



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101887061 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 17

(21) 申请号 201010236537. X

G01N 33/558 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 26

(71) 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街 59 号

(72) 发明人 师东方 杨旭东 于迪

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 金永焕

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

一种用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法, 它涉及一种检测大肠杆菌菌毛的试纸条及其制备方法。本发明提供了一种用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。试纸条由 PVC 背衬、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成。方法: 制免疫原; 抗 F5 菌毛多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上; 制抗 F5 菌毛单克隆抗体; 抗 F5 菌毛单克隆抗体 - 胶体金标记物包被在结合垫上; 五、在 PVC 背衬上依次连续粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 切成试纸条即完成。本发明试纸条具有良好的特异性、稳定性和敏感性, 可以用来对产肠毒素大肠杆菌 F5 菌毛进行鉴定, 具有检测结果直观, 便于保存。

1. 一种用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条,由 PVC 背衬 (1)、样品垫 (2)、结合垫 (3)、硝酸纤维素膜 (4) 和吸水垫 (5) 组成,在 PVC 背衬 (1) 上依次连续粘附有样品垫 (2)、结合垫 (3)、硝酸纤维素膜 (4) 和吸水垫 (5),所述结合垫 (3) 与所述硝酸纤维素膜 (4) 之间有搭接,所述硝酸纤维素膜 (4) 与所述吸水垫 (5) 之间有搭接;所述结合垫 (3) 上包被有抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物,所述硝酸纤维素膜 (4) 上分别包被有抗 F5 菌毛多克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠 IgG 构成的质控线。

2. 制备权利要求 1 所述用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的方法,其特征在于用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法按以下步骤实现:一、诱导原核表达 F5 菌毛蛋白,纯化该融合蛋白,即免疫原;二、制备抗 F5 菌毛多克隆抗体,然后包被在硝酸纤维素膜上构成检测线,再将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜 (4) 上构成质控线;三、制备抗 F5 菌毛单克隆抗体;四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,然后将抗 F5 菌毛单克隆抗体加入胶体金溶液中,制得抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物,然后包被在结合垫 (3) 上;五、在 PVC 背衬 (1) 上依次连续粘附样品垫 (2)、步骤四所得结合垫 (3)、步骤二所得硝酸纤维素膜 (4) 和吸水垫 (5),然后切成 6mm×3mm 宽的试纸条,即完成用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备。

3. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤二中制备抗 F5 菌毛多克隆抗体的具体步骤:a、将免疫浓度为 1mg/mL 的免疫原,按体积比 1:1 加入弗氏完全佐剂混合乳化,然后在家兔背部多点皮下注射,注射量为 0.2mL/只;b、两周后,改用弗氏不完全佐剂乳化免疫原,以同样方法进行第二次免疫,并且每隔三周加强免疫,每周进行耳缘静脉采血,用间接 ELISA 方法检测抗体效价,待效价达到 6.4×10^4 后,心脏采血分离血清,然后用辛酸硫酸铵粗提结合 Protein G 亲和层析进行纯化,获得抗 F5 菌毛多克隆抗体。

4. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤三中制备抗 F5 菌毛单克隆抗体的具体步骤:a、将免疫浓度为 1mg/mL 的免疫原,按体积比 1:1 加入弗氏完全佐剂混合乳化,然后腹腔注射 BALB/C 小鼠,注射量为 0.2mL/只;b、两周后,改用弗氏不完全佐剂乳化免疫原,以同样方法进行第二次免疫;c、两周后,断尾采血检测抗体效价,若 ELISA 效价达到 2^{10} 以上,腹腔注射 0.2ml 免疫原加强免疫,三天后处死小鼠,取其脾脏,用于细胞融合,用间接酶联免疫吸附试验筛选阳性杂交瘤细胞,筛选获得一株稳定分泌抗 F5 菌毛蛋白基因的单克隆抗体,命名为 F5-1,抗体亚类为 IgG1,并为 κ 链抗体;d、采用分泌抗 F5 菌毛的单克隆抗体的杂交瘤细胞株以体内诱生腹水法制备抗体,用辛酸-硫酸铵粗提结合 Protein G 亲和层析进行纯化,获得抗 F5 菌毛单克隆抗体。

5. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤四中采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液的具体步骤:a、向 250ml 的三角瓶中加入 50ml 质量浓度为 0.01% 的氯金酸水溶液,搅拌加热至沸腾;b、向沸腾的溶液中加入 500 μ l 质量浓度为 1% 柠檬酸三钠水溶液,继续加热保持沸腾 15min;c、关掉热源继续搅拌 15min,冷却后用 0.22 μ m 滤膜过滤至去离子水恢复到原体积,即完成胶体金溶液制备。

6. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤四中制得抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物的具体步骤:a、将 pH 值为 7.2 的胶体金溶液置于磁力搅拌器上,在 5min 内以结合量 $54\mu\text{g/ml}$,逐滴将抗 F5 菌毛单克隆抗体加入胶体金溶液中,继续搅拌 30min,加入体积浓度为 5.0% 的 BSA 至终浓度为 1.0%,继续摇匀 30min;b、利用低温高速离心法纯化免疫金:将免疫金于 4°C 下,1500r/min 离心 30min,吸取上清;然后在 4°C 下将上清以 14000r/min 的速度继续离心 30min,吸出弃掉上清;用 1/10 原体积的 0.01M、pH 值为 7.2 的 PB 溶液将纯化好的胶体金沉淀重悬,置 4°C 避光保存;所述 PB 溶液中含有质量浓度为 0.5% 的 BSA 和质量浓度为 1% 的海藻糖。

7. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤四中抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合垫 (3) 上的具体步骤:将结合垫浸泡于质量浓度为 5% 的海藻糖中 30 min,置于 37°C 下烘干,然后用 Biodot 点膜仪将制备好的抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合垫上,再置于 37°C 下烘干;所述海藻糖中含有质量浓度为 0.2% 的吐温-20。

8. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤五中样品垫 (2) 的处理:将样品垫 (2) 浸泡于 0.02 M、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 中 30 min,置于 37°C 下烘干;所述 Tris-HCl 中含有质量浓度为 0.1% 的吐温-20。

9. 根据权利要求 2 所述的用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于步骤五中硝酸纤维素膜 (4) 的处理:1、将硝酸纤维素膜 (4) 浸泡于包被液 0.01M、pH 值为 7.2 的 Tris-cl 缓冲液中 30min,置于 37°C 下烘干;2、用 PBS 将抗 F5 菌毛多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 的浓度分别稀释为 1.5mg/ml 与 0.8mg/ml ,以 $1.2\mu\text{l/cm}$ 的抗体喷膜速度将其喷涂于硝酸纤维素膜 (4) 上作为检测线 T 和质控线 C,检测线 T 靠近结合垫 (3) 端,质控线 C 靠近吸水垫 (5) 端,检测线 T 与质控线 C 间距为 0.5mm;3、将喷有检测线 T 和质控线 C 的硝酸纤维素膜 (4) 用 0.01M、pH 值为 7.2 的 Tris-cl 封闭 30min,置于 37°C 下烘干;所述 Tris-cl 中含有质量浓度为 2% 的 BSA 和质量浓度为 0.2% 的吐温-20。

一种用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测大肠杆菌菌毛的试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 统计表明我国由大肠杆菌引起的动物腹泻的发病率和死亡率分别占整个腹泻发病率和死亡率的 56.2% 和 24.7%，给养猪业生产造成了巨大经济损失。产肠毒素大肠杆菌 (ETEC) 是引起仔猪腹泻的重要病原之一，但其他的病原，如猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒等也均能引起仔猪严重的腹泻，因此，灵敏、准确地鉴定病原是诊断和防治猪腹泻病的重要前提。

[0003] 大肠杆菌菌毛抗原在 ETEC 引起的腹泻上起着先导和加剧的作用，F5 (K99) 阳性菌在引起仔猪腹泻的 ETEC 中最为常见，目前检测该菌的方法有凝集试验、ELISA、核酸检测、小肠上皮细胞粘附试验，以及 MRHA 和在此基础上的血凝抑制反应 (HI)。传统 F5⁺ETEC 分离鉴定方法特异性强，但费时费力，不适应临床检测的需要；凝集试验操作简便，快捷适于现场检测，但单因子血清不易购买，且反复使用易被污染；小肠上皮细胞粘附试验需要的小肠片段不易获得和保存；MRHA 和 HI 用于凝集的红细胞不宜长期保存；核酸检测和 ELISA 方法灵敏度高，但因使用特定仪器局只限于实验室操作，难以推广。因此，急需建立一种特异、准确、操作简便、适合现地应用的 F5 菌毛检测方法。

