



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374887 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811190467.1

(22)申请日 2018.10.12

(71)申请人 北京纳百生物科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术
开发区科创十四街11号院3号楼

(72)发明人 杨春江 赵荣茂 于在江 莫勋
郭秀锋 宋辉 吴佳兴 魏佳玥
宋世燕

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

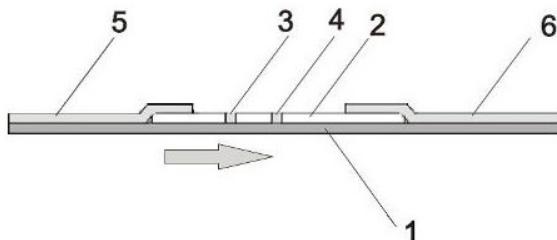
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒
及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种具有高灵敏度和特异性的牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒，其主要由BVDV抗原胶体金检测试纸条、包被有冻干的胶体金标记P80特异性单克隆抗体的微孔试剂、酶标板架、样本稀释液等组成。本发明提供的检测试剂盒无需昂贵设备，操作简便，无需特殊培训，检测灵敏度高，非常适合基层实验室、现场检测等领域广泛应用。



1. 一种牛病毒性腹泻病毒P80抗原胶体金检测试剂盒,主要由P80抗原胶体金检测试纸条和包被有冻干的胶体金标记P80特异性单克隆抗体的微孔试剂组成,其中:

所述P80抗原胶体金检测试纸条由PVC背板、吸水垫、样品垫、喷涂有包被有捕获抗体的检测线(T线)和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(C线)的硝酸纤维素膜(NC膜)构成;其中硝酸纤维素膜为整个检测反应的载体,粘贴在PVC背板上,其C线端粘贴有吸水垫,吸水垫与C线的距离为4~10mm,并与NC膜重合约1~3mm,T线端粘贴有样品垫,样品垫的上端与T线的距离为4~10mm,并与NC膜重合约1~3mm;

所述包被有冻干的胶体金标记P80特异性单克隆抗体的微孔试剂中包被的抗体是有如SEQ ID No.1所列基因序列表达的蛋白免疫小鼠制备获得。

2. 根据权利要求1所述的胶体金检测试剂盒,其特征在于,所述的包被有捕获抗体的检测线(T线)(3),其捕获抗体可为P80蛋白特异性单克隆抗体、P80蛋白多克隆抗体、牛病毒性腹泻病毒多克隆抗体、牛病毒性腹泻病毒单克隆抗体,其中优选为如SEQ ID No.1所列基因序列表达蛋白免疫小鼠制备获得的单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的胶体金检测试剂盒,其特征在于,所述的样品垫为玻璃纤维或纤维素或者纺织聚合物,其经过缓冲液浸泡后晾干,所述缓冲液为含有5%蔗糖、3%甲醇、0.5%吐温-20的0.01M 磷酸盐缓冲液(pH7.2);所述的吸水垫为玻璃纤维。

4. 根据权利要求1所述的胶体金检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒检测牛血清中牛病毒性腹泻病毒P80抗原的检测步骤为:

(1) 采集牛血清,采集好之后保存在适当条件或者当场检测;

(2) 取采集的血清20μl,血清稀释液(pH7.2 PBS)380μl于离心管中,上下次打3次充分混匀;

(3) 打开试剂盒外包装盒,取出1桶试剂盒,然后根据样本数量取出合适的试纸条,将剩余的试纸条盖好,如试剂盒在2~8℃保存,应提前至少30分钟取出在室温平衡;

(4) 用微量移液器或者其它移液装置吸取稀释好的血清样本200μl至为含有微孔试剂的微孔中,上下吸打3次,使微孔试剂与血清样本充分混匀,然后室温计时5min;

(5) 将试纸条的末端(即样品垫端)插入有血清样本的微孔中,计时5min,如果试剂盒有破损,请更换试剂盒;

(6) 判定结果:当试纸条的C线显色,T线颜色浅于C线时,样本检测结果为阴性;当试纸条的C线显色,T线颜色等于或深于C线时,样本检测结果为阳性,T线颜色越深,阳性越强;当试纸条的C线不显色,样本检测结果为无效,应更换试纸条重新检测。

牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于动物疫病诊断检测领域,涉及一种牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒及其在牛病毒性腹泻检测中的应用。

背景技术

[0002] 牛病毒性腹泻(Bovine Viral Diarrhea, BVD)是由牛病毒性腹泻病毒(Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)所引起的病毒性传染病。各种年龄的牛群都易感染,其中犊牛易感性最高。传染源主要是病牛,其分泌物、排泄物、血液和脾脏等都含有病毒,以直接接触或间接接触方式传播。

