



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152501 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201810013771.2

(22)申请日 2018.01.08

(71)申请人 山东畜牧兽医职业学院

地址 261000 山东省潍坊市高新区胜利东  
街88号

申请人 潍坊科瑞斯生物科技有限公司

(72)发明人 胡士林 崔晓辰 郑建楠 李明群  
曹雷 马爱霞 崔尚金

(74)专利代理机构 北京卓特专利代理事务所  
(普通合伙) 11572

代理人 段宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

A群牛轮状病毒检测试剂盒和该病毒抗体胶  
体金试剂制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种A群牛轮状病毒检测试剂盒,包含试剂R1和试剂R2。本发明还涉及一种A群牛轮状病毒检测试剂盒的制备方法,包括烧制胶体金;将抗体与胶体金纳米颗粒偶联,得到偶联抗体的纳米金颗粒溶液;离心,沉淀用含稳定剂、防腐剂的缓冲液重悬,调整浓度。本发明具有较高的检测灵敏度和特异性,稳定性好,操作简单,反应时间短;适用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计,反应后不产生沉淀,便于反应杯清洗;本发明试剂盒与IPMA、ELISA、免疫荧光、免疫层析等方法对样本中BBoV检测数据统计分析,检测结果可靠,较胶乳法生产成本更低,具有较大的市场竞争力。

1.一种A群牛轮状病毒检测试剂盒,包含试剂R1和试剂R2,其特征在于:

所述试剂R1为pH 6.0-8.0的缓冲液,其包括稳定剂、高分子加速剂、表面活性剂和防腐剂;

所述试剂R2为A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂,其包括稳定剂、抗A群牛轮状病毒抗体纳米金颗粒、防腐剂和缓冲液。

2.根据权利要求1所述的A群牛轮状病毒检测试剂盒,其特征在于:

所述试剂R1的缓冲液包括醋酸盐缓冲液、氯化铵缓冲液、磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷TRIS缓冲液、硼砂-氢氧化钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、3-(N-吗啉)丙磺酸MOPS缓冲液、3-(环己胺)-2-羟基-1-丙磺酸CAPSO缓冲液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES缓冲液中的一种或几种。

3.根据权利要求1所述的A群牛轮状病毒检测试剂盒,其特征在于:

所述试剂R1的稳定剂包括亚氨基二乙酸、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠、二乙烯三胺五乙酸钠、1,2-环己二醇缩水甘油、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇和牛血清蛋白中的一种或几种;

所述试剂R1的防腐剂包括叠氮钠、苯酚、Proclin、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种;

所述试剂R1的高分子加速剂包括脂肪醇聚氧乙烯醚、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸钠、聚乙二醇、羟丙基甲基纤维素和羟甲基纤维素钠中的一种或几种;

所述试剂R1的表面活性剂包括Triton系列、Tween系列、月桂醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯壬基苯基醚和聚氧乙烯辛基苯基醚中的一种或几种。

4.根据权利要求3所述的A群牛轮状病毒检测试剂盒,其特征在于:

所述试剂R1的稳定剂为质量体积比0.2-2% 的牛血清蛋白BSA;

所述试剂R1的高分子加速剂为质量体积比0.2-0.5% 的聚乙二醇PEG8000;

所述试剂R1的防腐剂为质量体积比0.1-0.5%的Proclin300;

所述试剂R1的表面活性剂为质量体积比0.05-0.1% Tween20;

所述试剂R1的缓冲液为pH6.0-8.0的磷酸盐缓冲液。

5.根据权利要求1所述的A群牛轮状病毒检测试剂盒,其特征在于:

所述试剂R2的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、硼酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris-Cl缓冲液、HEPS缓冲液中的一种或多种;

所述试剂R2的稳定剂包括小牛血清、BSA、脱脂乳、明胶、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇、甲醇、乙醇、乙二醇、丙三醇、Triton、Tween一种或几种;

所述试剂R2的防腐剂包括叠氮钠、苯酚、Proclin、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种;

所述试剂R2的抗A群牛轮状病毒抗体包括鼠抗A群BRoV单克隆抗体、羊抗A群BRoV多克隆抗体、兔抗A群BRoV多克隆抗体、鸡抗A群BRoV单克隆抗体一种或多种混合。

6.根据权利要求5所述的A群牛轮状病毒检测试剂盒,其特征在于:

所述试剂R2的稳定剂为质量体积比10-20%蔗糖、质量体积比0.5-2% BSA和质量体积比3-10%甘油;

