

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101666799 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200910181759. 3

(22) 申请日 2009. 07. 23

(73) 专利权人 江苏省农业科学院
地址 210014 江苏省南京市钟灵街 50 号

(72) 发明人 王永山 刘洁 夏兴霞 何孔旺
张雪寒 费荣梅

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 张素卿

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/552 (2006. 01)

(56) 对比文件

孙洋等. 肠出血性大肠杆菌 0157 胶体金

免疫层析试纸条的研制. 《中国人兽共患病学报》. 2008, 第 24 卷 (第 4 期), 356-359.

王静等. 上转磷光免疫层析检测肠出血性大肠杆菌 0157. 《中国食品卫生杂志》. 2007, 第 19 卷 (第 1 期), 41-44.

审查员 张丽华

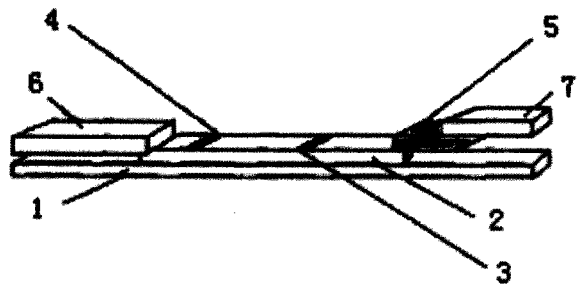
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

大肠杆菌 0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条

(57) 摘要

本发明涉及一种大肠杆菌 0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条,属于抗体检测试剂盒技术领域。由颗粒为 20nm 的胶体金溶液标记纯化的羊抗鼠 IgG 制成胶体金垫、分别用大肠杆菌 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG 包被的硝酸纤维素膜作为检测线和质控线、玻璃纤维素膜制成的样品吸收垫、吸水滤纸制成的吸收垫组装成的检测试纸条、阳性血清、阴性血清、血清样品稀释液和试纸条使用说明书组成。该试纸条使用简便、快速、敏感,10 分钟内即可获得检测结果,适用于在动物养殖场、食品生产企业等地区调查与追溯鼠 0157:H7 感染状况时的现场检测以及在开展食品安全环境风险评估时使用。



1. 一种大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条,是由颗粒为 20nm 的胶体金溶液标记纯化的羊抗鼠 IgG 制成胶体金垫、分别用 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG 包被的硝酸纤维素膜作为检测线和质控线、玻璃纤维素膜制成的样品吸收垫、吸水滤纸制成的吸收垫组装成的检测试纸条,其制备方法为:

1) 大肠杆菌 0157:H7 抗原的制备

培养大肠杆菌 0157:H7, 3500r/min 离心 30min, 用 PBS 重悬, 0.5% 甲醛灭活, PBS 洗 3 次, 沉淀重悬于 PBS, -20℃ 冻存储用;

2) 免疫胶体金的制备

取 20nm pH 值为 7.0 的颗粒胶体金溶液, 加入蛋白量为 27.5 μg/ml 的已纯化羊抗鼠 IgG, 在室温下搅拌 30min, 加质量体积比 10% 牛血清白蛋白 BSA 使其终浓度为质量体积比 0.4%, 室温搅拌 5min, 加质量体积比 10% PEG 使 PEG 终浓度为质量体积比 0.2%, 室温搅拌 5min; 12000r/min 离心 45min, 吸取离心上清, 沉淀溶于 2ml 保存液中, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 置 4℃ 保存备用, 制得胶体金标记抗体原液; 保存液配制方法: 0.1g 四硼酸钠、0.25g BSA、0.025g Na₂CO₃ 加水溶解后用 6N HCl 调 pH 至 7.4, 补水至 250ml, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 4℃ 保存;

3) 金标抗体玻璃纤维素膜的制备

取胶体金标记抗体原液 1ml, 加入工作液 2ml 稀释, 混匀, 均匀地加在玻璃纤维素膜上, 制成金标抗体玻璃纤维素膜, 即胶体金垫, 37℃ 干燥, 4℃ 保存备用; 工作液配制方法: 6.1g Na₂HPO₄·12H₂O、8.5g NaCl、5.0g PVP40、2.1g 硼酸、1.0g PEG4000、0.5g BSA 加水溶解后用 6N HCl 调 pH 至 7.4, 补水至 1000ml, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 4℃ 保存;

