



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106841608 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201611186051.3

(22)申请日 2016.12.20

(71)申请人 江苏雷森生物科技有限公司

地址 221116 江苏省徐州市铜山区大学路
99号高新区大学创业园B区六层

(72)发明人 秦雷 朱丹丹 张旭东 陈芳
沙森 许席席 彭雪婷 秦允震
卓雨晴 谭影影

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

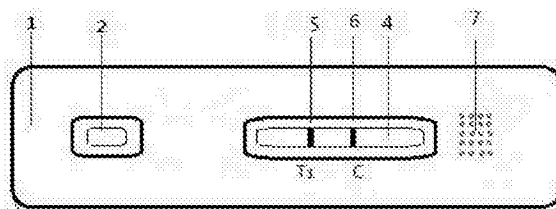
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种快速确诊猫白血病的检测方法及其试纸条的制备

(57)摘要

本发明提供了一种用于猫白血病的快速确诊的检测方法及其试纸条的制备,本发明以猫白血病病毒(Feline leukemia virus,简称FeLv)为目标物,以化学共价偶联法制备了相应的,应用荧光标记的免疫层析方法于猫白血病病毒检测中。本发明提供的用于猫白血病病毒快速检测的试纸条,灵敏度高,可得出阴性/阳性结果同时还会定量给出样品中猫白血病病毒的含量,测试结果更为清晰且稳定性较高,可在室温下保存较长时间。



1. 一种荧光微球标记的抗体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将定量的荧光乳胶微球溶液加到缓冲溶液中稀释,超声1.5min,得到荧光微球分散液。

(2) 向步骤(1)中的荧光乳胶微球分散液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

(3) 活化结束后,将步骤(2)中的荧光乳胶微球分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用步骤(1)中的缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用步骤(4)中缓冲溶液复溶重悬。

(4) 取FeLV单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

(5) 将步骤(3)中复溶的纳米颗粒分散液加入到步骤(4)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

(6) 反应结束后,将步骤(5)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

(7) 将步骤(6)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到荧光微球标记的抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种荧光微球标记的抗体的制备方法,其特征在于:步骤(1)的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为7.2。

3. 根据权利要求1一种荧光微球标记的抗体的制备方法,其特征在于:步骤(2)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

4. 根据权利要求1所述的一种荧光微球标记的抗体的制备方法,其特征在于:步骤(3)中复溶的缓冲溶液以及步骤(4)的缓冲溶液均是硼酸缓冲溶液,其pH值为7.8。

5. 根据权利要求1所述的一种荧光微球标记的抗体的制备方法,其特征在于:荧光微球可以是一种金属胶体颗粒、一种磁颗粒,包括但不限于乳胶纳米颗粒。

6. 一种使用权利要求1~5任何一项所述制备方法制备种荧光微球标记的抗体制备的试纸条其特征在于,试剂盒的结构如图1所示:在塑料底板(1)一端粘贴样品垫(2),样品垫的一端紧密压接喷涂有荧光微球标记的毛白血病病毒抗体的结合垫(3),结合垫(3)一端紧密压接硝酸纤维素NC膜(4),NC膜上包被有检测线T1(5)和质控线C(6),NC膜的另一端连接吸水垫(7)形成试纸,试纸装入塑料卡壳内形成试纸卡。

7. 一种使用权利要求1~6任何一项所述制备方法制备的荧光微球标记的抗体制备的试纸条,包括以下步骤:

(1) (1) 抗体标记的荧光微球中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

(2) 将步骤(1)中的抗体标记的荧光微球溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在烘箱中37℃下烘干1h。

(3) 将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃下在烘箱中烘干1h。

(4) 组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

8. 根据权利要求7所述的荧光微球标记的抗体制备的试纸条,其特征在于:步骤(2)中标记抗体荧光微球溶液的浓度为1.5mg/mL,涂覆量为5μL/cm。

9. 根据权利要求6所述的荧光微球标记的抗体制备的试纸条, 其特征在于: 步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠 IgG 多克隆抗体, 涂覆量为 $0.9\mu\text{L}/\text{cm}$; 检测线包被的抗体为 FeLv 单克隆抗体, 涂覆量为 $0.9\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