发明内容

[0004] 本发明目的是提供一种用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。

[0005] 用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条，由 PVC 背衬、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成，在 PVC 背衬上依次连续粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述结合垫与所述硝酸纤维素膜之间有搭接，所述硝酸纤维素膜与所述吸水垫之间有搭接；所述结合垫上包被有抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物，所述硝酸纤维素膜上分别包被有抗 F5 菌毛多克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠 IgG 构成的质控线。

[0006] 用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法按以下步骤实现：一、诱导原核表达 F5 菌毛蛋白，纯化该融合蛋白，即免疫原；二、制备抗 F5 菌毛多克隆抗体，然后包被在硝酸纤维素膜上构成检测线，再将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上构成质控线；三、制备抗 F5 菌毛单克隆抗体；四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，然后将抗 F5 菌毛单克隆抗体加入胶体金溶液中，制得抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物，然后包被在结合垫上；五、在 PVC 背衬上依次连续粘附样品垫、步骤四所得结合垫、步骤二所得硝酸纤维素膜和吸水垫，然后切成 6mm×3mm 宽的试纸条，即完成用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备。

[0007] 本发明用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条，选用抗 F5 菌毛多克

隆抗体作为检测线,抗 F5 菌毛单克隆抗体为胶体金标记的抗体,利用夹心法来检测待测样品中是否含有 F5 菌毛。本发明用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条具有良好的特异性、稳定性和敏感性,可以用来对产肠毒素大肠杆菌 F5 菌毛进行鉴定,具有检测结果直观,便于保存,单次使用成本较低等优点,适合于临床诊断和基层推广应用。

[0008] 本发明的原理:若待检液中含 F5 菌毛,当待测液进入样品垫时,由于毛细效应向前移动, F5 菌毛与结合垫上的抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物(简称为免疫金)形成 Au-Ab-F5 菌毛二联复合物,复合物在硝酸纤维素膜上继续层析泳动,与检测线上的抗 F5 菌毛多克隆抗体结合形成 McAb-F5 菌毛-Au-Ab 三联复合物,并被固定在检测线的抗 F5 菌毛多克隆抗体截留下来,形成可见的红色条带;未结合的 Au-Ab-F5 菌毛复合物由于层析作用,继续迁移向前,与固定在质控线上的羊抗鼠 IgG 结合而被截留下来,形成可见的红色条带,即阳性结果是在检测线和质控线上均呈现红色条带;

若待测液不含 F5 菌毛,固定于结合垫上的免疫金因毛细效应随待测液体向前移动,不能与检测线上的抗 F5 菌毛多克隆抗体结合,只与固定在质控线上的羊抗鼠 IgG 结合形成二联复合物被截留下来,形成可见的红色条带,即阴性结果只在质控线上形成红色条带;如果质控线上没有红色条带出现,则该试纸条无效。

[0009] 本发明的优势在于:

1、制备了抗大肠杆菌 F5 菌毛的抗体(单克隆抗体和多克隆抗体):本发明诱导原核表达的大肠杆菌 F5 菌毛蛋白纯化后作为免疫原,制备的抗体与天然大肠杆菌 F5 菌毛有很好的结合能力且特异性良好、抗体效价较高,为试纸条的制备奠定了良好的基础;

2、试纸条组装材料的选择和各种缓冲溶液的配方:尽管胶体金试纸条检测方法在检测领域有着广泛的应用,但由于制备试纸条针对的抗体不同、实验条件的限制导致其他人制备试纸条所用的组装材料和缓冲溶液对本发明无参考价值;本发明结合理论用排列组合的方法对组装材料和缓冲溶液进行了大量的筛选,克服了实验过程中遇到的检测线出现假阳性、免疫金探针死金、免疫金探针层析过程中亲水分离、试纸条检测线和质控线颜色浅等问题,筛选出针对本发明特定抗体的组装材料和各种缓冲溶液。

