸盐缓冲溶液的pH为7.4。

7. 权利要求1~6任一项所述试纸的制备方法,其特征不在于包括以下步骤:将含有15mg/mL肝素、22mg/mL枸杞酸钠、400mg/mL硫酸铵的混合溶液固定于样本垫上,将浓度为6 $\mu$ g/mL的抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合垫上,利用三维喷点平台将含有4mg/mL孕酮全抗原、12mg/mL透明质酸钠、7mg/mL1,2-戊二醇的混合溶液固定在硝酸纤维素膜上作为检测线T,利用三维喷点平台将浓度为0.4mg/mL的羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG固定在硝酸纤维

素膜上作为质控线C,保持检测线T与质控线C间距0.7cm,37℃干燥8h,而后将硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,将样本垫和结合垫黏附于硝酸纤维素膜的一端、将吸水纸黏附于所述硝酸纤维素膜的另一端,所述样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸五者在硝酸纤维素膜上的分布位置依次为样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸,将整体切成若干条状物。

8. 权利要求1~6任一项所述试纸用于检测母犬孕酮的应用,其特征在于包括以下步骤:取待测动物血清,加至所述试纸的样本垫上,15min后观察检测线T、质控线C的显色情况;当检测线T显色强度大于质控线C时,血清中孕酮含量小于等于5ng/mL;当检测线T显色强度小于质控线C时血清中孕酮含量为10~20ng/mL;当检测线T不显色时血清中孕酮含量大于20ng/mL。

## 一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及胶体金免疫层析技术领域,具体涉及一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 在犬类饲养工作中,判断母犬是否发情是展开配种工作的重要前提。对母犬进行发情鉴定,能有效判断母犬的发情阶段,以便确定适宜的配种时机,提高受胎率和产仔率,对提高犬繁殖性能和繁殖水平具有重要生产实践意义。发情鉴定的传统方法有外部观察法、试情法、阴道上皮细胞检测法、电测阻法等。外部观察法需要检测人员具有丰富的理论及实践经验,对于异常发情或发情症状不明显的母犬判断准确率不高。试情法易受公犬的配种欲望及周围环境因素影响,在实际工作中使用率不高。阴道上皮细胞检测法、电测阻法需要相应的仪器设备及试剂,易对母犬造成伤害,因此在实际工作中难以推广。

[0003] 孕酮是由卵巢分泌的具有生物活性的主要孕激素,母犬在不同的发情时期,体内孕酮值会有显著变化,并呈现一定的规律,因此可用于在分子水平上评价母犬的发情行为。目前,运用于检测孕酮的现代仪器方法有高效液相色谱(HPLC)、液相色谱质谱联用仪(LC-MS/MS)、放射免疫分析法(RIA)、化学发光免疫法(CLIA)等方法,其中由于HPLC、LC-MS/MS样本处理难、检测成本高等原因,不适用于现场快速检测。使用RIA、CLIA检测孕酮,虽然检测灵敏度高,但需要昂贵的配套仪器来检测。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,以解决现有技术中发情母犬孕酮检测方法较为复杂、检测不方便的技术问题。

[0005] 本发明要解决的另一技术问题是如何在建立便捷检测方法的过程中保证检测效果的灵敏性和准确性。

[0006] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术中缺乏一种上述试纸的制备方法。

[0007] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,包括样本垫,结合垫,检测线T,质控线C,硝酸纤维素膜,吸水纸和PVC背衬,其中硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,所述硝酸纤维素膜的一端黏附有样本垫和结合垫,另一端黏附有吸水纸,检测线T和质控线C位于所述硝酸纤维素膜的表面上,所述样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸五者在硝酸纤维素膜上的分布位置依次为样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸,所述检测线T与质控线C的间距为0.7cm;

[0009] 所述样本垫上同时固定有浓度为15mg/mL的肝素、浓度为22mg/mL的枸杞酸钠、浓度为400mg/mL的硫酸铵;

[0010] 所述结合垫上固定有浓度为6 $\mu$ g/mL的抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物;

[0011] 所述检测线T含有浓度为4mg/mL的孕酮全抗原、浓度为12mg/mL的透明质酸钠以及

浓度为7mg/mL的1,2-戊二醇;

