



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101819209 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 201010177066.X

C12N 15/70(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.15

G07K 14/09(2006.01)

(71) 申请人 厦门出入境检验检疫局检验检疫技
术中心

地址 361026 福建省厦门市海沧区建港路
2165 号

(72) 发明人 孔繁德 林祥梅 徐淑菲 朱文钊
韩雪清 吴绍强 陈信忠 龚艳清
梅琳

(74) 专利代理机构 厦门市新华专利商标代理有
限公司 35203

代理人 李宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 15/42(2006.01)

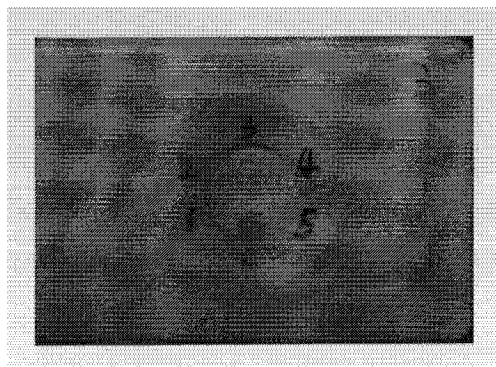
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结
构蛋白 3AB 抗体的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法,具体包括如下步骤:a) 口蹄疫 FMD 3AB 非结构蛋白的合成;b) SPA 胶体金的制备;c) 反应试剂盒的制作;d) 应用反应试剂盒作为载体,先将步骤 a) 中合成的 3AB 非结构蛋白抗原于 NC 膜上,封闭后加待测样品,洗涤后用步骤 b) 中制备的 SPA 作为胶体金标记蛋白检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体。本发明具有操作简便快速,不需特殊仪器设备,斑点色泽鲜艳,特异性强,灵敏性高,结果易于判断,且检测样本可以保存的特点。



1. 一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法,其特征在于具体包括如下步骤:

- a) 口蹄疫 FMD 3AB 非结构蛋白的合成;
- b) SPA 胶体金的制备;
- c) 反应试剂盒的制作;

d) 应用反应试剂盒作为载体,先将步骤 a) 中合成的 3AB 非结构蛋白抗原于 NC 膜上,封闭后加待测样品,洗涤后用步骤 b) 中制备的 SPA 作为胶体金标记蛋白检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法,其特征在于所述的口蹄疫 FMD 3AB 非结构蛋白的合成步骤为:首先经 GenBank 检索分析,参照已公布的亚洲株 (AY687333) 选取 3AB 基因,根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则,在不影响氨基酸序列的前提下,修改 3AB 序列中的部分稀有密码子,将其分为 9 条长引物,各长引物之间设计 12 个互补序列,经重叠 PCR 法得到 2 条 3AB 基因,基因的核苷酸序列分别为:

SEQIDNO. 1:

P 3AB 5' NdeI 5' -GGAATTCCATATGATCAGCATTCCG-3';

SEQIDNO. 2:

P 3AB 3' SalI 5' -ACGCGTCGACCTCAGT GACAATCAA 3';

然后在上述 2 条 3AB 基因中引入的酶切位点为 NdeI 和 SalI;所引入的表达载体 PET-28(a+);利用表达载体 PET-28(a+) 构建重组表达质粒,转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,筛选重组质粒,命名为 PET-28-3AB;接着进行重组质粒的诱导表达;然后将诱导表达后的菌体利用超声破碎仪破碎后进行纯化和复性。

3. 如权利要求 2 所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于所述的超声破碎时采用的超声破碎缓冲液的配方为:20mM Tris-HCl,0.5M NaCl,1Mm EDTA PH8.0,1mg/ml 溶菌酶。

4. 如权利要求 2 所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于所述的纯化过程中采用的包涵体洗涤液配方为:20mM Tris-HCl PH8.0,0.5M NaCl,2M 碳酰二胺,2%聚乙二醇辛基苯基醚;采用的包涵体变性缓冲液配方为:20mM Tris-HCl PH8.0,0.5M NaCl,8M 碳酰二胺,100mM β -巯基乙醇,2%聚乙二醇辛基苯基醚;所述的复性过程中采用的复性缓冲液配方为:20mM Tris-HCl PH8.0,50Mm NaCl,1%甘油。

