



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459119 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410642350. 8

(22) 申请日 2014. 11. 14

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5378 2011. 10. 21

(71) 申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818 号

(72) 发明人 章礼平 李登峰 刘联国 方静
徐然 陈梅娟

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 何仲

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

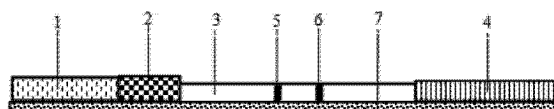
权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其
制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其制备方法,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维膜、吸水垫和底板,特点是在底板上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜、吸水垫,该结合垫上包被有所述的抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物,该硝酸纤维膜上分别包被有甲鱼系统性败血症球病毒抗原构成的检测线和兔抗鸡卵黄抗体构成的质控线,优点是灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确性高。



1. 一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条,其特征在于:所述的试纸条由条形底板和在条形底板上依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫;所述的结合垫上包被有抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物,所述的硝酸纤维素膜上分别设置有由甲鱼系统性败血症病毒抗原包被的检测线和由兔抗鸡卵黄抗体(IgY)包被的质控线。

2. 根据权利要求1所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条,其特征在于所述的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物的制备方法如下:将抗甲鱼系统性败血症卵黄抗体与胶体金颗粒直径为15-30nm的胶体金溶液按6-8 μ g:1mL混合后,在pH5.4的条件下搅拌振荡30-60min,加含10wt%的牛血清白蛋白的PBST缓冲液作为稳定剂,采用低速离心2000-3500rpm,10-20min,再高速离心12000-15000rpm,1-1.5h,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物。

3. 一种根据权利要求1所述的甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 样品垫的制备

将玻璃纤维纸浸泡于含1wt%牛血清白蛋白、2.5wt%蔗糖、1wt%海藻糖、1wt%吐温-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液中30min后取出,于37℃干燥2-3h即得到样品垫,真空封装,4℃保存备用;

(2) 特定包被的结合垫的制备

将玻璃纤维纸浸泡于含1wt%牛血清白蛋白、2.5wt%蔗糖、1wt%海藻糖、1wt%吐温-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液中30min后,于37℃干燥1-2h后,在每平方厘米的玻璃纤维纸上均匀喷涂10-20 μ L的抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物,真空冷冻干燥1-2h,即得到结合垫,真空封装,4℃保存备用;

(3) 特定包被的硝酸纤维素膜的制备

将甲鱼系统性败血症球状病毒抗原用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成检测线;将兔抗鸡卵黄抗体用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成质控线,即得到特定包被的硝酸纤维素膜,真空冷冻干燥1-1.5h,真空封装,4℃保存备用;其中检测线与质控线相互平行,所述的检测线靠近结合垫端,所述的质控线靠近吸水垫端;

(4) 试纸条的制备

将步骤(1)得到的样品垫、步骤(2)得到的特定包被的结合垫、步骤(3)得到的特定包被的硝酸纤维素膜和吸水垫按序搭接并粘贴于底板上,裁成4-6mm宽的细条,即得甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条,真空封装,4℃保存。

4. 根据权利要求3所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于所述的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原的制备方法如下:取攻毒感染死亡的小甲鱼,冰上解剖取其内脏,称量,按1:5-1:20加入预先冰浴过的含有1mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)的TNE缓冲溶液中匀浆,将匀浆液于4℃,8000g离心20min,沉淀用含1mM PMSF的TNE缓冲液重新悬浮匀浆后再次于4℃,8000g离心20min,合并两次离心所得上清液,将上清液于4℃,6000g离心10min后,取上清液于4℃,38000g离心1.5h,用预冷的TM缓冲液洗去沉淀上层疏松部分,取下层结实白色沉淀部分用含1mM PMSF的预冷的TM缓冲液重悬后于4℃,3500g离心5min后,取上清液再次于4℃,38000g离心1.5h,用TM缓冲液洗去上层疏松部分,下层结实的白色沉淀再次用含1mM PMSF的预冷的TM缓冲液重悬后于4℃,3500g离心

5min 后,取上清液再次于 4℃,38000g 离心 1.5h,用 TM 缓冲液洗去上层疏松部分,最终得到的下层结实的白色沉淀即为甲鱼系统性败血症病毒抗原。

5. 根据权利要求 4 所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于所述的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物的制备方法如下:

(1) 抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体的制备

取健康的初产蛋的母鸡作为免疫对象,将甲鱼系统性败血症病毒抗原和弗氏完全佐剂等体积混合,充分乳化后对母鸡的双翅、双腿、背部和胸肌部位肌肉注射进行基础免疫,每只母鸡免疫剂量为 500-800 μ g/mL,15-20 天后,将甲鱼系统性败血症病毒抗原和弗氏不完全佐剂进行等体积混合,充分乳化后对母鸡肌肉注射进行加强免疫,每只母鸡免疫剂量为 400-600 μ g/mL,加强免疫重复进行三次,每次间隔时间为 7-10 天,然后收集鸡蛋测定效价,当卵黄抗体效价 $>1:20000$ 时收集鸡蛋,分离卵黄,用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体;

