

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710055760.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007年11月28日

[11] 公开号 CN 101078727A

[22] 申请日 2007.6.13

[21] 申请号 200710055760.2

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院军事
兽医研究所

地址 130062 吉林省长春市青龙路1068号

[72] 发明人 夏咸柱 杨松涛 黄耕 王承宇
高玉伟 王铁成 侯小强 高明华
苏建青

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责
任公司

代理人 陈宏伟

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测
试纸及其制备技术

[57] 摘要

本发明提供了一种犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸，将胶体金标记的羊抗犬和猫 IgG 混合包被在玻璃纤维素膜上，制成结合垫；将纯化的狂犬病病毒、犬瘟热病毒、猫瘟热病毒和犬细小病毒等抗原分别包被在硝酸纤维素膜的检测线 R、D、F、P 等处，将兔抗羊 IgG 包被在硝酸纤维素膜的质控线 C 处，制成检测膜；当被检样品中含有相应病毒抗体时，可先与金标羊抗犬和猫 IgG 结合，然后在层析作用下与相应检测线上的抗原结合而富集，再经银染液加强染色后形成肉眼可见的色带，进而根据显色结果进行判定。本发明不需要借助其它仪器设备，并可同时对多种犬猫科动物重要疫病抗体进行检测，特别适用于现场检测和流行病学调查。

1、一种犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金联合检测试纸，其特征在于：衬板 8 封套在塑料夹 1 内，塑料夹 1 的表面开设有加样孔 2 和观察孔 3，衬板 8 的表面上组装有经过处理的样品垫 4、结合垫 5、检测膜 6 和吸收垫 7。其中，结合垫 5 由玻璃纤维素膜制成，上包被有胶体金标记的羊抗犬和猫 IgG；检测膜 6 由硝酸纤维素膜制成，上喷点有多条检测线和 1 条质控线，R、D、F、P 等为检测线，分别包被 RV、CDV、FPV 和 CPV 等纯化抗原，C 为质控线，包被有兔抗羊 IgG；检测膜与吸收垫 7 相连。

2、根据权利要求 1 所述的检测试纸制备方法，包括下述步骤：

1) 病毒抗原制备：用狂犬病毒 (RV)、犬瘟热病毒 (CPV)、猫瘟热病毒 (FPV) 和犬细小病毒 (CPV) 等分别接种 Vero 细胞、F81 细胞等各自敏感细胞进行培养增殖，然后分别浓缩提纯，制备 RV、CDV、FPV 和 CPV 等纯化抗原，加保护剂，于-30℃保存备用；

2) 羊抗犬和猫 IgG 制备：用所纯化的犬和猫血清 IgG 分别免疫羊，制备羊抗犬和猫血清，并分别提取其 IgG，制备羊抗犬和猫 IgG，加保护剂，于-30℃保存备用；

3) 金标羊抗犬和猫 IgG 制备：用所制备的羊抗犬和猫 IgG 分别进行胶体金标记，制备金标羊抗犬和猫 IgG，加防腐剂，于 4℃保存备用；

4) 兔抗羊 IgG 制备：以纯化的羊 IgG 免疫家兔，制得兔抗羊免疫血清，并从中提取 IgG，制备兔抗羊 IgG，加保护剂，于-30℃保存备用；

5) 试纸制备与组装：按附图所示，先将金标羊抗犬和猫 IgG 按一定比

例混合后,包被于玻璃纤维素膜,制成结合垫;然后分别将纯化的 RV、CDV、FPV 和 CPV 等抗原喷点于硝酸纤维素膜 (NC) 的检测线 R、D、F、P 等处,将兔抗羊 IgG 喷点于 NC 膜的质控线 C 处,制成检测膜;最后再按金标层析试纸制备要求,将样品垫、结合垫、检测膜和吸收垫进行粘连、压制和裁切,制成犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸,装于塑料夹内制成检测卡,加干燥剂分装、封闭于塑料袋内,于 4°C 干燥保存;

6) 银加强法相应试剂的配制:

活化液的配制:以去离子水配制 0.05mol/L、PH3.8 的柠檬酸盐缓冲液;

银染液的配制:将乙酸银、对苯二酚、阿拉伯树胶溶于去离子水中,使其终浓度分别为 0.11%、0.35%-1.7%和 7%-10%;

