

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910094753.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 9 日

[11] 公开号 CN 101598729A

[22] 申请日 2009.7.23

[21] 申请号 200910094753.2

[71] 申请人 花群义

地址 518010 广东省深圳市和平路 2049 号和平大厦检验楼 702 室

[72] 发明人 花群义 杨俊兴 阮周曦 曾少灵
曹琛福 吕建强 陈 兵 秦智锋
卢体康 杨建明 林庆燕 陶 虹

[74] 专利代理机构 云南派特律师事务所

代理人 张 怡

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

蓝舌病病毒快速检测试纸条及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及生物技术领域。本发明所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条由样品吸收垫 1、硝酸纤维膜 3、吸水垫 6 和底板 7 构成，样品吸收垫、硝酸纤维膜、吸水垫依次排列固定在底板上，样品吸收垫为呈线性排列的固定于不透水材料上的多孔纤维，其上载有胶体金垫，胶体金垫为蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体和胶体金的结合物，检测线 4 位于所述的硝酸纤维膜上，其上包被或喷上蓝舌病病毒多克隆抗体，对照线 5 位于所述的硝酸纤维膜上，其上包被或喷上 proteinA。本发明所述的试纸条特异性，敏感性高，检测快速，可于 10 分钟内观察结果，特别适用于口岸检疫、野外和现场检疫。本发明能够直接、快速对蓝舌病病毒抗原做出检测，而且不需要特殊的设备，也无需专门的技术人员。

1、一种蓝舌病病毒快速检测试纸条，其特征在于由样品吸收垫（1）、硝酸纤维膜（3）、吸水垫（6）和底板（7）构成，样品吸收垫（1）、硝酸纤维膜（3）、吸水垫（6）依次排列固定在底板（7）上，样品吸收垫（1）为呈线性排列的固定于不透水材料上的多孔纤维，其上载有胶体金垫（2），胶体金垫（2）为蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体和胶体金的结合物，检测线（4）位于所述的硝酸纤维膜上（3），其上包被或喷上蓝舌病病毒多克隆抗体，对照线（5）位于所述的硝酸纤维膜（3）上，其上包被或喷上 protein A。

2、根据权利要求 1 所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条，其特征在于所述的不透水材料为 PVC。

3、根据权利要求 1 所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条，其特征在于所述的多孔纤维为玻璃纤维。

4、根据权利要求 1 所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

一、蓝舌病病毒 VP7 蛋白单克隆抗体的制备：用纯化的蓝舌病病毒免疫 BALB/c 小鼠三次；取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，用间接 ELISA 方法检测分泌抗 BTV VP7 蛋白的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，用 BALB/c 小鼠制备单抗腹水；

二、胶体金的烧制和待标记单抗的准备：用柠檬酸钠还原法烧制直径 20nm~50nm 胶体金颗粒，取-20℃保存的纯化好的蓝舌病病毒的 VP7 蛋白的单克隆抗体，将其浓度调整为 1mg/mL，4℃保存备用；

三、胶体金标记抗体最适稳定量的测定：将准备好的待标记单克隆抗体做系列稀释为 5μg/mL~90μg/mL，分别取 1mL，加入每管 1mL 分装好金胶溶液中，以测定最适标记量；

四、抗体的胶体金标记：将 2mg 蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液，在电磁搅拌器搅拌下，缓慢将单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中进行标记；

五、胶体金标记抗体的纯化：标记好单克隆抗体的胶体金溶液纯化后，于含 1% 牛血清白蛋白和含 0.02%NaN₃ 的 0.02mol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液中重悬为原体积的 1 / 10，4℃保存备用；

六、胶体金标记抗体吸附玻璃纤维：用 0.02 mol/L pH8.6 TBS 稀释金标单克隆抗体，吸附于玻璃纤维滤纸上，制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维；

七、检测线和控制线的印迹：在硝酸纤维膜上设定出检测线和对照线位置，用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg/L 的蓝舌病多克隆抗体和 protein A 形成检测线和对照线。

八、胶体金标记试纸条的组装：在 PVC 底板上按顺序组合样品吸收垫、吸附有胶体金标记单克隆抗体的玻璃纤维、包被有检测线和对照线的硝酸纤维膜和吸水垫制备成检测试纸条，装入塑料外壳的检测卡内。

