



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107907680 B

(45)授权公告日 2020.02.18

(21)申请号 201710936059.5  
 (22)申请日 2017.09.30  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107907680 A  
 (43)申请公布日 2018.04.13  
 (73)专利权人 伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心  
 地址 835000 新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州伊犁河路304号  
 专利权人 新疆出入境检验检疫局检验检疫技术中心  
 新疆农业大学  
 (72)发明人 王振宝 季新成 员丽娟 何晓杰 雷程红 葛婷 叶尔保勒 叶尔兰·阿不都买金 阿斯喀·夏热甫汉 哈森

(51)Int.Cl.  
 G01N 33/569(2006.01)  
 G01N 33/558(2006.01)  
 G01N 33/532(2006.01)  
 (56)对比文件  
 CN 106872697 A,2017.06.20,  
 CN 107012251 A,2017.08.04,  
 CN 103412121 A,2013.11.27,  
 Ruth Waite.Preliminary studies into novel detection methods for honeybee pathogens.《Proceedings of XXXVIII International Apicultural Congress》.2003,  
 康熙雄.免疫胶体金层析技术.《免疫胶体金技术临床应用》.军事医学科学出版社,2010,  
 审查员 毕秀华

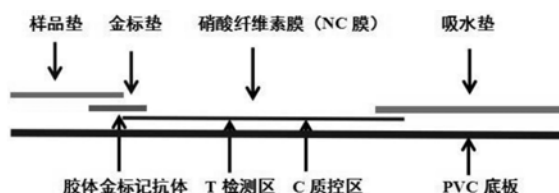
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸及其制备与应用

(57)摘要

本发明公开检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸及其制备与应用,具体包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,其中金标垫上含有胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体,硝酸纤维素膜上有用PLMP蛋白多克隆抗体预包被的检测线,用羊抗兔IgG溶液预包被的质控线,制备的胶体金免疫试纸特异性强,对阴性菌液均无检出情况,特异度可达100%,灵敏性较好,对幼虫芽孢杆菌的菌液及阳性样品最低检出浓度分别为 $10^5$  CFU/mL和 $10^6$  CFU/mL,检测重复性好,性能稳定,保存期达到3个月。



1. 检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,其特征在于,具体包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,所述的金标垫上含有胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,其特征在于,所述的硝酸纤维素膜上有用PLMP蛋白多克隆抗体预包被的检测线,用羊抗兔IgG溶液预包被的质控线。

3. 如权利要求1所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,其特征在于,所述的胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体的标金量为 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4. 如权利要求2所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,其特征在于,所述的检测线的抗体包被浓度为 $1.2\text{mg}/\text{mL}$ ,抗体包被体积为 $1.5\mu\text{L}$ 。

5. 如权利要求2所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,其特征在于,所述的质控线的抗体包被浓度为 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ ,抗体包被体积为 $1.5\mu\text{L}$ 。

6. 如权利要求1所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸的制备方法,其特征在于,具体采用以下技术步骤:

(1) 制备胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体:吸取 $10\text{mL}$ 胶体金溶液于已经酸洗、硅化处理好的离心管中,置于涡旋振荡器上,调至 $1500\text{r}/\text{min}$ ,逐滴加入 $0.2\text{mol}/\text{L}$ 的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液 $150\mu\text{L}$ ,同时振荡混匀以调至 $\text{pH}9.0$ ,逐滴加入 $240\mu\text{g}$ 的PLMP蛋白多克隆抗体, $1500\text{r}/\text{min}$ 振荡混匀 $10\text{min}$ ,随后加入 $10\%$ 的BSA使其终浓度为 $1\%$ ,振荡混匀后静置 $30\text{min}$ ;将标记好的胶体金抗体溶液于 $4^\circ\text{C}$ , $1000\text{r}/\text{min}$ 离心 $10\text{min}$ 后取上清液,上清液置于 $4^\circ\text{C}$ , $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 $10\text{min}$ ,将上清液和沉淀分开,收集沉淀,上清液再置于 $4^\circ\text{C}$ , $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 $30\text{min}$ ,收集两次沉淀即是纯化标记好的胶体金抗体复合物,取体积为最初未经纯化的金标记抗体溶液体积的 $1/10$ 为胶体金重悬液用量,将其加入至两次收集的沉淀中,重悬沉淀即为纯化好的金标抗体,于 $4^\circ\text{C}$ 保存;

(2) 金标垫的制备:用干净的剪刀将金标垫裁剪成 $0.7\text{cm}\times 10\text{cm}$ 大小的长条,将裁剪好的金标垫浸泡在金标垫处理液中 $30\text{min}$ , $4^\circ\text{C}$ 过夜干燥,将已经纯化好的金标抗体溶液均匀滴于处理好的金标垫上,悬空平放,于室温下自然干燥,除去多余水分,而后置于 $4^\circ\text{C}$ 风干,密封保存;

