



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727848 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710874451.1

(22)申请日 2017.09.25

(71)申请人 贵州省人民医院

地址 550002 贵阳市南明区中山东路83号

(72)发明人 余福勋 聂瑛洁 罗振华 蒋立
黄学勇 许汴利

(74)专利代理机构 北京栈桥知识产权代理事务所(普通合伙) 11670

代理人 潘卫锋

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,属于生物检测技术领域,所述试纸条含有:胶体金标记的特异性SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜;待测样本中的抗SFTS抗体先与胶体金标记SFTS重组抗原反应,然后硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应,形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记SFTS重组抗原夹心复合物,通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。本发明具有简便快速、特异性强、灵敏度高、准确可靠、成本低等优点,不需要特殊仪器,可肉眼直接判读结果的,对新布尼亚病毒的诊断和防治具有非常重要的医学价值。

A
CN 107727848

CN

1. 一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述试纸条含有:胶体金标记的特异性SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜;待测样本中的抗SFTS抗体先与胶体金标记SFTS重组抗原反应,然后硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应,形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记SFTS重组抗原夹心复合物,通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。

2. 根据权利要求1所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述特异性SFTS重组抗原的制备方法为:

(1) 分离得到SFTS病毒的病毒株,用RNA提取试剂提取出SFTS病毒的RNA;

(2) 以SFTS病毒株的基因组为模板,通过PCR扩增得到N蛋白基因产物;

(3) 用内切酶Sph I和Hind III酶切处理在目的基因两侧带有限制性内切酶Sph I和Hind III识别位点的所述SFTS病毒株N蛋白基因PCR产物,与经相同酶切处理的表达载体pQE 30连接,构建重组表达质粒,转化大肠杆菌的感受态细胞,得到阳性克隆重组质粒;用终浓度0.3mmol/L的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后即获得特异性SFTS重组抗原。

3. 一种如权利要求1至2任意一项所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,该方法包括下述步骤:

S1、制备胶体金标记的特异性SFTS重组抗原的玻璃纤维膜:

(1) 胶体金溶液的制备:

用王水浸泡容器一定时间,然后用超纯水清洗干净,烘干;取1%氯金酸1mL加入到去离子双蒸水中至终体积为100mL,得到的氯金酸浓度为0.01%,将得到的氯金酸加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存备用;

(2) 金标特异性SFTS重组抗原的制备:

取上述制备的胶体金溶液,用0.1mol/L NaOH调节pH至6.0-8.5;用磷酸盐缓冲液(PB)将特异性SFTS重组抗原的稀释至抗原浓度为0.3-1.0mg/mL;取所述稀释液,在4℃条件下2400r/min离心28min,吸取上清液,弃去沉淀,边搅拌边将上清液逐滴加入到上述调节好pH的胶体金溶液中,静置;加入稳定剂,在4℃条件下2400r/min离心28min,静置,弃上清,留沉淀物,用缓释剂重悬,即得到胶体金标记的特异性SFTS重组抗原;

(3) 将标记好胶体金的特异性SFTS重组抗原溶液均匀涂布到已经处理好的玻璃纤维素膜上,冷冻干燥,制备成胶体金垫,备用;

S2、制备包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜:

将特异性SFTS重组抗原稀释成1mg/mL,将鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体稀释成1mg/mL;将稀释好的特异性SFTS重组抗原均匀喷在硝酸纤维素膜上,得到检测线;将稀释好的鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体均匀喷在硝酸纤维素膜上,得到质控线,室温包被过夜,封袋备用;

S3、制备试纸条:

将样品垫在封闭液中浸泡40min,烘干,封装备用;将PVC底板、硝酸纤维素膜检测层、样品垫、玻璃纤维素膜和吸水垫组合,PVC底板上硝酸纤维素膜的上方粘帖吸水纸,硝酸纤维

素膜与吸水纸相互交叠0.2mm,在硝酸纤维素膜的下方依次粘贴玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜之间以及玻璃纤维膜与样品垫之间相互交叠0.2mm,即得所述检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

