

[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 200910078821.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101493459A

[22] 申请日 2009.3.4

[21] 申请号 200910078821.6

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100025 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

[72] 发明人 王 静 张晓龙 孙肖红 李 伟
杨 宇 胡孔新 谢士嘉

[74] 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理有限公司

代理人 尹振启

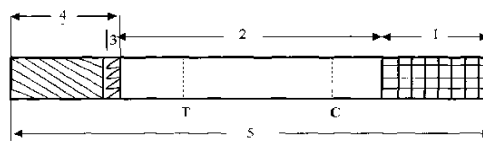
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

一种炭疽芽孢杆菌及其芽孢的胶体金检测试纸及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开了一种检测试纸，该试纸包含：
(1)反应支持物；(2)吸水垫；(3)硝酸纤维膜，该膜包被有炭疽芽孢杆菌抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；(4)金标抗体保护膜，其中含有胶体金标记的炭疽芽孢杆菌抗体。本发明试纸可以配合小型仪器进行半定量检测，不需专业培训，结果清晰易辨并能客观保存数据，操作简单，易于推广，适合基层，适合于突发事件的现场检测，适合流行病学调查，并对炭疽芽孢杆菌的感染诊断起到辅助作用。



- 1、一种检测试纸，其特征在于，它包含：
 - (1) 反应支持物；
 - (2) 吸水垫；
 - (3) 硝酸纤维膜，该膜包被有炭疽芽孢杆菌抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；
 - (4) 金标抗体保护膜，其中含有胶体金标记的炭疽芽孢杆菌抗体。
- 2、根据权利要求1所述的试纸，其中，它还包含样品垫，该样品垫的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。
- 3、根据权利要求1所述的试纸，其中，所述吸水垫选用滤纸；所述反应支持物选用 PVC 板；所述金标抗体纤维膜的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维，其上均匀涂布有胶体金标记的抗体。
- 4、根据权利要求3所述的试纸，其中，所述金标抗体保护膜由将胶体金标记的羊抗 St 均匀涂布在聚脂膜、玻璃纤维膜或滤纸纤维膜上来制成。
- 5、根据权利要求2所述的试纸，其中，所述反应支持物(5)位于底层，所述硝酸纤维膜(2)位于反应支持物(5)上的中部，该膜的 T 处是兔抗 St 多克隆抗体包被的检测条带，并且 C 处是兔抗羊 IgG 包被的质控条带；所述金标抗体保护膜(3)位于硝酸纤维膜上部的一侧并与之部分重叠，该膜含有胶体金标记的羊抗 St 多克隆抗体；所述吸水垫(1)位于硝酸纤维膜(2)上部的相对于金标抗体保护膜(3)而言的另一侧并与硝酸纤维膜(2)部分重叠；所述样品垫(4)位于硝酸纤维膜(2)上与吸水垫(1)相反的一侧并与金标抗体保护膜(3)部分重叠。
- 6、根据权利要求5所述的试纸，其中，所述吸水垫一侧为起始端，所述样品垫一侧为末端，所述检测抗体的条带位于接近末端，所述质控条带接近于起始端。

7、根据权利要求5所述的试纸，其中，所述抗炭疽或炭疽芽孢的抗体可以是多抗，也可是单抗；多抗可是羊抗炭疽菌或炭疽芽孢、兔抗炭疽菌或炭疽芽孢、鼠抗炭疽菌或炭疽芽孢等；所述质控抗体根据金标抗体的免疫源可选择羊抗兔、鼠抗兔、人抗兔、兔抗羊、鼠抗羊、人抗羊、羊抗鼠、人抗鼠、兔抗鼠等的IgG。

8、根据权利要求5所述的试纸，其中，所述抗炭疽多克隆抗体的浓度为0.5-5mg/ml；抗炭疽单克隆抗体的浓度为0.1-5mg/ml。

9、根据权利要求5所述的试纸，其中，所述质控抗体的浓度为0.1-2mg/ml。

10、根据权利要求5所述的试纸，其中，所述抗炭疽抗体标记1ml胶体金的量为5-20ug。

11、一种制备权利要求1-10任一项所述的炭疽芽孢杆菌的检测试纸的制备方法，该方法包括：

(1)用隔流喷金划线机以一定喷膜速度喷涂抗炭疽抗体和质控抗体两个条带的硝酸纤维膜；

(2)制备一种含有胶体金标记的抗炭疽抗体的金标抗体保护膜，将胶体金标记的抗炭疽抗体均匀涂布在聚脂膜、玻璃纤维膜或滤纸纤维膜上，并烘干或冷冻干燥后，制成金标抗体保护膜。

