



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106290841 A

(43) 申请公布日 2017.01.04

---

(21) 申请号 201510242765.0

(22) 申请日 2015.05.13

(71) 申请人 上海凯创生物技术有限公司

地址 201317 上海市浦东新区下沙镇工业园  
区鹤立路

(72) 发明人 毛远丽 翟志青

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 郭婧婧 许亦琳

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

---

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及乳胶法免疫层析领域，具体公开了一种霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒，包括试剂条，所述试剂条包括衬底、滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸，所述滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上，所述致敏乳胶聚酯膜上包被有彩色乳胶颗粒标记的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I，免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 的检测线和包被了羊抗兔 IgG 的质控线。本发明的霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒反应灵敏，检测方便、检测结果稳定，节约成本。

1. 一种霍乱弧菌 01 乳胶法检测试剂盒, 包括试剂条, 所述试剂条包括衬底、滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸, 所述滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上, 其特征在于, 所述致敏乳胶聚酯膜上包被有彩色乳胶颗粒标记的抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I , 免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 II 的检测线和包被了羊抗兔 IgG 的质控线。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述彩色乳胶颗粒为粒径 290 ~ 300nm 的聚苯乙烯颗粒。

3. 权利要求 1-2 任一权利要求所述的霍乱弧菌 01 乳胶法检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤 :

1) 致敏乳胶颗粒的制备 : 用羧基化的聚苯乙烯标记抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I , 获得致敏乳胶颗粒 ;

2) 致敏乳胶聚酯膜的制备 : 用步骤 1) 获得的致敏乳胶颗粒包被聚酯膜, 获得致敏乳胶聚酯膜 ;

3) 将抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 II 和羊抗兔抗体分别喷在硝酸纤维素膜检测线和质控线的位置上, 烘干备用, 制得免疫硝酸纤维素膜 ;

4) 将滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在 PVC 片上, 切裁制得试剂条 ;

5) 将试剂条装入塑料盒, 获得霍乱弧菌 01 乳胶法检测试剂盒。

4. 如权利要求 3 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 致敏乳胶颗粒的制备为 :

a. 取一定体积的羧基化的聚苯乙烯, 用 2 ~ 3 倍体积 20mM pH 6.0 的碳酸缓冲溶液多次冲洗、离心、弃上清, 获得羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀 ;

b. 用 1 ~ 1.5 倍体积 20mM pH 6.0 的磷酸缓冲溶液悬浮上一步获得的羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀, 并加入 1 ~ 1.5 倍体积的水溶性炭化二亚胺, 室温下搅拌 20 ~ 30 分钟, 最后用 2 ~ 3 倍体积 0.01M pH 8.0 的硼酸缓冲溶液多次冲洗、离心、弃上清, 获得待标记物 ;

c. 向步骤 b 获得的所述待标记物中加入 2 ~ 3 倍体积 0.2M pH 7.0 的硼酸缓冲液制成乳胶悬液, 并向所述乳胶悬液中加入抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I ;

d. 充分反应过夜, 加入终止剂终止反应, 获得致敏乳胶颗粒。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 a 中碳酸缓冲溶液为 20mM pH 6.0 含 0.01% SDS 的碳酸缓冲溶液。

6. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 a 中羧基化的聚苯乙烯浓度为 6 ~ 12w/v %, 所述步骤 b 中水溶性炭化二亚胺的浓度为 9 ~ 10mg/ml。

7. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 c 乳胶悬液中羧基化的聚苯乙烯颗粒偶联抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I 的量为 : 0.5mg 抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I / 10mg 聚苯乙烯颗粒。

8. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 2) 中致敏乳胶聚酯膜的制备具体步骤为 :

A. 用乳胶缓冲液稀释致敏乳胶颗粒, 获得 0.3 ~ 0.5w/v % 的致敏乳胶溶液 ;

B. 用步骤 A 制备好的致敏乳胶溶液喷涂聚酯膜, 干燥, 制得致敏乳胶聚酯膜。

9. 如权利要求 8 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 A 中的乳胶缓冲液配方如下 :

