



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101949927 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010249600. 3

(22) 申请日 2010. 08. 10

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号

(72) 发明人 王静 景滢滢 王振东 杨宇

(74) 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理有限公司 11003

代理人 尹振启

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

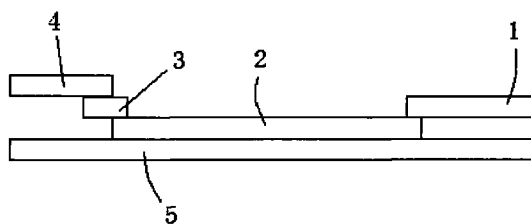
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种土拉弗朗西斯菌检测试纸及其制备方法、利用该检测试纸的检测方法和定量检测系统

(57) 摘要

本发明公开了一种土拉弗朗西斯菌检测试纸及其制备方法、利用该检测试纸的检测方法和定量检测系统,本发明利用胶体金标记和双抗体夹心免疫层析技术,建立土拉弗朗西斯菌的快速检测方法,建立的检测土拉弗朗西斯菌的胶体金免疫层析方法,能快速、灵敏、特异、准确地检测样品中的土拉弗朗西斯菌,并可实现定量,适用于现场快速检测。



1. 一种土拉弗朗西斯菌检测试纸,其特征在于,该检测试纸包括反应支撑物、紧密连接于反应支撑物上表面中部的硝酸纤维膜,硝酸纤维膜起始端的上表面与吸水垫部分重叠连接、硝酸纤维膜末端的上表面与含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体的金标抗体保护膜部分重叠连接,金标抗体保护膜的上表面部分重叠连接有样品垫,其中,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有质控抗体包被的质控条带、靠近其末端处设置有兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带。

2. 如权利要求 1 所述的土拉弗朗西斯菌检测试纸,其特征在于,所述反应支持物为 PCV 板,吸水垫为滤油纸;所述金标抗体保护膜为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维。

3. 如权利要求 1 所述的土拉弗朗西斯菌检测试纸,其特征在于,所述样品垫为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维,其采用含有吐温 20 的磷酸盐缓冲液进行预处理;所述质控抗体根据金标抗体的免疫源选择为抗兔 IgG 或者 SPA,其优选为羊抗兔 IgG。

4. 如权利要求 1 所述的土拉弗朗西斯菌检测试纸,其特征在于,所述试纸整体的外部包裹有外壳,该外壳上对应于所述样品垫处设置有样品孔,外壳上对应于所述质控条带、检测条带处设置有观察窗。

5. 一种上述土拉弗朗西斯菌检测试纸的制备方法,其特征在于,该制备方法具体为:

1) 制备胶体金:配制浓度为 0.01% 的 HAuCl_4 水溶液,并调整其 pH 值为 6-8,用 PBS 稀释抗体至浓度为 0.2mg/ml;

2) 制备金标抗体保护膜:取步骤 1) 中制备的胶体金分装于若干个离心管中,每支离心管中抗体量为 2-10ug,轻摇混匀后放置;每管中加入 10% 的 BSA100u1,混匀放置;将上面初步制得的胶体金探针进行第一步离心处理,弃上清液;每支离心管中加入 1ml 重悬液悬浮沉淀后进行第二步离心处理;弃上清液,管底得到暗红色的疏松状沉淀,加入 500u1 重悬液重悬后进行第三步离心处理,取上清液,均匀滴加在金标抗体保护膜的膜体上,并干燥处理;

3) 喷涂硝酸纤维膜:在膜体上喷涂羊抗兔 IgG 包被的质控条带、兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带,再将胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体均匀涂布在膜体上;

4) 将反应支撑物、硝酸纤维膜、吸水垫、金标抗体保护膜和样品垫按照试纸结构形式进行组装来制备检测试纸。

6. 如权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 1) 中的具体步骤为:磁力搅拌下准确加入 1ml 1% 的 HAuCl_4 ,同时加入 1.5-3ml 1% 的柠檬酸三钠水溶液,颜色稳定后继续加热,冷却至室温后加纯水至 100ml,4℃ 避光保存;用 K_2CO_3 调 pH 值最优为 7.0-7.5 后,用 PBS 稀释抗体至 0.2mg/ml,并保持胶体金稳定。

7. 如权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 2) 中所述第一步离心处理中在 12000rpm、4℃ 下离心 30 分钟,所述第二步离心处理在 12000rpm、4℃ 下离心 30 分钟,第三步离心处理在 1000rpm、4℃ 下离心 10 分钟。

8. 如权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 3) 中利用隔流喷金划线机以 10-100mm/s 的喷膜速度喷涂所述质控条带和检测条带,所述兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体浓度为 1-5mg/ml,采用 PB 稀释液稀释;所述羊抗兔 IgG 浓度为 0.1-5mg/ml。

9. 一种利用上述检测试纸快捷检测土拉弗朗西斯菌的方法,其特征在于,该方法具体为:将待测标本与样品稀释液混匀,再将样品混合液加入试纸样品孔处,液体依靠虹吸作用

向试纸另一端扩展,待测标本中含有的土拉弗朗西斯菌将与胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体形成相应的复合物,该复合物与兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体结合,在检测条带处形成红色线条来提示检测到相应的菌类;复合物与羊抗兔 IgG 形成红色沉淀线,以检验试纸的有效性。

