



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 208847749 U

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201820621281.6

(22)申请日 2018.04.27

(73)专利权人 北京纳百生物科技有限公司

地址 101111 北京市通州区科创十四街11
号院3号楼

(72)发明人 于在江 莫勋 郭秀锋

(74)专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有
限公司 11577

代理人 李芙蓉 孙进华

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

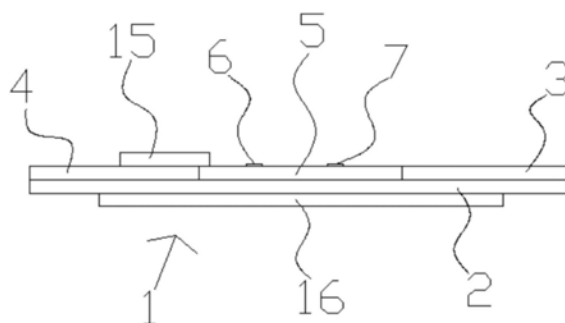
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)实用新型名称

一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件

(57)摘要

本实用新型公开了一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,涉及动物疫病免疫检测技术领域。它包括微孔板架、盒体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管。本实用新型针对阿留申病的确诊检测,与现有的CIEP、PCR和ELISA等方法比较,检测灵敏、速度快、操作简便,检测灵敏度满足阿留申病筛选监控的需求,且操作简便,一般的养殖场工人无需培训即可上手操作。成本低廉,给养殖单位节省大量成本。无需特殊仪器设备,非常适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用,有助于阿留申病的大规模筛选检测和防控。



1. 一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,其特征在于:它包括微孔板架(10)、盒体(13)、多个胶体金试纸(1)、多个微孔试剂(8)、多个塑料桶(14)和多个一次性塑料吸管;

所述胶体金试纸(1)包括PVC背板(2),在PVC背板(2)的底面上设置有双面胶垫(16),所述双面胶垫(16)的顶面粘贴在PVC背板(2)上,双面胶垫(16)的底面上附着有胶垫保护膜,在PVC背板(2)的顶面由左至右依次附着有样品垫(4)、硝酸纤维素膜(5)和吸水垫(3),在样品垫(4)与硝酸纤维素膜(5)的对接处顶面粘贴有截流固定垫(15),所述截流固定垫(15)的右端粘贴在硝酸纤维素膜(5)上,截流固定垫(15)的左端粘贴在样品垫(4)上并延伸至样品垫(4)的顶面中部;在所述硝酸纤维素膜(5)上由左至右间隔喷涂有检测线(6)和质控线(7),且在检测线(6)上喷涂有重组阿留申病毒抗原,在质控线(7)上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

所述微孔试剂(8)包括包被有胶体金标记阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体的塑料微孔(8a),在塑料微孔(8a)的顶端敞口端通过塑料孔盖帽(9)进行密封,且八个塑料微孔(8a)依次连接形成一组微孔试剂(8);

所述盒体(13)为长方形壳体,盒体(13)的顶端敞口处设置有与盒体(13)一侧连接的扣盖,在盒体(13)的内部放置有纸托(11),在所述纸托(11)上开设有多个孔位(12);

每个塑料桶(14)内放置有一组微孔试剂(8)和八个胶体金试纸(1),且每个塑料桶(14)放置在盒体(13)中纸托(11)上相应的孔位(12)内。

2. 根据权利要求1所述的一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述塑料桶(14)的个数为十二个,所述纸托(11)上开设有的孔位(12)的个数为十二个。

3. 根据权利要求1所述的一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述胶体金试纸(1)的整体长度为7cm,胶体金试纸(1)的整体宽度为4cm;检测线(6)和质控线(7)的整体宽度均为2mm。

4. 根据权利要求1所述的一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述微孔板架(10)为96孔塑料板架。

5. 根据权利要求1所述的一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,其特征在于:所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。

一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件

技术领域

[0001] 本实用新型涉及动物疫病免疫检测技术领域,具体涉及一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件。