5. 如权利要求 1 所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于所述的 SPA 为金黄色葡萄球菌重组 A 蛋白。

6. 如权利要求 1 或 5 所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于所述的 SPA 胶体金的制备包括采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,然后胶体金溶液中逐滴加入金黄色葡萄球菌重组 A 蛋白;其中所采用的重悬缓冲液为含 1%酪蛋白,0.05%聚乙二醇 6000,0.05%吐温-20,0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液;所采用的胶体金稀释液为含 1%酪蛋白,0.05%聚乙二醇 6000,5%蔗糖,0.05%吐温-20,0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液。

7. 如权利要求 1 所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在

于:所述的反应试剂盒为塑料方形小盒,大小为4.8cm×3cm×0.7cm,分底和盖两部分,盖面有直径0.5cm圆孔,盒内有两层,第一层为硝酸纤维素膜,NC膜下紧贴着第二层为吸水纸垫。

8. 如权利要求1所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于所述的步骤d)为:在反应试剂盒圆孔内的NC膜上点样,一点为口蹄疫FMD 3AB抗原1uL,作为检测点;另一点为已知口蹄疫FMD 3AB抗体阳性的猪血清1uL作为质控点;室温干燥后加入100uL封闭液,渗入干燥后加入待检血清100uL;渗入后加入100uL冲洗;渗入后加入标记好的SPA胶体金80uL;待渗入后再加入洗涤液100uL,洗去未结合的SPA胶体金;5min内若在膜上出现红色斑点即为阳性,否则为阴性。

9. 如权利要求8所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于:所述的封闭液为含1%酪蛋白和0.05%吐温-20的0.01mol/L pH 7.2的PBS缓冲液;所述的洗涤液为含0.05%吐温-20的0.01mol/L pH 7.2的PBS缓冲液;PBS缓冲液配方为:NaH₂PO₄·H₂O 0.276g,无水Na₂HPO₄1.136g,NaCl 8.76g,KCl0.187g,加适量蒸馏水溶解后定容至1000mL。

10. 如权利要求8所述的海洋球石藻病毒外壳重组蛋白原核表达的制备方法,其特征在于:所述的口蹄疫FMD 3AB抗原蛋白点样时浓度为0.0875mg/mL。

一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用斑点免疫金渗滤法 (DIGFA) 检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫 (Foot and mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒感染引起的偶蹄动物共患的一种急性、热性、高度接触性传染病。该病以口腔黏膜、舌面、唇、鼻镜、蹄部和乳房皮肤发生水疱和溃烂为特征。世界动物卫生组织 (OIE) 将该病列为 A 类动物传染病之首。由于该病发病率高, 传播速度快, 流行范围广, 一旦暴发则不易控制和消灭, 严重影响畜牧业生产和国际贸易, 造成巨大经济损失, 该病流行历史长久, 在世界各地分布很广。包括中国在内的大多数发展中国家主要是通过注射灭活疫苗的方法预防 FMD。因此, 建立能区分灭活疫苗免疫动物与感染动物的鉴别诊断方法非常必要。成熟的鉴别诊断方法既能真实的反映一个地区或畜群中 FMDV 的感染状况, 也是 OIE 判定一个地区或国家有无 FMD 的依据之一。

[0003] 口蹄疫的病原为口蹄疫病毒 (FMDV), 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属。病毒有 A、C、O、SAT I、SAT II、SAT III 和 Asia I 七个主型, 每个型内又有亚型, 亚型内还有抗原性差异的毒株, 各型之间抗原性不同, 且几乎没有交叉免疫性, 这给 FMD 的诊断和防制带来了极大的困难。FMDV 基因组含有一个大的开放阅读框, 编码一个大的聚蛋白, 聚蛋白逐级成熟裂解为病毒结构蛋白 (VP1、VP2、VP3、VP4) 和非结构蛋白 (NSP :L、2A、2B、2C、3A、3B、3ABC、3D 等)。包括中国在内的大多数发展中国家主要是靠疫苗注射免疫来预防口蹄疫, 而免疫注射后的动物血清中也能够检测到口蹄疫抗体, 利用传统口蹄疫病毒抗原包被检测口蹄疫抗体未能达到区分是野毒感染动物还是灭活疫苗免疫动物的目的。

