



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107607718 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201710824241.1

(22)申请日 2017.09.13

(71)申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路  
238号

(72)发明人 战文斌 王欣茹 唐小千 绳秀珍  
邢婧

(74)专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有  
限公司 37201

代理人 王铎

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸  
及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸及其制备方法。所述诊断试纸,包括载体板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫位分别于所述载体板的上端、中部和下端;所述金标垫载有金标鼠抗牙鲈免疫球蛋白单抗,其边缘一端重叠在样品垫之下,另一端重叠在硝酸纤维素膜之上;所述硝酸纤维素膜上设有两条检测线T2、T1和一条质控线C,质控线C靠近吸水垫;所述检测线T1、T2包被迟缓爱德华氏菌特异性抗原,分别为:铁结合相关蛋白和无机焦磷酸酶,所述质控线C包被羊抗小鼠IgG。本发明具如下优点:检测快速简便,灵敏准确;成本低,稳定性好;适用于牙鲈养殖过程中迟缓爱德华氏菌病的快速、准确诊断。

1. 一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸,包括载体板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫和吸水垫位于所述载体板的两端,硝酸纤维素膜位于所述载体板的中部;所述样品垫与硝酸纤维素膜交界处设有载有金标鼠抗牙鲈免疫球蛋白单克隆抗体的金标垫,所述金标垫一端边缘重叠在样品垫之下,另一端边缘重叠在硝酸纤维素膜之上,其特征在于所述硝酸纤维素膜上设有依次排列的两条条检测线T2、T1和一条质控线C,所述质控线C靠近吸水垫;所述检测线T1包被迟缓爱德华氏菌特异性抗原:铁结合相关蛋白,所述检测线T2包被迟缓爱德华氏菌特异性抗原:无机焦磷酸酶;所述质控线C包被有羊抗小鼠IgG。

2. 根据权利要求1所述的快速诊断试纸,其特征在于所述抗牙鲈免疫球蛋白单克隆抗体能特异性结合牙鲈免疫球蛋白的重链,是由杂交瘤细胞株JF-IgM-H分泌所得,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC-C200631,保藏单位为中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2006年7月6日。

3. 根据权利要求1所述的快速诊断试纸,其特征在于所述铁结合相关蛋白为迟缓爱德华氏菌特异性抗原,能特异性结合牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清。

4. 根据权利要求1所述的快速诊断试纸,其特征在于所述无机焦磷酸酶为迟缓爱德华氏菌特异性抗原,能特异性结合牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清。

5. 一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸的制备方法,其特征在于它包括如下步骤:

(1) 鼠抗牙鲈免疫球蛋白单克隆抗体的腹水生产与纯化:

复苏并培养分泌抗牙鲈免疫球蛋白单抗的杂交瘤细胞株JF-IgM-H,腹腔注射BALB/c小鼠,采集腹水,辛酸-硫酸铵法提纯获得单抗;

(2) 特异性抗原铁结合相关蛋白和无机焦磷酸酶的制备与纯化

通过多次蛋白免疫印迹实验,选定了两种特异性抗原:铁结合相关蛋白和无机焦磷酸酶,通过原核表达技术和His标签蛋白纯化技术制备所述抗原;

(3) 金标垫的制备

采用柠檬酸三钠还原法制成颗粒大小为20 -30 nm的胶体金,再以碳酸钾溶液调节胶体金pH值为8.2;将抗牙鲈免疫球蛋白单抗加入胶体金中,再加入牛血清白蛋白,离心纯化后用金标保存液悬起,即为金标单抗液体;将制成的金标单抗液体喷涂到玻璃纤维上,冷冻干燥,即为载有金标单抗的金标垫;

(4) 硝酸纤维素膜的制备

分别将一定浓度的抗原Dps和IPP按照一定间距和浓度顺序喷涂于硝酸纤维素膜作为检测线T1、T2,将羊抗小鼠IgG喷涂于硝酸纤维素膜作为质控线,晾干,于封闭液中浸泡,PBST漂洗,干燥;

(5) 牙鲈迟缓爱德华氏菌病血清学快速诊断试纸的制作

在载体板上依次贴上硝酸纤维素膜、吸水垫、金标垫和样品垫,放入切条机槽内切割成3.7 mm宽的试纸,将切好的试纸放入装有干燥剂的铝箔袋内封口,装入包装卡壳,密封于铝箔袋中保藏,即为本发明试纸。

## 一种牙鲆迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种诊断试纸条及其制备方法,特别涉及一种牙鲆迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸及其制备方法,属于免疫学、微生物学及诊断试剂交叉技术领域。

### 背景技术

[0002] 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是一种革兰氏阴性细菌,其菌宿主范围非常广泛,不仅可以感染淡水和海水中养殖的多种鱼类,同时也可感染两栖、爬行类、海洋哺乳类动物以及人类,其导致的迟缓爱德华氏菌病(edwardsieliasis)每年给海水养殖业造成巨大的经济损失。由于缺乏有效的治疗措施,对该病的及时诊断有利于预防控制疾病的暴发和减少经济损失。

[0003] 目前的诊断方法主要是对病原菌进行鉴定,比如聚合酶链式反应(PCR)、实时定量PCR、环介导等温扩增技术(LAMP)以及酶联免疫反应(ELISA)等。这些方法虽可有效地用于疾病诊断,但是都需要专用仪器和专业人员,耗时长、操作复杂,不适用于基层养殖场的实时检测。而且这些方法需要将鱼杀死从而进行检测,不能用于亲本鱼体疾病的筛查。血清学方法是诊断、监测动物及人类的疾病的常规方法。然而经典的血清学方法,如凝集实验和间接ELISA,是基于全细胞抗原,其应用受到细菌种间交叉反应的限制。因此,研制一种快速、灵敏、准确的血清学诊断方法不仅有助于养殖户进行现场检测,而且对研究人员开展流行病学调查具有重要意义,其所反映的抗体水平也可以用来评估鱼体的免疫状况。随着蛋白质组学技术和生物信息学的不断发展,利用细菌的特异性抗原蛋白建立的血清学检测方法已成为可能并已有相关报道。此外,胶体金免疫层析法具有准确度高、操作简单,结果快速可见,成本低,无需专业人员和设备等优点,其间接法广泛应用于血清学诊断。目前基于特异性抗原的胶体金免疫层析试纸条尚未用于水产动物疾病诊断。

