



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101900729 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 200910133493. 5

(22) 申请日 2009. 05. 29

(73) 专利权人 杨圣佐

地址 100071 北京市海淀区厂洼小区 8 号楼
2 门 602

(72) 发明人 杨圣佐

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/552 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101363863 A, 2009. 02. 11, 权利要求
1-8, 说明书第 3 页第 9 行至第 4 页第 14 行, 实施
例 4、5, 附图 1A, 1B.

CN 101363863 A, 2009. 02. 11, 权利要求
1-8, 说明书第 3 页第 9 行至第 4 页第 14 行, 实施
例 4、5, 附图 1A, 1B.

CN 200965534 Y, 2007. 10. 24, 全文.

CN 101363854 A, 2009. 02. 11, 全文.

US 6824975 B2, 2004. 11. 30, 全文.

US 2009/0047691 A1, 2009. 02. 19, 全文.

陈国强等. 猪链球菌 2 型分型血清的制
备. 《畜牧与兽医》. 2007, 第 39 卷 (第 02 期),
摘要, 第 50 页第 1.2 节至 2.3 节.

姜艳华等. 猪链球菌 35 个血清型标准抗血清
的制备及应用. 《中国动物检疫》. 2008, 第 25 卷
(第 09 期), 摘要, 第 20 页第 1.1 节至第 2.4 节.

R Higgins, et al. An update on
Streptococcus suis identification.
《Journal of Veterinary Diagnostic
Investigation》. 1990, 第 2 卷 (第 3
期), 249-252.

Marcelo Gottschalk, et
al. Immunomagnetic Isolation of
Streptococcus suis Serotypes 2 and 1/2 from
Swine Tonsils. 《J. Clin. Microbiol.》. 1999,
第 37 卷 (第 9 期), 2877-2881.

审查员 许珊萍

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

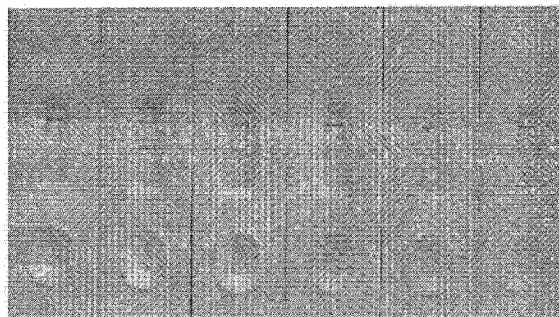
(54) 发明名称

一种检测猪链球菌的试纸及其制备方法和用
途

(57) 摘要

本发明公开了一种检测猪链球菌 2 型的试
纸, 还公开了该试纸的制备方法和用途. 本发
明的检测试纸包括样品垫、胶金垫、NC 膜和
吸收垫四部分, 采用胶体金免疫层析技术制
备. 本发明的检测试纸的制备包括制备猪链
球菌 2 型多克隆抗体、制备胶体金、制备胶
体金探针、喷膜和试纸条组装等步骤. 采用
本发明的检测猪链球菌 2 型的试纸进行检测,
10 分钟即可观察结果, 最低可检出 10⁶CFU/ml
猪链球菌 2 型菌. 该胶体金试纸具有很强的
特异性, 仅与 2 型和 1/2 型猪链球菌反应,
而与其它血清型猪链球菌和其它族的链球
菌无交叉反应. 该试纸具简便和快速等特
点, 可以作为一种人猪链球菌 2 型初筛的
诊断方法, 适于在临床和现场使用.

1 2 3 4 5 6



1. 一种检测猪链球菌 2 型的免疫层析试纸,包括样品垫、胶体金垫、NC 膜和吸收垫,其特征在于胶体金垫上有胶体金探针,该探针标记有猪链球菌 2 型抗体,NC 膜上有检测带和质控带,检测带包被有猪链球菌 2 型抗体,其中猪链球菌 2 型抗体为针对猪链球菌 2 型抗原的多克隆抗体,所述猪链球菌 2 型抗原为猪链球菌 *S. suis*149 全菌抗原。

2. 根据权利要求 1 所述检测猪链球菌 2 型的免疫层析试纸,其中猪链球菌 2 型抗体为采用醛化灭活的猪链球菌 2 型抗原免疫制备的兔抗猪链球菌 2 型抗体。

3. 根据权利要求 2 所述检测猪链球菌 2 型的免疫层析试纸,其中检测带包被兔抗猪链球菌 2 型抗体浓度为 2.0mg/ml。

4. 权利要求 1 或 2 所述检测猪链球菌 2 型的免疫层析试纸的制备方法,包括如下步骤:

- (1) 制备猪链球菌 2 型抗体;
- (2) 胶体金及标记有猪链球菌 2 型抗体的胶体金探针的制备;
- (3) 将猪链球菌 2 型抗体和抗猪链球菌 2 型多抗抗体喷于 NC 膜上进行包被;
- (4) 将吸收垫、样品垫及处理后的胶体金垫和 NC 膜叠加粘到 PVC 板上,组装成完整的试纸。

