

[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 200810000444. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/571 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月9日

[11] 公开号 CN 101216492A

[22] 申请日 2008.1.10

[21] 申请号 200810000444. X

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

[72] 发明人 崔尚金

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司
代理人 孙皓晨 费碧华

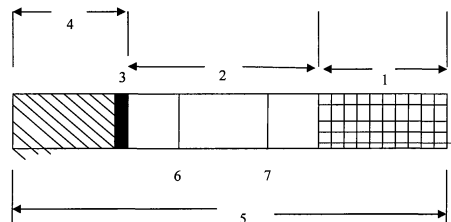
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

快速检测猪伪狂犬抗体的试纸条及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种快速检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条及其制备方法。本发明试纸条由样品垫(4)、玻璃纤维膜(3)、硝酸纤维素膜(2)、吸水垫(1)和支持物(5)组成；所述的硝酸纤维素膜含有一条由猪伪狂犬 gE 蛋白包被而成的检测线(6)和由兔抗猪伪狂犬病毒抗体包被而成的对照线(7)；所述的玻璃纤维膜结合有胶体金标记的猪伪狂犬 gE 蛋白。本发明试纸条可以大批量制备，工艺简单，生产成本低廉；可快速检测样本中可能存在的猪伪狂犬抗体，灵敏度高、重复性好，操作简便、快速、准确、直观、结果容易判定，适合基层以及突发事件的大批量现场检测，适合流行病调查，对猪伪狂犬病毒感染诊断起到辅助作用。



1、一种快速检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条，其特征在于：包括样品垫（4）、玻璃纤维膜（3）、硝酸纤维素膜（2）、吸水垫（1）和支持物（5）；所述的硝酸纤维素膜含有一条由猪伪狂犬gE蛋白包被而成的检测线（6）和由兔抗猪伪狂犬病毒抗体包被而成的对照线（7）；所述的玻璃纤维膜结合有胶体金标记的猪伪狂犬gE蛋白；玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水垫按照以下次序相连接并附着在支持物上：玻璃纤维膜与靠近硝酸纤维素膜检测线（6）的一端相连接，吸水垫与靠近硝酸纤维素膜对照线（7）的一端相连接；样品垫附着在玻璃纤维膜上，样品垫的一端与硝酸纤维素膜相衔接。

2、按照权利要求1所述的试纸条，其特征在于：所述的支持物（5）是塑料板、硬纸板或铝板。

3、按照权利要求1所述的试纸条，其特征在于：所述的兔抗猪伪狂犬抗体按照以下方法制备得到：用猪伪狂犬弱毒抗原采用多点注射法免疫阴性家兔3只，每隔2周加强免疫1次，共进行3次，最后一次免疫10天后采血，分离血清，纯化后，即得。

4、按照权利要求1的试纸条，其特征在于：所述的硝酸纤维素膜能够由尼龙膜替换。

5、按照权利要求1的试纸条，其特征在于：所述硝酸纤维素膜上的检测线和对照线之间的间隔为3-5mm。

6、按照权利要求5的试纸条，其特征在于：所述硝酸纤维素膜上的检测线和对照线之间的间隔为4mm。

7、一种制备权利要求1所述的检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条的方法，包括：

（1）用喷膜机将胶体金标记的猪伪狂犬gE蛋白复合物喷涂在玻璃纤维膜上，备用；

（2）将猪伪狂犬gE蛋白和兔抗猪伪狂犬抗体依次间隔3-5mm喷在硝酸纤维素膜上，分别作为检测线和对照线，将包被好的硝酸纤维素膜封闭其余蛋白结合位点，洗涤，干燥，备用；

（3）将硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜、样品垫、吸水垫按照以下次序粘贴在支持板上：将玻璃纤维膜连接在靠近硝酸纤维素膜检测线的一端，边缘附着在硝酸纤维素膜上；样品垫附着在玻璃纤维膜上，与硝酸纤维素膜衔接；吸水滤纸板连接在硝酸纤维素膜的另一端，边缘附着在硝酸纤维素膜上；

