



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727853 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710795942.7

(22)申请日 2017.09.06

(83)生物保藏信息

CGMCC No. 14311 2017.07.05

(71)申请人 大连海洋大学

地址 116000 辽宁省大连市沙河口区黑石礁街52号

(72)发明人 李强 王博雅 黎睿君 叶仕根

(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 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

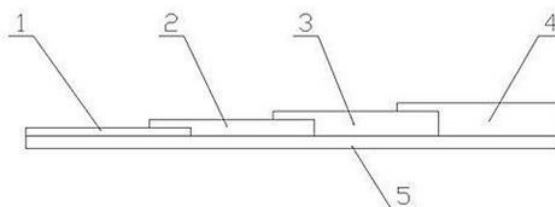
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

灿烂弧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——灿烂弧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灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT单克隆抗体,硝酸纤维素膜上有包被灿烂弧菌多克隆抗体的检测线a及由羊抗鼠IgG构成的质控线b,所述灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No.14311的杂交瘤细胞4A5免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。



1. 一种灿烂弧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灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体,硝酸纤维素膜(2)上有包被有灿烂弧菌多克隆抗体的检测线a 及由羊抗鼠IgG 构成的质控线b,所述灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 14311 的杂交瘤细胞4A5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 所述的灿烂弧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. 制备灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体:取保藏号为CGMCC No. 14311 的抗灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体的杂交瘤细胞株4A5免疫小鼠,取小鼠腹水,置离心管离心后收集上清并纯化,即得灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体;

b. 制备胶体金:采用30 nm 胶体金溶液,并调整胶体金溶液的pH 至8.2,备用;

c. 制备胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体:在电磁搅拌器下将灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体缓慢加入备用的胶体金溶液中,单克隆抗体的质量和胶体金溶液的体积比为0.018:1,经纯化和浓缩后形成胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体;

d. 对金标垫和硝酸纤维素膜处理:将胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体以9  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  均匀喷涂在金标垫上;将灿烂弧菌多克隆抗体稀释成0.5 mg/mL,以1  $\mu\text{L}/\text{cm}$  喷涂于硝酸纤维素膜上,形成检测线a ;将羊抗鼠IgG 稀释成1 mg/mL,以1  $\mu\text{L}/\text{cm}$  喷涂于硝酸纤维素膜上,形成质控线b,37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥4 h ;

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 所述灿烂弧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. 14311 的抗灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体的杂交瘤细胞株4A5制成细胞悬液,1000 r/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 $5 \times 10^6$  cells/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,2000 r/min,10 min,离心后收集上清并采用Protein-G 亲和层析法纯化收集的腹水,即得灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体。

## 灿烂弧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—灿烂弧菌的胶体金免疫层析试纸条及制备方法。

### 背景技术

[0002] 灿烂弧菌隶属于属弧菌科(*Vibrionaceae*),弧菌属(*Vibrio*),是刺参(*Apostichopus japonicus*)“化皮病”(腐皮综合征)的主要致病菌。该病具有传染性强、传播范围广的特点,能引起刺参发生大面积的体表溃疡、口肿溃烂、身体萎缩、排脏等症状。此外,灿烂弧菌也能导致多种鱼类、双壳贝类、甲壳类和棘皮动物发病甚至死亡,使被感染的鱼体两侧,特别是靠近尾部处出现出血点,导致皮肤腐烂,形成溃疡,背鳍、胸鳍、尾鳍的鳍条基部充血,肾脏、肝脏糜烂等症状。目前,针对灿烂弧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、酶联免疫吸附法及PCR 技术等。上述检测方法均因操作复杂、耗时长、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0.3 cm 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。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灿烂弧菌单克隆抗体,以至于目前对于灿烂弧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灿烂弧菌中得以应用。

### 发明内容

[0004] 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—灿烂弧菌的胶体金免疫层析试纸条及制备方法。

[0005] 本发明的技术解决方案是:一种灿烂弧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,所述金标垫上喷涂有胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT 单克隆抗体,硝酸纤维素膜上有包被灿烂弧菌多克隆抗体的检测线a 及由羊抗鼠IgG 构成的质控线b,所述灿烂弧菌鞭毛蛋白

