



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108362877 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201810067151.7

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.01.24

(71)申请人 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

地址 730050 甘肃省兰州市小西湖硷沟沿335号

申请人 北京天之泰生物科技有限公司
北京天恩泰生物科技有限公司

(72)发明人 吴培星 韩涛 宋楠 付军权
李纯玲 张继瑜

(74)专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 11129

代理人 吴泳历

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

猫杯状病毒荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明“猫杯状病毒荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法”，涉及动物病毒检测技术，其特征在于：包括背衬以及在背衬上依次设置的结合垫、层析膜以及吸水垫，构成可使液体样品从结合垫层析到吸水垫的层析路径；所述结合垫上结合有荧光微球标记抗体复合物；所述层析膜上设置有与所述层析路径垂直的检测线 and 对照线。可用于现场快速检测，步骤简单快捷，且灵敏度和特异性都与PCR方法相当，可用于猫杯状病毒的检测和预防。

1. 一种猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 荧光免疫层析检测试纸条, 其特征在于:

包括背衬以及在背衬上依次设置的结合垫、层析膜以及吸水垫, 构成可使样品从结合垫层析到吸水垫的层析路径;

所述结合垫上结合有荧光微球标记抗体复合物; 所述层析膜上设置有与所述层析路径垂直的检测线 and 对照线;

所述荧光微球标记抗体复合物是荧光微球与兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) F蛋白多克隆抗体的偶联物;

所述检测线由羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 多克隆抗体包被而成, 所述对照线由葡萄球菌蛋白 (Staphylococcal Protein A, SPA) 包被而成;

所述荧光微球粒径为180-240nm。

2. 根据权利要求1所述的试纸条, 其特征在于, 所述结合垫上, 所述荧光微球标记抗体复合物的包被密度: 以兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) F蛋白多克隆抗体质量计为7.5ug/每平方厘米。

3. 根据权利要求2所述的试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球标记抗体复合物是通过如下步骤制备而得: 将荧光微球与兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) F蛋白多克隆抗体以2~6mg:1~3mg的比例, 优选2~5mg:1mg, 2~4mg:1mg或3mg:1mg的比例, 进行偶联反应制得。

4. 根据权利要求3所述的试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球标记抗体复合物是通过如下步骤制备而得: 向pH5.0, 浓度0.02mol/L的PBS溶液中依次加入所述荧光微球、加入浓度为10mg/ml的EDC溶液, 再加入兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) F蛋白多克隆抗体, 室温下缓慢搅拌2h, 加入终浓度为2%的BSA溶液封闭30min后, 以10000r/min、4℃离心10min, 移出上清液, 所得沉淀中即含有所述荧光微球标记抗体复合物。

5. 根据权利要求3所述的试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球的粒径210nm。

6. 根据权利要求1-5任一所述的试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球为稀土铕荧光微球。

7. 根据权利要求1-5任一所述的试纸条, 其特征在于, 所述试纸条宽度为3mm, 所述检测线和对照线的宽度也为3mm; 所述检测线上, 所述的羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 多克隆抗体包被量为0.5ug/条, 所述的葡萄球菌蛋白包被量为0.3ug/条; 优选地, 检测线和对照线相距5mm。

8. 根据权利要求1所述的试纸条, 其特征在于,

所述结合垫的上游还设置有样品垫; 用于接收样品, 并将样品中的物质输送到结合垫上;

优选地, 还包括外壳, 所述外壳对应所述样品垫的位置有开口, 对应检测线和质控线的位置设置为透明或开口结构。

9. 权利要求1-8任一所述的猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 荧光免疫层析检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 包括

制备所述荧光微球标记抗体复合物: 将荧光微球与兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) F蛋白多克隆抗体以2~6mg:1~3mg的比例, 优选2~5mg:1mg, 2~4mg:

1mg或3mg:1mg的比例,进行偶联反应;

将荧光微球标记抗体复合物溶液以5ul/cm喷在结合垫上,真空抽干;

