



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101852803 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 201010197930. 2

(22) 申请日 2010. 06. 11

(71) 申请人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 李刚 范晓娟 张坤

(74) 专利代理机构 北京五月天专利商标代理有限公司 11294

代理人 何宜章

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

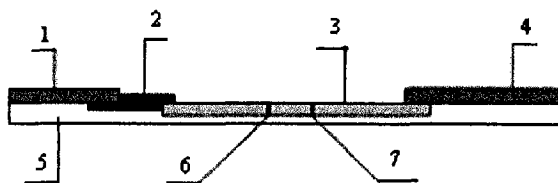
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种用于检测犬、猫的狂犬病毒抗体的胶体金试纸卡及其制备方法和应用

### (57) 摘要

本发明涉及一种用于检测犬、猫狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡,通过在硝酸纤维素膜上同时包被狂犬病病毒相关抗原、金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA) 抗体两个条带,并采用胶体金标记 SPA,得到了一种通用型检测试纸卡,应用免疫层析原理检测犬、猫血清中的狂犬病病毒抗体,实现检测犬和猫两种动物狂犬病病毒抗体的目的。克服了现有检测技术操作复杂、繁琐、检测时间长、需要仪器、不能用同一种试纸卡检测不同动物中抗体的不足。



1. 一种用于检测犬、猫的狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡,其特征在于,包括:

- (1) 同时包被狂犬病病毒相关抗原和 SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜;
- (2) 包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜,

其中,狂犬病病毒相关抗原包括狂犬病病毒颗粒或基因工程制备的狂犬病病毒抗原, SPA 抗体是指金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体。

2. 根据权利要求 1 所述试纸卡,其特征在于,所述狂犬病病毒相关抗原为狂犬病病毒核蛋白。

3. 根据权利要求 2 所述试纸卡,其特征在于,所述狂犬病病毒核蛋白通过原核表达制得。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述试纸卡,其特征在于,所述狂犬病病毒核蛋白的浓度为  $1.2 \pm 0.1 \text{ mg/ml}$ , SPA 抗体的浓度为  $1.5 \pm 0.1 \text{ mg/ml}$ 。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述试纸卡,其特征在于,该试纸卡还包括反应支持物、吸水纸、样品垫和塑料卡。

6. 根据权利要求 5 所述试纸卡,其中塑料卡具有滴加样品窗口和观察窗口,观察窗口处标有检测线 T 和质控线 C。

7. 根据权利要求 5 所述试纸卡,其中样品垫通过如下步骤制得:将玻璃纤维膜放入含有封闭试剂和表面活性剂的溶液中浸泡,并进行干燥。

8. 一种制备权利要求 1-7 所述的胶体金试纸卡的方法,其特征在于,包括如下步骤:

a. 胶体金标记 SPA 的制备及其纯化:

往 pH 值为 5.2-5.5 的胶体金的溶液中加入 SPA 和封闭剂,得到胶体金标记 SPA,即金标 SPA,再通过差速离心对其进行纯化;

b. 包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜的制备:

将纯化后的金标 SPA 涂布至玻璃纤维膜上,并进行干燥;

c. 同时包被狂犬病病毒相关抗原、SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜的制备:

分别用狂犬病病毒相关抗原、SPA 抗体在硝酸纤维素膜上划线,分别作为试纸卡中的检测线 T 与质控线 C,并进行孵育或干燥;

d. 试纸卡的组装

依次将同时包被狂犬病病毒相关抗原和 SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜、包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜、样品垫、吸水纸粘贴到反应支持物上。

9. 权利要求 1-7 之任一所述胶体金试纸卡在检测犬、猫狂犬病病毒抗体的应用。

10. 一种试剂盒,其特征在于,包括权利要求 1-7 任一所述的胶体金试纸卡。

## 一种用于检测犬、猫的狂犬病毒抗体的胶体金试纸卡及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测犬、猫狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡,属于宠物抗体检测领域。

