



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108931644 B

(45) 授权公告日 2021.09.10

(21) 申请号 201810797244.5

CN 107513101 A, 2017.12.26

(22) 申请日 2018.07.19

CN 106432434 A, 2017.02.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 9103255 A1, 1991.03.21

申请公布号 CN 108931644 A

CN 104292300 A, 2015.01.21

(43) 申请公布日 2018.12.04

CN 101724605 A, 2010.06.09

(73) 专利权人 河南省农业科学院

CN 1798976 A, 2006.07.05

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路
116号

US 2008280296 A1, 2008.11.13

(72) 发明人 张改平 杨苏珍 孙亚宁 邢广旭
刘运超 王方雨 柴书军 邓瑞广

Yang, SZ等.A rapid

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所
(普通合伙) 41122immunochromatographic strip for
neutralizing antibodies detection of foot
and mouth disease virus serotype 0.《RSC
ADVANCES》.2017,第7卷(第76期),第48095-
48101页.

代理人 张爱军 徐文婷

Yang, SZ等.Development of a peptide-
based immunochromatographic strip for
differentiation of serotype 0 Foot-and-
mouth disease virus-infected pigs from
vaccinated pigs.《JOURNAL OF VETERINARY
DIAGNOSTIC INVESTIGATION》.2010,第22卷(第3
期),第412-415页. (续)

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

CN 102818898 A, 2012.12.12

CN 102818898 A, 2012.12.12

CN 104090107 A, 2014.10.08

CN 105319363 A, 2016.02.10

CN 102662063 A, 2012.09.12

CN 107219365 A, 2017.09.29

审查员 刘莉丹

权利要求书1页 说明书7页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免
疫鉴别诊断二联试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条,该试纸条包括利用口蹄疫病毒VP1表位多肽人工抗原印制的检测线1,和利用口蹄疫病毒非结构蛋白表位多肽人工抗原印制的检测线2。本发明制备的人工抗原具有容易获得,结构稳定,纯度可达99%,成本低,可快速大量生产等优点,解决了传统表达蛋白表达量低,难以保证天然的空间结构,复性困难,难以除去菌体蛋白,影响检测结果的特异性等缺点,也解决了使用灭活病毒存在病毒灭

活不全的风险。本发明还对金标垫进行预处理,更有利于金标垫吸水及金标蛋白的释放,有效解决现有试纸存在的金标蛋白释放慢且不完全,影响试纸产品检测准确性、灵敏度及保质期等问题。



[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

李夏莹等. 口蹄疫病毒研究进展.《中国畜牧兽医》.2015,第42卷(第7期),第1910-1916页.

1. 一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条, 其特征在于, 试纸条包括样品垫、金标垫、吸收垫、底板、检测线和对照线, 检测线和对照线印制在硝酸纤维素膜垫; 所述检测线包括利用口蹄疫病毒VP1表位多肽人工抗原印制的检测线1, 和利用口蹄疫病毒非结构蛋白表位多肽人工抗原印制的检测线2;

所述非结构蛋白表位多肽人工抗原为人工合成口蹄疫病毒非结构蛋白2B上第1096~1106位氨基酸RTPEDLERA EK, 2C上第1414~1425位氨基酸HEKVSSHPIFKQ, 及3B上第1602~1613位氨基酸GPYAGPMERQKP, 并在其-NH₄端加入一个半胱氨酸, 再偶联载体蛋白形成的人工抗原;

采用口蹄疫病毒非结构蛋白2B上第1096~1106位氨基酸多肽制备的人工抗原, 2C上第1414~1425位氨基酸多肽制备的人工抗原, 3B上第1602~1613位氨基酸多肽制备的人工抗原, 按质量比1:1:1混合;

对所述金标垫进行预处理, 将处理液喷涂在纤维垫上, 干燥, 得到预处理的金标垫;

处理液由以下原料组成: BSA 5%, PVP-10 0.1%, Triton X-100 0.1%, 余量为0.02mol/L的Na₂B₄O₇·10H₂O溶液。

