



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1880961 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200610072297. 8

CN 1632586 A, 2005. 06. 29, 说明书 2 - 5 页.

(22) 申请日 2006. 04. 18

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病学研究所

龙军, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素单克隆抗体制备与应用. 中国公共卫生 21
1. 2005, 21(1), 25-26 页.

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号

审查员 边昕

(72) 发明人 端青 姜永强 郑裕玲 檀华
朱虹 何君

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005068647 A2, 2005. 07. 28, 全文.

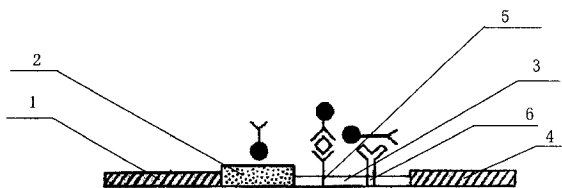
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素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 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸, 包括样品垫 1、紧密连接于所述样品垫一端的含有 B 型葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记胶体金探针的金标垫 2、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜 (NC 膜) 3 和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫 4; 所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线 5 和质控线 6, 所述检测线为 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体, 所述质控线为羊抗兔 IgG。本发明用于临床标本、污染物和环境中 B 型金黄的葡萄球菌肠毒素的检出, 也可用于制备 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的鉴定。



1. 一种检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸,包括样品垫 (1)、紧密连接于所述样品垫一端的含有 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记胶体金探针的金标垫 (2)、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜 (3) 和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫 (4);所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线 (5) 和质控线 (6),所述检测线为 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体,所述 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素抗体为兔抗体;所述质控线为羊抗兔 IgG。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸,其特征在于:所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成;所述吸水垫的下面还紧密连接有背板。

3. 一种制备检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸的方法,包括以下步骤:

1) 制备 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体,将 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体喷到纤维膜上,包被 NC 膜的一个区域,得到检测线;将抗兔 IgG 的抗抗体溶液喷到纤维膜上,包被 NC 膜的另一区域,得到质控线;37°C 干燥 2.5-4 小时,然后将其一端粘贴在吸水纸垫上;

2) 制备胶体金标探针,将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液,取 100ml 加热至沸,搅动下加入 1.6ml 的 1% 柠檬酸三钠水溶液,继续加热煮沸 10-15 分钟,冷却后用水恢复至原体积,用 K_2CO_3 调 pH 值为 9.2,按 36ug/ml 加入 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体,搅拌 20 分钟,然后加入 10% BSA 5ml,搅拌 20 分钟,加 1ml 10% PEG20000,搅拌 20 分钟,3200rpm 离心 15 分钟,吸出上清,10500rpm 离心 25 分钟,弃上清,沉淀用四硼酸钠保存液收集,得到胶体金标探针。

3) 制备含有 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记免疫胶体金探针溶液;取 5ml,加入 0.5g 蔗糖充分溶解,将玻璃纤维或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液,-20°C ~ -50°C 放置 8-12 小时,冻干机抽干即得到金标垫,将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的靠近所述检测线的一端;

4) 在步骤 2) 中的金标垫上面再贴样品垫,得到检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:所述 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体的浓度为 2.5mg/ml;抗兔 IgG 的浓度为 3mg/ml;所述吸水垫的下面还粘贴有背板;所述调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度为 0.2M。

5. 含有权利要求 1 或 2 所述的检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸的试剂盒。

一种检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的试纸及其制备方法,特别涉及一种检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸,还涉及其制备方法。

背景技术

[0002] 葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcal enterotoxin, SE) 是由金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 产生的蛋白质外毒素,可分为 A ~ I 多个血清型。其中以葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 产毒量最高 (高树德,汪美先,主编,防疫检验手册, p83-85, 1982, 人民卫生出版社)。由于 SEB 是重要的失能性毒素,因此作为经典的生物战剂被列入《国际禁止生物武器公约》核查清单。“9. 11 事件”以后,美国在其国家反恐预案中又将 SEB 与炭疽杆菌等烈性微生物一起,列为最有可能用于进行生物恐怖活动的生物战剂。

[0003] SEB 造成中毒的特点是潜伏期短,进入体内后 1 ~ 3 小时发病。主要症状为恶心、呕吐,也有腹痛和腹泻。一般一天左右痊愈,极少死亡。人感受剂量估计为 20 μ g,但也有 1 ~ 7 μ g 而发病者。对 2 ~ 3kg 小猴胃内半数呕吐量为 5 μ g,腹腔注射幼猫 SEB 致呕吐量为 0.5 μ g (高树德,汪美先,主编,防疫检验手册, p83-85, 1982, 人民卫生出版社)。

