



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687302 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201911045715.8

C12N 15/34(2006.01)

(22)申请日 2019.10.30

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

(71)申请人 浙江省医学科学院

地址 310007 浙江省杭州市西湖区天目山路182号

(72)发明人 卓洵辉 丁豪杰 丁建祖 陆绍红
孔庆明 陈睿 郑斌 童群波
楼滢

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司
33200

代理人 林超

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

C07K 14/01(2006.01)

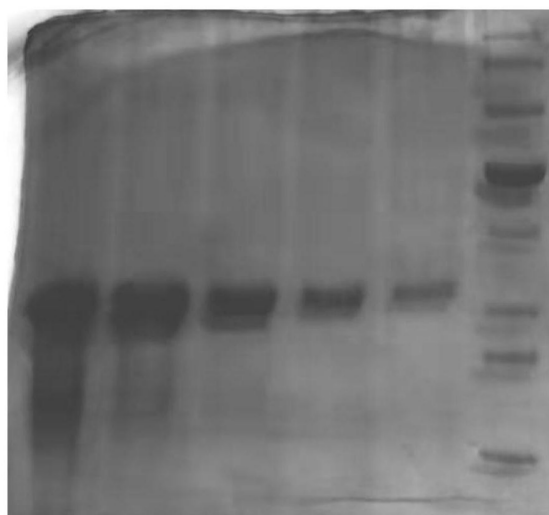
权利要求书3页 说明书7页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金快速检测试纸条及方法

(57)摘要

本发明公开了一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金快速检测试纸条及方法。包括PVC板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、C线和T线，胶体金试纸条中采用金标蛋白CAP重组蛋白，为去核定位信号的优势抗原表位肽并带有His标签，通过原核表达系统低温诱导表达至上清液；标记于T线(抗原检测试纸条)或C线(抗体检测试纸条)的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清，通过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连CAP重组蛋白后纯化处理。本发明能快速检测猪血清中的抗原或抗体，敏感性高、特异性强，有较好的稳定性，操作简单，能较好地满足不同层次的需求，易于向基层推广。



1. 一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试纸条,包括PVC板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、C线和T线,PVC板的上端为吸水垫,作为手持部分;PVC板的中端为反应区,反应区上布置硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜之上布置有金标垫、C线和T线,C线为质控线,T线为检测线;PVC板的下端为样品垫,作为待检血清样品的区域;其特征在于:所述的金标垫上吸附有金标蛋白;所述的试纸条用于抗原胶体金检测时,金标垫上吸附的金标蛋白为胶体金标记的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,硝酸纤维素膜层上的T线为抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,C线为山羊抗兔IgG多克隆抗体;所述的试纸条用于抗体胶体金检测时,金标垫上吸附的金标蛋白为胶体金标记的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,硝酸纤维素膜层上的T线为protein A重组蛋白,C线为抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清。

2. 根据权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条,其特征在于:所说的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白为去核定位信号、带His标签的利用原核表达系统低温诱导表达至上清液的重组蛋白最后经镍柱纯化获得,所述的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白与猪圆环病毒2型阳性血清特异结合。

3. 根据权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条,其特征在于:所说的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,为猪圆环病毒2型CAP重组蛋白免疫新西兰大白兔后收集兔血清,再通过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连猪圆环病毒2型CAP重组蛋白后纯化获得的兔血清。

4. 根据权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条,其特征在于:所述的试纸条使用的判断标准为:

当能清晰看到T线和C线,T线和C线均为红色,且线条单一、清楚、背景色浅,则判定待检血清样品的检测结果为阳性;

当未能清晰看到T线、但能清晰看到C线,C线为红色,则判定待检血清样品的检测结果为阴性;

当未能清晰看到T线和C线,即T线和C线均未出现红色,则判定待检血清样品的检测结果无效。

5. 根据权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条,其特征在于:所说的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白采用以下方法进行制备:

1) 设计引物和PCR扩增:

利用PCV2序列设计并合成两对引物的四条引物序列,以重组质粒pMD-PCV为模板进行PCR扩增,四条引物序列如下:

cap-F1:5-ctggatccaatggcatcttcaacacccgc-3,如SEQ ID NO.1;

cap-R1:5-agcagggccagaattcaaccttaacctttc-3,如SEQ ID NO.2;

cap-F2:5-ggttggaattctggccctgctccccaatcac-3,如SEQ ID NO.3;

cap-R2:5-cccaagctttcacttagggttaagtggggg-3,如SEQ ID NO.4;

首先,分别将以cap-F1、cap-R1为一组和以cap-F2、cap-R2为一组的两组分别进行第一轮PCR扩增,94℃热启动5分钟,94℃变性45秒,60℃退火30秒,72℃延伸30秒,循环30次,最后72℃延伸10分钟;

