



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 204495837 U

(45) 授权公告日 2015.07.22

(21) 申请号 201520097978.4

(22) 申请日 2015.02.11

(73) 专利权人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段

(72) 发明人 赵朴 郑玉姝 郑丽敏 高杰

郭文娟 郭燕 韩红霞 苗培

陈磊 牛然 马小静 聂红敏

耿向华 姚雪静 丁静静

(74) 专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理

事务所(普通合伙) 11369

代理人 史霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

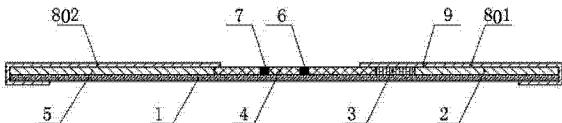
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 实用新型名称

一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条

(57) 摘要

本实用新型公开了一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条，包括：检测层，其包括依次连接的样品吸附层、结合层、纤维素膜层和吸水层，样品吸附层限定了用于接触待检测样品的第一端，吸水层限定了远离待检测样品的第二端，结合层包含有胶体金标记的禽脑脊髓炎病毒的第一抗体；检测线，其设置在纤维素膜层上，检测线包含包被的禽脑脊髓炎病毒的第二抗体，第一抗体和所述第二抗体与禽脑脊髓炎病毒结合的位点不同；对照线，其也设置在纤维素膜层上且比检测线远离第一端，所述对照线包含包被的羊/兔抗小鼠免疫球蛋白G。与其他检测方法相比，该试纸条特异性、灵敏度高、操作简便、结果显示直观、准确、快速，检测成本低廉。



1. 一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,包括:

检测层,其包括依次连接的样品吸附层、结合层、纤维素膜层和吸水层,所述样品吸附层限定了用于接触待检测样品的第一端,所述吸水层限定了远离待检测样品的第二端,所述结合层包含有胶体金标记的禽脑脊髓炎病毒的第一抗体;

检测线,其设置在所述纤维素膜层上,所述检测线包含包被的禽脑脊髓炎病毒的第二抗体,所述第一抗体和所述第二抗体与所述禽脑脊髓炎病毒结合的位点不同;

对照线,其也设置在所述纤维素膜层上且比所述检测线远离所述第一端,所述对照线包含包被的羊/兔抗小鼠免疫球蛋白G。

2. 如权利要求1所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述第一抗体为禽脑脊髓炎病毒的单克隆抗体或多克隆抗体,所述第二抗体为禽脑脊髓炎病毒的多克隆抗体或单克隆抗体。

3. 如权利要求1所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述纤维素膜层为硝酸纤维素膜、纤维素膜、羧化纤维素膜和聚偏二氟乙烯膜中的任意一种制成。

4. 如权利要求1至3任一项所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,还包括:

支撑层,所述检测层固定在所述支撑层的上表面。

5. 如权利要求4所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,还包括:

第一保护膜,其设置在所述检测层的上面,且一端向下弯折包覆住所述第一端,而另一端延伸到所述纤维素膜层一端的上方;

第二保护膜,其设置在所述检测层的上方,且一端向下弯折包覆住所述第二端,而另一端延伸到所述纤维素膜层另一端的上方;

其中,所述第一保护膜为白色,所述第二保护膜的颜色与所述第一保护膜的颜色不相同。

6. 如权利要求4所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述第一保护膜设置有样品标记线,所述样品标记线与远离所述第一端的所述样品吸附层的一侧的距离为0.3~0.7cm处。

7. 如权利要求1所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述支撑层由不吸水的硬质塑胶片或硬纸条制成;所述吸水层用吸水纸制成。

8. 如权利要求1所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述样品吸附层由玻璃棉、尼龙纤维和聚酯纤维中的任意一种制成。

9. 如权利要求1所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述结合层由玻璃棉、尼龙纤维和聚酯纤维中的任意一种制成。

10. 如权利要求1所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,其特征在于,所述检测线和所述对照线的形状排列为“||”、“++”、“—”、“—”和“卜”中的任意一种。

一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种检测禽脑脊髓炎病毒的器具,特别是涉及一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条。