4) 固相硝酸纤维素膜 NC 的制备

用 0.01M pH7.2 的 PBS 分别稀释大肠杆菌 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG, 用蛋白浓度为 2.0mg/ml 大肠杆菌 0157:H7 抗原和蛋白浓度为 2.0mg/ml 纯化鼠血清 IgG 点样于 NC 膜上分别作为检测线和质控线, 室温干燥, 封闭, 层析试验背景清晰;

5) 试纸条的组装

在宽 2×长 9cm PVC 底板上 (1), 中间段粘贴宽 2×长 3cm 固相硝酸纤维素膜, 即 NC 膜 (2); 靠近固相纤维素膜检测线 T 线一端的 PVC 底板表面粘贴 2×2cm 的胶体金-羊抗鼠 IgG 抗体结合物玻璃纤维膜 (5), 此玻璃纤维素膜与 NC 膜 (2) 重叠 0.1cm, 另一端与 2×1cm 的样品吸收垫 (7) 重叠 0.2cm; 靠近固相纤维素膜质控线 C 线一端的 PVC 底板表面黏贴 2×3.5cm 的吸水滤纸制成的吸收垫 (6), 与 NC 膜重叠 0.1cm; 抗体固相硝酸纤维素膜 NC 膜 (2) 上划有一条大肠杆菌 0157:H7 抗原检测线 T 线 (3) 和一条鼠血清 IgG 质控线 C 线 (4);

T 线划在长 3cm×宽 2cm NC 膜一侧 1cm 的位置上, 将浓度为 2.0mg/mL 的大肠杆菌 0157:H7 抗原装入划膜机, 喷涂于 NC 膜上, 另一喷头划质控线 C 线, 浓度为 2.0mg/mL 的鼠血清 IgG, C 线划在 NC 膜另一侧 1cm 的位置上, 检测线与质控线的距离为 1cm, 点样量均为 5 μl 喷在硝酸纤维素膜上, 组装好的纸板按纵向剪切, 裁成宽度为 2.5mm 的条状, 即为抗体检测试纸条成品。

大肠杆菌 0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种大肠杆菌 0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条,属于抗体检测试剂盒技术领域。专用于鼠血清中大肠杆菌 0157:H7 抗体的快速检测,适用于动物养殖场、食品生产企业等地区调查与追溯鼠 0157:H7 感染状况时的现场检测以及在开展食品安全环境风险评估时使用。

二、背景技术

[0002] 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)0157:H7 是一种重要的人兽共患病原微生物,人感染 0157:H7 可患腹泻、出血性结肠炎 (HC)、溶血性尿毒综合征 (HUS) 及血栓性血小板减少紫癜 (TTP) 等严重并发症,严重者可导致死亡 (夏兴霞,刘洁,王永山,诸玉梅,欧阳伟,何孔旺,张雪寒. 动物源性人兽共患细菌病防控生物新制剂的研究:I. 分泌抗大肠杆菌 0157:H7 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立. 江苏农业学报,2009,25(2):291-295)。1982 年在美国首次发现,在此后的 20 多年中,由 0157:H7 所致的疾病在全世界范围内都有散发和暴发,1996 年曾在日本暴发流行。2001 年,在中国江苏、安徽等地也发生了多次食源性感染 0157:H7 事件,导致 177 人死亡,引起了全社会的广泛关注。0157:H7 的感染因具有暴发流行趋势、强烈的致病性与致死性以及抗生素治疗可能会加剧病情等特点,已成为全球性的公共卫生问题,世界卫生组织已将 0157:H7 列为新的食源性病原菌。

[0003] 食源性以及与带菌动物接触是人感染 0157:H7 的主要途径,反刍动物是 0157:H7 的主要宿主,阳性率 0.1%~16%,此外,从鹅、鸡、马、鹿、海鸥、绵羊、山羊、鸽子、鸭、兔、狗、猫的粪便中也可分离到 0157:H7。鼠与食品生产和人类生活关系密切,在疫病传播中起重要作用,对食品安全和人类健康威胁极大,但至今缺乏有关鼠感染 0157:H7 的状况及其流行病学意义的研究资料。

