



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107202883 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201710378121.3 *G01N 33/577*(2006.01)

(22)申请日 2017.05.24 *G01N 33/533*(2006.01)

(83)生物保藏信息 *G01N 33/543*(2006.01)

CCTCC No:C201712 2017.02.24 *G01N 33/52*(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 徐成蔚

地址 266000 山东省青岛市市南区龙江路
25号甲2号1单元402户

(72)发明人 徐成蔚 尹伟力 刘瑶 孙涛
张四化 凌红丽

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/561(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

检测鸭坦布苏病毒的侧向流免疫层析测定
产品及相关试剂与制备方法

(57)摘要

本发明公开了检测鸭坦布苏病毒的侧向流免疫层析测定产品及相关试剂与制备方法。本发明公开的鸭坦布苏病毒的免疫检测产品,包括相互连接的样品垫、吸收垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,包被膜位于样品垫和吸收垫之间,样品垫上负载有荧光纳米晶标记单抗,检测线包被有鸭坦布苏病毒抗体,质检线包被有与荧光纳米晶标记单抗特异结合的第二抗体;荧光纳米晶标记单抗为将杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体和氨基修饰的荧光纳米晶颗粒以肽键共价结合形成的聚合物;杂交瘤细胞在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC No:C201712。实验证明,本发明的鸭坦布苏病毒的免疫检测产品可以特异识别DTMUV,灵敏度高。

1. 鸭坦布苏病毒的免疫检测产品, 包括相互连接的样品垫、吸收垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜, 所述包被膜位于所述样品垫和所述吸收垫之间, 其特征在于: 所述样品垫上负载有荧光纳米晶标记单抗, 所述检测线包被有鸭坦布苏病毒抗体, 所述质控线包被有与所述荧光纳米晶标记单抗特异结合的第二抗体;

所述荧光纳米晶标记单抗为将杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体和氨基修饰的荧光纳米晶颗粒以肽键共价结合形成的聚合体;

所述杂交瘤细胞在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC No:C201712。

2. 根据权利要求1所述的产品, 其特征在于: 所述荧光纳米晶标记单抗按照包括如下步骤的方法制备: 将所述氨基修饰的荧光纳米晶颗粒与所述单克隆抗体按照1:3的质量比进行反应得到以肽键共价结合形成的荧光纳米晶颗粒与所述单克隆抗体的偶联物。

3. 根据权利要求1或2所述的产品, 其特征在于: 所述鸭坦布苏病毒抗体为以序列2或序列2的第21-136位所示的蛋白质为抗原免疫动物得到的多克隆抗体或单克隆抗体。

4. 根据权利要求3所述的产品, 其特征在于: 所述动物为家兔。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的产品, 其特征在于: 所述与所述荧光纳米晶标记单抗特异结合的第二抗体为羊抗鼠IgG。

6. 权利要求1中所述的杂交瘤细胞。

7. 权利要求1中所述的单克隆抗体。

8. 检测或辅助检测鸭坦布苏病毒的方法, 包括:

将待测样品加至权利要求1-5中任一所述产品的样品垫上, 根据紫外线下所述产品的检测线是否发光确定待测样品是否含有鸭坦布苏病毒: 如所述检测线发光, 待测样品含有或候选含有鸭坦布苏病毒; 如所述检测线不发光, 待测样品不含或候选不含鸭坦布苏病毒。

9. 检测或辅助检测鸭坦布苏病毒的成套试剂, 由权利要求1中所述杂交瘤细胞或所述单克隆抗体与权利要求1-5中任一所述鸭坦布苏病毒抗体组成。

10. 下述任一应用:

X1、权利要求1中所述杂交瘤细胞在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

X2、权利要求1中所述单克隆抗体在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

X3、权利要求1-5中任一所述产品在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

X4、权利要求9所述成套试剂在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

X5、权利要求1中所述杂交瘤细胞在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

X6、权利要求1中所述单克隆抗体在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

X7、权利要求1-5中任一所述产品在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

X8、权利要求9所述成套试剂在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

X9、权利要求1中所述杂交瘤细胞在制备单克隆抗体中的应用;

X10、序列2或序列2的第21-136位所示的蛋白质在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用。

检测鸭坦布苏病毒的侧向流免疫层析测定产品及相关试剂与制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域中,检测鸭坦布苏病毒的侧向流免疫层析测定产品及相关试剂与制备方法。

背景技术

[0002] 鸭坦布苏病毒病是黄病毒科黄病毒属鸭坦布苏病毒(Duck tembus Virus,DTMUV)引起的以鸭死亡和蛋鸭产蛋下降为特征的新发传染病。自2010年4月以来,在我国河北、江苏、安徽、浙江、福建等地区产蛋鸭和种鸭群中先后出现了鸭坦布苏病毒病,鸭群患病后4~5d左右产蛋率可从80~85迅速下降至20~30,甚至停产,发病率达60~100%,该病在中国大部分省份均有发生和流行,给养鸭业造成了严重的经济损失。加强对该病检测方法的研究,对控制鸭坦布苏病毒病的发生,保护和促进养鸭业的健康发展,具有重要意义。

[0003] 目前,DTMU的检测主要依赖病毒分离和分子生物学检测。病毒分离是DTMUV的传统检测方法,主要从病鸭的卵泡膜、脑、脾脏、肝脏等病变组织分离病毒。鸭坦布苏病毒的快速检测主要使用PCR方法。颜丕熙等成功建立了鸭坦布苏病毒套式RT-PCR检测方法;Yan等根据鸭坦布苏病毒E基因序列设计特异性引物和Taq Man探针,建立了快速检测鸭坦布苏病毒实时荧光定量RT-PCR方法;张帅等在对鸭坦布苏病毒序列比对分析的基础上,建立了该病毒一步式RT-PCR检测方法;姬希文等以纯化的毒株作为包被抗原,建立了检测鸭坦布苏病毒血清抗体的间接ELISA法;郝明飞等对鸭坦布苏病毒E基因进行了克隆表达并初步建立了快速检测鸭坦布苏病毒的间接ELISA法。高绪慧等建立了探针检测鸭黄病毒的地高辛标记DNA的方法。这些方法过程繁多,操作复杂,检测时间长,成本高,而且还需要专业的设备和技术人员,不适合田间样品的检测。目前急需一种可特异、简便、快速检测DTMUV的方法。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是如何检测鸭坦布苏病毒。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了鸭坦布苏病毒的免疫检测产品,包括相互连接的样品垫、吸收垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,所述包被膜位于所述样品垫和所述吸收垫之间,其特征在于:所述样品垫上负载有荧光纳米晶标记单抗,所述检测线包被有鸭坦布苏病毒抗体,所述质检线包被有与所述荧光纳米晶标记单抗特异结合的第二抗体;

[0006] 所述荧光纳米晶标记单抗为将杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体(将该单克隆抗体命名为A单抗)和氨基修饰的荧光纳米晶颗粒以肽键共价结合形成的聚合物;