所述试剂R2的抗A群牛轮状病毒抗体纳米金颗粒为标记有鼠抗A群BRoV单克隆抗体的

粒径为 $60\pm1.5\text{nm}$ 的金纳米颗粒；

所述试剂R2的防腐剂为质量体积比0.1-0.5%的Proclin300；

所述试剂R2的缓冲液为pH6.0-8.0的磷酸盐缓冲液；

金纳米颗粒与抗体质量比为1:0.8-1:1.6。

7. 一种A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂的制备方法，其特征是包括以下步骤：

步骤1) 烧制胶体金；

步骤2) 将抗体与胶体金纳米颗粒偶联，得到偶联抗体的纳米金颗粒溶液；

步骤3) 离心，沉淀用含稳定剂、防腐剂的缓冲液重悬，调整浓度至 $OD_{540\text{nm}}$ 为0.2。

8. 根据权利要求7所述的A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂的制备方法，其特征是所述步骤1)具体的包括：

步骤1.1) 配制1%氯金酸溶液，将1g氯金酸加入100mL超纯水中，4℃避光保存备用；

步骤1.2) 配制1%柠檬酸三钠溶液，将1g柠檬酸三钠溶于100mL超纯水中，备用；

步骤1.3) 在清洗干净的圆底烧瓶中加超纯水100mL，放入磁力搅拌子1枚，加入1%氯金酸溶液1mL, 600rpm高速搅拌并加热至溶液沸腾，迅速加入1%柠檬酸三钠溶液1.5mL，继续加热和搅拌10min，溶液颜色先变黑后变红，停止加热并继续搅拌10min，然后停止搅拌恢复至室温并用超纯水恢复至100mL；制得胶体金溶液，超滤去掉小分子备用。

9. 根据权利要求7所述的A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂的制备方法，其特征是所述步骤2)具体的包括：

步骤2.1) 利用抗A群牛轮状病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株，以体内诱生腹水的方式制备抗体；

步骤2.2) 用Protein G柱进行纯化，0.01M PBS、pH7.2、4℃透析过夜，12000rpm、4℃离心30min，收集上清即得A群牛轮状病毒单克隆抗体，用紫外分光光度计或蛋白分析仪测定得出抗体浓度；

步骤2.3) 取100mL胶体金溶液，用1% K2CO3调节pH至7.5-10.0，按最适蛋白量缓慢加入A群牛轮状病毒单克隆抗体，在磁力搅拌器下反应10min，加入BSA溶液至最终浓度为1%，继续搅拌5min，得到A群牛轮状病毒单克隆抗体金标复合物，4℃过夜。

10. 根据权利要求7所述的A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂的制备方法，其特征是所述步骤3)具体的包括：

步骤3.1) 将A群牛轮状病毒单克隆抗体金标复合物以3000rpm离心30min；

步骤3.2) 去除聚合凝集杂质，再以12000rpm、4℃离心30min，弃上清，用重悬液(1%BSA+0.01MPBS)复溶，重复洗涤3次；

步骤3.3) 收集沉淀，用质量体积比20%蔗糖、质量体积比2% BSA、质量体积比10%甘油、质量体积比0.5%的Proclin300作为稳定剂的0.01M的PBS缓冲液重悬沉淀，调整浓度至 $OD_{540\text{nm}}$ 为0.2，分装备用。

## A群牛轮状病毒检测试剂盒和该病毒抗体胶体金试剂制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体的说是一种A群牛轮状病毒检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 轮状病毒是各种幼龄动物和婴幼儿病毒性腹泻的病原之一。1968年Mebus等人在美国阿拉斯加州一农场犊牛腹泻粪便中首次发现牛轮状病毒(Bovine rotavirus,BRoV),以后在欧洲、美洲、澳大利亚、新西兰、日本等都发现了由牛轮状病毒引起的犊牛腹泻。

[0003] BRoV属于呼肠孤病毒科轮状病毒属的双链RNA病毒,BRoV感染时引起犊牛爆发肠道机能紊乱的一种急性肠道传染病,以呕吐、腹泻、脱水和酸碱平衡紊乱为主要特征,给养牛业带来严重的危害。BRoV病毒粒子略呈圆形,具有双层衣壳,直径65-75nm。中央是一个电子致密六角形核心,为RV的芯髓,直径37-40nm;芯髓周围绕有一个电子透明层,壳粒由此向外呈辐射状排列,构成内衣壳;外周是一层由光滑薄膜构成的外衣壳,厚约20nm,是在内质网膜上芽生时获得的。以核心为毂,以呈辐射状排列的内衣壳为轮辐,以外衣壳为辋,构成特征性的轮状结构。电子显微镜水平下可以对轮状病毒与呼肠孤病毒加以区分。电子显微镜观察发现,轮状病毒的内衣壳壳粒为棍棒状,向外呈辐射状排列,外周为一层由光滑薄膜构成的外衣壳,故而病毒粒子表面光滑;相反,呼肠孤病毒内衣壳的壳粒接近球形或呈短棱柱状,外衣壳的壳粒清楚可见,故整个病毒的表面呈粗糙颗粒状。此外,轮状病毒的核心小于呼肠孤病毒的核心。

