



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109116021 A

(43)申请公布日 2019.01.01

(21)申请号 201810886871.6

(22)申请日 2018.08.06

(71)申请人 文珊

地址 421431 湖南省衡阳市衡东县石湾镇
光明村4组

(72)发明人 文珊

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒,包括虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡和/或虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡和层析稀释液,其中,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗原胶体金层析检测试剂,虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗体胶体金层析检测试剂,所述层析稀释液由终浓度1%casein,0.4%Tween-20和10mM PBS缓冲系统组成;所述试剂盒具有特异性、敏感性等特点。

1. 一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒,其特征在于:包括虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡和/或虾血细胞虹彩病毒检测试纸卡和层析稀释液,其中,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗原胶体金层析检测试剂,虾血细胞虹彩病毒检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗体胶体金层析检测试剂,所述层析稀释液由终浓度1%casein,0.4%Tween-20和10mMPBS缓冲系统组成,其中,

所述虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡是由下述方法得到的:

病毒亲和纯化抗体的标记:选择胶体金用0.2M K₂CO₃调节其pH值,加入虾血细胞虹彩病毒亲和纯化抗体,室温标记和封闭,离心后用复溶液悬浮;

鸡IgY的标记:选择胶体金用0.2M K₂CO₃调节其pH值,用鸡IgY室温标记,标记后室温封闭,离心后用复溶液悬浮;

免疫金的制备:将病毒亲和纯化抗体免疫金和鸡IgY免疫金混合铺金,过夜烘干;

包被:

C线:在NC膜上包被抗鸡IgY多抗,加入保护剂做保护;

T线:在NC膜上包被重组抗原亲和纯化抗体,加入保护剂做保护;

所述虾血细胞虹彩病毒检测试纸卡是由下述方法得到的:

病毒抗原的标记:选择胶体金用0.2M K₂CO₃调节其pH值,加入虾血细胞虹彩病毒抗原,室温标记和封闭,离心后用复溶液将沉淀复溶;

鸡IgY的标记:选择胶体金用0.2M K₂CO₃调节其pH值,用鸡IgY室温标记,标记后室温封闭,离心后用复溶液悬浮;

免疫金的制备:将病毒抗原免疫金和鸡IgY免疫金混合铺金,过夜烘干;

包被:

C线:在NC膜上包被抗鸡IgY多抗,并加入抗体保护剂保护;

G线:在NC膜上包被抗人IgG单抗,并加入保护剂进行保护;

M线:在NC膜上包被抗人IgM单抗,并加入保护剂进行保护。

2. 根据权利要求1所述的虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒,其特征在于:虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒包含30μl滴管,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡,层析稀释液及虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒说明书,其虾血细胞虹彩病毒抗体检测试剂盒包含5μl直吸管,虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡,层析稀释液及虾血细胞虹彩病毒抗体检测试剂盒说明书;或者为抗原抗体二合一检测试剂盒,即包括30μl滴管+5μl直吸管,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡+虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡,层析稀释液及虾血细胞虹彩病毒抗原抗体检测试剂盒说明书。

3. 根据权利要求1所述的虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤如下:

(1) 通过分子克隆、蛋白表达好验证以及蛋白纯化的方式获得NP蛋白;

(2) SFTSV病毒免疫豚鼠,制得的多抗血清经过NP蛋白亲和纯化得到抗SFTSV NP豚鼠多抗;

(3) NP蛋白免疫豚鼠获得NP蛋白多抗血清后与NP蛋白亲和纯化抗NP蛋白多抗;

(4) 利用步骤(2)中产物进行虾血细胞虹彩病毒抗原诊断免疫金的制备;利用步骤(3)中产物进行虾血细胞虹彩病毒抗原诊断包被膜的制备;利用步骤(1)中产物进行虾血细胞

虹彩病毒抗体检测免疫金的制备。

一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及试剂盒领域,尤其是一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒。

背景技术

[0002] 自1954年Xeros在沼泽大蚊 (*Tiphoneula paludosa*) 中发现首例虹彩病毒以来,人们已经陆续从两栖类、甲壳类、鱼类和爬行类中发现虹彩病毒。根据国际病毒分类委员会第九次报告,虹彩病毒科 (Iridoviridae) 下设五个属:即虹彩病毒属 (Iridovirus) ,绿虹彩病毒属 (Chloriridovirus) ,蛙病毒属 (Ranavirus) ,淋巴囊肿病毒属 (Lymphocystivirus) 和细胞肿大病毒属 (Megalocytivirus) ,其中后面三个属的虹彩病毒可以感染鱼类。