定影液的配制:20%的硫代硫酸钠水溶液。

犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸及其制备技术

技术领域：

本发明涉及一种犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸及其制备技术，用于犬猫科动物狂犬病、犬瘟热、猫瘟热和犬细小病毒病等重要疫病的抗体快速检测，属于动物疫病检测技术领域。

背景技术：

犬狂犬病、犬瘟热、猫瘟热和犬细小病毒病等犬、猫科动物重要疫病不仅严重危害我国毛皮经济动物产业，而且严重威胁着虎、狮、狼等多种珍稀野生动物的健康，有的还可导致人的发病死亡。要从根本上控制这些疫病，最重要的手段是疫苗的免疫接种，但疫苗接种后动物体内是否产生了达到免疫保护水平的抗体，需要依靠一定技术手段进行检测。对于犬、猫科动物重要疫病，目前国际上常用的抗体检测方法有免疫荧光灶抑制试验、酶联免疫吸附试验、小鼠脑内中和试验、细胞中和试验、血凝-血凝抑制试验等方法，但这些方法都需要一定的仪器设备和较高的操作技术，影响了其推广应用。

胶体金是近年来发展起来的一种检测技术，由 Faulk 和 Taylor(1971)首先用于免疫电镜，现在成了荧光素、放射性同位素和酶标记以外的一大补充。胶体金试纸是利用抗原抗体反应及免疫层析原理，将抗原或抗体以胶体金标记，当待检样品中含有与抗原或抗体特异结合的抗体或抗原时，就

会发生聚集而产生肉眼可见的色带，具有简便、快速，结果直观、准确等优点。

发明内容：

本发明提供了一种犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸，能够简便、快速、准确地检测出犬、猫科动物体内含有的狂犬病、犬瘟热、猫瘟热和犬细小病毒病等重要疫病的抗体。

本发明还公开了上述检测试纸的制备技术，适合于工业化生产。

本发明的解决方案是根据抗原抗体能特异结合的免疫学基本原理，利用胶体金免疫层析技术和银染加强技术，将胶体金标记的羊抗犬和猫 IgG 混合包被在玻璃纤维素膜上，制成结合垫；将纯化的狂犬病病毒（RV）、犬瘟热病毒（CDV）、猫瘟热病毒（FPV）和犬细小病毒（CPV）等抗原分别包被在硝酸纤维素膜（NC）的检测线 R、D、F、P 等处，将兔抗羊 IgG 包被在硝酸纤维素膜的质控线 C 处，制成检测膜；当被检样品中含有相应病毒抗体时，可先与金标羊抗犬和猫 IgG 结合，然后在层析作用下与相应检测线上的抗原结合而富集，再经银染液加强染色后形成肉眼可见的色带，进而根据显色结果进行判定。

此外，本发明提供的制备方法，主要涉及以下几个方面的内容：

1、病毒抗原制备：用狂犬病毒（RV）、犬瘟热病毒（CPV）、猫瘟热病毒（FPV）和犬细小病毒（CPV）等分别接种 Vero 细胞、F81 细胞等各自敏感细胞进行培养增殖，然后分别进行浓缩提纯，制备 RV、CDV、FPV 和 CPV 等纯化抗原，加保护剂，于-30℃保存备用。

2、羊抗犬和猫 IgG 制备：用所纯化的犬和猫血清 IgG 分别免疫羊，制

备羊抗犬和猫血清，并提取其 IgG，制备羊抗犬和猫 IgG，加保护剂，于-30℃保存备用。

3、金标羊抗犬和猫 IgG 制备：用所制备的羊抗犬和猫 IgG 分别进行胶体金标记，制备金标羊抗犬和猫 IgG，加防腐剂，于 4℃保存备用。

4、兔抗羊 IgG 制备：以纯化的羊 IgG 免疫家兔，制得兔抗羊免疫血清，并从中提取 IgG，制备兔抗羊 IgG，加保护剂，于-30℃保存备用。

5、试纸制备与组装：按附图所示，先将金标羊抗犬和猫 IgG 按一定比例混合后，包被于玻璃纤维素膜，制成结合垫；然后分别将纯化的 RV、CDV、FPV 和 CPV 等抗原喷点于硝酸纤维素膜（NC）的检测线 R、D、F、P 等处，将兔抗羊 IgG 喷点于 NC 膜的质控线 C 处，制成检测膜；最后再按金标层析试纸制备要求，将样品垫、结合垫、检测膜和吸收垫进行粘连、压制和裁切，制成犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸，装于塑料夹内制成检测卡，加干燥剂分装、封闭于塑料袋内，于 4℃干燥保存。

