



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103509759 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201310433521. 1

(22) 申请日 2013. 09. 22

(83) 生物保藏信息

CCTCC C201359 2013. 06. 06

(71) 申请人 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心

地址 518045 广东省深圳市福强路 1011 号

申请人 深圳市三方圆生物科技有限公司

(72) 发明人 贾鹏 钟松清 何俊强 郑晓聪

谭攀 王津津 刘荭 史秀杰

兰文升 于力 谢冬霞

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 彭家恩 彭愿洁

(51) Int. Cl.

C12N 5/20(2006. 01)

C07K 16/10(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

C12R 1/91(2006. 01)

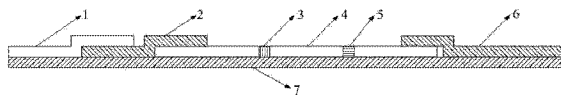
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

抗 IHNV 单克隆抗体 5H3 及其应用

(57) 摘要

本申请公开了一种抗传染性造血组织坏死病毒(IHNV)单克隆抗体5H3及其应用。该单克隆抗体由杂交瘤细胞株IHNV-5H3分泌,该细胞株的保藏号为CCTCC C201359。该杂交瘤细胞株IHNV-5H3能稳定产生单克隆抗体5H3,该抗体具有抗体效价高、灵敏度高、特异性强、与天然抗原的亲合力强等优点。本申请还提供了一种包含该单克隆抗体5H3的快速检测试纸条及其试剂盒,其采用胶体金免疫层析检测技术,具有良好的灵敏度、特异性、稳定性、重复性和再现性等特点。同时,该试纸条和试剂盒使用简单方便、检测速度快、检测结果直观且检测成本低,可满足食品安全、屠宰、检测机构等的检测要求,特别适用于现场检测。



1. 保藏号为 CCTCC C201359 的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3。
2. 一种抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体由保藏号 CCTCC C201359 的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3 产生。
3. 根据权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3 在制备传染性造血组织坏死病毒检测试剂或设备中的应用。
4. 如权利要求 2 所述的抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体在制备传染性造血组织坏死病毒检测试剂或设备中的应用。
5. 一种传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条,其特征在于:所述试纸条包含权利要求 2 所述的抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条,其特征在于:所述的抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体包附胶体金。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的快速检测试纸条在传染性造血组织坏死病毒检测中的应用。
8. 一种传染性造血组织坏死病毒检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括如权利要求 5 或 6 中所述的传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒在传染性造血组织坏死病毒检测中的应用。

抗 IHN 单克隆抗体 5H3 及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及传染性造血组织坏死病毒检测领域,特别涉及一种抗传染性造血组织坏死病毒(IHN)单克隆抗体 5H3 及其应用。

背景技术

[0002] 鱼传染性造血器官坏死病(或称传染性造血器官坏死病, infectious haematopoietic necrosis of fish, IHN)是由一种毒力很强的弹状病毒,即传染性造血器官坏死病毒血症病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, 简称 IHN)所引起的急性、全身性的严重传染病,致病因子 IHN 病毒粒子呈弹状,有囊膜,其内表面为基质蛋白(M),囊膜上有糖蛋白(G)突起膜内有基质蛋白、核蛋白、聚合酶等,侵染的主要靶器官是肾造血组织。这种爆发性疾病最早流行于北美太平洋西北养殖场的鲑科鱼类稚幼鱼,后来在日本、欧洲和朝鲜也曾检测到。1988年在中国东北地区各养鳟场陆续发现该病毒,最近在深圳和北京 2 个水产养殖场牙鲈、虹鳟及从美国进口的匙吻鲟卵中也检测到 IHN 的存在。

