

[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 200710119068.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 21 日

[11] 公开号 CN 101074956A

[22] 申请日 2007.6.19

[21] 申请号 200710119068.1

[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

[72] 发明人 端 青 汪 黎 李 艳 柏长青
朱 虹 檀 华 何 君 左婷庭
宋立华

[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 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测嗜肺军团菌抗原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嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法。该试纸包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有抗嗜肺军团菌血清抗原的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，所述检测线含有嗜肺军团菌抗原特异性抗体，所述质控线含有能与所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体。本发明的免疫层析试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

1、一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸，包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有抗嗜肺军团菌血清抗原的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，所述检测线含有嗜肺军团菌抗原特异性抗体，所述质控线含有能与所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体。

2、根据权利要求1所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸，其特征在于：所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体为以嗜肺军团菌抗原为抗原免疫动物得到的抗体；所述嗜肺军团菌抗原为嗜肺军团菌血清1型、2型、3型、4型、5型、6型、7型、8型、9型或10型抗原；所述免疫动物为兔、猴、鸡或鼠；所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体为抗兔抗抗体；所述检测线含有的嗜肺军团菌抗原特异性抗体的浓度为5-7mg / mL，所述质控线含有的能与嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体的浓度为3-5mg / mL。

3、根据权利要求1所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸，其特征在于：所述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的背面紧密连接一背板。

4、一种制备权利要求1所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备嗜肺军团菌抗原特异性抗体和嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体；将嗜肺军团菌抗原特异性抗体溶液喷到纤维素膜上形成检测线，将嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体溶液喷到所述纤维膜的另一区域形成质控线，然后将吸水垫粘贴在所述纤维素膜的远离所述测试带的一端；

2) 制备嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液，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，将其粘贴在步骤1) 得到的纤维素膜的靠近所述检测线的一端；

3) 将在步骤2) 中得到的金标垫上远离所述检测线的一端粘贴样品垫，得到检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸。

5、根据权利要求4所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法，其特征在于：所述步骤1) 中的嗜肺军团菌抗原特异性抗体为以嗜肺军团菌抗原为抗原免疫动物得到的抗体；所述嗜肺军团菌抗原为嗜肺军团菌血清1型抗原、2型、3型、4型、5型、6型、7型、8型、9型或10型抗原；所述免疫动物为兔、猴、鸡或鼠；所述检测线含有的嗜肺军团菌抗原特异性抗体的浓度为5-7mg/mL，所述质控线含有的能与嗜肺

军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体的浓度为3-5mg/mL。

6、根据权利要求4所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法，其特征在于：所述步骤1)中嗜肺军团菌抗原特异性抗体的制备方法为：将福氏完全佐剂与嗜肺军团菌抗原混合乳化后皮下多点注射进行免疫，免疫剂量为2mg/mL/只，共免疫4-6次，每次间隔10天，末次免疫10天后对免疫动物血清进行琼脂糖双向扩散试验，检测血清效价，达到1:32以上后采血，对抗血清进行纯化，得到嗜肺军团菌抗原特异性抗体。

7、根据权利要求4所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法，其特征在于：所述步骤1)中的干燥温度为30-45℃，干燥时间为2.5-3.5小时。

8、根据权利要求4所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法，其特征在于：所述步骤2)中嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法包括以下步骤：

A. 将HAuCl₄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%柠檬酸三钠水溶液，继续加热煮沸，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；

B. 将步骤1)获得的胶体金溶液的pH值调至8.5-9.5，每100mL胶体金溶液加入终浓度为48μg/mL的嗜肺军团菌血清抗原特异性抗体，搅拌25-35分钟，加入5mL 10% BSA，搅拌20-30分钟，再加入1mL 10% PEG20000，搅拌20-30分钟，先在20,000-23,500rpm下离心25-35分钟，吸出上清，再将上清在10000-12000rpm下离心25-35分钟，弃上清，用0.05-0.1M的四硼酸钠溶液洗涤沉淀，并将其保存于8-10mL 0.05-0.1M的四硼酸钠溶液中，得到嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的胶体金探针溶液。

9、根据权利要求8所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法，其特征在于：所述步骤B中用K₂CO₃溶液或HCl溶液调pH值；所述调节pH值的K₂CO₃溶液的浓度为0.15-0.25M；所述调节pH值HCl溶液的浓度为0.08-0.12mol/L。

