



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101303351 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200810122729. 0

(22) 申请日 2008. 06. 26

(73) 专利权人 中华人民共和国徐州出入境检验检疫局

地址 221600 江苏省徐州市西安南路 130 号

(72) 发明人 宋阳威 张鑫宇 张常印 孙怀昌  
吴亚力 何玲 张敬友

(74) 专利代理机构 徐州市三联专利事务所  
32220

代理人 何君

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

(56) 对比文件

龙塔 等. 流行性牛白血病的病原及传播途径研究进展. 《动物医学进展》. 2005, 第 25 卷 (第 6 期), 65-68.

Bicka et al. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in Escherchia coli and its use in the immunoblotting assay. 《Acta Biochimica Polonica》. 2001, 第 48 卷 (第 1 期), 227-232.

周毅. 牛白血病病毒 gp51 基因的克隆、表达及 ELISA 抗体检测方法的建立. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》. 2008, (第 2 期), D050-328.

审查员 张丽颖

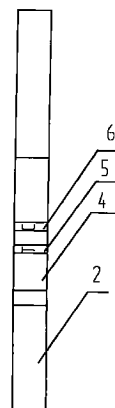
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种牛白血病病毒 (BLV) 囊膜糖蛋白 gp51 体外表达、分离纯化, 和胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法。构建重组原核表达载体 pET-32a-gp51, 在大肠杆菌中诱导表达 GP51 重组蛋白, 层析法纯化出 His-gp51 融合蛋白, 将纯化的 His-gp51 融合蛋白和羊抗牛 IgG 点样于硝酸纤维膜上, 分别作为捕获 BLV 抗体的检测线 (T 线) 和捕获牛 IgG 的质控线 (C 线), 将胶体金标记的羊抗牛 IgG (Fc) 抗体吸附于玻璃纤维制成金标垫, 从而组装成胶体金试纸条。根据检测线和质控线是否出现色带来确定血清中是否存在牛白血病抗体。



1. 一种胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条的制备方法,包括牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 体外表达、分离纯化,其特征是:构建重组原核表达载体 pET-32a-gp51,在大肠杆菌中诱导表达 GP51 重组蛋白;所述的 GP51 重组蛋白是由 PCR 法从 BLV-FLK DNA 中成功扩增出牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 基因,构建了 gp51 原核表达载体,重组蛋白主要以不溶性包涵体在大肠杆菌中表达,表达的重组蛋白能被 BLV 阳性血清识别;经尿素变性和复性后,用 Ni 柱纯化法获得单一的 His-gp51 融合蛋白条带,将纯化的 His-gp51 融合蛋白和羊抗牛 IgG 点样于硝酸纤维膜上,分别作为捕获 BLV 抗体的检测线和捕获牛 IgG 的质控线,将胶体金标记的羊抗牛 IgG-Fc 抗体吸附于玻璃纤维制成金标垫。

## 胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种牛白血病病毒 (BLV) 囊膜糖蛋白 gp51 体外表达、分离纯化, 和胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法, 属动物检疫检测技术, 主要应用于公共卫生领域。

