

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410069351.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年10月11日

[11] 授权公告号 CN 1279360C

[22] 申请日 2004.7.19

[21] 申请号 200410069351.4

[71] 专利权人 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
军医科院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 端青 左庭婷 郑玉玲 姜永强

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书2页 说明书5页

[54] 发明名称

一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法。本发明所提供的检测肉毒毒素的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的包被有抗肉毒抗体的纤维膜、紧密连接于所述纤维膜上的含有抗肉毒抗体的免疫金胶体探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫。为了使用方便，所述吸水纸垫的下面还紧密连接有背板。利用本发明所提供的免疫层析试纸检测肉毒，非专业人员按照说明书即可操作，标本处理过程简单，5分钟内观察结果，最少可检出A型肉毒2ng/ml，检测灵敏度不受标本来源的影响。该肉毒毒素免疫检测试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

1、一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的包被有抗肉毒抗体的宽度在 2.5-3mm 的纤维膜、紧密连接于所述纤维膜上的含有抗肉毒抗体的免疫金胶体探针的宽度为 5-7mm 的金标垫和紧密连接于所述金标垫的宽度为 20-30mm 的样品垫；该免疫层析试纸的制备过程如下：1) 制备抗肉毒抗体；将抗肉毒抗体溶液喷到纤维膜上，室温晾干，然后将其粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备抗肉毒抗体的免疫胶体金探针溶液；将玻璃纤维膜或树脂浸泡到该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，干燥后粘贴在步骤 1) 得到的粘贴在吸水纸垫上的喷有抗肉毒抗体的纤维膜上；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再粘贴样品垫，得到检测肉毒毒素的免疫层析试纸；

其中，所述抗肉毒抗体按如下方法制备：家兔皮下多点注射毒素 0.25mg 加福氏完全佐剂免疫，10 天后追加免疫，共追加 2 次，末次追加后 10 天抽血；

所述抗肉毒抗体的免疫金胶体探针按如下过程制备：

(1) 将 0.01%HAuCl₄ 水溶液，加热煮沸，每 100ml HAuCl₄ 溶液进行如下操作：搅动下加入 1.5ml 的 1%柠檬酸三钠水溶液，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，得到胶体金溶液；

(2) 确定最低偶联抗体浓度：调节胶体金溶液 pH9.0，将抗肉毒抗体稀释为不同浓度，分别取 5μl、10μl、15μl、20μl、25μl，加入到 1ml 胶体金溶液中，混匀后于室温下放置 5min，加入 10% NaCl 水溶液 0.1ml，混匀，静置，10-20min 后观察液体颜色，胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量，为稳定 1ml 胶体金溶液所需最低偶联抗体量；

(3) 将 120%上述最低偶联抗体量的抗肉毒抗体加入到 50ml 胶体金溶液中，混匀后得到抗肉毒抗体的免疫胶体金探针溶液。

2、根据权利要求 1 所述的检测肉毒毒素的免疫层析试纸，其特征在于：所述吸水纸垫的下面还紧密连接有背板。

3、根据权利要求 1 所述的检测肉毒毒素的免疫层析试纸，其特征在于：所述纤维膜为硝酸纤维膜或醋酸纤维膜；所述样品垫为玻璃纤维膜。

4、一种制备检测肉毒毒素的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备抗肉毒抗体；将抗肉毒抗体溶液喷到纤维膜上，室温晾干，然后将其粘贴在吸水纸垫上；所述抗肉毒抗体按如下方法制备：皮下多点注射毒素 0.25mg 加福氏完全佐剂免疫，10 天后追加免疫，共追加 2 次，末次追加后 10 天抽血；

2) 制备抗肉毒抗体的免疫胶体金探针溶液：将玻璃纤维膜或树脂浸泡到该免疫胶体金探针溶液，得到宽度为 5-7mm 的金标垫，干燥后粘贴在步骤 1) 得到的粘贴在吸水纸垫上的喷有抗肉毒抗体的宽度在 2.5-3mm 的纤维膜上；所述抗肉毒抗体的免疫胶体金探针按如下过程制备：

