

Asia1 型口蹄疫病毒胶体金免疫层析检测方法的建立

林彤, 邵军军, 丛国正, 独军政, 高闪电, 常惠芸, 谢庆阁

中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点实验室, 兰州 730046

摘要: 为建立一种快速、简便、灵敏检测 Asia1 型口蹄疫病毒的胶体金免疫层析方法(GICA)。本研究采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记纯化的抗 Asia1 型口蹄疫病毒的单克隆抗体, 将该标记物与羊抗豚鼠 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane)上, 作为检测带和质控带。经条件优化, 组装成检测 Asia1 型口蹄疫的诊断试纸条。用该试纸条分别对 A、O、C 和 Asia1 型口蹄疫病毒抗原以及猪水泡病病毒抗原等 87 份样品进行了检测, 发现该试纸条不与口蹄疫病毒 A、O、C 型以及猪水泡病病毒抗原发生反应, 特异性良好。用该试纸条对口蹄疫细胞毒(TCID₅₀ 为 6.25)的 10 倍系列稀释液进行了检测, 最低可以检测到大约 10⁻⁴。该试纸条与其他传统诊断方法的符合率为 98.8%。初步实验确定该试纸条在 4°C 下可保存 3 个月、37°C 和室温下大概可保存 1 周左右。该试纸条是一种快速、灵敏、特异的 FMD 抗原检测方法, 对现场检测具有一定实用价值。

关键词: Asia1 型 FMDV, 单克隆抗体, 胶体金, 免疫层析法

Establishment of colloidal gold-immunochromatography assay strip for detection of type Asia1 foot-and-mouth disease virus

Tong Lin, Junjun Shao, Guozheng Cong, Junzheng Du, Shandian Gao, Huiyun Chang, and Qingge Xie

Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China

Abstract: To establish a sensitive, rapid and simple gold immunochromatography assay (GICA) for detecting Asia1 type of foot-and-mouth disease virus (FMDV) from the field samples. The purified anti-FMDV type Asia1 monoclonal antibody labeled with colloidal gold and the goat anti-Guinea pig IgG were wrapped onto nitrocellulose membrane as the test line (T line) and the control line (C line), respectively. The strip was then further optimized. A total of 87 field samples were detected. The results indicated a correct rate of 98.8% for detecting FMDV Asia1 type. No cross reaction was found with swine vesicular disease (SVD) and FMDV O, A and C type antigen. The sensitivity of the strip can reach to 10⁻⁴ (TCID₅₀ 6.25). It had the same results for positive and negative specimens tested in three times. This strip could be stored at 4°C for three months. In this study, the established gold immunochromatographic strip test kit is simple, rapid, sensitive and specific for detecting FMDV type Asia1, and is potentially useful for the for pen-side diagnosis.

Keywords: FMDV Asia I type, monoclonal antibody, colloidal gold, immunochromatography test

Received: October 20, 2008; **Accepted:** January 20, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA10A204), National Science and Technology Pillar Program (No. 2006BAD06A17).

Corresponding author: Huiyun Chang. Tel: +86-931-8342052; E-mail: changhuiyun@126.com

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA10A204), 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD06A17)资助。

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染偶蹄类动物而引发的一种急性、热性、高度接触性传染病,此病流行广、传播快、发病率高,多次在世界范围内发生大流行,严重威胁国际畜牧业贸易^[1]。快速、准确的病原学诊断是控制口蹄疫疫情蔓延和追踪疫源的重要环节。它可使一线防疫人员在疫情暴发时对现场做出正确的诊断,及时确定病原、切断传播途径、采取有效的防范措施。胶体金免疫层析技术(A gold immunochromatographic assay, GICA)是20世纪90年代以来在胶体金标记技术、免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术^[2]。由于运用可目测的标记物(胶体金或染色乳胶)而得到直观的实验现象(显色),使得这种分析技术具备操作快速简便,无须仪器,结果准确、灵敏,可常温下运输保存等优点,已广泛应用于生物医学等各个领域。单克隆抗体由于具有良好的理化性状高度均一性、生物活性单一性、与抗原结合的特异性,便于人为处理和质量控制^[3]。所以单抗被广泛用于诊断试剂,在动物医学领域应用起步较晚,已报道的口蹄疫快速诊断技术研究,主要与口蹄疫抗体^[4]和病原性^[5,6]诊断有关,而将胶体金免疫层析技术应用于口蹄疫病原多血清型诊断的研究尚未见报道。本研究针对现今FMDV定型检测技术操作的繁琐复杂,同时根据国际口蹄疫流行状况,结合单抗的诊断优势,利用免疫胶体金技术建立了检测Asia1型口蹄疫的诊断方法,为FMDV的快速诊断提供了新的手段。

