



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107389934 A

(43)申请公布日 2017.11.24

(21)申请号 201710525164.X

(22)申请日 2017.06.30

(66)本国优先权数据

201610509943.6 2016.06.30 CN

(71)申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区  
荣华南路11号

(72)发明人 王慧煜 吴绍强 韩雪清 林祥梅  
梅琳

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条,属于蛋白质工程技术领域。本发明试纸条是在硝酸纤维素膜(NC膜)上包被牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28的混合抗原和羊抗兔IgG、兔抗羊IgG,在玻璃纤维素膜上包被荧光标记的兔抗牛IgG、羊抗牛IgG,检测标本中的牛布鲁氏菌抗体,本发明试纸条操作简单、方便、快速,不需特殊仪器设备,不需专业培训,结果清晰易辨,易于推广,适合基层,适合于现场检测和流行病学调查,对牛布鲁氏菌感染诊断起到辅助作用,具有良好的市场应用前景。

1. 一种牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条,其特征在于,含有硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上包被牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28三者的混合抗原和二抗IgG;所述玻璃纤维素膜包括样品垫和结合释放垫,结合释放垫上包被荧光标记的二抗IgG。

2. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于,硝酸纤维素膜上二抗IgG为羊抗兔IgG和兔抗羊IgG。

3. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于,结合释放垫上包被荧光标记的二抗IgG为兔抗牛IgG和羊抗牛IgG。

4. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述混合抗原中OMP19浓度为0.4mg/mL、OMP22浓度为0.8mg/mL、OMP28浓度1.5mg/mL。

5. 如权利要求1-4任一所述的试纸条,其特征在于,硝酸纤维膜上的兔抗羊IgG浓度为0.5mg/ml。

6. 如权利要求1-4任一所述的试纸条,其特征在于,玻璃纤维素膜上包被的荧光标记的兔抗牛IgG浓度为0.5mg/ml,荧光标记的羊抗牛IgG浓度为0.75mg/ml。

7. 如权利要求1-4任一所述的试纸条,其特征在于,所述硝酸纤维素膜为HFC13502。

8. 如权利要求1-4任一所述的试纸条,其特征在于,所述结合释放垫为8964型号的玻璃纤维素膜,所述样品垫为GF-08型号的玻璃纤维素膜。

9. 权利要求1-8任一所述的试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28;

(2) 硝酸纤维膜的制备:将牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28三种抗原的混合物喷于硝酸纤维膜上,形成检测线,其中,OMP19浓度为0.4mg/mL、OMP22浓度为0.8mg/mL、OMP28浓度1.5mg/mL;将羊抗兔IgG和兔抗羊IgG浓度0.5mg/mL喷于硝酸纤维膜上,形成控制线,且于37°C中干燥2小时,备用;

(3) 玻璃纤维膜的制备:包括样品垫和结合释放垫,结合释放垫上包被1mg/ml荧光标记的兔抗牛IgG和0.75mg/mL的羊抗牛IgG;

(4) 最后在PVC底板上依次相互搭接玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫。

## 牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质工程技术领域,具体地,涉及一种以牛布鲁氏菌外膜蛋白为检测抗原的牛布鲁氏菌并荧光标记免疫层析试纸条。

### 背景技术

[0002] 布鲁氏菌病是一种在世界范围内影响严重的人畜共患病。布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的,主要侵害动物的生殖系统,引起流产和不孕不育,带来严重的经济损失。确诊布病的诊断方法是对致病微生物的分离培养鉴定。

[0003] 目前在血清学诊断方法上,大部分都是基于检测抗布鲁菌脂蛋白(脂多糖,LPS)的抗体,虽然虎红平板凝集和补体结合实验在世界范围内最认可和接受的测试,但是由于实验结果有交叉性,实验操作步骤繁琐、费时等诟病,在实际操作中应用较少。基于检测布鲁氏菌LPS的ELISA方法不能区分自然感染和疫苗感染的缺陷。因此很有必要研发一种既不使用全菌也不使用脂蛋白LPS的诊断抗原。

[0004] 外膜蛋白OMP,不仅是布鲁氏菌结构蛋白和功能蛋白,而且也是布鲁氏菌重要的抗原和毒力因子,对维持布鲁氏菌细胞膜的完整性和选择性至关重要。然而遗憾的是在布鲁氏菌如何生存和致病力感染中,外膜蛋白OMP起到的作用尚未被人知晓。外膜蛋白OMP28已经被全面的研究了,在作为ELISA诊断抗原上具有较好的反应原性和特异性,也可以作为候选疫苗。但将OMP19、OMP22、OMP28多种蛋白混合后用于布鲁氏菌的诊断还未有研究报道。

[0005] 在布鲁氏菌病一般的检测方法中,细菌分离等试验虽然作为检测布鲁氏菌病的金标准,但是它们耗时长;酶联免疫吸附试验(ELISA)和一些分子生物学方法也同样要求有专业实验室作为试验进行的保障,这些作为实验室检测的传统试验方法,它们的优点给畜牧业前期的发展带来了不可磨灭的功绩。但随着社会的不断进步,人民物质生活不断地丰富,高速的发展导致进出口检验检疫额度的不断增加。所以这就要求口岸检验检疫工作者重新开发一些新的技术去改善这些敏感性低、易发生交叉反应、耗时长、不易操作等的缺点。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现:首先构建包含牛布鲁氏菌外膜蛋白基因OMP19、OMP22、OMP28的表达载体,通过将三种基因的表达载体分别转化入感受态细胞,得到牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28表达工程菌;经IPTG诱导表达;将表达产物过镍-NTA琼脂糖树脂层析柱,洗脱得到纯化的牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28。选取了牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28,将它们组合作为包被抗原,将荧光标记的二抗IgG喷涂于结合垫上,建立一种检测牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条方法,并将它初步应用于临床样品的检测中。

[0008] 进一步地,本发明提供的牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条,含有硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上包被牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28

