



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109975541 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201811602771.2

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2018.12.26

G01N 33/532(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO: C2018147 2018.06.15

CCTCC NO: C2018146 2018.06.15

(71)申请人 山东绿都生物科技有限公司

地址 256600 山东省滨州市滨城区黄河路
二号169号

(72)发明人 武玉香 于金枝 孙珊珊 唐世云
刘捷

(74)专利代理机构 北京智为时代知识产权代理
事务所(普通合伙) 11498

代理人 王加岭

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

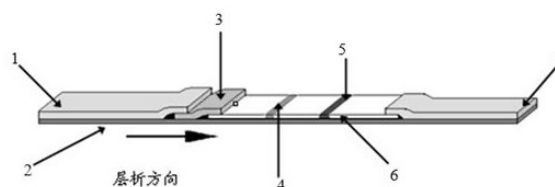
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种快速检测犬瘟热病毒抗原的检测卡及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种适用于国内市场的定量检测犬瘟热病毒抗原检测卡的制备方法,具体步骤为:(1)犬瘟热病毒的分离、培养、纯化;(2)抗犬瘟热病毒配对单克隆抗体的制备,包括免疫程序、细胞融合、杂交瘤筛选及克隆化、抗体制备及纯化;(3)犬瘟热病毒快速检测胶体金检测卡及其制备方法,包括样品垫处理、喷膜、C、T线确定、被测样本的处理、检测卡性能测定。本发明可以快速、灵敏、准确的定性检测国内犬瘟热病毒,克服了国内检测犬瘟热病毒胶体金检测卡开发用的配对单抗为进口原料,进口原料的单抗以某个国家分离的当前病毒制备,克服了检测过程中因地域遥远病毒变异漏检的现象。



1. 一种快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡,所述检测卡包括依次相连接的吸水垫、基膜、金标垫和样品垫,其特征在于,所述基膜上设置有C线和T线,所述C线上包被有羊抗鼠IgG的抗体,所述金标垫中含有胶体金标记的第一单克隆抗体,所述T线上包被有第二单克隆抗体;所述第一单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO: C2018146的杂交瘤细胞株分泌得到。

2. 根据权利要求1所述的快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡,所述第二单克隆抗体由保藏编号为保藏编号为CCTCC NO: C2018147的杂交瘤细胞株分泌得到。

3. 权利要求1或2所述的快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡的制备方法,包括以下步骤:

步骤一,抗体制备及纯化:采用动物体内腹水诱生法制备单克隆抗体36D9和37C7;采用SPA柱法对腹水进行纯化,即得抗犬瘟热病毒单克隆抗体36D9和37C7 ;

步骤二,胶体金溶液的熬制;

步骤三,抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体的标记:每 1 mL金液先加45 微升1% K_2CO_3 ,然后再加入37C7单克隆抗体,按照每1 mL胶体金溶液加入6 μ g抗犬瘟热病毒单克隆抗体37C7,室温下120rpm摇30 min,加入10%牛血清白蛋白 20 μ L,室温下120rpm摇30 min,12000rpm离心20 min,弃上清,用0.01MPBS 溶解沉淀,即得到标记好的抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体标记物;

步骤四,金标垫处理及胶体金膜的制备:选择聚脂纤维6613作为金标结合垫;将金标垫浸泡在处理液A中5min,处理液A为0.01M PBS,pH7.4,0.2%Triton X-100,取出37 $^{\circ}$ C烘干,备用;将标记好的抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体标记物用划膜仪以5 μ L/cm的浓度喷涂在处理好的金标垫上,室温自然晾干或者37 $^{\circ}$ C烘干,制成含有抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体标记物的胶体金膜;

步骤五,样品垫处理:选择DL42为样品垫,将样品垫,浸泡在处理液B中5min,处理液B为0.01 M PBS,pH7.4,1%Triton X-100,1%BSA,0.05% NaN_3 ,取出37 $^{\circ}$ C烘干,备用;

