



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568204 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910885693.X

G01N 33/553(2006.01)

(22)申请日 2019.09.19

G01N 33/543(2006.01)

(66)本国优先权数据

G01N 33/533(2006.01)

201910498544.8 2019.06.10 CN

G01N 33/58(2006.01)

(71)申请人 青岛海润检测股份有限公司

G01N 21/76(2006.01)

地址 266000 山东省青岛市黄岛区江山南路458号创业大厦101室

(72)发明人 刘刚 梁德勇 单虎 尹青青  
杨珍 尹召花

(74)专利代理机构 北京天奇智新知识产权代理  
有限公司 11340  
代理人 陈岚崴

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

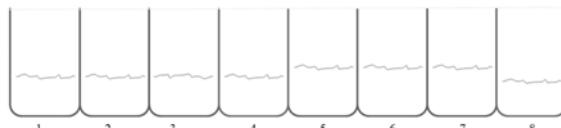
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病  
毒抗体的化学发光试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种一步法定量检测犬瘟热  
病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，属于  
生物检测技术领域。本发明的一种一步法定量检  
测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂  
盒，由抗犬IgG免疫磁珠、荧光反应液、样本处理  
液、洗涤液组成；其中，所述的荧光反应液为不同  
荧光标记的犬细小病毒抗原和犬瘟热病毒抗原  
溶液。本发明的检测试剂盒可快速、准确的同时  
鉴别诊断犬瘟热病毒抗体和犬细小病毒抗体水  
平，具有特异性强、灵敏度高、重复性好、操作简  
便等特点，具有良好的应用前景。



1. 一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：由抗犬IgG免疫磁珠、荧光反应液、样本处理液、洗涤液组成；

其中，所述的荧光反应液为不同荧光标记的犬细小病毒抗原和犬瘟热病毒抗原溶液。

2. 根据权利要求1所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述样本处理液为含有0.1%防腐剂、0.1%阻断剂的0.95%NaCl溶液。

3. 根据权利要求1所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述洗涤液为含0.05%Tween-20的PBS缓冲液。

4. 根据权利要求1～3任一项所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述抗犬IgG免疫磁珠为带有官能团修饰的直径100-300nm的超顺磁珠与抗犬IgG的共价偶联物，其中所用磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、苯甲磺酰基磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种；所述抗犬IgG为鼠抗犬IgG单抗。

5. 根据权利要求4所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述抗犬IgG免疫磁珠的制备方法为：

吸取浓度为1mg/mL的羧基免疫磁珠1mL到离心管中，将离心管置于磁力架中将磁珠和缓冲液分离，用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠4-8次，在上述洗涤后的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸溶液100-500uL重悬，加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺各100-500uL，室温震荡活化，将活化好的磁珠置于磁力架上，弃上清，向磁珠中加入100-500ug鼠抗犬IgG单抗，室温持续旋转孵育60-120min，置于磁力架上，弃上清，收集免疫磁珠，加入含5%BSA的0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)500-1000uL重悬磁珠，反应30-60min，置于磁力架上，弃上清，加入保存液500-1000uL。

6. 根据权利要求5所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述保存液为含5%BSA、3%蔗糖、0.05%Tween-20的0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)。

7. 根据权利要求1～3任一项所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述的荧光反应液为FITC标记的犬细小病毒抗原和PE-Cy5标记的犬瘟热病毒抗原按1:1质量比混合而成。

8. 根据权利要求7所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述FITC标记的犬细小病毒抗原和PE-Cy5标记的犬瘟热病毒抗原均由以下方法制备而成：

将病毒抗原用0.05M CBS缓冲液稀释至蛋白浓度为20mg/mL，混匀，将三角烧瓶置冰槽中，电磁搅拌5-10min。边搅拌边将荧光素渐渐加入病毒抗原溶液中，5-10min内加完，避免将荧光素粘于瓶壁或搅拌玻璃棒上；加毕后，继续4℃避光搅拌过夜；结合完毕后，将混合溶液2500rpm离心20min除去沉淀物，装入透吸袋中后再置于烧杯中，用pH8.0 Tris-C1缓冲液4℃透析过夜；取透析过夜的标记物，过葡萄糖凝胶G-25柱，调整浓度为3～6mg/mL，分装、贮存于4℃冰箱。

