



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102375060 A

(43) 申请公布日 2012.03.14

(21) 申请号 201010257697.2

(22) 申请日 2010.08.19

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号五所

(72) 发明人 周蕾 王浩然 郭兆彪 杨瑞馥

(74) 专利代理机构 北京太兆天元知识产权代理有限公司 11108

代理人 张韬

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 11 页 附图 6 页

(54) 发明名称

一种基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘

(57) 摘要

本发明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘通过 UCP 颗粒与十通道免疫层析试纸盘的结合使得一次加样即可实现十种靶标的检测,实现了高通量的现场快速定量检测。而具有极强兼容性的样品处理液则保证了检测结果的特异性与敏感性。最终为食源性病原体的现场检测、监测提供了有效的技术手段,有助于食源性疾病的预防与控制。

1. 一种基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘:其特征在于该试纸盘的结构组成为:

试纸盘由上盖 [1] 与底壳 [2] 构成(如附图 2 所示),底壳 [2] 中均匀放置有针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌 O1 群和霍乱弧菌 O139 群十种食源性致病菌的十种单靶标检测试纸 [3],每种单靶标检测试纸 [3] 针对一种食源性致病菌的特异性检测;试纸盘内十种单靶标检测试纸 [3] 上放置有引流片 [4],引流片 [4] 将上盖 [1] 的加样孔 [5] 与十种单靶标检测试纸 [3] 的样品垫 [6] 相互连通,保证液体样品在十种单靶标检测试纸 [3] 之间分配的均匀性;装配完整的试纸盘中,加样孔 [5] 对应于引流片 [4],结果扫描窗 [7] 对应于分析膜 [8],终点指示窗 [9] 对应于吸水垫 [10]。

2. 如权利要求 1 所述的食源性致病菌检测试纸盘,其特征在于其中单靶标检测试纸 [3] 的结构组成为:样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8]、吸水垫 [10] 和粘性底衬 [12]。

3. 如权利要求 2 所述的食源性致病菌检测试纸盘,其特征在于其中样品垫 [6] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:吸水纸、纤维素膜、玻璃纤维、无纺布或滤血膜。

4. 如权利要求 2 所述的食源性致病菌检测试纸盘,其特征在于其中结合垫 [11] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:玻璃纤维、聚酯膜或无纺布;结合垫 [11] 中固定有 UCP 结合物 [13];UCP 结合物 [13] 由作为示踪物的 UCP 颗粒 [14] 以及作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 结合而成。

5. 如权利要求 2 所述的食源性致病菌检测试纸盘,其特征在于其中分析膜 [8] 是微观结构均匀的物质:硝酸纤维素膜或尼龙膜;其中,分析膜 [8] 上设置有检测带 T[16] 与质控带 C[17];检测带 T[16] 为某靶标特异性抗体 B[18],质控带 C[17] 为某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19];检测带 T[16] 上的某靶标特异性抗体 B[18] 作为固相探针与 UCP 结合物 [13] 上作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 可构成双抗体夹心模式对某靶标进行特异性的检测,而质控带 C[17] 可与 UCP 结合物 [13] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常。

6. 如权利要求 2 所述的食源性致病菌检测试纸盘,其特征在于其中吸水垫 [10] 是具有较大床体积的物质:吸水纸或纤维素膜。

7. 如权利要求 2 所述的食源性致病菌检测试纸盘,其特征在于其中粘性底衬 [12] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC 板,其可使样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 以及吸水垫 [10] 按照适当的重叠关系粘贴固定,从而保证液体在单靶标检测试纸内部流动的连续性。

8. 如权利要求 4 所述的食源性致病检测试纸盘,其特征在于其中 UCP 颗粒 [14] 可通过上转换发光现象对样品中某种靶标 [20] 的存在与否以及浓度予以指示。

9. 如权利要求 5 所述的食源性致病检测试纸盘,其特征在于其中某靶标特异性抗体 A[15] 与某靶标特异性抗体 B[18],可为单抗也可为多抗,可相同也可不同。

10. 如权利要求 1-9 任一所述的食源性致病检测试纸盘的制备方法,其特征在于该方法为:

A. 结合垫 [11] 制备:将针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌 O1 群和霍乱弧菌 O139 群十种食源性致病菌的十种 UCP 结合物 [13] 分别制备各自

的结合垫,制备方法相同,均为:将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 用结合物稀释液稀释至终浓度为 0.5-3mg/ml,结合物稀释液为 pH = 7.20.03M PB 含 1-10% BSA、0.5-10%海藻糖、0.5-10%蔗糖和 0.1-1% Tween20,将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 加于可作为结合垫 [11] 的玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,于 37-50°C 下 30min-3h,烘干备用;

B. 分析膜 [8] 制备:针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的分析膜,制备方法相同,均为:将 1-2mg/ml 某靶标特异性抗体 B[18]、1-2mg/ml 某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 喷点于可作为分析膜的硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T[16] 和质控带 C[17],于 35-40°C 下 30min-90min,烘干备用;

C. 单靶标检测试纸 [3] 剪切成型:针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的单靶标检测试纸 [3],制备方法相同,均为:将样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 和吸水垫 [10] 依次粘贴于粘性底衬 [12] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 3 所示);将单靶标检测试纸 [3] 剪切为 4mm 宽的成品;

D. 试纸盘装配:将与甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的十种单靶标检测试纸 [3] 置于试纸盘底壳 [2] 上,确保每种试纸位置序号固定可查,将引流片 [4] 置于十种单靶标检测试纸 [3] 上并与样品垫 [6] 重叠,盖上上盖 [1] 即得可对一份样品进行十种靶标检测的成品试纸盘。

11. 如权利要求 10 所述的食源性致病检测试纸盘的制备方法,其特征在于该方法为:

A. 结合垫 [11] 制备:将针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种 UCP 结合物 [13] 分别制备各自的结合垫,制备方法相同,均为:将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 用结合物稀释液稀释至终浓度为 2mg/ml,结合物稀释液为 pH = 7.20.03M PB 含 5% BSA、5%海藻糖、5%蔗糖和 0.5% Tween20,将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 加于可作为结合垫 [11] 的玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,于 40°C 下 2h,烘干备用;

B. 分析膜 [8] 制备:针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的分析膜,制备方法相同,均为:将 1.5mg/ml 某靶标特异性抗体 B[18]、1.5mg/ml 某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 喷点于可作为分析膜的硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T[16] 和质控带 C[17],于 37°C 下 60min,烘干备用;

C. 单靶标检测试纸 [3] 剪切成型:针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的单靶标检测试纸 [3],制备方法相同,均为:将样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 和吸水垫 [10] 依次粘

贴于粘性底衬 [12] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 3 所示);将单靶标检测试纸 [3] 剪切为 4mm 宽的成品;

D. 试纸盘装配:将与甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的十种单靶标检测试纸 [3] 置于试纸盘底壳 [2] 上,确保每种试纸位置序号固定可查,将引流片 [4] 置于十种单靶标检测试纸 [3] 上并与样品垫 [6] 重叠,盖上上盖 [1] 即得可对一份样品进行十种靶标检测的成品试纸盘。

12. 一种食源性致病菌的检测方法,其特征在于在检测过程中采用权利要求 1-9 任一所述的基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘,检测方法为:

A. 样品预处理:水样、食品、粪便样品直接检测或用增菌液增菌 4h-5h 后再进行检测;

B. 样品处理:将 0.5-1.5 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液混合,样品处理液为 0.03-0.3M pH = 7.2PB 含 0.1-0.5M NaCl,0.1-1% SDS,0.1-1% NP40 和 0.1-1% Tween20 的混合液;

C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至权利要求 1-9 任一所述的食源性致病菌检测试纸盘的加样孔 [5] 中;

D. 层析反应:静置 10-20min 待层析反应完成;

E. 结果判读(如附图 4 所示):用上转换发光生物传感器通过试纸盘上的结果扫描窗 [7] 依次对每个通道中试纸的分析膜 [8] 上的检测带 T[16] 与质控带 C[17] 进行扫描分析,每扫描完一个通道即旋转 36 度进行下一个通道的扫描;