(3) 检测线和质控线的制备:取两块经酸洗硅化处理过的玻璃片,移液器吸取PLMP蛋白多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗均匀涂于玻璃片的侧面,涂完后玻璃片侧面印于NC膜上,检测线与质控线间隔 $0.5\text{cm}$ ,将PLMP蛋白多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗包被在硝酸纤维素膜上的检测线和质控线,包被之后于室温自然干燥;

(4) 试纸条组装:将底板裁剪成宽为 $3.2\text{cm}/\text{条}$ ,先将硝酸纤维素膜底面粘贴于底板上,经抗体包被后的金标垫裁剪为 $6.0\text{cm}\times 0.7\text{cm}$ 压硝酸纤维素膜 $2\text{mm}$ 平铺粘贴在底板上,剪样品垫 $6.0\text{cm}\times 1.8\text{cm}$ 压金标垫 $2\text{mm}$ 粘贴在底板上,剪吸水垫 $6.0\text{cm}\times 1.7\text{cm}$ 压硝酸纤维素膜 $2\text{mm}$ 粘贴在底板上,在金标垫与样品垫连接处用衔接胶带粘住,压紧各层,用剪刀将组装好的试纸条裁切呈宽为 $3\text{mm}$ 的小条,密封干燥置于 $4^\circ\text{C}$ 保存。

7. 如权利要求6所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸的制备方法,其特征在于,所述的PLMP蛋白多克隆抗体由PLMP蛋白注射免疫家兔制备获得。

8. 如权利要求1所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸在检测蜂蜜、蜂蜡、成蜂和菌液中幼虫芽孢杆菌的应用。

9. 如权利要求8所述的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸在检测蜂蜜、蜂蜡、成蜂和菌液中幼虫芽孢杆菌的应用,其特征在於,具体采用以下技术步骤:

(1) 样品前处理:

(a) 蜂蜜:取5g蜂蜜充分溶解于40mL去离子水中,吸取100 $\mu$ L溶液,滴加到试纸条样品垫上,进行检测;

(b) 蜂蜡或成蜂:将蜂蜡或成蜂放入破壁管中,加入适当的双蒸水,固定在破壁仪上,进行破碎,破碎后取上清100 $\mu$ L进行检测;

(c) 菌液:无需处理,直接取100 $\mu$ L菌液样品,滴加到试纸条样品垫上,进行检测;

(2) 用胶体金层析试纸条检测:

将所取液体滴到样品垫上,室温下作用10-15min;

(3) 结果判定:

(a) 阳性:质控线、检测线均呈现红色条带,说明样本中有幼虫芽孢杆菌PLMP蛋白存在;

(b) 阴性:检测线不出现红色条带,质控线呈现红色条带,说明样本中没有幼虫芽孢杆菌PLMP蛋白存在;

(c) 失效:如果检测线、质控线均不出现红色条带或仅有检测线出现红色条带,说明试纸条失效。

## 检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸及其制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明主要涉及分子生物学技术领域,具体地说,本发明涉及多克隆抗体制备的技术领域。

### 背景技术

[0002] 美洲幼虫腐臭病(American foulbrood,AFB),是由幼虫芽孢杆菌(Paenibacillus larvae,P.larvae)引起的蜜蜂幼虫及蜂蛹的一种急性、烈性传染病。幼虫芽孢杆菌主要致病因子是一些胞外分泌的蛋白酶,研究表明,这些蛋白酶为含锌的金属蛋白酶(Paenibacillus larvae metaloproteases,PLMP),参与幼虫退化。此病危害严重,毁灭性强且只感染蜜蜂幼虫,在感染前期,幼虫体色由正常的珍珠白变为棕黄、褐色甚至黑褐色,房盖凹陷,潮湿色暗;在感染后期,幼虫死亡后的尸体能拉出2cm-3cm的细丝,散发鱼腥臭味,最后以黑褐色的鳞片状物紧贴在巢房壁。P.larvae芽孢抵抗力强,能抵抗热、化学物质,在高温干燥等恶劣环境下能存活多年。该病一旦发生极易造成蜂群衰弱及蜂群死亡。该病最初于英国发生,后传至欧美,现遍及全世界,世界动物卫生组织(OIE)将其列为法定报告动物疫病,我国将其列为二类动物疫病和进境动物检疫疫病。中国是养蜂大国,也是最大的蜂产品生产和出口国,该病对我目前对AFB的鉴国养蜂业的发展以及蜂产品质量已造成严重影响。

[0003] 目前对AFB的鉴定方法主要包括病原的分离鉴定和PCR方法,这些方法由于耗时、需特殊仪器设备和专业技术人员等,不利于现场快速诊断。为解决养蜂生产因具有流动性、分散性、野外作业等特点给蜂病诊断和防控带来的现实困难,因此建立一种准确、灵敏、利于现场快速诊断AFB的方法具有重要意义。尚未见关于采用免疫学方法进行检测AFB的报道,免疫分析方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)和胶体金免疫层析法(GICA),具有灵敏度高、特异性好、成本低、操作方便等特点,适于大批量样品筛选。GICA作为一种新的免疫学检测方法,既有免疫学方法的特异性,又有简便快速、不需仪器的特点,其在医学、动植物检疫、食品检测等多领域已得到了广泛应用。开发检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金试纸条有助于幼虫芽孢杆菌快速、准确的检测。

