

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103235127 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201310133198. 6

G01N 33/532 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 17

(71) 申请人 河南省农业科学院

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路  
116 号

(72) 发明人 罗俊 滕蔓 张改平 崔治中

邓瑞广 江国托 邢广旭 赵鹏  
杨继飞 鄧玉宝 杨艳艳 郭军庆  
王方雨 乔松林 王丽

(74) 专利代理机构 郑州金成知识产权事务所

(普通合伙) 41121

代理人 郭增欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

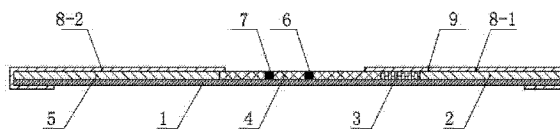
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

马立克氏病病毒快速检测试纸条

(57) 摘要

本发明公开一种快速检测马立克氏病病毒 MDV 的试纸条,包括不吸水的支撑层、附着在支撑层上的吸附层,吸附层由样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及吸水层依次拼接而成,所述纤维素膜层上标记有抗羊 IgG 或抗小鼠 IgG 的对照印迹,以及含有抗 MDV 抗体的检测印迹,所述抗 MDV 抗体为抗 MDV 的单克隆抗体或多克隆抗体;所述金标抗体纤维层上附着有与检测印迹对应的以胶体金标记的抗 MDV 的多克隆抗体或单克隆抗体。该试纸条检测的特异性强、敏感性高,操作简便,快速,结果显示直观、准确,检测成本较低,适合马立克氏病病毒的现场快速检测;使用范围广,便于推广应用。



1. 一种快速检测马立克氏病病毒 MDV 的试纸条,包括不吸水的支撑层、附着在支撑层上的吸附层,所述吸附层由样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及吸水层依次拼接而成,其特征在于:所述纤维素膜层上标记有抗羊 IgG 或抗小鼠 IgG 的对照印迹,以及含有抗 MDV 抗体的检测印迹,所述抗 MDV 抗体为抗 MDV 的单克隆抗体或多克隆抗体;所述金标抗体纤维层上附着有与检测印迹对应的以胶体金标记的抗 MDV 的多克隆抗体或单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于:所述纤维素膜层由硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、羧化纤维素膜或聚偏二氟乙烯膜制成。

3. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于:所述样品吸附纤维层由玻璃棉、尼龙纤维或聚酯纤维制成。

4. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于:所述支撑层由不吸水的硬质塑胶片或硬纸条制成;所述吸水层用吸水纸制成。

5. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于:所述金标抗体纤维层由玻璃棉、尼龙纤维或聚酯纤维制成。

6. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于:在所述样品吸附纤维层、金标抗体纤维层及吸水层上敷设有保护膜,且在样品吸附纤维层与金标抗体纤维层交界处对应的保护膜上偏向样品吸附纤维层一侧 0.3 ~ 0.7 cm 处印制有样品标记线。

7. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征在于:检测印迹与对照印迹的排列组合为“||”、“//”、“++”、“一一”、“— —”、“卜卜”中的一种。

8. 根据权利要求 1 ~ 7 任一项所述的试纸条,其特征在于:所述胶体金标记的抗 MDV 的单克隆抗体是通过以下方法制备的:

筛选抗 MDV 的单克隆细胞株,扩大培养,用 PBS 洗涤后 1000 r/min 离心 10 min, PBS 洗 2 遍,收集细胞,以每只  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  个细胞量对经产母鼠进行腹腔注射,10 ~ 20 d 后采集小鼠腹水,4000 r/min 离心 10 min 后取上清,得到单克隆抗体腹水;

用柠檬酸钠还原法制备金溶胶:在 50 ~ 100 mL 沸腾的 0.01% ~ 0.05% (wt) 氯金酸水溶液中加入 2 ~ 4 mL 的 0.5% ~ 2% (wt) 柠檬酸三钠溶液,反应后获得直径为 15-20 nm 的胶体金溶胶;以 0.1 mol/L 的  $K_2CO_3$  调节胶体金溶胶的 pH 值至 8.5-9.5,以 1:1000 ~ 1:1300 的印迹比将所述的单克隆抗体腹水加入胶体金溶胶中,印迹 10 min 后,加 20% (wt) 的 PEG-10000 至 PEG-10000 的终浓度为 0.05% (wt),4°C 下、1500 ~ 3000 r/min 离心 20 min,除去未结合的胶体金颗粒,4°C 下、15000 r/min 离心 1 h,弃上清液,获得初步纯化的金标抗体蛋白混合物;然后用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析,分离纯化金标蛋白,得到胶体金印迹的抗 MDV 单抗。

