



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061135 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810963056.5

(22)申请日 2018.08.22

(71)申请人 广州艺佳生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城掬泉路3号广州国际企
业孵化器D区D501号

(72)发明人 李来庆

(74)专利代理机构 东莞市神州众达专利商标事
务所(普通合伙) 44251

代理人 陈世洪

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

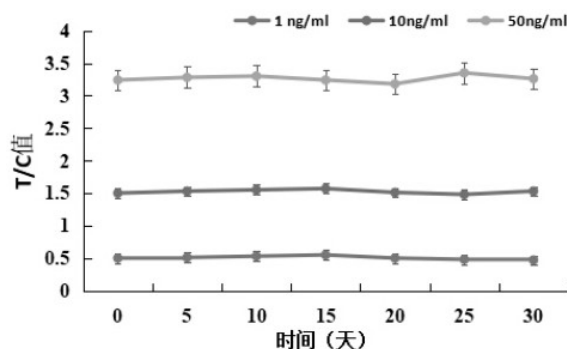
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法

(57)摘要

本发明提供一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法,样本垫的处理:将样本垫置于含有1%BSA、0.5%Tween-20、0.1%NaN₃的0.02mol/L PB缓冲液中,浸泡3min后放置在60℃真空干燥箱中充分干燥备用;荧光微球结合垫的制备:将RLN标记的荧光纳米微球和鸡IgG标记的荧光纳米微球,使用上海金标喷金划膜仪喷在荧光结合垫上,35℃干燥过夜处理;本试剂填补国内没有犬早孕检测试剂的空白,实现犬松弛素的定性、定量、快速检测,在交配后最快15天,即可检测出是否怀孕,大大早于外部观察法、触诊法的20天检测以及超声波的30天检测。



1. 一种犬早孕检测试剂条的制备, 其特征在于包括如下步骤:

S1: 样本垫的处理: 将样本垫置于含有1%BSA、0.5%Tween-20、0.1%NaN₃的0.02mol/L PB缓冲液中, 浸泡3min后放置在60℃真空干燥箱中充分干燥备用;

S2: 荧光微球结合垫的制备: 将RLN标记的荧光纳米微球和鸡IgG标记的荧光纳米微球, 使用上海金标喷金划膜仪喷在荧光结合垫上, 35℃干燥过夜处理;

S3: T、C线的制备: 使用抗体稀释液 (pH7.4的PBS缓冲液和体积比为0.05%Proclin300组成) 对山羊IgG和RLN包被抗体R014进行稀释, 使用喷金划膜仪均匀喷在NC膜的质控线和检测线上, 两线距离5mm, 喷完后35℃干燥过夜备用;

S4: 试剂条组装: 将样本垫、结合垫、NC膜、吸水纸依次搭接地粘贴在PVC底板上, 用切条机切成4.0mm宽的试纸条, 置于有干燥剂的锡箔袋中密封保存。

2. 根据权利要求1所述的一种犬早孕检测试剂条的制备, 其特征在于: 所述荧光纳米微球通过使用粒径200nm钬离子荧光微球, 抗体标记使用的是EDC和NHS活化微球上的羧基, 活化后的羧基与蛋白上的氨基结合使Eu-CM偶联上蛋白, 参照微球说明书进行标记, 抗体微球按照质量比为1:10进行标记实验, 用0.05mol/l 吗啉乙磺酸缓冲液 (MES) 离心洗涤钬离子荧光微球2次, 按照每毫克微球分别加入等质量的EDC和NHS, 室温下震荡反应30min, 12000g离心去除上清 (以除去多余的EDC和NHS), 使用MES缓冲液清洗沉淀2次, 按量加入检测抗体E001, 室温震荡反应2h, 12000g离心去除上清, 用pH7.5PBS缓冲液洗涤沉淀2次并复溶于PBS缓冲液中, 然后加入封闭缓冲液 (由0.05mol/l Tris、5%牛血清白蛋白 (w/v)、0.05% Triton X-100 (v/v) 和0.09%叠氮化钠 (w/v) 组成, 封闭缓冲液的pH值为7.5) 进行封闭, 4℃封闭过夜, 使用PBS洗涤2次, 4℃保存备用。

