



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1700008 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200510050188.1

(22) 申请日 2005.06.21

(73) 专利权人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市石桥路 198 号

(72) 发明人 张雪娟 卢福庄 方兰勇 冯尚连
项美华 程菊芬 周永学

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公
司 33214

代理人 沈伧伧

学》. 2004, 928-930.

郑葵阳 等. 快速斑点免疫金染色法检测抗
日本血吸虫抗体方法的建立与初步应用. 《中国
人兽共患病杂志》. 2003, 89-94.

Feng Chan Han, et al. Dot immunogold
filtration assay for rapid detection of
anti-HAV IgM in Chinese. 《World Journal of
Gastroenterology》. 2000, 400-401.

审查员 唐宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件

刘宜升等. 斑点免疫金染色法与免疫金银
染色法诊断日本血吸虫病的比较. 《中国热带医

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒其制备
及应用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种诊断家畜血吸虫病斑点金
渗滤试剂盒其制备及应用方法,属新型的免疫标
记技术和家畜血吸虫病免疫学诊断技术。本发
明将胶体金直接标记在日本血吸虫抗原蛋白质
上,适用于牛、羊、猪、兔等多种动物血吸虫病抗
体的检测;在应用时仅需将被检家畜血样干纸浸
出液,点在硝酸纤维素膜上作为固定相,再滴加血
吸虫抗原胶体金 2~3 滴 (100~150 μl),2 分钟
内即形成肉眼可见的红色斑点,结果判断容易,
一个反应盒可做 4 份待检血样,降低了检测成本,
提高了效率,具有敏感、特异、检出率高,省工、
省时、成本低等优点。与粪孵血吸虫毛蚴法相
比,阳性符合率达 100%,阴性符合率 99.2%。

CN 1700008 B

1. 诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒,包括盒体、内置反应盒,黑色试剂瓶、生理盐水瓶、玻璃毛细管及标准阳性血纸、阴性血纸,其特征是所述反应盒由盒底、盒盖组成的塑料小盒,盒盖中央有一直径 0.8cm 圆孔,盒内装满吸水垫料、紧贴盒盖圆孔内放一层 1.1×1.1cm 硝酸纤维素膜,紧闭盒盖即成反应盒;所述黑色试剂瓶内装有血吸虫抗原胶体金;所述血吸虫抗原胶体金能与待测感染血吸虫家畜的血样浸出液反应形成红色阳性斑点;所述血吸虫抗原胶体金按以下工艺步骤制备而成:

(1) 胶体金的制备以 1% 氯金酸、1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mMK₂CO₃ 及双蒸水为原料,先将 1% 氯金酸与双蒸水按体积比 1 : 79 配成 A 液;将 1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mMK₂CO₃ 与双蒸水按体积比 4 : 0.03 ~ 0.15 : 0.03 ~ 0.15 : 15.70 ~ 15.94 配成 B 液;再将 A 液、B 液在水浴内同时加热到 59 ~ 61°C,搅拌 A 液,快速加入 B 液,继续搅拌 1 分钟,在 10 ~ 13 分钟内加热至沸腾,制成颗粒直径 D = 8 ~ 12nm 的胶体金,该胶体金液颜色由黑→蓝→紫→红色时即成;

(2) 血吸虫可溶性抗原与纯化抗原的制备将日本血吸虫卵研磨后,用 0.85% NaCl 溶液按重量配成 5% 溶液,置 -25°C 反复冻融 7 次,用超声波处理该液 20 分钟后,在 4°C 下以 13000rpm 离心 60 分钟,吸取上清液为血吸虫可溶性抗原;该可溶性抗原经层析分离纯化得血吸虫纯化抗原;再将这两种抗原分别用双蒸水进行透析去除盐分后,即成血吸虫可溶性抗原与血吸虫纯化抗原;

(3) 胶体金 pH 值的调整将步骤 (1) 胶体金液在包被前用 0.25mMK₂CO₃ 调整 pH 值为 7.15 ~ 7.25;

(4) 血吸虫抗原包被胶体金按体积重量比将步骤 (3) 胶体金液 100ml 与血吸虫可溶性抗原 1.16 ~ 1.52mg 或与血吸虫纯化抗原 0.58 ~ 0.76mg 混合进行包被,搅拌 10 分钟后,依次加入 10% 叠氮钠 96 μl、10% 牛血清白蛋白 10 μl、10% 聚乙二醇 30 μl,搅匀后 1500rpm/min 离心 30 分钟,吸收红色上清液,即成血吸虫抗原胶体金,并按量分装于黑色试剂瓶内。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征是,其中所述配制胶体金的 B 液的组分与含量为 1% 柠檬酸三钠 4.0ml、1% 鞣酸 0.09ml、25mMK₂CO₃ 0.09ml 与双蒸水 15.82ml;制成的胶体金颗粒直径为 10 < D ≤ 11nm;胶体金液 pH 值调为 7.20;包被胶体金液的抗原采用血吸虫可溶性抗原,胶体金液与抗原的体积重量比为 100ml : 1.30mg。

诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒其制备及应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及家畜血吸虫病的诊断技术领域,尤其涉及家畜血吸虫病斑点金免疫渗滤诊断试剂盒及其制备方法与应用方法。

背景技术

[0002] 家畜血吸虫病既危害家畜健康,又是其病源的重要散播者。随着我国血防工作的深入开展,虽已取得较大成绩,但目前我国尚有 100 多个县(市、区)未能控制该病传播,同时在已基本消灭家畜血吸虫病的省、地区也仍有长期巩固与监测的任务。若采用常规粪孵血吸虫毛蚴法检测,需要投入较大的人力、物力和资金;现有的血清学诊断家畜血吸虫病方法有 IHA 法、ELISA 法,但其检测时间长,单个样品检测需要 0.5 ~ 3 小时,而且这些方法中均含有潜在致癌物质的酶显色底物。要完成国务院提出的“到 2015 年底,力争全国所有未控制血吸虫病流行的县(市、区)达到血吸虫病传播控制标准”,急需有新的诊断技术支撑,因此寻找一种快速、简便,适用于家畜血吸虫病流行病学调查、普查、诊断、流通市场现场检疫的方法,已成为防疫部门迫切希望解决的问题。

[0003] 目前,在诊断人血吸虫病的方法中尚有金标法,丁建祖等浙江省医学科学院寄生虫病研究所快速检测日本血吸虫抗体的金标免疫渗滤法的建立及应用 中国寄生虫病防治杂志 1998 11(4):308;沈丽英等浙江省医学科学院寄生虫病研究所 血吸虫抗体金标免疫诊断试剂盒的研制 中国公共卫生 2000 16(3):244;张素娥等 浙江省医学科学院寄生虫病研究所 金标抗 rSjc26GST 多克隆抗体斑点免疫金渗滤法检测血吸虫循环抗原的研究 中国血吸虫病防治杂志 2000 12(5):265;干小仙等 浙江省医学科学院寄生虫病研究所 金标渗滤法快速检测血吸虫循环抗原的现场应用研究 中国人畜共患病杂志 2000 16(2):19 该技术是将胶体金标记在兔抗人 IgG 或者兔抗血吸虫虫卵多抗或者 GST-PcAb 上作为探针和显色剂,将血吸虫可溶性虫卵抗原或血吸虫重组蛋白多抗包被在硝酸纤维素膜上作为捕捉抗体,组成双夹心 DIGFA(金标免疫渗滤法)。检测时在测试盒的硝酸纤维素膜上滴加 100 μ l 待检人血清,再用金标探针显色的一种免疫学检测方法。该法存在的主要问题是需要制备血吸虫重组蛋白多抗或者兔抗人 IgG 或者兔抗血吸虫虫卵多抗或者 GST-PcAb,制备这些专一多抗周期长,手续繁杂,成本很高,限制了它们在普查家畜血吸虫病中推广应用。而且在制备胶体金标记的探针时,通常以试管目测法确定多抗的用量,为了保证充分包被,避免多余胶体金与非特异蛋白结合而干扰检测结果判断,一般在此基础上再增加 10%~20%的多抗的用量,然后又为了去除多余的游离多抗,又需要进行层析或高速离心等纯化处理,这些处理或者对设备条件要求很高,或者处理过程周期长,步骤繁杂,因此成本均高,不利于产业化开发;三是由于该法以捕捉多抗为固相,以待测血清和胶体金探针为流动相,所以一块反应盒仅能检测 1 个人的血样,其检测成本较高而效率较低;同时其含有包被抗原或多抗的硝酸纤维素膜的测试盒需在 4~8 $^{\circ}$ C 的条件下贮藏,对大面积推广应用增加了难度;四是反应步骤多,带来的干扰也相对增多。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对上述不足之处,提供一种敏感、特异、结果可靠、成本低廉、检测效率较高的家畜血吸虫病诊断试剂盒;本发明的另一目的是提供该试剂盒中血吸虫抗原胶体金的简便、省本、省时的制备方法;本发明的第三个目的是提供一套应用该试剂盒对家畜血吸虫病进行简便,快速,准确的诊断方法。

[0005] 本发明斑点金免疫渗滤法的基本原理是一种采用硝酸纤维素膜为家畜待检血样的固相载体,以亲和层析原理为基础,抗原胶体金结合物为液相,并同时作为探针和指示剂,而建立起来的一种新型的免疫检测方法。其中胶体金颗粒的表面带负电荷与血吸虫抗原蛋白分子的正电荷基团因静电作用形成牢固的结合,同时金颗粒又有高电子密度的特性,当这些被标记的抗原与相应的抗体配体大量聚集时,便形成肉眼可见的红色斑点。