10. 一种利用上述检测试纸定量检测土拉弗朗西斯菌的检测系统,其特征在于,该检测系统包括检测试纸和胶体金测试条判读仪,其中检测试纸包括硝酸纤维膜和含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体的金标抗体保护膜,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有质控抗体包被的质控条带、靠近其末端处设置有兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带;胶体金测试条判读仪能够判读该试纸条对土拉弗朗西斯菌的检测结果,以实现检测。

一种土拉弗朗西斯菌检测试纸及其制备方法、利用该检测试纸的检测方法和定量检测系统

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及土拉弗朗西斯菌的快速定性和定量检测方法以及胶体金免疫检测试纸条。

背景技术

[0002] 土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*, Tula) 简称土拉菌,该菌能引起“土拉热”的人畜共患病,感染者会出现皮肤溃烂、淋巴腺肿大、肺部感染和伤寒样症状,病情严重甚至死亡。该菌具有分布广泛,传播途径多样,感染剂量低、致病性强等特点。注射 10cfu、与皮肤接触 10-50cfu、或摄入 10^2-10^8 cfu 该细菌都能导致土拉菌病感染。因此该细菌被列为与鼠疫、炭疽等同列的 A 类恐怖源,已引起全世界的高度重视。《禁止化学武器公约》也将土拉热也被列为最为严格的控制对象。

[0003] 生物安全问题已引起全球关注,美国疾病预防控制中心将土拉菌列为最有可能用于生物武器的病原体。从国家生物安全战略高度看,我国境内,尤其是出入境口岸应加强对土拉菌的反生物恐怖的研究。反生物恐怖的首要任务是迅速作出诊断,明确病原,以便及时正确救治病人,减少继发性传播,迅速有效地控制和防治疫情的蔓延。胶体金标记的免疫层析方法具有快速、简便、不需要依赖重要装备、能够实现现场检测等特点,成为目前传染病快速诊断中研究的热点。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种土拉弗朗西斯菌检测试纸及其制备方法、利用上述检测试纸快捷检测土拉弗朗西斯菌的方法、和利用上述检测试纸定量检测土拉弗朗西斯菌的检测系统。

[0005] 为实现上述目的,本发明一种土拉弗朗西斯菌检测试纸,包括反应支撑物、紧密连接于反应支撑物上表面中部的硝酸纤维膜,硝酸纤维膜起始端的上表面与吸水垫部分重叠连接、硝酸纤维膜末端的上表面与含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体的金标抗体保护膜部分重叠连接,金标抗体保护膜的上表面部分重叠连接有样品垫,其中,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有质控抗体包被的质控条带、靠近其末端处设置有兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带。

[0006] 进一步,所述反应支持物为 PCV 板,吸水垫为滤油纸。

[0007] 进一步,所述金标抗体保护膜为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维。

[0008] 进一步,所述样品垫为玻璃纤维膜、聚脂膜或滤纸纤维,其采用含有吐温 20 的磷酸盐缓冲液进行预处理。

[0009] 进一步,所述质控抗体根据金标抗体的免疫源选择为抗兔 IgG 或者 SPA,其优选为羊抗兔 IgG。

[0010] 进一步,所述试纸整体的外部包裹有外壳,该外壳上对应于所述样品垫处设置有

样品孔,外壳上对应于所述质控条带、检测条带处设置有观察窗。

[0011] 一种上述土拉弗朗西斯菌检测试纸的制备方法,具体为:

[0012] 1) 制备胶体金:配制浓度为0.01%的HAuCl₄水溶液,并调整其pH值为6-8,用PBS稀释抗体至浓度为0.2mg/ml;

[0013] 2) 制备金标抗体保护膜:取步骤1)中制备的胶体金以1ml/管分装于若干个1.5ml的离心管中,每支管中抗体量为2-10ug,轻摇混匀后放置;每管中加入10%的BSA100u1,混匀放置;将上面初步制得的胶体金探针进行第一步离心处理,弃上清液;每支离心管中加入1ml重悬液悬浮沉淀后进行第二步离心处理;弃上清液,管底得到暗红色的疏松状沉淀,加入500u1重悬液重悬后进行第三步离心处理,取上清液,均匀滴加在金标抗体保护膜的膜体上,并干燥处理;

[0014] 3) 喷涂硝酸纤维膜:在膜体上喷涂羊抗兔IgG包被的质控条带、兔抗重组FopA-L多克隆抗体检测条带,再将胶体金标记的FopA-S多克隆抗体均匀涂布在膜体上;

[0015] 4) 将反应支撑物、硝酸纤维膜、吸水垫、金标抗体保护膜和样品垫按照试纸结构形式进行组装来制备检测试纸。

[0016] 进一步,所述步骤1)中的具体步骤为:磁力搅拌下准确加入1ml 1%的HAuCl₄,同时加入1.5-3ml 1%的柠檬酸三钠水溶液,颜色稳定后继续加热,冷却至室温后加纯水至100ml,4℃避光保存;用K₂CO₃调PH值最优为7.0-7.5后,用PBS稀释抗体至0.2mg/ml,并保持胶体金稳定。

[0017] 进一步,所述步骤2)中所述第一步离心处理中在12000rpm、4℃下离心30分钟,所述第二步离心处理在12000rpm、4℃下离心30分钟,第三步离心处理在1000rpm、4℃下离心10分钟。

