

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/558

G01N 33/569 G01N 33/02



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03142652.2

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1458527A

[22] 申请日 2003.6.11 [21] 申请号 03142652.2

[30] 优先权

[32] 2002. 8. 21 [33] CN [31] 02128910.7

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道 1 号

[72] 发明人 李君文 宋 农 王新为 郑金来  
古长庆 金 敏 晁福寰

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理  
事务所

代理人 张宏祥

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 免疫纸层析条及用其快速检测食品中致病菌和毒素的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种敏感、特异、快速检测食物中的常见致病菌或毒素的免疫纸层析条及敏感、特异、快速的检测方法。本发明免疫纸层析条及用其快速检测食品中致病菌和毒素的方法是对食品中常见致病菌或毒素和食物中毒快速检测的新技术及应用。目前，国内外有许多关于应用胶体金免疫层析试纸检测可溶性抗原的报道，作为颗粒性抗原的细菌，国外用萃取或其它方法处理后再检测。本发明选用特点的专用层析膜，优化其它条件，使免疫层析条能直接用于检测细菌。既可用于食品中常见致病菌的快速检测，也可用于食物中毒的快速诊断。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种免疫纸层析条，在载体表面设置有硝酸纤维素膜，其特征是，所述硝酸纤维素膜两端分别设置有食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫和吸水板垫，所述两垫之间依次固定有对照线、细菌抗体检测线，所述食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫设置有吸收板垫。
2. 根据权利要求1所述的免疫纸层析条，其特征是，所述食品中常见致病菌包括：沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肉毒杆菌、副溶血弧菌、致病性大肠杆菌、变形杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单核增生李斯特菌、霍乱弧菌、粪链球菌、大肠杆菌 O157: H7。
3. 根据权利要求1所述的免疫纸层析条，其特征是，所述食品中毒素包括：葡萄球菌肠毒素、肉毒毒素、黄曲霉毒素。
4. 一种使用权利要求1所述的免疫纸层析条快速检测食品中致病菌和毒素的方法，其特征是，包括下述步骤：
  - (1) 准备待检样品液；
  - (2) 将权利要求1所述的免疫层析试纸条放置于待检样品液内，样品液高度不可超过胶体金结合物垫，
  - (3) 待样品液泳动到吸收板垫时，取出免疫层析试纸，放置5~20分钟观察结果；
  - (4) 若检测结果为细菌或毒素抗体检测线显色，则说明待检验样品含有目的细菌或毒素。

## 免疫纸层析条及其快速检测食品中致病菌和毒素的方法

### 技术领域

本发明涉及食品常见致病菌或毒素的快速检测，更具体地说，是涉及一种利用胶体金及免疫层析技术快速检测食品中常见致病菌或毒素的免疫纸层析条及其检测方法。

### 背景技术

“民以食为天”人类要生存就离不开食物。在任何社会的经济中食品都是最重要的商品之一。因此，食品安全的问题为千千万万人所关注。但目前的食品安全问题却不容乐观。当今世界，由于污染的食物引起疾病是生活水平下降、健康水平下降和经济生产力下降的重要原因。食物中毒已是一种最普遍的社会、经济、环境问题。据统计，仅在1980年，除中国以外的发展中国家，有10亿5岁以下的儿童患急性腹泻病，其中有500万患儿死亡，也就是说，当年平均每分钟就有10个腹泻患儿死亡，其中大部分急性腹泻病例是由微生物污染食物引起的。近年来，在美、日大肠杆菌O<sub>157</sub>H<sub>7</sub>食物中毒的爆发流行、比利时的“二恶英事件”、英国的“疯牛病”都充分说明，食品面临严峻的挑战。

