



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108845149 A

(43)申请公布日 2018.11.20

(21)申请号 201810732140.6

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2018.07.05

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发  
区科学大道100号

申请人 河南中泽生物工程有限公司

(72)发明人 王爱萍 张改平 周景明 陈玉梅

栗宁 刘红亮 祁艳华 刘燕凯

郭亚楠 马丽萍 张静

(74)专利代理机构 河南科技通律师事务所

41123

代理人 张晓辉 樊羿

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图3页

(54)发明名称

同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法。该试纸条包括支撑板,硝酸纤维素膜,样品垫,金标抗体垫,吸水纸,检测线T2,检测线T1和质控线,金标抗体垫标记抗PRRSV及CSFV的IgG混合物,检测线T1包被抗PRRSV N蛋白单克隆抗体,检测线T2包被抗CSFV E2蛋白单克隆抗体,质控线包被羊抗鼠IgG。提供了同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条的制备方法。本发明的同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条快速、简便、特异性好,为猪繁殖与呼吸综合征及猪瘟的联合免疫监测和流行病学研究提供技术支持,对猪病的防控有着重要的意义。



1. 一种同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条,包括支撑板,硝酸纤维素膜,样品垫,金标抗体垫,吸水纸,检测线T2,检测线T1和质控线,其特征在于,所述金标抗体垫标记有抗PRRSV的IgG和抗CSFV的IgG的混合物,所述检测线T1包被有抗PRRSV N蛋白单克隆抗体,所述检测线T2包被有抗CSFV E2蛋白单克隆抗体,所述质控线包被有羊抗鼠IgG。

2. 根据权利要求1所述的同時检测猪繁殖与呼吸綜合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条,其特征在于,所述抗PRRSV N蛋白单克隆抗体或抗CSFV E2蛋白单克隆抗体的ELISA效价不小于 $10^5$ 。

3. 根据权利要求1所述的同時检测猪繁殖与呼吸綜合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条,其特征在于,所述抗PRRSV N蛋白单克隆抗体的亚型为IgG1型或IgG2a型。

4. 根据权利要求1所述的同時检测猪繁殖与呼吸綜合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条,其特征在于,所述抗CSFV E2蛋白单克隆抗体的亚型为IgG1型。

5. 一种权利要求1所述同時检测猪繁殖与呼吸綜合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 分别对PRRSV N蛋白和CSFV E2蛋白基因进行密码子优化后克隆,原核表达N蛋白,杆状病毒表达E2蛋白,蛋白分别纯化后获得外源N蛋白和E2蛋白;

(2) 制备抗PRRSV N蛋白单克隆抗体和抗CSFV E2蛋白单克隆抗体:

以纯化的N蛋白和E2蛋白为抗原分别免疫BALB/c小鼠,筛选获得PRRSV的杂交瘤细胞株,CSFV的杂交瘤细胞株,分别对比选择亲和力强的杂交瘤细胞株制备单克隆抗体;

(3) 制备试纸条:

I. 采用柠檬酸三钠法制备胶体金溶液;

II. 将所述抗PRRSV和抗CSFV的IgG混合物作为金标抗体,胶体金和抗体经稳定剂处理后吸附于玻璃纤维膜上,真空干燥,裁剪得标记垫;

III. 分别将步骤(2)所得的抗PRRSV N蛋白单克隆抗体和抗CSFV E2蛋白单克隆抗体喷到包被膜上的检测线T1和T2,将羊抗鼠IgG喷/印到质控线,晾干,封袋备用;

IV. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、标记垫、包被膜和吸水纸得试纸板,切割成不同宽度即成。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,在所述步骤(II)中:所述吸附时的pH值控制为7.8;所述胶体金和所述抗体的配比为 $25\mu\text{g}$ 抗体/ $\text{ml}$ 胶体金。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,在所述步骤(III)中,所述质控线和两条检测线间隔 $4\text{mm}$ 。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,在所述步骤(III)中,所述抗PRRSV N蛋白单克隆抗体或抗CSFV E2蛋白单克隆抗体包被时的浓度控制为 $2\text{mg}/\text{mL}$ 。

