

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103245783 A

(43) 申请公布日 2013.08.14

(21) 申请号 201310154128.9

(22) 申请日 2013.04.27

(71) 申请人 广东海大畜牧兽医研究院有限公司
地址 510000 广东省广州市高新技术产业开发区新桂二路 56 号中试楼 101 室

(72) 发明人 李中圣 刘小琴 罗均 赵焱
陈轶雯

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288
代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

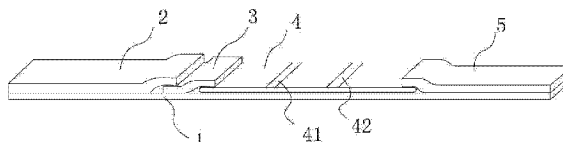
权利要求书2页 说明书6页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法。包括 PVC 底板、样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸，样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸按照层析方向依次设置在 PVC 底板上，并且样品垫的一端叠在胶体金结合垫前端，胶体金结合垫的后端叠在硝酸纤维素膜的一端，吸水滤纸的前端叠在硝酸纤维素膜的另一端；所述硝酸纤维素膜上分别喷制有检测线和质控线，所述胶体金结合垫由一层硝酸纤维素膜和喷在该硝酸纤维素膜上的 rTTsuV2ORF1' 胶体金组成。本发明的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸，能够快速 TTsuV2 抗体，结构简单，使用方便，并具有良好的灵敏度和特异性。



1. 一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,其特征在於:其包括 PVC 底板、样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸,样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸按照层析方向依次设置在 PVC 底板上,并且样品垫的一端叠在胶体金结合垫前端,胶体金结合垫的后端叠在硝酸纤维素膜的一端,吸水滤纸的前端叠在硝酸纤维素膜的另一端;所述硝酸纤维素膜上分别喷制有检测线和质控线,所述胶体金结合垫由一层硝酸纤维素膜和喷在该硝酸纤维素膜上的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金组成。

2. 根据权利要求 1 所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,其特征在於所述的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金是通过以下方法制备而成:

1)TTSuV2 ORF1 蛋白序列分析与筛选:筛选出具有较强抗原的 TTSuV2 ORF1' 氨基序列 SEQ ID NO:1;

2)TTSuV2 ORF1' 的表达与纯化:以步骤 1)中的氨基序列所对应的核酸序列为模板应用 Primer Premier5.0 设计引物正向引物 SEQ ID NO:2 和反向引物 SEQ ID NO:3,经过 PCR 扩增构建插入 TTSuV2 ORF1' 的 pET21b 重组质粒,双酶切 PCR 产物及载体,连接,转化 E. coli :DH5 α 后,获取载体,提取重组质粒 pET21b-TTSuV2 ORF1';再将质粒转化入 E. coli BL21,涂布于 LA 平板上,培养 6-9 小时后挑取单菌落,并将挑取的单菌落接种于 LA 液体培养基中,培养 2-5 小时,加入的 IPTG 进行诱导;3-8 小时后,离心、收集菌体,最后,应用切胶回收的方法回收蛋白,1 \times PBS 透析后获得 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白;

3)免疫胶体金制备:取质量浓度为 0.01% 氯金酸水溶液并加热至沸腾,滴加 1% 柠檬酸三钠水溶液并不断搅拌,在氯金酸水溶液由金黄色变为紫红色后继续煮沸 15 min,冷却后以蒸馏水恢复至原体积,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用;

4)rTTSuV2 ORF1' 胶体金的制备:将 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白溶液浓度至 1 mg/mL 后转入透析袋中,2-8 $^{\circ}$ C 下用浓度为 20 mmol/L、pH 值为 7.0 的 Tris 缓冲液透析过夜;之后在透析处理之后的 rTTSuV2 ORF1' 中加入等量的步骤 3)中的胶体金中,2-8 $^{\circ}$ C 静置并使 rTTSuV2 ORF1' 充分与胶体金结合,然后按每 10 mL 胶体金加 2 mL 质量浓度为 5% BSA 溶液比例加入 BSA 溶液,充分混匀后离心 0.5-1.5 h,弃上清液,胶体金沉淀用保护液再溶解,即制得 rTTSuV2 ORF1' 免疫胶体金。