蓝舌病病毒快速检测试纸条及制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其是一种用于检测蓝舌病病毒抗原的快速检测试纸条，以及这种快速检测试纸条的制备方法。

背景技术

蓝舌病 (Bluetongue disease, BLU) 是由呼肠孤病毒科 (reoviridae) 环状病毒属 (Obivirus genus) 的蓝舌病病毒 (Bluetongue virus, BTV) 引起的一种烈性动物传染病，由库蠓传播，主要危害绵羊、山羊、牛等家畜，并在世界范围内广泛流行，世界动物卫生组织 (World organisation for animal health, OIE) 将 BLU 列为重要动物传染病。在很多国家动物贸易协定中，BLU 是必须进行检疫的传染病之一。近年来，随着气候变暖，BLU 在欧洲许多国家的发病率增加，严重影响着国际动物贸易。

BTV 共有 24 个血清型，BTV 基因组含有 10 个双链 RNA 片段 (dsRNA)，由 19218bp 组成，编码 7 种结构蛋白 (VP1-VP7) 和 4 种非结构蛋白 (NS1、NS2、NS3 和 NS3A)，7 种结构蛋白的 4 种形成双层蛋白衣壳，外壳主要由 VP2 和 VP5 构成，而内壳主要由 VP3 和 VP7 构成。VP2 是病毒型特异性抗原和血凝蛋白，诱导产生中和抗体，还与病毒的毒力和细胞吸附作用有关。VP5 也与中和抗体的产生和病毒毒力有关。VP7 是核芯衣壳表面壳粒的主要成分，约占病毒总蛋白的 1/3，是病毒可溶性群特异性抗原。在 BLU 检测方法中，琼脂扩散试验 (Agar Gel Immuno Diffusion, AGID) 因其操作简便、成本低而在世界范围内被广泛应用，也是迄今 OIE 推荐使用的方法之一，但该方法使用的抗原与相关病毒如鹿流行性出血病病毒 (Epizootic hemorrhagic disease virus of deer, EHDV) 存在一定的交叉反应性，所以 AGID 检测的特异性较差。

中国专利申请号 200810231379.1 公开了一种“蓝舌病病毒检测试纸条”，包括支撑层、附着在支撑层上的吸附层，所述吸附层是由样品吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及吸水层依次拼接而成，所述纤维素膜层上标记有用蓝舌病病毒抗体溶液印制的隐形检测印迹，纤维素膜层上还标记有用羊抗小鼠、兔抗小鼠、羊抗牛或兔抗牛 IgG 溶液印制的隐形对照印迹，所述金标抗体纤维层上附着有与隐形检测印迹对应的以胶体金标记的抗蓝舌病病毒

的多克隆抗体或单克隆抗体。中国专利申请号 200810226505.4 公开了一种“蓝舌病病毒抗原的 ELISA 检测方法及试剂盒”，是用抗蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体作为包被及酶标抗体的双抗夹心 ELISA 检测方法。该试剂盒包括作为包被及酶标抗体的抗蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体。中国专利申请号 200810223912.X 公开了一种“蓝舌病病毒的生物条形码检测方法”，是以蓝舌病病毒的 VP7 蛋白作为检测对象进行的生物条形码检测方法。所述 MMP 探针包被有抗 VP7 蛋白的单克隆抗体，NP 探针包被有抗 VP7 蛋白的多克隆抗体。所述对蓝舌病病毒进行生物条形码检测的条形码 DNA 链具有序列表中 SEQ ID No: 1 的核苷酸序列，互补探针 NP 链具有序列表中 SEQ ID No: 2 的核苷酸序列。

竞争酶联免疫吸附试验 (c-ELISA) 可将蓝舌病与相关病毒病区别，而双抗体夹心法 ELISA 可直接进行病毒抗原的检测。

目前，研制快速、便捷、适合于口岸检疫和现场诊断的检测试纸条，在蓝舌病的快速诊断、检疫和流行病学调查中具有更重要的应用价值。

发明内容

本发明的目的是提供一种直接检测蓝舌病病毒抗原的蓝舌病病毒快速检测试纸条。

本发明的另一目的是提供这种检测试纸条的制备方法。

本发明所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条由样品吸收垫、硝酸纤维膜、吸水垫和底板构成，样品吸收垫、硝酸纤维膜、吸水垫依次排列固定在底板上，样品吸收垫为呈线性排列的固定于不透水材料上的多孔纤维，其上载有胶体金垫，胶体金垫为蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体和胶体金的结合物，检测线位于所述的硝酸纤维膜上，其上包被或喷上蓝舌病病毒多克隆抗体，对照线位于所述的硝酸纤维膜上，其上包被或喷上 protein A。