2. 根据权利要求1所述的试纸条, 其特征在于, VP1表位多肽人工抗原为人工合成口蹄疫病毒VP1上第142~158位氨基酸多肽, 并偶联载体蛋白形成的人工抗原; 口蹄疫病毒VP1上第142~158位氨基酸多肽为口蹄疫病毒O/GX/09-7毒株VP1上第142~158位氨基酸序列NNVRGDLQVLAQKAERA; 口蹄疫病毒O/HN/CHA/93毒株VP1上第142~158位氨基酸序列SNVRGDLQVLAQKAERA; 口蹄疫病毒O/TAW/97毒株VP1上第142~158位氨基酸序列NNVRGDLQVLAQKAERT; 口蹄疫病毒O/MYA/98毒株VP1上第142~158位氨基酸序列TNVRGDLQVLAQKAARP中至少一种。

3. 根据权利要求2所述的试纸条, 其特征在于, 口蹄疫病毒O/GX/09-7毒株、O/HN/CHA/93毒株、O/TAW/97毒株、O/MYA/98毒株VP1上第142~158位氨基酸多肽按质量比1:1:1:1混合。

4. 根据权利要求1所述的试纸条, 其特征在于, 还包括利用抗待检动物物种的二抗IgG印制的对照线。

5. 根据权利要求1所述的试纸条, 其特征在于, 喷涂方法为: 沿纤维垫长度方向的中心喷涂处理液, 且喷涂后纤维垫上的处理液两侧边缘线与纤维垫对应侧的侧沿之间均存在间隙。

6. 根据权利要求1所述的试纸条, 其特征在于, 干燥的条件为: 37-42℃, 10-70min。

一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 口蹄疫是由口蹄疫病毒引起偶蹄动物的一种烈性传染性疫病。口蹄疫病毒具有多型性、易变性、宿主广泛性、传染力极强性,所以一旦发病即呈流行性、大爆发性。更为严重的是,口蹄疫是一种烈性传染病,据有极强的传染性,对于发病动物以及接触病原的同群动物,必需进行严格隔离、封锁、禁止动物移动和畜产品上市等,因此,导致发病地区甚至发病国家的畜产品进出口贸易停止,造成巨大的经济损失。

[0003] 发展中国家控制口蹄疫的主要策略是疫苗免疫,口蹄疫免疫动物群体疫苗免疫动物免疫效果、母源抗体以及免疫程序的制定都需要依赖抗体检测。目前口蹄疫病毒抗体水平检测的血清学方法主要是液相阻断ELISA(Liquid phase blocking ELISA,LPBE)以及抗体检测试纸条。这些方法所用的抗原主要是灭活病毒或者表达蛋白,灭活病毒存在病毒灭活不全、纯化困难的问题;表达蛋白存在这蛋白表达量低、菌体蛋白难以除去等问题。抗体检测试纸条具有快速、简便、成本低廉的优势,金标垫是试纸的重要组成部分,它决定了金标蛋白的活性和释放性,因此对胶体金免疫层析试纸的效果影响很大。目前,金标垫的制备方法为在纤维棉上直接喷涂或浸泡胶体金标记的蛋白/抗体,或将纤维棉采用处理液浸泡处理后,再喷涂或浸泡胶体金标记的蛋白。但在使用过程中发现,因金标垫处理方法及处理液配方不合适,往往存在金标蛋白释放慢且不完全、从而影响试纸产品检测准确性、灵敏度及保质期等问题。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术中表达蛋白表达量低,难以保证天然的空间结构,复性困难,菌体蛋白影响检测结果的特异性以及灭活病毒存在病毒灭活不全的风险等缺点,以及现有试纸存在的金标蛋白释放慢且不完全,影响试纸产品检测准确性、灵敏度及保质期等问题,本发明结合现有口蹄疫检测ELISA方法和试纸条的优缺点,利用多肽表位制备的人工抗原及金标垫处理方法,发明一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条。

[0005] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0006] 一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条,包括利用口蹄疫病毒VP1表位多肽人工抗原印制的检测线1,和利用口蹄疫病毒非结构蛋白表位多肽人工抗原印制的检测线2。

[0007] VP1表位多肽人工抗原为人工合成口蹄疫病毒VP1上第142~158位氨基酸多肽,并偶联载体蛋白形成的人工抗原;口蹄疫病毒VP1上第142~158位氨基酸多肽为口蹄疫病毒O/GX/09-7毒株VP1上第142~158位氨基酸序列NNVRGDLQVLAQKAERA;口蹄疫病毒O/HN/CHA/

