

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/532

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410069326.6

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1632586A

[22] 申请日 2004.7.16

[21] 申请号 200410069326.6

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物
流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军医
科学院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 端青 何君 檀华 左庭婷

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关畅

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 一种检测土拉菌感染的免疫层析试
纸及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法。本发明所提供的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫上面的硝酸纤维膜、紧密连接于所述硝酸纤维膜上面的含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫上面的样品垫；所述硝酸纤维膜载有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为土拉菌多糖抗原，所述质控线为可和金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体。本发明的检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法与现有的其他方法相比，特异性强，更简便，更快速，更适于临床和特殊情况下现场使用。

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

1、一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫上面的硝酸纤维膜、紧密连接于所述硝酸纤维膜上面的含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫上面的样品垫；所述硝酸纤维膜载有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为土拉菌多糖抗原，所述质控线为可和金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体。

2、根据权利要求 1 所述的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，其特征在于：所述吸水纸垫的下面还紧密连接有背板。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，其特征在于：所述土拉菌多糖抗原可按下述方法制备：将土拉弗朗西斯菌接种在葡萄糖半胱氨酸血琼脂培养基中，37℃培养 48-96h，用无菌生理盐水洗下菌苔，水浴中加热至 68℃，加入 68℃的等体积 90%酚溶液，继续在 68℃搅拌 30-40min 分钟，取出冷却至室温，7000-8000rpm 离心，吸出水层，PBS 透析过夜，即得到土拉菌多糖抗原。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，其特征在于：所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针，可按下述方法制备：用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%，煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作：加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 1.6ml，继续煮沸 10-20min，用纯水恢复至 100ml，冷却至室温后用 K_2CO_3 调 pH 至 6-7，搅拌加入 SPA 0.7mg，15-20min 后加入 10%的聚乙二醇 20000 2ml，继续搅拌 30-40min，15000-16000 rpm 离心 30-35min，弃上清，沉淀即为 SPA 标记胶体金探针。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，其特征在于：所述金标垫的材料为玻璃纤维膜或聚脂。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，其特征在于：所述可和金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体为羊、兔、豚鼠、猪、小鼠或猴 IgG。

7、一种制备检测土拉菌感染的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备土拉菌多糖抗原；用 0.01M pH7.2 的 PB 将该抗原和可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体分别稀释至 2-2.5mg/1，然后分别喷于硝酸纤维膜上形成相互分离的检测线和质控线，37℃干燥 2-4 小时，然后将其粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针；将该探针溶于 0.01M 四硼酸钠缓冲溶液，然后将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入上述探针溶液中，取出冷冻真空干燥 18-32 小时后，得到金标垫，将其粘贴在步骤 1) 中得到的硝酸纤维膜上，上面喷有相互分离

的检测线和质控线；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再粘贴样品垫，得到检测土拉菌感染的免疫层析试纸。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述吸水纸垫的下面还粘贴有背板。

9、根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其特征在于：所述土拉菌多糖抗原可按下述方法制备：将土拉弗朗西斯菌接种在葡萄糖半胱氨酸血琼脂培养基中，37℃培养 48-96h，用无菌生理盐水洗下菌苔，水浴中加热至 68℃，加入 68℃的等体积 90%酚溶液，继续在 68℃搅拌 30-40 分钟，取出冷却至室温，7000-8000rpm 离心，吸出水层，PBS 透析过夜，即得到土拉菌多糖抗原；所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针，可按下述方法制备：用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%，煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作：加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 1.6ml，继续煮沸 10-20 分钟，用纯水恢复至 100ml，冷却至室温后用 K_2CO_3 调 pH 至 6-7，搅拌加入 SPA 0.7mg，15-20min 后加入 10%的聚乙二醇 20000 2ml，继续搅拌 30-40min，15000 -16000rpm 离心 30-35min，弃上清，沉淀即为 SPA 标记胶体金探针。

10、根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其特征在于：所述金标垫的材料为玻璃纤维膜或聚脂；所述可和金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体为羊、兔、豚鼠、猪、小鼠或猴 IgG。

一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测土拉菌感染的试纸及其制备方法，特别涉及一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