4.根据权利要求3所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金标记特异性SFTS重组抗原用pH调节剂调节pH值为6.0~8.5,所述的玻璃纤维素膜上的胶体金标记特异性SFTS重组抗原的含量为0.05~0.2 μ g/cm²。

5.根据权利要求3所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述胶体金标记特异性SFTS重组抗原调节其pH值为6.0~8.5,所述的玻璃纤维素膜上的胶体金标记特异性SFTS重组抗原的含量为0.05~0.2 μ g/cm²。

6.根据权利要求3所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的检测线中所述的特异性SFTS重组抗原的含量为0.06~0.09 μ g/cm²。

7.根据权利要求3所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,所述的质控线中的鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体的含量为0.08~1.0 μ g/cm²。

一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体是涉及一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 新布尼亚病毒 (Novel Bunyavirus, SFTS Bunyavirus), 是发热伴血小板减少综合症 (Fever with Thrombocytopenia Associated syndrome, SFTS) 的病原, 为布尼亚病毒科白蛉热病毒属的一种新型病毒, 于2009年在中国首先发现, 也是中国首例发现的新型病毒。是威胁我国人民健康和公共卫生安全的重要新发传染病, 其临床表现以发热伴血小板、白细胞减少和消化道症状为主要特征, 重症死亡率高达15~30%, 严重影响着人民的健康和生命安全。到目前为止, 全国已有河南、江苏、湖北、山东、安徽和辽宁等26个省发现病例, 每年有数千病例, 造成数百人死亡。中国国家疾控中心、河南省疾控中心、江苏省疾控中心等单位先后成功的分离到该病病毒, 并对其进行了病原学、流行病学、临床医学等研究。目前该病毒序列已经阐明, 但是对SFTS尚无特效药治疗和疫苗预防。

[0003] SFTS很容易与血液、消化、呼吸等多系统疾病相混淆, 加上临床医生对其缺乏认知, 给该病的诊断和鉴别诊断带来困难。该病毒需要通过实验室手段进行确诊, 常用的方法有病毒分离培养、病毒核酸检测和免疫学检测等。病毒分离和免疫学检测或是操作复杂、费时, 不能快速得到检测结果, 或是检测敏感度不够。

[0004] 当前, 基于PCR技术 (常规PCR或荧光定量PCR) 对病毒核酸进行检测是对SFTS进行早期快速诊断的重要手段。PCR技术具有检测敏感性高, 操作简单、快速等优点, 然而其前期投入费用较大 (对实验室功能分区以及PCR仪的依赖), 而且易受实验室污染而导致假阳性, 加上SFTS为人兽共患自然疫源性疾病, 多发生于山区和丘陵等医疗卫生条件相对较差的地区, 所以, 亟待建立一种快速、可靠的, 适合基层单位和现场应用的SFTS病毒检测技术。

发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是现有的新布尼亚病毒检测技术不符合快速、简便、高灵敏度的要求, 进而提供一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

[0006] 本发明的技术方案是: 一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条, 所述试纸条含有: 胶体金标记的特异性SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜; 待测样本中的抗SFTS抗体先与胶体金标记特异性SFTS重组抗原反应, 然后与硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应, 形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记特异性SFTS重组抗原夹心复合物, 通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。

[0007] 进一步地, 所述特异性SFTS重组抗原的制备方法为:

[0008] (1) 分离得到SFTS病毒的病毒株, 用RNA提取试剂提取出SFTS病毒的RNA;

[0009] (2) 以SFTS病毒株的基因组为模板,通过PCR扩增得到N蛋白基因产物;

[0010] (3) 用内切酶Sph I和Hind III酶切处理在目的基因两侧带有限制性内切酶Sph I和Hind III识别位点的所述SFTS病毒株N蛋白基因PCR产物,与经相同酶切处理的表达载体pQE 30连接,构建重组表达质粒,转化大肠杆菌的感受态细胞,得到阳性克隆重组质粒;用终浓度0.3mmol/L的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后即获得特异性SFTS重组抗原。