F1gT 单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 14311 的抗灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体的杂交瘤细胞株4A5 免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。

[0006] 一种上述的灿烂弧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. 制备灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体:取保藏号为CGMCC No. 14311 的抗灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体的杂交瘤细胞株4A5 免疫小鼠,取小鼠腹水,置离心管离心后收集上清并纯化,即得灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 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30 nm 胶体金溶液,并调整胶体金溶液的pH 至8.2,备用;

c. 制备胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体:在电磁搅拌器下将灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体缓慢加入备用的胶体金溶液中,单克隆抗体的质量和胶体金溶液的体积比为0.018 :1,经纯化和浓缩后形成胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体;

d. 对金标垫和硝酸纤维素膜处理:将胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体以9  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  均匀喷涂在金标垫上;将灿烂弧菌多克隆抗体稀释成0.5 mg/mL,以1  $\mu\text{L}/\text{cm}$  喷涂于硝酸纤维素膜上,形成检测线a ;将羊抗鼠IgG 稀释成1 mg/mL,以1  $\mu\text{L}/\text{cm}$  喷涂于硝酸纤维素膜上,形成质控线b,37  $^{\circ}\text{C}$ 干燥4 h;

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。

[0007] 所述a 步骤是取保藏号CGMCC No. 14311 的抗灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体的杂交瘤细胞株4A5制成细胞悬液,1000 r/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 $5 \times 10^6$  cells/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,2000 r/min,10 min,离心后收集上清并采用Protein-G 亲和层析法纯化收集的腹水,即得灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体。

[0008] 本发明可应用于检测灿烂弧菌,与现有检测方法相比,具有以下优点:

(1) 检测快速:检测时间仅5~10 min,现场即可出结果;

(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 $1 \times 10^5$  cells/mL ;

(3) 操作简便,无需专业人员和辅助的特殊仪器;

(4) 有效期长:2-8  $^{\circ}\text{C}$ 密封保存,有效期为1 年。

## 附图说明

[0009] 图1 是本发明实施例的结构示意图。

[0010] 杂交瘤细胞4A5保藏日期:2017年7月5日;

分类命名:抗灿烂弧菌鞭毛蛋白F1gT 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

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);

保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号;

保藏号:CGMCC No. 14311 。

## 具体实施方式

[0011] 本发明的灿烂弧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灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体,硝酸纤维素膜2上有包被灿烂弧菌多克隆抗体的检测线a和有羊抗鼠IgG构成的质控线b,所述灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 14311的杂交瘤细胞4A5免疫小鼠,得小鼠腹水经纯化制备而成。

[0012] 本发明的灿烂弧菌胶体金免疫层析试纸条制备方法,按以下步骤进行:

1. 制备灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体:取生长旺盛,形态良好的杂交瘤细胞4A5制成细胞悬液,1000 r/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 $5 \times 10^6$  cells/mL,备用;取6~8周龄Balb/C小白鼠,腹腔内注射无菌的液体石蜡0.5 mL/只,1周后,腹腔内注射杂交瘤细胞株4A5 0.5 mL/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(2000 r/min,10 min),离心后收集上清,采用Protein-G亲和层析法纯化收集的腹水,即灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体。

[0013] 2. 制备胶体金:采用柠檬酸三钠还原法制备30 nm胶体金,是将100 mL 0.01%氯化金,加热至沸腾;取2 mL的1%柠檬酸钠加入上述溶液中,迅速混合均匀,再保持沸腾10 min,直至溶液颜色呈透亮的红色,自然冷却后蒸馏水恢复至100 mL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。