9 ~ 11v% 1.0M Tris 液, 0.25 ~ 0.35w/v% 聚乙二醇 20000, 0.18 ~ 0.20w/v% 牛血清白蛋白, 0.15 ~ 0.25w/v% 脱脂牛奶, 0.28 ~ 0.30w/v% 酪蛋白, 和 0.04 ~ 0.06w/v% 叠氮化钠, 用盐酸调节 pH 至 8.0 ± 0.02, 余量为水。

10. 权利要求 1-2 任一权利要求所述的试剂盒在制备霍乱弧菌 O1 检测试剂中的应用。

## 霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术领域，具体涉及一种霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒及其制备与应用。

### 背景技术

[0002] 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 是霍乱的病原体，根据其 O 抗原的不同可分为 200 多个血清群，其中 O1 群是引起人类霍乱的主要血清群。霍乱是一种古老且流行广泛的烈性传染病之一。人类是霍乱弧菌的唯一易感者。霍乱弧菌进入消化道到达小肠，在肠粘膜表面吸附并迅速繁殖。产生的霍乱肠毒素作用于小肠粘膜，引起小肠液过度的分泌。曾在世界上引起多次大流行，主要表现为上吐下泻，导致脱水和代谢性酸中毒、循环衰竭，死亡率甚高。属于国际检疫传染病。

[0003] 霍乱是我国法定的甲类传染病，国家要求在接诊 24h 内报出检验结果。因此，及早鉴定出霍乱弧菌对控制该病的流行和治疗有极其重要的意义。目前霍乱弧菌的快速诊断方法如快速制动试验和免疫荧光菌球试验等效果不理想，主要因为患者粪便中的霍乱弧菌时常少，最少时检查结果呈阴性。

[0004] 乳胶层析法是以彩色乳胶为标记物的免疫层析法，其检测原理与胶体金免疫层析法相类似，它不需要仪器，直接用肉眼判读结果，具有操作简单、快速，试剂稳定性好，易保存，单人份独立包装，试剂损耗少等优点，适合临床患者、健康体检者等标本的快速筛查。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术缺陷，从提高检测灵敏度出发，提供一种检测灵敏度高、特异性强、检测快速的霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒。

[0006] 本发明的第一方面公开了一种霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒，包括试剂条，所述试剂条包括衬底、滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸，所述滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上，所述致敏乳胶聚酯膜上包被有彩色乳胶颗粒标记的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I，免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 的检测线和包被了羊抗兔 IgG 的质控线。

[0007] 较优的，所述彩色乳胶颗粒为粒径 290 ~ 300nm 的聚苯乙烯颗粒。

[0008] 较优的，所述彩色乳胶颗粒的颜色为红色。

[0009] 本发明致敏乳胶聚酯膜上标记有彩色乳胶颗粒的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I 和免疫硝酸纤维素膜检测线 (T 线) 包被的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 均为单克隆抗体。

[0010] 本发明的另一方面，提供了一种霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0011] 1) 致敏乳胶颗粒的制备：用羧基化的聚苯乙烯标记抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I，获得致敏乳胶颗粒；

[0012] 2) 致敏乳胶聚酯膜的制备 :用步骤 1) 获得的致敏乳胶颗粒包被聚酯膜,获得致敏乳胶聚酯膜;

[0013] 3) 将抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 II 和羊抗兔抗体分别喷在硝酸纤维素膜检测线 (T 线) 和质控线 (C 线) 的位置上,烘干备用,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0014] 4) 将滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在 PVC 片上,切裁制得试剂条;

[0015] 5) 将试剂条装入塑料盒,获得霍乱弧菌 01 乳胶法检测试剂盒。

[0016] 较优的,所述步骤 1) 致敏乳胶颗粒的制备为:

[0017] a. 取一定体积的羧基化的聚苯乙烯,用 2 ~ 3 倍体积 20mM pH 6.0 的碳酸缓冲溶液多次冲洗、离心、弃上清,获得羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀;

