



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108318685 A

(43)申请公布日 2018.07.24

(21)申请号 201810417581.7

(22)申请日 2018.05.04

(71)申请人 广州敏捷生物技术有限公司
地址 510000 广东省广州市黄埔区瑞和路
39号G2栋601

(72)发明人 汤永平 梁展鹏

(74)专利代理机构 广州市科丰知识产权代理事
务所(普通合伙) 44467
代理人 王海曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

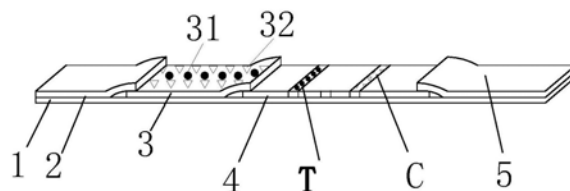
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析
检测卡与制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法;旨在提供一种灵敏度高,检测结果可靠的用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡;其技要点包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的CCV单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CCV单克隆抗体的检测T线;属于动物疫病检测领域。



1. 一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,包括底板(1),在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于,所述结合垫(3)上设有荧光微球标记的CCV单克隆抗体(31)和荧光微球标记的羊抗鸡IgY(32),所述的硝酸纤维膜(4)设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CCV单克隆抗体的检测T线。

2. 根据权利要求1所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,还包括样品稀释瓶(6)。

3. 根据权利要求2所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述样品稀释瓶(6)内装有样品稀释液,所述样品稀释液为含0.8% S21、0.03% Proclin300的0.01M的pH7.4磷酸盐缓冲液。

4. 制备权利要求1所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的方法,在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于:

A) 所述的样品垫的制备方法为:

1) 配制样品垫处理液:含1% BSA、0.2% PVP 58000、0.5% Tween-20的pH 7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液;

2) 将步骤1)中制备的缓冲液5.0 μ L/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上;

B) 所述的结合垫(3)的制备方法为:

1) 将用荧光微球标记的CCV单克隆抗体和用荧光微球标记的羊抗鸡IgY按照体积比20:1混合均匀,超声2s,间歇5s,重复3次;

2) 按3.5 μ L/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

C) 所述的反应膜的制备方法为:

1) 用含抗体包被稀释液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

2) 用抗体包被稀释液将CCV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T检测线工作液;

3) 取底板(1)粘贴硝酸纤维膜;

4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

5. 根据权利要求4所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述的抗体包被稀释液为含1%海藻糖的0.05M的磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求5所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,荧光微球标记的CCV单克隆抗体的制备方法为:

1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL 0.1M MES缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L 20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入5000 μ L淬灭剂,超声2s;

4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g CCV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

5) 封闭:加入2mL标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

7. 根据权利要求5所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,荧光微球标记的羊抗鸡IgY的制备方法为:

1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的0.05M MES缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

5) 封闭:加入500 μ L标记封闭液,封闭30min;

6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

8. 根据权利要求6或者7所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的微球为含有稀土镧元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25 $^{\circ}$ C;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

9. 根据权利要求6或者7所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

10. 根据权利要求6或者7所述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述活化淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;所述标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;所述标记荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白、1%葡聚糖T10和0.05%酪蛋白钠的0.03%Proclin300的0.05M pH 7.8 Tris缓冲液。

用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种免疫荧光层析检测卡,具体地说,是一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,本发明还公开了该免疫荧光层析检测卡的制备方法。

背景技术

[0002] 犬冠状病毒病的病原体是犬冠状病毒(Canine Corona Virus,CCV)。以轻重不一的胃肠炎为临床特征,临床上呈致死性的水样腹泻。突然发病、精神消沉、食欲废绝、呕吐、排出恶臭稀软而带粘液的粪便。呕吐常可持续数天,直至出现腹泻前才有所缓解。以后,粪便由精状、半糊状至水样,呈橙色或绿色,内含粘液和数量不等的血液。迅速脱水,体重减轻。感染源主要是病犬和带毒犬,病犬排毒时间为14天,保持接触必传染的能力为期更长病犬经呼吸道、消化道随口涎、鼻液和粪便向外排毒,污染饲料、饮水、笼具和周围环境,直接或间接地传给有易感动物。CCV在粪便中可存活6—9天,在水中也可保持数日的传染性,因此一旦发病,则很难制止传播流行。犬冠状病毒广泛分布于全世界,是对我国养犬业、毛皮动物养殖业危害最大的疫病之一。

