

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.04

猪瘟抗体胶体金快速定量检测卡的研制

李成洪¹, 宋青龙^{2,3*}, 王晓中¹, 唐 达¹, 傅 巍², 杨春柳²

(1.重庆市畜牧科学院, 重庆 402460, 2.北京龙科方舟生物工程技术有限公司, 北京 100193; 3.国家饲料工程技术研究中心, 北京 100193)

[收稿日期] 2017-11-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 07-0022-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 应用胶体金免疫层析技术, 结合胶体金定量读数仪研制出一种快速定量检测猪血清中猪瘟抗体水平的检测卡。该检测卡以胶体金标记高灵敏的猪瘟重组 E2 蛋白, 同时在 NC 膜上包被同一蛋白, 经正交实验确定最适条件, 同时通过与对照线的颜色对比, 应用胶体金定量读数仪, 可对样本中猪瘟抗体水平进行定量。该检测卡检测方法简便、快速、稳定性好。与猪圆环病毒病、猪伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征等常见猪疫病抗体均无交叉反应。检测 71 份猪血清样本结果与 ELISA 结果的符合率达 90.1%。结果表明, 实验研制的猪瘟抗体胶体金快速定量检测卡可用于基层兽医站和养殖企业的检测。

[关键词] 猪瘟抗体; 胶体金; 检测卡

Development of Colloidal Gold Rapid and Quantitative Test Card for Classical Swine Fever Antibody

LI Cheng-hong¹, SONG Qing-long^{2,3*}, WANG Xiao-zhong¹, TANG Da¹, FU Wei², YANG Chun-liu²

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China;

2. Beijing Longkefangzhou Bio-Engineering Technology Co. Ltd, Beijing 100193, China;

3. National Feed Engineering Technology Research Center, Beijing 100193, China)

Corresponding author: SONG Qing-long, E-mail: sq119972002@126.com

Abstract: Colloidal gold immunochromatography was applied to develop a rapid quantitative test card at the antibody level of classical swine fever (CSF) combined with colloidal gold quantitative reading meter. The test card was labeled by colloidal gold that contained high sensitive recombination E2 protein of classical swine fever, and the NC membrane was coated by recombination E2 protein. The orthogonal experiments was used to determine the optimum condition which compared with the color of control line, and then the CSF antibody level of classical swine fever can be quantified by colloidal gold quantitative reading meter. This test card is simple, fast and stable, also it has no cross-reaction with common swine disease antibodies such as porcine circovirus disease, swine pseudo rabies, porcine reproductive and respiratory syndrome. 71 serum samples of swine were detected by

基金项目: 重庆市农发资金项目(16411)

作者简介: 李成洪, 高级兽医师, 从事新兽药研发工作。

通讯作者: 宋青龙。E-mail: sq119972002@126.com

this research, and the coincidence rate of CSF antibody was 90.1% compared to ELISA. The results showed that the developed rapid quantitative test card of CSF antibody colloidal gold could be used in the detection of veterinary station and aquaculture enterprises.

Key words: classical swine fever antibody; colloidal gold; test card

猪瘟是由猪瘟病毒(CSFV)引起的一种急性、发热、具有高度传染性的疫病,在自然条件下只感染猪,不同年龄、性别、品种的猪和野猪都易感,一年四季均可发生,且病死率高,传播迅速,蔓延地区广,对养猪业构成了极大威胁。本病在 1833 年首次发现于美国,之后其流行遍及全球,给养猪业造成巨大的经济损失^[1]。20 世纪 50 年代,我国猪瘟兔化弱毒疫苗问世后,对猪瘟的控制主要依赖于疫苗免疫,因此,疫苗免疫效果的优劣对猪瘟防控起了决定性作用,而猪瘟抗体水平的监测是疫苗免疫效果评价的主要方法^[2]。目前市场上检测猪瘟抗体的产品主要是进口的 ELISA 试剂盒^[3],但其价格昂贵,需要专业人员操作,且检测时间长^[4]。而现有的猪瘟抗体胶体金及荧光免疫层析检测卡,只能做定性检测^[5],即根据 T 线的有无判定样本中猪瘟抗体的阴阳性^[6-8]。这种判定凭肉眼观察^[9-10],主观性较强,且结果对于疫苗免疫效价的评定意义不大。因此,应用胶体金免疫层析技术,结合胶体金定量读数仪,进行了快速定量猪瘟抗体检测卡的研制,以期可快速定量检测猪血清中猪瘟抗体水平。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料 氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),国药;猪瘟重组 E2 蛋白,北京龙科方舟生物工程技术有限公司;羊抗鼠 IgG、小鼠 IgG,上海金标生物科技有限公司;硝酸纤维素膜,Millipore;胶体金结合垫、样品垫、吸水纸,上海金标生物科技有限公司;猪瘟病毒抗体检测试剂盒(ELISA),IDEXX;猪圆环病毒病阳性血清、猪伪狂犬病阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清、猪乙型脑炎阳性血清、待检血清,重庆市畜牧科学院。

