



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956980 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810308427.6

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2018.04.09

(71)申请人 新乡学院

地址 453003 河南省新乡市金穗大道191号

(72)发明人 李鹏 王选年 冯春花 王利平
岳锋 孙国鹏 张艳芳 朱艳平
张万方 王玲玲 武乐祎 任鹏举
王亚平

(74)专利代理机构 新乡市平原智汇知识产权代理事务所(普通合伙) 41139

代理人 路宽

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法。本发明的技术方案要点为：试纸条的底层为PVC板构成的支撑层，该支撑层上依次黏附有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，金标抗体结合垫上吸附有胶体金标记的多肽P25，硝酸纤维素膜上喷涂有兔抗鸡IgG溶液印制的检测线和新城疫病毒多肽P25表位抗体溶液印制的质控线，多肽P25的氨基酸序列为Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Leu Arg Met Ala。本发明还具体公开了该鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法。本发明的一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条检测快速且特异性强，便于在现场快速检测NDV抗体。

1. 一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:所述试纸条的底层为PVC板构成的支撑层,该支撑层上依次黏附有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,其中金标抗体结合垫上吸附有胶体金标记的多肽P25,硝酸纤维素膜上喷涂有兔抗鸡IgG溶液印制的检测线和新城疫病毒多肽P25表位抗体溶液印制的质控线,检测线和质控线之间的距离为5mm,多肽P25的氨基酸序列为Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Leu Arg Met Ala。

2. 根据权利要求1所述的一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:所述的样品垫和金标抗体结合垫的叠压宽度为2mm,金标抗体结合垫和硝酸纤维素膜的叠压宽度为2mm,吸收垫和硝酸纤维素膜的叠压宽度为2mm。

3. 一种权利要求1所述的一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法,其特征在于具体步骤为:

(1) 鸡新城疫病毒高免血清的制备

将新城疫病毒接种于鸡成纤维细胞,72h后收获新城疫病毒,用蔗糖梯度离心的方法纯化新城疫病毒,以1mg/mL的浓度肌肉注射给2周龄的小鸡,当出现临床症状时采集血清,用多肽P25通过ELISA方法检测抗体滴度,并将收集到的血清于56℃灭活30min,于-70℃保存备用;

(2) 多肽P25表位抗体的制备

根据SulfoLink® Immobilization Kit试剂盒将多肽P25稀释至500μg/mL并标记免疫亲和层析柱,将制备的鸡新城疫病毒高免血清通过免疫亲和层析柱,最后用洗脱液洗脱多肽P25表位抗体,重复2-3次,将收集到的多肽P25表位抗体于-20℃保存备用;

(3) 金标抗体结合垫的制备

向100mL pH=7.5的胶体金溶液中加入多肽P25溶液,混匀后,RT温育30min,加入10wt% BSA至其终浓度为1wt%,混匀后,RT孵育10min,4℃,12000r/min离心25min,弃上清,沉淀用10mL重悬液进行重悬,充分吹打后于4℃保存备用,其中重悬液包括20mM Na₂B₄O₇、1wt% BSA、2wt%蔗糖、0.1wt% Triton X-100和0.1wt% NaN₃,余量为去离子水;

(4) 硝酸纤维素膜的制备

将新城疫病毒多肽P25表位抗体和兔抗鸡IgG分别用PBS稀释到1mg/mL按1μL/cm均匀喷涂到硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线,检测线和质控线相距5mm位于硝酸纤维素膜的中心,室温自然干燥,封装后于4℃保存备用;

(5) 试纸条的组装

将胶体金标记多肽P25吸附于结合垫上得到金标抗体结合垫,再将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫按次序保持2mm的重叠宽度后粘贴至PVC板构成的支撑层上,然后裁切为宽度为4mm的长条状试纸条,再将试纸条装入试纸卡中,放入烘烤箱中干燥保存备用。