[0003] BVD自然感染的潜伏期为7~10天,短者为2天,长者为14天。临幊上表现形式有慢性感染、急性感染及持续感染等。其中持续感染(Persistent Infection, PI)是母牛妊娠早期BVDV病毒经胎盘垂直感染胎儿造成的。多数PI牛表现为早产、生长缓慢、发育不良及饲养困难等,部分个体抵抗力差,并在出生后六个月内死亡,母源抗体不能改变犊牛的病毒血症状态。PI牛最大的危害是持续排毒,它是BVDV在自然界维持存在的一种形式。鉴于BVDV病毒的持续感染特性,目前兽医临幊上并无有效防御办法,国内外主要采取持续淘汰和疫苗免疫等方法进行本病的防控。

[0004] BVDV病毒属于黄病毒科的瘟病毒属,是单链RNA病毒,长度为12.3 kb~12.5 kb,编码8种非结构蛋白p20、p7、p125、p10、p30、p58和p75。其中p125蛋白在致细胞病变(CP)型BVDV病毒结构中呈NS3(p80)形式存在。p80蛋白大约由680个氨基酸残基组成,分子量约为80kDa,在瘟病毒属中非常保守,是免疫优势蛋白。特别是P80蛋白本身在病毒基因中存在,并不表达,病毒感染动物之后才会在动物体内表达P80蛋白。自然感染和弱毒活疫苗免疫后的动物中都可以产生针对 p80的抗体,因此具有重要的诊断价值,P80抗原和P80抗体也成为目前BVD诊断检测的靶标。

[0005] 传统的诊断检测BVD的方法有分子生物学方法、酶联免疫试剂盒方法、胶体金检测法等,其中分子生物学方法以聚合酶链式反应(PCR)为代表,通过检测病毒分子来确认动物是否被感染,其操作繁琐,试剂和设备昂贵,对于牛场来说难以操作;酶联免疫法利用96孔酶标板为载体,以抗原抗体特异性反应为原理检测动物是否感染BVD病毒或者产生BVD病毒抗体,具有灵敏度高、特异性好等特点,美中不足的是操作过程较为繁琐,加样精准度要求高,且需要酶标仪、恒温箱等实验设备来确保反应环境,基层养殖场、特别是现场检测时难以开展;传统的卡壳式胶体金检测试纸卡,同样利用抗原抗体反应原理,检测BVD抗原或抗体,并且操作简便、反应时间短,唯一缺陷是灵敏度不够高,可能存在假阴性或者假阳性,面对BVD净化检测的要求时难以满足。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足,解决基层养殖场现场检测牛病毒性腹泻的棘手难题,本发明提供了一种具有高灵敏度和特异性的牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒,其

主要由BVDV抗原胶体金检测试纸条、包被有冻干的胶体金标记P80特异性单克隆抗体的微孔试剂、酶标板架、样本稀释液等组成。本发明提供的检测试剂盒无需昂贵设备,操作简便,无需特殊培训,检测灵敏度高,非常适合基层实验室、现场检测等领域广泛应用。

[0007] 本发明的另外一个目的是提供上述牛病毒性腹泻病毒抗原检测试剂盒的制备方法。该制备方法简便、所需原料简单,易于制备、可以在较短时间内制备成功,产生较大经济效益。

[0008] 本发明还提供了一种上述牛病毒性腹泻病毒检测试剂盒在检测牛血清中BVDV的应用。利用该方法检测时,养殖场无需恒温箱和酶标仪,无需专门的场地,只要有采集好的血清样本和操作台面即可完成检测。整体耗时仅为10min,省时省力。

[0009] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

一种具有高灵敏度和特异性的牛病毒性腹泻病毒抗原检测试剂盒,其主要由BVDV抗原胶体金检测试纸条、包被有冻干的胶体金标记P80蛋白特异性单克隆抗体的微孔试剂、微孔板架、样本稀释液等组成。

[0010] 其中,所述的BVDV抗原胶体金检测试纸条(图2和图3)由PVC背板(1)、硝酸纤维素膜(NC膜)(2)、样品垫(5)、吸水垫(6)构成。进一步地,其中硝酸纤维素膜(2)为整个检测反应的载体,粘贴在PVC背板(1)上,其上喷涂有包被有捕获抗体的检测线(T线)(3)和包被有鼠抗牛抗抗体的质控线(C线)(4)的,其T线端粘贴有样品垫(5),样品垫的上端与T线的距离为4~10mm,并与NC膜重合约1~3mm;其C线端粘贴有吸水垫(6),吸水垫与C线的距离为4~10mm,并与NC膜重合约1~3mm。检测样本时,样品垫部分浸入稀释的血清样本,确保样本能在虹吸作用下沿胶体金试纸条由样品垫向吸水垫方向(图2箭头方向)爬行。