### 发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种简便、快速、灵敏度高、特异性强的迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸,其检测结果肉眼可见,不需要专业仪器设备,适用于牙鲆养殖现场对迟缓爱德华氏菌病的快速诊断。

[0005] 本发明的另一个目的是提供上述牙鲆迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸的制备方法。

[0006] 本发明通过多次免疫印迹实验筛选鉴定得到迟缓爱德华氏菌的特异性抗原,克服了抗原免疫交叉反应对结果判定的干扰问题,并利用胶体金间接免疫层析技术实现对牙鲆迟缓爱德华氏菌病的快速诊断。

[0007] 本发明的目的是由以下具体技术方案实现的:

一种牙鲆迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸,包括载体板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫和吸水垫位于所述载体板的两端,所述硝酸纤维素膜位于所述载体板的中部;所述样品垫与硝酸纤维素膜交界处设有载有金标鼠抗牙鲆免疫球蛋白(IgM)

单克隆抗体的金标垫,所述金标垫一端边缘重叠在样品垫之下,另一端边缘重叠在硝酸纤维素膜之上;所述硝酸纤维素膜上设有依次排列的两条检测线T2、T1和一条质控线C,所述质控线C靠近吸水垫;所述检测线T1包被迟缓爱德华氏菌特异性抗原:铁结合相关蛋白(DNA-binding ferritin-like protein,Dps),所述检测线T2包被迟缓爱德华氏菌特异性抗原:无机焦磷酸酶(Inorganic pyrophosphatae,IPP),所述质控线C包被羊抗小鼠IgG。

[0008] 所述的鼠抗牙鲈免疫球蛋白(IgM)单克隆抗体能特异性结合牙鲈IgM的重链,抗体类型为IgG,是由杂交瘤细胞株JF-IgM-H分泌所得,杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC-C200631,保藏单位为中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2006年7月6日。

[0009] 所述铁结合相关蛋白(DNA-binding ferritin-like protein,Dps)和无机焦磷酸酶(Inorganic pyrophosphatae,IPP)为迟缓爱德华氏菌特异性抗原,能特异性结合牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清。

[0010] 一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸的制备方法,包括以下步骤:

(1)鼠抗牙鲈免疫球蛋白单克隆抗体的腹水生产与纯化:

复苏并培养分泌抗牙鲈IgM单抗的杂交瘤细胞株JF-IgM-H,腹腔注射BALB/c小鼠,采集腹水,辛酸-硫酸铵法提纯获得单抗;

(2)特异性抗原Dps和IPP的制备与纯化:

通过多次蛋白免疫印迹实验,选定两种特异性抗原:铁结合相关蛋白(Dps)和无机焦磷酸酶(IPP),通过原核表达技术和His标签蛋白纯化技术制备所述抗原;

(3)金标垫的制备:

采用柠檬酸三钠还原法,取0.01%氯金酸溶液100 mL,将烧杯放在磁力搅拌器上,打开加热模式,待煮沸,搅拌条件下快速加入1.5 mL的1%柠檬酸钠溶液,继续搅拌加热,待溶液呈红色或橙红,停止加热,继续搅拌2-3 min,自然冷却,补足失水,制成颗粒大小为20-30 nm的胶体金,用0.1mol/L碳酸钾溶液调节胶体金pH值为8.2;将抗牙鲈IgM单抗加入胶体金中,再加入牛血清白蛋白(BSA),离心纯化后用金标保存液悬起,即为金标单抗液体;将制成的金标单抗液体喷涂到玻璃纤维上,冷冻干燥,即为载有金标单抗的金标垫;

(4)硝酸纤维素膜的制备:

分别将一定浓度的抗原Dps和IPP按照一定间距和浓度顺序喷涂于硝酸纤维素膜作为检测线T1、T2,将羊抗小鼠IgG喷涂于硝酸纤维素膜作为质控线,晾干,于封闭液中浸泡,PBST漂洗,干燥;

(5)牙鲈迟缓爱德华氏菌病血清学快速诊断试纸的制作:

在载体板上依次贴上硝酸纤维素膜、吸水垫、金标垫和样品垫,放入切条机槽内切割成3.7 mm宽的试纸,将切好的试纸放入装有干燥剂的铝箔袋内封口,装入包装卡壳,密封于铝箔袋中保藏,即为本发明试纸。

[0011] 利用本发明试纸对牙鲈迟缓爱德华氏菌病进行检测的方法,其步骤如下:

平放本发明试纸检测卡,向样品孔中滴加经过处理的检测样品液100  $\mu$ L,等待10-15 min,肉眼观察检测结果,根据检测线T1、T2显色情况来判断鱼体患病情况。

[0012] 所述待检样品的前处理方法如下:

从牙鲈尾静脉采取1 mL血液,血样室温静置,待血清自然析出后,吸取上清,即为待测鱼血清。将血清稀释10倍,即为检测样品液。

[0013] 本发明采用间接免疫层析原理。当样品扩散至金标垫时,金标单抗将与样品中的牙鲈IgM结合,形成大量的金标单抗-IgM复合物,由于毛细管作用,该复合物随着样品液进入硝酸纤维素膜,如果样品中含有抗迟缓爱德华氏菌的抗体,当样品液到达检测线T2时,一部分金标单抗-IgM复合物与包被在此处的特异性抗原IPP结合,形成金标单抗-IgM-IPP的复合结构,单抗上标记的胶体金颗粒在此处固定并累积使得检测线T2显现肉眼可见的红色。剩余的金标单抗-IgM复合物继续随样品液沿膜前行,到达检测线T1时,另一部分金标单抗-IgM复合物与包被在此处的特异性抗原Dps结合,检测线T1也出现肉眼可见的红色。最后样品液前行至质控线时,未与血清中IgM结合的游离金标单抗和未与检测线上抗原反应的金标单抗-IgM复合物将会结合在预先包被羊抗小鼠IgG的质控线上,形成金标单抗-羊抗小鼠IgG复合物或金标单抗-IgM-羊抗小鼠IgG复合物,在质控线处也出现由胶体金颗粒固定并累积显现肉眼可见的红色。若检测样品中不含迟缓爱德华氏菌抗体或抗体浓度,两条检测线不同时红色,质控线显现红色;若质控线和检测线处都不显示红色,说明试纸失效,检测结果无效。

