

研究报告

鲤疱疹病毒II型抗体胶体金检测试纸条的制备和分析

孙瑜翀¹, 张小米¹, 计晓花¹, 谢佳容¹, 吕利群^{*2}

1 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306

2 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306

孙瑜翀, 张小米, 计晓花, 谢佳容, 吕利群. 鲤疱疹病毒II型抗体胶体金检测试纸条的制备和分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5449-5458.

SUN Yuchong, ZHANG Xiaomi, JI Xiaohua, XIE Jiarong, LYU Liqun. Preparation and analysis of colloidal gold test strips for cyprinid herpesvirus-2 antibody[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5449-5458.

摘要:【背景】由鲤疱疹病毒II型(cyprinid herpesvirus-2, CyHV-2)引起的疱疹病毒性造血坏死病在鲫和金鱼中的暴发给水产养殖业造成了巨大的经济损失。【目的】开发一种快速、现场检测鲫是否感染过 CyHV-2 和监测鲫 CyHV-2 IgM 抗体水平的胶体金检测试纸条。【方法】将 CyHV-2 与胶体金结合作为金标抗原、Protein A 作为检测线、兔源 rORF66 多克隆抗体进行划线作为质控线, 分析胶体金试纸条最佳制备及组装条件, 确定胶体金标记最适 pH、金标抗原最适浓度, 以及检测线(test line, T 线)、质控线(control line, C 线)最适划线浓度等。【结果】本研究制备的 CyHV-2 抗体胶体金试纸条可以使用全血测试, 与常见的其他鱼类抗体血清无交叉反应, 如草鱼呼肠孤病毒抗体阳性血清、鳊虹彩病毒抗体阳性血清等。试纸条最低限度可以检测到 1:100 稀释的阳性血清抗体, 由试纸条检测线的深浅可以初步判断鱼体中抗体水平。试纸条通过对 10 条鲫鱼血清样品检测并和金鱼造血器官坏死病毒检测方法(GB/T 36194—2018)进行 Kappa 分析, Kappa 值为 0.80, 表明二者有较高的符合率。【结论】本研究制备的试纸条具有较高的灵敏度和特异性, 具有操作简单和成本较低的特点, 对鱼类检疫、鱼体抗体水平评价等具有实际应用价值。

关键词: 鲤疱疹病毒II型; 胶体金试纸条; 抗体; 现场检测

资助项目: 江苏省重点研发计划(BE2021369)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2021369).

*Corresponding author. E-mail: lqlv@shou.edu.cn

Received: 2023-05-05; Accepted: 2023-07-13; Published online: 2023-09-21

Preparation and analysis of colloidal gold test strips for cyprinid herpesvirus-2 antibody

SUN Yuchong¹, ZHANG Xiaomi¹, JI Xiaohua¹, XIE Jiarong¹, LYU Liqun^{*2}

¹ National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

² Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: [Background] Hematopoietic necrosis caused by cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2) has led to serious economic losses in aquaculture due to its spread in crucian carp, goldfish and other species. [Objective] To develop an on-site colloidal gold test strip for detecting and monitoring the level of IgM antibodies against CyHV-2 in crucian carp. [Methods] CyHV-2 was combined with colloidal gold as the gold-labeled antigen. Protein A was employed as the detection line, and rabbit-derived rORF66 polyclonal antibody as the quality control line. The optimal preparation and assembly conditions of colloidal gold test strips were analyzed, and the optimal pH and concentration of colloidal gold-labeled antigen, as well as the optimal marking concentrations of test line (T line) and quality control line (C line), were determined. [Results] The colloidal gold test strips prepared in this study did not cross-react with other common fish antibody-positive sera, such as grass carp reovirus antibody-positive serum, mandarin fish iridovirus antibody-positive serum, largemouth black bass iridovirus antibody-positive serum, and carp spring viremia virus antibody-positive serum. The test strips can detect serum antibodies at a minimum dilution of 1:100, and the density of the detection line can help roughly judge the antibody level. The test strips were used to detect 10 crucian carp serum samples and compared with the detection method of goldfish haematopoietic necrosis virus (GB/T 36194—2018). The Kappa value was 0.80, indicating a high coincidence rate between the two methods. [Conclusion] The test strips prepared in this study have high sensitivity, high specificity, simple operation, and low cost, demonstrating the potential for fish quarantine and evaluation of fish antibody levels against CyHV-2.

