



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105372422 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201510753943. 6

(22) 申请日 2015. 11. 06

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2015177 2015. 10. 21

CCTCC NO:C2015178 2015. 10. 21

(71) 申请人 通威股份有限公司

地址 610000 四川省成都市高新区二环路南
四段 11 号

(72) 发明人 肖丹 刘天强 黄冠军 阳涛
刘衍鹏 戴景辉

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 张娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

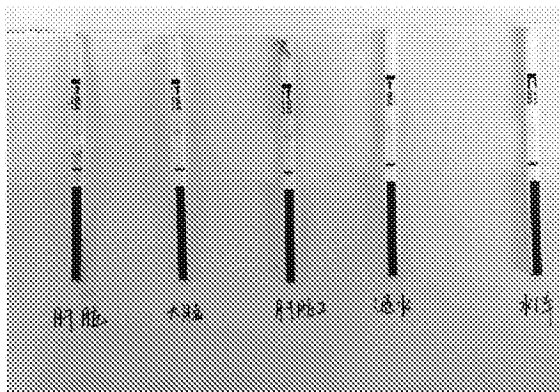
权利要求书2页 说明书9页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

无乳链球菌的胶体金快速检测试纸

(57) 摘要

本发明公开了一种无乳链球菌的胶体金快速检测试纸,它为双抗体夹心法检测试纸,其中,采用的两种抗体为中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体以及中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株分泌的抗体。本发明无乳链球菌单克隆抗体制备的胶体金快速检测试纸,其灵敏度高,特异性好,操作方便、快速,解决了现有无乳链球菌检测的问题,应用前景良好。



1. 一种检测无乳链球菌的胶体金免疫层析试纸,其特征在于:采用的两种无乳链球菌抗体为中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体以及中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株分泌的抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测试纸,其特征在于:所述中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体用于制备金标抗体;中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株分泌的抗体用于包被硝酸纤维素膜,形成检测区。

3. 根据权利要求1所述的检测试纸,其特征在于:所述抗体的制备方法如下:

(1) 分别取保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株和保藏号:CCTCC NO:C2015178的杂交瘤细胞株,注射入BALB/c小鼠腹水中增殖;

(2) 收集腹水,纯化,即可。

4. 根据权利要求3所述的检测试纸,其特征在于:步骤(2)中,所述纯化是采用Protein G Sepharose亲和层析柱纯化。

5. 根据权利要求1~4任意一项所述的检测试纸,其特征在于:所述试纸的结构如下:包括PVC底板(1)和设于其上的硝酸纤维素膜(2),样品垫(7)通过胶体金垫(3)与硝酸纤维素膜(2)一端连接,硝酸纤维素膜(2)另一端搭接有吸水垫(4),所述硝酸纤维素膜(2)上靠近胶体金垫(3)的一侧设有检测区(5),靠近吸水垫(4)的一侧设有质控区(6)。

6. 根据权利要求5所述的检测试纸,其特征在于:所述样品垫(7)搭接在胶体金垫(3)一端上表面,胶体金垫(3)另一端搭接在硝酸纤维素膜(2)上表面。

7. 根据权利要求5所述的检测试纸,其特征在于:所述质控区(6)上包被有羊抗鼠的多克隆抗体(10)。

8. 一种制备权利要求1~7任意一项所述的检测试纸的方法,其特征在于:步骤如下:

a、取中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体,与胶体金混合,制备金标抗体,喷涂于玻璃纤维膜上,制得胶体金垫;

b、取硝酸纤维素膜,粘贴于PVC底板(1)上,将样品垫通过胶体金垫与硝酸纤维素膜的一端连接,再在硝酸纤维素膜的另一端搭接吸水垫;

c、再在硝酸纤维素膜靠近胶体金垫的一侧喷涂取中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株包被的抗体作为检测区,在靠近吸水垫的一侧包被羊抗鼠IgG作为质控区。

9. 一种无乳链球菌的免疫学检测试剂盒,其特征在于:它包括如下两种无乳链球菌单克隆抗体:采用的两种无乳链球菌抗体为中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体以及中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株分泌的抗体。

10. 根据权利要求9所述的检测试剂盒,其特征在于:所述抗体的制备方法如下:

(1) 分别取保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株和保藏号:CCTCC NO:C2015178的杂交瘤细胞株,注射入BALB/c小鼠腹水中增殖;

(2) 收集腹水,纯化,即可。

11. 根据权利要求10所述的检测试剂盒,其特征在于:步骤(2)中,所述纯化是采用Protein G Sepharose亲和层析柱纯化。

12. 根据权利要求 9 ~ 11 任意一项所述的检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒还包括免疫荧光检测用试剂、放射免疫检测用试剂、酶联免疫吸附检测用试剂或免疫金胶体检测用试剂。

13. 权利要求 1 ~ 7 任意一项所述的检测试纸以及权利要求 9 ~ 12 任意一项所述的检测试剂盒在制备检测无乳链球菌的试剂中的用途。

14. 一种无乳链球菌的检测方法, 其特征在于: 步骤如下: 用权利要求 1 ~ 7 任意一项所述的检测试纸的样品垫浸润待检样品, 观察检测区和质控区是否显色, 即可。

15. 一种无乳链球菌的检测方法, 其特征在于: 步骤如下: 取待检样本, 用权利要求 9 ~ 12 任意一项所述的检测试剂盒检测, 即可。

16. 根据权利要求 14 或者 15 所述的检测方法, 其特征在于: 所述待检样本为鱼体或者养殖水体。

无乳链球菌的胶体金快速检测试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及一种无乳链球菌的胶体金快速检测试纸。