土拉菌病(Tularaemia)是一种急性、感染性人兽共患疾病，其致病菌是土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*) (简称土拉菌)，易感动物为啮齿类动物，人通过破损的皮肤、结膜感染，吸入或食入极少量(10-50个)土拉菌便可发病，临床表现表现为皮肤溃烂、淋巴腺肿大、肺部感染和伤寒样症状，病情严重者甚至死亡。

土拉菌病一般是根据流行病学资料、临床表现和实验室诊断的综合结果作为诊断依据。其临床表现为潜伏期约1周，突发性寒战，发热(38-39℃)，伴有头痛、盗汗、食欲减退、肝脾肿大，感染部位出现淋巴结肿大、皮肤溃疡，扁桃体坏死等病兆；经由呼吸道吸入感染者可出现咳嗽，胸痛，严重者可导致肺炎，如未及时治疗，病死率高达60%。

流行病学所调查的资料为发病前1-2周是否去过森林草原、沼泽地、湖边、河滩等可能存在土拉菌的疫源地，是否与野生动物，特别是与野兔等啮齿动物有过接触史或蜱叮咬史，是否去过战区或特殊(如生物恐怖袭击)情况下的生物战剂污染区。

土拉菌病的实验室诊断主要为病原学诊断和血清抗体检测。病原学诊断方法是采集疑是土拉菌病患者或病畜皮肤或腺体溃疡病灶分泌物、脓、血、痰样品，接种葡萄糖半胱氨酸血琼脂培养基，37℃ 5%CO₂培养72h，挑取灰白色、圆形、边缘整齐、表面光滑凸起、形态典型的菌落，制备玻片作革兰氏染色，如为革兰氏阴性球杆菌，则继续进行生化鉴定和血清学试验，必要时需动物测毒；由于土拉菌生长条件要求十分苛刻，一般临床实验室不容易分离成功。血清抗体检测的原理为：人、家畜和野生动物感染土拉菌后均可出现有诊断意义的血清抗体，初次特异抗体的出现一般是在感染后1周，4-6周抗体滴度可达最高，以后逐步下降，半年至1年后仍能检测出特异性抗体。

土拉菌多糖抗原具有较好的特异性和免疫原性，文献报道的土拉血清抗体检测方法有试管凝集法、红细胞凝集法和ELIAS等，所用抗原均为土拉菌多糖抗原。本发明的发明人曾用土拉菌多糖抗原致敏鸡血球，制备间接血球凝集试剂，在疫源地

流行病学调查中用于检测人和动物土拉血清抗体（李俐、冯志鹤、赵忠利 新疆塔城地区土拉弗氏菌病初步调查 中华流行病学杂志 1985, 6 (1): 20）。2000年俄罗斯报道用斑点免疫酶法检测人和动物土拉血清抗体，血清样品来自患土拉菌病或免疫土拉菌的人或动物，检测所用抗原也是土拉菌多糖，结果表明具有较好的特异性，不与新杀手弗朗西斯菌、布鲁氏菌、霍乱弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌等发生交叉反应（Aronova NV, Pavlovich NV. The use of Francisella tularensis lipopolysaccharide in the dot solid phase enzyme immunoassay Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2000, (5):75-8）。

胶体金免疫层析技术（Immuno-Chromatographic Assay, ICA）用于临床疾病诊断近年来发展较快，其基本原理为：将待检物的配对物（抗原或抗体）包被在NC膜上用于捕捉，然后用免疫胶体金探针检测，阳性样品2分钟后出现肉眼可见的沉淀线，该技术与其它方法比较，优势在于其样品处理简单，不需要专门仪器和人员培训，非专业人员按照说明书即可操作，并可迅速观察结果，很适合现场和基层使用。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸（ICA试纸）。

本发明所提供的检测土拉菌感染的免疫层析试纸（ICA试纸），包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫上面的硝酸纤维膜、紧密连接于所述硝酸纤维膜上面的含有金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫上面的样品垫；所述硝酸纤维膜载有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为土拉菌多糖抗原，所述质控线为可和金黄色葡萄球菌蛋白A结合的抗体。

