



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106596930 A

(43) 申请公布日 2017. 04. 26

(21) 申请号 201510662526. 0

(22) 申请日 2015. 10. 15

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 刘静 张淑雅

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光检测试纸条及其制备方法,本发明试纸条含有样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫,结合垫上含有荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体,该单域抗体对抗原 FMDV 具有高特异性和高灵敏性。本发明基于新发现的特异性单域抗体与抗原的免疫学原理检测养殖猪粪便中的 FMDV 病毒或饲料血浆蛋白中 FMDV 的污染,可用于进行现场快速检测或实验室检测,只需 5-10min;若与荧光定量检测仪连用,可实现定量检测;操作简单方便,操作人员不需要专业培训,且不需要专门实验室,克服了现有检测方法的局限性,具有良好的市场前景。

1. 一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,包含附着于底板上且依次紧密相连的样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其特征在于:所述结合垫上含有荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体;所述层析膜上设置有一条检测线和一条质控线,检测线靠近结合垫,质控线靠近吸水垫,检测线上包被有抗 FMDV 的多克隆抗体,质控线上包被有能与荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体结合的蛋白;其中所述的抗 FMDV 单域抗体为权利要求 1 或 2 任一所述的单域抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述质控线上包被的能与荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体结合的蛋白为兔抗双峰驼 IgG。

3. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述样品垫为玻璃纤维膜。

4. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述层析膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述吸水垫为吸水纸。

6. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述质控线和检测线之间的距离为 4.5~5.5mm。

7. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述质控线用 0.5~1.5mg/mL 兔抗双峰驼 IgG 进行包被,用量为 1 μ L/cm。

8. 根据权利要求 1 所述的一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,其特征在于:所述检测线用 0.8—1.2 mg/mL 抗 FMDV 多克隆抗体包被,用量为 2 μ L/cm。

一种定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的偶蹄动物共患的急性、热性、接触性传染病,最易感染的动物是黄牛、水牛、猪、骆驼、羊、鹿等;黄羊、麝、野猪、野牛等野生动物也易感染此病。口蹄疫病毒目前有 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 (即南非 1、2、3 型)和 Asia1 (亚洲 1 型)7 个血清型。各型之间几乎没有免疫保护力,感染了一型口蹄疫的动物仍可感染另一型口蹄疫病毒而发病。FMDV 属于小 RNA 病毒科口疮病毒属,是偶蹄类动物高度传染性疾病(口蹄疫)的病原。在病毒的中心为一条单链的正链 RNA,由大约 8000 个碱基组成,是感染和遗传的基础;周围包裹着蛋白质决定了病毒的抗原性、免疫性和血清学反应能力;病毒外壳为对称的 20 面体。FMDV 在病畜的水泡皮内和淋巴液中含毒量最高。在发热期间血液内含毒量最多,奶、尿、口涎、泪和粪便中都含有 FMDV。口蹄疫在亚洲、非洲和中东以及南美均有流行,在非流行区也有散发病例。

[0003] 口蹄疫发病后一般不致死,但会使病兽的口、蹄部出现大量水疱,高烧不退,使实际畜产量锐减。另外,有个别口蹄疫病毒的变种可传染给人。因此,每次爆发后只能屠宰和集体焚毁染病牲畜以绝后患。由于口蹄疫传播迅速、难于防治、补救措施少,被称为畜牧业的“头号杀手”。因此,检测通过有效方法检测猪口蹄疫病毒刻不容缓。

发明内容

[0004] 为了解决上述存在的问题,本发明通过研究,制备了一种特异性高、灵敏度高的纳米抗体(抗 FMDV 单域抗体),并基于此抗体制备了一种能够快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光检测试纸条。

[0005] 本发明的目的在于提供一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条。

[0006] 本发明所采取的技术方案是:

一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条,包含附着于底板上且依次紧密相连的样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫;所述结合垫上含有荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体;所述层析膜上设置有一条检测线和一条质控线,检测线靠近结合垫,质控线靠近吸水垫,检测线上包被有抗 FMDV 的多克隆抗体,质控线上包被有能与荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体结合的蛋白;

