



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104597255 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201510059481. 8

(22) 申请日 2015. 02. 04

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市南湖狮子山街 1 号

(72) 发明人 吴斌 李慧 但汉并 彭忠

胡睿铭 汤细彪 董晓辉 何启盖
陈焕春

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡及其制备方法和应用, 试纸卡是由免疫胶体金试纸条和卡体组成。免疫胶体金试纸条是将硝酸纤维素膜粘贴在纸条底板上, 在硝酸纤维素膜的一端粘贴有金标结合垫和样品垫, 硝酸纤维素膜的另一端粘贴有吸水垫; 硝酸纤维素膜上设有包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 质控线, 检测线与质控线相互平行, 检测线靠近金标结合垫一端, 质控线靠近吸水垫一端。免疫胶体金试纸条放置于试纸卡的卡体中, 检测线和质控线设置在其检测窗孔所对应的位置。该试纸卡用于猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的快速检测, 其结构简单, 操作方便, 灵敏度高、结果清晰。

1. 一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,包括卡体(1)、加样孔(2)、检测线(3)、检测窗孔(4)、质控线(5)、样品垫(6)、支撑背板(7)、金标结合垫(8)、硝酸纤维素膜(9)、吸水垫(10)、底板(11),其特征在于:硝酸纤维素膜(9)粘贴在底板(11)上面,在硝酸纤维素膜(9)的一端有金标结合垫(8)和样品垫(6),硝酸纤维素膜(9)的另一端粘贴有吸水垫(10);依次为样品垫(6)、金标结合垫(8)、硝酸纤维素膜(9)、吸水垫(10),且各垫相接处分别部分重合;硝酸纤维素膜(9)上的检测线(3)包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株,质控线(5)包被有羊抗鼠 IgG,检测线(3)与质控线(5)相互平行,相距 6~8mm,与免疫胶体金试纸条的长相垂直,检测线(3)靠近金标结合垫(8)一端,质控线(5)靠近吸水垫(10)一端;免疫胶体金试纸条放置于卡体中,检测线(3)和质控线(5)设置在检测窗孔(4)所对应的位置,加样端与加样孔(2)位置相对应。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,其特征在于:所述的金标结合垫为金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,其特征在于:所述的检测线(3)与质控线(5)分别包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株和羊抗鼠 IgG。

4. 根据权利要求 1 所述的一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,其特征在于:所述的样品垫(6)与金标结合垫(8)为缓冲液处理过的吸水纸和玻璃纤维,缓冲液的配方为:含 0.5% (w/v)牛血清白蛋白,3% (w/v)蔗糖,0.5% (v/v)吐温-20 的 10mmol/L 的 PBS, PH8.5。

5. 根据权利要求 1 所述的一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡的制备方法,其步骤是:

A. 制备并纯化猪伪狂犬病病毒:将-78~-82℃保存的伪狂犬病病毒鄂 A 株取出,按 0.5 个 MOI 接种 pK-15 细胞,出现 90% 细胞病变后收毒,将病毒液反复冻融 2~4 次,56℃灭活,将病毒液 8000rpm 离心,弃沉淀,并将离心后的上清液放入洁净的烧杯中,在磁力搅拌器搅拌下,将硫酸铵按 41.5~43.5g 每 100ml 的剂量加入烧杯中的病毒液中,搅拌过夜,低温高速 12000rpm、4℃离心 10min,弃掉上清,沉淀用 10mM PH9.0 Tris-HCL 重悬;用 10mM PH9.0 Tris-HCL 为透析液,在 4℃下透析 22~26h,其间多次更换透析液,透析完全后回收透析袋中病毒液,27000rpm 超高速离心,沉淀用 1/5 体积的 10mM PH9.0 Tris-HCL 重悬,蔗糖密度梯度离心,收集不同条带的病毒并超速离心脱糖,将不同条带病毒用病毒保护剂重悬,保存备用,所述病毒保护剂为含有 3% (w/v)蔗糖,0.2% (w/v)牛血清白蛋白的 10mM PH7.2 PBS 溶液;

