



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105445465 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510782408. 3

G01N 21/64(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 11. 16

(71) 申请人 珠海国际旅行卫生保健中心

地址 519020 广东省珠海市拱北侨光路 133 号

申请人 广州市疾病预防控制中心

(72) 发明人 史咏梅 何晖 汪海波 冯子力

伍碧梅 涂承宁 谭华 叶立青

(74) 专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司

司 44214

代理人 王贤义 何承鑫

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/553(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明旨在提供一种快速、灵敏、简便的检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒,以及该试剂盒的制备方法。本发明通过对免疫功能化的时间分辨磁性荧光纳米材料与副溶血性弧菌特异性的结合实现对副溶血性弧菌的分离和富集;所捕获的待检菌体再与免疫层析试纸条上的副溶血性弧菌特异性多克隆抗体结合,通过检测在紫外灯下试纸条上荧光信号实现对样本中待测菌的检测。本发明可应用于微生物致泻性致病菌检测领域。

1. 一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒,其特征在于:它包括反应微孔试剂、免疫层析试纸条和副溶血性弧菌样品稀释液;

所述反应微孔试剂为密封有冻干的磁性荧光纳米免疫复合微球和反应液混合物的酶标板微孔;

所述磁性荧光纳米免疫复合微球为以 Fe_3O_4 为核心,内外包裹两层二氧化硅,中间包裹一层稀土金属钕离子螯合物的双功能纳米复合材料,纳米材料表面偶联抗副溶血性弧菌单克隆抗体;

所述反应液为含有Tris、HZT、BSA和Tween20的混合溶液。

2. 根据权利要求1所述的一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒,其特征在于:所述免疫层析试纸条包括PVC板;在所述PVC板上依次设置有吸水垫、硝酸纤维素膜和样品垫,其中所述样品垫上包括Tris、海藻糖、BSA、Tween20、NaCl、PVP-30,所述硝酸纤维素膜上包裹兔抗副溶血性弧菌多克隆抗体和羊抗鼠二抗。

3. 根据权利要求1所述的一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒,其特征在于:所述副溶血性弧菌稀释液为灭菌超纯水。

4. 一种如权利要求1所述的快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒的制备方法,其特征在于,该方法包括反应微孔试剂制备步骤和免疫层析试纸条制备步骤;

所述反应微孔试剂制备步骤为:

(1)磁性荧光纳米颗粒的修饰:将纳米复合材料在氨基硅烷乙醇溶液中加热回流12-24小时,用乙醇洗涤,再用戊二酸酐的二甲基饱和溶液重悬并室温搅拌2-4小时,再次乙醇洗涤后用双蒸水制成1mg/ml悬浮液保存,即为氨基化修饰的磁性荧光纳米微球;

(2)制备磁性荧光纳米免疫复合微球:取以上经修饰的荧光纳米微球悬浮液按照1:11:4:4体积比与2-吗啉乙磺酸(MES, 50mmol/L, pH6.0)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 100mmol/L)、1-(3-二甲氨基丙基)3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC, 100mmol/L)混合并室温摇动反应30分钟,离心弃去上清再以MES重悬,加入抗副溶血性弧菌单克隆抗体室温反应1小时,加入等体积牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液(BSA-PBS, pH6.0)继续反应1小时,离心弃去上清MES洗涤沉淀3次,并用1/3体积Tris-HCl(100mmol/L, pH8.0)重悬,4℃保存;

(3)制备反应微孔:配制终浓度为100mMTris pH9.0、10%HZT、1%BSA、2%T-20的混合液与以上制备的免疫复合微球按照5:1体积比充分混合,加入酶标板反应微孔内,-80℃放置4小时以上,冻干机抽干;

免疫层析试纸条的制备步骤为:

(1)使用20mMTris pH8.0和2%海藻糖混合液将兔抗副溶血性弧菌多克隆抗体稀释终浓度为9mg/ml,使用PBS、0.1%BSA和2%海藻糖混合液将羊抗鼠二抗稀释为1mg/ml;

