



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110007081 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201910324838.9

(22)申请日 2019.04.22

(71)申请人 贵州省畜牧兽医研究所

地址 550005 贵州省贵阳市南明区小碧乡老里坡

(72)发明人 王璇 文正常 吴巧彤 潘淑惠

(74)专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100

代理人 李余江 程新敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

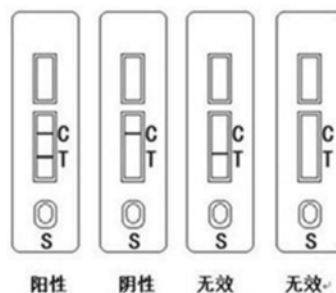
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法,包括用羊肺炎支原体BNCC126187株RPS11基因质粒重组纯化抗原为免疫抗原,制备羊支原体肺炎特异性单克隆抗体;经胶体金颗粒单克隆抗体蛋白标记、纯化、质量鉴定及条件优化,建立羊支原体肺炎胶体金免疫层析检测方法;将得到的鼠RPS11单克隆抗体与胶体金探针结合在玻璃纤维膜上,与固相NC膜组装得到金标检测试纸条。本发明研制的金标诊断检测试纸条对羊支原体肺炎的诊断检测具有快速、灵敏、特异及操作简便的良好特性,为羊支原体肺炎的早期诊断检测及流行病学调查工作开展奠定了良好的技术基础。



1. 一种羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法,其特征在于:用羊肺炎支原体BNCC126187株RPS11基因质粒重组纯化抗原为免疫抗原,制备羊支原体肺炎特异性单克隆抗体;经胶体金颗粒单克隆抗体蛋白标记、纯化、质量鉴定及条件优化,建立羊支原体肺炎胶体金免疫层析检测方法;将得到的鼠RPS11单克隆抗体与胶体金探针结合在玻璃纤维膜上,与固相NC膜组装得到金标检测试纸条。

2. 根据权利要求1所述的羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法,其特征在于:所述羊支原体肺炎特异性单克隆抗体制备方法包括如下步骤:

S1,动物免疫:将纯化的pET28a-RPS11重组蛋白作为免疫抗原对雌性小鼠进行皮下多点注射,经3次免疫后小鼠静脉采血,收集血清包被后,用间接ELISA法检测血清抗体效价,并选择性加强免疫;

S2,间接ELISA检测方法的建立与免疫效价检测:用纯化的pET28a-RPS11重组纯化蛋白作为抗原,按常规方法建立间接ELISA;通过方阵滴定,确定抗原包被浓度以及阳性血清的最佳稀释度,对免疫小鼠进行血清效价检测;

S3,细胞融合:摘除眼球处死小鼠,并收集阳性对照血,取出脾脏,制备成单细胞悬液,然后取出处于对数期的SP2/0细胞处理后,与脾细胞以一定比例混合,50%PEG1450作用后,以基础培养基DMEM稀释终止,低速离心后,再用含胎牛血清的HAT培养基轻轻悬浮并混匀,培养、观察和记录细胞生长情况;

S4,杂交瘤细胞的筛选与克隆:将SP2/0细胞与免疫小鼠脾脏细胞杂交融合并换液,在显微镜下观察,当融合细胞长至培养孔底面积10%时,吸取上清,用间接ELISA酶标板筛选确定出阳性孔后,按有限稀释法连续亚克隆直至阳性率达100%;细胞定株后扩大培养选用胎牛血清培养基,当细胞密度达到设定值时,离心处理、收集沉淀并冻存;

S5,单克隆抗体小鼠腹水的制备:选择小鼠先用液体石蜡行小鼠腹腔注射,一周后将杂交瘤细胞经PBS重悬后接种到小鼠腹腔中,待小鼠腹部膨大后采集腹水,收集腹水离心,准备纯化;

S6,单克隆抗体的纯化:用足够的起始缓冲液平衡Protein G-琼脂糖亲和层析柱;取待纯化的样品上柱,洗涤,收集洗脱液;纯化的单克隆抗体用SDS-PAGE鉴定其纯度。

3. 根据权利要求1所述的羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法,其特征在于:胶体金免疫层析方法的建立包括如下步骤:

S11,胶体金溶液的制备:取HAuCl₄水溶液加热煮沸,加入枸橼酸三钠水溶液煮沸至橙红色,制备成胶体金颗粒溶液;

S12,胶体金标记蛋白的制备:取若干小玻璃试管,分别加入制备好的胶体金溶液,用碳酸钾溶液将胶体金溶液的PH分别调为梯度植,取RPS11标记单抗溶液加入上述胶体金管中,混匀后室温放置,然后每管分别加入NaCl溶液,混匀,室温静置,观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低PH;再将PH调为梯度最低PH±0.1;重复上述试验;记录仍保持红色的最低PH,即为最适PH;

S13,标记抗体最适量的选择:采用蛋白梯度法确定RPS11标记单克隆抗体与胶体金结合的最适浓度;

S14,胶体金探针的制备和纯化:将最适PH胶体金溶液加入RPS11标记单克隆抗体,在室温下电磁搅拌,制得胶体金-抗体结合物溶液,将BSA加入制得的胶体金-抗体结合物溶液

中,室温搅拌,离心,吸出上清,将沉淀物溶于BSA的PB液中重悬,滤膜过滤,保存备用;

S15,胶体金-抗体结合物原液工作浓度的确定和金标垫的制备:用工作液将胶体金-抗体结合物原液按不同比例进行稀释,取胶体金-抗体结合物稀释液,均匀地加在玻璃纤维膜上,烤干,即为金标垫,测试后确定胶体金标记抗体的最适工作浓度;

S16,不同型号硝酸纤维素膜的选择:选择几种不同型号的NC膜,通过包括跑板功能测试、胶体金溶液在不同型号NC膜上流动性、滞后度和背景残留的测试和NC膜的重新选择测试在内的试验,确定最适型号的NC膜;

S17,检测线及质控线条件的建立和优化:将NC膜上T线及C线的包被抗体设置几个浓度梯度,选择显色效果最优的一组作为RPS11单克隆抗体使用浓度T线和羊抗鼠IgG抗体使用浓度C线;

S18,T线及C线的点膜:用PBS将鼠RPS11单克隆抗体和羊抗鼠IgG抗体分别稀释至所需浓度,用划膜机在NC膜上点膜;喷好的NC膜置烤干干燥。

4.根据权利要求1所述的羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法,其特征在于:金标检测试纸条的组装包括如下步骤:将PVC底板切条,在PVC底板中间粘贴抗体固相NC膜,在PVC底板下端粘贴玻璃纤维膜探针条带,并与固相抗体NC膜部分重叠,然后在下端粘贴样本垫与探针条带部分重叠,在PVC底板上端粘贴吸水纸,并与抗体固相NC膜部分重叠,切成试纸条。

羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及畜牧兽医技术领域,特别是一种羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法。

背景技术

[0002] 羊支原体肺炎(Mycoplasmal pneumonia of sheep and goats,MPSG)是由绵羊肺炎支原体(Mycoplasma ovipneumoniae,Movi)、丝状支原体山羊亚种(Mycoplasma mycoides subsp.Capri,Mmc)和山羊支原体山羊亚种(Mycoplasma capricolum subsp.Capricolum,Mcc)等支原体引起的在绵羊和山羊中流行普遍的接触性传染病(徐春光等,2014)。夏末和秋季,气温骤变或长途运输应激时较常发生和流行(陈怀涛,2004)。

[0003] 根据贵州省畜牧兽医研究所对贵州部分地区非免疫羊群的羊支原体肺炎血清学调查实验表明(文正常等,2011),羊支原体肺炎已成为一种影响贵州肉羊养殖的主要危害传染性疫病。该病为条件性传染性疫病,潜伏期较长,当临床症状明显时往往处于发病晚期,给治疗带来困难,临床发病羊只多为预后不良,加之生产上盲目使用药物导致的药物抑制给病原分离诊断带来困难。

