



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104237518 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201410174902. 7

(22) 申请日 2014. 04. 25

(71) 申请人 深圳国际旅行卫生保健中心  
地址 518000 广东省深圳市福田区皇岗口岸生活区 1 号综合楼

(72) 发明人 史蕾 向军俭 马岚 赵芳 吴峰  
闻一鸣 冬冰

(74) 专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有限公司 44223

代理人 王震宇

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

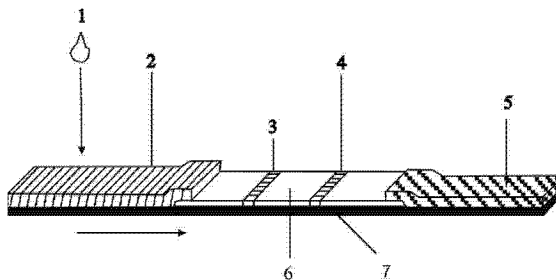
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品及制备方法

(57) 摘要

一种检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品及制备方法,该产品包括相互连接的样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间,所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体,所述检测线包被有单增李斯特菌包被抗体,所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体;所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体为将待标记单增李斯特菌抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。该测定产品用来检测单增李斯特菌,灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。



1. 一种检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,包括样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,所述包被膜连接于所述样品垫和所述吸水垫之间,所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体,所述检测线包被有单增李斯特菌包被抗体,所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体;所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体为将待标记单增李斯特菌抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。

2. 根据权利要求1所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的平均直径为100nm、80-200nm或60-300nm;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的直径变异系数为15%、10%-20%或10%-30%;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度为40emu/g。

3. 根据权利要求1或2所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体按照包括如下步骤的方法制备:将所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记单增李斯特菌抗体以50:3的质量比进行反应得到以肽键共价结合形成的磁性纳米粒子与单增李斯特菌抗体的偶联物。

4. 根据权利要求3所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺进行活化;所述活化中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化所用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺的浓度分别为5mM和10mM;所述活化的温度为37℃,时间为0.5h。

5. 根据权利要求3或4所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中,所述将羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记单增李斯特菌抗体以50:3的质量比进行反应是在37℃在浓度为50mM pH为8.5的硼砂缓冲液中反应3.5小时。

6. 根据权利要求3、4或5所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中还包括将所述磁性纳米粒子与单增李斯特菌抗体的偶联物用BSA溶液封闭后得到所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的步骤,所述BSA溶液的质量百分浓度为5%,所述封闭的温度为37℃,时间为0.5h。

7. 根据权利要求1-6中任一所述的侧向流免疫层析测定产品,其特征在于,所述检测线与所述样品垫的距离小于所述质控线与所述样品垫的距离。

8. 一种制备权利要求1-6中任一所述的侧向流免疫层析测定产品的方法,其特征在于,包括:

I、分别制备权利要求1-6中任一所述的侧向流免疫层析测定产品中所述样品垫和所述包被膜;

II、将步骤I得到的所述样品垫、所述包被膜和吸水垫相互连接,得到所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间的侧向流免疫层析测定产品。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述包被膜的制作方法包括:将所述单增李斯特菌包被抗体以为2mg/ml的浓度包被于硝酸纤维素膜得到所述检测线,将权利要求1-6中任一所述的侧向流免疫层析测定产品中所述第二抗体以1mg/ml的浓度包被于所述硝酸纤维素膜上与所述检测线相互分离的区域,得到所述质控线,具有所述检测线和所述

质控线的所述硝酸纤维素膜即为所述包被膜。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于,所述样品垫的制作方法包括:将权利要求 1-6 中任一所述的磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体以 0.5mg/ml 的浓度包被于玻璃纤维素膜得到所述样品垫。

## 检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及侧向流免疫层析测定产品及其制备方法,特别是检测单增李斯特菌(单核细胞增生性李斯特氏菌)的侧向流免疫层析测定产品及制备方法。

### 背景技术

[0002] 侧向流免疫层析测定(LFIA, Lateral flow immunoassay)是20世纪末期出现的新型免疫检测方法,具有简便快速的特点,在多种病毒检测如HIV、乙肝病毒以及激素检测方面有广泛应用。其通过结合免疫标记技术和膜层析技术,在极短时间内,无需特殊条件,即可做出结果判断,已经成为一种重要的便捷免疫检测方法。