(2)使用喷膜仪将二者按照1ul/cm喷于硝酸纤维素膜上制得T线和C线;

(3)再附以样本垫、吸收垫、PVC底板制成免疫层析试纸条。

一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物致泻性致病菌检测领域,尤其涉及一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 感染性腹泻是一组由细菌、病毒、原虫等多病原体引起的、以腹泻为主的肠道传染病,是长期以来危害人民群众的常见病和多发病,广泛流行于世界各地。由于该病发病率高、流行极其广泛,影响人们的身体健康,给社会带来沉重的经济负担,已成为全球尤其是发展中国家的重要公共卫生问题。据WHO估计,全世界每天约有数千万人发病,每年腹泻病例高达30~50亿例次,有500~1 000万病例因严重腹泻而死亡,平均每天死亡2.5万人,在我国,感染性腹泻病的发病率一直位居肠道传染病的首位。2006~2007年我国其它感染性腹泻报告年均发病率为56.69/10万,细菌性痢疾报告年均发病率为30.05/10万。近年来爆发的感染性腹泻病疫情显示愈演愈烈之势,2010年10月海地暴发霍乱疫情,全国报告近100万病例,致死约7000人。2011年5月爆发于德国的出血性大肠杆菌感染疫情3个月内在德国造成50人死亡,3000多人感染,此次疫情同时波及欧洲和美国、加拿大等16个国家。随着全球经济一体化进程的加快,国际间人员交往和经济贸易量增长快速,造成传染病在国际间传播流行的危险性急剧增加。因此,开展快速有效的致泻性病原菌快速检测工作对口岸卫生安全和社会稳定意义重大。

[0003] 多种肠道细菌可通过繁殖或毒素造成感染性腹泻。最常见的有志贺菌、沙门菌、弯曲菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌、致泻性大肠艾希菌、梭状芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌及耶尔森菌等引起。副溶血性弧菌是一种嗜盐性细菌。副溶血性弧菌食物中毒,是进食含有该菌的食物所致,主要来自海产品,如墨鱼、海鱼、海虾、海蟹、海蜇,以及含盐分较高的腌制食品,如咸菜、腌肉等。本菌存活能力强,在抹布和砧板上能生存1个月以上,海水中可存活47天。临床上以急性起病、腹痛、呕吐、腹泻及水样便为主要症状。本病多在夏秋季发生于沿海地区,常造成集体发病。由于海鲜空运,内地城市病例也渐增多。

[0004] 目前以上致病菌检测的方法主要是2大类:一是国标方法传统培养鉴定法,二是不断发展的快速检测法。传统培养鉴定法具有结果准确可靠,不需要复杂仪器等特点,但由于其检测周期长、过程繁琐、试剂繁多等缺陷,已远远不能满足现代快速检测的需要。基于免疫学、生物医学、分子生物学方法原理的各种快速检测法具有快速优点,但由于其需要昂贵的设备、需带回专业实验室检测等缺陷,无法满足现场检测的需要。

[0005] 磁性纳米材料是当今世界领域的研究热点之一,在高密度磁记录、磁流体、磁传感等方面得到广泛应用。运用于生物医学领域的纳米材料被称之为纳米生物材料,磁性纳米生物材料具有良好的磁导向性、生物相容性、生物降解性和活性功能基团等特点,由于其具有的生物活性、亲和性、反应活性可结合各种功能分子如酶、抗体、细胞、DNA或RNA等,因而在靶向药物、酶的固定化、免疫测定、细胞分离、分类等领域有广泛应用。本发明技术利用磁