3. 根据权利要求1所述的一种犬早孕检测试剂条的制备, 其特征在于: 所述检测抗体E001与包被抗体R014通过将纯化的犬松弛素与载体蛋白KLH交联, 以常规方法与福氏佐剂混合后免疫Balb/C小鼠, 50微克/只, 2周/次, 经过5次皮下免疫后, 测定效价在1:320000以上, 分离脾脏, 与骨髓瘤细胞进行融合, 以纯化的犬松弛素为抗原, 间接ELISA法筛选松弛素单克隆抗体, 用竞争抑制法对获得的特异性克隆进行配对, 筛选得到配对抗体的检测抗体E001和包被抗体R014。

4. 根据权利要求3所述的一种犬早孕检测试剂条的制备, 其特征在于: 所述犬松弛素通过将松弛素B肽链和A肽链分别在N端添加大肠杆菌蛋白信号肽设计成分泌肽链, 在同一表达载体于大肠杆菌膜外周间隙分泌表达, 并在膜外周间隙的氧化环境中形成B肽链和A肽链间的二硫键, 自组装成成熟的犬松弛素。

5. 根据权利要求3所述的一种犬早孕检测试剂条的使用方法, 其特征在于: 使用抗原稀释液 (PBS缓冲液+1%BSA+0.5%Tween20) 稀释血清样本, 震荡混匀, 取100μl血清混悬液, 加入检测卡的加样孔中, 10分钟后通过荧光检测仪分别检测T、C线位置的荧光信号, 仪器将T、C位置的荧光信号换算成数字信息, 并计算出T、C位置荧光信号强度的比值, 用ELISACalc软件绘制标准曲线。

一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法

技术领域

[0001] 本发明是一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法,属于基因工程领域。

背景技术

[0002] 现有技术中,母犬的妊娠诊断方法很多,目前较常用的方法有外部观察法、触诊检查法、超声波探测法等。触诊检查法:当母犬怀孕20天左右,子宫开始变的粗大,在腹壁触摸可以明显感知子宫直径变粗。外部观察法和触诊法均需要有相当经验的人才能作出较正确的诊断。妊娠25天后,可以触摸到胎儿(如摸到有鸡蛋大小、富有弹性的肉球)。超声波探测可用于发现怀孕19-25天的胎犬心脏跳动。随着胎犬的发育,其准确率增加,怀孕36-42天的准确率为85%。体型太小的母犬,由于腹部动脉的跳动,误诊率稍高,所以需要一种新的检测方法来解决上述问题。

发明内容

[0003] 针对现有技术存在的不足,本发明目的是提供一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法,以解决上述背景技术中提出的问题,本发明使用方便,便于操作,稳定性好,可靠性高。

[0004] 为了实现上述目的,本发明是通过如下的技术方案来实现:一种犬早孕检测试剂条的制备,包括如下步骤:

[0005] S1:样本垫的处理:将样本垫置于含有1%BSA、0.5%Tween-20、0.1%NaN₃的0.02mol/L PB缓冲液中,浸泡3min后放置在60℃真空干燥箱中充分干燥备用;

[0006] S2:荧光微球结合垫的制备:将RLN标记的荧光纳米微球和鸡IgG标记的荧光纳米微球,使用上海金标喷金划膜仪喷在荧光结合垫上,35℃干燥过夜处理;

[0007] S3:T、C线的制备:使用抗体稀释液(pH7.4的PBS缓冲液和体积比为0.05%Proclin300组成)对山羊IgG和RLN包被抗体R014进行稀释,使用喷金划膜仪均匀喷在NC膜的质控线和检测线上,两线距离5mm,喷完后35℃干燥过夜备用;