三者的混合抗原和二抗IgG;所述玻璃纤维素膜包括样品垫和结合释放垫,结合释放垫上包被荧光标记的二抗IgG。

[0009] 优选地,本发明试纸条上,硝酸纤维素膜上二抗IgG为羊抗兔IgG和兔抗羊IgG。

[0010] 优选地,本发明试纸条上结合释放垫上包被荧光标记的二抗IgG为兔抗牛IgG和羊抗牛IgG。

[0011] 本发明发现羊抗牛IgG可以与牛血清很好地反应,在待选择的所有抗体中,此抗体效价较高;且与兔抗羊IgG很好地结合故选择这两个二抗。

[0012] 所述混合抗原中OMP19浓度为0.4mg/mL、OMP22浓度为0.8mg/mL、OMP28浓度1.5mg/mL。

[0013] 本发明试纸条所使用的牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28已在中国专利CN105445473A中公开。

[0014] 优选地,本发明试纸条中硝酸纤维膜上的兔抗羊IgG浓度为0.5mg/ml。

[0015] 优选地,本发明试纸条中玻璃纤维素膜上包被的荧光标记的兔抗牛IgG浓度为0.5mg/ml,荧光标记的羊抗牛IgG浓度为0.75mg/ml。

[0016] 本发明经过反复对比试验,发现硝酸纤维素膜为HFC13502检测线显示颜色深,便于视读。硝酸纤维素膜HFC13502为上海捷宁生物有限公司的产品。

[0017] 优选地,本发明选用结合释放垫为8964型号的玻璃纤维素膜,样品垫为GF-08型号的玻璃纤维素膜。均为上海捷宁生物有限公司的产品。

[0018] 进一步地,本发明还提供了牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0019] (1) 制备牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28;

[0020] (2) 硝酸纤维膜的制备:将牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28三种抗原的混合物喷于硝酸纤维膜上,形成检测线,OMP19浓度为0.4mg/mL、OMP22浓度为0.8mg/mL、OMP28浓度1.5mg/mL;将羊抗兔IgG和兔抗羊IgG浓度为0.5mg/ml喷于硝酸纤维膜上,形成控制线,且于37°C中干燥2小时,备用;

[0021] (3) 玻璃纤维膜的制备:包括样品垫和结合释放垫,结合释放垫上包被1mg/ml荧光标记的兔抗牛IgG和0.75mg/mL的羊抗牛IgG;

[0022] (4) 最后在PVC底板上依次相互搭接玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫。

[0023] 目前,用IDEXX试剂盒对布鲁氏菌病进行ELISA检测,往往是其他检测技术的对照方法。因此,发明人在试验中,同样使用IDEXX试剂盒检测作为对照试验,检测牛布鲁氏菌病血清,然后将两者进行符合率的计算。经对200份牛血清样品检测结果显示,本发明的荧光免疫层析试纸条与IDEXX试剂盒检测方法的符合率为93.5%,说明本发明的牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条在实际应用过程中,与IDEXX试剂盒ELISA检测方法的使用效果基本相同。综合来看,本发明建立的牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条方法的检测速度和便利性良好,可以应用在牛布鲁氏菌病大量筛查工作中。

## 附图说明

[0024] 图1为rOMP19重组蛋白SDS-PAGE电泳分析图,M.蛋白分子质量标准,1.重组表达菌裂解液上清,2.重组表达菌裂解液沉淀,3纯化的重组蛋白。

[0025] 图2为rOMP22重组蛋白SDS-PAGE电泳分析图,M.蛋白分子质量标准,1.重组表达菌裂解液上清,2.重组表达菌裂解液沉淀,3.纯化的重组蛋白。

[0026] 图3为rOMP28重组蛋白SDS-PAGE电泳分析图,M.蛋白分子质量标准,1.重组表达菌裂解液上清,2.重组表达菌裂解液沉淀,3.纯化的重组蛋白。

[0027] 图4为本发明试纸条组装示意图。

[0028] 图5为底板对比情况图,其中1.普通底板,2.黑色底板,3.进口底板。

[0029] 图6为荧光抗体显色情况图,1.荧光标记兔抗牛IgG,2.荧光标记羊抗牛IgG。

[0030] 图7为抗体反应对比图,其中,1.荧光标记的兔抗牛IgG,2.荧光标记的羊抗牛IgG。

[0031] 图8为NC膜处理结果对比图,1.未处理的NC膜,2.处理过的NC膜。

[0032] 图9为抗体浓度优化结果图。

[0033] 图10为标准血清验证结果对比图,其中,1.阳性标准血清,2.阴性标准血清。

## 具体实施方式

[0034] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0035] 若未特别指明,实施例中所用的化学试剂均为常规市售试剂,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0036] 以下实施例的材料和试剂情况如下:牛布病标准阴阳性血清由中国兽医药品监察所提供,被检牛血清来自天津某养殖场96份,大肠埃希氏菌DH5 $\alpha$ 和BL21 (DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司,pCold-TF载体由中国检验检疫科学研究院动检所保存。

[0037] 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶BamH I、XhoI I、T4DNA连接酶、诱导剂IPTG购自TaKaRa公司;封闭用马血清购自Gibico公司,酶标二抗HRP标记的羊抗牛IgG购自美国Rockland公司;PageRuler Prestained Protein Ladder经典蛋白marker (10-170kDa)、BCA蛋白浓度检测试剂盒购自美国Thermo Scientific公司;NI-NTA Agrose购自德国Qiagen公司;IDEXX牛布鲁菌抗体检测(血清)试剂盒购自美国爱德士生物科技公司;TMD单组份显色试剂盒(可溶型)购自北京索莱宝生物科技有限公司。其他试剂均为分析纯。

