

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510015656.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/569 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/558 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766614A

[22] 申请日 2005.10.27

[21] 申请号 200510015656.1

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫生  
学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道一号

[72] 发明人 李君文 王新为 金敏 湛志强

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事  
务所  
代理人 陆艺

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

## [54] 发明名称

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，包括如下步骤：(1)制备纳米免疫磁颗粒悬液：①葡聚糖纳米磁颗粒的制备；②纳米免疫磁颗粒悬液的制备；(2)免疫层析试纸条的制备(3)检测：①在检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液，吸附，磁板吸引，弃上清后洗涤，加入生理盐水制成悬液；②将免疫层析试纸条的样品板端插入悬液中；③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时，取出免疫层析试纸条，放置2~20分钟观察结果，本发明操作简便，不需要任何仪器设备，检测快速，纳米免疫磁颗粒浓集、分离病原体只需2~30分钟，免疫层析试纸条检测病原体只需2~15分钟，非常适于现场快速检测病原体。

1. 快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 制备纳米免疫磁颗粒悬液：

①葡聚糖纳米磁颗粒的制备：

a. 将 0.5~1.2 mol/L 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  水溶液 10~20ml 与 0.5~2.5mol/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  水溶液 2~6ml 混合，在氮气氛下，滴加至 10~30ml 的 30~70% 的葡聚糖 T-40 水溶液中，所述葡聚糖 T-40 水溶液的浓度为 g/ml 百分比浓度，混合，50~70℃，水浴 10~30 分钟，在 150~500 转/分钟的搅拌下，10~30 分钟内，向混合液中滴加 3~7 mol/L 的氨水 35-45ml，温度保持 50~70℃，并始终通氮气，制成悬液；

b. 将悬液用乙酸或稀盐酸调至 pH 为 6.0-8.0；

c. 将悬液中的聚集体在离心力为  $600 \times g$ ，离心 10~20 分钟去除；游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离，洗脱平衡液为 pH 为 6~pH 为 8 的 0.005~0.02mol/L 磷酸盐缓冲液，收集的颗粒冷冻干燥，使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5~10mg/ml；

d. 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 0.5~2.0ml，加入 10~30mmol/L  $\text{NaIO}_4$  水溶液 0.25ml，150 转/分钟避光阻氧震荡 0.5~12 小时后，加入 1-3mol/L 乙二醇的水溶液 0.1~0.3ml 终止氧化，用 pH 为 6~pH 为 8 的 0.005-0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 4℃透析 18~48 小时，去除过量的  $\text{NaIO}_4$ ，使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 3~8mg/ml；

②纳米免疫磁颗粒悬液的制备

向葡聚糖纳米磁颗粒悬液中加入 10~30  $\mu\text{g}/\text{mg}$  葡聚糖纳米磁颗粒量的 SARS 冠状病毒抗体或霍乱弧菌抗体或嗜肺军团杆菌抗体或沙门氏菌抗体或副溶血弧菌抗体或流行性感冒病毒抗体或丙型肝炎病毒抗体，混匀后，4℃避光放置 6~24 小时，加入 0.2~1mol/L  $\text{NaBH}_4$  水溶液还原 10~60 分钟，加入  $\text{NaBH}_4$  的量为 0.1~0.5ml/ml 葡聚糖纳米磁颗粒悬液，多余的抗体用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱过滤与结合物分离，制成纳米免疫磁颗粒悬液；

(2) 免疫层析试纸条的制备

在纸质或塑料载体表面设置硝酸纤维素膜，在所述硝酸纤维素膜表面的一端设置样品板，在所述硝酸纤维素膜与样品板之间设置胶体金探针结合物垫，所述胶体金探针结合物垫的长度为所述样品板长度的 1/4~1/2，所述胶体金探针结合物垫的一端与所述样品板的近中端齐平，所述硝酸纤维素膜表面的另一端设置吸水纸，在所述样品板与所述吸水纸之间依次设置对照线、病原体检测线，所述胶体金探针结合物垫结合有 SARS 冠状病毒抗体或霍乱弧菌抗体或嗜肺军团杆菌抗体或沙门氏菌抗体或副溶血弧菌抗体或流行性感冒病毒抗体或丙型肝炎病毒抗体；

(3) 检测

①在 1ml 检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液 2~20  $\mu\text{l}$ ，吸附 3~20 分钟，在 15~35℃，

磁板吸引 2-10 分钟，弃上清后用含体积百分比为 0.05%~0.1%的吐温-20 的 0.005~0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 0.5~1.0ml 洗涤一次，加入 0.5~5.0ml 生理盐水制成悬液；②将免疫层析试纸条的样品板端插入步骤①制成的悬液中，控制所述悬液不要没过样品板的近中端；③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时，取出免疫层析试纸条，放置 2~20 分钟观察结果。