### 发明内容

[0004] 为了解决现有技术中蜜蜂幼虫芽孢杆菌的检测方法耗时较长,操作技术要求较高,不利于现场快速检测的问题,本发明旨在提供一种检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸及其制备与应用,建立一种准确、灵敏、利于现场快速检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的方法。

[0005] 本发明通过以下技术方案实现的:

[0006] 本发明具体提供一种检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,具体包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,其中金标垫上含有胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体,硝酸纤维素膜上有用 PLMP蛋白多克隆抗体预包被的检测线(T线),用羊抗兔IgG溶

液预包被的质控线(C线)。

[0007] 优选的,胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体的标金量为30 $\mu$ g/mL。

[0008] 优选的,检测线的抗体包被浓度为1.2mg/mL,抗体包被体积为 1.5 $\mu$ L。

[0009] 优选的,质控线的抗体包被浓度为1.0mg/mL,抗体包被体积为 1.5 $\mu$ L。

[0010] 同时,本发明提供上述检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸的制备方法,具体采用以下技术步骤:

[0011] (1) 制备胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体:吸取10mL胶体金溶液于已经酸洗、硅化处理好的离心管中,置于涡旋振荡器上,调至1500r/min,逐滴加入0.2mol/L的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液150 $\mu$ L,同时振荡混匀以调至pH 9.0,逐滴加入240 $\mu$ g的PLMP蛋白多克隆抗体,1500r/min振荡混匀10min,随后加入10%的BSA使其终浓度为1%,振荡混匀后静置30min;将标记好的胶体金抗体溶液于4 $^{\circ}$ C,1000 r/min离心10min后取上清液,上清液置于4 $^{\circ}$ C,5000r/min离心10 min,将上清液和沉淀分开,收集沉淀,上清液再置于4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心30min,收集两次沉淀即是纯化标记好的胶体金抗体复合物,取体积为最初未经纯化的金标记抗体溶液体积的1/10为胶体金重悬液用量,将其加入至两次收集的沉淀中,重悬沉淀即为纯化好的金标抗体,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0012] (2) 金标垫的制备:用干净的剪刀将金标垫裁剪成0.7cm $\times$ 10 cm大小的长条,将裁剪好的金标垫浸泡在金标垫处理液中30min,4 $^{\circ}$ C过夜干燥,将已经纯化好的金标抗体溶液均匀滴于处理好的金标垫上,悬空平放,于室温下自然干燥,除去多余水分,而后置于4 $^{\circ}$ C风干,密封保存。

[0013] (3) 检测线和质控线的制备:取两块经酸洗硅化处理过的玻璃片,移液器吸取PLMP蛋白多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗均匀涂于玻璃片的侧面,涂完后玻璃片侧面印于NC膜上,检测线与质控线间隔0.5 cm,将PLMP蛋白多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗包被在硝酸纤维素膜上的检测区和质控区,包被之后于室温自然干燥。

[0014] (4) 试纸条组装:将底板裁剪成宽为3.2cm/条,先将硝酸纤维素膜底面粘贴于底板上,经抗体包被后的金标垫裁剪为6.0cm $\times$ 0.7cm 压硝酸纤维素膜2mm平铺粘贴在底板上,剪样品垫6.0cm $\times$ 1.8cm 压金标垫2mm粘贴在底板上,剪吸水垫6.0cm $\times$ 1.7cm压硝酸纤维素膜2mm粘贴在底板上,在金标垫与样品垫连接处用衔接胶带粘住,压紧各层,用剪刀将组装好的试纸条裁切呈宽为3mm的小条,密封干燥置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0015] 优选的,本发明采用的PLMP蛋白多克隆抗体由PLMP蛋白注射免疫家兔制备获得。

[0016] 进一步,本发明还提供上述检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸在检测蜂蜜、蜂蜡、成蜂和菌液中幼虫芽孢杆菌的应用方法,具体采用以下技术步骤:

[0017] (1) 样品前处理:

[0018] (a) 蜂蜜:取5g蜂蜜充分溶解于40mL去离子水中,吸取100 $\mu$  L溶液,滴加到试纸条样品垫上,进行检测。

[0019] (b) 蜂蜡或成蜂:将蜂蜡或成蜂放入破壁管中,加入适当的双蒸水,固定在破壁仪上,进行破碎。破碎后取上清100 $\mu$ L进行检测。

[0020] (c) 菌液:无需处理,直接取100 $\mu$ L菌液样品,滴加到试纸条样品垫上,进行检测。

[0021] (2) 用胶体金层析试纸条检测:

[0022] 将所取液体滴到样品垫上,室温下作用10-15min。

[0023] (3) 结果判定

[0024] (a) 阳性:质控线、检测线均呈现红色条带,说明样本中有幼虫芽孢杆菌PLMP蛋白存在。

[0025] (b) 阴性:检测线不出现红色条带,质控线呈现红色条带,说明样本中没有幼虫芽孢杆菌PLMP蛋白存在。

[0026] (c) 失效:如果检测线、质控线均不出现红色条带或仅有检测线出现红色条带,说明试纸条失效。

[0027] 通过实施本发明的技术方案,可以达到以下有益效果:

[0028] (1) 本发明提供的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸,特异性强,对阴性菌液均无检出情况,特异度可达100%,灵敏性较好,对幼虫芽孢杆菌的菌液及阳性样品最低检出浓度分别为 $10^5$  CFU/mL和 $10^6$ CFU/mL。

[0029] (2) 本发明提供的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸检测重复性好,性能稳定,保存期可以达到3个月,使用方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

## 附图说明

[0030] 图1显示为检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫层析试纸模式图。

[0031] 图2显示为实施例五中胶体金免疫层析试纸条的结果判断示意图。

[0032] 图3显示为试纸条特异性测试结果。其中试纸条1为幼虫芽孢杆菌菌液,试纸条2为蜂房链球菌菌液,试纸条3为蜜蜂败血杆菌菌液,试纸条4为蜜蜂哈夫尼肠杆菌菌液,试纸条5为双蒸水。

## 具体实施方式

[0033] 下面,举实施例说明本发明,但是,本发明并不限于下述的实施例。

[0034] 本发明采用的羊抗兔IgG、胶体金溶液、四氯金酸,过滤样品垫、胶体金垫、吸水垫、硝酸纤维素膜(Millipore135)、PVC底板、塑料卡、衔接胶带均购自上海捷宁生物科技有限公司;BSA,购自Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯试剂均自常规渠道购买,PLMP蛋白多克隆抗体由PLMP蛋白注射免疫家兔,采用本领域常规技术手段制备获得的兔抗体血清。

[0035] 本发明中选用的所有材料、试剂和仪器都为本领域熟知的,但不限制本发明的实施,其他本领域熟知的一些试剂和设备都可适用于本发明以下实施方式的实施。

[0036] 实施例一:PLMP多抗的纯化

[0037] 1、血清预处理

[0038] 用干净的注射器抽取6mL兔血清,用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤。

[0039] 2、辛酸沉淀非IgG蛋白

[0040] 取50mL高压灭菌后的离心管,加入24mL的乙酸缓冲液和6mL 经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后的兔血清,振荡混匀,用1mol/L NaOH将其pH调至4.5。加入正辛酸2.25mL,于室温中搅拌30min,10000rpm 离心20min后,弃去沉淀。注射器吸取剩余液体部分,用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,加入1/10体积的0.01mol/L的PBS溶液(PH=7.4),再用1mol/L NaOH将pH调至7.4,置冰浴中进行后续实验。

## [0041] 3、硫酸铵沉淀IgG

[0042] 冰浴环境下,向上述溶液中加入等体积的饱和硫酸铵,搅拌混匀 30min,然后静置 2h,4℃,10000rpm离心20min,弃去上清。剩余沉淀用0.01 mol/L PBS溶液溶解。沉淀溶解后,装入透析袋中,先用ddH<sub>2</sub>O透析2h,再用0.01mol/L PBS于4℃透析过夜,期间每4h 更换透析液。最后4℃,10000rpm离心10min,收集上清。

## [0043] 实施例二:金标垫的制备

## [0044] 1、胶体金最适pH值的确定

[0045] 本试验以加入0.2mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>的量为标准。取10个1.5mL的离心管并标记好号码,在各个离心管中分别加入1mL的胶体金溶液。向各个离心管中分别加入一定量的0.2mol/L的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>充分混匀(如表3-2所示),随后向各管中加入30μg经纯化的多克隆抗体,再次混匀,于室温静置30min。向每个离心管中缓慢加入20μL10% NaCl溶液,充分混匀后室温静置2小时。观察10个离心管的颜色变化及有无沉淀聚集的黑色颗粒出现。选择开始无聚集的那一管的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液的加入量,则为本试验中胶体金最适0.2mol/L的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>的加入量,即最适pH值。用精确pH试纸确定其数值,结果如表1。

## [0046] 表1:胶体金标记抗体最适pH的测定

[0047]

项 目	管 号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
胶体金 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
抗体 (μg)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

[0048]

0.2mol/LK <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	0
10%NaCl (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

[0049] 按照表1所排顺序观察可见,第1-3管有不同程度的变蓝聚沉现象,第4-9管的颜色呈透明酒红色,第4管的比第10管(对照)稍微深一些,说明胶体金与多抗的吸附较好,故而选用第4管所对应0.2 mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>量。使用精密pH试纸检测,加入0.2mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>的量为20μL时,胶体金溶液的pH值为9.0。因此,胶体金标记的最佳 pH值为9.0。