其中所述的抗 FMDV 单域抗体为上述所述的单域抗体。

[0007] 进一步的,上述质控线上包被的能与荧光微球标记的抗 FMDV 单域抗体结合的蛋白为兔抗双峰驼 IgG。

[0008] 进一步的,上述样品垫为玻璃纤维膜。

[0009] 进一步的,上述层析膜为硝酸纤维素膜。

[0010] 进一步的,上述吸水垫为吸水纸。

[0011] 进一步的,上述质控线和检测线之间的距离为 4.5~5.5mm。

[0012] 进一步的,上述质控线用 0.5~1.5mg/mL 兔抗双峰驼 IgG 进行包被,用量为 1 μ L/cm。

[0013] 进一步的,上述检测线用 0.8~1.2 mg/mL 抗 FMDV 多克隆抗体包被,用量为 2 μ L/cm。

[0014] 本发明的有益效果是:

1) 本发明制备的免疫荧光快速试纸技术是应用纳米荧光颗粒(荧光微球标记的 FMDV 单域抗体)构建出一种可定性同时定量的快速检测试纸。操作者无需培训和专业背景,操作简单,5~10 分钟即可获得结果,若与荧光定量仪连用,可实现定量检测,同时该技术灵敏度明显优于传统的胶体金检测试纸技术,具有广阔的市场前景。

[0015] 2) 抗体作为免疫试纸条检测技术的核心部分,其特异性及亲和力决定了测定结果的准确性和灵敏度。本发明采用了特定制备的高灵敏的、FMDV 特异性的单域重链(VHH)抗体,研制成检测 FMDV 病原的快速检测试纸,目前在国内外均未见报道。

附图说明

[0016] 图 1 为实施例 1 中 RT-PCR 扩增 VHH 基因片段的效果图;

图 2 为 SDS-PAGE 检测 FMDV 单域抗体的结果;

图 3 为 FMDV 免疫荧光快速检测试纸条的结构示意图,其中 1 为塑料底板,2 为样品垫,3 为结合垫,4 为硝酸纤维素膜,5 为吸水纸,6 为检测线 T,7 为质控线 C。

具体实施方式

[0017] 实施例 1 猪口蹄疫病毒重链单域抗体的制备

1) 动物免疫

在双峰驼颈背部皮下和双侧后腿皮下进行多点接种 FMDV 灭活疫苗。首次免疫剂量为 1mL/头,共 2 头;7 天后二免,2 mL/头;之后间隔 14 天免疫一次,每次免疫 4 mL,共免疫 3 次,全程共免疫 5 次。最后一次免疫后 7 天采血 500 mL 分离淋巴细胞,提取总 RNA 进行下一步实验。

[0018] 2) 单域抗体库的构建

设计引物扩增 VHH 基因片段,通过前期大量实验研究筛选出效果最好的引物,其序列如下:

VHH-F:5' — CCTTTCTATGCAGGCCAGCCGGCCGCA—3' ;

VHH-R:5' — GTTATTATTATTCAGATTATTATGCGGCC—3' ;

利用引物 VHH-F 和 VHH-R 对所提取的总 RNA 进行 RT-PCR 扩增,获得大小约 500bp 的条带(如图 1 所示),将该目的条带和载体 pCANTAB-5E (购自广州创伟生物技术有限公司)分别经 SfiI 和 NotI 双酶切后,再连接并转化大肠杆菌 TG1,涂布 AmprLB 平板进行筛选,过夜培养后洗下所有菌落用含 20% 甘油的 LB 培养基保存,冻于 -70°C 备用,获得抗 FMDV 的单域抗体基因库。

[0019] 取上述单域抗体基因库与辅助噬菌体 M13K07 进行混合培养 12 小时后,4000rpm 离心 10min,取上清于灭菌离心管中,冰浴 1h 后,9000rpm 离心 15min,弃上清,沉淀用 PBS 悬

浮,然后 1200g 离心 10min 确保细菌充分分离,收集上清,即为噬菌体单域抗体库。

[0020] 3) 特异性单域抗体的筛选

以 FMDV 抗原包被 ELISA 板,对上述噬菌体单域抗体库进行淘洗筛选,经 3 轮筛选后,筛选到 2 个阳性克隆与 FMDV 特异性反应、且与抗原结合灵敏度较高,分别命名为 C1one1 和 C1one2,对获得的阳性克隆分别进行 DNA 测序分析,测序结果显示 C1one1, C1one2 中目的基因片段大小分别为 477bp (SEQID NO :3), 474bp,经氨基酸比对, C1one1 和 C1one2 中单域抗体的氨基酸序列均为 VHH 重链抗体序列。