[0003] 单核细胞增生性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)又称单增李斯特菌。李斯特菌是一类普遍存在于环境中的细菌,而单增李斯特菌则是李斯特菌中唯一的一种人畜共患病致病菌,也是常见的食源性致病菌之一,它能引起肠胃炎症、脑膜炎、败血病、流产等临床症状,对新生儿、孕妇、老年人及免疫力低下人群的危害尤为严重,致死率高达20%。单核增生李斯特氏菌广泛存在于各种食物中,并能在食品加工后的冷冻及真空包装等条件下存活,是食品安全的一大隐患。有关单增李斯特菌的食物污染事件在国外时有报道,包括2008年发生在加拿大的肉类感染单增李斯特菌事件以及2011年在美国发生的毒香瓜事件都导致了多人死亡;尽管在国内至今没有报道单增李斯特菌相关的集体中毒事件,但据质检部门检查报告显示,在多种进口肉类中,单增李斯特菌的检出率是相对较高的,因此,建立快速、有效及结果可靠的检测方法,对于保障消费者健康具有重要意义。

[0004] 目前,检测单核增生李斯特氏菌的传统方法是通过对样品进行二次增菌,利用选择性分离培养基和显色培养基进行分离与鉴定。选择性分离培养基如PALCAM、OXA,或显色培养基如CHROMagar李斯特培养基,它们主要通过成分中的某种物质与细菌的代谢产物发生化学反应并产生颜色变化,从而区分不同的菌株。选择性培养基常用于区分不同种属的细菌,但难以鉴别属内的不同菌株;显色培养基具有高特异性的特点,但由于其价格昂贵,检测周期长等缺点,实际应用范围不广。除了常规的检测方法以外,随着分子检测技术和免疫学检测技术的日渐成熟,以核酸扩增检测技术和酶联免疫法检测为代表的检测方法因具有特异性强及检测速度快特点,正逐渐取代原有的检测方法。但大部分由于需要较高的技术和条件以及检测速度相对较慢,限制了在口岸检疫中的现场使用。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品及制备方法,该测定产品检测单增李斯特菌灵敏可靠、结果便于保存及量化分析、操作简便快速。

[0006] 本发明所提供的侧向流免疫层析测定产品,包括样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜,所述包被膜连接于所述样品垫和所述吸水垫之间,所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体,所述检测线包被有单增李斯特菌包被抗

体,所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体;所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体为将待标记单增李斯特菌抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合体。

[0007] 上述侧向流免疫层析测定产品中,所述检测线与所述样品垫的距离小于所述质控线与所述样品垫的距离。

[0008] 所述单增李斯特菌包被抗体可为单增李斯特菌单克隆抗体或单增李斯特菌多克隆抗体;所述待标记单增李斯特菌抗体可为单增李斯特菌单克隆抗体或单增李斯特菌多克隆抗体。

[0009] 上述侧向流免疫层析测定产品中,所述待标记单增李斯特菌抗体的亲和常数为 $10^8\text{M}^{-1}$ 、 $10^6 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ 或 $10^7 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ ;所述单增李斯特菌包被抗体的亲和常数为 $10^8\text{M}^{-1}$ 、 $10^6 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ 或 $10^7 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ ;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的平均直径为100nm、80-200nm或60-300nm;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的直径变异系数(CV)可为15%、10%-20%或10%-30%;所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度可为40emu/g。

[0010] 其中,所述待标记单增李斯特菌抗体的亲和常数具体可为 $10^8\text{M}^{-1}$ ,所述单增李斯特菌包被抗体的亲和常数具体可为 $10^6 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ ,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的平均直径可为100nm,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的直径变异系数(CV)可为15%,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度可为40emu/g。

[0011] 所述羧基修饰的磁性纳米粒子具体可为羧基修饰的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子。

[0012] 在本发明的一个实施例中,所述待标记单增李斯特菌抗体是购自Abnova公司的编号为MAB0532抗单增李斯特菌的鼠单克隆抗体。所述单增李斯特菌包被抗体是购自Abnova公司的编号为MAB0529抗单增李斯特菌的鼠单克隆抗体。所述磁性纳米粒子是购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为MP-2的聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 水溶性纳米晶,所述磁性纳米粒子为羧基修饰的磁性纳米粒子,所述羧基修饰的磁性纳米粒子平均直径为100nm,直径变异系数(CV)为15%,所述羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度为40emu/g。与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体为羊抗鼠IgG抗体。

[0013] 本发明中,所述待标记单增李斯特菌抗体和所述单增李斯特菌包被抗体亲和常数均是指对单增李斯特菌的亲和常数。

[0014] 上述侧向流免疫层析测定产品中,所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体按照包括如下步骤的方法制备:将所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记单增李斯特菌抗体以50:3的质量比进行反应得到以肽键共价结合形成的磁性纳米粒子与单增李斯特菌抗体的偶联物。

