



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470836 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910401632.1

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.05.14

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2017247 2017.11.22

CCTCC NO:C2017248 2017.11.22

(71)申请人 广州维佰生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区玉岩路  
12号实验楼三楼315-7房

(72)发明人 潘玉

(74)专利代理机构 广州凯东知识产权代理有限公司 44259

代理人 罗丹

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

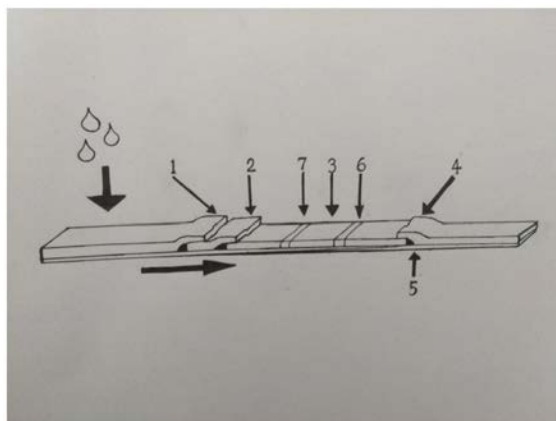
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测禽白血病病毒的荧光微球免疫层析试纸及其制备方法,属于荧光免疫层析检测领域。本发明所述试纸由底板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸组成。其中,所述样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸水平方向顺序连接粘贴在底板上。所述层析膜上包被有禽白血病病毒单克隆抗体3F6的检测T线和羊抗鼠单克隆抗体构成的质控C线;所述结合垫上含荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7。本发明用于检测蛋清、血清和泄殖腔拭子样品,通过荧光检测仪读取分析结果,从而实现对样品中禽白血病病毒的定量检测。该发明具有方便快捷、操作简单、检测时间短、特异性强、灵敏度高、定量检测等优点。



1. 一种检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸,由底板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸组成,底板上依次连接粘贴样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸,其特征在于,所述层析膜上依次包被有禽白血病病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体,以禽白血病病毒单克隆抗体3F6包被区域为检测T线,以羊抗鼠单克隆抗体包被区域为质控C线;所述结合垫上含有荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7。

2. 一种如权利要求1所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 制备一对禽白血病病毒单克隆抗体;

2) 用荧光微球标记禽白血病病毒单克隆抗体5B7,保存于微球重悬液,并将其喷涂在结合垫上;

3) 将禽白血病病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体分别包被于层析膜上;

4) 将样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸依次连接粘贴在底板上,切割、组装成试纸。

3. 如权利要求1-2任一所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸,其特征在于,所述的荧光微球内部填充镧系元素的螯合物。

4. 如权利要求1-3任一所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸,其特征在于,所述的镧系元素为铈、钐、钕、镨中的一种。

5. 如权利要求1-2任一所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述包被于层析膜上的禽白血病病毒单克隆抗体3F6是使用禽白血病病毒P27蛋白免疫小鼠制备获得,由保藏编号为CCTCC NO:C2017248的杂交瘤细胞株3F6分泌产生。

6. 如权利要求1-2任一所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7是禽白血病病毒P27蛋白免疫小鼠制备获得,由保藏编号为CCTCC NO:2017247的杂交瘤细胞株5B7分泌产生。

7. 如权利要求1-2任一所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记禽白血病病毒单克隆抗体5B7的方法,包括如下步骤:

1) 将荧光微球溶于100nM的磷酸二氢钠缓冲液,加入(EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)反应20分钟,使微球表面羧基基团活化;

2) 置4℃下以17500rpm离心1小时后弃上清,加入50mM的MES(2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物),以100w的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒;

3) 加入禽白血病病毒单克隆抗体5B7,使单克隆抗体与微球表面羧基基团偶联,室温(15~25℃)震荡反应2小时;

4) 加入含10%BSA(牛血清白蛋白)的磷酸盐缓冲液(浓度、稀释液和量,比如含1%牛血清蛋白的磷酸盐缓冲液),用于封闭微球上未标记单克隆抗体的羧基基团,室温(15~25℃)震荡反应10分钟;

5) 置4℃下以17500rpm离心45分钟后弃上清,加入微球重悬液,以100w的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,置4℃环境保存。