[0018] 进一步,所述步骤3)中利用隔流喷金划线机以10-100mm/s的喷膜速度喷涂所述质控条带和检测条带,所述兔抗重组FopA-L多克隆抗体浓度为1-5mg/ml,采用PB稀释液稀释;所述羊抗兔IgG浓度为0.1-5mg/ml。

[0019] 进一步,所述FopA-S多克隆抗体标记1ml胶体金的量为3~5ug,采用PBS稀释,其pH为6-8。

[0020] 一种利用上述检测试纸快捷检测土拉弗朗西斯菌的方法,具体为:将待测标本与样品稀释液混匀,再将样品混合液加入试纸样品孔处,液体依靠虹吸作用向试纸另一端扩展,待测标本中含有的土拉弗朗西斯菌将与胶体金标记的FopA-S多克隆抗体形成相应的复合物,该复合物与兔抗重组FopA-L多克隆抗体结合,在检测条带处形成红色线条来提示检测到相应的菌类;复合物与羊抗兔IgG形成红色沉淀线,以检验试纸的有效性。

[0021] 一种利用上述检测试纸定量检测土拉弗朗西斯菌的检测系统,包括检测试纸和胶体金测试条判读仪,其中检测试纸包括硝酸纤维膜和含有胶体金标记的FopA-S多克隆抗体的金标抗体保护膜,硝酸纤维膜上靠近其起始端处设置有质控抗体包被的质控条带、靠近其末端处设置有兔抗重组FopA-L多克隆抗体检测条带;胶体金测试条判读仪能够判读该试纸条对土拉弗朗西斯菌的检测结果,以实现检测。

[0022] 本发明的土拉弗朗西斯菌检测试纸,基于纯化的FopA多抗标记胶体金,构建双抗体夹心法检测抗原,具有操作简单,检测时间短,无需专业人员,适合快速现场检测等优点。

附图说明

- [0023] 图 1 为土拉弗朗西斯菌胶体金免疫层析试纸条的目测敏感性图；
- [0024] 图 2 为特异性检测试验图；
- [0025] 图 3 为土拉弗朗西斯菌胶体金免疫层析试纸条模拟样品检测图；
- [0026] 图 4 为本发明检测试纸的拟合直线图；
- [0027] 图 5A 为本发明检测试纸的正面示意图；
- [0028] 图 5B 为本发明检测试纸的侧面示意图；
- [0029] 图 6A 为本发明检测试纸的阳性检测结果示意图；
- [0030] 图 6B 为本发明检测试纸的阴性检测结果示意图；
- [0031] 图 6C 为本发明检测试纸的无效检测结果示意图。

具体实施方式

[0032] 如图 1 至图 4, 图 5A、图 5B、图 6A、图 6B、图 6C 所示, 图 1 是土拉弗朗西斯菌胶体金免疫层析试纸条的目测敏感性图, 1-5 分别表示检测的样品浓度依次为空白对照、75ug/mL、7.5ug/mL、750ng/mL、375ng/mL。如图 1 所示, 75ug/mL、7.5ug/mL、750ng/mL 为阳性反应; 375ng/mL 无阳性反应; 即肉眼可观察到的最低浓度为 750ng/mL。

[0033] 图 2 为特异性检测试验图, 1 表示检测 750ng/mL 的马秋波 GP2 蛋白, 2 表示天花 M1R 蛋白, 3 表示禽流感 NP 蛋白, 4 表示登革病毒 Deng-E-D3 蛋白, 5 表示普氏立克次体 120N 蛋白。

[0034] 图 3 为土拉弗朗西斯菌胶体金免疫层析试纸条模拟样品检测; 测试条 1: 阴性对照、2~5: 分别为含 FopA 蛋白 750ng/mL 梨汁、面粉、饼干、果冻。

[0035] 图 5A、图 5B 中, 1: 吸水垫; 2: 硝酸纤维膜, T: 包被兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带; C: 包被羊抗兔 IgG 的质控条带; 3: 含有胶体金标记 FopA-S 多克隆抗体的玻璃纤维膜; 4: 样品垫; 5: 反应支持物。

[0036] 图 6A、图 6B、图 6C 是本发明的检测结果示意图; 出现 T、C 两条线表示阳性; 只出现 C 一条线表示阴性; T、C 两条线均不出现表示无效。

[0037] 本发明采用胶体金标记, 实质是抗体蛋白等生物大分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。胶体金对蛋白质的吸附主要取决于 pH 值和蛋白质的最小稳定浓度, 离子浓度和蛋白质分子量等也影响二者之间的吸附。本发明发现在胶体金检测试纸条的制备过程中 pH 值和离子浓度条件是关键, 胶体金是一种很不稳定的胶体, 通常认为, 在 pH 值等于蛋白质等电点或较高于等电点时吸附效果最好, 而且易形成牢固的复合物来稳定胶体金。此时蛋白质分子主要呈电中性, 与胶体金颗粒相互静电吸引力较小, 而蛋白质分子的表面张力却最大, 处于一种微弱的水化状态, 因此较易吸附于金颗粒的表面形成一个蛋白质层, 阻止了胶体金颗粒的相互接触, 使胶体金处于一个相对稳定状态。当 pH 值低于蛋白质的等电点时, 蛋白质主要带正电荷, 胶体金带负电荷, 二者极易结合形成大的聚合物而失去结合蛋白质的能力。pH 值高于蛋白质等电点时, 蛋白质带负电荷, 与金颗粒的负电荷相互排斥而不能互相结合。因此常用牛血清白蛋白, 卵白蛋白, 聚乙二醇或明胶作为稳定剂来防止蛋白质与胶体金的聚合与沉淀。经本实验证明本系统采用牛血清白蛋白作为稳定剂, 其特异性、敏感性都很好。本实验经过多次条件摸索得出: K^+ 对整个胶体金检测系统的影响较大, 所以在