背景技术

[0002] 罗非鱼是原产于非洲的热带鱼类,上世界七八十年代我国多次从国外引种,并选育出长势快、产量高、抗病力强的品种,此后迅速成功推广养殖。目前,我国不仅是世界上最大的罗非鱼养殖生产国,也是最大的罗非鱼出口国。国内罗非鱼养殖集中在广东、海南、广西、福建等南方地区。2009 年开始在罗非鱼养殖密集区先后暴发罗非鱼“突眼症”,该病来势凶猛,发病率高达 35%,发病鱼死亡率接近 100%,且病害持续时间长,药物防治难以控制病情,养殖户损失惨重。

[0003] 及时准确的发现和诊断病原,是成功预防和治疗罗非鱼链球菌病的前提。目前,对于无乳链球菌的诊断,主要采用(1)分子生物学的方法,如 PCR 法进行诊断,该类方法依赖于贵重的仪器设备和专业的技术人员,检测时间长达 4-6 个小时,非常不利于在基层推广运用。(2)常规的分离培养法,依赖于专业操作人员的显微镜形态判断,容易造成误判,此类方法的培养时间长达 18-24 个小时,也不适用于无乳链球菌的快速检测。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种无乳链球菌的胶体金快速检测试纸。

[0005] 胶体金免疫层析检测试纸:是以硝酸纤维素膜为固相载体,以胶体金作为示踪标记物,与抗体结合,在微孔膜的渗滤作用或毛细管作用下,利用抗原抗体的反应的高度特异性和胶体金特有的颜色对金标抗体与抗原或二抗的结合进行示踪,显示肉眼可见的红色条带或斑点,从而实现对待测物的定性或定量分析。

[0006] 本发明双抗体胶体金免疫层析试纸:即是以硝酸纤维素膜为固相载体,以胶体金作为示踪标记物,特异性的抗体 1 以条带状固定在硝酸纤维素膜上,另一特异性的抗体 2 与胶体金溶液结合形成的金标抗体。当待测样品加到试纸条一端的样品垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的金标抗体,相互反应后再移动至固定有抗体 1 的检测区时,待测物和金标抗体形成的复合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,通过可目测的胶体金标记物得到肉眼可见的红色条带,从而实现对待测物的定性或定量分析。

[0007] 本发明无乳链球菌的胶体金免疫层析检测试纸,它是基于双抗体夹心检测原理研制的胶体金免疫层析试纸,其中,采用的两种抗体为中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177 的细胞株分泌的抗体以及中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178 的细胞株分泌的抗体。

[0008] 本发明保藏号为:CCTCC NO:C2015177 的细胞株,于 2015 年 10 月 21 日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),其地址为:中国·武汉·武汉大学。

[0009] 本发明保藏号为:CCTCC NO:C2015178 的细胞株,于 2015 年 10 月 21 日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),其地址为:中国·武汉·武汉大学。

[0010] 其中,所述中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体用于制备金标抗体;中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株分泌的抗体用于包被硝酸纤维素膜,形成检测区。

[0011] 优选地,所述抗体的制备方法如下:

[0012] (1) 分别取保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株和保藏号:CCTCC NO:C2015178的杂交瘤细胞株,注射入BALB/c小鼠腹水中增殖;

[0013] (2) 收集腹水,纯化,即可。

[0014] 优选地,步骤(2)中,所述纯化是采用Protein G Sepharose亲和层析柱纯化。

[0015] 优选地,所述试纸的结构如下:包括PVC底板和设于其上的硝酸纤维素膜,样品垫通过胶体金垫与硝酸纤维素膜一端连接,硝酸纤维素膜另一端搭接有吸水垫,所述硝酸纤维素膜上靠近胶体金垫的一侧设有检测区,靠近吸水垫的一侧设有质控区。

[0016] 优选地,所述样品垫搭接在胶体金垫一端上表面,胶体金垫另一端搭接在硝酸纤维素膜上表面。

[0017] 进一步优选地,所述质控区上包被有一层羊抗鼠的多克隆抗体层。

[0018] 本发明还提供了制备前述检测试纸的方法,步骤如下:

[0019] a、取中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体,与胶体金混合,制备金标抗体,喷涂于玻璃纤维膜上,制得胶体金垫;

[0020] b、取硝酸纤维素膜,粘贴于PVC底板(1)上,将样品垫通过胶体金垫与硝酸纤维素膜的一端连接,再在硝酸纤维素膜的另一端搭接吸水垫;

[0021] c、再在硝酸纤维素膜靠近胶体金垫的一侧喷涂取中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株包被的抗体作为检测区,在靠近吸水垫的一侧包被羊抗鼠IgG作为质控区。

[0022] 本发明还提供了一种检测无乳链球菌的免疫检测试剂盒,它包括如下两种无乳链球菌单克隆抗体:采用的两种无乳链球菌抗体为中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株分泌的抗体以及中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号:CCTCC NO:C2015178的细胞株分泌的抗体。

[0023] 所述抗体的制备方法如下:

[0024] (1) 分别取保藏号:CCTCC NO:C2015177的细胞株和保藏号:CCTCC NO:C2015178的杂交瘤细胞株,注射入BALB/c小鼠腹水中增殖;