发明内容

[0004] 为了解决上述问题, 本发明的目的在于提供了一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法, 本发明具有操作简便快速, 不需特殊仪器设备, 斑点色泽鲜艳, 特异性强, 灵敏性高, 结果易于判断, 且检测样本可以保存的特点。

[0005] 为达到上述的目的, 本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体的检测方法, 具体包括如下步骤:

[0007] a) 口蹄疫 FMD 3AB 非结构蛋白的合成;

[0008] b) SPA 胶体金的制备;

[0009] c) 反应试剂盒的制作;

[0010] d) 应用反应试剂盒作为载体, 先将步骤 a) 中合成的 3AB 非结构蛋白抗原点于 NC 膜上, 封闭后加待测样品, 洗涤后用步骤 b) 中制备的 SPA 作为胶体金标记蛋白检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体。

[0011] 所述的口蹄疫 FMD 3AB 非结构蛋白的合成步骤为：首先经 GenBank 检索分析，参照已公布的亚洲株 (AY687333) 选取 3AB 基因，根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则，在不影响氨基酸序列的前提下，修改 3AB 序列中的部分稀有密码子，将其分为 9 条长引物，各长引物之间设计 12 个互补序列，经重叠 PCR 法得到 2 条 3AB 基因，基因的核苷酸序列分别为：

[0012] SEQIDNO. 1：

[0013] P 3AB 5' NdeI 5' -GGAATTCCATATGATCAGCATTCCG-3'；

[0014] SEQIDNO. 2：

[0015] P 3AB 3' SalI 5' -ACGCGTCGACCTCAGT GACAATCAA 3'；

[0016] 然后在上述 2 条 3AB 基因中引入的酶切位点为 NdeI 和 SalI；所引入的表达载体 PET-28(a+) (购于 Novagen 公司，代理商为厦门鹭隆生物科技发展有限公司)；利用表达载体 PET-28(a+) 构建重组表达质粒，转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，筛选重组质粒，命名为 PET-28-3AB；接着进行重组质粒的诱导表达；然后将诱导表达后的菌体利用超声破碎仪破碎后进行纯化和复性。

[0017] 所述的超声破碎时采用的超声破碎缓冲液的配方为：20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1Mm EDTA PH8.0, 1mg/ml 溶菌酶 (BBI 原装，上海生工生物工程技术有限公司代理)。

[0018] 所述的纯化过程中采用的包涵体洗涤液配方为：20mM Tris-HCl PH8.0, 0.5M NaCl, 2M 碳酸二胺 (Urea), 2% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton)；采用的包涵体变性缓冲液配方为：20mM Tris-HCl PH8.0, 0.5M NaCl, 8M 碳酸二胺 (Urea), 100mM β -巯基乙醇, 2% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton)；所述的复性过程中采用的复性缓冲液配方为：20mM Tris-HCl PH8.0, 50mM NaCl, 1% 甘油。

[0019] 所述的 SPA 为金黄色葡萄球菌重组 A 蛋白 (购于北京本元正阳基因技术股份有限公司)。

[0020] 所述的 SPA 胶体金的制备包括采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，然后胶体金溶液中逐滴加入金黄色葡萄球菌重组 A 蛋白；其中所采用的重悬缓冲液为含 1% 酪蛋白, 0.05% 聚乙二醇 6000 (PEG6000), 0.05% 吐温 -20, 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液；所采用的胶体金稀释液为含 1% 酪蛋白, 0.05% 聚乙二醇 6000 (PEG6000), 5% 蔗糖, 0.05% 吐温 -20, 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液。

[0021] 所述的反应试剂盒为塑料方形小盒，大小为 4.8cm \times 3cm \times 0.7cm，分底和盖两部分，盖面有直径 0.5cm 圆孔，盒内有两层，第一层为硝酸纤维素膜 (NC 膜)，NC 膜下紧贴着第二层为吸水纸垫。