[0004] 各血清型葡萄球菌肠毒素间存在交叉抗原,这与各型葡萄球菌肠毒素基因间所编码的核苷酸序列有较高的同源性有关,如 SEB 基因核苷酸序列与 SEA 有 30% 的同源性,与 SEC 有 75% 的同源性。

[0005] 目前研究认为,SEB 为超抗原 (SAg),它们具有强大的刺激能力,可与抗原提呈细胞 (APC) 上的主要组织相容性复合物 II 类分子 (MHC II) 形成复合物,不经加工直接与 T 细胞抗原受体的 β 链 V 区 (TCRV β) 结合。由于 TCRV β 区基因核苷酸序列非常保守,同一个体内 T 细胞可具有相同的 V β 成分。因此,单一的 SAg 在极低浓度 (1 ~ 10 μ g/L) 即可激活大量 T 细胞 (数量可达全部 T 细胞的 5% ~ 10%,甚至 40%)。

[0006] 利用动物试验测定肠毒素是经典的方法 (高树德,汪美先,主编,防疫检验手册, p83-85, 1982, 人民卫生出版社;雷祚荣,编著,葡萄球菌毒素和葡萄球菌毒素病, p119-140, 1992, 中国科学技术出版社),但只有极少数动物对肠毒素敏感,如乳猫和猴。这些动物成本高,来源困难,试验操作繁琐,费时长。另外,猫呕吐试验是不特异的,其他非肠毒素类产物也致猫呕吐;猴试验测定肠毒素虽然是特异的,但葡萄球菌肠毒素食物中毒的多数食品含毒量往往低于 1 μ g/100g 食品,不能致试验猴产生感受而出现症状。因此,动物试验测定肠毒素一般仅用于科学研究,而不适用于毒素检测。

[0007] 免疫学方法 (雷祚荣,编著,葡萄球菌毒素和葡萄球菌毒素病, p119-140, 1992, 中国科学技术出版社)测定 SEB 主要有免疫双扩法 (DD)、反向间接血凝法 (RPHA)、反向乳胶凝集实验 (RPLA)、固相放射免疫技术 (SPRIA)、免疫印迹技术 (Immunoblotting) 以及酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等。

[0008] 最早用于定量检测肠毒素的是 DD 法,因其灵敏度较低、所需标本量大且操作繁

琐,未能推广。SPRIA 方法在灵敏度和特异性方面均有所提高,SPRIA 测定各种食品提取液的灵敏度为 5 ~ 10ng/g 食品。免疫印迹、RPHA 和 RPLA 方法灵敏度与 SPRIA 相当,但这些方法操作烦琐,难以推广使用。

[0009] ELISA 是目前较常用的免疫学方法,测定肠毒素的 ELISA 采用双抗体夹心法。该法以抗 SEB 多抗作为捕获抗体包被聚氯乙烯 96 孔板,与样品中的 SEB 结合,并通过 HRP 酶标记抗体显色,整个检测过程方便、快捷、且敏感性和特异性均较高,测定细菌培养物上清液灵敏度可达 0.5 ~ 2.5ng/ml,而且可以用于 SEB 的定量。但该法的缺陷仍然是耗时较长,需 4 小时左右,且步骤较为烦琐。

[0010] 几种常见免疫学方法检测 SEB 的比较见表 1。

[0011] 表 1 几种常见免疫学方法检测 SEB 的比较

[0012]

试验类型	灵敏度	局限性
双向琼脂扩散	μ g	不敏感
反向间接血凝	5 ~ 10ng/g 食品	不稳定
反向乳胶凝集	5 ~ 10ng/g 食品	容易有非特异反应
固相放射免疫	5 ~ 10ng/g 食品	有放射性
ELISA	0.5 ~ 2.5ng/ml	耗时长,步骤烦琐
免疫印迹	5 ~ 10ng/g 食品	耗时长,步骤烦琐

[0013] 近年来发展的测定 SEB 免疫学方法有光纤生物传感器和免疫胶体金技术。光纤生物传感器用于检测 SEB 灵敏度可达 ng/ml 的浓度,但目前光纤生物传感器离实用还有一段距离 (Slavik R, Homola J, Brynda E, A miniature fiber optic surface plasmon resonancesensor for fast detection of staphylococcal enterotoxin B, BiosensBioelectron, 2002, 17 :591-595)。