选择抗体稀释液、样品处理液等都要避免引进 K^+ ,也可以采用透析去除 K^+ 。

[0038] 本发明提供一种方便、快捷地检测土拉弗朗西斯菌检测试纸,同时可利用金标免疫分析仪进行的半定量检测方法。该检测试纸的工作原理是利用特异性抗原-抗体的结合,用胶体金标记抗体,与待检抗原结合后,使与试纸上结合的捕获抗体显色。本发明还涉及制备上述检测试纸的制备方法。

[0039] 本发明能够基于一份标本和一个试纸,快速方便地检测出标本中的土拉弗朗西斯菌,节省了大量人力物力,方便、快速、简捷。

[0040] 一种方便、快捷地检测土拉弗朗西斯菌的方法,其中包括将待测标本与样品稀释液混匀,再将样品混合液加入试纸样品孔处,样品中的液体依靠虹吸作用上行,10-15分钟判读结果;所述检测试纸包括:

[0041] (1) 反应支持物;

[0042] (2) 吸水垫;

[0043] (3) 硝酸纤维膜,该膜包被有兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体和质控抗体的检测条带和质控条带;

[0044] (4) 金标抗体保护膜,其中含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体;

[0045] (5) 样品垫,采用含有吐温 20 的磷酸盐缓冲液对玻璃纤维素膜进行预处理;

[0046] 其中反应支持物为 PCV 板,吸水垫为滤油纸,硝酸纤维膜依次包被羊抗兔 IgG、兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体 1mg/ml,金标抗体保护膜为含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体的玻璃纤维膜或聚脂膜或滤纸纤维,样品垫选用玻璃纤维膜或聚脂膜或滤纸纤维。

[0047] 本发明土拉弗朗西斯菌检测试纸,其中吸水垫、硝酸纤维膜、金标抗体保护膜、样品垫和反应支持物按照附图 5A 所示方式构成;反应支持物 5 位于底层,硝酸纤维膜 2 位于反应支持物 5 上的中部,该膜的 T 处是兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带,并且 C 处是羊抗兔 IgG 包被的质控条带;玻璃纤维膜 3 位于硝酸纤维膜上部的一侧并与其部分重叠,该膜含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体;吸水垫 1 位于硝酸纤维膜 2 上部的相对于玻璃纤维膜 3 而言的另一侧并与其部分重叠。样品垫 4 位于 2 上与 1 相反的一侧并与其部分重叠。

[0048] 本发明土拉弗朗西斯菌检测试纸,以吸水垫一侧为末端,样品垫一侧为末端,兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体检测条带位于接近起始端,羊抗兔 IgG 包被的质控条带接近于起始端。

[0049] 本发明土拉弗朗西斯菌检测试纸的制备方法,该制备方法包括以下步骤:胶体金探针的制备,金标垫的制备,硝酸纤维膜的喷涂包被,样品垫的预处理。

[0050] 1、胶体金探针的制备

[0051] (1) 将 $H AuCl_4$ 先配制为 0.01% 水溶液。磁力搅拌下准确加入 1ml 1% 的 $H AuCl_4$,同时加入 1.5-3ml 1% 的柠檬酸三钠水溶液。颜色稳定后继续加热,冷却至室温后加纯水补足至 100ml,4℃ 避光保存。

[0052] (2) 用 K_2CO_3 调 PH 值为约 6-8,优选为约 7.0-8.0,更优选约 7.0-7.5 后。

[0053] (3) 将胶体金调至 pH 7.0-7.5,用 PBS 稀释抗体至 0.2mg/ml。

[0054] (4) 保持胶体金稳定。

[0055] 本发明还提供一种获得维持胶体金稳定的抗体最佳标记剂量的方法,该方法包

括：

[0056] a. 取 10 支洁净的 1.5ml 离心管,分别加入胶体金溶液 1ml。

[0057] b. 在 1-10 号管内分别加入 10ml、20ml、30ml、40ml、50ml、60ml、70ml、80ml、90ml、100ml 的 PB,再依次加入稀释好的 0.2mg/ml 的待标记抗体 90ml、80ml、70ml、60ml、50ml、40ml、30ml、20ml、10ml、0ml,混匀,静置 2 分钟。

[0058] c. 在 10 个管内分别加入 10% NaCl 溶液 100ml,混匀后室温静置 2 小时,观察颜色变化。

[0059] 未加抗体及加入量不足以稳定胶体金的试管中的液体颜色呈现由红变蓝的变化,而加入抗体量达到或超过最低稳定剂量的试管则保持红色不变。与对照管(1号管)相比,颜色最接近、含抗体剂量最低的试管所含的抗体剂量,即为 1ml 胶体金所必须的抗体稳定剂量,在此基础上再加 20%抗体,即为抗体最佳标记剂量。本发明经过反复试验和分析,得出的结果表明:维持胶体金溶液适宜抗体量为 2-10ug,优选抗体量 2-8ug,更优选 3-6ug,最优选为 3-5ug。

