



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102375059 A

(43) 申请公布日 2012.03.14

(21) 申请号 201010257686.4

(22) 申请日 2010.08.19

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路 155 号

(72) 发明人 阚飙 周蕾 郝民 郭兆彪
邱海燕 杨瑞馥

(74) 专利代理机构 北京太兆天元知识产权代理
有限责任公司 11108

代理人 张韬

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种基于多重上转换发光免疫层析技术的霍乱检测分型试纸

(57) 摘要

本发明基于多重上转换发光免疫层析技术(UPT-LF)的霍乱检测分型试纸通过将UCP颗粒作为标记物与免疫层析技术相结合,并将传统的单靶标检测免疫层析试纸拓展为多重检测,最终所建立的基于多重UPT-LF的霍乱检测分型试纸,具有操作简便、快速、敏感性高、特异性好的特点,可在野外现场实现样品中O1群与O139群霍乱弧菌的定量检测与分型。

1. 一种基于多重上转换发光免疫层析技术的霍乱检测分型试纸,其特征在于该检测分型试纸的结构组成为:

样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4] 和粘性底衬 [5]。

2. 如权利要求 1 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的样品垫 [1] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:吸水纸、纤维素膜、玻璃纤维、无纺布或滤血膜。

3. 如权利要求 1 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的结合垫 [2] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:玻璃纤维、聚酯膜或无纺布;结合垫 [2] 中固定有 UCP 结合物混合物 [6],UCP 结合物混合物 [6] 中包括:两种检测结合物,即 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8],一种质控结合物,即 UCP-羊 IgG 结合物 [9];其中,UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 由 UCP 颗粒和 01 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成;UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 由 UCP 颗粒和 0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成;UCP-羊 IgG 结合物 [9] 由 UCP 颗粒和羊 IgG 结合而成;UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 和 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 可分别高特异性地与 01 群霍乱弧菌 [10]、0139 群霍乱弧菌 [11] 结合;UCP-羊 IgG 结合物 [9] 可质控层析过程正常与否。

4. 如权利要求 1 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的分析膜 [3] 是微观结构均匀的物质:硝酸纤维素膜或尼龙膜;其中,分析膜 [3] 上设置有检测带 T1[12]、检测带 T2[13] 和质控带 C[14];检测带 T1[12] 为 01 群霍乱弧菌单抗 B,检测带 T2[13] 为 0139 群霍乱弧菌单抗 B,质控带 C[14] 为兔抗羊 IgG;检测带 T1[12] 即 01 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 01 群霍乱弧菌,检测带 T2[13] 即 0139 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 0139 群霍乱弧菌,而质控带 C[14] 即兔抗羊 IgG 可与 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常。

5. 如权利要求 1 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的吸水垫 [4] 是具有较大床体积的物质:吸水纸或纤维素膜。

6. 如权利要求 1 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的粘性底衬 [5] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质:PVC 板。

7. 如权利要求 3 或 4 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的 01 群霍乱弧菌单抗 A 与 01 群霍乱弧菌单抗 B,可为同一种特异性单抗,也可为两种特异性单抗;

8. 如权利要求 3 或 4 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的 0139 群霍乱弧菌单抗 A 与 0139 群霍乱弧菌单抗 B,可为同一种特异性单抗,也可为两种特异性单抗;

9. 如权利要求 3 或 4 所述的检测分型试纸,其特征在于其中所述的 UCP 颗粒,可通过上转换发光现象对样品中 01 群霍乱弧菌 [10] 与 0139 群霍乱弧菌 [11] 的存在与否以及浓度予以指示。

10. 如权利要求 1-9 任一所述的检测分型试纸的制备方法,其特征在于该方法包括如下步骤:

A. 结合垫 [2] 的制备:将 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7]、UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 和 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 混合,得 UCP 结合物混合物 [6],用 pH = 7.2 的 0.03M PB 含 1-10% BSA、0.1-10% 海藻糖和 0.1-10% 蔗糖的混合液作为结合物稀释液将 UCP 结合物混合物 [6] 稀释至终浓度为 0.5-3mg/ml,将 UCP 结合物混合物 [6] 加于玻璃纤

维、聚酯膜或无纺布上,于 37-50°C 下烘干 30min-3h,得结合垫 [2],备用;

B. 分析膜 [3] 的制备:将 1-2mg/ml 01 群霍乱弧菌单抗 B、1-2mg/ml 0139 群霍乱弧菌单抗 B 和 1-2mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T1[12]、检测带 T2[13] 和质控带 C[14],于 35-40°C 下烘干 30min-1h,得分析膜 [3],备用;

C. 将样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘帖于粘性底衬 [5] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 2 所示);将试纸剪切为 2-4mm 宽单独可用的成品,得本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸;成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

11. 如权利要求 10 所述的检测分型试纸的制备方法,其特征在于该方法包括如下步骤:

A. 结合垫 [2] 的制备:将 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7]、UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 和 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 混合,得 UCP 结合物混合物 [6],用 pH = 7.2 的 0.03M PB 含 5% BSA、5% 海藻糖和 5% 蔗糖的混合液作为结合物稀释液将 UCP 结合物混合物 [6] 稀释至终浓度为 2mg/ml,将 UCP 结合物混合物 [6] 加于玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,于 40°C 下烘干 1.5h,得结合垫 [2],备用;

B. 分析膜 [3] 的制备:将 1.5mg/ml 01 群霍乱弧菌单抗 B、1.5mg/ml 0139 群霍乱弧菌单抗 B 和 1.5mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T1[12]、检测带 T2[13] 和质控带 C[14],于 37°C 下烘干 40 分钟,得分析膜 [3],备用;

C. 将样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘帖于粘性底衬 [5] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 2 所示);将试纸剪切为 3mm 宽单独可用的成品,得本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸;成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

12. 一种霍乱弧菌的检测分型方法,其特征在于在检测过程中采用权利要求 1-9 任一所述的基于多重上转换发光免疫层析技术的霍乱检测分型试纸,检测流程为:

A. 样品预处理:水样、食品、粪便等样品可直接检测或用碱性蛋白胨水增菌 4h-5h 后再进行检测;

B. 样品处理:将 0.5-2 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液(0.1-0.3M pH = 7.2PB 含 0.1-1M NaCl,0.1-1% SDS)混合;

C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至权利要求 1-8 所述的多重 UPT-LF 试纸的样品垫 [1] 上;

D. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;

E. 结果判读:用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描;

定性检测:只有质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性;检测带 T1[12] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群霍乱弧菌阳性;检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;

定量检测:将检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T1、T2、C, T1/C 为 01 群霍乱弧菌的检测值, T2/C 为 0139 群霍乱弧菌的检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中 01 群与 0139 群霍乱弧菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

