

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910029628.3

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月2日

[11] 公开号 CN 101520459A

[22] 申请日 2009.4.8

[21] 申请号 200910029628.3

[71] 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市钟灵街50号

[72] 发明人 王芳 李超美 胡波 范志宇  
蔡少平 徐为中 张则斌 何孔旺

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 张素卿

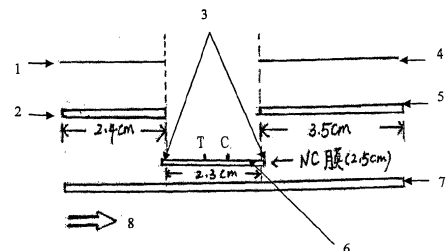
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

## [54] 发明名称

兔出血症病毒胶体金检测试纸条

## [57] 摘要

本发明涉及一种兔出血症病毒(RHDV)胶体金检测试纸条,属于胶体金免疫检测技术领域。试纸条底板一端为胶体金-RHDV多克隆抗体结合物玻璃纤维膜,抗体固相硝酸纤维素膜位于中间,其上划有一条RHDV单抗检测线T线和一条羊抗兔IgG质控线C线,底板另一端为吸水纸。当被检样品中带RHDV时,RHDV可与胶体标记的抗RHDV多克隆抗体发生特异结合而被抗RHDV单克隆抗体识别,即发生双抗夹心特异结合,因而可检测样品中是否含有RHDV。本发明可以提供应用单克隆抗体、多克隆抗体建立的RHDV免疫学检测方法,该方法具有快速、准确、方便等优点,尤其适合现场检测和初筛检验,具有广阔的前景。



1、兔出血症病毒胶体金检测试纸条，其特征是，

由底板(7)、吸水纸(5)、胶体金-RHDV多克隆抗体结合物玻璃纤维膜(2)、抗体固相硝酸纤维素膜，简称NC膜(6)、蓝色胶带(4)、白色MAX箭头胶带(1)组成；

底板(7)一端表面粘贴胶体金-RHDV多克隆抗体结合物玻璃纤维膜(2)，长2.4cm；抗体固相硝酸纤维素膜，简称NC膜(6)，长2.5cm，粘贴在底板(7)表面中间段，此NC膜一端与玻璃纤维膜(2)重叠0.1cm(3)，另一端与吸水纸(5)重叠0.1cm(3)；底板(7)另一端表面粘贴吸水纸(5)，长3.5cm；

抗体固相硝酸纤维素膜，简称NC膜(6)上划有一条RHDV单克隆抗体检测线T线和一条羊抗兔IgG质控线C线。

2、权利要求1所述兔出血症病毒胶体金检测试纸条的制备方法，包括：

(1)RHDV单克隆抗体的制备及测定

复苏RHDV单克隆抗体杂交瘤细胞株A3C，培养至对数生长期，将 $10^6$ 个杂交瘤细胞注射到已用石蜡油致敏一周的小鼠腹腔，当小鼠腹部极度膨胀且行动迟缓时抽取腹水，离心，弃去脂肪，再用辛酸-硫酸铵法纯化，利用核酸蛋白分析仪测得纯化单抗浓度为5.73mg/mL，间接ELISA方法测定该抗体效价为 $30 \log_2$ ；

(2)RHDV多克隆抗体制备及测定

常规方法制备RHDV多克隆抗体，该多克隆抗体血凝抑制效价为 $12 \log_2$ ，用DEAE-纤维素层析柱纯化多克隆抗体IgG，利用核酸蛋白分析仪测得浓度为7.00mg/mL，纯化的多克隆抗体血凝抑制效价为 $11 \log_2$ ；

(3)胶体金-抗体结合物的制备和纯化

①取调到最佳pH7.4的胶体金溶液20mL，在磁力搅拌下，缓慢加入0.6mL浓度为1mg/mL的RHDV多克隆抗体，在室温下搅拌30分钟；

②加质量体积比10%BSA牛血清白蛋白0.8mL，室温搅拌5分钟；

③加质量体积比10%PEG聚乙二醇20000 0.4mL，室温搅拌5分钟；

④9000~11000r/min，离心40~60分钟，弃去上清；

⑤沉淀溶于2mL胶体金-抗体保存液中，用0.45 $\mu$ m滤膜过滤，以上所得到的溶液为胶体金-抗体结合物原液，置4 $^{\circ}$ C保存备用，其中胶体金-抗体保存液配制方法为：四硼酸钠，0.1g；BSA，0.25g；NaN<sub>3</sub>，0.025g，加超纯水溶解后，用6N HCl调pH至7.4，补超纯水至250mL，再用0.45 $\mu$ m微孔滤器过滤，4 $^{\circ}$ C保存备用，有效期6个月。

(4)胶体金-抗体结合物玻璃纤维膜的制备

①将制备好的胶体金-抗体结合物原液1mL，加工作液3mL稀释成1:4的使用浓度，获得

胶体金-抗体结合物稀释液，其中工作液配制方法为：NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O，6.10g；NaCl，8.50g；PVP40，5.00g；硼酸，2.10g；PEG MW4000，1.00g；10%BSA，50mL；NaN<sub>3</sub>，0.20g，加超纯水溶解后，用6N HCl调pH至7.0~7.5，补超纯水至1000mL，再用0.45μm微孔滤器过滤，4℃保存备用，有效期6个月；

②把玻璃纤维膜剪成2.4cm×8cm/条；

③将剪好的玻璃纤维膜放在平坦干净的玻璃板上，取1.4mL胶体金-抗体结合物稀释液，加在玻璃纤维膜上，使玻璃纤维膜浸透，然后置37℃烘干，置4℃保存备用；

(5)抗体固相硝酸纤维素膜的制备

选择型号为whatman Prima 40的NC膜，将浓度为2.0mg/mL RHDV单克隆抗体溶液装入划膜机喷头划检测线T线，T线划在长2.5cm×宽8.0cm NC膜左侧1.1cm的位置上，将浓度为1.0mg/mL的羊抗兔IgG装入划膜机另一喷头划质控线C线，C线划在NC膜左侧1.6cm的位置上，检测线与质控线的距离为0.45cm，参数均为1.0μL/cm喷在硝酸纤维素膜上；

