



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103777004 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410051704. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 14

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No 7214 2013. 01. 23

CGMCC No 7215 2013. 01. 23

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 匡华 胥传来 孔德昭 马伟

徐丽广 宋珊珊 刘丽强

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

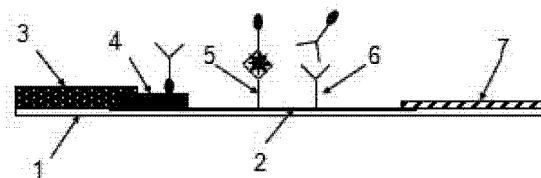
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条, 以及该免疫胶体金试纸条的制备方法, 属于免疫检测技术领域。该试纸条由样品垫、涂覆金标标记抗 SEE 抗体 1E5 (CGMCC No. 7214) 的金标垫, 在检测线、质控线分别包被有抗 SEE 抗体 2E3 (CGMCC No. 7215) 及羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜构成, 依次按样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘附在 PVC 底板上。该试纸条操作简便、快速、准确, 测试全过程只需 5 分钟, 不受环境条件的干扰, 特异性好, 检测灵敏度高, 最低检测限为 0. 25ng/mL。本发明适用于海关、企业、医院、检验检疫单位等, 可实现食品或临床样本中金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的快速检测。



1. 一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条, 其特征在于: 包括 PVC 底板(1), 在 PVC 底板(1) 两端分别设有样品垫(3) 和吸水垫(7);

PVC 底板(1) 中部设置有硝酸纤维素膜检测层(2), 在硝酸纤维素膜检测层(2) 与样品垫(3) 之间设置有金标垫(4); 所述金标垫(4) 一端与样品垫(3) 相连接叠放, 另一端叠放于硝酸纤维素膜检测层(2) 上;

所述硝酸纤维素膜检测层(2) 上依次设置有检测线(5) 和质控线(6)。

2. 根据权利要求 1 所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条, 其特征在于: 所述金标垫(4) 包被有金标标记抗 SEE 抗体 1E5。

3. 根据权利要求 1 所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条, 其特征在于: 所述检测线(5) 上包被有抗 SEE 抗体 2E3。

4. 根据权利要求 1 所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条, 其特征在于: 所述质控线(6) 上包被有羊抗鼠 IgG。

5. 权利要求 1 所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法, 金黄色葡萄球菌肠毒素 E 缩写为 SEE, 其特征在于步骤为:

(1) 抗 SEE 特异性单克隆抗体的制备:

以北京军事医学科学院提供的重组表达的 SEE 为免疫原, 免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠, 经免疫、细胞融合、筛选, 共筛选到 10 个细胞株;

(2) 特异性 SEE 双抗体检测抗体的筛选:

将步骤(1) 纯化后的 10 株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶 HRP, 直接法鉴定标记成功后进行双抗体夹心法配对, 确定特异性免疫胶体金快速检测试纸条所需要抗 SEE 抗体; 其中 1E5 为金标抗体, 2E3 为包被抗体;

(3) 金黄色葡萄球菌肠毒素 E 免疫胶体金快速检测试纸条的制备:

a、空白胶体金的制备:

采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒, 在锥形瓶中加入 200mL 去离子水和 2mL 质量浓度为 1% 的氯金酸, 搅拌加热至沸腾, 快速加入 4mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠, 继续加热 15~20 分钟, 至呈亮红色, 然后室温中冷却, 4℃ 冷藏保存;

b、胶体金标记抗体的制备:

空白胶体金溶液用 0.1M K_2CO_3 调节 pH 值至 7.4, 搅拌中滴加适量浓度抗体, 每毫升空白胶体金溶液加入 30 μ g 抗体 1E5, 继续搅拌 30 分钟, 离心, 吸取上清, 用金标抗体保存液重旋;

c、金标垫的制备:

调试三维平面点膜喷金仪仪器 HM3055, 将标记好胶体金的抗 SEE 抗体 1E5 均匀的喷在玻璃纤维膜上, 喷液量 0.6 μ L /cm, 37℃ 烘干过夜, 封袋备用;

d、包被膜的制备:

调试三维平面点膜喷金仪仪器 HM3055, 将稀释好的抗 SEE 抗体 2E3 均匀喷在硝酸纤维素膜上, 得到检测线; 将稀释好的羊抗鼠 IgG 均匀喷在硝酸纤维素膜上, 得到质控线, 喷液量为 0.6 μ L /cm, 37℃ 烘干过夜, 封袋备用;

