



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101666800 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 26

(21) 申请号 200910190437. 5

(22) 申请日 2009. 09. 16

(73) 专利权人 花群义

地址 518010 广东省深圳市和平路 2049 号
和平大厦检验大楼 702 室

(72) 发明人 花群义 阮周曦 杨俊兴 杨云庆
曾少灵 张彩虹 孙洁 吕建强
秦智锋 陶虹

(74) 专利代理机构 深圳市中知专利商标代理有
限公司 44101
代理人 成义生 罗永前

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008/063890 A2, 2008. 05. 29, 全文.

孙洪正等. 水疱性口炎研究进展. 《动物医学进展》. 2007, 第 28 卷 (第 10 期), 72-76.

杨桂梅等. 水泡性口炎病毒和牛病毒性腹泻病毒的检测方法研究. 《内蒙古农业大学学报》. 2005, 第 27 卷 (第 02S 期), 50-53.

审查员 潘浩

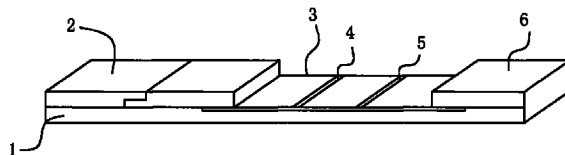
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

水泡性口炎病毒快速检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

一种水泡性口炎病毒快速检测试纸条及其制备方法, 试纸条包括: 基板 (1)、吸附有胶体金标记的水泡性口炎病毒的单克隆抗体的样品吸收垫 (2)、设有检测线 (4) 和对照线 (5) 的硝酸纤维膜 (3) 及吸水垫 (6), 且所述吸收垫 (2)、硝酸纤维膜 (3) 及吸水垫 (6) 沿基板 (1) 的长度方向依次设置在基板 (1) 板面上。制作方法包括 a、制备水泡性口炎病毒单克隆抗体; b、烧制胶体金, 并准备待标记单抗; c、对抗体进行胶体金标记和纯化; d、将纯化的胶体金标记抗体吸附于多孔纤维样品吸收垫上; e、在硝酸纤维膜上形成由水泡性口炎多克隆抗体和蛋白质 A 包被或喷附的检测线和对照线; f、将样品吸收垫、硝酸纤维膜和吸水垫依次设置在基板板面上, 形成检测试纸条。本发明无须使用特殊的设备和专门的技术人员, 即可直接、快速对水泡性口炎病毒抗原做出检测。



