



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110174510 A

(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201910341732.X

(22)申请日 2019.04.26

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

(72)发明人 蒋再学 罗满林 吴佳俊 蒋梅  
卜婉迪 肖丽

(74)专利代理机构 桂林市华杰专利商标事务所  
有限责任公司 45112

代理人 杨雪梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

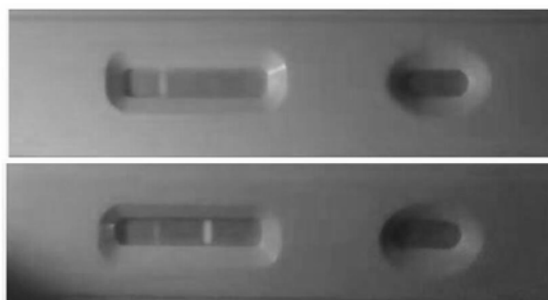
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

### (54)发明名称

一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法

### (57)摘要

本发明公开了一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法,在粘性底板上依次粘贴样品垫、结合垫(固定抗体)、层析膜和吸水纸,还包括PCV3单克隆抗体的配对标记,是取多支PCV3单克隆抗体分别标记荧光微球,采用双抗体夹心原理:在硝酸纤维素膜上的测试区包被抗PCV3抗原单克隆抗体、质控区包被的鸡IgY,荧光标记另外一株PCV3单克隆抗体和羊抗鸡IgY。本发明的优点在于,不需要接种实验室仪器,检测时间快速,检测结果可见。与层析免疫方法不同的是,荧光免疫层析技术采用荧光微球作为标记物,每个微球中可包裹成千上万个荧光分子,大大提高了标记效率,有效的提高了灵敏度;同时荧光微球表面修饰有合适密度的羧基,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高标记物的稳定性。



1. 一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法,在粘性底板上依次粘贴样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸,其特征在于:

还包括PCV3单克隆抗体的配对标记,是取多支PCV3单克隆抗体分别标记荧光微球,具体步骤如下:

(1)将20 $\mu$ L荧光微球溶于500 $\mu$ L的100 nM pH 6.2磷酸二氢钠缓冲液,加入10 $\mu$ L的50 mM 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和10 $\mu$ L的50 mM N-羟基琥珀酰亚胺反应20 min,使微荧光球表面羧基基团活化;

(2)活化后,置于4 $^{\circ}$ C下,以17500 rpm离心1 h后弃上清,加入500 $\mu$ L的50 mM 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液,以100 W的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,使之分散;

(3)分散后,加入40 $\mu$ g PCV3单克隆抗体,使PCV3单克隆抗体与荧光微球表面羧基基团偶联,室温震荡反应2h;

(4)震荡反应后,加入50 $\mu$ L含10%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,用于封闭微球上未标记单克隆抗体的羧基基团,15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C震荡反应10 min;

(5)震荡反应后,以17500 rpm离心45min,离心后弃上清,加入500 $\mu$ L微球重悬液,以100 W的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,使之分散,置于4 $^{\circ}$ C环境保存;

所述样品垫的制备是将其浸泡于样品垫处理液中,1h后取出,置于室温干燥16 h~18 h;

所述层析膜的制备是将多支PCV3单克隆抗体做为检测抗体分别与羊抗鸡单克隆抗体包被于层析膜,具体步骤如下:

(A)用含0.5%海藻糖的pH7.4的磷酸缓冲盐溶液稀释PCV3单克隆抗体至终浓度1.0 mg/mL,用pH7.4的磷酸缓冲盐溶液稀释羊抗鸡单克隆抗体至终浓度1.0 mg/mL;

(B)将稀释后的PCV3单克隆抗体按1.2  $\mu$ L/cm的包被量包被在层析膜上,作为检测T线区域;

(C)将稀释后的羊抗鸡单克隆抗体按1.0  $\mu$ L/cm的包被量包被在层析膜上,作为质控C线区域;

(D)包被后层析膜置于37 $^{\circ}$ C烘3 h,再置于15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C干燥环境下保存;

