



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105954514 A

(43)申请公布日 2016.09.21

(21)申请号 201610465660.6

(22)申请日 2016.06.21

(71)申请人 郑州中道生物技术有限公司
地址 450000 河南省郑州市高新区国家大
学科技园(东区)5号楼F座

(72)发明人 张杰 王军 王盼 卜攀攀
曾小宇 苗银萍 任宝红 鲁龙
余清卫 赵林萍

(74)专利代理机构 北京迎硕知识产权代理事务
所(普通合伙) 11512
代理人 张群峰 吕良

(51)Int. Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

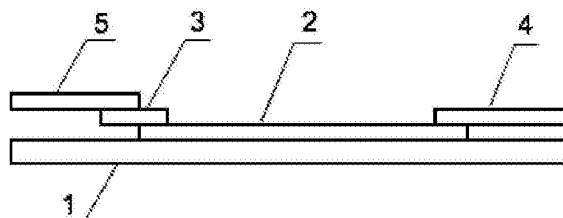
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条及其制备方法。该试纸条基于膜免疫层析的原理,采用胶体金双抗原夹心法来制备,以葡萄球菌A蛋白(SPA)为捕获抗原,以口蹄疫病毒3ABC和伪狂犬病毒GE蛋白为检测抗原。在检测一份血清样品时,可同时诊断猪口蹄疫和伪狂犬病的野毒感染。该试纸条操作便捷,不需要仪器设备,结果判读简单,能够满足基层组织、农户对于重大疫病诊断的需求,对猪口蹄疫、伪狂犬病防控具有重要意义。



1. 一种口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条, 该试纸条包括底板、包被膜、玻璃纤维膜、吸水纸和样品垫;

其中, 包被膜的底面粘贴在底板上, 包被膜正面的两端分别粘贴玻璃纤维膜和吸水纸; 在玻璃纤维膜远离吸水纸一端的正面粘贴样品垫; 在包被膜上设有检测线I、检测线II和质控线, 检测线I包被口蹄疫病毒3ABC蛋白, 检测线II包被伪狂犬病毒GE蛋白, 质控线包被兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体; 玻璃纤维膜上喷涂有葡萄球菌A蛋白胶体金颗粒标记偶联物。

2. 根据权利要求1所述的口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条, 其中检测线I、检测线II和质控线三条线呈平行布置, 相邻两线间隔0.4-1.0cm。

3. 一种口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 将口蹄疫病毒3ABC蛋白、伪狂犬病毒GE蛋白、兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体分别用包被缓冲液稀释后形成浓度为1.0-3.0mg/mL的喷涂液; 用喷膜仪在包被膜上分别喷涂划线相应喷涂液, 形成检测线I、检测线II和质控线;

(2) 将双蒸水置于磁力搅拌器上加热至沸腾, 迅速加入氯金酸溶液; 煮沸之后加入柠檬酸三钠溶液, 加样体积为氯金酸溶液的1.5-3倍; 煮沸10-30分钟后, 冷却至室温形成胶体金溶液;

(3) 用碳酸钾调节胶体金溶液PH值至7.5-8.0, 按60ug抗体/mL胶体金溶液的比例加入SPA蛋白, 混匀后静置; 再按5%体积的量加入10%牛血清白蛋白溶液, 混匀后静置; 离心弃去上清, 用标记洗涤液洗涤; 沉淀物用十分之一初始胶体金溶液体积的金标蛋白保存液溶解, 然后按照每毫升溶液铺10-15cm²的量喷涂于玻璃纤维膜上, 真空干燥后备用;

(4) 将步骤(1)中制成的包被膜粘贴在底板上面, 再将步骤(3)中制成的玻璃纤维膜粘贴在包被膜的一端, 将吸水纸粘贴在包被膜的另一端, 在玻璃纤维膜远离吸水纸的一端的正面粘贴样品垫;

(5) 用切条机将步骤(4)中制成的大板切成宽度为3-5cm的单条, 形成口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条。