[0060] 2、金标垫的制备

[0061] 取上述 pH 的胶体金以 1ml/管分装于 1.5ml 的离心管中。每支管中为 2-10ug,优选抗体量 2-8ug,更优选 3-6ug,最优选为 3-5ug,轻摇混匀后放置。每管中加入 10%的 BSA100ul,混匀放置。将上面初步制得的胶体金探针在 12000rpm、4℃下离心 30 分钟,弃上清液。每支离心管中加入 1ml 重悬液悬浮沉淀后同上离心。弃上清液,管底得到暗红色的疏松状沉淀,加入 500ul 重悬液重悬后于 4℃,1000rpm,离心 10 分钟;取上清液,均匀滴加在 1cm 宽的玻璃纤维上,37℃干燥。

[0062] 3、硝酸纤维膜的喷涂

[0063] (1) 利用隔流喷金划线机以 50mm/s 的喷膜速度包被检测兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体和质控羊抗兔 IgG 两个条带的硝酸纤维膜;

[0064] 在该喷涂包被膜的步骤中,喷膜速度优选是 10-100mm/s,更优选是 45-55mm/s,最优选是 50mm/s;所述兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体,其加入量为 1-5mg/ml,该多克隆抗体的稀释液可以为 PB;质控羊抗兔 IgG 可以购自鼎国生物技术公司,其浓度为 0.1-5mg/ml 更优选是 0.5-2.5mg/ml,最优选为 1mg/ml;

[0065] (2) 制备一种含有胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体的玻璃纤维膜,将胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体均匀涂布在玻璃纤维膜上。抗体用 PBS 稀释,pH 为 6-8,优选 7-8,最适 PH 值为 7.0-7.5。

[0066] 本发明还公开了所述试纸在检测土拉弗朗西斯菌中的应用,参见附图 3。

[0067] 在本发明检测土拉弗朗西斯菌的方法中,先将待测标本放入装有稀释液的小瓶内,再用移液器将样品混合液加入试纸的样品垫 4 处(即末端),样品中的液体依靠虹吸作用上行,一般需 10-15 分钟判读结果:

[0068] 如标本中含有土拉弗朗西斯菌,则它将与试纸上胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体形成相应的复合物,液体展开上行并与硝酸纤维膜上的兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体结合,形成红色线条,即在“T”处形成红色条带。

[0069] 无论是否含有相对应的抗原,胶体金标记多克隆抗体继续随液体继续上行并与该膜上的羊抗兔 IgG 形成红色沉淀线,即在“C”处形成红色条带。此线是质控线,如胶体金失

效,此线就不会出现,说明试纸失效。如图 6 所示。

[0070] 阳性结果会出现 2 条红色沉淀线,阴性结果出现 1 条红色沉淀线,如不出现线条说明试纸失效。如若肉眼无法辨别 T 处红色条带,可利用金标免疫分析仪进行半定量检测。

[0071] 本发明的技术方案是:采用兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体和羊抗兔 IgG 分别固相于硝酸纤维膜上,结合胶体金标记的 FopA-S 多克隆抗体,应用膜层析双抗体夹心法的原理检测标本中的土拉弗朗西斯菌。

[0072] 本发明还提供一种将胶体金测试条与胶体金生物传感器有机整合的定量检测土拉弗朗西斯菌的检测系统。运用胶体金测试条判读仪的优势在于,判读仪能够在人眼无法正确识别可疑物检测是否存在阳性的情况下,正确判读该试纸条检测结果。减少了因人为主观判读带来的错误率,增加了客观性、准确性;并且可实现定量检测。此外,胶体金判读仪携带方便、使用简单、判定准确、结果客观、易保留,为检验工作带来了方便。

[0073] 本发明涉及的上述土拉弗朗西斯菌检测试纸,它还包含金标抗体保护膜。

[0074] 本发明涉及的上述土拉弗朗西斯菌检测试纸,其中反应支持物选用 PVC 板。

[0075] 本发明涉及的上述土拉弗朗西斯菌检测试纸,其中吸水垫选用滤纸。

[0076] 本发明涉及的上述土拉弗朗西斯菌检测试纸,其中金标抗体保护膜选用聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

[0077] 实施例 1:胶体金免疫层析试纸条的制备

[0078] 材料和方法

[0079] 1、抗原及抗体

[0080] 兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体、FopA-S 多克隆抗体由中国检科院卫生检疫所提供。羊抗兔 IgG(购自鼎国生物技术公司)

[0081] 2、层析测试条耗材

[0082] 结合垫(玻璃纤维)、硝酸纤维素膜(NC 膜,SHF 1350225)、样品垫及吸水垫、滤纸购自 Minipore 公司。

[0083] 3、实验仪器

[0084] 金标免疫分析仪可购自中国科学院上海光学精密机械研究所、中国检验检疫科学研究院联合研制的分析仪。

[0085] 4、胶体金免疫层析试纸条的制备

[0086] 4.1 胶体金结合垫

[0087] 将 pH 值 7.0 ~ 7.5、浓度 0.2mg/ml 的 FopA-S 多克隆抗体标记于柠檬酸钠法制备 25nm 的胶体金颗粒的胶体金颗粒,37°C 干燥。