[0025] (2) 收集腹水,纯化,即可。

[0026] 步骤(2)中,所述纯化是采用Protein G Sepharose亲和层析柱纯化。

[0027] 优选地,所述试剂盒还包括免疫荧光检测用试剂、放射免疫检测用试剂、酶联免疫吸附检测用试剂或免疫金胶体检测用试剂。

[0028] 本发明两种单克隆抗体可以与无乳链球菌有效结合,带有的显色物质显色明显,可以与现有任意的免疫检测技术常规用试剂联用,检测无乳链球菌。

[0029] 现有的免疫检测技术包括免疫荧光技术、放射免疫检测技术、酶联免疫吸附技术和免疫金胶体技术,本发明两种单克隆抗体可以分别与常规的免疫荧光检测试剂、放射免疫检测试剂、酶联免疫吸附检测试剂或免疫金胶体检测试剂联合使用,使用免疫荧光技术、放射免疫检测技术、酶联免疫吸附技术或免疫金胶体技术,准确检测无乳链球菌。

[0030] 1. 免疫荧光技术:免疫荧光技术是利用荧光素标记的抗体(或抗原)检测组织、细胞或血清中的相应抗原(或抗体)的方法。2. 放射免疫检测技术:放射免疫检测技术是目前灵敏度最高的检测技术,利用放射性同素标记抗原(或抗体),与相应抗体(或抗原)结合后,通过测定抗原抗体结合物的放射检测结果。3. 酶联免疫吸附检测技术(ELISA):酶联免疫检测是目前应用最广泛的免疫检测方法。该方法是将二抗标记上酶,抗原抗体反应的特异性与酶催化底物的作用结合起来,根据酶作用底物后的显色颜色变化来判断试验结果,其敏感度可达 ng 水平。常见用于标记的酶有辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)等。4. 免疫金胶体技术:该方法是将二抗标记上胶体金颗粒,利用抗原抗体间的特异性反应,最终将胶体金标记的二抗吸附于渗滤膜上,此方法简单,快速,广泛应用于临床筛查。

[0031] 本发明还提供了前述的检测试纸和检测试剂盒在制备检测无乳链球菌中的用途。

[0032] 本发明还提供了一种无乳链球菌的检测方法,步骤如下:用本发明检测试纸的样品垫浸润待检样品,观察检测区和质控区是否显色,即可。

[0033] 本发明还提供了一种无乳链球菌的检测方法,步骤如下:取待检样本,用前所述的检测试剂盒检测,即可。

[0034] 优选地,所述待检样本为鱼体或者养殖水体。

[0035] 本发明无乳链球菌单克隆抗体制备的胶体金快速检测试纸,其灵敏度高,特异性好,操作方便、快速,解决了现有无乳链球菌检测的问题,应用前景良好。

[0036] 在本试纸成功研制之前,国际上尚无针对无乳链球菌的胶体金快速检测试纸的报道。从已有文献来看,研制该试纸所需要的生物材料非常难以制备和获取。因此,本试纸的成功研制在世界上尚属首次,处于世界领先水平。

[0037] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0038] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0039] 图 1 单抗的纯化结果

[0040] 图 2 试纸的结构,1:PVC 底板;2:硝酸纤维素膜;3:胶体金垫;4:吸水垫;5:检测区;6:质控区;7:样品垫;

[0041] 图 3 1: 6×10^{10} CFU/ml;2: 6×10^9 CFU/ml;3: 6×10^8 CFU/ml;4: 6×10^7 CFU/ml;5: 6×10^6 CFU/ml;C Line:质控线;T Line:检测线;

[0042] 图 4 试纸条的特异性测试;

[0043] 图 5 发病鱼组织及水体的检测结果。

具体实施方式

[0044] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照试剂盒说明书选择。

[0045] 实验材料:

[0046] 细菌:无乳链球菌 TW3 用于克隆和制备重组抗原,无乳链球菌 (ATCC 51487)、无乳链球菌 C918(牛源)、无乳链球菌 TW7(鱼源)、无乳链球菌 TW10(鱼源)、鮟爱德华氏菌、粪肠球菌、海豚链球菌、豚鼠气单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌、枯草芽孢杆菌、溶藻弧菌、阴沟肠杆菌、腐败希瓦氏菌、肺炎克雷伯氏菌、幽门螺杆菌、嗜麦芽寡养单胞菌、奇异变形杆菌、热带念珠菌、伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌、大肠埃希氏菌、白色念珠菌、弗氏柠檬酸杆菌、绿脓杆菌、溶血葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和淋病奈瑟氏菌由通威股份动物保健研究所保存。

[0047] 实施例 1 本发明检测试纸的制备

[0048] 一、单克隆抗体的制备

[0049] 1.1 重组抗原的制备

[0050] 1) 基因克隆。用 Promega 公司的 DNA 提取试剂盒提取无乳链球菌 TW3 的基因组 DNA,根据无乳链球菌 sip 基因(罗非鱼源, HQ878436.1, Genbank),设计如表 1 所示的引物,上下游引物分别包含 BamH I 和 Sal I 限制性内切酶位点。采用设计的引物对扩增 sip 基因,扩增条件如下:DNA 94℃ 预变性 5min 后,设置程序 94℃、30s, 55℃、35s 和 72℃、78s,共 30 个循环;然后 72℃ 延伸 10min。

[0051] 2) 转化、表达与纯化。将扩增后的 sip DNA 连接到 pET32a 载体上,该载体含有编码六聚组氨酸的序列。用 pET32a-sip 转化大肠埃希氏菌 BL21。转化子在含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37℃ 培养。加入 0.8mM 异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 并于 37℃ 再培养 5h,以表达带六聚组氨酸标签的重组 Sip (rSip)。超声震荡提取含有 rSip 的可溶部分,然后使用 IMAC 亲和层析柱进行纯化和洗脱,并使用二喹啉甲酸检测试剂盒 (Sigma-Aldrich) 测定蛋白浓度。