12、权利要求1-10任一项所述的试纸在检测炭疽芽孢杆菌中的应用，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。

13、由权利要求11所述的方法制备的检测炭疽芽孢杆菌及其芽孢的试纸。

一种炭疽芽孢杆菌及其芽孢的胶体金检测试纸 及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于生物检测领域，具体涉及一种炭疽芽孢杆菌抗原及其芽孢的检测试纸及其制备方法和在检测炭疽芽孢杆菌中的应用。

背景技术

炭疽是由炭疽杆菌所引起的一种人畜共患急性传染病。人们从认识这种疾病并与其斗争已经有100多年的历史，积累了丰富的防治经验。然而，目前阶段，炭疽对人类仍然构成威胁，在世界各地频繁出现爆发流行，特别是在发展中国家。近年来在非洲最严重的人间流行发病达万余人，每年有大批的牲畜死亡，造成重大的经济损失，人类炭疽病例也不断发生。

人是通过直接或间接接触感染动物而发病，主要是剥食病畜肉、吸入污染炭疽芽孢的气溶胶而感染。所以，人类发病多为继发感染，其传染源为患病的草食动物。动物炭疽通常是食入了被污染的水、草后感染炭疽。人类对炭疽普遍易感，其感染途径经消化道、呼吸道或皮肤接触而使人致病。其中皮肤炭疽是最常见的形式，易发生于接触污染的动物或动物制品的工业或农业部门中。

现有的免疫学检测方法常采用荚膜抗体作酶标或荧光抗体染色进行诊断，分子生物学有 PCR 方法，还有许多种传统的检验方法，包括细菌分离培养、溶血性实验、荚膜染色、噬菌体裂解实验、串珠实验等，但上述方法耗时长，而且必须进行大量的纯化细菌，要求购买昂贵的仪器，操作繁琐复杂，需要专业人士具备熟练的操作技能才能准确检测。

发明内容

本发明的目的是提供一种方便、快捷地检测炭疽芽孢杆菌的试纸，同时可利用金标免疫分析仪或金标免疫试纸条的反射式光度计等阅读仪

进行的定量检测方法。该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。

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炭疽芽孢杆菌或芽孢，节省了大量人力物力，方便、快速、简捷。

本发明涉及一种方便、快捷地检测炭疽芽孢杆菌的检测试纸，它包含：

(1) 反应支持物；

(2) 吸水垫；

(3) 硝酸纤维膜，该膜包被有兔抗炭疽芽孢杆菌疫苗株 sterne (St) 多克隆抗体检测条带和质控兔抗羊 IgG 的质控条带；

(4) 金标抗体保护膜，其中含有胶体金标记的炭疽芽孢杆菌抗体。

本发明涉及的上述炭疽芽孢杆菌的检测试纸，它还包含样品垫，该样品垫的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

本发明涉及的上述炭疽芽孢杆菌的检测试纸，其中反应支持物选用 PVC 板。

本发明涉及的上述炭疽芽孢杆菌的检测试纸，其中吸水垫选用滤纸。

本发明涉及的上述炭疽芽孢杆菌的检测试纸，其中金标抗体保护膜的膜材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维，其上均匀涂布有胶体金标记的羊抗 St 抗体。

另一方面，本发明涉及的上述炭疽芽孢杆菌的检测试纸，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 1 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 St 多克隆抗体包被的检测条带，并且 C 处是兔抗羊 IgG 包被的质控条带；金标抗体保护膜 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羊抗 St 多克隆抗体；吸水垫 1 位于硝酸纤维膜 2 上部的相对于金标抗体保护膜 3 而言的另一侧并与 2 部分重叠；样品垫 4 位于 2 上与 1 相反的一侧并与 3 部分重叠。