[0015] 所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺进行活化;所述活化中,所述羧基修饰的磁性纳米粒子活化所用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺的浓度分别为5mM和10mM;所述活化的温度为 $37^\circ\text{C}$ ,时间为0.5h。

[0016] 在本发明的一个实施例中,按照如下方法对羧基修饰的磁性纳米粒子进行活化:将2.5mg的上述羧基修饰的磁性纳米粒子与5mmol1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和10mmol NHS(N-羟基丁二酰亚胺)在MES缓冲液(0.1M、pH4.7)中在 $37^\circ\text{C}$ 反应

0.5h,得到活化后羧基修饰的磁性纳米粒子。

[0017] 所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中,所述将羧基修饰的磁性纳米粒子活化后与所述待标记单增李斯特菌抗体以 50 :3 的质量比进行反应是在 37℃ 在浓度为 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液中反应 3.5 小时。所述 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液可按照如下方法配制:将 1.9g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  溶于 100ml 水中,调 pH 至 8.5 得到 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液。

[0018] 所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中还包括将所述磁性纳米粒子与单增李斯特菌抗体的偶联物用 BSA 溶液封闭后得到所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的步骤,所述 BSA 溶液的浓度为 5% (质量百分浓度),所述封闭的温度为 37℃,时间为 0.5h。

[0019] 所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备方法中,还包括将用 BSA 溶液封闭后得到的所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体用 0.02M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液进行洗涤和悬浮的步骤。

[0020] 所述侧向流免疫层析测定产品还可包括背板和 / 或保护膜,可以试纸、卡等形式存在。

[0021] 上述侧向流免疫层析测定产品可按照下述方法制备。

[0022] 制备上述侧向流免疫层析测定产品的方法包括:

[0023] I、分别制备上述侧向流免疫层析测定产品中所述样品垫和所述包被膜;

[0024] II、将步骤 I 得到的所述样品垫、所述包被膜和吸水垫相互连接,得到所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间的侧向流免疫层析测定产品。

[0025] 其中,所述包被膜的制作方法包括:将所述单增李斯特菌包被抗体以为 2mg/ml 的浓度包被于硝酸纤维素膜得到所述检测线,将所述侧向流免疫层析测定产品中所述第二抗体以 1mg/ml 的浓度包被于所述硝酸纤维素膜上与所述检测线相互分离的区域,得到所述质控线,具有所述检测线和所述质控线的所述硝酸纤维素膜即为所述包被膜。

[0026] 上述包被膜的制作方法中,所述检测线和所述质控线的包被均是采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet Quanti3000 喷头将 2mg/ml 所述单增李斯特菌包被抗体溶液和 1mg/ml 所述第二抗体溶液喷涂至所述硝酸纤维素膜,完成所述检测线和所述质控线的包被。其中,2mg/ml 所述单增李斯特菌包被抗体溶液和 1mg/ml 所述第二抗体溶液的溶剂均可 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液。所述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液可按照如下方法配制:称取 2.3g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.524g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8.77g NaCl 溶于水,用水定容至 1L,调 pH 至 7.4,得到 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液。

[0027] 其中,所述样品垫的制作方法包括:将所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体以 0.5mg/ml 的浓度包被于玻璃纤维素膜得到所述样品垫。

[0028] 所述样品垫的制作方法中,所述玻璃纤维素膜在包被所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体前,进行如下预处理:将所述玻璃纤维素膜在膜处理缓冲液中在 37℃ 浸泡 1 小时,得到经过预处理的玻璃纤维素膜;所述膜处理缓冲液按照如下方法配制:将 Triton X-100、BSA、蔗糖溶于上述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液使 Triton X-100 的质量百分含量为 0.2%、BSA 的质量百分含量为 1%、蔗糖的质量百分含量为 1%,调 pH 至 7.4,得到膜处理缓冲液。所述将所述的磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体以 0.5mg/ml 的浓度包被于玻

玻璃纤维膜是将所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体用所述膜处理缓冲液配成所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体含量为 0.5mg/ml 的液体,将所述液体喷涂于将所述经过预处理的玻璃纤维膜,经干燥后得到所述样品垫。其中,所述喷涂可采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet Quanti3000 喷头进行。