[0052] 表 1 用于表达 sip 基因的引物增子 (~ 1302bp)

[0053]

引物	序列 (5'-3')	限制性酶切位点
Sip-bamh1-fw	5'-GCCGGATCCATGGAAATGAATAAAAAGGTAC-3'	<u>BamH I</u>
Sip-sal1-re	5'-GCGGTCGACTTAGTTAAAGGATACGTGAACGTGG-3'	<u>Sal I</u>

[0054] 3) 电泳和免疫印迹。对纯化的 rSip 进行 SDS-PAGE 电泳(凝胶浓度 12%),考马斯亮蓝染色或免疫印迹来显示蛋白质条,同时使用针对无乳链球菌的多抗,以检测 rSip 的活性。

[0055] 用蛋白 rSip 作为生产单抗的免疫原和 ELISA 检测中的抗原, rSip 的氨基酸序列 (SEQ ID NO.1) 如下:

[0056] MEMNKKVLLTSTMAASLLSVASVQAQETDTTWTARTVSEVKADLVKQDNKSSYTVKYGDTL SVI SEAMS
IDMNVLAKINNIADINLIYPETTLTVTYDQKSHATSMK IETPATNAAGQTTATVDLKTNQSVADQK VSLNTI SEG
MTPEAATTIVSPMKTYSSAPALKSKEVLAQGGQAVSQAAAANEQVSPAPVKSITSEVPAAKEEVKPTQTSVSQSTTVSP
ASVAAETPAPVAKVAPVRTVAAPRVASVK VVTPKVEVGASPEHVSAPAVPVT TTTSTATDSKLQATEVKSV PVAQKA
PTATPVAQPASTTNAVA AHPENARLQPHVAA YKEKVASTYGVNEFSTYRAGDPGDH GKGLAVDFIVGKNQALGNEVA

QYSTQNMAANNISYVIWQQKFYSNTNSIYGPANTWNPDRGGVTANHYDHHVHSFN。

[0057] 1.2 免疫程序

[0058] 用经弗式完全佐剂 (Sigma-Aldrich) 乳化 (乳化方法:将抗原和弗氏完全佐剂等体积混合,吸入一支注射器内,取下注射器针头,用软管连接另一支注射器,扎带固定好软管,轮流推动两支注射器,使混合液通过软管在注射器之间来回流动,从而达到乳化目的) 的 25 μ g, 50 μ g, 100 μ g 和 150 μ g rSip 蛋白分别腹腔注射雌性 BALB/c 小鼠 (8 周龄)。4 和 8 周后,用经弗式不完全佐剂 (Sigma-Aldrich) 乳化的相同抗原再次注射 (乳化方法及注射剂量同前) 小鼠。第 10 周,最后单独腹腔注射 rSip 蛋白 (注射剂量同前) 一次。

[0059] 1.3 杂交瘤产生和针对 Sip 蛋白的单抗生产

[0060] 最后一次加强注射后三天,获取免疫小鼠脾细胞 (分离方法:取高免 BALB/c 小鼠,拉颈处死后,于 75% 酒精中浸泡 3 ~ 5min,无菌操作打开腹腔,并小心取出脾脏至于平皿中,加入少量 DMEM 基础培养基漂洗 2 ~ 3 次,并仔细去除脾脏周围的结缔组织。然后在另一培养皿中倒入无血清将铜网盖于其上,取脾脏于铜网上,用研磨棒轻轻研磨,待细胞释放完全后,收集脾细胞,1000rpm 离心 10min)。根据 Situ 和 Wu 描述的方法:用 50% (w/v) 聚乙二醇 4000 (Sigma-Aldrich),将脾细胞和骨髓瘤细胞 S/P20 以 5:1 的比例进行融合 (细胞融合的步骤:S/P20 细胞由成都中医药大学饶朝龙教授惠赠。融合步骤:取对数生长期的 S/P20 细胞与脾细胞按比例充分混匀,1000rpm 离心 10min,弃上清液,用手掌轻击离心瓶底,打散沉淀的细胞。将离心瓶置于 40°C 水浴中,在 1min 内边旋转边加入 1ml PEG4000,再加入 15ml 无血清 RPMI-1640 培养基终止融合,在 90s 内加完,由慢到快,前 5s 加 1ml。室温静置 10min,1000rpm 离心 10min,弃上清,将含 HAT 和 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基加到细胞融合物中,悬浮细胞,分配到已有饲养细胞的 96 孔细胞培养板,置于 37°C、5% CO₂ 的温箱中培养),得到杂交瘤细胞。

[0061] 筛选步骤 1:

[0062] 将得到的杂交瘤细胞在次黄嘌呤 - 氨蝶呤 - 胸苷培养基中培养,以 5 μ g/ml 的 rSip 作为包被抗原,用 ELISA 检测培养上清中的抗体,以筛选杂交瘤细胞,得到 ELISA 鉴定为阳性的杂交瘤细胞。

[0063] 筛选步骤 2:

[0064] 将 ELISA 鉴定为阳性的杂交瘤细胞于 BALB/c 小鼠腹水中增殖。收集腹水,使用 Protein G Sepharose 亲和层析柱 (GE Healthcare Life Sciences) 纯化 (纯化方法:用注射器穿刺吸取小鼠腹水,在 4°C,12000g 条件下离心 15min 除去较大的凝块。将处理好的腹水用 0.02M pH 7.0 的 PBS 缓冲液稀释 10 倍,0.45 μ m 滤膜过滤,然后上样流经 0.02M pH 7.0 的 PBS 缓冲液平衡好的蛋白 G 亲和层析柱。用 0.1M pH 2.7 的 Gly-HCl 为洗脱液进行洗脱,收集洗脱峰,并用 1.0M pH 9.0 的 Tris-HCl 调 pH 至约 7.0,最后透析脱盐并冷冻干燥) 腹水中的 rSip 单抗。