[0011] 所述的包被有捕获抗体的检测线(T线)(3),其捕获抗体可为P80蛋白特异性单克隆抗体、P80蛋白多克隆抗体、牛病毒性腹泻病毒多克隆抗体、牛病毒性腹泻病毒单克隆抗体等,其中优选抗体为P80蛋白特异性单克隆抗体,是由如SEQ ID No.1所列基因序列表达的蛋白质免疫小鼠制备筛选的;

所述的包被有羊抗鼠抗抗体的质控线(C线)(4),在包被时还可加入染料,标记出C线位置,以方便客户检测时识别试纸条的方向;

所述的样品垫(5)为玻璃纤维或纤维素或者纺织聚合物,其经过缓冲液浸泡后晾干,所述缓冲液为含有5%蔗糖、3%甲醇、0.5%吐温-20的0.01M 磷酸盐缓冲液(pH7.2);

所述的吸水垫(6)为玻璃纤维。

[0012] 所述包被有冻干的P80特异性单克隆抗体(7)的微孔试剂(图4)是将胶体金颗粒标记的P80特异性单克隆抗体稀释至一定浓度,冷冻干燥在酶标微孔(8)中,然后用酶标板孔盖(9)密封。

[0013] 所述微孔板架为普通96孔酶标板板架。

[0014] 本发明还提供牛病毒性腹泻病毒P80抗原胶体金检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

1. P80蛋白特异性单克隆抗体的制备:

(1) BVDV病毒P80基因的合成:根据Genbank公布的牛病毒性腹泻病毒P80基因序列(登录号A22708.1),并依据其优势表位,进行串联后进行基因合成(基因序列如SEQ ID NO.1所列),并插入pUC载体(命名为pUC-P80),由上海生物工程有限公司完成。

[0015] (2) 基因克隆及载体构建:

根据SEQ ID No.1 所列基因序列设计引物,分别在上下游引物的近5' 端添加Xho I和Kpn I酶切位点,其中上游引物为:ccgctcgagggactggaaaccggatg;下游引物为:gggttaccctctagtctttgatcttctatg。以pUC-P80基因为模板扩增目标片段,双酶切后,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。然后与表达载体pFastBac HT-B连接得到重组表达载体pFastBac HT-P80,构建成功后测序鉴定。

[0016] (3) 重组基因工程菌构建、诱导表达及纯化:

将阳性重组质粒pFastBac HT-P80转座DH10Bac感受态细胞,通过用KTG抗生素和蓝白斑筛选阳性克隆,提取Bacmid,转染SF9昆虫细胞,观察转染后的细胞病变并收集重组杆状病毒。将重组杆状病毒以MOI 0.1感染SF9昆虫细胞,4d后5000r/min离心10min收集上清。目的蛋白的纯化参照Ni-NTA纯化系统说明书进行。

[0017] (4) 免疫动物及抗体筛选

采用市售的BVDV灭活疫苗或重组P80蛋白抗原免疫小鼠,采集血清测定效价。利用重组P80蛋白筛选特异性抗体,并用牛传染性鼻气管炎病毒、牛轮状病毒等无关病毒做交叉筛选,获得P80特异性单克隆抗体。

[0018] 2. 捕获抗体的制备

P80捕获抗体可以是P80蛋白特异性单克隆抗体、P80蛋白多克隆抗体、牛病毒性腹泻病毒多克隆抗体、牛病毒性腹泻病毒单克隆抗体等中的一种或多种混合。

[0019] 其中P80单克隆抗体及BVDV单克隆抗体制备方法见前述。

[0020] P80多克隆抗体及BVDV多克隆抗体制备过程为将纯化的P80蛋白或者BVDV病毒以一定剂量免疫新西兰兔,多次免疫后采集血清测定效价,待效价较高时采集血清,亲和层析纯化后备用。

[0021] 3 胶体金颗粒的制备

以柠檬酸钠还原法制备粒径为20~40nm胶体金颗粒备用。取0.01%氯金酸水溶液加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入体积比为1.5%~2.5%的1%柠檬酸三钠水溶液,继续搅拌加热,溶液呈透亮的酒红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,2~8℃保存。

[0022] 4 胶体金标记P80单克隆抗体的制备及冻干

将纯化的P80特异性单克隆抗体稀释至一定浓度用制备好的胶体金颗粒标记后用定量分液器以100~150μl/孔的量包被在酶标板微孔(8)中,然后2~8℃孵育一定时间,洗板后封闭,再次洗板拍干备用。

[0023] 将包被有金标P80特异性单克隆抗体的酶标板使用冻干机冷冻干燥后盖章酶标板孔盖(9)密封后作为微孔试剂储存在2~8℃干燥环境中备用。

[0024] 5划膜及组装

将捕获抗体(T线抗体)和质控线抗抗体(C线抗抗体)用0.01M PBS (pH7.2)缓冲液稀释至一定浓度,用划膜仪喷涂在硝酸纤维素膜上作为检测线;