[0014] 本发明具有以下优点:检测快速,10 min左右出现肉眼直视结果;操作简便,不需要专业人员;检测成本低,无需专业仪器设备,适合养殖现场检测;灵敏度高,特异性强,具可重复性;储存方便,稳定性好,室温下有效期6个月,4 °C下有效期12个月;适用于牙鲈养殖过程中迟缓爱德华氏菌病的快速、简便、准确诊断。

## 附图说明

[0015] 图1是迟缓爱德华氏菌特异性抗原筛选结果图。

[0016] 其中,M:蛋白质分子量标准;1:迟缓爱德华氏菌全菌蛋白;2:一抗为未经吸附处理的牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清;3:一抗为经过吸附处理的牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清;4:一抗为其他五种抗血清的混合;5:一抗为健康牙鲈的血清。

[0017] 图2是Western blotting分析迟缓爱德华氏菌重组抗原特异性结果图。

[0018] 其中,M:蛋白质分子量标准;1,2:rDps 和 rIPP 与牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清反应结果;3,4:rDps 和 rIPP 与其它五种抗血清的混合物反应结果;5,6: rDps 和 rIPP与健康牙鲈血清反应结果。

[0019] 图3是ELISA分析迟缓爱德华氏菌重组抗原特异性结果图。

[0020] 其中,1:一抗为牙鲈抗迟缓爱德华氏菌血清;2:一抗为牙鲈抗海豚链球菌血清;3:一抗为牙鲈抗鳗弧菌血清;4:一抗为牙鲈抗鱼肠道弧菌血清;5:一抗为牙鲈抗溶藻弧菌血清;6:一抗为牙鲈抗副溶血弧血清;7:一抗为健康牙鲈血清。

[0021] 图4是本发明的快速诊断试纸的结构示意图。

[0022] 其中,1、样品垫;2、金标垫;3、硝酸纤维素膜;4、吸水垫;5、载体板;6、检测线T2;7、检测线T1;8、质控线。

[0023] 图5是本发明的快速诊断试纸对牙鲈样品检测结果示意图。

[0024] 其中,I:牙鲈感染迟缓爱德华氏菌;II、III:牙鲈未感染迟缓爱德华氏菌,但存在与抗原Dps或IPP存在免疫交叉反应的其他病原菌的抗体;IV:牙鲈未感染迟缓爱德华氏菌;V:试纸失效或本次操作出现问题。

[0025] 图6是本发明的快速诊断试纸对牙鲈样品实际检测结果图。

[0026] 其中,I:牙鲈感染迟缓爱德华氏菌;II-VI:牙鲈未感染迟缓爱德华氏菌。

[0027] 图7是本发明的快速诊断试纸对不同稀释度的牙鲈样品实际检测结果图。

[0028] 其中,I-V:稀释度分别为1:20、1:40、1:60、1:80、1:100的牙鲈血清;VII:稀释度为1:120的牙鲈血清。

## 具体实施方式

[0029] 下面结合附图并通过具体实施例来进一步说明本发明。

[0030] 以下实施例所用材料及仪器:

实验动物牙鲈购自山东日照某牙鲈养殖场,体重300 g,暂养1周,水温为 20-22℃,pH为7.4-7.8,期间连续充气,每天换水一次,投喂颗粒饲料一次。

[0031] 迟缓爱德华氏菌、鳃弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、鱼肠道弧菌和海豚链球菌菌株由本实验室鉴定并保藏。

[0032] 倒置显微镜(购自Olympus公司);高速冷冻离心机(Sigma公司);NanoDrop8000(购自Thermo公司);PCR仪、琼脂糖凝胶电泳系统、SDS-PAGE凝胶电泳系统和电转印系统(购自Bio-rad公司);酶标仪(购自TECAN);蛋白纯化系统(购自GE公司);喷膜仪XYZ3060、半自动贴膜仪LM5000、切条仪(购自Bidot公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(购自Beyotime公司);Ex Taq、dNTP mix、感受态细胞BL21、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR产物回收试剂盒(购自Transgen公司);IPTG、尿素、透析袋(购自Solarbio公司);HisTrap<sup>TM</sup>HAP亲和层析柱(5 mL)、柠檬酸三钠、氯金酸、羊抗小鼠IgG、牛血清白蛋白、Tween-20(购自Sigma公司);硝酸纤维素膜(购自Whatman公司)。

[0033] 实施例1:迟缓爱德华氏菌特异性抗原的筛选

### 1. 抗血清的制备

实验所用病原菌菌种冻存于-80℃超低温冰箱,使用前置于冰上融化。于超净工作台用接种环挑取菌液,将迟缓爱德华氏菌菌液划线在普通琼脂(LB)平板,置于30℃培养,将弧菌和链球菌分别划线在2216E平板和脑心浸液(BHI)固体培养基,置于28℃培养。待平板长出单菌落后,挑取单菌落,分别接种到BHI液体培养基中,迟缓爱德华氏菌于30℃,弧菌和链球菌于28℃,振荡培养过夜。培养液经8 000 rpm离心10 min,收集菌体沉淀,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)洗三次,每次10 min。麦氏比浊仪测定各菌液浓度,用无菌PBS调整迟缓爱德华氏菌、鳃弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌的浓度至 $1 \times 10^8$  CFU/mL,将海豚链球菌浓度调整为 $1 \times 10^7$  CFU/mL,腹腔注射感染牙鲈,每组10尾,每尾100  $\mu$ L,对照组注射等量无菌PBS。攻毒三周后,采集体弱、行为异常、濒死的鱼体的血液。在攻毒后第28天时,采集存活鱼体的血液。血液样品室温倾斜放置1 h,转入4℃过夜,次日4℃,8 000 g离15 min。上清即为各组的抗血清,于-20℃冻存,待后续实验使用。