定性检测:对某种靶标而言只有质控带 C[17] 有信号产生,则样品为某种靶标阴性;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均有信号产生,则样品为某种靶标阳性;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;某几种靶标检测均为阳性,则说明该样品中同时存在某几种靶标;

定量检测:在某种靶标检测中将检测带 T[16]、质控带 C[17] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T、C, T/C 值即为检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中十种食源性致病菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

13. 如权利要求 12 所述的食源性致病菌的检测方法,其特征在于检测方法为:

A. 样品预处理:水样、食品、粪便样品直接检测或用增菌液增菌 4.5h 后再进行检测;

B. 样品处理:将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液混合,样品处理液为 0.1M pH = 7.2PB 含 0.2M NaCl,0.1% SDS,0.3% NP40,0.2% Tween20 的混合液;

C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至权利要求 1-9 任一所述的食源性致病菌检测试纸盘的加样孔 [5] 中;

D. 层析反应:静置 15min 待层析反应完成;

E. 结果判读(如附图 4 所示):用上转换发光生物传感器通过试纸盘上的结果扫描窗 [7] 依次对每个通道中试纸的分析膜 [8] 上的检测带 T[16] 与质控带 C[17] 进行扫描分析,每扫描完一个通道即旋转 36 度进行下一个通道的扫描;

定性检测:对某种靶标而言只有质控带 C[17] 有信号产生,则样品为某种靶标阴性;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均有信号产生,则样品为某种靶标阳性;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;某几种靶标检测均

为阳性,则说明该样品中同时存在某几种靶标;

定量检测:在某种靶标检测中将检测带 T[16]、质控带 C[17] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T、C, T/C 值即为检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中十种食源性致病菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

一种基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测 试纸盘

发明领域

[0001] 本发明涉及一种基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘,其可经一次加样即完成样品中十种食源性致病菌的定性定量检测。

背景技术

[0002] 食品安全已成为全球重要的公共卫生问题,食源性疾病是食品安全的主要问题,世界卫生组织将食源性疾病定义为:“凡是通过摄食进入人体的,使人体患感染性或中毒性的疾病。”这里包括了由食品微生物污染和化学性物质引起的食源性疾病。而微生物引起的食源性疾病是食品安全的主要问题。世界卫生组织 2002 年 3 月公布,全球每年因食源性微生物污染引起的腹泻病例达到数十亿,死亡的 0-15 岁儿童约 170 万。在发达国家至少有 1/3 的人患食源性疾病,在食源性疾病上花费达数十亿美元。近年来,在国外食源性疾病事件频频发生,如英国的疯牛病,日本的出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 和雪印牛奶的葡萄球菌肠毒素中毒暴发,法国的李斯特氏菌中毒等。在我国尽管沙门氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌引起的食物中毒仍占主要位置,但近年来其它新的病原菌如出血性大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌等引起的食物中毒报道呈上升趋势。1999 年苏皖等地引起的 O157:H7 大规模暴发流行,急性肾功能衰竭患者 195 人,死亡人数 177 人,病死率为 90.8%。

[0003] 快速高效的对水源、食品以及食品加工、贩售环境中的食源性致病菌进行检测与监测是降低食源性疾病的关键环节。食源性致病菌检测与常规病原体检测的突出区别在于食源性致病菌种类繁多,因而监测时无法针对性检测只能大范围筛查。如对人致病的沙门氏菌就包括甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌等十数种,此外还有霍乱弧菌、大肠杆菌、副溶血弧菌等等不一而足,而监测样品与环境中可能含有其中的任何一种或任何一种。传统的单靶标检测技术,无论是核酸检测还是免疫检测,均需对一份样品重复多次操作,方可完成多靶标的一一检测,这样不仅增加监测的繁冗费时费力,且极易出现人工错误、延长检测时间、现场可操作性差。若一次加样即可实现多靶标的同步检测,则可在最大程度上预防以及控制食源性疾病的发生。

[0004] 十通道免疫层析试纸盘是基于免疫层析技术的高通量检测方法,其利用试纸盘的独特内部设计使得样品在各通道内试纸之间的均匀分配以及后续的同步层析得以实现,由此将免疫层析的快速便捷与高通量得以融合(见附图 1)。然而,传统免疫层析中所使用的胶体金、染料等颜色示踪物则由于敏感性低、稳定性差、无法定量等缺陷限制了这一技术的发展。上转换发光材料(Up-Converting Phosphor, UCP)的出现弥补了这一不足。UCP 颗粒是一种稀土金属的杂合晶体颗粒,其由于独特的化学组成以及物理结构,因而具有了自然界中独一无二的上转换发光现象,即其可由低能的红外光激发发射高能的可见光。这一上转换发光的特性使 UCP 颗粒作为免疫层析的示踪物可抵抗样品的荧光背景干扰,因而保

证了检测的敏感性、稳定性与特异性。此外,以光学信号取代颜色变化作为结果的指征,使得基于 UCP 颗粒的免疫层析可实现精确定量。若能将 UCP 颗粒与十通道免疫层析试纸盘相结合则可实现高通量的现场快速定量检测。

[0005] 发明技术

[0006] 本发明目的在于公开一种基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘,其可克服在先技术无法实现食源性致病菌的高通量现场检测以及传统免疫层析技术敏感性低、稳定性差、不可定量的问题,将 UCP 颗粒作为示踪物与十通道免疫层析试纸盘相结合,最终实现了高通量的现场快速定量检测。

[0007] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的结构组成为:

[0008] 试纸盘由上盖 [1] 与底壳 [2] 构成(如附图 2 所示),底壳 [2] 中均匀放置有针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌 O1 群和霍乱弧菌 O139 群十种食源性致病菌的十种单靶标检测试纸 [3],每种单靶标检测试纸 [3] 针对一种食源性致病菌的特异性检测;试纸盘内十种单靶标检测试纸 [3] 上放置有引流片 [4],引流片 [4] 将上盖 [1] 的加样孔 [5] 与十种单靶标检测试纸 [3] 的样品垫 [6] 相互连通,保证液体样品在十种单靶标检测试纸 [3] 之间分配的均匀性;装配完整的试纸盘中,加样孔 [5] 对应于引流片 [4],结果扫描窗 [7] 对应于分析膜 [8],终点指示窗 [9] 对应于吸水垫 [10]。

[0009] 单靶标检测试纸的结构组成为:样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8]、吸水垫 [10] 和粘性底衬 [12]。

[0010] 其中,样品垫 [6] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:吸水纸、纤维素膜、玻璃纤维、无纺布或滤血膜。

[0011] 其中,结合垫 [11] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:玻璃纤维、聚酯膜或无纺布;结合垫 [11] 中固定有 UCP 结合物 [13];UCP 结合物 [13] 由作为示踪物的 UCP 颗粒 [14] 以及作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 结合而成。

[0012] 其中,分析膜 [8] 是微观结构均匀的物质:硝酸纤维素膜或尼龙膜;其中,分析膜 [8] 上设置有检测带 T[16] 与质控带 C[17];检测带 T[16] 为某靶标特异性抗体 B[18],质控带 C[17] 为某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19];检测带 T[16] 上的某靶标特异性抗体 B[18] 作为固相探针与 UCP 结合物 [13] 上作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 可构成双抗体夹心模式对某靶标进行特异性的检测,而质控带 C[17] 可与 UCP 结合物 [13] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常。

[0013] 其中,吸水垫 [10] 是具有较大床体积的物质:吸水纸或纤维素膜。

[0014] 其中,粘性底衬 [12] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC 板,其可使样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 以及吸水垫 [10] 按照适当的重叠关系粘贴固定,从而保证液体在单靶标检测试纸内部流动的连续性。