## 快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法

### 技术领域

本发明涉及一种分离、浓缩与检测病原体的方法。

### 背景技术

在人类历史上，传染病曾是人类健康与生命的大敌，夺去过千百万人的生命，给人类造成巨大的灾难。但人类一直在与传染病进行着长期不懈的斗争，并在二十世纪初及中期消灭了天花，脊髓灰质炎、小儿破伤风等即将被消灭，许多传染病受到控制等。然而，进入二十世纪70年代以来，在人类传染病防治方面又出现了许多新情况，主要表现在：一些被控制的传染病又死灰复燃、卷土重来，如霍乱、结核等，重新对人类健康构成威胁；另外，一系列新传染病相继出现或被发现，其中一些已经给人类带来了巨大灾难和恐慌，如传染性非典型肺炎(SARS)、在非洲流行的埃博拉出血热、全世界流行的艾滋病等。

不论是已有传染病的死灰复燃还是新发现的传染病，若想得到有效控制，必须遵循早发现传染源、切断传播途径、保护易感人群这一经典的传染病防治策略，其中早期发现传染源是最有效的一个环节，而建立一套快速、准确、敏感的病原体检测方法是实现早期发现病原体的唯一途径。

目前，针对病原体的快速检测方法主要包括：酶联免疫吸附试验(ELISA)、PCR、免疫荧光技术、生物芯片技术、直接显微镜或电镜染色技术等，这些技术都需要昂贵的仪器设备、并必须由专门受过培训的人员操作。二十世纪80年代初发展起来一种新的免疫检测技术——免疫层析技术。它借助毛细作用，使样品在条状纤维制成的膜上泳动，其中的待测物与膜上一定区域的配体结合，通过酶促显色反应或直接使用着色标记物。该技术的优点是检测速度快，5~15分钟即可出结果；不须进行结合标记物与自由标记物的分离，省去了烦琐的加样、洗涤步骤，因而操作简单；且不需仪器，非常适合现场检测之用。目前有人用此技术检测早早孕以及结核杆菌、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、耶尔森氏菌等病原微生物。但该技术目前仍存在假阳性及假阴性率较高等问题，原因可能与胶体金材料(尤其是胶体金的粒径)，抗体纯度、特异性，膜材料，样品处理等有关。

目前应用的病原体快速检测技术绝大多数是建立在微生物的纯培养基基础上的，如果将样品处理、纯化、浓集时间算在内，则所需时间仍很长。因此，解决微生物的快速、高效分离与浓集技术也是实现病原体快速检测的关键技术之一。中国专利CN200410094032.9公开了“一种纳米免疫磁颗粒制备方法及应用”，在样品的分离和浓缩过程中，该项发明的纳米免疫磁颗粒技术具有多方面的优点，包括特异性强、分离效果较好、操作简便、使用范围广(几乎可用于所有样品的处理)等。

中国专利CN03142652.2公开了“免疫纸层析条及用其快速检测食品中致病菌和毒素的方法”它可以快速地检测样品中所含有的细菌或毒素,但实验中我们发现,这种检测方法对于被检样品所含病原体量很少的情况下,不易检出。而一些可以引起“重要疾病”的病原体如:嗜肺军团杆菌、霍乱弧菌、沙门氏菌、副溶血弧菌、流行性感病毒、丙型肝炎病毒及引起SARS的病原体—冠状病毒变种的快速分离、浓集与检测关系到社会的稳定和人民的健康安全。

嗜肺军团杆菌可以引起军团病,军团病临床表现为发热、周身酸痛、咳嗽、胸痛、呼吸困难和腹泻等,肺部X光片有肺炎改变,死亡率15.4%(美国资料),军团病在临床表现上与SARS基本一样,但几乎无传染性。因此,如何快速检测与诊断军团病,或者说如何快速区分检测与诊断军团病和SARS对早期发现、隔离、治疗与控制SARS具有十分重要的意义。目前,分离培养和直接免疫荧光技术是检测军团病病原体的最常用方法,但操作繁琐、耗时很长(7~14天),而且嗜肺军团杆菌培养很困难,必须用特殊的培养基。PCR及其相关技术在嗜肺军团杆菌检测方面屡有报道,并被认为是较有前途的快速检测技术,然而,检测时间仍需4~8小时。