9. 根据权利要求8所述一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，其特征在于：所述荧光素的加入量为0.01mg/mg病毒抗原。

# 一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒

## 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒。

## 背景技术

[0002] 近几年,随着我国军犬、警犬、实验用犬和宠物犬饲养量的增加,异地交流增多,犬瘟热和犬细小病毒病在我国犬中的发病率和致死率均有上升趋势。犬瘟热与犬细小病毒病都是急性、高发性传染病,而且都表现为高热、呕吐、腹泻等相似症状。犬瘟热(CD)是由犬瘟热病毒(CDV)感染引起的世界范围内广泛发生的一种犬的急性、高接触性病毒传染病,CDV隶属于副黏病毒科麻疹病毒属,其自然宿主包括大部分的食肉目动物。CD主要发生于幼犬,早起表现为早期双相热、急性鼻卡他、支气管炎、卡他性肺炎、严重肠胃炎,有些患病动物足垫增厚、鼻部角质化等,容易引起细菌或其他病毒混合感染或继发感染,有的患病动物康复后留有麻痹、抽搐、癫痫样发作等后遗症,发病率90%以上,死亡率达50%。临床症状多样,是犬养殖业中危害最大的传染病。除犬科动物外,鼬科、浣熊科及大熊猫科等多种动物均可感染发病,CDV对宠物饲养、经济动物养殖及动物园观赏动物产生严重危害。犬细小病毒病是由犬细小病毒(CPV)感染引起的高度的接触性传染病,分肠炎型和心肌炎型,各种年龄的犬均可感染。但以刚断乳至90日龄的犬发病较多,发病率50-100%,死亡率达到50%。幼犬有的突然呼吸困难,心力衰竭,短时间内可呈现心肌炎症状而突然死亡。据临床发病犬的种类来看,纯种犬及外来犬比土种犬发病率高。本病一年四季均可发生,但以天气寒冷的冬春季多发。病犬的粪便中含毒量最高。常规免疫接种一种有效的预防犬瘟热和犬细小病毒病的保护措施,因此,体内抗体水平的高低决定动物机体抗感染能力强弱。

[0003] 目前,常规抗体检测多采用ELISA法、免疫层析法等,ELISA法检测技术要求高,需要专业技术人员,适于批量检测而不适于个体快速多项检验,胶体金免疫层析技术具有快速简便优点,但也存在灵敏度低、准确性重复性较差、难以进行定量等缺点。

## 发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒,该试剂盒可用于犬疫苗免疫的鉴别诊断和评估疫苗免疫效果,检测灵敏度高、特异性强,重复性和稳定性佳,使用快捷方便,具有良好的应用前景。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒,由抗犬IgG免疫磁珠、荧光反应液、样本处理液、洗涤液组成;

[0007] 其中,所述的荧光反应液为不同荧光标记的犬细小病毒抗原和犬瘟热病毒抗原溶液。

[0008] 在上述方案的基础上,所述样本处理液为含有0.1%防腐剂、0.1%阻断剂的

0.95%NaCl溶液。

[0009] 在上述方案的基础上,所述洗涤液为含0.05%Tween-20的PBS缓冲液。

[0010] 在上述方案的基础上,所述抗犬IgG免疫磁珠为带有官能团修饰的直径100-300nm的超顺磁珠与抗犬IgG的共价偶联物,其中所用磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、苯甲磺酰基磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种;所述抗犬IgG为鼠抗犬IgG单抗。

[0011] 在上述方案的基础上,所述抗犬IgG免疫磁珠的制备方法为:

[0012] 吸取1mL羧基免疫磁珠(1mg/mL)到离心管中,将离心管置于磁力架中将磁珠和缓冲液分离,用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠4-8次,在上述洗涤后的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸溶液100-500uL,重悬,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺各100-500uL,室温震荡活化,将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,向磁珠中加入100-500ug鼠抗犬IgG单抗,室温持续旋转孵育60-120min,置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠,加入含5%BSA的0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)500-1000uL重悬磁珠,反应30-60min,置于磁力架上,弃上清,加入保存液500-1000uL。