1.1.2 仪器设备 三维平面点膜喷金仪 HM3030,上海金标生物科技有限公司;微电脑自动斩切机

ZQ2000,上海金标生物科技有限公司;高速冷冻离心机 H-2050R,长沙湘仪离心机仪器有限公司;紫外连续扫描分光光度计,Thermo;数显磁力搅拌电热套,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;手持式胶体金定量读数仪,深圳元秦科技有限公司;电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 胶体金溶液的制备 在圆底烧瓶中加入 1 L 超纯水加热至煮沸,加入 10 mL 1% 氯金酸溶液,2 min 后加入 12 mL 1% 柠檬酸三钠溶液,此时溶液颜色由黑色逐渐变为酒红色。继续煮沸 15 min 后停止加热,冷却至室温,4 ℃ 贮存。紫外扫描检测胶体金溶液质量。

1.2.2 抗原最佳标记 pH 值的确定 取 1 mL 胶体金溶液,分别加入 1、3、5、8、10、15、20 μL 浓度为 0.2 mol/L 的碳酸钾(K_2CO_3)溶液调节 pH 值^[11],猪瘟重组 E2 蛋白按照 0.02 mg/mL 标记,终浓度 1% BSA 封闭,离心去上清液后用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤一次,再次离心后用 150 μL 悬浮液悬浮。小鼠 IgG 按照 0.01 mg/mL 标记后,与标记好的抗原等体积混匀。混合液按 10 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 喷金量包被在胶体金结合垫上,37 ℃ 干燥 2 h。

猪瘟重组 E2 蛋白和羊抗鼠 IgG 分别稀释到 1.0 mg/mL,按 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 划膜量包被到 NC 膜上,37 ℃ 干燥 1 h。组装大板、切条,用猪瘟病毒弱阳性血清检测,观察 T 线显色情况,选择没有死金的且显色最强的 K_2CO_3 溶液用量作为最佳标记 pH 值。

1.2.3 抗原最佳标记浓度与最佳包被浓度的确定 用确定的最佳标记 pH 值,猪瘟重组 E2 蛋白分别按照 0.01、0.02、0.03、0.04 mg/mL 标记,小鼠 IgG 按照 0.01 mg/mL 标记。猪瘟重组 E2 蛋白分别按照 0.2、0.4、0.8、1.0 mg/mL 包被在 T 线位置,进行正交实验,检测猪瘟病毒阳性血清、弱阳性血清和阴性

血清。选择弱阳性血清显色明显且阳性血清与弱阳性血清显色差异最大的组合为最佳条件。在此条件下,羊抗鼠 IgG 分别按照 0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL 包被在 C 线位置,检测猪瘟病毒阳性血清,选择 C 线显色强度与 T 线相当的包被浓度为最佳条件。

将包被有猪瘟重组 E2 蛋白和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜、喷有猪瘟重组 E2 蛋白偶联胶体金的聚酯垫、玻璃纤维滤纸与吸水纸组装在 PVC 底板上,用切条机切成 4.0 mm 宽的试纸条,装入检测卡壳中,即为最终的检测卡。

1.2.4 样品检测方法的确定 将猪瘟阳性血清、弱阳性血清、阴性血清分别取 50、80、100、150 μL 加到加样孔中,室温反应 10、13、15、20 min 观察结果,确定加样量及反应时间。

1.2.5 标准曲线的建立 用猪瘟阴性血清按梯度稀释阳性血清,用 ELISA 试剂盒检测并计算其阻断率,分别取 80 μL 加到检测卡的加样孔中,室温反应 15 min,放入胶体金定量读数仪中,读取 T 线与 C 线的峰面积比值即 T/C 值,每个浓度重复检测 5 次,计算平均值。以 T/C 值平均值为横坐标、血清样本阻断率为纵坐标,制作标准曲线。

1.2.6 结果判定方法的建立 检测卡检测 20 份猪瘟抗体阴性血清,用定量读数仪读取 T/C 值,计算 cutoff 值。检测临床样本的 T/C 值小于该值判定为阴性,大于该值同时小于阻断率为 40 血清样本对应的 T/C 值为灰区,大于阻断率为 40 血清样本对应的 T/C 值的样本则以定量读数仪结果为最终结果。