然后按照图2和图3将干燥固定后的硝酸纤维素膜(2)贴在PVC背板(1)上,粘贴好样品垫(5)、吸水垫(6),其中硝酸纤维素膜(2)为整个检测反应的载体,粘贴在PVC背板(1)上,其T线端粘贴有样品垫(5),样品垫的上端与T线的距离为4~10mm,并与NC膜重合约1~3mm;C线端粘贴有吸水垫(6),吸水垫与C线的距离为4~10mm,并与NC膜重合约1~3mm。最后用切条机

切成4.5mm的试纸条备用。

[0025] 挑选裁切整齐无残缺的试纸条(图2)8条和微孔试剂一条(图4,含有8个微孔)盛放于含有干燥剂的塑料瓶中,密封,将12个塑料瓶贴好标签后放置在刻有孔位的试剂盒纸托上,然后继续装入1个酶标板架、1份说明书,最后装入试剂盒外包装盒,塑封,至此牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒制备完毕。

[0026] 此外,本发明还涉及一种使用本试剂盒检测牛血清中牛病毒性腹泻病毒P80抗原的检测方法,包括如下步骤:

第一步,采集牛血清,采集好之后保存在适当条件(例如2~8℃不超过8小时或冻存于-20℃)或者当场检测;

第二步,将采集的血清20μl加入含有400μl样本液稀释的试管中,剧烈晃动30s;

第三步,用塑料吸管吸取6~8滴(约200μl)稀释提取的血清样本,溶解在微孔试剂中,上下吸打若干次,确保充分溶解,然后室温计时5min;

第四步,将试纸条的样品垫段插入有样本的微孔中,计时5min。

[0027] 根据试纸条的显色情况判定结果:

当试纸条的C线显色,T线颜色浅于C线时,样本检测结果为阴性。当试纸条的C线显色,T线颜色等于或深于C线时,样本检测结果为阳性,T线颜色越深,阳性越强。当试纸条的C线不显色,样本检测结果为无效。

[0028] 与传统的病原学分析方法及ELISA分析方法相比,本发明具有以下有益效果:

1)操作简单,无需特殊仪器设备。从试剂、仪器设备来看,本方法无需有机试剂,检测样本经稀释后可以直接检测,降低了操作难度,非常适合于基层检测实验室推广应用。

[0029] 2)耗时短,检测效率高。整体检测时间10min,检测效率高。

[0030] 3)检测灵敏度高,成本低。方法利用免疫检测技术优势,具有极高的检测灵敏度,且单次检测成本不超过10元。

[0031] 4)检测结果可定性定量。在有胶体金读数仪的情况下,可以测定T线和C线的显色并可绘制校准曲线,可以定量及半定量检测抗原浓度。

[0032] 本发明提供的牛病毒性腹泻病毒抗原检测试剂盒与传统技术相比较,优势明显,技术改进明显,特别是针对当前BVD复杂的防控形势,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

附图说明

[0033] 图1 重组BVDV P80抗原鉴定图。

[0034] 图2 胶体金试纸组装结构图。

[0035] 图3 胶体金试纸的纵剖面图。

[0036] 图4 胶体金试剂盒微孔试剂结构图。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施方式来进一步描述本发明。本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚,但这些实施例仅是范例性质,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式

进行修改或者替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围。下述试剂、实验材料,如没有特殊说明,均来源于商品化产品。

[0038] 实施例1:P80蛋白特异性单克隆抗体的制备

1) p80基因克隆及重组表达载体构建

根据Genbank公布的牛病毒性腹泻病毒P80基因序列(序列号:A22708.1)并分析其优势表位,进行串联后进行基因合成(基因序列如SEQ ID NO.1所列),用Primer和DNASTar设计扩增引物,并在引物中引入酶切位点Kpn I和XhoI,引物序列由上海生工合成。设计的引物序列如下:

上游引物:ccgctcgagggactggaaaccggatg

下游引物:ggttaccctctagtctttatcttctatg

p80基因片段以pUC-p80质粒为模板,用PCR方法扩增。反应条件:94 °C预变性5min,94 °C变性45 s,退火条件为55. 6°C 45s,72°C延伸2 min,30个循环后,再72°C延伸7min,4°C终止反应。纯化的PCR 产物与表达载体pFastBac HT-B分别进行双酶切后,经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用T4 DNA 连接酶4 °C连接过夜,连接产物转化DH5α感受态细胞。阳性重组质粒命名为pFastBac HT-P80。

[0039] 2) 重组p80蛋白的诱导表达

将阳性重组质粒转座DH10Bac感受态细胞,通过用KTG抗生素和蓝白斑筛选阳性克隆,提取Bacmid,转染SF9昆虫细胞,观察转染后的细胞病变并收集重组杆状病毒。将重组杆状病毒以MOI 0.1感染SF9昆虫细胞,4d后5000r/min离心10min收集上清。用10%的聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE电泳,结果表明在约39KDa处出现特异性条带,即p80蛋白表达成功。

