

[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 200910067167.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101587122A

[22] 申请日 2009.6.24

[21] 申请号 200910067167.9

[71] 申请人 吉林大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号
吉林大学畜牧兽医学院

[72] 发明人 陈克研 高 丰 贺文琦 陆慧君
宋德光 岳占碰 高 巍 王 丽

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限
责任公司
代理人 陈宏伟

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原检测
试纸条及其制备方法

[57] 摘要

本发明是一种快速检测猪血凝性脑脊髓炎病毒 (HEV) 的新技术—胶体金免疫层析技术, 利用这种技术做成的快速诊断猪血凝性脑脊髓炎的试纸条。本发明研制了猪血凝性脑脊髓炎病毒的单克隆抗体 (Ab1) 和兔抗猪血凝性脑脊髓炎病毒的多克隆抗体 (Ab2)。Ab1 标记胶体金作为金标抗体, Ab2 作捕获抗体, 正常抗小鼠 IgG 抗体作质量控制抗体。利用抗体、硝酸纤维膜 (NC 膜)、结合垫、样品垫、背衬、塑料卡等材料加工组装成试纸条。这种试纸条可以检测患病猪脑组织及粪便中的猪血凝性脑脊髓炎病毒。这种技术具有操作简单、快速、敏感和特异性好等特点, 非常适于发病现场、门诊以及实验条件不具备的场所等临床样品检测使用。

1、一种猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原诊断试剂条，在硝酸纤维素膜（3）的两端分别设有金标垫（2）和吸收垫（4），金标垫（2）上端为样品垫（1），其特征在于：金标垫（2）包被有纯化的 HEV 单克隆抗体胶体金偶联标记物，检测线（5）包被有纯化的兔抗 HEV 抗体，质控线（6）包被有正常抗小鼠 IgG 抗体，质控线（6）侧贴有吸收垫（4）。

2、权利要求 1 所述检测试纸条的制备方法，包括下述步骤：

①猪血凝性脑脊髓炎病毒抗原制备：将猪血凝性脑脊髓炎病毒接种长满单层的 PK-15 细胞，37℃CO₂ 培养箱内培养 72h，制备猪血凝性脑脊髓炎病毒细胞培养液，采用差速离心、超速离心及蔗糖密度梯度离心纯化所培养的病毒，制成猪血凝性脑脊髓炎病毒纯化抗原；

② 猪血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备：

应用上述所制备的纯化猪血凝性脑脊髓炎病毒免疫 BALB/c 小鼠，取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合，用间接 ELISA 和血凝抑制试验 (HI) 筛选，获得杂交瘤细胞株，猪血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体；

③兔抗猪血凝性脑脊髓炎病毒多克隆抗体的制备：应用上述所制备的纯化猪血凝性脑脊髓炎病毒免疫家兔，分离血清制成兔抗猪血凝性脑脊髓炎病毒多克隆抗体；

④猪血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体胶体金偶联标记物的制备：应用上述猪血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体和氯金酸，采用柠檬酸钠标记法制得猪血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体胶体金偶联标记物；

⑤猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原诊断试剂条的组装：将纯化的猪

血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体用胶体金标记，喷点于玻璃纤维膜（3）上制备成金标垫（2），将纯化的兔抗猪血凝性脑脊髓炎病毒多克隆抗体和购买的正常抗小鼠 IgG 抗体分别包被在硝酸纤维素膜（3）上的检测线（5）处和质控线（6）处。

一种猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原检测试纸条 及其制备方法

技术领域：

本发明涉及一种由血凝性脑脊髓炎病毒引起疾病的检测方法，尤其是提供了一种猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原检测试纸条，同时还公开了其制备方法，属于疾病检测技术领域。

背景技术：

猪血凝性脑脊髓炎是由血凝性脑脊髓炎病毒(简称：HEV)引起仔猪的一种急性、高度接触性传染病。HEV 主要侵害 1-3 周龄的仔猪，临床上以仔猪呕吐、衰竭和明显的神经症状为主要特征，死亡率高达 20-100%。由于该病的发生呈世界范围内分布，所以其对养猪业的威胁或潜在影响较大。目前，常规的 HEV 检测技术主要有病毒分离鉴定、RT-PCR、中和试验、补体结合试验、琼脂扩散试验等，上述方法在检测 HEV 起到一定的作用，然而用于临床上快速、准确地诊断该病时都存在着不同程度的缺陷，这些诊断方法和检疫规程研究的滞后已影响到对该病流行时的快速检测。

