



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109765366 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(21)申请号 201910096803.4

(22)申请日 2019.01.31

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730000 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 陈豪泰 张永光 孙跃峰 祁林林
张杰 潘丽

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

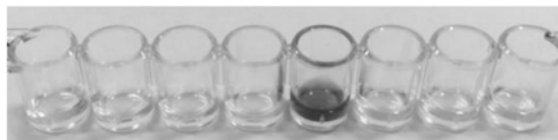
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法,涉及酶联免疫技术领域,所述试剂盒包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被。本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒3AB的抗体,具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点,该方法操作简便、快速、成本低廉,可以在室温下可视化检测,适合于在临床应用中进行推广,为口蹄疫病毒3AB抗体的快速检测提供可靠的技术手段。



1. 一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒,其特征在于,包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述口蹄疫病毒3AB蛋白的包被浓度为1~2 μ g/mL。
3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括洗涤液、血清稀释液、底物显色液、终止液、标准阳性血清和标准阴性血清。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述洗涤液包括磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液中含有质量分数为0.03~0.08%的吐温-20,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。
5. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述血清稀释液包括磷酸盐缓冲液,所述缓冲液中含有脱脂奶粉,所述脱脂奶粉的浓度为45~55g/L。
6. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述底物显色液包括TMB溶液。
7. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述所述终止液包括SDS溶液或硫酸溶液。
8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗。
9. 利用权利要求1~8任一项所述的试剂盒非诊断目的地检测口蹄疫病毒3AB抗体的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - 1) 将所述血清稀释液以体积比1:40稀释血清样本,得到稀释血清;
 - 2) 向所述酶标板的孔中加入步骤1)得到的稀释血清,在15~30 $^{\circ}$ C下孵育0.5~1.5h,弃去孔中的液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第一拍干酶标板;
 - 3) 向步骤2)得到的第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗,在15~30 $^{\circ}$ C下孵育0.5~1.5h,弃去孔中液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第二拍干酶标板;
 - 4) 向步骤3)得到的第二拍干酶标板的孔中加入底物显色液,在15~30 $^{\circ}$ C下避光显色15~25min,当孔中的颜色为蓝色时,检测到口蹄疫病毒3AB抗体,当孔中的颜色为无色时,未检测到口蹄疫病毒3AB抗体。
10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述酶标二抗经磷酸盐缓冲液稀释20000倍后,加入孔中。

一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫技术领域,具体涉及一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫是一种由口蹄疫病毒(FMDV)所致的急性的、热性的、高度接触性传染病,主要侵害偶蹄兽,经常在羊、牛、猪等动物中传播。发病时易感动物的唇和蹄部出现水疱,同时伴有发烧、食欲不振等症状,患病动物体重和产奶量大幅下降。口蹄疫病毒易通过空气传播,传染性强,流行快速,易感动物在抵抗力较弱的情况下也会导致死亡,给养殖户造成巨大的经济损失,严重阻碍了养殖业的发展。

[0003] 目前对于口蹄疫病毒3AB抗体的诊断方法和疫苗免疫效果的评价方法只能在实验室完成,不适合基层检测,需要建立更为灵敏、快捷和简便的可视化的检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法。本发明提供的试剂盒能够简便、快速及准确检测口蹄疫病毒3AB抗体,无需借助实验室的仪器和设备,更加适合基层检测。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒,包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被。

[0007] 优选地,所述口蹄疫病毒3AB蛋白的包被浓度为1~2 μ g/mL。

[0008] 优选地,所述试剂盒还包括洗涤液、血清稀释液、底物显色液、终止液、标准阳性血清和标准阴性血清。

[0009] 优选地,所述洗涤液包括磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液中含有质量分数为0.03~0.08%的吐温-20,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。

[0010] 优选地,所述血清稀释液包括磷酸盐缓冲液,所述缓冲液中含有脱脂奶粉,所述脱脂奶粉的浓度为45~55g/L。

[0011] 优选地,所述底物显色液包括TMB溶液。

[0012] 优选地,所述终止液包括SDS溶液或硫酸溶液。

[0013] 优选地,所述酶标二抗包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗。

[0014] 本发明还提供了上述技术方案所述的试剂盒非诊断目的地检测口蹄疫病毒3AB抗体的方法,包括以下步骤:

[0015] 1) 将所述血清稀释液以体积比1:40稀释血清样本,得到稀释血清;

[0016] 2) 向所述酶标板的孔中加入步骤1)得到的稀释血清,在15~30 $^{\circ}$ C下孵育0.5~1.5h,弃去孔中的液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第一拍干酶标板;

[0017] 3) 向步骤2)得到的第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗,在15~30 $^{\circ}$ C下

孵育0.5~1.5h,弃去孔中液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第二拍干酶标板;

[0018] 4)向步骤3)得到的第二拍干酶标板的孔中加入底物显色液,在15~30℃下避光显色15~25min,当孔中的颜色为蓝色时,检测到口蹄疫病毒3AB抗体,当孔中的颜色为无色时,未检测到口蹄疫病毒3AB抗体。

