

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610000294.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 101000346A

[22] 申请日 2006.1.9

[21] 申请号 200610000294.3

[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
科院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 端青 檀华 朱虹 何君
左庭婷 苏裕心

[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 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测炭疽芽孢杆菌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炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸及其制备方法。该检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸,包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针的金标垫、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维素膜(NC膜)和紧密连接于所述硝酸纤维素膜另一端的吸水垫;所述硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体,所述质控线为抗鼠抗抗体或抗兔抗抗体。本发明用于临床标本、污染物和环境中的炭疽芽孢杆菌抗原的检出,也可用于纯培养炭疽芽孢杆菌的鉴定。

1、一种检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，包括依次紧密串联的样品垫、含有炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维膜(NC膜)和吸水垫；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌多克隆抗体，所述质控线为能与所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌多克隆抗体特异结合的抗抗体。

2、根据权利要求1所述的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，其特征在于：当所述金标垫中的胶体金探针是炭疽芽孢杆菌单克隆抗体标记的，所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体；当所述金标垫中的胶体金探针是炭疽芽孢杆菌多克隆抗体标记的，所述检测线为炭疽芽孢杆菌多克隆抗体，所述炭疽芽孢杆菌多克隆抗体优选为兔多克隆抗体，所述质控线优选为抗兔抗抗体。

3、根据权利要求1所述的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体为抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体。

4、根据权利要求1所述的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成；所述吸水垫的下面还紧密连接有背板。

5、根据权利要求1或2所述的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针由下述方法制备：

1) 制备胶体金溶液：采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒，具体方法为：将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液，取 100mL 加热至沸腾，搅动下准确加入 1.4mL 的 1% 柠檬酸三钠水溶液，继续加热煮沸 10-15 分钟，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，即得到胶体金溶液；

2) 用 0.2 M K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH9.2，取 50ml 胶体金溶液，按 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体，搅拌 20-30 分钟，然后加入 10% BSA 5ml，搅拌 20-30 分钟，加 1ml 10% PEG20000，搅拌 20-30 分钟，23,000g 离心 15 分钟，吸出上清，20,000-32,500g 离心 20-35 分钟，收集沉淀即得到炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针；所述百分含量均为质量百分含量。

6、一种制备检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体，将炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体溶液喷到纤维膜上，包被 NC 膜的一个区域，得到检测线；将抗炭疽芽孢杆菌单克隆抗体的抗抗体或多克隆抗体的抗抗体溶液喷到纤维膜上，包被 NC 膜的另

一区域，得到质控线；37℃干燥 0.5-3 小时，然后将其粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备含有炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记免疫胶体金探针溶液，取免疫胶体金探针溶液5ml，加入0.5g蔗糖充分溶解，将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，-20℃~-50℃放置8-12小时后，冻干机抽干，将其粘贴在步骤1)得到的纤维膜的靠近所述检测线的一端；

3) 将在步骤 2) 中得到的金标垫另一端再粘贴样品垫，得到检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸；

当所述金标垫中的胶体金探针是炭疽芽孢杆菌单克隆抗体标记的，所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体；当所述金标垫中的胶体金探针是炭疽芽孢杆菌多克隆抗体标记的，所述检测线为炭疽芽孢杆菌多克隆抗体，所述炭疽芽孢杆菌多克隆抗体优选为兔多克隆抗体，所述质控线为抗兔抗抗体。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体的浓度为 7mg/ml；所述能与所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌多克隆抗体特异结合的抗抗体浓度为 4mg/ml；所述吸水垫的下面还粘贴有背板。

8、炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567。

9、权利要求 8 所述的抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 产生的单克隆抗体。

10、含有权利要求 1-5 中任一所述的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的试剂盒。

一种检测炭疽芽孢杆菌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炭疽芽孢杆菌的试纸及其制备方法，特别涉及一种检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

