

西方马脑炎病毒抗体快速检测试纸条的研制

王林林^{1,2}, 杨宇¹, 王旺¹, 王振东², 王静¹

(1 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123; 2 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110866)

摘要: **目的** 研制一种快速检测西方马脑炎病毒(WEEV)抗体的试纸条。**方法** 利用胶体金标记和免疫层析技术, 用25 nm胶体金标记葡萄球菌A蛋白, 并用硝酸纤维膜包被WEEV抗原及羊抗兔IgG作为检测带和质控带, 研制出WEEV抗体快速检测试纸条。对该试纸条的敏感性、特异性和稳定性做出评价, 并拟合检测曲线进行半定量检测。在健康人血清、兔血清和鼠血清中添加WEEV抗体模拟污染样品, 评价该方法的检测能力。**结果** 该试纸条可在20 min内完成定性和半定量检测, 灵敏度为120 ng/ml, 模拟样品的检测灵敏度也相同。线性范围120~1200 ng/ml。对发病症状相似以及近缘的其他病毒进行检测, 均无非特异反应。试纸条在37 °C下保存1个月, 检测结果不变。**结论** 该试纸条具有快速、简便、灵敏、特异、稳定的特点, 适用于现场检测。

关键词: 西方马脑炎病毒; 免疫层析技术; 胶体金试纸; 定性检测; 定量检测

中图分类号: R373 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2011)05-0421-03

Design of a test strip for rapid detection of antibodies against Western equine encephalitis virus

WANG Lin-lin^{1,2}, YANG Yu¹, WANG Wang¹, WANG Zhen-dong², WANG Jing¹

1 China Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China; 2 Shenyang Agricultural University, Institute of Biological Science and Technology, Shenyang 110866, Liaoning Province, China

Corresponding author: WANG Jing, Email: wangjing0115@126.com

Supported by the Project of AQSIQ Public Benefic (No. 2007GYJ024, 2007GYJ023) and Science and Technology Projects of AQSIQ (No. 2010IK211)

Abstract: Objective To develop a test strip for rapid detection of antibodies against Western equine encephalitis virus (WEEV). **Methods** Staphylococcal protein A was labeled with 25 nm colloidal gold via immune-chromatography; cellulose nitrate-coated WEEV antigens and goat anti-rabbit antibodies were used as the test zone and the control zone, respectively. The sensitivity, specificity and stability of the test strip were evaluated and semi-quantitative detection was conducted with a curve of best fit. The detection capability of the test strip was assessed using healthy human serum, rabbit serum and rat serum samples containing simulated WEEV antibodies. **Results** The qualitative and semi-quantitative detection was completed within 20 min, with a resulting sensitivity of 120 ng/ml in simulated samples. The linear range of sensitivity was 120-1200 ng/ml. No nonspecific reaction was observed when applied to other homologous viruses and those leading to similar symptoms. Storage at 37 °C over a month did not make a difference in the test result. **Conclusion** The test strip is a fast, simple, sensitive, specific and reliable tool for detection of WEEV and is suitable for field application.

Key words: Western equine encephalitis virus; Immunochromatography; Immunogold labeling; Qualitative detection; Quantitative detection

西方马脑炎(Western equine encephalitis, WEE)是由WEE病毒(WEEV)引起的能使人类和马等多种动物致死的一种急性病毒性脑炎。WEEV可经呼吸道传播感染,但主要是由蚊虫传播。1990年何海怀等^[1]从新疆乌苏县采集的按蚊和博乐县的全沟硬蜱(*Ixodes persulcatus*)中分离出WEEV。吕新军等^[2]在对我国人体血清调查中发现, WEEV抗体阳性率为2.71%。这

些情况都证实WEEV在我国的存在,说明WEEV有可能成为我国感染性疾病的新病原之一。

目前WEEV的检测方法主要有细胞分离培养方法检测活病毒和分子生物学方法检测病毒的核酸,即RT-PCR检测等^[3-4]。上述检测方法或费时费力或者费用昂贵,兼有快速、敏感的WEEV检测方法较少。WEEV的抗原性是由囊膜糖蛋白E1和E2决定的。E1含有一个中和抗原位点,感染WEEV后会产生相应抗体,所以检测WEEV E1C抗体即可得知是否感染该病毒。为了快速、及时的检测WEEV,建立一种快速、敏感、简便、特异和稳定的检测方法是十分必要的。胶体金免疫层析技术(gold immunochromatographic assay,