5. 根据权利要求 4 所述方法,其中制备猪链球菌 2 型抗体采用直接用醛化灭活的猪链球菌 2 型抗原免疫动物进行,获得的抗体为多克隆抗体。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述方法,其中 NC 膜上检测带、质控带包被用猪链球菌 2 型抗体及抗猪链球菌 2 型抗抗体分别为兔抗猪链球菌 2 型抗体和羊抗兔免疫血清,二者浓度分别为 2.0mg/ml 和 0.5mg/ml。

7. 根据权利要求 4 或 5 所述方法,其中样品垫和胶体金垫采用玻璃纤维,吸收垫采用吸水滤纸。

8. 权利要求 1 或 2 所述免疫层析试纸在制备猪链球菌 2 型检测试剂中的用途。

9. 根据权利要求 8 所述用途,检测猪链球菌 2 型灵敏度达到 10^6 CFU/ml。

一种检测猪链球菌的试纸及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测猪链球菌的试纸,具体涉及一种检测猪链球菌 2 型的免疫层析试纸,还涉及该试纸的制备方法及用途。

背景技术

[0002] 人猪链球菌病属国家规定的二类动物疫病,是一种人畜共患传染病。人感染猪链球菌病是人类感染猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* serotype 2, SS2) 等所致的一种人畜共患疾病。猪链球菌属于兰氏分类法的 R 群,有 35 个血清型,以猪链球菌 2 型流行最广,致病性最强。猪链球菌不仅可以引发猪脑膜炎、心内膜炎、败血症、关节炎、多浆膜炎、肺炎甚至突然死亡,还可以经破损皮肤或黏膜侵入人体,导致人感染发病,对农场和屠宰场工人的构成了威胁。人感染猪链球菌临床表现为败血症、中毒性休克综合征 (TSS) 和脑膜炎。人感染猪链球菌病的主要传染源是病死猪,主要传播途径为宰杀病死猪,切割、清洗病死猪肉等,手部皮肤有损伤的人员尤易感染。进食未煮熟、煮透的病死猪肉也可引起感染。近年来我国面临着猪链球菌感染暴发流行加重的威胁,1998 年与 2005 年猪链球菌在我国两次爆发流行,共造成 229 人感染,其中死亡 53 例。在我国猪链球菌引起人、猪共感染发病,不但给养猪业造成严重经济损失,也给公共卫生和食品安全带来了威胁。该病引起了世界范围的公共卫生领域的高度重视,越来越多的研究者开始对猪链球菌进行更深入的研究。

[0003] 传统的对猪链球菌病原的分离鉴定主要依靠传统的分离培养和生化鉴定,然后用猪链球菌高免血清进行凝集试验分型。生化鉴定虽然能较可靠的检测鉴定出猪链球菌 2 型,但其必需以分离出的纯菌为基础,但是这两种方法操作繁琐,不利于进行现场快速诊断。为提高我国对突发公共事件相关的安全监控能力,迫切需要建立我国具有高效、敏感、快速、高特异性的检测技术。

[0004] 胶体金免疫快速诊断技术(快速诊断试纸条)是 20 世纪 90 年代以来在单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术。该技术主要是将特异性的抗原或抗体以条带状固定在硝酸纤维素膜 (NC) 上,胶体金标记试剂吸附在结合垫上,当待测样品加到试纸条一端的样品垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,待测物和金标试剂的复合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,通过可目测的胶体金标记物得到直观的显色结果。而流离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离的目的。胶体金免疫层析快速诊断技术可以在短时间内提供结果,该检测法快捷、方便、精确、可靠、廉价而且操作简易的。

[0005] 到目前为止,尚未见到采用胶体金免疫层析技术检测猪链球菌 2 型的报道。

发明内容

[0006] 本发明公开了一种检测猪链球菌 2 型的免疫层析试纸,还公开了该试纸的制备方法及其用途。

[0007] 本发明的免疫层析试纸为胶体金免疫层析试纸,包括样品垫、胶金垫、NC膜和吸收垫四部分。在胶金垫上有胶体金探针,NC膜上有检测带和指控带,检测带和指控带分别包被有猪链球菌2型抗体及抗猪链球菌2型抗抗体。上述猪链球菌2型抗体为猪链球菌2型。猪链球菌2型抗体可以为猪链球菌2型免疫不同动物获得的抗体,优选兔抗猪链球菌2型抗体;制备猪链球菌2型抗体,可以选择醛化的猪链球菌2型抗原免疫而成,如甲醛和戊二醛,优选1%甲醛于37℃灭活7d即可作为免疫原,可保证抗体良好的特异性。抗猪链球菌2型抗抗体可以通过免疫不同动物获得,优选羊抗兔免疫血清,可以购买商业化抗体。上述两种在检测带和指控带上包被的抗体可以采用不同浓度,优选浓度分别为兔抗猪链球菌2型抗体浓度为2.0mg/ml,羊抗兔免疫血清浓度为0.5mg/ml。