[0038] 实施例1 牛布鲁氏菌重组蛋白OMP19、OMP22、OMP28的表达及纯化

[0039] 1、重组蛋白OMP19、OMP22、OMP28的诱导与表达

[0040] 将由中国检验检疫科学研究院提供的布鲁氏菌pCold-TF/OMP19、pCold-TF/OMP22和pCold-TF/OMP28重组质粒转化到E.coliBL21 (DE3)感受态细胞中培养,在LB液体培养基中培养过夜。此时将菌液划线涂布到含100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C摇菌培养12~16h。挑单个完整菌落到LB液体培养基中,再加入1%的氨苄青霉素,37 $^{\circ}$ C振荡培养12h左右。次日将5mL细菌培养液转接到500mL含1%的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 230转速培养2.5h,至菌液OD<sub>600</sub>值为0.6~0.8时,加入1M/mL的诱导剂IPTG,15 $^{\circ}$ C 200转速培养24h后将菌液收集。菌液在4 $^{\circ}$ C条件下6000转速离心15min,然后弃掉上清,以PBS缓冲液重悬沉淀;在冰浴条件下超声处理约15min至液体澄清,然后4 $^{\circ}$ C条件下5000转速离心15min,收集上清液(即粗蛋白液)和沉淀。

[0041] 2、重组蛋白OMP19、OMP22、OMP28的亲层析纯化

[0042] 按照QIAGEN公司的NI-NTA agrose试剂说明书进行操作,使用前先将NI-NTA agrose填料在4℃条件下500转速离心3min,以去除NI-NTA agrose填料中本身带有的起保存作用的酒精,再在每个1.5mLEP管中加入1mLTris-Hcl buffer (pH8.0) 将其平衡,而后加入上述粗蛋白液中,随即将粗蛋白液与NI-NTA agrose用封口膜封口于4℃条件下,在静音混合器上充分结合4h或过夜。重组蛋白与NI-NTA agrose填料结合充分后,先用10mmol/L浓度咪唑洗脱重组蛋白与NI-NTA agrose填料至考马斯亮蛋白定量检测液检测不变为蓝色为止;再用50mmol/L浓度咪唑洗脱重组蛋白与NI-NTA agrose填料,同样洗至蛋白定量检测液检测不变为蓝色为洗脱干净,最后用200mmol/L浓度咪唑收集洗脱液。洗脱液以30kD蛋白分子量截留的超滤离心管浓缩,同时至少更换4次Tris-Hcl buffer (pH8.0) 液,混匀后离心以降低浓缩蛋白液中咪唑的浓度。纯化后的重组蛋白用Thermo公司的BCA试剂盒测浓度后,分装保存于-80℃冰箱。按照试剂盒使用操作步骤:首先配制BCA检测工作液:将BCA试剂A与BCA试剂B按照50:1的体积比混合;接下来稀释标准品:将标准品按表1配制;随后加样:吸取25μL的各标准品和样品加入96孔板;在加样孔中加入200μL BCA工作液,置于37℃环境中30min;然后冷却到室温后,读取OD<sub>562</sub>;最终以浓度为纵坐标,以OD值为横坐标制作标准曲线,计算蛋白浓度。

[0043] 表1 标准品的配制

[0044]

BCA 标曲	稀释剂(μL)	BSA 原液 (μL)	BSA 浓度 (μg/mL)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175B	750
E	325	325C	500
F	325	325E	250
G	325	325F	125
H	400	100G	25
I	400	0	0

[0045] 3、重组蛋白OMP19、OMP22、OMP28的SDS-PAGE鉴定

[0046] 在诱导表达纯化重组蛋白OMP19、OMP22、OMP28的过程中,分别取上清、沉淀和纯化好的蛋白样品,加入1×蛋白质上样缓冲液,煮沸8min,各取5μL上样,浓缩胶以80V电压,电泳20min至样品压成一条直线,分离胶以150V电泳50min。将SDS-PAGE胶在考马斯亮蓝染色液中染色过夜,在洗脱液中洗脱至背景颜色变浅后拍照分析。以下为SDS-PAGE的操作步骤:

[0047] (1) 制胶:准备洁净干燥的玻璃板固定在支架上,把配制好的浓度为8%的分离胶

缓慢匀速地注入两玻璃板的间隙中(大概4.5mL一块),使分离胶的液面距离玻璃板的上沿大概5cm的距离。之后在分离胶上,加入约1mL的超纯水填满玻璃板间隙。等分离胶完全凝固后,倒出上层的液体,随后用吸水纸吸干残留液体。保证水分吸干后,将配好的浓缩胶缓慢匀速注入两玻璃板的间隙,插入梳子,室温水平放置,等待胶凝固。

[0048] (2) 上样:将凝固好的胶放入电泳槽内,在电泳槽中加好1×SDS电泳液,待胶凝固好后放入槽内,并缓缓将梳子拔出,浸泡30min,取适量marker和样品煮沸、离心,点样各5μL。

[0049] (3) 电泳:打开电源,将电压调至80V。观察溴酚蓝指示剂跑到浓缩胶与分离胶的交界处时,马上将电压调到150V;观察到溴酚蓝指示剂马上接近分离胶底部时,关闭电泳仪开关。

[0050] (4) 染色:将凝胶放入盛有考马斯亮蓝染色液的培养皿中,水平摇床上染色4h左右。

[0051] (5) 脱色:先用超纯水对染好色的凝胶进行冲洗,而后将其轻轻放入脱色液中,水平振荡洗涤5次,每次大概30min,直至条带清晰为止,拍照、分析。

[0052] SDS-PAGE结果表明,诱导表达的重组蛋白rOMP19、rOMP22和rOMP28均为可溶性表达,经NI-NIA agrose亲和层析纯化后,获得了纯度较高的重组蛋白。pCold-TF载体标签大小为52kD,rOMP19、rOMP22、rOMP28的大小分别为17kD、22kD和26kD,图中蛋白条带大小与预期的基本符合。BCA试剂盒检测重组蛋白rOMP19、rOMP22、rOMP28浓度分别为0.4mg/mL、0.8mg/mL、1.5mg/mL。见图1-图3。

