



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108414753 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810417751.1

(22)申请日 2018.05.04

(71)申请人 广州敏捷生物技术有限公司
地址 510000 广东省广州市黄埔区瑞和路
39号G2栋601

(72)发明人 汤永平 梁展鹏

(74)专利代理机构 广州市科丰知识产权代理事
务所(普通合伙) 44467
代理人 王海曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

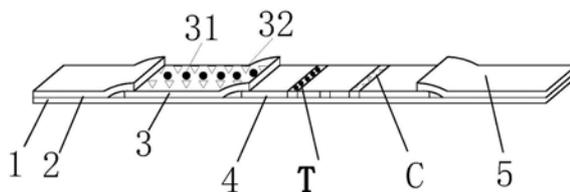
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析
检测卡与制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法;旨在提供一种灵敏度高,检测结果可靠的用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡;其技术要点包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的CPV单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被抗CPV单克隆抗体的检测T线;属于动物疫病检测领域。



1. 一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,包括底板(1),在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于,所述结合垫(3)上设有荧光微球标记的CPV单克隆抗体(31)和荧光微球标记的羊抗鸡IgY(32),所述的硝酸纤维膜(4)设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CPV单克隆抗体的检测T线。

2. 根据权利要求1所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,还包括样品稀释瓶(6)。

3. 根据权利要求2所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,其特征在于,所述样品稀释瓶(6)内装有样品稀释液,所述样品稀释液为含0.8% S21、0.03% Proclin 300的0.01M的pH7.4磷酸盐缓冲液。

4. 制备权利要求1所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的方法,在底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维膜(4)和吸水垫(5),其特征在于:

A) 所述的样品垫的制备方法为:

1) 配制样品垫处理液:含1% BSA、0.1% S9和0.05% Proclin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液;

2) 将步骤1)中制备的缓冲液10 μ L/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上;

B) 所述的结合垫(3)的制备方法为:

1) 将用荧光微球标记的CPV单克隆抗体和用荧光微球标记的羊抗鸡IgY按照体积比20:1混合均匀,超声2s,间歇5s,重复3次;

2) 按3.5 μ L/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

C) 所述的反应膜的制备方法为:

1) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

2) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液将CPV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T检测线工作液;

3) 取底板(1)粘贴硝酸纤维膜;

4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

5. 根据权利要求2所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,荧光微球标记的CPV单克隆抗体的制备方法为:

1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL 0.1M MES缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入500 μ L淬灭剂,超声2s;

4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g CPV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

5) 封闭:加入2mL标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上

反应30min;

6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

6. 根据权利要求4所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,荧光微球标记的羊抗鸡IgY的制备方法为:

1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的标记缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

5) 封闭:加入500 μ L标记封闭液,封闭30min;

6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

7. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述的微球为含有稀土镧元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25 $^{\circ}$ C;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

8. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

9. 根据权利要求5或者6所述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,其特征在于,所述活化淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;所述标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;所述标记荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白、0.3%PVP、0.05%丙三醇、牛IgG、0.05%Tween-40和0.03%Proclin 300的0.05M pH 7.8Tris缓冲液。

用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种免疫荧光层析检测卡,具体地说,是一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,本发明还公开了该免疫荧光层析检测卡的制备方法。

背景技术

[0002] 犬细小病毒(CPV)主要感染犬,尤其幼犬,传染性极强,死亡率也高。一年四季均可发病,以冬、春多发。饲养管理条件骤变,长途运输,寒冷,拥挤均可促使本病发生。病犬是主要传染源,呕吐物、唾液、粪便中均有大量病毒。康复犬仍可长期通过粪便向外排毒。有证据表明人、虱、苍蝇和蟑螂可成为CPV的机械携带者。健康犬与病犬或带毒犬直接接触,或经污染的饲料和饮水通过消化道感染。

[0003] 临床上可根据血常规检测结果和本病的主要症状进行初步诊断。血常规检测红细胞压积增加,白细胞值正常或偏低,常提示病毒病。病犬排泄番茄汁样或酱油样带腥臭气味的血便是本病的特征性症状,可作为初诊依据。

[0004] 目前,最常应用的检测犬细小病毒(CPV)的方法是血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)及ELISA方法。其中HA试验最为经济,但是也存在缺点,一方面获取造价昂贵新鲜的红细胞比较困难,另一方面,该方法只适用于CPV感染后期样本检测,不适应近年来早期、快速检测的要求。ELISA方法则应用较多,但操作要求较高,并且还需要酶标仪判定结果,因此不适于基层使用。

[0005] 中国专利201310705249.8提供一种用于检测犬细小病毒的胶体金试纸条,所述胶体金试剂条包含:包被犬细小病毒抗原的多克隆抗体和二抗IgG两个条带的硝酸纤维膜;含有胶体金标记犬细小病毒抗原的单克隆抗体的玻璃纤维膜。但是该方法采用自制的犬细小病毒抗原的多克隆抗体作为包被抗体,可能存在与其他同类病毒的交叉反应,特异性欠佳。另外该专利采用传统的胶体金层析技术,免疫标记物依靠静电吸附,存在灵敏度较低、难以定量、重复性和稳定性较差等缺陷,无法完全满足临床的检测需求。