又一方面，本发明涉及的上述炭疽芽孢杆菌的检测试纸，以吸水垫一侧为起始端，样品垫一侧为末端，羊抗 St 多克隆抗体的检测条带位于接近末端，兔抗羊 IgG 包被的质控条带接近于起始端。

本发明再一个目的是提供制备所述检测炭疽芽孢杆菌的试纸的方法，该方法包括以下步骤：胶体金探针的制备，金标垫的制备，硝酸纤维膜的喷涂包被。

1、胶体金探针的制备

(1) 将 HAuCl_4 先配制为0.01%水溶液，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补足至100 ml，4℃避光保存；

(2) 用 K_2CO_3 调PH值为约7-9，优选为约7.8-8.9，更优选约8.2-8.5；

(3) 将胶体金调至pH 8.2-8.5，用5 mM PB (pH 7.2) 稀释抗体至0.2 mg/ml；

(4) 保持胶体金稳定。

本发明还在于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：

a. 取10支洁净的1.5 ml离心管，分别加入胶体金溶液1ml；

b. 在1-10号管内分别加入10 μl 、20 μl 、30 μl 、40 μl 、50 μl 、60 μl 、70 μl 、80 μl 、90 μl 、100 μl 的5 mM PB，再依次加入稀释好的0.2 mg/ml的待标记抗体90 μl 、80 μl 、70 μl 、60 μl 、50 μl 、40 μl 、30 μl 、20 μl 、10 μl 、0 μl ，混匀，静置2分钟；

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

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1 ml 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8-15ug，优选抗体量10-12ug，更优选10.5-11.5ug，最优选为11ug。

2、金标垫的制备

取上述pH的胶体金以1ml/管分装于1.5 ml的离心管中。每支管中加入8-15 ug标记剂量，优选抗体量10-12 ug，更优选10.5-11.5 ug，最优选为11ug的抗体，轻摇混匀后放置。每管中加入10%的BSA100 μl ，混

匀放置。将上面初步制得的胶体金探针在12000 rpm、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500 μl 重悬液重悬后于4℃，1000 rpm，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。

3、硝酸纤维膜的喷涂包被

(1) 利用隔流喷金划线机以 50mm/s 的喷膜速度包被兔抗 St 多克隆抗体和质控兔抗羊 IgG 两个条带的硝酸纤维膜；

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 St 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 PBS；质控兔抗羊 IgG 可以购自鼎国生物技术公司，其浓度为 0.1-5 mg/ml 更优选是 0.5-2.5 mg/ml，最优选为 1mg/ml；

(2) 制备含有胶体金标记的羊抗 St 的金标抗体保护膜，具体为：将胶体金标记的羊抗 St 均匀涂布在玻璃纤维膜上来制备，其中，抗体用 PB 稀释，pH 为 7 - 9，优选 7.5 - 9，最适 PH 值为 8.5。

本发明还公开了所述试纸在检测炭疽芽孢杆菌中的应用，参见附图 2。

在本发明检测炭疽芽孢杆菌的方法中，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“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：

如标本中含有炭疽芽孢杆菌，则它将与试纸上胶体金标记的炭疽芽孢杆菌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炭疽芽孢杆菌多克隆抗体结合，形成红色线条，即在“T”处形成红色条带。

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兔抗羊 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。

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。还可利用金标免疫分析仪进行定性或定量检测。

本发明的技术方案是：采用纯化的炭疽芽孢杆菌多克隆抗体、和兔抗羊 IgG 分别固相于硝酸纤维膜上，结合胶体金标记的羊抗炭疽多抗，应用膜层析双抗体夹心法的原理检测标本中的炭疽芽孢杆菌。

附图说明

图 1A 本发明试纸的正面示意图。

图 1B 本发明试纸的侧面示意图。

其中，图 1A 和 1B：1：吸水垫；2：硝酸纤维膜（T：包被抗 St 多克隆抗体检测条带；C：包被兔抗羊 IgG 的质控条带）；3：金标抗体纤维膜；4：样品垫；5：反应支持物。