[0040] 3) 重组p80蛋白的纯化及鉴定

目的蛋白的纯化参照Ni-NTA纯化系统说明书进行,此处不再赘述。纯化后的蛋白用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量,以SDS-PAGE鉴定纯度后分装,-80°C保存备用。

[0041] 以Western Blot鉴定重组p80蛋白抗原性:

纯化蛋白煮样后进行SDS-PAGE电泳,通过湿法转印至NC膜上;经5%脱脂奶粉封闭后一次加入一抗(BVDV阳性血清,1:100稀释,由中国兽医药品监察所提供的),37°C孵育2h,TBST洗涤3次,10min/次;然后加入二抗(兔抗牛IgG HRP,1:3000稀释,由sigma公司提供),37°C孵育1h,继续TBST洗涤3次,10min/次;最后加入二氨基联苯胺DAB底物显色,以去离子水终止反应,拍照保存结果。

[0042] 以ELISA法鉴定重组p80蛋白抗原性:

将纯化的重组p80蛋白用0.05M碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释至2μg/mL按照每孔50μL包被酶标板,4°C过夜包被,然后以PBST洗板3次,250μl/孔,每次60s,然后以200μL 1%明胶(1g明胶溶于100mL PBS,pH 7.2~7.4,过滤除菌)封闭酶标板,37°C封闭2小时;继续PBST洗板1次;再取牛病毒性腹泻BVDV阳性血清(1:100稀释)、牛传染性鼻气管炎(IBRV)阳性血清(1:100稀释)、阴性血清、空白PBS对照各50μL加入不同孔中,37°C孵育30min;弃去孔中液体,洗板3次;加入HRP酶标二抗50μL每孔,继续37°C孵育30min;弃去孔中液体,洗板3次;加入TMB底物,50μL每孔,37°C孵育10min,再以2M硫酸终止反应;酶标仪读取450nm吸光度值。结果显示空白对照及阴性对照的OD值应当介于均小于0.25,而阳性血清的OD值大于1.0,即所纯化

的重组p80蛋白具有良好的抗原性,可与BVDV阳性血清反应,而与IBRV阳性血清、BVDV阴性血清及无关对照不反应。

[0043] 4) p80特异性单克隆抗体的制备

A:利用重组p80抗原免疫小鼠制备:

将p80蛋白按照50 μ g/次/只的剂量免疫balb/C小鼠,首次免疫时与登记量的弗氏完全佐剂混合乳化,后续免疫时与等量的弗氏不完全佐剂佐剂混合乳化。多次免疫后采集血清测定效价,挑选血清效价较高的小鼠,利用75 μ g /只的剂量腹腔注射加强免疫,最后去脾脏细胞与SP2/0瘤细胞进行融合,按照常规方法以P80包被的酶标板筛选阳性克隆。有限稀释至单克隆状态后测定细胞培养上清效价,并以牛病毒性腹泻病毒、牛传染性鼻气管炎、牛冠状病毒等进行交叉反应监测,筛选能与BVDV、P80反应,而与其余病毒无反应的抗体细胞株,制备腹水抗体,纯化备用。

[0044] B:利用市售的BVDV疫苗免疫小鼠制备:

利用市场采购的BVDV疫苗,按照50 μ g/次/只的剂量免疫balb/C小鼠,首次免疫时加入等量弗氏完全佐剂乳化,后续免疫无需加入。多次免疫后采集血清测定效价,挑选血清效价较高的小鼠,利用100 μ g /只的剂量腹腔注射加强免疫,最后去脾脏细胞与SP2/0瘤细胞进行融合,按照常规方法以P80包被的酶标板筛选阳性克隆,并按照A方法中的筛选步骤筛选特异性单克隆抗体,制备腹水后纯化备用。

[0045] 实施例2:p80抗原胶体金检测试剂盒中捕获抗体的制备

p80抗原胶体金检测试剂盒中捕获抗体的制备步骤同实施例1第(4)部分。此处不再赘述。

[0046] 实施例3:胶体金颗粒的制备

以柠檬酸钠还原法制备粒径为20-40nm胶体金颗粒,具体操作如下:

- (1) 取250 ml圆底烧瓶,量取100 ml蒸馏水并加1 ml 1%氯金酸溶液,搅拌加热至煮沸;
- (2) 加入1.5ml 1%柠檬酸钠水溶液至上述氯金酸水溶液中,搅拌混匀,并保持沸腾10min,此间溶液颜色将由透明变黑,再逐渐变红,最终溶液呈酒红色;
- (3) 10min后停止加热,待溶液冷却后,补加蒸馏水定容至100ml,此即胶体金溶液;
- (4) 将制备好的胶体金溶液置于2~8℃保存。