（4）将粘好的支持板材料切成60mm长、4mm宽的试纸条，即得。

快速检测猪伪狂犬抗体的试纸条及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测动物疾病的试纸条，尤其涉及一种快速检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条，本发明还涉及该试纸条的制备方法和应用方法，属于动物疾病检验检疫领域。

背景技术

猪伪狂犬病（Pseudorabies, PR）是由猪疱疹病毒 I 型引起的一种高度传染性、致死性传染病。猪是该病最主要的贮存宿主和传染源，健康猪与病猪、带毒猪直接接触可感染本病。成年猪常为隐性感染；怀孕母猪发生流产、死胎、弱胎、木乃伊胎；新生仔猪出现发热及神经症状，甚至衰竭死亡，死亡率可达 100%。近年来，该病不断传播蔓延，给养猪业造成巨大的经济损失。

目前，公知的猪伪狂犬抗体快速检测试剂盒（ELISA 法），系采用酶联免疫技术检测样品（血清）中猪伪狂犬抗体的方法。即：采用猪伪狂犬灭活弱毒或弱毒疫苗株经纯化、浓缩制成的抗原包被微孔板，在试验中，加入稀释的对照血清和待检血清，经温育后，若样品中含有猪伪狂犬特异性抗体，则将与微孔板上抗原结合，经洗涤除去未结合的抗体和其他成分后；再加入酶标二抗，与微孔板上抗原抗体复合物发生特异性结合；再经洗涤除去未结合的酶结合物，在孔中加 TMB 或 OPD 底物液，与酶反应形成有色产物，加入终止液反应后，用酶标仪固定波长（450nm 或 630nm）测定各反应孔中的 OD 值。ELISA 适合大批样品的检测，成为了一种常规的检测方法。但是，该方法抗原的制备过程必须经过病毒的细胞培养、病毒纯化等繁琐模式，特异性不高、稳定性差，而且成本高；检测时需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用，检测操作人员需要经过专业培训；操作过程相对比较复杂；检测所需要时间比较长；检测所需费用高。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服现有技术存在的问题，提供一种能够快速检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条，该试纸条不需要专业的技术人员进行操作，方法简

便易学，不用任何仪器进行辅助检测，检测结果特异性高，重复性好。

本发明所要解决的技术问题是通过以下技术方案来实现的：

一种快速检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条，包括由样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜（NCM）、吸水垫和支持物组成；所述的硝酸纤维素膜含有一条由猪伪狂犬gE蛋白包被而成的检测线和由兔抗猪伪狂犬抗体包被而成的对照线；所述的玻璃纤维膜结合由胶体金标记的猪伪狂犬gE蛋白；玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水垫按照以下次序相连接并附着在支持物上：玻璃纤维膜与靠近硝酸纤维素膜检测线的一端相连接，吸水垫与靠近硝酸纤维素膜对照线的一端相连接；样品垫附着在玻璃纤维膜上，样品垫的一端与硝酸纤维素膜相衔接。

其中，所述的支持物只要具有一定的硬度，将样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水垫负载于其上，达到支持和负载的目的即可，可以选用各种材料作为本发明的支持物，例如塑料板（优选为PVC）、硬纸板、铝板等。

所述的猪伪狂犬gE蛋白可按照常规的基因工程方法进行制备或表达，这些方法都是本领域技术人员所能掌握或通晓的。

所述的兔抗猪伪狂犬抗体可参考以下方法制备得到：用猪伪狂犬弱毒抗原采用多点注射法免疫阴性家兔3只，每隔2周加强免疫1次，共进行3次，最后一次免疫10天后采血，分离血清，纯化后得兔抗猪伪狂犬IgG。

所述硝酸纤维素膜（该硝酸纤维素膜也可由尼龙膜来替换）上的检测线和对照线之间的间隔优选为3-5mm，更优选为4mm。

一种制备本发明的检测猪伪狂犬抗体的试纸条的方法，包括：

（1）用喷膜机将胶体金标记的猪伪狂犬gE蛋白复合物喷涂在玻璃纤维膜上，备用；

（2）将猪伪狂犬gE蛋白和兔抗猪伪狂犬抗体IgG依次间隔3-5mm 喷在硝酸纤维素膜上，分别作为检测线和对照线，将包被好的硝酸纤维素膜封闭其余蛋白结合位点，洗涤，干燥，备用；