[0008] 本发明的检测猪链球菌2型的免疫层析试纸的制备方法包括制备猪链球菌2型抗体;胶体金的制备;胶体金探针的制备;将猪链球菌2型抗体和抗猪链球菌2型抗抗体在NC膜上进行包被;将吸收垫、样品垫及处理后的胶金垫和NC膜叠加粘到PVC板上,组装成完整的试纸等步骤。

[0009] 制备猪链球菌2型抗体采用直接用猪链球菌2型免疫动物的方法进行,获得的抗体为多克隆抗体。首先需要制备猪链球菌2型抗原,先将猪链球菌2型培养,收集菌液后甲醛灭活即可作为抗原。然后用抗原免疫动物,免疫按常规方法进行,免疫前和每次免疫后采血通过ELISA方法测定动物抗体滴度。经过6次免疫后抗体滴度达到一般免疫反应水平,为 10^7 ,所获得的抗体可用于胶体金免疫层析试纸条的制备。获得的猪链球菌2型先要经过纯化,可以采用蛋白A-琼脂糖亲和层析法进行。纯化好的抗体透析后-70℃保存备用。

[0010] 胶体金的制备采用柠檬酸钠还原法进行制备,获得直径约25nm的胶体金。

[0011] 胶体金探针的制备:将制备的猪链球菌2型抗体用纯水透析,而且在使用抗体前一般要先离心去除易形成的二聚体。用碳酸钾溶液调节胶体金溶液的pH值,与制备的猪链球菌2型抗体混合,离心去上清后用含1%BSA的PBS溶解沉淀,离心后再次重悬沉淀,离心取上清即为标记好的胶体金探针。其中胶体金溶液的pH值为 ≥ 8.5 ,优选8.5。猪链球菌2型抗体的最适抗体保护量为22 μ g/mL。

[0012] 接着是将猪链球菌2型抗体和抗猪链球菌2型多抗抗体在NC膜上进行包被。首先将猪链球菌2型抗体用PBS工作液透析,然后将稀释好的猪链球菌2型抗体和羊抗兔抗体,分别在NC膜上划线进行包被,成为T带和C带,见图1。包被的抗体浓度为 ≥ 2.0 mg/ml,以2.0mg/ml为最佳,用BSA溶液进行封闭,1.5%为最佳浓度。

[0013] 本发明还公开了检测猪链球菌的免疫层析试纸的用途。该用途是通过下列试验进行验证的。

[0014] 首先验证本发明试纸的敏感性,将培养的猪链球菌稀释成不同浓度的菌液,加样品稀释液进行检测,以不含猪链球菌2型的样品液为空白对照。本发明的胶体金免疫层析试纸检测猪链球菌的灵敏度为 1.0×10^6 CFU/ml。

[0015] 然后验证本发明试纸的特异性。将培养的猪链球菌、其它链球菌属以及金色葡萄球菌、单增李斯特菌、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希菌、产气荚膜梭菌分别培养,稀释成浓度 $> 10^8$ CFU/ml的菌悬液,用本发明检测猪链球菌的免疫层析试纸进行检测。用该试纸条检测猪链球菌2型国内及国外的流行株与非流行株以及致病株与非致病株,结果均为阳性;尤其令人惊奇的是,尽管该抗体采用醛化的猪链球菌粗抗原制备,但具有良好的血清特异

性,除猪链球菌 1/2 型外,该试纸条与其它血清型的猪链球菌无交叉反应。说明该试纸条检测范围广,特异性好。该免疫试纸与常见的致病菌和链球菌属的 15 个群也均无交叉反应。依据以上的结果显示,该试纸条具有良好的特异性。

[0016] 接着是验证本发明试纸的稳定性。分别在 4℃ 和室温保存 3 个月,在 37℃ 存放 15 天后,检测结果均未发生变化,说明试纸稳定性好。

[0017] 本发明的试纸还经过了模拟标本的检测。通过检测,本发明试纸的灵敏度结果可达到 10^6 CFU/ml,空白样本的检测结果为阴性。

[0018] 本发明的检测猪链球菌的免疫层析试纸是应用猪链球菌 2 型的多克隆抗体,根据双抗体夹心法的原理研制而成。克服了传统细菌免疫学诊断试剂的采用全菌抗原制备抗体、特异性较差、常与近缘细菌存在交叉反应、实用性较差等缺陷。利用本发明试纸检测猪链球菌 2 型,标本处理简单,10 分钟即可观察结果,最低可检出 10^6 CFU/ml。通过对模拟样品的检测,其灵敏度高、特异性好。尤其令人惊奇的是,尽管该抗体采用醛化的猪链球菌粗抗原制备,但具有良好的血清特异性,除猪链球菌 1/2 型外,该试纸条与其它血清型的猪链球菌无交叉反应。也就是说,本发明使用的抗体虽然是多抗,但制备的胶体金免疫层析试纸具有较高的特异性,这是本领域技术人员所不能想到的,具有意想不到的效果。本发明的试纸具有敏感性、特异性、简便性和快速性等特点,适于在临床和现场使用,可以作为一种人猪链球菌初筛的诊断方法,该试纸的应用有利于我们对猪链球菌疫情的了解和控制。

