



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109765368 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(21)申请号 201910096814.2

(22)申请日 2019.01.31

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730000 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 陈豪泰 张永光 孙跃峰 祁林林
张杰 潘丽

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

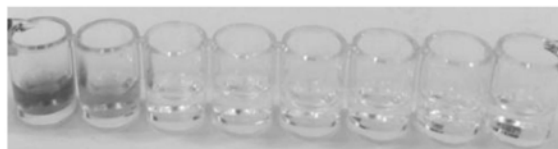
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒,涉及酶联免疫技术领域,所述试剂盒包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被。本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒2C的抗体,具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点,该方法操作简便、快速、成本低廉,可以在室温下可视化检测,适合于在临床应用中进行推广,为口蹄疫病毒2C抗体的快速检测提供可靠的技术手段。



1. 一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒,其特征在于,包括酶标板和酶标二抗;
所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述口蹄疫病毒2C蛋白的包被浓度为1~2 μ g/mL。
3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括洗涤液、血清稀释液、底物显色液、终止液、阳性血清和阴性血清。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述洗涤液包括磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液中含有质量分数为0.03~0.08%的吐温-20,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。
5. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述血清稀释液包括磷酸盐缓冲液,所述缓冲液中含有脱脂奶粉,所述脱脂奶粉的浓度为45~55g/L,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。
6. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述底物显色液包括TMB溶液。
7. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述所述终止液包括SDS溶液或硫酸溶液。
8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗。

一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫技术领域,具体涉及一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫是一种由口蹄疫病毒(FMDV)所致的急性的、热性的、高度接触性传染病,主要侵害偶蹄兽,经常在羊、牛、猪等动物中传播。发病时易感动物的唇和蹄部出现水疱,同时伴有发烧、食欲不振等症状,患病动物体重和产奶量大幅下降。口蹄疫病毒易通过空气传播,传染性强,流行快速,易感动物在抵抗力较弱的情况下也会导致死亡,给养殖户造成巨大的经济损失,严重阻碍了养殖业的发展。

[0003] 目前对于口蹄疫病毒2C抗体的诊断方法和疫苗免疫效果的评价方法只能在实验室完成,因为操作过程离不开实验室的仪器和设备,不适合基层检测。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒,采用本发明的试剂盒,无需借助实验室的仪器和设备,能够适合基层检测。

[0005] 本发明提供了一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒,包括酶标板和酶标二抗;

[0006] 所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被。

[0007] 优选的,所述口蹄疫病毒2C蛋白的包被浓度为1~2 μ g/mL。

[0008] 优选的,所述试剂盒还包括洗涤液、血清稀释液、底物显色液、终止液、阳性血清和阴性血清。

[0009] 优选的,所述洗涤液包括磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液中含有质量分数为0.03~0.08%的吐温-20,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。

[0010] 优选的,所述血清稀释液包括磷酸盐缓冲液,所述缓冲液中含有脱脂奶粉,所述脱脂奶粉的浓度为45~55g/L,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。

[0011] 优选的,所述底物显色液包括TMB溶液。

[0012] 优选的,所述所述终止液包括SDS溶液或硫酸溶液。

[0013] 优选的,所述酶标二抗包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗。

[0014] 本发明提供了一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒,包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被。在本发明中,当动物感染口蹄疫病毒以后,产生2C抗体,通过检测2C抗体来达到检测目的。

[0015] 本发明实施例的结果显示:本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒2C的抗体,具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点,该方法操作简便、快速、成本低廉,可以在室温下可视化检测,适合于在临床应用中进行推广,为口蹄疫病毒2C抗体的快速检测提供可靠的技术手段。

附图说明

[0016] 图1为本发明提供的试剂盒检测结果,其中,从左到右,1和2,口蹄疫病毒血清;3,猪流行性腹泻病毒抗体;4,猪瘟病毒;5,猪圆环病毒抗体;6,猪细小病毒抗体;7,伪狂犬病毒抗体;8,蓝耳病病毒抗体。

具体实施方式

[0017] 本发明提供了一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒,包括酶标板和酶标二抗;所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被。