发明内容：

本发明公开一种猪血凝性脑脊髓炎病毒检测试纸条，用于诊断猪血凝性脑脊髓炎，解决了常规的 HEV 检测方法速度慢、准确性差等缺欠。

本发明还提供了 HEV 检测试纸条的制备方法，适用于工业化生产。

本发明提供的 HEV 检测试纸条，在硝酸纤维素膜的两端分别设有金标垫和吸收垫，金标垫上端为样品垫，金标垫包被有纯化的 HEV 单克隆抗体胶体金偶联标记物，检测线包被有纯化兔抗 HEV 抗体，质控线包被有正常抗小鼠 IgG 抗体，质控线侧贴有吸收垫。

本发明 HEV 检测试纸条的制备方法，包括以下步骤：

本发明根据抗原抗体能特异结合的免疫学基本原理，将纯化 HEV 单克隆抗体用胶体金标记，喷点于玻璃纤维膜上制备成金标垫，将纯化的兔 HEV 抗体和正常抗小鼠 IgG 抗体分别包被在硝酸纤维素膜（NC 膜）上的检测线处和质控线处，当被检样品中含有 HEV 抗原时，则于金标垫与胶体金标记的 HEV 单克隆抗体抗体结合，并在吸收垫的作用下，向前渗透泳动，与检测线上的 HEV 单克隆抗体再次结合，出现肉眼可见的色带。

本发明试纸条的使用方法如下：取病死猪脑组织乳化物约 0.5ml 加入小试管中，然后插入试纸条，待 3-5 分钟反应带清晰后观察结果（见图 2）。出现 1 条红色(对照)沉淀线，为 HEV 诊断阴性；出现 2 条红色(样品和对照)沉淀线，为 HEV 诊断阳性，未出现沉淀线则为无效。

本发明的积极效果在于：首次将单克隆抗体与胶体金免疫层析技术结合，制备 HEV 胶体金检测试纸条，并拟应用于临床，提高 HEV 的防治能力，可以快速，灵敏检测 HEV，避免了复杂的操作，无需特殊检测仪器，结果易于观察判断，可以适应多种检测环境，以及多种检测需要。并且检测结果可以长期保存，便于对照分析。可用于肉眼水平的免疫检测，样本用量极小，对操作者无毒性，对环境无污染等。因此应用胶体金技术研制 HEV 抗原检测试纸条具有重大的社会意义和广阔的市场前景。

附图说明

图 1. HEV 检测装置示意图；

1.样品垫；2.金标垫；3.硝酸纤维素膜；4.吸收垫；5.检测线；6.质控线。

图 2. HEV 试纸条检测结果判定。

具体实施方式

通过以下实施例进一步举例描述本发明，并不以任何方式限制本发明，在不背离本发明的技术解决方案的前提下，对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

实施例 1

猪血凝性脑脊髓炎病毒抗原制备

将猪血凝性脑脊髓炎病毒接种 PK-15 细胞，细胞病变 (CPE) 达 80% 以上，收获病毒，反复冻融 3 次后，3000r/min 离心 30min，除去细胞碎片；再经 5 000r/min，离心 30 min，取上清以 24 000 r/min 离心 3h，将沉淀用少量 PBS 充分悬浮，即得粗提病毒。将病毒粗制剂进行 25%、35%、45%、55% 不连续蔗糖密度梯度离心，20 000 r/min 离心 2 h，收集病毒带，然后加适量 PBS 缓冲液再次超速离心除去蔗糖，最后用 PBS 缓冲液稀释沉淀物，即得纯化病毒。

实施例 2

猪血凝性脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备与纯化

将本申请人自己制备的分泌抗 HEV 的单克隆抗体杂交瘤细胞系注射 Ba1b/C 小鼠腹腔，诱生腹水，生产单克隆抗体。取所得的小鼠腹水 5ml 与适量的二氧化硅混合，

