



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110346554 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201810283311.1

(22)申请日 2018.04.02

(71)申请人 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司

地址 471003 河南省洛阳市自由贸易试验区
洛阳片区高新区华夏路6号

申请人 洛阳中科基因检测诊断中心有限公司

(72)发明人 田克恭 王莹

(74)专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书3页 说明书25页
序列表9页

(54)发明名称

一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒及
制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及一种试剂盒包括酶免疫层析检测测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元,缓冲液包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂以及过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水中的任一种;酶免疫层析检测测试纸条包括底物垫,其上吸附有经底物垫稀释液稀释后干燥而成的酶底物,底物垫稀释液包括无水乙醇、pH7.4 0.1M PBS溶液以及0.5%~4% W/V PEG6000或PEG4000;酶免疫层析检测测试纸条包括酶标垫,其上吸附有经酶标抗体稀释液稀释后干燥而成酶标抗体,酶标抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、以及0.5% V/V PEG4000、PEG6000或PEG8000中的任一种;酶免疫层析检测测试纸条包括检测线和质控线,检测线上固定有经固定抗体稀释液稀释的固定抗体,所述固定抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5% V/V海藻糖、0.1% V/V Tween-20。

1. 一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒, 所述试剂盒包括酶免疫层析检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元, 其特征在于,

所述缓冲液包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂, 以及过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水中的任一种; 优选地所述磷酸盐缓冲液为pH7.4 0.1M PBS溶液; 优选地所述大分子蛋白为BSA、OVA、胎牛血清中的一种或多种; 优选地所述防腐剂为庆大霉素、硫酸卡那霉素、叠氮钠、硫柳汞及其盐类、Proclin300中的任一种; 所述过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水的浓度为0.02%~0.2%W/V; 优选地所述过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水的浓度为0.05%~0.1%W/V; 进一步优选地包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.1%~0.5%V/V Tween-20、0.02%V/V Proclin300、0.05%V/V过氧化氢脲、以及0.5%~1%W/V的任一种BSA、OVA和胎牛血清;

所述酶免疫层析检测试纸条包括底物垫, 其上吸附有经底物垫稀释液稀释后干燥而成的酶底物, 所述底物垫稀释液包括无水乙醇、pH7.4 0.1M PBS溶液以及0.5%~4%W/V PEG6000或PEG4000; 优选地, 底物垫稀释液包括2%V/V无水乙醇、0.1%V/VPEG4000、pH7.4的0.1M PBS;

所述酶免疫层析检测试纸条包括酶标垫, 其上吸附有经酶标抗体稀释液稀释后干燥而成酶标抗体, 所述酶标抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、以及0.5%V/V PEG4000、PEG6000或PEG8000中的任一种; 优选地, 所述酶标抗体稀释液包括0.5%V/VPEG4000、pH7.4的0.1M PBS;

所述酶免疫层析检测试纸条包括检测线和质控线, 所述检测线上固定有经固定抗体稀释液稀释的固定抗体, 所述固定抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%V/V海藻糖、0.1%V/V Tween-20。

2. 根据权利要求1所述的酶免疫层析检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元, 其中,

所述检测试纸条从纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区; 所述底物供应区包括所述底物垫, 其上吸附有干燥的酶底物, 优选地所述酶底物为四甲基联苯胺; 所述样品供应区包括所述酶标垫, 其上吸附有酶标抗体, 所述酶优选为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶, 所述酶底物能与所述酶标抗体上的酶产生显色反应; 所述检测区包括所述检测线以及所述质控线, 所述质控线上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗;

所述缓冲液供应单元用于将所述缓冲液供给至所述检测试纸条的底物供应区, 并使得缓冲液和随缓冲液扩散的样品处理液、酶底物和酶标抗体沿检测试纸条的纵向而向远离底物供应区的一端迁移。

3. 根据权利要求2所述的酶免疫层析检测试剂盒, 其特征在于, 所述酶标抗体溶解于所述酶标抗体稀释液中的浓度为0.5~10 μ g/ml、所述固定抗体溶解于所述固定抗体稀释液中的浓度为0.5~1mg/ml、羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗溶解于磷酸盐缓冲液或所述固定抗体稀释液中的浓度为1~3mg/ml、酶底物溶解于底物垫稀释液的终浓度为0.5%~4%W/V。

4. 根据权利要求2所述的酶免疫层析检测试剂盒, 其特征在于, 所述检测线和所述质控线两线间距 ≥ 5 mm。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 酶标抗体中的单克隆抗体和固定抗体中的单克隆抗体

为CCTCC No:C2014198小鼠杂交瘤细胞3G12分泌的猪圆环病毒2型单克隆抗体3G12和CCTCC No:C2014199小鼠杂交瘤细胞2F8分泌的猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8的任意组合；或者

为猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB2和猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB1的任意组合，所述单克隆抗体PEDV-McAB2重链可变区为SEQ ID No.1所示、轻链可变区为SEQ ID No.2所示，所述单克隆抗体PEDV-McAB1重链可变区为SEQ ID No.3所示、轻链可变区为SEQ ID No.4所示；或者

为猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体TGEV-3D2和猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体TGEV-4B4的任意组合，所述单克隆抗体TGEV-3D2重链可变区为SEQ ID No.5所示、轻链可变区为SEQ ID No.6所示，所述单克隆抗体TGEV-4B4重链可变区为SEQ ID No.7所示、轻链可变区为SEQ ID No.8所示；或者

为抗A型流感病毒核蛋白单克隆抗体IV-McAB1和抗A型流感病毒核蛋白单克隆抗体IV-McAB2的任意组合，所述单克隆抗体IV-McAB1重链可变区为SEQ ID No.9所示、轻链可变区为SEQ ID No.10所示，所述单克隆抗体IV-McAB2重链可变区为SEQ ID No.11所示、轻链可变区为SEQ ID No.12所示；或者

为CCTCC No:C201578小鼠骨髓杂交瘤细胞10B11株分泌的犬细小病毒单克隆抗体CPV-10B11和CCTCC No:C201579小鼠骨髓杂交瘤细胞10H4株分泌的犬细小病毒单克隆抗体CPV-10H4的任意组合；或者

为CCTCC No:C2015201小鼠骨髓杂交瘤细胞1G5分泌的犬瘟热病毒单克隆抗体CDV-1G5和CCTCC No:C2015202小鼠骨髓杂交瘤细胞6E11株分泌的犬瘟热病毒单克隆抗体CDV-6E11的任意组合；或者

为犬腺病毒单克隆抗体CAV-5G4和犬腺病毒单克隆抗体CAV-1A1的任意组合，所述单克隆抗体CAV-5G4重链可变区为SEQ.ID No.13所示、轻链可变区为SEQ.ID No.14所示，所述单克隆抗体CAV-1A1重链可变区为SEQ.ID No.15所示、轻链可变区为SEQ.ID No.16所示。

6. 根据权利要求1所述的酶免疫层析检测试剂盒，其特征在于，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和防腐剂；优选地，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和Proclin300；更优选地，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~2.0%W/V CHAPS、0.5%~2.0%W/V皂苷和0.02%V/V Proclin300；最优选地，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%W/V CHAPS、1%W/V皂苷、0.02%V/V Proclin300。

7. 根据权利要求6所述的酶免疫层析检测试剂盒，其特征在于，固体样品溶解于所述样品处理液的溶解量为0.08~0.5g/500-1500 μ l，液体样品溶解于所述样品处理液的溶解量为500~1500 μ l/500-1500 μ l；经样品处理液溶解后的样品检测用量为50~150 μ l；

所述样品选自组织、血清、肛门分泌物、粪便、咽鼻分泌物、眼鼻分泌物和病毒培养物。

8. 一种用于权利要求1-7任一项所述试剂盒的样品处理液，其特征在于，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和防腐剂；优选地，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和Proclin300；更优选地，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~2.0%W/V CHAPS、0.5%~2.0%W/V皂苷和0.02%V/V Proclin300；最优选地，所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%W/V CHAPS、1%W/V皂苷、0.02%V/V

Proclin300。

9. 根据权利要求8所述的样品处理液,其特征在于,所述样品处理液检测的样品选自组织、血清、肛门分泌物、粪便、咽鼻分泌物、眼鼻分泌物和病毒培养物。

10. 一种制备权利要求1-8任一项所述试剂盒的方法,其特征在于,包括:

步骤(1) 配制缓冲液;

步骤(2) 使用底物垫稀释液将底物稀释,并将其吸附于吸附物即得底物垫,干燥后置于检测试纸条中;

步骤(3) 标记单克隆抗体为酶标抗体,用酶标抗体稀释液将其稀释,并吸附于吸附物即得酶标垫,干燥后置于检测试纸条中;

步骤(4) 固定抗体经固化抗体稀释液稀释并作为检测线固定于检测试纸条中,羊抗鼠多抗或羊抗鼠单抗固定于质控线,干燥;

步骤(5) 配制样品处理液;以及

步骤(6) 将所述酶免疫层析检测试纸条、所述样品处理液、所述缓冲液和缓冲液供应单元装配成试剂盒。

一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒及制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒及其制备方法与应用,属于生物检测领域。

背景技术

[0002] 目前,在生物检测领域利用双抗体夹心检测抗原较为常见,其中,有通过酶标记或酶标记后层析的方式建立的检测方法,如张立怀等文献(张立怀等,检测禽流感病毒抗原的双抗体夹心ELISA方法的建立.中国医药生物技术,2009,4(1):62-64)中报道的以单克隆抗体-多克隆抗体夹心原理建立的酶联免疫吸附方法ELISA检测禽流感病毒抗原,以及如中国专利CN104062430A报道的以单克隆抗体-单克隆抗体夹心原理建立的酶层析法检测试纸条检测流感病毒。其中,以单克隆抗体-单克隆抗体(双单抗)夹心检测抗原最为常见。

[0003] 但是,在基于现有技术的反复试验摸索中发现了这样的现象:涉及双抗体(双单抗)夹心原理的快速检测产品在确定2株抗体可用于双抗体夹心检测抗原后,随之的搭配模式研究结果呈现出其中1株单克隆抗体只能用于标记而另1株单克隆抗体只能作为检测线上固定化的抗体,若将2株抗体的搭配模式改变,即将产品中2株单抗的位置互换,则会引起非特异反应或降低检测灵敏度。

[0004] 另外,现有产品中样品处理液、缓冲液所含成分不一,在实际检测中往往导致靶抗原未得到充分裂解或反应不够充分。并且不同试剂盒样品处理液通常仅针对特定待检物来源样品有效,对其它动物疫病抗原未必有效(参见商品化试剂盒的说明书,多标有“不能使用其它试剂盒的样品处理液或样本稀释液”),这导致实际检测使用其他类型的样品时灵敏度低、敏感性不好,甚至出现非特异反应,影响检测速度,严重时会使病情恶化或导致病毒肆意传播。

[0005] 因此,现有技术中缺乏一种能够使双抗夹心检测抗原的标记抗体和固定抗体互换的试剂盒,也缺少一种能够解决对不同来源的样品均能充分处理以保证检测效果的试剂盒。

发明内容

[0006] 为解决现有技术的不足,本发明的一个目的是提供一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒,所述试剂盒包括酶免疫层析检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元,其特征在于,

[0007] 所述缓冲液包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂,以及过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水中的任一种;优选地所述磷酸盐缓冲液为pH7.4 0.1M PBS溶液;优选地所述大分子蛋白为BSA、OVA、胎牛血清中的一种或多种;优选地所述防腐剂为庆大霉素、硫酸卡那霉素、叠氮钠、硫柳汞及其盐类、Proclin300中的任一种;所述过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水的浓度为0.02%~0.2%W/V;优选地所述过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水的浓度为0.05%~0.1%W/V;进一步优选地包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.1%~