1 材料和方法

1.1 材料

Asia1型FMDV及其他型FMDV、猪水泡病病毒(SVDV)乳鼠抗原及健康乳鼠组织样品均由国家口蹄疫参考实验室保存;四氯金酸(HAuCl_4)和聚乙二醇(PEG20000)、柠檬酸三钠、碳酸钾购自中国医药集团上海化学试剂公司;酪蛋白、牛血清白蛋白、聚乙二醇(PEG-1500)及BSA购自Sigma公司;NC膜、滤器和滤膜购自Millipore公司;玻璃纤维膜、无纺布、吸水垫、不干胶以及PVC垫板购自上海金标生物科技有限公司;其他试剂均为国内分析纯。

1.2 单克隆抗体的纯化及效价测定

将保存的抗Asia1型口蹄疫病毒VP1蛋白的单克隆抗体采用体内诱生腹水法制备大量单抗。6~8周龄健康Balb/c小鼠,按0.5 mL/只腹腔注射经高压灭菌的液体石蜡,7~10 d后每只小鼠腹腔接种 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞,经7~10 d后可见小鼠腹部明显膨大,无菌操作采集腹水。腹水经1000 r/min离心10 min,弃去上层脂肪层,收集中层腹水, -70°C 冻存储用。下层细胞仍可按前述方法继续传代诱生腹水,以进一步获得大量的单克隆抗体。本试验中采用饱和硫酸铵沉淀和Sephacryl S-300 HR层析2种方法结合,对含有单克隆抗体的腹水进行纯化。

1.3 胶体金的制备

胶体金的制备常采用柠檬酸三钠还原法,操作步骤如下:称取 HAuCl_4 用三蒸水配制成终浓度为0.01%的溶液。取100 mL 0.01% HAuCl_4 溶液加热至沸腾,迅速加入新配制的1%的柠檬酸三钠溶液2 mL,继续煮沸,直至溶液变成酒红色,冷却后加入三蒸水恢复至原体积。鉴定胶体金可通过肉眼观察和电镜观察。质量好的胶体金颜色呈酒红色,透明度好,无混浊现象。

1.4 金标记抗体的制备

采用离心法获得标记好的胶体金抗体:1)取一定量的金溶液,加入单克隆抗体后,搅拌20 min,置于 4°C 30 min。2)按照金溶液体积的0.04%加入PEG20000稳定剂。3)搅拌20 min,置于 4°C , 2 h以上。4)2000 r/min离心10 min,弃沉淀。5)8000 r/min离心30 min,保留沉淀。6)将沉淀用金稀释液悬浮,最终体积为原始体积的8%。用无纺纱浸湿,于 37°C 烤箱中,干燥平整成金标记抗体反应膜备用。

1.5 测试条的组装和切割

测试条的主要构成:PVC塑料板是反应体的支撑物;在塑料底板上分别将玻璃纤维素膜、干燥金标记单抗玻璃纤维素膜、已固定有配对单抗和羊抗豚鼠IgG的NC膜及吸水滤纸按1图装配,配件与带有双面粘胶的塑料底板结合粘接。装配好的纸板按纵向剪切,裁成宽度为4 mm的条状,即为检测试纸条。NC为反应膜,显示整体系统的反应结果;T线、C线两点依次为检测线、对照线;手柄吸水垫为粗纤维吸水纸;PVC与样品吸收垫之间,以及NC膜之间都需要用胶固定,上层再粘贴一层纤维布,可加速吸水。