[0006] 本发明的目的是通过下述技术方案予以实现的。

[0007] 一种诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒,包括盒体、内置反应盒、黑色试剂瓶、生理盐水瓶(内装有0.85%生理盐水)及玻璃毛细管(内径1mm)及标准阳性血纸、阴性血纸;其中所述反应盒由盒底、盒盖组成的塑料小盒,盒盖中央有一直径0.8cm的小圆孔,盒内装满吸水垫料,紧贴盒盖小圆孔内放一层1.1×1.1cm硝酸纤维素膜(孔径为0.45 μ 或0.65 μ),紧闭盒盖即成反应盒;所述黑色试剂瓶内装有血吸虫抗原胶体金。

[0008] 一种制备上述诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒的方法,所述盒体、黑色试剂瓶、生理盐水瓶及玻璃毛细管均为常规实验用品;所述黑色试剂瓶内装有的血吸虫抗原胶体金按以下原料比例与工艺步骤制备而成:

[0009] (1)、胶体金的制备 胶体金以1%氯金酸、1%柠檬酸三钠、1%鞣酸、25mMK₂CO₃及双蒸水为原料,先将1%氯金酸与双蒸水按体积比1:79配成A液;再将1%柠檬酸三钠、1%鞣酸、25mMK₂CO₃与双蒸水按体积比4:0.03~0.15:0.03~0.15:15.70~15.94配成B液;将配制好的A液、B液在水浴内同时加热到59~61℃,在电磁搅拌器上搅拌A液,快速加入B液,继续搅拌1分钟,在10~13分钟内加热至沸腾,氯金酸在鞣酸-柠檬酸钠还原剂的作用下,使金离子还原成金原子,其液体颜色由黑→蓝→紫→红色,此时合成的胶体金颗粒直径R=8~12nm,较稳定,在4℃下可保存13个月。

[0010] (2) 血吸虫可溶性抗原与纯化抗原的制备 将日本血吸虫卵置玻璃研磨器中研磨后,用0.85%NaCl溶液按重量配成5%浓度溶液,置-25℃反复冻融7次,用40KHz、400W超声波探头浸入溶液内处理20分钟,在4℃下以13000rpm离心60分钟,吸取上清液为血吸虫可溶性抗原;将可溶性抗原经葡聚糖凝胶G200分离纯化,将其中有活性的第I峰与II峰合并作为血吸虫纯化抗原;再将该可溶性抗原及纯化抗原分别装入透析袋,用双蒸水进行透析去除盐分后,即成合格的包被用的血吸虫可溶性抗原与血吸虫纯化抗原。

[0011] (3) 胶体金pH值的调整 胶体金与血吸虫抗原的结合在等电点的条件下最稳定,因此,胶体金液在被血吸虫抗原包被前,需用0.25MK₂CO₃调整胶体金液的pH值为7.15~7.2,才能使胶体金与血吸虫抗原牢固地结合。

[0012] (4) 血吸虫抗原包被胶体金 按体积重量比每100ml胶体金液与血吸虫可溶性抗原1.16~1.52mg或与血吸虫纯化抗原0.58~0.76mg混合进行包被,搅拌10分钟后,依次加入适量的10%叠氮钠、10%牛血清白蛋白和10%聚乙二醇,搅匀后1500rpm/min离心30分钟,吸收红色上清液,即成血吸虫抗原胶体金,并按量分装于黑色试剂瓶内封口,保存。

[0013] 上述血吸虫抗原胶体金制备方法的一种优选方案是,其中所述配制胶体金的 B 液的组分与含量为 1% 柠檬酸三钠 4.0ml、1% 鞣酸 0.09ml、25mMK₂CO₃0.09ml、双蒸水 15.82ml;制成的胶体金颗粒直径为 $10 < D \leq 11\text{nm}$;胶体金液 pH 值调为 7.20;包被胶体金液的抗原采用血吸虫可溶性抗原,胶体金液与抗原的体积重量比为 100ml : 1.30mg。

[0014] 一种应用上述诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒诊断家畜血吸虫病的方法,具体是按以下步骤操作:

[0015] (1) 待检家畜干燥血纸血样的采取 采取动物耳静脉血 2 ~ 5 滴 / 头,滴于纸面,阴凉干燥,备用;

[0016] (2) 干燥血纸血样浸出液的提取 裁取含血样部位干燥血纸,按每 0.24cm² 加 0.5 毫升 0.85% 生理盐水比例在容器内浸泡,每 5 分钟摇动 1 次,浸泡 15 ~ 20 分钟后即成血样浸出液;

[0017] (3) 血样浸出液点样 用内径 1mm 玻璃毛细管吸取上述血样浸出液 1 μ l,点在反应盒圆孔内硝酸纤维素膜面上,每膜可点一至四份的待检血样;