背景技术

[0002] 水貂阿留申病是传统的毛皮动物的三大重要疫病之一,是由阿留申病毒所引起的传染性疾病,病毒主要侵害网状内皮系统。阿留申水貂病的特征是,患病动物浆细胞增多,血液丙种球蛋白增高,持续性病毒血症,免疫复合物肾小球肾炎和肝炎,坏死性动脉炎,贫血及进行性衰竭。该病广泛流行于世界各养貂国家,我国也不例外,国内水貂养殖场水貂阿留申病感染率为40%~70%,最高感染率达80%。

[0003] 阿留申病潜伏期长,经胃肠道外途径接种,血液中出现丙种球蛋白升高的时间平均为21~30d,自然感染的潜伏期更长,有的可达1年以上。临床表现分急性和慢性两种。急性型:突然拒食,体温下降,可视粘膜苍白,卷缩卧地不动,濒死期出现轻瘫,有的死前双目失明,多数发病12~36小时死亡,至死有渴欲。慢性型:食欲长期时好时坏,瘦弱,被毛粗乱无光,可视粘膜苍白,鼻镜、爪垫无血色,有的口上腭有大片的溃疡,并覆有灰绿色固膜,有的愈后留有黑色斑痕。喜饮水,排出沥青样粪便,或红黑色血滴。后期有的患貂双目失明,共济失调,后抽搐死亡。

[0004] 由于阿留申病感染后容易引起免疫抑制,目前并无有效疫苗及治疗方法,建立健全貂场的兽医卫生防疫制度是防止本病蔓延流行的有效措施。在引进种貂时应长期隔离观察,阴性者方可混群;而建立定期检疫制度是净化貂群、消灭阿留申病的最好途径。应用合适的检测方法,结合冬季取皮进行水貂阿留申病检疫,严格淘汰阳性病貂,才能收到切实的效果。

[0005] 目前国内外公认的阿留申病确诊金标准方法为对流免疫电泳检测(Counter Immunoelectrophoresis, CIEP)。但其检测敏感度低、不利于临床推广、难以实现样品高通量检测,限制了其在基层水貂养殖场的大规模应用。近年来,国内外学者也报道了基于聚合酶链式反应(CPR)、荧光定量PCR和ELISA等诊断方法,并逐渐突破了CIEP诊断的局限。这些方法虽然检测通量高,准确度也高,但由于依赖于大型分析检测设备、操作过程也较为繁琐,在基层养殖单位还是难以开展检测,一般都是由基层养殖企业采集血样之后送样检测。

[0006] 综上所述,如果能开发建立出一种适合于基层养殖单位检测的阿留申病快速检测器具,则能快速建立起基层养殖场检测实验室的检测体系和检测能力,为阿留申病的防控提供最有力的工具。

实用新型内容

[0007] 本实用新型的目的在于提供一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,用以解决在实际的阿留申病确诊检测中,现有的对流免疫电泳检测,其检测敏感度低、不利于临床推广、难以实现样品高通量检测,限制了其在基层水貂养殖场的大规模应用。基于聚

合酶链式反应、荧光定量PCR和ELISA等诊断方法,由于均依赖于大型分析检测设备、操作过程也较为繁琐,在基层养殖单位难以开展检测。亟需一种适合于基层养殖单位检测的阿留申病快速检测器具的问题。

[0008] 为实现上述目的,本实用新型的技术方案为:一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件,它包括微孔板架、盒体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管;

[0009] 所述胶体金试纸包括PVC背板,在PVC背板的底面上设置有双面胶垫,所述双面胶垫的顶面粘贴在PVC背板上,双面胶垫的底面上附着有胶垫保护膜,在PVC背板的顶面由左至右依次附着有样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,在样品垫与硝酸纤维素膜的对接处顶面粘贴有截流固定垫,所述截流固定垫的右端粘贴在硝酸纤维素膜上,截流固定垫的左端粘贴在样品垫上并延伸至样品垫的顶面中部;在所述硝酸纤维素膜上由左至右间隔喷涂有检测线和质控线,且在检测线上喷涂有重组阿留申病毒抗原,在质控线上喷涂有羊抗鼠IgG抗体;

[0010] 所述微孔试剂包括包被有胶体金标记阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体的塑料微孔,在塑料微孔的顶端敞口端通过塑料孔盖帽进行密封,且八个塑料微孔依次连接形成一组微孔试剂;

[0011] 所述盒体为长方形壳体,盒体的顶端敞口处设置有与盒体一侧连接的扣盖,在盒体的内部放置有纸托,在所述纸托上开设有多个孔位;

