



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109975538 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201910308259.5

(22)申请日 2019.04.17

(71)申请人 广州悦洋生物技术有限公司

地址 510320 广东省广州市广州国际生物
岛螺旋三路8号第七层701、702单元

(72)发明人 曹立辉 李雪平 窦文茂 古杰
孙贝贝 蔡晓丽 欧贤斌

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

代理人 颜希文 宋静娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

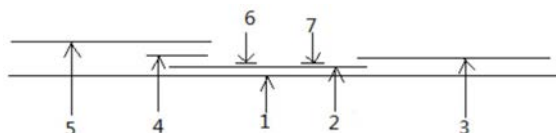
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条,包括样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸和PVC板;其中荧光微球标记垫上包被荧光微球标记的鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记的牛副结核蛋白;NC膜上设有检测线T1、T2和质控线C,检测线T1包被兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体,检测线T2包被辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG,质控线包被表达纯化的IFN- γ 。本发明可以直接将采取的全血加入到已经稀释好的结核菌素中,反应后直接读数。本发明可以做到一卡同时检测两种疾病。同时本发明的生产成本低,可以快速,并定量检测,优势明显。



1. 一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条,其特征在于,包括样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸和PVC板;其中荧光微球标记垫上包被荧光微球标记的鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记的牛副结核蛋白;NC膜上设有检测线T1、T2和质控线C,检测线T1包被兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体,检测线T2包被辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG,质控线C包被表达纯化的IFN- γ 。

2. 如权利要求1所述的检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条,其特征在于,所述检测线T1、T2、质控线C之间的距离是分别5~8mm。

3. 如权利要求1所述的检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条,其特征在于,所述荧光微球的粒径为200~300nm。

4. 一种如权利要求1-3任一项所述的检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:免疫荧光微球分别标记鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白的制备

(1) 将免疫荧光微球清洗并活化;

(2) 免疫荧光微球分别与鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白进行偶联;

(3) 封闭免疫荧光微球上未结合表面基团;

(4) 将偶联完成后的免疫荧光微球置于4℃保存;

S2:免疫层析试剂条的制备

(1) 将样品垫、荧光微球标记垫分别用2%~5%的BSA浸泡,然后烘干;

(2) 将荧光微球标记鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记牛副结核蛋白按照1:1的质量比混匀,用喷膜机喷到所述标记垫上;

(3) 将兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体稀释至效价的100倍,兔抗牛IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG)稀释至效价的1000倍,牛伽马干扰素(IFN- γ)稀释至浓度200ng/mL;

(4) 将步骤(3)稀释的溶液分别用喷膜机划线,在NC膜上分别标记为T1(兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体)、T2(兔抗牛IgG-HRP)、C线(IFN- γ);T1、T2、C线之间距离为5mm,最后将试纸条置于37℃烘12小时;

S3:进行组装:

将样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸依次重叠粘贴在PVC底板上,用切条机将整个大板纵向切成一定规格的试纸条,然后干燥密封储存在4℃,最后将试纸条与塑胶外壳组装形成检测卡。

5. 如权利要求4所述的检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤S1(1)中所述活化微球1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺的浓度均为50mg/mL。

6. 如权利要求4所述的检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤S1(2)中鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白均以1:12的质量比分别与免疫荧光微球进行偶联。

一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术检测领域,具体涉及一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 1942年Wissman经研究发现,某些 β -二酮与钼配合后可吸收紫外光,发出强烈的钼离子的特征荧光;1979年,芬兰Soini和Hemmia提出“时间分辨荧光免疫分析”理论;1983年,Soini和Kojila提出以镧系元素标记为示踪螯合物和时间分辨荧光测量相结合,建立一种新的非反射性微量分析技术;上世纪90年代,芬兰wallac以及加拿大Cisbio公司分别推出DELFI A和HTRF时间分辨免疫分析技术平台,取得商业成功;2003年,上海新波生物技术有限公司应用DELFI A技术平台推出了首个体外诊断产品,截止目前上市产品已达30余个。