[0008] S4:试剂条组装:将样本垫、结合垫、NC膜、吸水纸依次搭接地粘贴在PVC底板上,用切条机切成4.0mm宽的试纸条,置于有干燥剂的锡箔袋中密封保存。

[0009] 进一步地,所述荧光纳米微球通过使用粒径200nm镧离子荧光微球,抗体标记使用的是EDC和NHS活化微球上的羧基,活化后的羧基与蛋白上的氨基结合使Eu-CM偶联上蛋白,参照微球说明书进行标记,抗体微球按照质量比为1:10进行标记实验,用0.05mol/l吗啉乙磺酸缓冲液(MES)离心洗涤镧离子荧光微球2次,按照每毫克微球分别加入等质量的EDC和NHS,室温下震荡反应30min,12000g离心去除上清(以除去多余的EDC和NHS),使用MES缓冲液清洗沉淀2次,按量加入检测抗体E001,室温震荡反应2h,12000g离心去除上清,用pH7.5PBS缓冲液洗涤沉淀2次并复溶于PBS缓冲液中,然后加入封闭缓冲液(由0.05mol/l Tris、5%牛血清白蛋白(w/v)、0.05%Triton X-100(v/v)和0.09%叠氮化钠(w/v)组成,封闭缓冲液的pH值为7.5)进行封闭,4℃封闭过夜,使用PBS洗涤2次,4℃保存备使用。

[0010] 进一步地,所述检测抗体E001与包被抗体R014通过将纯化的犬松弛素与载体蛋白KLH交联,以常规方法与福氏佐剂混合后免疫Balb/C小鼠,50微克/只,2周/次,经过5次皮下免疫后,测定效价在1:320000以上,分离脾脏,与骨髓瘤细胞进行融合,以纯化的犬松弛素为抗原,间接ELISA法筛选松弛素单克隆抗体,用竞争抑制法对获得的特异性克隆进行配对,筛选得到配对抗体的检测抗体E001和包被抗体R014。

[0011] 进一步地,所述犬松弛素通过将松弛素B肽链和A肽链分别在N端添加大肠杆菌蛋白信号肽设计成分泌肽链,在同一表达载体于大肠杆菌膜外周间隙分泌表达,并在膜外周间隙的氧化环境中形成B肽链和A肽链间的二硫键,自组装成成熟的犬松弛素。

[0012] 一种犬早孕检测试剂条的使用方法,使用抗原稀释液(PBS缓冲液+1%BSA+0.5%Tween20)稀释血清样本,震荡混匀,取100 μ l血清混悬液,加入检测卡的加样孔中,10分钟后通过荧光检测仪分别检测T、C线位置的荧光信号,仪器将T、C位置的荧光信号换算成数字信息,并计算出T、C位置荧光信号强度的比值,用ELISACalc软件绘制标准曲线。

[0013] 本发明的有益效果:本发明的一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法,本试剂填补国内没有犬早孕检测试剂的空白,实现犬松弛素的定性、定量、快速检测,在交配后最快15天,即可检测出是否怀孕,大大早于外部观察法、触诊法的20天检测以及超声波的30天检测。

附图说明

[0014] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0015] 图1为本发明一种犬早孕检测试剂条的稳定性数据统计图;

[0016] 图2为本发明一种犬早孕检测试剂条中RLN标准曲线图;

具体实施方式

[0017] 为使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。

[0018] 请参阅图1,本发明提供一种技术方案:一种犬早孕检测试剂条的制备,包括如下步骤:

[0019] S1:样本垫的处理:将样本垫置于含有1%BSA、0.5%Tween-20、0.1%NaN₃的0.02mol/L PB缓冲液中,浸泡3min后放置在60℃真空干燥箱中充分干燥备用;

[0020] S2:荧光微球结合垫的制备:将RLN标记的荧光纳米微球和鸡IgG标记的荧光纳米微球,使用上海金标喷金划膜仪喷在荧光结合垫上,35℃干燥过夜处理;