[0003] IHN 主要感染鲑、鳟鱼,敏感寄主通常为稚幼鱼,一般认为成鱼比稚幼鱼难以感染,成鱼一般不表现临床症状,成为病毒的终身携带者,在苗种期感染 IHN 后残留的带病毒鱼是主要传染源,病毒可随着粪、尿、性腺产物排入水中。病毒放到水中或拌在饲料中投喂均可引起发病。感染 IHN 的病鱼典型体表症状为厌食嗜睡、异常游动、眼突出、体色发黑、腹部积水,鳍条基部和肛门周围充血,肛门外有白色不透明粪便,有些感染该病毒后存活的鱼脊柱变形。解剖病鱼可见肝脏、脾脏、肾脏、肠道等充血,并有卡他性炎症,体腔内有积水,鳃及内脏颜色变淡;口腔、骨骼肌、脂肪组织、腹膜、脑膜、鳃和心包膜常有出血斑点,肠出血,鱼苗的卵黄囊也会出血、因充满浆液而膨大,肠道内常常没有食物。显微镜检结果表明,肾脏、造血组织、胰脏、肠道和肾上腺皮质出现退化和坏死;胃、肠固有膜的颗粒细胞、部分胰腺及胰岛细胞也会发生变性和坏死。

[0004] IHN 被国际兽疫局列为必须申报的疾病,是鱼类口岸第 I 类检疫对象,被我国列为二类动物疫病。

[0005] 防止 IHN 的传播是控制 IHN 发生的重要环节,而加强检疫是防止 IHN 传播的关键,因此应用灵敏、有效、快速的病毒检测技术非常重要。目前, IHN 的检测技术主要有细胞培养、免疫学技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术(RT-PCR、Real-time RT-PCR、等温扩增技术)等。采用核酸检测技术,如专利 CN1687447(2005),公开了用 RT-PCR 法同步检测三种鱼病病毒的试剂盒及其检测方法;专利 CN102212620A(2011)公开了检测三种鱼类弹状病毒的测量审核用试剂盒,为用 PCR 方法检测此三种病毒的准确性提供了测评基准。然而,以上检查方法均需要一定的条件和技术,或因为需要特殊仪器,或因为费用昂贵等,其现场检测推广及多次重复追踪复查受到限制。此外,采用免疫学技术检测,如专利 US20050163795A1 和“朱旭等,传染性造血器官坏死病毒糖蛋白抗血清的制备及应用,《渔业科学进展》,201206(33)”采用 IHN-G 蛋白(表达蛋白)作为抗原,制备抗体,检测 IHN,却仍存在不能确保 IHN-G 蛋白有很好的抗原性,或抗原活性蛋白含量低、抗体特异性差的缺

点。

[0006] 20 世纪 80 年代兴起的胶体金免疫层析检测, 基于血清学检测原理, 操作简单快捷、结果清晰易于判断、无需复杂的实验技能和特殊设备, 特别适于现场检测。因此, 研究开发适合于快速检测用的抗 IHNV 单克隆抗体具有重要意义。

发明内容

[0007] 本申请的一个目的是提供一种适用于快速检测的抗传染性造血组织坏死病毒 (IHNV) 单克隆抗体。

[0008] 本申请的另一个目的是提供该单克隆抗体在传染性造血组织坏死病毒检测中的应用, 特别的提供了一种特异性高、灵敏度高的传染性造血组织坏死病毒 (IHNV) 快速检测试纸条及其试剂盒。

[0009] 为了实现上述目的, 本申请采用了以下技术方案:

[0010] 本申请公开了一种可产生抗传染性造血组织坏死病毒 (IHNV) 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3, 该细胞株已于 2013 年 6 月 6 日保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏号为 CCTCC C201359。

[0011] 本申请公开了一种由上述保藏号 CCTCC C201359 的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3 产生的抗 IHNV 单克隆抗体, 在本申请中也将该抗体称为抗 IHNV 单克隆抗体 5H3 (或简称为单克隆抗体 5H3)。

[0012] 本申请同时公开了保藏号 CCTCC C201359 的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3 在制备 IHNV 检测试剂或设备中的应用。

[0013] 本申请还公开了上述抗 IHNV 单克隆抗体 5H3 在制备 IHNV 检测试剂或设备中的应用。

[0014] 本申请提供了一种 IHNV 快速检测试纸条, 该试纸条包含上述抗 IHNV 单克隆抗体 5H3。

[0015] 进一步的, 上述 IHNV 快速检测试纸条中, 抗 IHNV 单克隆抗体 5H3 包附胶体金。

[0016] 本申请还提供了一种 IHNV 检测试剂盒, 该试剂盒包括上述 IHNV 快速检测试纸条, 例如可由上述 IHNV 快速检测试纸条组装而成。

[0017] 本申请还提供了上述 IHNV 快速检测试纸条或 IHNV 检测试剂盒在 IHNV 检测中的应用。

[0018] 由于采用了上述技术方案, 本申请的有益效果在于:

[0019] 本申请提供的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3 能稳定产生抗 IHNV 单克隆抗体 5H3, 该抗体特异性好、效价高, 可应用于 IHNV 快速检测领域。

[0020] 同时, 本申请提供了一种 IHNV 快速检测试纸条及其试剂盒, 将胶体金检测技术应用到 IHNV 的检测领域, 在胶体金试纸上全部使用抗体作为基本试剂, 生物安全性好, 不存在试纸条扩散病毒的潜在危险。该试纸条具有特异性强、敏感性高、稳定性好, 同时具备可重复性和再现性等优点, 检测结果受外界因素影响较小, 可在养殖现场进行检测, 安全稳定, 胶体金无毒性, 不造成环境污染, 其胶体金颗粒与单克隆抗体是物理吸附不改变抗体的性质, 可最大限度的保持单抗的活性。

附图说明

[0021] 图 1 为本申请具体实施方式中的一种传染性造血组织坏死病毒快速检测试纸条的结构示意图。

[0022] 保藏信息

[0023] 培养物名称 : 杂交瘤细胞株 IHN-5H3

[0024] 保藏日期 : 2013 年 6 月 6 日

[0025] 保藏单位 : 湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心, 即中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)

[0026] 保藏编号 : CCTCC C201359

具体实施方式

[0027] 本申请采用灭活纯化的 IHN 做免疫原, 制备得到了杂交瘤细胞株 IHN-5H3, 该杂交瘤细胞株细胞染色体稳定, 能稳定、高表达的分泌出具有高抗原亲和力、高特异性、效价高的抗 IHN 单克隆抗体 5H3。具体的, 该单抗可由上述杂交瘤细胞株通过注射 Balb/c 小鼠腹腔, 诱生腹水, 通过辛酸-硫酸铵纯化而大量获得。该获得的单克隆抗体 5H3 是针对病毒的天然结构的所有抗体, 有比较好的抗原性, 与天然抗原的亲和力强, 同时特异性好、抗体效价高, 可以作为 IHN 多种检测方法中的重要试剂原料。该抗 IHN 单克隆抗体 5H3 特别适用于 IHN 快速检测领域, 尤其适用于 IHN 胶体金免疫层析检测法。

[0028] 由抗 IHN 单克隆抗体 5H3 制备得到的 IHN 胶体金快速检测试纸条, 特异性强、敏感性高、稳定性好, 同时具备可重复性和再现性等优点。该试纸条可进一步与其他部件构成 IHN 检测试剂盒, 其 IHN 快速检测试纸条则是该试剂盒的核心。本申请提供的试纸条及其试剂盒生产和检测成本低。使用该试纸条不需另配其它仪器、设备和试剂, 节省大量仪器、设备和附加试剂费用, 专业和非专业人士均可随时随地进行现场检测, 节省检测成本。其应用范围广, 便于普遍推广, 而且方便携带和保存, 能满足不同层次人员的需要, 包括专业化验、海关检疫、卫生防疫、质量监测、畜产品加工、集约化养殖和个体养殖等, 具有广阔的市场前景和较好的经济、社会效益。同时, 该试纸条和试剂盒可快速检测, 10-15 分钟即可完成检测。由于不需特殊仪器设备, 且操作简单, 一步完成, 无需专业人员操作, 因此特别适用于现场操作。

[0029] 本申请中的单克隆抗体 5H3 除了应用于上述胶体金免疫层析检测试纸条外, 还可以用于其他 IHN 检测试剂盒、试剂或设备中。本领域技术人员可以理解, 将本申请所述的单克隆抗体 5H3 直接或间接结合其他信号基团 (如磁性微球、辣根过氧化物酶等), 或将本申请所述的单克隆抗体 5H3 作为包被抗体 (例如 ELISA), 则可用于其他形式的 IHN 检测试剂或设备。故本申请所制备得到的杂交瘤细胞及其分泌的抗体可广泛适用于制备 IHN 检测试剂或设备。