Keywords: cyprinid herpesvirus-2; colloidal gold test strip; antibodies; on-site testing

鲤疱疹病毒Ⅱ型(cyprinid herpesvirus-2, CyHV-2)是鲫(*Carassius* sp.)的疱疹病毒性造血坏死(herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN)病原体。CyHV-2有一个含有双链DNA基因组的二十面体衣壳和一个携带病毒糖蛋白的脂质包膜,在受感染的鱼体脾脏和肾脏的造血细胞以及鳃中繁殖和组装^[1]。CyHV-2对金鱼、鲫甚至金鱼和鲤鱼的杂交种都具有高致病性^[2]。CyHV-2是疱疹病毒目异疱疹病毒科

(Alloherpesviridae)鲤鱼病毒属(Cyvirus)的一个成员,其他属于该属的病毒包括鲤疱疹病毒Ⅰ型、鲤疱疹病毒Ⅲ型^[3-4]。1992年和1993年春天,疱疹病毒性造血坏死病首次暴发于日本养殖的金鱼,导致金鱼严重死亡,科学家从患病金鱼中首次分离出CyHV-2,自1992-1993年第一次报道以来,世界各地都报道了CyHV-2感染,包括美国^[5-6]、澳大利亚^[7]、英国^[8-9]、中国^[10]。

CyHV-2 的抗体目前尚无成熟的检测手段, 实验室可以通过制备鲫 IgM 单克隆抗体检测 CyHV-2 的抗体。CyHV-2 病毒可以通过 PCR 方法检测, 依据现行国家标准《金鱼造血器官坏死病毒检测方法(GB/T 36194—2018)^[11]》。Wu 等^[12]研制了一种免疫层析试纸, 让水产养殖设施工作人员能够快速现场检测 CyHV-2。在实际应用中, 针对 CyHV-2 抗体检测的相关免疫实验需要专业人员进行操作, 并且对特异性抗体的要求高, 检测仪器设备比较复杂, 检测时间长。这些弊端的存在突显了开发快速简便的临床检测方法的必要性和重要性。胶体金免疫层析试纸条技术(colloidal gold immunochromatography assay, GICA)将胶体金标记技术、免疫检测技术、层析分析技术和单(多)克隆抗体技术等多种技术相结合, 具有特异性高、反应迅速、操作简单、成本低等特点。GICA 技术已成功应用于妊娠检测、病原体抗体检测、病原检测、疾病相关的标志物检测、药物残留检测等诸多领域, 胶体金试纸条中免疫复合物将被截留或富集在检测带上, 标记物(胶体金)会呈现直观的显色试验现象; 若样品中不含待检物, 则会同游离标记物一起到达质控线^[13], 结果非常直观易懂。胶体金免疫层析试纸条具有价格低廉、不需要专业人员操作、检测快捷和特异性强的优点^[14], 因此 GICA 技术特别适用于水产养殖临床检测。

GICA 通常使用硝酸纤维素膜作为载体, 以胶体金标记的抗原或抗体作为示踪剂。本研究采用病毒抗原、多克隆抗体等材料开发一种适用于检测 CyHV-2 抗体的胶体金免疫层析试纸条, 使用全血样本快速检测鲫鱼体内的抗体水平。此技术若成功应用于 CyHV-2 抗体的检测, 则能够克服当前 CyHV-2 临床快检技术缺乏的现实问题, 对 CyHV-2 的监测起重要作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

CyHV-2 毒株由本实验室分离并保存; 鲫鳍条细胞系(GiCF)^[15]由本实验室构建并保存; 健康鲫鱼购自五四农场; M199 培养基购自吉诺生物技术有限公司; 胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 病毒基因组 DNA 提取试剂盒购自天根公司; DL2000 DNA Marker 和 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司; 国家标准引物(GB/T 36194—2018)由本实验室保存; 四氯金酸、柠檬酸三钠、海藻糖购自 Sigma-Aldrich 公司; 曲拉通-100 购自北京普利莱基因技术有限公司; 10×PBS Buffer 购自北京酷来搏科技有限公司; rORF66 蛋白^[16]、兔源 rORF66 多克隆抗体由本实验室制备并保存; 鲫 IgM 单克隆抗体^[17]由盐城工学院提供; 草鱼呼肠孤病毒抗体阳性血清、鳊虹彩病毒抗体阳性血清、大口黑鲈虹彩病毒抗体阳性血清和鲤春病毒血症病毒抗体阳性血清由本实验室保存; Protein A 购自 Proteintech 公司; 硝酸纤维素膜(Sartorius CN 140)、吸水纸、结合垫、样品垫、PVC 底板均购自上海捷宁生物科技有限公司。

