

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710054393.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月10日

[11] 公开号 CN 101051050A

[22] 申请日 2007.5.14

[21] 申请号 200710054393.4

[71] 申请人 郑州万泰生物科技有限公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业开发区冬青街7号

[72] 发明人 王伟 青震涛 刁琳琪 王芸
宁捷

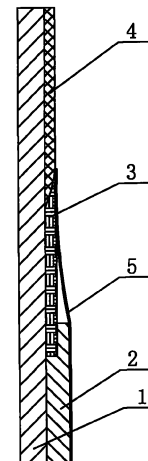
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

[54] 发明名称

大肠杆菌 O157 检测条

[57] 摘要

大肠杆菌 O157 检测条，包括基材，基材上面下部覆盖有引水材料，引水材料上部与玻璃纤维膜相接，玻璃纤维膜上部与硝酸纤维膜相接，玻璃纤维膜上吸附有抗大肠杆菌 O157 单克隆标记抗体，硝酸纤维膜上自上而下分布有一条包被有抗鼠 IgG 的质控线、一条包被有抗大肠杆菌 O157 单克隆抗体的检测线，玻璃纤维膜及引水材料上覆盖有覆膜。利用本发明可快速、准确地对大肠杆菌 O157 进行检测。



1、大肠杆菌0157检测条，包括基材，基材上面下部覆盖有引水材料，引水材料上部与玻璃纤维膜相接，玻璃纤维膜上部与硝酸纤维膜相接，其特征在于，玻璃纤维膜上吸附有抗大肠杆菌0157单克隆标记抗体，硝酸纤维膜上自上而下分布有一条包被有抗鼠IgG的质控线、一条包被有抗大肠杆菌0157单克隆抗体的检测线，玻璃纤维膜及引水材料上覆盖有覆膜。

2、如权利要求1所述的大肠杆菌0157检测条，其特征在于，所述的抗大肠杆菌0157单克隆抗体可按下述方法制备：（1）免疫，灭活大肠杆菌0157:H7稀释成 10^9 cfu/ml，每只小鼠腹腔注射0.5ml，每间隔一周同样剂量加强注射一次，共4-5次，融合前三天，尾静脉注射同样抗原加强免疫；（2）细胞融合，取免疫小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合，分种于7块96孔培养板，置于5%CO₂、37℃培养箱培养；（3）筛选，将大肠杆菌0157:H7置于-20℃冰箱冷冻，然后室温解冻，如此反复数次；将其用包被缓冲液做1:100倍稀释，包被微孔板，每孔50ul室温过夜，再用封闭液封闭残余位点；筛选时，将50ul培养上清加于微孔中，37℃反应40分钟，洗涤三次，加辣根过氧化物酶，反应40分钟，显色；（4）克隆，强阳性孔用有限稀释法进行克隆化培养，当细胞生长到铺满孔底1/5时，再用间接ELISA法检测，强阳性孔再克隆，反复3-4次，至阳性率达到100%；（5）腹水制备，将杂交瘤细胞扩大培养，注射于经过预处理的BALB/c小鼠腹腔，每只 2×10^5 个，7-10天小鼠腹部隆起，活体穿刺抽取腹水；（6）抗体纯化，用辛酸-硫酸铵法将含有单克隆抗体的腹水纯化。

大肠杆菌O157检测条

技术领域

本发明属于疾病检测诊断用具技术领域，特别涉及一种大肠杆菌 O157 检测条。

背景技术

大肠杆菌是人和动物肠道常见菌群之一，也是引起食源性疾病的主要细菌，可分为致病性和非致病性两大类。根据其血清型可将致病性大肠杆菌分为5类：产肠毒素大肠杆菌(ETEC)、肠致病性大肠杆菌(EPEC)、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)、肠出血性大肠杆菌(EHEC)、肠粘附性大肠杆菌(EAEC)。大肠杆菌(E. Coli)O157是肠出血性大肠杆菌(EHEC)的主要血清型，可引起出血性肠炎，感染病人的典型症状为血便、腹痛、低热或不发热，约有10%的病人发展为溶血性尿毒综合症(HUS)及血栓性血小板减少性紫癜(TTP)，并可对被感染病人的肠道、肝、脾、肾、淋巴、脑、呼吸系统和神经系统造成损伤，平均死亡率2—7%。其危及生命的并发症以急性肾功能衰竭、溶血性贫血和血小板减少为特征，老人和儿童为高危人群，易发生溶血性尿毒症，死亡率高达30%以上。世界卫生组织已把大肠杆菌(E. Coli)O157出血性肠炎列为新发传染病。

控制大肠杆菌O157感染疫情的发生及蔓延的一个关键因素在于快速、准确地从不同标本中检测出病原菌，从而为综合防治感染提供可靠的诊断依据。目前对大肠杆菌O157尚无理想的快速检测方法，主要通过病原分离鉴定，但细菌培养需要较长时间，一般需要24小时以上，甚至几天，不利于及时确诊并采取相应控制措施。而其他一些辅助诊断方法如凝集实验、免疫荧光法等，普遍存在灵敏度低、特异性差等问题，有些还需要特殊仪器，操作复杂。