[0004] 本发明基于我国食品安全的严峻形势和对快速检测试剂盒的迫切需求,运用胶体金免疫层析技术,制备鼠血清 0157:H7 抗体胶体金免疫层析检测试纸条,为监测动物养殖场、食品生产企业等地区鼠 0157:H7 的感染状况提供简便快速的抗体检测方法,为开展 0157:H7 流行病学追溯、调查以及食品安全环境风险评估提供技术支撑。

三、发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明针对当前我国部分动物养殖场、食品生产企业等地区鼠较多的环境现状,研制一种简便、快速、并适合于现场使用的监测鼠大肠杆菌 0157:H7 抗体胶体金免疫层析检测试纸条,用于 0157:H7 流行病学调查、追溯以及食品安全环境风险评估。

[0007] 技术方案本发明的具体实施方案如下:

[0008] 一种大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条,由颗粒为 20nm 的胶体金溶液标记纯化的羊抗鼠 IgG 制成胶体金垫、分别用 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG 包被的硝酸纤维素膜作为检测线和质控线、玻璃纤维素

膜制成的样品吸收垫、吸水滤纸制成的吸收垫组装成的检测试纸条、阳性血清、阴性血清、血清样品稀释液和试纸条使用说明书组成。

[0009] 上述检测试纸条,其制备方法为:

[0010] 1) 大肠杆菌 0157:H7 抗原的制备

[0011] 培养大肠杆菌 0157:H7, 3500r/min 离心 30min, 用 PBS 重悬, 0.5% 甲醛灭活, PBS 洗 3 次, 沉淀重悬于 PBS, -20℃ 冻存备用;

[0012] 2) 免疫胶体金的制备

[0013] 取 20nm 颗粒胶体金溶液 (在波长 521nm 时的光吸收值为 1.847, $A_{521} = 1.847$) 20ml, 在磁力搅拌 (200r/min) 下缓慢加入已纯化的羊抗鼠 IgG, 在室温下搅拌 30min, 加质量体积比 10% 牛血清白蛋白 BSA 使其终浓度为质量体积比 0.4%, 室温搅拌 5min, 加质量体积比 10% PEG 使 PEG 终浓度为质量体积比 0.2%, 室温搅拌 5min; 12000r/min 离心 45min, 吸取离心上清, 沉淀溶于 2ml 保存液中, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 置 4℃ 保存备用, 制得胶体金标记抗体原液;

[0014] 3) 金标抗体玻璃纤维素膜的制备

[0015] 取胶体金标记抗体原液 1ml, 加入工作液 2ml 稀释, 混匀, 均匀地加在玻璃纤维素膜上, 制成金标抗体玻璃纤维素膜, 即胶体金垫, 37℃ 干燥, 4℃ 保存备用;

[0016] 4) 固相硝酸纤维素膜 NC 的制备

[0017] 用 0.01M pH7.2 的 PBS 分别稀释大肠杆菌 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG, 用蛋白浓度为 2.0mg/ml 大肠杆菌 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG 点样于 NC 膜上分别作为检测线和质控线, 室温干燥, 封闭, 层析试验背景清晰;

[0018] 5) 试纸条的组装

[0019] 在宽 2× 长 9cm PVC 底板上 (1), 中间段粘贴宽 2× 长 3cm 固相硝酸纤维素膜, 即 NC 膜 (2); 靠近固相纤维素膜检测线 T 线一端的 PVC 底板表面粘贴 2×2cm 的胶体金-羊抗鼠 IgG 抗体结合物玻璃纤维膜 (5), 此玻璃纤维素膜与 NC 膜 (2) 重叠 0.1cm, 另一端与 2×1cm 的样品吸收垫 (7) 重叠 0.2cm; 靠近固相纤维素膜质控线 C 线一端的 PVC 底板表面黏贴 2×3.5cm 的吸水纸 (6), 与 NC 膜重叠 0.1cm; 抗体固相硝酸纤维素膜 NC 膜 (2) 上划有一条大肠杆菌 0157:H7 抗原检测线 T 线 (3) 和一条鼠血清 IgG 质控线 C 线 (4)。