然后将两组PCR扩增获得的两种产物以1:1溶液质量混合作为第二轮的模板,以F1、R2为引物进行第二轮的融合PCR扩增,94℃变性45秒,60℃退火30秒,72℃延伸60秒,循环20

次,最后72℃延伸10分钟;

最后获得最终PCR扩增产物;

2) 原核表达载体的构建及诱导表达:

将最终PCR扩增产物利用胶回收试纸条回收,用BamH I和Hind III双酶切pET32a质粒和最终PCR扩增产物,然后相连接转化至BL21感受态细胞,挑取单克隆菌落,扩繁后加入1mM的IPTG中于16摄氏度摇床进行低温诱导表达,获得培养基;

3) 重组蛋白的纯化:

将培养基以8000g离心力离心5分钟收集菌液,加入7ml的PBS重悬;超声破碎至菌液清澈,再以8000g离心力离心5分钟收集上清液,最后上清液通过镍柱分离纯化目的蛋白。

6. 根据权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条,其特征在于:所说的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,具体制备为:用经镍柱分离纯化制备获得的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白作为抗原,采用多点注射法免疫新西兰大白兔2只,每2周免疫1次,共免疫3次,首免用弗氏完全佐剂,之后2次用弗氏不完全佐剂,最后一次免疫后10天心脏采血,分离血清;然后将CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,通过该琼脂糖凝胶纯化获得含有特异性抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白的IgG抗体的免疫兔血清。

7. 应用于权利要求1-6任一所述猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条的制备方法,其特征在于方法包括:

(1) 胶体金溶液的制备:将5ml浓度为1%的HAuCl₄,迅速加入500ml煮沸的水中,加入柠檬酸钠0.1125g,继续加热5分钟,调低转速,使溶液自然冷却到50℃,最后置于4℃封存;

(2) 制备金标蛋白溶液:每1ml胶体金溶液加入12μl浓度为0.2mol/L的K₂CO₃溶液及10μg的经镍柱分离纯化制备获得的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,加入10%的牛血清蛋白溶液(BSA)使其终浓度为1%,继续搅拌振荡30min,之后4℃冰箱静置2h,通过差速离心,收集金标蛋白,用缓冲液溶解4℃保存,获得金标蛋白溶液;

(3) 试纸条制备:在PVC板的两端分别布置样品垫和吸水垫,样品垫和吸水垫之间布置硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次布置金标垫、T线和C线,金标垫上吸附1:5稀释的金标蛋白溶液,硝酸纤维素膜的封闭条件为1h;其中检测抗体的试纸条的T线布置为浓度为4mg/ml的protein A重组蛋白,C线布置为浓度为0.5mg/ml的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清;检测抗原的试纸条T线布置为浓度为0.5mg/ml的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,C线布置为山羊抗兔IgG多克隆抗体。

8. 根据权利要求7所述的猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条的制备方法,其特征在于:

所述的样品垫下方的PVC板开设检测孔,检测孔用于加入待检血清样品。

9. 应用于权利要求1-6任一所述猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条的使用方法,其特征在于方法包括:

(1) 检测程序:将待检血清样品用样品稀释液稀释,将待检血清样品的原液、按1:50体积配比稀释、按1:100体积配比稀释和按1:200体积配比稀释的样品各取100μl加入到不同试纸条下端的样品区中,静置5-10min后观察;

(2) 结果判定:在各个样品检测的试纸条中,采用以下方式判断:

当能清晰看到T线和C线,T线和C线均为红色,且线条单一、清楚、背景色浅,则判定待检血清样品的检测结果为阳性;

当未能清晰看到T线、但能清晰看到C线,C线为红色,则判定待检血清样品的检测结果为阴性;

当未能清晰看到T线和C线,即T线和C线均未出现红色,则判定待检血清样品的检测结果无效。

猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金快速检测试纸条及方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域的诊断技术的一种试纸条,特别是涉及一种猪圆环病毒2型(PCV2)抗原或抗体的胶体金检测试纸条、制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒2型(porcine circovirus 2,PCV2)是引起猪断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome,PMWS)的主要病原,引起患畜进行性消瘦、生长缓慢、呼吸困难等症状。此外,PCV2还与猪皮炎与肾病综合征、增生性坏死性肺炎、猪呼吸道疾病综合征、繁殖障碍等病的有关。PCV2感染引起的相关的疾病广泛存在于世界范围内,导致的猪死亡率为10%-30%不等,给养猪业造成严重的经济损失。

[0003] 国内外采用的猪圆环病毒2型主要检测方法有病毒分离培养,聚合酶链式反应,间接免疫荧光,酶联免疫吸附试验等。这些方法都可以检测到PCV2的抗原及抗体,但存在操作时间长,过程复杂,需要专业的操作人员及专门的仪器设备等限制条件,难以在基层普及和推广。研制快速、简单及准确的检测方法,对猪群中PCV2病原及抗体水平进行实时监控,对于疾病的预防及控制具有重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供猪圆环病毒2型(PCV2)抗原及抗体检测胶体金试纸条,可有效检测猪血清中的抗原或抗体,用于PCV2感染的抗原、抗体的诊断。

