



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 208795748 U

(45)授权公告日 2019.04.26

(21)申请号 201821587407.9

(22)申请日 2018.09.28

(73)专利权人 苏州西山生物技术有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区

星湖街218号生物医药产业园C4-5F

(72)发明人 时长军 张文娟 冯小龙

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有

限公司 32103

代理人 马明渡 杨超

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

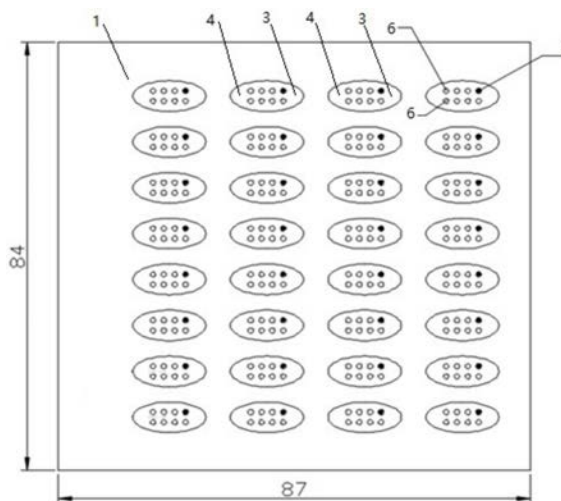
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)实用新型名称

一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒

(57)摘要

一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒,其特征在于:包括抗原板、与抗原板相匹配的深孔板以及塑料平皿;抗原板从下到上依次由支撑板、硝酸纤维膜以及盖板组成,硝酸纤维膜固定在支撑板上,硝酸纤维膜上预点有多组按顺序排列的含有病毒抗原的病毒抗原点,盖板固定设置在硝酸纤维膜上,盖板上设有多个反应孔,反应孔的数量和位置与病毒抗原点的组数和位置对应设置,一组病毒抗原点位于盖板上一个反应孔内。本实用新型可一次性同时检测出多种病毒抗体,可直接加样进行检测,操作简单,检测速度快,效率高,所需样本量和试剂量均很少,也便于储存和运输。



1. 一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 包括抗原板、与抗原板相匹配的深孔板以及塑料平皿; 所述抗原板从下到上依次由支撑板、硝酸纤维膜以及盖板组成, 所述硝酸纤维膜固定在支撑板上, 硝酸纤维膜上预点有多组按顺序排列的含有病毒抗原的病毒抗原点, 所述盖板固定设置在硝酸纤维膜上, 盖板上设有多个反应孔, 所述反应孔的数量和位置与硝酸纤维膜上病毒抗原点的组数和位置对应设置, 一组病毒抗原点位于盖板上一个反应孔内。

2. 根据权利要求1所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述支撑板和盖板的材质均为PVC板, 所述支撑板上粘贴有作为抗原载体的硝酸纤维膜。

3. 根据权利要求1所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述盖板上设有按阵列排列的8行4列共32个反应孔或8行6列共48个反应孔, 反应孔内有定位点。

4. 根据权利要求3所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述深孔板上设有8行12列共96个样本稀释孔, 所述抗原板上反应孔的列间距与深孔板上样本稀释孔的列间距相匹配。

5. 根据权利要求1所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述塑料平皿的尺寸为10cm×10cm。

6. 根据权利要求1所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述硝酸纤维膜上预点的病毒抗原为实验猴易感的B病毒、猴T细胞趋向性病毒1型、猴逆转录D型病毒、麻疹病毒、埃博拉病毒、猴痘病毒、狂犬病毒、猴病毒40、猴水痘病毒、猴泡沫病毒、实验小鼠SPF级必检病毒、实验大鼠SPF必检病毒以及重组蛋白抗原的至少一种抗原。

7. 根据权利要求6所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述实验小鼠SPF级必检病毒为小鼠鼠痘病毒、小鼠肝炎病毒、小鼠微小病毒、小鼠肺炎病毒、小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型以及小鼠仙台病毒全病毒抗原中的一种。

8. 根据权利要求6所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述实验大鼠SPF必检病毒为大鼠汉坦病毒、大鼠细小病毒KRV株、大鼠细小病毒H1株、大鼠肺炎病毒、大鼠冠状病毒、大鼠涎腺腺炎病毒、大鼠呼肠孤病毒Ⅲ型以及小鼠仙台病毒全病毒抗原中的一种。