[0003] 虹彩病毒病是一种广泛存在于水生动物且危害较大的病毒性疾病。目前,虹彩病毒成为一些鱼类、两栖类动物的新型病原体,特别是水产养殖业中的经济类品种再加上其特殊的生物学特性,因此越发引起人们的关注和重视。

[0004] 对虾感染虹彩病毒,最早于1993年Lightner和Redman在靠近厄瓜多尔对虾养殖场发现了被虹彩病毒感染的原糙对虾 (*Protrachypene precipua* Burkenroad)。这是首次报道十足目动物能够感染虹彩病毒。对感染虹彩病毒的原糙对虾组织病理学观察发现,表皮上皮细胞(鳃、胃内层甚至遍布全身)呈现典型的虹彩病毒的感染;造血组织,触角腺上皮组织,以及心脏、肌肉、皮下组织、鳃、肝胰腺中的结缔组织细胞和吞噬细胞也被虹彩病毒感染。

[0005] 2017年,中科院黄海研究所科研人员在浙江严重死亡的南美白对虾上发现一种新病毒,相关研究报道称新分离的病毒属于虹彩病毒科,但不属于虹彩病毒科下已建立的五个属,感染该病毒的虾造血组织、鳃丝、肝胰腺、附肢和肌肉的血细胞中出现嗜碱性包涵体和核固缩现象,因此命名为虾血细胞虹彩病毒 (SHIV)。

[0006] 对于虾血细胞虹彩病毒,我们的了解不是很多,也还没有正式的文献报道,建立一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒,能够方便在疫病发生早期快速、准确的诊断疫病,为疫病的防控提供有效的参考。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒,包括虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡和/或虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡和层析稀释液,其中,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗原胶体金层析检测试剂,虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗体胶体金层析检测试剂,所述层析稀释液由终浓度1% casein,0.4% Tween-20和10mMPBS缓冲系统组成,其中,

[0010] 所述虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡是由下述方法得到的:

- [0011] 病毒亲和纯化抗体的标记:选择胶体金用0.2M K2CO3调节其pH值,加入虾血细胞虹彩病毒亲和纯化抗体,室温标记和封闭,离心后用复溶液悬浮;
- [0012] 鸡IgY的标记:选择胶体金用0.2M K2CO3调节其pH值,用鸡IgY室温标记,标记后室温封闭,离心后用复溶液悬浮;
- [0013] 免疫金的制备:将病毒亲和纯化抗体免疫金和鸡IgY免疫金混合铺金,过夜烘干;
- [0014] 包被:
- [0015] C线:在NC膜上包被抗鸡IgY多抗,加入保护剂做保护;
- [0016] T线:在NC膜上包被重组抗原亲和纯化抗体,加入保护剂做保护;
- [0017] 所述虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡是由下述方法得到的:
- [0018] 病毒抗原的标记:选择胶体金用0.2M K2CO3调节其pH值,加入虾血细胞虹彩病毒抗原,室温标记和封闭,离心后用复溶液将沉淀复溶;
- [0019] 鸡IgY的标记:选择胶体金用0.2M K2CO3调节其pH值,用鸡IgY室温标记,标记后室温封闭,离心后用复溶液悬浮;
- [0020] 免疫金的制备:将病毒抗原免疫金和鸡IgY免疫金混合铺金,过夜烘干;
- [0021] 包被:
- [0022] C线:在NC膜上包被抗鸡IgY多抗,并加入抗体保护剂保护;
- [0023] G线:在NC膜上包被抗人IgG单抗,并加入保护剂进行保护;
- [0024] M线:在NC膜上包被抗人IgM单抗,并加入保护剂进行保护。
- [0025] 优选地,上述的虾血细胞虹彩病毒抗原抗体检测试剂盒,其虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒包含30μl滴管,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡,层析稀释液及虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒说明书,其虾血细胞虹彩病毒抗体检测试剂盒包含5μl直吸管,虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡,层析稀释液及虾血细胞虹彩病毒抗体检测试剂盒说明书;或者为抗原抗体二合一检测试剂盒,即包括30μl滴管+5μl直吸管,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡+虾血细胞虹彩病毒抗体检测试纸卡,层析稀释液及虾血细胞虹彩病毒抗原抗体检测试剂盒说明书。
- [0026] 上述的虾血细胞虹彩病毒抗原抗体检测试剂盒的制备方法,步骤如下:
- [0027] (1)通过分子克隆、蛋白表达好验证以及蛋白纯化的方式获得NP蛋白;
- [0028] (2)SFTSV病毒免疫豚鼠,制得的多抗血清经过NP蛋白亲和纯化得到抗SFTSV NP豚鼠多抗;
- [0029] (3)NP蛋白免疫豚鼠获得NP蛋白多抗血清后与NP蛋白亲和纯化抗NP蛋白多抗;
- [0030] (4)利用步骤(2)中产物进行虾血细胞虹彩病毒抗原诊断免疫金的制备;利用步骤(3)中产物进行虾血细胞虹彩病毒抗原诊断包被膜的制备;利用步骤(1)中产物进行虾血细胞虹彩病毒抗体检测免疫金的制备。
- [0031] 本发明的有益效果是:
- [0032] 所述虾血细胞虹彩病毒抗原抗体检测试剂盒能够检测虾血细胞虹彩病毒抗原抗体。其中,虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒能够方便、快捷地检测出血清中是否含有虾血细胞虹彩病毒抗原;虾血细胞虹彩病毒抗体检测试剂盒可以为虾类疾病监测提供灵敏快捷的工具;IgM抗体检测和抗原检测联合使用具有早期诊断的价值,具有特异性、敏感性等特点。

