



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110221067 A

(43)申请公布日 2019.09.10

(21)申请号 201910644896.X

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2019.07.16

G01N 21/78(2006.01)

(71)申请人 吉林大学

地址 130022 吉林省长春市前进大街2699号

(72)发明人 刘明远 刘晓雷 杨勇 王学林

白雪 唐斌 丁静 王楠 张小波

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 邓宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

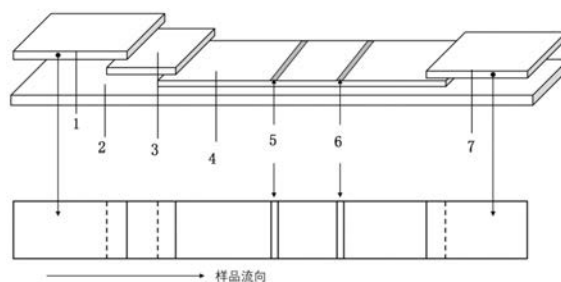
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用

(57)摘要

一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用,属于荧光免疫检测技术领域。为了更快速、稳定、准确检测旋毛虫感染,本发明提供了一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条,包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂由原核表达的重组肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原组成的旋毛虫鸡尾酒抗原;所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG,上述各组分组合后制备成试纸条,本发明可用于猪旋毛虫感染的早期快速检测。



1. 一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条, 包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板, 其特征在于, 所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG; 所述样品垫上设置有加样孔; 所述层析膜上设有检测线与质控线, 其中检测线上喷涂有旋毛虫鸡尾酒抗原, 所述旋毛虫鸡尾酒抗原由肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原、成虫期的Ts-ZH68重组抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原组成; 所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG。

2. 根据权利要求1所述的猪旋毛虫病抗体检测试纸条, 其特征在于, 所述样品垫材质为玻璃纤维素膜XQ-Y8; 所述结合垫材质为玻璃纤维素膜Ahistrom8964; 所述层析膜材质为硝酸纤维素膜Millipore135。

3. 根据权利要求1所述的猪旋毛虫病抗体检测试纸条, 其特征在于, 所述旋毛虫鸡尾酒抗原中原核表达的重组肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原的浓度比为(0.5-1):(0.5-1):(0.5-0.75):(0.5-0.75)mg/mL。

4. 权利要求1所述的猪旋毛虫病抗体检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 旋毛虫鸡尾酒抗原的制备: 分别将表达肌幼虫期的Ts-WM5重组蛋白、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组蛋白、成虫期的Ts-ZH68重组蛋白和新生幼虫期的Ts-T668中C端的重组蛋白的各重组质粒转化宿主菌, 经诱导表达后, 超声破碎菌体, 离心收集沉淀, 尿素溶解包涵体, 然后经亲和纯化分别获得肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原、成虫期的Ts-ZH68重组抗原、新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原, 将各重组抗原按照浓度比混合后获得旋毛虫鸡尾酒抗原;

2) 结合垫的制备: 将时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG喷涂在结合垫上, 真空抽干后干燥保存备用;

3) 检测线和质控线的制备: 将步骤1) 中获得的旋毛虫鸡尾酒抗原与0.5-1mg/mL兔抗山羊IgG分别喷涂在层析膜上, 形成检测线与质控线, 37℃干燥2-3h, 使用封闭剂浸泡干燥后的层析膜1-2h, 随后37℃干燥1-2h, 密封保存备用; 所述旋毛虫鸡尾酒抗原中肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原, 终浓度分别为0.5-1mg/mL、0.5-1mg/mL、0.5-0.75mg/mL和0.5-0.75mg/mL;

4) 试纸条的组装: 在底板上沿样品检测时的层析方向依次将样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫粘贴在底板上, 制成试纸条。

5. 根据权利要求4所述的制备方法, 其特征在于, 步骤1) 所述肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.2所示; 肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.4所示; 成虫期的Ts-ZH68重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.5-SEQ ID NO.6所示; 新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.7-SEQ ID NO.8所示。

6. 根据权利要求4所述的制备方法, 其特征在于, 步骤2) 所述喷涂, 点样速度为50μL/cm。

7. 根据权利要求4所述的制备方法, 其特征在于, 步骤3) 所述喷涂, 点样速度为1μL/cm。

8. 权利要求1所述的猪旋毛虫病抗体检测试纸条在旋毛虫病检测中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用, 其特征在于, 将待测血清用样品稀释液稀释后, 加入到试纸条加样孔中, 室温静置5~20min, 用紫外灯照射试纸条观察结果, 待测样品如果质控线和检测线均显色, 则判定为阳性; 如果仅质控线显色, 而检测线不显色, 则判定为阴性。

一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫检测技术领域,具体涉及一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 旋毛虫病是一种危害非常严重的人兽共患病,其不但可给畜牧业生产造成巨大的经济损失,而且对人类身体健康也构成巨大威胁,人或动物主要通过生食或半生食含有旋毛虫的肉类(主要为猪肉)而发病。