[0034] 2. 免疫印迹实验

将超声波破碎的迟缓爱德华氏菌全菌破碎液样品与电泳样品缓冲液等体积混匀,煮沸5 min,冷却后加样进行SDS-PAGE,分离胶浓度为12% (V/V),浓缩胶浓度为3 % (V/V),在30 mA恒定电流进行电泳。电泳结束后,凝胶用电转印系统(Bio-Rad)将蛋白转移到PVDF膜上(恒压30V,90min),转印后PVDF膜用PBS洗10 min,均匀剪裁置于含4% BSA的PBS溶液中4℃封闭过夜,PBST洗涤3次,每次5 min;将漂洗干净的膜置于3% BSA 中,于37℃封闭1 h,用

PBST洗涤3次,每次5 min。分四组加入不同的一抗,分别为牙鲆抗迟缓爱德华氏菌全菌血清(1:100),吸附处理的牙鲆抗迟缓爱德华氏菌全菌血清(1:100),牙鲆抗四种弧菌和海豚链球菌抗血清的混合物(终稀释度1:100)以及健康牙鲆血清。于37℃ 孵育1.5 h,用PBST洗涤3次,每次5 min。

[0035] 抗血清的吸附处理步骤为:首先制备灭活的鳗弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、鱼肠道弧菌和海豚链球菌。将各菌液浓度用无菌PBS调至 $10^9$ CFU/mL,加入适量福尔马林,使福尔马林终浓度为0.5%,28℃放置48小时,期间不断取出摇匀。然后4℃下8 000 g 离心15min,PBS重悬再离心,洗涤3次。最后一次离心后用2 mL的牙鲆抗迟缓爱德华氏菌血清重悬,将混合物在37℃轻晃培养2 h,使菌体吸附抗血清中与灭活菌体交叉反应的抗体。然后4℃,10 000 rpm 离心5 min,取上清,即为菌体吸附处理后的牙鲆抗迟缓爱德华氏菌血清。

[0036] 而后,加入鼠抗牙鲆IgM单克隆抗体2D8(1:2 000),37℃孵育1 h,同上步洗涤后加入AP标记的羊抗鼠IgG抗体(1:5 000),同上步孵育洗涤。最后加入现配的NBT/BCIP发色液,避光发色3-5 min,观察至出现淡紫色条带时,将膜放至纯水中停止发色。

[0037] 通过比较发现,未经吸附处理和经吸附处理的迟缓爱德华氏菌鱼多抗均与20 kDa处的蛋白条带结合,而其他病原菌的混合多抗不与该蛋白条带反应,因此鉴定20 kDa处的蛋白条带为迟缓爱德华氏菌的特异性蛋白条带(如图1所示)。

### [0038] 3. 质谱鉴定

根据免疫印迹实验结果,确定特异性的凝胶条带。佩戴头套,口罩和手套,将20 kDa凝胶条带切下,装在全无菌1.5 mL离心管中,送至上海博苑生物公司进行串联质谱分析,结果鉴定得到2个迟缓爱德华氏菌菌相关蛋白(如表1),分别为铁相关蛋白(DNA-binding ferritin-like protein,Dps)和无机焦磷酸酶(Inorganic pyrophosphatae,IPP)。

[0039] 表1 20 kDa蛋白质质谱鉴定结果

序号 Number	蛋白名称 Protein Name	登记号 Accession No.	理论 等电点 Theoretical pI	相对分子 质量 Theoretical MW (Da)	评分/匹配 肽段数目 Mascot Score /No. of Match Peptides	序列 覆盖率 Protein Coverage
铁结合相关蛋白						
1	DNA-binding ferritin-like protein	gi 267985766	5.44	19817	265/4	37%
无机焦磷酸酶						
2	Inorganic pyrophosphatae	gi 291092003	4.98	19723	203/3	26%

根据质谱鉴定结果,在NCBI数据库中查询到蛋白质的编码基因与氨基酸序列,具体信息如下:

Dps基因序列为:ATGAGCACGGTTAAAAAAGCGACGTCCAAGCACGCCAACG

TCTTCCCCTGGCCACGCCAACCGATCTGGGCCATGAGGCAACCAAGCAATCAGCGCAGCAATGAATGCACTG  
CTGGCCGACATTTTTGCCCTTTACCTGAAAACCAAGAATTTCCACTGGCATATGAGTGGCCCGCATTTCGCGACTA

CCATCTGCTGCTGGACGAGCAAAGCGCACAGCTGTTTGCCATGACCGATGATATTGCTGAACGCGTACGTAAAGTTG  
GCGGCAATACCCTGCACTCCATAGGCGAAATCTCCCGGATGCAGCGGATTAAGACAATGATGCCGAGTACGTGCAT  
CCCATCGACATGCTGGCTGAGCTGTGTGAAGACAACAAACAGGTCGCCGCTGAGCTGCGCGCCGCCATGCGGTCTG  
CGATGAGTATCACGACATCTCCAGCGCCAGCCTGATCGAAAACGGATCGACGAAACTGAACGCCGCGTCTGGTTCC  
TGTTTGAAGCCTGCCGCCGCGCTAA

Dps氨基酸序列为:MSTVKKSDVQARQRLPLATPTDLGHEATKAISAAMNALLAD

IFALYLKTKNFHWHMSGPHFRDYHLLLDEQSAQLFAMTDDIAERVRKVGNTLHSGEISRMQRIKDNDAEYV  
DPIDMLAELCEDNKQVAAELRAAHAVCDEYHDISSASLIENWIDETERRVWFLFEACRRA

IPP基因序列为:ATGAGCTTGATCAACGTCCCGGCCGGTAAAGATATGCCGGAA

GATATCTATGTAGTGATCGAAATCCCGGCTAACGCCGATCCGATCAAATATGAAATCGACAAAGACACTGGTG  
CCCTGTTTGTAGACCGCTTCATGTCTACCGCCATGTTCTACCCGTGCAACTACGGCTACATCAACCACACCCTGTCT  
CTGGACGGCGATCCGGTTGACGTGCTGGTCCCGACTCCGTATCCGCTGCAGCCAGGTTCTGTGATCCGCTGCCGCC  
GGTCGGCGTGCTGAAGATGACCGACGAAGCGGGCGAAGATGCCAAGCTGGTCGCCGTTCCGCACAGCAAACACTGACCA  
AAGAGTATGATCACATTAAGATGTGAACGATCTCCCGAACTGCTGCGTGCCAGATCGCCACTTCTTTGAACAC  
TACAAAGATCTGGAAAAAGGTAAGTGGGTCAAAGTTGACGGCTGGGATAACGCCGATGCAGCCAAGGCCGAGATCAT  
CGCCTCTTTGAAACGCGCTAAGAACAAGTAA

