



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104034897 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410274790. 2

(22) 申请日 2014. 06. 19

(71) 申请人 广西博士海意信息科技有限公司

地址 530022 广西壮族自治区南宁市民族大道 38-2 号 1211 室

(72) 发明人 李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云
蓝文苑

(74) 专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司 44214

代理人 李珊

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种猪瘟病毒快速检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种猪瘟病毒快速检测试剂盒,属于病毒检测领域。本发明通过设计的可检测猪瘟病毒的通用引物,并将 PT-PCR 技术与核酸胶体金免疫层析技术相结合,建立的适用于猪瘟病毒的快速检测试剂盒。本发明设计和优化了一种检测猪瘟病毒的通用引物,并与核酸胶体金层析试纸条技术联用在短时间内即可完成不同种锦紫苏类病毒的 PCR 产物的检测,不需要电泳和溴化乙锭的染色,更为快速实用,简单,灵敏,且安全无污染。

1. 一种猪瘟病毒的快速检测试剂盒,其特征在于,主要由以下几种试剂和层析试纸条组成:

试剂 A:病毒 RNA 提取液,由常规现有技术的 RNA 提取液构成;

试剂 B:包括 10×One step RNA PCR buffer, MgCl₂, DNTTP Mixture, RNase Inhibitor, AMV-Optimized Taq, AMV RTase, 正向引物,反向引物,所述正向引物,反向引物分别标记了地高辛、荧光素,所述正向引物(F-primer)序列为 5'-ACGGAGGGACTAGCCGTAGTG-3',

反向引物(R-primer)序列为 5'-CTGTTAGTGGGCCTCTGCAGC-3';

试纸条:由玻璃纤维膜、NC 膜、吸水纸和双面胶塑料板组成,硝酸纤维素膜(NC 膜)粘贴在双面胶塑料板上,玻璃纤维膜和吸水纸分别粘贴在 NC 膜的两侧并且与 NC 膜有部分重叠;NC 膜上有 T 点(检测点)和 C 点(质控点),T 点位于靠近玻璃纤维膜的一侧,玻璃纤维膜上固定有胶体金标记的兔抗地高辛抗体,T 点固定的是鼠抗荧光素抗体,C 点固定的是羊抗兔多克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述的猪瘟病毒的快速检测试剂盒,其特征在于:所述的胶体金标记的兔抗地高辛抗体的溶液配制方法为:

(1)取纯化好的兔抗地高辛多克隆抗体 300 μg,在磁力搅拌下缓慢加入胶体金溶液 18 mL,室温搅拌 30 min;

(2)加入 10% 牛血清白蛋白 1 mL,室温搅拌 5 min;

(3)加入 10% 聚乙二醇 0.4 mL,室温搅拌 5 min;

(4) 12,000 r/min,离心 30 min,去上清,加入 2 mL 保存液(取四硼酸钠 0.1 g,BSA 0.25 g,溶于 250 mL 蒸馏水)悬浮沉淀;

(5)加入 8 mL 稀释液(取 Na₂HPO₄·12H₂O 6.1 g,NaCl 8.5 g,PVP40 5 g,硼酸 2.1 g,PEG 1 g,10% BSA 50 mL,溶于 1000 mL 蒸馏水),取少量进行检定,其余置 4°C 保存。

3. 如权利要求 2 所述的猪瘟病毒的快速检测试剂盒,其特征在于,所述胶体金溶液的制备法如下:

a. 取 1% 氯金酸 0.6 mL,加 30 mL 超纯水加热煮沸;

b. 加 37°C 预热的 1% 柠檬酸钠溶液 0.9 mL,快速一次加入,溶液由蓝逐渐变为紫红色,煮沸 3-5 min,补水至总体积 31.5 mL;

c. 冷却后,用 0.2 mol/L K₂CO₃ 调 pH 至 8.0-9.0,用 0.45 μm 滤膜过滤,4°C 保存。

一种猪瘟病毒快速检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于病毒检测领域,具体涉及一种猪瘟病毒快速检测试剂盒。

背景技术

[0002] 猪瘟病毒是 ssRNA 病毒,黄病毒科瘟病毒属,其 RNA 为单股正链。病毒粒子呈圆形,大小为 38 ~ 44nm,核衣壳是立体对称二十面体,氯化铯中浮密度 1.15 ~ 1.17g/ml,有包膜。猪瘟病毒在细胞质内复制,不能凝集红血球,与牛腹泻病毒有相关抗原。该病毒对乙醚敏感,对温度、紫外线、化学消毒剂等抵抗力较强。