[0021] 4) 单域抗体的诱导表达及验证

1. SDS-PAGE 实验

将上述实施例 1 中获得的 2 个阳性克隆利用含有 EcoRI 和 BamHI 位点的引物进行 PCR 扩增(分别以 C1one1, C1one2 噬菌体 DNA 为模板),其中引物序列为:

VHH-F1:5' —AGAATTCCTTTCTATGCAGGCCAGCCGGCCGCA-3' ;

VHH-R1:5' —ACGGATCCGTTATTATTATTTCAGATTATTATGCGGCC-3' ;

将 PCR 扩增片段凝胶回收后经双酶切,酶切片段与表达载体 pSMK 连接,构建单域抗体重组表达载体,并转化大肠杆菌 BL21 分别获得重组菌 BL21-1, BL21-2,经 IPTG 诱导表达,分别提取、纯化目的蛋白(即为 FMDV 单域抗体)。利用 SDS-PAGE 对表达产物进行鉴定,结果显示,特异性蛋白带出现在 14. 3KD 左右,与预期大小相符(如图 2 所示)。

[0022] 2. 抗原结合能力实验

用 ELISA 方法检测上述筛选出的单域抗体(即上述重组菌 BL21-1 和 BL21-2 表达的目的蛋白)与抗原结合的能力,结果显示,重组菌 BL21-1 表达的目的蛋白(即 C1one1 体内目的基因编码的蛋白)与 FMDV 抗原结合的能力较高,灵敏度更高,而重组菌 BL21-2 表达的目的蛋白与 FMDV 抗原的结合能力相对较弱(如表 1 所示)。所以选用重组菌 BL21-1 表达的目的抗体蛋白(即 C1one1 体内目的基因编码的抗体)进行后续试纸条的研制。

[0023] 表 1 2 个阳性克隆中表达的单域抗体与抗原 FMDV 的结合能力检测

克隆	FMDV 抗原 (OD630)	未包被抗原对照 (OD630)
C1one1	2. 295	0. 0852
C1one2	0. 653	0. 0525
PBS (阴性对照)	0. 128	0. 0521

实施例 2 FMDV 多克隆抗体的制备

使用 FMDV 灭活疫苗免疫昆明小鼠,0. 5mL/只,共 5 只,首免后 7 天进行二免,1mL/只;之后每隔 14 天进行免疫 1 次,1mL/只,共免疫 3 次。最后 1 次免疫结束后 7 天采血检测血清效价,结果为阳性的收集全部血液分离血清作为 FMDV 多克隆抗体备用。

[0024] 实施例 3 FMDV 免疫荧光快速检测试纸条的制备

1) FMDV 单域抗体的制备

将上述实验例 1 中获得的重组菌 BL21-1 进行 IPTG 诱导表达、提取、纯化目的蛋白,即得 FMDV 单域抗体;

2) FMDV 单域抗体—荧光微球探针的制备

荧光微球羧基化:将 100uL 荧光微球(购自广州美津泰生物技术有限公司)溶于 500 μ L 纯净水中,然后分别加入终浓度为 10 mg 的 EDC 和 6 mg 的 NHS, 27 $^{\circ}$ C 孵育 30min,反应液 4 $^{\circ}$ C, 10000 rpm/min,离心 1min,弃去上清,重复 3 次,去除多余的 EDC 和 NHS。沉淀用 500uL

PBS 重悬,超声 5min,即可。

[0025] FMDV 单域抗体-荧光微球探针的制备:将 500 μ L 上述已羧基化的荧光微球溶液与 100 μ L 浓度为 0.2~1.0mg/mL 步骤 1) 制备的 FMDV 单域抗体混合,室温反应 3h;然后加入 5 μ L 10%BSA 来封闭微球的剩余羧基,孵育 1.5h, 4 $^{\circ}$ C 8000rpm/min 离心 5min,弃去上清未结合的抗体。用 200 μ L 含有 1%BSA,2%Tween-20 和 25% 海藻糖的 pH7.2 PBS(盐离子浓度为 10mM)重悬,即为制备好的 FMDV 单域抗体-荧光微球探针,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0026] 3) 抗 FMDV 单域抗体-荧光微球探针结合垫的制备

将聚酯纤维膜用 0.1% Tween-20 处理 10min,60 $^{\circ}$ C 抽风烘干,将上述制备的抗 FMDV 单域抗体-荧光微球探针按 1.5 μ L/cm 喷于聚酯纤维膜结合垫上,37 $^{\circ}$ C 抽风烘干,室温干燥环境下保存备用。