[0005] 本发明的目的是针对我国目前PCV2感染的普遍存在造成巨大经济损失及缺乏有效现场可使用的检测试纸条的现状,提供快速检测的胶体金试纸条,降低检测成本,能大规模应用的现场诊断方法。

[0006] 本发明的猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试纸条是通过以下技术方案实现的:

[0007] 一、一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试纸条,包括PVC板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、C线和T线,PVC板的上端为吸水垫,作为手持部分;PVC板的中端为反应区,反应区上布置硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜之上布置有金标垫、C线和T线,C线为质控线,T线为检测线,从样品垫到吸水垫方向的硝酸纤维素膜上依次布置金标垫、T线和C线;PVC板的下端为样品垫,作为待检血清样品的区域;所述的金标垫上吸附有金标蛋白;所述的试纸条用于抗原胶体金检测时,金标垫上吸附的金标蛋白为胶体金标记的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,硝酸纤维膜层上的T线为抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,C线为山羊抗兔IgG多克隆抗体;所述的试纸条用于抗体胶体金检测时,金标垫上吸附的金标蛋白为胶体金标记的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,硝酸纤维膜层上的T线为protein A重组蛋白,C线为抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清。

[0008] 制备试纸条时是将胶体金标记的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,使其吸附于金标垫上;抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清标记于硝酸纤维素膜上的T线(抗原检测试

纸条)或C线(抗体检测试纸条),将PVC板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序组装完成。

[0009] 具体实施将试纸条各部分组装完毕后,在切割机上将试纸条切割成4mm宽的条带,密封保存备用,以提高试纸条的利用率。

[0010] 所说的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白(简称为CAP重组蛋白)为去核定位信号、带His标签的利用原核表达系统低温诱导表达至上清液的基因工程重组蛋白最后经镍柱纯化获得,所述的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白与猪圆环病毒2型阳性血清特异结合。

[0011] 现有猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金的检测方法对血清里面的抗原量要求很高。本发明通过镍柱纯化特殊制备了猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,在待检血清样品里面更少量的抗原量情况下,依然能稳定检测出准确结果,提高了识别率,解决了原有少量抗原量识别不出来的技术问题。

[0012] 所说的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,为猪圆环病毒2型CAP重组蛋白免疫新西兰大白兔后收集兔血清,再通过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连猪圆环病毒2型CAP重组蛋白后纯化获得的兔血清。

[0013] 所述的试纸条使用的判断标准为:

[0014] 当能清晰看到T线和C线,T线和C线均为红色,且线条单一、清楚、背景色浅,则判定待检血清样品的检测结果为阳性;

[0015] 当未能清晰看到T线、但能清晰看到C线,C线为红色,则判定待检血清样品的检测结果为阴性;

[0016] 当未能清晰看到T线和C线,即T线和C线均未出现红色,则判定待检血清样品的检测结果无效。

[0017] 所说的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白采用以下方法进行制备:

[0018] 1) 设计引物和PCR扩增:

[0019] 利用PCV2序列设计并合成两对引物的四条引物序列,以重组质粒pMD-PCV为模板进行PCR扩增,四条引物序列如下:

[0020] cap-F1:5-ctggatccaatggcatcttcaacacccgc-3,如SEQ ID NO.1;

[0021] cap-R1:5-agcagggccagaattcaaccttaacctttc-3,如SEQ ID NO.2;

[0022] cap-F2:5-ggttggaattctggccctgctccccaatcac-3,如SEQ ID NO.3;

[0023] cap-R2:5-cccaagctttcacttaggggttaagtggggg-3,如SEQ ID NO.4;

[0024] 所述的cap-F1和cap-R2分别带有BamH I和Hind III酶切位点。

[0025] cap-F1、cap-R1、cap-F2、cap-R2的溶液浓度均为0.5 μ mol/ μ l。

[0026] 首先,分别将以cap-F1、cap-R1为一组和以cap-F2、cap-R2为一组的两组分别进行第一轮PCR扩增,94 $^{\circ}$ C热启动5分钟,94 $^{\circ}$ C变性45秒,60 $^{\circ}$ C退火30秒,72 $^{\circ}$ C延伸30秒,循环30次,最后72 $^{\circ}$ C延伸10分钟;

[0027] 然后将两组PCR扩增获得的两种产物以1:1溶液质量混合作为第二轮的模板,以F1、R2为引物进行第二轮的融合PCR扩增,94 $^{\circ}$ C变性45秒,60 $^{\circ}$ C退火30秒,72 $^{\circ}$ C延伸60秒,循环20次,最后72 $^{\circ}$ C延伸10分钟;