[0022] 所述的步骤 d) 为：在反应试剂盒圆孔内的 NC 膜上点两点，一点为口蹄疫 FMD 3AB 抗原 1 μ l，作为检测点；另一点为已知口蹄疫 FMD3AB 抗体阳性的猪血清 1 μ l 作为质控点；室温干燥后加入 100 μ l 封闭液，渗入干燥后加入待检血清 100 μ l；渗入后加入 100 μ l 冲洗；渗入后加入标记好的 SPA 胶体金 80 μ l；待渗入后再加入洗涤液 100 μ l，洗去未结合的 SPA 胶体金；5min 内若在膜上检测点和质控点均出现红色斑点即为阳性，若只有质控点出现红色斑点，则为阴性，而检测点和质控点均不出现红色斑点，则说明试剂无效。

[0023] 所述的封闭液为含 1% 酪蛋白和 0.05% 吐温 -20 的 0.01mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液；所述的洗涤液为含 0.05% 吐温 -20 的 0.01mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液；所述的 PBS

缓冲液配方为： $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.276g, 无水 Na_2HPO_4 1.136g, NaCl 8.76g, KCl 0.187g, 加适量蒸馏水溶解后定容至 1000mL。

[0024] 所述的口蹄疫 FMD 3AB 抗原蛋白点样时浓度为 0.0875mg/mL。

[0025] 本发明的有益效果是：首先在疫苗生产过程中，绝大部分的非结构蛋白已被消除，因此免疫动物后，体内不产生非结构蛋白抗体；而自然感染动物体内有非结构蛋白的表达，可刺激产生相应的抗体。本发明是以重组表达的口蹄疫 3AB 非结构蛋白作为抗原，利用 SPA 胶体金的特性，研究胶体金免疫渗滤技术快速检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体，建立一种能够区分口蹄疫疫苗免疫动物和野毒感染的快速检测方法。主要应用微孔滤膜（NC 膜）作载体的免疫检测技术，先将抗原点于 NC 膜上，封闭后加待测样品，洗涤后用胶体金探针检测相应抗体。通过金颗粒来放大免疫反应系统，使反应结果在固相载体 NC 膜上显示出来。该法操作简便、快速，不需特殊仪器设备，斑点色泽鲜艳，易于判断，且检测样本可以保存。本发明是将纯化的口蹄疫病毒 3AB 非结构蛋白抗原包被在硝酸纤维膜上，利用胶体金标记 SPA 显色，建立一种能够区分口蹄疫疫苗免疫与野毒感染动物的快速检测方法。通过应用 DIGFA 法和 ELISA 方法同时对 150 份猪血清进行检测，结果 DIGFA 法阳性率为 6%，ELISA 法阳性率为 5.3%，两者符合率达 99.3%。本发明选用的口蹄疫病毒 3AB 非结构蛋白抗原特异性好，与胶体金标记的 SPA 组成检测试剂盒用于检测口蹄疫病毒 3AB 非结构蛋白抗体，具有特异性强，灵敏性高，操作简单，耗时短，结果易于判断，且与口蹄疫免疫猪血清、猪细小病毒、猪瘟、猪蓝耳病和猪伪狂犬病毒阳性血清不发生交叉反应。该方法的成功研制，能够简单快速地判断动物中是否感染口蹄疫病毒，为有效控制该病将发挥重要作用。特别对于是养猪和养牛大国的中国，建立简便、快速、准确的区分口蹄疫疫苗抗体还是野毒感染产生的抗体的检测方法，以便更加广泛地应用到广大养殖户，随时进行检测；基层兽医部门定期进行大面积普查和监测以及口岸一线部门开展快速通关放行，这对于有效地控制口蹄疫的传播起到非常积极地效果，可以为预防这些传染病提供诊断依据。