[0011] 进一步地,所述的RNA提取试剂的组成成分为:质量浓度为0.6-0.8%的溴化钠、质量浓度为0.2-0.5%的硫氰酸胍、质量浓度为0.1-0.2%的四氯化碳、质量浓度为1.2-1.4%的乙酸乙酯、质量浓度为0.2-0.5%的2-乙氧基乙醇、质量浓度为0.05-0.15%的Triton X-100,余量为DEPC-H₂O。

[0012] 进一步地,所述的一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法包括下述步骤:

[0013] S1、制备胶体金标记的特异性SFTS重组抗原的玻璃纤维膜:

[0014] (1) 胶体金溶液的制备:

[0015] 用王水浸泡容器一定时间,然后用超纯水清洗干净,烘干;取1%氯金酸1mL加入到去离子双蒸水中至终体积为100mL,得到的氯金酸浓度为0.01%,将得到的氯金酸加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存备用;

[0016] (2) 金标特异性SFTS重组抗原的制备:

[0017] 取上述制备的胶体金溶液,用0.1mol/L NaOH调节pH至6.0-8.5;用磷酸盐缓冲液(PB)将特异性SFTS重组抗原的稀释至抗原浓度为0.3-1.0mg/mL;取所述稀释液,在4℃条件下2400r/min离心28min,吸取上清液,弃去沉淀,边搅拌边将上清液逐滴加入到上述调节好pH的胶体金溶液中,静置;加入稳定剂,在4℃条件下2400r/min离心28min,静置,弃上清,留沉淀物,用缓释剂重悬,即得到胶体金标记的特异性SFTS重组抗原;

[0018] (3) 将标记好胶体金的特异性SFTS重组抗原溶液均匀涂布到已经处理好的玻璃纤维素膜上,冷冻干燥,制备成胶体金垫,备用;

[0019] S2、制备包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜:

[0020] 将特异性SFTS重组抗原稀释成1mg/mL,将鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体稀释成1mg/mL;将稀释好的特异性SFTS重组抗原均匀喷在硝酸纤维素膜上,得到检测线;将稀释好的鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体均匀喷在硝酸纤维素膜上,得到质控线,室温包被过夜,封袋备用;

[0021] S3、制备试纸条:

[0022] 将样品垫在封闭液中浸泡40min,烘干,封装备用;将PVC底板、硝酸纤维素膜检测层、样品垫、玻璃纤维素膜和吸水垫组合,PVC底板上硝酸纤维素膜的上方粘帖吸水纸,硝酸纤维素膜与吸水纸相互交叠0.2mm,在硝酸纤维素膜的下方依次粘贴玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜之间以及玻璃纤维膜与样品垫之间相互交叠0.2mm,即得所述检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

[0023] 更进一步地,所述胶体金标记特异性SFTS重组抗原用pH调节剂调节pH值为6.0-8.5,所述的玻璃纤维素膜上的胶体金标记特异性SFTS重组抗原的含量为0.05~0.2μg/

cm²。

[0024] 更进一步地,所述的检测线中所述的特异性SFTS重组抗原的含量为0.06~0.09μg/cm²。

[0025] 更进一步地,所述的质控线中的鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体的含量为0.08~1.0μg/cm²。

[0026] 本发明的检测原理为:若待测人或者动物血清样本中含有抗SFTS抗体,则人或者动物血清中的抗SFTS抗体先与玻璃纤维膜上的胶体金标记特异性SFTS重组抗原反应,形成特异性SFTS抗体-胶体金标记特异性SFTS重组抗原复合物,当该复合物层析至硝酸纤维膜上预先包被在检测线上的特异性SFTS重组抗原处时,此处的重组抗原会识别改复合物中的特异性SFTS抗体,从而形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记特异性SFTS重组抗原夹心复合物,并在此固定并累积出现肉眼可见的红色线,未反应的金标特异性SFTS重组抗原则仍继续层析前行,当到达点预先包被在质控线上的鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体处时,胶体金标记特异性SFTS重组抗原被其结合住,从而在此处也出现由胶体金颗粒固定并累积而显现出肉眼可见的红色线,结果是:检测线显示红色表示SFTS病毒抗体阳性;检测线不显示红色,表示SFTS病毒抗体阴性,即检测样品中不含SFTS病毒抗体或是SFTS病毒抗体含量极低,质控线显示红色,表示试纸有效;质控线处不显示红色,说明试纸失效,即或是特异性SFTS重组抗原、或是鼠抗-特异性SFTS重组抗原单克隆抗体失活,检测结果无效。

