



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109856397 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201811602846.7

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.12.26

(83)生物保藏信息

CCTCC NO: C2018148 2018.06.15

CCTCC NO: C201582 2015.06.11

(71)申请人 山东绿都生物科技有限公司

地址 256600 山东省滨州市滨城区黄河路
二号169号

(72)发明人 武玉香 于金枝 曲光刚 张莎莎

(74)专利代理机构 北京智为时代知识产权代理
事务所(普通合伙) 11498

代理人 王加岭

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

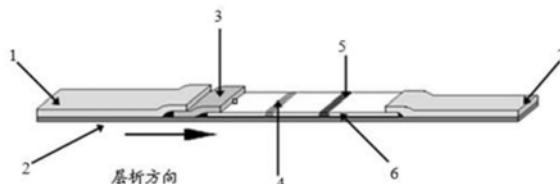
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及
其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法,具体步骤为:(1)配对的抗兔瘟病毒单克隆抗体的制备,包括免疫程序、细胞融合、杂交瘤筛选及克隆化、抗体制备及纯化;(2)快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法,包括胶体金单克隆抗体的制备、样品垫处理、喷膜、C,T线确定、被测样本的处理、性能测定。本发明可以快速、灵敏、准确的检测兔子的肝脏、肾脏部位的兔瘟病毒感染,克服了国内检测兔瘟病毒主要以红细胞凝集实验的方法,大大缩短了检测时间,为现场检测提供了方便。



1. 一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡，所述胶体金检测卡包括依次相连接的吸水垫、基膜、金标垫和样品垫，其特征在于，所述基膜上设置有C线和T线，所述C线上包被有羊抗鼠 IgG的抗体，所述金标垫中含有胶体金标记的第一单克隆抗体，所述T线上包被有第二单克隆抗体；所述第一单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201582的杂交瘤细胞株分泌得到。

2. 根据权利要求1所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡，所述第二单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018148的杂交瘤细胞株分泌得到。

3. 一种分泌抗兔瘟病毒抗体的杂交瘤细胞株，所述分泌抗兔瘟病毒抗体的杂交瘤细胞株9D4于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:C2018148，保藏地址为中国武汉-武汉大学。

4. 权利要求1所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法，包括以下步骤：

步骤一，抗体制备及纯化：采用动物体内腹水诱生法制备单克隆抗体VP60-2F4和VP60-9D4；采用SPA柱法对腹水进行纯化，即得抗兔瘟VP60单克隆抗体VP60-2F4和VP60-9D4；

步骤二，胶体金溶液的熬制；

步骤三，抗兔瘟病毒VP60-2F4单克隆抗体的标记：用0.1mol/L的K₂CO₃调节步骤二所制备得到的胶体金溶液的pH值为9.0，每1mL胶体金溶液加入6μg抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4，室温下120rpm摇30min，加入10%牛血清白蛋白20μL，室温下120rpm摇30min，12000rpm离心20min，弃上清，用0.01MPBS溶解沉淀，即得到标记好的抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物；

步骤四，金标垫处理及胶体金膜的制备：选择聚脂纤维6613作为金标结合垫，将金标垫浸泡在处理液A中5min，处理液A为0.01M PBS，pH7.4, 0.2% Triton X-100，取出37℃烘干，备用；将标记好的抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物用划膜仪以5μL/cm的浓度喷涂在处理好的金标垫上，室温自然晾干或者37℃烘干，制成含有抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物的胶体金膜；

步骤五，样品垫处理：选择DL42为样品垫，将样品垫，浸泡在处理液B中5min，处理液B为0.01M PBS，pH7.4, 1% Triton X-100, 1% BSA, 0.05% NaN₃，取出37℃烘干，备用；

步骤六，C、T线确定：选择Sartorius CN140膜，分别将抗兔瘟病毒VP60-9D4单克隆抗体和羊抗鼠二抗作为T线和C线划在NC膜上，浓度分别为1mg/mL和0.6mg/mL，用划膜仪依次以1μL/cm的浓度喷涂在NC膜上，37℃包被2h后，室温自然晾干或者37℃烘干，制成基膜；

