

# 猪圆环病毒 2 型抗体免疫金标检测试纸的研制

金颜辉<sup>1</sup> 黄印尧<sup>2</sup> 张长弓<sup>2</sup> 许先明<sup>1</sup> 颜江华<sup>3</sup> 杨得胜<sup>1</sup> 孔繁德<sup>2</sup> 王生育<sup>3</sup>

(1 福建省畜牧兽医总站 福州 350003; 2 厦门出入境检验检疫局 厦门 361005;

3 厦门大学医学院抗癌研究中心 厦门 361005)

**摘要** 应用酶联免疫原理和胶体金层析技术,采用特殊的生产工艺,在玻璃纤维膜包被胶体金标记 PCV-2 抗原,在硝酸纤维素膜上检测线和对照线处分别包被 PCV-2 抗原和兔抗 PCV-2 抗体,制成猪圆环病毒 2 型抗体免疫金标检测试纸。当待检样品阳性时,在检测线处形成抗原抗体的免疫复合物而凝聚显色;当待检样品阴性时,检测线处不形成抗原抗体免疫复合物不显色。整个试验过程只需 15 min。试纸与 ELISA 试剂比较,两者都具有微量、特异、准确的优点,且金标试纸独具操作方便、快速和结果直观、容易判定的优点。

**关键词** 猪圆环病毒 免疫 胶体金试纸

中图分类号: S852.65+9.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-4331(2007)01-0005-03

## Study of Colloidal Gold Strip in Detecting the Antibody of Porcine Circovirus Type 2

Jin Yanhui<sup>1</sup> Huang Yinyao<sup>2</sup> Zhang Changgong<sup>2</sup> Xu xianming<sup>1</sup> Yan Jianghua<sup>3</sup> Yang Desheng<sup>1</sup> Kong Fande<sup>2</sup> Wang Shengyu<sup>3</sup>

(1 Fujian Provincial General Station of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fuzhou 350003;

2 Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 361005; 3 Cancer Research Center of Medical School, Xiamen University, 361005)

**Abstract** Based on the principle of immune-ELISA and colloidal gold immunochromatography, with special product technicals, Colloidal gold strip was prepared and applied to detect the anti-PCV-2 antibody. PCV-2 and anti-PCV-2 antibody was coated on the test region and control zone respectively. The color was appeared on the test region because of the compound of antigen-antibody when the sample was positive. There was no color appeared when the sample was negative. The whole experimentation merely needed fifteen minutes. The test result shows this strip has the same merits as that of ELISA test in microanalysis, high specialty and accurate. No special instrument is needed and the test can be completed easily in a short time.

**Key words** Porcine circovirus Immunity Immunogold Labelling

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是一种免疫抑制性病毒,它除了本身引起仔猪多系统衰竭综合征外,更为严重的是破坏了机体的免疫功能,引发多种传染性疾病的发生,造成猪只大量死亡,是当今严重危害养猪业发展的一个重要传染病。感染 PCV-2 的仔猪,对人工接种疫苗都能起到免疫抑制作用,比如接种猪瘟疫苗,机体无法产生保护性抗体,造成猪瘟的发生。为了有效防止圆环病毒病的发生和流行,开展抗体监测,及时淘汰带毒的种猪、隔离带毒仔猪显得尤为重要。目前,我国检测猪圆环病毒抗体只有酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂,该法具有微量、特异、灵敏的优点。但检测时需要有酶标仪、洗板机等设备,较好的实验室和经验丰富的技术人员,检测样品的一个流程最少需要 4 h 以上,检测成本较高,不适用于基层兽医站和养猪场,为此开展了一种微量、快速、简便、结果容易判定的金标检测法研究,现报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 材料 圆环病毒(PCV-2)抗原由福建省动物疫病诊断中心提供;硝酸纤维素膜,德国 S&S 公司产品;玻璃纤维, MILLIPORE 公司产品;氯金酸,上

海试剂一厂产品;底板、吸水纸由厦门市波生生物技术有限公司生产;其他试剂, SIGMA 公司产品或上海试剂一厂产品,分析纯。

### 1.2 PCV-2 抗体快速检测试纸的制备

1.2.1 胶体金的制备 用柠檬酸三钠还原法制备浓度为万分之四的胶体金溶液;

