



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187968 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811091645.5

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2018.09.19

(71)申请人 郑州大学

地址 450000 河南省郑州市高新技术开发区科学大道100号

申请人 河南中泽生物工程有限公司

(72)发明人 张改平 王爱萍 陈玉梅 刘东民

周景明 王彦伟 祁艳华 刘燕凯

刘红亮 秦云飞 李永欣

(74)专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所

(普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页

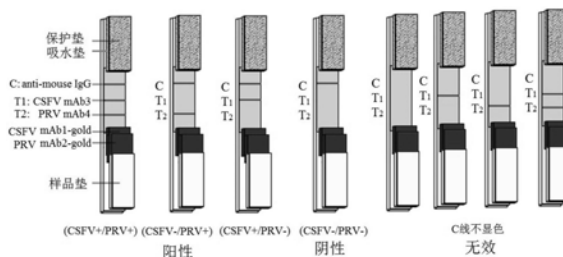
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法,包括支撑板、样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫,NC膜上含有猪瘟病毒检测线T1“|”,猪伪狂犬病毒检测线T2“|”和质控线C“|”印迹。检测时,在检测膜显现三条红色条带“|||”为猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒共感染,出现检测线T1和质控线C两条红色条带“||”为只有猪瘟病毒感染;出现检测线T2和质控线C两条红色条带“||”为只有猪伪狂犬病毒感染;只显现一条红色条带“|”为阴性,两种病毒都未感染。本检测试纸特异性强,敏感性高,反应谱广,可检测现有多数流行毒株,且操作简便、快速,可广泛用于猪瘟病毒感染与猪伪狂犬病毒感染检测,易于在生产实践中推广应用。



1. 一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸,包括支撑板(1)和固定在支撑板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为样品垫(3)、金标垫、NC膜(2)和吸水垫(6),其特征在于,金标垫包括依次上下叠放设置在支撑板上的上层金标垫(4)和下层金标垫(5),在下层金标垫上吸附有胶体金标记的抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1,在上层金标垫上吸附有胶体金标记的抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2,NC膜上设有兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C(7),抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb3印制的检测线T1(8)以及抗猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体mAb4印制的检测线T2(9)。

2. 根据权利要求1所述的二联金标检测试纸,其特征在于,抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1、mAb3的制备方法包括:(1)猪瘟病毒免疫原的制备,(2)杂交瘤细胞株的建立,(3)单克隆抗体的制备,(4)单克隆抗体的纯化,(5)单克隆抗体的抗体效价鉴定,(6)单克隆抗体识别抗原表位分析。

3. 根据权利要求2所述的二联金标检测试纸,其特征在于,
猪瘟病毒免疫原的制备:

以猪瘟病毒标准强毒株石门株接种猪肾细胞PK-15,制备病毒培养液,经过离心、超滤浓缩,纯化后,测定猪瘟病毒的半数细胞培养物感染量TCID₅₀达10⁻⁷以上,用纯化的猪瘟病毒作为一种免疫原;同时用杆状病毒表达系统制备并纯化的猪瘟病毒E2蛋白作为另一种免疫原;

杂交瘤细胞株的建立:

将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合,充分乳化,以20μg/只免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔15-21天;第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价,选择ELISA和IPMA效价高的小鼠,免疫原按50μg/只小鼠尾部静脉注射进行超免,超免后3-4天,处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合;将1×10⁸的脾细胞与2×10⁷的SP2/0骨髓瘤细胞混合,PEG4000诱导细胞融合,用HAT选择培养基培养7-10天后,取杂交瘤细胞培养上清以ELISA和IPMA筛选阳性杂交瘤细胞;选取强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚克隆,扩大培养后冻存细胞,制备抗猪瘟病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株。

4. 根据权利要求2所述的二联金标检测试纸,其特征在于,
单克隆抗体的制备:

以体内诱生腹水制备单抗:取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株10⁷个/只,7d-10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存;

单克隆抗体的纯化:

以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG;

单克隆抗体的抗体效价鉴定:

以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价,单抗上清和腹水的ELISA效价分别在1:6.4×10⁵以上,IPMA效价分别在1:1600以上;

单克隆抗体识别抗原表位分析:

以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析,筛选获得识别猪瘟病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb1、mAb3。

5. 根据权利要求1所述的二联金标检测试纸,其特征在于,抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2、mAb4的制备方法包括:(1)猪伪狂犬病毒免疫原的制备,(2)杂交瘤细胞株的建立,(3)

单克隆抗体的制备, (4) 单克隆抗体的纯化, (5) 单克隆抗体的抗体效价鉴定, (6) 单克隆抗体识别抗原表位分析。

6. 根据权利要求5所述的二联金标检测试纸, 其特征在于,

猪伪狂犬病毒免疫原的制备:

以PRV新流行株汤阴株的gE蛋白为靶标, 优化合成gE蛋白胞外区主要编码区基因, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 在原核表达系统中表达gE蛋白并纯化, 即得;

杂交瘤细胞株的建立:

将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合, 充分乳化, 以20 μ g/只免疫BALB/c小鼠3次, 每次间隔15-21天; 第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价, 选择ELISA和IPMA效价高的小鼠, 免疫原按50 μ g/只小鼠尾部静脉注射进行超免, 超免后3-4天, 处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合; 将1 \times 10⁸的脾细胞与2 \times 10⁷的SP2/0骨髓瘤细胞混合, PEG4000诱导细胞融合, 用HAT选择培养基培养7-10天后, 取杂交瘤细胞培养上清以ELISA和IPMA筛选阳性杂交瘤细胞; 选取强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚克隆, 扩大培养后冻存细胞, 制备抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株。

7. 根据权利要求5所述的二联金标检测试纸, 其特征在于,

单克隆抗体的制备:

以体内诱生腹水制备单抗: 取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠, 腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株10⁷个/只, 7d-10d后抽取腹水, 离心后取上清, 分装, 冻存;

单克隆抗体的纯化:

以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG;

单克隆抗体的抗体效价鉴定:

以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价, 单抗上清和腹水的ELISA效价分别在1:6.4 \times 10⁵以上, IPMA效价分别在1:1600以上;

单克隆抗体识别抗原表位分析

以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析, 筛选获得识别猪伪狂犬病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb2、mAb4。

8. 一种如权利要求1-7任一项所述的二联金标检测试纸的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒免疫原的制备:

以猪瘟病毒标准强毒株石门株接种猪肾细胞PK-15, 制备病毒培养液, 经过离心、超滤浓缩, 纯化后, 测定猪瘟病毒的半数细胞培养物感染量TCID₅₀达10⁻⁷以上, 用纯化的猪瘟病毒作为一种免疫原; 同时用杆状病毒表达系统制备并纯化的猪瘟病毒E2蛋白作为另一种免疫原;

猪伪狂犬病毒免疫原的制备:

以PRV新流行株汤阴株的gE蛋白为靶标, 优化合成gE蛋白胞外区主要编码区基因, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 在原核表达系统中表达gE蛋白并纯化, 即得;

(2) 单克隆抗体的制备

①杂交瘤细胞株的建立:

将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合, 充分乳化, 以20 μ g/只免疫BALB/c小鼠3次, 每