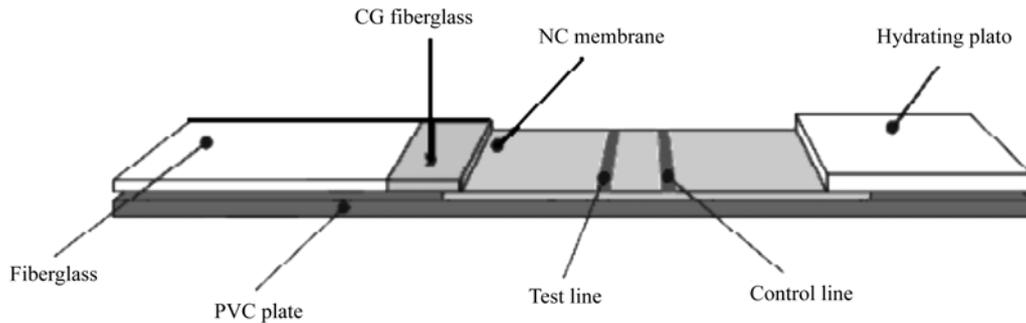


图 1 免疫层析试纸条结构

Fig. 1 Sketch map of the gold immunochromatographic strip.

1.6 测试条的初步试验

分别用生理盐水、PBS(0.01 mol/L)和 Asia1 型 FMDV(1:1000 稀释)标准细胞毒 3 种液体进行测试。

1.7 金标试纸条的特异性试验

用金标试纸条分别对 Asia1 型、A 型及 O 型 FMDV 细胞毒, C 型表达抗原和猪水泡病病毒(SVDV)进行测试。同时出现检测线和质控线的判为阳性, 只有质控线而无检测线的为阴性, 若质控线不出现为无效需重新进行测试。

1.8 金标试纸条的敏感性试验

将 Asia1 型 FMDV 细胞毒(毒价 TCID₅₀ 为 6.25)做 10 倍梯度稀释, 然后用试纸条对不同浓度的 Asia1 型 FMDV 进行检测。判断方法参照 1.5。

1.9 金标试纸条的稳定性试验

制备好的试纸条分别放在室温、4°C 冰箱、37°C 干燥恒温箱, 每间隔一定时间后取出部分进行检测。观察检测线和质控线有无、反应线的清晰度以及结合垫释放金标抗体的程度等。

1.10 金标试纸条的符合率实验

将 87 份国家口蹄疫参考实验室已定型确认的田间样品分别运用反向间接血凝, 定型 RT-PCR 及所建立的胶体金试纸条进行检测。统计检测结果, 并计算本实验所建立的方法与其他方法的符合率。

2 结果

2.1 胶体金的外观颜色及电镜观测

制备的胶体金溶液呈酒红色, 待其冷却后加入一定量的蒸馏水控制其浓度, 合格可用的胶体金溶液检测波长 OD₅₂₃ 在 1.1~1.2 范围内。工作中所制备的胶体金直径通过在透射电镜观察颗粒大小。测得

(n=250)平均粒径为(40.06±0.7)nm。符合标记用胶体金要求。

2.2 单克隆抗体纯化结果

采用饱和硫酸铵沉淀和 Sephacryl S-300 HR 层析法对 1B8、5E1 和 5E2 这 4 株杂交瘤细胞经小鼠体内诱生法所采集到的腹水进行纯化。纯化后的单抗进行 SDS-PAGE 电泳(图 2), 收集的蛋白中以 I_g 抗体重链和轻链为主, 分子量分别在 45.0 kD 和 25.0 kD 左右, 通过图 2 可以看出, 3 株单抗的电泳条带符合预期的大小。

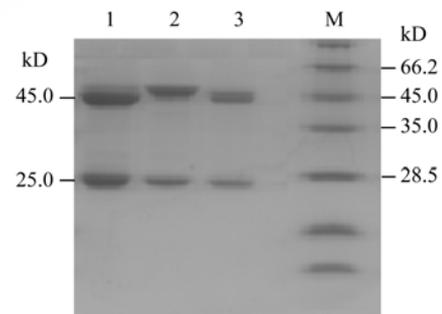


图 2 纯化后 3 株单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified three stains monoclonal antibody. 1: 5E1 strain; 2: 5E2 strain; 3: 1B8 strain; M: protein marker.