图 2：检测结果示意图；T、C 两条线阳性；C 一条线阴性；无效。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1、检测炭疽芽孢杆菌的胶体金试纸的制备

1、胶体金探针的制备

(1) 将 HAuCl_4 先配制成 0.01% 水溶液，取 100 ml 纯水加热至沸腾。磁力搅拌下准确加入 1 ml 1% 的 HAuCl_4 ，同时加入 1.5 ml 质量分数为 1% 的柠檬酸三钠水溶液。颜色稳定后继续加热煮沸 15 分钟，冷却至室温后加纯水补足至 100ml，4℃ 避光保存。

(2) K_2CO_3 调 pH 值为 8.2-8.5 左右。

(3) 将胶体金调至适宜的 pH，优选 8.0-8.5，更优选 8.2，用 5mM PB (pH 7.2) 稀释抗体至 0.2 mg/ml。

2、金标垫的制备

取 pH 8.2 的胶体金以 1ml/管分装于 1.5 ml 的离心管中。每支管中加入最佳标记剂量的抗体，轻摇混匀后放置 5 分钟或稍长，此步为抗体与胶体金颗粒结合。每管中加入 10% 的 BSA 100 μl ，混匀放置 15 分钟或稍长，此步为封闭。将上面初步制得的胶体金探针以 12000 rpm，离心 30 分钟，4℃，弃上清液。每支离心管中加入 1 ml 重悬液悬浮沉淀后同上离心。弃上清液，留下管底暗红色疏松状沉淀，加入 500 μl 重悬液重悬后于 4℃，1000 rpm，离心 10 分钟；取上清液，均匀的滴加在 1cm 宽的玻璃纤维上，

37° 干燥2.5-3小时。

3、硝酸纤维膜的喷涂包被

(1) 利用隔流喷金划线机以 50mm/s 的喷膜速度包被兔抗 St 多克隆抗体 (1.5mg/ml 含有 1%BSA) 和质控兔抗羊 IgG(购自鼎国生物技术公司, 1mg/ml) 两个条带的硝酸纤维膜;

(2) 含有胶体金标记羊抗 St 11ug 的玻璃纤维膜, 5mMPB 稀释; 最适 PH 值为 8.5

实施例 2、炭疽芽孢杆菌及其芽孢检测试纸

参见图 1, 反应支持物为 6.2cm × 0.4cm PCV 板; 吸水垫为 2cm × 0.4cm 的滤油纸; 1.8cm × 0.4cm 的硝酸纤维膜依次包被兔抗羊 IgG (购自鼎国生物技术公司, 1mg/ml), 羊抗 St 多克隆抗体 1.5mg/ml (含有 1%BSA 封闭剂), 含有 0.4cm × 0.4cm 胶体金标记的羊抗 St 多克隆抗体 (标金浓度: 11ug PB 稀释; 最适 PH 值为 8.5) 玻璃纤维膜; 样品垫为 2.7cm × 0.4cm 的玻璃纤维膜; 即形成了炭疽芽孢杆菌及其芽孢检测试纸。

实施例 3、检测方法

参见附图 2, 将待测标本与样品稀释液混匀, 再用移液器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:

如含有炭疽芽孢杆菌抗原, 则与试纸上胶体金标记的羊抗 St 多抗形成相应的复合物, 上行与包被在硝酸纤维膜上的流兔抗 St 多抗结合, 形成红色线条, 即在“T”处形成红色条带。

无论是否含有相对应的抗原, 胶体金标记多抗继续向上爬行与包被在膜上的兔抗羊 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。

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。

实施例 4、DJM-3 定量金标免疫分析仪半定量检测

1、可先用检测法检测炭疽芽孢杆菌试纸条 20 个阴性值, 利用金标仪检

测试其 T/C 的比值平均计算出炭疽芽孢杆菌试纸条的定阈值。

2、其次利用定阈值来用金标仪机器检测炭疽芽孢杆菌试纸条能达到的最低浓度。

3、判读结果时大于或等于定阈值为阳性，小于定阈值为阴性。

本发明所述的试纸可以配合小型仪器进行半定量检测，不需专业培训，结果清晰易辨并能客观保存数据，操作简单，易于推广，适合基层，适合于突发事件的现场检测，适合流行病学调查，并对炭疽芽孢杆菌的感染诊断起到辅助作用。