3. 根据权利要求 2 所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,其特征在於:所述检测线是将透析处理后的 rTTSuV2 ORF1' 喷在硝酸纤维素膜而形成线,所述质控线是 TTSuV2 强阳性抗体在硝酸纤维素膜而形成线。

4. 根据权利要求 1 所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,其特征在於:步骤 3)中胶体金的 pH 值为 9-11。

5. 一种如权利要求 1-4 任一项所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,其特征在於其是按照以下步骤制备:

1)TTSuV2 ORF1' 蛋白序列分析与筛选:用 ProtScale 生物软件筛选出具有较强抗原的 TTSuV2 ORF1' 氨基序列 SEQ ID NO:1;

2)构建 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白:以步骤 1)中的氨基序列所对应的核酸序列为模板应用 Primer Premier5.0 设计正向引物 SEQ ID NO:2 和反向引物 SEQ ID NO:3,化学转化法转入 E. Coli BL21 感受态细胞中,筛选重组的 TTSuV2 ORF1' 拷贝子,获得 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白 rTTSuV2 ORF1';

3)胶体金制备:取质量浓度为0.01%氯金酸水溶液并加热至沸腾,滴加1%柠檬酸三钠水溶液并不断搅拌,在氯金酸水溶液由金黄色变为紫红色后继续煮沸,冷却后以蒸馏水恢复至原体积,2-8℃保存待用;

4)免疫胶体金的制备:将TTSuV2 ORF1'重组蛋白溶液浓度至1 mg/mL转入透析袋中,2-8℃下用浓度为20 mmol/L、pH值为7.0的Tris缓冲液透析过夜;之后在透析处理的rTTSuV2 ORF1'中按照rTTSuV2 ORF1'与胶体金的体积比为50-300 μL/10mL的比例加入步骤3)中的胶体金,2-8℃静置并使rTTSuV2 ORF1'充分与胶体金结合,然后按每10 mL胶体金加2 mL质量浓度为5% BSA溶液比例加入BSA溶液,充分混匀后离心0.5-1.5 h,弃上清液,胶体金沉淀用保护液再溶解,即制得rTTSuV2 ORF1'免疫胶体金;

5)胶体金试纸的组装:将制备的rTTSuV2 ORF1'胶体金喷于硝酸纤维素膜上,真空冷冻干燥后形成胶体金结合垫;在硝酸纤维素膜上喷制检测线和质控线;然后将样品垫、胶体金结合垫、喷制好检测线和质控线的硝酸纤维素膜及吸水纸组装一起,即为猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸。

6. 根据权利要求5所述的猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,其特征在于获得TTSuV2 ORF1'重组蛋白rTTSuV2 ORF1'的方法是:以步骤1)中的氨基酸序列所对应的核酸序列为模板应用Primer Premier5.0设计引物正向引物SEQ ID NO:2和反向引物SEQ ID NO:3,经过PCR扩增构建插入TTSuV2 ORF1'的pET21b重组质粒,双酶切PCR产物及载体,连接,转化E. coli :DH5 α后,获取正确的载体,提取重组质粒pET21b-TTSuV2 ORF1';再将质粒转化入E. coli BL21,涂布于LA平板上,培养6-9小时后挑取单菌落,并将挑取的单菌落接种于LA液体培养基中,培养2-5小时,加入的IPTG进行诱导;3-8小时后,离心、收集菌体,最后,应用切胶回收的方法回收蛋白,1×PBS透析后获得rTTSuV2 ORF1'。

7. 根据权利要求6所述的猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,其特征在于步骤2)PCR扩增的条件为94℃ 45 S,55℃ 45 S,72℃ 90 S,共30个循环,最后72℃延伸10分钟。

8. 根据权利要求5所述的猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,其特征在于:步骤4)中所述的保护液为含有1%BSA,且pH=7.0,浓度为0.01 mol/L Tris-HCl溶液。

