



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109781980 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201910088471.5

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2019.01.30

G01N 33/532(2006.01)

(71)申请人 河南中泽生物工程有限公司

地址 451162 河南省郑州市航空港区迎宾
路南侧4号楼1-2层

申请人 郑州大学

(72)发明人 王爱萍 陈玉梅 赵建国 刘运超

邢广旭 孙亚宁 冯景

(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 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

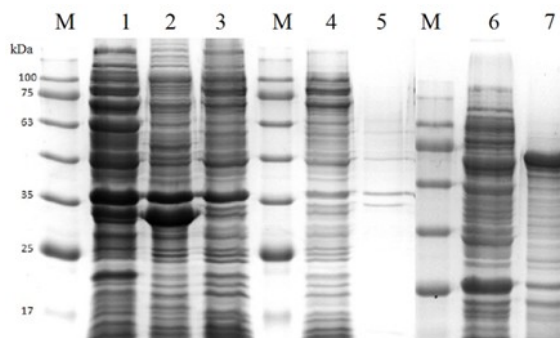
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用,旨在解决非洲猪瘟病毒检测难的技术问题。该检测卡的金标垫上吸附有胶体金标记的抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbI;检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C,还设有抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbII印制的检测线T。设计一种非洲猪瘟病毒快速检测卡的使用方法:采集待检样本加PBS或水混悬或研磨;滴入所述非洲猪瘟病毒快速检测卡的加样端;水平放置观察结果。本发明的非洲猪瘟病毒快速检测卡采用双抗体夹心法,特异性强、敏感性高,检测效率高,高效实用,具有重要的实际应用价值。



1. 一种非洲猪瘟病毒快速检测卡,包括试纸条,所述试纸条包括支撑板和固定在所述支撑板上的吸附层,所述吸附层从测试端开始依次为样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫,其特征在于,所述金标垫上吸附有胶体金标记的抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbI;所述检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C,还设有含抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbII的检测线T。

2. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,所述多克隆抗体PoAbI由以下步骤制得:

(1) 分别原核表达核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的p30基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的p54基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的p72基因,制备非洲猪瘟病毒p30、p54和p72重组蛋白;

(2) 分别取所述重组p30、p54和p72蛋白免疫兔;

(3) 高免血清辛酸-硫酸铵法纯化获得多克隆抗体PoAbI的IgG。

3. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,在所述步骤(2)中,动物免疫时每只兔的剂量为100~200 μ g/1ml 重组p30蛋白,100~200 μ g/1ml 重组p54蛋白,100~200 μ g/1ml 重组p72蛋白。

4. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,所述多克隆抗体PoAbI的ELISA效价为 $1:2 \times 10^3 \sim 1:2 \times 10^7$ 。

5. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,所述多克隆抗体PoAbII经以下步骤制得:

(1) 分别原核表达核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的p30基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的p54基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的p72基因,制备非洲猪瘟病毒p30、p54和p72重组蛋白;

(2) 分别取所述重组p30、p54和p72蛋白免疫鼠;

(3) 高免血清辛酸-硫酸铵法纯化获得多克隆抗体PoAbII的IgG。

6. 根据权利要求5所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,在所述步骤(2)中,动物免疫时每只鼠的剂量为50~100 μ g/500ml 重组p30蛋白,50~100 μ g/500ml 重组p54蛋白,50~100 μ g/500ml 重组p72蛋白。

7. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,所述多克隆抗体PoAbII的ELISA效价为 $1:3.2 \times 10^4$ 到 $1:8.192 \times 10^6$ 。

8. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡,其特征在于,所述支撑板由不吸水的韧性PVC材料制成;所述样品垫由玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;所述金标垫由玻璃纤维棉制成;所述检测膜由硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成。

9. 权利要求1所述非洲猪瘟病毒快速检测卡的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 采集待检样本,加PBS或水混悬或研磨,得待检溶液;

(2) 将所述待检溶液滴入权利要求1所述非洲猪瘟病毒快速检测卡的加样端;水平放置3min~6 min观察结果;

(3) 若检测卡的质控线C和检测线T显现两条红棕色条带,表示待检样品中含有ASFV p30蛋白、p54蛋白、p72蛋白抗原中的至少一种;

若仅检测卡的质控线C显现一条红棕色条带,表示待检样品未检出ASFV p30蛋白和/或p54蛋白和/或p72蛋白抗原;

若检测卡未显现任何条带表明检测操作不当或检测卡失效。

10. 根据权利要求9所述的非洲猪瘟病毒快速检测卡的使用方法,其特征在于,所述样本为猪血清、病猪组织、死猪组织、粪便、疫苗、体液中的任意一种。

非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)引起的主要感染家猪、野猪、灌木猪等猪类的烈性传染病,死亡率高,给养猪业造成巨大的经济损失。ASFV是目前已知的唯一一种DNA虫媒病毒,ASFV只感染家猪和野猪,不感染人类,野猪感染ASFV后通常呈隐性感染,另外,软蜱也是ASFV的宿主和传播媒介。ASFV于1921年在肯尼亚首次被发现,随后在非洲南部和东部的许多国家均发现ASFV的存在。2018年8月2日下午17时,经中国动物卫生与流行病学中心诊断,沈阳市沈北新区沈北街道(新城子)五五社区发生疑似非洲猪瘟疫情,并于8月3日上午11时确诊。截至2019年1月黑龙江、江苏、安徽等22个省份相继出现ASF疫情。因此,当前亟需加强对ASF的检疫及防控。