8. 如权利要求1-2任一所述的检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,微球重悬液是含2%海藻糖、8%蔗糖、1%Tween-20、1%酪蛋白钠盐、2%BSA、0.05%NaN<sub>3</sub>,pH值8.5的0.2M硼酸硼砂缓冲液。

9. 一种权利要求1-2任一所述的禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸在检测禽白血病

病毒中的应用,包括如下步骤:

- 1) 待测样品处理;
- 2) 用禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸进行检测;
- 3) 用荧光检测仪分析检测结果。

## 一种检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫检测领域,具体涉及一种检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 禽白血病(Avian leucosis)是由反转录病毒科(Retroviridae)禽白血病/肉瘤病毒群病毒(Avian leukosis/sarcoma virus)引起的禽类多种肿瘤性疾病的总称。本病在世界各地均有发生,是危害养禽业的主要疾病之一。禽白血病导致的经济损失主要有2个方面。一是产生肿瘤,导致鸡的死亡。二是产生非肿瘤综合征,表现为生产指标发生变化,如性成熟推迟、母鸡产蛋率下降、蛋重下降、受精率下降和孵化率下降,由此严重影响养鸡生产。此外,禽白血病一旦感染后,可引起鸡群的免疫抑制,会继发诸如马立克氏病、传染性法氏囊、鸡传染性贫血等免疫抑制病,从而造成更严重的损失。研究和控制禽白血病都是至关重要的。

[0003] 目前,检测禽白血病比较经典且常用的方法有ELISA法、RT-PCR法、琼脂扩散实验法等。但由于以上方法均需求先进检测仪器,检测费用昂贵,步骤繁琐耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适合用于基层企事业单位的大量快速筛查检测。

[0004] 现有的利用侧向层析技术快速检测禽白血病病毒的方法有使用胶体金作标记物的免疫层析技术,该技术目前已有注册专利包括《J亚群禽白血病病毒快速检测试纸卡及应用》(CN102426242A)、《抗禽白血病病毒p27蛋白单克隆抗体,包含该单克隆抗体的金标试纸条及应用》(CN105198986A)、《快速检测禽白血病抗原的试纸条及其制备方法》(CN102636646A)等。胶体金免疫层析技术具有检测速度快,价格便宜、操作简单等特点,但胶体金颗粒本身的理化性质导致其技术有一定的局限性。胶体金对环境酸碱度较为敏感,且颗粒不均以及胶体金颗粒可能出现不可逆的聚集现象,导致胶体金试纸存在稳定性差的问题。此外,因为肉眼观察的方法使得观察结果因人而异,无法实现定量检测;此外对于阳性与阴性的判定标准模糊限制了其检测低浓度样品的能力也因此限制了灵敏度。因此,稳定性低、灵敏度低、无法实现定量检测、基质效应明显背景干扰大,且颜色单一,难以实现多检或联检等缺点限制其于定量检测领域的应用。

[0005] 荧光微球免疫层析技术是以具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂作为示踪物,继胶体金免疫层析技术后发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合,与胶体金免疫层析技术一样具有快速检测、操作简单等优点。但相比于胶体金等传统标记物,荧光微球的发光强度可以随激发光的强度增强而增强,因此有望提高免疫层析技术的检测限;而微球壳结构的作用下,荧光微球具有相对稳定的形态结构,粒径均一、稳定性高、单分散性好、重复性好、发光效率高,有较好的生物相容性;且形成微球后染料荧光淬灭大大减少,发射强而稳定,基本不收外界环境介质变化的影响。此外,荧光微球免疫层析技术结合荧光免疫分析仪的使用,通过机器读取荧光信号并加以分析,既避免了肉眼观察带来的误差,又能实现定量检测;通过建立标准曲

线的方法可以从检测结果计算样品实际浓度。因此相比于上述检测方法,荧光微球免疫层析技术同时具有检测灵敏度高、操作要求简便的优点,既能满足基层企业作快速大量筛查检测,又能用于科研等定量检测分析。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术中的不足,提供一种操作简单、携带方便且制备成本低,可快速定量检测禽白血病病毒的荧光微球免疫层析试纸。

[0007] 本发明的另一个目的是提供上述禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法

[0008] 本发明的另一个目的是提供上述禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的使用方法

[0009] 本发明的上述目的是通过如下方案实现的:

[0010] 一种禽白血病荧光微球免疫层析试纸,由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸、底板组成,底板上依次连接地粘贴样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸;所述层析膜上依次包被有禽白血病病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体,以禽白血病病毒单克隆抗体3F6包被区域为检测T线,以羊抗鼠单克隆抗体包被区域为质控C线;所述结合垫含有荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7。

[0011] 所述荧光微球内部填充镧系元素的螯合物,为铈、钐、铽、镱中的一种。

[0012] 进一步的,上述荧光微球表面修饰有羧基官能团,荧光微球由聚苯乙烯包被,粒径为100~300nm。

[0013] 本发明提供的禽白血病荧光微球免疫层析试纸的制备方法,包括如下步骤:

[0014] 1) 制备一对禽白血病病毒单克隆抗体;

[0015] 2) 用荧光微球标记禽白血病病毒单克隆抗体5B7,保存于微球重悬液,并将其喷涂在结合垫上;

[0016] 3) 将禽白血病病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体分别包被于层析膜膜上;

[0017] 4) 将样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸依次连接粘贴在底板上,切割、组装成试纸。

[0018] 所述的一对禽白血病病毒单克隆抗体的制备方法,具体步骤如下:

[0019] 1) 用大肠杆菌BL21 (DEE3) 原核表达系统,制备重组禽白血病病毒P27蛋白;

[0020] 2) 用重组禽白血病P27蛋白免疫BALB/c小鼠,取免疫鼠脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞通过融合建立杂交瘤细胞株、进而进行筛选,得到一对分泌禽白血病病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0021] 3) 取杂交瘤细胞注射于经预处理的BALB/cx小鼠腹腔,使其产生腹水,采集小鼠腹水进行分离纯化制得一对禽白血病病毒单克隆抗体。

[0022] 所述的荧光微球标记禽白血病病毒单克隆抗体5B7的处理方法,具体步骤如下:

[0023] 1) 将20 $\mu$ l荧光微球溶于500 $\mu$ l的100nM pH 6.2磷酸二氢钠缓冲液,加入10 $\mu$ l50mM EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和10 $\mu$ l 50mM NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)反应20分钟,使微球表面羧基基团活化;

[0024] 2) 置4 $^{\circ}$ C下,以17500rpm离心1小时后弃上清,加入500 $\mu$ l的50mM MES (2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物),以100w的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,使之分

散；

[0025] 3) 加入40 $\mu$ g禽白血病病毒单克隆抗体5B7,使单克隆抗体与微球表面羧基基团偶联,室温震荡反应2小时；

[0026] 4) 加入50 $\mu$ l含10%BSA的磷酸盐缓冲液,用于封闭微球上未标记单克隆抗体的羧基基团,室温(15~25 $^{\circ}$ C)震荡反应10分钟；

[0027] 5) 置4 $^{\circ}$ C下,以17500rpm离心45分钟离心后弃上清,加入500 $\mu$ l清,微球重悬液,以100w的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,使之分散,置4 $^{\circ}$ C环境保存。

[0028] 进一步的,上述的微球重悬液是含2%海藻糖、8%蔗糖、1%Tween-20、1%酪蛋白钠盐、2%BSA、0.05%NaN<sub>3</sub>,pH为8.5的0.2M硼酸硼砂缓冲液。

[0029] 所述荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7喷涂在结合垫上的处理方法,具体是,将荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7按5~7 $\mu$ l/cm的喷涂量喷涂于结合垫上,置37 $^{\circ}$ C烘干3小时,置于室温(15~25 $^{\circ}$ C)干燥环境下保存。

[0030] 进一步的,上述结合垫材质为玻璃纤维材料。

[0031] 所述的将禽白血病病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体包被于层析膜上的处理方法,具体步骤如下：

[0032] 1) 用含0.5%海藻糖的pH值7.4的PBS(磷酸缓冲液)稀释禽白血病病毒单克隆抗体3F6至终浓度1.0mg/ml,用pH值7.4的PBS稀释羊抗鼠单克隆抗体至终浓度1.0mg/ml；