Blotting Substrate 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; PCR 仪和 Bio-Rad-CFX Manager (3.1), Bio-Rad 公司; XYZ 三维划膜喷金仪、裁条机和贴板机, 上海金标生物科技有限公司。

1.2 CyHV-2 病毒扩增

将保存在-150 °C冰箱的 CyHV-2 病毒液解冻, 选取在 27 °C细胞培养箱生长 1-2 d 的 GiCF 细胞, 用显微镜观察生长状态, 细胞长为单层且状态较好时开始接种病毒。先用移液管吸出 T75 培养瓶中的培养液, 加入 2 mL 解冻的 CyHV-2 病毒液(1.05×10^9 copies/mL), 25 °C孵育 2 h, 然后吸出病毒液, 加入 10 mL

含 2%胎牛血清的 M199 培养基。放置于 25 °C 细胞培养箱,待出现细胞病变效应,继续培养 1–2 d,使病毒充分释放于培养液中。用离心管收集病毒液并于 800 r/min 离心 5 min,以此去除细胞碎片,上清液使用 0.22 μm 过滤膜过滤,参照病毒基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,然后参照 TaKaRa TB Green II 说明书进行 qPCR 以确定病毒载量,病毒保存至 -150 °C 冰箱。

1.3 鲫鱼抗体阳性血清的制备

将购买的健康鲫鱼(14–16 cm)放入 200 L 的塑料桶暂养 7 d,确认无病毒或其他病原感染,取 10 条鲫鱼,每条鲫鱼腹腔注射 500 μL 的 CyHV-2 病毒液(10^9 copies/mL),鲫鱼放入 20 L 曝氧水以及加热棒保持 25 °C 的玻璃缸。待 21 d 后每条鲫鱼尾静脉抽血,收集血液于 1.5 mL 离心管中,4 °C 静置一夜。然后解剖鲫鱼,取肾、脾、肝胰脏,提取病毒 DNA 并参照 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 说明书进行 PCR,产物使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,剩余病变组织保存于 -20 °C。第二天将血样品 800 r/min 离心 5 min,吸取血清移入新的离心管中。取 Dot Blot 仪器,将 0.45 μm 的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜剪切成合适大小,然后将 PVDF 膜浸润于甲醇溶液中 30 s,纯水润洗 1 min。将 PVDF 膜置于仪器中,每孔滴加 1 mg/mL 的 rORF66 蛋白 2.5 μL,待点样液体吸收后,每孔滴加 200 μL 纯水配制的 5%脱脂牛奶,室温 200 r/min 摇床封闭 2 h。封闭完成后吸出孔内液体, PBST 洗 4 次,每次 8 min。加入鲫鱼抗体阳性血清,每孔 200 μL,室温 200 r/min 摇床孵育 2 h。洗膜,加入鲫鱼 IgM 单克隆抗体(稀释比例 1:1 000),每孔 200 μL,室温 200 r/min 摇床孵育 2 h。洗膜,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊

抗鼠 IgG,每孔 200 μL,室温 200 r/min 摇床孵育 2 h。洗膜,将显色液 1:1 混合后对 PVDF 膜进行显色 30 s,利用 ECL 胶成像系统进行观察。其余抗体阳性血清保存于 -20 °C 冰箱。

1.4 胶体金的制备

首先将玻璃容器清洗干净,加入 100 mL 浓度为 0.01%的氯金酸溶液,置于加热磁力搅拌器上加热搅拌,待溶液彻底煮沸 3 min 后迅速加入 1%柠檬酸三钠溶液 2 mL,搅拌并持续加热,溶液变黑再变紫红色后,继续加热 10 min 待反应完全,冷却后补充到原体积,此时溶液呈酒红色,用分光光度计和透射电镜进行质量鉴定。

1.5 胶体金标记抗原最适 pH 的确定

用 0.2 mol/L 的 K_2CO_3 溶液将 6 管胶体金溶液分别调节 pH 值为 4.0–9.0,每管 3 mL,在不同 pH 溶液中加入适量的 CyHV-2 病毒液,充分混合均匀静置 30 min 后加入 10% NaCl 溶液 0.1 mL,混合均匀静置 2 h,使用分光光度计测定每个 pH 梯度 OD_{520} 值。

1.6 胶体金标记抗原最适标记量的确定

将 6 管胶体金溶液调节至最适 pH,每管 3 mL,分别向胶体金溶液中加入 15、30、45、60、75 和 90 μL 的 CyHV-2 病毒液,混合均匀后静置 30 min,随即加入 0.1 mL 10% NaCl 溶液混合均匀后静置 2 h,使用分光光度计检测每个浓度 OD_{520} 值。