[0027] 4) 硝酸纤维素膜的包被

使用自动喷膜仪在硝酸纤维素膜(NC 膜)上喷 C,T 线(如图 3 所示)。C 线为质控线,包被兔抗双峰驼工 gG,浓度为 0.5~1.5mg/mL,优选 1 mg/mL,喷量为 1 μ L/cm;T 线为检测线,包被实施例 2 制备的 FMDV 多克隆抗体,浓度为 0.8~1.2 mg/mL,喷量为 2 μ L/cm;C,T 线之间的距离为 5mm。将喷好的 NC 膜在 37 $^{\circ}$ C 温箱中烘干,得到包被后的 NC 膜。

[0028] 5) 样品垫的制备

将玻璃纤维膜用含 2% (w/v)PVP,3% Tween-20 和 2% (w/v)PEG 的 10mmol/L pH7.2 PBS 饱和和处理,37 $^{\circ}$ C 抽风烘干,室温干燥条件保存备用。

[0029] 6) FMDV 免疫荧光快速检测试纸条的组装

如图 3 所示,将上述制备好的样品垫 2、FMDV 单域抗体-荧光微球探针结合垫 3、包被后的硝酸纤维素膜 4、吸水纸 5 由一端依次粘贴在塑料底板 1 上,样品垫 2 与结合垫 3 重叠部分的宽度为 2mm、结合垫 3 与包被后的硝酸纤维素膜 4 重叠部分的宽度为 2mm。

[0030] 首先,在塑料底板 1 的中心瓢贴上包被后的硝酸纤维素膜 4;在硝酸纤维素膜 4 靠近质控线 7 的一端搭接劲贴上吸水纸 5;在硝酸纤维素膜 4 的另一端搭接劲贴上结合垫 3;在结合垫 3 的另一端搭接劲贴上样品垫 2,得到 FMDV 免疫荧光快速检测试纸条。

[0031] 上述试纸条检测结果的判断

①若检测线 T 和质控线 C 在紫外激发光照射下同时显现绿色荧光印迹,表示检测结果为阴性,说明被检测样本中不含 FMDV,或浓度小于 10^4 TCID₅₀/mL;

② 检测线 T 在紫外激发光照射下不显现绿荧光印迹,只有质控线 C 在激发光下显现绿色荧光印迹;或者 T 线比 C 线颜色浅;表示检测结果为阳性,说明被检测样品中含 FMDV,且浓度大于或等 10^4 TCID₅₀/mL;

若将 FMDV 免疫荧光检测试纸条与荧光定量检测仪连用,可实现定量检测。

[0032] 实施例 4 FMDV 免疫荧光检测试纸条特异性试验

用实施例 3 制备的试纸条分别检测猪传染性胃肠炎(TGEV)、猪轮状病毒(Prov)的细胞培养液,猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRW)、猪蓝耳病毒(PRRS)、猪腹泻病毒(PEDV)阳性样品以及 FMDV 阳性样品。结果显示试纸条检测 FMDV 阳性样品为阳性反应,其它样品均为阴性。表明试纸条特异性良好。

[0033] 实施例 5 FMDV 免疫荧光试纸条敏感性试验

将 FMDV 的细胞培养液进行倍比稀释,样品浓度分别为 10^7 TCID₅₀/mL, 10^6 TCID₅₀/mL,

$10^5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, $10^4\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, $10^3\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 试验结果表明, $10^7\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, $10^6\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, $10^5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, $10^4\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 均为阳性, 与进口普通胶体金试纸条对比发现, 进口试纸条的检测限为 $10^5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 本发明的荧光试纸条比其敏感 10 倍。

[0034] 实施例 6 FMDV 免疫荧光检测试纸条临床应用

将猪的粪使用棉签蘸取后放入样品处理液中搅拌混匀, 或取少许血浆蛋白加入样品处理液中混匀, 1-2 分钟后取上清 3-5 滴滴加于上述 FMDV 免疫荧光快速检测试纸条的样品垫上, 加样后 5—10min 后, 观察 T 和 C 线的颜色的不同, 来判断待测样品中是否含有 FMDV 病毒。若样品中 FMDV 的浓度小于 $10^4\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 则 T 线显色与 C 线相同, 结果为阴性; 若样品中 FMDV 的浓度大于或等于 $10^4\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 则 T 线比 C 线颜色浅或完全看不到线, 颜色越浅则样品中 FMDV 的浓度越高, 结果即为阳性。若将 FMDV 免疫荧光试纸条与荧光定量检测仪连用, 可实现定量检测。

