



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108107220 A

(43)申请公布日 2018.06.01

(21)申请号 201711297700.1

(22)申请日 2017.12.08

(71)申请人 广州源起健康科技有限公司
地址 510530 广东省广州市广州高新技术
产业开发区瑞泰路2号

(72)发明人 李根平

(74)专利代理机构 广州市深研专利事务所
44229

代理人 姜若天

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

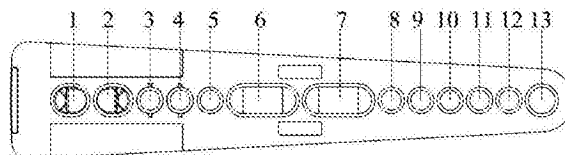
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,由O型口蹄疫抗体阴性血清、O型口蹄疫抗体阳性血清、VP1包被磁珠、生物素化羊抗猪抗体、链霉亲和素标记荧光物质、洗涤液和增强液组成。本发明的磁珠具有更大结合面积,大大提高检测范围,缩短反应时间,提高灵敏度。具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱,有利于降低成本,提高灵敏度;比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。采用链酶亲和素-生物素信号放大系统,进一步提高了检测的灵敏度,比ELISA和化学发光灵敏度更高。配套全自动检测仪器,实现现场自动化操作,可同时检测一份或多份样本,操作简便快速、价格低廉。



1. 一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于由O型口蹄疫抗体阴性血清、O型口蹄疫抗体阳性血清、VP1包被磁珠、生物素化羊抗猪抗体、链霉亲和素标记荧光物质、洗涤液和增强液组成。

2. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述的VP1包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μ m的超顺磁珠与VP1蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链霉亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种。

3. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述的荧光物质为镧系螯合物,为铈、钐、铽、镱组成的螯合物。

4. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述VP1包被磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应0.5~1小时;上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入VP1,室温持续旋转孵育30~240分钟;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有1%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联VP1的活化羧基位点,反应30~60min;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液;所述的免疫磁珠保存液为含5%BSA,10%蔗糖,0.1%Tween-20和0.1%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

5. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述的生物素化羊抗猪抗体的制备方法为:用0.1 M pH 8.0碳酸氢钠缓冲液对羊抗猪抗体充分透析;用DMSO 溶解生物素;向蛋白质溶液加入生物素溶液,在室温下持续搅拌,保温2~4小时;在4 $^{\circ}$ C,对PBS充分透析,以除去游离的生物素;样品加入5%BSA,将结合产物置4 $^{\circ}$ C,避光保存;将上述制备好的生物素化羊抗猪抗体稀释,使羊抗猪的终浓度为0.001~0.005g/L。

6. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述链霉亲和素标记荧光物质的SA标记铈的制备方法为:取出SA置于10KD超滤离心管,离心,弃去滤液;加入标记缓冲液,离心,弃去滤液;重复此操作4~5次;将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体;加入标记缓冲液,静置3~5min,再将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的SA;按照质量比SA:铈螯合物DTTA-Eu=3:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~24小时;用Sepharose CL-6B凝胶柱纯化SA-Eu³⁺,然后加入SA-Eu³⁺保存剂,使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C储存备用;将上述制备好的SA-Eu³⁺稀释,使SA的终浓度为0.005~0.010g/L。

7. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述洗涤液的配方为:0.08~0.15% Tween-20,0.02%ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液。

8. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述增强液的配方为:0.03%乙酸钠、0.0001~0.0005%B-NTA、0.0024% TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

9. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述0型口蹄疫抗体阴性血清的制备方法为:取未经疫苗免疫的健康仔猪血清,0型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒测试血清抗体为阴性。

10. 如权利要求1所述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒,其特征在于,所述0型口蹄疫抗体阳性血清的制备方法为:对2月龄仔猪肌肉免疫1毫升猪口蹄疫0型灭活疫苗,1个月后加强免疫1次,加强免疫后2周静脉采血,分离血清,用0型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒将血清抗体效价标定为1:512。

一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及动物疫病检测技术领域,具体地说,本发明涉及一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒。

[0003]