（3）将硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜、样品垫、吸水垫按照以下次序粘在支持板上：将玻璃纤维膜连接在靠近硝酸纤维素膜检测线的一端，边缘附着在硝酸纤维素膜上；样品垫附着在玻璃纤维膜上，与硝酸纤维素膜衔接；吸水滤纸板连接在硝酸纤维素膜的另一端，边缘附着在硝酸纤维素膜上；

（4）将粘好的支持板材料切成60mm长、4mm 宽的试纸条，即得。

本发明试纸条的检测方法：

1 操作方法：在检测前先将样本和试纸条放在室温条件下放置一段时间（10分钟），使其恢复至室温；从铝箔袋中取出检测试纸条；在椭圆形加样孔内加入3—5滴（100—200 μ l）待检猪血液或血清样品；将试纸条平放在桌面上，在室温下静置20分钟判定结果；

2 结果判断：

无效：在对照线和检测线都不出现色线；

阴性：在对照线出现一条色线，在检测线不出现色线；

弱阳性：在对照线出现一条颜色较深的紫红色线，而在检测线出现一条颜色很浅的紫红色线；

阳性：在对照线和检测线各出现一条颜色较深的紫红色线，样品中的抗体表达水平越高，检测线色线颜色越深。

本发明利用基因工程技术表达猪伪狂犬gE蛋白，采用酶联免疫原理和膜层析技术制成快速检测猪血液或血清中抗体的试纸条。与ELISA和IFA相比，本发明具有以下明显的优势：安全性好，无需培养病毒本身，避免了因操作病毒造成的病毒扩散；可以大批量制备，工艺简单，生产成本低廉；抗原成分稳定均一，操作简便省力，不用仪器，检测结果特异性高，重复性好。整个实验仅需15分钟。操作简便、快速、准确、灵敏度高、直观、结果容易判定。

本发明结合胶体金标记技术和膜层析技术，可快速检测样本中可能存在的猪伪狂犬病毒抗体，达到快速检测、及时控制疫情的目的，为下一步的分离鉴定创造了有利条件，节省了大量的人力物力，方便、快速、简便，不需特殊仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨；操作简单、易于推广、适合基层以及突发事件的大批量现场检测，适合流行病学调查，对猪伪狂犬病毒感染诊断起到辅助作用。

附图说明

图1 本发明试纸条的正面示意图；

图2 本发明试纸条的侧面示意图；

图3 检测结果示意图：从左至右依次为：检测线和对照线显色为阳性；对照线显色为阴性；检测线和对照线两条带未显色为无效。

附图标记说明：1-吸水垫；2-硝酸纤维膜（6-包被基因工程表达猪伪狂犬gE蛋白；7-包被兔抗猪伪狂犬抗体）；3-含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜；4-样品垫；5-反应支持物。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

实施例1 本发明检测抗体试纸条的制备

1 基因工程表达猪伪狂犬 gE 蛋白制备

(1) 材料来源

PRV 闽 A 毒株，由中国兽药监察所提供。

受体菌 BL21 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存；pMD18-T 载体、各种限制性内切酶及修饰酶、pGEX-6P-1、Trizol 试剂盒等均购于大连宝生物公司；GST 标签纯化试剂盒购于 Mersham Biosciences 公司；IPTG、氨苄青霉素购自上海生工。

(2) 病毒 DNA 的提取和基因的 RT-PCR 扩增

DNA 的提取按 Trizol 试剂盒说明书进行；根据 GeneBank 中猪伪狂犬病毒设计一对针对 PRV gE 基因的特异性引物：upper, 5'-CGGATCCCCGAGCCTCTCCGC CGAGAC-3', lower, 5'-GAAGGCGGGTCAGGCGGTC AG-3' 反转录按反转录试剂盒说明书进行。取 5 μ l cDNA 产物用作 PCR 反应。含有 SalI 位点；扩增片段大小约为 1.0kb。