[0029] 本发明的侧向流免疫层析测定产品可用于检测食物样品中是否含有单增李斯特菌。

[0030] 本发明的侧向流免疫层析测定产品与磁性复合粒子标记的免疫层析检测技术相关,是采用磁性复合粒子作为标记材料,进行快速免疫层析测定的一类方法,该技术整合了磁性纳米材料化学合成、标记技术、测流免疫层析技术等相关领域的研究。本发明的侧向流免疫层析测定产品基于侧流免疫层析的原理,加入待测样品后,样品中的单增李斯特菌与磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体结合后层析到检测线(T线)处,在T线处与喷涂的单增李斯特菌包被抗体形成包被抗体-抗原-磁标记抗体免疫复合物,多余的磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体则在质控线(C线)处与抗鼠 IgG 形成的磁标免疫复合物。用磁性试纸判读仪测定 T 线处磁性微球的磁强强度,通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果,C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0031] 本发明的有益效果:

[0032] 本发明的侧向流免疫层析测定产品能够实现对单增李斯特菌的快速和高灵敏测定,具有如下优点:灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。本发明的侧向流免疫层析测定产品对单增李斯特菌的灵敏度达  $10^4$ CFU/mL。本发明可有效满足有关于单增李斯特菌的卫生检疫需要,对于相关疫情的监控和防范具有重要意义。

#### 附图说明

[0033] 图 1 为检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品结构示意图;

[0034] 图 2 为聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的水溶性纳米晶电镜图;

[0035] 图 3 为侧向流免疫层析测定试纸检测值与浓度标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0036] 以下结合附图对本发明的实施例作详细说明。应该强调的是,下述说明仅仅是示例性的,而不是为了限制本发明的范围及其应用。

[0037] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0038] 下述实施例中所用的磁性纳米粒子是购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 MP-2 的聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的磁性  $Fe_3O_4$  水溶性纳米晶(图 2),其核心为  $Fe_3O_4$  纳米颗粒,固含量为 30mg/ml,为羧基修饰的磁性纳米粒子,该羧基修饰的磁性纳米粒子平均直径为 100nm,直径变异系数(CV)为 15%;该羧基修饰的磁性纳米粒子的饱和磁化强度为 40emu/g。

[0039] 下述实施例中所用的待标记单增李斯特菌抗体是购自 Abnova 公司的编号为 MAB0532 抗单增李斯特菌的鼠单克隆抗体。

[0040] 下述实施例中的单增李斯特菌包被抗体是购自 Abnova 公司的编号为 MAB0529 抗单增李斯特菌的鼠单克隆抗体。

[0041] 下述实施例中用于制作样品垫的玻璃纤维素膜购自 Whatman 公司、商品目录号为 Standard17。

[0042] 下述实施例中用于制作包被膜的硝酸纤维素膜购自 Whatman 公司、商品目录号为 Immunopore® FP。

[0043] 下述实施例中的 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液按照如下方法配制：称取 2.3gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.524g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>O、8.77g NaCl 溶于纯水，用纯水定容至 1L，调 pH 至 7.4，得到 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液。

[0044] 下述实施例中的膜处理缓冲液按照如下方法配制：将 Triton X-100、BSA、蔗糖溶于上述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液使 Triton X-100 的质量百分含量为 0.2%、BSA 的质量百分含量为 1%、蔗糖的质量百分含量为 1%，调 pH 至 7.4，得到膜处理缓冲液。

[0045] 下述实施例中的 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液按照如下方法配制：称取 1.9gNa<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 溶于 100ml 纯水，调 pH 至 8.5 得到 50mM pH 为 8.5 的硼砂缓冲液。

[0046] 如图 1 所示，根据本发明的实施例，侧向流免疫层析测定产品包括样品垫 2、吸水垫 5 和具有相互分离的检测线 3 和质控线 4 的包被膜 6，样品垫 2、吸水垫 5 和包被膜 6 都安置在一背板 7 上。其中，所述包被膜 6 连接在所述样品垫 2 和所述吸水垫 5 之间，所述检测线 3 与所述样品垫 2 的距离小于所述质控线 4 与所述样品垫 2 的距离。所述样品垫 2 上负载有磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体，所述检测线 3 包被有单增李斯特菌包被抗体，所述质控线 4 包被有与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体；所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体为将待标记单增李斯特菌抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合体。

[0047] 在较优选实施例中，产品的厚度在 5.0±0.1mm 的范围（即 4.9-5.1mm）。在较优选实施例中，吸水垫 5 的长度在 25.0±0.1mm 的范围、包被膜 6 的长度在 35.0±0.1mm 的范围，样品垫 2 的长度在 25.0±0.1mm 的范围，检测线 3 与质控线 4 的距离在 5.0±0.1mm 的范围。经研究发现，上述优化的尺寸结构设计，可以使测定产品在满足检测的较高准确性的基础上获得较好的检测效率，并有效节省产品的材料。