[0003] 对于屠宰动物旋毛虫病的检验,常采用的法规检验方法为镜检法及集样消化法。然而以上两方法均存在一定的弊端,镜检法费时费力而且敏感性差,其敏感性为肉中虫体密度达到每克3条虫体时方可检出。集样消化法虽可大大提高检出率,将虫体检出率提高至每克肉1条虫体,但该方法仍十分繁琐,在发现阳性样品时仍需对阳性组采用消化法进行逐头检测。从敏感性的角度来看,由镜检法和集样消化法所造成漏检的肉类均存在安全隐患并可引起人类的感染(摄入75条虫体即可引起人的感染)。应用间接荧光免疫试验,免疫酶染色试验,免疫印迹试验,免疫吸附试验(ELISA)等技术来检测旋毛虫抗体,操作较复杂,常需要2-3个小时检测出结果,而且需要昂贵的仪器和专业技能人员在实验室完成,不能应用于现场和基层单位进行猪旋毛虫病的检测。

[0004] 目前,旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ES抗原是OIE及国际旋毛虫委员会规定的唯一的用于血清学抗体检测的标准抗原。然而ES抗原成分复杂,制备繁琐、生产周期长、批次质量不均,而且存在严重的诊断盲区(感染后19d前无法检出)和交叉反应等问题,因而阻碍了其实际应用。

发明内容

[0005] 针对如何快速、稳定、准确检测猪旋毛虫感染情况,本发明提供了一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条,包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述样品垫上设置有加样孔;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂有旋毛虫鸡尾酒抗原,所述旋毛虫鸡尾酒抗原由肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原、成虫期的Ts-ZH68重组抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原组成;所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG。

[0006] 进一步地限定,所述样品垫材质为玻璃纤维素膜XQ-Y8;所述结合垫材质为玻璃纤维素膜Ahistrom8964;所述层析膜材质为硝酸纤维素膜Millipore135。

[0007] 进一步地限定,所述旋毛虫鸡尾酒抗原中原核表达的重组肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原的浓度比为(0.5-1):(0.5-1):(0.5-0.75):(0.5-0.75)mg/mL。

[0008] 本发明还提供了上述旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 1) 旋毛虫鸡尾酒抗原的制备: 分别将表达肌幼虫期的Ts-WM5重组蛋白、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组蛋白、成虫期的Ts-ZH68重组蛋白和新生幼虫期的Ts-T668中C端的重组蛋白的各重组质粒转化宿主菌, 经诱导表达后, 超声破碎菌体, 离心收集沉淀, 尿素溶解包涵体, 然后经亲和纯化分别获得肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原、成虫期的Ts-zh68重组抗原、新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原, 将各重组抗原按照浓度比混合后获得旋毛虫鸡尾酒抗原;

[0010] 2) 结合垫的制备: 将时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG喷涂在结合垫上, 真空抽干后干燥保存备用;

[0011] 3) 检测线和质控线的制备: 将步骤1) 中获得的旋毛虫鸡尾酒抗原与0.5-1mg/mL兔抗山羊IgG分别喷涂在层析膜上, 形成检测线与质控线, 37℃干燥2-3h, 使用封闭剂浸泡干燥后的层析膜1-2h, 随后37℃干燥1-2h, 密封保存备用; 所述旋毛虫鸡尾酒抗原中肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原, 终浓度分别为0.5-1mg/mL、0.5-1mg/mL、0.5-0.75mg/mL和0.5-0.75mg/mL;

[0012] 4) 试纸条的组装: 在底板上沿样品检测时的层析方向依次将样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫粘贴在底板上, 制成试纸条。

[0013] 进一步地限定, 步骤1) 所述肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.2所示; 肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.4所示; 成虫期的Ts-ZH68重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.5-SEQ ID NO.6所示; 新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原制备时所用的引物如SEQ ID NO.7-SEQ ID NO.8所示。

[0014] 进一步地限定, 步骤2) 所述喷涂, 点样速度为50 μ L/cm。

[0015] 进一步地限定, 步骤3) 所述喷涂, 点样速度为1 μ L/cm。

[0016] 本发明还提供了上述猪旋毛虫病检测试纸条在旋毛虫病检测中的应用。

[0017] 进一步地限定, 是指将待测血清用样品稀释液稀释后, 加入到试纸条加样孔中, 室温静置5~10min, 用紫外灯照射试纸条观察结果, 待测样品如果质控线和检测线均显色, 则判定为阳性; 如果仅质控线显色, 而检测线不显色, 则判定为阴性。

[0018] 名词术语解释说明:

[0019] 肌幼虫期的Ts-WM5抗原: 通过对旋毛虫肌幼虫的cDNA文库进行免疫学筛选, 获得一个高丰度强反应原性的抗原蛋白, 命名为WM5, 生物信息学序列分析WM5蛋白属于丝氨酸蛋白抑制剂。

[0020] 肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原: 通过对旋毛虫肠道感染性幼虫的cDNA文库进行免疫学筛选, 获得一个高丰度强反应原性的抗原蛋白, 命名为WN10, 生物信息学序列分析WN10蛋白具有3个类似于cystatin的结构域, 认为该蛋白属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂样蛋白。