将结合垫,层析膜,吸水垫依次装配到试纸条底衬上。

10.根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于,还包括将浓度为2mg/ml的羊抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)多克隆抗体和浓度为1mg/ml的葡萄球菌蛋白分别包被在层析膜上,形成相距5mm的所述检测线和所述对照线;

优选地,所述荧光微球标记抗体复合物的制备步骤如下:向pH5.0,浓度0.02mol/L的PBS溶液中依次加入所述荧光微球、加入浓度为10mg/ml的EDC溶液,再加入兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体,室温下缓慢搅拌2h,加入终浓度为2%的BSA溶液封闭30min后,以10000r/min、4℃离心10min,移出上清液,所得沉淀中即含有所述荧光微球标记抗体复合物;

优选地,在将所述荧光微球标记抗体复合物碰到结合垫之前,先采用pH8.2,含2%吐温的浓度为0.05M的硼酸缓冲溶液浸泡处理结合垫;

优选地,还包括制备兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体:用纯化的猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白免疫家兔,采血并分离血清,FCV F-ELISA检测抗体效价,若效价达到1:5000以上,通过颈动脉放血,分离血清,灭活后用抗体纯化柱对多克隆抗体进行纯化,用PBS稀释至1mg/ml;

优选地,还包括羊抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)多克隆抗体的制备:用纯化的猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)免疫绵羊,经耳静脉采血并分离血清,用FCV-ELISA检测抗体效价,若效价达到1:5000以上,通过颈动脉放血,分离血清,灭活后用抗体纯化柱对多克隆抗体进行纯化,用PBS稀释至2mg/ml。

猫杯状病毒荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于动物病毒检测技术领域,具体涉及猫杯状病毒(Feline calicivirus, FCV)荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV),为杯状病毒科,水疱性病毒属,是一种单链RNA病毒。FCV是猫病毒性呼吸道传染病主要表现为口腔溃疡、眼鼻分泌物增多、流涎、结膜炎、羞明、口腔炎、气管炎、支气管炎,伴有双相热。是猫的多发病,发病率高,强毒株感染可发生肺炎、呼吸困难、甚至死亡。主要传染源为病猫和带毒猫,病猫在急性期可随分泌物和排泄物排出大量病毒,直接传染易感猫。带毒猫经治疗,症状可消失,但临床康复后仍长期排毒,是危险的传染源。

[0003] 目前,检测FCV的方法包括:电镜观察技术、免疫荧光试验、病毒核酸的PCR检测等试验,然而这些方法费时费力,所以难以推广虽然特异性和敏感性都很高,但需要专门的仪器设备和技术人员,只能用于实验室检测。这些方法均不适用于现场检测、快速检测和基层兽医部门临床检测。现有的针对动物病毒检测方法包括荧光免疫层析检测的方法,荧光免疫层析技术,是免疫荧光技术工和传统免疫层析技术相结合发展创新的一种定量新型检测技术。免疫层析技术以固定有检测线和控制线的条状纤维层析材料为固定相,测试液为流动相,通过毛细作用使待测物在层析条上移动,待测物在线处发生特异性免疫反应。游离物在线处发生免疫反应。该技术在保留胶体金免疫层析技术操作简便、检测快速、便携性强的优点外,还通过荧光示踪增强技术实现了检测结果的精确定量。

[0004] 针对猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)建立荧光免疫层析检测试纸和检测技术,用于现场快速检测,有利于对感染流行病学的调查,从而为即的预防和控制提供科学的依据,有利于动物的健康发展,成为本领域技术人员函待解决的技术难题。目前还未见到报道。

发明内容

[0005] 基于上述领域的技术需求和空白,本发明建立了针对猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)的荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法,可以用于FCV的快速检测和现场检测:

[0006] 为了达到上述技术效果,本发明的技术方案包括

[0007] 一种猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)荧光免疫层析检测试纸条,其特征在于:

[0008] 包括背衬以及在背衬上依次设置的结合垫、层析膜以及吸水垫,构成可使样品从结合垫层析到吸水垫的层析路径;

[0009] 所述结合垫上结合有荧光微球标记抗体复合物;所述层析膜上设置有与所述层析路径垂直的检测线和对照线;

