



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645682 A

(43)申请公布日 2017. 05. 10

(21)申请号 201611080554.2

(22)申请日 2016.11.30

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730030 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 孙世琪 郭慧琛 张韵 常艳燕
魏衍全 茹嘉喜 智晓莹 杜平
刘湘涛 殷宏 罗建勋

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

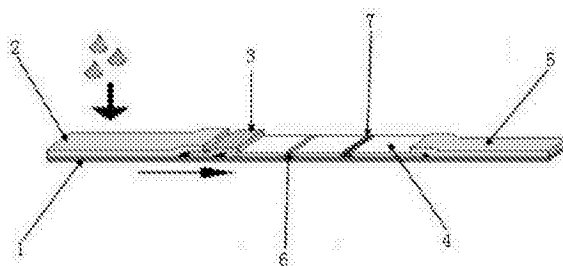
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸
及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法,涉及血清学检测技术领域,包括底板,底板的顶部设置有检测层,检测层包括检测线和对照线,检测层的顶部靠近对照线的一侧设置有吸收层,靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫,免疫金标垫的顶部设置有样品垫;免疫金标垫上涂覆有胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有proteinG,检测线上涂覆/浸润有Asia I型口蹄疫病毒样颗粒相对应的纯化后蛋白,对照线上涂覆/浸润有兔IgG。所述免疫金标垫胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$ 。本发明,能够实时快速诊断Asia I型口蹄疫,且准确度较高。



1. 一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:包括底板(1),底板(1)的顶部设置有检测层(4),检测层(4)上设置有检测线(6)和对照线(7),检测层(4)的顶部靠近对照线(7)的一侧设置有吸收层(5),靠近检测线(6)的一侧设置有免疫金标垫(3),免疫金标垫(3)的顶部设置有样品垫(2);

免疫金标垫(3)上涂覆有胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有proteinG,检测线(6)上涂覆/浸润有Asia I型口蹄疫病毒样颗粒相对应的纯化蛋白,对照线(7)上涂覆/浸润有兔IgG;

所述免疫金标垫(3)上胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$ 。

2. 如权利要求1所述的一种用于检测Asia I型口蹄疫的试纸,其特征在于:所述免疫金标垫(3)上胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1.3$ 。

3. 如权利要求1所述的一种用于检测Asia I型口蹄疫的试纸,其特征在于:所述免疫金标垫(3)的吸附比例为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

4. 如权利要求1所述的一种用于检测Asia I型口蹄疫的试纸,其特征在于:所述检测线(6)上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒。

5. 如权利要求1所述的一种用于检测Asia I型口蹄疫的试纸,其特征在于:所述对照线(7)上涂覆/浸润有浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG。

6. 一种用于检测Asia I型口蹄疫的试纸的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、制备LgG,制备并纯化胶体金,将胶体金与proteinG按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 反应,得到免疫胶体金,将浓度为 $1 \sim 1.2 \text{g}/\text{mL}$ 的免疫胶体金按吸附比为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 吸附在玻璃膜上,得到免疫金标垫(3);

B、使用硝酸纤维膜作为检测层(4)基材,在检测线(6)上喷涂浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒,在对照线(7)上喷涂浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG;

在检测层(4)的中部距检测线(6) $0.3 \sim 1 \text{cm}$ 处,喷涂对照线(7),喷膜量为 $5 \sim 15 \mu\text{L}/1 \text{cm}$ 进行喷膜,喷膜后干燥得到检测层(4);

C、在底板1的顶部设置检测层(4),并将检测层(4);压平,将吸收层(5)一部分固定在底板(1)上,一部分固定在检测层(4);上靠近对照线(7)的部分,将免疫金标垫(3)的一侧固定在底板(1)上,另一侧固定在检测层(4);靠近检测线(6)的一侧,样品垫(2)的一侧固定在底板(1)上,样品垫(2)的另一侧固定在免疫金标垫(3)上。

7. 如权利要求6所述的用于测试动物Asia I型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,其特征在于:免疫金标垫(3)的制备方法为:使用浓度为 0.1M 的 K_2CO_3 调整胶体金的pH值为 5.9 ,按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 将相应的proteinG溶液加入胶体金中放置 30min 后,在转速为 $10000 \text{r}/\text{min}$ 、温度为 4°C 的条件下离心 30min ,将沉淀溶于重悬液中混合均匀,用玻璃膜吸附后晾干。

8. 如权利要求6所述的用于测试动物Asia I型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,其特征在于:所述检测线(6)上Asia I型口蹄疫病毒样颗粒的浓度为 $0.8 \text{mg}/\text{mL}$,所述对照线(7)上免疫兔血清IgG的浓度为 $1 \text{mg}/\text{mL}$ 。