(2) 胶体金标记抗甲鱼系统性败血症卵黄抗体

将抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 15-30nm 的胶体金溶液按 6-8 μ g:1mL 混合,在 pH5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min,加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂,采用低速离心 2000-3500rpm,10-20min,再高速离心 12000-15000rpm,1-1.5h,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物,将所述的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物是用含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、0.02wt% 叠氮化钠的 pH 7.4 的 0.01M PBS 缓冲液重悬至所述的胶体金溶液体积的 1/10-1/20 作为其工作浓度。

6. 根据权利要求 5 所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体的具体方法如下:称取适量步骤(1)分离得到的卵黄,按体积比 1:9 加入 pH5.0 的 0.05M 的乙酸—乙酸钠缓冲液,搅拌均匀后 4℃ 静置过夜,8000g 离心 20min,取上清液加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%,4℃ 搅拌 6h,10000g 离心 20min,沉淀用 10-20 倍卵黄质量的双蒸馏水重悬,加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%,4℃ 搅拌过夜,10000g 离心 20min,沉淀用少量 pH7.4 的 0.01M 的 PBS 缓冲液重悬后,在 PBS 缓冲液中透析过夜即得到抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体。

7. 根据权利要求 5 所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于步骤(2)中胶体金溶液制备方法如下:将 100mL 0.01wt% 的氯金酸溶液,加热煮沸后,边搅拌边加入 1-2mL 1wt% 柠檬酸三钠迅速摇匀,继续加热,溶液由淡黄色变黑变酒红色,至颜色稳定后继续加热 5-10min,冷却后补足失水至 100mL,无菌密封,4℃ 避光保存。

8. 根据权利要求 5 所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于:所述的检测线距离所述的结合垫 6-8mm;所述的质控线距离所述的吸水垫 6-8mm,所述的检测线和所述的质控线的宽度分别为 1-1.5mm,两条线相距为 5mm。

9. 根据权利要求 5 所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法,其特征在于:所述的 TNE 缓冲液配制方法如下:Tris 6.0578g、NaCl 12g、乙二胺四乙酸二钠 1.8612g,补足双蒸馏水至 1L,调节 pH 至 8.5,高压灭菌;

所述的 TM 缓冲液配制方法如下:Tris 6.0578g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.0338g,补足双蒸馏水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌;

所述的 PBST 缓冲液配制方法如下:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g、 KH_2PO_4

0.2g, 500 μ L 吐温 -20, 补足双蒸馏水至 1L, 调节 pH 至 7.4, 高压灭菌;

所述的 PBS 缓冲液配制方法如下: NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g, 补足双蒸馏水至 1L, 调节 pH 至 7.4, 高压灭菌;

所述的乙酸-乙酸钠缓冲液配方如下: 乙酸钠 2.604g、冰乙酸 1.095g, 补足双蒸馏水至 1L, 调 pH 至 5.0, 高压灭菌。

10. 根据权利要求 3 所述的一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法, 其特征在于: 所述的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原的包被量为 2-4 μ L/cm; 所述的兔抗鸡卵黄抗体的包被量为 1-2 μ L/cm, 所述的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原中含有浓度为 1mM 的苯甲基磺酰氟和 5wt% 的海藻糖。

一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学检测技术,尤其是涉及一种基于卵黄抗体、胶体金免疫层析技术的用以快速检测动物各种组织、血液及粪便中甲鱼系统性败血症病毒的检测试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 甲鱼是最负盛名的滋补强体珍品之一,全身皆可入药,是我国传统的中药材,具有较高的经济价值。随着人民生活水平日益提高以及对甲鱼的食用、药用价值认识的深入,甲鱼的需求量不断增大,人工养殖甲鱼业应用而生。但随着养殖规模的扩大,疾病频频暴发,愈演愈烈,其中主要以甲鱼系统性败血症为主。

[0003] 甲鱼系统性败血症是发生于甲鱼生态养殖场的一种暴发性疾病,6—9 月份为其发病高峰期,其来势凶猛,7-10 天内发病池塘累积死亡率可达 90-100%。病鳖主要为体重 150-200g 的幼鳖,成鳖也有患病感染。该病的原发性病原为甲鱼系统性败血症球状病毒(Soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus,STSSSV)(保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 5378),患病甲鱼主要症状为出血性败血,心、肝、肠胃等组织中存在大量球状病毒颗粒。经调查,甲鱼系统性败血症一旦爆发,常规药物治疗无效,给养殖产业带来巨大经济损失。因此,在苗种购买、引进和发病初期进行检测,确定病情,以便及时采取措施控制传染和情况恶化,对减少养殖场损失具有重要意义。