背景技术

[0004] 口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus ,FMDV)可引起偶蹄动物的急性、热性、高度接触性传染病,即通常所说的口蹄疫(Foot and Mouth Disease ,FMD)。该病毒引起的病害具有传播迅速、感染率高的特点,主要通过呼吸道和消化道传播,仅数个感染性病毒粒子便可引起易感动物发病,甚至造成世界性的大流行,给畜牧业带来很严重的经济损失,因此FMDV是世界各国检疫和防疫的重点对象。FMDV为单股正链RNA病毒,基因组全长约8.5kb,编码组成病毒衣壳的蛋白为4种结构蛋白VP1、VP2、VP3和VP4以及10种成熟的非结构蛋白(L、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D及3AB和3ABC复合体)。在FMDV的4种结构蛋白中,VP1蛋白存在主要抗原位点,而且含有FMD病毒宿主识别位点。单独的VP1蛋白即可刺激机体产生中和抗体,是有效的目标抗原。

[0005] 口蹄疫病毒目前有O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3(即南非1、2、3型)和Asia1(亚洲1型)7个血清型。各型之间几乎没有免疫保护力,感染了一型口蹄疫的动物仍可感染另一型口蹄疫病毒而发病。目前7个血清型中的O型、A型和Asia1型在中国交替流行,涉及面广、疫情复杂、破坏性强,造成很大危害。当前我国预防和控制口蹄疫主要以疫苗免疫为主,但FMDV的血清型众多,不同亚型的疫苗之间无交叉保护作用,且国内外口蹄疫疫苗质量参差不齐,因此建立一种简便、快速、灵敏度高的FMDV感染和/或免疫后抗体检测方法对预防和控制口蹄疫的发生和流行具有十分重要的意义。

[0006] 传统的FMDV的检测方法主要是血清学诊断。在血清学诊断技术中,OIE推荐的检测FMDV抗体的标准方法为中和试验,但中和试验需要使用活病毒,需在特殊实验室完成,且操作费时。酶联免疫吸附分析法具有灵敏、特异性高等优点,但操作繁琐费时。化学发光法具有灵敏度高、特异性好的优点,但需要特殊、大型、昂贵设备,检测时间长。

[0007]

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服上述技术缺陷,提供一种成本低廉、操作简单、准确、灵敏的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,由O型口蹄疫抗体阴性血清、O型口蹄疫抗体阳性血清、VP1包被磁珠、生物素化羊抗猪抗体、链霉亲和素标记荧光物质、洗涤液和增强液组成。

[0010] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述的VP1包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μm 的超顺磁珠与VP1蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种。

[0011] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述的荧光物质为镧系螯合物,为铕(Eu^{3+})、钐(Sm^{3+})、铽(Tb^{3+})、镝(Dy^{3+})等稀土元素组成的螯合物。

[0012] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述VP1包被磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应0.5~1小时;上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入VP1,室温持续旋转孵育30~240分钟;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有1%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联VP1的活化羧基位点,反应30~60min;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液;所述的免疫磁珠保存液为含5%BSA,10%蔗糖,0.1%Tween-20和0.1%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0013] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述的生物素化羊抗猪抗体的制备方法为:用0.1 M pH 8.0碳酸氢钠缓冲液对羊抗猪抗体充分透析;用DMSO溶解生物素;向蛋白质溶液加入生物素溶液,在室温下持续搅拌,保温2~4小时;在4 $^{\circ}\text{C}$,对PBS充分透析,以除去游离的生物素;样品加入5%BSA,将结合产物置4 $^{\circ}\text{C}$,避光保存;将上述制备好的生物素化羊抗猪抗体稀释,使羊抗猪的终浓度为0.001~0.005g/L。

[0014] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述链霉亲和素标记荧光物质的SA标记铕的制备方法为:取出SA置于10KD超滤离心管,离心,弃去滤液;加入标记缓冲液,离心,弃去滤液;重复此操作4~5次;将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体;加入标记缓冲液,静置3~5min,再将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的SA;按照质量比SA:铕螯合物DTTA-Eu=3:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~24小时;用Sepharose CL-6B凝胶柱纯化SA-Eu $^{3+}$,然后加入SA-Eu $^{3+}$ 保存剂,使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μm 滤膜过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用;将上述制备好的SA-Eu $^{3+}$ 稀释,使SA的终浓度为0.005~0.010g/L。