[0048] 根据本发明的实施例，侧向流免疫层析测定产品的制备方法包括以下步骤：

[0049] （一）羧基修饰的磁性纳米粒子标记探针的制备

[0050] 采用适合的羧基修饰的磁性纳米粒子，活化其表面的羧基后，采用化学偶联的方式将单增李斯特菌抗体定向连接到该羧基修饰的磁性纳米粒子表面。

[0051] （二）测试区 T 线和 C 线处抗原 / 抗体的包被

[0052] 采用喷膜仪器，于测试区的 T 线处喷涂单增李斯特菌包被抗体，于 C 线处喷涂抗鼠 IgG 抗体。

[0053] （三）样品垫处标记探针的包被

[0054] 采用喷涂仪器，于样品垫特定位置处喷涂磁性微球标记的抗单增李斯特菌抗体（磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体）。

[0055] （四）反应板的组装成型

[0056] 按照反应板的结构图（见图 1）要求，于塑料支撑背板 7 中间粘贴作为测试区的硝酸纤维素（NC）膜，于 NC 膜的 T 线端粘贴样品垫 2，C 线端粘贴吸水垫 5。在其上面粘贴透明保护膜。采用试纸分切机，将整块反应板分切为一定宽带的纸条，用装有干燥剂的专门的

铝箔袋进行包装。

#### [0057] (五) 抗原-抗体磁标免疫复合物的形成

[0058] 于上述组装成型的反应板的加样孔处加入待测样品 1, 样品 1 中的单增李斯特菌与磁标记的单增李斯特菌抗体(磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体)结合后层析到 T 线处喷涂的单增李斯特菌包被抗体, 在 T 线处形成包被抗体-抗原-磁标记抗体免疫复合物, 多余的磁标单增李斯特菌抗体(磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体)则在 C 线处与抗鼠 IgG 形成的磁标免疫复合物。

#### [0059] (六) 磁标免疫复合物磁场强度检测

[0060] 用磁性试纸判读仪测定 T 线处磁性微球的磁场强度, 通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果, C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0061] 所述的磁标免疫复合物的磁场强度, 是指在 T 线和 C 线处分别滞留的结合磁珠的数量用美国 Quantum Dot 的磁共振检测仪 MAR 测定后所得到的数值。通过双抗体夹心免疫反应的条件, 研究发现, 经大量测定不同临床血清样本可确定出各不同正常样本的测定均值, 以此作为临界值(cutoff) 来确定 T 线检测样本的阳性或阴性结果。C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

#### [0062] 实施例 1、检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的制备

##### [0063] (一) 磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体的制备

[0064] 以饱和磁化强度为 40emu/g、平均直径为 100nm、直径变异系数(CV) 为 15% 的聚马来酸十六醇酯(PMAH) 修饰的磁性  $Fe_3O_4$  水溶性纳米晶(购自深圳市泰勒斯科技有限公司, 产品目录号为 MP-2) 作为羧基修饰的磁性纳米粒子, 以对单增李斯特菌亲和常数为  $10^8 M^{-1}$  的抗单增李斯特菌的鼠单克隆抗体(购自 Abnova 公司, 编号为 MAB0532) 作为待标记单增李斯特菌抗体, 按照下述方法制备磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体:

[0065] 取 2.5mg 的上述羧基修饰的磁性纳米粒子用 MES 缓冲液(0.1M、pH4.7) 洗涤并用 0.4T 的磁架分离富集后, 用 1ml MES 缓冲液(0.1M、pH4.7) 重悬, 加入 1-乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺(EDC) 至终浓度为 5mM、加入 NHS(N-羟基丁二酰亚胺) 至终浓度为 10mM, 在 37℃, 反应半小时得到活化后羧基修饰的磁性纳米粒子。

[0066] 用 50mM pH8.5 的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的磁性纳米粒子, 取 0.15mg 上述待标记单增李斯特菌抗体和 2.5mg 上述活化后羧基修饰的磁性纳米粒子混合到 50mM pH8.5 的硼砂缓冲液中充分混匀。37℃ 下反应 3.5 小时, 让抗体和磁性粒子形成稳定的肽键共价结合得到磁性纳米粒子与单增李斯特菌抗体的偶联物。反应结束后, 加入终浓度为 5% (质量百分含量) 的 BSA 溶液对磁性纳米粒子与单增李斯特菌抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭, 反应在 37℃ 下进行 0.5 小时。完成后, 用 pH7.4 的 0.02M PBS 缓冲液洗涤、重悬得到 25mg/ml 磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体液体, 4℃ 保存待用。