[0018] b. 用 1 ~ 1.5 倍体积 20mM pH 6.0 的磷酸缓冲溶液悬浮上一步获得的羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀,并加入 1 ~ 1.5 倍体积的水溶性炭化二亚胺,室温下搅拌 20 ~ 30 分钟,最后用 2 ~ 3 倍体积 0.01M pH 8.0 的硼酸缓冲溶液多次冲洗、离心、弃上清,获得待标记物;

[0019] c. 向步骤 b 获得的所述待标记物中加入 2 ~ 3 倍体积 0.2M pH 7.0 的硼酸缓冲液制成乳胶悬液,并向所述乳胶悬液中加入抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I;

[0020] d. 充分反应过夜,加入终止剂终止反应,获得致敏乳胶颗粒。

[0021] 在致敏乳胶颗粒的制备过程中,加入的水溶性炭化二亚胺、各缓冲溶液的体积均以初始所取的羧基化的聚苯乙烯的体积为基准,按本发明所述的体积倍数加入:如所取的羧基化的聚苯乙烯颗粒的体积为 1mI,则需要加入的 pH 6.0 20mM 的磷酸缓冲溶液体积可以为 1 ~ 1.5mI, pH 7.0 0.2M 的硼酸缓冲液的体积为 2 ~ 3mI。

[0022] 更优的,所述步骤 a 中碳酸缓冲溶液为 20mM pH 6.0 含 0.01% SDS 的碳酸缓冲溶液。添加有 SDS 的碳酸缓冲溶液可以更好的洗去乳胶的表面活性物,清洗效果更好。

[0023] 更优的,所述步骤 a 中羧基化的聚苯乙烯浓度为 6 ~ 12w/v%。

[0024] 更优的,所述步骤 a 中的离心条件为 12000 ~ 14000rpm, 离心 10min。

[0025] 更优的,所述步骤 b 中水溶性炭化二亚胺的浓度为 9 ~ 10mg/mI。

[0026] 更优的,所述步骤 b 中的离心条件为 12000 ~ 14000rpm, 离心 10min。

[0027] 更优的,所述步骤 c 乳胶悬液中羧基化的聚苯乙烯颗粒偶联抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I 的量为:0.5mg 抗霍乱弧菌 01 型单克隆抗体 I / 10mg 聚苯乙烯颗粒。

[0028] 更优的,所述步骤 d 中终止剂为 50mM pH 8.2 的 Tris-HCl。

[0029] 本发明中,v% 指体积百分比;w/v% 指重量体积百分比,如 1w/v% 即为 100mI 溶液中含 1g 物质。

[0030] 较优的,所述步骤 2) 中致敏乳胶聚酯膜的制备具体步骤为:

[0031] A. 用乳胶缓冲液稀释致敏乳胶颗粒,获得 0.3 ~ 0.5w/v% 的致敏乳胶溶液;

[0032] B. 用步骤 A 制备好的致敏乳胶溶液喷涂聚酯膜,干燥,制得致敏乳胶聚酯膜。

[0033] 更优的,所述步骤 A 中的乳胶缓冲液配方如下:9 ~ 11v% 1.0M Tris 液,0.25 ~ 0.35w/v% 聚乙二醇 20000,0.18 ~ 0.20w/v% 牛血清白蛋白,0.15 ~ 0.25w/v% 脱脂牛奶,0.28 ~ 0.30w/v% 酪蛋白,和 0.04 ~ 0.06w/v% 叠氮化钠,用盐酸调节 pH 至 8.0 ± 0.02,余量为水。

[0034] 最优的,所述步骤 A 中的乳胶缓冲液配方如下:10v% 1.0M Tris 液、0.3w/v% 聚乙

二醇 20000、0.2w/v% 牛血清白蛋白、0.2w/v% 脱脂牛奶、0.3w/v% 酪蛋白, 和 0.05w/v% 叠氮化钠, 用盐酸调节 pH 至 8.0 ± 0.02, 余量为水。

[0035] 进一步较优的, 为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和特异性, 本发明所述的乳胶缓冲液还包括下列组分: 果糖、氯化钾和甘氨酸, 且果糖、氯化钾和甘氨酸的总浓度为 3.25 ~ 4.75g/L, 缓冲液的 pH 值为 7.3 - 7.5。