13. 如权利要求 12 所述的霍乱弧菌的检测分型方法,其特征在于检测流程为:

A. 样品预处理:水样、食品、粪便等样品可直接检测或用碱性蛋白胨水增菌 4.5h 后再进行检测;

B. 样品处理:将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液(0.15M pH=7.2PB 含 0.3M NaCl,0.3% SDS)混合;

C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至上述本发明多重 UPT-LF 试纸的样品垫 [1] 上;

D. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;

E. 结果判读:用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描;

定性检测:只有质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性;检测带 T1[12] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群霍乱弧菌阳性;检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;

定量检测:将检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T1、T2、C, T1/C 为 01 群霍乱弧菌的检测值, T2/C 为 0139 群霍乱弧菌的检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中 01 群与 0139 群霍乱弧菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

一种基于多重上转换发光免疫层析技术的霍乱检测分型试纸

发明领域

[0001] 本发明涉及一种基于多重上转换发光免疫层析技术的试纸,特别涉及一种可对霍乱弧菌 O1 群与 O139 群进行同步检测与分型的基于多重上转换发光免疫层析技术的试纸。

背景技术

[0002] 霍乱 (Cholera) 是由 O1 血清群和 O139 血清群霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 引起的急性肠道传染病,是以发病急、传播快、波及范围广、能引起大流行为特征的国际检疫传染病之一,也是《中华人民共和国传染病防治法》规定的甲类传染病之一,《国内交通卫生检疫条例》也将其列为检疫传染病。它可以引起散发、流行、暴发、甚至世界性大流行,不仅危害人民健康,而且影响人民正常生活、生产、旅游、经贸、交通运输、甚至社会安定。

[0003] 根据菌体 (O) 抗原的不同,目前已将霍乱弧菌分出 200 个以上的 O 血清群 (Oserogroups),但仅发现 O1 和 O139 群霍乱弧菌能引发霍乱。1992 年以前,仅 O1 群霍乱弧菌 (*V. cholerae* O1) 的两个生物型,即古典生物型 (Classical biotype) 和埃尔托生物型 (El Tor biotype) 引发了七次霍乱世界大流行。而对 O1 群以外的其他血清群,统称为非 O1 群霍乱弧菌 (*V. cholerae* non-O1)。非 O1 群霍乱弧菌广泛分布于自然界水体中,一般不致病或仅引起散发性腹泻病例和肠道外感染。但 1992 年 10 月,印度首次发生了由非 O1 群霍乱弧菌引起的霍乱大暴发,其病原被鉴定为 O139 血清群霍乱弧菌 (*V. cholerae* O139)。这个新确认的 O139 群与其他非 O1 群霍乱弧菌最大的不同点在于,它能产生与 O1 群霍乱弧菌相同的霍乱毒素 (Cholera toxin, CT),所引起的霍乱在临床和流行病学上也与 O1 群霍乱弧菌所致霍乱基本相同:主要通过水引起暴发流行,人感染后,该菌在肠内大量繁殖,造成腹泻、呕吐、严重脱水,如不医治会造成死亡。此外,O139 群霍乱由于抗原发生了变异,人群对其缺乏免疫力。发病以青壮年为主,男性病例明显多于女性,无明显季节性,冬春季也可引起暴发流行。由此可见,霍乱弧菌的快速检测,并在检测中对血清型 (O1 群还是 O139 群) 进行同步的判断,将对霍乱的预防以及霍乱发生后及时有效的控制处理具有重要的意义。

[0004] 目前所使用的常规的霍乱弧菌检测分型技术包括:诊断血清玻片凝集试验、PCR、胶体金试纸等,这些方法有的只能在实验室进行,无法在野外现场使用;有的操作流程较为复杂历时较长;有的敏感性低、特异性差;有的一次操作只能对一种目标被检物进行检测,无法检测与分型同步进行。因而急需操作简便、快速、敏感性高、特异性好、检测分型同步的现场技术。免疫层析技术是经典的现场快速检测技术,操作简便、快速;上转换发光材料 (Up-Convertng Phosphor,UCP) 是新型的稀土金属晶体光学材料,其独特的物理结构以及化学组成使其具有绝无仅有的上转换发光现象,即 UCP 颗粒可由红外光激发、发射可见光;上转换发光技术 (Up-converting Phosphor Technology,UPT) 促成了免疫层析技术与上转换发光材料的结合,即通过一系列表面修饰与活化后将 UCP 颗粒作为标记物应用于免疫层析,在红外光照射下以独特的上转换发光现象揭示生物活性分子之间高灵敏度特异性的识别,进而光信号转换为电信号实现了目标被检物的准确定量。若能建立多重上转换发光免

疫层析技术 (UPT-based later-flow assay, UPT-LF assay) 则可在保证简便、快速、敏感性、特异性、定量能力的同时实现 01 群与 0139 群霍乱弧菌的检测与分型。

[0005] 发明技术

[0006] 本发明目的在于公开一种基于多重上转换发光免疫层析技术 (基于多重 UPT-LF) 的霍乱检测分型试纸。

[0007] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的结构组成为:

[0008] 样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4] 和粘性底衬 [5] (如附图 1 所示)。

[0009] 其中, 样品垫 [1] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质: 吸水纸、纤维素膜、玻璃纤维、无纺布或滤血膜。

[0010] 其中, 结合垫 [2] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质: 玻璃纤维、聚酯膜或无纺布; 结合垫 [2] 中固定有 UCP 结合物混合物 [6], UCP 结合物混合物 [6] 中包括: 两种检测结合物, 即 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8], 一种质控结合物, 即 UCP-羊 IgG 结合物 [9]; 其中, UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 由 UCP 颗粒和 01 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成; UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 由 UCP 颗粒和 0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成; UCP-羊 IgG 结合物 [9] 由 UCP 颗粒和羊 IgG 结合而成; UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 和 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 可分别高特异性地与 01 群霍乱弧菌 [10]、0139 群霍乱弧菌 [11] 结合; UCP-羊 IgG 结合物 [9] 可质控层析过程正常与否。

[0011] 其中, 分析膜 [3] 是微观结构均匀的物质: 硝酸纤维素膜或尼龙膜; 其中, 分析膜 [3] 上设置有检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13] 和质控带 C [14]; 检测带 T1 [12] 为 01 群霍乱弧菌单抗 B, 检测带 T2 [13] 为 0139 群霍乱弧菌单抗 B, 质控带 C [14] 为兔抗羊 IgG; 检测带 T1 [12] 即 01 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 01 群霍乱弧菌, 检测带 T2 [13] 即 0139 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 0139 群霍乱弧菌, 而质控带 C [14] 即兔抗羊 IgG 可与 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常。

[0012] 其中, 吸水垫 [4] 是具有较大床体积的物质: 吸水纸或纤维素膜。

[0013] 其中, 粘性底衬 [5] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质: PVC 板。