[0018] 在本发明中,所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被,所述包被的浓度优选为1~2 μ g/mL。本发明对所述包被采用的方法没有特殊限定,采用常规包被即可。

[0019] 在本发明中,所述酶标板优选经浓度为50g/L的脱脂奶粉溶液封闭。

[0020] 在本发明中,所述酶标二抗优选包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗,所述包括猪的酶标二抗或牛的酶标二抗优选为商品化的产品。

[0021] 在本发明中,所述试剂盒还优选包括洗涤液、血清稀释液、底物显色液、终止液、阳性血清和阴性血清。

[0022] 在本发明中,所述洗涤液优选包括磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液中含有质量分数优选为0.03~0.08%的吐温-20,更优选为0.05%;所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.2。

[0023] 在本发明中,所述血清稀释液优选包括磷酸盐缓冲液,所述缓冲液中含有脱脂奶粉,所述脱脂奶粉的浓度优选为45~55g/L,更优选为50g/L;所述磷酸盐缓冲液的pH值优选为7.2。

[0024] 在本发明中,所述底物显色液优选包括TMB溶液,本发明对所述TMB溶液的浓度没有特殊限定,采用常规底物显色时,所需的TMB浓度即可。

[0025] 在本发明中,所述终止液优选包括SDS溶液或硫酸溶液。本发明对所述SDS溶液或硫酸溶液的浓度没有特殊限定,采用常规终止酶联免疫反应中所需的浓度即可。

[0026] 在本发明中,所述阳性血清优选为感染口蹄疫的血清,所述阴性血清优选为健康动物的血清。

[0027] 在本发明中,所述试剂盒检测口蹄疫病毒2C抗体的方法,优选包括以下步骤:

[0028] 1) 将所述血清稀释液以体积比1:40稀释血清样本,得到稀释血清;

[0029] 2) 向所述酶标板的孔中加入步骤1)得到的稀释血清,在20~25℃下孵育50~70min,,弃去孔中的液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第一拍干酶标板;

[0030] 3) 向步骤2)得到的第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗,在20~25℃下孵育50~70min,弃去孔中液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第二拍干酶标板;

[0031] 4) 向步骤3)得到的第二拍干酶标板的孔中加入底物显色液,在20~25℃下显色15~25min,当孔中的颜色为蓝色时,检测到口蹄疫病毒2C抗体,当孔中的颜色为无色时,未检测到口蹄疫病毒2C抗体。

[0032] 本发明将所述血清稀释液以体积比1:40稀释血清样本,得到稀释血清。

[0033] 本发明向所述酶标板的孔中加入得到的稀释血清,在20~25℃下孵育50~70min,,弃去孔中的液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第一拍干酶标板。

[0034] 在本发明中,所述酶标板的孔中加入稀释血清的量优选为100 μ L。

[0035] 在本发明中,所述酶标板的孔中加入稀释血清后进行孵育,所述孵育的温度为20~25℃,优选为21~24℃,更优选为22~23℃;所述孵育的时间为50~70min,优选为55~65min,最优选为60min。

[0036] 在本发明中,所述洗涤的次数优选为3次。

[0037] 本发明向得到的第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗,在20~25℃下孵育50~70min,弃去孔中液体,洗涤液洗涤、拍干,得到第二拍干酶标板。

[0038] 在本发明中,所述第一酶标板的孔中,加入稀释后的酶标二抗的量优选为100μL。在本发明中,所述酶标二抗优选用磷酸盐缓冲液进行稀释,稀释倍数优选为20000倍。

[0039] 在本发明中,所述第一拍干酶标板的孔中加入稀释后的酶标二抗进行孵育,所述孵育的温度为20~25℃,优选为21~24℃,更优选为22~23℃;所述孵育的时间为50~70min,优选为55~65min,最优选为60min。

[0040] 在本发明中,所述洗涤的次数优选为3次。

[0041] 本发明向得到的第二拍干酶标板的孔中加入底物显色液,在20~25℃下显色15~25min,当孔中的颜色为蓝色时,检测到口蹄疫病毒2C抗体,当孔中的颜色为无色时,未检测到口蹄疫病毒2C抗体。