[0012] 所述质控线C是浓度为0.4mg/mL的羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG。

[0013] 作为优选,所述抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物是通过以下方法制备的:

[0014] 1) 用还原剂将氯金酸还原成粒径为25~35nm的胶体金颗粒溶液;

[0015] 2) 将所述胶体金颗粒溶液与抗孕酮单克隆抗体按1:0.001 (mL:g) 的比例混合,得到胶体金复合物,经封闭和浓缩得到孕酮单克隆抗体-胶体金标记物。更优的,所述胶体金颗粒的粒径为30nm。

[0016] 作为优选,所述还原剂为柠檬酸三钠。

[0017] 作为优选,步骤1) 具体包括以下操作:取100mL浓度为0.01% (w/v) 的氯金酸水溶液加热至沸腾,向其中加入1.45mL浓度为1% (w/v) 柠檬酸三钠水溶液并不断搅拌,待溶液颜色变成紫红色后,继续加热两分钟后停止加热,冷却至室温。

[0018] 作为优选,步骤1) 所得的胶体金颗粒溶液在525nm波长条件下具有最高吸收峰。

[0019] 作为优选,步骤2) 具体包括以下操作:调节所述胶体金颗粒溶液的pH值至6,以胶体金颗粒溶液与抗孕酮单克隆抗体1:0.001 (mL:g) 的比例,在搅拌条件下将抗孕酮单克隆抗体逐液加入至所述胶体金颗粒溶液中,搅拌60min,而后向其中加入胶体金颗粒溶液用量0.1倍体积的、浓度为1% (w/v) 的PEG20000水溶液,继续搅拌30min后向其中加入胶体金颗粒溶液用量0.1倍体积的、浓度为10% (w/v) 的BSA水溶液,封闭30min,而后以8000rpm的转速在4℃条件下离心30min,取固相,用重悬液重悬至浓度为6μg/mL,即得到孕酮单克隆抗体-胶体金标记物;

[0020] 所述重悬液是含有1%BSA、2%蔗糖、0.05%PEG20000、0.1%NaN<sub>3</sub>的、浓度为0.02mol/L的磷酸盐缓冲溶液;所述磷酸盐缓冲溶液的pH为7.4。

[0021] 本发明同时还提供了上述试纸的制备方法,包括以下步骤:将含有15mg/mL肝素、22mg/mL枸杞酸钠、400mg/mL硫酸铵的混合溶液固定于样本垫上,将浓度为6μg/mL的抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合垫上,利用三维喷点平台将含有4mg/mL孕酮全抗原、12mg/mL透明质酸钠、7mg/mL1,2-戊二醇的混合溶液固定在硝酸纤维素膜上作为检测线T,利用三维喷点平台将浓度为0.4mg/mL的羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG固定在硝酸纤维素膜上作为质控线C,保持检测线T与质控线C间距0.7cm,37℃干燥8h,而后将硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,将样本垫和结合垫黏附于硝酸纤维素膜的一端、将吸水纸黏附于所述硝酸纤维素膜的另一端,所述样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸五者在硝酸纤维素膜上的分布位置依次为样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸,将整体切成若干条状物。

[0022] 本发明同时还提供了上述试纸用于检测发情母犬孕酮的应用,包括以下步骤:取待测动物血清,加至所述试纸的样本垫上,15min后观察检测线T、质控线C的显色情况;当检测线T显色强度大于质控线C时,血清中孕酮含量小于等于5ng/mL;当检测线T显色强度小于质控线C时血清中孕酮含量为10~20ng/mL;当检测线T不显色时血清中孕酮含量大于20ng/mL。

[0023] 在以上技术方案中,所述检测线T显色强度大于质控线C,是指肉眼观察下颜色检测线T的颜色深度大于质控线C的颜色深度。

[0024] 作为优选,上述试纸在使用前于密封干燥条件保存。

[0025] 本发明提供了一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法,该技术方案基于

胶体金免疫层析技术,采用竞争法,将改良的孕酮抗原组合物、羊(兔)抗鼠IgG以条带状固定在硝酸纤维素膜(NC)上,抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物固定在结合垫上,当待检样本加至试纸条加样孔,通过毛细管作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记物后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域,待检物与胶体金标记物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。