所述PCV3的荧光免疫层析检测卡的组装,将样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸依次粘贴在底板上,样品垫的始端与粘性底板的始端对齐,吸水纸的末端与粘性底板的末端对齐,层析膜上检测T线区域和质控C线区域均为与所述吸水纸的水平方向垂直的条状带;

检测T线区域位于近结合垫的一侧;质控C线区域位于近吸水纸的一侧;将吸水纸用机器切成条,装在特制的塑料卡中,形成检测卡。

2. 根据权利要求1所述的PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于:

所述微球重悬液是将荧光微球重悬于硼酸盐缓冲液制备而成;

所述样品垫处理液由含有0.05v/v%Tween 20、5w/v%蔗糖、0.5v/v%Triton X 100、0.5w/v%BSA的0.01mol/L PBS溶液混合而成。

## 一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫层析检测领域,具体是一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法。

### 背景技术

[0002] 猪圆环病毒(PCV)长期威胁着我国养猪业的健康发展。以往的研究主要针对猪圆环病毒2型(PCV2)的研究。近些年,新出现的猪圆环病毒3型(PCV3)对养猪业造成了巨大的经济损失。临床上急需一种可以快速对PCV3进行检测的方法。

[0003] 分子生物学诊断可以对病原进行快速的诊断,然而这类检测方法需要借助实验室仪器等进行检测。另外一方面,病原的实验室检测需要对病原进行分离及保存。需要一定的低温环境运输,病原运输到实验室再进行检测。检测周期最快需要1天。而临床上的疫病发展迅速,多一天时间,多一天传播风险。

[0004] 另外一方面,不论是PCR检测还是荧光定量PCR检测,均需要借助多种实验试剂进行操作,还需要专业的技术人员进行操作,检测成本昂贵。

[0005] 免疫层析技术(Immunochromatographic Assay, ICA)是结合免疫技术和色谱层析技术的一种分析方法,该方法具有特异性、操作简单、快速等特点,广泛应用于临床诊断、环境监测、食品安全等重要领域。传统免疫层析技术以胶体金为标记物,通过条带显色对目标物定性检测或半定量分析。该方法虽然简单快速,但灵敏度较差,难以准确定量。荧光免疫层析技术作为一项新型免疫检测技术,既保留了传统胶体金试纸条的现场快速检测优点,又加入了荧光检测技术的高灵敏度特点,成为提高免疫层析方法检测性能的主要途径之一。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法,采用该检测卡可以对PCV3进行快速检测,检测结果即时可见。

[0007] 本发明PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备,采用双抗体夹心原理:在硝酸纤维素膜上的测试区包被抗PCV3抗原单克隆抗体、质控区包被的鸡IgY,荧光标记另外一株PCV3单克隆抗体和羊抗鸡IgY。

[0008] 本发明一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法,在粘性底板上依次粘贴样品垫、结合垫(固定抗体)、层析膜和吸水纸,还包括PCV3单克隆抗体的配对标记,是取多支PCV3单克隆抗体分别标记荧光微球,具体步骤如下:

(1)将20 $\mu$ L荧光微球溶于500 $\mu$ L的100 nM pH 6.2磷酸二氢钠缓冲液,加入10 $\mu$ L的50 mM 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和10 $\mu$ L的50 mM N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)反应20 min,使微荧光球表面羧基基团活化;

(2)活化后,置于4 $^{\circ}$ C下,以17500 rpm离心1 h后弃上清,加入500 $\mu$ L的50 mM 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液,以100 W的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,

使之分散；

(3) 分散后，加入40 $\mu$ g PCV3单克隆抗体，使PCV3单克隆抗体与荧光微球表面羧基基团偶联，室温震荡反应2h；

(4) 震荡反应后，加入50 $\mu$ L含10%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液，用于封闭微球上未标记单克隆抗体的羧基基团，15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C震荡反应10 min；