[0003] 猪感染ASFV的临床特征是高烧、腹泻、出血和皮肤泛红。一些临床症状和尸检结果,如脾肿大、淋巴结和肾脏出血,与猪感染古典猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)的症状并无区别。现有技术还没有针对ASFV的疫苗和有效治疗方法,控制方式主要依靠执行严格的卫生防疫措施和焚毁病猪的方式。因此,ASFV的快速、可靠检测至关重要—ASFV的快速检测不仅是ASF防控所必需的,也是与其临床症状类似的猪疾病进行鉴别诊断所必需的。

[0004] 目前,检测非洲猪瘟诊断方法有红细胞吸附试验、直接免疫荧光试验、动物接种试验、ELISA、聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR)等。其中红细胞吸附试验、直接免疫荧光试验的敏感性不高和特异性不强,动物接种试验不安全。诊断ASFV的常规方法是在猪骨髓(PBM)细胞培养中进行病毒分离(VI),尽管该方法可靠且敏感,但该检测所需时间过长(6天)。上述方法测定时操作复杂、费时、费力,需要特定的仪器设备和专业技术人员,很难在基层普及推广。

[0005] 因此,鉴于以上问题,研制一种既特异性强、灵敏度高,又快速、简便、可直接检测ASFV的快速检测试纸具有重大意义。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种非洲猪瘟病毒快速检测卡,以解决非洲猪瘟病毒检测难的技术问题。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明的技术思路如下:

发明人经过长期、大量研究和实践,结合ASFV的CP204L 基因是ASFV 基因分型中的靶基因,其编码的P30 蛋白是ASFV 主要的结构蛋白之一,在病毒感染的早期表达和分泌,并在病毒侵入过程中发挥作用;E183L 基因是基因分型靶标,其编码的P30蛋白是ASFV 主要的结构蛋白之一,位于病毒颗粒类脂外膜,在病毒感染过程中发挥重要作用,涉及病毒侵

入、跨膜域,对病毒膜蛋白的形成是必需的,具有较好的免疫原性而且比较保守。P72 蛋白是ASFV 主要的结构蛋白之一,存在于病毒衣壳的表面,具有很好的免疫原性,表达于病毒感染的晚期,能与所有感染猪的血清发生免疫学反应,选择P30、P30、P72蛋白应用到非洲猪瘟病毒快速检测卡中。具体技术方案如下:

设计一种非洲猪瘟病毒快速检测卡,包括试纸条,所述试纸条包括支撑板和固定在所述支撑板上的吸附层,所述吸附层从测试端开始依次为样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫,所述金标垫上吸附有胶体金标记的抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbI;所述检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C,还设有含抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbII的检测线T。

[0008] 其中,所述多克隆抗体PoAbI由以下步骤制得:

(1) 分别原核表达核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的p30基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的p54基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的p72基因,制备非洲猪瘟病毒p30、p54和p72重组蛋白;

(2) 分别取所述重组p30、p54和p72蛋白免疫兔;

(3) 高免血清辛酸-硫酸铵法纯化获得多克隆抗体PoAbI的IgG。

[0009] 优选的,在所述步骤(2)中,动物免疫时每只兔的剂量为100~200 μ g/1ml 重组p30蛋白,100~200 μ g/1ml 重组p54蛋白,100~200 μ g/1ml 重组p72蛋白。

[0010] 优选的,所述多克隆抗体PoAbI的ELISA效价为1:2 \times 10³~1:2 \times 10⁷。

[0011] 其中,所述多克隆抗体PoAbII经以下步骤制得:

(1) 分别原核表达核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的p30基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的p54基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的p72基因,制备非洲猪瘟病毒p30、p54和p72重组蛋白;

(2) 分别取所述重组p30、p54和p72蛋白免疫鼠;

(3) 高免血清辛酸-硫酸铵法纯化获得多克隆抗体PoAbII的IgG。

[0012] 优选的,在所述步骤(2)中,动物免疫时每只鼠的剂量为50~100 μ g/500 μ l 重组p30蛋白,50~100 μ g/500 μ l 重组p54蛋白,50~100 μ g/500 μ l 重组p72蛋白。

[0013] 优选的,所述多克隆抗体PoAbII的ELISA效价为1:3.2 \times 10⁴到1:8.192 \times 10⁶。

[0014] 优选的,所述支撑板由不吸水的韧性PVC材料制成;所述样品垫由玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;所述金标垫由玻璃纤维棉制成;所述检测膜由硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成。

[0015] 上述非洲猪瘟病毒快速检测卡的使用方法包括以下步骤:

(1) 采集待检样本,加PBS或水混悬或研磨,得待检溶液;

(2) 将所述待检溶液滴入所述非洲猪瘟病毒快速检测卡的加样端;水平放置3min~6min观察结果;

(3) 若检测卡的质控线C和检测线T显现两条红棕色条带,表示待检样品中含有ASFV p30蛋白、p54蛋白、p72蛋白抗原中的至少一种;

若仅检测卡的质控线C显现一条红棕色条带,表示待检样品未检出ASFV p30蛋白和/或p54蛋白和/或p72蛋白抗原;