步骤七，检测卡的组装。

5. 根据权利要求4所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法，其中所述胶体金溶液的熬制采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，具体步骤为：量取99mL的超纯水装入250mL的圆底烧瓶，放入搅拌子，置于磁力搅拌器上，加入1%氯金酸溶液1mL，适当速度搅拌，打开加热开关，待溶液沸腾后迅速一次性加入1.6mL 1%柠檬酸三钠溶液，氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色，颜色稳定后继续加热10min，待溶液冷却后，用微孔滤膜过滤，4℃保存备用，紫外扫描得到最大吸收峰为523nm的胶体金颗粒。

6. 根据权利要求4所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法，所述胶体金标记的抗兔瘟病毒VP60-2F4单克隆抗体的悬浮保存液配方组成为pH8.5的0.01MTris缓冲液，内含2%酪蛋白、1%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

7. 根据权利要求4所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法,所述胶体金颗粒大小为25nm。

8. 根据权利要求4所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法,所述检测线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M Tris缓冲液,内含10%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠;质控线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M PBS缓冲液,内含10%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

9. 一种兔瘟病毒检测试剂盒,其包括权利要求1-2中任一项所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡和样本稀释液。

10. 根据权利要求9所述的兔瘟病毒检测试剂盒,其特征在于,所述样本稀释液的配方为0.9%生理盐水溶液,内含5%牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠。

一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法，属于生物检测技术领域。

背景技术

[0002] 兔瘟，又被称作兔病毒性出血综合症，是对兔威胁最严重的一种病毒性传染病，其突出的特点是发病快、传播急速、从发病到死亡时间很短，死亡率很高。兔群一旦被感染，往往全群覆没。这种疾病在青年兔以及成年兔中发病率最高，受季节影响很小，一般在春季和秋季最容易爆发。兔子养殖户，必须要严格做好兔瘟防治，否则一旦感染了此疾病，必然会带来非常重大的经济损失。兔瘟病毒(RHDV)传染将给予兔群以毁灭性打击，危害性极大。RHDV是养兔业和实验用兔必检病毒之一。随着我国养兔业的发展及实验动物标准化程度的普及和提高，RHDV诊断方法的建立和标准化不可或缺。

[0003] 目前常用的RHDV检测方法是血凝抑制试验(HI)，HI试验需要人O型红血球，血清需经过吸附处理，过程较为繁琐；结果判定易受许多主、客观因素的影响，所以在实际应用中受到很多限制。而胶体金诊断方法具有特异性和敏感性强、快速准确、通量高等特点，是动物传染病检疫、免疫抗体水平监测和流行病学调查广泛采用的诊断技术。VP60是RHDV唯一结构蛋白，是病毒免疫保护性抗原，在RHDV诊断、新型疫苗的研制中具有十分重要的意义。

[0004] 在现有兔瘟病毒的检测中，目前国内研究较少，发明专利申请 CN201510380893.1 系发明人研制的一种兔瘟病毒抗体快速检测卡，具体步骤为：(1) 抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体的制备，包括免疫程序、细胞融合、杂交瘤筛选及克隆化、抗体制备及纯化；(2) 兔瘟病毒抗体快速检测卡的制备，包括胶体金溶液的熬制、抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体的标记、金标垫处理、样品垫处理、C,T线确定。本发明可以快速、灵敏、准确的检测兔瘟病毒抗体，克服了国内检测兔瘟抗体主要以红细胞血凝，酶联免疫检测的问题。但是该方法不能有效检测是病毒感染导致的血清阳性还是疫苗接种后产生的血清阳性。

[0005] 基于现有兔瘟病毒的检测方法不丰富的问题，市场上需要有效的兔瘟病毒检测手段，以解决RHDV检测困难的技术问题。因此，开发更加灵敏、准确的兔瘟病毒的检测方法是亟需解决的技术问题。

发明内容

[0006] 为解决以上技术问题，丰富兔瘟病毒的检测手段，本发明旨在提供了一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法和应用，本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡能够快速、灵敏、准确的检测兔瘟病毒，减少了检测时间和降低检测成本。