10、根据权利要求4-9任一项所述的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法，其特征在于：向所述步骤2)中的嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液中添加0.05-0.1g/mL蔗糖；将金标垫在-20℃至-50℃冷冻10-12小时，并将其冷冻抽干后，再与纤维素膜粘贴；在所述步骤3)获得的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的背面紧密粘贴一背板；所述纤维素膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜；所述吸水垫为吸水纸；所述样品垫为玻璃纤维膜。

一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种嗜肺军团菌抗原的检测试纸及其制备方法，特别是涉及一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

军团菌(*Legionella*)是1976年发现的。当时美国退伍军人于费城集会，期间暴发流行了一种原因不明的严重肺炎，与会者149人感染，34人死亡。从死者肺组织中分离得到一种新菌，命名为军团菌。目前，已发现的军团菌属有43个种、65个血清型，其中与人类疾病关系最密切的为嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, LP)，研究表明，80%~85%的军团菌肺炎由LP引起，现已发现15个血清型的LP。

军团病(Legionnaires' disease, LD)是由军团菌感染引起的一种急性细菌性呼吸道传染病，以军团菌肺炎和庞蒂亚克热为主要表现，易暴发流行。近年来，国外有许多军团病疫情的报道：2000~2002年，仅欧洲就共报道军团病189次，10322人感染。我国也有军团病小规模疫情的发生：2000年1月，北京市某新兵训练营地发生了军团病，发病率为89%；2000年7月，因空调系统冷凝水导致的庞蒂亚克热型军团病在某写字楼员工中发生，发病率为61.9%。

大多数军团病患者有与其它病原体引起的非典型肺炎一致的临床表现，如咳嗽、发热和肌痛，胸部X片显示肺部浸润现象等，故常导致误诊、漏诊，未经治疗的军团病患者死亡率达25%。由于嗜肺军团菌是引起军团菌肺炎的主要病原体，故对其的快速检测显得尤为重要。嗜肺军团菌抗原检测的方法很多，例如：ELISA、PCR、免疫传感器技术等。但在实践中，这些方法的使用暴露出一些共同的劣势，例如：实验必须在专门的实验室中进行；需要电源和特殊的仪器；操作人员必须经过专门培训；实验系统不容易标准化，为使结果可信，需要进行多次预试验和设立多项对照；试验操作步骤繁琐，至少需要2小时以上。

免疫胶体金技术是近年来迅速发展的快速检测技术，该技术与其它方法比较，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。

发明内容

本发明目的是提供一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸

(Immuno-Chromatographic Assay, ICA)。

为解决上述技术问题,本发明采取以下技术方案:一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸(ICA试纸),包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有抗嗜肺军团菌血清抗原的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,所述检测线含有嗜肺军团菌抗原特异性抗体,所述质控线含有能与所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体。

所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体为以嗜肺军团菌抗原为抗原免疫动物得到的抗体,所述嗜肺军团菌抗原可为嗜肺军团菌血清1型抗原、2型、3型、4型、5型、6型、7型、8型、9型或10型抗原,优选为嗜肺军团菌血清1型抗原,所述免疫动物的选择是多种多样的,如兔、猴、鸡或鼠等常用的免疫动物;所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体优选为抗兔抗抗体,尤其优选为羊抗兔IgG;所述检测线含有的嗜肺军团菌抗原特异性抗体的浓度可为5-7mg/mL,所述质控线含有的能与嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体的浓度可为3-5mg/mL。

所述吸水垫和样品垫均由吸水材料制备。

检测样品时可将上述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的样品垫直接浸于样品中;为使使用更加方便,所述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的背面还紧密连接一背板,背板材料的选择是多种多样的,如塑料、树脂或聚氯乙烯板(PVC板)等,再将该带有背板的免疫层析试纸装入试剂盒中,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嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的方法。

本发明所提供的制备上述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的方法,包括以下步骤:

1) 制备嗜肺军团菌抗原特异性抗体和嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体;将嗜肺军团菌抗原特异性抗体溶液喷到纤维素膜上形成检测线,将嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体溶液喷到所述纤维膜的另一区域形成质控线,然后将吸水垫粘贴在所述纤维素膜的远离所述测试带的一端;