[0007] 所述杂交瘤细胞在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC No:C201712。所述杂交瘤细胞是将小鼠脾细胞与NS0细胞融合得到的细胞;所述小鼠脾细胞为以序列2所示的蛋白质(其名称为蛋白质A)免疫小鼠得到的可分泌抗蛋白质A抗体的脾细胞。

[0008] 所述A单抗可特异识别序列2或序列2的第21-136位所示的蛋白质与鸭坦布苏病

毒。

[0009] 上述产品中,所述包被膜可为具有相互分离的所示检测线和所述质控线的硝酸纤维素膜。

[0010] 上述产品中,所述样品垫和所述包被膜间还可含有连接垫;所述连接垫负载有荧光纳米晶标记单抗。

[0011] 上述产品中,所述荧光纳米晶标记单抗可按照包括如下步骤的方法制备:将所述氨基修饰的荧光纳米晶颗粒与所述单克隆抗体按照1:3的质量比进行反应得到以肽键共价结合形成的荧光纳米晶颗粒与所述单克隆抗体的偶联物。

[0012] 所述氨基修饰的荧光纳米晶颗粒为利用氨基硅烷修饰荧光纳米晶颗粒得到的产物。

[0013] 所述荧光纳米晶颗粒具体可由BHHCT与 $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 制备得到。

[0014] 上述产品中,所述鸭坦布苏病毒抗体可为以序列2或序列2的第21-136位所示的蛋白质为抗原免疫动物得到的多克隆抗体或单克隆抗体。

[0015] 上述产品中,所述动物可为家兔。

[0016] 上述产品中,所述与所述荧光纳米晶标记单抗特异结合的第二抗体可为羊抗鼠IgG。

[0017] 为解决上述技术问题,本发明还提供了所述杂交瘤细胞。

[0018] 为解决上述技术问题,本发明还提供了所述A单抗。

[0019] 为解决上述技术问题,本发明还提供了检测或辅助检测鸭坦布苏病毒的方法,该方法包括:

[0020] 将待测样品加至所述产品的样品垫上,孵育5-30分钟后根据紫外线下所述产品的检测线是否发光确定待测样品是否含有鸭坦布苏病毒:如所述检测线发红光,待测样品含有或候选含有鸭坦布苏病毒;如所述检测线不发红光,待测样品不含或候选不含鸭坦布苏病毒。

[0021] 上述方法中,所述孵育时间可为10-20分钟。

[0022] 为解决上述技术问题,本发明还提供了检测或辅助检测鸭坦布苏病毒的成套试剂,该成套试剂由所述杂交瘤细胞或所述A单抗与所述鸭坦布苏病毒抗体组成。

[0023] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述任一应用:

[0024] X1、所述杂交瘤细胞在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

[0025] X2、所述A单抗在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

[0026] X3、所述产品在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

[0027] X4、所述成套试剂在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用;

[0028] X5、所述杂交瘤细胞在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

[0029] X6、所述A单抗在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

[0030] X7、所述产品在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

[0031] X8、所述成套试剂在检测或辅助检测鸭坦布苏病毒中的应用;

[0032] X9、所述杂交瘤细胞在制备单克隆抗体中的应用;

[0033] X10、序列2或序列2的第21-136位所示的蛋白质在制备检测或辅助检测鸭坦布苏病毒产品中的应用。

[0034] 本发明研制了一种特异、简便、快速、直观的鸭坦布苏病毒的免疫检测产品(检测DTMUV的荧光纳米晶试纸条),实验证明,本发明的鸭坦布苏病毒的免疫检测产品可以特异识别DTMUV,检测鸭坦布苏病毒的灵敏度为0.1ng/mL鸭坦布苏病毒蛋白,重复性好,可在4℃下可以保存6个月;具有高特异性、高敏感性和高准确性,特异性达99.47%,敏感性达92.86%,准确性达98.60%。本发明的鸭坦布苏病毒的免疫检测产品可以检测DTMUV抗原,检测时间需要10-20分钟,在紫外线下可以直接确定结果,为有效监控DTMUV的发病提供了有力的工具,并可以用于临床诊断。

[0035] 生物材料保藏说明

[0036] 生物材料的分类命名:杂交瘤细胞株

[0037] 生物材料的菌株编号:DTMUV-E-10A7

[0038] 生物材料的保藏单位名称:中国典型培养物保藏中心(cctcc)

[0039] 生物材料的保藏单位简称:CCTCC

[0040] 生物材料的保藏单位地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号,武汉大学保藏中心
邮编:430072

[0041] 生物材料的保藏日期:2017年2月24日

[0042] 生物材料的保藏中心登记入册编号:CCTCC No:C201712

附图说明

[0043] 图1为纯化前后蛋白质A的检测结果。

[0044] 图2为A单抗的SDS-PAGE电泳检测结果。

[0045] 图3为在不同抗体浓度下的质检线与检测线发生目的反应后在紫外下的亮度。其中质控线为质检线;1为羊抗鼠IgG抗体的浓度为0.8mg/mL,2为羊抗鼠IgG抗体的浓度为1mg/mL;3为A单抗的浓度为0.8mg/mL,4为A单抗的浓度为1mg/mL。

[0046] 图4为荧光纳米晶试纸条的结构。

[0047] 图5为荧光纳米晶试纸条A的特异性检测结果。其中,1为阴性血清,2为PBS,3为DTMUV,4为DPV,5为DHV,6为NDV,7为AIV,8为IBV,9为ARV,10为EDSV。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0049] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0050] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0051] 下述实施例中的鸭坦布苏病毒(Duck tembus Virus,DTMUV)为DTMUV FX2010分离株(姬希文,闫丽萍,颜丕熙,李国新,张七斤,李泽君.鸭坦布苏病毒抗体间接ELISA检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2011,08:630-634.)公众可从申请人处获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0052] 下述实施例中的鸭瘟病毒(DPV)(齐雪峰,程安春,汪铭书,杨晓燕,贾仁勇,陈孝跃.鸭瘟病毒抗体间接ELISA检测试剂盒的研制[J].中国兽医科学,2007,08:690-694.)、鸭病毒性肝炎病毒(DHV)(马秀丽,宋敏训,于可响,廖明,辛朝安.鸭病毒性肝炎病毒VP1基因

表达及其抗体检测ELISA方法的建立[J].微生物学报,2008,08:1110-1114.)、番鸭源禽I型副粘病毒(NDV)(傅光华,程龙飞,施少华,彭春香,黄瑜.番鸭源禽I型副粘病毒PX2/03株P基因的克隆及原核表达[J].福建农林大学学报(自然科学版),2007,06:599-603.)、禽流感病毒(AIV)(谭伟,徐倩,谢芝勋.禽流感病毒研究概述[J].基因组学与应用生物学,2014,01:194-199.)、禽传染性支气管炎病毒(IBV)(周生,王红宁,唐梦君,黄勇,柳萍.禽传染性支气管炎病毒SAIBk株全基因组的分段克隆、测序及分析[J].畜牧兽医学报,2007,01:72-77.)、番鸭呼肠孤病毒(ARV)(祁保民,陈晓燕,吴宝成,姚金水,张红雷.番鸭呼肠孤病毒诱导的细胞凋亡观察[J].畜牧兽医学报,2010,04:495-499.)、减蛋综合症病毒(EDSV)(陈滔.重组减蛋综合症病毒Knob-S蛋白免疫原性及鸡IL-2和IL-18对其免疫增强效应研究[D].湖南农业大学,2012),公众均可从申请人处获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0053] 下述实施例中的pET-28a(+)为Novagen公司的产品,产品目录号为69865-3。