9. 根据权利要求 8 所述的试纸条,其特征在于:所述抗 MDV 的单克隆细胞株是由以下方法制备的:

用原核表达 MDV 囊膜糖蛋白 gB 的重组质粒 PET-28a-gB 转化大肠杆菌 BL-21,挑取阳性克隆菌株;阳性菌液经 IPTG 诱导表达和培养,上清液经超声波裂解后过镍柱纯化,得到纯化的重组 gB 蛋白;

将纯化的重组 gB 蛋白以 20 ~ 30  $\mu$ g/ 只的剂量用福氏佐剂乳化制备免疫原免疫 6 周龄 Balb/c 系小鼠三次,每次间隔 15 ~ 30 d;最后一次加强免疫后 3 ~ 4 d,将免疫小鼠

眼球放血,拉颈致死后置于 75% (v) 酒精溶液中浸泡 5 ~ 10 min, 无菌取其脾细胞, 剪碎并经 100 目尼龙网过滤, 用 GNK 洗液混悬脾细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 收集脾细胞; 将  $1 \times 10^8$  个脾细胞与  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$  个 NS0 骨髓瘤细胞混合, 再用 GNK 洗液混悬后, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将细胞沉淀于 37°C 水浴中, 在 1 min 内缓缓加入 0.7 ~ 1.0 mL 的 pH 为 8.5 ~ pH 9.0 的 PEG-1500 中, 边加边摇晃, 然后再缓慢加入 GNK 洗液 15 ml, 37°C 水浴 5 min 后补足 GNK 洗液至总体积为 40 ml, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 将细胞沉淀重悬于 1640/HAT 选择培养基中, 最后以 200  $\mu$ L/ 孔铺板至 96 孔培养板, 置于 37°C、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7~10 d, 杂交瘤的培养上清用间接免疫荧光试验检测, 挑选荧光较强的细胞克隆, 用有限稀释法连续进行三次细胞亚克隆, 最后筛选得到特异性的抗 MDV 的单抗杂交瘤细胞株。

10. 根据权利要求 9 所述的试纸条, 其特征在于: 所述 GNK 洗液是由以下方法制备的: 称取 NaCl 24g、KCl 1.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 10.68g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.34g、葡萄糖 6g、苯酚红 0.03g, 混合后加双蒸水至 3000 ml, 115°C 灭菌 15 min。

## 马立克氏病病毒快速检测试纸条

### [0001] 技术领域

本发明涉及一种检测马立克氏病的器具,特别是涉及一种快速检测马立克氏病病毒的胶体金试纸条。

### 技术背景

[0002] 马立克氏病(Marek's disease, MD)是由马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)引起的一种禽类高度接触性、传染性、淋巴组织增生性肿瘤病。该病以外周神经、性腺、虹膜、各种内脏器官、肌肉和皮肤单核细胞的浸润和肿瘤形成为主要特征。临床上MD发病鸡群表现为生长不均匀、极度消瘦、死亡等症状,最常见的病变是神经损害和多种实质脏器的淋巴肿瘤,以肝脏、脾脏肿瘤最为多见,因神经损害导致的不对称性进行性麻痹,最终可引起单个或多个肢体的完全性麻痹。根据症状和病变发生部位,MD在临床上分为四种类型,即神经型、内脏型、眼型和皮肤型,有时也可混合发生。MDV主要危害鸡,鹌鹑、山鸡也有发病。

[0003] MDV有三种不同血清型,不同血清型毒株既含有共同抗原,也含有特异性抗原。近年来MDV的毒力呈不断增强趋势,至今已发生三次大的毒力变异。MD免疫的失败在世界各地屡有发生,我国也存在类似情况。因此,及时对临床病例进行快速诊断,对该病的有效防控具有重要意义。

[0004] MD的诊断主要有病毒分离培养、血清学检测、病毒核酸检测和病理组织观察、DNA探针技术、端粒酶活性检测等手段,目前临床上最常用的是前三种。病毒分离鉴定不但对临床诊断很有价值,对流行病学及病原学研究亦至关重要,但该方法检测周期长,约需1-2个月,同时细胞培养的操作要求高,局限性较大。血清学检测方法包括荧光抗体法(FA)、免疫过氧化酶法、琼脂扩散试验(AGP)及酶联免疫吸附试验(ELISA)。这些方法都需要在实验室内由专业技术人员操作,主要用于检测毛囊上皮、溶细胞感染的淋巴细胞组织及细胞培养物等样品,但在淋巴瘤和潜伏感染的组织中很难检测到MDV抗原。病毒核酸检测主要是用PCR技术检测组织样本或细胞培养物中的MDV病毒基因组DNA,可以用于鉴别诊断致弱毒株和野毒株。与病毒分离培养相似,分子生物学检测方法操作复杂、需要特殊仪器及专业技术人员。血清学方法虽然相对简便,但仍需要荧光显微镜、酶标仪和许多配套试剂,以及较复杂的操作步骤和实验室工作环境,不适合生产或现场的快速诊断,因此,该方法难以在生产基层或兽医临床上推广应用。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:提供一种简便、准确、结果直观、肉眼可判的快速检测马立克氏病病毒的试纸条,与其他检测方法相比,该试纸条特异性强、灵敏度高、操作简便、结果显示快,检测成本低廉。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案:

一种快速检测马立克氏病病毒MDV的试纸条,包括不吸水的支撑层、附着在支撑层上

的吸附层,所述吸附层由样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及吸水层依次拼接而成,所述纤维素膜层上标记有抗羊 IgG 或抗小鼠 IgG 的对照印迹,以及含有抗 MDV 抗体的检测印迹,所述抗 MDV 抗体为抗 MDV 的单克隆抗体或多克隆抗体;所述金标抗体纤维层上附着有与检测印迹对应的以胶体金标记的抗 MDV 的多克隆抗体或单克隆抗体。

[0007] 所述纤维素膜层由硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、羧化纤维素膜或聚偏二氟乙烯膜制成;所述样品吸附纤维层由玻璃棉、尼龙纤维或聚酯纤维制成。

[0008] 所述支撑层由不吸水的硬质塑胶片或硬纸条制成;所述吸水层用吸水纸制成;所述金标抗体纤维层由玻璃棉、尼龙纤维或聚酯纤维制成。

[0009] 在所述样品吸附纤维层、金标抗体纤维层及吸水层上敷设有保护膜,且在样品吸附纤维层与金标抗体纤维层交界处对应的保护膜上偏向样品吸附纤维层一侧 0.3 ~ 0.7 cm 处印制有样品标记线,检测印迹与对照印迹的排列组合为“||”、“/ /”、“++”、“— —”、“— —”、“— —”中的一种。

[0010] 所述胶体金标记的抗 MDV 的单克隆抗体是通过以下方法制备的:

筛选抗 MDV 的单克隆细胞株,扩大培养,用 PBS 洗涤后 1000 r/min 离心 10 min, PBS 洗 2 遍,收集细胞,以每只  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  个细胞量对经产母鼠进行腹腔注射,10 ~ 20 d 后采集小鼠腹水,4000 r/min 离心 10 min 后取上清,得到单克隆抗体腹水;

用柠檬酸钠还原法制备金溶胶:在 50 ~ 100 mL 沸腾的 0.01% ~ 0.05% (wt) 氯金酸水溶液中加入 2 ~ 4 mL 的 0.5% ~ 2% (wt) 柠檬酸三钠溶液,反应后获得直径为 15-20 nm 的胶体金溶胶;以 0.1 mol/L 的  $K_2CO_3$  调节胶体金溶胶的 pH 值至 8.5-9.5,以 1:1000 ~ 1:1300 的印迹比将所述的单克隆抗体腹水加入胶体金溶胶中,印迹 10 min 后,加 20% (wt) 的 PEG-10000 至 PEG-10000 的终浓度为 0.05% (wt),4°C 下、1500 ~ 3000 r/min 离心 20 min,除去未结合的胶体金颗粒,4°C 下、15000 r/min 离心 1 h,弃上清液,获得初步纯化的金标抗体蛋白混合物;然后用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析,分离纯化金标蛋白,得到胶体金印迹的抗 MDV 单抗。

[0011] 所述抗 MDV 的单克隆细胞株是由以下方法制备的:

用原核表达 MDV 囊膜糖蛋白 gB 的重组质粒 PET-28a-gB 转化大肠杆菌 BL-21,挑取阳性克隆菌株;阳性菌液经 IPTG 诱导表达和培养,上清液经超声波裂解后过镍柱纯化,得到纯化的重组 gB 蛋白;