10. 如权利要求1~5任一项所述的制备方法制备的荧光微球标记的抗体在猫白血病病毒检测中的应用。

11. 如权利要求6~9任一项所述的试纸条在猫白血病病毒检测中的应用。

一种快速确诊猫白血病的检测方法及其试纸条的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于猫白血病的快速确诊的检测方法及其试纸条的制备,属于医学检验领域。

背景技术

[0002] 猫白血病病毒 (FeLV) 世界性猫感染的常见原因,并伴随有较高的发病率和死亡率。猫白血病的常发病症有恶性淋巴瘤、骨髓性白血病以及变性性胸腺萎缩和非再生性贫血等,其中对猫最严重的是恶性淋巴瘤。猫白血病病毒 (FeLV) 的特征在于会引发猫的终生感染,早期并不会出现明显的症状,随之会出现持续性的病毒血症,后期治疗十分困难,最终会产生致命的结果。在发病早期准确确诊猫白血病并及时给予治疗,是治愈猫白血病的最佳选择。持续性感染的病猫成为了猫白血病病毒 (FeLV) 的直接传染源,其唾液、粪便、尿、乳汁、鼻腔分泌物均含有病毒,通过呼吸道、消化道传染到健康猫。将确诊的病猫隔离是控制猫白血病病毒 (FeLV) 的有效途径。因此,一种快速准确确诊猫白血病的检测方法是控制和治疗猫白血病的关键。

[0003] 猫白血病早期症状不明显,仅仅根据临床症状很难确诊,要确诊猫白血病,有效的检测方法必不可少。目前,常用的检测法有:血常规检查、病理切片、酶联免疫吸附、免疫胶体金技术等方法检测病猫组织中的FeLV。其中血常规检查和病理切片检测检测时间较长,起不到快速诊断的效果。酶联免疫吸附的检测成本相对较高,并且在检测过程中影响因素较多,易出现假阳性结果,对于猫白血病的检测,酶联免疫吸附法准确度欠佳。同时,胶体金检测信号较弱、灵敏度低等限制了其应用。因此需要一种稳定的,易操作,耗时短、灵敏度高的检测方法用于猫白血病的确诊。

发明内容

[0004] 基于此,本发明的目的在于一种易操作,耗时短、灵敏度高、定量检测猫白血病病毒的方法及其试纸的制备,实现猫白血病早期病毒的快速检测。此方法采用荧光定量侧向免疫层析原理检测猫全血,血浆,血清,唾液或眼泪中的猫白血病病毒 (FeLV)。本发明所述的抗体标记的荧光微球可以是一种金属胶体颗粒、一种磁颗粒,包括但不限于乳胶纳米颗粒。此荧光微球标记的抗体,以荧光乳胶微球为例的制备方法,包括以下步骤:

[0005] (1) 将定量的荧光乳胶微球溶液加到缓冲溶液中稀释,超声1.5min,得到荧光微球分散液。

[0006] (2) 向步骤(1)中的荧光乳胶微球分散液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

[0007] (3) 活化结束后,将步骤(2)中的荧光乳胶微球分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用步骤(1)中的缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用步骤(4)中缓冲溶液复溶重悬。

[0008] (4) 取FeLV单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

[0009] (5) 将步骤(3)中复溶的纳米颗粒分散液加入到步骤(4)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0010] (6) 反应结束后,将步骤(5)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0011] (7) 将步骤(6)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到荧光微球标记的抗体。

[0012] 步骤(1)的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为7.2。

[0013] 步骤(2)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

[0014] 步骤(3)中复溶的缓冲溶液以及步骤(4)的缓冲溶液均是硼酸缓冲溶液,其pH值为7.8。

[0015] 本发明还提供了一种基于上述方法制备的荧光微球标记的抗体的试纸条,其特征在于,试剂盒的结构如图1所示:在塑料底板(1)一端粘贴样品垫(2),样品垫的一端紧密压接喷涂有荧光微球标记的猫白血病病毒抗体的结合垫(3),结合垫(3)一端紧密压接硝酸纤维素NC膜(4),NC膜上包被有检测线T1(5)和质控线C(6),NC膜的另一端连接吸水垫(7)形成试纸,试纸装入塑料卡壳内形成试纸卡。包括以下组装步骤:

[0016] (1) 抗体标记的荧光微球中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

[0017] (2) 将步骤(1)中的抗体标记的荧光微球溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在烘箱中37℃下烘干1h。

[0018] (3) 将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃下在烘箱中烘干1h。

[0019] (4) 组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

[0020] 步骤(2)中标记抗体荧光微球溶液的浓度为1.5mg/mL,涂覆量为5μL/cm。

[0021] 步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠IgG多克隆抗体,涂覆量为0.9μL/cm;检测线包被的抗体为FeLv单克隆抗体,涂覆量为0.9μL/cm。

[0022] 本发明提供了此猫白血病病毒检测试纸条的使用方法:

[0023] (1) 使用移液器,取定量体积的猫血清、血浆、全血或唾液样品加入到样品稀释液中,充分混合后,取定量体积的测试液加入到试纸条的加样槽中,使用配套荧光定量检测仪器,15min后打印检测报告,可得出阴性/阳性结果同时还会定量给出样品中猫白血病病毒的含量。

[0024] 本发明提供了上述制备方法制备的试纸条在猫白血病检测中的应用。

[0025] 相对于现有技术,本发明提出猫白血病的检测方法及其试纸条,有以下优势:

[0026] (1) 本发明所述的抗体标记的方法是利用荧光微球表面的功能基团,采用化学共价键合的方式与抗体结合,使得抗体标记的荧光微球更为稳定。

[0027] (2) 本发明所述试纸用于猫白血病检测时,使用配套的荧光定量检测仪器,仅在15分钟内即可得到准确的结果,大大节约了检测时间。

[0028] (3) 本发明所述试纸用于猫白血病检测时,比起胶体金、酶联免疫吸附法可准确地定量地测出猫白血病病毒(FeLv)的量。

[0029] (4) 本发明所述试纸用于猫白血病检测时,最低检测限可达到4ng/mL,灵敏度高于胶体金、酶联免疫吸附法。

附图说明

[0030] 本发明的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明中的示意实施例用于说明本发明,并不对本发明构成限定。

[0031] 图1为本发明内容中猫白血病病毒检测试纸条的结构示意图。

[0032] 图2为本发明实施例一中的荧光微球标记抗体的单分散性验证结果。

[0033] 图3为本发明实施例一中的荧光微球标记的抗体的荧光稳定性验证结果。

具体实施方式

[0034] 以下对本发明进行详细说明,但不用来限制本发明的范围。

[0035] 实施例一

[0036] 一种用于猫白血病检测的荧光微球标记的抗体的荧光稳定性验证,包括以下步骤:

[0037] (1) 将定量的荧光乳胶微球溶液加到缓冲溶液中稀释,超声1.5min,得到荧光微球分散液。

[0038] (2) 向步骤(1)中的荧光乳胶微球分散液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

[0039] (3) 活化结束后,将步骤(2)中的荧光乳胶微球分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用步骤(1)中的缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用步骤(4)中缓冲溶液复溶重悬。

[0040] (4) 取FeLv单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

[0041] (5) 将步骤(3)中复溶的纳米颗粒分散液加入到步骤(4)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0042] (6) 反应结束后,将步骤(5)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0043] (7) 将步骤(6)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到抗体标记的荧光微球。

[0044] 步骤(1)的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为7.2。

[0045] 步骤(2)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

[0046] 步骤(3)中复溶的缓冲溶液以及步骤(4)的缓冲溶液均是硼酸缓冲溶液,其pH值为7.8。

[0047] 本发明还提供了一种基于上述方法制备的荧光微球标记的抗体的试纸条,包括以下组装步骤:

[0048] (1) 抗体标记的荧光微球中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

[0049] (2) 将步骤(1)中的抗体标记的荧光微球溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在

烘箱中37℃下烘干1h。

[0050] (3) 将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃下在烘箱中烘干1h。

[0051] (4) 组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

[0052] 步骤(2)中标记抗体荧光微球溶液的浓度为2mg/mL,涂覆量为5μL/cm。

[0053] 步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠IgG多克隆抗体,稀释倍数为11倍,涂覆量为0.9μL/cm;检测线包被的抗体为FeLv单克隆抗体,稀释倍数为10倍,涂覆量为0.9μL/cm。