(1) 将 0.01%HAuCl₄水溶液，加热煮沸，每 100ml HAuCl₄溶液进行如下操作：搅动下加入 1.5ml 的 1%柠檬酸三钠水溶液，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，得到胶体金溶液；

(2) 确定最低偶联抗体浓度：调节胶体金溶液 pH9.0，将抗肉毒抗体稀释为不同浓度，分别取 5 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l 加入到 1ml 胶体金溶液中，混匀后于室温下放置 5min，加入 10% NaCl 水溶液 0.1ml，混匀，静置，10-20min 后观察液体颜色，胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量，为稳定 1ml 胶体金溶液所需最低偶联抗体量；

(3) 将 120%上述最低偶联抗体量的抗肉毒抗体加入到 50ml 胶体金溶液中，混匀后得到抗肉毒抗体的免疫胶体金探针溶液；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再粘贴上宽度为 20-30mm 的样品垫，得到检测肉毒毒素的免疫层析试纸。

5、根据权利要求 4 所述的制备检测肉毒毒素的免疫层析试纸的方法，其特征在于：所述吸水纸垫的下面还粘贴有背板。

6、根据权利要求 4 或 5 所述的制备检测肉毒毒素的免疫层析试纸的方法，其特征在于：所述纤维膜为硝酸纤维膜或醋酸纤维膜；所述样品垫为玻璃纤维膜。

一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种肉毒毒素的检测试纸及其制备方法，特别涉及一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

肉毒毒素(Botulinum toxins)是肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)在无氧条件下产生的外毒素，是天然物质中毒力最强的嗜神经毒素。根据抗原性的不同分为A—G 7个型，其中A、B、E型主要引起人类中毒，而且以A型肉毒毒素毒力最强，C型则主要引起动物中毒。肉毒毒素作为经典的生物战剂，被列入国际禁止生物武器公约核查清单。9.11以后，又被美国列为最有可能用于进行生物恐怖活动的生物剂。

肉毒毒素检测最经典的方法是小鼠致死及中和试验，目前仍是最敏感、可信的方法。但该方法比较繁琐和耗时，不适于现场和临床使用。

分子生物学和免疫学检测是另外的两类方法，前者有基因探针和PCR，用于检测肉毒梭菌；后者包括放射免疫、反向血凝、反向乳胶凝集、酶联免疫吸附(ELISA)等方法，用于检测肉毒毒素，表1为不同免疫学方法检测肉毒毒素的比较(Szilagyi M, Rivera VR, Neal D, Merrill GA, Poli MA Development of sensitive colorimetric capture elisas for *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes A and B. *Toxicon* 2000 Mar;38(3):381-9)。

表1. 不同免疫学方法检测肉毒毒素的比较

检测方法	可检测物	敏感性	特异性
放射免疫	血清样品	>20ng/ml	100%
反向血球凝集	污染食物	10ng/ml	>90%
反向乳胶凝集	污染食物	4-8ng/ml	
酶联免疫吸附	污染食物	5ng/ml	

另外，不同标本用不同方法检测肉毒毒素的敏感性也有差别，如表2显示小鼠致死试验和ELISA在检测不同标本中的差异：同一份生薯条标本中，小鼠致死实验检测出肉毒毒素 10^4 MLD/g，而ELISA测出 5×10^5 MLD/g；熟薯条中分别为 10^5 MLD/g和 10^5 MLD/g；呕吐物测出结果是一致的，均为100MLD/g，而培养上清又分别为 10^5 MLD/ml和 10^4 MLD/ml，说明这些方法的敏感性受标本类型的影响(Ferreira JL, Eliasberg SJ, Harrison MA, Edmonds P. Detection of preformed type A botulinal toxin in hash

brown potatoes by using the mouse bioassay and a modified ELISA test. J AOAC Int 2001 Sep-Oct;84(5):1460-4)。