若检测卡未显现任何条带表明检测操作不当或检测卡失效。

[0016] 优选的,所述样本为猪血清、病猪组织、死猪组织、粪便、疫苗、体液中的任意一种。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益技术效果在于:

1. 本发明快速检测卡以双抗体夹心法为依托,优选兔抗ASFV p30蛋白、p54蛋白和p72蛋白特异性多克隆抗体PoAbI作为胶体金标记单抗,优选豚鼠抗ASFV p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbII为检测线制备而成,其特异性强、敏感性高,检测效率高,高效实用。

[0018] 2. 本发明快速检测卡适应性强,不受宿主样品的来源限制,试样可以是猪血清、病猪组织、死猪组织、粪便、疫苗,甚至是从动物分泌出来的体液,包括血液、血清、血浆、尿、眼泪、唾液等。

[0019] 3. 本发明快速检测卡的检测结果显示直观、易判断,结果判定直观、准确、简单明了,比如,以显示红色或棕红色的检测印迹和对照印迹作为检测的阳性和阴性标记,即在纤维素膜层上只显示一条棕红色对照印迹C,表示在被检样品中无ASFV感染;若在纤维素膜层上显示两条棕红色,一条对照印迹C和一条棕红色检测印迹T,则表示被检动物有ASFV感染。

[0020] 4. 本发明快速检测卡成本低,使用本发明胶体金免疫层析试纸条不需要另配其它仪器、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实时在线检测,无需支付专家诊断费及相关费用,可大大节省检测成本,降低检测费用。

[0021] 5. 本发明快速检测卡操作简便、快速且方便携带和保存,在检测过程只要将其待检样品稀释后滴加入测试端,5分钟左右即可判定检测结果,适合现场ASFV诊断,能够满足基层组织、屠宰场、养殖户对于ASFV诊断的需求,具有广阔的市场应用场景。

附图说明

[0022] 图1为重组菌表达的 p30、p54和p72蛋白的SDS-PAGE电泳图;

图中,M为Marker;1为p30超声上清;2为p30超声沉淀;3为pET28a空载对照;4为p54超声上清;5为p54超声沉淀;6为p72超声上清;7为p72超声沉淀;

图2为纯化的重组菌表达p30、p54和p72蛋白的SDS-PAGE电泳图;

图中,M为Marker;1为p30蛋白;2为p54蛋白;3为p72蛋白;

图3为快速检测卡内部试纸条的结构示意图;

图中,1为支撑板,2为检测膜,3为样品垫,4为金标垫,5为质控线C,6为检测线T,7为吸水垫;

图4为快速检测卡完整结构示意图;

图5为快速检测卡检测结果判断示意图;

图中,A表示ASFV感染;B表示阴性,即样本中未感染ASFV;图C中质控线C线不显色,表示测试结果无效。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图和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。

[0024] 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。

[0025] 实施例一:制备非洲猪瘟病毒快速检测卡

1. 密码子改造

依据GenBank公布的Georgia 2008毒株序列(GenBank:MH910495.1),结合发明人研究实践经验并考虑大肠杆菌表达系统密码子偏好性,同时结合mRNA二级结构避免发夹结构,尤其是核糖体结合位点附近的RNA结构,进行密码子改造、优化,改造后的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的ASFV的p30蛋白基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的ASFV的p54蛋白基因、核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的ASFV的p72蛋白基因;通过基因改造可有效提高mRNA的稳定性和蛋白质的翻译效率,最终提高蛋白表达量,为蛋白质的大量表达提供物质基础。

[0026] 2. 原核表达载体的制备

(1)以pUC57质粒为框架,由上海生工生物工程有限公司分别合成含ASFV p30、p54、p72基因的重组载体,并分别命名为pUC57-p30、pUC57-p54、pUC57-p72;

(2)以上述合成重组载体pUC57-p30、pUC57-p54、pUC57-p72为模板,分别根据模板基因序列设计克隆基因p30、p54、p72的特异性引物对如下:

p30:

p30-F:5' -AGGATCCATGGACTTCATCCTGAACAT-3' (SEQ ID NO.4);

p30-R:5' -GCCTCGAGTTATTTTTTTTCAGCAG -3' (SEQ ID NO.5);

p54:

p54-F:5' -AGGATCCATGGACTCTGAATTCTTCCA-3' (SEQ ID NO.6);

p54-R:5' - GCCTCGAGTTACAGAGAGTTTCCAG-3' (SEQ ID NO.7);

P72:

p72-F:5' -AGGATCCATGGCTTCTGGTGGTGCTTTCTG-3' (SEQ ID NO.8);

p54-R:5' - ACTCGAGTTAGGTAGAGTAACGCAGAAC-3' (SEQ ID NO.9);

(3)进行PCR扩增,分别获得ASFV p30、p54、p72基因并将其克隆连接至pET28a载体,构建原核表达载体pET28a-p30、pET28a-p54及pET28a-p72;

(4)将原核表达载体pET28a-p30、pET28a-p54及pET28a-p72分别转化大肠杆菌BL21 DE3感受态细胞,获得表达菌株pET28a-p30-BL21、pET28a-p72-BL21和pET28a-54-BL21;

(5)利用大肠杆菌表达系统分别表达ASFV p30、p54、p72蛋白并纯化,具体方法如下:

将重组菌在LB培养基中培养至OD₆₀₀=0.6~0.8时,加入终浓度为0.3 mmol/L的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)作为诱导剂,30℃,220r/min诱导表达12 h,收获表达菌;将得到的菌体按照1g/ml重悬于0.01mol/L PBS缓冲液中,超声破碎后离心收集上清和沉淀,SDS-PAGE电泳图如图1所示;经Ni柱纯化蛋白;将纯化后的蛋白透析除去咪唑,收集透析袋内的溶液,经8000r/min、4℃离心10 min,弃去沉淀,收集上清获得p30、p54和p72蛋白作为免疫抗原和包被抗原,SDS-PAGE电泳图如图2所示,-20℃保存备用。

[0027] 3. 动物免疫

设置4组试验:2组免疫新西兰大白兔,2组免疫豚鼠;

新西兰大白兔通过背部皮下多点注射的方法免疫,用弗氏完全佐剂分别与纯化的免疫抗原p30、p54和p72蛋白混合物乳化,免疫剂量分别为(100μg/p30 +100μg/p54 +100μg/p72)和(200μg/p30+200μg/p54+200μg/p72)每只兔免疫1ml,每组各4只;在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量进行加强免疫3次,第3次加强免疫后

两周,耳缘静脉采血,间接ELISA测血清效价结果显示,兔多抗血清效价在 $1:2 \times 10^3$ 到 $1:2 \times 10^7$ 之间。

[0028] 豚鼠通过背部皮下多点注射的方法免疫,用弗氏完全佐剂分别与免疫抗原p30、p54和p72蛋白混合物乳化,分别免疫豚鼠,每组各4只,免疫剂量分别为(50 μ g/p30+50 μ g/p54+50 μ g/p72)和(100 μ g/p30+100 μ g/p54+100 μ g/p72)每只豚鼠免疫500 μ l;在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量进行加强免疫3次,第3次加强免疫后两周,背中足静脉取血,间接ELISA测血清效价,结果显示豚鼠多抗血清效价在 $1:3.2 \times 10^4$ 到 $1:8.192 \times 10^6$ 之间。

[0029] 4. 多克隆抗体的制备

将新西兰大白兔仰卧在操作台上,剪去心前区毛,用碘酒、酒精消毒皮肤。用左手触摸胸骨左缘第3~4肋间隙,选择心脏跳动最明显处作穿刺点,右手持注射器,将针头插入胸腔,通过针头感到心脏跳动时,再将针头刺进心脏,然后抽出血液。高免血清辛酸-硫酸铵法纯化获得多克隆抗体PoAbI的IgG,间接ELISA测效价,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0030] 将豚鼠仰卧在操作台上,剪去心前区毛,用碘酒、酒精消毒皮肤。用左手触摸胸骨左缘第3~4肋间隙,选择心脏跳动最明显处作穿刺点,右手持注射器,将针头插入胸腔,通过针头感到心脏跳动时,再将针头刺进心脏,然后抽出血液。高免血清辛酸-硫酸铵法纯化获得多克隆抗体PoAbII的IgG,间接ELISA测效价,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0031] 间接ELISA测多克隆抗体效价检测结果取表1所示:

表1间接ELISA测多克隆抗体效价

多克隆抗体	包被原	PoAbI	PoAbII
血清效价	p30	$1:2 \times 10^3 \sim 1:2 \times 10^6$	$1:1.6 \times 10^4 \sim 1:4.096 \times 10^6$
	p54	$1:2 \times 10^4 \sim 1:2 \times 10^7$	$1:3.2 \times 10^3 \sim 1:8.192 \times 10^6$
	p72	$1:2 \times 10^4 \sim 1:2 \times 10^7$	$1:3.2 \times 10^3 \sim 1:4.096 \times 10^6$
纯化 IgG 效价	p30	$1:5.12 \times 10^5$	$1:1.024 \times 10^6$
	p54	$1:4.096 \times 10^6$	$1:4.096 \times 10^6$
	p72	$1:8.192 \times 10^6$	$1:4.096 \times 10^6$

[0032] 5. 金标抗体的制备

(1) 胶体金的制备:

取100 mL超纯水置于500 mL洁净的锥形瓶,加入1 mL 1%(w/v)氯金酸溶液煮沸;在搅拌状态下迅速加入新鲜配制的1 mL 1%(w/v)柠檬酸钠溶液,煮沸约3 min至溶液颜色由黄色变为紫红色,继续煮沸2 min;待溶液冷却至室温,补超纯水至100 mL,以0.2 mol/L K_2CO_3 调pH至9.0,4 $^{\circ}$ C避光保存备用。

[0033] (2) 最适标记蛋白浓度测定

取待标记的多克隆抗体PoAbI的IgG,用20 mmol/L硼酸钠溶液(pH 9.0)4 $^{\circ}$ C过夜透析。在微孔板中以25 μ L超纯水 1:2、1:4、1:8……分别倍比稀释待标记病毒单抗;各孔加入125 μ L胶体金溶液,室温静置5 min;加入125 μ L 1 mol/L NaCl溶液;各孔颜色随蛋白浓度的降低而由红色变为蓝色。以颜色未变蓝的IgG最高稀释度的蛋白浓度为胶体金最适标记浓度,胶体金标记时,蛋白浓度增加20%;