[0021] S3:T、C线的制备:使用抗体稀释液(pH7.4的PBS缓冲液和体积比为0.05%Proclin300组成)对山羊IgG和RLN包被抗体R014进行稀释,使用喷金划膜仪均匀喷在NC膜的质控线和检测线上,两线距离5mm,喷完后35℃干燥过夜备用;

[0022] S4:试剂条组装:将样本垫、结合垫、NC膜、吸水纸依次搭接地粘贴在PVC底板上,用切条机切成4.0mm宽的试纸条,置于有干燥剂的锡箔袋中密封保存。

[0023] 荧光纳米微球通过使用粒径200nm钕离子荧光微球,抗体标记使用的是EDC和NHS活化微球上的羧基,活化后的羧基与蛋白上的氨基结合使Eu-CM偶联上蛋白,参照微球说明

书进行标记,抗体微球按照质量比为1:10进行标记实验,用0.05mol/l吗啉乙磺酸缓冲液(MES)离心洗涤钨离子荧光微球2次,按照每毫克微球分别加入等质量的EDC和NHS,室温下震荡反应30min,12000g离心去除上清(以除去多余的EDC和NHS),使用MES缓冲液清洗沉淀2次,按量加入检测抗体E001,室温震荡反应2h,12000g离心去除上清,用pH7.5PBS缓冲液洗涤沉淀2次并复溶于PBS缓冲液中,然后加入封闭缓冲液(由0.05mol/l Tris、5%牛血清白蛋白(w/v)、0.05%Triton X-100(v/v)和0.09%叠氮化钠(w/v)组成,封闭缓冲液的pH值为7.5)进行封闭,4℃封闭过夜,使用PBS洗涤2次,4℃保存备使用。

[0024] 检测抗体E001与包被抗体R014通过将纯化的犬松弛素与载体蛋白KLH交联,以常规方法与福氏佐剂混合后免疫Balb/C小鼠,50微克/只,2周/次,经过5次皮下免疫后,测定效价在1:320000以上,分离脾脏,与骨髓瘤细胞进行融合,以纯化的犬松弛素为抗原,间接ELISA法筛选松弛素单克隆抗体,用竞争抑制法对获得的特异性克隆进行配对,筛选得到对抗体的检测抗体E001和包被抗体R014。

[0025] 犬松弛素通过将松弛素B肽链和A肽链分别在N端添加大肠杆菌蛋白信号肽设计成分泌肽链,在同一表达载体于大肠杆菌膜外周间隙分泌表达,并在膜外周间隙的氧化环境中形成B肽链和A肽链间的二硫键,自组装成成熟的犬松弛素。

[0026] 一种犬早孕检测试剂条的使用方法,使用抗原稀释液(PBS缓冲液+1%BSA+0.5%Tween20)稀释血清样本,震荡混匀,取100μl血清混悬液,加入检测卡的加样孔中,10分钟后通过荧光检测仪分别检测T、C线位置的荧光信号,仪器将T、C位置的荧光信号换算成数字信息,并计算出T、C位置荧光信号强度的比值,用ELISACalc软件绘制标准曲线。

[0027] 1.标准曲线的建立

[0028] 将购买的松弛素重组抗原,用样本稀释液准确稀释成0,0.5,1,5,10,50ng/mL 6个浓度。用上述浓度的抗原进行荧光免疫层析,每个浓度平行检测6次,反应时间为10min。以RLN重组抗原标准品浓度为横坐标,T/C值为纵坐标,绘制标准曲线,如图2所示。四参数方程为 $y = (7.00464 - 0.01787) / [1 + (x / 50.69831) - 0.98241] + 0.01787$, $R^2 = 0.99991$ 。该层析试剂的最低检测限为0.08ng/ml,检测灵敏度为0.15ng/ml。