1.2.2 胶体金的标记 量取胶体金 50 mL,将胶体金调节 pH7.3,搅拌下加入 PCV-2 抗原 1.3 mg 进行偶联,继续搅拌 30 min,加入 20% 的 PEG 终止反应,10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀,用金标缓冲液复溶至 50 mL,备用;

1.2.3 冷冻干燥 将胶体金标记的 PCV-2 抗原溶液均一喷涂在玻璃纤维纸上,并冷冻干燥备用;

1.2.4 抗原、抗体包被 把圆环病毒(PCV-2)抗原和兔抗 PCV-2 抗体分别包被在硝酸纤维素膜的检测线 T 及对照线 C,干燥备用;

1.2.5 试纸的组装 把胶体金包被好的硝酸纤维素膜、吸水纸、加样区玻璃纤维按顺序贴到不干胶底板上,切割成条,分装铝箔袋,袋内装入干燥剂,密封,常温保存。

1.3 对比检测试剂 华中农业大学生产的“圆环病

毒(PCV-2)抗体酶联免疫吸附试剂”。

1.4 检测样品 检测血清样品: 采自福州、厦门、漳州种猪场猪血清样品 34 份、鸡血清 1 份、鸭血清 1 份、兔血清 1 份、犊牛血清 1 份、人血清 1 份。对照血清: 猪圆环病毒(PCV-2)标准阳性血清(华中农业大学提供), 兔抗猪瘟血清 1 份、兔抗口蹄疫(0 型)血清 1 份、兔抗繁殖与呼吸综合征血清 1 份、兔抗猪伪犬病血清 1 份、兔抗细小病毒血清 1 份、兔抗乙型脑炎血清 1 份(由本研究实验室和福建省动物疫病诊断中心提供)。

## 2 检测方法和判定标准

2.1 检测方法 取出“猪圆环病毒(PCV-2)抗体免疫金标检测试纸”袋, 撕开铝箔袋, 取出检测卡, 平放于桌面, 在加样孔(S)加入检测样品(血清或血液) 100  $\mu$ L, 在室温中静置 15 min 后观察结果。

2.2 判定标准 分为无效、阴性、弱阳性、阳性。

2.2.1 无效 检测线(T)和对照线(C)均不出现紫红色线, 说明本试纸已失效;

2.2.2 阴性 检测线(T)不出现色线, 对照线(C)出现颜色较深的紫红色线, 说明样品无 PCV 抗体;

2.2.3 弱阳性 检测线(T)出现一条颜色很淡的紫红色线, 对照线(C)出现一条颜色较深的紫红色线, 说明检测样品含有可以抵抗 PCV-2 强毒攻击的最低保护体原;

2.2.4 阳性 检测线(T)的对照线(C)都出现一条颜色较深的紫红色线, 说明检测样品中含有可以抵抗 PCV-2 强毒攻击的抗体, 检测线的颜色与抗体含量成正比, 检测线颜色越深, 说明样品中的抗体含量越多, 反之, 说明样品中的抗体含量越少。

## 3 结果

3.1 特异性检测 取出金标试纸, 按检测方法, 分别在各试纸卡的加样孔 S 中加入 PCV-2 标准阳性血清、鸡血清、鸭血清、兔血清、犊牛血清、人血清、兔抗 HC 血清、兔抗 FMD 血清、兔抗 PRRS 血清、兔抗 PR 血清、兔抗细小病毒血清、兔抗乙型脑炎血清。检测结果见表 1。

表 1 特异性检测结果

血清	阴阳性	血清	阴阳性
PCV-2 标准阳性血清	+	兔抗乙型脑炎血清	-
兔抗 HC 血清	-	鸡血清	-
兔抗 FMD 血清	-	鸭血清	-
兔抗 PRRS 血清	-	兔血清	-
兔抗 PR 血清	-	犊牛血清	-
兔抗细小病毒血清	-	人血清	-