加入等体积的巴比妥缓冲液，室温震荡 30min 后，4℃静置 1h，3000r/m 离心 10min；取上清加二倍体积的醋酸缓冲液，用 0.1M 盐酸调 PH 值至 4.6，在磁力搅拌器下，每毫升腹水加 33 μl 辛酸，搅拌 30min，4℃静置 2h，4℃，15000r/m 离心 30min，得上清液 25ml，加 2.5ml 0.1M 磷酸盐缓冲液，用 0.1M NaOH 调 PH 值至 7.6，搅拌下缓慢加等体积的饱和硫酸铵至终浓度为 0.227g/ml，4℃静置 1h 后，4℃，12000r/m 离心 30min，弃上清，沉淀用 4ml 0.01M 磷酸盐缓冲液重悬装入透析袋，对 500ml 0.01M 磷酸盐缓冲液充分透析后，4℃，12000r/m 离心 30min，弃沉淀，收集上清液，测得蛋白浓度为 1.8mg/ml，经 SDS-PAGE 电泳鉴定为纯化的单克隆抗体，纯度为 98%。以该单克隆抗体 (Ab1) 作为金标用抗体。

实施例 3

兔抗 HEV 多克隆抗体的制备及纯化

取健康家兔 2 只，用纯化的 HEV 抗原加等量弗氏完全佐剂进行皮下首免，每只 400 μg (2ml)，两周后同剂量抗原加弗氏不完全佐剂加强免疫，两周后重复 1 次，7d 后以间接 ELISA (波长为 490nm) 检测兔血清 HEV 多抗的效价，待血清抗体效价大于 $1:6 \times 10^4$ 时，兔颈静脉放血提取血清制成。采用上述辛酸饱和硫酸铵法纯化血清，用在试纸条 NC 膜上的检测线上，可与金标抗体—HEV 抗原抗体复合物结合，形成夹心抗原抗体复合物。

实施例 4

猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原检测试纸条及其制备方法

1、胶体金颗粒的制备：取 1% 氯金酸溶液 1 ml 加 99 ml 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液，加热沸腾后，取 1% 柠檬酸三钠 1 ml 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中，继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为酒红色，颜色稳定后继续加热 5 min，室温冷却，补充失水至原体积。在透射电镜下观察，可见金颗粒大小基本一致，分布均匀。测量 100 个胶体金颗粒直径，计算平均直径约 40nm。

2、免疫胶体金复合物的制备：目测法确定胶体金与 HEV 单克隆抗体用量比例。用 0.1 mol/L 的碳酸钾溶液调节胶体金溶液的 pH 至 8.4，取 11 支洁净试管，每管分装胶体金溶液 (1 ml/管)。将 HEV 单克隆抗体逐级稀释后 (由 0.5 μg ~ 5g 另设对照管)，顺序加入一系列装有 1 ml 胶体金的试管中混匀；5min 后，在 2~11 管内分别加入 10% 氯化钠溶液 0.1ml，混匀，室温静置 2 h 以上观察结果；1 号管既不加抗体也不加氯化钠溶液，为对照管；未加抗体的 11 号管也为对照 (见表 1)；未加抗体及加入量不足以

稳定胶体金的试管，即呈现由红变蓝的聚沉现象，而加入量达到或超过最低稳定量的试管则保持胶体金的红色不变。以此使胶体金红色不变而抗体含量最低试管的蛋白量，即为稳定 1 ml 胶体金的必需蛋白量，也即最低稳定量。在胶体金标记 HEV 单克隆抗体最低稳定量的基础上再加上 10% 即为稳定胶体金所需 HEV 单克隆抗体的实际所需用量，根据用以标记胶体金的总量计算出所需要 HEV 单克隆抗体的总量。在电磁搅拌下，将标准 HEV 单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中，加入 HEV 单克隆抗体时应逐滴加入，1mg 的 HEV 单克隆抗体大约 5min 加完；在磁性搅拌下加入终浓度为 1% 的牛血清白蛋白(BSA)。