1.7 金标抗原的制备

取 800 μL 胶体金溶液于离心管中,将离心管置于冰上操作,调节至最适 pH,涡旋 3 min,静置 3 min;向胶体金溶液中加入最适标记量 120%的 CyHV-2 病毒液,涡旋 3 min,静置 3 min;加入 200 μL 5% BSA 溶液(1×PBS 配制)使 BSA 终浓度为 1%,涡旋 3 min,静置 3 min;然后 4 °C、1 500 r/min 离心 20 min;观察无沉淀则效果好,继续 4 °C、8 000–9 900 r/min 离心 30 min,

此时胶体金应沉淀于底部, 吸除上清, 沉淀用 1/10 体积的金标复溶液(含 5%海藻糖、1% BSA 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液)重悬, 保存至 4 °C。

1.8 质控线最适划线浓度的确定

取硝酸纤维素膜(NC 膜), 将兔源 rORF66 多克隆抗体稀释成 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2 mg/mL 依次划线, 组装成试纸条, 检测阴性血清和阳性血清, 15 min 后根据显色情况确定质控线最适划线浓度。

1.9 检测线最适划线浓度的确定

取硝酸纤维素膜(NC 膜), 将 ProteinA 稀释成 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2 mg/mL 后依次划线, 组装成试纸条, 检测阴性血清和阳性血清, 15 min 后根据显色情况确定检测线最适划线浓度。

1.10 试纸条的组装

将结合垫用裁条机切割成 9 mm 的细条, 用预处理液(0.01 mol/L 含 2% Tween-20、5%海藻糖的 PBS 缓冲液, pH 7.4)浸泡 30 min, 37 °C 干燥箱烘干 1 h, 收于干燥袋中备用; 将样品垫用裁条机切割成 15 mm 的细条, 用预处理液(0.01 mol/L 含 0.2% Triton X-100 的 PBS 缓冲液, pH 7.4)浸泡 30 min, 37 °C 干燥箱烘干 1 h, 收于干燥袋中备用。将吸水纸用裁条机切割成 17 mm 的细条, 收于干燥袋中备用。用 XYZ 三维划膜喷气仪对 NC 膜进行划线, 用 ProteinA 溶液在检测线(test line, T 线)处划线, 用 rORF66 多克隆抗体在质控线(control line, C 线)处划线, 置

于 37 °C 干燥箱干燥 1 h。用制备好的金标抗原溶液滴加到结合垫上, 浸润结合垫, 置于 37 °C 干燥箱干燥 1 h。如图 1 所示, 取 PVC 底板置于贴条机上, 依次组装, 重叠 2 mm 固定在 PVC 底板上, 将贴好的试纸板用裁条机切成 4.2 mm 宽的试纸条。

1.11 试纸条测试方法与结果判定

室温下, 将 200 μ L 现场吸取的鲫鱼全血(也可以使用静置析出的血清进行测试)立即滴加至样品孔内, 15 min 内观察结果。如检测线(T 线)和质控线(C 线)均出现红色为阳性; 检测线不显色, 质控线显色为阴性; 质控线不显色判定为试纸条失效。

1.12 试纸条特异性检验

为了确定该试纸条的特异性, 使用实验室制备的鲤疱疹病毒II型抗体阳性血清、草鱼呼肠孤病毒抗体阳性血清、鳃虹彩病毒抗体阳性血清、大口黑鲈虹彩病毒抗体阳性血清和鲤春病毒血症病毒抗体阳性血清验证潜在交叉反应。

1.13 试纸条灵敏性检验

将鲫鱼抗体阳性血清用 PBS 缓冲液稀释为 1:5、1:10、1:20、1:50、1:100、1:200 和 1:500, 观察 T 线显色情况, T 线显色最浅的稀释度为最低检出浓度。

1.14 试纸条符合性检验

用研制的 CyHV-2 抗体胶体金试纸条可以检出 CyHV-2 抗体, 可依此判断鲫鱼是否感染

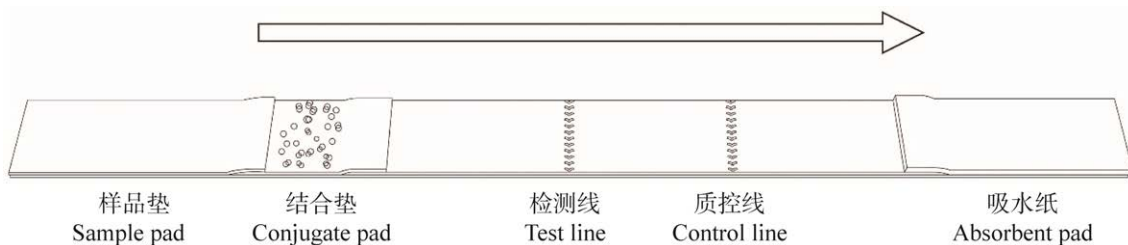


图 1 胶体金试纸条结构图

Figure 1 Structure of colloidal gold test strips.