[0004] 目前,病原体的检测方法主要有分离培养、电镜观察、PCR、ELISA、色谱分析等,这些方法多耗时耗力,需要专用场地和仪器设备,需要专业人员操作。研究人员已成功建立了 ELISA 检测甲鱼系统性败血症病毒(STSSSV)的技术,但是整个检测过程至少需要数小时,且对操作者要求较高,需要酶标仪这样的专业设备。

[0005] 胶体金免疫层析(gold-immunochromatography assay GICA)是 20 世纪 80 年代开始发展起来的新的免疫分析方式,是应用胶体金标记技术,以胶体金作为示踪物,基于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术,它具有简便,快速,特异性强,灵敏度高,费用低的优点。依据胶体金免疫层析技术,在国内外无论人医应用方面,还是兽医应用方便,都已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测各种病原和有毒有害物质的试纸条。但是,目前国内外还没有公开任何关于甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其制备方法的相关研究报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种基于胶体金免疫层析技术的特异性强、灵敏度高、检测速度快、成本低并且操作简便的甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其制备方法,满足了现场快速检测的需求。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条,所述的试纸条由条形底板和在条形底板上依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素

膜及吸水垫；所述的结合垫上包被有抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物，所述的硝酸纤维素膜上分别设置有由甲鱼系统性败血症病毒抗原包被的检测线和由兔抗鸡卵黄抗体(IgY)包被的质控线。

[0008] 所述的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物的制备方法如下：将抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 15-30nm 的胶体金溶液按 6-8 μ g : 1mL 混合，在 pH5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合，加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂，采用低速离心 2000-3500rpm, 10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物，再高速离心 12000-15000rpm, 1-1.5h 去除未结合的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体，取离心管底部暗红色沉淀即得到抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物。

[0009] 一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 样品垫的制备

将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中 30min 后取出，于 37℃ 干燥 2-3h 即得到样品垫，真空封装，4℃ 保存备用；

(2) 特定包被的结合垫的制备

将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中 30min 后，于 37℃ 干燥 1-2h 后，在每平方厘米的玻璃纤维纸上均匀喷涂 10-20 μ L 的抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物，真空冷冻干燥 1-2h，即得到结合垫，真空封装，4℃ 保存备用；

(3) 特定包被的硝酸纤维素膜的制备

将甲鱼系统性败血症球状病毒抗原用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成检测线；将兔抗鸡卵黄抗体用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成质控线，即得到特定包被的硝酸纤维素膜，真空冷冻干燥 1-1.5h，真空封装，4℃ 保存备用；其中检测线与质控线相互平行，所述的检测线靠近结合垫端，所述的质控线靠近吸水垫端；

(4) 试纸条的制备

将步骤(1)得到的样品垫、步骤(2)得到的特定包被的结合垫、步骤(3)得到的特定包被的硝酸纤维素膜和吸水垫按序搭接并粘贴于底板上，裁成 4-6mm 宽的细条，即得甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条，真空封装，4℃ 保存。

[0010] 所述的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原的制备方法如下：取攻毒感染死亡的小甲鱼，冰上解剖取其内脏，称量，按 1:5-1:20 加入预先冰浴过的含有 1mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)的 TNE 缓冲溶液中匀浆，将匀浆液于 4℃, 8000g 离心 20min，沉淀用含 1mM PMSF 的 TNE 缓冲液重新悬浮匀浆后再次于 4℃, 8000g 离心 20min，合并两次离心所得上清液，将上清液于 4℃, 6000g 离心 10min 后，取上清液于 4℃, 38000g 离心 1.5h，用预冷的 TM 缓冲液洗去沉淀上层疏松部分，取下层结实白色沉淀部分用含 1mM PMSF 的预冷的 TM 缓冲液重悬后于 4℃, 3500g 离心 5min 后，取上清液再次于 4℃, 38000g 离心 1.5h，用 TM 缓冲液洗去上层疏松部分，下层结实的白色沉淀部分再次用含 1mM PMSF 的预冷的 TM 缓冲液重悬后于 4℃, 3500g 离心 5min 后，取上清液再次于 4℃, 38000g 离心 1.5h，用 TM 缓冲液洗去上层疏松部分，最终得到的下层结实的白色沉淀即为甲鱼系统性败血症球状病毒抗原。

[0011] 所述的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物的制备方法如下：

(1) 抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体的制备

取健康的初产蛋的母鸡作为免疫对象，将甲鱼系统性败血症病毒抗原和弗氏完全佐剂等体积混合，充分乳化后对母鸡的双翅、双腿、背部和胸肌部位肌肉注射进行基础免疫，每只母鸡免疫剂量为 500-800 μ g/mL，15-20 天后，将甲鱼系统性败血症病毒抗原和弗氏不完全佐剂进行等体积混合，充分乳化后对母鸡肌肉注射进行加强免疫，每只母鸡免疫剂量为 400-600 μ g/mL，加强免疫重复进行三次，每次间隔时间为 7-10 天，然后收集鸡蛋测定效价，当卵黄抗体效价 $>1:20000$ 时收集鸡蛋，分离卵黄，用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体；