[0003] 利用 RT-PCR 检测类病毒是一种非常灵敏的方法。通常 RT-PCR 灵敏度比 cRNA 探针的斑点杂交灵敏度高 10-100 倍(Nakahara et al, 1999)。RT-PCR 对模板的纯度要求高,如果检测样品中存在扩增抑制物的话,将很难扩增出目的条带,尤其是果树类的材料,含有大量的多酚类和糖类等。糖类一般可以用乙二醇单甲醚来去除。PVP 能有效束缚酚类化合物,在 PCR 混合物中加入 PVP 能有效地除去从组织中制备的 RNA 中的阻遏物(Koonjul et al, 1999)。但是 PCR 产物的检测常规方法是采用琼脂糖凝胶电泳进行,电泳后需要进行溴化乙锭染色后在紫外光下观察,溴化乙锭对人具有中等毒性和致癌性,易造成环境污染,这也严重限制了此方法的推广。

发明内容

[0004] 本发明的目的正是针对上述现有技术所存在的问题而专门研制的一种猪瘟病毒的快速检测试剂盒,快速,灵敏,准确检测出带有锦紫苏类病毒的植株。

[0005] 本发明的试剂盒主要由以下几种试剂和层析试纸条组成:

试剂 A:病毒 RNA 提取液,由常规现有技术的 RNA 提取液构成;

试剂 B:包括 10×One step RNA PCR buffer, MgCl₂, DNTP Mixture, RNase Inhibitor, AMV-Optimized Taq, AMV RTase, 正向引物,反向引物,所述正向引物,反向引物分别标记了地高辛、荧光素,所述正向引物(F-primer)序列为 5'-ACGGAGGGACTAGCCGTAGTG-3',

反向引物(R-primer)序列为 5'-CTGTTAGTGGGCCTCTGCAGC-3';

试纸条:由玻璃纤维膜、NC 膜、吸水纸和双面胶塑料板组成,硝酸纤维素膜(NC 膜)粘贴在双面胶塑料板上,玻璃纤维膜和吸水纸分别粘贴在 NC 膜的两侧并且与 NC 膜有部分重叠;NC 膜上有 T 点(检测点)和 C 点(质控点),T 点位于靠近玻璃纤维膜的一侧,玻璃纤维膜上固定有胶体金标记的兔抗地高辛抗体,T 点固定的是鼠抗荧光素抗体,C 点固定的是羊抗兔多克隆抗体。

[0006] 本试剂盒中试纸条中所述的胶体金标记的兔抗地高辛抗体的溶液配制方法为:

(1)取纯化好的兔抗地高辛多克隆抗体 300 μg,在磁力搅拌下缓慢加入胶体金溶液 18 mL,室温搅拌 30 min;

(2)加入 10% 牛血清白蛋白 1 mL,室温搅拌 5 min;

(3)加入 10% 聚乙二醇 0.4 mL,室温搅拌 5 min;

(4) 12,000 r/min, 离心 30 min, 去上清, 加入 2 mL 保存液(取四硼酸钠 0.1 g, BSA 0.25 g, 溶于 250 mL 蒸馏水) 悬浮沉淀;

(5) 加入 8 mL 稀释液(取 Na₂HPO₄·12H₂O 6.1 g, NaCl 8.5 g, PVP40 5 g, 硼酸 2.1 g, PEG 1 g, 10% BSA 50 mL, 溶于 1000 mL 蒸馏水), 取少量进行检定, 其余置 4℃ 保存。

[0007] 上述步骤(1)中的胶体金溶液的制备法如下:

a. 取 1% 氯金酸 0.6 mL, 加 30 mL 超纯水加热煮沸;

b. 加 37℃ 预热的 1% 柠檬酸钠溶液 0.9 mL, 快速一次加入, 溶液由蓝逐渐变为紫红色, 煮沸 3-5 min, 补水至总体积 31.5 mL;

c. 冷却后, 用 0.2 mol/L K₂CO₃ 调 pH 至 8.0-9.0, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 4℃ 保存。