[0021] 成虫期的Ts-ZH68抗原: 通过对旋毛虫3日龄成虫的cDNA文库进行免疫学筛选, 获得一个高丰度强反应原性的抗原蛋白, 命名为ZH68, 生物信息学序列分析ZH68蛋白属于丝氨酸蛋白酶。

[0022] 新生幼虫期的Ts-T668-C抗原: 通过对旋毛虫新生幼虫的cDNA文库进行免疫学筛选, 获得一个高丰度强反应原性的抗原蛋白, 命名为T668, 生物信息学序列分析T668蛋白属

于丝氨酸蛋白酶蛋白。肽扫描分析表明其C端是免疫显性区域,即主要的抗原区域,本发明使用的是其C端的免疫显性区域,记为Ts-T668-C。

[0023] 有益效果

[0024] 本发明利用旋毛虫不同发育时期的诊断抗原基因的原核表达重组蛋白:肌幼虫期的Ts-WM5重组蛋白、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组蛋白、成虫期的Ts-ZH68重组蛋白和新生幼虫期的Ts-T668重组蛋白作为猪旋毛虫病的抗体检测抗原,制备鸡尾酒抗原,所建立的旋毛虫抗体捕获荧光免疫层析检测试纸条检测方法与ES ELISA相比具有高的灵敏性和特异性,显著缩短了检测盲区。

[0025] 本发明制备的试纸条具有抗原制备简单,操作简单、快速和结果易判读等ES ELISA不具备的优点,同时在检测时不与其他寄生虫阳性血清发生交叉反应,特异性及灵敏度高;且具有长期稳定的特点,实用性较强、容易保存、具有市场开发价值。具有广泛推广空间,极具市场前景。

附图说明

[0026] 图1本发明试纸条结构示意图;其中1为样品垫;2为底板;3为结合垫;4为硝酸纤维素膜;5为检测线;6为质控线;7为吸水垫;

[0027] 图2本发明试纸条检测结果判定示意图;其中1为加样孔;2为检测线;3为质控线;
a) 为阳性结果示意图;b) 为阴性结果示意图;c) 为无效示意图。

具体实施方式

[0028] 在旋毛虫检测方面还没有利用本发明所制备的旋毛虫鸡尾酒抗原作为诊断抗原检测猪旋毛虫病抗体的荧光免疫层析试纸条,本发明采用时间分辨免疫荧光微球作为标记物,通过对各种固相材料的选择和反应体系及反应条件的优化,建立了一种基于旋毛虫鸡尾酒抗原作为诊断抗原的猪旋毛虫病抗体检测荧光免疫层析试纸条。在制作试纸条时,将制备的旋毛虫鸡尾酒抗原喷涂在NC膜检测线上,兔抗山羊IgG喷涂在其质控线上,连同喷涂有时间分辨荧光微球的羊抗猪结合垫、样品垫、吸水纸和底板进行猪旋毛虫病抗体检测试纸条的组装。待检样品利用NC膜的毛细作用会向试纸条的上方移动,若待检样品呈阳性,试纸条的检测线和质控线均显色;如待检样品呈阴性,试纸条即只有质控线显色;若试纸条的质控线不显色即试纸条已失效。该试纸条具有特异、敏感、快速、简单等特点,不需要较高的专业技能和其他试剂,为旋毛虫抗体检测提供了新的技术平台,可广泛应用于猪旋毛虫病的基层现场快速准确初筛。下面具体描述本发明所述的旋毛虫病检测试纸条及其制备方法与应用。

[0029] 本发明所述试剂或仪器设备均可通过商业化途径购买获得。

[0030] 实施例1.猪旋毛虫病抗体检测试纸条。

[0031] 本实施例所述的猪旋毛虫病抗体检测试纸条,包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述样品垫上设置有加样孔;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂有旋毛虫鸡尾酒抗原,所述旋毛虫鸡尾酒抗原由肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原(T668C端免疫显性区域)四种重组抗原组成。

所述旋毛虫鸡尾酒抗原中原核表达的重组肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原、成虫期的Ts-ZH68重组抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原的浓度比为(0.5-1):(0.5-1):(0.5-0.75):(0.5-0.75)mg/mL。所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG,所述样品垫材质为玻璃纤维素膜XQ-Y8;所述结合垫材质为玻璃纤维素膜Ahistrom8964;所述层析膜材质为硝酸纤维素膜Millipore135。

[0032] 实施例2.猪旋毛虫病抗体检测测试纸条的制备方法。

[0033] 1.旋毛虫鸡尾酒抗原的制备:分别将表达肌幼虫期的Ts-WM5重组蛋白、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组蛋白、成虫期的Ts-ZH68重组蛋白和新生幼虫期的Ts-T668-C重组蛋白的各重组质粒转化宿主菌,经诱导表达后,超声破碎菌体,离心收集沉淀,尿素溶解包涵体,然后经亲和纯化分别获得肌幼虫期的Ts-WM5重组抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10重组抗原、成虫期的Ts-ZH68重组抗原、新生幼虫期的Ts-T668-C重组抗原,将各重组抗原按照浓度比混合后获得旋毛虫鸡尾酒抗原。

[0034] 具体方法如下:

[0035] 1)四种重组抗原的制备方法如下:

[0036] a.虫体总RNA的提取:

[0037] 用TRIzol试剂分别提取肌幼虫(ML)、3日龄成虫(Ad3)及新生幼虫(NBL)的总RNA。提取方法如下:

[0038] (1)每50-100mg的样品加入1mL TRIzol试剂。

[0039] (2)玻璃匀浆器匀浆20min,研磨捣碎组织。室温静置5min。

[0040] (3)加入0.2mL氯仿/mL,剧烈振荡15s,室温静置3min。

[0041] (4)12000g、4℃离心15min,离心后混合液分为上、中、下三层。上层无色水相主要为RNA,中层乳白色主要为基因组DNA、蛋白和多糖等成分,下层红色有机相主要为酚、氯仿。

[0042] (5)吸取上层无色水相于无菌离心管中,加入0.5mL异丙醇/mL,颠倒混匀,室温静置10min。

[0043] (6)12000g、4℃离心10min,弃上清。

[0044] (7)加入1mL 75%乙醇(DEPC水配制)洗涤RNA沉淀。

[0045] (8)7500g、4℃离心5min,弃上清。

[0046] (9)将液体吸净,风干RNA,用30μL无RNase的DEPC水溶解RNA,55℃水浴10min。

[0047] (10)1%琼脂糖凝胶电泳鉴定提取总RNA的完整性,核酸蛋白测定仪检测其纯度。稀释各组样品总RNA浓度至60ng/μL,-70℃保存备用。

[0048] b.反转录反应:

[0049] 取不同发育时期虫体总RNA各0.3μg,加入如下反应体系:

	M-MLV 5× Reaction Buffer	5.0μL
	dNTP Mixture	1.0μL
[0050]	M-MLV RT	1.0μL
	RNAase inhibitor	0.5μL
	oLigo dT ₁₈	1.0μL

[0051] RNAase-free水至25μL,

[0052] 混匀后于42℃反应1h。-20℃保存。

[0053] c. 引物设计

[0054] 分别根据GenBank数据库中Ts-WM5抗原基因, 登录号:DQ864973、旋毛虫Ts-WN10抗原基因, 登录号:EU263325、Ts-ZH 68基因, 登录号:EU263332和Ts-T668基因, 登录号:AY491941(本发明扩增Ts-T668基因C段区域, 引物如下)序列设计目的基因PCR特异引物, 送由上海生工合成。

[0055] Ts-WM5抗原基因扩增所用模板为肌幼虫cDNA, 扩增引物如下:

[0056] TsWM5-F: 5' -TAACGAATTC ATGGA AACAGAAATT-3' ;

[0057] TsWM5-R: 5' -GACGCTCGAG TTAACATTCAACAGTTG-3' ;

[0058] Ts-WN10抗原基因扩增所用模板为3日龄成虫cDNA, 扩增引物如下:

[0059] TsWN10-F: 5' -TAACGAATTCAGATACTTGGTGA-3' ;

[0060] TsWN10-R: 5' -GACGCTCGAGTTAACATTCAACA-3' ;

[0061] Ts-ZH68基因扩增所用模板为3日龄成虫cDNA, 扩增引物如下:

[0062] Tszh68-F: 5' -TAACGAATTC ATTATGAATGTGGCACCTTA-3' ;

[0063] Tszh68-R: 5' -GACGCTCGAG TTAACGGAAAAAAGTG-3' ;

[0064] Ts-T668基因C段区域扩增所用模板为新生幼虫cDNA, 扩增引物如下:

[0065] TsT668-F: 5' -TAACGAATTC GAAAATTCTCCTGAAG-3' ;

[0066] TsT668-R: 5' -GACGCTCGAG TTACTTAGAAAAGTG-3' 。

[0067] 下划线部分为引入的EcoRI、XhoI酶切位点。

[0068] d. 表达载体的构建:

[0069] 以反转录获得的cDNA (肌幼虫, 成虫, 新生幼虫) 为模板分别扩增Ts-WM5, Ts-WN10, Ts-ZH68和Ts-T668-C。

[0070] PCR反应体系 (50uL) 如下:

10×Ex Taq Buffer	5uL
10mM dNTPs	1uL
Ex Taq	0.5uL
[0071] 10pM 上游引物	2uL
10pM 下游引物	2uL
cDNA 模板	3uL
灭菌 ddH ₂ O	36.5uL

[0072] 反应条件为95℃预变性5min, 95℃45s, 53℃45s, 72℃45s, 循环30个, 72℃终延伸10min。对PCR产物胶回收。将胶回收得到的目的基因Ts-WM5、Ts-WN10、Ts-ZH68和Ts-T668-C以及原核表达载体pET28a分别进行双酶切, 酶切体系如下:

	10×H Buffer	2uL
	EcoRI	2uL
[0073]	XhoI	2uL
	目的基因	10uL
	灭菌 ddH ₂ O	4uL
[0074]	同时,对原核表达载体pET28a进行双酶切,酶切体系如下:	
	10×H Buffer	2uL
	EcoRI	2uL
[0075]	XhoI	2uL
	pET28a 载体	10uL
	灭菌 ddH ₂ O	4uL