[0036] 更优选的, 各组分在乳胶缓冲液中的浓度为:

[0037] 果糖 1.0~2.0g/L; 氯化钾 0.25~0.5g/L; 甘氨酸 2.0~2.25g/L。

[0038] 更优的, 步骤 B 中用致敏乳胶溶液喷涂聚酯膜, 每 261mm × 220mm 聚酯膜上喷涂 1.28mL 致敏乳胶溶液, 干燥, 制得致敏乳胶聚酯膜。

[0039] 较优的, 所述步骤 3) 中, 喷在硝酸纤维素膜质控线 (C 线) 上的羊抗兔 IgG 的浓度为 1.0 ~ 2.0mg/mL, 喷在硝酸纤维素膜检测线 (T 线) 上的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 浓度为 1.0 ~ 2.0mg/mL。较优的, 每 50mL 长硝酸纤维素膜分别包被有 6mL 的羊抗兔 IgG 和 6mL 的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 溶液, 检测线和质控线的间距为 4.0 ~ 6.0mm。

[0040] 本发明制备的霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒灵敏度高, 特异性强; 此外本发明的试剂盒还具有操作简单, 价格低, 储存和运输方便等优点。

[0041] 本发明霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒的使用方法:

[0042] 1. 样品的处理: 用专用取样棒随机从病人粪便的不同部位取样, 取样量以沾满专用取样棒前端的小圆环为准; 准备一个样品处理管, 竖直放于处理管支架上, 并在样品管里加入 0.6mL 蒸馏水; 将专用取样棒上取好的样品插入样品管中的蒸馏水充分搅拌均匀, 备用; 建议处理好的样品及时检测, 如不能立即检测处理好的样品可在 2 ~ 8°C 下储存 48 小时。

[0043] 2. 样品的检测: 用吸管吸取样品液 2~3 滴加入到样品槽中, 待检样品在毛细作用下向吸水纸端层析, 依次通过聚酯膜、硝酸纤维素膜。到达聚酯膜后, 被乳胶标记的单克隆抗体充分识别并结合, 继续层析到硝酸纤维素膜上, 与硝酸纤维素膜上包被的抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体单克隆 - II 发生免疫反应, 显现出相应的红色线条。

[0044] 3. 结果的判读: 在滴加样品后 8~15 分钟判读结果。

[0045] 阳性: 在检测试剂条的检测线和质控线位置各出现一条红色线条, 表示样品中有霍乱弧菌 O1 型抗原的存在。

[0046] 阴性: 只在质控线位置出现一条红色线条, 表示样品中无霍乱弧菌 O1 型抗原的存在。

[0047] 无效: 质控线位置无红线出现, 表示结果无效, 应重试。

[0048] 本发明的有益效果在于: 本发明的霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒灵敏度高, 特异性强; 此外本发明的试剂盒还具有操作简单, 价格低, 储存和运输方便等优点。

## 附图说明

[0049] 图 1: 霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒试剂条示意图 (1. 滤样纸 2. 致敏乳胶聚酯膜 3. 免疫硝酸纤维素膜 4. 吸水纸 5. 检测线 6. 质控线)

## 具体实施方式

[0050] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0051] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0052] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0053] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001 ;Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley& Sons, New York, 1987 and periodic updates ;the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego ;WoIffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998 ;METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P. M. Wasserman and A. P. WoIffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999 ;和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 等。

[0054] 实施例 1 霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒的制备

[0055] 一、试剂来源 :

[0056] 羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (购自美国美迪生物技术有限公司 MAXMED LABORATORIES INC.)