B. 制备金标结合垫,其方法如下:

(1)所述的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体是由杂交瘤细胞 2E6 分泌的,杂交瘤细胞 2E6 制备方法为:采用杂交瘤细胞技术,用纯化的猪伪狂犬病病毒鄂 A 株免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合,用 HAT 选择性培养基进行培养后,再用猪伪狂犬病病毒鄂 A 株和伪狂犬病病毒 gE/gI 基因缺失株进行间接免疫荧光筛选,筛选后的阳性细胞经有限稀释法克隆,再用猪伪狂犬病病毒感染的阳性对照血清和猪伪狂犬病病毒基因缺失疫苗免疫的阴性对照血清进行 ELISA 筛选,最终筛选出单克隆抗体,分泌此抗体的细胞株命名为杂交瘤细胞 2E6;

(2)制备猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体:将 2E6 细胞接种于经液体石蜡处理过一

周以后的 Balb/C 小鼠腹腔内 ;7 ~ 10 天后,待小鼠腹部明显隆起,收取小鼠腹水 ;4℃ 条件下 10000 rpm 离心 10 min,取上清即为腹水 ;辛酸 - 硫酸铵两步沉淀法纯化腹水,测定浓度后分装并冻存于 -78~ -82℃ 冰箱中 ;

(3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金溶液 :取 110ml 超纯水,倒入已硅化好的平底蓝盖瓶中,加入 1.0ml 1%w/v 氯金酸,混匀,将蓝盖瓶放在磁力搅拌加热器的加热套内,放入洁净的磁力搅拌子,调节转速为 150r/min,打开加热旋钮,加热至沸腾,继续加热 2min,迅速的一次性加入 1.75ml 1%w/v 柠檬酸三钠溶液,继续加热 14~16min,直至溶液变为亮葡萄红色,停止加热,溶液自然冷却至室温,用超纯水将胶体金溶液体积补平至 100ml,通过分光光度计扫描在 450-600 nm 处光谱,测得最大吸收波长为 523 nm,电镜下观察金颗粒大小均匀,直径为 30nm ;

(4) 金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体,制备金标结合垫 :将上述步骤(3) 所得的胶体金用 0.2 mol/LK₂CO₃ 调节 pH 值到 8~8.4 ;加入上述步骤(2) 所得的单克隆抗体,搅拌 28~32 min 后,加入 10% BSAw/v 溶液继续搅拌 2h 之后,将溶液在 4℃ 条件下以 9000 rpm 离心 30 min,弃掉上清,沉淀用 1/5 原体积重悬液重悬,将重悬液喷涂在金标结合垫上,所述的重悬液为含有 3% (w/v) 蔗糖,0.05% (w/v) 吐温 -20 的 5mM PH8.5 PB 溶液 ;

C. 将纯化的猪伪狂犬病病毒鄂 A 株和兔抗鼠 IgG 抗体分别稀释到浓度 2mg/ml 和 1mg/ml,喷涂在硝酸纤维素膜上的检测线和质控线的位置 ;

D. 将底板、硝酸纤维素膜、金标结合垫、样品垫、吸水垫按顺序粘合在一起组成得到检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的免疫胶体金试纸条 ;

E. 免疫胶体金试纸条放置于在卡体中,组装好试纸卡,检测线和质控线设置在检测窗孔所对应的位置,加样端与加样孔位置相对应。

6. 权利要求 1 所述的一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡在猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测中的应用。

一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及动物病毒学与免疫学检测技术领域,更具体涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的免疫胶体金试纸卡,同时还涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的免疫胶体金试纸卡的制备方法,还涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的免疫胶体金试纸卡的用途。

背景技术

[0002] 猪伪狂犬病(PR)是由伪狂犬病病毒(PRV)引起的一种急性传染病。感染猪的临床特征为体温升高,新生仔猪表现神经症状。成年猪常为隐性感染,妊娠母猪感染后可引起流产、死胎及呼吸系统症状。本病广泛分布于世界各国,在我国也广泛存在,是重要的传染病之一,一旦发病,很难根除,给养猪业造成了极大的损失,使生产效益极大的降低,严重制约着我国养猪业的健康发展。被列为国家中长期动物疫病防治规划中二类优先防治的国内动物疫病。因此,该病的净化和根除计划分外重要。

[0003] PRV 整个基因组大小约为 150Kb,已被发现有 11 种糖蛋白,分别命名为 gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、TK、gL、gM 和 gN。目前国际广泛应用的疫苗是 gE 基因与 TK 基因双缺失疫苗。将双基因缺失疫苗注射动物后,动物不能产生缺失蛋白抗体。因此,可以通过检测 gE 蛋白抗体的有无来确定猪只是否感染伪狂犬病病毒野生毒株。