为了使用更加方便，所述吸水纸垫的下面还紧密连接有背板。背板的材料可以是多种多样的，如塑料、树脂等。

本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测土拉菌感染的免疫层析试纸的方法。

本发明所提供的制备上述检测土拉菌感染的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备土拉菌多糖抗原；用0.01M pH7.2的PB将该抗原和可与金黄色葡萄球菌蛋白A结合的抗体分别稀释至2-2.5mg/1，然后分别喷于硝酸纤维膜上形成相互分离的检测线和质控线，37℃干燥4-12小时，然后将其粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针；将该探针溶于0.01M四硼酸钠缓冲溶液，然后将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入上述探针溶液中，取出冷冻真空干燥18-32小时后，得到金标垫，将其粘贴在步骤1)中得到的硝酸纤维膜上，上面喷有

相互分离的检测线和质控线；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再粘贴样品垫，得到检测土拉菌感染的免疫层析试纸。

为了使用更加方便，所述吸水纸垫的下面还粘贴有背板。

本发明所提供的检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法中，所述土拉菌多糖抗原可按下述方法制备：将土拉弗朗西斯菌接种在葡萄糖半胱氨酸血琼脂培养基中，37℃培养 48-96h，用无菌生理盐水洗下菌苔，水浴中加热至 68℃，加入 68℃的等体积 90%酚溶液，继续在 68℃搅拌 30-40min，取出冷却至室温，7000-8000 rpm 离心，吸出水层，PBS 透析过夜，即得到土拉菌多糖抗原；所述金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针，可按下述方法制备：用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%，煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作：加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 1.6ml，继续煮沸 10-20min，用纯水恢复至 100ml，冷却至室温后用 K_2CO_3 调 pH 至 6-7，搅拌加入 SPA 0.7mg，15-20min 后加入 10%的聚乙二醇 20000 2ml，继续搅拌 30-40min，15000-16000 rpm 离心 30-35min，弃上清，沉淀即为 SPA 标记胶体金探针；所述金标垫的材料可为玻璃纤维膜或聚脂膜；所述与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体可为羊、兔、豚鼠、猪、小鼠或猴等 IgG。

其中，调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度可为 0.15-0.25M，优选为 0.2M。

在实际应用中，所述硝酸纤维膜的厚度可为 2.5-3mm（孔径 2-200 μ m）；所述金标垫的厚度可为 30-70mm；所述样品垫的厚度可为 0.1-0.2mm。

本发明的检测土拉菌感染的免疫层析试纸可用于检测人和动物土拉血清抗体，从而诊断土拉菌病。与斑点免疫酶法检测原理相同，检测土拉菌感染的免疫层析试纸是将土拉菌多糖包被在 NC 膜上，用于捕捉样品中土拉抗体，然后用标记了 SPA（金黄色葡萄球菌蛋白 A）的免疫胶体金探针检测；阳性样品中，土拉抗体（IgG 和 IgM）的 Fc 端与金颗粒上的 SPA 结合，Fab 端与 NC 膜上的土拉多糖结合，层析 2 分钟后出现肉眼可见的沉淀线。本发明的检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法与现有的其他方法相比，特异性强，更简便，更快速，更适于临床和特殊情况下现场使用。

具体实施方式

实施例 1、检测土拉菌感染的免疫层析试纸的制备

材料

氯金酸 ($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$)，分析纯，上海试剂一厂；

柠檬酸三钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)，分析纯，北京化工厂；

碳酸钾 (K_2CO_3)，分析纯，北京化工厂；

硝酸纤维膜，购于美国Millipore公司，HF B 504；

玻璃纤维膜，购于南京双威实业公司；

聚脂，购于上海良信公司；

金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA)，购于 Amersham Pharmacia Biotech 公司；

土拉菌株（由中国人民解放军微生物流行病学研究所菌种库保藏，保藏号为 410062）；

羊抗人 IgG（购于北京经科宏达生物技术有限公司）

正常小鼠血清、正常豚鼠血清、正常兔血清和正常人血清均按常规方法分离保存；

土拉免疫小鼠血清、土拉免疫豚鼠血清、土拉免疫兔血清和土拉免疫人血清均以土拉菌多糖为抗原，按常规方法制备保存。

1、土拉菌多糖抗原的制备

土拉弗朗西斯菌接种葡萄糖半胱氨酸血琼脂斜面，37℃培养 72 小时，无菌生理盐水洗下菌苔，水浴中加热至 68℃，加入 68℃等体积 90%酚溶液，继续在水浴中搅拌 30 分钟，取出冷却至室温，7000rpm 离心，小心吸出上层水层，PBS 透析过夜，即为土拉菌多糖抗原，4℃保存。

