



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109655614 A

(43)申请公布日 2019. 04. 19

(21)申请号 201910143162.3

(22)申请日 2019.02.26

(71)申请人 广州维佰生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区玉岩路
12号实验楼三楼315-7房

(72)发明人 关剑池 伍绮文 罗梦珍 潘玉

(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 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

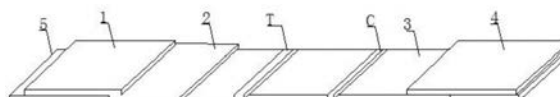
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸及其
其制备方法与检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法与检测方法;旨在提供特异性强、灵敏性高、重复性好,既可以定量又可以定性分析的牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸;其技术方案包括包括由底板,所述的底板依次衔接有样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫,所述的层析膜上设有C线和T线,所述的结合垫为喷涂有将标记了BrG11抗体的荧光微球;所述的T线上喷涂BrF11抗体;所述的C线涂划羊抗鼠IgG抗体;本发明属于实验动物的病原检测领域。



1. 一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸, 其特征在于, 包括由底板 (5), 其特征在于, 所述的底板 (5) 依次衔接有样品垫 (1)、结合垫 (2)、层析膜 (3) 和吸水垫 (4), 所述的层析膜上设有C线和T线, 所述的结合垫 (2) 为喷涂有将标记了BrG11抗体的荧光微球; 所述的T线上喷涂BrF11抗体; 所述的C线涂划羊抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸, 其特征在于, 所述的层析膜为硝酸纤维素膜。

3. 制备权利要求1所述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的方法, 其特征在于, 将标记了BrG11抗体的荧光微球喷涂于硝酸纤维素膜制得结合垫 (2); 将BrF11抗体涂划于层析膜 (3) 上制成检测T线; 将羊抗鼠IgG抗体涂划于层析膜 (3) 上制成质控C线; 最后, 在底板 (5) 依次衔接有样品垫 (1)、结合垫 (2)、层析膜 (3) 和吸水垫 (4)。

4. 权利要求3所述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法, 其特征在于, 所述的荧光微球标记BrG11抗体的方法, 依次包括下述步骤:

1) 将10 μ l 荧光微球原液用50mmol/LMES稀释至总体积400 μ l, 加入10 μ l 50mmol/L NHS混匀, 再加入10 μ l 50mmol/L EDC混匀, 摇床孵育20min, 离心弃上清;

2) 加入400 μ l 50mmol/LMES复溶, 使用超声细胞粉碎仪分散微球;

3) 向体系加入20 μ g BrG11抗体, 摇床孵育2h;

4) 加入50 μ l 10% BSA用于封闭, 摇床孵育20min; 离心弃上清, 加入400 μ l 荧光微球保存液复溶, 使用超声细胞粉碎仪分散微球, 标记后的微球于4 $^{\circ}$ C保存。

5. 根据权利要求1所述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法, 其特征在于, 所述的MES的pH 6.5。

6. 一种牛布氏菌病荧光微球免疫的检测方法, 其特征在于, 依次包括下述步骤:

1) 将牛布氏菌病抗原分别稀释成浓度为 1×10^6 CFU/ml、 2×10^6 CFU/ml、 4×10^6 CFU/ml、 4096×10^6 CFU/ml、 8192×10^6 CFU/ml、 16384×10^6 CFU/ml的溶液, 各取100 μ l分别滴加到权利要求1的牛布氏菌病荧光微球免疫层析试纸的样品垫上, 反应15分钟后用发射365nm激光的荧光检测仪检测荧光信号, 记录各组的T值、C值、T/C值;

2) 将T/C值作纵坐标, 将牛布氏菌病抗原浓度2对数, 作横坐标, 通过作散点图, 分析牛布氏菌病抗原与T/C值的变化趋势, 截取浓度2对数为2~12的区域数据作指数拟合曲线, 得出标准曲线方程 $y = 0.0235e^{0.4774x}$, 其相关系数 $R^2 = 0.9982$, 将样品检测的T/C值作为y值代入公式可计算出样品中牛布氏菌病抗原的量。

牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法与检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于实验动物的病原检测领域,具体涉及牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸,本发明还涉及该检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 布氏菌病是目前世界上流行最广、危害最大的人兽共患病之一,在全世界170多个国家和地区有人、畜布鲁菌病存在和流行。我国25个省(市、区)有人、畜布鲁菌病存在和流行。随着畜牧业的快速发展,布鲁菌病在多数疫区明显有回升趋势。2005年全国新发病19664人,发病率为1.504/10万,超过历史最高记录。布鲁菌是细胞内寄生的革兰氏阴性菌,主要引起人的波状热和慢性感染以及动物睾丸炎和流产等,直接危害公共安全,造成严重的经济损失。

[0003] 目前,检测牛布氏菌病比较经典且常用的方法有ELISA法、RT-PCR法、琼脂扩散实验法等。但由于以上方法均需求先进检测仪器,检测费用昂贵,步骤繁琐耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适合用于基层企事业单位的大量快速筛查检测。

[0004] 胶体金免疫层析具有检测速度快,价格便宜、操作简单等特点,但仍存在一些缺陷,如稳定性差、灵敏度低、无法实现定量检测、基质效应明显背景干扰大,且颜色单一,难以实现多检或联检。

[0005] 荧光微球免疫层析技术是以具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂作为示踪物,继胶体金免疫层析技术后发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合,与胶体金免疫层析技术一样具有快速检测、操作简单等有点。

[0006] 但相比于胶体金等传统标记物,荧光微球的发光强度可以随激发光的强度增强而增强,因此有望提高免疫层析技术的检测限;而微球壳结构的作用下,荧光微球具有相对稳定的形态结构,粒径均一、稳定性高、单分散性好、重复性好、发光效率高,有较好的生物相容性;且形成微球后染料荧光淬灭大大减少,发射强而稳定,基本不收外界环境介质变化的影响。因此相比于上述检测方法,荧光微球免疫层析技术同时具有检测灵敏度高、操作要求简便的优点,既能满足基层企事业单位快速大量筛查检测,又能用于科研等定量检测分析。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种检测灵敏度高、操作要求简便的牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸。

[0008] 本发明的另一目的在于提供上述布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法。

[0009] 本发明的最后一个目的是提供上述的检布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的检测方法。

[0010] 为此,本发明提供的第一个技术方案为:

[0011] 一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸,包括由底板,所述的底板依次衔接有样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫,所述的层析膜上设有C线和T线,所述的结合垫为喷涂有将标记了BrG11抗体的荧光微球;所述的T线上喷涂BrF11抗体;所述的C线涂划羊抗鼠IgG抗体。

[0012] 进一步的,上述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸,所述的层析膜为硝酸纤维素膜。

[0013] 本发明提供的第二个技术方案是这样的:

[0014] 一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的方法,将标记了BrG11抗体的荧光微球喷涂于硝酸纤维素膜制得结合垫;将BrF11抗体涂划于层析膜上制成检测T线;将羊抗鼠IgG抗体涂划于层析膜上制成质控C线;最后,在底板依次衔接有样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫。

[0015] 进一步的,上述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,所述的荧光微球标记BrG11抗体的方法,依次包括下述步骤:

[0016] 1) 将10 μ l 荧光微球原液用50mmol/LMES稀释至总体积400 μ l,加入10 μ l 50mmol/LNHS混匀,再加入10 μ l 50mmol/LEDC混匀,摇床孵育20min,离心弃上清;

[0017] 2) 加入400 μ l 50mmol/LMES复溶,使用超声细胞粉碎仪分散微球;

[0018] 3) 向体系加入20 μ g BrG11抗体,摇床孵育2h;

[0019] 4) 加入50 μ l 10%BSA用于封闭,摇床孵育20min;离心弃上清,加入400 μ l 荧光微球保存液复溶,使用超声细胞粉碎仪分散微球,标记后的微球于4℃保存。

[0020] 进一步的,上述的一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,所述的MES的pH 6.5。

[0021] 本发明提供的第三个技术方案是这样的:

[0022] 一种牛布氏菌病荧光微球免疫的检测方法,依次包括下述步骤:

[0023] 1) 将牛布氏菌病抗原分别稀释成浓度为 1×10^6 CFU/ml、 2×10^6 CFU/ml、 4×10^6 CFU/ml~ 4096×10^6 CFU/ml、 8192×10^6 CFU/ml、 16384×10^6 CFU/ml的溶液,各取100 μ l分别滴加到权利要求1的牛布氏菌病荧光微球免疫层析试纸的样品垫上,反应15分钟后用发射365nm激光的荧光检测仪检测荧光信号,记录各组的T值、C值、T/C值;