(2) 胶体金标记抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体

将抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 15-30nm 的胶体金溶液按 6-8 μ g:1mL 混合，在 pH5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合，加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂，采用低速离心 2000-3500rpm，10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物，再高速离心 12000-15000rpm，1-1.5h 去除未结合的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体，取离心管底部暗红色沉淀即得到抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物，将所述的抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物用含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、0.02wt% 叠氮化钠的 pH 7.4 的 0.01M PBS 缓冲液重悬至所述的胶体金溶液体积的 1/10-1/20 作为其工作浓度。

[0012] 用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体的具体方法如下：取步骤(1)分离得到的卵黄，按体积比 1:9 加入 pH5.0 的 0.05M 的乙酸-乙酸钠缓冲液，搅拌均匀后 4℃ 静置过夜，8000g 离心 20min，取上清液加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%，4℃ 搅拌 6h，10000g 离心 20min，取沉淀用 10-20 倍卵黄质量的双蒸馏水重悬，加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%，4℃ 搅拌过夜，10000g 离心 20min，沉淀用少量 pH7.4 的 0.01M 的 PBS 缓冲液重悬后，在 PBS 缓冲液中透析过夜，即得到抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体。

[0013] 步骤(2)中胶体金溶液制备方法如下：将 100mL 0.01wt% 的氯金酸溶液，加热煮沸后，边搅拌边加入 1-2mL 1wt% 柠檬酸三钠迅速摇匀，继续加热，溶液由淡黄色变黑变酒红色，至颜色稳定后继续加热 5-10min，冷却后补足失水至 100 mL，无菌密封，4℃ 避光保存。

[0014] 所述的检测线距离所述的结合垫 6-8mm；所述的质控线距离所述的吸水垫 6-8mm，所述的检测线和所述的质控线的宽度分别为 1-1.5mm，两条线相距为 5mm。

[0015] 所述的 TNE 缓冲液配制方法如下：Tris 6.0578g、NaCl 12g、乙二胺四乙酸二钠 1.8612g，补足双蒸馏水至 1L，调节 pH 至 8.5，高压灭菌；

所述的 TM 缓冲液配制方法如下：Tris 6.0578g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.0338g，补足双蒸馏水至 1L，调节 pH 至 7.4，高压灭菌；

所述的 PBST 缓冲液配制方法如下：NaCl 8g、KCl 0.2g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g，500 μ L 吐温-20，补足双蒸馏水至 1L，调节 pH 至 7.4，高压灭菌；

所述的 PBS 缓冲液配制方法如下：NaCl 8g、KCl 0.2g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g，补足双蒸馏水至 1L，调节 pH 至 7.4，高压灭菌；

所述的乙酸-乙酸钠缓冲液配方如下：乙酸钠 2.604g、冰乙酸 1.095g，补足双蒸馏水至 1L，调 pH 至 5.0，高压灭菌。

[0016] 所述的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原的包被量为 2-4 μ L/cm；所述的兔抗鸡卵

黄抗体的包被量为 1-2 $\mu\text{L}/\text{cm}$, 所述的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原中含有浓度为 1mM 的苯甲基磺酰氟和 5wt% 的海藻糖作为蛋白酶抑制剂和抗原保护剂。

[0017] 本发明选用甲鱼系统性败血症球状病毒作为检测线, 抗甲鱼系统性败血症球状病毒特异性卵黄抗体作为胶体金标记的抗体, 利用竞争法来检测待测样品中是否含有甲鱼系统性败血症球状病毒。通过待检样品中的甲鱼系统性败血症球状病毒与包被于硝酸纤维膜上的甲鱼系统性败血症球状病毒抗原共同竞争结合抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体-胶体金标记物。若待检样品中甲鱼系统性败血症球状病毒的量高于试纸条的检测限, 抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体-胶体金标记物与样品中甲鱼系统性败血症球状病毒全部结合, 从而不与固定在硝酸纤维膜上的病毒结合而不出现红色条带而显阳性; 若待检样品中不含甲鱼系统性败血症球状病毒或其量低于试纸条的检测限, 抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体-胶体金标记物不能与样品中甲鱼系统性败血症球状病毒全部结合, 这样金标抗体在层析过程中会被固定在硝酸纤维膜上的病毒结合而出现红色条带而显阴性。因此, 若待测样品试纸条的检测线和质控线同时出现红色条带, 则判断为阴性样品; 若待测样品试纸条检测线不出现红色条带, 同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品; 若质控线上没有红色条带出现, 则该试纸条无效。

[0018] 与现有技术相比, 本发明的优点在于

- 1、检测快速: 整个检测过程只需 5-10 分钟, 能够满足现场检测的需要;
- 2、检测准确率高、特异性强: 本反应与其他病毒没有交叉反应, 检测准确性能达到 95% 以上, 与操作复杂的 ELISA 结果相同;
- 3、携带方便, 操作简便: 本发明改变了对甲鱼系统性败血症球状病毒的检测必须由专业人士
- 4、本发明的检测试纸条制备工艺简单, 成本低廉, 不需要任何特殊仪器、设备;
- 5、本发明的检测试纸条储存方便, 对温度要求不高, 在 4℃ 可有效保存半年以上;
- 6、本发明的检测试纸条不仅可以用于检测动物的各组织, 也可以用于检测血液和粪便。