[0007] 为解决以上技术问题，本发明的技术方案如下：

[0008] 一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡，所述胶体金检测卡包括依次相连接的吸水垫7、基膜6、金标垫3和样品垫1，其特征在于，所述基膜上设置有C线和T线，所述C线上包被有羊抗鼠IgG的抗体，所述金标垫中含有胶体金标记的第一单克隆抗体，所述T线上包被

有第二单克隆抗体；所述第一单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C201582的杂交瘤细胞株分泌得到；所述第二单克隆抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018148的杂交瘤细胞株分泌得到。

[0009] 本发明还请求保护分泌抗兔瘟病毒抗体的杂交瘤细胞株，第一分泌抗兔瘟病毒抗体的杂交瘤细胞株2F4于2015年6月11日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:C201582，保藏地址为中国武汉-武汉大学；第二分泌抗兔瘟病毒抗体的杂交瘤细胞株Vp60 9D4于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:C2018148，保藏地址为中国武汉-武汉大学。

[0010] 本发明还请求保护所述兔瘟快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法，包括以下步骤：

[0011] 步骤一，抗体制备及纯化：采用动物体内腹水诱生法制备单克隆抗体 VP60-2F4和VP60-9D4；采用SPA柱法对腹水进行纯化，即得本发明抗兔瘟 VP60单克隆抗体VP60-2F4和VP60-9D4；

[0012] 步骤二，胶体金溶液的熬制；

[0013] 步骤三，抗兔瘟病毒VP60-2F4单克隆抗体的标记：用0.1 mol/L的K₂CO₃调节步骤二所制备得到的胶体金溶液的pH值为9.0，每1mL胶体金溶液加入 6μg抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4，室温下120rpm摇30min，加入 10%牛血清白蛋白20μL，室温下120rpm摇30min，12000rpm离心20min，弃上清，用0.01MPBS溶解沉淀，即得到标记好的抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物；

[0014] 步骤四，金标垫处理及胶体金膜的制备：选择聚脂纤维6613作为金标结合垫，将金标垫浸泡在处理液A中5min，处理液A为0.01M PBS, pH7.4, 0.2% Triton X-100，取出37℃烘干，备用；将标记好的抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物用划膜仪以5μL/cm的浓度喷涂在处理好的金标垫上，室温自然晾干或者37℃烘干，制成含有抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体 VP60-2F4标记物的胶体金膜；

[0015] 步骤五，样品垫处理：选择DL42为样品垫，将样品垫，浸泡在处理液B 中5min，处理液B为0.01M PBS, pH7.4, 1% Triton X-100, 1% BSA, 0.05% NaN₃，取出37℃烘干，备用；

[0016] 步骤六，C、T线确定：选择Sartorius CN140膜，分别将抗兔瘟病毒VP60-9D4 单克隆抗体和羊抗鼠二抗作为T线和C线划在NC膜上，浓度分别为1mg/mL 和0.6mg/mL，用划膜仪依次以1μL/cm的浓度喷涂在NC膜上，37℃包被 2h后，室温自然晾干或者37℃烘干，制成基膜；

[0017] 步骤七，检测卡的组装。

[0018] 所述胶体金溶液的熬制采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金，具体步骤为：量取99mL的超纯水装入250mL的圆底烧瓶，放入搅拌子，置于磁力搅拌器上，加入1%氯金酸溶液1mL，适当速度搅拌，打开加热开关，待溶液沸腾后迅速一次性加入1.6mL 1%柠檬酸三钠溶液，氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色，颜色稳定后继续加热10min，待溶液冷却后，用微孔滤膜过滤，4℃保存备用，紫外扫描得到最大吸收峰为523nm的胶体金颗粒。

[0019] 所述胶体金标记的抗兔瘟病毒VP60-2F4单克隆抗体的悬浮保存液配方组成为pH 8.5的0.01MTris缓冲液，内含2%酪蛋白、1%牛血清白蛋白、0. 5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

[0020] 所述胶体金颗粒大小为25nm。

[0021] 所述检测线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M Tris缓冲液,内含10%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠;质控线包被时的缓冲液配方成分为pH 8.5的0.01M PBS缓冲液,内含10%牛血清白蛋白、0.5%聚乙二醇20000、0.1%叠氮钠。