[0029] 2.回收率实验

[0030] 向10份未妊娠的犬血清中加入高、中、低浓度的RLN重组抗原,测定血清回收率。得到RLN在血清中的回收率在100.14%-110.71%之间变化。

[0031] 表2 回收率实验

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
本 编 号										
始 浓 度	0.12	0.08	0.04	0.07	0.16	0.14	0.08	0.11	0.14	0.12
[0032] 入 浓 度	1	1	1	10	10	10	50	50	50	50
测 浓 度	1.24	1.12	1.14	10.12	10.24	11.06	50.15	50.24	51.1	52.42
收 率	110.71	103.70	109.62	100.50	100.79	109.07	100.14	100.26	101.91	104.59

[0033] 3. 精密度实验

[0034] 采用本发明检测试剂盒对精确定量的高、中、低三个标准品浓度进行测定,各设置10各复孔。如表2所示,本试剂盒的批内变异系数和批间变异系数均较小,符合试剂盒规定要求。

	样本	平均值 (ng/ml)	标准差	变异系数(%)
[0035]	分析内 (n=10)	低	1.25	0.16
		中	10.2	1.03
		高	52.2	5.12
	分析间 (n=10)	低	1.36	0.14
		中	8.24	0.95
		高	47.26	4.98

[0036] 4. 稳定性实验

[0037] 本研究采用热稳定加速实验确定本免疫层析试剂的稳定性,将制备好的检测试剂封口后在37℃电热鼓风干燥箱放置30天,每5天检测10ng/ml、50ng/ml和200ng/ml的RLN重组抗原标准品,考察本方法的加速稳定性情况。结果见图1,37℃加速30天相当于4℃放置超过两年。因此本免疫层析试剂在4℃保存时可以保持相对稳定。

[0038] 实施例1:使用抗原稀释液稀释血清样本(15天和20天血清样本未稀释,25天血清样本稀释2倍,30天和60天血清样本稀释5倍),震荡混匀。取100μl样本加入检测卡的加样孔中,10分钟后通过荧光检测仪分别检测T、C线位置的荧光信号,计算出T、C位置荧光信号强

度的比值。同时,使用试剂盒中的标准品,绘制标准曲线,按照标准曲线计算各个样本的RLX浓度,其中妊娠15天的孕犬血清松弛素浓度为 $0.22 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$,20天孕犬血清松弛素浓度为 $0.35 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$,25天孕犬血清松弛素浓度为 $4.85 \pm 1.23 \text{ ng/ml}$,30天孕犬血清松弛素浓度为 $100.42 \pm 22.8 \text{ ng/ml}$,60天孕犬血清松弛素浓度为 $536.46 \pm 104.85 \text{ ng/ml}$,本发明试剂条可用于犬早孕检测及犬分娩监控。

[0039] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点,对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0040] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