[0014] 其中, 01 群霍乱弧菌单抗 A 与 01 群霍乱弧菌单抗 B, 可为同一种特异性单抗, 也可分为两种特异性单抗;

[0015] 其中, 0139 群霍乱弧菌单抗 A 与 0139 群霍乱弧菌单抗 B, 可为同一种特异性单抗, 也可分为两种特异性单抗;

[0016] 其中, UCP 颗粒, 可通过上转换发光现象对样品中 01 群霍乱弧菌 [10] 与 0139 群霍乱弧菌 [11] 的存在与否以及浓度予以指示。

[0017] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的制备方法为:

[0018] A. 结合垫 [2] 的制备: 将 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7]、UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 和 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 混合, 得 UCP 结合物混合物 [6], 用 pH = 7.2 的 0.03M PB 含 1-10% BSA、0.1-10% 海藻糖和 0.1-10% 蔗糖的混合液作为结合物稀释液将 UCP 结合物混合物 [6] 稀释至终浓度为 0.5-3mg/ml, 将 UCP 结合物混合物 [6] 加于玻

玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,于 37-50°C 下烘干 30min-3h,得结合垫 [2],备用;

[0019] B. 分析膜 [3] 的制备:将 1-2mg/ml 01 群霍乱弧菌单抗 B、1-2mg/ml 0139 群霍乱弧菌单抗 B 和 1-2mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T1[12]、检测带 T2[13] 和质控带 C[14],于 35-40°C 下烘干 30min-1h,得分析膜 [3],备用;

[0020] C. 将样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘帖于粘性底衬 [5] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 2 所示);将试纸剪切为 2-4mm 宽单独可用的成品,得本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸;成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0021] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的制备方法优选为:

[0022] A. 结合垫 [2] 的制备:将 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7]、UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 和 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 混合,得 UCP 结合物混合物 [6],用 pH = 7.2 的 0.03M PB 含 5% BSA、5% 海藻糖和 5% 蔗糖的混合液作为结合物稀释液将 UCP 结合物混合物 [6] 稀释至终浓度为 2mg/ml,将 UCP 结合物混合物 [6] 加于玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,于 40°C 下烘干 1.5h,得结合垫 [2],备用;

[0023] B. 分析膜 [3] 的制备:将 1.5mg/ml 01 群霍乱弧菌单抗 B、1.5mg/ml 0139 群霍乱弧菌单抗 B 和 1.5mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T1[12]、检测带 T2[13] 和质控带 C[14],于 37°C 下烘干 40 分钟,得分析膜 [3],备用;

[0024] C. 将样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘帖于粘性底衬 [5] 上,确保相互之间的重叠关系(如附图 2 所示);将试纸剪切为 3mm 宽单独可用的成品,得本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸;成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0025] 一种用本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸检测分型霍乱弧菌的方法:

[0026] A. 样品预处理:水样、食品、粪便等样品可直接检测或用碱性蛋白胨水增菌 4h-5h 后再进行检测;

[0027] B. 样品处理:将 0.5-2 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液(0.1-0.3MpH = 7.2PB 含 0.1-1M NaCl,0.1-1% SDS)混合;

[0028] C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至上述本发明多重 UPT-LF 试纸的样品垫 [1] 上;

[0029] D. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;

[0030] E. 结果判读:用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描;

[0031] 定性检测:只有质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性;检测带 T1[12] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群霍乱弧菌阳性;检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;

[0032] 定量检测:将检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T1、T2、C, T1/C 为 01 群霍乱弧菌的检测值, T2/C 为 0139 群霍乱弧菌的检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中

01 群与 0139 群霍乱弧菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

[0033] 一种用本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸检测分型霍乱弧菌的方法优选为:

[0034] A. 样品预处理:水样、食品、粪便等样品可直接检测或用碱性蛋白胨水增菌 4.5h 后再进行检测;

[0035] B. 样品处理:将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0.15M pH = 7.2PB 含 0.3M NaCl, 0.3% SDS) 混合;

[0036] C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至上述本发明多重 UPT-LF 试纸的样品垫 [1] 上;

[0037] D. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;

[0038] E. 结果判读:用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描;

[0039] 定性检测:只有质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性;检测带 T1[12] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 01 群霍乱弧菌阳性;检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 有信号产生,则样品为 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均有信号产生,则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;

[0040] 定量检测:将检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 的信号强度 (即峰面积) 依次赋值于 T1、T2、C, T1/C 为 01 群霍乱弧菌的检测值, T2/C 为 0139 群霍乱弧菌的检测值,经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后,通过任意样品的检测值即可获得该样品中 01 群与 0139 群霍乱弧菌的有无及具体浓度,从而实现定量检测。

[0041] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的检测原理为:

[0042] 检测中将液体样品添加至样品垫 [1] 上后,液体样品自样品垫 [1] 渗透入结合垫 [2];在液体样品基质的作用下,结合垫 [2] 中固定的 UCP 结合物混合物 [6] 将重新溶解游离,并同样品一同离开结合垫 [2] 进入分析膜 [3],在毛细作用下,通过检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 向吸水垫 [4] 的方向涌动;在这一过程中,检测带 T1[12]/检测带 T2[13]/质控带 C[14]、UCP 结合物混合物 [6]、样品中的 01 群/0139 群霍乱弧菌之间将发生特异性的免疫反应,从而产生可检测的信号,如附图 3 所示:

[0043] 1、01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性样品 (图 3A):样品中既不含有 01 群霍乱弧菌 [10],也不含有 0139 群霍乱弧菌 [11],因而检测带 T1[12] 即 01 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 之间、检测带 T2[13] 即 0139 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 之间,无法发生结合,UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 只能依次流过检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14];而质控结合物即 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 则在通过质控带 C[14] 即兔抗羊 IgG 时,通过免疫反应将 UCP 颗粒固定于质控带 C[14],从而产生可检测的信号;最终,对于 01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性样品而言,只有质控带 C[14] 上有信号产生;

[0044] 2、01 群霍乱弧菌阳性样品 (图 3B):样品中含有 01 群霍乱弧菌 [10],但不含有 0139 群霍乱弧菌 [11],因而检测带 T1[12] 即 01 群霍乱弧菌单抗 B/01 群霍乱弧菌 [10]/UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 之间可通过双抗体夹心模式的免疫反应将 UCP 颗粒固

定于检测带 T1[12],从而产生可检测的信号;而 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 只能依次流过检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14],而无法结合于检测带 T2[13];质控结合物即 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 则在通过质控带 C[14] 即兔抗羊 IgG 时,通过免疫反应将 UCP 颗粒固定于质控带 C[14],从而产生可检测的信号;最终,对于 01 群霍乱弧菌阳性样品而言,检测带 T1[12] 与质控带 C[14] 上均有信号产生;