口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明总体涉及动物疫病快速诊断试纸条,具体涉及口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条。

背景技术

[0002] 口蹄疫(foot-and-mouth disease,FMD)是一种急性、热性、高度接触性传染病,猪、牛、羊等偶蹄类动物最易感。猪口蹄疫的发病率高,传播迅速,可造成母猪流产、仔猪大批死亡,带来严重的经济损失。我国对口蹄疫采取强制免疫策略,每年都会使用大量的灭活疫苗,并监测疫苗免疫效果,提高动物临床抗体水平。如何区分疫苗免疫动物和野毒感染动物成为影响口蹄疫防控的关键。在口蹄疫疫苗生产过程中,3ABC非结构蛋白会被除去,因此动物接种口蹄疫疫苗不产生3ABC抗体。因此,检测3ABC蛋白抗体,可作为诊断野毒感染的重要指标。

[0003] 伪狂犬病(Pseudorabies virus,PRV)是一种猪的急性传染病,主要侵害生殖系统,可导致母猪不孕、流产、死胎,哺乳仔猪大量死亡,对成年育肥猪猪可引起生长停滞、增重缓慢等,是危害养猪业的重大传染病之一。疫苗免疫接种是防控伪狂犬病的重要措施。目前,可用的伪狂犬疫苗均为弱毒活疫苗,能否鉴别免疫动物和野毒感染动物是伪狂犬病净化的关键。通过基因工程技术构建缺失GE蛋白基因的伪狂犬病毒突变株,所制备的疫苗接种动物,不会诱导产生GE蛋白抗体。所以,通过检测GE蛋白抗体,可以精确区分伪狂犬疫苗免疫猪群和野毒感染猪群。

[0004] 随着生物技术的发展,目前市面上已经有猪口蹄疫3ABC和伪狂犬病GE抗体检测试剂盒,但主要是酶联免疫吸附试验(ELISA)检测法。ELISA操作繁琐,耗时较长,而且需要仪器,不利于临床实地的疾病诊断。之后出现了一种类似专利CN103792373A的胶体金快速检测卡,但是只能单一诊断伪狂犬病野毒感染。猪口蹄疫、伪狂犬病对怀孕母猪和仔猪危害大,严重破坏养猪业可持续发展,研制快速、多联的疾病诊断技术具有重大意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于:提供一种动物疫病快速诊断试纸条及其制备方法,该试纸条可同时诊断猪口蹄疫和伪狂犬病的野毒感染。

[0006] 本发明通过以下技术方案实现:该试纸条包括底板、包被膜、玻璃纤维膜、吸水纸和样品垫;其中,包被膜的底面粘贴在底板上,包被膜正面的两端分别粘贴玻璃纤维膜和吸水纸;在玻璃纤维膜远离吸水纸一端的正面粘贴样品垫;在包被膜上设有检测线I、检测线II和质控线,检测线I包被口蹄疫病毒3ABC蛋白,检测线II包被伪狂犬病毒GE蛋白,质控线包被兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体;玻璃纤维膜上喷涂有葡萄球菌A蛋白(SPA)胶体金颗粒标记偶联物。

[0007] 本发明试纸条应用双抗原夹心法,当被检样品中含有3ABC或GE抗体时,则在样品垫处与SPA蛋白结合,形成“SPA抗原-抗体复合物”,并在吸水纸的作用下向前渗透泳动。当

复合物到达检测线I,3ABC抗体与口蹄疫病毒3ABC蛋白发生特异性结合,形成“SPA抗原-3ABC抗体-3ABC抗原复合物”,在包被膜上出现肉眼可见的色带。当复合物到达检测线II,GE抗体与伪狂犬病毒GE蛋白发生特异性结合,形成“SPA抗原-GE抗体-GE抗原复合物”,在包被膜上出现肉眼可见的色带。当被检样品中不含3ABC和GE抗体时,胶体金标记的SPA泳动至质控线,与兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体结合,在包被膜上出现肉眼可见的色带。检测时,吸取待检血清样品1滴,滴到样品垫上,观察检测线I、II和质控线是否出现红色色带,从而判定动物是否被口蹄疫、伪狂犬野毒感染。