附图说明

[0026] 图 1 是本发明 FMD 最佳点样抗原浓度的选择实验结果图；

[0027] 图 2 是本发明一种配方，不同用量的封闭液的选择实验结果图；

[0028] 图 3 是本发明另一种配方，不同用量的封闭液的选择实验结果图；

[0029] 图 4 是本发明胶体金标记 SPA 最佳浓度的选择实验结果图。

具体实施方式

[0030] 下面结合附图对本发明作进一步详细的说明。

[0031] 1、本实施例首先合成 FMD 3AB 非结构蛋白

[0032] 表达引物和表达重组质粒构建所用的抗原为原核表达的口蹄疫 3AB 蛋白，FMD 非结构蛋白 3AB 基因的合成经 GenBank 检索分析，参照已公布的亚洲株（AY687333）选取 3AB 基因，根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则，在不影响氨基酸序列的前提下，修改 3AB 序列中的部分稀有密码子，将其分为 9 条长引物，各长引物之间设计 12 个互补序列，经重叠 PCR 法得到 2 条 3AB 基因，基因的核苷酸序列分别为：

[0033] SEQIDNO. 1：

[0034] P 3AB 5' NdeI 5' -GGAATTCCATATGATCAGCATTCCG-3' ;

[0035] SEQIDNO. 2 ;

[0036] P 3AB 3' SalI 5' -ACGCGTCGACCTCAGT GACAATCAA 3' .

[0037] 引入酶切位点 NdeI 和 SalI 用表达载体 PET-28(a⁺) 构建重组表达质粒, 转化到 DH5 α 感受态, 筛选重组质粒, 命名为 PET-28-3AB。

[0038] 重组质粒的表达将测序正确的表达质粒转化到表达菌株 BL21 (DE3) 感受态, 挑取阳性单菌落到含卡那霉素的 LB 培养基中, 按 1 : 100 接种于含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基培养至 OD_{0.6} ~ 0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 诱导表达 6h 后收集菌体, 取样用 12% SDS-PAGE 观察分析结果。

[0039] 表达蛋白的纯化、复性将诱导表达后的菌体用超声破碎缓冲液 (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1Mm EDTA, PH8.0, 1mg/ml 溶菌酶) 按 20ml/g 菌体重悬沉淀, 用超声破碎机进行超声破碎, 分别收集超声破碎上清和沉淀, 取样进行 SDS-PAGE 分析, 观察目的蛋白表达情况。超声沉淀经包涵体洗涤液 (20mM Tris-HCl PH8.0, 0.5M NaCl, 2M Urea, 2% Triton) 洗涤后用包涵体变性缓冲液 (20mM Tris-HCl PH8.0, 0.5M NaCl, 8M Urea 100mM β -巯基乙醇, 2% Triton) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜。溶解后的包涵体用镍离子亲和层析柱进行纯化, 纯化方法参照说明书进行。将纯化洗脱的蛋白用复性缓冲液 (20mM Tris-HCl PH8.0, 50mM NaCl, 1% 甘油) 稀释一倍后再用复性缓冲液至 4 $^{\circ}$ C 进行透析复性, 每隔 6 ~ 8h 换液一次, 共透析 24h, 最后用超纯水或用 5mM Tris-HCl PH8.0 进行透析二次。为提高蛋白浓度可以用蔗糖或 PEG20000 进行浓缩, 浓缩后的蛋白用紫外分光光度计测定蛋白含量, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0040] 2、SPA 胶体金的制备

[0041] 1) 胶体金溶液的制备: 用柠檬酸三钠还原法制备, 取 1% 氯金酸 1mL 加入到 99mL 超纯水中, 所得氯金酸溶液浓度为 0.01%, 用水浴磁力搅拌锅加热至沸腾, 在磁力搅拌器以一定转速不断搅拌下迅速加入 2mL 的 1% 柠檬酸三钠水溶液, 继续搅拌加热约 15min 至溶液颜色稳定不变。此法制得的胶体金呈葡萄酒色, 经紫外分光光度计测其吸收峰在 520nm 处, 得到的胶体金颗粒直径约为 20nm 左右, 冷却后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光保存。