[0057] 硝酸纤维素薄膜、聚酯膜、聚苯乙烯颗粒 (购自德国赛多利斯公司 SARTORIUS)

[0058] 聚苯乙烯颗粒 (购自 WHATMAN 公司)

[0059] 二、制备步骤 :

[0060] 方法 1 :

[0061] 1. 致敏乳胶颗粒的制备 :

[0062] a. 取 0.4mL 10% 羧基化的聚苯乙烯乳胶放入离心管中,加入 1mL pH 6.0 含 0.01% SDS 20mM 的碳酸缓冲液冲洗两次,14000g/min 离心 10min,弃上清,获得羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀。

[0063] b. 用 0.5mL pH 6.0 20mM 的磷酸缓冲溶液悬浮上一步获得的羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀,并加入 0.5mL 10% 水溶性炭化二亚胺,室温下搅拌 30 分钟,最后用 0.8mL 0.01M

pH 8.0 的硼酸缓冲溶液冲洗三次、离心、弃上清，获得待标记物。

[0064] c. 向步骤 b 获得的待标记物中加入 1mI 0.2M pH 7.0 的硼酸缓冲液制成乳胶悬液，并向该乳胶悬液中加入 2mg 抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I。

[0065] d. 充分反应 12 小时后，加入 50mM pH8.2 的 Tris-HCl 作为终止剂终止反应，获得致敏乳胶颗粒。

[0066] 2. 致敏乳胶聚酯膜的制备：

[0067] (1) 乳胶缓冲液的制备：取 800mI 纯化水，往里加入 100mI 1.0M Tris 液，准确称取 3.0g 聚乙二醇 20000、2.0g 牛血清白蛋白，2.0g 脱脂牛奶，3.0g 酪蛋白溶液，0.5g 叠氮化钠，1.5g 果糖，0.4g 氯化钾，2.20g 甘氨酸，加入溶液中，充分溶解，混合均匀，用盐酸调节 pH 至 8.0，加纯化水至总体积 1000mI。

[0068] (2) 用上一步的乳胶缓冲液稀释致敏乳胶颗粒，获得 0.4w/v% 的致敏乳胶溶液。

[0069] (3) 取 1.28mI 致敏乳胶溶液用点乳胶机喷点在预处理后的聚酯膜上，置于 37℃ 的温度下烘干 2 小时，密封 4-30℃ 下避光保存，制得致敏乳胶聚酯膜。

[0070] 3. 免疫硝酸纤维素膜的制备：

[0071] 将 2.0mg/mI 羊抗兔抗体和 1.5mg/mI 抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 分别喷在硝酸纤维素膜质控线和检测线的位置上，37℃ 下烘干 2 小时，密封 4-30℃ 下避光保存，制得免疫硝酸纤维素膜。每 50m 长硝酸纤维素膜分别包被有 6mI 的羊抗兔 IgG 和抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 溶液，检测线和质控线的间距为 5mm。

[0072] 4. 将滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在 PVC 片上，裁制得试剂条；将试剂条装入塑料盒制得检测试剂盒，获得霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒。（如图 1 所示）。

[0073] 方法 2：

[0074] 1. 致敏乳胶颗粒的制备：

[0075] a. 取 1mI 6% 羧基化的聚苯乙烯乳胶放入离心管中，加入 2mI pH 6.0 含 0.01% SDS20mM 的碳酸缓冲液冲洗三次，12000g/min 离心 10min，弃上清，获得羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀。

[0076] b. 用 1.5mI pH 6.0 20mM 的磷酸缓冲溶液悬浮上一步获得的羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀，并加入 1.5mI 9% 水溶性炭化二亚胺，室温下搅拌 20 分钟，最后用 3mI 0.01M pH 8.0 的硼酸缓冲溶液冲洗三次、离心、弃上清，获得待标记物。

[0077] c. 向步骤 b 获得的待标记物中加入 2mI pH 7.0 0.2M 的硼酸缓冲液制成乳胶悬液，并向该乳胶悬液中加入 2.5mg 抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I。

[0078] d. 充分反应过夜后，加入终止剂终止反应，获得致敏乳胶颗粒。

[0079] 2. 致敏乳胶聚酯膜的制备：

[0080] (1) 乳胶缓冲液的制备：取 800mI 纯化水，往里加入 90mI 1.0M Tris 液，准确称取 3.5g 聚乙二醇 20000、1.8g 牛血清白蛋白，1.5g 脱脂牛奶，3.0g 酪蛋白溶液，0.6g 叠氮化钠，1.0g 果糖，0.25g 氯化钾，2.00g 甘氨酸，加入溶液中，充分溶解，混合均匀，用盐酸调节 pH 至 8.0，加纯化水至总体积 1000mI。