9. 根据权利要求6-8任一项所述的猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,其特征在于:步骤3)中还包括用0.1 mol/L的K₂CO₃调节胶体金的pH值至9-11。

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及兽药领域,具体涉及一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法。

[0003]

背景技术

[0004] 输血传播病毒(Transufsion Transmitted Viurs, TTV)是一类无囊膜,二十面体,单股负链环状的 DNA 病毒,电镜观察病毒颗粒直径约为 30-32 nm。TTV 首次由日本学者从一例未知病原的非甲-非戊型输血后肝炎病人的血清中发现,随后人们在非灵长类以及猪、牛、羊、犬,猫、家禽等多种家养及野生动物体内也发现了 TTV 的感染。2009 年,国际病毒分类协会(ICTV)将猪的 TTV 划分到指环病毒科(Anelloviridae)细环病毒属(Iotatorquevirus),并进一步划分为两个种:猪 1 型细环病毒(TTSuV1)和猪 2 型细环病毒(TTSuV2)。

[0005] 2004 年,McKeown 对中国,爱荷华州,泰国,安大略,韩国,西班牙,魁北克和萨斯喀彻温省这六个不同国家地区的 154 份猪血清进行检测, TTSuVs 阳性率可高达 66.2%。近年来,我国关于 TTSuV1 和 TTSuV2 的报道逐渐增多, TTSuVs 的感染具有广泛性和普遍性,这一特点引起了诸多科研工作者的关注。根据目前的报道,国内采用 PCR 检测发现 TTSuV2 抗原在猪血清中的检出率在 30%-80%, TTSuV2 的感染在增强 PMWS 和 PDNS 病症方面起着重要的作用。

[0006] TTSuV2 感染后,诱导机体产生 TTSuV2 的特异性抗体, TTSuV2 抗原的含量(TTSuV2 感染或其结构蛋白的量)与血清中 TTSuV2 特异性抗体的滴度呈正相关。目前行业内还没有关于 TTSuV2 抗体快速诊断方法,因此提供一种 TTSuV2 抗体快速诊断方法的试纸具有重要的意义。

[0007]

发明内容

[0008] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,能够快速 TTSuV2 抗体,结构简单,使用方便,并具有良好的灵敏度和特异性。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,通过该方法获得一种灵敏度高和特异性良好的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸。

[0010] 为实现上述方案,本发明所采用的技术方案如下:

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,其包括 PVC 底板、样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸,样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸按照层析方向依次设置在 PVC 底板上,并且样品垫的一端叠在胶体金结合垫前端,胶体金结合垫的后端叠在硝酸纤维素膜的一端,吸水滤纸的前端叠在硝酸纤维素膜的另一端;所述硝酸纤维素膜上分别喷制有检测线和质控线,所述胶体金结合垫由一层硝酸纤维素膜和喷在该硝酸纤维素膜上的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金组成。

[0011] 在本发明中,所述的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金是通过以下方法制备而成:

1)TTSuV2 ORF1 蛋白序列分析与筛选:筛选出具有较强抗原的 TTSuV2 ORF1' 氨基序列 SEQ ID NO:1;

2) TTSuV2 ORF1' 的表达与纯化:以步骤 1) 中的氨基序列所对应的核酸序列为模板应用 Primer Premier5.0 设计正向引物 SEQ ID NO:2 和反向引物 SEQ ID NO:3,经过 PCR 扩增构建插入 TTSuV2 ORF1' 的 pET21b 重组质粒,双酶切 PCR 产物及载体,连接,转化 E. coli: DH5 α 后,获取正确的载体,提取重组质粒 pET21b-TTSuV2 ORF1';再将质粒转化入 E. coli BL21,涂布于 LA 平板上,培养 6-9 小时后挑取单菌落,并将挑取的单菌落接种于 LA 液体培养基中,培养 2-5 小时,加入的 IPTG 进行诱导;3-8 小时后,离心、收集菌体,最后,应用切胶回收的方法回收蛋白,1 \times PBS 透析后获得 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白;

