



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103777018 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410030295. 7

(22) 申请日 2014. 01. 16

(71) 申请人 江西农业大学

地址 330000 江西省南昌市江西农业大学校
内

(72) 发明人 刘平 胡国良 郭小权 曹华斌
刘佩 李麟 张彩英 黄爱民
罗军荣

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

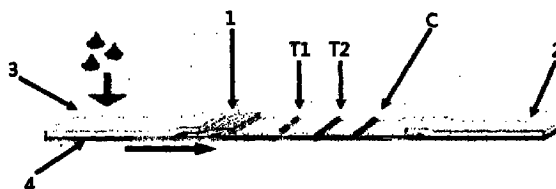
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌快速诊断试纸条
的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条的制备方法,涉及一种生物快速检测技术领域。包括分析膜 (5) 和金标抗体结合垫 (1),分析膜 (5) 上用抗放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体做为检测线 1 (T1) 和检测线 2 (T2) 以及羊抗兔 IgG 做为质控线 (C),金标抗体结合垫 (1) 上是 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白抗兔多克隆抗体。本发明解决了现有技术中存在的检验速度慢、灵敏度低、操作复杂等问题。



1. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条的制备方法,其特征 在于,包括分析膜 (5) 和金标抗体结合垫 (1),分析膜 (5) 上用抗放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体做为检测线 1(T1) 和检测线 2(T2) 以及羊抗兔 IgG 做为质控线 (C),金标 抗体结合垫 (1) 上是 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白抗兔多克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条 的制备方法,其特征 在于,抗放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体通过杂交融合技术方 法,筛选出放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株而获得;融合蛋白抗兔 多克隆抗体通过 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白可溶性抗原多次免疫新西兰大白兔而获得。

3. 如权利要求 1 或 2 所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸 条的制备方法,其特征 在于,分析膜 (5) 的材料为硝酸纤维膜,金标抗体结合垫 (1) 的材料 为玻璃纤维膜。

4. 如权利要求 1 或 2 所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸 条的制备方法,其特征 在于,快速诊断试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白的多克隆抗体制备:选择健康成年公兔(2-3 月龄, 2-3kg) 做免疫动物,将纯化的 His-ApxI-ApxIV 融合蛋白重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积 混合乳化,进多次免疫动物获得免疫血清。

(2)pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV 融合蛋白的单克隆抗体制备:将融合蛋白 pE380-ApxI、pE380-ApxIV 注入 Balb/c 小鼠中,再采用细胞融合技术进行杂交瘤阳性克隆 筛选,筛选出阳性杂交瘤进行体外和体内培养获得单克隆抗体。

(3) 制备分析膜 (5):将步骤 (1) 制备的抗放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 在硝酸纤维膜 上形成检测线 1(T1) 和检测线 2(T2),羊抗兔 IgG 在硝酸纤维膜上形成质控线 (C),以供备 用。

(4) 制备金标抗体结合垫 (1):采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,并采用标记体 系标记 pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白的多克隆抗体,将金标抗体在与支持膜上固相化。

(5) 组装试纸条:将步骤 (2) 的分析膜 (5)、步骤 (3) 的金标抗体结合垫 (1)、吸水纸 (2)、样品垫 (3)、PVC 底板 (4) 组装成胶体金快速检测试纸条。

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌快速诊断试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物快速检测技术领域,具体涉及猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 猪传染性胸膜肺炎是由猪胸膜肺炎放线杆菌引起的一种猪的高度接触性传染病,也是当代国际公认危害现代养猪业五大重要传染病之一,也是当今大型养猪场的三大呼吸道传染病之一。在临床剖检上主要以肺出血、坏死和纤维素性渗出为主要病变,急性病例病死率高。本病发病季节明显,在气温较低的冬季、早春晚秋等气候恶劣的时节多发。任何年龄的猪对本病均易感,其中 3 月龄最易感。感染了胸膜肺炎放线杆菌的猪,在临床上常易继发其他细菌性疾病如副猪嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌等,还有支原体、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV)、猪圆环病毒 (PCV) 及伪狂犬病病毒 (PRV) 等,引起复杂的呼吸道综合症,加重对感染猪只的危害。