[0012] 每个塑料桶内放置有一组微孔试剂和八个胶体金试纸,且每个塑料桶放置在盒体中纸托上相应的孔位内。

[0013] 优选的,所述塑料桶的个数为十二个,所述纸托上开设有的孔位的个数为十二个。

[0014] 优选的,所述胶体金试纸的整体长度为7cm,胶体金试纸的整体宽度为4cm;检测线和质控线的整体宽度均为2mm。

[0015] 优选的,所述微孔板架为96孔塑料板架。

[0016] 优选的,所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。

[0017] 优选的,阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体为鼠抗阿留申病毒VP1蛋白单克隆抗体和鼠抗阿留申病毒VP2蛋白单克隆抗体的混合物。

[0018] 本实用新型具有如下优点:

[0019] 本实用新型针对阿留申病的确诊检测,与现有的CIEP、PCR和ELISA等方法比较,突出优点在于:一、检测灵敏、速度快、操作简便,单个样本检测时间为5min,检测灵敏度满足阿留申病筛选监控的需求,且操作简便,一般的养殖场工人无需培训即可上手操作。二、成本低廉,单个样本检测成本不超过2~3元,与CIEP方法相当,是PCR方法的几十分之一,是ELISA方法的三分之一,甚至更少,给养殖单位节省大量成本。三、无需特殊仪器设备,非常适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用,有助于阿留申病的大规模筛选检测和防控。四、可以现场检测,尤其是在引种环节,可以做到头头检、批批检,检测灵活方便。

附图说明

[0020] 图1为本实用新型中胶体金试纸的主视结构示意图;

[0021] 图2为本实用新型中胶体金试纸的俯视结构示意图;

- [0022] 图3为本实用新型中胶体金试纸的仰视结构示意图
[0023] 图4为微孔试剂的结构示意图；
[0024] 图5是塑料桶的结构示意图；
[0025] 图6为微孔板架的结构示意图；
[0026] 图7为盒体及纸托的结构示意图。

具体实施方式

[0027] 以下实施例用于说明本实用新型，但不用来限制本实用新型的范围。

[0028] 实施例1

[0029] 这里需要说明的是，所述方位词左、右、上、下均是以图1所示的视图为基准定义的，应当理解，所述方位词的使用不应限制本申请所请求的保护范围。

[0030] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0031] 如图1至图7所示，一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件，它包括微孔板架10、盒体13、多个胶体金试纸1、多个微孔试剂8、多个塑料桶14和多个一次性塑料吸管；

[0032] 所述胶体金试纸1包括PVC背板2，在PVC背板2的底面上设置有双面胶垫16，所述双面胶垫16的顶面粘贴在PVC背板2上，双面胶垫16的底面上附着有胶垫防护膜，在PVC背板2的顶面由左至右依次附着有样品垫4、硝酸纤维素膜5和吸水垫3，在样品垫4与硝酸纤维素膜5的对接处顶面粘贴有截流固定垫15，所述截流固定垫15的右端粘贴在硝酸纤维素膜5上，截流固定垫15的左端粘贴在样品垫4上并延伸至样品垫4的顶面中部；在所述硝酸纤维素膜5上由左至右间隔喷涂有检测线6和质控线7，且在检测线6上喷涂有重组阿留申病毒抗原，在质控线7上喷涂有羊抗鼠IgG抗体；

[0033] 所述微孔试剂8包括包被有胶体金标记阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体的塑料微孔8a，在塑料微孔8a的顶端敞口端通过塑料孔盖帽9进行密封，且八个塑料微孔8a依次连接形成一组微孔试剂8；

