



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108845128 A

(43)申请公布日 2018.11.20

(21)申请号 201810417584.0

(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 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

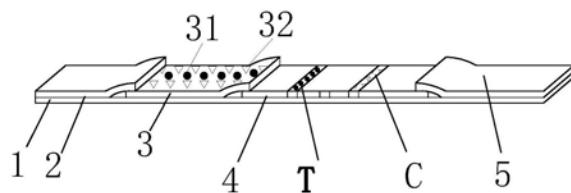
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

用于检测犬瘟热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瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡及其制备方法；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡；其技术要点包括底板，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CDV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CDV单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。



1. 一种用于检测犬瘟热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CDV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CDV单克隆抗体的检测T线。

2. 根据权利要求1所述的一种检测犬瘟热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所述的一种检测犬瘟热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瘟热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0.5% S9、0.05% 酪蛋白钠、0.3% PVP和0.5% TritonX-305的0.01M pH8.0硼酸盐缓冲液;

2) 将步骤1)中制备的缓冲液10μl/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CDV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3.5μl/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3%蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

2) 用含3%蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将CDV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1μL/cm;

5) 完成后将片材放置在37℃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瘟热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CDV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标记缓冲液,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20μl-50μl标记活化剂A和20μl-50μl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500μl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20-200μg CDV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。

6. 根据权利要求4所述的一种用于检测犬瘟热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的标记缓冲液,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。

7. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬瘟热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。

8. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的标记缓冲液为0.05M MES缓冲液;所述的标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH8.0乙醇胺溶液;所述的标记荧光微球稀释液为含0.05%酪蛋白钠、0.5% S9、0.3% PVP、0.05% Tween-20和0.03% Proclin300的pH8.0硼酸缓冲液;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

9. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的标记活化剂A为50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;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的0.05M MES缓冲液。

用于检测犬瘟热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,是一种用于检测犬瘟热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] 犬瘟热(CD)是世界范围内广泛发生的一种犬的急性、高接触性的病毒传染病,其病原为犬瘟热病毒(CDV),隶属于副黏病毒科麻疹病毒属,其自然宿主包括大部分的食肉目动物。

[0003] 早期双相热型、急性鼻卡他及随后的支气管炎、卡他性肺炎、严重的胃肠炎和神经症状为特征,有些患病动物的鼻和足垫还表现过度角化。也是一种传染性强,临床症状多样,容易继发细菌和其他病毒的混合感染或继发感染,发病率高达80%,患病动物在康复后还易留有麻痹、抽搐、癫痫样发作等后遗症。常规免疫接种在正常情况下是一种高度有效的预防保护措施,但据报道,犬瘟热在德国、法国、日本、美国和芬兰等国家常规免疫执行很好的地区也会有不同程度的流行,这表明预防接种过的犬也可能发病,而发病机制可能存在新的变化。

[0004] 近几年,随着我国军犬、警犬、实验用犬和宠物犬饲养量的大幅增加,以及异地交流的增多,犬瘟热在我国犬中的发病率和致死率均有升高的趋势,而且临床表现也与以往有所不同。病犬以呈现双相热型、鼻炎、严重的消化道障碍和呼吸道炎症等为特征。幼犬的死亡率在90%以上,成犬的死亡率在50%以上。少数病例可发生脑炎。除犬科动物外,鼬科、浣熊科及大熊猫科等多种动物也可感染发病。因此,CDV是当前对宠物饲养业、经济动物养殖业和动物园观赏业危害最大的疫病。

[0005] 中国专利201711054386.4公开了一种犬瘟热病毒抗体快速定量检测卡及使用方法,包括检测卡外壳和装配在检测卡外壳内的试纸条,所述试纸条包括带压敏胶的塑料底板,在底板上依次粘贴样品垫、标记物垫、硝酸纤维膜和吸水纸,所述标记物垫由载体基层和标记物组成,标记物为载体基层上喷涂镧系荧光检测微球和镧系荧光质控微球形成的一层膜,所述硝酸纤维膜上包被犬瘟热病毒重组抗原为检测线,包被兔抗鸡IgY抗体为质控线,标记物为标记有犬瘟热病毒结构蛋白H蛋白的重组抗原的荧光检测微球和标记鸡IgY抗体的荧光质控微球。但是该检测试剂开需要先行制备H蛋白,其步骤繁琐,所需要的试剂原料成本较高,并且需要专业人员进行蛋白的合成。另外该检测试剂检测是样本的犬瘟热病毒抗体,不能直接检测犬粪便中的病毒性抗原,不利于疾病早期快速诊断与治疗。