[0008] 本发明的积极效果是:

[0009] 1、本发明操作便捷,不需要仪器设备,结果判读简单。在检测一份血清样品时,可同时诊断猪口蹄疫和伪狂犬病野毒感染。能够满足基层组织、农户对于重大疫病诊断的需求。

[0010] 2、本发明采用双抗原夹心法,不受样品的宿主来源限制,除了诊断猪口蹄疫和伪狂犬病野毒感染,还可用于多种动物口蹄疫野毒感染的鉴别诊断。

[0011] 3、本发明将免疫层析法与胶体金技术相结合,研制出快速诊断试纸条。相对于ELISA,试纸条原辅料更为简单,成本低,有益于推广应用。

附图说明

[0012] 图1为本发明试纸条的侧面结构示意图。图中1:底板;2:包被膜;3:玻璃纤维膜;4:吸水纸;5:样品垫。

[0013] 图2为图1的正面结构示意图。图中6:检测线I;7:检测线II;8:质控线。

[0014] 图3为口蹄疫野毒感染阳性和伪狂犬野毒感染阳性结果示意图。包被膜2上的检测线I6、检测线II7和质控线8均出现红色色带。

[0015] 图4为口蹄疫野毒感染阳性和伪狂犬野毒感染阴性结果示意图。包被膜2上的检测线I6和质控线8均出现红色色带,检测线II7不出现红色色带。

[0016] 图5为伪狂犬野毒感染阳性和口蹄疫野毒感染阴性结果示意图。包被膜2上的检测线II7和质控线8均出现红色色带,检测线I6不出现红色色带。

[0017] 图6为口蹄疫野毒感染阴性和伪狂犬野毒感染阴性结果示意图。包被膜2上的质控线8出现红色色带,检测线I6和检测线II7均不出现红色色带。

[0018] 图7为本发明检测无效结果示意图。包被膜2上的质控线8、检测线I6和检测线II7均不出现红色色带。

[0019] 图8为本发明检测无效结果示意图。包被膜2上的质控线8不出现红色色带,检测线I6和检测线II7出现红色色带。

[0020] 图9为本发明检测无效结果示意图。包被膜2上的质控线8和检测线I6均不出现红色色带,检测线II7出现红色色带。

[0021] 图10为本发明检测无效结果示意图。包被膜2上的质控线8和检测线II7均不出现红色色带,检测线I6出现红色色带。

具体实施方式

[0022] 下面结合附图具体介绍本发明的口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条及其制

备方法。本领域技术人员应该理解,下面描述的实施例只是为了更好地理解本发明,并不用来限制本发明。

[0023] 如图1所示,根据本发明的口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条包括底板1、包被膜2、玻璃纤维膜3、吸水纸4以及样品垫5。其中,包被膜2粘贴在底板1上面,包被膜2正面的两端分别粘贴玻璃纤维膜3和吸水纸4。在玻璃纤维膜3远离吸水纸4的一端的正面粘贴样品垫5。底板1通常为PVC材质,包被膜2为硝酸纤维素膜(NC膜)。在玻璃纤维膜3上涂覆有胶体金标记SPA蛋白。

[0024] 如图2所示,在包被膜2上设有检测线I6、检测线II7和质控线8。检测线I6包被口蹄疫病毒3ABC蛋白,检测线II7包被伪狂犬病毒GE蛋白,质控线8包被兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体。所述检测线I6、检测线II7和质控线8在包被膜2上呈3条线平行排列,依据检测线I6、检测线II7和质控线8是否出现红色色带来进行结果判定。

[0025] 下述实施例中的主要原材料来源为:口蹄疫病毒3ABC蛋白、伪狂犬病毒GE蛋白由郑州中道生物技术有限公司制备。其它试剂和材料均可来源于商业途径。所述的实验方法,若无特别说明,均为常规实验方法。