次间隔15-21天;第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价,选择ELISA和IPMA效价高的小鼠,免疫原按50 μ g/只小鼠尾部静脉注射进行超免,超免后3-4天,处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合;将 1×10^8 的脾细胞与 2×10^7 的SP2/0骨髓瘤细胞混合,PEG4000诱导细胞融合,用HAT选择培养基培养7-10天后,取杂交瘤细胞培养上清以ELISA和IPMA筛选阳性杂交瘤细胞;选取强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚克隆,扩大培养后冻存细胞,制备抗猪瘟病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株和猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株;

②单克隆抗体的制备:

以体内诱生腹水制备单抗:取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Ba1b/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株 10^7 个/只,7d-10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存;

③单克隆抗体的纯化

以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG;

④单克隆抗体的鉴定:

(a) 单克隆抗体的抗体效价

以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价,单抗上清和腹水的ELISA效价分别在 $1:6.4 \times 10^5$ 以上,IPMA效价分别在1:1600以上;

(b) 单克隆抗体识别抗原表位分析

以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析,筛选获得识别猪瘟病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb1、mAb3,以及识别猪伪狂犬病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb2、mAb4;

⑤金标抗体的制备

以柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金,并标记抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1与抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2;

⑥免疫层析试纸条的制备

(a) 金标垫的制备:将金标抗体吸附于玻璃纤维棉中,制得金标垫;

(b) NC膜的制备:将抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb3、抗猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体mAb4和兔抗小鼠IgG分别喷点于硝酸纤维素NC膜中央,形成检测线T1、T2和质控线C印迹;

(c) 将样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫按顺序粘贴在支撑板上后,裁切成合适尺寸获得试纸产品。

一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种同时对两种家畜疫病鉴定的检测器具,特别是涉及一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 猪瘟(classical swine fever,CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus,CSFV)引起的一种以高热、出血和高死亡率为特征的高度接触性传染病,世界动物卫生组织(OIE)将其列入OIE疫病名录,为需申报的动物传染病,我国列为一类动物疫病。我国采用免疫猪瘟兔化弱毒(hog cholera lapinized vaccine,HCLV)疫苗预防和控制了CSF的大规模流行,但近年来CSF的流行和发病特点又发生新变化,多表现为非典型、慢性和隐性感染,出现了所谓“非典型猪瘟”、“温和型猪瘟”和“带毒母猪综合征”,因此其仍是危害养猪业的主要传染病之一。CSFV属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus),与同属的牛病毒性腹泻病毒1型(bovine diarrhea virus 1,BVDV-1)、牛病毒性腹泻病毒2型(BVDV-2)、绵羊边界病毒(border disease virus,BDV)和长颈鹿瘟病毒(pestivirus of giraffe)具有很高的同源性,并存在血清学交叉反应。CSFV基因组为单股正链RNA,大小约12.3kb,由5'端非编码区(5'-untranslated region,5'-UTR)、一个开放阅读框(open reading frame,ORF)和3'-端非编码区(3'-UTR)构成,且5'端无甲基化“帽子”结构,3'端无多聚腺苷酸(poly A)结构。CSFV的ORF编码约3899个氨基酸残基的多聚蛋白前体,由病毒和宿主细胞蛋白酶加工形成12种成熟的病毒蛋白,即C、Erns、E1和E2等4种结构蛋白和Npro、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B等8种非结构蛋白。依据5'-UTR、E2和NS5B基因序列差异,CSFV分为3个基因群,10个基因亚群,即1.1、1.2、1.3、2.1、2.2、2.3、3.1、3.2、3.3和3.4。流行病学调查显示,我国2000年后的CSFV流行毒株分为3个基因亚群,即1.1、2.1和2.2,其中2.1基因亚群在我国猪瘟流行中占主导地位。

[0003] 伪狂犬病(Pseudorabies,PR)是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)引起的一种多种动物共患的传染病;猪PRV是一种猪的疱疹病毒,分类学命名为猪疱疹病毒I型(Suid herpesvirus1)。猪是PRV的传染源和自然贮存宿主,感染后表现为发热、仔猪神经症状和高死亡率、大中猪出现呼吸道症状等临床特征。消化道、呼吸道、精液、胎盘及空气等是PRV的主要传播途径。PRV对于口鼻部呼吸道的上皮细胞具有非常强的嗜性;其基因组是大小约为150kb的线性双链DNA,编码70-100余种蛋白。2011年底,在河北、河南、山东、山西等多个省份许多使用Bartha-K61疫苗免疫猪场爆发了疑似PR的疫病,发病猪出现高温(40-42℃)、食欲不振、咳嗽、腹泻并伴随有系统性神经症状,新生仔猪死亡率高;病毒分离等实验证实引起这场疫病爆发的源头是变异的PRV病毒,这对PR的防控提出了严峻挑战。目前PRV主要疫苗依然是Bartha-K61株或者新变异株的gE缺失苗,因此检测gE蛋白及其抗体是判断PRV感染与否的关键。

[0004] 针对当前国内畜群中猪瘟及猪伪狂犬病毒流行状况,迫切需要建立快速、简单、特

异的病原检测及抗体水平检测方法。目前用于CSF、PRV抗原检测的方法很多,主要为病毒分离、中和试验和免疫组化试验等,这些方法操作繁琐、费时,均不便于大批量样品检测。酶联免疫吸试验(ELISA)、RT-PCR方法虽然具有较高的敏感性和特异性,但这些检测方法需要依赖于PCR仪或荧光定量PCR仪,存在操作相对繁琐、耗时较长、检测成本高等不足,并且对仪器设备及操作人员技术要求高,不适于基层实验室操作,限制了其在流行病学调查和兽医临床中的应用。免疫层析试纸是在单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的一种新型体外检测技术,是理想的即时检测(point-of-care test, POCT)和现场检测技术,其具有更加灵敏、特异、简便、快速等优点,尤其是可实现“傻瓜式”操作,即不需要任何附加仪器设备即可进行现场检测,并在1-5分钟内判定结果,广泛应用于各种分析物的定性和半定量快速检测,包括抗原、半抗原、抗体和核酸,已成为当今最快速敏感的免疫学检测技术之一。但目前尚未见猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒二联金标试纸的相关报道。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法,该试纸条具有特异、灵敏、快速、简便的特点。

[0006] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸,包括支撑板和固定在支撑板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫,金标垫包括依次上下叠放设置在支撑板上的上层金标垫和下层金标垫,在下层金标垫上吸附有胶体金标记的抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1,在上层金标垫上吸附有胶体金标记的抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2,NC膜上设有兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C,抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb3印制的检测线T1以及抗猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体mAb4印制的检测线T2。

[0008] 抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1、mAb3的制备方法包括:(1)猪瘟病毒免疫原的制备,(2)杂交瘤细胞株的建立,(3)单克隆抗体的制备,(4)单克隆抗体的纯化,(5)单克隆抗体的抗体效价鉴定,(6)单克隆抗体识别抗原表位分析。

[0009] 猪瘟病毒免疫原的制备:

[0010] 以猪瘟病毒标准强毒株石门株接种猪肾细胞PK-15,制备病毒培养液,经过离心、超滤浓缩,纯化后,测定猪瘟病毒的半数细胞培养物感染量TCID₅₀达10⁻⁷以上,用纯化的猪瘟病毒作为一种免疫原;同时用杆状病毒表达系统制备并纯化的猪瘟病毒E2蛋白作为另一种免疫原。

[0011] 杂交瘤细胞株的建立:

[0012] 将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合,充分乳化,以20μg/只免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔15-21天;第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价,选择ELISA和IPMA效价高的小鼠,免疫原按50μg/只小鼠尾部静脉注射进行超免,超免后3-4天,处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合;将1×10⁸的脾细胞与2×10⁷的SP2/0骨髓瘤细胞混合,PEG4000诱导细胞融合,用HAT选择培养基培养7-10天后,取杂交瘤细胞培养上清以ELISA和IPMA筛选阳性杂交瘤细胞;选取强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚

克隆,扩大培养后冻存细胞,制备抗猪瘟病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0013] 单克隆抗体的制备:

[0014] 以体内诱生腹水制备单抗:取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株 10^7 个/只,7d-10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存。

[0015] 单克隆抗体的纯化:

[0016] 以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG。

[0017] 单克隆抗体的抗体效价鉴定:

[0018] 以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价,单抗上清和腹水的ELISA效价分别在 $1:6.4 \times 10^5$ 以上,IPMA效价分别在1:1600以上。

[0019] 单克隆抗体识别抗原表位分析:

[0020] 以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析,筛选获得识别猪瘟病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb1、mAb3。

[0021] 抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2、mAb4的制备方法包括:(1)猪伪狂犬病毒免疫原的制备,(2)杂交瘤细胞株的建立,(3)单克隆抗体的制备,(4)单克隆抗体的纯化,(5)单克隆抗体的抗体效价鉴定,(6)单克隆抗体识别抗原表位分析。

[0022] 猪伪狂犬病毒免疫原的制备:

[0023] 以PRV新流行株汤阴株的gE蛋白为靶标,优化合成gE蛋白胞外区主要编码区基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,在原核表达系统中表达gE蛋白并纯化,即得。

[0024] 杂交瘤细胞株的建立:

[0025] 将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合,充分乳化,以 $20\mu\text{g}$ /只免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔15-21天;第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价,选择ELISA和IPMA效价高的小鼠,免疫原按 $50\mu\text{g}$ /只小鼠尾部静脉注射进行超免,超免后3-4天,处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合;将 1×10^8 的脾细胞与 2×10^7 的SP2/0骨髓瘤细胞混合,PEG 4000诱导细胞融合,用HAT选择培养基培养7-10天后,取杂交瘤细胞培养上清以ELISA和IPMA筛选阳性杂交瘤细胞;选取强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚克隆,扩大培养后冻存细胞,制备抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0026] 单克隆抗体的制备:

[0027] 以体内诱生腹水制备单抗:取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株 10^7 个/只,7d-10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存;

[0028] 单克隆抗体的纯化:

[0029] 以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG;

[0030] 单克隆抗体的抗体效价鉴定:

[0031] 以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价,单抗上清和腹水的ELISA效价分别在 $1:6.4 \times 10^5$ 以上,IPMA效价分别在1:1600以上;

[0032] 单克隆抗体识别抗原表位分析

[0033] 以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析,筛选获得识别猪伪狂犬病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb2、mAb4。

[0034] 一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0035] (1)猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒免疫原的制备:

[0036] 以猪瘟病毒标准强毒株石门株接种猪肾细胞PK-15,制备病毒培养液,经过离心、超滤浓缩,纯化后,测定猪瘟病毒的半数细胞培养物感染量TCID₅₀达10⁻⁷以上,用纯化的猪瘟病毒作为一种免疫原;同时用杆状病毒表达系统制备并纯化的猪瘟病毒E2蛋白作为另一种免疫原;

[0037] 猪伪狂犬病毒免疫原的制备:

[0038] 以PRV新流行株汤阴株的gE蛋白为靶标,优化合成gE蛋白胞外区主要编码区基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,在原核表达系统中表达gE蛋白并纯化,即得;

[0039] (2) 单克隆抗体的制备

[0040] ① 杂交瘤细胞株的建立:

[0041] 将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合,充分乳化,以20μg/只免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔15-21天;第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价,选择ELISA和IPMA效价高的小鼠,免疫原按50μg/只小鼠尾部静脉注射进行超免,超免后3-4天,处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合;将1×10⁸的脾细胞与2×10⁷的SP2/0骨髓瘤细胞混合,PEG 4000诱导细胞融合,用HAT选择培养基培养7-10天后,取杂交瘤细胞培养上清以ELISA和IPMA筛选阳性杂交瘤细胞;选取强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚克隆,扩大培养后冻存细胞,制备抗猪瘟病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株和猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株;

[0042] ② 单克隆抗体的制备:

[0043] 以体内诱生腹水制备单抗:取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株10⁷个/只,7d-10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存;

[0044] ③ 单克隆抗体的纯化

[0045] 以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG;

[0046] ④ 单克隆抗体的鉴定:

[0047] (a) 单克隆抗体的抗体效价

[0048] 以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价,单抗上清和腹水的ELISA效价分别在1:6.4×10⁵以上,IPMA效价分别在1:1600以上;

[0049] (b) 单克隆抗体识别抗原表位分析

[0050] 以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析,筛选获得识别猪瘟病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb1、mAb3,以及识别猪伪狂犬病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb2、mAb4;

[0051] ⑤ 金标抗体的制备

[0052] 以柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金,并标记抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1与抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2;

[0053] ⑥ 免疫层析试纸条的制备

[0054] (a) 金标垫的制备:将金标抗体吸附于玻璃纤维棉中,制得金标垫;

[0055] (b) NC膜的制备:将抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb3、抗猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体mAb4和兔抗小鼠IgG分别喷点于硝酸纤维素NC膜中央,形成检测线T1、T2和质控线C印迹;

[0056] (c) 将样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫按顺序粘贴在支撑板上后,裁切成合适尺寸获得试纸产品。

[0057] 本发明有益的积极效果

[0058] 本发明分别以猪瘟病毒标准强毒石门株、杆状病毒表达的猪瘟E2蛋白、猪伪狂犬病毒汤阴株gE蛋白为免疫原,通过杂交瘤细胞技术生产鉴定抗猪瘟病毒单克隆抗体和猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体,利用酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)筛选猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的单克隆抗体,以叠加酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选识别不同抗原表位的单克隆抗体。用于胶体金标记的单克隆抗体mAb1和猪瘟病毒检测线T1的单克隆抗体mAb3分别识别猪瘟病毒的不同抗原表位,用于胶体金标记的单克隆抗体mAb2和猪伪狂犬病毒检测线T2的单克隆抗体mAb4分别识别猪伪狂犬病毒的不同抗原表位,两对单克隆抗体特异识别猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒,相互之间没有交叉反应。胶体金标记单克隆抗体mAb1和猪瘟病毒检测线T1单克隆抗体mAb3可识别猪瘟病毒多数流行毒株,胶体金标记单克隆抗体mAb2和猪伪狂犬病毒检测线T2单克隆抗体mAb4可识别猪伪狂犬病毒多数流行毒株,有利于在生产实践中推广应用。

