



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102759624 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201210248861. 2

(22) 申请日 2012. 07. 18

(73) 专利权人 吉林大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号

(72) 发明人 丁壮 董航 黄志强

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司 22100

代理人 王薇

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

C12N 5/18(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102288751 A, 2011. 12. 21,

CN 102023217 A, 2011. 04. 20, 全文.

WO 2009/073689 A1, 2009. 06. 11, 全文.

US 2008/0268427 A1, 2008. 10. 30, 全文.

李倬等. 牛病毒性腹泻病毒夹心 ELISA 快速

检测方法的建立与初步应用. 《甘肃农业大学学报》. 2012, 第 47 卷 (第 3 期),

张丽颖等. 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 抗原捕获 ELISA 检测方法的建立. 《畜牧与兽医》. 2009, 第 41 卷 (第 8 期),

K. Kameyama et al. Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhea virus antigen. 《Journal of Virological Methods》. 2006, 第 138 卷

方绍庆等. 应用抗原捕捉 ELISA 快速检测牛病毒性腹泻病毒. 《中国畜牧兽医》. 2005, 第 32 卷 (第 12 期),

审查员 王在竹

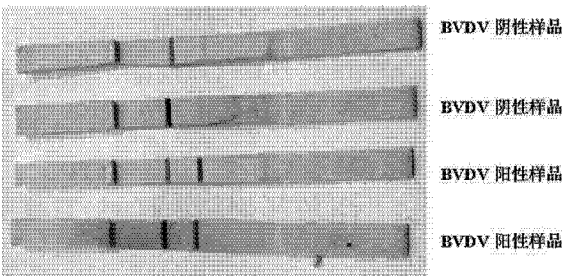
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的免疫胶体金试纸条

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的胶体金试纸条,其特征在于:试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上;其中结合垫上包被有胶体金标记的 BVDV 单克隆抗体;硝酸纤维素膜上分别包被有 BVDV 纯化的多克隆抗体构成的检测线 T 线和葡萄球菌蛋白 A(SPA) 构成的质控线 C 线。其具有特异性强、灵敏度高、操作简单和诊断快速的显著优点,可用于梅花鹿粘膜病病毒的快速检测及疫病诊断。



1. 一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒 (BVDV) 的胶体金试纸条, 试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上; 其特征在于: 结合垫上包被有胶体金标记的 BVDV 全病毒单克隆抗体; 硝酸纤维素膜上分别包被有纯化的 BVDV 多克隆抗体构成的检测线 T 线和葡萄球菌蛋白 A (SPA) 构成的质控线 C 线; 所述的纯化的 BVDV 多克隆抗体检测线 T 线是将 BVDV 1 型和 2 型血清抗体混合后, 用饱和硫酸铵法粗提 IgG, 用 DU-800 核酸 / 蛋白分析仪测定蛋白含量, 将其稀释至 2 mg/ml, 调整机器划线为 T 线; 硝酸纤维素膜上包被的葡萄球菌蛋白 A (SPA) 构成的质控线 C 线是选用一种能够与 IgG 分子 Fc 片段特异性结合的蛋白 SPA 喷涂于质控线上, 用包被缓冲液将 SPA 稀释到 50 μg/ml, 调整机器划线为 C 线; 检测线靠近结合垫, 距结合垫一端约 5mm, 质控线靠近吸收垫, 距吸收垫端 3 mm; 质控线与检测线的距离 5-8 mm; 在硝酸纤维素膜的质控线上的 SPA, 可与金标单克隆抗体结合, 以检验试纸条的有效性。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒 (BVDV) 的胶体金试纸条, 其特征在于结合垫上包被的胶体金标记的 BVDV 单克隆抗体及试纸条的制备过程如下:

(1) 单克隆抗体的制备: 使用灭活的 BVDV 对小鼠进行免疫, 通过免疫鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合培养, 产生杂交瘤细胞株; 使用杂交瘤细胞对小鼠进行腹腔注射, 取腹水加以纯化;

(2) 试纸条制备: 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 用胶体金标记 BVDV 单克隆抗体制备金标抗体, 将结合垫浸泡于封闭液即 2% BSA、0.5% 吐温-20、2.5% 蔗糖、0.05% 叠氮钠、0.01 M PBS 中 30 min, 37°C 烘干; 然后将制备好的金标抗体均匀喷涂于结合垫上, 每毫升铺 20 平方厘米, 冻干、保存。