[0019] 甲鱼系统性败血症球状病毒 (Soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus, STSSSV), 毒株为 P1015 株, 保藏号为 CGMCC No. 5378, 于 2011 年 10 月 21 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所。

附图说明

[0020] 图 1 为本发明试纸条的结构示意图, 图中 1 为样品垫, 2 为结合垫, 3 为硝酸纤维素膜, 4 为吸收垫, 5 为检测线, 6 为质控线, 7 为条形底板;

图 2 为本发明试纸条的制备工艺流程图。

具体实施方式

[0021] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0022] 具体实施例 1

一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条, 如图 1 所示, 该试纸条由条形底板 7 和在条形

底板 7 上依次搭接的样品垫 1、结合垫 2、硝酸纤维素膜 3 及吸水垫 4；结合垫 2 上包被有抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物，硝酸纤维素膜 3 上分别设置有由甲鱼系统性败血症病毒抗原包被的检测线 5 和由兔抗鸡卵黄抗体(IgY)包被的质控线 6。

[0023] 上述抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体—胶体金标记物的制备方法如下：将抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体与胶体金颗粒直径 15-30nm 的胶体金溶液按 6-8 μg :1mL 混合，在 pH5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合，加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂，采用低速离心 2000-3500rpm, 10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物，再高速离心 12000-15000rpm, 1-1.5h 去除未结合的抗甲鱼系统性败血症病毒卵黄抗体，取离心管底部暗红色沉淀即得到抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物。

[0024] 具体实施例 2

快速检测甲鱼系统性败血症球状病毒胶体金试纸条的制备方法，如图 2 所示，其具体操作步骤如下：

(1) 甲鱼系统性败血症球状病毒的纯化

取攻毒感染死亡的小甲鱼，冰上解剖取其内脏，称量后按体积比 (1:5)-(1:20) 加入预先冰浴过的含有 1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 TNE 缓冲溶液中匀浆，将匀浆液于 4℃, 8000g 离心 20min, 沉淀用含 1mM PMSF 的 TNE 缓冲液重新悬浮匀浆后再次于 4℃, 8000g 离心 20min, 合并两次离心所得上清液，将上清液于 4℃, 6000g 离心 10min 后，取上清液于 4℃, 38000g 离心 1.5h, 用预冷 TM 缓冲液洗去沉淀上层疏松部分，取下层结实白色沉淀部分用含 1mM PMSF 的预冷的 TM 缓冲液重悬后于 4℃, 3500g 离心 5min 后，取上清液再次于 4℃, 38000g 离心 1.5h, 用 TM 缓冲液洗去上层疏松部分，下层结实的白色沉淀再次用含 1mM PMSF 的预冷的 TM 缓冲液重悬后于 4℃, 3500g 离心 5min 后，取上清液再次于 4℃, 38000g 离心 1.5h, 用 TM 缓冲液洗去上层疏松部分，最终得到的下层结实的白色沉淀即为甲鱼系统性败血症球状病毒抗原。该甲鱼系统性败血症球状病毒 (Soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus, STSSSV), 毒株为 P1015 株，保藏号为 CGMCC No. 5378, 于 2011 年 10 月 21 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；

(2) 抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体的制备

取健康的初产蛋的母鸡作为免疫对象，将甲鱼系统性败血症球状病毒抗原和弗氏完全佐剂等体积混合，充分乳化后对母鸡的双翅、双腿、背部和胸肌部位肌肉注射进行基础免疫，每只母鸡免疫剂量为 500-800 μg /mL, 15-20 天后，将甲鱼系统性败血症球状病毒抗原和弗氏不完全佐剂进行等体积混合，充分乳化后对母鸡肌肉注射进行加强免疫，每只母鸡免疫剂量为 400-600 μg /mL, 加强免疫重复进行三次，每次间隔时间为 7-10 天，进行三次免疫后收集鸡蛋测定效价，当卵黄抗体效价 $>1:20000$ 时收集鸡蛋，分离卵黄，用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体。卵黄抗体的纯化的具体方法如下：称取适量卵黄，按 1:9 加入乙酸-乙酸钠缓冲液 (0.05M, pH5.0)，搅拌均匀后 4℃ 静置过夜，8000g 离心 20min, 取上清液加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%，4℃ 搅拌 6h, 10000g 离心 20min, 沉淀用初始卵黄质量 10-20 倍的蒸馏水重悬，加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%，4℃ 搅拌过夜，10000g 离心 20min, 取沉淀用少量 PBS 溶液 (0.01M, pH7.4) 重悬，在 PBS 溶液中透析过夜，即得到抗甲鱼系统性球状病毒卵黄抗体；