[0004] BRoV存在多种血清型,我国牛群中轮状病毒感染以A群为主,在A群BRoV中VP6蛋白是群抗原,在各毒株中高度保守。我国BRoV的诊断主要依赖于实验室的常规诊断,这些常规的诊断技术有其优点,但也有其固有的缺点。成本高、需要特殊的昂贵的仪器、需要特殊技术人员、存在有害物质等因素影响了对BRoV的及时诊断,尤其是对BRoV的现地诊断,从而也影响了对BRoV的及时预防和治疗。

[0005] 随着单克隆抗体技术的发展和全自动生化分析仪、蛋白分析仪的普及,免疫比浊技术已经发展出多种快速免疫比浊检测技术,已被广泛应用于临床诊断、生物材料分析的等技术实践中。

[0006] 纳米颗粒增强比浊法(Particle-enhanced turbidimetric immunoassay,PETIA)是一种较为稳定、准确的均相免疫比浊检测方法。

[0007] PETIA法大体分为两种:一种是散射比浊检测法,另一种是透射比浊检测法。这两种方法的基本原理非常相似,都是在高分子纳米微球的表面交联单克隆抗体,当交联有抗体的微球与抗原结合后,在短时间内会迅速聚集在一起,改变了反应液的散光性能或透光性能。而且,反应液散光性能或透光性能(即吸光度)的改变与被测抗原的浓度有较强的相关性,在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。

[0008] PETIA检测方法是在均相反应体系中进行抗原、抗体反应及结果的测定。抗原、抗

体反应后,直接测定反应液的吸光度值,省却了ELISA法反复孵育和洗板等烦琐操作步骤,几分钟就能获得结果,省时省力。

[0009] 此外,PETIA操作步骤的简化也相应地避免了许多人为操作因素和试剂、环境等外界因素的干扰,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的存在情况。纳米级粒子的推出解决了对单克隆抗体结合的能力不强,临床检测的线性范围窄,干扰因素多,实验稳定性差等问题,大大促进了免疫比浊法在临床上的广泛应用。

## 发明内容

[0010] 本发明要解决的第一个技术问题是提供一种A群牛轮状病毒检测试剂盒,该检测试剂盒具有较高的检测灵敏度和特异性,稳定性好,操作简单,反应时间短;可适用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计,反应后不产生沉淀,便于反应杯清洗。

[0011] 本发明要解决的第二个技术问题是提供一种A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂的制备方法,该方法不需要预处理样本,操作简便、准确可靠、重复性好,可用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计上使用。

[0012] 为解决第一个技术问题,本发明提供了一种A群牛轮状病毒检测试剂盒,包含试剂R1和试剂R2;所述试剂R1为pH 6.0-8.0的缓冲液,其包括稳定剂、高分子加速剂、表面活性剂和防腐剂;所述试剂R2为A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂,其包括稳定剂、抗A群牛轮状病毒抗体纳米金颗粒、防腐剂和缓冲液。

[0013] 进一步地,所述试剂R1的缓冲液包括醋酸盐缓冲液、氯化铵缓冲液、磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷TRIS缓冲液、硼砂-氢氧化钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、3-(N-吗啉)丙磺酸MOPS缓冲液、3-(环己胺)-2-羟基-1-丙磺酸CAPSO缓冲液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES缓冲液中的一种或几种。

[0014] 进一步地,所述试剂R1的稳定剂包括亚氨基二乙酸、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠、二乙烯三胺五乙酸钠、1,2-环己二醇缩水甘油、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇和牛血清蛋白中的一种或几种;所述试剂R1的防腐剂包括叠氮钠、苯酚、Proclin、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种;所述试剂R1的高分子加速剂包括脂肪醇聚氧乙烯醚、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸钠、聚乙二醇、羟丙基甲基纤维素和羟甲基纤维素钠中的一种或几种;所述试剂R1的表面活性剂包括Triton系列、Tween系列、月桂醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯壬基苯基醚和聚氧乙烯辛基苯醚中的一种或几种。

[0015] 优选的,所述试剂R1的稳定剂为质量体积比0.2-2% 的牛血清蛋白BSA;所述试剂R1的高分子加速剂为质量体积比0.2-0.5% 的聚乙二醇PEG8000;所述试剂R1的防腐剂为质量体积比0.1-0.5%的Proclin300;所述试剂R1的表面活性剂为质量体积比0.05-0.1% Tween20;所述试剂R1的缓冲液为pH6.0-8.0的磷酸盐缓冲液。

[0016] 进一步地,所述试剂R2的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、硼酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris-C1缓冲液、HEPS缓冲液中的一种或多种;所述试剂R2的稳定剂包括小牛血清、BSA、脱脂乳、明胶、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇、甲醇、乙醇、乙二醇、丙三醇、Triton、Tween一种或几种;所述试剂R2的防腐剂包括叠氮钠、苯酚、Proclin、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种;所述试剂R2的抗A群牛轮状病毒抗体包括鼠抗A

