

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510051358.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 9 月 13 日

[11] 公开号 CN 1831536A

[22] 申请日 2005.3.8

[21] 申请号 200510051358.8

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物  
流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军医  
科院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 端 青 檀 华 何 君 朱 虹  
苏裕心

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 关 畅

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

一种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

本发明公开了一种检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的纤维素膜、紧密连接于所述纤维素膜的含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫；所述纤维素膜上设有一条测试带和一条对照带；所述测试带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体，所述对照带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体。本发明的免疫层析试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

1、一种检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的纤维素膜、紧密连接于所述纤维膜的含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫；所述纤维素膜上设有一条测试带和一条对照带；所述测试带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体，所述对照带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体。

2、根据权利要求 1 所述的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述测试带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的浓度为 2.0-2.6mg / mL，所述对照带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体的浓度为 2.5-3.0mg / mL。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述免疫层析试纸紧密连接有背板。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，其特征在于：所述抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针的制备方法如下：

1) 将 0.01%HAuCl<sub>4</sub>水溶液，加热煮沸，每 100mL HAuCl<sub>4</sub>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 28 μg / 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。

5、含有权利要求 1—4 任一所述的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的试剂盒。

6、一种制备检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体和抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体；将抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体溶液喷到纤维素膜上形成测试带，将抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体喷到所述纤维素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素膜的远离所述测试带的一端；

2) 制备抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液；将玻璃纤维膜、树脂或无纺布浸入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的靠近所述测试带的一端；

3) 在步骤 2) 中的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。

7、根据权利要求 6 所述的制备检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的方法，其特征在于：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，

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

8、根据权利要求 6 或 7 所述的制备检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的方法，其特征在于：所述吸水纸垫的下面粘贴有背板。

9、根据权利要求 6 或 7 所述的制备检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的方法，其特征在于：所述纤维膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜；所述样品垫为玻璃纤维膜。

## 一种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

本发明涉及一种致病菌的检测试纸及其制备方法，特别是涉及一种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，又名黑死病，是一种传播性和致死率较高的传染病，人类鼠疫按发病形式分为三种：腺鼠疫、肺鼠疫和败血型鼠疫。其中，腺鼠疫和肺鼠疫的潜伏期分别为2-10天和2-3天，病死率分别高达50%和100%。因此，监测鼠疫流行及早期诊断是鼠疫防治工作的重要内容。

目前世界上有20多个国家每年都有局部地区鼠疫爆发流行的报道。尽管鼠疫自发现至今已有一个多世纪，但临床对疑似患者的实验室诊断仍然存在不少困难，尤其是适合基层快速筛查的方法还未见报道，因而不能对该病患者进行及时的早期诊断治疗，是贫困及边远地区人群传播速度快和死亡率高的主要原因。

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验程序一般分为四步，包括显微镜涂片检查、细菌培养、鼠疫噬菌体裂解试验和动物试验。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。噬菌体裂解试验用于细菌鉴定，动物试验用于污染材料中病原的分离及其毒力测定。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，材料中如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。

鼠疫血清学试验的基础是鼠疫耶尔森氏菌具有其特异性荚膜抗原-F<sub>1</sub>抗原,而耶尔森氏菌属中的其它细菌如假结核耶尔森氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌均不具有F<sub>1</sub>抗原,因此不会在以鼠疫菌F<sub>1</sub>抗原为基础的血清学试验中发生交叉反应

(Neubauer H, Rahalison L, Brooks TJ. Serodiagnosis of human plague by an anti-F<sub>1</sub> capsular antigen specific IgG/IgM ELISA and immunoblot Epidemiol Infect. 2000 Dec;125(3):593-7.)。