表 2. 小鼠致死试验和 ELISA 在检测不同标本中肉毒毒素的差异

标本类型	小鼠致死实验 (MLD)	ELISA (MLD)
生薯条	1×10^4	5×10^4
熟薯条	10^6	10^5
呕吐物	10^2	10^2
培养上清	10^7	10^4

1ng 肉毒毒素相当 5×10^5 MLD (最小致死量)

发明内容

本发明的目的是提供一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸。

本发明所提供的检测肉毒毒素的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的包被有抗肉毒抗体的纤维膜、紧密连接于所述纤维膜上的含有抗肉毒抗体的免疫金胶体探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫。

为了使用更加方便，所述吸水纸垫的下面还紧密连接有背板。背板的材料优选的是塑料。

本发明的另一个目的是提供制备上述检测肉毒毒素的免疫层析试纸的方法。

本发明所提供的制备检测肉毒毒素的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备抗肉毒抗体；将抗肉毒抗体溶液喷到纤维膜上，室温晾干，然后将其粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备抗肉毒抗体的免疫胶体金探针溶液；将玻璃纤维膜或树脂浸泡到该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，干燥后粘贴在步骤 1) 得到的粘贴在吸水纸垫上的喷有抗肉毒抗体的纤维膜上；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再粘贴样品垫，得到检测肉毒毒素的免疫层析试纸。

为了使用更加方便，所述吸水纸垫的下面还粘贴有背板。

在本发明所提供的检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法中，所述抗肉毒抗体按如下方法制备：皮下多点注射家兔(2ml/只)：毒素 0.25mg+福氏完全佐剂免疫，10 天后追加免疫，共追加 2 次，末次追加后 10 天抽血。

而抗肉毒抗体的免疫金胶体探针的制备方法如下：

1) 将 0.01%HAuCl₄ 水溶液，加热煮沸，每 100ml HAuCl₄ 溶液进行如下操作：搅动下加入 1.5ml 的 1%柠檬酸三钠水溶液，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，得到胶体金溶液；

2) 确定最低偶联抗体浓度：调节胶体金溶液 pH9.0，将抗肉毒抗体稀释为不同浓

度, 分别取 5ul、10ul、15ul、20ul、25ul 加入到 1ml 胶体金溶液中, 混匀后于室温下放置 5min, 加入 10% NaCl 水溶液 0.1ml, 混匀, 静置, 10-20min 后观察液体颜色, 胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量, 为稳定 1ml 胶体金溶液所需最低偶联抗体量;

3) 将 120% 上述最低偶联抗体量的抗肉毒抗体加入到 50ml 胶体金溶液中, 混匀后得到抗肉毒抗体的免疫胶体金探针溶液。

在实际应用中, 所述纤维膜为硝酸纤维膜, 宽度控制在 2.5-3mm 为宜; 所述金标垫的材料为玻璃纤维膜、聚脂等, 宽度为 5-7mm; 所述样品垫为玻璃纤维膜, 宽度为 20-30mm。

A 型肉毒对人具有极强的神经毒性, 经口的绝对致死量约为 0.3mg。利用本发明所研制的胶体金 ICA 检测试纸检测肉毒, 非专业人员按照说明书即可操作, 标本处理简单, 5 分钟内观察结果, 最少可检出 A 型肉毒 2ng/ml, 检测灵敏度不受标本来源的影响。该肉毒毒素免疫检测试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点, 适于临床和现场使用。

具体实施方式

实施例 1、检测肉毒毒素的免疫层析试纸的制备

材料

氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 分析纯, 上海试剂一厂;

柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 分析纯, 北京化工厂;

A 型肉毒, 兰州生物制品研究所, 110U / 支;