将已喷好的硝酸纤维素膜于24℃，相对湿度40%以下，真空干燥2小时，铝箔袋密封，标明半成品批号，放置4℃保存；

(6)组装

①将PVC底板切成长8.2cm×宽8.0cm的条；

②在PVC底板表面，距左端2.3cm处粘贴长2.5cm的抗体固相NC膜，T线在左，C线在右；

③在PVC底板左端表面粘贴长2.4cm的玻璃纤维膜，玻璃纤维膜右端与固相抗体NC膜左端重叠0.1cm，再在玻璃纤维膜上粘附一层带白色MAX箭头胶带；

④在PVC底板右端表面粘贴长3.5cm的吸水纸，其左端与抗体固相NC膜右端重叠0.1cm，再在吸水纸上粘附一层蓝色胶带；

⑤用切条机切成宽约4.0mm~5.0mm的试纸条，在装配区将切好的试纸条合并0.5g干燥剂一包放入包装袋内。

3、权利要求1或2所述兔出血症病毒胶体金检测试纸条的检测方法，包括：

将随机抽取的试纸条插入检测样品中，室温下作用5~15min，阳性反应出现上、下两条玫瑰红线，即下端检测线T线和上端质控线C线，T线显示该样品中含有兔出血症病毒；阴性反应只在质控线C线出现一条玫瑰红线。

4、权利要求1或2所述兔出血症病毒胶体金检测试纸条在制备兔出血症诊断试剂盒方面的应用。

## 兔出血症病毒胶体金检测试纸条

### 技术领域

本实用新型涉及兔出血症病毒（RHDV）胶体金检测试纸条，属于胶体金免疫检测技术领域。

### 背景技术

兔出血症（RHD），又称兔瘟，是由兔出血症病毒（RHDV）引起的一种以急性、高度传染性、大面积死亡为特征的兔传染病，感染兔通常48~72 h死亡，主要特征为传染性极强、呼吸系统出血、肝坏死、脏器水肿、淤血和出血等变化，给全世界养兔业造成了巨大的经济损失。国际兽医局将该病列为B类传染病，我国农业部96号令颁布为二类疫病。

目前，检测 RHDV 的常用方法有血凝试验（HA）、免疫扩散法、荧光抗体法、酶联免疫吸附法（ELISA）、电镜观察法、RT-PCR 法。在临床检测中，上述几种方法对该病毒的诊断均具有一定的意义。HA、免疫扩散法方便快捷，但敏感性较低，不适宜于微量病毒的检测。ELISA、荧光抗体法较为成熟，但易出现非特异性。电镜观察法直观，但费用昂贵。RT-PCR 法敏感、快速，但费用昂贵而且有设备限制。迄今为止，还未见有 RHDV 免疫胶体金试纸条方法建立的报道。胶体金免疫试纸条与其他诊断方法相比较，体现出以下特点：①快捷迅速，可在 5~15min 内显示结果；②灵敏准确，结果受外因影响较小，可在养殖场现场进行检测；③操作简单，不需要任何特殊仪器和设备，尤其适合在基层推广应用；④成本低廉，所需样本和试剂量少；⑤保存和运输方便，一般保存于 4℃冰箱，甚至可常温保存；⑥安全稳定，胶体金无毒性，不造成环境污染，其胶体金颗粒与抗原是物理吸附不改变抗原的性质，可最大限度的保持抗原的活性。因此，研制 RHDV 胶体金试纸条能更直观地诊断兔出血症，为该病的检测、检疫提供良好的工具。

### 发明内容

**技术问题** 本发明的目的是以单克隆抗体为基础，通过免疫胶体金标记技术研制一种操作简单、成本低廉、快捷迅速的检测兔出血症病毒的胶体金检测试纸条。

**技术方案** 本发明是以单克隆抗体为基础，通过免疫胶体金标记技术研制检测兔出血症病毒的胶体金检测试纸条。首先是 RHDV 单克隆抗体的制备与纯化，RHDV 多克隆抗体的制备与纯化及胶体金标记，其次为划膜，然后将试纸条各组成成分进行组装，最后对试纸条的特异性、敏感性、重复性、再现性、稳定性进行试验，最终制备检测兔出血症病毒的试纸条。

兔出血症病毒胶体金检测试纸条，其特征是，

由底板(7)、吸水纸(5)、胶体金-RHDV 多克隆抗体结合物玻璃纤维膜(2)、抗体固相硝

酸纤维素膜（简称 NC 膜）（6）、蓝色胶带（4）、白色 MAX 箭头胶带（1）组成；

底板（7）一端表面粘贴胶体金-RHDV 多抗结合物玻璃纤维膜（2），长 2.4cm；抗体固相硝酸纤维素膜（NC 膜）（6），长 2.5cm，粘贴在底板（7）表面中间段，此 NC 膜一端与玻璃纤维膜（2）重叠 0.1cm（3），另一端与吸水纸（5）重叠 0.1cm（3）；底板（7）另一端表面粘贴吸水纸（5），长 3.5cm；

