



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102121937 A

(43) 申请公布日 2011.07.13

(21) 申请号 201010235526.X

(22) 申请日 2010.07.14

(83) 生物保藏信息

CCTCC C201048 2010.06.06

(71) 申请人 福建省淡水水产研究所

地址 350002 福建省福州市鼓楼区西洪路
555 号

(72) 发明人 樊海平 辛志明 曾占壮 吴斌
张新艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

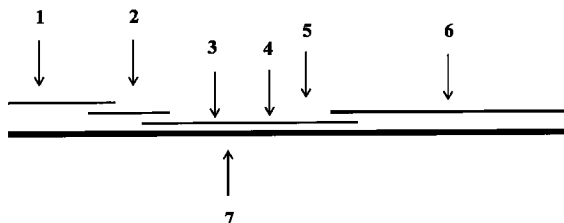
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测嗜水气单胞菌胶体金免疫层析
试纸条

(57) 摘要

一种快速检测嗜水气单胞菌胶体金免疫层析试纸条本,该发明涉及一种利用纳米胶体金颗粒标记抗体技术和双抗体夹心免疫层析法检测抗原模式,制备了嗜水气单胞菌的胶体金免疫层析检测试纸条。提供一种嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用。该试纸条含有样品垫、金标垫、带有检测线和质控线抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸、底板,将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次重叠相连粘贴在底板上组装而成。本试纸条检测应用操作简单、特异性好、灵敏度高、方便快捷,不需要特速仪器设备,不需专业培训,结果清晰易辨,易于推广。适合用于对嗜水气单胞菌的感染、污染的检测。



1. 一种嗜水气单胞菌的胶体金免疫层析检测试纸条,其特征在于:该试纸条包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水纸、底板,底板上以样品垫为起始端,依次重叠粘贴固定有样品垫、金标垫、带有检测线和质控线抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:样品垫的材料选自玻璃纤维、滤纸纤维或聚脂膜,金标垫的金标抗体支持膜选自玻璃纤维、滤纸纤维或聚脂膜,吸水纸选用吸水滤纸,底板选用带不干胶的PVC板。

3. 一种嗜水气单胞菌的胶体金免疫层析检测试纸条的制备方法,其特征在于:该试纸条的制备方法包括以下步骤:(1) 制备抗嗜水气单胞菌单克隆抗体或多克隆抗体;(2) 纳米胶体金颗粒的制备;(3) 制备抗嗜水气单胞菌单克隆抗体或多克隆抗体的胶体金标记物,形成金标抗体;(4) 将金标抗体均匀喷涂到金标抗体支持膜上,经干燥形成金标垫;(5) 将抗嗜水气单胞菌单克隆抗体或抗嗜水气单胞菌多克隆抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的检测线位置作为检测线捕获抗体,抗金标抗体的二抗或葡萄球菌A蛋白喷涂到硝酸纤维素膜上的质控线位置作为质控线捕获抗体,封闭空白位点,充分干燥;(6) 将吸水纸、带有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、底板组装成胶体金免疫层析检测试纸条。

4. 一种嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条的应用,其特征在于:该试纸条应用于检测嗜水气单胞菌。

5. 根据权利要求4所述的试纸条用于嗜水气单胞菌检测的方法,其特征在于该检测步骤如下:

- (1) 取 80-150 μ L 待检样本加在检测试纸条的加样区;
- (2) 在 15min 内观察检测结果。

一种快速检测嗜水气单胞菌胶体金免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条及其制备和在嗜水气单胞菌检测上的应用。