[0024] 2) 将T/C值作纵坐标,将牛布氏菌病抗原浓度2对数,作横坐标,通过作散点图,分析牛布氏菌病抗原与T/C值的变化趋势,截取浓度2对数为2~12的区域数据作指数拟合曲线,得出标准曲线方程 $y=0.0235e^{0.4774x}$,其相关系数 $R^2=0.9982$,将样品检测的T/C值作为y值代入公式可计算出样品中牛布氏菌病抗原的量。

[0025] 本发明的有益效果是:

[0026] 与现有技术相比,本发明提供的计算方案同时具有检测灵敏度高、操作要求简便的优点,既能满足基层企事业作快速大量筛查检测,又能用于科研等定量检测分析。

附图说明

[0027] 图1是牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸结构图;

[0028] 图2是检测梯度浓度阳性样品结果。

- [0029] 图3是截取阳性结果数据建立拟合曲线
- [0030] 图中各个符号代表元件及其类似元件如下：
- [0031] 1-样品垫；2-结合垫；3-层析膜；4-吸水纸；5-底板

具体实施方式

[0032] 下面结合附图说明和具体实施方式对本发明的权利要求做进一步的详细说明。

[0033] 实施例1

[0034] 本发明提供一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸，参阅图1，包括由底板5，所述的底板5依次衔接有样品垫1、结合垫2、层析膜3和吸水垫4，所述的层析膜上设有C线和T线，所述的结合垫2为喷涂有将标记了BrG11抗体的荧光微球；所述的T线上喷涂BrF11抗体；所述的C线涂划羊抗鼠IgG抗体。

[0035] 实施例2

[0036] 实施1中的牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法为：

[0037] 材料与方法

[0038] 1、抗体、检测抗原、荧光微球试剂与仪器

[0039] BrG11与BrF11购自广州健阳生物科技有限公司；

[0040] 布病疫苗购自哈药集团生物有限公司用于作阳性检测样品；

[0041] 210nm荧光微球(货号MD021)购自南京微测生物公司；

[0042] 荧光免疫分析仪购自南京微测生物公司；

[0043] XYZ轴喷金划膜仪购自金标生物；

[0044] 2、抗体偶联标记荧光微球

[0045] 根据羧基活化偶联原理，将抗体偶联标记荧光微球。将10 μ l 荧光微球原液用50mmol/L MES (pH 6.5) 稀释至总体积400 μ l，加入10 μ l 50mmol/LNHS混匀，再加入10 μ l 50mmol/L EDC混匀，摇床孵育20min；离心弃上清，加入400 μ l 50mmol/LMES复溶，使用超声细胞粉碎仪分散微球；向体系加入20 μ g BrG11抗体，摇床孵育2h；加入50 μ l 10%BSA用于封闭，摇床孵育20min；离心弃上清，加入400 μ l 荧光微球保存液复溶，使用超声细胞粉碎仪分散微球。标记后的微球于4℃保存。

[0046] 3、荧光微球检测试纸的制备

[0047] 将标记了BrG11抗体的荧光微球喷涂于玻璃纤维素膜上制备成结合垫；将BrF11抗体涂划于硝酸纤维膜上制成检测T线；将羊抗鼠IgG抗体涂划于硝酸纤维素膜上制成质控C线；将制备好的结合垫2，层析膜3与底板5、样品垫1、吸水纸6组装，并使用切条机裁切成试纸条。

[0048] 实施例3

[0049] 用牛布氏菌病荧光微球免疫层析试纸检测阳性样品

[0050] 将牛布氏菌病抗原分别稀释成浓度为1 $\times$ 10⁶CFU/ml、2 $\times$ 10⁶CFU/ml、4 $\times$ 10⁶CFU/ml $\sim$ 4096 $\times$ 10⁶CFU/ml、8192 $\times$ 10⁶CFU/ml、16384 $\times$ 10⁶CFU/ml的溶液，各取100 μ l分别滴加到实施例2制备的牛布氏菌病荧光微球免疫层析试纸的样品垫上，反应15分钟后用发射365nm激光的荧光检测仪(上海微测生物公司)检测荧光信号，记录各组的T值(T线荧光信号强度)、C值(C线荧光信号强度)、T/C值(T线与C线荧光信号比值)。

