



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107942061 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711220878.6

(22)申请日 2017.11.29

(71)申请人 洛阳现代生物技术研究有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛龙区科技园
开元大道西S8号

(72)发明人 李秀梅 闫玉良 李俊俊 杨丹
刘近 张晓亮 李玉婉 石方方
王芳

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 张随

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

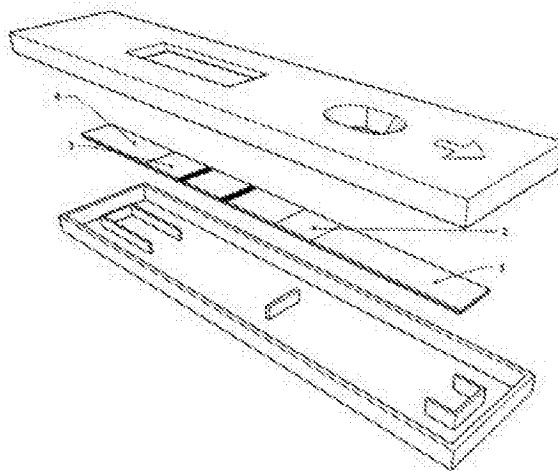
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法,属于免疫学检测领域,试纸卡包括卡壳和试纸条,试纸条包括底板及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫;检测垫为设有质控线C和检测线T的硝酸纤维素膜,质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体,检测线T包被灭活的猪传染性胃肠炎病毒;结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的抗E2蛋白单克隆抗体的玻璃纤维素膜;样品垫是经样品处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜。本发明制备的试纸卡具有更好的稳定性、更高的灵敏度,同时可通过荧光信号分析达到半定量检测的目的。



1. 一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,包括卡壳和设在卡壳内的试纸条;卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座;试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫;卡盖上对应于检测垫的区域设有视窗,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔,卡座内设有固定试纸条的卡槽;所述底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸;其特征在于:所述检测垫为设有质控线C和检测线T的硝酸纤维素膜,质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体,检测线T包被灭活的猪传染性胃肠炎病毒;所述结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的抗E2蛋白的单克隆抗体的玻璃纤维素膜;所述样品垫是经样品垫处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜。

2. 如权利要求1所述的一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,其特征在于:在所述卡盖上设有从吸水垫方向指向样品垫方向的指示箭头。

3. 如权利要求1所述的一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,其特征在于:所述质控线C和检测线T是将包被液划膜于检测垫制得,其中,羊抗鼠单克隆抗体包被液的浓度为0.5mg/ml,猪传染性胃肠炎灭活病毒包被液的浓度为0.3mg/ml。

4. 如权利要求1所述的一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,其特征在于:所述时间分辨荧光微球为直径200 nm的含有高亮稀土染料的羧基聚苯乙烯微球。

5. 如权利要求1所述的一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,其特征在于:所述结合垫是将荧光微球-抗体复合物溶液喷至玻璃纤维素膜上制得,所述荧光微球-抗体复合物溶液中,抗E2蛋白的单克隆抗体的标记量是20 μ g/ml。

6. 如权利要求1所述的一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,其特征在于:所述样品垫处理液为pH 8.0 的PBS缓冲液,其中含有的成分及其浓度分别为:质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.5%的PVP-K30,质量分数为0.5%的PEG-20000,体积分数为2%的Tween-20。

7. 制备如权利要求1-6任意一种所述的检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡的方法,其特征在于:包括以下步骤:

检测垫的制备:制备浓度为0.5mg/ml的羊抗鼠单克隆抗体包被液和浓度为0.3mg/ml的灭活的猪传染性胃肠炎病毒包被液,将两种包被液各自单独倒吸至划膜机管线中,在硝酸纤维素膜上均按照0.8 μ l/cm划线,其中,羊抗鼠单克隆抗体包被液划出质控线C,灭活的猪传染性胃肠炎病毒包被液划出检测线T;然后将经划线的硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中干燥3-4 h,制得检测垫;

结合垫的制备:将荧光微球分散液置于离心管中;加入MES缓冲液,在超声条件下混匀,离心弃上清,收集微球沉淀,重复此步骤以清洗微球;将微球沉淀溶解于MES缓冲液中,混匀,加入EDC溶液,22-25 $^{\circ}$ C避光活化,离心弃上清,加MES缓冲液,超声打散微球,离心弃上清;加入硼酸缓冲液,超声打散,然后加入20 μ g抗E2蛋白单克隆抗体混匀,避光反应;加入甘氨酸溶液,避光反应30min,再加入BSA溶液,避光反应30min,完成封闭;离心复溶,形成荧光微球-抗体复合物溶液;以50 μ l/ml的量向荧光微球-抗体复合物溶液中加入色素,形成混合液,将混合液喷至玻璃纤维素膜上,干燥,制得结合垫;