1.2.7 检测卡特异性检测 猪瘟检测卡分别检测猪圆环病毒病阳性血清、猪伪狂犬病阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清、猪乙型脑炎阳性血清,确定本检测卡的特异性。

1.2.8 检测卡重复性及加速稳定性检测 检测卡分别检测猪瘟抗体阴性、弱阳性、阳性血清,每份血清样本重复检测 5 次,考察其重复性。将检测卡放置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中,分别于第 0、2、4、6、8 周检测猪瘟

抗体阴性、弱阳性、阳性血清,考察检测卡的稳定性。

1.2.9 样本检测 随机选取 71 份猪血清样本,分别用 ELISA 试剂盒和本检测卡检测猪瘟抗体水平,比较检测结果。

2 结果与分析

2.1 胶体金溶液扫描结果 以双蒸水为对照,用紫外分光光度计在 400~700 nm 连续扫描,测定吸收曲线和吸收峰,结果为: $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$, $\text{OD}_{\text{max}} = 0.109$ 。所制备的胶体金溶液颗粒大小在 40 nm 左右,颜色为透明的酒红色,液面无油质类漂浮物,可用于试纸条制备。

2.2 抗原最佳标记 pH 值 胶体金中加入 5 μL 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液调节 pH 值时,标记抗原没有死金现象,且显色最强,调节后的胶体金溶液的 pH 值在 8.0 左右。

2.3 抗原最佳标记浓度与最佳包被浓度 通过正交实验,确定猪瘟重组 E2 蛋白和小鼠 IgG 分别按 0.01 mg/mL 标记、T 线猪瘟重组 E2 蛋白按照 0.8 mg/mL 包被、C 线羊抗鼠 IgG 按照 1.0 mg/mL 包被为最佳条件组合。

2.4 样品检测方法的确定 取血清样本 80 μL 加到加样孔中,室温反应 10 min,为样本的检测条件。

2.5 标准曲线的建立 通过检测梯度稀释的阳性血清,确定线性范围及对应的 T/C 值。以 T/C 值平均值为横坐标、阳性样本阻断率为纵坐标,建立标准曲线如图 1。

2.6 结果判定方法的建立 检测卡检测 20 份猪瘟抗体阴性血清,用定量读数仪读取 T/C 值,计算 cutoff 值为 0.035。确定检测临床样本的 T/C 值小于 0.035 判定为阴性,大于 0.035 同时小于 0.331 判定为灰区,大于 0.331 的则以定量读数仪结果为最终结果。

2.7 检测卡的特异性 本检测卡检测猪圆环病毒病阳性血清、猪伪狂犬病阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清、猪乙型脑炎阳性血清,结果均为阴性(图 2),说明检测卡与以上疫病抗体无交叉反应。

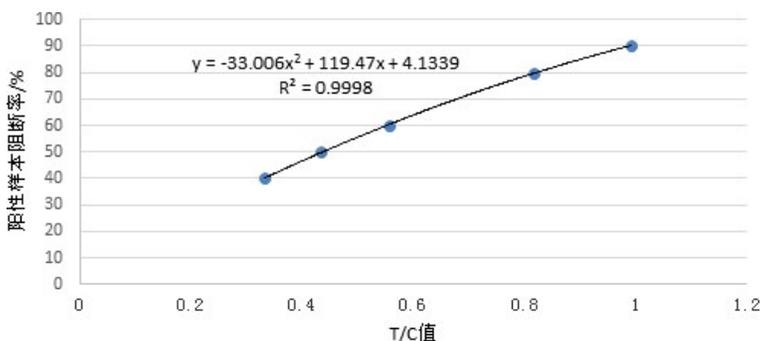
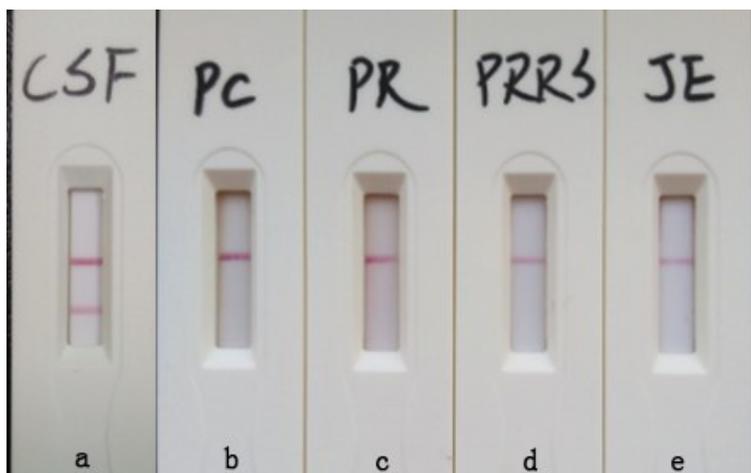