[0065] 将纯化的单抗 (浓度 2mg/ml) 与胶体金液体结合,室温 (RT) 放置 5min。加入 5% PEG 后,立即 8000rpm 离心 30min。于 12ml 离心管中收集红色沉淀,用胶体金保护剂重悬,并稀释至工作浓度 (通常 OD₅₃₂ = 30-50)。然后将溶液置于 4°C。

[0066] 用 0.1M PBS 将另一单抗稀释至 2mg/ml。用 0.1M PBS 将羊抗鼠 IgG 稀释至 1.0mg/ml。前者用于包被 NC 膜上的检测区,后者用于质控区。然后将膜在 37°C 下保持 24h。用 BB

缓冲液 (Artron BioResearch Inc) 封闭后,用 WB 缓冲液洗膜,然后室温干燥。

[0067] 试纸条组装有样品垫、结合垫、反应膜和吸附垫。用自动切条机将试纸切成 3mm 小条。

[0068] 将所有结合的 - 单抗与包被的 - 单抗配对,用于试纸条制备。将试纸条的样品垫插入无乳链球菌样品中,直至 NC 膜的一半浸入到液体中。室温下,3-10min 后观察到质控区和检测区的形成。筛选对无乳链球菌显示出最强的阳性信号,对其它受试细菌显示出阴性结果的配对抗体。

[0069] 细胞融合后共获得 84 个阳性细胞系。纯化所有 84 个单抗并用作试纸条组装的包被抗体 / 结合抗体。经过多次配对测试之后,找到 NC7b-CE12 配对显示出对无乳链球菌有最强信号,对其它细菌无信号。

[0070] 将分别表达单抗 NC7b 和单抗 CE12 的杂交瘤细胞株,分别命名为杂交瘤细胞株 TWDB-WR-1 和杂交瘤细胞株 TWDB-WR-2,并于 2015 年 10 月 21 日保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏号分别为 CCTCC NO :C2015178 和 CCTCC NO :C2015177。

[0071] 2、单抗制备

[0072] 取杂交瘤细胞株 TWDB-WR-1 和杂交瘤细胞株 TWDB-WR-2 分别按照如下方法制备单抗 NC7b 和单抗 CE12 :

[0073] 取前述杂交瘤细胞株于 BALB/c 小鼠腹水中增殖,具体是将灭菌液体石蜡腹腔注射 8 周龄的 BALB/c 小鼠,0.5ml/ 只。7 天后,将前述两株杂交瘤细胞株分别用无血清 RPMI-1640 培养基悬起,1000rpm 离心 5min,弃上清,洗去培养基中的血清,再用适量无血清 RPMI-1640 培养基重悬细胞沉淀,分别注射入小鼠腹腔,每只 0.5ml (含约 10^6 个杂交瘤细胞。收集腹水 (7 天后采取腹部明显鼓起小鼠的腹水),使用 Protein G Sepharose 亲和层析柱 (GE Healthcare Life Sciences) 纯化 (纯化的具体步骤 :用注射器穿刺吸取小鼠腹水,在 4℃,12000g 条件下离心 15min 除去较大的凝块。将处理好的腹水用 0.02M pH 7.0 的 PBS 缓冲液稀释 10 倍,0.45 μm 滤膜过滤,然后上样流经 0.02M pH 7.0 的 PBS 缓冲液平衡好的蛋白 G 亲和层析柱。用 0.1M pH 2.7 的 Gly-HCl 为洗脱液进行洗脱,收集洗脱峰,并用 1.0M pH 9.0 的 Tris-HCl 调 pH 至约 7.0,最后透析脱盐并冷冻干燥) 腹水中的 rSip 单抗。

[0074] 纯化结果见图 1 所示,可以看出,本发明获得了纯品的单抗 NC7b 和单抗 CE12。

[0075] 二、检测试纸的制备

[0076] 本发明试纸条为双抗体夹心法试纸条,试纸结构图图 2 所示 :

[0077] 胶体金制备 :主要采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金。在 10ml 体系氯金酸溶液中加入 150 μl 柠檬酸钠,肉眼观察胶体金颗粒颜色均一,呈酒红色,有明显光晕,经电镜观察胶体金颗粒大小一致,颗粒直径在 20nm 左右。经紫外扫描金颗粒,其峰宽较窄,表明胶体金溶液分散性良好。

[0078] 金标抗体的制备方法 :取单抗 CE12 (步骤一制备),与胶体金液体结合,室温 (RT) 放置 5min。加入 5% PEG 后,立即 8000rpm 离心 30min。于 12ml 离心管中收集红色沉淀,用胶体金保护剂重悬,并稀释至工作浓度 ($OD_{532} = 30-50$),4℃ 保存备用)。

[0079] 将标记好的金标抗体包被于玻璃纤维膜上,制成胶体金垫 :取金标抗体溶液加入到喷涂机的喷头储存瓶中,喷涂玻璃纤维膜,烘干,即为胶体金垫。

[0080] 试纸组装（结构如图 2 所示）：PVC 底板（1）上粘贴的硝酸纤维素膜（2），样品垫（7）通过胶体金垫（3）与硝酸纤维素膜（2）一端连接，硝酸纤维素膜（2）另一端搭接有吸水垫（4），所述硝酸纤维素膜（2）上靠近胶体金垫（3）的一侧包被有本发明单抗 NC7b（步骤一制备）作为检测区（5），靠近吸水垫（4）的一侧包被有羊抗鼠 IgG 作为质控区（6）。

