(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110297088 A
(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910646237.X

(22)申请日 2019.07.17

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场路徐家坪1号

(72)发明人 蒋韬 林密 李昕 孙燕燕 李峰松 包艳芳 陈夏辉 杨光

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 瞿晓晶

(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)

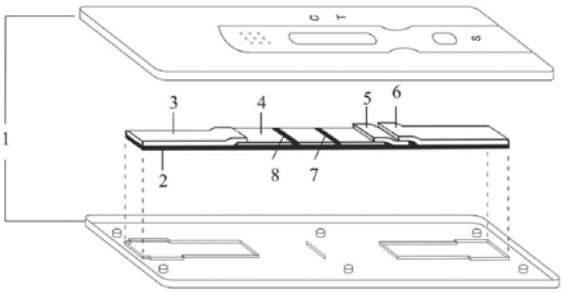
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法，属于口蹄疫病毒快速检测技术领域。本发明所述试纸卡包括卡壳、PVC衬板、吸收垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫，所述金标垫上标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体；所述硝酸纤维素膜上包被标有羊抗兔IgG抗体的质控带和标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的检测带。本发明所述试纸卡能够确定口蹄疫O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒及其含量，并且操作简单快速，适合于疫苗质量的检测与评价。



CN 110297088 A

1.口蹄疫病毒定量检测试纸卡,所述试纸卡包括卡壳(1)、PVC衬板(2)、吸收垫(3)、硝酸纤维素膜(4)、金标垫(5)和样品垫(6),其特征在于,所述金标垫上标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体;所述硝酸纤维素膜上包被标有羊抗兔IgG抗体的质控带(7)和标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的检测带(8)。

2.根据权利要求1所述的试纸卡,其特征在于,所述试纸卡检测的样品包括口蹄疫疫苗半成品、口蹄疫疫苗成品、含口蹄疫病毒的组织或含口蹄疫病毒的液体样品。

3.根据权利要求2所述的试纸卡,其特征在于,所述口蹄疫疫苗成品在检测前进行破乳处理;所述含口蹄疫病毒的组织在检测前进行分散处理;所述含口蹄疫病毒的液体样品在检测前进行离心,取上清。

4.根据权利要求3所述的试纸卡,其特征在于,所述破乳处理为:将口蹄疫疫苗成品与破乳剂按照质量比为(4～5):1混合,振荡后3000～5000rpm离心10～15min,取下层液体;

所述破乳剂为正丁醇、正戊醇或三氯乙烯。

5.根据权利要求3所述的试纸卡,其特征在于,所述分散处理为:将含口蹄疫病毒的组织进行研磨,然后与分散剂按照质量比为1:5混合,4℃浸毒过夜,次日以3000～5000rpm离心5～10min,取上清;

所述分散剂为0.11mol/L磷酸盐缓冲液或DMEM培养液。

6.权利要求1～5任一项所述口蹄疫病毒定量检测试纸卡的制备方法,包括以下步骤:

1)调节胶体金溶液的pH至8.0～8.5,加终浓度为2～15μg/ml O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体,搅拌30～40min,加入终浓度为0.5～1%的酪蛋白,搅拌30～40min,8000～10000rpm离心30～60min,弃去上清,所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/10～1/20的胶体金缓冲液中,得到免疫胶体金溶液,将所述免疫胶体金溶液进行喷涂,得到标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的金标垫;

2)使用磷酸盐缓冲液,分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.2～1mg/mL,将标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体作为检测带抗体稀释至0.2～1mg/mL,分别按1～2μL/cm的喷量分别将质控带抗体和检测带抗体喷于硝酸纤维素膜上,形成质控带与检测带,37℃干燥后,置于封闭液中浸泡3～5min,取出后37℃干燥;

3)将试纸卡进行组装;

所述步骤1)和步骤2)没有时间先后顺序的限定。

7.根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤1)所述胶体金缓冲液为含质量百分含量为5～15%的海藻糖、质量百分含量为1%的酪蛋白和质量百分含量为0.5～1‰的NP-40的pH值为7.4、摩尔浓度为0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

8.根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤2)所述封闭液为含质量百分含量为2.5～5%的牛血清白蛋白和质量百分含量为0.5～1‰NP-40的pH值为7.4,摩尔浓度为0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及口蹄疫病毒快速检测技术领域，具体涉及口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot andMouth Disease，FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的偶蹄类动物共患的急性、热性、接触性传染病。口蹄疫病毒有A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2和SAT3共7个血清型。虽然各型病毒引起的发病征候相同，但型间无交叉免疫，病后康复或免疫动物仍可感染其它血清型病毒而发病。因此，同一个地区可同时流行多个血清型的口蹄疫。口蹄疫主要危害猪牛羊等主要家畜畜种，可造成巨大的经济损失。中国猪、牛、羊养殖量最大、邻国众多，诊断及防控口蹄疫不仅对本国农牧业发展起关键作用，而且对全球口蹄疫防控有重要意义。由于口蹄疫传播迅速，难以防治，补救措施少，所以快速敏感的检测技术对于及时采取措施、防控疫情蔓延至关重要。