[0014] 免疫胶体金技术测定 SEB 的原理与 ELISA 相同,也是双抗体夹心法,即将抗 SEB 抗体包被在硝酸纤维素 (NC) 膜上用于捕捉 SEB,然后用抗 SEB 抗体标记的免疫胶体金探针进行检测,阳性标本经过 2-10 分钟左右的纸层析后,出现肉眼可见的沉淀线。胶体金方法已用于肉毒毒素的快速检测,具有很高的敏感度 (左庭婷,端青,姜永强等,A 型肉毒毒素胶体金免疫层析法检测试纸条的研制,军事医学科学院院刊,2003 年第 6 期)。

[0015] 免疫胶体金技术与其它方法比较,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,很适合突发事件现场和基层使用。美国军方以及几家试剂公司已经开始研制该检测试剂。

[0016] 目前尚未见到免疫层析试纸检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的报道。

发明内容

[0017] 本发明的目的是提供一种检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸 (Immuno-Chromatographic Assay, ICA)。

[0018] 本发明所提供的检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸,包括样品垫 1、

紧密连接于所述样品垫一端的含有 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记胶体金探针的金标垫 2、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜 (NC 膜) 3 和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫 4 ;所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线 5 和质控线 6,所述检测线为 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体,所述质控线为羊抗兔 IgG。

[0019] 为了使用更加方便,所述吸水垫的下面还紧密连接有背板。背板的材料可以是多种多样的,如塑料、树脂等。

[0020] 所述 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体优选为兔抗体,所述质控线优选为羊抗兔 IgG。

[0021] 本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸的方法。

[0022] 本发明所提供的制备上述检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸的方法,包括以下步骤:

[0023] 1) 制备 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体,将 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体喷到纤维膜上,包被 NC 膜的一个区域,得到检测线;将抗兔 IgG 的抗抗体溶液喷到纤维膜上,包被 NC 膜的另一区域,得到质控线;37℃干燥 2.5-4 小时,然后将其一端粘贴在吸水纸垫上。

[0024] 2) 制备含有 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记免疫胶体金探针溶液,取 5ml,加入 0.5g 蔗糖充分溶解,将玻璃纤维或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液,-20℃~ -50℃放置 8-12 小时,冻干机抽干即得到金标垫,将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的靠近所述检测线的一端。

[0025] 3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再贴样品垫,得到检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸。

[0026] 为了使用更加方便,所述吸水垫的下面还粘贴背板。

[0027] 本发明所提供的检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸及其制备方法中,所述 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记胶体金探针可由下述方法制备:

[0028] 1) 将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液,取 100ml 加热至沸,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,继续加热煮沸 10-15 分钟,直到液体颜色稳定成葡萄酒红色,得到胶体金溶液,冷却后用水恢复至原体积;

[0029] 2) 取 50ml 胶体金,加 0.2M K_2CO_3 或 0.1M HCl 0.5ml 调 pH 值为 9.2,按 $36 \mu\text{g/ml}$ 加入纯化的 SEB 抗体,搅拌 20 分钟,加 10% BSA 5ml,搅拌 20 分钟,加 1ml 10% PEG20000,搅拌 20 分钟,3200rpm 离心 15 分钟,吸出上清,10500rpm 离心 25 分钟,弃上清,沉淀用四硼酸钠洗涤一次后用 5ml 四硼酸钠保存液收集沉淀,得到胶体金标探针。

[0030] 所述调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度可为 0.15-0.25M,优选为 0.2M;所述调节 pH 值 HCl 的浓度可为 0.08-0.12M,优选为 0.1M。

[0031] 本发明的免疫层析试纸采用双抗体夹心法,将抗 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体包被在硝酸纤维素膜上,用于捕捉标本中的 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素抗原,然后用特异性抗体标记的免疫胶体金探针进行检测。

[0032] 本发明的试纸可用于临床标本、污染物和环境中 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的检出,也可用于制备 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的鉴定。本发明的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,很适合突发事件现场和基层使用。

附图说明

[0033] 图 1 为 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素免疫层析试纸的结构示意图。免疫层析试纸由吸水垫 4、硝酸纤维膜 3、金标垫 2 和玻璃纤维膜样品垫 1 四部分组成;硝酸纤维膜 3 上包被有检测线 5 和质控线 6。