[0018] (4) 滴加血吸虫抗原胶体金 反应盒点血样后室温下放置 40 ~ 90 秒钟,再往其硝酸纤维素膜上滴加 2 ~ 3 滴约 100 ~ 150 μ l 血吸虫抗原胶体金;

[0019] (5) 观察并记录结果 观察反应盒若点样处出现红色斑点即为阳性,否则为阴性。

[0020] 本发明的有益效果:

[0021] 一是本发明金标免疫渗滤法检测血吸虫病抗体仅需 2 步操作,比夹心双抗金标免疫渗滤法的 6 ~ 7 个操作步骤减少 4 ~ 5 步,同时也省去了抗抗体或多克隆抗体的制备,节约了成本;

[0022] 二是本发明是在探明了日本血吸虫抗原包被胶体金的最适稳定量及胶体金标记血吸虫抗原最佳 pH 值的基础上,将该抗原与胶体金直接结合成抗原胶体金,因无游离的抗原,故结合后不需要浓缩、层析纯化或高速离心纯化等繁杂处理,比多抗胶体金降低生产成本 70% 以上,工效提高 50 倍以上,制作工艺简单,省工、省时、节省成本,有利于产业化开发;

[0023] 三是该抗原胶体金具有多功能的特性,可直接应用于牛、羊、猪、兔等各种家畜血吸虫病抗体的检测,克服了常规金标法检测不同种属动物疾病需制备各自专一的金标抗体,使用受局限,成本高等缺点;

[0024] 四是该抗原胶体金能检测出自然感染 1 对血吸虫的病牛抗体,能检测出人工感染 7 ~ 42 天的血吸虫病畜抗体,与粪孵血吸虫毛蚴法阳性符合率达 100%,阴性符合率达 98.7%,具有敏感、特异、检出率高等特点;同时该诊断试剂在 4℃ 下保存 12 个月,对 30 份阳性及 30 份阴性血纸每星期检测一次,每次结果一致,表明该诊断试剂稳定性及重现性均好;

[0025] 五是本发明检测方法以血纸替代常规血清样品,解决了农村基层制备血清采血量,并需离心设备进行分离加工,血清的输送与贮藏还需冷藏等诸多难题;该方法操作简单,显色快速,将待检血纸浸出液 1 μ l 点在硝酸纤维素膜上作为固相,一个反应盒最多可点 4 份血样而互不干扰,然后仅需点 3 滴 (150 μ l) 血吸虫抗原胶体金作为流动相,其抗原与特异抗体在数秒钟即能结合,检测过程不到 2 分钟就能完成,在反应处发生抗原抗体金颗粒聚集,形成肉眼可见的红色斑点即为阳性,阴性则仅留白色背景,该结果判断容易,并

可长期保存,以利于回顾性分析和研究,因此与诊断人血吸虫病的金标法相比其检测工效提高了数倍也显著降低了成本;

[0026] 六是这种以红色胶体金标记血吸虫抗原来检测待检血样,可省去酶标法加底物显色的步骤,也没有潜在致癌物质酶显色底物的危害。

具体实施方式

[0027] 本发明通过以下实施例和试验例作进一步具体描述。

[0028] 实施例 1:(诊断试剂盒)

[0029] 包括盒体、内置反应盒、黑色试剂瓶、生理盐水瓶(内装有 0.85%生理盐水)和点血样用的玻璃毛细管(内径 1mm)及标准阳性血纸、阴性血纸,提供该两纸目的,一是供使用人检查所用的血吸虫抗原胶体金是否有效,二是为使用者提供判别阴性反应和阳性反应的参考标准;其中,反应盒为 3cm×2.5cm×0.6cm 的塑料小盒,分盒底和盒盖两部分,盒盖中央有一个 0.8cm 的小圆孔,盒内垫满吸水材料,在小圆孔下和吸水材料之上放置一层 1.1×1.1cm 的硝酸纤维素膜(孔径为 0.45 μ 或 0.65 μ),合紧盒盖即组成反应盒;在黑色试剂瓶内装有血吸虫抗原胶体金。

[0030] 实施例 2:(胶体金的制备方法 1)

[0031] 本发明以 1%氯金酸、1%柠檬酸三钠、1%鞣酸、25mMK₂CO₃ 与双蒸水为原料,采用鞣酸-柠檬酸钠还原法制备胶体金。柠檬酸钠主要为还原剂,而鞣酸具有还原和保护的双重作用,控制“晶核”的形成过程。鞣酸用量多少决定胶体金粒径形成的大小,因此改变鞣酸的用量,可达到制备所需直径颗粒的胶体金之目的。本例 A 液,B 液各原料组分的配比见表 1:

[0032] 表 1 A 液、B 液的配制 (单位 ml)

A 液 80ml	1%氯金酸	1.0ml
	双蒸水	79.0 ml
B 液 20ml	1%柠檬酸三钠	4.0 ml
	1%鞣酸	0.03 ml
	25mMK ₂ CO ₃	0.03 ml
	双蒸水	15.94 ml