[0045] 3、0139 群霍乱弧菌阳性样品(图 3C):样品中不含有 01 群霍乱弧菌 [10],但含有 0139 群霍乱弧菌 [11],因而检测带 T2[13] 即 0139 群霍乱弧菌单抗 B/0139 群霍乱弧菌 [11]/UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 之间可通过双抗体夹心模式的免疫反应将 UCP 颗粒固定于检测带 T2[13],从而产生可检测的信号;而 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 只能依次流过检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14],而无法结合于检测带 T1[12];质控结合物即 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 则在通过质控带 C[14] 即兔抗羊 IgG 时,通过免疫反应将 UCP 颗粒固定于质控带 C[14],从而产生可检测的信号;最终,对于 0139 群霍乱弧菌阳性样品而言,检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 上均有信号产生;

[0046] 4、01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性样品(图 3D):样品中既含有 01 群霍乱弧菌 [10],又含有 0139 群霍乱弧菌 [11],因而检测带 T1[12] 即 01 群霍乱弧菌单抗 B/01 群霍乱弧菌 [10]/UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 之间、检测带 T2[13] 即 0139 群霍乱弧菌单抗 B/0139 群霍乱弧菌 [11]/UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 之间,均可通过双抗体夹心模式的免疫反应将 UCP 颗粒分别固定于检测带 T1[12] 与检测带 T2[13],从而产生可检测的信号;质控结合物即 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 也在通过质控带 C[14] 即兔抗羊 IgG 时,通过免疫反应将 UCP 颗粒固定于质控带 C[14],从而产生可检测的信号;最终,对于 01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性样品而言,检测带 T1[12]、检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 上均有信号产生。

[0047] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸通过将 UCP 颗粒作为标记物与免疫层析技术相结合,并将传统的单靶标检测免疫层析试纸拓展为多重检测,最终所建立的基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸,具有操作简便、快速、敏感性高、特异性好的特点,可在野外现场实现样品中 01 群与 0139 群霍乱弧菌的定量检测与分型。

附图说明:

[0048] 图 1:本发明基于多重上转换发光免疫层析技术(UPT-LF)的霍乱检测分型试纸结构图;

[0049] 图 2:本发明基于多重上转换发光免疫层析技术(UPT-LF)的霍乱检测分型试纸粘帖示意图;

[0050] 图 3:本发明基于多重上转换发光免疫层析技术(UPT-LF)的霍乱检测分型试纸检测原理图;

[0051] 图 4:01 群霍乱弧菌浓度响应曲线与定量检测曲线;

[0052] 图 5:0139 群霍乱弧菌浓度响应曲线与定量检测曲线;

[0053] 图 6:01 群与 0139 群霍乱弧菌混合样品检测;

[0054] 图 7:01 群霍乱弧菌特异检测性能评价;

[0055] 图 8:0139 群霍乱弧菌特异检测性能评价。

[0056] 下述实验例和实施例用于进一步说明但不限于本发明。

[0057] 实验例 1 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的灵敏度与定量能力评价实验

[0058] 1、标准菌液样品制备：

[0059] (1) 用碱性蛋白胨水分别培养 O1 群与 O139 群霍乱弧菌至对数中期；

[0060] (2) 8000rpm, 5min 离心浓缩；

[0061] (3) 平板计数, 确定准确的菌液浓度；

[0062] (4) 用碱性蛋白胨水将菌浓度分别调至 0cfu/ml (即碱性蛋白胨水)、 10^4 cfu/ml、 10^5 cfu/ml、 10^6 cfu/ml、 10^7 cfu/ml, 以此作为灵敏度以及定量能力评价的标准品。

[0063] 2、使用本发明实施例 1 方法制备得到的基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸对系列浓度标准品进行检测, 操作流程如下：

[0064] (1) 样品处理：将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0.15M pH = 7.2PB 含 0.3M NaCl, 0.3% SDS) 混合；

[0065] (2) 添加样品：将处理后的液体样品滴加 140 μ l 至本发明多重 UPT-LF 试纸的样品垫上, 每个样品重复检测 3 次；

[0066] (3) 层析反应：静置 15min 待层析反应完成；

[0067] (4) 结果判读：用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描, 检测结果以 T1/C 值 (O1 群) 和 T2/C 值 (O139 群) 表示；

[0068] 3、实验结果：

[0069] 实验结果如附图 4 和附图 5 所示：

[0070] (1) 判定值的确定：以空白样品 (碱性蛋白胨水) 三次检测值 T/C 的均值 +3 倍标准差 ($\bar{x} + 3SD$) 作为判定值, O1 群与 O139 群检测的判定值均为 0.3, T1/C 大于 0.3 则为 O1 群阳性, T2/C 大于 0.3 则为 O139 群阳性；

[0071] (2) 灵敏度评价： 10^4 cfu/ml O1 群霍乱弧菌标准品的检测值 (T1/C) 与 10^4 cfu/ml O139 群霍乱弧菌标准品的检测值 (T2/C) 均大于 0.3, 因而基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸其对 O1 群与 O139 群霍乱弧菌的检测敏感性均可达到 10^4 cfu/ml；

[0072] (3) 定量能力评价：以 LOG(T/C 值) 作为 x, 以 LOG(cfu/ml) 作为 y, 绘制标准定量曲线并经统计拟合, 即可获得 O1 群与 O139 群的定量拟合公式：

[0073] O1 群定量拟合公式： $y = 2.7148x + 4.9796, R^2 = 0.9972$

[0074] x 为 LOG(T1/C 值), y 为 LOG(cfu/ml)；

[0075] O139 群定量拟合公式： $y = 3.2923x + 5.5629, R^2 = 0.9917$

[0076] x 为 LOG(T1/C 值), y 为 LOG(cfu/ml)；

[0077] 其中 O1 群与 O139 群霍乱弧菌定量拟合公式的决定系数 (R^2) 分别达到了 0.9972 与 0.9917, 由此说明本发明多重 UPT-LF 具有很好的定量能力, 经推导定量公式的最终形式为：

[0078]

$$\text{样品中 O1 群霍乱弧菌的浓度} = 10^{(2.7148 \times \log^{T1/C} + 4.9796)} \text{ cfu/ml}$$

[0079]

样品中 O139 群霍乱弧菌的浓度 = $10^{(3.2923 \times \log T2/C + 5.5629)}$ cfu/ml

[0080] 将样品检测中获得的 T1/C 值与 T2/C 值带入公式,即可获得最终的定量结果。

[0081] 实验例 2 本发明基于多重 UPT-LF 的的霍乱检测分型试纸的检测分型同步能力评价实验

[0082] 1、O1 群与 O139 群霍乱弧菌混合样品制备：

[0083] 用碱性蛋白胨水分别培养 O1 群与 O139 群霍乱弧菌至对数中期；8000rpm, 5min 离心浓缩；平板计数,确定准确的菌液浓度；用碱性蛋白胨水配制混合菌液样品,浓度设置如表 1 所示：