过 CyHV-2 病毒, 使用胶体金试纸条和金鱼造血器官坏死病毒检测方法(GB/T 36194—2018) 分别对 10 份鲫鱼样品进行检测, 根据尹梅^[18] 的方法进行 Kappa 分析, 比较两者的符合率。

2 结果与分析

2.1 鲫鱼抗体阳性血清的制备结果

取注射感染 CyHV-2 后出现明显症状且存活至 21 d 的鲫鱼, 注射器尾静脉取 CyHV-2 抗体阳性全血, 离心静置后取上清, 梯度稀释的鲫鱼抗体阳性血清 Dot-blot 结果如图 2 所示, 抗体效价为 1:320, 说明本次制备的鲫鱼 IgM 阳性血清质量佳, 可用于试纸条的测试。

2.2 胶体金的制备结果

利用化学还原法制备胶体金溶液, 溶液颜色呈酒红色, 透亮无沉淀。通过紫外分光光度计测定, 结果如图 3 所示, 胶体金吸光度最大

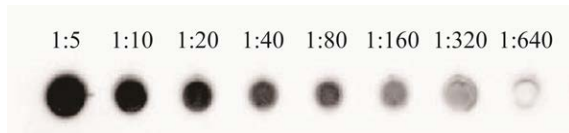


图 2 系列稀释的鲫鱼抗体阳性血清 Dot-blot 检测分析

Figure 2 Dot-blot analysis of positive crucian carp antibody serum diluted sequentially.

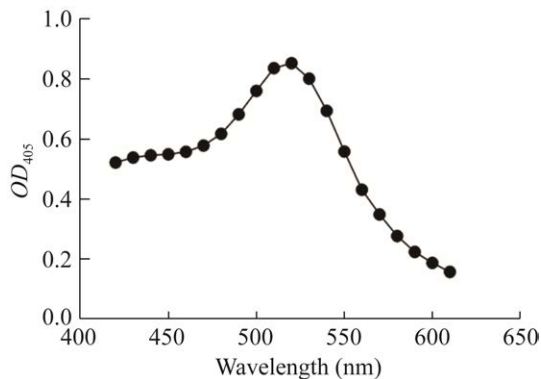


图 3 胶体金颗粒的质量鉴定

Figure 3 Quality examination of colloidal gold particles.

吸收峰波长为 520 nm, 最大吸收峰对应的吸光度约为 0.853, 根据回归方程 $Y=0.786X+505.53$ (Y 为最大吸收波长, X 为粒径大小) 可知^[19], 胶体金的平均粒径大小约为 20 nm。以上参数说明烧制的胶体金质量良好, 可用于试纸条的制作。

2.3 胶体金标记 CyHV-2 最适 pH

根据分光光度计测定胶体金不同 pH 值在 OD_{520} 的值, 结果显示随着 pH 值的升高吸光度随之升高, 在达到峰值后, 随着 pH 值继续升高吸光度开始降低, 观察颜色变化, pH 值过低会导致胶体金溶液产生聚沉发生明显的颜色变化, pH 7.0 的胶体金溶液均匀无聚沉, 因此金标抗原最适 pH 值为 7.0。

2.4 胶体金标记 CyHV-2 最适标记量

根据分光光度计测定胶体金不同抗原标记量在 OD_{520} 的值, 结果显示随着抗原标记量的增加吸光度随之升高, 在达到峰值后, 随着抗原标记量的继续增加, 吸光度开始降低, 观察颜色变化, 加入抗原过少也会导致胶体金溶液产生聚沉变成蓝紫色, 考虑成本情况, 胶体金溶液均匀无聚沉的最低抗原标记量 120% 为最适浓度, 因此每 1 000 μ L 胶体金溶液抗原最适标记量为 2 μ L。