一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的免疫胶体金试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的胶体金试纸条,属于一种新的动物诊断试剂,应用于畜牧兽医学领域。本发明具有深远的研究性和广泛的应用性,包括对地区内梅花鹿粘膜病的流行病学调查,以及净化鹿场和快速对梅花鹿粘膜病进行诊断。

背景技术

[0002] 梅花鹿的粘膜病,其致病病毒为牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV) / 粘膜病病毒(mucosal disease virus MDV)。该病的主要特征是恶心、呕吐、腹痛、腹泻,排水样便或稀便,白细胞减少,粘膜溃疡,发热及全身不适等症状,更严重的是产生免疫耐受与免疫抑制、先天性缺陷等情况,还可以导致怀孕母鹿的流产。检测 BVDV 的方法有很多种,在早期,人们使用病毒分离、免疫荧光技术、ELISA 等检测 BVDV,但这些方法存在特异性不高,不能现场应用等实际问题。免疫胶体金技术(Immune colloidal gold technique) 是以胶体金作为标记检测相应抗原或抗体的一种新型的免疫标记技术。氯金酸(HAuCl_4) 这种物质会与还原剂如白磷、鞣酸、枸橼酸钠等发生相互作用,最终聚合形成大小固定的金颗粒,这些金颗粒由于静电作用相互吸附,会形成一种稳定的胶体状态,这种稳定的胶体状态称之为称为胶体金。在弱碱环境下,由于胶体金带负电荷,蛋白质分子上存在的正电荷基团,因此胶体金会与蛋白质分子形成牢固的静电结合,这种静电结合不会影响蛋白质的生物特性。胶体金不仅仅能与蛋白质相结合,还可以与如 SPA、PHA、ConA 等大分子相结合。由于胶体金与蛋白质结合物有着的一些独特的免疫和生物学特性,并且胶体金本身具有一些如高电子密度、形状及颜色反应等物理特性,因此在免疫学、组织学和细胞生物学等领域,胶体金得以广泛地应用。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的胶体金试纸条,其利用免疫学抗原抗体能特异性结合原理,将单抗用胶体金标记后与抗原结合,这种抗原抗体结合物再与抗鹿粘膜病全病毒多抗结合,形成夹心单抗-抗原-多抗结合物在硝酸纤维素膜(NC膜)上出现颜色反应,可以肉眼观察;其特点有简单、快速和高特异性等。并且价格低廉,适用于基层或临床诊断鹿粘膜病。

[0004] 本发明的技术方案是这样实现的:1. 一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒(BVDV) 的胶体金试纸条,试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上;其特征在于:结合垫上包被有胶体金标记的 BVDV 全病毒单克隆抗体;硝酸纤维素膜上分别包被有纯化的 BVDV 多克隆抗体构成的检测线 T 线和葡萄球菌蛋白 A (SPA) 构成的质控线 C 线;所述的纯化的 BVDV 多克隆抗体检测线 T 线是将 BVDV 1 型和 2 型血清抗体混合后,用饱和硫酸铵法粗提 IgG,用 DU-800 核酸/蛋白分析仪测定蛋白含量,将其稀释至 2 mg/ml,调整机器划线为 T 线;硝酸纤维素膜上包被的葡萄球菌蛋白 A (SPA) 构成的质控线 C 线是选用一种能够与 IgG 分子 Fc 片段特异性结合的蛋白 SPA 喷涂于质控线上,用包被缓冲

液将 SPA 稀释到 50 μ g/ml,调整机器划线为 C 线;检测线靠近结合垫,距结合垫一端约 5mm,质控线靠近吸收垫,距吸收垫端 3 mm;质控线与检测线的距离 5-8 mm;在硝酸纤维素膜的质控线上的 SPA,可与金标单克隆抗体结合,以检验试纸条的有效性。

[0005] 结合垫上包被的胶体金标记的 BVDV 单克隆抗体及试纸条的制备过程如下:

[0006] (1) 单克隆抗体的制备:使用灭活的 BVDV 对小鼠进行免疫,通过免疫鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合培养,产生杂交瘤细胞株;使用杂交瘤细胞对小鼠进行腹腔注射,取腹水加以纯化;

[0007] (2) 试纸条制备:采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,用胶体金标记 BVDV 单克隆抗体制备金标抗体,将结合垫浸泡于封闭液即 2% BSA、0.5% 吐温-20、2.5% 蔗糖、0.05% 叠氮钠、0.01 M PBS 中 30 min,37 $^{\circ}$ C 烘干;然后将制备好的金标抗体均匀喷涂于结合垫上,每毫升铺 20 平方厘米,冻干、保存。