目前普遍认为引起SARS的病原体为冠状病毒变种,目前已经报道了几种快速检测方法,如PCR技术、基因芯片、ELISA技术、免疫荧光技术及病原体分离培养等。这些检测方法本身需要2个小时或更长时间。样品处理目前能见到的报道包括5月8日由国家质检总局中国进出口商品检验技术研究所研制开发的食品、动植物及其产品中SARS病毒检测方法中包含病毒的富集与分离内容,但采用的仍是传统的技术;东南大学吴健雄实验室报道一种“空气中SARS病毒快速浓集装置”,他们采用一种类似于鼻腔结构和鼻粘膜材料的气体吸收浓集病毒并利用PCR技术进行病毒检测。但WHO传染病部门项目负责人斯托尔认为上述检测与诊断技术都需要专业人员在专业实验室中进行,耗时太长,临床上急需的是操作简单、结果准确、快速的检测与诊断方法或技术。

霍乱弧菌的检测与诊断主要靠传统的分离培养与生化鉴定技术,由于涉及细菌分离、浓集与纯化步骤,所以一般需要7~15天左右时间才能确诊,给预防与治疗带来很大困难。

#### 发明内容

本发明的目的是提供一种快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法。本发明可以将待检样本中小于 $10^6$ 个致病微生物/ml的重要疾病病原体进行分离、浓集并进行检测。

本发明的技术方案概述如下:

一种快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法,其特征是包括如下步骤:

(1) 制备纳米免疫磁颗粒悬液:

① 葡聚糖纳米磁颗粒的制备:

a. 将 $0.5\sim 1.2\text{ mol/L}$ 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 $10\sim 20\text{ml}$ 与 $0.5\sim 2.5\text{ mol/L}$ 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 $2\sim 6\text{ml}$ 混合,在氮气气氛下,滴加至 $10\sim 30\text{ml}$ 的 $30\sim 70\%$ 的葡聚糖T-40水溶液中,所述葡聚糖T-40水溶液的浓度为 $\text{g/ml}$ 百分比浓度,混合, $50\sim 70^\circ\text{C}$ ,水浴 $10\sim 30$ 分钟,在 $150\sim 500$ 转/分钟的搅拌下, $10\sim 30$ 分钟内,向混合液中滴加 $3\sim 7\text{ mol/L}$ 的氨水 $35\sim 45\text{ml}$ ,

温度保持 50~70°C, 并始终通氮气, 制成悬液;

b. 将悬液用乙酸或稀盐酸调至 pH 为 6.0-8.0;

c. 将悬液中的聚集体在离心力为  $600\times g$ , 离心 10~20 分钟去除; 游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离, 洗脱平衡液为 pH 为 6~pH 为 8 的 0.005~0.02mol/L 磷酸盐缓冲液, 收集的颗粒冷冻干燥, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5~10mg/ml;

d. 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 0.5~2.0ml, 加入 10~30mmol/L  $\text{NaIO}_4$  水溶液 0.25ml, 150 转/分钟避光阻氧震荡 0.5~12 小时后, 加入 1-3mol/L 乙二醇的水溶液 0.1~0.3ml 终止氧化, 用 pH 为 6~pH 为 8 的 0.005-0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 4°C 透析 18~48 小时, 去除过量的  $\text{NaIO}_4$ , 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 3~8mg/ml;

## ②纳米免疫磁颗粒悬液的制备

向葡聚糖纳米磁颗粒悬液中加入 10~30  $\mu\text{g}/\text{mg}$  葡聚糖纳米磁颗粒量的 SARS 冠状病毒抗体或霍乱弧菌抗体或嗜肺军团杆菌抗体或沙门氏菌抗体或副溶血弧菌抗体或流行性感冒病毒抗体或丙型肝炎病毒抗体, 混匀后, 4°C 避光放置 6~24 小时, 加入 0.2~1mol/L  $\text{NaBH}_4$  水溶液还原 10~60 分钟, 加入  $\text{NaBH}_4$  的量为 0.1~0.5ml/ml 葡聚糖纳米磁颗粒悬液, 多余的抗体用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱过滤与结合物分离, 制成纳米免疫磁颗粒悬液;

## (2) 免疫层析试纸条的制备

在纸质或塑料载体表面设置硝酸纤维素膜, 在所述硝酸纤维素膜表面的一端设置样品板, 在所述硝酸纤维素膜与样品板之间设置胶体金探针结合物垫, 所述胶体金探针结合物垫的长度为所述样品板长度的 1/4~1/2, 所述胶体金探针结合物垫的一端与所述样品板的近中端齐平, 所述硝酸纤维素膜表面的另一端设置吸水纸, 在所述样品板与所述吸水纸之间依次设置对照线、病原体检测线, 所述胶体金探针结合物垫结合有 SARS 冠状病毒抗体或霍乱弧菌抗体或嗜肺军团杆菌抗体或沙门氏菌抗体或副溶血弧菌抗体或流行性感冒病毒抗体或丙型肝炎病毒抗体;