## 同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物病毒检测技术领域,具体涉及一种同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是目前世界养猪业危害最为严重的病毒性疾病。感染猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)后母猪以生殖障碍为特征,主要表现为早产、晚期流产、死胎、木乃伊胎、发热、厌食等,感染的仔猪表现为呼吸道症状,也有神经症状。其在发病过程中会出现两耳皮肤发绀发紫,故又称为“蓝耳病”。PRRSV有两种主要的血清类型,分别是基因I型(欧洲型)和II型(美洲型)。I型以 Lelystad 株(LV 株)为代表,II型以 VR2332 株为代表。感染PRRSV的猪和感染后康复的猪都能排毒。接触感染、精液传播、空气传播是PRRSV的主要传播途径,鸟类、鼠类、人类等运输工具都可能成为本病的媒介。

[0003] 猪瘟是由猪瘟病毒(CSFV)引起的一种急性、热性和高度接触的病毒性传染病,该病以流行广、发病率和死亡率高为特征,给养猪业带来惨重损失。该病被国际动物法规列入A类种传染病,被我国动物卫生法规列为一类传染病。

[0004] 猪繁殖与呼吸综合征和猪瘟是近年来危害我国养猪业的主要疫病,其中以蓝耳病危害最为严重。在美国及欧洲一些养猪业发达的国家已经采用“疫病净化战略”,即针对一些动物重大疫病如猪口蹄疫、猪瘟等停止使用预防性疫苗,采用严格检疫、监测和净化猪群等措施予以防控。目前,疫苗免疫与疫病监控联用依然是我国猪病防控的主要措施。

[0005] 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种广泛应用于测定液体样本中的蛋白、抗体或激素的免疫分析技术,具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点,适用于大量临床标本的同时检测。目前国内外已经建立了很多关于PRRSV及CSFV感染检测的ELISA方法;但本申请发明人研究发现,这些检测方法绝大多数都是基于抗体检测的,这种基于抗体检测的方法有一定的局限性;就PRRSV而言,猪感染PRRSV后最早7天才能诱发可检测的抗体,个别猪甚至感染PRRSV 3周后仍然检测不到抗体,这种不能及时检出PRRSV感染的状况给后续采取措施来控制PRRS的大面积爆发造成了一定阻碍。

[0006] 因此,当前亟需开发出能够在感染早期同时检测PRRSV及CSFV两种猪共患病的新方法,进而避免病毒感染早期而出现的抗体空白现象,以达到对病毒感染的检测更直观、快速、准确的检测目的。

### 发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法,以期实现操作简单快速,结果清晰易辨,一步多检

的早期检测。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

设计一种同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条,包括支撑板,硝酸纤维素膜,样品垫,金标抗体垫,吸水纸,检测线T2,检测线T1和质控线,所述金标抗体垫标记有抗PRRSV和CSFV的IgG混合物,所述检测线T1包被有抗PRRSV N蛋白单克隆抗体,所述检测线T2包被有抗CSFV E2蛋白单克隆抗体,所述质控线包被有羊抗鼠IgG。

[0009] 优选的,所述抗PRRSV N蛋白单克隆抗体或抗CSFV E2蛋白单克隆抗体的ELISA效价不小于 $10^5$ 。

[0010] 优选的,所述抗PRRSV N蛋白单克隆抗体的亚型为IgG1型或IgG2a型。

[0011] 优选的,所述抗CSFV E2蛋白单克隆抗体的亚型为IgG1型。

[0012] 上述同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 分别对PRRSV N蛋白和CSFV E2蛋白基因进行密码子优化后合成并克隆至不同表达载体,原核表达N蛋白,杆状病毒表达E2蛋白,蛋白分别纯化后获得外源N蛋白和E2蛋白;

(2) 制备抗PRRSV N蛋白单克隆抗体和抗CSFV E2蛋白单克隆抗体:

以纯化的N蛋白和E2蛋白为抗原分别免疫BALB/c小鼠,筛选得阳性的PRRSV的杂交瘤细胞株和CSFV的杂交瘤细胞株,分别选择亲和力强的杂交瘤细胞株制备单克隆抗体;

(3) 制备试纸条:

I. 采用柠檬酸三钠法制备胶体金溶液;

II. 将所述抗PRRSV和CSFV的IgG混合物作为金标抗体,胶体金和抗体经稳定剂处理后吸附于玻璃纤维膜上,真空干燥,裁剪得标记垫;

III. 分别将步骤(2)所得的抗PRRSV N蛋白单克隆抗体和抗CSFV E2蛋白单克隆抗体喷到包被膜上的检测线T1和T2,将羊抗鼠IgG喷到质控线,晾干,封袋备用;

IV. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、标记垫、包被膜和吸水纸得试纸板,切割成不同宽度得试纸条。