[0033] 2) 将稀释后的禽白血病病毒单克隆抗体3F6按1.2 $\mu$ l/cm的包被量包被在层析膜上,作为检测T线区；

[0034] 3) 将稀释后的羊抗鼠单克隆抗体按1.0 $\mu$ l/cm抗体羊抗鼠的包被量包被在层析膜上,作为质控C线区；

[0035] 4) 置37 $^{\circ}$ C烘干3小时,置室温(15~25 $^{\circ}$ C)干燥环境下保存。

[0036] 进一步的,上述层析膜材质为硝酸纤维素材料。

[0037] 所述样品垫的制备方法为,将样品垫浸泡于样品垫处理液中,1小时后取出,置室温(15~25 $^{\circ}$ C)干燥16~18小时。

[0038] 进一步的,上述样品垫材质为玻璃纤维材料。

[0039] 进一步的,上述样品垫处理液是含1%蔗糖、1%海藻糖、1%BSA、0.5%Tween-20、0.05%NaN<sub>3</sub>的pH7.4的0.2M硼酸硼砂缓冲液。

[0040] 本发明提供的监测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸的使用方法,包括如下步骤：

[0041] 1) 待测样品处理；

[0042] 2) 用禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸进行检测；

[0043] 3) 用荧光检测仪分析检测结果。

## 附图说明

[0044] 根据一个或多个不同的实施方式,参考下列附图对本发明进行了详细描述。附图仅为示例目的而提供,并且仅描述本发明典型或示例型的实施方式。这些附图被提供以促进读者对本发明的理解,将不认为限制本发明的宽度、范围或应用性。

[0045] 图1是本发明中用荧光免疫层析技术检测细小病毒的试纸条示意图。图1中,附图

标记1-7说明:1-样品垫;2-结合垫;3-层析膜;4-吸水纸;5-底板;6-质控C线;7-检测T线。

[0046] 图2是用禽白血病毒荧光微球免疫层析试纸检测阳性样品。

[0047] 图3是对禽白血病毒荧光微球免疫层析试纸检测阳性样品的荧光检测仪读数 结果作拟合曲线。

### 具体实施方式

[0048] 实施例1,禽白血病毒荧光微球免疫层析试纸的制备

[0049] 禽白血病毒荧光微球免疫层析试纸的制备方法,包括如下步骤:

[0050] 1) 制备一对禽白血病毒单克隆单克隆抗体;

[0051] 2) 用荧光微球标记禽白血病毒单克隆抗体5B7,保存于微球重悬液,并将其喷涂在结合垫上;

[0052] 3) 将禽白血病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体分别包被于层析膜 上;

[0053] 4) 将样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸依次连接粘贴在底板上,切割、组装 成试纸。

[0054] 下面分步详细叙述:

[0055] 1. 禽白血病毒单克隆抗体的制备

[0056] 1) 重组pET-28a-P27的构建

[0057] 根据GeneBank公布的禽白血病毒P27蛋白的基因序列,设计P27蛋白基 因合成序列,并在序列首尾加入BamH和Sal I酶位点。将合成的片段与pET-28a 载体进行连接,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,涂布于含有50mg/ml卡那霉素 的LB平板,置37 $^{\circ}$ C温箱中,培养14小时。挑取单个菌落,置5ml含有50mg/ml 卡那霉素的LB液体培养基中,置37 $^{\circ}$ C震荡培养箱中培养8小时。提取质粒DNA, 用BamH和Sal I酶位点进行酶切鉴定,经琼脂糖电泳检测有5368bp和750bp两 条带的质粒为合格的pET-28a-P27重组质粒。

[0058] 2) 重组P27蛋白的表达和纯化

[0059] 将鉴定合格的pET-28a-P27重组质粒,转化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态 细胞,涂布于含有50mg/ml卡那霉素的LB平板,置37 $^{\circ}$ C温箱中,培养12小时。挑取单个菌落,置5ml含有50mg/ml卡那霉素的LB液体培养基中,置37 $^{\circ}$ C震 荡培养箱中培养12小时。次日,按照1:100的比例接种新鲜的含有50mg/ml卡 那霉素的LB液体培养基,置37 $^{\circ}$ C震荡培养箱中培养至菌液OD<sub>600nm</sub>值在0.6~0.7 时,加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)溶液,使其终浓度为0.8mM,继续 诱导培养5小时。取100ml诱导后的菌液,置4 $^{\circ}$ C、以8000rpm离心10分钟, 弃上清,用PBS重悬菌液,置4 $^{\circ}$ C、以8000rpm离心10分钟,用10ml PBS重 悬菌体。取100 $\mu$ l悬浮菌体与25 $\mu$ l 5X SDS-Laoding Buffer混合,置100 $^{\circ}$ C金属 浴上作用10分钟后,冰浴5分钟。对处理后的样品进行十六烷基磺酸钠-聚丙烯 酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测,分离胶的浓度为12%,并以为添加诱导剂的 重组菌作为对照。确定重组P27蛋白表达后,对剩余的悬浮菌体通过Nii-NTA 进行纯化,并以SDS-PAGE进行检测和以BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