1. 一种水泡性口炎病毒快速检测试纸条,其特征在于,该试纸条包括:
基板(1),它是由不透水材料制成的条形板状体;
样品吸收垫(2),它由多孔纤维制成,该样品吸收垫内吸附有胶体金标记的水泡性口炎病毒的单克隆抗体,该单克隆抗体的制备是将纯化的水泡性口炎病毒免疫 BALB / c 小鼠三次,然后取免疫小鼠的脾细胞与 SP2 / 0 骨髓瘤细胞融合,并由间接 ELISA 方法检测分泌抗 VSV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞,再由 BALB / c 小鼠制备单抗腹水;
形成样品吸收垫(2)的多孔纤维为玻璃纤维;
硝酸纤维膜(3),其上设有检测线(4)和对照线(5),其中,检测线(4)上包被或喷附有水泡性口炎病毒多克隆抗体,对照线(5)上包被或喷附有蛋白质 A;
吸水垫(6),且
所述吸收垫(2)、硝酸纤维膜(3)及吸水垫(6)沿基板(1)的长度方向依次设置在基板(1)板面上。
2. 如权利要求1所述的水泡性口炎病毒快速检测试纸条,其特征在于,形成基板(1)的不透水材料为聚氯乙烯。
3. 如权利要求1所述的水泡性口炎病毒快速检测试纸条的制作方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:
 - a、制备水泡性口炎病毒单克隆抗体,水泡性口炎病毒单克隆抗体的制备是将纯化的水泡性口炎病毒免疫 BALB / c 小鼠三次,然后取免疫小鼠的脾细胞与 SP2 / 0 骨髓瘤细胞融合,并由间接 ELISA 方法检测分泌抗 VSV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞,再由 BALB / c 小鼠制备单抗腹水;
 - b、烧制胶体金,并准备待标记单抗,然后测定胶体金标记抗体的最适稳定量;
 - c、对抗体进行胶体金标记,接着对胶体金标记抗体进行纯化;
 - d、将纯化的胶体金标记抗体吸附于多孔纤维样品吸收垫上;
 - e、在硝酸纤维膜上形成由水泡性口炎多克隆抗体和蛋白质 A 包被或喷附的检测线和对照线;
 - f、在基板上沿长度方向将吸附有胶体金标记单克隆抗体的样品吸收垫、包被有检测线和对照线的硝酸纤维膜和吸水垫依次设置在基板板面上,形成检测试纸条,并将其装入塑料外壳的检测卡内。
4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(b)中,胶体金的烧制和待标记单抗的准备是由柠檬酸钠还原法烧制直径 20nm ~ 50nm 胶体金颗粒,取 -20℃ 保存的纯化好的水泡性口炎病毒的单克隆抗体,将其浓度调整为 1mg / mL,4℃ 保存备用;将准备好的待标记单克隆抗体做系列稀释为 5 μ g / mL ~ 90 μ g / mL,分别取 1mL,加入每管 1mL 分装好金胶溶液中,以测定胶体金标记抗体的最适稳定量。
5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(c)中,抗体的胶体金标记是将 2mg 水泡性口炎病毒的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液,在电磁搅拌器搅拌下,缓慢将单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中进行标记,然后进行胶体金标记抗体的纯化:标记好单克隆抗体的胶体金溶液纯化后,于含 1% 牛血清白蛋白和含 0.02% NaN_3 的 0.02mol / L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液中重悬为原体积的 1 / 10,4℃ 保存备用。
6. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(d)中,将 0.02mol / L pH8.6 TBS 稀释

金标单克隆抗体吸附于玻璃纤维滤纸上,形成吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维。

7. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,步骤 (e) 中,在硝酸纤维素膜上设定出检测线和对照线位置,用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg / L 的水泡性口炎多克隆抗体和蛋白质 A,形成检测线和对照线。

水泡性口炎病毒快速检测试纸条及其制作方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种用于检测水泡性口炎病毒抗原的快速检测试纸条及其制作方法。

【背景技术】

[0002] 水泡性口炎是由弹状病毒科水泡病毒属的水泡性口炎病毒(Vesicularstomatitis Virus, VSV)引起的人畜共患的重大动物疫病。其包括印第安纳(Indiana, IN型)和新泽西(New Jersey, NJ型)两个血清型。牛、猪、马、羊和其它多种野生动物可感染,人感染后出现类似流感和登革热的症状。临床症状与口蹄疫(FMD)不易区别,该病的存在及流行直接影响人类及动物健康。水泡性口炎病毒的基因组编码包含N, NS, M, G, L等5种病毒蛋白,其中,N蛋白是该病毒核衣壳的主要蛋白,为VSV的群特异性抗原。1950年证实此病为人畜共患病。目前,水泡性口炎病毒最常用的诊断方法包括病毒分离鉴定、病毒中和试验(VN)、补体结合试验(CF)、液相阻断ELISA(LP-ELISA)、竞争酶联免疫吸附试验(c-ELISA)、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)等。其中,病毒中和试验(VN)和补体结合试验(CF)两种方法因试验复杂、麻烦、耗时、不安全、需在生物安全三级(P3)实验室内进行,且有时产生非特异性反应,应用受到限制,且其它诊断方法也各有其一定的局限性而无法用于快速诊断。目前,国内口岸检疫中急需VS的快速检测方法和试剂。研制快速、便捷、适合于口岸检疫和现场诊断的检测试纸条,在水泡性口炎的快速诊断、检疫和流行病学调查中具有更重要的应用价值。