基金项目:质检公益项目(2007GYJ024, 2007GYJ023); 国家质检总局科技计划项目(2010IK211)

作者简介:王林林(1983-),女,硕士,从事媒介生物快速检测技术研究。Email: linwang2009@126.com

通讯作者:王静, Email: wangjing0115@126.com

GICA)^[5]不仅敏感性高、特异性强,最重要的是不需要昂贵的仪器设备,检测时间短,操作人员不需经特殊培训,非常适用于现场应用。国内尚未见该技术用于检测 WEEV 抗体的报道。本研究根据其原理研制了检测 WEEV 抗体的胶体金免疫层析试纸条,并对该试纸条的可行性做出评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗原及抗体 纯化的 WEEV E1C 抗原与兔抗重组 WEEV 抗原的多克隆抗体由本实验室制备;羊抗兔 IgG,购自鼎国生物技术公司。

1.1.2 主要试剂及层析测试条耗材 二水合柠檬酸三钠($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)、氯金酸($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$)、SPA 均购自 Sigma 公司;牛血清白蛋白(BSA) 购自 Merck 公司。结合垫(玻璃纤维膜)、硝酸纤维素膜(NC膜)、样品垫、吸水纸均购自 Millipore 公司。

1.1.3 主要仪器 DJM-4 金标条阅读仪,由中国科学院上海光学精密机械研究所、中国检验检疫科学研究院联合研制。

1.2 实验方法

1.2.1 胶体金免疫层析试纸条的制备

1.2.1.1 胶体金结合物的制备 采用柠檬酸钠还原法制备 25 nm 的胶体金颗粒^[6]。将制备好的胶体金溶液调至最适 pH 6.6~7.0,加入最适蛋白量 4 μ g,混匀,反应 10 min 后,加入 BSA,使其最终浓度为 1%^[7]。13 400 \times g 离心 30 min,吸出上清,沉淀物用悬浮液重悬至原体积,再高速离心 1 次,然后浓缩至原体积的 1/4,4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

1.2.1.2 试纸条的组装 将吸水垫、包被硝酸纤维素膜(检测带:重组 WEEV E1C 抗原 2 mg/ml;质控带:羊抗兔 1.2 mg/ml)、结合垫(玻璃纤维膜上喷涂胶体金结合物,37 $^{\circ}$ C 干燥 2 h)、样品垫从上到下依次固定于底衬卡上,用切条机切成宽度为 0.4 cm 的试纸条,将切好的试纸条装壳,然后与干燥剂封装在铝箔袋内,即为检测试纸条。

1.2.2 灵敏度的检测 将 WEEV 抗体用样品处理液稀释至浓度为 90、120、180、300、600、900、1200 ng/ml。各取 100 μ l 待检样品加入到制备好的层析条样品垫端,20 min 后观察结果。

1.2.3 定量检测 对 20 份健康人血清样品进行检测,用 DJM-4 金标条阅读仪扫描读取信号 T/C 比值。20 个样品 T/C 比值的平均值与 3 倍标准差之和即为 Cut-off 值。将显色后的金标条放入金标条阅读仪扫描,读取 T/C 比值,若比值大于判定值即为阳性,反之,则为阴性。

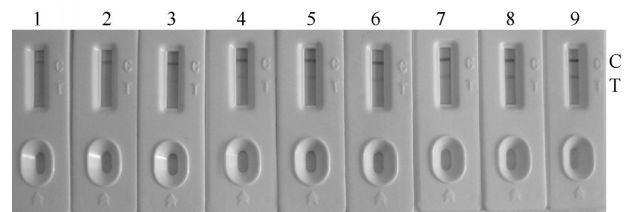
1.2.4 特异性检测 以制备好的胶体金试纸条对 63 份鼠血清、84 份人血清进行检测,对试纸条进行特异性评价。