(3) gE 基因 PCR 扩增及克隆

50 μ l 反应体系中加 5 μ l 10 \times LA pCRTM Buffer II (含 Mg²⁺)、2U TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶、0.4 μ mol/L 引物、200 μ mol/L dNTPs、1 μ l 模板。循环参数为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C/50sec, 68 $^{\circ}$ C/50sec, 72 $^{\circ}$ C/2min, 35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接产物转化后所得细菌。

(4) 表达载体的构建

利用限制性内切酶 BamHI 和 SalI 双酶切 pMD-gE，回收 gE 基因和同样处理的原核表达载体 pGEX-6P-1 连接，转化 BL21 菌。碱裂解法小量提取质粒，BamHI/XhoI 双酶切筛选阳性重组质粒，并命名为 pGEX-gE。

(5) gE 基因的诱导表达

将含有重组质粒 pGEX-gE 的 BL21 菌种在含氨苄青霉素的 LB 平板上划线，37 $^{\circ}$ C

培养过夜，挑取单个菌落，于含 Amp 的 LB 中 37℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.6-0.7 时，加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.6mM/L，继续于 25-37℃ 振荡培养 3.5 小时，收获细菌。离心后将菌体用 0.5mol/L NaCl、20mmol/L Tris·Cl (pH=7.6) 洗两次，然后用 PBS 悬浮细胞。

(6) PRV gE 蛋白纯化

用吸管将处理好的样品加入 GST 亲和层析柱中，控制流速使其在范围 0.2-1ml/min 内。加入 10 倍柱床体积的酶切缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, pH 7.5) 洗涤一次，允许柱床排干；同时准备酶混合物，每 1ml 柱床体积将 80μl (160U) 的酶混入 920μl 酶切缓冲液中，将酶混合物加入柱中，封闭柱子后 5℃ 消化 4h 以上；加入 3 倍柱床体积的酶切缓冲液洗脱目的蛋白。

2 制备兔抗猪伪狂犬高免血清

用猪伪狂犬弱毒抗原(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)采用多点注射法免疫阴性家兔3只，每隔2周加强免疫1次，共进行3次，最后一次免疫10天后采血，分离血清，纯化后得兔抗猪伪狂犬IgG。

3 胶体金颗粒制备

将氯化金(中国医药集团上海化学试剂公司)配制成0.01%水溶液，取100 ml 煮沸2 min 后，边搅拌边加入柠檬酸三钠(1%) 2 ml，煮沸至溶液颜色变成酒红色后，继续煮沸至适宜浓度 (OD₅₃₅ = 0.9312)，冷却后加入双蒸馏水恢复到原体积，置4℃ 保存。

4 胶体金标记gE蛋白制备及纯化

将待标记蛋白倍比稀释，分别取100μl加入1 ml胶体金中，10min 后加入10% NaCl 100μl，4℃ 静止1 h。取胶体金颜色没有发生改变的最高稀释倍数为准，在此基础上加30%为最佳标记量。取一定量调配好的胶体金用0.2 mol/ L K₂CO₃ 调至pH = 9.0，按最佳标记量加入表达抗原，室温作用20 min，加入Tris-HCl (pH 8.0, 20 mmol/ L) 配制的BSA，使终浓度为1%，4℃ 放置2 h后使用。将金标抗原3000 r/ min 离心30 min，取上清，60000g离心60 min，沉淀用0.02 mol/ L pH7.2 含0.1 % BSA的PBS溶解，恢复到原体积。再超离1次，沉淀用少许上述PBS溶解，使OD_{535nm} = 1.5。0.22μm滤膜过滤，4℃ 保存备用。

5、试纸条的组装

(1) 用喷膜机将胶体金标记的猪伪狂犬gE蛋白复合物喷涂在玻璃纤维膜上，

备用;

(2) 将猪伪狂犬gE蛋白和兔抗猪伪狂犬病毒IgG依次间隔3-5mm 喷在硝酸纤维素膜上, 分别作为检测线和对照线, 将包被好的硝酸纤维素膜封闭其余蛋白结合位点, 洗涤, 干燥, 备用;