### 背景技术

[0002] BLV 检测方法主要有病毒直接检测、血清学方法、分子生物学方法以及其他方法。目前已有的血清学方法主要有琼脂扩散试验 (AGID)、间接免疫荧光试验 (IIFA)、补体结合试验 (CFA)、放谢免疫试验 (RIA) 及酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。但琼脂扩散试验检测周期稍长, 一般需要一到两天的时间, 而 ELISA 方法检测速度相对来说较快 (需要数小时), 目前使用的检测试剂盒为美国 IDEXX 公司生产, 但是其价格昂贵, 普及使用受到极大的影响, 而且需要酶标仪等仪器设备。BLV 感染最常用的检测方法就是血清学方法, 虽然这些方法操作简单, 能有效地检测 BLV 的感染, 防止其流行, 然而这些方法也存在着某些不可弥补的局限性, 如①在病毒早期阶段不能测出抗体, 不能检出早期感染; ②易出现非特异性反应, 产生假阳性结果; ③由于新生小牛能从母乳中获得抗体, 因此血清学方法不能被动免疫或主动免疫; ④检测所需时间较长; ⑤检测费用昂贵等。另外, 不同的血清学方法检测 BLV 阳性血清, 其敏感程度也不一样。Monti GE 等 (2005) 在研究实验性感染 BLV 牛阳性血清转变时间时发现, AGID 比 ELISA 检出时间要早, 但 Reichel 等 (1998) 发现 ELISA 试验比 AGID 和电泳免疫印迹 (EIB) 敏感性提高 10%, 多检出约 10% 的反应血清。即使同一种检测方法, 其敏感程度也不一样, MPRidge SE 等 (2005) 通过比较发现, 在目前较灵敏的 Lactelisa ELISA 法可检测稀释 200 倍奶样中 BLV 抗体。Antonio DG 等 (2004) 利用重组杆状病毒表达了 BLV gp51, 并用该表达的 gp51 研制出检测 BLV 阳性血清的 ELISA 检测方法, 该方法与传统的 BLV ELISA 检测方法相比, 符合率为 99%, 与 AGID 相比, 符合率为 100%, 且将标准阳性血清稀释 1600 倍时, 检测结果仍显示强阳性, 而这两种 ELISA 方法都会增加假阳性的几率。免疫胶体金快速诊断技术是目前较常使用的一项技术, 且有逐渐取代 ELISA 的等检测方法的趋势。随着胶体金免疫层析技术的逐步完善, 譬如可以对一个样品进行多项检测, 以及可以定量检测等, 使其更易得到市场的青睐。而免疫胶体金快速诊断技术的无污染、便捷、灵敏、安全, 不仅更适合于未来环保型社会, 而且利于野外检测, 有着相当大的应用前景。其优点具体表现在以下几方面: ①快捷迅速, 大大缩短出结果时间。出结果的时间都在几分钟之内, 这是目前其它快速检测方法所无法达到的, 如市场上销售的金标 hCG 快速检测纸条一般 1-2min 内就能出结果, 这种快速与胶体金本身显色特点有关, 也与免疫层析法以及“免疫浓缩”有关, 而其他如 ELISA 法出结果要 1-2h; PCR 步骤繁琐, 耗时甚长。②灵敏准确, 结果受外因影响较少。免疫胶体金快速诊断方法并不因为其快速而牺牲了它的灵敏准确性。如用 GICA 试纸条检测 HBsAg 标准品, 灵敏度可达 1ng/ml。用 GICA 与酶免疫法比较检测了 395 份不同血清标本中 HBsAg, 两法符合率为 99.0%。此外, 由于胶体金标记蛋白

质是一物理结合过程,结合牢固,很少引起蛋白质活性改变,所以试剂非常稳定,不受温度等外界因素影响,可在实验室,甚至野外进行检测,实验结果也可长期保存。③安全简便,不需任何仪器和设备。免疫胶体金检测方法不需任何仪器和设备,只需制备好的试纸条或试剂盒即可,由于胶体金本身具有颜色,比 ELISA 省略了加显示剂和终止液的步骤,大大简化了操作,更适合于野外临床的现场应用。因为没有诸如放射性同位素、邻苯二胺等有害物质参与,所以也不会污染环境,具有放射性同位素或酶标等检测方法所无法比拟的安全性。④成本低廉,所需试剂和样本量少。因为“免疫浓缩”效应存在,免疫胶体金实验所需试剂和样本量都非常少,样本量可低至 1-2 $\mu$ l,再加上无需任何仪器和设备,并且可单份标本检测,使成本大幅下降。目前国内外尚无将胶体金诊断试纸应用到检测 BLV 感染方面的报道。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是要克服上述现有技术的不足之处,提供一种胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法,包括牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 体外表达、分离纯化,和胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条,构建重组原核表达载体 pET-32a-gp51,在大肠杆菌中诱导表达 GP51 重组蛋白,层析法纯化出 His-gp51 融合蛋白。将纯化的 His-gp51 融合蛋白和羊抗牛 IgG 点样于硝酸纤维膜上,分别作为捕获 BLV 抗体的检测线(T线)和捕获牛 IgG 的质控线(C线),将胶体金标记的羊抗牛 IgG (Fc) 抗体吸附于玻璃纤维制成金标垫,从而组装成胶体金试纸条。根据检测线和质控线是否出现色带来确定血清中是否存在牛白血病抗体。用本发明所述的试纸条检测,简便、快速、准确,适用于基层、流调、隔离检疫,和快速检测,便于及时淘汰感染牛,减少经济损失,有效控制该病的发生。