[0059] 本发明针对CSFV感染和PRV感染鉴定的关键技术问题,筛选鉴定了可特异性识别CSFV和PRV的高亲和力配对单克隆抗体,建立了基于免疫层析试纸的蛋白芯片技术平台,研制出的猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸,实现了猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的同时联检,可有效检测猪群猪瘟病毒感染与猪伪狂犬病毒感染,并且操作简单,人人都可操作,能较好满足不同层次人员的需要,如疫病监测、海关检疫、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等,易于大范围推广应用,为我国猪瘟和猪伪狂犬病毒的防控与净化提供技术支撑,对猪瘟和猪伪狂犬疫情监测和防控有重要意义,具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。检测试纸条具有下列各项优点:

[0060] (1) 猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的联检。猪瘟病毒,猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸在NC膜上含有识别猪瘟病毒的检测线T1和识别猪伪狂犬病毒的检测线T2,可同步进行猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的联检,实现猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的检测。

[0061] (2) 特异性强,敏感性高。猪瘟病毒,猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸以可特异性与猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒结合的高亲和力配对单克隆抗体为基础制备而成,单克隆抗体的特异性强且敏感性高,金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成,二者通过异性电荷间的范德华力相结合,胶体金对标记抗体的反应性影响很小,且具有较高的标记率。因此,检测试纸具有较高的特异性和敏感性。

[0062] (3) 操作简便快速。使用鉴别检测试纸时无需任何其它试剂,只要将其插入待检样品10s左右,在5min内即可判定检测结果。

[0063] (4) 显示检测结果形象、直观准确。检测试纸以显示红棕色“|”、“||”、“|||”、和“|||”印迹作为检测的阴性、猪瘟病毒感染、猪伪狂犬病毒感染和两种病毒共感染阳性标记,即在NC膜上显示一条棕红色条带“|”为猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒阴性,表示被检测样品猪瘟病毒或者猪伪狂犬病毒感染,两条棕红色条带“||”为猪瘟病毒阳性,表示被检样品为猪瘟病毒感染,两条棕红色条带“|||”为猪伪狂犬病毒阳性,表示被检样品为猪伪狂犬病毒感染,三条棕红色条带“|||”为猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒共感染阳性,表示被检样品为猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒共感染,结果判定形象、直观、准确,简单明了,不易出现假阴性和假阳性误判。

[0064] (5) 样品预处理简单,检测成本低,无需配置昂贵仪器。该检测试纸检测成本低,样

品预处理简单,血液样本只需进行简单稀释即可用于检测;不需另配仪器设备,使现场检测一步到位。

附图说明

[0065] 图1为本发明检测试纸的结构示意图。图中,1为支撑板,2为NC膜,3为样品垫,4为上层金标垫,5为下层金标垫,6为吸水垫,7为质控线C,8为检测线T1,9为检测线T2。

[0066] 图2为本发明检测试纸的俯视图。

[0067] 图3为本发明检测试纸的装配示意图。

[0068] 图4为本发明中涉及到的纯化蛋白的SDS-PAGE鉴定。图中,A为纯化的CSFV E2蛋白,B为纯化的PRV gE蛋白。

[0069] 图5为本发明中CSFV、PRV单抗IPMA检测结果。

[0070] 图6为本发明试纸检测结果判断示意图。

[0071] 图7为本发明中试纸特异性检测结果。其中1为含有PRV和CSFV的阳性对照,2为PCV2,3为PRRSV,4为PEDV,5为阴性对照PK15培养上清,6为阴性对照BHK21培养上清。

具体实施方式

[0072] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0073] 实施例1

[0074] 如图1-2所示,一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸,包括支撑板1和固定在支撑板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为样品垫3、金标垫、NC膜2和吸水垫6,金标垫包括依次上下叠放设置在支撑板上的上层金标垫4(即金标垫2)和下层金标垫5(即金标垫1),在下层金标垫上吸附有胶体金标记的抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb1,在上层金标垫上吸附有胶体金标记的抗猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2,NC膜上设有兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线(C)7,抗猪瘟病毒单克隆抗体mAb3印制的检测线(T1)8,以及抗猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体mAb4印制的检测线(T2)9。

[0075] 支撑板材料为不吸水的韧性PVC材料。

[0076] 样品垫材料为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜。金标垫材料为玻璃纤维棉。NC膜材料为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜。吸水垫材料为吸水滤纸。

[0077] 检测线和质控线除“|”直线式印迹外,还可以为“十”字型排列印迹、“└└”字型排列印迹、“┌┌”字型排列印迹、“┘┘”字型排列印迹或“┌┘”字型排列印迹。

[0078] 实施例2

[0079] 本发明猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸的制备:首先制备猪瘟病毒免疫原和猪伪狂犬病毒免疫原,进而制备并筛选相应的高亲和力、高特异性单克隆抗体。其中猪瘟病毒单克隆抗体mAb1和猪伪狂犬病毒单克隆抗体mAb2用于制备金标抗体,特异性识别猪瘟病毒且与mAb1识别抗原表位不同的单克隆抗体mAb3用于印制猪瘟病毒检测线印迹T1“|”,特异性识别猪伪狂犬病毒且与mAb2识别抗原表位不同的单克隆抗体mAb4用于印制猪伪狂犬病毒检测线印迹T2“|”;其次制备兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA,用于印制质控线印迹C“|”;再组装制备好的样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫以及支撑板。其中,各产品的制备方法如下:

[0080] 1、猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒免疫原的制备：

[0081] 猪瘟病毒免疫原的制备：

[0082] 以猪瘟病毒标准强毒株石门株接种猪肾细胞PK-15,48-60h收取病毒培养液,4℃、3000r/min低速离心30min去除杂质,利用50kDa超滤膜对病毒培养液进行超滤浓缩,以Sepherose4Fast Flow琼脂糖凝胶柱对猪瘟病毒进行凝胶过滤层析纯化,测定猪瘟病毒的半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)达10⁻⁷以上,用纯化的猪瘟病毒作为一种免疫原免疫一组BALB/c小鼠;同时用杆状病毒表达系统制备并纯化的猪瘟病毒E2蛋白(图4A)作为另一种免疫原,免疫另一组BALB/c小鼠,用于制备相应的单克隆抗体。

[0083] 猪伪狂犬病毒免疫原的制备：

[0084] 以PRV新流行株(汤阴株)的gE蛋白为靶标,优化合成gE蛋白胞外区主要编码区基因(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示),在原核表达系统中表达gE蛋白,利用Ni-NTA亲和层析和离子交换纯化的gE蛋白(图4B),并免疫小鼠,用于制备针对gE蛋白上具有免疫优势的表位的单克隆抗体。