【发明内容】

[0003] 本发明旨在解决水泡性口炎病毒抗原的快速检测问题,而提供一种无须使用特殊的设备和专门的技术人员,即可直接、快速对水泡性口炎病毒抗原做出检测的水泡性口炎病毒快速检测试纸条。

[0004] 本发明还提供了该水泡性口炎病毒快速检测试纸条的制作方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供一种水泡性口炎病毒快速检测试纸条,该试纸条包括:

[0006] 基板,它是由不透水材料制成的条形板状体;

[0007] 样品吸收垫,它由多孔纤维制成,该样品吸收垫内吸附有胶体金标记的水泡性口炎病毒的单克隆抗体;

[0008] 硝酸纤维膜,其上设有检测线和对照线,其中,检测线上包被或喷附有水泡性口炎病毒多克隆抗体,对照线上包被或喷附有蛋白质A;

[0009] 吸水垫,且

[0010] 所述吸收垫、硝酸纤维膜及吸水垫沿基板的长度方向依次设置在基板板面上。

[0011] 形成基板的不透水材料为聚氯乙烯。

[0012] 形成样品吸收垫的多孔纤维为玻璃纤维。

[0013] 本发明还提供了所述水泡性口炎病毒快速检测试纸条的制作方法,该方法包括如下步骤:

[0014] a、制备水泡性口炎病毒单克隆抗体,其制备过程为:(1)水泡性口炎病毒的纯化,用水泡性口炎病毒(VSV)接种BHK-21细胞长成单层,收获的细胞培养病毒液反复冻融3次,以8000转/分离心30分钟,取上清液,超速离心和不连续蔗糖密度梯度离心,收获提纯的病毒条带,用核酸蛋白分析仪测定蛋白含量为2.4g/L,-20℃保存备用;(2)用提纯的水泡性口炎抗原加等体积弗氏完全佐剂乳化,和弗氏不完全佐剂乳化,免疫BALB/c小鼠三次;(3)取免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞在50%聚乙二醇(MW4000)融合剂下融合,HAT筛选培养基筛选杂交瘤细胞,用间接ELISA方法检测分泌抗VSV的阳性孔;(4)用有限稀释法进行细胞克隆,经间接ELISA筛选阳性克隆,获得能稳定传代并分泌抗VSV的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞;(5)将获得的分泌抗VSV的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞注射入BALB/c小鼠腹腔制备单抗腹水;(6)采集单克隆抗体腹水,测定抗体效价、蛋白含量和亲和力,腹水ELISA效价高达为1:1024000,用核酸蛋白分析仪测定纯化腹水IgG的含量为1.97g/L,亲和力分常数高达 $5.41 \times 10^7 \text{mol/L}$ 。用间接ELISA方法鉴定制备的单克隆抗体仅与水泡性口炎病毒有特异性免疫反应,而与其它相关病毒(如BTV、AKV、EHDV、PPRV等)没有任何免疫反应。

[0015] b、烧制胶体金,并准备待标记单抗,然后测定胶体金标记抗体的最适稳定量,具体地说,是由柠檬酸钠还原法烧制直径20nm~50nm胶体金颗粒,取-20℃保存的纯化好的水泡性口炎病毒的单克隆抗体,将其浓度调整为1mg/mL,4℃保存备用;将准备好的待标记单克隆抗体做系列稀释为 $5 \mu\text{g/mL} \sim 90 \mu\text{g/mL}$,分别取1mL,加入每管1mL分装好金胶溶液中,以测定胶体金标记抗体的最适稳定量。

[0016] c、对抗体进行胶体金标记,接着对胶体金标记抗体进行纯化,具体地说,是将2mg水泡性口炎病毒的单克隆抗体溶于100mL胶体金溶液中,在电磁搅拌器搅拌下,缓慢将单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中进行标记。然后在其中加入5%的牛血清白蛋白使其终浓度为1%,4℃静置2~4小时,弃沉淀物,将胶体金溶液离心处理,弃去上清,将沉淀用含0.01~0.06%叠氮钠,0.02mol/L pH8.2Tris-HCl缓冲液稀释为原体积的10%,4℃保存备用。