将纯化的重组 gB 蛋白以 20 ~ 30  $\mu$ g/ 只的剂量用福氏佐剂乳化制备免疫原免疫 6 周龄 Balb/c 系小鼠三次,每次间隔 15 ~ 30 d;最后一次加强免疫后 3 ~ 4 d,将免疫小鼠眼球放血,拉颈致死后置入 75% (v) 酒精溶液中浸泡 5 ~ 10 min,无菌取其脾细胞,剪碎并经 100 目尼龙网过滤,用 GNK 洗液混悬脾细胞,1000 r/min 离心 10 min,收集脾细胞;将  $1 \times 10^8$  个脾细胞与  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$  个 NS0 骨髓瘤细胞混合,再用 GNK 洗液混悬后,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,将细胞沉淀于 37°C 水浴中,在 1 min 内缓缓加入 0.7 ~ 1.0 mL 的 pH 为 8.5 ~ pH 9.0 的 PEG-1500 中,边加边摇晃,然后再缓慢加入 GNK 洗液 15 mL,37°C 水浴 5 min 后补足 GNK 洗液至总体积为 40 mL,1000 r/min 离心 10 min,弃上清;将细胞沉淀重悬于 1640/HAT 选择培养基中,最后以 200  $\mu$ L/ 孔铺板至 96 孔培养板,置于 37°C、5% 的  $CO_2$  培养箱中培养 7~10 d,杂交瘤的培养上清用间接免疫荧光试验检测,挑选荧光较强的细胞克隆,用有限稀释法连续进行三次细胞亚克隆,最后筛选得到特异性的抗 MDV 的单抗杂

交瘤细胞株。

[0012] 所述 GNK 洗液是由以下方法制备的：称取 NaCl 24g、KCl 1.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  10.68g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.34g、葡萄糖 6g、苯酚红 0.03g，混合后加双蒸水至 3000 ml，115℃ 灭菌 15 min。

[0013] 本发明的有益效果：

(1) 本发明根据 ELISA 的基本原理，用免疫层析试纸检测病毒，利用微孔滤膜的渗滤浓缩和毛细管作用，将抗原-抗体反应由 ELISA 的传统液相环境转到固相滤膜上快速进行，并采用胶体金印迹代替酶印迹，凭肉眼直接观察胶体金的显色状况，即时获得检测结果，因此该方法比 ELISA 等血清学方法更为简便、快速。

[0014] (2) 检测特异性强，敏感性高。试纸条以胶体金印迹高亲和力的特异性单抗/多抗为基础制备而成，金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成，二者通过异性电荷间的范德华力相结合，胶体金标对单抗/多抗特异性和亲和力(结合力)影响很小，且具有较高的印迹率。

[0015] (3) 操作简便，快速。使用本发明试纸条时无需附加任何其它仪器和试剂，只要将其测试端插入待检样品液中 30 秒左右，在 1-5 分钟内即可判定检测结果。

[0016] (4) 结果显示直观、准确。试纸条以显示棕红色的检测印迹和对照印迹作为检测的阳性和阴性印迹，即在纤维素膜上显示两条棕红色印迹，表示病毒在被检测样品液中被检出，结果为阳性；在纤维素膜上只显示一条棕红色对照印迹 C，表示病毒在被检测样品液中未检出，结果为阴性。结果判定直观、准确，简单明了，不易出现假阴性和假阳性的误判。

[0017] (5) 减少投资和检测成本。使用该试纸条不需另配其它仪器、设备和试剂，节省大量仪器、设备和附加试剂费用，专业和非专业人士均可随时随地进行现场检测，无需支付专家诊断检查费或送样品去诊断室的路费，节省检测成本。使用该试纸条检测每份样品仅需人民币 3~5 元，比用通常的仪器分析(每份样品 300 元左右)和进口 ELISA 试剂盒(每份样品 30 元左右)的检测费大幅下降。

[0018] (6) 应用范围广，便于普遍推广。本发明操作简单，成“一步式”或“傻瓜式”，而且方便携带和保存，能满足不同层次人员的需要，包括专业化验、海关检疫、卫生防疫、质量监测、畜产品加工、集约化养殖和个体养殖等，具有广阔的市场前景和较好的经济、社会效益。

## 附图说明

[0019] 图 1 为本发明试纸条的俯视结构示意图。

[0020] 图 2 为图 1 的试纸条的侧面结构示意图。

[0021] 图中 1 为支撑层，2 为样品吸附纤维层，3 为金标抗体纤维层，4 为纤维素膜层，5 为吸水层，6 为检测印迹，7 为对照印迹，8-1 为测试端保护膜，8-2 为手柄端保护膜，9 为印迹线。

## 具体实施方式

[0022] 实施例 1：一种快速检测马立克氏病病毒(MDV)的试纸条，参见图 1、图 2。支撑层 1 以塑胶薄片条制成，样品吸附纤维层 2 以玻璃棉制成，金标抗体纤维层 3 上附着有胶体金标记的抗 MDV 单克隆抗体的玻璃棉制成的金标抗体，纤维素膜层 4 为硝酸纤维素制成，吸水