图 1 猪瘟抗体快速定量检测卡标准曲线

Fig 1 Standard curve of CSF rapid and quantitative test card



a.猪瘟阳性对照,CSF;b.猪圆环病毒病,PC;c.猪伪狂犬病,PR;d.猪繁殖与呼吸综合征,PRRS;e.猪乙型脑炎,JE

图 2 检测卡特异性结果

Fig 2 Specificity of CSF rapid and quantitative test card

2.8 检测卡重复性结果 用同批次检测卡分别检测猪瘟抗体阴性、弱阳性、阳性血清,每个浓度重复

检测 5 次,批内重复性结果见表 1。结果表明,猪瘟抗体检测卡的批内重复性好,无明显差异。

表 1 检测卡批内重复性

Tab 1 Intra repeatability of CSF rapid and quantitative test card

血清样本	ELISA 阻断率/%	卡 1	卡 2	卡 3	卡 4	卡 5	变异系数/%
阴性血清	13	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	--
弱阳性血清	50	48	45	52	48	49	5
阳性血清	80	85	87	74	72	79	8

2.9 检测卡加速稳定性结果 将检测卡放置于 45 °C 温箱中,于第 0、2、4、6、8 周检测猪瘟抗体阴性、弱阳性、阳性血清,其稳定性结果见表 2。可以看出,检测卡在 45 °C 下保存 8 周其检测结果无明显

差异,可依此确定检测卡室温保质期最少为 6 个月。

2.10 样品检测结果 检测卡和 ELISA 试剂盒检测 71 份样本中猪瘟抗体结果见表 3。部分样本具体对比结果见表 4。

表 2 检测卡稳定性

Tab 2 Stability of CSF rapid and quantitative test card

血清样本	ELISA 阻断率/%	0 周	2 周		4 周		6 周		8 周	
		检测值	检测值	变异系数/%	检测值	变异系数/%	检测值	变异系数/%	检测值	变异系数/%
阴性血清	13	阴性	阴性	--	阴性	--	阴性	--	阴性	--
弱阳性血清	50	52	54	3	51	1	47	7	43	13
阳性血清	80	83	84	1	80	3	74	8	70	12

表 3 检测卡与 ELISA 检测猪瘟抗体结果符合情况

Tab 3 The detected results of the test card and ELISA

ELISA	定量检测卡		合计
	阳性	阴性	
阳性	38	5	43
阴性	2	26	28
合计	40	31	71

表 4 猪瘟抗体定量检测卡检测样本结果

Tab 4 Detection results of CSF rapid and quantitative test card

样本编号	ELISA 阻断率/%	定量卡 T/C 值	定量卡阻断率/%	相对误差/%
7	25	0.022	阴性	--
14	13	0.012	阴性	--
21	17	0.009	阴性	--
37	11	0.013	阴性	--
65	23	0.006	阴性	--
5	52	0.414	48	4
16	86	0.817	81	3
19	92	0.797	80	7
22	52	0.451	52	0
25	67	0.557	61	5
38	62	0.556	61	1
49	82	0.58	63	13
52	88	0.991	92	2
68	58	0.433	50	7
70	78	0.575	63	11

由表 3 可见,相对 ELISA 检测法,定量检测卡检测阳性为 40 份,阴性为 31 份,假阳性为 2 份,假阴性为 5 份。定量检测卡的灵敏度为 88.4%,特异性为 92.9%,总符合率为 90.1%。

由表 4 可见,定量检测卡检测猪瘟抗体阳性样本的阻断率与 ELISA 结果有较好的符合度,相对误差在 15% 以内。

3 讨论与结论

猪瘟是妨碍养猪业发展的主要疫病之一,在猪瘟的防疫中,猪瘟抗体水平的检测是十分必要的,其高低反应了猪对猪瘟病毒的抵抗能力及疫苗免疫效果。目前主要用 ELISA 试剂盒检测猪瘟抗体水平,但其检测时间通常需要 1.5~3 h^[12-13]。实验研制的胶体金定量检测卡结合手持式定量读数仪,