[0015] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述洗涤液的配方为:0.8~1.5% Tween-20,0.02%ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液。

[0016] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述增强液的配方为:0.03%乙酸钠、0.0001~0.0005% β -NTA、0.0024% TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

[0017] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述0型口蹄疫抗体阴性血清的制备方法为:取未经疫苗免疫的健康仔猪血清,0型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒测试血清抗体为阴性。

[0018] 在上述的荧光免疫磁微粒定量检测0型口蹄疫抗体试剂盒中,所述0型口蹄疫抗体阳性血清的制备方法为:对2月龄仔猪肌肉免疫1毫升猪口蹄疫0型灭活疫苗,1个月后加强

免疫1次,加强免疫后2周静脉采血,分离血清,用O型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒将血清抗体效价标定为1:512。

[0019] 所述荧光物质的激发波长为300~350nm,发射波长为500~650nm。

[0020] 本发明所述的检测O型口蹄疫抗体试剂盒的检测原理为间接法,试剂条的反应孔中预装有VP1免疫磁珠,测试时,先将待测样本(血清或血浆)加到试剂的反应孔中,再加入生物素(Biotin)化羊抗猪抗体,室温孵育洗涤后加入链酶亲和素(Streptavidin,SA)标记的荧光物质。经过室温孵育,形成VP1免疫磁珠-O型口蹄疫抗体-生物素化羊抗猪抗体-链酶亲和素标记的荧光物质四元复合物。洗涤后,再加入增强液,在激发光的作用下,荧光物质发射一定波长的光信号,被免疫荧光检测仪识别,样本中O型口蹄疫抗体越多,产生的荧光信号强度越强。将O型口蹄疫抗体浓度与荧光信号值拟合剂量-反应曲线,即可按此测值得到未知样本中O型口蹄疫抗体的浓度。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

(1) 粒径均匀、磁性强的固相磁珠代替传统的ELISA板式反应和层析法的物理吸附反应方式,因磁珠具有更大的结合面积与能在液相中分散而充分反应,大大提高检测范围,缩短反应时间,提高灵敏度。由于磁珠与抗原或抗体为共价偶联,克服了物理吸附的不稳定性,因此免疫磁珠保存时间久且更稳定。

[0022] (2) 采用时间分辨荧光免疫分析技术,采用镧系螯合物铈、铽、钆、镱作为标记物,其具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱,有利于降低本底,提高灵敏度;紫外光激发具有较高量子产率、较大Stokes位移,避免激发光谱和荧光发射光谱以及生物基质发射的光谱重合,荧光衰变时间长等优点,比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0023] (3) 采用链酶亲和素-生物素信号放大系统,进一步提高了检测的灵敏度,比ELISA和化学发光灵敏度更高。

[0024] (4) 配套全自动检测仪器,实现现场自动化操作,可同时检测一份或多份样本,操作简便快速(30分钟即可出结果)、价格低廉。

附图说明

[0025] 图1是荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒利用试剂条进行检测,试剂条的结构俯视示意图。

[0026] 图2是荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒利用试剂条进行检测,试剂条的结构示意图。

[0027] 1、测试孔1,2、测试孔2,3、生物素化抗体,4、链酶亲和素标记荧光物质,6、洗液,7、洗液,8、样本稀释液1,9、样本稀释液2,12、增强液,5、10、11、13均为预备孔。

[0028]

具体实施方式

[0029] 本发明所述的VP1包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μ m的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠有羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠等其中的一种或几种。

[0030] 本发明所述的荧光物质为镧系螯合物,主要有铕(Eu^{3+})、钐(Sm^{3+})、铽(Tb^{3+})、镝(Dy^{3+})等稀土元素组成的螯合物。

[0031] 本发明中所采用的VP1蛋白为大肠杆菌重组蛋白。

[0032] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0033] 实施例1

在该实施例中,荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒由试剂条和O型口蹄疫阴性、阳性血清组成。

