



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103278636 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201310218943. 7

(22) 申请日 2013. 06. 04

(83) 生物保藏信息

CGMCC No7303 2013. 02. 21

(73) 专利权人 大连海洋大学

地址 116000 辽宁省大连市西岗区黄河路
219 号

(72) 发明人 李强 李华 刘志强 叶仕根
景宏丽

(74) 专利代理机构 大连非凡专利事务所 21220

代理人 闪红霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

审查员 陈伟潘

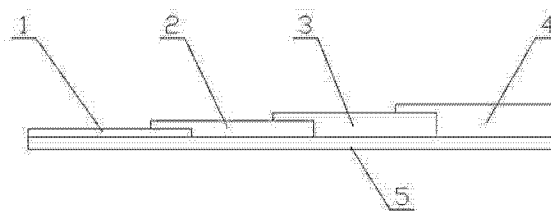
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种可快速检测刺参“化皮病”病原菌——黄海希瓦氏菌的胶体金免疫层析试纸条及制备方法,有底板,在底板上从一端依次由上至下呈阶梯状地粘有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水垫,所述金标垫上喷涂有胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体,硝酸纤维素膜上有包被黄海希瓦氏菌多克隆抗体的检测线 a 及由羊抗鼠 IgG 构成的质控线 b,所述黄海希瓦氏菌单克隆抗体是由保藏号为 CGMCCNo. 7303 的杂交瘤细胞免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。



1. 一种黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条,有底板(5),在底板(5)上从一端依次由上至下呈阶梯状地粘有样品垫(4)、金标垫(3)、硝酸纤维素膜(2)及吸水垫(1),其特征在于:所述金标垫(3)上喷涂有胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体,喷涂量 $9\mu\text{l}/\text{cm}^2$,硝酸纤维素膜(2)上有包被浓度为 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ 的黄海希瓦氏菌多克隆抗体的检测线a,喷涂量 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 及由浓度为 $2\text{mg}/\text{ml}$ 的羊抗鼠IgG构成的质控线b,喷涂量 $2\mu\text{l}/\text{cm}$,所述黄海希瓦氏菌单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 7303的杂交瘤细胞免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。

2. 一种如权利要求1所述的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于按以下步骤进行:

a. 制备黄海希瓦氏菌单克隆抗体:取保藏号为CGMCC No. 7303的抗刺参“化皮病”病原菌-黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株SM-3D9免疫小鼠,取小鼠腹水,置离心管离心后收集上清并纯化,即得黄海希瓦氏菌单克隆抗体;

b. 制备胶体金:采用柠檬酸三钠作为还原剂制备 $18\sim 20\text{nm}$ 胶体金溶液,并调整胶体金溶液的pH至8.2,备用;

c. 制备胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体:在电磁搅拌器下将黄海希瓦氏菌单克隆抗体缓慢加入备用的胶体金溶液中,黄海希瓦氏菌单克隆抗体的质量和胶体金溶液的体积比为0.025:1,经纯化和浓缩后形成胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体;

d. 对金标垫和硝酸纤维素膜处理:将胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体以 $9\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 均匀喷涂在金标垫上;将黄海希瓦氏菌多克隆抗体稀释成 $1.2\text{mg}/\text{ml}$,以 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 喷涂于硝酸纤维素膜上,形成检测线a;将羊抗鼠IgG稀释成 $2\text{mg}/\text{ml}$,以 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 喷涂于硝酸纤维素膜上,形成质控线b, 37°C 干燥4h;

e. 组装:将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次由上至下呈阶梯状固定于不干胶底板上,样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分之间有重叠部分,切成规格宽度的试纸条。

3. 根据权利要求2所述黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于所述a步骤是取保藏号为CGMCC No. 7303的抗刺参“化皮病”病原菌-黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株SM-3D9制成细胞悬液, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min,去上清,用1640细胞培养液重悬细胞,使最终细胞密度为 5×10^6 个/ml,得到杂交瘤细胞液;用杂交瘤细胞液免疫小鼠, $7\sim 10$ 天后取小鼠腹水,置离心管离心, $2000\text{r}/\text{min}$,10min,离心后收集上清并采用Protein-A亲和层析法纯化收集的腹水,即得黄海希瓦氏菌单克隆抗体。