具体实施方式

- [0033] 为使本发明目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进行详细说明。
- [0034] 实施例1
- [0035] 一种虾血细胞虹彩病毒抗原抗体检测试剂盒,具有如下:
- [0036] 材料方法与结果
- [0037] 1.NP蛋白的制备
- [0038] 1.1序列合成:
- [0039] NCBI上搜索基因序列(GenBank:KC292285.1),送往金唯智生物科技有限公司合成。
- [0040] 1.2分子克隆:
- [0041] (1)将合成的含有目的基因序列对应的穿刺菌扩增,获得扩增质粒;
- [0042] (2)将质粒进行双酶切(BamHI&NdeI),同时使用相同的限制性内切酶酶切表达质粒pET-28a,37℃酶切1小时;
- [0043] (3)核酸电泳,将母的片段回收,方法参考天根琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书;
- [0044] (4)连接;
- [0045] 体系如下:
- [0046]

Gene NP	3μl
pET-28a	2μl
5×T4 ligase buffer	2μl
T4 Ligase	1μl
ddH ₂ O	2μl

- [0047] 室温连接25分钟;
- [0048] (5)转化T1感受态
- [0049] 将连接产物加入T1感受态中,冰浴30min;42℃热激90sec,迅速放入冰上,静置2min;加入1mlLB液体培养基,37℃培养1小时;5000rpm,离心3min,弃900μl上清,重悬菌体,涂布于含有卡那霉素的LB固体培养基上;37℃培养过夜;
- [0050] (6)挑取单克隆,37℃过夜震荡培养;
- [0051] (7)提取质粒,具体步骤参考天根质粒小提试剂盒说明书;
- [0052] (8)双酶切验证:
- [0053] 酶切体系如下:
- [0054]

pET-28a-NP	6μl
10×Green Buffer	2μl
BamH I	1μl
Nde I	1μl
ddH ₂ O	10μl

- [0055] 1.3表达验证
- [0056] (1)将酶切正确的质粒转化入表达菌株BL21 (DE3),转化方法同转化T1感受态;