[0026] 本发明所述试纸条采用3条带显色的胶体金免疫层析法制备,显示条带为红色色带,具体制备方法如下:

[0027] 1.1包被膜2的制备

[0028] 在硝酸纤维素膜上分别喷涂口蹄疫病毒3ABC蛋白、伪狂犬病毒GE蛋白和兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体,并呈3条线平行排列,分组组成检测线I6、检测线II7和质控线8。37℃烘干处理2小时,置装有干燥剂的密封袋中保存备用。

[0029] 检测线I6:调试喷膜仪,喷液量为1 μ I/cm,用包被缓冲液稀释口蹄疫病毒3ABC蛋白,浓度为2.5mg/mL,用喷膜仪喷涂划线。

[0030] 检测线II7:调试喷膜仪,喷液量为1 μ I/cm,用包被缓冲液稀释伪狂犬病毒GE蛋白,浓度为3.0mg/mL,用喷膜仪喷涂划线。

[0031] 质控线8:调试喷膜仪,喷液量为1 μ I/cm,用包被缓冲液稀释兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体,浓度为1mg/mL,用喷膜仪喷涂划线。

[0032] 所述包被缓冲液配方:称取牛血清白蛋白0.01g,十二水合磷酸氢二钠30.072g,磷酸二氢钾2.176g,用超纯水溶解,并定容至1000mL。

[0033] 包被膜2上所划3条线应细致均匀,相邻两线间隔0.4-1.0cm。

[0034] 1.2玻璃纤维膜3的制备

[0035] (1)胶体金溶液的制备

[0036] 将双蒸水置于磁力搅拌器上加热至沸腾,迅速加入浓度为1%的氯金酸溶液至终浓度为0.02%。煮沸5分钟,之后加入浓度为1%的柠檬酸三钠溶液,加样体积为氯金酸溶液的1.8倍。煮沸10分钟后,冷却至室温,再用双蒸水调整氯金酸浓度为0.02%,常温避光保存备用。

[0037] (2)胶体金标记SPA玻璃纤维膜3的制备

[0038] 用5M碳酸钾调节胶体金溶液PH值至7.5-8.0,按60 μ g抗体/mL胶体金溶液的比例加入SPA蛋白,混匀后静置5分钟。再按5%体积的量加入10%牛血清白蛋白溶液,混匀后静置5分钟。10000rpm离心30分钟,弃去上清,用标记洗涤液洗涤1次。沉淀用十分之一初始胶体金

体积的金标蛋白保存液溶解,然后按照每毫升溶液铺 10cm^2 的量喷涂于玻璃纤维膜3上。真空干燥3小时,置装有干燥剂的密封袋中保存备用。

[0039] 所述10%牛血清白蛋白溶液:取牛血清白蛋白100g,用双蒸水定容至1000mL。

[0040] 所述标记洗涤液:取牛血清白蛋白4g,聚乙二醇80002g,聚乙烯吡咯烷酮2g,蔗糖2g,Tris 1.211g,用双蒸水定容至1000mL,并调节PH至8.1。

[0041] 所述金标蛋白保存液:取牛血清白蛋白25g,聚乙二醇80005g,Tris 10.2g,氢氧化钠2.5g,吐温207.5mL,用双蒸水定容至1000mL,并调节PH至8.5。

[0042] 1.3大板组条

[0043] 各组份规格(长×宽):底板1(30cm×7.6cm)、包被膜2(30cm×2.0cm)、样品垫5(30cm×3.0cm)、涂覆胶体金标记SPA蛋白的玻璃纤维膜3(30cm×0.7cm)和吸水纸4(30cm×3.2cm)。

[0044] 各层的组合方式如下:将包被膜2粘贴在底板1上面,包被膜2正面的两端分别粘贴玻璃纤维膜3和吸水纸4。在玻璃纤维膜3远离吸水纸4的一端的正面粘贴样品垫5。即在底板1上按顺序依次粘贴包被膜2、玻璃纤维膜3、吸水纸4、样品垫5。