步骤六,C、T线确定:选择Sartorius CN140膜,分别将抗犬瘟热病毒36D9单克隆抗体和羊抗鼠二抗作为T线和C线划在NC膜上,浓度分别为1 mg/mL和0.6mg/mL,用划膜仪依次以1 μ L/cm的浓度喷涂在NC膜上, 37 $^{\circ}$ C包被2h后,室温自然晾干或者37 $^{\circ}$ C烘干,制成基膜;

步骤七,检测卡的组装。

4. 根据权利要求3所述的快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡的制备方法,所述胶体金溶液的熬制采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,具体步骤为:量取99 mL的超纯水装入250 mL的圆底烧瓶,放入搅拌子,置于磁力搅拌器上,加入1%氯金酸溶液1 mL,适当速度搅拌,打开加热开关,待溶液沸腾后迅速一次性加入1.6 mL 1%柠檬酸三钠溶液,氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色,颜色稳定后继续加热10 min,待溶液冷却后,用微孔滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C保存备用,紫外扫描得到最大吸收峰为523nm的胶体金颗粒。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述胶体金颗粒大小为25nm。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述胶体金标记的抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体的悬浮保存液配方组成为pH 8.5的0.01MTris缓冲液,内含2%酪蛋白、1% 牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

7. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述检测线包被时的缓冲液配方成分

为pH 8.5的0.01M Tris缓冲液,内含10% 牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠;质控线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M PBS缓冲液,内含10% 牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

8.一种快速检测犬瘟热病毒病原的测试剂盒,其包括权利要求1或2所述的一种快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡和样本稀释液,所述样本稀释液的配方为0.9%生理盐水溶液,内含5% 牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠,0.5%丙氨酸。

9.一种分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株,所述分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株Cdv 36D9于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C2018147,保藏地址为中国武汉-武汉大学。

10.一种分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株,所述分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株Cdv 37C7于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C2018146,保藏地址为中国武汉-武汉大学。

一种快速检测犬瘟热病毒抗原的检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种适用于国内市场的定性检测犬瘟热病毒抗原的检测卡及其制备方法,属于生物检测技术领域。

背景技术

[0002] 犬瘟热是一种急性、传染性极强的病毒病,在幼犬中本病的死亡率较任何其他传染病为高。犬瘟热也是水貂的一种传染病,又称貂瘟,死亡率很高,引起严重的经济损失。10多年来,中国的犬貂市场越来越大,在宠物店,我们能看到琳琅满目的写着英文字母的诊断产品,可食用产品,治疗性用品,喜爱宠物的人们不计价钱的高低信赖进口的产品。即使是开发抗原诊断试纸产品的原材料——单克隆抗体,也是依赖进口,几年来芬兰HyTest,韩国金诺JBT 等品牌几乎如垄断性的占据了中国大部分市场,但是由于他们开发抗体用的免疫原都是分离的他们本国本土的病毒,众所周知,在不同国家,不同区域都可以分离获得多株病毒,变异程度随区域而改变。市场客户反馈的问题大多是某些株型出现漏检现象,灵敏度逊色于进口产品。