[0054] 下述实施例中的非变性镍柱结合缓冲液I由溶剂和溶质组成,溶剂为水,溶质及其浓度分别为:0.1M Tris-HCl、0.1M NaCl、0.01M咪唑(Imidazole)、0.5mM EDTA,pH为8.0。

[0055] 下述实施例中的非变性镍柱洗脱缓冲液II的制备方法由溶剂和溶质组成,溶剂为水,溶质及其浓度分别为:0.1M Tris-HCl、0.1M NaCl、0.5M咪唑(Imidazole)、0.5mM EDTA,pH为8.0。

[0056] 下述实施例中的BALB/C小鼠为南方医科大学广东省医学实验动物中心产品。

[0057] 下述实施例中的家兔为济南朋悦实验动物繁育有限公司产品。

[0058] 实施例1、抗体的制备

[0059] 一、作为抗原的融合蛋白的制备

[0060] 1、重组载体的获得

[0061] 将pET-28a(+)载体的Nde I和Hind III识别序列间的DNA片段替换为序列1的所示的来源于鸭坦布苏病毒(Duck tembus Virus,DTMUV)的DNA分子,保持pET-28a(+)载体的其他序列不变,得到重组载体,将该重组载体命名为pET-A,pET-A能表达序列2所示的融合蛋白质,将该融合蛋白质命名为蛋白质A。

[0062] 其中,序列1所示的DNA分子编码序列2所示的蛋白质,序列1的第61-408位编码序列2的第21-136位所示的蛋白质,序列1的第1-60位为pET-28a(+)载体上的DNA序列,序列1的第13-30位编码序列2的第5-10位所示的His-tag。

[0063] 表达对照蛋白的重组载体的获得:

[0064] 将pET-28a(+)载体的Nde I和Hind III识别序列间的DNA片段替换为序列3的所示的来源于鸭坦布苏病毒(Duck tembus Virus,DTMUV)的DNA分子,保持pET-28a(+)载体的其他序列不变,得到重组载体,将该重组载体命名为pET-B,pET-B能表达序列4所示的融合蛋白质,将该融合蛋白质命名为蛋白质B.蛋白质B及与之相关的实验在本申请中作为对照。

[0065] 其中,序列3所示的DNA分子编码序列4所示的蛋白质。

[0066] 2、重组菌的获得

[0067] 将步骤1的pET-A导入大肠杆菌BL21(DE3)中,得到重组菌,将该重组菌命名为BL21-pET-A;将步骤1的pET-B导入大肠杆菌BL21(DE3)中,得到重组菌,将该重组菌命名为BL21-pET-B;将pET-28a(+)载体导入大肠杆菌BL21(DE3)中,得到重组菌,将该重组菌命名

为BL21-pET。

[0068] 3、融合蛋白的获得

[0069] 挑取步骤2的BL21-pET-A的单菌落接入含有卡那霉素培养基(卡那霉素培养基为向LB培养基中加入卡那霉素得到的卡那霉素浓度为50 μ g/ml的液体培养基)中,于37 $^{\circ}$ C过夜培养,得到过夜培养物。将过夜培养物接种于1L卡那霉素培养基中,在37 $^{\circ}$ C下剧烈振荡(200rpm)发酵培养,得到发酵液,该发酵液的OD₆₀₀值在0.6-0.8左右;向发酵液中加入IPTG,得到蛋白诱导前液,蛋白诱导前液中IPTG的浓度为0.1mM;将蛋白诱导前液在20 $^{\circ}$ C、80rpm的条件下过夜培养(共培养12小时),得到蛋白诱导发酵液;将蛋白诱导发酵液在6000rpm下离心10分钟,弃上清液,收集菌体;用非变性镍柱结合缓冲液I重悬菌体后,得到菌体悬液;用超声波破碎菌体悬液中的菌体后,12 000rpm离心10min,收集上清液,该上清液即为含有蛋白质A的粗提液,超声波破碎菌体的条件为:超声5s,间歇5s,40w的功率,30个循环。

[0070] 按照上述方法,将BL21-pET-A替换为BL21-pET-B,其他步骤均不变,得到含有蛋白质B的粗提液;按照上述方法,将BL21-pET-A替换为BL21-pET,其他步骤均不变,得到作为对照的蛋白粗提液。

[0071] 4、融合蛋白的纯化

[0072] 采用镍柱亲和层析对步骤3的含有蛋白质A的粗提液进行纯化,在Amersham公司的AKTA FPLC系统中用1ml装量的HiTrap chelating HP column(镍柱)纯化上清。非变性镍柱结合缓冲液I用于平衡纯化柱体和上样。蛋白上样量为10ml,流速设为1ml/min。用非变性镍柱洗脱缓冲液A(非变性镍柱洗脱缓冲液A由非变性镍柱结合缓冲液I和非变性镍柱洗脱缓冲液II的混合溶液组成,其中,非变性镍柱洗脱缓冲液II占非变性镍柱洗脱缓冲液A的体积百分比为25%)进行洗涤,去除非特异性结合的杂蛋白。用非变性镍柱洗脱缓冲液B(非变性镍柱洗脱缓冲液B由非变性镍柱结合缓冲液I和非变性镍柱洗脱缓冲液II的混合溶液组成,其中,非变性镍柱洗脱缓冲液II占非变性镍柱洗脱缓冲液B的体积百分比为80%)进行洗脱,收集含洗脱峰的洗脱液,该洗脱液中为纯化后的蛋白溶液,将其命名为蛋白溶液1,用SDS-PAGE检测蛋白溶液1中蛋白质A的纯度。结果显示(图1)蛋白溶液A含有高纯度的蛋白质A,大小为20kDa左右。图1中,A为SDS-PAGE结果,B为western-blot结果,一抗为his tag抗体,泳道M为蛋白分子量标准,泳道1和3均为含有蛋白质A的粗提液,泳道2和4均为蛋白溶液1。

[0073] 按照上述方法,将含有蛋白质A的粗提液替换为含有蛋白质B的粗提液,其他步骤均不变,得到含有蛋白质B的纯化后的蛋白溶液,将其命名为蛋白溶液B,用SDS-PAGE检测蛋白溶液B中蛋白质B的纯度。结果显示蛋白溶液B含有纯的蛋白质B,大小为22kDa左右。

