

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103149361 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201310047822.0

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2013.02.06

(71) 申请人 河南科技大学

地址 471000 河南省洛阳市涧西区西苑路  
48号

(72) 发明人 司丽芳 孔维丽 熊建利 任洪涛  
李健 毛薇

(74) 专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所  
(普通合伙) 41120

代理人 罗民健

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

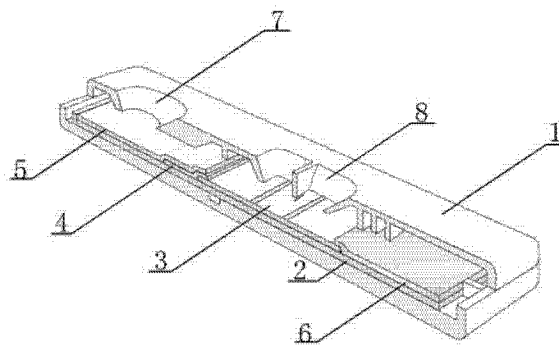
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

犬早孕因子胶体金检测试纸卡及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及犬早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法和应用,所述检测试纸卡由卡槽和胶体金试纸条组成,胶体金试纸条由支撑薄片、纤维素膜、含有金标抗体的玻璃纤维膜、载样垫和吸水垫组成,所述的纤维素膜设置在支撑薄片的中部,纤维素膜一侧的支撑薄片上依次粘贴有含有金标抗体的玻璃纤维膜和载样垫,纤维素膜另一侧的支撑薄片上粘贴有吸水垫,所述纤维素膜的中部有一条含有犬早孕因子抗体的检测线和一条含有羊抗兔二抗的质控线,该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测快速的优点,且不需要使用仪器设备,成本低廉,操作方便,能广泛应用于宠物犬爱好者、家犬养殖场和宠物医院对犬早期妊娠的诊断,为了解母犬孕情和对母犬假孕进行诊断奠定了基础。



1. 犬早孕因子胶体金检测试纸卡,其特征在于:所述检测试纸卡由卡槽和胶体金试纸条组成,卡槽具有一个容置空腔,且卡槽上设置有观察区和加样孔,胶体金试纸条主要由支撑薄片、纤维素膜、含有金标抗体的玻璃纤维膜、载样垫和吸水垫组成,所述的纤维素膜设置在支撑薄片的中部,纤维素膜一侧的支撑薄片上依次粘贴有含有金标抗体的玻璃纤维膜和载样垫,纤维素膜另一侧的支撑薄片上粘贴有吸水垫,所述纤维素膜的中部有一条含有犬早孕因子抗体的检测线和一条含有羊抗兔二抗的质控线,胶体金试纸条设置在卡槽的容置空腔内,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载样垫。

2. 如权利要求所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡,其特征在于:所述载样垫中金标抗体为兔抗犬早孕因子多克隆抗体。

3. 如权利要求所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡,其特征在于:所述纤维素膜中犬早孕因子抗体为鼠源单克隆抗体。

4. 如权利要求所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡,其特征在于:所述纤维素膜中羊抗兔二抗为羊抗兔 IgG 抗体。

5. 如权利要求 1 所述的犬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) 制备含有检测线和质控线的纤维素膜

a、采用体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原以 5 ~ 10ug 免疫 Ba1b/c 小鼠,取脾脏细胞与 SP2/0 瘤细胞进行融合后获得单克隆抗体;

b、采用喷膜机,调整喷液量为 30ul/40cm,用包被缓冲液稀释单克隆抗体,浓度为 50ug/ml,在纤维素膜中适当位置划线,即为检测线,晾干备用;

c、采用喷膜机,调整喷液量为 30ul/40cm,用包被缓冲液稀释羊抗兔 IgG 抗体,浓度为 1mg/ml,在纤维素膜上与检测线平行的位置划线,间隔 5mm,即为质控线,晾干得到含有检测线和质控线的纤维素膜;

d、用封闭工作液将步骤 c 制备的纤维素膜于室温封闭 60 分钟,取出后置 37℃ 下晾干,封存备用;

2) 制备涂覆金标抗体的玻璃纤维膜

a、采用体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原以 10 ~ 20ug 免疫家兔后采血,提取 IgG 抗体,制备多克隆抗体;

b、将上述步骤 a 制备的多克隆抗体置于透析袋中在中进行透析除盐,调整胶体金溶液 PH 值为 9.2 ~ 9.5,在电磁搅拌下,以 0.2mg/min 的滴加速度将抗体溶液逐滴加入胶体金溶液中,然后在电磁搅拌下加入牛血清白蛋白,使溶液中牛血清白蛋白的浓度为 1%,即得粗制金标抗体;

c、将粗制的金标抗体以 1500r/min 低速离心 1h,取上清液在 4℃ 温度下以 15000r/min 的转速离心操作 1h,取沉淀以原体积溶于缓冲液中,即得纯化的金标抗体;

d、将纯化的金标抗体均匀喷涂于玻璃纤维膜中,干燥,得到涂覆金标抗体的玻璃纤维膜,封存备用;