[0004] 目前,贵州肉羊专业规模化养殖相对滞后,大部分地区仍以农户小规模分散养殖为主,其分布主要在边远山区,无论从养殖设施条件、规范化养殖生产技术应用以及疫病特异性检测诊断技术设备和实验条件手段等,都难以满足现代养羊生产的技术需求。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为克服现有技术缺陷,提供一种羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法,包括用羊肺炎支原体BNCC126187株RPS11基因质粒重组纯化抗原为免疫抗原,制备羊支原体肺炎特异性单克隆抗体;经胶体金颗粒单克隆抗体蛋白标记、纯化、质量鉴定及条件优化,建立羊支原体肺炎胶体金免疫层析检测方法;将得到的鼠RPS11单克隆抗体与胶体金探针结合在玻璃纤维膜上,与固相NC膜组装得到金标检测试纸条。

[0008] 其中,前述的羊支原体肺炎特异性单克隆抗体制备方法包括如下步骤:

[0009] S1,动物免疫:将纯化的pET28a-RPS11重组蛋白作为免疫抗原对雌性小鼠进行皮下多点注射,经3次免疫后小鼠静脉采血,收集血清包被后,用间接ELISA法检测血清抗体效价,并选择性加强免疫;

[0010] S2,间接ELISA检测方法的建立与免疫效价检测:用纯化的pET28a-RPS11重组纯化蛋白作为抗原,按常规方法建立间接ELISA;通过方阵滴定,确定抗原包被浓度以及阳性血清的最佳稀释度,对免疫小鼠进行血清效价检测;

[0011] S3,细胞融合:摘除眼球处死小鼠,并收集阳性对照血,取出脾脏,制备成单细胞悬

液,然后取出处于对数期的SP2/0细胞处理后,与脾细胞以一定比例混合,50%PEG1450作用后,以基础培养基DMEM稀释终止,低速离心后,再用含胎牛血清的HAT培养基轻轻悬浮并混匀,培养、观察和记录细胞生长情况;

[0012] S4,杂交瘤细胞的筛选与克隆:将SP2/0细胞与免疫小鼠脾脏细胞杂交融合并换液,在显微镜下观察,当融合细胞长至培养孔底面积10%时,吸取上清,用间接ELISA酶标板筛选确定出阳性孔后,按有限稀释法连续亚克隆直至阳性率达100%;细胞定株后扩大培养选用胎牛血清培养基,当细胞密度达到设定值时,离心处理、收集沉淀并冻存;

[0013] S5,单克隆抗体小鼠腹水的制备:选择小鼠先用液体石蜡行小鼠腹腔注射,一周后将杂交瘤细胞经PBS重悬后接种到小鼠腹腔中,待小鼠腹部膨大后采集腹水,收集腹水离心,准备纯化;

[0014] S6,单克隆抗体的纯化:用足够的起始缓冲液平衡Protein G-琼脂糖亲和层析柱;取待纯化的样品上柱,洗涤,收集洗脱液;纯化的单克隆抗体用SDS-PAGE鉴定其纯度。

[0015] 进一步的,胶体金免疫层析方法的建立包括如下步骤:

[0016] S11,胶体金溶液的制备:取 HAuCl_4 水溶液加热煮沸,加入枸橼酸三钠水溶液煮沸至橙红色,制备成胶体金颗粒溶液;

[0017] S12,胶体金标记蛋白的制备:取若干小玻璃试管,分别加入制备好的胶体金溶液,用碳酸钾溶液将胶体金溶液的PH分别调为梯度植,取RPS11标记单抗溶液加入上述胶体金管中,混匀后室温放置,然后每管分别加入NaCl溶液,混匀,室温静置,观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低PH;再将PH调为梯度最低PH ± 0.1 ;重复上述试验;记录仍保持红色的最低PH,即为最适PH;

[0018] S13,标记抗体最适量的选择:采用蛋白梯度法确定RPS11标记单克隆抗体与胶体金结合的最适浓度;

[0019] S14,胶体金探针的制备和纯化:将最适PH胶体金溶液加入RPS11标记单克隆抗体,在室温下电磁搅拌,制得胶体金-抗体结合物溶液,将BSA加入制得的胶体金-抗体结合物溶液中,室温搅拌,离心,吸出上清,将沉淀物溶于BSA的PB液中重悬,滤膜过滤,保存备用;