[0076] 将酶切反应体系置37℃水浴静置2h,之后进行胶回收。将双酶切后的目的基因分别与pET28a载体进行连接,体系为:10×T4DNA Ligase Buffer 1uL,酶切后目的基因4uL,酶切后pET28a 1.5uL,T4DNA连接酶1uL,ddH₂O 2.5uL。16℃连接过夜。将连接产物全部转化Ecoli DH5a感受态细胞,挑取单菌落进行PCR鉴定和测序。阳性重组质粒转化BL21 (DE3) 感受态细胞。

[0077] e. 重组蛋白诱导表达与纯化:

[0078] 对验证分别正确转入质粒Ts-WM5,Ts-WN10,Ts-ZH68和Ts-T668-C的4个表达菌分别进行扩大培养,取10mL菌液接种于含50μg/mL Kan的1L新鲜LB液体培养基中,于震荡摇床中37℃180rpm/min培养至菌液OD₆₀₀达到0.4~0.6,加入终浓度为0.5mM的IPTG,并将摇床温度设定为37℃,继续培养5h后将菌液倒入50mL离心管中,配平后,4℃,3000rpm,离心30min。弃去上清,沉淀用5mL的PBS洗涤菌体1次,然后用40mL细菌裂解液重悬后,反复冻融3-4次后超声破碎。超声条件为功率400W,超声时间4秒,间歇时间5秒,全程时间约为30分钟。超声破碎的菌体分装于1.5mL离心管,4℃10000g离心10min,弃掉上清,留沉淀,加2mol/L尿素1mL/管,4℃重悬2min,4℃10000g离心10min,弃掉上清,留沉淀。用2mol/L尿素反复吹洗2-3次,4℃10000g离心,弃掉上清保留沉淀,称重,加8mol/L尿素溶解包涵体沉淀(每0.01g包涵体加50μL 8mol/L尿素)。

[0079] 使用美国GE Healthcare公司的AKTA Purifier 100系统纯化His标签的表达蛋白。将His-Trap HP柱与系统连接,流速为1mL/min用5-10个柱体积的Binding Buffer平衡His-Trap HP柱至紫外吸收曲线平稳。紫外吸收峰调零后用上样环进行蛋白上样,当Binding Buffer洗脱峰平衡后改用Elution Buffer进行洗脱,出现洗脱峰后延迟500μL用无菌试管收集洗脱液,将洗脱的重组抗原,依次经透析及3KDa超滤管浓缩后即得到旋毛虫重组抗原Ts-WM5、重组抗原Ts-WN10,重组抗原Ts-ZH68和重组抗原Ts-T668-C,经SDS-PAGE检验纯化结果。

[0080] 细菌裂解液:Tris碱6.055g,NaCl 5.844,Na₂EDTA • 2H₂O 0.37g,溶菌酶100mg,PMSF 0.17g,调节pH至7.4,定容至1000mL。

[0081] Elution Buffer:NaCl 14.61g,咪唑17g,NaH₂PO₄·2H₂O 0.2964g,Na₂HPO₄·12H₂O 2.009g,尿素240g,溶于450mL ddH₂O,调节pH至7.4,定容至500mL。

[0082] Binding Buffer:NaCl 14.61g,咪唑1g,NaH₂PO₄·2H₂O 0.2964g,Na₂HPO₄·12H₂O 2.009g,尿素240g,溶于450mL ddH₂O,调节pH至7.4,定容至500mL。

[0083] 检测抗原的制备:

[0084] 分别将纯化的肌幼虫期的Ts-WM5、肠道感染性幼虫的Ts-WN10、成虫期的Ts-ZH68和新生幼虫期的Ts-T668-C (T688C端免疫显性区域) 按比例混合制备成“鸡尾酒”抗原,终浓度分别为1mg/mL,1mg/mL,0.5mg/mL和0.5mg/mL。

[0085] 2. 结合垫的制备:将时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG喷涂在结合垫上,4℃真空抽干,于4℃干燥保存备用;具体方法为:

[0086] 利用EDC和NHS活化微球上的羧基,活化后的羧基与蛋白上的氨基结合,促使Eu-CM偶联上蛋白。

[0087] a) 向100μL (1mg,1% (w/v)) 时间分辨荧光微球中,加入400μL 0.05mol/L 2-吗啉乙磺酸MES溶液,并借助超声设备分散,然后加入50μL N-羟基琥珀酰亚胺NHS (16mg/mL) 和50μL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC (8mg/mL) 混匀,室温孵育1-2h;反应结束后,离心后弃上清,0.02M磷酸缓冲液(PB,1.9mL NaH₂PO₄·H₂O (2.76g/L),8.1mL 3.56g/L (Na₂HPO₄·2H₂O)),漂洗2次后,500μLPB重悬。

[0088] b) 加入100μL的5mg/mL山羊抗猪IgG (0.01mol/L PBS缓冲液稀释),室温孵育1h。

[0089] c) 加入100μL的0.1mol/L甘氨酸溶液,室温孵育30min。

[0090] d) 4℃,8000×g离心15min,弃上清。

[0091] e) 加入8000μL偶联储存液重悬。(ProcLin300,0.05mL,BSA 1g,聚乙二醇400,2g,加0.05mol/L PBS溶液至100mL。