[0008] 所述该纸条的检测方法是:使用单克隆抗体技术制备抗鹿粘膜病毒的单克隆抗体,利用免疫学抗原抗体能特异性结合原理,胶体金标记抗原与抗体结合。由于毛细管作用,反应复合物沿包被膜向前泳动,若样品中存在鹿粘膜病病毒强毒株,到达检测线时遇到包被在硝酸纤维素膜上的兔抗鹿粘膜病全病毒多抗,就会形成金标单抗-鹿粘膜病病毒株-兔抗鹿粘膜病全病毒多抗复合物,从而凝集在检测线上,形成特异性的红色沉淀线;没有和鹿粘膜病病毒强毒结合金标单克隆抗体则会直接通过检测线,富集在质控线上形成红色沉淀线,即判为阳性结果。若样品中无鹿粘膜病病毒,反应复合物到达检测线时遇到捕获抗体就不会形成多抗-鹿粘膜病病毒-金标单抗复合物,反应复合物通过检测线,富集在质控线上,形成红色沉淀,即判为阴性结果。

[0009] 本发明的积极效果是

[0010] 1、具有生物安全性,其所使用的金标单抗、兔抗鹿粘膜病多抗及羊抗鼠二体均为抗体,不含活病毒,因此不存在散毒的危险;

[0011] 2、特异性强,胶体金试纸条金标抗体均为敏感性和特异性较好的单克隆抗体,因此提高了检测的敏感性和特异性;

[0012] 3、生产成本低,金标单抗可由相应的杂交瘤细胞系通过注射 Balb/c 小鼠腹腔,诱生腹水,兔抗 BVDV 多抗可由鹿粘膜全病毒免疫新西兰白兔产生,二者通过辛酸-硫酸铵纯化而大量获得;

[0013] 4、其可快速检测即 5-10min;不需要特殊仪器和设备,可适用于现场操作;操作简单,一步完成,无需专业人员操作;检测成本低;储存方便。

附图说明

[0014] 图 1 为本发明试纸条的实物图。

[0015] 图 2 为本发明试纸条结果判定示意图。

具体实施方式

[0016] 实施例 1 BVDV 多克隆抗体纯化

[0017] 取 10ml 免疫 BVDV 的新西兰白兔血清与等量 0.8% 氯化钠溶液混合后,逐滴加入饱和硫酸铵溶液 20ml,使成 50% 饱和度的硫酸铵溶液。4 $^{\circ}$ C 静止 30min 取出,4 $^{\circ}$ C 3000rpm 离

心 30min, 弃上清, 沉淀中加入 20ml 0.8% 氯化钠溶液; 待沉淀溶解后, 缓慢加入 10ml 饱和硫酸铵溶液, 使成 33% 饱和度的硫酸铵溶液。4℃ 静置 30min 取出, 4℃ 3000rpm 离心 30min, 弃上清, 沉淀中加入 1ml 0.8% 氯化钠溶液, 装入透析袋内用 0.8% 氯化钠溶液透析除盐。用 2% 氯化钡溶液检测硫酸铵是否透析完全。透析完全后, 蛋白溶液用 PEG20000 浓缩至适当体积, 4℃ 12000rpm 离心 10min, 取上清, 测定蛋白质含量, 即为粗提的兔抗 BVDV IgG。

[0018] 实施例 2 BVDV 免疫蛋白单克隆抗体的制备:

[0019] 1、动物免疫

[0020] 先使用弗氏完全佐剂将纯化的 BVDV 完全乳化, 再取 6-8 周龄健康 Balb/C 小鼠 5 只, 共采取 3 次免疫, 一免将完全乳化的免疫原, 每只小鼠进行腹腔注射, 大约 100 μg 左右, 在 14d 后实施加强免疫。二免以及三免以弗氏不完全佐剂将纯化的 BVDV 乳化, 之后将对每只小鼠进行腹腔注射, 大约 100 μg。在三免后 15d, 取 100 μg 纯化的病毒蛋白进行腹腔注射。在融合前 3 ~ 4d 左右, 取 50 μg 纯化的病毒蛋白进行尾静脉注射。

[0021] 2、分泌抗 BVDV 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

[0022] 将免疫合格的鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合, 加入适量的含 HAT 的选择性培养基进行培养, 用纯化病毒进行间接 ELISA 筛选。反复筛选至所有孔显示阳性, 并对这些杂交瘤细胞进行亚克隆, 选择并确定可以稳定分泌抗体的阳性杂交瘤细胞株。