食物污染是引起人类疾病与死亡的重要原因，人类疾病的60%以上是由于在食物污染所致，随着世界环境污染的日益严重，食品中有害因素来源更加广泛，种类也日益复杂。这些污染物一方面直接威胁人类健康，同时也污染作为食品的动、植物，并通过食入进而影响人体健康和生命安全。食品中可能出现的有害因素可分为三大类：1. 生物性污染。微生物、寄生虫及虫卵、昆虫都可造成生物性污染。其中微生物污染主要是细菌与细菌毒素、霉菌与霉菌毒素所造成的污染，这是造成食品污染最常见的因素。2. 化学性污染。包括各种有害金属、非金属有机化合物和无机化合物等，农药的污染在这类污染中占很大的比例。3. 放射性污染。主要来自于放射性物质的开采，冶炼以及生产和生产中的排放。在上述三大类中，生物性污染又是食物污染的主要原因。生物污染中，微生物污染又是生物污染的主要原因。据统计，在我国，1987年—1999年十年间有关食物中毒的报道中，细菌性食物中毒占食物中毒的42.86%，另据《1999年全国监督统计报告》，在中毒人数上，细菌中毒人数为8505人，高于农药及化学物质引起的中毒人数(5105人)，和动、植物所引起的人数(2719人)。在国外，美国1993年—1997年的检测结果，在病因明确的食物性疾病中，细菌性因素占总次数的75%，病例数的86%及死亡数的100%。食品细菌污染主要包括沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肉毒杆菌、副溶血弧菌、致病性大肠杆菌、变形杆菌、小肠结肠炎耶

尔森氏菌、单核增生李斯特菌、霍乱弧菌、粪链球菌、大肠杆菌 O157: H7, 等; 毒素为葡萄球菌肠毒素、肉毒毒素、黄曲霉毒素, 等。

上述食品中常见致病菌或毒素广泛存在于自然界中, 在人和动物中有广泛的宿主, 食物受到污染的机会很多, 易受污染的食物种类也很多。食物中毒由于起病急, 患者集中, 因而快速的病原学诊断对疫情的控制尤为重要。传统的细菌学检测方法主要是培养法, 一般要经过前增菌、选择性增菌及生化血清学反应的鉴定等步骤, 常需 5—7 天, 且很繁琐, 并且, 因抗菌素的广泛应用的干扰物质的存在, 严重影响检测结果, 有时致病菌根本培养不出来。

致病菌污染食物并在其中大量生长繁殖产生毒素是细菌性食物中毒发生的最主要原因, 只有当人体摄入大量的致病菌时才可能引起食物中毒。当  $10^5$ — $10^9$  个活菌进入人体时才出现临床症状, 所以, 亟需建立一种速、敏感、特异、简便的检测食物中毒的方法。胶体金用于免疫学检测研究是本世纪 80 年代发展起来的一项新技术, 也是一项新的纳米技术。1980 年, Muller 等人应用该技术对牛痘进行了免疫电镜研究, 同年, Geoghegan 和 Leuving 应用胶体金进行被动凝集试验, 1983 年 Leuving 利用胶体金做了人妊娠诊断研究, 显示了胶体金技术在诊断学应用的广阔前景。在随后的研究中, 有人将胶体金检测技术与免疫层析技术结合, 使细菌的快速检测成为现实。免疫层析技术是八十年代初发展的快速免疫分析技术。它借助毛细作用, 使样品在条状纤维制成的膜上泳动, 其中的待测物与膜上一定区域的配体结合, 通过酶促反应直接使用着色使用着色标记, 短时间便可得到直观的结果。它不须进行结合物与自由标记物的分离, 省去了烦琐的加样、洗涤步骤, 因而操作简便, 快速, 人员不用培训, 不需仪器, 很适合于现场使用。

但到目前为止, 尚未见有国产免疫层析条检测细菌的报道。国外有检测霍乱弧菌、结核杆菌的报道, 检测限在  $10^5$ — $10^6$  cfu/ml。国外检测细菌的层析条采用单克隆抗体, 对目样品检测前要进行预处理(裂解), 较为繁琐。单克隆抗体技术虽然特异性强, 但由于结合位点单一, 需采用针对抗原不同表位的两种抗体; 另外, 细菌抗原结构复杂, 空间位阻使标记有胶体金的单抗不易与细菌结合。

#### 发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术中存在的不足, 提供一种敏感、特异、快速检测食物中的常见致病菌或毒素的免疫纸层析条及敏感、特异、快速的检测方法。

本发明胶体金标记的免疫纸层析条, 在载体表面设置有硝酸纤维素膜, 所述硝酸纤维素膜两端分别设置有食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫和吸水板垫, 所述两垫之间依次固定有对照线、细菌抗体检测线, 所述食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫设置有吸收板垫。