发明内容

本发明目的在于提供一种可快速、准确地对大肠杆菌O157进行检测的大肠杆菌O157检测条。

为达上述目的，本发明采用如下技术方案：大肠杆菌0157检测条，包括基材，基材上面下部覆盖有引水材料，引水材料上部与玻璃纤维膜相接，玻璃纤维膜上部与硝酸纤维膜相接，玻璃纤维膜上吸附有抗大肠杆菌0157单克隆标记抗体，硝酸纤维膜上自上而下分布有一条包被有抗鼠IgG的质控线、一条包被有抗大肠杆菌0157单克隆抗体的检测线，玻璃纤维膜及引水材料上覆盖有覆膜。

所述的抗大肠杆菌0157单克隆抗体可按下述方法制备：（1）免疫，灭活大肠杆菌0157：H7稀释成 10^9 cfu/ml，每只小鼠腹腔注射0.5ml，每间隔一周同样剂量加强注射一次，共4-5次，融合前三天，尾静脉注射同样抗原加强免疫；（2）细胞融合，取免疫小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合，分种于7块96孔培养板，置于体积百分比浓度5%CO₂、37℃培养箱培养；（3）筛选，将大肠杆菌0157：H7置于-20℃冰箱冷冻，然后室温解冻，如此反复数次；将其用包被缓冲液做体积比1：100倍稀释，包被微孔板，每孔50u1室温过夜，再用封闭液封闭残余位点；筛选时，将50u1培养上清加于微孔中，37℃反应40分钟，洗涤三次，加辣根过氧化物酶，反应40分钟，显色；（4）克隆，强阳性孔用有限稀释法进行克隆化培养，当细胞生长到铺满孔底1/5时，再用间接ELISA法检测，强阳性孔再克隆，反复3-4次，至阳性率达到100%；（5）腹水制备，将杂交瘤细胞扩大培养，注射于经过预处理的BALB/c小鼠腹腔，每只 2×10^5 个，7-10天小鼠腹部隆起，活体穿刺抽取腹水；（6）抗体纯化，用辛酸-硫酸铵法将含有单克隆抗体的腹水纯化。

本发明中胶体金制备过程为：用体积百分比浓度1%的甲基硅油水溶液硅化所使用的玻璃器皿，将1000ml去离子水加热煮沸5分钟，加入重量百分比浓度1%的氯金酸水溶液10ml，加热混合2分钟，加入重量百分比浓度1%的柠檬酸三钠水溶液18ml，快速混合10分钟，呈现深红色，冷却至15-30℃，加入重量百分比浓度1%的PEG水溶液1ml混匀，即得所需胶体金颗粒。胶体金标记物制备：经实验确定标记抗体的PH为7.0-8.0，最佳标记蛋白量为25ug单抗/ml胶体金。取所需量的胶体金溶液，每ml胶体金中加入25ug单抗，室温搅拌混合10分钟，加入终止蛋白继续搅拌混合20分钟。将上述标记物15000rpm离心60

分钟，弃上清，将沉淀以原体积（胶体金溶液等体积）0.01MPH8.2的PBS水溶液溶解，如上重复离心两次。最后沉淀物用0.01MPH8.2的PBS水溶液悬浮，恢复至原体积的40%，即胶体金结合物（胶体金标记物）。将胶体金结合物均匀分散于玻璃纤维上，干燥备用。

本发明中，检测线、质控线的最佳包被液浓度均为2mg/ml，包被温度和时间均为37℃、1小时。

本发明利用胶体金免疫层析双抗体夹心法检测标本中大肠杆菌0157抗原。以胶体金作为标记物，以硝酸纤维膜作为包被载体，硝酸纤维膜上包被两种抗体，一种是抗大肠杆菌0157单克隆抗体，用于捕捉标本中的抗原；另一种是兔抗鼠多抗，用于本检测条的质控。再辅以其他原材料，组装成检测条。检测过程中，标本利用微孔膜的层析作用移动，移动过程中发生抗原抗体反应。标本中如含有大肠杆菌0157抗原，首先与胶体金标记抗体（Au-Ab）结合，形成Au-Ab-Ag复合物，当Au-Ab-Ag复合物遇到膜上包被的抗体时，即形成Au-Ab-Ag---Ab双抗体夹心复合物，呈现目测可见的红色条带，显色程度与抗原含量成正比。利用本发明检测大肠杆菌0157抗原，方法简单、快速、灵敏度高、特异性好，灵敏度和特异性均达95%以上；重复性良好，在线性实验中，菌量为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 cfu/ml的标本，经测定显色呈梯度递减，显示显色程度与抗原含量成正比；稳定性实验表明，本发明在4—25℃可保持稳定18个月。