[0047] 实施例4:胶体金标记p80特异性单克隆抗体的制备

将制备好的p80特异性单克隆抗体用稀释液稀释后用胶体金颗粒标记,具体操作如下:

- (1) 取制备的胶体金溶液10ml至离心管中,加入适量的0.1M K₂CO₃溶液,此时pH值约为7.5。

[0048] (2) 取制备的p80特异性单克隆抗体溶液140 μ l加入到胶体金溶液中,室温孵育20分钟。

[0049] (3) 加入牛血清白蛋白(BSA)0.02g使其终浓度为0.2%,充分混匀。4℃条件下,10000r/min离心40分钟,弃上清。

[0050] (4) 用2ml 0.02mol/l磷酸盐缓冲液(1%蔗糖、1%海藻糖、2%BSA、0.02%叠氮钠)复溶沉淀,此即标记好的抗体胶体金溶液。

[0051] (5) 将标记好的胶体金抗体溶液用0.22 μ m的滤膜过滤除菌,置2~8℃保存备用。

[0052] 实施例5:微孔试剂的制备

将制备好的胶体金标记的p80特异性抗体用稀释液稀释后,用包被机平均分配至96孔微孔板中,利用冻干机冷冻干燥,具体操作如下:

(1) 将制备的胶体金标记抗体用0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液(碳酸钠1.59g,碳酸氢钠2.93g,用灭菌去离子水溶解至1000mL, pH 9.6)稀释到5μg/mL,按100μL/孔包被96孔酶标板(Nunc, 468667), 2~8℃作用14~18小时。

[0053] (2) 弃去孔中的包被液,每孔加入300μL 1×PBS-Tween洗涤液(终浓度为0.1%的Tween-20溶于PBS中,121℃高压灭菌, pH 7.2)洗板4次,每次3分钟。最后一次拍干。

[0054] (3) 每孔加入200μL的1%明胶(1g明胶溶于100 mL PBS, pH 7.2~7.4, 0.22μm滤膜过滤除菌),37℃封闭2小时后弃去。

[0055] (4) 每孔加入250μL PBST(终浓度为0.1%的Tween-20溶于PBS中,121℃高压灭菌, pH 7.2)洗板1次,3分钟/次,拍干。

[0056] (5) 弃去洗涤液,经0.1mba真空干燥10小时。

[0057] (6) 冻干完毕,迅速取出含有冻干试剂的酶标板,盖上酶标微孔盖,与干燥剂一起放置于2~8℃保存备用。

[0058] 实施例6:胶体金试剂盒的组装

1. 胶体金试纸条部件制备及组装

(1) 将300mm×25mm的硝酸纤维素膜粘贴在300mm×6cm的PVC背板上,备用。

[0059] (2) 将纯化的捕获抗体用缓冲液(含有3%甲醇、1%蔗糖、0.05%叠氮钠的0.02M磷酸盐缓冲液, pH 7.4)作1:200稀释,用划膜仪以0.1μl/mm喷涂到粘贴在PVC背板上硝酸纤维素膜的检测线(T线)的位置,待固定。

[0060] (3) 继续用上述缓冲液将羊抗鼠IgG抗体稀释至0.5 mg/mL,用划膜仪以0.1μl/mm的体积喷涂到黏附在PVC背板上的硝酸纤维素膜的质控线(C线)上,待干燥备用。

[0061] (4) 将喷有检测线(T线)和质控线(C线)的硝酸纤维素膜置于37℃恒温干燥箱中,烘干16h,室温干燥贮存。

[0062] (5) 将聚酯纤维膜样品垫(300mm×17mm)浸泡于样品垫溶液(含3%蔗糖、1%吐温-20、0.05%叠氮钠的0.02M磷酸盐缓冲液)中1小时,然后转移至37℃恒温箱中干燥16小时,备用。

[0063] (6) 将吸水纸裁切成300mm×17mm,备用。

[0064] (7) 按照图2及图3所示,先将硝酸纤维素膜(3)粘贴到PVC板(7)的相应位置,然后将样品垫(1),吸水纸(4)依次粘贴到PVC板(7)的相应位置。使样品垫(2)与硝酸纤维素膜(3)部分接触,约1~2mm;使吸水纸(4)与硝酸纤维素膜(3)部分接触,约2~3mm。用切条机将其切成4.5mm宽的小条,备用。

[0065] 胶体金检测试剂盒的组装

(1) 挑选裁切整齐无残缺的试纸8条和微孔试剂一条(含有8个微孔(8),每个孔中含有冻干试剂(7),8个微孔用微孔板盖帽(9)盖住)盛放于含有干燥剂的塑料瓶中,密封;

(2) 将12个塑料瓶贴好标签后放置在刻有孔位的试纸条包装桶纸托上,然后继续装入1个酶标板架、1份说明书,最后装入试剂盒外包装盒,塑封;