表 1 确定胶体金与 HEV 单克隆抗体用量比例

	1 号管	2-10 号管	11 号管
胶体金溶液 1 ml	+	+	+
HEV 单克隆抗体	+	+	-
		5min	
10%氯化钠溶液 0.1ml	-	+	+
		2h	

3、免疫胶体金的纯化：采用低温超速离心法纯化金标 HEV 单克隆抗体，以除去溶液中未标记的 HEV 单克隆抗体和未充分标记的胶体金以及在标记过程中可能形成的各种聚合物。先将金标 HEV 单克隆抗体在 4℃下，3000r/min 低速离心 40min，小心吸取上清液，弃去沉淀；上清再以 10000r/min 4℃离心 40min，弃去上清。用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS(内含 1% BSA, 0.02% 叠氮钠)溶解沉淀至原体积，充分稳定后过夜。再以 4℃10000r/min 离心 40min，弃上清液。用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS(内含 1% BSA, 0.02% 叠氮钠)溶解沉淀至原体积的 1/10，4℃贮存备用（见流程图）。

4、金标垫（结合释放垫）的制备：将胶体金标记 HEV 单克隆抗体作 1：5，1：10，1：50，1：100，1：500，1：1000 稀释后，均匀等量浸于同样大小的玻璃纤维素膜制成金标垫。达到试纸条敏感度要求的最适胶体金复合物的稀释度，为工作浓度。保存液稀释胶体金标记 HEV 单克隆抗体原液至工作浓度，均匀浸于玻璃纤维素膜，冷冻真空干燥后密封保存。

5、固相硝酸纤维素膜的制备：硝酸纤维素膜的实验反应区，定义为检测带，将兔抗 HEV 抗体以直线形包被于检测带，距离检测带 5 mm 远的质控带(C)以直线形包被正常抗小鼠 IgG 抗体。37℃干燥 2 h，4℃密封保存。

6、样品垫的处理：1%的BSA作为封闭蛋白质均匀浸于玻璃纤维素膜，室温干燥备用。

7、吸收垫用硬质吸水滤纸制备。

8、材料组装：在塑料底板上分别将加样用玻璃纤维、冻干金标记抗HEV单克隆抗体玻璃纤维、已固定有兔抗HEV抗体和抗小鼠IgG抗体的硝酸纤维素膜及硬质吸水滤纸按图1装配，配件与塑料底板的结合可用双面胶或其它粘性材料粘接。装配好的纸板按纵向剪切，裁成宽度为4mm的条状即可。

实施例5 试纸使用方法：

(1) 样品制备：

脑组织悬液：将病死猪脑组织研磨，用生理盐水制成1:10乳剂，用乳剂直接进行测试，如浑浊先离心取上清液；

(2) 操作：取制成的脑乳剂标本约0.5ml加入小试管中，然后将样品垫1端插入试纸条，注意不要超过样品垫1，待1分钟左右取出平放，5分钟读取结果。

(3) 检测结果：参见图2，

1. 阳性：在检测线(5)处，质控线(6)处，各出现一条紫红色条带，判定为阳性；检测线(5)处条带色泽的深浅，依检测样品中HEV抗原含量的高低而变化，含量越高色带越深，反之越浅。

2. 阴性：在质控线(6)处，出现一条紫红色条带，检测线(5)处未出现一条紫红色条带，说明检测样品中无HEV抗原存在。

3. 无效：在检测线(5)处，质控线(6)处，都无明显条带出现。

实验例1 实验室检测结果

用本产品检测猪瘟病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒及猪伪狂犬病毒，结果为阴性。证明检测卡较为特异。将阳性病毒液分别稀释成HA效价1:2¹⁻¹⁰的各5份，用试纸条进行检测，结果当HA效价为2²以下时试纸条检测为阴性，HA效价为2³以上时试纸条检测为阳性，结果见表2。

表2 试纸条敏感度检测结果

病毒HA效价	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
试纸条试验	—	—	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

实验例2

临床检测结果

经检测 188 例疑似猪血凝性脑脊髓炎病毒致死仔猪脑组织样本，出现两条带 141 例，占 76.6%。试纸条法（T2）与目前常规应用的 RT-PCR（T1）检测方法相比较，灵敏度为 98.6%，特异度 100%，结果见表 3。