[0034] 图 2 SEB 的 FPLC 纯化图谱,最高峰含 SEB。

[0035] 图 3 纯化的 SEB SDS-PAGE 分析。

[0036] 图 4 SEB 抗体 FPLC 纯化图谱,最高峰含 SEB 抗体。

具体实施方式

[0037] 主要材料:氯金酸(HAuCl_4) (购自 Sigma 公司,1g/瓶包装);硝酸纤维膜(NC膜)、样品垫和吸水滤纸(购自 Millipore 公司)。

[0038] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (FRI 243),为产 SEB 标准株,引自美国威斯康辛大学食品研究所,由军事医学科学院微生物流行病学研究所保存。

[0039] 福氏完全佐剂和不完全佐剂,为 Sigma 公司产品。

[0040] SP-Sepharose HP、rProteinA 抗体亲和层析预装柱,为 Amersham 公司产品。

[0041] 下述实施例中的实验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0042] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0043] 实施例 1、检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸的制备

[0044] 1、B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体的制备

[0045] 1) B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的制备

[0046] 采用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) FRI 243 进行产毒培养。SEB 菌株在营养肉汤中 37℃ 过夜活化,次日按 1% 接种量扩大培养,37℃ 培养 48 小时。4℃ 8000rpm 离心 15 分钟,收集上清。上清中含有 SEB,产毒量约为 100-200 $\mu\text{g/ml}$ 培养基。500ml 上清用 5mM PB pH7.0 缓冲液稀释 10 倍后加入 SP-Sepharose HP 柱(该柱预先平衡至 pH7.0),上样流速 5ml/min。穿透峰 UV2800mAU,用 5mM PB pH7.0 缓冲液平衡至 UV60mAU 开始用洗脱液(0.04M PBpH7.4-0.5mNaCl)洗脱,收集峰 UV1600mAU,收集 3ml/管,共收集 14 管,即为纯化的 SEB。图 2 为 SEB 色谱层析纯化图谱,最高峰为 SEB。纯化的 SEB 以 BCA 试剂盒(PIERCE 产品)定量,1mg/瓶分装,冷冻干燥保存。SDS-PAGE 检测纯化的 SEB 为一条带,为电泳纯(纯度 95%以上,见图 3),分子量 30kDa。Lane1~4 为纯化毒素,Lane5 为 Amersham 低分子量标准。

[0047] 2) B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体的制备

[0048] 选用体重 2kg 健康雌性新西兰家兔(购自中国人民解放军军事医学科学院动物中心),用生理盐水配制上述纯化 SEB,吸取所需用量与等量佐剂混合,首次免疫采用福氏完全佐剂,其他次数采用不完全佐剂。免疫方案见表 2。每周耳静脉采血,分离血清,双相琼脂扩散法测定 SEB 抗体效价,至效价 $\geq 1:32$,收集全血,分离血清。

[0049] 表 2 SEB 免疫方案

[0050]

注射次数	间隔 (周)	剂量 (mg/0.5ml)	注射途径
1		0.01	皮下
2	1	0.05	皮下
3	1	0.10	肌肉
4	1	0.50	肌肉
5	4	2.00	肌肉
6	4	5.70	肌肉
7	1 周后试血	10	肌肉

[0051] 用蛋白 A 柱亲和层析纯化抗 SEB 抗体。取抗 SEB 兔免疫血清 2ml, 用 5mM PB pH7.0 缓冲液稀释 100 倍后上样, 上样流速 3ml/min, 穿透峰 UV200mAU, 用 5mM PB pH7.0 缓冲液平衡至 UV10mAU 开始线性洗脱, 洗脱液为 0.1M 柠檬酸和柠檬酸钠 (pH3.0), 收集峰达 UV2800mAU, 分步收集 3ml/管 (每管加 10% 的 1.5M pH8.8 Tris 用于中和洗脱液), 共收集 2 管。最高峰为 SEB 抗体。图 4 为 SEB 抗体色谱层析纯化图谱, 最高峰为 SEB 抗体。BCA 法测定抗体蛋白为 2mg/ml。

[0052] 2、制备免疫胶体金探针

[0053] 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。冷却后用蒸馏水恢复至原体积, 制成颗粒直径为 25nm 的胶体金颗粒。