发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种灵敏度高,检测结果重现性的用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡。

[0007] 本发明的第二个目的是提供上述检测试剂卡的制备方法。

[0008] 为此,本申请提供的第一个技术方案是这样的:

[0009] 一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,包括底板,在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,所述结合垫上设有荧光微球标记的CPV单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY,所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CPV单克隆抗体的检测T线。

[0010] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,还包括样品稀释瓶。

[0011] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述样品稀释瓶内装有样品稀释液,所述样品稀释液为含0.8% S21、0.03% Proclin 300的0.01M的pH7.4磷酸盐缓冲液。

[0012] 本申请提供的第二个技术方案是这样的:

[0013] 一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在底板上依次衔接有样品垫结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫,其中:

[0014] A) 所述的样品垫的制备方法为:

[0015] 1) 配制样品垫处理液:含1% BSA、0.1% S9和0.05% Proclin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液;

[0016] 2) 将步骤1)中制备的缓冲液10 μ L/cm的浓度喷涂于玻璃纤维上;

[0017] B) 所述的结合垫的制备方法为:

[0018] 1) 将用荧光微球标记的CPV单克隆抗体和用荧光微球标记的羊抗鸡IgY按照体积比20:1混合均匀,超声2s,间歇5s,重复3次;

[0019] 2) 按5.0 μ L/cm、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0020] C) 所述的反应膜的制备方法为:

[0021] 1) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C质控线工作液;

[0022] 2) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液将CPV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T检测线工作液;

[0023] 3) 取底板粘贴硝酸纤维膜;

[0024] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm;

[0025] 5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜。

[0026] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记的CPV单克隆抗体的制备方法为:

[0027] 1) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL 0.1M MES缓冲液,加入荧光微球1mg,涡旋混匀;

[0028] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0029] 3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入5000 μ L淬灭剂,超声2s;

[0030] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20-200 μ g CPV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0031] 5) 封闭:加入2mL标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

[0032] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

[0033] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,荧光微球标记的羊抗鸡IgY的制备方法为:

[0034] 1) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的标记缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

[0035] 2) 微球的活化:在上述离心管中加入20 μ L-50 μ L标记活化剂A和20 μ L-50 μ L标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0036] 3) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

[0037] 4) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入100 μ g羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0038] 5) 封闭:加入500 μ L标记封闭液,封闭30min;

[0039] 6) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入2mL标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

[0040] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述的微球为含有稀土镧元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25 $^{\circ}$ C;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0041] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

[0042] 进一步的,上述的一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,所述活化淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液;所述标记封闭液为含3%牛血清白蛋白的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液;所述标记荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白、0.3%PVP、0.05%丙三醇、牛IgG、0.05%Tween-40和0.03%Proclin 300的0.05M pH 7.8Tris缓冲液。与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有如下优点:

[0043] 1、本发明操作步骤简单,对样品预处理方法进行优化,只需要采集猫血清,稀释后加入到检测卡的加样孔中即可检测,检测速度快,10分钟出结果,结果即可定性观察又可定量测定,大大降低检测成本,减少工作量。

[0044] 2、本申请提供的技术方案,通过对样品垫处理液和标记荧光微球稀释液的优化,相比传统工艺,灵敏度明显高,最低检测限 (LOD) 可达到0.86ng/mL (原工艺1.56ng/mL),线性更好,剂量-反应曲线的决定系数由0.9874提升到0.9989。

[0045] 3、本申请提供的技术方案对结合垫、硝酸纤维素膜制备过程严格考究、优化,进一步提高了检测卡的精密度。

[0046] 4、本申请采用专用样品垫处理液,荧光微球释放更充分,;重复性好,低中高三个水平质控变异系数均低于10% (7.53%、6.45%和4.69%);另外缓冲液中加入生物防腐剂 Proclin 300,可以有效保持检测试剂的稳定性,并保护检测者不受常规防腐剂例如叠氮钠等的危害。

附图说明

[0047] 图1是本发明提供的检测试纸卡结构示意图;

[0048] 图2是本发明提供的检测试纸条结构示意图;

[0049] 图3是本发明提供的另一种检测试纸卡结构示意图;

[0050] 图4是本发明提供的检测卡判定结果为阳性时示意图;

[0051] 图5是本发明提供的检测卡判定结果为阴性示意图;

- [0052] 图6是本发明提供的检测卡判定结果为无效时一种示意图；
- [0053] 图7是本发明提供的检测卡判定结果为无效时另一种示意图；
- [0054] 图8是本申请提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。
- [0055] 图9是对比例提供的病毒抗原浓度检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施方式,对本发明的权利要求作进一步的详细说明。