一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及血清学检测技术领域,具体涉及一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot-and-mouth disease,FMD)是由FMD病毒(FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性的传染病。该病毒主要分为A型、O型、C型、SAT1型、SAT2型、SAT3型和Asia I型7种血清型,各血清型之间不能产生交叉免疫保护。此外,FMDV还包括许多亚型和突变株,目前已发现80多种亚型,同一血清型内的不同亚型或分离株的抗原性也有不同程度的差异,血清学交叉反应的程度也各不相同,这种特性给FMD的诊断和防制造成一定的困难。

发明内容

[0003] 针对现有技术中存在的缺陷,本发明的目的在于提供一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法,能够实时快速诊断Asia I型口蹄疫,且准确度较高。

[0004] 为达到以上目的,本发明采取的技术方案是:

[0005] 一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸,包括底板,底板的顶部设置有检测层,检测层上设置有检测线 and 对照线,检测层的顶部靠近对照线的一侧设置有吸收层,靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫,免疫金标垫的顶部设置有样品垫;

[0006] 免疫金标垫上涂覆有胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有proteinG,检测线上涂覆/浸润有Asia I型口蹄疫病毒样颗粒相对应的纯化蛋白,对照线上涂覆/浸润有兔IgG;

[0007] 所述免疫金标垫上胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$ 。

[0008] 在上述技术方案的基础上,所述免疫金标垫上胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1.3$ 。

[0009] 在上述技术方案的基础上,所述免疫金标垫的吸附比例为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0010] 在上述技术方案的基础上,所述检测线上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒。

[0011] 在上述技术方案的基础上,所述对照线上涂覆/浸润有浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG。

[0012] 一种用于检测Asia I型口蹄疫的试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0013] A、制备LgG,制备并纯化胶体金,将胶体金与proteinG按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 反应,得到免疫胶体金,将浓度为 $1 \sim 1.2 \text{g}/\text{mL}$ 的免疫胶体金按吸附比为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 吸附在玻璃膜上,得到免疫金标垫;

[0014] B、使用硝酸纤维膜作为检测层基材,在检测线上喷涂浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒,在对照线上喷涂浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG;

[0015] 在检测层的中部距检测线 $0.3 \sim 1 \text{cm}$ 处,喷涂对照线,喷膜量为 $5 \sim 15 \mu\text{I}/1 \text{cm}$ 进行喷膜,喷膜后干燥得到检测层;

[0016] C、在底板1的顶部设置检测层,并将检测层;压平,将吸收层一部分固定在底板上,一部分固定在检测层;上靠近对照线的部分,将免疫金标垫的一侧固定在底板上,另一侧固定在检测层;靠近检测线的一侧,样品垫的一侧固定在底板上,样品垫的一侧固定在底板上,另一侧固定在免疫金标垫上。

[0017] 在上述技术方案的基础上,免疫金标垫的制备方法为:使用浓度为0.1M的 K_2CO_3 调整胶体金的pH值为5.9,按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 将相应的proteinG溶液加入胶体金中放置30min后,在转速为10000r/min、温度为4℃的条件下离心30min,将沉淀溶于重悬液中混合均匀,用玻璃膜吸附后晾干。

[0018] 在上述技术方案的基础上,所述检测线上Asia I型口蹄疫病毒样颗粒的浓度为0.8mg/mL,所述对这线上免疫兔血清IgG的浓度为1mg/mL。

[0019] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0020] (1)本发明的一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸,检测层上设置有检测线和对照线,检测层靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫,免疫金标垫的顶部设置有样品垫。免疫金标垫包括胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有proteinG标记物,检测线涂覆/浸润有Asia I型口蹄疫病毒样颗粒,对照线上涂覆/浸润有兔IgG,免疫金标垫上胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$,检测线上涂覆/浸润有浓度为0.5~1mg/mL的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒。

[0021] 在使用时,直接将血液样品稀释后在现场进行检测,如果血液样品中含有Asia I型口蹄疫抗体,血液样品中的抗体与免疫金标垫中proteinG修饰的胶体金结合形成复合物,与检测线上Asia I型口蹄疫病毒样颗粒结合形成紫红色线条,继续前行,未与抗原结合的抗体携带重组蛋白proteinG与对照线中的IgG抗体形成紫红色线条。

[0022] 将检测结果与常规的CFT、VNT凝集试验、免疫扩散和ELISA进行比较,结果基本一致,且本发明的血液未经过纯化,说明本发明的准确度较高,且检测条件不高,稳定性较好,具有操作简单、检测快速、结果清楚,易于判断和保存,且无需大型仪器设备,成本较低,能够用于临床快速实时检测,快速检测流行病,便于快速采取相应措施,避免疾病大规模爆发。