层 5 由吸水滤纸制成,将编号 2、3、4、5 各层依次粘贴在支撑层 1 上,彼此拼接的交界处纤维互相交叉渗透。纤维素膜层 4 上设有抗 MDV 多克隆抗体 IgG 溶液标记检测印迹 6(代号 T),以及以羊(兔)抗小鼠 IgG 溶液标记出对照印迹 7(代号 C);检测印迹与对照印迹的排列形式为“| |”。测试端保护膜 8-1 覆盖在样品吸附纤维层 2 和金标抗体纤维层 3 上面,在测试端保护膜 8-1 上偏向于样品吸附纤维层 2 的一侧 0.5cm 处印有印迹线 9,印迹线右端印有箭头及 MAX 字样,吸水层 5 上覆盖有其它颜色(如黄色或蓝色)的手柄端保护膜 8-2。

[0023] 用于对照印迹的羊(或兔)抗小鼠 IgG 抗体,及用于检测印迹和金标抗体纤维层的抗 MDV 的多克隆抗体和单克隆抗体的制备方法如下:

(1) 羊(或兔)抗小鼠 IgG 的制备

以饱和硫酸铵法提取小鼠血清中的 IgG:取 1 份血清加 2 份 PBS 液(pH 7.2)混匀,再加等体积的饱和硫酸铵液混匀,置 4℃冰箱内 2 h,在 4℃、10000 r/min 离心 15 min,弃上清液;以适量 PBS 液(pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵液至其最终浓度为 33%,置 4℃冰箱内 2 小时,在 4℃、10000 r/min 条件下离心 15 min,弃上清液,以少量 PBS 液(pH7.2)溶解沉淀,置 4℃冰箱内用 PBS 液(pH7.2)过夜透析,换液 2~3 次,在 4℃、10000 r/min 条件下离心 15min,收集上清液,以紫外分光光度计测定其蛋白浓度。按 50 μg/kg~100 μg/kg 体重的剂量经皮下或肌肉注射 IgG 至抗体阴性健康羊或家兔 3~4 次,末次免疫 20 d 后静脉采血,以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1:2000 以上,心脏采血或颈动脉放血,分离制备高免血清。以饱和硫酸铵法提取羊(或兔)抗小鼠的 IgG(其提取方法与上述提取小鼠血清 IgG 相同,不再重述),用于标记本发明试纸条的对照印迹。

[0024] (2) 抗 MDV 单克隆抗体细胞株的制备

用原核表达 MDV 囊膜糖蛋白 B (Glycoprotein B, gB) 的重组质粒 PET-28a-gB 转化大肠杆菌 BL-21,挑取阳性克隆菌株,接种于 5 mL LB 液体培养基中,37℃振荡培养过夜。取 5 mL 培养物转接于 100 mL LB 液体培养基中,37℃培养约 3 h,达到对数生长期,即 OD<sub>600</sub> 约 0.8~1.2,按照每毫升培养基加入 10 μl 100 mmol/L IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 诱导表达,28℃条件下缓慢振荡培养 4~5 h。在 4℃、5000 r/min 条件下离心 15~20 min,弃上清,按 1 g 湿重菌体/2~5 ml 平衡缓冲液的比例充分悬浮菌体沉淀。用超声波裂解仪裂解,直至云雾状的菌液变得比较清亮,4℃、15000 rpm 离心 15 min,收集上清液备用。

[0025] 将上清液上样至用平衡缓冲液(NaCl 500 mmol/L、PB 20 mmol/L、咪唑 5 mmol/L, pH 8.0)平衡的镍离子亲和层析柱,再依次分别用含 30 mmol/L、50 mmol/L、75 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液(NaCl 500 mmol/L、PB 20 mmol/L, pH7.4)进行分阶段洗脱,收集各阶段洗脱液。将各阶段洗脱峰进行 SDS-PAGE 分析,电泳完毕后用考马斯亮蓝 G2250(甲醇:水:冰乙酸 = 4.5:4.5:1)室温染色 2 h,用脱色液(40% 甲醇、10% 冰乙酸)脱色至背景清晰,观察纯化结果表明:重组菌经 IPTG 诱导后有明显的与预期大小相符的目的蛋白条带,说明 gB 蛋白在 *E. coli* 中获得了大量表达,经亲和层析的重复洗脱液中,前两次洗脱的纯化蛋白含量最大,此后洗脱液中含量迅速减少,电泳与浓度测定结果一致,表明洗脱液中的 MDV gB 表达蛋白纯度较高,可满足单抗制备免疫原的需要。