[0003] 疫苗免疫是防控口蹄疫的主要手段，口蹄疫灭活疫苗是目前使用的主要疫苗，在防控中发挥了重要作用。疫苗中的有效抗原，及完整病毒颗粒的含量，是口蹄疫灭活疫苗质量的关键。因此，口蹄疫灭活疫苗病毒含量的检测，可以控制口蹄疫灭活疫苗的生产过程中的质量，比较各批次间疫苗的差异，评价疫苗半成品、成品质量，从而提高生产效率、改进生产工艺。给动物进行口蹄疫免疫接种时，往往不同厂家或不同批次间存在疫苗效价的差异，低效价疫苗易导致免疫失败，因此，快速、准确测定口蹄疫病毒灭活疫苗中的病毒含量，对筛选有效的口蹄疫防疫疫苗具有实际的应用价值。在口蹄疫灭活疫苗免疫接种前，快速评价疫苗中的病毒含量，对免疫预防工作具有重要意义。

[0004] 目前，检测口蹄疫病毒的方法主要为病毒分离、血清学及分子生物学鉴定方法，这三类方法大多需要专业的技术或设备，或者检测时间相对较长。口蹄疫病毒含量测定主要应用的方法主要为密度梯度法、凝胶过滤色谱法、ELISA、荧光定量RT-PCR等方法，蔗糖密度梯度离心法对FMDV的血清型毒株没有限制，但无法检测多价成品疫苗各血清型病毒的抗原含量；ELISA方法操作相对简单，一次性可检测大量样品，但是制备单克隆抗体的过程复杂，并且对检测的病毒株有限制；凝胶过滤色谱法则自动化程度高，但检测灵敏度及对杂质含量较高的样品分离效率目前不高，荧光定量RT-PCR往往由于试剂、操作等因素的影响会产生一些误差，并且受研究技术水平的限制，绝对定量的精度和准确度不高。因此建立一种操作快速简单，结果有效准确的口蹄疫病毒定量检测方法具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法。本发明所述试纸卡能够确定口蹄疫O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒及其含量，并且操作简单快速，适合于疫苗质量的检测与评价。

[0006] 本发明提供了口蹄疫病毒定量检测试纸卡，优选的是，所述试纸卡检测的样品包

括口蹄疫疫苗半成品、口蹄疫疫苗成品、含口蹄疫病毒的组织或含口蹄疫病毒的液体样品。

[0007] 优选的是，所述口蹄疫疫苗成品在检测前进行破乳处理；所述含口蹄疫病毒的组织在检测前进行分散处理；所述含口蹄疫病毒的液体样品在检测前进行离心，取上清。

[0008] 优选的是，所述破乳处理为：将口蹄疫疫苗成品与破乳剂按照质量比为(4～5):1混合，振荡后3000～5000rpm离心10～15min，取下层液体；

[0009] 所述破乳剂为正丁醇、正戊醇或三氯乙烯。

[0010] 优选的是，所述分散处理为：将含口蹄疫病毒的组织进行研磨，然后与分散剂按照质量比为1:5混合，4℃浸毒过夜，次日以3000～5000rpm离心5～10min，取上清；

[0011] 所述分散剂为0.11mol/L磷酸盐缓冲液或DMEM培养液。

[0012] 本发明还提供了上述技术方案所述口蹄疫病毒定量检测试纸卡的制备方法，包括以下步骤：

[0013] 1)调节胶体金溶液的pH至8.0～8.5，加终浓度为2～15μg/ml O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体，搅拌30～40min，加入终浓度为0.5～1％的酪蛋白，搅拌30～40min，8000～10000rpm离心30～60min，弃去上清，所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/10～1/20的胶体金缓冲液中，得到免疫胶体金溶液，将所述免疫胶体金溶液进行喷涂，得到标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的金标垫；

[0014] 2)使用磷酸盐缓冲液，分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.2～1mg/mL，将标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体作为检测带抗体稀释至0.2～1mg/mL，分别按1～2μL/cm的喷量分别将质控带抗体和检测带抗体喷于硝酸纤维素膜上，形成质控带与检测带，37℃干燥后，置于封闭液中浸泡3～5min，取出后37℃干燥；