经测定结果分析PoAbI的最佳标记浓度分别为:10 μ g/mL。

[0034] (3) 多克隆抗体PoAbI IgG的胶体金标记

取2 mL 最适蛋白浓度的待标记多克隆抗体PoAbI的IgG,加入10 mL胶体金溶液(pH 9.0),迅速混匀,室温作用30 min;加入混合液体积10%的含10%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)的20 mmol/L硼酸钠溶液,迅速混匀,室温作用10 min-15 min;4 $^{\circ}$ C、12000 r/min离心30min,小心移去上清;以含1%(w/v)BSA的20 mmol/L硼酸钠溶液重悬沉淀,同上离心,弃上清;重复洗涤1次,沉淀用1 mL TB缓冲液(20 mmol/L Na₂B₄O₇,1%(w/v)BSA,0.1%(w/v)NaN₃)调整金标抗体至0.2 mg/mL,充分吹打后,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0035] 6. 检测膜的制备

用生理盐水分别将可同时识别ASFV p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbII的IgG和SPA稀释至2.0mg/mL和1.0mg/mL,用0.22 μ m 微孔滤膜过滤备用。将NC膜置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定,然后以50 dots/ μ L/cm分别将多克隆抗体PoAbII的IgG或SPA溶液喷点于NC膜中央,形成检测线(T线)和质控线(C线)印迹;检测线与质控线相距5mm。将检测膜室温自然干燥72 h后,加入干燥剂密封,室温保存备用。

[0036] 7. 金标垫的制备

用含1%(w/v)BSA和0.1%(w/v)NaN₃的20 mmol/L Na₂B₄O₇缓冲液均匀喷洒于玻璃纤维棉上,制成金标抗体结合垫;然后按照每毫升溶液铺10cm²的量将获得的金标抗体混合液喷涂于金标抗体结合垫上。

[0037] 真空干燥3 h,置装有干燥剂的密封袋中保存备用。

[0038] 8. 样品垫的制备

样品垫选用玻璃纤维棉,用含0.1 mol/L NaCl、0.2% Tween 20(v/v)和 0.1%(w/v)叠氮钠的PBS(pH 7.2)溶液浸泡玻璃棉条;置50 $^{\circ}$ C干燥箱30 min干燥,加干燥剂室温密闭保存备用。

[0039] 9. 吸水垫的制备

吸水垫选用吸水性较好的吸水滤纸,室温密闭保存备用。

[0040] 10. 支撑板的制备

支撑板为单面不干胶的PVC塑料板。

[0041] 11. 检测卡的组装

先将检测膜粘贴于支撑板中央,然后将金标垫和样品垫依次粘贴于检测膜的样品端,各层间重叠1 mm~2 mm,再将吸水垫粘贴于检测膜的另一端,与检测膜重叠1 mm~2 mm。

[0042] 试纸条的机构如图3所示:

试纸条包括支撑板1和固定在支撑板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为样品垫3、金标垫4、检测膜2和吸水垫7,在金标垫4上吸附有胶体金标记的兔抗ASFV p30、p54、p72蛋白特异性多克隆抗体PoAbI的混合物,检测膜上设有金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C 5,豚鼠抗ASFV p30、p54和p72蛋白多克隆抗体PoAbII印制的检测线T 6。

[0043] 其中,支撑板材料为不吸水的韧性PVC材料。样品垫材料为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜。金标垫材料为玻璃纤维棉。检测膜材料为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜。吸水垫材料为吸水滤纸。

[0044] 试纸条制备完成后,将试纸条装入塑料卡壳中,盖紧卡壳,制成快速检测卡,并将

其装入避光的铝箔袋中,加干燥剂封口后室温干燥保存备用。

[0045] 检测卡的结构如图4所示,包括卡壳和试纸条。

[0046] 本发明检测卡的检测反应原理为:

当将含有ASFV p30蛋白或p54蛋白或p72蛋白抗原的待检样品加入胶体金试纸加样区(S),待检溶液通过虹吸带动待检抗原及金标抗体混合物一起向硝酸纤维素膜扩散,并最终渗透到滤纸层中,在扩散过程中金标抗体与待检抗原p30蛋白或p54蛋白或p72蛋白相结合,金标抗体与待检抗原p30蛋白或p54蛋白或p72蛋白相结合,形成金标抗体-抗原复合物PoAbI-p30或PoAbI-p54或PoAbI-p72。金标复合物可与检测膜上的多克隆抗体PoAbII检测印迹结合生成红棕色“|”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在检测膜上与质控印迹中的SPA结合生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红棕色阳性标记“||”,表示样品中含有ASFV(图5A);当样品中不含ASFV p30蛋白或p54蛋白或p72蛋白抗原时,没有金标抗体-抗原复合物形成,不能与T检测印迹结合,则生成阴性标记“|”(图5B)。如果检测膜上没有红棕色标记显示(图5C)则表明检测卡已失效。

[0047] 其中,检测线和质控线除“||”直线式印迹外,还可以为“十十”字型排列印迹、“十十”字型排列印迹、“┌┌”字型排列印迹、“└└”字型排列印迹或“┌└”字型排列印迹。