[0015] 其中,UCP 颗粒 [14] 可通过上转换发光现象对样品中某种靶标 [20] 的存在与否以及浓度予以指示。

[0016] 其中,某靶标特异性抗体 A[15] 与某靶标特异性抗体 B[18],可为单抗也可为多抗,可相同也可不同。

[0017] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的制备方法为:

[0018] A. 结合垫 [11] 制备 : 将针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种 UCP 结合物 [13] 分别制备各自的结合垫, 制备方法相同, 均为 : 将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 用结合物稀释液稀释至终浓度为 0.5-3mg/ml, 结合物稀释液为 pH = 7.20.03M PB 含 1-10% BSA、0.5-10% 海藻糖、0.5-10% 蔗糖和 0.1-1% Tween20, 将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 加于可作为结合垫 [11] 的玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上, 于 37-50°C 下 30min-3h, 烘干备用 ;

[0019] B. 分析膜 [8] 制备 : 针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的分析膜, 制备方法相同, 均为 : 将 1-2mg/ml 某靶标特异性抗体 B [18]、1-2mg/ml 某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 喷点于可作为分析膜的硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T [16] 和质控带 C [17], 于 35-40°C 下 30min-90min, 烘干备用 ;

[0020] C. 单靶标检测试纸 [3] 剪切成型 : 针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的单靶标检测试纸 [3], 制备方法相同, 均为 : 将样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 和吸水垫 [10] 依次粘贴于粘性底衬 [12] 上, 确保相互之间的重叠关系 (如附图 3 所示); 将单靶标检测试纸 [3] 剪切为 4mm 宽的成品 ;

[0021] D. 试纸盘装配 : 将与甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的十种单靶标检测试纸 [3] 置于试纸盘底壳 [2] 上, 确保每种试纸位置序号固定可查, 将引流片 [4] 置于十种单靶标检测试纸 [3] 上并与样品垫 [6] 重叠, 盖上上盖 [1] 即得本发明可对一份样品进行十种靶标检测的成品试纸盘。

[0022] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的制备方法优选为 :

[0023] A. 结合垫 [11] 制备 : 将针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种 UCP 结合物 [13] 分别制备各自的结合垫, 制备方法相同, 均为 : 将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 用结合物稀释液稀释至终浓度为 2mg/ml, 结合物稀释液为 pH = 7.20.03M PB 含 5% BSA、5% 海藻糖、5% 蔗糖和 0.5% Tween20, 将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 加于可作为结合垫 [11] 的玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上, 于 40°C 下 2h, 烘干备用 ;

[0024] B. 分析膜 [8] 制备 : 针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的分析膜, 制备方法相同, 均为 : 将 1.5mg/ml 某靶标特异性抗体 B [18]、1.5mg/ml 某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 喷点于可作为分析膜的硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T [16] 和质控带 C [17], 于 37°C 下 60min, 烘干备用 ;

[0025] C. 单靶标检测试纸 [3] 剪切成型 : 针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的单靶标检测试纸 [3], 制备方法相同, 均为 : 将样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 和吸水垫 [10] 依次粘贴于粘性底衬 [12] 上, 确保相互之间的重叠关系 (如附图 3 所示); 将单靶标检测试纸 [3] 剪切为 4mm 宽的成品;

[0026] D. 试纸盘装配 : 将与甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的十种单靶标检测试纸 [3] 置于试纸盘底壳 [2] 上, 确保每种试纸位置序号固定可查, 将引流片 [4] 置于十种单靶标检测试纸 [3] 上并与样品垫 [6] 重叠, 盖上上盖 [1] 即得本发明可对一份样品进行十种靶标检测的成品试纸盘。

[0027] 一种用食源性致病菌检测试纸盘检测食源性致病菌的方法 :

[0028] A. 样品预处理 : 水样、食品、粪便样品直接检测或用增菌液增菌 4h-5h 后再进行检测 ;

[0029] B. 样品处理 : 将 0.5-1.5 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液混合, 样品处理液为 0.03-0.3M pH = 7.2PB 含 0.1-0.5M NaCl, 0.1-1% SDS, 0.1-1% NP40 和 0.1-1% Tween20 的混合液 ;

[0030] C. 添加样品 : 将处理后的液体样品滴加至本发明食源性致病菌检测试纸盘的加样孔 [5] 中 ;

[0031] D. 层析反应 : 静置 10-20min 待层析反应完成 ;

[0032] E. 结果判读 (如附图 4 所示) : 用上转换发光生物传感器通过试纸盘上的结果扫描窗 [7] 依次对每个通道中试纸的分析膜 [8] 上的检测带 T[16] 与质控带 C[17] 进行扫描分析, 每扫描完一个通道即旋转 36 度进行下一个通道的扫描 ;

[0033] 定性检测 : 对某种靶标而言只有质控带 C[17] 有信号产生, 则样品为某种靶标阴性 ; 若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均有信号产生, 则样品为某种靶标阳性 ; 若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均无信号产生, 则层析系统异常检测失败, 需进行再次检测 ; 某几种靶标检测均为阳性, 则说明该样品中同时存在某几种靶标 ;

[0034] 定量检测 : 在某种靶标检测中将检测带 T[12]、质控带 C[17] 的信号强度 (即峰面积) 依次赋值于 T、C, T/C 值即为检测值, 经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后, 通过任意样品的检测值即可获得该样品中十种食源性致病菌的有无及具体浓度, 从而实现定量检测。

[0035] 一种用食源性致病菌检测试纸盘检测食源性致病菌的方法优选为 :

[0036] A. 样品预处理 : 水样、食品、粪便样品直接检测或用增菌液增菌 4.5h 后再进行检测 ;

[0037] B. 样品处理 : 将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液混合, 样品处理液为 0.1M pH = 7.2PB 含 0.2M NaCl, 0.1% SDS, 0.3% NP40, 0.2% Tween20 的混合液 ;

[0038] C. 添加样品 : 将处理后的液体样品滴加至本发明食源性致病菌检测试纸盘的加样孔 [5] 中 ;

[0039] D. 层析反应 :静置 15min 待层析反应完成 ;

[0040] E. 结果判读 (如附图 4 所示) :用上转换发光生物传感器通过试纸盘上的结果扫描窗 [7] 依次对每个通道中试纸的分析膜 [8] 上的检测带 T[16] 与质控带 C[17] 进行扫描分析,每扫描完一个通道即旋转 36 度进行下一个通道的扫描 ;

[0041] 定性检测 :对某种靶标而言只有质控带 C[17] 有信号产生,则样品为某种靶标阴性 ;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均有信号产生,则样品为某种靶标阳性 ;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测 ;某几种靶标检测均为阳性,则说明该样品中同时存在某几种靶标 ;

[0042] 定量检测 :在某种靶标检测中将检测带 T[12]、质控带 C[17] 的信号强度 (即峰面积) 依次赋值于 T、C, T/C 值即为检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中十种食源性致病菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

[0043] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的检测原理为 (如附图 5 所示) :

[0044] 检测中将液体样品添加至试纸盘的加样孔 [5] 中,加样孔 [5] 下连通的引流片 [4] 将液体样品均匀分配至甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群、霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的每个单靶标检测试纸 [3] 的样品垫 [6],液体样品自样品垫 [6] 渗透入结合垫 [11] ;在液体样品基质的作用下,结合垫 [11] 中固定的 UCP 结合物 [13] 将重新溶解游离,并同样品一同离开结合垫 [11] 进入分析膜 [8],在毛细作用下,通过检测带 T[16]、质控带 C[17] 向吸水垫 [10] 的方向涌动 ;在这一过程中,检测带 T[16] / 质控带 C[17]、UCP 结合物 [13]、样品中的某靶标 [20] 之间将发生特异性的免疫反应,从而产生可检测的信号 :

[0045] 1、某靶标阴性的样品 (图 5A) :样品中不含有某靶标 [20],因而检测带 T[16] 即作为固相探针的某靶标特异性抗体 B[18] 与 UCP 结合物 [13] 中作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 之间无法发生结合,UCP 结合物 [13] 只能流过检测带 T[16] ;而质控带 C[17] 上的某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 则可与 UCP 结合物 [13] 上的某靶标特异性抗体 A[15] 直接结合,由此通过免疫反应将 UCP 颗粒 [14] 固定于质控带 C[17] 上,从而产生可检测的信号 ;最终,对于某靶标阴性的样品而言,只有质控带 C[17] 上有信号产生 ;