1.2.5 稳定性检测 将试纸条加干燥剂密封,置 37 $^{\circ}$ C 下保存,每隔 1 周检测 1 次样品,鉴定层析试纸条的稳定性。

1.2.6 模拟样品检测 将健康人血清、鼠血清、兔血清用样品处理液 100 倍稀释,向稀释后的健康人血清、鼠血清、兔血清中加入 WEEV 抗体,使其浓度为 120、180、300、600 ng/ml。各取 100 μ l 样品加入到制备好的层析条样品垫端,20 min 后观察结果。

2 结果

2.1 直观检测灵敏度 用胶体金免疫层析试纸条检测不同浓度的 WEEV 抗体。如图 1 所示,在浓度为 120、180、300、450、600、900、1200 ng/ml 时出现阳性反应;90 ng/ml 时无阳性反应;即肉眼可观察到的最低浓度为 120 ng/ml。



注:C.质控带;T.检测带;1.阴性对照;2~9.WEEV 抗体浓度 90、120、180、300、450、600、900、1200 ng/ml。

图1 WEEV 胶体金免疫层析试纸条的检测灵敏度

Fig.1 Sensitivity detection of the WEEV antibody colloidal gold immunochromatographic strip

2.2 定量检测

2.2.1 结果判定 经过计算判定值为 0.011,金标条阅读仪检测 WEEV 抗体各浓度的结果见表 1。可以看出 WEEV 抗体检测灵敏度为 120 ng/ml。

表1 WEEV 抗体胶体金免疫层析试纸条各浓度检测结果
Table 1 Test result of the WEEV antibody colloidal gold immunochromatographic strip under different concentrations

抗体浓度(ng/ml)	T/C 值	结果
0	0.000	-
90	0.002	-
120	0.014	+
180	0.025	+
300	0.042	+
450	0.054	+
600	0.074	+
900	0.114	+
1200	0.139	+

2.2.2 标准曲线 以 WEEV 抗体浓度为横坐标(x),金标分析仪读值 T/C 比值为纵坐标(y),建立胶体金检测

标准曲线(图2)。当WEEV抗体浓度为120~1200 ng/ml时,抗体的浓度与金标分析仪读值T/C比值之间呈良好的线性关系,线性回归方程为 $y=0.0001x+0.0025$, $R^2=0.9947$ 。

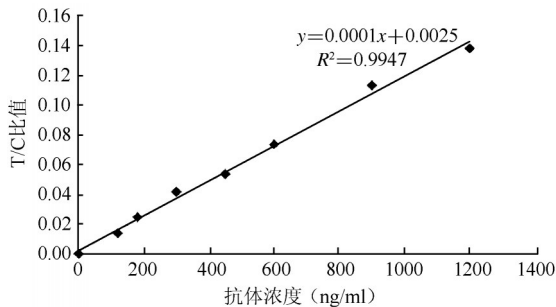


图2 WEEV抗体胶体金免疫层析试纸条检测系统拟合工作曲线

Fig. 2 Fitted curve for WEEV antibody colloidal gold immunochromatographic strip

2.3 特异性评价 将63份鼠血清用样品处理液1:10稀释后检测,结果有6份检出阳性,检测阳性率为9.52%;对105份人血清进行检测,结果有7份检出阳性,阳性率为6.67%。

2.4 稳定性评价 将新制备的胶体金免疫层析试纸条于37℃存放4周,分别用不同浓度的WEEV抗体进行检测,结果显示,检测灵敏度为120 ng/ml;用委内瑞拉马脑炎病毒E2兔血清、东方马脑炎病毒E1C抗体进行检测均为阴性反应。该检测结果与新制备的检测试纸条相比,灵敏度无明显下降,且特异性良好。

2.5 模拟样品评价 将健康人血清、鼠血清、兔血清用样品处理液100倍稀释后作为待检样品,把稀释后的健康人血清、鼠血清、兔血清中加入不同浓度的WEEV抗体进行检测,结果显示,健康人血清、鼠血清、兔血清为阴性,WEEV抗体的样品在以上血清中的灵敏度为120 ng/ml。