性荧光纳米颗粒连接副溶血性弧菌特异性抗体,通过磁性纳米材料的富集功能,取代了传统的增菌等前处理步骤;纳米颗粒包裹了具有时间分辨荧光特性的镧系金属螯合物,使其具备极高的灵敏性,解决了免疫层析技术的定量检测及副溶血性弧菌现场快速检测的技术瓶颈问题。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种快速、灵敏、简便的检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒,以及该试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明所述试剂盒所采用的技术方案是:所述试剂盒包括反应微孔试剂、免疫层析试纸条和副溶血性弧菌样品稀释液;

所述反应微孔试剂为密封有冻干的磁性荧光纳米免疫复合微球和反应液混合物的酶标板微孔;

所述磁性荧光纳米免疫复合微球为以 Fe_3O_4 为核心,内外包裹两层二氧化硅,中间包裹一层稀土金属铈离子螯合物的双功能纳米复合材料,纳米材料表面偶联抗副溶血性弧菌单克隆抗体;

所述反应液为含有Tris、HZT、BSA和Tween20的混合溶液。

[0008] 进一步地,所述免疫层析试纸条包括PVC板;在所述PVC板上依次设置有吸水垫、硝酸纤维素膜和样品垫,其中所述样品垫上包括Tris、海藻糖、BSA、Tween20、NaCl、PVP-30,所述硝酸纤维素膜上包裹兔抗副溶血性弧菌多克隆抗体和羊抗鼠二抗。

[0009] 另进一步地,所述副溶血性弧菌稀释液为灭菌超纯水。

[0010] 本发明所述试剂盒的制备方法所采用的技术方案是,该方法包括反应微孔试剂制备步骤和免疫层析试纸条制备步骤;

所述反应微孔试剂制备步骤为:

(1)磁性荧光纳米颗粒的修饰:将纳米复合材料在氨基硅烷乙醇溶液中加热回流12-24小时,用乙醇洗涤,再用戊二酸酐的二甲基饱和溶液重悬并室温搅拌2-4小时,再次乙醇洗涤后用双蒸水制成1mg/ml悬浮液保存,即为氨基化修饰的磁性荧光纳米微球;

(2)制备磁性荧光纳米免疫复合微球:取以上经修饰的荧光纳米微球悬浮液按照1:11:4:4体积比与2-吗啉乙磺酸(MES, 50mmol/L, pH6.0)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 100mmol/L)、1-(3-二甲氨基丙基)3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC, 100mmol/L)混合并室温摇动反应30分钟,离心弃去上清再以MES重悬,加入抗副溶血性弧菌单克隆抗体室温反应1小时,加入等体积牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液(BSA-PBS, pH6.0)继续反应1小时,离心弃去上清MES洗涤沉淀3次,并用1/3体积Tris-HCl(100mmol/L, pH8.0)重悬,4℃保存;

(3)制备反应微孔:配制终浓度为100mM Tris pH9.0、10%HZT、1%BSA、2%T-20的混合液与以上制备的免疫复合微球按照5:1体积比充分混合,加入酶标板反应微孔内,-80℃放置4小时以上,冻干机抽干;

免疫层析试纸条的制备步骤为:

(1)使用20mM Tris pH8.0和2%海藻糖混合液将兔抗副溶血性弧菌多克隆抗体稀释终浓度为9mg/ml,使用PBS、0.1%BSA和2%海藻糖混合液将羊抗鼠二抗稀释为1mg/ml;

(2)使用喷膜仪将二者按照1ul/cm喷于硝酸纤维素膜上制得T线和C线;

(3)再附以样本垫、吸收垫、PVC底板制成免疫层析试纸条。

[0011] 本发明的有益效果是：本发明通过对免疫功能化的时间分辨磁性荧光纳米材料与副溶血性弧菌特异性的结合实现对副溶血性弧菌的分离和富集；所捕获的待检菌体再与免疫层析试纸条上的副溶血性弧菌特异性多克隆抗体结合，通过检测在紫外灯下试纸条上荧光信号实现对样本中待测菌的检测。整个检测过程简便快捷，灵敏度高，成本低，可在20分钟内完成。可适用于口岸检疫部门、疾控中心等机构，为公共卫生安全提供技术保障。