3)免疫胶体金制备:取质量浓度为 0.01% 氯金酸水溶液并加热至沸腾,滴加 1% 柠檬酸三钠水溶液并不断搅拌,在氯金酸水溶液由金黄色变为紫红色后继续煮沸,冷却后以蒸馏水恢复至原体积,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用;

4) rTTSuV2 ORF1' 胶体金的制备:将 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白溶液浓度至 1 mg/mL 后转入透析袋中,2-8 $^{\circ}$ C 下用浓度为 20 mmol/L、pH 值为 7.0 的 Tris 缓冲液透析过夜;之后在透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 中按照 rTTSuV2 ORF1' 与胶体金的体积比为 50-300 μ L/10mL 的比例加入步骤 3) 中的胶体金,2-8 $^{\circ}$ C 静置并使 rTTSuV2 ORF1' 充分与胶体金结合,然后按每 10 mL 胶体金加 2 mL 质量浓度为 5% BSA 溶液比例加入 BSA 溶液,充分混匀后离心 0.5-1.5 h,弃上清液,胶体金沉淀用保护液再溶解,即制得 rTTSuV2 ORF1' 免疫胶体金。

[0012] 本发明中所述检测线是将透析处理后的 rTTSuV2 ORF1' 喷在硝酸纤维素膜而形成线,所述质控线是 TTSuV2 强阳性抗体在硝酸纤维素膜而形成线。

[0013] 本发明中所述 TTSuV2 强阳性抗体是通过 TTSuV2 ELISA 抗体诊断试剂盒对 290 份猪血清样品进行筛选,选择 OD 值为 0.8-0.9 的样品。

[0014] 在上述方案的基础上,本发明所述的步骤 3) 中胶体金的 pH 值为 9-11。

[0015] 一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸的制备方法,其特征在于其是按照以下步骤制备:

1)TTSuV2 ORF1' 蛋白序列分析与筛选:用 ProtScale 生物软件筛选出具有较强抗原的 TTSuV2 ORF1' 氨基序列 SEQ ID NO:1;

2) 构建 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白:以步骤 1) 中的氨基序列所对应的核酸序列为模板应用 Primer Premier5.0 设计引物正向引物 SEQ ID NO:2 和反向引物 SEQ ID NO:3,化学转化法转入 E. coli BL21 感受态细胞中,筛选重组的 TTSuV2 ORF1' 拷贝子,获得 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白 rTTSuV2 ORF1';

3)胶体金制备:取质量浓度为 0.01% 氯金酸水溶液并加热至沸腾,滴加 1% 柠檬酸三钠

水溶液并不断搅拌,在氯金酸水溶液由金黄色变为紫红色后继续煮沸 15 min,冷却后以蒸馏水恢复至原体积,2-8℃保存待用;

4) 免疫胶体金的制备:将 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白溶液浓度至 1 mg/mL 后转入透析袋中,2-8℃下用浓度为 20 mmol/L、pH 值为 7.0 的 Tris 缓冲液透析过夜;之后在透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 中按照 rTTSuV2 ORF1' 与胶体金的体积比为 50-300 μL/10mL 的比例加入步骤 3) 中的胶体金,2-8℃静置并使 rTTSuV2 ORF1' 充分与胶体金结合,然后按每 10 mL 胶体金加 2 mL 质量浓度为 5% BSA 溶液比例加入 BSA 溶液,充分混匀后离心 0.5-1.5 h,弃上清液,胶体金沉淀用保护液再溶解,即制得 rTTSuV2 ORF1' 免疫胶体金;

5) 胶体金试纸的组装:将制备的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金喷于硝酸纤维素膜上,真空冷冻干燥后形成胶体金结合垫;在硝酸纤维素膜上喷制检测线和质控线;然后将样品垫、胶体金结合垫、喷制好检测线和质控线的硝酸纤维素膜及吸水纸组装一起,即为猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸。