[0003] 猪胸膜肺炎放线杆菌引起猪传染性胸膜肺炎主要与较多的毒力因子有关,包括脂多糖 (LPS)、外膜蛋白 (OMP)、转铁结合蛋白 (TBP)、荚膜 (CP)、溶血外毒素 (Apx) 等这些毒力因子都能引起胸膜肺炎的发生。其中的 Apx 是一种对肺泡巨噬细胞起毒性作用的物质,可抑制肺泡巨噬细胞的吞噬活性,同时, Apx 对外周单核细胞及淋巴细胞也有细胞毒性作用,被认为是引起感染并使肺组织严重损伤的主要原因。Apx 分为 ApxI、Apx II、ApxIII、ApxIV 四种不同型的毒素, ApxI、Apx II、ApxIII 是引起疾病临床症状的出现以及典型的肺部病变必需物质,被公认为引起猪传染性胸膜肺炎的主要毒力因子。对临床疾病诊断有重要意义。

[0004] ApxI 是引起猪传染性胸膜肺炎疾病临床症状的出现以及典型的肺部病变主要毒力因子,但在诊断方法特异性差,很难检测完 APP 所有血清型,因与其他放线杆菌如猪放线杆菌、罗斯放线杆菌、猪扁桃体放线杆菌等存在交叉反应。而 APP 所有血清型都分泌 ApxIV, ApxIV 的种间特异性很强,在其它种属的放线杆菌和其它能分泌 ApxI、ApxI 毒素的革兰氏阴性杆菌中则均检测不到 ApxIV,也可以用以区分疫苗免疫和野毒感染。因此,本发明根据 ApxI 和 ApxIV 两者之间不同特性,采用胶体金快速免疫层析法,使用两条检测线和一条控制线的试纸条的方法,制备出能检测放线杆菌外溶血毒素中 ApxI 的快速诊断纸条。

[0005] 现有技术中,猪传染性胸膜肺炎放线杆菌检测试纸条存在检验速度慢、灵敏度低、操作复杂等缺点。

发明内容

[0006] 本发明提供猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条的制备方法,解决了现有技术中存在的检验速度慢、灵敏度低、操作复杂等问题。

[0007] 为解决上述问题,本发明采用如下技术方案:猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条的制备方法,包括分析膜 5 和金标抗体结合垫 1,分析膜 5 上用抗

放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体做为检测线 T1 和检测线 T2 以及羊抗兔 IgG 做为质控线 C, 金标抗体结合垫 1 上是 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白抗兔多克隆抗体。

[0008] 抗猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体通过杂交融合技术方法, 筛选出猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株而获得; 融合蛋白抗兔多克隆抗体通过 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白可溶性抗原多次免疫新西兰大白兔而获得。

[0009] 分析膜 5 的材料为硝酸纤维膜, 金标抗体结合垫 1 的材料为玻璃纤维膜。

[0010] 快速诊断试纸条的制备方法, 包括以下步骤:

[0011] (1) pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白的多克隆抗体制备: 选择健康成年公兔 (2-3 月龄, 2-3kg) 做免疫动物, 将纯化的 His-ApxI-Apx IV 融合蛋白重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合乳化, 进多次免疫动物获得免疫血清。

[0012] (2) pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV 融合蛋白的单克隆抗体制备: 将融合蛋白 pE380-ApxI、pE380-ApxIV 注入 Balb/c 小鼠中, 再采用细胞融合技术进行杂交瘤阳性克隆筛选, 筛选出阳性杂交瘤进行体外和体内培养获得单克隆抗体。

[0013] (3) 制备分析膜 5: 将步骤 (1) 制备的抗猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 在硝酸纤维膜上形成检测线 T1 和检测线 T2, 羊抗兔 IgG 在硝酸纤维膜上形成质控线 C, 以供备用。

[0014] (4) 制备金标抗体结合垫 1: 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 并采用标记体系标记 pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白的多克隆抗体, 将金标抗体在与支持膜上固相化。

[0015] (5) 组装试纸条: 将步骤 (2) 的分析膜 5、步骤 (3) 的金标抗体结合垫 1、吸水纸 2、样品垫 3、PVC 底板 4 组装成胶体金快速检测试纸条。

[0016] 本发明的优点有: (1) 检测快速, 可在 10-20min 出结果; (2) 特异性好, 该试纸条与传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxII、ApxIII, 以及其他放线杆菌如猪放线杆菌、罗斯放线杆菌、猪扁桃体放线杆菌等无交叉反应; (3) 灵敏度高; (4) 稳定性好; (5) 操作简便, 快速, 适合基层畜牧养殖者、基层畜牧技术推广单位和畜牧动物检疫的使用。

附图说明

[0017] 图 1 是本发明的组装结构示意图;