[0003] 实用新型专利CN207601094Y公开了一种犬瘟热病毒试剂卡,包括试剂卡壳体及上下叠设于壳体内的多个试纸条;所述试纸条的靠近所述样品垫的一端固定有拉手;加样孔上层叠套设有多层可分离的膜套。通过在试剂卡壳体内部设置可容纳多个试纸条的腔体,并将试纸条层叠设置,需要使用时,使得最上端的试纸条以及膜套为未使用的即可,也可将已经使用的试纸条抽出丢弃或更换至最下端。本实用新型的犬瘟热病毒试剂卡只需要一张试剂卡即可对多个样本进行检测,或对同一样本进行多次检测,有效的降低了成本。然而,该实用新型专利中并未公开具体的单抗类型,且相关申请人也未公开使用何种单抗,其仅属于结构上的改进。发明专利申请CN201711054386.4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、硝酸纤维素膜和吸水纸,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,所述硝酸纤维素膜上包被犬瘟热病毒H蛋白抗原为检测线,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。该方法检测灵敏度高,检测的批内差及批间差小,有较好的重复性,性能稳定,既可检测全血样本,也可以检测血清和血浆样本,与RV(狂犬病毒)、CPV(犬细小病毒)、CPIV(犬副流感病毒)、CAV(犬腺病毒)、CCV(犬冠状病毒)等抗体没有交叉反应。可实现犬瘟热病毒抗体现场快速检测,但是该方法仅能用于检测血清中的抗体含量,不能有效区分是因为病毒感染产生的抗体还是接种疫苗后产生的抗体。发明专利申请201610537306.X公开了犬瘟热病毒胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法,该试纸条包括PVC底板,依次粘贴在PVC底板上的样品垫、金标结合垫、带有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、吸收垫;金标结合垫包被有纯化的犬瘟热病毒单克隆抗体N18与胶体金的偶联标记物,硝酸纤维素膜上的检测线包被有纯化的犬瘟热病毒单克隆抗体C42,硝酸纤维素膜上

的质控线包被有羊抗鼠IgG。

[0004] 我们通过分离中国区域内不同株病毒,选择致病强的毒株作为免疫原,肩负着沉重的社会责任感,致力于为中国市场提供自给自足的原材料,减弱进口的垄断,至此CDV病毒诊断的配对单抗在灵敏度方面、检测的迅速程度、漏检控制等方面都做出了积极贡献。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡及其制备方法,本发明为快速、灵敏、准确的检测犬瘟热病毒减少了时间和成本。

[0006] 为解决以上技术问题,本发明采用如下技术方案:

一种快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡,所述检测卡包括依次相连接的吸水垫、基膜、金标垫和样品垫,其特征在于,所述基膜上设置有C线和T线,所述C线上包被有羊抗鼠IgG的抗体,所述金标垫中含有胶体金标记的第一单克隆抗体,所述T线上包被有第二单克隆抗体;所述第一单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO: C2018146的杂交瘤细胞株分泌得到。

[0007] 所述的快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡,所述第二单克隆抗体由保藏编号为保藏编号为CCTCC NO: C2018147的杂交瘤细胞株分泌得到。

[0008] 一种分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株,所述分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株Cdv 36D9于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C2018147,保藏地址为中国武汉-武汉大学。

[0009] 一种分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株,所述分泌抗犬瘟热病毒抗体的杂交瘤细胞株Cdv 37C7于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C2018146,保藏地址为中国武汉-武汉大学。

[0010] 所述的快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡的制备方法,包括以下步骤:

步骤一,抗体制备及纯化:采用动物体内腹水诱生法制备单克隆抗体36D9和37C7;采用SPA柱法对腹水进行纯化,即得抗犬瘟热病毒单克隆抗体36D9和37C7 ;

步骤二,胶体金溶液的熬制;

步骤三,抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体的标记:每 1 mL金液先加45 微升1% K₂CO₃,然后再加入37C7单克隆抗体,按照每1 mL胶体金溶液加入6μg抗犬瘟热病毒单克隆抗体37C7,室温下120rpm摇30 min,加入10%牛血清白蛋白 20μL,室温下120rpm摇30 min,12000rpm离心20 min,弃上清,用0.01MPBS 溶解沉淀,即得到标记好的抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体标记物;

步骤四,金标垫处理及胶体金膜的制备:选择聚脂纤维6613作为金标结合垫。将金标垫浸泡在处理液A中5min,处理液A为0.01M PBS,pH7.4,0.2%Triton X-100,取出37℃烘干,备用;将标记好的抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体标记物用划膜仪以5μL/cm的浓度喷涂在处理好的金标垫上,室温自然晾干或者37℃烘干,制成含有抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体标记物的胶体金膜;

步骤五,样品垫处理:选择DL42为样品垫,将样品垫,浸泡在处理液B中5min,处理液B为0.01 M PBS,pH7.4,1%Triton X-100,1%BSA,0.05% NaN₃,取出37℃烘干,备用;