[0027] 本发明的有益效果是:本发明利用制备的特异性SFTS重组抗原作为检测人及动物血清中的抗SFTS抗体,结合胶体金免疫层析法,不仅具有简便快速、特异性强、灵敏度高、准确可靠、成本低等优点,不需要特殊仪器,可肉眼直接判读结果的,对新布尼亚病毒的诊断和防治具有非常重要的医学价值。而且本发明既可检测人,又可用于不同种类动物,使用便利,能很好的用于偏远地区病人诊断及动物现场流行病学监测。

具体实施方式

[0028] 实施例1:

[0029] 一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条含有:胶体金标记的SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜;待测样本中的抗SFTS抗体先与胶体金标记SFTS重组抗原反应,然后与硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应,形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记SFTS重组抗原夹心复合物,通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。

[0030] 其中,所述特异性SFTS重组抗原的制备方法为:

[0031] (1)从感染SFTS病毒的动物的生理学样本或组织样本中,或是损伤组织中,分离得到SFTS病毒的病毒株,用RNA提取试剂提取出SFTS病毒的RNA;所述的RNA提取试剂的组成成分为:质量浓度为0.6%的溴化钠、质量浓度为0.2%的硫氰酸胍、质量浓度为0.1%的四氯化碳、质量浓度为1.2%的乙酸乙酯、质量浓度为0.2%的2-乙氧基乙醇、质量浓度为0.05%的Triton X-100,余量为DEPC-H₂O;

[0032] (2)以SFTS病毒株的基因组为模板,通过PCR扩增得到N蛋白基因产物;

[0033] (3) 用内切酶Sph I和Hind III酶切处理在目的基因两侧带有限制性内切酶Sph I和Hind III识别位点的所述SFTS病毒株N蛋白基因PCR产物,与经相同酶切处理的表达载体pQE 30连接,构建重组表达质粒,转化大肠杆菌的感受态细胞,得到阳性克隆重组质粒;用终浓度0.3mmol/L的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后即获得特异性SFTS重组抗原。

[0034] 该检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法包括下述步骤:

[0035] S1、制备胶体金标记的SFTS重组抗原玻璃纤维膜:

[0036] (1) 胶体金溶液的制备:

[0037] 用王水浸泡容器一定时间,然后用超纯水清洗干净,烘干;取1%氯金酸1mL加入到去离子双蒸水中至终体积为100mL,得到的氯金酸浓度为0.01%,将得到的氯金酸加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存备用;

[0038] (2) 金标SFTS重组抗原的制备:

[0039] 取上述制备的胶体金溶液,用0.1mol/L NaOH调节pH至6.0;用磷酸盐缓冲液(PB)将SFTS重组抗原稀释至抗体浓度为0.3mg/mL;取所述稀释液,在4℃条件下2400r/min离心28min,吸取上清液,弃去沉淀,边搅拌边将上清液逐滴加入到上述调节好pH的胶体金溶液中,静置;加入稳定剂,在4℃条件下2400r/min离心28min,静置,弃上清,留沉淀物,用缓释剂重悬,即得到胶体金标记的SFTS重组抗原;

[0040] (3) 将得到的胶体金标记SFTS重组抗原用pH调节剂调节pH值为6.0,用三维平面点膜喷金仪器HM3055,将标记好胶体金的SFTS病毒重组抗原溶液均匀涂布到已经处理好的玻璃纤维素膜上,使玻璃纤维素膜上的胶体金标记SFTS病毒重组抗原的含量为0.05 μ g/cm²,冷冻干燥,制备成胶体金垫,备用;