0.5%V/V Tween-20、0.02%V/V Proclin300、0.05%V/V过氧化氢脲、以及0.5%~1%W/V的任一种BSA、OVA和胎牛血清；

[0008] 所述酶免疫层析检测试纸条包括底物垫，其上吸附有经底物垫稀释液稀释后干燥而成的酶底物，所述底物垫稀释液包括无水乙醇、pH7.4 0.1M PBS溶液以及0.5%~4%W/V PEG6000或PEG4000；优选地，底物垫稀释液包括2%V/V无水乙醇、0.1%V/VPEG4000、pH7.4的0.1M PBS；

[0009] 所述酶免疫层析检测试纸条包括酶标垫，其上吸附有经酶标抗体稀释液稀释后干燥而成酶标抗体，所述酶标抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、以及0.5%V/V PEG4000、PEG6000或PEG8000中的任一种；优选地，所述酶标抗体稀释液包括0.5%V/VPEG4000、pH7.4的0.1M PBS；

[0010] 所述酶免疫层析检测试纸条包括检测线和质控线，所述检测线上固定有经固定抗体稀释液稀释的固定抗体，所述固定抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%V/V海藻糖、0.1%V/V Tween-20。

[0011] 本发明的酶免疫层析检测试剂盒，通过特定组成的缓冲液、底物垫稀释液、酶标抗体稀释液、固定抗体稀释液，解决了原双抗夹心法酶免疫层析中两种抗体之间不能互换的问题，还在使用原单克隆抗体配对时进一步提高了检测灵敏度，且在使用互换的单克隆抗体配对时检测灵敏度能与互换前相当或更优。

[0012] 作为本发明的一种实施方式，本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中，所述试剂盒包括检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元，其中，所述检测试纸条从纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区；所述底物供应区包括所述底物垫，其上吸附有干燥的酶底物，优选地所述酶底物为四甲基联苯胺；所述样品供应区包括所述酶标垫，其上吸附有酶标抗体，所述酶优选为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶，所述酶底物能与所述酶标抗体上的酶产生显色反应；所述检测区包括所述检测线以及所述质控线，所述质控线上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗；所述缓冲液供应单元用于将所述缓冲液供给至所述检测试纸条的底物供应区，并使得缓冲液和随缓冲液扩散的样品处理液、酶底物和酶标抗体沿检测试纸条的纵向而向远离底物供应区的一端迁移。

[0013] 作为本发明的一种实施方式，本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中，所述酶标抗体溶解于酶标抗体稀释液中的浓度为0.5~10 μ g/ml、所述固定抗体溶解于固定抗体稀释液中的浓度为0.5~1mg/ml、羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗溶解于固定抗体稀释液中的浓度为1~3mg/ml、酶底物溶解于底物稀释液的终浓度为0.5%~4%W/V。

[0014] 本发明的酶标抗体、固定抗体、酶底物的浓度取特定的范围，能步骤检测灵敏度的进一步提高。

[0015] 作为本发明的一种实施方式，本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中，所述检测线、质控线两线间距 ≥ 5 mm。

[0016] 作为本发明的一种实施方式，本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中，酶标抗体中的单克隆抗体和固定抗体中的单克隆抗体为CCTCC No:C2014198小鼠杂交瘤细胞3G12分泌的猪圆环病毒2型单克隆抗体3G12和CCTCC No:C2014199小鼠杂交瘤细胞2F8分泌的猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8的任意组合；或者为猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB2和猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB1的任意组合，所述单克隆抗体PEDV-McAB2重链可

变区为SEQ ID No.1所示、轻链可变区为SEQ ID No.2所示,所述单克隆抗体PEDV-McAB1重链可变区为SEQ ID No.3所示、轻链可变区为SEQ ID No.4所示;或者为猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体TGEV-3D2和猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体TGEV-4B4的任意组合,所述单克隆抗体TGEV-3D2重链可变区为SEQ ID No.5所示、轻链可变区为SEQ ID No.6所示,所述单克隆抗体TGEV-4B4重链可变区为SEQ ID No.7所示、轻链可变区为SEQ ID No.8所示;或者为抗A型流感病毒核蛋白单克隆抗体IV-McAB1和抗A型流感病毒核蛋白单克隆抗体IV-McAB2的任意组合,所述单克隆抗体IV-McAB1重链可变区为SEQ ID No.9所示、轻链可变区为SEQ ID No.10所示,所述单克隆抗体IV-McAB2重链可变区为SEQ ID No.11所示、轻链可变区为SEQ ID No.12所示;或者为CCTCC No:C201578小鼠骨髓杂交瘤细胞10B11株分泌的犬细小病毒单克隆抗体CPV-10B11和CCTCC No:C201579小鼠骨髓杂交瘤细胞10H4株分泌的犬细小病毒单克隆抗体CPV-10H4的任意组合;或者为CCTCC No:C2015201小鼠骨髓杂交瘤细胞1G5分泌的犬瘟热病毒单克隆抗体CDV-1G5和CCTCC No:C2015202小鼠骨髓杂交瘤细胞6E11株分泌的犬瘟热病毒单克隆抗体CDV-6E11的任意组合;或者为犬腺病毒单克隆抗体CAV-5G4和犬腺病毒单克隆抗体CAV-1A1的任意组合,所述单克隆抗体CAV-5G4重链可变区为SEQ ID No.13所示、轻链可变区为SEQ ID No.14所示,所述单克隆抗体CAV-1A1重链可变区为SEQ ID No.15所示、轻链可变区为SEQ ID No.16所示。

[0017] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为PCV2-3G12,所述固定抗体为PCV2-2F8;或所述酶标抗体为PCV2-2F8,所述固定抗体为PCV2-3G12。

[0018] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为PEDV-McAB2,所述固定抗体为PEDV-McAB1;或所述酶标抗体为PEDV-McAB1,所述固定抗体为PEDV-McAB2。

[0019] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为TGEV-3D2,所述固定抗体为TGEV-4B4;或所述酶标抗体为TGEV-4B4,所述固定抗体为TGEV-3D2。

[0020] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为IV-McAB1,所述固定抗体为IV-McAB2;或所述酶标抗体为IV-McAB2,所述固定抗体为IV-McAB1。

[0021] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为CPV-10B11,所述固定抗体为CPV-10H4;或所述酶标抗体为CPV-10H4,所述固定抗体为CPV-10B11。

[0022] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为CDV-1G5,所述固定抗体为CDV-6E11;或所述酶标抗体为CDV-6E11,所述固定抗体为CDV-1G5。

[0023] 作为本发明的一种实施方式,所述酶标抗体为CAV-5G4,所述固定抗体为CAV-1A1;或酶标抗体为CAV-1A1,所述固定抗体为CAV-5G4。

[0024] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和防腐剂;优选地,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和Proclin300;更优选地,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~2.0%W/V CHAPS、0.5%~2.0%W/V皂苷和0.02%V/V Proclin300;最优选地,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%W/V CHAPS、1%W/V皂苷、0.02%V/V Proclin300。

[0025] 本发明通过使用特定组成的样品处理液,实现了对多种检测靶标样品的检测,克服了现有技术中一种酶免疫层析检测试剂盒只能检测一种或几种检测靶标样品的缺陷。

[0026] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中,固体样品

溶解于所述样品处理液的溶解量为0.08~0.5g/500~1500 μ l,液体样品溶解于所述样品处理液的溶解量为500~1500 μ l/500~1500 μ l;所经样品处理液溶解的样品检测用量为50~150 μ l。

[0027] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的酶免疫层析检测试剂盒中,所述样品选自组织、血清、肛门分泌物、粪便、咽鼻分泌物、眼鼻分泌物和病毒培养物。

[0028] 本发明的酶免疫层析检测试剂盒能对多种样品进行检测。

[0029] 本发明的再一目的是提供一种上述试剂盒的制备方法,包括:

[0030] 步骤(1)配制缓冲液;

[0031] 步骤(2)使用底物垫稀释液将底物稀释,并将其吸附于吸附物即得底物垫,干燥后置于检测试纸条中;

[0032] 步骤(3)标记单克隆抗体为酶标抗体,用酶标抗体稀释液将其稀释,并吸附于吸附物即得酶标垫,干燥后置于检测试纸条中;

[0033] 步骤(4)固定抗体经固化抗体稀释液稀释并作为检测线固定于检测试纸条中,羊抗鼠多抗或羊抗鼠单抗固定于质控线,干燥;

[0034] 步骤(5)配制样品处理液;以及

[0035] 步骤(6)将所述酶免疫层析检测试纸条、所述样品处理液、所述缓冲液和缓冲液供应单元装配成试剂盒。

[0036] 本发明制备的试剂盒,解决了利用双抗体夹心原理制备的现有产品中2株抗体的位置互换的技术难题,有效降低了发生非特异性反应的风险,提高了检测灵敏度。

[0037] 本发明的再一目的是提供基于非诊断目来使用上述试剂盒来检测样品中病毒的方法,所述检测方法包括:

[0038] 步骤(1)使用所述样品处理液预处理待检测样品;

[0039] 步骤(2)将经步骤(1)预处理的样品加入所述检测试纸条中;

[0040] 步骤(3)通过所述缓冲液供应单元向所述检测试纸条供应所述缓冲液,并静置反应30分钟;以及

[0041] 步骤(4)反应后观察所述检测试纸条,若质控线无条带,则无论检测线是否有条带本次检测都判定为无效;若质控线有条带,则检测线有条带即为阳性,检测线无条带即为阴性。

[0042] 本发明的再一目的是提供一种样品处理液,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和防腐剂;优选地,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和Proclin300;更优选地,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~2.0%W/V CHAPS、0.5%~2.0%W/V皂苷和0.02%V/V Proclin300;最优选地,所述样品处理液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%W/V CHAPS、1%W/V皂苷、0.02%V/V Proclin300。

[0043] 本发明的样品处理液,能与不同商品化试剂盒配合使用。当本发明的样品处理液在与商品化试剂盒联用时,其检测灵敏度较原商品化试剂盒的检测灵敏度更好;并且能对多种样品进行检测,克服了现有技术中一种酶免疫层析检测试剂盒只能检测一种或几种检测靶标样品的缺陷。

[0044] 作为本发明的一种实施方式,本发明的样品处理液所检测的样品选自组织、血清、肛门分泌物、粪便、咽鼻分泌物、眼鼻分泌物和病毒培养物。

具体实施方式

[0045] 以下,对本发明的一些示例性实施方式进行详细说明以使本发明更易被本领域技术人员所理解。

[0046] 为简单明了起见,已在本发明的“发明内容”部分列举的一些实施方式在本“具体实施方式”部分不再赘述。

[0047] 本发明中“酶层析法检测试纸条”、“酶免疫层析检测试纸条”、或“检测试纸条”可互换使用。

[0048] 本发明中“酶标抗体”可与“标记抗体”互换使用,是以酶标记为主的单克隆抗体。术语“酶”包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、小牛肠碱性磷酸酶。其中,辣根过氧化物酶HRP所使用的底物为邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、氨基水杨酸、邻联苯甲胺或2,2'-连胺基-2(3-乙基-并噻唑啉磺酸-6)铵盐,优选为四甲基联苯胺(TMB);碱性磷酸酶所使用的底物为对-硝基苯磷酸酯(p-NPP)或萘酚-AS-Mx磷酸盐+重氮盐;葡萄糖氧化酶所使用的底物为ABTS+HRP+葡萄糖或葡萄糖+甲硫酚噻+噻唑兰; β -半乳糖苷酶所使用的底物为4-甲基伞形酮- β -D半乳糖苷(4MUG)或硝基酚半乳糖苷(ONPG)。

[0049] 本发明中“固定抗体”又称捕获抗体,固定于检测试纸条检测线(简称T线)上,用于捕获层析而来的抗原与标记抗体形成的复合物。

[0050] 术语“磷酸盐缓冲液”是指含有磷酸或其盐并被调至理想pH值的溶液,是生物化学研究中使用最为广泛的一种缓冲液。一般地,磷酸盐缓冲液是从磷酸或磷酸盐(包括但不限于钠和钾盐)制备的。本领域已经知道一些磷酸盐,例如磷酸二氢钠和磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和磷酸氢二钾、磷酸钠和磷酸钾。已经知道磷酸盐是以盐的水合物形式存在的。由于缓冲液的二级解离作用,缓冲的pH值范围很宽,例如约pH4至约pH10的范围,优选约pH5至pH9的范围,更有选约pH7至约pH8的范围,最优选约pH7.4。进一步优选地,所述磷酸盐缓冲液为含氯化钠和氯化钾的磷酸盐缓冲液。本发明中“磷酸盐缓冲液”与PBS可互换使用。

