



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106018799 A

(43)申请公布日 2016. 10. 12

(21)申请号 201610318472.0

(22)申请日 2016.05.12

(71)申请人 山东省农业科学院 畜牧兽医研究所
地址 250100 山东省济南市历城区桑园路8号

(72)发明人 李俊 彭喆 黄保华 时建立
王莉莉 王金宝 徐绍建 吴晓燕
朱晓琳 郑书轩 张玲玲

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

代理人 唐宁

(51)Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

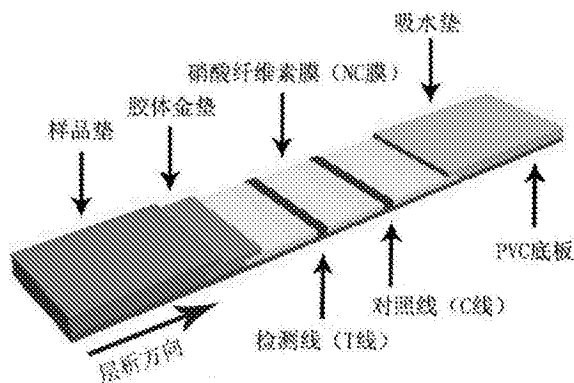
权利要求书3页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种沙门氏菌的检测试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种沙门氏菌的检测试纸及其制备方法,具体提供了一种沙门氏菌的检测试纸,其包括底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向,所述底板上依次组装有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中,所述胶体金垫上含有胶体金标记的沙门氏菌抗体,所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线和对照线,所述检测线由能与沙门氏菌结合的沙门氏菌抗体划膜制成,所述对照线由能与沙门氏菌抗体结合的羊抗兔抗体划膜制成。



1. 一种沙门氏菌的检测试纸,其包括底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向,所述底板上依次组装有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

其中,所述胶体金垫上含有胶体金标记的沙门氏菌抗体,

所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线和对照线,所述检测线由能与沙门氏菌结合的沙门氏菌抗体划膜制成,所述对照线由能与沙门氏菌抗体结合的羊抗兔抗体划膜制成。

2. 根据权利要求1所述的检测试纸,其中,所述胶体金标记的沙门氏菌抗体通过以下方法制得:

取100单位体积的双蒸水煮沸然后加入1单位体积的1%氯金酸溶液,继续煮沸1-10min,然后加入3单位体积的1%的柠檬酸三钠,搅拌至液体颜色由灰色变成黑色再变成紫色,再煮沸至液体颜色变为酒红色,再加双蒸水至100单位体积,获得胶体金溶液;优选地,所述胶体金溶液在520nm和535nm处的吸光值为0.8-1.0;

调节胶体金溶液的pH至8.0;在胶体金溶液中加入沙门氏菌抗体至沙门氏菌抗体的浓度为8-11 μ g/mL(9.6 μ g/mL),混匀后加入10%PEG20000至PEG20000的浓度为1%,获得纯化前的胶体金标记的沙门氏菌抗体;

将胶体金标记的沙门氏菌抗体以2000r/min,4 $^{\circ}$ C离心20min,弃去沉淀;

将上一步所得上清以10000r/min,4 $^{\circ}$ C离心30min,弃去上清;

用0.05mol/L的TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)缓冲液溶解沉淀至纯化前的原体积,重复前两步的离心2~3次,将沉淀溶于1/10TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)中至纯化前原体积,4 $^{\circ}$ C保存备用,获得纯化后的胶体金标记的沙门氏菌抗体。

3. 根据权利要求2所述的检测试纸,其中,所述沙门氏菌抗体是通过以下方法获得的:以沙门氏菌用培养基沙门氏菌,培养后取两株呈现沙门氏菌特征性的菌落并扩大培养,保存备用;测得菌液浓度约为 1×10^{10} CFU,细菌用0.3%的甲醛灭活24小时,灭活后菌液经细菌检验平板不再长菌;将灭活后的菌液加入弗氏不完全佐剂制作成疫苗用于免疫新西兰白兔,1mL菌液/只,背部皮下注射,共免疫4次,每次间隔15天,采用同样方法再连续注射4次,四疫前兔耳静脉采血检测抗体生成情况;经测试合格者颈动脉采血,分离血清,即得沙门氏菌抗体。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的检测试纸,其中,所述胶体金垫是经过是BSA、SDS和Tween-20处理过的,

优选地,所述胶体金垫通过如下方法制得:

配制胶体金垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

把玻璃纤维膜放置于胶体金处理液中浸泡30min,37 $^{\circ}$ C烘干;

将胶体金标记的沙门氏菌抗体以5 μ L/cm的喷量喷涂于经处理液处理过的玻璃纤维素膜上,烘干。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的检测试纸,其中,所述样品垫是经过是BSA、SDS和Tween-20处理过的,