[0081] (2) 用上一步的乳胶缓冲液稀释致敏乳胶颗粒，获得 0.2w/v% 的致敏乳胶溶液。

[0082] (3) 取 1.28mI 致敏乳胶溶液用点乳胶机喷点在预处理后的聚酯膜上，置于 37℃ 的

温度下烘干 2 小时,密封 4-30℃下避光保存,制得致敏乳胶聚酯膜。

[0083] 3. 免疫硝酸纤维素膜的制备 :

[0084] 将 1.5mg/ml 羊抗兔抗体和 2.0mg/ml 抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 分别喷在硝酸纤维素膜质控线和检测线的位置上,37℃下烘干 2 小时,密封 4-30℃下避光保存,制得免疫硝酸纤维素膜。每 50m 长硝酸纤维素膜分别包被有 6ml 的羊抗兔 IgG 和抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 溶液,检测线和质控线的间距为 5mm。

[0085] 4. 同方法 1。

[0086] 方法 3 :

[0087] 1. 致敏乳胶颗粒的制备 :

[0088] a. 取 0.5ml 12% 羧基化的聚苯乙烯乳胶放入离心管中,加入 1.5ml pH 6.0 含 0.01% SDS20mM 的碳酸缓冲液冲洗两次,13000g/min 离心 10min, 弃上清, 获得羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀。

[0089] b. 用 0.5ml pH 6.0 20mM 的磷酸缓冲溶液悬浮上一步获得的羧基化的聚苯乙烯颗粒沉淀, 并加入 0.5ml 10% 水溶性炭化二亚胺, 室温下搅拌 25 分钟, 最后用 1.5ml 0.01M pH8.0 的硼酸缓冲溶液冲洗两次、离心、弃上清, 获得待标记物。

[0090] c. 向步骤 b 获得的待标记物中加入 1.5ml pH 7.0 0.2M 的硼酸缓冲液制成乳胶悬液, 并向该乳胶悬液中加入 3.75mg 抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 I 。

[0091] d. 充分反应过夜后, 加入终止剂终止反应, 获得致敏乳胶颗粒。

[0092] 2. 致敏乳胶聚酯膜的制备 :

[0093] (1) 乳胶缓冲液的制备 : 取 800ml 纯化水, 往里加入 110ml 1.0M Tris 液, 准确称取 2.5g 聚乙二醇 20000、1.9g 牛血清白蛋白, 2.5g 脱脂牛奶, 2.8g 酪蛋白溶液和 0.4g 叠氮化钠 2.0g 果糖, 0.5g 氯化钾, 2.25g 甘氨酸加入溶液中, 充分溶解, 混合均匀, 用盐酸调节 pH 至 8.0, 加纯化水至总体积 1000ml 。

[0094] (2) 用上一步的乳胶缓冲液稀释致敏乳胶颗粒, 获得 0.6w/v % 的致敏乳胶溶液。

[0095] (3) 取 1.28ml 致敏乳胶溶液用点乳胶机喷点在预处理后的聚酯膜上, 置于 37℃ 的温度下烘干 2 小时, 密封 4-30℃ 下避光保存, 制得致敏乳胶聚酯膜。

[0096] 3. 免疫硝酸纤维素膜的制备 :

[0097] 将 1.0mg/ml 羊抗兔抗体和 1.0mg/ml 抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 分别喷在硝酸纤维素膜质控线和检测线的位置上,37℃下烘干 2 小时,密封 4-30℃下避光保存,制得免疫硝酸纤维素膜。每 50m 长硝酸纤维素膜分别包被有 6ml 的羊抗兔 IgG 和抗霍乱弧菌 O1 型单克隆抗体 II 溶液,检测线和质控线的间距为 4mm。