附图说明

[0012] 图1是免疫复合微球制备示意图；

图2是反应微孔及免疫层析试纸条结构示意图；

图3是样品检测示意图；

图4是在紫外光激发下的阴性、阳性对照结果。

具体实施方式

[0013] 如图1至4所示，在本实施例中，本发明所述试剂盒包括反应微孔试剂、免疫层析试纸条和副溶血性弧菌样品稀释液；

所述反应微孔试剂为密封有冻干的磁性荧光纳米免疫复合微球和反应液混合物的酶标板微孔；所述磁性荧光纳米免疫复合微球为以 Fe_3O_4 为核心，内外包裹两层二氧化硅，中间包裹一层稀土金属铈离子螯合物的双功能纳米复合材料，纳米材料表面偶联抗副溶血性弧菌单克隆抗体；所述反应液为含有Tris、H2T、BSA和Tween20的混合溶液；

所述免疫层析试纸条包括PVC板a；在所述PVC板a上依次设置有吸水垫b、硝酸纤维素膜c和样品垫d，其中所述样品垫d上包括Tris、海藻糖、BSA、Tween20、NaCl、PVP-30，所述硝酸纤维素膜c上包裹兔抗副溶血性弧菌多克隆抗体和羊抗鼠二抗；

所述副溶血性弧菌稀释液为灭菌超纯水。

[0014] 上述试剂盒的制备方法包括反应微孔试剂制备步骤和免疫层析试纸条制备步骤；所述反应微孔试剂制备步骤为：

(1)磁性荧光纳米颗粒的修饰：取适量铈离子标记的磁性荧光纳米颗粒加入氨基硅烷乙醇溶液中，加热回流12~24 h，用乙醇洗涤加热回流后产物。用戊二酸酐的二甲基甲酰胺(DMF)饱和溶液重悬纳米颗粒，室温搅拌2~4 h。再次用乙醇洗涤纳米颗粒，用双蒸水重悬纳米颗粒，制成1 mg/ml 悬浮液备用，所得即为表面氨基修饰的时间分辨磁性荧光纳米微球。

[0015] (2)制备磁性荧光纳米免疫复合微球：取50 μl 修饰后的荧光纳米颗粒加入550 μl 浓度为50mmol/L 的2-吗啉乙磺酸(MES, pH6.0)，再加入100mg/ml 的N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)各200 μl ， $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 摇动30 min。离心，弃去上清液，用1 ml MES(50 mmol/L)重悬颗粒。加入适量抗副溶血性弧菌SPA 单克隆抗体， $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 振摇1 h。再加入等体积2%牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液(BSA-PBS, pH7.4)，继续振摇1 h。离心，弃去上清液，用1 ml MES(50 mmol/L)洗涤颗粒，共洗涤3次。最后用300 μl 的10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)重悬颗粒， 4°C 保存备用，所得即为免疫化磁性纳米微球。

[0016] (3)制备反应微孔:配制终浓度为的100mM-HCl(pH9.0)、10%HZT、1%BSA、2%Tween-20的反应液50u1与以上制备的10u1免疫化磁性纳米微球混匀,并将其加入酶标板的反应微孔内,-80°C储存4小时以上,冻干机冻干后密封保存,所得即为反应微孔试剂。

[0017] 免疫层析试纸条的制备步骤为:

(1)使用20mMTris pH8.0和2%海藻糖混合液将兔抗副溶血性弧菌多克隆抗体稀释终浓度为9mg/ml,使用PBS、0.1%BSA和2%海藻糖混合液将羊抗鼠二抗稀释为1mg/ml;

(2)使用喷膜仪将二者按照1u1/cm喷于硝酸纤维膜上制得T线和C线;