“9.11”恐怖事件以后，由炭疽芽孢杆菌引起的生物恐怖首先在美国成为现实。在“炭疽邮件”事件中，已被证实感染皮肤炭疽7例（纽约市4例，新泽西州3例），吸入性炭疽11例（华盛顿特区5例，新泽西和佛罗里达州各2例，纽约市和康涅狄格州各1例），其中5例吸入性炭疽患者死亡。此后，炭疽芽孢杆菌引起的恐怖在世界各地蔓延开来，陆续发生炭疽施放的疑似案件的国家包括加拿大、法国、德国、英国、瑞典、奥地利、波兰、日本、墨西哥、以色列、新西兰等（Anon. From CDC's homepage. <http://www.cdc.org>）。我国安全部门也多次受到“白色粉末”的惊扰。

炭疽芽孢杆菌是经典的生物战剂，由于其容易大批量生产、对环境因素抵抗力强、易施放、易扩散、可引起严重致死性疾病和社会极度恐慌，而被列入国际禁止生物武器公约生物战剂清单（Knudson GB, Elliott TB, Brook I, Shoemaker MO, et al. Nuclear, biological, and chemical combined injuries and countermeasures on the battlefield. *Mil Med* 2002 Feb;167(2 Suppl):95-7）。“9.11”恐怖事件以后，特别是近年来全球性的恐怖活动愈演愈烈，烈性病原微生物也成为恐怖分子实施恐怖活动的一个工具。美国国家反恐预案红色警报（最高级）中列有的可引起生物恐怖的烈性病原微生物，第一个病原体即是炭疽芽孢杆菌。

炭疽芽孢杆菌用于生物恐怖袭击一般是以喷洒和放置的形式给予实施，如在邮件中放置含有炭疽芽孢杆菌的粉末，收件人在拆看邮件时会通过皮肤接触和呼吸道吸入而感染皮肤炭疽和肺炭疽，此时必须快速隔离和治疗感染者，并封锁和消毒环境，防止扩散。另外也有不法分子为破坏社会秩序，引起恐慌而进行讹诈。如2002年美国犹太社区组织收到来自马尼拉的一封邮件中漏出红色粉末状物质，在物质性质不明的情况下，值班工人被隔离了8个多小时，并被迫脱去内衣，在人行道上用消毒剂喷洒身体，同时两个街区被封锁，后被证明是一宗恶作剧。因此，病原体的快速侦检对于确定是否发生生物恐怖袭击十分重要，只有在尽可能短的时间内收集并确定可疑物品的性质，才能决定下一步的行动，把损失和影响控制到最小。

“炭疽邮件”事件后，美国投入大量经费对环境中炭疽芽孢杆菌污染的快速检测和

疾病的快速诊断进行研究，其方法主要有直接免疫荧光法(DFA)和聚合酶链反应(PCR)。

直接免疫荧光法：2002年美国报道了在DFA试验中分别用抗炭疽芽孢杆菌菌体抗原的荧光抗体和抗炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的荧光抗体检测230株炭疽芽孢杆菌及其56株类属芽孢杆菌(包括枯草芽孢杆菌9株、巨大芽孢杆菌11株、蜡样芽孢杆菌23株和苏云金芽孢杆菌12株)的情况。230株炭疽芽孢杆菌中，81株分离自病人、病畜和环境，144株分离自“9.11”后“炭疽邮件”事件。用抗炭疽芽孢杆菌菌体抗原的荧光抗体检测的阳性率分别为：炭疽芽孢杆菌99.1%(228/230)，蜡样芽孢杆菌43%(10/23)，苏云金芽孢杆菌16.7%(2/12)，9株枯草芽孢杆菌和11株巨大芽孢杆菌均为阴性。用抗炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的荧光抗体检测的阳性率分别为：炭疽芽孢杆菌99.6%(229/230)，未检出的1株炭疽芽孢杆菌已知不产荚膜，而56株类属芽孢杆菌中除1株巨大芽孢杆菌反应阳性外，其余55株均为阴性。试验说明，抗炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的抗体具有较好的特异性，荚膜是决定炭疽侵袭力的重要成分，所以炭疽芽孢杆菌有毒株一般都有荚膜。另外，试验显示DFA的敏感性(最小可检出菌量)为 10^4 cfu/ml与PCR实验敏感性相同。虽然PCR实验也能达到与DFA同样的敏感性，即 10^4 cfu/ml，但由于PCR实验条件要求苛刻，容易出现假阳性，所以没有被FDA批准(Mse of onsite technologies for rapidly assessing environmental Bacillus anthracis contamination on surfaces in buildings. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2001 Dec 7; 50(48):1087)。