群B<sub>R</sub>oV单克隆抗体、羊抗A群B<sub>R</sub>oV多克隆抗体、兔抗A群B<sub>R</sub>oV多克隆抗体、鸡抗A群B<sub>R</sub>oV单克隆抗体一种或多种混合。

[0017] 优选的，所述试剂R2的稳定剂为质量体积比10-20%蔗糖、质量体积比0.5-2% BSA和质量体积比3-10%甘油；所述试剂R2的抗A群牛轮状病毒抗体纳米金颗粒为标记有鼠抗A群B<sub>R</sub>oV单克隆抗体的粒径为60±1.5nm的金纳米颗粒；所述试剂R2的防腐剂为质量体积比0.1-0.5%的Proclin300；所述试剂R2的缓冲液为pH6.0-8.0的磷酸盐缓冲液。金纳米颗粒与抗体质量比为1:0.8-1:1.6。

[0018] 为解决第二个技术问题，本发明提供一种A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂的制备方法，该方法包括如下步骤：步骤1) 烧制胶体金；步骤2) 将抗体与胶体金纳米颗粒偶联，得到偶联抗体的纳米金颗粒溶液；步骤3) 离心，沉淀用含稳定剂、防腐剂的缓冲液重悬，调整浓度至OD<sub>540nm</sub>为0.2。

[0019] 其中，步骤1) 具体的包括：步骤1.1) 配制1%氯金酸溶液，将1g氯金酸加入100mL超纯水中，4℃避光保存备用；步骤1.2) 配制1%柠檬酸三钠溶液，将1g柠檬酸三钠溶于100mL超纯水中，备用；步骤1.3) 在清洗干净的圆底烧瓶中加超纯水100mL，放入磁力搅拌子1枚，加入1%氯金酸溶液1mL，600rpm高速搅拌并加热至溶液沸腾，迅速加入1%柠檬酸三钠溶液1.5mL，继续加热和搅拌10min，溶液颜色先变黑后变红，停止加热并继续搅拌10min，然后停止搅拌恢复至室温并用超纯水恢复至100mL；制得胶体金溶液，超滤去掉小分子备用。

[0020] 步骤2) 具体的包括：步骤2.1) 利用抗A群牛轮状病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株，以体内诱生腹水的方式制备抗体；步骤2.2) 用Protein G柱进行纯化，0.01M PBS、pH7.2、4℃透析过夜，12000rpm、4℃离心30min，收集上清即得A群牛轮状病毒单克隆抗体，用紫外分光光度计或蛋白分析仪测定OD<sub>280nm</sub>得出抗体浓度；步骤2.3) 取100mL胶体金溶液，用1%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节pH至7.5-10.0，按最适蛋白量缓慢加入A群牛轮状病毒单克隆抗体，在磁力搅拌器下反应10min，加入BSA溶液至最终浓度为1%，继续搅拌5min，得到A群牛轮状病毒单克隆抗体胶体金复合物，4℃过夜。

[0021] 步骤3) 具体的包括：步骤3.1) 将A群牛轮状病毒单克隆抗体胶体金复合物以3000rpm离心30min；步骤3.2) 去除聚合凝集杂质，再以12000rpm、4℃离心30min，弃上清，用重悬液(1%BSA+0.01MPBS)复溶，重复洗涤3次；步骤3.3) 收集沉淀，用质量体积比20%蔗糖、质量体积比2% BSA、质量体积比10%甘油、质量体积比0.5%的Proclin300作为稳定剂的0.01M的PBS缓冲液(pH7.2)重悬沉淀，调整浓度至OD<sub>540nm</sub>为0.2，分装备用。

[0022] 本发明产生了如下有益效果：

1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度和特异性，稳定性好，操作简单，反应时间短，从检测导出结果最多只需10min；

2) 本发明试剂盒可适用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计，反应后不产生沉淀，便于反应杯清洗；

3) 本发明试剂盒与IPMA、ELISA、免疫荧光、免疫层析等方法对样本中B<sub>R</sub>oV检测数据统计分析，无显著差异，检测结果可靠，同时较胶乳法生产成本更低，具有较大的市场竞争力；

4) 通过纳米金颗粒标记的A群牛轮状病毒抗体与待检样本反应前后溶液的浊度变化判断A群牛轮状病毒的存在与否。该方法不需要预处理样本，操作简便、准确可靠、重复性好，可用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计上使用。

## 具体实施方式

[0023] 本发明提供了一种A群牛轮状病毒检测试剂盒，其包含试剂R1和试剂R2。试剂R1为pH 6.0-8.0的缓冲液，其包括稳定剂、高分子加速剂、表面活性剂和防腐剂；所述试剂R2为A群牛轮状病毒抗体胶体金试剂，其包括稳定剂、抗A群牛轮状病毒抗体纳米金颗粒、防腐剂和缓冲液。