[0060] 3) 免疫和检测

[0061] 将纯化后的重组P27蛋白与等量(V/V)弗氏完全佐剂乳化后,免疫6周龄 SPF雌性BALB/c小鼠,100 $\mu$ g/只。间隔14日后,将纯化后的重组P27蛋白与 等量(V/V)弗氏完全不佐剂乳化后,再次免疫该小鼠,100 $\mu$ g/只。间隔14后, 用重组P27蛋白对小鼠的血清通过间接ELISA的方法测定血清中抗体效价,对 效价测定合格的小鼠进行后期的细胞融合。融合前3

~5日,腹腔注射重组P27 蛋白,100 $\mu$ g/只。

#### [0062] 4) 细胞融合

[0063] 取效价测定合格的免疫小鼠,无菌条件下取出其脾细胞,与 $10^7$ 个SP2/0骨髓瘤细胞通过PEG1450在37 $^{\circ}$ C水浴中进行细胞融合,即为杂交瘤细胞,融合后的细胞,置含20%胎牛血清的DMEM培养基中,混合均匀后分装于6块96孔细胞板中,置37 $^{\circ}$ C、含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。期间注意观察细胞形态、生长大小和换新鲜的培养基。

#### [0064] 5) 筛选

[0065] 用重组P27蛋白建立的间接ELISA方法对杂交瘤细胞培养上清进行检测,以SPF雌性BALB/c小鼠血清作为阴性对照,以免疫鼠血清作为阳性对照。选择检测结果为阳性的细胞孔,通过有限稀释法进行细胞克隆,继续置37 $^{\circ}$ C、含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。生长到适宜状态时,继续对其进行检测盒克隆培养,共进行3次的检测盒克隆,最终我们获得了两株针对重组P27蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7。

其中,禽白血病毒单克隆抗体3F6由中国典型培养物保藏中心(武汉大学)保藏,地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号武汉大学校内武汉大学保藏中心,保藏日期:2017年11月22日、保藏编号:CCTCC NO.C2017248,分类命名:杂交瘤细胞株(拉丁文名称Mammalia lineae cellulam);

禽白血病毒单克隆抗体5B7由中国典型培养物保藏中心(武汉大学)保藏,地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号武汉大学校内武汉大学保藏中心,保藏日期:2017年11月22日、保藏编号:CCTCC NO.C2017247,分类命名:杂交瘤细胞株(拉丁文名称Mammalia lineae cellulam);

#### [0066] 6) 腹水的制备和纯化

[0067] 取8周龄SPF雌性BALB/c小鼠,腹腔注射弗氏不完全佐剂,0.5ml/只。2日后,分别腹腔注射禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7的杂交瘤细胞 $2.5 \times 10^5$ 个细胞/只。待其腹部明显肿大时,用注射器针头收集腹水。收集的腹水通过ProteinG进行纯化,以BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度

#### [0068] 7) 鉴定

[0069] (1) 效价测定将纯化后的禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7用PBS按照1:100、1:200……1:204800的梯度做2倍倍比稀释,用重组P27蛋白建立的间接ELISA方法对其进行效价测定,以SP2/0骨髓瘤细胞制备的抗体作为阴性对照。检测结果显示,禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7的抗体效价分别是1:102400和1:204800。

[0070] (2) 抗体亚类鉴定用小鼠抗体亚类鉴定试剂盒与禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7进行鉴定。结果显示,禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7的亚类均为IgG1。

[0071] (3) 特异性鉴定将禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7分别是禽白血病毒、鸡新城疫病毒和鸡马立克氏病病毒进行Western Blotting试验。结果显示,禽白血病毒单克隆抗体3F6和5B7仅与禽白血病毒呈现阳性反应,与鸡新城疫病毒和鸡马立克氏病病毒均呈现阴性反应。