[0035] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

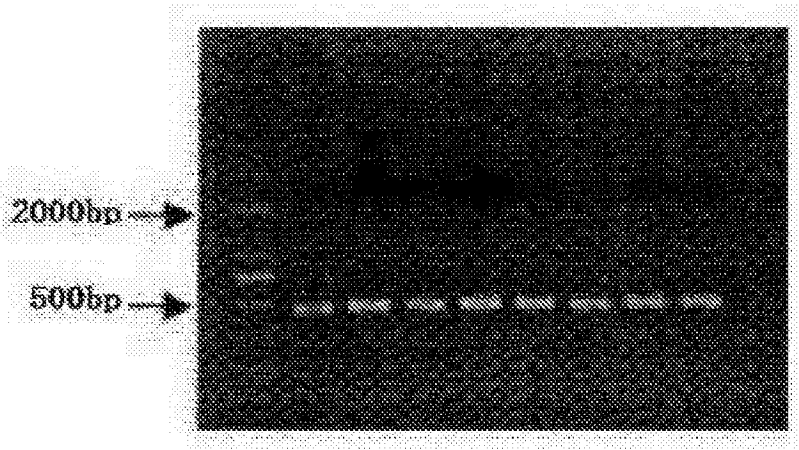


图 1

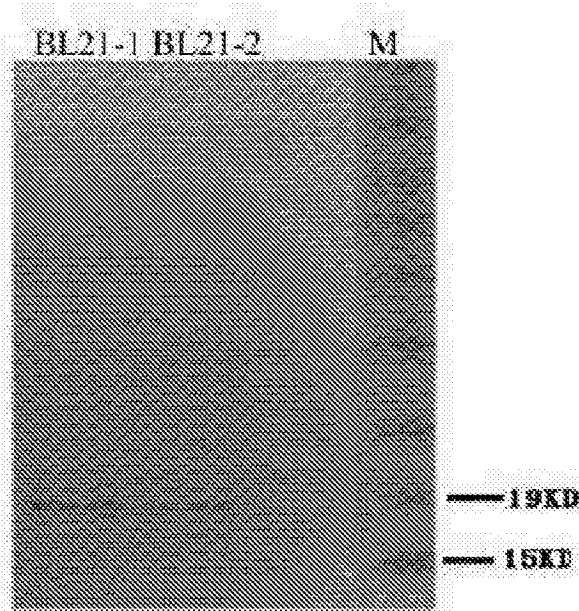


图 2

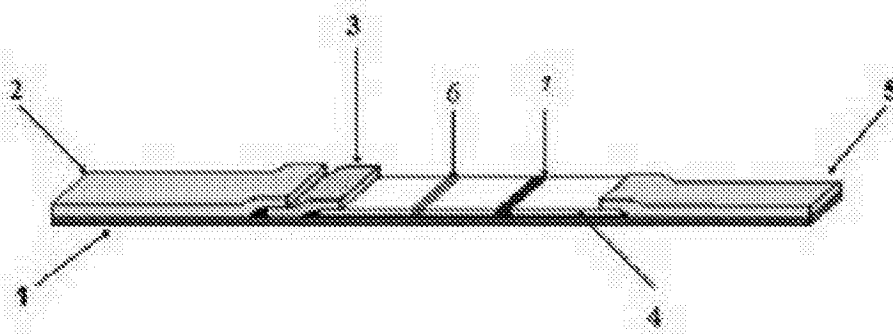


图 3

专利名称(译)	一种定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光试纸条		
公开(公告)号	CN106596930A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201510662526.0	申请日	2015-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 刘静 张淑雅		
发明人	洪霞 刘静 张淑雅		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56983 G01N33/68 G01N2333/09		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速定量检测猪口蹄疫病毒的免疫荧光检测试纸条及其制备方法,本发明试纸条含有样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫,结合垫上含有荧光微球标记的抗FMDV单域抗体,该单域抗体对抗原FMDV具有高特异性和高灵敏性。本发明基于新发现的特异性单域抗体与抗原的免疫学原理检测养殖猪粪便中的FMDV病毒或饲料血浆蛋白中FMDV的污染,可用于进行现场快速检测或实验室检测,只需5-10min;若与荧光定量检测仪连用,可实现定量检测;操作简单方便,操作人员不需要专业培训,且不需要专门实验室,克服了现有检测方法的局限性,具有良好的市场前景。