[0046] 2、某靶标阳性的样品 (图 5B) :样品中含有某靶标 [20],因而检测带 T[16] 即作为固相探针的某靶标特异性抗体 B[18] 与 UCP 结合物 [13] 中作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 之间可通过双抗体夹心模式的免疫反应将 UCP 颗粒固定于检测带 T[16] 上,从而产生可检测的信号 ;而质控带 C[17] 上的某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 也可与 UCP 结合物 [13] 上的某靶标特异性抗体 A[15] 直接结合,由此同样通过免疫反应将 UCP 颗粒 [14] 固定于质控带 C[17] 上,进而产生可检测的信号 ;最终,对于某靶标阳性的样品而言,检测带 T[16] 与质控带 C[17] 上均有信号产生。

[0047] 本发明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘通过 UCP 颗粒与十通道免疫层析试纸盘的结合使得一次加样即可实现十种靶标的检测,实现了高通量的现场快速定量检测。而具有极强兼容性的样品处理液则保证了检测结果的特异性与敏感性。最终为食源性病原体的现场检测、监测提供了有效的技术手段,有助于食源性疾病的预

防与控制。

附图说明：

[0048] 图 1 :十通道免疫层析试纸盘

[0049] 图 2 :食源性致病菌检测试纸盘结构图；

[0050] 图 3 :单靶标检测试纸粘帖示意图；

[0051] 图 4 :食源性致病菌检测试纸盘定性定量检测示意图；

[0052] 图 5 :食源性致病菌检测试纸盘检测原理图；

[0053] 图 6 :食源性致病菌检测试纸盘灵敏度与定量能力；

[0054] 图 7 :食源性致病菌检测试纸盘特异性评价。

[0055] 下述实验例和实施例用于进一步说明但不限于本发明。

[0056] 实验例 1 :本发明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘的灵敏度与定量能力评价实验

[0057] 1、标准菌液样品制备：

[0058] (1) 用液体培养基分别培养甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌至对数中期；

[0059] (2) 8000rpm, 5min 离心浓缩；单增李斯特菌不经浓缩直接进行后续操作；

[0060] (3) 平板计数, 确定准确的菌液浓度；

[0061] (4) 用液体培养基将菌浓度分别调至 0cfu/ml (即液体培养基)、 10^4 cfu/ml、 10^5 cfu/ml、 10^6 cfu/ml、 10^7 cfu/ml, 以此作为灵敏度以及定量能力评价的标准品。

[0062] 2、使用本发明实施例 1 制备的基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘对系列浓度标准品进行检测, 操作流程如下：

[0063] (1) 样品处理 :将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0. 1M pH = 7. 2PB 含 0. 2M NaCl, 0. 1% SDS, 0. 3% NP40, 0. 2% Tween20) 混合；

[0064] (2) 添加样品 :将处理后的液体样品滴加 1000 μ l 至试纸盘的加样孔中上, 每个样品重复检测 3 次；

[0065] (3) 层析反应 :静置 15min 待层析反应完成；

[0066] (4) 结果判读 :用上转换发光生物传感器对试纸盘进行扫描, 检测结果以 T1/C1—T10/C10 值表示；

[0067] 3、实验结果：

[0068] 实验结果如附图 6 所示：

[0069] (1) 判定值的确定 :以空白样品 (液体培养基) 三次检测值 T/C 的均值 +3 倍标准差 ($\bar{x} + 3SD$) 作为判定值, 十种单靶标检测试纸的判定值均为 0. 3, T/C 大于 0. 3 则为某种靶标阳性, T/C 小于 0. 3 则为某种靶标阴性；

[0070] (2) 灵敏度评价 :十种食源性致病菌 10^4 cfu/ml 时的 T/C 值均大于 0. 3, 因而基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群、霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的检测灵敏度均

可达到 10^4 cfu/ml ;

[0071] (3) 定量能力评价 :以 T/C 值作为 x,以 LOG(cfu/ml) 作为 y,绘制标准定量曲线并经统计拟合,即可获得十种食源性致病菌各自对应的定量拟合公式,其拟合决定系数 R^2 为 0.9384-0.9974,由此说明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘具有较为准确的定量能力,最终检测时将某样品的 T1/C1-T10/C10 依次带入十个定量公式,即可确定某份样品中十种食源性致病菌的有无以及具体浓度 ;

[0072] 实验例 2 :本发明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘的特异性

[0073] 评价实验

[0074] 1、标准菌液样品制备 :

[0075] (1) 用液体培养基分别培养甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌至对数中期 ;

[0076] (2)8000rpm,5min 离心浓缩 ;单增李斯特菌不经浓缩直接进行后续操作 ;

[0077] (3) 平板计数,确定准确的菌液浓度 ;

[0078] (4) 用液体培养基将菌浓度分别调至 0cfu/ml (即液体培养基)、 10^4 cfu/ml、 10^5 cfu/ml、 10^6 cfu/ml、 10^7 cfu/ml,以此作为特异性评价的标准品 ;

[0079] 2、使用本发明实施例 1 制备的基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘对系列浓度标准品进行检测,操作流程如下 :

[0080] (1) 样品处理 :将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0.1M pH = 7.2PB 含 0.2M NaCl,0.1% SDS,0.3% NP40,0.2% Tween20) 混合 ;

[0081] (2) 添加样品 :将处理后的液体样品滴加 1000 μ l 至试纸盘的加样孔中上 ;

[0082] (3) 层析反应 :静置 15min 待层析反应完成 ;

[0083] (4) 结果判读 :用上转换发光生物传感器对试纸盘进行扫描,检测结果以 T1/C1--T10/C10 值表示 ;

[0084] 3、实验结果 :

[0085] 实验结果如附图 7 所示,本发明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘各检测指标特异性良好,不存在非特异交叉的干扰。

[0086] 下述实施例均能实现上述实验例所述的效果。

具体实施方式

[0087] 实施例 1 :本发明食源性致病菌检测试纸盘的制备

[0088] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的结构组成为 :

[0089] 试纸盘由上盖 [1] 与底壳 [2] 构成 (如附图 2 所示),底壳 [2] 中均匀放置有针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种单靶标检测试纸 [3],每种单靶标检测试纸 [3] 针对一种食源性致病菌的特异性检测 ;试纸盘内十种单靶标检测试纸 [3] 上放置有引流片 [4],引流片 [4] 将上盖 [1] 的加样孔 [5] 与十种单靶标检测试纸 [3] 的样品垫 [6] 相互连通,保证液体样品

在十种单靶标检测试纸 [3] 之间分配的均匀性 ; 装配完整的试纸盘中, 加样孔 [5] 对应于引流片 [4], 结果扫描窗 [7] 对应于分析膜 [8], 终点指示窗 [9] 对应于吸水垫 [10]。

[0090] 单靶标检测试纸的结构组成为 : 样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8]、吸水垫 [10] 和粘性底衬 [12]。

[0091] 其中, 样品垫 [6] 是吸水纸。

[0092] 其中, 结合垫 [11] 是玻璃纤维 ; 结合垫 [11] 中固定有 UCP 结合物 [13] ; UCP 结合物 [13] 由作为示踪物的 UCP 颗粒 [14] 以及作为液相探针的某靶标特异性抗体 A [15] 结合而成。

[0093] 其中, 分析膜 [8] 是硝酸纤维素膜 ; 其中, 分析膜 [8] 上设置有检测带 T [16] 与质控带 C [17] ; 检测带 T [16] 为某靶标特异性抗体 B [18], 质控带 C [17] 为某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] ; 检测带 T [16] 上的某靶标特异性抗体 B [18] 作为固相探针与 UCP 结合物 [13] 上作为液相探针的某靶标特异性抗体 A [15] 可构成双抗体夹心模式对某靶标进行特异性的检测, 而质控带 C [17] 可与 UCP 结合物 [13] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常 ;

