



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107860911 A

(43)申请公布日 2018.03.30

(21)申请号 201711144839.2

(22)申请日 2017.11.17

(71)申请人 河南省科学院生物研究所有限责任  
公司

地址 450003 河南省郑州市花园路28号

(72)发明人 杨书豪 王玉金 李珊珊 刘丽  
杜迅 刁文涛 胡宜亮 宁萌  
向凌云 王雪研 冯菲

(74)专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通  
合伙) 41113

代理人 胡雨薇

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/559(2006.01)

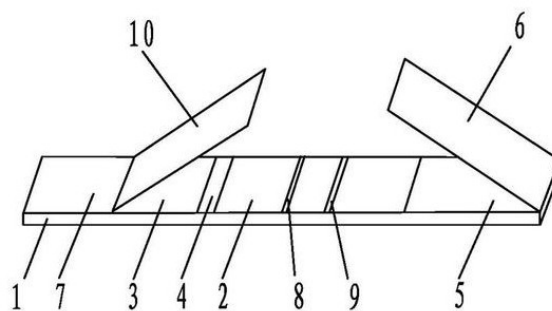
权利要求书4页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种致病性沙门氏菌测试条的制备方法

(57)摘要

本发明涉及致病性沙门氏菌测试条的制备方法,可有效解决现有检测方法费时、繁琐的问题,技术方案是,包括基材PVC、玻璃纤维和硝酸纤维膜,基材PVC板上固定有第一覆膜、引水玻璃纤维、载体玻璃纤维、硝酸纤维膜和吸水棉浆板,硝酸纤维膜上包被有检测区和质控区,引水玻璃纤维和载体玻璃纤维上覆盖有第二覆膜,吸水棉浆板上覆盖有第三覆膜;制备方法:制备纯化的单克隆抗体、制备胶体金颗粒、制备标记物、包被纤维膜、组装测试条;测试条采用胶体金免疫层析检测法,将免疫反应的特异性、层析方法的快速性、以及胶体金颗粒作为示踪物的直观性等诸多优点结合在一起,实现对致病性沙门氏菌简便、特异、灵敏的快速检测,稳定可靠。



1. 一种致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC板、玻璃纤维和硝酸纤维膜,其特征在于,基材PVC板1上依次固定有第一覆膜7、引水玻璃纤维3、载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2和吸水棉浆板5,所述的硝酸纤维膜2上包被有检测区8和质控区9,所述的引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,所述的吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,其制备方法包括以下步骤:

(1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加100-140 $\mu$ l正辛酸,混匀,18-22 $^{\circ}$ C室温放置30-60分钟,4 $^{\circ}$ C下10000-15000转/分钟离心20-30分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.2-7.4,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.277-0.377g,18-22 $^{\circ}$ C放置20-30分钟,4 $^{\circ}$ C下8000-12000转/分离心10-20分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH 7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH 7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析36-48小时,每4-6小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.3-0.5ml/只小鼠,1-3周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体;

(2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1000ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸4-6分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液1.5-2.5ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

(3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照2-4 $\mu$ g /ml胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,10000-15000转/分钟下离心20-30分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗O12、O6、O3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

(4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗O12、O6、O3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为1~5mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的包被浓度为0.5~2mg/ml;

(5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试

条。

2. 根据权利要求1所述的致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC板、玻璃纤维和硝酸纤维膜,其特征在于,基材PVC板1上依次固定有第一覆膜7、引水玻璃纤维3、载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2和吸水棉浆板5,所述的硝酸纤维膜2上包被有检测区8和质控区9,所述的引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,所述的吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,其制备方法包括以下步骤:

(1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加100  $\mu$ l正辛酸,混匀,18 $^{\circ}$ C室温放置60分钟,4 $^{\circ}$ C下15000转/分钟离心20分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.2,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.277g,18 $^{\circ}$ C放置30分钟,4 $^{\circ}$ C下8000转/分离心20分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH 7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH 7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析36小时,每4小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.3ml/只小鼠,1周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体;

(2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1000ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸4分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液1.5ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

(3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,10000转/分钟下离心30分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗O12、O6、O3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

(4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗O12、O6、O3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为1mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的包被浓度为0.5mg/ml;

(5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试条。

3. 根据权利要求1所述的致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC板、玻璃纤维和硝酸纤维膜,其特征在于,基材PVC板1上依次固定有第一覆膜7、引水玻璃纤维3、载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2和吸水棉浆板5,所述的硝酸纤维膜2上包被有检测区8和质控区9,所述的引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,所述的吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,其制备方法包括以下步骤:

(1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加120  $\mu$ l正辛酸,混匀,20 $^{\circ}$ C室温放置45分钟,4 $^{\circ}$ C下12500转/分钟离心25分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.3,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.327g,20 $^{\circ}$ C放置25分钟,4 $^{\circ}$ C下10000转/分离心15分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH 7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析42小时,每5小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.4ml/只小鼠,2周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体;

(2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1000ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸5分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1.0ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液2.0ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

(3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,12500转/分钟下离心25分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗O12、O6、O3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

(4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗O12、O6、O3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为2.5mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的包被浓度为1.0mg/ml;

(5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试条。

4. 根据权利要求1所述的致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC板、玻璃纤维和硝酸纤

维膜,其特征在于,基材PVC板1上依次固定有第一覆膜7、引水玻璃纤维3、载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2和吸水棉浆板5,所述的硝酸纤维膜2上包被有检测区8和质控区9,所述的引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,所述的吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,其制备方法包括以下步骤:

(1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加140  $\mu$ l正辛酸,混匀, 22 $^{\circ}$ C室温放置30分钟,4 $^{\circ}$ C下10000转/分钟离心30分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.4,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.377g, 22 $^{\circ}$ C放置20分钟,4 $^{\circ}$ C下12000转/分离心10分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH 7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH 7.4的PBS缓冲液 4 $^{\circ}$ C透析48小时,每6小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.5ml/只小鼠, 3周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗 O 12、O 6、O 3单克隆抗体;

(2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1200ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸6分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液2.5ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

(3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照4 $\mu$ g /ml胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗 O 12、O 6、O 3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,15000转/分钟下离心20分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗 O 12、O 6、O 3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

(4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗 O 12、O 6、O 3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为5mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3特异性单克隆抗体的包被浓度为2mg/ml;

(5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试条。

## 一种致病性沙门氏菌测试条的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,特别是一种致病性沙门氏菌测试条的制备方法。

### 背景技术

[0002] 沙门氏菌广泛分布于自然界,在人和动物中有广泛的宿主,沙门氏菌是引起食物中毒最常见的病原菌,在我国细菌性食物中毒爆发数 and 发病人数多年来排第一位,在引起沙门氏菌中毒的食品中,绝大多数是肉类等动物性食品,其次为蛋、奶及其制品。沙门氏菌食物中毒主要症状有寒战、头痛、头晕、恶心与痉挛性腹痛,继之出现呕吐、腹泻、全身酸痛或发热。每天腹泻可达7~8次。严重者,特别是儿童,老年人和体弱者常因脱水、酸中毒、无尿、心力衰竭等,救治不及时而危及生命。

[0003] 沙门氏菌属型别繁多,抗原复杂,从人和动物中分离出67个菌群、2000多个血清型和变种,对人致病的主要是A、B、C、D、E群,每群包含数个菌种,其中A、B、D群沙门氏菌含有共同的菌体抗原O<sub>12</sub>,C群沙门氏菌含有共同的菌体抗原O<sub>6</sub>,E群沙门氏菌含有共同菌体抗原O<sub>3</sub>。目前对沙门氏菌的检验普遍采用分离培养法,报告检测结果大致需要4-7天,程序繁琐,耗时太长,所以,建立快速而准确的检测方法一直是沙门氏菌检验研究的核心问题,提高沙门氏菌检测的灵敏度和特异性、缩短检测时间、简化检测程序,是沙门氏菌检测的发展趋势。

### 发明内容

[0004] 针对上述情况,为解决现有技术之缺陷,本发明的目的就是提供一种致病性沙门氏菌测试条的制备方法,可有效解决现有沙门氏菌检测方法费时、繁琐的问题。

[0005] 本发明解决的技术方案是,一种致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC、玻璃纤维和硝酸纤维膜,基材PVC板(1)上依次固定有第一覆膜(7)、引水玻璃纤维(3)、载体玻璃纤维(4)、硝酸纤维膜(2)和吸水棉浆板(5),所述的硝酸纤维膜(2)上包被有检测区(8)和质控区(9),所述的引水玻璃纤维(3)和载体玻璃纤维(4)上覆盖有第二覆膜(10),所述的吸水棉浆板(5)上覆盖有第三覆膜(6),其制备方法包括以下步骤:

#### (1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加100-140 $\mu$ l正辛酸,混匀,18-22 $^{\circ}$ C室温放置30-60分钟,4 $^{\circ}$ C下10000-15000转/分钟离心20-30分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.2-7.4,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.277-0.377g,18-22 $^{\circ}$ C放置20-30分钟,4 $^{\circ}$ C下8000-12000转/分钟离心10-20分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH 7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH 7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析36-48小时,每4-6小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.3-0.5ml/只小鼠,1-3周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O<sub>12</sub>、O<sub>6</sub>、O<sub>3</sub>抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即

为抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3 单克隆抗体的小鼠腹水；按照上述方法分别制备纯化的抗 O 12、O 6、O 3 单克隆抗体；

(2) 制备胶体金颗粒：

采用柠檬酸三钠还原法，将 1000ml 蒸馏水，100℃ 煮沸 4-6 分钟，再加入质量浓度 1% 的氯金酸溶液 1ml 和质量浓度 1% 的柠檬酸三钠溶液 1.5-2.5ml，搅拌至溶液呈深红色，冷却至室温，得胶体金颗粒溶液；

(3) 制备标记物：

取 3 份步骤 (2) 制备的胶体金颗粒溶液，各 100ml，按照 2-4 $\mu$ g /ml 胶体金分别加入步骤 (1) 制备的纯化的抗 O 12、O 6、O 3 单克隆抗体，搅拌 2 分钟后用质量浓度 10% 的牛血清白蛋白终止反应，10000-15000 转/分钟下离心 20-30 分钟，沉淀用浓度 0.01M、pH7.4 的 PBS 稀释至原体积的 10%，分别得胶体金标记的抗 O 12、O 6、O 3 单克隆抗体，再按照体积比 1:1:1 的比例混合得混合液，用玻璃纤维吸附混合液，得标记物；

(4) 包被纤维膜：

取步骤 (1) 制备的纯化抗 O 12、O 6、O 3 单克隆抗体，按蛋白含量 1:1:1 比例混合，以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区 (8)；抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区 (9)；检测区 (8) 和质控区 (9) 的包被划线相距 5mm，抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为 1 ~5mg/ml，抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3 特异性单克隆抗体的包被浓度为 0.5~2mg/ml；

(5) 组装测试条：

取基材 PVC 板 (1)，将第一覆膜 (7)、引水玻璃纤维 (3)、含步骤 (3) 制备的标记物的载体玻璃纤维 (4)、硝酸纤维膜 (2)，吸水棉浆板 (5) 固定粘贴于基材 PVC 板 (1) 上，所述的硝酸纤维膜 (2) 上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区 (9) 和抗沙门氏菌菌体抗原 O 12、O 6、O 3 特异性单克隆抗体的检测区 (8)，检测区 (8) 和质控区 (9) 暴露在覆膜外形成检测窗，引水玻璃纤维 (3) 和载体玻璃纤维 (4) 上覆盖有第二覆膜 (10)，吸水棉浆板 (5) 上覆盖有第三覆膜 (6)，切割成长条即得致病性沙门氏菌测试条。

[0006] 本发明制备的致病性沙门氏菌测试条采用胶体金免疫层析检测法，将免疫反应的特异性、层析方法的快速性、以及胶体金颗粒作为示踪物的直观性等诸多优点结合在一起，实现同时对 A、B、C、D、E 群沙门氏菌简便、特异、灵敏的快速检测，稳定可靠，经济和社会效益显著。

## 附图说明

[0007] 图 1 为本发明一种致病性沙门氏菌测试条的结构示意图。

## 具体实施方式

[0008] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作详细说明。

[0009] 本发明在具体实施中，是由以下实施例实现。

[0010] 由以下步骤实现：

### 实施例 1

本发明在具体实施中，由以下步骤实现：

一种致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC、玻璃纤维和硝酸纤维膜,基材PVC板(1)上依次固定有第一覆膜(7)、引水玻璃纤维(3)、载体玻璃纤维(4)、硝酸纤维膜(2)和吸水棉浆板(5),所述的硝酸纤维膜(2)上包被有检测区(8)和质控区(9),所述的引水玻璃纤维(3)和载体玻璃纤维(4)上覆盖有第二覆膜(10),所述的吸水棉浆板(5)上覆盖有第三覆膜(6),其制备方法包括以下步骤:

(1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加100 $\mu$ l正辛酸,混匀,18 $^{\circ}$ C室温放置60分钟,4 $^{\circ}$ C下15000转/分钟离心20分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.2,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.277g,18 $^{\circ}$ C放置30分钟,4 $^{\circ}$ C下8000转/分离心20分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH 7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH 7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析36小时,每4小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.3ml/只小鼠,1周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体;

(2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1000ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸4分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液1.5ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

(3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照2 $\mu$ g/ml胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,10000转/分钟下离心30分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗O12、O6、O3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

(4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗O12、O6、O3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为1mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的包被浓度为0.5mg/ml;

(5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试条。

[0011] 实施例2

本发明在具体实施中,由以下步骤实现:

一种致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC、玻璃纤维和硝酸纤维膜,基材PVC板(1)上依次固定有第一覆膜(7)、引水玻璃纤维(3)、载体玻璃纤维(4)、硝酸纤维膜(2)和吸水棉浆板(5),所述的硝酸纤维膜(2)上包被有检测区(8)和质控区(9),所述的引水玻璃纤维(3)和载体玻璃纤维(4)上覆盖有第二覆膜(10),所述的吸水棉浆板(5)上覆盖有第三覆膜(6),其制备方法包括以下步骤:

(1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加120 $\mu$ l正辛酸,混匀,20 $^{\circ}$ C室温放置45分钟,4 $^{\circ}$ C下12500转/分钟离心25分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.3,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.327g,20 $^{\circ}$ C放置25分钟,4 $^{\circ}$ C下10000转/分离心15分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析42小时,每5小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.4ml/只小鼠,2周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体;

(2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1000ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸5分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1.0ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液2.0ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

(3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照3 $\mu$ g/ml胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,12500转/分钟下离心25分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗O12、O6、O3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

(4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗O12、O6、O3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为2.5mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的包被浓度为1.0mg/ml;

(5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试条。

### [0012] 实施例3

本发明在具体实施中,由以下步骤实现:

一种致病性沙门氏菌测试条,包括基材PVC、玻璃纤维和硝酸纤维膜,基材PVC板(1)上依次固定有第一覆膜(7)、引水玻璃纤维(3)、载体玻璃纤维(4)、硝酸纤维膜(2)和吸水棉浆板(5),所述的硝酸纤维膜(2)上包被有检测区(8)和质控区(9),所述的引水玻璃纤维(3)和载体玻璃纤维(4)上覆盖有第二覆膜(10),所述的吸水棉浆板(5)上覆盖有第三覆膜(6),其制备方法包括以下步骤:

#### (1) 制备纯化的单克隆抗体:

取体积计的1份小鼠腹水和3份pH4.4浓度60mM的醋酸盐缓冲液,按每毫升腹水滴加140  $\mu$ l正辛酸,混匀,22 $^{\circ}$ C室温放置30分钟,4 $^{\circ}$ C下10000转/分钟离心30分钟,弃去沉淀,上清液用NaOH调节pH值至7.4,再加入硫酸铵,硫酸铵加入量为每毫升上清液中0.377g,22 $^{\circ}$ C放置20分钟,4 $^{\circ}$ C下12000转/分离心10分钟,弃上清液,沉淀物用所取小鼠腹水1/2倍体积pH7.4的PBS溶液溶解,装入透析袋,对pH7.4的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析48小时,每6小时换一次透析液,制成纯化的单克隆抗体;所述的小鼠腹水是指将液体石蜡注射于BALb/c小鼠腹腔内,注射量为0.5ml/只小鼠,3周后,分别将分泌抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3抗体的杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内,注射杂交瘤细胞的数量为 $2 \times 10^6$ /只小鼠,小鼠出现腹水后用无菌注射器采集腹水,即为抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3单克隆抗体的小鼠腹水;按照上述方法分别制备纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体;

#### (2) 制备胶体金颗粒:

采用柠檬酸三钠还原法,将1200ml蒸馏水,100 $^{\circ}$ C煮沸6分钟,再加入质量浓度1%的氯金酸溶液1ml和质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液2.5ml,搅拌至溶液呈深红色,冷却至室温,得胶体金颗粒溶液;