[0085] ATGGGTGACGACGACCTGGACGGTGACCTGAACGGTGACGACCGTCGTGCTGGTTTCGGTCTGCTCTGGCTTCTCTGCGTGAAGCTCCGCCGGCTCACCTGGTTAACGTTTCTGAAGGTGCTAACTCACCTGGACGCTCGTGGTGACGGTGCTGTTGTTGCTGGTATCTGGACCTTCTGCGGTTTCGTGGTTGCGACGCTGTTGCTGTTACCATGGTTTGCTTCGAAACCGCTTGCCACCCGGACCTGGTTCTGGGTTCGTGCTTTCGGTTCGGAAAGCTCCGGAACGTGGTATCGGTGACTACCTGCCGCCGAAGTTCGCGTCTGCAGCGTGAACCGCCGATCGTTACCCCGAACGTTGGTCTCCGCACCTGACCGTTTCGTGCTACCCCGAACGACACCGGTCTGTACACCTGCACGACGCTTCTGGTCCGCGTGCTGTTTTCTTCGTTGCTGTTGGTGACCGTCCGCCGGCTCCGCTGGCTCCGGTTGGTCCGGCTAGGCATGAACCGAGGTTCCACGCTCTGGGCTTCCACTCTCAGCTGTTCTCTCCGGGTGACACCTTCGACCTGATGCCGCGTGTGTTTCTGACATGGGTGACTCTCGTGAAAACCTCACCGCTACCCTGGACTGGTACTACGCTCGTGCTCCGCCGCGTTGCCTGCTGTACTACGTTTACGAACCGTGCATCTACCACCCGCGTGCTCCGGAATGCTAA (SEQ ID NO.1)

[0086] 2、抗猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒单克隆抗体的制备

[0087] (1) 杂交瘤细胞株的建立：

[0088] 将免疫原分别与弗氏免疫佐剂等量混合,充分乳化,以20μg/只免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔15-21天;第3次免疫后分别用ELISA和IPMA测定免疫小鼠效价,选择ELISA和IPMA效价高的小鼠,免疫原按50μg/只小鼠尾部静脉注射进行超免,超免后3-4天,处死小鼠无菌取其脾细胞用于细胞融合;将1×10⁸的脾细胞与2×10⁷的SP2/0骨髓瘤细胞混合,PEG 4000诱导细胞融合,用HAT选择培养基培养7-10天后,取杂交瘤细胞培养上清以酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)筛选阳性杂交瘤细胞。分别以猪瘟标准毒株感染PK-15细胞,PRV标准毒株感染BHK21细胞,经甲醇固定后,5%脱脂奶37℃封闭1h;加待检细胞培养上清50μL/孔,设HAT培养基和小鼠免疫血清为阴性和阳性对照;加1:500辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠IgG抗体(50μL/孔),37℃作用30min;每步反应后均用含0.05%Tween-20的PBS充分洗涤;以底物AEC室温显色10-20min,用水冲洗中止显色后,在显微镜下观察显色结果。选取IPMA强阳性、细胞生长旺盛的克隆孔采用有限稀释进行3-5轮亚克隆,扩大培养后冻存细胞,制备抗猪瘟病毒单克隆抗体和抗猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0089] (2) 单克隆抗体的制备：

[0090] 以体内诱生腹水制备单抗:取经降殖烷或液体石蜡致敏的经产Balb/c小鼠,腹腔注射对数生长期的杂交瘤细胞株 10^7 个/只,7d-10d后抽取腹水,离心后取上清,分装,冻存。

[0091] (3) 单克隆抗体的纯化:

[0092] 以辛酸-硫酸铵法从小鼠腹水中纯化单抗IgG。取1mL小鼠腹水,加入2mL 0.06mol/L乙酸钠缓冲液(pH 5.0),以0.1mol/L HCl调至pH 4.5;于室温搅拌下,逐滴加入33mL辛酸,4℃静置2h,15000r/min离心30min,弃沉淀;在离心上清中加入1/10体积0.01mol/L PBS(pH7.4),以0.1mol/L NaOH调至pH 7.4;于冰浴条件下加入饱和硫酸铵至终浓度45%,4℃静置2h,10000r/min离心30min,弃上清;以适量PBS重悬沉淀,对PBS透析过夜,换液3次。以分光光度计法或考马斯亮蓝染色法(Bradford法)测定纯化单克隆抗体IgG的蛋白含量在1mg/mL以上。

[0093] (4) 单克隆抗体的鉴定

[0094] (a) 单克隆抗体的抗体效价:

[0095] 以ELISA和IPMA测定杂交瘤细胞培养上清和腹水的单抗效价,单抗上清和腹水的ELISA效价分别在 $1:6.4 \times 10^5$ 以上,IPMA效价分别在1:1600以上。

[0096] (b) 单克隆抗体识别抗原表位分析:

[0097] 以阻断ELISA或叠加ELISA对单克隆抗体识别的抗原表位进行分析,筛选获得识别猪瘟病毒不同抗原表位的单克隆抗体,以及识别猪伪狂犬病毒不同抗原表位的单克隆抗体,具体方法为:

[0098] ① 阻断ELISA

[0099] 以CSFV Erns/E2重组蛋白为检测抗原,阻断ELISA鉴定CSFV单克隆抗体对CSFV阳性血清的抑制效应,筛选出可以与猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒发生特异性反应的单克隆抗体。

[0100] ② 叠加ELISA

[0101] 首先利用包被抗原的酶标板以间接ELISA测定各单抗的工作浓度,绘制抗原饱和曲线。在双抗叠加ELISA试验中,根据抗原饱和曲线适当稀释单抗,进行下一步叠加ELISA实验,具体步骤如下:

[0102] 1) 包被:用VLPs包被96孔酶标反应板,37℃,孵育2h;

[0103] 2) 封闭:每孔加入50μL的5%脱脂奶,37℃封闭1h;

[0104] 3) 洗涤:PBST洗板3次,甩干;

[0105] 4) 加一抗(待检单抗):每孔加入50μL单个或两个不同组合的mAb,其稀释度均为饱和定量抗原的稀释度,两个mAb量相等,同时用PBS作阴性对照(NC),商品化抗HPV16单抗作阳性对照(PC);37℃孵育30min;

[0106] 5) 洗涤:PBST洗6次,甩干;

[0107] 6) 加酶标二抗:将HRP标记的羊抗鼠IgG用PBS稀释至工作浓度后(1:1000),每孔各加50μL,37℃孵育30min;

[0108] 7) 洗涤:PBST洗板6次,甩干;

[0109] 8) 显色:TMB显色液显色6min;

[0110] 9) 终止:每孔各加50μL的终止液(2mol/L H₂SO₄);

[0111] 10) 读数:反应终止后在酶标仪上测定各孔的OD₄₅₀值。

[0112] 11) 分析结果:叠加指数(additivity indexes,AI)计算公式如下:

[0113] $AI = (A(1+2) - (A1+A2)/2) / ((A1+A2) - (A1+A2)/2) \times 100\%$

[0114] 其中:A1为mAb1的OD₄₅₀值;A2为mAb2的OD₄₅₀值;A(1+2)为mAb1叠加mAb2的OD₄₅₀值;当AI<30%判定为针对同一抗原位点,AI≥30%为针对不同抗原位点,AI值越大,抗原位点重叠的可能性越小。

[0115] 用识别不同抗原表位的抗猪瘟病毒单克隆抗体进行双抗夹心试纸试验,最终筛选获得分别识别猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒不同抗原表位的单克隆抗体mAb1、mAb3和mAb2、mAb4,其IPMA检测结果如图5所示;mAb1、mAb2用于胶体金标记;mAb3用于猪瘟病毒检测线T1印迹,mAb4用于猪伪狂犬病毒检测线T2印迹。