3) 制备犬早孕因子胶体金检测试纸卡

将涂有检测线和质控线的纤维素膜粘贴在支撑薄片的中部,在纤维素膜的一侧依次粘贴含有金标抗体的玻璃纤维膜和载样垫,在纤维素膜的另一侧粘贴吸水垫,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犬早孕因子胶体金检测试纸卡。

6. 如权利要求 5 所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法,其特征在于:所述步骤 1) 中的包被缓冲液为经过 0.45 $\mu$  滤膜过滤的 0.05M、PH9.6 的碳酸盐缓冲液。

7. 如权利要求 5 所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法,其特征在于:所述步骤 1) 中的封闭工作液为 2% 牛血清白蛋白、2% 脱脂奶粉和 0.01M、PH7.0 的碳酸盐缓冲液混合后用 0.45 $\mu$  滤膜过滤得到的封闭工作液。

8. 如权利要求 5 所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法,其特征在于:所述步骤 2) 中的透析除盐使用的透析液为双蒸水或 0.005M、PH7.0 低浓度的盐水。

9. 如权利要求 1 所述的犬早孕因子胶体金检测试纸卡在诊断犬早期妊娠中应用,其特征在于:所述应用的具体步骤为:经脉采集母犬血液 0.5ml,于 1mlEP 管中静置分离血清,将所得的血清滴加在本试纸卡的载样垫中,在试纸卡的检测线、质控线位置均出现红色条带时,早孕因子检测为阳性;仅质控线出现一条红色条带时,为阴性结果;在试纸卡的质控线未出现红色条带时为无效结果。

## 犬早孕因子胶体金检测试纸卡及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物医学免疫检测领域,具体是涉及一种检测犬早孕因子的胶体金试纸卡的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 假孕症是犬在繁殖季节常见的一种疾病,多发于3~5岁母犬,是指母犬发情后在未交配或配后没有受孕的情况下,全身状况和行为出现妊娠所特有变化的一种综合征。犬假孕有时伴有子宫疾病,会引起严重的后果,轻则不孕,重则死亡。近年来,随着养犬业和宠物行业的蓬勃发展,母犬假孕的发生率也随之升高,据报道交配假孕率高达50%~75%,这是目前母犬繁殖率低下的一个重要原因,也给养犬业带来了巨大的经济损失。因此,对犬进行早期妊娠诊断可以尽早确定犬是否发生假孕,及时采取复配及治疗措施,以便缩短空怀期。目前多种妊娠诊断方法中B超检测准确率高,但B超确诊受孕要在母犬配种后30天左右,且需要价格昂贵的设备,在犬饲养场及家庭宠物犬主中应用存在困难。如能开发检测快速、灵敏度高、特异性强、使用简便、价格低廉的胶体金试纸卡将具有十分重要的现实意义。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是为解决上述技术问题的不足,提供一种犬早孕因子胶体金检测试纸卡及其制备方法和应用,可以临床快速检测母犬早孕因子,用于母犬早期妊娠的临床诊断。

[0004] 本发明为解决上述技术问题的不足,所采用的技术方案是:犬早孕因子胶体金检测试纸卡,所述检测试纸卡由卡槽和胶体金试纸条组成,卡槽具有一个容置空腔,且卡槽上设置有观察区和加样孔,胶体金试纸条主要由支撑薄片、纤维素膜、含有金标抗体的玻璃纤维膜、载样垫和吸水垫组成,所述的纤维素膜设置在支撑薄片的中部,纤维素膜一侧的支撑薄片上依次粘贴有含有金标抗体的玻璃纤维膜和载样垫,纤维素膜另一侧的支撑薄片上粘贴有吸水垫,所述纤维素膜的中部有一条含有犬早孕因子抗体的检测线和一条含有羊抗兔二抗的质控线,胶体金试纸条设置在卡槽的容置空腔内,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载样垫。

[0005] 所述载样垫中金标抗体为兔抗犬早孕因子多克隆抗体。

[0006] 所述纤维素膜中犬早孕因子抗体为鼠源单克隆抗体。

[0007] 所述纤维素膜中羊抗兔二抗为羊抗兔IgG抗体。

[0008] 犬早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法,包括以下步骤:

1) 制备含有检测线和质控线的纤维素膜

a、采用体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原以5-10ug免疫Balb/c小鼠,取脾脏细胞与SP2/0瘤细胞进行融合后获得单克隆抗体;

b、采用喷膜机,调整喷液量为30u1/40cm,用包被缓冲液稀释单克隆抗体,浓度为50ug/ml,在纤维素膜中适当位置划线,即为检测线,晾干备用;

c、采用喷膜机,调整喷液量为 30ul/40cm,用包被缓冲液稀释羊抗兔 IgG 抗体,浓度为 1mg/ml,在纤维素膜上与检测线平行的位置划线,间隔 5mm,即为质控线,晾干得到含有检测线和质控线的纤维素膜;

d、用封闭工作液将步骤 c 制备的纤维素膜于室温封闭 60 分钟,取出后置 37℃ 下晾干,封存备用;

### 2) 制备涂覆金标抗体的玻璃纤维膜

a、采用体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原以 10-20ug 免疫家兔后采血,提取 IgG 抗体,制备多克隆抗体;

b、将上述步骤 a 制备的多克隆抗体置于透析袋中在中进行透析除盐,调整胶体金溶液 PH 值为 9.2 ~ 9.5,在电磁搅拌下,以 0.2mg/min 的滴加速度将抗体溶液逐滴加入胶体金溶液中,然后在电磁搅拌下加入牛血清白蛋白,使溶液中牛血清白蛋白的浓度为 1%,即得粗制金标抗体;

c、将粗制的金标抗体以 1500r/min 低速离心 1h,取上清液在 4℃ 温度下以 15000r/min 的转速离心操作 1h,取沉淀以原体积溶于缓冲液中,即得纯化的金标抗体;

d、将纯化的金标抗体均匀喷涂于玻璃纤维膜中,干燥,得到涂覆金标抗体的玻璃纤维膜,封存备用;

### 3) 制备犬早孕因子胶体金检测试纸卡

将涂有检测线和质控线的纤维素膜粘贴在支撑薄片的中部,在纤维素膜的一侧依次粘贴含有金标抗体的玻璃纤维膜和载样垫,在纤维素膜的另一侧粘贴吸水垫,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犬早孕因子胶体金检测试纸卡。

[0009] 所述步骤 1) 中的包被缓冲液为经过 0.45u 滤膜过滤的 0.05M、PH9.6 的碳酸盐缓冲液。

[0010] 所述步骤 1) 中的封闭工作液为 2% 牛血清白蛋白、2% 脱脂奶粉和 0.01M、PH7.0 的碳酸盐缓冲液混合后用 0.45u 滤膜过滤得到的封闭工作液。

[0011] 所述步骤 2) 中的透析除盐使用的透析液为双蒸水或 0.005M、PH7.0 低浓度的盐水。

[0012] 犬早孕因子胶体金检测试纸卡在诊断犬早期妊娠中应用,经脉采集母犬血液 0.5ml,于 1mlEP 管中静置分离血清,将所得的血清滴加在本试纸卡的载样垫中,在试纸卡的检测线、质控线位置均出现红色条带时,早孕因子检测为阳性;仅质控线出现一条红色条带时,为阴性结果;在试纸卡的质控线未出现红色条带时为无效结果。

[0013] 有益效果

本发明所述的胶体金试纸卡利用现代国际最先进的胶体金免疫层析技术,通过试纸卡中纤维素膜上分别喷涂含犬早孕因子抗体的检测线和含羊抗兔 IgG 抗体的质控线,能够临床检测犬早孕因子,为宠物犬爱好者、家犬养殖场和宠物医院等提供一种临床诊断母犬早期妊娠的试纸卡,该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测快速的优点,且不需要使用仪器设备,成本低廉,操作方便,能广泛应用于宠物犬爱好者、家犬养殖场和宠物医院对犬早期妊娠的诊断,为了解母犬孕情和对母犬假孕进行诊断奠定了基础。

## 附图说明

[0014] 图 1 是本发明的胶体金试纸卡的结构示意图；

图中：1、卡槽，2、支撑薄片，3、纤维素膜，4、含有金标抗体的玻璃纤维膜，5、载样垫，6、吸水垫，7、加样孔，8、观察区。

## 具体实施方式

[0015] 以下是本发明的具体实施例：

1) 制备含有检测线和质控线的纤维素膜

a、采用体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原以 5-10ug 免疫 Ba1b/c 小鼠，取脾脏细胞与 SP2/0 瘤细胞进行融合后获得单克隆抗体；