[0026] 实验中发现,由于常规取样条件下所得的血清样品仍存在一定的凝固现象,由此对样品的毛细上升作用存在一定的影响,而且由于不同样品的凝固程度不均等,因而难以保证显色效果的可重复性。针对这一问题,本发明在样本垫上固定了具有良好体外抗凝血作用的肝素和枸橼酸钠,有效保证了试纸检测结果的可重复性。另外,本发明发现血清中大量蛋白成分对孕酮抗原与抗体结合反应可能存在影响,因此本发明在样本垫中固定过量硫酸铵,使样品中的大部分蛋白变性失活,从而不影响后续的发光反应效果。此外,本发明意外发现,在孕酮全抗原的基础上进行复配改良,可能对显色效果存在影响,本着这种实验思路,本发明考察了检测线T的多种成分组合,最终确定了含有孕酮全抗原、透明质酸钠以及1,2-戊二醇的组合方案;通过这一改进,在不影响检测结果的前提下放大了显色程度,便于观察检测线T与质控线C的色差。

[0027] 本发明主要具有以下技术优势:(1)检测过程中不需要对母犬进行绑定,避免母犬在应激情况下对其生理带来的不利影响;(2)检测过程中不需对母犬阴道内部进行采样,避免对发情母犬阴道内部污染或感染;(3)不需借助大型仪器设备,所耗费用低;(4)缓解了血清样品凝结现象,同时降低了样品中其他成分对检测结果的影响;(5)检测过程无需孕酮标品作为指示,操作简便、快捷,仅需15-20min;(6)灵敏度较高,可达5ng/mL,检测结果更加便于观察;(7)室温保存、单犬检测,可现场进行检测。(8)通过对孕酮含量的检测来判断母犬发情的方法更加客观、准确。

## 附图说明

[0028] 图1是本发明试纸的检测原理图。

[0029] 图2是本发明试纸的结构示意图。

[0030] 图3是本发明具体实施方式中样本检测结果图;其中,从左至右加标血清样本浓度分别为0、5、10、15、20、25、30ng/mL。

## 具体实施方式

[0031] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0032] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0033] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人

员普遍理解的不同含义。

[0034] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0035] 实施例1

[0036] 1、一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法

[0037] 1.1胶体金的制备

[0038] 胶体金是氯金酸在还原剂的作用下,可聚合成一定大小的金颗粒,并由于静电作用而稳定的带负电的疏水胶溶液。免疫胶体金技术的基本原理是,胶体金表面带负电,与蛋白质分子的正电荷基团静电结合,形成的复合物不会影响蛋白质的生物特性。本发明选择柠檬酸三钠作为还原剂制备胶体金,具体过程如下:取100mL0.01%氯金酸水溶液于洁净的锥形瓶中加热至沸,快速加入1.45mL1%柠檬酸三钠并不断搅拌,待溶液颜色变成紫红色后,继续加热两分钟后停止加热,冷却至室温,4℃保存备用。此胶体金是否符合生产需求,除用肉眼观察颜色、均匀性和通透性,还需要借助紫外可见分光光度计分析,胶体金在525nm处有最高吸收峰,同时,电镜图显色制备的胶体金颗粒均匀性好、颗粒大小约30nm。

[0039] 1.2胶体金标记抗体的制备

[0040] 调节胶体金pH值至6,在恒速搅拌器均匀搅拌的作用下,超纯水稀释实验室自制的抗孕酮单克隆抗体至胶体金1/10体积,并逐滴加入到胶体金溶液中,60min后按胶体金1/10体积加入1%PEG20000,30min后按胶体金1/10体积加入10%BSA,封闭30min后,通过离心(8kr/min,4℃,30min)获得浓缩的金标抗体。再加入重悬液(含1%BSA、2%蔗糖、0.05%PEG20000、0.1%NaN<sub>3</sub>的pH为7.4的0.02mol/L的磷酸盐缓冲溶液)重悬金标抗体。

[0041] 1.3孕酮胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备

[0042] 检测孕酮胶体金免疫层析试纸条,包括样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水纸和PVC背衬;硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,结合垫和样本垫黏附在硝酸纤维素膜上靠近检测线的一端,吸水纸黏附在硝酸纤维素膜上靠近质控线的一端;

[0043] 硝酸纤维素膜上依次分布样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸;