样品垫的制备:将玻璃纤维素膜放入配置好的样品垫处理液中,浸泡0.5 h,放入37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,干燥8-10 h,制得样品垫;

试纸卡的组装:以PVC板为底板,将样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫依次搭接粘贴在底

板上,每个相邻处搭接时有1-2mm重叠,并使检测垫上的检测线T靠近样品垫一侧、质控线C靠近吸水垫一侧,用切条机将贴好的PVC板切成3mm宽的条状,形成试纸条;将试纸条与卡壳组合,密封保存。

8.如权利要求7所述的制备检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡的方法,其特征在于:在结合垫的制备中,所述色素为胭脂红、柠檬黄、果绿、日落黄或亮蓝。

9.利用如权利要求1-6任意一种所述的试剂盒检测肛拭子样本中猪传染性胃肠炎病毒抗体的方法,其特征在于:具体操作如下:用生理盐水浸湿棉签后拭取猪粪便、直肠,立即将棉签插入装有稀释液的样本管中,充分搅动棉签直至棉签上的样本全部溶入稀释液,将棉签在管壁上挤干后丢弃,样本液静置备用;取出检测卡,用吸管吸取已准备好的澄清样本上清液,向加样孔内滴加2-3滴;室温反应5-10 min,按卡盖上指示箭头的方向将试纸卡插入荧光免疫分析仪的卡槽中,读取T/C值,判定结果。

一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体涉及一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法。

背景技术

[0002] 猪传染性胃肠炎(TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)引起的仔猪胃肠炎,是一种高度接触性传染病,以呕吐、严重腹泻、脱水致两周龄内仔猪高死亡率为特征的病毒性传染病。TGEV属于冠状病毒科、冠状病毒亚科 α 冠状病毒属1群成员。TGE多发生于冬季和春季,在全球各地区均有发生,呈地方性流行或发生于局部地区,病毒可通过直接接触、乳汁、呼吸道传播,康复猪带毒时间可长达8周,是发病猪场的主要传染源。该病通常和大肠杆菌、轮状病毒混合感染,导致哺乳仔猪和断奶仔猪死亡率增多,造成养猪业严重的经济损失。

[0003] 快速准确的诊断有利于猪传染性胃肠炎的预防与控制,目前国内外已报道的用于猪传染性胃肠炎病毒抗体检测的方法有很多,主要有病原学诊断,直接和间接荧光抗体检测,补体结合试验,酶联免疫吸附试验(ELISA)以及分子生物学诊断,但均存在成本高、操作繁琐、检测周期长等缺点,且仅适用于检测机构而无法应用于实际生产生活。而在兽医临床疾病诊断和检验检疫中,通常应用于养殖场和广大基层单位,面对大批量样本、大面积普查和现场诊断的需求,免疫胶体金技术是现在市场上应用最广泛的。胶体金技术虽然有快捷、方便、无需特殊仪器等优势,但也存在不足之处:胶体金标记方式静电吸附,稳定性差;胶体金技术结果判定以肉眼识别,误差大、灵敏度低。在胶体金技术基础上发展的以荧光微球作为示踪物的免疫层析技术,逐渐进入科研领域,目前利用此项技术检测猪传染性胃肠炎抗体仍是空白,如何利用该技术制备灵敏性、稳定性等更佳的检测产品以应用于养殖业实现大批量精准测定仍是科研工作者奋力的目标。

发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明的目的在于提供一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法,为系统化、便捷化、规范化地检测猪传染性胃肠炎病毒抗体提供一种新方法。

[0005] 检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡,包括卡壳和设在卡壳内的试纸条;卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座;试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫;卡盖上对应于检测垫的区域设有视窗,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔,卡座内设有固定试纸条的卡槽;所述底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸;其特征在于:所述检测垫为设有质控线C和检测线T的硝酸纤维素膜,质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体,检测线T包被灭活的猪传染性胃肠炎病毒;所述结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的抗猪传染性胃肠炎病毒E2蛋白单克隆抗体的玻璃纤维素膜;所述样品垫是经样品垫处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜。

