



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 208443853 U

(45)授权公告日 2019.01.29

(21)申请号 201820988547.0

(22)申请日 2018.06.26

(73)专利权人 安阳工学院

地址 455000 河南省安阳市开发区黄河大道西段安阳工学院

(72)发明人 连凯琪 周玲玲 张杰 苗银萍
张明亮 宋玉伟 关现军 王双山

(74)专利代理机构 北京迎硕知识产权代理事务所(普通合伙) 11512

代理人 钱扬保 张群峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(ESM)同样的发明创造已同日申请发明专利

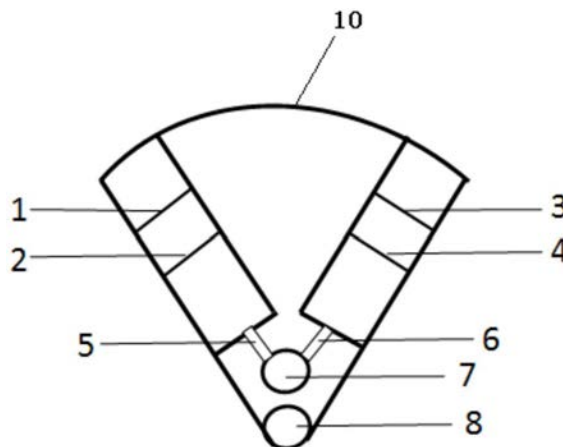
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)实用新型名称

圆环病毒3型免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡

(57)摘要

本实用新型涉及一种用于圆环病毒3型(PCV-3)免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡。该免疫速测卡包括扇形底板,在扇形底板的相对两边表面上分别沿径向设有检测试纸I和检测试纸II,在扇形底板的圆心处设有金标孔,邻近金标孔设置有加样孔,加样孔分别通过第I样品引流道和第II样品引流道与检测试纸I和检测试纸II连接。该免疫速测卡不使用仪器设备,操作便捷,结果判读简单,能够满足基层农户以及动物疫病防疫部门对于新出现的PCV-3的诊断与检测需求,对新发PCV-3的防控具有重要意义。



1. 一种圆环病毒3型免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡,其特征在于,所述免疫速测卡包括扇形底板,在扇形底板的相对两边表面上分别沿径向设有检测试纸I和检测试纸II,在扇形底板的圆心处设有金标孔,邻近金标孔设置有加样孔,加样孔分别通过第I样品引流道和第II样品引流道与检测试纸I和检测试纸II连接。

2. 根据权利要求1所述的免疫速测卡,其特征在于,

其中,检测试纸I设置有检测线和质控线,分别包被PCV-3Cap蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体;检测试纸II设置有检测线和质控线,分别包被PCV-3Rep蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体;金标孔中包被有链球菌G蛋白胶体金颗粒标记偶联物。

圆环病毒3型免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡

技术领域

[0001] 本实用新型总体涉及动物疫病快速诊断领域,具体涉及一种用于区分新发PCV-3 Cap基因工程亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗与野毒感染的免疫速测卡。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒(Porcine circoviruses,PCV)是一种无囊膜的单链环状DNA病毒,猪圆环病毒(PCV)粒子直径17-22nm,是目前兽医学上发现的最小的动物病毒。2016年以前,在猪群中仅发现PCV-1和PCV-2两个基因型。其中,PCV-1对猪无致病性,而PCV-2在猪场能引起呼吸、繁殖、消化等多系统症状,对养猪业造成重大的经济损失。2016年,美国堪萨斯州立大学研究人员Palinski等利用宏基因组测序技术从皮炎肾病综合征(PDNS)和繁殖障碍母猪及其流产胎儿体内鉴定出一种新的圆环病毒,并命名为PCV-3,美国多个洲猪群中随即被证实存在PCV-3感染。波兰、韩国、泰国等也报道了猪群中存在PCV-3的感染。随后,我国科研人员也相继检测到PCV-3,已有至少13个省猪场存在PCV-3感染,且主要分布于中东部地区。

[0003] 市场上流行的PCV-2疫苗主要是Cap基因工程亚单位疫苗和全病毒灭活疫苗,其中Cap亚单位疫苗的出现对于PCV-2的防控起到关键作用,使用该疫苗能够区分疫苗免疫与野毒感染。鉴于此,PCV-3的Cap蛋白也将成为开发PCV-3新型诊断技术的一个重要抗原。当前,有关PCV-3报道的文献主要集中在流行病学、分子诊断和序列分析等相关的研究,没有关于免疫诊断技术开发的报道,也没有免疫诊断产品投入市场。