优选地,所述样品垫通过如下方法制得:

配制样品垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后

过滤；

把样品垫放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干。

6.根据权利要求1-5任一项所述的检测试纸,其中,设置检测线和对照线的硝酸纤维素膜是将沙门氏菌抗体稀释为2mg/mL,羊抗兔抗体稀释为2mg/mL,并分别以1 μ L/cm的剂量在硝酸纤维素膜上进行划膜,划膜后烘干。

7.权利要求1-6任一项所述的检测试纸的制备方法,其包括如下步骤:

1)制备胶体金标记的沙门氏菌抗体:

1-1)取100单位体积的双蒸水煮沸然后加入1单位体积的1%氯金酸溶液,继续煮沸1-10min,然后加入3单位体积的1%的柠檬酸三钠,搅拌至液体颜色由灰色变成黑色再变成紫色,再煮沸至液体颜色变为酒红色,再加双蒸水至100单位体积,获得胶体金溶液;优选地,所述胶体金溶液在520nm和535nm处的吸光值为0.8-1.0;

1-2)调节胶体金溶液的pH至8.0;

在胶体金溶液中加入沙门氏菌抗体至沙门氏菌抗体的浓度为8-11 μ g/mL(9.6 μ g/mL),混匀后加入10%PEG20000至PEG20000的浓度为1%,获得纯化前的胶体金标记的沙门氏菌抗体;

1-3)将胶体金标记的沙门氏菌抗体以2000r/min,4℃离心20min,弃去沉淀;

1-4)将上一步所得上清以10000r/min,4℃离心30min,弃去上清;

1-5)用0.05mol/L的TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)缓冲液溶解沉淀至纯化前的原体积,重复前两步的离心2~3次,将沉淀溶于1/10TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)中至纯化前原体积,4℃保存备用,获得纯化后的胶体金标记的沙门氏菌抗体;

2)制备胶体金垫:

2-1)配制胶体金垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

2-2)把玻璃纤维膜放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干;

2-3)将胶体金标记的沙门氏菌抗体以1 μ L/cm的喷量喷涂于经处理液处理过的玻璃纤维膜上,烘干;

3)制备样品垫:

3-1)配制样品垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

3-2)把样品垫放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干;

4)制备设置检测线和对照线的硝酸纤维素膜:

4-1)将沙门氏菌抗体稀释为2mg/mL,羊抗兔抗体稀释为2mg/mL,并分别以1 μ L/cm的剂量在硝酸纤维素膜上划膜,划膜后烘干;

5)组装:依次将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫粘贴在底板上即得。

8.权利要求1-6所述的检测试纸在检测沙门氏菌中的应用。

9.一种非诊断目的的检测沙门氏菌的方法,其包括以下步骤:

a)对待测样品进行预处理;

b)将预处理获得的待测样品以权利要求1-6任一项所述的检测试纸进行检测;

其中,步骤1)为:

a-1)将待测样品匀浆,并加入缓冲蛋白胨水中,混匀后37℃培养8-18h;
a-2)取步骤a-1)培养液1ml-10ml,加入四硫酸钠煌绿增菌液中42℃培养18-24h;
a-3)取步骤a-2)培养液1ml-10ml,加入亚硒酸盐胱氨酸增菌液中37℃培养18-24h;
优选地,检测步骤设立阳性对照。

一种沙门氏菌的检测试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测方法,具体涉及门氏菌的检测试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 沙门氏菌是一种常见的人畜共患肠道病原菌,不仅能引起畜禽伤寒、副伤寒等疾病,还能造成人类腹泻、细菌性食物中毒等常见病,威胁人类健康。已知的沙门氏菌血清型有2000余种,广泛分布在自然界中。与人类疾病有关的血清型主要集中于A~E群,其中,鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌和肠炎沙门氏菌最为常见。在世界各国各类细菌性的食物中毒中,沙门氏菌引起的食物中毒高居前列。人畜感染沙门氏菌后可能加重病症或加大死亡率,也可能会降低动物繁殖力,造成巨大的经济损失,并严重威胁人民群众的身体健康和畜牧业的健康发展,对其防治历来是公共卫生的一项重要课题。快速、准确、简便地检测出沙门氏菌,在医疗卫生、食品卫生、动物疫病监测等方面具有重要的意义。

[0003] 检测沙门氏菌一直以传统检测方法为主,非选择性和选择性增菌、可疑细菌分离等常规方法虽然经典可靠,但程序复杂、十分繁琐,不仅费时费力而且敏感性和特异性较差,漏检率较高。而免疫荧光法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链反应(PCR)技术等方法需要使用指定的仪器设备、具备相应的试验条件和技能,难以在基层推广。胶体金标记免疫分析法是近年兴起并快速发展的一种新型分析技术,其特点是快捷简便、成本低、无污染且无需培训,非常适合现场检测。与ELISA相比,具有显色时间短、无需仪器等优点,具有广阔的市场前景和应用价值。本研究采用猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌免疫兔制得的兔抗沙门氏菌多抗血清,研制胶体金试纸条用于临床快速检测。