上述的不透水材料为 PVC，所述的多孔纤维为玻璃纤维。

本发明的检测蓝舌病病毒抗原快速诊断试纸条仅与 BTV 病毒抗原发生特异性免疫反应，呈现明显的检测线和对照线，而与其它相关病毒（如 EHDV、AKV、VSV、PPRV 等）没有任何免疫反应，不出现检测线，只出现对照线。

本发明所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条的制备方法由以下步骤组成：

一、蓝舌病病毒 VP7 蛋白单克隆抗体的制备：用纯化的蓝舌病病毒免疫 BALB/c 小鼠三

次；取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，用间接 ELISA 方法检测分泌抗 BTV VP7 蛋白的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，用 BALB/c 小鼠制备单抗腹水；

二、胶体金的烧制和待标记单抗的准备：用柠檬酸钠还原法烧制直径 20nm~50nm 胶体金颗粒，取-20℃保存的纯化好的蓝舌病病毒的 VP7 蛋白的单克隆抗体，将其浓度调整为 1mg/mL，4℃保存备用；

三、胶体金标记抗体最适稳定量的测定：将准备好的待标记单克隆抗体做系列稀释为 5μg/mL~90μg/mL，分别取 1mL，加入每管 1mL 分装好金胶溶液中，以测定最适标记量；

四、抗体的胶体金标记：将 2mg 蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液，在电磁搅拌器搅拌下，缓慢将单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中进行标记；

五、胶体金标记抗体的纯化：标记好单克隆抗体的胶体金溶液纯化后，于含 1% 牛血清白蛋白和含 0.02%NaN₃ 的 0.02mol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液中重悬为原体积的 1 / 10，4℃保存备用；

六、胶体金标记抗体吸附玻璃纤维：用 0.02 mol/L pH8.6 TBS 稀释金标单克隆抗体，吸附于玻璃纤维滤纸上，制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维；

七、检测线和控制线的印迹：在硝酸纤维膜上设定出检测线和对照线位置，用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg/L 的蓝舌病多克隆抗体和 protein A 形成检测线和对照线。

八、胶体金标记试纸条的组装：在 PVC 底板上按顺序组合样品吸收垫、吸附有胶体金标记单克隆抗体的玻璃纤维、包被有检测线和对照线的硝酸纤维膜和吸水垫制成检测试纸条，装入塑料外壳的检测卡内。

上述的步骤一中，蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体制备过程为：蓝舌病病毒的纯化，用 BTV 病毒接种 BHK-21 细胞长成单层，收获的细胞培养病毒液反复冻融 3 次，以 8000r/min 离心 30 min，取上清液，超速离心和不连续蔗糖密度梯度离心，收获提纯的病毒条带，用核酸蛋白分析仪测定蛋白含量为 3.268g/L，-20℃保存备用；用提纯的蓝舌病抗原加等体积弗氏完全佐剂乳化，和弗氏不完全佐剂乳化，免疫 BALB/c 小鼠三次；取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇 (MW4000) 融合剂下融合，HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞，用间接 ELISA 方法检测分泌抗 BTV VP7 蛋白的阳性孔；用有限稀释法进行细胞克隆，经间接 ELISA 筛选阳性克隆，获得能稳定传代并分泌抗 BTV VP7 蛋白的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞；将获得的分泌抗 BTV VP7 蛋白的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞注射入 BALB/c 小鼠腹腔制备单抗腹水；采集单克隆抗体腹水，测定抗体效价、蛋白含量和亲和力，腹水 ELISA

效价高达 1: 512000, 用核酸蛋白分析仪测定纯化腹水 IgG 的含量为 1.97 g/L。亲和力分常数高达 5.41×10^7 mol/L。用间接 ELISA 方法鉴定制备的单克隆抗体仅与 蓝舌病病毒及其 VP7 蛋白有特异性免疫反应, 而与其它相关病毒 (如 EHDV、AKV、VSV、PPRV 等) 没有任何免疫反应。