[0018] 图 2 试纸条检测结果图。

[0019] 图中符号说明: 1 为金标抗体结合垫、2 为吸水纸、3 为样品垫、4 为 PVC 底板、5 为分析膜、T1 为检测线 1、T2 为检测线 2、C 为质控线。

具体实施方式

[0020] 下面用最佳的实施例对本发明做详细的说明。

[0021] 如图 1 所示, 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素 ApxI 快速诊断试纸条的制备方法, 包括分析膜 5 和金标抗体结合垫 1, 分析膜 5 上用抗放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体做为检测线 T1 和检测线 T2 以及羊抗兔 IgG 做为质控线 C, 金标抗体结合垫 1 上是 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白抗兔多克隆抗体。

[0022] 抗猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体通过杂交融合技术

方法,筛选出放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株而获得;融合蛋白抗兔多克隆抗体通过 p380-ApxI-ApxIV 的融合蛋白可溶性抗原多次免疫新西兰大白兔而获得。

[0023] 分析膜 5 的材料为硝酸纤维素膜,金标抗体结合垫 1 的材料为玻璃纤维膜。

[0024] 快速诊断试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0025] (1)pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白的多克隆抗体制备:选择健康成年公兔(2-3 月龄,2-3kg)做免疫动物,将纯化的 His-ApxI-Apx IV 融合蛋白重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合乳化,进多次免疫动物获得免疫血清。

[0026] (2)pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV 融合蛋白的单克隆抗体制备:将融合蛋白 pE380-ApxI、pE380-ApxIV 注入 Balb/c 小鼠中,再采用细胞融合技术进行杂交瘤阳性克隆筛选,筛选出阳性杂交瘤进行体外和体内培养获得单克隆抗体。

[0027] (3)制备分析膜 5:将步骤(1)制备的抗猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV 在硝酸纤维素膜上形成检测线 T1 和检测线 T2,羊抗兔 IgG 在硝酸纤维素膜上形成质控线 C,以供备用。

[0028] (4)制备金标抗体结合垫 1:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,并采用标记体系标记 pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白的多克隆抗体,将金标抗体在支持膜上固相化。

[0029] (5)组装试纸条:将步骤(2)的分析膜 5、步骤(3)的金标抗体结合垫 1、吸水纸 2、样品垫 3、PVC 底板 4 组装成胶体金快速检测试纸条。

[0030] 本发明有如下实施例:

[0031] 实施例 1ApxI、pSE380ApxIV、ApxI-ApxIV 基因克隆、原核表达载体重组质粒诱导表达及蛋白纯化

[0032] 1 材料与方法

[0033] 1.1 菌株:大肠杆菌(DH5 α /BL21)。

[0034] 1.2 主要试剂和仪器:LA/LB 培养基,电泳仪,电泳槽,紫外凝胶成像系统,核酸蛋白分析仪,超高速冷冻离心机。

[0035] 1.3 质粒:pSE380

[0036] 2 实验方法

[0037] 2.1 克隆猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外毒素 ApxI/ApxIV/ApxI-ApxIV 基因

[0038] 根据 GenBank 中查找 ApxI/ApxIV 基因的序列,应用 Premier5.0 软件分别设计 2 对引物,从感染猪传染性胸膜肺炎病猪的血清中扩增 ApxI/ApxIV 基因,再以 ApxI/ApxIV 混合 PCR 产物为模板,用 ApxI 基因为上游引物,ApxIV 基因下游收物进行 PCR 扩增出 ApxI-ApxIV 基因。

[0039] 2.2 构建 pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV、pSE380-ApxI-ApxIV 原核表达载体

[0040] 先将纯化后的 PCR 扩增产物连接到克隆载体 pMD18-T 上,以酶切鉴定和测序正确的质粒作为第二次 PCR 扩增的模板。重新设计引物(引入酶切位点)并合成引物,进行第二次 PCR 扩增,以上述同样的方法获得测序正确的重组质粒。从这些重组质粒上切下目的片段,将其亚克隆到表达载体 pSE380 上,再次酶切鉴定和测序,获得各自的重组表达质粒。

[0041] 2.3pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV、pSE380-ApxI-ApxIV 原核表达载体重组质粒诱导表达及蛋白纯化

[0042] 用诱导剂 (IPTG) 诱导转化 pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV、pSE380-ApxI-ApxIV 表达载体的大肠杆菌 BL21 (DE3), 优化表达条件, SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 检测融合蛋白表达; 在变性条件下用 Ni-NTA argrose 介质分离纯化 His-ApxI、His-ApxIV、His-ApxI-ApxIV 融合重组蛋白。