虽然免疫荧光试验和PCR在实验室得到了较好的应用，但这两个试验都需要特殊的仪器和试剂，必须是有经验的技术人员在实验室中操作，并且标本处理需要较长的时间，因此不适于在基层和突发事件现场使用。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸(Immuno-Chromatographic Assay, ICA)。

本发明所提供的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，包括依次紧密串联的样品垫、含有炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维素膜(NC膜)和吸水垫；所述硝酸纤维素膜包被有相互分离的一条检测线和一条质控线，所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌多克隆抗体，所述质控线为能与所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌多克隆抗体特异结合的抗抗体。

当所述金标垫中的胶体金探针是炭疽芽孢杆菌单克隆抗体标记的，所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体，所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体优选为抗炭疽芽孢杆菌杂交

瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体；当所述金标垫中的胶体金探针是炭疽芽孢杆菌多克隆抗体标记的，所述检测线为炭疽芽孢杆菌多克隆抗体，所述炭疽芽孢杆菌多克隆抗体优选为兔多克隆抗体，所述质控线优选为抗兔抗抗体。

所述抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 已于 2005 年 12 月 15 日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）。

所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成，如由玻璃纤维膜、吸水纸、树脂等制成。

使用时，可将检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的样品垫直接浸于样品中；为了使用更加方便，所述吸水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、聚氯乙烯板（PVC板）等。再将该带有背板的试纸装入试剂盒中，该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口，对应于检测线和质控线的部位设有观测窗。

本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的方法。

本发明所提供的制备上述检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体，将炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体溶液喷到纤维膜上，包被 NC 膜的一个区域，得到检测线；将抗炭疽芽孢杆菌单克隆抗体的抗抗体或多克隆抗体的抗抗体溶液喷到纤维膜上，包被 NC 膜的另一区域，得到质控线；37℃干燥 0.5-1.5 小时，然后将其粘贴在吸水纸垫上。

2) 制备含有炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记免疫胶体金探针溶液；取该免疫胶体金探针溶液 5ml，加入 0.5g 蔗糖充分溶解，将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，-20℃~-50℃放置 8-12 小时后，冻干机抽干，将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的靠近所述检测线的一端。

3) 将在步骤 2) 中得到的金标垫上面再粘贴样品垫，得到检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸。

所述步骤 1) 中，炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体的浓度为 6.5-7.5mg/ml；能与所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌多克隆抗体特异结合的抗抗体浓度为 3.5-4.5mg/ml。

为了使用更加方便，所述吸水垫的下面还粘贴背板。

所述抗抗体可为羊抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG。

本发明所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针可由下述方

法制备:

1) 将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液, 取 100ml 加热至沸, 搅动下准确加入 1.4ml 的 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液, 继续加热煮沸 10-15 分钟, 直到液体颜色稳定成葡萄酒红色, 得到胶体金溶液, 冷却后用水恢复至原体积;

2) 用 K_2CO_3 或 HCl 调 pH 值为 8.5-9.5, 配制含有浓度为 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 的炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体的免疫胶体金探针溶液; 所述百分含量均为质量百分含量。

所述调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度可为 0.15-0.25M, 优选为 0.2M; 所述调节 pH 值的 HCl 的浓度可为 0.05-0.2M, 优选为 0.1M。

所述炭疽芽孢杆菌单克隆抗体由抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌。

炭疽杆菌荚膜抗原是炭疽杆菌的特异性抗原, 炭疽杆菌所属的芽孢杆菌属的其它细菌不具备荚膜抗原。另外, 炭疽杆菌有毒株具有丰富的荚膜抗原, 而炭疽杆菌弱毒株和无毒株具有少量或不具有荚膜抗原。因此, 用炭疽杆菌有毒株制备含丰富荚膜抗原的全菌体抗原免疫动物, 可以得到炭疽杆菌特异性抗体。本发明的免疫层析试纸采用双抗体夹心法, 将抗炭疽芽孢杆菌特异性抗体包被在硝酸纤维素膜上, 用于捕捉标本中的炭疽芽孢杆菌抗原, 然后用特异性抗体标记的免疫胶体金探针进行检测。

炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体在 ELISA、免疫荧光和凝集试验中与不同炭疽芽孢杆菌菌株发生特异性反应, 但不与其他相关细菌如枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、矮小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等发生交叉反应。实验表明, 炭疽芽孢杆菌免疫层析试纸具有较好的特异性, 其检测限可达到 10^5 - 10^6 cfu/ml。本发明检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸可检出不同来源的炭疽杆菌, 包括强毒株、弱毒株、毒力突变株和疫苗株炭疽杆菌, 检测限为 10^5 - 10^6 cfu/ml 炭疽杆菌。而 2002 年寄给美国参议院的白色粉末中含有的炭疽杆菌是以克来计算的, 这个数量是可以引起本试剂阳性反应的百万倍以上。因此, 本发明检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的敏感性可以满足生物恐怖威胁第一反应组织现场的需要。

本发明检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸不受大于 1mg/ml 牛血清蛋白、冰激凌、食糖、家庭灰尘、滑石粉、脱脂奶粉、面粉、碳酸氢钠、发酵粉、衣物去污剂等物质的干扰。5% 的牛奶、血清, 10% 的蜂蜜以及土壤, 均不影响本发明炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的检测结果。因此, 本发明的炭疽杆菌免疫层析试纸可用于临床标本、污染物如染有血液或体内渗出物的牲畜皮毛和环境中炭疽杆菌的检出, 也可用于纯培养炭疽芽孢杆菌的鉴定。本发明的优势在于检测过程中标本处理简单, 不需要专门仪器

和人员培训，非专业技术人员按照说明书即可操作，并可迅速观察结果，很适合突发事件现场和基层使用。

附图说明

图 1 为炭疽芽孢杆菌免疫层析试纸的结构示意图（1 为玻璃纤维膜样品垫、2 为金标垫、3 为硝酸纤维膜、4 为吸水垫、5 为硝酸纤维膜 3 上包被的检测线、6 为硝酸纤维膜 3 上包被的质控线）。

具体实施方式

主要材料：氯金酸(HAuCl_4)（购自成都化学试剂厂，1g/瓶包装）；硝酸纤维膜（NC 膜）、样品垫和吸水滤纸（购自 Millipore 公司）。

实施例中所用到的菌种均购自军事医学科学院微生物流行病学研究所菌种库，保藏号如下：

炭疽芽孢杆菌（保藏号）：17003-59（强毒株），17003-62（强毒株），170047（弱毒株，产荚膜），170042（突变株，A16 变异所得，用作疫苗）和 170044（疫苗株）

枯草芽孢杆菌（保藏号）：170213，170312，170314，170504

苏云金芽孢杆菌（保藏号）：170071，170501，170509

蜡样芽孢杆菌（保藏号）：170061，170062，170064，170065，170313

巨大芽孢杆菌（保藏号）：170505，170506

矮小芽孢杆菌（保藏号）：170516

地衣芽孢杆菌（保藏号）：170513

下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

下述实施例中的百分含量，如无特别说明，均为质量百分含量。

实施例 1、检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的制备

1、炭疽芽孢杆菌特异性抗体的制备

1) 炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的制备

炭疽杆菌（保藏号 17003-59）接种普通营养琼脂斜面，37℃培养 6 小时。用营养肉汤洗下菌苔并接种 0.8% NaHCO_3 、0.2% 活性炭营养琼脂培养基，37℃、20% CO_2 培养 22 小时。用 5% 甲醛盐水洗下粘稠菌苔于盐水瓶中，放置 37℃ 过夜。无菌试验观察 7 天，证明无活菌后，将菌液 10,000g 离心 10 分钟，收集沉淀，用无菌生理盐水配制成 2 倍比浊浓度（约 10^9 CFU/ml），即为炭疽芽孢杆菌荚膜抗原。

2) 炭疽芽孢杆菌单克隆抗体的制备

采用 BALB/c 小鼠作为免疫动物，颈背部皮下多点注射福氏完全佐剂炭疽芽孢杆

菌荚膜抗原 1ml/只，间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞，与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞融合，用炭疽杆菌荚膜抗原采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液，筛选阳性孔。经过多次融合和筛选，获得了多株分泌炭疽芽孢杆菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。选择分泌抗体滴度较高的杂交瘤细胞株继续克隆传代，利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到多次克隆传代的稳定分泌单克隆抗体的阳性抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567。