[0006] 进一步的,在所述卡盖上设有从吸水垫方向指向样品垫方向的指示箭头。

[0007] 进一步的,所述质控线C和检测线T是将包被液划膜于检测垫制得,其中,羊抗鼠单克隆抗体包被液的浓度为0.5mg/ml,猪传染性胃肠炎灭活病毒包被液的浓度为0.3mg/ml。

[0008] 进一步的,所述时间分辨荧光微球为直径200 nm的含有高亮稀土染料的羧基聚苯乙烯微球。

[0009] 进一步的,所述结合垫是将荧光微球-抗体复合物溶液喷至玻璃纤维素膜上制得,所述荧光微球-抗体复合物溶液中,抗E2蛋白单克隆抗体的标记量是20 μ g/ml。

[0010] 进一步的,所述样品垫处理液为pH 8.0 的PBS缓冲液,其中含有的成分及其浓度分别为:质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.5%的PVP-K30,质量分数为0.5% 的PEG-20000,体积分数为2%的Tween-20。

[0011] 本发明还保护制备上述检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡的方法,包括以下步骤:

检测垫的制备:制备浓度为0.5mg/ml的羊抗鼠单克隆抗体包被液和浓度为0.3mg/ml的灭活的猪传染性胃肠炎病毒包被液,将两种包被液各自单独倒吸至划膜机管线中,在硝酸纤维素膜上均按照0.8 μ l/cm划线,其中,羊抗鼠单克隆抗体包被液划出质控线C,灭活的猪传染性胃肠炎病毒包被液划出检测线T;然后将经划线的硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中干燥3-4 h,制得检测垫;

结合垫的制备:将荧光微球分散液置于离心管中;加入MES缓冲液,在超声条件下混匀,离心弃上清,收集微球沉淀,重复此步骤以清洗微球;将微球沉淀溶解于MES缓冲液中,混匀,加入EDC溶液,22-25 $^{\circ}$ C避光活化,离心弃上清,加MES缓冲液,超声打散微球,离心弃上清;加入硼酸缓冲液,超声打散,然后加入20 μ g抗E2蛋白单克隆抗体混匀,避光反应;加入甘氨酸溶液,避光反应30min,再加入BSA溶液,避光反应30min,完成封闭;离心复溶,形成荧光微球-抗体复合物溶液;以50 μ l/ml的量向荧光微球-抗体复合物溶液中加入色素,形成混合液,将混合液喷至玻璃纤维素膜上,干燥,制得结合垫;

所述样品垫的制备:将玻璃纤维素膜放入配置好的样品垫处理液中,浸泡0.5 h,放入37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,干燥8-10 h,制得样品垫;

试纸卡的组装:以PVC板为底板,将样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫依次搭接粘贴在底板上,每个相邻处搭接时有1-2mm重叠,并使检测垫上的检测线T靠近样品垫一侧、质控线C靠近吸水垫一侧,用切条机将贴好的PVC板切成3mm宽的条状,形成试纸条;将试纸条与卡壳组合,密封保存。

[0012] 进一步的,所述结合垫的制备中,所述色素为胭脂红、柠檬黄、果绿、日落黄或亮蓝。

[0013] 本发明另外还保护利用上述试纸卡检测肛拭子样本中猪传染性胃肠炎病毒抗体的检测方法:用生理盐水浸湿棉签后拭取猪粪便、直肠,立即将棉签插入装有稀释液的样本管中,充分搅动棉签直至棉签上的样本全部溶入稀释液,将棉签在管壁上挤干后丢弃,样本液静置备用;取出检测卡,用吸管吸取已准备好的澄清样本上清液,向加样孔内滴加2-3滴;室温反应5-10 min,按卡盖上指示箭头的方向将试纸卡插入荧光免疫分析仪的卡槽中,读取T/C值,根据浓度标准曲线,计算得到对应样品中所检猪传染性胃肠炎抗体的浓度。

[0014] 本发明所述试纸卡检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的原理是间接法测抗体:当将含

有待测猪传染性胃肠炎抗体的样品滴加在加样区,待测样品中的猪传染性胃肠炎抗体与结合垫中的荧光微球-抗E2蛋白单克隆抗体复合物特异性结合,通过毛细作用向吸水垫一侧层析,当到达固定着抗原的检测线后,猪传染性胃肠炎抗体与猪传染性胃肠炎灭活病毒发生免疫反应,而多余的荧光微球标记物继续向前层析,与固定在质控线的羊抗鼠单抗结合。反应结束后,用紫外光源对检测垫扫描,检测线T和质控线C的荧光微球发出高强度荧光。另外荧光微球中稀土元素的荧光衰变时间相比普通荧光团长,是其103~106倍。通过延缓测量时间,待样品基质中自然发光的短寿命荧光全部衰变后,再测量稀土元素的特异性荧光,达到完全消除本底干扰的效果,实现高信噪比。