IPP氨基酸序列为:MSLINVPAGKMPEDIYVIEIPANADPIKYEIDKDTGALFVD

RFMSTAMFYPCNYGYINHTLSLDGDPVDVLPPTYPLQPGSVIRCRPVGLKMTDEAGEDAKLVAVPHSKLTK  
EYDHIKDVNDLPELLRAQIAHFFEHYKDLEKKGWVKVDGWDNADAAKAEIIASFERAKNK。

#### [0040] 4. 重组抗原的制备及特异性分析

(1) 目的片段的克隆:基于已公布的迟缓爱德华氏菌基因组信息(Genebank No. CP001135),通过 Primer5.0 软件分析,设计抗原Dps的特异性引物为:

Dps-F:5' -CGGGATCCATGAGCACGGTAAAAAAGCG-3' ;

Dps-R:5' -CCCAAGCTTGGCGCGGCGGCAG-3' 。

#### [0041] 特异性抗原IPP的引物为:

IPP-F:5' -CGGGATCCATGAGCTTGATCAACGTC-3' ;

IPP-R:5' -CCCAAGCTTCTTGTCTTAGCGCGTTTGA-3' 。

#### [0042] 划线部分分别为BamHI和Hind III酶切位点。

[0043] PCR反应体系(25 μL体系):DEPC水 17 μL,10×Ex Taq Buffer 2.5 μL,dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μL,F-Primer 1 μL,R-Primer 1 μL,模板(稀释后的迟缓爱德华氏菌菌液)1 μL,Ex Taq 0.5 μL。扩增程序为:95℃ 10 min,1个循环;95℃ 30 s,57℃ 30s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 10 min。用1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化的DNA片段。并进行双酶切实验,具体反应体系为:回收PCR产物:1 μg,K buffer:2 μL,BamHI:1 μL,Hind III:1 μL,加ddH<sub>2</sub>O至终体积20 μL,37℃酶切4 h,取出后直接利用PCR产物纯化试剂盒对酶切产物进行纯化,经琼脂糖电泳确定纯度,用NanoDrop 8000测定浓度。纯化产物-20℃冻存储备用。

[0044] (2) 双酶切、连接、转化及阳性菌检测:以限制性内切酶BamHI和HindIII分别对产物和pET-28a质粒进行双酶切,根据目的基因浓度和pET-28a质粒浓度,调整两者的浓度比例。最终的反应体系如下:目的基因6 μL,T4 DNA Ligase:2 μL,pET-28a质粒:2 μL,T4 DNA

Ligase buffer:2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O:8  $\mu\text{L}$ , 连接体系于16  $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。将10  $\mu\text{L}$ 连接反应产物加入100  $\mu\text{L}$ 感受态细胞DH5 $\alpha$ 内,于冰上放置30 min。取出后置于42  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激50 s,然后立即将反应物移回至冰上放置1 min。加入900  $\mu\text{L}$  LB液体培养基,于37  $^{\circ}\text{C}$ 空气浴恒温摇床上速度下振荡培养1 h(220 rpm)。取振荡培养的菌液200  $\mu\text{L}$ 涂布于含有50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那抗生素平板上,涂布均匀直至菌液完全被平板吸收,置于37  $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。将含卡那抗生素的LB平板划分区域,用10  $\mu\text{L}$ 枪头挑取单菌落转接到各区域内,37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。待长成米粒型菌落时,挑取菌落作为PCR反应模板,以目的基因的上游引物和T7下游引物进行菌落PCR,扩增完成后,琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。PCR检测的阳性克隆送桑尼公司进行测序。测序结果在NCBI中进行BLAST在线比对。挑取测序正确的菌落,接种于100 mL LB(含0.1 %卡那抗生素)液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,然后质粒小量提取试剂盒提取质粒,转化至BL21(DE3)感受态细胞中,转化及阳性菌检测步骤同上。将阳性菌接种于含卡那抗生素的LB液体培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,取500  $\mu\text{L}$ 菌液与等体积30 %的甘油混匀,保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

[0045] (3) 重组菌诱导表达及纯化:将重组表达菌接种到含0.1%卡那抗生素的500 mL LB液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养6 h,收集1 mL菌体,然后加入终浓度为1.0 mmol/L IPTG诱导表达12 h后,再收集1 mL菌体。剩下的培养物于8000 g离心10 min后,再加入50 mL Binding buffer(8 mol/L尿素,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,30 mmol/L咪唑,调整pH值至7.4)。经过超声破碎之后,12000 g离心5 min。样品需要用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,然后加入镍琼脂糖亲和层析柱,经Binding buffer平衡后,以Elution buffer(8 mol/L尿素,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,500 mmol/L咪唑,调整pH值至7.4)作为洗脱液,把洗脱下来的蛋白分步进行收集,然后分步透析,透析液中尿素浓度从8 mol/L、6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L至0 mol/L依次降低,中间间隔12 h更换透析液,最后以PBS透析。SDS-PAGE检测IPTG诱导前后和纯化后的样品。透析完成的样品首先需要通过电泳检测纯度,高纯度的蛋白可以进行后续试验,并保存在-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

#### [0046] 5. Western blotting和ELISA分析重组抗原特异性

重组抗原的分子量大小为25kDa,经SDS-PAGE后转膜后进行免疫印迹实验,一抗分别为牙鲆抗迟缓爱德华氏菌全菌血清,其他五种细菌抗血清的混合和健康的牙鲆血清,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,PBST洗涤三次,每次5 min。然后加入鼠抗牙鲆IgM单克隆抗体2D8(1:2 000),37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,同上步洗涤后加入AP标记的羊抗鼠IgG抗体(1:5 000),同上步孵育洗涤。最后加入现配的NBT/BCIP发色液,避光发色3-5 min,观察至出现淡紫色条带时,将膜放至纯水中停止发色。结果显示,重组抗原只与与牙鲆抗迟缓爱德华氏菌血清反应,不与其他五种抗血清和健康牙鲆血清反应(如图2)。