[0015] 3)将试纸卡进行组装；

[0016] 所述步骤1)和步骤2)没有时间先后顺序的限定。

[0017] 优选的是步骤1)所述胶体金缓冲液为含质量百分含量为5～15％的海藻糖、质量百分含量为1％的酪蛋白和质量百分含量为0.5～1‰的NP-40的pH值为7.4、摩尔浓度为0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0018] 优选的是，步骤2)所述封闭液为含质量百分含量为2.5～5％的牛血清白蛋白和质量百分含量为0.5～1‰NP-40的pH值为7.4，摩尔浓度为0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0019] 本发明提供了口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法。本发明所述试纸卡能够测定出组织或液体样品中口蹄疫O型、A型或亚洲I型病毒及其含量，同时，本试纸卡对口蹄疫灭活疫苗半成品、成品中抗原含量的检测，可以在生产过程中监测并控制疫苗的质量；对疫苗使用者来说，可以用试纸卡筛选优质疫苗，避免接种失败。现有的口蹄疫病毒含量的检测方法大多所需时间较长或是操作方法较为复杂，在实际应用中需要简单快速的检测方法，本试纸试纸卡操作简便快速，并且成本较低，适用于田间样品检测及生产应用。

附图说明

[0020] 图1为本发明提供的试纸卡结构示意图；

[0021] 图2为本发明提供的口蹄疫病毒定量检测试纸卡检测结果图；

[0022] 图3为口蹄疫O型病毒标准曲线；

[0023] 图4为口蹄疫A型病毒标准曲线；

[0024] 图5为口蹄疫亚洲I型病毒标准曲线。

具体实施方式

[0025] 本发明提供了口蹄疫病毒定量检测试纸卡。在本发明中，所述试纸卡检测的样品包括口蹄疫疫苗半成品、口蹄疫疫苗成品、含口蹄疫病毒的组织或含口蹄疫病毒的液体样品。

[0026] 在本发明中，所述口蹄疫疫苗成品在检测前进行破乳处理；所述含口蹄疫病毒的组织在检测前进行分散处理；所述含口蹄疫病毒的液体样品在检测前进行离心，取上清。在本发明中，疫苗半成品不需要处理。

[0027] 在本发明中，所述破乳处理为：将口蹄疫疫苗成品与破乳剂按照质量比为(4～5)：1混合，振荡后3000～5000rpm离心10～15min，取下层液体；

[0028] 所述破乳剂为正丁醇、正戊醇或三氯乙烯。

[0029] 在本发明中，所述分散处理为：将含口蹄疫病毒的组织进行研磨，然后与分散剂按照质量比为1:5混合，4℃浸毒过夜，次日以3000～5000rpm离心5～10min，取上清；

[0030] 所述分散剂为0.11mol/L磷酸盐缓冲液或DMEM培养液。

[0031] 本发明还提供了上述技术方案所述口蹄疫病毒定量检测试纸卡的制备方法，包括以下步骤：

[0032] 1)调节胶体金溶液的pH至8.0～8.5，加终浓度为2～15μg/ml O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体，搅拌30～40min，加入终浓度为0.5～1％的酪蛋白，搅拌30～40min，8000～10000rpm离心30～60min，弃去上清，所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/10～1/20的胶体金缓冲液中，得到免疫胶体金溶液，将所述免疫胶体金溶液进行喷涂，得到标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的金标垫；

[0033] 2)使用磷酸盐缓冲液，分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.2～1mg/mL，将标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体作为检测带抗体稀释至0.2～1mg/mL，分别按1～2μL/cm的喷量分别将质控带抗体和检测带抗体喷于硝酸纤维素膜上，形成质控带与检测带，37℃干燥后，置于封闭液中浸泡3～5min，取出后37℃干燥；

[0034] 3)将试纸卡进行组装；

[0035] 所述步骤1)和步骤2)没有时间先后顺序的限定。

[0036] 本发明调节胶体金溶液的pH至8.0～8.5，加终浓度为2～15μg/ml O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体，搅拌30～40min，加入终浓度为0.5～1％的酪蛋白，搅拌30～40min，8000～10000rpm离心30～60min，弃去上清，所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/10～1/20的胶体金缓冲液中，得到免疫胶体金溶液，将所述免疫胶体金溶液进行喷涂，得到标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的金标垫。在本发明中，优选用0.2mol/L的K_2CO_3调节胶体金溶液的pH值。本发明所述免疫胶体金溶液在喷涂前优选保存在4℃环境下。在本发明中，所述胶体金溶液优选通过柠檬酸三钠还原法制备，具体地，所述制备方法优选为：取0.01％氯金酸水溶液1000mL加热至沸腾，边搅动边加入1％柠檬酸三钠溶液15mL，待溶液由黑色逐渐转为红色，继续煮沸5min，停止加热并冷却至室温。制备好的胶体金溶液在分光光度计下检测其最高吸收峰值为523nm。在本发明中，所述胶体金缓冲液优选为含质量百分含量为5～15％的海藻糖、质量百分含量为1％的酪蛋白和质量百分含量为0.5～1‰的NP-40的pH值

