

[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 200810200027. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101676725A

[22] 申请日 2008.9.18

[21] 申请号 200810200027. X

[71] 申请人 上海海泰金芯生物分子检测技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路 1118 号 6 楼

[72] 发明人 葛海鹏

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法

[57] 摘要

一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，包括一个纤维膜，纤维膜上设置有测试带和对照带，测试带中喷涂有鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体溶液，对照带上喷涂有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体，在纤维膜上靠近对照带的一侧设置有吸水垫，在纤维膜上靠近测试带的一侧设置有金标垫，金标垫中设置有抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液，金标垫上设置有样品垫，样品垫设置在远离测试带的金标垫的一侧。本发明还提供了一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法。本发明的免疫层析试纸可达到与反向血凝实验同样的特异性和敏感性，并且更加简便快速，是检测鼠疫流行及早期检测的有效方法。

1. 一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，包括一个纤维膜，其特征在于：所述的纤维膜上设置有测试带和对照带，所述的测试带中喷涂有鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体溶液，所述的对照带上喷涂有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体，在所述的纤维膜上靠近对照带的一侧设置有吸水垫，在所述的纤维膜上靠近测试带的一侧设置有金标垫，所述的金标垫为玻璃纤维膜、树脂或无纺布，所述的金标垫中设置有抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液，所述的金标垫上设置有样品垫，所述的样品垫设置在远离测试带的金标垫的一侧。
2. 如权利要求 1 所述的一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述的纤维膜的另外一侧设置有背板。
3. 一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法，特征在于：包括一个制备鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体和抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体的过程，将鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体溶液喷到纤维膜上形成测试带，将抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体喷到所述纤维膜的另一区域形成对照带，然后将吸水纸垫粘贴在所述纤维膜的远离所述测试带的一端；包括一个制备抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液的过程，将玻璃纤维膜、树脂或无纺布进入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，将其粘贴在纤维素膜的靠近所述测试带的一端，然后在金标垫的远离所述测试带的一端粘贴样品垫，得到检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。
4. 如权利要求 3 所述的一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法，特征在于：所述测试带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的浓度为 2.0-2.26mg/mL。
5. 如权利要求 3 所述的一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法，特征在于：所述对照带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的浓

度为 2.5-3.0 mg/mL。

6. 如权利要求3所述的一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法，特征在于：所述鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针的制备方法包括如下步骤，

1) 将 0.01%HAuCl₄ 水溶液，加热煮沸，每 100mLHAuCl₄ 溶液进行如下操作：搅动下加入 1.6mL 的 1%柠檬酸三钠水溶液，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，得到胶体金溶液；

2) 配制含有浓度为 28μg/mL 的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体的免疫胶体金探针溶液。

7. 一种试剂盒，特征在于：所述的试剂盒中设置有权利要求 1 所述的用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。

用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域：

本发明涉及生物化学领域，尤其涉及一种免疫层析试纸，具体来说是一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术：

鼠疫的致病菌鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）是人们早已熟知的烈性病原微生物，具有容易获得，致病性强，致死率高，对自然环境的抵抗力较强的特点，不同性别和年龄的人都是易感人群，因而被公认为是经典的生物战剂。“9.11”事件以后，美国国家反恐预案将鼠疫耶尔森氏菌列为生物恐怖红色警报（最高级）中的烈性病原微生物，对环境中鼠疫耶尔森氏菌的快速检测现已成为反生物恐怖的重要内容。

鼠疫耶尔森氏菌经典的检测程序一般分为四步，包括显微镜涂片检查、细菌培养、鼠疫噬菌体裂解实验和动物实验。涂片检查和细菌培养的标本一般是采集疑似病人或动物的淋巴结吸出物、痰、脑脊液或死者的肺部组织材料。鼠疫耶尔森氏菌是杆状、不形成芽孢、革兰氏呈阴性且两端浓染的厌氧菌。腺鼠疫中80%以上的血液标本培养为阳性，初代培养需要观察3-5天。噬菌体裂解实验用于细菌鉴定，动物实验用于污染材料中病原的分离及毒力的测定。将被检材料制成悬液，通过腹腔、皮下和经皮等途径接种0.2-0.5mL于小白鼠或豚鼠，材料中若果有一定数量的鼠疫耶尔森氏菌，动物一般在接种2天后死亡。

发明内容：

本发明所要解决的技术问题在于提供一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法，所述的这种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸要解决现有技术中的检测鼠疫耶尔森氏菌的方法灵敏度低，检测

方法复杂，时间长的技术问题。

本发明一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，包括一个纤维膜，所述的纤维膜上设置有测试带和对照带，所述的测试带中喷涂有鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体溶液，所述的对照带上喷涂有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体，在所述的纤维膜上靠近对照带的一侧设置有吸水垫，在所述的纤维膜上靠近测试带的一侧设置有金标垫，所述的金标垫为玻璃纤维膜、树脂或无纺布，所述的金标垫中设置有抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液，所述的金标垫上设置有样品垫，所述的样品垫设置在远离测试带的金标垫的一侧。

进一步的，所述的纤维膜的另外一侧设置有背板。

本发明还提供了一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法，包括一个制备鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体和抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体的过程，将鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体溶液喷到纤维膜上形成测试带，将抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体喷到所述纤维膜的另一区域形成对照带，然后将吸水纸垫粘贴在所述纤维膜的远离所述测试带的一端；包括一个制备抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液的过程，将玻璃纤维膜、树脂或无纺布进入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，将其粘贴在纤维素膜的靠近所述测试带的一端，然后在金标垫的远离所述测试带的一端粘贴样品垫，得到检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。