[0041] S2、制备包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜:

[0042] 将特异性SFTS重组抗原稀释成1mg/mL,将鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体稀释成1mg/mL;用三维平面点膜喷金仪器HM3055,将稀释好的特异性SFTS重组抗原均匀喷在硝酸纤维素膜上,使特异性SFTS重组抗原的含量为0.06 μ g/cm²,得到检测线;将稀释好的鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体均匀喷在硝酸纤维素膜上,使鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的含量为0.08 μ g/cm²,得到质控线,室温包被过夜,封袋备用;

[0043] S3、制备试纸条:

[0044] 将样品垫在封闭液中浸泡40min,烘干,封装备用;将PVC底板、硝酸纤维素膜检测层、样品垫、玻璃纤维素膜和吸水垫组合,PVC底板上硝酸纤维素膜的上方粘帖吸水纸,硝酸纤维素膜与吸水纸相互交叠0.2mm,在硝酸纤维素膜的下方依次粘贴玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜之间以及玻璃纤维膜与样品垫之间相互交叠0.2mm,即得所述检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

[0045] 实施例2:

[0046] 一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条含有:胶体金标记的SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜;待测样本中的抗SFTS抗体先与

胶体金标记SFTS重组抗原反应,然后与硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应,形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记SFTS重组抗原夹心复合物,通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。

[0047] 其中,所述特异性SFTS重组抗原的制备方法为:

[0048] (4)从感染SFTS病毒的动物的生理学样本或组织样本中,或是损伤组织中,分离得到SFTS病毒的病毒株,用RNA提取试剂提取出SFTS病毒的RNA;所述的RNA提取试剂的组成成分为:质量浓度为0.6%的溴化钠、质量浓度为0.2%的硫氰酸胍、质量浓度为0.1%的四氯化碳、质量浓度为1.2%的乙酸乙酯、质量浓度为0.2%的2-乙氧基乙醇、质量浓度为0.05%的Triton X-100,余量为DEPC-H₂O;

[0049] (5)以SFTS病毒株的基因组为模板,通过PCR扩增得到N蛋白基因产物;

[0050] (6)用内切酶Sph I和Hind III酶切处理在目的基因两侧带有限制性内切酶Sph I和Hind III识别位点的所述SFTS病毒株N蛋白基因PCR产物,与经相同酶切处理的表达载体pQE 30连接,构建重组表达质粒,转化大肠杆菌的感受态细胞,得到阳性克隆重组质粒;用终浓度0.3mmol/L的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后即获得特异性SFTS重组抗原。

[0051] 该检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法包括下述步骤:

[0052] S1、制备胶体金标记的SFTS重组抗原玻璃纤维膜:

[0053] (1)胶体金溶液的制备:

[0054] 用王水浸泡容器一定时间,然后用超纯水清洗干净,烘干;取1%氯金酸1mL加入到去离子双蒸水中至终体积为100mL,得到的氯金酸浓度为0.01%,将得到的氯金酸加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存备用;

[0055] (2)金标SFTS重组抗原的制备:

[0056] 取上述制备的胶体金溶液,用0.1mol/L NaOH调节pH至6.0;用磷酸盐缓冲液(PB)将SFTS重组抗原稀释至抗体浓度为0.3mg/mL;取所述稀释液,在4℃条件下2400r/min离心28min,吸取上清液,弃去沉淀,边搅拌边将上清液逐滴加入到上述调节好pH的胶体金溶液中,静置;加入稳定剂,在4℃条件下2400r/min离心28min,静置,弃上清,留沉淀物,用缓释剂重悬,即得到胶体金标记的SFTS重组抗原;

[0057] (3)将得到的胶体金标记SFTS重组抗原用pH调节剂调节pH值为6.0,用三维平面点膜喷金仪仪器HM3055,将标记好胶体金的SFTS病毒重组抗原溶液均匀涂布到已经处理好的玻璃纤维素膜上,使玻璃纤维素膜上的胶体金标记SFTS病毒重组抗原的含量为0.05μg/cm²,冷冻干燥,制备成胶体金垫,备用;