(3) 胶体金标记抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体的方法

用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金溶液。用新制的去离子水配制100mL 0.01%的氯金酸,加热煮沸后,边搅拌边加入2mL 1%柠檬酸三钠迅速摇匀,继续加热,溶液由淡黄色变黑变酒红色,至颜色稳定后继续加热5-10min,冷却后补足失水至100mL,无菌密封,4℃避光保存;

将抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体与胶体金颗粒直径为15-30nm的胶体金溶液按6-8 μ g:1mL混合,在pH5.4的条件下通过搅拌振荡30-60min使其结合,加含10wt%的牛血清蛋白的PBST缓冲液作为稳定剂,采用低速离心(2000-3500rpm,10-20min)去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物,再高速离心(12000-15000rpm,1-1.5h)去除未结合的卵黄抗体,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物;将所述的抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物用含1wt%牛血清白蛋白、2.5wt%蔗糖、1wt%海藻糖、0.02wt%叠氮化钠的pH 7.4的0.01M PBS缓冲液重悬至胶体金溶液体积的1/10-1/20作为其工作浓度;

(4) 结合垫的包被

将玻璃纤维纸浸泡于含1wt%牛血清白蛋白、2.5wt%蔗糖、1wt%海藻糖、1wt%吐温-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液中30min后,37℃干燥1-2h后,在每平方厘米的玻璃纤维纸上均匀喷涂10-20 μ L抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物,真空冷冻干燥1-2h,即得到结合垫,真空封装,4℃保存备用;

(5) 样品垫的处理

将玻璃纤维纸浸泡于含1wt%牛血清白蛋白、2.5wt%蔗糖、1wt%海藻糖、1wt%吐温-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液中30min后取出,37℃干燥2-3h即得到样品垫,真空封装,4℃保存备用;

(6) 硝酸纤维膜的包被

将甲鱼系统性败血症球状病毒抗原用点膜仪将其包被于硝酸纤维膜上形成检测线,包被量为2-4 μ L/cm;将兔抗鸡卵黄抗体用点膜仪将其包被于硝酸纤维膜上形成质控线,包被量为1-2 μ L/cm,即得到特定包被的硝酸纤维素膜,真空冷冻干燥1-1.5h,真空封装,4℃保存备用;其中检测线与质控线相互平行,所述的检测线靠近结合垫端,所述的质控线靠近吸水垫端;甲鱼系统性败血症球状病毒抗原中含有浓度为1mM的苯甲基磺酰氟(蛋白酶抑制剂)和5wt%的海藻糖(抗原保护剂);

(7) 试纸条组装

将样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维膜(3)、吸水垫(4)按图1所示的顺序依次粘附在条形底板(7)上,条形底板作为支撑载体,由下及上是由玻璃纤维纸组成的样品吸收区,然后是吸附了胶体金所标记的卵黄抗体的玻璃纤维层,其次是硝酸纤维膜,在硝酸纤维膜与条形底板之间为一高分子材料制成的背衬膜,来阻止粘合剂中的有机溶剂对硝酸纤维膜上所包被抗体的破坏。最上一层是吸水层,由滤纸组成,外面用胶带封住,成为手持部分。各层之间均有1.5mm左右的重叠交叉。将试纸条切成4-6mm宽的小条,真空封装,4℃保存。

[0025] 其中步骤(1)中采用的TNE缓冲液配制方法是:Tris 6.0578g、NaCl 12g、乙二醇四乙酸二钠 1.8612g补足双蒸馏水至1L,调节pH至8.5,高压灭菌;TM缓冲液配制方法是:Tris 6.0578g、MgCl₂·6H₂O 2.0338g补足双蒸馏水至1L,调节pH至7.4,高压灭菌。

[0026] 步骤(2)(3)(4)、(5)中采用的 PBS 缓冲液配制方法是:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g 补足双蒸馏水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌。

[0027] 步骤(3)中采用的 PBST 缓冲液配制方法如下:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g,500 μL 吐温-20,补足双蒸馏水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌。

[0028] 步骤(2)中的乙酸-乙酸钠缓冲液配方如下:乙酸钠 2.604g、冰乙酸 1.095g,补足双蒸馏水至 1L,调 pH 至 5.0,高压灭菌。

[0029] 具体实施例 3

胶体金试纸条对临床样品的检测,具体步骤如下:

1、对组织样品的检测

取患病甲鱼的组织样品,将 TNE 缓冲液滴加于组织样上,破碎组织,静置 5 分钟后,将检测试纸条插入待检样品中,10 分钟后观察结果:只在试纸条的质控区出现一条红线者为阳性,即样品中带有甲鱼系统性败血症球状病毒;若试纸条检测线和质控线同时出现红线者为阴性。