[0004] 本发明的目的是以如下技术方案实现的:一种胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法,包括牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 体外表达、分离纯化,和胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条,其特征是:构建重组原核表达载体 pET-32a-gp51,在大肠杆菌中诱导表达 GP51 重组蛋白,层析法纯化出 His-gp51 融合蛋白,将纯化的 His-gp51 融合蛋白和羊抗牛 IgG 点样于硝酸纤维膜上,分别作为捕获 BLV 抗体的检测线(T线)和捕获牛 IgG 的质控线(C线),将胶体金标记的羊抗牛 IgG (Fc) 抗体吸附于玻璃纤维制成金标垫。

[0005] 所述的一种胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法,其特征是:PCR 法从 BLV-FLK DNA 中成功扩增出牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 基因,构建了 gp51 原核表达载体,重组蛋白主要以不溶性包涵体在大肠杆菌中表达,表达的重组蛋白能被 BLV 阳性血清识别;经尿素变性和复性后,用 Ni 柱纯化法获得单一的 His-gp51 融合蛋白条带,纯化的重组蛋白具有良好的免疫反应性,用胶体金标记羊抗牛 IgG (Fc) 抗体,最佳标记量为 6  $\mu$ g/ml;用纯化的 His-gp51 融合蛋白作为抗原包被硝酸纤维膜,建立了检测 BLV 血清抗体的胶体金免疫层析法(GICA)。

[0006] 一种制备权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条,其特征是:将试纸条分为四个部分:上段为吸水滤纸(7),吸收检测样品中多余液体;中段为固相硝酸纤维素膜(4),包括判读结果的检测带 T 和指示试纸条质量的质控带 C;下段为玻璃纤维素膜(2)(加样区),接触待检测样品;中下段之间为金标垫(3),吸附胶体金标记羊抗

牛 IgG (Fc) 抗体复合物 (6) 和 His-gp51 融合蛋白区带 (5), 整个试纸条贴附于双面胶白色塑料背板 (1),

[0007] 所述的试纸条的组装操作按如下步骤进行:

[0008] 1)、固相硝酸纤维素膜 (4) 黏附于硬质塑料底板, 长约 30mm;

[0009] 2)、黏附吸水滤纸 (7), 长约 25mm, 并与固相硝酸纤维素膜 (4) 重叠 2mm;

[0010] 3)、5mm 长的金标垫 (3) 与固相硝酸纤维素膜 (4) 重叠 2mm;

[0011] 4)、玻璃纤维素膜 (2) 长约 20mm 与金标垫重叠 2mm;

[0012] 5)、用切条机切割成 4mm 宽的条形带, 密封干燥保存。

[0013] 本发明的优点是: 胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸具有检测快速、使用方便、灵敏度高、价格低廉、结果易判断等特点, 可大大提高检测的时间, 减少隔离期间饲养成本; 操作过程不需要特殊的仪器设备, 节省检测仪器设备的投入、维持经费; 低廉的制作成本, 不但可为国家节省大量的购买进口 ELISA 试剂盒外币费用, 还可普及用于牛白血病的大面积普查。该检测试纸除了可用于出入境检疫之外, 还可用于国内牛场该病的检测, 及时淘汰 BLV 感染牛, 有效防止该病的进一步蔓延, 减少饲养成本, 提高牧民收入。

#### 附图说明

[0014] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步说明;