[0045] 1.4切条

[0046] 用切条机将大板切成单条,每条宽度为3-5cm。

[0047] 下面再详细描述本发明的试纸条检测原理和结果判定。

[0048] 2.1试纸条检测原理

[0049] 本发明试纸条应用双抗原夹心法,用SPA蛋白作为捕获抗原,用口蹄疫病毒3ABC和伪狂犬病毒GE蛋白作为检测抗原。其原理是当被检样品中含有3ABC或GE抗体时,则在样品垫5处与SPA蛋白结合,形成“SPA抗原-抗体复合物”,并在吸水纸4的作用下向前渗透泳动。当复合物到达检测线I6,3ABC抗体与口蹄疫病毒3ABC蛋白发生特异性结合,形成“SPA抗原-3ABC抗体-3ABC抗原复合物”,在包被膜2上出现肉眼可见的色带。当复合物到达检测线II7,GE抗体与伪狂犬病毒GE蛋白发生特异性结合,形成“SPA抗原-GE抗体-GE抗原复合物”,在NC膜上出现肉眼可见的色带。当溶液泳动至质控线8,与兔抗葡萄球菌A蛋白IgG抗体结合,在包被膜2上出现肉眼可见的色带。检测时,吸取待检血清样品1滴,滴到样品垫5上,观察检测线I6、II7和质控线8是否出现红色色带,从而判定动物是否被口蹄疫、伪狂犬病野毒感染。

[0050] 2.2试纸条结果判定

[0051] 下面结合附图,具体介绍本发明试纸条的结果判定标准。

[0052] 如图3所示,包被膜2上的检测线I6、检测线II7和质控线8均出现红色色带,则口蹄疫和伪狂犬病均为野毒感染阳性。

[0053] 如图4所示,包被膜2上的检测线I6和质控线8均出现红色色带,检测线II7不出现红色色带,则口蹄疫野毒感染阳性,而伪狂犬病野毒感染阴性。

[0054] 如图5所示,包被膜2上的检测线II7和质控线8均出现红色色带,检测线I6不出现红色色带,则口蹄疫野毒感染阳性和伪狂犬病野毒感染阴性。

[0055] 如图6所示,包被膜2上的质控线8出现红色色带,检测线I6和检测线II7均不出现红色色带,则口蹄疫和伪狂犬病均为野毒感染阴性;

[0056] 当出现以下几种情况时,检测结果无效:包被膜2上的质控线8、检测线I6和检测线II7均不出现红色色带(图7);包被膜2上的质控线8不出现红色色带,检测线I6和检测线II7

出现红色色带(图8); 包被膜2上的质控线8和检测线I6不出现红色色带, 检测线II7出现红色色带(图9); 包被膜2上的质控线8和检测线II7不出现红色色带, 检测线I6出现红色色带(图10)。