[0004] 在中国,猪伪狂犬病病毒 gE 基因缺失疫苗也正在广泛应用,gE 基因缺失疫苗免疫接种后,在被免疫的猪血清中不能检测到针对 gE 蛋白的抗体,为利用血清进行 PRV 野生毒株感染猪和 gE 基因缺失疫苗免疫接种猪进行鉴别诊断提供了条件,这也是猪伪狂犬病净化和根除计划的基础。因此,在净化和根除计划中,监测和检测猪血清中的伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体是非常重要的一个环节。对已经免疫接种过的猪进行血清抗体检测,如果检测到 gE 蛋白抗体,说明猪已经感染了猪伪狂犬病病毒的野生毒株,可将感染的猪只淘汰,彻底净化和根除猪伪狂犬病。

[0005] 目前国内检测猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体一般采用酶联免疫吸附试验(ELISA),但是由于这种检测方法的特殊性,必须在实验室中完成,所用时间长,费用高。因此建立一种快速、方便、特异性高、灵敏度强、现场可用的检测方法很有优势。

发明内容

[0006] 本发明的目的是在于提供了一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,本试纸卡检测快速,成本低廉,操作方便,灵敏度高;本发明的优点是使用了不饱和标记法标记猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体,提高了检测的灵敏性和特异性。

[0007] 本发明的另一个目的是在于提供了一种猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡的制备方法,试纸卡制备过程简单,原辅料廉价易得,试纸卡操作简单,临床使用中不需要任何设备,便于携带和现场使用。

[0008] 本发明还有一个目的是在于提供了一种猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡在检测猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体中的应用,主要针对现有的猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测方法操作繁琐,检测耗时耗力,还需专业人员操作的现象,此试纸卡操作简单,检测快速、准确,结果易于判断,无需专业人员及仪器操作,且可在养猪现场使用。

[0009] 为了实现以上的目的,本发明采用以下技术方案:

一种用于检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,试纸卡是由免疫胶体金试纸条和卡体组成。卡体包括支撑背板、检测窗孔和加样孔;免疫胶体金试纸条包括样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、底板,硝酸纤维素膜上设有包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 质控线。其连接关系是:硝酸纤维素膜粘贴在底板上面,在硝酸纤维素膜的一端粘贴有金标结合垫和样品垫,吸水垫粘贴于硝酸纤维素膜的另一端;样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫相接处(1—3 毫米)分别部分重合,检测线与质控线相互平行,相距 6~8mm,且与胶体金试纸条的长相垂直,检测线靠近(1-2 mm)金标结合垫一端,质控线靠近(1-2 mm)吸水垫一端。免疫胶体金试纸条放置于卡体中,检测线和质控线设置在检测窗孔所对应的位置,加样端与加样孔位置相对应。

[0010] 所述的金标结合垫(购自上海杰一生物技术有限公司)为金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体;

所述的检测线与质控线分别包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株和羊抗鼠 IgG。

[0011] 所述的样品垫与金标结合垫具体为缓冲液处理过的吸水纸和玻璃纤维,缓冲液的配方为:含 0.5% (w/v)牛血清白蛋白(BSA),3% (w/v)蔗糖,0.5% (v/v)吐温-20 的 10mmol/L 的 PBS, PH8.5。

[0012] 所述的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体为 2E6 细胞所制。

[0013] 一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡的制备方法,其步骤是:

A. 制备并纯化猪伪狂犬病病毒(PRV):将 -78~-82℃ 保存的伪狂犬病病毒鄂 A 株(该伪狂犬病病毒鄂 A 株来源见参考文献:陈焕春等,猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定,畜牧兽医学报,1998 年 02 期)取出,感染单层的 pK-15 细胞(购自中国典型培养物保藏中心, CCTCC, GDC061, PK-15 细胞的编号是 GDC061),提取病毒 DNA,经 PCR 鉴定正确后,0.5 个 MOI 接种 pK-15 细胞,出现 90% 细胞病变后收毒,将病毒液反复冻融 2~4 次,56℃ 灭活,将病毒液 8000rpm 离心 10min,弃掉沉淀,并将离心后的上清液放入洁净的烧杯中,在磁力搅拌器搅拌下,将硫酸铵按 41.5~43.5g 每 100ml 的剂量缓慢加入烧杯中的病毒液中,搅拌过夜,低温高速 12000rpm、4℃ 离心 10min,弃掉上清,沉淀用 1/5 原体积的 10mM PH9.0 Tris-HCL 重悬,用 10mM PH9.0 Tris-HCL 为透析液,4℃ 透析 22~26h,期间多次更换透析液,回收透析袋中病毒液,27000rpm 超高速离心 1h,沉淀用 1/5 原体积的 10mM PH9.0 Tris-HCL 重悬,设置四个蔗糖密度梯度分别为 60% (w/v)、45% (w/v)、35% (w/v)、20% (w/v)进行梯度离心,收集不同条带的病毒后,脱糖,将不同条带病毒用病毒保护剂重悬,检测猪伪狂犬病病毒 gE 阳性,最终确定用 35% 条带病毒作为检测线包被物。所述病毒保护剂为含有 3%w/v 蔗糖,0.2%w/v 牛血清白蛋白的 10mM PH7.2 PBS 溶液。