- [0057] (2) 挑取三个单克隆于5ml LB液体培养基,37℃过夜震荡培养;
- [0058] (3) 吸取1ml培养物转接至50ml LB液体培养基,37℃震荡培养至OD600为0.6左右;
- [0059] (4) 加入终浓度为1mM IPTG,25℃诱导过夜;
- [0060] (5) 收集菌体,9500rpm,5min,4℃;
- [0061] (6) 用10ml Lysis Buffer (T20N200) 重悬菌体,超声破碎10min,取破碎液1ml,离心,12000rpm,10min,4℃,取上清,沉淀用等体积的8M尿素重悬,将上清与沉淀进行SDS-PAGE电泳。
- [0062] 1.4蛋白纯化
- [0063] (1) 按照上述表达条件扩大培养至1L表达体系;
- [0064] (2) 培养4L合并纯化,25℃过夜诱导后,收集菌体,5000rpm,15min,4℃;
- [0065] (3) 30ml/L Lysis Buffer重悬菌体,超声破碎30min,然后高压破碎4轮;
- [0066] (4) 离心分离沉淀:4℃,18000rpm,40min,收集上清,记为Load;
- [0067] (5) Ni柱亲和纯化,上样前先用Lysis Buffer平衡,上样流速:2ml/min,流穿液记为Flow;
- [0068] (6) Lysis Buffer冲洗三个柱体积;
- [0069] (7) 含20mM咪唑的Lysis Buffer冲洗三个柱体积;
- [0070] (8) 含50mM咪唑的Lysis Buffer冲洗三个柱体积;
- [0071] (9) 然后用含500mM咪唑的Lysis Buffer洗脱目的蛋白NP;
- [0072] (10) SDS-PAGE检测蛋白纯度;
- [0073] (11) 取纯度较高,蛋白量较大的第三管蛋白进行阳离子交换层析;
- [0074] (12) 平衡离子柱,平衡buffer (T20N50) ;
- [0075] (13) 稀释蛋白至盐浓度为50mM,稀释蛋白记为Load,上样,流速为2ml/min,流穿液记为Flow;
- [0076] (14) 用平衡buffer冲洗3个柱体积,记为Wash;
- [0077] (15) 用A buffer (T20N80) 冲洗3个柱体积,样品编号An;
- [0078] (16) 用B buffer (T20N150) 冲洗3个柱体积,样品编号Bn;
- [0079] (17) 用C buffer (T20N200) 冲洗3个柱体积,样品编号Cn;
- [0080] (18) 用D buffer (T20N1000) 冲洗3个柱体积,样品编号Dn;
- [0081] (19) SDS-PAGE电泳检测纯度。
- [0082] 1.5结论
- [0083] 得到纯度为100% 目的蛋白NP:B3、浓度为2.1mg/ml,体积为12ml;B2、浓度为0.256mg/ml,体积为9ml;B4、浓度为0.35mg/ml,体积为11.5ml。
- [0084] 2.SFTSV纯化病毒的制备
- [0085] 2.1病毒液的获得
- [0086] 1.5L灭活病毒液,滴度 1×10^7 IFU/ml。
- [0087] 2.2病毒纯化
- [0088] (1) 过滤:Vero细胞培养的SFTSV病毒液1.5L,4500rpm离心40min,去沉淀,再用过滤器过滤至澄清;
- [0089] (2) 浓缩:用100kd 0.1m²的膜包超滤浓缩病毒液至60ml。用TNE buffer洗膜。得到

的60ml浓缩液再经4500rpm离心30min,弃沉淀置4℃备用;

[0090] (3) 蔗糖梯度密度离心:蔗糖梯度60%,30%,15%,35000rpm,离心22h;

[0091] (4) 离心后收样,用分部收集器收集样品,用紫外检测仪扫描280蛋白图谱。对各管样本进行蔗糖含量及抗原含量测定,绘制曲线;

[0092] (5) 合并抗原含量高峰管,用Sephacryl-100HR进行脱糖,上样及洗脱流速3.5ml/min;

[0093] (6) 再纯化:用4FF柱层析进行分离,上样速度10ml/min,柱50cm×1.6cm,280nmA=1.0,收集第一峰,再用100kd膜包超滤浓缩;

[0094] (7) 最终得到纯化病毒。

[0095] 3.豚鼠抗NP蛋白和SFTSV多抗血清制备

[0096] 3.1实验动物:豚鼠,雌性,6-8周龄,体重250-300g;完全弗氏佐剂,货号F5881,批号SLBN9312V;不完全弗氏佐剂,货号:F5506,批号:SLBM7414V。