[0074] 二、多克隆抗体的制备

[0075] 按剂量1mg蛋白质A/只,皮下分点注射免疫家兔,利用福氏不完全佐剂(FIA)增强免疫效果,首免后每隔2周用同样的方法进行加强免疫,共免疫6次,最后一次免疫后两周,耳静脉采血,分离血清,用蛋白质A包被的ELISA板检测抗体效价,取具有较高的抗体滴度家兔的颈动脉血,收集全血,分离得到兔抗血清。

[0076] 用辛酸硫酸铵法粗提取兔抗血清IgG,透析,再依次过SephadexG25和DEAE纤维素柱进一步提纯,并将收集的蛋白质于透析袋中。置蔗糖或聚乙二醇中浓缩,得到抗蛋白质A的IgG,将其命名为A多抗,用核酸蛋白检测仪测定蛋白质含量,将其稀释至10mg/mL,置于-

80℃保存备用。利用蛋白质A检测A多抗的抗体效价,检测到A多抗的抗体效价为1:16。

[0077] 按照上述方法,将蛋白质A替换为蛋白质B,其他步骤均不变,得到抗蛋白质B的IgG,将其命名为B多抗,用核酸蛋白检测仪测定蛋白质含量,将其稀释至10mg/mL,置于-80℃保存备用。

[0078] 三、单克隆抗体的制备

[0079] 1、免疫:

[0080] 选取8周龄BALB/C小鼠10只,以步骤一的蛋白质A与FCA作为免疫原,免疫剂量为200μg/只(100μg蛋白质A+100μL FCA+0.1%Tween 80),皮下分点注射。于首免后2-6周进行,免疫剂量为200μg/只(100μL蛋白质A+100μL FIA+0.1%Tween80)。共免疫3-4次,每次免疫间隔2周。最后1次免疫10天后,断尾采血分离血清,用间接ELISA法检测血清抗体效价。

[0081] 2、杂交瘤细胞的建立与阳性克隆的筛选:

[0082] 选取ELISA法检测抗体效价(1:1000)较高的免疫小鼠,眶下窦采血,分离血清。脱颈致死小鼠;无菌手术取出脾脏制备脾细胞,并与NS0细胞在50%PEG作用下进行细胞融合;将融合后的细胞悬液加到96孔细胞培养板上,用HAT培养基进行选择培养。融合后的细胞置37℃,5%CO₂培养箱中培养;用间接ELISA法以0.5μg/孔的蛋白质A的量包被酶标板进行阳性筛选。P/N大于2.1时即为阳性。对强阳性、细胞生长旺盛的孔进行3次有限稀释克隆化,得到克隆化的阳性杂交瘤细胞株,将该杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株DTMUV-E-10A7,杂交瘤细胞株DTMUV-E-10A7已于2017年2月24日保藏于中国典型培养物保藏中心(cctcc),保藏中心登记注册编号:CCTCC No:C201712。

[0083] 3、单抗的大量制备:

[0084] 采用腹水法大量制备单克隆抗体。将步骤2的杂交瘤细胞株DTMUV-E-10A7扩大培养,待细胞浓度达 5×10^5 个/mL时停止换液,直至细胞全部死亡,收集培养液,测定其ELISA效价;8周龄BALB/C小鼠腹腔注射液体石蜡10天后再腹腔注射杂交瘤细胞株E92,每只小鼠腹腔注射 10^7 个杂交瘤细胞株DTMUV-E-10A7,7天后抽取腹水,用DTMUV病毒悬液包被酶标板测其ELISA效价。

[0085] 4、单抗的纯化:

[0086] 采用辛酸-硫酸铵法进行单抗的纯化。(1)将20mL步骤3得到的腹水加入离心管中,于4℃12000rpm下离心15min,将上清液转移至另一容器中;(2)向上清液中加入4倍血清体积的0.06M pH4.8的醋酸缓冲液,室温边加边搅拌,得到混合液体;(3)向步骤(2)得到的混合液体中加入适量的辛酸(每毫升混合液体中加入33μL辛酸),滴加时要缓慢,室温滴加,边滴加边搅拌;(4)辛酸滴加完后,室温搅拌30min;(5)于4℃离心,12000rpm×30min,取上清,用滤纸过滤,得到滤液;(6)向滤液中加入硫酸铵至45%饱和度(SAS),室温搅拌30min,4℃静置2h或过夜;(7)于4℃离心12000rpm下离心30min,弃上清,沉淀用适量0.01mol/L PH7.4PBS重悬,用0.01mol/L PH7.4PBS于4℃透析24h,其间换液4次;(8)将透析物于4℃、12000rpm下离心30min,收集上清液分装于EP管中,该上清液即为含有纯化后的抗蛋白质A的单克隆抗体(即A单抗)的液体,将该液体命名为A单抗溶液,用核酸蛋白检测仪测定A单抗溶液中的A单抗含量,稀释至10mg/mL,置于-20℃保存。

[0087] 用ELISA的方法检测A单抗溶液中A单抗的效价,A单抗的效价为1:51200。

[0088] 将步骤3得到的未纯化的腹水和A单抗溶液进行SDS-PAGE电泳分析(图2)。未纯化

腹水上清泳道出现多条杂带(泳道1),而纯化后的单克隆抗体(A单抗溶液)仅在53ku和22ku出现IgG轻链和重链的条带,无杂带出现(泳道2),表明纯化效果良好。

[0089] 5、单克隆抗体特异性检测:

[0090] 用A单抗分别与鸭瘟病毒(DPV)、鸭病毒性肝炎病毒(DHV)、番鸭源禽I型副粘病毒(NDV)、禽流感病毒(AIV)、禽传染性支气管炎病毒(IBV)、番鸭呼肠孤病毒(ARV)、减蛋综合症病毒(EDSV)和鸭坦布苏病毒(DTMUV)以及阴性血清(未感染DTMUV的鸭的血清)与蛋白质A包被的ELISA板反应,鉴定A单抗的特异性。具体方法如下:

[0091] 将病毒抗原稀释成浓度为5 μ g/mL的工作抗原、蛋白质A稀释成浓度为5 μ g/mL的工作抗原,取100 μ L工作抗原加入酶免板的各个孔中,每种抗原9个孔,加入包被液(pH 9.6, 15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 0.2M NaCl),放置于4 $^{\circ}$ C冷藏箱过夜;将包被好抗原酶免板弃去孔内液体,同时用PBS缓冲液洗3次,每次每孔300 μ L,最后一次拍干酶免板;按100 μ L/孔加入封闭液,37 $^{\circ}$ C放置1h;PBS缓冲液洗3次;按100 μ L/孔加入A单抗,同时设立阳性对照(DTMUV阳性血清,感染DTMUV的鸭子的血清)、阴性对照(DTMUV阴性血清,未感染DTMUV的鸭子的血清)和空白对照(不加A单抗),每种抗原的阳性对照、阴性对照和空白对照均3个孔;37 $^{\circ}$ C放置1h;用PBS缓冲液洗3次,每次每孔300 μ L,拍干;按100 μ L/孔加入酶标二抗(二抗为羊抗鼠IgG抗体),37 $^{\circ}$ C放置1h,用PBS缓冲液洗3次,每次每孔300 μ L,拍干;按100 μ L/孔加入TMB,37 $^{\circ}$ C闭光孵育20min;按100 μ L/孔加入稀硫酸,终止反应,在10min,将酶免板放置于在酶标仪上记录OD值;结果判定:以OD_{阳性对照}/OD_{阴性对照} \geq 2.1为阳性。若阴性对照孔透明或接近透明,阳性对照孔显呈黄色或蓝色,则可直接判定检测结果。