[0006] 中国专利201310562376.7公开了一种犬瘟热病毒抗原化学发光检测试剂盒,其方案包括设置在盒体内的包被板和试剂,所述试剂包括辣根过氧化酶标记羊抗鼠的抗体、包被溶液、封闭溶液、洗涤液和化学发光液,所述包被板为包被有犬瘟热病毒抗体的发光板,所述犬瘟热病毒抗体的稀释度为1:700-1000,辣根过氧化酶标记羊抗鼠的抗体稀释度为1:2500;所述发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板;所述犬瘟热病毒抗体的包被是将犬瘟热病毒抗体置于0.1mol/L的包被溶液中,在4℃的温度下反应包被12h,然后采用

封闭溶液密封于发光板上的孔内；所述包被溶液为碳酸钠和碳酸氢钠溶于水中制成的碳酸盐缓冲液，且碳酸根的浓度为0.1mol/L；所述封闭溶液为每100mL水中加入10g的BSA制成的BSA溶液，然后向其中依次加入BSA溶液重量5%的脱脂奶粉、1%的明胶和0.05%的NaN₃。但是该检测试剂盒的线性范围并不高，专利未能公开试剂的剂量反应曲线；采用辣根过氧化酶标记羊抗鼠的抗体，特异性可能受到影响。另外整个操作非常繁琐费时，需要样品稀释、加样、洗涤、加酶标羊抗鼠的抗体、洗涤、加发光液、检测等一系列步骤，不利于疾病早期快速诊断与治疗。

发明内容

[0007] 针对上述问题，本发明的目的是提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡。

[0008] 本发明的第二个目的是提供上述检测试剂卡的制备方法。

[0009] 为此，本申请提供的第一个技术方案是这样的：

[0010] 一种用于检测犬瘟热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，所述结合垫上设有荧光微球标记的CDV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CDV单克隆抗体的检测T线。

[0011] 进一步的，上述的一种检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡，还包括样品稀释瓶。

[0012] 进一步的，上的一种检测犬瘟热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。

[0013] 本申请提供的第二个技术方案是这样的：

[0014] 一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法，在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫，其中：

[0015] A) 所述的样品垫的制备方法为：

[0016] 3) 配制样品垫处理液：含0.5% S9、0.05% 酪蛋白钠、0.3% PVP和0.5% TritonX-305的0.01M pH8.0硼酸盐缓冲液；

[0017] 4) 将步骤1)中制备的缓冲液5μl/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上；

[0018] B) 所述的结合垫的制备方法为：

[0019] 1) 将用荧光微球标记的CDV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；

[0020] 2) 按3.5μl/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上；

[0021] C) 所述的反应膜的制备方法为：

[0022] 1) 用含3% 蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将鸡IgY稀释到1mg/mL，即为C质控线工作液；

[0023] 2) 用含3% 蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液将CDV单克隆抗体稀释到1mg/mL，即为T检测线工作液；

[0024] 3) 取底板粘贴硝酸纤维膜；

[0025] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$;

[0026] 5) 完成后将片材放置在 37°C 干燥箱中干燥过夜。

[0027] 进一步的,上述的一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的荧光微球标记的CDV单克隆抗体的制备方法为:

[0028] 1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL标记缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

[0029] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入 $20\mu\text{l}-50\mu\text{l}$ 标记活化剂A和 $20\mu\text{l}-50\mu\text{l}$ 标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0030] 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 μl 淬灭剂,超声2s;

[0031] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入 $20-200\mu\text{g}$ CDV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0032] 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;

[0033] 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。

[0034] 进一步的,上述的一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的荧光微球标记的羊抗鸡IgY的制备方法为:

[0035] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的标记缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

[0036] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入 $20\mu\text{l}-50\mu\text{l}$ 标记活化剂A和 $20\mu\text{l}-50\mu\text{l}$ 标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0037] 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;

[0038] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入 $100\mu\text{g}$ 羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0039] 5) 封闭:加入 $500\mu\text{l}$ 标记封闭液,封闭30min;