[0030] 此外, 本申请中所采用的传染性造血组织坏死病毒 (Infectious hematopoietic necrosis virus, 简称 IHN) 的毒株为 IHN-UK, 英国 CEFAS 赠送, 由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心保存, 紫外分光光度仪 MK3 购自 Thermo Fisher scientific 公司。

[0031] 下面通过具体实施方式结合附图对本申请作进一步详细说明。

[0032] 实施例一：传染性造血组织坏死病毒的纯化

[0033] 差速离心的方法,10000g, 将挑斑后的病毒接种到已长成单层的 EPC 细胞中,置于 15℃ 培养箱中培养。收集病变的细胞。冻融三次,4℃ 条件下,10,000g 离心 10min,去除细胞碎片。上清液以 140,000g (Beckman sw28 转头)于 4℃ 离心 3h,收集沉淀,加入适量 PBS 悬浮。悬浮的病毒置于蔗糖梯度(30%、45%、60%) 顶部,4℃ 以 140,000g 离心 3h,收集位于蔗糖浓度 30% 与 45% 界面的病毒。加 PBS 洗涤后,140,000g 离心 3.5h 去蔗糖,收集沉淀,悬于适量的 STE 缓冲液中,置 -20℃ 保存备用,所述 SET 缓冲液含 0.1mol/LNaCl, 10mmol/LTris-Cl (PH8.0), 1mmol/L EDTA (PH8.0)。

[0034] 实施例二：抗传染性造血组织坏死病毒单克隆抗体的制备：

[0035] (1) 共选取 8 周龄 BALB/C 小鼠 5 只,免疫程序如下：

[0036] 首免：以实施例 1 中得到的纯化后的 IHNV 作为免疫原,以 Quick Antibody-Mouse5W 作为免疫佐剂,免疫剂量为 10 μg/只(10 μg 免疫原 +10 μg Quick Antibody-Mouse5W+ 生理盐水 80ul),大腿肌肉注射。

[0037] 加强免疫：于首免后第 21 天进行,免疫剂量为 10 μg/只(10 μg 免疫原 +10 μg Quick Antibody-Mouse5W+ 生理盐水 80ul),共免疫 2 次,第 35 天断尾采血分离血清,用间接 ELISA 法检测抗 IHNV 悬液的血清抗体效价。若效价达到 1:5000,即可用于细胞融合。

[0038] 选取 ELISA 法检测抗体较高的免疫小鼠,眶下窦采血,分离血清。脱颈致死小鼠；

[0039] 无菌手术取出脾脏制备脾细胞,并与 NS0 细胞在 50%PEG 作用下进行细胞融合；

[0040] 将融合后的细胞悬液加到 96 孔细胞培养板上,用 HAT 培养基进行选择培养。融合后的细胞置 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养；

[0041] 用间接 ELISA 法以 0.5 μg/孔的蛋白的量包被酶标板进行阳性筛选。P/N 大于 2.1 时即为阳性。对强阳性、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化,得到保藏号为 CCTCC C201359 的杂交瘤细胞株 IHNV-5H3。

[0042] (2) 单抗的大量制备：

[0043] 本例采用腹水法大量制备抗 IHNV 单克隆抗体 5H3。将杂交瘤细胞株 IHNV-5H3 扩大培养,给腹腔注射液体石蜡 10 天后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10⁷ 个细胞,7 天后抽取腹水,用 IHNV、病毒悬液包被酶标板测其 ELISA 效价、抑制价。

[0044] (3) 单抗的纯化：

[0045] 采用辛酸—硫酸铵法进行单抗的纯化。将 20mL 腹水加入离心管中,于 4℃ 12000rpm×15min,将上清转移至另一容器中；

[0046] 向上清中加入 4 倍腹水体积的 0.06M pH4.8 的醋酸缓冲液,室温边加边搅拌；

[0047] 向上述混合物中加入适量的辛酸(33 μL/mL),滴加时要缓慢,室温滴加,边滴加边搅拌；辛酸滴加完后,室温搅拌 30min；

[0048] 于 4℃ 离心,12000rpm×30min,取上清,用滤纸过滤；

[0049] 向滤液中加入 ≤ 45% 的饱和硫酸铵溶液(SAS),室温搅拌 30min,4℃ 静置 2h 或过夜；

[0050] 于 4℃ 离心 12000rpm×30min,弃上清,沉淀用适量 0.01mol/L PH7.4PBS 重悬,用 0.01mol/L PH7.4PBS 于 4℃ 透析 24h,其间换液 4 次；