[0004] PCV基因组含有四个编码阅读框(ORFs),其中ORF1编码病毒的复制酶相关蛋白(Rep),Rep是圆环病毒复制必须的非结构蛋白,ORF2编码病毒唯一的衣壳结构蛋白(Cap)。应用Cap亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗防控PCV疫情时,被免疫动物不会产生Rep蛋白抗体。因此,Cap和Rep蛋白是开发PCV-3免疫诊断技术及产品的重要靶标,特别是开发能够评价PCV-3疫苗免疫效果,同时能够区分Cap亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗与野毒感染的新型免疫诊断技术及产品具有重大的临床应用价值。

实用新型内容

[0005] 本实用新型的目的在于:提供一种用于PCV-3型免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡,该速测卡可同时评价PCV-3疫苗免疫效果,并区分PCV-3的Cap亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗与野毒感染。

[0006] 本实用新型通过以下技术方案实现:所述免疫速测卡包括扇形底板,在扇形底板的相对两边表面上分别沿径向设有检测试纸I和检测试纸II,在扇形底板的圆心处设有金标孔,邻近金标孔设置有加样孔,加样孔分别通过第I样品引流道和第II样品引流道与检测试纸I和检测试纸II连接。

[0007] 具体情况下,检测试纸I设置有检测线和质控线,分别包被PCV-3 Cap蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体;检测试纸II设置有检测线和质控线,分别包被PCV-3 Rep蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体;金标孔中包被有链球菌G蛋白(SPG)胶体金颗粒标记偶联物。

[0008] 本实用新型速测卡应用双抗原夹心法,当被检样品中含有Cap或Rep抗体时,则在金标孔中与SPG蛋白结合,形成“SPG蛋白-抗体复合物”溶液;将复合物溶液滴加到加样孔,溶液分别向检测试纸I和检测试纸II渗透泳动。当复合物到达检测试纸I的检测线时,SPG蛋白-Cap抗体复合物中的Cap抗体与PCV-3的Cap蛋白发生特异性结合,形成“SPG蛋白-Cap抗体-Cap抗原复合物”,出现肉眼可见的色带。当复合物到达检测试纸II的检测线时,SPG蛋白-Rep抗体复合物中的Rep抗体与PCV-3的Rep蛋白发生特异性结合,形成“SPG蛋白-Rep抗体-Rep抗原复合物”,出现肉眼可见的色带。

[0009] 当被检样品中不含Cap或Rep抗体时,胶体金标记的SPG蛋白泳动至检测试纸I和检测试纸II的质控线,与兔免疫球蛋白IgG抗体结合,出现肉眼可见的色带。

[0010] 检测时,吸取9滴血清稀释液滴加到金标孔中,再加入1滴待检血清样品,将金标孔底部包被物质与待检血清充分混匀,之后将混匀后的样品溶液全部滴加到加样孔中,观察检测试纸I、II的检测线和质控线是否出现红色色带,从而判定动物免疫PCV-3疫苗之后抗体效价是否合格,并能同时鉴别区分PCV-3的Cap基因工程亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗和PCV-3野毒感染。

[0011] 本实用新型的积极效果是:

[0012] 1、本实用新型首次针对圆环病毒新基因型病毒PCV-3开发了快速免疫诊断产品,对PCV新型突发疫情的防控具有重大临床价值。

[0013] 2、本实用新型速测卡用途广泛,既可用于评价PCV-3灭活疫苗和Cap亚单位疫苗以及病毒样颗粒疫苗的免疫效果,也可用于鉴别区分PCV-3的Cap亚单位疫苗或病毒样颗粒疫苗与野毒感染,一检多效,检测效率高。

[0014] 3、本实用新型速测卡采用链球菌G蛋白(SPG)作为捕获抗原,相对于葡萄球菌A蛋白(SPA)具有更广泛的抗体结合能力,同时采用金标孔-液相反应模式,与传统玻璃纤维膜胶体金标记技术相比,本实用新型试剂盒胶体金标记抗原与待检血清抗体反应更加完全,检测灵敏度更高。