上述的步骤四中, 制备蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体和制备胶体金标记抗体溶液的过程为: 将 2mg 蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液中, 再在其中加入 5% 的牛血清白蛋白使其终浓度为 1%, 4℃ 静置 2~4h, 弃沉淀物, 将胶体金溶液离心处理, 弃去上清, 将沉淀用含 0.01~0.06% 叠氮钠, 0.02mol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液稀释为原体积的 10%; 将胶体金溶液浸入玻璃纤维至液体开始渗出为止而形成金标抗体层, 然后将玻璃纤维在室温温度干燥。即制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维。

上述的步骤七中, 在硝酸纤维膜上设定出检测线和对照线位置, 用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg/L 的蓝舌病多克隆抗体和 protein A 形成检测线和对照线, 按 2 μ L/1cm 设置喷膜量, 喷膜 37℃ 干燥, 2h, 再用 0.01mol/L pH7.2 含 3% 牛血清白蛋白的 PBS, 在 37℃ 下封闭 45min, 0.01mol/L pH7.0 的 PBS 漂洗, 再将硝酸纤维膜室温下干燥, 将硝酸纤维膜贴于不透水材料上, 再将浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料和另一个多孔纤维材料分别贴于不透水材料上并使两者位于硝酸纤维膜的两端, 在浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料上且不与硝酸纤维膜相连的一端设置另一块多孔吸水材料, 以制成手柄和吸水垫。

蓝舌病病毒抗原快速诊断试纸条制备过程: 在制备好蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体、蓝舌病病毒多克隆抗体、protein A 和胶体金后即可进行试纸条的制备, 其过程如下: 将 2mg 蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液中, 再在其中加入 5% 的牛血清白蛋白使其终浓度为 1%, 4℃ 静置 2~4h, 弃沉淀物, 将胶体金溶液离心处理, 弃去上清, 将沉淀用含 0.01~0.06% 叠氮钠, 0.02mol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液稀释为原体积的 10%; 将胶体金溶液浸入玻璃纤维至液体开始渗出为止而形成金标抗体层, 然后将玻璃纤维在室温温度干燥。即制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维。基于硝酸纤维膜上的检测线和控制线的印迹: 在硝酸纤维膜上设定出检测线和对照线位置, 用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg/L 的蓝舌病多克隆抗体和 protein A 形成检测线和对照线, 按 2 μ L/1cm 设置喷膜量, 喷膜 37℃ 干燥, 2h, 再用 0.01mol/L pH7.2 含 3% 牛血清白蛋白的 PBS, 在 37℃ 下封闭 45min, 0.01mol/L pH7.0 的 PBS 漂洗, 再将硝酸纤维膜室温下干燥, 将硝酸纤维膜贴于不透水材料上, 再将浸

润有金标混合溶液的多孔纤维材料和另一个多孔纤维材料分别贴于不透水材料上并使两者位于硝酸纤维膜的两端，在浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料上且不与硝酸纤维膜相连的一端设置另一块多孔吸水材料，以制成手柄和吸水垫。

本发明的优点在于：本发明提供的检测蓝舌病病毒抗原快速诊断试纸条特异性强，敏感性高，检测快速，可于 10 分钟内观察结果，特别适用于口岸检疫、野外和现场检疫。本发明能够直接、快速对蓝舌病病毒抗原做出检测，而且不需要特殊的设备，也无需专门的技术人员。

附图说明

图 1 为本发明示意图。

图中：1—样品吸收垫，2—胶体金垫，3—硝酸纤维膜，4—检测线（T 线），5—对照线（C 线），6—吸水垫，7—底板。

具体实施方式

1、蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体制备过程：

(1) BHK-21 细胞长成单层后接种 BTV，37℃反应 1h。加入无血清的基础培养基继续培养，2~3d 后细胞病变（CPE）达 75%以上时，收获病毒。将收获的病毒液反复冻融 3 次，以 8000r/min 离心 30 min，取上清液。以 28000r/min 4℃超速离心 3h。沉淀用 1/100 原体积的 PBS 溶解，然后采用 20%、60%（w/v）不连续蔗糖密度梯度 20000r/min 4℃超速离心 3h，收获提纯的病毒条带作为免疫抗原，用 DU800 核酸蛋白分析仪测定蛋白含量，-20℃保存备用。