9. 根据权利要求6所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述重组蛋白抗原为B病毒、猴T细胞趋向性病毒1型、猴逆转录D型病毒、埃博拉病毒、大鼠汉坦病毒的重组蛋白抗原中的一种。

10. 根据权利要求1所述的一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒还包括一台用于将染色后的抗原板成像的成像仪。

一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种板式固相酶联免疫检测试剂盒,具体涉及一种检测非人灵长类实验动物多项病毒的新型板式斑点免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 灵长类实验动物是研究病毒感染性疾病、神经系统疾病及肿瘤等疾病和新药研发所必需的重要动物模型。随着研究的深入,对灵长类实验动物的需求量及其品质的要求也不断提高。我国科技部已经制定实验猴健康标准,明确要求普通级动物必须是B病毒阴性,SPF级动物必须是B病毒、包括STLV、SIV、SRV在内的逆转录病毒等阴性,但因为缺乏可靠的检测方法,灵长类实验动物健康检测远远跟不上行业发展的需要,因此,提供一种灵敏度高、特异性强、检测速度快、效率高、稳定性好的猴病毒检测方法已成为必然的需求。现有的检测方法主要是玻片法和ELISA法、斑点免疫法免疫梳法,前两种方法一次只能检测出一种病毒,操作繁琐,检测速度慢,效率低;免疫梳法制作成本高,操作繁琐,不易推广。例如斑点免疫法如中国专利CN202393770U公开了一种实验动物多项病毒的简易蛋白芯片定性检测试剂盒,该试剂盒包括按矩阵预点了多种病毒抗原及参照细胞的芯片膜、用于加样的载样条、渗滤用的渗滤垫和反应的塑料平皿,所述的载样条贴覆在所述的芯片膜上按矩阵排列的每组抗原点上,这种试剂盒需要将载样条逐个对应贴覆在芯片膜上,操作比较繁琐,检测速度慢,效率低。中国专利CN202393769U公开了一种梳式斑点酶联免疫多项病毒检测试剂盒,包括抗原梳、与抗原梳相匹配的深孔板和塑料平皿、所述抗原梳设置有多个平行的梳齿,这种试剂盒在检测时需要将梳齿插入到深孔板中,深孔板中的样品需没过梳齿,因此该试剂盒需要的样品量大,制作成本高。

发明内容

[0003] 为解决现有技术操作繁琐、检测速度慢、效率低以及需要样品量大的不足,本实用新型的目的在于提供一种灵敏度高、特异性强、检测速度快、效率高、制作成本低且易于推广的新型斑点多项病毒抗体检测试剂盒。

[0004] 为达到上述目的,本实用新型采用的技术方案是:一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒,包括抗原板、与抗原板相匹配的深孔板以及塑料平皿;所述抗原板从下到上依次由支撑板、硝酸纤维膜以及盖板组成,所述硝酸纤维膜固定在支撑板上,硝酸纤维膜上预点有多组按顺序排列的含有病毒抗原的病毒抗原点,所述盖板固定设置在硝酸纤维膜上,盖板上设有多个反应孔,所述反应孔的数量和位置与硝酸纤维膜上病毒抗原点的组数和位置对应设置,一组病毒抗原点位于盖板上一个反应孔内。

[0005] 上述技术方案中的有关内容解释如下:

[0006] 1、上述方案中,所述支撑板和盖板的材质均为PVC板,所述支撑板粘贴有作为抗原载体的硝酸纤维膜。

[0007] 2、上述方案中,所述盖板上设有按阵列排列的8行4列共32个反应孔或8行6列共48

个反应孔。

[0008] 3、上述方案中,所述深孔板上设有8行12列共96个样本稀释孔,即深孔板的规格为0.2 ml 96孔,深孔板每列具有8个孔,所述抗原板上反应孔的列间距与深孔板上样本稀释孔的列间距相匹配。

[0009] 4、上述方案中,所述塑料平皿的尺寸为10cm×10cm。

[0010] 5、上述方案中,所述硝酸纤维膜上预点的病毒抗原为实验猴易感的B病毒、猴T细胞趋向性病毒1型、猴逆转录D型病毒、麻疹病毒、埃博拉病毒、猴痘病毒、狂犬病毒、猴病毒40、猴水痘病毒、猴泡沫病毒、实验小鼠SPF级必检病毒、实验大鼠SPF必检病毒以及重组蛋白抗原的至少一种抗原,可按需组合。