步骤六,C、T线确定:选择Sartorius CN140膜,分别将抗犬瘟热病毒36D9单克隆抗体和羊抗鼠二抗作为T线和C线划在NC膜上,浓度分别为1 mg/mL和0.6mg/mL,用划膜仪依次以1μ

L/cm的浓度喷涂在NC膜上，37℃包被2h后，室温自然晾干或者37℃烘干，制成基膜；

步骤七，检测卡的组装。

[0011] 所述胶体金溶液的熬制采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，具体步骤为：量取99 mL的超纯水装入250 mL的圆底烧瓶，放入搅拌子，置于磁力搅拌器上，加入1%氯金酸溶液1 mL，适当速度搅拌，打开加热开关，待溶液沸腾后迅速一次性加入1.6 mL 1%柠檬酸三钠溶液，氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色，颜色稳定后继续加热10 min，待溶液冷却后，用微孔滤膜过滤，4℃保存备用，紫外扫描得到最大吸收峰为523nm的胶体金颗粒。

[0012] 所述胶体金颗粒大小为25nm。

[0013] 所述胶体金标记的抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体的悬浮保存液配方组成为pH 8.5的0.01M Tris缓冲液，内含2%酪蛋白、1%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

[0014] 所述检测线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M Tris缓冲液，内含10%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠；质控线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M PBS缓冲液，内含10%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

[0015] 一种快速检测犬瘟热病毒病原的测试剂盒，其包括所述的一种快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡和样本稀释液。

[0016] 所述样本稀释液的配方为0.9%生理盐水溶液，内含5%牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠，0.5%丙氨酸。

[0017] 基于以上技术方案，本发明具有如下优点和有益效果：

首先，本发明采用采用双抗体夹心法模式的免疫层析定性检测方法，直接检测病原本身，解决了现有技术胶体金试纸条不能有效区分是犬瘟热病毒感染导致的血清阳性还是疫苗接种后产生的血清阳性的问题，从而能够准确发现犬瘟热病毒的感染，实现疾病的有效控制。另外，相比传统的ELISA、PCR等检测手段，本发明的检测方法更加简单，适合推广使用，且经过试验验证，本发明的胶体金检测卡的敏感度更高。

[0018] 其次，本发明通过特定配对单克隆抗体的组合实现了犬瘟热病毒的高效和灵敏检测，本发明实施例1所制备得到的快速检测犬瘟热病毒病原检测卡的敏感性高于对比实施例1，且也高于目前市场、文献上所报道的检测灵敏度，如CN2016...306.X所报道的检测灵敏度为3.13μg/mL。研究发现，对抗体的使用位置也影响了快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡检测的灵敏度，当将实施例1结合垫上的单克隆抗体和T线的单克隆抗体交换后得到的对比实施例1，其检测灵敏度明显低于本发明实施例1，这对于本领域技术人员而言是预料不到的。

[0019] 再次，基于本发明的快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡，本发明开发了相关的检测试剂盒，并对其中的稀释液进行了优化，尽管从检测结果可知，常规的生理盐水溶液或者稀释液二作为样品稀释液也能实现犬瘟热病毒的准确检测，然而，本发明的稀释液一作为样品稀释液，能够提高病原检测的灵敏度，相比稀释液二能够检测到32倍稀释度下的阳性样品和稀释液三能够检测到8倍稀释度下的阳性样品，本发明的稀释液一更能检测到64倍稀释度下的阳性样品，可见，稀释液中丙氨酸的加入提高了检测卡检测的灵敏度，取得了预料不到的技术效果。

[0020] 综上所述，本发明可以快速、灵敏、准确的检测犬瘟热病毒的感染，大大缩短了检

测时间,为现场检测提供了方便。

[0021] 附图说明:

图1:本发明快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡结构示意图;其中:1.样品垫、2.PVC板、3.金标垫、4.检测线、5.质控线、6.基膜、7.吸水垫。

[0022] 图2:本发明快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡阳性结果判定图,若C线显色,而T线显色,判为阳性。