#### (3) 制备标记物:

取3份步骤(2)制备的胶体金颗粒溶液,各100ml,按照4 $\mu$ g/ml胶体金分别加入步骤(1)制备的纯化的抗O12、O6、O3单克隆抗体,搅拌2分钟后用质量浓度10%的牛血清白蛋白终止反应,15000转/分钟下离心20分钟,沉淀用浓度0.01M、pH7.4的PBS稀释至原体积的10%,分别得胶体金标记的抗O12、O6、O3单克隆抗体,再按照体积比1:1:1的比例混合得混合液,用玻璃纤维吸附混合液,得标记物;

#### (4) 包被纤维膜:

取步骤(1)制备的纯化抗O12、O6、O3单克隆抗体,按蛋白含量1:1:1比例混合,以划线的方式固化到纤维膜上形成检测区8;抗鼠免疫球蛋白抗体以划线的方式固化到纤维膜上形成质控区9;检测区8和质控区9的包被划线相距5mm,抗鼠免疫球蛋白抗体包被浓度为5mg/ml,抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的包被浓度为2mg/ml;

#### (5) 组装测试条:

取基材PVC板1,将第一覆膜7、引水玻璃纤维3、含步骤(3)制备的标记物的载体玻璃纤维4、硝酸纤维膜2,吸水棉浆板5固定粘贴于基材PVC板1上,所述的硝酸纤维膜2上包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区9和抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体的检测区8,检测区8和质控区9暴露在覆膜外形成检测窗,引水玻璃纤维3和载体玻璃纤维4上覆盖有第二覆膜10,吸水棉浆板5上覆盖有第三覆膜6,切割成长条即得致病性沙门氏菌测试

条。

[0013] 本发明同时检测对人致病的A、B、C、D、E群沙门氏菌测试条,包括基材、覆盖于基材前部的引水玻璃纤维、载体玻璃纤维以及覆盖于这两种材料之上的覆膜;粘贴于基材中部的硝酸纤维膜;覆盖于基材后部的吸水材料及其上面的覆膜。测试条前部载体玻璃纤维上吸附有红色胶体金颗粒标记的抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体。中部纤维膜上自前往后分布有一条包被有抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3特异性单克隆抗体混合物的检测区,一条包被有抗鼠免疫球蛋白抗体的质控区。

[0014] 所述基材为PVC板,前部引水材料为玻璃纤维,载体纤维为玻璃纤维,覆膜为不干胶膜。中部纤维膜为硝酸纤维膜。后部吸水材料为棉浆板,覆膜为不干胶膜。引水玻璃纤维、载体玻璃纤维、硝酸纤维膜、棉浆板依次搭接并粘附于PVC板上,搭接方式为后一材料的上端面与前一材料的下端面衔接。其制备方法是,由以下步骤实现:首先制备用于标记胶体金颗粒和包被硝酸纤维膜的单克隆抗体、制备胶体金颗粒、制备胶体金颗粒标记物、固化标记物、包被纤维膜,再将上述制备好的包被膜、固化标记物、引水玻璃纤维、吸水棉浆板固定粘结于基材PVC板上,覆盖上覆膜,切割成4mm宽的长条即可。

[0015] 本发明可有效用于同时检测A、B、C、D、E群沙门氏菌,涵盖主要的对人致病性沙门氏菌。本发明测试条在使用时,将引水玻璃纤维一端竖向插入标本样品中,或将标本样品滴至引水玻璃纤维上,样品在毛细管力作用下,沿测试条向吸水棉浆板方向泳动,当标本样品中含有A、B、C、D、E群沙门氏菌中的任何一种细菌,它们与相应的胶体金颗粒标记抗体结合,形成抗体+抗原复合物。当样品泳动至包被有抗沙门氏菌菌体抗原O12、O6、O3的特异性单克隆抗体混合物的检测区时,与相应的包被单克隆抗体结合而被截留,形成肉眼可见的紫红色的检测线,剩余标记单克隆抗体继续向前移动,到达包被有抗鼠抗体区域即质控区,与抗鼠抗体结合形成质控线。检测区出现紫红色检测线,表明样品中含有A、B、C、D、E群沙门氏菌中的至少一种;检测区无检测线出现,表明样品中不含有A、B、C、D、E群沙门氏菌。无论检测区有无检测线出现,质控区均有质控线出现,当不出现质控线,表明测试条失效。利用本测试条,只需一次加样,5~10分钟即可对A、B、C、D、E群沙门氏菌进行检测。该方法简便、快捷、结果准确。

