



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103940994 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201310085541. 4

(22) 申请日 2013. 03. 15

(73) 专利权人 河南省农业科学院

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路
116 号

(72) 发明人 邓瑞广 李学伍 赵东 杨继飞
柴书军 王丽 王方雨 张改平

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101339192 A, 2009. 01. 07,

CN 101666800 A, 2010. 03. 10,

CN 101285070 A, 2008. 10. 15,

CN 102533663 A, 2012. 07. 04,

CN 1840703 A, 2006. 10. 04,

WO 9632647 A1, 1996. 10. 17,

王凤等. 猪水疱疹病诊断技术的研究进展. 《猪业科学》. 2012, (第 8 期),

郭伟娜. 猪水疱性口炎的诊断与防控策略. 《畜牧与饲料科学》. 2009, 第 30 卷 62-65.

王彬等. 猪水疱病诊断技术的研究进展. 《猪业科学》. 2010, (第 04 期), 30-33.

杨俊兴等. 水疱性口炎病毒单克隆抗体的制备与生物学特性鉴定. 《动物医学进展》. 2010, 第 31 卷 (第 7 期),

审查员 刘彦宁

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联
检测试纸条

(57) 摘要

本发明涉及一种猪三种疫病的检测试剂显示的器具,特别是涉及一种猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎快速诊断试纸条,试纸条含支撑层、反应试剂载体吸附层,支撑层为不吸水薄片条,反应试剂载体吸附层粘贴于支撑层上,从样品测试端依次为纤维层,上述三种疫病抗原金标单抗或多抗纤维层,纤维素膜层,手柄端为吸水材料层;分别用上述三种疫病抗原配对单抗或多抗或单抗溶液在纤维层上喷检测印迹“|||”、“///”、或“\\ \”,分别用羊(兔)抗小鼠或猪 IgG 的多抗或用 SPA 溶液在纤维素膜层上喷对照印迹“|”、“/”或“\”。该试纸条特异、敏感、直观、准确、简便、快速,能在畜禽饲养、肉类加工和检疫等相关部门推广应用。



1. 一种检测猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎的三联检测试纸条,该试纸条含有支撑层和吸附层,支撑层为不吸水的薄片层,吸附层附着在支撑层上,吸附层从测试端依次为样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层和手柄端的吸水材料层,在纤维素膜层上制备有检测印迹和对照印迹,其特征是金标抗体纤维层吸附有纳米级金颗粒标记的抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的三种单克隆抗体,检测印迹用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的配对单抗或多克隆抗体印制,对照印迹用羊或兔抗小鼠 IgG 的多克隆抗体或金黄色葡萄球菌 A 蛋白印制;或金标抗体纤维层吸附有纳米级金颗粒标记的抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体的多克隆抗体,检测印迹分别用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的单抗制备,对照印迹用金黄色葡萄球菌 A 蛋白或抗猪 IgG 多抗制备;

其中,抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的三种单克隆抗体的制备方法如下:

用 $50 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 病原体特异抗原免疫 Balb/c 系小鼠三次,每次间隔 $15 \sim 30\text{d}$;第三次加强免疫后 $3 \sim 4\text{d}$,将免疫小鼠眼球放血,拉颈致死,用 75% 酒精浸泡 $5 \sim 10\text{min}$,无菌条件下取其脾脏,剪碎并经 100 目尼龙网过滤, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min ,收集脾细胞;将 1×10^8 个脾细胞与 $2 \sim 5 \times 10^7$ 个 NS0 骨髓瘤细胞混合, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 弃上清,将含有沉淀细胞的离心管置于 37°C 的水中,并缓缓加入 $0.7 \sim 1\text{ml}$ $40\% \sim 50\%$ PEG4000 作用 1min ,所述 PEG4000 的 pH 为 $8.5 \sim 9.0$,然后缓慢加入无血清 1640 培养基 15ml ,以终止 PEG 的作用, 37°C 水浴 $5 \sim 10\text{min}$, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀重悬于 HAT 选择培养基中,并以 $100 \mu\text{l} \sim 200 \mu\text{l}$ /孔加入 96 孔培养板,置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养;培养 $7 \sim 10\text{d}$ 后,以 $5 \mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化的病原体特异抗原包被 96 孔酶标板,以酶联免疫吸附试验检测杂交瘤的培养上清,挑取 $\text{OD}_{450} \geq 0.5$ 的强阳性细胞克隆,进行连续三次的有限稀释法克隆化,获得阳性杂交瘤细胞株,其染色体数为 $92 \sim 98$,其分泌的单克隆抗体能够特异识别相应的病原体,而不与其它猪的病原体发生交叉反应,亲和力常数达 $10^9 \sim 10^{10}$,轻链亚型为 κ 或 λ ,重链亚型为 I g G_1 、 I g G_{2a} 、 I g G_{2b} 或 I g G_3 。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是检测印迹用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的配对单抗制备即用上述三种病原体特异抗原的配对单抗溶液分别制备。

3. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是支撑层用不吸水的硬质塑胶片条或硬纸条制成;测试端样品吸附纤维层用玻璃棉制成;金标抗体纤维层用玻璃棉和金标抗体制成,金标抗体是单抗或多克隆抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是纤维素膜层用硝酸纤维素膜、或纯纤维素膜、或羧化纤维素膜制成。

5. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是吸水材料层用吸水纸制成。

6. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是检测印迹和对照印迹为直线式、或斜线式,纤维素膜层上含有三条检测印迹和一条对照印迹,检测印迹和对照印迹的排列形式为“||||”、“////”、“\\\\" 中的任一种。

7. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是在测试端样品吸附纤维层、金标抗体纤维层及吸水材料层上覆盖有保护膜,在测试端样品吸附纤维层与金标抗体纤维层交界处对应

的保护膜上印制有样品标记线,该标记线偏向测试端样品吸附纤维层一侧约 0.5cm 处。

猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条

[0001] 一、技术领域

[0002] 本发明是一种涉及猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎检测试剂显示器具,特别是涉及一种可同时检测猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎的三联检测试纸条。

[0003] 二、技术背景

[0004] 猪水疱病 (Swine vesicular disease, SVD) 又称猪传染性水疱病,是由猪水疱病病毒 (Swine vesicular disease virus, SVDV) 引起猪的一种急性接触性传染病。该病的流行性强,发病率高,临床上多以蹄冠、蹄叉出现水疱为特征,偶尔在唇、舌、口部、鼻端和腹部及乳头周围皮肤也发生水疱,常以流行形式发病,对养猪业的危害较大,因而其防治问题极受重视,世界动物卫生组织 (OIE) 将其列为动物 A 类传染病。猪水泡病病毒 (Swine vesicular disease virus, SVD) 为小 RNA 病毒科肠道病毒属的一个成员,与人柯萨奇病毒 (Coxsackievirus) 尤其是柯萨奇病毒 B5 (Coxsackievirus B5, CVB5) 在理化特性、生物学特性及血清学关系等方面有很多相似性。SVD 是 1966 年在意大利首次发现的,1968 年分离证实了 SVDV。临床症状与口蹄疫、猪水疱性疹及猪水疱性口炎极为相似,但不感染牛、羊等偶蹄动物。病猪及病愈后带毒猪是该病的主要传染源,主要经伤口和消化道感染,病毒由粪、尿、水疱液及水疱皮排除。不同品种、年龄、性别的猪均可发生,但以乳猪和幼猪最为敏感。自然感染时潜伏期为 2~4 天,发病初期轻度体温反应。蹄冠、蹄叉、蹄底发生水疱:初期苍白肿胀,36~48 小时水疱凸出,有米粒至黄豆大,水疱内充满清亮或淡黄色液体,指压稍软;经 1~2 天破溃,形成溃疡面。重者蹄壳与蹄冠裂开、脱落。若继发细菌感染,则蹄部受损害。病猪疼痛、运步困难、跛行或爬行,或卧地不起,食欲减少或废绝。部分病猪在鼻盘上有水疱,但出现较晚。有时也在唇、舌面、腭和乳头出现水疱和溃疡。新生仔猪发病后可导致死亡。剖检特征性的病变在蹄部,内脏器官无肉眼病变。