[0092] f) 4℃超声分散1min,4℃条件下避光保存。

[0093] 将上述制备获得的含有偶联抗体山羊抗猪IgG的荧光微球用试纸喷膜仪喷涂至300×5mm玻璃纤维素膜Ahistrom8964上,速度为50μL/cm,4℃真空抽干,于4℃干燥保存备用。

[0094] 3. 检测线和质控线的制备:旋毛虫鸡尾酒抗原,其中肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-zh68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原,终浓度分别为1mg/mL,1mg/mL,0.5mg/mL和0.5mg/mL,作为检测线试剂,0.5mg/mL的兔抗山羊IgG,作为质控线试剂,用试纸喷膜仪将两种试剂分别点在硝酸纤维素膜Millipore135上,点样速度为1μL/cm,喷涂后37℃干燥2h,使用封闭剂(磷酸缓冲液PBS含质量分数为2%的BSA)浸泡干燥后的硝酸纤维素膜Millipore135 1-2h,37℃干燥1-2h,4℃密封保存备用。

[0095] 4. 试纸条的组装:在底板上沿检测时的层析方向依次将样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫粘贴在底板上,制成试纸卡,具体方法为:按图1示意图所示,将荧光专用黑色底板、样品垫XQ-Y8、结合垫Ahistrom8964、吸水垫H5072、硝酸纤维素膜Millipore135粘在一起,并用试纸条切割机将其切成3.5mm宽的试纸条,将试纸条放入试纸卡中,将试纸卡放入含有干燥剂的密封袋内,密封后于4℃保存备用。

[0096] 考察本发明制备的猪旋毛虫病抗体检测试纸条灵敏性、特异性以及稳定性。

[0097] 1. 灵敏性试验:

[0098] 用旋毛虫检测试纸条检测不同感染条件下的猪血清中抗旋毛虫抗体,将检测结果和OIE提供的标准酶联免疫吸附抗体检测方法进行对比。确保检测中应用的试纸条来自同一批次。OIE提供的标准酶联免疫吸附方法的步骤如下:

[0099] (1) 包被液稀释肌幼虫ES抗原至5 μ g/mL,每孔0.5 μ g进行包被,于4 $^{\circ}$ C静置12h。

[0100] (2) 弃去酶标板中的包被液,洗涤液洗涤3次。

[0101] (3) 加入100 μ L按1:50稀释处理后的猪血清,室温孵育30min。

[0102] (4) 重复步骤(2)。

[0103] (5) 加入100 μ L HRP标记的兔抗猪IgG,1:1000倍稀释,孵育30min。

[0104] (6) 重复步骤(2)后,加入100 μ L的TMB底物显色液。

[0105] (7) 10min后,在450nm波长条件下进行吸光度检测,如果发现所得结果为阴性的4倍判定为阳性。

[0106] 本发明试纸条与ELISA分别检测60份猪感染旋毛虫血清,结果显示ELISA检测58份血清为阳性,2份血清为阴性,“鸡尾酒”重组抗原试纸条检测也可以检测到58份阳性血清,其中1份ES ELISA为阴性,而“鸡尾酒”重组抗原试纸条为阳性。90份阴性血清,ELISA 86为阴性,“鸡尾酒”抗原89份为阴性。说明两种方法在检测动物旋毛虫病方面一致率和吻合度较强;试纸条和ELISA在敏感性上的差异无统计学意义,同时“鸡尾酒”重组抗原可以降低假阳性率。说明本发明的敏感性与OIE推荐的猪旋毛虫病抗体检测方法(ELISA)相当,而特异性高于ES ELISA。同时又具备操作简单、快速和结果易判读等ELISA不具备的优点,具有广泛推广空间,极具市场前景。

[0107] 2. 旋毛虫病检测试纸条的特异性检测:

[0108] 检测其他寄生虫阳性血清,主要有猪蛔虫、弓形虫、猪囊虫、日本血吸虫和华支睾吸虫阳性血清和阴性血清,并进行特异性分析。除猪旋毛虫阳性血清外,其他血清均为阴性,即旋毛虫病检测试纸条不与其他寄生虫发生交叉反应,满足其特异性要求。

[0109] 3. 猪感染不同剂量及时间点旋毛虫检测:

[0110] 对感染旋毛虫后不同时间点猪血清的抗旋毛虫抗体检测,在重度感染时(20000条/只)消化法检测为每克肌肉幼虫数636.7-1257.6Lpg,ES ELISA 20-25天可以检测到旋毛虫感染,而鸡尾酒抗原试纸条可以在16-20天检测到旋毛虫感染。在中度感染时(1000条/只)消化法检测为每克肌肉幼虫数30.7-98.5Lpg,ES ELISA 30-40天可以检测到旋毛虫感染,而鸡尾酒抗原试纸条可以在20-30天检测到旋毛虫感染。在低度感染时(100条/只)消化法检测为每克肌肉幼虫数1.7-7.2Lpg,ES ELISA 35-50天可以检测到旋毛虫感染,而本发明所述试纸条可以在25-35天检测到旋毛虫感染,与ES ELISA相比,基于鸡尾酒抗原的试纸条检测灵敏度明显提高,可以在旋毛虫感染早期检测到抗旋毛虫抗体。进一步对旋毛虫感染后期的血清即感染后90,120,150天的血清进行检测,ES ELISA和试纸条在旋毛虫不同感染剂量都可以检测到旋毛虫抗体。由此可见,本发明所述的抗原制备的免疫荧光试纸条对旋毛虫病早期诊断具有一定价值。

