



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104483480 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201410810543. X

G01N 21/64(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 23

(71) 申请人 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心

地址 100026 北京市朝阳区甜水园街 6 号

申请人 中华人民共和国临沂出入境检验检疫局

中国检验检疫科学研究院

(72) 发明人 张捷 杨向莹 许美玲 邹明强
汪琦 张晓光 舒咬根 陈广全

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 赵敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

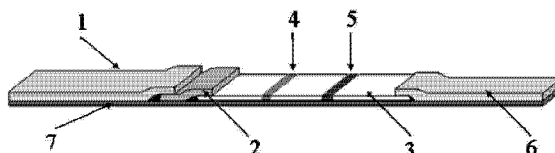
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条

(57) 摘要

本发明涉及一种基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析检测试纸条及制备方法与应用,本发明采用低噪声激发式荧光染料作为标记物,采用免疫层析技术,制备靶向于副溶血弧菌的免疫层析试纸条,检测时,采用专用便携式低噪声激发式荧光扫描仪分别扫描质控线和检测线,以检测线荧光强度检测值实现样本的定性及定量检测,该试纸条适用于食品及病理样本中副溶血弧菌即时检测,本发明具有快速、高敏、兼顾定性及精准定量及便携的特点。



1. 一种基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,其特征在于,包括:

底板(7)以及沿所述底板(7)的长度方向上依次粘附在所述底板上的样品垫(1)、结合垫(2)、抗体承载膜(3)和吸水垫(6),且所述样品垫(1)、结合垫(2)、抗体承载膜(3)和吸水垫(6)之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠;所述抗体承载膜(3)粘附于所述底板(7)的中间部位,其上设置有相间隔的检测线(4)和质控线(5),所述检测线(4)靠近所述结合垫(2),所述质控线(5)靠近所述吸水垫(6);

所述结合垫(2)上喷涂有低噪声激发式荧光染料标记的可与所述副溶血弧菌特异性结合的单克隆抗体;

所述检测线(4)由可与所述副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体涂层形成;所述质控线(5)由与所述副溶血弧菌以及所述可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体均无关的抗体涂层形成。

2. 根据权利要求1所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,其特征在于,所述结合垫(2)上喷涂的所述可与副溶血弧菌特异性结合的单克隆抗体为兔抗副溶血弧菌单克隆抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,其特征在于,形成所述检测线(4)的所述可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体为兔抗副溶血弧菌多克隆抗体。

4. 根据权利要求1-3任一所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,其特征在于,形成所述质控线(5)的抗体为羊抗兔 IgG 多克隆抗体。

5. 根据权利要求1-4任一所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,其特征在于,所述的低噪声激发式荧光染料为发射波长为 777nm,激发波长为 790nm 的荧光分子。

6. 根据权利要求5所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,其特征在于,所述的低噪声激发式荧光染料为 NHS 活化的低噪声激发式荧光染料 DyLight800。

7. 一种制备权利要求1-6任一所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条的方法,其特征在于,包括如下步骤:

A) 取以 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液稀释 10 倍的所述低噪声激发式荧光染料,染料与副溶血弧菌单克隆抗体按 1:2 质量比混合均匀,室温条件下避光反应 2 小时,随后将所得的标记产物放入含有 PBS 缓冲液的透析袋中,4℃透析 4 小时,向所述标记好的标记产物中添加终浓度为 1.5% BSA、0.15% Tween20 和 0.15%叠氮化钠,4℃保存,备用;

B) 在所述结合垫(2)上喷涂以层析缓冲液稀释 2000 倍后的上述步骤 A) 中的所述标记产物,然后室温风干,备用;

C) 使用含 5% BSA,0.1% Tween 20 的 PBS 的 pH 为 7.4 的缓冲液喷涂在所述样品垫(1)上,室温风干后,备用;

D) 分别取所述副溶血弧菌多克隆抗体和所述与副溶血弧菌以及可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体均无关的抗体用划线机在所述抗体承载膜(3)上划所述检测线(4)和所述质控线(5),室温风干,备用;

E) 将上述步骤获得的所述样品垫 (1)、所述结合垫 (2)、所述抗体承载膜 (3) 和所述吸水垫 (6) 沿所述底板 (7) 的长度方向上依次粘附, 然后切割成试纸条, 即得。

8. 权利要求 1-6 任一所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条在定性及定量检测副溶血弧菌领域中的用途。