[0053] 4、ELISA对重组抗原OMP19、OMP22、OMP28组合反应原性鉴定

[0054] (1) 包被抗原:将布鲁氏菌的表达纯化好的的外膜蛋白OMP19、OMP22和OMP28混合(蛋白浓度:1μg/mL),以每孔100μL的量包被于酶标板上,4℃过夜,次日甩干上清,用PBST洗剂每孔300μL量洗板,振荡2min,洗板5次,甩干后拍干。

[0055] (2) 封闭:选择合适的封闭液,每孔100μL加入到酶标板中,在37℃温箱中孵育1h,甩干上清,同(1)洗板。

[0056] (3) 孵育一抗:将血清用PBST按照合适的比例稀释后,每孔加入100μL,37℃温箱中孵育1h,甩干上清,同(1)洗板干。

[0057] (4) 孵育二抗:用PBST以合适的比例稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗牛IgG,每孔加入100μL,37℃温箱中1h,甩干上清,同(1)洗板。

[0058] (5) TMB显色:每孔加入TMB显色液100μL,37℃室温避光反应15min。

[0059] (6) 终止反应:每孔加入50μL稀释过的终止液,终止显色。

[0060] (7) 比色:酶标仪测定OD<sub>450</sub>值,分析重组蛋白的反应原性。

[0061] 利用ELISA试验,可以有效地检测出制备的牛布鲁氏菌重组蛋白组合能否作为检测抗原,与标准血清及待检血清发生特异性结合。以下我们采用20份牛血清,其中包括2份牛布鲁氏菌病标准阳性血清,1份牛布鲁氏菌病标准阴性血清,2份牛布鲁氏菌病阳性血清和15份牛未知血清,通过IDEXX试剂盒一起检测这20份牛血清样品。检测结果见表2。

[0062] 表2 重组蛋白OMP19、OMP22、OMP28组合为检测抗原的ELISA检测试验结果

样品编号	样品状态	IDEXX 测定结果	本试验测定结果
1	标准阳性	+	+
2	标准阳性	+	+
3	标准阴性	-	-
4	未知血清	-	-
5	未知血清	-	-
6	未知血清	-	-
[0063] 7	未知血清	-	-
8	未知血清	-	-
9	未知血清	-	-
10	阳性	+	+
11	未知血清	-	-
12	未知血清	-	-
13	未知血清	-	-
14	未知血清	-	-
15	未知血清	-	-
16	阳性	+	+
17	未知血清	-	-
[0064] 18	未知血清	-	-
19	未知血清	-	-
20	未知血清	-	-

[0065] “+”代表阳性结果，“-”代表阴性结果

[0066] 实施例2 牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条的制备

[0067] 本发明的牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条是由硝酸纤维素 (NC) 膜、结合释放垫 (玻璃纤维膜)、样品垫 (玻璃纤维膜)、吸水垫 (纸) 和底板五个部分组成。组装顺序如图 4 所示。

[0068] 1、硝酸纤维素 (NC) 膜的选择

[0069] 在免疫层析快速检测中,NC膜作为包被抗原或者抗体的固相支持物,其种类和性质对层析效果有着显著影响,没有一种NC膜可以作为最佳NC膜适用于所有快速检测反应中,任何新产品的开发均需要重新筛选NC膜。由于作为包被抗原或者抗体的蛋白质种类繁多

多,与NC膜的结合能力也存在着千差万别,故对于NC膜的选择,通常会从它的层析速度、灵敏度及非特异性结合几方面综合考虑。而对于膜的点样环境:发明人了解到湿度最好保持在一个恰到好处的范围内。同时较为关键的一方面是点膜仪器与膜表面情况关系:点样方式分为划膜式和非接触点膜式。可能以上因素都会对试验有着不同程度的影响,都是需要在试验过程中注意的关键点。为此本试验挑选了硝酸纤维素膜Pa1190、CN140、HFC13502和Millipore180(均购自上海捷宁生物科技有限公司),将它们分别组装成试纸条,通过检测Tris-HCl缓冲液,观察各种膜的层析速度及显色情况。

[0070] 试验从不同NC膜点样显色结果可以看出,不同NC膜点样显色颜色都很深,没有明显区别;不同NC膜组装的试纸条试剂展开速度和加样5min后的检测线显色结果显示:Pa1190和Millipore180试剂展开速度较快,5min内检测线显色较浅,CN140、HFC13502试剂展开速度较慢,HFC13502上检测线显色较CN140上检测线显色深,因此,HFC13502更符合试纸条设计要求。

[0071] 表3 NC膜对比情况

[0072]

NC 膜型号	Pall90	CN140	HFC13502	Millipore180
显色情况	+++	+++	+++	+++
实际展开速度 (s)	73	89	85	70
5min 后检测线显色情况	+	++	+++	+

[0073] 2、结合释放垫(玻璃纤维素膜)的选择

[0074] 结合垫位于层析系统的中间,是承载标记物的部分,结合垫质量的优劣将直接影响检测结果的稳定性和有效性。一般要求结合垫的质地均一旦非特异性吸附低,这样才能更好地负载荧光标记物和待检测样品,而使标记物不被吸附,很好地释放出来。

[0075] 结合释放垫(玻璃纤维素膜)的选择结果

[0076] 分别组装试纸条。Class24和GFC20300组装的试纸条上控制线较8964组装的试纸条上控制线颜色浅,且Class24和GFC20300上有大量的荧光残余。玻璃纤维垫8964的质地均一旦非特异性吸附低,能很好地负载荧光标记物和待检测样品,而不被吸附,只有少量荧光残余,所以选择使用8964型号玻璃纤维素膜作为结合垫。

[0077] 表4 结合垫(玻璃纤维素膜)对比情况

玻璃纤维素膜	8964	Glass 24	GFC20300
荧光抗体释放情况	少量残余	大量残余	大量残余
检测线显色情况	+++	++	++

[0079] 3、样品垫(玻璃纤维素膜)的选择

[0080] 上样垫又名样品垫,是样品首先经过的区域,在检测的过程中对液态样品起到初步过滤的作用,还有一点就是要保证样品垫在吸收样品之后具有良好的脱水性,不粘连样

