

[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 200610000295.8

[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 101000347A

[22] 申请日 2006.1.9

[21] 申请号 200610000295.8

[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 14 页 附图 1 页

[54] 发明名称

检测土拉热弗朗西斯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土拉热弗朗西斯菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸，包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有土拉热弗朗西斯菌单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膜(NC膜)和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体。本发明用于临床标本、污染物和环境中的土拉热弗朗西斯菌抗原的检测，也可用于纯培养土拉热弗朗西斯菌的鉴定。

1、一种检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸，包括依次紧密串联的样品垫、含有土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体。

2、根据权利要求1所述的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体为抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体。

3、根据权利要求1所述的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述质控线为羊抗鼠 IgG。

4、根据权利要求1所述的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸，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所述的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体标记胶体金探针由下述方法制备：将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液，取 100ml 加热至沸，搅动下加入 1.6ml 的 1% 柠檬酸三钠水溶液，继续加热煮沸 10-15 分钟，冷却后用水恢复至原体积，用 K_2CO_3 调 pH 值为 8.5-9.5，按 30ug/ml 加入土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，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 分钟，23,000g 离心 15 分钟，吸出上清，25,000g-35,000g 离心 25-35 分钟，弃上清，沉淀用四硼酸钠保存液收集，得到胶体金标探针；所述百分含量均为质量百分含量。

6、一种制备检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，将土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体喷到纤维膜上，包被 NC 膜的一个区域，得到检测线；将抗鼠 IgG 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 2-4 小时，然后将其一端粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备含有土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体标记免疫胶体金探针溶液；取 5ml 所述含有土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体标记免疫胶体金探针溶液，加入 0.5g 蔗糖充分溶解，将玻璃纤维或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液，-20℃ ~ -50℃ 放置 10 小时，冻干机抽干即得到金标垫，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) 在步骤 2) 中的金标垫上面再贴样品垫，得到检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层

析试纸。

7、根据权利要求6所述的方法，其特征在于：所述土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体的浓度为1 mg/ml；抗鼠 IgG 的浓度为3 mg/ml；所述吸水垫的下面还粘贴有背板；所述调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度为0.15-0.25M。

8、抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No.1566。

9、权利要求8所述的抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No.1566 产生的单克隆抗体。

10、含有权利要求1-5 中任一所述的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸的试剂盒。

检测土拉热弗朗西斯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土拉热弗朗西斯菌的试纸及其制备方法，特别涉及一种检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

土拉热弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)是重要的生物战剂，已被列入国际禁止生物武器公约致病微生物核查清单。2001年6月美国微生物学报刊登了一篇“防生物危害工作组(The Working Group on Civilian Biodefense)”关于土拉热弗朗西斯菌作为生物武器进行恐怖袭击危险性评估报告。这个工作组由来自美国医学科研机构和军队、政府有关部门的25名专家组成，通过检索1966年1月至2000年10月间的相关文献，最后得出结论：土拉热弗朗西斯菌具有被利用进行生物恐怖袭击的潜在危险。该结论依据以下事实：(1)通过简易发酵即可大量得到土拉热弗朗西斯菌。(2)土拉热弗朗西斯菌容易传播，如形成气溶胶通过空气传播，或污染环境通过尘埃和水传播。另外，与鼠疫等烈性致病菌比较，土拉热弗朗西斯菌在环境中具有更强的抵抗力，如在水、土壤、尸体和兽皮中可存活几周，在0℃耐受几个月，在冷冻的兔肉中存活几年。患者及病畜皮肤、腺体溃疡病灶分泌物、血、痰标本，或死亡动物肝、脾标本中，均含有大量土拉热弗朗西斯菌，更容易被恐怖分子利用。(3)人和动物易感，少于10个土拉热弗朗西斯菌即可使人和动物感染。(4)可引起致死性疾病。世界卫生组织最近估计，50千克土拉热弗朗西斯菌气溶胶可使一个五百万居民的城市中25万人感染，其中1.9万人死亡。因此，美国疾病控制中心估算，应对土拉热弗朗西斯菌气溶胶生物恐怖袭击，每10万人需经费54亿美元(ennis DT, Inglesby TV, Henderson DA. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management JAMA 2001, 6;285(21):2763-73)。“9.11”恐怖事件以后美国将土拉热弗朗西斯菌列入生物恐怖红色警报(最高级)中的病原菌。