发明内容

[0004] 为了解决上述问题,本发明一个方面提供了一种沙门氏菌的检测试纸,其包括底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向,所述底板上依次组装有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

[0005] 其中,所述胶体金垫上含有胶体金标记的沙门氏菌抗体,

[0006] 所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线和对照线,所述检测线由能与沙门氏菌结合的沙门氏菌抗体划膜制成,所述对照线由能与沙门氏菌抗体结合的羊抗兔抗体划膜制成。

[0007] 其中,所述胶体金标记的沙门氏菌抗体通过以下方法制得:

[0008] 取100单位体积的双蒸水煮沸然后加入1单位体积的1%氯金酸溶液,继续煮沸1-10min,然后加入3单位体积的1%的柠檬酸三钠,搅拌至液体颜色由灰色变成黑色再变成紫色,再煮沸至液体颜色变为酒红色,再加双蒸水至100单位体积,获得胶体金溶液;优选地,所述胶体金溶液在520nm和535nm处的吸光值为0.8-1.0;

[0009] 调节胶体金溶液的pH至8.0;在胶体金溶液中加入沙门氏菌抗体至沙门氏菌抗体的浓度为8-11 μ g/mL(9.6 μ g/mL),混匀后加入10%PEG20000至PEG20000的浓度为1%,获得

纯化前的胶体金标记的沙门氏菌抗体；

[0010] 将胶体金标记的沙门氏菌抗体以2000r/min,4℃离心20min,弃去沉淀；

[0011] 将上一步所得上清以10000r/min,4℃离心30min,弃去上清；

[0012] 用0.05mol/L的TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)缓冲液溶解沉淀至纯化前的原体积,重复前两步的离心2~3次,将沉淀溶于1/10TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)中至纯化前原体积,4℃保存备用,获得纯化后的胶体金标记的沙门氏菌抗体。

[0013] 其中,所述胶体金垫是经过是BSA、SDS和Tween-20处理过的,

[0014] 优选地,所述胶体金垫通过如下方法制得:

[0015] 配制胶体金垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

[0016] 把玻璃纤维膜放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干;

[0017] 将胶体金标记的沙门氏菌抗体以5μL/cm的喷量喷涂于经处理液处理过的玻璃纤维膜上,烘干。

[0018] 其中,所述样品垫是经过是BSA、SDS和Tween-20处理过的,

[0019] 优选地,所述样品垫通过如下方法制得:

[0020] 配制样品垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

[0021] 把样品垫放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干。

[0022] 其中,设置检测线和对照线的硝酸纤维素膜是将沙门氏菌抗体稀释为2mg/mL,羊抗兔抗体稀释为2mg/mL,并分别以1μL/cm的剂量在硝酸纤维素膜上进行划膜,划膜后烘干。

[0023] 本发明的另一个方面提供了一种沙门氏菌检测试纸的制备方法,其包括如下步骤:

[0024] 1)制备胶体金标记的沙门氏菌抗体:

[0025] 1-1)取100单位体积的双蒸水煮沸然后加入1单位体积的1%氯金酸溶液,继续煮沸1-10min,然后加入3单位体积的1%的柠檬酸三钠,搅拌至液体颜色由灰色变成黑色再变成紫色,再煮沸至液体颜色变为酒红色,再加双蒸水至100单位体积,获得胶体金溶液;优选地,所述胶体金溶液在520nm和535nm处的吸光值为0.8-1.0;

[0026] 1-2)调节胶体金溶液的pH至8.0;

[0027] 在胶体金溶液中加入沙门氏菌抗体至沙门氏菌抗体的浓度为8-11μg/mL(9.6μg/mL),混匀后加入10%PEG20000至PEG20000的浓度为1%,获得纯化前的胶体金标记的沙门氏菌抗体;

[0028] 1-3)将胶体金标记的沙门氏菌抗体以2000r/min,4℃离心20min,弃去沉淀;

[0029] 1-4)将上一步所得上清以10000r/min,4℃离心30min,弃去上清;

[0030] 1-5)用0.05mol/L的TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)缓冲液溶解沉淀至纯化前的原体积,重复前两步的离心2~3次,将沉淀溶于1/10TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)中至纯化前原体积,4℃保存备用,获得纯化后的胶体金标记的沙门氏菌抗体;

[0031] 2)制备胶体金垫:

[0032] 2-1)配制胶体金垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

[0033] 2-2)把玻璃纤维膜放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干;