[0084] 表 1 碱性蛋白胨水配制混合菌液样品的浓度设置表

[0085]

样品 序号	浓度 (cfu/ml)		样品 序号	浓度 (cfu/ml)		样品 序号	浓度 (cfu/ml)		样品 序号	浓度 (cfu/ml)		样品 序号	浓度 (cfu/ml)	
	O1	O139		O1	O139		O1	O139		O1	O139		O1	O139
1	0	0	6	0	10 ⁴	11	0	10 ⁵	16	0	10 ⁶	21	0	10 ⁷
2	10 ⁴	0	7	10 ⁴	10 ⁴	12	10 ⁴	10 ⁵	17	10 ⁴	10 ⁶	22	10 ⁴	10 ⁷
3	10 ⁵	0	8	10 ⁵	10 ⁴	13	10 ⁵	10 ⁵	18	10 ⁵	10 ⁶	23	10 ⁵	10 ⁷
4	10 ⁶	0	9	10 ⁶	10 ⁴	14	10 ⁶	10 ⁵	19	10 ⁶	10 ⁶	24	10 ⁶	10 ⁷
5	10 ⁷	0	10	10 ⁷	10 ⁴	15	10 ⁷	10 ⁵	20	10 ⁷	10 ⁶	25	10 ⁷	10 ⁷

[0086] 2、使用本发明实施例 1 方法制备的基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸对混合样品进行检测,操作流程如下：

[0087] (1) 样品处理：将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0.15M pH = 7.2PB 含 0.3M NaCl, 0.3% SDS) 混合；

[0088] (2) 添加样品：将处理后的液体样品滴加 140 μl 至多重 UPT-LF 试纸的样品垫上；

[0089] (3) 层析反应：静置 15min 待层析反应完成；

[0090] (4) 结果判读：用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描,检测结果以 T1/C 值 (O1 群) 和 T2/C 值 (O139 群) 表示；

[0091] 3、实验结果：

[0092] 实验结果如附图 6 所示,本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸可以实现 O1 群与 O139 群霍乱弧菌的同步检测与分型。

[0093] 实验例 3 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的特异性评价实验

[0094] 1、菌株选择：

[0095] (1) O1 群霍乱弧菌特异检测性能评价：选取麦氏弧菌、河弧菌、大肠杆菌 (2 株)、福氏至贺菌 (2 株)、副溶血弧菌 (2 株)、嗜水气单胞菌 (2 株)、创伤弧菌 (2 株)、沙门氏菌 (3 株)、拟态弧菌、O139 群霍乱弧菌 (15 株)、非 O1 群非 O139 群霍乱弧菌 (15 株) 对基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的 O1 群霍乱弧菌检测特异性进行评价,同时以 O1 群霍乱弧菌作为阳性对照；

[0096] (2) O139 群霍乱弧菌特异检测性能评价：选取麦氏弧菌、河弧菌、大肠杆菌 (2 株)、福氏至贺菌 (2 株)、副溶血弧菌 (2 株)、嗜水气单胞菌 (2 株)、创伤弧菌 (2 株)、沙门氏菌 (3 株)、拟态弧菌、O1 群霍乱弧菌 (15 株)、非 O1 群非 O139 群霍乱弧菌 (15 株) 对基于多

重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的 O139 群霍乱弧菌检测特异性进行评价,同时以 O139 群霍乱弧菌作为阳性对照;

[0097] 2、细菌培养及样品制备:

[0098] 用各自适宜的培养基进行细菌培养,至对数中期;8000rpm,5min 离心浓缩;平板计数,确定准确的菌液浓度;用碱性蛋白胨水将所有的特异性评价菌株以及特异性检测菌株均稀释至 10^7 cfu/ml。

[0099] 3、使用本发明实施例 1 方法制备的基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸对各种菌液进行检测,操作流程如下:

[0100] (1) 样品处理:将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0.15M pH = 7.2PB 含 0.3M NaCl,0.3% SDS) 混合;

[0101] (2) 添加样品:将处理后的液体样品滴加 140 μ l 至多重 UPT-LF 试纸的样品垫上;

[0102] (3) 层析反应:静置 15min 待层析反应完成;

[0103] (4) 结果判读:用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描,检测结果以 T1/C 值 (O1 群) 和 T2/C 值 (O139 群) 表示;

[0104] 4、实验结果:

[0105] 实验结果如附图 7 与附图 8 所示,本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸可以特异性的检测 O1 群与 O139 群霍乱弧菌,而对其它生境近似、传播途径近似或种属近缘的菌株没有非特异响应。

[0106] 下述实施例均能实现上述实验例所述的效果。

具体实施方式

[0107] 实施例 1:本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸及其制备方法

[0108] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的结构组成为:样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4] 和粘性底衬 [5] (如附图 1 所示)。

[0109] 其中,样品垫 [1] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:吸水纸。

[0110] 其中,结合垫 [2] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质:玻璃纤维;结合垫 [2] 中固定有 UCP 结合物混合物 [6],UCP 结合物混合物 [6] 中包括:两种检测结合物,即 UCP-O1 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 与 UCP-O139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8],一种质控结合物,即 UCP-羊 IgG 结合物 [9];其中,UCP-O1 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 由 UCP 颗粒和 O1 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成;UCP-O139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 由 UCP 颗粒和 O139 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成;UCP-羊 IgG 结合物 [9] 由 UCP 颗粒和羊 IgG 结合而成;UCP-O1 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 和 UCP-O139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 可分别高特异性地与 O1 群霍乱弧菌 [10]、O139 群霍乱弧菌 [11] 结合;UCP-羊 IgG 结合物 [9] 可质控层析过程正常与否。

[0111] 其中,分析膜 [3] 是微观结构均匀的物质:硝酸纤维素膜;其中,分析膜 [3] 上设置有检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13] 和质控带 C [14];检测带 T1 [12] 为 O1 群霍乱弧菌单抗 B,检测带 T2 [13] 为 O139 群霍乱弧菌单抗 B,质控带 C [14] 为兔抗羊 IgG;检测带 T1 [12] 即 O1 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-O1 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 O1 群霍乱弧菌,检测带 T2 [13] 即 O139 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-O139 群霍乱弧菌

单抗 A 结合物 [8] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 O139 群霍乱弧菌,而质控带 C[14] 即兔抗羊 IgG 可与 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常。

