

孙亚宁, 杨苏珍, 邢云瑞, 等. 基于量子点的非洲猪瘟病毒抗体荧光免疫层析试纸研制 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 101-108.

SUN Y N, YANG S Z, XING Y R, et al. Establishment of a quantum dots-based immunochromatographic strip for detection of African swine fever virus specific antibodies [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 101-108.

基于量子点的非洲猪瘟病毒抗体荧光免疫层析试纸研制

孙亚宁, 杨苏珍, 邢云瑞, 范璐, 乔松林, 卢清侠, 张改平*

(河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了研发灵敏、准确的非洲猪瘟快速诊断试纸产品, 本研究基于免疫层析技术原理, 以非洲猪瘟病毒 (ASFV) p72 蛋白三聚体为检测抗原, 量子点 (QDs) 为标记材料, 金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 为检测线, p72 单克隆抗体为质控线, 建立了非洲猪瘟病毒抗体荧光免疫层析试纸, 并对试纸的检测性能进行鉴定。结果: 荧光免疫层析试纸检测 ASFV 标准阳性血清的效价为 1 : 102 400, 与猪瘟病毒、口蹄疫病毒、伪狂犬病病毒、猪繁殖与呼吸道综合征病毒及猪圆环病毒 2 型阳性血清抗体无交叉反应, 在临床样本检测中与商业化 ASFV 抗体检测试剂盒的符合率为 92.92%。综上, 该试纸具有良好的灵敏度、特异性、准确性及稳定性, 可用于临床样品中 ASFV 抗体的快速筛查。

关键词: 非洲猪瘟; 量子点; p72 蛋白; 抗体; 试纸

中图分类号: S854.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)10-0101-08

Establishment of a quantum dots-based immunochromatographic strip for detection of African swine fever virus specific antibodies

SUN Yaning, YANG Suzhen, XING Yunrui, FAN Lu, QIAO Songlin, LU Qingxia, ZHANG Gaiping*

(Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Based on the principle of immunochromatography, water-soluble quantum dots (QDs) were used as the labeling material conjugated with the trimer of ASFV protein, Staphylococcus aureus protein A and ASFV p72 monoclonal antibody immobilized on the strip were used as the detection line and quality control line, respectively, and a sensitive and accurate test strip for rapid detection of African swine fever was established in this study. The results showed that the sensitivity of the immunochromatographic test strip was 1 : 102 400, with no cross-reaction with antibody positive sera of swine fever virus, swine foot-and-mouth disease virus, pseudorabies virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. The total coincidence rate of the strip with the commercial ELISA kit was 92.92%. This strip had good sensitivity, specificity, accuracy and stability, which might be used for rapid screening of African swine fever virus specific antibodies.

Keywords: African swine fever; quantum dots; p72 protein; antibody; strip

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 在家猪及野猪中引起的一种急性、热性及高度传染性疾病, 死亡率可高达 100%^[1]。世界卫生组织将其列为必须通报的动物疫病。2018 年 8 月我国首次发现 ASFV^[2],

随后病毒迅速蔓延肆虐, 给我国造成了巨大的经济损失, 成为养猪业的“头号杀手”^[3]。迄今, 尚无有效的疫苗及治疗方法, 因此早期监测、早处置、提高生物安全防控水平是预防和控制非洲猪瘟的有效措施^[4-5]。建立灵敏、准确、快速的检测方法可实现非洲猪瘟的早期现场快速检测, 对控制非洲猪瘟疫情意义重大。

目前非洲猪瘟的检测方法主要以实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR)^[6] 和酶联免疫吸附分析 (ELISA)^[7] 为主。RT-qPCR 主要用于病原检测, 可以检测猪组织、血液以及人员、车辆、食品、环境等样品中的 ASFV^[8], 其敏感性和特异性要优于免疫学

收稿日期: 2023-11-24; 修回日期: 2024-08-01

基金项目: 河南省自然科学基金青年基金项目 (232300421274); 河南省农业科学院优秀青年科技基金项目 (2022YQ25); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (222102110413); “中原英才计划” (育才系列) - 中原青年拔尖人才项目 (ZYYCYU202012148)

第一作者: 孙亚宁, 女, 博士, 副研究员

* 通信作者: 张改平, 研究员, 研究方向为动物免疫学及动物病毒分子致病机制, E-mail: zhanggaip@126.com.