[0040] 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。

[0041] 进一步的,上述的一种用于检测犬瘟热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: $1.05\text{g}/\text{cm}^3$;折射率: $1.59@589\text{nm}, 25^\circ\text{C}$;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0042] 进一步的,上述的一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的标记缓冲液为0.05MMES缓冲液;所述的标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M $\text{pH}8.0$ 乙醇胺溶液;所述的标记荧光微球稀释液为含0.05%酪蛋白钠、0.5%S9、0.3%PVP、0.05%Tween-20和0.03%Proclin300的 $\text{pH}8.0$ 硼酸缓冲液;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

[0043] 进一步的,上述的一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的标记活化剂A为50mg/mL $\text{N}-\text{羟基琥珀酰亚胺}$ 的0.05M的MES缓冲液;所述的标记活化剂B为含50mg/mL $\text{1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐}$ 的0.05MMES缓冲液。

[0044] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有如下优点:

[0045] 1、本发明提供的技术方案操作步骤简单,对样品预处理方法进行优化,只需要采集犬血清,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。

[0046] 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0.86ng/mL(原工艺1.56ng/mL),线性更好,剂量-反应曲线的决定系数由0.9874提升到0.9989。

[0047] 3、本发明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。

[0048] 4、本发明提供的技术方案采用的样品垫处理液,荧光微球释放更充分,重复性好,低中高三个水平质控变异系数(CV)均低于10%(8.45%、5.64%和5.85%);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,并且确保检查的灵敏度。

附图说明

[0049] 图1是本发明提供的检测试纸卡结构示意图;

[0050] 图2是本发明提供的检测试纸条结构示意图;

[0051] 图3是本发明提供的另一种检测试纸卡结构示意图;

[0052] 图4是本发明提供的检测卡判定结果为阳性时示意图;

[0053] 图5是本发明提供的检测卡判定结果为阴性示意图;

[0054] 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;

[0055] 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;

[0056] 图8是本申请提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

[0057] 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

[0058] 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。

实施例1

[0060] 本发明提供的一种用于检测犬瘟热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内设有用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测犬瘟热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的CDV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CDV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。

实施例2

[0062] 本申请提供的另一种用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图3,包括盒体9,所述的盒体9内设有样品稀释液瓶6,吸管8以及用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡位于壳体

7内,所述用于检测犬瘟热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的CDV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CDV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。

[0063] 实施例3

[0064] 实施例1和实施例2提供的用于检测犬瘟热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CDV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。

[0065] 具体制备方法如下:

[0066] 1.1结合垫的制备

[0067] 1.1.1 CDV单克隆抗体的标记

[0068] 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。

[0069] 2)稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL标记缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;所述的标记缓冲液为0.05MMES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)。

[0070] 3)微球的活化:在上述离心管中加入20-50μl(优选30μl)mg/mL50mg/mL标记活化剂A,涡旋混匀后加入20-50μl(优选30μl)50mg/mL标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0071] 所述的标记活化剂A为50mg/mL-N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述的标记活化剂B为50mg/mL50mg/mL1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05MMES缓冲液。

[0072] 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,超声2s;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

[0073] 5)抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20μgCDV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0074] 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;

[0075] 所述标记封闭液含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04Mph8.0乙醇胺溶液;

[0076] 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。

[0077] 所述标记荧光微球稀释液为含0.05%酪蛋白钠、0.5%S9、0.3%PVP、0.05%Tween-20和0.03%Proclin300的pH8.0硼酸缓冲液。

[0078] 1.1.2质控C线抗体的标记

[0079] 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。

[0080] 2)稀释微球:稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL标记缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;所述的标记缓冲液为0.05MMES缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸);

[0081] 3) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ l-50 μ l(优选30 μ l)标记活化剂A和20 μ l-50 μ l(优选30 μ l)标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;所述的标记活化剂A为50mg/mL-N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述的标记活化剂B为含50mg/mL-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05MMES缓冲液。

[0082] 4) 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1mL淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

[0083] 5) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入0.1mg羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0084] 6) 封闭:加入标记封闭液,封闭30min;

[0085] 所述标记封闭液含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH8.0乙醇胺溶液;

[0086] 7) 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,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

[0087] 所述标记荧光微球稀释液为含0.05%酪蛋白钠、0.5%S9、0.3%PVP、0.05%Tween-20和0.03%Proclin300的pH8.0硼酸缓冲液。