(5) 震荡反应后，以17500 rpm离心45min，离心后弃上清，加入500 $\mu$ L微球重悬液，以100 W的功率超声重悬3次，每次工作时间3秒，间隔时间3秒，使之分散，置于4 $^{\circ}$ C环境保存；

所述微球重悬液是将荧光微球重悬于硼酸盐缓冲液制备而成；

所述样品垫的制备是将其浸泡于样品垫处理液中，1h后取出，置于室温干燥16 h ~18 h；

样品垫处理液由含有0.05v/v%Tween 20、5w/v%蔗糖、0.5v/v%Triton X 100、0.5w/v%BSA的0.01mol/L PBS溶液混合而成；

所述层析膜的制备是将多支PCV3单克隆抗体做为检测抗体分别与羊抗鸡单克隆抗体包被于层析膜，具体步骤如下：

(A) 用含0.5%海藻糖的pH7.4的磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释PCV3单克隆抗体至终浓度1.0 mg/mL，用pH7.4的磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释羊抗鸡单克隆抗体至终浓度1.0 mg/mL；

(B) 将稀释后的PCV3单克隆抗体按1.2  $\mu$ L/cm的包被量包被在层析膜上，作为检测T线区域；

(C) 将稀释后的羊抗鸡单克隆抗体按1.0  $\mu$ L/cm的包被量包被在层析膜上，作为质控C线区域；

(D) 包被后层析膜置于37 $^{\circ}$ C烘3 h，再置于15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C干燥环境下保存；

所述PCV3的荧光免疫层析检测卡的组装，将样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸依次粘贴在底板上，样品垫的始端与粘性底板的始端对齐，吸水纸的末端与粘性底板的末端对齐，层析膜上检测T线区域和质控C线区域均为与所述吸水纸的水平方向垂直的条状带；

检测T线区域位于近结合垫的一侧；质控C线区域位于近吸水纸的一侧；将吸水纸用机器切成 3.96 mm 宽的小条，装在特制的塑料制卡中，形成检测卡；

将检测卡置于2~8 $^{\circ}$ C阴凉避光环境用铝箔袋干燥密封保存。

[0009] 测试时，样本滴加到检测卡的加样孔中，在毛细效应下向上层析，样本中的PCV3抗原与荧光微球标记的抗体结合，扩散至测试区，被包被的抗PCV3抗原单克隆抗体捕获，并形成复合物聚集于测试区。在激发光的作用下，荧光物质发射一定波长的光信号，被荧光免疫层析检测卡识别，并转化为一定的数值。将该数值计算出样本中抗原的浓度或者在一定光的波长下显示特异性条带。

[0010] 本发明的优点在于，不需要接种实验室仪器，检测时间快速，检测结果可见。

[0011] 与层析免疫方法不同的是，荧光免疫层析技术采用荧光微球作为标记物，每个微球中可包裹成千上万个荧光分子，大大提高了标记效率，有效的提高了灵敏度；同时荧光微球表面修饰有合适密度的羧基，用于与蛋白或抗体的共价偶联，提高标记物的稳定性。具有优势如下：

(1) 灵敏度高，比胶体金检测技术灵敏度高2-3个数量级；

(2) 可定量检测，可给出待测物的具体浓度；

- (3) 标记物稳定, 抗干扰强, 检测结果重复性好;
- (4) 操作简便, 检测时间短, 可用于现场筛查;
- (5) 成本便宜, 性价比高。

## 附图说明

[0012] 图1为实施例PCV3荧光免疫层次检测卡对PCV3的检测结果。

## 具体实施方式

[0013] 下面结合实施例和附图对本发明内容作进一步的说明, 但不是对本发明的限定。

## 实施例

[0014] 一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法, 在粘性底板上依次粘贴样品垫、结合垫(固定抗体)、层析膜和吸水纸, 还包括PCV3单克隆抗体的配对标记, 是取8支PCV3单克隆抗体分别标记荧光微球, 具体步骤如下:

(1) 将20 $\mu$ L荧光微球溶于500 $\mu$ L的100 nM pH 6.2磷酸二氢钠缓冲液, 加入10 $\mu$ L的50 mM 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和10 $\mu$ L的50 mM N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)反应20 min, 使微荧光球表面羧基基团活化;

(2) 活化后, 置于4 $^{\circ}$ C下, 以17500 rpm离心1 h后弃上清, 加入500 $\mu$ L的50 mM 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液, 以100 W的功率超声重悬3次, 每次工作时间3秒, 间隔时间3秒, 使之分散;

(3) 分散后, 加入40 $\mu$ g PCV3单克隆抗体, 使PCV3单克隆抗体与荧光微球表面羧基基团偶联, 室温震荡反应2h;

(4) 震荡反应后, 加入50 $\mu$ L含10%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液, 用于封闭微球上未标记单克隆抗体的羧基基团, 15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C震荡反应10 min;

(5) 震荡反应后, 以17500 rpm离心45min, 离心后弃上清, 加入500 $\mu$ L微球重悬液, 以100 W的功率超声重悬3次, 每次工作时间3秒, 间隔时间3秒, 使之分散, 置于4 $^{\circ}$ C环境保存;

所述微球重悬液是将荧光微球重悬于硼酸盐缓冲液制备而成;

所述样品垫的制备是将其浸泡于样品垫处理液中, 1h后取出, 置于室温干燥16 h~18 h;

样品垫处理液由含有0.05v/v% Tween 20、5w/v%蔗糖、0.5v/v% Triton X 100、0.5w/v% BSA的0.01mol/L PBS溶液混合而成;

所述层析膜的制备是将8支PCV3单克隆抗体做为检测抗体分别与羊抗鸡单克隆抗体包被于层析膜, 具体步骤如下:

(A) 用含0.5%海藻糖的pH7.4的磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释PCV3单克隆抗体至终浓度1.0 mg/mL, 用pH7.4的磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释羊抗鸡单克隆抗体至终浓度1.0 mg/mL;

(B) 将稀释后的PCV3单克隆抗体按1.2  $\mu$ L/cm的包被量包被在层析膜上, 作为检测T线区域;

(C) 将稀释后的羊抗鸡单克隆抗体按1.0  $\mu$ L/cm的包被量包被在层析膜上, 作为质控C线区域;

(D) 包被后层析膜置于37℃烘3 h,再置于15℃~25℃干燥环境下保存;

所述PCV3的荧光免疫层析检测卡的组装,将样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸依次粘贴在底板上,样品垫的始端与粘性底板的始端对齐,吸水纸的末端与粘性底板的末端对齐,层析膜上检测T线区域和质控C线区域均为与所述吸水纸的水平方向垂直的条状带;

检测T线区域位于近结合垫的一侧;质控C线区域位于近吸水纸的一侧;将吸水纸用机器切成 3.96 mm 宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成检测卡;

将检测卡置于2~8℃阴凉避光环境用铝箔袋干燥密封保存。

[0015] 采用本实施例PCV3的荧光免疫层析检测卡对样品进行检测:

将200 mg/L的PCV3 Cap蛋白作为标准品,按一定比例稀释为至少6种浓度(表1中的是最终抗体配对的结果),最低浓度不大于10 mg/L,最高浓度不小于150 mg/L,在荧光免疫定量分析仪上按试剂说明书进行操作,将每一浓度的样本重复检测5次,计算T/C均值。在蓝勃干式免疫荧光分析软件上,用双对数曲线进行剂量-反应曲线拟合,确定下表1中的信息后开始免疫层析检测卡的烧制。

[0016] 取100 μL F3代PCV3病毒液加100 μL裂解液混匀,滴加5滴到加样孔,5 min后紫外手电筒照射观察结果或免疫荧光仪上机分析。

[0017] 表1 腹水配对的最后优化结果

包被抗体	C7F			D2D		
	B7D	C7F	D4C	D2D	C7F	D4C
标记抗体						
零点(显色深浅)	无	+	无	无	无	无
PCV3-cap 浓度(0.084 mg/mL)	+	+	+	+	++	+
PCV3-cap 浓度(0.0168 mg/mL)	+	+	+	无	+	+
PCV3-cap 浓度(0.0084 mg/mL)	±	+	±	无	+	±