牛血清白蛋白 (BSA), 分析纯, 进口分装

聚乙二醇 (PEG), 分析纯, 进口分装

硝酸纤维膜, 购于美国 Millipore 公司, HF B 504;

玻璃纤维膜, 购于南京双威实业公司;

1、制备抗肉毒抗体

皮下多点注射家兔 (2ml/只): 毒素 0.25mg+福氏完全佐剂免疫, 10 天后追加免疫, 共追加 2 次, 末次追加后 10 天抽血。

2、制备免疫胶体金探针

1) 将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液, 取 100ml 加热至沸腾, 搅动下准确加入 1.5ml 的 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液, 液体颜色稳定成葡萄酒红色, 即得到胶体金溶液。

2) 确定最低偶联抗体浓度: 调节胶体金溶液 pH9.0, 将抗肉毒抗体稀释为不同浓度, 分别取 5ul、10ul、15ul、20ul、25ul 加入到 1ml 胶体金溶液中, 混匀后于室温

下放置 5min, 加入 10% NaCl 水溶液 0.1ml, 混匀, 静置, 10-20min 后观察液体颜色, 胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量, 即为稳定 1ml 胶体金所需抗体的最低浓度。

3) 将 120% 上述最低偶联抗体量的抗肉毒抗体加入到 50ml 胶体金溶液中, 混匀后即得免疫胶体金探针溶液。

3、胶体金颗粒与免疫金探针的电镜观察

于透射电镜下, 可见胶体金颗粒呈圆形或椭圆形, 大小均匀一致, 计数 100 个金颗粒, 颗粒直径约为 25nm; 胶体金偶联抗体后, 可见金颗粒外围有明显的低电子密度晕圈, 表面吸附有蛋白。结果表明, 按照以上技术路线制备的胶体金颗粒和免疫金探针合格。

4、检测肉毒毒素的免疫层析试纸的制备

检测肉毒毒素的免疫层析试纸由吸水纸垫、硝酸纤维膜、金标垫和玻璃纤维膜样品垫四部分组成。

用浓度为 0.01M, pH7.0-pH7.5 的 PBS 稀释抗肉毒抗体到 7mg/ml, 用 BioDot 公司 XYZ3000 点样仪喷到 2.5mm 宽的 NC 膜上, 室温晾干, 然后将其用双面胶粘贴在吸水纸垫上; 将 5-7mm 宽的玻璃纤维膜浸泡到制备好的免疫胶体金探针溶液中制备成金标垫, 4℃放置 30min, -50℃冷冻抽干后, 将该金标垫用双面胶粘贴在上述包被有抗肉毒抗体的硝酸纤维膜上, 再在该金标垫上面用双面胶粘贴 25mm 宽的玻璃纤维膜样品垫, 最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上, 按所需大小切割, 即为检测肉毒毒素的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

实施例 2、肉毒检测试验

1、ICA 试纸检出 A 型肉毒的敏感性

以兰州生物制品研究所生产的精制注射用 A 型肉毒为标准, 经生理盐水有限稀释后, 作为样品检测液, 取肉毒 ICA 检测试纸, 分别浸入不同肉毒浓度样品检测液中, 2 分钟后开始观察结果, 15 分钟观察终止。结果报告: 出现 1 条红色 (对照) 沉淀线为阴性, 即无 A 型肉毒检出; 出现 2 条红色 (样品和对照) 沉淀线为阳性, 即有 A 型肉毒检出。

本发明所提供的肉毒 ICA 试纸可检出 20U/ml, 即 20LD₅₀ (约 2ng/ml)。文献报道, ELISA 方法检测 A 型肉毒纯品的敏感性为 100DLM (最小致死量), ICA 试纸有更高的敏感性。

2、ICA 检测试纸对 B 型和 E 型肉毒的检出以及与 A 型和 B 型肠毒素的交叉反应

将粗制的 B 型和 E 型肉毒毒素, 以及金黄色葡萄球菌 A 型和 B 型肠毒素稀释成不同浓度 100ug/ml、50ug/ml、25ug/ml、12.5ug/ml、6.25ug/ml, 用 ICA 试纸检测, 结