(2) 用提纯的蓝舌病病毒首次免疫 BALB/c 鼠后，每隔 2 周免疫 1 次，共免疫 3 次，注射剂量分别 100μg、100μg 和 200μg。首免时加等体积弗氏完全佐剂乳化，二免和三免时加等体积弗氏不完全佐剂乳化。三免后第 15d，断尾采血分离血清，用间接 ELISA 检测抗 BTV 血清抗体效价。于融合前 3d，通过尾静脉注射 BTV 强化免疫一次，剂量为 100μg。

(3) 用间接 ELISA 筛选阳性克隆，分别用 BHK 细胞增殖的 BTV 病毒、VP7 基因工程表达抗原和 BHK 细胞建立间接 ELISA。首先用 DU 800 核酸蛋白分析仪测定各种抗原的蛋白浓度。再用方阵滴定法确定最佳包被抗原浓度，并对包被时间及温度进行优化。3 种 ELISA 方法分别命名为：BTV-ELISA、BTV VP7-ELISA 和 BHK-ELISA，这 3 种 ELISA 方法用于对杂交瘤细胞培养上清进行筛选，以获得抗 BTV VP7 的单克隆抗体阳性克隆。

(4) 杂交瘤细胞注射入 BALB/c 鼠腹腔制备大量单抗腹水: 取 12 周龄左右 BALB /C 小鼠, 腹腔注射 0.5ml 降植烷, 7d 后腹腔注入 $5\sim10\times10^5$ 个杂交瘤细胞, 注射后 7~10d 可见小鼠腹部明显膨大, 采取腹水, 2000r/min 离心 5min, 收集上清液, 即为单克隆抗体腹水, 测定抗体效价, 分装后-80℃冻存备用。

(5) 采集单克隆抗体腹水, 测定抗体的特异性、效价、蛋白含量和亲和力, 腹水 ELISA 效价高达 1: 512000, 用核酸蛋白分析仪测定纯化腹水 IgG 的含量为 1.97 g/L, 亲和力分常数高达 5.41×10^7 mol/L。用 BTV-ELISA、VP7-ELISA 和 BHK-ELISA 同时进行特异性检测, 制备的单克隆抗体仅与 BTV 病毒和 BTV VP7 蛋白抗原有特异性免疫反应, 而与其它相关病毒 (如 EHDV、AKV、VSV、PPRV 等) 没有任何免疫反应。

(6) 采用硫酸铵沉淀法和柱层析法进行蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体纯化。

2、蓝舌病病毒抗原快速检测试纸条制备:

(1) 用去离子双蒸水配制 1% 的氯化金水溶液, 取 1% 的氯化金水溶液 1mL, 加双蒸水 99mL 配置成 0.01% 的氯化金水溶液 100mL。加热至沸腾, 迅速加入浓度为 1% 柠檬酸三钠水溶液 1mL, 继续煮沸, 同时观察液体颜色变化情况, 当煮沸约 5~8min 液体出现透明的酒红色时终止反应。用电镜测定制备的胶体金颗粒的大小及其形状, 大约为 20nm~50nm。待冷却后用 0.1mol/L K₂CO₃ 或 0.1N HCl 调整胶体金的 pH 值至 8.2~8.6, 4℃避光保存。

(2) 胶体金颗粒平均直径的测定: 用支持膜的镍网 (铜网也可) 蘸取金标蛋白试剂, 自然干燥后直接在透射电镜下观察, 或用醋酸铀复染后观察。计算 100 个金颗粒的平均直径。平均直径达到 20nm~50nm。

(3) 待标记蓝舌病病毒 VP7 蛋白单克隆抗体的准备: 取-20℃保存的纯化好的蓝舌病病毒的 VP7 蛋白的单克隆抗体, 将其预先对 0.005mol/L pH7.0 NaCl 溶液中 4℃透析过夜, 以除去多余的盐离子, 于 15000r/min 离心 20min, 取上清, 去除聚合物, 测定蛋白质浓度, 并将抗体浓度调整为 1mg/mL, 4℃保存备用。

(4) 胶体金与标记单克隆抗体最适用量之比的测定: 将用 0.1mol/L K₂CO₃ 或 0.1N HCl 调整好 pH 值 (8.2~8.6) 的胶体金, 分装 10 管, 每管 1mL; 将准备好的待标记单克隆抗体做系列稀释为 5μg/mL~90μg/mL, 分别取 1mL, 加入以上分装好金胶溶液的 Eppendorf 管中, 混匀; 对照管不加单克隆抗体, 只加 1mL 稀释液。5min 后, 在上述各管中加入 0.1mL 10% (w/v) 的 NaCl 溶液, 充分混匀后静置 2h, 观察结果。对照管 (未加单克隆抗体) 和加入单克隆抗体的量不足以稳定胶体金的各管, 均呈现出由红变蓝的聚沉现象, 而加入单克隆抗体量达到