具体方法为：以体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原免疫 Ba1b/c 小鼠，按 0.5ml/只皮下多点注射，间隔 10 天，进行 3 次。融合前，小鼠腹腔注射 0.3ml 抗原进行加强免疫。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。

[0016] 犬早孕因子蛋白的分离、纯化：取经超生波检测的妊娠 18 天的孕犬动脉血，血液凝结后取自然析出的血清，在该血清中加中性盐至 35% 浓度沉淀蛋白质，离心操作后取上清液，在上清液中加入中性盐至 45% 离心浓度，离心后取上清，获得沉淀物后，在 56℃ 温度下、30min 灭活，采用 DEAE-琼脂糖凝胶及 CM-琼脂糖凝胶离子交换层析技术、抗孕犬全血清 Ig-Sepharose 4B 亲和层析技术对该沉淀物进行分离纯化，用玫瑰花环抑制实验对该沉淀物活性进行检测，结果显示，经层析过柱后的提取物具有 EPF（早孕因子）活性，经 SD-PAGE 银染显色证实该沉淀物为多肽。

[0017] b、采用喷膜机，调整喷液量为 30ul/40cm，用包被缓冲液稀释单克隆抗体，浓度为 50ug/ml，在纤维素膜 3 中适当位置划线，即为检测线，晾干备用；

c、采用喷膜机，调整喷液量为 30ul/40cm，用包被缓冲液稀释羊抗兔 IgG 抗体，浓度为 1mg/ml，在纤维素膜 3 上与检测线平行的位置划线，间隔 5mm，即为质控线，晾干得到含有检测线和质控线的纤维素膜 3；

d、用封闭工作液将步骤 c 制备的纤维素膜 3 于室温封闭 60 分钟，取出后置 37℃ 下晾干，封存备用；

包被缓冲液的制备：将 0.05M、PH9.6 的碳酸盐缓冲液，用 0.45u 滤膜过滤，置于 4℃ 保存备用。

[0018] 封闭缓冲液的制备：将 0.01M、PH7.0 的碳酸盐缓冲液，用 0.45u 滤膜过滤，置于 4℃ 保存备用。

[0019] 封闭工作液的配制：将含 2% 牛血清白蛋白、2% 脱脂奶粉；0.01M、PH7.0 的碳酸盐缓冲液，用 0.45u 滤膜过滤，置于 4℃ 保存备用。

[0020] 2) 制备涂覆金标抗体的玻璃纤维膜

a、采用体外提取并浓缩的犬早孕因子蛋白作为免疫原以 10-20ug 免疫家兔后采血，提

取 IgG 抗体,制备多克隆抗体;

具体方法为:犬早孕因子 1mg 蛋白家兔背部多点注射,间隔 10 天,连续注射 3 次,最后一次采用静脉注射 2mg 该蛋白,经脉注射一周后耳经脉采取,采用 ELISA 方法测定抗体效价,抗体效价合格后心脏采血,分离血清;兔抗犬早孕因子血清经饱和硫酸铵盐析法粗提、透析,再经过 G25 和纤维素柱进一步纯化,将收集的蛋白质于透析袋中浓缩,即得多克隆抗体。

[0021] b、将上述步骤 a 制备的多克隆抗体置于透析袋中在双蒸水或 0.005M、PH7.0 低浓度的盐水中进行透析除盐,中间换 3 次透析液。在胶体金标记抗体最低稳定量的基础上再加上 20% 即为为稳定胶体金所需抗体的实际量,根据用以标记的胶体金的总量计算所需的待标记抗体的总量。调整胶体金溶液 PH 值到 9.2-9.5。在电磁搅拌下,将抗体溶液逐滴加入胶体金溶液中,速度控制在 0.2mg/min。在电磁搅拌下加入牛血清白蛋白,使溶液中牛血清白蛋白的浓度为 1%,即得粗制金标抗体。

[0022] c、将粗制的金标抗体以 1500r/min 低速离心 1h,取上清液在 4℃ 温度下以 15000r/min 的转速离心操作 1h,取沉淀以原体积溶于缓冲液中,即得纯化的金标抗体;

d、将纯化的金标抗体均匀喷涂于玻璃纤维膜中,干燥,得到涂覆金标抗体的玻璃纤维膜 4,封存备用;