[0015] 有益效果:

1、本发明利用试纸卡内的试纸条实现对猪传染性胃肠炎病毒抗体的定性检测,采用荧光微球技术,快速便捷,稳定性更好,相比胶体金试纸条中胶体金颗粒与蛋白质的静电引力结合作用,带有羧基端的荧光微球与抗体以共价键相连,更加稳定;灵敏度更高,相比胶体金、普通荧光免疫层析技术灵敏度高2~3个数量级;短时间内实现批量检测,检测时间不足10min,相比ELISA试剂盒时间缩短,同时通过荧光分析仪检测荧光信号,根据内置的标准曲线量化对应成分的含量,相比胶体金免疫层析试纸条的定性检测,为猪传染性胃肠炎病毒抗体的检测提供更加全面的检测手段。

[0016] 2、本发明除采用荧光微球作为免疫标记外,有关试纸卡的制备过程也尤为重要,它直接关系到试纸卡检测的灵敏性和稳定性,其中,采用独创的制备方法制备结合垫,经清洗、活化、标记、封闭、染色等步骤,将荧光微球标记的单克隆抗体包埋于玻璃纤维素膜上形成结合垫。其中,封闭时相继加入甘氨酸和BSA,进行二次封闭,能够避免非特异性反应对检测结果的干扰;此外,由于荧光微球标记物在自然光下呈无色状态,喷涂后很难在玻璃纤维素膜上找出其位置及喷涂效果,为解决这一难题,将复溶后的标记物加入胭脂红,进行喷涂时就可肉眼观察到喷涂结合物的位置及均匀度,且该步骤对检测结果无影响。为制备检测性能更佳的试纸卡奠定基础。

附图说明

[0017] 图1为本发明试纸条及卡壳结构示意图;其中:1、样品垫;2、结合垫;3、检测垫;4、吸水垫。

具体实施方式

[0018] 下面通过具体的实施例对本发明做进一步的解释说明。

[0019] 实施例1、试纸卡的制备

1、荧光微球-抗体复合物的制备

(1)清洗:取50 μ l荧光微球至1.5ml离心管中,加入1ml 0.01M MES缓冲液中,震荡混匀,15000r/min离心15min,弃上清,加入1ml 0.01M MES缓冲液,超声打散微球;重复此步骤三次,已达到清洗微球的目的,最后得到清洗后的微球液;

(2)活化:向1ml微球液中,加入250 μ l EDC溶液,避光活化2h,15000r/min离心15min,弃上清,加入1ml 0.01M MES缓冲液,超声打散微球,15000r/min离心15min,弃上清;

(3)标记:加入1ml 0.05M 硼酸盐缓冲液,超声打散,加入20 μ g 抗E2蛋白单克隆抗体混

匀,避光反应2h;

(4)封闭1:加入100 μ l 1M 甘氨酸溶液,避光反应30min;

(5)封闭2:加入100 μ l 10%BSA溶液,避光反应30min;

(6)离心复溶:15000r/min离心15min,弃上清,加入1ml稀释液,超声打散微球,得荧光微球-抗体复合物溶液;

(7)染色:向荧光微球-抗体复合物溶液中加入50 μ l胭脂红溶液,充分混匀,得混合液;

(7)喷涂:将混合液按照3 μ l/cm喷至玻璃纤维素膜上;

(8)干燥:将喷有混合液的玻璃纤维素膜放入37℃鼓风干燥箱中,干燥3-4 h,制得结合垫;将干燥后的结合垫放入干燥器中,备用。

[0020] 以上步骤中所述荧光微球为直径200nm的含有高亮稀土染料的羧基聚苯乙烯微球;吸收波长为365nm,检测波长是610nm。

[0021] 所述EDC为(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐),是一种可溶于水的碳二亚胺。

[0022] E2蛋白是猪传染性胃肠炎病毒的表面糖蛋白,在决定宿主细胞亲嗜性方面起作用,还具有膜融合作用,使病毒核蛋白进入细胞浆,E2还携带B淋巴细胞主要的抗原决定簇,具有高免疫原性。

[0023] 2、样品垫制备

(1)配制pH 7.4的PBS:称取8g NaCl,5.8g Na₂HPO₄,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄溶于1L纯化水中,即为pH 7.4的PBS;