(3)再附以样本垫、吸收垫、PVC底板制成免疫层析试纸条。

[0018] 下面,利用上述方法制备得到的试剂盒来对具体的样品进行检测并记录结果。

[0019] 实施例一:腹泻、呕吐物及饮料、牛奶等液体待测样品,直接取100u1的样品(可腹泻呕吐物状态添加生理盐水或PBS缓冲液),与100u1样品稀释液一同加入反应杯中即可检测。

[0020] 实施例二:水产品、成型粪便、肉类、蔬菜瓜果等固态待测物,先称取一定量的样品,加入生理盐水或PBS缓冲液等,匀浆均质,再与等体积稀释液一同加入反应杯进行检测。

[0021] 结果读取在试纸条在反应杯内吸取反应液后10分钟内放置于紫外灯下观察。

[0022] 检测结果:

特异性:用本发明建立的免疫层析法检测过夜培养的表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门菌、志贺菌、大肠杆菌、01 群霍乱弧菌、0139 群霍乱弧菌、副溶血性弧菌、甲乙丙型副伤寒菌,鼠伤寒菌,志贺菌,大肠杆菌0157,检测结果均为阴性。

[0023] 灵敏度:用生理盐水稀释副溶血性弧菌培养液制备成系列浓度梯度菌液测试本方法的最低检测限为 4.9×10^3 CFU/ml。直接检测,呕吐物和粪便的检测限为 4.9×10^3 CFU/ml。以预检副溶血性弧菌阴性并人工系列浓度菌液污染后培养物的样本检测限依次为:卤猪肉 4.9×10^2 CFU/ml、生猪肉 4.9×10^3 CFU/ml、鸡肉 4.9×10^2 CFU/ml、牛奶 4.9×10^2 CFU/ml、经培养粪便 4.9×10^3 CFU/ml。

[0024] 以上所述为本发明的较佳实施例而已,但本发明不应该局限于该实施例所公开的内容。所以凡是不脱离本发明所公开的精神下完成的等效或修改,都落入本发明保护的范围内。