一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫层析试纸条的制备技术领域,具体涉及一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 新城疫 (Newcastle Disease) 是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的一种急性、热性、败血性和高触性禽类传染病,其发病率与死亡率都很高,严重危害着我国养禽业的发展。新城疫病毒属于副黏病毒科 (Paramyxoviridae)、禽腮腺炎病毒属,单股负链RNA病毒,有囊膜,其基因组全长为15186bp,编码6个结构蛋白,包括磷蛋白 (P)、核蛋白 (NP)、基质蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、大蛋白 (L) 以及血凝素-神经氨酸蛋白 (HN) 六种蛋白。血凝素-神经氨酸酶蛋白 (HN) 具有血凝素活性 (HA) 及神经酸氨酶活性 (NA) 并能协同F蛋白发挥作用,在病毒感染过程中,HN蛋白特异地识别宿主细胞表面唾液酸受体,这是病毒感染宿主细胞所必须的,并且能够诱导机体产生保护性免疫抗体。

[0003] 目前,常用的检测方法有血凝素反应 (hemagglutinin, HA)、血凝抑制反应 (hemagglutinin inhibition, HI)、酶联免疫吸附试验法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和实时定量PCR等检测方法,然而这些方法都比较耗时费力,需要实验室特殊的设备才能检测,并且不能及时地对鸡新城疫病毒的流行传播做出诊断,也不能及时地对是否具有鸡新城疫病毒抗体做出诊断。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题是提供了一种鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法,根据鸡新城疫病毒HN蛋白设计合成13条多肽,分别与鸡新城疫病毒临床抗体进行ELISA检测,筛选到多肽P25 (其氨基酸序列为TCPDEQDYQLRMA) 能够与鸡新城疫病毒发生特异性反应,将多肽P25标记胶体金后制备快速检测试纸条用于快速检测鸡新城疫病毒抗体。

[0005] 本发明为解决上述技术问题采用如下技术方案,一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:所述试纸条的底层为PVC板构成的支撑层,该支撑层上依次黏附有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,其中金标抗体结合垫上吸附有胶体金标记的多肽P25,硝酸纤维素膜上喷涂有兔抗鸡 IgG 溶液印制的检测线和新城疫病毒多肽P25表位抗体溶液印制的质控线,检测线和质控线之间的距离为5mm,多肽P25的氨基酸序列为Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Leu Arg Met Ala。

[0006] 进一步优选,所述的样品垫和金标抗体结合垫的叠压宽度为2mm,金标抗体结合垫和硝酸纤维素膜的叠压宽度为2mm,吸收垫和硝酸纤维素膜的叠压宽度为2mm。

[0007] 本发明所述的一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测

试纸条的制备方法,其特征在于具体步骤为:

[0008] (1) 鸡新城疫病毒高免血清的制备

[0009] 将新城疫病毒接种于鸡成纤维细胞,72h后收获新城疫病毒,用蔗糖梯度离心的方法纯化新城疫病毒,以1mg/mL的浓度肌肉注射给2周龄的小鸡,当出现临床症状时采集血清,用多肽P25通过ELISA方法检测抗体滴度,并将收集到的血清于56℃灭活30min,于-70℃保存备用;

[0010] (2) 多肽P25表位抗体的制备

[0011] 根据SulfoLink® Immobilization Kit试剂盒将多肽P25稀释至500μg/mL并标记免疫亲和层析柱,将制备的鸡新城疫病毒高免血清通过免疫亲和层析柱,最后用洗脱液洗脱多肽 P25表位抗体,重复2-3次,将收集到的多肽P25表位抗体于-20℃保存备用;

[0012] (3) 金标抗体结合垫的制备

[0013] 向100mL pH=7.5的胶体金溶液中加入多肽P25溶液,混匀后,RT温育30min,加入10wt%BSA至其终浓度为1wt%,混匀后,RT孵育10min,4℃,12000r/min离心25min,弃上清,沉淀用10mL重悬液进行重悬,充分吹打后于4℃保存备用,其中重悬液包括20mM Na₂B₄O₇、1wt%BSA、2wt%蔗糖、0.1wt%Triton X-100和0.1wt%NaN₃,余量为去离子水;

[0014] (4) 硝酸纤维素膜的制备

[0015] 将新城疫病毒多肽P25表位抗体和兔抗鸡IgG分别用PBS稀释到1mg/mL按1μL/cm均匀喷涂到硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线,检测线和质控线相距5mm位于硝酸纤维素膜的中心,室温自然干燥,封装后于4℃保存备用;