### 背景技术

[0002] 狂犬病(Rabies)是一种由狂犬病病毒(Rabies virus,RV)引起的人畜共患病。迄今为止,还没有有效的方法治疗狂犬病,一旦发病,死亡率几乎是100%。据世界卫生组织报道,全球每年有50000至100000人因狂犬病而死亡。犬、猫是狂犬病的主要传染源。因此,对于狂犬病的控制关键在于切断传染源,对犬、猫进行免疫接种。但是犬、猫免疫是否有效,需要检测其体内的抗体水平。目前,检测RV抗体常用的方法有传统的小鼠中和试验(Mouse neutralization test,MNT)、WHO推荐的快速荧光灶抑制试验(Rapid fluorescent focus inhibition test,RFFIT)、OIE推荐的荧光抗体病毒中和试验(fluorescent antibody virusneutralization test,FAVN)和酶联免疫吸附实验(Enzyme linkedimmunosorbent assay,ELISA)。这些方法需要技术熟练的专业人员、昂贵的仪器设备和试剂,需要接触RV标准攻毒株,以及检测时间较长,给基层检测RV免疫抗体带来了一定的困难。为有效预防和控制狂犬病,建立一种快速、便捷、特异的抗体检测方法是十分必要的。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种方便、快捷地既能检测犬的又能检测猫的狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡(也可称作检测卡、试纸条、检测条等),通过在硝酸纤维素膜(NC膜)上同时包被狂犬病病毒相关抗原(如狂犬病病毒核蛋白)、金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)抗体两个条带,并采用胶体金标记SPA,得到了一种通用型检测试纸卡,应用免疫层析原理检测犬、猫血清中的狂犬病病毒免疫抗体,实现检测犬和猫两种动物狂犬病病毒抗体的目的。克服了现有检测技术操作复杂、繁琐、检测时间长、需要仪器、不能用同一种试纸卡检测不同动物中抗体的不足。

[0004] 本发明的另一目的是提供一种用于检测犬、猫的狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡的制备方法。

[0005] 本发明的再一目的是提供一种用于检测犬、猫的狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡的应用。

[0006] 本发明的再一目的是提供一种包括本发明的用于检测犬、猫的狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡的试剂盒。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明提供了一种用于检测犬、猫的狂犬病病毒抗体的试纸卡,其包括:

[0008] (1) 同时包被狂犬病病毒相关抗原、SPA抗体两个条带的硝酸纤维素膜,

[0009] (2) 包被有胶体金标记SPA的玻璃纤维膜。

[0010] 所述的狂犬病病毒相关抗原包括狂犬病病毒颗粒或基因工程制备的狂犬病病毒抗原。

[0011] 本发明所述的试纸卡还包括：反应支持物、吸水纸、样品垫和塑料卡。

[0012] 其中，狂犬病病毒相关抗原优选为狂犬病病毒核蛋白（即 N 蛋白），反应支持物优选为 PVC 板，吸水纸优选为滤纸，样品垫优选为玻璃纤维膜，塑料卡具有滴加样品窗口和观察窗口。

[0013] 本发明还公开了该试纸卡在检测犬、猫狂犬病病毒抗体中的应用。

[0014] 一种用于检测犬、猫的狂犬病病毒抗体的试纸卡的制备方法，包括如下步骤：

[0015] a. 胶体金标记 SPA 的制备及其纯化：

[0016] 往 pH 值为 5.2-5.5（优选为 5.3）的胶体金的溶液中加入 SPA 和封闭剂，胶体金与 SPA 的配比为：相对于每毫升胶体金，SPA 为 3-5  $\mu$ g，得到胶体金标记 SPA（即金标 SPA），再通过差速离心对其进行纯化；

[0017] b. 包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜的制备：

[0018] 将纯化后的金标 SPA 涂布至玻璃纤维膜上，并进行干燥，避光保存备用；

[0019] e. 同时包被狂犬病病毒相关抗原、SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜的制备：