[0034] 2-3)将胶体金标记的沙门氏菌抗体以1 μ L/cm的喷量喷涂于经处理液处理过的玻璃纤维膜上,烘干;

[0035] 3)制备样品垫:

[0036] 3-1)配制样品垫处理液:用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20混匀后过滤;

[0037] 3-2)把样品垫放置于胶体金处理液中浸泡30min,37℃烘干;

[0038] 4)制备设置检测线和对照线的硝酸纤维素膜:

[0039] 4-1)将沙门氏菌抗体稀释为2mg/mL,羊抗兔抗体稀释为2mg/mL,并分别以1 μ L/cm的剂量在硝酸纤维素膜上划膜,划膜后烘干;

[0040] 5)组装:依次将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫粘贴在底板上即得。

[0041] 本发明另一个方面提供了前述的检测试纸在检测沙门氏菌中的应用。

[0042] 本发明另一个方面提供了一种非诊断目的的检测沙门氏菌的方法,其包括以下步骤:

[0043] a)对待测样品进行预处理;

[0044] b)将预处理获得的待测样品以前述的检测试纸进行检测;

[0045] 其中,步骤1)为:

[0046] a-1)将待测样品匀浆,并加入缓冲蛋白胨水中,混匀后37℃培养8-18h;

[0047] a-2)取步骤a-1)培养液1ml-10ml,加入四硫酸钠煌绿增菌液中42℃培养18-24h;

[0048] a-3)取步骤a-2)培养液1ml-10ml,加入亚硒酸盐胱氨酸增菌液中37℃培养18-24h;

[0049] 优选地,检测步骤设立阳性对照。

[0050] 本试验是将胶体金与沙门氏菌抗体的偶联物喷涂在玻璃纤维膜的胶体金垫上,沙门氏菌抗体和羊抗兔抗体分别喷于硝酸纤维素膜的检测线和对照线上。当待检样品加在玻璃纤维膜上的样品区时,由于毛细管作用,样品迅速浸透胶体金垫,金标抗体被溶解,并在上部吸水垫材料吸水涨力的牵引下随着样品溶液沿膜条向前移动。若样品中存在沙门氏菌,它就和金标抗体形成复合物。随后,通过检测线区域时,检测线上固相化的沙门氏菌抗体其他表位捕获复合物中的沙门氏菌,在检测线处形成一条肉眼清晰可见的紫红色线。其余复合物继续前移,通过质控线时,固相化的羊抗兔抗体捕获复合物中的沙门氏菌抗体,出现紫红色线。该线必须出现,否则试纸条失效。若待检样品中没有沙门氏菌,金标沙门氏菌抗体将不会与包被在检测线上的固相化沙门氏菌抗体结合,检测线上不会出现紫红色线。

[0051] 本试验建立的沙门氏菌抗原胶体金试纸条具有很强的便捷性和实用性。本方法兼有免疫反应和色谱层析的优点,无需设备、操作简单,时间短、效率高,特异性强、灵敏度高,稳定性较好。与增菌培养基配合使用,即可作为沙门氏菌监测和诊断的常规手段,具有很强的推广和应用价值。目前国外沙门氏菌胶体金试纸条检测灵敏度能达到 $1.07 \times 10^7 \sim 1.07 \times 10^8$ cfu/ml,国内试纸条灵敏度可达 $1.07 \times 10^6 \sim 1.07 \times 10^7$ cfu/ml,本实验制备的试纸条灵敏度能达到 1.07×10^7 cfu/ml,且特异性良好。在检测时无须样品预处理,可以直接使用前增菌培养基如缓冲蛋白胨水(BPW)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、四硫酸钠煌绿增菌液(TTB)等,将增菌后的样品滴加到试纸条的样品区即可。减少了繁琐的试剂稀释、配制等步

骤,结果直观易判定,即拆即用,非专业人员也可操作。试纸条4℃或37℃存放5个月,检测结果稳定。通过对实验室周边超市和菜市场的猪肉、鸡肉和鸡蛋等随机采样检测,结果均为阴性,说明市场上抽检的肉样和鸡蛋没有受到沙门氏菌污染。

附图说明

- [0052] 图1沙门氏菌胶体金试纸条组装示意图。
- [0053] 图2沙门氏菌胶体金试纸条灵敏性实验。
- [0054] 图3沙门氏菌胶体金试纸条特异性实验。
- [0055] 图4沙门氏菌胶体金试纸条灵敏性比较实验。
- [0056] 图5沙门氏菌胶体金试纸条特异性比较实验。
- [0057] 图6沙门氏菌胶体金试纸条保存期实验。
- [0058] 图7肉样和鸡蛋在SC中培养后滴入本试纸条的结果。
- [0059] 图8肉样和鸡蛋在TTB中培养后滴入本试纸条的结果。