[0034] 所述盒体13为长方形壳体，盒体13的顶端敞口处设置有与盒体13一侧连接的扣盖，在盒体13的内部放置有纸托11，在所述纸托11上开设有多个孔位12；

[0035] 每个塑料桶14内放置有一组微孔试剂8和八个胶体金试纸1，且每个塑料桶14放置在盒体13中纸托11上相应的孔位12内。

[0036] 同时，在盒体13内一并发入产品操作说明书、质控报告等，形成完整的检测试剂盒。

[0037] 本实用新型的组装方法为：

[0038] 一、胶体金标记阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体微孔试剂的准备：

[0039] (一)阿留申病毒结构蛋白VP1和结构蛋白VP2的克隆表达及纯化。

[0040] 根据Genbank公开的阿留申病毒基因序列(编号:KT329428.1)的结构蛋白VP1和VP2的序列，用Primer和DNASTar设计扩增引物，分别在上下游引物的近5'端添加EcoR I和Hind III酶切位点，以人工合成全长基因KT329428.1为模板，扩增目标片段，双酶切后，将VP1和VP2两个目的片段分别与质粒载体pET-28a(+)以3:1的比例混合，同T4 DNA连接酶在16℃条件下进行粘性末端定向连接，然后转化入BL21(DE3)感受态细胞。

[0041] 将经酶切鉴定和PCR鉴定均为阳性的VP1重组蛋白表达基因工程菌和VP2重组工程菌测序鉴定,并将测序序列在Genbank数据库中做Blast对比分析。

[0042] 分别将VP1和VP2重组基因工程菌接种于含50 μ g/ml卡那霉素的LB液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C,180r/min下摇床振荡培养至对数生长期中期(OD_{600nm}为0.6~0.8),加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1.0mmol/l,继续诱导培养1~5小时,用pH7.2的PBS洗涤1次,将菌体悬液用溶菌酶和超声裂解,4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心20min,将可溶蛋白和包涵体分开。分别去裂解上清和沉淀进行SDS-PAGE电泳,分析重组蛋白的可溶性。用His-Tag亲和层析柱(Merck产品)分离纯化重组VP1和VP2蛋白,-20 $^{\circ}$ C以下保存备用。

[0043] (二)阿留申病毒结构蛋白VP1和结构蛋白VP2特异性单克隆抗体的制备与筛选:

[0044] 以纯化的VP1和VP2蛋白免疫balb/c小鼠,50 μ g每次,首次免疫时与等量弗氏完全佐剂乳化混匀,后续免疫与弗氏不完全佐剂乳化混匀。免疫方式为皮下多点注射。5次免疫后采血测定效价,然后以100 μ g前述免疫原加强免疫,按照常规方法进行细胞融合,以纯化蛋白继续筛选特异性单克隆抗体。挑选抗体灵敏度较高,并且与细小病毒、犬瘟病毒无交叉反应的单抗细胞株用于后续试纸条生产。

[0045] (三)VP1和VP2重组蛋白特异性单克隆抗体的纯化。

[0046] 采用体内诱生法制备VP1和VP2重组蛋白特异性单抗,收集腹水后以饱和硫酸铵沉淀法纯化腹水抗体,具体操作参考文献进行。粗纯的腹水抗体继续以Protein G亲和层析柱纯化,具体操作参考亲和柱操作说明书进行,此处不再赘述。亲和纯化获得高纯度的VP1和VP2重组蛋白特异性单克隆抗体即可直接用于胶体金标记。

[0047] (四)胶体金的制备:

[0048] 取0.01%氯金酸水溶液100ml用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.5ml,继续搅拌加热20min,溶液呈透亮的红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,4 $^{\circ}$ C保存。

[0049] (五)胶体金颗粒标记单抗的制备:

[0050] 取制备好的胶体金颗粒溶液,用0.1mol/L K₂CO₃或0.1mol/L HCl调节胶体金溶液的pH值为8.2。置于磁力搅拌器上,然后将纯化后的黄VP1和VP2重组蛋白特异性以PBS按照1:2000的比例稀释后加入胶体金溶液中搅拌反应60分钟,VP1单抗与VP2单抗的体积比为1:1,然后将PEG20000溶液加入混合反应液中,使PEG的最终浓度约为1%,置于在4 $^{\circ}$ C和条件下冷冻离心机11000~13000rpm速离心10分钟后弃去上清液。

[0051] 将下层沉淀用PBS反复洗涤并继续离心弃去多余上清液,最后将沉淀物以PBS缓冲液重悬,使最终的蛋白浓度约为25~50 μ g/mL左右。

[0052] 制备好的金标抗体按照100 μ L的量分装于96孔酶标板孔中,冷冻干燥,然后以酶标板孔盖帽密封,此时,阿留申病毒抗体检测试纸条所用的微孔试剂制备完毕。制备好的微孔试剂置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0053] 二、阿留申病毒抗体检测试纸条检测线、质控线溶液的准备:

[0054] 将纯化的VP1和VP2重组蛋白以PBS稀释至20 μ g/mL后,等体积混合备用。

[0055] 将商品化的羊抗鼠二抗以PBS稀释至200 μ g/mL备用。

[0056] 三、胶体金试纸的组装:

[0057] 用划膜仪在硝酸纤维素膜5上喷涂出两条线,即检测线6和质控线7,包被量分别为

1.0 μ L/cm²和1.0 μ L/cm²;将喷涂好的硝酸纤维素膜5置于37℃干燥2h;然后将硝酸纤维素膜5粘贴在PVC背板2上,同时在PVC背板2靠近质控线7的一段粘贴上吸水垫3、在另一端粘贴上样品垫4。将粘贴好的PVC大板用切条机切成宽度为4mm的单条状。挑选其中吸水垫3、样品垫4完整,且质控线7、检测线6无损坏的单条作为备用。

[0058] 四、胶体金检测试剂盒的组装:

[0059] 将一组微孔试剂和八个胶体金试纸1装在含有干燥剂的塑料桶14中,贴好标签;十二个塑料桶14装在盒体13中纸托11上相应的孔位12内,然后贴好外标签,盒体13塑封后放置于2-8℃保存。

[0060] 五、本实用新型检测操作时的使用方法如下:

[0061] (一)准备样本和试纸条:将血清样本和试纸条从冷藏环境中取出,置于室温30min以上,使其充分回温。

[0062] (二)打开盒体13,根据检测样本的数量取相应数量的胶体金试纸1、微孔试剂8、一次性吸管和微孔板架10。

[0063] (三)将准备好的微孔试剂8放置在微孔板架10上,用一次性塑料吸管吸取两滴血清(约10 μ L)至样本检测稀释管中,混合均匀,然后将混合好的血清样本吸取0.2mL加入含有微孔试剂8的塑料微孔8a中,上下吸打三次,使得稀释样本与冷冻干燥的胶体金标记的阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体充分混合;

[0064] (四)取出胶体金试纸1,将样品垫4端插入混匀的塑料微孔中,开始计时5min,完毕,根据试纸条说明书判断检测结果。

[0065] (五)如果检测线6比质控线7的颜色浅或者不显色,则为阳性,如果检测线6比质控线7的颜色深,则为阴性。如果质控线7不显色,则结果作废,需要更换胶体金试纸1重新检测。

[0066] 通过在样品垫4与硝酸纤维素膜5的对接处顶面粘贴截流固定垫15,一方面可以防止在使用过程中样品垫4与硝酸纤维素膜5发生位置窜动,造成检测结果不准确,另一方起到截流作用,防止血清样本过盛而出现冲样的发生。对此为了防止样品垫4插入血清样本过深,故设置双面胶垫16,在插入前撕去双面胶垫16底面上的胶垫保护膜,并将双面胶垫16底面贴在塑料微孔中内壁上合适的位置处,来控制样品垫4插入血清样本的深度,防止插入过深,影响检测结果。

[0067] 实施例2

[0068] 在上述技术方案基础上,所述塑料桶14的个数为十二个,所述纸托11上开设有的孔位12的个数为十二个。如此设置,配备数量充足,满足实际需要。

[0069] 实施例3

[0070] 在上述技术方案基础上,所述胶体金试纸1的整体长度为7cm,胶体金试纸1的整体宽度为4cm;检测线6和质控线7的整体宽度均为2mm。如此设置,体积小,操作方便,满足实际需要。

[0071] 实施例4

[0072] 在上述技术方案基础上,所述微孔板架10为96孔塑料板架。如此设置,塑料板架工作性能稳定,用于提供检测反应的支撑载体,满足实际需要。

[0073] 实施例5

[0074] 在上述技术方案基础上,所述一次性塑料吸管为0.2mL的一次性巴士吸管。如此设置,工作性能稳定,使用方便,满足实际使用需要。

[0075] 实施例6

[0076] 在上述技术方案基础上,阿留申病毒结构蛋白特异性单克隆抗体为鼠抗阿留申病毒VP1蛋白单克隆抗体和鼠抗阿留申病毒VP2蛋白单克隆抗体的混合物。如此设置,确保检测效果,满足实际使用需要。