93毒株VP1上第142~158位氨基酸序列SNVRGDLQVLAQKAERA;口蹄疫病毒O/TAW/97毒株VP1上第142~158位氨基酸序列NNVRGDLQVLAQKAERT;口蹄疫病毒O/MYA/98毒株VP1上第142~158位氨基酸序列TNVRGDLQVLAQKAARP中至少一种。

[0008] 优选的,口蹄疫病毒O/GX/09-7毒株、O/HN/CHA/93毒株、O/TAW/97毒株、O/MYA/98毒株VP1上第142~158位氨基酸多肽按质量比1:1:1:1混合。

[0009] 非结构蛋白表位多肽人工抗原为人工合成口蹄疫病毒非结构蛋白2B上第1096~1106位氨基酸RTPEDLERA EK,2C上第1414~1425位氨基酸HEKVSSHPIFKQ,3B上第1602~1613位氨基酸GPYAGPMERQKP中至少一种,并在其-NH₄端加入一个半胱氨酸,再偶联载体蛋白形成的人工抗原。

[0010] 优选的,口蹄疫病毒非结构蛋白2B上第1096~1106位氨基酸多肽制备的人工抗原,2C上第1414~1425位氨基酸多肽制备的人工抗原,3B上第1602~1613位氨基酸多肽制备的人工抗原,按质量比1:1:1混合。

[0011] 试纸条还包括利用抗待检动物物种的二抗IgG印制的对照线。

[0012] 试纸条包括样品垫、金标垫、吸收垫及底板;检测线和对照线印制在硝酸纤维素膜垫。

[0013] 对金标垫进行预处理,将处理液喷涂在纤维垫上,干燥,得到预处理的金标垫。

[0014] 处理液由以下原料组成:BSA5%,PVP-10 0.1%,Triton X-100 0.1%,余量为0.02mol/L的Na₂B₄O₇·10H₂O溶液;喷涂方法为:沿纤维垫长度方向的中心喷涂处理液,且喷涂后纤维垫上的处理液两侧边缘线与纤维垫对应侧的侧沿之间均存在间隙。

[0015] 干燥的条件为:37-42℃,10-70min。

[0016] 本发明有益效果:

[0017] 1、本发明试纸所用检测线抗原使用合成的表位多肽,偶联载体蛋白后的人工抗原,具有容易获得,结构稳定,纯度可达99%,成本低,可快速大量生产等优点,这种人工抗原的使用解决了传统表达蛋白表达量低,难以保证天然的空间结构,复性困难,难以除去菌体蛋白,影响检测结果的特异性等缺点,也解决了使用灭活病毒存在病毒灭活不全的风险。

[0018] 2、在多联抗体检测的试纸模式中,金标蛋白只能选择能结合哺乳动物IgG的蛋白(如SPA)或者抗抗体。在本发明的试纸系统中,对照线为抗待检测动物物种的二抗IgG,二抗IgG既能结合金标物,又能结合未被检测线抗原蛋白拦截的IgG-金标物,保证了对照线显色的稳定性。

[0019] 3、本发明金标垫处理液中配方简单、不含糖,更有利于金标垫吸水及金标蛋白的释放。其中,BSA及PVP-10能封闭纤维棉及NC膜,同时保护金标蛋白的稳定性;Na₂B₄O₇·10H₂O可以提供碱性离子环境,更利于抗原抗体反应及金标蛋白的释放;Triton X-100用于金标垫的处理可以加速金标蛋白的释放,且可以降低产品的非特异性。本发明处理液选择不加糖的原因:糖在产品存放过程中很容易结晶,会影响金标蛋白的释放,以及金颗粒在膜上的移动速度,从而影响产品的货架期及检测准确性。

[0020] 4、本发明公开的方法不同于现有将金标垫在处理液中浸泡的方法,而是直接喷涂在玻璃纤维棉上,选择喷涂的方式替代浸泡预处理金标垫,能够有效改善浸泡金标垫产生的边缘效应;喷涂的方式会使处理液在局部固定,能让金标垫其余部分保持蓬松的状态,增加金标垫的吸水性及粘附性,适用性更广泛;喷涂的方式可以使金标蛋白喷涂后固定在一