[0013] 进一步的,在所述步骤(II)中:所述吸附时的pH值控制为7.8;所述胶体金和所述抗体的配比为 $25\mu\text{g}$ 抗体/ml胶体金。

[0014] 进一步的,在所述步骤(III)中,所述质控线和两条检测线间隔4mm。所述抗PRRSV N蛋白单克隆抗体或抗CSFV E2蛋白单克隆抗体包被时的浓度控制为 $2\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益技术效果在于:

1. 本发明制备的试纸条是基于双抗夹心ELISA抗原检测法的原理,其是针对PRRSV和CSFV抗原的检测,能够避免病毒感染早期而出现的抗体空白现象,因而对病毒感染的检测更直观、快速。

[0016] 2. 本发明制备的试纸条能同时检测PRRSV及CSFV两种猪共患病,快速、简便、特异性好,实现了准确、快速的检测目的。

[0017] 3. 本发明实现了一步多检的检测方法,操作简单快速,结果清晰易辨,适合基层推广。

[0018] 4. 本发明的试纸条为猪繁殖与呼吸综合征及猪瘟的免疫监测和流行病学监测研究提供了技术支撑,其对猪病的防控有着重要的意义。

## 附图说明

[0019] 图1为N蛋白的SDS-PAGE电泳和Western blot检测图，

图中，M为Marker；1为N蛋白；

图2为E2蛋白的SDS-PAGE电泳和Western blot检测图，

图中，M为Marker；1为E2蛋白；

图3为杂交瘤细胞株的IPMA检测图；

图4为试纸条的结构示意图，

图中，1为支撑板，2为硝酸纤维素膜，3为样品垫，4为金标抗体垫，5为吸水纸，6为检测线T2，7为检测线T1，8为质控线C；

图5为试纸条结果判定示意图。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例来说明本发明的具体实施方式，但以下实施例只是用来详细说明本发明，并不以任何方式限制本发明的范围。

[0021] 在以下实施例中所涉及的仪器设备如无特别说明，均为常规仪器设备；所涉及的试剂如无特别说明，均为市售常规试剂；所涉及的试验方法，如无特别说明，均为常规方法。

[0022] 实施例一：免疫原选择及制备

### 1. 免疫原的选择

发明人长期大量研究发现，在猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）基因组所编码的蛋白中，有ORF7编码的核衣壳蛋白，即N蛋白高度保守；其次，在机体中由N蛋白激发的免疫反应性远远高于其它蛋白。

[0023] 基于以上两点，研究筛选该N蛋白成为检测PRRSV的首选靶标蛋白。

[0024] 2. 免疫原的制备

#### A: 免疫原N蛋白的制备

(1) 克隆猪繁殖与呼吸综合征病毒N蛋白基因序列，连入表达载体pET-28a，得重组表达载体pET-28a-N；

(2) 将重组表达载体pET-28a-N用CaCl<sub>2</sub>法转入感受态细胞*E. coli* BL21 (DE3) 中，获得阳性重组大肠杆菌BL21 (DE3)；

(3) 将阳性重组*E. coli* BL21 (DE3) 接种于LB培养基中，在IPTG浓度为 0.5 mM的条件下，30℃诱导表达10小时后，收集样品进行超声破碎及Ni柱纯化；

(4) 将纯化后蛋白经SDS-PAGE电泳和Western blot检测；

结果如图1所示。

[0025] 鉴定结果显示，获得的N蛋白纯度较高；

#### B: 免疫原E2蛋白的制备

(1) 穿梭载体的构建：猪瘟病毒E2蛋白基因序列按照杆状病毒表达系统密码子偏爱性进行优化，将其N端分别引入信号肽序列和6×His标签，其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，送上海生工生物工程有限公司合成，以合成基因为模板，将其克隆至表达载体pFast-BacI载体，得重组表达载体pFast-Bac-E2；将重组表达载体pFast-Bac-E2用CaCl<sub>2</sub>法转入感受态

细胞DH10Bac *E. coli*中,将pFast-Bac-E2转座到Bacmid上面,经蓝白斑筛选挑取白斑,获得阳性重组穿梭载体Bacmid-Bac-E2;

(2) 提取杆粒:用Bacmid小量抽提试剂盒提取Bacmid-Bac-E2杆粒用于昆虫细胞转染试验;

(3) 重组杆状病毒的初步构建:将纯化获得的Bacmid-Bac-E2 DNA与脂质体Lipofectamine 2000(按照质量体积比( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )1:3)转染sf9细胞,分离P1代重组杆状病毒Ac-Bac-E2;P1代重组杆状病毒以MOI=0.1的量接种,接毒后27℃培养72~96小时,收集细胞上清即为P2代病毒,测定TCID<sub>50</sub>,分别收集细胞上清和沉淀初步检测E2蛋白在上清中表达;