具体实施方式

[0060] 本发明所用的所有试剂均为分析纯,其中氯金酸、碳酸钾购自国药集团化学试剂公司;羊抗兔抗体、单面胶PVC板、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜(NC膜)购自上海金标生物科技有限公司;紫外分光光度计购自Amersham公司;高速冷冻离心机购自Sigma公司;胶体金点样系统(喷涂机、切条机、手动贴膜机)购自Bio Dot公司,对比用国内某品牌沙门氏菌胶体金试纸条(批号20150211)、国外某品牌沙门氏菌胶体金试纸条(批号KW852015)。

[0061] 本发明所用的菌株猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌均购自中国科学院微生物研究所(CGMCC, No. 1.1859和1.1190);大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、巴氏杆菌、肺炎克雷伯杆菌、奇异变形杆菌、链球菌等由山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室保存和提供。检测用猪肉和鸡蛋购自实验室周边超市和农贸市场。

[0062] 本发明所用的沙门氏菌抗体由山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室制备。

[0063] 实施例1抗体的制备与纯化

[0064] 将沙门氏菌用专用培养基活化,培养后呈现特征性菌落。将两株沙门氏菌扩大培养,保存备用。测得菌液浓度约为 1×10^{10} CFU,细菌用0.3%的甲醛灭活24小时,灭活后菌液经细菌检验平板不再长菌。灭活后的菌液加入弗氏不完全佐剂制作成疫苗用于免疫新西兰白兔,1mL/只,背部皮下注射,共免疫4次,每次间隔15d,采用同样方法再连续注射4次,四免前兔耳静脉采血检测抗体生成情况。经测试合格者颈动脉采血,分离血清,冷冻保存。

[0065] 实施例2胶体金溶液的制备

[0066] 取100mL双蒸水加热沸腾后加入1mL 1%的氯金酸溶液,摇匀后继续加热沸腾3min,然后迅速加入1%的柠檬酸三钠溶液1mL,转至磁力搅拌器中搅拌2min,此时颜色由灰色变成黑色,再变成紫色,放到电炉上加热沸腾6min,颜色变为酒红色,冷却后再加蒸馏水定容至100mL。胶体金溶液需避光、4℃保存。

[0067] 实施例3胶体金标记的沙门氏菌的制备与纯化

[0068] 取需制备量的胶体金溶液,用0.2mol/L的 K_2CO_3 或0.1mol/L的HCl溶液调胶体金溶液的pH至8.0。然后按每1mL胶体金溶液加入9.6 μ g纯化的兔抗体,磁力搅拌混合均匀,加入

10%PEG20000至终浓度为1%，混匀后4℃静置过夜即为标记好的金标抗体。将金标单抗用2000r/min、4℃离心20min，弃去沉淀；10000r/min、4℃离心30min，弃去上清。用0.05mol/L的TBS(内含1%BSA,0.05%NaN₃)缓冲液溶解沉淀至原体积，重复离心2~3次，将沉淀溶于1/10原体积的TBS中，4℃保存备用。

[0069] 实施例4金标抗体最适蛋白量的确定

[0070] 用0.2mol/L的K₂CO₃或0.1mol/L的HCl溶液调胶体金溶液的pH至8.0。取pH8.0的胶体金溶液9管，每管1ml，前8管每管分别加入倍比稀释的抗体100ul，浓度分别为4ug/ml、5ug/ml、6ug/ml、7ug/ml、8ug/ml、9ug/ml、10ug/ml，设空白对照。混匀后室温反应5min，再每管分别加入10%的NaCl溶液100ul，混匀后室温静置2h，观察颜色变化。空白管及单抗蛋白量不足以稳定金溶胶的各孔呈现由红变蓝的聚沉现象，而单抗蛋白量达到或超过最低稳定量的各管仍保持红色不变。选择8ug/ml为最佳，再此基础上加量20%为标记的最适蛋白量，最终抗体浓度约为9.6ug/ml。

[0071] 实施例5质控线、检测线浓度的确定

[0072] 把羊抗兔抗体作系列稀释后包被到NC膜上，从1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml到5mg/ml，每个浓度分别包被两个试纸条(设一个重复)，与吸附有金标抗体的玻璃纤维膜组条进行免疫层析，比较质控线显色水平。在每个条上包被1ul稀释好的羊抗兔抗体，最后两个试纸条为空白对照。在样品垫滴入水后，发现包被1mg/ml二抗的试纸条出线颜色较浅，2mg/ml、3mg/ml出线颜色较明显，4mg/ml、5mg/ml条带颜色不再加深，最终确定对照线的浓度为2mg/ml。把沙门氏菌抗体作系列稀释，从1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml到5mg/ml，分别取1ul包被于NC膜上，与最佳稀释度金标抗体纤维膜组装成试纸条。对照线均包被2mg/ml的羊抗兔抗体1ul。在样品垫滴入水，发现1mg/ml出线颜色较浅，2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml到5mg/ml出线颜色较明显，最终确定检测线的浓度为2mg/ml。羊抗兔抗体和沙门氏菌抗体都是稀释成2mg/ml，用机器以1ul/cm划膜，划膜后37℃烘干，加入干燥剂，热合封口，置4℃冰箱备用。