[0016] (5) 试纸条的组装

[0017] 将胶体金标记多肽P25吸附于结合垫上得到金标抗体结合垫,再将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫按次序保持2mm的重叠宽度后粘贴至PVC板构成的支撑层上,然后裁切为宽度为4mm的长条状试纸条,再将试纸条装入试纸卡中,放入烘烤箱中干燥保存备用。

[0018] 本发明与现有技术相比具有以下有益效果:采用胶体金标记的多肽P25成功制备了 NDV抗体快速检测试纸条,该NDV抗体快速检测试纸条显示出较高的灵敏度和特异性,与其它家禽疾病如IBDV和AIV无交叉反应性,与商品化ELISA试剂盒检测结果高度一致,达到97.22%。此外,NDV抗体快速检测试纸条能够在3-5min内检测NDV抗体,而不依赖于任何其它仪器或试剂,因此,便于在现场快速诊断NDV抗体。

附图说明

[0019] 图1是本发明一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条的结构示意图;

[0020] 图2是本发明一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条的检测示意图;

[0021] 图3是本发明一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条特异性检测图。

具体实施方式

[0022] 以下通过实施例对本发明的上述内容做进一步详细说明,但不应该将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实施例,凡基于本发明上述内容实现的技术均属于本发明的范围。

[0023] 实施例

[0024] 如图1所示,一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条,所述试纸条的底层为PVC板构成的支撑层,该支撑层上依次黏附有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,其中金标抗体结合垫上吸附有胶体金标记的多肽 P25,硝酸纤维素膜上喷涂有兔抗鸡 IgG溶液印制的检测线和新城疫病毒多肽P25表位抗体溶液印制的质控线,检测线和质控线之间的距离为5mm,多肽P25的氨基酸序列为Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Leu Arg Met Ala。

[0025] 一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法为:

[0026] (1) 鸡新城疫病毒高免血清的制备

[0027] 将新城疫病毒接种于鸡成纤维细胞,72h后收获新城疫病毒,用蔗糖梯度离心的方法纯化新城疫病毒,以1mg/mL的浓度肌肉注射给2周龄的小鸡,当出现临床症状时采集血清,用多肽P25通过ELISA方法检测抗体滴度,并将收集到的血清于56℃灭活30min,于-70℃保存备用;

[0028] (2) 多肽P25表位抗体的制备

[0029] 根据 SulfoLink® Immobilization Kit 试剂盒将多肽P25稀释至500μg/mL并标记免疫亲和层析柱,将制备的鸡新城疫病毒高免血清通过免疫亲和层析柱,最后用洗脱液洗脱多肽P25表位抗体,重复2-3次,将收集到的多肽P25表位抗体于-20℃保存备用;

[0030] (3) 金标抗体结合垫的制备

[0031] 向100mL pH=7.5的胶体金溶液中加入多肽P25溶液,混匀后,RT温育30min,缓慢加入10wt% BSA至其终浓度为1wt%,混匀后,RT孵育10min,4℃,12000r/min离心25min,弃上清,沉淀用10mL重悬液进行重悬,充分吹打后于4℃保存备用,其中重悬液包括20mM Na₂B₄O₇、1wt% BSA、2wt% 蔗糖、0.1wt% Triton X-100和0.1wt% NaN₃,余量为去离子水;

[0032] (4) 硝酸纤维素膜的制备

[0033] 将新城疫病毒多肽P25表位抗体和兔抗鸡 IgG分别用PBS稀释到1mg/mL按1μL/cm²均匀喷涂到硝酸纤维素膜上作为质控线和检测线,检测线和质控线相距5mm位于硝酸纤维素膜的中心,室温自然干燥,封装后于4℃保存备用;

[0034] (5) 试纸条的组装

[0035] 将胶体金标记多肽P25吸附于结合垫上得到金标抗体结合垫,再将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫按次序保持2mm的重叠宽度后粘贴至PVC板构成的支撑层上,然后裁切为宽度为4mm的长条状试纸条,再将试纸条装入试纸卡中,放入烘烤箱中干燥保存备用。

[0036] 免疫层析试纸检测原理如图2所示,用生理盐水稀释的待检血清样品滴至样品垫上后,在毛细作用下,从样品垫一端往吸收垫一端流动,若样品中含有NDV抗体,金标多肽P25 会与之结合形成抗体-抗原-胶体金复合物,形成的复合物在移动至检测线和质控线处时,样品中的NDV抗体与检测线上的兔抗鸡 IgG结合并形成一条红线即为检测线(T线),质控