[0020] S15,胶体金-抗体结合物原液工作浓度的确定和金标垫的制备:用工作液将胶体金-抗体结合物原液按不同比例进行稀释,取胶体金-抗体结合物稀释液,均匀地加在玻璃纤维膜上,烤干,即为金标垫,测试后确定胶体金标记抗体的最适工作浓度;

[0021] S16,不同型号硝酸纤维素膜的选择:选择几种不同型号的NC膜,通过包括跑板功能测试、胶体金溶液在不同型号NC膜上流动性、滞后度和背景残留的测试和NC膜的重新选择测试在内的试验,确定最适型号的NC膜;

[0022] S17,检测线及质控线条件的建立和优化:将NC膜上T线及C线的包被抗体设置几个浓度梯度,选择显色效果最优的一组作为RPS11单克隆抗体使用浓度T线和羊抗鼠IgG抗体使用浓度C线;

[0023] S18,T线及C线的点膜:用PBS将鼠RPS11单克隆抗体和羊抗鼠IgG抗体分别稀释至所需浓度,用划膜机在NC膜上点膜;喷好的NC膜置烤干干燥。

[0024] 进一步的,金标检测试纸条的组装包括如下步骤:将PVC底板切条,在PVC底板中间粘贴抗体固相NC膜,在PVC底板下端粘贴玻璃纤维膜探针条带,并与固相抗体NC膜部分重叠,然后在下端粘贴样本垫与探针条带部分重叠,在PVC底板上端粘贴吸水纸,并与抗体固

相NC膜部分重叠,切成试纸条。

[0025] 本发明研制的金标诊断检测试纸条对羊支原体肺炎的诊断检测具有快速、灵敏、特异及操作简便的良好特性,为羊支原体肺炎的早期诊断检测及流行病学调查工作开展奠定了良好的技术基础。

附图说明

[0026] 图1是胶体金试纸条的测试结果判定;

[0027] 图2是试纸条检测结果判定。

具体实施方式

[0028] 下面通过实例对本发明进一步具体描述。本发明设计的思想或同类物质的简单替代属于本发明的保护范围。下述方法中所涉及配料或材料,如无特殊说明,均为商业途径可获得。相关实验方法中如无特殊说明的均为本技术领域现有常规方法。其中的数值或数值比例,如无标注,均指质量数值或质量比例。

[0029] 实施例1:

[0030] 1材料与amp;方法

[0031] 1.1试验动物与重组蛋白抗原

[0032] 6周龄BALB/c雌性小鼠(中国武汉)购自湖北省实验动物研究中心,等级SPF级,许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。

[0033] 抗原为羊肺炎支原体RPS11基因重组质粒经大肠杆菌菌株表达系统表达纯化的pET28a-RPS11纯化蛋白,抗原表位集中区重组蛋白分子质量为19kDa,重组蛋白纯度>85%。由贵州省畜牧兽医研究所畜禽疫病研究室制备保存。

[0034] 1.2待检抗原与主要试剂

[0035] 猪肺炎支原体、鸡滑液支原体、大肠杆菌、沙门氏菌及链球菌(中国青岛)购自青岛立见生物公司;阴性山羊血清(中国广州)购自广州蕊特生物科技有限公司;羊支原体肺炎红细胞凝集检测试剂(中国兰州)购自兰州兽医研究所。

[0036] PEG1450购自MERCK(德国);培养基DMEM购自Thermo(美国);HAT,G,弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂均购自Sigma(美国);酶标二抗(Rabbit Anti-Rat whole IgG)购自Jackson(美国);Glutamine(Gln)谷氨酰胺、Penicillin-Streptomycin Solution(青链双抗)、亲和层析柱料、PBS-T、封闭液、显色液等均为市售半成品,由实验室配制合成;SP2/0骨髓瘤细胞为武汉金开瑞生物工程有限公司冻存。稳定剂为5%的胎牛血清(BSA)和1%聚乙二醇(分子量20KD),由实验室制备。