检测方法。但是在变异毒株感染及感染康复后 RT-qPCR 的漏检率较高,且无论是 RT-qPCR 还是 ELISA 均需要在实验室环境进行检测,不能实现现场快速检测。免疫层析技术是近年来迅速发展的一种体外诊断技术,相比 ELISA 方法具有快速、准确、方便、无需专业人员及设备,几分钟内可出结果等优点,可以实现现场快速检测,但是免疫学检测方法检测病原的灵敏度不及 RT-qPCR。基于我国未使用 ASFV 疫苗的现状,一旦 ASFV 抗体检测为阳性则可以确诊为已感染或者曾经感染 ASFV^[9],且针对感染康复猪的检测更有优势,因此开展非洲猪瘟抗体检测是一种可靠且准确的 ASF 诊断方法,建立 ASFV 抗体免疫层析检测技术,可以实现 ASFV 快速、准确的现场检测。

p72 蛋白是 ASFV 衣壳最主要的结构蛋白,在病毒表面以同源三聚体形式存在,约占病毒总蛋白的 32%,抗原表位高度保守^[10-12]。本研究拟以量子点 (quantum dots, QDs) 为标记材料,以正确折叠的 p72 重组蛋白三聚体为检测抗原,以金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (*Staphylococcus aureus* protein A, SPA) 为拦截线,建立基于 QDs 的 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸,并结合荧光定量分析仪实现检测结果的数字化,为 ASFV 抗体现场快速检测提供更灵敏、特异的检测手段。

1 材料与方法

1.1 阳性血清和主要试剂

p72 蛋白三聚体 (HEK293F 细胞表达)、P72 单克隆抗体 IgG、猪繁殖与呼吸道综合征病毒 (PRRSV) 抗体阳性血清、口蹄疫病毒 (FMDV) 抗体阳性血清、113 份田间血清 (2020—2022 年河南省各大猪场),均由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室收集及保存;ASFV 标准阳性血清 (强毒株)、猪瘟病毒 (CSFV) 标准阳性血清、伪狂犬病病毒 (PRV) 标准阳性血清、猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 标准阳性血清,购自中国兽医药品监察所。

水溶性羧基化量子点 (CdSe/ZnS, QDs-COOH, 5 $\mu\text{mol/L}$, 激发波长 620 nm \pm 5 nm) 购自北京北达聚邦科技有限公司; 喹乙磺酸 (MES)、N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 购自 Sigma 公司; 重组 SPA 蛋白购自杭州纽龙生物科技有限公司; 氯金酸、酪蛋白购自美国 Sigma 公司; 无 IgG、无蛋白酶的牛血清白蛋白

(BSA) 购自美国 Jackson Immuno Research 公司; 硝酸纤维素膜 (HF13502S25, 30 cm \times 2 cm)、玻璃纤维垫、吸水纸购自美国 Millipore 公司; ASFV ELISA 抗体检测试剂盒购自韩国金诺公司; 氢氧化钠, 叠氮钠等其他试剂为国内市售分析纯级。

1.2 主要仪器

电热鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司; HGS802 压壳机购自杭州峰航科技有限公司; 900 型薄膜连续封口机购自广州华丰包装设备有限公司; SIGMA4-16K 离心机购自德国 Sigma 公司; 加热磁力搅拌器购自德国 IKA 公司; U-3000 紫外可见分光光度计购自日本岛津公司; BioDot-XYZ 3060 三维喷点系统、BioDot-CM 4000 斩切机购自美国 Bio-Dot 公司; ESE-Quant FLUO 荧光读条仪购自德国 Qiagen 公司。

1.3 QDs-p72 抗原探针的制备

参考 Shang 等^[13]及 Li 等^[14]方法,利用活泼酯法将量子点与 P72 蛋白三聚体偶联,制备 QDs-p72 抗原探针 (图 1A)。取 20 μL 量子点 (5 $\mu\text{mol/L}$) 于离心管中,然后加入 0.05 mol/L MES 20 μL (pH=6.0) 溶液稀释,随后加入 2 mg/mL EDC 5 μL (MES) 溶液,室温避光震荡反应 20 min,再加入 2 mg/mL NHS 10 μL (双蒸水) 溶液,室温避光震荡反应 10 min,然后加入 0.3 mg/mL p72 蛋白 100 μL (PBS),室温避光震荡反应 3 h,最后加入 0.01 mol/L BSA (PBS) 溶液至终浓度为 1%,室温避光震荡反应 30 min,17 500 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,去上清液,400 μL 重悬液溶解沉淀,即为 QDs-p72 抗原探针,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸组装

使用 BioDot-XYZ 3060 三维喷点系统将 QDs-p72 抗原探针溶液以 3.6 $\mu\text{L/cm}$ 的量喷涂于处理过的玻璃纤维棉上,42 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 50 min 制备结合垫,避光密封保存备用。

使用 BioDot-XYZ 3060 三维喷点系统将 0.7 mg/mL SPA (PBS) 及 2 mg/mL p72 单克隆抗体 (PBS) 以 1 $\mu\text{L/cm}$ 的量分别喷涂于 NC 膜上,形成检测线 (T 线) 及质控线 (C 线),42 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 1 h,避光密封保存备用。