[0051] 将透析物于 4℃ 离心 12000rpm×30min, 收集上清分装于 EP 管中, 用核酸蛋白测定仪测定蛋白含量, 稀释至 10mg/mL, 置于 -20℃ 保存。

[0052] (4) 单克隆抗体特异性检测:

[0053] 用纯化的抗 IHNV 单克隆抗体 5H3 分别与其他鱼类病毒(锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血病毒(VHSV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、真鲷虹彩病毒(RSIV)、草鱼出血病病毒(GCHV) 和流行性造血器官坏死病毒(EHNV)) 包被的 ELISA 板反应, 鉴定单克隆抗体的特异性。

[0054] 实施例三: IHNV 胶体金快速检测试纸条的制备

[0055] (1) 胶体金颗粒的制备

[0056] 取 1% 氯金酸溶液 1ml, 加 99ml 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液, 加热沸腾后, 取 1% 柠檬酸三钠 1.6ml 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中, 继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色, 颜色稳定后继续加热 5min, 室温冷却, 补充失水至原体积。

[0057] (2) 胶体金-抗体复合物试剂的制备与纯化:

[0058] 取 100ml 胶体金溶胶, 用 0.1mol/L 碳酸钾调节金溶胶至所需 pH, 大约调到 pH8.0;

[0059] 迅速向金溶胶中加入最佳标记量的抗 IHNV 单克隆抗体 5H3(10ug/ml) 搅拌 2-3 分钟充分混合, 室温下反应 10 分钟;

[0060] 迅速加入 10ml 10% 牛血清白蛋白(BSA) 溶液, 充分混合, 室温下反应 10 分钟;

[0061] 取胶体金溶液至离心管中于 13000 转 4℃ 冷冻离心机离心 30 分钟, 小心吸去上清液(切忌倾倒);

[0062] 将沉淀悬浮于 1/10 体积含 0.5mg/ml BSA 的磷酸缓冲液中, 置 4℃ 保存。

[0063] (3) 固相硝酸纤维素(NC)膜的活化

[0064] 裁取 20mm×3-4mm 的 NC 膜, 于 0.1mol/L 的碳二亚胺溶液中浸泡, 15min 后取出, 室温风干 8min。抗 IHNV 多克隆抗体(2mg/ml)包被于硝酸纤维素膜的观察结果的测试反应区, 定义为检测线(T), 包被羊抗鼠 IgG(2mg/ml) 于质控区, 定义为质控线(C), 且两者间距 4-10mm, 优选 6mm。

[0065] 其中, 该抗 IHNV 多克隆抗体可通过以下方法制备得到:

[0066] 将实施例 1 中纯化后的 IHNV 作为免疫原, 以 Quick Antibody-Rabbit5W 作为免疫佐剂, 免疫剂量为 30 μg/只(30 μg 免疫原+50 μL Quick Antibody-Rabbit5W), 再用生理盐水补充至 100ul, 每针次 100ul, 大腿肌肉注射免疫家兔, 首免后第 21 天用同样的方法进行加强免疫, 共免疫 2 次, 免疫后第 35 天耳静脉采血, 分离血清, 用表达蛋白包被的 ELISA 板检测抗体效价, 如果具有较高的抗体滴度, 通过颈动脉放血, 收集全血, 分离血清。用辛酸硫酸铵法提取 IgG, 用核酸蛋白测定仪测定蛋白含量, 将其稀释至 10mg/mL, 置于 -80℃ 保存备用。

[0067] 兔抗血清经饱和硫酸铵盐粗提, 透析, 再依次过 SephadexG25 和 DEAE 纤维素柱进一步提纯, 并将收集的蛋白质于透析袋中。置蔗糖或聚乙二醇中浓缩, 紫外分光光度计测其 280nm、260nm 波长处 OD 值, 以公式计算蛋白含量后 -20℃ 保存备用。