[0047] 取96孔酶标板,20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rDps和20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rIPP作为包被液分别加入到酶标板中,每孔100  $\mu\text{L}$ ,每组设置3个重复,4  $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。次日用PBST洗涤3次,每次5 min后,每孔加入200  $\mu\text{L}$  5 % BSA,37  $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,PBST洗涤三次,每次5 min。然后,分别加入六种抗血清(20倍稀释),每孔100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h。对照组加入健康牙鲆血清,同上述方法洗涤后,加入鼠抗牙鲆IgM单克隆抗体2D8(1:2 000),每孔100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,同上洗涤。每孔加入AP标记的羊抗鼠IgG抗体(1:5 000),每孔加入100  $\mu\text{L}$ ,同上述孵育和洗涤。每孔中加入100  $\mu\text{L}$ 新鲜配制的pNppNa发色液,置于酶标仪中,405 nm处读取OD值,计算阳性值与阴性对照吸光值之比(P/N)。结果显示,rDps和rIPP均只与迟缓爱德华氏菌抗血清反应P/N  $\geq$

2.1, 结果为阳性(如图3)。

#### [0048] 实施例2: 牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸的制备

##### 1. 鼠抗牙鲈IgM单抗的腹水制备和纯化

(1) 腹水的制备: 从-80℃超低温冰箱中取出杂交瘤细胞株JF-IgM-H, 随后立即放入37℃水浴锅中, 快速摇晃, 使细胞在1 min以内解冻。解冻后的细胞于200 g, 离心4 min, 无菌条件下弃上清。向冻存管中加入500 μL GIT培养基重悬细胞, 将细胞移入细胞培养孔中, 在5% CO<sub>2</sub>浓度的培养箱中培养。在倒置显微镜下观察杂交瘤细胞的生长状态, 对数生长期的杂瘤细胞外形浑圆, 透亮, 且大小一致, 排列整齐, 呈半致密分布。一般每3-4天进行一次传代, 选择处于生长旺盛、形态良好的对数生长期细胞供后续使用。收集杂交瘤细胞, 用无菌RPMI 1640清洗5次, 并用适量RPMI1640重悬。取8-12周龄的BALB/c小鼠, 腹腔注射0.5 mL无菌液体石蜡。一周后腹腔注射0.5 mL杂交瘤细胞悬液, 约含 $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ 个细胞。每天观察小鼠腹部情况, 如观察到小鼠腹部明显膨大, 用手触摸时皮肤有紧张感, 即可采集腹水。

[0049] (2) 腹水的纯化: 将获得的腹水于4℃冰箱内静置过夜, 次日4℃, 3 000 rpm, 离心10 min, 吸去上层脂类物质, 除去下层细胞沉淀物, 收集中间层腹水。按体积比1: 2加入到乙酸缓冲液(0.06 M, pH 4.8)中, 用0.1 M HCl调节pH值至4.5。逐滴加入正辛酸(每1 mL腹水加33 μL正辛酸), 缓慢搅拌30 min, 4℃静止过夜, 次日12 000 rpm 离心30 min, 取上清, 上清经0.45 μm滤膜过滤。加入1/10体积的10×PBS(其中含0.2 mmol/L EDTA), 用1 mol/L NaOH调节pH值至7.4, 冰浴条件下缓慢加入饱和硫酸铵溶液使硫酸铵的饱和度为45%, 搅拌30 min, 静置2 h。4℃条件下, 12 000 rpm离心30min, 取沉淀, 将沉淀溶于适量PBS中, 加入到透析袋中, 于超纯水中4℃透析, 其间更换透析液。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测得抗牙鲈IgM单抗的蛋白浓度为6 mg/mL。

##### [0050] 2. 胶体金标记鼠抗牙鲈IgM单抗的制备

(1) 胶体金的制备: 量取99 mL超纯水加入到烧杯中, 再加入1 mL浓度为1%氯金酸溶液, 使其终浓度为0.01%。将烧杯放在磁力搅拌器上, 打开加热模式, 待煮沸, 搅拌条件下快速加入1.5 mL的1%柠檬酸钠溶液, 继续搅拌加热。溶液逐渐由浅黄色变为灰色到紫色, 最后变成红色或橙红。停止加热, 继续搅拌2-3 min。自然冷却, 补足失水, 制成颗粒大小为20 - 30 nm的胶体金。用0.1 mol/L碳酸钾溶液调节pH值为8.2, 于4℃保存。

[0051] (2) 胶体金标记鼠抗牙鲈IgM单抗的制备: 1mL胶体金中加入18 μg单抗为最适标记比例, 取胶体金按此比例加入单抗, 缓慢搅动30 min, 再向其中加入BSA至终浓度为1%, 继续搅拌20 min。将上述溶液经3 000 rpm, 4℃离心20 min, 去除沉淀取上清液, 再将上清液经13 500 rpm, 4℃离心30 min, 弃去上清液得沉淀, 沉淀用金标抗体洗涤液(含1% BSA的0.01 mol/L PBS, pH 7.4)洗涤, 离心, 吸去上清液得到的沉淀即为金标单抗。将沉淀悬浮于金标抗体保存液(含1%蔗糖, 1% BSA, 0.1% Tween-20和0.02%叠氮钠的0.01 mol/L PBS, pH 7.4)中, 4℃保存。

##### [0052] 3. 金标垫2的制备

将金标单抗液体均匀喷涂到玻璃纤维上, 冷冻干燥, 避光密封低温保存。

##### [0053] 4. 硝酸纤维素膜4的制备

用无菌PBS将重组抗原Dps和IPP浓度分别调整为0.8 mg/mL和1.0 mg/mL, 用喷膜仪将浓度为0.8 mg/mL的Dps喷涂于硝酸纤维素膜上作为T1, 将浓度为1.0 mg/mL的IPP喷涂于硝