定范围内而不大面积扩散,更有利于金标蛋白的稳定及释放,大大提高胶体金免疫层析试纸的检测灵敏度及稳定性。

[0021] 5、操作简便、快速:使用本发明试纸条检测过程中无需附加任何其它仪器和试剂,只要将其测试端插入待检血清中30s左右,然后在5min左右即可判定检测结果。

[0022] 6、减少投资和降低检测成本:使用本发明快速检测试纸条,不需要另配其它仪器、设备和试剂,节省大量仪器、设备和附加试剂费用;一条试纸一次既可以检测口蹄疫免疫群体的抗体水平,又可以检测口蹄疫感染或带毒动物,而且专业和非专业人士均可随时随地进行实时在线检测,无需支付专家诊断检查费及其相关费用。因此,可以节省检测成本,降低检测费用。

[0023] 7、应用范围广、便于推广使用:本发明快速检测试纸条操作简单成“一步式”或“傻瓜式”,而且方便携带和保存,能满足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较大的经济、社会效益。

附图说明

[0024] 以下结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0025] 图1:口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条特异性检验结果。

[0026] 图2:口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条灵敏度检验结果。

[0027] 图3:实施例1处理过的金标垫和未经预处理的金标垫喷涂金标蛋白的效果。

[0028] 图4:对比方法处理的金标垫情况。

[0029] 图5:实施例2、对比方法处理的金标垫的使用情况。

具体实施方式

[0030] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。如无特殊说明,本发明具体实施方式中的“%”均为质量体积百分比(g/mL)。

[0031] 实施例1

[0032] 制备口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条:先根据口蹄疫病毒VP1上B细胞表位,和口蹄疫病毒非结构蛋白上B细胞表位,人工合成口蹄疫病毒结构蛋白VP1上表位多肽和口蹄疫病毒非结构蛋白2B、2C、3B上3条表位多肽,分别偶联载体蛋白,用于制备纤维素膜垫上的检测线1(T1)、检测线2(T2),同时制备抗待检动物物种的二抗IgG,用于制备纤维素膜垫上的对照线(C);制备金标垫处理液及金标垫预处理,用于喷涂金标蛋白;最后组装试纸条。

[0033] 1、口蹄疫病毒结构蛋白和非结构蛋白表位多肽的合成:

[0034] 合成口蹄疫病毒VP1上第142~158位氨基酸序列(氨基酸序列根据所检口蹄疫毒株不同而不同),在其-NH₄端加入一个半胱氨酸;合成口蹄疫病毒非结构蛋白2B上第1096~1106位氨基酸(氨基酸序列为:RTPEDLERA EK)、2C上第1414~1425为氨基酸(氨基酸序列为:HEKVSSHPIFKQ)、3B上第1602~1613位氨基酸序列(氨基酸序列为:GPYAGPMERQKP),分别在

其-NH₄端加入一个半胱氨酸,所有多肽序列均由商业公司合成和纯化。

[0035] 2、口蹄疫病毒结构蛋白和非结构蛋白表位多肽人工抗原的制备:

[0036] 用异型双功能试剂Sulfo-SMCC (MW:436.37, Spacer Arm Length:11.6 Å, Pierce) 活化载体蛋白BSA (或OVA) 上的-NH₂,具体操作步骤如下:

[0037] (1) 偶联缓冲液 (50mL): 0.15M NaCl, 0.1M PB缓冲液 (pH 7.2), 1μM EDTA (乙二胺四乙酸);

[0038] (2) BSA (牛血清白蛋白) 溶液: 称取8mg的载体蛋白BSA溶于1.0mL偶联缓冲液中;

[0039] (3) Sulfo-SMCC溶液: 称取2mg Sulfo-SMCC加入100μL的DMSO (二甲基亚砷) 中, 反复吹打, 使其充分溶解;

[0040] (4) 将BSA溶液和Sulfo-SMCC溶液混合, 充分混匀后, 室温下, 反应1h或37℃, 30min, 并不时的混匀;

[0041] (5) 用偶联缓冲液在4℃条件下对步骤(4)的溶液进行透析48h, 每6h换液一次, 去除多余的偶联剂 (Sulfo-SMCC) 和DMSO;