为7.4、摩尔浓度为0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。在本发明中，将所述免疫胶体金溶液进行喷涂的方法优选为：按照10-15μL/cm的喷量，用三维平面点喷仪在玻璃纤维纸上喷涂，37℃干燥后密封保存。

[0037] 本发明使用磷酸盐缓冲液，分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.2～1mg/mL，将标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体作为检测带抗体稀释至0.2～1mg/mL，分别按1～2μL/cm的喷量分别将质控带抗体和检测带抗体喷于硝酸纤维素膜上，形成质控带与检测带，37℃干燥后，置于封闭液中浸泡3～5min，取出后37℃干燥。本发明所述质控带和检测带优选间隔5mm的距离。在本发明中，所述封闭液为含质量百分含量为2.5～5％的牛血清白蛋白和质量百分含量为0.5～1‰NP-40的pH值为7.4，摩尔浓度为0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0038] 本发明将试纸卡进行组装。本发明所述试纸卡优选还包括外层的塑料卡。本发明所述纸质卡的结构为PVC衬板在最底部，衬板上的中段有硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上部左端贴有吸收垫，硝酸纤维素膜上部右端设有金标垫，金标垫右端设有样品垫。试纸卡的吸收垫和金标垫与硝酸纤维素膜的衔接处有交叠，金标垫与样品垫之间也有交叠。将上述试纸卡装入塑料卡中，对应于样品垫的部位设有加样孔，对应于硝酸纤维素膜的位置设有观测窗。本发明所述组装方法优选为：在PVC衬板上贴上含质控带和检测带的硝酸纤维素膜，在检测带下方贴上胶体金垫、样品垫，在质控带上方贴上吸收垫，然后将整个粘好的PVC板装入塑料卡中，对应于样品垫的部位设有加样孔，对应于硝酸纤维素膜的位置设有观测窗。本发明所述试纸卡能够检测口蹄疫疫苗半成品、成品、其他含口蹄疫病毒组织或液体等样品的病毒含量。

[0039] 在本发明中，所述试纸卡的使用方法为：将口蹄疫病毒O型、A型或亚洲I型病毒标准品加入到试纸卡中，反应15min后放入金标条阅读仪进行检测，已知不同浓度的样品检测得到的T/C值运用函数拟合出标准曲线，可根据函数关系式计算待测样品中的病毒含量。所述函数关系式为：y＝ax+b，其中y代表病毒含量(单位：μg/ml)，x代表T/C值，a代表斜率，b代表常数。本发明所述口蹄疫O型、A型或亚洲I型病毒标准品优选进行2倍梯度稀释后加入试纸卡中，加入量优选为70μL。在本发明中，所述金标条阅读仪的型号优选为TSR-100A。本发明当质控带不出现红色条带判为结果无效；当质控带出现红色条带判为结果有效。将T/C值带入到相应的标准曲线公式中计算出疫苗中的病毒含量。

[0040] 下面结合具体实施例对本发明所述的口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法做进一步详细的介绍，本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

[0041] 实施例1

[0042] 口蹄疫O型病毒定量检测试纸卡的制备：

[0043] 1.胶体金的制备：采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，取0.01％氯金酸水溶液1000ml加热至沸腾，边搅动边加入1％柠檬酸三钠溶液15ml，待溶液由黑色逐渐转为红色，继续煮沸5min，停止加热并冷却至室温。制备好的胶体金溶液在分光光度计下检测其最高吸收峰值为523nm。

[0044] 2.免疫胶体金的制备(胶体金标记O型口蹄疫病毒抗体)

[0045] 用0.2mol/L的K_2CO_3调节胶体金溶液至pH8.0，加入终浓度为2μg/ml O型口蹄疫病毒抗体，搅拌30min，之后在胶体金溶液中加入终浓度为1％的酪蛋白，搅拌30min，8000rpm

离心40min，弃去上清，所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/10的胶体金缓冲液中，置于4℃保存。

[0046] 上述胶体金缓冲液为含5％海藻糖、1％酪蛋白、0.5‰NP-40的pH7.4，0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0047] 3.喷金

[0048] 分别将已经制备好的免疫胶体金按照15μL/cm的喷量，用三维平面点喷仪在玻璃纤维纸上喷涂，37℃干燥后密封保存。

[0049] 4.硝酸纤维素膜上质控带与检测带的制备

[0050] 用pH7.4，0.02mol/L的磷酸盐缓冲液分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.5mg/mL，将O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒兔抗作为检测带抗体稀释至2mg/mL的工作浓度，分别按2μL/cm的喷量分别将以上两种抗体喷于硝酸纤维素膜上，形成质控带与检测带，两条带之间相距5mm，于37℃干燥后，置于封闭液中浸泡5min，取出后37℃干燥并密封保存。