[0003] 中国专利ZL201620488080.4公开了一种快速检测犬冠状病毒抗体的胶体金试纸卡,在塑料底板一端粘贴样品垫,样品垫的一端紧密压接含有标记抗犬冠状病毒抗原的金标垫,金标垫的一端紧密压接含有标记鼠IgG抗体的金标鼠IgG抗体垫,金标鼠IgG抗体垫一端紧密压接硝酸纤维素NC膜,NC膜上包被有相互分离的检测线T和质控线C,NC膜的另一端连接吸水垫形成试纸,试纸装入塑料卡壳内形成试纸卡。该专利采用传统的胶体金层析技术,免疫标记物依靠静电吸附,存在灵敏度较低、难以定量、重复性和稳定性较差等缺陷,无法完全满足临床的检测需求。另外,犬感染犬冠状病毒后,以轻重不一的胃肠炎为临床特征,冠状病毒一般存在于病犬的粪便中,而犬冠状病毒抗体一般存在犬的血液中,该专利采用双抗原夹心法检测粪便中的犬冠状病毒抗体,可能存在检出率较低,准确性较差等情况。

[0004] 中国专利ZL201410753855.1公开了一种用荧光免疫层析技术检测犬冠状病毒的试纸条,包括标记物垫和捕获膜,所述标记物垫含有荧光微球标记的犬冠状病毒检测抗体,所述捕获膜含有捕获探针。该方法存在下述问题:采用试剂瓶分装荧光标记的犬冠状病毒抗体,而不是直接喷到标记物垫上,这样整个检测卡非干式,需要冷藏,检测时,需要先把含犬冠状病毒的样品溶液加入到试剂瓶中,操作欠方便,不合适现场检测。

发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种灵敏度高,检测结果重现性好的用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡。

[0006] 本发明的第二个目的是提供上述检测试剂卡的制备方法。

[0007] 为此,本申请提供的第一个技术方案是这样的:

[0008] 一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,其特征在于,所述结合垫上设有荧光微球标

记的CCV单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维膜设有一条包被IgY的质控C线,以及一条包被CCV单克隆抗体的检测T线。

[0009] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,还包括样品稀释瓶。

[0010] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述样品稀释瓶内装有样品稀释液,所述样品稀释液为含0.8% S21、0.03% Proclin300的0.01M的pH7.4磷酸盐缓冲液。

[0011] 本申请提供的第二个技术方案是这样的:

[0012] 一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,

[0013] A) 所述的样品垫的制备方法为:

[0014] 1) 配制样品垫处理液:含1%BSA、0.2%PVP58000、0.5%Tween-20的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液;

[0015] 2) 将步骤1)中制备的缓冲液5.0 μ L/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上;

[0016] B) 所述的结合垫的制备方法为:

[0017] 1) 将用荧光微球标记的CCV单克隆抗体和用荧光微球标记的羊抗鸡IgY按照体积比20:1混合均匀,超声2s,间歇5s,重复3次;

[0018] 2) 按3.5 μ L/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0019] C) 所述的反应膜的制备方法为:

[0020] 1) 用含抗体包被稀释液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

[0021] 2) 用抗体包被稀释液将CCV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T检测线工作液;

[0022] 3) 取底板粘贴硝酸纤维膜;

[0023] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

[0024] 5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

[0025] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述的抗体包被稀释液为含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液。

[0026] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记CCV单克隆抗体的制备方法为:

[0027] 1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL0.05M MES缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

[0028] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0029] 3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入5000 μ L淬灭剂,超声2s;

[0030] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g CCV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0031] 5) 封闭:加入2mL标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

[0032] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧

光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

[0033] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记羊抗鸡IgY的制备方法为:

[0034] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的0.05M MES缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

[0035] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0036] 3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

[0037] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0038] 5) 封闭:加入500 μ L标记封闭液,封闭30min;

[0039] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

[0040] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25 $^{\circ}$ C;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0041] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

[0042] 进一步的,上述的一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述活化淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;所述标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;所述标记荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白、1%葡聚糖T10和0.05%酪蛋白钠的0.03%Proclin300的0.05M pH7.8Tris缓冲液。

[0043] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有如下优点:

[0044] 1、本发明操作步骤简单,对样品预处理方法进行优化,只需要采集猫血清,稀释后加入到检测卡的加样孔中即可检测,检测速度快,10分钟出结果,结果即可定性观察又可定量测定,大大降低检测成本,减少工作量。

[0045] 2、本申请提供的技术方案,通过对样品垫处理液和标记荧光微球稀释液的优化,相比传统工艺,灵敏度明显高,最低检测限(LOD)可达到2.69ng/mL(常规工艺6.25ng/mL),线性更好,剂量-反应曲线的决定系数由0.9892提升到0.9953。