(4) 蛋白表达与纯化:接毒后48小时分别收集细胞上清,Ni柱纯化E2蛋白,经SDS-PAGE电泳和Western blot检测;

结果如图2所示。

[0026] 鉴定结果显示,E2蛋白经纯化后纯度可达90%以上。

[0027] 实施例二:单克隆抗体制备及鉴定

### 1. 动物免疫

(1) 将实施例一制备所得的免疫原N蛋白及E2蛋白分别加入弗氏完全佐剂(首次免疫使用)或弗氏不完全佐剂,乳化制成免疫抗原;

(2) 通过背部皮下多点注射的方法,免疫4~8周龄的雌性BALB/c小鼠(4只/组),免疫剂量分别为20  $\mu\text{g}$ /只、40  $\mu\text{g}$ /只,各免 2只;

(3) 在首次免疫后,每隔3周用弗氏不完全佐剂与免疫抗原乳化后以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫;

(4) 四次免疫后,细胞融合前3~4天,通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的免疫原对BALB/c小鼠进行加强免疫,免疫剂量是50  $\mu\text{g}$  /只。

[0028] (5) 多抗血清效价和敏感性测定结果:

最后一次加强免疫后一周,分别对各小鼠进行剪尾采血,然后通过间接ELISA法和间接竞争ELISA法分别对3只小鼠多抗血清的效价和敏感性进行测定。选择效价最高的小鼠进行细胞融合。

[0029] 2. 细胞融合及单克隆抗体制备

(1) 采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量8:1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用HAT选择培养基进行筛选;

(2) 分装在铺有饲养细胞的96孔细胞培养板,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养,于融合后第五天每孔补加培养基50 $\mu\text{L}$ ,12天后,分别以N蛋白或E2蛋白作为包被抗原,通过间接ELISA法进行初筛;并同步选用相应的PRRSV或CSFV标准毒株进行免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)对杂交瘤细胞上清进行筛选,选出ELISA和IPMA同时显色的阳性杂交瘤细胞株进行下一步亚克隆;

(3) 通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3~4次亚克隆筛选,最终获得了6株能稳定分泌抗N蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株(1A3,5H5,2B10,2G3,1F4,3H1),2株能稳定分泌抗CSFV单克隆抗体的杂交瘤细胞株(3B8、2G5)。

[0030] 3. 免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)

IPMA操作过程:

Marc145细胞或PK15细胞(PRRSV用Marc145细胞、CSFV用PK15细胞)铺96孔细胞板,待细胞汇合度长至70%左右接毒。接毒后1h补加2%胎牛血清的DMEM培养基;48h后固定细胞:弃去96孔板中的培养基,PBST洗2~3次,50uL/孔加-20℃预冷的固定液(甲醇),室温静置10~15min;弃去固定液,PBST洗3次,200uL/孔加脱脂奶,四度过夜封闭;弃去封闭液,PBST洗3次,50 uL /孔加一定稀释度的一抗,37℃,1h;弃去一抗,PBST洗5~6次,拍干,50 uL /孔加一定倍数稀释的对应二抗,37℃,1h;弃去二抗,PBST洗5~6次,拍干,50 uL /孔,显色10min。(AEC显色液:每1ml ddw依次加A液1滴,B液2滴,C液1滴)。

[0031] 结果如图3所示:

经IPMA筛选,只有1F4、5H5能与PRRSV结合;3B8和2G5能与CSFV结合。

[0032] 4. 体内诱生腹水法制备单抗

选择经产的雌性Balb/c小鼠,腹腔内注射500μL灭菌石蜡,一周后,再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞,注射量为 $2 \times 10^5$ 个细胞,再过一周后,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化。

[0033] 5. 单抗腹水的鉴定

(1) 间接ELISA测定结果显示,2株IPMA阳性单抗的效价均达到 $10^6$ ;

(2) 亚型鉴定:用亚型鉴定试剂盒对单抗的亚型进行鉴定,鉴定结果显示5H5、1F4单克隆抗体分别属于IgG1、IgG2a型,3B8、2G5均为IgG1型。

[0034] 6. 稳定性鉴定

将所建立的单克隆杂交瘤细胞株连续培养3个月并反复液氮冻存复苏,从而鉴定杂交瘤细胞的稳定性。

[0035] 实施例三:抗体的纯化

辛酸-硫酸铵法进行抗体纯化,操作方法如下:

(1) 取出冻存的单抗腹水或抗血清,6000 r/min离心30min,获得上清液,用醋酸钠缓冲液(0.06mol/L pH4.8)稀释5倍。

[0036] (2) 用NaOH (5mol/L)调节pH为4.5,室温缓慢搅拌0.5 h,加正辛酸,最终浓度为25 μL/mL。

[0037] (3) 4℃下6000 r/min离心30min,保留上清。

[0038] (4) 用中速滤纸过滤得到的上清,并加入10×PBS缓冲液(pH7.4),体积为1/10,混合均匀后调节pH为7.4。

[0039] (5) 在4℃条件下向混合液中添加固体硫酸铵,添加比例为0.2778 g/ mL,可多次添加,30 min内添加完毕。

[0040] (6) 6000 r/min离心20min,扔掉上清液。添加起始腹水体积1/3的PBS(pH7.2)进行重悬,4℃下用PBS缓冲液透析24 h,期间换液3~4次,收集,分装,-20℃保存。

[0041] 实施例四:制备同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条

1. 胶体金溶液的制备

采用柠檬酸三钠法制备胶体金,方法如下:

取99mL ddw放入200mL带刻度的三角瓶中,将三角瓶放在加热磁力搅拌器上加热并搅拌,然后加入1m L 1%的氯金酸,加热搅拌至沸腾,然后快速加入1.6m L 1%的柠檬酸三钠,

持续加热搅拌,观察颜色由浅黄色逐渐变为深红色并至颜色不再变化后再加热搅拌5min,然后取下三角瓶冷却,待恢复室温后用无菌ddw定容至100mL,使用紫外扫描确定最大吸收峰波长为530nm 后4℃保存。

#### [0042] 2. 胶体金标记抗体的制备

将抗PRRSV和CSFV的IgG混合物作为金标抗体,其最佳结合pH值为7.8,胶体金和抗体的配比为25μg抗体/ml胶体金。标记胶体金经1%BSA稳定剂处理后按每平方厘米60μl的量取标记物溶液均匀吸附于玻璃纤维膜上,37℃真空干燥1小时,裁剪宽度为7mm,得到标记垫。

#### [0043] 3. 包被膜的制备

分别将实施例三纯化的抗N蛋白单克隆抗体5H5和抗CSFV抗体3B8用包被缓冲液调节至浓度为2mg/mL,将羊抗鼠IgG用包被缓冲液调节至浓度为1.8mg/mL,将单抗5H5和3B8分别喷到包被膜上的检测线T1和T2,将羊抗鼠IgG喷到包被膜上的质控区C线,所述单克隆抗体5H5、单克隆抗体3B8和羊抗鼠抗体的用量按包膜包被液量均为1μl/cm。质控线和两条检测线间隔4mm,在湿度<30%,温度37℃烘箱中晾干10小时,封袋,备用。

[0044] 4. 在底衬(尺寸为60\*300mm)上顺次相互搭接地粘贴样品垫(尺寸为18\*300mm,玻璃纤维棉材质,先经50mM、pH8.0的Tris-HCl缓冲液浸渍处理2h)、标记垫(尺寸为7\*300mm,玻璃纤维棉材质)、包被膜(尺寸为25\*300mm,硝酸纤维素材质)和吸水纸(尺寸为16\*300mm)得到试纸板,按照要求切割成不同宽度的试纸条。

[0045] 试纸条的结构如图4所示:

1为支撑板,2为硝酸纤维素膜,3为样品垫,4为金标抗体垫,5为吸水纸,6为检测线T2,7为检测线T1,8为质控线C。

#### [0046] 4. 使用方法

本发明的同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条,在使用时,组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳设有两个开孔,加样窗和显示孔,加样窗对应于所述的检测PRRSV和CSFV胶体金双联卡试纸条样品垫。

[0047] 其检测结果判定方法:

将待检测的样品加载样品垫上过滤后,若待测物中含有PRRSV抗原,则与试纸条上胶体金标记的抗PRRSV单克隆抗体形成相应复合物,上行被包被在硝酸纤维素膜上的抗PRRSV N蛋白单克隆抗体5H5拦截形成复合物,即在T1处形成红色条带;若样品中含有CSFV抗原物质,其与试纸条上胶体金标记的抗CSFV单克隆抗体形成的复合物继续上行,被包被在硝酸纤维素膜上的抗CSFV E2蛋白单克隆抗体3B8拦截形成复合物,即在T2处形成红色条带。无论是否含有PRRSV或CSFV抗原,胶体金标记的抗体都将向上层析被包被在NC膜上的羊抗鼠IgG拦截,在C处质控线上形成红色条带。此条带是质控线,若此线不出现,说明胶体金试纸条失效。