2.3 测试条的初步试验结果

分别用生理盐水、PBS(0.01 mol/L)、Asia1 型 FMDV 对测试条进行了初步试验。结果, 测试条的检测线和对照线显示清晰, 表明对单克隆抗体进行胶体金的制备是成功的(图 3)。

2.4 金标试纸条特异性试验结果

从试验结果中可以看出, 所制备的试纸条与表达的 Asia1 型 FMDV VP1 蛋白及其细胞毒, 而与 O 型、A 型、C 型及 SVDV 均不发生反应。

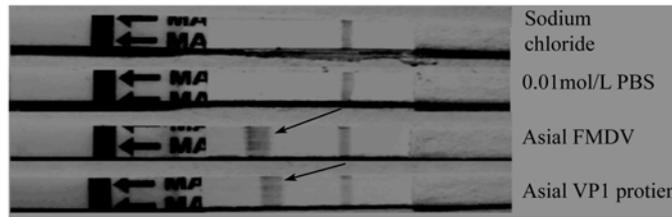


图3 金标试纸条初步测试
Fig. 3 Testing results of prepared strip.

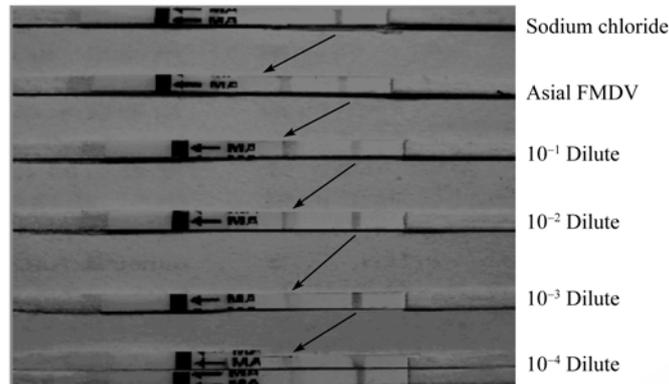


图4 试纸条的敏感性测试
Fig. 4 Sensitivity test of prepared strip.

表1 特异性试验

Table 1 Specificity test of prepared strip

	Asial VP1 protein	Asia1 type FMDV	O type FMDV	A type FMDV	C type expressed protein	SVDV
1B8+5E1	+	+	-	-	-	-
5E2+5E1	+	+	-	-	-	-

表2 稳定性试验

Table 2 Stability test of prepared strip

Time	4°C		Room temperature		37°C	
	1B8+5E1	5E2+5E1	1B8+5E1	5E2+5E1	1B8+5E1	5E2+5E1
One week	+	+	+	+	+	+
Two weeks	+	+	-	-	-	-
Two months	+	+	-	-	-	-
Three months	+	+	-	-	-	-

2.5 金标试纸条敏感性试验结果

将 Asia1 型口蹄疫细胞毒(毒价为 6.25TCID₅₀) 做 10 倍梯度稀释, 用 PBS 作阴性对照, 用全病毒液作阳性对照, 结果见图 4。从图中可以看出把 Asia1 型口蹄疫标准细胞毒 10⁻⁴ 稀释仍然可以检测到。

2.6 金标试纸条稳定性试验结果

从表 2 中可以看出所制备的试纸条在 4°C 下可保存 3 个月以上, 但室温及 37°C 中只能保存一周左右。在保存期内其检测性能没有太大的变化, 反应的敏感性变化不大。表明该试纸条在 4°C 保存条件

下具有良好的稳定性。

2.7 Asia1 型口蹄疫金标试纸条的完整形式

金标试纸条的包装形式如图 5 所示: 左图为 10 个试纸条为一个包装单位, 右图为试纸条的判定参照板。

2.8 Asia1 型口蹄疫金标试纸条田间试验

分别用间接血凝试剂盒、PCR 和金标试纸条检测 87 份样品的结果如表 3。

通过与间接血凝试剂盒以及 PCR 测序对比发现, 金标试纸条测试为阳性的样品, 反向间接血凝及 PCR



图 5 金标试纸条完整形式

Fig. 5 Complete form of prepared strip.