[0014] 3. 制备胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体:取已制备好的胶体金溶液10 mL,用0.2 mol/L  $K_2CO_3$ 溶液调整溶液pH至8.2,在电磁搅拌下,边搅拌边加入180  $\mu$ L 1 mg/mL单克隆抗体,继续搅拌30 min,再逐滴加入5% BSA至终浓度为1%,逐滴加入5% PEG 20000至终浓度为1%(以稳定胶体金颗粒的残留表位),搅拌30 min。1500 r/min,4℃离心20 min,取上清;将上清以10000 r/min,4℃离心60 min,弃上清;将沉淀以10 mL金标复溶液重悬,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℃保存备用。

[0015] 4. 对金标垫和硝酸纤维素膜处理:将胶体金标记的灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体以9  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>均匀喷涂在金标垫上;将灿烂弧菌多克隆抗体稀释成0.5 mg/mL,以1  $\mu$ 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1 mg/mL,以1  $\mu$ L/cm喷涂于硝酸纤维素膜上,形成质控线b,37℃干燥4 h。

[0016] 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。

[0017] 本发明的灿烂弧菌胶体金免疫层析试纸条结果判定:

将试纸条插入样品悬液中10 s后取出,室温放置5~10 min,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。

[0018] 本发明的灿烂弧菌胶体金免疫层析试纸条的特性分析:

### 1. 试纸条的特异性分析

用本发明的灿烂弧菌胶体金免疫层析试纸条检测灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) ATCC33125、灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) KCTC12679、灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 2CLM002、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) KCTC2471、哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) ATCC14126、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) KCCM40513、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) KCTC2711、河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) KCCM40827、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) ATCC2126、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) ATCC15947、希瓦氏菌 (*Shewanella oneidensis*) KCCM41821,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,用组装后的试纸条检测副溶血弧菌、哈维弧菌、溶藻弧菌、鳃弧菌、河流弧菌、创伤弧菌、迟缓爱德华氏菌、希瓦氏菌的结果均为阴性,而3株灿烂弧菌的检测结果成阳性,说明本试纸条与测试菌株无交叉反应,特异性强。

### [0019] 2. 试纸条的灵敏度检测

取不同浓度( $1 \times 10^9$  cells/mL 至  $1 \times 10^4$  cells/mL)的灿烂弧菌菌悬液,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 $1 \times 10^5$  cells/mL。

### [0020] 3. 试纸条的稳定性测试

将试纸条于2-8 °C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。

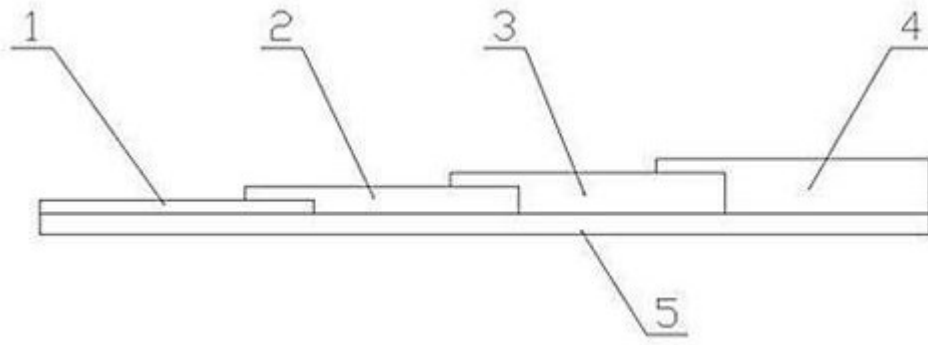


图1

专利名称(译)	灿烂弧菌胶体金免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107727853A</a>	公开(公告)日	2018-02-23
申请号	CN2017110795942.7	申请日	2017-09-06
[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 王博雅 黎睿君 叶仕根		
发明人	李强 王博雅 黎睿君 叶仕根		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56911 G01N2333/28		
其他公开文献	CN107727853B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种可快速检测刺参“化皮病”病原菌——灿烂弧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灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体，硝酸纤维素膜上有包被灿烂弧菌多克隆抗体的检测线a及由羊抗鼠IgG构成的质控线b，所述灿烂弧菌鞭毛蛋白FlgT单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No.14311的杂交瘤细胞4A5免疫小鼠，得小鼠腹水经纯化制备而成。