## [0050] 2、抗体最佳标记量的确定

[0051] 取10个经高压灭菌后的1.5mL离心管,每管加1.0mL胶体金溶液。根据3.1.8.1中确定的胶体金最适pH值,向各个离心管中分别加入5μg、10μg、15μg、20μg、25μg、30μg、35μg、40μg、45μg的PLMP多克隆抗体(如表2所示),充分混匀,室温静置10min。向每个离心管中缓慢加入10%NaCl 20μl,混匀,静置30min,观察各管的颜色变化。以胶体金溶液的颜色不发生改变的多抗加入量为稳定胶体金的最低用量,在此基础上再增加20%的多抗量,即为1mL胶体金溶液的最佳抗体标记量。

## [0052] 表2:胶体金标记抗体最适量的测定

[0053]

项 目	管 号									
Item	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
胶体金 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
抗体 (μg)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	0
0.2mol/LK <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
10%NaCl (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

[0054] 将胶体金调至pH为9.0,用0.01mol/L的PBS (pH 7.4) 稀释多抗至0.2mg/mL。抗体含量少的管中,出现变蓝的聚沉现象,而加入抗体达到或超过最低稳定量时,离心管中溶液保持红色不变。按照表2所排顺序观察可见,第5管的抗体量为最低抗体加入量为25μg/mL,为了稳定胶体金抗体需在此基础上再增加20%做为最佳标记量。所以抗体的最佳标金量是30μg/mL。

[0055] 3、金标抗体溶液的制备

[0056] 吸取10mL胶体金溶液于已经酸洗、硅化处理好的离心管中,置于涡旋振荡器上,调至1500r/min,逐滴加入0.2mol/L的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液150μL,同时振荡混匀以调至pH 9.0,逐滴加入240μg的PLMP 蛋白多克隆抗体,1500r/min振荡混匀10min,随后加入10%的BSA 使其终浓度为1%,振荡混匀后静置30min;将标记好的胶体金抗体溶液于4℃,1000r/min离心10min后取上清液,上清液置于4℃, 5000r/min离心10min,将上清液和沉淀分开,收集沉淀,上清液再置于4℃,10000r/min离心30min,收集两次沉淀即是纯化标记好的胶体金抗体复合物,取体积为最初未经纯化的金标记抗体溶液体积的 1/10为胶体金重悬液用量,将其加入至两次收集的沉淀中,重悬沉淀即为纯化好的金标抗体,于4℃保存。

[0057] 4、金标垫的制备

[0058] 用干净的剪刀将金标垫裁剪成0.7cm×10cm大小的长条,将裁剪好的金标垫浸泡在金标垫处理液中30min,4℃过夜干燥,将已经纯化好的金标抗体溶液均匀滴于处理好的金标垫上,悬空平放,于室温下自然干燥,除去多余水分,而后置于4℃风干,密封保存。

[0059] 实施例三:检测线和质控线的制备

[0060] 1、检测线包被抗体浓度的确定

[0061] 在检测线的NC膜上,分别滴加用PBS稀释的浓度为0.4mg/mL、0.6mg/mL、0.8mg/mL、1.0mg/mL、1.2mg/mL、1.4mg/mL、1.6 mg/mL、1.8mg/mL的1μL PLMP多抗,在质控线的NC膜上,滴加用PBS稀释的浓度为1.0mg/mL的羊抗兔IgG抗体1.0μL。用10 μg/mL纯化的PLMP蛋白进行检测,观察检测线显色情况,确定包被抗体的最佳浓度。

[0062] 当C线包被1.5μL浓度为1mg/mL的羊抗兔IgG抗体时,将 PLMP蛋白多抗设8个浓度梯度,用PLMP蛋白进行检测,观察可见,当其浓度由1.0mg/mL稀释至0.4mg/mL时颜色变浅,当其浓度由1.2 mg/mL到1.8mg/mL时,颜色逐渐变深。故选择浓度为1.2mg/mL的 PLMP蛋白多抗为T线最佳抗体包被浓度。

[0063] 2、检测线包被抗体体积的确定

[0064] 在确定检测线包被抗体的浓度的基础上,在检测线的NC膜上,分别滴加0.75μL、1.0μL、1.25μL、1.5μL、2.0μL的PLMP多抗。用PLMP蛋白进行检测,结果显示,1.5μL PLMP蛋白多抗为T线最佳抗体包被体积。

[0065] 3、质控线最佳包被条件的确定

[0066] (1) 质控线包被抗体浓度的确定

[0067] 在已确定的检测线最佳条件下,将经PBS稀释的浓度分别为0.2 mg/mL、0.4mg/mL、0.6mg/mL、0.8mg/mL、1.0mg/mL、1.2mg/mL、1.4mg/mL的羊抗兔IgG抗体,各取1.0 $\mu$ l滴加于质控线的NC膜上。用PLMP蛋白进行检测,确定包被抗体的最佳浓度。