品,这样才能充分发挥它的作用,与整个系统配合一致。

[0081] 样品垫(玻璃纤维素膜)的选择结果

[0082] 分别组装试纸条。GF-08、CB-SB08和CB-SB06(均购自上海捷宁生物科技有限公司)这3种样品垫都能完全吸收100 $\mu$ L样品,5min后GF-08型玻璃纤维素膜组装的试纸条检测线显色较其他两种颜色深,而且不粘连样品,可以与整个系统配合一致。

[0083] 表5 样品垫(玻璃纤维素膜)对比情况

	玻璃纤维素膜	GF-08	CB-SB08	CB-SB06
[0084]	样品吸收情况	吸收完全	吸收完全	吸收完全
	检测线显色情况	+++	++	++

[0085] 4、吸收垫(吸水纸)的选择

[0086] 吸收垫部分是免疫层析系统中的“动力部门”,通过毛细虹吸作用,让样品的流动有了明确的方向,加快了整个免疫层析系统的流动速度,同时防止了样品的随意流动。但由于吸收垫不参与免疫层析过程中所发生的免疫反应,因此只需选用结构较为致密、吸收量大的吸水纸便可。此外,与其他材料的匹配程度也应该作为考虑的条件之一。

[0087] 分别组装试纸条。H-5076、Cotton Linters 300和Cotton Linters 900(均购自上海捷宁生物科技有限公司)这3种吸收垫5min内都能将由NC膜层析过去的样品溶液完全吸收。3种膜的厚度分别为:0.90mm、1.83mm、2.59mm,考虑到GF-08厚度为0.37mm,NC膜HFC13502的厚度为0.12mm,故H-5076与试纸条的其他材料匹配较佳。H-5076吸收纸具有良好的吸水性能,吸收量大。

[0088] 表6 吸水垫对比情况

	吸收垫型号	H-5076	Cotton linters 300	Cotton linters 900
[0089]	层析后溶液吸收情况	吸收完全	吸收完全	吸收完全

[0090] 5、底板的选择

[0091] 免疫层析试纸条系统中的底板是一种具有一定粘性的底衬,在其他固相材料都选择处理且包被好的情况下按顺序依次贴到底板上。对于底板的选择,根据背景所衬托的显色情况,已知的有两类:一种是适用于胶体金免疫层析试纸条的普通底板;另一种是适用于荧光标记的免疫层析试纸条的荧光专用底板。

[0092] 分别组装试纸条。普通底板经紫外灯照射反光,不能达到预期目的;进口荧光专用底板和国产荧光专用黑色底板显色情况良好,见图5,但从成本考虑,选择黑色底板参与后续试验。(表7中的三种板,均购自上海捷宁生物科技有限公司)

[0093] 表7 底板对比情况

	底板类型	荧光专用底板(进口)	普通底板	黑色底板(国产)
[0094]	显色情况	+++	-	+++
	价格(元)	11	3	5

[0095] 6、荧光标记抗体与控制线(C线)上包被抗体的选择

[0096] 荧光标记抗体被喷涂在试纸条的结合垫上,与控制线(C线)上的二抗发生特异性结合反应,目的是为了保证整个试纸条层析过程的有效性,也就是当荧光标记的二抗与它相应的二抗发生了特异性结合反应,试纸条的控制线(C线)才会出现,表明整个层析反应过程有效;如果荧光标记的二抗没有与它相应的二抗发生特异性结合,控制线(C线)就不会出现,控制线处特异性结合的失败相应地会影响检测线(T线)位置的抗原抗体特异性结合,从而影响了整个层析系统的反应,造成试纸条免疫层析检测系统失败。所以,选择合适的抗体对至关重要。选择荧光标记的兔抗牛IgG和与它对应的羊抗兔IgG、荧光标记的羊抗牛IgG和与它对应的兔抗羊IgG两对抗体对进行试验。利用湿法即把样品和荧光标记抗体在EP管里混匀,再滴加到样品垫位置去爬膜,观察NC膜上控制线(C线)的显色情况,结果见图6。

[0097] 通过试验测试,选择荧光标记的兔抗牛IgG和与它对应的羊抗兔IgG以及荧光标记的羊抗牛IgG和与它对应的兔抗羊IgG两对抗体都可以发生特异性结合反应,控制线(C线)显色情况良好,表明两对抗体对都可以继续进行下一步试验。

[0098] 7、牛布鲁氏菌病标准阳性血清与相应抗牛荧光抗体的选择

[0099] 在试纸条研发前期阶段,用牛布鲁氏菌标准阳性血清与荧光标记抗牛抗体的特异性结合情况来验证试纸条免疫层析系统检测线(T线)的反应结果。如果牛布鲁氏菌病标准阳性血清与抗牛的荧光标记抗体发生特异性结合,牛布鲁氏菌病标准阳性血清以及后来的待检血清就会形成一种它们的带有荧光的结合物质,这种结合物质就会随着免疫层析系统的层析作用继续向前爬膜,经过检测线(T线)位置,带有荧光的抗体与牛布鲁氏菌病标准阳性血清结合物就会与检测线(T线)上包被的牛的布鲁氏菌重组蛋白发生特异性结合,从而使检测线(T线)显色,结合物质继续爬膜并与控制线(C线)上的相应的抗荧光抗体的二抗体结合从而显色,使试纸条检测系统建立成功。所以,选择合适、优质的荧光标记的抗体也非常重要。本实施例选择荧光标记的兔抗牛IgG和与它对应的羊抗兔IgG以及荧光标记的羊抗牛IgG和与它对应的兔抗羊IgG两对抗体分别标记在结合垫和硝酸纤维素膜上,分别于牛血清反应,观察反应情况。依然利用荧光标记的兔抗牛IgG和荧光标记的羊抗牛IgG包被在结合垫上,利用干法,让样品在NC膜上流动,观察试纸条整体的显色情况。