4. 根据权利要求3所述黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于所述保藏号为CGMCC No. 7303的抗刺参“化皮病”病原菌-黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株SM-3D9是按如下方法制备的:

f. 提取黄海希瓦氏菌;

g. 制备黄海希瓦氏菌液并免疫Balb/C小鼠;

h. 取小鼠脾脏进行细胞融合,产生融合的杂交瘤细胞,用间接酶联免疫技术筛选阳性细胞,通过有限稀释法进行克隆。

5. 根据权利要求4所述黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于所述提取黄海希瓦氏菌是按如下方法进行:取患“化皮病”刺参,用2216E培养基从溃疡

体壁处分离细菌,25℃下培养 24 ~ 48h,挑取肉红色圆形菌落进一步纯化,即得到黄海希瓦氏菌;所述培养基的组分及用量比例如下:蛋白胨 5g,酵母膏 1g,琼脂粉 20g,磷酸高铁 0.01g,陈海水 1000ml。

6. 根据权利要求 5 所述黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于所述 h 步骤是按照如下方法进行:在无菌条件下将免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞用 45% PEG1500 融合,融合细胞用 HAT 选择性培养液重悬,滴入加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,每孔 0.2ml,置于 37℃,CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养,两周后,检测杂交瘤细胞上清液,筛选阳性细胞,通过有限稀释法进行克隆,即获得阳性杂交瘤细胞。

黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于水产动物致病菌的免疫学快速检测技术领域,尤其是一种可快速检测刺参“化皮病”病原菌——黄海希瓦氏菌的胶体金免疫层析试纸条及制备方法。

背景技术

[0002] 刺参是我国北方沿海地区的重要经济养殖品种,近年来养殖规模不断壮大,已成为渔民转产增收的重要途径。然而,在大规模养殖过程中,刺参病害问题也日趋突出,出现了多种明显症状,甚至出现大规模死亡现象。目前,针对刺参病菌的检测方法主要有传统的微生物学检测技术、免疫荧光技术、酶联免疫吸附法、细菌凝集法以及 PCR 技术等。上述检测方法均因操作复杂、耗时久、需要特殊的仪器设备和专业人员,而达不到快速、现场检测的目的,不适合在基层推广使用。胶体金免疫层析试纸条以其快速简便、不需特殊仪器、结果可肉眼判读、灵敏度高、特异性强等优点,已成为当今快速敏感的免疫检测技术之一,并开始逐渐应用于水产养殖业的多个领域。

[0003] 胶体金免疫层析试纸条是宽度为 0.3cm 的试纸条,有底板,在底板上从一端依次由上至下呈阶梯状地粘有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水垫,各部分之间重叠相接。通常在金标垫上喷涂有胶体金标记的抗体,硝酸纤维素膜上有包被抗体的检测线 a 和有羊抗鼠 IgG 构成的质控线 b。其检测原理是利用吸水垫形成的毛细作用,置于样品垫上的被检测抗原首先与金标垫上的胶体金标记的抗体结合,并沿着硝酸纤维素膜(NC膜)继续向前移动,当到达固着有抗体的检测线 a 时,抗体将其捕获,随着反应进行,不断富集达到肉眼可见水平;过量的胶体金标记的抗体继续向前移动,到达固着有羊抗鼠 IgG 的质控线 b 时,被捕获并不断富集。因此若样品为阳性,则在检测线和质控线上均出现色条带,若样品为阴性,则仅在质控线上出现同样色彩的色条带。

[0004] “化皮病”是刺参病害中最为流行且影响最为严重的疾病,黄海希瓦氏菌是引起刺参“化皮病”的主要病原菌之一。但是,由于迄今为止并没有适用于胶体金免疫层析试纸条的黄海希瓦氏菌单克隆抗体,以至于目前对于黄海希瓦氏菌还是采用微生物学检测技术、免疫荧光技术、酶联免疫吸附法、细菌凝集法以及 PCR 技术等进行检测,胶体金免疫层析试纸条并没有在检测黄海希瓦氏菌中得以应用。