抗体固相硝酸纤维素膜（NC 膜）（6）上划有一条 RHDV 单克隆抗体检测线 T 线和一条羊抗兔 IgG 质控线 C 线。

上述兔出血症病毒胶体金检测试纸条的制备方法，包括：

#### (1)RHDV 单克隆抗体的制备及测定

复苏 RHDV 单克隆抗体（简称单抗）杂交瘤细胞株 A3C，培养至对数生长期，将  $10^6$  个杂交瘤细胞注射到已用石蜡油致敏一周的小鼠腹腔，当小鼠腹部极度膨胀且行动迟缓时抽取腹水，离心，弃去脂肪，再用辛酸-硫酸铵法纯化，利用核酸蛋白分析仪测得纯化单抗浓度为 5.73mg/mL，间接 ELISA 方法测定该抗体效价为  $30 \log 2$ ；

#### (2)RHDV 多克隆抗体制备及测定

常规方法制备 RHDV 多克隆抗体（简称多抗），多抗血凝抑制效价为  $12 \log 2$ 。用 DEAE-纤维素层析柱纯化多克隆抗体 IgG，利用核酸蛋白分析仪测得浓度为 7.00mg/mL，纯化的多克隆抗体血凝抑制效价为  $11 \log 2$ ；

#### (3)胶体金-抗体结合物的制备和纯化

①取调到最佳 pH7.4 的胶体金溶液 20mL，在磁力搅拌下，缓慢加入 0.6 mL 浓度为 1mg/mL 的 RHDV 多抗，在室温下搅拌 30 分钟；

②加质量体积比 10%BSA（牛血清白蛋白）0.8mL，室温搅拌 5 分钟；

③加质量体积比 10%PEG（聚乙二醇 20000）0.4mL，室温搅拌 5 分钟；

④9000~11000r/min，离心 40~60 分钟，弃去上清；

⑤沉淀溶于 2mL 胶体金-抗体保存液中，用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，以上所得到的溶液为胶体金-抗体结合物原液，置 4 $^{\circ}$ C 保存备用，其中胶体金-抗体保存液配制方法为：四硼酸钠，0.1g；BSA，0.25g；NaN<sub>3</sub>，0.025g，加超纯水溶解后，用 6N HCl 调 pH 至 7.4，补超纯水至 250mL，再用 0.45 $\mu$ m 微孔滤器过滤，4 $^{\circ}$ C 保存备用，有效期 6 个月。

#### (4)胶体金-抗体结合物玻璃纤维膜的制备

①将制备好的胶体金-抗体结合物原液 1mL，加工作液 3mL 稀释成 1:4 的使用浓度获得胶体金-抗体结合物稀释液，其中工作液配制方法为：NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O，6.10g；NaCl，8.50g；PVP40，5.00g；硼酸，2.10g；PEG(MW4000)，1.00g；10%BSA，

50ml;  $\text{NaN}_3$ , 0.20g, 加超纯水溶解后, 用 6N HCl 调 pH 至 7.0~7.5, 补超纯水至 1000ml, 再用 0.45 $\mu\text{m}$  微孔滤器过滤, 4 $^\circ\text{C}$  保存备用, 有效期 6 个月;

②把玻璃纤维膜剪成 2.4cm $\times$ 8cm/条;

③将剪好的玻璃纤维膜放在平坦干净的玻璃板上, 取 1.4ml 胶体金-抗体结合物稀释液, 加在玻璃纤维膜上, 使玻璃纤维膜浸透, 然后置 37 $^\circ\text{C}$  烘干, 置 4 $^\circ\text{C}$  保存备用;

(5)硝酸纤维素膜的制备

选择型号为 whatman Prima 40 的 NC 膜, 将浓度为 2.0mg/ml RHDV 单抗溶液装入划膜机喷头划检测线 T 线, T 线划在长 2.5cm $\times$ 宽 8.0cm NC 膜左侧 1.1cm 的位置上, 将浓度为 1.0mg/ml 的羊抗兔 IgG 装入划膜机另一喷头划质控线 C 线, C 线划在 NC 膜左侧 1.6cm 的位置上, 检测线与质控线的距离为 0.45cm, 参数均为 1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$  喷在硝酸纤维素膜上;

将已喷好的硝酸纤维素膜于 24 $^\circ\text{C}$ , 相对湿度 40%以下, 真空干燥 2 小时, 铝箔袋密封, 标明半成品批号, 放置 4 $^\circ\text{C}$  保存;

(6)组装

①将 PVC 底板切成长 8.2cm $\times$ 宽 8.0cm 的条;

②在 PVC 底板表面, 距左端 2.3cm 处粘贴抗体固相 NC 膜 (长 2.5cm), T 线在左, C 线在右;

③在 PVC 底板左端表面粘贴玻璃纤维膜 (长 2.4cm), 玻璃纤维膜右端与固相抗体 NC 膜左端重叠 0.1cm, 再在玻璃纤维膜上粘附一层带白色 MAX 箭头胶带;

④在 PVC 底板右端表面粘贴吸水纸 (长 3.5cm), 其左端与抗体固相 NC 膜右端重叠 0.1cm, 再在吸水纸上粘附一层蓝色胶带;

⑤用切条机切成宽 4.0mm~5.0mm 的试纸条, 在装配区将切好的试纸条合并 0.5g 干燥剂一包放入包装袋内。

兔出血症病毒胶体金检测试纸条的检测方法, 包括:

将随机抽取的试纸条插入样品中, 室温下作用 5~15min, 阳性反应出现上下两条玫瑰红线, 即下端检测线 T 线和上端质控线 C 线, T 线显示该样品中含有兔出血症病毒; 阴性反应只在质控线 C 线出现一条玫瑰红线。

### 有益效果

本发明的特点和优点如下: 本发明使用的兔出血症病毒单克隆抗体特异性好、效价高, 有利于增强该试纸条的特异性, 降低其使用成本; 由于使用抗体作为基本试剂, 生物安全性好, 不存在试纸条扩散兔出血症病毒的潜在危险; 胶体金免疫试纸条与其他诊断方法相比较, 体现出以下特点: 快捷迅速、操作简单、成本低廉、保存和运输方便, 另外,