[0016] 本发明经试验取得了非常满意的有益技术效果,用本测试条检测经过国标法验证的沙门氏菌样品用128份(A群26份;B群34份;C群21份;D群32份;E群15份),当细菌浓度大于 $10^5$ 个/毫升时,符合率为100%;检测非沙门氏菌样品72份,未出现假阳性,也就是说在现有的试验中,准确率为100%,非常稳定、可靠,而且,每一样品检测只需5~10分钟,与现有的分离培养法需相比,节约大量时间,速度之快、效率之高是现有技术无法相比的,具有很高的实用价值。

[0017] 本发明制备的测试条采用胶体金免疫层析检测法,将免疫反应的特异性、层析方法的快速性、以及胶体金颗粒作为示踪物的直观性等诸多优点结合在一起,实现主要致病性沙门氏菌的简便、快速、特异、灵敏的检测,是沙门氏菌检测技术上的一大创新,具有显著的经济和社会效益。

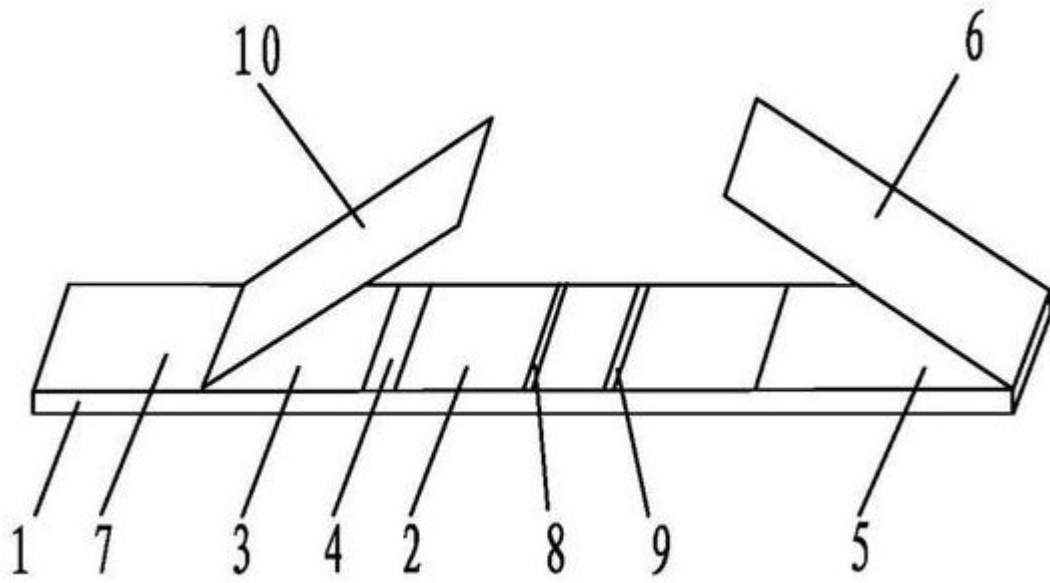


图1

专利名称(译)	一种致病性沙门氏菌测试条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107860911A</a>	公开(公告)日	2018-03-30
申请号	CN201711144839.2	申请日	2017-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	河南省科学院生物研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	河南省科学院生物研究所有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南省科学院生物研究所有限责任公司		
[标]发明人	杨书豪 王玉金 李珊珊 刘丽 杜迅 刁文涛 胡宜亮 宁萌 向凌云 王雪研 冯菲		
发明人	杨书豪 王玉金 李珊珊 刘丽 杜迅 刁文涛 胡宜亮 宁萌 向凌云 王雪研 冯菲		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/559		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/559		
代理人(译)	胡雨薇		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及致病性沙门氏菌测试条的制备方法，可有效解决现有检测方法费时、繁琐的问题，技术方案是，包括基材PVC、玻璃纤维和硝酸纤维膜，基材PVC板上固定有第一覆膜、引水玻璃纤维、载体玻璃纤维、硝酸纤维膜和吸水棉浆板，硝酸纤维膜上包被有检测区和质控区，引水玻璃纤维和载体玻璃纤维上覆盖有第二覆膜，吸水棉浆板上覆盖有第三覆膜；制备方法：制备纯化的单克隆抗体、制备胶体金颗粒、制备标记物、包被纤维膜、组装测试条；测试条采用胶体金免疫层析检测法，将免疫反应的特异性、层析方法的快速性、以及胶体金颗粒作为示踪物的直观性等诸多优点结合在一起，实现对致病性沙门氏菌简便、特异、灵敏的快速检测，稳定可靠。