[0043] 实施例 2pSE380-ApxI-ApxIV 多克隆抗

[0044] 1 材料与方法

[0045] 1.1 菌株: 大肠杆菌 (DH5 α /BL21)。

[0046] 1.2 主要试剂和仪器: LA/LB 培养基, HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 佛氏完全佐剂 / 佛氏不完全佐剂, 透析袋、电泳仪, 电泳槽, 紫外凝胶成像系统, 核酸蛋白分析仪, 超高速冷冻离心机。

[0047] 1.3 质粒: pSE380

[0048] 1.4 实验动物: 新西兰大白兔。

[0049] 2 实验方法

[0050] 2.1 实验动物免疫

[0051] 将制备好的 His-ApxI-ApxIV 融合蛋白重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合乳剂免疫动物, 选取 2 ~ 3 月龄, 体重为 2 ~ 3kg 的新西兰大白兔 2 只作为免疫动物, 一免: 0.5mg $\cdot$ mL⁻¹His-ApxI-ApxIV 融合蛋白与佛氏完全佐剂等比例混合后充分超声波乳化, 在四肢内侧皮下分点注射。3 周后, 进行二免, 减半量 His-ApxI-ApxIV 融合蛋白与佛氏不完全佐剂等比例混合, 背部皮下多点注射, 同时采血分离血清进行 ELISA 检测。每隔三周, 分别进行三免和四免。加免在四免后一周, 大量采血, 分离血清, 并 ELISA 检测抗体的特异性。

[0052] 2.2 血清抗体纯化

[0053] 血清抗体通过正辛硫 - 硫酸铵沉淀法纯化, 通过核酸分析仪测定, SDS-PAGE 垂直电泳分析。

[0054] 实施例 3pSE380-ApxI、pSE380-ApxIV 单克隆抗体的制备

[0055] 1 材料与方法

[0056] 1.1 实验材料: Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞, pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白, 大肠杆菌 (DH5 α /BL21); 细胞培养皿, 50mL 尖底离心管, 96 孔酶标板, 透析袋等。

[0057] 1.2 实验动物: Balb/c 小鼠。

[0058] 2. 实验方法

[0059] 2.1 试验动物免疫

[0060] 选 6 ~ 7 周龄的 Balb/c 雌性小鼠 6 只进行免疫。初次免疫, 0.5mg $\cdot$ mL⁻¹pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白分别与佛氏完全佐剂等比例混合, 超声乳化, 分别在腹部皮下多点注射各 3 只。3 周后, 第 2 次免疫, 减半量 pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白与佛氏不完全佐剂等比例混合, 背部皮下多点注射。每隔三周分别进行第 3 次和第 4 次免疫。最后一次免疫后一周收集血液, 以 ELISA 检测抗体的特异性及 SDS-PAEG 电泳法。

[0061] 2.2 细胞杂交融合

[0062] (1) 在融合操作前 24 小时, 将两个 70cm² 细胞培养皿里的骨髓瘤细胞用胰蛋白酶乙二胺四乙酸混合液脱离传代一次 (注意: 此步骤非常重要)。

[0063] (2) 次日,抽掉骨髓瘤细胞培养皿里的培养液,分别加入 5mL GENMED 清理液 (Reagent A),清洗生长中的细胞表面,吸掉 5mL 清洗液,分别加 3mL 自备的胰蛋白酶乙二胺四乙酸混合液,铺满整个培养平面置 37℃ 培养箱 3 分钟。

[0064] (3) 用手震动培养皿,使细胞脱落,然后分别加入 10mL GENMED 清理液 (Reagent A),分别取两种细胞悬液 (骨髓瘤细胞 $2 \sim 5 \times 10^7$,再已备好小鼠脾脏细胞 1×10^8) 的两个父代细胞合并到一个 50mL 锥形离心管,离心 10 分钟,弃上清。加 / 入 10mL GENMED 清理液 (Reagent A),混匀后,离心 $1000r \cdot \min^{-1}$ 10 分钟,去上清,用手指轻轻弹击离心管外壁直至细胞颗粒群松散。

[0065] (4) 加入 1.5mL GENMED 融合液 (Reagent B),充分混匀,置于室温下 1 分钟。加入 10mL GENMED 清理液 (Reagent A),轻轻混匀后,离心 $1000r \cdot \min^{-1}$ 10 分钟,去上清。加入自备的完全细胞培养液 8mL,充分混匀。