[0112] 其中,吸水垫 [4] 是具有较大床体积的物质;吸水纸。

[0113] 其中,粘性底衬 [5] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质;PVC 板。

[0114] 其中,O1 群霍乱弧菌单抗 A 与 O1 群霍乱弧菌单抗 B,可为同一种特异性单抗,也可分为两种特异性单抗;

[0115] 其中,O139 群霍乱弧菌单抗 A 与 O139 群霍乱弧菌单抗 B,可为同一种特异性单抗,也可分为两种特异性单抗;

[0116] 其中,UCP 颗粒,可通过上转换发光现象对样品中 O1 群霍乱弧菌 [10] 与 O139 群霍乱弧菌 [11] 的存在与否以及浓度予以指示。

[0117] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的制备方法为:

[0118] A. 结合垫 [2] 的制备:将 UCP-O1 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7]、UCP-O139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 和 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 混合,得 UCP 结合物混合物 [6],用 pH = 7.2 的 0.03M PB 含 5% BSA、5%海藻糖和 5%蔗糖的混合液作为结合物稀释液将 UCP 结合物混合物 [6] 稀释至终浓度为 2mg/ml,将 UCP 结合物混合物 [6] 加于玻璃纤维上,于 40℃ 下烘干 1.5h,得结合垫 [2],备用;

[0119] B. 分析膜 [3] 的制备:将 1.5mg/ml O1 群霍乱弧菌单抗 B、1.5mg/ml O139 群霍乱弧菌单抗 B 和 1.5mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于硝酸纤维素膜上分别作为检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13] 和质控带 C [14],于 37℃ 下烘干 40min,得分析膜 [3],备用;

[0120] C. 将作为样品垫 [1] 的吸水纸、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和作为吸水垫 [4] 的吸水纸依次粘帖于作为粘性底衬 [5] 的 PVC 板上,确保相互之间的重叠关系(如附图 2 所示);将试纸剪切为 3mm 宽,得本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸;成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0121] 实施例 2:用本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸检测霍乱弧菌的方法

[0122] A. 样品预处理:水样、食品、粪便等样品可直接检测或用碱性蛋白胨水增菌 4.5h 后再进行检测;

[0123] B. 样品处理:将 1 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液(0.15M pH = 7.2PB 含 0.3M NaCl,0.3% SDS)混合;

[0124] C. 添加样品:将处理后的液体样品滴加至本发实施例 1 制备的多重 UPT-LF 试纸的样品垫 [1] 上;

[0125] D. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;

[0126] E. 结果判读:用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描;

[0127] 定性检测:只有质控带 C [14] 有信号产生,则样品为 O1 群与 O139 群霍乱弧菌阴性;检测带 T1 [12] 与质控带 C [14] 有信号产生,则样品为 O1 群霍乱弧菌阳性;检测带 T2 [13] 与质控带 C [14] 有信号产生,则样品为 O139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13]、质控带 C [14] 均有信号产生,则样品为 O1 群与 O139 群霍乱弧菌阳性;检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13]、质控带 C [14] 均无信号产生,则层析系统异常检测失败,需进行再次检测;

[0128] 定量检测:将检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13]、质控带 C [14] 的信号强度(即峰面

积)依次赋值于 T1、T2、C, T1/C 为 01 群霍乱弧菌的检测值, T2/C 为 0139 群霍乱弧菌的检测值, 经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后, 通过任意样品的检测值即可获得该样品中 01 群与 0139 群霍乱弧菌的有无及具体浓度, 从而实现定量检测。

[0129] 实施例 3: 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的制备

[0130] 本发明基于多重 UPT-LF 的的霍乱检测分型试纸的结构组成为: 样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4] 和粘性底衬 [5] (如附图 1 所示)。

[0131] 其中, 样品垫 [1] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质: 纤维素膜。

[0132] 其中, 结合垫 [2] 是具有较大床体积且微观结构均匀的物质: 聚酯膜; 结合垫 [2] 中固定有 UCP 结合物混合物 [6], UCP 结合物混合物 [6] 中包括: 两种检测结合物, 即 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8], 一种质控结合物, 即 UCP-羊 IgG 结合物 [9]; 其中, UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 由 UCP 颗粒和 01 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成; UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 由 UCP 颗粒和 0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合而成; UCP-羊 IgG 结合物 [9] 由 UCP 颗粒和羊 IgG 结合而成; UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 和 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 可分别高特异性地与 01 群霍乱弧菌 [10]、0139 群霍乱弧菌 [11] 结合; UCP-羊 IgG 结合物 [9] 可质控层析过程正常与否。

[0133] 其中, 分析膜 [3] 是微观结构均匀的物质: 尼龙膜; 其中, 分析膜 [3] 上设置有检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13] 和质控带 C [14]; 检测带 T1 [12] 为 01 群霍乱弧菌单抗 B, 检测带 T2 [13] 为 0139 群霍乱弧菌单抗 B, 质控带 C [14] 为兔抗羊 IgG; 检测带 T1 [12] 即 01 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 01 群霍乱弧菌, 检测带 T2 [13] 即 0139 群霍乱弧菌单抗 B 与 UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 构成双抗体夹心模式可特异性的检测 0139 群霍乱弧菌, 而质控带 C [14] 即兔抗羊 IgG 可与 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 直接结合用于质控整个层析流程是否正常。

[0134] 其中, 吸水垫 [4] 是具有较大床体积的物质: 纤维素膜。

[0135] 其中, 粘性底衬 [5] 是单面涂有压力敏感胶的硬体材质: PVC 板。

[0136] 其中, 01 群霍乱弧菌单抗 A 与 01 群霍乱弧菌单抗 B, 可为同一种特异性单抗, 也可为两种特异性单抗;

[0137] 其中, 0139 群霍乱弧菌单抗 A 与 0139 群霍乱弧菌单抗 B, 可为同一种特异性单抗, 也可为两种特异性单抗;

[0138] 其中, UCP 颗粒, 可通过上转换发光现象对样品中 01 群霍乱弧菌 [10] 与 0139 群霍乱弧菌 [11] 的存在与否以及浓度予以指示。

[0139] 本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸的制备方法为:

[0140] A. 结合垫 [2] 的制备: 将 UCP-01 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [7]、UCP-0139 群霍乱弧菌单抗 A 结合物 [8] 和 UCP-羊 IgG 结合物 [9] 混合, 得 UCP 结合物混合物 [6], 用 pH = 7.2 的 0.03M PB 含 2% BSA、8% 海藻糖和 0.5% 蔗糖的混合液作为结合物稀释液将 UCP 结合物混合物 [6] 稀释至终浓度为 2.5mg/ml, 将 UCP 结合物混合物 [6] 加于聚酯膜上, 于 45°C 下烘干 1h, 得结合垫 [2], 备用;