[0024] 其中，试剂R1的缓冲液包括醋酸盐缓冲液、氯化铵缓冲液、磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷TRIS缓冲液、硼砂-氢氧化钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、3-(N-吗啉)丙磺酸MOPS缓冲液、3-(环己胺)-2-羟基-1-丙磺酸CAPSO缓冲液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES缓冲液中的一种或几种。试剂R1的稳定剂包括亚氨基二乙酸、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠、二乙烯三胺五乙酸钠、1,2-环己二醇缩水甘油、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇和牛血清蛋白中的一种或几种；试剂R1的防腐剂包括叠氮钠、苯酚、Proclin、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种；所述试剂R1的高分子加速剂包括脂肪醇聚氧乙烯醚、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸钠、聚乙二醇、羟丙基甲基纤维素和羟甲基纤维素钠中的一种或几种；所述试剂R1的表面活性剂包括Triton系列、Tween系列、月桂醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯壬基苯基醚和聚氧乙烯辛基苯基醚中的一种或几种。

[0025] 作为一种优选方案，本发明的试剂R1的稳定剂为质量体积比0.2-2%的牛血清白蛋白BSA；所述试剂R1的高分子加速剂为质量体积比0.2-0.5%的聚乙二醇PEG8000；所述试剂R1的防腐剂为质量体积比0.1-0.5%的Proclin300；所述试剂R1的表面活性剂为质量体积比0.05-0.1% Tween20；

所述试剂R2的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、硼酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris-CI缓冲液、HEPS缓冲液中的一种或多种；所述试剂R2的稳定剂包括小牛血清、BSA、脱脂乳、明胶、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇、甲醇、乙醇、乙二醇、丙三醇、Triton、Tween一种或几种；所述试剂R2的防腐剂包括叠氮钠、苯酚、Proclin、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种；所述试剂R2的抗A群牛轮状病毒抗体包括鼠抗A群BRoV单克隆抗体、羊抗A群BRoV多克隆抗体、兔抗A群BRoV多克隆抗体、鸡抗A群BRoV单克隆抗体一种或多种混合。

[0026] 作为一种优选方案，试剂R2的稳定剂为质量体积比10-20%蔗糖、质量体积比0.5-2% BSA和质量体积比3-10%甘油；所述试剂R2的抗A群牛轮状病毒抗体纳米金颗粒为标记有鼠抗A群BRoV单克隆抗体的粒径为 $60 \pm 1.5\text{nm}$ 的金纳米颗粒；所述试剂R2的防腐剂为质量体积比0.1-0.5%的Proclin300；所述试剂R2的缓冲液为pH6.0-8.0的磷酸盐缓冲液。金纳米颗粒与抗体质量比为1:0.8-1:1.6。

[0027] 其中，试剂R2为群牛轮状病毒抗体胶体金试剂，本发明提供一种试剂R2的制备方法该方法包括如下步骤：步骤1) 烧制胶体金；步骤2) 将抗体与胶体金纳米颗粒偶联，得到偶联抗体的纳米金颗粒溶液；步骤3) 离心，沉淀用含稳定剂、防腐剂的缓冲液重悬，调整浓度至 $OD_{540\text{nm}}$ 为0.2。

[0028] 其中，步骤1)具体的包括：步骤1.1)配制1%氯金酸溶液，将1g氯金酸加入100mL超纯水中，4℃避光保存备用；步骤1.2)配制1%柠檬酸三钠溶液，将1g柠檬酸三钠溶于100mL超纯水中，备用；步骤1.3)在清洗干净的圆底烧瓶中加超纯水100mL，放入磁力搅拌子1枚，加

入1%氯金酸溶液1mL,600rpm高速搅拌并加热至溶液沸腾,迅速加入1%柠檬酸三钠溶液1.5mL,继续加热和搅拌10min,溶液颜色先变黑后变红,停止加热并继续搅拌10min,然后停止搅拌恢复至室温并用超纯水恢复至100mL;制得胶体金溶液,超滤去掉小分子备用。

[0029] 步骤2)具体的包括:步骤2.1)利用抗A群牛轮状病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株,以体内诱生腹水的方式制备抗体;步骤2.2)用Protein G柱进行纯化,0.01M PBS、pH7.2、4℃透析过夜,12000rpm、4℃离心30min,收集上清即得A群牛轮状病毒单克隆抗体,用紫外分光光度计或蛋白分析仪测定 $OD_{280nm}$ 得出抗体浓度;步骤2.3)取100mL胶体金溶液,用1%**K2CO3**调pH至7.5-10.0,按最适蛋白量缓慢加入A群牛轮状病毒单克隆抗体,在磁力搅拌器下反应10min,加入BSA溶液至最终浓度为1%,继续搅拌5min,得到A群牛轮状病毒单克隆抗体金标复合物,4℃过夜。