(2)配制样品垫处理液:分别称取5g蔗糖,5g PVP-K30,5g PEG-20000,量取20ml Tween-20,至1L pH 7.4的PBS中,磁力搅拌器上混匀待用;

(3)样品垫的处理:将玻璃纤维素膜装于自封袋中,80ml/张,加入样品垫处理液,浸泡30 min;

(4)样品垫的干燥:将充分浸泡过的玻璃纤维素膜放入37℃鼓风干燥箱中,干燥8-10 h;放入干燥器中待用。

[0024] 3、检测垫的制备

检测垫是指包被了一条横向质控线(C线)和一条横向检测线(T线)的硝酸纤维素膜,C线与T线间距是3-4 mm。从样品垫到吸水垫方向依次为T线和C线。C线包被的是羊抗鼠单克隆抗体,具体实施步骤是将浓羊抗鼠单抗用包被工作液稀释成0.5mg/ml,倒吸至划膜机管线中,按照0.8 μ l/cm划出,放入37℃鼓风干燥箱中,干燥3-4 h;T线包被的是灭活的猪传染性胃肠炎病毒,具体实施步骤是将灭活的猪传染性胃肠炎病毒用划膜工作液稀释至0.3mg/ml,倒吸至划膜机管线中,按照0.8 μ l/cm划出,放入37℃鼓风干燥箱中,干燥3-4 h;放入干燥器中待用。所述检测垫是样品中有效成份与固定在膜上的活性物质发生特异性结合的区域。

[0025] 4、试纸卡的组装

以不吸水的PVC胶粘板为底板,将样品垫、样品结合垫、检测垫和吸水垫由上至下依次搭接粘贴在底板上,各组分在相邻处有1-2mm重叠,用切条机将贴好的PVC板切成3mm宽的试纸条,通过卡座内的卡槽与卡壳组合。其中,所述检测垫上的T线靠近样品垫一侧、对应的卡盖上“T”标志;质控线C线靠近吸水垫一侧,对应的卡盖上有“C”标志,如图1所示。所述吸水

垫为吸水滤纸,吸水滤纸裁切成长30 cm,宽1.9-2.1cm。所述吸水垫具有虹吸效果。

[0026] 所述卡盖的规格为70mm*20mm*5mm,卡盖中心有一16mm*3mm大小的视窗,卡盖与样品垫对应区域有标识为“S”的加样孔,加样孔下方有指示检测方向的箭头。

[0027]

实施例2、猪肛拭子中猪传染性胃肠炎病毒抗体的检测方法与比对试验

1、用生理盐水浸湿棉签后拭取猪粪便、直肠,立即将棉签插入装有稀释液的样本管中,充分搅动棉签直至棉签上的样本全部溶入稀释液,将棉签在管壁上挤干后丢弃,样本液静置备用;所述稀释液为pH7.4、0.05mol/L的PBS;

2、撕开检测卡铝箔包装袋,取出检测卡,放于平整、洁净的台面上;

3、用配套吸管吸取已准备好的澄清样本上清液,垂直而缓慢的滴加2-3滴(约60 μ l)到加样孔内;

4、5-10 min读取结果,按卡盖上所示箭头方向将试纸卡插入荧光免疫分析仪的卡槽中,读取T/C值,计算对应样品中猪传染性胃肠炎抗体的浓度;

5、定性判定标准:T/C值<0.1为阴性;T/C值 $\geq$ 0.1为阳性;C值为0,无效;

6、与胶体金试纸条的比较:选择20份猪传染性胃肠炎病毒抗体ELISA试剂盒检测出的弱阳性样本,用胶体金试纸条测试结果,检测5份阳性,15份阴性;用荧光微球试纸条检测,可测出16份阳性,4份阴性;

上述实验结果证明,荧光微球试纸条的敏感性较胶体金试纸条高。

[0028]

实施例3、胶体金标记抗E2蛋白单克隆抗体与荧光微球标记抗E2蛋白单克隆抗体稳定性的比对试验

1、将制备好的胶体金-抗体复合物的结合垫与荧光微球-抗体复合物的结合垫均放置37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中;

2、在第3天,5天,1周,2周,4周,8周,12周,20周,36周,48周分别对阴性样本和阳性样本进行检测,观察其稳定性;