土拉热弗朗西斯菌是苛养菌，培养基营养条件要求复杂，分离培养比较困难。而且土拉热弗朗西斯菌生长缓慢，尤其是初次分离培养，需要1-2周时间才能确定结果。因此，研究快速检出土拉热弗朗西斯菌的方法，对于生物战和生物恐怖现场中确定污染源和污染范围，及时诊断土拉热弗朗西斯菌感染，防止环境扩散和患者及时治疗十分重要，也是在突发事件中将生物危害减至最小程度的重要保证。

土拉热弗朗西斯菌快速检测常用的方法为免疫荧光试验、聚合酶链反应（PCR）、光纤生物传感器和免疫胶体金技术。

免疫荧光试验主要用于从人或动物病料涂片中直接检出土拉热弗朗西斯菌。斯堪的那维亚（Scandinavia）地区人通常通过蚊虫叮咬感染土拉热弗朗西斯菌，出现皮肤溃疡和腺体脓肿。1998年西班牙中北部送检25份疑是土拉热弗朗西斯菌病临床标本，其中腺体脓液17份，皮肤溃疡分泌物8份，这25份标本分别接种培养基进行病原分离，其中20份直接涂片后用免疫荧光染色镜检。结果3例（12%）培养出土拉热弗朗西斯菌，7例（35%）免疫荧光检测阳性；另外352例临床体征疑是土拉菌病的病人，用试管凝集试验检测土拉热血清抗体滴度 $\geq 1:160$ 的203例（58%），其中53例呈4倍升高。作者认为免疫荧光检测和血清抗体检测均能很好地应用于土拉热弗朗西斯菌感染的临床诊断（Labayru C, Palop A, Lopez-Urrutia L. *Francisella tularensis*: update on microbiological diagnosis after an epidemic outbreak *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999, 17(9):458-62）。

聚合酶链反应（PCR）主要用于环境中土拉热弗朗西斯菌的检测和实验室土拉热弗朗西斯菌的基因分型。如北半球分离到的土拉热弗朗西斯菌对哺乳动物的毒力有明显不同，但无法用普通生物学方法和血清学方法进行分类，通过PCR可将毒力不同的土拉热弗朗西斯菌合成4个亚种（Johansson A, Ibrahim A, Goransson I. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 2000, 38(11):4180-5）。

PCR也可用于疑似土拉热弗朗西斯菌病的临床标本的直接检测。但要求标本要新鲜，并且在采样过程中于标本中加入核酸酶抑制剂，如硫氰酸胍等，设计引物所用的模板多为16S rRNA和17KDa脂蛋白TUL4基因。1998年瑞典局部爆发流行土拉热弗朗西斯菌病。临床体征疑似40例中，20例（50%）土拉热杆菌培养阳性，29例（73%）血清抗体检测阳性，30例（75%）PCR检测阳性（其中8例培养与血清抗体检测均为阴性，而PCR检测阳性）。作者认为，直接用PCR从伤口标本中检出土拉热弗朗西斯菌比培养法敏感。另外，当病人还没有产生抗体时（土拉热弗朗西斯菌感染不到2周），用PCR诊断感染是一个及时的方法（Johansson A, Berglund L, Eriksson U. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* 2000, 38(1):22-6; Sjostedt A, Eriksson U, Berglund L. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia

by PCR. *J Clin Microbiol* 1997, 35(5):1045-8)。

光纤生物传感器也被研制用于检测环境中的土拉热弗朗西斯菌污染。其原理是应用核酸检测的特异性和抗原抗体反应。优势在于同时可检测多个不同目标, 3-10分钟可初步报告结果, 敏感性可达检测土拉热弗朗西斯菌 5×10^5 cfu/ml, 检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B 50ng/ml (Anderson GP, King KD, Gaffney KL. Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor. *Biosens Bioelectron* 2000, 14(10-11):771-7)。

近年来免疫胶体金技术在病原体检测方面的应用发展较快, 由于该技术的应用, 使得病原体的检测就像在家作早孕检测一样简便和快速。免疫胶体金技术的基本原理是用包被在硝酸纤维素(NC)膜上的配对物(抗原或抗体)进行捕捉, 然后用特异性标记的免疫胶体金探针进行检测, 阳性标本经过2分钟左右的纸层析后, 出现肉眼可见的沉淀线。

目前光纤生物传感器离实用还有一段距离。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土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸(Immuno-Chromatographic Assay, ICA)。

本发明所提供的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸, 包括依次紧密串联的样品垫、含有土拉热弗朗西斯菌单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, 所述检测线为土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体, 所述质控线为抗鼠抗抗体;