[0010] 附图说明

图 1 为具体实施方式一中用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的示意图,其中 1 为 PVC 背衬,2 为样品垫,3 为结合垫,4 为硝酸纤维素膜,5 为吸水垫,T 为检测线,C 为质控线。

具体实施方式

本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式,还包括各具体实施方式间的任意组合。

[0011] 具体实施方式一:结合图 1 说明本实施方式,本实施方式用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条,由 PVC 背衬 1、样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5 组成,在 PVC 背衬 1 上依次连续粘附有样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5,所述结合垫 3 与所述硝酸纤维素膜 4 之间有搭接,所述硝酸纤维素膜 4 与所述吸水垫 5 之间有搭接;所述结合垫 3 上包被有抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物,所述硝酸纤维素膜 4 上分别包被有抗 F5 菌毛多克隆抗体构成的检测线和羊抗鼠 IgG 构成的质控线。

[0012] 本实施方式中的 PVC 背衬 1、样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5 均购自上海金标生物科技有限公司。

[0013] 本实施方式用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条, 在使用时, 对待测样品进行处理后将之滴入样品垫 2 上即可, 样品垫 2 上可制作出加样孔。

[0014] 具体实施方式二: 本实施方式用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备方法按以下步骤实现: 一、诱导原核表达 F5 菌毛蛋白, 纯化该融合蛋白, 即免疫原; 二、制备抗 F5 菌毛多克隆抗体, 然后包被在硝酸纤维素膜上构成检测线, 再将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜 4 上构成质控线; 三、制备抗 F5 菌毛单克隆抗体; 四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 然后将抗 F5 菌毛单克隆抗体加入胶体金溶液中, 制得抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物, 然后包被在结合垫 3 上; 五、在 PVC 背衬 1 上依次连续粘附样品垫 2、步骤四所得结合垫 3、步骤二所得硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5, 然后切成 6mm×3mm 宽的试纸条, 即完成用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的制备。

[0015] 本实施方式步骤五中在 PVC 背衬 1 上依次连续粘附样品垫 2、步骤四所得结合垫 3、步骤二所得硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5 的具体过程是: 将结合垫连接在靠近硝酸纤维素膜检测线的一端, 边缘附着在硝酸纤维素膜上, 样品垫附着在结合垫的另一端上; 吸水垫连接在硝酸纤维素膜的另一端, 与硝酸纤维素膜的质控线相接近。

[0016] 本实施方式所得用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的应用评价:

1、特异性试验

将提纯的 F5、F4、F6、F41、F18ab 菌毛过滤除菌后稀释成 0.5mg/ml 进行检测, 只有 F5 菌毛检出结果为阳性, 而提纯的大肠杆菌 F4、F6、F41、F18ab 菌毛检测结果为阴性, 说明试纸条具有良好的特异性;

2、敏感性检测

当试纸条检测菌毛蛋白浓度为 1.492mg/ml、596.8 μ g/ml、238.7 μ g/ml、95.5 μ g/ml、38.2 μ g/ml 时, 试纸条的反应呈阳性, 而检测菌毛蛋白浓度为 15.2 μ g/ml 和 6.1 μ g/ml 时, 试纸条呈阴性反应, 该试纸条最低检出量为 38.2 μ g/ml;

3、稳定性检测

4 $^{\circ}$ C 条件下, 保存的试纸条至 120d 时检测线和质控线仍很清晰; 在室温条件下, 保存的试纸条至 90d 时检测线和质控线仍很清晰; 在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 保存的试纸条至 20d 后检测线和质控线变得模糊; 结果说明试纸条具有很好的稳定性;

4、重复性检测

取不同批次的试纸条检测不同批次 F5 菌毛蛋白, 每个样品重复检测 10 次, 结果显示批内、批间试纸条检测 F5 菌毛蛋白结果没有差别且检测线明显; 结果显示试纸条具有良好的重复性。

[0017] 本实施方式用于检测大肠杆菌 F5 菌毛的胶体金免疫层析试纸条的使用方法:

1、样品的预处理

将待检样品(如: 粪便、奶样等) 在伊红美兰琼脂培养基上划线培养, 分离单个菌落, 挑取紫黑色孤立菌落接种到 5ml 改良明卡培养基内, 振荡培养; 将培养好的细菌用含 2M 尿素的 0.01mol/L、pH 值为 7.2 的 PBS 洗涤, 离心后称取细菌细胞湿重, 以 0.1g/ml 湿重菌量