背景技术

[0002] 禽脑脊髓炎 (Avian Encephalomyelitis, AE) 是由禽脑脊髓炎病毒 (Avian Encephalomyelitis virus, AEV) 引起一种以主要侵害幼禽中枢神经系统为特征的急性、高度接触性传染病,又称流行性震颤 (Epidemic Tremor)。AE 主要引起雏鸡发生运动失调、站立不稳和头颈部的快速震颤,病死率为 20% -50% ;产蛋鸡感染后主要表现为产蛋突然下降,降幅为 5% -30%, 孵化率降低,并通过种蛋垂直传播,给养禽业造成了很大危害。

[0003] AE 广泛存在于世界各地,对养禽业的危害日趋严重。该病于 1932 年首次在美国发现,20 世纪 80 年代初传入我国,目前国内广泛存在,近年来疫情有上升的趋势。由于 AEV 属小 RNA 病毒,无囊膜,对氯仿和乙醚等有较强的抵抗力,很难从环境中消除,并且可通过水平接触和垂直传播,极大影响了我国养鸡业的健康发展。

[0004] 及时、快速诊断 AE,是有效控制 AE 的前提。目前 AE 的诊断主要有常规实验室检测和分子生物学两大类方法。常规方法主要有病毒分离鉴定和 AEV 抗体的血清学检测,包括琼脂免疫扩散试验 (AGP)、间接免疫荧光抗体试验 (IFA)、ELISA 等方法。分子生物学方法主要有 PCR 和核酸探针技术等。但 AEV 的病毒分离培养、AGP、IFA、ELISA、PCR 和核酸探针等检测技术操作复杂,需要昂贵的仪器设备、过程较长、耗时费力,需要特定仪器设备和专业技术人员操作,很难在基层普及,不能满足生产一线或疫病现场的快速诊断需要。因此,研究一种快速检测禽脑脊髓炎病毒感染的检测技术非常重要而迫切。

实用新型内容

[0005] 本实用新型的一个目的是解决至少上述问题或缺陷,并提供至少后面将说明的优点。

[0006] 本实用新型还有一个目的是提供了一种结果显示直观、准确、快速检测禽脑脊髓炎的试纸条,与其他检测方法相比,该试纸条特异性强、灵敏度高、操作简便、结果显示快速,检测成本低廉。

[0007] 为了实现根据本实用新型的这些目的和其它优点,本实用新型提供的技术方案为:

[0008] 一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,包括:

[0009] 检测层,其包括依次连接的样品吸附层、结合层、纤维素膜层和吸水层,所述样品吸附层限定了用于接触待检测样品的第一端,所述吸水层限定了远离待检测样品的第二端,所述结合层包含有胶体金标记的禽脑脊髓炎病毒的第一抗体;

[0010] 检测线,其设置在所述纤维素膜层上,所述检测线包含包被的禽脑脊髓炎病毒的第二抗体,所述第一抗体和所述第二抗体与所述禽脑脊髓炎病毒结合的位点不同,且第一

抗体与病毒结合不干扰第二抗体与病毒结合,这样,即使第一抗体和禽脑脊髓炎病毒特异性结合后,由于结合位点不同,也不影响第二抗体与及喉管炎病毒的特异性结合。

[0011] 对照线,其也设置在所述纤维素膜层上且比所述检测线远离所述第一端,所述对照线包含包被的羊 / 兔抗小鼠免疫球蛋白 G (IgG)。

[0012] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述第一抗体为禽脑脊髓炎病毒的单克隆抗体或多克隆抗体,所述第二抗体为禽脑脊髓炎病毒的多克隆抗体或单克隆抗体。

[0013] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述纤维素膜层为硝酸纤维素膜、纤维素膜、羧化纤维素膜和聚偏二氟乙烯膜中的任意一种制成。

[0014] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,还包括:

[0015] 支撑层,所述检测层固定在所述支撑层的上表面。

[0016] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条,还包括:

[0017] 第一保护膜,其设置在所述检测层的上面,且一端向下弯折包覆住所述第一端,而另一端延伸到所述纤维素膜层一端的上方;

[0018] 第二保护膜,其设置在所述检测层的上方,且一端向下弯折包覆住所述第二端,而另一端延伸到所述纤维素膜层另一端的上方;