进一步的，所述测试带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的浓度为 2.0-2.26mg/mL。

进一步的，所述对照带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的浓度为 2.5-3.0 mg/mL。

进一步的，所述鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针的制备方法如下：

3) 将 0.01%HAuCl₄ 水溶液, 加热煮沸, 每 100mLHAuCl₄ 溶液进行如下操作: 搅动下加入 1.6mL 的 1%柠檬酸三钠水溶液, 直到液体颜色稳定成葡萄酒红色, 得到胶体金溶液;

4) 配制含有浓度为 28μg/mL 的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体的免疫胶体金探针溶液。

本发明还提供了一种试剂盒, 所述的试剂盒中设置有上述的用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。

在实际应用中, 所述纤维素膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜, 宽度控制在 20-25mm 为宜; 所述金标垫宽度为 5-10mm; 所述样品垫为玻璃纤维膜, 宽度为 20-40mm。

本发明的免疫层析试纸可达到与反向血凝实验同样的特异性和敏感性, 并且更加简便快速, 是检测鼠疫流行及早期检测的有效方法。

本发明与其他检测鼠疫耶尔森氏菌的方法相比, 优势在于: 检测过程中标本处理简单, 不需要专门仪器和人员培训, 非专业技术人员按照说明书即可操作, 并可迅速观察结果, 具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点, 适于临床和现场使用。

具体实施方式:

实施例 1 制备抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体

选用体重 2Kg 的健康大耳白家兔, 皮下注射福氏完全佐剂鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原 2mg/只 (购于长春生物制品研究所), 并分别于初次免疫后的第 20 日、第 30 日和第 40 日追加免疫水剂一针, 剂量和途径与初次免疫相同, 末次免疫后 10 天测试血清中的抗体效价, 经琼脂双向扩散法检测抗体效价达到 1: 32 以上采血。

采用饱和硫酸铵盐析法对血液中的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体进行纯化, 经琼脂双向扩散法鉴定获得的抗体具有较好的特异性和亲和性。

实施例 2 制备免疫胶体金探针

1) 制备胶体金溶液：采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒，具体方法为：将 HAuCl_4 配置成 0.01% 水溶液，取 100mL 加热至沸腾，搅动下准确加入 1.6mL 的 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液，液体颜色稳定成葡萄酒红色，即得到胶体金溶液。

2) 确定胶体金偶联抗体饱和浓度：用 0.2M K_2CO_3 或 0.1M HCl 溶液调节胶体金溶液 pH 值至 9.0，将抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体稀释为 1mg/mL 浓度，分别取 5 μL 、10 μL 、15 μL 、20 μL 、25 μL 、30 μL 加入到 1mL 胶体金溶液各管中，混匀后于室温下放置 5min，加入 10%NaCl 水溶液 0.1mL，混匀，静置，10-20min 后观察液体颜色，胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量，即为稳定 1mL 胶体金溶液所需抗体的最适浓度，结果表明该最适浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ ，在此基础上增加 20% 抗体量，即为胶体金偶联抗体饱和浓度，该饱和浓度为 28 $\mu\text{g/mL}$ 。

3) 制备免疫胶体金探针溶液：按上述方法配制含有浓度为 28 $\mu\text{g/mL}$ 的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体的免疫胶体金探针溶液。

实施例 3 检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备

1) 用浓度为 0.01M，pH7.2 的 PBS 分别将质控抗体（羊抗兔 IgG）稀释至终浓度为 2.5-3.0mg/mL，将步骤一制备的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体稀释至终浓度为 2.0-2.26mg/mL，用 BioDot 公司 XYZ3000 点样仪将经稀释的羊抗兔 IgG 喷涂在 300mm 长，25mm 宽的 NC 膜上形成一条对照带，将经稀释的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体喷涂在上述 NC 膜的另一区域形成测试带，室温晾干，然后将吸水纸垫贴在 NC 膜的远离测试带的一端。

2) 将 300mm 长、10mm 宽的玻璃纤维膜进入步骤 2 制备的胶体金探针溶液，得到金标垫 4，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30min，-50 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻抽干后，将其贴在步骤 1)

得到的 NC 膜的靠近测试带 1 的一端。

3) 在步骤 2) 中的金标垫的远离测试带的一端粘贴 300mm 长、30mm 宽的玻璃纤维膜样品垫，得到鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。

专利名称(译)	用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN101676725A	公开(公告)日	2010-03-24
申请号	CN200810200027.X	申请日	2008-09-18
[标]发明人	葛海鹏		
发明人	葛海鹏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，包括一个纤维膜，纤维膜上设置有测试带和对照带，测试带中喷涂有鼠疫耶尔森氏菌F1抗原抗体溶液，对照带上喷涂有抗鼠疫耶尔森氏菌F1抗原抗体的抗抗体，在纤维膜上靠近对照带的一侧设置有吸水垫，在纤维膜上靠近测试带的一侧设置有金标垫，金标垫中设置有抗耶尔森氏菌F1抗原抗体的免疫胶体金探针溶液，金标垫上设置有样品垫，样品垫设置在远离测试带的金标垫的一侧。本发明还提供了一种用于检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备方法。本发明的免疫层析试纸可达到与反向血凝实验同样的特异性和敏感性，并且更加简便快速，是检测鼠疫流行及早期检测的有效方法。