##### [0067] (二) 检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的制备

[0068] 以对单增李斯特菌亲和常数为  $10^8 M^{-1}$  的 Abnova 公司的编号为 MAB0529 抗单增李斯特菌的鼠单克隆抗体, 作为单增李斯特菌包被抗体, 以羊抗鼠 IgG 抗体作为与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体制备包被膜, 具体方法如下:

[0069] 采用 pH7.4 的 0.02M PBS 缓冲液, 将羊抗鼠 IgG 抗体(长沙博优生物科技有限公司, ABGAM-0500) 配制为浓度 1mg/ml 溶液, 将单增李斯特菌包被抗体(abcam 公司, ab36055)

的浓度配制为浓度 2mg/ml 溶液,选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet Quanti3000 喷头将羊抗鼠 IgG 抗体喷至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的质控线 (Control Line, C 线) 位置,将单增李斯特菌包被抗体喷至检测线 (Test Line, T 线) 位置,于相对湿度为 10% 以下的干燥车间进行抽湿 4 小时后干燥待用,得到具有检测线和质控线的包被膜。

[0070] 用上述膜处理缓冲液浸泡玻璃纤维纸 1 小时,浸泡的温度为 37℃,于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后,用上述膜处理缓冲液稀释步骤 (一) 磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体液体至磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体含量为 0.5mg/ml 后,采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 AirJet Quanti3000 喷头将其喷涂至上述处理过的硝酸纤维素膜上制备形成样品垫,于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的具有检测线和质控线的包被膜、上述样品垫、吸水纸 (作为吸水垫)、背板和保护膜按图 1 所示进行搭配组装后,采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 5mm/ 条的宽度,得到检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸,装入检测用夹片待用。该试纸的结构示意图如图 1 所示。

[0071] 实施例 2、检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度检测

[0072] 以甲醛灭活的单增李斯特菌作为待测样品来测定实施例 1 的检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度。

[0073] 将单增李斯特菌标准株 (NICPBP54002) 从 -20℃ 冰箱取出,以 LEB 培养基活化后,0.3% 甲醛灭活 12h 后用生理盐水配制成系列浓度 ( $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10$ CFU/mL) 的稀释液,分别加入由实施例 1 得到的检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸中,并采用磁共振检测仪 MAR (Magna BioSciences, 8094-101-01&8094-101-02) 读取 RMU (相对磁场强度)。检测步骤:检测前先将待检测样品恢复室温 (25℃),用精确移液器取待检测样品 50  $\mu$ l 垂直缓慢滴入实施例 1 得到的检测甲醛灭活单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的样品垫,然后滴入 100  $\mu$ l 上述 pH 为 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液,20 分钟后用 MAR 进行测试。该甲醛灭活单增李斯特菌中,CFU/mL 的定义为每毫升菌落含量。

[0074] 其检测结果如下表 1 所示。从检测结果中可以得出实施例 1 的检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的灵敏度为  $10^4$ CFU/mL (取 T/C 值 0.015 为 CUT-OFF, 大于等于 0.015 为阳性结果,小于 0.015 为阴性结果;T/C 值为 Test-RMU/Ct1RMU)。

[0075] 甲醛灭活单增李斯特菌磁性试纸检测值与浓度曲线图如图 3 所示。

[0076] 表 1 甲醛灭活单增李斯特菌不同浓度稀释液的磁性试纸检测值

[0077]

甲醛灭活单增李斯特菌稀释液浓度 (CFU/ML)	Ct1RMU	Ct1Fit	Test-RMU	Test-Fit	T/C
0	4470.5	0.992179	0	0.1282832	0
10 <sup>1</sup>	3535.9	0.9930847	0	0.2111996	0
10 <sup>2</sup>	5255.1	0.9912122	0	0.1564488	0
10 <sup>3</sup>	5072.5	0.9910438	0	0.1608884	0
10 <sup>4</sup>	5653.3	0.9908828	94.2	0.7986089	0.016663
10 <sup>5</sup>	5516.6	0.9913481	255.9	0.9796031	0.046387

[0078]

10 <sup>6</sup>	2681.6	0.9900503	2046.4	0.9933073	0.763126
10 <sup>7</sup>	743.3	0.9902592	3142	0.9883515	4.227095
10 <sup>8</sup>	330.1	0.9866393	2927.7	0.9857249	8.869131
10 <sup>9</sup>	425.7	0.9886535	1459.5	0.9926273	3.428471