[0010] 所述荧光微球标记抗体复合物是荧光微球与兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体的偶联物;

[0011] 所述检测线由羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 多克隆抗体包被而成,所述对照线由葡萄球菌蛋白 (Staphylococcal Protein A,SPA) 包被而成;

[0012] 所述荧光微球粒径为180-240nm。

[0013] 在一些实施例中,所述结合垫上,其特征在于,所述结合垫上,所述荧光微球标记抗体复合物的包被密度:以兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体质量计为7.5ug/每平方厘米。

[0014] 在一些实施例中,所述荧光微球标记抗体复合物是通过如下步骤制备而得:将荧光微球与兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体以2~6mg:1~3mg的比例,优选2~5mg:1mg,2~4mg:1mg或3mg:1mg的比例,进行偶联反应制得。

[0015] 优选地,在一些实施例中,所述荧光微球标记抗体复合物是通过如下步骤制备而得:向pH5.0,浓度0.02mol/L的PBS溶液中依次加入所述荧光微球、加入浓度为10mg/ml的EDC溶液,再加入兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体,室温下缓慢搅拌2h,加入终浓度为2%的BSA溶液封闭30min后,以10000r/min、4℃离心10min,移上清液,所得沉淀中即含有所述荧光微球标记抗体复合物。

[0016] 在一些实施例中,优选所述荧光微球的粒径210nm。

[0017] 在一些实施例中,所述荧光微球为稀土铕荧光微球。

[0018] 上述任一所述的试纸条,其特征在于,所述试纸条宽度为3mm,所述检测线和对照线的宽度也为3mm;所述检测线上,所述的羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 多克隆抗体包被量为0.5ug/条,所述的葡萄球菌蛋白包被量为0.3ug/条;优选地,检测线和对照线相距5mm。

[0019] 上述任一所述的试纸条,所述结合垫的上游还设置有样品垫;用于接收样品,并将样品中的物质输送到结合垫上;

[0020] 优选地,还包括外壳,所述外壳对应所述样品垫的位置有开口,对应检测线和质控线的位置设置为透明或开口结构。

[0021] 本发明的另一方面,提供上述的猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 荧光免疫层析检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括

[0022] 制备所述荧光微球标记抗体复合物:将荧光微球与兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体以2~6mg:1~3mg的比例,优选2~5mg:1mg,2~4mg:1mg或3mg:1mg的比例,进行偶联反应;

[0023] 将荧光微球标记抗体复合物溶液以5ul/cm喷在结合垫上,真空抽干;

[0024] 将结合垫,层析膜,吸水垫依次装配到试纸条底衬上。

[0025] 优选地,还包括将浓度为2mg/ml的羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 多克隆抗体和浓度为1mg/ml的葡萄球菌蛋白分别包被在层析膜上,形成相距5mm的所述检测线和所述对照线;

[0026] 优选地,所述荧光微球标记抗体复合物的制备步骤如下:向pH5.0,浓度0.02mol/L的PBS溶液中依次加入所述荧光微球、加入浓度为10mg/ml的EDC溶液,再加入兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体,室温下缓慢搅拌2h,加入终浓度为2%的

BSA溶液封闭30min后,以10000r/min、4℃离心10min,移出上清液,所得沉淀中即含有所述荧光微球标记抗体复合物;

[0027] 优选地,在将所述荧光微球标记抗体复合物碰到结合垫之前,先采用pH8.2,含2%吐温的浓度为0.05M的硼酸缓冲溶液浸泡处理结合垫;

[0028] 优选地,还包括制备兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体:用纯化的猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白免疫家兔,采血并分离血清,,FCV F-ELISA检测抗体效价,若效价达到1:5000以上,通过颈动脉放血,分离血清,灭活后用抗体纯化柱对多克隆抗体进行纯化,用PBS稀释至1mg/ml;

[0029] 优选地,还包括羊抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)多克隆抗体的制备:用纯化的猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)免疫绵羊,经耳静脉采血并分离血清,用FCV-ELISA检测抗体效价,效价达到1:5000以上时,通过颈动脉放血,分离血清,灭活后用抗体纯化柱对多克隆抗体进行纯化,用PBS稀释至2mg/ml。

