



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102419371 A

(43) 申请公布日 2012.04.18

(21) 申请号 201110234151.X

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2011.08.16

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街  
1 号

(72) 发明人 牛长缨 顾永征 翟保平 林拥军

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 朱盛华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

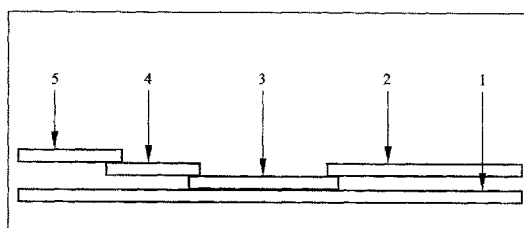
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸及其制备方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸及其制备方法。是在 PVC 塑料底板置搭接有金标结合垫、样品垫和吸水垫的硝酸纤维素包被膜,硝酸纤维素包被膜有包被多克隆抗体的检测线和包被羊抗鼠的质控线,金标结合垫包被胶体金颗粒标记抗体。制备是先制单克隆抗体、多克隆抗体及羊抗鼠,由单克隆抗体制备胶体金颗粒标记抗体,然后在 PVC 塑料底板上顺次搭接并粘贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫,硝酸纤维素膜设检测线和质控线,检测线包被多克隆抗体,质控线包被羊抗鼠,金标垫包被胶体金颗粒标记抗体,即得检测试纸。采用本发明方便快捷,可在 5-10min 内半定量检测迁飞性昆虫样品中的卵黄原蛋白含量,以确定迁飞性昆虫的虫源性质。



1. 胶体金层析法检测迁飞性昆虫卵黄原蛋白的检测试纸,在PVC塑料底板的中间置有硝酸纤维素包被膜,硝酸纤维素包被膜左边依次搭接金标结合垫、样品垫,右边搭接吸水垫,硝酸纤维素膜有检测线和质控线,其特征在于检测线包被作捕获抗体的多克隆抗体Ab2,质控线包被作质量控制抗体的羊抗鼠IgGAb3,金标结合垫包被胶体金颗粒标记抗体。

2. 制备权利要求1所述的胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸的方法,其特征在于具体步骤是:

1) 制备单克隆抗体Ab1:

a. 表达抗原蛋白:用pET28a+表达载体表达卵黄原蛋白部分核心片段,

b. 纯化抗原蛋白:用镍离子柱亲和层析目的蛋白,

c. 免疫和制备:

取已用纯化抗原蛋白免疫的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞,挑选阳性高的杂交瘤细胞进行克隆,制备单克隆杂交瘤细胞,持续培养20代,筛选并最终建立可稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,采用接种杂交瘤细胞至小鼠腹腔的方法制备腹水,再从腹水中提取单克隆抗体Ab1,

用纯化的抗原蛋白免疫新西兰大白兔,免疫8次后,颈动脉采血,制备多克隆抗体Ab2,

2) 制备胶体金颗粒标记抗体,

①先采用柠檬酸三钠还原法制取胶体金颗粒:取0.01%  $\text{HAuCl}_4$  水溶液100mL,加热至沸腾,迅速加入1.25mL的1%柠檬酸三钠水溶液,继续煮沸,反应5min,静置冷却,制得直径为40nm的胶体金颗粒,

②确定胶体金的最佳标记pH:取一系列小试管,分别加入5mL胶体金,用0.1mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节胶体金的pH值,然后在每种不同pH值的胶体金中分别加入1.0mg/mL的单克隆抗体Ab1100.0 $\mu\text{L}$ ,用封口膜封闭试管口,静置15min,4℃ 2000r/min离心10min,取上清液用紫外-可见光分光光度计在可见光范围400-600nm内进行扫描,获得胶体金可见光吸收光谱,测定最大吸收波长、吸光值,以出现最大吸收峰时对应的胶体金pH值为最佳标记pH值,