2004年德国科学家研制出针对鼠疫耶尔森氏菌F<sub>1</sub>抗原的ELISA商业化试剂盒,最小检测浓度为4 ng F<sub>1</sub>抗原/mL,检测血清和淋巴液的敏感度分别为90.1%和100%,特异性为98.4-100%(Spelttstoesser WD, Rahalison L, Grunow R. Evaluation of a standardized F<sub>1</sub> capsular antigen capture ELISA test kit for the rapid diagnosis of plague. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004 Jun, 41(2):149-55.)。此外,还可利用PCR方法扩增得到鼠疫耶尔森氏菌caf<sub>1</sub>基因以达到检测鼠疫耶尔森氏菌的目的,扩增产物长度为501bp,该方法已用于检测马达加斯加地区的218份疑似鼠疫患者的淋巴液标本。对该方法与细菌培养和ELISA法进行比较,鼠疫耶尔森氏菌培养呈阳性的标本中用PCR方法检测的敏感度为89%(57/64),F<sub>1</sub>抗原检测呈阳性的标本中用PCR方法检测的敏感度为80.7%(63/78)。细菌培养、F<sub>1</sub>抗原和抗体(n=105)检测均呈阴性的标本中用PCR方法检测的特异性为100%。此外,由于马达加斯加岛鼠疫患者标本来自偏远村庄,有可能在运输途中出现错误,因此研究者在相同的操作环境下对PCR试验的有效性进行了评价。结果表明在相同的操作环境下,PCR敏感性相对于细菌培养结果为50%(25/50),相对于F<sub>1</sub>抗原免疫捕获ELISA法为35.2%(19/54),用PCR法检测在这种条件下的特异性为96%。研究者认为,PCR试验的特异性高,但敏感度较细菌培养和F<sub>1</sub>抗原检测低。敏感度的限制可能是由于试验条件、模板中的PCR抑制物以及用于DNA提取的标本量小造成的。因此该方法不能作为鼠疫的常规诊断方法(Rahalison L, Vololonirina E, Ratsitorahina M. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):260-3.)。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。

本发明所提供的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸,包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的纤维素膜、紧密连接于所述纤维素膜的含有抗鼠疫耶尔森氏菌F<sub>1</sub>抗原的抗体免疫胶体金探针金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫;所述纤维素膜上设有一条测试带和一条对照带;所述测试带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌F<sub>1</sub>

抗原的抗体,所述对照带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体。

所述测试带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体浓度为 2.0-2.26 mg / mL,所述对照带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体的浓度为 2.5-3.0 mg / mL。

所述吸水纸垫和样品垫均由吸水材料制备。

为了方便使用,上述检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸还紧密连接一背板,再将该带有背板的试纸装入试剂盒中,该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口,对应于对照带和测试带的部位设有观测窗。

本发明的另一个目的是提供制备上述检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的方法。

本发明所提供的制备检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的方法,包括以下步骤:

1) 制备抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体和抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体;将抗鼠疫耶尔森氏菌 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;

2) 制备抗耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针溶液;将玻璃纤维膜、树脂或无纺布浸入该免疫胶体金探针溶液,得到金标垫,将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的靠近所述测试带的一端;

3) 在步骤 2) 中的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。

所述测试带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体浓度为 2.0-2.26 mg / mL 所述对照带上抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的抗抗体的浓度为 2.5-3.0 mg / mL。

为了方便使用,可将上述免疫层析试纸再紧密连接一背板,再将其装入试剂盒。

所述抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原抗体的免疫胶体金探针的制备方法如下:

1) 将 0.01%HAuCl<sub>4</sub>水溶液,加热煮沸,每 100mL HAuCl<sub>4</sub>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 28 μg / 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。

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 20-2.5mm 为宜;所述金标垫的宽度为 5-10mm;所述样品垫为玻璃纤维膜,宽度为 20-40mm。