[0030] 本发明通过荧光微球的粒径、种类、荧光微球与抗体偶联条件的优化,以及包埋量等因素的优化和选择,成功建立了能够高度特异、高灵敏度地检测猫杯状病毒的荧光免疫层析检测试纸条。与ELISA检测方法相比,两种方法检测结果符合率为98.9%。该试纸条具有检测快速、操作简便、不需要专门的仪器设备和专业技术人员的优点。另外,该试纸条易于保存和运输,使用检测样品量小,检测成本较低,操作安全,不造成环境污染。因此该方法特别适用于快速检测、基层兽医诊断部门临床检测和养殖企业自行检测等。该试纸条的研制,为FCV的检测、检疫和流行病学调查提供良好的工具。

附图说明

[0031] 图1所示为本发明一种猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)荧光免疫层析检测试纸条结构示意图:

[0032] 1-背衬、2-样品垫、3-结合垫、4-层析膜、41-检测线、42-对照线、5-吸水垫。

具体实施方式

[0033] 下文将结合图1及具体实施例详细描述本发明,但不作为对本发明保护范围的限制。

[0034] XYZ3050点样平台(美国BioDot公司)

[0035] CM4000切条机(美国BioDot公司)

[0036] 离心机(湘仪)

[0037] 酶标仪(Thermo Scientific)

[0038] 3月龄健康绵羊、20周龄BALB/c纯系小鼠购自实验动物中心。

[0039] EDC:1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,购买自SIGMA

[0040] 用猫细小病毒、猫疱疹病毒、猫传染性鼻支气管炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒以及标准阳性样品购买自荷兰GD公司。

[0041] 荧光微球:含铕时间分辨荧光微球,粒径为210nm,激发波长为340nm,发射波长为610nm,购自Merk公司。

[0042] 蛋白A/G抗体纯化柱:购买自SIGMA

[0043] 葡萄球菌蛋白:购买自SIGMA

[0044] 如图1所示一种猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 荧光免疫层析检测试纸条结构示意图,包括背衬1.样品垫;2.结合垫;3.检测线41和对照线42;4.吸水垫;所述检测线41包被有羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 多克隆抗体,所述对照线42包被有葡萄球菌蛋白,所述的兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体浓度为1mg/ml。

[0045] 实施例1.制备兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体的制备

[0046] (1) 用纯化的基因工程表达的猫杯状病毒F蛋白:

[0047] 参照2016年硕士论文,蒋艳妹的《猫杯状病毒VP1抗原性分析及间接ELISA诊断方法的建立》中记载的方法。

[0048] (2) 纯化猫杯状病毒F蛋白免疫3月龄健康家兔,免疫剂量为0.5mg/只,间隔2周免疫1次,共免疫4次,最后一次免疫15后天,经耳静脉采血并分离血清,检测抗体效价后;。

[0049] (3) 兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体的特异性和ELISA效价:用猫细小病毒、猫疱疹病毒、猫传染性鼻支气管炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒共4份病毒阳性血清,分别建立间接ELISA方法检测。结果显示,均不与这些抗原建立的ELISA有特异性结合,表明该抗体具有良好的特异性,用FCV检测抗体效价为1:5000。

[0050] (4) 通过颈动脉放血,分离血清,于56℃灭活30min,用抗体A/G纯化柱对多克隆抗体进行纯化,用DU-800核酸分析/蛋白分析仪测定IgG蛋白含量为2mg/ml,用pH7.2的0.02mol/lPBS稀释至1mg/ml。

[0051] 制备羊抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 多克隆抗体:

[0052] 用纯化的猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) 免疫3月龄健康绵羊,免疫剂量为3mg/只,间隔2周免疫1次,共免疫4次,最后一次免疫15后天,经耳静脉采血并分离血清,检测抗体效价后,通过颈动脉放血,分离血清,于56℃灭活30min,用抗体A/G纯化柱对多克隆抗体进行纯化,用DU-800核酸分析/蛋白分析仪测定IgG蛋白含量为3.1mg/ml,用pH7.2的0.02mol/lPBS稀释至2mg/ml。