[0013] 在上述方案的基础上,所述保存液为含5%BSA、3%蔗糖、0.05%Tween-20的0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)。

[0014] 在上述方案的基础上,所述的荧光反应液为FITC标记的犬细小病毒抗原和PE-Cy5标记的犬瘟热病毒抗原按1:1质量比混合而成。

[0015] 其中,所述FITC激发波长488nm,发射波长525nm;PE-Cy5激发波长488nm,发射波长670nm。

[0016] 在上述方案的基础上,荧光反应液的制备方法为:将病毒抗原用0.05M CBS缓冲液稀释至蛋白浓度为20mg/mL,混匀,将三角烧瓶置冰槽中,电磁搅拌5-10min。边搅拌边将荧光素渐渐加入病毒抗原溶液中,5-10min内加完,避免将荧光素粘于瓶壁或搅拌玻璃棒上;加毕后,继续4℃避光搅拌过夜;结合完毕后,将混合溶液2500rpm离心20min除去沉淀物,装入透吸袋中后再置于烧杯中,用pH8.0Tris-C1缓冲液4℃透析过夜;取透析过夜的标记物,过葡萄糖凝胶G-25柱,调整浓度为3~6mg/mL,分装、贮存于4℃冰箱。

[0017] 在上述方案的基础上,所述荧光素的加入量为0.01mg/mg病毒抗原。

[0018] 本发明的一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒的检测原理为捕获法,本发明试剂盒的使用过程为:首先,吸取10uL待检测样品(如血清、血浆等)加入到试剂条样本处理管中,经样品处理液处理后,取10uL加入到反应管中,样本中的抗体将被试剂条的反应管中预装的鼠抗犬IgG免疫磁珠捕获,室温孵育洗涤后加入荧光反应液,形成捕获二抗-抗体-抗原复合物,在激发光作用下,荧光物质发射一定波长光信号,被免疫荧光检测仪识别,荧光信号强度与样本中相应抗体浓度呈正比关系。

[0019] 本发明的有益效果

[0020] 待检样本于反应前经样品处理液特殊预处理,降低了特殊样本对检测结果的干扰,提高了检测结果的准确性。同时双重荧光标记技术可在同一激发光激发下,实现对犬瘟热病毒抗体和犬细小病毒抗体一步精准定量检测。配套全自动检测仪器可实现自动化操作,检测灵敏度高、特异性强,重复性和稳定性佳,使用快捷方便,具有良好的应用前景。

## 附图说明

- [0021] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明：
- [0022] 图1为本发明试剂盒所采用的单条式联管的结构示意图；
- [0023] 1、反应管，2样本处理管，3、试剂管(荧光反应液)，4、试剂管(洗涤液)，5-8、备用管；

## 具体实施方式

[0024] 在本发明中所使用的术语，除非有另外说明，一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0025] 下面结合具体实施例，并参照数据进一步详细的描述本发明。以下实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

### [0026] 实施例1

[0027] 参照附图1，本发明的一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，条式联管设计，主要包括抗犬IgG免疫微球(反应管1)、样本处理液(样本处理管2)、荧光反应液(试剂管3)，洗涤液(试剂管4)和备用管5-8。

[0028] 所述抗犬IgG免疫微球的制备方法为：吸取直径100-300nm羧基磁珠1mL到离心管中，将离心管置于磁力架中将磁珠和缓冲液分离，用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠4-8次，在上述洗涤后的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸溶液500uL重悬，加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺各500uL，室温震荡活化，将活化好的磁珠置于磁力架上，弃上清，向磁珠中加入鼠抗犬IgG单抗500ug，室温持续旋转孵育60-120min，置于磁力架上，弃上清，收集免疫磁珠，加入含5%BSA的0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)1mL重悬磁珠，反应30-60min，置于磁力架上，弃上清，加入含5%BSA、3%蔗糖、0.05%Tween-20的0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)1mL保存。