[0037] 1.3单克隆抗体的制备

[0038] 1.3.1动物免疫 将纯化的pET28a-RPS11重组蛋白作为免疫抗原对6周龄SPF级BALB/c雌性小鼠进行皮下多点注射,50μg(抗原)/只。初次免疫时使用弗氏完全佐剂,体积按照(抗原+PBS):完全佐剂=1:1的比例进行;首免14d后,使用弗氏不完全佐剂,以相同免疫剂量及途径进行二免;2周后进行三免,剂量与方法同二免。经3次免疫后小鼠静脉采血,一次取血量在20~30μL左右,37℃放置可10min,3200×g离心10min,然后收集血清,1μg/mL的浓度包被;用间接ELISA法检测血清抗体效价,选择血清效价较高小鼠腹腔加强免疫(四

免)。

[0039] 1.3.2间接ELISA检测方法的建立与免疫效价检测 用纯化的pET28a-RPS11重组纯化蛋白作为抗原,按常规方法建立间接ELISA。通过方阵滴定,确定抗原包被浓度以及阳性血清的最佳稀释度,对免疫小鼠进行血清效价检测。

[0040] 1.3.3细胞融合 末次冲击3d后,摘除眼球处死小鼠,并收集阳性对照血,取出脾脏,制备成单细胞悬液,然后取出处于对数期的SP2/0细胞处理后,与脾细胞以一定比例混合(1:5~1:10),50%PEG1450作用1min,以基础培养基DMEM稀释终止,低速离心后,再用含20%胎牛血清的HAT培养基轻轻悬浮并混匀,按照 2×10^7 /板铺至预先准备好的饲养层细胞板里,置于5%CO₂,37℃下培养。观察和记录细胞生长情况。

[0041] 1.3.4杂交瘤细胞的筛选与克隆 将SP2/0细胞与免疫小鼠脾脏细胞杂交融合后5d开始换液,隔3d换1次液,在显微镜下观察,当融合细胞长至培养孔底面积10%时,吸取上清,用间接ELISA酶标板筛选确定出阳性孔后,按有限稀释法连续亚克隆3次,直至阳性率达100%。细胞定株后扩大培养选用10%胎牛血清培养基,当细胞密度达到以 $(1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6)$ /mL时,128×g离心,收集沉淀并冻存。

[0042] 1.3.5单克隆抗体小鼠腹水的制备 选择8周龄BALB/c小鼠先用液体石蜡行小鼠腹腔注射,一周后将杂交瘤细胞(细胞数量达到 1×10^7)经PBS重悬后接种到小鼠腹腔中,7~10d待小鼠腹部膨大后采集腹水,收集腹水1800×g离心5min,准备纯化。

[0043] 1.3.6单克隆抗体的纯化 用足够的起始缓冲液(8~10mL)平衡Protein G-琼脂糖亲和层析柱(HiTrap Protein G 1mL,Pharmacia Biotech)。取待纯化的样品(每毫升样品含蛋白10.2~21.1mg)15~25mL上柱,流速为0.5mL/min,然后以同样的流速依次用起始缓冲液7~8mL、洗脱缓冲液6~7mL、起始缓冲液5mL洗涤,每管1mL收集洗脱液;纯化的单克隆抗体用SDS-PAGE鉴定其纯度。

[0044] 1.4单克隆抗体的鉴定

[0045] 1.4.1腹水效价测定 分别将重组蛋白按20μg/mL包被浓度96孔板每孔50μL,4℃放置过夜;采用间接ELISA的操作方法,将腹水按1:1000被比稀释,依次加入到包被有抗原的酶标板中进行检测。

[0046] 1.4.2单克隆抗体的亚型鉴定应用兔抗小鼠Ig类型的标准血清,取其杂交瘤细胞培养上清分别进行抗体亚型鉴定,其鉴定按Hycult Biotech公司的抗体亚型鉴定试剂盒中的说明书进行操作。

[0047] 1.5胶体金免疫层析方法的建立

[0048] 1.5.1胶体金溶液的制备 取0.01%HAuCl₄水溶液100mL加热煮沸,加入1%枸橼酸三钠水溶液2.5mL煮沸至橙红色,制备成20nm的胶体金颗粒溶液。