[0020] 分别用狂犬病病毒相关抗原（如狂犬病病毒核蛋白）、SPA 抗体在硝酸纤维素膜上划线，分别作为试纸卡中的检测线 T 与质控线（也叫对照线）C，并进行孵育或干燥，其中所述狂犬病病毒核蛋白的浓度为 1.2  $\pm$  0.1mg/ml，SPA 抗体的浓度为 1.5  $\pm$  0.1mg/ml。

[0021] f. 试纸卡的组装

[0022] 依次将同时包被狂犬病病毒相关抗原和 SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜、包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜、样品垫、吸水纸粘贴到反应支持物上。

[0023] 其中，胶体金溶液采用柠檬酸钠还原法制得。

[0024] 狂犬病病毒核蛋白（N 蛋白）通过原核表达制得。

[0025] SPA 及 SPA 抗体没有特别地限制，可为已知或者市售的。

[0026] 样品垫可通过如下步骤制得：将玻璃纤维膜放入含有封闭试剂和表面活性剂的溶液中浸泡，该溶液中还可包含缓冲剂或缓冲液，并进行干燥，该封闭试剂是本领域所熟知的，如牛血清白蛋白，该表面活性剂也是本领域所熟知的，如 Tween-20。

[0027] 本发明的有益效果是：同一种胶体金试纸卡可用于检测犬和猫两种动物的狂犬病病毒免疫抗体，可以作为一种通用型检测试纸卡。减少了检测的手续，可较长时间常温保存、方便、快速、简捷，不需要昂贵的仪器设备、操作熟练的技术人员、较长的检测时间，且可常温保存 12 个月以上，若在洁净低温条件下密封包装，保存期更长，易于在基层推广，适用于基层进行大批量检测，应用于疫苗免疫效果的评估与检测，对预防和控制甚至最终消灭狂犬病均具有重要意义。

## 附图说明

[0028] 图 1 是本发明的胶体金试纸卡的上部。

[0029] 图 2 是本发明的胶体金试纸卡的下部。

[0030] 图 3 为本发明的胶体金试纸卡的组装示意图；

[0031] 其中：

[0032] 1 样品垫 ;2 包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜 ;3 同时包被狂犬病病毒相关抗原和 SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜 ;4 吸水纸 ;5 底板 ;6 检测线 T ;7 质控线 C。

[0033] 图 4 为胶体金试纸卡检测结果示意图

[0034] 从左至右依次为 :T 线、C 线处各出现一条红色条带,说明该样品中含有狂犬病病毒抗体 ;若仅在 C 线处出现一条红色条带,说明该样品不含有狂犬病病毒抗体 ;若 C 线处不出现红色条带,说明试纸卡失效。

### 具体实施方式

[0035] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0036] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用的英文缩写均为本领域技术人员所熟知的。

[0037] 实施例 1 :胶体金的制备

[0038] 取经酸洗、硅化的 250mL 锥形瓶,加入 1mL 1% 氯金酸和 99mL 纯水,加热至沸腾 ;边搅拌边准确而迅速加入 1.5mL 新鲜配制且已过滤的 1% 柠檬酸三钠,在 3min 内锥形瓶中的溶液由淡黄色变成灰黑色,继而变成紫黑色,最后转变成紫红色。继续加热搅拌 15min,冷却至室温,加纯水恢复至原体积,该溶液即为胶体金溶液。避光保存于 4℃ 冰箱,备用。

[0039] 实施例 2 :狂犬病病毒 N 基因的克隆与表达

[0040] ① 目的基因的克隆

[0041] 根据 pET-32a(+) 表达载体的特点设计了一对两侧含有限制性内切酶 EcoR I、Xho I 酶切位点的引物,上游引物 RV NF :5' -CTGCGAATTCACGATGGATGCCGACAAGATTGT-3' ;下游引物 RV NR :5' -GCCACTCGAGTTATGAGTCACTCGAATACGT-3' 。