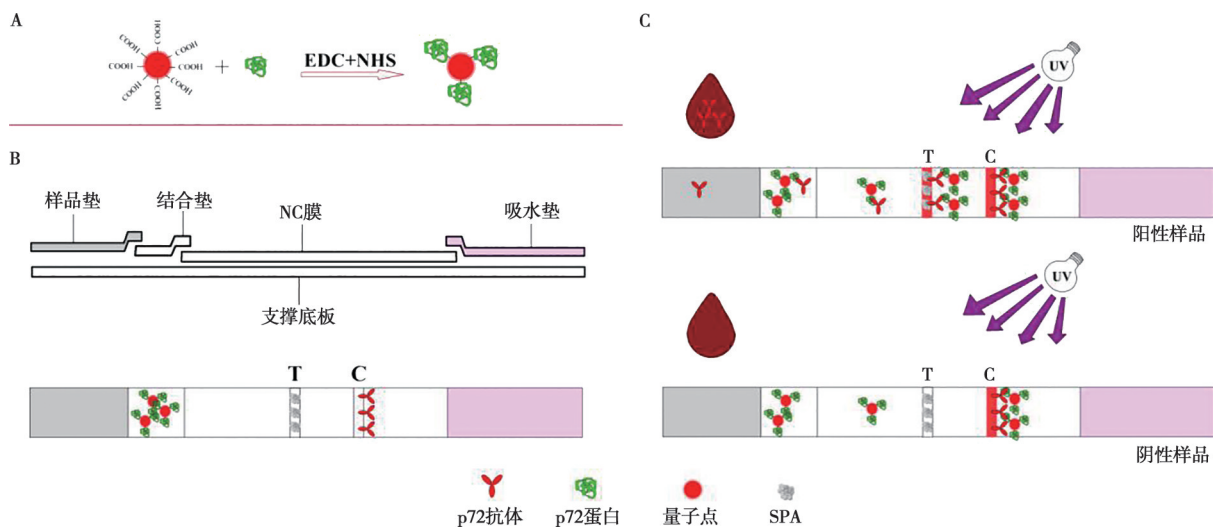
取处理过的 NC 膜、结合垫、样品垫、吸水垫按照图 1B 的位置依次粘贴于支撑底板上,各组份间重合 2~3 mm,按压紧实,注意粘贴过程避免损伤 NC 膜,然后用切割机切割成 3.0 mm 宽的试纸条,避光密封保存备用。

1.5 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸的检测方法及结果判定

本研究开发的试纸可以用于血清及全血样品的检测：将待检样品用 PBS 进行 100 倍稀释，然后取稀释过的样品 100 μL 于反应杯中，插入 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸进行检测，15 min 后，手持式紫外灯下肉眼观测结果，或 ESE-Quant FLUO 荧光读条仪读取 T 线荧光光谱峰面积（fluorescence intensity area, FIA）判定结果，应在 20 min 内完成结果判定。

ASFV 抗体荧光免疫层析试纸检测原理见图 1C。当检测阳性样品滴加于样品垫上时，在虹吸作用下流

经结合垫，样品中 ASFV 抗体（ASFV IgG）与结合垫上 QDs-p72 形成 ASFV QDs-p72-IgG 复合物，并继续向前流经 T 线时被 SPA 拦截形成 QDs 信号堆积，产生荧光信号，多余的 QDs-p72 流经 C 线时被 p72 单抗 IgG 拦截，形成 QDs 信号堆积，产生荧光信号，试纸 C、T 线均显示荧光信号。当样品为阴性时，样品中不含有 ASFV IgG，结合垫上 QDs-p72 流经 T 线时不与 SPA 发生反应，无荧光信号产生，流经 C 线时被 p72 单抗 IgG 拦截，形成 QDs 信号堆积，产生荧光信号，试纸仅 C 线显色。



A. 抗原探针制备原理；B. 试纸组成；C. 试纸检测原理。

图 1 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸制备及检测原理示意

1.5.1 肉眼观察结果判定标准

试纸仅 C 线处出现红色荧光条带，T 线不显色，结果判定为阴性，即样品中不含有 ASFV 抗体；试纸 C、T 线均出现红色荧光条带，结果判定为阳性，即样品中含有 ASFV 抗体，且抗体水平与 T 线显色强度在一定范围内呈正相关^[14]。试纸 C 线不显色则表示操作失误或试纸失效，应重新检测。

1.5.2 ESE-Quant FLUO 荧光读条仪结果判定标准

当在 T 线处没有信号峰出现，且 FIA 值为 0 时，结果判定为阴性，即样品中不含有 ASFV 抗体；当扫描图谱在 T 线处出现明显信号峰，且 FIA 值 ≥ 50 时，结果判定为阳性，即样品中含有 ASFV 抗体，且抗体浓度与 FIA 值在一定范围内成正相关。为了检测结果的准确性以及排除环境等各方面因素的影响，设置 FIA 值在 1~50 为可疑。