[0016] 获得 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白 rTTSuV2 ORF1' 的方法可以是本领域技术人员所掌握的任何生物学方法。在本发明中,优选的采用以下方法:以步骤 1) 中的氨基序列所对应的核酸序列为模板应用 Primer Premier 5.0 设计引物正向引物 SEQ ID NO:2 和反向引物 SEQ ID NO:3,经过 PCR 扩增构建插入 TTSuV2 ORF1' 的 pET21b 重组质粒,双酶切 PCR 产物及载体,连接,转化 *E. coli*:DH5 α 后,获取正确的载体,提取重组质粒 pET21b-TTSuV2 ORF1';再将质粒转化入 *E. coli* BL21,涂布于 LA 平板上,培养 6-9 小时后挑取单菌落,并将挑取的单菌落接种于 LA 液体培养基中,培养 2-5 小时,加入的 IPTG 进行诱导;3-8 小时后,离心、收集菌体,最后,应用切胶回收的方法回收蛋白,1×PBS 透析后获得 rTTSuV2 ORF1'。

[0017] 步骤 2) PCR 扩增的条件为 94℃ 45 S,55℃ 45 S,72℃ 90 S,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 分钟。

[0018] 本发明中 rTTSuV2 ORF1' 的纯度达到 90% 以上。

[0019] 步骤 4) 中所述的保护液为含有 1% BSA,且 pH=7.0,浓度为 0.01 mol/L Tris-HCl 溶液。

[0020] 发明人发现在制备胶体金的过程中,胶体金产生块状沉淀的现象,并发现经过 pH 值对胶体金的溶解度影响较大,为了确定胶体金的最佳 pH 值:取 6 份 10 mL 胶体金用 0.1 mol/L 的 K₂CO₃ 分别调 pH 为:7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和不调 pH,4℃ 静置 20 min 使 rTTSuV2 ORF1' 充分与胶体金结合,按每 10 mL 胶体金加 2 mL 5% BSA 溶液,充分混匀,配平后 13000 r/min (BECKMAN J2-21M) 4℃ 离心 1 h 后弃上清液,向各离心管中加入 10 mL 保护液,震荡混匀;观察发现,pH 7.0、8.0 和不调 pH 处理的胶体金沉淀成块状,且不易溶于保护液;pH 9.0、10.0 和 11.0 处理的胶体金沉淀易溶解。因此,在上述方案的基础,优选的,步骤 3) 中还包括用 0.1 mol/L 的 K₂CO₃ 调节胶体金的 pH 值至 9-11 的。

[0021] 另外,发明人发现,rTTSuV2 ORF1' 的胶体金标记浓度对检测的灵敏性有较大的影响,当标记浓度在 50-300 μL/10mL 是,检测的结果较为明显,为了找到最佳的标记浓度,本发明还在标记浓度在 50-300 μL/10mL 的范围内做了以下实验:取 5 份 10 mL 胶体金用 0.1 mol/L 的 K₂CO₃ 调 pH 为 9.0,每份加处理过的 rTTSuV2 ORF1' 50、100、150、200、300 μL,处理好的 rTTSuV2 ORF1' 喷分别涂于 5 张硝酸纤维素膜上真空冷冻干燥,分别将标记不同量的胶体金与喷好的膜组装成试纸条,加 TTSuV2 阳性血清、阴性血清;显色结果表明标

记浓度为 200 $\mu\text{L}/10\text{ mL}$ 时,显色时间最短,灵敏度最好。

[0022] 本发明的有益效果在于:本发明的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,能够快速 TTSuV2 抗体,结构简单,使用方便,并具有良好的名感性和特异性。

[0023] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0024]

附图说明

[0025] 图 1 为本发明所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸结构示意图;