[0042] 以 Trizol 法抽提 RV Flury LEP 毒液中的总 RNA,合成 cDNA,以此为模板 PCR 扩增 RV N 基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后,与 pGM-T 载体连接,转化至 E. coli DH5  $\alpha$  感受态细胞中,37℃ 培养过夜后提取质粒,将经过酶切和测序鉴定正确的重组质粒命名为 pGM-N。

[0043] ② N 基因融合表达载体的构建

[0044] 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切重组质粒 pGM-N 和原核表达载体 pET-32a(+),经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。将纯化后的 N 基因酶切产物与 pET-32a(+) 酶切产物按适量比例用 T4DNA 连接酶连接,将连接产物转化至 E. coli DH5  $\alpha$  感受态细胞中,37℃ 培养过夜后提取质粒,经过双酶切鉴定和测序分析获得阳性表达载体质粒 pET-N。

[0045] ③ 转化菌的诱导表达

[0046] 将阳性表达载体质粒 pET-N 转化至 E. coli BL21 (DE3),挑取单菌落进行扩增,当细菌培养至吸光度 OD<sub>600nm</sub> 值约为 0.6 时,加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 使其终浓度为 1mmol/L,于 28℃ 诱导表达 5h,目的蛋白以包涵体形式表达。

[0047] ④ 重组 N 蛋白的纯化与鉴定

[0048] 离心收集按照上述条件表达了 RV N 蛋白的大肠杆菌,用细菌裂解液重悬菌体后用超声破碎,离心弃上清,包涵体用含有 2mol/L 尿素和表面活性剂的溶液洗涤,用含有 8mol/L 尿素的溶液溶解包涵体,制备蛋白电泳样品,进行电洗脱纯化重组 N 蛋白,经低温透析复性、包埋浓缩获得重组 RV N 蛋白,用 Western blot 鉴定重组 N 蛋白的抗原性,同时用 BCA

蛋白定量试剂盒对复性好的蛋白进行定量。

[0049] 实施例 3:本发明的检测犬、猫狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡的制备

[0050] (1) 胶体金标记 SPA 及其纯化

[0051] 取实施例 1 制得的胶体金溶液,用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  调 pH 至 5.3,在磁力搅拌器下缓慢地逐滴加入适量的 1mg/mL SPA,使其终浓度为 3  $\mu$ gSPA/mL 胶体金,继续搅拌 15min,室温放置 20min。缓慢加入适量的 3% (w/v) 聚乙二醇 20000 (PEG-20000),使其终浓度为 0.3% (w/v),继续搅拌 15min,室温放置 15min。然后将该溶液 3000r/min 4℃离心 10min,吸出上清,弃黑色沉淀;再将上清 12000r/min 4℃离心 15min;弃上清留沉淀,沉淀用稀释液恢复至原体积的 1/10,即为纯化后的胶体金标记 SPA(即金标 SPA)。

[0052] (2) 包被有金标 SPA 的玻璃纤维膜的制备

[0053] 将纯化后的金标 SPA 涂布至玻璃纤维膜 Ahlstrom 8964,放入 37℃恒温箱中干燥,干燥后即包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜,放入密封袋中避光保存备用。

[0054] (3) 同时包被狂犬病病毒相关抗原、SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜的制备

[0055] 分别用实施例 2 制得的 1.2mg/mL 狂犬病病毒核蛋白(N 蛋白)、1.5mg/mLSPA 抗体在硝酸纤维素膜 Millipore 135 划线,分别作为试纸卡中的检测线 T 与质控线 C,放入 37℃恒温箱中孵育 4h,孵育后即同时包被狂犬病病毒相关抗原、SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜。

[0056] (4) 样品垫的制备

[0057] 将玻璃纤维膜 GF-06 放入含有牛血清白蛋白(BSA)和吐温-20(Tween-20)的溶液中浸泡 30min,37℃干燥过夜;