[0019] 优选地,所述酶标二抗经磷酸盐缓冲液稀释20000倍后,加入孔中。

[0020] 本发明提供了一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒,包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被。在本发明中,当动物感染口蹄疫病毒以后,产生3AB抗体,通过检测3AB抗体来达到检测目的。

[0021] 本发明实施例的结果显示:本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒3AB的抗体,具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点,该方法操作简便、快速、成本低廉,可以在室温下可视化检测,适合于在临床应用中推广,为口蹄疫病毒3AB抗体的快速检测提供可靠的技术手段。

附图说明

[0022] 图1为本发明提供的试剂盒检测结果,其中,从左到右,1,猪瘟病血清;2,乙脑病毒血清;3,猪圆环病毒血清;4,猪细小病毒血清;5,口蹄疫病毒血清;6,伪狂犬病毒血清;7,蓝耳病病毒血清;8,猪流感血清。

具体实施方式

[0023] 本发明提供了一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒,包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被。

[0024] 在本发明中,所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被,所述包被的浓度优选为1~2 μg/mL。本发明对所述包被采用的方法没有特殊限定,采用常规包被即可。

[0025] 在本发明中,所述酶标板优选经浓度为50g/L的脱脂奶粉溶液封闭。

[0026] 在本发明中,所述酶标二抗优选包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗,所述猪的酶标二抗或牛的酶标二抗优选为商品化的产品。

[0027] 在本发明中,所述试剂盒还优选包括洗涤液、血清稀释液、底物显色液、终止液、阳性血清和阴性血清。

[0028] 在本发明中,所述洗涤液优选包括磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液中含有质量分数优选为0.03~0.08%的吐温-20,更优选为0.05%;所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。

[0029] 在本发明中,所述血清稀释液优选包括磷酸盐缓冲液,所述缓冲液中含有脱脂奶粉,所述脱脂奶粉的浓度优选为45~55g/L,更优选为50g/L。

[0030] 在本发明中,所述底物显色液优选包括TMB溶液,本发明对所述TMB溶液的浓度没有特殊限定,采用常规底物显色时,所需的TMB浓度即可。

[0031] 在本发明中,所述终止液优选包括SDS溶液或硫酸溶液。本发明对所述SDS溶液或硫酸溶液的浓度没有特殊限定,采用常规终止酶联免疫反应中所需的浓度即可。

[0032] 在本发明中,所述标准阳性血清优选为感染口蹄疫的血清,所述标准阴性血清优选为健康动物的血清。在本发明实施例中,所述标准阴性血清优选为A型口蹄疫病毒阴性血清;标准阳性血清优选为A型口蹄疫病毒阳性血清。

[0033] 本发明还提供了上述技术方案所述的试剂盒非诊断目的地检测口蹄疫病毒3AB抗体的方法,包括以下步骤:

[0034] 1) 将所述血清稀释液以体积比1:40稀释血清样本,得到稀释血清;

[0035] 2) 向所述酶标板的孔中加入步骤1)得到的稀释血清,在15~30℃下孵育0.5~1.5h,弃去孔中的液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第一拍干酶标板;

[0036] 3) 向步骤2)得到的第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗,在15~30℃下孵育0.5~1.5h,弃去孔中液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第二拍干酶标板;

[0037] 4) 向步骤3)得到的第二拍干酶标板的孔中加入底物显色液,在15~30℃下避光显色15~25min,当孔中的颜色为蓝色时,检测到口蹄疫病毒3AB抗体,当孔中的颜色为无色时,未检测到口蹄疫病毒3AB抗体。

[0038] 本发明将所述血清稀释液以体积比1:40稀释血清样本,得到稀释血清。

[0039] 本发明向所述酶标板的孔中加入得到的稀释血清,在15~30℃下孵育0.5~1.5h,弃去孔中的液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第一拍干酶标板。

[0040] 在本发明中,所述酶标板的孔中加入稀释血清的量优选为100 μ L。

[0041] 在本发明中,所述酶标板的孔中加入稀释血清后进行孵育,所述孵育的温度为15~30℃,优选为18~28℃,更优选为20~25℃;所述孵育的时间为0.5~1.5h,优选为1.8~1.2h,最优选为1h。

[0042] 在本发明中,所述洗涤的次数优选为3次。

[0043] 本发明向得到的第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗,在15~30℃下孵育0.5~1.5h,弃去孔中液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第二拍干酶标板。

[0044] 在本发明中,所述第一酶标板的孔中,加入稀释后的酶标二抗的量优选为100 μ L。在本发明中,所述酶标二抗优选用磷酸盐缓冲液进行稀释,稀释倍数优选为20000倍。

[0045] 在本发明中,所述第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗进行孵育,所述孵育的温度为15~30℃,优选为18~28℃,更优选为20~25℃;所述孵育的时间为0.5~1.5h,优选为0.8~1.2h,最优选为1h。

[0046] 在本发明中,所述洗涤的次数优选为3次。

[0047] 本发明向得到的第二拍干酶标板的孔中加入底物显色液,在15~30℃下避光显色15~25min,当孔中的颜色为蓝色时,检测到口蹄疫病毒3AB抗体,当孔中的颜色为无色时,未检测到口蹄疫病毒3AB抗体。