附图说明

[0019] 图 1 为检测结果判读示意图

[0020] 图 2 为猪链球菌 2 型血清效价测定结果

[0021] 图 3 为试纸条的敏感性检测。其中 1 为空白对照 2,3,4,5,6 为猪链球菌 2 型,其中 2 为 1.0×10^8 CFU/ml,3 为 1.0×10^7 CFU/ml,4 为 1.0×10^6 CFU/ml,5 为 1.0×10^5 CFU/ml,6 为 1.0×10^4 CFU/ml。

[0022] 图 4 为试纸条的稳定性检测。其中 1 为金色葡萄球菌 10^8 CFU/ml,2 为猪链球菌 2 型 10^8 CFU/ml,3 为 *S. suis* 149 10^6 CFU/ml,4 为空白对照

具体实施方式

[0023] 实施例一猪链球菌 2 型抗体制备

[0024] 一、材料:

[0025] 菌株:猪链球菌 2 型(猪链球菌 *S. suis* 149 或 98012,也可采用相同血清型猪链球菌 2 型菌株),金色葡萄球菌,甲型副伤寒沙门氏菌,大肠埃希菌,猪链球菌 2 型,产气荚膜梭菌由军事医学科学院微生物所提供,15 种血清型的猪链球菌由哈尔滨兽医研究所提供,其余菌株购于中国药品生物制品检定所。

[0026] 实验动物:2kg 左右新西兰大耳白兔 2 只,雌性。由军事医学科学院实验动物中心提供。

[0027] 培养基:LB 培养基,THB 培养基,血平板均按常规方法制备

[0028] 主要设备与仪器:生物安全柜(美国 NUAIR 公司),Spectra Max Plus 全自动蛋白核酸酶联检测仪(美国 Molecular Devices 公司),ST-I 微型半干转移电泳仪(大连竞

迈生物科技公司生产), AKTA FPLC 蛋白纯化分析仪 (瑞典 AmershamPharmacia Biotech 公司), 隔流喷金划线机 (美国 IMAGEN ARISTA 公司), ND-1000 超微量蛋白定量仪 (美国 NanoDrop 公司), 酶联免疫吸附仪, 868 型 pH 计 (美国 Thermo 公司)。

[0029] 二、方法结果:

[0030] 1. 猪链球菌 2 型抗原的制备

[0031] 病原菌为完全抗原, 可以直接免疫动物获得抗体, 所以记数并灭活的 *S. suis* 149 即为制备猪链球菌 2 型多克隆抗体的抗原。将保存的猪链球菌 *S. suis*149 接种至 THB 液体培养基中, 于 37℃ 静置培养 7h, 无菌水收集菌液, 血平板计数。1% 甲醛于 37℃ 灭活 7d 即可作为免疫原。

[0032] 2. 猪链球菌 2 型多克隆抗体的制备和鉴定

[0033] 2.1 猪链球菌 2 型多克隆抗体的制备

[0034] 猪链球菌 2 型多克隆抗体通过免疫 2kg 左右的新西兰大白兔获得。在第一次免疫前耳静脉取血 ELISA 测定免疫动物是否具有天然抗体, 若有则弃用。若无则从第二次免疫开始每次免疫后 1 周耳静脉取血, 进行间接 ELISA 测抗体效价。免疫方案见表 1。

[0035] 表 1 猪链球菌 2 型免疫方案

免疫次数	抗原量 (CFU/只)	间隔时间(周)	免疫部位
1	5×10^8 CFU	2	静脉
2	1×10^9 CFU	1	静脉
[0036] 3	2×10^9 CFU	1	静脉
4	4×10^9 CFU	1	静脉
5	8×10^9 CFU	1	静脉
6	1.6×10^9 CFU	1	静脉

[0037] 2.2 猪链球菌 2 型抗体效价测定

[0038] 免疫后耳静脉取血 500 μ L, 37℃ 放置 1h, 然后 3000rpm 离心 10min, 再 10000rpm 离心 3min, 上清即为免疫血清。以间接 ELISA 测定血清中抗体的效价。方法如下:

[0039] 1) 用包被缓冲液稀释的菌为 10^9 CFU/mL, 100 μ L/ 孔, 4℃ 包被过夜或 37℃ 1~2 小时,

[0040] 2) 用 PBST 洗孔, 100 μ L/ 孔, 洗 3 遍, 每次 3min,

[0041] 3) 用含 3% BSA 的 PB 封闭, 200 μ L/ 孔, 置于 37℃ 孵箱内进行封闭 2 小时,

[0042] 4) PBST 洗 3 遍, 100 μ L/ 孔, 每次 3min,

[0043] 5) 用含 3% BSA 的 PBST 梯度系列稀释一抗, 每孔加 100 μ L, 37℃ 作用 1h

[0044] 6) PBST 洗 3 遍, 100 μ L/ 孔, 每次 3min

[0045] 7) 用含 3% BSA 的 PBST 稀释酶标抗体 (1 : 2000), 每孔 100 μ L, 37℃, 30~45min

[0046] 8) PBST 洗 4 遍, 100 μ L/ 孔, 3min/ 次

[0047] 9) 加 A、B 显色液, 每孔各 1 滴, 避光显色, 当阴性对照出现蓝色时加终止液 (2NH₂SO₄) 终止, 450nm 测得 OD, 以空白孔调零, 若待测孔 OD₄₅₀ 值大于或等于阴性对照孔 2.1 倍, 即判定为阳性, 从而得出血清效价。

[0048] 经过 7 周 6 次免疫后, 抗体滴度可达 10^7 , 已达到一般免疫反应的程度, 因此, 本试

验获得的猪链球菌 2 型抗体可用于胶体金免疫层析试纸条的制备。具体结果见图 2。

[0049] 2.3 多克隆抗体的纯化

[0050] 采用蛋白 A-琼脂糖亲和层析法纯化抗体,用 MabTrapTMG 亲和层析柱纯化抗体,样品经平衡缓冲液 (PB, 5mmol/L, pH7.0) 适当稀释后,上样于用平衡缓冲液平衡好的 MabTrapTMG 亲和柱,用 A 液彻底洗去杂蛋白后,换洗脱液 B 液将抗体洗下,收集洗下的抗体,收集试管事先已加 10% 的 1mol/L, pH 9.0 的 Tris-HCl,使 pH 恢复至 7.0 左右,以免失去活性。纯化好的抗体用 PBS 工作液透析 4℃ 两天,再 10000r/min 离心 30min,收集上清,-70℃ 保存备用。

[0051] 实施例二猪链球菌 2 型胶体金测试纸的制备

[0052] 一、材料:采用市购化学试剂,同实施例一。

[0053] 二、方法结果:

[0054] 1. 胶体金的制备

[0055] 采用柠檬酸钠还原法制备直径约 25nm 的胶体金。将 HAuCl₄ 先配成 1% 的水溶液,取 99ml 纯水加热至沸腾。搅动下加入 1ml 1% 的 HAuCl₄,再同时加 1.5ml 柠檬酸三钠水溶液。继续加热煮沸 15min 左右,观察到加入液体后颜色先变成黑,随后慢慢变成酒红色,看到酒红色后继续加热 3~5min 后停止加热,去离子水补至体积 100mL。得到的即为直径为 25nm 的胶体金,冷却后 4℃ 避光保存。

[0056] 2. 猪链球菌 2 型胶体金测试条的制备

[0057] 2.1 猪链球菌 2 型抗体标金前的处理

[0058] 由于猪链球菌 2 型抗体既要用于标金,也要用于喷膜,所以抗体在使用前的处理也是有所不同。把猪链球菌 2 型抗体分别用 PBS 工作液和纯水透析,以此来确定适于标金和喷膜的最佳抗体处理方法。

[0059] 结果:根据发明人实际试验摸索的条件显示,不同的使用目的有不同的要求:用于喷膜的猪链球菌 2 型抗体要用 PBS 工作液透析,使其有一定的离子强度,而利于包被。用于标金的猪链球菌 2 型抗体要求不含有盐离子,必须用纯水透析;抗体在使用前一般置于 -20℃ 保存,很容易形成二聚体而影响标金,特别是抗体浓度较高时,所以在用抗体前一般要先 4℃ 10000rpm 离心 30min。

[0060] 2.2 胶体金标记猪链球菌 2 型抗体的最佳 pH 值的测定试验

[0061] 用 0.1mol/L 的碳酸钾溶液将胶体金溶液的 pH 值分别调节到 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,各取 1mL 加入用 0.01mol/L 的 PBS (pH7.2) 稀释为 0.2mg/ml 的兔抗猪链球菌 2 型抗体 100 μL,混合均匀,室温反应 10 分钟,静置 2 小时,观察溶液颜色变化。然后 12000rpm 离心 10 分钟,去掉上清,加入含 1% BSA 的 PBS 溶解沉淀,以沉淀完全溶解呈均匀的透明紫红色溶液管的 pH 值为最佳。

