



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 202159064 U

(45) 授权公告日 2012. 03. 07

(21) 申请号 201120278960. 6

(22) 申请日 2011. 07. 29

(73) 专利权人 滨州职业学院

地址 256600 山东省滨州市滨城区黄河十二路 919 号

(72) 发明人 吴忆春

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

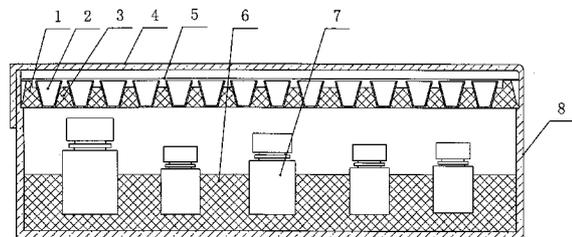
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 实用新型名称

猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒

(57) 摘要

本实用新型提供了一种猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒,它有箱体,箱体上面有盒盖,箱体内的下部有试剂瓶安装座,试剂瓶安装座上面的凹槽内安装有试剂瓶,试剂瓶安装座上方的盒体内安装有酶标板,酶标板上面有多排孔盒,孔盒之间有间隔垫,酶标板上面有盖板膜。这种试剂盒,结构简单合理,灵敏度高,提高了检出率,降低了抗原和酶结合物的用量,相应地也降低了成本;检测时间短,一般 2 个小时内即可出结果;样品无需无菌化处理;操作简便易行;检测成本低廉,适于推广。



1. 猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒,其特征在于,它有箱体(8),箱体上面有盒盖(4),箱体内的下部有试剂瓶安装座(6),试剂瓶安装座上面的凹槽内安装有试剂瓶(7),试剂瓶安装座上方的箱体内存有酶标板(1),酶标板上面有多排孔盒(2),孔盒之间有间隔垫(3),酶标板上面有盖板膜(5)。

## 猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒

### 技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种病毒抗体测定用具,特别涉及一种猪细小病毒抗体的测定用具。

### 背景技术

[0002] 猪细小病毒(英文简称 PPV)会引起妊娠母猪流产、死胎及胎儿木乃伊化,对养猪业危害较大,感染率高,在我国经产母猪及种公猪感染率高达 92%。80 年代以来,PPV 灭活苗及弱毒苗的使用,对于控制猪细小病毒的感染起到一定的作用。近年来,随养猪业的发展,大型集约化猪场的相继出现,该病呈上升趋势。目前,国内外已建立许多检测猪细小病毒的诊断方法:主要有血凝和血凝抑制试验(HA 和 HI)、荧光抗体技术(FAT)、放射免疫测定(RIA)、免疫微球试验(IBA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、银加强胶体金技术(SECGA)、单克隆抗体技术、核酸探针(NAP)检测技术、非放射性核酸杂交(NRNAH)以及多聚酶链式反应(PCR)等。ELISA 抗体测定作为一种快速的血清抗体检测方法适用于大样品的筛查和快速检测,在 PPV 的综合防控体系中发挥重要作用。但目前没有合适的测定用试剂盒,以适应高灵敏、可大规模检测的测定要求。

### 发明内容

[0003] 本实用新型所要解决的技术问题是,提供一种猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒,以适应高灵敏、可大规模检测的测定要求。

[0004] 本实用新型是这样实现的,猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒,它有盒体,盒体上面有盒盖,盒体内的下部有试剂瓶安装座,试剂瓶安装座上面的凹槽内安装有试剂瓶,试剂瓶安装座上方的盒体内安装有酶标板,酶标板上面有多排孔盒,孔盒之间有间隔垫,酶标板上面有盖板膜。

[0005] 采用上述结构的测定试剂盒,结构简单合理,灵敏度高,提高了检出率,降低了抗原和酶结合物的用量,相应地也降低了成本;检测时间短,一般 2 个小时内即可出结果;样品无需无菌化处理;操作简便易行;检测成本低廉,适于推广。

### 附图说明

[0006] 图 1 是本实用新型结构的示意图。

### 具体实施方式

[0007] 下面结合附图给出的实施例进一步说明本实用新型。

[0008] 如附图所示,本实用新型之猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒,它有盒体 8,盒体上面有盒盖 4,盒体内的下部有试剂瓶安装座 6,试剂瓶安装座上面的凹槽内安装有试剂瓶 7,试剂瓶安装座上方的盒体内安装有酶标板 1,酶标板上面有多排孔盒 2,孔盒之间有间隔垫 3,酶标板上面有盖板膜 5。