③确定胶体金的最佳单抗标记量,取一系列小试管,分别加入5mL胶体金,用0.1mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节胶体金至最适pH值,分别加入不同体积的1.0mg/mL的单克隆抗体Ab1,充分混匀,静置5min后每管分别加入10%的氯化钠1.0mL,摇匀,静置10min后于4℃ 2000r/min离心10min,取上清液用紫外-可见光分光光度计在400-600nm可见光范围内进行扫描,获得胶体金可见光吸收光谱,测定最大吸收波长、吸光值,以出现最大吸收峰时对应的蛋白质用量为最小保护剂量,再加20%为稳定胶体金的抗体蛋白实际用量,

④胶体金颗粒标记抗体,于50.0mL的小烧杯中加入20.0mL的胶体金,调pH至最佳标记pH值,在搅拌的状态下缓慢加入一定量稀释好的1mg/mL的单克隆抗体,搅拌30min;加入10% BSA至终浓度为1%,继续搅拌30min;4℃放置2h后,将上述胶体金标记物分装于7.0mL的离心管中,以2,000r/min离心15min,吸出上清液,弃沉淀;以8,700r/min离心45min,弃去上清液,加入标记洗涤液至原体积;再次以10,000r/min离心30min,弃去上清液,加入标记洗涤液至原体积;以10,000r/min离心30min,弃去上清液,沉淀用1.0mL标记洗涤液重悬,得胶体金颗粒标记抗体,在4℃下放置,

标记洗涤液是用下述方法配制的,0.002mol/L含0.1%聚乙二醇20000及0.05%叠氮钠,pH 9.0的硼酸缓冲液,0.22 $\mu\text{m}$ 膜滤过,在4℃下放置,

### 3) 试纸条的构建

在 PVC 塑料底板的中间置有硝酸纤维素包被膜,硝酸纤维素包被膜左边依次搭接金标结合垫、样品垫,右边搭接吸水垫,硝酸纤维素膜有检测线和质控线,金标结合垫包被胶体金颗粒标记抗体,检测线包被作捕获抗体的多克隆抗体 Ab2,质控线包被作质量控制抗体的羊抗鼠 IgG Ab3。

## 胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白 (Vg) 检测试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis* Guenée) 是广泛分布于亚洲和东非的重要迁飞性害虫,在我国几乎所有所有水稻产区该害虫均有分布,但在发生程度上存在明显的地域差别,主要危害区在泰沂山至秦岭一线以南地区。稻纵卷叶螟成虫具有远距离迁飞习性,在我国每年有 5 次北迁和 3 次南迁过程。大规模迁飞使稻纵卷叶螟的危害具有突发性,预测预报难度极大,往往猝不及防造成惨重损失,因此,对其准确、及时、精确地测报十分重要。

[0003] 对于稻纵卷叶螟的预测预报,很大程度上依赖以往经验、田间赶蛾和灯诱成虫等方法。将雌蛾解剖、镜检卵巢发育级别,根据雌蛾卵巢发育进度,可以分析虫源性质(迁入型、居留型、迁出型)及确定防治适期。研究发现,稻纵卷叶螟迁飞时,迁入型、居留型和迁出型在卵巢发育上存在明显差异,迁入期雌虫三级以上卵巢比例可以达到 80% 以上,很少存在一、二级卵巢;居留期雌虫卵巢分布比较平均,一、二级卵巢比例可以达到 30% -40%,高级别卵巢比例在 50% 左右;而迁出期雌虫卵巢则基本都处在一、二级,可以达到 80% 以上,高级别卵巢很少出现。然而,解剖卵巢在实际操作中存在工作量大、准确度低、人为因素明显、需要专业设备等缺陷,阻碍了稻纵卷叶螟测报的准确率,还需开发方便、快速、特异性强的测报方法。