[0019] 其中,所述第一保护膜为白色,所述第二保护膜的颜色与所述第一保护膜的颜色不相同。

[0020] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述第一保护膜设置有样品标记线,所述样品标记线与远离所述第一端的所述样品吸附层的一侧的距离为 0.3 ~ 0.7cm 处。

[0021] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述支撑层由不吸水的硬质塑胶片或硬纸条制成;所述吸水层用吸水纸制成。

[0022] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述样品吸附层由玻璃棉、尼龙纤维和聚酯纤维中的任意一种制成。

[0023] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述结合层由玻璃棉、尼龙纤维和聚酯纤维中的任意一种制成。

[0024] 优选的是,所述的检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条中,所述检测线和所述对照线的形状排列为“||”、“++”、“++”、“++”和“++”中的任意一种。

[0025] 本实用新型的试纸条所依据的测试原理是:待检样品溶液中的禽脑脊髓炎病毒 (Avian Encephalomyelitis virus, AEV) 与结合垫上的胶体金标记的 AEV 第一抗体特异性结合,AEV 与胶体金标记的抗体复合物在层析作用的推动下向试纸条第二端移动,当移动至包被 AEV 第二抗体的测试线时,形成双抗体夹心复合物并聚集显色,而游离的胶体金标记的第一抗体在移动到对照线时与羊 / 兔抗小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 抗体捕获并显色以表明试纸条的有效性。

[0026] 本实用新型至少包含如下有益效果:

[0027] (1) 本实用新型根据 ELISA 的基本原理,用免疫层析试纸检测病毒,利用微孔滤膜的渗滤浓缩和毛细管作用,将抗原 - 抗体反应由 ELISA 的传统液相环境转到固相滤膜上快

速进行，并采用胶体金印迹代替酶印迹，凭肉眼直接观察胶体金的显色状况，即时获得检测结果，因此该方法比 ELISA 等血清学方法更为简便、快速。

[0028] (2) 检测特异性强，敏感性高。该试纸条以胶体金印迹高亲和力的特异性单抗 / 多抗为基础制备而成，金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成，二者通过异性电荷间的范德华力相结合，胶体金标对单抗 / 多抗的特异性和亲和力（结合力）影响很小，且具有较高的印迹率。因此，该试纸条具有较高的特异性和敏感性，可检测到 2 纳克的相应病毒的蛋白。

[0029] (3) 操作简便，快速。使用本实用新型试纸条时无需附加任何其它仪器和试剂，只要将其测试端插入待检样品液中 30 秒左右，然后在 5 分钟左右即可判定检测结果。

[0030] (4) 结果显示直观、准确。该试纸条以显示棕红色的检测印迹和对照印迹作为检测的阳性和阴性印迹，即在纤维素膜上显示两条棕红色印迹，表示在被检测样品中有病毒检出，结果为阳性；在纤维素膜上只显示一条棕红色对照印迹 C，表示在被检测样品液中未检出病毒，结果为阴性。结果判定直观、准确，简单明了，不易出现假阴性和假阳性误判。

[0031] (5) 减少投资和检测成本。使用该试纸条，不需另配其它仪器、设备和试剂，节省大量仪器、设备和附加试剂费用；专业和非专业人士均可随时随地进行现场检测，无需支付专家诊断检查费或送样品去诊断室的路费，节省检测成本，检测费用低。

[0032] (6) 应用范围广，便于普遍推广应用。本实用新型操作简单，成“一步式”或“傻瓜式”，而且方便携带和保存，能满足不同层次人员的需要，包括专业化验、海关检疫、卫生防疫、质量监测、畜产品加工、集约化养殖到个体养殖等，具有广阔的市场前景和较好的经济、社会效益。

附图说明

[0033] 图 1 为本实用新型试纸条的俯视结构示意图；

[0034] 图 2 为本实用新型试纸条的侧面结构示意图。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图对本实用新型做进一步的详细说明，以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0036] 应当理解，本文所使用的诸如“具有”、“包含”以及“包括”术语并不排除一个或者多个其它元件或其组合的存在或添加。