该方法灵敏准确，结果受外因影响较小，可在养殖场现场进行检测；安全稳定，胶体金无毒性，不造成环境污染，其胶体金颗粒与抗原是物理吸附不改变抗原的性质，可最大限度的保持抗原的活性。因此，研制 RHDV 胶体金试纸条能更直观地诊断 RHD，为兔出血症病毒的检验、检疫提供良好的工具。

试验证明，本发明研制的兔出血症病毒单克隆抗体特异性好、效价高，可以作为 RHDV 多种检测方法的重要试剂。试验结果显示，该试纸条具有特异性强、敏感性高、稳定性好，同时具备可重复性和再现性等优点。

#### 附图说明

##### 图 1 胶体金试纸条纵向剖面

1. 白色胶带 (MAX 箭头); 2. 玻璃纤维素膜 (内含胶体金-兔多克隆抗体结合物);
3. NC 膜重叠部分 (分别约 0.1cm); 4. 蓝色胶带; 5. 吸水纸; 6. 硝酸纤维膜 (NC 膜, 2.5cm);
7. PVC 底板; 8. 样品流动方向; T. 检测线 (RHDV 单克隆抗体); C. 质控线 (羊抗兔 IgG)

##### 图 2 胶体金试纸条俯视图

##### 图 3 试纸条结果判定

##### 图 4 试纸条的特异性检测效果

1. RHDV 样品; 2. 兔大肠杆菌样品; 3. 兔波氏杆菌样品; 4. 阴性对照

##### 图 5 试纸条的敏感性检测效果

1. RHDV 样品的 HA 效价为  $7 \log 2$ ; 2. HA 效价为  $6 \log 2$ ; 3. HA 效价为  $5 \log 2$ ; 4. HA 效价为  $4 \log 2$
5. HA 效价为  $3 \log 2$ ; 6. HA 效价为  $2 \log 2$ ; 7. HA 效价为  $\log 2$ ; 8. 阴性对照

杂交瘤细胞株 A3C, 于 2009 年 3 月 24 日宝藏于中国典型培养物保藏中心 CCTCC, 地址: 武汉 武汉大学 邮编: 430072, 保藏编号为 CCTCC-C200921。

#### 具体实施方式

本发明采用的具体技术路线的步骤:

##### 一、RHDV 单克隆抗体制备及测定

###### 1、RHDV 单克隆抗体制备

复苏 RHDV 单克隆抗体 (简称单抗) 杂交瘤细胞株 A3C。杂交瘤细胞株 A3C, 于 2009 年 3 月 24 日宝藏于中国典型培养物保藏中心 CCTCC, 地址: 武汉 武汉大学 邮编: 430072, 保藏编号为 CCTCC-C200921。培养至对数生长期, 将  $10^6$  个杂交瘤细胞注射到已用石蜡油致敏一周的 BALB/c 小鼠腹腔, 当小鼠腹部极度膨胀且行动迟缓时抽取腹水, 离心, 弃去脂肪。

###### 2、RHDV 单克隆抗体的纯化

辛酸-硫酸铵法纯化 RHDV 单抗: (1) 取 RHDV 单抗腹水 5mL, 除掉表层脂质; (2) 用 20mL, 60mmol/L 的醋酸钠-醋酸缓冲液稀释, 并用 0.1mol/L 的氢氧化钠调混合液 pH 至 4.5; (3)

将辛酸逐滴缓慢加入单抗腹水中,边加边搅拌,以每毫升腹水25 $\mu$ L辛酸计算,加完后继续搅拌30min;(4)8000r/min离心30min,取上清按体积比10:1与0.01mol/L PBS混合,用0.1mol/L的氢氧化钠调pH至7.4;(5)加入硫酸铵(每升混合液加入硫酸铵0.227g),搅拌30min后,6000r/min,离心15min;(6)弃上清,将沉淀用适量PBS溶解后吸出并装入透析袋内,于4 $^{\circ}$ C条件下,用100倍体积的PBS透析24h,期间换液3~4次;(7)取出透析袋,吸出蛋白溶液,在4 $^{\circ}$ C条件下,以4000r/min,离心15min,取上清即为纯化产物,分装后于-20 $^{\circ}$ C保存。

利用核酸蛋白分析仪测得纯化单抗浓度为5.73mg/mL,间接ELISA方法测定该抗体效价为 $30 \log_2$ 。

## 二、RHDV多克隆抗体制备、测定和胶体金标记

### 1、RHDV多克隆抗体制备、测定

常规方法(孙敬方,动物实验方法学.北京,人民卫生出版社,2001,379-381)制备RHDV多克隆抗体(简称,多抗),多抗血凝抑制效价为 $12 \log_2$ 。用DEAE-纤维素层析柱纯化多克隆抗体IgG,利用核酸蛋白分析仪测得浓度为7.00mg/mL,纯化的多克隆抗体血凝抑制效价为 $11 \log_2$ ;

### 2、RHDV多克隆抗体胶体金标记和纯化

#### 2.1 RHDV多克隆抗体与胶体金结合的最佳pH确定

用胶体金梯度法确定抗体与胶体金结合的最佳pH值:

①取9支小玻璃试管,分别加入1mL制备好的胶体金溶液(20nm,上海捷宁生物科技有限公司购买);

②用0.2M碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH分别调为7.0、7.2、7.5、7.8、8.0、8.2、8.5、9.0、9.5;

③取50 $\mu$ L 1.0mg/mL的兔RHDV多克隆抗体IgG加入上述装有胶体金的试管中,震荡20min后室温放置20min;

④然后每管分别加入100 $\mu$ L 10%NaCl溶液,震荡混合20min后,室温放置20min;

⑤观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低pH;

⑥再将pH调为梯度最低pH $\pm$ 0.1;重复上述实验。记录仍保持红色的最低pH,即为最佳pH。实验结果显示,RHDV多克隆抗体与胶体金结合的最佳pH为7.4。