[0081] 在胶体金垫上包被抗体的方法：取抗体，制成抗体溶液，加入到喷涂机的喷头储存瓶中，喷涂试纸，烘干，即可。

[0082] 实施例 2 本发明检测试纸的性质检测

[0083] 1 性质检测

[0084] 1.1 试纸条灵敏度测试

[0085] 将无乳链球菌倍比稀释为 6×10^{10} CFU/ml 至 6×10^6 CFU/ml，然后用试纸条（即本发明实施例 1 建立的检测试纸）测试以评估其最小检测数量。

[0086] 1.2 试纸条特异性测试

[0087] 用试纸条测试无乳链球菌（ATCC 51487）、无乳链球菌 C918（牛源）、鮟爱德华氏菌、粪肠球菌、海豚链球菌、豚鼠气单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌、枯草芽孢杆菌、溶藻弧菌、阴沟肠杆菌、腐败希瓦氏菌、肺炎克雷伯氏菌、幽门螺杆菌、嗜麦芽寡养单胞菌、奇异变形杆菌、热带念珠菌、伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌、大肠埃希氏菌、白色念珠菌、弗氏柠檬酸杆菌、绿脓杆菌、溶血葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和淋病奈瑟氏菌。

[0088] 1.3 试纸条重复性测试

[0089] 分别用试纸条测试三个无乳链球菌样品和三个阴性样品，每个样品重复测试十次。

[0090] 1.4 实际样品测试

[0091] 采集发病罗非鱼，解剖并取豌豆大小的待检组织（肝或脑）于 1.5ml Ep 管中，捣碎后，加入 1ml 生理盐水，混匀后进行测试，同时无菌操作分离肝脏内的细菌，纯化后使用 PCR 体系进行检测，比较二者的检测结果。

[0092] 采用本发明试纸的测试方法：用本发明检测试纸的样品垫浸润待检样品，观察检测区和质控区是否显色，即可。其中，若试纸的检测区 5 和质控区 6 位置上均出现红色条带，则待检样品为检测阳性；若仅在质控区 6 位置上出现红色条带，而检测区 5 位置上无红色条带，则待检样品为检测阴性；若试纸条的质控区 6 位置上未出现红色条带，无论检测区位置上是否出现红色条带，检测结果都无效。

[0093] 2 检测结果

[0094] 2.1 灵敏度测试结果

[0095] 将无乳链球菌培养液 10 倍稀释至 6×10^{10} CFU/ml ~ 6×10^6 CFU/ml，以测试试纸条的灵敏度。当浓度为 6×10^7 CFU/ml 时，可见微弱的 T 线，但当浓度继续降至 6×10^6 CFU/ml 时，T 线不会出现（图 3）。图 3 显示该配对抗体的检测限为 6×10^7 CFU/ml。

[0096] 表 2 无乳链球菌试纸条的检测限

[0097]

无乳链球菌	血清型	分离源	检测限
TW3	Ia	鱼	6×10^7 CFU/ml
TW6	Ia	鱼	1.1×10^7 CFU/ml

TW7	Ia	鱼	1.3×10^7 CFU/ml
TW9	Ia	鱼	1.1×10^6 CFU/ml
TW10	Ia	鱼	1×10^7 CFU/ml
TW31	II	牛源	阴性

[0098] 2.2 特异性测试结果

[0099] 两个配对的快速检测试纸条对无乳链球菌具有高度特异性,与其它测试细菌无交叉反应(图4和表3)。

[0100] 表3 无乳链球菌试纸条的特异性测试

[0101]

	配对
结合-单抗	CE12
包被-单抗	NC7b
无乳链球菌(鱼源)	+++
无乳链球菌(牛源)	++
鲶爱德华氏菌	-
粪肠球菌	-
海豚链球菌	-
豚鼠气单胞菌	-
鼠伤寒沙门氏菌	++
金黄色葡萄球菌	++
霍乱弧菌	-
副溶血弧菌	-
嗜水气单胞菌	-
枯草芽孢杆菌	-
溶藻弧菌	++
阴沟肠杆菌	-
腐败希瓦氏菌	-
肺炎克雷伯氏菌	-
幽门螺杆菌	-
嗜麦芽寡养单胞菌	++
奇异变形杆菌	-
热带念珠菌	-
伤寒沙门氏菌	-
副伤寒沙门氏菌	-
粘质沙雷氏菌	++
大肠埃希氏菌	++
白色念珠菌	-
弗氏柠檬酸杆菌	-
绿脓杆菌	-
溶血葡萄球菌	-
鲍曼不动杆菌	++
淋病奈瑟氏菌	-

[0102] 2.3 重复性测试结果

[0103] 阴阳性符合率均为100%(表4)。

[0104] 表4 重复性测试结果

[0105]

样品类型	结果	总计	符合率 (%)
阳性样品	30(+)	30	100(30/30)
阴性样品	30(-)	30	100(30/30)

[0106] 2.4 实际样品的检测

[0107] 使用无乳链球菌检测试制对发病罗非鱼及发病池塘的水体进行了检测,结果表明,发病鱼体内含有大量的无乳链球菌,而水体中没有检测到无乳链球菌(图5),与PCR的检测结果一致(结果未提供),提示无乳链球菌在鱼体内得到了增殖,从而引发疾病。