[0030] 步骤3)具体的包括:步骤3.1)将A群牛轮状病毒单克隆抗体金标复合物以3000rpm离心30min;步骤3.2)去除聚合凝集杂质,再以12000rpm、4℃离心30min,弃上清,用重悬液(1%BSA+0.01MPBS)复溶,重复洗涤3次;步骤3.3)收集沉淀,用质量体积比20%蔗糖、质量体积比2% BSA、质量体积比10%甘油、质量体积比0.5%的Proclin300作为稳定剂的0.01M的PBS缓冲液(pH7.2)重悬沉淀,调整浓度至 $OD_{540nm}$ 为0.2,分装备用。

[0031] 本发明的检测原理是利用抗原抗体反应,先加入试剂R1,使样本中抗原位点暴露,若待测样本中存在A群BRoV,则加入试剂2后,金标抗BRoV抗体与BRoV抗原反应形成不溶的抗原抗体复合物,从而产生一定浊度变化;若待测样本中不存在A群BRoV,则加入试剂2反应后溶液浊度不变,从而判断待测样本中A群牛轮状病毒的存在与否。

[0032] 其中,纳米金颗粒以类似胶体状态存在,又称为胶体金。本发明所提供基于胶体金免疫比浊法的A群BRoV检测试剂盒中,试剂R1是一种促使抗原位点暴露促进抗原抗体反应的缓冲液,可以使用如表成分所示缓冲液。

磷酸二氢钠	0.286g
磷酸氢二钠	2.865g
BSA	2g
PEG8000	0.5g
Proclin300	0.5g
Tween-20	0.1g
纯水	100mL

[0033]

作为一种具体实施方式,A群牛轮状病毒检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

1.60nm胶体金制备过程

所需玻璃器皿用重铬酸钾浓硫酸洗液浸泡48h,自来水冲洗,洗洁精洗涤干净,自来水冲洗10遍,蒸馏水冲洗3遍,蒸馏水浸泡24h后用去离子水冲洗3遍,烘箱烘干备用;

1%氯金酸溶液配置:1g氯金酸加入100mL超纯水中,4℃避光保存备用;

1%柠檬酸三钠溶液配置:1g柠檬酸三钠溶于100mL超纯水中;

在清洗干净的1000mL圆底烧瓶中加超纯水100mL,放入磁力搅拌子1枚,加入1%氯金酸溶液1mL,600rpm高速搅拌并加热至溶液沸腾,迅速加入1%柠檬酸三钠溶液1.5mL,继续加热和搅拌10min,溶液颜色先变黑后变红,停止加热并继续搅拌10min,然后停止搅拌恢复至室

温并用超纯水恢复至100mL。电镜观察制得的胶体金粒径约为 $40\pm1.2\text{nm}$ ,超滤去掉小分子备用。

#### [0034] 2. 试剂R2制备过程

A群牛轮状病毒单克隆抗体制备:利用抗A群牛轮状病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株,以体内诱生腹水的方式大量制备抗体,用Protein G柱进行纯化,0.01M PBS(pH7.2)4℃透析过夜,12000rpm 4℃离心30min,收集上清即得A群牛轮状病毒单克隆抗体,用紫外分光光度计或蛋白分析仪测定OD280nm得出抗体浓度;

100mL胶体金溶液用1% K2CO3调节pH至9.6,按最适蛋白量缓慢加入A群牛轮状病毒单克隆抗体,在磁力搅拌器下反应10min,加入BSA溶液至终浓度为1%,继续搅拌5min,即得A群牛轮状病毒单克隆抗体检复合物,4℃过夜;

次日,3000rpm离心30min,去除聚合凝集杂质,再于12000rpm 4℃离心30min,弃上清,用重悬液(1%BSA+0.01MPBS)复溶,重复洗涤3次;

收集沉淀,用质量体积比20%蔗糖、质量体积比2% BSA、质量体积比10%甘油、质量体积比0.5%的Proclin300作为稳定剂的0.01M的PBS缓冲液(pH7.2)重悬沉淀,调整浓度至OD540nm为0.2,分装备用。

#### [0035] 试剂盒检测样本操作方法:

基于胶体金免疫比浊的A群牛轮状病毒检测试剂盒使用方法如下(日立7180全自动生化分析仪)

待测样本准备:现场用一次性取样勺取新鲜的呕吐物或粪便装入无菌采样管中,称取1g溶于1ml样品稀释液中,4℃ 3000rpm离心15min取上清至于冰盒中备用;

测定波长:主波长:540nm,副波长800nm;

试剂比例:R1:S:R2=200uL:10uL:60uL;