[0057] 实施例1

[0058] 本发明提供一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图2,包括壳体7,所述的壳体7内设有用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述包括用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡包括底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记CPV单克隆抗体31和荧光微球标记的羊抗鸡IgY32,所述的硝酸纤维膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CPV单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条73,方便试剂卡的取出与放入。

[0059] 实施例2

[0060] 本申请提供的另一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,参阅图1至图3,包括盒体9,所述的盒体9内设有样品稀释液瓶6,吸管8以及检测卡,所述检测卡包括壳体7,所述的壳体7内设有用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡,所述包括用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡底板1,在底板1上依次衔接有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维膜4和吸水垫5,所述结合垫3上设有荧光微球标记CPV单克隆抗体31和荧光微球标记的羊抗鸡IgY32,所述的硝酸纤维膜4设有一条包被鸡IgY的质控C线,以及一条包被CPV单克隆抗体的检测T线。所述的壳体7上设有与样品垫2相适配的加样孔72,与结合垫3相适配的观察窗口71,所述的壳体7上表面还设有防滑条73,方便试剂卡的取出与放入。

[0061] 实施例3

[0062] 实施例1和实施例2提供的用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡的制备方法,在温度(18~26)℃、湿度≤30%的环境下进行装配,在底板1上依次衔接有硝酸纤维膜4、吸水垫5、结合垫3和样品垫2;将粘贴好的大板切成4.0mm宽的试纸条,装入塑料卡壳内,即CPV检测卡;将每一检测卡置于铝膜袋中,加入干燥剂1包,热合封口备用。

[0063] 具体制备方法如下:

[0064] 1.1结合垫的制备

[0065] 1.1.1检测T线抗体的标记

[0066] 1) 选择微球:微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25℃;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0067] 2) 稀释荧光微球:取一离心管,加入1mL 0.1M的MES标记缓冲液(2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入荧光微球1mg,涡旋混匀。

[0068] 3) 微球的活化:在上述离心管中加入(20-50)μL 50mg/mL标记活化剂A,涡旋混匀后加入(20-50)μL 50mg/mL标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0069] 所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

[0070] 4) 活化淬灭:将活化后的荧光微球20000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入2mL淬灭剂(含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液),超声2s;

[0071] 所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

[0072] 5) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入20 μ g CPV单克隆抗体,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0073] 6) 封闭:加入200.0 μ L标记封闭液,超声2s,间歇5s,重复3次,超声完成后置于旋转培养器上反应30min;

[0074] 所述的标记封闭液为含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液。

[0075] 7) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入600.0 μ L标记荧光微球稀释液,超声,工作2S,间歇5S,重复3次。

[0076] 所述荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.3%PVP、0.05%丙三醇、牛IgG、0.05%Tween-40和0.03%Proclin 300的0.05M pH 7.8Tris缓冲液。

[0077] 1.1.2质控C线抗体的标记

[0078] 1) 选择微球:微球为含有稀土铕元素的荧光错配物的聚苯乙烯微球;密度:1.05g/cm³;折射率:1.59@589nm,25 $^{\circ}$ C;直径300nm;功能基团:羧基;外观:白色。

[0079] 2) 稀释微球:取一离心管,加入1mL的标记缓冲液,取荧光微球1.0mg,涡旋混匀;

[0080] 3) 微球的活化:在上述离心管中加入(20-50) μ L 50mg/mL标记活化剂A,涡旋混匀后加入(20-50) μ L 50mg/mL标记活化剂B,旋转培养器上反应30min;

[0081] 所述标记活化剂A为含50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的0.05M的MES缓冲液;所述标记活化剂B为含50mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的0.05M MES缓冲液。

[0082] 4) 活化淬灭:将活化后的荧光微球19000g离心30min,弃上清,留取沉淀,加入1mL淬灭剂,90W超声,工作2s,间歇5s,重复1次;

[0083] 所述的淬灭剂为含0.25%甲醇的0.1M的MES缓冲液。

[0084] 5) 抗体的标记:在超声重悬后的荧光微球中加入0.1mg羊抗鸡IgY,涡旋混匀,置于旋转培养器上反应30min;

[0085] 6) 封闭:加入标记封闭液,封闭30min;

[0086] 所述的标记封闭液为含3%牛血清白蛋白(BSA)的0.04M pH 8.0乙醇胺溶液。

[0087] 7) 纯化:完成上述反应后,19000g离心30min,吸去上清,留取沉淀,加入1mL标记荧光微球稀释液,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次。

[0088] 所述荧光微球稀释液为含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.3%PVP、0.05%丙三醇、牛IgG、0.05%Tween-40和0.03%Proclin 300的0.05M pH 7.8Tris缓冲液。