酸纤维素膜上作为检测线T2,检测线T1、T2之间相距3 mm;调整羊抗小鼠IgG的浓度为250  $\mu$ g/mL,将其喷涂于硝酸纤维素膜上作为质控线8,质控线8和检测线T1相距10 mm,质控线8靠近吸水垫4,检测线靠近样品垫1。将包被好的硝酸纤维素膜干燥后,于37  $^{\circ}$ C封闭液(含2% BSA的0.01 mol/L PBS,pH 7.4)中浸泡1 h,PBST漂洗,干燥。

[0054] 5. 本发明的牙鲆迟缓爱德华氏菌病血清学快速诊断试纸的制作

戴上手套,在载体板5的一侧顺次粘贴上硝酸纤维素膜3、金标垫2、样品垫1和吸水垫4,组装成试纸板。其中硝酸纤维素膜3的上边缘重叠在吸水垫4下边缘之下,硝酸纤维素膜3下边缘重叠在金标垫2上边缘之下,样品垫1的上边缘重叠在金标垫2下边缘之上(如图4)。将组装的试纸板放入切条机槽内切割成3.7 mm宽的试纸,装入包装卡壳,并密封于装有干燥剂的铝箔袋,即为本发明试纸。

[0055] 实施例3:牙鲆迟缓爱德华氏菌病血清学快速诊断试纸的检测方法

#### 1. 检测样品的制备

取患病牙鲆,从尾静脉采取1mL血液,血样室温静置1 h后吸取上清,即为待测鱼血清。将血清稀释10倍,即为检测样品液。

[0056] 2. 牙鲆迟缓爱德华氏菌病血清学快速诊断试纸的应用

平放本发明试纸检测卡,向样品孔中滴加经过处理的检测样品液100  $\mu$ L,等待约10 min,肉眼观察检测结果,根据检测线T1、T2显色情况来判断患病情况。

[0057] 3. 结果判断

I:检测线T、T2和质控线都显现红色,为阳性结果,表明感染过迟缓爱德华氏菌,存在迟缓爱德华氏菌抗体。

[0058] II、III:检测线T1或T2和质控线显现红色,为阴性结果,表明不存在迟缓爱德华氏菌抗体,但存在与抗原Dps或IPP存在交叉反应的其他病原菌的抗体。

[0059] IV:只有质控线显现红色,为阴性结果,表明不存在迟缓爱德华氏菌抗体。

[0060] V:检测线和质控线都不呈现红色,为无效结果,表明试纸失效或操作有问题(如图5)。

[0061] 实施例4:牙鲆迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸的特异性、灵敏度、重复性、稳定性测试

#### 1. 特异性

选择7组样品,样品分别是牙鲆感染迟缓爱德华氏菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、鱼肠道弧菌、海豚链球菌的血清以及健康牙鲆的血清。检测结果显示:第1组样品使T1、T2和质控线均显现红色(I),第2-6组样品只有质控线显现红色(II-VI)(如图6)。

[0062] 2. 灵敏度

将感染迟缓爱德华氏菌的牙鲆血清用PBS 进行梯度稀释(1:20、1:40、1:60、1:80、1:100、1:120),用试纸条进行检测。检测结果显示:稀释度为1:20、1:40、1:60、1:80、1:100的牙鲆血清使试纸条的检测线和质控线处均出现红线(I-V),结果为阳性。稀释度为1:120的牙鲆血清只有质控线显色,结果为阴性(VII)(如图7)。