采用体内诱生法，将 BALB/c 小鼠（8 周龄）腹腔注入灭菌石蜡油，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567，7-10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，得到纯化的单克隆抗体，小瓶分装，-20℃ 保存。

3) 炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体的制备：选用体重 2kg 健康大耳白家兔（购自中国人民解放军军事医学科学院动物中心），皮下注射福氏完全佐剂炭疽芽孢杆菌荚膜抗原 2mg/只，分别于初次免疫后第 20 天、第 25 天、第 30 天同样剂量和途径追加免疫水剂 1 针。末次免疫后 10 天试血，抗体凝集效价达到 1:10,000 以上放血。

采用常规的饱和硫酸铵盐析法对血液中的炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体进行纯化，经琼脂双向扩散法鉴定获得的抗体具有较好的特异性和亲和性。

4) 炭疽芽孢杆菌特异性抗体的特异性检测

采用免疫荧光法分别检测炭疽芽孢杆菌单克隆抗体和多克隆抗体的特异性。

分别将炭疽芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、矮小芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌菌体涂布在去油洁净的玻片抗原孔中，自然干燥后火焰固定。将用 PBS 对倍稀释的单克隆抗体和多克隆抗体分别滴加于上述各种抗原上，37℃ 反应 30 分钟，用 PBS 冲去抗体，再加抗鼠荧光抗体或抗兔荧光抗体于抗原孔中，37℃ 反应 30 分钟，用 PBS 冲去荧光抗体，加碱性甘油于荧光显微镜下观察。

纯化的炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体效价可达 1:10,000 以上，纯化的兔多克隆抗体效价可达 1:512 以上，所有稀释度的单克隆或多克隆抗体均不与枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、矮小芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌发生交叉反应。

2、制备免疫胶体金探针

1) 制备胶体金溶液：采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒，具体方法为：将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液，取 100mL 加热至沸腾，搅动下准确加入 1.4mL 的 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液，继续加热煮沸 10-15 分钟，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，冷却后用水恢复至原体积，即得到胶体金溶液。

2) 确定胶体金偶联抗体饱和浓度: 用 0.2 M K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH9.2, 准备 5 支洁净试管, 分别加入 1ml 胶体金溶液。将经纯化的炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体或兔多克隆抗体稀释为 1mg/ml, 分别向 4 支试管中加入 10 μ l、15 μ l、25 μ l、35 μ l, 另一支为对照, 混匀后于室温下放置 5 分钟, 加入 10% NaCl 水溶液, 混匀, 静置 10-20 分钟后观察液体颜色。胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量, 即为稳定 1ml 胶体金所需抗体的最适浓度, 以此为基础增加 20% 抗体量, 即为胶体金偶联抗体饱和浓度。结果表明: 维持胶体金溶液颜色不变的抗体量为 25 μ l, 即 25 μ g/ml。选择偶联抗体浓度为 30 μ g/ml。

3) 金标垫 2 的制备: 按上述方法配制含有浓度为 30 μ g / mL 的炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体或兔多克隆抗体的免疫胶体金探针溶液 50ml, 搅拌 20 分钟, 加 10%BSA 5ml, 搅拌 20 分钟, 加 1ml 10% PEG20000, 搅拌 20 分钟, 23,000g 离心 15 分钟, 吸出上清, 20,000~32,500g 离心 25 分钟, 弃上清, 沉淀用四硼酸钠洗涤一次后用四硼酸钠保存液收集沉淀 5ml。取金标探针 5ml 加入 0.5g 蔗糖, 充分溶解均匀加在玻璃纤维膜上, -20 $^{\circ}C$ ~-50 $^{\circ}C$ 放置 10 小时, 冻干机抽干, 得到金标垫 2。

3、检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的制备

如图 1 所示, 检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸由吸水垫 4、硝酸纤维膜 3、金标垫 2 和玻璃纤维膜样品垫 1 四部分组成; 硝酸纤维膜 3 上包被有检测线 5 和质控线 6。制备方法包括以下步骤:

1) NC 膜 3 的包被

炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 的包被: 用 0.01M pH7.2 PB ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39 g, Na_2HPO_4 1.07g, 去离子水 1000ml) 稀释炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体至终浓度为 7mg/ml, 用于包被检测线。用 0.01M pH 7.2 的 PBS ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39 g, Na_2HPO_4 1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水 1000ml) 稀释羊抗鼠 IgG 至终浓度为 4mg/ml, 用于包被质控线。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 300mm 长、25mm 宽硝酸纤维素膜上, 形成相互分离的检测线 5 和质控线 6, 37 $^{\circ}C$ 干燥 2.5h。

炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG 的包被: 用 0.01M pH7.2 PB 稀释炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体至终浓度为 7mg/ml, 用于包被检测线。用 0.01M pH 7.2 的 PBS 稀释羊抗兔 IgG 至终浓度为 4mg/ml, 用于包被质控线。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 300mm 长、25mm 宽硝酸纤维素膜上, 形成相互分离的检测线 5 和质控线 6, 37 $^{\circ}C$ 干燥 2.5h。

2) 检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的制备

将吸水纸垫 4 用双面胶粘贴于上述包被有炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 或包被有炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG 的 NC 膜 3 靠近质控线的一端；将在步骤 2 中制备的金标垫 2 用双面胶粘贴于 NC 膜 3 靠近检测线的一端；再在金标垫 2 的另一端用双面胶粘贴玻璃纤维膜样品垫 1；最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上，按所需大小切割，即为检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，加干燥剂后密封保存。

4、检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试剂盒的制备

为了方便使用，将步骤 3 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的下面再紧密连接一塑料背板，再将该带有背板的试纸装入试剂盒中，加干燥剂后密封保存。该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口，对应于对照带和测试带的部位设有观测窗。

5、检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的使用方法和原理

测定时将试纸条样品垫 1 浸入液体标本中，样品垫 1 即吸取液体向上端移动，流经金标垫 2 时使干片上的免疫金复合物复溶，并带动其向硝酸纤维素膜 3 渗移。若标本中有待测特异抗原，其可与免疫金复合物的抗体结合，此抗原抗体复合物流至检测线 5 即被固相抗体所获，在膜上显出红色反应线条。过剩的免疫金复合物继续前行，至质控线 6 与固相二抗结合，而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

实施例 2、炭疽芽孢杆菌的检测及与其它相关细菌的交叉试验

1、炭疽芽孢杆菌的检测

1) 购自军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验研究中心的 5 株不同来源的炭疽杆菌，包括强毒株 17003-59 和 17003-62、弱毒株 170047、毒力突变株 170042 和疫苗株 170044，分别用比浊法制成浓度为 10^6 cfu/ml 菌悬液作为样品检测液备用。

2) 经实施例 1 制备的包被炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 免疫层析试纸或包被有炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG 的免疫层析试纸检测均为阳性结果。

2、其他相关细菌的交叉试验

1) 购自军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验研究中心的枯草芽孢杆菌 170213、枯草芽孢杆菌 170312、腊样芽孢杆菌 170061、腊样芽孢杆菌 170062、苏云金芽孢杆菌 170071、苏云金芽孢杆菌 170501、巨大芽孢杆菌 170505、矮小芽孢杆菌 170516、地衣芽孢杆菌 170513 组成，分别用比浊法制成浓度为 10^8 cfu/ml 的菌悬液作为样品检测液备用。

2) 经实施例 1 制备的包被炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 免疫层析试纸或包被有炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG 的免疫层析试纸检测全部为阴性结果。

包被炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 免疫层析试纸检测结果如表 1 所示, 结果表明, 该试纸检测不同来源的 5 株炭疽芽孢杆菌不同分离株 10^6 cf μ /ml 均为阳性。用试纸检测相关细菌和常见菌 10^8 cf μ /ml 均为阴性。