### 3) 制备犬早孕因子胶体金检测试纸卡

将涂有检测线和质控线的纤维素膜 3 粘贴在支撑薄片 2 的中部,在纤维素膜 3 的一侧依次粘贴含有金标抗体的玻璃纤维膜 4 和载样垫 5,在纤维素膜 3 的另一侧粘贴吸水垫 6,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 1 中,卡槽的观察区 8 对应胶体金试纸条的显色区,加样孔 7 对应胶体金试纸条的载样垫,即为犬早孕因子胶体金检测试纸卡。

[0023] 本试纸卡可用来检测疑似早期妊娠阶段母犬血清中的早孕因子,操作时,经脉采集母犬血液 0.5ml,于 1mlEP 管中静置分离血清,将所得的血清滴加在本试纸卡的载样垫 5 中,在试纸卡的检测线 4、质控线 5 位置均出现红色条带时,早孕因子检测为阳性;仅质控线 5 出现一条红色条带时,为阴性结果;在试纸卡的质控线未出现红色条带时为无效结果。该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测快速的优点,且不需要使用仪器设备,成本低廉,操作方便,能广泛应用于宠物犬爱好者、家犬养殖场和宠物医院对犬早期妊娠的诊断,为了解母犬孕情和对母犬假孕进行诊断奠定了基础。

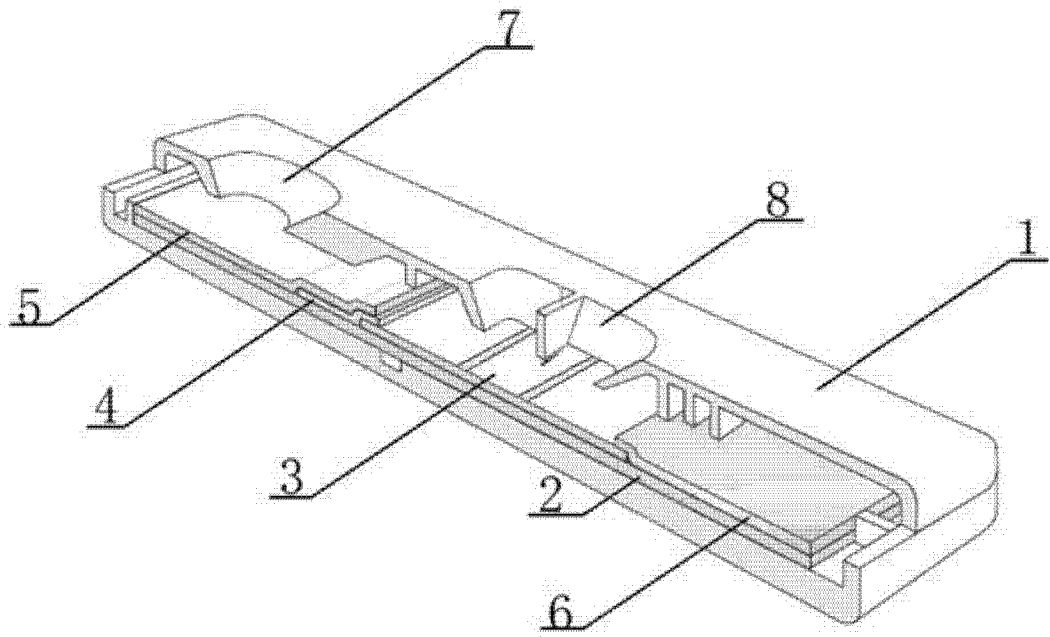


图 1

专利名称(译)	犬早孕因子胶体金检测试纸卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103149361A</a>	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201310047822.0	申请日	2013-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	司丽芳 孔维丽 熊建利 任洪涛 李健 毛薇		
发明人	司丽芳 孔维丽 熊建利 任洪涛 李健 毛薇		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及犬早孕因子胶体金检测试纸卡的制备方法和应用，所述检测试纸卡由卡槽和胶体金试纸条组成，胶体金试纸条由支撑薄片、纤维素膜、含有金标抗体的玻璃纤维膜、载样垫和吸水垫组成，所述的纤维素膜设置在支撑薄片的中部，纤维素膜一侧的支撑薄片上依次粘贴有含有金标抗体的玻璃纤维膜和载样垫，纤维素膜另一侧的支撑薄片上粘贴有吸水垫，所述纤维素膜的中部有一条含有犬早孕因子抗体的检测线和一条含有羊抗兔二抗的质控线，该试纸卡具有特异性强、灵敏度高、检测快速的优点，且不需要使用仪器设备，成本低廉，操作方便，能广泛应用于宠物犬爱好者、家犬养殖场和宠物医院对犬早期妊娠的诊断，为了解母犬孕情和对母犬假孕进行诊断奠定了基础。