[0097] 3.2免疫程序:初免——二免(初免两周后)——三免(二免两周后)——终免(三免三周后)——采血,期间,每次免疫前都采血留样检测抗体水平。

[0098] 3.3免疫剂量和方式:按照0.5ml/只,腹部皮下免疫。

[0099] 3.4采血及血清效价检测:最终心脏采血,将血液室温放置1-3小时,3000rpm/min离心15min,收集血清,测定NP蛋白和SFTSV多抗血清效价均可达到1:1000000以上。

[0100] 4.豚鼠抗NP蛋白和SFTSV多抗血清纯化

[0101] 4.1辛酸-硫酸铵法粗纯:

[0102] (1) 以0.06M醋酸-醋酸钠溶液4倍稀释血清,调节pH值4.5;

[0103] (2) 按照每ml血清体积加入40微升滴加辛酸,室温搅拌30分钟;

[0104] (3) 10000g离心力4度离心30分钟,弃沉淀,上清加入等体积的0.2MPBS并调节pH7.4;

[0105] (4) 加入等量体积的饱和硫酸铵溶液4℃过夜静置;

[0106] (5) 次日离心3000rpm30分钟,收集沉淀;

[0107] (6) 透析于0.01M磷酸盐缓冲液pH7.4。

[0108] 4.2亲和层析

[0109] 4.2.1NP抗原偶联CNBr-activated Sepharose 4B柱材

[0110] (1) 调整NP蛋白浓度3-5mg/ml;

[0111] (2) 称取需要重量的柱材干粉,1:100(W/V)溶解于溶胀液中,可使用玻璃棒轻柔搅拌至完全溶解;

[0112] (3) 使用抽滤系统用溶胀液进行充分的洗涤;

[0113] (4) 待洗涤结尾溶胀液接近抽干时加入偶联液,洗涤并换液为偶联液;

[0114] (5) 室温放置2h,间歇轻柔混匀(15min一次),之后4℃静置过夜;

[0115] (6) 利用抽滤装置抽去多余溶液,并使用少量偶联液流洗,收集这些液体,确定偶联效率使用;

[0116] (7) 使用封闭液1:20(W/V)重悬柱材,4℃封闭2h,间歇轻柔混匀(15min一次);

[0117] (8) 用酸性洗液、碱性洗液1:50-1:100(W/V)交替流洗3次,最终将柱材1:10(W/V)重悬于重悬液中,长期不使用可加入终浓度0.1%的叠氮钠;

- [0118] (9) 联柱材装入层析柱中；
- [0119] (10) 偶联效率的测定：本次试验偶联效率为90%。
- [0120] 4.2.2 豚鼠多抗利用偶联柱的亲和纯化
- [0121] (1) 使用5-10倍柱体积的平衡液充分平衡，使检测基线平直；
- [0122] (2) 上样，观察检测峰收集流穿液；
- [0123] (3) 使用平衡液洗涤杂蛋白，同时继续根据检测峰收集流穿液；
- [0124] (4) 利用洗脱液洗脱目的蛋白，根据检测峰收集洗脱峰；
- [0125] (5) 加入约1/10洗脱峰体积的中和液，并配合pH检测最终调节pH至7.4；
- [0126] (6) 待基线平直，改换平衡液中和柱材pH；
- [0127] (7) 改换保存液，将柱子上下口封闭4℃保存；
- [0128] 5. 虾血细胞虹彩病毒抗体胶体金层析检测试剂
- [0129] 5.1 标记的优化
- [0130] (1) 0.2M K₂CO₃加量的优化；
- [0131] 0,2.5,7.5,10,12.5,15,17.5,20ul/ml设置梯度试验；
- [0132] (2) NP抗原加入量：使用12ug/ml进行标记；
- [0133] (3) 标记方式的优化：搭桥标记与直接标记，性能相近，选择直接标记；
- [0134] (4) 悬浮体积的优化：250,500,750,1000ul/ml设置梯度试验悬浮免疫金；
- [0135] 标记条件的初步确认：40nm胶体金，0.2M K₂CO₃ 15ug/ml，NP抗原12ug/ml，标记20min RT；封闭液100ul/ml，封闭15min RT；500ul/ml利用pH8.5的金标悬浮液悬浮；55℃5h/45℃过夜烘干。
- [0136] 5.2 包被条件的初步确认：
- [0137] 抗鸡IgY多抗1mg/ml，终浓度0.1% BSA，20mM PB pH7.4补足体系。
- [0138] 抗人IgG单抗0.5mg/ml，20mM PB pH7.4补足体系。
- [0139] 抗人IgM单抗1mg/ml，20mM PB pH7.4补足体系。
- [0140] 5.3 加样方式及判读时间
- [0141] 5ul血清+3d层析稀释液，10-15min判读。(d=滴)
- [0142] 5.4 层析稀释液配方确定
- [0143] 终浓度1% casein, 0.4% Tween-20, 10mM PBS缓冲系统。
- [0144] 6. 虾血细胞虹彩病毒抗原胶体金层析检测试剂
- [0145] 6.1 标记的优化
- [0146] (1) 0.2M K₂CO₃加量的优化：0,5,10,15,20,25,30ul/ml设置梯度试验。
- [0147] (2) 病毒免疫豚鼠多抗NP亲和纯化抗体加入量：使用12ug/ml进行标记。
- [0148] (3) 标记方式的优化：选择直接标记。
- [0149] (4) 悬浮体积的优化：500,1000,1500,2000,2500,3000ul/ml设置梯度试验悬浮免疫金。
- [0150] 病毒亲和纯化抗体的标记：40nm胶体金，0.2M K₂CO₃ 25ul/ml，虾血细胞虹彩病毒抗原12ug/ml，标记20min RT；封闭液100ul/ml，封边15min RT；2.5ul/ml利用pH8.5的金标悬浮液悬浮；
- [0151] 鸡IgY的标记：40nm胶体金，0.2M K₂CO₃ 12ul/ml，鸡IgY 8ug/ml，标记20min RT；封