[0079] 检测灵敏度为 10<sup>4</sup> 个 /mL, 即 500 个菌 / 检测, 线性范围在 10<sup>4</sup>-10<sup>8</sup>, 当浓度高到 10<sup>9</sup> 时, 检测值下降, 出现胡克效应。

[0080] 实施例 3、检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸的特异性检测

[0081] 选择绵羊李斯特菌 (*L. iuanuii*)、英诺克李斯特菌 (*L. innocua*)、威尔斯李斯特菌 (*L. welshimeri*)、西尔李斯特菌 (*L. seeligeri*)、格氏李斯特菌 (*L. grayi*)、大肠杆菌 0157 (*Escherichia coli*0157)、沙门氏菌作为交叉反应检测样品, 由实施例 1 得到的检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸进行检测, 除了与绵阳李斯特菌、西尔李斯特菌有交叉反应以外, 与其他检测样品无交叉。具体方法和结果如下: 将生理盐水溶解, 分别加入由实施例 1 得到的检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定试纸中, 并采用磁共振检测仪 MAR 读取 RMU。

[0082] 表 2 特异性检测结果

[0083]

TestName	Ct1RMU	Ct1Fit	Test-RMU	Test-Fit	T/C
沙门氏菌	7447.7	0.9858572	59	0.9829324	0.007922
大肠杆菌	7733.3	0.9796289	74.2	0.9888651	0.009595
绵羊李斯特菌	1748.1	0.986193	2274	0.9881458	1.300841
英洛克李斯特菌	6828.2	0.9875784	0	0.2110946	0

格氏李斯特菌	6507.1	0.9852532	47.8	0.8404327	0.007346
希尔李斯特菌	3850.5	0.9870803	2166.7	0.9891912	0.562706
威尔斯李斯特菌	8100.2	0.9792305	104.7	0.8817242	0.012926

[0084] 本发明的实验证明,通过对磁性复合粒子、单增李斯特菌和单增李斯特菌抗体分子特性的研究,通过选择适合的磁性复合粒子与特异性的抗体进行定向共价化学偶联,获得功能性的磁性标记探针,并通过优化双抗体夹心免疫反应的各种条件,制备得到本发明的侧向流免疫层析测定产品,实现了对单增李斯特菌的快速和高灵敏测定,具有如下优点:灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。本发明的侧向流免疫层析测定产品对单增李斯特菌的灵敏度达  $10^4$ CFU/mL。本发明可有效满足有关于单增李斯特菌的卫生检疫需要,对于相关疫情的监控和防范具有重要意义。