本发明利用免疫胶体金技术制备的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸，其原理是用抗鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原的特异性抗体包被纤维膜形成一条测试带，用以捕捉检测样品中的鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原，然后用标记了鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原的特异性抗体的免疫胶体金探针检测，若检测样品中含有鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原，经过短暂层析后即可在测试带处出现一条肉眼可见的层析带。此外，所述纤维素膜的另一区域还包被有鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原特异性抗体的抗抗体，形成一条对照带，无论检测样品中是否含有鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原，标记了鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原的特异性抗体的免疫胶体金探针都应鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原特异性抗体的抗抗体结合，经过短暂层析后在对照带处出现一条肉眼可见的层析带，若未出现该条带，证明试纸失效。

应用本发明可检测环境中的鼠疫耶尔森氏菌，也可用于检测鼠疫患者病灶及其体液中的鼠疫耶尔森氏菌特异性抗原。

在用反向间接血凝法试剂盒检出结果与胶体金法结果一致。

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

本发明与其它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。

### **附图说明**

图 1 为透射电镜下的免疫胶体金颗粒

图 2 为检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的正面和纵截面结构示意图

### **具体实施方式**

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

#### **材料**

氯化金 (HAuCl<sub>4</sub>)，购自成都化学试剂厂；硝酸纤维膜 (NC 膜)，购自美国 Millipore 公司；玻璃纤维膜，购自上海良信公司；吸水滤纸，购自 Milipore 公司；塑料背板，购自北京燕华公司。

#### **微生物菌株**

鼠疫耶尔森氏菌 EV 株和 Evp 株购自中国疾病预防控制中心鼠疫布氏菌预防控制基地；假结核耶尔氏菌，小肠结肠炎耶尔氏菌，土拉弗朗西斯菌，布鲁氏菌，嗜肺军团菌，大肠埃希氏菌，痢疾志贺氏菌，沙门氏菌，绿脓杆菌和霍乱弧菌均由军事医

学科学院全军微生物检验研究中心菌种库提供。

#### 实施例 1、检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备

##### 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 1 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。

##### 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  $\text{HAuCl}_4$  配制成 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 0.2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  或 0.1 M  $\text{HCl}$  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  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、15  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、25  $\mu\text{L}$ 、30  $\mu\text{L}$  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%  $\text{NaCl}$  水溶液 0.1 mL，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  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ，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  $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。

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  $\mu\text{g} / \text{mL}$  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。

##### 3、胶体金颗粒与免疫金探针的电镜观察

取步骤 2 制备的免疫胶体金溶液 1 滴，附在有聚乙烯醇缩甲醛膜 (Formvar) 的铜网上，用滤纸吸走多余的液体，空气中使其自然干燥，然后于透射电镜下观察，可见免疫胶体金颗粒呈圆形或椭圆形，大小均匀一致，计数 100 个金颗粒，颗粒直径达到约 25nm，即制备合格的免疫胶体金颗粒 (图 1)；该免疫胶体金颗粒外围有明显的低电子密度晕圈，表明吸附有抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体。

##### 4、检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的制备

如图 2 所示 (图中 a 为检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的正面结构图，图中 b 为检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的纵截面结构图)，检测鼠疫耶尔森氏



菌的免疫层析试纸由吸水纸垫 8、硝酸纤维素膜（NC 膜）6、金标垫 4 和玻璃纤维膜样品垫 3 组成，硝酸纤维素膜 6 上设有一条测试带 1 和一条对照带 2，制备方法包括以下步骤：

1) 用浓度为 0.01M, pH 7.2 的 PBS 分别将质控抗体(羊抗兔 IgG)稀释至终浓度为 2.5-3.0 mg / mL, 将步骤 1 制备的抗鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的抗体稀释至终浓度为 2.0-2.26 mg / 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 膜的另一区域形成一条测试带, 室温晾干, 然后将吸水纸垫 8 粘贴在 NC 膜的远离测试带的一端。

2) 将 300mm 长、10mm 宽的玻璃纤维膜浸入步骤 2 制备的免疫胶体金探针溶液, 得到金标垫 4, 4℃放置 30 min, -50℃冷冻抽干后, 将其粘贴在步骤 1) 得到的 NC 膜 6 的靠近测试带 1 的一端。