[0088] 1.1.3 喷膜

[0089] 1) 将璃纤维裁切为(10±1)mm×(300±10)mm大小为结合垫;

[0090] 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;

[0091] 3) 按5.0 μ l/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0092] 4) 喷完后,37℃干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0093] 1.2 反应膜的制备

[0094] 1) 用含3%蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C线工作液。

[0095] 2) 用含3%蔗糖的pH7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)将另一株CDV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T线工作液。

[0096] 3) 取PVC底板,粘贴硝酸纤维膜。

[0097] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm。

[0098] 5) 完成后将片材放置在37℃干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0099] 1.3 样品垫制备

[0100] 1) 配制样品垫处理液:含0.5%S9、0.05%酪蛋白钠、0.3%PVP和0.5%TritonX-305的0.01M pH8.0硼酸盐缓冲液。

[0101] 2) 以5 μ l/cm的浓度将缓冲液喷涂于玻璃纤维上。

[0102] 对比试验

[0103] 本对比实验提供的检测试剂卡结构与实施例1提供的检测试剂卡结构基本一致,其不同之处在于,在制备过程中将实施例3中的样品垫处理液为含0.5%S9、0.05%酪蛋白钠、0.3%PVP和0.5%TritonX-305的0.01M pH8.0硼酸盐缓冲液替换为含0.5%Tween-20、0.1%牛血清白蛋白、0.5%Trition-100的50mM pH8.010mmol/L Tris-HCl缓冲液;将标记荧光微球稀释液含0.05%酪蛋白钠、0.5%S9、0.3%PVP、0.05%Tween-20和0.03%Proclin300

CN 108845128 A
的pH8.0硼酸缓冲液替换为含2%BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖、0.05%叠氮钠的pH8.010mmol/LTris-HCl缓冲液,其它条件和工艺参数均不变。

[0104] 检测方法

[0105] 为了便于本领域技术人员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。

[0106] 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CDV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CDV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。

[0107] 方法二:免疫荧光检测仪检测结果:

[0108] 1) 使用棉签采集病犬唾液、尿液、眼分泌物等;

[0109] 2) 取10 μ l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;

[0110] 3) 取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0111] 4) 吸取稀释后的样本75 μ l,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;

[0112] 5) 10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0113] 6) 荧光强度与样品中的CDV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 $\text{Log}(Y) = 0.6151\text{Log}(X) - 1.3923, R = 0.9971 (R^2 = 0.9942)$,参阅图3。

[0114] 免疫荧光检测仪检测结果:

[0115] 1、线性范围

[0116] 1.1 将CDV校准品用阴性血清分别稀释到0ng/mL、10ng/mL、40ng/mL、150ng/mL、600ng/mL、2000ng/mL、4000ng/mL、5000ng/mL、6000ng/mL、7000ng/mL和8000ng/mL;

[0117] 1.2 将以上各浓度样本分别取75 μ L,加入至制备好的犬CDV检测试剂中,每浓度重复测试2次;

[0118] 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。

[0119] 1.4 测试结果显示:试剂在检测5~300ng/mL的CDV线性拟合关系较好,r>0.9900,当CDV浓度增加到400ng/mL时,线性拟合r值小于0.9900,T/C增长减缓,CDV在400~500ng/mL时T/C值平缓,CDV达到800ng/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400ng/mL。

[0120] 2、最低检出限

[0121] 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4.26ng/mL,见表1和图8。

[0122] 表1

[0123]

本申请提供的检测试剂卡	剂量反应曲线	
	原始数值	取对数

[0124]

浓度 (ng/mL)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
0	0.12		
10	1.358	1.00	0.09
40	2.4245	1.60	0.36
150	3.592	2.18	0.54
600	5.554	2.78	0.74
2000	8.56	3.30	0.93
4000	11.57	3.60	1.06
最低检测限 (LOD) : 4.26 ng/mL			
r: 0.9983			
r^2 : 0.9967			

[0125] 用同样的方法检测对比实验提供的检测试剂卡,其最低检出限为7.56ng/mL,见表2和图9。

[0126] 表2

[0127]

对比文件 1 提供的检测试剂卡	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
	0	0.25		
	10	1.02	1.00	-0.11
	40	1.52	1.60	0.10
	150	2.25	2.18	0.30
	600	3.25	2.78	0.48
	2000	4.01	3.30	0.58
最低检测限 (LOD) : 7.56 ng/mL				
r: 0.9948				
r^2 : 0.9897				

