



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103823055 B

(45)授权公告日 2017.01.11

(21)申请号 201310634981.0

审查员 肖吉

(22)申请日 2013.12.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103823055 A

(43)申请公布日 2014.05.28

(73)专利权人 南京师范大学

地址 210097 江苏省南京市鼓楼区宁海路  
122号

(72)发明人 王文 安亮 任梦 肖政云 顾伟  
孟庆国 任乾

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

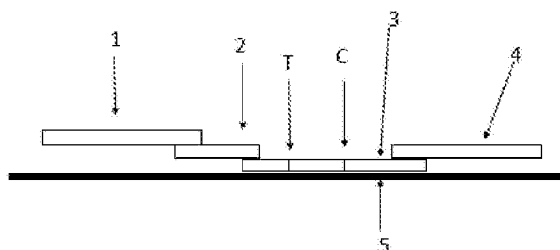
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条及其制备方法,该试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫、PVC板组成,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次固定在PVC板上;结合垫上喷涂有免疫胶体金颗粒的抗虾蟹螺原体多克隆抗体,所述硝酸纤维素膜包括包被有抗虾蟹螺原体多克隆抗体的检测线和包被有羊抗兔IgG抗体的质控线。当加入的样品中含有螺原体时,螺原体首先与胶体金-兔抗螺原体多克隆抗体形成复合物,在毛细作用下迁移至包被有螺原体多克隆抗体的检测线时被捕捉,检测线呈红色,因而可检测样品中是否含有螺原体。该试纸条具有快速、简捷,灵敏度高,特异性好的优点。



1. 一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条,其特征在於:该试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫、PVC板组成,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次固定在PVC板上;其特征在於所述结合垫是无纺布结合垫,其中喷涂有浓度为 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,喷涂量为 $30\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 的免疫胶体金颗粒标记的抗虾蟹螺原体多克隆抗体,可与样品中的虾蟹螺原体发生抗原-抗体特异性结合;所述硝酸纤维素膜包括包被有抗虾蟹螺原体多克隆抗体的检测线和包被有羊抗兔IgG抗体的质控线;其中,抗虾蟹螺原体多克隆抗体包被到硝酸纤维素膜上浓度为 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ ,包被参数为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ ,羊抗兔IgG抗体包被到硝酸纤维素膜上浓度为 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ ,包被参数为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ ;所述虾蟹螺原体多克隆抗体的效价为1:16384和1:65536;胶体金溶液的金颗粒粒径为 $40\sim 50\text{nm}$ ,胶体金溶液的 $\text{pH}=8$ ;所述检测线与质控线之间的间隔为 $5.0\text{mm}$ 。

2. 一种制备权利要求1所述的虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条的方法,其特征在於:该方法包括以下步骤:

(1) 虾蟹螺原体多克隆抗体制备及测定:采用经甲醛灭活后的虾蟹螺原体全菌作为免疫抗原,经4次人工免疫健康的新西兰大白兔,抽血进行效价测定,分离高效价虾蟹螺原体多克隆抗体并进行纯化;

(2) 纳米胶体金颗粒的制备:采用柠檬酸三钠作为还原剂制备 $40\sim 50\text{nm}$ 胶体金溶液,并调整胶体金溶液的 $\text{pH}$ 至8,备用;

(3) 制备抗虾蟹螺原体多克隆抗体的胶体金结合标记物:在电磁搅拌器下将抗虾蟹螺原体多克隆抗体缓慢加入备用的胶体金溶液中,虾蟹螺原体多克隆抗体的质量和胶体金溶液的体积比为0.015:1,经纯化和浓缩后形成胶体金结合标记的虾蟹螺原体多克隆抗体;

(4) 结合垫的制备:结合垫上喷涂的胶体金结合标记的虾蟹多克隆抗体的浓度为 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,喷涂量为 $30\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ;

(5) 抗体固相硝酸纤维素膜的制备:将抗虾蟹螺原体多克隆抗体包被到硝酸纤维素膜上的检测线位置作为检测线捕获抗体,浓度为 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ ,包被参数为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ ,抗结合抗体的羊抗兔IgG抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控线位置作为质控线捕获抗体,浓度为 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ ,包被参数为 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ ;