[0066] (5) 移入备有饲养层细胞 96 孔培养板中,2 ~ 4 块,每孔加 200 μ L 细胞融合的悬液,放进 37℃ 培养箱。

[0067] (6) 72 小时后开始细胞筛选,直至获得融合杂合子细胞克隆 (10 ~ 14 天)。

[0068] 2.3 阳性杂交瘤细胞的扩大培养

[0069] 经吹打阳性的杂交瘤细胞悬浮移到含有饲养层细胞的 24 孔板里扩大培养,与原孔一起加新鲜的 HT 培养基 (24 孔加 0.5mL,原孔加 0.1mL),并在 5% CO₂ 培养 24 ~ 48 小时,用 ELISA 检测,对分泌抗体较稳定较强的细胞株做重点培养及保存,做好编号并命名并及时冻存。

[0070] 2.4 有限稀释法单克隆化

[0071] 在 96 孔板中进行有限稀释法单克隆化细胞培养,将前一天预先制备饲养层细胞,再进行细胞克隆化。待做克隆化的杂交瘤细胞用含 20% 胎牛血清细胞培养液稀释每毫升中 5、10、50 个细胞,分别加入已准备好的饲养细胞的 96 孔板中,每孔 100 μ L。到第二次或第三次亚克隆时,只作一个稀释度,调整至每毫 5 ~ 10 个细胞,将 96 孔板放在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。定时观察,待细胞长到孔面积约一半时,吸半培养液检测,阳性孔中的细胞继续单克隆化,并扩大培养、冻存备用。

[0072] 2.5 腹水的制备

[0073] (1) 腹水诱导:注射杂交瘤细胞之前一两周,将用于诱导腹水的每只小鼠腹腔注射 IFA0.2mL/只,进行分笼并加强饲养管理。

[0074] (2) 扩大培养杂交瘤细胞株:检测到强阳性的上清抗体杂交瘤细胞扩大培养至对数生长期,并用作于诱导腹水。

[0075] (3) 注射杂交瘤细胞:收集对数生长期内的杂交瘤细胞于 $1000 \sim 1500r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 ~ 10min,弃上清,用约 0.5 ~ 1mL RPMI1640 无血清培养液重悬细胞,每只小鼠 i. p6 ~ 32×10^5 个杂交瘤细胞。

[0076] (4) 收集腹水:约 7 ~ 10 天后观察 Balb/c 小鼠腹部,有明显腹部肿胀者,用 12 号注射器针头穿刺腹腔下侧收取腹水并测定其效价,将于 -80℃ 备用。

[0077] 2.6 腹水效价和特异性检测

[0078] 腹水样品用 ELISA 及 SDS-PAEG 进行检测分析。

[0079] 2.7pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白单克隆抗体腹水交叉反应实验同

pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白多克隆抗体的检测。

[0080] 2. 8pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白单克隆抗体（腹水）纯化

[0081] 2. 9pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白单克隆抗体正辛硫 - 硫酸铵沉淀纯化

[0082] 实施例 3. 胶金体的制备

[0083] 1. 材料与方法

[0084] 1. 1 主要试剂 :HAuCl₄, 兔抗 pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白多克隆抗体, 柠檬酸三钠, 牛血清白蛋白 (BSA), 脱脂奶粉, PEG20000, K₂CO₃。

[0085] 1. 2 主要仪器 :高速冷冻离心机, 电子台秤, 气浴恒温振荡器, DK-SD 型电热恒温水槽, 紫外 - 可见分光光度计。

[0086] 1. 3 柠檬酸三钠还原法的胶体金制备

[0087] 胶体金的制备采取柠檬酸三钠还原法, 用 500mL 的烧杯, 加入 2. 4mL 1% 的 HAuCl₄ 于 240mL 蒸馏水中 (终浓度为 0. 01%), 分别分装于 6 个 80mL 烧杯中, 各 40mL。电磁炉加热至沸腾, 加入 1% 的柠檬酸三钠, 各为 0. 2mL、0. 4mL、0. 6mL、0. 8mL、1mL、1. 2mL (分别标记为 :1、2、3、4、5、6 号), 继续加热并搅拌, 用肉眼观察胶体金溶液颜色变化, 等溶液由黄变黑、紫、酒红色后再加热 5 ~ 10min。冷却至室温, 各样品用超纯水补足至 40mL, 继续加热 5min、冷却、补足超纯水, 重复三次。