附图说明

[0023] 图1为本发明实施例中用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸的结构示意图。

[0024] 图中:1-底板,2-样品垫,3-免疫金标垫,4-检测层,5-吸收层,6-检测线,7-对照线。

具体实施方式

[0025] 以下结合附图及实施例对本发明作进一步详细说明。

[0026] 参见图1所示,本发明实施例提供一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸,包括采用PVC制成的底板1,底板1的顶部设置有检测层4,检测线6上设置有检测线6和对照线7,检测层4的顶部靠近对照线7的一侧设置有吸收层5,靠近检测线6的一侧设置有免疫金标垫3,免疫金标垫3的顶部设置有样品垫2。

[0027] 免疫金标垫3包括胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有proteinG标记物,检测线6

涂覆/浸润有Asia I型口蹄疫病毒样颗粒,对照线7上涂覆/浸润有兔IgG,本实施例中,免疫金标垫3上胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$,免疫金标垫3上胶体金与proteinG的最佳比例为 $2 \times 10^4:1.3$,免疫金标垫3的吸附比例为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0028] 检测线6上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒,对照线7上涂覆/浸润有浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG。

[0029] 本发明还提供一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0030] S1、制备IgG:用proteinG采用多点注射法免疫阴性家兔2只,每隔2周加强免疫1次,共进行3次,最后一次免疫10天后采血备用,放入 4°C 冰箱过夜沉淀,将沉淀的全血在转速为 $4000 \text{r}/\text{min}$ 的条件下离心10min,取上清即为血清。将20mI血清中加入20mI生理盐水中,再加入10mI饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,混合均匀后静置30min,然后在转速为 $3000 \text{r}/\text{min}$ 的条件下离心20min,弃去沉淀除去纤维蛋白,取上清液。

[0031] b、在上清液中加入30mI $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液,混合均匀后静置30min,在转速为 $3000 \text{r}/\text{min}$ 的条件下离心20min,弃上清液,取沉淀物,向沉淀物中加20mI生理盐水,10mI $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液,混合均匀后静置30min, $3000 \text{r}/\text{min}$ 离心20min,弃上清。

[0032] 重复b步骤2~3次后,向纯化后的沉淀中加入10mI生理盐水并透析,先放入纯水中透析过夜除盐,然后放入生理盐水中在 4°C 下透析24h,透析期间每2~3h换液一次。

[0033] 检测透析是否完全:检测试剂为浓度为1%的 BaCl_2 (用于检测 SO_4^{2-}) 或以纳氏试剂 (用于检测 NH_4^+):取3~4mI透析液,加入检测试剂1~2滴,出现砖红色即认为有 NH_4^+ 存在),出现白色沉淀即有 SO_4^{2-} 存在,透析至无沉淀出现后,离心去沉淀(去除杂蛋白),上清液即为纯化后的兔IgG。

[0034] S2、制备胶体金:取1g氯金酸溶于100mI三蒸水中制成浓度为1%的氯金酸溶液,向99mI水中加入1mI 1%的氯金酸水溶液,加热至沸腾,边搅拌边逐滴加入1mI浓度为1%的柠檬酸钠三钠水溶液,待颜色变红后继续煮沸5min,冷却后加入蒸馏水至100mI,即为胶体金放置于温度为 4°C 的条件下保存。

[0035] S3、判断proteinG的最小蛋白用量:取一个1.5mI离心管,加入1mI胶体金,用0.1M的 K_2CO_3 调节PH值至8;取96孔板,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的胶体金,取 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 $5 \text{mg}/\text{mI}$ 的proteinG加入 $990 \mu\text{L}$ 的蒸馏水中,取 $1 \sim 20 \mu\text{L}$ proteinG溶液分别加入每孔混匀,室温静置15min;每孔加入浓度为10%的 NaCl 溶液 $20 \mu\text{L}$ 混合均匀,在室温下放置10min,观察胶体金颜色变化,记录颜色仍保持红色的最小蛋白用量,重复3次,取平均值,本实施例中,最小蛋白用量为 $10 \mu\text{L}$,即每 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 $1 \text{g}/100 \text{mI}$ 的胶体金至少需要 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 $0.05 \text{mg}/\text{mI}$ 的proteinG,胶体金与proteinG的质量比为 $2 \times 10^4:1$,最佳胶体金与proteinG的比例为 $2 \times 10^4:1.3$,在实际使用时,可以根据需要调整胶体金和proteinG的比例,可以为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 。

[0036] S4、制备proteinG修饰的胶体金和免疫金标垫3:将相应比例的proteinG溶液加入胶体金中放置30min,再加入1%BSA(牛血清白蛋白)放置30min,在转速为 $10000 \text{r}/\text{min}$ 、温度为 4°C 的条件下离心30min,取沉淀溶于重悬液中溶解,均匀的铺在玻璃纤维膜上,吸附比为 $5 \sim 15 \mu\text{L}/\text{cm}$,最佳吸附比为 $10 \mu\text{L}/\text{cm}$,得到免疫金标垫3。