[0030] 2、对腹水样品的检测

取患病甲鱼的腹水,将检测试纸条插入待检甲鱼腹水样品中,10 分钟后观察结果。判断标准同 1。

[0031] 3、对肝囊内容物上清的检测

取患病甲鱼的肝囊内容物,静置取上清,将检测试纸条插入待检甲鱼肝囊内容物上清样品中,10 分钟后观察结果。判断标准同 1。

[0032] 4、对血液样品的检测

对健康甲鱼进行攻毒感染试验,攻毒后 48h,72h 取其血清,将检测试纸条插入待测甲鱼血清中,10 分钟后观察结果。判断标准同 1。

[0033] 5、对粪便样品的检测

收集患病甲鱼粪便,用 TNE 缓冲液溶解粪便样品后取上清,将检测试纸条插入待检样品中,10 分钟后观察结果。判断标准同 1。

[0034] 6、对患病甲鱼养殖池水的检测

取患病甲鱼养殖池水,将检测试纸条插入待检样品中,10 分钟后观察结果。判断标准同 1。

[0035] 7、对阴性样品的检测

将检测试纸条插入不含甲鱼系统性败血症病毒的双蒸馏水中和健康甲鱼血清中,10 分钟后观察结果,有两条带者为阴性。

[0036] 8、所有临床样品检测结果用酶联免疫吸附法(ELISA)进行比较。

[0037] 检测结果见表 1,我们可以看到患病甲鱼的组织样品,腹水样品,肝囊内容物上清样品,血清样品以及粪便样品均只有质控区出现一条红线,即检测结果均为阳性。对于不含甲鱼系统性败血症病毒的双蒸馏水和健康甲鱼血样的检测,结果试纸条的检测线和质控线均出现了条带,为阴性结果。所有检测结果均与 ELISA 结果相同,两者具有高度一致性。感染 48h 后的甲鱼血清显示阳性结果,表明我们可以通过胶体金试纸条在甲鱼患病初期进行检测确定病因,从而对症下药,及时防治,防止病情扩大,减少养殖户损失,同时也可以作为在苗种引进时的一种初步筛选工具。而用胶体金试纸条检测患病甲鱼粪便可确定病因,更

是方便实用,养殖户只需收集甲鱼的粪便即可。

[0038] 表 1 甲鱼系统性败血症球状病毒试纸条检测临床样品结果

检测样品	胶体金试纸条	酶联免疫吸附法
攻毒 48h 后甲鱼血清	+	+
攻毒 72h 后甲鱼血清	+	+
患病甲鱼组织	+	+
患病甲鱼腹水	+	+
患病甲鱼肝囊物	+	+
患病甲鱼粪便	+	+
健康甲鱼血清	—	—
双蒸蒸馏水	—	—

+ :试纸条只出现质控线一条红线,为阳性结果 ;

— :试纸条出现两条红线,为阴性结果。

[0039] 具体实施例 4

胶体金试纸条的灵敏度检测,具体步骤如下 :

按具体实施例 2 中步骤(1)的方法,纯化甲鱼系统性败血症球状病毒,用少量的 PBS 缓冲液的进行重悬稀释,用超微量核酸 / 蛋白测定仪 (Nanodrop 2000) 进行测定其蛋白含量。用 PBS 缓冲液将其进行一系列的梯度稀释,分别稀释为 5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 。吸取甲鱼系统性败血症球状病毒液 (100 μL) 滴加于检测试纸条的样品垫上,静置 10 分钟后观察结果。以检测线消失的最低检测浓度为其最低检测极限。

[0040] 检测结果见表 2,我们可以看出在甲鱼系统性败血症球状病毒浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ 时试纸条上均出现两条线,检测结果为阴性,而当甲鱼系统性败血症球状病毒浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,检测线消失,只有控制区出现一条红线,检测结果为阳性。因此,甲鱼系统性败血症球状病毒检测试纸条的检测极限为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0041] 表 2 甲鱼系统性败血症球状病毒试纸条灵敏度检测结果

甲鱼系统性败血症球状病毒浓度	检测结果
5 $\mu\text{g/mL}$	—
15 $\mu\text{g/mL}$	—
25 $\mu\text{g/mL}$	—
50 $\mu\text{g/mL}$	+
100 $\mu\text{g/mL}$	+

+ :试纸条只出现质控线一条红线,为阳性结果 ;

— :试纸条出现两条红线,为阴性结果。

[0042] 具体实施例 5

甲鱼系统性败血症球状病毒检测试纸条的特异性检测,其具体步骤如下 :

将对虾白斑综合症病毒 (WSSV)、三疣梭子蟹呼肠孤病毒 (CRV) 和甲鱼系统性败血症球状病毒 (STSSSV) 分别稀释至 100 $\mu\text{g/mL}$,用制备的试纸条分别检测这三种病毒,每种病毒做三个重复,10 分钟后观察结果。若试纸条只在控制区出现一条红线,则检测结果为阳性,若试纸条的检测区和控制区都分别出现一条红线,则检测结果为阴性。