将 PVC 底板(1)、硝酸纤维素膜检测层(2)、样品垫(3)、金标垫(4)、检测线(5)、质控线(6) 和吸水垫(7) 组合, 即得产品金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条。

6. 权利要求 1 所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条的应用,其特征在在于:适用于海关、企业、医院、检验检疫单位,可实现食品或临床样本中金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的快速检测,最低检测限为 0.25ng/mL。

一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条,以及该免疫胶体金试纸条的制备方法,可以实现金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的快速检测诊断,适用于大量样品的现场检测、食物中毒的快速检测与应急处理,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种常见的食源性致病菌,金黄色葡萄球菌分泌的肠毒素 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 引起的中毒占金黄色葡萄球菌食物中毒的 95%。

[0003] 在食品加工过程中,经过热处理可以杀灭金黄色葡萄球菌,然而一旦菌体产生外分泌的肠毒素,那么存在于食物中的肠毒素非常稳定,100℃ 30min 不被破坏,摄入人体后可以抵抗肠胃液中蛋白酶的分解,并引起人体的呕吐、腹泻等症状。2011 年我国公布速冻面米制品新国标 GB19295—2011,金黄色葡萄球菌由原来的不得检出变为限量检出,因此为了杜绝食品中金黄色葡萄球菌活菌数合格而肠毒素超标的情况,肠毒素的快速检测对于保障食品安全具有更加重要的意义。

[0004] 近年来,ELISA 凭借其灵敏、快速、特异性好、易于推广的特点越来越多地用于肠毒素的检测,但胶体金试纸条具有操作简单、稳定性高、不需要借助专门仪器、适合现场快速检测的优点,因此对于大量样品的现场检测、食物中毒的快速检测具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种检测金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条,操作简单,快速方便,灵敏度高,稳定性好,成本低廉。

[0006] 本发明另一个目的在于提供一种免疫胶体金试纸条的制备方法,包括抗 SEE 特异性抗体的制备,SEE 双抗体检测抗体的筛选,SEE 免疫胶体金检测试纸条的制备。该试纸条操作简便、快速、准确,检测全过程只需 5 分钟,不受环境条件的干扰,特异性好,检测灵敏度高,最低检测限为 0.25ng/mL。本发明适用于海关、企业、医院、检验检疫单位等,可实现食品或临床样本中金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的快速检测。

[0007] 本发明的技术方案,一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条,包括 PVC 底板,在 PVC 底板两端分别设有样品垫和吸水垫;

PVC 底板中部设置有硝酸纤维素膜检测层,在硝酸纤维素膜检测层与样品垫之间设置有金标垫;所述金标垫一端与样品垫相连接叠放,另一端叠放于硝酸纤维素膜检测层上;

所述硝酸纤维素膜检测层上依次设置有检测线和质控线。

[0008] 所述金标垫包被有金标标记抗 SEE 抗体 1E5 (CGMCC No. 7214)。所述检测线上包被有抗 SEE 抗体 2E3 (CGMCC No. 7215)。所述质控线上包被有羊抗鼠 IgG。

[0009] 所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法,金黄色

葡萄球菌肠毒素 E 缩写为 SEE, 步骤为 :

(1) 抗 SEE 特异性单克隆抗体的制备 :

以北京军事医学科学院提供的重组表达的 SEE 为免疫原, 免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠, 经免疫、细胞融合、筛选, 共筛选到 10 个细胞株 ;

(2) 特异性 SEE 双抗体检测抗体的筛选 :

将步骤(1)纯化后的 10 株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶 HRP, 直接法鉴定标记成功后进行双抗体夹心法配对, 确定特异性免疫胶体金快速检测试纸条所需要抗 SEE 抗体 ; 其中 1E5 为金标抗体, 2E3 为包被抗体 ;

(3) 金黄色葡萄球菌肠毒素 E 免疫胶体金快速检测试纸条的制备 :

a、空白胶体金的制备 :

采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒, 在锥形瓶中加入 200mL 去离子水和 2mL 质量浓度为 1% 的氯金酸, 搅拌加热至沸腾, 快速加入 4mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠, 继续加热 15~20 分钟, 至呈亮红色, 然后室温中冷却, 4℃ 冷藏保存 ;

b、胶体金标记抗体的制备 :

空白胶体金溶液用 0.1M K_2CO_3 调节 PH 值至 7.4, 搅拌中滴加适量浓度抗体, 每毫升空白胶体金溶液加入 30 μ g 抗体 1E5 (CGMCC No. 7214), 继续搅拌 30 分钟, 离心, 吸取上清, 用金标抗体保存液重旋 ;

c、金标垫的制备 :