(6) 将吸收垫、带有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫、PVC板组装成胶体金免疫层析检测试纸条。

3. 根据权利要求2所述的制备虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条的方法,其特征在於所述(1)步骤虾蟹螺原体多克隆抗体效价分别为1:16384和1:65536,用Protein A亲和层析柱纯化多克隆抗体,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定抗体浓度并调整为 $2\text{mg}/\text{ml}$ 。

4. 根据权利要求3所述的制备虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条的方法,其特征在於所述(5)步骤检测线与质控线之间的间隔为 $5.0\text{mm}$ 。

## 一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种虾蟹螺原体胶体金免疫层析检测试纸条及其制备和在虾蟹螺原体检测上的应用。

### 背景技术

[0002] 中华绒螯蟹螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*菌株保藏号CCTCC M207170<sup>T</sup>=DSM21848<sup>T</sup>)是一种新型虾蟹病原,不仅是河蟹“颤抖病”的致病菌,也是引起克氏原螯虾、南美白对虾和罗氏沼虾等水生甲壳动物重大疫病的致病菌,给养殖业带来巨大损失。目前虾蟹螺原体病原的检测可以利用光镜、电镜、PCR、ELISA、培养等检测技术,但这些技术(除ELISA外)都需要相关的仪器、设备和技术,无法在用于现场快速检测。而我们前期建立的ELISA快速检测技术,虽然可以用于生产实际的现场快速检测,但由于操作步骤较多,检测花费需要3h,操作者还需要进行培训。所以,需要研制一种更为简便、快速、廉价和适应性广的技术,有利于推广和应用。

[0003] 胶体金免疫层析技术由于其快速、便捷,不需特殊设备,结果判断直观等优势,越来越受到人们的重视。迄今为止,还未见有虾蟹螺原体免疫胶体金试纸条方法建立的报道。胶体金免疫试纸条与其他诊断方法相比较,体现出以下特点:①快捷迅速,可在5~15min内显示结果;②灵敏准确,结果受外因影响较小,可在对虾养殖场现场进行检测;③操作简单,不需要任何特殊仪器和设备,尤其适合在基层推广应用;④成本低廉,所需样本和试剂量少;⑤保存和运输方便,一般保存于4℃冰箱,甚至可常温保存,而且保存期可以长达2年。本发明利用多克隆抗体和胶体金标记技术建立虾蟹螺原体胶体金免疫层析快速检测方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是以多克隆抗体为基础,通过免疫胶体金标记技术研制一种操作简单、成本低廉、快捷迅速的检测虾蟹螺原体的胶体金检测试纸条。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条,它包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫、PVC板。其中,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次固定在PVC板上;其特征在于所述结合垫是无纺布结合垫,其中喷涂有免疫胶体金颗粒的抗虾蟹螺原体多克隆抗体,可与样品中的虾蟹螺原体发生抗原-抗体特异性结合;所述硝酸纤维素膜包括包被有抗虾蟹螺原体多克隆抗体的检测线和包被有羊抗兔IgG抗体的质控线。

[0006] 一种上述试纸条的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0007] (1)虾蟹螺原体多克隆抗体制备:采用经甲醛灭活后的螺原体全菌作为免疫抗原,经4次人工免疫健康的新西兰大白兔,抽血进行效价测定,分离高效价螺原体多克隆抗体并进行纯化;

[0008] (2)纳米胶体金颗粒的制备:采用柠檬酸三钠作为还原剂制备40~50nm胶体金溶

液,并调整胶体金溶液的pH至8,备用;

[0009] (3)制备抗虾蟹螺原体多克隆抗体的胶体金标记物:在电磁搅拌器下将抗虾蟹螺原体多克隆抗体缓慢加入备用的胶体金溶液中,虾蟹螺原体多克隆抗体的质量和胶体金溶液的体积比为0.015:1,经纯化和浓缩后形成胶体金标记的虾蟹螺原体多克隆抗体;

[0010] (4)结合垫的制备:结合垫上喷涂的胶体金标记的虾蟹多克隆抗体的浓度为15ug/ml,喷涂量为30ul/cm<sup>2</sup>;