[0037] 如图 1 和图 2 所示，本实用新型提供一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条，包括：

[0038] 检测层，其包括依次连接的样品吸附层 2、结合层 3、纤维素膜层 4 和吸水层 5，所述样品吸附层 2 限定了用于接触待检测样品的第一端，所述吸水层 5 限定了远离待检测样品的第二端，所述结合层 3 包含有胶体金标记的禽脑脊髓炎病毒的第一抗体；

[0039] 检测线 6，其设置在所述纤维素膜层 4 上，所述检测线 6 包含包被的禽脑脊髓炎病毒的第二抗体，所述第一抗体和所述第二抗体与所述禽脑脊髓炎病毒结合的位点不同，且第一抗体与病毒结合不干扰第二抗体与病毒结合；作为优选，所述第一抗体采用禽脑脊髓炎病毒的单克隆抗体时，第二抗体采用禽脑脊髓炎病毒的多克隆抗体，所述第一抗体采用禽脑脊髓炎病毒的多克隆抗体时，所述第二抗体为禽脑脊髓炎病毒的单克隆抗体。这样，第

一抗体和第二抗体可分别与禽脑脊髓炎病毒的不同位点结合。即使第一抗体和禽脑脊髓炎病毒特异性结合后,由于结合位点不同,也不影响第二抗体与禽脑脊髓炎病毒的特异性结合。

[0040] 对照线 7,其也设置在所述纤维素膜层 4 上且比所述检测线 6 远离所述第一端,以保证检测结果的有效性和可信性。所述对照线包含包被的羊 / 兔抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG)。

[0041] 检测样品时,取禽类的组织,磨碎后重悬,将该试纸条的第一端即样品吸附层 2 插入到重悬后的样品溶液中,约 30 秒后取出该试纸条,水平放置约 1-5 分钟。当试纸条的第一端(样品吸附层)插入待检测样品溶液后,由于层析作用待检样品溶液带动待检禽脑脊髓炎病毒(AEV)和结合层 3 中的胶体金标记的禽脑脊髓炎病毒的第一抗体一起向纤维素膜层 4 扩散,并最终渗入第二端的吸水层 5 中。扩散过程中,若待检样品溶液中含有禽脑脊髓炎病毒,则该病毒可与该病毒胶体金标记的第一抗体特异性结合,继续扩散,该禽脑脊髓炎病毒与纤维素膜层 4 上检测线 6 中的第二抗体结合,从而检测线 6 处显示出棕红色的印迹;而对照线 7 中的羊抗或兔抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG)与胶体金标记的第一抗体结合,也形成棕红色的印迹。如果待检样品液中没有 AEV,该试纸条只在对照线 7 处显示出一条棕红色印迹;如果纤维素膜层 4 上没有任何棕红色印迹显示,则表明试纸条已失效或操作失误。

[0042] 作为优选,为了层析速度更快、效果更好,所述纤维素膜层 4 采用硝酸纤维素膜、纤维素膜、羧化纤维素膜和聚偏二氟乙烯膜中的任意一种制成。

[0043] 作为优选,为了使该试纸条更加牢固和便于抓握,该试纸条,还包括:

[0044] 支撑层 1,所述检测层固定在所述支撑层 1 的上表面。例如,支撑层 1 可由不吸水的硬质塑胶片或硬纸条制成。

[0045] 作为优选,为了保护该试纸条不被污染,该试纸条,还包括:

[0046] 第一保护膜 801,其设置在所述检测层的上方,且一端向下弯折包覆住所述第一端,而另一端延伸到所述纤维素膜层 4 一端的上方;

[0047] 第二保护膜 802,其设置在所述检测层的上方,且一端向下弯折包覆住所述第二端,而另一端延伸到所述纤维素膜层 4 另一端的上方;这样,第一和第二保护膜 801,802 延伸到纤维素膜层 4 的两端将试纸条保护出来,同时也能保证检测线 6 和对照线 7 也能暴露在检测者的视野中,便于观察。

[0048] 其中,所述第一保护膜 801 为白色,设置为白色也便于看到样品吸收层 2 是否吸收了样品,为了便于区分试纸条的两端,所述第二保护膜 802 的颜色与所述第一保护膜的颜色不相同。