[0005] 猪水疱性疹是由猪水疱性疹病毒引起的猪的一种急性、热性传染病。其特征是口腔粘膜和蹄部皮肤发生水疱,破溃后成为溃疡。病毒为单股 RNA 型病毒,直径为 30~40nm。病毒可在猪肾原代或传代细胞上能分离培养,经 48~72 小时便产生细胞病变。该病毒抵抗力较强,于 60℃ 经 30 分才能灭活,在室温可存活 6 周。对碱性消毒剂较敏感。病猪为主要传染源,通过引进感染猪及其产品而传染此病。本病的传播主要是通过病猪与健猪直接接触而引起,或饲喂被污染的饲料、肉食品垃圾、屠宰下脚料,以及未经煮熟的厨房残羹、泔水等途径造成传播。自然感染仅发生于猪,不同年龄、性别和品种无明显差异。仓鼠和犬皮内接种可出现水疱。本病的发生无明显的季节性。发病率低的只有 10%,而高的可达 100%,其差异与猪的易感性、饲养管理和病毒型等有关。潜伏期为 1~7d。病初体温升至 40.5~41.5℃ 持续数日。精神沉郁,食欲减少。随后在鼻盘、唇、口腔、跖部、趾间、蹄冠、母猪乳头等部位陆续出现灰白色水疱和鲜红色的溃疡面。严重者不能行走,疼痛嚎叫,甚至蹄壳脱落,以及流涎、拒食。如无继发感染,多在 1 周内康复。孕猪有的发生流产。少数哺乳仔猪可发生死亡。一般预后良好,病死率 5% 左右。部分猪只呈隐性感染而耐过,但在一定时期内带毒。患本病后的猪对同型病毒有免疫力。

[0006] 水疱性口炎是由水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 引起的

一种急性热性人畜共患传染病。该病毒属于弹状病毒科 (Rhabdovifidae) 水疱病毒属 (Vesiculovirus), 是有囊膜的单股负链 RNA 病毒。VSV 是引起牛、马、猪等多种动物和人共感染的重要传染病, 水疱性口炎的病原, 在兽医和公共卫生领域均具有重要意义。VSV 呈嗜上皮性, 受感染的家畜主要表现为口、蹄和乳头周围的水疱样损害, 产肉量和产奶量下降, 一般不引起动物死亡。人感染后出现类似流感的症状, 但不会引发水疱。VSV 感染牛和猪时, 临床症状与口蹄疫、猪水疱病、猪水疱疹不易区别, 而且该病使猪的生产能力下降而造成严重的经济损失, 并对国际贸易产生严重影响, 有着重要的社会经济和公共卫生意义。世界动物卫生组织 (OIE) 将水疱性口炎 (Vesicular stomatitis, VS) 列为法定通报传染病。本病毒在 7 ~ 13 日龄鸡胚绒毛尿囊膜上和尿囊腔内均能增殖, 并于 24 ~ 48 小时时内致死鸡胚。还能在多种动物的肾或上皮原代细胞和多种传代细胞培养中良好地增殖, 并产生细胞病变。传播途径主要是损伤的皮肤和粘膜, 在猪群中主要以接触方式传播, 而不是经消化道感染。双翅目昆虫是本病的重要传播媒介, 白蛉、伊蚊和螨都分离到本病毒。通过人工接种可使包括实验动物在内的各种动物发病。自然感染时潜伏期为 2 ~ 5 天, 而人工感染多为 1 天。病初体温升高 40 ~ 41℃, 精神沉郁, 食欲减退和流涎。病猪鼻部水疱较为常见, 蹄部水疱多发于蹄叉而少见于蹄冠部, 内含黄色透明液体。水疱破裂后显露溃疡面, 病猪站立困难, 并出现跛行。