[0062] 试验结果如表 2-4 所示, pH ≤ 7.5 各管中溶液颜色呈不同程度的蓝色, pH ≥ 7.5, 各管中溶液颜色无变化,离心后 pH ≤ 8.0 的标记管中沉淀不能完全溶解, pH ≥ 8.5 的标记管中沉淀完全溶解,溶液呈透明酒红色,如表 2.4 所示。因此,胶体金标记的最佳 pH 值为 8.5。

[0063] 表 2.4 猪链球菌 2 型抗体胶体金最佳 pH 值的测定

[0064]

pH值	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
胶体金颜色	蓝色	蓝色	蓝色	红色	红色	红色	红色
溶解性	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全	完全	完全

[0065] 2.3 猪链球菌 2 型抗体最佳标金量的测定试验 (试管观察法)

[0066] 胶体金是一种很不稳定的胶体,特别是调节好 pH 值后,但是加入适当的蛋白后能使胶体金稳定。所以必须确定胶体金标记猪链球菌 2 型抗体的最佳标记量。测量其最佳标记量必须在最佳 pH 值和离子浓度情况下进行。将胶体金调至最佳 pH。用 0.01mol/L 的 PBS(pH7.2) 稀释兔抗猪链球菌 2 型抗体至 0.2mg/mL。按表 2 操作。

[0067] 表 2 试管观察法测定稳定胶体金最小标记量

[0068]

试剂	试管号										对照管
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
抗体 (μ l)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
纯水 (μ l)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
胶体金 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀, 放置 2min											
10%NaCl (μ l)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
摇匀, 放置 2h 观察											

[0069] 静置后观察,含抗体量少的管呈现出由红变蓝的聚沉现象,而加入抗体达到或超过最低稳定量的试管中的溶液则保持红色不变。使红色保持不变的抗体含量最低的试管的抗体量就是抗体的最适保护量,在此基础上增加 20% 为稳定胶体金的抗体的最佳标记量。

[0070] 将胶体金调至 pH8.5,用 0.01mol/L 的 PBS(pH7.2) 稀释兔抗猪链球菌抗体 0.2mg/mL。按表 2 加入各种试剂后,观察溶液凝聚状况,如表 3 结果显示,含抗体量少的管呈现出由红变蓝的聚沉现象,而加入抗体达到或超过最低稳定量的试管中的溶液则保持红色不变。因此,猪链球菌 2 型胶体金探针的最适抗体保护量为 22 μ g/mL。

[0071] 表 3 猪链球菌 2 型抗体胶体金最佳标记量的测定

[0072]

抗体浓度 ug/ml	26	24	22	20	18	16	14	12	10	8	对 照
胶体金 溶液颜色	红 色	红 色	红 色	蓝 色	蓝 色	蓝 色	蓝 色	蓝 色	蓝 色	蓝 色	蓝 色

[0073] 2.4 胶体金探针的制备

[0074] 用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调整胶体金 pH 至 8.5,取 1ml 置于 1.5mlEP 管中,加 0.2mg/ml 的猪链球菌 2 型抗体 110 μ l,混匀 30min 后,加 10% BSA 100 μ l,混匀 30min 后 (或 4 $^{\circ}$ C 过夜) 在 4 $^{\circ}$ C 下,12000r/min 离心 30min 后,用 1ml 重悬液 (0.01mol/L Tris-HCl,pH 8.2,1% BSA,5% 蔗糖) 重悬沉淀;再于 4 $^{\circ}$ C 下 12000r/min 离心 30min 后,用 500 μ l 重悬液重悬沉淀 4 $^{\circ}$ C 下 1000r/min 离心 4min,上清即为胶体金探针,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0075] 2.5 最佳喷膜浓度和最佳封闭浓度的确定试验

[0076] 用 0.01mol/L 的 PB(pH7.2) 把猪链球菌 2 型抗体和羊抗兔抗体分别(稀释为 3.5、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5mg/mL 浓度,而且每个浓度的抗体均含有 2.0%、1.5%、1.0%、0.75%、0.5% BSA 的各一管,用于封闭。取稀释好的猪链球菌 2 型抗体(T带)和羊抗兔抗体(C带),见图 1,用隔流喷金划线机在 NC 膜上划线,把划完线的 NC 膜置于 37°C 干燥 2h。用猪链球菌 2 型的菌悬液和不含猪链球菌 2 型的空白对照同时检测以确定最佳的抗体包被浓度和封闭浓度。

[0077] 试验结果显示,随着抗体包被浓度的增加,指示线的色泽也逐渐加深,在到达 2.0mg/ml 以上后色泽不再加深,因此确定 2.0mg/ml 为最佳兔抗猪链球菌 2 型 IgG 抗体包被点样浓度。以空白对照不出现假阳性时的 BSA 浓度为最佳封闭浓度,因此确定 1.5% 为最佳封闭浓度。