[0011] 进一步地,所述实验小鼠SPF级必检病毒为小鼠鼠痘病毒小鼠肝炎病毒、小鼠微小病毒、小鼠肺炎病毒、小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型以及小鼠仙台病毒全病毒抗原中的一种。

[0012] 进一步地,所述实验大鼠SPF必检病毒为大鼠汉坦病毒、大鼠细小病毒KRV株、大鼠细小病毒H1株、大鼠肺炎病毒、大鼠冠状病毒、大鼠涎腺炎病毒、大鼠呼肠孤病毒Ⅲ型以及小鼠仙台病毒全病毒抗原中的一种。

[0013] 进一步地,所述重组蛋白抗原为B病毒、猴T细胞趋向性病毒1型、猴逆转录D型病毒、埃博拉病毒、大鼠汉坦病毒的重组蛋白抗原中的一种。

[0014] 6、上述方案中,所述试剂盒还包括一台用于将染色后的抗原板成像的成像仪。而通过成像仪将染色后的抗原板拍成照片,再经过软件的处理和分析,可以对结果做定量分析。

[0015] 7、上述方案中,所述病毒抗原点是指预点的病毒抗原所在的位置,病毒抗原点上具有病毒抗原。

[0016] 8、上述方案中,硝酸纤维膜通过贴合的方式固定在支撑板上,盖板也通过贴合的方式固定在硝酸纤维膜上。

[0017] 上述抗原板使用贴附有硝酸纤维膜的PVC板为病毒抗原的载体,先将该硝酸纤维膜贴于PVC板材上,再将所需检测的病毒抗原按顺序点布在硝酸纤维膜上。将待检样本在深孔板中进行稀释,然后用多孔道移液枪成排加入到抗原板对应的反应孔中,样本中相关的病毒抗体和硝酸纤维膜上相应的抗原发生特异性结合,孵育后洗涤加入酶标二抗,形成抗原-抗体-酶复合物,洗涤除去非结合物,最后加入显色剂显色,一定时间后终止反应,通过所述一系列的反应使得相应的抗原点呈现肉眼可见的斑点,达到定性检测病毒的目的。

[0018] 本实用新型的有益效果是:

[0019] (1) 本实用新型提供的检测试剂盒,可在两小时内,一次性同时检测出多种病毒抗体,实现了多种病毒同步检测,减少了每个标本的采样量。

[0020] (2) 一个抗原板可以同时检测32份或48份样本,一次实验可以同时操作多块抗原板,不需要加热设备,大大提高了检测的速度和效率。

[0021] (3) 使用硝酸纤维膜作为固相载体,可以增加抗原吸附量,提高了免疫反应的效率和敏感性,而且可批量加工,且易于保存,稳定性及重复性好,结果可靠。

[0022] (4) 制作方便,成本低廉。检测过程不需要特殊仪器设备,结果可以肉眼观察,并能长期保存,适合养殖场或基层单位使用。也可以使用匹配的成像仪,通过成像仪将染色后的抗原板拍成照片,再经过软件的处理和分析,可以对结果做定量分析。

[0023] 总之,本实用新型的试剂盒一次性同时检测出多种病毒抗体,无需再贴覆载样条,可直接加样进行检测,操作简单,检测速度快,效率高,所需样本量和试剂量均很少,也便于储存和运输。

附图说明

[0024] 图1为本实用新型所述的抗原板的结构示意图;

[0025] 图2为本实用新型所述的与图1所示的抗原板相匹配的深孔板的俯视图。

[0026] 以上附图中:1、抗原板;2、深孔板;3、硝酸纤维膜;4、反应孔;5、样本稀释孔;6、病毒抗原点;7、定位点。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图及实施例对本实用新型作进一步描述:

[0028] 实施例:一种新型多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒

[0029] 参见附图1和附图2所示,该检测试剂盒包括抗原板1、与抗原板1相匹配的0.2 ml 96孔深孔板2以及10cm×10cm的塑料平皿(图中未示出);所述抗原板1从下到上依次由支撑板、硝酸纤维膜3以及盖板组成,所述硝酸纤维膜3固定贴合在支撑板上,硝酸纤维膜3上预点有多组按顺序排列的含有病毒抗原的病毒抗原点6,所述盖板固定贴合在硝酸纤维膜3上,盖板上设有8行4列共32个椭圆形反应孔4,所述反应孔4的数量和位置与硝酸纤维膜3上病毒抗原点的组数和位置对应设置,一组病毒抗原点6位于盖板上的一個反应孔4内。

[0030] 所述支撑板和盖板的材质均为PVC板,支撑板上粘贴有作为抗原载体的硝酸纤维膜3。

[0031] 所述深孔板2上设有8行12列共96个样本稀释孔5,所述抗原板1上反应孔3的列间距与深孔板2上样本稀释孔5的列间距相匹配。

[0032] 所述硝酸纤维膜3上预点的病毒抗原为实验猴易感的B病毒、猴T细胞趋向性病毒1型、猴逆转录D型病毒、麻疹病毒、埃博拉病毒、猴痘病毒、狂犬病毒、猴病毒40、猴水痘病毒、猴泡沫病毒、实验小鼠SPF级必检病毒、实验大鼠SPF必检病毒以及重组蛋白抗原的至少一种抗原,可按需组合。所述实验小鼠SPF级必检病毒为小鼠鼠痘病毒小鼠肝炎病毒、小鼠微小病毒、小鼠肺炎病毒、小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型以及小鼠仙台病毒全病毒抗原中的一种。所述实验大鼠SPF必检病毒为大鼠汉坦病毒、大鼠细小病毒KRV株、大鼠细小病毒H1株、大鼠肺炎病毒、大鼠冠状病毒、大鼠涎腺炎病毒、大鼠呼肠孤病毒Ⅲ型以及小鼠仙台病毒全病毒抗原中的一种。所述重组蛋白抗原为B病毒、猴T细胞趋向性病毒1型、猴逆转录D型病毒、埃博拉病毒、大鼠汉坦病毒的重组蛋白抗原中的一种。

[0033] 所述试剂盒还包括一台用于将染色后的抗原板成像的成像仪,通过成像仪将染色后的抗原板拍成照片,再经过软件的处理和分析,可以对结果做定量分析。

[0034] 将待检样本加入到深孔板2中稀释后,加入抗原板1的反应孔4内,样本中相关的病毒抗体和硝酸纤维膜3上相应的抗原发生特异性结合,洗涤后加入酶标二抗,形成抗原-抗体-酶复合物,洗涤清楚非结合物,最后加入显色剂显色一定时间后终止反应,通过所述一系列的反应使得相应的抗原点呈现肉眼可见的斑点,达到定性检测病毒的目的。

[0035] 新型板式斑点多项病毒检测试剂盒对病毒抗体的定性检测方法如下:

[0036] 1、准备新型板式斑点多项病毒检测试剂盒内的材料及试剂

[0037] (1) 10cm×10cm塑料平皿；

[0038] (2) 96孔0.2 ml深孔板；

[0039] (3) 将硝酸纤维膜3贴于厚原带胶的PVC板(即支撑板)上,将所需检测的病毒抗原按矩阵点于硝酸纤维膜3上,具体为:如图1所示:图中每个抗原板1的反应孔4位置点有八个点,第一个标记点(颜色实际为紫色)用于定位,作为定位点7,其它点为病毒抗原点6;然后切割成87×84mm矩形。

[0040] (4) 将提前切割好含椭圆形反应孔的0.4mmPVC板(规格87×84mm,即盖板)参考硝酸纤维膜3上的定位点7贴合并压实,制成抗原板1,4℃干燥保存。

[0041] (5) 碱性磷酸酶标记的IgG二抗；

[0042] (6) 碱性磷酸酶底物；

[0043] (7) 0.1%PBST 洗涤液,室温保存；

[0044] (8) 样本稀释液, 4℃保存；

[0045] 2、操作步骤

[0046] (1) 将抗原板1从冰箱拿出,平衡20-30分钟至室温,放入5样本稀释液中封闭0.5小时,封闭后用蒸馏水冲洗,放入10cm×10cm塑料平皿中以0.1%PBST浸泡待用。