[0046] 3、本申请提供的技术方案对结合垫、硝酸纤维膜制备过程严格考究、优化,进一步提高了检测卡的精密度。

[0047] 4、本申请根据检测靶标不同,探索并采用专用样品垫处理液,免疫层析更充分,免疫反应效率更好;重复性好,低中高三个水平质控变异系数均低于10%(8.62%、6.59%和4.61%);另外缓冲液中加入生物防腐剂Proclin300,可以有效保持检测试剂的稳定性,并保护检测者不受常规防腐剂例如叠氮钠等的危害。

附图说明

- [0048] 图1是本发明提供的检测试纸卡结构示意图；
[0049] 图2是本发明提供的检测试纸条结构示意图；
[0050] 图3是本发明提供的另一种检测试纸卡结构示意图；
[0051] 图4是本发明提供的检测卡判定结果为阳性时示意图；
[0052] 图5是本发明提供的检测卡判定结果为阴性示意图；
[0053] 图6是本发明提供的检测卡判定结果为无效时一种示意图；
[0054] 图7是本发明提供的检测卡判定结果为无效时另一种示意图；
[0055] 图8是本申请提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。
[0056] 图9是对比例提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0057] 下面结合具体实施方式,对本发明的权利要求作进一步的详细说明。

[0058] 实施例1

[0059] 本发明提供一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图2,包括壳体7,所述的壳体7内设有用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡包括底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记CCV单克隆抗体31和荧光微球标记的羊抗鸡IgY32,所述的硝酸纤维膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CCV单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条73,方便试剂卡的取出与放入。

[0060] 实施例2

[0061] 本申请提供的另一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图3,包括箱体9,所述的箱体9内设有样品稀释液瓶6,吸管8以及用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡位于壳体7内,所述用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡包括底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记CCV单克隆抗体31和荧光微球标记的羊抗鸡IgY32,所述的硝酸纤维膜4设有一条包被IgY的质控C线,以及一条包被CCV单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条73,方便试剂卡的取出与放入。

[0062] 实施例3

[0063] 实施例1和实施例2提供的用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在温度(18~26)℃、湿度≤30%的环境下进行装配,在底板1上依次衔接有硝酸纤维膜4、吸水垫5、结合垫3和样品垫2;将粘贴好的大板切成4.0MM宽的试纸条,装入塑料卡壳内,即CCV检测卡;将每一检测卡置于铝膜袋中,加入干燥剂1包,热合封口备用。

[0064] 具体制备方法如下:

[0065] 1.1结合垫的制备

[0066] 1.1.1CCV单克隆抗体的标记

[0067] 1) 选择微球:微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0068] 2) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL0.1M的MES标记缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),加入荧光微球1mg,涡旋混匀。

[0069] 3) 微球的活化:在上述离心管中加入(20-50)μL(优选30μL)50mg/mL标记活化剂A,所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.05M的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),涡旋混匀后加入(200-500)(优选300μL)μL50mg/mL标记活化剂B,所述的标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),旋转培养器上反应30min;

[0070] 4) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液),超声2s;

[0071] 5) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20μgCCV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0072] 6) 封闭:加入200.0μL标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;所述标记封闭液为含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH8.0乙醇胺溶液;

[0073] 7) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入600.0μL标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

[0074] 所述的荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白(BSA)、1%葡聚糖T10和0.05%酪蛋白钠的0.03%Proclin300的0.05M pH 7.8 Tris缓冲液。

[0075] 1.1.2羊抗鸡IgY的标记

[0076] 1) 选择微球:微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0077] 2) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL0.1M的MES标记缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),加入荧光微球1mg,涡旋混匀。

[0078] 3) 微球的活化:在上述离心管中加入(20-50)μL(优选30μL)50mg/mL标记活化剂A,所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的0.05M的MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),涡旋混匀后加入(20-50)μL(优选30μL)50mg/mL标记活化剂B,所述的标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的0.05M MES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),旋转培养器上反应30min;

[0079] 4) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液),超声2s;

[0080] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入0.25mg羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0081] 5) 封闭:加入标记封闭液,封闭30min;所述标记封闭液为含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;

[0082] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入1mL标记荧光微球稀释液。

[0083] 所述的荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白(BSA)、1%葡聚糖T10和0.05%酪蛋

白钠的0.03%Proclin300的0.05M pH 7.8 Tris缓冲液。

[0084] 1.1.3喷膜

[0085] 1) 将玻璃纤维裁切为(10±1) mm×(300±10) mm大小为结合垫；

[0086] 2) 将标记后的T、C线抗体按20:1 (V:V) 混合均匀,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次；

[0087] 3) 按3.5μL/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上；

[0088] 4) 喷完后,37℃干燥箱中干燥过夜(16~18) h。

[0089] 1.2反应膜的制备

[0090] 1) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将IgY稀释到1mg/mL,即为C线工作液。