2.5 质控线最适划线浓度

将兔源 rORF66 多克隆抗体稀释成 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2 mg/mL, 依次划线, 组装成试纸条, 检测阴性血清和阳性血清, 15 min 后的结果显示, 抗体浓度在 0.6 mg/mL 以上时显色明显, 而抗体浓度在 0.6 mg/mL 以下时显色不清晰, 因此质控线最适划线浓度为 0.6 mg/mL。

2.6 检测线最适划线浓度

将 Protein A 稀释成 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2 mg/mL, 依次划线, 组装成试纸条, 检测阴性血清和阳性血清, 15 min 后结果显示蛋白浓度在 1.0 mg/mL 显色最为明显, 因此检测线最

适划线浓度为 1.0 mg/mL。

2.7 试纸条特异性检验结果

使用实验室制备的鲤疱疹病毒II型抗体阳性血清、草鱼呼肠孤病毒抗体阳性血清、鳊虹彩病毒抗体阳性血清、大口黑鲈虹彩病毒抗体阳性血清、鲤春病毒血症病毒抗体阳性血清验证潜在交叉反应。结果如图 4 所示, 该试纸条与鲤鱼疱疹病毒II型抗体阳性血清呈阳性反应, 而与其他血清无交叉反应, 表明该试纸条具有良好的特异性。

2.8 试纸条灵敏性检验结果

使用该试纸条检测倍数稀释的 CyHV-2 抗体阳性血清, 检测线随着抗体浓度的降低而变浅, 稀释至 1:100 时仍呈阳性(图 5), 本试纸条可采用全血检测, 稀释的血清仍然可以检测到抗体, 表明本研究制备的试纸条灵敏度良好。



图 4 鲤疱疹病毒 II 型抗体胶体金试纸条特异性检验结果 1: 鲤疱疹病毒 II 型阳性血清; 2: 草鱼呼肠孤病毒阳性血清; 3: 鳊虹彩病毒阳性血清; 4: 大口黑鲈虹彩病毒阳性血清; 5: 鲤春病毒血症病毒阳性血清

Figure 4 Specificity test of colloidal gold strip for cyprinid herpesvirus-2 antibody. 1: Cyprinid herpesvirus-2 positive serum; 2: Grass carp reovirus positive serum; 3: Siniperca chuatsi iridovirus positive serum; 4: Positive serum of largemouth bass iridovirus; 5: Carp spring viremia virus positive serum.



图 5 鲤疱疹病毒 II 型抗体胶体金试纸条灵敏性检验结果

Figure 5 Sensitivity test of cyprinid herpesvirus-2 antibody colloidal gold test strip.

2.9 试纸条符合性检验结果

使用胶体金试纸条和金鱼造血器官坏死病毒检测方法(GB/T 36194—2018)分别对 10 份鲫鱼样品进行检测, 试纸条与国家标准检测结果同为阳性的样本共 5 份, 两者的 Kappa 值为 0.80, 结果说明胶体金试纸条的准确性良好(表 1)。

3 讨论与结论

CyHV-2 感染在金鱼中最为严重, 可导致所有年龄段的金鱼 100%死亡率, 日死亡率为 1%–5%, 尤其是在水温为 15–20 °C 的情况下, 受影响的金鱼无精打采并且待在池塘底部^[20]。CyHV-2 感染的鲫鱼在身体和鳍的不同部位出

表 1 CyHV-2 抗体胶体金试纸条与金鱼造血器官坏死病毒检测方法比较

Table 1 Result comparison of CyHV-2 antibody colloidal gold test strip and goldfish hematopoietic organ necrosis virus detection methods

金鱼造血器官坏死病毒检测方法	CyHV-2 抗体胶体金试纸条	Kappa 值
Detection method of goldfish haematopoietic organ necrosis virus	CyHV-2 antibody colloidal gold test strip	Kappa value
阴性 Negative	4	阴性 Negative 5
阳性 Positive	6	阳性 Positive 5
总计 Total	10	总计 Total 10

血, 肛门肿胀, 鳃和眼睛出血^[21]。水平疾病传播是鱼类种群之间 CyHV-2 传播的常见方式。鱼类之间的直接传播可以通过接触受感染的鱼或无症状携带 CyHV-2 的鱼来实现^[22]。Ito^[23]发现, 在 13–15 °C 的水温下感染 CyHV-2 的金鱼既未死亡, 也未获得对该疾病的抵抗力, 而是作为感染其他鱼类的携带者。许多国家暴发了严重的 CyHV-2 感染, 因此, 在将鱼类引入当地市场之前, 在检疫设施中使用敏感的诊断方法对鱼类进行 CyHV-2 筛查至关重要, 我们根据胶体金免疫层析试纸条技术开发了一种快速、现场检测鱼类感染 CyHV-2 病毒和监测鱼类 IgM 抗体水平的方法。