[0094] 其中, 吸水垫 [10] 是吸水纸。

[0095] 其中, 粘性底衬 [12] 是 PVC 板, 其可使样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 以及吸水垫 [10] 按照适当的重叠关系粘贴固定, 从而保证液体在单靶标检测试纸内部流动的连续性。

[0096] 其中, UCP 颗粒 [14] 通过上转换发光现象对样品中某种靶标 [20] 的存在与否以及浓度予以指示。

[0097] 其中, 某靶标特异性抗体 A [15] 与某靶标特异性抗体 B [18], 可为单抗也可为多抗, 可相同也可不同。

[0098] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的制备方法为 :

[0099] A. 结合垫 [11] 制备 : 将针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种 UCP 结合物 [13] 分别制备各自的结合垫, 制备方法相同, 均为 : 将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 用结合物稀释液稀释至终浓度为 2mg/ml, 结合物稀释液为 pH = 7. 20. 03M PB 含 5% BSA、5% 海藻糖、5% 蔗糖和 0. 5% Tween20, 将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 加于可作为结合垫 [11] 的玻璃纤维上, 于 40°C 下 2h, 烘干备用 ;

[0100] B. 分析膜 [8] 制备 : 针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的分析膜, 制备方法相同, 均为 : 将 1. 5mg/ml 某靶标特异性抗体 B [18]、1. 5mg/ml 某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 喷点于可作为分析膜的硝酸纤维素膜上分别作为检测带 T [16] 和质控带 C [17], 于 37°C 下 60min, 烘干备用 ;

[0101] C. 单靶标检测试纸 [3] 剪切成型 : 针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的单靶标检测试纸 [3], 制备方法相同, 均为 : 将样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 和吸水垫 [10]

依次粘贴于粘性底衬 [12] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 3 所示);将单靶标检测试纸 [3] 剪切为 4mm 宽的成品;

[0102] D. 试纸盘装配:将与甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的十种单靶标检测试纸 [3] 置于试纸盘底壳 [2] 上,确保每种试纸位置序号固定可查,将引流片 [4] 置于十种单靶标检测试纸 [3] 上并与样品垫 [6] 重叠,盖上上盖 [1] 即得本发明可对一份样品进行十种靶标检测的成品试纸盘。

[0103] 实施例 2:用实施例 1 方法制备的本发明食源性致病菌检测试纸盘检测食源性致病菌的方法(如图 4 所示):

[0104] A. 样品预处理:水样、食品、粪便样品用增菌液增菌 4.5h 后再进行检测;

[0105] B. 样品处理:将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液混合,样品处理液为 0.1M pH = 7.2PB 含 0.2M NaCl,0.1% SDS,0.3% NP40,0.2% Tween20 的混合液;

[0106] C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至本发明实施例 1 制备的食源性致病菌检测试纸盘的加样孔 [5] 中;

[0107] D. 层析反应:静置 15min 待层析反应完成;

[0108] E. 结果判读(如附图 4 所示):用上转换发光生物传感器通过试纸盘上的结果扫描窗 [7] 依次对每个通道中试纸的分析膜 [8] 上的检测带 T[16] 与质控带 C[17] 进行扫描分析,每扫描完一个通道即旋转 36 度进行下一个通道的扫描;

[0109] 定性检测:对某种靶标而言只有质控带 C[17] 有信号产生,则样品为某种靶标阴性;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均有信号产生,则样品为某种靶标阳性;若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;某几种靶标检测均为阳性,则说明该样品中同时存在某几种靶标;

[0110] 定量检测:在某种靶标检测中将检测带 T[12]、质控带 C[17] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T、C, T/C 值即为检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中十种食源性致病菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

[0111] 实施例 3:本发明食源性致病菌检测试纸盘的制备

[0112] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的结构组成为:

[0113] 试纸盘由上盖 [1] 与底壳 [2] 构成(如附图 2 所示),底壳 [2] 中均匀放置有针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种单靶标检测试纸 [3],每种单靶标检测试纸 [3] 针对一种食源性致病菌的特异性检测;试纸盘内十种单靶标检测试纸 [3] 上放置有引流片 [4],引流片 [4] 将上盖 [1] 的加样孔 [5] 与十种单靶标检测试纸 [3] 的样品垫 [6] 相互连通,保证液体样品在十种单靶标检测试纸 [3] 之间分配的均匀性;装配完整的试纸盘中,加样孔 [5] 对应于引流片 [4],结果扫描窗 [7] 对应于分析膜 [8],终点指示窗 [9] 对应于吸水垫 [10]。

[0114] 单靶标检测试纸的结构组成为:样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8]、吸水垫 [10] 和粘性底衬 [12]。

[0115] 其中,样品垫 [6] 是纤维素膜。

[0116] 其中,结合垫 [11] 是聚酯膜;结合垫 [11] 中固定有 UCP 结合物 [13];UCP 结合物 [13] 由作为示踪物的 UCP 颗粒 [14] 以及作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 结合而成。

[0117] 其中,分析膜 [8] 是尼龙膜;其中,分析膜 [8] 上设置有检测带 T[16] 与质控带 C[17];检测带 T[16] 为某靶标特异性抗体 B[18],质控带 C[17] 为某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19];检测带 T[16] 上的某靶标特异性抗体 B[18] 作为固相探针与 UCP 结合物 [13] 上作为液相探针的某靶标特异性抗体 A[15] 可构成双抗体夹心模式对某靶标进行特异性的检测,而质控带 C[17] 可与 UCP 结合物 [13] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常;

[0118] 其中,吸水垫 [10] 是纤维素膜。

[0119] 其中,粘性底衬 [12] 是 PVC 板,其可使样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 以及吸水垫 [10] 按照适当的重叠关系粘贴固定,从而保证液体在单靶标检测试纸内部流动的连续性。

[0120] 其中,UCP 颗粒 [14] 通过上转换发光现象对样品中某种靶标 [20] 的存在与否以及浓度予以指示。

[0121] 其中,某靶标特异性抗体 A[15] 与某靶标特异性抗体 B[18],可为单抗也可为多抗,可相同也可不同。

[0122] 本发明食源性致病菌检测试纸盘的制备方法为:

[0123] A. 结合垫 [11] 制备:将针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌的十种 UCP 结合物 [13] 分别制备各自的结合垫,制备方法相同,均为:将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 用结合物稀释液稀释至终浓度为 2.5mg/ml,结合物稀释液为 pH = 7.20.03M PB 含 2% BSA、2%海藻糖、8%蔗糖和 0.8% Tween20,将某种靶标的 UCP 结合物 [13] 加于可作为结合垫 [11] 的聚酯膜上,于 45℃下 1h,烘干备用;

[0124] B. 分析膜 [8] 制备:针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的分析膜,制备方法相同,均为:将 1.8mg/ml 某靶标特异性抗体 B[18]、1.2mg/ml 某靶标特异性抗体 A 的二抗 [19] 喷点于可作为分析膜的尼龙膜上分别作为检测带 T[16] 和质控带 C[17],于 40℃下 30min,烘干备用;

[0125] C. 单靶标检测试纸 [3] 剪切成型:针对甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌分别制备各自的单靶标检测试纸 [3],制备方法相同,均为:将样品垫 [6]、结合垫 [11]、分析膜 [8] 和吸水垫 [10] 依次粘贴于粘性底衬 [12] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 3 所示);将单靶标检测试纸 [3] 剪切为 4mm 宽的成品;

[0126] D. 试纸盘装配:将与甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 0157、霍乱

弧菌 01 群和霍乱弧菌 0139 群十种食源性致病菌对应的十种单靶标检测试纸 [3] 置于试纸盘底壳 [2] 上, 确保每种试纸位置序号固定可查, 将引流片 [4] 置于十种单靶标检测试纸 [3] 上并与样品垫 [6] 重叠, 盖上上盖 [1] 即得本发明可对一份样品进行十种靶标检测的成品试纸盘。