[0088] 4.2 硝酸纤维素膜

[0089] 检测带:兔抗重组 FopA-L 多克隆抗体 1mg/ml;质控带:羊抗兔 IgG:1mg/ml,37°C 干燥。

[0090] 4.3 组装

[0091] 将样品垫、结合垫、吸水垫依次贴在带有豁合剂的底衬卡,切成 0.4cm 的条,干燥,装壳,室温贮存备用。

[0092] 实施例 2:样品的定性和定量检测的判定

[0093] 1、样品的处理

[0094] (1) 液体 -- 梨汁首先用缓冲液分别以适当的比例稀释混匀；(2) 固体 / 半固体 -- 称取白色粉末：(面粉、饼干) 和半固态果冻加入缓冲液溶解后，取溶解后的上清溶液将重组土拉菌 FopA 蛋白分别加入其中使 FopA 蛋白的终浓度达 750ng/mL。

[0095] 表 1 土拉菌样品检测及灵敏度

[0096]

样品	处理方法	灵敏度
梨汁	1: 4 PB 稀释, 0.1 M K ₂ CO ₃ 调节 pH8.4, 100 uL 上样	750 ng/mL
面粉	1: 10 PB 稀释, 0.1 M K ₂ CO ₃ 调节 pH8.4, 100 uL 上样	750 ng/mL
饼干	2 g 加入 10 mL PB 溶解静止取上清, 0.1 M K ₂ CO ₃ 调节 pH 8.4, 100 uL 上样	750 ng/mL
果冻	2 g 加入 5 mL PB 溶解, 0.1 M K ₂ CO ₃ 调节 pH 8.4, 100 uL 上样	750 ng/mL

[0097] 2 定性检测

[0098] 将处理后的样品和样品处理液（作为阴性样品）100uL 加到制备好的层析条样品垫端，静置 15min，观察结果。检测带和质控带均出现红色判为阳性，仅质控带出现红色为阴性，检测带和质控带均不显色，则为试纸条失效。

[0099] 3、定量检测

[0100] 3.1 判定值 (CUT-OFF) 的确定

[0101] 按 1.6.1 将阴性样品检测 20 次，用金标免疫分析仪扫描读取信号 T/C 比值。20 个样品 T/C 比值的平均值 (AVERAGE) 与 3 倍标准差 (STDEVA) 之和为 CUT-OFF 值。

[0102] 3.2 定量检测判定

[0103] 将显色后的金标条放入金标免疫分析仪扫描，读取信号 T/C 比值，大于判定值为阳性。

[0104] 实施例 3：灵敏度试验

[0105] 1、定量检测的灵敏度

[0106] 检测不同浓度土拉弗朗西斯菌，经过计算判定值 (CUT-OFF) 为 0.003，浓度为 750ng/mL 的土拉弗朗西斯菌的平均 T/C 比值分别为的值均高于 0.003 结果为阳性；当土拉弗朗西斯菌浓度大于 750ng/mL 时，T/C 比值平均值大于 0.003，故定量检测灵敏度为 750ng/mL。

[0107] 表 2 土拉菌胶体金免疫层析试纸条各浓度检测结果

[0108]

土拉菌 FopA				
蛋白浓度 (ng/mL)	检测值 T	指控值 C	T/C 值	结果
0	0.001	1.857	0	-
375	0.004	1.799	0.002	-
750	0.497	1.662	0.299	+
1500	0.591	1.768	0.334	+
3000	0.646	1.789	0.361	+
6000	0.7	1.745	0.401	+
12000	0.815	1.634	0.499	+
24000	1.049	1.587	0.661	+

[0109] 2、直观检测灵敏度评价

[0110] 按确定的最佳反应条件制备胶体金免疫层析试纸条,检测不同浓度的土拉弗朗西斯菌。将土拉弗朗西斯菌用样品处理液稀释成浓度依次为75ug/mL、7.5ug/mL、750ng/mL、375ng/mL。如图1所示,75ug/mL、7.5ug/mL、750ng/mL,同时进行检测。

[0111] 结果如图1所示,直接目测的灵敏度750ng/mL显色更加清晰。

[0112] 3、样品实用性检测

[0113] 分别选取了梨汁、面粉、饼干、果冻为模拟样品检测,不同的材料其处理方法不同(表1)各种样品的处理方式,处理后样品的检测灵敏度均为750ng/mL。

[0114] 实施例4:特异性试验

[0115] 按确定的最佳反应条件制备胶体金免疫层析试纸条,以样品稀释液同样检测750ng/mL的马秋波GP2蛋白、天花M1R蛋白、禽流感NP蛋白、登革病毒Deng-E-D3蛋白和普氏立克次体120N蛋白。以制备好的胶体金免疫层析试纸条检测,并与同样浓度的土拉菌FopA蛋白样品对照,同时检测空白对照。结果如图2所示,该检测试纸条对于这些蛋白及毒素均无非特异现象出现,对土拉弗朗西斯菌特异性检测效果良好。