胶体金溶液是通过 HAuCl_4 在还原剂柠檬酸三钠的还原作用下制成的, 在弱碱性的环境下, 胶体金颗粒彼此排斥, 因此胶体金颗粒处于一个分散的、较为稳定的状态。成功制备胶体金的关键之一是制备过程中使用的锥形烧瓶的洁净程度。因此, 在制备胶体金之前, 有必要严格清洁烧金过程中使用的玻璃器皿, 还原剂的加入量、加入时间等因素可以使四氯金酸聚合形成不同大小金颗粒^[24]。本研究选择制备约 20 nm 的胶体金颗粒, 使用较小的金颗粒可以降低检测时假阳性的概率。在优化试纸条过程中仍然出现了假阳性和假阴性的结果, 通过控制变量, 筛查了最优条件的 pH、抗原标记量、结合垫和样品垫的预处理, 以及最佳封闭液的选择等优化手段。

值得强调的是, 本研究发现结合垫和样品垫的预处理以及彻底烘干对胶体金的层析释放过程至关重要, 经过多次对比试验后, 我们得出结论是必须预处理试纸条耗材, 所有经过润湿的材料需要彻底烘干, 但是不可以时间过长, 否则会导致抗原或抗体降解失效; 另一个影响试纸条工作性能的因素是 NC 膜的封闭液

选择, 封闭可以防止和减少样品或标记物对捕获线和整个膜的非特异性吸附, 封闭也被用于控制层析速率。实验中, 封闭过程确实可以减少非特异性结合, 但是也大大影响了试纸条工作效率, 层析速度极为缓慢。因此, 我们的选择是不进行封闭, 通过更换 T 线、C 线以及金标抗原的材料来避免非特异性结合。在胶体金标记抗原的制备过程中, 我们发现不经过第二次高速离心洗涤的金标溶液可以良好复溶, 转速是最重要的影响因素, 在低转速 5 000 r/min 时金标抗原颗粒无法沉淀浓缩, 在过高转速 12 000 r/min 时胶体金不可重悬。因此, 调整最适合制备胶体金试纸条的优化手法十分重要。

CyHV-2 病毒侵染鱼体后在体内迅速增殖, 鱼类的免疫系统能在抵御病原入侵和感染疾病后的恢复上发挥重要作用, IgM 是鱼类特异性免疫应答中最主要的介质。目前, 血清中抗体效价的高低已成为反映水生动物免疫水平较为理想的可靠指标^[25]。此试纸条通过对比金鱼造血器官坏死病毒检测方法(GB/T 36194—2018), Kappa 分析结果表明试纸条符合率高, 其中有一例检出 CyHV-2 但未检出抗体, 分析认为是鱼体免疫后抗体产生有延迟, IgM 抗体水平暂未达到检测最低限度。

综上所述, 本研究通过多次尝试并优化胶体金制备流程, 成功开发了一种现场、快速检测鱼体 CyHV-2 抗体的胶体金免疫层析试纸条, 能够为鱼类传染病检疫、抗体水平检测等有关领域作出贡献。

REFERENCES

- [1] JUNG SJ, MIYAZAKI T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(3): 211-220.
- [2] HEDRICK RP, WALTZEK TB, MCDOWELL TS. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish×common carp hybrids to cyprinid