[0015] 4、本实用新型提供了一种新型多联检测卡模型。扇形多联检测卡相对于传统平行多联卡,一次加样,可以同时检测多个指标,检测效率高;相对于在单个试纸条设置多个检测线,本实用新型去除了抗原间干扰,准确率高。

[0016] 5、本实用新型速测卡操作便捷,不需要仪器设备,结果判读简单,能够满足基层组织、农户对于重大疫病诊断的需求。

附图说明

[0017] 图1为本实用新型的免疫速测卡正面结构示意图。图中1:检测试纸I质控线;2:检测试纸I检测线;3:检测试纸II质控线;4:检测试纸II检测线;5:检测试纸I样品引流道;6:检测试纸II样品引流道;7:加样孔;8:金标孔。

[0018] 图2为Cap和Rep蛋白的纯化鉴定效果图。重组菌pET30a-Rep/BL21诱导表达产物的SDS-PAGE鉴定结果。图中1:Cap蛋白纯化;M:蛋白Marker;2:Rep蛋白纯化。

具体实施方式

[0019] 下面结合附图具体介绍本实用新型的PCV-3免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测

卡及其制备方法。本领域技术人员应该理解,下面描述的实施例只是为了更好地理解本实用新型,并不用来限制本实用新型。

[0020] 如图1所示,免疫速测卡包括扇形底板10,在扇形底板10的相对两边表面上分别沿径向设有检测试纸I和检测试纸II,在扇形底板10的圆心处设有金标孔8,邻近金标孔8设置有加样孔7,加样孔7分别通过第I样品引流道5和第II样品引流道6与检测试纸I和检测试纸II连接。金标孔8具体可为微型试管或微型槽。

[0021] 检测试纸I和检测试纸II共用加样孔7和金标孔8。其中,检测试纸I设置有检测线2和质控线1,分别包被PCV-3 Cap蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体;检测试纸II设置有检测线4和质控线3,分别包被PCV-3 Rep蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体;检测试纸I上设置样品引流道5,检测试纸II上设置样品引流道6;金标孔8中包被有SPG胶体金颗粒标记偶联物。

[0022] 在优选实施例中,检测试纸I和检测试纸II在扇形底板10上的隔开角度为30-45°,从而既能保证相互不会干扰,同时也能使检测卡保持较小尺寸。

[0023] 下述实施例中的主要原材料来源为:PCV-3衣壳蛋白Cap和复制酶蛋白Rep由安阳工学院(河南省动物疫病防控与营养免疫院士站实验室)制备。其它试剂和材料均可来源于商业途径。所述的实验方法,若无特别说明,均为常规实验方法。

[0024] 本实用新型所述速测卡采用胶体金免疫层析法制备,显示条带为红色色带,具体制备方法如下:

[0025] 1.1 Cap和Rep蛋白制备

[0026] 本实用新型速测卡所使用的抗原原料包括PCV-3的衣壳蛋白Cap(NCBI序列号:KY075988.1)和复制酶蛋白Rep(NCBI序列号:KY075988.1),采用基因工程方法合成去除核定位信号区域的Cap蛋白(510bp)和Rep蛋白(636bp)基因序列,并且进行了密码子优化。采用大肠杆菌表达载体pET-30a进行Cap和Rep蛋白的原核表达,采用柱亲和层析法纯化蛋白,最终获得纯化的表达产物。如图2所示,Cap蛋白为27.5kDa,Rep蛋白为32kDa。

[0027] 1.2免疫速测卡的制备

[0028] (1)检测试纸I、II制备:在硝酸纤维素膜上分别喷PCV-3圆环病毒Cap蛋白、Rep蛋白和兔免疫球蛋白IgG抗体,分组组成质控线1、检测线2、质控线3和检测线4。37°C烘干处理2小时,置装有干燥剂的密封袋中保存备用。具体如下:

[0029] 检测线2:用包被缓冲液稀释Cap蛋白,浓度为2.5mg/mL,将喷膜仪设置为喷液量1uL/cm,用喷膜仪喷涂划线。

[0030] 检测线4:用包被缓冲液稀释Rep蛋白,浓度为3mg/mL,将喷膜仪设置为喷液量1uL/cm,用喷膜仪喷涂划线。

[0031] 质控线1、3:用包被缓冲液稀释兔免疫球蛋白IgG抗体,浓度为1mg/mL,将喷膜仪设置为喷液量1uL/cm,用喷膜仪喷涂划线。

[0032] 所述包被缓冲液成分:0.01mol/L的PH=7.2的PBS,BSA 0.2%,PVP 0.1%,PEG 0.1%,dry milk 0.2%,casein 0.04%,sodium azid 0.02%,Tween-20 0.3%,sugar 2.5%。