[0033] 将配制好的 A 液、B 液在水浴内同时加热到 59 ~ 61℃,在电磁搅拌器上搅拌 A 液,快速加入 B 液,继续搅拌 1 分钟,在 10 ~ 13 分钟内加热至沸腾,氯金酸在鞣酸-柠檬酸钠还原剂的作用下,使金离子还原成金原子,其胶体金液颜色由黑→蓝→紫→红色,此时合成的胶体金颗粒直径为 11 < D ≤ 12nm,较稳定,在 4℃下可保存 13 个月。

[0034] 实施例 3:(胶体金的制备方法 2)

[0035] 表 2 A 液、B 液的配制 (单位 ml)

A 液 80ml	1%氯金酸	1.0ml
	双蒸水	79.0 ml
B 液 20ml	1%柠檬酸三钠	4.0
	1%鞣酸	0.09ml
	25mMK ₂ CO ₃	0.09ml
	双蒸水	15.82 ml

[0036] A 液与 B 液的配制与合成方法同实施例 1, 制成的胶体金颗粒直径为 $10 < D \leq 11\text{nm}$ 。

[0037] 实施例 4:(胶体金的制备方法 3)

[0038] 表 3 A 液、B 液的配制 (单位 ml)

A 液 80ml	1%氯金酸	1.0ml
	双蒸水	79.0 ml
B 液 20ml	1%柠檬酸三钠	4.0
	1%鞣酸	0.15ml
	25mMK ₂ CO ₃	0.15 ml
	双蒸水	15.7 ml

[0039] A 液与 B 液的配制与合成方法同实施例 1, 制成的胶体金颗粒直径为 $8 < D \leq 10\text{nm}$ 。

[0040] 实施例 5:(血吸虫可溶性抗原与血吸虫纯化抗原的制备方法)

[0041] 将日本血吸虫卵置玻璃研磨器中研磨后,用 0.85% NaCl 溶液按重量比配成 5% 溶液,置 -25℃ 反复冻融 7 次,用 40KHz、400W 超声波探头浸入溶液内进行超声波处理 20 分钟,在 4℃ 下以 13000rpm 离心 60min,吸取上清液即为血吸虫可溶性抗原;将该血吸虫可溶性抗原经葡聚糖凝胶 G200 分离纯化,用 0.01M 磷酸盐缓冲液 pH7.0 洗脱,流速为 14ml/hr,以 3ml/管收集洗脱液,洗脱液在 280nm 下测 A 值,将有活性的第 I 峰与 II 峰合并即为血吸虫纯化抗原;将上述可溶性抗原和纯化抗原各自装入透析袋,用双蒸水进行透析去除盐分,即得包被胶体金用的血吸虫抗原,透析去除盐分的目的是防止胶体金聚沉和干扰胶体金与蛋白质的结合。

[0042] 实施例 6:(血吸虫抗原包被胶体金最适稳定量的测定)

[0043] 在血吸虫抗原包被胶体金之前,必须做好胶体金与血吸虫抗原用量比例的测定,以达到标记时采用最小抗原用量来实现与胶体金的充分结合,不仅可以节省抗原的用量,而且在包被后的抗原胶体金中没有游离的抗原蛋白质,因而可简化离心纯化的步骤;具体采用目测法,取 6 支试管,每一试管中加入实施例 2、3 或 4 所制 1ml 胶体金,每管中再加入不同量的由实施例 5 所制抗原,按表 4、5 所示进行。

[0044] 表 4 胶体金与血吸虫可溶性抗原用量比例的测定

管号	试	1	2	3	4	5	6
体金 (ml)	胶	1	1	1	1	1	1
吸虫可溶性抗原 (μg)	血	3.9	7.7	11.6	15.5	19.3	0
10% NaCl (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
果观察	结	紫	紫红	红色	红色	红色	蓝

[0045] 表 5 胶体金与纯化抗原用量比例的测定

试管号	1	2	3	4	5	6
胶体金 (ml)	1	1	1	1	1	1
血吸虫纯化抗原 (μg)	1.45	2.90	4.35	5.80	7.25	0
10% NaCl (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
结果观察	紫蓝	紫红	紫红	红色	红色	蓝

[0046] 未加抗原由红色变蓝色,加入抗原量不足以稳定胶体金的试管,由红色变紫蓝色或紫红色;而加入抗原达到或超过最低稳定量的试管则胶体金的红色不变,如表 4 中的第 3 管,表 5 中的第 4 管即为稳定 1ml 胶体金所需的抗原用量。

[0047] 实施例 7:(血吸虫抗原胶体金的制备方法 1)