背景技术

[0002] 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 在自然界中广泛分布,是水产养殖中常见的致病菌,临床急性感染主要表现为出血性败血症,慢性感染则主要表现为皮肤溃疡或肠炎,具有流行广、发病率高、死亡率高等特点,常导致较大的经济损失,严重影响水产养殖业的发展。建立准确的病原检测技术是防控嗜水气单胞菌危害的基本前提。国内对嗜水气单胞菌的检测与疾病诊断进行了一系列的研究,杨其升通过生化试验鉴定嗜水气单胞菌;高汉娇利用直接荧光抗体法检测鲢鱼败血症病原嗜水气单胞菌,吴淑勤等建立了间接荧光抗体技术检测鳊鱼嗜水气单胞菌;陈琼等利用外毒素 HEC 制备单克隆技术检测嗜水气单胞菌,钱冬等建立了嗜水气单胞菌的多克隆抗体 ELISA 检测法,检测灵敏度达 $9.77 \times 10^4 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测时间为 1.5h 左右;朱大玲等建立了检测 aerA 和 ahpA 双毒力基因检测致病性嗜水气单胞菌毒力的 PCR 检测方法。已建立的这些方法都存在着不便于基层生产应用、设备要求高、检测过程时间长等缺点。

[0003] 胶体金免疫层析技术由于其快速、便捷,不需特殊设备,结果判断直观等优势,越来越受到人们的重视。本发明利用单克隆抗体和胶体金标记技术建立嗜水气单胞菌胶体金免疫层析快速检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于公开一种嗜水气单胞菌的胶体金快速检测试纸条,并提供该试纸条的制备方法与在嗜水气单胞菌检测上的应用,具有特异、准确、快速、操作简单、现场检测、高通量检测、易于推广应用的优点。应用该试纸条检测嗜水气单胞菌全过程不超过 15min。

[0005] 本发明嗜水气单胞菌胶体金快速检测试纸条,是由包被了抗嗜水气单胞菌单克隆抗体胶体金标记物的金标垫、包被了抗嗜水气单胞菌单克隆抗体或多克隆抗体和兔抗鼠 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白或葡萄球菌 G 蛋白的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水纸、底板等组成,底板上以样品垫为起始端,依次重叠粘贴固定有样品垫、金标垫、带有检测线和质控线抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸。

[0006] 为了实现上述目的,本发明所采取的技术方案如下:

[0007] (1) 抗嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备:通过嗜水气单胞菌灭活抗原免疫 Balb/c 小鼠,制备脾细胞悬液、骨髓瘤细胞悬液;将脾细胞与骨髓瘤细胞经过细胞杂交融合,筛选阳性单克隆细胞孔;经进一步的阳性克隆化及其筛选,建立抗迟缓爱德华氏菌阳性、特异性好的细胞株 1 株,命名为 AhMcAb 1F3。取杂交瘤细胞株 AhMcAb 1F3 在培养后腹腔注射 Balb/c 小鼠制备腹水,并经过纯化获得抗嗜水气单胞菌单克隆抗体 AhMcAb 1F3;

[0008] (2) 纳米胶体金的制备 :将 100mL 0.01% 氯金酸用 1mL 1% 柠檬酸三钠制备纳米胶体金颗粒 ;

[0009] (3) 抗嗜水气单胞菌单克隆抗体 AhMcAb 1F3 的胶体金标记物制备 :用 0.1mol ·L K₂CO₃ 将上述胶体金溶液的 pH 值调至 8.5, 将胶体金溶液与抗嗜水气单胞菌单克隆抗体 AhMcAb 1F3 按 100mL 胶体金溶液加入 0.2mg 单克隆抗体的比例混合均匀, 并使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物, 在通过纯化、浓缩 后形成胶体金标记物 ;

[0010] (4) 兔抗嗜水气单胞菌多克隆抗体的制备 :用嗜水气单胞菌灭活菌抗原多次免疫新西兰兔, 获得兔抗嗜水气单胞菌多克隆抗体血清, 纯化兔抗嗜水气单胞菌多克隆抗体 ;

[0011] (5) 将嗜水气单胞菌单克隆抗体 AhMcAb 1F3 胶体金标记物喷涂在金标垫上, 将兔抗嗜水气单胞菌多克隆抗体和兔抗鼠 IgG 喷涂在硝酸纤维素膜的检测线和质控线位置上, 在 37℃ 干燥箱烘干 ;