[0042] (6) 用偶联缓冲液调整载体蛋白BSA浓度至5mg/mL, 该溶液即为SMCC活化载体蛋白 (SMCC-BSA), -20℃冻存备用。

[0043] 载体蛋白上的-NH₂经活化后和多肽 (Pep) N末端半胱氨酸 (Cys) 的-SH相连, 形成人工结合抗原 (BSA-Pep)。偶联步骤为: 称取4mg多肽, 以0.01M的PBS缓冲液充分溶解后 (对于溶解性比较低的多肽要用DMF或DMSO溶解); 加入300μL 0.01M PB缓冲液 (pH 7.2, 含5mM EDTA), 制备多肽储存液, 浓度为10mg/mL。偶联时, 取20μL多肽储存液, 加入等体积含5mM EDTA的0.01M PB缓冲液 (pH 7.2) 中, 再加入40μL SMCC-BSA溶液充分混合, 室温反应4h后, 4℃孵育过夜。用生理盐水在4℃条件下对上述溶液进行透析48h, 每6h换液一次, 去除多余的偶联剂; 以紫外分光光度计测定其蛋白浓度。

[0044] 3、羊抗或兔抗被检测动物物种IgG的二抗的制备:

[0045] 以50μg~100μg IgG/kg体重经皮下和肌肉注射阴性健康羊或家兔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。取1体积血清加2体积PBS缓冲液 (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缓冲液 (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缓冲液 (pH7.2) 溶解沉淀, 置4℃冰箱内用PBS缓冲液 (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。

[0046] 4、金标蛋白的制备:

[0047] 以柠檬酸钠还原法制备金溶胶: 即在50~100mL沸腾的质量分数0.01~0.05%氯金酸水溶液中加入2~4mL质量分数0.5~2%柠檬酸三钠溶液, 获得直径15nm左右的胶体金。以0.1mol/L的K₂CO₃调胶体金pH至8.5~9.5, 以1:1000~1300的标记比将待标记的蛋白SPA加入pH8.5~9.5的胶体金中, 标记10min后, 加质量分数20%PEG-10000至其最终浓度为0.05%, 4℃、1500~3000r/min离心20min, 除去未结合的胶体金颗粒, 4℃、15000r/min离心1h, 弃上清液, 获得胶体金标记蛋白。

[0048] 5、金标垫的制备:

[0049] 金标垫预处理方法：利用喷涂仪器将处理液以 $8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量喷涂在纤维垫上， 42°C 烘50min，得到预处理的金标垫。金标垫处理液由以下原料组成：BSA 5%，PVP-10 0.1%，Triton X-100 0.1%，余量为 $0.02\text{mol}/\text{L}$ 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液。喷涂方法为：沿纤维垫长度方向的中心喷涂处理液，且喷涂后纤维垫上的处理液两侧边缘线与纤维垫对应侧的侧沿之间均存在间隙。然后将制备的胶体金标记蛋白均匀的喷涂在金标垫上， 42°C 烘40min。

[0050] 6、试纸条的组装

[0051] 将口蹄疫病毒结构蛋白表位多肽人工抗原，喷涂在硝酸纤维素膜上，形成检测印迹/线1 (T1)，将口蹄疫病毒非结构蛋白表位多肽人工抗原，喷涂在硝酸纤维素膜上，形成检测印迹/线2 (T2)，将羊抗或兔抗被检测动物物种IgG的二抗喷涂在硝酸纤维素膜上，形成对照印迹/线 (C)；将样品垫、金标垫、纤维素膜垫、吸收垫依次黏贴在底板上，裁切成合适尺寸获得试纸。

[0052] 在样品垫与金标垫交界处对应的面层上印制有红色样品标记线，且印有max字样，该标记警告线距离样品垫顶端一侧1.1-1.2cm处。

[0053] 本发明快速检测试纸条实施检测的原理：

[0054] 当本发明快速检测试纸条测试端插入待检测血清后，待检血清通过虹吸带动待检血清抗体及金标蛋白玻璃棉中的金标蛋白一起向硝酸纤维素膜扩散，并最终渗入手柄端滤纸中，扩散过程中抗体可与金标蛋白相结合，该结合物进而与纤维素膜上的人工抗原检测印迹结合，从而显示出棕红色的检测印迹 (T1和/或T2)；而对照线印迹可与金标物结合，形成棕红色对照印迹 (C)。如果待检血清中没有口蹄疫病毒抗体和/或疫苗抗体，试纸条只显示出一条 (个) 棕红色对照印迹 (C)；如果待检血清中含有抗口蹄疫病毒抗体和/或疫苗抗体，则先与其金标蛋白结合，再与纤维素膜上的人工抗原检测印迹T1和/或T2结合，显示出棕红色的检测印迹，为阳性标记；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或操作失误。