1.6 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸性能鉴定

1.6.1 灵敏度

将 ASFV 抗体标准阳性血清从 1:50 起用 PBS 倍比稀释，然后用 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸进行检测，以试纸能检测为阳性的最大稀释倍数为该血清的试纸效价。同时用韩国金诺 ASFV ELISA 抗体检测试剂盒检测 ASFV 抗体标准阳性血清效价，通过对比 2 种方法的效价从而评价 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸灵敏度。

1.6.2 特异性

取 ASFV、CSFV、PRV、PRRSV、PCV2 抗体阳性血清，按照 1.5 的检测方法用 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸进行检测，根据结果评价试纸特异性。

1.6.3 重复性

取 3 批 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸，每批次 9 条，按照 1.5 的检测方法检测 1:10 000 稀释的

ASFV 标准阳性血清, 计算平均值及变异系数 (CV), 评价试纸的批内及批间重复性。

1.6.4 稳定性

将 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸室温干燥环境下放置 6 个月, 按照 1.6.1 方法检测试纸灵敏度; 按照 1.6.3 方法检测试纸重复性, 根据结果评价试纸稳定性。

1.6.5 临床样本检测

取 113 份田间血清, 分别用 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸及韩国金诺 ASFV ELISA 抗体检测试剂盒进行检测, 计算 2 种检测方法符合率。针对 2 种方法检测不一致的样品, 采用 RT-qPCR 方法进一步确认, 具体操作参照文献 [6] 进行。

2 结果与分析

2.1 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸条件的优化

为了提高 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸的检测性能, 分别对 QDs-p72 抗原探针制备过程中偶联剂用量及 p72 蛋白用量, 结合垫上 QDs-p72 抗原探针用量、NC 膜 C 线、T 线包被浓度及试纸的反应时间等条件进行了优化。

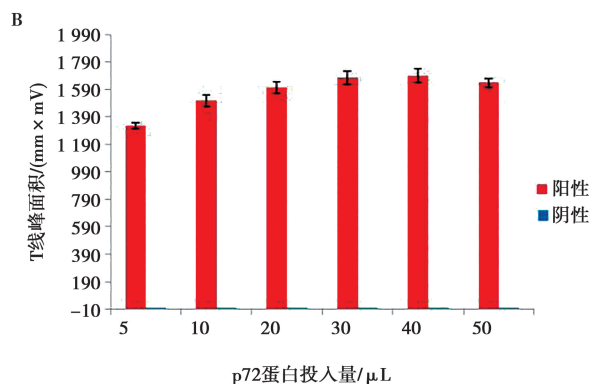
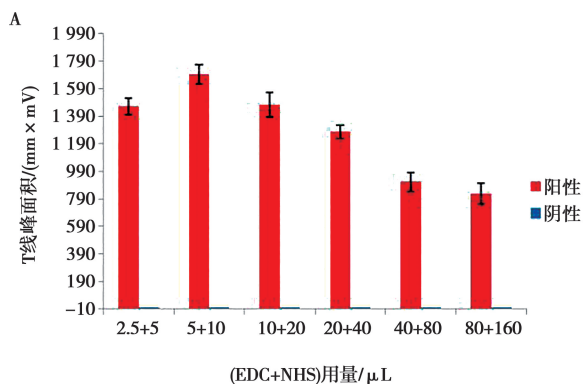
图 2A 为荧光探针制备过程中偶联试剂 EDC 与 NHS 用量的优化结果, 结果显示当 20 μL QDs 中加入 5 μL EDC、10 μL NHS 时, 试纸 T 线的显色最好, 阴性也未见非特异性反应, 因此确定此条件为偶联试剂的较优条件。从结果还可以看出加入偶联试剂的量对 QDs-p72 抗原探针的偶联效率影响较大, 也是影响试纸检测性能的主要因素。

图 2B 为荧光探针制备过程中 p72 蛋白用量的优化结果, 结果显示, 随着 p72 蛋白投入量的增加, 在检测阳性样品时试纸 T 线显色逐渐增加, 当 20 μL QDs 中 p72 蛋白投入量在 30 μg 时, T 线显色趋于稳定, 且当 p72 蛋白投入量达到 50 μg 时, 阳性样品 T 线有下降的趋势; 在检测阴性样品时, 各蛋白浓度标