[0020] T 线划在长 3cm× 宽 2cm NC 膜一侧 1cm 的位置上, 将浓度为 2.0mg/mL 的大肠杆菌 0157:H7 抗原装入划膜机, 喷涂于 NC 膜上, 另一喷头划质控线 C 线, 浓度为 2.0mg/mL 的鼠血清 IgG, C 线划在 NC 膜另一侧 1cm 的位置上, 检测线与质控线的距离为 1cm, 点样量均为 5 μ l 喷在硝酸纤维素膜上, 组装好的纸板按纵向剪切, 裁成宽度为 2.5mm 的条状, 即为抗体检测试纸条成品。

[0021] 上述检测试纸条的用法, 其特征在于:

[0022] 在检测抗体时, 将待检鼠血清样本用含多联菌免疫血清的样品稀释液稀释 100 倍, 取 200 μ l 滴加于试纸条的反应区, 若在检测线处和质控线处均出现红色条带, 表明待检血清样本中含有大肠杆菌 0157:H7 抗体, 判为阳性; 若仅在质控线处出现红色条带, 表明待检样品中不含大肠杆菌 0157:H7 抗体, 则判为阴性; 若质控线不出现红色条带, 不论检测线是否出现红色条带, 均表示实验失败或试纸条失效。

[0023] 上述检测试纸条的用法中, 使用含体积比 2% 多联菌免疫血清的 0.01M pH7.2

的 PBS 溶液稀释受试鼠血清样本。

[0024] 有益效果本发明的特点和优点如下：

[0025] 大肠杆菌 0157:H7 是一种经食源传播和感染的病原菌，建立快速、敏感、特异的检测试剂是防控该病的重要措施之一。目前，国内外研制的检测试剂均以检测抗原或核酸为基础，尚缺乏抗体检测方法。

[0026] 本发明针对当前我国食品卫生安全的主要问题和对快速检测试剂盒的迫切需求，运用先进的胶体金免疫层析技术，建立了大肠杆菌 0157:H7 鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条，该试纸条使用简便、快速、特异、敏感、实用，10 分钟内即可获得结果，在 0157:H7 流行病学调查、追溯以及食品安全环境风险评估方面具有重要的应用价值。

四、附图说明

[0027] 图 1 胶体金免疫层析试纸条的结构

[0028] 1. PVC 底板；2. 硝酸纤维素膜 (NC 膜)；3. 检测线；4. 质控线；5. 胶体金垫；6. 吸收垫 (吸水滤纸)；7. 样品吸收垫 (玻璃纤维素膜)

[0029] 图 2 胶体金免疫层析试纸条结果判定标准

[0030] 图 3. 试纸条的检测结果

[0031] 1. 水；2. 阴性鼠血清；3. 阳性鼠血清

[0032] 图 4. 试纸条的敏感性检测结果

[0033] 1. 阴性对照；2-7. 分别为阳性鼠血清稀释度为 $1 : 1 \times 10^7 \sim 1 : 1 \times 10^2$

五、具体实施方式

[0034] 1 实验材料

[0035] 玻璃纤维素膜、硝酸纤维素 (NC) 膜和 20nm 颗粒胶体金溶液 (在波长 521nm 时的光吸收值为 1.847, $A_{521} = 1.847$) 购自上海捷宁生物科技有限公司；

[0036] 纯化的鼠血清 IgG 系用硫酸铵盐析和 DEAE 纤维素方法 (刘玉斌, 苟仕金主编. 动物免疫学实验技术. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989, 8-15) 从鼠血清中提取；

[0037] 纯化羊抗鼠 IgG 系用纯化的鼠血清 IgG 注射免疫山羊 4 次后, 制备免疫血清, 进一步用硫酸铵盐析和 DEAE 纤维素方法纯化；

[0038] 多联菌免疫兔血清系用肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K88、K99、0159、0141、TOP10、B121、BJ5183 和猪链球菌 (*Streptococcus suis*) SS-1 混合抗原 (所述菌株均购自南京天邦生物科技有限公司), 注射免疫 4 次后的兔血清；

[0039] 50 份 0157:H7 免疫鼠血清 (阳性血清) 系用 0157:H7 免疫 BALB/c 小鼠方法制备；20 份阴性血清采自清洁级小鼠。以上动物均购自扬州大学比较医学中心。