#### [0072] 2. 荧光微球标记的禽白血病毒单克隆抗体5B7的制备

[0073] 1) 将20 $\mu$ l荧光微球溶于500 $\mu$ l的100nM pH 6.2磷酸二氢钠缓冲液,加入10 $\mu$ l50mM EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和10 $\mu$ l 50mM NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)

反应20分钟,使微球表面羧基基团活化;

[0074] 2) 置4℃下,以17500rpm离心1小时后弃上清,加入500μl的50mM MES,以100w的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,使之分散;

[0075] 3) 加入40μg禽白血病病毒单克隆抗体5B7,使单克隆抗体与微球表面羧基基团偶联,室温震荡反应2小时;

[0076] 4) 加入50μl含10%BSA的磷酸盐缓冲液,用于封闭微球上未标记单克隆抗体的羧基基团,室温(15~25℃)震荡反应10分钟;

[0077] 5) 置4℃下,以17500rpm离心45分钟离心后弃上清,加入500清,微球重悬液,以100w的功率超声重悬3次,每次工作时间3秒,间隔时间3秒,使之分散,置4℃环境保存

[0078] 上述的微球重悬液是含2%海藻糖、8%蔗糖、1%Tween-20、1%酪蛋白钠盐、2%BSA、0.05%NaN<sub>3</sub>,pH为8.5的0.2M硼酸硼砂缓冲液。

[0079] 3. 结合垫的制备

[0080] 将荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7按5~7抗体标记的的喷涂量喷涂于结合垫上,置37℃烘干3小时,置室温(15~25℃)干燥环境下保存。

[0081] 进一步的,上述结合垫材质为玻璃纤维材料。

[0082] 4. 禽白血病病毒单克隆抗体3F6与羊抗鼠单克隆抗体包被于层析膜

[0083] 1) 用含0.5%海藻糖的pH值7.4的PBS稀释禽白血病病毒单克隆抗体3F6至终浓度1.0mg/ml,用pH值7.4的PBS缓冲液稀释羊抗鼠单克隆抗体至终浓度1.0mg/ml;

[0084] 2) 将稀释后的禽白血病病毒单克隆抗体3F6按1.2μl/cm的包被量包被在层析膜上,作为检测T线区;

[0085] 3) 将稀释后的羊抗鼠单克隆抗体按1.0μl/cm的包被量包被在层析膜上,作为质控C线区;

[0086] 4) 置37℃烘干3小时,置室温(15~25℃)干燥环境下保存。

[0087] 5. 样品垫的制备

[0088] 将样品垫浸泡于样品垫处理液中,1小时后取出,置室温干燥16~18小时。

[0089] 上述样品垫材质为玻璃纤维材料。

[0090] 上述样品垫处理液是含1%蔗糖、1%海藻糖、1%BSA、0.5%Tween-20、0.05%NaN<sub>3</sub>的pH值7.4的0.2M硼酸硼砂缓冲液。

[0091] 6. 各部件的组装

[0092] 将所述样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸依次按顺序粘贴在所述底板上;样品垫的末端与结合垫始端相连,结合垫的末端与层析膜的始端相连,层析膜的末端与吸水纸的始端相连,样品垫的始端与粘性底衬的始端对齐,吸水纸的末端与粘性底衬的末端对齐,层析膜上检测T线区域和质控C线区域均为与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测T线位于近于结合垫的一侧;质控线位于近于吸水纸的一侧;将试纸条用机器切成3.96mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡。将试纸卡置于2~8℃阴凉避光环境用铝箔袋干燥密封保存。

[0093] 实施例2,用禽白血病荧光微球免疫层析试纸检测阳性样品

[0094] 将重组禽白血病病毒P27蛋白分别稀释成浓度为1ng/ml,10ng/ml,100ng/ml,1000ng/ml,10000ng/ml,100000ng/ml的溶液,各取1000μl分别滴加到实施例1中制备的禽

白血病荧光微球免疫层析试纸的样品垫上,反应15分钟后用发射 365nm激光的荧光检测仪(上海微测生物公司)检测荧光信号,记录各组的T 值(T线荧光信号强度)、C值(C线荧光信号强度)、T/C值(T线与C线荧光 信号比值)。