[0049] 一种更优选的做法是:再所述第一保护膜 801 上设置样品标记线 9,所述样品标记线 9 与远离所述第一端的所述样品吸附层 2 的一侧的距离为 0.3 ~ 0.7cm 处,可在样品标记线 9 处印上箭头及 MAX 字样。

[0050] 作为优选,所述样品吸附层 2 可由例如玻璃棉、尼龙纤维和聚酯纤维中的任意一种制成。所述吸水层 5 可用吸水纸制成。所述结合层 3 可由例如玻璃棉、尼龙纤维和聚酯纤维中的任意一种制成。

[0051] 作为优选,所述检测线 6 和所述对照线 7 在纤维素膜层 4 上显示出来的形状排列的形式可以为下列形式中的任意一种:“||”、“++”、“ $\perp \perp$ ”、“ $\top \top$ ”、和

“十十”。

[0052] 实施例 1

[0053] 如图 1 和图 2 所示,图中 1 为以塑胶薄片条制成的支撑层,2 为以玻璃棉制成的样品吸附层,3 为附着有胶体金标记的抗 AEV 单克隆抗体的玻璃棉制成的金标抗体纤维层,即结合层,4 为硝酸纤维素膜制成的纤维素膜层,5 为由吸水滤纸制成的吸水层,将样品吸附层 2、结合层 3、纤维素膜层 4、吸水层 5 各层依次粘贴在支撑层 1 上,彼此拼接的交界处纤维互相交叉渗透。在纤维素膜层 4 上,以抗 AEV 多克隆抗体 IgG 溶液标记检测线 6(代号 T),以羊(兔)抗小鼠 IgG 溶液标记对照线 7(代号 C);检测线与对照线的排列形式为“||”。第一保护膜 801 覆盖在样品吸附 2 和结合层 3 上面的第一端,其为白色保护膜,在样品吸附层 2 和结合层 3 交界处对应的第一保护膜 801 上偏向于样品吸附层 2 一侧 0.5cm 处印有印迹线 9,印迹线的右端印有箭头及 MAX 字样,吸水层 5 即第二端上覆盖有其它颜色(如黄色)的第二保护膜 802。

[0054] 用于对照印迹的羊(兔)抗小鼠 IgG 和羊(兔)抗兔羊 IgG,及用于检测印迹和结合层上的金标抗 AEV 的多克隆抗体和单克隆抗体的制备方法如下:

[0055] (1) 羊(兔)抗小鼠 IgG 和羊(兔)抗兔羊 IgG 的制备

[0056] 以饱和硫酸铵法提取小鼠血清中的 IgG:取 1 份血清加 2 份 PBS 液(pH7.2)混匀,加等体积饱和硫酸铵液混匀,置 4℃冰箱内 2 小时,在 4℃、10000r/min 离心 15min,弃上清液;以适量 PBS 液(pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵液至其最终浓度为 33%,置 4℃冰箱内 2 小时,在 4℃、10000r/min 条件下离心 15min,弃上清液,以少量 PBS 液(pH7.2)溶解沉淀,置 4℃冰箱内用 PBS 液(pH7.2)过夜透析,换液 2-3 次,在 4℃、10000r/min 条件下离心 15min,收集上清液,以紫外分光光度计测定其蛋白浓度。以 50 μg ~ 100 μg(IgG)/kg 体重经皮下或肌肉注射抗体阴性健康羊或家兔 3-4 次,末次免疫 20 天后,静脉采血,以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1:2000 以上,心脏采血或颈动脉放血,收集其高免血清,以饱和硫酸铵法提取羊(兔)抗小鼠/鸡的 IgG(其提取方法与上述提取小鼠血清 IgG 相同,不再重述),同理制备羊/兔抗兔/羊 IgG,用于标记本实用新型试纸条的对照印迹。