6、银加强法相应试剂的配制：

活化液的配制：以去离子水配制 0.05mol/L、PH3.8 的柠檬酸盐缓冲液。

银染液的配制：将乙酸银、对苯二酚、阿拉伯树胶溶于去离子水中，使其终浓度分别为 0.11%、0.35%-1.7%和 7%-10%。

定影液的配制：20%的硫代硫酸钠水溶液。

检测时，将试纸平放于桌面，取待检血清或抗凝全血 50-100 微升滴加于加样孔，10-15 分钟后以活化液洗涤，再向检测膜滴加 30—50 微升银染液，5 分钟后以去离子水洗涤，再滴加 50-100 微升定影液，8-10 分钟后判定。在质控线出现明显色带的前提下，检测线出现色带者则判定其相应抗

体阳性，反之则判定为抗体阴性；如质控线不出现色带，表明检测试剂失效，需查明原因复试。

本发明与现有的技术相比较具有如下优点：本发明简便、适用、快速、经济、无污染、易操作和判读，不需要借助其它仪器设备，并可同时对多种犬猫科动物重要疫病抗体进行检测，特别适用于现场检测和流行病学调查等。本发明的制备方法科学、成本低、稳定性高、重复性好，易于制造、保存和运输。

附图说明

图 1 是本发明检测试纸的结构示意图：

图 2 是本发明检测试纸剖面图。

1—塑料夹；2—加样孔；3—观察孔；4—样品垫；5—结合垫(由玻璃纤维素膜制成，包被有金标羊抗犬和猫 IgG)；6—检测膜(由硝酸纤维素膜制成，其上喷点有数条检测线和 1 条质控线)；7—吸收垫；8—衬板。R、D、F、P 等为检测线，分别包被有 RV、CDV、FPV 和 CPV 等纯化抗原；C 为质控线，包被有兔抗羊 IgG。

具体实施方式

通过以下实施例进一步举例描述本发明，并不以任何方式限制本发明，在不背离本发明的技术解决方案的前提下，对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

实施例 1

根据图 1 所示，本发明检测试纸结构如下：

衬板 8 封套在塑料夹 1 内，塑料夹 1 的表面开设有加样孔 2 和观察孔 3，

衬板 8 的表面上组装有经过处理的样品垫 4、结合垫 5、检测膜 6 和吸收垫 7。其中，结合垫 5 由玻璃纤维素膜制成，上包被有胶体金标记的羊抗犬和猫 IgG；检测膜 6 由硝酸纤维素膜制成，上喷点有多条检测线和 1 条质控线，R、D、F、P 等为检测线，分别包被 RV、CDV、FPV 和 CPV 等纯化抗原，C 为质控线，包被有兔抗羊 IgG；检测膜与吸收垫 7 相连。

实施例 2

1、病毒抗原制备：用狂犬病毒（RV）、犬瘟热病毒（CPV）、猫瘟热病毒（FPV）和犬细小病毒（CPV）等分别接种 Vero 细胞、F81 细胞等各自敏感细胞进行培养增殖，然后分别进行浓缩提纯，制备 RV、CDV、FPV 和 CPV 等纯化抗原，加保护剂，于-30℃保存备用。

2、羊抗犬和猫 IgG 制备：用所纯化的犬和猫血清 IgG 分别免疫羊，制备羊抗犬和猫血清，并提取其 IgG，制备羊抗犬和猫 IgG，加保护剂，于-30℃保存备用。

3、金标羊抗犬和猫 IgG 制备：用所制备的羊抗犬和猫 IgG 分别进行胶体金标记，制备金标羊抗犬和猫 IgG，加防腐剂，于 4℃保存备用。

4、兔抗羊 IgG 制备：以纯化的羊 IgG 免疫家兔，制得兔抗羊免疫血清，并从中提取 IgG，制备兔抗羊 IgG，加保护剂，于-30℃保存备用。

5、试纸制备与组装：按附图所示，先将金标羊抗犬和猫 IgG 按一定比例混合后，包被于玻璃纤维素膜，制成结合垫；然后分别将纯化的 RV、CDV、FPV 和 CPV 等抗原喷点于硝酸纤维素膜（NC）的检测线 R、D、F、P 等处，将兔抗羊 IgG 喷点于 NC 膜的质控线 C 处，制成检测膜；最后再按金标层析试纸制备要求，将样品垫、结合垫、检测膜和吸收垫进行粘连、压