线上的新城疫病毒多肽P25表位抗体则将会与金标多肽P25结合形成另一条红线即为质控线(C线)。由于阴性血清中不含有NDV抗体,因此检测线上的兔抗鸡IgG不能与抗体-抗原-胶体金复合物结合而拦截金标多肽P25,所以检测线处无条带,但是质控线上的新城疫病毒多肽P25表位抗体却能始终与金标多肽P25结合而形成一条红线,因此通过质控线能判断试纸条是否有效。

[0037] 试纸条的敏感性检测

[0038] 将NDV标准血清,按照1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400倍比稀释,用NDV抗体快速检测试纸进行检测,在滴加样品5-10min后读取结果。同时用NDV抗体商品化ELISA检测试剂盒,对以上血清进行检测。

[0039] 通过检测倍比稀释的阳性NDV血清,检测NDV快速检测试纸条的敏感性。同时运用NDV抗体商品化ELISA试剂盒检测,结果表明阳性血清稀释到1:51200后,试纸检测结果显示阳性,而商品化的ELISA试剂盒判断为可疑。表明试纸敏感性良好,与ELISA试剂盒相当。

[0040] 试纸条的特异性检测

[0041] 以NDV阳性抗体10份,NDV阴性抗体5份、禽流感病毒(AIV)抗体1份、鸡法氏囊病毒(IBDV)抗体1份,用PBS 1:100稀释后用NDV抗体快速检测试纸条检测,5-10min后,观察试纸检测结果。

[0042] 试纸检测NDV阳性血清10份,NDV阴性血清5份、禽流感病毒(AIV)抗体1份、鸡法氏囊病毒(IBDV)抗体1份,用PBS 1:100稀释后,用试纸条检测结果显示,能与NDV阳性血清反应,不与NDV阴性血清以及其他病毒感染的阳性血清反应,结果如图3所示,从左至右依次为NDV阳性血清、NDV阴性血清、AIV阳性血清和IBDV阳性血清。临床样品检测

[0043] 收集不同地区疑是感染NDV病毒病鸡血清36份,用PBS 1:100稀释后用NDV抗体快速检测试纸条检测,同时用商品化ELISA试剂盒检测,对比两种方法的符合率。

[0044] 将河南各地市鸡场采集的36份猪血清,PBS稀释1:100,用NDV抗体快速检测试纸条对其进行检测,同时用商品化ELISA试剂盒检测,检测结果见表1,结果表明试纸与ELISA有较高的符合率,为97.22% (35/36)。

[0045] 表1 NDV抗体临床检测结果

[0046]	Strip	ELISA	
		Positive	Negative
		Positive	1
	Negative	0	5

[0047] 新城疫是危害我国养禽业最严重的疫病之一,与高致病性禽流感并列为世界公认的最重要的2个禽类疫病。该病为OIE规定的必须报告的疾病,也是我国规定的一类动物疫病,世界各国对新城疫的防制和研究一直十分重视。HN蛋白是NDV病毒一种重要的多功能表面糖蛋白,由细胞质结构域、跨膜区、茎区和球状头组成,其中存在受体结合表位、神经氨酸酶活性位点和抗原表位。前期试验表明,新城疫病毒HN蛋白的多肽P25可以与NDV超免疫血清反应。

[0048] 本发明采用胶体金标记的多肽P25成功制备了NDV抗体快速检测试纸条,该NDV抗

体快速检测试纸条显示出较高的灵敏度和特异性,与其它家禽疾病如IBDV和AIV无交叉反应性,与商品化ELISA试剂盒检测结果高度一致,达到97.22%。此外,NDV抗体快速检测试纸条能够在3-5min内检测NDV抗体,而不依赖于任何其它仪器或试剂,因此,便于在现场快速诊断NDV抗体。

[0049] 以上实施例描述了本发明的基本原理、主要特征及优点,本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明原理的范围内,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进均落入本发明保护的范围内。