3) 在步骤 2) 中的金标垫 4 的远离测试带 1 的一端粘贴 300 mm 长、30 mm 宽的玻璃纤维膜样品垫 3, 得到鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸。

#### 5、检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试剂盒的制备

为了方便使用, 将步骤 4 制备的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸的下面再紧密连接一塑料背板, 再将该带有背板的试纸装入试剂盒中, 加干燥剂后密封保存。该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口, 对应于对照带和测试带的部位设有观测窗。

### 实施例 2、鼠疫耶尔森氏菌及其 F1 抗原的检测及与其它细菌的交叉试验

#### 一、鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原的检测

1) 将鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原(购于长春生物制品研究所)用生理盐水从 1000  $\mu$ g/mL 按 100、10、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$   $\mu$ g/mL 梯度稀释后作为样品检测液备用。

2) 取实施例 1 步骤 5 制备的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试剂盒, 分别向样品孔中加入步骤 1) 中的样品检测液 3 滴(约 150 $\mu$ L), 5 min 后开始观察结果, 观察 15 min。结果表明浓度为 100、10、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$   $\mu$ g/mL 的样品检测液, 均在测试带和对照带处均出现一条红色沉淀线, 检测结果呈阳性。

#### 二、鼠疫耶尔森氏菌的检测及与其它细菌的交叉试验

1) 鼠疫耶尔森氏菌 EV 株和 Evp 株划线接种于普通琼脂平板, 37℃培养 24 小时, 挑取单菌落接种于小试管中, 用生理盐水制成菌悬液, 分别比浊后, 用生理盐水从 1 千万 CFU/mL 做 2 倍比稀释, 即按 500 万 CFU/mL、250 万 CFU/mL、125 万 CFU/mL、

62.5 万 CFU/mL、31.25 万 CFU/mL、15.6 万 CFU/mL、7.8 万 CFU/mL 梯度稀释后作为样品检测液备用；将假结核耶尔氏菌、小肠结肠炎耶尔氏菌、大肠埃希氏菌、痢疾志贺氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、霍乱弧菌、布鲁氏菌和嗜肺军团菌等均按上述同样方法制备样品检测液。

2) 取实施例 1 步骤 5 制备的检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试剂盒，分别向点样孔中加入步骤 1) 中的样品检测液 3 滴（约 150 $\mu$ L），5 min 后开始观察结果，观察 15 min。结果表明点有耶尔森氏菌样品检测液的免疫层析试剂盒，在观测窗中观察到在测试带和对照带处均出现一条红色沉淀线，检测结果呈阳性，即有鼠疫耶尔森氏菌检出；点有其它菌种样品检测液的免疫层析试剂盒，在对照带处出现一条红色沉淀线，而测试带处未出现红色沉淀线，检测结果呈阴性，即没有鼠疫耶尔森氏菌检出。上述检测结果表明用本发明的免疫层析试纸可特异性的检测出鼠疫耶尔森氏菌，检测结果不受其它菌种的影响。

鼠疫反向间接血凝法测定药盒（购自全国鼠疫布氏菌病防治基地）与本发明的鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒检测的结果基本一致。

实施例 3、不同批次鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒对鼠疫耶尔森氏菌、鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原的检测及与其它细菌的交叉试验

一、不同批次鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒对鼠疫耶尔森氏菌、鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原的检测

按实施例 1 的方法制备三批鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒，批号分别为 200401、200402 和 200403，用其对不同浓度的鼠疫耶尔森氏菌 EV 株和 Evp 株样品检测液以及鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原进行检测，检测结果如表 1、表 2 和表 3 所示，表明应用本发明的鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒检测不同鼠疫耶尔森氏菌毒株，最低检出单位为 15.6 万 CFU/mL，检测鼠疫耶尔森氏菌 F<sub>1</sub> 抗原，最低检出单位为 1ng/mL。