[0023] 图3:本发明快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡阴性结果判定图,若C线显色,T线不显色,判为阴性。

[0024] 图4:本发明快速检测犬瘟热病毒病原的检测卡无效结果判定图,在观察孔内,若C线不显色,则结果无效,建议重新测试。

[0025] 具体实施方式:

下面结合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而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。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。

[0026] 实施例1:一种快速检测犬瘟热病毒病原检测卡的制备方法,具体步骤为:

(1)犬瘟热病毒的分离、培养、纯化。

[0027] 选取山东,广东,四川等3个地区,经PCR确诊为强阳性的眼睛分泌物,接种至F81细胞盲传3代,收集病变显著的细胞,冻存,并扩大培养,收毒,超滤浓缩10倍,然后反复冻融3次,10000rpm离心30分钟,上蔗糖密度梯度,30%,35%,40%,45% 4个梯度,26000rpm离心 30分钟,分别取出各层,测定病毒所在位置和含量。

[0028] (2)抗犬瘟热病毒配对单克隆抗体的制备

①免疫程序

将纯化的1mg/ml左右的三个地区的病毒作为免疫原与501佐剂按体积比1:0.2-0.3的比例混合,对8-10周龄Balb/c小鼠进行免疫,腿部肌肉注射,50 μ g/只,以后每隔1周免疫一次,免疫剂量、部位同上;5免后加强免疫,腹腔注射,不加佐剂,剂量加倍;

②细胞融合

将Balb/c小鼠体内的脾细胞与其腹腔内的骨髓瘤细胞按照细胞数量20:0.5-1.5的比例混合,800rpm离心5-8min,弃去上清,于30S内加入1mL50%PEG(W/W),静置1min,在第一个1min内缓慢加入1mL无血清的DMEM培养基,在第二个1min内缓慢加入2mL无血清的DMEM培养基,在第三个1min内缓慢加入2mL无血清的DMEM培养基,在第四个1min内缓慢加入5mL无血清的DMEM培养基,在第五个1min内缓慢加入10mL无血清的DMEM培养基,800rpm离心10min,弃上清,用含20%小牛血清的完全培养基重悬细胞,细胞计数为 $3-6 \times 10^5$ 个/mL铺于含 $2-6 \times 10^4$ 个/mL饲养细胞的细胞培养板,置于CO₂培养箱中;

③杂交瘤筛选及克隆化

待细胞长至孔底的1/3时,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔,将阳性孔采用有限稀释法进行亚克隆,第6天,取细胞上清检测,经过多次配对测试,最终选取抗犬瘟热病毒配对杂交瘤细胞株之一CdV 36D9于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C2018147,保藏地址为中国武汉-武汉大学;分泌抗犬瘟热病毒

的配对杂交瘤细胞株之二Cdv 37C7于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO: C2018146,保藏地址为中国武汉-武汉大学;

④ 抗体制备及纯化

单克隆抗体的生产:采用动物体内腹水诱生法;

单克隆抗体的纯化:采用SPA柱法对腹水进行纯化,即得本发明抗犬瘟热病毒单克隆抗体;

(3) 犬瘟热病毒抗原快速检测卡的制备

①胶体金溶液的熬制

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

②抗犬瘟热病毒37C7株单克隆抗体的标记

每 1 ml金液先加45 微升1%K₂CO₃, 然后再加入抗体,按照每1 mL胶体金溶液加入6μg 抗犬瘟热病毒单克隆抗体,室温下120rpm摇30 min,加入10%牛血清白蛋白 20μL,室温下120rpm摇30 min,12000rpm离心20 min,弃上清,用0.01M PBS 溶解沉淀,即得到标记好的抗犬瘟热病毒单克隆抗体标记物;