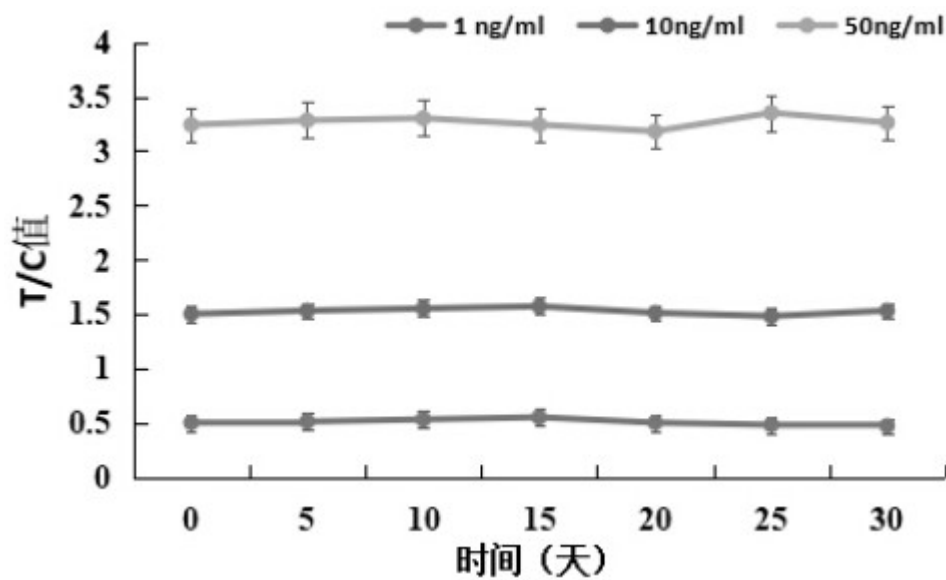


图1

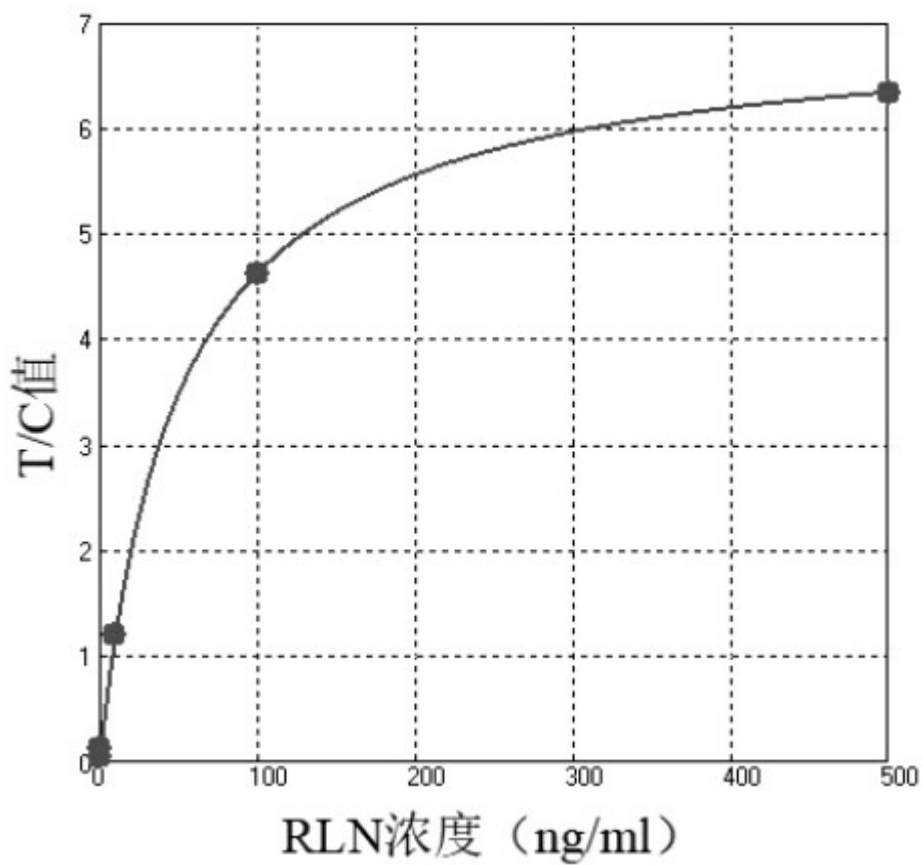


图2

专利名称(译)	一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法		
公开(公告)号	CN109061135A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810963056.5	申请日	2018-08-22
[标]发明人	李来庆		
发明人	李来庆		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6428 G01N21/6486 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	陈世洪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种犬早孕检测试剂条的制备及使用方法，样本垫的处理：将样本垫置于含有1%BSA、0.5%Tween-20、0.1%NaN₃的0.02mol/L PB缓冲液中，浸泡3min后放置在60℃真空干燥箱中充分干燥备用；荧光微球结合垫的制备：将RLN标记的荧光纳米微球和鸡IgG标记的荧光纳米微球，使用上海金标喷金划膜仪喷在荧光结合垫上，35℃干燥过夜处理；本试剂填补国内没有犬早孕检测试剂的空白，实现犬松弛素的定性、定量、快速检测，在交配后最快15天，即可检测出是否怀孕，大大早于外部观察法、触诊法的20天检测以及超声波的30天检测。