[0047] (2) 将待检血清样本按照一定稀释比例用样本稀释液稀释于0.2 ml深孔板2中,将稀释好的血清震荡混匀。

[0048] (3) 将浸泡抗原板1的0.1%PBST倒出,用吸水纸吸走反应孔4中剩余的0.1%PBST,用多道移液器将稀释好的血清加入到抗原板1上的反应孔4内,室温反应30分钟。

[0049] (4) 孵育结束后,先用吸水纸吸走样本稀释液,再用0.1%PBST快速冲洗抗原板1后置于加入洗涤液的新的10cm×10cm塑料平皿中,置于摇床上中速摇动。洗涤3遍,每遍5分钟。

[0050] (5) 将碱性磷酸酶标记的二抗按所需浓度稀释混匀后加入平皿中,置室温(20-25℃)孵育30分钟。

[0051] (7) 倒出二抗溶液,加入洗涤液,在摇床上快速摇动。洗涤3遍,每遍5分钟。洗完后将洗涤液倒出,并用吸水纸吸除抗原板1的反应孔4内的剩余洗涤液。

[0052] (8) 将显色液加入塑料平皿中,染色2-5分钟,然后用水冲洗抗原板1片刻,置于空气中自然晾干,最后判读结果。染色后,病毒抗体阳性的点蓝紫色(可视点),病毒抗体阴性的抗原点无着色。

[0053] 3、结果判定,可以选用3.1和/或3.2所述方式进行判读。

[0054] 3.1肉眼判读

[0055] 阳性(P):若对照细胞点无色或颜色很淡,但病毒抗原点颜色达试剂盒中提供的阳性对照点深度或更深,则判为阳性；

[0056] 阴性(N):若病毒抗原点无色,或颜色很浅且与相应对照细胞点接近,判为阴性。

[0057] 3.2对检测结果做定量分析

[0058] 取获得的带有免疫斑点的抗原板1,通过成像仪将抗原板1成像,再用Image J软件进行处理和分析。即可对所检测的病毒抗体做定量分析。

[0059] 本实用新型提供的检测试剂盒,可在两小时内,一次性同时检测出B病毒、STLV、

SIV、SRV、麻疹病毒、埃博拉病毒、猴痘病毒、狂犬病毒、猴病毒40及猴泡沫病毒等多种病毒抗体中的任意数种,实现了多种病毒同步检测,减少了每个标本的采样量。一个抗原板1可以同时检测32份样本,一次实验可以同时检测多个抗原板,大大提高了检测的速度和效率。预点了若干病毒抗原的硝酸纤维膜可批量加工,且易于保存,稳定性及重复性好,结果可靠。

[0060] 上述实施例只为说明本实用新型的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本实用新型的内容并据以实施,并不能以此限制本实用新型的保护范围。凡根据本实用新型精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本实用新型的保护范围之内。