[0048] 如图5所示,观察结果阳性则出现两条结合线,T1显色说明样品中有PRRSV;T2显色说明样品中有CSFV,T1、T2均显示说明样品中有PRRSV和CSFV,判定结果阴性仅出现一条质控线C,若C条带不显色则试剂条无效。

[0049] 上面结合实施例对本发明作了详细的说明,但是,所属技术领域的技术人员能够理解,在不脱离本发明宗旨的前提下,还可以对上述实施例中的各个具体参数进行变更,形成多个具体的实施例,均为本发明的常见变化范围,在此不再一一详述。

## SEQUENCE LISTING

<110> 郑州大学,河南中泽生物工程有限公司

<120>

同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法

<130> 2018

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1158

<212> DNA

<213> *Sus scrofa*

<400> 1

```

atgctactag taaatcagtc acaccaaggc ttcaataagg aacacacaag caagatggta 60
agcgtattg ttttatatgt gcttttggcg gcggcggcgc attctgcctt tgcgcatcac 120
catcaccatc accgcctggc ctgcaaggag gactaccgct acgcatcag cagcaccaac 180
gagatcggcc tgctgggcgc cggcggcctg accaccacct ggaaggagta cagccacgac 240
ctgcagctga acgacggcac cgtgaaggcc atctgcgtgg ccggcagctt caagatcacc 300
gccctgaacg tggtagccg ccgctacctg gccagcctgc acaagggcgc cctgctgacc 360
agcgtgacct tcgagctgct gttcgacggc accaacccca gcaccgagga gatgggcgac 420
gacttcggct tcggcctgtg ccccttcgac accagccccg tggtagagg caagtacaac 480
accaccctgc tgaacggcag cgccttctac ctggtgtgcc ccatcggctg gaccggcgtg 540
atcgagtgca ccgccgtgag ccccaccacc ctgcgcaccg aggtggtgaa gaccttccgc 600
cgcgagaagc cttccccca ccgcatggac tgcgtgacca ccaccgtgga gaacgaggac 660
ctgttctact gcaagctggg cggcaactgg acctgcgtga agggcgagcc cgtggtgtac 720
accggcggcc aggtgaagca gtgcaagtgg tgcggcttcg acttcaacga gcccgcggc 780
ctgccccact accccatcgg caagtgcac ctggccaacg agaccggcta ccgcatcgtg 840
gacagcaccg actgcaaccg cgacggcgtg gtgatcagcg ccaaggcag ccacgagtgc 900
ctgatcggca acaccaccgt gaaggtgcac gccagcgacg agcgcctggg ccccatgccc 960
tgccgccccca aggagatcgt gagcagcgcc ggccccgtgc gcaagaccag ctgcaccttc 1020
aactacgcca agaccctgaa gaacaagtac tacgagcccc gcgacagcta cttccagcag 1080
tacatgctga agggcgagta ccagtactgg ttcgacctgg acgtgaccga ccgccacagc 1140
ggctacttcg ccgagttc 1158