表 3 RT-PCR（T1）与试纸条法（T2）对比实验统计表

	阳性	阴性
T1	143	45
T2	141	45
	灵敏度 98.6%	特异度 100%

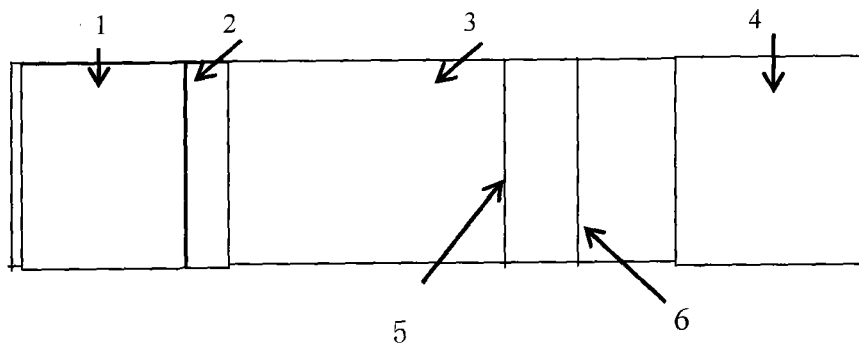


图 1

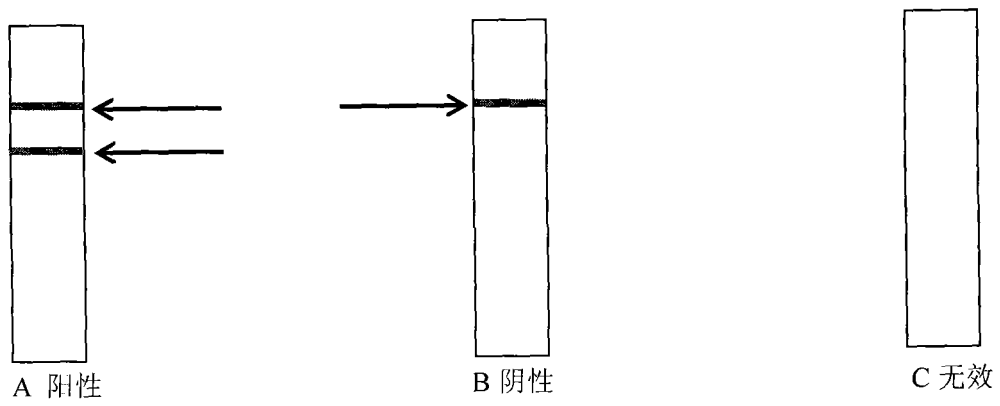


图 2

专利名称(译)	一种猪血凝性脑脊髓炎病毒胶体金抗原检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101587122A	公开(公告)日	2009-11-25
申请号	CN200910067167.9	申请日	2009-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	陈克研 高丰 贺文琦 陆慧君 宋德光 岳占碰 高巍 王丽		
发明人	陈克研 高丰 贺文琦 陆慧君 宋德光 岳占碰 高巍 王丽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种快速检测猪血凝性脑脊髓炎病毒(HEV)的新技术-胶体金免疫层析技术, 利用这种技术做成的快速诊断猪血凝性脑脊髓炎的试纸条。本发明研制了猪血凝性脑脊髓炎病毒的单克隆抗体(Ab1)和兔抗猪血凝性脑脊髓炎病毒的多克隆抗体(Ab2)。Ab1标记胶体金作为金标抗体, Ab2作捕获抗体, 正常抗小鼠IgG抗体作质量控制抗体。利用抗体、硝酸纤维膜(NC膜)、结合垫、样品垫、背衬、塑料卡等材料加工组装成试纸条。这种试纸条可以检测患病猪脑组织及粪便中的猪血凝性脑脊髓炎病毒。这种技术具有操作简单、快速、敏感和特异性好等特点, 非常适于发病现场、门诊以及实验条件不具备的场所等临床样品检测使用。

	1号管	2-10号管	11号管
胶体金溶液 1 ml	+	+	+
HEV 单克隆抗体	+	+	-
		5min	
10%氯化钠溶液 0.1ml	-	+	+
		2h	