[0054] 2) 确定胶体金偶联抗体饱和浓度: 用 0.2 M K_2CO_3 或 0.1 M HCl 调节胶体金溶液 pH9.2, 准备 5 支洁净试管, 分别加入 1ml 胶体金溶液。将经纯化的抗 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体稀释为 1mg/ml, 分别向 4 支试管中加入 10 μl 、15 μl 、25 μl 、35 μl , 另一支为对照, 混匀后于室温下放置 5 分钟, 加入 10% NaCl 水溶液, 混匀, 静置 10-20 分钟后观察液体颜色。胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量, 即为稳定 1ml 胶体金所需抗体的最适浓度, 以此为基础增加 20% 抗体量, 即为胶体金偶联抗体饱和浓度。结果表明: 维持胶体金溶液颜色不变的抗体量为 30 μl , 即 30 $\mu\text{g/ml}$ 。选择偶联抗体浓度为 36 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0055] 3) 金标垫 2 的制备: 按上述方法配制含有浓度为 36 $\mu\text{g/ml}$ 的抗 SEB 特异性抗体的免疫胶体金探针溶液 50ml, 搅拌 20 分钟, 加 10% BSA 5ml, 搅拌 20 分钟, 加 1ml 10% PEG20000, 搅拌 20 分钟, 3200rpm 离心 15 分钟, 吸出上清, 10500rpm 离心 25 分钟, 弃上清, 沉淀用四硼酸钠洗涤一次后用四硼酸钠保存液收集沉淀 5ml。取金标探针 5ml 加入 0.5g 蔗糖, 充分溶解均匀加在玻璃纤维膜上, $-20^\circ\text{C} \sim -50^\circ\text{C}$ 放置 8-12 小时, 冻干机抽干, 得到金标垫 2。

[0056] 3、B 型金黄色葡萄球菌肠毒素快速检测试纸的制备

[0057] 如图 1 所示, 检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸由吸水垫 4、硝酸纤维素膜 3、金标垫 2 和玻璃纤维膜样品垫 1 四部分组成; 硝酸纤维素膜 3 上包被有检测线 5 和质控线 6。

[0058] 1) NC 膜 3 的包被:

[0059] 用 0.01M pH7.2 PB 缓冲液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, Na_2HPO_4 1.07g, 去离子水 1000ml) 稀释抗 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体, 浓度为 2.5mg/ml, 用于包被检测线。用 0.01M pH 7.2 的 PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, Na_2HPO_4 1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水 1000ml) 稀释羊抗兔 IgG, 浓度为 3mg/ml, 用于包被质控线。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 2.5mm 厚硝酸纤维素膜上, 形成相互分离的检测线 5 和质控线 6, 37°C 干燥 2.5-4h。

[0060] 2) B 型金黄色葡萄球菌肠毒素快速检测试纸的制备

[0061] 将吸水垫 4 用双面胶粘贴在包被的硝酸纤维素膜 3 的一端, 将包被的 NC 膜 3 用双面胶粘贴在步骤 2 中制备的金标垫 2 的一端; 在金标垫 2 上用双面胶粘贴玻璃纤维膜样品垫 1; 再最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上, 按所需大小切割, 即为检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

[0062] 4、检测 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试剂盒的制备

[0063] 为了方便使用, 将步骤 3 制备的 B 型金黄色葡萄球菌肠毒素快速检测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。

[0064] 5、B 型金黄色葡萄球菌肠毒素快速检测试纸的使用方法和原理

[0065] 测定时将试纸条样品垫 1 浸入液体标本中, 样品垫 1 即吸取液体向上端移动, 流经金标垫 2 时使干片上的免疫金复合物复溶, 并带动其向硝酸纤维素膜 3 渗移。若标本中有待测特异抗原, 其可与免疫金复合物的抗体结合, 此抗原抗体复合物流至检测线 5 即被固相抗体所获, 在膜上显出红色反应线条。过剩的免疫金复合物继续前行, 至质控线 6 与固相羊抗兔 IgG 结合, 而显出红色质控线条。反之, 阴性标本则无反应线条, 而仅显示质控线条。

[0066] 实施例 2、B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的检测及与其它相关毒素的交叉试验

[0067] 1、B 型金黄色葡萄球菌肠毒素的敏感性检测

[0068] 1) SEB (1mg/支) 由军事医学科学院微生物流行病学研究所制备, 经生理盐水有限稀释后作为样品检测液。

[0069] 2) 经实施例 1 制备的包被 SEB 特异性抗体和羊抗兔 IgG 的免疫层析试纸检测, 加入样品检测液 3 滴 (约 150 μ l), 2 分钟后开始观察结果, 15 分钟终止观察。检测不同浓度 SEB, 10ng/ml 以上均可检出 (见表 3), 与其它免疫学方法比较具有较高的敏感性。

[0070] 表 3 敏感性测定结果

[0071]