[0088] 1. 4 胶体金紫外光扫描鉴定

[0089] 用紫外 - 可见分光光度计对 6 种不同胶体金在 400 ~ 700nm 波长下进行扫描, 获得胶体金吸收光谱, 并测定出最大吸收峰波的吸光值。据光谱的胶体金颗粒直径及分布特征, 制备不同直径胶体金颗粒, 对胶体金进行扫描, 获得胶体金最大吸收峰波长与粒径在 10 ~ 90nm 粒径范围内得出 $Y = 0. 4271X + 514. 56$ ($r = 0. 874$, $P < 0. 01$) 直线回归方程 (X 为颗粒粒径, Y 为最大吸收峰波长), 按 $Y = 0. 4271X + 514. 56$ 方程可算出各胶体金颗粒直径大小。再把 6 种不同的胶体金溶液静置于 4℃ 一段时间, 在不同的时间段检查胶体金溶液的颜色变化和颗粒沉淀情况, 选出一种较稳定的胶体金标记抗体用。

[0090] 1. 5 最适宜抗体蛋白结合量

[0091] 通过 Mey 氏稳定化试验方 :取 20mL 胶体金溶液用 0. 1mol/L K₂CO₃ 调节 pH 值, 用 14 个 1. 5mL EP 管分别取 1mL 胶体金溶液, 再用不同浓度的兔抗白 pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白多克隆抗体进行标记, 每种浓度的做 7 个样, 室温搅拌 30min 后加入 0. 1mL 10% NaCl 溶液, 室温静置一两小时, 观察胶体金 - 抗体溶液的颜色, 再进紫外分光光度扫描测定 520nm/580nm 的 OD 值, 选出制备金标抗最佳的抗体量。

[0092] 1. 6 抗体蛋白与胶体金结合最适宜 pH 值的选择

[0093] 通过 Mey 氏稳定化试验 :取 8 个 1. 5mL EP 管, 各加入 1mL 胶体金, 分别用 0. 1mol/L K₂CO₃ 调 pH 为 5、6、7、8、9、10、11、12 后, 每个 pH 做 7 样, 每管各加入浓度为 30 μg/ml 的兔抗 pSE380-ApxI-ApxIV 融合蛋白多克隆抗体 100 μL, 搅拌 30min 后各管分别加入 0. 1mL 10% NaCl 液体, 室温下静置 1 ~ 2h, 观察其颜色变化, 再用紫外分光光度计扫描测定各管 520nm/580nm 的 OD 值, 选出最佳制备金标抗的 pH 值。

[0094] 1. 7 抗体 - 胶体金复合物稳定剂的选择

[0095] 为了防止金标抗体在长时间内发生聚沉, 将标记好的金标抗体复合物分别选用 BSA、PEG20000 作稳定剂, 并比较它们之间使用的效果, 选择金标抗体发生沉淀最少的做为

本实验的稳定剂。其方法：用 3 个 1.5mL EP 管，分别加入 1mL 已配制好金标抗体溶液，分别加入稳定剂 10% BSA100 μ L；10% PEG20000100 μ L；10% BSA50 μ L+10% PEG2000050 μ L 放置一段时间，颜色仍保持红色，不聚沉或聚沉较少的为最佳稳定剂。

[0096] 1.8 胶体金复合物缓冲液的选择

[0097] 选用不同的缓冲液稀释已标记的抗体胶体金复合物，选出有利于保持胶体金复合物状态稳定的缓冲液，本实验选配制三种胶体金抗体缓冲液。比较这三种缓冲液的稳定性及胶体金颗粒聚沉情况，通过正交设计进行实验，选出最佳的胶体金-抗体复合物缓冲液。

[0098] 实施例 5 试纸条组成及临床应用

[0099] 1. 材料与方法

[0100] 1.1 血清型 1,5,9,10 和 11 型 APP 菌的毒素（本实验自己提取）

[0101] 1.2 主要试剂及耗材：硝酸纤维素膜（NC 膜）、玻璃纤维素膜、PVC 板等耗材。

[0102] 2. 实验方法

[0103] 2.1 斑点金免疫渗滤试验

[0104] 用斑点金免疫渗滤试验确定单克隆抗体及羊抗兔 IgG 包被量，用抗 pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白单克隆抗体做检测线（T）以及羊抗兔 IgG 做为质控线（C），用的 PBS（0.01mol/L pH7.4）缓冲液将抗体按 1：0 ~ 1：128 倍比数稀释，各取 2 μ L 点样于 0.45 微孔滤膜上，渗入滤膜后形成斑点。待抗体完全充分干燥。将滤膜浸泡于 5% 脱脂奶粉中，室温封闭 1 ~ 2h 后。用 PBST 洗膜 2 ~ 3 次，每次 3 ~ 5min。然后将洗好的滤膜用吸水滤纸吸干水，再放置一段时间使膜完全干燥后，滴加 pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白悬液（ 1×10^5 cfu $\cdot$ mL⁻¹）与金标抗体结合物，室温静置数分钟。待出现红色斑点为止。然后在室温下用 PBST 洗涤液振荡洗涤 4 次，每次 3 ~ 5min。