[0116] 实施例5:标准曲线拟合

[0117] 以土拉菌FopA蛋白的浓度为横坐标(X),金标分析仪读值T/C比值(Y)为纵坐标作图,建立胶体金检测标准曲线。(参见图4)。

[0118] 检测土拉弗朗西斯菌各个浓度下,经过计算判定值(CUT-OFF)为0.003的T/C读值。可见浓度为375ng/ml的土拉菌FopA蛋白的平均T/C比值均为0.002,低于0.003,为阴性,当土拉菌FopA蛋白浓度为750~24000ng/ml时,蛋白的浓度与其金标分析仪读值T/C比值之间呈良好的线性关系,拟合曲线见图4。线性方程为: $y = 0.003x + 0.037$; $R^2 = 0.9861$ 。

[0119] 实施例6:回收率试验

[0120] 在线性检测范围内,检测已知浓度的土拉弗朗西斯菌,根据金标分析仪读值T/C比值和标准曲线计算出检测浓度,检测浓度与理论浓度的比值百分率为回收率。由表

2 可见,检测理论浓度为 750,1500,3000,6000ng/ml 的土拉菌 FopA 蛋白时,其回收率在 56.7%~89.2%之间。

[0121] 表 2 土拉菌胶体金免疫层析试纸条检测的回收率

[0122]

金标分析 仪	检测浓 度	理论浓 度	回收率
T/C 比值	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)
0.299	425	750	56.7
0.334	1325	1500	88.3
0.361	2675	3000	89.2
0.401	4675	6000	77.9

[0123] 实施例 7 :稳定性试验

[0124] 参见图 3,取在 37℃放置的土拉弗朗西斯菌胶体金检测试纸条进行检测,第 7d 的检测结果可见土拉弗朗西斯菌测试条的稳定性良好,在 37℃放置 7d 后仍能特异性的检出土拉弗朗西斯菌,而且敏感性也未下降。和新制备的检测试纸条相比,灵敏度没有明显下降,且特异性良好。