[0141] B. 分析膜 [3] 的制备: 将 2mg/ml 01 群霍乱弧菌单抗 B、2mg/ml 0139 群霍乱弧菌单抗 B 和 1mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于尼龙膜上分别作为检测带 T1 [12]、检测带 T2 [13] 和质

控带 C[14], 于 40℃ 下烘干 30min, 得分析膜 [3], 备用;

[0142] C. 将作为样品垫 [1] 的纤维素膜、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和作为吸水垫 [4] 的纤维素膜依次粘帖于作为粘性底衬 [5] 的 PVC 板上, 确保相互之间的重叠关系 (如附图 2 所示); 将试纸剪切为 4mm 宽, 得本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸; 成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0143] 实施例 4: 用本发明基于多重 UPT-LF 的霍乱检测分型试纸检测霍乱弧菌的方法:

[0144] A. 样品预处理: 水样、食品、粪便等样品可直接检测或用碱性蛋白胨水增菌 4.5h 后再进行检测;

[0145] B. 样品处理: 将 1.5 倍体积经过预处理的样品与 1 倍体积样品处理液 (0.2M pH=7.2PB 含 0.6M NaCl, 0.7% SDS) 混合;

[0146] C. 添加样品: 将处理后的液体样品滴加至本发明实施例 3 制备的多重 UPT-LF 试纸的样品垫 [1] 上;

[0147] D. 层析反应: 静置数分钟待层析反应完成;

[0148] E. 结果判读: 用上转换发光生物传感器对试纸进行扫描;

[0149] 定性检测: 只有质控带 C[14] 有信号产生, 则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阴性; 检测带 T1[12] 与质控带 C[14] 有信号产生, 则样品为 01 群霍乱弧菌阳性; 检测带 T2[13] 与质控带 C[14] 有信号产生, 则样品为 0139 群霍乱弧菌阳性; 检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均有信号产生, 则样品为 01 群与 0139 群霍乱弧菌阳性; 检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 均无信号产生, 则层析系统异常检测失败, 需进行再次检测; 定量检测: 将检测带 T1[12]、检测带 T2[13]、质控带 C[14] 的信号强度 (即峰面积) 依次赋值于 T1、T2、C, T1/C 为 01 群霍乱弧菌的检测值, T2/C 为 0139 群霍乱弧菌的检测值, 经标准浓度菌液标定并绘制定量曲线后, 通过任意样品的检测值即可获得该样品中 01 群与 0139 群霍乱弧菌的有无及具体浓度, 从而实现定量检测。