[0100] 分别将荧光标记的兔抗牛IgG和荧光标记的羊抗牛IgG抗体包被在结合垫上,并将布鲁氏菌重组外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28组合,羊抗兔IgG和兔抗羊IgG分别划在NC膜上,利用干法,将组装好的免疫层析试纸条插在含有牛布鲁氏菌病标准阳性稀释血清里,结果见图7,由荧光标记的羊抗牛IgG抗体能与牛布鲁氏菌病标准阳性血清很好地结合,并随着毛细作用使它继续向前流动,到检测线(T线)处与布鲁氏菌重组外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28发生反应,使T线显色。

[0101] 8、硝酸纤维素(NC)膜的处理

[0102] NC膜处理的主要目的是为了减少样品或标记物对捕获线和整个膜的非特异性吸附。在抗体与膜结合后,要进行三步处理:

[0103] (1)干燥或烘干

[0104] 将划好质控线和检测线的NC膜进行干燥或烘干处理,能够维持免疫反应活性并与膜牢固结合。抗原和抗体与NC膜的结合需要足够的干燥时间和温度,以保证检测线(T线)和控制线(C线)的正常显色以及试验的稳定性结果。

[0105] (2) 使用封闭剂浸泡干燥后的NC膜

[0106] 使用封闭剂的作用是将NC膜上除了检测线(T线)和控制线(C线)以外的位点用封闭剂有效地填补上,这样能够防止整个NC膜对检测液体的非特异性吸附。常用的封闭剂有各种蛋白质(脱脂奶粉、BSA等)、表面活性剂(Tween20、TritonX-100)。

[0107] (3) 烘干浸泡后的NC膜

[0108] 将浸泡后的NC膜取出烘干,备用。观察封闭与不封闭NC膜的检测效果,研究其对假阳性的影响。

[0109] NC膜处理的关键步骤在于封闭液对于抗原、抗体的固定作用,封闭液合适的浓度和温度对试验的顺利进行更是起到了重要的促进作用。本发明通过阅读大量参考文献,选择用含1%BSA和0.5%Tween20的0.01M的PBS(pH为7.4)缓冲液浸泡NC膜2h,成功地检测出了检测线(T线)和控制线(C线)。结果见图8。

[0110] 9、样品垫(玻璃纤维素膜)的预处理同时通过对样品垫进行适当的预处理,将上样垫放入含有表面活性剂的蒸馏水中,对其进行浸泡,然后放入干燥箱内干燥后备用。该方法对改善样品pH值和提高样品的释放效果有很大帮助。能改善假阳性、假阴性等问题,对优化试纸的性能也起到一定的有利作用。

[0111] 荧光标记羊抗牛IgG与兔抗羊IgG的浓度优化:结合垫上荧光标记抗体浓度是荧光信号强弱的决定因素,不同稀释倍数的荧光抗体加到结合垫上,层析反应发生时,荧光抗体与控制线(C线)上的不同浓度的抗体发生反应情况也是荧光抗体作用的关键性因素,所以检测到最小荧光信号的量即为最佳用量。(表中A-C分别指代不同浓度两种抗体包被的试纸条)

[0112] 表8 荧光标记羊抗牛IgG与兔抗羊IgG的浓度梯度(单位:mg/mL)

[0113]

项 目	荧光标记羊抗牛 IgG 浓 度		荧光标记羊抗牛 IgG 浓 度
	1.5mg/mL	0.75mg/mL	0.375mg/mL
兔 抗 羊 IgG 浓 度:0.5mg/mL	A1	A2	A3
兔 抗 羊 IgG 浓 度:0.25mg/mL	B1	B2	B3
兔 抗 羊 IgG 浓 度:0.125mg/mL	C1	C2	C3

[0114] 结合垫上荧光标记抗体浓度是影响荧光信号强弱的决定性因素,不同稀释倍数的荧光抗体加到结合垫上,层析反应发生时,试纸条亮度不同,所以检测到最小荧光信号的量即为最佳用量。同样地,控制线上的抗体包被浓度也是同样的原理。在本实施例中由于兔抗羊IgG的浓度较低,所以兔抗羊IgG只能使用最大浓度0.5mg/mL为最佳使用浓度,对荧光标

记羊抗牛IgG浓度进行梯度检测。结果试纸条检测线最小荧光标记羊抗牛IgG结果为0.75mg/mL。结果见图9。

#### [0115] 11、试纸条的组装

[0116] 在水平桌面,将包被有检测线(T线)和控制线(C线)的NC膜裁剪成300mm×25mm大小;按照粘性PVC底板划分切割好的位置,黏贴到300mm×60mm大小的粘性PVC底板上,要求左右对齐,不要超出所划分的NC膜所在的位置;然后轻轻抹平膜面。接下来将裁剪成300mm×2mm的经过预处理、包被有荧光标记抗体的玻璃纤维素膜,在NC膜的左侧压住NC膜1mm处,黏贴到PVC底板上,并小心抹平。之后将300mm×19mm的作为样品垫的玻璃纤维素膜,在结合垫左侧并压住结合垫1mm处,黏贴到PVC底板上并小心抹平。最后将300mm×16mm吸水垫靠NC膜右侧并压住NC膜1mm,黏贴到PVC底板上,并小心抹平。用切条机切成4.0mm宽的试纸,将切好的试纸合并0.5g干燥剂一包放入试纸条储存桶内。

#### [0117] 实施例3 牛布鲁氏菌ELISA检测方法的建立

##### [0118] 1、牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条标准血清的验证

[0119] 取牛布鲁氏菌病标准阳性和阴性血清,将它们用PBS缓冲液按1:50倍稀释,用实施例2组装好的荧光标记试纸条对两种血清进行测试。结果见图10,阳性血清显示阳性结果,阴性血清显示阴性结果。由此可知,试纸条具备检测能力。