[0012] (6) 将喷涂有检测线与质控线抗体的硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水纸等依次粘在底板上 ;

[0013] (7) 将依次粘好的底板材料切成裁切成宽 × 长为 0.35cm × 6cm 的长条即为嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条, 包装备用。本发明的积极效果在于 :

[0014] (1) 低价格 :产品生产流程简单, 生产成本低 ;

[0015] (2) 检测速度快 :全过程 15min 内完成 ;

[0016] (3) 可以生产现场检测、高通量检测 ;

[0017] (4) 高质量 :本方法制备而成的试纸条特异性好、灵敏度高、重复性好 ;

[0018] (5) 操作简单 :本方法制备而成的试纸条以胶体金作为指示标记, 快速定性, 结果准确、快速, 操作简便, 只需要加样检测与结果记录步骤 ;

[0019] (6) 易于推广使用 :操作人员无需专业培训, 按说明书即可完成操作。

附图说明

[0020] 图 1 为本发明嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条的组装结构图, 其中 :1 是样品垫 ;2 是金标垫 ;3 是检测线显色位置 ;4 是质控线显色位置 ;5 是 硝酸纤维素膜 ;6 是吸水纸 ;7 是底板。

[0021] 图 2 为本发明嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条的外观结构图, 其中 :8 是塑料外壳 ;9 是结果读取窗口 ;10 是检测样品加样区。

具体实施方式

[0022] 本发明的具体实施方式参照下面的实施例进行详细说明, 但并不局限于此。实施例 1、抗嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备

[0023] 制备嗜水气单胞菌灭活抗原, 免疫 Balb/c 小鼠, 制备脾细胞悬液和骨髓瘤细胞悬液 ;将脾细胞与骨髓瘤细胞经过细胞杂交融合, 筛选阳性单克隆细胞孔 ;建立抗嗜水气单胞菌单克隆抗体细胞株 AhMcAb 1F3, 该细胞株已于 2010 年 6 月 6 日在中国典型培养物保藏中心保藏, 保藏编号为 CCTCC NO :C201048, 制备并纯化抗嗜水气单胞菌单克隆抗体 AhMcAb 1F3。

[0024] 实施例 2、兔抗嗜水气单胞菌多克隆抗体血清的制备

[0025] 制备嗜水气单胞菌灭活抗原,首免加等量的完全弗氏佐剂,注射新西兰兔,2-3 周内进行二免,抗原加等量不完全弗氏佐剂,一个月后三免。免疫结束,通过颈动脉割取血,经 $5000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后收集血清,经过纯化后分装, -80°C 保存备用。

[0026] 实施例 3、胶体金颗粒的制备

[0027] 取 250mL 三角瓶一个,制备 1%氯化金 100mL,加热沸腾;取 1mL 的 1%柠檬酸钠加入上述溶液中,迅速混合均匀,再保持沸腾 15min,自然冷却后蒸馏水恢复至 100mL 体积;胶体金溶液用硅化过的试剂瓶分装 4°C 保存,备用。

[0028] 实施例 4、金标垫的制备

[0029] 取两个 50mL 的试管,分别加入 10mL 25nm 胶体金;加入适量 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{CO}_3$ 调整 pH 为最适浓度; 4°C 条件下,加入最佳标记浓度的抗嗜水气单胞菌单克隆抗体 AhMcAb 1F3 反应 20min, 4°C $12000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30min,弃去上清;每支离心管中加入 10mL 重悬液悬浮沉淀后同上离心,弃上清液,管底得到暗红色的疏松状沉淀,重悬液为 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB 缓冲液(含 1% BSA、0.02% PEG、0.3% Tween-20、 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl);重复离心 1 次,弃去上清; $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB(含 1% BSA、0.02% PEG、0.3% Tween-20、12% 蔗糖、1% NaN_3 、 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 重悬沉淀, 4°C 冰箱储存备用。