序列表

<110> 新乡学院

<120> 一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 1

Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Leu Arg Met Ala

1

5

10

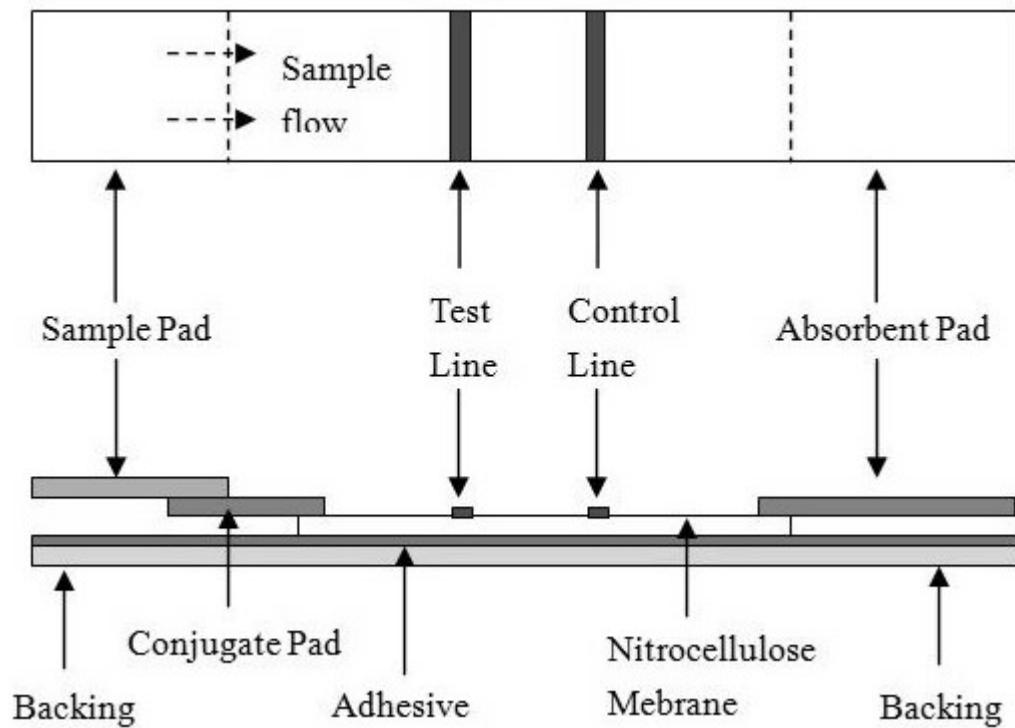


图1

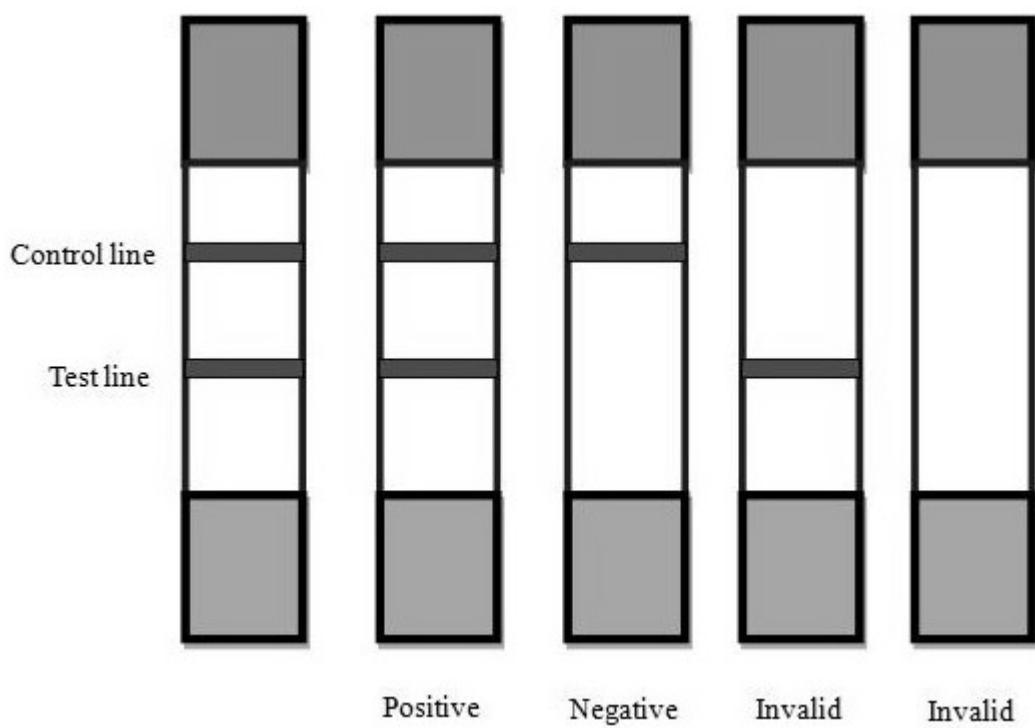


图2

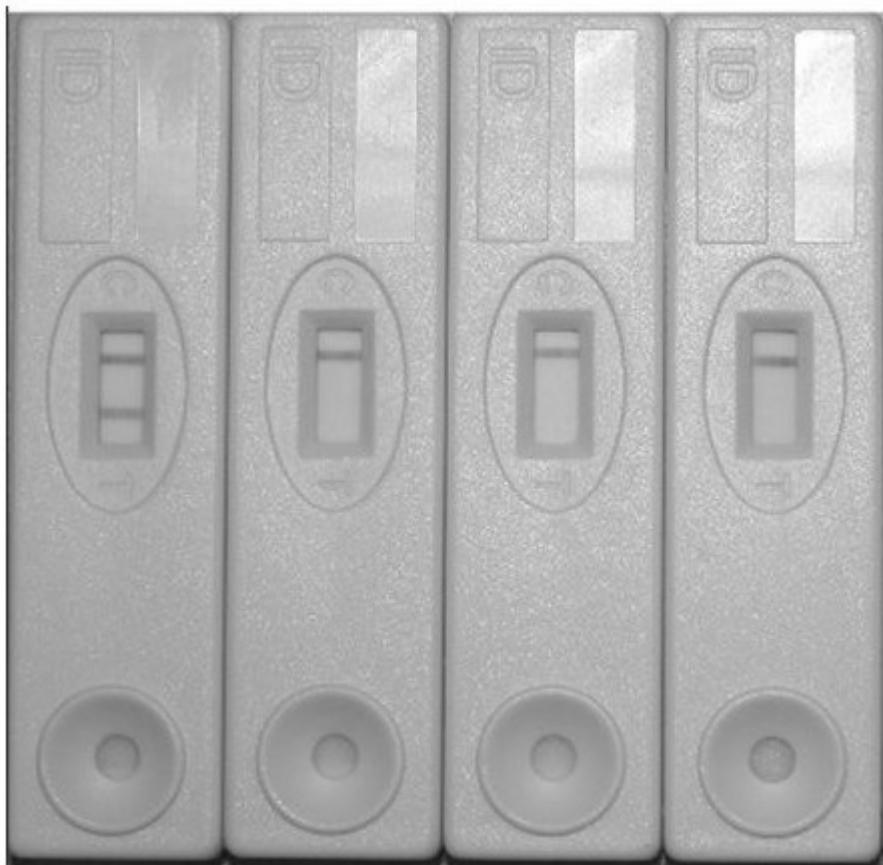


图3

专利名称(译)	一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN108956980A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810308427.6	申请日	2018-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	新乡学院		
申请(专利权)人(译)	新乡学院		
当前申请(专利权)人(译)	新乡学院		
[标]发明人	李鹏 王选年 冯春花 王利平 岳峰 孙国鹏 张艳芳 朱艳平 张万方 王玲玲 武乐祎 任鹏举 王亚平		
发明人	李鹏 王选年 冯春花 王利平 岳峰 孙国鹏 张艳芳 朱艳平 张万方 王玲玲 武乐祎 任鹏举 王亚平		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/68 G01N33/532 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/56983 G01N33/6854 G01N2333/465		
代理人(译)	路宽		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法。本发明的技术方案要点为：试纸条的底层为PVC板构成的支撑层，该支撑层上依次黏附有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，金标抗体结合垫上吸附有胶体金标记的多肽P25，硝酸纤维素膜上喷涂有兔抗鸡IgG溶液印制的检测线和新城疫病毒多肽P25表位抗体溶液印制的质控线，多肽P25的氨基酸序列为Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Leu Arg Met Ala。本发明还具体公开了该鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法。本发明的一种应用表位多肽建立的鸡新城疫病毒抗体免疫胶体金快速检测试纸条检测快速且特异性强，便于在现场快速检测NDV抗体。