SEB 样品浓度	5ng/ml	10ng/ml	20ng/ml	40ng/ml	80ng/ml	160ng/ml
检测结果	-	+	+	+	+	+

[0072] 2、其他相关毒素的交叉试验

[0073] 1) 葡萄球菌 A 型肠毒素 (SEA, 1mg/支)、葡萄球菌 C 型肠毒素 (SEC, 1mg/支)、A 型肉毒毒素 (BONTA, 1 μ g/支) 和产气荚膜梭菌 α 毒素 (1 μ g/支), 均由军事医学科学院微生物流行病学研究所制备, 经生理盐水有限稀释后作为样品检测液。

[0074] 2) 经实施例 1 制备的包被 SEB 特异性抗体和羊抗兔 IgG 的免疫层析试纸检测, 将

SEA、SEC、BONTA 和 α 毒素稀释成不同浓度,分别加入样品检测液 3 滴 (约 150 μ l),2 分钟后开始观察结果,15 分钟终止观察。结果见表 4。

[0075] 表 4 特异性测定结果

[0076]

样品名称	SEA			SEC			BONTA			α 毒素		
浓度 (μ g/ml)	1	5	10	0.05	0.1	0.2	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
检测结果	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

[0077] 从表 4 可以看出,SEB 快速检测试剂与 100ng/ml 以上的葡萄球菌 C 型肠毒素发生交叉反应,与 10 μ g/ml 以下葡萄球菌 A 型肠毒素、1 μ g/ml 以下 A 型肉毒毒素和 1 μ g/ml 以下产气荚膜梭菌 α 毒素等毒素不发生交叉反应。

[0078] SEB 快速检测试剂与 100ng/ml 以上的葡萄球菌 C 型肠毒素发生交叉反应,与 SEB 和 SEC 有较高的同源性有关。

[0079] SEB 快速检测试剂与 μ g 水平的葡萄球菌 A 型肠毒素、A 型肉毒毒素和产气荚膜梭菌 α 毒素等毒素不发生交叉反应,显示了较好的特异性

[0080] 实施例 3、SEB 快速检测试剂对模拟环境标本中 SEB 的检出

[0081] 1、模拟标本的制备

[0082] 选用火腿肠、牛奶,人血清、普通肉汤培养基和土壤模拟环境现场标本,分别称取火腿肠 2g,剪碎置容器中,加入 5ml 无菌生理盐水,充分搅拌混匀,静置沉淀;牛奶用生理盐水 1 : 4 稀释;血清用生理盐水 1 : 10 稀释;普通肉汤用原液;土壤称取 1g,加入 5ml 无菌生理盐水,2000rpm 离心 10-15 分钟。

[0083] 每种样品一式多份,1 份取上清用作阴性对照,其他样品加入已知浓度 SEB 纯品,使样品分别含有 SEB 20ng/ml、40ng/ml、80ng/ml 和 1600ng/ml,作为模拟阳性检测标本。

[0084] 2、实验方法

[0085] 取 SEB 快速检测试剂,分别于试剂样品垫上加入上述检测样本 3 滴 (约 0.2ml),2 分钟后开始观察结果,15 分钟观察终止。结果判定:检测线和质控线处出现 2 条红色沉淀线为阳性,即有 SEB 检出;质控线处出现 1 条红色沉淀线为阴性,即无 SEB 检出。

[0086] 3、实验结果

[0087] 表 5 为 SEB 快速检测试剂检测模拟标本的结果。

[0088] 表 5 SEB 快速检测试剂 (胶体金法) 检测模拟标本

[0089]

样品	取样 (g)	生理盐水 (ml)	阴性 对照	A 型肉毒毒素 (ng/ml)				实际检出能力	
				10	20	40	80	(ng/g)	(ng/ml)
火腿肠	2	5	-	-	-	+	+	100	

样品	取样 (g)	生理盐水 (ml)	阴性 对照	A 型肉毒毒素 (ng/ml)				实际检出能力	
				10	20	40	80	(ng/g)	(ng/ml)
土壤	1	5	-	-	+	+	+	200	
牛奶		1 : 4	-	-	-	+	+		160
血清		1 : 10	-	-	-	+	+		400
普通肉汤	原液		-	-	+	+	+		20

[0090] 从表中可以看出,SEB 快速检测试剂(胶体金法)的特异性不受标本来源的影响,用做阴性对照的样品检测结果全部为阴性;SEB 快速检测试剂(胶体金法)检测不同样品的灵敏度,即检测不同样品中所含 SEB 的最低浓度(实际检出能力)为:火腿肠 100ng/g,土壤 200ng/g,牛奶 160ng/ml,血清 400ng/ml,普通肉汤 20ng/ml。