9. 一种利用权利要求 1-6 任一所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条检测副溶血弧菌的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

a) 以含 5% BSA, 0.1% Tween 20 的 PBS 的 pH 为 7.4 的缓冲液稀释处理待测样品, 超声破菌后取上清液作为待检样利用权利要求 1-6 任一所述的试纸条进行免疫层析检测;

b) 荧光扫描所述检测线 (4) 和所述质控线 (5), 分别测定所述检测线 (4) 和所述质控线 (5) 区域的荧光强度, 若所述质控线 (5) 区域出现荧光发射峰, 则表明该试纸条有效, 反之则无效; 若所述检测线 (4) 区域同时出现荧光发射峰则为阳性结果, 反之则为阴性。

10. 根据权利要求 9 所述的检测副溶血弧菌的方法, 其特征在于, 还包括制备标准曲线及定量检测的步骤: 其中

所述制备标准曲线的步骤包括: 取副溶血弧菌菌株标准品配制成 1-100 倍梯度浓度的系列标准品; 并将上述浓度系列标准品超声破菌后分别用所述的试纸条进行免疫层析, 荧光扫描所述检测线 (4) 和所述质控线 (5), 分别测定所述检测线 (4) 和所述质控线 (5) 区域的荧光强度, 制作抗原浓度与荧光强度比之间关系的标准曲线, 并拟合方程;

所述定量检测的步骤包括: 取待测样品以所述的试纸条进行免疫层析检测, 利用上述标准曲线及方程计算得到所述副溶血弧菌浓度。

基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于医学检测领域,具体地说涉及一种基于低噪声激发式荧光染料标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 副溶血弧菌作为致病菌检测的一项重要指标,在公共卫生、食品卫生、畜牧兽医和出入境检验检疫中均有重要的意义,同时也对副溶血弧菌的快速及高精度的定量检测提出了更高的要求。为探求快速、准确、高灵敏度、易操作且能够定量的检测方法,世界各国学者进行了大量研究,从以传统方法为基础发展到以免疫学、分子生物学为基础的快速检测方法,并在实践中不断取得新进展。

[0003] 免疫层析技术是一项有效结合了层析法卓越分离能力和免疫反应高度特异性的新型免疫检测技术,当前在疾病快速诊断、环境污染物分析及致病生物因子检定等领域得到广泛应用。其原理是将特异抗原或抗体固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素膜一端浸入样品后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当迁移至交联标记抗体的特定区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合形成抗原-标记抗体复合物,经标记物的显色、发光或电化学反应而使该区域显示一定的信号,从而实现特异性免疫诊断。常用的标记物包括生色型探针(包括胶体金、胶体碳、着色微球等)和荧光分子(如有机荧光染料、量子点、稀土元素配合物、上转磷光颗粒等)。

[0004] 然而上述的标记物却存在灵敏度有限且无法实现精确定量检测等缺陷,进而限制了免疫层析技术的广泛应用。如现有技术中常见的利用酶标记催化生色底物的酶促反应而显色,可用于抗原或抗体的直接检测,将该方法应用于食品中副溶血弧菌的检测,通过单克隆抗体大大降低假阳性率,但是该方法的灵敏度较分子生物学方法低,且必须经过增菌筛选纯培养步骤,因此难以在短时间内得到检测结果。

[0005] 对于现有的胶体金免疫层析技术,通过胶体金等纳米颗粒的聚集反应而显色,从而实现结果判定。虽然该方法具有便捷、快速、准确和无污染等特点被广泛应用于医学检测和临床诊断,在病原体检测方面,其敏感性、特异性具有其他免疫学方法无可比拟的优势,且无需特殊仪器设备,对检测人员的专业要求低,有良好的基层应用开发前景。但这种方法中存在标记物的稳定性较差,颜色单一,灵敏度较低,受基质的背景干扰大等缺陷,且只能定性检测,不能做到精确定量检测,上述标记灵敏度有限且无法实现精确定量,限制了免疫层析技术的应用。

[0006] 另外,现有免疫层析技术一直主要用于对蛋白类的检测,对于微生物的检测则所见甚少,同时更难以实现微生物的定量检测,对于快速检测致病菌而言,其应用受到极大的限制。

发明内容

[0007] 为此,本发明所要解决的技术问题在于现有技术中难于快速定量检测副溶血弧菌

的问题,进而提供一种基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,并进一步公开了其应用。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供一种基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,包括:

[0009] 底板以及沿所述底板的长度方向上依次粘附在所述底板上的样品垫、结合垫、抗体承载膜和吸水垫,所述样品垫、结合垫、抗体承载膜和吸水垫之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠;所述抗体承载膜粘附于所述底板的中间部位,其上设置有相间隔的检测线和质控线,所述检测线靠近所述结合垫,所述质控线靠近所述吸水垫;

[0010] 所述结合垫上喷涂有低噪声激发式荧光染料标记的可与副溶血弧菌特异性结合的单克隆抗体;

[0011] 所述检测线由可与所述副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体涂层形成;所述质控线由与所述副溶血弧菌以及所述可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体均无关的抗体涂层形成。

[0012] 所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,所述结合垫上喷涂所述的可与副溶血弧菌特异性结合的单克隆抗体为兔抗副溶血弧菌单克隆抗体(由 Abcam 公司提供)。

[0013] 所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,所述检测线上的可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体涂层为兔抗副溶血弧菌多克隆抗体(由 Abcam 公司提供)。

[0014] 所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,形成所述质控线的抗体为羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。

[0015] 所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,所述的低噪声激发式荧光染料为发射波长为 650-1000nm。优选的,所述的低噪声激发式荧光染料为发射波长为 777nm,发射光波长为 790nm 的荧光分子。

[0016] 所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,所述的低噪声激发式荧光染料为 DyLight800。

[0017] 所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条,所述质控线与所述检测线平行设置,所述检测线和所述质控线间距 0.5cm。

[0018] 本发明提供了一种制备所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条的方法,包括如下步骤:

[0019] A) 取以 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液稀释 10 倍的所述低噪声激发式荧光染料(便于取样准确),染料与副溶血弧菌单克隆抗体按 1:2 质量比混合均匀,室温条件下避光反应 2 小时,随后将所得的标记产物放入含有 PBS 缓冲液的透析袋中,4℃透析 4 小时,向所述标记好的标记产物中添加终浓度为 1.5% BSA、0.15% Tween20 和 0.15%叠氮化钠,4℃保存,备用;

[0020] B) 在所述结合垫上喷涂以层析缓冲液稀释 2000 倍后的上述步骤 A) 中的所述标记产物,然后室温风干,备用;

[0021] C) 使用含 5% BSA,0.1% Tween 20 的 PBS(pH 为 7.4) 缓冲液喷涂在所述样品垫上,室温风干后,备用;

[0022] D) 分别取所述副溶血弧菌多克隆抗体和与副溶血弧菌以及可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体均无关的抗体用划线机在所述抗体承载膜上划所述检测线和所述质控线, 室温风干, 备用;

[0023] E) 将上述步骤获得的所述样品垫、所述结合垫、所述抗体承载膜和所述吸水垫沿所述底板的长度方向上依次粘附, 然后切割成试纸条, 即得;

[0024] 本发明提供了一种由上述的制备方法制得的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条在定性及定量检测副溶血弧菌领域中的用途。

[0025] 本发明提供了一种利用所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条定性检测副溶血弧菌的方法, 包括如下步骤:

[0026] a) 以含 5% BSA, 0.1% Tween 20 的 PBS (pH 为 7.4) 缓冲液稀释处理待测样品, 取上清液超声破菌后作为检样, 用所述的试纸条进行免疫层析;

[0027] b) 荧光扫描所述检测线和所述质控线, 分别测定所述检测线和所述质控线区域的荧光强度, 若所述质控线区域出现荧光发射峰, 则表明该试纸条有效, 反之则无效; 若所述检测线区域同时出现荧光发射峰则为阳性结果, 反之则为阴性。

[0028] 所述的检测副溶血弧菌的方法, 还包括制备标准曲线及定量检测的步骤; 其中:

[0029] 所述制备标准曲线的步骤包括: 取副溶血弧菌菌株标准品配制成 1-100 倍梯度浓度的系列标准品; 并将上述浓度系列标准品超声破菌后分别用所述的试纸条进行免疫层析, 荧光扫描所述检测线和所述质控线, 分别测定所述检测线和所述质控线区域的荧光强度, 制作抗原浓度与荧光强度比之间关系的标准曲线, 并拟合方程;

[0030] 所述定量检测的步骤包括: 取待测样品以所述的试纸条进行免疫层析, 利用上述标准曲线及工作方程求得所述副溶血弧菌浓度。

[0031] 本发明的上述技术方案相比现有技术具有以下优点:

[0032] (1) 本发明所述的基于基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条, 其发射光谱位于低噪声激发式区域 (波长为 650-1100nm) 的基于低噪声激发式荧光标记的探针具有较高的信噪比, 并由此保障了其高检测灵敏度, 同时由于生物基体极少在低噪声激发式光谱区自发荧光, 使得基于此类探针标记的分析检测免受背景荧光干扰; 因散射光强度与波长的四次方成反比, 发射光位于长波区的基于低噪声激发式荧光标记的探针受其干扰小。与常用的胶体金免疫层析试纸条相比, 基于低噪声激发式荧光染料标记的免疫层析体系对靶标菌的灵敏度提高约 100 倍; 如副溶血弧菌胶体金免疫层析试纸条的最低检出限为 1×10^4 CFU/mL, 而本发明中基于低噪声激发式荧光染料的副溶血弧菌免疫层析试纸条的最低检出限为 1.2×10^2 CFU/mL;

[0033] (2) 本发明所述的低噪声激发式荧光副溶血弧菌免疫层析试纸条定性检测副溶血弧菌的方法具有便携的优势, 适用于现场、即时、快速检测, 本方法所涉的免疫层析试纸条及低噪声激发式荧光扫描仪均属于便携可移动装置, 且整个检测过程可在 10min 内完成, 适用于现场、即时、快速检测, 相对于传统培养法 5-6 天的检测周期及繁琐的培养基配制等过程具有显著的时效性优势; 相对于 PCR 及实时荧光定量 PCR 法等分子生物学方法则在仪器的检测速度、便携性及现场适用性上呈现明显优势;

[0034] (3) 本发明所述的低噪声激发式荧光副溶血弧菌免疫层析试纸条定量检测副溶血弧菌的方法可对所述副溶血弧菌进行定量检测, 传统的免疫层析法依赖胶体金颗粒的聚集

效应而生色以判读结果,其颜色深浅虽与样品中靶标菌的浓度存在一定的数量关系,但无法进行准确定量,而本发明将低噪声激发式荧光染料标记于特异性抗体上,检测线的荧光强度直接体现了与捕获分子相结合的靶标菌的量,加之质控线不随样本改变的荧光强度作为内参,通过扫描检测线及质控线上的荧光强度、计算比值,并与标准曲线比较即可得出检样中靶标菌的浓度。

附图说明

[0035] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中

[0036] 图 1 是实施例 1 中所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条的示意图;

[0037] 图 2 是实施例 2 中所述的副溶血弧菌低噪声激发式荧光检测图;

[0038] 图 3 是实施例 2 中所述定性检测副溶血弧菌方法的特异性试验结果图

[0039] 图 4 是实施例 3 中所述的副溶血弧菌的标准曲线。

[0040] 图中附图标记表示为:1-样品垫,2-结合垫,3-硝酸纤维素膜,4-检测线,5-质控线,6-吸水垫,7-底板。

具体实施方式

[0041] 实施例 1

[0042] 本实施例所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条如图 1 所示,其包括,底板 7 以及沿所述底板 7 的长度方向上依次粘附在所述底板上的样品垫 1、结合垫 2、抗体承载膜 3 和吸水垫 6;且所述样品垫 1、结合垫 2、抗体承载膜 3 和吸水垫 6 之间,依次与且仅与相邻部位相接触且部分重叠;所述抗体承载膜 3 上粘附于所述底板 7 的中间部位,其上设置有相间隔的检测线 4 的质控线 5,所述检测线 4 靠近所述结合垫 2,所述质控线 5 靠近所述吸水垫 6;所述质控线 4 与所述检测线 5 平行设置,所述检测线和所述质控线间距 0.5cm。

[0043] 所述结合垫 2 上喷涂有低噪声激发式荧光染料标记的可与副溶血弧菌特异性结合的单克隆抗体兔抗副溶血弧菌单克隆抗体(由 Abcam 公司提供);所述检测线 4 由可与所述副溶血弧菌特异性结合的兔抗副溶血弧菌多克隆抗体(由 Abcam 公司提供)涂层形成;所述质控线 5 由与所述副溶血弧菌以及所述可与副溶血弧菌特异性结合的多克隆抗体均无关的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体涂层形成。