表 1 炭疽杆菌快速检测试剂(胶体金法)检测标准品结果

细菌	保藏号	菌量 (cf μ /ml)	检测结果
炭疽杆菌 (强毒株)	17003-59	10^6	+
	17003-62	10^6	+
	(弱毒株) 170047	10^6	+
	(突变株) 170042	10^6	+(弱)
	(疫苗株) 170044	10^6	+(弱)
枯草杆菌	170213	10^8	-
	170312	10^8	-
	170314	10^8	-
	170504	10^8	-
苏云金杆菌	170071	10^8	-
	170501	10^8	-
	170509	10^8	-
蜡样杆菌	170061	10^8	-
	170062	10^8	-
	170064	10^8	-
	170065	10^8	-
	170313	10^8	-
巨大芽孢杆菌	170505	10^8	-
	170506	10^8	-
矮小芽孢杆菌	170516	10^8	-
地衣芽孢杆菌	170513	10^8	-

实施例 3、检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的稳定性试验

按照制造检定规程要求,对实施例 1 制备的包被抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 或包被有炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG 的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸试剂盒的质量分别进行稳定性考核,以确定试剂保存条件及有效期。

将实施例 1 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸试剂盒中的三批(批号:020101、020102、020103,其中 020101、020102 为包被抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体;020103 包被有炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG),分别放入 37℃和 20℃孵箱中。37℃孵箱中的试剂盒,于放置后 10 天、20 天、30 天取出检测。20℃孵箱中的试剂盒,于放置后每月检测 1 次,观察并记录 14 个月的实验结果。

将炭疽芽孢杆菌接种葡萄糖半胱氨酸血琼脂,37℃ 5%CO₂培养 48 小时。用无菌生理盐水洗下菌苔,调至比浊浓度,沸水 10 分钟,冷却至室温。用生理盐水调菌液 10⁸ cfu/ml、10⁷ cfu/ml、10⁶ cfu/ml、10⁵ cfu/ml,即为检测用菌液。

取实施例 1 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸试剂盒,分别加入经上述稀释的菌液样本 3 滴(约 150ul),并以生理盐水为阴性对照,2 分钟后开始观察结果,15 分钟观察终止。结果报告:只于质控线处出现 1 条红色沉淀线为阴性,即无炭疽芽孢杆菌检出;于质控线处和检测线处各出现 1 条红色沉淀线为阳性,即有炭疽芽孢杆菌检出,质控线和检测线处均无红色沉淀线,说明试纸失效。检测结果如表 2~4 所示。检测结果表明,实施例 1 制备的包被抗炭疽芽孢杆菌杂交瘤细胞株 Ba5 CGMCC No. 1567 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 或包被有炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体和羊抗兔 IgG 的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸试剂盒 20℃ 放置 14 个月和 37℃ 放置 30 天,检测结果无区别。该两种试剂盒 4-25℃避光保存,有效期为 12 个月。

表 2. 免疫层析试纸试剂盒 020101 批稳定性试验结果

批 次	放置温度	放置时间	炭疽芽孢杆菌菌液 (cfu/ml)				盐水
			10^8	10^7	10^6	10^5	
020101	37°C	10 天	+	+	+	+	-
		20 天	+	+	+	+	-
		30 天	+	+	+	+	-
	20°C	1 个月	+	+	+	+	-
		2 个月	+	+	+	+	-
		3 个月	+	+	+	+	-
		4 个月	+	+	+	+	-
		5 个月	+	+	+	+	-
		6 个月	+	+	+	+	-
		7 个月	+	+	+	+	-
		8 个月	+	+	+	+	-
		9 个月	+	+	+	+	-
		10 个月	+	+	+	+	-
		11 个月	+	+	+	+	-
12 个月	+	+	+	+	-		
13 个月	+	+	+	+	-		
14 个月	+	+	+	+	-		

表 3. 免疫层析试纸试剂盒 020102 批稳定性试验结果

批次	放置温度	放置时间	炭疽芽孢杆菌菌液 (cfu/ml)				盐水
			10^8	10^7	10^6	10^5	
020102	37°C	10 天	+	+	+	+	-
		20 天	+	+	+	+	-
		30 天	+	+	+	+	-
	20°C	1 个月	+	+	+	+	-
		2 个月	+	+	+	+	-
		3 个月	+	+	+	+	-
		4 个月	+	+	+	+	-
		5 个月	+	+	+	+	-
		6 个月	+	+	+	+	-
		7 个月	+	+	+	+	-
		8 个月	+	+	+	+	-
		9 个月	+	+	+	+	-
		10 个月	+	+	+	+	-
		11 个月	+	+	+	+	-
12 个月	+	+	+	+	-		
13 个月	+	+	+	+	-		
14 个月	+	+	+	+	-		