##### [0120] 2、牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条的特异性试验

[0121] 用实施例2制得的荧光标记免疫层析试纸条,同时检测牛结核病血清、牛蓝舌病血清、牛病毒性腹泻血清、牛口蹄疫血清、牛巴氏杆菌病血清、牛白血病和牛布鲁氏菌病血清。结果显示,荧光标记免疫层析试纸条检测牛的结核病血清、牛蓝舌病血清、牛病毒性腹泻血清、牛口蹄疫血清、牛巴氏杆菌病血清和牛白血病血清均为阴性。牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条不与其他疫病血清发生交叉反应。

##### [0122] 3、牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条的敏感性和重复性试验

[0123] 用实施例2制得的荧光标记免疫层析试纸条同时检测用0.01MPBS稀释为1:10、1:50、1:100、1:200和1:500的牛布鲁氏菌标准阳性血清,出现阳性信号的血清最高稀释度作为试纸条的敏感度。用同一批次试纸条检测同一血清,观察检测结果是否相同。

[0124] 本发明实施例2制得的荧光免疫层析试纸条最高可检出0.01M的PBS稀释1:100的牛布鲁氏菌病标准阳性血清。且用同一批次试纸条检测同一浓度标准阳性血清,通过检测结果可以看出重复性试验结果良好。

#### [0125] 实施例4 牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条的初步应用

##### [0126] 1、ELISA方法对样品的检测

[0127] 本试验使用IDEXX试剂盒,对200份血清样品进行检测,记录检测结果。检出阳性结果31份。

##### [0128] 操作过程如下:

[0129] 首先取出试剂盒内的抗原包被板,记录样本位置。

[0130] (1) 在每个孔加入190 $\mu$ L“稀释缓冲液N.2”。

[0131] (2) 在一个适当孔加入10 $\mu$ L未稀释的阴性对照。

[0132] (3) 在两个适当孔加入10 $\mu$ L未稀释的阳性对照。

[0133] (4) 在剩余孔加入10 $\mu$ L未稀释的样品。

- [0134] (5) 混匀后,18-26℃条件下孵育60分钟左右。
- [0135] (6) 将各孔液体弃掉。
- [0136] (7) 用300μL洗涤液洗涤板孔,洗涤5次。每次洗涤后,将各孔内液体吸走,但不能在加入下一批液体前使孔内干燥,在最后一次洗涤完毕后,将孔中残留洗涤液在吸水纸上拍干。
- [0137] (8) 每孔加入100μL酶标抗体。
- [0138] (9) 盖上盖子,18~26℃条件下孵育30分钟左右。
- [0139] (10) 重复操作(7)。
- [0140] (11) 每孔加入100μLTMB底物溶液。
- [0141] (12) 室温条件下避光孵育20分钟。
- [0142] (13) 每孔加入100μL终止液,使反应终止。
- [0143] (14) 测量并记录样本和对照的吸光值A(450)。
- [0144] (15) 计算结果。
- [0145] 2、牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条方法对样品的检测
- [0146] 将200份血清样品,按标号顺序摆放好,取1.5mLEP管按此顺序编码,对此200份样品用PBS缓冲液进行1:50稀释,用实施例2制得的荧光试纸条对这200份牛血清样品进行检测,5分钟后记录荧光试纸条显色结果。由于近些年来IDEXX试剂盒普遍作为ELISA检测方法的标准对照试验,所以本发明同样利用IDEXX试剂盒作为荧光试纸条的对比参照。计算两种试验方法的符合率。结果在200份样品血清中,显示阳性结果的为29份,由此对比可以得出两试验的符合率为93.5%。
- [0147] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