[0017] d、将纯化的胶体金标记抗体吸附于多孔纤维样品吸收垫上,具体地说,是将0.02mol/LpH8.6 TBS稀释金标单克隆抗体胶体金溶液浸入玻璃纤维至液体开始渗出为止而形成金标抗体层,然后将玻璃纤维在室温温度干燥。即制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维。

[0018] e、在硝酸纤维膜上形成由水泡性口炎多克隆抗体和蛋白质A包被或喷附的检测线和对照线,具体地说,是在硝酸纤维膜上设定出检测线和对照线位置,用喷膜机分别在其所在位置喷上2.5mg/L的水泡性口炎多克隆抗体和蛋白质A形成检测线和对照线,按 $2 \mu\text{L/cm}$ 设置喷膜量,喷膜后在37℃干燥2小时,再用0.01mol/L pH7.2含3%牛血清白蛋白的PBS,在37℃下封闭45分钟,用0.01mol/L pH7.0的PBS漂洗,再将硝酸纤维膜室温下干燥。

[0019] f、在基板上沿长度方向将样品吸收垫、吸附有胶体金标记单克隆抗体的玻璃纤维、包被有检测线和对照线的硝酸纤维膜和吸水垫依次设置在基板板面上,形成检测试纸

条,并将其装入塑料外壳的检测卡内。具体地说,是将硝酸纤维膜贴于不透水基板上,再将浸润有金标记单克隆抗体混合溶液的多孔纤维材料样品吸收垫和另一个多孔纤维材料样品吸收垫分别贴于不透水基板上,并使两者位于硝酸纤维膜的两端,在浸润有金标单克隆抗体混合溶液的多孔纤维材料样品吸收垫上的不与硝酸纤维膜相连的一端设置一块多孔吸水材料,以形成手柄和吸水垫。

[0020] 本发明的贡献在于,它有效解决了水泡性口炎病毒抗原的快速检测问题。实验数据表明,本发明的水泡性口炎病毒抗原快速检测试纸条不仅特异性强,敏感性高,稳定,操作简便,而且制备方法简单,使用快捷迅速,可在 10 分钟之内得出结果,安全简便,不需任何仪器和设备,成本低廉,所需试剂和样本量少,因此特别适合用于出入境口岸和基层检疫部门水泡性口炎的现场快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

【附图说明】

[0021] 图 1 为本发明示意图。

【具体实施方式】

[0022] 下列实施例是对本发明的进一步解释和说明,对本发明不构成任何限制。

[0023] 1、水泡性口炎病毒的单克隆抗体制备过程:

[0024] (1)BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒 (VSV),在 37℃ 的温度反应 1 小时。加入无血清的基础培养基继续培养,2 ~ 3d 后细胞病变 (CPE) 达 75% 以上时,收获病毒。将收获的病毒液反复冻融 3 次,以 8000 转 / 分离心 30 分钟,取上清液。以 28000 转 / 分,温度 4℃ 超速离心 3 小时。沉淀用 1/100 原体积的 PBS 溶解,然后采用 20%、60% (w/v) 不连续蔗糖密度梯度 20000 转 / 分,温度 4℃ 超速离心 3 小时,收获提纯的病毒条带作为免疫抗原,用 DU800 核酸蛋白分析仪测定蛋白含量,-20℃ 保存备用。

[0025] (2) 用提纯的水泡性口炎病毒首次免疫 BALB/c 鼠后,每隔 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次,注射剂量分别 100 μg、100 μg 和 200 μg。首免时加等体积弗氏完全佐剂乳化,二免和三免时加等体积弗氏不完全佐剂乳化。三免后第 15d,断尾采血分离血清,用间接 ELISA 检测抗 VSV 血清抗体效价。于融合前 3d,通过尾静脉注射 VSV 强化免疫一次,剂量为 100 μg。