(3) 将硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜、样品垫、吸水垫按照以下次序粘贴在支持板上: 将玻璃纤维膜连接在靠近硝酸纤维素膜检测线的一端, 边缘附着在硝酸纤维素膜上; 样品垫附着在玻璃纤维膜上, 与硝酸纤维素膜衔接; 吸水滤纸板连接在硝酸纤维素膜的另一端, 边缘附着在硝酸纤维素膜上;

(4) 将粘好的支持板材料切成60mm长、4mm 宽的试纸条, 即得。

试验例 1 本发明快速检测试纸条的相关试验

试验材料

猪伪狂犬强毒闽 A 株, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供;

高免血清的制备: 用猪伪狂犬病毒抗原, 用不同剂量、间隔一定时间、用多点注射法多次免疫阴性健康猪 4 头, 最后 1 次免疫 10 后天采血;

参考病毒血清: 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 阳性血清、猪轮状病毒 (PRoV) 阳性血清、猪细小病毒 (PPV) 阳性血清, 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 阳性血清均为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所流行病学与诊断中心提供; 分离血清。

待检血清: 采自黑龙江、天津、福建等全国各地 36 个猪场的 1285 头份血清和全血 (其中 460 头为假设健康猪被采猪全血), 鸡血清、鸭血清、鹅血清、羊血清各 15 份, 共计 825 份血清和 460 份全血。并把上述血清、全血编号待检;

对照试剂盒 ELISA 和 SN 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

一、本发明试纸条敏感性试验

应用本发明试纸条 (实施例 1 所制备) 对已知高免阳性血清进行检测, 与 ELISA 进行比较。

将高免阳性血清作 1:50 倍稀释后, 按 2 倍进行递减稀释, 然后进行检测。结果同一份 PRV 阳性高免血清, 间接 ELISA 检测, 最低检出量为 1:3200-6400, 用本发明试纸条 (GICA) 进行检测, 最低检出量为 1:3200。本发明胶体金免疫试纸条敏感性比 ELISA 低一个稀释度。

用本发明胶体金试纸条、ELISA 试剂盒和中和试验，分别对上述 1285 份血清和全血进行检测，结果基本一致，其中，825 份猪血清中阳性 72 份，阴性 753 份。在作上述中和试验时，825 份猪血清中，滴度在 1:16 以上的样品 61 份，滴度在 1:16 以下的样品 6 份。

二、 本发明试纸条特异性试验

向配制好的基因表达蛋白金标溶液中加入猪流行性腹泻病毒（PEDV）阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）阳性血清、猪轮状病毒（PRoV）阳性血清、猪细小病毒（PPV）阳性血清、猪圆环病毒阳性血清，进行特异性检测。结果用猪圆环病毒（PCV）阳性血清、猪流型性腹泻病毒（PEDV）阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）阳性血清、猪轮状病毒（PRoV）阳性血清、猪瘟阳性血清、猪细小病毒（PPV）阳性血清进行 GICA 检测均不出现红色斑点，而用纯化的 PRV 阳性高免血清和未纯化的 PRV 阳性血清则出现红色斑点。

三、 批内和批间的重复性试验

批内重复性试验：3 份阴阳血清样品在同一批次试纸条试验中每份样品平行设 6 个重复；批间重复性试验：在 5 个不同试验日重复测定 6 批产品。试验结果为：批内重复变异系数为 2.75-7.6%之间；批间重复变异系数为 4.1-9.3%之间。

四、 符合率试验

用中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供 ELISA 诊断试剂盒和中和试验，将上述 885 份血清作 1:40 倍稀释后，按 2 倍进行递减稀释，然后进行检测，进行结果判定。实验结果显示，用本发明胶体金试纸条检测与用 ELISA、中和试验两种方法检测的符合率分别为 98.63%和 95.83%。用本发明胶体金抗体检测试纸条对上述采猪场的 460 份血液进行检测，并把检测结果和对应血清检测结果进行对照，结果完全相符。