[0033] (2)金标孔的制备

[0034] 取双蒸水置于磁力搅拌器上加热至沸腾,迅速加入浓度为1%的氯金酸溶液至终浓度为0.02%。煮沸5分钟,之后加入浓度为1%的柠檬酸三钠溶液,加样体积为氯金酸溶液

的2倍。煮沸20分钟后,形成酒红色澄清溶液,停止加热冷却至室温,再用双蒸水调整浓度为0.02%,4℃避光保存备用。

[0035] 用0.1mol/L碳酸钾调节调节胶体金溶液PH至8.0,逐滴加入SPG蛋白,每mL胶体金溶液加入60ug抗体,混匀后静置5分钟。再加入10%牛血清白蛋白溶液,至终浓度1%,混匀后静置5分钟。10000rpm离心20分钟,弃去上清,用洗涤液洗涤1次。沉淀用十分之一初始胶体金体积的金标蛋白保存液溶解,然后按照20uL/孔的量加入金标孔中。真空干燥3小时,置装有干燥剂的密封袋中保存备用。

[0036] 所述10%牛血清白蛋白溶液:取牛血清白蛋白100g,用双蒸水定容至1000mL。

[0037] 所述洗涤液:取牛血清白蛋白4g,聚乙二醇8000 2g,聚乙烯吡咯烷酮2g,蔗糖2g,Tris 1.211g,用双蒸水定容至1000mL,并调节PH至8.1。

[0038] 所述金标蛋白保存液:取牛血清白蛋白25g,聚乙二醇8000 5g,Tris 10.2g,氢氧化钠2.5g,吐温20 7.5mL,用双蒸水定容至1000mL,并调节PH至8.5。

[0039] (3) 免疫速测卡组装

[0040] 将检测试纸I、II分别固定在扇形底板10的相应卡槽内,将金标孔8固定于扇形底板10的圆心处,形成免疫速测卡。

[0041] 1.3血清稀释液制备

[0042] 称取NaCl 8g,KCl 0.2g,Na₂HPO₄·12H₂O 3.63g,KH₂PO₄ 0.24g,溶于900ml双蒸水中,用盐酸调pH值至7.4,加水定容至1L,常温保存备用。

[0043] 1.4试剂盒制备

[0044] 用铝箔袋将免疫速测卡和干燥剂封口包装,和移液管、血清稀释液一起组装成试剂盒,用于评价新发PCV-3疫苗免疫效果和诊断野毒感染。

[0045] 1.5免疫速测卡性能研究

[0046] 采用传统玻璃纤维膜胶体金标记技术制备试纸条,与本实用新型的金标孔-液相反反应模式的速测卡同时检测Cap蛋白和Rep蛋白免疫兔血清。将免疫血清按2倍梯度倍比稀释,本实用新型的速测卡能够检测Cap和Rep血清效价分别为64和32,而传统玻璃纤维膜胶体金标记技术制备试纸条能够检测Cap和Rep血清效价分别为8和4。因此,与传统玻璃纤维膜胶体金标记技术相比,本实用新型速测卡胶体金标记抗原与待检血清抗体反应更加完全,检测灵敏度更高。

[0047] 下面再详细描述本实用新型的速测卡的检测原理和结果判定方法。

[0048] 本实用新型的免疫速测卡应用双抗原夹心法,用SPG蛋白作为捕获抗原,用圆环病毒PCV-3 Cap和Rep蛋白作为检测抗原。其原理是当被检样品中含有Cap或Rep抗体时,首先在金标孔内与胶体金标记的SPG蛋白结合,形成“SPG蛋白-Cap/Rep抗体复合物”溶液;将溶液转移到加样孔,并同时向检测试纸I、II渗透泳动。当复合物溶液到达检测试纸I的检测线时,复合物中Cap抗体与PCV-3 Cap蛋白发生特异性结合,形成“SPG蛋白-Cap抗体-Cap抗原复合物”,在检测线出现肉眼可见的色带。当复合物到达检测试纸II的检测线时,复合物中Rep抗体与PCV-3 Rep蛋白发生特异性结合,形成“SPG蛋白-Rep抗体-Rep抗原复合物”,在检测线出现肉眼可见的色带。当复合物溶液泳动至检测试纸I、II的质控线时,与兔免疫球蛋白IgG抗体结合,在质控线上出现肉眼可见的色带。检测时,在金标孔中加入血清稀释液,吸取待检血清样品滴加到金标孔中,将孔底部包被抗原与待检血清充分混匀,之后将样品滴

