



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645685 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611081550.6

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2016.11.30

G01N 33/577(2006.01)

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730030 甘肃省兰州市城关区盐场堡  
徐家坪1号

(72)发明人 孙世琪 郭慧琛 张韵 常艳燕  
魏衍全 茹嘉喜 智晓莹 杜平  
刘湘涛 殷宏 罗建勋

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int. Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

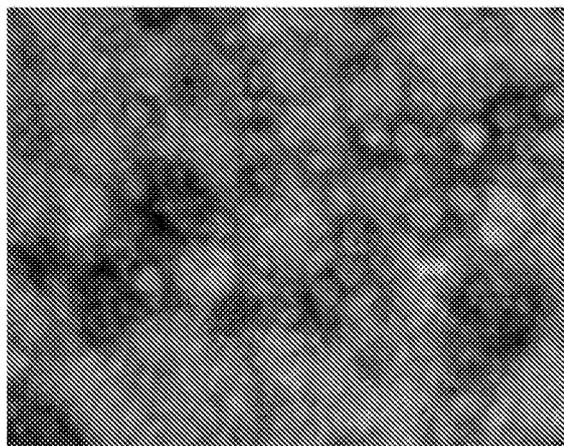
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

### (54)发明名称

一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸  
及其制备方法

### (57)摘要

本发明公开了一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法,涉及血清学检测技术领域,包括底板,底板的顶部设置有检测层,检测层上设置有检测线和对照线,检测层的顶部靠近对照线的一侧设置有吸收层,靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫,免疫金标垫的顶部设置有样品垫;免疫金标垫上涂覆有胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有SPA标记物,检测线上涂覆/浸润有A型口蹄疫病毒样颗粒,对照线上涂覆/浸润有兔IgG。本发明能够缩短检测周期,实现现场进行实时快速的测定。



1. 一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:包括底板(1),底板(1)的顶部设置有检测层(4),检测层(4)上设置有检测线(6)和对照线(7),检测层(4)的顶部靠近对照线(7)的一侧设置有吸收层(5),靠近检测线(6)的一侧设置有免疫金标垫(3),免疫金标垫(3)的顶部设置有样品垫(2);

免疫金标垫(3)上涂覆有胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有SPA标记物,检测线(6)上涂覆/浸润有A型口蹄疫病毒样颗粒,对照线(7)上涂覆/浸润有兔IgG。

2. 如权利要求1所述的一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:所述免疫金标垫(3)上胶体金与SPA的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$ 。

3. 如权利要求2所述的一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:所述免疫金标垫(3)上胶体金与SPA的比例为 $2 \times 10^4:1.3$ 。

4. 如权利要求1所述的一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:所述免疫金标垫(3)的吸附比例为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

5. 如权利要求1所述的一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:所述检测线(6)上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的A型口蹄疫病毒样颗粒。

6. 如权利要求1所述的一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,其特征在于:所述对照线(7)上涂覆/浸润有浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG。

7. 一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,其特征在于、包括以下步骤:

A、制备LgG,制备并纯化胶体金,将胶体金与SPA按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 反应,得到免疫胶体金,将浓度为 $1 \sim 1.2 \text{g}/\text{mL}$ 的免疫胶体金按吸附比为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 吸附在玻璃膜上,得到免疫金标垫(3);

B、使用硝酸纤维膜作为检测层(4)基材,在检测线(6)上喷涂浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的A型口蹄疫病毒样颗粒,在对照线(7)上喷涂浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG;

在检测层(4)的中部距检测线(6) $0.3 \sim 1 \text{cm}$ 处,喷涂对照线(7),喷膜量为 $5 \sim 15 \mu\text{I}/1 \text{cm}$ 进行喷膜,喷膜后干燥得到检测层(4);

C、在底板1的顶部设置检测层(4),并将检测层(4);压平,将吸收层(5)一部分固定在底板(1)上,一部分固定在检测层(4);上靠近对照线(7)的部分,将免疫金标垫(3)的一侧固定在底板(1)上,另一侧固定在检测层(4);靠近检测线(6)的一侧,样品垫(2)的一侧固定在底板(1)上,样品垫(2)的一侧固定在底板(1)上,另一侧固定在免疫金标垫(3)上。