发明内容

[0005] 本发明是为了解决现有技术所存在的上述技术问题,提供一种可快速检测刺参“化皮病”病原菌的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条及制备方法。

[0006] 本发明的技术解决方案是:一种黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条,有底板,在底板上从一端依次由上至下呈阶梯状地粘有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水垫,其特征在于:所述金标垫上喷涂有胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体,硝酸纤维素膜上有包被黄海希瓦氏菌多克隆抗体的检测线 a 及由羊抗鼠 IgG 构成的质控线 b,所述黄海希瓦氏菌单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 7303 的抗刺参“化皮病”病原菌—黄海希瓦氏菌单

克隆抗体的杂交瘤细胞株 SM-3D9 免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。

[0007] 一种上述的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于按以下步骤进行:

[0008] a. 制备黄海希瓦氏菌单克隆抗体:取保藏号为 CGMCC No. 7303 的抗刺参“化皮病”病原菌-黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 SM-3D9 免疫小鼠,取小鼠腹水,置离心管离心后收集上清并纯化,即得黄海希瓦氏菌单克隆抗体;

[0009] b. 制备胶体金:采用柠檬酸三钠作为还原剂制备 18~20nm 胶体金溶液,并调整胶体金溶液的 pH 至 8.2,备用;

[0010] c. 制备胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体:在电磁搅拌器下将黄海希瓦氏菌单克隆抗体缓慢加入备用的胶体金溶液中,黄海希瓦氏菌单克隆抗体的质量和胶体金溶液的体积比为 0.025:1,经纯化和浓缩后形成胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体;

[0011] d. 对金标垫和硝酸纤维素膜处理:将胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体以 $9\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 均匀喷涂在金标垫上;将黄海希瓦氏菌多克隆抗体稀释成 1.2mg/ml,以 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 喷涂于硝酸纤维素膜上,形成检测线 a;将羊抗鼠 IgG 稀释成 2mg/ml,以 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 喷涂于硝酸纤维素膜上,形成质控线 b,37°C 干燥 4h;

[0012] e. 组装:将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次由上至下呈阶梯状固定于不干胶底板上,样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分之间有重叠部分,切成规格宽度的试纸条。

[0013] 所述 a 步骤是取保藏号为 CGMCC No. 7303 的抗刺参“化皮病”病原菌-黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 SM-3D9 制成细胞悬液,1000r/min 离心 5 min,去上清,用 1640 细胞培养液重悬细胞,使最终细胞密度为 5×10^6 个/ml,得到杂交瘤细胞液;用杂交瘤细胞液免疫小鼠,7~10 天后取小鼠腹水,置离心管离心,2000r/min,10min,离心后收集上清并采用 Protein-A 亲和层析法纯化收集的腹水,即得黄海希瓦氏菌单克隆抗体。

[0014] 所述黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于所述保藏号为 CGMCC No. 7303 的抗刺参“化皮病”病原菌-黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 SM-3D9 是按如下方法制备的:

[0015] f. 提取黄海希瓦氏菌;

[0016] g. 制备黄海希瓦氏菌液并免疫 Balb/C 小鼠;

[0017] h. 取小鼠脾脏进行细胞融合,产生融合的杂交瘤细胞,用间接酶联免疫技术筛选阳性细胞,通过有限稀释法进行克隆。

[0018] 所述提取黄海希瓦氏菌是按如下方法进行:取患“化皮病”刺参,用 2216E 培养基从溃疡体壁处分离细菌,25°C 下培养 24~48h,挑取肉红色圆形菌落进一步纯化,即得到黄海希瓦氏菌;所述培养基的组分及用量比例如下:蛋白胨 5g,酵母膏 1g,琼脂粉 20g,磷酸高铁 0.01g,陈海水 1000ml。