或超过最低稳定量的各管仍保持红色不变；以稳定 1mL 胶体金溶液红色不变的最低单克隆抗体用量，即为该标记单克隆抗体的最佳用量。取加入单克隆抗体浓度最低而染色没有发生变化的管为最适标记量，在此基础上再补加 10 % (V/V) 浓度为 1mg/mL 的单克隆抗体溶液，即为稳定胶体金所需抗体实际用量。

(5) 胶体金与蓝舌病病毒 VP7 单克隆抗体的结合与标记：将 2mg 蓝舌病病毒 VP7 蛋白的单克隆抗体溶于 100mL 胶体金溶液中。在电磁搅拌器搅拌下，缓慢将单克隆抗体溶液加入胶体金溶液中，2mg 的抗体大约用 10min 加完，加完后继续搅动 30min，继续加入过滤除菌的 5% 牛血清白蛋白溶液，使其终浓度达到 1%，再缓慢搅动 20min 后，4℃ 静置 2~4h，弃沉淀物，用 0.45 μM 滤膜过滤胶体金标记的单抗溶液。

(6) 胶体金标记单克隆抗体的纯化：以 1500r/min 将标记好单克隆抗体的胶体金溶液进行离心 15min，弃去凝聚的沉淀留上清。上清移入新的离心管后 15000r/min 于 4℃ 离心 30min，弃上清留沉淀。沉淀物溶于含 1% 牛血清白蛋白和含 0.02% NaN₃ 的 0.02mol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液中，将沉淀重悬为原体积的 1 / 10，4℃ 保存备用。

(7) 胶体金标记抗体吸附玻璃纤维：用 0.02 mol/L pH8.6 TBS 稀释金标单克隆抗体，充分混匀后，将 1cm×5cm 大小玻璃纤维滤纸浸入金标单抗溶液中，至液体开始从玻璃纤维中渗出为止而形成金标抗体层，取出后阴干，即制成了吸附有胶体金标记抗体的玻璃纤维，裁成 5mm×5cm 的长条备用。

(8) 基于硝酸纤维膜上的检测线和控制线的印迹：在硝酸纤维膜上设定出检测线和对照线位置，用喷膜机分别在其所在位置喷上 2.5mg/L 的蓝舌病多克隆抗体和 protein A 形成检测线和对照线，按 2 μL/1cm 设置喷膜量，喷膜 37℃ 干燥，2h，再用 0.01mol/L pH7.2 含 3% 牛血清白蛋白的 PBS，在 37℃ 下封闭 45min，0.01mol/L pH7.0 的 PBS 漂洗，再将硝酸纤维膜室温下干燥，将硝酸纤维膜贴于不透水材料上，再将浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料和另一个多孔纤维材料分别贴于不透水材料上并使两者位于硝酸纤维膜的两端，在浸润有金标混合溶液的多孔纤维材料上且不与硝酸纤维膜相连的一端设置另一块多孔吸水材料，以制成手柄和吸水垫。

(9) 蓝舌病病毒抗原快速检测试纸条的组装：揭开 PVC 底板上的不干胶后，贴上喷涂有蓝舌病多克隆抗体（检测线，T 线）和 protein A（对照线，C 线）的硝酸纤维膜，将制备好的吸附有胶体金标记单克隆抗体的玻璃纤维与硝酸纤维膜的检测线一端连接并压在硝酸纤维膜上后，粘贴在 PVC 底板上，在胶体金垫上覆盖未吸附有胶体金的玻璃纤维作为样品吸收垫，

然后用厚的吸水垫作手柄并压在硝酸纤维膜靠对照线的一端，最后用切割机将试纸条切成5mm×5cm即可（参见附图）。检测试纸条装入塑料外壳的检测卡内，检测卡上贴上试纸条名称标签，装入铝箔袋，放入干燥剂，抽气密封，在铝箔袋上贴上产品说明书。