[0085] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

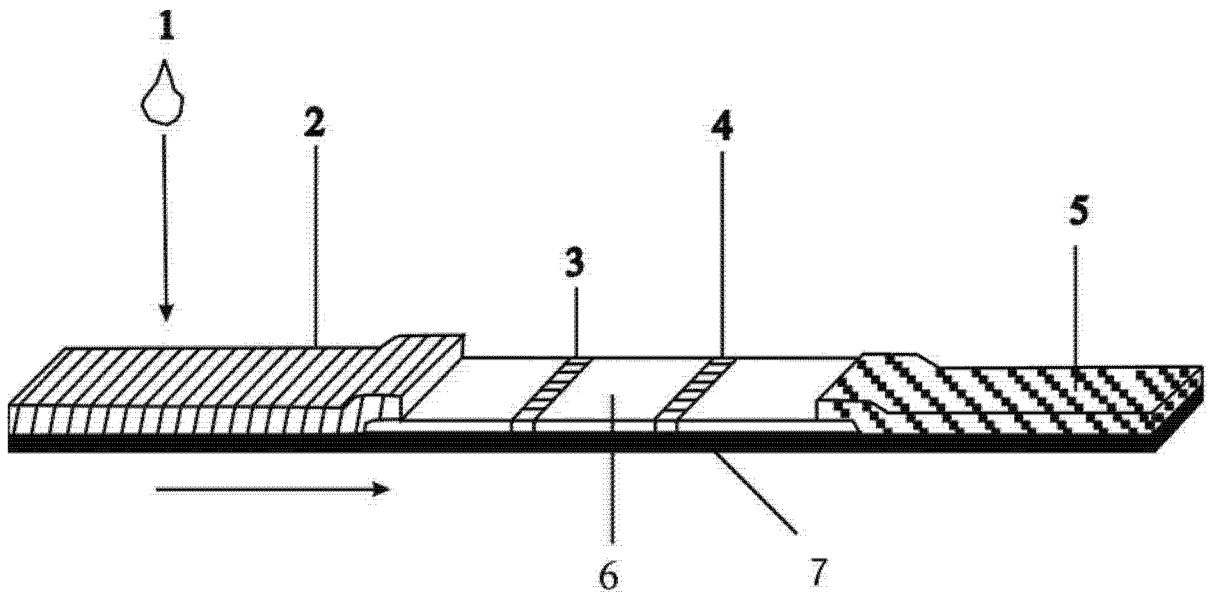


图 1

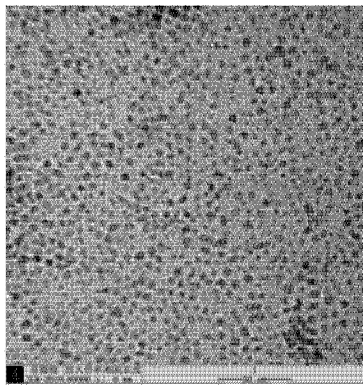


图 2

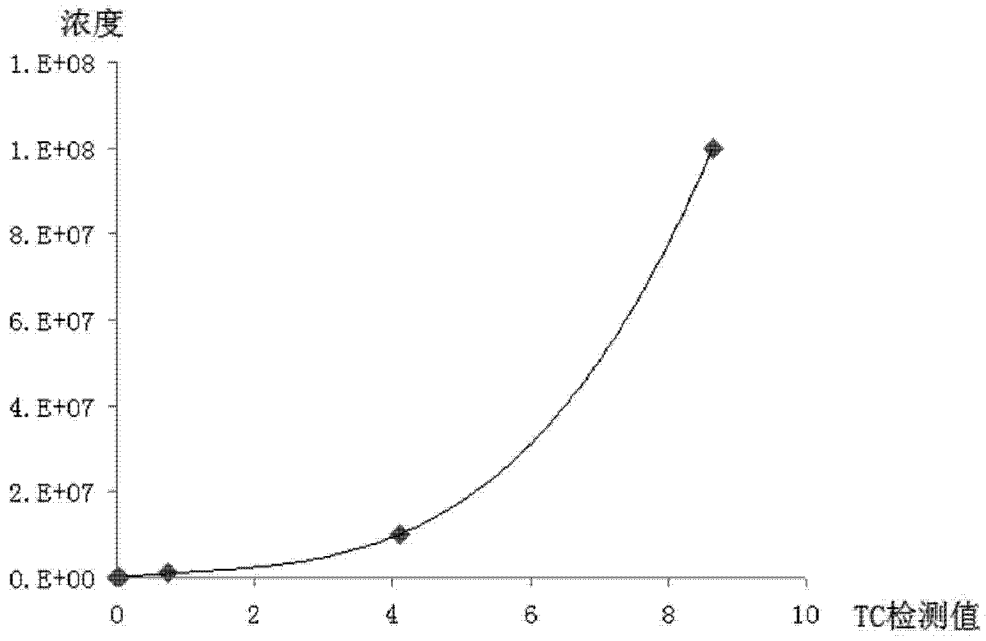


图 3

专利名称(译)	检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104237518A</a>	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201410174902.7	申请日	2014-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	深圳国际旅行卫生保健中心		
申请(专利权)人(译)	深圳国际旅行卫生保健中心		
当前申请(专利权)人(译)	深圳国际旅行卫生保健中心		
[标]发明人	史蕾 向军俭 马岚 赵芳 吴峰 闻一鸣 冬冰		
发明人	史蕾 向军俭 马岚 赵芳 吴峰 闻一鸣 冬冰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911 G01N33/577		
代理人(译)	王震宇		
其他公开文献	CN104237518B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测单增李斯特菌的侧向流免疫层析测定产品及制备方法，该产品包括相互连接的样品垫、吸水垫和具有相互分离的检测线和质控线的包被膜，所述包被膜位于所述样品垫和所述吸水垫之间，所述样品垫上负载有磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体，所述检测线包被有单增李斯特菌包被抗体，所述质控线包被有与所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体特异结合的第二抗体；所述磁性纳米粒子标记单增李斯特菌抗体为将待标记单增李斯特菌抗体和羧基修饰的磁性纳米粒子以肽键共价结合形成的聚合物。该测定产品用来检测单增李斯特菌，灵敏度高、特异性强、快速、简便，可实现客观化测定。