[0044] 所述的低噪声激发式荧光染料为发射波长为 777nm,发射光波长为 790nm 的 NHS 活化的基于低噪声激发式荧光标记的染料 DyLight800 作为荧光分子。

[0045] 上述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0046] A) 取以 PBS(pH 为 7.4) 缓冲液稀释 10 倍的所述低噪声激发式荧光染料 DyLight800(由美国 ThermoFisher 公司提供)1.4 μ L 与 20 μ g 的所述副溶血弧菌单克隆抗体混合均匀,室温条件下避光反应 2 小时,随后将所得的标记产物放入含有 PBS 缓冲液的透析袋中,4 $^{\circ}$ C 透析过夜 4 小时,去除游离的荧光染料,向所述标记好的抗体溶液标记产物中

添加终浓度为 1.5% BSA、0.15% Tween20 和叠氮化钠 0.15%，4℃ 保存，备用；

[0047] B) 选取玻璃纤维素膜为所述结合垫 2，在所述结合垫 2 上喷涂以层析缓冲液稀释 2000 倍后的上述步骤 A) 中的标记产物，然后室温风干，备用；

[0048] C) 选取纤维素膜为所述样品垫 1，使用含 5% BSA、0.1% Tween 20 的 PBS (pH 为 7.4) 缓冲液喷涂在所述样品垫 1 上，室温风干后，备用；

[0049] D) 选取硝酸纤维素膜为所述抗体承载膜 3，分别取所述副溶血弧菌多克隆抗体和所述羊抗兔 IgG (由北京华大蛋白质公司提供) 多克隆抗体用划线机在所述抗体承载膜 3 上划所述检测线 4 和所述质控线 5，室温风干，备用；

[0050] E) 将上述步骤获得的所述样品垫 1、所述结合垫 2、所述抗体承载膜 3 和所述吸水垫 6 沿所述底板 7 的长度方向上依次粘附，具体为在底板 7 中间先铺设抗体承载膜 3，然后在抗体承载膜 3 的与质控线 5 相临近的一端铺吸水垫 6，使吸水垫 6 与抗体承载膜 3 部分重叠，然后在抗体承载膜 3 的与检测线 4 相临近的一端铺所述结合垫 2，使所述抗体承载膜 3 与检测线 4 相临近的一端部分重叠，随后在所述结合垫 2 的另一端再部分重叠的铺设所述样品垫 1，最后切割成 0.5cm 宽，即得试纸条。

[0051] 实施例 2

[0052] 本实施例提供了一种利用所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条进行定性检测副溶血弧菌的方法，包括如下步骤：

[0053] a) 取鱼肉样品 25g，剪碎用 225mL 含 5% BSA、0.1% Tween 20 的 PBS (pH 为 7.4) 缓冲液稀释样品，取洗脱液进行超声破菌，直径 3mm 探头，工作 5s，休息 5s，40% 能量 (由宁波先倡电子科技有限公司提供的超声细胞粉碎机，型号为 XC-CD 型)，共计 30 次循环，吸取 50 μ L 经超声处理的检样滴加到样品垫 1 上，待吸收干后再滴加 50 μ L 层析液，另取所述缓冲液作为阴性对照，用所述的试纸条进行免疫层析；

[0054] b) 室温放置 15min 后，用便携式基于低噪声激发式荧光标记的扫描仪 (由北京博润福得科技发展有限公司提供) 分别测定所述检测线 4 和所述质控线 5 区域的荧光强度，若所述质控线 5 区域出现荧光发射峰，则表明该试纸条有效，反之则无效；若所述检测线 4 区域同时出现荧光发射峰则为阳性结果，反之则为阴性，附图 2 给出了对上述样品的定性检测结果。

[0055] 所述定性检测副溶血弧菌方法的特异性试验：分别取实验室分离的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、大肠埃希氏菌、单增李斯特菌和副溶血弧菌调制成为 0.6×10^4 CFU/mL 的菌液，然后按照上述的超声处理方法进行破菌处理，吸取 50 μ L 经超声处理的样本滴加到样品垫上，待吸收干后再滴加 50 μ L 上述的 PBS 缓冲液，室温放置 15min 后，用便携式近红外荧光扫描仪 (由北京博润福得科技发展有限公司提供) 读数，附图 3 为所述定性检测副溶血弧菌方法的特异性试验结果图，从图中可以看出，除副溶血弧菌样品外，其余检测的细菌在检测线位置均未出现发射峰，各菌的试纸条均在质控线处出现发射峰，表明本方法对副溶血弧菌的检测特异性好，与其他四个菌属无交叉反应。