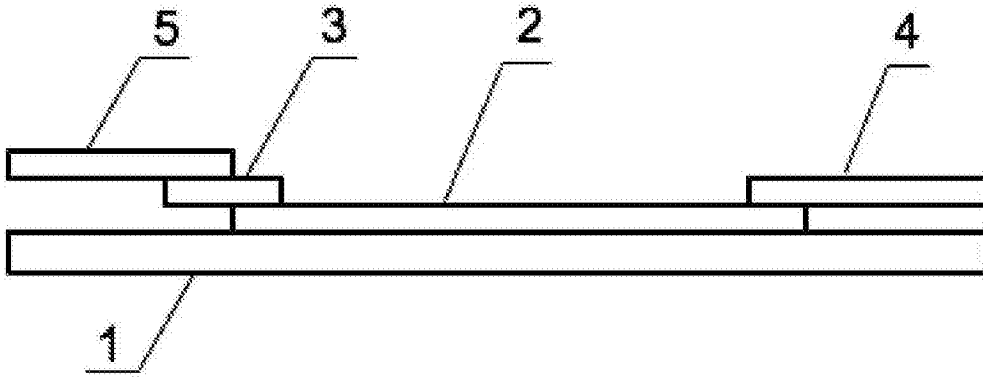


图1

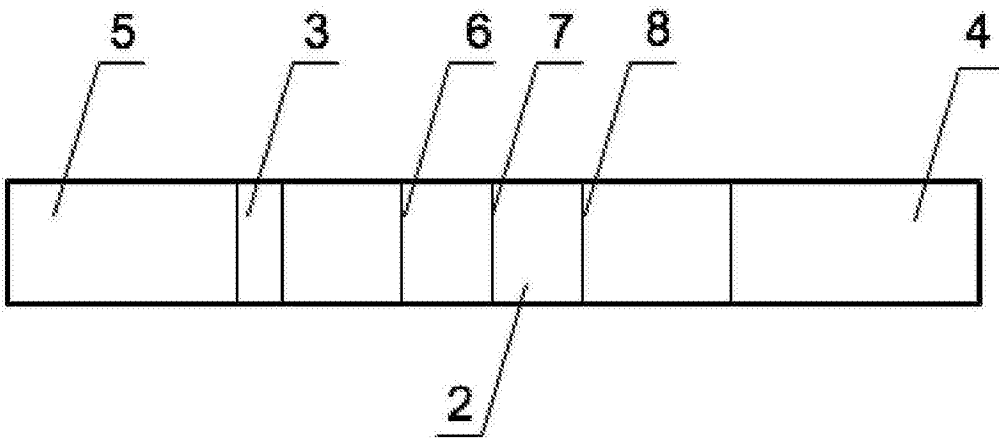


图2

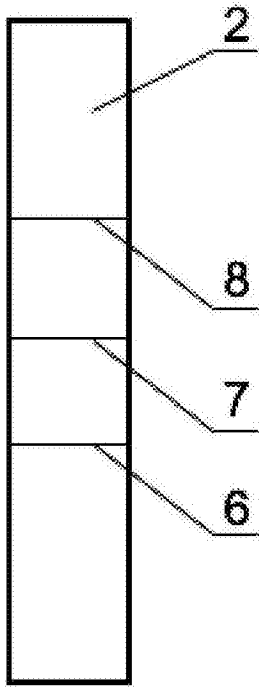


图3

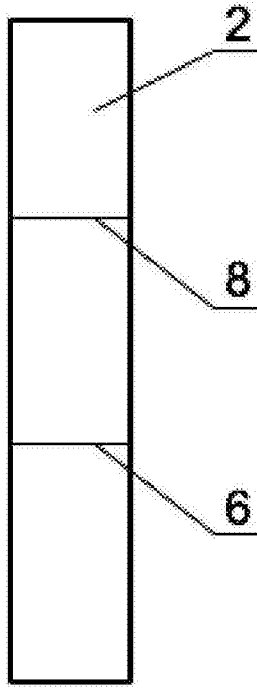


图4

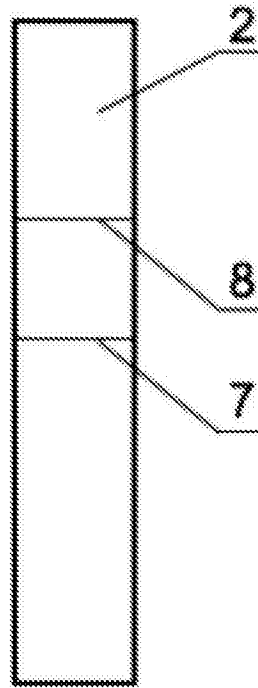


图5

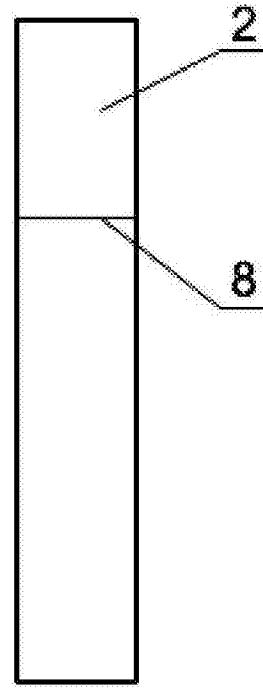


图6

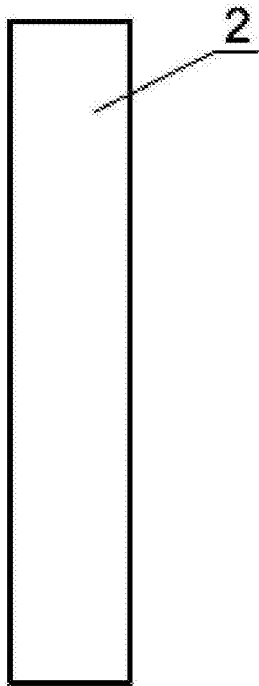


图7

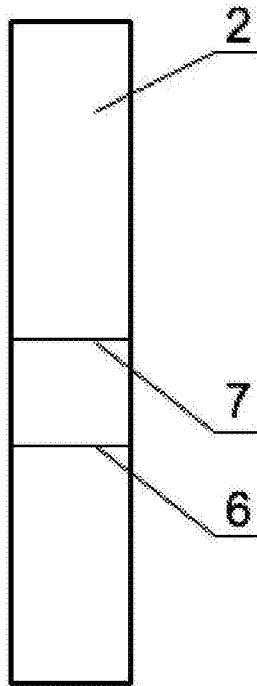


图8

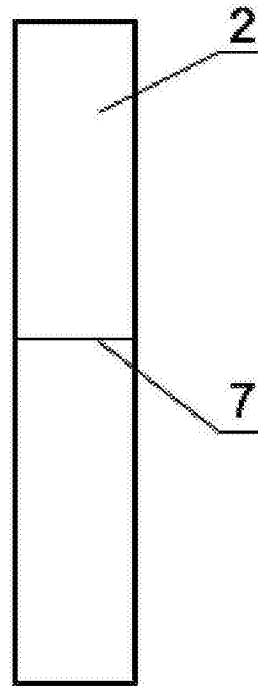


图9

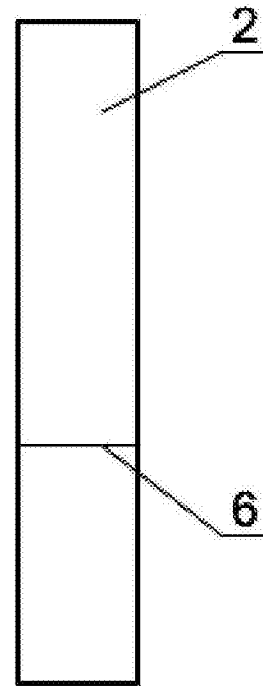


图10

专利名称(译)	口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN105954514A	公开(公告)日	2016-09-21
申请号	CN201610465660.6	申请日	2016-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	郑州中道生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州中道生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州中道生物技术有限公司		
[标]发明人	张杰 王军 王盼 卜攀攀 曾小宇 苗银萍 任宝红 鲁龙 余清卫 赵林萍		
发明人	张杰 王军 王盼 卜攀攀 曾小宇 苗银萍 任宝红 鲁龙 余清卫 赵林萍		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/56994 G01N2333/09		
代理人(译)	张群峰 吕良		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种口蹄疫和伪狂犬病二联快速检测试纸条及其制备方法。该试纸条基于膜免疫层析的原理，采用胶体金双抗原夹心法来制备，以葡萄球菌A蛋白(SPA)为捕获抗原，以口蹄疫病毒3ABC和伪狂犬病毒GE蛋白为检测抗原。在检测一份血清样品时，可同时诊断猪口蹄疫和伪狂犬病的野毒感染。该试纸条操作便捷，不需要仪器设备，结果判读简单，能够满足基层组织、农户对于重大疫病诊断的需求，对猪口蹄疫、伪狂犬病防控具有重要意义。