[0042] 在本发明中,所述底物显色液的加入量优选为100μL/孔。在本发明中,所述显色的温度优选为21~24℃,更优选为22~23℃;所述显色的时间优选为18~23min,更优选为20min。

[0043] 下面结合具体实施例对本发明所述的一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒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。

[0044] 实施例1

[0045] 1、样品稀释液、洗涤液、终止液的配制

[0046] 包被液为0.05M碳酸盐缓冲液:Na₂CO₃1.59g,NaHCO₃2.93g,加蒸馏水定容至1000mL,pH为9.6;

[0047] 样品稀释液为含50g/L脱脂奶粉的洗涤液;

[0048] 洗涤液为含0.05%Tween-20的0.01MpH为7.2的磷酸盐缓冲液,其配方为:

[0049] NaCl:8.5g,NaH₂PO₄·2H₂O:0.356g,NaH₂PO₄·12H₂O:2.772g,将其混合后,再用蒸馏水溶解并定容至1000mL,再向其中加入0.5mL吐温-20得到上述洗涤液;

[0050] 终止液为:配置1%SDS溶液。

[0051] 2、抗原的最适包被浓度和血清的最适稀释度的确定

[0052] 结果显示当抗原的稀释度为2.0μg/mL每孔,血清以1:40倍稀释,酶标二抗以1:20000倍稀释。

[0053] 3、作用时间的优化

[0054] 抗原的最佳封闭时间为20min,血清反应时间为1h,酶标二抗最佳孵育时间为40min,最佳显色时间为20min。

[0055] 4.操作程序的确定

[0056] 按照以上各项所确定的最佳操作条件,确定的操作程序为:取出已包被并封闭好的ELISA板条,用血清稀释液将待检血清做1:40倍稀释,加入酶标板各孔,每孔100μL,各加一孔,A型口蹄疫病毒阴性、阳性血清各加两孔(阳性血清和阴性血清分别为感染口蹄疫的

血清和健康动物血清,分别用PBS稀释100倍),室温作用1h;弃去孔内液体,每孔用洗涤液洗3次并拍打,弃尽孔内液体;每孔加入100 μ L酶标二抗,室温作用1h;弃去孔内液体,每孔用洗涤液洗涤3次并拍打,弃尽孔内液体;每孔加入100 μ LTMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物显色液后,室温避光显色20min,加入100 μ LSDS终止液;肉眼观察颜色,蓝色为阳性,无色为阴性。

[0057] 实施例2

[0058] 试剂盒的特异性试验:

[0059] 按实施例1建立的方法分别检测已知的猪瘟病毒、乙脑病毒、猪圆环病毒、猪细小病毒、伪狂犬病毒、蓝耳病病毒和口蹄疫病毒2C阳性血清样品,阴性为无色,阳性为蓝色。结果见图1。

[0060] 根据图1可知,采用本发明提供的试剂盒能够准确检测口蹄疫,与其它病毒无交叉反应,具有特异性。

[0061] 由以上实施例可以得出,本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒2C的抗体,具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点,该方法操作简便、快速、成本低廉,可以在室温下可视化检测,适合于在临床应用中进行推广,为口蹄疫病毒2C抗体的快速检测提供可靠的技术手段。

[0062] 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。



图1

专利名称(译)	一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒		
公开(公告)号	CN109765368A	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201910096814.2	申请日	2019-01-31
[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	陈豪泰 张永光 孙跃峰 祁林林 张杰 潘丽		
发明人	陈豪泰 张永光 孙跃峰 祁林林 张杰 潘丽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/68 G01N21/78		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测口蹄疫病毒2C抗体的试剂盒，涉及酶联免疫技术领域，所述试剂盒包括酶标板和酶标二抗；所述酶标板经口蹄疫病毒2C蛋白包被。本发明提供的试剂盒检测口蹄疫病毒2C的抗体，具有高效、灵敏特异性和重复性均良好的优点，该方法操作简便、快速、成本低廉，可以在室温下可视化检测，适合于在临床应用中进行推广，为口蹄疫病毒2C抗体的快速检测提供可靠的技术手段。