[0048] 实施例二:利用非洲猪瘟病毒快速检测卡检测非洲猪瘟病毒

1. 检测样品溶液的制备

采集待检猪血清、病(死)猪组织、粪便和疫苗等不同检测样本,加适量PBS或水进行简单混悬或研磨。

[0049] 2. 检测卡检测

将待检溶液滴入胶体金免疫层析试纸条加样端;水平放置3min~6 min观察结果。

[0050] 3. 检测结果判定

检测卡显现两条红棕色条带(检测线和质控线均显色)“||”,表示待检样品中含有ASFV抗原;仅显现一条红棕色条带(质控线)“|”为阴性,表示待检样品未检出ASFV p30蛋白或p54蛋白或p72蛋白抗原;检测卡未显现任何条带表明检测操作不当或检测卡失效,需以另取检测检测卡重新检测。

[0051] 上面结合附图和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> 河南中泽生物工程有限公司, 郑州大学

<120> 非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用

<130> 2019

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 585

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

```
atggacttca tcctgaacat ctctatgaaa atggaagtta ttttcaaac cgacctgcgt 60
tcttctagtc aggttgtctt ccacgcaggt tctctgtaca actggttctc tgttgaaatc 120
atcaactctg gtcgtatcgt taccaccgct atcaaaacc tgctgtctac cgttaaatac 180
gacatcgta aatctgctcg tatctacgct ggtcagggtt acaccgaaca ccaggctcag 240
gaagaatgga acatgatcct gcacgttctg ttcgaagaag aaaccgaatc ttctgcttct 300
tctgaaaaca tccacgaaaa aaacgacaac gaaaccaacg aatgcacctc ttctttcgaa 360
accctgttcg aacaggaacc gtcttctgaa gttccgaaag actctaaact gtacatgctg 420
gctcagaaaa ccgttcagca catcgaacag tacggtaaag ctccggactt caacaaagtt 480
atccgtgctc acaacttcat ccagaccatc tacggtacc cgctgaaaga agaagaaaaa 540
gaagttgttc gtctgatggt tatcaaactg ctgaaaaaaa aataa 585
```

<210> 2

<211> 552

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

```
atggactctg aattcttcca gccggtttac ccgcgtcact acggtgaatg cctgtctccg 60
gttaccacc cgtctttctt ctctaccac atgtacacca tcctgatcgc tatcgttggt 120
ctggttatca tcatcatcgt tctgatctac ctgttctctt ctcgtaaaaa aaaagctgct 180
gctatcgaag aagaagacat ccagttcacc aaccgtacc aggaccagca gtgggttgaa 240
gttaccaccg agccgggtac ctctaaaccg gctgggtgcta ccaccgcttc tgttggtaaa 300
ccggttaccg gtcgtccggc taccaaccgt ccggtacca acaaaccggt taccgacaac 360
ccgaccgacc gtctgggtat ggtaccggt ggtecggtg ctgctccggc tgctgcttct 420
gctccggtc acccggtga accgtacacc accgttacca cccagaacac cgcttctcag 480
accatgtctg ctatcgaaaa cctgcgtcag cgtaaacct acaccacaa agacctggaa 540
aactctctgt aa 552
```

<210> 3

<211> 1938

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

atggcttctg gtggtgcttt ctgcctgata gctaacgacg gtaaagctga caaaatcatc 60
ctggctcagg acctgctgaa ctctcgtatc tctaacaatca aaaacgtaa caaatcttac 120
ggtaaaccgg acccgaacc gacctgtct cagatcgaag aaaccacct ggttcacttc 180
aacgctcact tcaaaccgta cgttccagtt ggcttcgaat acaacaaggt tcgtccgcac 240
accggtaccc cgaccctggg taacaaactg accttcggta tcccgcagta cggtgacttc 300
ttccacgaca tggttggta ccacatctg ggtgcttgc actcttcttg gcaggacgct 360
ccgatccagg gtacctctca gatgggtgct cacggtcagc tgcagacctt cccgcgtaac 420
ggttacgact gggacaacca gaccccgtg gaaggtgctg tttacacct gggtgacctg 480
ttcggtcgtc cgategttcc gggtaacaaa aacgcttacc gtaacctggg ttactactgc 540
gaataaccgg gtgaacgtct gtacgaaaat gttaggttcg acgttaacgg caactctctg 600
gacgaatact cttctgacgt taccacctg gttcgtaaat tctgcatccc gggtgacaaa 660
atgaccggtt acaaacacct cgttggtcag gaagtaagcg ttgaaggtac ctctgggtccg 720
ctgctgtgca acatccacga cctgcacaaa ccgcaccagt ctaaaccgat cctgaccgac 780
gaaaacgaca cccagcgtac ctgctctcac accaaccga aattctgtc tcagcacttc 840
ccggaaaact ctcaacaat ccagaccgt ggtaaacagg acatcaccac gatcaccgac 900
gctacctacc tggacatccg tcgtaacgtt cactactctt gcaacggtcc gcagacccccg 960
aaatactacc agccgccgt ggctctgtgg atcaaactgc gtttctggtt caacgaaaac 1020
gttaacctgg ctatcccgtc tgtttctatc ccgttcggcg agaggttcat caccatcaag 1080
ctggcttctc agaaagacct ggtaacgaa ttcccgggtc tgttcgttcg tcagtctctg 1140
ttcatcgctg gtcgtccgtc tcgtcgtaac atccgttca aaccgtggtt catcccgggt 1200
gttatcaacg aaatctctct gaccaacaac gaactgtaca tcaacaacct gttcgttacc 1260
ccggaaaatc acaacctgtt cgtaaactg gttcgtttct ctctgatccg tgttcacaaa 1320
accaggtta cccacaccaa caacaaccac cacgacgaaa aactgatgtc tgctctgaaa 1380
tggccgatcg aatacatgtt catcggctg aaaccgacct ggaacatctc tgaccagaac 1440
ccgcaccagc accgtgactg gcacaaattc ggtcacgttg ttaacgctat catgcagccg 1500
accaccacg ctgaaatctc tttccaggac cgtgacaccg ctctgccgga cgcttgctct 1560
tctatctctg acatctctcc ggttacctac ccgatcacc tgccgatcat caaaaacatc 1620
tctgttaccg ctacaggtat caacctgata gacaaattcc cgtctaaatt ctgctcttct 1680
tacatcccgt tccactacgg tggtaacgt atcaaaacc cggacgacc gggtgctatg 1740
atgatcacct tcgctctgaa accgcgtgaa gaataccagc cgtctggtea catcaacgtt 1800
tctcgtgctc gtgaattcta catctcttgg gacaccgact acgttggttc taccaccacc 1860
gctgacctgg ttgtttctgc ttctgctatc aacttctgc tgctgcagaa cggttctgct 1920
gttctgcgtt actctacc 1938