[0095] 表1检测阳性样品结果

|        | 浓度 c(ng/ml)     | lg(c) | T/C 值  |
|--------|-----------------|-------|--------|
|        | 10 <sup>5</sup> | 5     | 3.2445 |
|        | 10 <sup>4</sup> | 4     | 3.7787 |
| [0096] | 10 <sup>3</sup> | 3     | 1.7059 |
|        | 10 <sup>2</sup> | 2     | 0.6313 |
|        | 10 <sup>1</sup> | 1     | 0.1678 |
|        | 1               | 0     | 0.0216 |

[0097] 将T/C值作纵坐标,将重组禽白血病病毒P27蛋白浓度的10对数,即lg(c), 作横坐标,通过作散点图,分析重组禽白血病病毒P27蛋白浓度与T/C值的变化趋势。该组数据中,浓度c为1ng/ml至10000ng/ml的数据,即lg(c)为0至4 的数据,呈明显的线性关系,截取该段数据作拟合曲线,得出标准曲线方程  $y=0.0567x^3-0.0216x^2+0.1177x+0.0203$ 。通过将样品检测的T/C值作为y值代入公式可计算出样品中禽重组禽白血病病毒P27蛋白的量。

[0098] 虽然本申请详细描述了具体的实施例,但本申请不限于这些实施例,相反,其意图涵盖包括在实施例的精神和范围内的各种修改和同等方案,在一些具体情况下,可以缺少和增加某个或某些技术特征而不脱离本发明的精神和范围,本申请的范围仅由权利要求书限定。