[0026] (3) 用间接 ELISA 筛选阳性克隆,分别用 BHK 细胞增殖的 EHDV 病毒抗原和 BHK 细胞建立间接 ELISA。首先用 DU 800 核酸蛋白分析仪测定各种抗原的蛋白浓度。再用方阵滴定法确定最佳包被抗原浓度,并对包被时间及温度进行优化。两种 ELISA 方法分别命名为: VSV-ELISA 和 BHK-ELISA,这两种 ELISA 方法用于对杂交瘤细胞培养上清进行筛选,以获得抗 VSV 的单克隆抗体阳性克隆。

[0027] (4) 杂交瘤细胞注射入 BALB/c 鼠腹腔制备大量单抗腹水:取 12 周龄左右 BALB/C 小鼠,腹腔注射 0.5ml 降植烷,7d 后腹腔注入 5 ~ 10×10⁵ 个杂交瘤细胞,注射后 7 ~ 10d 可见小鼠腹部明显膨大,采取腹水,2000 转 / 分离心 5 分钟,收集上清液,即为单克隆抗体腹水,测定抗体效价,分装后 -80℃ 温度冻存备用。

[0028] (5) 采集单克隆抗体腹水,测定抗体的特异性、效价、蛋白含量和亲和力,腹水 ELISA 效价高达为 1 : 1024000,用核酸蛋白分析仪测定纯化腹水 IgG 的含量为 2.13g/L,亲和力分常数高达 8.57×10⁷mo1/L。用 VSV-ELISA 和 BHK-ELISA 同时进行特异性检测,制备

的单克隆抗体仅与 VSV 病毒抗原具有特异性免疫反应,而与其它相关病毒(如 BTV、AKV、EHDV、PPRV 等)没有任何免疫反应。

[0029] (6) 采用硫酸铵沉淀法和柱层析法进行水泡性口炎病毒的单克隆抗体纯化。

[0030] 2、水泡性口炎病毒抗原快速检测试纸条制作:

[0031] (1) 用去离子双蒸水配制 1% 的氯化金水溶液,取 1% 的氯化金水溶液 1mL,加双蒸水 99mL 配置成 0.01% 浓度的氯化金水溶液 100mL。加热至沸腾,迅速加入浓度为 1% 柠檬酸三钠水溶液 1mL,继续煮沸,同时观察液体颜色变化情况,当煮沸约 5~8 分钟液体出现透明的酒红色时终止反应。用电镜测定制备的胶体金颗粒的大小及其形状,测得胶体金颗粒的直径大约为 20nm~50nm。待冷却后用 0.1mol/LK₂CO₂ 或 0.1N HCl 调整胶体金的 pH 值至 8.2~8.6,4℃ 避光保存。

[0032] (2) 胶体金颗粒平均直径的测定:用支持膜的镍网(铜网也可)蘸取金标蛋白试剂,自然干燥后直接在透射电镜下观察,或用醋酸铀复染后观察。计算 100 个金颗粒的平均直径,其平均直径达到 20nm~50nm。

[0033] (3) 待标记水泡性口炎病毒单克隆抗体的准备:取 -20℃ 保存的纯化好的水泡性口炎病毒的单克隆抗体,将其预先对 0.005mol/L pH7.0NaCl 溶液中 4℃ 的温度透析过夜,以除去多余的盐离子,于 15000 转/分离心 20 分钟,取上清,去除聚合物,测定蛋白质浓度,并将抗体浓度调整为 1mg/mL,4℃ 的温度保存备用。

[0034] (4) 胶体金与标记单克隆抗体最适用量之比的测定:将用 0.1mol/LK₂CO₂ 或 0.1N HCl 调整好 pH 值(8.2~8.6)的胶体金,分装 10 管,每管 1mL;将准备好的待标记单克隆抗体做系列稀释为 5 μg/mL~90 μg/mL,分别取 1mL,加入以上分装好金胶溶液的 Eppendorf 管中,混匀;对照管不加单克隆抗体,只加 1mL 稀释液。5 分钟后,在上述各管中加入 0.1mL 10% (w/v) 的 NaCl 溶液,充分混匀后静置 2 小时,观察结果。对照管(未加单克隆抗体)和加入单克隆抗体的量不足以稳定胶体金的各管,均呈现出由红变蓝的聚沉现象,而加入单克隆抗体量达到或超过最低稳定量的各管仍保持红色不变。以稳定 1mL 胶体金溶液红色不变的最低单克隆抗体用量,即为该标记单克隆抗体的最佳用量。取加入单克隆抗体浓度最低而染色没有发生变化的管为最适标记量,在此基础上再补加 10% (V/V) 浓度为 1mg/mL 的单克隆抗体溶液,即为稳定胶体金所需抗体实际用量。