[0092] 结果显示,A单抗可特异识别蛋白质A,A单抗与相应病毒抗原包被ELISA板反应时呈强阳性,与其它病毒包被ELISA板反应时均为阴性(表1)。表明A单抗可以特异识别DTMUV。

[0093] 表1、单克隆抗体特异性试验

[0094]

抗体		ELISA 检测									
		蛋白质 A	DTMUV	DPV	DHV	NDV	AIV	IBV	ARV	EDSV	阴性血清
A 单 抗	OD ₄₅₀ 值	1.782	1.631	0.088	0.108	0.101	0.077	0.062	0.098	0.109	0.115
	阴性/阳性	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

[0095] 注:表1中,“-”表示阴性,“+”表示阳性。

[0096] 实施例2、荧光纳米晶试纸条的制备

[0097] 一、荧光纳米晶颗粒的制备及表面修饰

[0098] 1、荧光纳米晶颗粒制备

[0099] 将1.1mL的去离子水加入100mL的洁净圆底烧瓶中,然后再分别加入4.74g的TritonX-100、3.64g的正辛醇以及14.50g环己烷,制成W/O型微乳液,向其中加入6.15mg BHHCT(Abcam,货号:ab145314)和1.37mg EuCl₃·6H₂O(上海永叶生物科技有限公司,货号:S42353);搅拌0.5h后,加入200 μ L的TEOS(Sigma公司,货号:X-020)和200 μ L 12mol/L的浓氨水;室温搅拌反应24小时后,加入约40mL丙酮结束反应,离心弃上清液。沉淀部分分别用乙

醇和超纯水将沉淀洗3次后,于真空干燥箱中干燥2h,得到荧光纳米晶颗粒。

[0100] 2、荧光纳米晶颗粒的表面修饰

[0101] (1) 将氨基硅烷溶于无水乙醇中得到氨基硅烷的质量百分比浓度为5%的氨基硅烷溶液;

[0102] (2) 将步骤1的荧光纳米晶颗粒于150℃加热4h干燥;然后用1mol/L四水乙酸镍洗涤几次,离心去上清液,得到清洗后的荧光纳米晶颗粒;

[0103] (3) 在通风橱内,将步骤(1)的氨基硅烷溶液和步骤(2)的清洗后的荧光纳米晶颗粒加热回流12-24h,温度为120℃;冷却,用1mol/L四水乙酸镍洗涤产物,弃上清液,得到氨基化颗粒;

[0104] (4) 将戊二酸酐溶于二甲基甲酰胺(DMF)中,直至接近饱和,加入三乙胺,得到溶液甲,溶液甲中戊二酸酐的浓度为1g/mL,三乙胺的浓度为1mg/mL;将步骤(3)所得氨基化颗粒悬浮于溶液甲中,搅拌2-4h;用DMF洗涤氨基化表面,然后用去离子水洗涤干净,得到表面修饰后的荧光纳米晶颗粒,用去离子水重悬表面修饰后的荧光纳米晶颗粒,得到表面修饰后的荧光纳米晶颗粒(即氨基修饰的荧光纳米晶颗粒)浓度为1mg/mL的荧光纳米晶颗粒液体,备用。

[0105] 二、荧光纳米晶颗粒标记单克隆抗体

[0106] 取步骤一的荧光纳米晶颗粒液体50μL,用50mM MES缓冲液(pH6.0)洗涤2次,1mL/次;用600μL 50mM MES缓冲液(pH6.0)重悬荧光纳米晶颗粒,得到颗粒悬浮液,将其命名为颗粒悬浮液1;向该颗粒悬浮液1中加入sulfo-NHS和EDC,得到反应液1,反应液1中sulfo-NHS的浓度为20mg/mL,EDC的浓度为20mg/mL,将反应液1室温摇动反应30min;离心,弃上清液;用1mL 50mM缓冲液MES(pH6.0)洗涤颗粒一次;用1mL 50mM缓冲液MES(pH6.0)重悬颗粒,得到颗粒悬浮液,将其命名为颗粒悬浮液2;向颗粒悬浮液2中加入50μg实施例1的A单抗,室温振摇反应1h,得到反应液2;向反应液2中加入与反应液2等体积的PBS-BSA溶液(PBS-BSA溶液为向PBS中加入BSA得到的BSA质量百分比浓度为2%的液体,pH7.4),继续反应1h,得到反应液3;将反应液3离心,检测上清液中抗体的浓度。

[0107] 按照上述方法,将向颗粒悬浮液2中加入实施例1的A单抗的量分别设为50μg、100μg、150μg、200μg、250μg、300μg对荧光纳米晶颗粒进行标记,用BCA蛋白检测试剂盒检测标记后的上清液中抗体的浓度。取上清液中的抗体的浓度刚好升高的前一个浓度为最佳抗体用量,最终确定与50μL 1mg/mL荧光纳米晶颗粒共价偶联的最佳A单抗的量为150μg。

[0108] 将150μg A单抗与50μL 1mg/mL荧光纳米晶颗粒共价偶联得到的反应液3进行离心,弃上清液;用50mM MES缓冲液(pH6.0)洗涤颗粒3次,1mL/次,弃上清液,得到荧光纳米晶颗粒标记的A单抗;用300μL重悬液(重悬液为向10mM Tris-HCl(pH8.0)中加入蔗糖得到的蔗糖的质量百分比浓度为10%的液体)重悬荧光纳米晶颗粒标记的A单抗,得到荧光纳米晶颗粒标记A单抗悬浮液,4℃保存备用。

[0109] 三、荧光纳米晶试纸条的制备

[0110] 1、荧光纳米晶试纸条中硝酸纤维素膜的制备

[0111] 以A多抗作为硝酸纤维素膜上的检测线包被抗体,以羊抗鼠IgG(ABCAM公司,ab6789)作为硝酸纤维素膜上的质控线包被抗体,具体方法如下:

[0112] 采用0.02M PBS(pH=7.4)缓冲液,将羊抗鼠IgG抗体和A多抗的浓度均配制为浓度

1mg/mL,利用Bio-Dot XYZ3050喷膜系统将羊抗鼠IgG抗体喷至硝酸纤维素膜(NC膜)的质检线(C线)位置,将A多抗喷至检测线(Test Line,T线)位置,喷样速度为1.0 μ L/cm,然后于相对湿度为10%以下的干燥条件下进行抽湿4小时后,得到喷有抗体的硝酸纤维素膜,干燥密封保存待用。