[0014] B. 制备金标结合垫,其制备方法如下:

(1)所述的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体是由杂交瘤细胞 2E6 分泌的,杂交瘤细胞 2E6 制备方法为:采用杂交瘤细胞技术(参见文献:沈关心、周汝麟,现代免疫学实验技

术,武汉:湖北科学技术出版社,1998),用纯化的猪伪狂犬病病毒鄂A株免疫BALB/c小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基(购自SIGMA公司)进行培养后,再用猪伪狂犬病病毒鄂A株和伪狂犬病病毒gE/gI基因缺失株(参见中国发明专利申请公开说明书,申请专利号200510019513.8)进行间接免疫荧光筛选,筛选后的阳性细胞经有限稀释法克隆,再用猪伪狂犬病病毒感染的阳性对照血清和猪伪狂犬基因缺失疫苗免疫的阴性对照血清进行ELISA筛选,最终筛选出单克隆抗体,分泌此抗体的细胞株命名为杂交瘤细胞2E6。

[0015] (2) 制备猪伪狂犬病病毒gE蛋白单克隆抗体:将2E6细胞接种于经液体石蜡处理过一周以后的Balb/C小鼠;7~10天后,待小鼠腹部明显隆起,取小鼠腹水;4℃条件下10000 rpm离心10 min,取上清即为腹水;辛酸-硫酸铵两步沉淀法纯化腹水,测定浓度后分装冻存于-78~-82℃冰箱中。

[0016] (3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金:量筒取110ml超纯水,倒入已硅化好的平底蓝盖瓶中,加入1.0ml 1% (w/v) 氯金酸,混匀。将蓝盖瓶放在磁力搅拌加热器的加热套内,放入干净的磁力搅拌子,调节转速为150r/min,打开加热旋钮,加热至沸腾(100~110℃),继续加热两分钟,一次性迅速加入1.75ml 1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液,继续加热14~16min,直至溶液变为亮葡萄红色,停止加热,自然冷却至室温(20~25℃),用超纯水将金溶液体积补平100ml。通过分光光度计扫描在450~600 nm处光谱,最大吸收波长为523 nm,电镜下观察金颗粒大小均匀,直径为30nm。

[0017] (4) 金颗粒标记猪伪狂犬病病毒gE蛋白单克隆抗体,制备金标结合垫:将上述步骤(3)所得的胶体金用0.2 mol/L碳酸钾调节pH值到8~8.4;加入上述步骤(2)所得的克隆抗体,缓慢搅拌28~32 min,加入10% BSA (w/v) 溶液,继续搅拌2h后,将溶液以9000 rpm离心30 min,弃掉上清,沉淀用1/5原溶液体积重悬液重悬,将重悬液喷涂在金标结合垫上,所述的重悬液为含有3% (w/v) 蔗糖,0.05% (w/v) 吐温-20的5mM PH8.5 PB溶液;

C. 将纯化的伪狂犬病病毒鄂A株和兔抗鼠IgG抗体分别稀释到浓度2mg/ml和1mg/ml,分别喷涂在硝酸纤维素膜的检测线和质控线位置。

[0018] D. 将底板、硝酸纤维素膜、金标结合垫、样品垫、吸水垫按顺序粘贴在一起组成得到检测猪血清中伪狂犬病病毒gE蛋白抗体的免疫胶体金试纸条。

[0019] E. 免疫胶体金试纸条放置于卡体中,组装好试纸卡,检测线和质控线设置在检测窗孔所对应的位置,加样端与加样孔位置相对应。

[0020] 所述金标结合垫为玻璃纤维制成,所述样品垫和吸水垫为滤纸制成。

[0021] 一种猪血清中伪狂犬病病毒gE蛋白抗体的试纸卡在猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体检测中的应用,其步骤是:

(1) 4℃冰箱中取出封闭袋,从封闭袋中取出检测卡,常温(20~25℃)下平放静置,恢复常温;

(2) 用稀释液将待检血清做2倍稀释:60μl稀释液和60μl待检血清混合均匀;

(3) 取出100μl上述混合液缓慢滴加到加样孔中,加样完成后将试纸条平放在桌面上,30min内观察结果。如果质控线与检测线均显色,则样品血清为伪狂犬病病毒gE蛋白阴性血清;如果质控线显色,检测线不显色,则样品血清为伪狂犬病病毒g蛋白阳性血清;质控线与检测线均不显色,则试纸条无效。

[0022] 所述的稀释液是含有 0.8% (w/v)BSA,0.05% (v/v)吐温-20 的 0.01M 的 PH8.5 的 PBS。

与现有技术相比,本发明的有益效果为:

(1) 适用于猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的快速检测,本试纸卡检测结果特异性强,灵敏度高。临床上猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测常用酶联免疫吸附试验检测,100 份酶联免疫吸附试验检测的伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体阳性血清,20 份酶联免疫吸附试验检测的伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体阴性血清,用本发明的试纸条检测结果显示与酶联免疫吸附试验检测结果全部相符。


[0023] (2) 本发明用于猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测,灵敏度高,特异性好,检测时间短,无需专业人员操作,可鉴别诊断猪只是否为野毒感染。本检测卡结构简单,操作方便易于掌握,无需专业人员操作,成本低廉易于推广使用。

附图说明

[0024] 图 1 为一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡的结构示意图。

[0025] 图 2 为一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的胶体金试纸条的剖面图。

[0026] 注:1:卡体;2:加样孔;3:检测线;4:侧窗孔;5:质控线;6:样品垫;7:支撑背板;8:金标结合垫;9:硝酸纤维素膜;10:吸水垫;11:底板;

“”代表点样方向;“”代表样本流动方向。

具体实施方式

[0027] 实施例 1

如图 1 和图 2 所示,一种用于检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡,试纸卡是由免疫胶体金试纸条和卡体组成。卡体包括支撑背板(7)、检测窗孔(4)和加样孔(2);免疫胶体金试纸条包括样品垫(6)、金标结合垫(8)、硝酸纤维素膜(9)、吸水垫(10)、底板(11),硝酸纤维素膜(9)上设有包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的检测线(3)和包被有羊抗鼠 IgG 质控线(5)。其连接关系是:硝酸纤维素膜(9)粘贴在底板(11)上面,在硝酸纤维素膜(9)的一端粘贴有金标结合垫(8)和样品垫(6),吸水垫(10)粘贴于硝酸纤维素膜 9 的另一端;样品垫(6)、金标结合垫(8)、硝酸纤维素膜(9)、吸水垫(10)相接处(1~3 毫米)分别部分重合,检测线(3)与质控线(5)相互平行,相距 6~8mm,且与胶体金试纸条的长相垂直,检测线(3)靠近(1~2 mm)金标结合垫(8)一端,质控线(5)靠近(1~2 mm)吸水垫(10)一端。免疫胶体金试纸条放置于卡体中,检测线(3)和质控线(5)设置在检测窗孔(4)所对应的位置,加样端与加样孔(2)位置相对应。

[0028] 所述的金标结合垫上为包被有金颗粒标记的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体;

所述的检测线与质控线分别包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株和羊抗鼠 IgG (购自北京博奥森生物技术有限公司)。

[0029] 所述的样品垫与金标结合垫具体为缓冲液处理过的吸水纸和玻璃纤维,缓冲液的配方为:含 0.5% (w/v)牛血清白蛋白(BSA),3% (w/v)蔗糖,0.5% (v/v)吐温-20 的 10mmol/

L 的 PBS, PH8.5。

[0030] 所述的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体为 2E6 细胞所制。

[0031] 实施例 2

试纸卡的制备是基于胶体金免疫层析检测技术,本研究的检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白的抗体试纸卡的制作选择竞争法。

