

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253202 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201010173609. 0

(22) 申请日 2010. 05. 17

(71) 申请人 北京库尔科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命园路 29 号 C
座 100 号

(72) 发明人 李锋 陈立柱

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

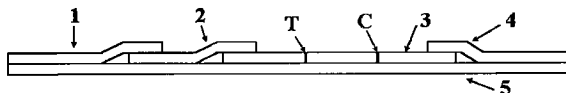
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物学免疫方法的测定技术领域,特别涉及一种苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法。试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)。胶体金垫为胶体金标记的苏云金芽孢杆菌多抗玻璃纤维(或无纺布),硝酸纤维素膜上依次包被了苏云金芽孢杆菌多抗作为检测线(T线),羊抗鼠IgG抗体作为质控线(C线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备苏云金芽孢杆菌检测试剂盒,用于检测样本中可能存在的苏云金芽孢杆菌,本发明具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。



1. 一种苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法,其特征在于由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和 PVC 支撑板组成,样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫依次粘贴在 PVC 支撑板上,胶体金垫为胶体金标记的苏云金芽孢杆菌多抗玻璃纤维或无纺布,硝酸纤维素膜上依次包被了苏云金芽孢杆菌多抗作为检测线(T线),羊抗鼠 IgG 抗体作为质控线(C线)。

2. 一种权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的样品垫为玻璃纤维或无纺布,吸样垫为吸水滤纸。

3. 一种权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂枸橼酸三钠作用下制成大小为 20-40nm 的胶体金颗粒。

4. 一种权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金垫的制备方法为:取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 9.0,室温放置 10 分钟;逐滴加入蛋白浓度为 0.2mg/ml 的苏云金芽孢杆菌多抗 0.04ml,混合均匀,室温放置 30 分钟;加入 0.075ml 10%牛血清蛋白(BSA)溶液,混合均匀,室温放置 10 分钟;11000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,用含 5%蔗糖的 0.002mol/L pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 5ml 复溶,重复 2 次;最后用硼酸盐缓冲液溶解至 3ml,得到苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物;将苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物按 1ml 铺 56cm^2 的比例均匀铺在无纺布上,再置干燥间,在温度 38°C ,湿度小于 30%的条件下干燥 2-4 小时,制成胶体金垫。

5. 一种权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上的两条线的包被方法为:设定划膜仪涂覆参数 $1\mu\text{L}/\text{cm}$,分别用微量进样器取 0.2ml 苏云金芽孢杆菌多抗、羊抗鼠 IgG,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆苏云金芽孢杆菌多抗(T线)、羊抗鼠 IgG(C线)。划线后将硝酸纤维素膜放置在烘箱中,温度 38°C ,干燥 24 小时,备用。

6. 一种权利要求 1 所述的苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的苏云金芽孢杆菌检测试剂盒的组装方法为:将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫由一端依次黏附在 PVC 支撑板上,即可形成检测苏云金芽孢杆菌的试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明是涉及生物学免疫方法的测定技术领域,特别是涉及一种以胶体金免疫层析法快速检测苏云金芽孢杆菌的检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 于 1901 年在日本被发现, 1911 年由柏林纳从地中海粉螟的患病幼虫中分离出来, 并依其发现地点德国苏云金省而命名。苏云金芽孢杆菌简称苏云金杆菌, 为革兰氏阳性土壤杆菌, 属于芽孢杆菌属, 其菌体为短杆状, 生鞭毛, 单生或形成短链。它在芽孢形成过程中产生称为 δ -内毒素的杀虫伴胞晶体蛋白(控制合成这种蛋白质的基因在质粒上), 这些蛋白具有很高的杀虫活性。

[0003] 本发明采用胶体金免疫层析技术, 制备一种快速检测苏云金芽孢杆菌的试剂盒。这种方法开始于上个世纪 90 年代中期, 是在免疫渗滤法的基础上发展起来的, 是免疫亲和技术、印刷技术、免疫标记技术和层析技术的结合。这种方法不仅具有敏感、特异、便捷、快速等特点, 而且适合基层和现场使用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种方便、快捷地检测苏云金芽孢杆菌的试剂盒, 用于检测样本中的苏云金芽孢杆菌。本试剂盒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, 与包被在硝酸纤维素膜上的抗体结合形成夹心物而显色。本发明还涉及制备上述检测试剂盒的方法。

[0005] 本发明的技术方案: 一种苏云金芽孢杆菌检测试剂盒, 由样品垫 (1)、胶体金垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3)、吸样垫 (4) 和 PVC 支撑板 (5) 组成, PVC 支撑板上依次粘贴样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫, 胶体金垫上包被了苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物, 硝酸纤维素膜上依次包被有苏云金芽孢杆菌多抗和羊抗鼠 IgG 抗体, 其中以苏云金芽孢杆菌多抗包被线作为检测线 (T 线), 羊抗鼠 IgG 抗体包被线作为质控线 (C 线)。

[0006] 本发明还提供了一种苏云金芽孢杆菌检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0007] (1) 制备胶体金颗粒

