

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710057469.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月24日

[11] 公开号 CN 101059516A

[22] 申请日 2007.5.25

[21] 申请号 200710057469.9

[71] 申请人 天津市禽病诊断培训中心

地址 300402 天津市北辰区宜兴埠

[72] 发明人 梁智选

[74] 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有限公司

代理人 闫俊芬

权利要求书2页 说明书6页

## [54] 发明名称

鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤  
试验检测方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法,首先取1uL CAV层析抗原点在NC膜(0.45 μ m硝酸纤维素膜)斑点中央,室温下自然干燥0.5h,用PBS洗3min、除去未吸附上的抗原;将点样后的NC膜浸于封闭液(0.01Mol/L、pH7.4 PBS,含5%BSA、0.5%Tween-20)中,37℃作用下30min,用PBS洗3min、除去未吸附的封闭液、凉干;加待检血清标本100uL于NC膜的点样处,37℃作用下30min;加金标兔抗鸡IgG 100UL,37℃作用下15min,用去离子水洗3min;NC膜浸入硝酸银显影液中、室温下避光作用10min,移入定影液中、室温下作用5min,然后用去离子水冲洗,自然干燥后观察结果。若与金标抗体作用20min,经银染色后NC膜上呈现红色斑点的则

为阳性、黑色斑点为强阳性,否则为阴性。本发明对CAV进行临床诊断不仅切实可行,且具有快速、准确、特异的优点,满足了临床诊断的要求,为检测CAV抗体提供了便利条件。

1. 一种鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法，其特征是，按照下述步骤进行：

(1) 点样：取 1 $\mu$ L 鸡传染性贫血病毒 (CAV) 层析抗原点在 NC 膜斑点中央，室温下自然干燥 0.5h，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 min、除去未吸附上的抗原；

其中 CAV 层析抗原按照下述步骤制备：

a、CAV VP1 基因的克隆及原核表达载体的构建：根据发表的 CAV VP1 基因组序列分别设计引物，以 CAV 天津分离 TJBD33 株为模板，采用聚合酶链式反应方法扩增出 690 bp 的 DNA 片段；将扩增的 DNA 片段纯化后克隆至 pGM-T Easy 载体中构建重组克隆质粒；通过酶切、克隆将 CAV VP1 基因片段分别插入原核表达载体，转化感受态大肠杆菌 DH $_{5\alpha}$ ，用聚合酶链式反应方法挑选阳性菌落，培养后提取表达 CAV VP1 基因的重组质粒；

b、CAV VP1 表达蛋白的制备：将上述阳性菌落接种于 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6，然后加入异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 于 26 $^{\circ}$ C 条件下诱导 3.5h，获得表达 CAV VP1 蛋白的菌体；培养表达重组蛋白的细菌，裂解后用几丁柱方法进行纯化，得到 CAV 层析抗原；

(2) 封闭：将点样后的 NC 膜浸于封闭液中，封闭液为 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液，PBS 溶液中含 5% 牛血清白蛋白 (BSA)、0.5% 吐温-20 (Tween-20)，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30min，用 PBS 溶液洗 3min、除去未吸附的封闭液后晾干；

(3) 加待检血清：加待检血清标本 100 $\mu$ L 于 NC 膜的点样处，37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min；

(4) 加金标抗体：加金标兔抗鸡免疫球蛋白 (IgG) 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 作用下 15min，用去离子水洗 3 min；

其中金标兔抗鸡免疫球蛋白 (IgG) 按照下述步骤制备:

a、胶体金颗粒的制备: 分别按要求制备 A 液和 B 液; A 液: 1% HAuCl<sub>4</sub> 水溶液 1mL 加入 79mL 双馏水中混匀; B 液: 1% 枸橼酸三钠 4mL, 0.1Mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.025mL, 1% 鞣酸 0.1mL, 双馏水 15.875mL; 将 A 液、B 液分别加热至 60℃, 在电磁搅拌下迅速将 B 液加入 A 液中, 溶液变蓝, 继续加热搅拌、煮沸直至溶液呈亮红色且颜色再不发生变化为止, 室温下冷却, 分装为每份 1mL 保存于 4℃;