[0073] 实施例6胶体金垫和样品垫的优化处理

[0074] (1)配制胶体金垫和样品垫处理液：用pH7.4的PBS加入1%的BSA、0.5%的SDS、1%的Tween-20用漩涡振荡器混匀后过滤备用。

[0075] (2)把玻璃纤维膜和样品垫放置于处理液中浸泡30min，37℃烘干，备用。

[0076] 实施例7胶体金试纸条的组装

[0077] 取优化处理过的玻璃纤维膜，由喷涂机将确定为最佳稀释度的金标单抗液按5ul/cm的喷量喷涂于玻璃纤维膜上，再将沙门氏菌抗体、羊抗兔抗体分别包被在硝酸纤维素膜上的检测线(T线)和对照线(C线)的位置，烘干后加入干燥剂，热合封口，置4℃冰箱备用。依次将样品垫、胶体金垫、NC膜(其上包被有检测线和质控线)和吸水垫粘贴在PVC底板(支持物)上(图1)，用切刀切成3mm宽的条带即可用于检测。

[0078] 实施例8待测样品的预处理

[0079] 将待测样品匀浆后取2.5g到22.5ml的BPW(缓冲蛋白胨水)中，混匀后37℃培养8-18h，把培养液各取1ml到10ml，并加入TTB(四硫酸钠煌绿增菌液)中42℃培养18-24h，再另取1ml到10mlSC(亚硒酸盐胱氨酸增菌液)中37℃培养18-24h。把培养液滴入试纸条，观察检测结果。同时设阳性对照(沙门氏菌菌液)。

[0080] 结果

[0081] 1沙门氏菌抗体效价检测及纯化

[0082] 分离的血清经玻片凝集实验抗体效价达到1:256,采用Protein A Sepharose TMCL-4B柱进行纯化,纯化后其蛋白含量为15mg/mL。其余未纯化血清分装冷冻保存。

[0083] 2兔抗沙门氏菌抗体胶体金的制备和试纸条的优化组装

[0084] 2.1胶体金质量鉴定配制好的胶体金溶液用紫外分光光度计测波长在520nm和535nm处的吸光值,吸光值在0.8-1.0之间。肉眼观察为酒红色。

[0085] 2.2灵敏性与特异性把 1.07×10^9 cfu/ml沙门氏菌菌液作 $10^0 \sim 10^{10}$ 倍系列稀释,终浓度分别为 $1.07 \times 10^9 \sim 1.07 \times 10^{-1}$ cfu/ml,共11个梯度。用组装好的试纸条进行检测,每个试纸条各加入80u1,检测灵敏性至 1.07×10^7 cfu/ml为阳性, 1.07×10^6 cfu/ml显示弱阳性(图2)。取8个组装好的试纸条,分别加入沙门氏菌、大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、巴氏杆菌、肺炎克雷伯杆菌、奇异变形杆菌、链球菌、水各80u1。沙门氏菌检测显示阳性反应,奇异变形杆菌有较弱的假阳性,其他均呈阴性(图3)。

[0086] 2.3灵敏性与特异性比较用本实验建立的试纸条分别和国内、国外某品牌试纸条的灵敏性、特异性做比较实验。把 1.07×10^9 cfu/ml沙门氏菌菌液作 $10 \sim 10^6$ 倍系列稀释,终浓度分别为 $1.07 \times 10^8 \sim 1.07 \times 10^3$ cfu/ml,和细菌原液用组装好的试纸条进行检测,每个试纸条各加入80u1,并设阴性对照。本实验制备的试纸条与国内某品牌试纸条检测浓度 1.07×10^7 cfu/ml为阳性, 1.07×10^6 cfu/ml显示弱阳性;而国外某品牌试纸条在 1.07×10^8 cfu/ml、 1.07×10^7 cfu/ml均为弱阳性(图4)。取本实验室制备、国内某品牌和国外某品牌组装好的试纸条各9个,分别加入大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌、双歧杆菌、奇异变形杆菌、副猪嗜血杆菌、链球菌、沙门氏菌、水(阴性对照)各80u1,沙门氏菌检测均呈阴性(图5)。