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、树脂等。

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。

所述土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体优选为抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体。

所述抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 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)。

所述质控线可为羊抗鼠 IgG。

本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测土拉热弗朗西斯菌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热弗朗西斯菌的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，将土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体喷到纤维膜上，包被 NC 膜的一个区域，得到检测线；将抗鼠 IgG 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 2-4 小时，然后将其一端粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备含有土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体标记免疫胶体金探针溶液；取 5ml 所述含有土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体标记免疫胶体金探针溶液，加入 0.5g 蔗糖充分溶解，将玻璃纤维或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液，-20℃~-50℃放置 8-12 小时，冻干机抽干即得到金标垫，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) 在步骤 2) 中的金标垫上面再贴样品垫，得到检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸。

为了使用更加方便，所述吸水垫的下面还粘贴背板。

本发明所提供的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸及其制备方法中，所述土拉热弗朗西斯菌单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 1.6ml 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 9.0，按 30ug/ml 加入土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，搅拌 20 分钟，配制土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体的免疫胶体金探针溶液 50ml，然后加入 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 25-35min，弃上清，收集沉淀用四硼酸钠保存液收集，得到胶体金标探针。

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 HCl 的浓度可为 0.08-0.12mol/L，优选为 0.1mol/L。

所述土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体由抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌。

本发明的免疫层析试纸采用双抗体夹心法，将抗土拉热弗朗西斯菌特异性单克

隆抗体包被在硝酸纤维素膜上，用于捕捉标本中的土拉热弗朗西斯菌抗原，然后用特异性单克隆抗体标记的免疫胶体金探针进行检测。

抗土拉热菌杂交瘤细胞株Ft5 CGMCC No.1566分泌的单克隆抗体在ELISA、免疫荧光和凝集试验中与不同土拉热弗朗西斯菌菌株发生特异性反应，但不与其他相关细菌如布鲁氏菌、鼠疫菌、嗜肺军团菌、霍乱弧菌、以及大肠杆菌、痢疾杆菌、沙门氏菌和绿脓杆菌发生交叉反应。该单克隆抗体与Ft9（端青，赵忠利，田青，等. 土拉菌单克隆抗体的制备及其特性的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(2): 3-4.）比较，均有较好的亲和性和特异性，且前者的效价比后者更高，达 10^7 以上，其检测土拉菌限可达到 10^4-10^5 cfu/ml。

本发明的试纸可用于临床标本、污染物和环境中的土拉热弗朗西斯菌的检出，也可用于纯培养土拉热弗朗西斯菌的鉴定。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为土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体与不同土拉热弗朗西斯菌抗原免疫印迹试验结果

图2为土拉热弗朗西斯菌免疫层析试纸的结构示意图

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）；硝酸纤维素膜（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：所有土拉热弗朗西斯菌株、大肠埃希氏菌、痢疾志贺氏菌、沙门氏菌、变形杆菌、绿脓杆菌、霍乱弧菌、布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、嗜肺军团菌和金黄色葡萄球菌，均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菌种库。

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、检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸的制备

1、土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体的制备

1) 土拉热弗朗西斯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弗氏完全佐剂土拉热弗朗西斯菌疫苗株（军事医学科学院微生物流行病学研究所，保藏号410062）免疫原乳化剂，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，用下述

土拉热弗朗西斯菌全菌甲醛固定抗原采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液，筛选阳性孔。经过多次融合和筛选，获得了多株分泌土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体杂交瘤细胞株。选择其中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土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566。

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 Ft5 CGMCC No. 1566 $5 \times 10^5 - 10^6$ 个/只，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°C 保存。

在凝集试验中抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体与土拉热弗朗西斯菌各个菌株可在 2 分钟内发生特异性凝集，但不与其他相关或常见菌发生凝集；在免疫荧光试验中抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体可与土拉热弗朗西斯菌各个菌株发生反应，但不与其他相关或常见菌发生交叉反应。说明抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体具有较高的特异性。该单克隆抗体与 Ft9（端青，赵忠利，田青，等. 土拉菌单克隆抗体的制备及其特性的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(2): 3-4.）均有较好的亲和性和特异性，且前者的效价比后者更高，达 10^7 以上。