[0051] 术语“大分子蛋白”包括但不限于牛血清白蛋白BSA、卵清白蛋白OVA、胎牛血清。

[0052] 术语“防腐剂”包括但不限于庆大霉素、硫酸卡那霉素、叠氮钠、硫柳汞及其盐类、Proclin300。

[0053] 本发明中所述的“吸附物”是由可以吸附目标物并在缓冲液中释放所吸附的目标物的材料构成。吸附物不改变所要吸附的目标物的化学性质。例如,在本发明的一些实施例中吸附物可以吸附底物垫稀释液而制成底物垫,底物垫则能够在缓冲液的作用下释放底物。吸附物的例子包括但不限于玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和聚酯膜。

[0054] 术语“玻璃纤维膜”简称玻璃纤维,包括玻璃纤维素膜、玻璃纤维滤膜及玻璃纤维滤纸。

[0055] 术语“皂苷”又称saponin、碱皂体、皂素、皂苷、皂角苷或皂草苷,是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷,分类方式多种,可分为单糖链皂苷、双糖链皂苷、三糖链皂苷,又可分为酸性皂苷、中性皂苷,还可分为甾体皂苷、三萜皂苷。所述皂苷包括甾体皂苷、三萜皂苷,优选为洋地黄皂苷。术语“洋地黄皂苷”又称digitonin、毛地黄皂苷、地芫脱皂苷、毛地黄叶苷。

[0056] 术语“CHAPS”是一种去污剂或去垢剂,又称3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲基氨基]-1-丙磺酸、3-((3-胆汁氨丙基) 二甲基胺)-1-丙磺酸、3-[3-(胆酰胺丙基) 二甲氨基]丙磺酸内盐、3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、和3-[3-(胆酰胺丙基) 二甲氨基]丙磺酸内盐。

[0057] 术语“质控线”又称对照线。

[0058] 本发明提供了一种酶免疫层析检测试剂盒,所述试剂盒包括酶免疫层析检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元,其特征在于,

[0059] 所述缓冲液包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂,以及过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水中的任一种;

[0060] 所述酶免疫层析检测试纸条包括底物垫,其上吸附有经底物垫稀释液稀释后干燥而成的酶底物,所述底物垫稀释液包括无水乙醇、pH7.4 0.1M PBS溶液以及0.5%~4%W/V PEG6000或PEG4000;

[0061] 所述酶免疫层析检测试纸条包括酶标垫,其上吸附有经酶标抗体稀释液稀释后干燥而成酶标抗体,所述酶标抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、以及0.5%V/V PEG4000、PEG6000或PEG8000中的任一种;

[0062] 所述酶免疫层析检测试纸条包括检测线和质控线,所述检测线上固定有经固定抗体稀释液稀释的固定抗体,所述固定抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%V/V海藻糖、0.1%V/V Tween-20。

[0063] 作为本发明试剂盒的一个实施方式,所述试剂盒包括检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元,其中,

[0064] 所述检测试纸条从纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区;所述底物供应区包括所述底物垫,其上吸附有干燥的酶底物;所述样品供应区包括所述酶标垫,其上吸附有酶标抗体,所述酶底物能与所述酶标抗体上的酶产生显色反应;所述检测区包括所述检测线和所述质控线,所述质控线上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗;

[0065] 所述缓冲液供应单元用于将所述缓冲液供给至所述检测试纸条的底物供应区,并使得缓冲液和随缓冲液扩散的样品处理液、酶底物和酶标抗体沿检测试纸条的纵向而向远离底物供应区的一端迁移。

[0066] 能够实现上述功能的所述缓冲液供应单元在现有技术中是已知的。例如所述缓冲液供应单元可以是如中国专利CN104062430A所描述的结构,缓冲液存储于底物缓冲槽中,通过将检测试纸条的底物垫连接的展开液垫浸入底物缓冲槽中而将缓冲液供给至检测试纸条的底物供应区,并且通过在检测试纸条的检测区后设置吸水垫,利用吸水垫的毛细管力使缓冲液沿检测试纸条的纵向方向上向检测区迁移。或者,可以通过将检测试纸条放置于底物供应区较高而检测区较低的支承斜坡上,利用缓冲液自身的重力使供应至底物供应区的缓冲液迁移至检测区。

[0067] 本发明以辣根过氧化物酶HRP标记抗体及辣根过氧化物酶HRP所使用的底物四甲基联苯胺(TMB)为例将在实施例2中进行详细阐述。进一步地,本发明辣根过氧化物酶HRP所需的受氢体为以过氧化氢 H_2O_2 为主要成分的固体或液体的,包括但不限于过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水等。

[0068] 本发明所涉及的猪类单克隆抗体主要包括:

[0069] (1) 猪圆环病毒2型单克隆抗体3G12 (简称PCV2-3G12) 由小鼠杂交瘤细胞3G12 (保藏号为CCTCC No:C2014198) 分泌获得, 猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8 (简称PCV2-2F8) 由小鼠杂交瘤细胞2F8 (保藏号为CCTCC No:C2014199) 分泌获得。2株小鼠杂交瘤细胞均保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国武汉·武汉大学, 保藏日期为2014年11月3日。参见中国专利CN105717293A。

[0070] (2) 猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB2、猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB1, 其中, 所述单克隆抗体PEDV-McAB2重链可变区为SEQ ID No.1所示、轻链可变区为SEQ ID No.2所示, 所述单克隆抗体PEDV-McAB1重链可变区为SEQ ID No.3所示、轻链可变区为SEQ ID No.4所示, 参见中国专利CN105461805A。

[0071] (3) 猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体TGEV-3D2, 其重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.5、轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.6; 猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体TGEV-4B4, 其重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.7、轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.8。

[0072] 本发明所涉及的禽类单克隆抗体主要包括:

[0073] (4) 抗A型流感病毒核蛋白单克隆抗体IV-McAB1、抗A型流感病毒核蛋白单克隆抗体IV-McAB2, 其中, 所述单克隆抗体IV-McAB1重链可变区为SEQ ID No.9所示、轻链可变区为SEQ ID No.10所示, 所述单克隆抗体IV-McAB2重链可变区为SEQ ID No.11所示、轻链可变区为SEQ ID No.12所示, 参见中国专利CN104062430A。

[0074] 本发明所涉及的犬类单克隆抗体主要包括:

[0075] (5) 犬细小病毒单克隆抗体10B11 (简称CPV-10B11) 由小鼠骨髓杂交瘤细胞10B11株 (保藏号为CCTCC No:C201578) 分泌获得, 犬细小病毒单克隆抗体10H4 (简称CPV-10H4) 由小鼠骨髓杂交瘤细胞10H4株 (保藏号为CCTCC No:C201579) 分泌获得。2株小鼠杂交瘤细胞均保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国武汉·武汉大学, 保藏时间为2015年05月20日。参见中国专利CN104928258A。

[0076] (6) 犬瘟热病毒单克隆抗体1G5 (简称CDV-1G5) 由小鼠骨髓杂交瘤细胞1G5 (保藏号为CCTCC No:C2015201) 分泌获得, 犬瘟热病毒单克隆抗体6E11 (简称CDV-6E11) 由小鼠骨髓杂交瘤细胞6E11株 (保藏号为CCTCC No:C2015202) 分泌获得。2株杂交瘤细胞均保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国武汉·武汉大学, 保藏时间为2015年11月25日。参见中国专利CN105695420A。

[0077] (7) 犬腺病毒单克隆抗体CAV-5G4, 其重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No.13所示的氨基酸序列, 轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No.14所示的氨基酸序列; 和犬腺病毒单克隆抗体CAV-1A1, 其重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No.15所示的氨基酸序列, 其轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No.16所示的氨基酸序列。

[0078] 本发明还提供了一种用于酶免疫层析检测试剂盒的缓冲液, 其包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂。

[0079] 本发明还提供了一种用于酶免疫层析检测试剂盒的样品处理液, 其包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和防腐剂。

[0080] 本发明制备的样品处理液, 可用于病毒液、粪便、血清、微生物拭子 (含眼鼻拭子、鼻咽拭子、泄殖拭子)、研磨后的组织样品的溶解, 以用于双单抗夹心原理构建的酶免层析

检测类试纸条准确检测处理后的样品。

[0081] 本发明还提供了一种用制备于酶免疫层析检测试剂盒的底物垫稀释液,包含无水乙醇、PEG4000和pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含无水乙醇、PEG6000和pH7.4 0.1M PBS溶液。

[0082] 本发明还提供了一种用于制备酶免疫层析检测试剂盒的酶标抗体稀释液,包含PEG4000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含PEG6000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含PEG8000、pH7.4 0.1M PBS溶液。

[0083] 本发明还提供了提供一种用于制备酶免疫层析检测试剂盒的固化抗体稀释液,包含pH7.4 0.1M PBS溶液、海藻糖和Tween-20。

[0084] 本发明还提供了所述试剂盒的制备方法,包括:

[0085] 步骤(1)配制缓冲液;

[0086] 步骤(2)使用底物垫稀释液将底物稀释,并将其吸附于吸附物即得底物垫,干燥后置于检测试纸条中;

[0087] 步骤(3)标记单克隆抗体为酶标抗体,用酶标抗体稀释液将其稀释,并吸附于吸附物即得酶标垫,干燥后置于检测试纸条中;

[0088] 步骤(4)固定抗体经固化抗体稀释液稀释并作为检测线固定于检测试纸条中,羊抗鼠多抗或羊抗鼠单抗固定于质控线,干燥;

[0089] 步骤(5)配制样品处理液;以及

[0090] 步骤(6)将所述酶免疫层析检测试纸条、所述样品处理液、所述缓冲液和缓冲液供应单元装配成试剂盒。

[0091] 作为本发明的试剂盒的制备方法一种实施方式,所述制备方法包括:

[0092] 步骤(1)配制缓冲液;

[0093] 步骤(2)使用底物垫稀释液将底物稀释,并将其吸附于吸附物即得底物垫,干燥后置于检测试纸条的底物供应区中;

[0094] 步骤(3)标记单克隆抗体为酶标抗体,用酶标抗体稀释液将其稀释,并吸附于吸附物即得酶标垫,干燥后置于检测试纸条的样品供应区中;

[0095] 步骤(4)固定抗体经固定抗体稀释液稀释,以及羊抗鼠多抗或羊抗鼠单抗经磷酸盐缓冲液或固化抗体稀释液稀释,分别作为检测线、质控线固定于检测试纸条的检测区中,干燥;

[0096] 步骤(5)配制样品处理液;以及

[0097] 步骤(6)装配试剂盒,使得所述检测试纸条从纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区,并使得缓冲液供应单元能够将所述缓冲液供给至所述检测试纸条的底物供应区,还使得缓冲液沿检测试纸条的纵向方向而向远离底物供应区的一端迁移。

[0098] 作为本发明的试剂盒的制备方法的一种实施方式,所述制备方法包括:

[0099] 步骤(1)配制缓冲液;

[0100] 步骤(2)使用底物垫稀释液将底物稀释至0.5%~4%W/V,并将其吸附于吸附物即得底物垫,干燥后置于检测试纸条的底物供应区中;

[0101] 步骤(3)标记单克隆抗体为酶标抗体,用酶标抗体稀释液将其稀释至0.5~10 μ g/ml,并吸附于吸附物即得酶标垫,干燥后置于检测试纸条的样品供应区中;

[0102] 步骤(4)固定抗体经固定抗体稀释液稀释至0.5~1mg/ml,以及羊抗鼠多抗或羊抗

鼠单抗经磷酸盐缓冲液或固化抗体稀释液稀释至1~3mg/ml,并分别作为检测线、质控线固定于检测试纸条的检测区中,干燥;