[0057] (2) 抗 AEV 单克隆抗体的制备

[0058] 差速离心、蔗糖密度梯度离心对 AEV 鸡胚毒进行浓缩、纯化,甲醛灭活后用福氏佐剂乳化制备免疫原。

[0059] 以 50-100 μg/只剂量的免疫原免疫 Balb/c 系小鼠三次,每次间隔 15-30 天;第三次加强免疫后 3-4 天,将免疫小鼠眼球放血,拉颈致死,于 75% 酒精浸泡 5-10min,无菌取其脾细胞;剪碎并经 100 目尼龙网过滤,用 GNK 洗液混悬脾细胞,1000r/min 离心 10min,收集脾细胞;将 1×10^8 个的脾细胞与 2×10^7 - 5×10^7 个的 NS0 骨髓瘤细胞混合,再用 GNK 洗液混悬后,1000r/min 离心 10min 弃上清,细胞沉淀于 37℃ 的水浴中在 1min 内缓缓加入 0.7-1.0mL 的 PEG-1500(pH8.5-pH9.0) 边加边摇,然后缓慢加入 GNK 洗液 15rn1,以终止 PEG 的作用;37℃ 水浴 5min,1000r/min 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀重悬于 1640/HAT 选择培养基中,并加入 96 孔培养板(200 μL/孔),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 7-10 天后,以 5-10 μg/mL 的纯化 AEV VP1 蛋白包被 96 孔酶标板,以酶联免疫吸附试验(ELISA)检测杂交瘤的培养上清,挑取强阳性细胞克隆(OD450 ≥ 0.5),连续三次的有限稀释法进行亚克隆,最后筛选得到特异性抗 AEV 的单克隆细胞。

[0060] 该杂交瘤细胞染色体数为 92-98, 其分泌的抗 AEV 的单克隆抗体特异地与 AEV 反应, 亲和力常数达 10^{9-10} , 轻链亚型为 κ 或 λ , 重链亚型为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, 用于制备金标单克隆抗体。

[0061] (3) 抗 AEV 金标单克隆抗体和金标单克隆抗体纤维膜的制备

[0062] 将筛选到的特异性抗 AEV 的单克隆细胞扩大培养, PBS 洗后 1000r/min 离心 10min, 收集细胞, 以 1×10^6 - 2×10^6 个 / 只对经产母鼠进行腹腔注射, 10-20 天后采集小鼠腹水, 4000r/min 离心 10min 后的上清即为所需的单克隆抗体腹水。

[0063] 以柠檬酸钠还原法制备金溶胶: 在 50-100mL 沸腾的 0.01-0.05% 氯金酸水溶液中加入 2-4mL 的 0.5-2% 柠檬酸三钠溶液, 反应后获得直径 15nm 左右的胶体金。以 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调胶体金 pH 值至 8.5-9.5, 以 1 : 1000-1300 的印迹比将待印迹的抗 AEV 单克隆抗体腹水加入 pH8.5-9.5 的金溶胶中, 印迹 10min 后, 加 20wt% 的 PEG-10000 至 PEG-10000 终浓度达到 0.05%, 4℃ 下、1500-3000r/min 离心 20min, 除去未结合的胶体金颗粒, 4℃ 下、15000r/min 离心 1 小时, 弃上清液, 获得初步纯化的金标抗体蛋白混合物后, 用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析, 分离纯化金标蛋白, 获得胶体金印迹的抗 AEV 单克隆抗体。

[0064] 将 1 : 100-1 : 500 稀释的胶体金印迹的上述单克隆抗体吸附于精制玻璃棉 (尼龙纤维或聚酯纤维) 中, 4℃ 下低温真空干燥, 即制得抗 AEV 金标单克隆抗体纤维膜, 即结合层 3。

[0065] (4) 抗 AEV 多克隆抗体的制备

[0066] 同上使用灭活的 AEV 鸡胚毒, 单独多次免疫接种抗体阴性健康羊或兔。末次免疫 20 天后静脉采血, 以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1 : 1024 以上, 心脏采血或颈动脉放血, 收集其高免血清, 以饱和硫酸铵法提取血清中的 IgG 抗体 (方法与提取小鼠血清 IgG 相同, 不重述)。

[0067] (5) 上述试纸条的检测操作方法

[0068] a 检测样品液的制备: 取病鸡的组织如脑和胰等, 将其剪碎、研磨, 以生理盐水制成 1 : 2-1 : 5 倍的待检测样品悬液, 置 4℃ 室温澄清或离心;