[0091] 2) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将另一株CCV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T线工作液。

[0092] 3) 取PVC底板,粘贴硝酸纤维膜。

[0093] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1μL/cm。

[0094] 5) 完成后将片材放置在37℃干燥箱中干燥过夜(16~18) h。

[0095] 1.3样品垫制备

[0096] 1) 配制样品垫处理液:含1%BSA、0.2%PVP58000、0.5%Tween-20的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0097] 2) 以5.0μL/cm的浓度将缓冲液喷涂于玻璃纤维上。

[0098] 对比试验

[0099] 将实施例3中的样品垫处理液1%BSA、0.2%PVP58000、0.5%Tween-20的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)换成0.5%Tween-20、0.1%牛血清白蛋白、0.5%Trition-100的50mM pH 8.0 10mmol/L Tris-HCl缓冲液;将标记荧光微球稀释液含1%牛血清白蛋白(BSA)、1%葡聚糖T10和0.05%酪蛋白钠的0.03%Proclin300的0.05M pH 7.8 Tris缓冲液换为含2%BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖、0.05%叠氮钠的pH 8.0 10mmol/L Tris-HCl缓冲液,其它条件和工艺参数均不变。

[0100] 检测方法

[0101] 为了便于使用本申请提供的检测卡,下面给出本申请提供的检测卡提供两种检测方法。

[0102] 方法一:采用紫外灯照射,参阅图4至图7:用手持式紫外线灯照射观察窗口,当质控线和检测线都有量荧光出现时(图4),说明样品中CCV抗原为阳性;当只有质控线有荧光而检测线无荧光出现时(图5),说明样品中CCV抗原为阴性;质控线未出现荧光(图6、图7),则代表操作有误或检测结果无效,需重复试验。

[0103] 方法二:免疫荧光检测仪检测结果:

[0104] 1) 使用棉签采集病犬粪便;

[0105] 2) 取10μL加入含有1.0mL样品稀释液(含0.8%S21、0.03%Proclin300的0.01M的pH7.4磷酸盐缓冲液)的样品管中,充分混匀;

[0106] 3) 取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0107] 4) 吸取稀释后的样本75μL,加入到检测卡的加样孔中,将检测卡放入到仪器的卡

槽中,开始计时;

[0108] 5) 10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0109] 6) 荧光强度与样品中的CCV浓度成正比,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算,剂量反应曲线 $\text{Log}(Y) = 0.7932\text{Log}(X) - 1.6475$, $R = 0.9976$ ($R^2 = 0.9953$),参阅图3。

[0110] 免疫荧光检测仪检测结果:

[0111] 1、线性范围

[0112] 1.1将CCV校准品用阴性血清分别稀释到0ng/mL、10ng/mL、30ng/mL、90ng/mL、270ng/mL、800ng/mL、2400ng/mL、3000ng/mL、4000ng/mL、5000ng/mL、6000ng/mL、7000ng/mL和8000ng/mL;

[0113] 1.2将以上各浓度样本分别取75 μ L,加入至制备好的猫CCV检测试剂中,每浓度重复测试2次;

[0114] 1.3反应10min后,将试纸放入干式免疫荧光分析仪中,读取T/C值,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算。

[0115] 1.4测试结果显示:试剂在检测10~4000ng/mL的CCV线性拟合关系较好, $r > 0.9900$,当CCV浓度增加到4000ng/mL时,线性拟合 r 值小于0.9900,T/C增长减缓,CCV在4000~5000ng/mL时T/C值平缓,CCV达到6000ng/mL时,T/C值反而降低。因此本检测的最大检测范围可以达到4000ng/mL。

[0116] 2、最低检出限

[0117] 将阴性血清,重复测试20次,计算T/C均值,将其代入剂量-反应曲线中,得出本方法的最低检出限为2.69ng/mL,见表1和图8。

[0118] 表1

		剂量反应曲线			
		原始数值		取对数	
		浓度 (ng/ml)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
[0119] 本申请提供的检测试剂卡		0	0.02		
		10	0.15	1.00	-0.89
		30	0.35	1.48	-0.48
		90	0.85	1.95	-0.08
		270	2.1	2.43	0.32
		800	5.2	2.90	0.71
		2400	9.12	3.38	0.96
		最低检测限 (LOD) : 2.69ng/ml			
		r: 0.9976			
	[0120]		r ² :0.9953		