[0025] 本发明可应用于微生物致泻性致病菌检测领域。

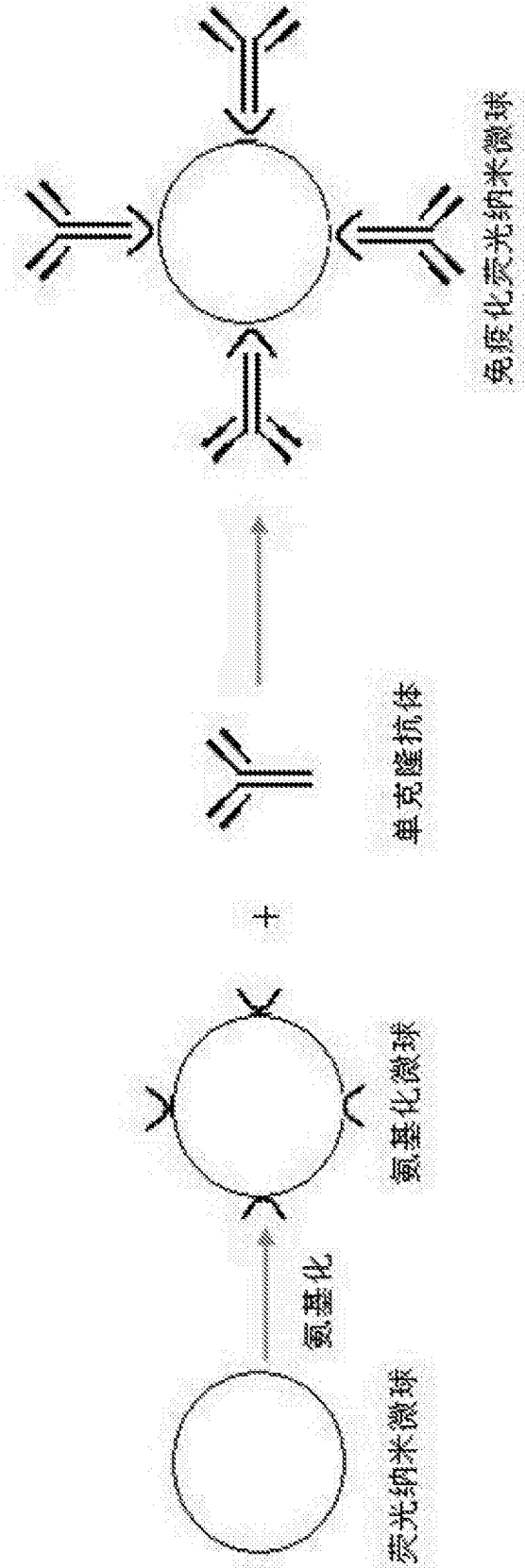


图1

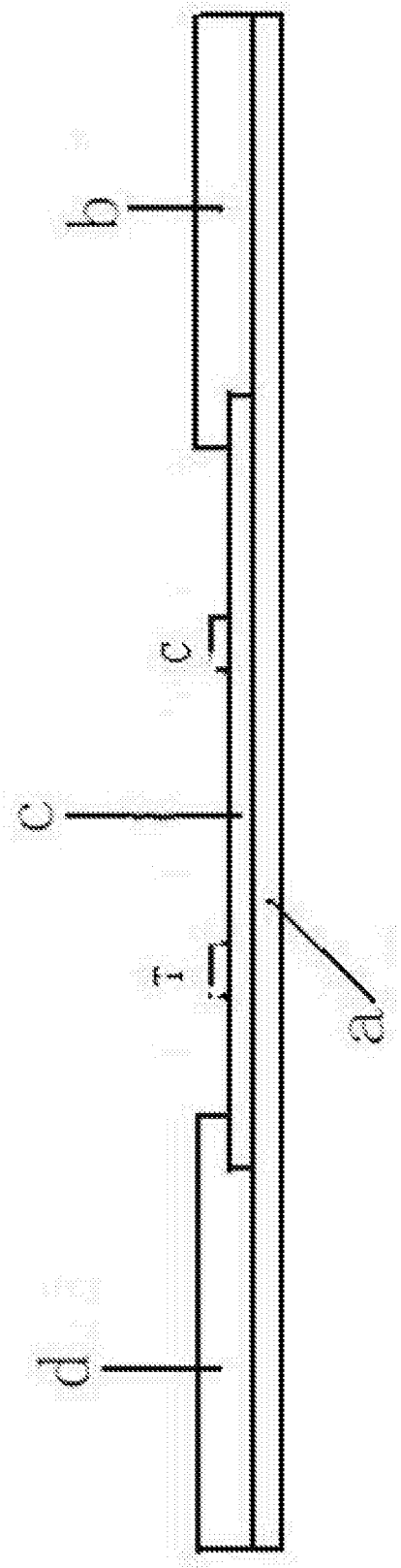


图2

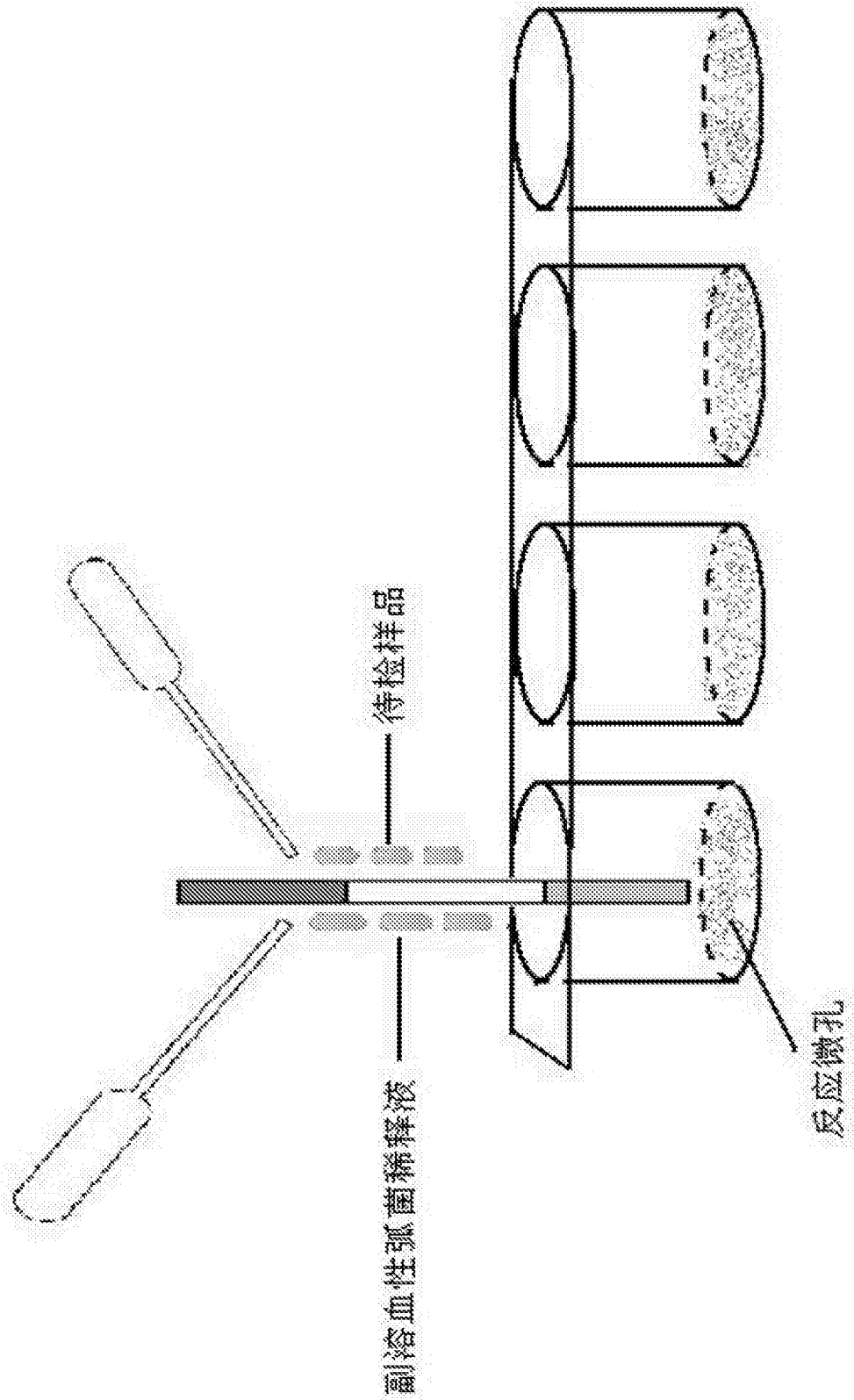


图3

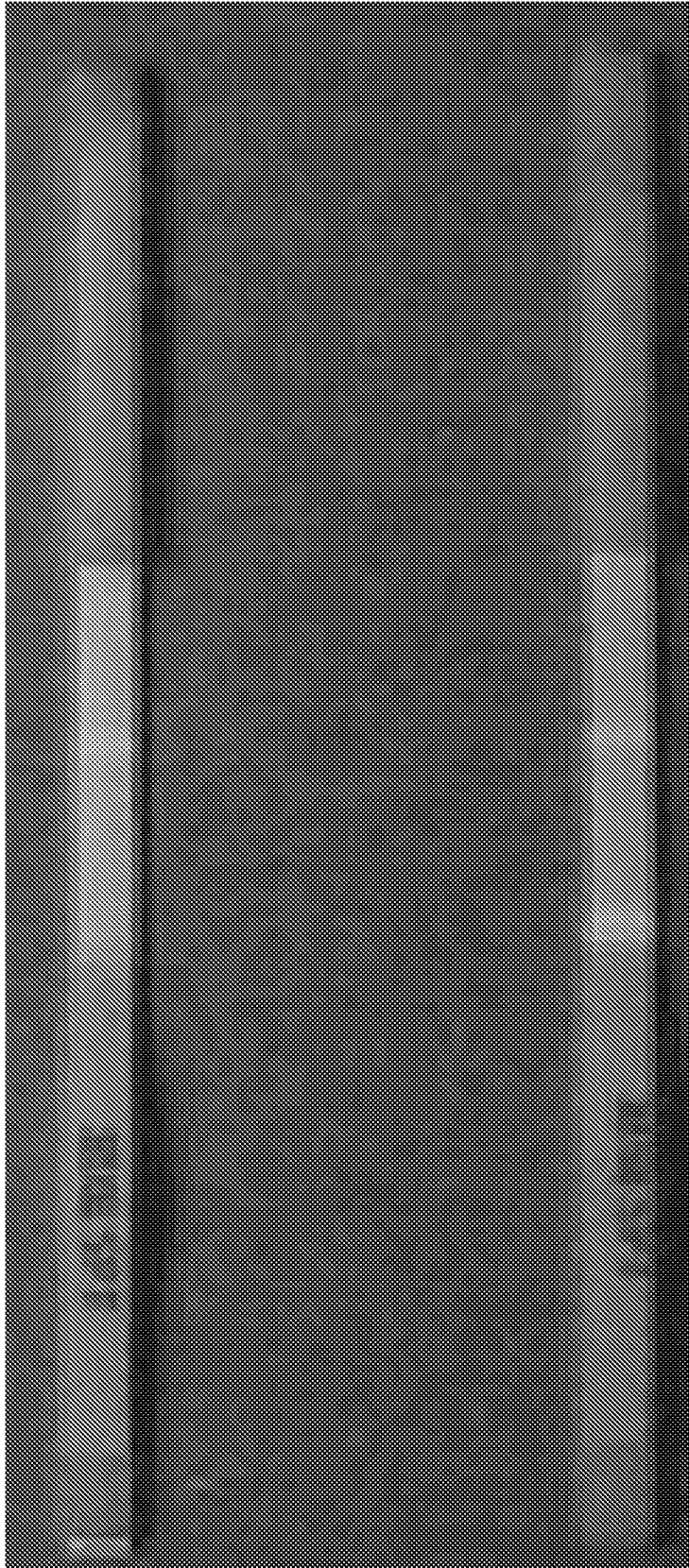


图4

专利名称(译)	一种快速检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN105445465A	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201510782408.3	申请日	2015-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	珠海国际旅行卫生保健中心 广州市疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	珠海国际旅行卫生保健中心 广州市疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	珠海国际旅行卫生保健中心 广州市疾病预防控制中心		
[标]发明人	史咏梅 何晖 汪海波 冯子力 伍碧梅 涂承宁 谭华 叶立青		
发明人	史咏梅 何晖 汪海波 冯子力 伍碧梅 涂承宁 谭华 叶立青		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/553 G01N33/569 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/6408 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/553 G01N33/56916		
代理人(译)	王贤义		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明旨在提供一种快速、灵敏、简便的检测副溶血性弧菌的荧光纳米免疫层析试剂盒，以及该试剂盒的制备方法。本发明通过对免疫功能化的时间分辨磁性荧光纳米材料与副溶血性弧菌特异性的结合实现对副溶血性弧菌的分离和富集；所捕获的待检菌体再与免疫层析试纸条上的副溶血性弧菌特异性多克隆抗体结合，通过检测在紫外灯下试纸条上荧光信号实现对样本中待测菌的检测。本发明可应用于微生物致泻性致病菌检测领域。