2) 制备嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液,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,将其粘贴在步骤1)得到的纤维素膜的靠近所述检测线的一端;

3) 将在步骤2) 中得到的金标垫上远离所述检测线的一端粘贴样品垫, 得到检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸。

在上述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备方法中, 步骤1) 中所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体为以嗜肺军团菌抗原为抗原免疫动物得到的抗体, 所述嗜肺军团菌抗原可为嗜肺军团菌血清1型、2型、3型、4型、5型、6型、7型、8型、9型或10型抗原, 优选为嗜肺军团菌血清1型抗原, 所述免疫动物的选择是多种多样的, 如兔、猴、鸡或鼠等常用的免疫动物, 优选为兔; 所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体优选为抗兔抗抗体, 尤其优选为羊抗兔IgG; 所述检测线含有的嗜肺军团菌抗原特异性抗体的浓度可为5-7mg/mL, 所述质控线含有的能与嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体的浓度可为3-5mg/mL。

步骤1) 中所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体的制备方法可为: 采用皮下多点注射方式进行免疫, 每只注射嗜肺军团菌抗原2mg/mL, 同时加注福氏佐剂0.1mL/只, 共免疫4-6次(优选为5次), 每次间隔10天, 末次免疫10天后对免疫动物血清进行琼脂糖双向扩散试验, 检测血清效价, 达到1:32以上即可采血, 对抗血清进行纯化, 得到嗜肺军团菌抗原特异性抗体。

步骤1) 中的干燥温度可为30-45℃, 优选为37℃, 干燥时间可为2.5-3.5小时。

步骤2) 中嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法可包括以下步骤:

A. 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(优选为10-12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;

B. 将步骤1) 获得的胶体金溶液的pH值调至8.5-9.5, 每100mL胶体金溶液加入终浓度为48 $\mu\text{g/mL}$ 的嗜肺军团菌血清抗原特异性抗体, 搅拌25-35分钟, 加入5mL 10% BSA, 搅拌20-30分钟, 再加入1mL 10% PEG20000, 搅拌20-30分钟, 先在20,000-23,500rpm下离心25-35分钟, 吸出上清, 再将上清在10000-12000rpm下离心25-35分钟, 弃上清, 用0.05-0.1M的四硼酸钠溶液洗涤沉淀, 并将其保存于8-10mL 0.05-0.1M的四硼酸钠溶液中, 得到嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的胶体金探针溶液。

在上述嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法中, 可用 K_2CO_3 溶液或HCl溶液调pH值为8.5-9.5, 所述调节pH值的 K_2CO_3 溶液的浓度可为0.15-0.25M, 优选为0.2M; 所述调节pH值HCl溶液的浓度可为0.08-0.12mol/L, 优选为0.1mol/L。为弥补因加热蒸发损失的水分, 可用水将胶体金溶液恢复至原体积。

为使嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针与玻璃纤维膜或聚脂膜更好地结合,可向步骤2)中的嗜肺军团菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液中添加0.05-0.1g/mL蔗糖;为使金标垫更易与纤维素膜粘贴,可将金标垫在-20℃至-50℃冷冻10-12小时,并将其冷冻抽干后,再与纤维素膜粘贴。

所述吸水垫和样品垫均由吸水材料制备。

检测样品时可将上述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的样品垫直接浸于样品中;为使使用更加方便,所述检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的背面还紧密连接一背板,背板材料的选择是多种多样的,如塑料、树脂或聚氯乙烯板(PVC板)等,再将该带有背板的免疫层析试纸装入试剂盒中,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。

在实际应用中,所述纤维素膜可为硝酸纤维素膜(NC膜)或醋酸纤维素膜,宽度控制在2.5-3.0mm为宜;所述吸水垫可为吸水纸,宽度为20-40mm,厚度为0.1-0.2mm;所述金标垫的宽度为5-10mm;所述样品垫为玻璃纤维膜,宽度为20-40mm。