[0048] 取实施例 2 所制胶体金液 100ml,在电磁搅拌下用 25mM K_2CO_3 调 pH 值为 7.15,然后逐滴加入实施例 5 所制血吸虫可溶性抗原 1.16mg 或纯化抗原 0.58mg,继续搅拌 10 分钟后,依次加入 10%叠氮钠 96 μl 、10%牛血清白蛋白 10 μl 、10%聚乙二醇 30 μl ,搅匀后,1500rpm/min 离心 30 分钟,吸出上清红色液体,则为血吸虫抗原胶体金产品,按包装规格 10ml/瓶或 20ml/瓶分装于黑色聚乙烯瓶内封口,置 4~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0049] 实施例 8:(血吸虫抗原胶体金的制备方法 2)

[0050] 取实施例 3 所制胶体金液 100ml,在电磁搅拌下将胶体金用 25mM K_2CO_3 调 pH 值为 7.20,然后逐滴加入实施例 5 所制血吸虫可溶性抗原 1.30mg 或纯化抗原 0.67mg,其余步骤同实施例 7。

[0051] 实施例 9:(血吸虫抗原胶体金的制备方法 3)

[0052] 取实施例 4 所制胶体金液 100ml,在电磁搅拌下将胶体金用 25mM K_2CO_3 调 pH 值为 7.25,然后逐滴加入实施例 5 所制血吸虫可溶性抗原 1.52mg 或血吸虫纯化抗原 0.76mg,其余步骤同实施例 7。

[0053] 实施例 10:(家畜血吸虫病斑点金免疫渗滤检测方法)

[0054] 按以下具体步骤操作：

[0055] (1) 待检家畜干燥血纸血样的采取 采取动物耳静脉血 2 ~ 5 滴 / 头, 滴于新华滤纸上, 阴凉处干燥, 备用。

[0056] (2) 以打孔器裁取干燥血纸圆片 (0. 24cm²) 1 片, 投入已编号的清洁、干燥试管或青霉素瓶内, 加入 0. 5 毫升生理盐水 (0. 85% NaCl) 浸泡, 每隔 5 分钟摇动 1 次, 15 ~ 20 分钟后, 则为血纸浸出液备用。

[0057] (3) 取塑料反应盒, 用记号笔在圆孔外四周按顺时针编上相应血样号。

[0058] (4) 用内径 1mm 玻璃毛细管吸取血纸浸出液, 将玻璃毛细管轻贴硝酸纤维素膜点样 1 μ l 左右 (每个样品用一根毛细管, 不能混用), 若 1 个血样, 将血样点在塑料反应盒硝酸纤维素膜中央; 若 2 ~ 4 个血样, 则沿距小圆孔边缘 1mm 左右按顺时针点样。

[0059] (5) 点好样品后, 反应盒室温放置 40 ~ 90 秒钟。

[0060] (6) 加实施例 7、8 或 9 所制血吸虫抗原胶体金 2 ~ 3 滴 (约 100 ~ 150 μ l) ;

[0061] (7) 观察并记录结果 在硝酸纤维素膜上点血样处出现红色斑点为阳性, 否则为阴性。

[0062] 试验例说明：

[0063] (1) 供试血纸样品：

[0064] i 血吸虫病牛血纸 (湖北、四川), 经粪孵法查见有血吸虫毛蚴的牛采血, 制备血纸。

[0065] ii 自然感染血吸虫病牛血纸 (湖南), 经解剖冲虫法收集到自然感染 1 对血吸虫虫体的牛采血, 制备血纸。

[0066] iii 健康牛血纸来自浙江、黑龙江、吉林、山东屠宰场, 经粪孵法未见血吸虫毛蚴, 采血, 制备血纸。

[0067] iv 人工感染血吸虫病牛血纸 人工感染血吸虫尾蚴 50 ~ 500 条的牛, 在感染后 3、5、7、14、21、28、35、42 天时采血, 制备血纸。

[0068] v 人工感染血吸虫病兔血纸及血清 人工感染血吸虫尾蚴 20 ~ 800 条的兔, 在感染后 7 天、14 天、21 天、28 天、35 天、41 天、80 天的兔采血, 制备血纸及血清。

[0069] vi 健康牛血纸、人工及自然感染血吸虫的牛血纸、自然感染肝片吸虫的牛血纸、人工感染肝片吸虫羊血纸、人工感染锥虫的羊血纸、人工感染蛔虫的猪血纸、自然感染囊虫的猪血纸。

[0070] (2) 测定试剂, 装置与方法：

[0071] 试剂盒 见实施例 1；

[0072] 血吸虫抗原胶体金 按实施例 7、8 或 9 制备；

[0073] 血吸虫抗原胶体金检测方法 按实施例 10 方法；

[0074] 兔抗血吸虫卵可溶性 由浙江省医学科学院寄生虫病

[0075] 抗原多抗胶体金 研究所提供；

[0076] 兔抗血吸虫卵可溶性抗原

[0077] 多抗胶体金检测方法 按试剂盒中所附说明书

[0078] 斑点酶标法试剂 由浙江省农科院畜牧兽医所提供

[0079] 斑点酶标法检测方法 浙江畜牧兽医, 1993 18 卷第 4 期

[0080] 试验例 1 : (斑点金渗滤法与粪孵血吸虫毛蚴法阳性符合率对比)