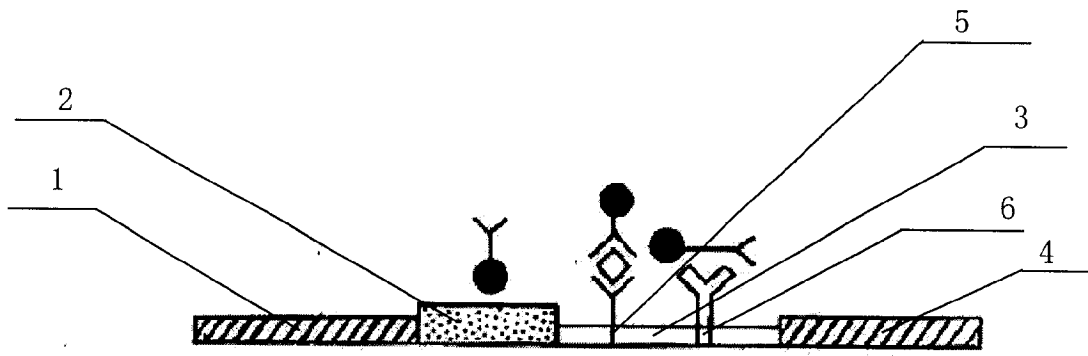


图 1

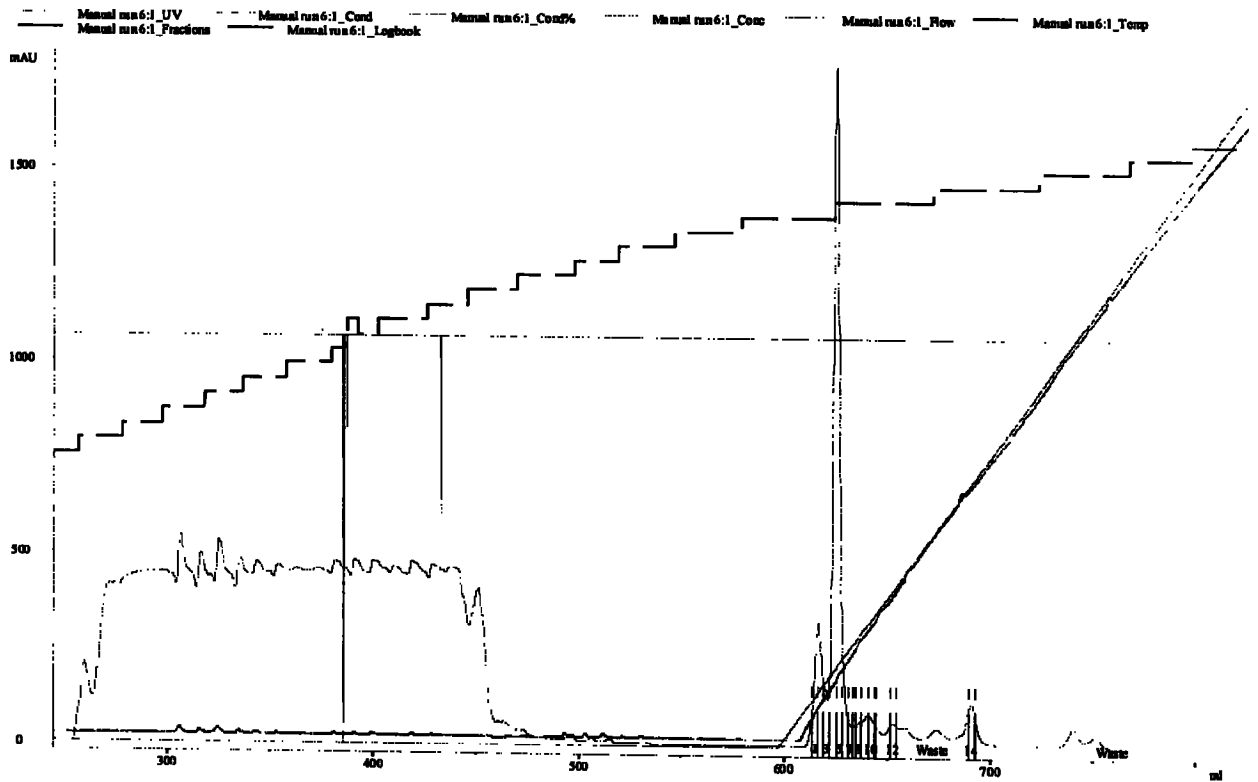


图 2



图 3

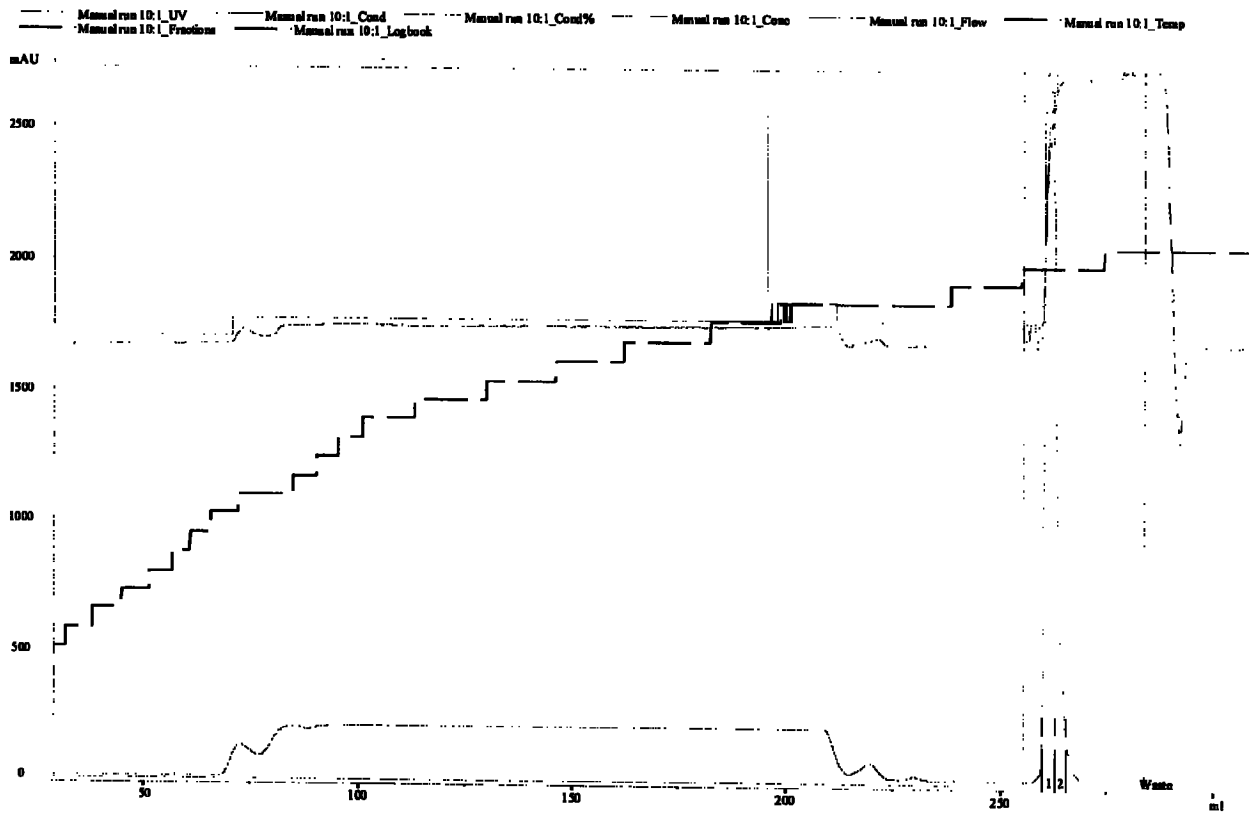


图 4

专利名称(译)	一种检测B型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN1880961B	公开(公告)日	2010-11-24
申请号	CN200610072297.8	申请日	2006-04-18
[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 姜永强 郑裕玲 檀华 朱虹 何君		
发明人	端青 姜永强 郑裕玲 檀华 朱虹 何君		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1880961A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测B型金黄色葡萄球菌肠毒素的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸，包括样品垫1、紧密连接于所述样品垫一端的含有B型葡萄球菌肠毒素特异性抗体标记胶体金探针的金标垫2、与上述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜(NC膜)3和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫4；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线5和质控线6，所述检测线为B型金黄色葡萄球菌肠毒素特异性抗体，所述质控线为羊抗兔IgG。本发明用于临床标本、污染物和环境中的B型金黄色葡萄球菌肠毒素的检出，也可用于制备B型金黄色葡萄球菌肠毒素的鉴定。