[0068] 经过 1 次初免, 1 次加强免疫后, 兔抗血清效价可达 1:30000 以上, 具有很高的抗血清效价。

[0069] 其中, 多克隆抗体动物种属来源应为非小鼠来源, 可为兔、山羊、绵羊、人、猪、马、

牛,制备多克隆的方法可以进行简单替换。

[0070] (4) 金标结合垫的制备:

[0071] 取 40 μ L 的上述胶体金-抗体复合物试剂用金标稀释液进行 3 倍稀释,裁取 7mm \times 10cm 的玻璃纤维素膜,浸泡于上述稀释后的胶体金-抗体复合物溶液中,再于室温洁净条件真空干燥备用,该金标稀释液为含 0.01M PBS、0.5% (质量百分含量) BSA、0.2% Twen-20 (体积百分含量)、2.5% 蔗糖 (质量百分含量) 的缓冲液。

[0072] (5) 样品垫的制备:

[0073] 截取 1.1cm \times 10cm 的玻璃纤维素膜,将其均匀浸泡于如下溶液中 10min,再在室温洁净条件真空干燥备用,所述溶液为含 0.01M PBS、0.5% (质量百分含量) BSA、0.2% Twen-20 (体积百分含量) 的缓冲液。

[0074] (6) 试纸条的组装

[0075] 试纸条由样品垫、金标结合垫、固相硝酸纤维素膜及吸水纸 4 个部分组成。样品垫和金标结合垫用玻璃纤维素膜,底板为双面胶聚乙烯塑料板。顺序装配,裁成宽度为 3mm 的检测试纸条。本例中试纸条的结构示意图如图 1 所示,该胶体金快速检测试纸条,包括样品垫 1、胶体金结合垫 2、检测线(T) 3、固相硝酸纤维素膜 4、质控线(C) 5、吸水纸 6 以及底板 7。其中底板 7 一端粘贴样品垫 1,另一端粘贴吸水纸 6,胶体金结合垫 2 是由胶体金标记的抗 IHNV 单克隆抗体复合物结合在玻璃纤膜,其一端置于样品垫 1 下,另一端紧密连接固相硝酸纤维素膜 4;检测线(T) 3 为抗 IHNV 多克隆抗体;质控线(C) 5 为羊抗鼠 IgG 抗体;检测线(T) 3 和质控线(C) 5 位于固相硝酸纤维素膜底板 4 的中间;吸水纸 6 连接固相硝酸纤维素膜 4。

[0076] (7) 待测样品的前处理

[0077] 当所述样品为鱼类组织时,病毒释放后,样品前处理方法为:

[0078] 1) 取样方式:表面健康的鱼:取肾、脾和脑;有临床症状的鱼:体长 \leq 4cm 取全鱼;体长在 4~6cm 之间,取包括肾脏和脑在内的所有脏器;体长 \geq 6cm,取肾、脾和脑;

[0079] 2) 取组织 6~7g,加入适量已灭菌石英砂,充分研磨,然后加入 50mL M199 培养基(含 10%FBS 和 100IU/mL 青霉素和 100 μ g/mL 双氢链霉素的双抗),转入 50ml 离心管,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。最后取孵育后的细胞悬液作为检测样品。

[0080] (8) 检测方法与判断标准

[0081] 将待检测样品滴加到试纸条的样品垫上,水平放置,反应 10min。

[0082] 判断标准:若只在质控线 C 出现红色,则表示为阴性;若在试纸的质控线、检测线均出现红色,则判定为阳性。

[0083] 实施例四:试纸条的检测试验

[0084] (1) 样品中传染性造血组织坏死病毒的检测

[0085] 抗体标记在胶体金颗粒上,当加入样本后,金标抗体和样本一起向硝酸纤维素膜方向扩散,并最终渗入吸水纸端,扩散过程中待检的 IHNV 可与胶体金标记的抗 IHNV 单克隆抗体相结合。当样本中的 IHNV 超过检测限时,检测线(T)显红色,多余的金标单克隆抗体与质控线(C)的羊抗鼠 IgG 二抗相结合显色,C 线显红色,形成 2 条红色印记为阳性;反之,待测样品中无 IHNV 时,胶体金标记抗体在向硝酸纤维素膜方向扩散的过程中,不能与抗 IHNV 多克隆抗体相结合,不能形成固相多克隆抗体-抗原-胶体金标记抗体复合物,因此 T 线