[0113] 在喷制质检线时,采用用0.02M PBS (pH=7.4) 缓冲液将羊抗鼠IgG抗体配制为不同浓度的羊抗鼠IgG抗体溶液(不同羊抗鼠IgG抗体溶液中羊抗鼠IgG抗体的浓度分别为0.5mg/mL、0.8mg/mL、1mg/mL、1.2mg/mL、1.5mg/mL) 喷至NC膜的C线处,并在相对湿度为10%以下的干燥条件下进行抽湿4小时后,用步骤二的抗体标记颗粒悬浮液进行检测,在紫外线下观察,结果发现,随着羊抗鼠IgG浓度的增加,质检线的亮度也逐渐增加,在达到1mg/mL后亮度不再明显增加,因此确定质检线的最佳包被条件为1mg/mL的羊抗鼠IgG。

[0114] 在喷制检测线时,采用用0.02M PBS (pH=7.4) 缓冲液将A多抗配制为不同浓度的A多抗溶液(不同A多抗溶液中A多抗的浓度分别为0.5mg/mL、0.8mg/mL、1mg/mL、1.2mg/mL、1.5mg/mL) 喷至NC膜的C线处,并在相对湿度为10%以下的干燥条件下进行抽湿4小时后,用步骤二的抗体标记颗粒悬浮液与蛋白质A反应后得到的颗粒进行检测,在紫外线下观察,结果发现,随着A多抗浓度的增加,检测线的亮度也逐渐增加,在达到1mg/mL后亮度不再明显增加,因此确定检测线的最佳包被条件为1mg/mL的A多抗。如图3所示。

[0115] 2、荧光纳米晶试纸条中样品垫的制备

[0116] 用膜处理缓冲液(膜处理缓冲液为向0.02M PBS (pH=7.4) 中加入TritonX-100、BSA和蔗糖得到的TritonX-100、BSA和蔗糖的质量百分比浓度分别为2%、1%和1%的溶液) 处理玻璃纤维样品垫,抽湿4小时待用;用上述膜处理缓冲液按1:100稀释步骤二的荧光纳米晶颗粒标记A单抗悬浮液,得到稀释的荧光纳米晶颗粒标记A单抗悬浮液,采用Bio-Dot XYZ3050喷膜系统将稀释的荧光纳米晶颗粒标记A单抗悬浮液喷涂至上述处理过的样品垫上,喷有荧光纳米晶颗粒标记A单抗的样品垫,抽湿干燥备用。

[0117] 3、连接垫的制备

[0118] 用膜处理缓冲液处理硝酸纤维素膜连接垫,抽湿4小时待用;采用Bio-Dot XYZ3050喷膜系统将步骤二的稀释的荧光纳米晶颗粒标记A单抗悬浮液喷涂至上述处理过的连接垫上,喷有荧光纳米晶颗粒标记A单抗的连接垫,抽湿干燥备用。

[0119] 4、荧光纳米晶试纸条的组装

[0120] 按照图4进行组装:

[0121] 制备好的连接垫与样品垫重叠连接。将喷有检测线和质检线硝酸纤维素膜粘贴于衬板上,将吸水垫、连接垫重叠的样品垫分别粘帖于硝酸纤维素膜的两端,均与NC膜重合叠压3mm,试纸条装配模式同胶体金试纸条,进而采用Bio-Dot GM4500切条机将其裁成5mm宽的条状,4 $^{\circ}$ C密封干燥保存备用。

[0122] 荧光纳米晶试纸条A的预期反应结果:

[0123] 当待检液体样品沿着试纸条通过毛细作用向上泳动时,如果被检样品中含有DTMUV时,DTMUV的抗原首先与荧光纳米晶颗粒上的A单抗结合形成复合物,该复合物继续流动,与被固定在检测线上的A多抗结合捕获,从而在检测线上富集,在紫外线照射激发下发出红光,没有被捕获的结合有A单抗的荧光纳米晶颗粒继续向前流动,与固定在质检线上的羊抗鼠IgG免疫球蛋白结合,并在质检线上富集,在紫外线照射激发下发出红光;如果被检

样品中不含DTMUV时,结合有A单抗的荧光纳米晶颗粒与固定在质检线上的羊抗鼠IgG免疫球蛋白结合,并在质检线上富集,在紫外线照射激发下发出红光。

[0124] 在紫外线照射下,在检测线和质检线同时出现红色条带的判为阳性反应,待检液体中含有DTMUV抗原;只在质检线出现红色条带的判为阴性反应,待检液体中不含DTMUV抗原;如果质检线未出现红色条带,则表明操作过程不正确或试纸条失效。

[0125] 按照步骤1至步骤4的方法,将A多抗替换为B多抗,B多抗的用量为A多抗的最佳用量,其他步骤均不变,得到荧光纳米晶试纸条,将该荧光纳米晶试纸条命名为荧光纳米晶试纸条B,作为对照。

[0126] 实施例3、荧光纳米晶试纸条的特异性

[0127] 实验重复三次,每次重复实验的具体步骤如下:

[0128] 用实施例2的荧光纳米晶试纸条A和荧光纳米晶试纸条B分别检测鸭瘟病毒(DPV)、鸭病毒性肝炎病毒(DHV)、番鸭源禽I型副粘病毒(NDV)、禽流感病毒(AIV)、禽传染性支气管炎病毒(IBV)、番鸭呼肠孤病毒(ARV)、减蛋综合症病毒(EDSV)和鸭坦布苏病毒(DTMUV)以及阴性血清(未感染DTMUV的鸭的血清),具体步骤如下:

[0129] 用PBS分别重悬鸭瘟病毒(DPV)、鸭病毒性肝炎病毒(DHV)、番鸭源禽I型副粘病毒(NDV)、禽流感病毒(AIV)、禽传染性支气管炎病毒(IBV)、番鸭呼肠孤病毒(ARV)、减蛋综合症病毒(EDSV)和鸭坦布苏病毒(DTMUV),分别得到相应病毒悬液,即DPV悬液、DHV悬液、NDV悬液、AIV悬液、IBV悬液、ARV悬液、EDSV悬液和DTMUV悬液,各病毒悬液中病毒的含量相同。

[0130] 用移液器将DPV悬液、DHV悬液、NDV悬液、AIV悬液、IBV悬液、ARV悬液、EDSV悬液和DTMUV悬液以及PBS和阴性血清分别垂直缓慢滴至实施例2的荧光纳米晶试纸条A的样品垫上,10-20min后在紫外线下进行观察,结果如表2和图5所示。

[0131] 用移液器将DPV悬液、DHV悬液、NDV悬液、AIV悬液、IBV悬液、ARV悬液、EDSV悬液和DTMUV悬液以及PBS和阴性血清分别垂直缓慢滴至实施例2的荧光纳米晶试纸条B的样品垫上,10-20min后在紫外线下进行观察,结果如表2所示。

[0132] 表2、荧光纳米晶试纸条特异性试验结果

[0133]