[0043] 检测结果见表 3, 我们可以看出用试纸条检测对虾白斑综合症(WSSV)和三疣梭子蟹呼肠孤病毒(CRV)时, 在试纸条的检测区和控制区分别都出现了一条红线, 即检测结果为阴性; 而用试纸条检测甲鱼系统性败血症球状病毒时只在试纸条的控制区出现了一条红线, 检测结果为阳性。由此可见, 这种甲鱼系统性败血症球状病毒检测试纸条具有良好的特异性, 它不与对虾白斑综合症(WSSV)和三疣梭子蟹呼肠孤病毒(CRV)发生交叉反应。

[0044] 表 3 甲鱼系统性败血症球状病毒试纸条特异性检测结果

检测样品	检测结果
对虾白斑综合症 (WSSV)	—
三疣梭子蟹呼肠孤病毒 (CRV)	—
甲鱼系统性败血症球状病毒 (STSSV)	+

[0045] 当然, 上述说明并非对本发明的限制, 本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内, 作出的变化、改型、添加或替换, 也应属于本发明的保护范围。

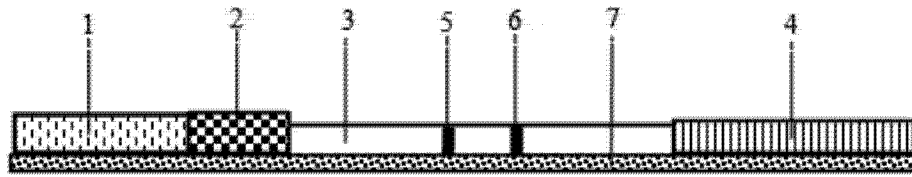


图 1

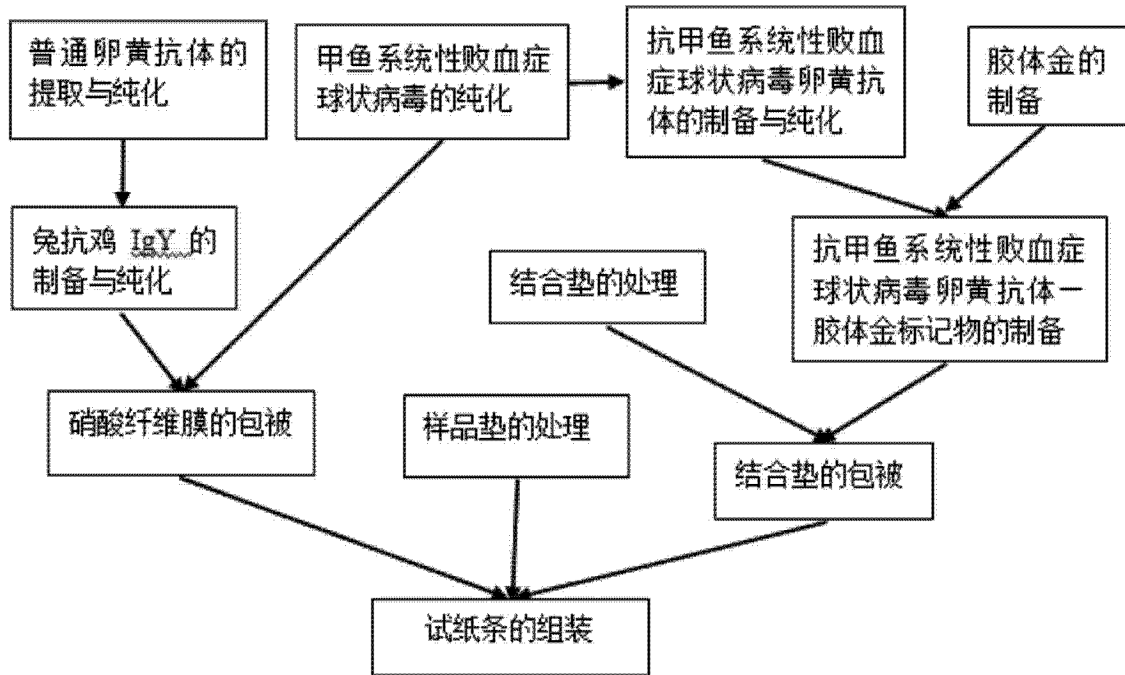


图 2

专利名称(译)	一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN104459119A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410642350.8	申请日	2014-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	章礼平 李登峰 刘联国 方静 徐然 陈梅娟		
发明人	章礼平 李登峰 刘联国 方静 徐然 陈梅娟		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/56983 G01N2800/26		
代理人(译)	何仲		
其他公开文献	CN104459119B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甲鱼系统性败血症病毒检测试纸条及其制备方法，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维膜、吸水垫和底板，特点是在底板上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜、吸水垫，该结合垫上包被有所述的抗甲鱼系统性败血症球状病毒卵黄抗体—胶体金标记物，该硝酸纤维膜上分别包被有甲鱼系统性败血症球病毒抗原构成的检测线和兔抗鸡卵黄抗体构成的质控线，优点是灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确性高。