不显色,胶体金标记抗体只能与羊抗鼠 IgG 二抗结合,C 线显红色,记为阴性;如果硝酸纤维素膜没有显示红色标记或 C 线不显色,则表明试纸失效。

[0086] (2) 试纸条的敏感性试验:分别将已知病毒阳性细胞培养液 10 份经过倍比稀释,分别用试纸条进行检测,并且与病毒分离试验进行敏感性比较,结果表明试纸条的灵敏度为 100TCID₅₀, CV 值小于 15%。

[0087] (3) 试纸条的特异性试验:检测 IHNV 时显示为阳性,当将狗鱼弹状病毒(PFRV)、牙鲆弹状病毒(HRV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血病毒(VHSV)、真鲷虹彩病毒(RSIV)、草鱼出血病病毒(GCHV)和流行性造血器官坏死病毒(EHNV)等几种病毒阳性细胞培养液分别加入试纸的样品垫上,静置反应 10min 后,检测结果均为阴性,说明本试纸条特异性好,结果见表 1,其中“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0088] 表 1. 试纸条的特异性试验

[0089]

检测样品	IHNV	PFRV	HRV	IPNV	KHV	SVCV	VHSV	RSIV	GCHV	EHNV
检测结果	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0090] (4) 试纸条的重复性试验:相同条件下,每天分别检测批内重复 20 份已知阳性样品和已知阴性样品,批间取 3 个不同的批次进行检测,持续检测 7 天,通过试纸条显色的变化来确定试纸条的重复性。结果显示试纸条检测结果一致,说明该试纸条的重复性好。

[0091] (5) 金标试纸条的稳定性试验:稳定性主要通过破坏性试验(55℃)和实际情况下长期稳定性试验。55℃老化试验的原理根据阿仑尼乌斯公式: $d(\ln k)/dT = -E_a/RT^2$, E_a 为表观活化能, R 为摩尔气体常量。变化趋势为 T 增大,一般 k 也增大, E_a 约等于 19.5Kcal/mol。计算出对应的温度与老化天数关系,55℃ 15 天相当于 25℃ 一年。全部数值以 25℃ 一年稳定性情况对比。

[0092] 将 3 个批次检测试纸条分为两组,每组 500 份,一组置 55℃ 恒温温箱中,与室温放置(25℃)的另一组,同时进行对比实验,通过对检测限,假阴性率,假阳性率的变化,对其稳定性进行考察。

[0093] 检测时间:将一组置 55℃ 恒温温箱中,测试的时间间隔为第 7 天,第 15 天,第 21 天,第 28 天,与室温放置的另一组,同时进行对比实验,考察其检测限、假阳性率、假阴性率,室温的对照组为 25℃,测试的时间间隔为第 7 天,第 28 天,第 56 天,第三个月,以后每隔 3 个月做一次。

[0094] 观察内容: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。

[0095] 假阳性率:用不同保存条件和批次的检测试纸各 20 份分别检测 20 份确证阴性鱼肾脏的假阳性率。假阳性率 = 假阳性数 / 20 × 100%。

[0096] 假阴性率:用不同保存条件和批次的检测试纸各 20 份分别检测 20 份确证阳性鱼

肾脏的假阴性率。假阴性率 = 假阴性数 / 20 × 100%。

[0097] IHNV 胶体金快速检测试纸条在不同条件和不同保存时间下,对其假阳性率和假阴性率进行检测,结果见表 2,表 3,表 4,表 5,表 6,表 7。

[0098] 表 2. 稳定性测定表

[0099]

时间	55℃ 7天		55℃ 15天	
	假阳性率试验	假阴性率试验	假阳性率试验	假阴性率试验
批次 1	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 2	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 3	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)

[0100] 注:括号中数字代表相应的比率(假阳性率或假阴性率)

[0101] 表 3. 稳定性测定表

[0102]