[0019] 所述 h 步骤是按照如下方法进行:在无菌条件下将免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞用 45% PEG1500 融合,融合细胞用 HAT 选择性培养液重悬,滴入加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,每孔 0.2ml,置于 37°C,CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养,两周后,检测杂交瘤细胞上清液,筛选阳性细胞,通过有限稀释法进行克隆,即获得阳性杂交瘤细胞。

[0020] 本发明可应用于检测黄海希瓦氏菌,与现有检测方法相比,具有以下优点:

- [0021] (1) 检测快速 :检测时间仅 5~10min,现场即可出结果 ;
- [0022] (2) 特异性强、灵敏度高 :本试纸条与其他水产动物常见的致病菌无交叉反应,最低检测限为 5×10^5 cells/ml ;
- [0023] (3) 操作简便,无需专业人员和辅助的特殊仪器 ;
- [0024] (4) 有效期长 :2-8℃密封保存,有效期为 1 年。

附图说明

- [0025] 图 1 是本发明实施例的结构示意图。
- [0026] SM-3D9 杂交瘤细胞保藏日期 :2013 年 2 月 21 日 ;
- [0027] 分类命名 :抗刺参“化皮病”病原菌—黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 ;
- [0028] 保藏单位 :中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC) ;
- [0029] 保藏单位地址 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号 ;
- [0030] 保藏号 :CGMCC No. 7303。

具体实施方式

[0031] 本发明的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条结构与现有技术相同,有底板 5,在底板 5 上从一端依次由上至下呈阶梯状粘有样品垫 4、金标垫 3、硝酸纤维素膜 2 及吸水垫 1,各部分之间重叠相接。与现有技术所不同的是金标垫 3 上喷涂有胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体,硝酸纤维素膜 2 上有包被黄海希瓦氏菌多克隆抗体的检测线 a 和有羊抗鼠 IgG 构成的质控线 b,所述黄海希瓦氏菌单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 7303 的抗刺参“化皮病”病原菌—黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。

[0032] 所述分泌抗黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞是按如下方法制备 :

[0033] 一. 刺参“化皮病”病原菌—黄海希瓦氏菌的分离 :

[0034] 1. 取患“化皮病”刺参,以平板划线法从溃疡体壁处分离细菌,用 2216E 培养基(蛋白胨 5g,酵母膏 1g,琼脂粉 20g,磷酸高铁 0.01g,陈海水 1000ml)接种后于 25℃下培养 24 ~ 48h,挑取优势菌进一步纯化,即得到黄海希瓦氏菌 ;

[0035] 2. 对优势菌按照常规方法进行生理生化指标分析,结果表明该菌在 2216E 培养基上可形成肉红色圆形菌落,在 TCBS 培养基上可形成绿色圆形菌落,革兰氏阴性,氧化酶、接触酶阳性,柠檬酸盐阴性,甘露醇阴性,肌醇阳性,鸟氨酸脱羧酶阴性,对 O/129 不敏感,可以产生硫化氢。

[0036] 3. 对优势菌进行 16SrDNA 基因序列同源性分析,具体操作如下 :利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN BIOTECHS0. LTD)提取细菌 DNA,细菌 16S rDNA 通用扩增引物 PCR 扩增。PCR 反应总体系 25 μ l,反应条件为 :94℃变性 4min ;94℃变性 45s,53℃复性 30s,72℃延伸 1min,30 个循环 ;72℃温育 7min。PCR 产物进行 1 % 的琼脂糖凝胶电泳, E. B 染色,紫外检测并照相。用普通琼脂糖凝胶 DAN 回收试剂盒纯化(TIANGEN Midi Purification Kit) PCR 产物,交由大连宝生物工程有限公司进行测序,通过 Blast 从 GeneBank 数据库中检索与待测菌序列同源性较高的细菌基因序列,从中选取同源性较高的已知菌株采用 Clustal X1.8 软件进行多序列匹配排列,用 Mega3.0 采用邻接法(Neighbor-joining

method)获得系统发育树,通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数集 1 000 次。结果表明该菌与黄海希瓦氏菌(*S. marisflavi* KCCM 41822)自然聚类,相似率是 99.86%,置信度为 100%。