[0026] 将纯化的 gB 表达蛋白以 20~30 μg/只的剂量用福氏佐剂乳化制备免疫原,免疫 6 周龄 Balb/c 系小鼠三次,每次间隔 15-30 天;最后一次加强免疫 3~4 天后,将免疫小鼠眼球放血,拉颈处死,于 75%(v)的酒精溶液中浸泡 5~10 min,无菌取其脾细胞、剪碎并经

100 目尼龙网过滤,用 GNK 洗液(NaCl 24g、KCl 1.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  10.68g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.34g、葡萄糖 6g、苯酚红 0.03g,混合后加双蒸水至 3000 ml,115℃灭菌 15 min)混悬脾细胞,1000 r/min 离心 10 min,收集脾细胞;将  $1 \times 10^8$  的脾细胞与  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$  的 NS0 骨髓瘤细胞混合,再用 GNK 洗液混悬后,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,细胞沉淀于 37℃ 的水浴中,在 1 min 内缓缓加入 0.7 ~ 1.0 mL 的 PEG-1500 (pH 8.5 ~ 9.0),边加边摇,然后缓慢加入 GNK 洗液 15 ml,以终止 PEG 的作用,37℃ 水浴 5 min 后补加 GNK 洗液至总体积 40 ml,1000 r/min 离心 10 min 弃上清,将细胞沉淀重悬于 1640/HAT 选择培养基中,以 200  $\mu\text{L}$ /孔铺板至 96 孔细胞培养板,置于 37℃、5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 7 ~ 10 d,用间接免疫荧光试验(Indirect immunofluorescence assay, IFA)检测细胞培养上清,挑选荧光较强的细胞克隆,用有限稀释法连续进行三次细胞亚克隆,最后筛选得到特异性的抗 MDV 的单抗杂交瘤细胞株。

#### [0027] (3) 抗 MDV 金标单克隆抗体和金标单克隆抗体纤维膜的制备

将筛选到的特异性抗 MDV 的单抗细胞株扩大培养, PBS 洗 2 遍后 1000 r/min 离心 10 min,收集细胞并以  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  个/只的细胞量腹腔注射经产母鼠,10 ~ 20 d 后采集小鼠腹水,4000 r/min 离心 10 min,上清即为所需的单克隆抗体腹水。以柠檬酸钠还原法制备金溶胶,即在 50 ~ 100 mL 沸腾的 0.01% ~ 0.05% (wt) 氯金酸水溶液中加入 2 ~ 4 mL 的 0.5% ~ 2% (wt) 柠檬酸三钠溶液,反应后获得直径 15 nm 左右的胶体金。以 0.1 mol/L 的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调胶体金 pH 值至 8.5 ~ 9.5,以 1:1000 ~ 1:1300 的印迹比将待印迹的抗 MDV 的单抗腹水加入 pH 8.5 ~ 9.5 的金溶胶中,印迹 10 min 后,加 20% (wt) 的 PEG-10000 至 PEG-10000 终浓度达到 0.05%,4℃、1500 ~ 3000 r/min 条件下离心 20 min,除去未结合的胶体金颗粒,4℃、15000 r/min 条件下离心 1 h,弃上清液,获得初步纯化的金标抗体蛋白混合物,用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析,分离纯化金标蛋白,获得胶体金印迹的抗 MDV 单抗。将 1:100 ~ 1:500 稀释的胶体金印迹的上述单克隆抗体吸附于精制玻璃棉(尼龙纤维或聚酯纤维)中,4℃ 下低温真空干燥,即制得抗 MDV 金标单克隆抗体纤维膜。

#### [0028] (4) 抗 MDV 多克隆抗体的制备

差速离心或蔗糖密度梯度离心对 MDV CEF 细胞毒进行浓缩、纯化,甲醛灭活后用福氏佐剂乳化制备免疫抗原,单独多次免疫接种抗体阴性健康羊或兔。末次免疫 20 d 后静脉采血,以 IFA 检测其血清抗体效价在 1:2000 以上时,心脏采血或颈动脉放血,分离制备高免血清,以饱和硫酸铵法提取血清中 IgG 抗体(方法与提取小鼠血清 IgG 相同,不重述)。

#### [0029] (5) 试纸条的检测操作方法

a、样品液的制备 无菌取病鸡的全血,以抗凝剂生理盐水作 1:10~1:50 倍稀释,离心分离血液淋巴细胞悬液待检。若取病鸡的组织(如骨髓、肝脏、脾脏等)将其剪碎、研磨,以生理盐水制成 1:2 ~ 1:5 的待检测样品悬液,置 4℃ 澄清或离心。

[0030] b、检测操作 将试纸条测试端插入待检测样品上清中,插入深度不超过印迹线(MAX),约 30 s 后取出试纸条,水平放置约 1 ~ 5 min,同时观察结果。