图 2 为采用本发明所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸检测样品结果图。

具体实施方式

[0026] 以下是本发明的具体实施例。

[0027] 实施例 1

如图 1 所示,本发明所述的猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,其包括 PVC 底板 1、样品垫 2、胶体金结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 及吸水滤纸 5,样品垫 2、胶体金结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 及吸水滤纸 5 按照层析方向依次设置在 PVC 底板 1 上,并且样品垫 2 的一端叠在胶体金结合垫 3 前端,胶体金结合垫 3 的后端叠在硝酸纤维素膜 4 的一端,吸水滤纸 5 的前端叠在硝酸纤维素膜 4 的另一端;所述硝酸纤维素膜 4 上分别喷制有检测线 41 和质控线 42,所述胶体金结合垫由一层硝酸纤维素膜和喷在该硝酸纤维素膜上的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金组成;并通过以下方法制备:

1) TTSuV2 ORF1' 蛋白序列分析与筛选:用 ProtScale 生物软件筛选出具有较强抗原的 TTSuV2 ORF1' 氨基序列 SEQ ID NO:1;

2) 以步骤 1) 中的氨基序列所对应的核酸序列为模板应用 Primer Premier5.0 设计正向引物 SEQ ID NO:2 和反向引物 SEQ ID NO:3 经过 PCR 扩增构建插入 TTSuV2 ORF1' 的 pET21b 重组质粒构建插入 TTSuV2 ORF1' 的 pET21b 重组质粒,用化学转化法转入 E. Coli BL21 感受态细胞,具体程序如下:PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 S,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 S,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 S,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 分钟,双酶切 PCR 产物及载体,连接,转化 E. coli :DH5 α 中,对转化产物提取重组质粒 pET21b-TTSuV2 ORF1',再将质粒转化入 E. coli BL21,涂布于 LA 平板上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 小时,观察转化子的生长;挑取单菌落,接种于 700 μL LA 液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 小时,加入 1mM 的 IPTG 进行诱导;6 小时后,离心、收集菌体,最后应用切胶回收的方法回收蛋白,1 \times PBS 透析,SDS-PAGE 再次验证蛋白纯度,用蛋白定量试剂盒进行定量分析,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

3) 胶体金制备:取质量浓度为 0.01% 氯金酸水溶液并加热至沸腾,滴加 1% 柠檬酸三钠水溶液并不断搅拌,在氯金酸水溶液由金黄色变为紫红色后继续煮沸 15 min,冷却后以蒸馏水恢复至原体积;

4) 免疫胶体金的制备:rTTSuV2 ORF1' 用 pH 值为 9.0 的胶体金进行标记,具体步骤为将 TTSuV2 ORF1' 重组蛋白溶液浓度至 1 mg/mL 后转入透析袋中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下用浓度为 20 mmol/L、pH 值为 7.0 的 Tris 缓冲液透析过夜;之后将经透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 蛋白溶液与胶体金按照 50 $\mu\text{L}/10\text{ mL}$ 的比例混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置并使 rTTSuV2 ORF1' 充分与胶体金结合,

然后按每 10 mL 胶体金加 2 mL 质量浓度为 5% BSA 溶液比例加入 BSA 溶液,充分混匀后离心 1h,弃上清液,胶体金沉淀用保护液再溶解,即制得 rTTSuV2 ORF1' 免疫胶体金;

5) 胶体金试纸的组装:将制备的 rTTSuV2 ORF1' 胶体金喷于硝酸纤维素膜上,真空冷冻干燥后形成胶体金结合垫;在硝酸纤维素膜上喷制检测线和质控线;然后将样品垫、胶体金结合垫、喷制好检测线和质控线的硝酸纤维素膜及吸水纸按照图 1 所述的结构进行组装,即为猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸。

[0028] 实施例 2

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,按照与实施例 1 相同的制备方法制备而成。其与实施例 1 的区别在于:步骤 4 中)所采用的胶体金的 pH 值调整至 10.0,经透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 蛋白溶液与胶体金的混合比例为 100 μ L/10mL。

[0029] 实施例 3

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,按照与实施例 1 相同的制备方法制备而成。其与实施例 1 的区别在于:步骤 4 中)所采用的胶体金的 pH 值调整至 11.0,经透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 蛋白溶液与胶体金的混合比例为 150 μ L/10mL。