[0087] 2.6稳定性制备的试纸条3批,各取100条,分别置4℃冰箱和37℃培养箱中,每隔1周分别取出2条。常温保存了9周的试纸条滴入水和菌液8min后,C线和T线都很弱,隐约能看到。封口的试纸条常温保存和4℃保存了7周后滴入水和菌液,4℃保存的出现要比常温保存的出现更深些(图6)。

[0088] 3试纸条的检测将2015年9月份购自山东省济南市周边超市和菜市场的肉样和鸡蛋用试纸条检测,结果发现样品均呈阴性(图7、图8、表1)。

[0089] 表1沙门氏菌胶体金试纸条临床检测结果

[0090]

检测样品类型	增菌培养基类型	样品编号	检测结果
猪肉	SC	1	—
		2	—
		3	—
		4	—
	TTB	1	—
		2	—
		3	—
		4	—
鸡肉	SC	5	—
		6	—
	TTB	5	—
		6	—
鸡蛋	SC	7	—
		8	—
	TTB	7	—
		8	—
阴性对照	SC	—	
	TTB	—	
阳性对照	SC	+	
	TTB	+	

[0091] 参考文献

[0092] [1]孔繁德,黄印尧,赖清金.免疫胶体金技术及其发展前景.福建畜牧兽医,2002,24(7):42-44。

[0093] [2]Yoshimasu MA,Zawistowski J.Application of rapid dot blot immunoassay for detection of Salmonella enterica serovar enteritidis in eggs, poultry,and other foods[J].Appl EnvironMicrobiol,2001,67(1):459-461.

[0094] [3]Hara-Kudo Y,Kumagai S,Masuda T et al.Detection of Salmonella enteritidis in shell and liquid eggs using enrichment and plating[J].Int J food Microbiol.2001,64:395-399.