[0051] 上述封闭液为含2.5％的牛血清白蛋白，0.5‰NP-40的pH7.4，0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0052] 5.试纸卡的组装

[0053] 在PVC衬板上贴上含质控带和检测带的硝酸纤维素膜，在检测带下方贴上胶体金垫、样品垫，在质控带上方贴上吸收垫，然后将整个粘好的PVC板装入塑料卡中，对应于样品垫的部位设有加样孔，对应于硝酸纤维素膜的位置设有观测窗。

[0054] 6.标准曲线的拟合

[0055] 将口蹄疫病毒O型病毒标准品进行2倍梯度稀释，分别将70μL每个稀释度的样品滴入加样孔，反应15min后，置于金标条阅读仪内进行检测(见图2)，读出T/C值(平行检测3次)，如表1所示。

[0056] 表1 T/C值结果

[0057]

标准品浓度（μg/ml）	10	5	2.5	1.25	0.625
T/C 值	2.596	1.525	0.723	0.661	0.348

[0058] 根据T/C值与相应标准品的浓度拟合出标准曲线(如图3所示)，生成标准曲线的函数关系式。

[0059] 疫苗样品的处理：

[0060] 将1mL口蹄疫O型灭活疫苗与破乳剂按4:1比例混合，充分震荡，3000rpm离心10min，吸取下层抗原液体，4℃保存待检。

[0061] 疫苗样品的检测：

[0062] 取处理好的样品70μL滴加到口蹄疫O型病毒定量检测试纸卡中，待反应15min后，将试纸条置于金标条阅读仪内，读出T/C值。

[0063] 结果判定：

[0064] 当质控带不出现红色条带判为结果无效；当质控带出现红色条带判为结果有效。

[0065] 将T/C值带入到相应的标准曲线公式y＝4.1759x-1.0134计算出疫苗中的病毒含量(μg/mL)。

[0066] 实施例2

[0067] 口蹄疫A型病毒定量检测试纸卡的制备:

[0068] 1.胶体金的制备:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,取0.01%氯金酸水溶液1000ml加热至沸腾,边搅动边加入1%柠檬酸三钠溶液15ml,待溶液由黑色逐渐转为红色,继续煮沸5min,停止加热并冷却至室温。制备好的胶体金溶液在分光光度计下检测其最高吸收峰值为523nm。

[0069] 2.免疫胶体金的制备(胶体金标记A型口蹄疫病毒抗体)

[0070] 用0.2mol/L的K_2CO_3调节胶体金溶液至pH8.0,加入终浓度为5μg/mlA型口蹄疫病毒抗体,搅拌30min,之后在胶体金溶液中加入终浓度为1%的酪蛋白,搅拌30min,8000rpm离心40min,弃去上清,所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/15的胶体金缓冲液中,置于4℃保存。

[0071] 上述胶体金缓冲液为含5%海藻糖、1%酪蛋白、0.5‰NP-40的pH7.4,0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0072] 3.喷金

[0073] 分别将已经制备好的免疫胶体金按照15μL/cm的喷量,用三维平面点喷仪在玻璃纤维纸上喷涂,37℃干燥后密封保存。

[0074] 4.硝酸纤维素膜上质控带与检测带的制备

[0075] 用pH7.4,0.02mol/L的磷酸盐缓冲液分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.5mg/mL,将A型口蹄疫病毒兔抗作为检测带抗体稀释至4mg/mL的工作浓度,分别按2μL/cm的喷量分别将以上两种抗体喷于硝酸纤维素膜上,形成质控带与检测带,两条带之间相距5mm,于37℃干燥后,置于封闭液中浸泡5min,取出后37℃干燥并密封保存。

[0076] 上述封闭液为含2.5%的牛血清白蛋白,0.5‰NP-40的pH7.4,0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0077] 5.试纸卡的组装

[0078] 在PVC衬板上贴上含质控带和检测带的硝酸纤维素膜,在检测带下方贴上胶体金垫、样品垫,在质控带上方贴上吸收垫,然后将整个粘好的PVC板装入塑料卡中,对应于样品垫的部位设有加样孔,对应于硝酸纤维素膜的位置设有观测窗。

[0079] 6.标准曲线的拟合

[0080] 将口蹄疫病毒A型病毒标准品进行2倍梯度稀释,分别将70μL每个稀释度的样品滴入加样孔,反应15min后,置于金标条阅读仪内进行检测,读出T/C值,结果如表2所示。

[0081] 表2 T/C值结果

[0082]

标准品浓度(μg/ml)	10	5	2.5	1.25	0.625
T/C 值	1.95	1.18	0.83	0.39	0.21

[0083] 根据T/C值与相应标准品的浓度拟合出标准曲线(如图4所示),生成标准曲线的函数关系式。

[0084] 含口蹄疫病毒组织或含口蹄疫病毒的液体样品的处理:

[0085] 将动物机体组织按照置于组织匀浆机中充分研磨，加入组织分散剂制成1:5的组织悬液，4℃浸毒过夜，次日以10000rpm离心5min，取上清液备用。

[0086] 水泡液不经过研磨处理，以3000rpm离心，取上清液备用。

[0087] 待测样品的检测：

[0088] 取处理好的样品70μL滴加到A型试纸卡加样孔中，反应15min后，将试纸条置于金标条阅读仪内，读出T/C值。

[0089] 结果判定

[0090] 当质控带不出现红色条带判为结果无效；当质控带出现红色条带判为结果有效。

[0091] 将T/C值带入到相应的标准曲线公式y＝5.4254x-1.073计算出疫苗中的病毒含量(μg/mL)。

[0092] 实施例3

[0093] 口蹄疫亚洲I型病毒定量检测试纸卡的制备:

[0094] 1.胶体金的制备：采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，取0.01％氯金酸水溶液1000ml加热至沸腾，边搅动边加入1％柠檬酸三钠溶液15ml，待溶液由黑色逐渐转为红色，继续煮沸5min，停止加热并冷却至室温。制备好的胶体金溶液在分光光度计下检测其最高吸收峰值为523nm。

[0095] 2.免疫胶体金的制备(胶体金标记亚洲I型口蹄疫病毒抗体)

[0096] 用0.2mol/L的K_2CO_3调节胶体金溶液至pH8.0，加入终浓度为1μg/ml亚洲I型口蹄疫病毒抗体，搅拌30min，之后在胶体金溶液中加入终浓度为1％的酪蛋白，搅拌30min，8000rpm离心40min，弃去上清，所得沉淀复溶于胶体金溶液体积1/10的胶体金缓冲液中，置于4℃保存。

[0097] 上述胶体金缓冲液为含5％海藻糖、1％酪蛋白、0.5‰NP-40的pH7.4，0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0098] 3.喷金

[0099] 分别将已经制备好的免疫胶体金按照15μL/cm的喷量，用三维平面点喷仪在玻璃纤维纸上喷涂，37℃干燥后密封保存。

[0100] 4.硝酸纤维素膜上质控带与检测带的制备

[0101] 用pH7.4，0.02mol/L的磷酸盐缓冲液分别将羊抗兔IgG抗体作为质控带抗体稀释至0.5mg/mL，将亚洲I型口蹄疫病毒兔抗作为检测带抗体稀释至4mg/mL的工作浓度，分别按2μL/cm的喷量分别将以上两种抗体喷于硝酸纤维素膜上，形成质控带与检测带，两条带之间相距5mm，于37℃干燥后，置于封闭液中浸泡5min，取出后37℃干燥并密封保存。

[0102] 上述封闭液为含2.5％的牛血清白蛋白，0.5‰NP-40的pH7.4，0.11mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0103] 5.试纸卡的组装

[0104] 在PVC衬板上贴上含质控带和检测带的硝酸纤维素膜，在检测带下方贴上胶体金垫、样品垫，在质控带上方贴上吸收垫，然后将整个粘好的PVC板装入塑料卡中，对应于样品垫的部位设有加样孔，对应于硝酸纤维素膜的位置设有观测窗。

[0105] 6.标准曲线的拟合

[0106] 将口蹄疫病毒亚洲I型病毒标准品进行2倍梯度稀释，分别将70μL每个稀释度的样

品滴入加样孔，反应15min后，置于金标条阅读仪内进行检测，读出T/C值，如表3所示。

[0107] 表3 T/C值结果

[0108]

标准品浓度（μg/ml）	10	5	2.5	1.25	0.625
T/C 值	1.85	0.91	0.48	0.25	0.13

[0109] 根据T/C值与相应标准品的浓度拟合出标准曲线(如图5所示)，生成标准曲线的函数关系式。

[0110] 口蹄疫灭活疫苗半成品处理：

[0111] 未乳化前的灭活疫苗可直接作为待检样品进行检测。

[0112] 待测样品的检测：

[0113] 取待测样品70μL滴加到亚洲I型试纸卡加样孔中，反应15min后，将试纸条置于金标条阅读仪内，读出T/C值。

[0114] 结果判定

[0115] 当质控带不出现红色条带判为结果无效；当质控带出现红色条带判为结果有效。

[0116] 将T/C值带入到相应的标准曲线公式y＝5.554x-0.1572计算出疫苗中的病毒含量(μg/mL)。

[0117] 常规的口蹄疫检测试纸卡仅仅作为定性检测样品的阴阳性，本发明除了可以定性检测口蹄疫样品外，更重要的是可以对阳性样品进行定量检测，具体得测定出样品中病毒含量，可以更深入地应用到疫苗成品或者半成品检测中。