## (3) 检测

①在 1ml 检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液 2~20  $\mu\text{l}$ , 吸附 3~20 分钟, 在 15~35°C, 磁板吸引 2-10 分钟, 弃上清后用含体积百分比为 0.05%~0.1% 的吐温-20 的 0.005~0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 0.5~1.0ml 洗涤一次, 加入 0.5~5.0ml 生理盐水制成悬液; ②将免疫层析试纸条的样品板端插入步骤①制成的悬液中, 控制所述悬液不要没过样品板的近中端; ③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时, 取出免疫层析试纸条, 放置 2~20 分钟观察结果。

本发明的优点是:

- 1、操作简便, 不需要任何仪器设备;
- 2、检测快速, 纳米免疫磁颗粒浓集、分离病原体只需 2~30 分钟, 免疫层析试纸条检测病原体只需 2~15 分钟, 非常适于现场快速检测病原体;
- 3、这套技术可以明显提高病原体的检测灵敏度, 比 ELISA (酶联免疫吸附试验) 灵敏度

提高1~3个数量级。

#### 附图说明

图1为本发明采用TECNAI-20透射电子显微镜拍得的纳米免疫磁颗粒电镜照片,放大倍数:×100000。照片显示葡聚糖纳米磁颗粒核心大小为5~10nm。

图2为免疫层析试纸条的结构示意图。

#### 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明:

##### 实施例1

纳米免疫磁颗粒的制备:

##### ①葡聚糖纳米磁颗粒的制备:

a. 将1.0 mol/L的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液15ml与2.0mol/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液4ml混合,在氮气氛下,滴加至20ml的50%的葡聚糖T-40水溶液中,所述葡聚糖T-40水溶液的浓度为g/ml百分比浓度,混合,60℃,水浴20分钟,在转速为300转/分钟的搅拌下,20分钟内,向混合液中滴加5 mol/L的氨水40ml,温度保持60℃,并始终通氮气,制成悬液;

b. 将悬液用乙酸调至pH为7.0;

c. 将悬液中的聚集体在离心力为 $600 \times g$ ,离心15分钟去除;游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖S-300凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离,洗脱平衡液为pH为7的0.01mol/L磷酸盐缓冲液,收集的颗粒冷冻干燥,使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为8mg/ml;

d. 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液1.0ml,加入20mmol/L  $\text{NaIO}_4$ 水溶液0.25ml,150转/分钟避光阻氧震荡6小时后,加入2mol/L乙二醇的水溶液0.2ml终止氧化,用pH为7的0.01mol/L磷酸盐缓冲液4℃透析24小时,去除过量的 $\text{NaIO}_4$ ,使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为5mg/ml;

##### ②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备

向葡聚糖纳米磁颗粒悬液中加入 $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ 葡聚糖纳米磁颗粒量的SARS冠状病毒抗体,混匀后,4℃避光放置12小时,加入0.6mol/L  $\text{NaBH}_4$ 水溶液还原30分钟,加入 $\text{NaBH}_4$ 的量为0.3ml/ml葡聚糖纳米磁颗粒悬液,多余的抗体用Sephacryl S-300凝胶层析柱过滤与结合物分离,制成纳米免疫磁颗粒悬液;

##### (2) 免疫层析试纸条的制备

(见图2)在纸质载体1的表面设置硝酸纤维素膜2,在所述硝酸纤维素膜表面的一端设置纸质的样品板3,在所述硝酸纤维素膜与样品板之间设置胶体金探针结合物垫4,所述胶体金探针结合物垫的长度为所述样品板长度的1/4,所述胶体金探针结合物垫的一端与所述样品板的近中端齐平,所述硝酸纤维素膜表面的另一端设置吸水纸5,在所述样品板与所述吸水纸之间依次设置对照线6、病原体检测线7,所述胶体金探针结合物垫结合有SARS冠状病毒抗体;

对照线是通过机器喷涂或手工描划的浓度为2mg/ml的羊抗兔抗体水溶液或羊抗鼠抗体水溶液或葡萄球菌A蛋白水溶液线;

病原体检测线是通过机器喷涂或手工描划的浓度为 0.5~3mg/ml SARS 冠状病毒抗体的线。

### (3) 检测

①在 1ml 检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液 10  $\mu$ l, 吸附 10 分钟, 在 20 $^{\circ}$ C, 磁板吸引 6 分钟, 弃上清后用含体积百分比为 0.08% 的吐温-20 的 0.008mol/L 的磷酸盐缓冲液 0.8ml 洗涤一次, 加入 2ml 生理盐水制成悬液; ②将免疫层析试纸条的样品板端插入步骤①制成的悬液中, 控制所述悬液不要没过样品板的近中端; ③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时, 取出免疫层析试纸条, 放置 10 分钟观察结果。