其操作简便、步骤单一,加样 80 μL 后反应只需 10 min,即可读取 T/C 值及对应的阻断率,避免了人为主观判断造成的差异,适用于单个及多个样本的检测。与 ELISA 结果相比,检测卡灵敏度为 88.4%,特异性为 92.9%,总符合率为 90.1%。检测阳性样本的阻断率与 ELISA 结果的相对误差在 15%以内,符合度较好。同时检测卡只需常温储存,加速稳定性实验结果表明 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 8 周其结果差异仍小于 15%,相当于常温放置 6 个月。实验研制的猪瘟抗体快速定量检测卡使用方便、快速,成本低,可用于猪瘟抗体的快速检测,适合基层兽医站和养殖企业使用。

参考文献:

- [1] 吴增坚,杨奎. 非典型猪瘟[J]. 畜牧与兽医, 2000, 32(2): 35-37.
Wu Z J, Yang K. Nontypical classical swine fever[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2000, 32(2): 35-37.
- [2] 徐璐,范学政,徐和敏,等. 猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法的建立和优化[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(3): 15-18.
Xu L, Fan X Z, Xu H M, *et al.* Development and optimization of the indirect ELISA method to detect antibody against classical swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 48(3): 15-18.
- [3] 吴秀娟,李凯航,杨显超,等. 猪瘟病毒 5 种 ELISA 抗体检测试剂盒的比较[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(5): 78-81.
Wu X J, Li K H, Yang X C, *et al.* Comparison of 5 antibody detection kits for classical swine fever virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2015, 32(5): 78-81.
- [4] 靳雯雯,杨俊兴,花群俊,等. 非洲猪瘟病毒抗体检测间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(7): 1043-1046.
Jin W W, Yang J X, Hua Q J, *et al.* Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection antibody against African swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(7): 1043-1046.
- [5] 杨明,陈伯祥,孙晓林,等. 猪瘟胶体金快速诊断试纸条的研制[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(2): 34-37.
Yang M, Chen B X, Sun X L, *et al.* Development of rapid test strip for classical swine fever virus[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2010, 45(2): 34-37.
- [6] 付连军,姜成,李沐森. 猪瘟快速诊断金标试纸条的研制及应用[J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(3): 17-19.
Fu L J, Jiang C, Li M S. Development and application of colloidal gold strip for rapid diagnosis of classical swine fever virus[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2011, 30(3): 17-19.
- [7] 李华玮,郑鸣. 胶体金免疫层析法检测猪瘟(强弱毒区分)抗体研究[J]. 广东农业科学, 2012, (7): 130-132.
Li H W, Zheng M. Study on gold immunochromatography assay for detection of hog cholera antibody[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(7): 130-132.
- [8] Xuewu Li, Li Wang, Xiao Shi, *et al.* Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of antibodies against classical swine fever virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 180: 32-37.
- [9] 林彦星,曹琛福,张彩虹,等. 非洲猪瘟病毒抗体量子点检测试纸条的研制[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(10): 1214-1220.
Lin Y X, Cao C F, Zhang C H, *et al.* Establishment of a quantum dots-based immunochromatographic strip for detection of the antibodies against African swine fever virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(10): 1214-1220.
- [10] 张鑫宇,左伟勇,朱善元,等. 非洲猪瘟病毒 p54 抗体胶体金试纸检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(4): 281-285.
Zhang X Y, Zuo Y Z, Zhu S Y, *et al.* Establishment of colloidal gold strip for detecting antibody against African swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(4): 281-285.
- [11] 宋青龙,李成洪,傅巍,等. 黄曲霉毒素 B1 胶体金快速定量检测试剂盒的研发[J]. 动物营养学报, 2017, 29(10): 3703-3709.
Song Q L, Li C H, Fu W, *et al.* Development of aflatoxin B1 colloidal gold rapid and quantitative test kit[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(10): 3703-3709.
- [12] 何雁南,栾后利,董晓辉,等. 检测猪瘟抗体间接 ELISA 方法的建立及应用[J]. 养殖与饲料, 2007, (7): 5-8.
He Y N, Luan H L, Dong X H, *et al.* Development and application of the indirect ELISA method to detect antibody against classical swine fever virus[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2007, (7): 5-8.
- [13] 徐维成,范秀铭,岳正河. 胶体金法与酶联免疫吸附测定法检测猪瘟抗体的比较[J]. 畜牧兽医杂志, 2014, 33(6): 20-21.
Xu W C, Fan X M, Yue Z H. Comparison of colloidal gold and ELISA on swine fever antibody detection[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014, 33(6): 20-21.