[0128] 3、精密度

[0129] 将CDV校准品用阴性血清稀释至20ng/mL、200ng/mL、100ng/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8.45%、5.64%和5.85%),见表3,因此本检测方法具有较高的精密度。

[0130] 表3

[0131]

质控品	浓度	变异系数
质控I	20ng/mL	8.45%
质控II	200ng/mL	5.64%
质控III	1000ng/mL	5.85%

[0132] 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酶联免疫法、化学发光法和其他荧光免疫层析法在检测犬瘟热病毒原时的检测性能进行比较,见表4。

[0133] 表4

[0134]

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 107589268 A	简单快捷	犬温热病毒抗体	双抗原夹心法检测抗体, 不能直接检测病原体; 定量检测, 剂量-反应曲线未知
酶联免疫(ELISA)法	CN 104502588 A	繁琐费时、需要专业人员	犬温热病毒抗体	双抗原夹心法定性检测抗体, 不能直接检测病原体; 试剂冷藏, 无法满足现场快速检测
荧光免疫层析技术	CN 105738620 A	简单快捷	犬温热病毒抗原	定量检测, 剂量-反应曲线未提供; 灵敏度可达到 10 ng/mL。
化学发光法	CN 103675273 B	较繁琐费时	犬温热病毒抗原	标记抗体为羊抗鼠的多抗, 可能影响试剂特异性; 定性检测; 试剂冷藏, 无法满足现场快速检测
本发明型提供的方法		简单快捷	犬温热病毒抗原	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 4.26 ng/mL。