[0058] S2、制备包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜:

[0059] 将特异性SFTS重组抗原稀释成1mg/mL,将鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体稀释成1mg/mL;用三维平面点膜喷金仪仪器HM3055,将稀释好的特异性SFTS重组抗原均匀喷在硝酸纤维素膜上,使特异性SFTS重组抗原的含量为0.06μg/cm²,得到检测线;将稀释好的鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体均匀喷在硝酸纤维素膜上,使鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的含量为0.08μg/cm²,得到质控线,室温包被过夜,封袋备用;

[0060] S3、制备试纸条：

[0061] 将样品垫在封闭液中浸泡40min,烘干,封装备用;将PVC底板、硝酸纤维素膜检测层、样品垫、玻璃纤维素膜和吸水垫组合,PVC底板上硝酸纤维素膜的上方粘帖吸水纸,硝酸纤维素膜与吸水纸相互交叠0.2mm,在硝酸纤维素膜的下方依次粘贴玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜之间以及玻璃纤维膜与样品垫之间相互交叠0.2mm,即得所述检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

[0062] 实施例3:

[0063] 一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条含有:胶体金标记的SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜;待测样本中的抗SFTS抗体先与胶体金标记SFTS重组抗原反应,然后与硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应,形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记SFTS重组抗原夹心复合物,通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。

[0064] 其中,所述特异性SFTS重组抗原的制备方法为:

[0065] (7) 从感染SFTS病毒的动物的生理学样本或组织样本中,或是损伤组织中,分离得到SFTS病毒的病毒株,用RNA提取试剂提取出SFTS病毒的RNA;所述的RNA提取试剂的组成成分为:质量浓度为0.6%的溴化钠、质量浓度为0.2%的硫氰酸胍、质量浓度为0.1%的四氯化碳、质量浓度为1.2%的乙酸乙酯、质量浓度为0.2%的2-乙氧基乙醇、质量浓度为0.05%的Triton X-100,余量为DEPC-H₂O;

[0066] (8) 以SFTS病毒株的基因组为模板,通过PCR扩增得到N蛋白基因产物;

[0067] (9) 用内切酶Sph I和Hind III酶切处理在目的基因两侧带有限制性内切酶Sph I和Hind III识别位点的所述SFTS病毒株N蛋白基因PCR产物,与经相同酶切处理的表达载体pQE 30连接,构建重组表达质粒,转化大肠杆菌的感受态细胞,得到阳性克隆重组质粒;用终浓度0.3mmol/L的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后即获得特异性SFTS重组抗原。

[0068] 该检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条的制备方法包括下述步骤:

[0069] S1、制备胶体金标记的SFTS重组抗原玻璃纤维膜:

[0070] (1) 胶体金溶液的制备:

[0071] 用王水浸泡容器一定时间,然后用超纯水清洗干净,烘干;取1%氯金酸1mL加入到去离子双蒸水中至终体积为100mL,得到的氯金酸浓度为0.01%,将得到的氯金酸加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.0mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止,冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存备用;

[0072] (2) 金标SFTS重组抗原的制备:

[0073] 取上述制备的胶体金溶液,用0.1mol/L NaOH调节pH至6.0;用磷酸盐缓冲液(PB)将SFTS重组抗原稀释至抗体浓度为0.3mg/mL;取所述稀释液,在4℃条件下2400r/min离心28min,吸取上清液,弃去沉淀,边搅拌边将上清液逐滴加入到上述调节好pH的胶体金溶液中,静置;加入稳定剂,在4℃条件下2400r/min离心28min,静置,弃上清,留沉淀物,用缓释剂重悬,即得到胶体金标记的SFTS重组抗原;

[0074] (3) 将得到的胶体金标记SFTS重组抗原用pH调节剂调节pH值为6.0,用三维平面点

膜喷金仪器HM3055,将标记好胶体金的SFTS病毒重组抗原溶液均匀涂布到已经处理好的玻璃纤维素膜上,使玻璃纤维素膜上的胶体金标记SFTS病毒重组抗原的含量为0.05 μ g/cm²,冷冻干燥,制备成胶体金垫,备用;