[0081] 本发明斑点金渗滤法与粪孵血吸虫毛蚴法阳性、阴性符合率对比

牛血纸来源	本发明斑点金免疫渗滤方法检测结果		粪孵毛蚴法检测结果	
	阳性	阴性	阳性	阴性
湖北	59 头		59 头	
四川	80 头		80 头	
浙江		52 头		52 头
吉林		32 头		32 头
黑龙江		20 头		20 头
山东	1 头	25 头		26 头

[0082] 注：以本发明的斑点金渗滤法与粪孵血吸虫毛蚴法分别检测 139 头血吸虫病阳性牛血纸，阳性符合率为 100%；检测 130 头血吸虫病阴性牛的血纸，阴性符合率 99.2%。

[0083] 试验例 2：(斑点金渗滤法与斑点酶标法阳性、阴性符合率对比)

[0084] 斑点金渗滤法与斑点酶标法阳性、阴性符合率对比

牛血纸来源	本发明斑点金渗滤方法检测结果		斑点酶标法检测结果	
	阳性	阴性	阳性	阴性
湖北	59 头		59 头	
四川	80 头		80 头	
浙江		52 头		52 头
吉林		32 头		32 头
黑龙江		20 头		20 头
山东	1 头	25 头	1 头	25 头

[0085] 注：以本发明斑点金渗滤法和斑点酶标法分别检测 139 头血吸虫阳性牛和 130 头血吸虫阴性牛的血纸，阳性符合率和阴性符合率两者均相同。

[0086] 试验例 3：(对人工感染血吸虫病牛不同感染期血纸的检测)

[0087] 斑点金免疫渗滤法测定人工感染不同时间血吸虫病牛血纸的反应

感染时间 (天)	3	5	7	14	21	28	35	42
1# 牛	-	±	++	++	++	+++	+++	++++
2# 牛	-	-	++	++	++	++	+++	+++
3# 牛	-	±	++	++	++	+++	++++	++++
4# 牛	-	±	++	++	++	++	+++	++++
5# 牛	-	-	++	++	++	++	+++	++++

[0088] 注：不显色或淡黄色判为“-”，淡桔黄色判为“±”，淡桔红色判为“+”，依红色由浅到深分别判为“++”、“+++”和“++++”，“++”以上判为阳性。

[0089] 人工感染血吸虫尾蚴 50～500 条的牛 5 头，在感染后 3、5、7、14、21、28、35、42 天分别采血，制备血纸，按实施例 10 介绍的的血纸检测方法进行检测；结果，人工感染血吸虫 7～42 天的病牛血样均出现红色斑点，而人工感染前及人工感染 3、5 天的血样均不显示红色斑点。

[0090] 试验例 4：(不同人员同法操作试验)

[0091] 斑点金免疫渗滤法检测自然感染血吸虫病牛血纸的可重复性检验

操作人员	1		2		3		4		5	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
湖北阳性牛血纸 12 份	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0
四川阳性牛血纸 8 份	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0
浙江阴性牛血纸 7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7
黑龙江阴性牛血纸 5 份	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
吉林阴性牛血纸 11 份	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11
山东阴性牛血纸 6 份	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6

[0092] 由湖北和四川粪孵毛蚴阳性牛的血纸样品中分别随机抽取 12 份和 8 份,由浙江、黑龙江、吉林、山东粪孵毛蚴阴性牛的血纸中分别随机取 7 份、5 份、11 份和 6 份,共 49 个样品,由 5 个操作人员按照实施例 10 的方法分别操作检测,阳性和阴性的判别结果 5 人一致。

[0093] 试验例 5:(对羊、猪和兔阳性血纸符合率和阴性血纸符合率的检测)

[0094] 病羊血纸样品 2 个,猪血纸样品 5 个,兔血纸样品 5 个(均系人工感染血吸虫),以及健康羊、猪、兔血纸样品各 5 个,以实施例 10 的方法进行检测,阳性血纸符合率和阴性血纸符合率均为 100%。

[0095] 试验例 6:(血吸虫抗原胶体金保存期试验)

[0096] 血吸虫抗原胶体金保存期测定

保存时间 (月数)	测定结果			
	4~8℃ 保存		室温 保存	
	阳性血纸	阴性血纸	阳性血纸	阴性血纸
0.5	+	-	+	-
1	+	-	+	-
1.5	+	-	+	-
2	+	-	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	/	/
5	+	-	/	/
6	+	-	/	/
7	+	-	/	/
8	+	-	/	/
9	+	-	/	/
10	+	-	/	/
11	+	-	/	/
12	+	-	/	/