(3) 至此牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒制备完毕。

[0066] 实施例7:利用牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒检测牛血清样本

(1) 采集牛血清,采集好之后保存在适当条件或者当场检测;

(2) 取采集的血清20 μ l, 血清稀释液(pH7.2 PBS)380 μ l于离心管中, 上下次打3次充分混匀;

(3) 打开试剂盒外包装盒, 取出1桶试纸条, 然后根据样本数量取出合适的试纸条, 将剩余的试纸条盖好。如试纸条在2~8°C保存, 应提前至少30分钟取出在室温平衡。

[0067] (4) 用微量移液器或者其它移液装置吸取稀释好的血清样本200 μ l至为含有微孔试剂的微孔中, 上下吸打3次, 使微孔试剂与血清样本充分混匀, 然后室温计时5min;

(5) 将试纸条的末端(即样品垫端)插入有血清样本的微孔中, 计时5min, 如果试纸条有破损, 请更换试纸条;

(6) 判定结果: 当试纸条的C线显色, T线颜色浅于C线时, 样本检测结果为阴性。当试纸条的C线显色, T线颜色等于或深于C线时, 样本检测结果为阳性, T线颜色越深, 阳性越强。当试纸条的C线不显色, 样本检测结果为无效, 应更换试纸条重新检测。

[0068] 实施例8: 牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒的敏感性和特异性检测

利用本发明研制的牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒检测牛病毒性腹泻病毒原液、牛传染性鼻气管炎病毒原液、进口胎牛血清、阴性质控血清, 其中病毒原液稀释比例为1:100、1:200、1:400、1:800操作过程按照实施例6进行, 结果表明牛传染性鼻气管炎病毒原液、进口胎牛血清、阴性质控血清检测C线显色、T线不显色或有微弱阴影, 即检测结果均为阴性; 而BVDV病毒原液作1:100、1:200、1:400稀释时, C线显色、T线也显色, 并且T线颜色比C线深, 随着稀释度的增加, T线颜色还在变浅, 检测结果整体判断为阳性; 1:800稀释时, C线显色、T线也显色, T线颜色与C线比较接近, 即检测均为弱阳性。

[0069] 本发明的牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒具有良好的特异性, 与阴性对照和无关病毒无交叉反应, 并且对牛病毒性腹泻病毒原液检测最大稀释度到1:800, 敏感性良好。

[0070] 实施例9: 本发明牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒与进口试剂盒检测结果的对比

分别利用自制牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒与美国进口IDEXX试剂盒检测118份临床血清, 其中进口试剂盒检测出阳性7份中, 自制试剂盒检测出抗原阳性5份, 另外2份为阴性; 进口试剂盒检测出阴性111份中, 自制试剂盒检测出抗原阴性111份。统计可知本发明的牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒与进口试剂盒整体符合率为98.31% (n=118), 即本发明试剂盒可初步用于BVDV抗原检测及BVDV感染净化程序中。

序列表

<110> 北京纳百生物科技有限公司

<120> 牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒及其应用

<130> F002

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 4

<211> 900

<212> DNA

<213> 人工序列(未知)

<400> 4

ggactggaaa ccggatggc ctacacacac caaggcggca tagttccgg ttccggcact 60
agtgaagggg acatggcaac tggatcacc tacgcctcat atggatattt ttgc当地atg 120
ccgcagccga agctcagggc cgcaatggta gagtattcat acatatttct ggatgagttat 180
cactgtgcta ctcctgagca gttggctgtc ataggaaaaa ttcacagatt ttctgaaagc 240
ataagggtgg ttgctatgac cgccacccca gcagggtcag taactacaac agggcaaaaa 300
cacccaaatag aagaattcat agtcctgag gtgatgaaag gggaaagaccc ttgaagccag 360
ttccttgaca tagcggggct aaaaatcccg gttgaggaga tgaaggtaa catgctggtc 420
ttcgtaccca caagaaacat ggcagttgat gtagccaaga aactaaaagc caaggctac 480
aactcagggt attactacag tggggaaagac ccggcttaact tgagggtggt aacatcacag 540
tccccatacg tcgttagtagc caccaatgcc attgagtcag ggtaacgct gccagattta 600
gatacagttg ttgacacagg tctgaagtgt gaaaagaggg tgagggtgtc atcaaaaaata 660
ccttcatacg taacaggcct taaaagaatg gctgtcactg tggcgaaca ggctggagga 720
ggaggttcca accagcaagt agtggagact gggaaagcac tgaagcaagt ggtaggactg 780
tcctctgctg agaatgccct gctcatagcc ctgtttgggt atgtaggata tcaagcttg 840
tcaaaaaagac acgtcccaat gatcacagac atatacacca tagaagatca aagactagag 900