本发明提供了一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法。该试纸利用了免疫胶体金技术及双抗体夹心检测法,用其检测嗜肺军团菌或嗜肺军团菌抗原的基本原理是:用嗜肺军团菌抗原特异性抗体包被纤维素膜,用以捕捉标本中的嗜肺军团菌或嗜肺军团菌抗原,然后用标记了嗜肺军团菌抗原特异性抗体的抗抗体的免疫胶体金探针进行检测。本发明的免疫层析试纸具有以下优点:1)敏感性及特异性高:实验室考核结果显示,本发明的免疫层析试纸可用于检测嗜肺军团菌血清1-10型抗原标本,并且不与其它生物发生交叉反应;2)检测方法简单、快速: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,标本中的嗜肺军团菌或嗜肺军团菌经过约5分钟的纸层析后,即可出现肉眼可见的沉淀线,从而为嗜肺军团菌病的治疗争取了时间,很适合突发事件现场和基层使用;3)制备方法简单,成本低廉,易于进行工业化生产。本发明将在嗜肺军团菌的检测及其相关疾病的诊断和治疗中发挥重要作用,应用前景广阔。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

图1为检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的正面和纵截面结构示意图

具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

材料:

硝酸纤维膜（NC膜）、样品垫和吸水滤纸，购自Millipore公司。

塑料背板，购自北京燕华公司。

实施例1、检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的制备

一、嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体的制备

1、嗜肺军团菌血清1型抗原的制备

将嗜肺军团菌血清1型菌株（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510101）接种在BCYE平板上，置于37℃、5% CO₂孵箱中培养，观察平板上的菌落形态，挑取典型的单个菌落，转接置BCYE斜面，置于37℃、5% CO₂孵箱中培养3-5天。将培养的斜面用无菌PBS（0.01M pH7.2）洗下菌苔，8000rpm离心25分钟，弃上清，收集菌体沉淀；每克湿重菌体悬浮在10mL 0.1M NaOH溶液中，室温搅拌1小时；浓醋酸调溶液pH值至3.0，8000rpm离心20分钟，弃沉淀，将上清用5N NaOH调至pH值为6.5-7.0，所得溶液用PBS（0.01M pH7.0）透析48小时，得到嗜肺军团菌血清1型抗原，冻干保存。

2、嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体的制备

选用体重2kg健康雌性大耳白家兔（购自中国人民解放军军事医学科学院动物中心），将福氏完全佐剂与步骤1获得的嗜肺军团菌抗原混合乳化后皮下多点注射进行免疫，免疫剂量为2mg/mL/只，分别于初次免疫后的第20日、第30日、第40日追加免疫水剂1针，追加剂量和途径与初次免疫相同，末次免疫后10天对免疫动物血清进行琼脂糖双向扩散试验，检测血清效价，结果为1:64（1:32以上即可）采血，采用常规的饱和硫酸铵盐析法对抗血清进行纯化，即用33%饱和硫酸铵盐析2次，透析脱盐后收集抗体，得到嗜肺军团菌抗原特异性抗体。采用紫外分光光度仪测定上述制备的嗜肺军团菌抗原特异性抗体蛋白的浓度，方法为：将蛋白适当稀释，分别在280nm及260nm波长下测定A值，根据以下公式计算得到蛋白浓度：

$$\text{蛋白含量 (mg/mL)} = (1.45A_{280\text{nm}} - 0.74A_{260\text{nm}}) \times \text{稀释倍数}。$$

结果按照上述方法纯化所得的嗜肺军团菌抗原特异性抗体蛋白的浓度为180mg/mL。

3、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HAuCl₄（购自Sigma公司，1g/瓶包装）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（Na₃C₆H₅O₇·2H₂O）水溶液，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0.2M K₂CO₃溶液（或0.1M HCl溶液）调节胶

体金溶液pH 8.5-9.5, 准备6支洁净试管, 分别加入1mL胶体金溶液。将经纯化的嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体稀释为1mg/mL, 分别向5支试管中加入10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 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40 μ l, 即40 μ g/mL, 选择偶联抗体浓度为48 μ g/mL。

3) 金标垫的制备: 按上述方法配制含有浓度为48 μ g/mL的嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体免疫胶体金探针溶液50mL, 搅拌30分钟(25-35分钟均可), 加10% BSA 5mL, 搅拌25分钟(20-30分钟均可), 加1mL 10% PEG20000, 搅拌25分钟(20-30分钟均可), 20,000~23,500rpm离心25分钟(20-30分钟均可), 弃上清, 将沉淀用四硼酸钠洗涤1次后用四硼酸钠保存液收集沉淀5mL。取嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体免疫胶体金探针溶液5mL加入0.5g蔗糖, 充分溶解均匀加在玻璃纤维膜上, -35 $^{\circ}$ C (-20 $^{\circ}$ C~-50 $^{\circ}$ C均可)放置11小时(10-12小时均可), 冻干机抽干, 得到金标垫。