[0069] b 检测操作: 将该试纸条第一端插入待检测样品中, 插入深度不超过印迹线, 约 30 秒后取出试纸条, 水平放置约 1-5 分钟, 同时观察结果。

[0070] c 结果判断: 如果在试纸条的纤维素膜层上只显示出一条棕红色对照线印迹 C, 表示检测结果呈阴性, 说明在被检样品液中未检测出 AEV; 如果试纸条上的纤维素膜层出现棕红色的对照线印迹 C 和检测线印迹 T, 表示检测结果呈阳性, 即在待检样品中检出 AEV; 如果纤维素膜层上没有任何棕红色印迹显示, 则表明试纸条已失效或操作有误。

[0071] (6) 上述试纸条的检测原理:

[0072] 当试纸条测第一端 (样品吸附层 2) 插入待检测样品溶液后, 待检溶液通过层析作用带动待检病鸡脑脊髓炎病毒及结合层中的金标抗体一起向纤维素膜层扩散, 并最终渗入第二端的吸水层中, 扩散过程中待检病毒可与该病毒相对应的金标单抗相结合, 进而与纤维素膜层上检测线中的抗该病毒的多抗 IgG 结合, 从而显示出棕红色的检测印迹 T; 而对照线印迹中的羊抗或兔抗小鼠 IgG 则可与金标单抗结合, 形成棕红色对照印迹 C。如果待检样品液中没有 AEV, 试纸条只显示出一条棕红色对照印迹 C; 如果纤维素膜上没有任何棕红色印迹显示, 则表明试纸条已失效或操作失误。

[0073] 实施例 2

[0074] 在该实施例中,该试纸条的结构、制备方法与上述实施例的方案基本相同,不同之处在于:由尼龙纤维制成的结合层 3 上附着以胶体金标记的抗 AEV 金标多克隆抗体;在硝酸纤维制成的纤维素膜层 4 上设有以抗 AEV 单克隆抗体 IgG 溶液喷涂的检测线 6,以羊(兔)抗兔(羊)IgG 溶液喷涂的对照线 7。其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均与实施例 1 方案相同。

[0075] 实施例 3

[0076] 在该实施例中,试纸条的结构、制备方法与实施例 1 方案基本相同,不同之处在于:由聚酯纤维制成的结合层 3 上附着有抗 AEV 金标的单克隆抗体;在聚偏二氟乙烯制成的纤维素膜层 4 上设有以对应的抗 AEV 多克隆抗体 IgG 溶液标记的检测线 6,以羊(兔)抗小鼠 IgG 溶液标记的对照线 7。其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均与实施例 1 方案相同。

[0077] 实施例 4

[0078] 在该实施例中,试纸条的结构、制备方法与实施例 3 基本相同,不同之处在于:由尼龙纤维制成的结合层 3 上附着抗 AEV 的金标多克隆抗体;聚偏二氟乙烯制成的纤维素膜层 4 上设有以对应的抗 AEV 单克隆抗体 IgG 溶液标记的检测线 6,以羊(兔)抗兔(羊)IgG 溶液标记的对照线 7。

[0079] 实施例 5

[0080] 在该实施例中,试纸条的结构、制备方法与实施例 3 基本相同,不同之处在于:由尼龙纤维制成的结合层 3 上附着有抗 AEV 的金标单克隆抗体;在聚偏二氟乙烯制成的纤维素膜层 4 上设有以识别另一表位的抗 AEV 单克隆抗体 IgG 溶液印制的检测线 6,以羊(兔)抗鼠 IgG 溶液印制的对照线 7,检测线与对照线的排列组合为“//”、“++”、“——”、“——”、“——”中的任意一种。

[0081] 实施例 6

[0082] 该快速检测试纸条结构和实施例 1 基本相同,不同之处在于:支撑层 1 由不吸水的硬纸条制成,样品吸附层 2 由尼龙纤维制成,纤维素膜层 4 采用纯纤维素膜制成。