[0105] 2.2 分析膜预处理

[0106] NC 膜（分析膜）首先用 0.4% 的甘油浸泡半小时后，置于 37℃ 烘干箱中脱水干燥 2 小时以固定蛋白。

[0107] 2.3 分析膜封闭液的优化

[0108] 以 0.01mol/L PBS 缓冲体系配制 2 种不同的封闭液以不同的浓度（1%、2%、3%、4%、5% 脱脂奶粉，1%、2%、3%、4%、5% BSA）分别对分析膜封闭 1h，再滴加胶体金溶液，根据 NC 膜上背景显色情况选择封闭液。

[0109] 2.4 分析膜干燥方式选择

[0110] 将用 pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白单克隆抗体和羊抗兔 IgG 作分别 T 线和 C 线包被在 NC 膜上作为分析膜，经过封闭和洗涤处理后的 NC 膜，在其条件不变情况下，将它分别置 37℃、室温和 4℃ 干燥，观察显色变化。

[0111] 2.3 胶体金-抗体复合物结合垫的制备

[0112] 将玻璃纤维膜剪成规格大小一样的小块（0.7×10.0cm）作为结合垫，然后浸泡于胶体金-抗体溶液中 30min。室温自然干燥，观察结合垫上金标抗体状态。

[0113] 2.4 样品垫制备

[0114] 将玻璃纤维素膜（样品垫）剪切成 2×10cm 规格大小的条带；玻璃纤维素膜浸入预处理液中（0.01mol/L pH8.2 硼酸，0.5% BSA，0.1% Tween-20）于 4℃ 或 37℃ 孵育 1 ~ 2h 后，将玻璃纤维素膜取出置于烘箱中 37℃ 充分烘干，保存备用。

[0115] 2.5 分析膜的抗体包被

[0116] 将 NC 膜做剪成规格大小一致的 (2.5×10.0cm) 条带;膜从下向上 1cm 处,用移液枪点上抗 pSE380-ApxI 和 pSE380-ApxIV 融合蛋白的单克隆抗体 1 : 2 作为检测线 (T);离检测带 0.7cm 处点上羊抗鼠 1 : 6 作为质控线;然后将 NC 膜于烘箱中 37℃ 充分烘干,5% 脱脂奶粉中 37℃ 封闭 1 ~ 2h 或 4℃ 过夜,取出干燥保存备用。

[0117] 2.6 吸水垫制备

[0118] 用滤纸当作吸水垫,将它剪成规格大小一致 (0.5×2cm) 的条带,置于干燥的环境中保存备用。

[0119] 2.7 试纸条组装

[0120] 将已处理好的各种固相材料,依次粘附于有底板上,形成一个完整的试纸条,具体流程如下:

[0121] (1) 将有粘性底板剪成 0.5×10cm 规格大小一致的条带。

[0122] (2) 将分析膜黏于底板上 2 ~ 8cm 处位置,检测线在前,质控线在后。

[0123] (3) 将金标结合垫贴于粘性底板上 2cm 处位置,上端压于分析膜的上端。重叠 0.5cm。

[0124] (4) 将样品垫膜黏于底板上,下端压于金标结合垫的上端,重叠 1cm。

[0125] (5) 吸水垫膜黏于底板上,上端压于分析膜的下端,重叠 1cm。

[0126] (6) 装配成形的条带保存于干燥的环境中检测备用。

[0127] 2.8 试纸条检测阳性结果判定

[0128] 以本实验提取 ApxI 作为阳性对照,0.01mol/L PBS 缓冲液为阴性对照。临床鉴定的 APP 的血清样品点加在试纸条的样品垫中,待样品层析完毕后观察检测结果。在检测应区中,T 线及 C 线都显红色条带,则表示检测到目的菌株,则判为阳性;若只有 T 线处显红色条带,则未检测到目的菌株,则判为阴性;若 T 线不显红色条带,试纸条失效。