悬浮于 0.01 mol/L、pH 值为 7.2 的 PBS 缓冲液中；采用 60℃ 水浴振摇 30min 的方法提取菌毛，在 4℃ 下以 10000r/min 离心 15min，吸取上清液，并用 0.22 μm 滤膜过滤后，得到待检液，备用；

2、检测

将待检液取 50 μL 加入试纸条加样孔中，5 ~ 10min 后观察结果；

3、结果判定

从待检液在硝酸纤维素膜 4 上层析算起，待结合垫完全释放，硝酸纤维素膜 4 上检测线 T 和质控线 C 显色清晰，到硝酸纤维素膜 4 上没有免疫金（抗 F5 菌毛单克隆抗体 - 胶体金标记物）扩散为止；检测线 T 和质控线 C 均为红色判定为阳性；检测线 T 不显色，质控线 C 为红色判定为阴性；质控线 C 不显色为试纸条失效。

[0018] 具体实施方式三：本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤二中制备抗 F5 菌毛多克隆抗体的具体步骤：a、将免疫浓度为 1mg/mL 的免疫原，按体积比 1:1 加入弗氏完全佐剂混合乳化，然后在家兔背部多点皮下注射，注射量为 0.2mL/只；b、两周后，改用弗氏不完全佐剂乳化免疫原，以同样方法进行第二次免疫，并且每隔三周加强免疫，每周进行耳缘静脉采血，用间接 ELISA 方法检测抗体效价，待效价达到 6.4×10^4 后，心脏采血分离血清，然后用辛酸硫酸铵粗提结合 Protein G 亲和层析进行纯化，获得抗 F5 菌毛多克隆抗体。其它与具体实施方式一相同。

[0019] 具体实施方式四：本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤三中制备抗 F5 菌毛单克隆抗体的具体步骤：a、将免疫浓度为 1mg/mL 的免疫原，按体积比 1:1 加入弗氏完全佐剂混合乳化，然后腹腔注射 BALB/C 小鼠，注射量为 0.2mL/只；b、两周后，改用弗氏不完全佐剂乳化免疫原，以同样方法进行第二次免疫；c、两周后，断尾采血检测抗体效价，若 ELISA 效价达到 2^{10} 以上，腹腔注射 0.2ml 免疫原加强免疫，三天后处死小鼠，取其脾脏，用于细胞融合，用间接酶联免疫吸附试验筛选阳性杂交瘤细胞，筛选获得一株稳定分泌抗 F5 菌毛蛋白基因的单克隆抗体，命名为 F5-1，抗体亚类为 IgG1，并为 κ 链抗体；d、采用分泌抗 F5 菌毛的单克隆抗体的杂交瘤细胞株以体内诱生腹水法制备抗体，用辛酸 - 硫酸铵粗提结合 Protein G 亲和层析进行纯化，获得抗 F5 菌毛单克隆抗体。其它与具体实施方式一相同。

[0020] 具体实施方式五：本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤四中采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液的具体步骤：a、向 250ml 的三角瓶中加入 50ml 质量浓度为 0.01% 的氯金酸水溶液，搅拌加热至沸腾；b、向沸腾的溶液中加入 500 μl 质量浓度为 1% 柠檬酸三钠水溶液，继续加热保持沸腾 15min；c、关掉热源继续搅拌 15min，冷却后用 0.22 μm 滤膜过滤至去离子水恢复到原体积，即完成胶体金溶液制备。其它与具体实施方式一相同。

[0021] 本实施方式中所得胶体金溶液为 30nm 胶体金溶液。

[0022] 具体实施方式六：本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤四中制得抗 F5 菌毛单克隆抗体 - 胶体金标记物（简称为免疫金）的具体步骤：a、将 pH 值为 7.2 的胶体金溶液置于磁力搅拌器上，在 5min 内以结合量 54 μg/ml，逐滴将抗 F5 菌毛单克隆抗体加入胶体金溶液中，继续搅拌 30min，加入体积浓度为 5.0% 的 BSA 至终浓度为 1.0%，继续摇匀 30min；b、利用低温高速离心法纯化免疫金：将免疫金于 4℃ 下，1500r/min 离心 30min，吸取上清；然后在 4℃ 下将上清以 14000r/min 的速度继续离心 30min，吸出弃掉上清；用 1/10 原体积