[0077] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本实用新型作了详尽的描述,但在本实用新型基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本实用新型精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本实用新型要求保护的范围。

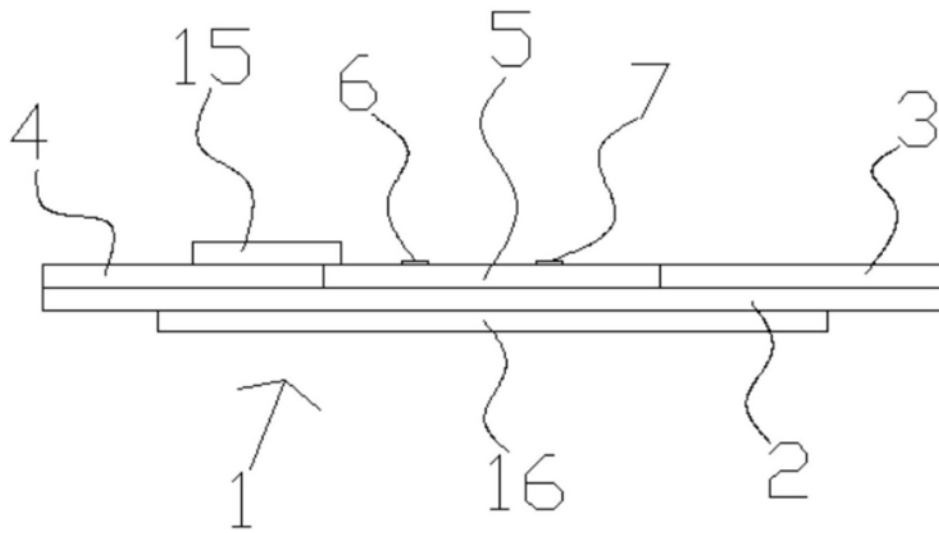


图1

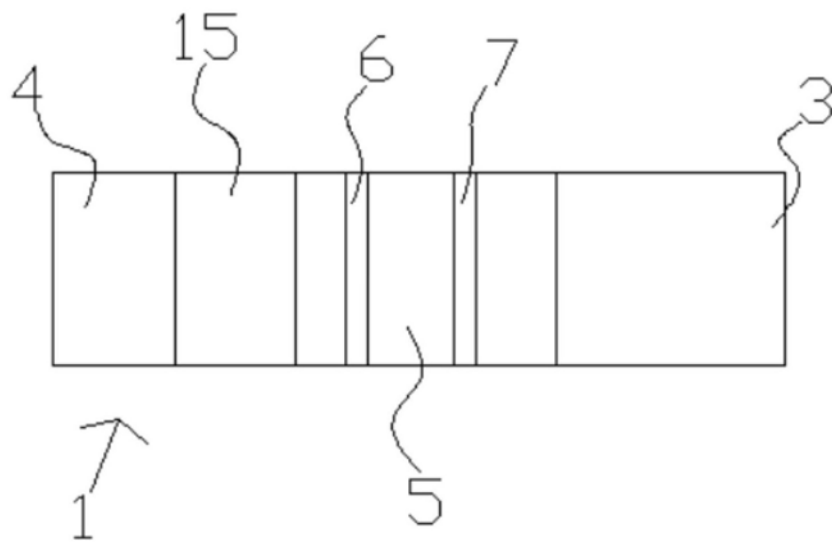


图2

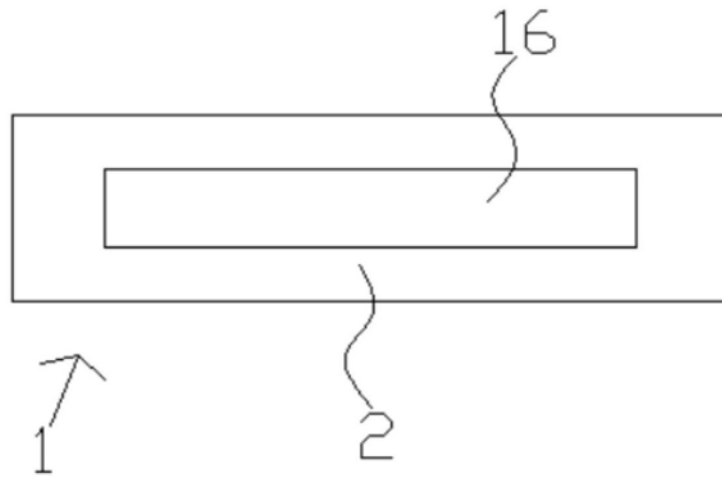


图3