[0049] 1.5.2胶体金标记蛋白的制备 取9支小玻璃试管,分别加入1mL制备好的胶体金溶液,用0.2mol/L碳酸钾溶液将胶体金溶液的PH分别调为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0和9.5,取50μL 1mg/mL的RPS11标记单抗溶液加入上述胶体金管中,混匀后室温放20min,然后每管分别加入100μL 10%NaCl溶液,混匀,室温静置1~2h,观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低PH。再将PH调为梯度最低PH±0.1;重复上述试验。记录仍保持红色的最低PH,即为最适PH。

[0050] 1.5.3标记抗体最适量的选择 采用蛋白梯度法确定RPS11标记单克隆抗体与胶体

金结合的最适浓度。具体操作为：取10支小玻璃试管，分别加入1mL调到最适PH胶体金溶液，将RPS11标记单克隆抗体用纯化水稀释成1mg/mL，各取0、5、10、20、30、40、60、80 μ L按顺序加入上述小试管中混匀，放置10min后，在每一小试管中加入0.1mL 10%NaCl水溶液，室温混匀静置2h，观察结果。未加入蛋白质对照管和加入蛋白质的量不足以稳定胶体金的试管，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仍保持红色不变。稳定1mL胶体金溶液红色不变的最低蛋白质用量所需的最小蛋白量，即为标记蛋白的最低用量。

[0051] 1.5.4胶体金探针的制备和纯化 将最适PH胶体金溶液20mL加入RPS11标记单克隆抗体，在室温下电磁搅拌30min，制得胶体金—抗体结合物溶液，将10%BSA 2mL加入制得的胶体金—抗体结合物溶液中（终浓度0.4%），室温搅拌10min，20000 \times g离心40~60min，仔细吸出上清，将沉淀物溶于2mL1%BSA的PB液中重悬，用0.45 μ m滤膜过滤，用0.45 μ m滤膜过滤，4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0052] 1.5.5胶体金—抗体结合物原液工作浓度的确定和金标垫的制备 用工作液将胶体金—抗体结合物原液按1:2、1:4、1:8与1:16进行稀释，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，置37 $^{\circ}$ C烤干，即为金标垫，测试后确定胶体金标记抗体的最适工作浓度。

[0053] 1.5.6不同型号硝酸纤维素膜的选择 选择几种不同型号的NC膜，通过跑板功能测试、胶体金溶液在不同型号NC膜上流动性、滞后度和背景残留的测试和NC膜的重新选择测试等试验，确定最适型号的NC膜。

[0054] 1.5.7检测线(T线)及质控线(C线)条件的建立和优化 将NC膜上T线及C线的包被抗体设置几个浓度梯度，选择显色效果最优的一组作为RPS11单克隆抗体使用浓度(T线)和羊抗鼠IgG抗体使用浓度(C线)。

[0055] 1.5.8T线及C线的点膜 用0.01mol/L PH8.0PBS将鼠RPS11单克隆抗体和羊抗鼠IgG抗体分别稀释至所需浓度，用划膜机在NC膜上点膜。T线与C线的距离为0.5cm，参数均为1 μ L/cm，喷好的NC膜置37~45 $^{\circ}$ C烤干干燥8h以上。

[0056] 1.6胶体金试纸条的组装和结果判定

[0057] 1.6.1组装 将PVC底板切成2.8mm \times 6cm的条，在PVC底板中间粘贴抗体固相NC膜，距离上段1.5cm，在PVC底板下端（即靠近NC膜的T线端）粘贴玻璃纤维膜探针条带，并与固相抗体NC膜重叠0.1cm，然后在下端粘贴1.7cm宽样本垫（玻璃纤维膜）与探针条带重叠0.1~0.2cm，在PVC底板上端（即靠近NC膜的C线端）粘贴1.7cm宽的吸水纸，并与抗体固相NC膜重叠0.1~0.2cm，切成2.8mm宽的试纸条。

[0058] 1.6.2结果判定 将随机抽取的试纸条检测卡，向加样孔中滴加60 μ L处理好的待检样品，室温下反应15min。观察结果，阳性反应出现上下2条红色条带，阴性反应只在C线出现1条红色条带。C线必须显色，否则说明该试纸条无效（图1）。