的 0.01M、pH 值为 7.2 的 PB 溶液将纯化好的胶体金沉淀重悬,置 4℃ 避光保存;所述 PB 溶液中含有质量浓度为 0.5% 的 BSA(牛血清白蛋白)和质量浓度为 1% 的海藻糖。其它与具体实施方式一相同。

[0023] 具体实施方式七:本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤四中抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合垫 3 上的具体步骤:将结合垫浸泡于质量浓度为 5% 的海藻糖中 30 min,置于 37℃ 下烘干,然后用 Biodot 点膜仪将制备好的抗 F5 菌毛单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合垫上,再置于 37℃ 下烘干;所述海藻糖中含有质量浓度为 0.2% 的吐温-20。其它与具体实施方式一相同。

[0024] 具体实施方式八:本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤五中样品垫 2 的处理:将样品垫 2 浸泡于 0.02 M、pH 值为 7.2 的 Tris-HCl 中 30 min,置于 37℃ 下烘干;所述 Tris-HCl 中含有质量浓度为 0.1% 的吐温-20。其它与具体实施方式一相同。

[0025] 具体实施方式九:本实施方式与具体实施方式二不同的是步骤五中硝酸纤维素膜 4 的处理:a、将硝酸纤维素膜 4 浸泡于包被液 0.01M、pH 值为 7.2 的 Tris-cl 缓冲液(TBS)中 30min,置于 37℃ 下烘干;b、用 PBS(磷酸盐缓冲液)将抗 F5 菌毛多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 的浓度分别稀释为 1.5mg/ml 与 0.8mg/ml,以 1.2 μ l/cm 的抗体喷膜速度将其喷涂于硝酸纤维素膜 4 上作为检测线 T 和质控线 C,检测线 T 靠近结合垫 3 端,质控线 C 靠近吸水垫 5 端,检测线 T 与质控线 C 间距为 0.5mm;c、将喷有检测线 T 和质控线 C 的硝酸纤维素膜 4 用 0.01M、pH 值为 7.2 的 Tris-cl 封闭 30min,置于 37℃ 下烘干;所述 Tris-cl 中含有质量浓度为 2% 的 BSA 和质量浓度为 0.2% 的吐温-20。其它与具体实施方式一相同。

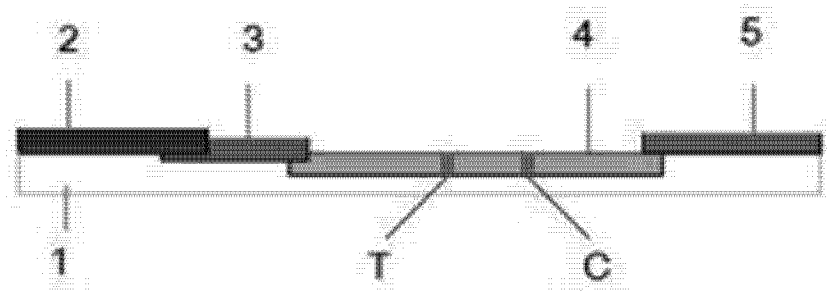


图 1

专利名称(译)	一种用于检测大肠杆菌F5菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101887061A	公开(公告)日	2010-11-17
申请号	CN201010236537.X	申请日	2010-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	师东方 杨旭东 于迪		
发明人	师东方 杨旭东 于迪		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/52 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	金永焕		
其他公开文献	CN101887061K1		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测大肠杆菌F5菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法，它涉及一种检测大肠杆菌菌毛的试纸条及其制备方法。本发明提供了一种用于检测大肠杆菌F5菌毛的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。试纸条由PVC背衬、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成。方法：制免疫原；抗F5菌毛多克隆抗体和羊抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜上；制抗F5菌毛单克隆抗体；抗F5菌毛单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合垫上；五、在PVC背衬上依次连续粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，切成试纸条即完成。本发明试纸条具有良好的特异性、稳定性和敏感性，可以用来对产肠毒素大肠杆菌F5菌毛进行鉴定，具有检测结果直观，便于保存。