3、其结果如下表1所示。

检测时间	胶体金复合物		荧光微球复合物	
	阴性样本	阳性样本	阴性样本	阳性样本
3 天	正常	C、T 线均显色	0	强阳
5 天	正常	C、T 线均显色	0	强阳
1 周	正常	C、T 线均显色	0	强阳
2 周	正常	C、T 线均显色	0	强阳
4 周	正常	C、T 线均显色	0	强阳
8 周	正常	C、T 线均显色	0	强阳
12 周	正常	C、T 线均显色	0	强阳
20 周	正常	检测线变弱	0	强阳
36 周	正常	检测线不显色	0	弱阳
48 周	正常	检测线不显色	0	弱阳

[0029] 由上表1可知,胶体金标记的抗体复合物随破坏实验时间的延长检测效果下降,在第20周的检测情况产生显著性变化;而使用荧光微球-抗体复合物结合垫的试纸条检测阳性样本在第36周有下降趋势,说明荧光微球标记抗体复合物比胶体金标记抗体复合物稳定。

[0030]

实施例4、探究结合垫添加色素指示剂对检验结果的影响

1、试纸卡A的制备过程参照实施例1,试纸卡B的结合垫制备中不添加胭脂红色素,其余组分均与试纸卡A保持一致;

2、取60 μ l的PBS、猪传染性胃肠炎病毒抗体阳性标准品和阴性标准品别上样试纸卡A和试纸卡B,室温反应5min;

3、荧光分析仪读取反应结果,如下表2所示:

样本	试纸卡 A			试纸卡 B		
	PBS	阳性标准品	阴性标准品	PBS	阳性标准品	阴性标准品
T/C 值	0.018	0.553	0.033	0.022	0.567	0.028
阴阳性	阴性	阳性	阴性	阴性	阳性	阴性

由上表2可知,在荧光微球试纸卡的结合垫制备中添加少量色素对样品检验结果没有影响,并且本试验中的胭脂红色素会随层析作用浓度变低,免疫反应结束后与未添加色素的试纸卡无表观差异。色素的添加对观察荧光微球-抗原结合物的喷涂效果和确定结合垫裁剪位置起了至关重要的作用,解决了荧光微球层析技术中的操作问题。

[0031] 需要说明的是,以上所述的实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的保护范围,本发明的保护范围以权利要求书为准。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对本发明作出的一些非本质的改进和调整仍属于本发明的保护范围。

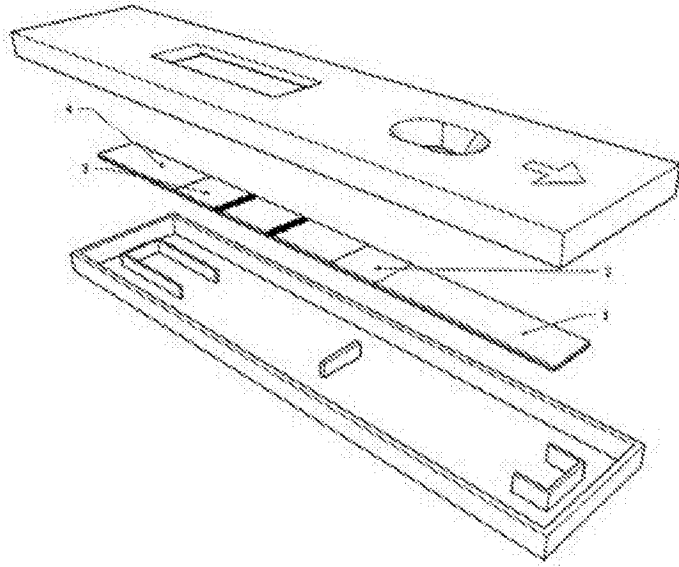


图1

专利名称(译)	一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法		
公开(公告)号	CN107942061A	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN201711220878.6	申请日	2017-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
[标]发明人	李秀梅 闫玉良 李俊俊 杨丹 刘近 张晓亮 李玉婉 石方方 王芳		
发明人	李秀梅 闫玉良 李俊俊 杨丹 刘近 张晓亮 李玉婉 石方方 王芳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的试纸卡、制备及其检测方法，属于免疫学检测领域，试纸卡包括卡壳和试纸条，试纸条包括底板及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫；检测垫为设有质控线C和检测线T的硝酸纤维素膜，质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体，检测线T包被灭活的猪传染性胃肠炎病毒；结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的抗E2蛋白单克隆抗体的玻璃纤维素膜；样品垫是经样品处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜。本发明制备的试纸卡具有更好的稳定性、更高的灵敏度，同时可通过荧光信号分析达到半定量检测的目的。