[0044] 样本垫上固定的是浓度为15mg/mL的肝素、浓度为22mg/mL的枸杞酸钠、浓度为400mg/mL的硫酸铵;

[0045] 结合垫上固定的是抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物,浓度为6μg/mL;

[0046] 检测线T上固定的是含有孕酮全抗原的混合溶液,其中孕酮全抗原浓度为4.0mg/mL,透明质酸钠浓度12mg/mL、1,2-戊二醇浓度7mg/mL;

[0047] 质控线C上固定的是羊(兔)抗鼠IgG,浓度为0.4mg/mL;

[0048] 检测线T与质控线C的间距为0.7cm;

[0049] 将孕酮全抗原组合物、羊(兔)抗鼠IgG通过仪器(BioDot XYZ,Irvine,CA,USA)分别固定在NC膜上作为检测线T和质控线C,37℃干燥8h;将NC膜黏附在PVC背衬上,样本垫,结合垫黏附在NC膜上靠近检测线T的一端,吸水纸黏附在NC膜上靠近质控线C的一端;将粘好的PVC材料切成一定宽度的试剂条;最终制成试纸条。

[0050] 孕酮胶体金免疫层析试纸条结构图见图2。

[0051] 检测时,将血清样本加至试纸加样孔,15min后肉眼观察显色结果。

[0052] 本发明基于竞争法,即将孕酮抗原、羊(兔)抗鼠IgG以条带状固定在硝酸纤维素膜(NC)上,抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物固定在结合垫上,当待检样本加至试纸条加样孔,通过毛细管作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记物后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域,待检物与胶体金标记物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。实验过程中C线一直有显色,当血清中孕酮含量低于5ng/mL时,足量的胶体金标记物和固定在NC膜上的T线反应形成强红色条带,且T线显色比C线显色深;当血清中孕酮含量高于10ng/mL时,适量或没有胶体金标记物与固定在NC膜上的T线形成弱红色条带或无条带。具体见图1。

[0053] 2、实验条件优化及效果验证

[0054] 2.1正交试验 $L_9(3)^4$ 确定本专利所用的试纸条最优条件

[0055] 表1血清中孕酮胶体金免疫快速检测试纸条试验因素水平表

[0056]

编号	金标抗体浓度 $\mu\text{g/mL}$	结合垫上金标抗体喷量 $\mu\text{L}$	检测线固定的孕酮全抗原浓度 $\text{mg/mL}$	显色强度					
				0ng/mL		10ng/mL		30ng/mL	
				T	C	T	C	T	C
1	3	2	2	+	+	+	+	-	+
2	3	5	3	+	+	+	+	-	+
3	3	8	4	+	+	+	+	-	+
4	6	2	3	++	+	+	+	-	+
5	6	5	4	+++	++	+	++	-	++
6	6	8	2	+++	++	++	++	-	++
7	9	2	4	+++	++	++	++	-	++
8	9	5	2	+++	++	++	++	-	++
9	9	8	3	+++	++	++	++	+	++

[0057] 注:+++显色较强;++显色强;+显色弱;-消线

[0058] 通过正交试验 $L_9(3)^4$ 对实验条件的优化得出最优条件为:金标抗体浓度 $6\mu\text{g/mL}$ ;结合垫上金标抗体喷量 $5\mu\text{L}$ ;检测线固定的孕酮全抗原浓度 $4\text{mg/mL}$ 。

[0059] 2.2在最优条件下本发明试纸条对实际样本进行检测

[0060] 2.2.1血清加标

[0061] 在阴性血清样本中分别加入孕酮标品,加标血清的浓度分别为:0、5、10、15、20、25、30ng/mL。取各浓度的加标血清样本加至试纸条加样孔,15min后肉眼观察显色结果。具体结果见图3。

[0062] 2.2.2实际样品测定

[0063] 取阳性血清样本加至试纸条加样孔,15min后肉眼观察显色结果:检测线T的显色强度比质控线C弱。

[0064] 2.3胶体金试纸条灵敏度试验

[0065] 取以上所述制成的试纸条,血清加标15个样本,化学发光检测真实样本浓度,每种样品重复3次,判断试纸条的检测灵敏度,结果见下表:

[0066] 表2本发明胶体金试纸条灵敏度试验

编号	样本加标浓度	化学发光检测结果	试纸条检测结果	
	ng/mL	ng/mL	T	C
1	0	0.037	+++	++
2	2.5	2.571	+++	++
3	5	5.017	++	++
4	7.5	7.531	+	++
5	10	10.091	+	++
6	12.5	12.568	+	++
[0067] 7	15	15.062	+	++
8	17.5	17.541	+	++
9	20	20.072	+	++
10	22.5	22.531	-	++
11	25	25.076	-	++
12	27.5	27.592	-	++
13	30	30.028	-	++
14	50	50.081	-	++
15	100	100.072	-	++

[0068] 注:+++显色较强;++显色强;+显色弱;-消线

[0069] 从以上结果可以看出,本发明孕酮胶体金免疫快速检测血清中孕酮试纸条的检测限为5ng/mL。

#### [0070] 2.4胶体金试纸条的特异性试验

[0071] 取以上所制备的试纸条,在阴性血清(化学发光测定为阴性)中分别加入醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、氢化可的松,使其终浓度为5、10、50、100、500ng/mL血清处理溶液。将上述处理液加至试纸条加样孔,15min后观察试纸条显色情况从而判断试纸条检测的特异性,每种浓度的血清处理样品做3次重复。结果如下表所示:

[0072] 表3血清中孕酮胶体金免疫快速检测试纸条特异性试验结果

[0073]

孕酮结构类似物	血清中孕酮胶体金免疫快速检测试纸条检测结果				
	5ng/mL	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL	500ng/mL
醋酸甲羟孕酮	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
醋酸氯地孕酮	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
醋酸甲地孕酮	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
氢化可的松	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0074] 从以上结果可以看出,醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、氢化可的松这些结构类似物在本发明血清中孕酮胶体金免疫快速检测试纸条检测中未产生交叉反应。

### [0075] 2.5胶体金试纸条的准确度试验

[0076] 本发明孕酮胶体金免疫层析试纸条是半定量卡。取以上所制备的试纸条,当血清中孕酮含量低于5ng/mL,样品检测结果视为阴性,视为母犬处于休情期、发情前期或进入发情期早期;当孕酮含量达到5ng/mL,视为样品中孕酮含量适宜,此时为发情母犬配种最佳时机,可以安排发情母犬进行配种;此后犬孕酮含量会继续上升到10ng/mL-20ng/mL,并维持4-6d。当血清中孕酮含量大于20ng/mL,视为样品中孕酮含量较高,犬已进入发情后期。

### [0077] 2.6胶体金试纸条保存期试验

[0078] 取以上所制备的试纸条,试剂盒保存条件为2-8℃,经6个月的测定,孕酮添加实际血清测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存条件下放置6天,进行加速稳定性试验,结果表明该胶体金试纸条各项指标完全符合要求。

### [0079] 实施例2

[0080] 一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,包括样本垫,结合垫,检测线T,质控线C,硝酸纤维素膜,吸水纸和PVC背衬,其中硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,所述硝酸纤维素膜的一端黏附有样本垫和结合垫,另一端黏附有吸水纸,检测线T和质控线C位于所述硝酸纤维素膜的表面上,所述样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸五者在硝酸纤维素膜上的分布位置依次为样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸,所述检测线T与质控线C的间距为0.7cm;

[0081] 所述样本垫上同时固定有浓度为15mg/mL的肝素、浓度为22mg/mL的枸杞酸钠、浓度为400mg/mL的硫酸铵;

[0082] 所述结合垫上固定有浓度为6μg/mL的抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物;

[0083] 所述检测线T含有浓度为4mg/mL的孕酮全抗原、浓度为12mg/mL的透明质酸钠以及浓度为7mg/mL的1,2-戊二醇;

[0084] 所述质控线C是浓度为0.4mg/mL的羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG。

[0085] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0086] 所述抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物是通过以下方法制备的:

[0087] 1) 用柠檬酸三钠将氯金酸还原成粒径为25~35nm的胶体金颗粒溶液;

[0088] 2) 将所述胶体金颗粒溶液与抗孕酮单克隆抗体按1:0.001 (mL:g) 的比例混合,得到胶体金复合物,经封闭和浓缩得到孕酮单克隆抗体-胶体金标记物。