[0007] 这三种病的临床症状相似, 鉴别诊断困难, 给此类疾病的控制带来了难度。快速鉴别检测可为发病猪群的治疗和病原体的清除提供科学依据, 是控制和消灭上述疾病的有效方法。目前对上述疾病的诊断方法主要有以下几种。

[0008] (1) 病毒的分离培养: 取典型的水疱组织及其液体匀浆稀释后, 加抗菌素 4℃ 作用 4 小时, 0.22mm 滤膜过滤, 滤液接种于铺满单层的猪肾传代细胞或猪肾细胞原代细胞上, 37℃ 吸附 1 小时, 加维持液继续培养 48~72 小时观察细胞病变。

[0009] (2) 动物接种试验: 取病料匀浆稀释后 0.22mm 滤膜过滤, 滤液分别接种于不同日龄乳鼠。连续观察记录乳鼠的死亡情况。根据乳鼠的死亡情况判定是否为猪水疱病、水疱性口炎、猪水疱疹。

[0010] (3) 血清学检测: 反向间接血凝试验, 可用戊二醛-甲醛固定绵羊红细胞并以豚鼠抗水疱病抗体致敏, 制成敏化红细胞诊断液, 诊断液与待检抗原(水疱液或水疱皮) 进行反向间接血凝试验, 2 ~ 7 小时可得出结果。中和试验, 取 1 ~ 2 日龄乳鼠 8 只, 试验组和对照组各 4 只, 试验组用抗水疱病血清与被检材料(病料研碎用生理盐水制成 1 : 5 稀释液, 每毫升加双抗, 置 4℃ 冰箱浸毒 6 小时, 取上清液) 即上述浸出液等量混合, 对照组用生理盐水代替抗血清, 置 37℃ 温箱中作用 1 小时, 每只乳鼠颈部皮下注射 0.1 毫升, 如对照组乳鼠全部死亡, 而试验组乳鼠存活即证明该检样中含备检病毒; 或取标准阳性血清和无菌水疱液, 采用微量血清中和法, 在 BHK-21 传代细胞上进行中和试验, 能够被标准阳性血清中和, 细胞不发生病变者, 判为阳性。琼扩试验, 本法用于检查水疱病疑似猪血清中的特异性抗体。凡能与标准抗原发生反应, 产生明显沉淀线者即可确诊。

[0011] (4) 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术: RT-PCR 技术具有高灵敏度、高特异性等优点, 已被广泛运用于许多疾病的病原体鉴定和流行病学调查。上述疾病的病原体检测均可使用 RT-PCR 技术进行检测。

[0012] 病毒的分离培养、血清学检测、反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术, 需要专业

人员在实验室操作,操作繁琐,检测费时费力;而且需要昂贵的仪器设备,如 PCR 仪、酶标仪和 CO₂培养箱等,对非专业人员而言,上述检测方法很难完成。虽然上述方法特异敏感,但每次只能检测一种猪病,且无法实现现场快速检测或诊断。本发明,研究一种简便快速、实时在线,同时检测三种猪病的三联检测试纸,对控制和消灭此类疾病意义重大。

[0013] 三、发明内容

[0014] 本发明的目的是为了克服现有技术中检测猪病病原存在的缺点,提供一种特异、敏感、简便快速的呼吸道疾病检测方法,研制出一次可同时检测三种猪细菌性呼吸道疾病的三联检测试纸。

[0015] 本发明的技术方案是:提供一种猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条,该试纸条含有支撑层和吸附层,支撑层为不吸水的薄片层,吸附层附着在支撑层上,吸附层从测试端依次为样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层和手柄端的吸水材料层,在纤维素膜层上设有检测印迹和对照印迹;金标抗体纤维层吸附有纳米级金颗粒标记的抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的三种单克隆抗体,检测印迹用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的配对单抗印制,对照印迹用羊抗或兔抗小鼠 IgG 的多克隆抗体;或金标抗体纤维层吸附有纳米级金颗粒标记的抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体的多克隆抗体,检测印迹分别用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的单抗制备,对照印迹用金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)或抗猪 IgG 多抗制备。