[0040] 2 大肠杆菌 0157:H7 抗原的制备

[0041] 大量培养大肠杆菌 0157:H7 500mL, 3500r/min 离心 30min, 用 PBS 重悬, 0.5% 甲醛灭活, PBS 洗 3 次, 沉淀重悬于 PBS, -20°C 冻存备用 (夏兴霞, 刘洁, 王永山, 诸玉梅, 欧阳伟, 何孔旺, 张雪寒. 动物源性人兽共患细菌病防控生物新制剂的研究: I. 分泌抗大肠杆菌 0157:H7 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立. 江苏农业学报, 2009, 25 (2) : 291-295)。

[0042] 3 免疫胶体金的制备

[0043] 3.1 胶体金标记的最佳 pH 测定

[0044] 取 1mg/mL 羊抗鼠 3 μ L, 分别加入 100 μ L pH 值为 7.0、8.0、9.0、10.0 的胶体金中, 混匀, 室温下放置 10 ~ 15min; 再分别加入 10% NaCl 溶液 20 μ L, 混匀, 静置 2h 后观察结果, 确定金标记最适 pH 值。当胶体金 pH 值为 7.0、8.0、9.0、10.0 时, 免疫胶体金溶液稳定, 颜色鲜艳, 胶体金标记蛋白时 pH 值为 7.0 (步骤 3.3 中用到的标记最适 PH)。

[0045] 3.2 最适标记蛋白浓度的测定

[0046] 取 10 支试管, 各加入 1.0ml 胶体金溶液。将羊抗鼠 IgG 用 0.01M PB pH7.2 分别稀释成 50 μ g/ml、45 μ g/ml、40 μ g/ml、35 μ g/ml、30 μ g/ml、25 μ g/ml、20 μ g/ml、15 μ g/ml、10 μ g/ml, 各取 1.0ml 按顺序加入上述胶体金溶液中。对照管加入 1ml 稀释液 (不含蛋白质), 混匀。放置 5min 后, 在上述每试管中加入 10% 氯化钠水溶液 0.1ml。混匀室温静置 1 ~ 2 小时, 观察结果。稳定胶体金的最小蛋白用量为 25 μ g/ml。在此基础上再增加 10% ~ 20% 即为待标记蛋白的实际用量, 本试验所用的蛋白量为 27.5 μ g/ml (步骤 3.3 用到的标记最适蛋白浓度)。

[0047] 3.3 胶体金的标记

[0048] 取 20nm 颗粒胶体金溶液 20ml, 在磁力搅拌下缓慢加入已纯化的羊抗鼠 IgG, 在室温下搅拌 30min。加 10% BSA 使其终浓度为 0.4%, 室温搅拌 5min。加 10% PEG 使其终浓度为 0.2%, 室温搅拌 5min。12000r/min 离心 45min, 小心吸取离心上清, 沉淀溶于 2ml 保存液中 (保存液配制方法: 0.1g 四硼酸钠、0.25g BSA、0.025g NaN_3 加水溶解后用 6N HCl 调 pH 至 7.4, 补水至 250ml, 用 0.45 μ m 滤膜过滤后, 4 $^{\circ}$ C 保存), 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0049] 4 大肠杆菌 0157:H7 抗体胶体金免疫层析试纸条的制备

[0050] 4.1 金标抗体玻璃纤维素膜的制备

[0051] 取金标抗体原液 1ml, 加入工作液 2ml 稀释 (工作液配制方法: 6.1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.5g NaCl、5.0g PVP40、2.1g 硼酸、1.0g PEG4000、0.5g BSA 加水溶解后用 6N HCl 调 pH 至 7.4, 补水至 1000ml, 用 0.45 μ m 滤膜过滤后, 4 $^{\circ}$ C 保存), 混匀, 均匀的加在玻璃纤维素膜上, 制成金标抗体玻璃纤维素膜 (胶体金垫), 37 $^{\circ}$ C 干燥, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0052] 4.2 固相硝酸纤维素膜 (NC) 的制备