加到加样孔,观察检测试纸I、II检测线和质控线是否出现红色色带,从而判定动物PCV-3免疫抗体效价及野毒感染情况。

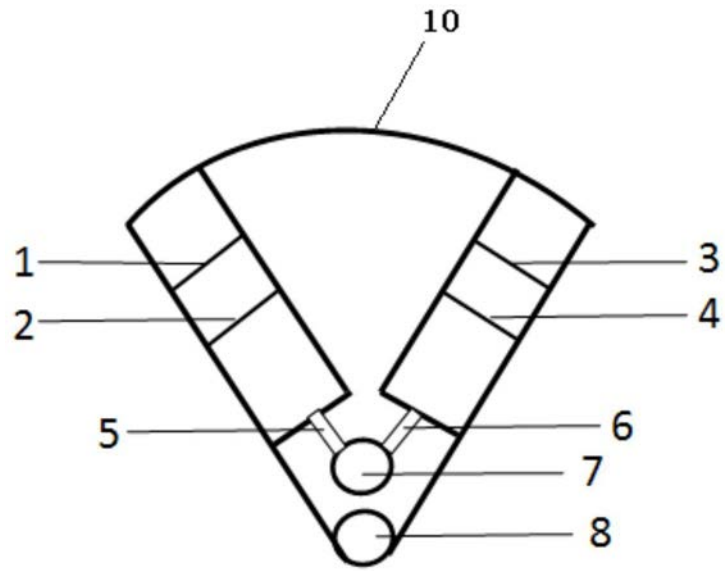


图1

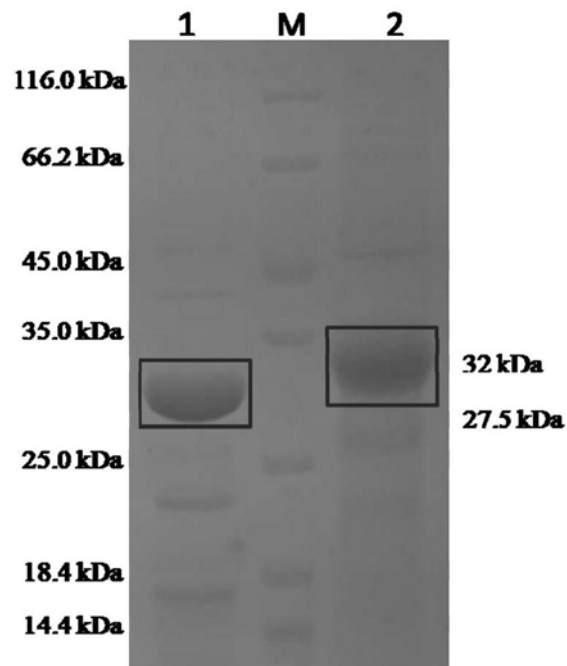


图2

专利名称(译)	圆环病毒3型免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡		
公开(公告)号	CN208443853U	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201820988547.0	申请日	2018-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	安阳工学院		
申请(专利权)人(译)	安阳工学院		
当前申请(专利权)人(译)	安阳工学院		
[标]发明人	连凯琪 周玲玲 张杰 苗银萍 张明亮 宋玉伟 关现军 王双山		
发明人	连凯琪 周玲玲 张杰 苗银萍 张明亮 宋玉伟 关现军 王双山		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/532		
代理人(译)	张群峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种用于圆环病毒3型(PCV-3)免疫评价与野毒感染诊断的免疫速测卡。该免疫速测卡包括扇形底板，在扇形底板的相对两边表面上分别沿径向设有检测试纸I和检测试纸II，在扇形底板的圆心处设有金标孔，邻近金标孔设置有加样孔，加样孔分别通过第I样品引流道和第II样品引流道与检测试纸I和检测试纸II连接。该免疫速测卡不使用仪器设备，操作便捷，结果判读简单，能够满足基层农户以及动物疫病防疫部门对于新出现的PCV-3的诊断与检测需求，对新发PCV-3的防控具有重要意义。