表 1 三批鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒对鼠疫 EV 株试验结果

鼠疫耶尔森氏菌 EV 株（万 CFU/mL）							
批 号	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8
200401	+	+	+	+	+	-	-
200402	+	+	+	+	+	-	-
200403	+	+	+	+	+	-	-

表 2 三批鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒对鼠疫 Evp 株试验结果

鼠疫耶尔森氏菌 Evp 株（万 CFU/mL）							
-------------------------	--	--	--	--	--	--	--

批 号	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8
200401	+	+	+	+	+	+	-
200402	+	+	+	+	+	+	-
200403	+	+	+	+	+	+	-

表 3 三批鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒对鼠疫菌 F1 抗原试验结果

鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原 (ug/mL)									
批 号	100	10	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
200401	+	+	+	+	+	+	-	-	-
200402	+	+	+	+	+	+	-	-	-
200403	+	+	+	+	+	+	-	-	-

## 二、不同批次鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒的交叉试验

用批号分别为 200401、200402 和 200403 的三批鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒对浓度为 10<sup>8</sup>CFU/ mL 的假结核耶尔氏菌、小肠结肠炎耶尔氏菌、大肠埃希氏菌、痢疾志贺氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、霍乱弧菌、布鲁氏菌、嗜肺军团菌和土拉弗朗西斯菌样品检测液进行检测，检测结果如表 4 所示，表明本发明的不同批次的鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒均不与上述相关细菌发生交叉反应，具有较高的特异性。

表 4 三批鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒交叉试验结果

菌 液 (10 <sup>8</sup> CFU/ mL )	检 测 盒 批 号		
	200401	200402	200403
假结核耶尔森氏菌	-	-	-
小肠结肠炎耶尔森氏菌	-	-	-
土拉弗朗西斯菌	-	-	-
布鲁氏菌	-	-	-
嗜肺军团菌	-	-	-
大肠杆菌	-	-	-
痢疾志贺氏菌	-	-	-
沙门氏菌	-	-	-
绿脓假单胞菌	-	-	-
霍乱弧菌	-	-	-

用本发明的鼠疫耶尔森氏菌免疫层析试剂盒检测临床血清标本，只需将标本样品（约 150μL）滴在样品垫上，5 min 后开始观察结果，观察 15 min，若在测试带和对照带处均出现一条红色沉淀线，表明检测结果呈阳性，即有鼠疫耶尔森氏菌检出。



图 1

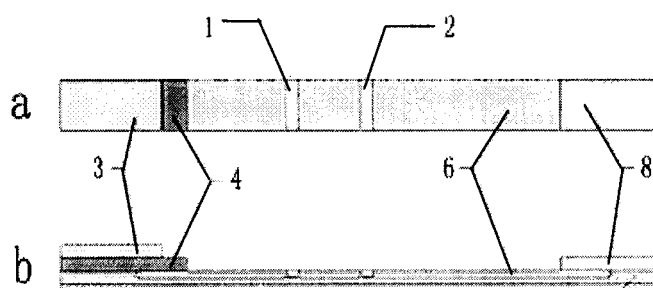


图 2

专利名称(译)	一种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	<a href="#">CN1831536A</a>	公开(公告)日	2006-09-13
申请号	CN200510051358.8	申请日	2005-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	端青 檀华 何君 朱虹 苏裕心		
发明人	端青 檀华 何君 朱虹 苏裕心		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/547 G01N33/52 G01N21/78 G01N33/533		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1831536B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测鼠疫耶尔森氏菌的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸，包括吸水纸垫、紧密连接于所述吸水纸垫的纤维素膜、紧密连接于所述纤维素膜的含有抗鼠疫耶尔森氏菌F1抗原抗体的免疫胶体金探针的金标垫和紧密连接于所述金标垫的样品垫；所述纤维素膜上设有一条测试带和一条对照带；所述测试带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌F1抗原抗体，所述对照带上含有抗鼠疫耶尔森氏菌F1抗原抗体的抗抗体。本发明的免疫层析试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