闭液100ul/ml,封边15min RT;160ul/ml利用pH8.5的金标悬浮液悬浮;

[0152] 免疫金的制备:1份病毒亲和纯化抗体免疫金+1份鸡IgY免疫金混合铺金,55℃5h/45℃过夜烘干。

[0153] 6.2包被条件的确认:

[0154] 抗鸡IgY多抗1mg/ml,终浓度0.1% BSA,20nM PB pH7.4补足体系。

[0155] NP蛋白亲和纯化抗体0.7mg/ml,20nM PB pH7.4补足体系。

[0156] 6.3加样方式及判读时间

[0157] 30ul血清+2d层析稀释液,10-15min判读。(d=滴)

[0158] 6.4层析稀释液配方的确认

[0159] 终浓度1% casein,0.4% Tween-20,10mM PBS缓冲系统。

[0160] 采用上述自制试剂盒盒虾血细胞虹彩病毒核酸检测试剂盒(PCR法)共同检测100份血清,抗原检测试剂盒检出率为22%,IgM检出率为48%,IgG检出率为9%。抗原和IgM抗体联合用于检测早期病毒感染检测率为56%,虾血细胞虹彩病毒核酸检测试剂盒PCR检出率为72%。

[0161] 以上实施例仅仅是本发明的几个实施例,但本发明并非局限于此。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出任何创造性劳动的前提下所得到的所有其他实施方式,都属于本发明所保护的范围。

专利名称(译)	一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109116021A	公开(公告)日	2019-01-01
申请号	CN201810886871.6	申请日	2018-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	文珊		
申请(专利权)人(译)	文珊		
当前申请(专利权)人(译)	文珊		
[标]发明人	文珊		
发明人	文珊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/54306 G01N2333/43508		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种虾血细胞虹彩病毒抗原检测试剂盒，包括虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡和/或虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡和层析稀释液，其中，虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗原胶体金层析检测试剂，虾血细胞虹彩病毒抗原检测试纸卡包含虾血细胞虹彩病毒抗体胶体金层析检测试剂，所述层析稀释液由终浓度1%casein，0.4%Tween-20和10mMPBS缓冲系统组成；所述试剂盒具有特异性、敏感性等特点。

【0046】

Gene NP	3μl
pET-28a	2μl
5XT4 ligase buffer	2μl
T4 Ligase	1μl
ddH ₂ O	2μl

【0047】室温连接25分钟；

【0048】(5)转化T1感受态

【0049】将连接产物加入T1感受态中，冰浴30min；42℃热激90sec，迅速放入冰上，静置