[0089] 1.1.3喷膜

[0090] 1) 将玻璃纤维裁切为(10 \pm 1)mm \times (300 \pm 10)mm大小为结合垫;

[0091] 2) 将标记后的T、C线抗体按20:1(V:V)混合均匀,90W超声,工作2s,间歇5s,重复3次;

[0092] 3) 按5.0 μ L/cm²、0.02MPa喷至剪裁后的结合垫上;

[0093] 4) 喷完后,37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0094] 1.2反应膜的制备

[0095] 1) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液 (PBS) 将鸡IgY稀释到1mg/mL,即为C线工作液。

[0096] 2) 用含1%海藻糖的0.01M的磷酸盐缓冲液 (PBS) 将另一株CPV单克隆抗体稀释到1mg/mL,即为T线工作液。

[0097] 3) 取PVC底板,粘贴硝酸纤维膜。

[0098] 4) 在硝酸纤维膜上划T线和C线,划线浓度均为1 μ L/cm。

[0099] 5) 完成后将片材放置在37 $^{\circ}$ C干燥箱中干燥过夜(16~18)h。

[0100] 1.3样品垫制备

[0101] 1) 配制样品垫处理液:含1%BSA、0.1%S9和0.05%Proclin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液。

[0102] 2) 以10 μ L/cm的浓度将缓冲液喷涂于玻璃纤维上。

[0103] 对比试验

[0104] 将实施例3中的样品垫处理液含1%BSA、0.1%S9和0.05%Proclin 300的0.2M pH9.0硼酸盐缓冲液替换成含0.5%Tween-20、0.1%牛血清白蛋白、0.5%Trtion-100的50mM pH 8.010mmol/L Tris-HCl缓冲液;将标记荧光微球稀释液含1%牛血清白蛋白(BSA)、0.3%PVP、0.05%丙三醇、牛IgG、0.05%Tween-40和0.03%Proclin 300的0.05M pH 7.8Tris缓冲液替换为含2%BSA、0.1%PEG4000、5%海藻糖、5%蔗糖、0.05%叠氮钠的pH 8.010mmol/L Tris-HCl缓冲液,其它条件和工艺参数均不变。

[0105] 检测方法

[0106] 为了便于使用本申请提供的检测卡,下面给出本申请提供的检测卡提供两种检测方法。

[0107] 方法一:采用紫外灯照射,参阅图4至图7:用手持式紫外线灯照射观察窗口,当质控线和检测线都有量荧光出现时(图4),说明样品中CPV抗原为阳性;当只有质控线有荧光而检测线无荧光出现时(图5),说明样品中CPV抗原为阴性;质控线未出现荧光(图6、图7),则代表操作有误或检测结果无效,需重复试验。

[0108] 方法二:免疫荧光检测仪检测结果:

[0109] 1) 使用棉签采集病犬粪便;

[0110] 2) 取10 μ L加入含有1.0mL样品稀释液(含0.8%S21、0.03%Proclin 300的0.01M的pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)的样品管中,充分混匀;

[0111] 3) 取出检测卡,打开干式免疫荧光检测仪;

[0112] 4) 吸取稀释后的样本75 μ L,加入到检测卡的加样孔中,将检测卡放入到仪器的卡槽中,开始计时;

[0113] 5) 10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试;

[0114] 6) 荧光强度与样品中的CPV浓度成正比,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算,剂量反应曲线 $\text{Log}(Y) = 0.358\text{Log}(X) - 0.2443$, $R = 0.9983$ ($R^2 = 0.9967$),参阅图3。

[0115] 免疫荧光检测仪检测结果:

[0116] 1.线性范围

[0117] 1.1将CPV校准品用阴性血清分别稀释到0ng/mL、7.81ng/mL、31.25ng/mL、125ng/

mL、500ng/mL、2000ng/mL、8000ng/mL、9000ng/mL、10000ng/mL、11000ng/mL、12000ng/mL、13000ng/mL和14000ng/mL；

[0118] 1.2将以上各浓度样本分别取75 μ L,加入至制备好的猫CPV检测试剂中,每浓度重复测试2次；

[0119] 1.3反应10min后,将试纸放入干式免疫荧光分析仪中,读取T/C值,通过内置标准曲线进行曲线拟合和浓度的计算。

[0120] 1.4测试结果显示:试剂在检测7.81~10000ng/mL的CPV线性拟合关系较好, $r > 0.9900$,当CPV浓度增加到12000ng/mL时,线性拟合 r 值小于0.9900,T/C增长减缓,CPV在12000~13000ng/mL时T/C值平缓,CPV达到14000ng/mL时,T/C值反而降低。因此本检测的最大检测范围可以达到10000ng/mL。

[0121] 2、最低检出限

[0122] 将阴性血清,重复测试20次,计算T/C均值,将其代入剂量-反应曲线中,得出本方法的最低检出限为2.26ng/mL,见表1和图8。

[0123] 表1

[0124]