#### 2.2 RHDV多克隆抗体与胶体金结合的最佳浓度确定

①将待标抗体溶液以4 $^{\circ}$ C,3000r/min,离心35min,去除多余的盐离子及蛋白残物;

②取 10 支小玻璃试管，分别加入 1.0mL 调到最佳 pH 胶体金溶液（20nm, 上海捷宁生物科技有限公司购买）；

③将 RHDV 多抗用 0.01M pH7.4 PB 稀释液（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2.9g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.3g; 加超纯水定容至 1000mL）分别稀释成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，各取 1.0 mL 按顺序加入上述小试管中，对照管加 1.0mL PB 稀释液，混匀；

④放置 5 分钟后，在每一小试管中加入 10% NaCl 溶液 0.1mL，混匀，室温静置 1~2 小时，观察结果；

⑤观察小试管颜色变化，对照管和加入蛋白质的量不足以稳定胶体金的各管，呈现由红变蓝的聚沉现象，而加入的蛋白量达到或超过最低稳定量的试管则保持红色不变，找出胶体金液由红变蓝的交界管，其所含的蛋白量即为稳定 1.0mL 胶体金所需的最小蛋白量。实际胶体金探针制备工作中，加入的抗体量往往为最小蛋白量的 120%~130%。

实验结果显示，兔 RHDV 多克隆抗体与胶体金结合的最小浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，结合的最佳浓度定为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.3 胶体金-抗体结合物的制备和纯化

①取调到 pH 为 7.4 的胶体金溶液 20mL（20nm, 上海捷宁生物科技有限公司购买），在磁力搅拌下，缓慢加入 0.6 mL 的兔瘟多抗（浓度为 1mg/mL），在室温下搅拌 30 分钟；

②胶体金-抗体结合物的稳定性检定：实验组：取 1mL 胶体金-抗体结合物液于小玻璃试管中，再加入 10% NaCl 溶液 1mL。对照组：取 1mL 调到最佳 pH 胶体金溶液于小玻璃试管中，再加入 10% NaCl 溶液 1mL。观察结果：对照组加入 10% NaCl 溶液后产生蓝色沉淀；实验组加入 10% NaCl 溶液后仍为无沉淀的紫红色液体。说明加入的 RHDV 多抗量合适。

③加 10%BSA 0.8mL（终浓度 0.4%），室温搅拌 5 分钟；

④加 10%PEG 0.4mL（终浓度 0.2%），室温搅拌 5 分钟；

⑤9000~11000r/min, 离心 40~60 分钟，弃去上清；

⑥沉淀溶于 2mL 胶体金-抗体保存液（四硼酸钠, 0.1g; BSA 0.25g;  $\text{NaN}_3$ , 0.025g; pH 7.4, 补超纯水至 250mL）中，用 0.45 $\mu\text{m}$  滤膜过滤，以上所得到的溶液为胶体金-抗体结合物原液，置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 三、试纸条各组成部分的制备及组装

### 1、试纸条各组成部分的制备

### 1.1 胶体金-抗体结合物玻璃纤维膜的制备

①将制备好的胶体金-抗体结合物原液 1mL, 加工作液 3mL 稀释成 1:4 的使用浓度, 获得胶体金-抗体结合物稀释液;

②把玻璃纤维膜(型号: Ahlstrom 8964, 上海捷宁生物科技有限公司购买)剪成 2.4cm × 8cm/条;

③将剪好的玻璃纤维膜放在平坦干净的玻璃板上, 取 1.4mL 胶体金-抗体结合物稀释液, 均匀地加在玻璃纤维膜上, 使玻璃纤维膜浸透, 然后置 37℃ 烘干, 置 4℃ 保存备用。

### 1.2 硝酸纤维素膜的确定

对比 5 种不同型号 NC 膜的跑板功能; 胶体金溶液在其上流动过程中的均匀程度、滞后度、背景残留程度与最终消退情况; 检测时试纸条的显色清晰度、流动速度、流动均匀度等情况, 选择能达到最佳平衡的型号为 whatman Prima 40 的 NC 膜。

### 1.3 检测线(T线)及质控线(C线)条件的优化

对 NC 膜上 T 线及 C 线设置几个抗体浓度梯度, 选择出最优的一组作为 RHDV 单抗浓度(T线)和羊抗兔 IgG 浓度(C线)。结果显示, RHDV 单抗浓度(T线)为 2.0mg/mL 和羊抗兔 IgG 浓度(C线)为 1.0mg/mL。

### 1.4 T线及C线的划膜方法

将纯化好的 RHDV 单抗和羊抗兔 IgG 用固相溶液 (pH8.0 0.01M PB;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1.74g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.44g) 分别稀释至终浓度为 2.0mg/mL 和 1.0mg/mL。将稀释好的 RHDV 单抗溶液装入划膜机(型号: HM3230; 厂家: 上海金标生物科技有限公司)喷头 2 (划检测线(T线)), 固定在距 NC 膜(宽 8.0cm × 长 2.5cm)左边缘 1.1cm 的位置上, 稀释好的羊抗兔 IgG 装入划膜机(型号: HM3230; 厂家: 上海金标生物科技有限公司)喷头 1 (划质控线(C线)), 固定在距硝酸纤维素膜左边缘 1.6cm 的位置上。质控线与检测线的距离为 4.5mm, 参数均为 1.0μL/cm 喷在硝酸纤维素膜上。

将已喷好的硝酸纤维素膜于 24℃, 相对湿度 40% 以下, 真空干燥 2 小时, 经检查外观、长度和干燥情况等, 合格后铝箔袋密封, 标明半成品批号, 放置 4℃ 保存。

## 2、组装

①将 PVC 底板(型号: J-B8, 上海捷宁生物科技有限公司购买)切成长 8.2cm × 宽 8.0cm 的条;