[0053] 实施例3.制备试纸条

[0054] (1) 荧光微球标记兔抗猫杯状病毒 (Feline calicivirus,FCV) F蛋白多克隆抗体

[0055] 采用EDC介导法将纯化的单克隆抗体和荧光微球(粒径为210nm,激发波长为470nm,发射波长为525nm,Merk公司产品)进行偶联。向5mlpH5.0的0.02mol/lPBS溶液中依次加入3mg荧光微球,15ul现配的浓度为10mg/ml的EDC溶液,再加入浓度为1mg/ml兔抗猫杯状病毒F蛋白多克隆抗体1ml,室温下缓慢搅拌2h,用终浓度为2%BSA的封闭30min后,10000r/min、4℃离心10min,移出上清液,加入500ul重悬沉淀物,充分混匀,将荧光微球标记抗体复合物于4℃保存备用。

[0056] (2) 结合垫的制备:用XYZ3050点样平台将荧光微球标记的多克隆抗体复合物溶液喷于300mm*5mm玻璃纤维棉上,喷量为5ul/cm,并于4℃真空抽干。

[0057] (3) 层析膜的制备

[0058] 检测线和对照线的制备首先将硝酸纤维素膜(35mm*300mm)粘贴于背衬(70mm*300mm)正中表面,用纯化的羊抗多克隆抗体(2mg/ml)和葡萄球菌蛋白(1mg/ml)分别作为检测线和对照线试剂。将两种试剂分别点在硝酸纤维素膜上,蛋白包被量分别为0.5ug/条和

0.3ug/条。点样时,检测线41位于硝酸纤维素膜中线,对照线42与检测线41之间距离为5mm。37℃干燥2h,4℃密封保存备。

[0059] (4) 纸条的组装和切割

[0060] 按图1所示,将背衬1和已点样检测线41和对照线42试剂的硝酸纤维膜4、荧光微球标记兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体复合物垫3、样品垫2、吸水垫5粘在一起,压实后,于CM4000切条机中,将其切成3mm宽的试纸条。

[0061] 根据点样速度和检测线试剂及对照线试剂的浓度,得出检测线和对照线试剂包被量分别为0.5ug/条和0.3ug/条。

[0062] 试纸条的检测原理、结果判定标准和检测步骤制备试纸条时,将荧光微球标记兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体复合物固定于复合物垫上,检测线为羊抗FCV多克隆抗体,对照线为SPA。检测时,阳性样品中的FCV与荧光微球标记兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体特异性地结合,在NC膜上移动时,被检测线上的FCV多克隆抗体捕获,荧光微球颗粒聚集于此,在荧光读取仪激发光源的激发下,形成可见的绿色荧光条带,即检测线。相反,阴性样品中不含FCV,在检测线处不形成绿色荧光条带。检测线试剂SPA与荧光微球标记兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体Fc片段结合,捕获金标复合物,形成对照线。无论样品中是否含有,荧光微球标记兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体均能与对照线试剂结合,形成对照线。在判定结果时,若检测线和对照线同时显色,则为阳性,若检测线不显色,对照线显色,则为阴性。若检测线和对照线均不显色或检测线显色且对照线不显色,均为无效结果,需更换试纸条重新检测。检测时,将试纸条平放于实验台上,取100ul用等检样品加于样品垫上,室温静置反应,在15min内使用荧光读取仪观察检测线和对照线显色情况,并进行结果判定。

[0063] 实验例1荧光免疫层析检测试纸条特异性、敏感性和符合率试验

[0064] (1) 试纸条的特异性

[0065] 用试纸条分别检测份猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)即标准阳性样品、其它相关病毒包括猫细小病毒、猫疱疹病毒、猫传染性鼻支气管炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒阳性样品及阴性对照样品。

[0066] 表1检测近似病毒结果

[0067]

样品	检测结果 (荧光值)	结果
禽白血病毒 P27 蛋白	1298	阳性
猫细小病毒	102	阴性
猫疱疹病毒	106	阴性
猫传染性鼻支气管炎病毒	97	阴性
猫传染性腹膜炎病毒阳性样品	105	阴性
阴性对照样品	108	阴性