[0011] (5)抗体固相硝酸纤维素膜的制备:将抗虾蟹螺原体多克隆抗体包被到硝酸纤维素膜上的检测线位置作为检测线捕获抗体,浓度为1.2mg/ml,包被参数为1μl/cm;抗金标抗体的羊抗兔IgG二抗喷涂到硝酸纤维素膜上的质控线位置作为质控线捕获抗体,浓度为1.2mg/ml,包被参数为1ul/cm;

[0012] (6)将吸收垫、带有检测线和质控线硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫、PVC板组装成胶体金免疫层析检测试纸条。

[0013] 其中,步骤(1)抗虾蟹螺原体多克隆抗体的制备:该多克隆抗体效价分别为1:16384和1:65536,用Protein A亲和层析柱纯化多克隆抗体,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定抗体浓度并调整为2mg/mL;

[0014] 将依次粘好的底板材料切成裁切成宽×长为0.3cm×6cm的长条即为虾蟹螺原体胶体金免疫层析检测试纸条,包装备用。

[0015] 用上述虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条检测的方法,包括:如图2所示,若将含有虾蟹螺原体检测样品加入随机抽取组装的试纸条中,虾蟹螺原体与金标抗体结合并在层析作用下与T线抗体结合,室温下作用15min,阳性结果出现两条红线,即检测线T线和质控线C线,T线显示该样品中含有虾蟹螺原体;若检测样品中不含有虾蟹螺原体,阴性结果只在质控线C线出现一条红线,显示该样品中没有虾蟹螺原体。

[0016] 本发明的积极效果在于:

[0017] (1)检测速度快:全过程15min内完成,现场即可出结果;

[0018] (2)高质量:本方法制备而成的试纸条特异性好、灵敏度高、重复性好;

[0019] (3)操作简单:本方法制备而成的试纸条以胶体金作为指示标记,快速定性,结果准确、快速,操作简便,只需要加样检测与结果记录;

[0020] (4)易于推广使用:操作人员无需专业培训,按说明书即可完成操作;

[0021] (5)成本低廉、运输方便、有效期长;

[0022] (6)安全稳定,胶体金无毒性,不造成环境污染。

## 附图说明

[0023] 图1为本发明虾蟹螺原体胶体金免疫层析检测试纸条的组装结构图。

[0024] 图2为本发明虾蟹螺原体胶体金免疫层析检测试纸条的原理模拟图及结果判定图。

[0025] 其中:1是样品垫;2是结合垫;T是检测线显色位置;C是质控线显色位置;3是硝酸纤维素膜;4是吸收垫;5是PVC板。

## 具体实施方式

[0026] 本发明采用的具体技术路线的步骤:

[0027] 一、抗原的制备

[0028] 将分离、培养获得的虾蟹螺原体病原CCTCC M207170,采用0.4%甲醛12-15小时灭活。灭活病原以12000r/min离心50分钟,洗涤,离心,重复3次,制备成抗原,用紫外分光光度计测定浓度,置于4℃冰箱保存备用。

[0029] 二、多克隆抗体制备、纯化和测定

[0030] 1、多克隆抗体制备

[0031] (1)将500 $\mu$ l抗原蛋白溶液溶入500 $\mu$ l弗氏完全佐剂中,用1ml注射器在新西兰大耳兔腹部皮下多点注射(第一次免疫);

[0032] (2)第一次免疫一周后,免疫抗原与弗氏不完全佐剂等比混匀,采用腹腔皮下多点注射方式(第二次免疫);

[0033] (3)第二次免疫一周后,免疫抗原与弗氏不完全佐剂等比混匀,采用腹腔皮下多点注射方式(第三次免疫);

[0034] (4)第三次免疫一周后,免疫抗原直接耳静脉注射,一周后,采用心脏采血,分离血清,-70℃保存,得到虾蟹螺原体多克隆抗体。

[0035] 2、多克隆抗体纯化和测定

[0036] 运用Protein A亲和层析柱对制备的虾蟹螺原体多克隆抗体进行纯化,并采用间接ELISA法对其效价进行测定。

[0037] 三、纳米胶体金颗粒制备

[0038] 采用柠檬酸三钠还原法制备40~50nm胶体金,先在玻璃烧瓶中加入100ml纯化水,于机械搅拌下加入3ml1%氯金酸溶液,用电热套加热至沸后再加入5ml1%柠檬酸三钠溶液,继续加热煮沸5分钟,直至溶液颜色呈玫瑰红色,待溶液冷却后用0.22 $\mu$ m的滤膜过滤,蒸馏水恢复至100ml体积;胶体金溶液棕色瓶4℃保存,备用,透射电镜下观察胶体金颗粒的均匀度及粒径。