五、 保存期试验

2003 年 12 月以来对保存的纸条试剂盒进行了试验，结果表明，试剂盒保存期均在 2 年以上。建议试剂盒在-20℃保存，有效期为 12-18 个月。

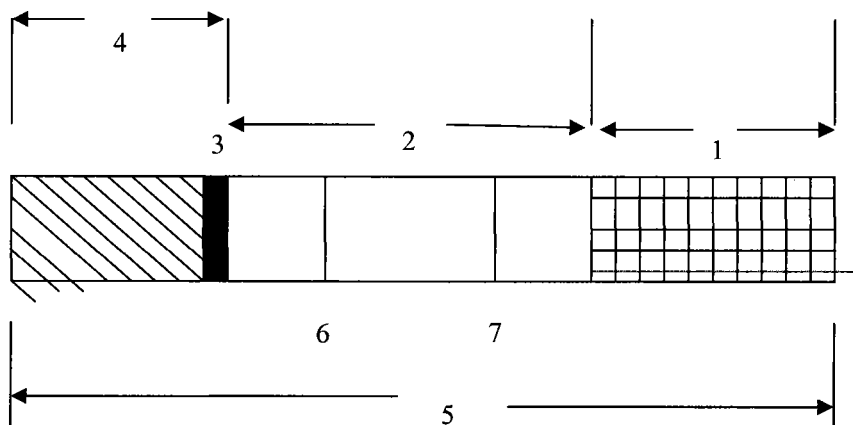


图 1

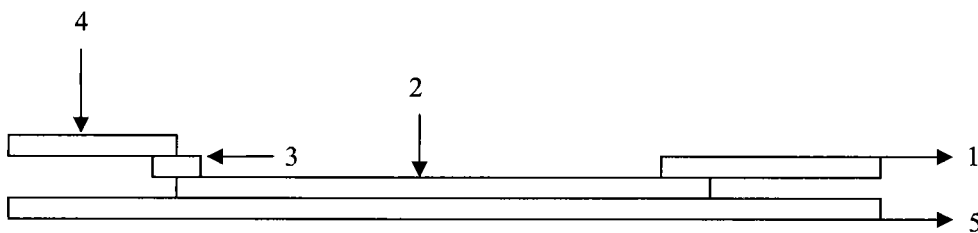
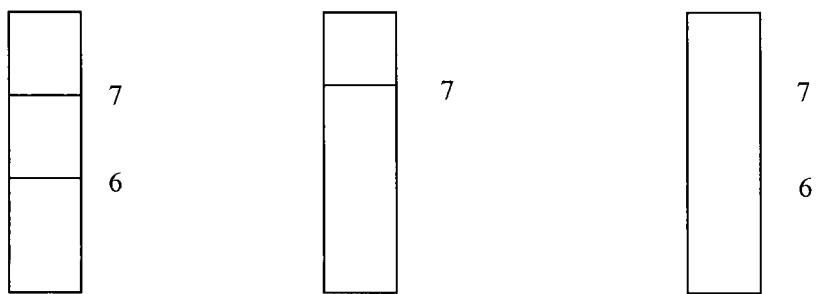


图 2



阳性

阴性

无效

图 3

专利名称(译)	快速检测猪伪狂犬抗体的试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101216492A	公开(公告)日	2008-07-09
申请号	CN200810000444.X	申请日	2008-01-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	崔尚金		
发明人	崔尚金		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/558 G01N33/52 G01N33/532		
代理人(译)	孙皓晨		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测猪伪狂犬病毒抗体的试纸条及其制备方法。本发明试纸条由样品垫(4)、玻璃纤维膜(3)、硝酸纤维素膜(2)、吸水垫(1)和支持物(5)组成；所述的硝酸纤维素膜含有一条由猪伪狂犬gE蛋白包被而成的检测线(6)和由兔抗猪伪狂犬病毒抗体包被而成的对照线(7)；所述的玻璃纤维膜结合有胶体金标记的猪伪狂犬gE蛋白。本发明试纸条可以大批量制备，工艺简单，生产成本低廉；可快速检测样本中可能存在的猪伪狂犬抗体，灵敏度高、重复性好，操作简便、快速、准确、直观、结果容易判定，适合基层以及突发事件的大批量现场检测，适合流行病学调查，对猪伪狂犬病毒感染诊断起到辅助作用。