表 3 符合率实验

Table 3 Coincidence test of prepared strip

	Indirect hemagglutinin	PCR	Golden strip
Positive	86	87	86
Negative	1	0	1
Coincidence (%)	100	98.8	98.8

测序均为阳性。其与反向间接血凝的符合率为 100%，与 PCR 测序的符合率为 98.8%。但是金标试纸条检测迅速，一般只要是处理好的样品，3~5 min 就能得出实验结果。在下一步试验中将对金标试纸条作进一步的优化，通过检测大量的田间样品获得更多的数据，来说明单克隆抗体金标试纸条可以作为以后检测 Asia1 型口蹄疫病毒的又一种手段。

3 讨论

口蹄疫是一种全球流行性烈性传染病，不仅影响畜牧业的发展，也给经济贸易活动特别是对外贸易带来严重影响和巨大的经济损失。随着口蹄疫病毒不断变异，新的变异株和亚型的不断出现^[7]，给口蹄疫的预防和控制带来了极大的困难。由于口蹄疫病原的诊断首先要采集疫区发病动物尚未溃破的新鲜水泡皮和水泡液，由专人送至专门实验室后方可进行诊断，一方面运输过程中的不确定因素往往会引起样品腐败，产生假阴性、漏检等结果，从而贻误确诊的时机，另一方面还存在因病料保存不善，引发散毒的危险。而现有的口蹄疫诊断方法中，病毒分离、中和试验、间接 ELISA、RT-PCR 等方法都必须在具备一定条件的实验室中才能完成。发展一种快速、简便、无需专业人员和仪器，可在野外、田间进行操作的新型诊断方法已成为一项急需解决的问题。

单克隆抗体因其具有良好的均质性和高效的特

异性而被广泛使用，单抗也可作为治疗性药物而关注，因其具有毒性低，也可用作传递药物的载体^[8]。口蹄疫单抗具有良好的血清型特异性而受到临床诊断的重视，在 1989 年就有关于 Asia1 型口蹄疫单克隆抗体的报道^[9]。本研究通过已制备的抗 Asia1 型口蹄疫病毒的单克隆抗体，用于标记纳米级的胶体金颗粒和包被硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane)，并结合免疫层析技术制备检测 Asia1 型 FMDV 的胶体金免疫层析测试条，最终建立快速准确而又安全的 Asia1 型 FMDV 胶体金免疫层析快速检测技术体系。

在本检测方法的建立过程中，采用磁力搅拌加热装置制备的胶体金，可有效保证不同批次胶体金制备的实验条件，包括反应容器、反应时间、搅拌速度等因素的一致性。电镜观察胶体金平均粒径为 $(40.06 \pm 0.70) \text{ nm}$ ，颗粒外形均一，尺寸变异系数小，可在 NC 膜上自由流动。根据文献选择 40 nm 胶体金颗粒^[10,11]，因为这一尺寸的颗粒大小适中，既易于辨识，又不会影响蛋白质与颗粒表面的结合，可使标记材料获得最佳性能。

口蹄疫有 7 个血清型，因型间抗原性的明显差异，某个血清型的感染康复动物不能交叉保护其他血清型病毒的攻击^[12]。在特异性实验中，本研究将各型 FMD 与其他水泡性疾病特别是 SVD 一同检验，检测结果显示，非 Asia1 口蹄疫病料结果均为阴性，而对 FMD 血清型的鉴定符合率为 100%，由此证实该试剂盒检测口蹄疫病毒时，与临床症状相似疾病的病原无交叉，无假阳性反应，具有很好的特异性。敏感性实验结果显示，试纸条在检测倍比稀释的同型阳性参考样本时，随着稀释倍数的增加，检测带的红色条带显色越浅，说明随着病毒含量的不断减少，试纸条的检测能力不断下降。通过与间接血凝试剂盒以及 PCR 对比发现，金标试纸条与间接血凝的结果完全一致。与传统诊断口蹄疫的方法相比，金标试纸条的阳性样品符合率为 100%，阴性样品的符合率为 98.8%。而且金标试纸条检测迅速，一般在 3~5 min 就可以得出检测结果。在下一步试验中将对金标试纸条作进一步的优化，通过检测大量的田间样品获得更多的数据，来说明单克隆抗体金标试纸条可以作为以后检测 Asia1 型口蹄疫病毒的又一种手段。