[0108] 试验结果说明,本发明无乳链球菌检测试纸的灵敏度高、特异性强、重复性好,可以准确检测实际样品。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 通威股份有限公司

<120> 无乳链球菌的胶体金快速检测试纸

<130> GY005-15P1435

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> rSip的氨基酸序列

<400> 1

Met Glu Met Asn Lys Lys Val Leu Leu Thr Ser Thr Met Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Val Ala Ser Val Gln Ala Gln Glu Thr Asp Thr Thr Trp
 20 25 30

Thr Ala Arg Thr Val Ser Glu Val Lys Ala Asp Leu Val Lys Gln Asp
 35 40 45

Asn Lys Ser Ser Tyr Thr Val Lys Tyr Gly Asp Thr Leu Ser Val Ile
 50 55 60

Ser Glu Ala Met Ser Ile Asp Met Asn Val Leu Ala Lys Ile Asn Asn
 65 70 75 80

Ile Ala Asp Ile Asn Leu Ile Tyr Pro Glu Thr Thr Leu Thr Val Thr
 85 90 95

Tyr Asp Gln Lys Ser His Thr Ala Thr Ser Met Lys Ile Glu Thr Pro
 100 105 110

Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Thr Thr Ala Thr Val Asp Leu Lys Thr
 115 120 125

Asn Gln Val Ser Val Ala Asp Gln Lys Val Ser Leu Asn Thr Ile Ser
 130 135 140

Glu Gly Met Thr Pro Glu Ala Ala Thr Thr Ile Val Ser Pro Met Lys

[0002]