[0056] 实施例 3

[0057] 利用所述的基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条定量检测副溶血弧菌的方法：

[0058] 制备标准曲线：取 10^7 CFU/mL 的副溶血弧菌纯菌 (本实验室分离株)，用

PBS(pH7.4) 稀释液将所述纯菌进行倍数系列稀释,制成 2.4×10^5 CFU/mL、 1.2×10^5 CFU/mL、 2.4×10^4 CFU/mL、 1.2×10^4 CFU/mL、 2.4×10^3 CFU/mL、 1.2×10^3 CFU/mL、 2.4×10^2 CFU/mL、 1.2×10^2 CFU/mL 的样品;超声破菌,直径 3mm 探头,工作 5s,休息 5s,40% 能量(由宁波先倡电子科技有限公司提供的超声细胞粉碎机,型号为 XC-CD 型),共计 30 次循环,吸取所述处理后的样品 50 μ L 滴加到样品垫 1 上,待吸收干后再滴加 50 μ L 上述 PBS 缓冲液;室温静置 10 分钟,将上述试纸条放入便携式低噪声激发式荧光扫描仪(北京博润福得科技发展有限公司)中读数。

[0059] 上述系列稀释的副溶血弧菌标准品分别进行检测,扫描获得检测线 4 和质控线 5 的荧光值,同时出现检测区域荧光峰和质控区域荧光峰方表明反应正常。每个稀释度样本平行测量两次,取平均值作为测量值,检测结果见表 1,以该值对相应的样品浓度制作标准工作曲线,如图 4 所示,并拟合得适用的标准曲线, $y = 1.51x + 1.6973$, $R^2 = 0.9836$ 。

[0060] 表 1:不同浓度副溶血弧菌标准品对应检测结果

[0061]

浓度 (CFU/mL)	2.4×10^5	1.2×10^5	2.4×10^4	1.2×10^4	2.4×10^3	1.2×10^3	2.4×10^2	1.2×10^2	2.4×10
----------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-----------------

[0062]

第一次测量	1.89	1.87	1.88	1.46	1.11	0.87	0.51	0.26	0.01
第二次测量	1.85	1.83	1.82	1.56	1.05	0.80	0.59	0.26	0.02
平均值	1.87	1.85	1.86	1.51	1.08	0.83	0.55	0.26	0.01

[0063] 采用添加回收试验方法,取未检出副溶血弧菌鱼鸡肉样品 75g,分作 3 份,分别加入一定量的副溶血弧菌,剪碎,用 225mL PBS 缓冲液稀释所述鱼肉样品,吸取 1ml 样本至 EP 管中,直径 3mm 探头,工作 5s,休息 15s,40% 能量(由宁波先倡电子科技有限公司提供的超声细胞粉碎机,型号为 XC-CD 型),共计 30 次循环。吸取 100 μ L 经超声处理的样品溶液滴加到样品垫 1 上,室温静置 10 分钟,将所述试纸条放入便携式低噪声激发式荧光扫描仪中读数,结果如下表 2 所示。

[0064] 表 2 根据标准曲线计算样品中的副溶血弧菌的浓度

[0065]

样品编号	检测值	副溶血弧菌浓度 (CFU/mL)	副溶血弧菌已知 浓度 (CFU/mL)
1	0.01	0	未添加
2	0.01	0	未添加
3	0.84	0.9×10^4	1.0×10^4