b、金标兔抗鸡 IgG 的制备与纯化: 分别取 10mL 上述胶体金溶液和兔抗鸡 IgG 抗体, 并将胶体金和兔抗鸡 IgG 抗体溶液分别以 0.1Mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调 pH 至 9.0, 在电磁搅拌下将兔抗鸡 IgG 抗体溶液, 加入胶体金溶液混合, 搅拌 10min, 并加入一定量 5% BSA 使溶液终浓度为 1%, 以防止兔抗鸡 IgG 抗体与胶体金聚合发生沉淀; 将胶体金兔抗鸡 IgG 结合物先 1500r/min 4℃ 离心 30 min, 弃掉由凝聚形成的沉淀; 将上清液于 4℃、15000 r/min 离心 1h, 小心吸取上清液并弃掉, 取沉淀; 将沉淀物用含 1% BSA、0.05% NaN<sub>3</sub> 的 0.01 Mol/L pH8.2 的 PB 液重悬沉淀至原量, 于 4℃ 下平衡过夜, 然后重复 4℃、15000 r/min 离心 1h 一次, 再将沉淀物重悬为原来体积的 1/5, 分装为每份 10mL 后于 4℃ 保存;

(5) 银加强染色: NC 膜浸入硝酸银显影液中、室温下避光作用 10min, 移入定影液中、室温下作用 5min, 然后用去离子水冲洗, 自然干燥后观察结果;

(6) 结果判定: 若与金标抗体作用 20min, 经银染色后 NC 膜上呈现红色斑点的则为阳性、黑色斑点为强阳性, 否则为阴性。

2. 根据权利要求 1 所述的鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法, 其特征是, 所述 NC 膜为 0.45um 的硝酸纤维素膜。

## 鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法

### 技术领域

本发明涉及病毒检测技术领域，更具体地说，是涉及一种鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验（DIGFA）检测方法。

### 背景技术

鸡传染性贫血病(Chicken Infectious Anemia, CIA)是鸡传染性贫血病毒(Chicken Anemia Virus, CAV)引起的一种以再生障碍性贫血和全身淋巴器官萎缩，造成免疫抑制为主要特征的病毒性传染病。其病原—鸡传染性贫血病毒1979年由日本学者Yuasa等首次报道以后，相继在西德、瑞典、英国、丹麦、波兰、美国、澳大利亚、荷兰及巴西等国陆续证实了本病的发生。我国于1992年首次分离到此病毒。CAV为环状单股DNA病毒，在国际病毒分类委员会（ICTV）发表的第六次病毒分类报告中将其与猪环状病毒、鸚鵡喙羽病病毒一起设立了一个新科，即圆环病毒科(Circoviridae)。

目前可以用于鸡传染性贫血的诊断方法主要有：CAV病毒的分离和鉴定、电镜观察、免疫荧光或过氧化物酶染色法和聚合酶链式反应(PCR)方法等。上述方法都需要荧光显微镜、酶标仪、PCR仪等昂贵的仪器设备，反应条件相对苛刻，再加上操作步骤繁琐，试验时间长等，因而使其在基层的应用受到一定的局限性。鉴于上述原因，研究新的快速、敏感、特异、简便、容易操作的CAV检测技术就显得十分必要，也是当前亟待解决的问题，这对于加强该病的诊断和预防研究具有极为重要的意义。

### 发明内容

本发明所要解决的技术问题是，克服现有技术中存在的不足，提供一种快速、简便、敏感性高的鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法。

本发明鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法，通过下述步骤予以实现：

(1) 点样：取 1 $\mu$ L 鸡传染性贫血病毒 (CAV) 层析抗原点在 NC 膜斑点中央，室温下自然干燥 0.5h，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 min、除去未吸附上的抗原；