[0022] 一种兔瘟病毒检测试剂盒,其包括本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡和样本稀释液。

[0023] 所述样本稀释液的配方为0.9%生理盐水溶液,内含5%牛血清白蛋白、0.1%吐温20、0.1%叠氮钠。

[0024] 基于以上技术方案,本发明具有如下优点:

[0025] 首先,本发明采用采用双抗体夹心法模式的免疫层析定性检测方法,直接检测病原本身,解决了现有技术胶体金试纸条不能有效区分是兔瘟病毒感染导致的血清阳性还是疫苗接种后产生的血清阳性的问题,从而能够准确发现兔瘟病毒的感染,实现疾病的有效控制。另外,相比传统的HA检测手段,本发明的检测方法更加简单,适合推广使用,且经过试验验证,本发明的胶体金检测卡的敏感度更高。

[0026] 其次,本发明通过特定配对单克隆抗体的组合实现了兔瘟病毒的高效和灵敏检测,本发明的试纸条的敏感性高于红细胞凝集试验,也高于采用其他单克隆抗体如7D3、5F4作为检测线喷涂抗体时的敏感性,说明本发明的单克隆抗体2F4和9D4之间具有相对更好的配对关系,其能够获得更为准确、灵敏的检测结果。

[0027] 综上所述,本发明可以快速、灵敏、准确的检测兔子的肝脏、肾脏部位的兔瘟病毒感染,克服了国内检测兔瘟病毒主要以红细胞凝集实验的方法,大大缩短了检测时间,为现场检测提供了方便。

附图说明:

[0028] 图1:本发明兔瘟病毒抗原快速检测卡结构示意图;其中:1.样品垫、2.PVC 板、3.金标垫、4.检测线、5.质控线、6.基膜、7.吸水垫。

[0029] 图2:本发明兔瘟病毒抗原快速检测卡阳性结果判定图,若C线显色,而T 线显色,判为阳性。

[0030] 图3:本发明兔瘟病毒抗原快速检测卡阴性结果判定图,若C线显色,T线不显色,判为阴性。

[0031] 图4:本发明兔瘟病毒抗原快速检测卡无效结果判定图,在观察孔内,若C 线不显色,则结果无效,建议重新测试。

具体实施方式:

[0032] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0033] 实施例1:一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的制备方法,具体步骤为: (1) 抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体的制备

[0034] 本公司业已获得抗兔瘟病毒VP60杂交瘤细胞株之一2F4于2015年6月 11日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C201582,保藏地址为中国武汉-武汉大学。基于以上成果,本公司继续制备与之配对的杂交瘤细胞株,采用如下方法制备:

[0035] ①免疫程序:

[0036] 将昆虫细胞表达蛋白VP60免疫原(山东省滨州畜牧兽医研究院)与501 佐剂(山东绿都生物科技有限公司,货号LD003)按体积比1:0.2-0.3的比例混合,对8-10周龄Balb/c小鼠进行免疫,腿部肌肉注射,50 μ g/只,以后每隔 1周免疫一次,免疫剂量、部位同上;5免后加强免疫,腹腔注射,不加佐剂,剂量加倍;

[0037] ②细胞融合:

[0038] 将Balb/c小鼠体内的脾细胞与其腹腔内的骨髓瘤细胞按照细胞数量20: 0.5-1.5的比例混合,800rpm离心5-8min,弃去上清,于30S内加入1mL50%PEG (W/W),静置1min,在第一个1min内缓慢加入1mL无血清的DMEM培养基,在第二个1min内缓慢加入2mL无血清的DMEM培养基,在第三个1min 内缓慢加入2mL无血清的DMEM培养基,在第四个1min内缓慢加入5mL 无血清的DMEM培养基,在第五个1min内缓慢加入10mL无血清的DMEM 培养基,800rpm 离心10min,弃上清,用含20%小牛血清的完全培养基重悬细胞,细胞计数为3-6 \times 10⁵个/mL 铺于含2-6 \times 10⁴个/mL 饲养细胞的细胞培养板,置于CO₂培养箱中;