```

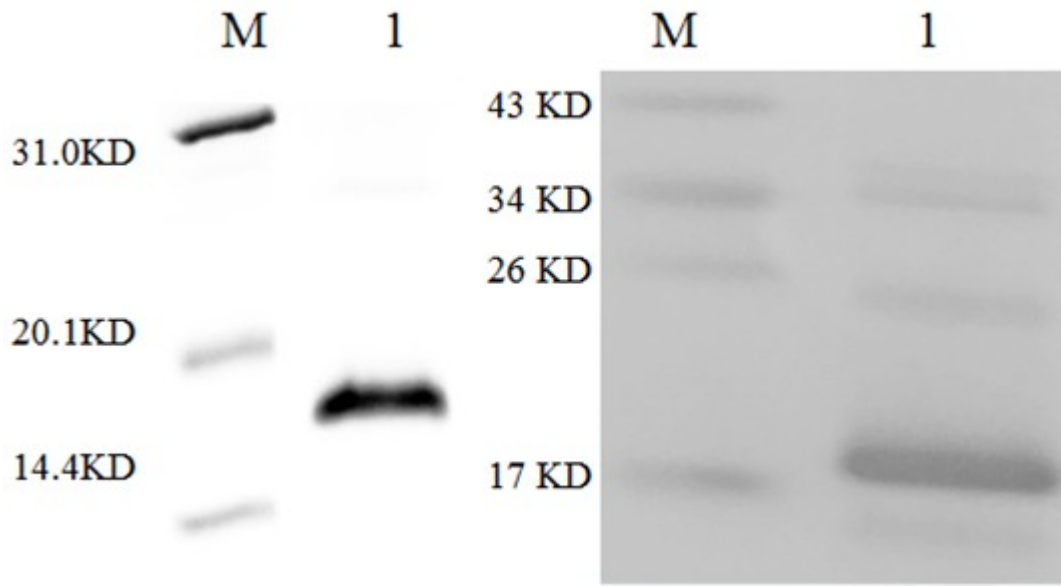


图1

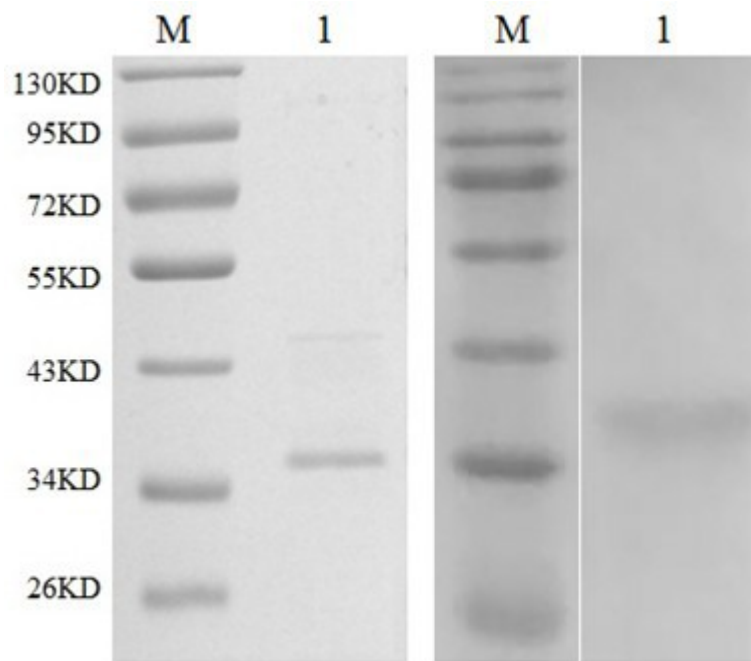


图2

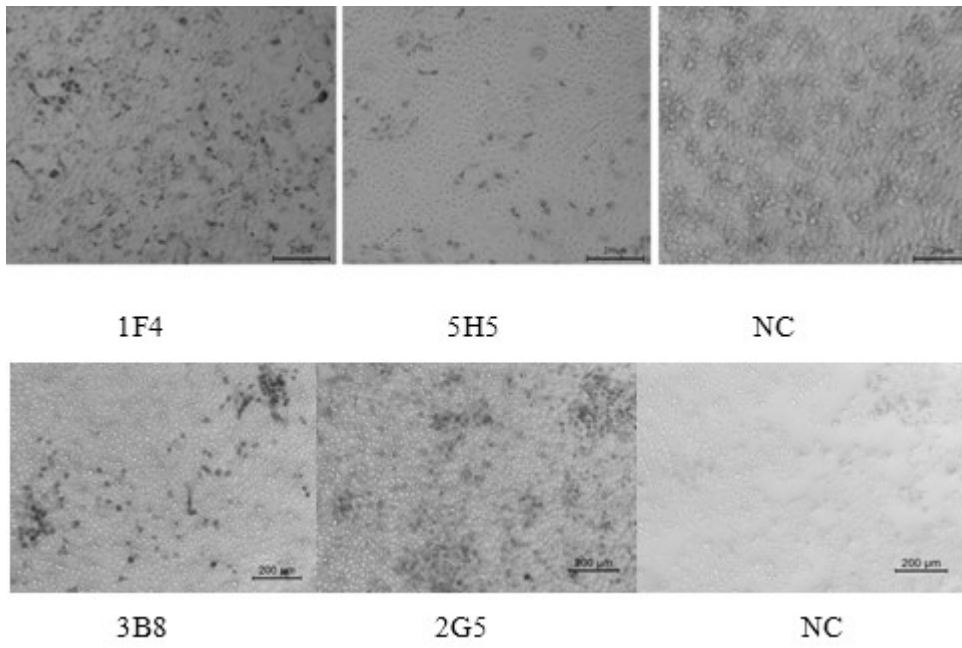


图3

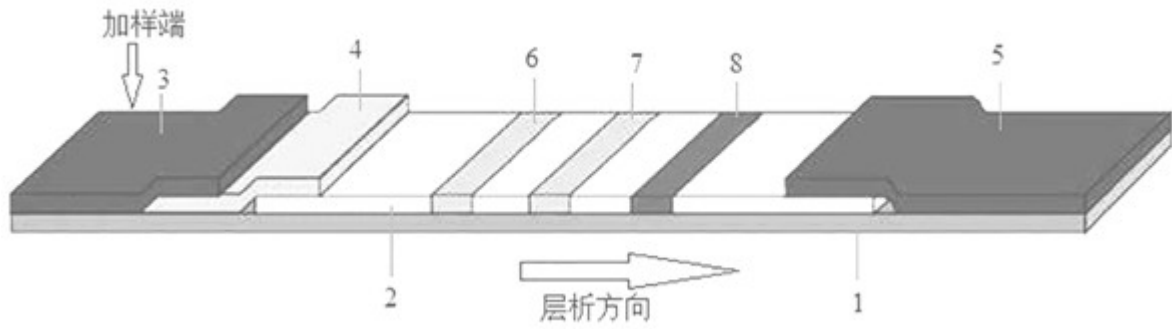


图4

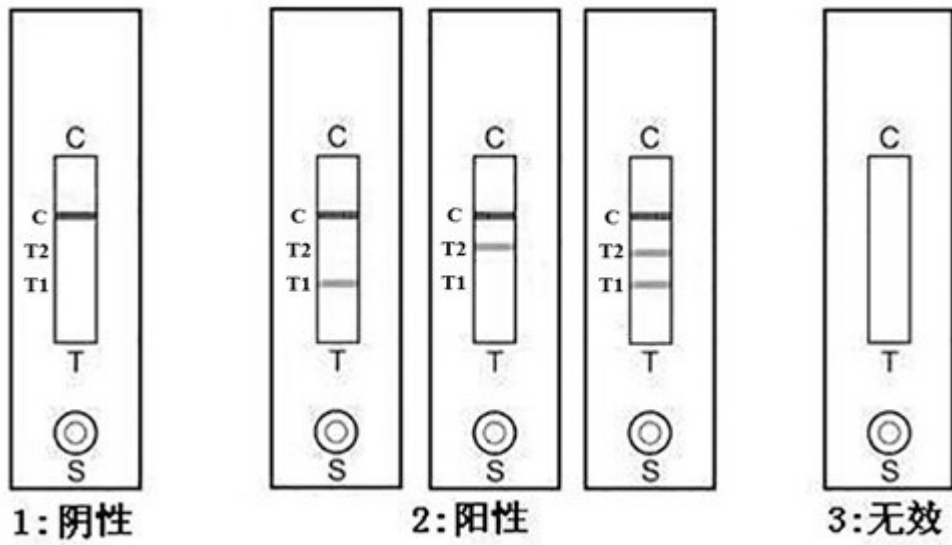


图5

专利名称(译)	同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108845149A</a>	公开(公告)日	2018-11-20
申请号	CN201810732140.6	申请日	2018-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学 河南中泽生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州大学 河南中泽生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学 河南中泽生物工程有限公司		
[标]发明人	王爱萍 张改平 周景明 陈玉梅 栗宁 刘红亮 祁艳华 刘燕凯 郭亚楠 马丽萍 张静		
发明人	王爱萍 张改平 周景明 陈玉梅 栗宁 刘红亮 祁艳华 刘燕凯 郭亚楠 马丽萍 张静		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/577 G01N2333/183 G01N2800/26		
代理人(译)	张晓辉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条及其制备方法。该试纸条包括支撑板，硝酸纤维素膜，样品垫，金标抗体垫，吸水纸，检测线T2，检测线T1和质控线，金标抗体垫标记抗PRRSV及CSFV的IgG混合物，检测线T1包被抗PRRSV N蛋白单克隆抗体，检测线T2包被抗CSFV E2蛋白单克隆抗体，质控线包被羊抗鼠IgG。提供了同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条的制备方法。本发明的同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的胶体金双联试纸条快速、简便、特异性好，为猪繁殖与呼吸综合征及猪瘟的联合免疫监测和流行病学研究提供技术支撑，对猪病的防控有着重要的意义。