8. 如权利要求7所述的用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,其特征在于:免疫金标垫(3)的制备方法为:使用浓度为 $0.1 \text{M}$ 的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调整胶体金的pH值为 $5.9$ ,按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 将相应的SPA溶液加入胶体金中放置 $30 \text{min}$ 后,在转速为 $10000 \text{r}/\text{min}$ 、温度为 $4^\circ\text{C}$ 的条件下离心 $30 \text{min}$ ,将沉淀溶于重悬液中混合均匀,用玻璃膜吸附后晾干。

9. 如权利要求7所述的用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,其特征在于:所述检测线(6)上A型口蹄疫病毒样颗粒的浓度为 $0.8 \text{mg}/\text{mL}$ ,所述对这线(7)上免疫兔血清IgG的浓度为 $1 \text{mg}/\text{mL}$ 。

## 一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及血清学检测技术领域,具体涉及一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] FMD(foot and mouth disease,口蹄疫)是由FMDV(foot and mouth disease virus,口蹄疫病毒)感染偶蹄类动物后引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,家畜中的牛、猪、山羊、绵羊等均为易感动物,口蹄疫一旦爆发往往造成大流行,不易控制和消灭,给疾病流行国家和地区的畜牧业带来严重的经济损失。因此,世界动物卫生组织(OIE)将该病列在15个A类动物疫病之首,我国政府也将口蹄疫排在14个一类动物传染病的第一位。

[0003] 口蹄疫病毒病毒的基因组RNA全长约8.5kb,依次为5' UTR、ORF和3' UTR组成,起重ORF约6.5kb长,由L基因、P1结构蛋白基因、P2和P3非结构蛋白基因以及其始密码子和终止密码子组成。

[0004] 口蹄疫病毒病毒的外壳为对称的20面体,由衣壳蛋白VP1,VP2,VP3和VP4组成,这些衣壳蛋白决定了病毒的抗原性、免疫性和血清学反应能力。

[0005] 目前已知的口蹄疫病毒病毒有7个血清型:0型、A型、C型、南非1型、南非2型、南非3型和Asia1型,同时,还包括65个以上的亚型。其中,A型口蹄疫病毒流行较为广泛,是仅次于0型口蹄疫的主要流行毒株。

[0006] 近年来,口蹄疫疫情频繁发生且呈全球化流行的态势,且A型口蹄疫多在我国周边国家发生和流行,这不仅对世界畜产品经济构成了巨大的威胁,而且引发了人们对食品安全等社会公共卫生问题的担忧,造成发生疫情的国家及地区的畜产品贸易损失惨重。

[0007] 目前口蹄疫抗体的检测方法主要包括CFT(补体结合试验)、VNT(人玻连蛋白)、凝集试验、免疫扩散和ELISA(酶联免疫吸附测定法)等,但是这些方法容易受到外部环境的干扰,需要在条件稳定的实验室中进行检测,检测周期长,无法在现场进行实时快速的测定。

[0008] 许多病毒的结构蛋白在不同的培养系统中具有组装成重复序列或者病毒样颗粒(virus-like particles,VLPs)的能力,这种VLPs不携带遗传物质,因此不具有感染性,VLPs能够重复并且高密度的展示抗原位点,能引起强烈的免疫反应。同时,一些病毒的VLPs与病毒的亚病毒粒子(subviral particles,SVPs)相似,能够VLPs直接作为疫苗使用,除此之外,VLPs还能作为载体,插入外源的抗原位点形成嵌合型的VLPs,基于VLPs的上述特征,口蹄疫病毒的VLPs成为目前口蹄疫检测研究的热点之一。

[0009] 大肠杆菌表达系统具有易于培养,设备简单且安全性高的优点,成为目前应用最为广泛的基因工程表达系统之一,被广泛应用于生物制药行业中,但是,在大肠杆菌中采用单独表达口蹄疫病毒外壳蛋白、或用不同质粒共转染大肠杆菌获得的基因工程菌的方法所表达的口蹄疫病毒外壳蛋白,不仅表达量非常低,而且常常不可溶,不能用于大规模商业应用,因此,采用传统的大肠杆菌表达系统制备A型口蹄疫病毒的VLPs以用于检测难以实现。

## 发明内容

[0010] 针对现有技术中存在的缺陷,本发明的目的在于提供一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法,能够缩短检测周期,实现现场进行实时快速的测定。

[0011] 为达到以上目的,本发明采取的技术方案是:

[0012] 一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,包括底板,底板的顶部设置有检测层,检测层包括检测线和对照线,检测层的顶部靠近对照线的一侧设置有吸收层,靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫,免疫金标垫的顶部设置有样品垫;

[0013] 免疫金标垫上涂覆有胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有SPA标记物,检测线上涂覆/浸润有A型口蹄疫病毒样颗粒,对照线上涂覆/浸润有兔IgG。

[0014] 在上述技术方案的基础上,所述免疫金标垫上胶体金与SPA的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$ 。

[0015] 在上述技术方案的基础上,所述免疫金标垫上胶体金与SPA的比例为 $2 \times 10^4:1.3$ 。

[0016] 在上述技术方案的基础上,所述免疫金标垫的吸附比例为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0017] 在上述技术方案的基础上,所述检测线上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的A型口蹄疫病毒样颗粒。

[0018] 在上述技术方案的基础上,所述对照线上涂覆/浸润有浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG。

[0019] 一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0020] A、制备LgG,制备并纯化胶体金,将胶体金与SPA按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 反应,得到免疫胶体金,将浓度为 $1 \sim 1.2 \text{g}/\text{mL}$ 的免疫胶体金按吸附比为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 吸附在玻璃膜上,得到免疫金标垫;

[0021] B、使用硝酸纤维膜作为检测层基材,在检测线上喷涂浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的A型口蹄疫病毒样颗粒,在对照线上喷涂浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG;

[0022] 在检测层的中部距检测线 $0.3 \sim 1 \text{cm}$ 处,喷涂对照线,喷膜量为 $5 \sim 15 \mu\text{I}/1 \text{cm}$ 进行喷膜,喷膜后干燥得到检测层;

[0023] C、在底板1的顶部设置检测层,并将检测层;压平,将吸收层一部分固定在底板上,一部分固定在检测层;上靠近对照线的部分,将免疫金标垫的一侧固定在底板上,另一侧固定在检测层;靠近检测线的一侧,样品垫的一侧固定在底板上,样品垫的一侧固定在底板上,另一侧固定在免疫金标垫上。

[0024] 在上述技术方案的基础上,免疫金标垫的制备方法为:使用浓度为 $0.1 \text{M}$ 的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调整胶体金的pH值为 $5.9$ ,按质量比为 $2 \times 10^4:1 \sim 1.5$ 将相应的SPA溶液加入胶体金中放置 $30 \text{min}$ 后,在转速为 $10000 \text{r}/\text{min}$ 、温度为 $4^\circ\text{C}$ 的条件下离心 $30 \text{min}$ ,将沉淀溶于重悬液中混合均匀,用玻璃膜吸附后晾干。

[0025] 在上述技术方案的基础上,所述检测线上A型口蹄疫病毒样颗粒的浓度为 $0.8 \text{mg}/\text{mL}$ ,所述对这线上免疫兔血清IgG的浓度为 $1 \text{mg}/\text{mL}$ 。

[0026] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0027] (1) 本发明的一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,由于检测层上设置有检测线和对比线,且检测线上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ A型口蹄疫病毒样颗粒,对照线

上涂覆/浸润有浓度为0.8~1.5mg/mL兔IgG,在使用时,直接将血液样品稀释后在现场(温度在0~35°均可)进行检测,如果血液样品中含有A型口蹄疫抗体,血液样品中的抗体与免疫金标垫中SPA修饰的胶体金结合形成复合物,与检测线上A型口蹄疫病毒样颗粒结合形成紫红色线条,继续前行,未与抗原结合的抗体携带重组蛋白SPA与对照线中的IgG抗体形成紫红色线条。

[0028] 将检测结果与常规的CFT、VNT凝集试验、免疫扩散和ELISA进行比较,结果基本一致,且本发明的血液未经过纯化,说明本发明的准确度较高,且检测条件不高,稳定性较好,具有操作简单、检测快速、结果清楚,易于判断和保存,且无需大型仪器设备,成本较低,能够用于临床快速实时检测,快速检测流行病,便于快速采取相应措施,避免疾病大规模爆发。