[0058] (5) 试纸卡的组装

[0059] 参见图 1-3,依次将同时包被狂犬病病毒相关抗原和 SPA 抗体两个条带的硝酸纤维素膜、包被有胶体金标记 SPA 的玻璃纤维膜、样品垫、吸水纸粘贴到底板 J-B8 上,切割成 0.4cm×8cm,将切割好的试纸条装入塑料卡内,使检测线和质控线均在胶体金试纸卡的观察窗口内,将胶体金试纸卡放入铝箔袋中,袋中加干燥剂,密封,常温保存。

[0060] 实施例 4:检测方法及其评判标准

[0061] 将胶体金试纸卡放在水平操作台上,取 10  $\mu$ L 血清滴加到样品孔 S,10 秒后垂直滴加 80  $\mu$ L PBST(即磷酸缓冲液和 Tween-20 的混合液),在室温下静止,15min 内判读结果:

[0062] 若样品中含有 RV 抗体,则与试纸卡中的胶体金标记 SPA 形成免疫复合物,通过毛细作用向上移动,被包被在硝酸纤维素膜上的狂犬病病毒核蛋白(N 蛋白)所捕获,在 T 线处形成红色条带。

[0063] 无论样品中是否含有相应的抗体,胶体金标记 SPA 通过毛细作用向上移动,与包被在硝酸纤维素膜上的抗 SPA 抗体相互作用,在 C 线处形成红色条带。此线为质控线,若胶体金标记 SPA 失效,此线就不会出现,说明试纸卡失效。

[0064] 在检测样品时,若出现了 2 条红色条带,即在 T 线、C 线处各出现一条红色条带,说明该样品中含有狂犬病病毒抗体;若仅在 C 线处出现一条红色条带,说明该样品不含有狂犬病病毒抗体;若 C 线处不出现红色条带,说明试纸卡失效。

[0065] 实施例 5:特异性和灵敏度实验

[0066] 1. 特异性实验

[0067] 用试纸卡对用五联苗（犬瘟热病毒病、犬细小病毒病、犬传染性肝炎、犬副流感、犬腺病毒二型）免疫的犬血清和三联苗（猫瘟热即猫泛白细胞减少病、猫杯状病毒病和传染性鼻气管炎）免疫的猫血清进行交叉反应检测,结果表明,该试纸卡与上述血清均无交叉反应,说明该试纸卡对于上述病原血清是特异的。

[0068] 2. 灵敏度试验:

[0069] 将荧光抗体病毒中和试验测定效价的犬血清用 PBST 稀释成 2IU/mL、1IU/mL、0.5IU/mL、0.25IU/mL、0IU/mL,各取 10  $\mu$  L,用试纸卡进行检测,结果表明,随着 RV 抗体效价的升高,T 线越来越深,当 RV 抗体效价大于或等于 0.5IU/mL 时,T 线清晰可见;低于该效价时,T 线模糊或不显色,因此该胶体金试纸卡检测 RV 抗体的灵敏度为 0.5IU/mL。

[0070] 将荧光抗体病毒中和试验测定效价的猫血清用 PBST 稀释成 2IU/mL、1IU/mL、0.5IU/mL、0.25IU/mL、0IU/mL,各取 10  $\mu$  L,用试纸卡进行检测,结果表明,随着 RV 抗体效价的升高,T 线越来越深,当 RV 抗体效价大于或等于 0.5IU/mL 时,T 线清晰可见;低于该效价时,T 线模糊或不显色,因此该胶体金试纸卡检测 RV 抗体的灵敏度为 0.5IU/mL。