[0078] 2.6 试纸条的组装

[0079] 胶体金测试条由样品垫、胶金垫、NC 膜和吸收垫四部分组成。样品垫和胶金垫采用玻璃纤维,吸收垫采用吸水滤纸。胶金垫上加胶体金探针,37°C 干燥 2h。NC 膜上检测带和指控带分别包被兔抗猪链球菌 2 型抗体 2.0mg/ml(溶解于 10mmol/L PB, pH 7.2, 1.5% BSA)及羊抗兔免疫血清 0.5mg/ml(溶解于 10mmol/L PBS, pH 7.2)。喷好膜后 37°C 干燥 1.5h。将吸收垫、样品垫及处理后的胶金垫、NC 膜叠加粘到 PVC 板上,组装成完整的试纸条,然后切割成 4mm/条,干燥避光保存。

[0080] 2.7 检测结果判读

[0081] 取 50 μ l 的待测样品和 50 μ l 样品处理液(1% Tween-20, 10mmol PBS, pH8.5) 加到制备好的试纸条样品垫上,15min 后观察检测结果。对结果的判定:阳性(+):检测带(T)和质控带(C)均出现红色条带;阴性结果(-):仅质控带(C)出现一条红色条带,在检测带(T)无红色条带出现;无效:质控带(C)未出现红色条带。如图 1 所示:

[0082] 实施例三猪链球菌 2 型胶体金测试纸的评价

[0083] 一、材料:同实施例一

[0084] 二、方法结果:

[0085] 1. 猪链球菌 2 型试纸条的敏感性试验

[0086] 将菌株 *S. suis* 149 划线接种于含 5% 羊血的哥伦比亚琼脂血平皿上,37°C, 5% CO₂ 培养 24h,挑取菌落,转接 THB 液体培养基中,37°C, 5% CO₂ 培养 6h, 4°C 8000r/min 离心 10min,再以 PBS 稀释成不同数量级的菌悬液,涂布血平板进行菌落计数。取 100 μ l 不同稀释度的菌液加等体积样品稀释液(1% Tween 20, 10mmol/L PBS, pH8.0) 用于检测。

[0087] 从 1.0×10^8 CFU/ml 猪链球菌 2 型样本 10 倍系列稀释,不含猪链球菌 2 型的样品液为空白对照,检测结果见图 3,免疫层析条检测灵敏度为 1.0×10^6 CFU/ml。

[0088] 2. 猪链球菌 2 型试纸条的特异性试验

[0089] 取甘油冻存的猪链球菌 2 型菌种按常规方法复苏,接种于含 5% 羊血的哥伦比亚琼脂血平皿上,培养时挑取单个菌落转接 Todd-Hewitt broth (THB) 培养基,37°C, 5% CO₂ 培养;金色葡萄球菌、单增李斯特菌、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希菌、产气荚膜梭菌,用比浊法制备 10^8 CFU/ml 菌液,取 100 μ l 菌液加等体积样品稀释液用于检测。

[0090] 取不同菌株的新鲜菌悬液(浓度 $> 10^8$ CFU/ml),用免疫试纸进行检测。应用该法

检测猪链球菌 15 个血清型, 仅与 SS1/2 有交叉反应。SS1/2 同时含有 1 型和 2 型抗原菌株, 因此试纸条不能区分 SS2 与 SS1/2。用该试纸条检测猪链球菌 2 型国内及国外的流行株与非流行株以及致病株与非致病株, 结果均为阳性, 说明该试纸条检测范围广, 特异性好。该免疫试纸与常见的致病菌和链球菌属的 15 个群均无交叉反应。依据以上的结果显示, 该试纸条具有良好的特异性。

[0091] 3. 猪链球菌 2 型试纸条的稳定性试验

[0092] 将胶体金免疫层析试纸条分别于 4℃ 和室温保存 3 个月, 37℃ 存放 15d 后取猪链球菌 2 型菌悬液 (浓度为 10^8 CFU/ml 和 10^6 CFU/ml) 和金黄色葡萄球菌 (浓度为 10^9 CFU/ml) 进行检测, 并与同样的 PBS 溶液做为样品空白对照。

[0093] 试验结果显示: 将胶体金免疫层析试纸条分别于 4℃ 和室温保存 3 个月, 37℃ 存放 15d 后取出检测, 结果见图 4, 检测结果未见改变。

[0094] 4. 模拟标本检测

[0095] 绞碎的瘦肉 50mg 和血清 100 μ l, 分别加入到 1ml 含不同浓度猪链球菌 2 型的样品稀释液中, 混匀, 静置 10min 或短暂离心 (8000rpm 离心 15s), 取样品进行检测。

[0096] 检测结果表明, 对瘦肉和血清模拟标本检测灵敏度结果仍可达到 10^6 CFU/ml。空白样本的检测结果为阴性。血清由于其组分和粘稠度等的原因, 在 NC 膜上的层析速率慢, 但检测灵敏度也能达到 10^6 CFU/ml。