2) 抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体的抗原识别位点的确定

土拉热弗朗西斯菌（军事医学科学院微生物流行病学研究所，保藏号 410062）接种于葡萄糖半胱氨酸兔血琼脂斜面， 37°C 培养 48 小时。

将上述培养的土拉热弗朗西斯菌用 0.5% 甲醛生理盐水收集菌液，混匀后用橡皮塞密盖， 37°C 过夜取出，即为土拉热弗朗西斯菌全菌甲醛固定抗原；

将上述培养的土拉热弗朗西斯菌用无菌生理盐水收集菌液，混匀后 100°C 水浴加热固定 10-15 分钟，即为土拉热弗朗西斯菌加热固定全菌抗原；

将上述培养的土拉热弗朗西斯菌用无菌生理盐水收集菌苔制备菌悬液，菌悬液置于 68°C 水浴平衡至 68°C 后缓慢加入等体积 68°C 90% 苯酚，搅拌 30 分钟。 4°C 水浴冷却 10 分钟， $10,000\text{g}$ 离心 45 分钟，吸出上层水相装入半透膜袋中流水透析 24 小时，然后与蒸馏水 4°C 透析 48 小时。收集袋中液体， $13,000\text{g}$ 离心 20 分钟，收集上清即为脂多糖抗原（LPS 抗原）。

以上述制备的土拉热弗朗西斯菌甲醛固定全菌抗原、土拉热弗朗西斯菌 LPS 抗原、分别经高碘酸钠和蛋白酶 K 处理的土拉热弗朗西斯菌 LPS 抗原和土拉热弗朗西斯菌加热固定全菌抗原为抗原，SDS-PAGE 电泳转移膜后与抗土拉热菌杂交瘤细胞株

Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体进行 Western-blot。结果如图 1 所示，表明抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体与土拉热弗朗西斯菌甲醛固定全菌抗原和加热固定全菌抗原出现细菌 LPS 典型的梯形免疫印迹带，与 LPS 抗原在 43-94KD 间出现免疫印迹带。抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体与经蛋白酶 K 处理的 LPS 抗原也出现免疫印迹带，但与经高碘酸钠处理的 LPS 抗原不出现免疫印迹带。结果表明抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体的抗原识别位点是土拉热弗朗西斯菌的 LPS 抗原，为土拉热弗朗西斯菌 LPS 的耐热成分。图 1 中 a 为土拉热弗朗西斯菌甲醛固定全菌抗原，b 为加热固定全菌抗原，c 为 Markers，d 为 LPS 抗原。

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 1.6mL 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，即得到胶体金溶液。冷却后用蒸馏水恢复至原体积，制成颗粒直径为 25nm 的胶体金颗粒。

2) 确定胶体金偶联抗体饱和浓度：用 0.2 M K_2CO_3 或 0.1 M HCl 调节胶体金溶液 pH9.0，准备 5 支洁净试管，分别加入 1ml 胶体金溶液。将经纯化的抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体稀释为 1mg/ml，分别向 4 支试管中加入 10 μl 、15 μl 、25 μl 、35 μl ，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 μl ，即 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。选择偶联抗体浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3) 金标垫 2 的制备：按上述方法配制含有浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单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% $\text{PEG}20000$ ，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 5 ml。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 $^{\circ}\text{C}$ ~-50 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 小时，冻干机抽干，得到金标垫 2。

3、土拉热弗朗西斯菌快速检测试纸的制备

如图 2 所示，检测土拉热弗朗西斯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。

1) NC 膜 3 的包被：

用 0.01M pH7.2 PB 缓冲液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 g, Na_2HPO_4 1.07g, 去离子水 1000ml) 稀释抗土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No.1566 分泌的单克隆抗体, 浓度为 1mg/ml, 用于包被检测线。用 0.01M pH 7.2 的 PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 g, Na_2HPO_4 1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水 1000ml) 稀释羊抗鼠 IgG, 浓度为 3mg/ml, 用于包被质控线。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 5 和质控线 6, 37°C 干燥 2.5h。

2) 土拉热弗朗西斯菌快速检测试纸的制备

将吸水垫 4 用双面胶粘贴在包被的硝酸纤维膜 3 的一端, 将包被的 NC 膜 3 用双面胶粘贴在步骤 2 中制备的金标垫 2 的一端; 在金标垫 2 上用双面胶粘贴玻璃纤维膜样品垫 1; 再最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上, 按所需大小切割, 即为检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

4、检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试剂盒的制备

为了方便使用, 将步骤 3 制备的土拉热弗朗西斯菌快速检测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、土拉热弗朗西斯菌快速检测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 与固相羊抗鼠 IgG 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、土拉热弗朗西斯菌的检测及与其它相关细菌的交叉试验