[0029] 所述荧光反应液的制备方法为：将犬细小病毒抗原用0.05M CBS缓冲液稀释至蛋白浓度为20mg/mL，混匀，将三角烧瓶置冰槽中，电磁搅拌5-10min。边搅拌边将FITC渐渐加入犬细小病毒抗原溶液中，加入量为每毫克蛋白加0.01mgFITC，避免将荧光素粘于瓶壁或搅拌玻璃棒上(大约5-10min内加完)。加毕后，继续4℃避光搅拌过夜。结合完毕后，将混合溶液2500rpm离心20min除去少量的沉淀物，装入透吸袋中后再置于烧杯中，用0.05M Tris-C1缓冲液(pH8.0)4℃透析过夜。取透析过夜的标记物，过葡萄糖凝胶G-25柱，调整浓度为5mg/mL，分装、贮存于4℃冰箱。

[0030] PE-Cy5标记犬瘟热病毒抗原的方法同FITC标记犬细小病毒抗原。

[0031] 所述的样本处理液为含有0.1%防腐剂、0.1%阻断剂的0.95%NaCl溶液；

[0032] 所述洗涤液为含0.05%Tween-20的PBS缓冲液。

[0033] 采用本发明试剂盒检测CDV和CPV，化学发光分析仪检测结果显示，在0.3-70IU/mL范围内线性拟合关系较好， $r>0.9900$ ；将阴性血清重复测试20次，计算T/C均值，代入剂量-反应曲线，得出本试剂盒检测CDV和CPV最低检测限均为0.15IU/mL。将CDV和CPV校准品稀释至0.5IU/mL和2IU/mL，分别用本试剂盒重复测定10次，计算变异系数，两个浓度的CV值均小于10% (CDV两个浓度分别为4.5% 和3.88%，CPV两个浓度分别为4.25% 和4.66%)。

[0034] 以上所述，仅是本发明的较佳实施例而已，并非是对本发明作其它形式的限制，任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。本领域的技术人员可以将其应用于其他分子、细胞、微生物的检测。但是凡是未脱离本发明技术方案内容，依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型，仍属于本发明技术方案的保护范围。

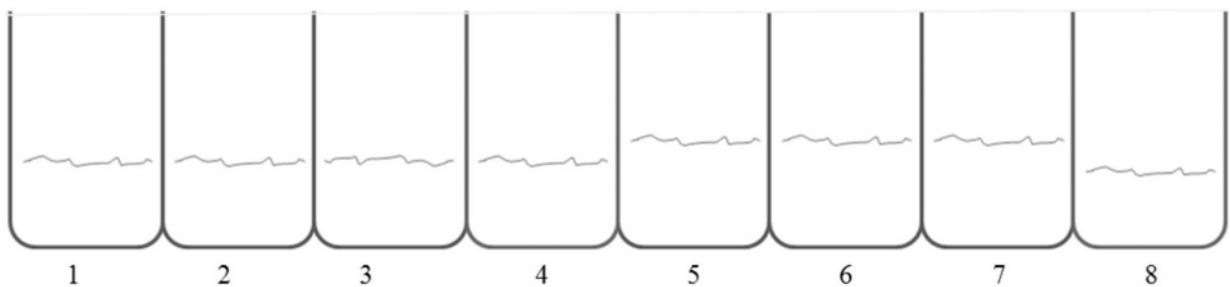


图1

专利名称(译)	一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110568204A</a>	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910885693.X	申请日	2019-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	青岛海润检测股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	青岛海润检测股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	青岛海润检测股份有限公司		
[标]发明人	刘刚 梁德勇 单虎 尹青青 杨珍 尹召花		
发明人	刘刚 梁德勇 单虎 尹青青 杨珍 尹召花		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/553 G01N33/543 G01N33/533 G01N33/58 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/553 G01N33/56983 G01N33/582 G01N33/6854 G01N2333/13		
代理人(译)	陈岚嵒		
优先权	201910498544.8 2019-06-10 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，属于生物检测技术领域。本发明的一种一步法定量检测犬瘟热病毒-犬细小病毒抗体的化学发光试剂盒，由抗犬IgG免疫磁珠、荧光反应液、样本处理液、洗涤液组成；其中，所述的荧光反应液为不同荧光标记的犬细小病毒抗原和犬瘟热病毒抗原溶液。本发明的检测试剂盒可快速、准确的同时鉴别诊断犬瘟热病毒抗体和犬细小病毒抗体水平，具有特异性强、灵敏度高、重复性好、操作简便等特点，具有良好的应用前景。