[0037] S5、制备检测层4

[0038] 使用硝酸纤维膜作为检测层4基材,在检测层4上标记检测线6和对照线7,检测线6

与对照线7之间的距离为0.3~1cm(最优为0.5cm),且对照线7位于纤维素膜的中段,在检测线6上喷涂浓度为0.5~1mg/mL(最优为0.8mg/mL)的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒;在对照线7上喷涂兔IgG,喷涂量为10 μ I/1cm。

[0039] S6、制备样品垫2:以玻璃纤维膜作为样品垫2的基材,将20mM的PB(磷酸盐缓存溶液)、1%的吐温20、1%的BSA和2.5%的蔗糖溶于100mI三蒸水中并过滤得到样品液,把玻璃纤维膜浸泡于该样品液中,完全浸润后取出并晾干。

[0040] S7、在底板1的顶部设置检测层4,并将检测层4压平,将吸收层5(吸水纸)一部分固定在底板1上,一部分固定在检测层4上靠近对照线7的部分,将免疫金标垫3的一侧固定在底板1上,另一侧固定在检测层4靠近检测线6的一侧,样品垫2的一侧固定在底板1上,样品垫2的另一侧固定在免疫金标垫3上。

[0041] 本发明胶体金试纸在使用时,先将样品稀释,然后将胶体金试纸的样品垫2端插入样品中,样品垫2上设置有液面线,样品的液面不能没过液面线,当吸收层5完全被液体浸润后,取出试纸条,平放后5~15分钟内观察结果。

[0042] 如果血液样品中含有Asia I型口蹄疫抗体,血液样品中的抗体与免疫金标垫3中proteinG修饰的胶体金结合形成复合物,与检测线6上Asia I型口蹄疫病毒样颗粒结合形成紫红色线条,继续前行,未与抗原结合的抗体携带重组蛋白proteinG与对照线7中的IgG抗体形成紫红色线条。

[0043] 如果对照线7不出现紫红条带则说明该试纸条失效,如果检测血液样品中不含有Asia I型口蹄疫相关抗体,则检测线6处不会出现紫红色条带,而对照线7处必定仍出现紫红色条带。

[0044] 本发明不局限于上述实施方式,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围之内。本说明书中未作详细描述的内容属于本领域专业技术人员公知的现有技术。

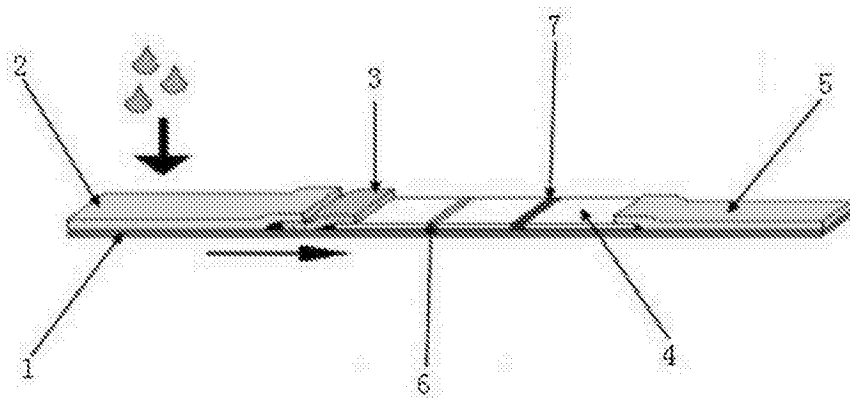


图1

专利名称(译)	一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN106645682A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611080554.2	申请日	2016-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	孙世琪 郭慧琛 张韵 常艳燕 魏衍全 茹嘉喜 智晓莹 杜平 刘湘涛 殷宏 罗建勋		
发明人	孙世琪 郭慧琛 张韵 常艳燕 魏衍全 茹嘉喜 智晓莹 杜平 刘湘涛 殷宏 罗建勋		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测Asia I型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法，涉及血清学检测技术领域，包括底板，底板的顶部设置有检测层，检测层包括检测线和对照线，检测层的顶部靠近对照线的一侧设置有吸收层，靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫，免疫金标垫的顶部设置有样品垫；免疫金标垫上涂覆有胶体金颗粒，该胶体金颗粒上结合有proteinG，检测线上涂覆/浸润有Asia I型口蹄疫病毒样颗粒相对应的纯化后蛋白，对照线上涂覆/浸润有兔IgG。所述免疫金标垫胶体金与proteinG的比例为2×10⁴:1~2。本发明，能够实时快速诊断Asia I型口蹄疫，且准确度较高。