检测样品包括临床样品(如, 血液、痰液、尿、脑脊液、粪便、唾液), 食品(畜禽肉类、海产品、牛奶、蛋、饭、菜、饮料), 环境样品(各种水—饮用水、纯净水、污水、河水、湖水)。

### 实施例 2

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法, 包括如下步骤:

#### (1) 制备纳米免疫磁颗粒悬液:

##### ①葡聚糖纳米磁颗粒的制备:

a. 将 0.5mol/L 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  水溶液 20ml 与 2.5mol/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  水溶液 2ml 混合, 在氮气氛下, 滴加至 10ml 的 70% 的葡聚糖 T-40 水溶液中, 所述葡聚糖 T-40 水溶液的浓度为 g/ml 百分比浓度, 混合, 50 $^{\circ}$ C, 水浴 30 分钟, 在 150 转/分钟搅拌下, 10 分钟内, 向混合液中滴加 3 mol/L 的氨水 45ml, 温度保持 50 $^{\circ}$ C, 并始终通氮气, 制成悬液;

b. 将悬液用调至 pH 为 6.0;

c. 将悬液中的聚集体在离心力为 600 $\times$ g, 离心 10 分钟去除; 游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离, 洗脱平衡液为 pH 为 6 的 0.005mol/L 磷酸盐缓冲液, 收集的颗粒冷冻干燥, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5mg/ml;

d. 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 0.5ml, 加入 10mmol/L  $\text{NaIO}_4$  水溶液 0.25ml, 150 转/分钟避光阻氧震荡 0.5 小时后, 加入 1mol/L 乙二醇的水溶液 0.3ml 终止氧化, 用 pH 为 6 的 0.005mol/L 磷酸盐缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析 48 小时, 去除过量的  $\text{NaIO}_4$ , 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 3mg/ml;

##### ②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备

向葡聚糖纳米磁颗粒悬液中加入 10  $\mu$ g/mg 葡聚糖纳米磁颗粒量的霍乱弧菌抗体, 混匀后, 4 $^{\circ}$ C 避光放置 6 小时, 加入 0.2mol/L  $\text{NaBH}_4$  水溶液还原 60 分钟, 加入  $\text{NaBH}_4$  的量为 0.1ml/ml 葡聚糖纳米磁颗粒悬液, 多余的抗体用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱过滤与结合物分离, 制成纳米免疫磁颗粒悬液;

#### (2) 免疫层析试纸条的制备

在纸质或塑料载体表面设置硝酸纤维素膜, 在所述硝酸纤维素膜表面的一端设置样品板, 在所述硝酸纤维素膜与样品板之间设置胶体金探针结合物垫, 所述胶体金探针结合物

垫的长度为所述样品板长度的 1/2, 所述胶体金探针结合物垫的一端与所述样品板的近中端齐平, 所述硝酸纤维素膜表面的另一端设置吸水纸, 在所述样品板与所述吸水纸之间依次设置对照线、病原体检测线, 所述胶体金探针结合物垫结合有霍乱弧菌抗体;

对照线是通过机器喷涂或手工描划的浓度为 2mg/ml 的羊抗兔抗体水溶液或羊抗鼠抗体水溶液或葡萄球菌 A 蛋白水溶液线。

病原体检测线是通过机器喷涂或手工描划的浓度为 0.5~3mg/ml 霍乱弧菌抗体线。

### (3) 检测

①在 1ml 检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液 2 $\mu$ l, 吸附 20 分钟, 在 35 $^{\circ}$ C, 磁板吸引 2 分钟, 弃上清后用含体积百分比为 0.05% 的吐温-20 的 0.005mol/L 的磷酸盐缓冲液 1.0ml 洗涤一次, 加入 0.5ml 生理盐水制成悬液; ②将免疫层析试纸条的样品板端插入步骤①制成的悬液中, 控制所述悬液不要没过样品板的近中端; ③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时, 取出免疫层析试纸条, 放置 20 分钟观察结果。

### 实施例 3

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法, 包括如下步骤:

#### (1) 制备纳米免疫磁颗粒悬液:

##### ①葡聚糖纳米磁颗粒的制备:

a. 将 1.2 mol/L 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  水溶液 10ml 与 0.5mol/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  水溶液 6ml 混合, 在氮气氛下, 滴加至 30ml 的 30% 的葡聚糖 T-40 水溶液中, 所述葡聚糖 T-40 水溶液的浓度为 g/ml 百分比浓度, 混合, 70 $^{\circ}$ C, 水浴 10 分钟, 在 500 转/分钟搅拌下, 30 分钟内, 向混合液中滴加 7 mol/L 的氨水 35ml, 温度保持 70 $^{\circ}$ C, 并始终通氮气, 制成悬液;

b. 将悬液用乙酸调至 pH 为 8.0;

c. 将悬液中的聚集体在离心力为 600 $\times$ g, 离心 20 分钟去除; 游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离, 洗脱平衡液为 pH 为 8 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液, 收集的颗粒冷冻干燥, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 10mg/ml;

d. 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 2.0ml, 加入 30mmol/L  $\text{NaIO}_4$  水溶液 0.25ml, 150 转/分钟避光阻氧震荡 12 小时后, 加入 3mol/L 乙二醇的水溶液 0.1ml 终止氧化, 用 pH 为 8 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析 18 小时, 去除过量的  $\text{NaIO}_4$ , 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 8mg/ml;