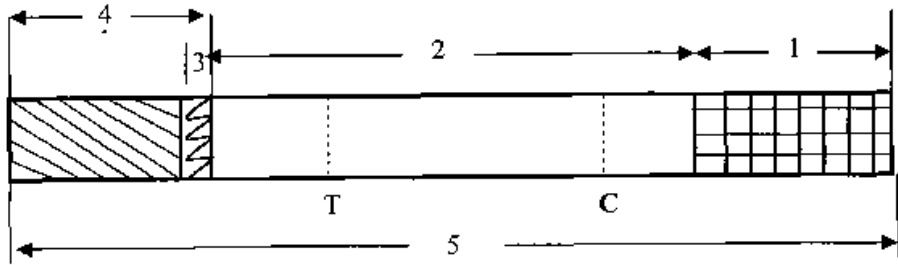


图 1A

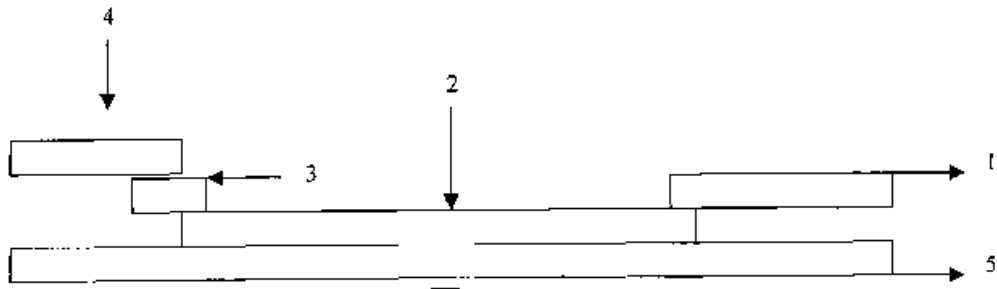


图 1B

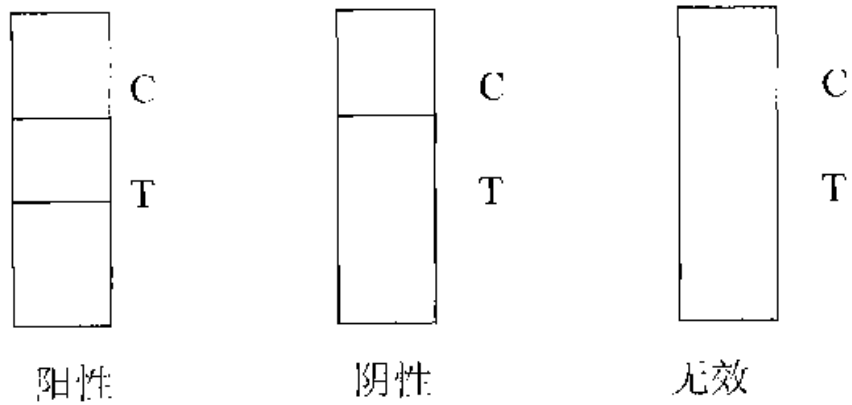


图 2

专利名称(译)	一种炭疽芽孢杆菌及其芽孢的胶体金检测试纸及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101493459A	公开(公告)日	2009-07-29
申请号	CN200910078821.6	申请日	2009-03-04
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 张晓龙 孙肖红 李伟 杨宇 胡孔新 谢士嘉		
发明人	王静 张晓龙 孙肖红 李伟 杨宇 胡孔新 谢士嘉		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测试纸，该试纸包含：(1)反应支持物；(2)吸水垫；(3)硝酸纤维膜，该膜包被有炭疽芽孢杆菌抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；(4)金标抗体保护膜，其中含有胶体金标记的炭疽芽孢杆菌抗体。本发明试纸可以配合小型仪器进行半定量检测，不需专业培训，结果清晰易辨并能客观保存数据，操作简单，易于推广，适合基层，适合于突发事件的现场检测，适合流行病学调查，并对炭疽芽孢杆菌的感染诊断起到辅助作用。