370

375

380

Ala Asn Asn Ile Ser Tyr Val Ile Trp Gln Gln Lys Phe Tyr Ser Asn
 385 390 395 400

Thr Asn Ser Ile Tyr Gly Pro Ala Asn Thr Trp Asn Ala Met Pro Asp
 405 410 415

Arg Gly Gly Val Thr Ala Asn His Tyr Asp His Val His Val Ser Phe
 420 425 430

Asn

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Sip-bamhl-fw

<400> 2

gccg gatcca tggaaatgaa taaaaaggta c

31

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Sip-sall-re

<400> 3

gcggtcgact tagttaaagg atacgtgaac gtgg

34

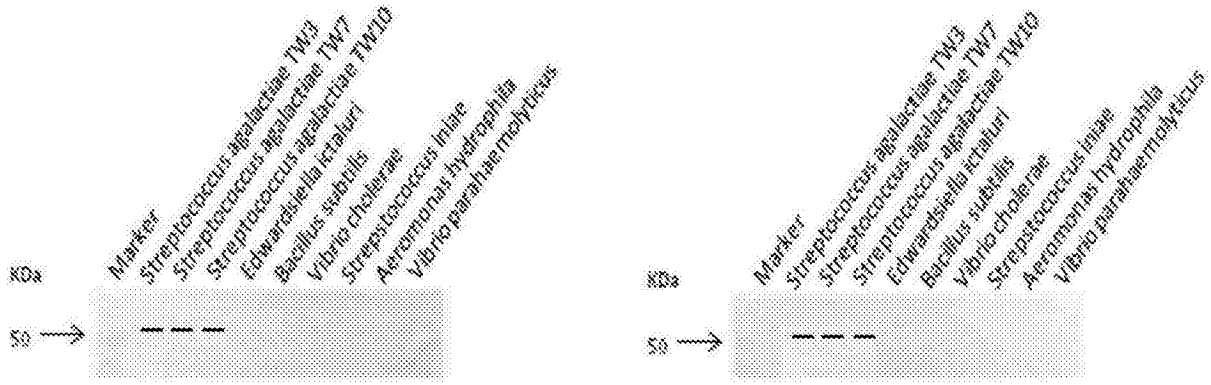


图 1

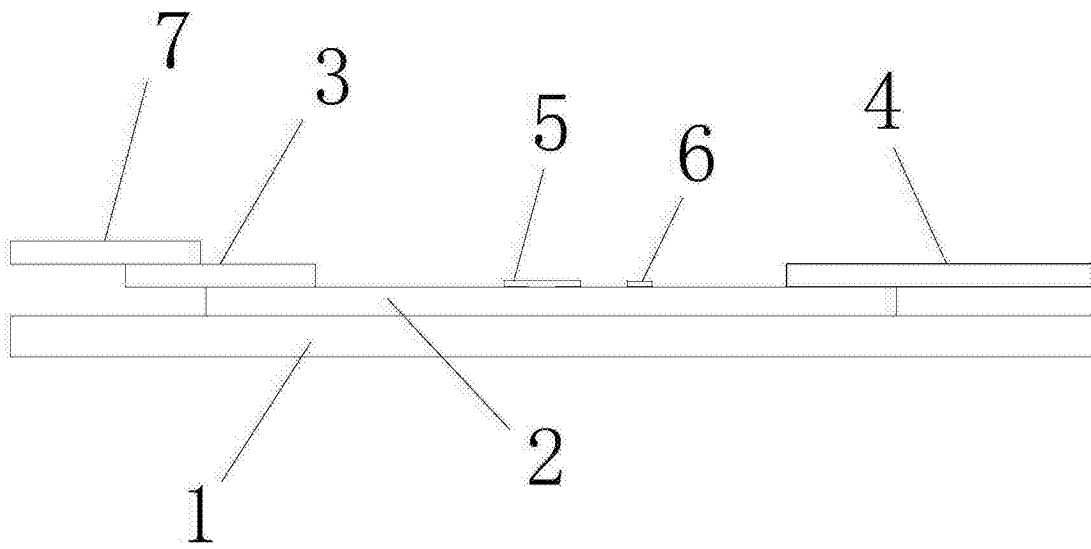


图 2

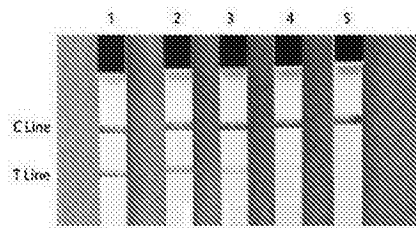


图 3

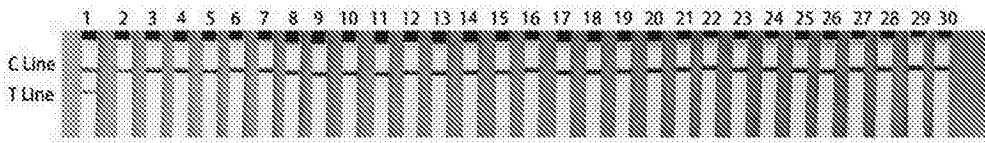


图 4

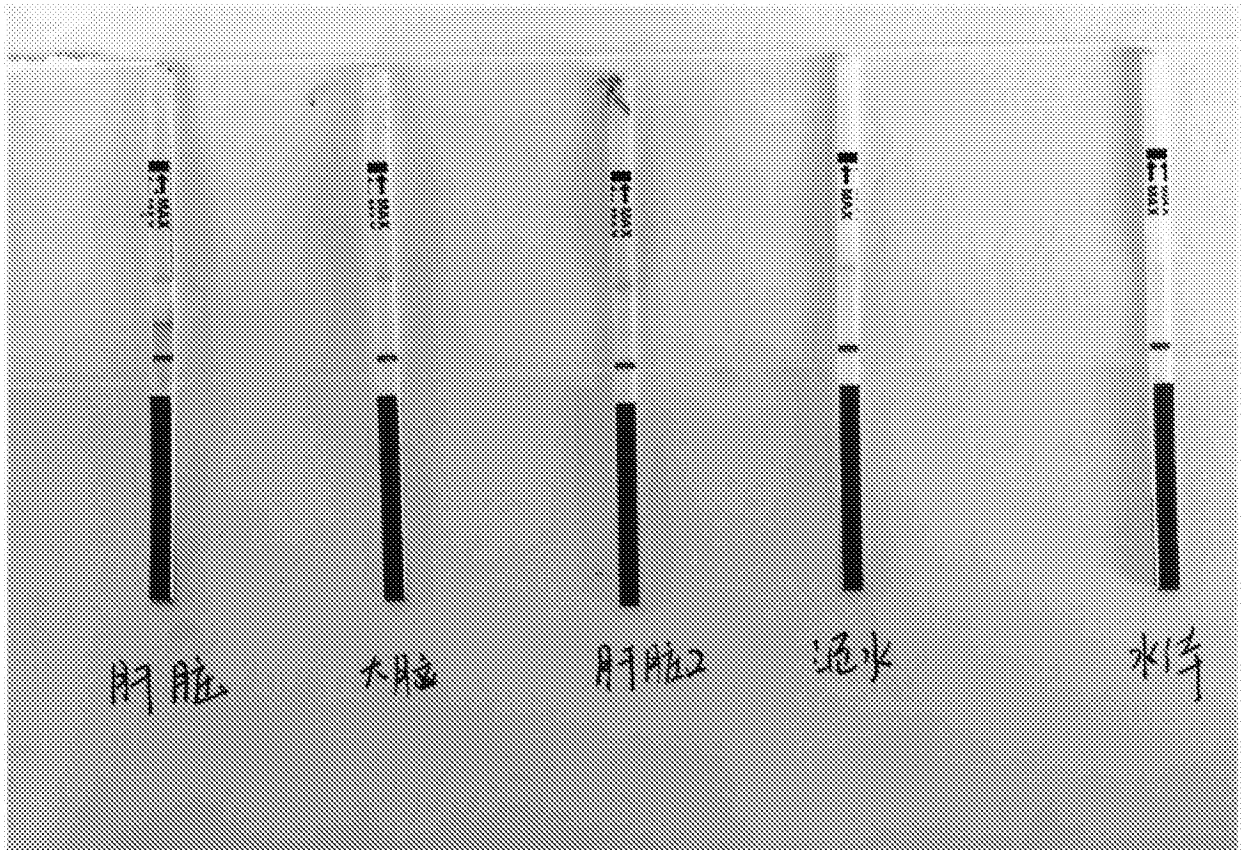


图 5

专利名称(译)	无乳链球菌的胶体金快速检测试纸		
公开(公告)号	CN105372422A	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201510753943.6	申请日	2015-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	通威股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	通威股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	通威股份有限公司		
[标]发明人	肖丹 刘天强 黄冠军 阳涛 刘衍鹏 戴景辉		
发明人	肖丹 刘天强 黄冠军 阳涛 刘衍鹏 戴景辉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/56944 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	张娟		
其他公开文献	CN105372422B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种无乳链球菌的胶体金快速检测试纸，它为双抗体夹心法检测试纸，其中，采用的两种抗体为中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号：CCTCC ? NO : C2015177的细胞株分泌的抗体以及中国典型培养物保藏中心保藏的保藏号：CCTCC ? NO : C2015178的细胞株分泌的抗体。本发明无乳链球菌单克隆抗体制备的胶体金快速检测试纸，其灵敏度高，特异性好，操作方便、快速，解决了现有无乳链球菌检测的问题，应用前景良好。