[0118] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

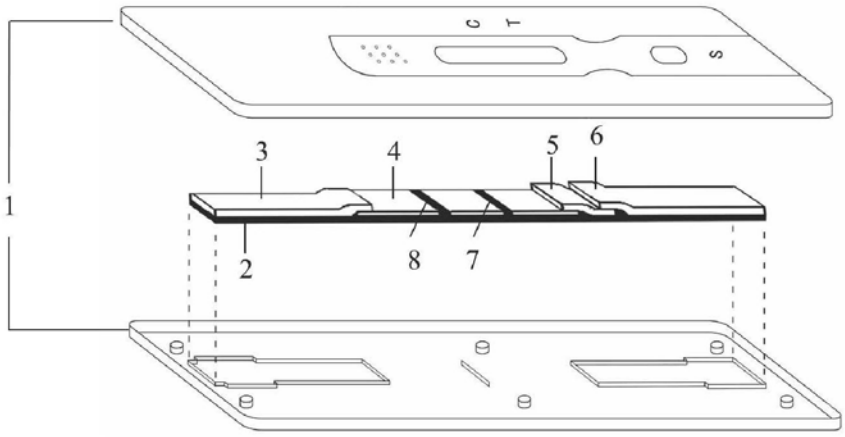

C
T
S
1
2
3
4
5
6
7
8

图1

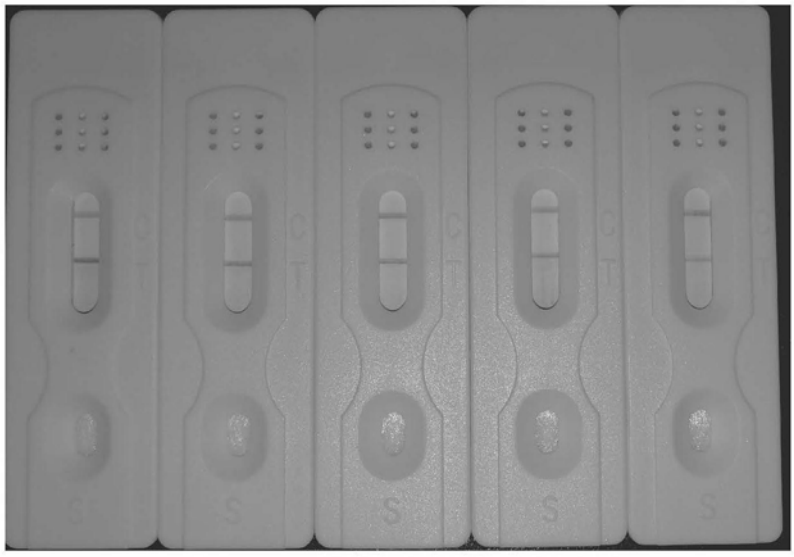


图2

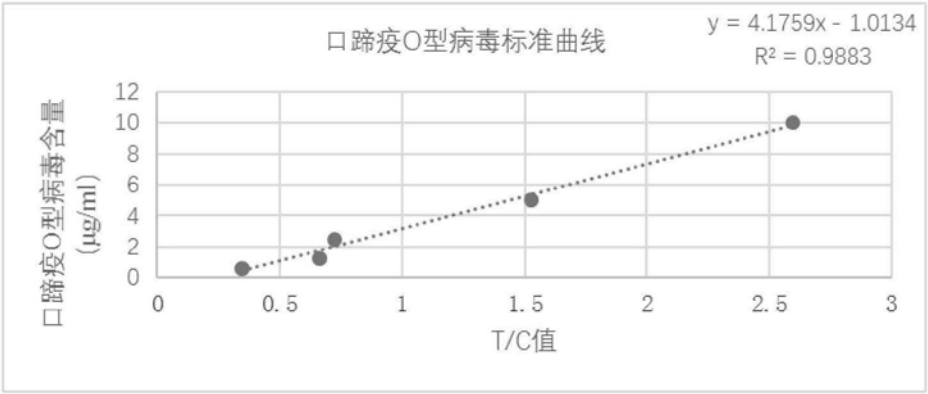

口蹄疫O型病毒标准曲线
y = 4.1759x - 1.0134
R² = 0.9883
口蹄疫O型病毒含量 (μg/ml)
12
10
8
6
4
2
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
T/C值