[0030] 取上述标记好的免疫胶体金溶液调整至一定浓度,均匀喷涂在玻璃纤维素膜上, 37°C 温箱中过夜干燥,密封包装置于 4°C 冰箱备用。

[0031] 实施例 5、硝酸纤维素膜上的检测线、质控线抗体的喷涂及封闭

[0032] 将硝酸纤维素膜用 1% 的甲醇溶液浸泡飘洗后,迅速轻柔洗干,干燥;将抗嗜水气单胞菌多克隆抗体 ($2\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、兔抗鼠 IgG 抗体 ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别加入 bio-dot 胶体金喷点系统的检测线、质控线的储存瓶中,调整划膜的位置,进行喷膜划线;将划好检测线、质控线的硝酸纤维素膜置于 37°C 温箱中烘干 2h;取出硝酸纤维素膜置于中性蛋白中浸泡润湿后立即取出,置于 37°C 温箱中封闭 4h 后,密封保存在 4°C 冰箱备用。

[0033] 试验结果制备了具有免疫活性的检测线和质控线,并用封闭液将空白位点封闭了的免疫硝酸纤维素膜。

[0034] 实施例 6、试纸条的组装

[0035] 将吸水纸、金标垫、样品垫分别裁成长条形 2.5cm、0.5cm、1.5cm;将免疫硝酸纤维素膜沿底板的长轴方向、距不干胶底板上边沿 2.2cm、下边 1.8cm 位置粘贴;将吸水纸与免疫硝酸纤维素膜重叠 0.3cm 处粘贴在硝酸纤维素膜的上方;将金标垫与免疫硝酸纤维素膜重叠 0.1cm 处粘贴在免疫硝酸纤维素膜的下方;样品垫与金标垫重叠 0.1cm 粘贴在金标垫的下方;将从上到下依次固定有将吸水纸、免疫硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫的底板裁切成宽 $\times$ 长为 0.35cm $\times$ 6cm 的长条,即成测试条,与干燥剂一起装入铝箔袋内,密封贮存。

[0036] 经过组装、剪裁、干燥、密封等步骤,即可组装成嗜水气单胞菌胶体金快速检测试纸条。

[0037] 实施例 7、检测方法

[0038] 待检样品的处理:固态样本如发病动物病灶组织、水产品或细菌培养物等样本,加适量蒸馏水研磨离心或静置待沉淀取上层清液;血液、腹水等液体样本可直接抽取检测样本;含菌量较少的样品可经过培养基增菌后取菌液直接检测;将嗜水气单胞菌胶体金快速检测试纸条恢复室温;抽取适量检测样本 80-150 μL ,缓慢加入检测试纸条上的样品垫上;

15min 后观察检测试纸条的显色情况,记录结果。

[0039] 检测结果:若含有嗜水气单胞菌,则与试纸上金标抗体形成相应的复合物,上行与包被在免疫硝酸纤维膜上的单克隆抗体结合,形成红色线条,即在“T”处形成红色条带。无论检测样品是否含有嗜水气单胞菌,金标抗体继续向上迁移与包被在膜上的兔抗鼠 IgG 形成红色沉淀线,即在“C”处形成红色条带。

[0040] 所以,若质控线显色,检测线不显色为阴性结果,检测样品不含有嗜水气单胞菌。若质控线显色,检测线显色为阳性结果,检测样品含有嗜水气单胞菌。若质控线不显色则检测结果判定为试纸条变质失效。