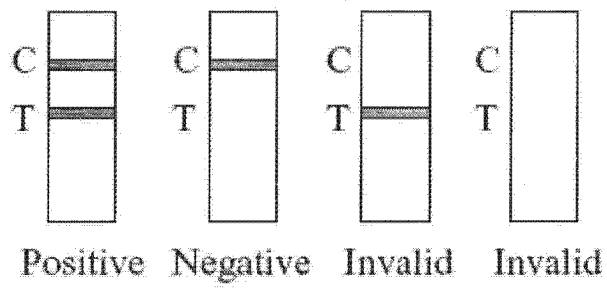


图 1

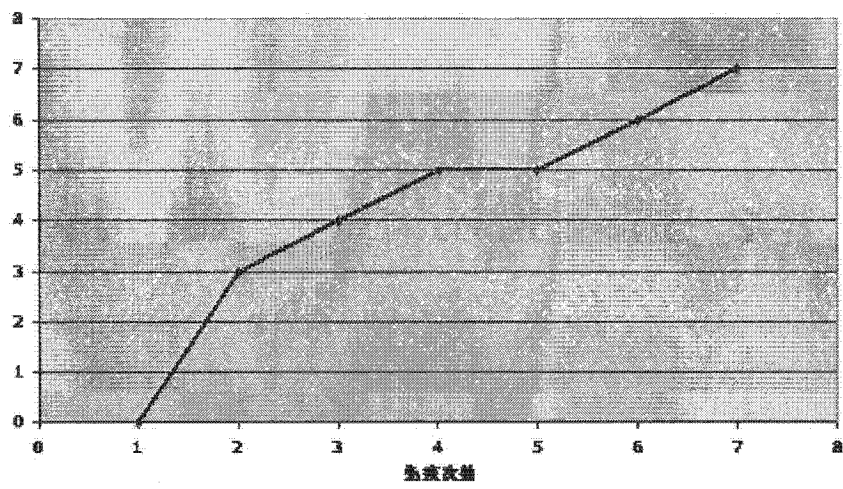


图 2

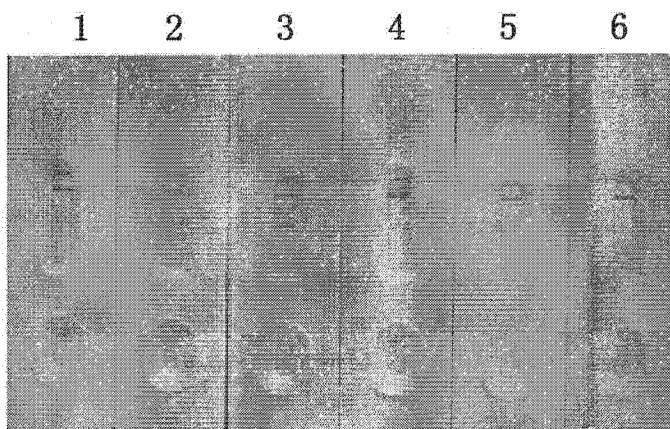


图 3

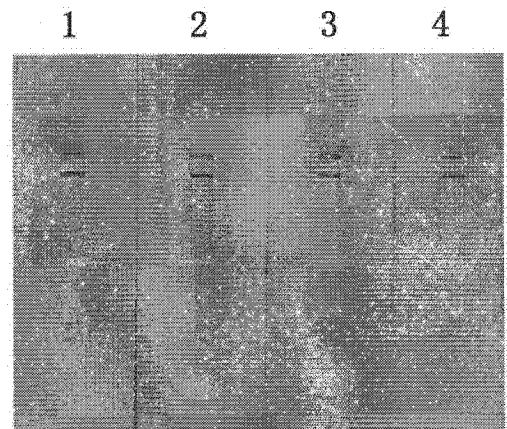


图 4

专利名称(译)	一种检测猪链球菌的试纸及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN101900729B	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN200910133493.5	申请日	2009-05-29
[标]发明人	杨圣佐		
发明人	杨圣佐		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/552		
其他公开文献	CN101900729A		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明公开了一种检测猪链球菌2型的试纸，还公开了该试纸的制备方法和用途。本发明的检测试纸包括样品垫、胶金垫、NC膜和吸收垫四部分，采用胶体金免疫层析技术制备。本发明的检测试纸的制备包括制备猪链球菌2型多克隆抗体、制备胶体金、制备胶体金探针、喷膜和试纸条组装等步骤。采用本发明的检测猪链球菌2型的试纸进行检测，10分钟即可观察结果，最低可检出106CFU/ml猪链球菌2型菌。该胶体金试纸具有很强的特异性，仅与2型和1/2型猪链球菌反应，而与其它血清型猪链球菌和其它族的链球菌无交叉反应。该试纸具简便和快速等特点，可以作为一种人猪链球菌2型初筛的诊断方法，适于在临床和现场使用。