[0083] 实施例 7

[0084] 该快速检测试纸条结构和实施例 1 基本相同,不同之处在于:样品吸附层 2 由聚酯纤维膜制成,纤维素膜层 4 采用羧化纤维素膜制成。

[0085] 实施例 8

[0086] 该快速检测试纸条结构和实施例 3 基本相同,不同之处在于:第一端的样品吸附层 2 用尼龙纤维制成,纤维素膜层 4 采用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 纤维膜制成。

[0087] 实施例 9

[0088] 该快速检测试纸条结构和实施例 5 基本相同,不同之处在于:样品吸附层 2 用聚酯纤维膜制成,纤维素膜层 4 采用纯纤维素膜制成。

[0089] 本实用新型操作简便、快速,结果显示直观、准确,减少了检测 AEV 的投资成本,应用范围广,便于普遍推广应用。而且方便携带和保存,能满足不同层次人员的需要,具有广阔的市场前景和较好的经济、社会效益。

[0090] 尽管本实用新型的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中

所列运用,它完全可以被适用于各种适合本实用新型的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本实用新型并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

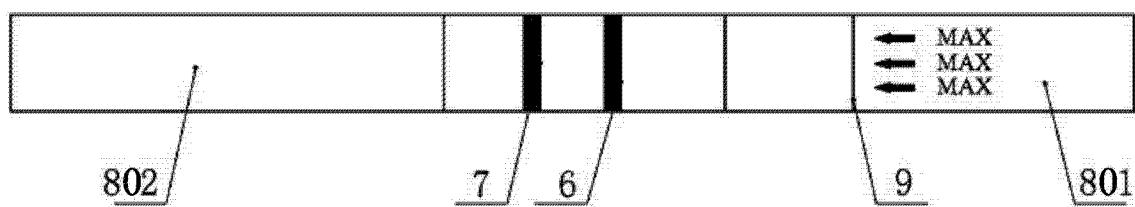


图 1

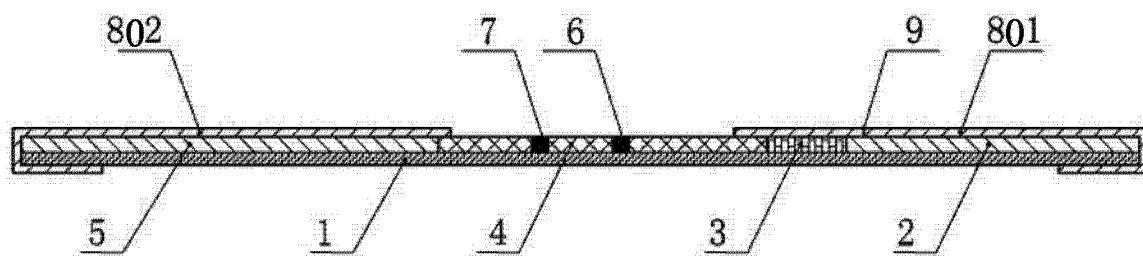


图 2

专利名称(译)	一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条		
公开(公告)号	CN204495837U	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201520097978.4	申请日	2015-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	赵朴 郑玉姝 郑丽敏 高杰 郭文娟 郭燕 韩红霞 苗培 陈磊 牛然 马小静 聂红敏 耿向华 姚雪静 丁静静		
发明人	赵朴 郑玉姝 郑丽敏 高杰 郭文娟 郭燕 韩红霞 苗培 陈磊 牛然 马小静 聂红敏 耿向华 姚雪静 丁静静		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	史霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种检测禽脑脊髓炎病毒的试纸条，包括：检测层，其包括依次连接的样品吸附层、结合层、纤维素膜层和吸水层，样品吸附层限定了用于接触待检测样品的第一端，吸水层限定了远离待检测样品的第二端，结合层包含有胶体金标记的禽脑脊髓炎病毒的第一抗体；检测线，其设置在纤维素膜层上，检测线包含包被的禽脑脊髓炎病毒的第二抗体，第一抗体和所述第二抗体与禽脑脊髓炎病毒结合的位点不同；对照线，其也设置在纤维素膜层上且比检测线远离第一端，所述对照线包含包被的羊/兔抗小鼠

免疫球蛋白G。与其他检测方法相比，该试纸条特异性强、灵敏度高、操作简便、结果显示直观、准确、快速，检测成本低廉。