[0037] 4. 所制备菌株致病性的确定:感染用刺参取自大连一养殖场,体重 1 ~ 3g,体长 2 ~ 5 cm,养殖水温 11 ~ 14℃;制备细菌悬液,浓度约 5×10^8 Cells/ml,通过背部体腔注射方式注射,0.1ml/头,对照组注射等量生理盐水,每组 10 头刺参,观察 14 天。结果表明,注射组刺参全部死亡,人工感染症状与自然发病症状相似,表现为“化皮”症状,从病灶处分离到与所注射的菌落形态一致的细菌。对照组在实验过程中无死亡现象。

[0038] 二. 制备分泌抗黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞:

[0039] 1. 制备菌液

[0040] 黄海希瓦氏菌在 2216E 培养基上 25℃培养 18 ~ 24 小时后,用无菌的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)制成菌悬液,经 0.5%福尔马林灭活 24 小时,14000r/min 离心 20min,0.01mol/L PBS 冲洗 2 次,血球板计数,调节细菌浓度为 4×10^8 cells/ml。

[0041] 2. 免疫小鼠

[0042] 用灭活的黄海希瓦氏菌作为抗原免疫 Balb/C 小鼠,共免疫 4 次,每次免疫剂量为 0.1ml,具体免疫程序如下:

[0043] 2.1 基础免疫,黄海希瓦氏菌与福氏完全佐剂等比混匀,采用腹腔注射方式;

[0044] 2.2 两周后第一次加强免疫,黄海希瓦氏菌与福氏不完全佐剂等比混匀,采用腹腔注射方式;

[0045] 2.3 三周后第二次加强免疫,采用尾静脉注射方式,无佐剂;

[0046] 2.4 四周后第三次加强免疫,采用尾静脉注射方式,无佐剂;

[0047] 2.5 第三次加强免疫后的第 3 天,将小鼠脱颈椎处死,取脾脏用于细胞融合。

[0048] 3. 细胞融合

[0049] 在无菌条件下将免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞用 45% PEG1500 融合,融合细胞用 HAT 选择性培养液重悬,滴入加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,每孔 0.2ml,置于 37℃,CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养,倒置相差显微镜观察杂交瘤细胞生长情况。大约两周后,取杂交瘤细胞上清液,进行检测。

[0050] 4. 间接酶联免疫技术筛选黄海希瓦氏菌杂交瘤株

[0051] 4.1 包被抗原:将上述制得的刺参“化皮病”病原菌—黄海希瓦氏菌用碳酸盐包被液(pH=9.6)稀释至 5×10^6 cells/ml,加入 96 孔酶标板中(100ul/孔),4℃包被过夜;

[0052] 4.2 PBS-T (PBS 含 0.05% Tween 20)洗 3 次,每次 5min;

[0053] 4.3 每孔加入 200ul 3% 的牛血清白蛋白(PBS 配)37℃封闭 1h;

[0054] 4.4 PBS-T 洗 3 次,每次 5min;

[0055] 4.5 加入 3 步骤所得杂交瘤细胞上清液,100 ul/孔,阴性对照用骨髓瘤细胞培养上清液代替;37℃,孵育 1h;

[0056] 4.6 PBS-T 洗 3 次,每次 5min;

[0057] 4.7 每孔加入 100 μl 碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗小鼠 IgG (1:4000),37℃,孵育 1h;

[0058] 4.8 PBS-T 洗 3 次,每次 5min;

[0059] 4.9 每孔加入 100 μ l PNPP 发色液,暗处反应 5~20min,每孔加入 50 μ l 2M 的 NaOH,稳定 3~5min,即可用 405nm 工作波长测定 OD 值,计算各实验孔与阴性对照 OD 值之比(P/N),当 P/N \geq 2.1 时该孔为阳性。