调试三维平面点膜喷金仪仪器 HM3055, 将标记好胶体金的抗 SEE 抗体 1E5 (CGMCC No. 7214) 均匀的喷在玻璃纤维膜上, 喷液量 0.6 μ L /cm, 37℃ 烘干过夜, 封袋备用 ;

d、包被膜的制备 :

调试三维平面点膜喷金仪仪器 HM3055, 将稀释好的抗 SEE 抗体 2E3 (CGMCC No. 7215) 均匀喷在硝酸纤维素膜上, 得到检测线 ; 将稀释好的羊抗鼠 IgG 均匀喷在硝酸纤维素膜上, 得到质控线, 喷液量为 0.6 μ L /cm, 37℃ 烘干过夜, 封袋备用 ;

将 PVC 底板、硝酸纤维素膜检测层、样品垫、金标垫、检测线、质控线和吸水垫组合, 即得产品金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条。

[0010] 适用于海关、企业、医院、检验检疫单位等, 可实现食品或临床样本中金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的快速检测, 最低检测限为 0.25ng/mL。

[0011] 本发明试纸条的工作原理 : 采用胶体金免疫层析技术, 选用 SEE 特异性抗体作为固相物, 利用双抗体夹心法原理检测样品中是否含有 SEE。当待检样品中含有 SEE 时, 抗原先和胶体金标记的抗 SEE 抗体 (1E5) 结合, 由于层析作用复合物沿包被膜向前移动, 当遇到检测线上的抗 SEE 抗体 (2E3) 时, 形成抗体 - 抗原 - 金标抗体复合物, 在检测线上富集, 形成红色沉淀线。

[0012] 本发明与现有技术相比具有如下优点 :

- 1、检测速度快, 全过程只需要 5 分钟即可, 可以试验大批量样品的快速检测 ;
- 2、灵敏度高, 最低检测限为 0.25ng/mL ;
- 3、操作简便, 无需经过专业培训, 易于推广 ;
- 4、不需要仪器, 适合现场检测 ;
- 5、过程简单, 直接上样检测, 样本量少。

[0013] 生物材料样品保藏：

1、一株单克隆细胞株，细胞株 14 号，株号为 1E5，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，登记编号为 CGMCC No. 7214，保藏日期为 2013 年 1 月 23 日。

[0014] 2、一株单克隆细胞株，细胞株 15 号，株号为 2E3，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，登记编号为 CGMCC No. 7215，保藏日期为 2013 年 1 月 23 日。

附图说明

[0015] 图 1 是本发明试纸条结构主视图。

[0016] 图 2 是本发明试纸条结构俯视图。

[0017] 附图标记说明：1、PVC 底板；2、硝酸纤维素膜检测层；3、样品垫；4、金标垫；5、检测线(T 线)；6、质控线(C 线)；7、吸水垫。

具体实施方式

[0018] 实施例 1

如图 1-2 所示，一种金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条，包括 PVC 底板 1，在 PVC 底板 1 两端分别设有样品垫 3 和吸水垫 7；

PVC 底板 1 中部设置有硝酸纤维素膜检测层 2，在硝酸纤维素膜检测层 2 与样品垫 3 之间设置有金标垫 4；所述金标垫 4 一端与样品垫 3 相连接叠放，另一端叠放于硝酸纤维素膜检测层 2 上；

所述硝酸纤维素膜检测层 2 上依次设置有检测线 5 和质控线 6。

[0019] 所述金标垫 4 包被有金标标记抗 SEE 抗体 1E5。所述检测线 5 上包被有抗 SEE 抗体 2E3。所述质控线 6 上包被有羊抗鼠 IgG。

[0020] 实施例 2

所述金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法，金黄色葡萄球菌肠毒素 E 缩写为 SEE，步骤为：

(1) 抗 SEE 特异性单克隆抗体的制备：

以重组表达的 SEE (北京军事医学科学院)为免疫原，免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠，免疫程序如下：第一周进行首免， $10 \mu\text{g}/\text{只}$ ，弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射；第四周进行二免， $8 \mu\text{g}/\text{只}$ ，弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射；第六周进行三免， $6 \mu\text{g}/\text{只}$ ，弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射；第七周尾部采血测效价，选择效价最高的小鼠；第八周进行冲刺免疫， $4 \mu\text{g}/\text{只}$ ，生理盐水溶解，腹腔注射；冲刺免疫 3 天后眼眶采血后进行融合。筛选采用间接 ELISA 进行，共筛选到 10 个细胞株；