[0032] 一种检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡的制备方法,其步骤是:

A. 制备并纯化猪伪狂犬病病毒:将 $-78\sim-82^{\circ}\text{C}$ 保存的伪狂犬病病毒鄂 A 株取出,感染单层的 pK-15 细胞,提取病毒 DNA,经 PCR 鉴定正确后,0.5 个 MOI 接种 pK-15 细胞,出现 90% 细胞病变后收毒,将病毒液反复冻融 2~4 次, 56°C 灭活,将病毒液 8000rpm 离心,弃沉淀,并将离心后的上清液放入洁净的烧杯中,在磁力搅拌器搅拌下,将硫酸铵按 41.5~43.5g 每 100ml 的剂量加入烧杯中的病毒液中,搅拌过夜,低温高速 12000rpm、 4°C 离心 10min,弃掉上清,沉淀用 10mM PH9.0 Tris-HCL 重悬。用 10mM PH9.0 Tris-HCL 为透析液,在 4°C 下透析 22~26h,其间多次更换透析液,透析完全后回收透析袋中病毒液,27000rpm 超高速离心,沉淀用 1/5 体积的 10mM PH9.0 Tris-HCL 重悬。设置四个密度梯度分别为 60% (w/v)、45% (w/v)、35% (w/v)、20% (w/v) 的蔗糖溶液进行梯度离心,收集不同条带的病毒后,脱糖,将不同条带病毒用病毒保护剂重悬,检测猪伪狂犬病病毒 gE 阳性,最终确定用 35% 条带病毒作为检测线包被物。所述病毒保护剂为含有 3%w/v 蔗糖,0.2%w/v 牛血清白蛋白的 10mM PH7.2 PBS 溶液。

[0033] B. 制备猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体:将杂交瘤细胞 2E6 接种于经液体石蜡处理过的 Balb/C 小鼠腹腔内;7~10 天后,待小鼠腹部明显隆起,收取小鼠腹水; 4°C 条件下 10000 rpm 离心 8~12min,取上清即为腹水;辛酸-硫酸铵两步沉淀法纯化腹水,测定浓度后分装并于 -80°C 冻存。

[0034] C. 金标结合垫的制备,其方法为:

(1)用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金:量筒取 110ml 超纯水,倒入已硅化好的平底盖瓶中,加入 1.0ml 1%(w/v)氯金酸,混匀。将盖瓶放在磁力搅拌加热器的加热套内,放入干净的磁力搅拌子,调节转速为 150r/min,打开加热旋钮,加热至沸腾($100\sim110^{\circ}\text{C}$),继续加热两分钟,一次性迅速加入 1.75ml 1%(w/v)柠檬酸三钠溶液,继续加热 15min,直至溶液变为亮葡萄红色,停止加热,自然冷却至室温,用超纯水将金溶液体积补平 100ml。通过分光光度计扫描在 450~600 nm 处光谱,最大吸收波长为 523 nm,电镜下观察金颗粒大小均匀,直径为 30nm。

[0035] (2)采用不饱和标记法标记猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体:软件分析猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体蛋白的等电点为 8.0,则最佳标记 PH 设置为 8.2。取上述制得的胶体金溶液用 0.1mol/L 碳酸钾溶液调节 PH 至 8.2,分别取 1 mL 于一系列 PE 管中,进行抗体最小标记量的测定。用超纯水将 gE 单克隆抗体(浓度为 2.5mg/mL)溶液进行 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $30\times$ 、 $40\times$ 、 $50\times$ 、 $60\times$ 、 $70\times$ 、 $80\times$ 逐级稀释,各取 100 μl 上述稀释单克隆抗体稀释液,按蛋白浓度从低到高顺序加入上述装有胶体金溶液的 EP 管中,混匀后静置 10 min,利用分光光度计测各管 580nm 的 OD 值,然后以 OD 值作为纵坐标,蛋白质浓度作为横坐标作一曲线,取曲线最先与横轴相接近的那一点的单克隆抗体浓度,并在此浓度基础上蛋单抗标记量下调 10%,即每 1 mL 胶体金溶液的最适当单克隆抗体的标记量为 4.5 μg 。

[0036] (3) 取 100ml 制备的胶体金溶液：用碳酸钾溶液调节至最适宜的 PH (8~8.4)，在搅拌状态下缓慢加入猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体，该标记量按步骤(2)确定。搅拌 30min 后，缓慢加入 10% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)以稳定体系，至终浓度为 1% (w/v) 继续搅拌 2h；