[0030] 实施例 4

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,按照与实施例 1 相同的制备方法制备而成。其与实施例 1 的区别在于:步骤 4 中)所采用的胶体金的 pH 值为 10.0,经透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 蛋白溶液与胶体金的混合比例为 150 μ L/10mL。

[0031] 实施例 5

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,按照与实施例 1 相同的制备方法制备而成。其与实施例 1 的区别在于:步骤 4 中)所采用的胶体金的 pH 值调整至 10.0,经透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 蛋白溶液与胶体金的混合比例为 200 μ L/10mL。

[0032] 实施例 6

一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸,按照与实施例 1 相同的制备方法制备而成。其与实施例 1 的区别在于:步骤 4 中)所采用的胶体金的 pH 值为 10.0,经透析处理的 rTTSuV2 ORF1' 蛋白溶液与胶体金的混合比例为 300 μ L/10mL。

[0033] 应用实施例

纸条检测结果的判读,如图 2 所示:

阳性:在观察孔内,检测线区(T)及对照线区(C)同时出现紫红色线。细环病毒抗体滴度越高,检测线(T)颜色越深。

[0034] 弱阳性:在观察孔内,检测线区(T)及对照线区(C)同时出现紫红色线,但检测线区(T)出现的颜色很浅。

[0035] 阴性:在观察孔内,只有对照线区(C)出现一条紫红色线。

[0036] 失效:在观察孔内,对照线区(C)和检测线区(T)都不出现紫红色线;或仅检测线区(T)出现紫红色线。

[0037] 稳定性测试:将本发明的诊断试纸密封后进行 37 $^{\circ}$ C 破坏试验,同时与 4 $^{\circ}$ C、室温存放的试纸对比,结果发现 37 $^{\circ}$ C 破坏 1~7 d 后,试纸检测的灵敏度、特异性、爬速、检测背景等指标与 4 $^{\circ}$ C 和室温存放的试纸条无明显区别;37 $^{\circ}$ C 破坏 8~12 d 后,与 4 $^{\circ}$ C 和室温存放的试纸条相比,其检测的灵敏度和特异性虽无明显变化,但在爬速、金释放速度和检测背景等方

面稍有下降。根据经验值,暂将此检测试纸有效期定为 1 年。

[0038] 特异性测试:将等量的 TTSuV2 阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征、流行性乙型脑炎、伪狂犬、传染性胸膜肺炎(猪气喘病)、猪萎缩性鼻炎及猪圆环病毒抗体阳性血清样本以及兔、牛、小白鼠和鸡血清样本用本发明的诊断试纸进行检测,测试诊断纸条的特异性;检测结果显示本发明的诊断试纸猪繁殖与呼吸综合征、流行性乙型脑炎、伪狂犬、传染性胸膜肺炎(猪气喘病)、猪萎缩性鼻炎及猪圆环病毒抗体阳性血清样本以及兔、牛、小白鼠和鸡血清均无交叉反应

敏感性测试:将 TTSuV2 阳性血清分别用本发明的诊断试纸与 TTSuV2 抗体 ELISA 诊断试剂盒检测对比,考核其敏感性,结果显示:阳性样品稀释 800 倍后试纸条 T 线仍有可辨的条带。

[0039]

上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

<110> 广东现代农业集团研究院有限公司
 <120> 一种猪 2 型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法
 <130>
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> TTSuV2 ORF1'
 <400> 1
 MetLysLys Gln His Lys Ile Val Leu Ser Gln Gln Asn Cys Asn
 5 10 15
 Pro Asn Arg Lys Gln Lys Pro Val Thr Leu Lys Phe Arg Pro Pro
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Ser Gln Trp Arg Leu Ser Arg Glu Leu Ala Lys
 35 40 45
 MetPro Leu Ile Arg Leu Gly Val Ser Phe Ile Asp Leu Thr Glu
 50 55 70
 Pro Trp Leu Glu Ala Trp Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Val Leu Gly
 75 80 85
 TyrGlu Ala Ile Lys Asp Gln Gly His Trp Ser Asn Trp Ala Gln
 90 95 100
 IleLys Tyr Tyr Trp Ile Tyr Asp Thr Gly Val Gly Asn Ala Val
 105 110 115
 TyrVal ValMetLeu Lys Lys Asp Ile Asp Asp Asn Pro Gly Lys
 120 125 130