本申请提供的检测试剂卡	剂量反应曲线			
	原始数值		取对数	
	浓度 (ng/ml)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
	0.00	0.02		
7.81	0.18	0.89	-0.80	
31.25	0.32	1.49	-0.53	
125.00	0.76	2.10	-0.13	
500.00	2.01	2.70	0.30	
2000.00	5.12	3.30	0.71	
8000.00	9.12	3.90	0.96	
最低检测限 (LOD)		2.26 ng/ml		
r		0.9971		
r ²		0.9942		

[0125] 用同样方法检测对比例1,其最低检出限为6.25ng/mL,见表2和图9。

[0126]

对比试验提供的检测试剂 卡	剂量反应曲线			
	原始数值		取对数	
	浓度 (ng/ml)	T/C	浓度 (ng/mL)	T/C
	0.00	0.02		
	7.81	0.10	0.89	-1.11
	31.25	0.23	1.49	-0.68
	125.00	0.67	2.10	-0.19
	500.00	1.86	2.70	0.26

[0127]

	2000.00	5.01	3.30	0.70
	8000.00	8.21	3.90	0.91
	最低检测限 (LOD)		4.56 ng/ml	
	r		0.9949	
	r ²		0.9899	

[0128] 3、精密度

[0129] 将CPV校准品用阴性血清稀释至20ng/mL、200ng/mL、1000ng/mL,用本方法检测卡每浓度重复测试10次,计算测试浓度的变异系数。结果表3所示,由此可以看出,本试剂盒检测的变异系数均小于10% (三个浓度分别为7.53%、6.45%和4.69%),见表3。因此本检测方法具有较高的精密度。

[0130] 表3

[0131]

质控品	浓度	变异系数 (CV)
质控I	20ng/mL	7.53%
质控II	200ng/mL	6.45%
质控III	1000ng/mL	4.69%

[0132] 为了更好的说明本发明的有益效果,下面给出采用本发明提供的检测试剂下与其他检测方法 (胶体金法、PCR法、酶联免疫法和化学发光法) 在检测犬细小病毒时的性能对比,见表4。

[0133] 表4

[0134]

检测方法	专利公开号	操作	待检物质	检测性能
胶体金	CN 10360492 A	简单快捷	犬细小病毒抗原	T 线和 C 线采用同一系统, 可能影响试剂特异性; 定性检测
PCR	CN 103614494 B	繁琐费时、需要专业人员	同时检测犬瘟热和犬细小病毒	基因检测; 同时检测两种病毒, 可能存在相互干扰; 定量检测
酶联免疫吸附法	CN 104502587 B	繁琐费时	犬细小病毒抗体	采用间接法, 标记抗体为羊抗鼠的多抗, 可能影响试剂特异性; 定性检测

[0135]

化学发光	CN 103630688 A	繁琐费时	犬细小病毒抗原	标记抗体为羊抗鼠的多抗, 可能影响试剂特异性; 定量检测; 试剂冷藏, 无法满足现场快速检测
本发明型提供的方法		简单快捷	犬细小病毒抗原	选用两株单抗和夹心法层析, 特异性好, 与其他同类病毒无交叉反应; T 线和 C 线采用双系统; 既可定性检测, 也可定量检测; 灵敏度可达到 2.26 ng/mL。