[0066] 上述表格数据可知,本发明采用基于荧光标记法测定的副溶血弧菌的浓度较为准确,可用于日常副溶血弧菌的检测之用。

[0067] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

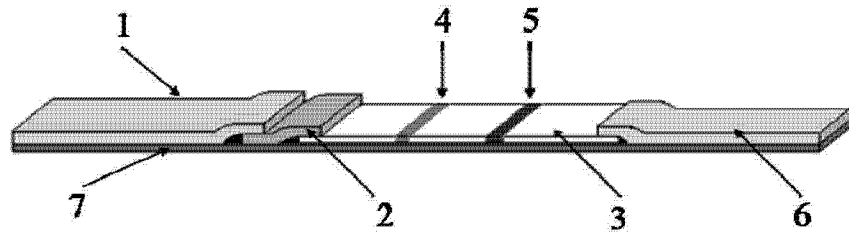


图 1

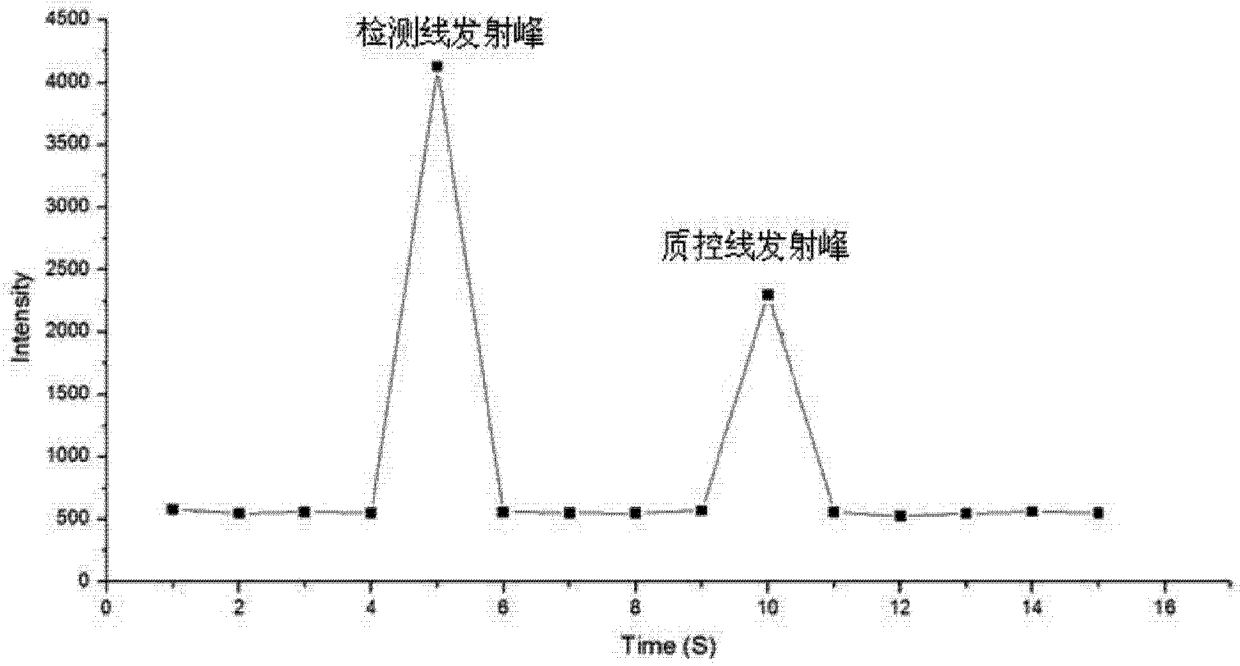


图 2

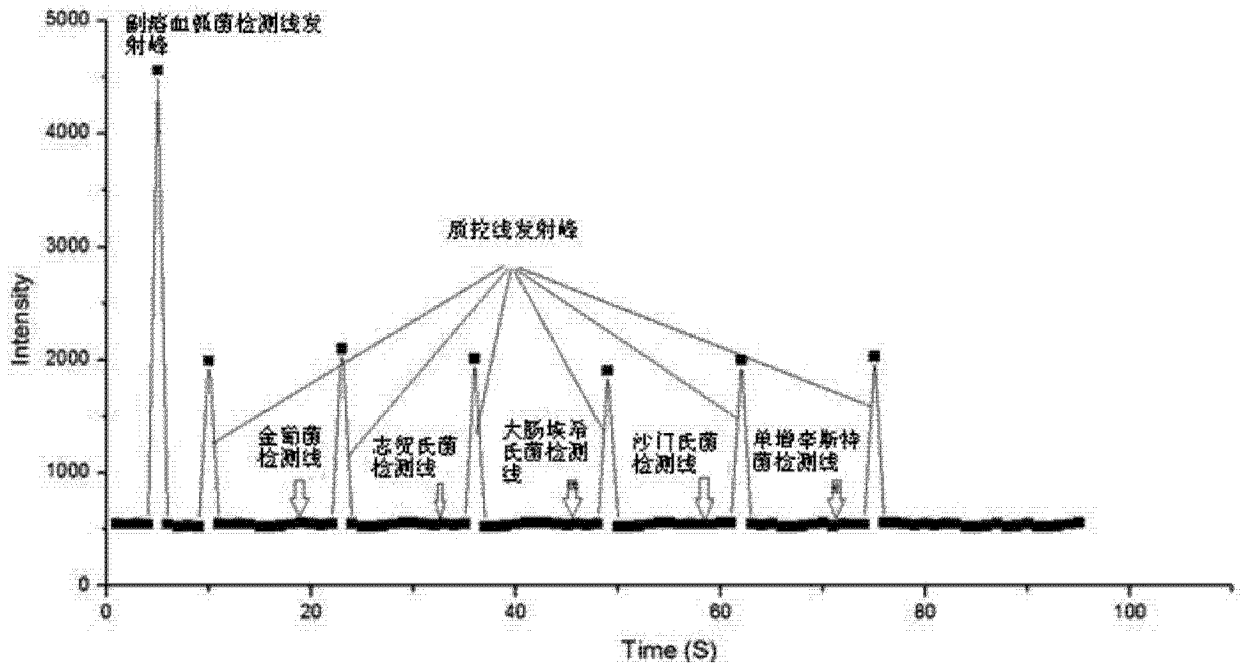


图 3

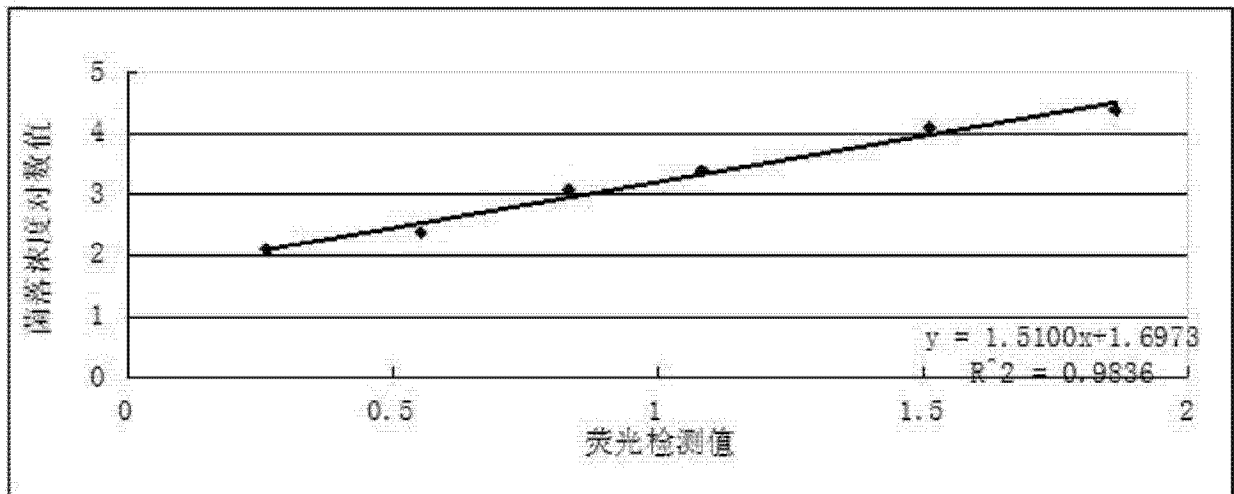


图 4

专利名称(译)	基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN104483480A	公开(公告)日	2015-04-01
申请号	CN201410810543.X	申请日	2014-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 中华人民共和国临沂出入境检验检疫局		
申请(专利权)人(译)	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 中华人民共和国临沂出入境检验检疫局 中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 中华人民共和国临沂出入境检验检疫局 中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	张捷 杨向莹 许美玲 邹明强 汪琦 张晓光 舒咬根 陈广全		
发明人	张捷 杨向莹 许美玲 邹明强 汪琦 张晓光 舒咬根 陈广全		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N21/6402 G01N33/533		
代理人(译)	赵敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于低噪声激发式荧光标记的副溶血弧菌免疫层析检测试纸条及制备方法与应用，本发明采用低噪声激发式荧光染料作为标记物，采用免疫层析技术，制备靶向于副溶血弧菌的免疫层析试纸条，检测时，采用专用便携式低噪声激发式荧光扫描仪分别扫描质控线和检测线，以检测线荧光强度检测值实现样本的定性及定量检测，该试纸条适用于食品及病理样本中副溶血弧菌即时检测，本发明具有快速、高敏、兼顾定性及精准定量及便携的特点。