##### ②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备

向葡聚糖纳米磁颗粒悬液中加入 30 $\mu$ g/mg 葡聚糖纳米磁颗粒量的嗜肺军团杆菌抗体, 混匀后, 4 $^{\circ}$ C 避光放置 24 小时, 加入 1mol/L  $\text{NaBH}_4$  水溶液还原 10 分钟, 加入  $\text{NaBH}_4$  的量为 0.5ml/ml 葡聚糖纳米磁颗粒悬液, 多余的抗体用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱过滤与结合物分离, 制成纳米免疫磁颗粒悬液;

#### (2) 免疫层析试纸条的制备

在纸质或塑料载体表面设置硝酸纤维素膜, 在所述硝酸纤维素膜表面的一端设置样品

板，在所述硝酸纤维素膜与样品板之间设置胶体金探针结合物垫，所述胶体金探针结合物垫的长度为所述样品板长度的 1/3，所述胶体金探针结合物垫的一端与所述样品板的近中端齐平，所述硝酸纤维素膜表面的另一端设置吸水纸，在所述样品板与所述吸水纸之间依次设置对照线、病原体检测线，所述胶体金探针结合物垫结合有嗜肺军团杆菌抗体；

对照线是通过机器喷涂或手工描划的浓度为 2mg/ml 的羊抗兔抗体水溶液或羊抗鼠抗体水溶液或葡萄球菌 A 蛋白水溶液线。

病原体检测线是通过机器喷涂或手工描划的浓度为 0.5~3mg/ml 嗜肺军团杆菌抗体线。

### (3) 检测

①在 1ml 检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液 20  $\mu$ l，吸附 3 分钟，在 15 $^{\circ}$ C，磁板吸引 10 分钟，弃上清后用含体积百分比为 0.1%的吐温-20 的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 0.5ml 洗涤一次，加入 5.0ml 生理盐水制成悬液；②将免疫层析试纸条的样品板端插入步骤①制成的悬液中，控制所述悬液不要没过样品板的近中端；③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时，取出免疫层析试纸条，放置 2 分钟观察结果。

#### 实施例 4

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，步骤同实施例 1，将其中的步骤（1）中②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备中的 SARS 冠状病毒抗体用沙门氏菌抗体取代；步骤（2）中免疫层析试纸条的制备中胶体金探针结合物垫结合有沙门氏菌抗体；病原体检测线为沙门氏菌抗体的线。

#### 实施例 5

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，步骤同实施例 1，将其中的步骤（1）中②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备中的 SARS 冠状病毒抗体用副溶血弧菌抗体取代；步骤（2）中免疫层析试纸条的制备中胶体金探针结合物垫结合有副溶血弧菌抗体；病原体检测线为副溶血弧菌抗体的线。

#### 实施例 6

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，步骤同实施例 2，将其中的步骤（1）中②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备中的霍乱弧菌抗体用流行性感冒病毒抗体取代；步骤（2）中免疫层析试纸条的制备中胶体金探针结合物垫结合有流行性感冒病毒抗体；病原体检测线为流行性感冒病毒抗体的线。

#### 实施例 7

快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，步骤同实施例 3，将其中的步骤（1）中②纳米免疫磁性颗粒悬液的制备中的嗜肺军团杆菌抗体用丙型肝炎病毒抗体取代；步骤（2）中免疫层析试纸条的制备中胶体金探针结合物垫结合有丙型肝炎病毒抗体；病原体检测线为丙型肝炎病毒抗体的线。

#### 实施例 8 临床样品中病原体的快速检测

取怀疑霍乱患者的腹泻病人粪便 10ml 放入一锥形瓶中，加生理盐水 10ml，剧烈振荡，稍静置，取上清液在 1ml，加入实施例 1 制备的纳米免疫磁性颗粒悬液 5  $\mu$ l 孵育 30

分钟，磁板吸引 10 分钟，弃上清后用含体积百分比为 0.05%的吐温-20 的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤一次，在 15 分钟内使相应的霍乱弧菌分离，用 1ml 生理盐水冲悬磁颗粒，将免疫层析试纸条的样品板端放置于待检样品内，待样品液泳动到吸收板垫时，取出免疫层析试纸，放置 5 分钟观察结果。若结果显示对照线和检测线均出现红色，则检测结果为阳性，若对照线出现红色，不出现红色检测线，则结果为阴性，若两条线均不出现，则检测失败。