时间	55℃ 21天		55℃ 28天	
	假阳性率试验	假阴性率试验	假阳性率试验	假阴性率试验
批次 1	2/20(10%)	0/20(0%)	4/20(20%)	0/20(0%)
批次 2	3/20(15%)	0/20(0%)	5/20(25%)	0/20(0%)
批次 3	3/20(15%)	0/20(0%)	5/20(25%)	0/20(0%)

[0103] 注:括号中数字代表相应的比率(假阳性率或假阴性率)

[0104] 表 4. 稳定性测定表

[0105]

时间	25℃ 7天		25℃ 28天	
	假阳性率试验	假阴性率试验	假阳性率试验	假阴性率试验
批次 1	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 2	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 3	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)

[0106] 注:括号中数字代表相应的比率(假阳性率或假阴性率)

[0107] 表 5. 稳定性测定表

[0108]

时间	25℃ 56天		25℃ 3个月	
	假阳性率试验	假阴性率试验	假阳性率试验	假阴性率试验
批次 1	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 2	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 3	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)

[0109] 注:括号中数字代表相应的比率(假阳性率或假阴性率)

[0110] 表 6. 稳定性测定表

[0111]

时间	25℃ 6个月		25℃ 9个月	
	假阳性率试验	假阴性率试验	假阳性率试验	假阴性率试验
批次 1	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 2	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)
批次 3	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)	0/20(0%)

[0112] 注:括号中数字代表相应的比率(假阳性率或假阴性率)

[0113] 表 7. 稳定性测定表

[0114]

时间	25℃ 12个月		25℃ 15个月	
	假阳性率试验	假阴性率试验	假阳性率试验	假阴性率试验
批次 1	0/20(0%)	0/20(0%)	3/20(15%)	0/20(0%)
批次 2	0/20(0%)	0/20(0%)	4/20(20%)	0/20(0%)
批次 3	0/20(0%)	0/20(0%)	3/20(15%)	0/20(0%)

[0115] 注:括号中数字代表相应的比率(假阳性率或假阴性率)

[0116] 实验结果表明:IHN 检测试纸条在 55℃ 下可稳定 15 天,换算为在室温下至少可稳定 12 个月,与 25℃ 一年稳定性情况一致,假阳性率和假阴性率均未变化,稳定性较好。

[0117] (6)试纸的验证试验:采用制备的试纸条分别对已知患有 IHN 病的 20 份鱼样中肾、脾和脑,以及已知为阴性健康的 20 份鱼样的肾、脾和脑进行检测,并与 real time PCR 方法进行比较,结果见表 8 和表 9,试验结果表明,当为阳性样品时,检测阳性符合率为 100%,与 real time PCR 检测结果一致;当为阴性样品时,检测结果出现 2 份假阳性结果,阴性符合率为 96.67% 以上,结果与 real time PCR 检测结果相差不大,说明本申请的试纸条可以对 IHN 病毒进行快速检测。

[0118] 表 8. 阳性样本检测结果

[0119]

样本 检测方法	阳性肾脏 (20 份)	阳性脾脏 (20 份)	阳性脑 (20 份)
试纸	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性
real time PCR	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性

[0120] 表 9. 阴性样本检测结果

[0121]

样本 检测方法	阴性肾脏 (20 份)	阴性脾脏 (20 份)	阴性脑 (20 份)
试纸	19 份阴性	18 份阴性	19 份阴性
real time PCR	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性

[0122] (7) 再现性试验:将同一批次的试纸条由不同的人员在同一实验室或不同实验室下操作,根据试纸条显色结果进行判断,结果表明,检测结果一致,试纸条具有再现性。

[0123] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换。

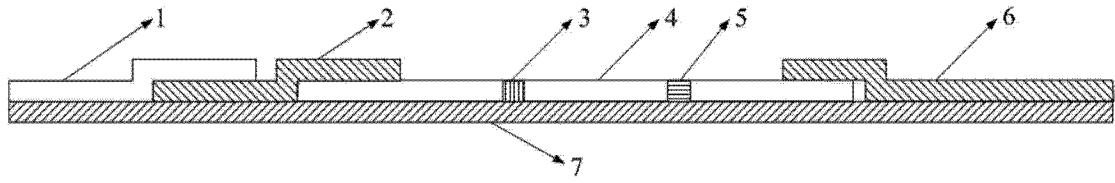


图 1