[0053] 用 0.01M pH7.2 的 PBS 分别稀释大肠杆菌 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG, 以不同的蛋白浓度点样于 NC 膜上分别作为检测线和质控线, 在检测线的一端做好标记, 室温干燥。以 0157:H7 免疫鼠血清为检测样品进行层析试验, 观察显色情况, 优化点样蛋白浓度。用蛋白浓度为 2.0mg/ml 大肠杆菌 0157:H7 抗原和纯化的鼠血清 IgG 点样于 NC 膜上分别作为检测线和质控线, 室温干燥, 封闭, 层析试验背景清晰。

[0054] 4.3 试纸条的组装

[0055] 如图 1 所示, 在约宽 2 \times 长 9cm PVC 底板上 (1), 中间段粘贴宽 2 \times 长 3cm 固相硝酸纤维素膜 (NC 膜 2); 靠近固相纤维素膜检测线 (T 线) 一端的 PVC 底板表面粘贴 2 \times 2cm 的胶体金-羊抗鼠 IgG 抗体结合物玻璃纤维膜 (5), 此玻璃纤维素膜与 NC 膜 (2) 重叠 0.1cm, 另一端与 2 \times 1cm 的样品吸收垫 (7) 重叠 0.2cm; 靠近固相纤维素膜质控线 (C 线) 一端的 PVC 底板表面黏贴 2 \times 3.5cm 的吸水纸 (6), 与 NC 膜重叠 0.1cm; 抗体固相硝酸纤维素膜 (NC

膜 2) 上划有一条大肠杆菌 0157:H7 抗原检测线 T 线 (3) 和一条鼠血清 IgG 质控线 C 线 (4)。

[0056] T 线划在长 3cm× 宽 2cm NC 膜一侧 1cm 的位置上,将浓度为 2.0mg/mL 的大肠杆菌 0157:H7 抗原装入划膜机,喷涂于 NC 膜上,另一喷头划质控线 C 线,浓度为 2.0mg/mL 的鼠血清 IgG, C 线划在 NC 膜另一侧 1cm 的位置上,检测线与质控线的距离为 1cm,点样量均为 5 μ l 喷在硝酸纤维膜上。组装好的纸板按纵向剪切,裁成宽度为 2.5mm 的条状,即为抗体检测试纸条成品。

[0057] 4.4 试纸条的使用

[0058] 在抗体检测时,将待检鼠血清样本用含 2% 多联菌免疫兔血清的 0.01MPBS pH7.2 溶液进行 1 : 100 稀释,取 200 μ l 滴加于试纸条的反应区,若在检测线处和质控线处均出现红色条带,表明待检样品中含有大肠杆菌 0157:H7 抗体,判为阳性;若仅在质控线处出现红色条带,表明待检样品中不含大肠杆菌 0157:H7 抗体,则判为阴性;若质控线不出现红色条带,不论检测线是否出现红色条带,均表示实验失败或试纸条失效(图 2)。用组装成的试纸条分别检测 0157:H7 阳性鼠血清、阴性鼠血清和水三种检测样品,只有 0157:H7 阳性鼠血清样品在检测线处出现红色条带,结果清晰易辨(图 3)。

[0059] 5 胶体金免疫层析试纸条的特异性检测

[0060] 用试纸条检测大肠杆菌 0157:H7 免疫鼠血清样本,均为阳性;检测沙门氏菌、大肠杆菌 K88、K99、0159、0141、TOP10、BL21、BJ5183 和链球菌 SS-1 免疫的鼠血清、清洁级鼠血清以及纯净水,全部为阴性,表明本试纸条具有良好的特异性。

[0061] 6 胶体金免疫层析试纸条的敏感性检测

[0062] 将大肠杆菌 0157:H7 免疫鼠血清样本从 1 : 1×10^2 对数倍比稀释至 1 : 1×10^7 ,将每一稀释度取 200 μ l 分别点样于胶体金免疫试纸条的点样处,10min 后观察结果。同时用大肠杆菌 0157:H7 抗原包被的间接 ELISA 检测,比较两者的检测结果。用试纸条检测 1 : 1×10^2 ~ 1 : 1×10^6 稀释度的 0157:H7 免疫鼠血清,在检测线与质控线处均出现红色条带,表明抗体检测结果为阳性;而 1 : 1×10^7 稀释度的血清,仅在质控线处出现明显的红色条带,表明抗体检测结果为阴性,与阴性对照相同(图 4)。在 ELISA 平行对照检测实验中,阳性鼠血清的效价为 1×10^5 ,与胶体金免疫层析试纸条检测方法的敏感度相当。本试纸条操作简便、快速、10 分钟内可获得结果;而用 ELISA 检测,从加入待检血清到判定结果至少需 2 小时。