③金标垫处理

选择聚脂纤维6613作为金标结合垫。将金标垫浸泡在处理液A中5min,处理液A为0.01Mpbs,pH7.4,0.2%Triton X-100,取出37℃烘干,备用;将标记好的抗犬瘟热病毒单克隆抗体标记物用划膜仪以5μL/cm的浓度喷涂在处理好的金标垫上,室温自然晾干或者37℃烘干,制成含有抗犬瘟热病毒单克隆抗体标记物的胶体金膜;

④样品垫处理

选择DL42为样品垫,将样品垫,浸泡在处理液B中5min,处理液B为 0.01 Mpbs,pH7.4,1%Triton X-100,1%BSA,0.05% NaN₃,5min,取出37℃烘干,备用;

⑤ C、T线确定

选择Sartorius Cn140膜,分别将抗犬瘟热病毒36D9单克隆抗体和羊抗鼠二抗作为T线和C线划在NC膜上,浓度分别为1 mg/mL和0.6mg/mL,用划膜仪依次以1μL/cm的浓度喷涂在NC膜上,37℃包被2h后,室温自然晾干或者37℃烘干,制成基膜。

⑥ 检测卡的组装。

[0029] 实施例2:被测样本前处理方法和检测方法

本发明犬瘟热病毒病原快速检测卡的使用方法如下:

a. 用棉签收集狗、貂、狐狸眼分泌物或者鼻液,唾液。

[0030] b. 打开样本收集试管,插入棉签。

[0031] c. 充分搅动棉签直至棉签上的样本溶入稀释液,然后丢弃棉签。

[0032] d. 振荡、混匀后,垂直样品管,吸取上清液并滴加3-5滴到检测卡中的样品孔中。

[0033] e. 5分钟时判断结果,其他时间判读无效。

[0034] (1) 阳性(图2):若C线显色,而T线显色,判为阳性。

[0035] (2) 阴性(图3):若C线显色,T线不显色,判为阴性。

[0036] (3) 无效(图4):在观察孔内,若C线不显色,则结果无效,建议重新测试。

[0037] 实施例3:检测卡性能测定

(1) 稳定性

①37℃加速稳定性试验

取三个批次(LD160613、LD170312、LD170920)的犬瘟热检测卡若干置于37℃保存。每次测定各取三个批次的检测卡若干,测定时间间隔为第3天、第7天、第10天、第14天、第17天、第20天,测定内容为显色情况、符合率。当实验结果中NC膜显色异常并且测试结果不准确时,则判定检测卡失效。

[0038] ②常温下稳定性试验

取三个批次(LD160613、LD170312、LD170920)的检测卡置于常温下保存,每次测定各取三个批次的检测卡若干,测试时间间隔为第1个月、第3个月、第6个月、第12个月、第18个月、第24个月;测定内容为显色情况、符合率。当实验结果中NC膜显色异常并且测试结果不准确时,则判定检测卡失效。

[0039] ③ 稳定性测定结果

表1稳定性测定结果

37℃3天	37℃7天	37℃10天	37℃14天	37℃17天	37℃20天
假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%
假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%
常温1个月	常温3个月	常温6个月	常温12个月	常温18个月	常温24个月
假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%	假阳性率 0%
假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%	假阴性率 0%

基于以上稳定性测定结果可知,无论是37℃加速稳定性试验还是常温下稳定性试验,本发明所述的犬瘟热检测卡均表现为良好的稳定性,检测结果假阳性率、假阴性率均为0%。说明本发明的检测卡产品具有良好的流通特性,无需冷藏等低温保藏手段,便于该项检测手段的推广。

[0040] (2) 特异性测定

特异性通常用交叉反应率来表示,交叉反应指抗体除与其相应的抗原发生特异性反应外还与其它抗原发生反应,交叉反应率越低表明特异性越强。

[0041] 为了测试本发明所述的犬瘟热检测卡的特异性,选取了犬瘟热病毒、犬细小病毒、犬腺病毒、犬冠状病毒、犬轮状病毒、狂犬病毒作为对照,采用本发明的犬瘟热检测卡分别进行检测。特异性检测结果参见表2:

表2 特异性检测结果

犬瘟热病毒	犬细小病毒	犬腺病毒
+	-	-
犬冠状病毒	犬轮状病毒	狂犬病毒
-	-	-

+ 代表阳性;-代表阴性

基于以上特异性检测结果可知,本发明所述的犬瘟热检测卡仅能检测出犬瘟热病毒,而对于犬细小病毒、犬腺病毒、犬冠状病毒、犬轮状病毒、狂犬病毒等犬类常见病毒均表现

为阴性,这说明本发明所述的犬瘟热检测卡具有良好的特异性,能够特异性的检测犬瘟热病毒。

[0042] (3) 符合率

临床收集到的100份样品,用此犬瘟热病原检测卡与PCR实验同时测定进行结果比对,发现两种方法对阳性和阴性的敏感度为100%。

[0043] 实施例4:敏感性试验

为了验证本发明的检测所述的快速检测犬瘟热病毒病原检测卡的敏感性,选择检测卡对稀释的不同浓度的犬瘟热病毒细胞毒样品进行检测,稀释浓度依次为25 $\mu\text{g/mL}$ 、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 、3.12 $\mu\text{g/mL}$ 、1.56 $\mu\text{g/mL}$ 、0.78 $\mu\text{g/mL}$ 。同时,在本实施例中还设置了对比试验例1,其是在实施例1的基础上,所述金标垫中含有胶体金标记的第一单克隆抗体由保藏编号为保藏编号为CCTCC NO: C2018147的杂交瘤细胞株分泌得到,所述T线上包被有第二单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO: C2018146的杂交瘤细胞株分泌得到。即采用抗犬瘟热病毒37C7单克隆抗体作为检测线T的抗体,而抗犬瘟热病毒36D9单克隆抗体与胶体金结合后划到结合垫上,其他工艺见实施例1。检测结果如下:

表3敏感性检测结果

抗原浓度 $\mu\text{g/mL}$	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78
实施例1	+++	+++	+++	++	+	+
对比实施例1	+++	+++	++	+	-	-

+ 代表阳性;-代表阴性

基于以上敏感性检测结果可知,本发明实施例1所制备得到的快速检测犬瘟热病毒病原检测卡的敏感性可以检测到稀释浓度0.78 $\mu\text{g/mL}$ 的犬瘟热病毒细胞毒样品,而对比实施例1仅能检测到稀释浓度0.78 $\mu\text{g/mL}$ 的犬瘟热病毒细胞毒样品,说明本发明实施例1所制备得到的快速检测犬瘟热病毒病原检测卡的敏感性高于对比实施例1,且也高于目前市场、文献上所报道的检测灵敏度,如CN2016...306.X所报道的检测灵敏度为3.13 $\mu\text{g/mL}$ 。另外,通过实施例1和对比实施例1的比较可知,两者的区别仅在于配对单克隆抗体使用的差异,当将实施例1结合垫上的单克隆抗体和T线的单克隆抗体交换后得到的对比实施例1,其检测灵敏度明显低于本发明实施例1,这对于本领域技术人员而言是预料不到的。

[0044] 实施例5:病原检测试验

选择经鉴定为犬瘟热病毒感染阳性的肉狗2只,用棉签收集狗者鼻液,打开样本收集试管,插入棉签,充分搅动棉签直至棉签上的样本溶入稀释液(2mL),然后丢弃棉签,振荡、混匀后,垂直样品管,吸取上清液,即制备得到样品原液。

[0045] 在检测过程中,分别采用了三种不同的稀释液进行比较,其中稀释液一为:0.9%生理盐水溶液,内含5% 牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠,0.5%丙氨酸;稀释液二为:0.9%生理盐水溶液,内含5% 牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠,1.0%丙氨酸;稀释液三为:0.9%生理盐水溶液,内含5% 牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠;稀释液四为

0.9%生理盐水溶液。并且对采样的样品原液采用相应稀释液进行稀释,分别是样品原液(1倍稀释)、2倍稀释、4倍稀释、8倍稀释、16倍稀释、32倍稀释、64倍稀释,分别采用实施例1制备得到的快速检测犬瘟热病毒病原检测卡进行检测,滴加3-5滴到检测卡中的样品孔中进行检测。具体检测结果如下表4:

表4病原检测试验结果

稀释倍数	1	2	4	8	16	32	64	128
稀释液一	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
稀释液二	+++	+++	++	++	++	+	-	-
稀释液三	+++	++	++	+	+	-	-	-
稀释液四	+++	++	+	+	-	-	-	-

+ 代表阳性;-代表阴性

基于以上结果可知,在本发明快速检测犬瘟热病毒病原检测卡的检测过程中,缓冲液的组成对于检测卡的灵敏度也有一定的影响,尽管从以上表4的检测结果可知,常规的生理盐水溶液或者稀释液二、三作为样品稀释液也能实现犬瘟热病毒的准确检测,然而,本发明的稀释液一作为样品稀释液,能够提高病原检测的灵敏度,相比稀释液二能够检测到32倍稀释度下的阳性样品、稀释液三能够检测到16倍稀释度下的阳性样品、稀释液四能够检测到8倍稀释度下的阳性样品,本发明的稀释液一更能检测到64倍稀释度下的阳性样品,可见,稀释液中特定浓度的丙氨酸的加入提高了检测卡检测的灵敏度,取得了预料不到的技术效果。

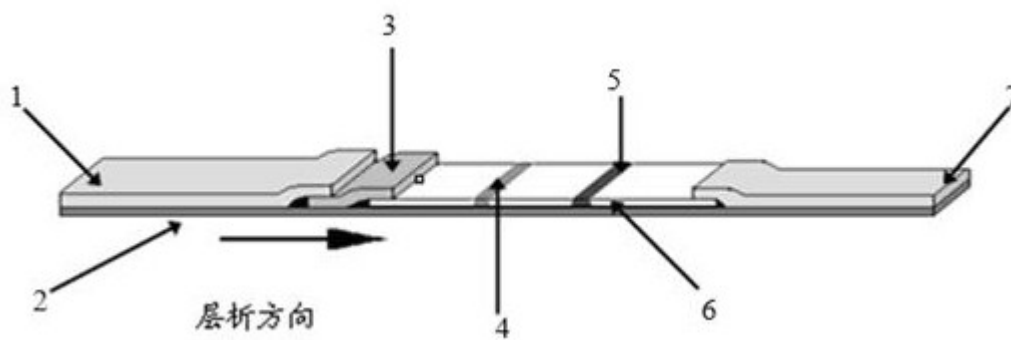


图1



图2



图3

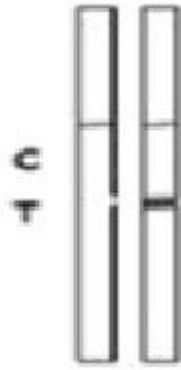


图4

专利名称(译)	一种快速检测犬瘟热病毒抗原的检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN109975541A	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201811602771.2	申请日	2018-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	山东绿都生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东绿都生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东绿都生物科技有限公司		
[标]发明人	武玉香 于金枝 孙珊珊 唐世云 刘捷		
发明人	武玉香 于金枝 孙珊珊 唐世云 刘捷		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种适用于国内市场的定量检测犬瘟热病毒抗原检测卡的制备方法，具体步骤为：（1）犬瘟热病毒的分离、培养、纯化；（2）抗犬瘟热病毒配对单克隆抗体的制备，包括免疫程序、细胞融合、杂交瘤筛选及克隆化、抗体制备及纯化；（3）犬瘟热病毒快速检测胶体金检测卡及其制备方法，包括样品垫处理、喷膜、C,T线确定、被测样本的处理、检测卡性能测定。本发明可以快速、灵敏、准确的定性检测国内犬瘟热病毒，克服了国内检测犬瘟热病毒胶体金检测卡开发用的配对单抗为进口原料，进口原料的单抗以某个国家分离的当前病毒制备，克服了检测过程中因地域遥远病毒变异漏检的现象。