4、嗜肺军团菌抗原快速检测试纸的制备

如图1所示(图中a为检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的正面结构图, 图中b为检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的纵截面结构图), 检测霍乱弧菌的免疫层析试纸由吸水垫4、硝酸纤维素膜(NC膜)3、金标垫2和玻璃纤维膜样品垫1四部分组成; 硝酸纤维素膜3上设有检测线5和质控线6, 该试纸的制备方法包括以下步骤:

1) NC膜3的包被

用0.01M pH7.2的PB缓冲液($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, Na_2HPO_4 1.07g, 去离子水1000mL)稀释嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体, 浓度为6mg/mL, 用于包被检测线。用0.01M pH7.2 PBS($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, Na_2HPO_4 1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水1000mL)稀释羊抗兔IgG, 浓度为4mg/mL, 用于包被质控线。用BIODOT公司XYZ3000喷膜机分别喷于2.5mm厚的硝酸纤维素膜上, 形成相互分离的检测线5和质控线6, 37 $^{\circ}$ C干燥2.5-3.5h。

2) 嗜肺军团菌抗原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素膜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, 即为检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

5、检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试剂盒的制备

为了方便使用，将步骤3制备的嗜肺军团菌抗原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。

6、嗜肺军团菌抗原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溶液，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与固相抗兔抗抗体结合，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、嗜肺军团菌抗原的检测及与其它相关细菌的交叉试验

一、不同血清型嗜肺军团菌抗原的检测

实施例1步骤一中嗜肺军团菌血清1型抗原的制备方法同样适用于嗜肺军团菌其它血清型抗原的制备，用由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提供的嗜肺军团菌血清1、2、3、4、5、6、7、9、10型菌株按实施例1的方法制备的抗原分别稀释成浓度为100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL、100ng/mL、10ng/mL的样品检测液备用。

取实施例1制备的装有本发明检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸的试剂盒，分别于点样口中加入上述样品检测液3滴（约150 μ l），2分钟后开始观察结果，15分钟观察终止。

结果报告：仅于质控观测窗口“C”（质控线）处出现1条红色沉淀线为阴性，即无嗜肺军团菌抗原检出；于检测观测窗口“T”（检测线）和质控观测窗口“C”（质控线）处出现2条红色沉淀线为阳性，即有嗜肺军团菌抗原检出；如质控观测窗口“C”（质控线）处未出现红色沉淀线，则说明检测试纸失效，此时无论检测观测窗口“T”（检测线）处是否出现沉淀线，检测结果不成立。

用实施例1制备的包被嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体和羊抗兔IgG的免疫层析试纸对上述嗜肺军团菌血清1、2、3、4、5、6、7、9、10型检测液进行检测，检测结果均为阳性，证明本发明的免疫层析试纸可用于各个血清型的嗜肺军团菌抗原的快速检测。

二、其它相关细菌的交叉试验

由军事医学科学院微生物流行病研究所微生物检验研究中心提供的浓度为100 μ g/mL鼠疫苗410050株F1抗原作为样品检测液备用。

用实施例1制备的包被嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体和羊抗兔IgG的免疫层析试纸对上述鼠疫苗410050株F1抗原样品检测液进行检测，结果为阴性，证明本发明的免疫层析试纸可用于各个血清型的嗜肺军团菌抗原的快速检测，特异性高。

实施例3、实验室考核

1、样品制备

实验共使用细菌10株，其中9株嗜肺军团菌（株号为：510101-5101010，购自军事医学科学院微生物流行病研究所微生物检验研究中心），1株鼠疫苗（株号为：410050，购自军事医学科学院微生物流行病研究所微生物检验研究中心）。将上述细菌分别接种至各自适宜的培养基，并在不同的条件下培养后提取抗原，嗜肺军团菌血清1、2、3、4、5、6、7、9、10型抗原分别稀释成浓度为100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL、100ng/mL和10ng/mL，鼠疫苗F1抗原浓度为100 μ g/mL，作为检测液备用。