[0054] 分别在不同时段用配套的荧光定量检测仪器测定荧光微球的荧光值。

[0055] 实验结果。

[0056] 1. 所制备的抗体标记的荧光微球单分散性的验证:此荧光微球分散液可在4℃下保存,分散状态稳定,一周后也未发现沉淀,如图1所示。长期静置,出现的沉淀只需移液器吸打数次或适当超声,使用物理剪切力即可快速重新单分散。

[0057] 2. 制备的荧光微球标记的抗体的荧光稳定性表征,如图2所示,随之时间变化,荧光微球标记的抗体的荧光总量并未发生差异性变化,此荧光微球标记的抗体具有良好的荧光稳定性。

[0058] 实施例二

[0059] 一种用于猫白血病病毒快速检测的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0060] (1) 将定量的荧光乳胶微球溶液加到缓冲溶液中稀释,超声1.5min,得到荧光微球分散液。

[0061] (2) 向步骤(1)中的荧光乳胶微球分散液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

[0062] (3) 活化结束后,将步骤(2)中的荧光乳胶微球分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用步骤(1)中的缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用步骤(4)中缓冲溶液复溶重悬。

[0063] (4) 取FeLv单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

[0064] (5) 将步骤(3)中复溶的纳米颗粒分散液加入到步骤(4)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0065] (6) 反应结束后,将步骤(5)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0066] (7) 将步骤(6)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到抗体标记的荧光微球。

[0067] 步骤(1)的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为7.2。

[0068] 步骤(2)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

[0069] 步骤(3)中复溶的缓冲溶液以及步骤(4)的缓冲溶液均是硼酸缓冲溶液,其pH值为7.8。

[0070] 本发明还提供了一种基于上述方法制备的抗体标记的荧光微球的试纸条,包括以下组装步骤:

[0071] (4) 抗体标记的荧光微球中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

[0072] (5) 将步骤(1)中的抗体标记的荧光微球溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在烘箱中37℃下烘干1h。

[0073] (6) 将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃下在烘箱中烘干1h。

[0074] (7) 组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

[0075] 步骤(2)中标记抗体荧光微球溶液的浓度为2mg/mL,涂覆量为5 μ L/cm。步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠IgG多克隆抗体,稀释倍数为11倍,涂覆量为0.9 μ L/cm;检测线包被的抗体为FeLv单克隆抗体,稀释倍数为10倍,涂覆量为0.9 μ L/cm。

[0076] 本发明提供了此猫白血病病毒检测试纸条的使用方法:

[0077] (1) 使用移液器,取定量体积的猫血清、血浆、全血或唾液样品加入到样品稀释液中,充分混合后,取定量体积的测试液加入到试纸条的加样槽中,使用配套荧光定量检测仪器,15min后打印检测报告,可得出阴性/阳性结果同时还会定量给出样品中猫白血病病毒的含量。

[0078] 实验与验证结果

[0079] 1. 使用本案例猫白血病病毒快速检测的试纸条测定50份临床样本,区间判定结果和样本值的符合率为98.6%。如图3为阴性和阳性的两组平行测试结果,两组测试结果均完全符合临床结果。本发明所述的猫白血病病毒快速检测的试纸条可以灵敏地定量检测样品中的猫白血病病毒。

[0080] 2. 使用本案例猫白血病病毒快速检测的试纸条的稳定性验证:组装后的试纸条,分别在两周、四周、八周后取出,取同样的测试样品检测,检测结果CV%较低,表明此试纸条具有良好的稳定性。