[0003] TRFIA就是建立在荧光微球标记的基础上,配合荧光免疫分析仪,达到快速、定量、准确检测目的的一种检测方法。

[0004] 目前检测牛结核的方法主要是ELISA检测全血中IFN- γ 、血清中牛结核抗体和胶体金检测血清中的抗体。此两种方法均以检测血清中牛结核抗体为目的,ELISA还可以检测全血中牛IFN- γ ,生产应用中比较普遍。

[0005] 但是ELISA检测费时费力;胶体金检测快速,但灵敏度不高,误差大,相比荧光免疫层析低1~2个数量级,一般为定性或者半定量检测,准确度不够。

发明内容

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供一种快速检测牛IFN- γ 的方法,即时间分辨免疫荧光分析法(TRFIA),本试纸条可以同时检测牛副结核病抗体。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条,包括样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸和PVC板;其中荧光微球标记垫上包被荧光微球标记的鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记的牛副结核蛋白;NC膜上设有检测线T1、T2和质控线C,检测线T1包被兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体,检测线T2包被辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG,质控线C包被表达纯化的IFN- γ 。

[0009] 优选地,所述检测线T1、T2、质控线之间的距离是分别5~8mm。

[0010] 优选地,所述荧光微球的粒径为200~300nm。

[0011] 本发明还提供了以上检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0012] S1:免疫荧光微球分别标记鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白的制备

[0013] (1)将免疫荧光微球清洗并活化;

[0014] (2)免疫荧光微球分别与鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白进行偶联;

- [0015] (3) 封闭免疫荧光微球上未结合表面基团；
- [0016] (4) 将偶联完成后的免疫荧光微球置于4℃保存。
- [0017] S2:免疫层析试剂条的制备
- [0018] (1) 将样品垫、荧光微球标记垫分别用2%~5%的BSA浸泡,然后烘干；
- [0019] (2) 将荧光微球标记鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记牛副结核蛋白按照1:1的质量比混匀,用喷膜机喷到所述标记垫上；
- [0020] (3) 将兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体稀释至效价的100倍,兔抗牛IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG) 稀释至效价的1000倍,牛伽马干扰素(IFN- γ) 稀释至浓度200ng/mL；
- [0021] (4) 将步骤(3) 稀释的溶液分别用喷膜机划线,在NC膜上分别标记为T1(兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体)、T2(兔抗牛IgG-HRP)、C线(IFN- γ) ;T1、T2、C线之间距离为5mm,最后将试纸条置于37℃烘12小时；
- [0022] S3:进行组装：
- [0023] 将样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸依次重叠粘贴在PVC底板上,用切条机将整个大板纵向切成一定规格的试纸条,然后干燥密封储存在4℃,最后将试纸条与塑胶外壳组装形成检测卡。
- [0024] 优选地,所述步骤S1(1)中所述活化微球时每毫克微球分别加入32 μ g1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和32 μ g N-羟基琥珀酰亚胺。
- [0025] 优选地,所述步骤S1(2)中鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白均以1:12的质量比分别与免疫荧光微球进行偶联。
- [0026] 相对于现有技术,本发明具备以下有益效果：
- [0027] 采用聚苯乙烯纳米微球对稀土荧光离子铕进行包裹,通过荧光预增强技术,提升单个荧光离子的荧光强度。通过对包裹技术的优化和改良,纳米微球中铕离子的密度可提升到10万个/微球,包裹完荧光离子后,在微球表面再进行葡聚糖修饰,大大提升了微球的稳定性和对可逆环境的抗干扰性。在此基础上可开发出灵敏度高于普通胶体金或有色乳胶免疫层析方法2~3个数量级的定量检测技术。
- [0028] 本发明的试剂条的优点是快速准确定量,集胶体金快速、酶联免疫定量、色谱质谱准确检测的特点于一身,实现10min内快速准确定量检测；随到随检,对检测样本量无要求,既可单个或少量样本随到随检,也可大量样本同时检测,并可实现现场检测；配置要求低,对配套的仪器设备及人员要求低,操作人员仅需短期培训就能熟练掌握；性价比高,生产成本比胶体金更低,一个卡可以同时检测牛结核和牛副结核两种疾病,更具竞争优势。
- [0029] 本发明检测卡灵敏度高,借助荧光免疫分析仪可以进行定量检测。简化了抗原刺激的操作,使抗原刺激更加简单、快捷。本发明可以直接将采取的全血加入到已经稀释好的结核菌素中,反应后直接读数。本发明可以做到一卡同时检测两种疾病。同时本发明的生产成本比ELISA和胶体金低,可以快速,并定量检测,优势明显。