[0016] 检测印迹用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原的配对单抗制备即用上述三种病原体特异抗原的配对单抗溶液分别制备;检测印迹用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体的多克隆抗体制备即为用上述三种病原体的多克隆抗体分别制备。

[0017] 支撑层用不吸水的硬质塑胶片条或硬纸条制成;测试端样品吸附纤维层用玻璃棉制成;金标抗体纤维层用玻璃棉和金标抗体制成,金标抗体可以是单抗或多克隆抗体。

[0018] 纤维素膜层用硝酸纤维素膜、或纯纤维素膜、或羧化纤维素膜、或聚偏二氟乙烯 PVDF 纤维素膜制成。

[0019] 吸水材料层用吸水纸制成。

[0020] 检测印迹和对照印迹为直线式、或斜线式,纤维素膜层上含有三条检测印迹和一条对照印迹,检测印迹和对照印迹的排列形式为“| | | |”、“/ / / /”、“\ \ \ \”中的任一种。

[0021] 试纸条吸附层上面含有一层保护层,保护层附着在吸附层上,在测试端样品吸附纤维层、金标抗体纤维层及吸水材料层上覆盖有保护膜,在测试端样品吸附纤维层与金标抗体纤维层交界处对应的保护膜上印制有样品标记线,该标记线偏向测试端样品吸附纤维层一侧处约 0.5cm 处。

[0022] 根据需要,选择上述金标抗体纤维层、检测印迹和对照印迹排列形式中一种形式。

[0023] 本发明的积极有益效果:

[0024] 1. 检测特异性强、敏感性高:本发明检测试纸条以纳米级金颗粒标记高亲和力特异性单克隆抗体或特异性多克隆抗体为基础而制成,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,金颗粒不影响单克隆抗体或多克隆

抗体的特异性和结合力,并且具有较高的标记率。本发明检测试纸条具有较高的特异性和敏感性,可检测到纳克级病原体蛋白。

[0025] 2. 操作简便、快速:使用本发明试纸条检测时无需附加任何其它仪器和试剂,只需将其测试端插入待检的样品液中 30 秒左右,然后在 1-5 分钟内即可判定检测结果。

[0026] 3. 检测结果直观、准确:本发明试纸条以是否显示棕红色的检测线和对照线作为判定阳性和阴性结果的依据,即只在纤维素膜的对照线印记处显示一条棕红色对照线 C,而在检测线印记处无棕红色条带显示,表示被检测的 3 种猪病均为阴性结果;在纤维素膜的对照线印记处显示一条棕红色对照线 C,在检测印迹处出现三条棕红色条带 T1、T2、T3 (T1 为猪水疱病, T2 为猪水疱性疹, T3 为猪水疱性口炎),则表示被检测的 3 种猪病均为阳性结果;在纤维素膜上显示一条棕红色对照线和三条棕红色检测线中的任一条或任两条,则表示在被检测 3 种猪病中的任一种或两种为阳性结果。无论阳性结果或阴性结果对照线 C 均应显示,当对照线 C 不显示时,说明试纸条失效。

[0027] 4. 检测费用降低:使用本发明检测试纸条,不需其它仪器及试剂,节省了仪器、设备和附加试剂费用;一条试纸一次可以检测 3 种猪病,非专业人员也可随时实时在线检测,无需支付专家诊断检查费及其相关费用,可极大的降低检测成本的投入,降低检测费用。

[0028] 5. 使用范围广:本发明检测试纸条操作简单,即“傻瓜式”操作,而且携带方便、易保存,可满足不同单位和不同层次人员的需要,包括专业化验、海关检疫、卫生防疫、质量监测、畜产品加工、集约化养殖到个体养殖等,具有广阔的市场前景和社会效益。