#### 实施例 9 人工染 SARS 冠状病毒样品的快速检测

在 1ml 尿液，或呼吸道分泌物，或血液，或粪便中加入  $10^7$  / ml TCID<sub>50</sub> (组织半数感染剂量) 的 SARS 冠状病毒，加生理盐水 1ml，剧烈振摇，稍静置，取上清液在 1ml，加入实施例 1 制备的纳米免疫磁性颗粒悬液 5  $\mu$ l 孵育 30 分钟，磁板吸引 10 分钟，弃上清后用含体积百分比为 0.05%的吐温-20 的 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤一次，在 15 分钟内使相应的 SARS 冠状病毒分离。用 1ml 生理盐水冲悬磁颗粒，将免疫层析试纸条放置于待检样品内，(放置的高度不可超过检测试纸条中的胶体金结合物垫)，待样品液泳动到吸收板垫时，取出免疫层析试纸，放置 5 分钟观察结果。若结果显示对照线和检测线均出现红色，则检测结果为阳性，若对照线出现红色，不出现红色检测线，则结果为阴性，若两条线均不出现，则检测失败。

#### 实施例 10 人工染沙门氏菌食品的快速检测

米饭、切成片状的馒头以及市场上购卖的酱猪肝、猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉生熟各 50g，切成小片，放入洁净锥形瓶中，加  $10^3$  / ml 甲型沙门氏菌 (菌种号为 50004 购自于卫生部国家菌种保存中心) 10ml，一定时间培养。固体样品取 10g 放入另一锥形瓶中，加生理盐水 90ml，剧烈振摇，稍静置，取上清液用于检测；牛奶取 1ml 用 9ml 生理盐水稀释后直接用于检测，各稀释样品液用琼脂计数法计细菌总数。在 1ml 检测样本中，加入实施例 1 制备的纳米免疫磁性颗粒悬液 20  $\mu$ l 孵育 5 分钟，磁板吸引 2 分钟，弃上清后用含体积百分比为 0.1%的吐温-20 的 0.005mol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤一次，在 10 分钟内使相应的沙门氏菌分离。用 1ml 生理盐水冲悬磁颗粒，将免疫层析试纸条放置于待检样品内，待样品液泳动到吸收板垫时，取出免疫层析试纸，放置 5 分钟观察结果。若结果显示对照线和检测线均出现红色，则检测结果为阳性，若对照线出现红色，不出现红色检测线，则结果为阴性，若两条线均不出现，则检测失败。

#### 实施例 11 人工染嗜肺军团杆菌水样的快速检测

在 10ml 水样中加入  $10^9$  / ml 嗜肺军团杆菌 (I 型)。取 1ml 样品，加入实施例 1 制备的纳米免疫磁性颗粒悬液 20  $\mu$ l 孵育 5 分钟，磁板吸引 2 分钟，弃上清后用含体积百分比为 0.1%的吐温-20 的 0.005mol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤一次，在 10 分钟内使相应的嗜肺军团杆菌分离。用 1ml 生理盐水冲悬磁颗粒，将免疫层析试纸条放置于待检样品内，待样品液泳动到吸收板垫时，取出免疫层析试纸，放置 5 分钟观察结果。若结果显示对照线和检测线均出现红色，则检测结果为阳性，若对照线出现红色，不出现红色检测线，则结果为阴性，若两条线均不出现，则检测失败。

---

霍乱弧菌、沙门氏菌、副溶血弧菌在中国医学细菌保藏管理中心保存，保藏号分别为：CMCC16001、CMCC50013、CMCC20001。按规定程序，研究人员可以从该所获得。