附图说明

图1为本发明结构示意图。

具体实施方式

大肠杆菌0157检测条，包括基材1，基材1上面下部覆盖有引水材料2，引水材料2上部与玻璃纤维膜3相接，玻璃纤维膜3上部与硝酸纤维膜4相接，玻璃纤维膜3上吸附有抗大肠杆菌0157单克隆标记抗体，硝酸纤维膜4上自上而下分布有一条包被有抗鼠IgG的质控线、一条包被有抗大肠杆菌0157单克隆抗体的检测线，玻璃纤维膜3及引水材料2上覆盖有覆膜5。

所述的抗大肠杆菌0157单克隆抗体可按下述方法制备：（1）免疫，灭活

大肠杆菌O157:H7稀释成 10^9 cfu/ml, 每只小鼠腹腔注射0.5ml, 每间隔一周同样剂量加强注射一次, 共4-5次, 融合前三天, 尾静脉注射同样抗原加强免疫;

(2) 细胞融合, 取免疫小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合, 分种于7块96孔培养板, 置于体积百分比浓度5%CO₂、37℃培养箱培养;

(3) 筛选, 将大肠杆菌O157:H7置于-20℃冰箱冷冻, 然后室温解冻, 如此反复数次; 将其用包被缓冲液做体积比1:100倍稀释, 包被微孔板, 每孔50u1室温过夜, 再用封闭液封闭残余位点; 筛选时, 将50u1培养上清加于微孔中, 37℃反应40分钟, 洗涤三次, 加辣根过氧化物酶, 反应40分钟, 显色;

(4) 克隆, 强阳性孔用有限稀释法进行克隆化培养, 当细胞生长到铺满孔底1/5时, 再用间接ELISA法检测, 强阳性孔再克隆, 反复3-4次, 至阳性率达到100%;

(5) 腹水制备, 将杂交瘤细胞扩大培养, 注射于经过预处理的BALB/c小鼠腹腔, 每只 2×10^5 个, 7-10天小鼠腹部隆起, 活体穿刺抽取腹水;

(6) 抗体纯化, 用辛酸-硫酸铵法将含有单克隆抗体的腹水纯化。

单克隆抗体采用两两配对法筛选, 筛选出两株单抗, 一株做为包被抗体, 一株做为标记抗体。检测线和质控线包被用包被液浓度均可选择2 mg/ml、3 mg/ml 或者4mg/ml, 包被温度和时间均为37℃ 1 小时。

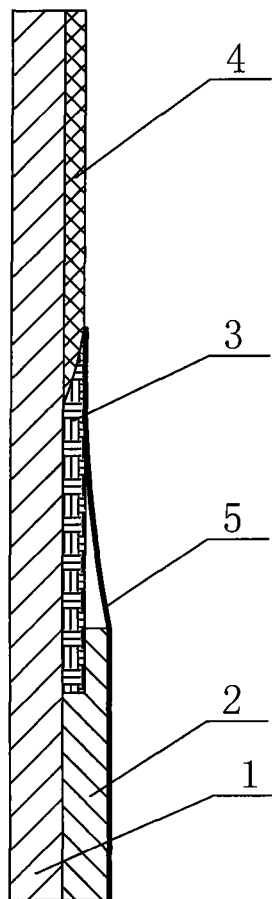


图 1

专利名称(译)	大肠杆菌O157检测条		
公开(公告)号	CN101051050A	公开(公告)日	2007-10-10
申请号	CN200710054393.4	申请日	2007-05-14
[标]发明人	王伟 青震涛 刁琳琪 王芸 宁捷		
发明人	王伟 青震涛 刁琳琪 王芸 宁捷		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

大肠杆菌O157检测条，包括基材，基材上面下部覆盖有引水材料，引水材料上部与玻璃纤维膜相接，玻璃纤维膜上部与硝酸纤维膜相接，玻璃纤维膜上吸附有抗大肠杆菌O157单克隆标记抗体，硝酸纤维膜上自上而下分布有一条包被有抗鼠IgG的质控线、一条包被有抗大肠杆菌O157单克隆抗体的检测线，玻璃纤维膜及引水材料上覆盖有覆膜。利用本发明可快速、准确地对大肠杆菌O157进行检测。

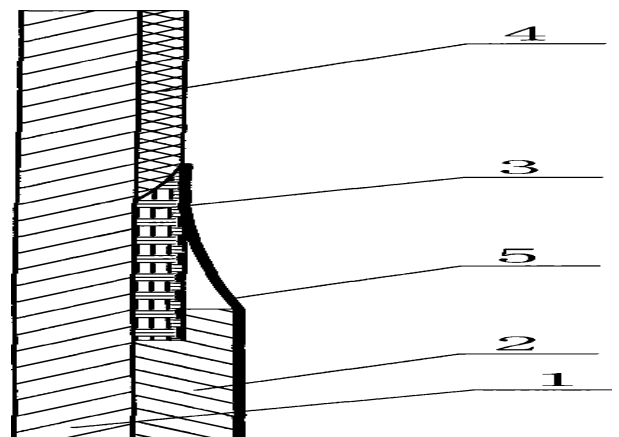


图 1