制和裁切，制成犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸，装于塑料夹内制成检测卡，加干燥剂分装、封闭于塑料袋内，于 4℃干燥保存。

6、银加强法相应试剂的配制：

活化液的配制：以去离子水配制 0.05mol/L、PH3.8 的柠檬酸盐缓冲液。

银染液的配制：将乙酸银、对苯二酚、阿拉伯树胶溶于去离子水中，使其终浓度分别为 0.11%、0.35%-1.7%和 7%-10%。

定影液的配制：20%的硫代硫酸钠水溶液。

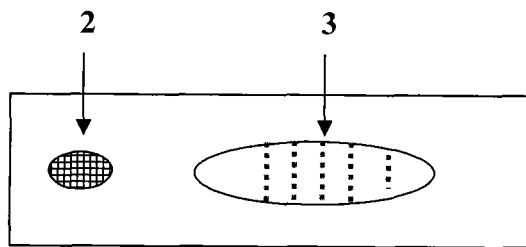


图 1

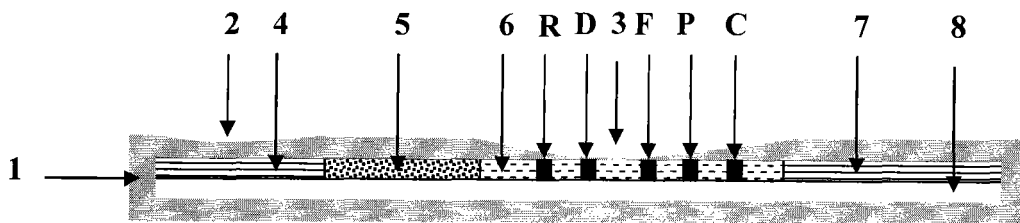


图 2

专利名称(译)	犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸及其制备技术		
公开(公告)号	CN101078727A	公开(公告)日	2007-11-28
申请号	CN200710055760.2	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
[标]发明人	夏咸柱 杨松涛 黄耕 王承宇 高玉伟 王铁成 侯小强 高明华 苏建青		
发明人	夏咸柱 杨松涛 黄耕 王承宇 高玉伟 王铁成 侯小强 高明华 苏建青		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/569 G01N33/549 G01N33/532		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种犬、猫科动物重要疫病抗体胶体金银联合检测试纸，将胶体金标记的羊抗犬和猫IgG混合包被在玻璃纤维素膜上，制成结合垫；将纯化的狂犬病病毒、犬瘟热病毒、猫瘟热病毒和犬细小病毒等抗原分别包被在硝酸纤维素膜的检测线R、D、F、P等处，将兔抗羊IgG包被在硝酸纤维素膜的质控线C处，制成检测膜；当被检样品中含有相应病毒抗体时，可先与金标羊抗犬和猫IgG结合，然后在层析作用下与相应检测线上的抗原结合而富集，再经银染液加强染色后形成肉眼可见的色带，进而根据显色结果进行判定。本发明不需要借助其它仪器设备，并可同时对多种犬猫科动物重要疫病抗体进行检测，特别适用于现场检测和流行病学调查。

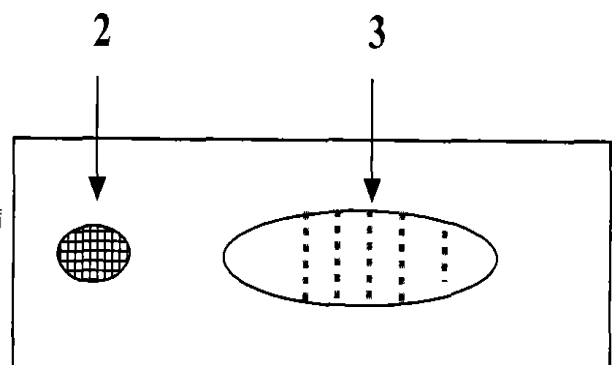


图 1