[0063] 7 胶体金免疫层析试纸条的稳定性检测

[0064] 将试纸条置于干燥器内,4℃ 密封干燥保存,每隔 30d 抽取一批,与新制备的试纸条平行检测阳性和阴性鼠血清样本,比较两者的检测结果。胶体金试纸条在 4℃ 干燥保存 6 个月后,与新制备的试纸条对比检测阳性和阴性鼠血清,特异性和敏感性均没有发现降低,说明本试纸条具有良好的稳定性。

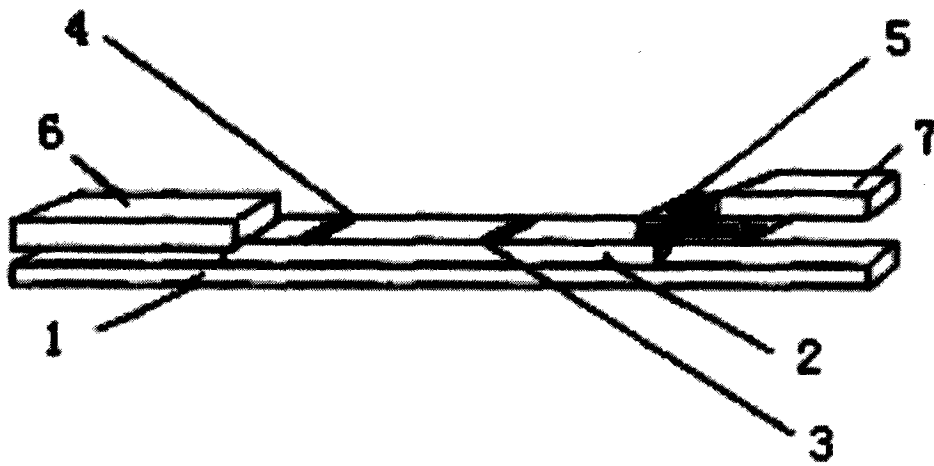


图 1

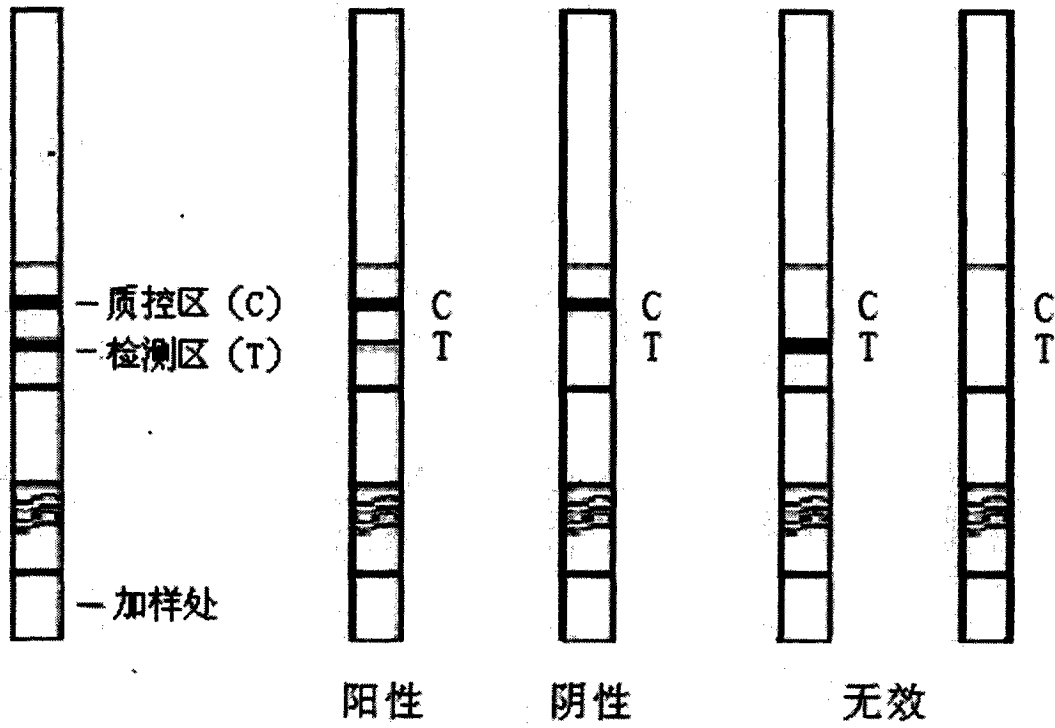


图 2

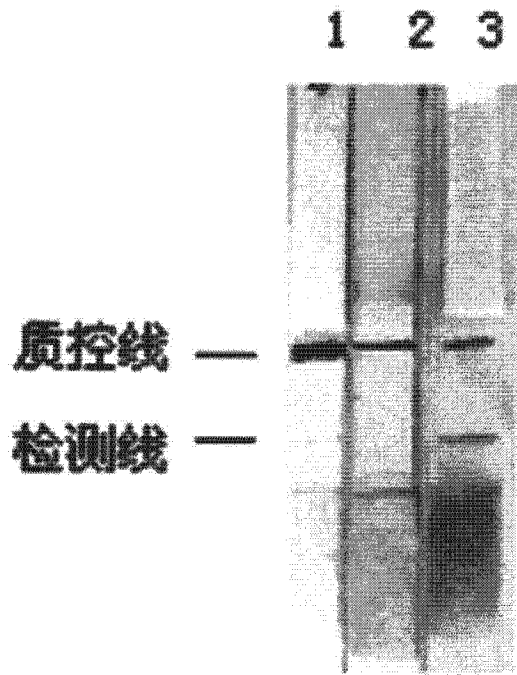


图 3

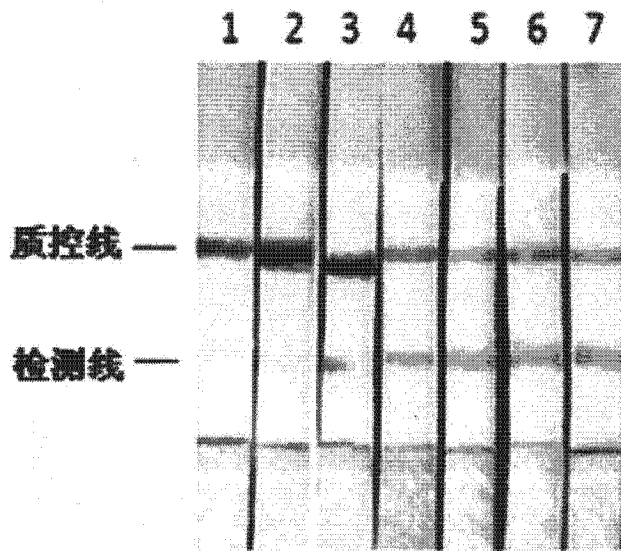


图 4

专利名称(译)	大肠杆菌O157:H7鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条		
公开(公告)号	CN101666799B	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN200910181759.3	申请日	2009-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	王永山 刘洁 夏兴霞 何孔旺 张雪寒 费荣梅		
发明人	王永山 刘洁 夏兴霞 何孔旺 张雪寒 费荣梅		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/552		
代理人(译)	张素卿		
审查员(译)	张丽华		
其他公开文献	CN101666799A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种大肠杆菌O157:H7鼠血清抗体胶体金免疫层析检测试纸条，属于抗体检测试剂盒技术领域。由颗粒为20nm的胶体金溶液标记纯化的羊抗鼠IgG制成胶体金垫、分别用大肠杆菌O157:H7抗原和纯化的鼠血清IgG包被的硝酸纤维素膜作为检测线和质控线、玻璃纤维素膜制成的样品吸收垫、吸水滤纸制成的吸收垫组装成的检测试纸条、阳性血清、阴性血清、血清样品稀释液和试纸条使用说明书组成。该试纸条使用简便、快速、敏感，10分钟内即可获得检测结果，适用于在动物养殖场、食品生产企业等地区调查与追溯鼠O157:H7感染状况时的现场检测以及在开展食品安全环境风险评估时使用。