[0039] ③杂交瘤筛选及克隆化:

[0040] 待细胞长至孔底的1/3时,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔,将阳性孔采用有限稀释法进行亚克隆,第6天,取细胞上清检测,最终选取分泌抗兔瘟病毒的配对杂交瘤细胞株之一Vp60 9D4于2018年6月15日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:C2018148,保藏地址为中国武汉-武汉大学;将同样分泌抗兔瘟病毒的配对杂交瘤细胞株7D3、5F4于本公司冻存。

[0041] ④抗体制备及纯化:

[0042] 单克隆抗体2F4和9D4的生产:采用动物体内腹水诱生法;

[0043] 单克隆抗体的纯化:采用SPA柱法对腹水进行纯化,即得本发明抗兔瘟 VP60单克隆抗体2F4和9D4;

[0044] (2) 兔瘟病毒抗体快速检测卡的制备

[0045] ①胶体金溶液的熬制:

[0046] 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,具体步骤为:量取99mL的超纯水装入250mL的圆底烧瓶,放入搅拌子,置于磁力搅拌器上,加入1%氯金酸溶液1mL,适当速度搅拌,打开加热开关,待溶液沸腾后迅速一次性加入1.6mL 1%柠檬酸三钠溶液,氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色,颜色稳定后继续加热10min,待溶液冷却后,用微孔滤膜过滤,4℃保存备用,紫外扫描得到最大吸收峰为523nm的胶体金颗粒。

[0047] ②抗兔瘟病毒VP60-2F4单克隆抗体的标记:

[0048] 用0.1 mol/L的K₂CO₃调节胶体金pH值为9.0,每1mL胶体金溶液加入 6 μ g抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4,室温下120rpm摇30min,加入 10%牛血清白蛋白20 μ L,室温下120rpm摇30min,12000rpm离心20min,弃上清,用0.01MPBS溶解沉淀,即得到标记好的抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物;

[0049] ③金标垫处理及胶体金膜的制备:

[0050] 选择聚脂纤维6613作为金标结合垫。将金标垫浸泡在处理液A中5min, 处理液A为0.01M PBS, pH7.4, 0.2% Triton X-100, 取出37℃烘干, 备用;

[0051] 将标记好的抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度喷涂在处理好的金标垫处理上, 室温自然晾干或者37℃烘干, 制成含有抗兔瘟病毒VP60单克隆抗体VP60-2F4标记物的胶体金膜。

[0052] ④样品垫处理:

[0053] 选择DL42为样品垫, 将样品垫, 浸泡在处理液B中5min, 处理液B为 0.01M PBS, pH7.4, 1% Triton X-100, 1% BSA, 0.05% NaN₃, 取出37℃烘干, 备用;

[0054] ⑤C,T线确定:

[0055] 选择Sartorius CN140膜(德国赛多利斯公司, 货号CN140), 分别将抗兔瘟病毒VP60-9D4单克隆抗体和羊抗鼠二抗作为T线和C线划在NC膜上, 浓度分别为1mg/mL和0.6mg/mL, 用划膜仪依次以1μL/cm的浓度喷涂在 NC膜上, 37℃包被2h后, 室温自然晾干或者37℃烘干, 制成包被膜。

[0056] 实施例2:被测样本前处理方法和检测方法

[0057] 取刚死亡兔子的肝脏和肾脏, 称取5g, 加5ml样本稀释液, 研磨至糊状, 反复冻融3次, 然后12000rpm离心5分, 取上清进行检测。

[0058] 本发明兔瘟病毒病原快速检测卡的使用方法是, 首先根据样本前处理方法进行样本的处理, 然后取样本提取液200微升加到检测卡的加样孔中, 5-10 分钟内判定结果。结果判定如图2、3和4。

[0059] (1) 阳性(图2):若C线显色, 而T线显色, 判为阳性。

[0060] (2) 阴性(图3):若C线显色, T线不显色, 判为阴性。

[0061] (3) 无效(图4):在观察孔内, 若C线不显色, 则结果无效, 建议重新测试。

[0062] 实施例3:检测卡性能测定

[0063] (1) 稳定性检测

[0064] ①37℃加速稳定性试验:

[0065] 取三个批次(LD160217、LD160312、LD160525)的兔瘟检测卡若干置于37℃保存。每次测定各取三个批次的检测卡若干, 测定时间间隔为第3天、第7天、第10天、第14天、第17天、第20天, 测定内容为显色情况、符合率。当实验结果中NC膜显色异常并且测试结果不准确时, 则判定检测卡失效。

[0066] ②常温下稳定性试验

[0067] 取三个批次(LD160217、LD160312、LD160525)的检测卡置于常温下保存, 每次测定各取三个批次的检测卡若干, 测试时间间隔为第1个月、第3 个月、第6个月、第12个月、第18个月、第24个月; 测定内容为显色情况、符合率。当实验结果中NC膜显色异常并且测试结果不准确时, 则判定检测卡失效。

[0068] ③稳定性测定结果:

[0069] 表1稳定性测定结果

| [0070] | 37°C3 天 | 37°C7 天 | 37°C10 天 |
|--------|----------|----------|----------|
| | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% |
| | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% |
| | 常温 1 个月 | 常温 3 个月 | 常温 6 个月 |
| | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% |
| | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% |
| | 37°C14 天 | 37°C17 天 | 37°C20 天 |
| | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% |
| | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% |
| | 常温 12 个月 | 常温 18 个月 | 常温 24 个月 |
| | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% | 假阳性率 0% |
| | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% | 假阴性率 0% |

[0071] 基于以上稳定性测定结果可知,无论是37℃加速稳定性试验还是常温下稳定性试验,本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡均表现为良好的稳定性,检测结果假阳性率、假阴性率均为0%。说明本发明的胶体金检测卡产品具有良好的流通特性,无需冷藏等低温保藏手段,便于该项检测手段的推广。

[0072] (2) 特异性检测

[0073] 特异性通常用交叉反应率来表示,交叉反应指抗体除与其相应的抗原发生特异性反应外还与其它抗原发生反应,交叉反应率越低表明特异性越强。

[0074] 为了测试本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的特异性,选取了巴氏杆菌、大肠杆菌、兔球虫、新城疫病毒、猪瘟病毒、羊瘟、犬瘟热作为对照,采用本发明的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡分别检测兔瘟病毒以及以上对照组,特异性检测结果参见表2:

[0075] 表2特异性检测结果

[0076]

| 兔瘟病毒 | 巴氏杆菌 | 大肠杆菌 | 兔球虫 |
|------|------|------|-----|
| + | - | - | - |
| 新城疫 | 猪瘟病毒 | 羊瘟 | 犬瘟热 |
| - | - | - | - |

[0077] +代表阳性;-代表阴性

[0078] 基于以上特异性检测结果可知,本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡仅能检测出兔瘟病毒,而对于巴氏杆菌、大肠杆菌、兔球虫、新城疫病毒、猪瘟病毒、羊瘟、犬瘟热等均表现为阴性,这说明本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡具有良好的特异性,能够特异性的检测兔瘟病毒。

[0079] (3) 符合率

[0080] 临床收集到的100份样品,用本发明所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡与红细胞凝集实验(HA)同时测定,进行结果比对,发现两种方法对阳性和阴性的敏感度为

100%。

[0081] 实施例4:敏感性试验

[0082] 为了验证本发明的检测所述的快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡的敏感性,采用试纸条检测与HA检测进行比较,同时,还设置了多组对照组,其中对照组1的胶体金检测卡采用保存于本公司的杂交瘤细胞株7D3制备得到的单克隆抗体7D3替换实施例1中的VP60-9D4单克隆抗体,将其喷涂在NC膜上作为T线;对照组2的胶体金检测卡采用保存于本公司的杂交瘤细胞株5F4制备得到的单克隆抗体5F4替换实施例1中的VP60-9D4单克隆抗体,将其喷涂在NC 膜上作为T线。用试纸条检测血凝(HA) 效价为 $1:10*2^6$ 、 $1:10*2^5$ 、 $1:10*2^4$ 、 $1:10*2^3$ 、 $1:10*2^2$ 、 $1:10*2^1$ 、 $1:10*2^0$ 的倍比稀释的RHDV阳性标准样品,同时以RHDV阴性标准样品作为阴性对照,进行敏感性实验,具体试验结果见下表 3:

[0083] 表3敏感性试验结果

[0084]

| | $1:10*2^6$ | $1:10*2^5$ | $1:10*2^4$ | $1:10*2^3$ | $1:10*2^2$ | $1:10*2^1$ | $1:10*2^0$ |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| HA | + | + | + | - | - | - | - |
| 实施例1 | + | + | + | + | + | + | + |
| 对照1 | + | + | + | + | + | - | - |
| 对照2 | + | + | + | - | - | - | - |

[0085] 由以上敏感性试验结果可知,用试纸条检测血凝(HA) 效价为 $1:10*2^6$ 、 $1:10*2^5$ 、 $1:10*2^4$ 、 $1:10*2^3$ 、 $1:10*2^2$ 、 $1:10*2^1$ 、 $1:10*2^0$ 的倍比稀释的RHDV阳性标准样品,实施例1快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡(9D4)的RHDV样品均出现T线、C线2条玫瑰红线,即均为RHDV阳性,而且T线随RHDV含量的升高,颜色加深;但是对照组1(7D3)的试纸条检测血凝(HA) 效价为 $1:10*2^1$ 、 $1:10*2^0$ 的样品均为阴性;对照组2(5F4)的试纸条检测血凝(HA) 效价为 $1:10*2^3$ 、 $1:10*2^2$ 、 $1:10*2^1$ 、 $1:10*2^0$ 的样品均为阴性;而在血凝试验中, HA效价 $\geq 1:10*2^4$ 被判定为阳性,而血凝(HA) 效价为 $1:10*2^3$ 、 $1:10*2^2$ 、 $1:10*2^1$ 、 $1:10*2^0$ 的样品均为阴性。因此,本发明实施例1的试纸条的敏感性高于红细胞凝集试验,也高于采用其他单克隆抗体如7D3、5F4作为检测线喷涂抗体时的敏感性,说明本发明的单克隆抗体2F4和9D4之间具有相对更好的配对关系,其能够获得更为准确、灵敏的检测结果。

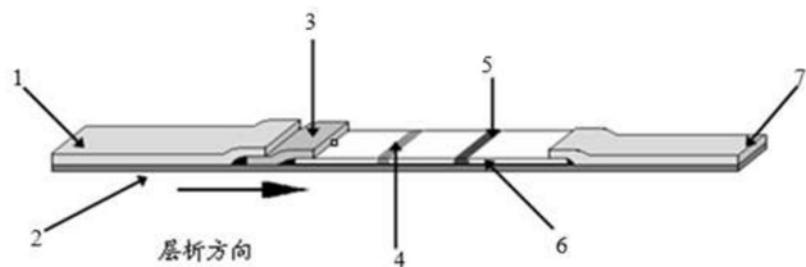


图2



图3



图4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN109856397A | 公开(公告)日 | 2019-06-07 |
| 申请号 | CN201811602846.7 | 申请日 | 2018-12-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 山东绿都生物科技有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 山东绿都生物科技有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 山东绿都生物科技有限公司 | | |
| [标]发明人 | 武玉香 于金枝 曲光刚 张莎莎 | | |
| 发明人 | 武玉香 于金枝 曲光刚 张莎莎 | | |
| IPC分类号 | G01N33/569 G01N33/531 G01N33/532 | | |
| 外部链接 | Espacenet Sipo | | |

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法，具体步骤为：(1)配对的抗兔瘟病毒单克隆抗体的制备，包括免疫程序、细胞融合、杂交瘤筛选及克隆化、抗体制备及纯化；(2)快速检测兔瘟病毒的胶体金检测卡及其制备方法，包括胶体金单克隆抗体的制备、样品垫处理、喷膜、C,T线确定、被测样本的处理、性能测定。本发明可以快速、灵敏、准确的检测兔子的肝脏、肾脏部位的兔瘟病毒感染，克服了国内检测兔瘟病毒主要以红细胞凝集实验的方法，大大缩短了检测时间，为现场检测提供了方便。