[0004] 现在用于检测的试纸有《一种间接竞争法检测微量氧化低密度脂蛋白胶体金试纸条》(中国专利申请号 200710202084.7),基本支持片 7 中间置层析显色膜 4,层析显色膜右边搭接吸水垫 1,左边依次搭接金标抗体垫 5、样品吸收垫 6,层析显色膜的显色区上设立质控带 2、检测带 3,检测带包被有作抗原用氧化低密度脂蛋白,质控带包被有第二种动物抗鼠的 IgG。《胶体金层析法半定量检测 2,4-D 的试纸条及其制备方法》(中国专利申请号 200710105596.1),PVC 板中间置硝酸纤维素包被膜 7,硝酸纤维素包被膜右边搭接吸水滤纸 8,左边依次搭接金标抗体区块 3、样品吸收区 1,硝酸纤维素包被膜的显色区上设立质控线和 T 测试区,T 测试区有四条显色线。

### 发明内容

[0005] 针对上述现状,本发明的目的旨在提供一种操作简单、快速灵敏、使用方便,检测效果好的胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸及其制备方法。

[0006] 本发明目的实现方式为,胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸,在 PVC 塑料底板的中间置有硝酸纤维素包被膜,硝酸纤维素包被膜左边依次搭接金标结合垫、样品垫,右边搭接吸水垫,硝酸纤维素膜有检测线和质控线,检测线包被作捕获抗体的多克隆

抗体 Ab2, 质控线包被作质量控制抗体的羊抗鼠 IgGAb3, 金标垫包被胶体金颗粒标记抗体。

[0007] 胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白 (Vg) 检测试纸的制备方法, 具体步骤是:

[0008] 1) 制备单克隆抗体 Ab1

[0009] a. 表达抗原蛋白: 用 pET28a+ 表达载体表达卵黄原蛋白部分核心片段

[0010] b. 纯化抗原蛋白: 用镍离子柱亲和层析目的蛋白

[0011] c. 免疫和制备:

[0012] 取已用纯化抗原蛋白免疫的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合, 制备杂交瘤细胞, 挑选阳性高的杂交瘤细胞进行克隆, 制备单克隆杂交瘤细胞, 持续培养 20 代, 筛选并最终建立可稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 采用接种杂交瘤细胞至小鼠腹腔的方法制备腹水, 再从腹水中提取单克隆抗体 Ab1。

[0013] 用纯化的抗原蛋白免疫新西兰大白兔, 免疫 8 次后, 颈动脉采血, 制备多克隆抗体 Ab2。

[0014] 2) 制备胶体金颗粒标记抗体

[0015] ①先采用柠檬酸三钠还原法制取胶体金颗粒: 取 0.01%  $\text{HAuCl}_4$  水溶液 100mL, 加热至沸腾, 迅速加入 1.25mL 的 1% 柠檬酸三钠水溶液, 继续煮沸, 反应 5min, 静置冷却, 制得直径为 40nm 的胶体金颗粒。

[0016] ②确定胶体金的最佳标记 pH: 取一系列小试管, 分别加入 5mL 胶体金, 用 0.1mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节胶体金的 pH 值, 然后在每种不同 pH 值的胶体金中分别加入 1.0mg/mL 的单克隆抗体 Ab1 100.0  $\mu\text{L}$ , 用封口膜封闭试管口, 静置 15min, 4℃ 2000r/min 离心 10min, 取上清液用紫外-可见光分光光度计在可见光范围 400-600nm 内进行扫描, 获得胶体金可见光吸收光谱, 测定最大吸收波长、吸光值, 以出现最大吸收峰时对应的胶体金 pH 值为最佳标记 pH 值。

[0017] ③确定胶体金的最佳单抗标记量: 取一系列小试管, 分别加入 5mL 胶体金, 用 0.1mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节胶体金至最适 pH 值, 分别加入不同体积的 1.0mg/mL 的单克隆抗体 Ab1, 充分混匀, 静置 5min 后每管分别加入 10% 的氯化钠 1.0mL, 摇匀, 静止 10min 后于 4℃ 2000r/min 离心 10min, 取上清液用紫外-可见光分光光度计在 400-600nm 可见光范围内进行扫描, 获得胶体金可见光吸收光谱, 测定最大吸收波长、吸光值, 以出现最大吸收峰时对应的蛋白质用量为最小保护剂量, 再加 20% 为稳定胶体金的抗体蛋白实际用量。