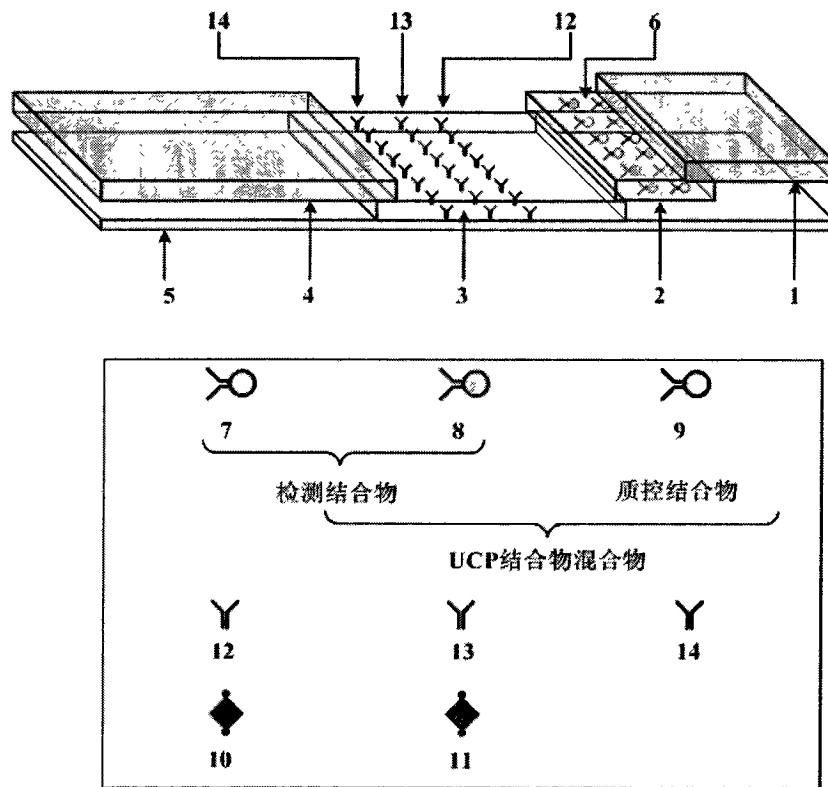


图 1

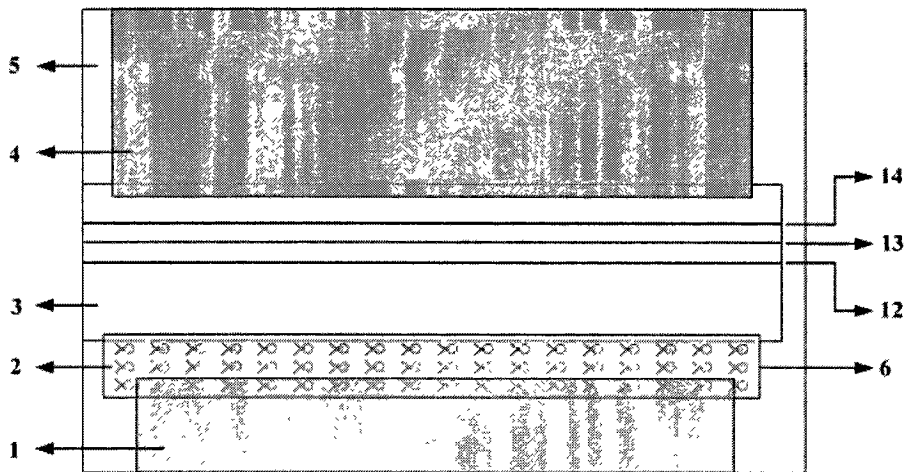


图 2

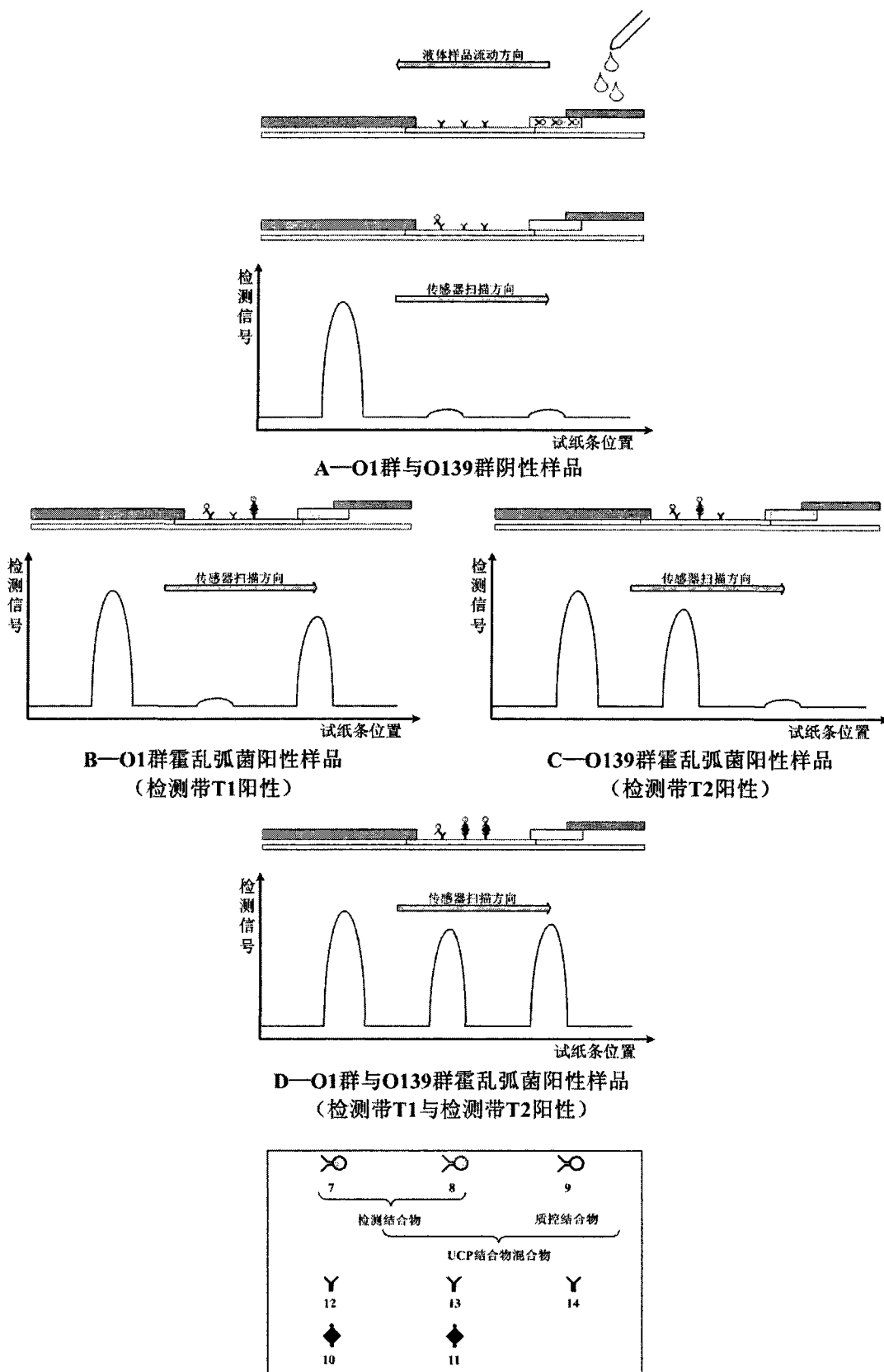


图 3

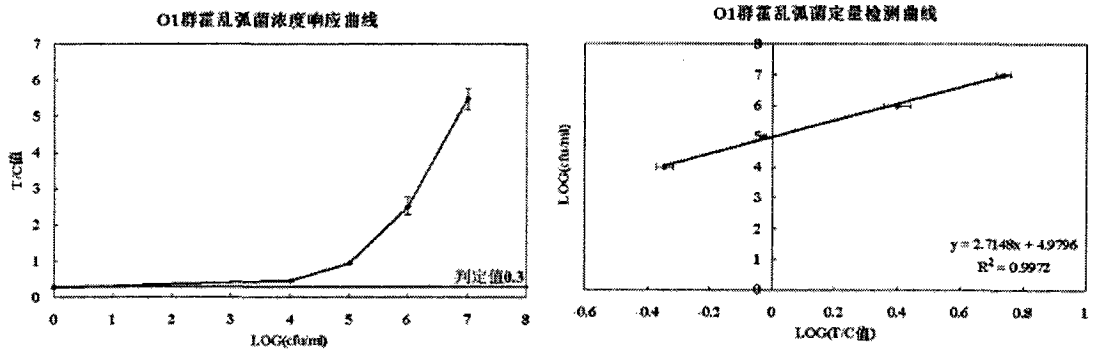


图 4

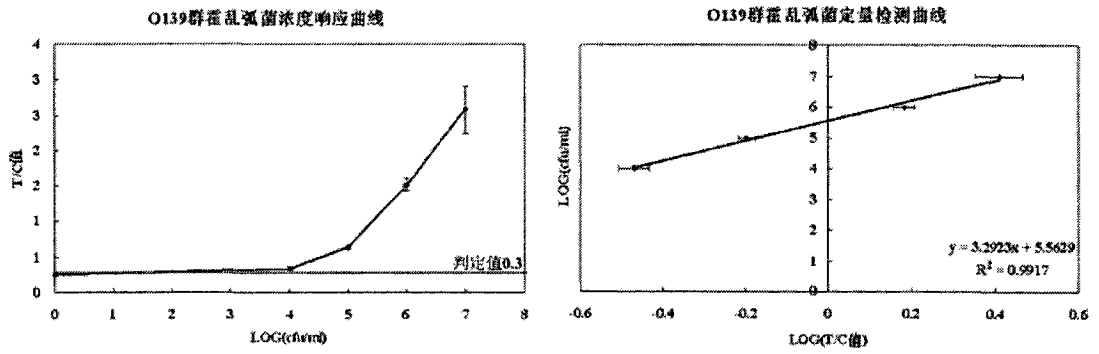


图 5

专利名称(译)	一种基于多重上转换发光免疫层析技术的霍乱检测分型试纸		
公开(公告)号	CN102375059A	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	CN201010257686.4	申请日	2010-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	阚飙 周蕾 郝民 郭兆彪 邱海燕 杨瑞馥		
发明人	阚飙 周蕾 郝民 郭兆彪 邱海燕 杨瑞馥		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	Y02A50/52		
代理人(译)	张韬		
其他公开文献	CN102375059B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明基于多重上转换发光免疫层析技术(UPT-LF)的霍乱检测分型试纸通过将UCP颗粒作为标记物与免疫层析技术相结合，并将传统的单靶标检测免疫层析试纸拓展为多重检测，最终所建立的基于多重UPT-LF的霍乱检测分型试纸，具有操作简便、快速、敏感性高、特异性好的特点，可在野外现场实现样品中O1群与O139群霍乱弧菌的定量检测与分型。