[0028] 最后获得最终PCR扩增产物;

[0029] 2) 原核表达载体的构建及诱导表达:

[0030] 将最终PCR扩增产物利用胶回收试纸条大量回收,用BamH I和Hind III双酶切pET32a质粒和最终PCR扩增产物,然后相连接转化至BL21感受态细胞,挑取单克隆菌落,扩繁后加入1mM的IPTG中于16摄氏度摇床进行低温诱导表达,获得培养基;

[0031] 3) 重组蛋白的纯化:

[0032] 将培养基以8000g离心力离心5分钟收集菌液,加入7ml的PBS重悬;超声破碎至菌液清澈,再以8000g离心力离心5分钟收集上清液,最后上清液通过镍柱分离纯化目的蛋白,具体实施之后经SDS-PAGE及western blot分别验证蛋白大小、纯度和抗原性。

[0033] 本发明利用大肠杆菌原核表达的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,制定免疫程序,免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,通过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连猪圆环病毒2型CAP重组蛋白对多克隆抗体进行特异性纯化。

[0034] 所说的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,具体制备为:

[0035] 用经镍柱分离纯化制备获得的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白作为抗原,采用多点注射法免疫新西兰大白兔2只,每2周免疫1次,共免疫3次,首免用弗氏完全佐剂,之后2次用弗氏不完全佐剂,最后一次免疫后10天心脏采血,分离血清;然后将CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,通过该琼脂糖凝胶纯化获得含有特异性抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白的IgG抗体的免疫兔血清。

[0036] 二、猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条的制备方法,所述的试纸条的制备如下:

[0037] (1) 胶体金溶液的制备:将5ml浓度为1%的HAuCl₄,迅速加入500ml煮沸的水中,加入柠檬酸钠0.1125g,继续加热5分钟,调低转速,使溶液自然冷却到50℃,最后置于4℃封存;

[0038] (2) 制备金标蛋白溶液:每1ml胶体金溶液加入12μl浓度为0.2mol/L的K₂CO₃溶液及10μg的经镍柱分离纯化制备获得的猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,加入10%的牛血清蛋白溶液(BSA)使其终浓度为1%,继续搅拌振荡30min,之后4℃冰箱静置2h,通过差速离心,收集金标蛋白,用缓冲液溶解4℃保存,获得金标蛋白溶液;

[0039] (3) 试纸条制备:在PVC板的两端分别布置样品垫和吸水垫,样品垫和吸水垫之间布置硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜两端分别和样品垫和吸水垫紧密衔接,硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次布置金标垫、T线和C线,金标垫上吸附1:5稀释的金标蛋白溶液,硝酸纤维素膜的封闭条件为1h;其中检测抗体的试纸条的T线布置为浓度为4mg/ml的protein A重组蛋白,C线布置为浓度为0.5mg/ml的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清;检测抗原的试纸条T线布置为浓度为0.5mg/ml的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,C线布置为山羊抗兔IgG多克隆抗体;

[0040] 将试纸条各部分组装完毕后,在切割机上将试纸条切割成4mm宽的条带,密封保存备用。

[0041] 所述的样品垫下方的PVC板开设检测孔,检测孔用于加入待检血清样品。

[0042] 三、猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金检测试剂条的使用方法,所述的试纸条的使用方法:

[0043] (1) 检测程序:将待检血清样品用样品稀释液稀释,将待检血清样品的原液、按1:50体积配比稀释、按1:100体积配比稀释和按1:200体积配比稀释的样品各取100μl加入到

不同试纸条下端的样品区中,静置5-10min后观察;

[0044] (2) 结果判定:在各个样品检测的试纸条中,采用以下方式判断:

[0045] 当能清晰看到T线和C线,T线和C线均为红色,且线条单一、清楚、背景色浅,则判定待检血清样品的检测结果为阳性;

[0046] 当未能清晰看到T线、但能清晰看到C线,C线为红色,则判定待检血清样品的检测结果为阴性;

[0047] 当未能清晰看到T线和C线,即T线和C线均未出现红色,则判定待检血清样品的检测结果无效。

[0048] 本试纸条的检测样品为血清。若为全血标本请于37℃放置2小时或4℃过夜后于离心机中1000g离心10分钟,取上清检测。

[0049] 本发明可快速检测猪血清中的抗原或抗体,胶体金试纸条中包含的金标蛋白CAP重组蛋白为去核定位信号的优势抗原表位肽,带有His标签,通过原核表达系统低温诱导表达至上清液;标记于T线(抗原检测试纸条)或C线(抗体检测试纸条)的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清,通过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连CAP重组蛋白后纯化获得。

[0050] 与现有技术相比,本发明的优点及积极效果在于:

[0051] 首先,本发明所选择的表位肽序列为PCV2中高度保守的一段,具有良好的免疫原性,使检测结果具有良好的特异性。

[0052] 再次,本发明中所使用的抗CAP兔多克隆抗体,是经过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连CAP重组蛋白后再一次纯化的多克隆抗体,识别并捕获样品中抗原的能力更强,特异性更好,能在抗原含量较低的血清中识别相应的抗原,与现有技术中只能检测组织中的抗原试纸条相比具有明显的优势及创新。

[0053] 第三,将本发明中的抗原检测试纸条和抗体检测试纸条相结合使用,能够判定是现症感染或是既往感染,对于疾病的防控具有实际的参考意义。

[0054] 第四,检测所需的时间大为缩短,从获取血清样本到最后获得检测结果,最高只需要20分钟,无需其他专门的设备,降低了检测硬件的要求,可在基层部门中大范围推广使用。

[0055] 综合来说,本发明敏感性高、特异性强,有较好的稳定性,操作简单,能较好地满足不同层次的需求,易于向基层检测中推广。

附图说明

[0056] 图1是重组CAP蛋白诱导表达结果图。

[0057] 图2是试纸条结构示意图试纸条。

[0058] 图3是结果判定示意图。

[0059] 图4是抗原检测试纸条敏感性检测结果。

[0060] 图5是抗体检测试纸条检测结果图。

[0061] 图6是抗原检测试纸条检测结果图。

具体实施方式

[0062] 本技术结合附图和具体实施例作进一步说明,应该理解,这些实例仅用于说明目

的,而不用于限制本发明范围。以下实施例中所涉及的仪器设备如无特别说明,均为常规仪器设备;所涉及的试剂如无特别说明,均为市售常规试剂;所涉及的试验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0063] 本发明的实施例如下:

[0064] 实施例1猪圆环病毒2型CAP抗原的制备

[0065] 以GenBank公布的PCV2 (GU325755) 序列为参考,扩增出相应的片段,连接至原核表达载体pET32a,利用原核表达系统表达并获得可溶性重组蛋白,即为猪圆环病毒2型CAP重组蛋白,其对应的基因序列如SEQ ID NO.5所示,经过HIS亲和纯化后作为PCV2的免疫抗原,蛋白纯化结果如图1所示。

[0066] 实施例2抗猪圆环病毒2型CAP抗原多克隆抗体的制备

[0067] (1) 取2.5Kg新西兰大白兔3只,首免以每只1mg CAP重组蛋白用量计算,加等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,在背部皮下注射6-8点,每点0.1-0.2ml。每两周免疫一次,之后用弗氏不完全佐剂进行乳化。第三次免疫后10天进行心脏采血收集血清。

[0068] (2) 调节重组CAP蛋白(10mg)的碳酸盐缓冲溶液pH至9.0,吸取1ml CNBr琼脂糖凝胶FF并洗涤表面的溶剂。将填料浸泡至重组蛋白缓冲液中,于25度摇床震荡混匀6小时。然后加入0.1mol/L的Tris-HCl (pH 8.3)继续封闭处理6小时。将填料装进柱子中,用1mol/L的NaCl溶液清洗10个柱床体积。

[0069] (3) 制备金标蛋白溶液:将胶体金溶液pH调节至8.2,再逐滴加入单克隆抗体,至其终浓度为12.5 μ g/ml,加入5%的牛血清蛋白溶液(BSA)溶液使其终浓度为1%,继续搅拌振荡30min,之后4℃冰箱静置2h,通过差速离心,收集金标蛋白,用缓冲液溶解4℃保存;

[0070] (4) 试纸条制备:参见图2,试纸条由PVC板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫所组成,上端为手持部分,即吸水垫部分;中端为反应区,即硝酸纤维素膜区域,其中C线为质控线,按照2mg/ml包被羊抗鼠IgG,T线为检测线,按照2mg/ml包被抗弓形虫SAG3单克隆抗体,硝酸纤维素膜最佳封闭条件为1h;在硝酸纤维素膜之上放有金标垫,按照1:5稀释金标抗体复合物,吸附金标抗体复合物;下端为样品区,即样品垫区域;将试纸条各部分组装完毕后,在切割机上将试纸条切割成4mm宽的条带,密封保存备用;

[0071] (5) 检测程序:将待检血清用生理盐水或PBS稀释,取100 μ l加入到试纸条下端的样品区中,静置10-15min后观察;

[0072] (6) 结果判定:样品检测的试纸条中,能够清晰的看到T线和C线,线条单一、清楚、背景色浅,则判定样品的检测结果为阳性;样品检测的试纸条中,未能清晰的看到T线,但C线出现清晰的红色,则判定样品的检测结果为阴性,T线和C线均未出现红色,则检测结果无效。参见图3。