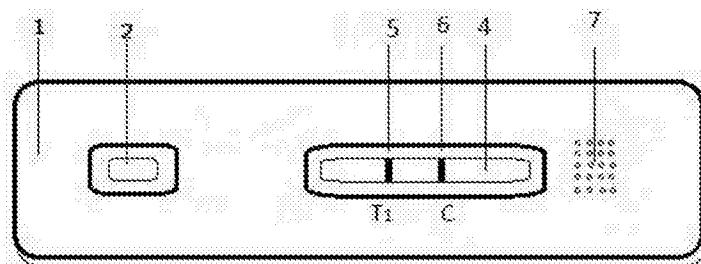


图1

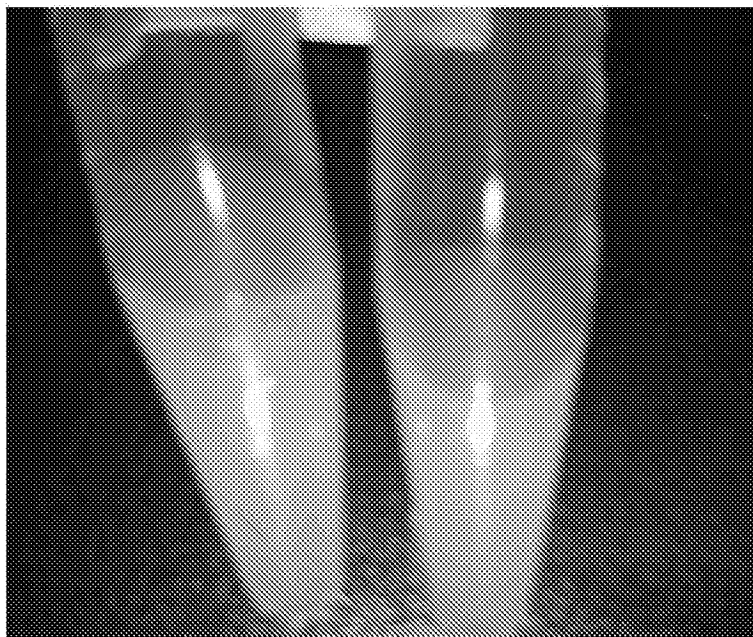


图2

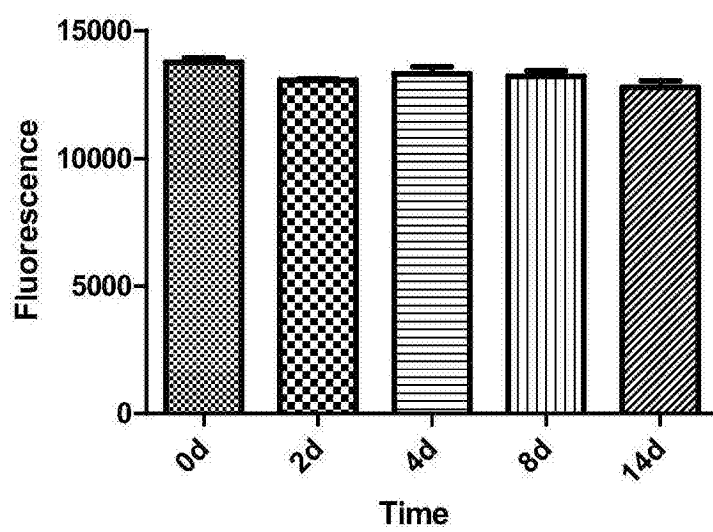


图3

专利名称(译)	一种快速确诊猫白血病的检测方法及其试纸条的制备		
公开(公告)号	CN106841608A	公开(公告)日	2017-06-13
申请号	CN201611186051.3	申请日	2016-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	江苏雷森生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏雷森生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏雷森生物科技有限公司		
[标]发明人	秦雷 朱丹丹 张旭东 陈芳 沙森 许席席 彭雪婷 秦允震 卓雨晴 谭影影		
发明人	秦雷 朱丹丹 张旭东 陈芳 沙森 许席席 彭雪婷 秦允震 卓雨晴 谭影影		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/533 G01N2333/15		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于猫白血病的快速确诊的检测方法及其试纸条的制备，本发明以猫白血病病毒(Feline leukemia virus，简称FeLv)为目标物，以化学共价偶联法制备了相应的，应用荧光标记的免疫层析方法于猫白血病病毒检测中。本发明提供的用于猫白血病病毒快速检测的试纸条，灵敏度高，可得出阴性/阳性结果同时还会定量给出样品中猫白血病病毒的含量，测试结果更为清晰且稳定性较高，可在室温下保存较长时间。