[0055] 试纸条的检测操作方法：

[0056] (1) 检测样品液的制备：无菌取被检动物的血液，并分离血清，以生理盐水作1:200倍稀释血清待测；将本发明快速检测试纸条测试端插入待检测血清中，插入深度不超过标记线，约30s后取出试纸条，水平放置约1~5min，同时观察结果。

[0057] (2) 结果判断：如果在检测试纸条纤维素膜层上只显示出一条 (个) 棕红色对照印迹 (C)，表示检测结果呈阴性，说明在被检血清中未检测出口蹄疫病毒抗体和/或口蹄疫疫苗抗体，即被检动物无口蹄疫病毒感染和/或口蹄疫疫苗免疫；如果检测试纸条上的纤维素膜层上出现棕红色的对照印迹 (C) 和检测印迹1 (T1)，表示检测结果呈阳性，即在待检血清中检测出口蹄疫疫苗抗体，即被检动物已进行口蹄疫疫苗免疫；如果检测印迹T1、T2同时出现，表示在待检血清中检测出口蹄疫病毒感染抗体，即被检动物已感染或携带口蹄疫病毒；如果纤维素膜带上没有任何棕红色印迹显示，则表明试纸条已失效或操作有误。

[0058] 实施例2

[0059] 口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条的制备方法如实施例1，检测线1上喷涂口蹄疫病毒O/GX/09-7毒株VP1上第142~158位氨基酸序列NNVRGDLQVLAQKAERA (SEQ ID NO.1)，在其-NH4端加入一个半胱氨酸，偶联载体蛋白BSA或OVA制备的人工抗原；检测线2上喷涂口蹄疫病毒非结构蛋白人工抗原，该人工抗原同时选

用口蹄疫病毒非结构蛋白2B上第1096~1106位氨基酸(氨基酸序列为:RTPEDLERA EK, SEQ ID NO.5)多肽,非结构蛋白2C上第1414~1425位氨基酸(氨基酸序列为:HEKVSSHPIFKQ, SEQ ID NO.6)多肽,非结构蛋白3B上第1602~1613位氨基酸(氨基酸序列为:GPYAGPMERQKP, SEQ ID NO.7)多肽,偶联载体蛋白BSA或OVA制备的人工抗原,三种人工抗原按质量比1:1:1混合。

[0060] 实施例3

[0061] 口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条的制备方法如实施例2,不同之处为,检测线1上人工抗原多肽为口蹄疫病毒O/HN/CHA/93毒株VP1上第142~158位氨基酸序列SNVRGDLQVLAQKAERA (SEQ ID NO.2)。

[0062] 实施例4

[0063] 口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条的制备方法如实施例2,不同之处为,检测线1上人工抗原多肽为口蹄疫病毒O/TAW/97毒株VP1上第142~158位氨基酸序列NNVRGDLQVLAQKAERT (SEQ ID NO.3)。

[0064] 实施例5

[0065] 口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条的制备方法如实施例2,不同之处为,检测线1上人工抗原多肽为口蹄疫病毒O/MYA/98毒株VP1上第142~158位氨基酸序列TNVRGDLQVLAQKAARP (SEQ ID NO.4)。

[0066] 验证例

[0067] 1、特异性检测

[0068] 本发明的试纸检测口蹄疫感染血清、口蹄疫免疫血清、口蹄疫阴性血清以及猪瘟病毒、猪蓝耳病病毒、猪圆环病毒、猪伪狂犬病毒、猪乙型脑炎病毒阳性血清,结果显示,本发明试纸的特异性为100%,与口蹄疫阴性血清及其它病毒阳性血清无交叉反应(如图1)。