[0031] c、结果判断 如果在试纸条纤维素膜上只显示出一条棕红色对照印迹 C,表示检测结果呈阴性,说明在被检样品液中未检测出 MDV;如果检测试纸条上的纤维素膜上出现棕红色的对照印迹 C 和检测印迹 T,表示检测结果呈阳性,即在待检样品中检测出 MDV;如果纤维素膜上没有任何棕红色印迹显示,则表明试纸条已失效或操作有误。

**[0032] (6) 本发明试纸条的灵敏性、特异性试验**

a、灵敏性试验。将 MDV 的 CEF 细胞培养液用 PBS (PH7.4) 或双蒸水分别配制成不同病毒滴度的病毒溶液 (100 PFU/mL、50 PFU/mL、25 PFU/mL、12.5 PFU/mL), -20℃ 反复冻融 3 次后, 将试纸条测试端插入病毒液中, 插入深度不超过印迹线 (MAX), 约 30 s 后取出试纸条, 水平放置约 1 ~ 5 min, 同时观察结果。插入 100 PFU/mL 和 50PFU/mL 病毒液中的试纸条均出现棕红色的对照印迹 C 和检测印迹 T, 即检测结果为阳性; 插入 25 PFU/mL 病毒液的试纸条出现棕红色的对照印迹 C, 但检测印迹 T 的棕红色较弱, 即检测结果为弱阳性; 插入 12.5 PFU/mL 病毒液的试纸条只显示出一条棕红色对照印迹 C, 即检测结果为阴性。由此可见, 该试纸条对 MDV 具有较高的灵敏度, 检测 MDV 的最低病毒滴度为 25 PFU/mL。

**[0033] b、特异性试验。**用本发明的试纸条检测与 MD 同类的家禽免疫抑制病病毒如禽白血病病毒 (ALV)、网状内皮组织增生症病毒 (REV)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 的病毒培养液, 结果显示该试纸条的检测结果均为阴性, 说明该试纸条用于检测 MDV 具有良好的特异性, 可用于 MDV 的快速检测。

**[0034] (7) 上述试纸条的测试原理**

当该试纸条测试端 (样品吸附带) 插入待检测样品溶液后, 待检溶液通过层析作用带动待检鸡病料中的 MDV 病毒粒子及金标抗体纤维膜中的金标抗体一起向纤维素膜层扩散, 并最终渗入手柄端吸水层中, 扩散过程中待检 MDV 可与相对应的金标单抗相结合, 进而与纤维素膜上检测印迹中的抗 MDV 的多抗 IgG 结合, 从而显示出棕红色的检测印迹 T; 而对照印迹中的羊抗或兔抗小鼠 IgG 则可与金标单抗结合, 形成棕红色对照印迹 C。如果待检样品液中没有 MDV, 试纸条只显示出一条棕红色对照印迹 C; 如果纤维素膜上没有任何棕红色印迹显示, 则表明试纸条已失效或操作失误。

**[0035] 实施例 2:**检测马立克氏病病毒的试纸条, 其结构、制备方法与实施例 1 基本相同, 不同之处在于: 由尼龙纤维制成的金标抗体纤维层 3 上附着以胶体金标记的抗 MDV 金标多克隆抗体; 在硝酸纤维素制成的纤维素膜层 4 上设有以抗 MDV 单克隆抗体 IgG 溶液喷涂的检测印迹 T, 以羊 (兔) 抗小鼠 IgG 溶液喷涂的对照印迹 C。其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均与实施例 1 相同, 不重述。

**[0036] 实施例 3:**检测马立克氏病病毒的试纸条, 其结构、制备方法与实施例 1 基本相同, 不同之处在于: 由聚酯纤维制成的金标抗体纤维层 3 上附着有抗 MDV 金标单克隆抗体; 在聚偏二氟乙烯制成的纤维素膜层 4 上以对应的抗 MDV 多克隆抗体 IgG 溶液标记出检测印迹, 以羊 (兔) 抗小鼠 IgG 溶液印上对照印迹 C。

**[0037] 实施例 4:**检测马立克氏病病毒的试纸条, 其结构、制备方法与实施例 3 基本相同, 不同之处在于: 由尼龙纤维制成的金标抗体纤维层 3 上附着抗 MDV 金标多克隆抗体; 聚偏二氟乙烯制成的纤维素膜层 4 上以对应的抗 MDV 单克隆抗体 IgG 溶液标记出检测印迹, 以羊 (兔) 抗小鼠 IgG 溶液标记出对照印迹 C。