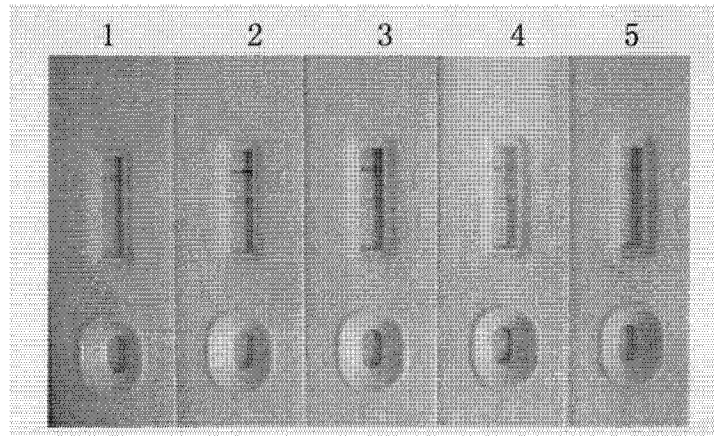


图 1

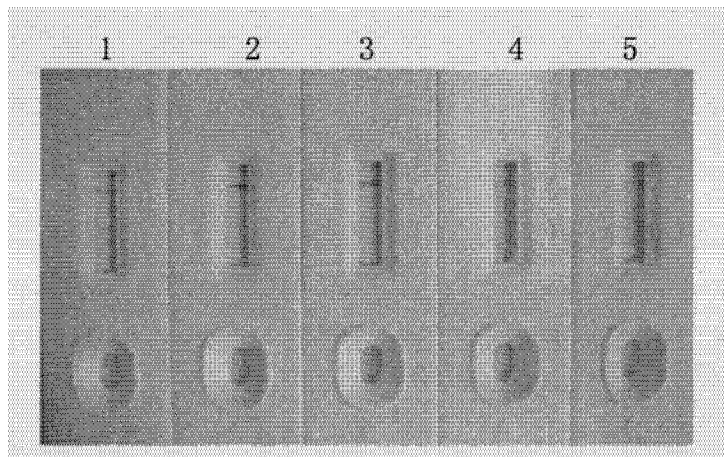


图 2

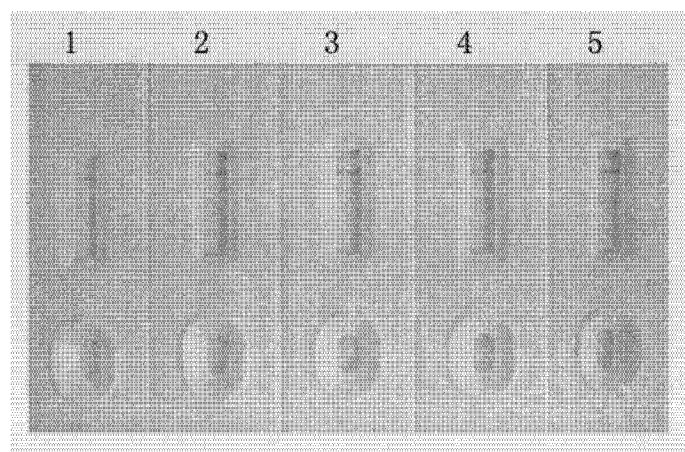


图 3

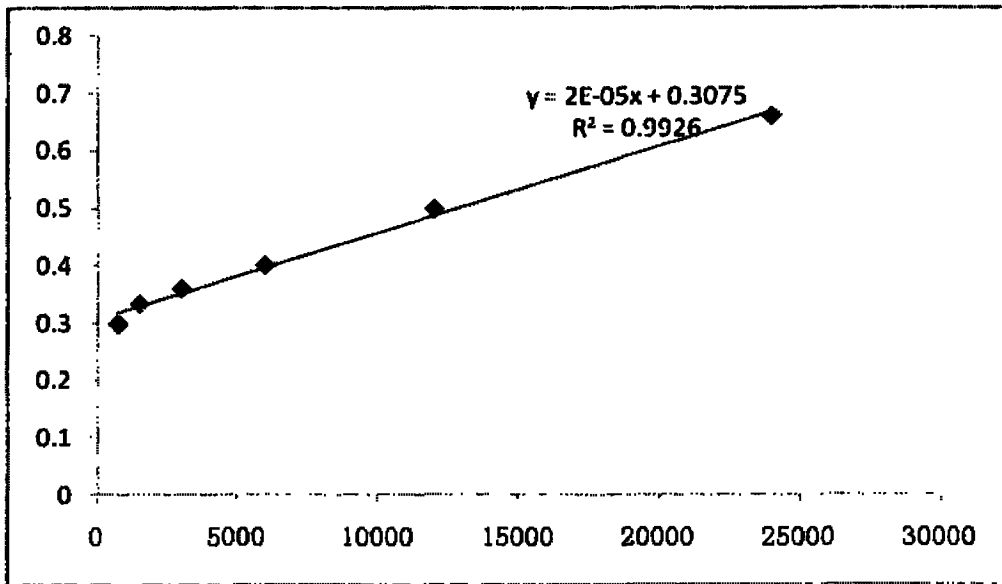


图 4

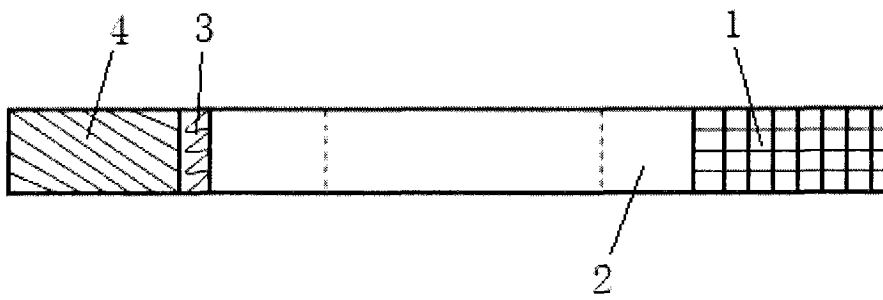


图 5A

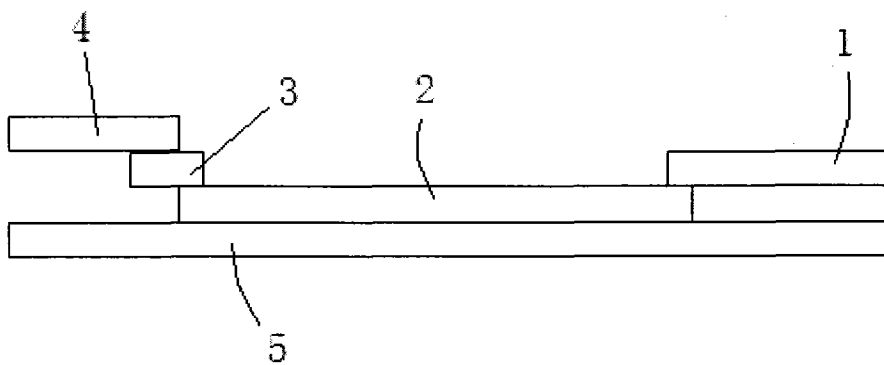


图 5B

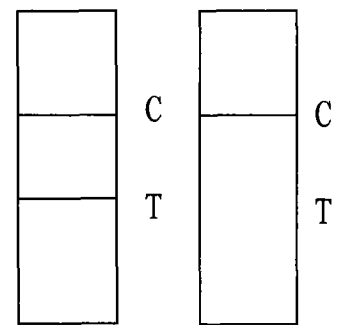


图 6A

图 6B

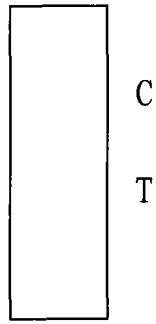


图 6C

专利名称(译)	一种土拉弗朗西斯菌检测试纸及其制备方法、利用该检测试纸的检测方法和定量检测系统		
公开(公告)号	CN101949927A	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010249600.3	申请日	2010-08-10
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	王静 景滢滢 王振东 杨宇		
发明人	王静 景滢滢 王振东 杨宇		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种土拉弗朗西斯菌检测试纸及其制备方法、利用该检测试纸的检测方法和定量检测系统，本发明利用胶体金标记和双抗体夹心免疫层析技术，建立土拉弗朗西斯菌的快速检测方法，建立的检测土拉弗朗西斯菌的胶体金免疫层析方法，能快速、灵敏、特异、准确地检测样品中的土拉弗朗西斯菌，并可实现定量，适用于现场快速检测。