[0069] 2、灵敏度检测

[0070] 用本发明的试纸检测倍比稀释的标准猪口蹄疫免疫血清,结果显示本发明试纸条对口蹄疫感染和免疫的标准阳性血清的灵敏度分别不低于1:3200和1:6400(如图2)。

[0071] 对比实验

[0072] 1、在实施例1处理过的金标垫上喷涂金标蛋白(喷涂位置与处理液喷涂位置相同),金标蛋白成聚集的一条线固定于金标垫上;而在未经预处理的金标垫上喷涂金标蛋白(喷涂位置与处理过的金标垫位置相同),金标蛋白成弥散状浸满整个金标垫,说明本发明处理的金标垫可以让金标蛋白固定在一定范围内,更有利于金标蛋白的稳定及释放(图3)。

[0073] 2、以其它金标垫的预处理方法作为对比,与本发明金标垫的预处理效果进行比较。对比金标垫的预处理方法为将纤维垫浸泡在处理液中15min,然后取出37℃下烘干,得到预处理的金标垫。处理液由以下原料组成:BSA 3%,海藻糖8%,Tween-20 2%,余量为0.01mol/L磷酸盐缓冲液。结果可知(图4),对比方法处理的金标垫干燥后分布不均匀,边缘出现处理物沉淀发黄,且质地较硬,因处理液中含有Tween-20无法粘附在支撑板上,在切割时容易发生金标垫脱落现象,这一缺点利用喷涂处理的方法可以改善。

[0074] 3、在实施例2和对比方法预处理的金标垫上喷涂胶体金标记的SPA,并制成试纸检测口蹄疫感染血清,10min后观察。实施例2金标垫上金标蛋白释放率在95%以上,对比方法的金标垫上金标SPA未完全释放,且试纸条显色弱于实施例2(图5)。

[0075] 以上所述仅为本发明最佳的实施例,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 河南省农业科学院
[0003]	<120> 一种口蹄疫病毒免疫抗体评价及感染与免疫鉴别诊断二联试纸条
[0004]	<160> 7
[0005]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 17
[0008]	<212> PRT
[0009]	<213> 口蹄疫病毒(Footand Mouth Disease Virus)
[0010]	<400> 1
[0011]	Asn Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Glu Arg
[0012]	1 5 10 15
[0013]	Ala
[0014]	<210> 2
[0015]	<211> 17
[0016]	<212> PRT
[0017]	<213> 口蹄疫病毒(Footand Mouth Disease Virus)
[0018]	<400> 2
[0019]	Ser Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Glu Arg
[0020]	1 5 10 15
[0021]	Ala
[0022]	<210> 3
[0023]	<211> 17
[0024]	<212> PRT
[0025]	<213> 口蹄疫病毒(Footand Mouth Disease Virus)
[0026]	<400> 3
[0027]	Asn Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Glu Arg
[0028]	1 5 10 15
[0029]	Thr
[0030]	<210> 4
[0031]	<211> 17
[0032]	<212> PRT
[0033]	<213> 口蹄疫病毒(Footand Mouth Disease Virus)
[0034]	<400> 4
[0035]	Thr Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg
[0036]	1 5 10 15
[0037]	Pro
[0038]	<210> 5

[0039]	<211>	11	
[0040]	<212>	PRT	
[0041]	<213>	口蹄疫病毒 (Footand Mouth Disease Virus)	
[0042]	<400>	5	
[0043]	Arg Thr Pro Glu Asp Leu Glu Arg Ala Glu Lys		
[0044]	1	5	10
[0045]	<210>	6	
[0046]	<211>	12	
[0047]	<212>	PRT	
[0048]	<213>	口蹄疫病毒 (Footand Mouth Disease Virus)	
[0049]	<400>	6	
[0050]	His Glu Lys Val Ser Ser His Pro Ile Phe Lys Gln		
[0051]	1	5	10
[0052]	<210>	7	
[0053]	<211>	12	
[0054]	<212>	PRT	
[0055]	<213>	口蹄疫病毒 (Footand Mouth Disease Virus)	
[0056]	<400>	7	
[0057]	Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln Lys Pro		
[0058]	1	5	10