[0029] 四、附图说明:

[0030] 图 1 一种猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条的侧视结构示意图

[0031] 图 2 一种猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条的俯视结构示意图

[0032] 五、具体实施方式:

[0033] 以下实施例仅为了进一步说明本发明,并不限制本发明的内容。猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条的制备,需要制备抗三种病原体特异抗原的单克隆抗体和多克隆抗体,用于制备检测印迹和金标抗体纤维层;同时需要制备羊或兔抗鼠 IgG 抗体,或羊或兔抗猪 IgG 抗体,用于制备对照印迹。

[0034] 1. 羊(兔)抗鼠或猪 IgG 抗体的制备:

[0035] 以饱和硫酸铵法提取小鼠或猪血清中的 IgG,取 1 份血清加 2 份 PBS 液(pH 7.2)混匀,加等体积饱和硫酸铵液混匀,置 4℃冰箱内 2h,在 4℃、10000r/min 离心 15min,弃上清液;以适量 PBS 液(pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵液至其最终浓度为 33%,置 4℃冰箱内 2h,在 4℃、10000r/min 条件下离心 15min,弃上清液,以少量 PBS 液(pH7.2)溶解沉淀,置 4℃冰箱内用 PBS 液(pH7.2)过夜透析,换液 2~3 次,在 4℃、10000r/min 条件下离心 15min,收集上清液,以紫外分光光度计测定其蛋白浓度。以 50 μg~100 μg(IgG)/kg 体重经皮下或肌肉注射抗体阴性健康羊或家兔 3~4 次,末次免疫 20 天后,静脉采血,以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1:2000 以上,心脏采血或颈动脉放血,收集其高免血清,以饱和硫酸铵法提取羊(兔)抗小鼠或猪的 IgG(其提取方法与上述提取小鼠血清 IgG 相同,不再重述),用于制备本发明试纸条的对照印迹。

[0036] 2. 猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体特异抗原单克隆抗体(Mi)的制备:

[0037] 每只用 50 μg ~ 100 μg 病原体特异抗原免疫 Balb/c 系小鼠三次,每次间隔 15 ~ 30d;第三次加强免疫后 3 ~ 4d,将免疫小鼠眼球放血,拉颈致死,用 75% 酒精浸疱 5 ~ 10min,无菌取其脾脏,剪碎并经 100 目尼龙网过滤,1000r/min 离心 10min,收集脾细胞;将 1×10^8 个脾细胞与 $2 \sim 5 \times 10^7$ 个 NS0 骨髓瘤细胞混合,1000r/min 离心 10min 弃上清,将含有沉淀细胞的离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水中,并缓缓加入 0.7 ~ 1ml 40% ~ 50% PEG4000 (pH 8.5 ~ 9.0) 作用 1min,然后缓慢加入无血清 1640 培养基 15ml,以终止 PEG 的作用,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 ~ 10min,1000r/min 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀重悬于 HAT 选择培养基中,并加入

[0038] 96 孔培养板(100 μl ~ 200 μl /孔),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。培养 7 ~ 10d 后,以 5 μg ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化的病原体特异抗原包被 96 孔酶标板,以酶联免疫吸附试验(ELISA)检测杂交瘤的培养上清,挑取强阳性细胞克隆($\text{OD}_{450} \geq 0.5$),进行连续三次的有限稀释法克隆化,获得阳性杂交瘤细胞株,其染色体数为 92 ~ 98,其分泌的单克隆抗体(M1, M2 或 M3),能够特异识别三种不同的病原体,而不与其它猪的病原体发生交叉反应,亲和力常数达 10^{9-10} ,轻链亚型为 κ 或 λ ,重链亚型为 IgG_1 、 IgG_{2a} 、 IgG_{2b} 、 IgG_3 ;获得的配对单克隆抗体,用于制金标单克隆抗体玻璃棉或检测印迹。

[0039] 3. 金标单抗玻璃棉的制备:

[0040] 利用柠檬酸钠还原法制备纳米级金颗粒:即在 50 ~ 100ml 沸腾的 0.01 ~ 0.05% 氯金酸水溶液中加入 2 ~ 4ml 的 0.5 ~ 2% 柠檬酸三钠溶液,获得直径 15nm 左右的纳米级金颗粒。以 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调金颗粒溶液的 pH 至 8.5 ~ 9.5,以 1:1000 ~ 1300 的标记比将待标记的单克隆抗体(M1, M2 或 M3)加入 pH8.5 ~ 9.5 的金溶胶中,标记 10min 后,加 20% PEG10000 至最终浓度为 0.05%,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1500 ~ 3000r/min 离心 20min,除去未结合的金颗粒,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15000r/min 离心 1h,弃上清,获金标抗体混合物后,用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析,分离纯化金标抗体,分别获得 M1、M2、M3 的金标抗体。将 1:100 ~ 500 稀释的三种金标抗体,吸附于精制玻璃棉中,4 $^{\circ}\text{C}$ 低温真空干燥,制备金标单克隆抗体玻璃棉。

[0041] 4. 病原体特异抗原多克隆抗体(Ci)的制备:

[0042] 病原体特异抗原多克隆抗体(Ci)的制备。分别采用国家批准的上述三种猪病的灭活疫苗、弱毒疫苗或标准抗原,多次免疫接种抗体阴性健康猪。末次免疫 20 天后静脉采血,以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1:2000 以上,心脏采血或颈动脉放血,收集其高免血清,以饱和硫酸铵法提取血清中 IgG 抗体(方法与小鼠血清 IgG 的提取相同,不再重述)。

[0043] 金标多抗和金标多抗玻璃棉的制备,与金标单抗玻璃棉的制备方法相同,不再重述。

[0044] 详见具体实施方式中的内容 3。

[0045] 5. 本发明检测试纸条检测原理

[0046] 当本发明检测试纸条测试端插入待检样品溶液后,待检溶液通过虹吸带动待检病原体进入金标抗体纤维层,并与其中的金标抗体(Mi 或 Ci)一起沿硝酸纤维素膜向手柄端扩散,最终渗入手柄端吸水材料层,扩散过程中金标抗体能够与相应的待检病原体结合,结合的金标抗体的病原体能够被纤维素膜上检测印迹的配对单抗或多抗拦截,当样品液中含有被检病原体时,则出现 1 ~ 3 条棕红色的检测线;羊或兔抗鼠或抗猪 IgG 则可与相应的金

标单抗或多抗结合,出现 1 条棕红色对照线。当待检样品液中没有上述病原体时,试纸条只显示出一条棕红色对照线;当纤维素膜上没有对照线显示时,则表明试纸条已失效。

[0047] 6. 本发明检测试纸条的检测操作方法

[0048] (1)检测样品的处理:取病猪病变组织,1:1~5 加入生理盐水并用剪刀剪碎,浸出液为待检样品,病猪全血或血清加入生理盐水 1:1~5 稀释后为待检样品。

[0049] (2)检测操作:将本发明检测试纸条样品端插入待检样品液中,插入深度不超过标记线 9,约 30 秒后取出试纸条,水平放置约 1~5 分钟,同时观察结果。

[0050] (3)结果判定:如果在检测试纸条纤维素膜上只显示出一条棕红色对照线 C,表示检测结果为阴性,说明在被检样品中不含上述 3 种病原体;如果检测试纸条上的纤维素膜出现对照线 C,检测印迹处出现 T1 或 T2 或 T3 检测线,表示检测结果为阳性,即在待检样品中含有猪水疱病病原体或猪水疱性疹病原体或猪水疱性口炎病原体;如果检测印迹处 T1 或 T2 或 T3 同时出现,表示在待检样品中存在上述 3 种病原体;如果纤维素膜上没有任何棕红色印迹显示,则表明试纸条已失效。