（10）试剂组成和使用方法：该蓝舌病病毒快速检测试纸条包括检测卡（1块）、缓冲液（1瓶）、干燥剂（1g）、说明书（1份）、外包装铝箔袋（1个）。使用方法：撕开外包装，取出检测板。取50μL~100μL样品加入孔中，再滴加入缓冲液3滴，10min观察结果。阳性结果：检测线和对照线均出现有紫红色条带，说明血清中有BTV病毒抗原；阴性结果：检测线无条带出现，而且对照线出现有紫红色条带，说明血清中无BTV病毒抗原；无效结果：如果对照线无色带，则检测结果无效，标本应重新检测。

（11）该蓝舌病病毒快速检测试纸条对出入境检验检疫相关实验室提供的200份样品进行检测，结果显示，阴性成立，阳性两条带，阴性一条带，结果与其它经典方法检测结果基本一致。

上述具体实施例的实验数据表明，本发明的蓝舌病病毒抗原快速检测试纸条，不仅特异性强，敏感性高，稳定，操作简便，而且制备方法简单。使用快捷迅速，可在10min之内得出结果，安全简便，不需任何仪器和设备，成本低廉，所需试剂和样本量少。特别适合用于出入境口岸和基层检疫部门蓝舌病的现场快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

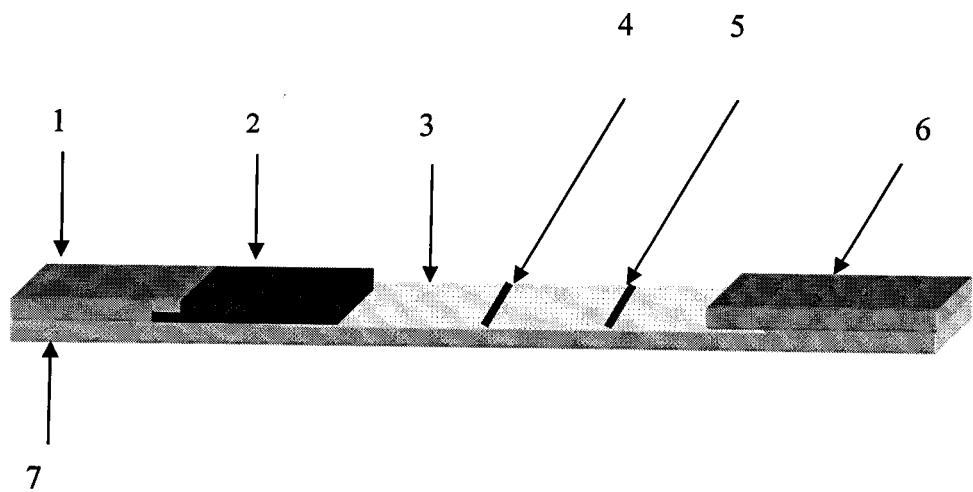


图 1

专利名称(译)	蓝舌病病毒快速检测试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN101598729A	公开(公告)日	2009-12-09
申请号	CN200910094753.2	申请日	2009-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	花群义		
申请(专利权)人(译)	花群义		
当前申请(专利权)人(译)	花群义		
[标]发明人	花群义 杨俊兴 阮周曦 曾少灵 曹琛福 吕建强 陈兵 秦智锋 卢体康 杨建明 林庆燕 陶虹		
发明人	花群义 杨俊兴 阮周曦 曾少灵 曹琛福 吕建强 陈兵 秦智锋 卢体康 杨建明 林庆燕 陶虹		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/552		
代理人(译)	张怡		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域。本发明所述的蓝舌病病毒快速检测试纸条由样品吸收垫1、硝酸纤维膜3、吸水垫6和底板7构成，样品吸收垫、硝酸纤维膜、吸水垫依次排列固定在底板上，样品吸收垫为呈线性排列的固定于不透水材料上的多孔纤维，其上载有胶体金垫，胶体金垫为蓝舌病病毒VP7蛋白的单克隆抗体和胶体金的结合物，检测线4位于所述的硝酸纤维膜上，其上包被或喷上蓝舌病病毒多克隆抗体，对照线5位于所述的硝酸纤维膜上，其上包被或喷上proteinA。本发明所述的试纸条特异性强，敏感性高，检测快速，可于10分钟内观察结果，特别适用于口岸检疫、野外和现场检疫。本发明能够直接、快速对蓝舌病病毒抗原做出检测，而且不需要特殊的设备，也无需专门的技术人员。

4 5