[0075] S2、制备包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜:

[0076] 将特异性SFTS重组抗原稀释成1mg/mL,将鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体稀释成1mg/mL;用三维平面点膜喷金仪器HM3055,将稀释好的特异性SFTS重组抗原均匀喷在硝酸纤维素膜上,使特异性SFTS重组抗原的含量为0.06 μ g/cm²,得到检测线;将稀释好的鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体均匀喷在硝酸纤维素膜上,使鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的含量为0.08 μ g/cm²,得到质控线,室温包被过夜,封袋备用;

[0077] S3、制备试纸条:

[0078] 将样品垫在封闭液中浸泡40min,烘干,封装备用;将PVC底板、硝酸纤维素膜检测层、样品垫、玻璃纤维素膜和吸水垫组合,PVC底板上硝酸纤维素膜的上方粘帖吸水纸,硝酸纤维素膜与吸水纸相互交叠0.2mm,在硝酸纤维素膜的下方依次粘贴玻璃纤维膜和样品垫,硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜之间以及玻璃纤维膜与样品垫之间相互交叠0.2mm,即得所述检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条。

[0079] 本发明的应用实验

[0080] 1、特异性试验:对已知的SFTS病毒抗体、RVF病毒抗体、登革热病毒抗体进行交叉试验。当样品中含有SFTS病毒抗体时,检测线呈阳性反应(红色),而当样品中含有RVF病毒抗体或登革热病毒抗体时,检测线呈阴性(无色),TEN缓冲液阴性对照,检测线也呈阴性反应。上述实验多次重复10次后结果相同,说明该方法具有高度的特异性。

[0081] 2、稳定性试验:将本发明的10批试纸在37℃恒温培养箱中放置7天后,与保存4℃的同批试纸同时检测10份SFTS病毒抗体阳性样品和10份SFTS病毒抗体阴性样品,结果显示:37℃作用7d对本发明的试纸无破坏作用,证明试纸在高温下稳定。

[0082] 3、保存期试验:将同一批制备的本发明的试纸,分别在4℃和室温保存1至12个月,于1个月、6个月、12个月取出,检测1份倍比稀释的SFTS病毒进行保存期敏感性试验,检测10份已知的SFTS病毒抗体、RVF病毒抗体、登革热病毒抗体阳性样品进行保存期特异性试验,观察期敏感性、特异性和稳定性,以确定试纸的保存期。结果显示:本发明的试纸经室温保存12个月期特异性、敏感性均不发生改变。

[0083] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明实施例技术方案的精神和范围。

专利名称(译)	一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN107727848A	公开(公告)日	2018-02-23
申请号	CN201710874451.1	申请日	2017-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	贵州省人民医院		
申请(专利权)人(译)	贵州省人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	贵州省人民医院		
[标]发明人	余福勋 聂瑛洁 罗振华 蒋立 黄学勇 许汴利		
发明人	余福勋 聂瑛洁 罗振华 蒋立 黄学勇 许汴利		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	潘卫锋		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种检测人及动物血清抗SFTS抗体的胶体金免疫层析试纸条，属于生物检测技术领域，所述试纸条含有：胶体金标记的特异性SFTS重组抗原的玻璃纤维膜、包被有特异性SFTS重组抗原的检测线和包被有鼠抗-SFTS重组抗原单克隆抗体的质控线的硝酸纤维素膜；待测样本中的抗SFTS抗体先与胶体金标记SFTS重组抗原反应，然后硝酸纤维素膜上对应的特异性SFTS重组抗原反应，形成特异性SFTS重组抗原-特异性SFTS抗体-胶体金标记SFTS重组抗原夹心复合物，通过胶体金颗粒特有的颜色示踪而判断特异性抗体的有无。本发明具有简便快速、特异性强、灵敏度高、准确可靠、成本低等优点，不需要特殊仪器，可肉眼直接判读结果的，对新布尼亚病毒的诊断和防治具有非常重要的医学价值。