[0121] 用同样方法检测对比比例试验,其最低检出限为6.25ng/mL,见表2和图9。

[0122] 表2

	剂量反应曲线			
	原始数值		取对数	
	浓度 (ng/ml)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
[0123] 对比文件 1 提供的检测试剂卡	0	0.02		
	10	0.08	1.00	-1.22
	30	0.24	1.48	-0.66
	90	0.64	1.95	-0.21
	270	1.86	2.43	0.26
	800	4.02	2.90	0.60
	2400	8.26	3.38	0.92
	最低检测限 (LOD) : 6.25ng/ml			
	r: 0.9946			
	r ² :0.9892			

[0124] 3、精密度

[0125] 将CCV校准品用阴性血清稀释至20ng/mL、200ng/mL、2000ng/mL,用本方法检测卡每浓度重复测试10次,计算测试浓度的变异系数。结果表3所示,由此可以看出,本试剂盒检测的变异系数均小于10% (三个浓度分别为8.62%、6.59%和4.61%),见表3,因此本检测方法具有较高的精密度。

[0126] 表3

[0127]

	浓度	CV
质控I	20ng/mL	8.62%
质控II	200ng/mL	6.59%
质控III	1000ng/mL	4.61%

[0128] 为了更好的说明本发明的有益效果,下面给出采用本发明提供的检测试剂与检测犬冠状病毒(CCV)的方法是血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)及ELISA方法,PCR检测法,胶体金方法在检测犬冠状病毒抗原时的结果对比实验,结果见表4。

[0129] 表4

检测方法	专利公开号	操作	待检物质	检测性能
荧光免疫层析法	CN 105738619 A	简单快捷	犬冠状病毒抗原	定量检测，剂量-反应曲线未提供； T线和C线采用同一系统
胶体金法	CN 204556642 U	简单快捷	犬冠状病毒和犬细小病毒	同时检测两种病毒，可能存在相互 干扰；定性检测
[0130] 胶体金法	CN 106290880 A	简单快捷	犬冠状病毒	选用特殊的样本处理液；定性检测
胶体金法	CN 203465269 U	简单快捷	犬冠状病毒、犬细小病毒和犬瘟热病毒	同时检测三种病毒，可能存在相互 干扰；定性检测
本发明型提供的方法		简单快捷	犬冠状病毒抗原	选用两株单抗和夹心法层析，特异性好，与其他同类病毒无交叉反应； T线和C线采用双系统； 既可定性检测，也可定量检测；灵敏度可达到 2.69 ng/mL。