[0068] (2) 质控线包被抗体体积的确定

[0069] 将羊抗兔IgG抗体,分别按0.75 $\mu$ L、1.0 $\mu$ L、1.25 $\mu$ L、1.5 $\mu$ L、2.0 $\mu$ L的体积包被于质控线的NC膜上。用PLMP蛋白进行检测,确定包被抗体的最佳体积。

[0070] 将羊抗兔IgG抗体按比例稀释后包被C线,进行试纸条检测,结果显示,C线包被浓度为1.0mg/mL,抗体体积为1.5 $\mu$ L时,检测效果最佳。

[0071] 4、硝酸纤维素膜的预处理

[0072] 取两块经酸洗硅化处理过的玻璃片,移液器吸取PLMP蛋白多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗均匀涂于玻璃片的侧面,涂完后玻璃片侧面印于NC膜上,检测线与质控线间隔0.5cm,将PLMP蛋白多克隆抗体、羊抗兔IgG二抗包被在硝酸纤维素膜上的检测区和质控区,包被之后于室温自然干燥。

[0073] 实施例四:试纸条组装

[0074] 将底板裁剪成宽为3.2cm/条,先将硝酸纤维素膜底面粘贴于底板上,经抗体包被后的金标垫裁剪为6.0cm $\times$ 0.7cm压硝酸纤维素膜2mm平铺粘贴在底板上,剪样品垫6.0cm $\times$ 1.8cm压金标垫2mm 粘贴在底板上,剪吸水垫6.0cm $\times$ 1.7cm压硝酸纤维素膜2mm粘贴在底板上,在金标垫与样品垫连接处用衔接胶带粘住,压紧各层,用剪刀将组装好的试纸条裁切呈宽为3mm的小条,密封干燥置于4 $^{\circ}$ C保存,胶体金免疫层析试纸条模式图如附图1所示。

[0075] 实施例五:检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸的应用方法

[0076] (1) 样品前处理:

[0077] (a) 蜂蜜:取5g蜂蜜充分溶解于40mL去离子水中,吸取100 $\mu$  L溶液,滴加到试纸条样品垫上,进行检测。

[0078] (b) 蜂蜡或成蜂:将蜂蜡或成蜂放入破壁管中,加入适当的双蒸水,固定在破壁仪上,进行破碎。破碎后取上清100 $\mu$ L进行检测。

[0079] (c) 菌液:无需处理,直接取100 $\mu$ L菌液样品,滴加到试纸条样品垫上,进行检测。

[0080] (2) 用胶体金层析试纸条检测:

[0081] 将所取液体滴到样品垫上,室温下作用10-15min。

[0082] (3) 结果判定

[0083] (a) 阳性:质控线、检测线均呈现红色条带,说明样本中有幼虫芽孢杆菌PLMP蛋白存在。

[0084] (b) 阴性:检测线不出现红色条带,质控线呈现红色条带,说明样本中没有幼虫芽孢杆菌PLMP蛋白存在。

[0085] (c) 失效:如果检测线、质控线均不出现红色条带或仅有检测线出现红色条带,说明试纸条失效。如附图2所示胶体金免疫层析试纸条的结果判断。

[0086] 实施例六:试纸条性能的测试

[0087] 1、试纸条特异性的测试

[0088] 分别将100 $\mu$ L的蜂房链球菌菌液、蜜蜂败血杆菌菌液、蜜蜂哈夫尼肠杆菌菌液、双蒸水滴至胶体金试纸条的加样垫上,10 min后结果如附图3所示,即检测幼虫芽孢杆菌阳性菌液样品的试纸条T线和 C线明显出现了红线,结果正确;阴性样品均只在质控线C线出现了红色,结果正确。

[0089] 2、试纸条敏感性的测试

[0090] 用同一批制备的胶体金试纸条,将幼虫芽孢杆菌菌液按 $10^8$  CFU/mL、 $10^7$ CFU/mL、 $10^6$ CFU/mL、 $10^5$ CFU/mL、 $10^4$ CFU/mL、 $10^3$ CFU/mL的稀释后进行检测,观察可见,1-2号试纸条T线在10-15 min之内未出现红线,3-6号试纸条T线在10-15min之内出现红色。由此确定试纸条对PLMP蛋白的检出限为 $10^5$ CFU/mL,可用于蜜蜂幼虫芽孢杆菌的检测。

[0091] 3、试纸条稳定性的测试

[0092] 将幼虫芽孢杆菌阳性菌液用置于4 $^{\circ}$ C和室温保存的试纸条检测,分别将7d、15d、30d、60d、90d进行数据整理,结果如表3所示,试纸条置于4 $^{\circ}$ C可保存3个月;室温保存至少1个月。

[0093] 表3:试纸条稳定性试验结果

[0094]