[0103] 步骤(5)配制样品处理液;以及

[0104] 步骤(6)装配试剂盒,使得所述检测试纸条从纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区,并使得缓冲液供应单元能够将所述缓冲液供给至所述检测试纸条的底物供应区,还使得缓冲液沿检测试纸条的纵向方向而向远离底物供应区的一端迁移。

[0105] 作为本发明的试剂盒的制备方法的一种实施方式,在所述制备方法中,所述检测线和所述质控线的间距 $\geq 5\text{mm}$ 。

[0106] 作为本发明的试剂盒的制备方法一种实施方式,在所述制备方法中,所述缓冲液包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂,优选地所述磷酸盐缓冲液为pH7.4 0.1M PBS溶液,优选地所述大分子蛋白为BSA、OVA、胎牛血清中的一种或多种,优选地所述防腐剂为庆大霉素、硫酸卡那霉素、叠氮钠、硫柳汞及其盐类、Proclin300中的任一种,更优选地还包含过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水中的任一种,进一步优选包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~1%W/V BSA、0.1%~0.5%V/V Tween-20、0.02%V/V Proclin300和过氧化氢脲,最优选包含过氧化氢脲、pH7.4的0.1M PBS、1%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300;所述样品处理液包含pH7.40.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和防腐剂,优选包含pH7.4 0.1M PBS溶液、CHAPS、皂苷和Proclin300,更优选包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~2.0%W/V CHAPS、0.5%~2.0%W/V皂苷和0.02%V/V Proclin300,最优选包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%W/V CHAPS、1%W/V皂苷和0.02%V/V Proclin300;所述底物垫稀释液包含无水乙醇、PEG4000和pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含无水乙醇、PEG6000和pH7.4 0.1M PBS溶液,优选包含2%V/V无水乙醇、0.1%V/V PEG4000和pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含2%V/V无水乙醇、0.1%V/V PEG6000和pH7.4 0.1M PBS溶液;所述酶标抗体稀释液包含PEG4000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含PEG6000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含PEG8000、pH7.4 0.1M PBS溶液,优选地包含0.5%V/V PEG4000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含0.5%V/V PEG6000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或包含0.5%V/V PEG8000、pH7.4 0.1M PBS溶液;以及所述固化抗体稀释液包含pH7.4 0.1M PBS溶液、海藻糖和Tween-20,优选包含pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%V/V海藻糖、0.1%V/V Tween-20。

[0107] 作为本发明的试剂盒的制备方法一种实施方式,所述步骤(1)中所述缓冲液为pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%~1%W/V BSA、0.1%~0.5%V/V Tween-20、0.02%V/V Proclin300;

[0108] 所述步骤(2)中所述底物垫稀释液为2%V/V无水乙醇、0.1%V/V PEG4000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或2%V/V无水乙醇、0.1%V/V PEG6000、pH7.4 0.1M PBS溶液;

[0109] 所述步骤(3)中所述酶标抗体稀释液为0.5%V/V PEG4000、pH7.40.1M PBS溶液,或0.5%V/V PEG6000、pH7.4 0.1M PBS溶液,或0.5%V/V PEG8000、pH7.4 0.1M PBS溶液;

[0110] 所述步骤(4)中所述固化抗体稀释液为pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%V/V海藻糖、0.1%V/V Tween-20;

[0111] 所述步骤(5)中所述样品处理液为pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%W/V CHAPS、1%W/V皂苷、0.02%V/V Proclin300。

[0112] 作为本发明检测方法的一个实施例,所述检测方法包括:

[0113] 步骤(1)使用所述样品处理液预处理待检测样品,使固体样品溶解于所述样品处理液的溶解量为0.08~0.5g/500~1500 μ l,液体样品溶解于所述样品处理液的溶解量为500~1500 μ l/500~1500 μ l;

[0114] 步骤(2)将50~150 μ l的经步骤(1)预处理的样品加入所述检测试纸条的样品供应区;

[0115] 步骤(3)通过所述缓冲液供应单元向所述检测试纸条供应所述缓冲液,并静置反应30分钟;以及

[0116] 步骤(4)反应后观察所述检测试纸条的检测区,若质控线无条带,则无论检测线是否有条带本次检测都判定为无效;若质控线有条带,则检测线有条带即为阳性,检测线无条带即为阴性。

[0117] 所述非诊断目的的动物疫病抗原检测包括流行病学分析、对离体组织进行定性定量检测、表位鉴定研究。

[0118] 然而,这并不排除本发明的试剂盒能够用于其他目的的病毒检测活动。

[0119] 本发明中所待检测样品的排毒途径主要是针对靶抗原感染后通过机体排毒途径进行代谢,如猪圆环病毒主要是通过组织、血液排毒,猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒主要是通过肛拭子、粪便排毒,A型流感主要通过咽鼻拭子排毒,犬细小病毒主要是肛拭子、粪便排毒,犬瘟热病毒主要是通过眼鼻拭子、肛拭子、粪便排毒,犬腺病毒主要是通过眼鼻拭子、肛拭子、粪便、血液等排毒。

[0120] 作为本发明的检测方法一种实施方式,所述待检测样品包括但不限于猪、禽、犬所产生的疫病抗原。即,本发明试剂盒的应用对象包括但不限于猪、禽、犬所产生的疫病抗原。

[0121] 作为本发明的检测方法一种实施方式,所述待检测样品原包括猪圆环病毒2型、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、A型流感病毒、犬细小病毒、犬瘟热病毒、犬腺病毒。

[0122] 本发明的缓冲液和样品处理液组合使用时能使以双抗体(特别是双单抗)夹心原理制备的现有产品所用到的固定、标记的2株单克隆抗体位置实现互换,完成用不同搭配模式2株单克隆抗体的制备的产品,检测样品后并不引起非特异反应并适当提高灵敏度。

[0123] 下面结合特定具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述更为清楚。这些实施例仅是范例性的,并非实施或运用本发明具体实施例的唯一形式,因此并不对本发明的范围构成任何限制。以下描述的实施方式中涵盖了多个具体实施方式的特征以及用于建构与操作这些具体实施方式的方法步骤与其顺序。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0124] 本发明实施例中所用到PBS缓冲液配制示例如下:氯化钠8g,氯化钾0.2g,磷酸氢二钠1.44g,磷酸二氢钾0.24g,调pH7.4,定容1L,包括但不限于此配方;化学试剂均为分析纯,购自国药集团。

[0125] 本发明所述的实验方法,若无特殊说明,均为常规方法;所述的生物材料,若无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0126] 实施例1现有产品所用单抗情况分析

[0127] 基于双抗体夹心原理,本发明技术团队及其他研发团队研制了一系列产品,简要如下:

[0128] 中国专利CN105717293A中猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8(简称PCV2-2F8)、3G12(简称PCV2-3G12)配对抗体活性检测时,发现只有包被抗体为PCV2-2F8、标记抗体PCV2-3G12时制备的酶免疫层析检测试纸条方可使用,若将2株抗体互换位置即包被抗体为PCV2-3G12、标记抗体PCV2-2F8时极大概率存在非特异反应。

[0129] 中国专利CN105461805A中猪流行性腹泻病毒单克隆抗体PEDV-McAB1、PEDV-McAB2,配对研究时发现只有固定抗体为PEDV-McAB1、标记抗体为PEDV-McAB2时制备的胶体金检测试纸条或酶免疫层析检测试纸条才可应用,若将2者互换位置制备成产品进行检测,结果极大概率率为假阳性。

[0130] 中国专利CN104062430A中A型流感病毒单克隆抗体1(简称IV-McAB1)、2(简称IV-McAB2),配对研究时发现只有固定抗体为IV-McAB2、标记抗体为IV-McAB1时制备的酶层析法检测试纸条才可使用,若将2者互换位置制备成产品进行检测,结果极大概率出现非特异性反应。

[0131] 中国专利CN104928258A中犬细小病毒单克隆抗体10B11、10H4,配对研究时发现只有固定抗体为10B11、标记抗体为10H4时制备的酶层析法检测试纸条才可使用,若将2者互换位置制备成产品进行检测,结果极大概率出现假阴性。

[0132] 中国专利CN105695420A中犬瘟热病毒单克隆抗体6E11、1G5,配对研究时发现只有固定抗体为6E11、标记抗体为1G5时制备的酶免疫层析检测试纸条或胶体金检测试纸条才可使用,若将2者互换位置制备成产品进行检测,结果极大概率出现假阴性。

[0133] 中国专利CN101149377A中检测曲霉的2株抗体中只有固定抗体为9D47A1、标记抗体为7E11A1时制备的产品方可产生最强的信号、避免非特异。

[0134] 基于此,本发明人开展了一系列研究以解决配对时2株抗体不能互换位置,或互换位置后造成灵敏度降低、产生非特异反应、造成假阳性假阴性等技术难题。

[0135] 考虑到试纸条临床应用时所需检测靶标主要包括眼鼻拭子、肛拭子、粪便、血液以及处理后的组织等,其中粪便中所含杂质较多,故本发明先就检测粪便的犬用犬细小病毒酶免疫层析检测试纸条为例进行详细的阐述。

[0136] 实施例2犬细小病毒酶免疫层析检测试剂盒的制备及评价

[0137] 为更好地评价犬细小病毒酶免疫层析检测试剂盒,本发明先以固定抗体为10H4、标记抗体为10B11进行试纸条制备(对应实施例2.1部分),并将犬细小病毒CVCC AV298株(购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心),犬细小病毒流行株CPV 2a型S2株和S0425株、犬细小病毒流行株CPV 2b型S0304株(参见Preparation and application of two monoclonal antibodies against canine parvovirus vaccine and field strains, Journal of Vaccines and Immunology, 2017, 3(1):001-004),以及20份阳性粪便、20份阴性粪便(分别经犬细小病毒PCR鉴定结果为阳性、阴性)作为样品盘,对试纸条进行全面分析。

[0138] 2.1缓冲液的制备

[0139] 缓冲液的各个组分含量见表1,其中若未标明具体含量,即意为余量由该组分(即PBS或柠檬酸-0.2M磷酸氢二钠)组成。取样进行外观检测、无菌检验(按现行中国兽药典附录进行)及保存期(2~30℃保存)研究,结果见表2。

[0140] 表1不同缓冲液所含组分汇总

[0141]

编号	缓冲液组分
----	-------

[0142]

A1	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH5.0 的 0.1M 柠檬酸-0.2M 磷酸氢二钠、0.02%V/VProclin300
A2	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.02%V/VProclin300
A3	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/VBSA、0.02%V/VProclin300
A4	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A5	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.1%V/VTween-80、0.02%V/VProclin300
A6	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A7	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A8	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/VBSA、0.5%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A9	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VBSA、0.5%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A10	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、0.2%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A11	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、1.2%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A12	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VBSA、0.05%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A13	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VBSA、0.6%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A14	0.05%W/V 过氧化氢脲、pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VOVA、0.6%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A15	0.05%W/V 过氧化氢尿素、pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300
A16	0.10%W/V 双氧水、pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/VBSA、0.1%V/VTween-20、0.02%V/VProclin300

[0143] 将缓冲液A1~A16、底物垫(按实施例2.2.a制备,底物垫稀释液为B3)、酶标垫(按实施例2.2.b制备,酶标抗体稀释液为C3)、检测区(按实施例2.2.c制备,固化抗体稀释液为D4),按实施例2.4依次制备对应试剂盒a1~a16,并按实施例2.5将样品盘样品用实施例2.3制备的样品处理液F4稀释进行检测,结果(见表2)显示:缓冲液外观均澄清、无菌检验均合格,保存期除A1为12个月外其余均为15个月,当缓冲液为A6时制备的试纸条在检测中未出现假阳性结果且检测CPV毒株特别是流行株的灵敏度较高。

[0144] 表2不同缓冲液检测结果及制备试剂盒后检测结果汇总

[0145]

试剂盒	所用缓冲液编号	缓冲液检测结果			制备试剂盒后检测结果					
		外观	无菌检验	保存期 (月)	检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性 粪便	阴性 粪便
					CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		