1、土拉热弗朗西斯菌的检测

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、浓度为 1×10^5 cfu/ml 的土拉热弗朗西斯菌株: 土拉热弗朗西斯菌 410101、土拉热弗朗西斯菌 410102、土拉热弗朗西斯菌 410103、土拉热弗朗西斯菌 410104、土拉热弗朗西斯菌 410105, 菌悬液作为样品检测液备用。

2) 经实施例 1 制备的包被土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 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、浓度为 10^8 cfu/ml 的布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌和嗜肺军团菌 3 种菌，菌悬液作为样品检测液备用。

2) 经实施例 1 制备的包被土拉热菌杂交瘤细胞株 Ft5 CGMCC No. 1566 分泌的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 的免疫层析试纸检测均为阴性结果。

实施例 3、临床和环境疑似土拉热弗朗西斯菌标本的检测

测定时，分别往实施例 1 制备的试剂盒的样品孔加入上述样品检测液 3 滴 (150ul)，2 分钟后通过检测窗口开始观察结果，15 分钟观察终止。结果报告：质控线处出现 1 条红沉淀线为阴性，而检测线处无沉淀线，即无土拉热弗朗西斯菌检出；质控线和检测线处各出现 1 条沉淀线为阳性，即有土拉热弗朗西斯菌检出。质控线和检测线处均无红色沉淀线，说明试纸失效。

1) 纯培养细菌：挑取疑似土拉热菌单个菌落，于小试管中制成 0.5ml 生理盐水菌悬液作为样品检测液。

临床标本：取疑似土拉热患者或病畜皮肤溃疡病灶分泌物、血、痰标本、或死亡动物肝脾研磨标本，加少量生理盐水充分振荡混均，自然沉降后取上清 0.5ml 作为样品检测液。

环境中污染物：取疑似土拉热菌污染的土壤、物体表面、动物皮毛的擦拭子，浸于 1ml 生理盐水中，自然沉降后或挤干擦拭子，取上清 0.5ml 作为样品检测液，或取疑似污染水 0.5ml 作为样品检测液。

上述样品用实施例 1 制备的免疫层析试纸检测，结果如表 1 所示，与 PCR 检测方法得到的结果一致。

表 1 土拉热弗朗西斯菌免疫层析试纸检测临床和环境疑似标本结果

标本	分泌物	血	痰标本	肝脾研磨标本	土壤	物体表面	擦拭子
检测结果	+	-	-	+	-	-	+

2) 阳性标准品：表 2 中的 19 株土拉热弗朗西斯菌不同分离株（军事医学科学院微生物流行病学研究所）

阴性标准品：表 2 中的大肠埃希氏菌、痢疾志贺氏菌、沙门氏菌、变形杆菌、绿脓杆菌、霍乱弧菌、布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、嗜肺军团菌和金黄色葡萄球菌（军事医学科学院微生物流行病学研究所）。

将上述菌种在相应固体培养基上传代，分别用生理盐水洗下菌苔，比浊法配制

菌悬液 10^5 cfu/ml 和 10^8 cfu/ml, 作为样品检测液备用。结果如表 1 所示, 用实施例 1 制备的试纸检测不同来源的 19 株土拉热弗朗西斯菌 10^5 cfu/ml 和 10^8 cfu/ml 均为阳性。用试纸检测相关细菌和常见菌 10^5 cfu/ml 和 10^8 cfu/ml 均为阴性。

表 2 土拉热弗朗西斯菌免疫层析试纸检测标准品

细菌名称	菌号	来源	10^5 cfu/ml	10^8 cfu/ml
土拉热弗朗西斯菌	410101	内蒙	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410102	前苏联	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410103	前苏联	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410104	前苏联	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410105	西藏	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410106	黑龙江	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410107	黑龙江	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410108	西藏	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410109	西藏	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410111	西藏	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410112	西藏	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410113	西藏	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410114	新疆	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410116	新疆	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410117	新疆	+	+
土拉热弗朗西斯菌	410118	日本	+	+
土拉热弗朗西斯菌	920601	新疆	+	+
土拉热弗朗西斯菌	920606	新疆	+	+
土拉热弗朗西斯菌	920607	新疆	+	+
大肠埃希氏菌	ATCC25922		—	—
痢疾志贺氏菌	430026		—	—
沙门氏菌	460694		—	—
变形杆菌	430065		—	—
绿脓杆菌	ATCC27853		—	—
霍乱弧菌	860061		—	—
布鲁氏菌	210105		—	—
鼠疫氏菌	410050		—	—
嗜肺军团菌	510101		—	—
金黄色葡萄球菌	ATCC6538		—	—