记的探针均未见非特异性反应, 因此确定 20 μL QDs 中加入 30 μg p72 蛋白为较优条件。

图 2C 为荧光探针喷涂量的优化, 图中横坐标标注喷涂量为同一浓度的探针用量, 由于机器最佳喷涂量为 3~9 $\mu\text{L}/\text{cm}$, 当所需浓度太少时, 需要用稀释液稀释后再进行喷涂, 而为了更好地对比结果, 本试验将喷涂量统一以原始浓度标注, 以便于结果统计分析。结果显示, 荧光探针喷涂量在 3.6 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 时阳性样品 T 线显色趋于饱和, 阴性未见非特异性, 因此确定荧光探针以 3.6 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量喷涂结合垫为较优条件。NC 膜 T 线包被 SPA 浓度优化, 通过喷涂不同的 SPA 浓度检测 ASFV 阴阳性血清样品, 结果显示: 当 SPA 浓度达到 1 mg/mL 时, 阳性样品 T 线显色达到饱和, 检测标准阴性样品时 T 线无显色, 但是在检测阴性样品盘时出现了 3% 的假阳性率, 因此逐渐降低 SPA 浓度为 0.9、0.8 和 0.7 mg/mL 检测阴性样品, 当 SPA 浓度下降为 0.7 mg/mL 时未见假阳性结果, 因此最终确定 T 线 SPA 最佳包被浓度为 0.7 mg/mL 。NC 膜 C 线包被 p72 单抗浓度优化, 基于间接法建立的抗体免疫层析试纸, 当样品中目标抗体浓度非常大时, 会使 C 线显色强度降低, 甚至消失, 因此, C 线喷涂浓度应在不影响 C 线宽度的前提下尽量提高, 分别喷涂 1、1.5、2、2.5 mg/mL 的 p72 单抗为 C 线, 结果显示, C 线宽度与 T 线相近的 p72 单抗最大喷涂浓度为 2 mg/mL 。

图 2D 为试纸显色时间的优化, 结果显示显色 5~10 min 时, 由于大量的荧光探针还在 NC 膜上流动, 造成试纸检测结果不稳定, CV 值非常高; 当显色 15 min 时试纸的反应基本结束, 在 15~20 min 时显色趋于稳定, CV 值在 15% 以内, 结果可靠^[15], 当显色 25 min 时显色有下降趋势, 且 CV 值升高, 因此选择显色时间为 15 min, 且应在 20 min 内完成结果判定。



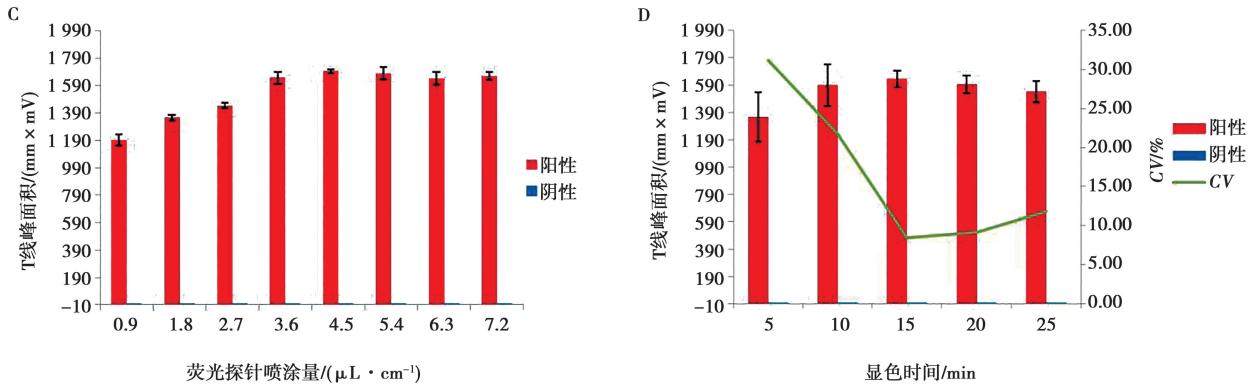


图2 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸条件优化

2.2 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸性能鉴定

2.2.1 灵敏度

ASFV 抗体荧光免疫层析试纸检测 ASFV 标准阳性血清效价见图 3，结果显示，试纸检测该血清的效

价为 1 : 102 400。利用韩国金诺 ASFV ELISA 抗体检测试剂盒检测该阳性血清的效价为 1 : 6 400，可见本试验制备的 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸灵敏度比韩国金诺 ASFV ELISA 抗体检测试剂盒高 16 倍。