[0039] 四、抗虾蟹螺原体多克隆抗体的胶体金标记物制备

[0040] (1)量取:准确移取胶体金50mL,置于含有搅拌子的小烧杯中,打开磁力搅拌器调至适当的速度;

[0041] (2)调pH:逐滴加入0.1mol/L  $K_2CO_3$ 调pH8.0为最佳值,室温搅拌5min;

[0042] (3)加多克隆抗体:逐滴缓慢加入最适标记量的多克隆抗体,室温搅拌30min;

[0043] (4)封闭:加入10%的BSA至终浓度为1%,继续搅拌10min;

[0044] (5)进一步封闭:4度静置1h;

[0045] (6)于4℃,10000rpm离心30分钟,弃上清液。

[0046] (7)浓缩:收集沉淀物,用重悬液润洗管壁并浓缩至5mL,置4℃备用。

[0047] 五、胶体金试纸条的制备

[0048] 1、试纸条各组成部分的制备

[0049] (1)硝酸纤维素膜(NC)的选择:应用已经选择好的胶体金,用不同流速的NC膜,包被虾蟹螺原体多克隆抗体于检测线和羊抗兔IgG二抗于质控线做流速试验,选择流速在5~10min的NC膜。

[0050] (2)封闭液的选择:分别选用0.01M pH7.2PBS缓冲液、0.01M pH8.0Tris-酸盐缓冲

液、0.02M pH9.6碳酸盐缓冲液作为封闭液,选最优结果。

[0051] (3)NC膜的喷洒:检测线喷洒纯化的虾蟹螺原体多克隆抗体,质控线喷洒羊抗兔IgG抗体,量的选择采取矩阵法。

[0052] (4)无纺布的滴加:将金标抗体做一定的稀释,稀释液为加入终浓度为0.01M pH7.2Tris、0.3%Casein、5%蔗糖、0.1%PVP40、0.2%Tween-20,按照每条试纸条约0.03ml/cm<sup>2</sup>量来滴加,选择最合适的滴加量,然后可将大批量滴加,在室温下干燥备用。

[0053] (5)无纺布的选择及处理:剪取无纺布素膜,分别于0.01M pH7.2PBS、0.1%Casein、5%蔗糖、0.1%PVP40、0.2%Tween-20,0.01M pH7.2PBS、0.2%Casein、5%蔗糖、0.1%PVP40、0.2%Tween-20,0.01M pH7.2Tris、0.3%Casein、5%蔗糖、0.1%PVP40、0.2%Tween-20中分别浸泡10min,取一定量金标抗体喷涂于无纺布上,室温干燥,选择最佳处理方法。

[0054] 2、试纸条的组装

[0055] 如图1,将NC膜3、结合垫2、吸收垫4和样品垫1依次粘在单面PVC板5上,其中结合垫2、吸收垫4均层叠在NC膜3上,分别与NC膜3重叠约2mm,样品垫1层叠于结合垫2上,二者重叠约2mm。NC膜3有检测线T和质控线C。用切割机将粘贴好的试纸板切成宽为3mm试纸条,将做好的试纸条与干燥剂一起装入铝箔袋内密封保存。

[0056] 六、结果判定

[0057] 将待检虾蟹血淋巴按照一定比例用配备的缓冲液进行稀释后滴入样品垫,15分钟后就可明显读出结果。如只出现质控线,说明样品呈阴性;如同时出现检测线和质控线,说明样品呈阳性;如没有出现任何线,说明此试纸条失效。