②在 PVC 底板表面, 距左端 2.3cm 处粘贴抗体固相 NC 膜(长 2.5cm, 型号: whatman Prima 40, 上海捷宁生物科技有限公司购买), T 线在左, C 线在右;

③在 PVC 底板左端表面粘贴玻璃纤维膜(长 2.4cm, 型号: Ahlstrom 8964, 上海捷

宁生物科技有限公司购买), 玻璃纤维膜右端与固相抗体 NC 膜左端重叠 0.1cm, 再在玻璃纤维膜上粘附一层带白色 MAX 箭头胶带 (又称 MAX 线标贴, 型号: P-03, 上海捷宁生物科技有限公司购买);

④在 PVC 底板右端表面粘贴吸水纸 (长 3.5cm, 型号: H-8, 上海捷宁生物科技有限公司购买), 吸水纸左端与抗体固相 NC 膜右端重叠 0.1cm, 再在吸水纸上粘附一层蓝色胶带 (又称, 色皮标签, 型号: 蓝色, 上海捷宁生物科技有限公司购买);

⑤用切条机切成宽 4.0mm~5.0mm 的试纸条, 在装配区将切好的试纸条合并 0.5g 干燥剂一包放入包装袋内。

#### 四、结果判定

将随机抽取的试纸条浸泡在 (不可超过箭头线) 待检肝脏样品中, 室温下作用 5~15min。阳性反应出现上、下两条玫瑰红线, 即下端检测线 T 线和上端质控线 C 线, T 线显示该样品中含有兔出血症病毒; 阴性反应只在质控线 C 线出现一条玫瑰红线, C 线必须呈玫瑰红色, 否则该试纸条无效。

#### 五、试纸条的特异性、敏感性、重复性、再现性、稳定性试验

##### 1、试纸条的特异性试验

用兔的常见病菌, 兔的大肠杆菌 (徐为中等, 应用微量凝集法检测家兔大肠杆菌抗体水平的试验. 江苏农业科学, 2002, 1: 54~55) 和波氏杆菌 (范志宇等, 新西兰白兔支气管败血波氏杆菌的分离与鉴定, 中国比较医学杂志, 2007, 17 (5): 278~282) 代替 RHDV 肝脏样品, 对试纸条的特异性进行测定。检测结果显示, RHDV 胶体金试纸条不与兔的其他常见病菌 (大肠杆菌和波氏杆菌) 发生交叉反应。

##### 2、试纸条的敏感性试验

分别检测 HA 效价为  $7 \log 2$ 、 $6 \log 2$ 、 $5 \log 2$ 、 $4 \log 2$ 、 $3 \log 2$ 、 $2 \log 2$ 、 $\log 2$ 、0 的含 RHDV 的肝脏组织液, 对试纸条的敏感性进行测定。检测结果显示, 试纸条的敏感性高于红细胞凝集试验。

##### 3、重复性试验

###### ①试纸条的批内重复性测试

选取在 4℃ 保存的同一批组装好的胶体金试纸条, 每天检测一次三个不同 HA 效价的 RHDV 肝脏样品 (设 3 个重复), 连续 7 天。通过检测试纸条的显色变化来确定试纸条的重复性。实验结果显示, 批内重复的变异系数为 2.5%。

## ②试纸条的批间重复性测试

选取保存于 4℃ 的 3 个不同批次制做的胶体金试纸条，选定在同一时间，同时检测同一 RHDV 肝脏样品（设 3 个重复）。然后通过检测试纸条的显色变化来确定试纸条的重复性。实验结果显示，批间重复的变异系数为 4.7%。

## 4、试纸条的再现性试验

将同一批次的试纸条由不同的人员在同一实验室和同一人员在不同的实验室进行操作，通过试纸条显色效果来确定试纸条的再现性，结果显示，该试纸条具有再现性。

## 5、试纸条的稳定性试验

将同一批次的试纸条分别用塑料袋及铝箔密封，加干燥剂于 4℃、-20℃、室温保存和在 37℃ 做加速破坏试验，在不同的保存期与新制备的试剂条插入同一 RHDV 阴、阳性肝脏样品中进行测定，通过检测试纸条显色的变化来确定试纸条的稳定性。

实验结果显示，同一批次的试纸条于 4℃ 保存 6 个月的期间，每周测定的结果显色条带的颜色均很清晰，说明试纸条在 4℃ 可保存 6 个月以上，还在继续检测；同一批次的试纸条于 -20℃ 保存 6 个月的期间，分别每半个月检测一次，迄今为止试纸条还没出现显色强度有所下降的变化，还在继续检测；同一批次的试纸条于 37℃ 破坏试验期间，每天都进行试纸条的检测，在第 12 天时试纸条颜色的强度有所降低。说明试纸条在 37℃ 可保存 11 天半，相当于 2~8℃ 存放 17 个月左右，稳定性符合国家所规定的指标。