试纸条	反应结果									
	DTMUV	DPV	DHV	NDV	AIV	IBV	ARV	EDSV	PBS	阴性血清
荧光纳米晶试纸条 A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
荧光纳米晶试纸条 B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0134] 注:表2中,“-”表示阴性,即质检线发红光且检测线无红光,“+”表示阳性,即质检线与检测线均发红光。

[0135] 结果显示,荧光纳米晶试纸条A可以特异识别DTMUV,荧光纳米晶试纸条B不能识别DTMUV。

[0136] 实施例4、荧光纳米晶试纸条的灵敏度

[0137] 实验重复三次,每次重复实验的具体步骤如下:

[0138] 用核酸蛋白测定仪测定鸭坦布苏病毒液280nm、260nm波长处OD值,按以下公式计算鸭坦布苏病毒蛋白浓度。鸭坦布苏病毒蛋白浓度(mg/mL) = (1.45 × OD₂₈₀ - 0.74 × OD₂₆₀) ×

稀释倍数

[0139] 将鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 用PBS悬浮,得到鸭坦布苏病毒液,将鸭坦布苏病毒液稀释,分别得鸭坦布苏病毒蛋白到浓度为0.05、0.1、1、5、10、20、50、100、200、500ng/mL的DTMUV悬液。检测前先将待检测样品恢复室温,用移液器将100 μ L各DTMUV悬液及PBS(即DTMUV的浓度为0ng/mL)垂直缓慢滴加在实施例2的荧光纳米晶试纸条A的样品垫上,10-20min后用手持式紫外灯进行照射,观察检测结果,如表3所示。

[0140] 根据文献《鸭坦布苏病毒E基因主要抗原域的原核表达及单克隆抗体的制备》(孙涛等,中国预防兽医学报,第38卷第6期,2016年6月)公开的单克隆细胞株4G8、6B12,获取这两株细胞株表达出的单抗4G8、6B12。

[0141] 按照实施例步骤三的方法,将A多抗分别替换为单抗4G8和6B12,单抗4G8和6B12的用量均为A多抗的最佳用量,其他步骤均不变,得到荧光纳米晶试纸条4G8和荧光纳米晶试纸条6B12。

[0142] 按照上述方法,将荧光纳米晶试纸条A替换为荧光纳米晶试纸条4G8和荧光纳米晶试纸条6B12,其他步骤均不变,得到荧光纳米晶试纸条4G8和6B12的灵敏度检测结果(表3)。

[0143] 表3、荧光纳米晶试纸条灵敏度试验结果

[0144]

试纸条	鸭坦布苏病毒蛋白浓度 (ng/mL)										
	0	0.05	0.1	1	5	10	20	50	100	200	500
荧光纳米晶试纸条 A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
荧光纳米晶试纸条 4G8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
荧光纳米晶试纸条 6B12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

[0145] 注:表3中,“-”表示阴性,即质检线发红光且检测线无红光,“+”表示阳性,即质检线与检测线均发红光。

[0146] 由上述结果可知,荧光纳米晶试纸条A可以检测到鸭坦布苏病毒蛋白浓度为0.1ng/mL的DTMUV,荧光纳米晶试纸条4G8可以检测到鸭坦布苏病毒蛋白浓度为100ng/mL的DTMUV,荧光纳米晶试纸条6B12可以检测到鸭坦布苏病毒蛋白浓度为100ng/mL的DTMUV,表明,荧光纳米晶试纸条A的灵敏度为0.1ng/mL鸭坦布苏病毒蛋白,远高于荧光纳米晶试纸条4G8和6B12的灵敏度。

[0147] 实施例5、荧光纳米晶试纸条的重复性

[0148] 实验重复三次,每次重复实验的具体步骤如下:

[0149] 用实施例4的10ng/mL的DTMUV悬液作为阳性样品检测随机抽取的实施例2的不同批次(共3个批次)及同一批次中不同的荧光纳米晶试纸条A(每批次选取30个),检测试纸条的重复性。阳性样品共检测随机抽取的不同批次及同一批次中不同的荧光纳米晶试纸条A 90个,具体实验按照实施例4进行,用PBS作为阴性对照样品。结果显示在紫外灯下这90个试纸条的结果一致,质检线与检测线均发荧光,表明,荧光纳米晶试纸条A的重复性好。

[0150] 实施例6、荧光纳米晶试纸条的质保期限

[0151] 实验重复三次,每次重复实验的具体步骤如下:

[0152] 取实施例2的荧光纳米晶试纸条A 100条,保存于4 $^{\circ}$ C冰箱中,在荧光纳米晶试纸条

A在4℃下保存分别满1、2、3、4、5、6、7、8、9和10个月时取出10条,连同新制备得到的荧光纳米晶试纸条A(即保存0个月)用实施例4的10ng/mL的DTMUV悬液作为阳性样品进行检测,确定荧光纳米晶试纸条A的质保期限(表4),用PBS作为阴性对照样品。

[0153] 表4、荧光纳米晶试纸条质保期限试验结果

试纸条	保存时间(月)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
荧光纳米晶试纸条 A	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*

[0155] 注:表4中,“*”表示质检线与检测线均无红光,“+”表示阳性,即质检线与检测线均发红光。

[0156] 结果发现,在4℃保存6个月内,荧光纳米晶试纸条A的检测结果没有任何变化,荧光纳米晶试纸条A在4℃保存满7个月及更长时间时,试纸条失效,不能检测到DTMUV。结果表明,荧光纳米晶试纸条A在4℃下可以保存6个月。

[0157] 实施例7、荧光纳米晶试纸条的准确性

[0158] 采用实施例2的荧光纳米晶试纸条A以及RT-PCR的方法对临床上采集的215个鸭血清样品进行DTMUV检测,结果如表5所示。RT-PCR用到的引物为:F1:5' CTAGTGAAGAATCCTACCG-3' F2:5' -AAGTGAATTCACCCCAACTGAGCC-3',采用的试剂为PrimeScript™One Step RT-PCR Kit Ver.2(宝生物工程(大连)有限公司,货号:RR057A)。

[0159] 表5、试纸条及RT-PCR检测样品的结果

试纸条	RT-PCR		
	阳性	阴性	总数
阳性	26	1	27
阴性	2	186	188
总数	28	187	215

[0161] 根据表4计算利用荧光纳米晶试纸条A检测DTMUV的特异性、敏感性和准确性,特异性为:186/187=99.47%;敏感性为:26/28=92.86%;准确性:(26+186)/215=98.60%。利用荧光纳米晶试纸条A检测DTMUV具有高特异性、高敏感性和高准确性。