[0060] 5. 克隆

[0061] 采用有限稀释法克隆阳性杂交瘤细胞。将阳性杂交瘤细胞用 1640 培养液重悬,10 倍梯度稀释至 10²cells/ml,取 1 ml 细胞液加入 9 ml 培养液,混合均匀,滴入加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,每孔 0.1 ml。选取只有一个杂交瘤细胞的培养孔,待细胞长满孔底 2/3 以上时,取上清液按照步骤 4 进行检测,所得阳性孔按照上述方法再克隆 2 次,即得分泌抗刺参“化皮病”病原菌—黄海希瓦氏菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 SM-3D9 (保藏号 CGMCC No. 7303)。

[0062] 本发明的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条制备方法,按以下步骤进行:

[0063] 1. 制备黄海希瓦氏菌单克隆抗体:取生长旺盛,形态良好的杂交瘤细胞(CGMCC No. 7303),制成细胞悬液,1000r/min 离心 5 min,去上清,用 1640 细胞培养液重悬细胞,使最终细胞密度为 5 \times 10⁶个/ml,备用;取 6~8 周龄 Ba1b/C 小白鼠,腹腔内注射无菌的液体石蜡 0.5ml/只,1 周后,腹腔内注射杂交瘤细胞株(CGMCC No. 7303) 0.5ml/只,7~10 天后,见小鼠腹部明显膨大,拉颈处死小鼠,用酒精棉球消毒下腹部皮肤后,用注射器抽取腹水,将收集的腹水混合,置离心管离心(2000r/min, 10min),离心后收集上清,采用 Protein-A 亲和层析法纯化收集的腹水,即黄海希瓦氏菌单克隆抗体。

[0064] 2. 制备胶体金:采用柠檬酸三钠还原法制备 18~20nm 胶体金,是将 100ml 0.01% 氯化金,加热至沸腾;取 2ml 的 1% 柠檬酸钠加入上述溶液中,迅速混合均匀,再保持沸腾 10min,直至溶液颜色呈透亮的红色,自然冷却后蒸馏水恢复至 100ml 体积;胶体金溶液棕色瓶 4 $^{\circ}$ C 保存,备用,透射电镜下观察胶体金颗粒的均匀度及粒径。

[0065] 3. 制备胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体:取已制备好的胶体金溶液 10ml,用 0.1mol/L K₂CO₃ 溶液调整溶液 pH 至 8.2,在电磁搅拌下,边搅拌边加入 250 μ l 1mg/ml 单克隆抗体,继续搅拌 30min,再逐滴加入 5% BSA 至终浓度为 1%,逐滴加入 5% PEG20000 至终浓度为 1% (以稳定胶体金颗粒的残留表位),搅拌 30min。1500r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20min,取上清;将上清以 10000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 60min,弃上清;将沉淀以 10ml 金标复溶液溶解,重复离心 2~3 次;最后将沉淀溶于原体积 1/10 金标稀释液中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0066] 4. 对金标垫和硝酸纤维素膜处理:将胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体以 9 μ l/cm² 均匀喷涂在金标垫上;将黄海希瓦氏菌多克隆抗体稀释成 1.2mg/ml,以 2 μ l/cm 喷涂于硝酸纤维素膜上,形成检测线 a;将羊抗鼠 IgG 稀释成 2mg/ml,以 2 μ l/cm 喷涂于硝酸纤维素膜上,形成质控线 b,37 $^{\circ}$ C 干燥 4h。

[0067] 5. 组装:将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次由上至下呈阶梯状固定于不干胶底板上,样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分之间有重叠部分,切成规格宽度的试纸条。

[0068] 本发明的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条结果判定:

[0069] 将试纸条插入样品悬液中 10s 后取出,室温放置 3~10min,观察质控线及检测线显色情况,阳性反应检测线及质控线处各出现 1 条红色条带;阴性反应只质控线出现一条红色条带;若质控线不出现红色条带,则表示测试条失效。