3 讨论

胶体金免疫层析试纸条是20世纪90年代发展起来的一种快速检测试纸条^[8],目前已经广泛应用于病毒^[9-10]、细菌^[11]、毒素^[12]等检测。制备该试纸条的关键是胶体金标记。影响胶体金标记的重要因素有2个:胶体金的pH值和蛋白标记量。一般认为胶体金pH值等于或稍高于蛋白质等电点时,蛋白质呈电中性,此时蛋白质分子与胶体金颗粒相互间的静电作用较小,但蛋白质分子的表面张力却最大,较易吸附于胶体金颗粒的表面,阻止胶体金颗粒间的相互接触,使胶体金处于稳定状态,因此本实验中选定最适pH 6.6~7.0。影响金标复合物的另一个重要因素是蛋白标记量,本研

究采用目测法确定每毫升胶体金最低标记3 μg抗体,为获得胶体金与蛋白的最大连接,故每毫升胶体金最适标记抗体量为4 μg。

本研究所研制的WEEV抗体胶体金免疫层析检测试纸条可以大量制备,且携带方便,整个检测时间仅需20 min,这是其他快速检测方法目前所无法达到的。敏感性和特异性试验表明,该试纸条敏感性相对较高,特异性良好。模拟样品的检测结果进一步证明该方法的灵敏性。该试纸条的可能假阳性率为6.67%~9.52%,符合实验要求。将试纸条在37℃存放4周后用于检测,质控线仍可清晰呈现,无非特异,表明稳定性较好。该试纸条检测所需试剂和样本量都非常少,仅需约10 μl样品,可进行单份样品检测,使检测成本大幅下降。此外,该试纸条不涉及全病毒及放射性同位素等有害物质,故不会污染环境或对人体造成伤害。

综上所述,研制的WEEV抗体胶体金免疫层析检测试纸条,成本低廉,无需人员特殊培训,具有快速、特异、灵敏、稳定、简便等特点,特别适合于WEEV的初筛,可满足出入境口岸动物检疫机构大批量、快速检测的需求,对WEEV抗体快速诊断具有重要意义。

参考文献

- [1] 何海怀,吕新军,杨益良,等.我国分离的2株病毒为重组甲病毒[J].中华实验和临床病毒学杂志,2001,15(2):120-124.
- [2] 吕新军,付士红,杨益良,等.我国分离的XJ-290260病毒鉴定为西方马脑炎病毒[J].病毒学报,2001,17(4):307-312.
- [3] Kang X, Li Y, Liu H, et al. A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detecting western equine and eastern equine encephalitis viruses[J]. Virol J, 2010, 7:284.
- [4] 汪中明,赵彤言,吴渊明,等.实验感染来亨鸡及蚊虫体内西方马脑炎病毒RT-PCR检测[J].寄生虫与医学昆虫学报,2007,14(4):213-216.
- [5] 鞠莹,曹远银.胶体金免疫层析快速诊断技术[J].现代生物医学进展,2009,9(11):2191-2193.
- [6] Chen J, Tang J, Yan F, et al. A gold nanoparticles/sol-gel composite architecture for encapsulation of immunoconjugate for reagentless electrochemical immunoassay [J]. Biomaterials, 2006, 27(10): 2313-2321.
- [7] Horisberger M, Vauthey M. Labelling of colloidal gold with protein [J]. Histochemistry, 1984, 80(1):13-18.
- [8] Arao S, Matsuura S, Nonomura M, et al. Measurement of urinary lactoferrin as a marker of urinary tract infection [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(3):553-557.
- [9] 彭伏虎,王政,张进良,等.胶体金试纸条检测H9亚型禽流感病毒的研究[J].畜牧兽医学报,2008,39(8):1081-1086.
- [10] Zhang J, Guo Y, Xiao Y, et al. A simple and rapid strip test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus [J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(7):883-886.
- [11] 王静,陈维娜,胡孔新,等.大肠杆菌O157胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J].卫生研究,2006,35(4):439-441.
- [12] 聂聪,王静,孙肖红,等.胶体金免疫层析技术快速定量检测相思子毒素[J].军事医学科学院院刊,2009,33(6):546-549.

收稿日期:2011-04-29