<110> 徐成蔚
 <120> 检测鸭坦布苏病毒的侧向流免疫层析测定产品及相关试剂与制备方法
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 1
 atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtgccg cggcagccat 60
 atgcctaccg aactgggca tggcactgtc gtggtggaat tgtcttatgc aggtaccgat 120
 gggccctgta gaggcccat atccatgtcg gcagatctga atgacatgac accagttgga 180
 cgcttgataa cagtcaaccc atacgtgtcg acctctcca cgggtgcca gataatggtg 240
 gaagtggaac ctccattcgg ggattcattc atcttagtag gaagtggaaa aggacagatc 300
 aggtaccagt ggcatagaag tgggagcaca attggaaaag cttttacgtc aactcctcaa 360
 ggagcacaaa ggatggttgc tttgggtgac actgcatggg attttgctg a 411
 <210> 2
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 2
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Val
 20 25 30
 Glu Leu Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Arg Val Pro Ile Ser
 35 40 45
 Met Ser Ala Asp Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr
 50 55 60
 Val Asn Pro Tyr Val Ser Thr Ser Ser Thr Gly Ala Lys Ile Met Val
 65 70 75 80
 Glu Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Phe Ile Leu Val Gly Ser Gly
 85 90 95
 Lys Gly Gln Ile Arg Tyr Gln Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly

	100		105		110	
Lys Ala Phe Thr Ser Thr Leu	Lys Gly Ala Gln Arg Met Val Ala Leu					
	115		120		125	
Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly						
	130		135			
<210> 3						
<211> 432						
<212> DNA						
<213> 人工序列						
<220>						
<223>						
<400> 3						
atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat	60					
atgttcagct gtctggggat gcagaaccga gactttgttg agggagtga tgggtgttgag	120					
tggatcgatg tcgttctgga aggaggctca tgtgtgacca tcacggcaaa agacaagccg	180					
accatagacg tcaagatgat gaacatggag gctacggaat tagcggttgt gagatcttac	240					
tgctatgagc cгааagtgc ggacgtgacg acagaatcca gatgcccaac catgggagag	300					
gctcataatc ccaaggcaac ttatgctgaa tacatatgca aaaaagattt tgtggacagg	360					
ggttggggca atggctgtgg cttgtttgga aaggggagca tacagacatg tgccaagttt	420					
gactgcacat ga	432					
<210> 4						
<211> 143						
<212> PRT						
<213> 人工序列						
<220>						
<223>						
<400> 4						
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro						
1	5		10		15	
Arg Gly Ser His Met Phe Ser Cys Leu Gly Met Gln Asn Arg Asp Phe						
	20		25		30	
Val Glu Gly Val Asn Gly Val Glu Trp Ile Asp Val Val Leu Glu Gly						
	35		40		45	
Gly Ser Cys Val Thr Ile Thr Ala Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val						
	50		55		60	
Lys Met Met Asn Met Glu Ala Thr Glu Leu Ala Val Val Arg Ser Tyr						
65	70		75		80	
Cys Tyr Glu Pro Lys Val Ser Asp Val Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro						
	85		90		95	

Thr	Met	Gly	Glu	Ala	His	Asn	Pro	Lys	Ala	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Ile
			100						105					110	
Cys	Lys	Lys	Asp	Phe	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu
			115						120					125	
Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Gln	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Asp	Cys	Thr	
			130						135					140	

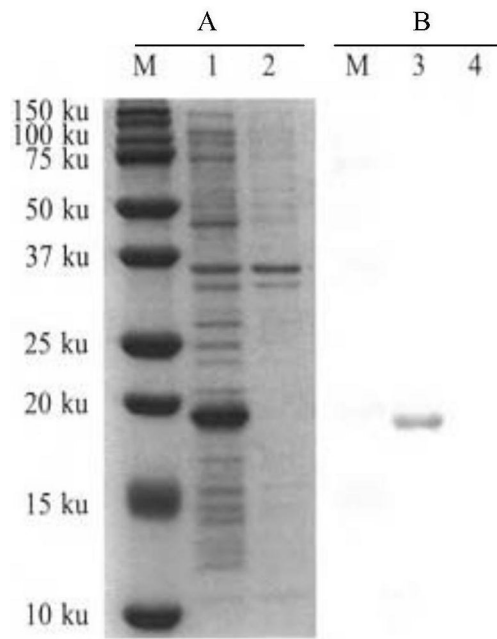


图1

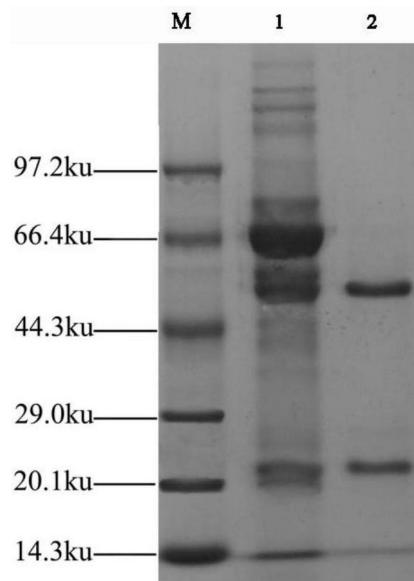


图2

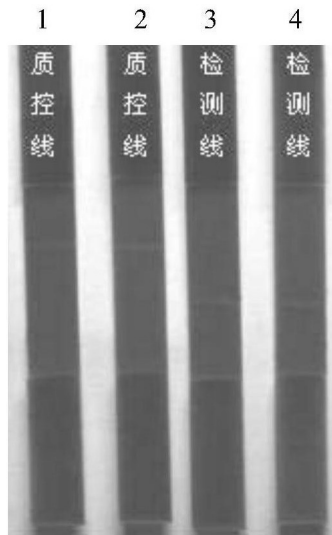


图3

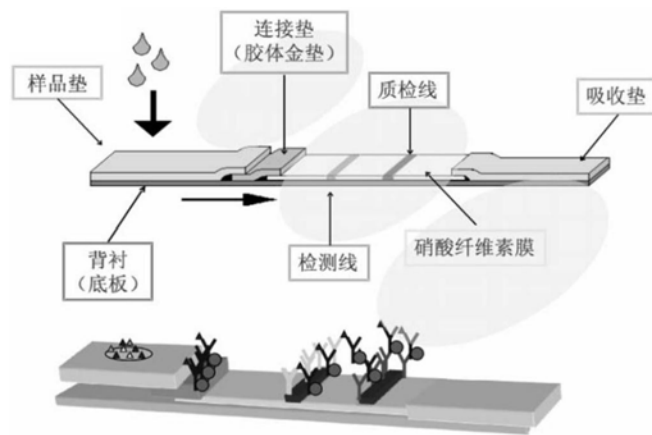


图4

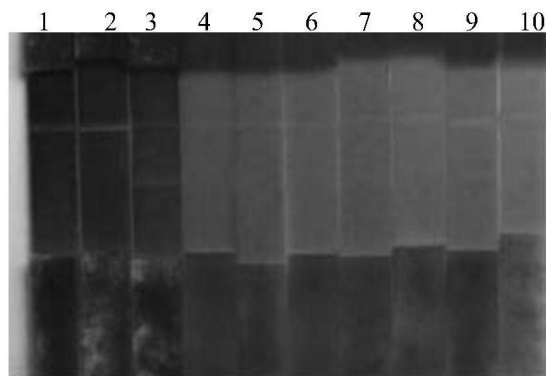


图5