[0008] 取 0.01% 的氯金酸水溶液 100mL, 加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 0.75mL, 继续煮沸约 5min, 出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0009] (2) 制备胶体金垫

[0010] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml, 用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 9.0, 室温放置 10 分钟; 逐滴加入蛋白浓度为 0.2mg/ml 的苏云金芽孢杆菌多抗 0.04ml, 混合均匀, 室温放置 30 分钟; 加入 0.075ml 10% 牛血清蛋白 (BSA) 溶液, 混合均匀, 室温放置 10 分钟; 11000 转离心 30 分钟, 仔细吸取上清液, 弃去, 用含 5% 蔗糖的 0.002mol/L pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 5mL 复溶, 重复 2 次; 最后用硼酸盐缓冲液溶解至 3mL, 得到苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物; 将苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物按 1mL

铺 56cm² 的比例均匀铺在无布上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30%的条件下干燥 2-4 小时,制成胶体金垫。

[0011] (3) 包被苏云金芽孢杆菌多抗、羊抗鼠 IgG

[0012] 设定划膜仪涂覆参数 1 μ L/cm,分别用微量进样器取 0.2mL 苏云金芽孢杆菌多抗、羊抗鼠 IgG,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆苏云金芽孢杆菌多抗(T 线)、羊抗鼠 IgG(C 线)。划线后将硝酸纤维素膜放置在烘箱中,温度 38℃,干燥 24 小时,备用。

[0013] (4) 试剂盒的组装

[0014] 将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫由一端依次黏附在 PVC 支撑板上,即可形成检测苏云金芽孢杆菌的试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

[0015] 本发明采用层析式双抗体夹心法,运用样品中含有的苏云金芽孢杆菌与金标苏云金芽孢杆菌多抗结合,然后在毛细管作用下层析至检测区,与事先包被在检测区的苏云金芽孢杆菌多抗反应,形成夹心物而显色的原理检测苏云金芽孢杆菌。

[0016] 本发明所述试剂盒的检测方法为:将被检样品平衡至室温;取出苏云金芽孢杆菌检测装置,水平放置;在样品垫中加入 2-3 滴样品,10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0017] 本发明所述的试剂盒采用胶体金免疫层析技术测定苏云金芽孢杆菌,检测时,将被测样品加在试纸条(卡)上的样品垫上,可以直接观察到免疫反应的结果,完成样品检测。本发明可用于检测样本中可能存在的苏云金芽孢杆菌,具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。

附图说明

[0018] 图 1 苏云金芽孢杆菌检测试剂盒结构示意图;

[0019] 附图符号说明:

[0020] 1:样品垫;

[0021] 2:含有标记苏云金芽孢杆菌多抗的胶体金垫;

[0022] 3:硝酸纤维素膜(T:包被了苏云金芽孢杆菌多抗的检测线;C:包被了羊抗鼠 IgG 的质控线);

[0023] 4:吸样垫;

[0024] 5:PVC 支撑板;

[0025] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。

[0026] 自左至右依次为 T、C 两条线阳性检测结果;C 一条线阴性检测结果;无效。

具体实施方式:

[0027] 实施例 1:苏云金芽孢杆菌检测试剂盒的制备

[0028] (1) 制备胶体金颗粒

[0029] 取 0.01% 的氯金酸水溶液 100mL,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 0.75mL,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0030] (2) 制备胶体金垫

[0031] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 9.0,室温放置 10 分钟;逐滴加入蛋白浓度为 0.2mg/ml 的苏云金芽孢杆菌多抗 0.04ml,混合均匀,室温放置 30 分钟;加入 0.075ml 10%牛血清蛋白 (BSA) 溶液,混合均匀,室温放置 10 分钟;11000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,用含 5%蔗糖的 0.002mol/L pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 5mL 复溶,重复 2 次;最后用硼酸盐缓冲液溶解至 3mL,得到苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物;将苏云金芽孢杆菌多抗-胶体金标记物按 1mL 铺 56cm² 的比例均匀铺在无纺布上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30%的条件下干燥 2-4 小时,制成胶体金垫。

[0032] (3) 包被苏云金芽孢杆菌多抗、羊抗鼠 IgG

[0033] 设定划膜仪涂覆参数 1 μ L/cm,分别用微量进样器取 0.2mL 苏云金芽孢杆菌多抗、羊抗鼠 IgG,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆苏云金芽孢杆菌多抗 (T 线)、羊抗鼠 IgG (C 线)。划线后将硝酸纤维素膜放置在烘箱中,温度 38℃,干燥 24 小时,备用。

[0034] (4) 试剂盒的组装

[0035] 将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫由一端依次黏附在 PVC 支撑板上,即可形成检测苏云金芽孢杆菌的试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

[0036] 实施例 2:苏云金芽孢杆菌检测试剂盒的要求

[0037] (1) 阴性参考品符合率

[0038] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 100 μ g/mL 的大肠杆菌标准溶液进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果, T 线不显色, C 线均呈现红色,结果为阴性。

[0039] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 100 μ g/mL 的牛血清蛋白标准溶液进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果, T 线不显色, C 线均呈现红色,结果为阴性。