检测结果显示, 除 PCV-2 标准阳性血清显示阳性反应外, 其余均显示阴性反应。说明本试纸法

特异性强。

3.2 准确性(敏感性)检测 取 34 份猪血清, 分别用金标试纸和 ELISA 试剂(华中农业大学提供,  $OD_{630} \geq 0.42$  判定为阳性,  $OD_{630} < 0.42$  为阴性)进行圆环病毒(PCV-2)抗体水平测定, 结果如表 2。

表 2 准确性(敏感性)检测结果

序号	血清	金标试纸结果	ELISA 试剂(OD 值)	ELISA 检测结果
1	PCV-2 标准阳性血清	+	1.88	+
2	PCV-2 标准阴性血清	-	0.086	-
3	血清样品 1	+	1.563	+
4	血清样品 2	+	1.179	+
5	血清样品 3	+	0.888	+
6	血清样品 4	弱阳性	0.485	+
7	血清样品 5	-	0.325	-
8	血清样品 6	-	0.203	-
9	血清样品 7	-	0.149	-
10	血清样品 8	-	0.134	-
11	血清样品 9	+	0.662	+
12	血清样品 10	+	1.249	+
13	血清样品 11	弱阳性	0.408	-
14	血清样品 12	+	1.606	+
15	血清样品 13	-	0.089	-
16	血清样品 14	+	0.986	+
17	血清样品 15	-	0.284	-
18	血清样品 16	-	0.097	-
19	血清样品 17	-	0.324	-
20	血清样品 18	弱阳性	0.458	+
21	血清样品 19	-	0.163	-
22	血清样品 20	+	0.782	+
23	血清样品 21	+	0.691	+
24	血清样品 22	-	0.237	-
25	血清样品 23	-	0.106	-
26	血清样品 24	-	0.337	-
27	血清样品 25	弱阳性	0.423	+
28	血清样品 26	+	0.684	+
29	血清样品 27	+	0.581	+
30	血清样品 28	-	0.097	-
31	血清样品 29	-	0.174	-
32	血清样品 30	+	0.537	+
33	血清样品 31	+	0.682	+
34	血清样品 32	-	0.337	-
阳性率		53% (18/34)		50% (17/34)

应用金标试纸法检测, 阳性率为 53% (18/34); 用 ELISA 试剂法检测, 阳性率为 50% (17/34), 两种方法差异不显著 ( $P < 0.05$ )。说明金标试纸法的准确性高。

3.3 线性(敏感性)比较 将 3 号猪血清用 PBS(PH 7.4)倍比稀释成 1:2(4 号)、1:4(5 号)、1:8(6 号)、1:16(7 号), 再用金标试纸和 ELISA 试剂进行 PCV-2 抗体水平测定, 结果显示金标检测线颜色与抗体水平成正比, 有明显的梯级效应, 抗体滴度越高, 检测线的颜色越深。

3.4 检测血液与血清比较 用金标试纸同时检测

# 黑尾鸥的人工繁育

陈金洪 厦门市思明区园林公园管理中心 361003

中图分类号: S839.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-4331(2007)01-0007-02

黑尾鸥属鸥形目, 鸥科。它是一种中型水禽, 成鸟喙为黄色, 先端为红色, 其后有一黑带位于红黄二色之间; 脚黄色, 夏羽头、颈和下体白色, 背深灰色, 尾上覆羽和尾羽白色, 具有宽阔的黑色亚端斑, 冬羽枕部和后颈缀有灰褐色。主要栖息于沿海海岸沙滩、湖泊、河流和沼泽地带, 常成群活动<sup>[1-2]</sup>。在圈养条件下人工繁育未见报道, 现将思明区园林公园 1999-2005 年黑尾鸥人工繁育情况报道如下。

## 1 人工孵化

1.1 蛋的收集、消毒和度量 黑尾鸥产蛋期在每年 5 月份至 6 月份, 蛋颜色因个体而异, 有蓝灰色、有灰褐色、有暗绿色, 壳上分布有黑褐色斑点, 种蛋收集采用产一枚取走一枚的方式进行, 1999-2005 年共收集 22 枚, 种蛋消毒采用 0.1% 新洁尔灭, 晾干后称重、测量、标记, 平均蛋重 61.2 g (56.5~67.0 g), 平均纵径 6.11 cm (5.90~6.40 cm), 平均横径为 4.27 cm (4.10~4.50 cm)。