2、金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 胶体金探针的制备

用纯水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%，煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作：加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 1.6ml，继续煮沸 10 分钟，用纯水恢复原体积（100ml），冷却至室温后用 0.2M K_2CO_3 调 pH 至 6，磁力搅拌下加入 SPA 0.7mg，15min 后加入 10%的聚乙二醇 20000 2ml，继续搅拌 30min，15000 rpm 离心 35min，弃上清，沉淀即为 SPA 标记胶体金探针，用 0.01M 四硼酸钠保存液恢复至原体积的十分之一，即 10ml，4℃冰箱保存。

3、检测土拉菌感染的免疫层析试纸的制备

检测土拉菌感染的免疫层析试纸由吸水纸垫、硝酸纤维膜、金标垫和玻璃纤维膜样品垫四部分组成。

分别用 0.01M pH 7.2 PB 稀释步骤 1 中制备的土拉菌感染多糖抗原至 2mg/ml 和羊抗人 IgG 至 2.5mg/ml，用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 2.5mm 厚硝酸纤维素膜上，形成相互分离的检测线和质控线，37℃干燥 2.5h，然后将其用双面胶粘贴在吸水纸垫上；将玻璃纤维膜或聚脂膜浸于步骤 2 中制备的 SPA 标记胶体金探针液中制备成金标垫，冷冻干燥机抽干后备用；将该金标垫用双面胶粘贴在上述具有

检测线和质控线的硝酸纤维膜上，再在该金标垫上面用双面胶粘贴硝酸纤维膜样品垫，最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上，按所需大小切割，即为检测土拉菌感染的免疫层析试纸，加干燥剂后密封保存。

实施例 2、检测临床血清样品

将待检人或动物血清样品用生理盐水按 1:100 稀释，取实施例 1 中制备的检测土拉菌感染的免疫层析试纸 1 条，浸入经上述稀释的血清样品中，2min 后开始观察结果，15min 观察终止。以血清效价 1:100 以上为阳性诊断标准，出现 1 条红色（对照）沉淀线，为土拉菌血清学诊断阴性，即无土拉菌感染；出现 2 条红色（样品和对照）沉淀线，为土拉菌血清学诊断阳性，即有土拉菌感染。

检测土拉菌感染的免疫层析试纸检测动物血清样品结果如表 1 所示，表明该试纸的检测结果与 IHA 一致，具有特异性。该试纸检测人血清样品结果如表 2 所示，表明检测土拉菌感染的免疫层析试纸与 IHA 在检测人血清样品中也具有较好的一致性和特异性。

表 1. 检测土拉菌感染的免疫层析试纸检测动物血清样品

样品 (编号)	IHA	ICA	样品 (编号)	IHA	ICA
免疫兔血清 (1)	+	+	正常小鼠血清 (1)	-	-
(2)	+	+	(2)	-	-
(3)	+	+			
正常兔血清 (1)	-	-	免疫豚鼠血清 (1)	+	+
(2)	-	-	(2)	+	+
			(3)	+	+
免疫小鼠血清 (1)	+	+	正常豚鼠血清 (1)	-	-
(2)	+	+	(2)	-	-
(3)	+	+			

表 2. 检测土拉菌感染的免疫层析试纸检测人血清样品

样品 (编号)	IHA	ICA	样品 (编号)	IHA	ICA
免疫人血清 (1)	+	+	正常人血清 (1)	-	-
(2)	+	+	(2)	-	-
			(3)	-	-
			(4)	-	-

专利名称(译)	一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN1632586A	公开(公告)日	2005-06-29
申请号	CN200410069326.6	申请日	2004-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	端青 何君 檀华 左庭婷		
发明人	端青 何君 檀华 左庭婷		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1279359C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法。本发明所提供的检测土拉菌感染的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫上面的硝酸纤维膜、紧密连接于所述硝酸纤维膜上面的含有金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫上面的样品垫；所述硝酸纤维膜载有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为土拉菌多糖抗原，所述质控线为可和金黄色葡萄球菌蛋白A结合的抗体。本发明的检测土拉菌感染的免疫层析试纸及其制备方法与现有的其他方法相比，特异性强，更简便，更快速，更适于临床和特殊情况下现场使用。