[0023] 3、抗体的纯化

[0024] 选择体型较大的 Balb/c 小鼠, 腹腔注射 0.5ml/只 灭菌石蜡, 7d-10d 后, 腹腔注射 1×10^6 个细胞/只阳性杂交瘤细胞, 待小鼠腹部膨大后 (约 7d-10d) 抽取腹水, 以 5000rpm 离心 5min, 取上清液于 -80℃ 保存备用。用蛋白 A/G 单克隆抗体纯化试剂盒对腹水进行纯化。

[0025] 实施例 3 金标单克隆抗体的制备

[0026] 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液。向 99ml 三蒸水中加入 1ml 浓度为 10g/L 的氯金酸溶液加热至沸腾, 迅速加入 2.4ml 10.5g/L 柠檬酸三钠溶液, 充分混匀, 继续加热约 5min-10min, 溶液由蓝色变为红色即可。向 50ml 胶体金溶液中加入适量纯化后的抗 BVDV 单克隆抗体, 室温搅拌 30min, 缓慢加入 5ml 100g/L BSA 继续搅拌 30min。4000rpm 离心 10min, 转移上清至另一离心管中, 离心 30min, 小心弃去上清, 用 5ml 50mmol/L PBS 重悬沉淀。将 5×300mm 的玻璃纤维棉浸泡于金标 McAb 溶液中, 取出真空抽干后避光保存。

[0027] 实施例 4 SPA 的获得

[0028] 葡萄球菌蛋白 A (SPA) 购置于 sigma 公司, 将 SPA 配成 50ug/ml, 保存备用。

[0029] 实施例 5 试纸条的研制

[0030] 1、硝酸纤维素膜的制备

[0031] 用自动喷膜机将 2mg/ml 纯化的 BVDV 多抗点在硝酸纤维膜上, 划为 T 线, 即为检测线靠近结合垫。将 1mg/ml SPA 点在硝酸纤维膜上, 划为 C 线。即为质控线靠近吸收垫。点样速度为 0.75 μL/cm。37℃ 干燥 2h 后, 4℃ 密封保存。

[0032] 2、样品垫的制备

[0033] 将样品垫浸泡于封闭液 (2% BSA、0.5% 吐温-20、2.5% 蔗糖、0.05% 叠氮钠、0.01M PBS) 中 30min, 37℃ 烘干, 封装。

[0034] 3、结合垫的制备

[0035] 将结合垫浸泡于封闭液(2% BSA、0.5% 吐温-20、2.5% 蔗糖、0.05% 叠氮钠、0.01M PBS)中 30min, 37℃ 烘干。然后将制备好的金标抗体均匀铺在结合垫上, 每毫升铺 20 平方厘米, 冻干、保存。

[0036] 4、试纸条的组装

[0037] 将背衬、样品垫、吸水垫、硝酸纤维膜、金标垫粘在一起, 利用切条机将其切成 3.5mm 宽的试纸条, 于 4℃ 干燥保存备用。用试纸条检测, 如果对照线和检测线均显色。则为阳性, 如果仅对照线显色, 而检测线不显色, 则为阴性。如果对照线不显色, 则检测无效, 应换用另一根试纸条, 再次检测。

[0038] 实施例 6 特异性与敏感性试验

[0039] 1 特异性试验

[0040] 用试纸条检测 BVDV 阳性样品, 结果均为阳性, 检测其它病毒阳性样品, 结果均为阴性。结果如表 1, 证明试剂条较为特异。

[0041]

检测样品	BVDV	蒸馏水	VSV	BTV	SVDV	PPRSV
检测结果	+	-	-	-	-	-

[0042] 2 敏感性试验

[0043] 分别用试纸条和 RT-PCR 检测不同稀释度的 BVDV 阳性样品, 结果表明试纸条检测极限为 1:160 稀释的样品, 试纸条相当于荧光 RT-PCR 的 64 倍。

表 2 胶体金试纸条敏感性试验										
样品稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
试纸条	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