[0040] (2) 阳性参考品符合率

[0041] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 500、1000、1500ng/mL 的苏云金芽孢杆菌标准品,各浓度分别进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果, T、C 线均呈现红色条带,结果为阳性。

[0042] (3) 最低检出量

[0043] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 0、300、500、1000ng/mL 的苏云金芽孢杆菌标准品,各浓度分别进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,0、300ng/mL 的苏云金芽孢杆菌标准品的检测结果为仅 C 线显色且显色度均一,为阴性结果;500、1000ng/mL 的苏云金芽孢杆菌标准品的检测结果为 T、C 线均显色,判定为阳性检测结果;最低检出量不高于 500ng/mL。

[0044] (4) 重复性

[0045] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 500ng/mL 的苏云金芽孢杆菌标准品,进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,结果均为阳性,显色度均一。

[0046] (5) 稳定性

[0047] 37℃放置 10 天后,各项指标均符合以上要求。

[0048] 实施例 3 : 苏云金芽孢杆菌检测试剂盒的检测方法

[0049] 将被检样品平衡至室温 ; 取出苏云金芽孢杆菌检测装置, 水平放置 ; 在样品垫中加入 2-3 滴样品, 样品中的液体依靠虹吸作用上行, 10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况, 判断检测结果。

[0050] 检测样本时, 若样本中含有苏云金芽孢杆菌, 则与胶体金标记的苏云金芽孢杆菌多抗结合形成相应的复合物, 在毛细管作用下复合物向吸样垫一端层析, 当样品 - 胶体金标记苏云金芽孢杆菌多抗复合物层析至硝酸纤维素膜上的苏云金芽孢杆菌多抗包被线 (T 线) 上时, 复合物与苏云金芽孢杆菌多抗结合, 形成“胶体金 - 苏云金芽孢杆菌多抗 - 苏云金芽孢杆菌 - 苏云金芽孢杆菌多抗”夹心物而凝聚显色, 此时 T 包被线可观察到红色条带。无论样品中是否含有苏云金芽孢杆菌, 胶体金标记苏云金芽孢杆菌多抗继续向吸样垫一端层析, 与包被在硝酸纤维素膜上的羊抗鼠 IgG 结合而凝聚显色, 此时 C 包被线可观察到红色条带。在 T 包被线可观察到红色条带, 判定为阳性结果, 即样品中含有苏云金芽孢杆菌 ; 无论样品中是否含有苏云金芽孢杆菌, 一条红色条带都会出现在质控线 (C)。质控区线 (C) 所显现的红色条带是判定是否有足够样本, 层析过程是否正常的标准, 同时也作为试剂的内控标准。

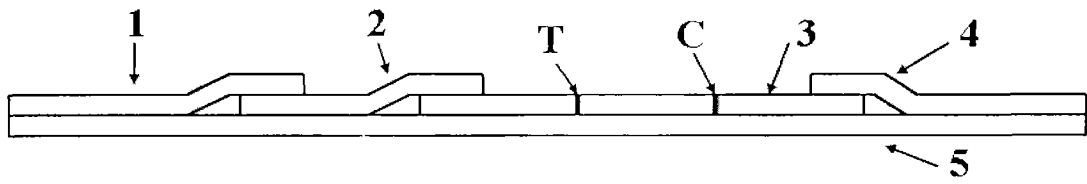


图 1

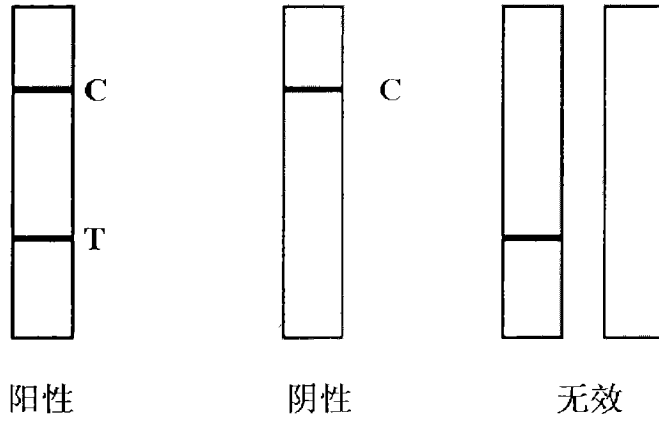


图 2

专利名称(译)	苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102253202A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201010173609.0	申请日	2010-05-17
[标]发明人	李锋 陈立柱		
发明人	李锋 陈立柱		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
其他公开文献	CN102253202B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物学免疫方法的测定技术领域，特别涉及一种苏云金芽孢杆菌检测试剂盒及其制备方法。试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)。胶体金垫为胶体金标记的苏云金芽孢杆菌多抗玻璃纤维(或无纺布)，硝酸纤维素膜上依次包被了苏云金芽孢杆菌多抗作为检测线(T线)，羊抗鼠IgG抗体作为质控线(C线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备苏云金芽孢杆菌检测试剂盒，用于检测样本中可能存在的苏云金芽孢杆菌，本发明具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。