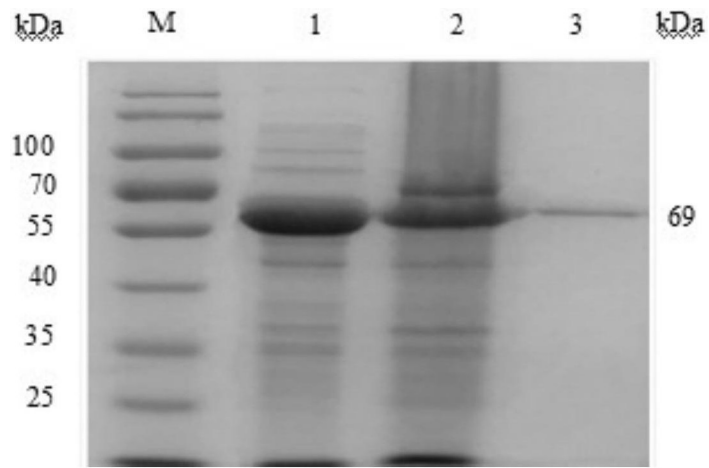


图1

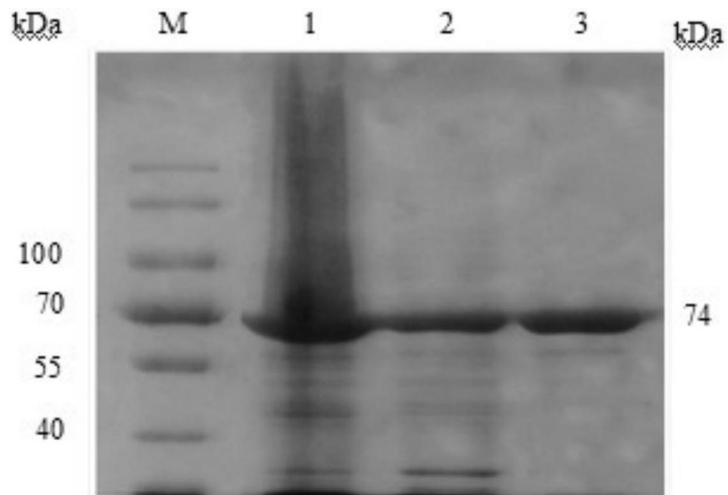


图2

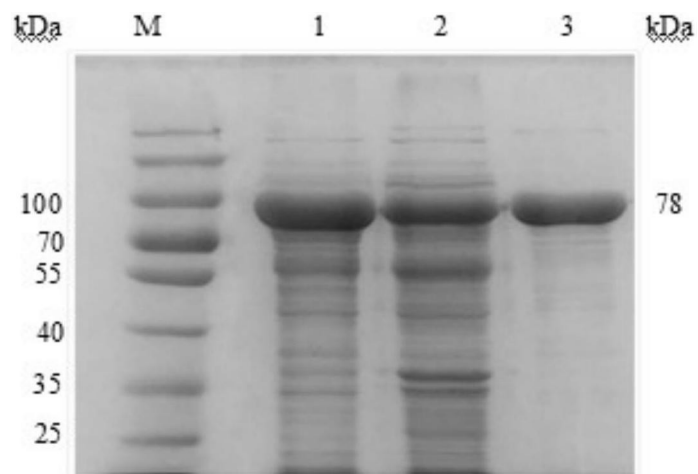


图3

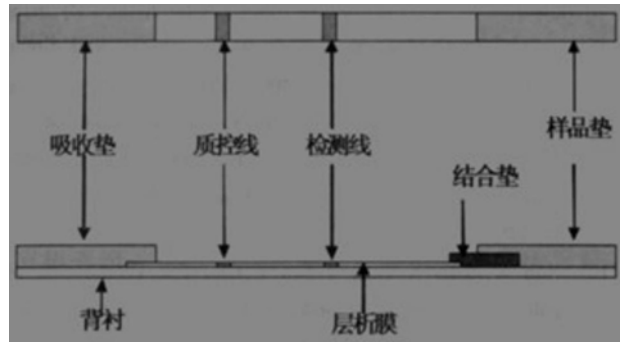


图4

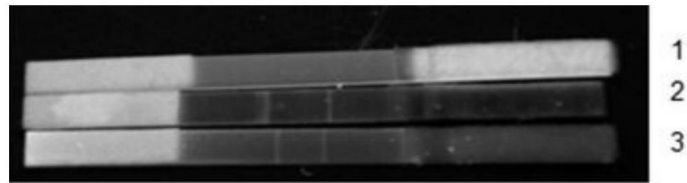


图5

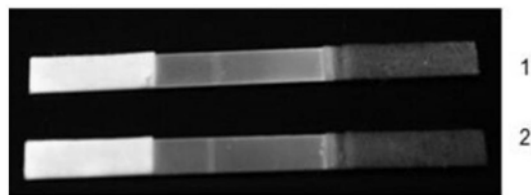


图6

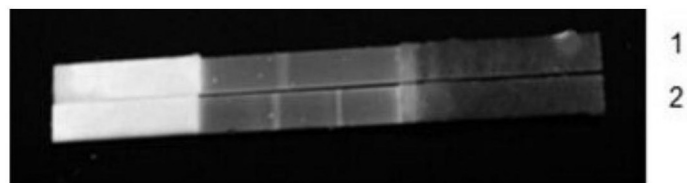


图7

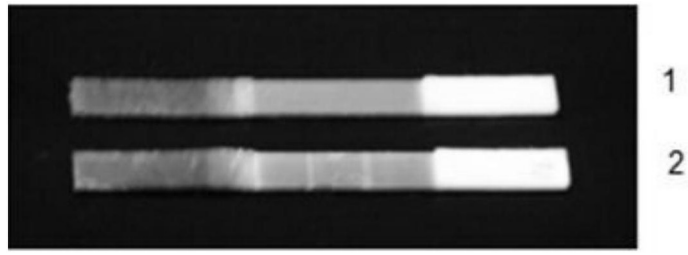


图8

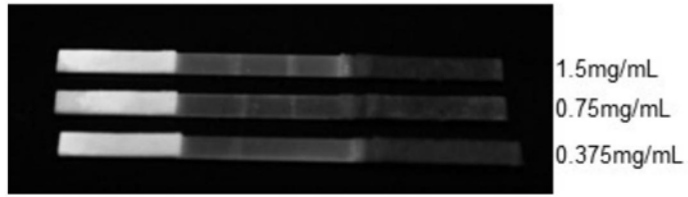


图9

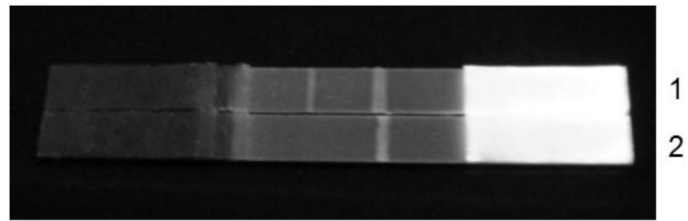


图10

专利名称(译)	牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN107389934A</a>	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	CN201710525164.X	申请日	2017-06-30
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	王慧煜 吴绍强 韩雪清 林祥梅 梅琳		
发明人	王慧煜 吴绍强 韩雪清 林祥梅 梅琳		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
代理人(译)	王文君 陈征		
优先权	201610509943.6 2016-06-30 CN		
其他公开文献	CN107389934B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种牛布鲁氏菌病荧光标记免疫层析试纸条，属于蛋白质工程技术领域。本发明试纸条是在硝酸纤维素膜(NC膜)上包被牛布鲁氏菌外膜蛋白OMP19、OMP22、OMP28的混合抗原和羊抗兔IgG、兔抗羊IgG，在玻璃纤维素膜上包被荧光标记的兔抗牛IgG、羊抗牛IgG，检测标本中的牛布鲁氏菌抗体，本发明试纸条操作简单、方便、快速，不需特殊仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨，易于推广，适合基层，适合于现场检测和流行病学调查，对牛布鲁氏菌感染诊断起到辅助作用，具有良好的市场应用前景。

BCA 标曲	稀释剂(μL)	BSA 原液 (μL)	BSA 浓度 (μg/mL)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175B	750
E	325	325C	500
F	325	325E	250
G	325	325F	125
H	400	100G	25
I	400	0	0