[0146]

a1	A1	澄清	合格	12	10 ^{4.0}	10 ^{4.2}	10 ^{4.1}	10 ^{4.0}	10/20	9/20
a2	A2	澄清	合格	15	10 ^{4.5}	10 ^{4.2}	10 ^{4.4}	10 ^{4.2}	9/20	10/20
a3	A3	澄清	合格	15	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{5.0}	8/20	11/20
a4	A4	澄清	合格	15	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{5.0}	12/20	9/20
a5	A5	澄清	合格	15	10 ^{5.0}	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{4.8}	9/20	8/20
a6	A6	澄清	合格	15	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
a7	A7	澄清	合格	15	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.2}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
a8	A8	澄清	合格	15	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	20/20	20/20
a9	A9	澄清	合格	15	10 ^{3.2}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
a10	A10	澄清	合格	15	10 ^{3.8}	10 ^{4.0}	10 ^{4.2}	10 ^{4.5}	13/20	15/20
a11	A11	澄清	合格	15	10 ^{3.2}	10 ^{4.0}	10 ^{3.8}	10 ^{4.2}	10/20	13/20
a12	A12	澄清	合格	15	10 ^{4.2}	10 ^{4.2}	10 ^{3.8}	10 ^{4.0}	13/20	12/20
a13	A13	澄清	合格	15	10 ^{4.5}	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}	10 ^{3.8}	13/20	12/20
a14	A14	澄清	合格	15	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
a15	A15	澄清	合格	15	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.2}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
a16	A16	澄清	合格	15	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	20/20	20/20

[0147] 注：阳性粪便、阴性粪便结果表示试纸条检测结果/PCR检测阳性或阴性样本总数。

[0148] 为评价缓冲液A6的主要成分含量是否影响检测结果,特设置范围(见表1编号A6~A13)进行进一步调试,结果(见表2)显示:当缓冲液为A6~A9(对应缓冲液主要成分为0.5%~1%W/VBSA、0.1%~0.5%V/VTween-20)时制备的试纸条的检测灵敏度高(10^{3.2}~10^{3.5}TCID₅₀/ml),检测临床样品与PCR检测结果一致;当缓冲液为A10~A13时制备的试纸条的检测灵敏度下降(>10^{3.5}TCID₅₀/ml),在检测临床样品时出现非特异反应概率较高。

[0149] 为评价缓冲液中过氧化氢脲的终浓度,特将缓冲液A6中过氧化氢脲的浓度依次调整为0.01%、0.02%、0.2%、0.3%W/V以制备试纸条,结果:当将过氧化氢脲为0.01%W/V时制备的试纸条用于检测阳性粪便时会有大概率出现阴性结果,当过氧化氢脲为0.3%W/V时制备的试纸条检测阴性粪便时会有大概率出现阳性结果,即存在假阳性假阴性的问题;而当过氧化氢脲为0.02%、0.2%W/V时制备的试纸条的检测灵敏度与A6结果相当,检测阳性粪便、阴性粪便结果均正确,故而将缓冲液中过氧化氢脲的终浓度设定为0.02%~0.2%W/V。

[0150] 为评价其它大分子蛋白如OVA替代BSA进行调试(见表1中A14),检测结果(见表2)与含BSA的缓冲液组装试纸条的检测结果一致,表明:其它大分子也可作为缓冲液组分并可达到检测较好的效果。

[0151] 另,将过氧化氢尿素、双氧水替代过氧化氢脲进行调试(见表1中A15~A16),检测结果(见表2)与含过氧化氢脲的缓冲液组装试纸条的检测结果一致,表明:过氧化氢尿素、双氧水也可作为缓冲液组分并可达到检测较好的效果。

[0152] 2.2检测试纸条的制备

[0153] 2.2.a底物区的底物垫的制备

[0154] 将底物四甲基联苯胺 (TMB) 用底物垫稀释液 (见表3) 进行稀释, 使TMB终浓度为0.5%~4%W/V, 吸附于作为吸附物的玻璃纤维膜, 干燥后使用。

[0155] 表3底物垫稀释液组分

[0156]

编号	底物垫稀释液组分
B1	2%V/V无水乙醇
B2	2%V/V无水乙醇、0.1%V/VPEG2000、pH7.4的0.1M PBS
B3	2%V/V无水乙醇、0.1%V/VPEG4000、pH7.4的0.1M PBS
B4	2%V/V无水乙醇、0.1%V/VPEG6000、pH7.4的0.1M PBS
B5	2%V/V无水乙醇、0.1%V/VPEG8000、pH7.4的0.1M PBS

[0157] 将缓冲液A6 (按实施例2.1制备)、底物垫 (TMB终浓度为1%)、酶标垫 (按实施例2.2.b制备, 酶标抗体稀释液为C3)、检测区 (按

[0158] 实施例2.2.c制备, 固化抗体稀释液为D4), 按实施例2.4依次制备试剂盒b1~b5, 并按实施例2.5将样品盘样品用实施例2.3制备的样品处理液F4稀释进行检测, 结果 (见表4) 显示: 当底物垫稀释液为B3或B4时制备的试纸条检测时对CPV毒株特别是流行株的灵敏度较高 ($10^{3.2} \sim 10^{3.5}$ TCID₅₀/ml), 检测临床样品与PCR检测结果一致; 当底物垫稀释液为B1、B2、B5时制备的试纸条的检测灵敏度下降 ($> 10^{3.5}$ TCID₅₀/ml), 检测临床样品出现非特异反应。

[0159] 表4不同底物垫稀释液制备试剂盒后检测结果汇总

[0160]

试剂盒	底物垫稀释液编号	制备试剂盒后检测结果					
		检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性粪便	阴性粪便
		CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		
b1	B1	$10^{5.0}$	$10^{5.2}$	$10^{5.1}$	$10^{5.0}$	9/20	10/20
b2	B2	$10^{4.8}$	$10^{5.0}$	$10^{4.6}$	$10^{4.7}$	10/20	13/20
b3	B3	$10^{3.5}$	$10^{3.4}$	$10^{3.5}$	$10^{3.3}$	20/20	20/20
b4	B4	$10^{3.5}$	$10^{3.2}$	$10^{3.5}$	$10^{3.3}$	15/20	13/20
b5	B5	$10^{5.0}$	$10^{4.8}$	$10^{4.5}$	$10^{4.2}$	13/20	11/20

[0161] 注: 阳性粪便、阴性粪便结果表示试纸条检测结果/PCR检测阳性或阴性样本总数。

[0162] 为评价底物垫吸附时TMB的终浓度, 特用底物垫稀释液将TMB稀释成终浓度为0.4%、0.5%、4%、5%W/V以制备试纸条, 结果: 当将TMB为0.4%W/V时制备的试纸条用于检测阳性粪便时结果大概率出现阴性, 当TMB为5%W/V时制备的试纸条检测阴性粪便时结果大概率出现阳性, 即存在假阳性假阴性的问题; 而当TMB为0.5%、4%W/V时制备的试纸条的检测灵敏度与B3结果相当, 检测阳性粪便、阴性粪便结果均正确, 故而将TMB的终浓度设定为0.5%~4%W/V。

[0163] 2.2.b样品供应区中酶标垫的制备

[0164] 2.2.b.1酶标抗体的制备

[0165] 采用改良过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶HRP的标记。称取20mg辣根过氧化物酶HRP溶于1ml超纯水中, 加入1ml新鲜配制的NaIO₄溶液 (30mg NaIO₄溶于1ml超纯水), 混匀, 2

~8℃避光作用30分钟;在上述溶液中加入40μl乙二醇,2~8℃避光作用30分钟;按照1mg经辛酸-饱和硫酸铵沉淀法纯化后的单克隆抗体加100μl上述混合液的比例,将两者混匀后,加入到透析袋中,混匀,用包被缓冲液(pH9.6,0.05mol/L碳酸盐缓冲液)透析6小时。整个操作需避光进行;将透析后的混合液转移至1.5ml EP管中,加入10μl新鲜配制的NaBH₄溶液(20mg NaBH₄溶于1ml超纯水),室温作用2小时,每隔30分钟混匀一次;加入等体积的饱和硫酸铵,混匀后,4℃作用15分钟。12000r/min离心10分钟,弃上清。将沉淀用与纯化抗体等体积的PBS与甘油的混合液(V:V=1:1)吹悬。

[0166] 2.2.b.2酶标抗体的鉴定

[0167] 外观评价:室温下,为红棕色液体,未见絮状物沉淀。

[0168] 质量评价:用紫外分光光度计检测酶标抗体在403nm和280nm的吸光值A,按“标记率=A_{403nm}/A_{280nm}”计算标记率;酶标抗体后的单克隆抗体量,即IgG量,按“IgG量(mg/ml)=(A_{280nm}-A_{403nm}×0.3)×0.62×稀释倍数”进行计算。结果见表5:

[0169] 表5酶标抗体的质量评价结果汇总

[0170]

标记抗体名称	IgG量(mg/ml)	标记率
CPV-10B11	1.0	60%
CPV-10H4	1.5	58%

[0171] 2.2.b.3酶标垫的制备

[0172] 将酶标抗体用不同的酶标抗体稀释液(见表6)稀释至单克隆抗体终浓度为0.5~10μg/ml后吸附于玻璃纤维膜上,干燥后使用。

[0173] 表6酶标抗体稀释液组分汇总

[0174]

编号	酶标抗体稀释液组分
C1	pH7.4的0.1M PBS
C2	0.5%V/VPEG2000、pH7.4的0.1M PBS
C3	0.5%V/VPEG4000、pH7.4的0.1M PBS
C4	0.5%V/VPEG6000、pH7.4的0.1M PBS
C5	0.5%V/VPEG8000、pH7.4的0.1M PBS

[0175] 将缓冲液A6(按实施例2.1制备)、底物垫(按实施例2.2.a制备,底物垫稀释液为B3)、酶标垫(酶标抗体含量为2μg/ml)、检测区(按实施例2.2.c制备,固化抗体稀释液为D4),按实施例2.4依次制备试剂盒c1~c5,并按实施例2.5将样品盘样品用实施例2.3制备的样品处理液F4稀释进行检测,结果(见表7)显示:当酶标抗体稀释液为C3、C4或C5时制备的试纸条对CPV毒株的检测灵敏度较高(10^{3.0}~10^{3.5}TCID₅₀/ml),检测临床样品与PCR检测结果一致;当底物垫稀释液为C1、C2时制备的试纸条的检测灵敏度下降(>10^{4.0}TCID₅₀/ml),检测临床样品出现非特异反应。

[0176] 表7不同酶标抗体稀释液制备试剂盒后检测结果汇总

[0177]

试剂盒	酶标抗体 稀释液编 号	制备试剂盒后检测结果					
		检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性粪 便	阴性粪 便
		CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		
c1	C1	10 ^{5.2}	10 ^{5.0}	10 ^{5.0}	10 ^{4.8}	8/20	10/20
c2	C2	10 ^{4.8}	10 ^{4.0}	10 ^{4.3}	10 ^{4.5}	15/20	14/20
c3	C3	10 ^{3.0}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	13/20	16/20
c4	C4	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
c5	C5	10 ^{3.2}	10 ^{3.2}	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	13/20	15/20

[0178] 注:阳性粪便、阴性粪便结果表示试纸条检测结果/PCR检测阳性或阴性样本总数。

[0179] 为评价酶标垫制备时酶标抗体含量的使用浓度,特用酶标抗体稀释液将酶标抗体稀释成工作浓度为0.4、0.5、10、12μg/ml以制备试纸条,结果:当酶标抗体工作浓度为0.4μg/ml时制备的试纸条对检测CPV流行株的灵敏度下降10~100倍,当酶标抗体工作浓度为12μg/ml时,用制备的试纸条检测阴性粪便结果大概率出现阳性,即存在假阳性结果;而当酶标抗体工作浓度为0.5、10μg/ml时制备的试纸条的检测灵敏度与C3结果相当,检测阳性粪便、阴性粪便结果均正确,故而将酶标抗体工作浓度设定为0.5~10μg/ml。