[0073] 在所有检测的试纸条上全部能清晰的看到C线的前提下,在阳性标准血清的试纸条上可以看到清晰的红色T线以及红色C线,在阴性标准血清的试纸条上可以看到清晰的C线但看不到T线,并且线条单一、清楚、背景色浅,才可以对样品检测的结果进行判定,否则应重做。

[0074] 本试纸条检测样品为血清,全血标本请于37℃放置2小时或4℃过夜后于离心机中1000g离心10分钟,取上清检测。

[0075] 实施例3抗原试纸条检测灵敏度的测定

[0076] 将CAP重组蛋白用PBS进行倍比稀释,从70 μ g/mL稀释至14 μ g/mL,2.8 μ g/mL,0.56 μ g/mL,112ng/mL,22.4ng/mL及4.48ng/mL,将各稀释后的CAP重组蛋白以及作为对照的PBS滴加至抗原检测试纸条中,结果如图4所示,试纸条最低能检测到22.4ng/mL的CAP重组蛋白,有良好的检测灵敏性。

[0077] 实施例4试纸条检测猪血清中的PCV2抗体

[0078] 使用PCV2抗原检测试纸条时,将待检猪血清样本用生理盐水或PBS1:50,1:100和1:200稀释为待检样品溶液,分别吸取100 μ l加至试纸条下端的样品区中,静置5-10min后观察。T线C线均出现红棕色线条表明样本为PCV2阳性,T线空白C线出现红棕色线条表明样本为PCV2阴性,试纸条未出现线条表明试纸条失效。将1份ELISA阳性和1份ELISA阴性血清样品分别稀释后进行检测,结果如图5所示,阴性样本原液及1:50,1:100和1:200稀释度的样本均未出现T线条带,阳性样本的1:50,1:100和1:200稀释度出现了T线条带,与ELISA结果吻合。

[0079] 实施例5试纸条检测猪血清中的PCV2抗原

[0080] 使用PCV2抗原检测试纸条时,将待检猪血清样本吸取100 μ l加至试纸条下端的样品区中,静置5-10min后观察。T线C线均出现红棕色线条表明样本为PCV2阳性,T线空白C线出现红棕色线条表明样本为PCV2阴性,试纸条未出现线条表明试纸条失效。将12份ELISA阳性血清使用抗原试纸条进行检测,结果如图6所示,11份样本出现2个条带,为PCV2阳性,1份样本只有C线出现条带,为PCV2阴性,与ELISA结果的符合率为91.7%。

[0081] 在所有检测的试纸条上全部能清晰的看到C线的前提下,在阳性标准血清的试纸条上可以看到清晰的红色T线以及红色C线,在阴性标准血清的试纸条上可以看到清晰的C线但看不到T线,并且线条单一、清楚、背景色浅,才可以对样品检测的结果进行判定,否则应重做。

[0082] 本发明是结合最佳实施例进行描述的,然而在阅读了本发明的上述内容后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0083] 本发明中涉及到的基因序列列表如下:

[0084] SEQ ID No.1;

[0085] 名称:cap-F1引物基因序列

[0086] 来源:人工合成

[0087] ctggatccaatggcatcttcaacacccgc

[0088] SEQ ID No.2;

[0089] 名称:cap-R1引物基因序列

[0090] 来源:人工合成

[0091] agcagggccagaattcaaccttaacctttc

[0092] SEQ ID No.3;

[0093] 名称:cap-F2引物基因序列

[0094] 来源:人工合成

[0095] ggttgattcttgccctgctccccaatcac

[0096] SEQ ID No.4;

[0097] 名称:cap-R2引物基因序列

[0098] 来源:人工合成

[0099] cccaagctttcacttaggttaagtggggg

[0100] SEQ ID No.5;