 MetAla Thr Glu Phe Lys Thr Thr Gln Gly Gln His Pro Asn Ala
 135 140 145
 Ile Asp His Ile Gln Leu Ile Asn Glu Gly Trp Pro Tyr Trp Leu
 150 155 160
 TyrPhe Phe Gly Lys Ser Glu Gln Asp Ile Lys Lys Glu Ala His
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ile Ala Arg Glu Tyr Ala Thr Asn Pro Lys Ser Arg
 180 185 190

 <210> 2
 <211> 20

〈212〉 DNA	
〈213〉 artificial	
〈400〉 2	
CGGAATTCGA AAAAAACAACA CAAAATAGTA	20
〈210〉 3	
〈211〉 21	
〈212〉 DNA	
〈213〉 artificial	
〈400〉 3	
CCCAAGCTTC TATCTTGATT TTGGATTTGT A	21

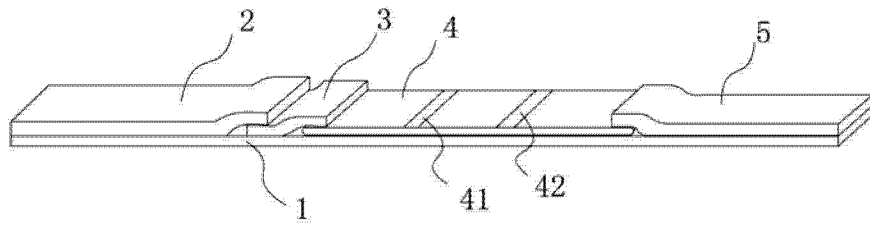


图 1

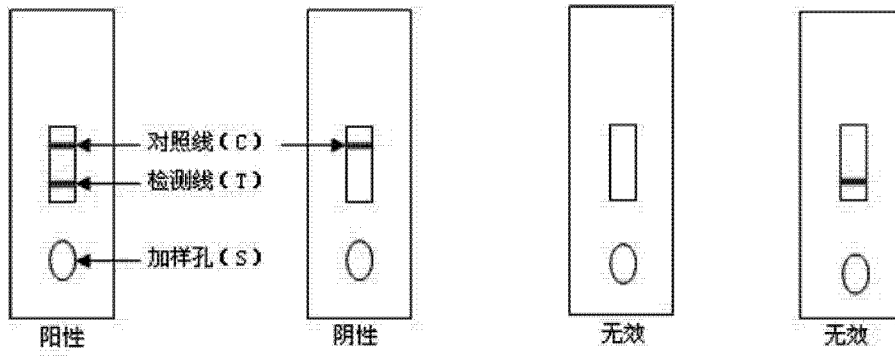


图 2

专利名称(译)	一种猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN103245783A	公开(公告)日	2013-08-14
申请号	CN201310154128.9	申请日	2013-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
[标]发明人	李中圣 刘小琴 罗均 赵焱 陈轶雯		
发明人	李中圣 刘小琴 罗均 赵焱 陈轶雯		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸及其制备方法。包括PVC底板、样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸，样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水滤纸按照层析方向依次设置在PVC底板上，并且样品垫的一端叠在胶体金结合垫前端，胶体金结合垫的后端叠在硝酸纤维素膜的一端，吸水滤纸的前端叠在硝酸纤维素膜的另一端；所述硝酸纤维素膜上分别喷制有检测线和质控线，所述胶体金结合垫由一层硝酸纤维素膜和喷在该硝酸纤维素膜上的rTTSuV2ORF1'胶体金组成。本发明的猪2型细环病毒抗体胶体金快速诊断试纸，能够快速TTSuV2抗体，结构简单，使用方便，并具有良好的灵敏度和特异性。