[0034] 其中,试剂条由测试孔1(VP1蛋白包被羧基磁珠)、第3孔(生物素化羊抗猪二抗)、第4孔(链酶亲和素标记铕)、洗液孔6与7、增强液孔12组成,如图1和图2所示。

[0035] 该荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒的制备过程如下,其中

(1) 免疫磁珠的制备方法:

① 洗涤磁珠

吸取1mg 直径 $1\mu\text{m}$ 羧基磁珠到1.5mI离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1mI 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)洗涤磁珠3~5次。

[0036] ② 磁珠活化

向上述洗涤好的磁珠中加入1mI 0.1M pH5.0的MES,加入 $20\mu\text{L}$ 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液(EDC)和 $20\mu\text{L}$ 50mg/mI N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温震荡反应0.5~1小时。

[0037] ③ VP1蛋白与磁珠的偶联

上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入0.05~1mg VP1,室温持续旋转孵育30~240分钟,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度。

[0038] ④ 封闭

上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠。加入含有1%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联VP1的活化羧基位点,反应30~60min。

[0039] ⑤ 储存

上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入 $200\mu\text{L}$ 免疫磁珠保存液。

[0040] 所述的保存液为含5%(w/v) BSA,10% (w/v) 蔗糖,0.1%(v/v) Tween-20和0.1%(w/v) 聚乙烯吡咯烷酮的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0041] 将上述制备好的免疫磁珠稀释,使VP1的终浓度为0.0025~0.0100g/L,分装至试剂条第1孔(测试孔1)中。

[0042] (2) 生物素化羊抗猪抗体的制备方法:

① 用0.1 M pH 8.0碳酸氢钠缓冲液对1mg羊抗猪抗体充分透析。

[0043] ② 用1mI DMSO 溶解1mg生物素。

[0044] ③ 向1mI蛋白质溶液(即含蛋白质1mg)加入 $120\mu\text{L}$ 生物素溶液(即含生物素120 μg),在室温下持续搅拌,保温2~4小时。

[0045] ④ 在 4°C ,对PBS充分透析,以除去游离的生物素。

[0046] ⑤ 样品加入5%(w/v) BSA,将结合产物置 4°C ,避光保存。

[0047] 将上述制备好的生物素化羊抗猪抗体稀释,使羊抗猪的终浓度为0.001~0.005g/

L,分装至试剂条第3孔中。

[0048] (3) SA标记铕制备方法:

①SA-Eu³⁺的制备

(1)取出1mg SA置于10KD超滤离心管,10000rpm离心10min,弃去滤液。

[0049] (2)加入标记缓冲液(0.05M pH9.0碳酸盐缓冲液)200μL,10000rpm离心10min,弃去滤液。重复此操作4~5次。

[0050] (3)将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的抗体。加入200μL标记缓冲液,静置3~5min,再将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的SA。

[0051] (4)按照质量比SA:铕螯合物DTTA-Eu=3:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~24小时。

[0052] ②SA-Eu³⁺的纯化

用Sephacryl CL-6B凝胶柱纯化SA-Eu³⁺,然后加入SA-Eu³⁺保存剂(15%(w/v)BSA+5%(w/v)ProcIn300),使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22μm滤膜过滤,4℃储存备用。

[0053] 将上述制备好的SA-Eu³⁺稀释,使SA的终浓度为0.005~0.010g/L,分装至试剂条第4孔中。

[0054] 所述的荧光物质铕的激发波长为340nm,发射波长为615nm。

[0055] (4)洗液的制备方法:

配制含有0.8~1.5%(v/v) Tween-20,0.02%(v/v) ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液,将配制好的溶液以每孔1600μL分装至洗液孔6和7中。

[0056] (5)增强液的制备方法:

配制含有0.03%(w/v)乙酸钠、0.0001~0.0005%(w/v)β-NTA、0.0024% (w/v) TOPO、0.08%(v/v)醋酸、0.1%(v/v)无水乙醇、0.05%(v/v)的Triton X-100的水溶液。将配制好的溶液以每孔300μL分装至试剂条第12孔(增强液孔)。