[0035] (5) 胶体金与水泡性口炎病毒单克隆抗体的结合与标记:将 2mg 水泡性口炎病毒的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液中。在电磁搅拌器搅拌下,缓慢将单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中,2mg 的抗体大约用 10 分钟加完,加完后继续搅动 30 分钟,继续加入过滤除菌的 5% 牛血清白蛋白溶液,使其终浓度达到 1%,再缓慢搅动 20 分钟后,4℃ 温度静置 2~4 小时,弃沉淀物,用 0.45 μM 滤膜过滤胶体金标记的单抗溶液。

[0036] (6) 胶体金标记单克隆抗体的纯化:以 1500 转/分将标记好单克隆抗体的胶体金溶液进行离心 15 分钟,弃去凝聚的沉淀留上清。上清移入新的离心管后 15000 转/分于 4℃ 温度离心 30 分钟,弃上清留沉淀。沉淀物溶于含 1% 牛血清白蛋白和含 0.02% NaN₃ 的 0.02mol/L pH8.2Tri s-HCl 缓冲液中,将沉淀重悬为原体积的 1/10,4℃ 温度保存备用。

[0037] (7) 胶体金标记抗体吸附玻璃纤维:用 0.02mol/LpH8.6 TBS 稀释金标单克隆抗体,充分混匀后,将 1cm×5cm 大小玻璃纤维滤纸浸入金标单抗溶液中,至液体开始从玻璃纤维中渗出为止而形成金标抗体层,取出后阴干,即制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃

纤维,裁成 5mm×5cm 的长条备用。

[0038] (8) 基于硝酸纤维膜上的检测线和控制线的印迹:在硝酸纤维膜上设定出检测线 and 对照线位置,用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg/L 的水泡性口炎多克隆抗体和 protein A 形成检测线和对照线,按 2 μ L/1cm 设置喷膜量,喷膜后在 37 $^{\circ}$ C 温度干燥 2 小时,再用 0.01mol/L pH7.2 含 3% 牛血清白蛋白的 PBS,在 37 $^{\circ}$ C 温度下封闭 45 分钟,0.01mol/L pH7.0 的 PBS 漂洗,再将硝酸纤维膜室温下干燥,将硝酸纤维膜贴于不透水材料基板上,再将浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料样品吸收垫和另一个多孔纤维材料样品吸收垫分别贴于不透水材料基板上,并使两者位于硝酸纤维膜的两端,在浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料样品吸收垫上且不与硝酸纤维膜相连的一端设置另一块多孔吸水材料,以形成手柄和吸水垫。

[0039] (9) 水泡性口炎病毒抗原快速检测试纸条的组装:揭开 PVC 基板 1 上的不干胶后,贴上喷涂有水泡性口炎多克隆抗体(检测线 4, T 线)和蛋白质 A(对照线 5, C 线)的硝酸纤维膜 3,将制备好的吸附有胶体金标记单克隆抗体的玻璃纤维与硝酸纤维膜的检测线一端连接并压在硝酸纤维膜 3 上后,粘贴在 PVC 基板 1 上,在胶体金垫上覆盖未吸附有胶体金的玻璃纤维作为样品吸收垫 2,然后用厚的吸水垫 6 作手柄,并压在硝酸纤维膜 3 靠对照线 5 的一端,最后用切割机将试纸条切成 5mm×5cm 即可(参见图 1)。检测试纸条装入塑料外壳的检测卡内,检测卡上贴上试纸条名称标签,装入铝箔袋,放入干燥剂,抽气密封,在铝箔袋上贴上产品说明书。