[0089] 同时,本实施例还提供了上述试纸用于检测母犬孕酮的应用,包括以下步骤:取待测动物血清,加至所述试纸的样本垫上,15min后观察检测线T、质控线C的显色情况;当检测线T显色强度大于质控线C时,血清中孕酮含量小于等于5ng/mL;当检测线T显色强度小于质控线C时血清中孕酮含量为10~20ng/mL;当检测线T不显色时血清中孕酮含量大于20ng/mL。

### [0090] 实施例3

[0091] 一种用于发情母犬孕酮检测的试纸,包括样本垫,结合垫,检测线T,质控线C,硝酸纤维素膜,吸水纸和PVC背衬,其中硝酸纤维素膜黏附在PVC背衬上,所述硝酸纤维素膜的一端黏附有样本垫和结合垫,另一端黏附有吸水纸,检测线T和质控线C位于所述硝酸纤维素膜的表面上,所述样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸五者在硝酸纤维素膜上的分布

位置依次为样本垫、结合垫、检测线T、质控线C、吸水纸,所述检测线T与质控线C的间距为0.7cm;

[0092] 所述样本垫上同时固定有浓度为15mg/mL的肝素、浓度为22mg/mL的枸杞酸钠、浓度为400mg/mL的硫酸铵;

[0093] 所述结合垫上固定有浓度为6 $\mu$ g/mL的抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物;

[0094] 所述检测线T含有浓度为4mg/mL的孕酮全抗原、浓度为12mg/mL的透明质酸钠以及浓度为7mg/mL的1,2-戊二醇;

[0095] 所述质控线C是浓度为0.4mg/mL的羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG。