[0180] 2.2.c检测区的制备

[0181] 固定抗体用固定抗体(见表8)稀释液稀释至0.5~1mg/ml,质控线用抗体用pH7.4 0.1M PBS缓冲液或固化抗体稀释液D4稀释至1mg/ml,分别吸附于硝酸纤维素膜的一端,两线间距≥5mm,干燥后使用。

[0182] 表8固化抗体稀释液组分汇总

[0183]

编号	固化抗体稀释液组分
D1	pH7.4 的 0.1M PBS
D2	pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%V/V 海藻糖
D3	pH7.4 的 0.1M PBS、0.05%V/V Triton-X 100
D4	pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%V/V 海藻糖、0.1%V/V Tween-20

[0184]

D5	pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VBSA、0.05%V/V Triton-X 100
D6	pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/VBSA、0.1%V/V Tween-80

[0185] 将缓冲液A6(按实施例2.1制备)、底物垫(按实施例2.2.a制备,底物垫稀释液为B3)、酶标垫(按实施例2.2.b制备,酶标抗体稀释液为C3)、硝酸纤维素膜(固定线上固定抗体浓度为0.8mg/ml),按实施例2.4依次制备试剂盒d1~d6,并按实施例2.5将样品盘样品用实施例2.3制备的样品处理液F4稀释进行检测,结果(见表9)显示:当制备检测线时,固化抗体稀释液为D4时制备的试纸条对检测CPV毒株的灵敏度较高(10^{3.0}~10^{3.5}TCID₅₀/ml),检测临床样品与PCR检测结果一致;当固化抗体稀释液为D1、D2、D3、D5或D6时制备的试纸条在检测样品时灵敏度下降(>10^{4.0}TCID₅₀/ml),且临床样品出现非特异反应。

[0186] 表9不同固化抗体稀释液制备试剂盒后检测结果汇总

[0187]

试剂盒	固化抗体 稀释液编 号	制备试纸盒后检测结果					
		检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性粪 便	阴性粪 便
		CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		
d1	D1	10 ^{5.2}	10 ^{5.0}	10 ^{4.5}	10 ^{4.8}	9/20	8/20
d2	D2	10 ^{4.8}	10 ^{4.0}	10 ^{4.3}	10 ^{4.5}	11/20	13/20
d3	D3	10 ^{4.5}	10 ^{4.2}	10 ^{4.3}	10 ^{4.8}	15/20	13/20
d4	D4	10 ^{3.0}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
d5	D5	10 ^{4.0}	10 ^{4.2}	10 ^{4.5}	10 ^{4.2}	14/20	15/20
d6	D6	10 ^{4.0}	10 ^{4.2}	10 ^{4.5}	10 ^{4.2}	13/20	15/20

[0188] 注:阳性粪便、阴性粪便结果表示试纸条检测结果/PCR检测阳性或阴性样本总数。

[0189] 为评价硝酸纤维素膜制备时固定抗体浓度,用固化抗体稀释液将固定抗体稀释成工作浓度为0.4、0.5、1.0、1.2mg/ml以制备试纸条,结果:当固定抗体工作浓度为0.4mg/ml时制备的试纸条对检测CPV流行株的灵敏度下降3~100倍,当固定抗体工作浓度为1.2mg/ml时制备的试纸条在检测阴性粪便时结果大概率为阳性,即存在假阳性结果;而当固定抗体浓度为0.5、1.0mg/ml时制备的试纸条的检测灵敏度与D4结果相当,检测阳性粪便、阴性粪便结果均正确,故而将固定抗体工作浓度设定为0.5~1.0mg/ml。

[0190] 2.3样品处理液的制备

[0191] 配制以下样品处理液(见表10),取样进行外观检测、无菌检验(按现行中国兽药典附录进行)及保存期研究,结果见表11。

[0192] 表10样品处理液所含组分汇总

[0193]

编号	样品处理液所含组分
F1	pH7.4 的 0.1M PBS、0.02%V/VProclin300

[0194]

F2	pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%V/V Triton-X 100、0.02%V/VProclin300
F3	pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/V CHAPS、0.02%V/VProclin300
F4	pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%W/V CHAPS、1%W/V 皂苷、0.02%V/VProclin300
F5	pH7.4 的 0.1M PBS、0.5%V/V Triton-X 100、1%W/V 皂苷、0.02%V/VProclin300
F6	pH7.4 的 0.1M PBS、1%W/V 皂苷、0.02%V/VProclin300

[0195] 将缓冲液A6(按实施例2.1制备)、底物垫(按实施例2.2.a制备,底物垫稀释液为B3)、酶标垫(按实施例2.2.b制备,酶标抗体稀释液为C3)、检测区(按实施例2.2.c制备,固化抗体稀释液为D4),按实施例2.4依次制备试剂盒f1~f6,并按实施例2.5将样品盘样品用实施例2.3制备的样品处理液F1~F6稀释进行检测,结果(见表11)显示:当样品处理液为F4时,检测CPV毒株的灵敏度较高(10^{3.2}~10^{3.5}TCID₅₀/ml),检测临床样品与PCR检测结果一致;当样品处理液为F1、F2、F3、F5、F6时,检测样品的灵敏度下降(>10^{4.0}TCID₅₀/ml),且临床样品出现非特异反应。

[0196] 表11用不同样品处理液制备试剂盒后检测结果汇总

[0197]

试剂盒	固化抗体 稀释液编 号	制备试剂盒后检测结果					
		检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性粪 便	阴性粪 便
		CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		
f1	F1	10 ^{5.0}	10 ^{5.0}	10 ^{4.8}	10 ^{4.5}	8/20	9/20
f2	F2	10 ^{4.6}	10 ^{4.2}	10 ^{4.5}	10 ^{4.3}	13/20	12/20
f3	F3	10 ^{4.5}	10 ^{4.0}	10 ^{4.3}	10 ^{4.5}	15/20	12/20
f4	F4	10 ^{3.2}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
f5	F5	10 ^{4.2}	10 ^{4.2}	10 ^{4.5}	10 ^{4.2}	15/20	16/20
f6	F6	10 ^{6.0}	10 ^{5.6}	10 ^{5.8}	10 ^{5.6}	14/20	15/20

[0198] 注：阳性粪便、阴性粪便结果表示试纸条检测结果/PCR检测阳性或阴性样本总数。

[0199] 为评价样品处理液中CHAPS的含量，将其他成分保持不变，CHAPS含量调整为0.4%、0.5%、2.0%、2.5%W/V以制备试剂盒并进行检测，结果：当样品处理液中所含CHAPS为0.4%时制备的试剂盒检测CPV的灵敏度下降10~100倍；当样品处理液中所含CHAPS为2.5%时制备的试剂盒检测阳性粪便为阴性、阴性粪便为阳性，存在严重的非特异；而当样品处理液中CHAPS含量为0.5%、2.0%时制备的试剂盒检测灵敏度与F4结果相当，检测阳性粪便、阴性粪便结果均正确，故而将样品处理液中CHAPS含量设定为0.5%~2.0%W/V。

[0200] 为评价样品处理液中皂苷的含量，将其他成分保持不变，皂苷含量调整为0.4%、0.5%、2.0%、3.0%W/V以制备试剂盒并进行检测，结果：当样品处理液中所含皂苷为0.4%时制备的试剂盒检测CPV的灵敏度下降10倍且检测阴性粪便为阳性；当样品处理液中所含CHAPS为3.0%时制备的试剂盒检测阳性粪便为阴性、阴性粪便为阳性，存在严重的非特异；而当样品处理液中皂苷含量为0.5%、2.0%时制备的试剂盒检测灵敏度与F4结果相当，检测阳性粪便、阴性粪便结果均正确，故而将样品处理液中皂苷含量设定为0.5%~2.0%W/V。

[0201] 另，为评价调试后的缓冲液A6、底物垫稀释液B3或B4、酶标抗体稀释液C3或C4或C5、固定抗体用稀释液D4各溶液主要成分是否影响试纸条的检测结果，将其互换位置进行评价。结果显示：各溶液主要成分互换位置后检测阴性粪便均出现非特异反应，且检测CPV流行株的灵敏度下降10~1000倍。因而，只有在试剂盒固定或特定位置使用对应的缓冲液和稀释液才能实现试剂盒在检测时敏感性和特异性。换句话说，不同于2株单克隆抗体的位置（本质上来说位置体现了反应顺序），缓冲液和稀释液的位置不能互换。

[0202] 2.4试剂盒的制备方法

[0203] 步骤(1) 配制缓冲液；

[0204] 步骤(2) 使用底物垫用稀释液将底物稀释至0.5%~4%W/V，并将其吸附于吸附物即得底物垫，干燥后置于检测试纸条的底物供应区中；

[0205] 步骤(3) 标记单克隆抗体为酶标抗体，用酶标抗体稀释液将其稀释至0.5~10μg/ml，并吸附于吸附物即得酶标垫，干燥后置于检测试纸条的样品供应区中；

[0206] 步骤(4) 固定抗体经固定抗体稀释液稀释至0.5~1mg/ml，以及羊抗鼠多抗或羊抗鼠单抗经磷酸盐缓冲液或固化抗体稀释液稀释至1~3mg/ml，并分别作为检测线、质控线固定于检测试纸条的检测区中，使两线间距≥5mm，干燥；

[0207] 步骤(5) 配制样品处理液,1ml/管;以及

[0208] 步骤(6) 装配试剂盒,将检测试纸条连接于缓冲液供应单元,并将步骤(1)配制的缓冲液注入缓冲液供应单元,使缓冲液供应单元能够将所述缓冲液供给至所述检测试纸条的底物供应区;检测试纸条自渐次远离缓冲液供应单元的方向包括底物供应区(硝酸纤维素膜左端,包括底物垫,其上吸附有干燥的酶底物)、样品供应区(硝酸纤维素膜中间,包括酶标垫,其上吸附有酶标抗体,所述酶底物能与所述酶标抗体上的酶产生显色反应,并在硝酸纤维素膜上向距所述缓冲液供应单元的远端迁移)、检测区(硝酸纤维素膜右端,包括检测线、质控线,所述检测线上固定化有固定抗体,所述质控线上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗),其中底物垫、酶标垫整段自左向右依次粘附于硝酸纤维素膜;将步骤(5)配制装管的样品处理液装入试剂盒中。

[0209] 2.5试剂盒的检测方法

[0210] 试剂盒的检测方法包括:

[0211] 步骤(1) 根据动物疫病抗原的排毒途径采集待检测样品,固体样品和/或液体样品溶解于样品处理液中。

[0212] 步骤(2) 将处理后的样品滴加至加入所述检测试纸条的样品供应区中;

[0213] 步骤(3) 通过所述缓冲液供应单元向所述检测试纸条供应所述缓冲液,并静置反应30分钟;以及

[0214] 步骤(4) 反应后观察所述检测试纸条的检测区,若质控线无条带,则无论检测线是否有条带本次检测都判定为无效;若质控线有条带,则检测线有条带即为阳性,检测线无条带即为阴性。

[0215] 选择CPV流行株S2株、阳性粪便对样品检测用量进行调试,用试剂盒(缓冲液A6、底物垫稀释液B3、酶标垫上酶标抗体稀释液C3、固化抗体稀释液D4以及样品处理液F4的组合)进行检测,结果(见表12):在样品检测用量为100 μ l的条件下,当固体样品溶解于500-1500 μ l样品处理液的量为0.05g时检测结果阴性(存在假阴性),当固体样品的溶解量为0.6g时出现样品处理液无法完成层析过程而导致结果无效,只有当固体样品为0.08~0.5g时检测结果有效且准确;同样地在样品检测用量为100 μ l的条件下,当液体样品溶解于500-1500 μ l样品处理液的量为300 μ l或2000 μ l时检测结果均为阴性(存在假阴性),只有当液体样品的溶解量为500~1500 μ l时结果才正确。当经样品处理液的样品的检测用量为25 μ l时检测结果均因层析过程进行一半后终止而导致检测结果无效,当样品检测用量为200 μ l时由于反应过度而导致假阴性结果,只有当样品检测用量为50~150 μ l时检测结果才有效且准确。