将上述制得的溶液以 9000 rpm 离心 30 min，弃掉上清，沉淀用 1/5 原溶液体积重悬液重悬，将重悬液喷涂在金标结合垫上，多余的溶液可以放置于 4℃ 保存；所述的重悬液为含有 3% (w/v) 蔗糖，0.05%w/v 吐温 -20 的 5mM PH8.5 PB 溶液。

[0037] D. 猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体快速检测胶体金试纸条检测卡的组装：

如图 1、图 2 所示试纸卡包括卡体(1)、底板(11)、样品垫(6)、金标结合垫(8)、硝酸纤维素膜(9)、吸水垫(10)。其中硝酸纤维素膜(9)上的检测线(3)包被有猪伪狂犬病病毒鄂 A 株，所述的质控线(5)包被有羊抗鼠 IgG，金标结合垫(8)上包被有金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体。

[0038] 将经过含有 0.5% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)，3% (w/v) 蔗糖，0.5% (v/v) 吐温 -20 的 10mmol/L 的 PBS，PH8.5 活化的金标结合垫、样品垫干燥备用；

在硝酸纤维素膜上适宜距离喷涂 1.5mg/ml 的上述提纯病毒液检测线和 1.0mg/ml 的羊抗鼠 IgG 质控线，两条线相互平行，相距 7mm；

于底板上依次粘贴吸水垫(10)、硝酸纤维素膜(9)、金标结合垫(8)、样品垫(6)，衔接处部分重合，得胶体金试纸条，将上述试纸条正面向上置于卡体中，得到猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测试纸卡，干燥条件密封保存备用。与试纸卡同步封存的还包括血清稀释液，稀释液是含有 0.8% (w/v) BSA，0.05% (v/v) 吐温 -20 的 0.01M 的 PH8.5 的 PBS。

[0039] 实施例 3：

一种猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的试纸卡在检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体中的应用，其步骤是：

A. 样品的处理：对猪进行前腔静脉采血，血样置于 4℃ 1h，用移液枪将析出的血清取出装入干净的 EP 管内，编号；

B. 检测：1) 4℃ 冰箱中取出封闭袋，从封闭袋中取出检测卡，室温(20℃~25℃)下平放静置，恢复常温。2) 用样品稀释液将待检血清做 2 倍稀释：60μl 样品稀释液和 60μl 待检血清混合均匀；3) 取出 100μl 上述混合液缓慢滴加到加样孔中，加样完成后将试纸条平放在桌面上，30min 内观察结果。

[0040] C. 结果判定：当检测样品为强阳性时，由于层析作用血清中 gE 阳性抗体与金标记猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体沿膜带向前移动，经过检测线时血清中 gE 阳性抗体与金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体竞争性与包被的猪伪狂犬病病毒鄂 A 株结合，从而检测线上的病毒 gE 结合位点不能捕获金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体而不显色；当检测样品为阴性时，检测线上的猪伪狂犬病病毒鄂 A 株大量捕获金颗粒标记的猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体，使检测线显红色。无论样品是否为阳性，点样后，游离的金颗粒标记猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体在质控线处与羊抗鼠 IgG 结合而富集显色。另外，点样后 30min 内，如果反应膜上的质控线没有显示红色线，无论的检测时线是否显示红色线，试纸条检测结果均视为无效。

[0041] 检测时只需将稀释的血清加在试纸卡的加样孔内，操作简便、快速、结果直观、准

确,灵敏度高。

[0042] 实施例 4 :

猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的免疫胶体金试纸卡的特异性与稳定性

本发明的猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的免疫胶体金试纸卡的特异性与稳定性测定如下 :

A. 特异性实验 :1) 检测缺失疫苗接种血清及导致猪疾病的常见病毒阳性血清 PRRSV、PCV2、CSFV、PPV,结果均为阴性 ;2) 检测 PRV 野毒感染猪血清,结果均为阳性。说明本检测卡具有很好的特异性。

[0043] B. 稳定性实验 :将本发明的批试纸条分别放置室温 (20~25℃)、4℃,每隔 1 个月取出同时检测 10 份 PRV gE 阳性血清样本、10 份 PRV gE 阴性血清样本样本,结果显示与预期结果相符,6 个月后 4℃与室温放置的试纸条仍较为稳定。