[0136] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

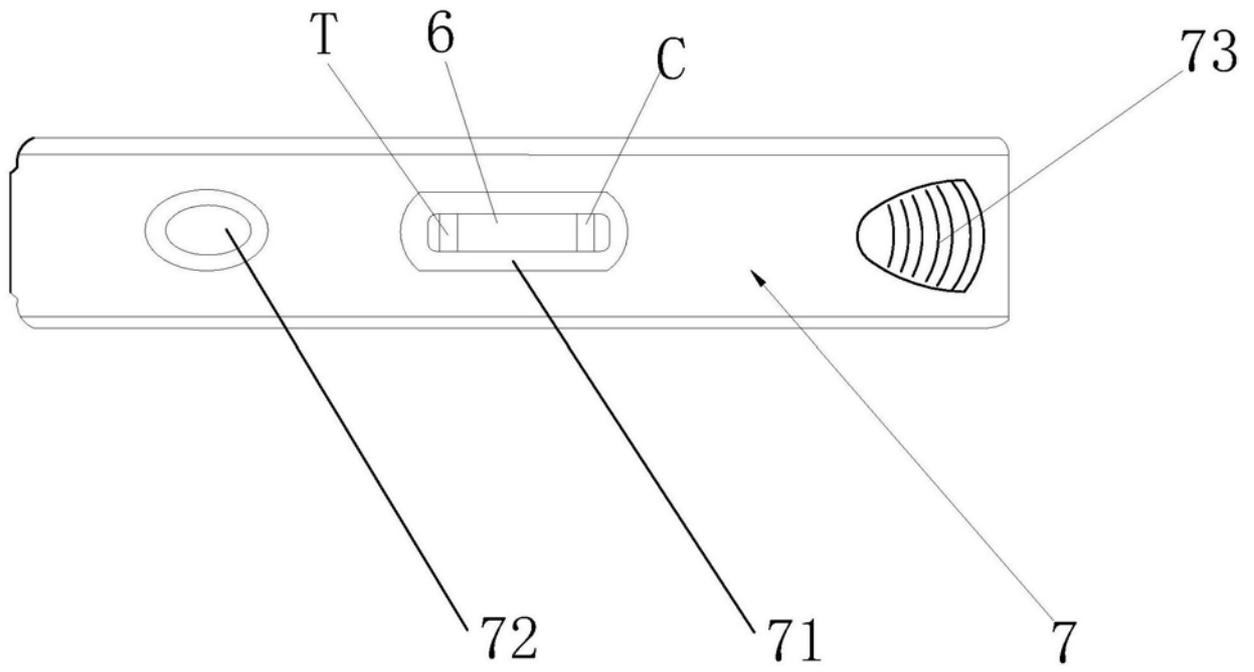


图1

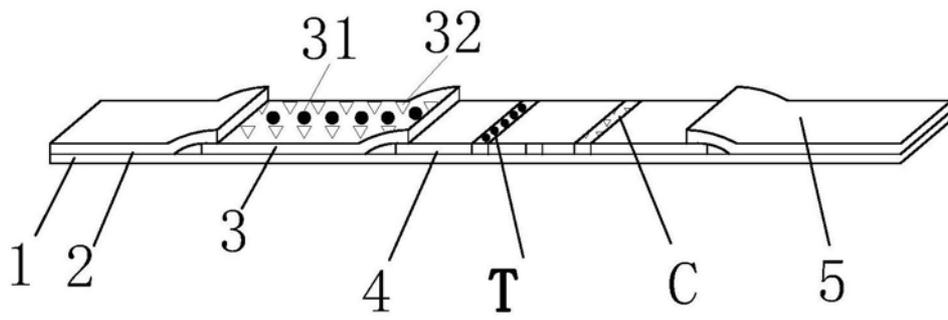


图2

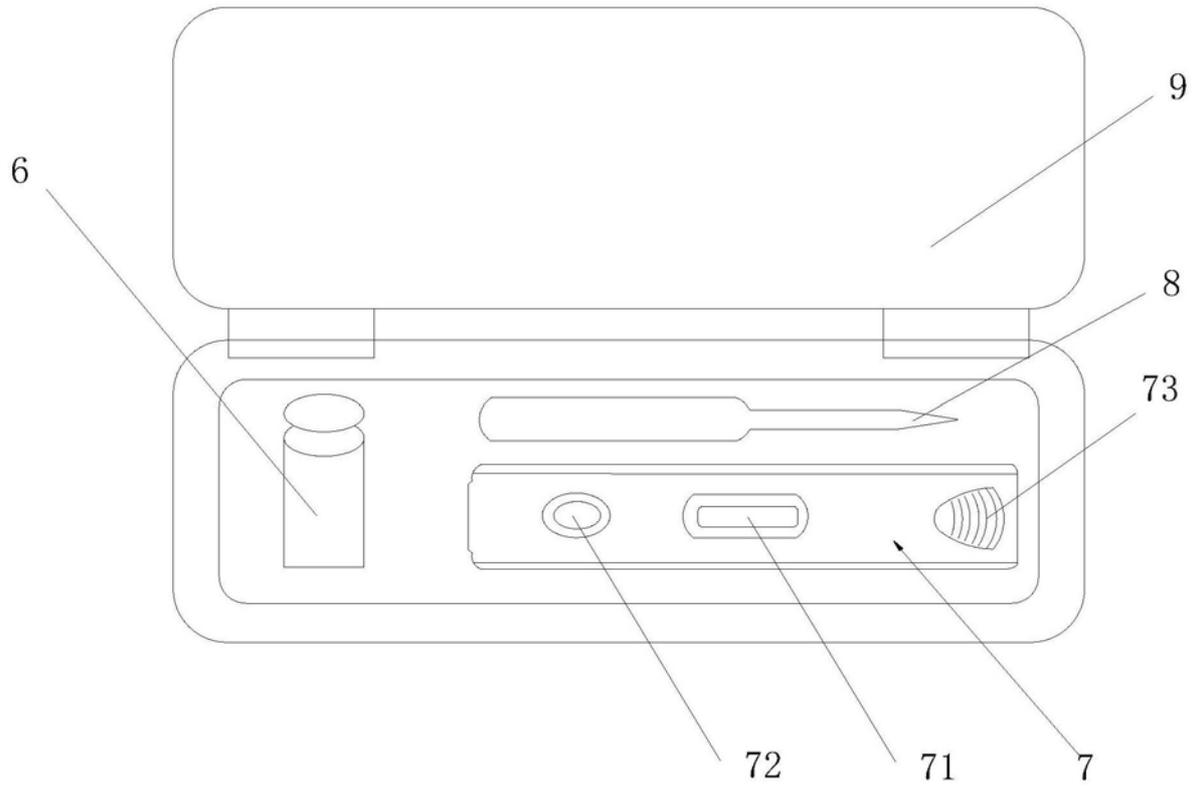


图3

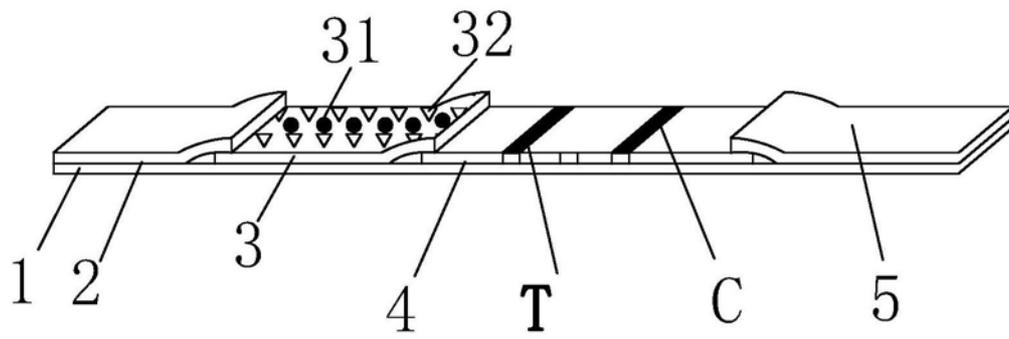


图4

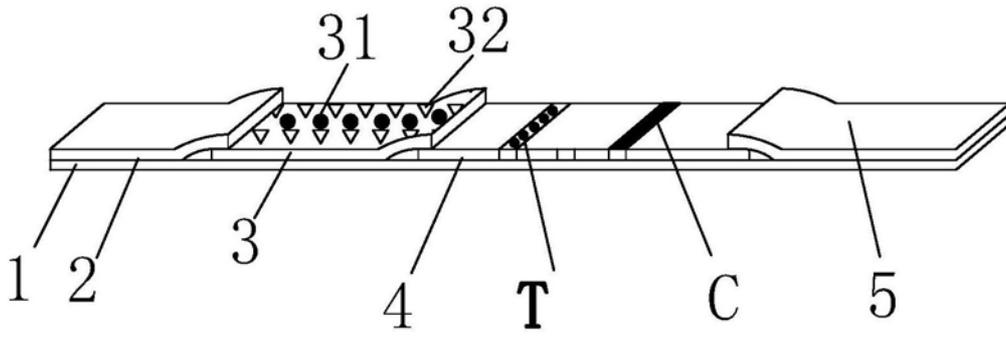


图5