图1

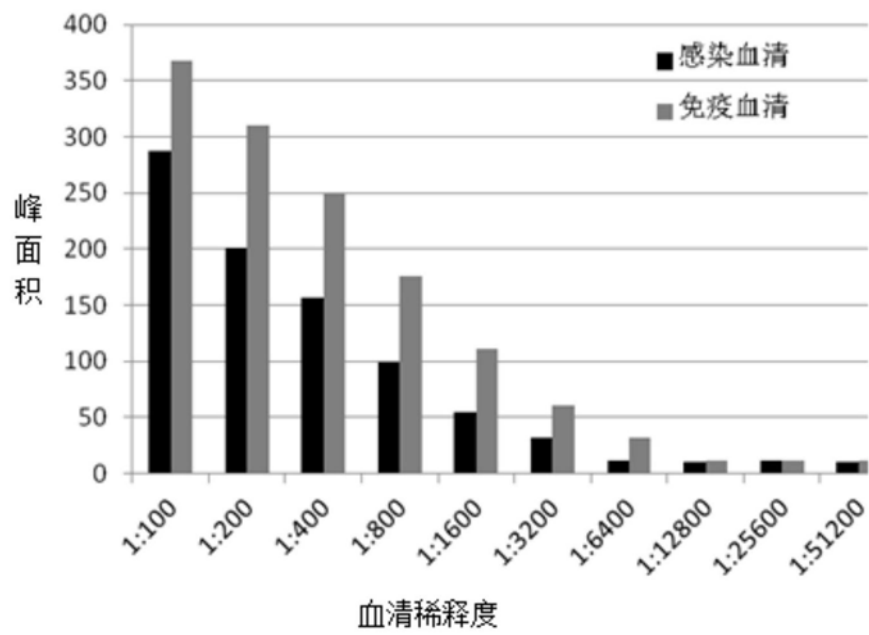


图2

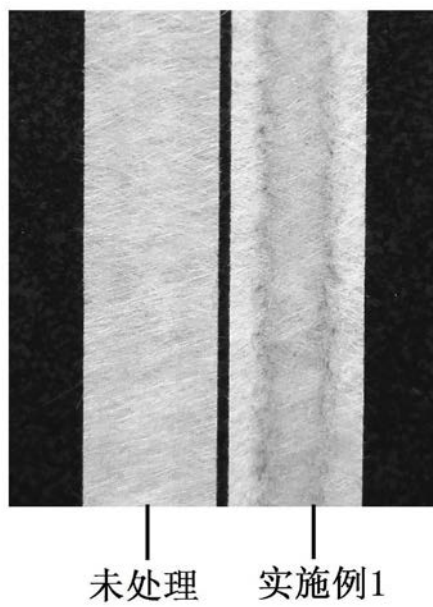


图3

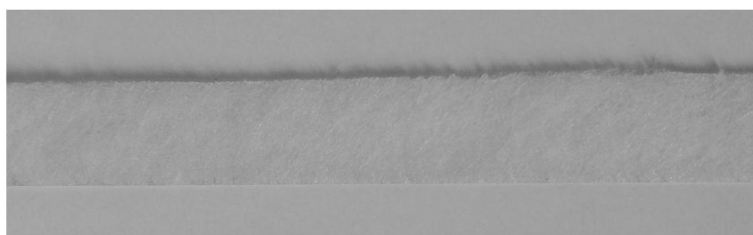


图4

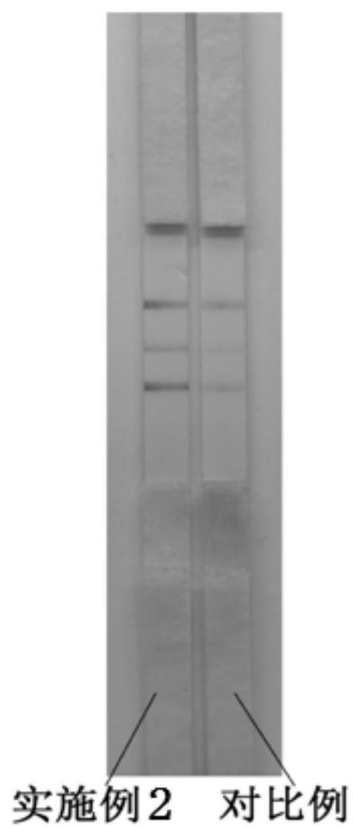


图5