[0127] 实施例 4: 用实施例 3 方法制备的本发明食源性致病菌检测试纸盘检测食源性致病菌的方法 (如附图 4 所示):

[0128] A. 样品预处理: 取水样、食品、粪便样品直接检测;

[0129] B. 样品处理: 将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液混合, 样品处理液为 0.2M pH = 7.2PB 含 0.3M NaCl, 0.5% SDS, 0.5% NP40 和 0.5% Tween20 的混合液;

[0130] C. 添加样品: 将处理后的液体样品滴加至本发明实施例 3 制备的食源性致病菌检测试纸盘的加样孔 [5] 中;

[0131] D. 层析反应: 静置 15min 待层析反应完成;

[0132] E. 结果判读 (如附图 4 所示): 用上转换发光生物传感器通过试纸盘上的结果扫描窗 [7] 依次对每个通道中试纸的分析膜 [8] 上的检测带 T[16] 与质控带 C[17] 进行扫描分析, 每扫描完一个通道即旋转 36 度进行下一个通道的扫描;

[0133] 定性检测: 对某种靶标而言只有质控带 C[17] 有信号产生, 则样品为某种靶标阴性; 若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均有信号产生, 则样品为某种靶标阳性; 若检测带 T[16] 与质控带 C[17] 均无信号产生, 则层析系统异常检测失败, 需进行再次检测; 某几种靶标检测均为阳性, 则说明该样品中同时存在某几种靶标;

[0134] 定量检测: 在某种靶标检测中将检测带 T[12]、质控带 C[17] 的信号强度 (即峰面积) 依次赋值于 T、C, T/C 值即为检测值, 经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后, 通过任意样品的检测值即可获得该样品中十种食源性致病菌的有无及具体浓度, 从而实现定量检测。