[0048] 在本发明中,所述底物显色液的加入量优选为100 μ L/孔。在本发明中,所述显色的温度优选为15~30℃,更优选为18~28℃,最优选为20~25℃;所述显色的时间优选为18~23min,更优选为20min。

[0049] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0050] 实施例1

[0051] 1、样品稀释液、洗涤液、终止液的配制

[0052] 包被液为0.05M碳酸盐缓冲液:Na₂CO₃1.59g,NaHCO₃2.93g,加蒸馏水定容至

1000mL, pH为9.6;

[0053] 样品稀释液为含50g/L脱脂奶粉的洗涤液;

[0054] 洗涤液为含0.05%Tween-20的0.01M pH为7.2的磷酸盐缓冲液,其配方为:

[0055] NaCl:8.5g, NaH₂PO₄·2H₂O:0.356g, NaH₂PO₄·12H₂O:2.772g, 将其混合后,再用蒸馏水溶解并定容至1000mL,再向其中加入0.5mL吐温-20得到上述洗涤液;

[0056] 终止液为:配置1%SDS溶液。

[0057] 2、抗原的最适包被浓度和血清的最适稀释度的确定

[0058] 结果显示当抗原的稀释度为2.0μg/mL每孔,血清以1:40倍稀释,酶标二抗以1:20000倍稀释。

[0059] 3、作用时间的优化

[0060] 抗原的最佳封闭时间为20min,血清反应时间为1h,酶标二抗最佳孵育时间为40min,最佳显色时间为20min。

[0061] 4. 操作程序的确定

[0062] 按照以上各项所确定的最佳操作条件,确定的操作程序为:取出已包被并封闭好的ELISA板条,用血清稀释液将待检血清做1:40倍稀释,加入酶标板各孔,每孔100μL,各加一孔,A型口蹄疫病毒阴性、阳性血清各加两孔(阳性血清和阴性血清分别为感染口蹄疫的血清和健康动物血清,分别用PBS稀释100倍),室温作用1h;弃去孔内液体,每孔用洗涤液洗3次并拍打,弃尽孔内液体;每孔加入100μL酶标二抗,室温作用1h;弃去孔内液体,每孔用洗涤液洗涤3次并拍打,弃尽孔内液体;每孔加入100μLTMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物显色液后,室温避光显色20min,加入100μLSDS终止液;肉眼观察颜色,蓝色为阳性,无色为阴性。

[0063] 实施例2

[0064] 试剂盒的特异性试验:

[0065] 按实施例1建立的方法分别检测已知的猪流感病毒、猪瘟病毒、乙脑病毒、猪圆环病毒、猪细小病毒、伪狂犬病毒、蓝耳病病毒和口蹄疫病毒3AB阳性血清样品,阴性为无色,阳性为蓝色。结果见图1。

[0066] 根据图1可知,采用本发明提供的试剂盒能够准确检测口蹄疫,与其它病毒无交叉反应,具有特异性。

[0067] 由以上实施例可以得出,本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒3AB的抗体,具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点,该方法操作简便、快速、成本低廉,可以在室温下可视化检测,适合于在临床应用中进行推广,为口蹄疫病毒3AB抗体的快速检测提供可靠的技术手段。

[0068] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

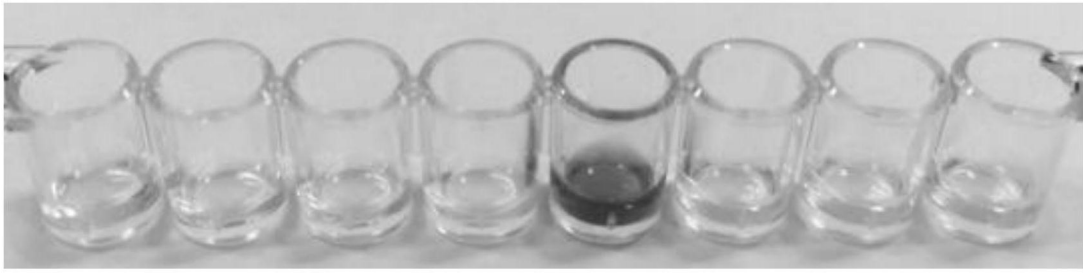


图1

专利名称(译)	一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN109765366A	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201910096803.4	申请日	2019-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	陈豪泰 张永光 孙跃峰 祁林林 张杰 潘丽		
发明人	陈豪泰 张永光 孙跃峰 祁林林 张杰 潘丽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/68 G01N21/78		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测口蹄疫病毒3AB抗体的试剂盒及其检测方法，涉及酶联免疫技术领域，所述试剂盒包括酶标板和酶标二抗；所述酶标板经口蹄疫病毒3AB蛋白包被。本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒3AB的抗体，具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点，该方法操作简便、快速、成本低廉，可以在室温下可视化检测，适合于在临床应用中推广，为口蹄疫病毒3AB抗体的快速检测提供可靠的技术手段。