[0051] 表1 检测阳性样品结果

	阳性浓度 × 10 ⁶ CFU/ml	浓度 2 对数	T/C 值
[0052]	0	阴性	0.0376
	1	0	0.0446
	2	1	0.0578
	4	2	0.0697
	8	3	0.0909
	16	4	0.1664
	32	5	0.2331
	64	6	0.4135
	128	7	0.6163
[0053]	256	8	1.0867
	512	9	1.7034
	1024	10	2.7228
	2048	11	4.5742
	4096	12	7.6784
	8192	13	9.3342
	16384	14	7.9785

[0054] 5、生成T/C值与浓度关系的拟合曲线

[0055] 将T/C值作纵坐标,将牛布氏菌病抗原浓度2对数,作横坐标,通过作散点图,分析牛布氏菌病抗原与T/C值的变化趋势。经过分析和比较,浓度2对数为2~12的区域,其数据呈明显的线性关系。截取该段数据作指数拟合曲线,得出标准曲线方程 $y=0.0235e^{0.4774x}$,其相关系数 $R^2=0.9982$,具有较高拟合程度。通过将样品检测的T/C值作为y值代入公式可计算出样品中牛布氏菌病抗原的量。

[0056] 6、根据拟合曲线计算样品浓度使用该试纸检测某阳性样品,其T/C值为0.9558,将 $y=0.9558$ 代入标准曲线方程 $y=0.0235e^{0.4774x}$,通过解方程 $x=\ln(0.9558/0.0235)/0.4774$,算得 $x=7.7618$ 。该阳性样品的浓度为 $2^{7.7618} \times 10^6 \text{CFU/ml}$,即 $217.04 \times 10^6 \text{CFU/ml}$ 。

[0057] 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,其它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。