[0116] 3、金标抗体的制备

[0117] (1) 胶体金的制备:

[0118] 取100mL超纯水置于500mL洁净的锥形瓶,加入1mL 1% (w/v) 氯金酸溶液煮沸;在搅拌状态下迅速加入新鲜配制的1mL 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液,煮沸约3min至溶液颜色由黄色变为紫红色,继续煮沸2min;待溶液冷却至室温,补超纯水至100mL,以0.2mol/L K₂CO₃调pH至9.0,4℃避光保存备用。

[0119] (2) 最适标记蛋白浓度测定

[0120] 取待标记病毒单抗IgG用20mmol/L硼酸钠溶液(pH 9.0)4℃过夜透析。在微孔板中以25μL超纯水1:2、1:4、1:8……分别倍比稀释待标记病毒单抗;各孔加入125μL胶体金溶液,室温静置5min;加入125μL 1mol/L NaCl溶液;各孔颜色随蛋白浓度的降低而由红色变为蓝色。以颜色未变蓝的单抗最高稀释度的蛋白浓度为胶体金最适标记浓度,胶体金标记时,蛋白浓度增加20%;经测定结果分析mAb1和mAb2的最佳标记浓度分别为:2.0μg/mL、2.4μg/mL。

[0121] (3) 单克隆抗体的胶体金标记

[0122] 取2mL最适浓度的待标记单抗IgG,加入10mL胶体金溶液(pH 9.0),迅速混匀,室温作用30min;加入混合液体积10%的含10% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)的20mmol/L硼酸钠溶液,迅速混匀,室温作用10min-15min;4℃、12000r/min离心30min,小心移去上清;以含1% (w/v) BSA的20mmol/L硼酸钠溶液重悬沉淀,同上离心,弃上清;重复洗涤1次,沉淀用1mL TB缓冲液(20mmol/L Na₂B₄O₇,1% (w/v) BSA,0.1% (w/v) NaN₃)调整至金标抗体0.2mg/mL,充分吹打后,4℃保存备用。

[0123] 4、NC膜的制备

[0124] 将2.5×30cm²的硝酸纤维素(NC)膜置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;用PBS缓冲液(pH 7.2)分别将特异性识别猪瘟病毒的单克隆抗体mAb3,特异性识别猪伪狂犬病毒的单克隆抗体mAb4以及兔抗小鼠IgG抗体(或SPA)稀释至1mg/mL,经0.22μm滤膜过滤后,以1μL/cm分别将单克隆抗体mAb3、mAb4和兔抗小鼠IgG抗体溶液喷点于硝酸纤维素NC膜中央,形成检测线(T1线、T2线)和质控线(C线)印迹;检测线T1与检测线T2、检测线T1与质控线均相距3mm。将NC膜置42℃干燥箱30min或室温自然干燥后,于4℃干燥密闭保存。

[0125] 5、金标垫的制备

[0126] 将玻璃纤维棉切成1.5×30cm²的长条,置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;用含1% (w/v) BSA、0.2% Tween 20 (v/v) 和0.1% (w/v) NaN₃的20mmol/L Na₂B₄O₇缓冲液均匀喷洒于玻璃纤维棉上,制成金标抗体结合垫,56℃干燥1h,室温干燥保存备用;取金标

抗体以15 μ L/cm将金标抗体溶液喷点于玻璃棉;置50 $^{\circ}$ C干燥箱30min干燥;将金标垫置于塑料袋中,加干燥剂4 $^{\circ}$ C密闭保存备用。

[0127] 6、样品垫的制备

[0128] 将玻璃纤维棉切成1.5 \times 30cm²的长条,以含0.1mol/L NaCl、0.2%Tween 20(v/v)和0.1% (w/v)叠氮钠的PBS (pH 7.2)溶液浸泡玻璃棉条;置50 $^{\circ}$ C干燥箱30min干燥;将样品垫置于塑料袋中,加干燥剂室温密闭保存备用。

[0129] 7、吸水垫的制备

[0130] 吸水垫选用吸水性较好的吸水滤纸,切成2.5 \times 30cm²的长条,室温密闭保存备用。

[0131] 9、支撑板的制备

[0132] 支撑板为单面不干胶的PVC塑料板,将其切成7.5 \times 30cm²的长板,制备支撑板。

[0133] 8、试纸的组装

[0134] 将样品垫、金标垫、NC膜、吸水垫根据图3所示的次序依次黏贴在有胶膜的支撑板上,具体操作时首先将NC膜粘贴于支撑板中央,然后将金标垫和样品垫依次粘贴于NC膜的样品端,各层间重叠1mm-2mm,再将吸水垫粘贴于NC膜的另一端,与NC膜重叠1mm-2mm,同时为了便于操作和保护,在吸水垫侧粘贴有保护垫,重叠1mm-2mm,作为手柄端,形成试纸半成品。将切割机进行切割,切割宽度设置为3mm,将试纸与小包装硅胶干燥剂一同装入铝箔袋并密封保存。

[0135] 本发明试纸的检测反应原理:

[0136] 当猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸样品端加入待检测样品溶液后,待检溶液通过虹吸带动待检CSFV抗原和PRV抗原及金标抗体mAb1、mAb2一起向硝酸纤维素膜扩散,并最终渗透到滤纸层中,在扩散过程中金标抗体mAb1、mAb2与待检CSFV或PRV抗原相结合,形成金标抗体-抗原复合物,猪瘟病毒的金标复合物可与NC膜上的猪瘟病毒检测印迹mAb3,生成红棕色“|”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在NC膜上与质控印迹中的pAb2或SPA,生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红棕色阳性标记“||”,表示样品中含有猪瘟病毒;猪伪狂犬病毒的金标复合物可与NC膜上的猪伪狂犬病毒检测印迹mAb4,生成红棕色“|”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在NC膜上与质控印迹中的兔抗小鼠IgG抗体或SPA,生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红棕色阳性标记“||”,表示样品中含有猪伪狂犬病毒;当样品中同时含有猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒时,可以同时与NC膜上的猪伪狂犬病毒检测印迹和猪伪狂犬病毒检测印迹结合,生成红棕色“||”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在NC膜上与质控印迹中的兔抗小鼠IgG抗体或SPA,生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成三条红棕色阳性标记“|||”,表示样品中同时含有猪伪狂犬病毒和猪伪狂犬病毒;当样品中不含猪瘟病毒抗原和猪伪狂犬病毒抗原时,没有金标抗体-抗原复合物形成,不能与猪瘟病毒检测印迹和猪伪狂犬病毒检测印迹结合,则生成阴性标记“|”。如果NC膜上没有红棕色标记显示,则表明试纸条已失效(图6)。