[0101] 名称:猪圆环病毒2型CAP重组蛋白基因序列

[0102] 来源:猪圆环病毒2型CAP重组蛋白

atgagcgata aaattattca cctgactgac gacagtttg acacggatgt actcaaagcg 60

gacggggcga tcctcgtega ttctgggca gagggtgcg gtccgtgcaa aatgategcc 120

ccgattctgg atgaaatcgc tgacgaatat cagggcaaac tgaccgttc aaaactgaac 180

[0103] atcgatcaaa accctggcac tgcgccgaaa tatggcatcc gtggtatccc gactctgctg 240

ctgttcaaaa acggtgaagt ggcggcaacc aaagtgggtg cactgtctaa aggtcagttg 300

aaagagtcc tcgacgctaa cctggccggt tctggtctg gccatatgca ccatcatcat 360

catcattctt ctggtctggt gccacgcggt tctggtatga aagaaaccgc tgctgctaaa 420

ttcgaacgcc agcacatgga cageccagat ctgggtaccg acgacgacga caaggccatg 480

gctgatatcg gatccaatgg catcttcaac accgcctct cccgcacat cggttatact 540

gtcaagaaaa ccacagtcag aacgccctcc tggaatgtgg acatgatgag atttaatt 600

aatgatttcc tccccagg agggggctca aacccctca ctgtgccctt tgaatactac 660

agaataagaa aggttaaggt tgaattctgg cctgctccc caatcacca gggtagacagg 720

[0104] ggagtgggct cactgctgt tattctagat gataactttg taacaaaggc caatgccta 780

acctatgacc cctatgtaaa ctactctcc cgccatacca taaccagcc cttctctac 840

cactcccgtg actttacccc gaaacctgtc ctgtagga caatcgatta ctccaaccc 900

aataacaaaa gaaatcaact ctggctgaga ctacaaacta ctggaaatgt agaccatgta 960

ggcctcggca ctgcgttcga aaacagtata tacgaccagg actacaatat ccgtataacc 1020

atgtatgtac aattcagaga atttaattctt aaagaccccc cacttaaccc taagtga 1077。

序列表

<110> 浙江省医学科学院

<120> 猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金快速检测试纸条及方法

<160> 5

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

ctggatccaa tggcatcttc aacacccgc 29

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

agcagggcca gaattcaacc ttaacctttc 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

ggttgaattc tggccctgct cccaatcac 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

cccaagcttt cacttagggt taagtggggg 30

<210> 5

<211> 1077

<212> DNA

<213> 未知 (Unknown)

<400> 5

atgagcgata aaattattca cctgactgac gacagttttg acacggatgt actcaaagcg 60

gacggggcga tcctcgtcga tttctgggca gagtgggtgcg gtccgtgcaa atgatcgcc 120

ccgattctgg atgaaatcgc tgacgaatat cagggcgaac tgaccgttgc aaaactgaac 180

atcgatcaaaa accctggcac tgcgccgaaa tatggcatcc gtggtatccc gactctgctg 240

ctgttcaaaa acggtgaagt ggcggcaacc aaagtgggtg cactgtctaa aggtcagttg 300
aaagagttcc tcgacgctaa cctggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat 360
catcattctt ctggtctggt gccacgcggt tctggtatga aagaaaccgc tgctgctaaa 420
ttcgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtaccg acgacgacga caaggccatg 480
gctgatatcg gatccaatgg catcttcaac accgcctct cccgcaccat cggttatact 540
gtcaagaaaa ccacagtcag aacgccctcc tggaatgtgg acatgatgag atttaattatt 600
aatgattttc ttccccagg agggggetca aacccccca ctgtgccctt tgaatactac 660
agaataagaa aggttaaggt tgaattctgg cctgctccc caatcaccca gggtgacagg 720
ggagtgggct cactgctgt tattctagat gataactttg taacaaaggc caatgcccta 780
acctatgacc cctatgtaaa ctactcctcc cgccatacca taaccagcc cttctctac 840
cactcccgt actttacccc gaaacctgtc cttgatagga caatcgatta cttccaaccc 900
aataacaaaa gaaatcaact ctggtgaga ctacaaacta ctggaaatgt agaccatgta 960
ggcctcggca ctgcgttcga aaacagtata tacgaccagg actacaatat ccgtataacc 1020
atgtatgtac aattcagaga atttaattctt aaagaccccc cacttaaccc taagtga 1077