REFERENCES

- [1] Lin T, Chang HY, Du HF, *et al.* Development and characterization of monoclonal antibodies against VP1 protein of Asia I type foot-and-mouth virus. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2007, **23**(11): 1034–1037.
林彤, 常惠芸, 杜惠芬, 等. Asia I 口蹄疫病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, **23**(11): 1034–1037.
- [2] Lu FZ, Fang LY, Zhang XJ, *et al.* Study on two-step dot immunogold filtration assay for detecting anti-schistosome antibodies in livestock. *Acta Veteri Zoo Sin*, 2006, **37**(7): 687–692.
卢福庄, 方兰勇, 张雪娟, 等. 检测家畜血吸虫抗体的二步金标免疫渗滤法研究. *畜牧兽医学报*, 2006, **37**(7): 687–692.
- [3] Shi LR, Wei D, Schneiter ME, *et al.* The Production, characterization and usage of monoclonal antibodies against Nef protein I. The peptide specificity of monoclonal anti-Nef protein analysed with synthetic peptides. *Immunol J*, 1991, **7**(1): 6–11.
史良如, 卫丹, Schneiter ME, 等. 抗 Nef 蛋白单抗的制备与鉴定及应用— : 应用合成 Nef 蛋白肽分析抗 Nef 蛋白单抗的特异性. *免疫学杂志*, 1991, **7**(1): 6–11.
- [4] Zhang CG, Jin YH; Huang YY, *et al.* Study and apply of colloidal gold strip in detecting the antibody of food and mouth disease. *Fujian J Ani Hus Vet*, 2004, **26**(1): 4–5.
张长弓, 金颜辉, 黄印堯, 等. 口蹄疫抗体免疫胶体金快速检测试纸法的建立. *福建畜牧兽医*, 2004, **26**(1): 4–5.
- [5] Reid SM, Ferris NP, Bruning A, *et al.* Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of foot-and-mouth disease virus antigen. *J Virol Methods*, 2001, **96**(2): 189–202.
- [6] Sugimura T, Suzuki T, Tsuda T, *et al.* Application of latex beads agglutination test for the detection of the antibody against virus-infection-associated (VIA) antigen of foot-and-mouth disease (FMD) virus. *J Vet Med Sci*, 2000, **62**(7): 805–807.
- [7] Gao F, Sun GB, Zhang JF, *et al.* Evaluation and prevention policy of epidemic actuality of foot-and-mouth disease abroad. *J Beijing Agri Coll*, 2006, **21**(1): 76–81.
高飞, 孙国斌, 张金凤. 国外口蹄疫流行现状分析及防治策略. *北京农学院学报*, 2006, **21**(1): 76–81.
- [8] Lin T, Du HF, Wu HB, *et al.* Development of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus O type and analysis of their biological characteristics. *Vet Sci Chin*, 2007, **37**(03): 48–52.
林彤, 杜惠芬, 吴海波, 等. 抗 O 型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性分析. *中国兽医科学*, 2007, **37**(3): 227–231.
- [9] Bachrach L, Tranutman R, Sydney S, *et al.* Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus. *Am J Vet Res*, 1964, **25**: 333–342.
- [10] Sun XL, Zhao XL, Tang J. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *Int J Food Microbiol*, 2005, **99**(2): 185–194.
- [11] Guan H, Zhou P, Zhou X, *et al.* Sensitive and selective detection of aspartic acid and glutamic acid based on polythiophene-gold nanoparticles composite. *Talanta*, 2008, **77**(1): 319–324.
- [12] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. 2nd Ed. Beijing: Scinces Press, 1997.
殷震, 刘景华主编. *动物病毒学*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.