附图说明

- [0030] 图1为本发明试纸条的结构示意图(1:PVC板；2:NC膜；3:吸水纸；4:荧光微球标记垫；5:样品垫；6:T线T1、T2；7:C线)；
- [0031] 图2为本发明试纸条的实物图；

- [0032] 图3为本发明试纸条与塑胶外壳的组装图；
- [0033] 图4为本发明牛结核IFN- γ 和牛副结核检测卡；
- [0034] 图5为本发明检测卡示意图(图中的T1、T2和C线均不显色，需要仪器读数)；
- [0035] 图6为本发明试纸条采用的荧光免疫分析仪。

具体实施方式

[0036] 为了便于本领域技术人员的理解，下面结合实施例及附图对本发明作进一步的说明。

[0037] 实施例1试剂条及其制备方法

[0038] 本实施例的检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条，包括样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸和PVC板；其中荧光微球标记垫上包被荧光微球标记的鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记的牛副结核蛋白；NC膜上设有检测线T1、T2和质控线C，检测线T1、T2、质控线之间的距离是分别5mm；检测线T1包被兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体，检测线T2包被辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG，质控线C包被表达纯化的IFN- γ 。

[0039] 本实施例中，所述荧光微球的粒径为200nm。

[0040] 本实施例检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条的制备方法，包括以下步骤：

[0041] S1：免疫荧光微球标记鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白的制备：

[0042] (1)微球的清洗

[0043] 使用前将微球混匀，取100 μ L的微球到一个新的2.0mL离心管中，然后加入200 μ L 50mM的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (pH6.0)混匀，15000rpm离心20分钟，去除上清液，最终将乳胶微球超声重悬于500 μ L MES缓冲液中。

[0044] (2)微球的活化

[0045] 用50mM MES (pH6.0) 缓冲溶液配制2 μ L N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) (50mg/mL) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) (50mg/mL) 反应液，旋涡振荡混匀使微球充分悬浮，置于混合器上室温旋转孵育15分钟。

[0046] (3)微球与鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和牛副结核蛋白偶联

[0047] 微球偶联鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体：孵育结束后，12000rpm离心5分钟，弃去上清，用500 μ L MES缓冲液洗涤2次，然后往微球中加入50 μ g的鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体，旋涡振荡混匀，室温孵育4小时；

[0048] 微球偶联牛副结核蛋白：孵育结束后，12000rpm离心5分钟，弃去上清，用500 μ L MES缓冲液洗涤2次，然后往微球中加入50 μ g的牛副结核蛋白，旋涡振荡混匀，室温孵育4小时。

[0049] (4)微球上未结合表面基团的封闭

[0050] 反应完成后，离心去除上清，然后往离心管中加入500 μ L的封闭液(2%BSA, 100mM乙醇胺溶液, pH8.0)进行封闭，室温孵育2小时。

[0051] (5)偶联完成后微球的保存

[0052] 偶联后的微球用Tris-HCl (50mM, pH8.0)洗涤，并复溶于Tris-HCl (50mM, pH8.0)缓冲液中，4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0053] S2:免疫层析试剂条的制备

[0054] (1) 将样品垫、荧光微球标记垫分别用2%~5%的BSA浸泡,然后在37℃烘12个小时。

[0055] (2) 用喷膜机将荧光微球标记鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体喷到所述标记垫上。