[0135] 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。

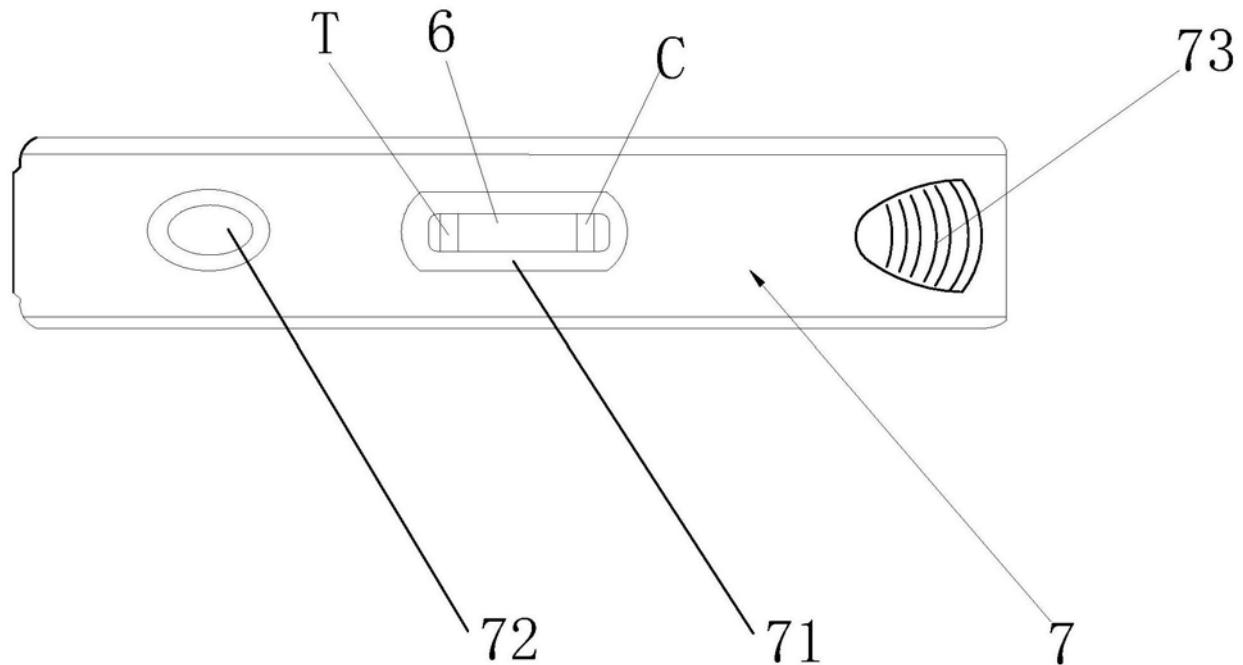


图1

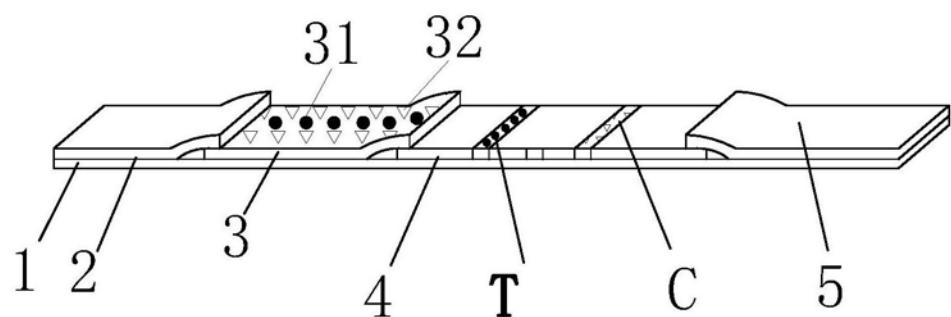


图2

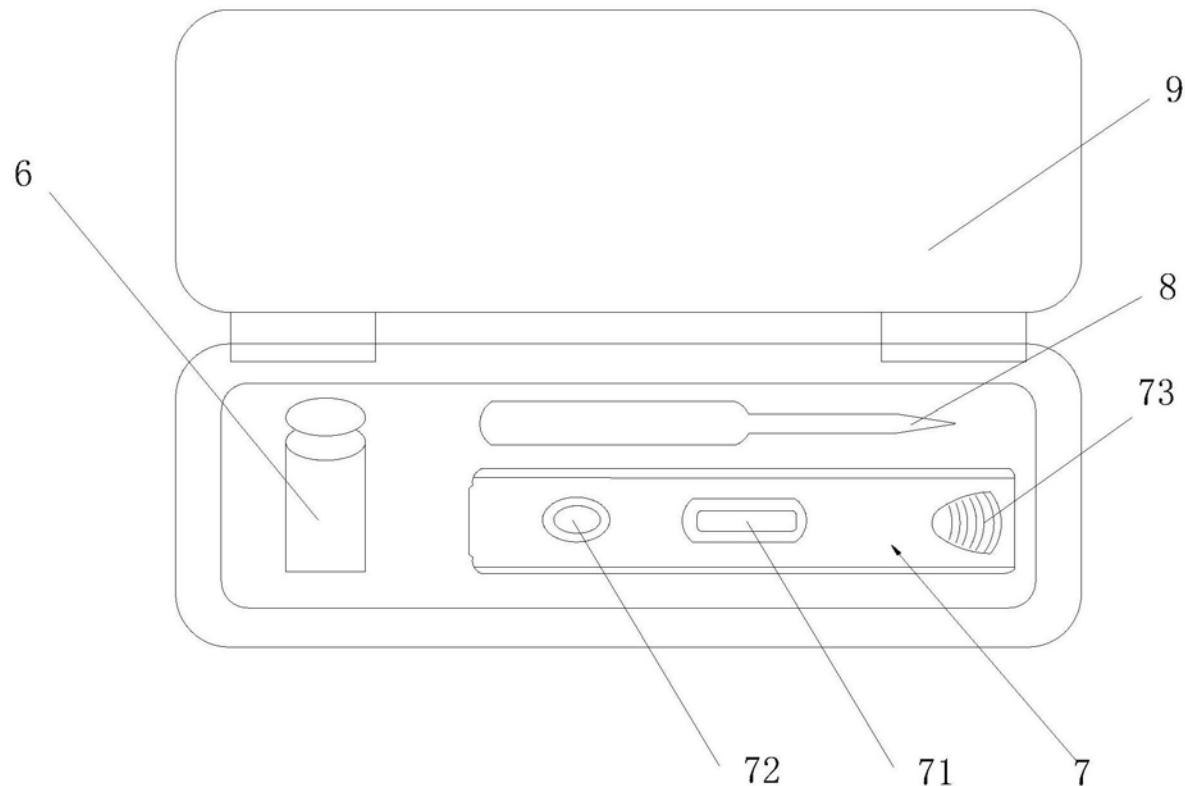


图3

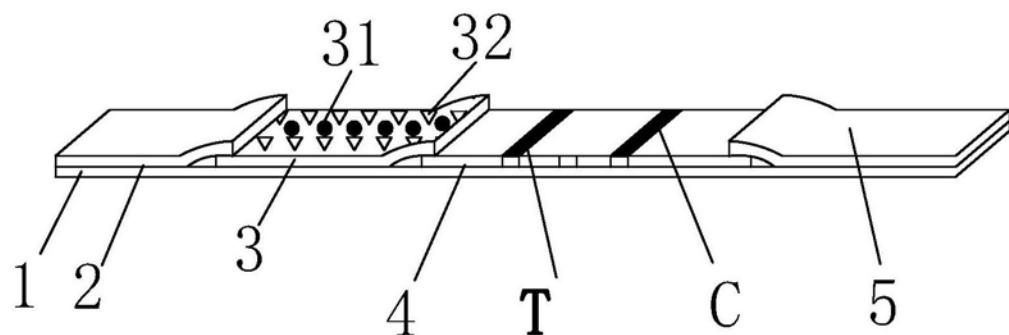


图4

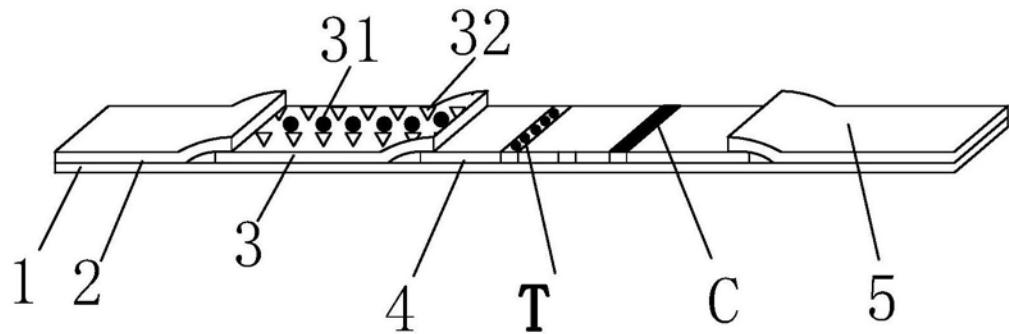


图5

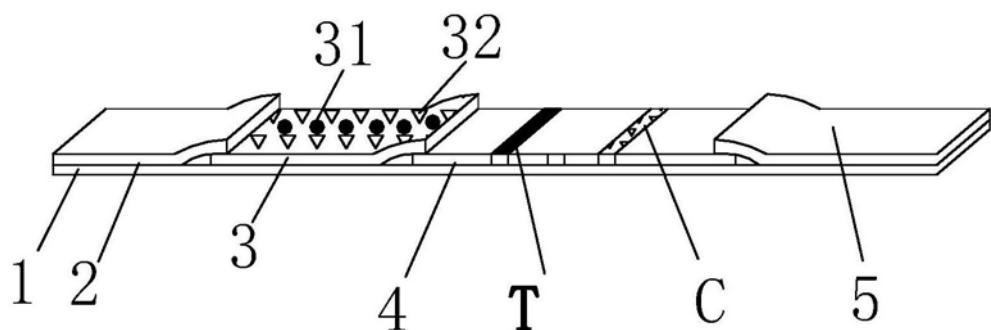


图6