### 附图说明

[0029] 图1为本发明实施例中用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸的结构示意图。

[0030] 图2为本发明实施例中体外组装的病毒样颗粒电镜图。

[0031] 图中:1-底板,2-样品垫,3-免疫金标垫,4-检测层,5-吸收层,6-检测线,7-对照线。

### 具体实施方式

[0032] 以下结合附图及实施例对本发明作进一步详细说明。

[0033] 参见图1所示,本发明实施例提供一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸,包括采用PVC制成的底板1,底板1的顶部设置有检测层4,检测层4包括检测线6和对照线7,检测线6上设置有检测线6和对照线7,检测层4的顶部靠近对照线7的一侧设置有吸收层5,靠近检测线6的一侧设置有免疫金标垫3,免疫金标垫3的顶部设置有样品垫2。

[0034] 免疫金标垫3包括胶体金颗粒,该胶体金颗粒上结合有SPA(金黄色葡萄球菌A蛋白)标记物,检测线6涂覆/浸润有A型口蹄疫病毒样颗粒,对照线7上涂覆/浸润有兔IgG。

[0035] 本实施例中,免疫金标垫3上胶体金与SPA的比例为 $2 \times 10^4:1 \sim 2$ 最优比例为 $2 \times 10^4:1.3$ ,免疫金标垫3的吸附比例为 $10 \sim 50 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0036] 检测线6上涂覆/浸润有浓度为 $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 的A型口蹄疫病毒样颗粒,对照线7上涂覆/浸润有浓度为 $0.8 \sim 1.5 \text{mg}/\text{mL}$ 的免疫兔血清IgG。

[0037] 本发明还提供一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0038] S1、制备IgG:

[0039] a、采集2只阴性家兔全血,放入4℃冰箱过夜沉淀,将沉淀的全血在转速为4000r/min的条件下离心10min,取上清即为血清。将20mI血清中加入20mI生理盐水中,再加入10mI饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,混合均匀后静置30min,然后在转速为3000r/min的条件下离心20min,弃去沉淀除去纤维蛋白,取上清液。

[0040] b、在上清液中加入30mI  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液,混合均匀后静置30min,在转速为3000r/min的条件下离心20min,弃上清液,取沉淀物,向沉淀物中加20mI生理盐水,10mI  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液,混合均匀后静置30min,3000r/min离心20min,弃上清。

[0041] 重复b步骤2~3次后,向纯化后的沉淀中加入10mI生理盐水并透析,先放入纯水中透析过夜除盐,然后放入生理盐水中在4℃下透析24h,透析期间每2~3h换液一次。

[0042] 检测透析是否完全:检测试剂为浓度为1%的BaCl<sub>2</sub>(用于检测SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)或以纳氏试剂(用于检测NH<sub>4</sub><sup>+</sup>):取3~4mI透析液,加入检测试剂1~2滴,出现砖红色即认为有NH<sub>4</sub><sup>+</sup>存在),出现白色沉淀即有SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>存在,透析至无沉淀出现后,离心去沉淀(去除杂蛋白),上清液即为纯化后的兔IgG。

[0043] S2、制备胶体金:取1g氯金酸溶于100mI三蒸水中制成浓度为1%的氯金酸溶液,向100mI水中加入1mI 1%的氯金酸水溶液,加热至沸腾,边搅拌边逐滴加入1.7mI浓度为1%的柠檬酸钠三钠水溶液,继续煮沸5min,冷却后加入蒸馏水至100mI,即为胶体金放置于温度为4℃的条件下保存。

[0044] S3、判断SPA的最小蛋白用量:取96孔板,每孔加入100μL的胶体金,将1~20μL浓度为0.05mg/mI的SPA分别加入每孔并混匀,静置15min,每孔加入20μL浓度为10%的NaCl,放置10min,颜色保持红色的为最小蛋白用量,在此基础上加30%为最佳标记量,本实施例中,最小蛋白用量为10μL,即每100μL浓度为1g/100mI的胶体金至少需要10μL浓度为0.05mg/mI的SPA,胶体金与SPA的质量比为2×10<sup>4</sup>:1,最佳胶体金与SPA的比例为2×10<sup>4</sup>:1.3,在实际使用时,可以根据需要调整胶体金和SPA的比例。

[0045] S4、制备SPA修饰的胶体金和免疫金标垫3:使用浓度为0.1M的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调整胶体金的pH值为5.9,按质量比为2×10<sup>4</sup>:1~1.5(最优为2×10<sup>4</sup>:1~1.3)将相应的SPA溶液加入胶体金中放置30min后,在转速为10000r/min、温度为4℃的条件下离心30min,将沉淀溶于重悬液中混合均匀,得到SPA修饰的胶体金溶液,选用玻璃膜作为免疫金标垫3基材,将玻璃膜放入SPA修饰的胶体金溶液中浸润并晾干,吸附比为10~50μL/cm,最佳吸附比为30μL/cm,得到免疫金标垫3。