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工合成
<400> 4
aggatccatg gacttcatcc tgaacat 27
<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 5
gcctcgagtt attttttttt cagcag 26
<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 6
aggatccatg gactctgaat tcttcca 27
<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 7
gcctcgagtt acagagagtt ttccag 26
<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 8
aggatccatg gcttctgggtg gtgctttctg 30
<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 9
actcgagtta ggtagagtaa cgcagaac 28

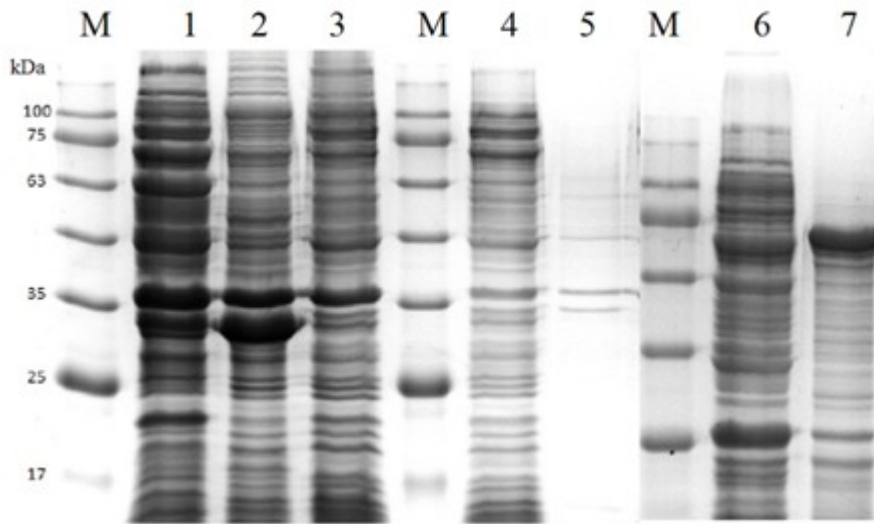


图1

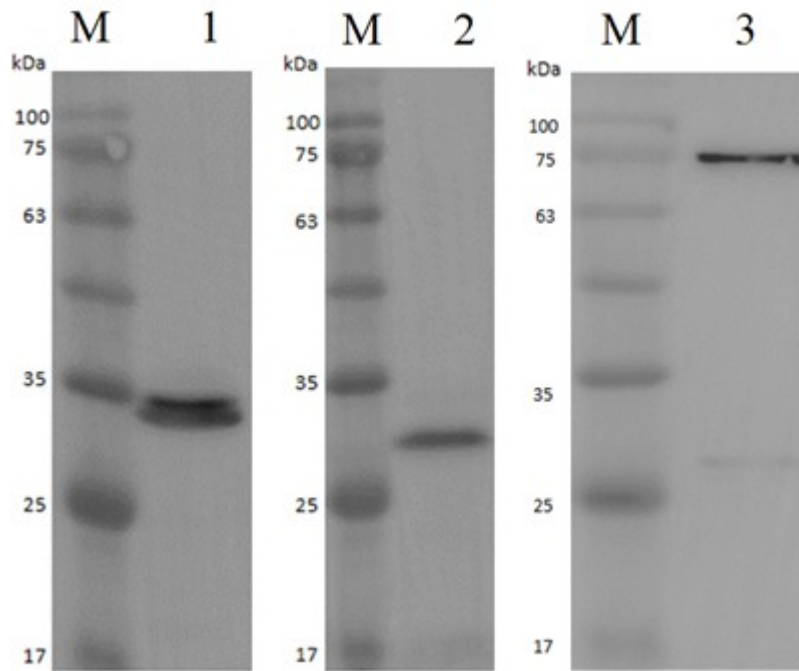


图2

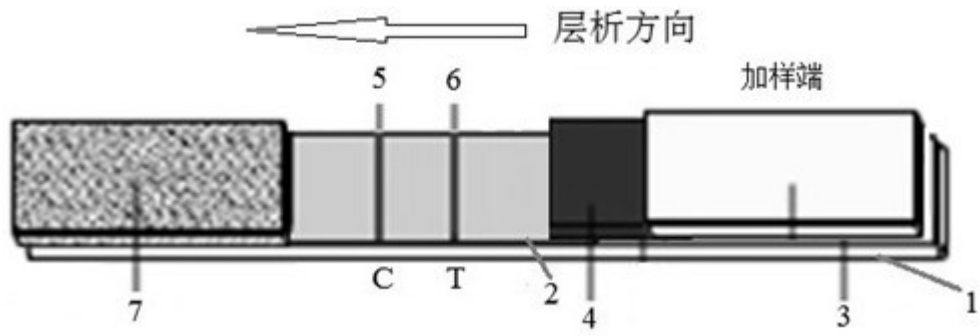


图3

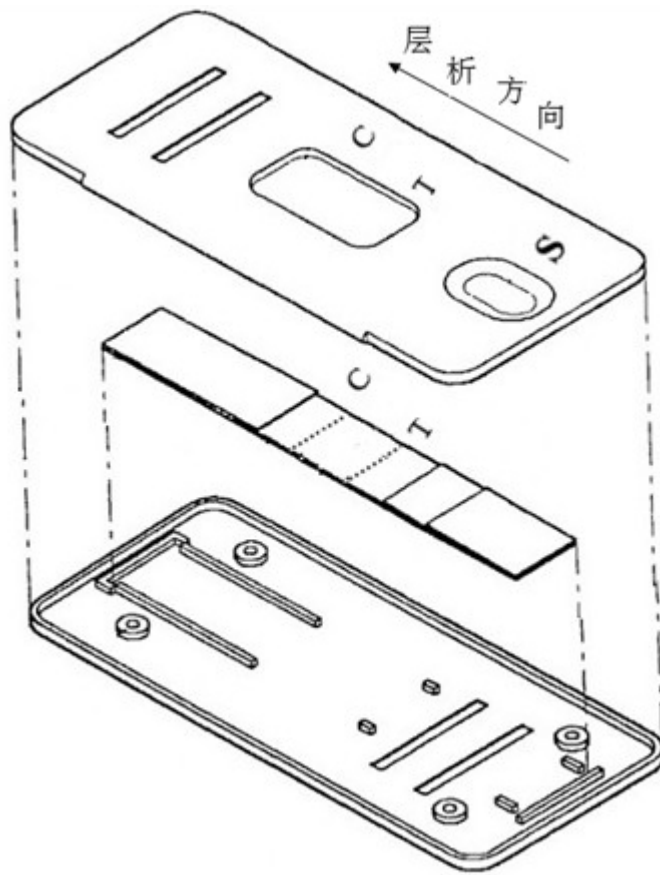


图4

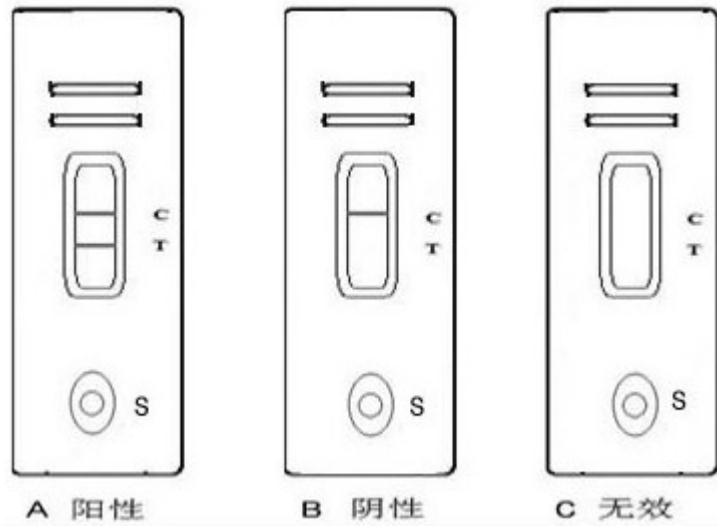


图5

专利名称(译)	非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用		
公开(公告)号	CN109781980A	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201910088471.5	申请日	2019-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	河南中泽生物工程有限公司 郑州大学		
申请(专利权)人(译)	河南中泽生物工程有限公司 郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南中泽生物工程有限公司 郑州大学		
[标]发明人	王爱萍 陈玉梅 赵建国 刘运超 邢广旭 孙亚宁 冯景		
发明人	王爱萍 陈玉梅 赵建国 刘运超 邢广旭 孙亚宁 冯景		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/58 G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	张晓辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种非洲猪瘟病毒快速检测卡及其应用，旨在解决非洲猪瘟病毒检测难的技术问题。该检测卡的金标垫上吸附有胶体金标记的抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbI；检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C，还设有抗非洲猪瘟病毒p30、p54和p72蛋白的多克隆抗体PoAbII印制的检测线T。设计一种非洲猪瘟病毒快速检测卡的使用方法：采集待检样本加PBS或水混悬或研磨；滴入所述非洲猪瘟病毒快速检测卡的加样端；水平放置观察结果。本发明的非洲猪瘟病毒快速检测卡采用双抗体夹心法，特异性强、敏感性高，检测效率高，高效实用，具有重要的实际应用价值。