[0216] 表12样品检测用量及滴加用量的调试结果

[0217]

溶解 用量	阳性粪便(g), 检测用量 100 μ l					CPV S2 株(μ l), 检测用量 100 μ l				
	0.05	0.08	0.1	0.5	0.6	300	500	1000	1500	2000
结果	阴性	阳性	阳性	阳性	无效	阴性	阳性	阳性	阳性	阴性
检测 用量	0.1g 样品稀释后时检测量(μ l)					500 μ l 样品稀释后检测量(μ l)				
	25	50	100	150	200	25	50	100	150	200
结果	无效	阳性	阳性	阳性	阴性	无效	阳性	阳性	阳性	阴性

[0218] 根据以上调试结果,本发明仅以此条件(即将缓冲液A6、底物垫稀释液B3、酶标抗

体稀释液C3、固化抗体稀释液D4以及样品处理液F4的组合,固体样品溶解于样品处理液的溶解量为0.08~0.5g/500~1500 μ l,液体样品溶解于样品处理液的溶解量为500~1500 μ l/500~1500 μ l,经样品处理液溶解后的样品检测用量为50~150 μ l)为例制备的同类试剂盒及其评价与应用进行详细阐述。

[0219] 2.6 2株单克隆抗体不同搭配模式制备的试剂盒评价

[0220] 2.6.a不同搭配模式制备的试剂盒灵敏度比较

[0221] 将试纸条中的2株单克隆抗体互换位置(见表13),并用样品盘进行评价,同时用商品化韩国安捷犬细小病毒胶体金检测试纸条进行平行试验,结果(见表13):根据现有技术以2株单抗配对模式制备的CPV试剂盒3(参见中国专利CN104928258A)检测样品盘中的样品灵敏度为 $10^{3.2} \sim 10^{3.5}$ TCID₅₀/ml;根据本发明得到的单抗位置不变的CPV试剂盒2检测样品盘中的灵敏度为 $10^{2.0} \sim 10^{2.5}$ TCID₅₀/ml,比CPV试剂盒1和市售的常用胶体金产品灵敏度高10~50倍;将现有2株单抗配对模式改变,即交换单抗位置后,根据本发明得到的CPV试剂盒1的检测灵敏度与CPV试剂盒3相当或更优,且检测阳性、阴性样品结果均准确,未出现非特异性反应。

[0222] 表13用不同搭配模式制备试剂盒后检测结果汇总

[0223]

试剂盒	固定抗体	酶标抗体	制备试剂盒后检测结果					
			检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性粪便	阴性粪便
			CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		
CPV 试剂盒 1	10H4	10B11	$10^{3.2}$	$10^{3.4}$	$10^{3.5}$	$10^{3.3}$	阳性	阴性
CPV 试剂盒 2	10B11	10H4	$10^{2.2}$	$10^{2.2}$	$10^{2.5}$	$10^{2.0}$	阳性	阴性
CPV 试剂盒 3	10B11	10H4	$10^{3.8}$	$10^{3.5}$	$10^{3.4}$	$10^{3.6}$	阳性	阴性
商品化-韩国安捷 CPV 试纸条			$10^{4.0}$	$10^{3.5}$	$10^{3.6}$	$10^{3.6}$	阳性	阴性

[0224] 2.6.b不同搭配模式制备的试剂盒特异性检测

[0225] 分别使用CPV试剂盒1、2、3检测特异性样品,包括犬瘟热病毒液、犬副流感病毒液、犬腺病毒1型病毒液、犬腺病毒2型病毒液、犬狂犬病毒液、健康犬粪便、犬瘟热病毒阳性犬粪便、犬轮状病毒阳性犬粪便、犬冠状病毒细胞毒样品,结果均为阴性,表明特异性良好。

[0226] 2.6.c不同搭配模式制备的试剂盒重复性研究

[0227] 分别将CPV试剂盒1、2用样品盘中样品、特异性样品进行批间、批内重复性研究,结果:CPV试剂盒1、2的批间、批内重复性良好。

[0228] 2.6.d不同搭配模式制备的试剂盒保存期研究

[0229] 分别将CPV试剂盒1、2于2~8℃放置6、9、12、15个月进行灵敏度、特异性检测,结果:检测结果符合率均为100%,表明试剂盒1、2均可在2~8℃保存12个月甚至15个月。

[0230] 2.6.e不同搭配模式制备的试剂盒的临床应用

[0231] 将经PCR鉴定为阳性200份、阴性200份临床样品分别用CPV试剂盒1、2进行检测,结果(见表14):CPV试剂盒1检测总符合率为94%,CPV试剂盒2检测总符合率为97%,可代替操作耗时且繁琐、需要专门的技术人员、专门的仪器设备才能实现的PCR检测方法进行临床的快速、准确的鉴定。

[0232] 表14不同试剂盒检测临床样品结果汇总

[0233]

试剂盒	阳性/鉴定总阳性	阴性/鉴定总阴性	总符合率
CPV试剂盒1	176/200	224/200	94%
CPV试剂盒2	187/200	213/200	97%

[0234] 实施例3其他酶免疫层析检测试剂盒的制备

[0235] 为进一步评价实施例2所优化的各个条件能否满足猪、禽、猫、犬其它抗原等动物疫病诊断检测中的应用,特将猪圆环病毒2型、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、A型流感病毒、犬瘟热病毒、犬腺病毒等逐一进行调试及评价,结果:(1)灵敏度,原搭配模式制备的试剂盒灵敏度均优于市售或现有的(高10~50倍),互换位置后的搭配模式制备的试剂盒灵敏度与原有搭配模式调试前的相当或更优;(2)特异性,均良好,无非特异性现象发生;(3)重复性,均良好;(4)保存期,均满足要求;(5)检测应用效果较好,均能快速、实地、准确地检测。以下就猪圆环病毒2型、A型流感病毒为代表进行简要阐述。

[0236] 3.1猪圆环病毒2型酶免层析检测试纸条

[0237] 3.1.a不同搭配模式制备的试剂盒灵敏度比较

[0238] 将试纸条中的2株单克隆抗体互换位置(见表15),并用PCV2不同亚型毒株以及PCR鉴定的临床阳性血清、阴性血清进行评价,结果(见表15,阳性组织、阴性组织、阳性血清、阴性血清均经PCR鉴定):根据现有技术以2株单抗配对模式制备的PCV2试剂盒3(参见中国专利CN105717293A)检测样品盘中的样品灵敏度为 $10^{4.0} \sim 10^{4.2}$ TCID₅₀/ml;根据本发明得到的PCV2试剂盒2检测样品盘中的灵敏度为 $10^{3.8} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml,比现有技术的PCV2试剂盒1灵敏度高10~15倍;将单抗配对模式改变后根据本发明得到的PCV2试剂盒1,其检测灵敏度与PCV2试剂盒3相当或更优,且检测阳性、阴性样品结果均准确,未出现非特异性反应。

[0239] 表15用不同搭配模式制备试剂盒后检测结果汇总

[0240]

试剂盒	固定抗体	酶标抗体	制备试剂盒后检测结果					
			检测 PCV2 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)		阳性组织	阴性组织	阳性血清	阴性血清
			ZJ/H 株	HH3 株				
PCV2 试剂盒 1	3G12	2F8	$10^{3.8}$	$10^{4.0}$	阳性	阴性	阳性	阴性
PCV2 试剂盒 2	2F8	3G12	$10^{3.0}$	$10^{3.0}$	阳性	阴性	阳性	阴性
PCV2 试剂盒 3	2F8	3G12	$10^{4.0}$	$10^{4.2}$	阳性	阴性	阳性	阴性

[0241] 3.1.b不同搭配模式制备的试剂盒特异性检测

[0242] 将PCV2试剂盒1、2分别检测特异性样品,包括猪圆环病毒1型病毒液、猪繁殖与呼吸综合征病毒液、高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒液、猪细小病毒液、猪伪狂犬病毒液、猪瘟病毒液、猪流行性腹泻病毒液,结果均为阴性,表明特异性良好。

[0243] 3.1.c不同搭配模式制备的试剂盒重复性研究

[0244] 分别将PCV2试剂盒1、2用样品盘中样品、特异性样品进行批间、批内重复性研究,结果:PCV2试剂盒1、2的批间、批内重复性良好。

[0245] 3.1.d不同搭配模式制备的试剂盒保存期研究

[0246] 分别将PCV2试剂盒1、2于2~8℃放置6、9、12、15个月进行灵敏度、特异性检测,结果:检测结果符合率均为100%,表明试剂盒1、2均可在2~8℃保存12个月甚至15个月。

[0247] 3.1.e不同搭配模式制备的试剂盒的临床应用

[0248] 将经病毒分离鉴定及PCR鉴定为阳性250份、阴性250份临床样品(含血清、研磨后的组织样品)分别用PCV2试剂盒1、2进行检测,结果(见表16):PCV2试剂盒1检测总符合率为91%,PCV2试剂盒2检测总符合率为94%,均优于PCV2试剂盒3(原有搭配模式,现有技术)的结果,可代替操作耗时且繁琐、需要专门的技术人员、专门的仪器设备才能实现的病毒分离鉴定或PCR检测方法进行临床的快速、准确的鉴定。

[0249] 表16不同试剂盒检测临床样品结果汇总

[0250]

试剂盒	阳性/鉴定总阳性	阴性/鉴定总阴性	总符合率
PCV2试剂盒1	205/250	295/250	91%
PCV2试剂盒2	220/250	280/250	94%
PCV2试剂盒3	200/250	300/250	90%

[0251] 3.2A型流感酶免层析检测试纸条

[0252] 3.2.a不同搭配模式制备的试剂盒灵敏度比较

[0253] 将试纸条中的2株单克隆抗体互换位置(见表17),并用流感不同亚型毒株以及动物攻毒试验前、后所采集的微生物拭子(即阴性拭子、阳性拭子)组成的样品盘进行评价,结果(见表17~18):以原有2株单抗配对模式根据现有技术制备的IV试剂盒3(参见中国专利CN104062430A)检测样品盘样品的灵敏度为0.01~0.1HA或 $10^{4.5} \sim 10^{5.5}$ EID₅₀/100μl;以原有2株单抗配对模式根据本发明得到的IV试剂盒2检测样品盘中的灵敏度为0.005~0.1HA或 $10^{3.5} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/100μl,比优化前的灵敏度高10~50倍;将原有2株单抗配对模式改变,即互换位置后,根据本发明得到的IV试剂盒1的检测灵敏度与IV试剂盒3相当或更优,且检测阳性、阴性样品结果均准确,未出现非特异性反应。

[0254] 表17用不同搭配模式制备试剂盒

[0255]

试剂盒	固定抗体	酶标抗体	检测 IV 不同毒株的灵敏度 (EID ₅₀ /100μl)	
			H5N1	H9N2
IV 试剂盒 1	单克隆抗体 2	单克隆抗体 1	$10^{4.2}$	$10^{5.2}$
IV 试剂盒 2	单克隆抗体 1	单克隆抗体 2	$10^{3.5}$	$10^{4.0}$
IV 试剂盒 3	单克隆抗体 1	单克隆抗体 2	$10^{4.5}$	$10^{5.5}$

[0256] 表18用不同搭配模式制备试剂盒检测结果汇总

[0257]

宿主	病毒亚型	毒株数	不同试剂盒检测下限（平均值）		
			IV 试剂盒 1	IV 试剂盒 2	IV 试剂盒前
禽	H1N1	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H2N1	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H3N3	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H4N6	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H5N1	40	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H7N7	2	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H10N8	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H6N1	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H11N1	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
禽	H12N5	1	0.1HA	0.01HA	0.1HA
禽	H8N4	1	0.05HA	0.005HA	0.1HA
禽	H9N2	4	0.05HA	0.01HA	0.1HA
猪	H1N1	2	0.01HA	0.01HA	0.01HA
猪	H1N2	3	0.01HA	0.01HA	0.01HA
猪	H3N2	4	0.01HA	0.01HA	0.01HA
马	H3N8	1	0.05HA	0.01HA	0.1HA
犬	H3N8	2	0.01HA	0.01HA	0.01HA
犬	H3N2	2	0.01HA	0.01HA	0.01HA
海鸥	H1N5	1	0.01HA	0.01HA	0.01HA
阴性拭子		5	阴性	阴性	阴性
阳性拭子		5	阳性	阳性	阳性