[0046] S5、制备检测层4

[0047] 使用硝酸纤维膜作为检测层4基材,在检测层4上标记检测线6和对照线7,检测线6与对照线7之间的距离为0.3~1cm(最优为0.5cm),且对照线7位于纤维素膜的中段,在检测线6上喷涂浓度为0.5~1mg/mL(最优为0.8mg/mL)的A型口蹄疫病毒样颗粒;在对照线7上喷涂兔IgG,喷涂量为10μI/1cm。

[0048] S6、制备样品垫2:以玻璃纤维膜作为样品垫2的基材,将20mM的PB(磷酸盐缓存溶液)、1%的吐温20、1%的BSA和2.5%的蔗糖溶于100mI三蒸水中并过滤得到样品液,把玻璃纤维膜浸泡于该样品液中,完全浸润后取出并晾干。

[0049] S7、在底板1的顶部设置检测层4,并将检测层4压平,将吸收层5(吸水纸)一部分固定在底板1上,一部分固定在检测层4上靠近对照线7的部分,将免疫金标垫3的一侧固定在底板1上,另一侧固定在检测层4靠近检测线6的一侧,样品垫2的一侧固定在底板1上,样品垫2的另一侧固定在免疫金标垫3上。

[0050] 本发明胶体金试纸在使用时,先将样品稀释,然后将胶体金试纸的样品垫2端插入样品中,样品垫2上设置有液面线,样品的液面不能没过液面线,当吸收层5完全被液体浸润后,取出试纸条,平放后5~15分钟内观察结果。

[0051] 如果血液样品中含有A型口蹄疫抗体,血液样品中的抗体与免疫金标垫3中SPA修饰的胶体金结合形成复合物,与检测线6上A型口蹄疫病毒样颗粒结合形成紫红色线条,继

续前行,未与抗原结合的抗体携带重组蛋白SPA与对照线7中的IgG抗体形成紫红色线条。

[0052] 如果对照线7不出现紫红条带则说明该试纸条失效,如果检测血液样品中不含有A型口蹄疫相关抗体,则检测线6处不会出现紫红色条带,而对照线7处必定仍出现紫红色条带。

[0053] 其中,A型口蹄疫病毒颗粒的制备方法包括以下步骤:

[0054] S1、制备A型口蹄疫病毒样颗粒:

[0055] S101、小泛素样修饰蛋白融合表达载体pSM的构建:

[0056] a、从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株EGY48基因组上扩增smt3基因 (GenBank 登陆号: AY558174), 引物序列如下: 上游引物smt3F: 5' GCCATGGGTCATCACCATCATCATCAC (6×His)GGGTCG GACTCAGAAGTCAATCAA 3' ;

[0057] 下游引物smt3F: 5' GGATCCGAGACCTTAAGGTCTCAACCTCCAATCTGTTCGCGGTG3' 。

[0058] b、使用经Nco I (限制性核酸内切酶) 和BamH I (一种限制性内切酶) 双酶切后将smt3基因插入到用同样内切酶处理的pET-28a载体中,所得载体为pSM1,将pSM1的卡那霉素抗性基因替换为氨苄抗性基因,得载体pSM2。

[0059] S2、重组表达载体的构建:

[0060] S201、A型口蹄疫病毒结构蛋白VP0,VP3和VP1基因的扩增:根据GenBank (基因库) 中记载的猪A型FMDV设计引物,使用Qiagen公司生产的RNaeasy Mini kit (一种试剂盒) 从猪A型口蹄疫病毒中提取该病毒的RNA,反转录后分别扩增获得VP0,VP3和VP1基因,反转录中PCR循环参数为:先在94℃下5min进行1个循环;然后依次在94℃下60s,58℃下60s,72℃下2.5min进行30个循环;最后一循环在72℃持续8min。

[0061] 引物序列如下:

[0062] 上游引物VP0-F BsmB I:

[0063] 5' TACTTCGTCTCCGCGGATCCGAGCCGGGCAATCCAGC;

[0064] 下游引物VP0-RBamH I:

[0065] 5' GCGAGTGGATCCATTAAGCTTGCCTCCTTCGAGGGGAGTTC;