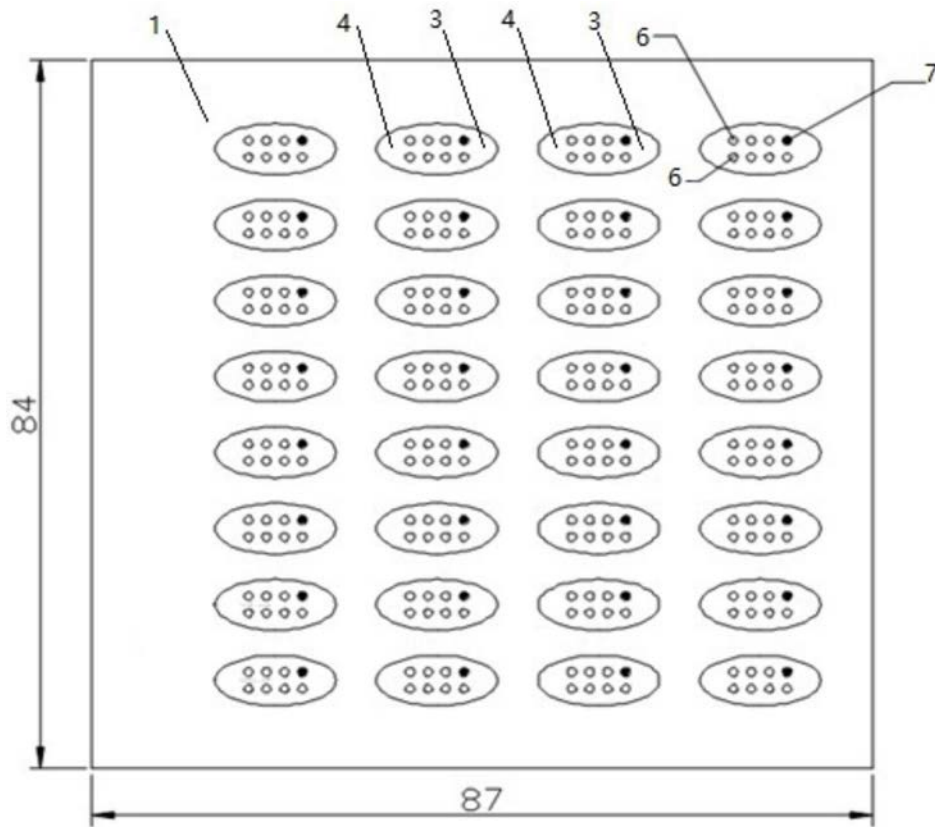


图1

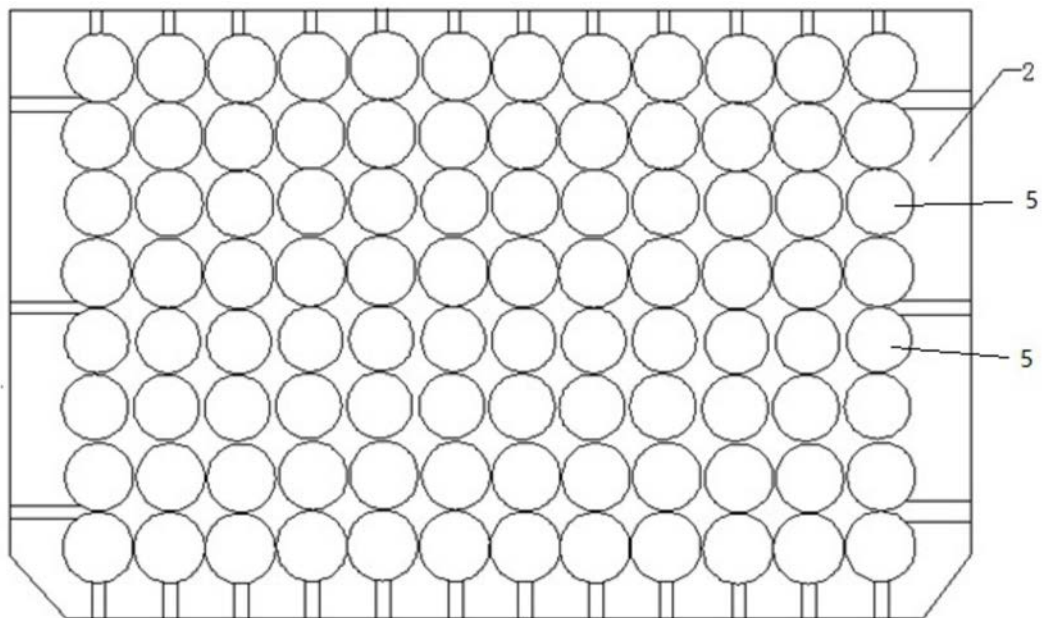


图2

专利名称(译)	一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN208795748U	公开(公告)日	2019-04-26
申请号	CN201821587407.9	申请日	2018-09-28
[标]发明人	时长军 张文娟 冯小龙		
发明人	时长军 张文娟 冯小龙		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	杨超		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种新型板式多项病毒抗体斑点免疫检测试剂盒，其特征在于：包括抗原板、与抗原板相匹配的深孔板以及塑料平皿；抗原板从下到上依次由支撑板、硝酸纤维膜以及盖板组成，硝酸纤维膜固定在支撑板上，硝酸纤维膜上预点有多组按顺序排列的含有病毒抗原的病毒抗原点，盖板固定设置在硝酸纤维膜上，盖板上设有多个反应孔，反应孔的数量和位置与病毒抗原点的组数和位置对应设置，一组病毒抗原点位于盖板上的一个反应孔内。本实用新型可一次性同时检测出多种病毒抗体，可直接加样进行检测，操作简单，检测速度快，效率高，所需样本量和试剂量均很少，也便于储存和运输。