[0258] 3.1.b不同搭配模式制备的试剂盒特异性检测

[0259] 将IV试剂盒1、2分别检测特异性样品,包括阴性SPF鸡的咽、泄殖腔拭子样品,健康鸡的咽、泄殖腔拭子样品,健康猪的鼻咽拭子样品,健康犬的鼻咽拭子样品,结果均为阴性,表明特异性良好。

[0260] 3.1.c不同搭配模式制备的试剂盒重复性研究

[0261] 分别将IV试剂盒1、2用样品盘中样品、特异性样品进行批间、批内重复性研究,结果:IV试剂盒1、2的批间、批内重复性良好。

[0262] 3.1.d不同搭配模式制备的试剂盒保存期研究

[0263] 分别将IV试剂盒1、2于2~8℃放置6、9、12、15个月进行灵敏度、特异性检测,结果:检测结果符合率均为100%,表明试剂盒1、2均可在2~8℃保存12个月甚至15个月。

[0264] 3.1.e不同搭配模式制备的试剂盒的临床应用

[0265] 将经SPF鸡胚接种病毒分离方法和RT-PCR方法鉴定为阳性200份、阴性200份临床样品分别用IV试剂盒1、2、3进行检测,结果(见表19):IV试剂盒1检测总符合率为94%,IV试剂盒2检测总符合率为96%,均优于IV试剂盒3(原有搭配模式,现有技术)检测的符合率92%,可代替操作耗时且繁琐、需要专门的技术人员、专门的仪器设备才能实现的SPF鸡胚接种病毒分离鉴定或PCR检测方法进行临床的快速、准确的鉴定。

[0266] 表19不同试剂盒检测临床样品结果汇总

[0267]

试剂盒	阳性/鉴定总阳性	阴性/鉴定总阴性	总符合率
IV试剂盒1	176/200	224/200	94%
IV试剂盒2	185/200	215/200	96%
IV试剂盒3	168/200	232/200	92%

[0268] 实施例4其它酶标抗体制备酶免层析检测试剂盒及其应用

[0269] 4.1其它酶标抗体

[0270] 碱性磷酸酶标记抗体:用戊二醛两步法标记单克隆抗体,用2%戊二醛溶液溶解碱性磷酸酶至其终浓度为20mg/ml,于生化培养箱中25℃静置过夜后转至透析袋,于2~8℃中的PBS溶液透析过夜,计算醛化浓度后调至2mg/ml,与1mg单克隆抗体混匀后转至透析袋,用包被缓冲液(pH9.6,0.05mol/L碳酸盐缓冲液,换液3次)透析过夜,之后更换为PBS溶液(换液3次)继续透析过夜,取出透析物,加等体积甘油后冻存备用。碱性磷酸酶标记抗体的鉴定与HRP酶标抗体相同,参考实施例2进行,结果见表20。 β -半乳糖苷酶标记抗体:用戊二醛法标记单克隆抗体,将5mg单克隆抗体与10mg β -半乳糖苷酶溶于2ml 0.1mol/L磷酸钾缓冲液(pH6.8)混合,于2~8℃透析过夜,用0.1mol/L磷酸钾缓冲液(pH6.8)稀释戊二醛至1%,向透析混合液中加入100 μ l稀释过的戊二醛,室温搅拌三小时后加入2mol/L甘氨酸液使其终浓度为0.1mol/L后室温放置2小时,将混合液于2~8℃用PBS透析过夜,10000转/分钟4℃离心30分,取上清,加等体积甘油后冻存备用。 β -半乳糖苷酶标记抗体的鉴定与HRP酶标抗体相同,参考实施例2进行,结果见表20。

[0271] 表20其它酶标抗体的质量评价结果汇总

[0272]

编号	其它酶标抗体简称	标记抗体名称	标记用酶	IgG量(mg/ml)	标记率
H1	CPV-10B11 碱	CPV-10B11	碱性磷酸酶	1.1	63%
H2	CPV-10H4 碱	CPV-10H4	碱性磷酸酶	1.3	59%
H3	CPV-10B11 β	CPV-10B11	β -半乳糖苷酶	1.0	65%
H4	CPV-10H4 β	CPV-10H4	β -半乳糖苷酶	1.6	61%

[0273] 4.2其它酶标抗体制备酶免层析检测试剂盒的组装及其应用

[0274] 用实施例4.1制备的碱性磷酸酶标记抗体、 β -半乳糖苷酶标记抗体H1~H4分别按照实施例2制备犬细小病毒酶免层析检测试剂盒h1~h4,并用样品盘中的样品进行检测,结果(见表21)表明:其它酶标抗体制备的酶免层析检测试剂盒也可实现有效检测,且试剂盒中两株抗体互换位置后检测结果相当。

[0275] 表21其它酶标抗体制备试剂盒后检测结果汇总

[0276]

试剂盒	试剂盒用单克隆抗体		制备试剂盒后检测结果					
	酶标抗体	固定抗体	检测 CPV 不同毒株的灵敏度 (TCID ₅₀ /ml)				阳性 粪便	阴性 粪便
			CVCC AV298 株	S2 株	S0425 株	S0304 株		
h1	澄清	合格	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
h2	澄清	合格	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.2}	10 ^{3.3}	20/20	20/20
h3	澄清	合格	10 ^{3.5}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	20/20	20/20
h4	澄清	合格	10 ^{3.2}	10 ^{3.4}	10 ^{3.5}	10 ^{3.3}	20/20	20/20

[0277] 注：阳性粪便、阴性粪便结果表示试纸条检测结果/PCR检测阳性或阴性样本总数。

[0278] 综上所述，在组合本发明试剂盒的缓冲液、底物垫稀释液和由酶标抗体稀释液、固定抗体稀释液制备的试纸条时，能够使以双单抗夹心原理制备的酶免层析检测试纸条所用到的固定、标记的2株单克隆抗的位置实现互换，从而实现用不同搭配模式2株单克隆抗体来制备检测试剂盒，并且用这样的试剂盒检测样品后不但不引起非特异反应还可以提高灵敏度。

SEQUENCE LISTING

<110> 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司

洛阳中科基因检测诊断中心有限公司

<120> 一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒及制备方法与应用

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 1

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Thr Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
           50           55           60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Ser Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
           100          105          110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
           115

```

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 2

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
           20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

```

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 3

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Pro Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Asp Gly Thr Trp Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser		
65	70	75
Glu Asp Leu Thr Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Arg Ser Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn		
100	105	

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 5

Met Cys Ser Trp Trp Ser Pro Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ala Leu
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Glu Asn His Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35	40	45
Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
Ile Ser Arg Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn		
85	90	95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu		
100	105	110

Lys

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 7

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val		
35	40	45
Ala Ala Ile Asn Ser Asn Gly Asp Val Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe		
65	70	75
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg His Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser		
115	120	

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr		

20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	
35	40	45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Asn Phe Asp Thr Pro Pro		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	
<210> 9		
<211> 147		
<212> PRT		
<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)		
<400> 9		
Met Ala Trp Leu Val Leu Phe Phe Cys Leu Trp Thr Phe Pro Ser Cys		
1	5	10
Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala		
20	25	30
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ile Trp Ser Gly Phe Ser Leu		
35	40	45
Thr Gly Tyr Gly Val His Val Val Lys Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Val Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser		
65	70	75
Thr Leu Arg Ser Lys Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asp Ser Arg Ser Gln		
85	90	95
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Thr Ala Val Tyr		
100	105	110
Tyr Cys Ala Lys Val Asp Tyr Asn Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Val Gly		
115	120	125
Gln Gly Thr Ser Trp Thr Val Ser Ser Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro		
130	135	140
Ser Ile His		
145		
<210> 10		
<211> 142		
<212> PRT		

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 10

```

Met Lys Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Val Phe Leu
1           5           10           15
Gly Ala Lys Cys Asp Trp Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          20           25           30
Ala Ser Leu Gly Asp Ile Trp Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly
          35           40           45
Thr Asn Ile Asn Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Arg Ala Pro
          50           55           60
Asn Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser
65           70           75           80
Lys Val Ser Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          85           90           95
Ser Leu Glu Asp Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Pro Gln Gln Ser
          100          105          110
Tyr Leu Pro Lys Gly Lys Ser Val Glu Ala Pro Lys Val Lys Ser Asn
          115          120          125
Gly Leu Met Leu His Gln Leu Tyr Pro Ser Ser His His Pro
          130          135          140

```

<210> 11

<211> 137

<212> PRT

<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)

<400> 11

```

Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Trp Leu Ser Glu Trp Gln Leu
1           5           10           15
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Trp Arg Pro Gly Thr Ser Val Arg Ile
          20           25           30
Ser Cys Arg Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Val
          35           40           45
Val Arg Gln Ser His Val Arg Ser Leu Glu Trp Ile Gly Lys Ile Asn
          50           55           60
Pro Tyr Asp Gly Trp Ser Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Arg Asp Lys Ala
65           70           75           80
Ser Leu Thr Trp Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu His
          85           90           95
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Lys Asn Tyr
          100          105          110

```

Gly Tyr Asp Gly Ala Met Ala Tyr Val Gly Gln Gly Thr Ser Trp Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser Ala Arg Thr Thr Pro Pro
 130 135
 <210> 12
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 杂交瘤细胞(hybridoma)
 <400> 12
 Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Trp Ile Met Ser Lys Gly
 1 5 10 15
 Gln Ile Trp Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 20 25 30
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Thr Ser Ser
 35 40 45
 Tyr Leu His Val Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Val
 50 55 60
 Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Lys Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 85 90 95
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Leu Ser Pro
 100 105 110
 Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Lys Ala Asp Ala
 115 120 125
 Ala Pro Thr
 130
 <210> 13
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 杂交瘤细胞(hybridoma)
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ile Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Phe Asp Pro Val Asn Val Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Tyr

Gly	Arg	Ile	Asn	Thr	Asn	Asn	Glu	Val	Ser	Thr	Tyr	Ala	Glu	Glu	Phe
50						55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Asn	Asp	Leu	Thr	Asn	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Met	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Val	Trp	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala								
			115				120								
<210> 16															
<211> 107															
<212> PRT															
<213> 杂交瘤细胞(hybridoma)															
<400> 16															
Asp	Thr	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Phe	Ile	Ser	Thr	Ser	Ile	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Phe
			20					25					30		
Val	Val	Trp	Tyr	Gln	Arg	Lys	Ser	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile
		35				40						45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Lys	Ser
65				70						75					80
Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

专利名称(译)	一种双抗夹心法酶免疫层析检测试剂盒及制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110346554A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201810283311.1	申请日	2018-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
[标]发明人	田克恭 王莹		
发明人	田克恭 王莹		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/5436		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种试剂盒包括酶免疫层析检测试纸条、样品处理液、缓冲液和缓冲液供应单元，缓冲液包含磷酸盐缓冲液、大分子蛋白、Tween-20和防腐剂以及过氧化氢脲、过氧化氢尿素、双氧水中的任一种；酶免疫层析检测试纸条包括底物垫，其上吸附有经底物垫稀释液稀释后干燥而成的酶底物，底物垫稀释液包括无水乙醇、pH7.40.1M PBS溶液以及0.5%~4%W/V PEG6000或PEG4000；酶免疫层析检测试纸条包括酶标垫，其上吸附有经酶标抗体稀释液稀释后干燥而成酶标抗体，酶标抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、以及0.5%V/V PEG4000、PEG6000或PEG8000中的任一种；酶免疫层析检测试纸条包括检测线和质控线，检测线上固定有经固定抗体稀释液稀释的固定抗体，所述固定抗体稀释液包括pH7.4 0.1M PBS溶液、0.5%V/V海藻糖、0.1%V/V Tween-20。