(2) 特异性 SEE 双抗体检测抗体的筛选：

将步骤(1)纯化后的 10 株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶 HRP，直接法鉴定标记成功后进行双抗体夹心法配对，确定特异性免疫胶体金快速检测试纸条所需要抗 SEE 抗体；其中 1E5 为金标抗体，2E3 为包被抗体；

(3) 金黄色葡萄球菌肠毒素 E 免疫胶体金快速检测试纸条的制备：

a、空白胶体金的制备：

采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒，在锥形瓶中加入 200mL 去离子水和 2mL 质量浓度为 1% 的氯金酸，搅拌加热至沸腾，快速加入 4mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠，继续加热 15~20 分钟，至呈亮红色，然后室温中冷却，4℃ 冷藏保存；

b、胶体金标记抗体的制备：

空白胶体金溶液用 0.1M K_2CO_3 调节 pH 值至 7.4，搅拌中滴加适量浓度抗体，每毫升空白胶体金溶液加入 30 μ g 抗体 1E5，继续搅拌 30 分钟，离心，吸取上清，用金标抗体保存液重旋；

c、金标垫的制备：

调试三维平面点膜喷金仪仪器 HM3055，将标记好胶体金的抗 SEE 抗体 1E5 均匀的喷在玻璃纤维膜上，喷液量 0.6 μ L /cm，37℃ 烘干过夜，封袋备用；

d、包被膜的制备：

调试三维平面点膜喷金仪仪器 HM3055，将稀释好的抗 SEE 抗体 2E3 均匀喷在硝酸纤维素膜上，得到检测线；将稀释好的羊抗鼠 IgG 均匀喷在硝酸纤维素膜上，得到质控线，喷液量为 0.6 μ L /cm，37℃ 烘干过夜，封袋备用；

将 PVC 底板 1、硝酸纤维素膜检测层 2、样品垫 3、金标垫 4、检测线 5、质控线 6 和吸水垫 7 组合，即得产品金黄色葡萄球菌肠毒素 E 的免疫胶体金快速检测试纸条。

[0021] 本发明试纸条的工作原理：采用胶体金免疫层析技术，选用 SEE 特异性抗体作为固相物，利用双抗体夹心法原理检测样品中是否含有 SEE。当待检样品中含有 SEE 时，抗原先和胶体金标记的抗 SEE 抗体(1E5)结合，由于层析作用复合物沿包被膜向前移动，当遇到检测线上的抗 SEE 抗体(2E3)时，形成抗体-抗原-金标抗体复合物，在检测线上富集，形成红色沉淀线。

[0022] 检测时如样品为阴性，则试纸条只有质控线 C 线显色；如果样品为阳性，肠毒素 E 含量值大于 0.25ng/mL，则试纸条质控线 C 线、检测线 T 线均显色。如果试纸条 C 线不显色，则说明试纸条质量出现问题。

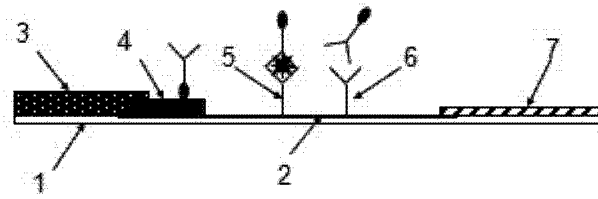


图 1

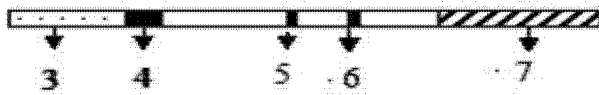


图 2

专利名称(译)	一种金黄色葡萄球菌肠毒素E的免疫胶体金快速检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN103777004A	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201410051704.1	申请日	2014-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	匡华 胥传来 孔德昭 马伟 徐丽广 宋珊珊 刘丽强		
发明人	匡华 胥传来 孔德昭 马伟 徐丽广 宋珊珊 刘丽强		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/558 G01N33/56938 G01N2333/31		
其他公开文献	CN103777004B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种金黄色葡萄球菌肠毒素E的免疫胶体金快速检测试纸条，以及该免疫胶体金试纸条的制备方法，属于免疫检测技术领域。该试纸条由样品垫、涂覆金标记抗SEE抗体1E5 (CGMCC No.7214)的金标垫，在检测线、质控线分别包被有抗SEE抗体2E3 (CGMCC No.7215)及羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜构成，依次按样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘附在PVC底板上。该试纸条操作简便、快速、准确，测试全过程只需5分钟，不受环境条件的干扰，特异性好，检测灵敏度高，最低检测限为0.25ng/mL。本发明适用于海关、企业、医院、检验检疫单位等，可实现食品或临床样本中金黄色葡萄球菌肠毒素E的快速检测。