[0096] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

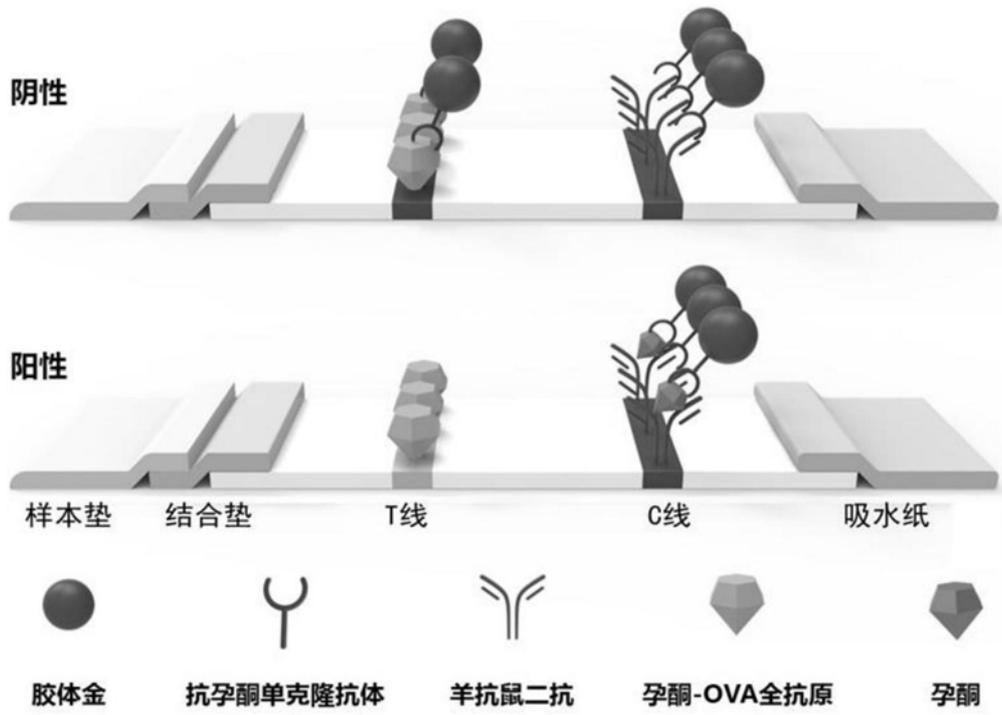


图1

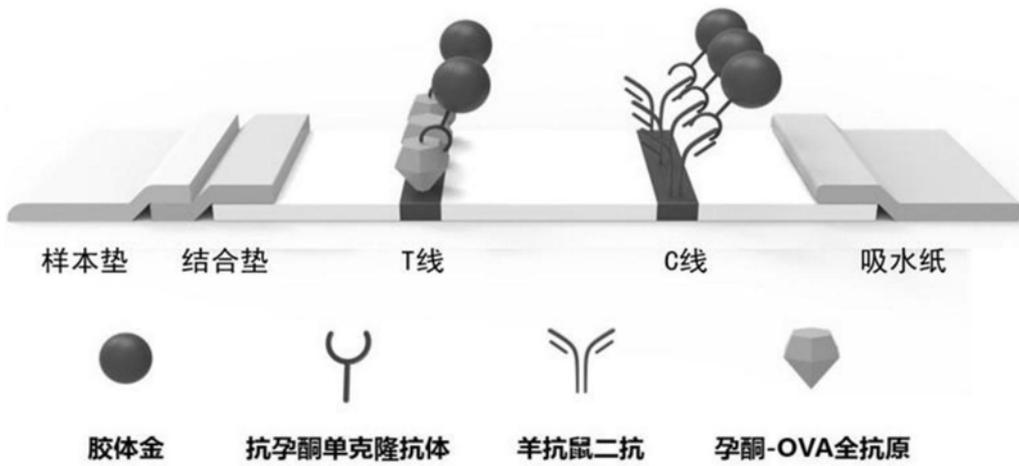


图2

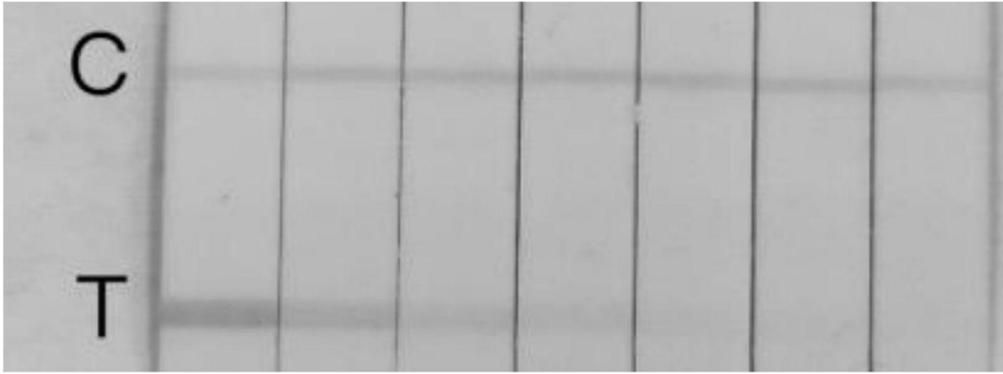


图3

专利名称(译)	一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108152515A</a>	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN201711431534.X	申请日	2017-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	公安部南昌警犬基地		
申请(专利权)人(译)	公安部南昌警犬基地		
当前申请(专利权)人(译)	公安部南昌警犬基地		
[标]发明人	熊前 李川武 潘彩霞 陈松昌 陈文瑶 吴衍 叶俊华 杨前勇 李红 王春亮 余盼 李强 戴宗浩		
发明人	熊前 李川武 潘彩霞 陈松昌 陈文瑶 吴衍 叶俊华 杨前勇 李红 王春亮 余盼 李强 戴宗浩		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577 G01N2333/575		
代理人(译)	刘华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种用于发情母犬孕酮检测的试纸及其制备方法，该技术方案基于胶体金免疫层析技术，采用竞争法，将改良的孕酮抗原组合物、羊(兔)抗鼠IgG以条带状固定在硝酸纤维素膜(NC)上，抗孕酮单克隆抗体-胶体金标记物固定在结合垫上，当待检样本加至试纸条加样孔，通过毛细管作用向前移动，溶解结合垫上的胶体金标记物后相互反应，再移动至固定的抗原或抗体的区域，待检物与胶体金标记物又与之发生特异性结合而被截留，聚集在检测带上，可通过肉眼观察到显色结果。本发明检测简单快速、无需复杂操作技巧和特殊设备，而且携带方便，此外，本发明可对孕酮实现半定量分析，结果灵敏、准确，以其评价母犬发情状况更加客观有效。