[0137] 实施例2、猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸检测实例操作方法

[0138] 1、检测样品溶液的制备:采集待检猪拭子(咽拭和肛拭)、病(死)猪组织、粪便和疫苗等不同检测样本,加适量PBS或水进行简单混悬或研磨。

[0139] 2、试纸检测:将猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸样品端浸入待检溶

液10s-20s;取出试纸水平放置5min观察结果。

[0140] 3、检测结果判定(图6):试纸显现三条红棕色条带(猪瘟病毒检测线、猪伪狂犬病毒检测线和质控线)“|||”为猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒共感染阳性,表示待检样品中同时含有猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒抗原;两条红棕色条带(猪瘟病毒检测线和质控线)“||”为CSFV阳性,表示待检样品中含有CSFV抗原;两条红棕色条带(猪伪狂犬病毒检测线和质控线)“||”为PRV阳性,表示待检样品中含有PRV抗原;仅显现一条红棕色条带(质控线)“|”为阴性,表示待检样品未检出CSFV和PRV抗原;试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效,需以另取检测试纸重新检测。

[0141] 实施例3、试纸的特异性、敏感性检测

[0142] 特异性:试纸特异性检测结果见图7,该试纸与PRRSV、PEDV、PCV2等猪源病毒均无交叉反应。

[0143] 灵敏度:试纸的敏感性检测选用细胞培养的CSFV和PRV病毒进行检测,样品选用PBS稀释法,分别将CSFV或PRV病毒滴度稀释至 10^6 TCID₅₀/mL,另外再按2倍倍比稀释在同一缓冲液中添加PRV病毒或CSFV病毒进行敏感性检测。二联试纸目测灵敏度结果显示,试纸在CSFV浓度 $\geq 10^{4.6}$ TCID₅₀/mL及PRV为 10^6 TCID₅₀/mL时试纸呈现阳性结果,在PRV浓度 $\geq 10^{3.2}$ TCID₅₀/mL及CSFV为 10^6 TCID₅₀/mL时试纸呈现阳性结果,所以试纸的对CSFV及PRV的灵敏度分别为 $10^{4.6}$ TCID₅₀/mL及 $10^{3.2}$ TCID₅₀/mL。

[0144] 以上所述仅为本发明最佳的实施例,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 郑州大学 河南中泽生物工程有限公司

<120> 一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 726

<212> DNA

<213> 猪伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus)

<400> 1

```
atgggtgacg acgacctgga cggtagactg aacggtgacg accgtcgtgc tggtttcggt 60
tctgctctgg cttctctgcg tgaagctccg ccggtcacc tggttaacgt ttctgaaggt 120
gctaaacttca ccctggacgc tcgtggtgac ggtgctgttg ttgctggtat ctggaccttc 180
ctgccggttc gtggttgcca cgtgtttgct gttaccatgg tttgcttcga aaccgcttgc 240
caccgggacc tggttctggg tcgtgcttgc gttccggaag ctccggaacg tggatcgggt 300
gactacctgc cgccggaagt tccgcgtctg cagcgtgaac cgccgatcgt taccgggaa 360
cgttgggtctc cgcacctgac cgttcgtcgt gctacccga acgacaccgg tctgtacacc 420
ctgcacgacg cttctggtcc gcgtgctgtt ttcttcgttg ctggttggtga ccgtccgccg 480
gctccgctgg ctccggttgg tccggctagg catgaaccga ggttccacgc tctgggcttc 540
cactctcagc tgttctctcc gggtagacacc ttcgacctga tgccgcgtgt tgtttctgac 600
atgggtgact ctcgtgaaaa cttcaccgct accctggact ggtactacgc tcgtgctccg 660
ccgcggtgcc tgctgtacta cgtttacgaa ccgtgcatct accaccgcg tgctccggaa 720
tgctaa 726
```