**[0038] 实施例 5:**检测马立克氏病病毒的试纸条, 其结构、制备方法与实施例 1 基本相同, 不同之处在于: 由尼龙纤维制成的金标抗体纤维层 3 上附着有抗 MDV 金标单克隆抗体; 在聚偏二氟乙烯制成的纤维素膜层 4 上以识别另一表位的抗 MDV 单克隆抗体 IgG 溶液印制出检测印迹, 以羊 (兔) 抗鼠 IgG 溶液标记出对照印迹 C, 检测印迹与对照印迹的排列组合为“/”、“++”、“— —”、“— —”、“— —”中的任意一种。

[0039] 实施例 6 : 试纸条结构和实施例 1 基本相同, 不同之处在于 : 支撑层 1 由不吸水的硬纸条制成, 样品吸附纤维层 2 由尼龙纤维制成, 纤维素膜层 4 用纯纤维素膜制成。

[0040] 实施例 7 : 试纸条结构和实施例 1 基本相同, 不同之处在于 : 样品吸附纤维层 2 由聚酯纤维膜制成, 纤维素膜层 4 用羧化纤维素膜制成。

[0041] 实施例 8 : 试纸条结构和实施例 1 基本相同, 不同之处在于 : 样品吸附纤维层 2 用尼龙纤维制成, 纤维素膜层 4 用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 纤维膜制成。

[0042] 实施例 9 : 试纸条结构和实施例 1 基本相同, 不同之处在于 : 样品吸附纤维层 2 采用聚酯纤维膜, 纤维素膜层 4 采用纯纤维素膜。

[0043]

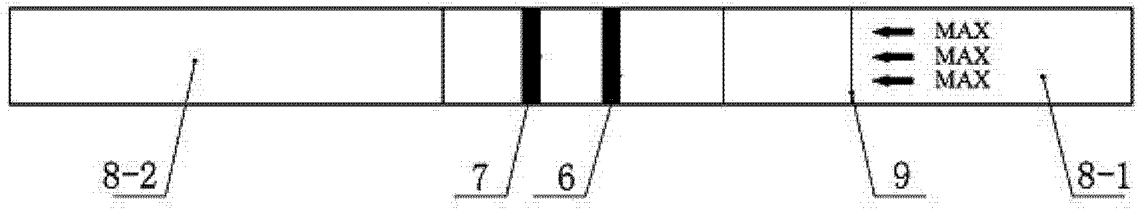


图 1

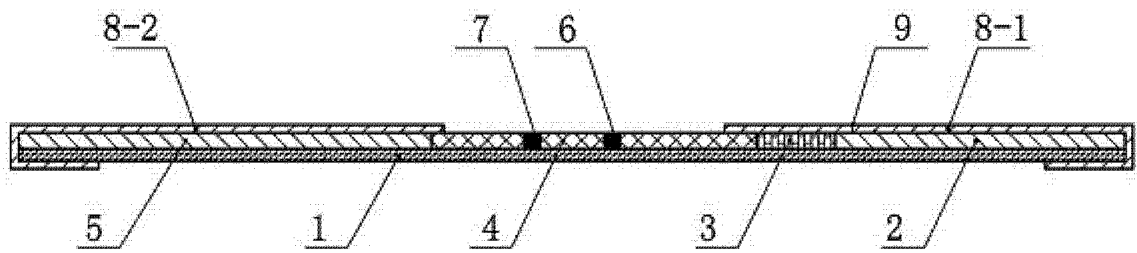


图 2

专利名称(译)	马立克氏病病毒快速检测试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN103235127A</a>	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201310133198.6	申请日	2013-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	罗俊 滕蔓 张改平 崔治中 邓瑞广 江国托 邢广旭 赵鹏 杨继飞 鄧玉宝 杨艳艳 郭军庆 王方雨 乔松林 王丽		
发明人	罗俊 滕蔓 张改平 崔治中 邓瑞广 江国托 邢广旭 赵鹏 杨继飞 鄧玉宝 杨艳艳 郭军庆 王方雨 乔松林 王丽		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开一种快速检测马立克氏病病毒MDV的试纸条，包括不吸水的支撑层、附着在支撑层上的吸附层，吸附层由样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及吸水层依次拼接而成，所述纤维素膜层上标记有抗羊IgG或抗小鼠IgG的对照印迹，以及含有抗MDV抗体的检测印迹，所述抗MDV抗体为抗MDV的单克隆抗体或多克隆抗体；所述金标抗体纤维层上附着有与检测印迹对应的以胶体金标记的抗MDV的多克隆抗体或单克隆抗体。该试纸条检测的特异性强、敏感性高，操作简便，快速，结果显示直观、准确，检测成本较低，适合马立克氏病病毒的现场快速检测；使用范围广，便于推广应用。