读点方式:在先加入试剂R1再加入样品S,反应5min后加入试剂R2,3s后读取吸光度A1,反应5min后读取吸光度A2,计算吸光度变化。

#### [0036] 试剂盒试验结果分析:

##### (1) 临界值及检测限确定

参考值以临界值为依据,样本中A群BRoV的存在与否是通过样本吸光度值与临界值之间的比较来判定的。

[0037] 结果的判定:待测样本OD值 $\geqslant$ CUT OFF值时,判为A群BRoV阳性;反之,为阴性。

[0038] 采用21份5%BSA溶液作为阴性样本,用本试剂盒进行检测,记录检测结果,见表1。计算20次结果的均值 $\bar{X}$ 与标准差SD,以均值加3倍标准差作为报告方法的临界值(CUT OFF= $\bar{X}+3SD$ )。

[0039] 其OD值中最小为0.179,最大为0.363,△为0.256,SD为0.048,CUT OFF=0.400,即当检测样本OD值 $\geqslant$ 0.4时判定为阳性。

#### [0040] 表1 阴性样本检测OD值

样本	OD值	样本	OD值	样本	OD值
1	0.287	8	0.228	15	0.238
2	0.321	9	0.275	16	0.235
3	0.288	10	0.189	17	0.214

4	0.309	11	0.185	18	0.276
5	0.363	12	0.212	19	0.299
6	0.247	13	0.283	20	0.198
7	0.279	14	0.211	21	0.274

将纯化后的浓度为100ng/mL的A群BRoV按照7个梯度倍比稀释后进行检测(50ng/mL、25ng/mL、12.5 ng/mL、6.25 ng/mL、3.12 ng/mL、1.58 ng/mL、0.79 ng/mL)。结果显示,本发明检测试剂盒具有较高的灵敏度,最低检测限为1.58ng/mL。

[0041] (2) 交叉反应检测

将牛轮状病毒、牛病毒性腹泻、产肠毒素大肠杆菌K88/K99/987P/F18粗体样品对其进行检测,根据测得的OD值比较待测样品的P/N值。结果表明,牛病毒性腹泻和大肠杆菌检测OD值均小于C0值0.4,同时P/N值均小于2.1,而牛轮状病毒OD值为2.568,P/N值为10.8(见表2)。表明本发明检测试剂盒特异性良好。

[0042] 表2 交叉反应结果

待测抗原	OD值	P/N值
BRoV	2.169	8.87
K88	0.276	1.16
K99	0.366	1.06
987P	0.339	1.11
F18	0.241	1.76
BDV-MD	0.339	1.15

(3) 不精密度分析

包括批内不精密度和批间不精密度的检测。

[0043] 批内不精密度:连续重复测定BRoV阳性样本10次,操作按说明书进行,计算测定结果的平均值 $\bar{X}$ 、标准偏差SD以及变异系数CV,结果见表3。

[0044] 批间不精密度包括不同批次试剂及不同检测时间的不精密度检测。取3批检测试剂盒分别在不同时间(初检、第3天、第6天)检测BRoV阳性样本10次,共重复3次,计算出平均值 $\bar{X}$ 、标准偏差SD以及变异系数CV等,结果见表3。结果表明,本发明检测试剂盒批内、批间不精密度CV值均低于15%。

[0045] 表3 批内、批间不精密度检测结果

时间	批次	$\bar{x}$	SD	CV
初检	第一批	<b>1.036</b>	<b>0.113</b>	<b>10.9%</b>
	第二批	<b>1.048</b>	<b>0.050</b>	<b>4.8%</b>
	第三批	<b>1.113</b>	<b>0.063</b>	<b>5.7%</b>
第3天	第一批	<b>1.075</b>	<b>0.078</b>	<b>7.3%</b>
	第二批	<b>1.097</b>	<b>0.100</b>	<b>9.1%</b>
	第三批	<b>1.061</b>	<b>0.056</b>	<b>5.3%</b>
第6天	第一批	<b>1.090</b>	<b>0.078</b>	<b>7.2%</b>
	第二批	<b>1.087</b>	<b>0.077</b>	<b>7.1%</b>
	第三批	<b>1.032</b>	<b>0.051</b>	<b>4.9%</b>
<b>合计</b>		<b>1.088</b>	<b>0.095</b>	<b>8.7%</b>

本发明产生了如下有益效果：

- 1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度和特异性,稳定性好,操作简单,反应时间短,从检测导出结果最多只需10min;
  - 2) 本发明试剂盒可适用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计,反应后不产生沉淀,便于反应杯清洗;
  - 3) 本发明试剂盒与IPMA、ELISA、免疫荧光、免疫层析等方法对样本中B<sub>RoV</sub>检测数据统计分析,无显著差异,检测结果可靠,同时较胶乳法生产成本更低,具有较大的市场竞争力;
  - 4) 通过纳米金颗粒标记的A群牛轮状病毒抗体与待检样本反应前后溶液的浊度变化判断A群牛轮状病毒的存在与否。该方法不需要预处理样本,操作简便、准确可靠、重复性好,可用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计上使用。
- [0046] 综上所述,本发明不限于上述具体实施方式。本领域技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的前提下,可做若干的更改或修饰。上述更改或修饰均落入本本发明的保护范围。