[0015] 附图 1 为本发明金标试纸组装示意图;

[0016] 附图 2 为发明金标试纸组装右视图;

[0017] 图中; 1、双面胶白色塑料背板, 2、玻璃纤维素膜, 3、金标垫, 4、固相硝酸纤维素膜, 5、His-gp51 融合蛋白区带, 6、羊抗牛 IgG (Fc) 抗体复合物, 7、吸水滤纸。

#### 具体实施方式

[0018] 如图所示: 一种胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法, 包括牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 体外表达、分离纯化, 和胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条, 其特征是: 构建重组原核表达载体 pET-32a-gp51, 在大肠杆菌中诱导表达 GP51 重组蛋白, 层析法纯化出 His-gp51 融合蛋白, 将纯化的 His-gp51 融合蛋白和羊抗牛 IgG 点样于硝酸纤维素膜上, 分别作为捕获 BLV 抗体的检测线 (T 线) 和捕获牛 IgG 的质控线 (C 线), 将胶体金标记的羊抗牛 IgG (Fc) 抗体吸附于玻璃纤维制成金标垫。

[0019] 所述的一种胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法, 其特征是: PCR 法从 BLV-FLK DNA 中成功扩增出牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 基因, 构建了 gp51 原核表达载体, 重组蛋白主要以不溶性包涵体在大肠杆菌中表达, 表达的重组蛋白能被 BLV 阳性血清识别; 经尿素变性和复性后, 用 Ni 柱纯化法获得单一的 His-gp51 融合蛋白条带, 纯化的重组蛋白具有良好的免疫反应性, 用胶体金标记羊抗牛 IgG (Fc) 抗体, 最佳标记量为  $6 \mu\text{g/ml}$ ; 用纯化的 His-gp51 融合蛋白作为抗原包被硝酸纤维素膜, 建立了检测 BLV 血清抗体的胶体金免疫层析法 (GICA)。

[0020] 一种制备权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条, 其特征是: 将试纸条分为四个部分: 上段为吸水滤纸 (7), 吸收检测样品中多余液体; 中段为固相硝酸纤维素膜 (4), 包括判读结果的检测带 T 和指示试纸条质量的质控带 C; 下段为玻璃

纤维素膜 (2) (加样区), 接触待检测样品; 中下段之间为金标垫 (3), 吸附胶体金标记羊抗牛 IgG (Fc) 抗体复合物 (6) 和 His-gp51 融合蛋白区带 (5), 整个试纸条贴附于双面胶白色塑料背板 (1),

[0021] 所述的试纸条的组装操作按如下步骤进行:

[0022] 1) 固相硝酸纤维素膜 (4) 黏附于硬质塑料底板, 长约 30mm;

[0023] 2) 黏附吸水滤纸 (7), 长约 25mm, 并与固相硝酸纤维素膜 (4) 重叠 2mm;

[0024] 3) 5mm 长的金标垫 (3) 与固相硝酸纤维素膜 (4) 重叠 2mm;

[0025] 4) 玻璃纤维素膜 (2) 长约 20mm 与金标垫重叠 2mm;

[0026] 5) 用切条机切割成 4mm 宽的条形带, 密封干燥保存。

[0027] PCR 法从 BLV-FLK DNA 中成功扩增出牛白血病病毒囊膜糖蛋白 gp51 基因, 与已发表 gp51 蛋白 (GenBank accession No :K02120) 的氨基酸序列完全一致; 构建了 gp51 原核表达载体, 重组蛋白主要以不溶性包涵体在大肠杆菌中表达, 经 Western blotting 证明, 表达的重组蛋白能被 BLV 阳性血清识别; 经尿素变性和复性后, 用 Ni 柱纯化法获得单一的 His-gp51 融合蛋白条带, 纯化的重组蛋白具有良好的免疫反应性, 可用于 BLV 感染牛血清学检测方法的建立; 用胶体金标记羊抗牛 IgG (Fc) 抗体, 最佳标记量为  $6 \mu\text{g/ml}$ ; 用纯化的 His-gp51 融合蛋白作为抗原包被硝酸纤维素膜, 建立了检测 BLV 血清抗体的胶体金免疫层析法 (GICA), 用建立的 GICA 检测牛血清 5-10min 即可获得结果, 用 BLV 标准阳性和阴性血清进行 5 次重复试验, 结果一致; 用制备的试纸条对 22 份 BL 临床样品进行检测, 初步结果与进口 ELISA 试剂盒比较, 阳性符合率为 88.89% (8/9), 阴性符合率为 84.62% (11/13)。