[0131] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

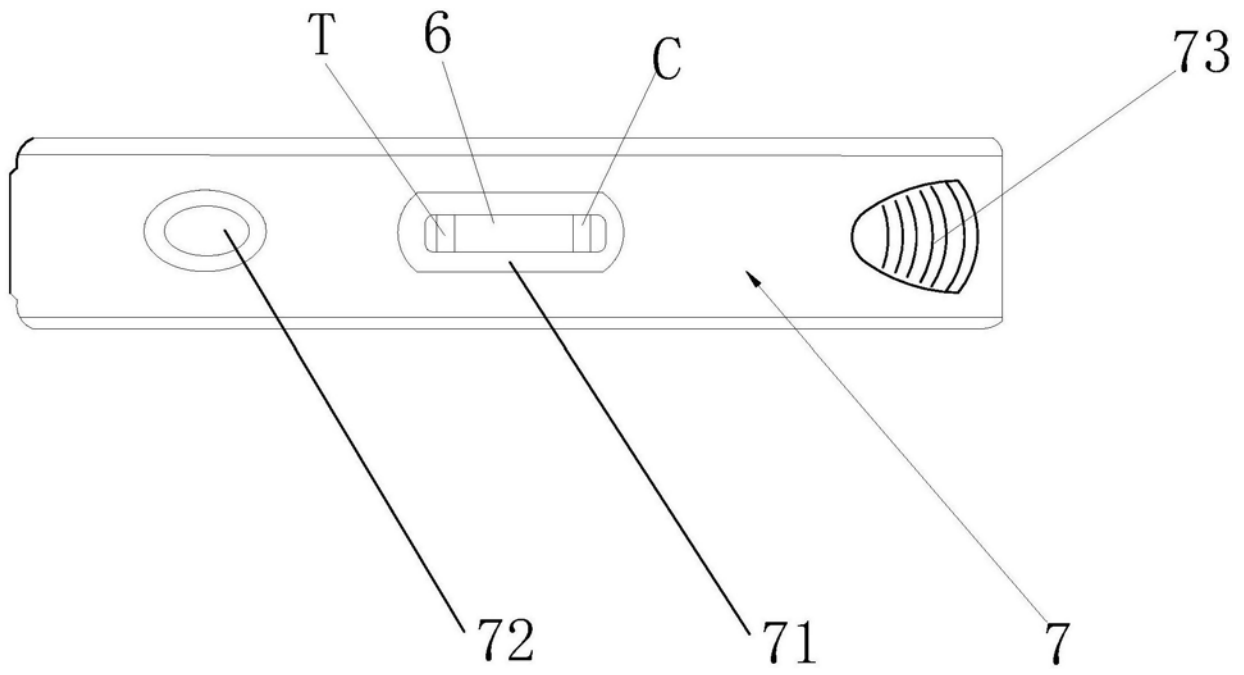


图1

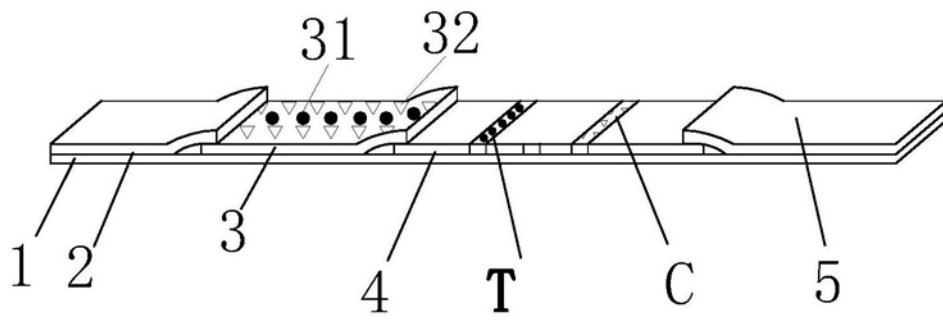


图2

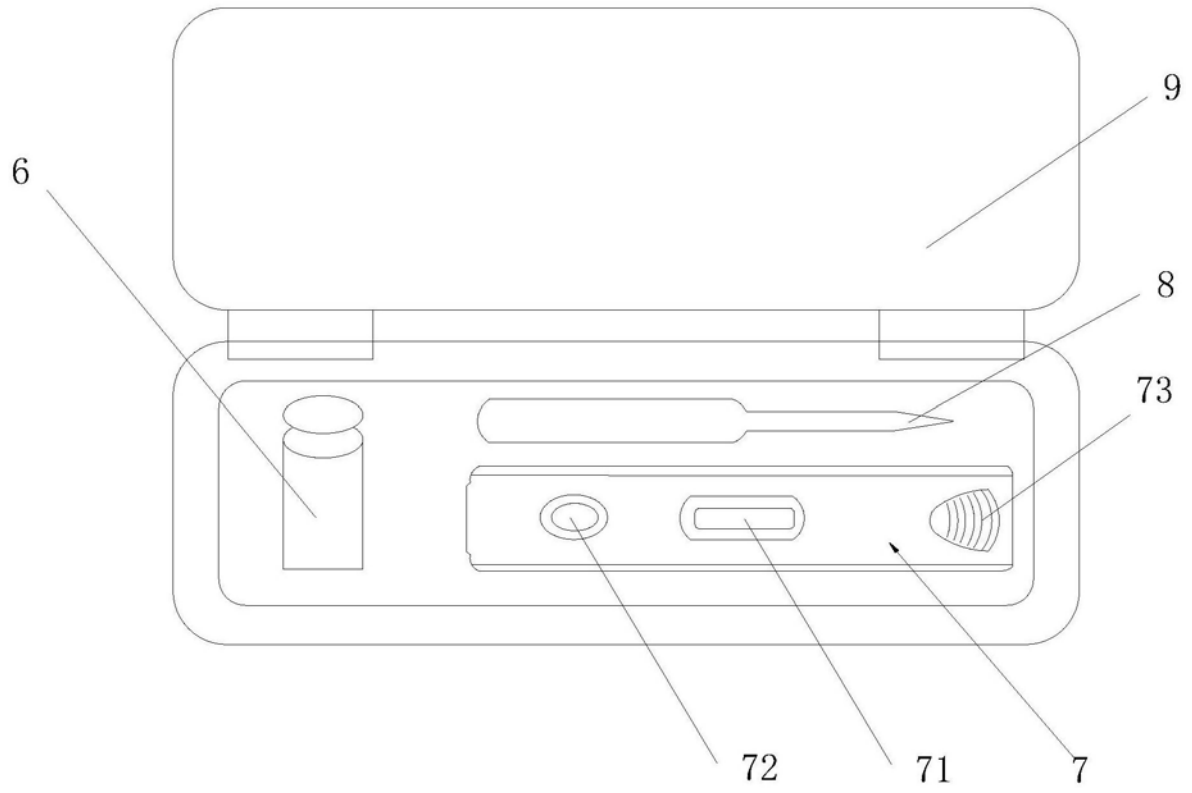


图3

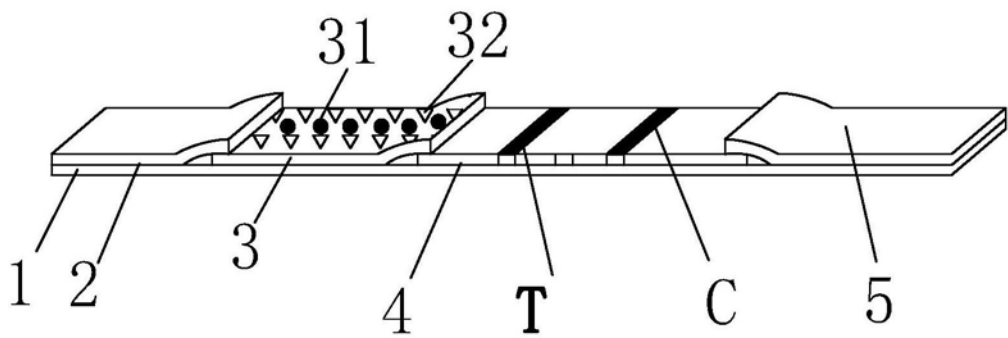


图4

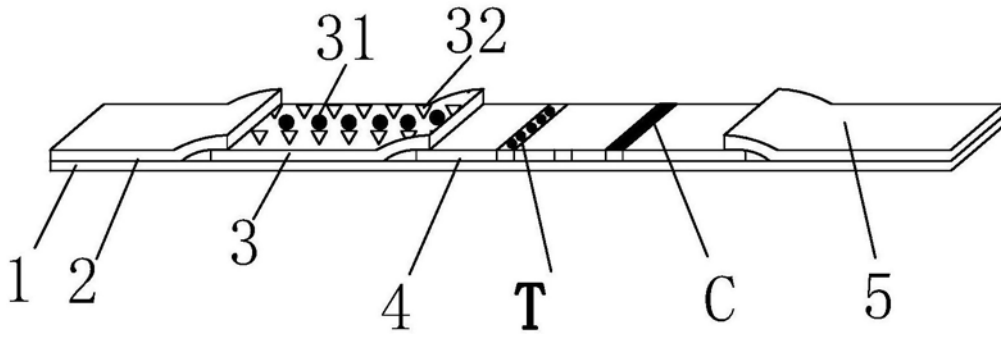


图5

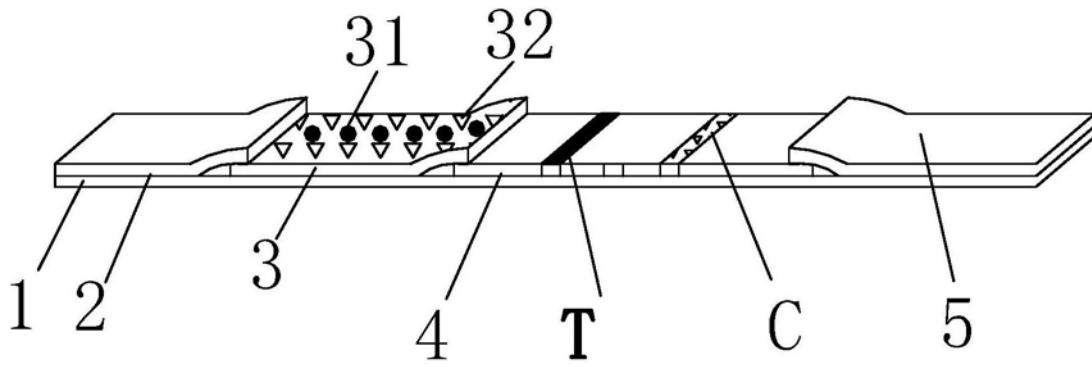