保存时间	保存温度	显色结果
7 d	4 $^{\circ}$ C	++++
	常温	++++
15 d	4 $^{\circ}$ C	++++
	常温	++++
30 d	4 $^{\circ}$ C	++++
	常温	+++
60 d	4 $^{\circ}$ C	+++
	常温	++
90 d	4 $^{\circ}$ C	+++
	常温	+

[0095] 注:“++++”表示显色明显,条带清晰;“+++”表示显色明显,条带清晰但颜色稍变淡;“++”表示T线颜色变淡,但检测结果准确;“+”表示T、C线颜色均变淡,但检测样品的阴阳性准确。

[0096] 4、试纸条重复性的测试

[0097] 用不同批次的试纸条分别检测幼虫芽孢杆菌阳性及阴性菌液,进行批间重复性试验。另外用同一批次的试纸条检测上述菌液,进行批内重复性试验。得到的结果一致,说明重复性较好。

[0098] 5、临床样品的检测

[0099] 本试验利用SN/T 1681-2011中PCR方法及研制的幼虫芽孢杆菌胶体金试纸对伊犁新源县10个蜂场采集到的40份蜜蜂幼虫、52份蜂蜜、22份蜂蜡及243只成蜂进行检测,结果如表4所示,特异度达到100%。

[0100] 表4:临床样品检测结果

[0101]

检测方法	阳性样品	阴性样品	阳性率
PCR	0	357	0
胶体金试纸条	0	357	0

[0102] 6、人工模拟污染样品的检测

[0103] 分别取1mL经双蒸水稀释的蜂蜜、经研磨的幼虫及蜂蜡，与1mL 浓度分别为 $10^9$ CFU/mL、 $10^8$ CFU/mL、 $10^7$ CFU/mL、 $10^6$ CFU/mL、 $10^5$ CFU/mL的幼虫芽孢杆菌菌液，充分混合，制备成人工模拟的污染样品。用本研究制备的胶体金试纸条对上述样品进行检测，应用本研究中制备的胶体金试纸条分别对处理后加入不同浓度的幼虫芽孢杆菌菌液进行人工模拟污染样品检测，结果显示蜂蜜最低检出幼虫芽孢杆菌浓度为 $10^6$ CFU/mL，蜜蜂幼虫最低检出幼虫芽孢杆菌浓度为 $10^5$ CFU/mL，蜂蜡最低检出幼虫芽孢杆菌浓度为 $10^5$ CFU/mL。

[0104] 综上所述，本发明提供的检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸，特异性强，对阴性菌液均无检出情况，特异度可达100%，灵敏性较好，对幼虫芽孢杆菌的菌液及阳性样品最低检出浓度分别为 $10^5$  CFU/mL和 $10^6$ CFU/mL；而且本胶体金免疫试纸检测重复性好，性能稳定，保存期可以达到3个月，使用方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

[0105] 如上所述，即可较好地实现本发明，上述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行了描述，并非对本发明的范围进行限定，在不脱离本发明设计精神的前提下，本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种改变和改进，均应落入本发明确定的保护范围内。