实施例 4、检测土拉热弗朗西斯菌抗原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 制备的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸试剂盒的质量进行稳定性考核，以确定试剂保存条件及有效期。

将实施例 1 制备的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸试剂盒中的三批（批号：020101、020102、020103），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。

将土拉热弗朗西斯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 制备的检测土拉热弗朗西斯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：于质控线处出现 1 条红色沉淀线为阴性，即无土拉热弗朗西斯菌检出；于质控线处和检测线处各出现 1 条红色沉淀线为阳性，即有土拉热弗朗西斯菌检出，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 3~5 所示。结果表明，实施例 1 制备的检测土拉热弗朗西斯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，实施例 1 制备的检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸试剂盒 4-25℃ 避光保存，有效期为 12 个月。

表 3. 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	土拉热弗朗西斯菌液 (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 4. 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	土拉热弗朗西斯菌液 (cfu/ml)				盐水
			10^8	10^7	10^6	10^5	
020102	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	+	+	+	+	-		

表 5. 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	土拉热弗朗西斯菌液 (cfu/ml)				盐水
			10^8	10^7	10^6	10^5	
020103	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	+	+	+	+	-		

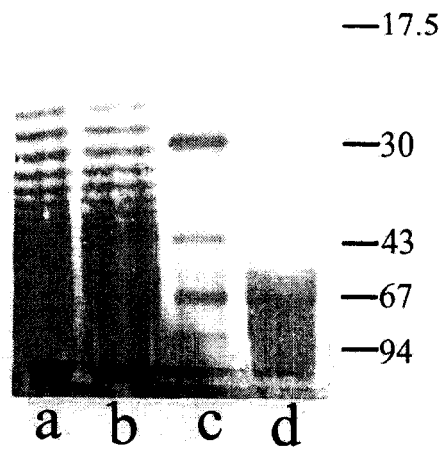


图 1

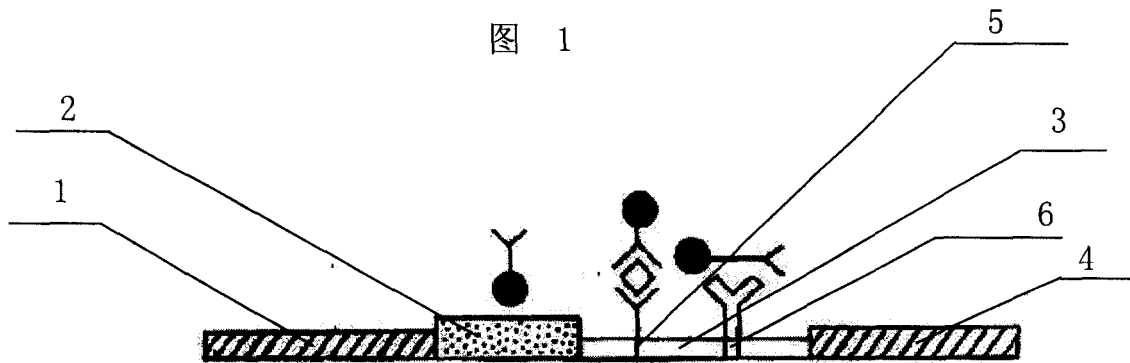


图 2

专利名称(译)	检测土拉热弗朗西斯菌的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN101000347A	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	CN200610000295.8	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	CN101000347B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测土拉热弗朗西斯菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸，包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有土拉热弗朗西斯菌单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，所述检测线为土拉热弗朗西斯菌单克隆抗体，所述质控线为抗鼠抗抗体。本发明用于临床标本、污染物和环境中的土拉热弗朗西斯菌抗原的检测，也可用于纯培养土拉热弗朗西斯菌的鉴定。

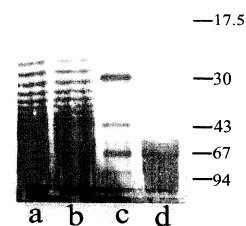


图 1

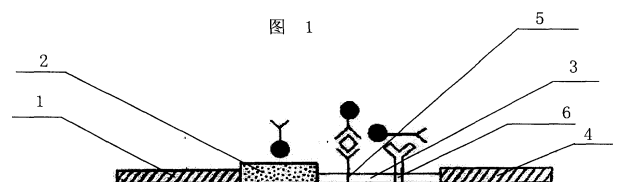


图 2