[0042] 2) SPA 标记: 取需制备量的胶体金溶液, 用 0.1mol/L K₂CO₃ 和 0.1mol/L 的 HCl 调其 pH 至 6.0。然后在磁力搅拌下逐滴加入 SPA (每 mL 胶体金溶液加入 6 μ g SPA), 继续磁力搅拌 30min 后加入 5% PEG (MW6000) 至终浓度 0.1%, 再继续搅拌 15min, 最后放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 静置过夜。次日将标记好的 SPA 胶体金 4000r/min 离心 10min, 取上清液 12000r/min 离心 30min, 小心吸弃上清。沉淀用重悬缓冲液 (含 1% 酪蛋白, 0.05% PEG6000, 0.05% Tween-20, 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液) 恢复至原体积。12000r/min 离心 30min, 弃上清。沉淀用胶体金稀释液 (含 1% 酪蛋白, 0.05% PEG6000, 5% 蔗糖, 0.05% Tween-20, 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液) 恢复至原体积的十分之一, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。PBS 缓冲液配方为: NaH₂PO₄ · H₂O 0.276g, 无水 Na₂HPO₄ 1.136g, NaCl 8.76g, KCl 0.187g, 加适量蒸馏水溶解后定容至 1000mL。

[0043] 3、反应试剂盒的制作

[0044] 反应盒为塑料方形小盒, 大小为 4.8cm × 3cm × 0.7cm, 分底和盖两部分, 盖面有直径 0.5cm 圆孔, 盒内有两层, 朝盖的第一层为硝酸纤维素膜 (NC 膜), NC 膜下紧贴着第二层吸水纸垫。

[0045] 4、应用反应试剂盒作为载体,先将步骤 a) 中合成的 3AB 非结构蛋白抗原点于 NC 膜上,封闭后加待测样品,洗涤后用步骤 b) 中制备的 SPA 作为胶体金标记蛋白检测口蹄疫非结构蛋白 3AB 抗体。

[0046] 1) 具体步骤 在圆孔内的 NC 膜上点两点,一点为 FMD 3AB 抗原 1 μ L,作为检测点;另一点为已知 FMD 3AB 抗体阳性的猪血清 1 μ L 作为质控点;室温干燥后加入 100 μ L 封闭液(含 1%酪蛋白和 0.05%吐温-20 的 0.01mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液)PBS 缓冲液配方为:NaH₂PO₄·H₂O 0.276g,无水 Na₂HPO₄ 1.136g,NaCl 8.76g,KCl 0.187g,加适量蒸馏水溶解后定容至 1000mL。渗入干燥后加入待检血清 100 μ L;渗入后加入 100 μ L 洗涤液(含 0.05%吐温-20 的 0.01mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液)冲洗(可根据情况洗 1 遍~3 遍);渗入后加入标记好的 SPA 胶体金 80 μ L;待渗入后再加入洗涤液 100 μ L(1 遍~3 遍),洗去未结合的 SPA 胶体金。5min 内若在膜上检测点和质控点均出现红色斑点即为阳性,若只有质控点出现红色斑点则为阴性,而检测点和质控点均不出现红色斑点,则说明试剂无效。

[0047] 2) 最佳点样抗原浓度的选择将重组表达纯化的 FMD 3AB 抗原用 pH 9.6 的 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液进行倍比稀释,然后根据浓度高低依次点样在 NC 膜上,分别进行 DIGFA 实验,如图 1 所示,本实施例所做的实验为:1 号板为检测 FMDV 3AB 阳性血清结果;2 号板为检测 FMDV 3AB 阴性血清结果 1~5. 依次为浓度为 0.35、0.175、0.0875、0.044 和 0.022mg/ml 的重组 3AB 抗原;C. 质控点。由图 1 可见:点样抗原量最小且实验结果斑点颜色最清晰抗原浓度作为最佳点样抗原浓度。实验结果显示,FMDV 3AB 蛋白以 0.0875mg/ml 点样时,抗原包被量最小且斑点颜色清晰。因此选择 0.0875mg/ml 的 FMDV 3AB 蛋白点样 1 μ L 作为最佳抗原包被量。

[0048] 3) 封闭液的选择用 不同配方的封闭液封闭 NC 膜进行 DIGFA 实验,如图 2 和图 3 所示,本实施例所做的实验为:图 2 所用封闭液为:(1) 含 1%酪蛋白、0.5% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS;(2) 含 0.5%酪蛋白、0.5% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS;(3) 含 1%酪蛋白、0.05% Tween-20 的 0.01mol/L PH7.2 的 PBS;(4) 含 0.5%酪蛋白、0.05% Tween-20 的 0.01mol/L PH7.2 的 PBS;图 3 所用封闭液为:(1) 含 1% BSA、0.5% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS;(2) 含 0.5% BSA、0.5% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS;(3) 含 1% BSA、0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS;(4) 含 0.5% BSA、0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS。并将实验结果进行对比,选择斑点颜色清晰且背景较浅的一组作为最适封闭液。结果显示,用含 1%酪蛋白、0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 和 0.5%酪蛋白、0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 封闭效果最好,斑点显色清楚,背景较浅。