[0059] 1.7胶体金试纸条的应用

[0060] 从特异性和重复性对试纸条进行评估。并将180份临床血清样品用试纸条和羊支原体肺炎间接血凝检测试剂进行检测，比较两种方法的符合率。

[0061] 2结果与分析

[0062] 2.1单克隆抗体的制备与鉴定

[0063] 2.1.1单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建 以纯化的RPS11重组蛋白免疫Balb/c小鼠,经效价检测结果显示,免疫效价超过1:128000,满足细胞融合条件。杂交瘤细胞融合试验结果表明,融合率为80%以上。选择7个阳性值较高的阳性孔进行3次亚克隆,共获得2株能够稳定分泌抗RPS11重组蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为3G9和1B6。挑取单克隆进行扩大培养,每传2代检测一次,至二十代以上仍呈强阳性反应。杂交瘤细胞株经1个月连续传代,冻存1个月后复苏培养,2个细胞株仍具有分泌单克隆抗体的能力,且抗体水平稳定。经克隆化建株并扩大培养后接种于小鼠体内生产腹水。用纯化的RPS11重组蛋白包被20 μ g/mL包被酶标板,每孔50 μ L。将倍比稀释法稀释的腹水作为一抗进行间接ELISA检测,结果显示3G9和1B6株杂交瘤细胞株诱生的小鼠腹水测定单克隆抗体的效价均高于10⁵。亚型检测鉴定结果显示:选定的2株杂交瘤细胞3G9和1B6均为单一亚型IgG1;WB检测细胞上清结果显示2株细胞在预期大小均有条带。

[0064] 2.1.2单克隆抗体的特异性 ELISA特异性检测试验结果显示,获得的2株单克隆抗体只与RPS11重组蛋白抗原呈反应阳性,而与其他比较菌株抗原蛋白无交叉反应,表明获得的单克隆抗体具有较高的特异性。

[0065] 2.2胶体金免疫层析方法的建立

[0066] 2.2.1胶体金标记的最适PH确定 经胶体金梯度法试验确定鼠RPS11单克隆抗体与胶体金结合的最适PH为7.4。

[0067] 2.2.2抗体最适标记量的确定 经蛋白梯度法试验显示,鼠RPS11单克隆抗体稳定1mL胶体金所需的最小抗体量为10 μ g/mL。

[0068] 2.2.3胶体金探针的制备和纯化 在1mL胶体金-抗体结合物溶液中加入10%NaCl水溶液1mL后,溶液仍为无沉淀的紫红色液体,说明制得的胶体金-抗体结合物原液具有良好的稳定性。

[0069] 2.2.4胶体金-抗体结合物原液工作浓度的确定和金标垫的制备 经试验测试结果显示,当胶体金-抗体结合物原液的工作浓度为1:4时,制得的金标垫检测效果最佳。

[0070] 2.2.5NC膜型号的选择 通过跑板功能测试、层析性能测试和重新选择试验综合评定后,NC膜型号为赛多利斯CN140。

[0071] 2.2.6检测线(T线)及质控线(C线)条件的建立和优化 对NC膜上T线及C线的包被抗体设置几个浓度梯度进行试验,结果表明,检测显色效果最优的一组浓度为:鼠RPS11单克隆抗体(T线上)工作浓度2mg/mL,羊抗鼠IgG抗体(C线上)工作浓度为1mg/mL。

[0072] 2.3胶体金试纸条的组装和结果判定

[0073] 随机抽取试纸条,对标准RPS11阴性样品和标准阳性样品进行检测,结果显示,标准RPS11阴性样品仅在C线出现一条玫瑰红线;检测结果显示,标准RPS11阳性样品出现T线、C线2条玫瑰红线,说明制备的试纸条有效(图2)。

[0074] 2.4胶体金试纸条的应用

[0075] 2.4.1试纸条的特异性 分别用猪肺炎支原体、鸡滑液支原体、大肠杆菌、沙门氏菌及链球菌代替羊支原体肺炎支原体,对试纸条特异性进行测定,结果显示,猪肺炎支原体、鸡滑液支原体、大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌和标准羊支原体肺炎阴性样品仅在C线出现1条玫瑰红线;标准羊支原体肺炎阳性样品出现T线、C线2条玫瑰红线,说明羊支原体肺炎RPS11单抗胶体金试纸条不与猪肺炎支原体、鸡滑液支原体、大肠杆菌、沙门氏菌及链球菌发生交