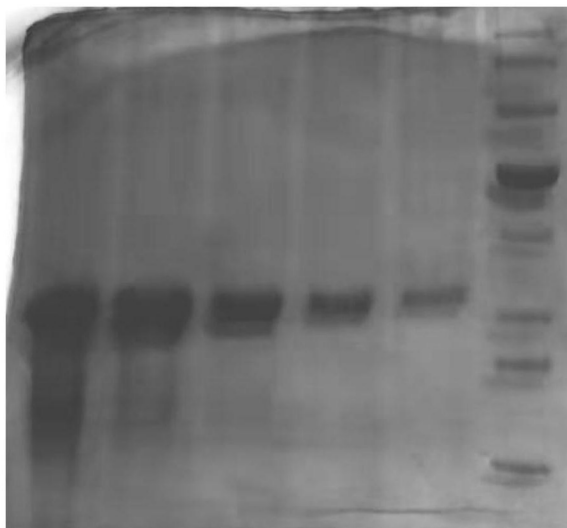


图1

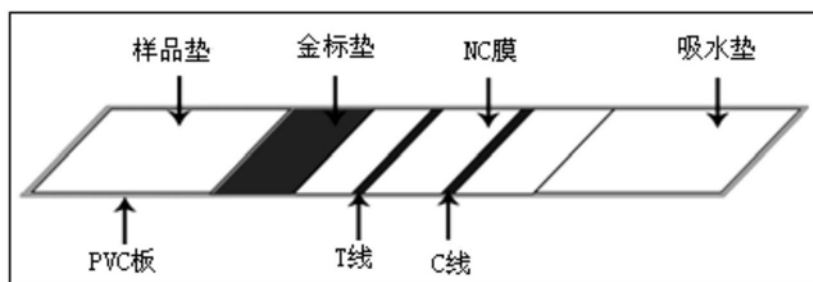


图2

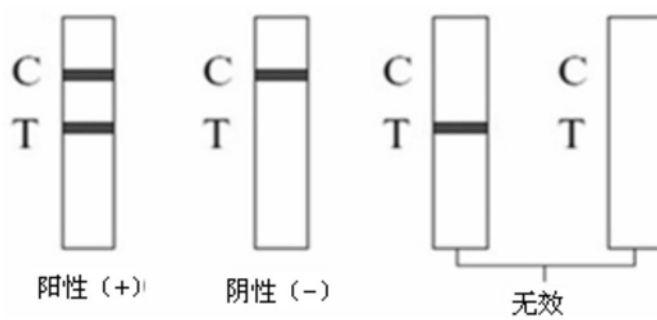


图3

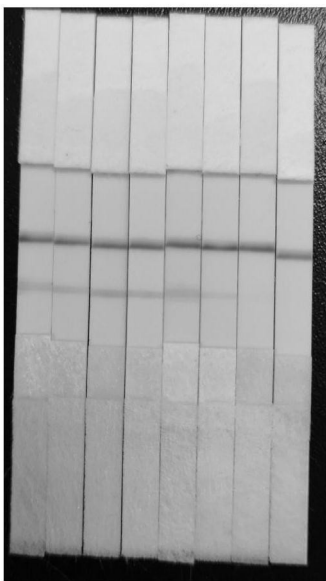


图4

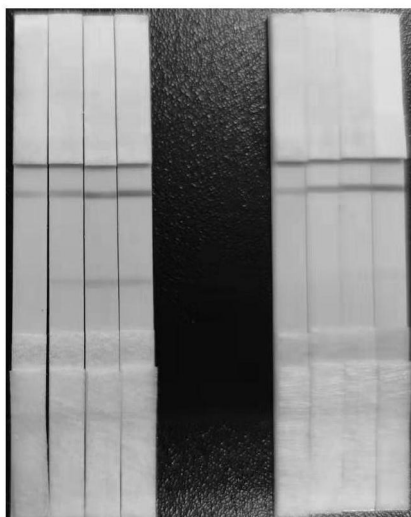


图5

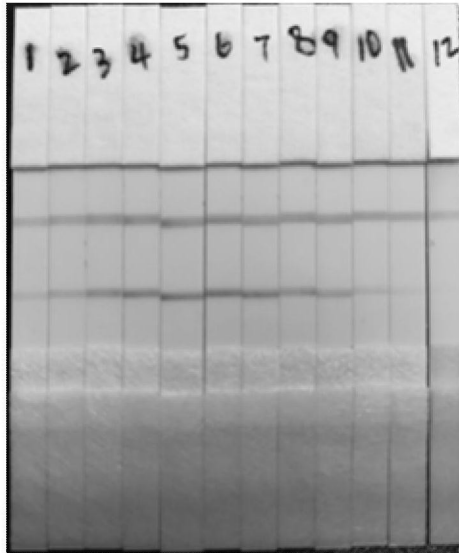


图6

专利名称(译)	猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金快速检测试纸条及方法		
公开(公告)号	CN110687302A	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201911045715.8	申请日	2019-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省医学科学院		
申请(专利权)人(译)	浙江省医学科学院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省医学科学院		
[标]发明人	卓洵辉 丁豪杰 丁建祖 陆绍红 孔庆明 陈睿 郑斌 童群波 楼涤		
发明人	卓洵辉 丁豪杰 丁建祖 陆绍红 孔庆明 陈睿 郑斌 童群波 楼涤		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 C07K14/01 C12N15/34 C12N15/70 G01N33/536		
CPC分类号	C07K14/005 C12N15/70 C12N2750/10022 G01N33/536 G01N33/56983 G01N33/68 G01N2333/01		
代理人(译)	林超		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪圆环病毒2型抗原或抗体胶体金快速检测试纸条及方法。包括PVC板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、C线和T线，胶体金试纸条中采用金标蛋白CAP重组蛋白，为去核定位信号的优势抗原表位肽并带有His标签，通过原核表达系统低温诱导表达至上清液；标记于T线(抗原检测试纸条)或C线(抗体检测试纸条)的抗猪圆环病毒2型CAP重组蛋白多克隆兔血清，通过CNBr活化琼脂糖凝胶FF偶连CAP重组蛋白后纯化处理。本发明能快速检测猪血清中的抗原或抗体，敏感性高、特异性强，有较好的稳定性，操作简单，能较好地满足不同层次的需求，易于向基层推广。