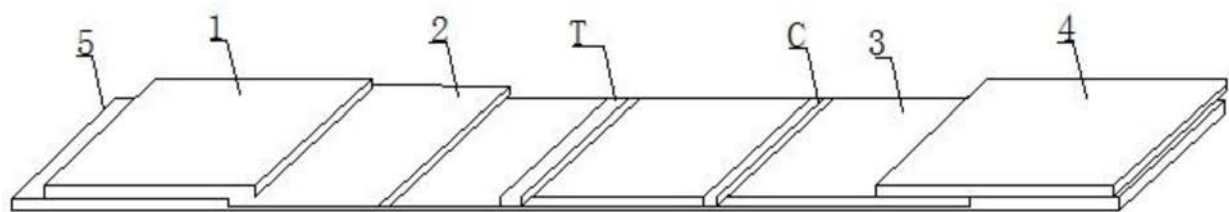


图1

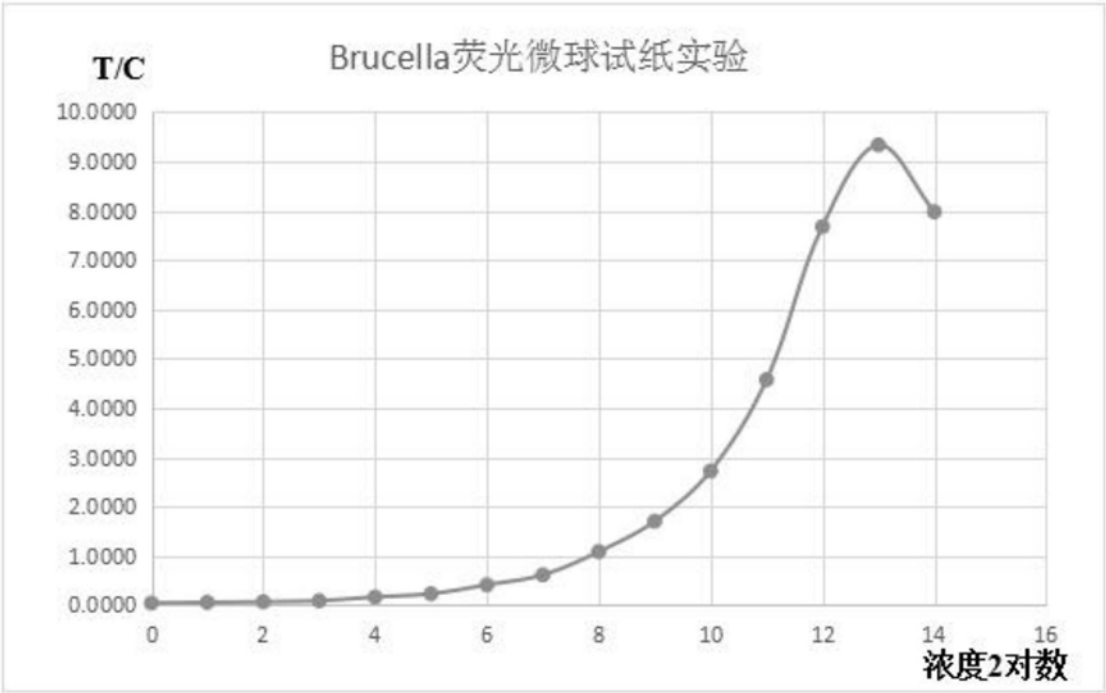


图2

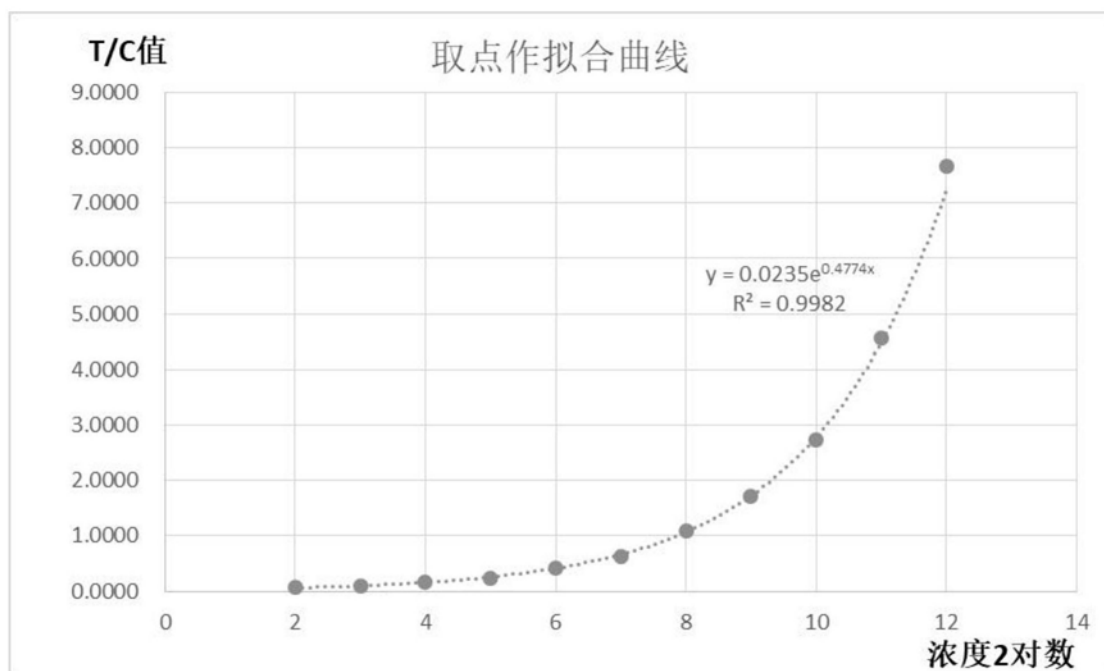


图3

专利名称(译)	牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法与检测方法		
公开(公告)号	CN109655614A	公开(公告)日	2019-04-19
申请号	CN201910143162.3	申请日	2019-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	广州维佰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州维佰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州维佰生物科技有限公司		
[标]发明人	伍绮文 罗梦珍 潘玉		
发明人	关剑池 伍绮文 罗梦珍 潘玉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法与检测方法；旨在提供特异性强、灵敏性高、重复性好，既可以定量又可以定性分析的牛布氏菌病病毒荧光微球免疫层析试纸；其技术方案包括包括由底板，所述的底板依次衔接有样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫，所述的层析膜上设有C线和T线，所述的结合垫为喷涂有将标记了BrG11抗体的荧光微球；所述的T线上喷涂BrF11抗体；所述的C线涂划羊抗鼠IgG抗体；本发明属于实验动物的病原检测领域。