[0063] 3. 重复性

用不同批次的试纸检测以上6组样品,每个批次试纸重复检测5次,结果无明显差异。

[0064] 4. 稳定性

将试纸放入室温与4 °C下,每15天用试纸检测(1)中7组样品。结果表明:室温下保存时有效期为6个月,4 °C下保存时有效期为12个月。

[0065] 本领域的普通技术人员都会理解,在本发明的保护范围内,对于上述实施例进行修改、添加和替换都是可能的,其都没有超出本发明的保护范围。

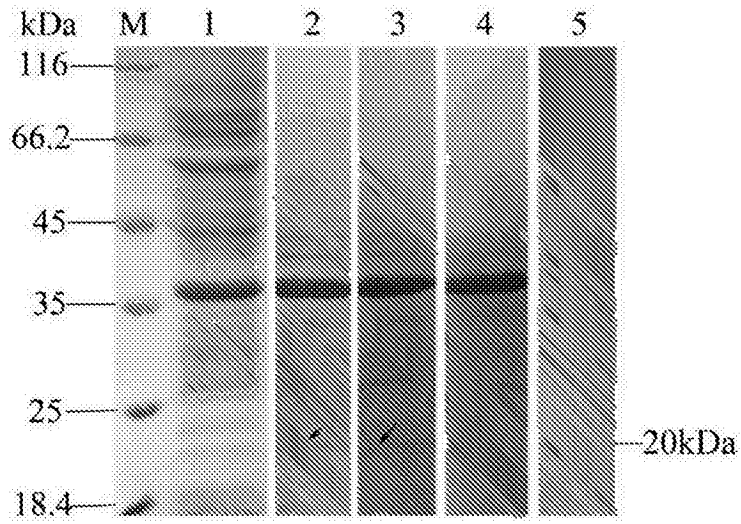


图1

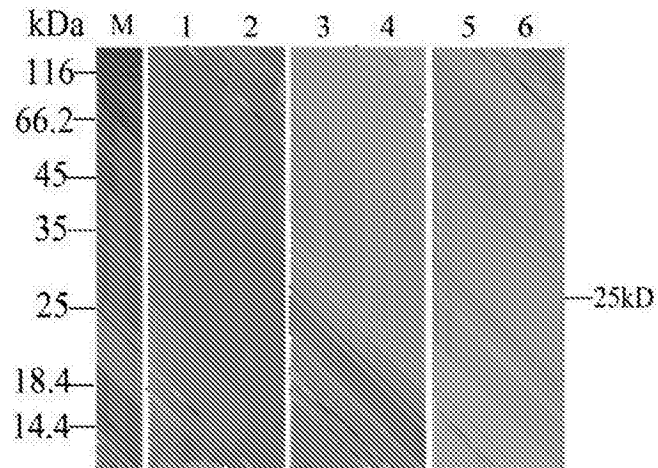


图2

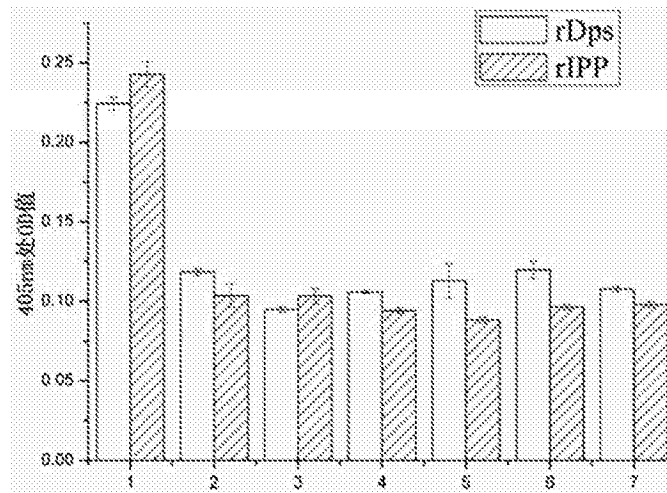


图3

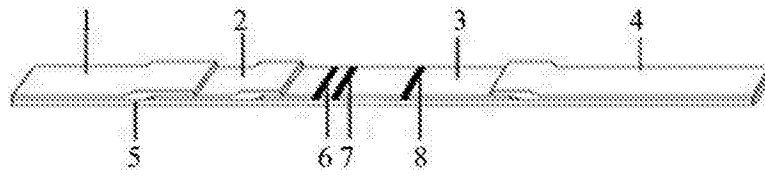


图4

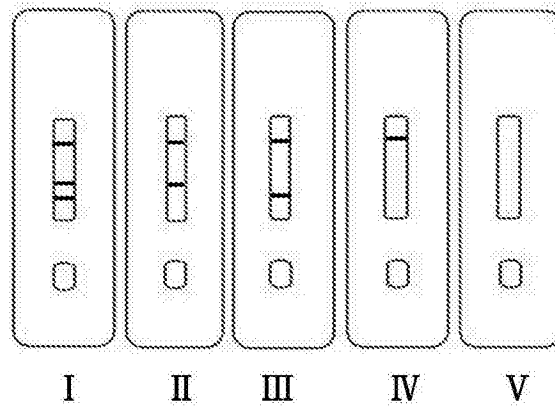


图5

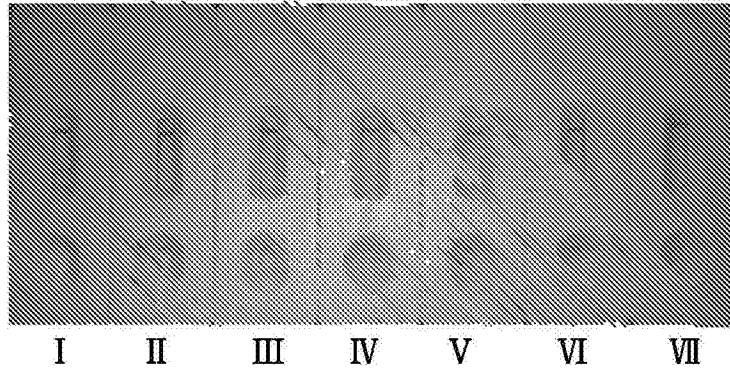


图6

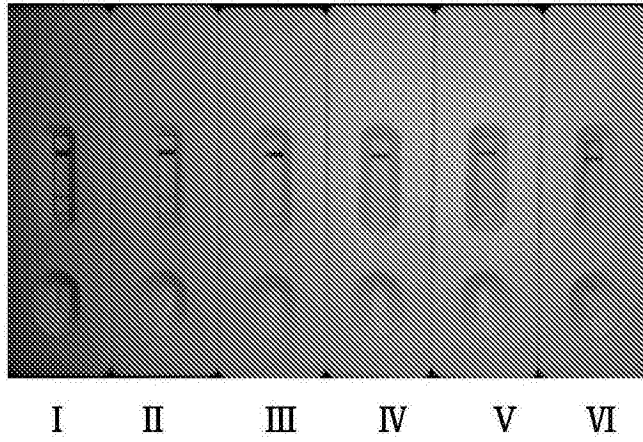


图7

专利名称(译)	一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107607718A</a>	公开(公告)日	2018-01-19
申请号	CN2017110824241.1	申请日	2017-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	战文斌 王欣茹 唐小千 绳秀珍 邢婧		
发明人	战文斌 王欣茹 唐小千 绳秀珍 邢婧		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	王铎		
其他公开文献	CN107607718B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种牙鲈迟缓爱德华氏菌病快速诊断试纸及其制备方法。所述诊断试纸，包括载体板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫位分别于所述载体板的上端、中部和下端；所述金标垫载有金标鼠抗牙鲈免疫球蛋白单抗，其边缘一端重叠在样品垫之下，另一端重叠在硝酸纤维素膜之上；所述硝酸纤维素膜上设有两条检测线T2、T1和一条质控线C，质控线C靠近吸水垫；所述检测线T1、T2包被迟缓爱德华氏菌特异性抗原，分别为：铁结合相关蛋白和无机焦磷酸酶，所述质控线C包被羊抗小鼠IgG。本发明具如下优点：检测快速简便，灵敏准确；成本低，稳定性好；适用于牙鲈养殖过程中迟缓爱德华氏菌病的快速、准确诊断。

序号 Number	蛋白名称 Protein Name	登记号 Accession No.	理论 等电点 Theoretical pI	相对分子 质量 Theoretical MW (Da)	评分/匹配 肽段数目 Mascof Score /No. of Match Peptides	序列 覆盖率 Protein Coverage
1	铁结合相关蛋白 DNA-binding ferritin-like protein	gi 267985766	5.44	19817	265/4	37%
2	无机焦磷酸酶 Inorganic pyrophosphatase	gi 291092003	4.98	19723	203/3	20%