[0056] (3) 将兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体稀释至效价的100倍,兔抗牛IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG)稀释至效价的1000倍,牛伽马干扰素(IFN- γ)稀释至浓度200ng/mL。

[0057] (4) 将步骤(3)稀释的溶液分别用喷膜机划线,在NC膜上分别标记为T1(兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体)、T2(兔抗牛IgG-HRP)、C线(IFN- γ);T1、T2、C线之间距离为5mm,最后将试纸条置于37℃烘12小时,

[0058] S3:进行组装:将样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸依次重叠粘贴在塑料底板上,用切条机将整个大板纵向切成一定规格的试剂条,然后干燥密封储存在4℃,最后将试纸条与塑胶外壳组装形成检测卡。

[0059] 实施例2应用实例

[0060] 1. 本实施例所采用的试剂准备:

[0061] 牛型结核菌素,禽型结核菌素,商品化试剂,购自中国兽医药品监察所。

[0062] 牛型结核菌素稀释至1000IU/mL,加入到抗凝管中,100 μ L/管,标记为bPPD;禽型结核菌素稀释至2000IU/mL,加入到抗凝管中,100 μ L/管,标记为aPPD。

[0063] PBS(0.01M,pH7.4)制备:称取氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠2.9g,磷酸二氢钾0.2g,加蒸馏水800mL溶解,用1mol/L氢氧化钠溶液调pH值至7.4,加蒸馏水定容至1000mL,经121.3℃高压灭菌20分钟,冷却。加入到抗凝管中,100 μ L/管,标记为PBS。

[0064] 2. 样品制备:

[0065] 无菌采集牛结核病阳性或阴性牛全血5mL,分别加入到bPPD,aPPD,PBS管中,1mL/管。管子盖严,轻轻晃动,使血液与刺激抗原或PBS充分混合,置37℃培养箱中培养16~20小时,取上清,得到该头牛的3份待检样品,即2种抗原刺激的血液培养上清和PBS血液培养上清。

[0066] 3. 检测:

[0067] 将抗原刺激处理好的样本,分别各取100 μ L加入到检测卡的样品孔中,室温放置10分钟,然后将检测卡插入到荧光免疫分析仪中读数,直观判定结果。

[0068] 牛结核判定依据:

[0069] 有效性:C线读数必须大于1.0。

[0070] 阳性=T1(bPPD的读数)-T1(PBS抗原的读数) ≥ 1.0 且T1(bPPD的读数)-T1(aPPD的读数) ≥ 1.0 。

[0071] 阴性=T1(bPPD的读数)-T1(PBS抗原的读数) < 1.0 或T1(bPPD的读数)-T1(aPPD的读数) < 1.0 。

[0072] 牛副结核判定依据:

[0073] 有效性:C线读数必须大于1.0。

[0074] 阳性:T2的读数 ≥ 1.0 。

[0075] 阴性:T2的读数 < 1.0 。

[0076] 实施例3牛结核IFN- γ 和牛副结核时间分辨免疫荧光分析检测卡的评估

[0077] 1.敏感性和特异性测试

[0078] 用牛结核阳性样品和牛副结核阳性样品进行敏感性检测。分别加入牛结核阳性处理样品bPPD,aPPD,PBS,室温反应10分钟,最终T1读数为:bPPD 138,aPPD 0.55,PBS 0.13,T2读数分别为0.94,0.88,0.91,结果为牛结核阳性,牛副结核阴性;加入牛副结核阳性样品,室温反应10分钟,最终T1读数为:bPPD 0.35,aPPD 0.26,PBS 0.19,T2读数分别为164,179,183,结果为牛结核阴性,牛副结核阳性。使用牛结核和牛副结核阴性样品进行非特异性检测,最终结果T1读数为0.75,T2读数为0.63,均为阴性。由此证明本发明的检测卡敏感性和特异性较高。