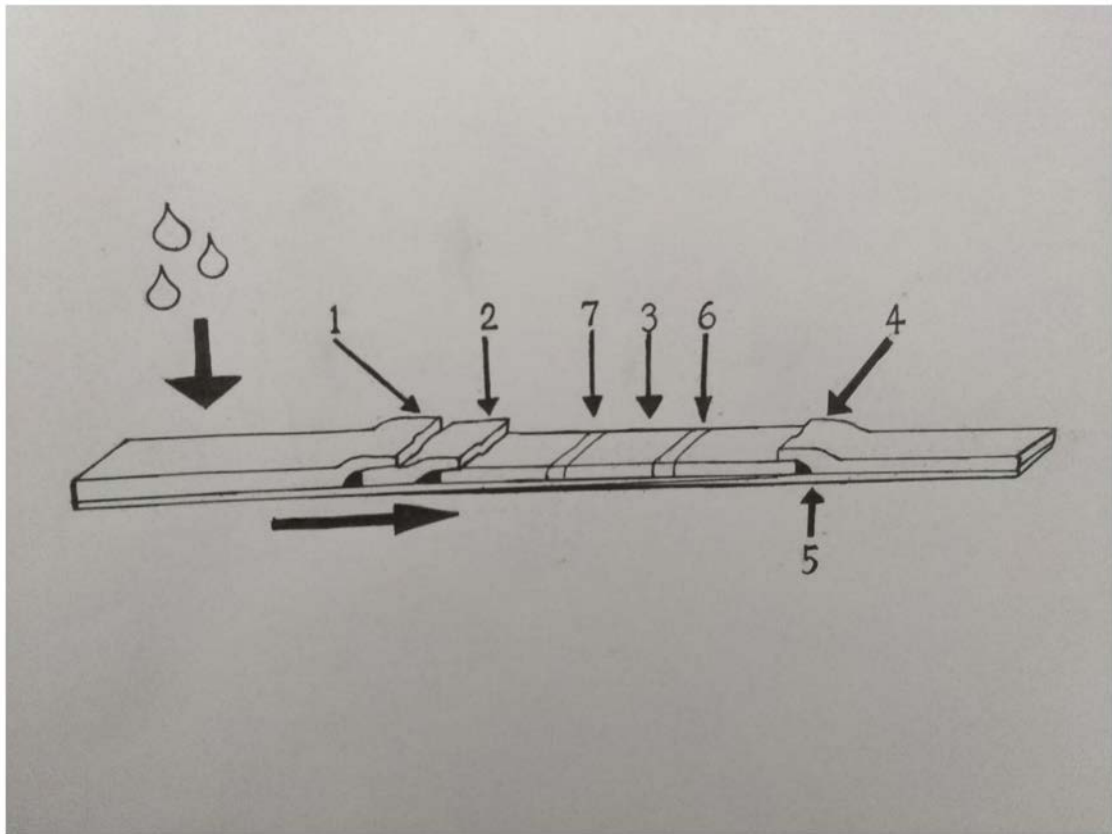


图1

|       |                       |                       |                       |                       |                       |        |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| 样品:   | ALV E                 | ALV E                 | ALV E                 | ALV E                 | ALV E                 | ALV E  |
| 浓度:   | 10 <sup>5</sup> ng/ml | 10 <sup>4</sup> ng/ml | 10 <sup>3</sup> ng/ml | 10 <sup>2</sup> ng/ml | 10 <sup>1</sup> ng/ml | 1ng/ml |
| T/C值: | 3.2445                | 3.7787                | 1.7059                | 0.6313                | 0.1678                | 0.0216 |



图2

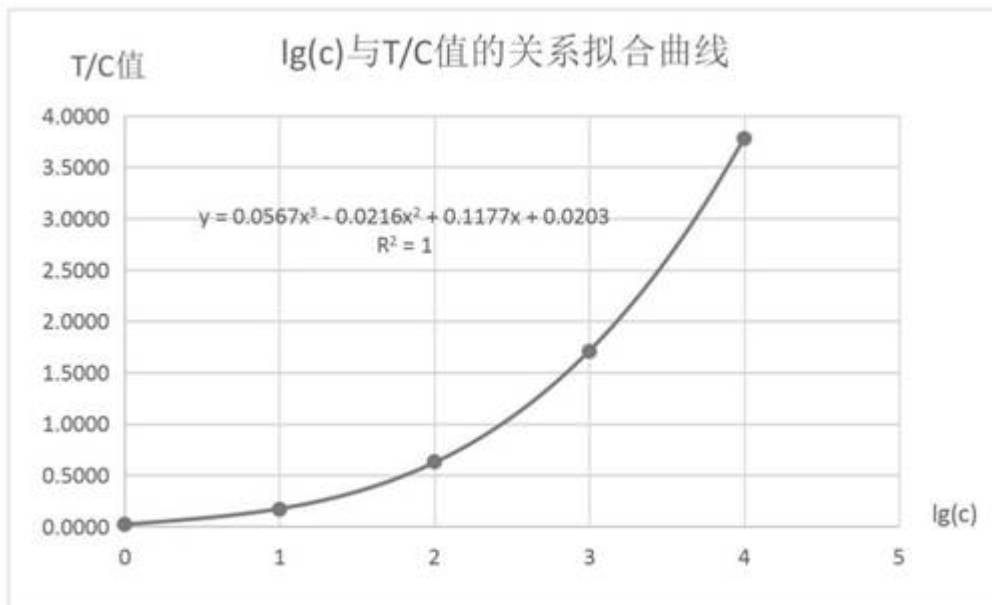


图3

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种检测禽白血病病毒荧光微球免疫层析试纸及其制备方法                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN110470836A</a>                      | 公开(公告)日 | 2019-11-19 |
| 申请号            | CN201910401632.1                                  | 申请日     | 2019-05-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 广州维佰生物科技有限公司                                      |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 广州维佰生物科技有限公司                                      |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 广州维佰生物科技有限公司                                      |         |            |
| [标]发明人         | 潘玉  |         |            |
| 发明人            | 潘玉  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/533 G01N33/543                  |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/54346 G01N33/56983 |         |            |
| 代理人(译)         | 罗丹  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>    |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种检测禽白血病病毒的荧光微球免疫层析试纸及其制备方法，属于荧光免疫层析检测领域。本发明所述试纸由底板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸组成。其中，所述样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸水平方向顺序连接粘贴在底板上。所述层析膜上包被有禽白血病病毒单克隆抗体3F6的检测T线和羊抗鼠单克隆抗体构成的质控C线；所述结合垫上含荧光微球标记的禽白血病病毒单克隆抗体5B7。本发明用于检测蛋清、血清和泄殖腔拭子样品，通过荧光检测仪读取分析结果，从而实现对样品中禽白血病病毒的定量检测。该发明具有方便快捷、操作简单、检测时间短、特异性强、灵敏度高、定量检测等优点。