图6

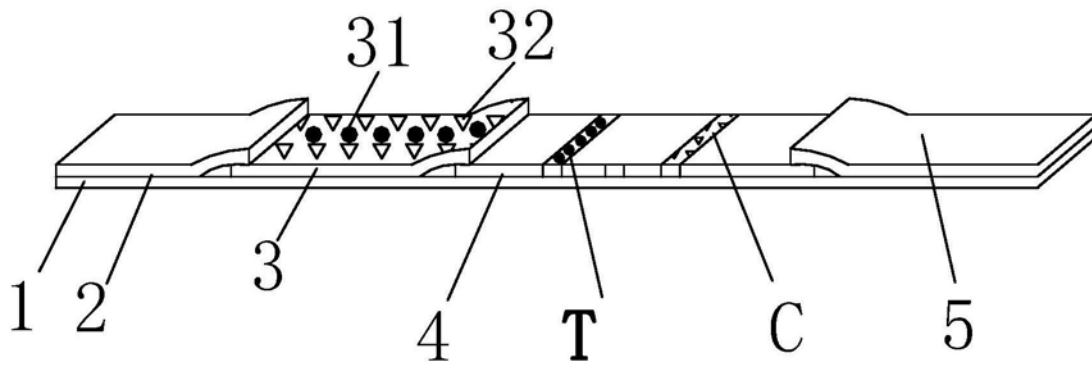


图7

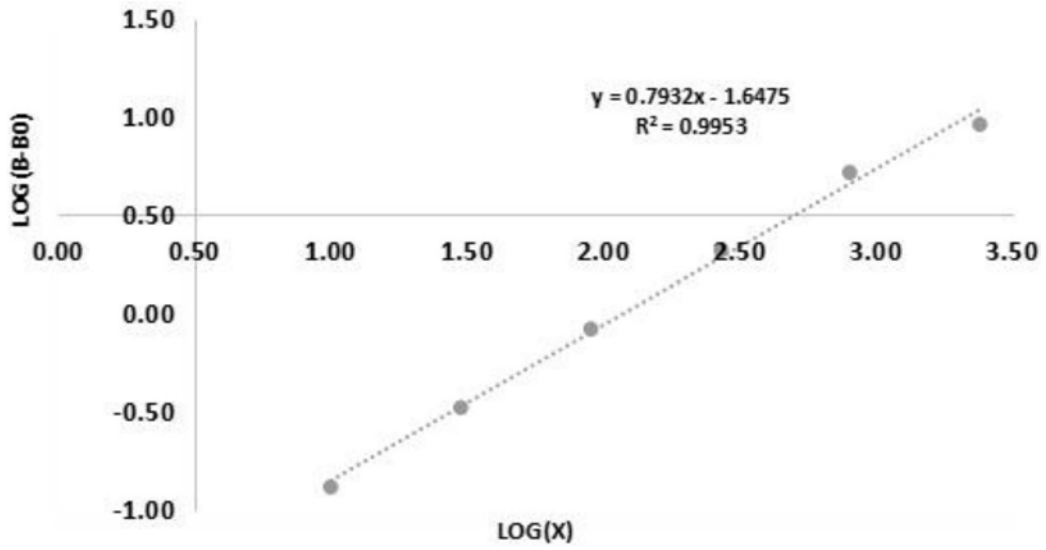


图8

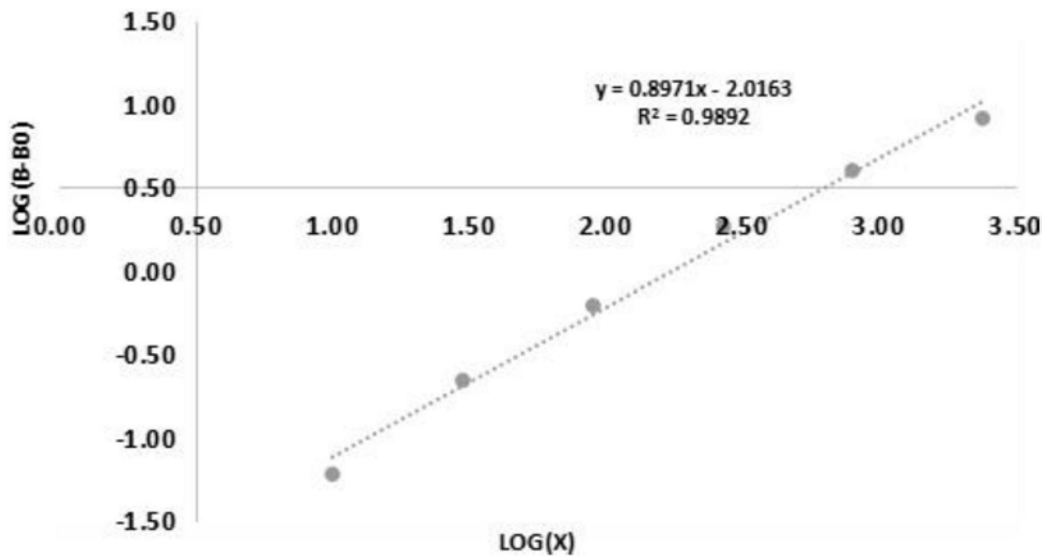


图9

专利名称(译)	用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法		
公开(公告)号	CN108318685A	公开(公告)日	2018-07-24
申请号	CN201810417581.7	申请日	2018-05-04
[标]发明人	汤永平 梁展鹏		
发明人	汤永平 梁展鹏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬冠状病毒抗原的免疫荧光层析检测卡；其技要点包括底板，在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫，所述结合垫上设有荧光微球标记的CCV单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY，所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线，以及一条包被CCV单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。