专利名称(译)	A群牛轮状病毒检测试剂盒和该病毒抗体胶体金试剂制备方法																																																			
公开(公告)号	<a href="#">CN108152501A</a>	公开(公告)日	2018-06-12																																																	
申请号	CN201810013771.2	申请日	2018-01-08																																																	
[标]申请(专利权)人(译)	山东畜牧兽医职业学院																																																			
申请(专利权)人(译)	山东畜牧兽医职业学院																																																			
当前申请(专利权)人(译)	山东畜牧兽医职业学院																																																			
[标]发明人	胡士林 崔晓辰 郑建楠 李明群 曹雷 马爱霞 崔尚金																																																			
发明人	胡士林 崔晓辰 郑建楠 李明群 曹雷 马爱霞 崔尚金																																																			
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531																																																			
代理人(译)	段宇																																																			
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>																																																			
摘要(译)	<p>本发明涉及一种A群牛轮状病毒检测试剂盒，包含试剂R1和试剂R2。本发明还涉及一种A群牛轮状病毒检测试剂盒的制备方法，包括烧制胶体金；将抗体与胶体金纳米颗粒偶联，得到偶联抗体的纳米金颗粒溶液；离心，沉淀用含稳定剂、防腐剂的缓冲液重悬，调整浓度。本发明具有较高的检测灵敏度和特异性，稳定性好，操作简单，反应时间短；适用于全自动生化分析仪、特种蛋白仪及分光光度计，反应后不产生沉淀，便于反应杯清洗；本发明试剂盒与IPMA、ELISA、免疫荧光、免疫层析等方法对样本中BRoV检测数据统计分析，检测结果可靠，较胶乳法生产成本更低，具有较大的市场竞争力。</p>																																																			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">时间</th> <th style="text-align: center;">批次</th> <th style="text-align: center;"><math>\bar{x}</math></th> <th style="text-align: center;">SD</th> <th style="text-align: center;">CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3" style="text-align: center; vertical-align: middle;">初检</td><td style="text-align: center;">第一批</td><td style="text-align: center;">1.036</td><td style="text-align: center;">0.113</td><td style="text-align: center;">10.9%</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">第二批</td><td style="text-align: center;">1.048</td><td style="text-align: center;">0.050</td><td style="text-align: center;">4.8%</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">第三批</td><td style="text-align: center;">1.113</td><td style="text-align: center;">0.063</td><td style="text-align: center;">5.7%</td></tr> <tr> <td rowspan="3" style="text-align: center; vertical-align: middle;">第3天</td><td style="text-align: center;">第一批</td><td style="text-align: center;">1.075</td><td style="text-align: center;">0.078</td><td style="text-align: center;">7.3%</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">第二批</td><td style="text-align: center;">1.097</td><td style="text-align: center;">0.100</td><td style="text-align: center;">9.1%</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">第三批</td><td style="text-align: center;">1.061</td><td style="text-align: center;">0.056</td><td style="text-align: center;">5.3%</td></tr> <tr> <td rowspan="3" style="text-align: center; vertical-align: middle;">第6天</td><td style="text-align: center;">第一批</td><td style="text-align: center;">1.090</td><td style="text-align: center;">0.078</td><td style="text-align: center;">7.2%</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">第二批</td><td style="text-align: center;">1.087</td><td style="text-align: center;">0.077</td><td style="text-align: center;">7.1%</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">第三批</td><td style="text-align: center;">1.032</td><td style="text-align: center;">0.051</td><td style="text-align: center;">4.9%</td></tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right; padding-right: 10px;">合计</td><td style="text-align: center;">1.088</td><td style="text-align: center;">0.095</td><td style="text-align: center;">8.7%</td></tr> </tbody> </table>				时间	批次	$\bar{x}$	SD	CV	初检	第一批	1.036	0.113	10.9%	第二批	1.048	0.050	4.8%	第三批	1.113	0.063	5.7%	第3天	第一批	1.075	0.078	7.3%	第二批	1.097	0.100	9.1%	第三批	1.061	0.056	5.3%	第6天	第一批	1.090	0.078	7.2%	第二批	1.087	0.077	7.1%	第三批	1.032	0.051	4.9%	合计		1.088	0.095	8.7%
时间	批次	$\bar{x}$	SD	CV																																																
初检	第一批	1.036	0.113	10.9%																																																
	第二批	1.048	0.050	4.8%																																																
	第三批	1.113	0.063	5.7%																																																
第3天	第一批	1.075	0.078	7.3%																																																
	第二批	1.097	0.100	9.1%																																																
	第三批	1.061	0.056	5.3%																																																
第6天	第一批	1.090	0.078	7.2%																																																
	第二批	1.087	0.077	7.1%																																																
	第三批	1.032	0.051	4.9%																																																
合计		1.088	0.095	8.7%																																																