[0111] 4. 田间样本分析:

[0112] 应用ELISA和本发明制备的检测试纸条对云南旋毛虫病高发地区13200多头圈养猪进行抗体检测,ES ELISA检测到旋毛虫感染血清阳性的猪共12头,同时试纸条可以也为阳性。而3头ELISA ELISA检测为阴性的,试纸条检测为阳性。对15头阳性血清猪经消化法检

测12头可检测到旋毛虫虫体,表明本发明所述的利用鸡尾酒抗原的试纸条相比于现有的ELISA和常规消化法检测结果更灵敏,适合基层猪旋毛虫感染的大面积普查和现场检测。

[0113] 5.旋毛虫病检测试纸条的重复性:

[0114] 选择不同批次的试纸条进行重复性分析。分别用4个不同批次的试纸条检测,经ELISA检测后的30份猪旋毛虫感染阳性血清及20份正常猪阴性血清;4个不同批次的试纸条对30份阳性血清检测结果均为阳性,对20份阴性血清检测结果均为阴性,显示出本发明良好的灵敏性和特异性,且稳定性和重复性良好。

[0115] 6.旋毛虫病检测试纸条的稳定性检测:

[0116] 将试纸条置于4℃和室温保存,每隔两周分别检测猪阳性和阴性血清各10份,共检测12次,敏感性和特异性均为100%,表明试纸条在4℃至少可保存6个月,即本发明的有效期至少为6个月。室温保存的试纸条第2周到第16周的结果敏感性和特异性均为100%,且检测线和控制线的颜色均不存在明显的差异。从第18周起,T线和C线的颜色均变浅,故室温环境下可保存16周。证明本发明具有长期稳定的特点,实用性较强、容易保存、具有市场开发价值。

[0117] 7.旋毛虫病检测试纸条的稳定性验证结果:

[0118] 检测后试纸条分别保存于室温和4℃,室温条件下检测结果4个月时可分辨清楚,4℃条件下检测结果6个月时依然清晰可见,说明本发明的检测结果保存时间为室温至少4个月和4℃至少6个月,再次显示出本发明长期稳定的特点。

[0119] 实施例3.猪旋毛虫病检测试纸条的制备方法。

[0120] 重复实施例2,与实施例2的不同在于,本实施中步骤3中作为检测线试剂的旋毛虫鸡尾酒抗原,其中肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原,终浓度分别为0.5mg/mL,0.5mg/mL,0.75mg/mL和0.75mg/mL;作为质控线试剂的兔抗山羊IgG,其浓度为0.75mg/mL。采用实施例2中所述的检测方法考察本实施例制备的猪旋毛虫病抗体检测试纸条的灵敏性、特异性以及稳定性,结果表明:在此浓度下进行检测与ES ELSIA相比同样可以提高检测灵敏度,达到早期检测到猪旋毛虫抗血清,但检测荧光强度在T线和C线弱于实施例2,在重度和中度感染时,检测灵敏性相同,而在低度感染时(100条/只)本实施例可以在30-35天检测到旋毛虫感染。对田间样本检测时与ES ELSIA检测结果相同,既ES ELISA和消化法检测为旋毛虫感染的猪,实施例为阳性,试纸条的稳定性和重复性结果同实施例2。

[0121] 实施例4.本发明所述的猪旋毛虫病检测试纸条在旋毛虫病检测中的应用。

[0122] 样品稀释:分别用样品稀释液将旋毛虫抗体阳性血清(如猪感染旋毛虫血清)、阴性血清(如正常猪血清)和待检血清(如猪血清)样品稀释10倍,即向90μL稀释液中加入10μL猪血清,用移液器混匀。将本发明制备的猪旋毛虫病抗体检测试纸条平放于操作台面,加样孔朝上,向加样孔中加入100μL稀释后的血清样品,室温静置5~10min。所述样品稀释液:氯化钠(NaCl) 9g,牛血清白蛋白(BSA) 2g,加双蒸水至1000mL配制而成。用紫外灯360-370nm照射试纸条观察结果。

[0123] 结果判定应在加样后20min内进行。阳性血清样品如果质控线和检测线均显色;阴性血清仅质控线显色,而检测线不显色;待测样品质控线显色,则试验成立,结果有效。