其中 CAV 层析抗原按照下述步骤制备：

a、CAV *VPI* 基因的克隆及原核表达载体的构建：根据发表的 CAV *VPI* 基因组序列分别设计引物，以 CAV 天津分离 TJB33 株为模板，采用聚合酶链式反应方法扩增出 690 bp 的 DNA 片段；将扩增的 DNA 片段纯化后克隆至 pGM-T Easy 载体中构建重组克隆质粒；通过酶切、克隆将 CAV *VPI* 基因片段分别插入原核表达载体，转化感受态大肠杆菌 DH $_{5\alpha}$ ，用聚合酶链式反应方法挑选阳性菌落，培养后提取表达 CAV *VPI* 基因的重组质粒；

b、CAV *VPI* 表达蛋白的制备：将上述阳性菌落接种于 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6，然后加入异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 于 26 $^{\circ}$ C 条件下诱导 3.5h，获得表达 CAV *VPI* 蛋白的菌体；培养表达重组蛋白的细菌，裂解后用几丁柱方法进行纯化，得到 CAV 层析抗原；

(2) 封闭：将点样后的 NC 膜浸于封闭液中，封闭液为 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液，PBS 溶液中含 5% 牛血清白蛋白 (BSA)、0.5% 吐温-20 (Tween-20)，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30min，用 PBS 溶液洗 3min、除去未吸附的封闭液后晾干；

(3) 加待检血清：加待检血清标本 100 $\mu$ L 于 NC 膜的点样处，37 $^{\circ}$ C 下

作用 30 min;

(4) 加金标抗体: 加金标兔抗鸡免疫球蛋白 (IgG) 100uL, 37℃作用下 15min, 用去离子水洗 3 min;

其中金标兔抗鸡免疫球蛋白 (IgG) 按照下述步骤制备:

a、胶体金颗粒的制备: 分别按要求制备 A 液和 B 液; A 液: 1% HAuCl<sub>4</sub> 水溶液 1mL 加入 79mL 双馏水中混匀; B 液: 1% 枸橼酸三钠 4mL, 0.1Mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.025mL, 1% 鞣酸 0.1mL, 双馏水 15.875mL; 将 A 液、B 液分别加热至 60℃, 在电磁搅拌下迅速将 B 液加入 A 液中, 溶液变蓝, 继续加热搅拌、煮沸直至溶液呈亮红色且颜色再不发生变化为止, 室温下冷却, 分装为每份 1mL 保存于 4℃;

b、金标兔抗鸡 IgG 的制备与纯化: 分别取 10mL 上述胶体金溶液和兔抗鸡 IgG 抗体, 并将胶体金和兔抗鸡 IgG 抗体溶液分别以 0.1Mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调 pH 至 9.0, 在电磁搅拌下将兔抗鸡 IgG 抗体溶液, 加入胶体金溶液混合, 搅拌 10min, 并加入一定量 5% BSA 使溶液终浓度为 1%, 以防止兔抗鸡 IgG 抗体与胶体金聚合发生沉淀; 将胶体金兔抗鸡 IgG 结合物先 1500r/min 4℃离心 30 min, 弃掉由凝聚形成的沉淀; 将上清液于 4℃、15000 r/min 离心 1h, 小心吸取上清液并弃掉, 取沉淀; 将沉淀物用含 1% BSA、0.05% NaN<sub>3</sub> 的 0.01 Mol/L pH8.2 的 PB 液重悬沉淀至原量, 于 4℃下平衡过夜, 然后重复 4℃、15000 r/min 离心 1h 一次, 再将沉淀物重悬为原来体积的 1/5, 分装为每份 10mL 后于 4℃保存;

(5) 银加强染色: NC 膜浸入硝酸银显影液中、室温下避光作用 10min, 移入定影液中、室温下作用 5min, 然后用去离子水冲洗, 自然干燥后观察结果;

(6) 结果判定: 若与金标抗体作用 20min, 经银染色后 NC 膜上呈现红色斑点的则为阳性、黑色斑点为强阳性, 否则为阴性。

本发明所述 NC 膜为 0.45um 的硝酸纤维素膜。

本发明的有益效果是：通过临床检测结果表明，本发明鸡传染性贫血 DIGFA 检测方法，不需要任何特殊仪器设备，且操作简便快速，所用试剂价格低廉，结果易于观察，可在数分钟内报告结果，具有快速，简便，敏感性高，特异性强和重复性好等优点，尤其适用于基层单位推广应用。