[0008] 本试剂盒中试纸条玻璃纤维素膜上固定有胶体金标记的兔抗地高辛多克隆抗体, T 点上喷有鼠抗荧光素单克隆抗体; C 点上喷有羊抗兔多克隆抗体。

[0009] 本发明的优点是: 设计和优化了一种检测猪瘟疫病毒的通用引物, 并与核酸胶体金层析试纸条技术联用, 设计成试剂盒, 在短时间内即可完成不同种锦紫苏类病毒的 PCR 产物的检测, 不需要电泳和溴化乙锭的染色, 更为快速实用, 简单, 灵敏, 且安全无污染。

[0010]

具体实施方式

[0011] 1. 样品 RNA 的提取:

将患病仔猪组织病料充分研磨制成悬浮溶液, 反复冻溶 3 次, 离心取上清, 加入试剂 A, 抽提 RNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增待检测液。

[0012] 2. RT-PCR:

取一定量待检测液, 加入试剂 B, 反应条件为 50℃ 15 min; 94℃ 2 min 使 RTase 失活; 94℃ 预变性 2min; 然后以 94℃ 30s、56℃ 30 s、72℃ 1 min 进行 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。反应结束, 取 5 微升 PCR 产物待用。正向引物, 反向引物分别标记了地高辛、荧光素。

[0013] 3. PCR 产物的胶体金核酸免疫层析检测:

在试纸条抗体固相硝酸纤维素层析膜(NC 膜)上靠近玻璃纤维素膜的一端点上 1 μL 的小鼠抗荧光素单克隆抗体作为检测点(T 点), 并固定。在 NC 膜上靠近吸水纸一端点上 1 μL 羊抗兔多克隆抗体作为质控点(C 点), 并固定。

[0014] 在离心管中加入 200 μL PBS 缓冲液, 然后加入 5 μL 的标记地高辛和荧光素引物的 PCR 产物。插入试纸条, 15 min 内观察显色结果。

[0015] T 点显色: 检测时, 将 PCR 产物链上标记的地高辛能够和兔抗地高辛多克隆抗体结合, 形成胶体金-兔抗地高辛抗体-PCR 产物复合物; 而 PCR 产物链上标记荧光素可以和 T 点上小鼠抗荧光素单克隆抗体结合, 则层析时该复合物可以被 T 点所捕获, 形成胶体金-兔抗地高辛抗体-PCR 产物-小鼠抗荧光素单克隆抗体的结构而使 T 点显色。

[0016] C 点显色: 试纸条的 C 点上喷上羊抗兔多克隆抗体, 则能形成胶体金-兔抗地高辛抗体-羊抗兔多克隆抗体或胶体金-兔抗地高辛多克隆抗体-(PCR 产物)-羊抗兔多克隆抗体的复合物。检测带毒材料时, 形成的胶体金-兔抗地高辛多克隆抗体-PCR 产物先被 T 点上荧光素抗体所捕获, 多余的复合物或没有完全被 T 点捕获的, 则被随后的 C 点所捕获形成胶体金-兔抗地高辛多克隆抗体-(PCR 产物)-羊抗兔多克隆抗体的复合物使 C 点显色。

而检测健康的材料或缓冲液时,C点所捕获的只是胶体金-兔抗地高辛多克隆抗体,形成胶体金-兔抗地高辛多克隆抗体-羊抗兔多克隆抗体而显色。

[0017] 因此,如果C、T点都显色,结果为阳性;阴性和空白对照应仅C点显色,T点不显色,结果为阴性和空白对照。C、T点都不显色,则试剂条失效,结果不能判定。

专利名称(译)	一种猪瘟病毒快速检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104034897A	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201410274790.2	申请日	2014-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
[标]发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/531		
代理人(译)	李珊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种猪瘟病毒快速检测试剂盒,属于病毒检测领域。本发明通过设计的可检测猪瘟病毒的通用引物,并将PT-PCR技术与核酸胶体金免疫层析技术相结合,建立的适用于猪瘟病毒的快速检测试剂盒。本发明设计和优化了一种检测猪瘟病毒的通用引物,并与核酸胶体金层析试纸条技术联用在短时间内即可完成不同种锦紫苏类病毒的PCR产物的检测,不需要电泳和溴化乙锭的染色,更为快速实用,简单,灵敏,且安全无污染。