[0049] 4) 胶体金标记 SPA 最佳浓度的选择将 SPA 胶体金做倍比稀释后与点有 FMDV 3AB 抗原的 NC 膜作用,选择背景颜色浅而效果最好的稀释倍数作为胶体金标记 SPA 浓度。如图 4 所示,本实施例所做的实验为:1~4 号板分别为按原体积 1/15、1/10、1/5、1/2.5 稀释的 SPA 胶体金,结果显示,按原体积 1/10 的稀释倍数效果较好,且背景颜色浅。

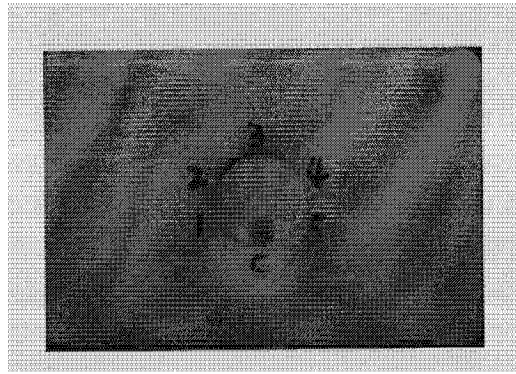


图 1

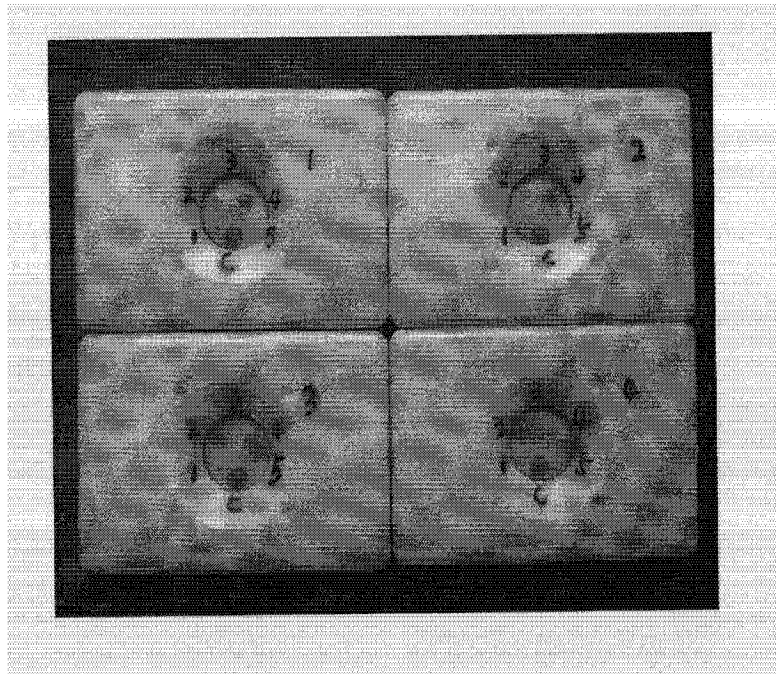


图 2

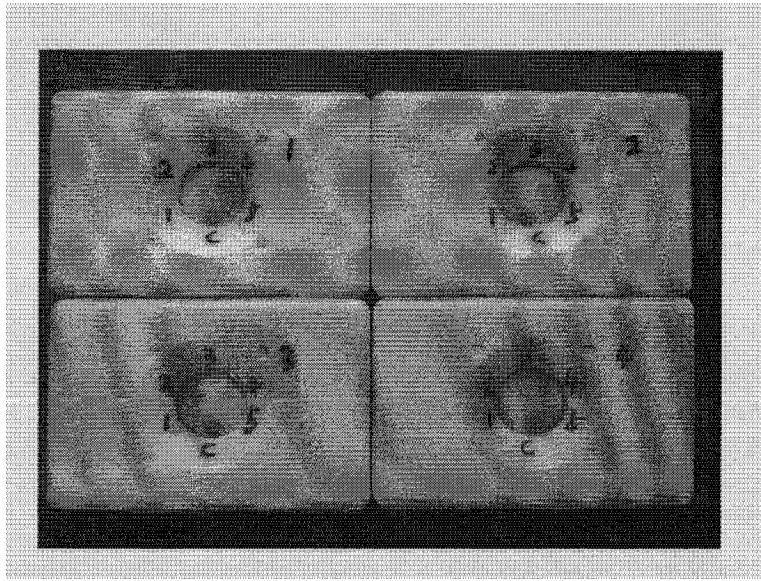


图 3

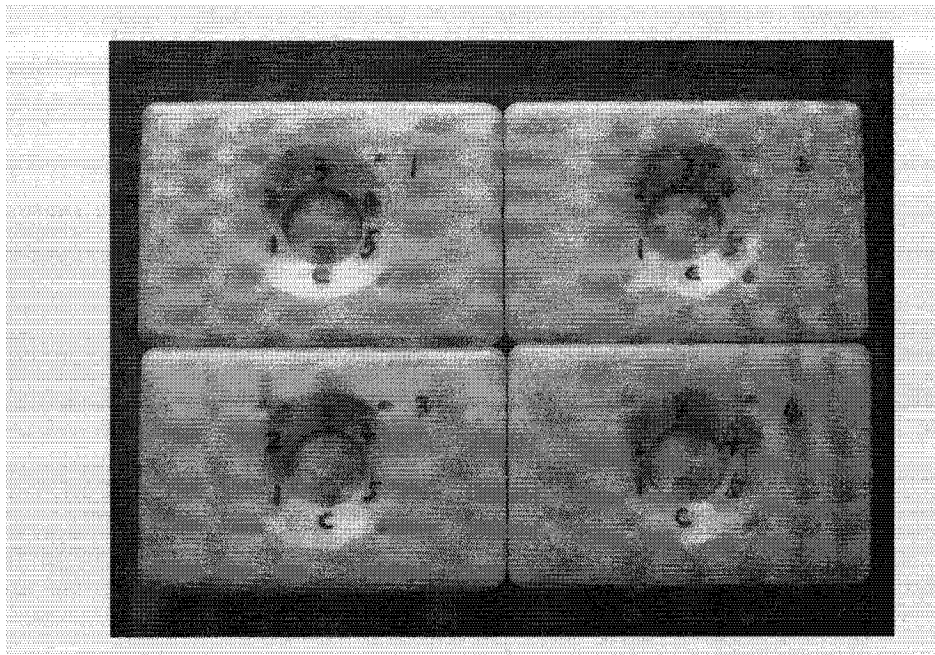


图 4

专利名称(译)	一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白3AB抗体的检测方法		
公开(公告)号	CN101819209A	公开(公告)日	2010-09-01
申请号	CN201010177066.X	申请日	2010-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	孔繁德 林祥梅 徐淑菲 朱文钊 韩雪清 吴绍强 陈信忠 龚艳清 梅琳		
发明人	孔繁德 林祥梅 徐淑菲 朱文钊 韩雪清 吴绍强 陈信忠 龚艳清 梅琳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 C12N15/42 C12N15/70 C07K14/09		
代理人(译)	李宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用斑点免疫金渗滤法检测口蹄疫非结构蛋白3AB抗体的检测方法，具体包括如下步骤：a)口蹄疫FMD 3AB非结构蛋白的合成；b)SPA胶体金的制备；c)反应试剂盒的制作；d)应用反应试剂盒作为载体，先将步骤a)中合成的3AB非结构蛋白抗原点于NC膜上，封闭后加待测样品，洗涤后用步骤b)中制备的SPA作为胶体金标记蛋白检测口蹄疫非结构蛋白3AB抗体。本发明具有操作简便快速，不需特殊仪器设备，斑点色泽鲜艳，特异性强，灵敏性高，结果易于判断，且检测样本可以保存的特点。