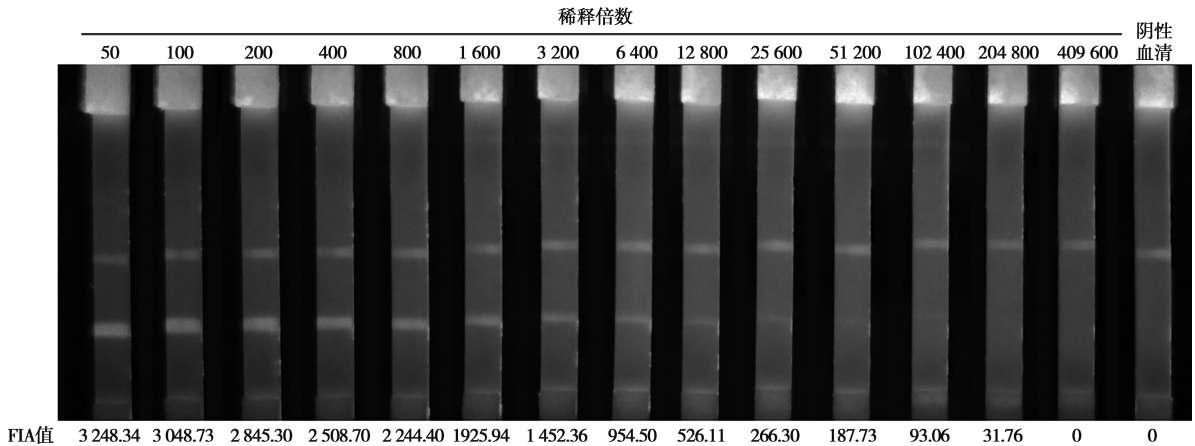


图3 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸灵敏度

2.2.2 特异性

ASFV 抗体荧光免疫层析试纸特异性检测结果见图 4。结果显示，试纸仅与 ASFV 阳性血清呈现阳性反应，与 CSFV、FMDV、PRV、PRRSV、PCV2 阳性血清均未发生反应，因此本试纸具有良好的特异性。

2.2.3 重复性

3 批次 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸检测 ASFV 标准阳性血清的结果见表 1，3 个批次的批内 CV 值分别为 11.81%、12.49% 和 11.78%；批间 CV 值为 12.51%，变异系数均小于 15%，说明 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸具有很好的重复性。

2.2.4 稳定性

ASFV 抗体荧光免疫层析试纸稳定性结果见表 2，结果显示试纸室温干燥环境下存放 6 个月，检测灵敏度为 1 : 102 400，与存放前相同；试纸的 CV 值为 13.36%，仍小于 15%。因此，ASFV 抗体荧光免疫层析试纸室温干燥环境下可以稳定存放 6 个月以上，具有较好的稳定性。

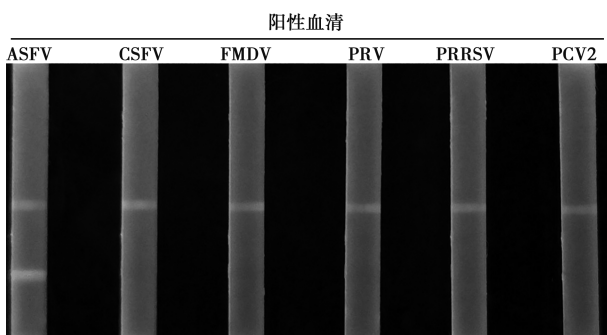


图4 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸特异性

表 1 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸重复性结果

重复数	FIA 值		
	批次 1	批次 2	批次 3
1	722.97	905.10	924.47
2	797.97	824.06	822.76
3	634.66	653.26	685.75
4	809.14	738.01	729.97
5	839.50	753.26	815.56
6	684.43	784.96	663.92
7	665.71	686.90	799.37
8	586.00	574.07	645.84
9	639.61	698.68	677.32
平均值	708.89	735.37	751.66
批内 CV/%	11.81	12.49	11.78
批间 CV/%		12.51	

表 2 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸稳定性

灵敏度		重复性	
血清稀释倍数	FIA 值	重复数	FIA 值
200	2 809.90	1	765.25
400	2 646.06	2	683.16
800	2 217.13	3	563.30
1 600	1 900.57	4	849.63
3 200	1 411.26	5	688.62
6 400	818.36	6	617.46
12 800	510.69	7	672.71
25 600	264.60	8	762.41
51200	216.61	9	870.93
102 400	89.13	平均值	719.27
204 800	43.39	批内 CV/%	13.36

2.3.5 临床样本检测

分别用 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸及韩国金诺 ASFV ELISA 抗体检测试剂盒对 113 份田间血清样品进行检测, 结果见表 3, ELISA 试剂盒检测出阳性样品 16 份, 可疑样品 4 份, 这 20 份样品荧光免疫层析试纸均检测为阳性, 阳性符合率为 100%; ELISA 试剂盒检测出阴性样品 93 份, 荧光免疫层析试纸检测阴性样品 89 份, 阴性符合率为 95.7%; 113 份样品中检测结果一致的样品 105 份, 总符合率为 92.92%。荧光免疫层析试纸阳性及可疑样品 FIA 值见表 4。ELISA 试剂盒检测的 4 份可疑样品分别是表 4 中 9 号、21 号、23 号及 24 号血清, 其 RT-qPCR 检测 Ct 值分别为 28.73、21.83、20.91、19.97, 确定为 ASFV 阳性样品, 从而说明 ASFV 抗体荧光免疫层析

试纸的检测灵敏度优于 ELISA 试剂盒。

表 3 临床样品检测

方法	结果	ELISA 试剂盒			合计
		阴性	可疑	阳性	
荧光试纸	阴性	89	0	0	89
	阳性	3	4	16	23
	可疑	1	0	0	1
	合计	93	4	16	113