[0018] ④胶体金颗粒标记抗体: 于 50.0mL 的小烧杯中加入 20.0mL 的胶体金, 调 pH 至最佳标记 pH 值, 在搅拌的状态下缓慢加入一定量稀释好的 1mg/mL 的单克隆抗体, 搅拌 30min; 加入 10% BSA 至终浓度为 1%, 继续搅拌 30min; 4℃ 放置 2h 后, 将上述胶体金标记物分装于 7.0mL 的离心管中, 以 2,000r/min 离心 15min, 吸出上清液, 弃沉淀; 以 8,700r/min 离心 45min, 弃去上清液, 加入标记洗涤液至原体积; 再次以 10,000r/min 离心 30min, 弃去上清液, 加入标记洗涤液至原体积; 以 10,000r/min 离心 30min, 弃去上清液, 沉淀用 1.0mL 标记洗涤液重悬, 得胶体金颗粒标记抗体, 在 4℃ 下放置。

[0019] 标记洗涤液是用下述方法配制的, 0.002mol/L 含 0.1% 聚乙二醇 20000 及 0.05% 叠氮钠, pH 9.0 的硼酸缓冲液, 0.22  $\mu\text{m}$  膜滤过, 在 4℃ 下放置。

[0020] 3) 试纸条的构建

[0021] 在 PVC 塑料底板的中间置有硝酸纤维素包被膜, 硝酸纤维素包被膜左边依次搭接金标结合垫、样品垫, 右边搭接吸水垫, 硝酸纤维素膜有检测线和质控线, 金标结合垫包被

胶体金颗粒标记抗体,检测线包被作捕获抗体的多克隆抗体 Ab2,质控线包被作质量控制抗体的羊抗鼠 IgG Ab3。

[0022] 使用本发明的检测试纸时,向样品垫滴加样品后,样品向前泳动至金标垫时,固态化的胶体金颗粒标记抗体迅速溶解释放,一起向前泳动至检测线,若样品中含有 Vg,金标单抗与 Vg 的复合物与检测线上的 (Ab2) 形成金标单抗 (Ab1)-Vg-(Ab2) 复合物而被截获,在检测线形成红色条带,部分金标单抗穿过检测线被包被于质控线的羊抗鼠 IgG 截获,形成红色条带,即判为阳性反应;反之,若样品中不含有 Vg,不会形成免疫复合物,不在检测线形成红色条带,部分金标单抗穿过检测线被包被于质控线的羊抗鼠 IgG 截获,在质控线形成红色条带,判为阴性反应。如检测线和质控线都不显色,则试纸条失效。

[0023] 采用本发明方便快捷,可在 5-10min 内半定量检测迁飞性昆虫样品中的卵黄原蛋白 (Vg) 含量,以确定迁飞性昆虫的虫源性质,适用于科研单位和基层植保部门对于迁飞性昆虫的预测预报。携带方便,操作简单;检测准确率高,特异性强。

## 附图说明

[0024] 附图试纸条结构示意图。

## 具体实施方式

[0025] 本申请人经研究发现,稻纵卷叶螟成虫卵巢发育与卵黄发生密切相关,卵黄(主要是卵黄原蛋白)在卵巢管内的不断沉积促进卵巢的发育和成熟,因此可通过卵黄原蛋白的沉积来判断卵巢的发育进度。基于这种思路,本申请人通过制备稻纵卷叶螟卵黄原蛋白的抗体,开发便携式胶体金试纸条,来检测卵巢中卵黄原蛋白的含量情况,快速判断稻纵卷叶螟的卵巢发育进度,确定虫源性质,为稻纵卷叶螟的准确测报提供新方法。

[0026] 本发明的检测试纸条是在 PVC 塑料底板 1 的中间置有硝酸纤维素包被膜 3,硝酸纤维素包被膜左边依次搭接金标结合垫 4、样品垫 5,右边搭接吸水垫 2,硝酸纤维素膜有检测线和质控线,检测线包被作捕获抗体的多克隆抗体 Ab2,质控线包被作质量控制抗体的羊抗鼠 IgG Ab3。