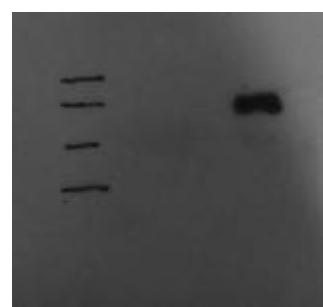


图1

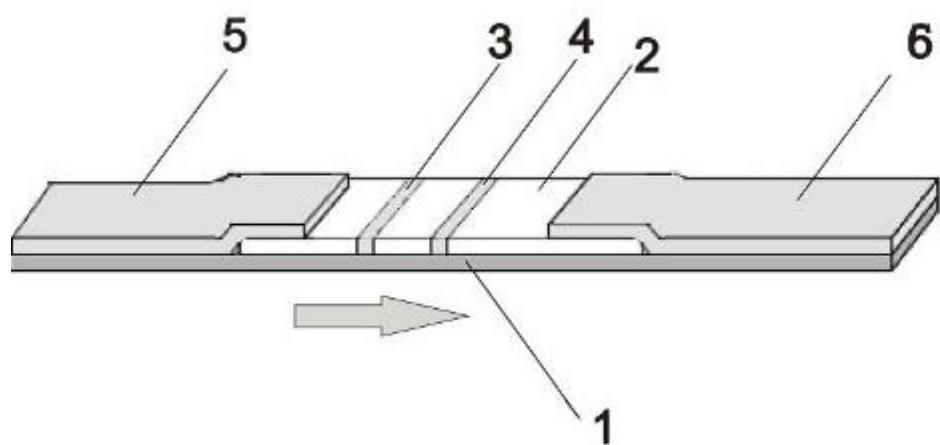


图2

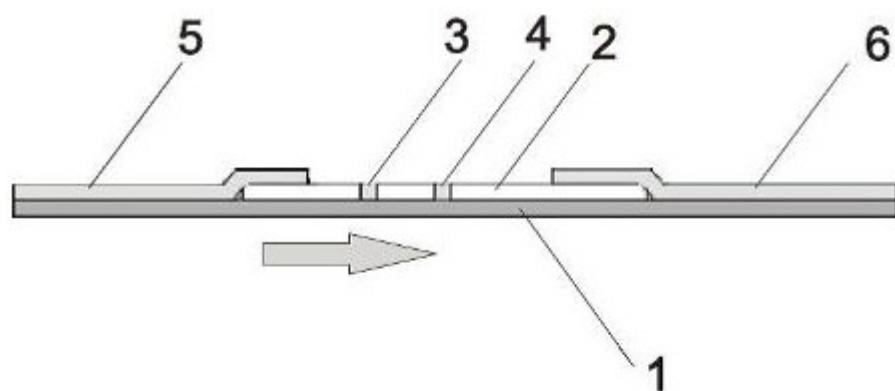


图3

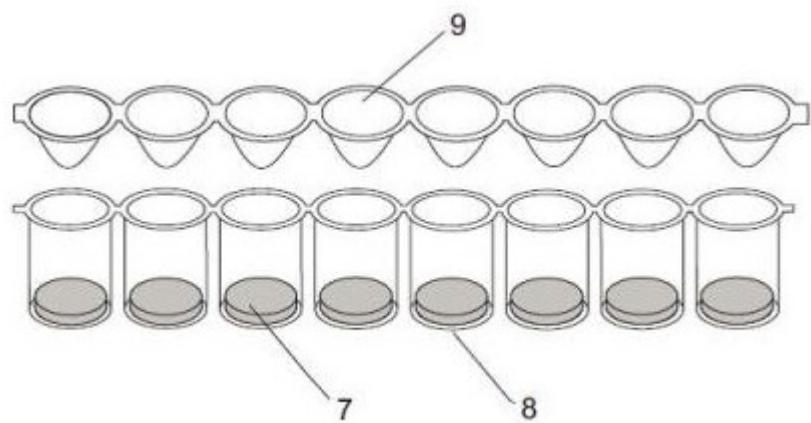


图4

专利名称(译)	牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109374887A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201811190467.1	申请日	2018-10-12
[标]发明人	杨春江 赵荣茂 于在江 莫勋 郭秀峰 宋辉 吴佳兴 魏佳玥 宋世燕		
发明人	杨春江 赵荣茂 于在江 莫勋 郭秀峰 宋辉 吴佳兴 魏佳玥 宋世燕		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/531 G01N33/54306		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种具有高灵敏度和特异性的牛病毒性腹泻病毒抗原胶体金检测试剂盒，其主要由BVDV抗原胶体金检测试纸条、包被有冻干的胶体金标记P80特异性单克隆抗体的微孔试剂、酶标板架、样本稀释液等组成。本发明提供的检测试剂盒无需昂贵设备，操作简便，无需特殊培训，检测灵敏度高，非常适合基层实验室、现场检测等领域广泛应用。