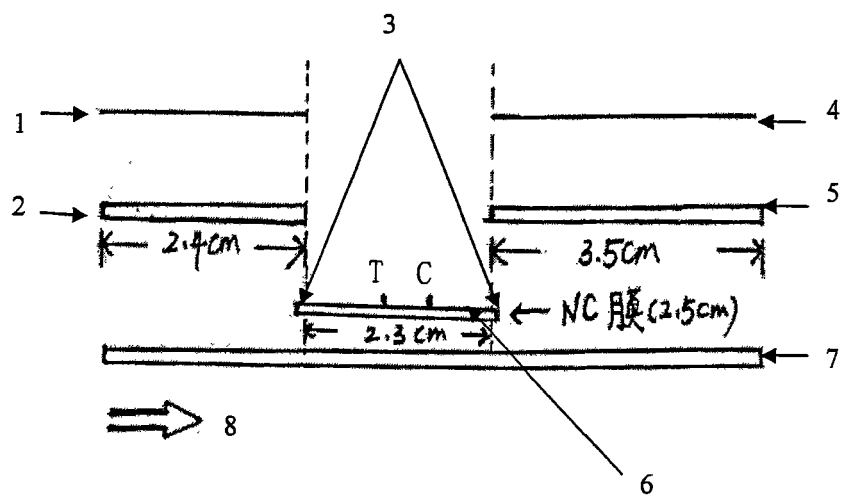


图1

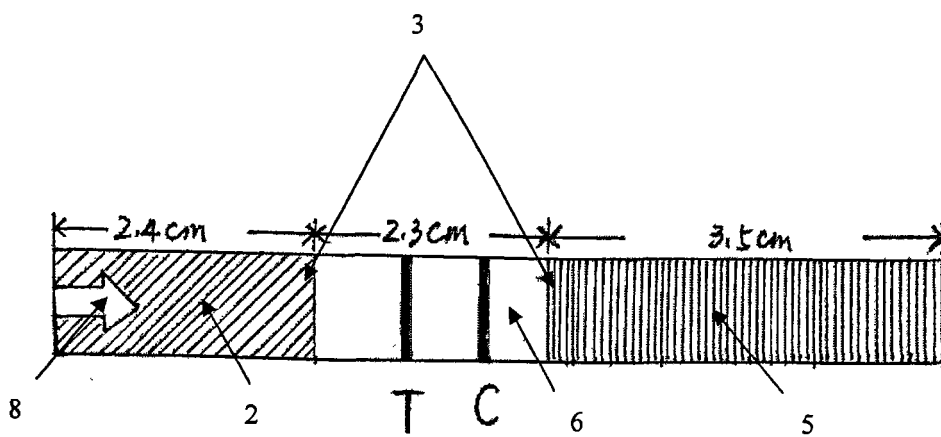


图2

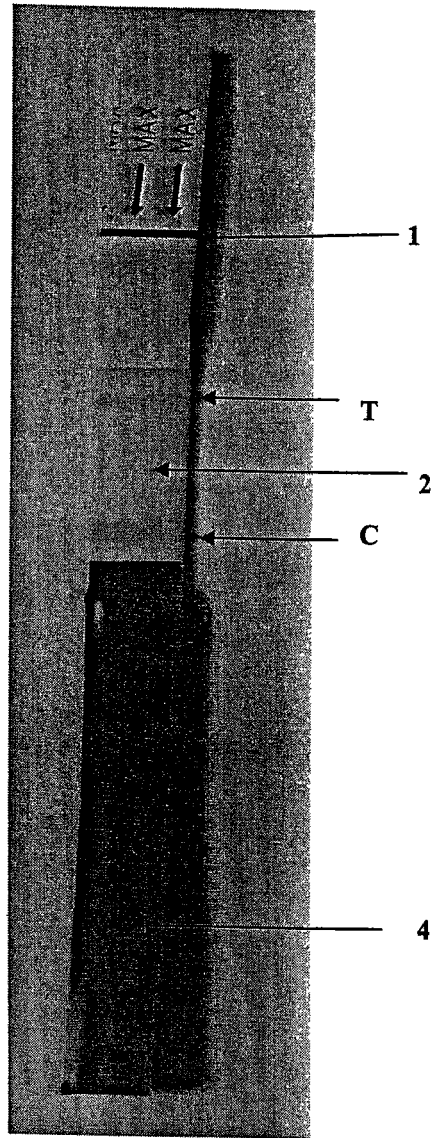


图3

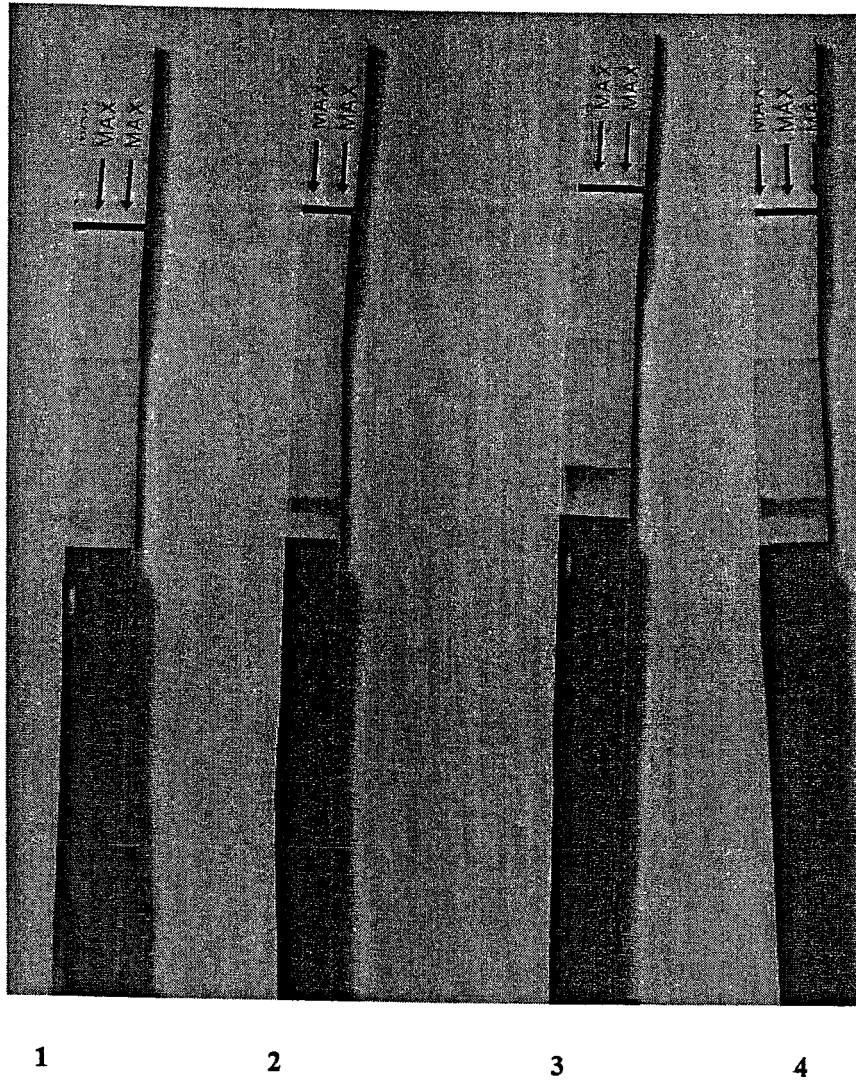


图 4

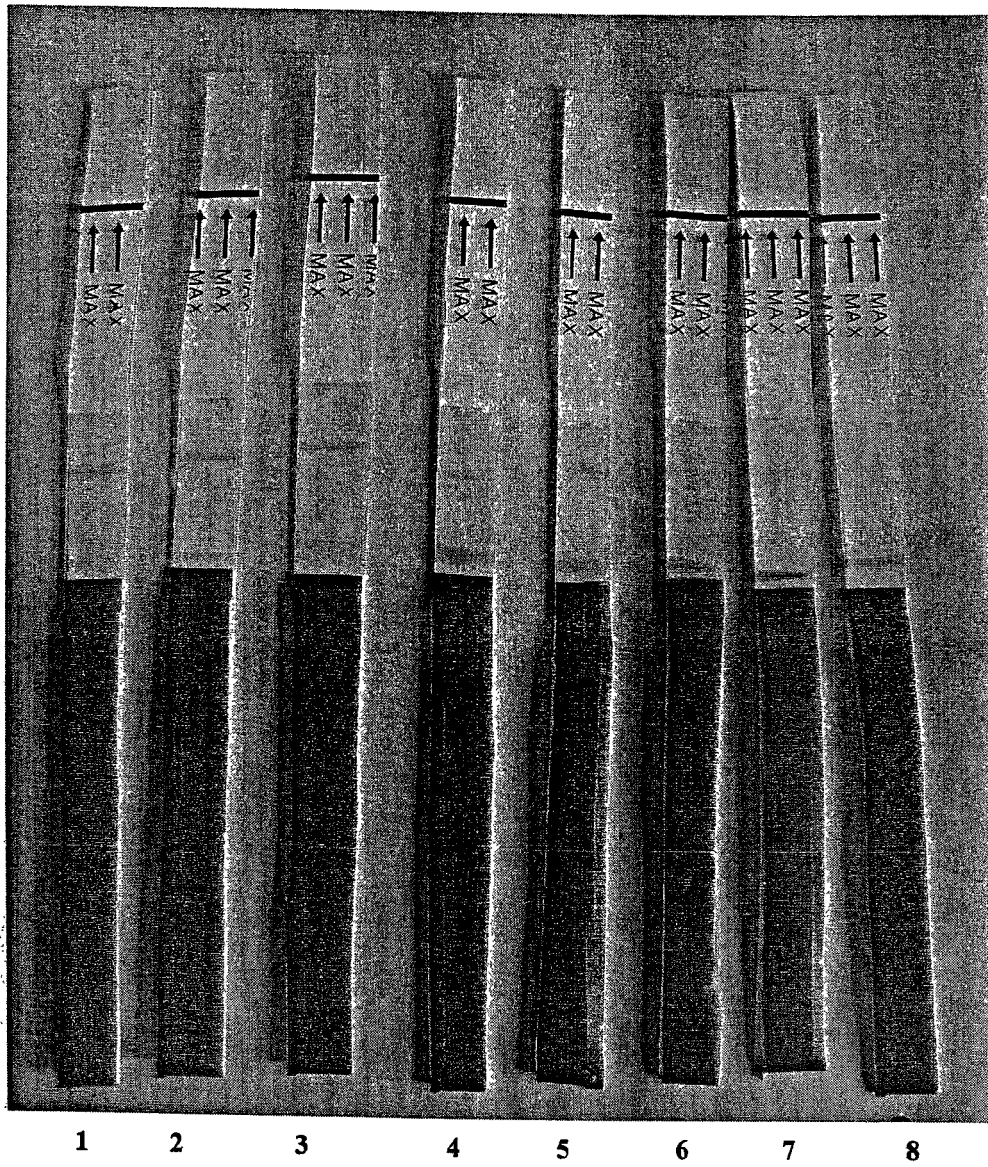


图 5

专利名称(译)	兔出血症病毒胶体金检测试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN101520459A</a>	公开(公告)日	2009-09-02
申请号	CN200910029628.3	申请日	2009-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	王芳 李超美 胡波 范志宇 蔡少平 徐为中 张则斌 何孔旺		
发明人	王芳 李超美 胡波 范志宇 蔡少平 徐为中 张则斌 何孔旺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/552 G01N33/532		
代理人(译)	张素卿		
其他公开文献	CN101520459B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种兔出血症病毒(RHDV)胶体金检测试纸条，属于胶体金免疫检测技术领域。试纸条底板一端为胶体金 - RHDV多克隆抗体结合物玻璃纤维膜，抗体固相硝酸纤维素膜位于中间，其上划有一条RHDV单抗检测线T线和一条羊抗兔IgG质控线C线，底板另一端为吸水纸。当被检样品中带RHDV时，RHDV可与胶体标记的抗RHDV多克隆抗体发生特异结合而被抗RHDV单克隆抗体识别，即发生双抗夹心特异结合，因而可检测样品中是否含有RHDV。本发明可以提供应用单克隆抗体、多克隆抗体建立的RHDV免疫学检测方法，该方法具有快速、准确、方便等优点，尤其适合现场检测和初筛检验，具有广阔的前景。