[0095] [4]王中民,李君文,郑金来.胶体金免疫层析法快速检测沙门氏菌.微生物学免疫学进展,2004,32(4):36。

[0096] [5]陈琼,孔繁德,张长弓,彭海滨,徐淑菲.沙门氏菌快速检测试纸条的研制与应用.福建畜牧兽医,2006,28(5):6-8。

[0097] [6]邵景东,陈飞,肖国平.09群沙门氏菌胶体金检测试剂盒的研制.检验检疫科学,2005,15(3):30-3。

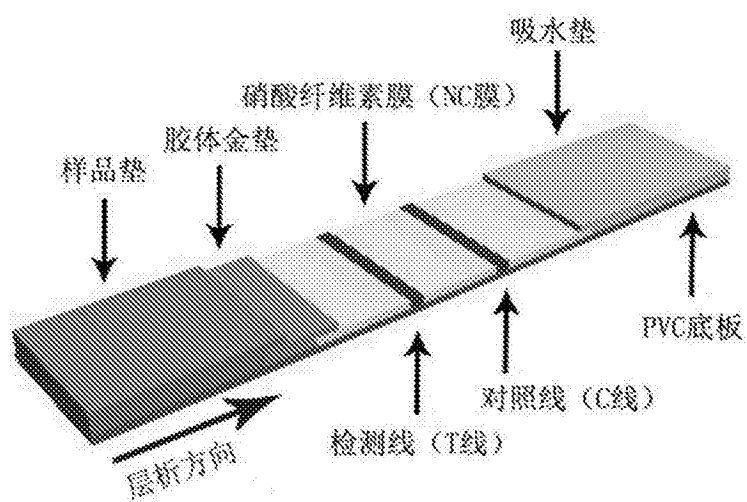


图1

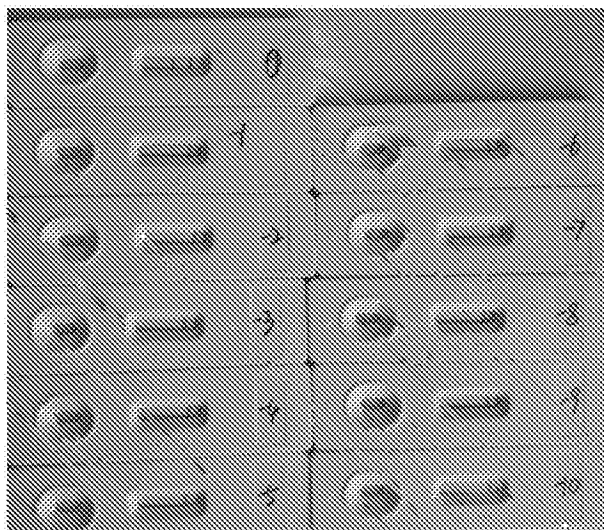


图2

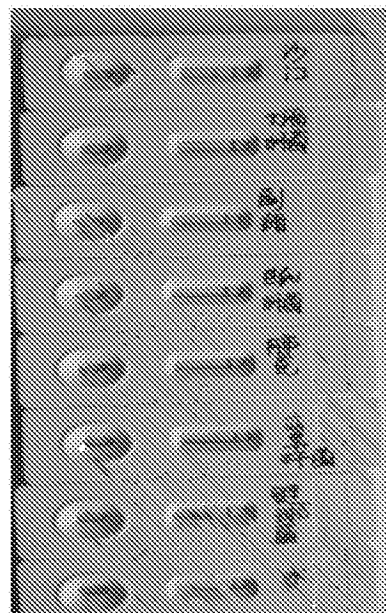


图3

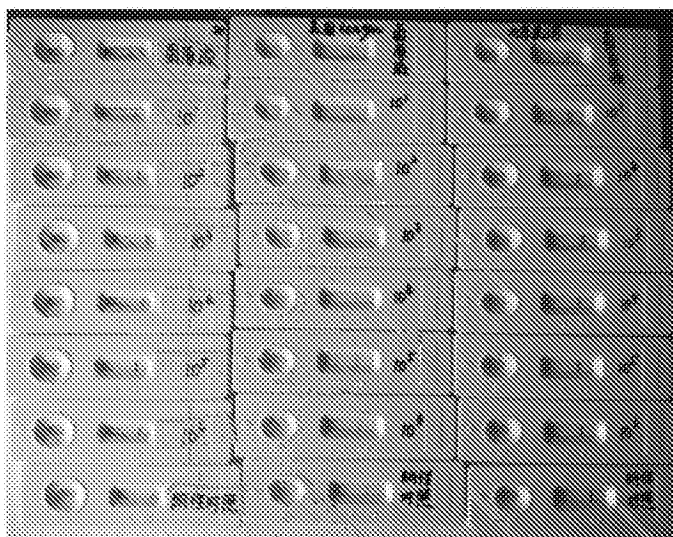


图4

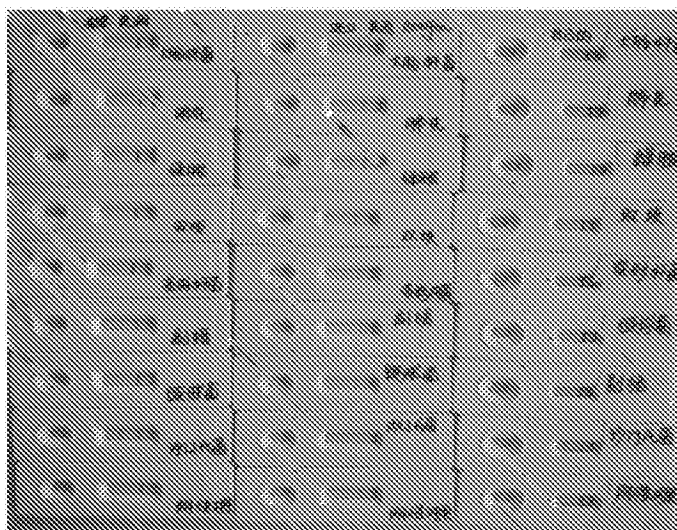


图5



图6



图7

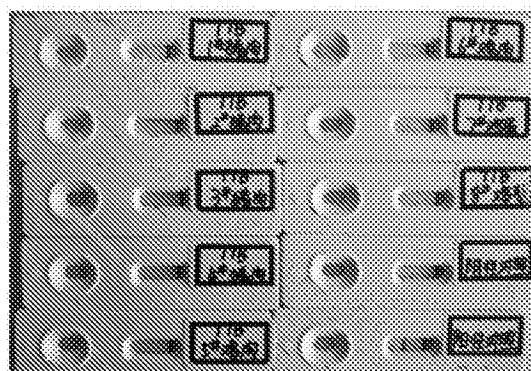


图8

专利名称(译)	一种沙门氏菌的检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN106018799A	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610318472.0	申请日	2016-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	李俊 彭喆 黄保华 时建立 王莉莉 王金宝 徐绍建 吴晓燕 朱晓琳 郑书轩 张玲玲		
发明人	李俊 彭喆 黄保华 时建立 王莉莉 王金宝 徐绍建 吴晓燕 朱晓琳 郑书轩 张玲玲		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/56916 G01N33/531 G01N33/532 G01N2333/255		
代理人(译)	唐宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种沙门氏菌的检测试纸及其制备方法，具体提供了一种沙门氏菌的检测试纸，其包括底板，所述底板具有第一端和第二端，并且沿所述第一端向第二端的方向，所述底板上依次组装有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，其中，所述胶体金垫上含有胶体金标记的沙门氏菌抗体，所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线 and 对照线，所述检测线由能与沙门氏菌结合的沙门氏菌抗体划膜制成，所述对照线由能与沙门氏菌抗体结合的羊抗兔抗体划膜制成。