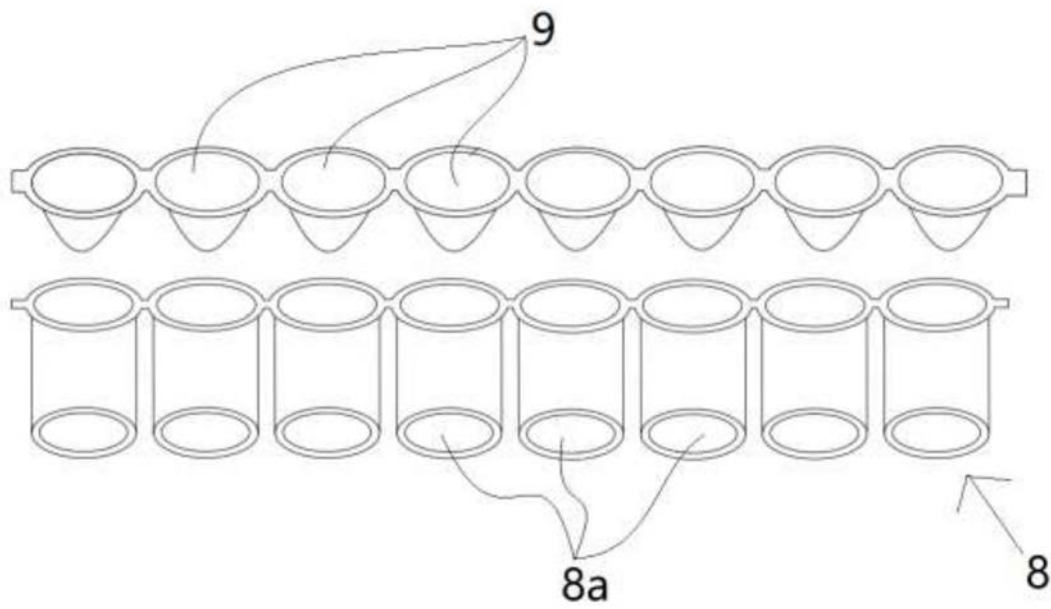


图4

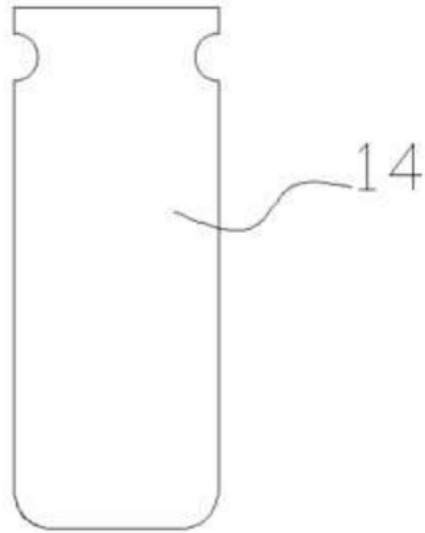


图5

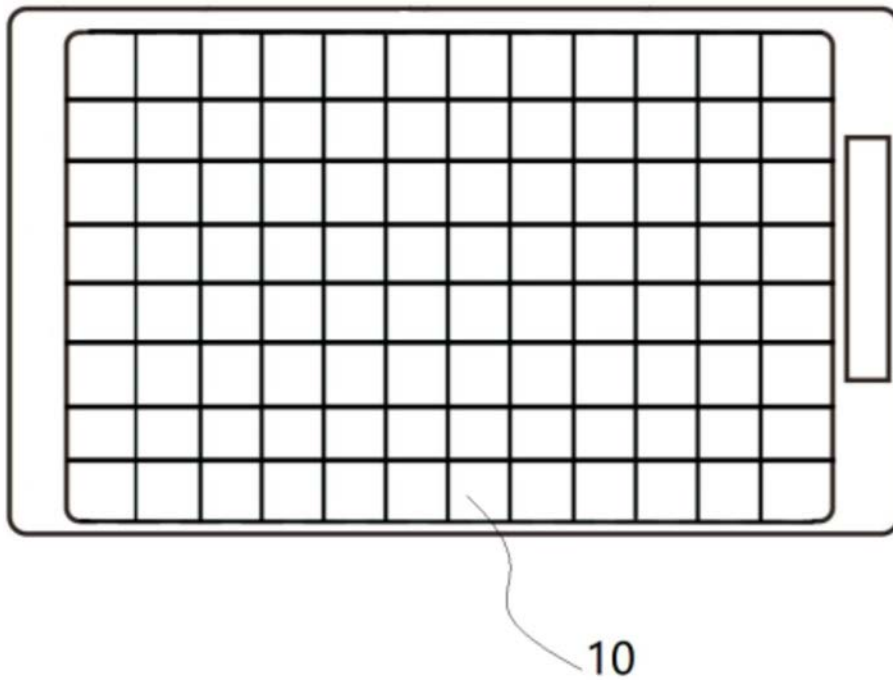


图6

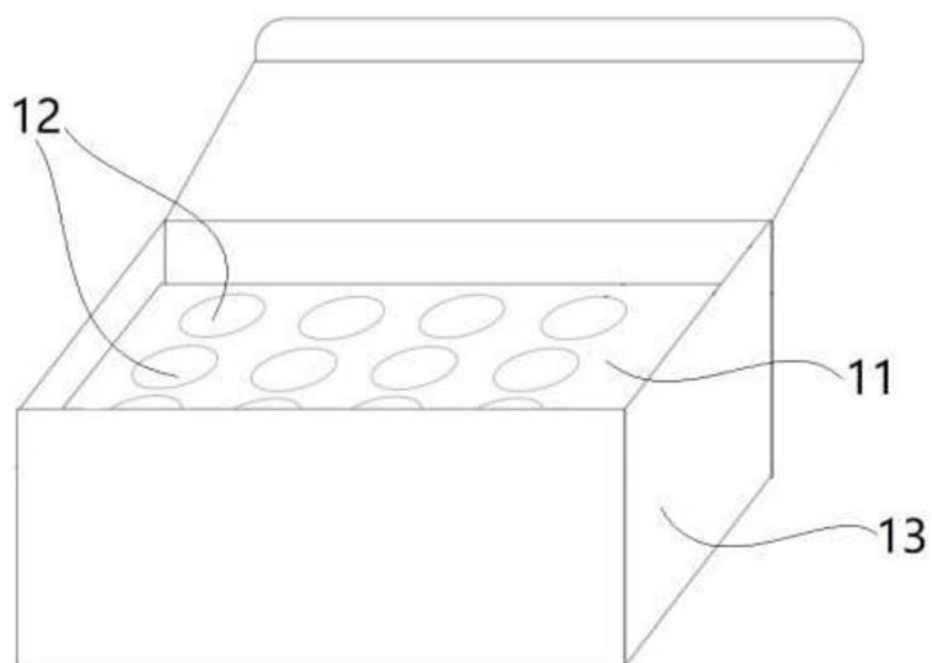


图7

专利名称(译)	一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件		
公开(公告)号	CN208847749U	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201820621281.6	申请日	2018-04-27
[标]发明人	于在江 莫勋 郭秀锋		
发明人	于在江 莫勋 郭秀锋		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	孙进华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种检测水貂阿留申病毒抗体的胶体金试纸条组件，涉及动物疫病免疫检测技术领域。它包括微孔板架、盒体、多个胶体金试纸、多个微孔试剂、多个塑料桶和多个一次性塑料吸管。本实用新型针对阿留申病的确诊检测，与现有的CIEP、PCR和ELISA等方法比较，检测灵敏、速度快、操作简便，检测灵敏度满足阿留申病筛选监控的需求，且操作简便，一般的养殖场工人无需培训即可上手操作。成本低廉，给养殖单位节省大量成本。无需特殊仪器设备，非常适合于基层实验室和养殖场等场合检测应用，有助于阿留申病的大规模筛选检测和防控。