[0027] 胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白 (Vg) 检测试纸的制备方法,具体步骤是:

[0028] 1) 制备单克隆抗体 Ab1

[0029] a. 表达抗原蛋白:用 pET28a(+) 表达载体表达卵黄原蛋白部分核心片段

[0030] b. 纯化抗原蛋白:用镍离子柱亲和层析目的蛋白

[0031] c. 免疫和制备:

[0032] 取已用纯化抗原蛋白免疫的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞,挑选阳性高的杂交瘤细胞进行克隆,制备单克隆杂交瘤细胞,持续培养 20 代,筛选并最终建立可稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,采用接种杂交瘤细胞至小鼠腹腔的方法制备腹水,再从腹水中提取单克隆抗体 Ab1。

[0033] 用纯化的抗原蛋白免疫新西兰大白兔,免疫 8 次后,颈动脉采血,制备多克隆抗体 Ab2。

[0034] 2) 制备胶体金颗粒标记抗体

[0035] ①先采用柠檬酸三钠还原法制取胶体金颗粒:取 0.01%  $\text{HAuCl}_4$  水溶液 100ml,加

热至沸腾,迅速加入 1.25mI 的 1%柠檬酸三钠水溶液,继续煮沸,溶液颜色逐渐出现灰色,然后颜色越来越深,由蓝色变成黑色,再加热出现酒红色,整个反应过程为 5min 左右。静置冷却,即制得直径约为 40nm 的胶体金颗粒。

[0036] ②确定胶体金的最佳标记 pH:取一系列小试管,分别加入 5mI 胶体金,用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  调节胶体金的 pH 值,然后在每种不同 pH 值的胶体金中分别加入 1.0mg/mI 的单克隆抗体 (Ab1) 100.0  $\mu$  L,用封口膜封闭试管口,静置 15min,4℃ 2000r/min 离心 10min,取上清液用紫外-可见分光光度计在可见光范围 400-600nm 内进行扫描,获得胶体金可见光吸收光谱,测定最大吸收波长、吸光值,以出现最大吸收峰时对应的胶体金 pH 值为最佳标记 pH 值。

[0037] ③确定胶体金的最佳单抗标记量:取一系列小试管,分别加入 5mI 胶体金,用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  调节胶体金至最适 pH 值,分别加入不同体积的 1.0mg/mI 的单克隆抗体 (Ab1),充分混匀。静置 5min 后每管分别加入 10%的氯化钠 1.0mI,摇匀,静止 10min 后于 4℃ 2000r/min 离心 10min。取上清液用紫外-可见分光光度计在可见光范围内 (400-600nm) 进行扫描,获得胶体金可见光吸收光谱,测定最大吸收波长、吸光值。以出现最大吸收峰时对应的蛋白质用量为最小保护剂量,再加 20%为稳定胶体金的抗体蛋白实际用量。

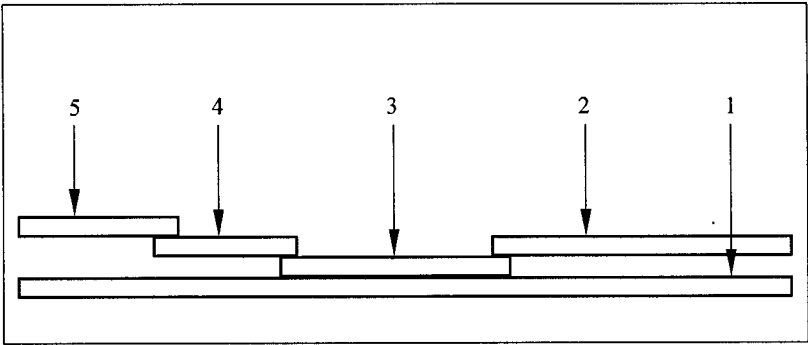
[0038] ④制备胶体金颗粒标记抗体:于 50.0mI 的小烧杯中加入 20.0mI 的胶体金,调 pH 至最佳标记 pH 值,在搅拌的状态下缓慢加入一定量稀释好的 1mg/mI 的单克隆抗体,搅拌 30min;加入 10% BSA 至终浓度为 1%,继续搅拌 30min;4℃ 放置 2h 后,将上述胶体金标记物分装于 7.0mL 的离心管中,以 2,000r/min 离心 15min,吸出上清液,弃沉淀;以 8,700r/min 离心 45min,弃去上清液,加入标记洗涤液至原体积;再次以 10,000r/min 离心 30min,弃去上清液,加入标记洗涤液至原体积;以 10,000r/min 离心 30min,弃去上清液,沉淀用 1.0mI 标记洗涤液重悬,得胶体金颗粒标记抗体,在 4℃ 下放置。