- [0009] 酶标板上可有 12 排,每排 8 个,共 96 个孔盒。
- [0010] 本实用新型之测定试剂盒的使用包括配置、组装、检测步骤。
- [0011] 1. 抗原预包被条制备:经由包被、封闭、干燥过程。
- [0012] a. 包被:用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液将病毒重组抗原稀释为  $4.25 \mu\text{g/ml}$ ,按  $100 \mu\text{l}$ /孔加于酶标板的孔盒中, $4^{\circ}\text{C}$ 温度下放置 10 小时,甩干;
- [0013] b. 封闭:用含 10%小牛血清、pH7.4 的磷酸盐缓冲液封闭孔盒后,甩干;
- [0014] c. 干燥:置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装物中保存备用。
- [0015] 2. 酶结合物制备:经由酶标记、酶工作液配制过程。
- [0016] 1) 酶标记
- [0017] a. 辣根过氧化物酶 (HRP) 的活化:用三蒸水配制 HRP ( $\text{RZ} \geq 3.0$ ) 溶液,加入高碘酸钠溶液, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 温度下避光 1 小时;加入乙二醇, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 温度下反应 28 ~ 32 分钟;加入 pH4.4 的醋酸盐缓冲液, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 温度下透析过夜,换透析液两次;
- [0018] b. 标记:将上述活化酶抗体,加入纯化的兔抗猪 IgG 中,用 pH 值为 9.5 的碳酸盐缓冲液调节 pH 至 9.2, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 温度下反应 20 小时;
- [0019] c. 还原:将硼氢化钠溶液加入前述反应混合物中, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 温度下反应 2 小时;结合物加入 pH6.0 的磷酸盐缓冲液  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 温度下透析液,换透析液两次,加中性甘油后  $-20^{\circ}\text{C}$ 温度下保存。
- [0020] 2) 酶工作液配制
- [0021] a. 缓冲液配制:以三蒸水配 pH7.4 的磷酸盐缓冲液,内含 2.5%聚乙二醇;0.1%牛血清白蛋白 (BSA);0.5%酶保护剂;0.5%硫柳汞钠;
- [0022] b. 用所配的缓冲液,按适当浓度 (通常为 10 倍) 稀释上述冻存的标记酶,即为酶工作液。
- [0023] 3. 其它试剂的配制
- [0024] 1) 20\* 浓缩洗涤液:用三蒸水做 20 倍稀释后使用;
- [0025] 2) 10\* 样品稀释液:用三蒸水做 10 倍稀释后使用;
- [0026] 3) 显色剂:本方法采用液体型 TMB,市场上有售。
- [0027] 4) 终止液:以三蒸水配 2M 硫酸溶液;
- [0028] 5) 阳性对照:取筛出的阳性血清 ( $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.00$ ) 加少量红色染料并按 1000 单位 /ml 加青霉素和链霉素,无菌过滤;
- [0029] 6) 阴性对照:取筛出的阴性血清 ( $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.100$ ),按 1000 单位 /ml 加青霉素和链霉素,无菌过滤。
- [0030] 4. 组装
- [0031] 将 1 瓶 20 倍浓缩洗涤液、1 瓶 10 倍样品稀释液、1 瓶 10 倍酶工作液、1 瓶 TMB 显色剂、1 瓶终止液、1 瓶阳性对照和 1 瓶阴性对照分别放在试剂瓶安装座上的凹槽内,再将 1 包 96 孔 / 包的抗原预包被板 (即酶联板) 放置在盒体内,将盖板膜放在酶标板上,盖上盒盖备用。
- [0032] 5. 检测
- [0033] 1) 取抗原预包被条 (即酶联板),每个孔盒内分别加入  $100 \mu\text{l}$  样品稀释液,再分别加入  $1 \mu\text{l}$  待测标本血清,同时设空白 (只加  $100 \mu\text{l}$  样品稀释液)、阴性对照 (加  $100 \mu\text{l}$ ,