[0068] 结果显示试纸条检测FCV阳性样品时为阳性反应,与其它病毒阳性及阴性对照样品时均为阴性。表明试纸条特异性良好。

[0069] (2) 试纸条的敏感性

[0070] 用试纸条检测系列稀释 10^1 – 10^7 的FCV阳性样品,同时用作对照,

[0071] 所用引物上游:cgGGATCCatgtgctcaacctgcgctaacg

[0072] 下游:cgGAATTCTcataacttagtcatgggactcct

[0073] 表2检测标准品验证试纸条灵敏性

[0074]

样品	本试纸条检测结果 (荧光值)	结果	对照方法: PCR 方法
原液			
原液稀释 10 倍	1363	阳性	阳性
原液稀释 10^2 倍	1231	阳性	阳性
原液稀释 10^3 倍	1276	阳性	阳性
原液稀释 10^4 倍	1138	阳性	阳性
原液稀释 10^5 倍	936	阳性	阳性
原液稀释 10^6 倍	596	阴性	阴性
原液稀释 10^7 倍	332	阴性	阴性

[0075] 结果显示试纸条可检出 10^5 稀释的阳性样品,可以达到PCR检测灵敏度。

[0076] (3) 试纸条与PCR方法检测结果

[0077] 用试纸条和PCR同时检测临床样品550份,结果如下表。

[0078] 根据检测结果计算得出,与PCR相比,试纸条敏感性为98.9%,特异性为98.7%,试纸条和PCR检测结果之间的符合率为98.9%

[0079] 详细数据见表1:

[0080] 表3临床样品检测结果

[0081]			PCR		
			阳性	阴性	总数
	试纸条	阳性	152	4	156
		阴性	2	392	394
		总数	154	396	550

[0082] 实施例4选择不同荧光微球对检测结果的影响

[0083] 在实施例3的一组平行实验中,荧光微球采用粒径均为210nm的含铈时间分辨荧光微球,含异硫氰酸罗丹明荧光微球,含1,8-萘二酰亚胺类荧光微球三种微球标记单抗,其余制作步骤完全同实施例1,做成3种试纸条。

[0084] 检测阴性血清和含有0.5ug FCV蛋白的阳性血清,结果如下表4:

[0085] 表4,采用不同荧光微球的检测结果差异

[0086]

	含铈时间分辨荧光 微球试纸条	含异硫氰酸罗丹明荧光 微球试纸条	含 1, 8-萘二酰亚胺类荧 光微球试纸条
阴性血清	96	472	607
含有 0.5ug FCV 蛋白 的阳性血清	1196	891	1242

[0087] 可以看到,210nm含铈时间分辨荧光微球的灵敏度明显比其他两种微球的高。

[0088] 进行同实验例1中的特异性、灵敏度实验完全一样的实验例,结果显示,210含铈时间分辨荧光微球试纸条的特异性,灵敏性都显著优于其余两组。

[0089] 实施例5荧光微球和多抗偶联的投料比对检测结果的影响

[0090] 在另一组平行实验中,比较了在,

[0091] 将实施例1的步骤二中,荧光微球(含铈时间分辨荧光微球)和单抗的投料比设计为6mg:1mg;3mg:1mg;3mg:3mg三种方案,其它操作和试剂完全同实施例1,做成三种试纸条检测样品(阴性血清,含有0.5ug血病病毒P27蛋白的血清)的荧光值,各重复检测8次,所得的结果见表5。

[0092] 表5荧光微球和单抗的不同投料比的试纸条检测结果差异

[0093]

	荧光微球和多抗 的投料比设计为 6mg: 1 mg	荧光微球和多抗的 投料比设计为 3mg: 1 mg	荧光微球和多抗 的投料比设计为 3mg: 3 mg
阴性血清	377	98	103
含有 0.5ug FCV 蛋 白的阳性血清	1076	1297	804