[0071] 实施例 6:本发明胶体金试纸卡的结果准确性

[0072] 采集 30 份犬的狂犬病病毒阳性血清和 30 份猫的狂犬病病毒阳性血清,分别用实施例 3 得到的胶体金试纸卡进行检测,其中,对于 30 份犬的狂犬病病毒阳性血清,胶体金试纸卡检出 29 份阳性结果,其准确率为 96.7%;对于 30 份猫的狂犬病病毒阳性血清,胶体金试纸卡检出 28 份阳性结果,其准确率为 93.3%。

[0073] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因

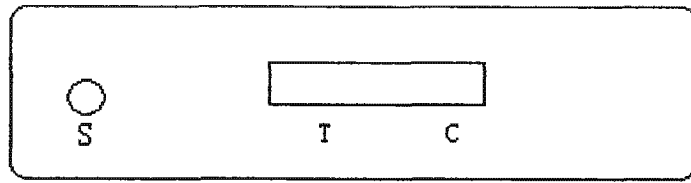


图 1

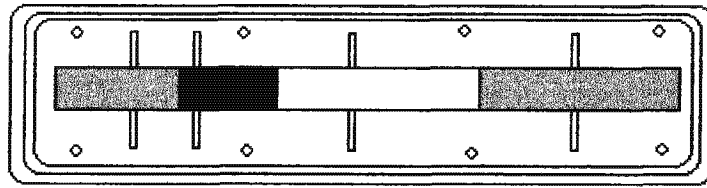


图 2

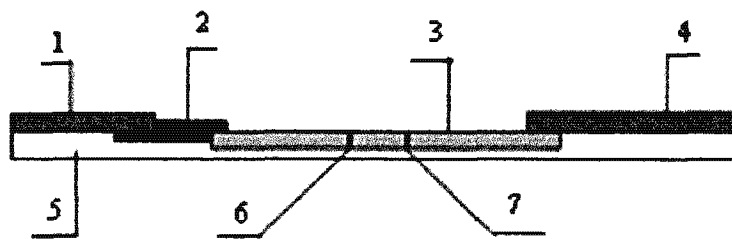


图 3

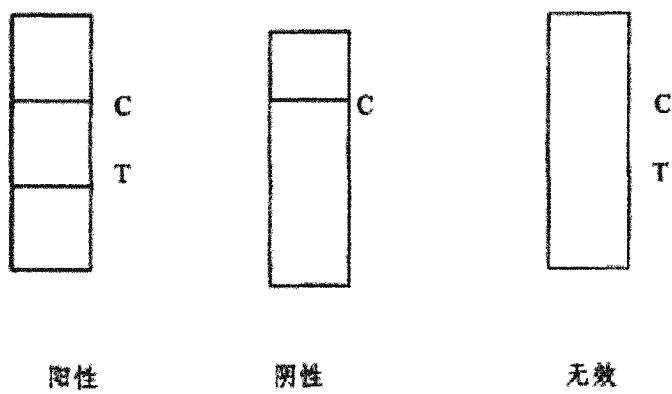


图 4

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种用于检测犬、猫的狂犬病毒抗体的胶体金试纸卡及其制备方法和应用               |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101852803A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-10-06 |
| 申请号            | CN201010197930.2                               | 申请日     | 2010-06-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所                               |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所                               |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所                               |         |            |
| [标]发明人         | 李刚<br>范晓娟<br>张坤                                |         |            |
| 发明人            | 李刚<br>范晓娟<br>张坤                                |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531               |         |            |
| 其他公开文献         | CN101852803B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测犬、猫狂犬病病毒抗体的胶体金试纸卡，通过在硝酸纤维素膜上同时包被狂犬病病毒相关抗原、金黄色葡萄球菌蛋白A (SPA)抗体两个条带，并采用胶体金标记SPA，得到了一种通用型检测试纸卡，应用免疫层析原理检测犬、猫血清中的狂犬病病毒抗体，实现检测犬和猫两种动物狂犬病病毒抗体的目的。克服了现有检测技术操作复杂、繁琐、检测时间长、需要仪器、不能用同一种试纸卡检测不同动物中抗体的不足。