[0057] (6)O型口蹄疫阴性血清、阳性血清制备方法:

制备猪O型FMDV阴性血清:取未经疫苗免疫的健康仔猪血清,O型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒测试血清抗体为阴性。

[0058] 制备猪O型FMDV阳性血清:对2月龄仔猪肌肉免疫1毫升猪口蹄疫O型灭活疫苗,1个月后加强免疫1次,加强免疫后2周静脉采血,分离血清,用O型口蹄疫间接血凝抗体检测试剂盒将血清抗体效价标定为1:512。

[0059] 实施例2 试剂条的制作与检测

本实施例中的试剂条,半成品通过以下工序组装而成:在第1、3、4、6、7、12分别分装100μL免疫磁珠、200μL生物素化羊抗猪抗体、SA-Eu³⁺、900μL洗液、900μL洗液、300μL增强液,然后用封膜机封口,所述的封板膜上涂有可供全自动荧光检测分析仪扫描识别的产品信息标识包括企业标准曲线、批次、生产日期、有效期。成品试剂条、分装好的O型口蹄疫阴性血清、阳性血清与其他配件组装成试剂盒。

[0060] 样本检测:

①加样:

将待测样本或者O型口蹄疫抗体标准品放入全自动仪器的装载系统,将试剂条插入试剂条卡槽,仪器自动识别封板膜的产品信息。在试剂条1或2中加入100μL待测样本,然后加

入生物素化羊抗猪抗体100 μ L。

[0061] ④ 孵育：

加样完成后37 $^{\circ}$ C震荡孵育10min。

[0062] ⑤ 洗涤：

孵育完成后,仪器自动洗孔5次,每次洗液200 μ L/孔。

[0063] ⑥ 加标记物：

加入100 μ L SA-Eu³⁺,37 $^{\circ}$ C震荡孵育10min;洗涤5次。

[0064] ⑦ 加入增强液：

洗涤完成后,加入增强液100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育3min。

[0065] ⑧ 检测：

试剂条被推入暗室,仪器自动检测并出结果。

[0066] 用来测试试剂条的全自动磁珠时间分辨荧光免疫分析仪包含样本装载系统、条码读取系统、加样系统、温育系统、荧光光源检测系统及自动软件分析控制系统。

[0067] 本发明所述的荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒,检测样本时只需将试剂条插入全自动仪器中,仪器自动完成加样、孵育、磁分离、检测过程,全程只需要30min即可以读取检测报告。

[0068] 本发明将固相磁珠、镧系元素、生物素-链酶亲和素放大系统融于一体,使其灵敏度大大提高,比胶体金、荧光免疫层析试剂灵敏度更高,更准确。相比化学发光法、ELISA检测时间短,价格低廉、可以实现大量样本现场检测。

[0069] 实施例3 灵敏度检测

本方法步骤如下：

(1) 将已标定抗体效价为1:512的猪O型FMDV阳性标准血清用样本稀释液从1:32开始做倍比稀释,分别是1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024六个稀释度,将稀释好的样本放入样本仓。

[0070] (2) 向试剂条测试孔中加入100 μ I生物素化羊抗猪抗体,37 $^{\circ}$ C孵育10min;然后弃上清,用洗液洗涤5次,每次加入200 μ I洗涤液;

(3) 向试剂条测试孔加入100 μ I稀释度为1:80000的SA-Eu³⁺,37 $^{\circ}$ C孵育10min,然后弃上清,用洗液洗涤;

(4) 向试剂条测试孔加入增强液100 μ I,孵育5min;

(5) 检测仪自动检测荧光值。

[0071] 若待测血清的荧光值 \geq 37695,则待测血清未感染O型口蹄疫病毒;

若待测血清的荧光值 $<$ 37695,则待测血清感染或候选感染O型口蹄疫病毒。

[0072] 所述参考值的确定方法为:计算100份标准阴性血清的荧光值平均值(\bar{x}_1)和标准差(s_1),根据统计学原则,待检血清的荧光值值 $\geq \bar{x}_1+3s_1$ 时,则可以在99.9%的水平上判为阳性。因此将 \bar{x}_1+3s_1 所得的值定为阴阳性血清的界限,即37695。