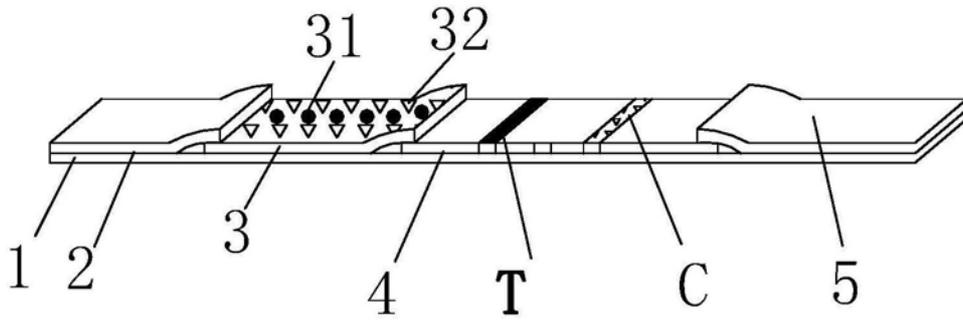


图6

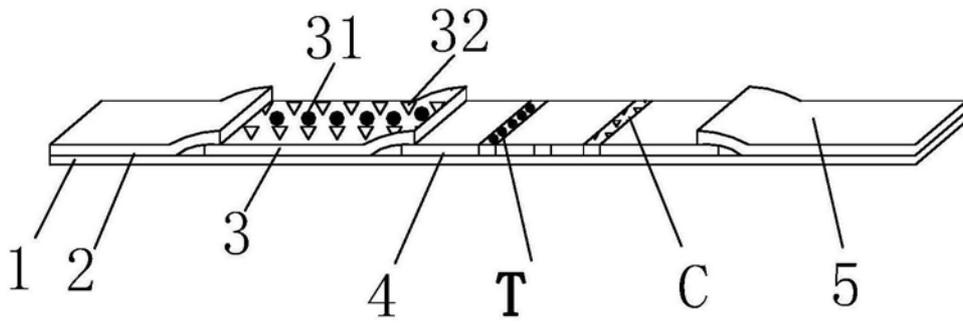


图7

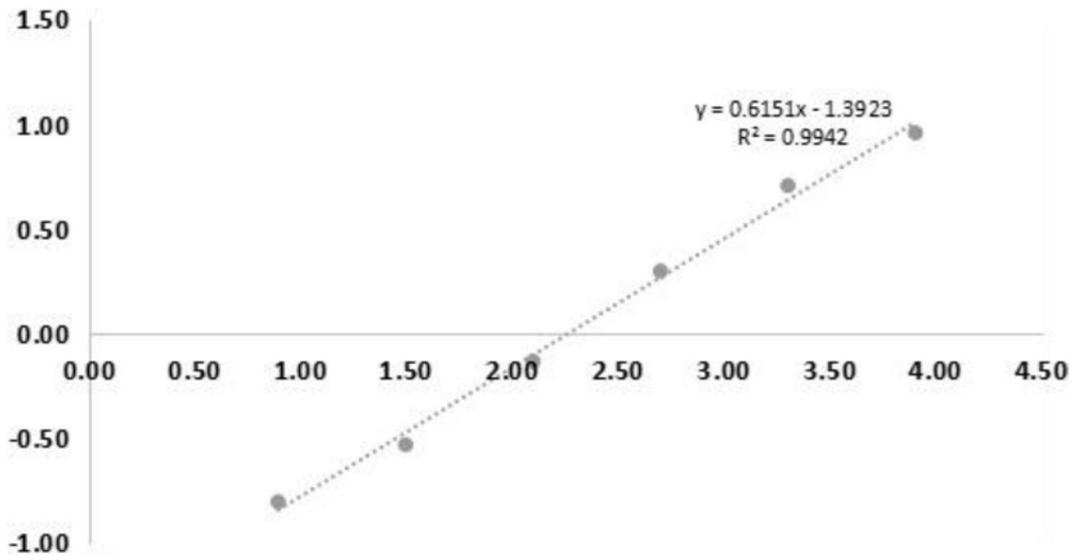


图8

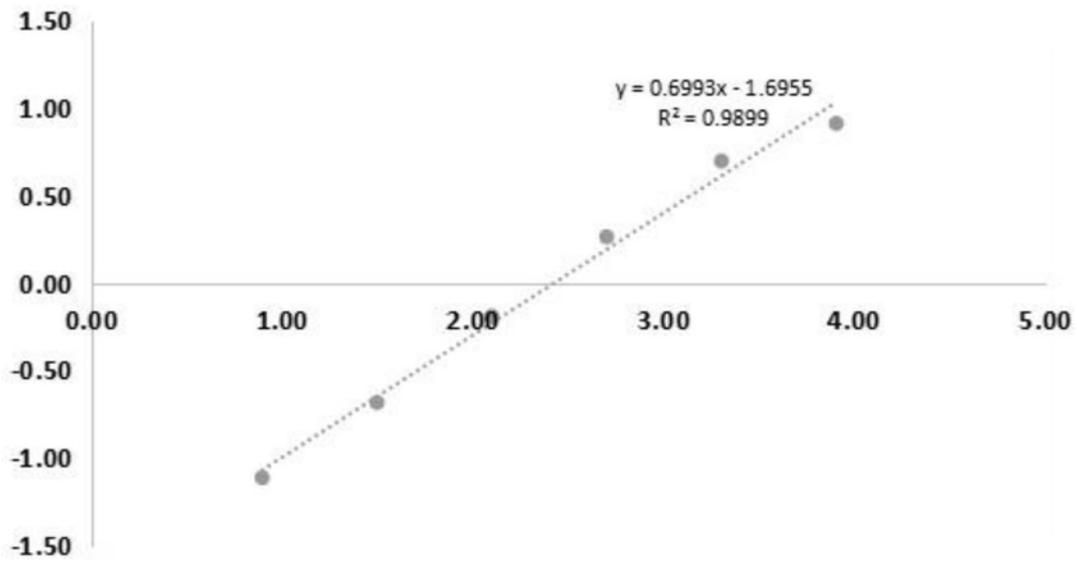


图9

专利名称(译)	用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法		
公开(公告)号	CN108414753A	公开(公告)日	2018-08-17
申请号	CN201810417751.1	申请日	2018-05-04
[标]发明人	汤永平 梁展鹏		
发明人	汤永平 梁展鹏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡与制备方法；旨在提供一种灵敏度高，检测结果可靠的用于检测犬细小病毒抗原的免疫荧光层析检测卡；其技术要点包括底板，在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫，所述结合垫上设有荧光微球标记的CPV单克隆抗体和荧光微球标记的羊抗鸡IgY，所述的硝酸纤维膜设有一条包被鸡IgY的质控C线，以及一条包被抗CPV单克隆抗体的检测T线；属于动物疫病检测领域。