图3

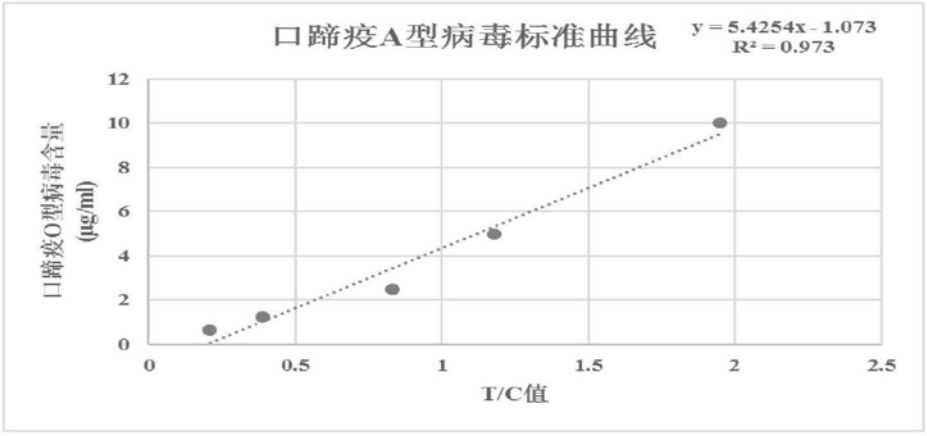

口蹄疫A型病毒标准曲线
y = 5.4254x - 1.073
R² = 0.973
口蹄疫O型病毒含量 (μg/ml)
T/C值
0
2
4
6
8
10
12
0
0.5
1
1.5
2
2.5

图4

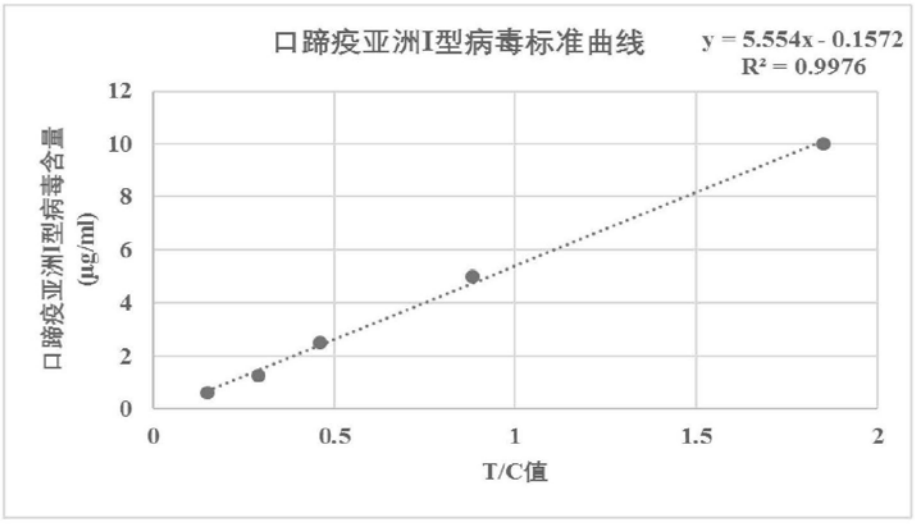
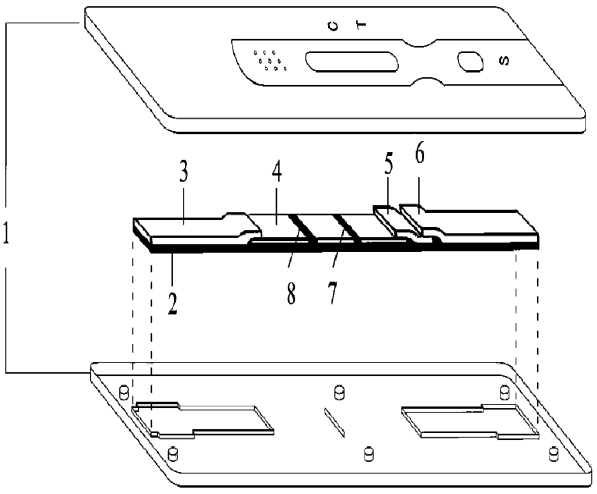

口蹄疫亚洲I型病毒标准曲线
y = 5.554x - 0.1572
R² = 0.9976
口蹄疫亚洲I型病毒含量 (μg/ml)
T/C值
0
2
4
6
8
10
12
0
0.5
1
1.5
2

图5

专利名称(译)	口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN110297088A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201910646237.X	申请日	2019-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	蒋韬 林密 李昕 孙燕燕 李峰松 包艳芳 陈夏辉 杨光		
发明人	蒋韬 林密 李昕 孙燕燕 李峰松 包艳芳 陈夏辉 杨光		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及口蹄疫病毒定量检测试纸卡及其制备方法，属于口蹄疫病毒快速检测技术领域。本发明所述试纸卡包括卡壳、PVC衬板、吸收垫、硝酸纤维素膜、金标垫和样品垫，所述金标垫上标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体；所述硝酸纤维素膜上包被标有羊抗兔IgG抗体的质控带和标有兔抗O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒抗体的检测带。本发明所述试纸卡能够确定口蹄疫O型、A型或亚洲I型口蹄疫病毒及其含量，并且操作简单快速，适合于疫苗质量的检测与评价。