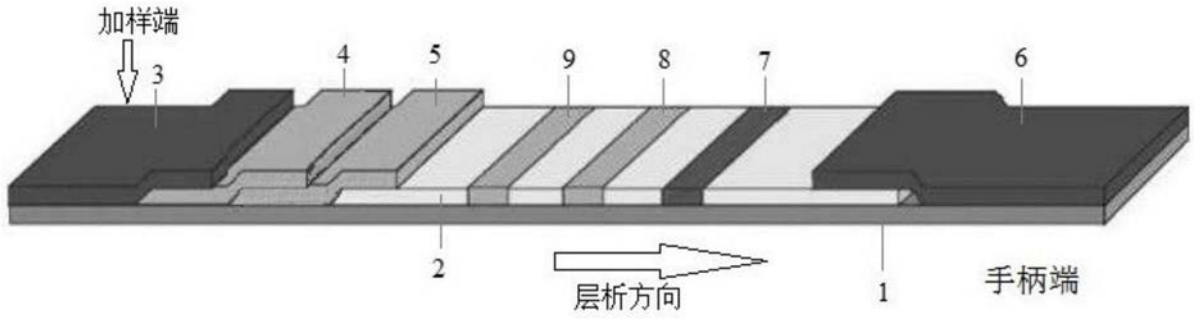


图1

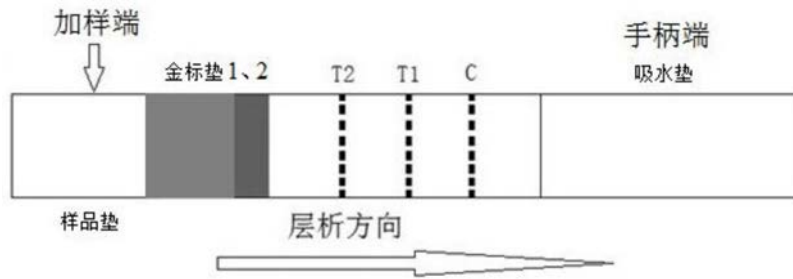


图2

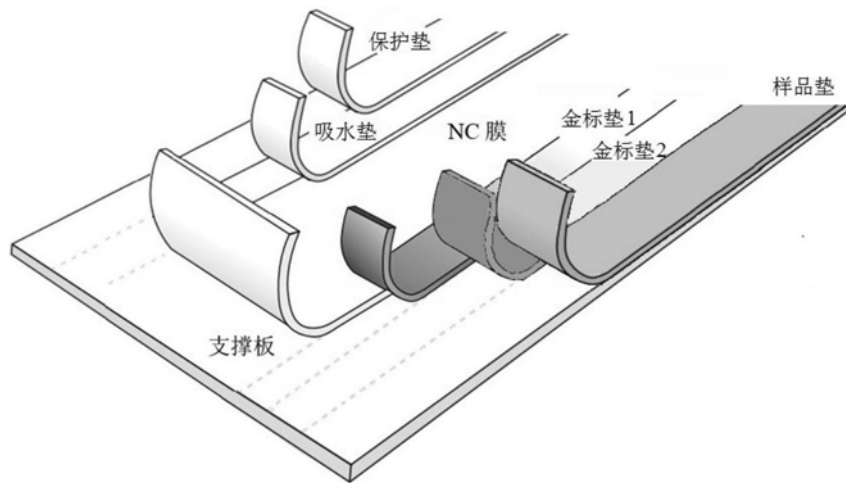


图3

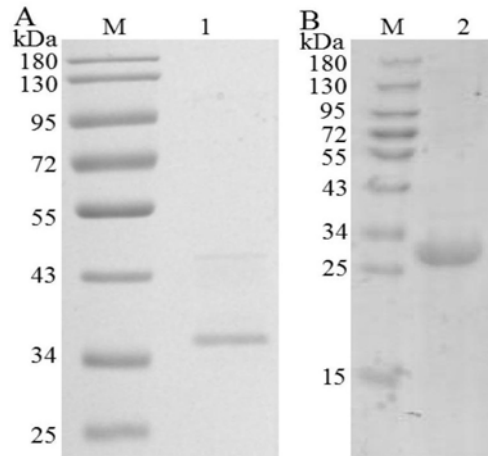


图4

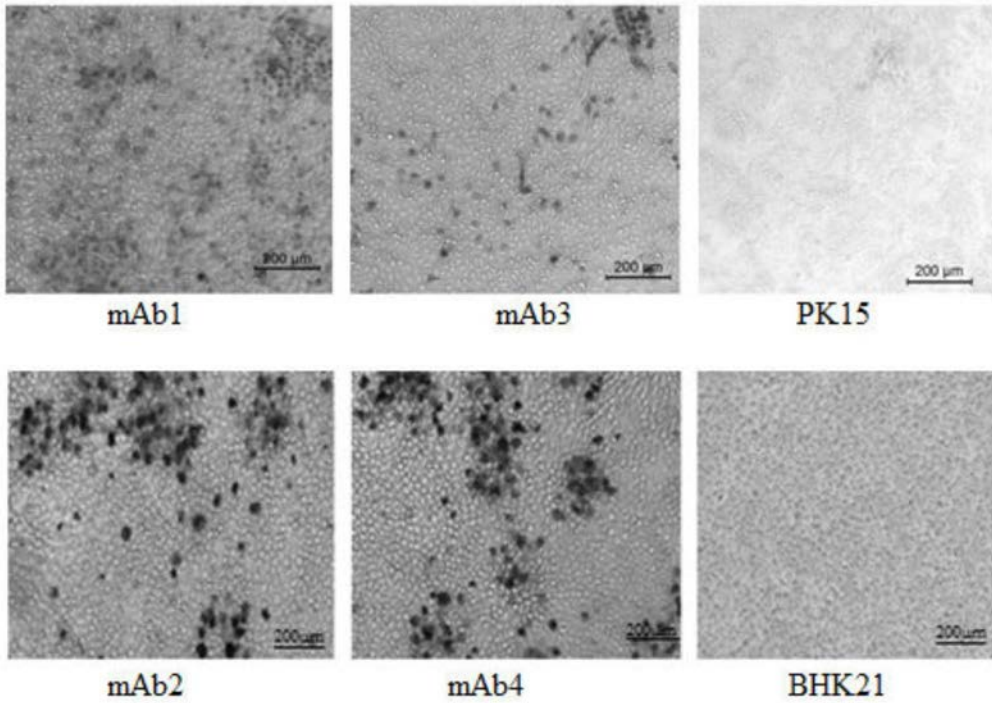


图5

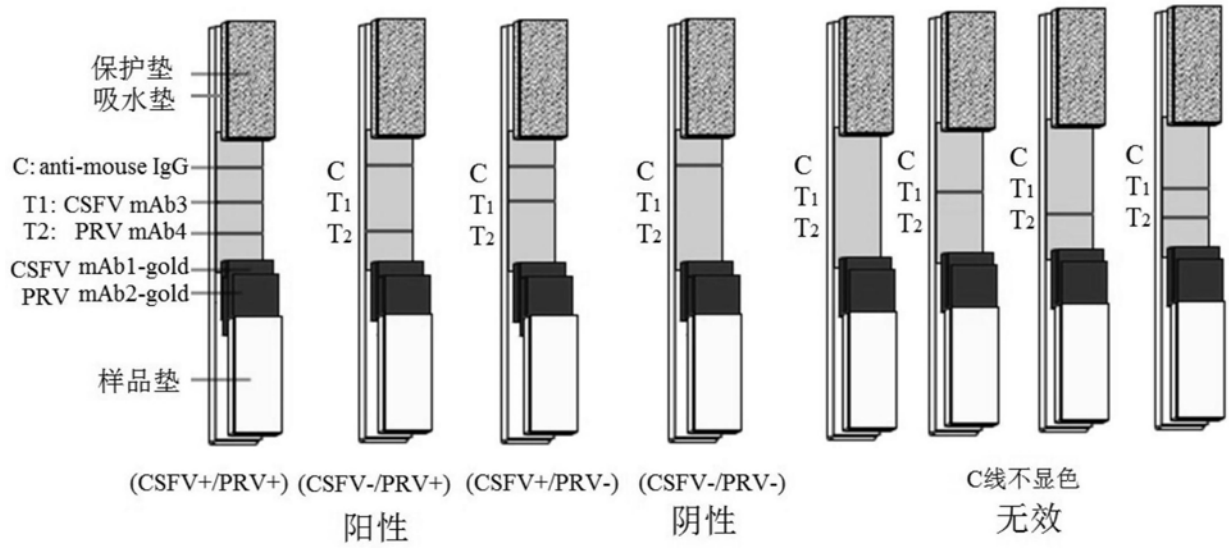


图6

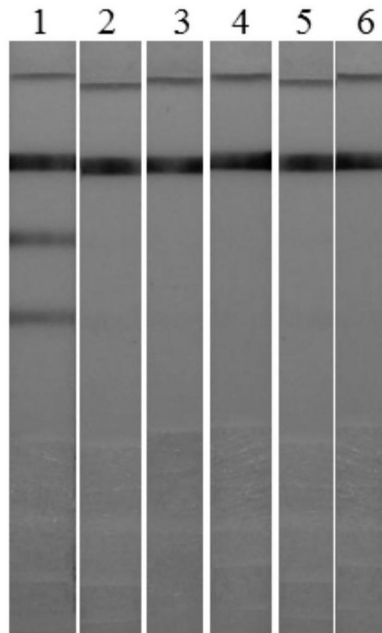


图7

专利名称(译)	一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN109187968A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201811091645.5	申请日	2018-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学 河南中泽生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州大学 河南中泽生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学 河南中泽生物工程有限公司		
[标]发明人	张改平 王爱萍 陈玉梅 刘东民 周景明 王彦伟 祁艳华 刘燕凯 刘红亮 秦云飞 李永欣		
发明人	张改平 王爱萍 陈玉梅 刘东民 周景明 王彦伟 祁艳华 刘燕凯 刘红亮 秦云飞 李永欣		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/531 G01N33/54306		
代理人(译)	张爱军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的二联金标检测试纸及其制备方法,包括支撑板、样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫,NC膜上含有猪瘟病毒检测线T1“|”,猪伪狂犬病毒检测线T2“|”和质控线C“|”印迹。检测时,在检测膜显现三条红色条带“|||”为猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒共感染,出现检测线T1和质控线C两条红色条带“||”为只有猪瘟病毒感染;出现检测线T2和质控线C两条红色条带“||”为只有猪伪狂犬病毒感染;只显现一条红色条带“|”为阴性,两种病毒都未感染。本检测试纸特异性强,敏感性高,反应谱广,可检测现有多数流行毒株,且操作简便、快速,可广泛用于猪瘟病毒感染与猪伪狂犬病毒感染检测,易于在生产实践中推广应用。