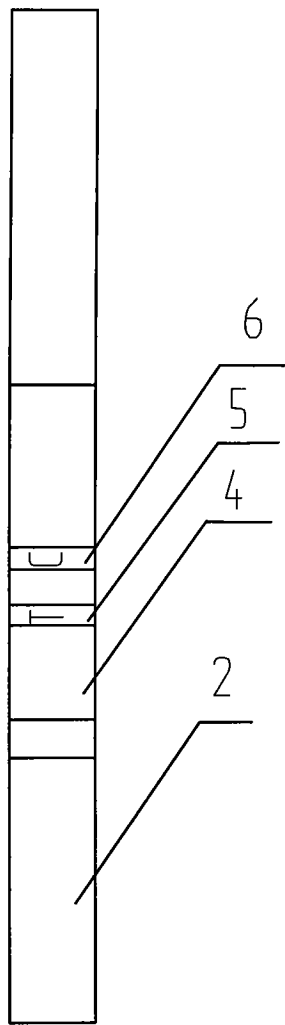


图 1

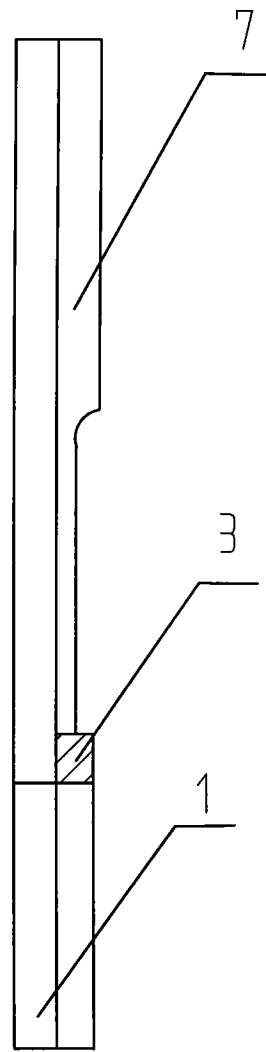


图 2

专利名称(译)	胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101303351B</a>	公开(公告)日	2012-12-05
申请号	CN200810122729.0	申请日	2008-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国徐州出入境检验检疫局		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国徐州出入境检验检疫局		
当前申请(专利权)人(译)	中华人民共和国徐州出入境检验检疫局		
[标]发明人	宋阳威 张鑫宇 张常印 孙怀昌 吴亚力 何玲 张敬友		
发明人	宋阳威 张鑫宇 张常印 孙怀昌 吴亚力 何玲 张敬友		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/52		
代理人(译)	什么先生		
审查员(译)	张丽颖		
其他公开文献	CN101303351A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种牛白血病病毒(BLV)囊膜糖蛋白gp51体外表达、分离纯化，和胶体金免疫层析法检测牛白血病抗体的试纸条及其制备方法。构建重组原核表达载体pET-32a-gp51，在大肠杆菌中诱导表达GP51重组蛋白，层析法纯化出His-gp51融合蛋白，将纯化的His-gp51融合蛋白和羊抗牛IgG点样于硝酸纤维素膜上，分别作为捕获BLV抗体的检测线(T线)和捕获牛IgG的质控线(C线)，将胶体金标记的羊抗牛IgG(Fc)抗体吸附于玻璃纤维制成金标垫，从而组装成胶体金试纸条。根据检测线和质控线是否出现色带来确定血清中是否存在牛白血病抗体。