[0124] 待测样品如果质控线和检测线均显色,则判定为阳性;如果仅质控线显色,而检测

线不显色,则判定为阴性;如质控线不显色,则检测无效,应更换试纸条重新检测,荧光免疫层析试纸条检测结果判定示意图见图2所示。

核苷酸序列表

<110> 吉林大学

<120> 一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用

<130>

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> TsWN10-F

<400> 1

taacgaattc cagatacttg gtga 24

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> TsWN10-R

<400> 2

gacgctcgag ttaacattca aca 23

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> TsWM5-F

<400> 3

taacgaattc atggaaacag aaatt 25

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> TsWM5-R

<400> 4

gacgctcgag ttaacattca acagttg 27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> TsZH68-F

<400> 5

taacgaattc attatgaatg tggcacctta 30

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> TsZH68-R

<400> 6

gacgctcgag ttaacggaaa aaagtg 26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> TsT668-F

<400> 7

taacgaattc gaaaattctc ctgaag 26

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> TsT668-R

<400> 8

gacgctcgag ttacttagaa aagtg 25

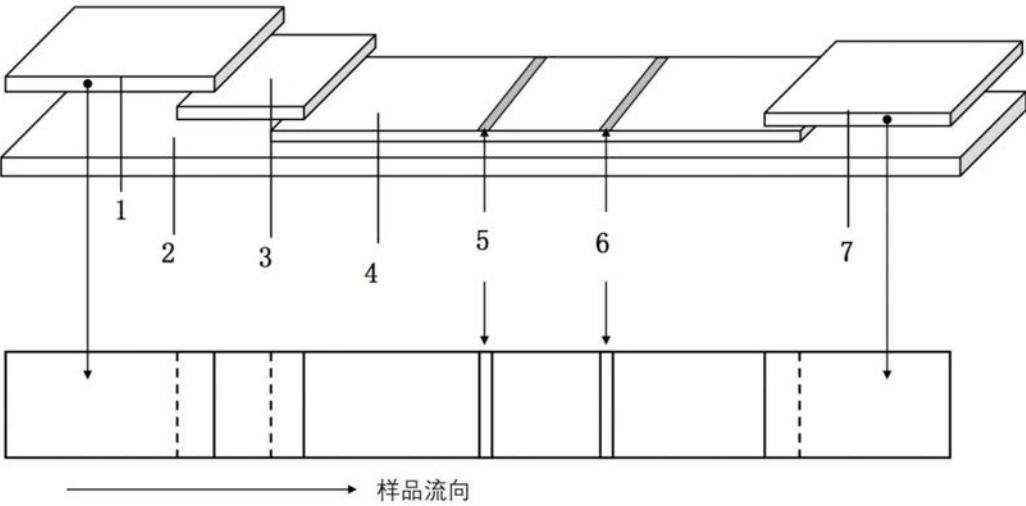


图1

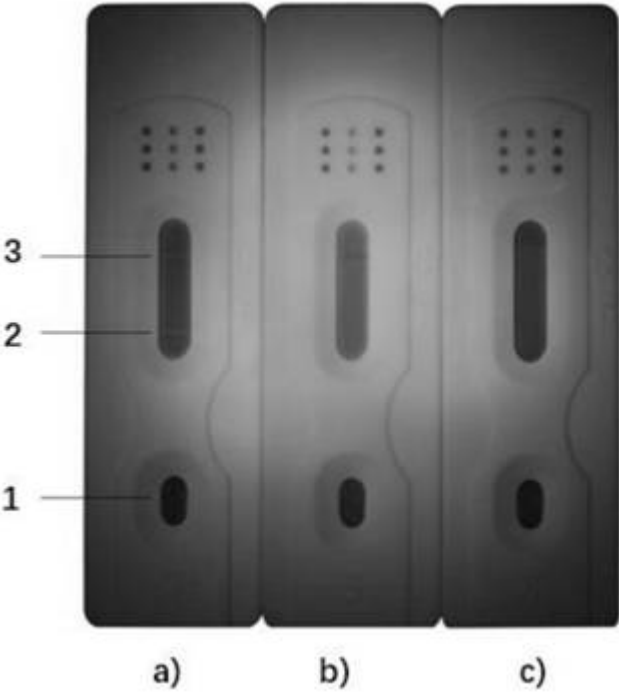


图2

专利名称(译)	一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110221067A	公开(公告)日	2019-09-10
申请号	CN201910644896.X	申请日	2019-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	刘明远 刘晓雷 杨勇 王学林 白雪 唐斌 丁静 王楠 张小波		
发明人	刘明远 刘晓雷 杨勇 王学林 白雪 唐斌 丁静 王楠 张小波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/78 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/569 G01N2021/6439		
代理人(译)	邓宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条及其制备方法与应用，属于荧光免疫检测技术领域。为了更快速、稳定、准确检测旋毛虫感染，本发明提供了一种猪旋毛虫病抗体检测试纸条，包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板，所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG；所述层析膜上设有检测线与质控线，其中检测线上喷涂由原核表达的重组肌幼虫期的Ts-WM5抗原、肠道感染性幼虫的Ts-WN10抗原、成虫期的Ts-ZH68抗原和新生幼虫期的Ts-T668-C抗原组成的旋毛虫鸡尾酒抗原；所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG，上述各组分组合后制备成试纸条，本发明可用于猪旋毛虫感染的早期快速检测。