[0079] 2.重复性测试

[0080] 用研究批间的和批内的差异来评估检测卡的可重复性。用牛结核阳性样品、牛结核阴性样品、牛副结核阳性样品、牛副结核阴性样品各5份,共20份样品进行检测。同一批次的产品,对20份样品重复检测三次,不同批次的产品,随机选择三个批次,对20份样品进行检测。分别计算批内检测结果的符合率和批间检测结果的符合率。结果变异系数(CV)不超过15%,表明重复性很好。

[0081] 批内检测结果:

[0082] 第一次:20份样品,只有一份牛副结核阳性样品检测结果为阴性,符合率95%;

[0083] 第二次:20份样品,符合率100%;

[0084] 第三次:20份样品,符合率100%。

[0085] 因此,本试纸条批内重复性良好。

[0086] 批间检测结果:

[0087] 第一批:20份样品,一份牛副结核阳性样品检测结果为牛结核阳性和牛副结核阳性,其他均符合,符合率95%;

[0088] 第二批:20份样品,一份牛副结核阳性样品检测结果为牛副结核阴性,其他均符合,符合率95%;

[0089] 第三批:20份样品,符合率100%。

[0090] 三批试纸条符合率在95%以上,重复性良好。

[0091] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

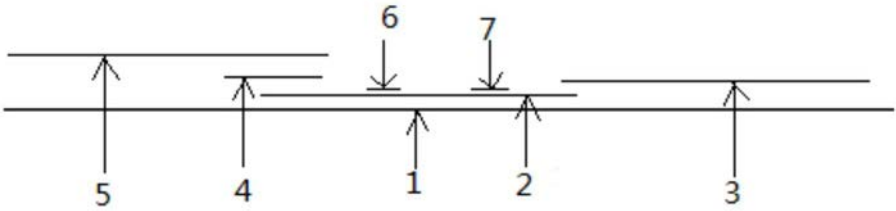


图1



图2

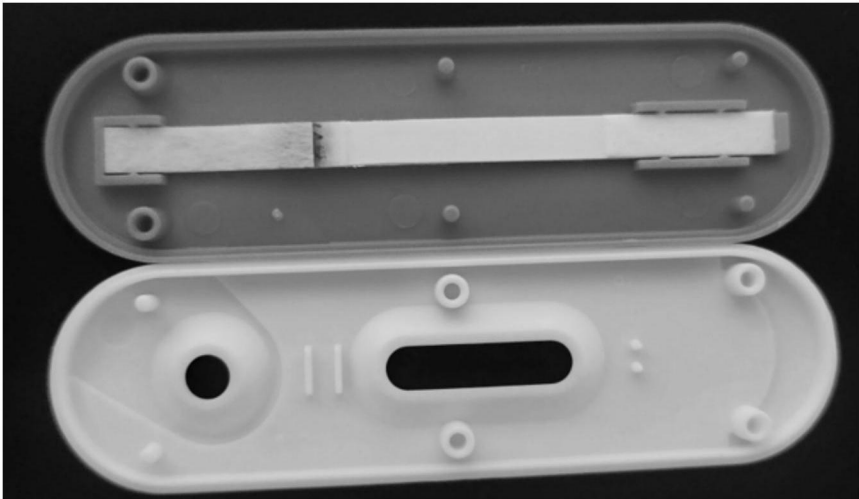


图3

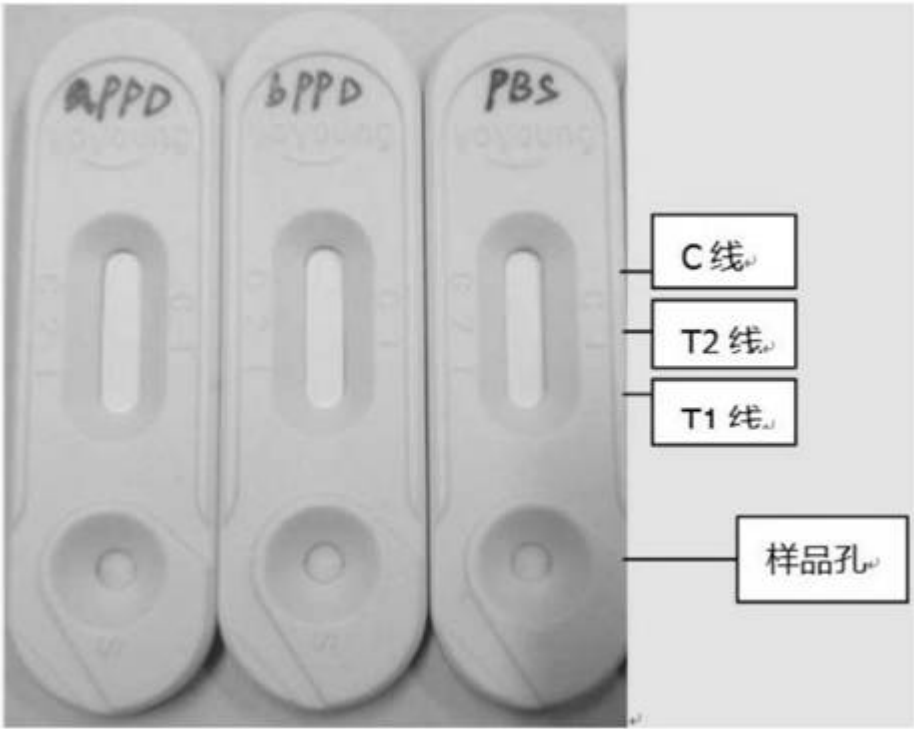


图4

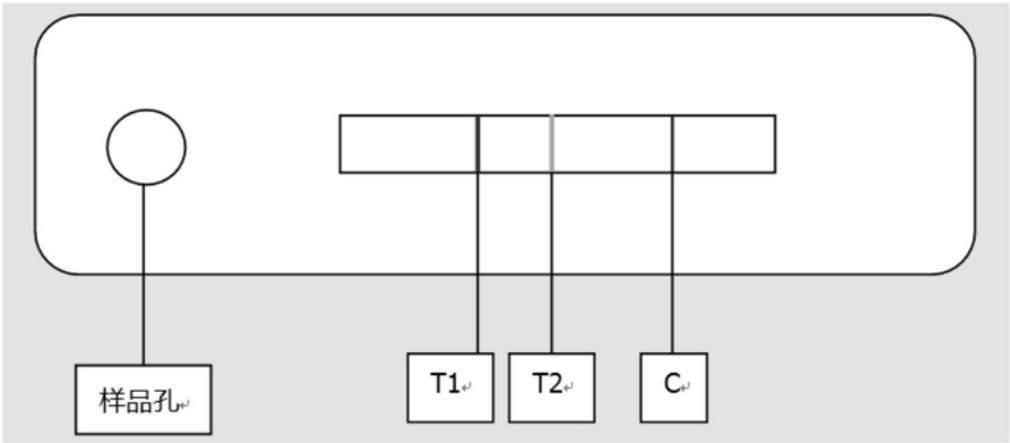


图5



图6

专利名称(译)	一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN109975538A	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201910308259.5	申请日	2019-04-17
[标]发明人	曹立辉 李雪平 窦文茂 古杰 孙贝贝 蔡晓丽		
发明人	曹立辉 李雪平 窦文茂 古杰 孙贝贝 蔡晓丽 欧贤斌		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/5695		
代理人(译)	颜希文		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测牛结核病IFN- γ 和牛副结核病抗体的试纸条，包括样品垫、荧光微球标记垫、NC膜、吸水纸和PVC板；其中荧光微球标记垫上包被荧光微球标记的鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体和荧光微球标记的牛副结核蛋白；NC膜上设有检测线T1、T2和质控线C，检测线T1包被兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体，检测线T2包被辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG，质控线包被表达纯化的IFN- γ 。本发明可以直接将采取的全血加入到已经稀释好的结核菌素中，反应后直接读数。本发明可以做到一卡同时检测两种疾病。同时本发明的生产成本低，可以快速，并定量检测，优势明显。