[0058] 七、试纸条的特异性、敏感性、重复性、再现性、稳定性试验

[0059] 1、试纸条的特异性试验

[0060] 用金黄色葡萄球菌*Staphylococcus Aureus*(ATCC6538)、大肠杆菌*Escherichia Coli*(ATCC8739)、枯草芽孢杆菌*Bacillus Subtilis*(ATCC6633)、副溶血弧菌*Vibrio Parahaemolyticus*(ATCC17802)、嗜水气单胞菌*Aeromonas Hydrophila*(ATCC17802)、南京农业大学于汉寿教授副教授馈赠的油菜花螺原体CR-1(于汉寿,阮康勤,纪燕玲,陈永萱,王志伟,3种植物花螺原体的分离及其基本特性,微生物学报,48(9):1141-1146,2008)、蜜蜂螺原体CH-1(微生物学报50(10):1366-1372,2010)代替虾蟹螺原体样品,对试纸条的特异性进行测定。检测结果显示,虾蟹螺原体胶体金试纸条不与所述细菌发生交叉反应,因此本实验室制备的该试纸条专一性强。

[0061] 2、试纸条的敏感性试验

[0062] 分别检测10<sup>8</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10CCU/mL的含虾蟹螺原体菌落,对试纸条的敏感性进行测定。检测结果显示,试纸条的敏感性为10<sup>4</sup>CCU/mL。

[0063] 3、试纸条的稳定性试验

[0064] 将同一批次的试纸条分别用塑料袋及铝箔密封,加干燥剂于4℃、-20℃、室温保存和在37℃做加速破坏试验,在不同的保存期与新制备的试剂条插入虾蟹螺原体样品中进行测定,通过检测试纸条显色的变化来确定试纸条的稳定性。