叉反应。

[0076] 2.4.2试纸条的重复性 4批次试纸条检测5份羊支原体肺炎阴性样品和羊支原体肺炎阳性样品,每个样品重复检测10次,检测结果完全一致,不同批次间、同一批次内检测结果完全一致。

[0077] 2.4.3试纸条的临床应用 应用建立的胶体金试纸条和间接血凝检测方法分别对180份生产场临床血清样本进行检测(表1)。结果表明,胶体金试纸条检测阳性率为35.00%,阴性率为65.00%;红细胞凝集试验阳性率为29.44%,阴性率为70.56%;两者间阳性符合率为94.34%,阴性符合率为89.76%,总符合率达91.11%。

[0078] 表1 180份临床血清胶体金试纸条与HA试验检测结果

[0079]

检测方法 Detection methods		HA 试验 HA test		
		+	-	合计 Total
胶体金试纸条 Colloidal gold strip	+	50	13	63
	-	3	114	117
合计 Total		53	127	180

[0080] 本发明建立的羊支原体肺炎胶体金检测试纸条,具有较好的检测特异性,与羊支原体肺炎红细胞凝集试验方法相比,两者符合率达91.11%。本发明制备的鼠RPS11标记单克隆抗体免疫抗原为羊支原体肺炎基因重组质粒pET28a-RPS11纯化蛋白,具有较强的诱导和增强宿主免疫应答的功能。制备的鼠RPS11标记单克隆抗体与常规抗体相比较,具有单一的特异性,可与羊肺炎支原体选择性RPS11基因抗原决定簇发生特异性反应,且重复性较好。试验制备的胶体金检测诊断试剂,生产实际操作中,不需要特殊检测仪器,特别适合广大的基层兽医人员用于羊支原体肺炎的诊断及批量检测工作。当然,以上只是本发明的具体应用范例,本发明还有其他的实施方式,凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案,均落在本发明所要求的保护范围之内。

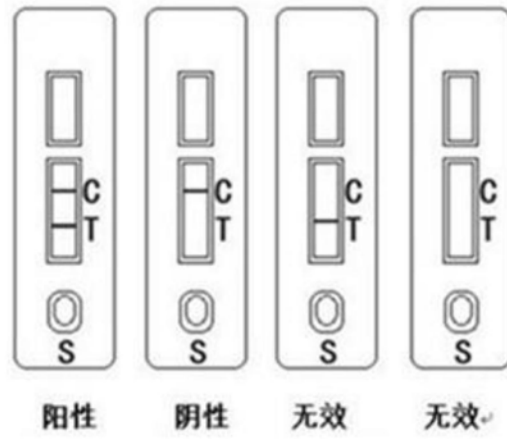


图1



图2

专利名称(译)	羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法		
公开(公告)号	CN110007081A	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201910324838.9	申请日	2019-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	贵州省畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	贵州省畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	贵州省畜牧兽医研究所		
[标]发明人	王璇 文正常 吴琦彤 潘淑惠		
发明人	王璇 文正常 吴琦彤 潘淑惠		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56933 G01N33/577 G01N33/58		
代理人(译)	李余江		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种羊支原体肺炎免疫胶体金标记快速诊断试纸制备方法，包括用羊肺炎支原体BNCC126187株RPS11基因质粒重组纯化抗原为免疫抗原，制备羊支原体肺炎特异性单克隆抗体；经胶体金颗粒单克隆抗体蛋白标记、纯化、质量鉴定及条件优化，建立羊支原体肺炎胶体金免疫层析检测方法；将得到的鼠RPS11单克隆抗体与胶体金探针结合在玻璃纤维膜上，与固相NC膜组装得到金标检测试纸条。本发明研制的金标诊断检测试纸条对羊支原体肺炎的诊断检测具有快速、灵敏、特异及操作简便的良好特性，为羊支原体肺炎的早期诊断检测及流行病学调查工作开展奠定了良好的技术基础。