## 具体实施方式

下面结合实施例对本发明做进一步描述。

首先进行检测中自制试剂的制备：

### 1. CAV 层析抗原的制备：

a、鸡传染性贫血病毒 VP1 基因的克隆及原核表达载体的构建：根据发表的鸡贫血病毒 (CAV) VP1 基因组序列分别设计引物，以 CAV 天津分离 TJBD33 株为模板，采用 PCR 方法扩增出与预期设计大小相符的 DNA 片段；将扩增的 DNA 片段纯化后克隆至 pGM-T easy 载体中构建重组克隆质粒；通过酶切、克隆将 CAV VP1 基因片段分别插入原核表达载体，转化感受态大肠杆菌 DH<sub>5</sub> $\alpha$ ，用聚合酶链式反应方法挑选阳性菌落，培养后提取表达 CAV VP1 基因的重组质粒；

b、鸡传染性贫血病毒 VP1 表达蛋白的制备：将上述阳性菌落接种于 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中培养，然后加入异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导，获得表达 CAV VP1 蛋白的菌体；培养表达重组蛋白的细菌，裂解后用几丁柱方法进行纯化，得到 CAV 层析抗原。

### 2. 金标兔抗鸡免疫球蛋白 (IgG) 的制备：

a、胶体金颗粒的制备：分别按要求制备 A 液和 B 液；A 液：1% HAuCl<sub>4</sub> 水溶液 1mL 加入 79mL 双馏水中混匀；B 液：1% 枸橼酸三钠 4mL，0.1Mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.025mL，1% 鞣酸 0.1mL，双馏水 15.875mL；将 A 液、B 液分别加热至 60℃，在电磁搅拌下迅速将 B 液加入 A 液中，溶液变蓝，继续加热搅拌、

煮沸直至溶液呈亮红色且颜色再不发生变化为止，室温下冷却，分装（每份 1mL）保存于 4℃；

b、金标兔抗鸡 IgG 的制备与纯化：分别取 10mL 的上述胶体金溶液和兔抗鸡 IgG 抗体，并将胶体金和兔抗鸡 IgG 抗体溶液分别以 0.1Mol/L  $K_2CO_3$  调 pH 至 9.0，在电磁搅拌下将兔抗鸡 IgG 抗体溶液，加入胶体金溶液混合，搅拌 10min，并加入一定量 5% BSA 使溶液终浓度为 1%，以防止兔抗鸡 IgG 抗体与胶体金聚合发生沉淀；将胶体金兔抗鸡 IgG 结合物先 1500r/min 4℃离心 30 min，弃掉由凝聚形成的沉淀；将上清液于 4℃、15000 r/min 离心 1h，小心吸取上清液并弃掉，取沉淀；将沉淀物用含 1% BSA、0.05%  $NaN_3$  的 0.01 Mol/L pH8.2 的 PB 液重悬沉淀至原量，于 4℃下平衡过夜，然后重复 4℃、15000 r/min 离心 1h 一次，再将沉淀物重悬为原来体积的 1/5，分装（每份 10mL）后于 4℃保存。

实施例 1：某鸡场的鸡出现精神沉郁、衰弱、消瘦、体重减轻、死亡率高临床症状。经病理剖检可见：喙、肉髯和可视黏膜苍白；血液稀薄，血凝时间延长；骨髓呈黄白色。采取了病鸡的 10 份血清，100 倍稀释后进行 CAV DOT-DIGFA 检测。检测程序如下：

(1) 点样：取 1 $\mu$ L CAV 层析抗原点在 NC 膜(0.45 $\mu$ m 硝酸纤维素膜)斑点中央，室温下自然干燥 0.5h，用 PBS 洗 3 min、除去未吸附上的抗原。

(2) 封闭：将点样后的 NC 膜浸于封闭液(0.01Mol/L、pH7.4 PBS，含 5% BSA、0.5% Tween-20)中，37℃作用下 30min，用 PBS 洗 3min、除去未吸附的封闭液、晾干；