[0044] 结果如表 2。

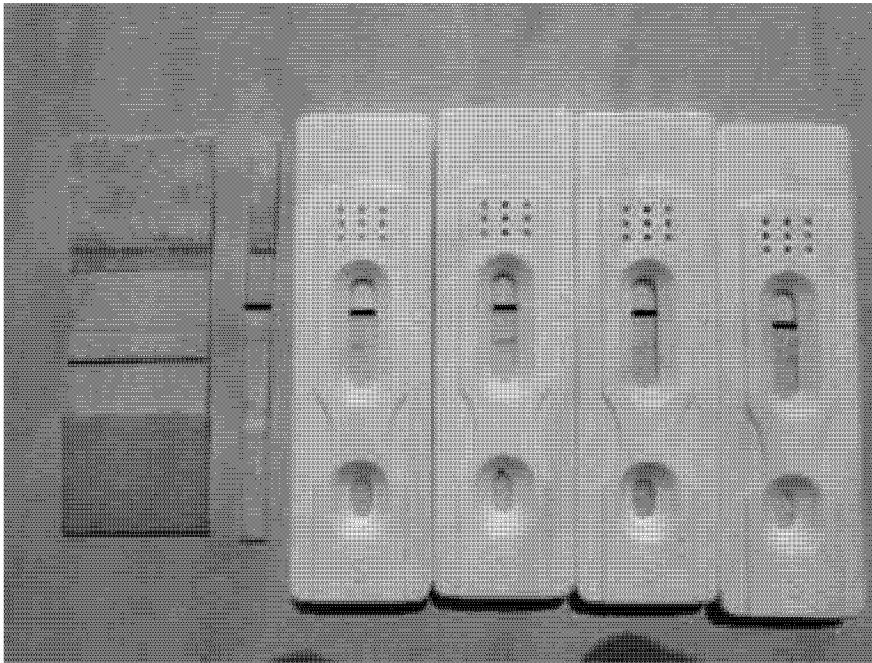


图 1

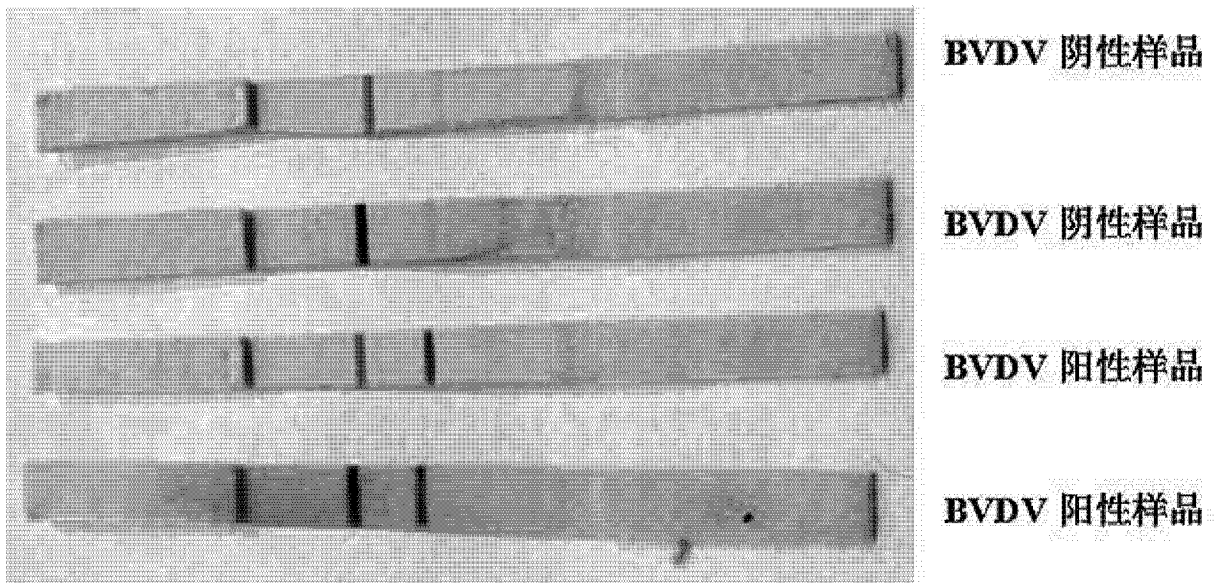


图 2

专利名称(译)	一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的免疫胶体金试纸条		
公开(公告)号	CN102759624B	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201210248861.2	申请日	2012-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	丁壮 董航 黄志强		
发明人	丁壮 董航 黄志强		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531 C12N5/18		
代理人(译)	王薇		
其他公开文献	CN102759624A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测梅花鹿粘膜病病毒的胶体金试纸条，其特征在于：试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上；其中结合垫上包被有胶体金标记的BVDV单克隆抗体；硝酸纤维素膜上分别包被有BVDV纯化的多克隆抗体构成的检测线T线和葡萄球菌蛋白A(SPA)构成的质控线C线。其具有特异性强、灵敏度高、操作简单和诊断快速的显著优点，可用于梅花鹿粘膜病病毒的快速检测及疫病诊断。