[0070] 本发明的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条的特性分析：

[0071] 1. 试纸条的特异性分析

[0072] 用本发明的黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条检测黄海希瓦氏菌(编号 AP629、AP630、AP631 和 AP632)、鳃弧菌(HUFP 5001)、溶藻弧菌(KCCM 40513)、哈维弧菌(ATCC 14126)、副溶血弧菌(KCTC 2471)、杀鲑气单胞菌(MT 004)、鲷爱德华菌(ATCC 33202)、大肠杆菌(ATCC 29532),同时以 PBS 为阴性对照,评价特异性及交叉反应情况,所用细菌浓度为 10^8 cells/mL。结果显示,用试纸条检测鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维弧菌、副溶血弧菌、杀鲑气单胞菌、鲷爱德华菌、大肠杆菌均呈阴性,而黄海希瓦氏菌的检测结果均成阳性,说明本试纸条与测试菌株无交叉反应,特异性强。

[0073] 2. 试纸条的灵敏度检测

[0074] 取不同浓度(5×10^9 cells/ml 至 5×10^4 cells/ml)的黄海希瓦氏菌悬液,用胶体金试纸条检测,评价其最低检测量。结果显示试纸条的最低检测限为 5×10^5 cells/ml。

[0075] 3. 试纸条的稳定性测试

[0076] 将试纸条于 2-8℃ 密封保存 1 年,每隔 1 个月检测一次,各项指标均符合以上要求。

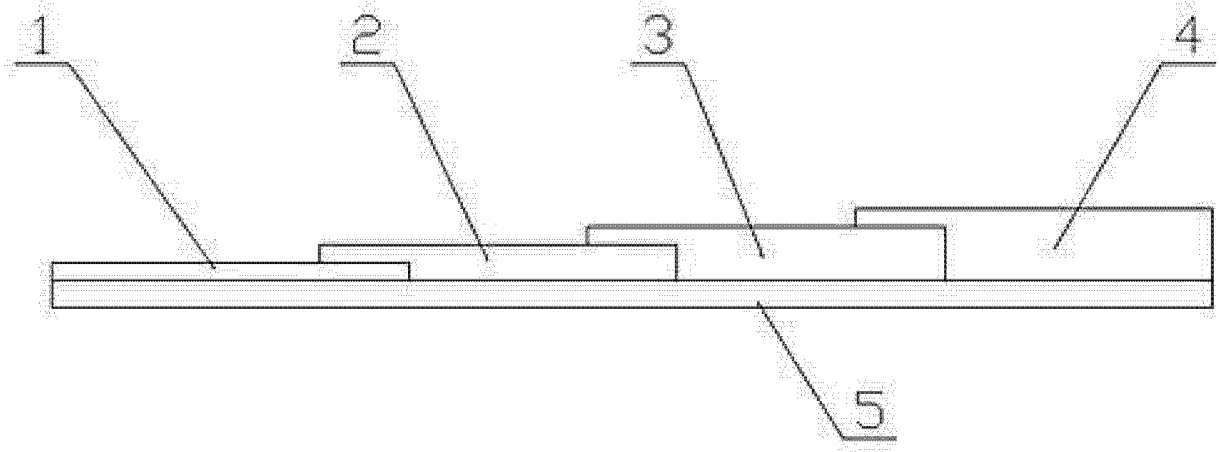


图 1

专利名称(译)	黄海希瓦氏菌胶体金免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN103278636B	公开(公告)日	2015-04-15
申请号	CN201310218943.7	申请日	2013-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	大连海洋大学		
申请(专利权)人(译)	大连海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连海洋大学		
[标]发明人	李强 李华 刘志强 叶仕根 景宏丽		
发明人	李强 李华 刘志强 叶仕根 景宏丽		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN103278636A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种可快速检测刺参“化皮病”病原菌——黄海希瓦氏菌的胶体金免疫层析试纸条及制备方法，有底板，在底板上从一端依次由上至下呈阶梯状地粘有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水垫，所述金标垫上喷涂有胶体金标记的黄海希瓦氏菌单克隆抗体，硝酸纤维素膜上有包被黄海希瓦氏菌多克隆抗体的检测线a及由羊抗鼠IgG构成的质控线b，所述黄海希瓦氏菌单克隆抗体是由保藏号为CGMCCNo.7303的杂交瘤细胞免疫小鼠，得小鼠腹水经纯化制备而成。