(3) 加待检血清：加待检血清标本 100 $\mu$ L 于 NC 膜的点样处，37℃作用下 30 min。

(4) 加金标抗体：加金标兔抗鸡 IgG 100 $\mu$ L，37℃作用下 15min，用去离子水洗 3 min。

(5) 银加强染色：NC 膜浸入硝酸银显影液中、室温下避光作用 10min，

移入定影液中、室温下作用 5min, 然后用去离子水冲洗, 自然干燥后观察结果。

(6) 结果判定: 若与金标抗体作用 20min, 经银染色后 NC 膜上呈现红色斑点的则为阳性、黑色斑点为强阳性, 否则为阴性。

结果 NC 膜上呈现红色斑点, 表明 10 份血清均为阳性。由于该鸡群从未做过 CAV 免疫, 说明感染了 CAV。

实施例 2: 某鸡场的鸡发生死亡, 经剖检发现, 股骨的骨髓被脂肪组织取代, 呈脂肪色、淡黄色。胸腺萎缩甚至完全退化, 颜色呈深红褐色, 法氏囊的外壁呈半透明状态, 肝脏肿胀、褪色, 腺胃黏膜出血, 疑似为鸡传染性贫血。随机采集了 20 只鸡的血清, 100 倍稀释后用 DOT-DIGFA 方法进行 CAV 抗体检测。检测步骤如下:

取 1 $\mu$ L CAV 层析抗原点在 NC 膜(0.45 $\mu$ m 硝酸纤维素膜)斑点中央, 室温下自然干燥 0.5h, 用 PBS 洗 3 min、除去未吸附上的抗原;

将点样后的 NC 膜浸于封闭液(0.01mol/L、pH7.4 PBS, 含 5% BSA、0.5% Tween-20)中, 37 $^{\circ}$ C 作用下 30min, 用 PBS 洗 3min、除去未吸附的封闭液、晾干;

加待检血清标本 100 $\mu$ L 于 NC 膜的点样处, 37 $^{\circ}$ C 作用下 30 min; 加金标兔抗鸡 IgG 100 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 作用下 15min, 用去离子水洗 3 min;

银加强染色: NC 膜浸入硝酸银显影液中、室温下避光作用 10min, 移入定影液中、室温下作用 5min, 然后用去离子水冲洗, 自然干燥后观察结果。

结果判定: 若与金标抗体作用 20min, 经银染色后 NC 膜上呈现红色斑点的则为阳性、黑色斑点为强阳性, 否则为阴性。

结果 NC 膜上呈现红色斑点, 表明 20 份血清均为阳性。由于该鸡群从未做过 CAV 免疫, 说明感染了 CAV。

专利名称(译)	鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101059516A</a>	公开(公告)日	2007-10-24
申请号	CN200710057469.9	申请日	2007-05-25
[标]发明人	梁智选		
发明人	梁智选		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N21/78		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种鸡传染性贫血病毒抗体斑点免疫胶体金渗滤试验检测方法，首先取1uL CAV层析抗原点在NC膜(0.45μm硝酸纤维素膜)斑点中央，室温下自然干燥0.5h，用PBS洗3min、除去未吸附上的抗原；将点样后的NC膜浸于封闭液(0.01Mol/L、pH7.4 PBS，含5%BSA、0.5% Tween - 20)中，37°C作用下30min，用PBS洗3min、除去未吸附的封闭液、凉干；加待检血清标本100uL于NC膜的点样处，37°C作用下30min；加金标兔抗鸡IgG 100UL，37°C作用下15min，用去离子水洗3min；NC膜浸入硝酸银显影液中、室温下避光作用10min，移入定影液中、室温下作用5min，然后用去离子水冲洗，自然干燥后观察结果。若与金标抗体作用20min，经银染色后NC膜上呈现红色斑点的则为阳性、黑色斑点为强阳性，否则为阴性。本发明对CAV进行临床诊断不仅切实可行，且具有快速、准确、特异的优点，满足了临床诊断的要求，为检测CAV抗体提供了便利条件。