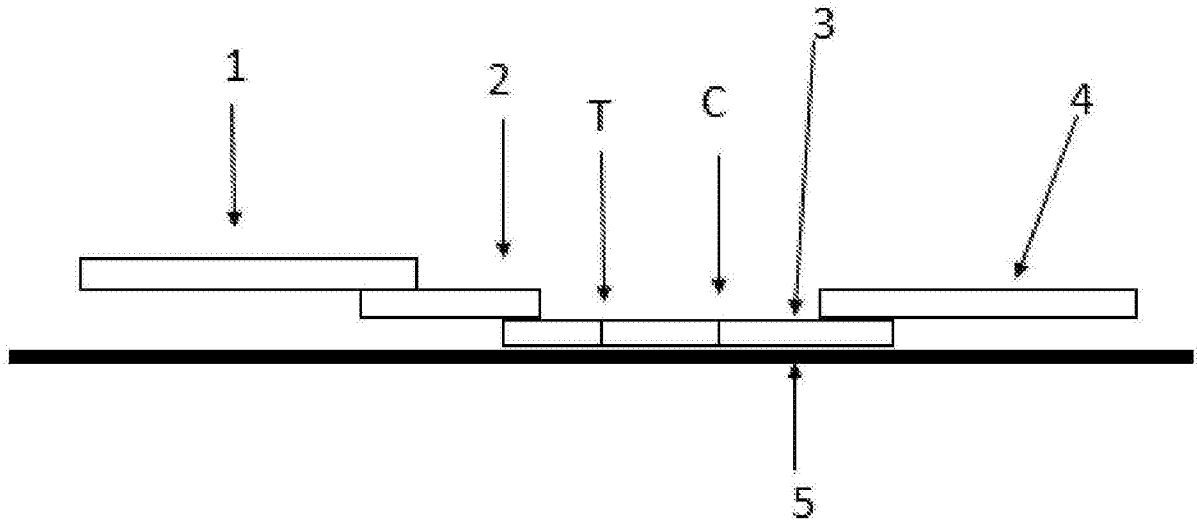


图1

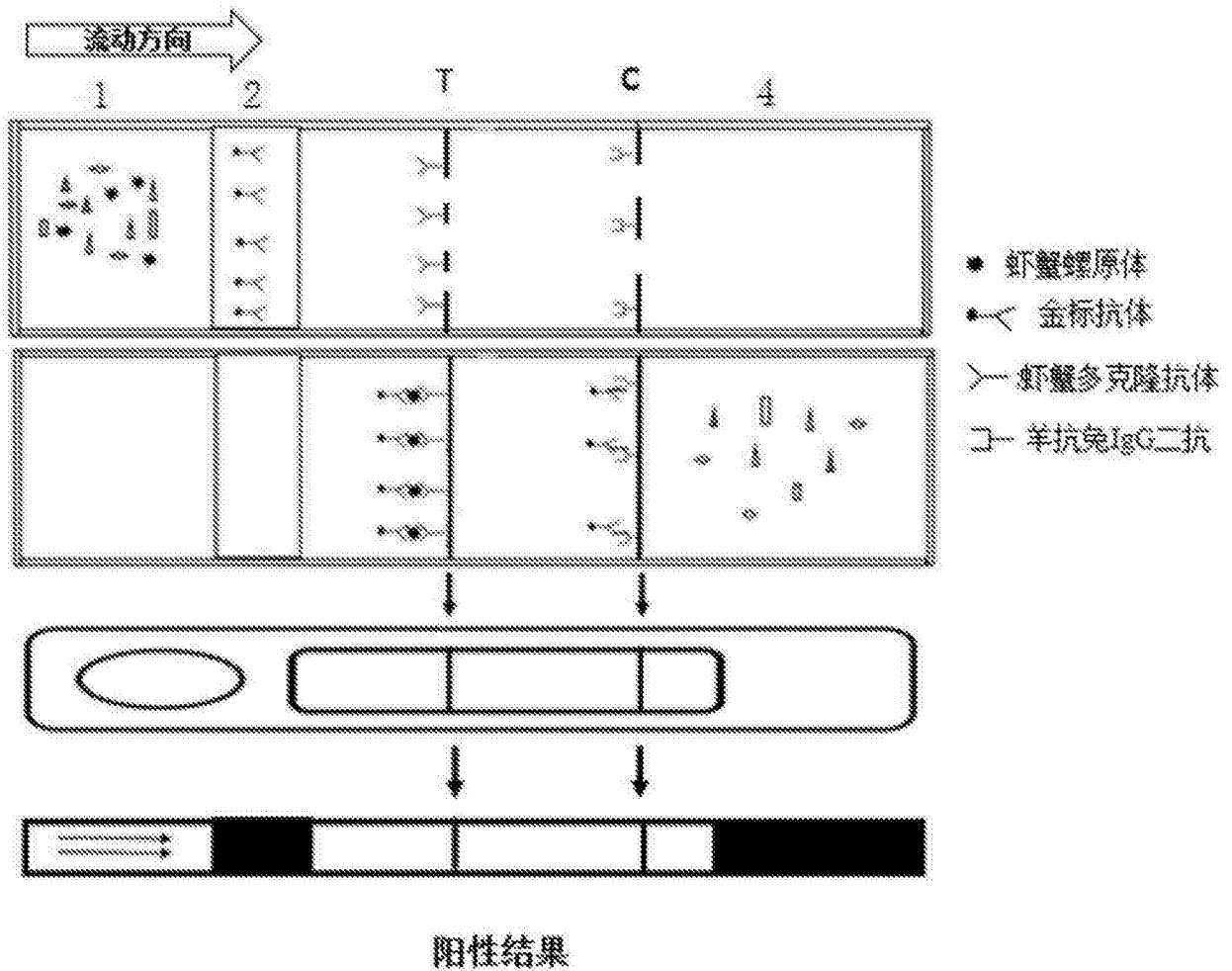


图2

专利名称(译)	一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103823055B</a>	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201310634981.0	申请日	2013-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	王文 安亮 任梦 肖政云 顾伟 孟庆国 任乾		
发明人	王文 安亮 任梦 肖政云 顾伟 孟庆国 任乾		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/56911 G01N2333/43508		
代理人(译)	卢亚丽		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN103823055A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测虾蟹螺原体胶体金免疫层析试纸条及其制备方法，该试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸收垫、PVC板组成，所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次固定在PVC板上；结合垫上喷涂有免疫胶体金颗粒的抗虾蟹螺原体多克隆抗体，所述硝酸纤维素膜包括包被有抗虾蟹螺原体多克隆抗体的检测线和包被有羊抗兔IgG抗体的质控线。当加入的样品中含有螺原体时，螺原体首先与胶体金-兔抗螺原体多克隆抗体形成复合物，在毛细作用下迁移至包被有螺原体多克隆抗体的检测线时被捕捉，检测线呈红色，因而可检测样品中是否含有螺原体。该试纸条具有快速、简捷，灵敏度高，特异性好的优点。