[0094] 可以看出,荧光微球和多抗的投料比在3:1时灵敏度更高;也发现2~5mg:1mg或2~4mg:1mg的投料比能得到与3:1相近的效果,

[0095] 进行同实验例1中的特异性、灵敏度实验完全一样的实验例,结果显示,荧光微球和单抗的投料比设计为3mg:1mg的试纸条的特异性,灵敏性都显著优于其余两组。

[0096] 本发明所制备的兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体,具有与FCV特异性结合的活性,并与其他相关病毒无交叉反应,表明该兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体可以用于免疫学检测方法。基于荧光微球标记的兔抗猫杯状病毒(Feline calicivirus,FCV)F蛋白多克隆抗体和SPA作为主要材料,建立免疫层析检测试纸条具有良好的特异性和敏感性,与PCR检测方法相比,两种方法检测结果符合率为98.9%。该试纸条具有检测快速、操作简便、不需要专业技术人员。另外,该试纸条易于保存和运输,使用检测样品量小,检测成本较低,操作安全,不造成环境污染。因此该方法特别适用于FCV的快速检测、基层兽医临床检测等。该试纸条的研制为检测、检疫和流行病学调查提供良好的工具。

[0097] 上述详细说明是针对发明的可行实施例的具体说明,该实施例并非用以限制本发明的专利范围,凡未脱离本发明的等效实施或变更,均应当包含于本发明的专利范围内。

[0098] 另外,本领域技术人员还可在本发明权利要求公开的范围和精神内做其它形式和细节上的各种修改、添加和替换。当然,这些依据本发明精神所做的各种修改、添加和替换等变化,都应包含在本发明所要求保护的范围之内。

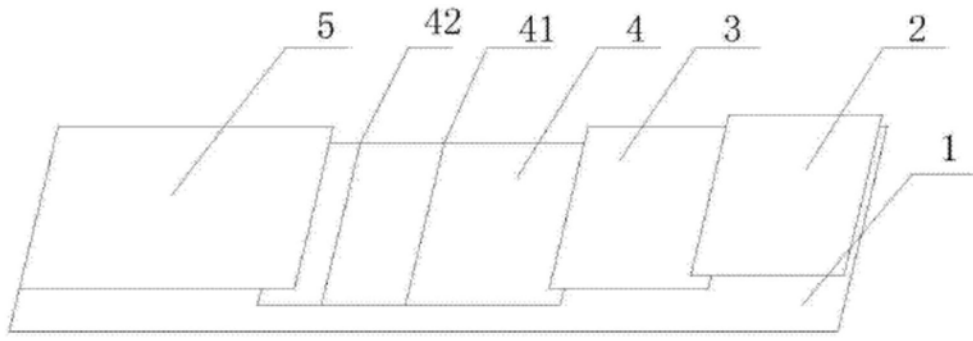


图1

专利名称(译)	猫杯状病毒荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN108362877A	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201810067151.7	申请日	2018-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 北京天之泰生物科技有限公司 北京天恩泰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 北京天之泰生物科技有限公司 北京天恩泰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 北京天之泰生物科技有限公司 北京天恩泰生物科技有限公司		
[标]发明人	吴培星 韩涛 宋楠 付军权 李纯玲 张继瑜		
发明人	吴培星 韩涛 宋楠 付军权 李纯玲 张继瑜		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明“猫杯状病毒荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法”，涉及动物病毒检测技术，其特征在于：包括背衬以及在背衬上依次设置的结合垫、层析膜以及吸水垫，构成可使液体样品从结合垫层析到吸水垫的层析路径；所述结合垫上结合有荧光微球标记抗体复合物；所述层析膜上设置有与所述层析路径垂直的检测线和对照线。可用于现场快速检测,步骤简单快捷，且灵敏度和特异性都与PCR方法相当，可用于猫杯状病毒的检测和预防。

样品	检测结果 (荧光值)	结果
禽白血病毒 P27 蛋白	1298	阳性
猫细小病毒	102	阴性
猫疱疹病毒	106	阴性
猫传染性鼻支气管炎病毒	97	阴性
猫传染性腹膜炎病毒阳性样品	105	阴性
阴性对照样品	108	阴性