所述的食物中常见致病菌为沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肉毒杆菌、副溶血弧菌、致病性大肠杆菌、变形杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单核增生李斯特菌、霍乱弧菌、粪链球菌、大肠杆菌 O157: H7, 等; 毒素为葡萄球菌肠毒素、肉毒毒素、黄曲霉毒素等。

本发明使用胶体金标记的免疫纸层析条检测食品中致病菌的方法，包括下述步骤：

- (1) 准备待检样品液；
- (2) 将权利要求 1 所述的免疫层析试纸条放置于待检样品液内，样品液高度不可超过胶体金结合物垫，
- (3) 待样品液泳动到吸收板垫时，取出免疫层析试纸，放置 5~20 分钟观察结果；
- (4) 若检测结果为细菌或毒素抗体检测线显色，则说明待检验样品含有目的细菌或毒素。

本发明与现有技术相比的有益效果是：

1. 检测操作简便，对样品不需进行预处理、不需洗涤；
2. 检测快速，不须任何仪器；
3. 不须人员培训，没有受过任何专业培训的人员按说明书也可进行样品检验。

#### 具体实施方式

下面对本发明做进一步描述。

本发明胶体金标记的免疫纸层析条，在载体表面设置有硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜两端分别设置有食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫和吸水板垫，两垫之间依次固定有对照线、细菌抗体检测线，食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫设置有吸收板垫。

本发明胶体金标记的免疫纸层析条的制备，首先收集食品中常见致病菌或毒素，即沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肉毒杆菌、副溶血弧菌、致病性大肠杆菌、变形杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单核增生李斯特菌、霍乱弧菌、粪链球菌、大肠杆菌 O157: H7，葡萄球菌肠毒素、肉毒毒素、黄曲霉毒素等，用于制备抗原，利用上述抗原免疫白兔，用于制备抗体，然后将抗体纯化，用于制备免疫胶体金，将免疫胶体金与探针结合物垫结合，食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫置于硝酸纤维素膜的一端，另一端设置吸水板垫，两垫之间依次固定有对照线、细菌或毒素抗体检测线，食品中常见致病菌或毒素胶体金探针结合物垫设置有吸收板垫。

结合实施例对本发明使用胶体金标记的免疫纸层析条检测食品中致病菌或毒素的方法做进一步描述。

#### 实施例 1：人工染沙门氏菌食品的检测

将米饭、切成片状的馒头以及市场上购卖的酱猪肝，火腿肠、猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉生熟各 50g，切成小片，放入洁净锥形瓶中，加  $10^3$  / ml 鼠伤寒沙门氏菌（菌种号为 50020 购自于卫生部国家菌种保存中心）10ml，一定时间培养。固体样品取 10g 放入另一锥形瓶中，加生理盐水 90ml，剧烈振摇，稍静置，取上清液用于检测；牛奶取 1ml 用 9ml 生理盐水稀释后直接用于检测，各稀释样品液用琼脂计数法计细菌总数。检测方法为：将免疫层析试纸条放置于待检样品

内，（放置的高度不可超过检测试纸条中的胶体金结合物垫），待样品液泳动到吸收板垫时，取出沙门氏菌免疫层析试纸，放置 5 分钟观察结果。结果显示，经染菌的食品样品液，细菌计数范围在  $2.1 \times 10^6 \sim 8.0 \times 10^8$  cfu/ml 层析条检测都为阳性结果。

#### 实施例 2：不同食品样品制备方法的检测

将米饭、馒头、酱猪肉 100g 切成小片，放入洁净的锥形瓶中，加  $10^3$  cfu/ml 甲型沙门氏菌（菌种号为 50004 购自于卫生部国家菌种保存中心）10ml，一定时间培养。每份样品各取 10g 分加放入含 90ml 生理盐水、0.01mol/l pH 7.4 磷酸盐缓冲液、自来水、蒸馏水的锥形瓶中，剧烈振荡，稍静置，取上清液用于检测，各稀释样品液用琼脂计数法计细菌总数。检测方法为：将免疫层析试纸条放置于待检样品内，（放置的高度不可超过检测试纸条中的胶体金结合物垫），待样品液泳动到吸收板垫时，取出沙门氏菌免疫层析试纸，放置 10 分钟观察结果。结果显示，经染菌的食品样品液，细菌计数范围在  $2.2 \times 10^6 \sim 7.8.0 \times 10^8$  cfu/ml 层析条检测都为阳性结果