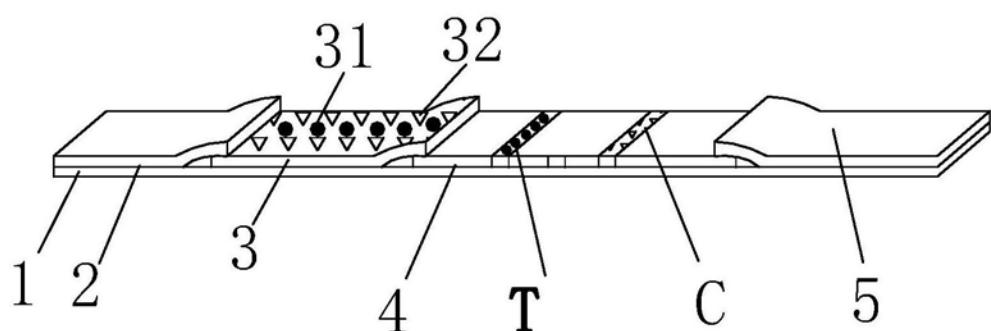


图7

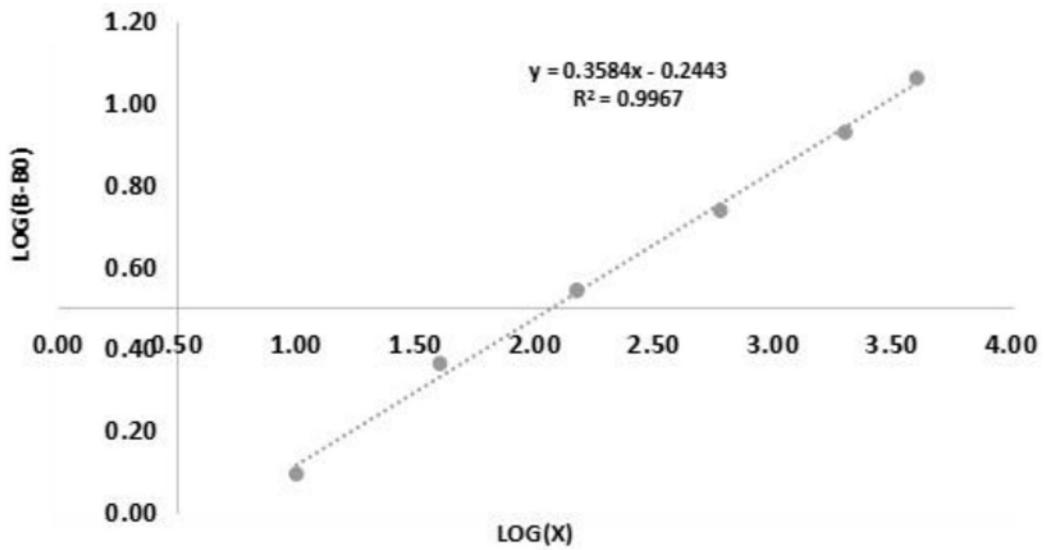


图8

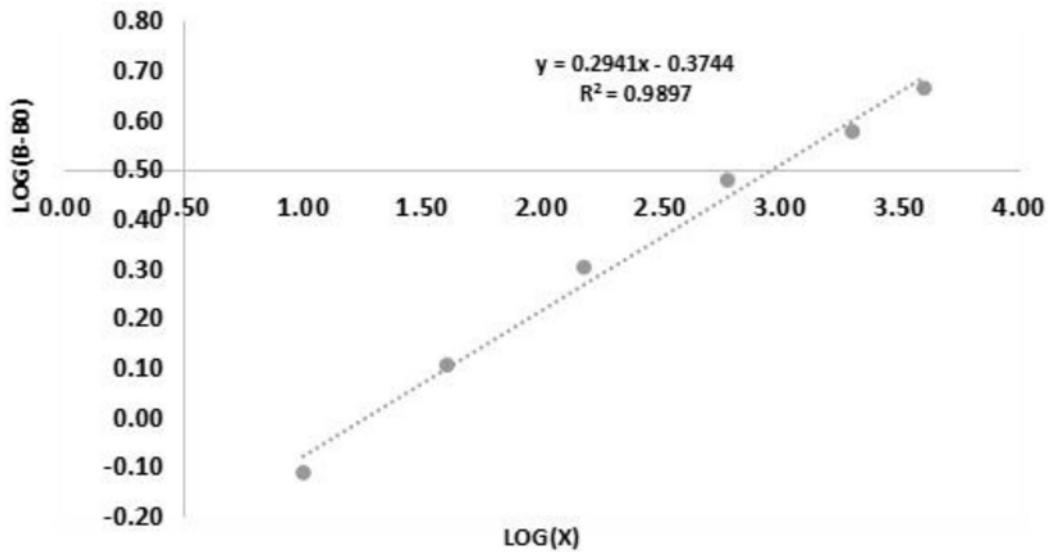


图9

专利名称(译)

用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法

公开(公告)号

[CN108845128A](#)

公开(公告)日

2018-11-20

申请号

CN201810417584.0

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 G01N33/533 G01N33/577

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瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡及其制备方法；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬瘟热病毒抗原的免疫荧光层析检测卡；其技术要点包括底板，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CDV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CDV单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。