[0051] 实施例一:猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条

[0052] 参见图 1 和图 2,图中 1 为支撑层,用硬质塑胶薄片条制成,2 为测试端的样品吸附纤维层,用玻璃棉制成,3 为金标抗体纤维层,吸附有纳米级金颗粒标记的抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体的三种单克隆抗体的玻璃棉,根据上述具体实施方式 3 中所述的制备方法制备其金标单抗玻璃棉,4 为纤维素膜层,采用硝酸纤维素膜制成,5 为吸水材料层,用吸水纸制成,将编号 2、3、4、5 各层从左端测试端至右粘贴在硬质塑胶薄片条 1 上,彼此之间交界处互相交叉重叠。在硝酸纤维素膜层 4 上,6 为分别用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体的配对单抗溶液印制的检测印迹 T1、T2、T3,7 为用羊或兔抗鼠 IgG 溶液印制的对照印迹 C,检测印迹和对照印迹为直线式、或斜线式,两种印迹带排列形成的组合形式为“||||”、“////”、“\\ \\ \\ \\”中的任一种。8-1 为覆盖在测试端样品吸附纤维层 2 和金标抗体纤维层 3 上面的白色保护膜,在 2 和 3 交界处对应保护膜 8-1 位置上偏向于样品吸附纤维层 2 一侧 0.5cm 处印有标记线 9,9 的右端印有箭头及 max 字样,吸水材料层 5 (手柄端)上覆盖有其它颜色(如黄色)保护膜 8-2。

[0053] 待测样品溶液的制备及检测操作步骤,与具体实施方式 6 中的检测操作方法相同,不再重述。

[0054] 实施例二:猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条,与实施例一基本相同,不同之处在于:

[0055] 金标抗体纤维层 3 用吸附有金颗粒标记的抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎的三种多克隆抗体的玻璃棉制成,根据上述具体实施方式 3 中所述的制备方法制备其金标多克隆抗体玻璃棉;在硝酸纤维素膜层 4 上,6 为分别用抗猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎病原体的单抗溶液印制的检测印迹 T1、T2、T3,7 为用羊或兔抗猪 IgG 溶液印制对照印迹 C,两种印迹带排列形成的组合形式为“||||”、“////”、“\\ \\ \\ \\”中的任一种。其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均与具体实施方式 6 中的操作方法相同,不再重述。



图 1

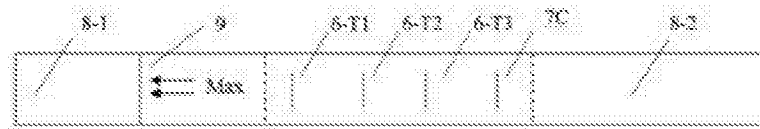


图 2

专利名称(译)	猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎三联检测试纸条		
公开(公告)号	CN103940994B	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201310085541.4	申请日	2013-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	邓瑞广 李学伍 赵东 杨继飞 柴书军 王丽 王方雨 张改平		
发明人	邓瑞广 李学伍 赵东 杨继飞 柴书军 王丽 王方雨 张改平		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/558 G01N33/56994 G01N33/587 G01N2333/085 G01N2333/145		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN103940994A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种猪三种疫病的检测试剂显示的器具，特别是涉及一种猪水疱病、猪水疱性疹及猪水疱性口炎快速诊断试纸条，试纸条含支撑层、反应试剂载体吸附层，支撑层为不吸水薄片条，反应试剂载体吸附层粘贴于支撑层上，从样品测试端依次为纤维层，上述三种疫病抗原金标单抗或多抗纤维层，纤维素膜层，手柄端为吸水材料层；分别用上述三种疫病抗原配对单抗或多抗或单抗溶液在纤维层上喷检测印迹“| | |”、“///”、或“\ \ \”，分别用羊（兔）抗小鼠或猪IgG的多抗或用SPA溶液在纤维素膜层上喷对照印迹“|”、“/”或“\”。该试纸条特异、敏感、直观、准确、简便、快速，能在畜禽饲养、肉类加工和检疫等相关部门推广应用。