SARS 冠状病毒、流行性感冒病毒、丙型肝炎病毒毒株在中国疾病预防控制中心病毒所保存，但无保藏号。按规定程序，研究人员可以从该所获得。

嗜肺军团杆菌在中国疾病预防控制中心流行病研究所保存，但无保藏号。按规定程序，研究人员可以从该所获得。

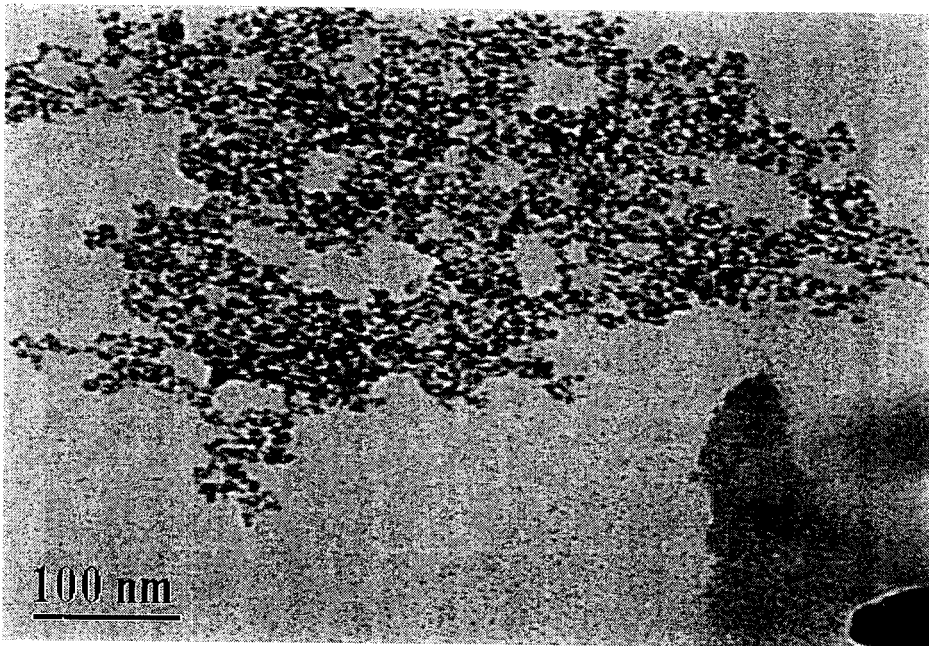


图1

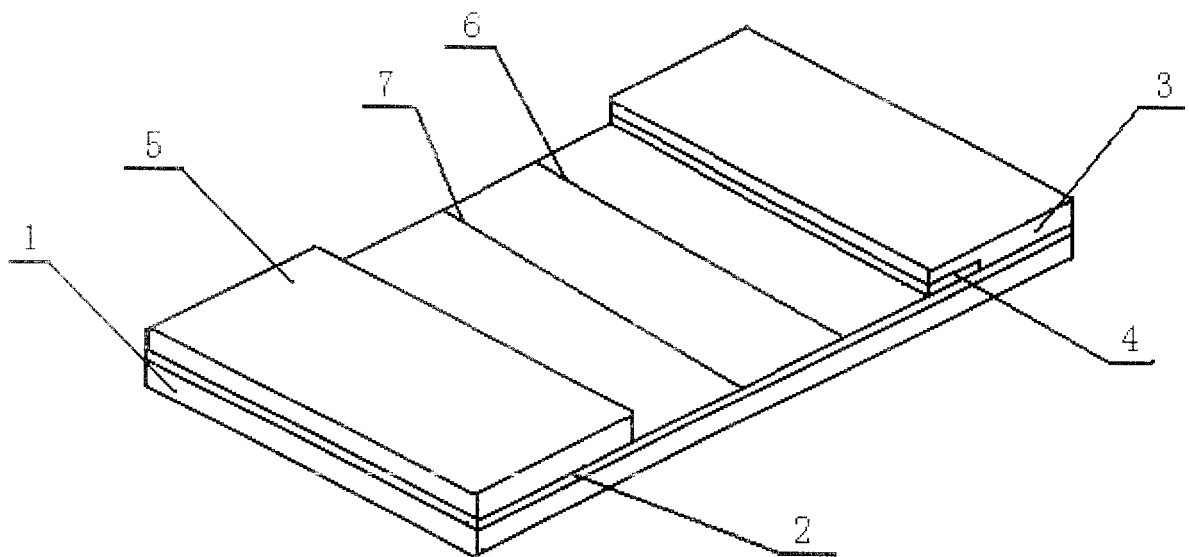


图2

专利名称(译)	快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1766614A</a>	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510015656.1	申请日	2005-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	李君文 王新为 金敏 谌志强		
发明人	李君文 王新为 金敏 谌志强		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/569		
代理人(译)	陆艺		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种快速分离、浓集与检测重要疾病病原体的方法，包括如下步骤：(1)制备纳米免疫磁颗粒悬液：①葡聚糖纳米磁颗粒的制备；②纳米免疫磁颗粒悬液的制备；(2)免疫层析试纸条的制备(3)检测：①在检测样本中加入纳米免疫磁颗粒悬液，吸附，磁板吸引，弃上清后洗涤，加入生理盐水制成悬液；②将免疫层析试纸条的样品板端插入悬液中；③观察免疫层析试纸条上的溶液泳动到吸收纸时，取出免疫层析试纸条，放置2~20分钟观察结果，本发明操作简便，不需要任何仪器设备，检测快速，纳米免疫磁颗粒浓集、分离病原体只需2~30分钟，免疫层析试纸条检测病原体只需2~15分钟，非常适于现场快速检测病原体。