表 4. 免疫层析试纸试剂盒 020103 批稳定性试验结果

批 次	放置温度	放置时间	炭疽芽孢杆菌菌液 (cfu/ml)				盐水
			10^8	10^7	10^6	10^5	
020103	37℃	10 天	+	+	+	+	-
		20 天	+	+	+	+	-
		30 天	+	+	+	+	-
	20℃	1 个月	+	+	+	+	-
		2 个月	+	+	+	+	-
		3 个月	+	+	+	+	-
		4 个月	+	+	+	+	-
		5 个月	+	+	+	+	-
		6 个月	+	+	+	+	-
		7 个月	+	+	+	+	-
		8 个月	+	+	+	+	-
		9 个月	+	+	+	+	-
		10 个月	+	+	+	+	-
		11 个月	+	+	+	+	-
12 个月	+	+	+	+	-		
13 个月	+	+	+	+	-		
14 个月	+	+	+	+	-		

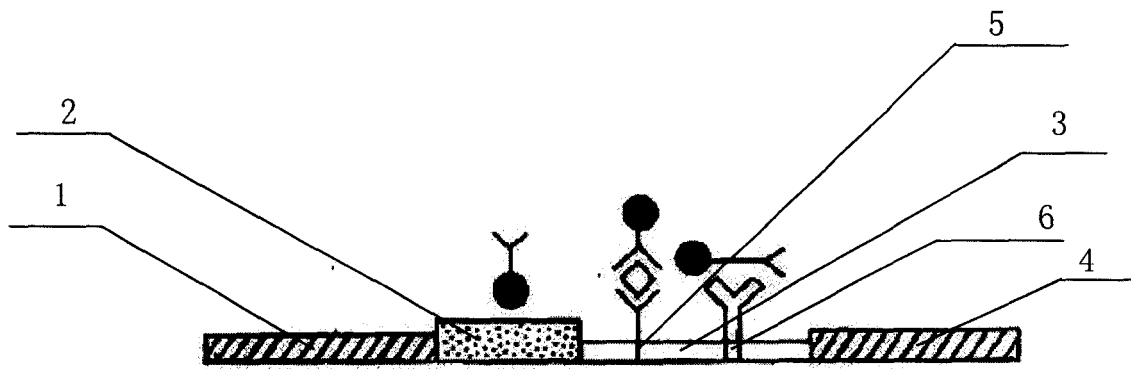


图 1

专利名称(译)	一种检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN101000346A	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	CN200610000294.3	申请日	2006-01-09
[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		
当前申请(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 檀华 朱虹 何君 左庭婷 苏裕心		
发明人	端青 檀华 朱虹 何君 左庭婷 苏裕心		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 G01N21/78		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101000346B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸及其制备方法。该检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸，包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体标记胶体金探针的金标垫、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维素膜(NC膜)和紧密连接于所述硝酸纤维素膜另一端的吸水垫；所述硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或炭疽芽孢杆菌兔多克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体或抗兔抗抗体。本发明用于临床标本、污染物和环境中炭疽芽孢杆菌抗原的检出，也可用于纯培养炭疽芽孢杆菌的鉴定。

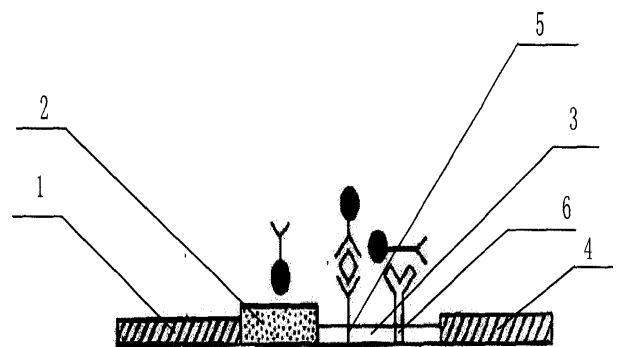


图 1