[0066] 上游引物VP1-F BsmB I:

[0067] 5' GGACTTCGTCTCACTACTGCCACCGGGGAATC;

[0068] 下游引物VP1-R BamH I:

[0069] 5' GCTTATGGATCCTTACAGGAGTTGTTTTGCTGGG

[0070] 上游引物VP3-F BsmB I:

[0071] 5' GCACTTCGTCTCGCGATTGTCCCGGTTGCAT;

[0072] 下游引物VP3-R BamH I:

[0073] 5' GCGCACGGATCCTTGTGAGCGGGGTCAATCG。

[0074] S202、将经BsmB I/BamH I (两种限制性内切酶) 双酶切后的VP0、VP3和VP1片段分别插入经Bsa I酶切处理的pSM1,pSM2和pSM1,得到重组表达载体pSM1/VP0,pSM2/VP3和pSM1/VP1。

[0075] S3、双表达重组载体的构建:

[0076] 以pSM1/VP1为模板,以T7BamH I/VP1Xho I为引物扩增获得含有T7启动子等原核表达元件和VP1基因的DNA片段,经BamH I/Xho I双酶切后插入用同样酶切处理的pSM1/VP0

中,得双表达重组载体pSM1/VP0-VP1,引物序列如下:上游引物T7BamH I:5' GCAATTGGA CCCGTCCGGCGTAGAGGATCGA,下游引物VP1Xho I:5' GCGCACCTCGAGCTACTGTTGCCGAGCGTCCAC。

[0077] S4、蛋白表达与纯化。

[0078] 将测序正确的阳性重组质粒pSM2/VP3和pSM1/VP0-VP1共转化到感受态细胞BL21-CodonPlus (DE3)-RIL中,挑取单克隆菌落接种于含有氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素3种抗生素的LB培养基(一种培养基的名称)中,在温度为37℃、转速为220r/min的条件下培养12h,然后将培养的表达菌以1:100比例重新接种200mI含上述3种抗生素的LB培养基中,在温度为37℃、转速为220r/min的条件下培养至OD600值为0.9左右,留样1mI作为诱导前对照。

[0079] 其余菌液转入温度为16℃、加入IPTG(异丙基硫代半乳糖)至浓度为0.5mmol/L诱导表达16h,诱导后的菌液在转速为4750r/min的条件下离心20min后收取菌体,随后按1:50浓缩比例将菌体悬浮于buffer A(缓冲剂,配方为:500mmol/L NaCl,20mmol/L Tris-HCl,20mmol/L Imidazole,2mmol/L DTT,0.05% TritonX-100,pH 8.4),充分混匀后在冰上超声波处理6min,然后在温度为4℃的条件下11500×g离心15min后收集上清,得到重组蛋白。

[0080] 使用His标签蛋白纯化试剂盒(一种用于纯化蛋白的试剂盒)纯化重组蛋白:将重组蛋白样品进行10%SDS-PAGE电泳,随后采用湿转法将重组蛋白转移至聚偏氟乙烯杂交膜(PVDF膜)上,用封闭液(PBS,5%脱脂奶粉,pH 7.0)在37℃条件下封闭1h,然后分别用抗His一抗(摩尔比为1:3000)和抗FLAG一抗在37℃下孵育1h,使用PBST(一种缓存溶液)充分洗涤后分别用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG(摩尔比为1:6000)和山羊抗兔IgG(摩尔比为1:4000)在37℃孵育1h,PBST充分洗涤后于暗室内加入发光底物反应3min,置于Kozak胶片下曝光,显影及定影固定后,观察目的蛋白的表达情况,经过观察可知,采用本方法获得了预期大小的蛋白,且该蛋白具有免疫活性。

[0081] S5、口蹄疫病毒样颗粒的体外组装:

[0082] 参照invitrogen的试剂使用说明,用小泛素样修饰融合蛋白,通过HisTrap HP除去小泛素样修饰蛋白,收集含有VP0、VP1和VP3的液体,用透析缓冲液PBS(pH 7.5)透析组装成目的病毒样颗粒。

[0083] S6、使用电镜观察口蹄疫病毒样颗粒:

[0084] 使用PBS在温度为4℃的条件下透析组装病毒样颗粒,经超滤浓缩后,将10μI含病毒样颗粒的液体加到200目的铜网上,在室温吸附2~3min,用滤纸吸干铜网,用浓度为3%的磷钨酸染色,用型号为Hitachi,H-7100FA的透射电镜观察,其体外组装的病毒样颗粒电镜观察结果参见图2,可见多个直径约20nm的病毒样颗粒,由该图片可知,本发明成功的在原核生物体外组装得到病毒颗粒。

[0085] 本发明不局限于上述实施方式,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围之内。本说明书中未作详细描述的内容属于本领域专业技术人员公知的现有技术。

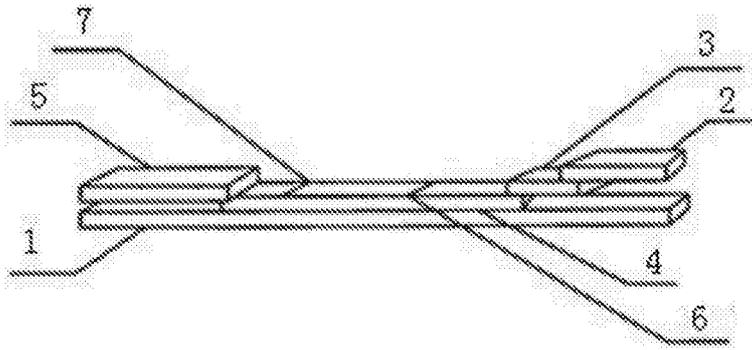


图1

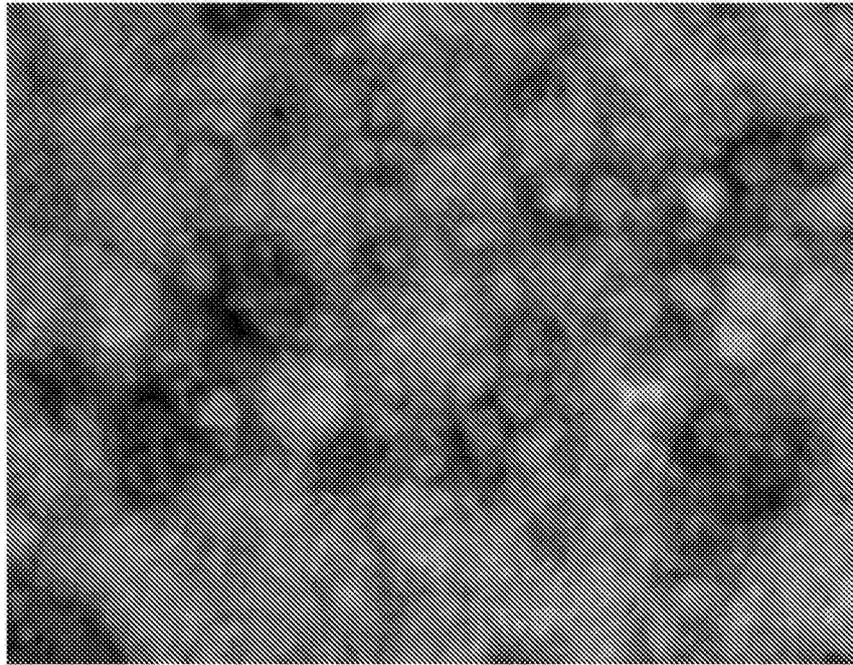


图2

专利名称(译)	一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106645685A</a>	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611081550.6	申请日	2016-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	孙世琪 郭慧琛 张韵 常艳燕 魏衍全 茹嘉喜 智晓莹 杜平 刘湘涛 殷宏 罗建勋		
发明人	孙世琪 郭慧琛 张韵 常艳燕 魏衍全 茹嘉喜 智晓莹 杜平 刘湘涛 殷宏 罗建勋		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种用于测试动物A型口蹄疫的胶体金试纸及其制备方法，涉及血清学检测技术领域，包括底板，底板的顶部设置有检测层，检测层上设置有检测线 and 对照线，检测层的顶部靠近对照线的一侧设置有吸收层，靠近检测线的一侧设置有免疫金标垫，免疫金标垫的顶部设置有样品垫；免疫金标垫上涂覆有胶体金颗粒，该胶体金颗粒上结合有SPA标记物，检测线上涂覆/浸润有A型口蹄疫病毒样颗粒，对照线上涂覆/浸润有免IgG。本发明能够缩短检测周期，实现现场进行实时快速的测定。