1.2 人工孵化条件 孵化机采用自动控温、控湿, 孵化温度设定为 37.5℃, 湿度为 60%~65%, 蛋以 2 d 内入孵为佳, 孵化 7 d 后每天早晚各晾蛋 10 min,

孵至第 22 天即可移入出雏盘, 出雏盘底部应垫上干净粗布, 防止底部太滑而伤及幼雏腿部。

1.3 检验受精和胚胎发育情况 黑尾鸥蛋壳颜色较深, 并有黑褐色斑点, 透光性相对较差, 但其蛋壳薄, 采用自制大功率灯泡照蛋器, 通过照蛋基本可以了解胚胎发育情况。可选择在第 7 天照蛋, 未发育的蛋除了蛋黄所在位置较暗外其余部分比较透亮, 有受精蛋因为发育时蛋黄扩展以及上面附有血管, 照蛋可见一半透亮, 一半暗红, 到第 14 天因尿囊扩展包绕整个蛋白, 看上去整个蛋内容物暗红, 到第 18 天基本看不清内部, 可将蛋放在水平玻璃上轻轻拨动, 待静止后观察, 活胚蛋会出现晃动。

1.4 孵化结果 经统计, 1999-2005 年入孵 22 枚, 受精 18 枚, 受精率为 81.8%, 出雏 15 羽, 孵化率为 83.3%, 孵化期平均为 26.1 d (26.0~26.5 d), 从气室出现裂缝到破壳出雏平均 60 h (48~72 h), 初生雏平均重为 43.7 g (40.0~48.6 g), 初生雏重占蛋重平均为 70.9% (67.2%~74.8%)。

## 2 人工育雏

2.1 饲养环境 幼雏出壳后应在出雏盘中停留 1 d,

10 头生猪血液和对应分离的血清, 结果见表 3。

表 3 血液与血清检测结果比较

结果	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血清	-	-	-	弱阳性	+	+	-	-	弱阳性	+
血液	-	-	-	弱阳性	+	+	-	-	弱阳性	+

用金标试纸分别检测血液和对应的血清, 结果完全一致。说明金标试纸不仅可以检测血清, 同时可以检测血液, 在大田检测时可以免去分离血清的工作, 检测更快更简便。

## 4 小结与讨论

本试纸是将胶体金标记技术 (Immunogold Labelling Technique) 与免疫层析技术 (Immunochromatographic Assay) 有机结合, 组成胶体金标记免疫层析法 (Immunogold chromatographic Assay, IGCA) 检测试剂。具体做法是将抗原或抗体标记于胶体金上, 与被测样品一起借助条状纤维膜上液体流动的作用力移行至反应区, 利用抗原抗体特异性结合, 在反应区内形成肉眼可见的颜色沉积, 以此指示被测定物的

存在与否。检测阳性标本时, 样品中的 PCV-2 抗体将同胶体金标记的金标抗原结合物反应, 形成复合物并沿层析条向前移行, 液体移行至检测线包被区时, 与预包被的 PCV-2 抗原形成抗原抗体复合物而凝聚显色。游离胶体金标记的 PCV-2 抗原则在对照线处与兔抗 PCV-2 抗体结合而富集显色; 对于阴性标本, 由于没有 PCV-2 存在, 在检测线区将不会出现抗原抗体复合物而不显色, 仅在对照线处显色。试验结果应在 25 min 内判定。

应用胶体金免疫层析技术建立的“猪圆环病毒 2 型抗体免疫金标检测试纸”, 不需要实验室和任何器械, 只要将待检样品的血清或血液加入检测卡的加样孔内, 平放, 在室温下静置 15 min, 就可以准确地检测出被检样品是否带有 PCV-2 抗体, 同时还可以通过检测线颜色的深浅判定抗体的含量高低。本试纸与 ELISA 法一样, 都具有微量、准确、灵敏度高的优点, 但又比 ELISA 法操作简便、快速、结果直观、容易判定, 同时检测成本低廉, 很适合于基层检测机构、养猪场使用。