2、实验方法

用实施例1制备的包被嗜肺军团菌血清1型抗原特异性抗体和羊抗兔IgG的免疫层析试纸对步骤1制备的嗜肺军团菌抗原快速检测试剂进行检测，取上述用不同菌株制备的嗜肺军团菌抗原快速检测试剂，分别于样品垫上加入上述样品检测液3滴（约150 μ l），2分钟后开始观察结果，15分钟观察终止。

结果报告：仅于质控观测窗口“C”（质控线）处出现1条红色沉淀线为阴性，即无嗜肺军团菌抗原检出；于检测观测窗口“T”（检测线）和质控观测窗口“C”（质控线）处出现2条红色沉淀线为阳性，即有嗜肺军团菌抗原检出；如质控观测窗口“C”（质控线）处未出现红色沉淀线，则说明检测试纸失效，此时无论检测观测窗口“T”（检测线）处是否出现沉淀线，检测结果不成立。

3、实验结果

嗜肺军团菌抗原快速检测试剂的实验室考核结果如表1所示，从表1可以看出，本发明的检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸可以检出10ng/mL的嗜肺军团菌血清1型抗原，10 μ g/mL嗜肺军团菌血清2、3、4、5、6、7、9、10型抗原，且不与100 μ g/mL鼠疫苗F1抗原发生交叉反应。上述检测结果证明本发明的免疫层析试纸可用于各个血清型的嗜肺军团菌抗原的快速检测，并具有较高的灵敏度及特异性。

表1 嗜肺军团菌抗原快速检测试剂（胶体金法）实验室考核

细菌	株号	血清型	抗原量
----	----	-----	-----

			100 μg/mL	10 μg/mL	1 μg/mL	100 ng/mL	10 ng/mL
嗜肺军团菌	510101	1	+	+	+	+	+
	510102	2	+	+	-	-	-
	501103	3	+	+	-	-	-
	510104	4	+	+	-	-	-
	510105	5	+	+	-	-	-
	510106	6	+	+	-	-	-
	510107	7	+	+	-	-	-
	510109	9	+	+	-	-	-
	510110	10	+	+	-	-	-
鼠疫菌	410050		-	-	-	-	-

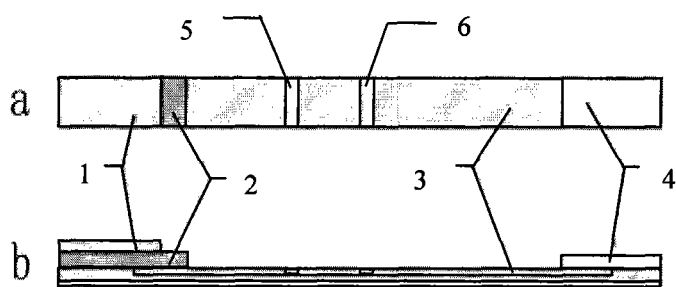


图 1

专利名称(译)	一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN101074956A	公开(公告)日	2007-11-21
申请号	CN200710119068.1	申请日	2007-06-19
[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研究所		
[标]发明人	端青 汪黎 李艳 柏长青 朱虹 檀华 何君 左婷庭 宋立华		
发明人	端青 汪黎 李艳 柏长青 朱虹 檀华 何君 左婷庭 宋立华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101074956B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测嗜肺军团菌抗原的免疫层析试纸及其制备方法。该试纸包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有抗嗜肺军团菌血清抗原的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，所述检测线含有嗜肺军团菌抗原特异性抗体，所述质控线含有能与所述嗜肺军团菌抗原特异性抗体特异结合的抗抗体。本发明的免疫层析试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

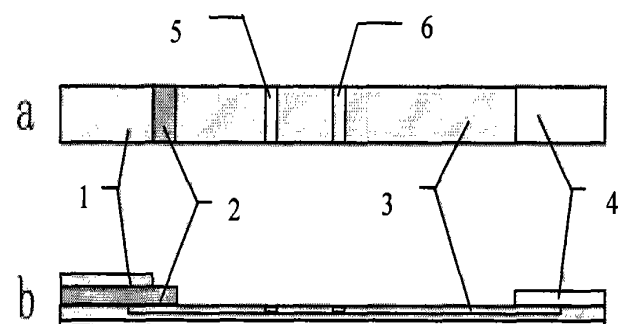


图 1