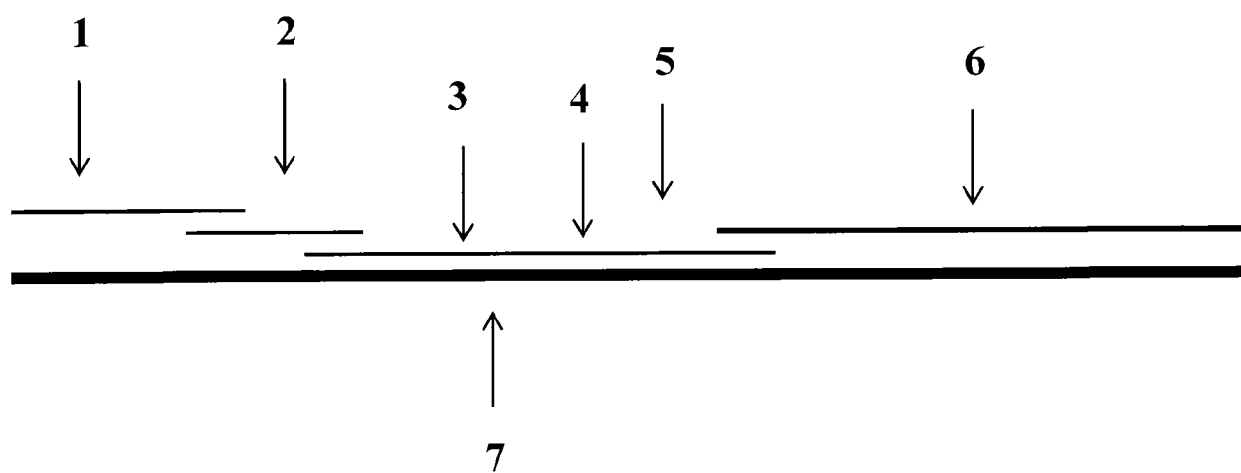


图 1

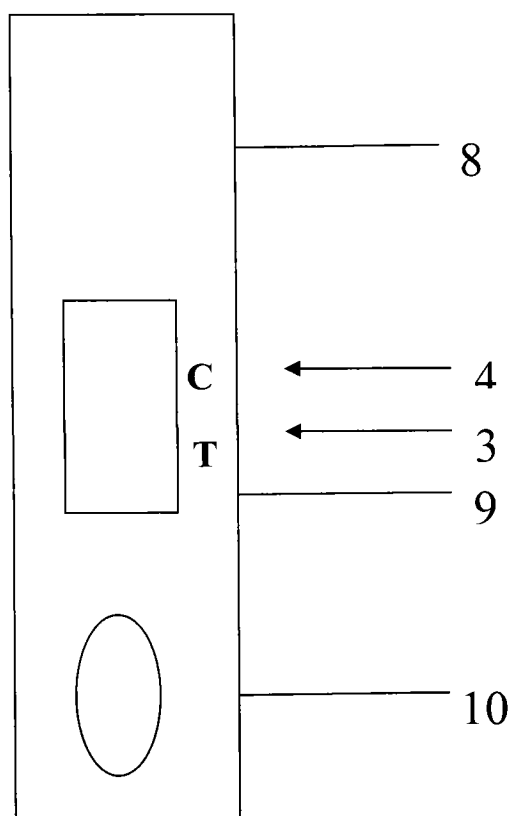


图 2

专利名称(译)	一种快速检测嗜水气单胞菌胶体金免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN102121937A	公开(公告)日	2011-07-13
申请号	CN201010235526.X	申请日	2010-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	福建省淡水水产研究所		
申请(专利权)人(译)	福建省淡水水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	福建省淡水水产研究所		
[标]发明人	樊海平 辛志明 曾占壮 吴斌 张新艳		
发明人	樊海平 辛志明 曾占壮 吴斌 张新艳		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速检测嗜水气单胞菌胶体金免疫层析试纸条本，该发明涉及一种利用纳米胶体金颗粒标记抗体技术和双抗体夹心免疫层析法检测抗原模式，制备了嗜水气单胞菌的胶体金免疫层析检测试纸条。提供一种嗜水气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用。该试纸条含有样品垫、金标垫、带有检测线和质控线抗体的硝酸纤维素膜、吸水纸、底板，将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次重叠相连粘贴在底板上组装而成。本试纸条检测应用操作简单、特异性好、灵敏度高、方便快捷，不需要特速仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨，易于推广。适合用于对嗜水气单胞菌的感染、污染的检测。