[0097] 注:血吸虫抗原胶体金系按实施例 7、8 或 9 方法制备。

[0098] 试验结果在 4~8℃ 下保存 12 个月仍有效,在室温下可保存 3 个月之久。

[0099] 试验例 7:(家畜血吸虫病斑点金渗滤法的特异性试验)

[0100] 以本发明家畜血吸虫病斑点金渗滤法试剂盒分别检测健康牛血纸、人工及自然感染血吸虫的牛血纸、自然感染肝片吸虫的牛血纸、人工感染肝片吸虫羊血纸、人工感染锥虫的羊血纸、人工感染蛔虫的猪血纸、自然感染囊虫的猪血纸。其反应见下表。

[0101] 家畜血吸虫病斑点金免疫渗滤法试剂盒的特异性检测

血 样	头份数	反应结果
健康牛血纸	20	-
人工及自然感染血吸虫病牛血纸	139	+
自然感染肝片吸虫病牛血纸	22	-
人工感染肝片吸虫病羊血纸	15	-
人工感染锥虫病羊血纸	11	-
人工感染蛔虫病猪血纸	8	-
自然感染囊虫病猪血纸	7	-

[0102] 检测结果表明,血吸虫抗原胶体金仅对血吸虫病牛血纸呈阳性斑点反应,对健康牛血纸、人工及自然感染肝片吸虫病牛与病羊血纸、人工感染锥虫病羊血纸、人工感染蛔虫病猪血纸、自然感染囊虫病猪血纸均未出现红色斑点,证实上述 5 种寄生虫病之间无交叉反应现象,说明该诊断试剂有较强的特异性。

[0103] 试验例 8:(本发明血吸虫抗原胶体金与兔抗血吸虫卵可溶性抗原多抗胶体金的比较)

[0104] 用本发明试剂盒和兔抗血吸虫卵可溶性抗原多抗胶体金试剂盒(双夹心 DIGFA 法)分别对人工感染血吸虫尾蚴 20~500 条的 0 天、7 天、14 天、21 天、28 天、35 天、41 天和 80 天兔血清进行检测,应用本发明试剂盒对血清作 50~300 倍稀释点样仅需 1 μ l,而兔抗血吸虫卵可溶性抗原多抗胶体金试剂盒使用的血清不稀释,每次用量为 100 μ l。结果见下表:

[0105] 血吸虫抗原胶体金与兔抗血吸虫卵可溶性抗原多抗胶体金

[0106] 检测血吸虫病兔抗体的灵敏度比较

[0107]

兔血清 (感染 S. 天数)	血吸虫抗原胶体金		兔抗血吸虫卵可溶性抗原多抗胶体金	
	血清稀释 倍数	检测结果	血清稀释 倍数	检测结果
0 天	0	—	0	—
7 天	0~50	+	0	—
14 天	0~50	+	0	—
21 天	0~50	+	0	—
28 天	0~100	+	0	+
35 天	0~150	+	0	+
41 天	0~200	+	0	+
80 天	0~300	+	0	+

[0108] 检测结果表明,用本发明的血吸虫抗原胶体金试剂盒可以检测出人工感染血吸虫 7~80 天的病兔抗体,而兔抗血吸虫卵可溶性抗原多抗胶体金试剂盒只能检测出人工感染血吸虫 28~80 天的病兔抗体,而且每次测定所需的血清数量较多。所以本发明试剂盒的检测灵敏度比双夹心 DIGFA 法试剂盒高,可提早 21 天测出血吸虫病兔抗体。

[0109] 同时,应用本发明能测出自然感染仅 1 对血吸虫病牛的血纸抗体,证实斑点金渗滤法具有很高的敏感性。

专利名称(译)	诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒其制备及应用方法		
公开(公告)号	CN1700008B	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	CN200510050188.1	申请日	2005-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
[标]发明人	张雪娟 卢福庄 方兰勇 冯尚连 项美华 程菊芬 周永学		
发明人	张雪娟 卢福庄 方兰勇 冯尚连 项美华 程菊芬 周永学		
IPC分类号	G01N33/569 G01N21/78 G01N33/532 G01N33/53		
审查员(译)	唐宁		
其他公开文献	CN1700008A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种诊断家畜血吸虫病斑点金渗滤试剂盒其制备及应用方法，属新型的免疫标记技术和家畜血吸虫病免疫学诊断技术。本发明将胶体金直接标记在日本血吸虫抗原蛋白质上，适用于牛、羊、猪、兔等多种动物血吸虫病抗体的检测；在应用时仅需将被检家畜血样干纸浸出液，点在硝酸纤维素膜上作为固定相，再滴加血吸虫抗原胶体金2~3滴(100~150μl)，2分钟内即形成肉眼可见的红色斑点，结果判断容易，一个反应盒可做4份待检血样，降低了检测成本，提高了效率，具有敏感、特异、检出率高，省工、省时、成本低等优点。与粪孵血吸虫毛蚴法相比，阳性符合率达100%，阴性符合率99.2%。