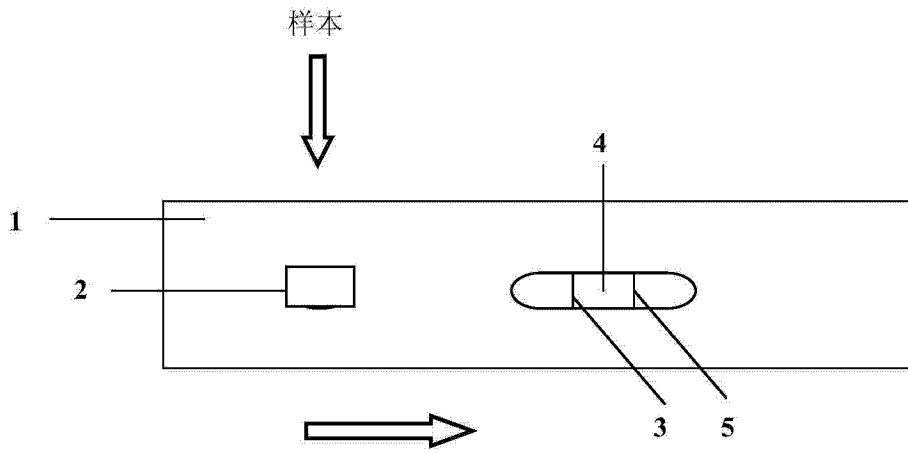


图 1

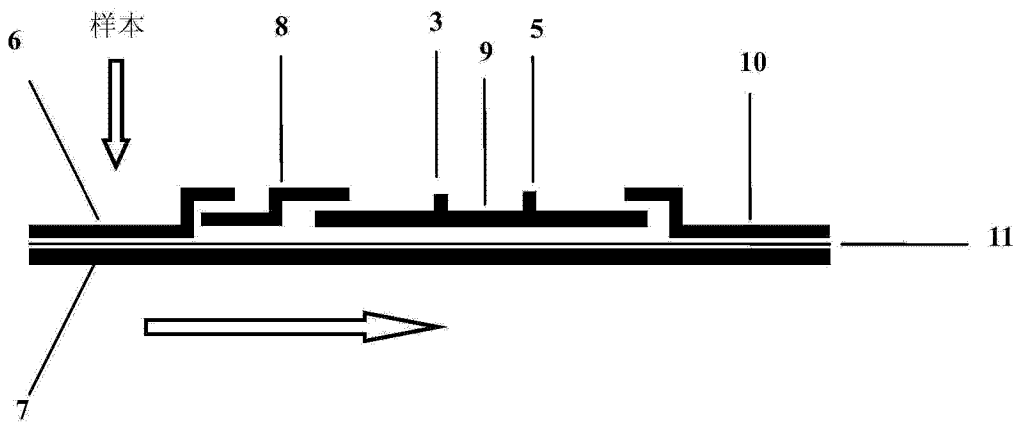


图 2

专利名称(译)	一种检测猪血清中伪狂犬病病毒gE蛋白抗体的试纸卡及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104597255A	公开(公告)日	2015-05-06
申请号	CN201510059481.8	申请日	2015-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	吴斌 李慧 但汉并 彭忠 胡睿铭 汤细彪 董晓辉 何启盖 陈焕春		
发明人	吴斌 李慧 但汉并 彭忠 胡睿铭 汤细彪 董晓辉 何启盖 陈焕春		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/577		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN104597255B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测猪血清中伪狂犬病病毒gE蛋白抗体的试纸卡及其制备方法和应用，试纸卡是由免疫胶体金试纸条和卡体组成。免疫胶体金试纸条是将硝酸纤维素膜粘贴在纸条底板上，在硝酸纤维素膜的一端粘贴有金标结合垫和样品垫，硝酸纤维素膜的另一端粘贴有吸水垫；硝酸纤维素膜上设有包被有猪伪狂犬病病毒鄂A株的检测线和包被有羊抗鼠IgG质控线，检测线与质控线相互平行，检测线靠近金标结合垫一端，质控线靠近吸水垫一端。免疫胶体金试纸条放置于试纸卡的卡体中，检测线和质控线设置在其检测窗孔所对应的位置。该试纸卡用于猪血清中伪狂犬病病毒gE蛋白抗体的快速检测，其结构简单，操作方便，灵敏度高、结果清晰。