表1的结果是不同PCV抗体配对的结果。

[0018] 采用本实施例PCV3的荧光免疫层析检测卡对样品进行检测,结果如图1所示,图中白色条带代表特异性条带。

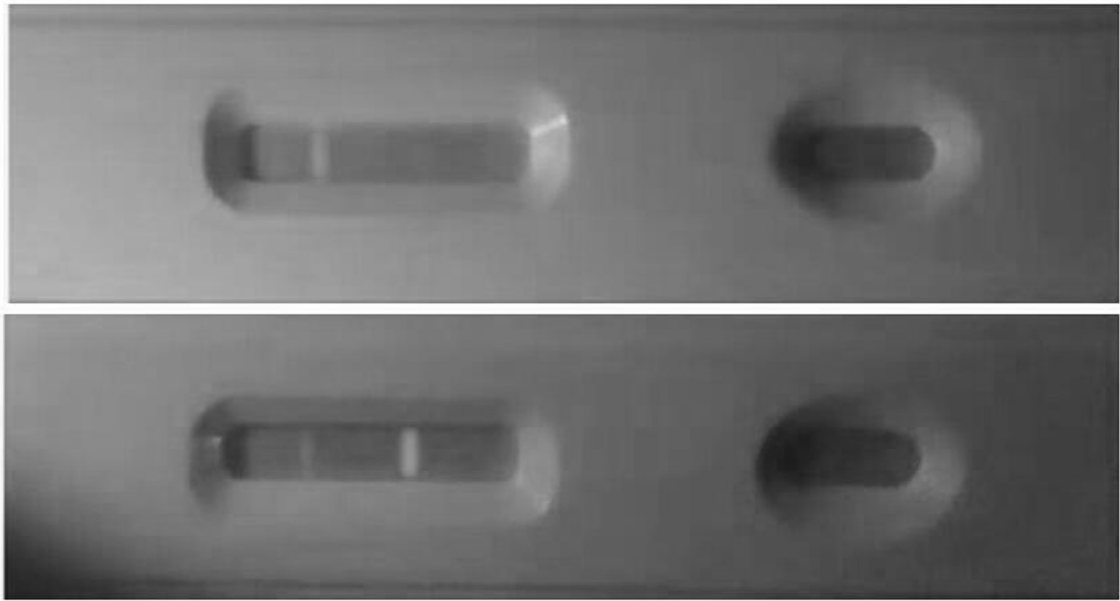


图1

专利名称(译)	一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110174510A</a>	公开(公告)日	2019-08-27
申请号	CN201910341732.X	申请日	2019-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	蒋再学 罗满林 吴佳俊 蒋梅 肖丽		
发明人	蒋再学 罗满林 吴佳俊 蒋梅 卜婉迪 肖丽		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	杨雪梅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种PCV3的荧光免疫层析检测卡的制备方法，在粘性底板上依次粘贴样品垫、结合垫（固定抗体）、层析膜和吸水纸，还包括PCV3单克隆抗体的配对标记，是取多支PCV3单克隆抗体分别标记荧光微球，采用双抗体夹心原理：在硝酸纤维素膜上的测试区包被抗PCV3抗原单克隆抗体、质控区包被的鸡IgY，荧光标记另外一株PCV3单克隆抗体和羊抗鸡IgY。本发明的优点在于，不需要接种实验室仪器，检测时间快速，检测结果可见。与层析免疫方法不同的是，荧光免疫层析技术采用荧光微球作为标记物，每个微球中可包裹成千上万个荧光分子，大大提高了标记效率，有效的提高了灵敏度；同时荧光微球表面修饰有合适密度的羧基，用于与蛋白或抗体的共价偶联，提高标记物的稳定性。