不加样品稀释液)、阳性对照(加 100  $\mu$  l, 不加样品稀释液), 7 $^{\circ}$ C 温度下孵育 60 分钟后, 甩干;

[0034] 2) 用洗涤液洗涤 3 ~ 5 遍, 甩干;

[0035] 3) 加 1 滴前述的酶结合物工作液(空白不加), 37 $^{\circ}$ C 温度下孵育 60 分钟后, 甩干;

[0036] 4) 用洗涤液洗涤 3 ~ 5 遍, 甩干;

[0037] 5) 依次加 100  $\mu$  l 显色剂, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟;

[0038] 6) 每孔加终止液 100  $\mu$  l, 酶标仪检测 OD450nm。

[0039] 上述的 BSA 可以用小牛血清和脱脂奶粉代替, 优选 BSA。

[0040] 包被过程是在 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 温度下过夜。

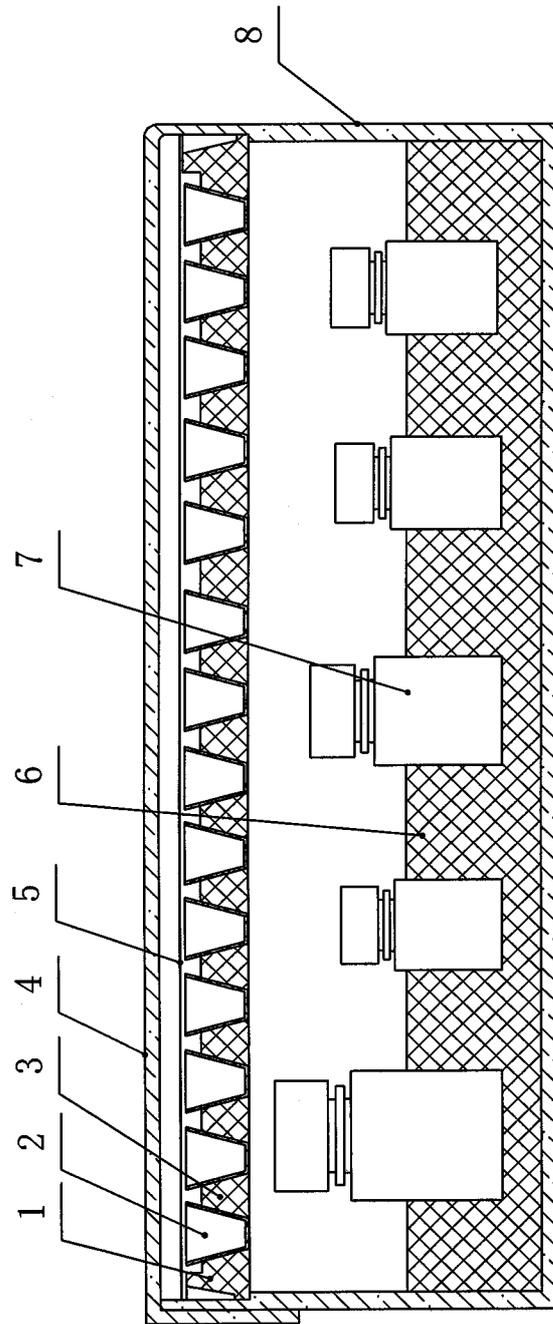


图 1

专利名称(译)	猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN202159064U</a>	公开(公告)日	2012-03-07
申请号	CN201120278960.6	申请日	2011-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	滨州职业学院		
申请(专利权)人(译)	滨州职业学院		
当前申请(专利权)人(译)	滨州职业学院		
[标]发明人	吴忆春		
发明人	吴忆春		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本实用新型提供了一种猪细小病毒抗体间接酶联接免疫吸附剂测定用试剂盒，它有盒体，盒体上面有盒盖，盒体内的下部有试剂瓶安装座，试剂瓶安装座上面的凹槽内安装有试剂瓶，试剂瓶安装座上方的盒体内安装有酶标板，酶标板上面有多排孔盒，孔盒之间有间隔垫，酶标板上面有盖板膜。这种试剂盒，结构简单合理，灵敏度高，提高了检出率，降低了抗原和酶结合物的用量，相应地也降低了成本；检测时间短，一般2个小时内即可出结果；样品无需无菌化处理；操作简便易行；检测成本低廉，适于推广。