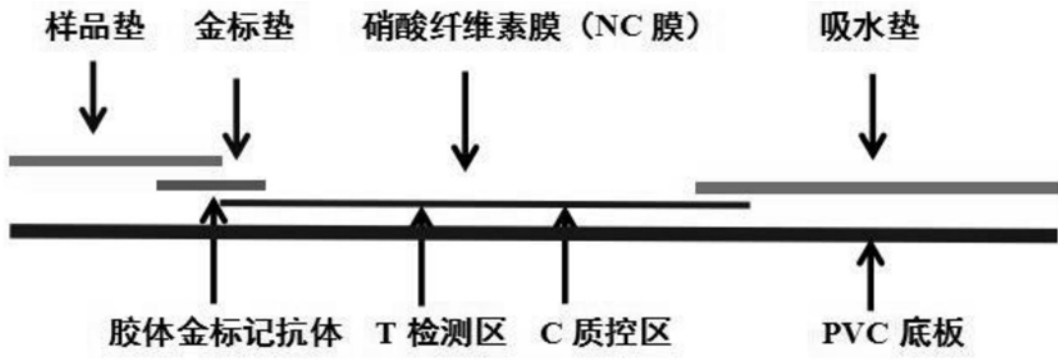


图1

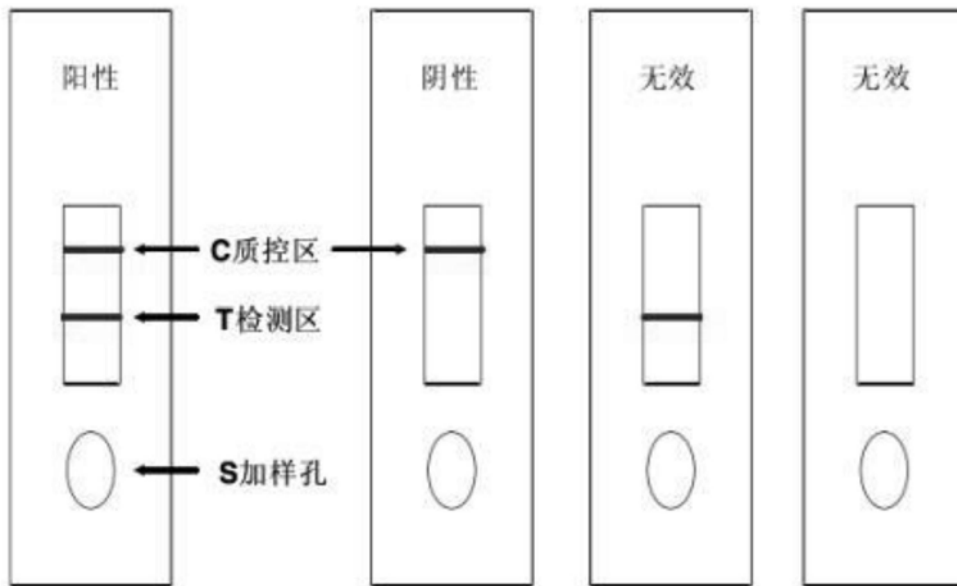


图2

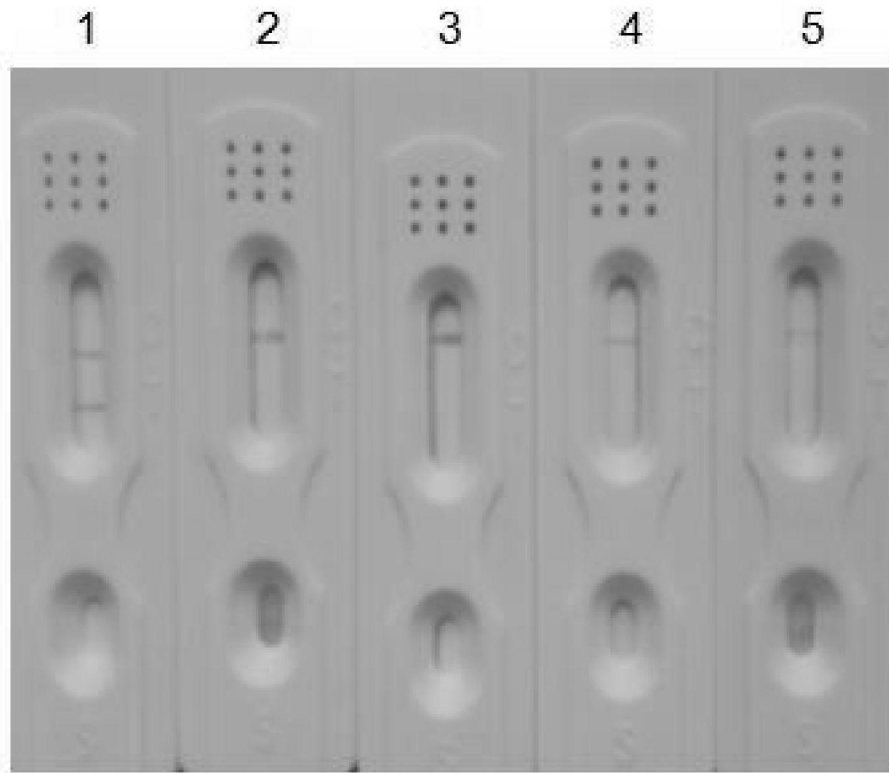


图3

专利名称(译)	检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸及其制备与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107907680B</a>	公开(公告)日	2020-02-18
申请号	CN2017110936059.5	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心 新疆出入境检验检疫局检验检疫技术中心 新疆农业大学		
申请(专利权)人(译)	伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心 新疆出入境检验检疫局检验检疫技术中心 新疆农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心 新疆出入境检验检疫局检验检疫技术中心 新疆农业大学		
[标]发明人	王振宝 季新成 员丽娟 何晓杰 雷程红 葛婷 叶尔保勒 叶尔兰阿不都买金 阿斯喀夏热甫汉 哈森		
发明人	王振宝 季新成 员丽娟 何晓杰 雷程红 葛婷 叶尔保勒 叶尔兰·阿不都买金 阿斯喀·夏热甫汉 哈森		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56911 G01N2333/32		
其他公开文献	CN107907680A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开检测蜜蜂幼虫芽孢杆菌的胶体金免疫试纸及其制备与应用，具体包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板，其中金标垫上含有胶体金标记的PLMP蛋白多克隆抗体，硝酸纤维素膜上有用PLMP蛋白多克隆抗体预包被的检测线，用羊抗兔IgG溶液预包被的质控线，制备的胶体金免疫试纸特异性强，对阴性菌液均无检出情况，特异度可达100%，灵敏性较好，对幼虫芽孢杆菌的菌液及阳性样品最低检出浓度分别为105 CFU/mL和106 CFU/mL，检测重复性好，性能稳定，保存期达到3个月。