[0129] 2.9 试纸条灵敏度检测

[0130] 将提取好的 ApxI,稀释成不同浓度的液。各取 300 μL 点入试纸条,每个浓度重复 5 次,待样品层析完毕后观察检测结果。

[0131] 2.10 试纸条特异的性检测

[0132] 以猪放线杆菌、罗斯放线杆菌、猪扁桃体放线杆菌、大肠杆菌及多杀性巴氏杆菌感染后血清,用移液枪吸取 300 μL 点入试纸条的样品垫上,每个标本重复 3 次,待样品层析完毕后观察。

[0133] 最后应说明的是:显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之内。

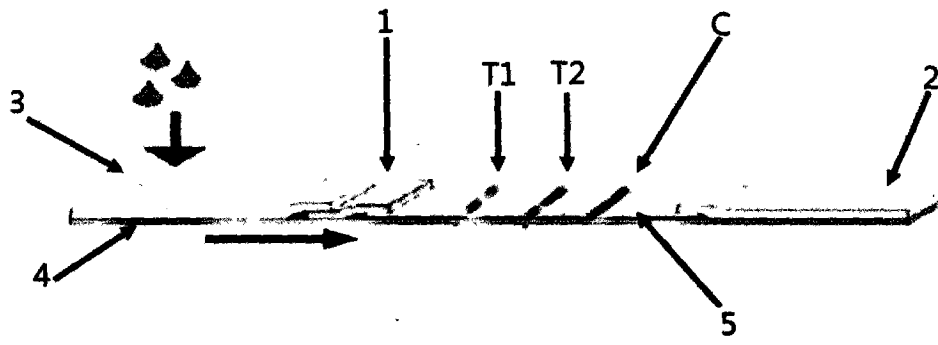


图 1

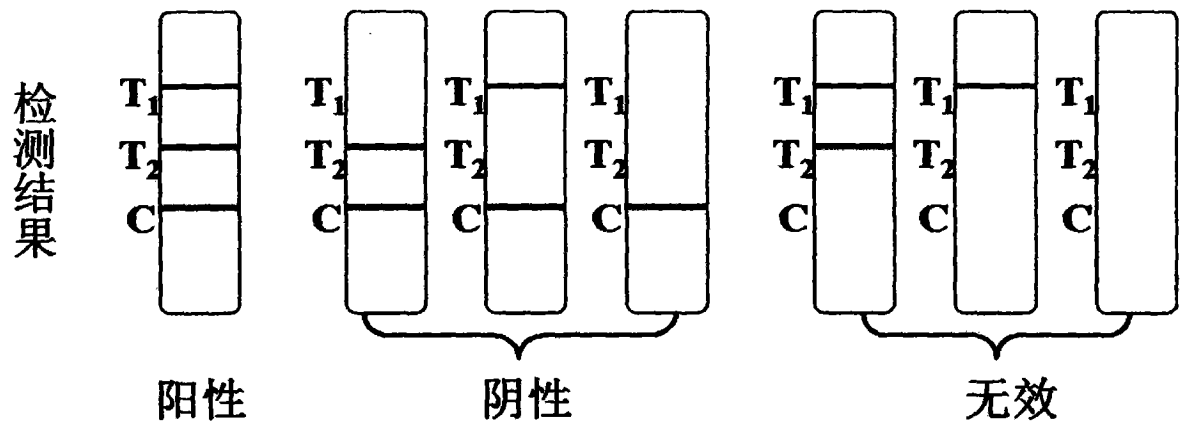


图 2

专利名称(译)	猪传染性胸膜肺炎放线杆菌快速诊断试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN103777018A	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201410030295.7	申请日	2014-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	江西农业大学		
申请(专利权)人(译)	江西农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	江西农业大学		
[标]发明人	刘平 胡国良 郭小权 曹华斌 刘佩 李麟 张彩英 黄爱民 罗军荣		
发明人	刘平 胡国良 郭小权 曹华斌 刘佩 李麟 张彩英 黄爱民 罗军荣		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/54386 G01N33/558 G01N2333/195		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了猪传染性胸膜肺炎放线杆菌外溶血毒素ApxI快速诊断试纸条的制备方法，涉及一种生物快速检测技术领域。包括分析膜(5)和金标抗体结合垫(1)，分析膜(5)上用抗放线杆菌外毒素ApxI/ApxIV单克隆抗体做为检测线1(T1)和检测线2(T2)以及羊抗兔IgG做为质控线(C)，金标抗体结合垫(1)上是p380-ApxI-ApxIV的融合蛋白抗兔多克隆抗体。本发明解决了现有技术中存在的检验速度慢、灵敏度低、操作复杂等问题。