[0039] 标记洗涤液是用下述方法配制的,0.002mol/L 含 0.1%聚乙二醇 20000 及 0.05%叠氮钠, pH 9.0 的硼酸缓冲液,0.22  $\mu$  m 膜滤过,在 4℃ 下放置。

[0040] 3) 试纸条的构建

[0041] 采用双抗体夹心法构建卵黄原蛋白免疫层析快速检测试纸条。在 PVC 塑料底板 1 的中间置有硝酸纤维素包被膜 3,硝酸纤维素包被膜左边依次搭接金标结合垫 4、样品垫 5,右边搭接吸水垫 2,硝酸纤维素膜有检测线和质控线,检测线包被作捕获抗体的多克隆抗体 Ab2,质控线包被作质量控制抗体的羊抗鼠 IgG Ab3,金标结合垫 4 包被胶体金颗粒标记抗体。

[0042] 使用本发明的检测试纸时,向样品垫滴加样品后,样品在毛细管作用下向前泳动,当泳动向前泳动至金标垫时,固态化的胶体金颗粒标记抗体迅速溶解释放,一起向前泳动至检测线 (T),若样品中含有  $V_g$ ,胶体金颗粒标记抗体与  $V_g$  的复合物与检测线上的 (Ab2) 形成金标单抗 (Ab1)- $V_g$ -(Ab2) 复合物而被截获,在检测线形成红色条带,部分金标单抗穿过检测线被包被于质控线的羊抗鼠 IgG 截获,形成红色条带,即判为阳性反应;反之,若样品中不含有  $V_g$ ,不会形成免疫复合物,不在检测线形成红色条带,部分金标单抗穿过检测线被包被于质控线的羊抗鼠 IgG 截获,在质控线形成红色条带,判为阴性反应。如检测线和质控线都不显色,则试纸条失效。





专利名称(译)	胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102419371A</a>	公开(公告)日	2012-04-18
申请号	CN201110234151.X	申请日	2011-08-16
[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	牛长缨 顾永征 翟保平 林拥军		
发明人	牛长缨 顾永征 翟保平 林拥军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	朱盛华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种胶体金层析法迁飞性昆虫卵黄原蛋白检测试纸及其制备方法。是在PVC塑料底板置搭接有金标结合垫、样品垫和吸水垫的硝酸纤维素包被膜，硝酸纤维素包被膜有包被多克隆抗体的检测线和包被羊抗鼠的质控线，金标结合垫包被胶体金颗粒标记抗体。制备是先制单克隆抗体、多克隆抗体及羊抗鼠，由单克隆抗体制备胶体金颗粒标记抗体，然后在PVC塑料底板上顺次搭接并粘贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素包被膜、吸水垫，硝酸纤维素膜设检测线和质控线，检测线包被多克隆抗体，质控线包被羊抗鼠，金标垫包被胶体金颗粒标记抗体，即得检测试纸。采用本发明方便快捷，可在5-10min内半定量检测迁飞性昆虫样品中的卵黄原蛋白含量，以确定迁飞性昆虫的虫源性质。