表 4 荧光免疫层析试纸阳性及可疑样品检测结果

样品编号	FIA 值	结果判定
1	190.89	阳性
6	57.06	阳性
8	2 156.67	阳性
9	230.71	阳性
10	39.04	可疑
16	2 604.50	阳性
19	188.82	阳性
21	130.91	阳性
22	39.42	阳性
23	293.51	阳性
24	142.93	阳性
25	1189.99	阳性
26	2 094.51	阳性
27	1 782.54	阳性
28	2 499.93	阳性
29	832.83	阳性
30	2 224.50	阳性
31	2 178.11	阳性
32	2 759.28	阳性
33	1 103.53	阳性
34	2 412.31	阳性
35	2 283.72	阳性
36	2 279.75	阳性
50	315.53	阳性

3 讨论

由于目前 ASF 缺乏有效的疫苗, 为防止疫病的传播, 就需要快速、可靠的早期诊断技术。ASF 的诊断不仅要考虑正在感染的动物, 而且也要考虑曾经感染过 ASFV 的动物。因此在疫情控制和根除中, 需要病毒和抗体同时检测才能进行准确地诊断^[9]。在 ASF 诊断中, 核酸检测灵敏度高、特异性强, 在早期诊断

中优势明显^[16]。与核酸检测不同, 抗体检测不需要核酸提取和扩增等步骤, 且在亚急性感染、慢性感染及感染康复等时期检测更加准确, 更适合现场的快速诊断^[14]。免疫层析试纸因具有可现场快速检测的优势, 逐渐被人们认可并应用于 ASFV 抗体检测中。Li 等^[17]利用原核表达了截短的 p54 蛋白, 建立了荧光免疫层析试纸, 灵敏度与特异性与商业化 ELISA 试剂盒相当; Zhu 等^[18]利用酵母表达系统表达的 p72 蛋白, 建立了 ASFV 抗体检测试纸, 检测灵敏度为 1 : 10 000; Li 等^[14]建立了基于量子点的 p30 和 p54 双探针 ASFV 抗体检测试纸, 检测灵敏度为 1 : 64 000; 李鹏宇等^[19]以 P54t 多肽作为检测抗原, 建立 ASFV 抗体检测试纸, 检测灵敏度为 1 : 12 800。本研究制备的 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸具有更好的灵敏度, 且选择 SPA 为拦截线可以拦截部分 IgM^[20-21], 在 ASF 早期诊断中具有优势。

免疫层析技术中最常用的标记材料是胶体金^[22], 通过胶体金的聚集形成肉眼可见的红色, 因为不需要任何检测仪器和设备就可以实现现场检测, 因此应用最为广泛。随着科技的发展, 针对快速检测有了更高的需求, 超灵敏检测及数字化已经成为免疫层析检测的发展趋势。虽然目前已有很多胶体金免疫层析分析仪可以将检测试纸的检测结果数字化, 但多是通过将 C、T 线的色密度转化为光密度进行处理, 由于色密度信号仅来自于 NC 膜表面 10 μm, 其中约 90% 的信号会因为光的折射、散射等因素出现损失, 影响检测的准确性^[23], 基于胶体金标记的免疫层析试纸已经无法满足需求。量子点与胶体金、荧光染料等材料相比, 具有激发波长范围宽、发射光谱窄而对称、量子产率高、光化学稳定性和生物相容性好等优点, 在提高快检产品检测灵敏度、稳定性及数字化分析准确性等方面具有明显的优势^[24], 已经广泛应用于纳米生物传感器领域, 实现对抗原、抗体及核酸的超灵敏检测^[25-26]。基于量子点的荧光免疫层析试纸, 不仅可以借助便携的紫外灯实现裸眼结果判定, 还可以通过仪器实现精确的结果判定, 实现检测结果的数字化, 更有利于规模化猪场的数据管理及分析。

4 结论

本研究以 ASFV p72 蛋白三聚体为检测抗原, 成功制备了基于量子点的 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸, 该试纸操作简单, 样品无需特殊处理, 20 min 内即可完成结果判定。借助便携紫外灯可实现检测结果的裸眼判定, 利用荧光读条仪可实现检测结果的数字化。试纸的检测灵敏度为 1 : 102 400, 优于商业化 ASFV ELISA 检测试剂盒; 试纸不与 PRRSV、PPV、

PCV2、PRV、CSFV 阳性血清及 ASFV 阴性血清反应, 具有良好的特异性; 批内及批间变异系数均小于 15%, 具有较好的重复性; 在室温干燥条件下可稳定保存半年以上; 在临床样本检测中与商业化 ASFV 检测试剂盒的符合率为 92.92%, 可以用于猪场的现场诊断。因此本研究制备的 ASFV 抗体荧光免疫层析试纸检测性能良好, 可以满足商业化需求, 为基层 ASFV 抗体的现场快速检测提供技术手段。

参考文献:

- [1] 张军杰, 郭小勇, 宋庆庆, 等. 非洲猪瘟 (综述) [J]. 国外畜牧学 (猪与禽), 2019, 39 (8): 10-12.
- [2] 王清华, 任炜杰, 包静月, 等. 我国首例非洲猪瘟的确诊 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35 (9): 1-4.
- [3] 徐志远, 施远国, 陈兵, 等. 非洲猪瘟病毒荧光量子点检测试纸条的研制 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53 (4): 419-425.
- [4] DIXON L K, STAHL K, JORI F, et al. African swine fever epidemiology and control [J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2020, 8: 221-246.
- [5] GALLARDO C, NIETO R, SOLER A, et al. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in eastern European Union countries: how to improve surveillance and control programs [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53 (8): 2555-2565.
- [6] WANG A, JIA R, LIU Y, et al. Development of a novel quantitative real-time PCR assay with lyophilized powder reagent to detect African swine fever virus in blood samples of domestic pigs in China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67 (1): 284-297.
- [7] ZHAO H, REN J, WU S, et al. HRP-conjugated-nanobody-based eELISA for rapid and sensitive clinical detection of ASFV antibodies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106 (11): 4269-4285.
- [8] 刘俊, 杨作丰, 郭洪军, 等. 部分规模猪场传播媒介非洲猪瘟病毒检测分析 [J]. 中国动物检疫, 2023, 40 (6): 20-24.
- [9] BELTRÁN-ALCRUDO D, ARIAS M, GALLARDO C, et al. African swine fever: detection and diagnosis: a manual for veterinarians [M] //FAO Animal Production and Health Manual. Rome: Food and Agriculture Organization of the united nations, 2017: 1119-1810.
- [10] LIU S, LUO Y, WANG Y, et al. Cryo-EM structure of the African swine fever virus [J]. Cell Host Microbe, 2019, 26 (6): 836-843.
- [11] OURA C A L, EDWARDS L, BATTEN C A. Virological diagnosis of African swine fever: comparative study of available tests [J]. Virus Research, 2013, 173 (1): 150-158.
- [12] LIU Q, MA B, QIAN N, et al. Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72 [J]. Cell Research, 2019, 29 (11): 953-955.
- [13] SHANG Y, CAI S, YE Q, et al. Quantum dot nanobeads-labelled lateral flow immunoassay strip for rapid and sensitive detection of

- Salmonella* Typhimurium based on strand displacement loop - mediated isothermal amplification [J]. *Engineering*, 2022, 19: 62-70.
- [14] LI J, BAI Y, LI F, et al. Rapid and ultra-sensitive detection of African swine fever virus antibody on site using QDM based-ASFV immunosensor (QAIS) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1189: 339187.
- [15] 张改平, 刘庆堂, 邓瑞广, 等. 磺胺二甲基嘧啶残留快速检测阻断 ELISA 试剂盒的研制及其性能测定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31 (1): 51-55.
- [16] ZHU Y, SHAO N, CHEN J, et al. Multiplex and visual detection of African swine fever virus (ASFV) based on Hive-Chip and direct loop - mediated isothermal amplification [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1140: 30-40.
- [17] LI C, HE X, YANG Y, et al. Rapid and visual detection of African swine fever virus antibody by using fluorescent immunochromatography test strip [J]. *Talanta*, 2020, 219: 121284.
- [18] ZHU W, MENG K, ZHANG Y, et al. Lateral flow assay for the detection of African swine fever virus antibodies using gold nanoparticle-labeled acid - treated p72 [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 9: 804981.
- [19] 李鹏宇, 张蕾, 董春娜, 等. 非洲猪瘟抗体胶体金免疫层析检测方法的建立及评价 [J]. *病毒学报*, 2023, 39 (6): 1-5.
- [20] 高学慧. 金黄色葡萄球菌 (ATCC6538) 蛋白 A 基因的克隆及应用研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [21] SHPIGEL E, GOLDLUST A, ESHEL A, et al. Expression, purification and applications of staphylococcal protein A fused to cellulose-binding domain [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2011, 31 (3): 197-203.
- [22] 杨娅林, 陆彦蓉, 殷晓阳, 等. 基于纳米材料的免疫层析试纸在兽药残留检测中的应用 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56 (10): 60-68.
- [23] HUANG Z, HU S, XIONG Y, et al. Application and development of superparamagnetic nanoparticles in sample pretreatment and immunochromatographic assay [J]. *TrAC: Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 114: 151-170.
- [24] 谢青云, 易玮婕, 李嘉豪, 等. 适合早期诊断的非洲猪瘟 sIgA 抗体量子点免疫层析检测方法建立 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (10): 1-14.
- [25] BAO M, JENSEN E, CHANG Y, et al. Magnetic bead-quantum dot (MB-Qdot) clustered regularly interspaced short palindromic repeat assay for simple viral DNA detection [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12 (39): 43435-43443.
- [26] NOROUZI M, ZAREI GHOBADI M, GOLMIMI M, et al. Quantum dot-based biosensor for the detection of human T-lymphotropic virus-1 [J]. *Analytical Letters*, 2017, 50 (15): 2402-2411.