#### 实施例 3：人工染志贺氏菌食品的检测

米饭、切成片状的馒头以及市场上购卖的酱猪肝、猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉生熟各 50g，切成小片，放入洁净锥形瓶中，加  $10^3$  / ml 志贺氏菌（菌种号为 51335 购自于卫生部国家菌种保存中心）10ml，一定时间培养。固体样品取 10g 放入另一锥形瓶中，加生理盐水 90ml，剧烈振摇，稍静置，取上清液用于检测；牛奶取 1ml 用 9ml 生理盐水稀释后直接用于检测，各稀释样品液用琼脂计数法计细菌总数。检测方法为：将免疫层析试纸条放置于待检样品内，（放置的高度不可超过检测试纸条中的胶体金结合物垫），待样品液泳动到吸收板垫时，取出沙门氏菌免疫层析试纸，放置 15 分钟观察结果。结果显示，经染菌的食品样品液，细菌计数范围在  $1.7 \times 10^6 \sim 6.6 \times 10^8$  cfu/ml 层析条检测都为阳性结果。

#### 实施例 4：人工染葡萄球菌食品的检测

米饭、切成片状的馒头以及市场上购卖的酱猪肝、猪肉、牛肉、饼干、鸡肉、鸭肉生熟各 50g，切成小片，放入洁净锥形瓶中，加  $10^3$  / ml 志贺氏菌（菌种号为 26073 购自于卫生部国家菌种保存中心）10ml，一定时间培养。固体样品取 10g 放入另一锥形瓶中，加生理盐水 90ml，剧烈振摇，稍静置，取上清液用于检测；牛奶取 1ml 用 9ml 生理盐水稀释后直接用于检测，各稀释样品液用琼脂计数法计细菌总数。检测方法为：将免疫层析试纸条放置于待检样品内，（放置的高度不可超过检测试纸条中的胶体金结合物垫），待样品液泳动到吸收板垫时，取出沙门氏菌免疫层析试纸，放置 20 分钟观察结果。结果显示，经染菌的食品样品液，细菌计数范围在  $1.4 \times 10^6 \sim 7.6 \times 10^8$  cfu/ml 层析条检测都为阳性结果。

本发明是对食品中常见致病菌或毒素和食物中毒快速检测的新技术及应用。目前，国内外有许多关于应用胶体金免疫层析试纸检测可溶性抗原的报道，作为颗粒性抗原的细菌，国外用萃取或其它方法处理后再检测。本发明选用特点的专用层析

膜，优化其它条件，使免疫层析条能直接用于检测细菌。各种人工污染的食品，经简单处理即可用于检测，检测灵敏度与纯培养的菌悬液相同。人工染菌的米饭、猪肉样品，用生理盐水、磷酸盐缓冲液、自来水处理，检测结果未见差别。这极大地方便了现场样品的处理和检测，预示该免疫层析试纸条所具有的广阔的应用前景。其推广必为人类防疫治病做出创造性的贡献。

专利名称(译)	免疫纸层析条及用其快速检测食品中致病菌和毒素的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1458527A</a>	公开(公告)日	2003-11-26
申请号	CN03142652.2	申请日	2003-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	李君文 宋农 王新为 郑金来 古长庆 金敏 晁福寰		
发明人	李君文 宋农 王新为 郑金来 古长庆 金敏 晁福寰		
IPC分类号	G01N33/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/569		
代理人(译)	张宏祥		
优先权	02128910.7 2002-08-21 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种敏感、特异、快速检测食物中的常见致病菌或毒素的免疫纸层析条及敏感、特异、快速的检测方法。本发明免疫纸层析条及用其快速检测食品中致病菌和毒素的方法是对食品中常见致病菌或毒素和食物中毒快速检测的新技术及应用。目前，国内外有许多关于应用胶体金免疫层析试纸检测可溶性抗原的报道，作为颗粒性抗原的细菌，国外用萃取或其它方法处理后再检测。本发明选用特点的专用层析膜，优化其它条件，使免疫层析条能直接用于检测细菌。既可用于食品中常见致病菌的快速检测，也可用于食物中毒的快速诊断。