[0040] (10) 试剂组成和使用方法:该水泡性口炎病毒快速检测试纸条包括检测卡一块、缓冲液一瓶、干燥剂 1g、说明书一份、外包装铝箔袋一个。使用方法:撕开外包装,取出检测板。取 50 μ L ~ 100 μ L 样品加入孔中,再滴加入缓冲液 3 滴,10 分钟后观察结果。阳性结果:检测线 4 和对照线 5 均出现有紫红色条带,说明血清中有水泡性口炎病毒抗原;阴性结果:检测线 4 无条带出现,而且对照线 5 出现有紫红色条带,说明血清中无水泡性口炎病毒抗原;无效结果:如果对照线 5 无色带,则检测结果无效,标本应重新检测。

[0041] (11) 该水泡性口炎病毒快速检测试纸条对出入境检验检疫相关实验室提供的 30 份样品进行检测,结果显示,阴阳性成立,阳性两条带,阴性一条带,结果与其它经典方法检测结果基本一致。

[0042] 上述具体实施例的实验数据表明,本发明的水泡性口炎病毒抗原快速检测试纸条,不仅特异性强,敏感性高,稳定,操作简便,而且制备方法简单。使用快捷迅速,可在 10 分钟之内得出结果,安全简便,不需任何仪器和设备,成本低廉,所需试剂和样本量少。特别适合用于出入境口岸和基层检疫部门水泡性口炎的现场快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

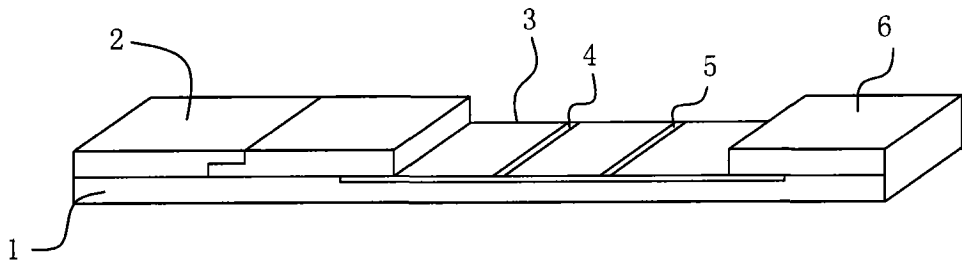


图 1

专利名称(译)	水泡性口炎病毒快速检测试纸条及其制作方法		
公开(公告)号	CN101666800B	公开(公告)日	2014-03-26
申请号	CN200910190437.5	申请日	2009-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	花群义		
申请(专利权)人(译)	花群义		
当前申请(专利权)人(译)	花群义		
[标]发明人	花群义 阮周曦 杨俊兴 杨云庆 曾少灵 张彩虹 孙洁 吕建强 秦智锋 陶虹		
发明人	花群义 阮周曦 杨俊兴 杨云庆 曾少灵 张彩虹 孙洁 吕建强 秦智锋 陶虹		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	罗永前		
审查员(译)	潘浩		
其他公开文献	CN101666800A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种水泡性口炎病毒快速检测试纸条及其制作方法，试纸条包括：基板(1)、吸附有胶体金标记的水泡性口炎病毒的单克隆抗体的样品吸收垫(2)、设有检测线(4)和对照线(5)的硝酸纤维膜(3)及吸水垫(6)，且所述吸收垫(2)、硝酸纤维膜(3)及吸水垫(6)沿基板(1)的长度方向依次设置在基板(1)板面上。制作方法包括a、制备水泡性口炎病毒单克隆抗体；b、烧制胶体金，并准备待标记单抗；c、对抗体进行胶体金标记和纯化；d、将纯化的胶体金标记抗体吸附于多孔纤维样品吸收垫上；e、在硝酸纤维膜上形成由水泡性口炎多克隆抗体和蛋白质A包被或喷附的检测线和对照线；f、将样品吸收垫、硝酸纤维膜和吸水垫依次设置在基板板面上，形成检测试纸条。本发明无须使用特殊的设备和专门的技术人员，即可直接、快速对水泡性口炎病毒抗原做出检测。