- herpesvirus-2 and herpesvirus-3[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 26-34.
- [3] HEDRICK RP, GILAD O, YUN S, SPANGENBERG JV, MARTY GD, NORDHAUSEN RW, KEBUS MJ, BERCOVIER H, ELDAR A. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(1): 44-57.
- [4] DAVISON AJ, KUROBE T, GATHERER D, CUNNINGHAM C, KORF I, FUKUDA H, HEDRICK RP, WALTZEK TB. Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [5] GROFF JM, LAPATRA SE, MUNN RJ, ZINKL JG. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, 10(4): 375-378.
- [6] GOODWIN AE, KHOO L, LAPATRA SE, BONAR C, KEY DW, GARNER M, LEE MV, HANSON L. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 11-18.
- [7] STEPHENS F, RAIDAL S, JONES B. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2004, 82(3): 167-169.
- [8] JEFFERY KR, BATEMAN K, BAYLEY A, FEIST SW, HULLAND J, LONGSHAW C, STONE D, WOOLFORD G, WAY K. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(11): 649-656.
- [9] ITO T, KURITA J, OZAKI A, SANO M, FUKUDA H, OTOTAKE M. Growth of cyprinid herpesvirus 2 (C_γHV-2) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(3): 193-202.
- [10] ZHU M, LI K, XUAN Y, SUN Z, LIU B, KUMAR D, JIANG M, PAN Y, ZHANG Y, GONG Y, LU X, YU D, HU X, CAO G, XUE, R. Host Range and vertical transmission of cyprinid herpesvirus 2[J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2019, 19: 645-652.
- [11] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 金鱼造血器官坏死病毒检测方法: GB/T 36194—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- Standardization Administration of the People's Republic of China. Detection method of goldfish haematopoietic necrosis virus: GB/T 36194—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese).
- [12] WU R, XUE Y, HUANG J, OZDEMIR E, LI Y, DING S. Development and evaluation of a convenient immunochromatographic strip test for rapid detection of cyprinid herpesvirus 2 (C_γHV-2)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2021, 143: 195-203.
- [13] 柳旭伟, 葛文霞, 张文举, 杨力伟. 胶体金免疫层析技术及其在动物疾病诊断中的应用[J]. *中国动物传染病学报*, 2016, 24(5): 74-80.
- LIU XW, GE WX, ZHANG WJ, YANG LW. Application of colloidal-gold immunochromatography assay (GICA) to diagnostics of animal diseases[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2016, 24(5): 74-80 (in Chinese).
- [14] 董旭旭, 孙威, 曹攀, 刘晓丹. 胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用研究现状[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3243-3254.
- DONG XX, SUN W, CAO P, LIU XD. Colloidal gold immunochromatographic test strip for virus detection: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(9): 3243-3254 (in Chinese).
- [15] LU JF. A novel cell line established from caudal fin tissue of *Carassius auratus gibelio* is susceptible to cyprinid herpesvirus 2 infection with the induction of apoptosis[J]. *Virus Research*, 2018, 258: 19-27.
- [16] 张小米, 阙顺政, 龙晨, 王浩, 吕利群. 鲤疱疹病毒II型 ORF66 截短蛋白多克隆抗体的制备及互作多肽筛选[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(5): 796-802.
- ZHANG XM, QUE SZ, LONG C, WANG H, LÜ LQ. Preparation of polyclonal antibodies to cyhv-2 orf66 truncated protein and screening of intercalating peptides[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(5): 796-802 (in Chinese).
- [17] 郭宝琴, 魏畅, 王轶南, 李强. 异育银鲫 IgM 单克隆抗体的制备及其应用[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(3): 450-456.
- GUO BQ, WEI C, WANG YN, LI Q. Development and application of monoclonal antibody against IgM of silver Prussian carp *Carassius auratus gibelio*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2022, 37(3): 450-456 (in Chinese).
- [18] 尹梅. 猪瘟病毒抗体胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制及初步应用[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2013.
- YIN M. Preparation and application of colloidal gold

- immunochromatography strip for CSFV antibody[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [19] YU GL, YU XL, YANG GP, TANG Y, DIAO YX. A novel diagnostic method to detect duck tembusu virus: a colloidal gold-based immunochromatographic assay[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1001.
- [20] P K, SAHOO. Detection of goldfish haematopoietic necrosis herpes virus (Cyprinid herpesvirus-2) with multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish: first evidence of any viral disease outbreak in ornamental freshwater aquaculture farms in India[J]. *Acta Tropica*, 2016, 161: 8-17.
- [21] FICHI G, CARDETI G, COCUMELLI C, VENDRAMIN N, TOFFAN A, ELENI C, SIEMONI N, FISCHETTI R, SUSINI F. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(10): 823-830.
- [22] GOODWIN AE, SADLER J, MERRY GE, MARECAUX EN. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: case studies from commercial goldfish farms[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(3): 271-278.
- [23] ITO T. Susceptibility of Japanese *Cyprininae* fish species to cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169(3/4): 128-134.
- [24] 王悦欣, 舒黎辉, 杨雨琦, 王亚荣, 吴平, 寇启明, 孙琦, 乐涛. 鸡传染性支气管炎病毒抗体胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 38(5): 122-128.
- WANG YX, SHU LH, YANG YQ, WANG YR, WU P, KOU QM, SUN Q, LE T. Development of colloidal gold immunochromatographic test strip for avian infectious bronchitis virus antibody[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, 38(5): 122-128 (in Chinese).
- [25] WANG D. A research on Ig heavy chain constant region of five acipenser-Dae[J]. *Hereditas*, 2006, 28(10): 1247.