[0073] 结果如表1所示,本方法检测血清样本在1:1024稀释时仍可判为阳性。

[0074] 表1 灵敏度试验结果

血清稀释倍数	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
本方法	1251486	640589	320784	160257	80258	40589

实施例4 特异性实验

用本方法分别检测如下待测血清：猪伪狂犬病毒（PRV）阳性血清、猪瘟病毒（CSFV）阳性血清、猪细小病毒（PPV）阳性血清，猪圆环病毒（PVC）阳性血清，同时设猪O型FMDV阳性、阴性血清对照，观察本方法的特异性。

[0075] 结果见表2，所述待测血清的荧光值 <37695 ，待测血清与O型口蹄疫病毒抗体无交叉反应，可以看出，本发明方法能特异性检测O型口蹄疫病毒抗体。

[0076] 表2特异性实验结果

	PRV	CSFV	PPV	PVC	FMDV(+)	FMDV(-)
荧光值	27421	14389	15624	25126	125984	18345

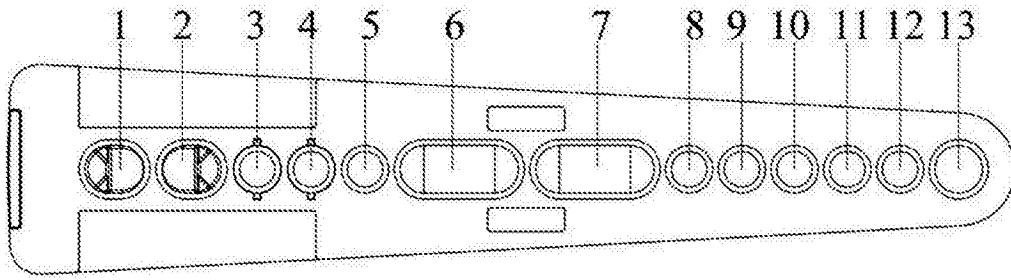


图1

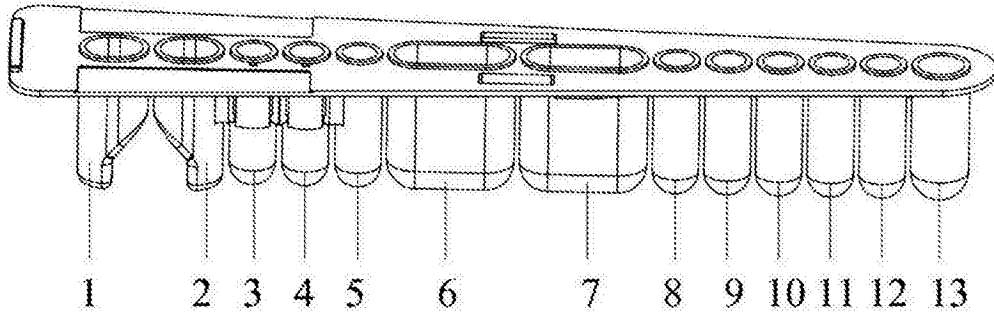


图2

专利名称(译)	一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒		
公开(公告)号	CN108107220A	公开(公告)日	2018-06-01
申请号	CN201711297700.1	申请日	2017-12-08
[标]发明人	李根平		
发明人	李根平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6857 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种荧光免疫磁微粒定量检测O型口蹄疫抗体试剂盒，由O型口蹄疫抗体阴性血清、O型口蹄疫抗体阳性血清、VP1包被磁珠、生物素化羊抗猪抗体、链霉亲和素标记荧光物质、洗涤液和增强液组成。本发明的磁珠具有更大结合面积，大大提高检测范围，缩短反应时间，提高灵敏度。具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱，有利于降低成本，提高灵敏度；比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。采用链霉亲和素-生物素信号放大系统，进一步提高了检测的灵敏度，比ELISA和化学发光灵敏度更高。配套全自动检测仪器，实现现场自动化操作，可同时检测一份或多份样本，操作简便快速、价格低廉。