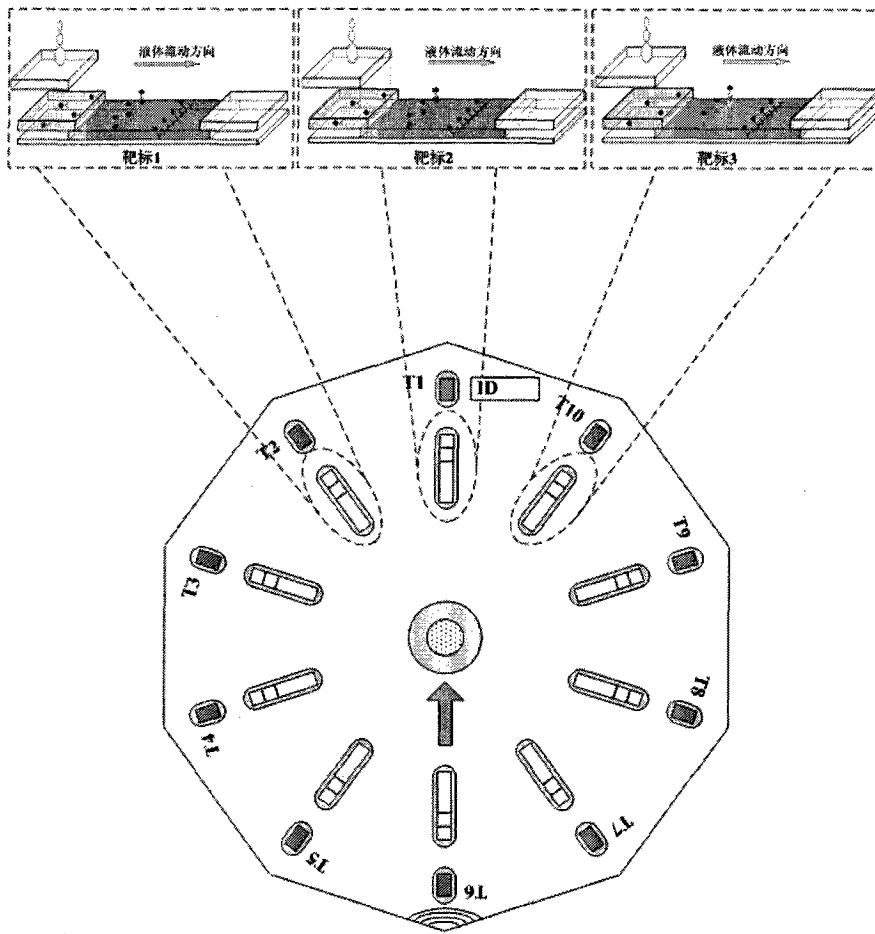


图 1

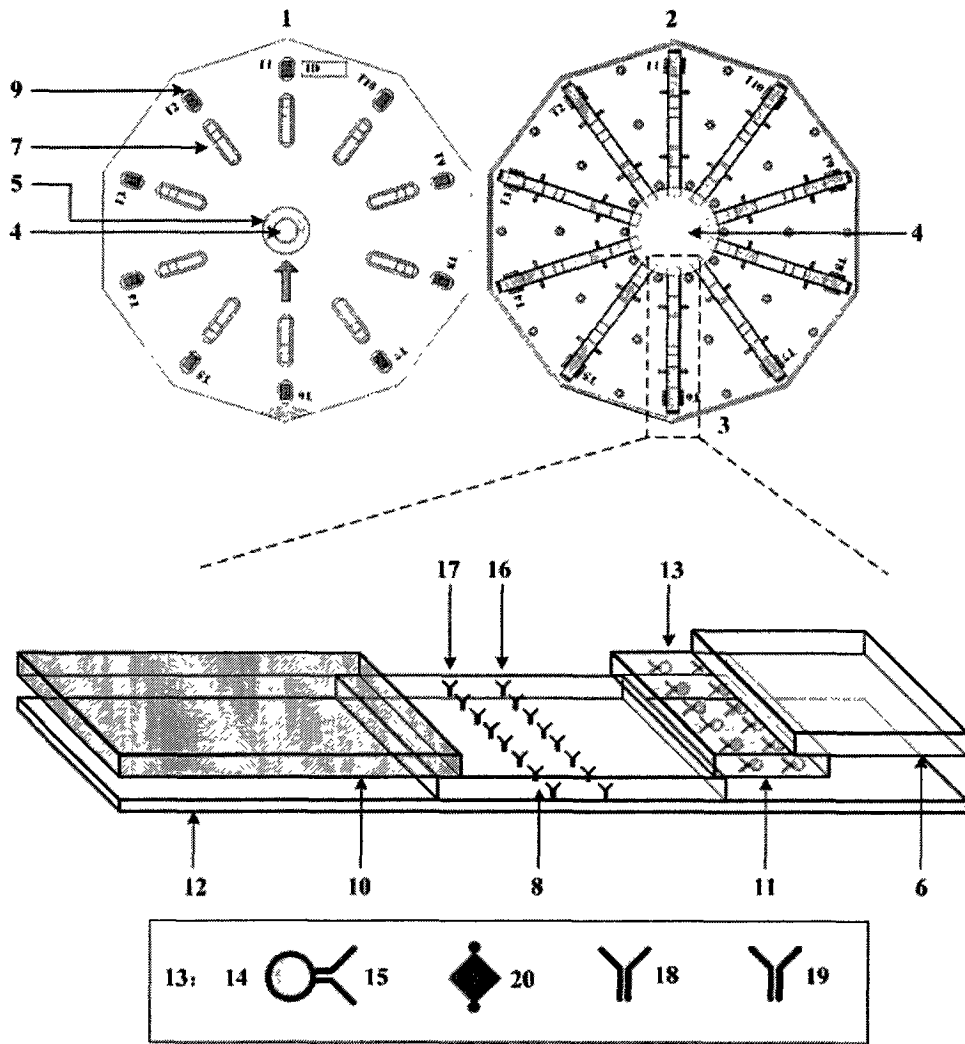


图 2

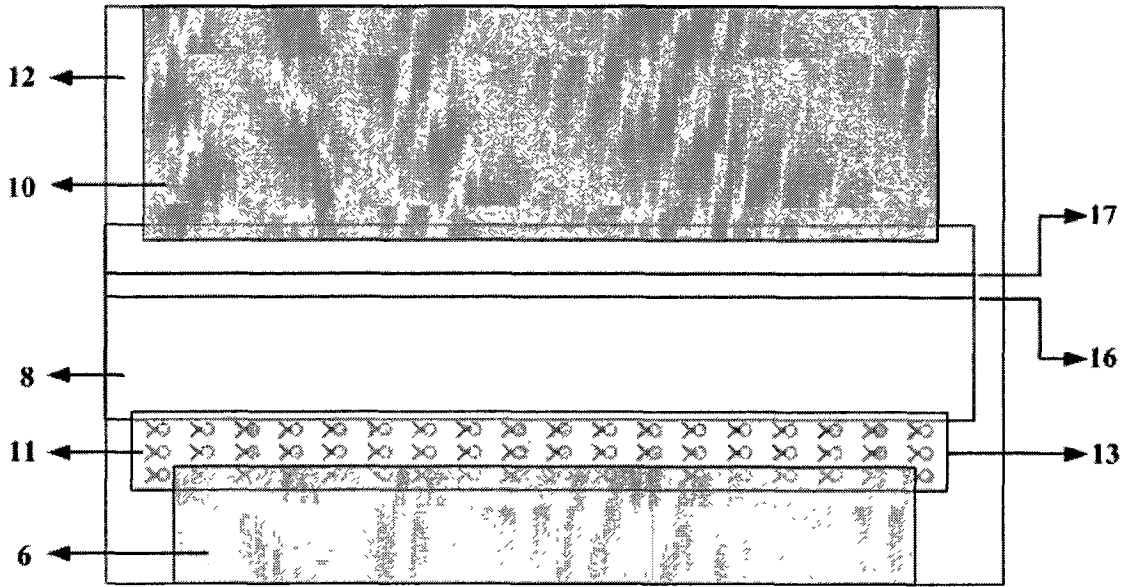


图 3

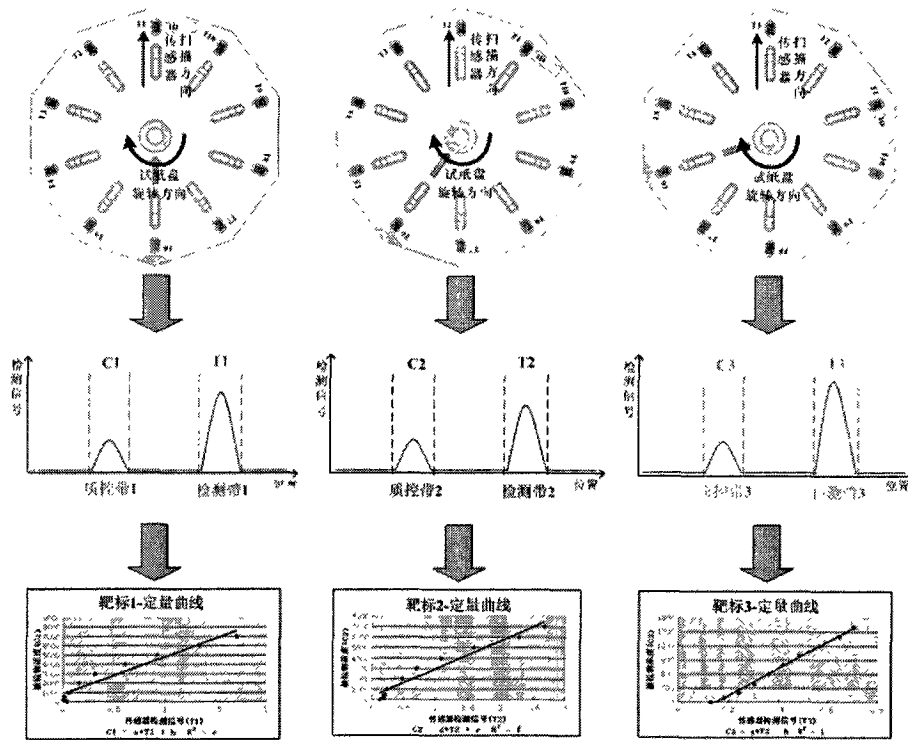


图 4

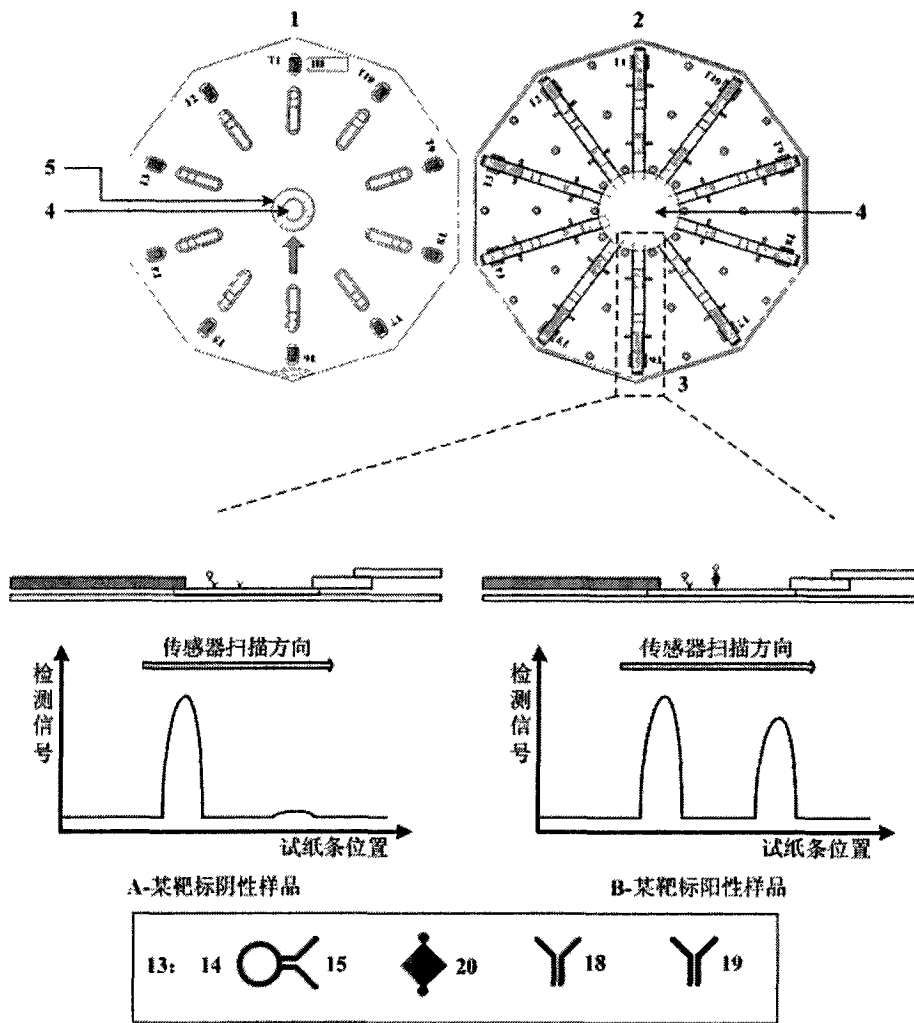


图 5

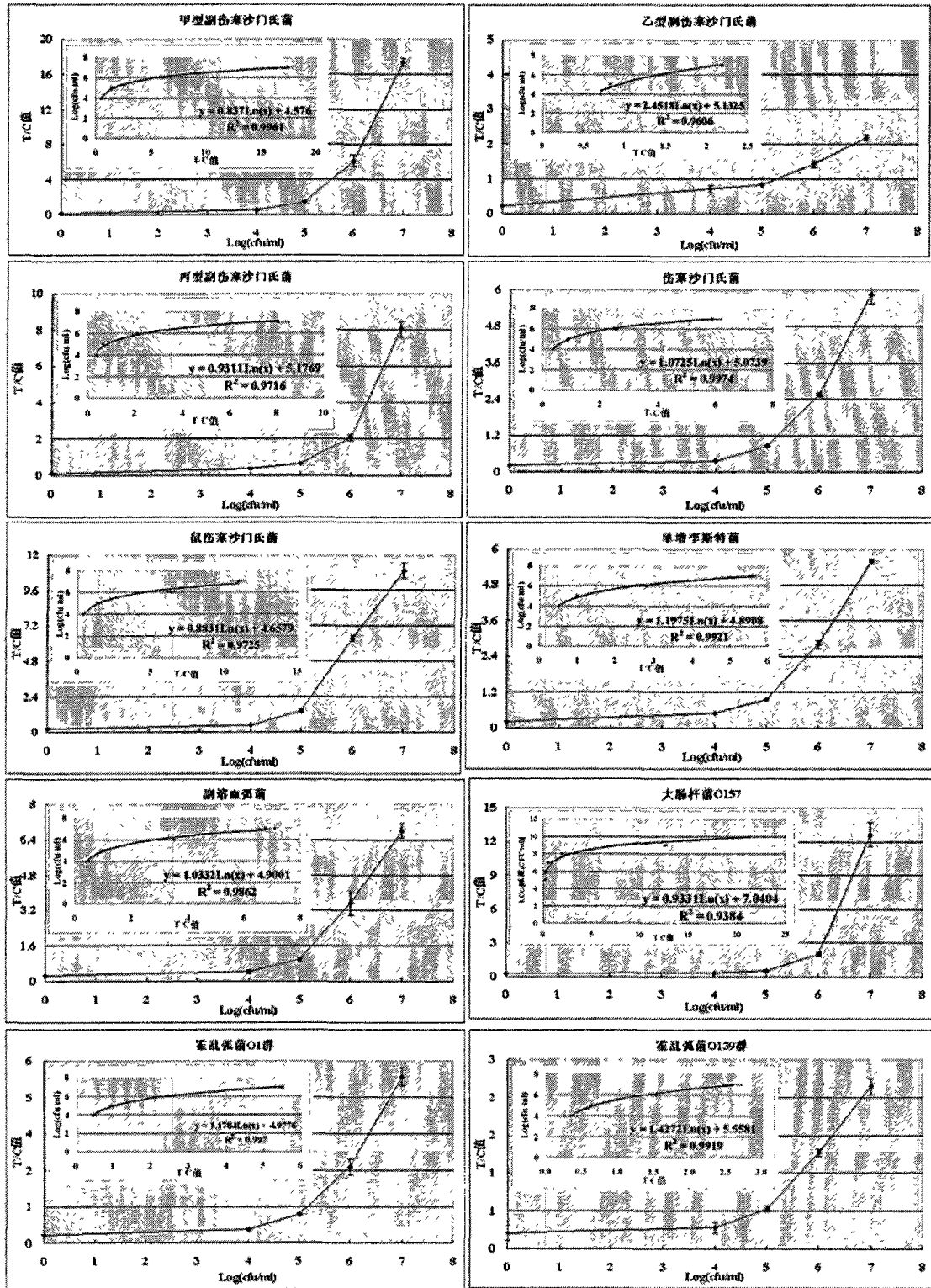


图 6

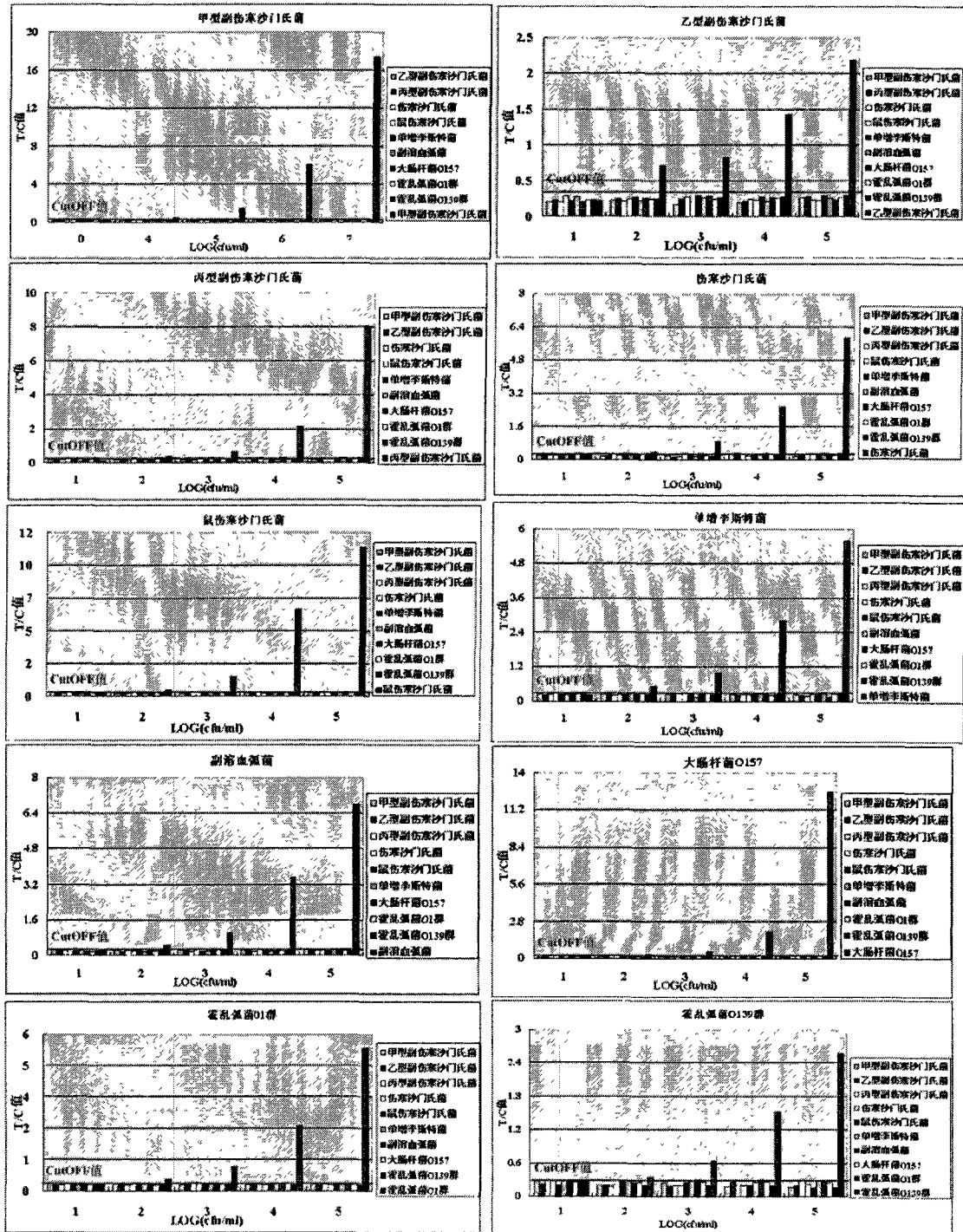


图 7

专利名称(译)	一种基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘		
公开(公告)号	CN102375060A	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	CN201010257697.2	申请日	2010-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	周蕾 王浩然 郭兆彪 杨瑞馥		
发明人	周蕾 王浩然 郭兆彪 杨瑞馥		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	Y02A50/52		
代理人(译)	张韬		
其他公开文献	CN102375060B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明基于上转换发光十通道免疫层析的食源性致病菌检测试纸盘通过UCP颗粒与十通道免疫层析试纸盘的结合使得一次加样即可实现十种靶标的检测，实现了高通量的现场快速定量检测。而具有极强兼容性的样品处理液则保证了检测结果的特异性与敏感性。最终为食源性病原体的现场检测、监测提供了有效的技术手段，有助于食源性疾病的预防与控制。