果表明, 该试纸能检测出少于 10ug/ml B 型和 E 型肉毒, 并且不与 A 型肠毒素 (168ug/ml) 和 B 型肠毒素 (50ug/ml) 交叉。

引起人类中毒的 A、B、E 型肉毒中, A 型占 95% 以上, 各型肉毒间存在交叉抗原, 我们在 ICA 试纸制备中采用的是抗肉毒多抗, 所以除能检出 A 型肉毒外, 还能检出 B 型和 E 型肉毒, 这也是临床和现场检测所需要的。

3、模拟标本中的肉毒检测

选用几种常见肉毒中毒食品, 如火腿肠、腐乳、豆豉、蘑菇、牛奶和普通肉汤培养基等用于制备模拟标本。先分别称取火腿肠、腐乳、豆豉和蘑菇各 2g, 土壤 1g, 捣碎置容器中, 加入 5ml 无菌生理盐水, 充分搅拌混匀, 静置沉淀, 牛奶 1:4 稀释, 普通肉汤用原液。每种样品一式 4 份, 1 份取上清用作阴性对照, 其他 3 份分别加入浓度为 32ng/ml、16ng/ml、8ng/ml 的 A 型肉毒, 作为模拟阳性标本。

ICA 试纸检测模拟标本中 A 型肉毒的结果如表 1 所示。除土壤标本需离心外, 其它标本按上述采样及处理后, 可直接用于检测, ICA 试纸检测的特异性不受标本来源的影响; 从表中可以看出, 检测腐乳敏感性为 4ng/g, 火腿肠、蘑菇为 8ng/g, 豆豉为 16ng/g, 检测牛奶、血清和普通肉汤分别为 128ng/ml、64ng/ml 和 16ng/ml。

表 1. ICA 试纸检测模拟标本中 A 型肉毒

	处理方法	阴性对照	32ng/ml	16ng/ml	8ng/ml
火腿肠	2g+5ml 生理盐水	-	+	-	-
腐乳	2g+5ml 生理盐水	-	+	+	-
豆豉	2g+5ml 生理盐水	-	+	+	-
蘑菇	2g+5ml 生理盐水	-	+	-	-
牛奶	1:4 稀释	-	+	-	-
血清	1:2 稀释	-	+	-	-
普通肉汤	原液	-	+	+	-
土壤	1g+5ml 生理盐水	-	+	+	-

专利名称(译)	一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN1279360C	公开(公告)日	2006-10-11
申请号	CN200410069351.4	申请日	2004-07-19
[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	端青 左庭婷 郑玉玲 姜永强		
发明人	端青 左庭婷 郑玉玲 姜永强		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1632587A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测肉毒毒素的免疫层析试纸及其制备方法。本发明所提供的检测肉毒毒素的免疫层析试纸,包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的包被有抗肉毒抗体的纤维膜、紧密连接于所述纤维膜上的含有抗肉毒抗体的免疫金胶体探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫。为了使用方便,所述吸水纸垫的下面还紧密连接有背板。利用本发明所提供的免疫层析试纸检测肉毒,非专业人员按照说明书即可操作,标本处理过程简单,5分钟内观察结果,最少可检出A型肉毒2ng/ml,检测灵敏度不受标本来源的影响。该肉毒毒素免疫检测试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点,适于临床和现场使用。

Int 2001 Sep-Oct;84(5):1460-4)。

表 2. 小鼠致死试验和 ELISA 在检测不同标本中肉毒毒素的差异

标本类型	小鼠致死实验 (MLD)	ELISA (MLD)
生薯条	1×10^4	5×10^4
熟薯条	10^6	10^5
呕吐物	10^2	10^2
培养上清	10^7	10^4

1ng 肉毒毒素相当 5×10^7 MLD (最小致死量)