[0098] 4. 同方法 1。

[0099] 实施例 2 对比试剂盒的制备

[0100] 对比试剂盒的制备方法 : 乳胶缓冲液中不含果糖、氯化钾和甘氨酸, 其他试剂及实验方法均同实施例 1 中方法 1 ~ 3。

[0101] 实施例 3 霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒的特异性实验

[0102] 检测方法 :

[0103] 1. 取实施例 1 制备的霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒和实施例 2 的对比试剂盒, 将试剂盒放置在水平台面上。

[0104] 2. 待测样品的制备 :按表 1 的四类实验对象,用专用取样棒随机从检测者粪便的不同部位取样,取样量以沾满专用取样棒前端的小圆环为准 ;准备一个样品处理管,竖直放于处理管支架上,并在样品管里加入 0.6mI 蒸馏水 ;将专用取样棒上取好的样品插入样品管中的蒸馏水充分搅拌均匀作为待测样品。

[0105] 3. 每类实验对象为 100 人,检测结果如表 1 :

[0106] 表 1 霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒特异性试验结果

[0107]

| 检验对象         | 实施例 1 试剂盒检测结果 |        |
|--------------|---------------|--------|
|              | 阳性 (例)        | 阴性 (例) |
| 正常人          | 0             | 100    |
| 感染大肠杆菌患者     | 0             | 100    |
| 感染痢疾杆菌患者     | 0             | 100    |
| 感染霍乱弧菌 O1 患者 | 100           | 0      |

| 检验对象         | 对比试剂盒检测结果 |        |
|--------------|-----------|--------|
|              | 阳性 (例)    | 阴性 (例) |
| 正常人          | 3         | 97     |
| 感染大肠杆菌患者     | 8         | 92     |
| 感染痢疾杆菌患者     | 6         | 94     |
| 感染霍乱弧菌 O1 患者 | 97        | 3      |

[0108] 由上表可知,本发明的霍乱弧菌 O1 乳胶法检测试剂盒对大肠杆菌及痢疾杆菌均无交叉反应,特异性良好。

[0109] 以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案,并不能理解为对本发明的限制。此外,本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化,在不脱离本发明的范围和精神的前提下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述,但应当理解,本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上,各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

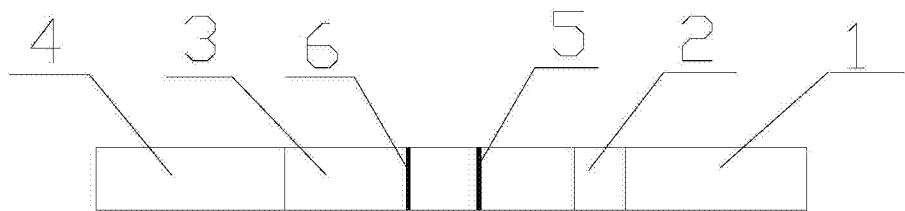


图 1

|                |   |                      |            |
|----------------|---|----------------------|------------|
| 专利名称(译)        | 霍乱弧菌O1乳胶法检测试剂盒  |                      |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN106290841A</a>                              | 公开(公告)日              | 2017-01-04 |
| 申请号            | CN201510242765.0  | 申请日                  | 2015-05-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上海凯创生物技术有限公司  |                      |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 上海凯创生物技术有限公司  |                      |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 上海凯创生物技术有限公司  |                      |            |
| [标]发明人         | 毛远丽<br>翟志青  |                      |            |
| 发明人            | 毛远丽<br>翟志青  |                      |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/532 G01N33/558                          |                      |            |
| CPC分类号         | Y02A50/52 G01N33/56911 G01N33/532 G01N33/558 G01N2333/183 |                      |            |
| 代理人(译)         | 郭婧婧   |                      |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                 | <a href="#">Sipo</a> |            |

**摘要(译)**

本发明涉及乳胶法免疫层析领域，具体公开了一种霍乱弧菌O1乳胶法检测试剂盒，包括试剂条，所述试剂条包括衬底、滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸，所述滤样纸、致敏乳胶聚酯膜、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于所述衬底上，所述致敏乳胶聚酯膜上包被有彩色乳胶颗粒标记的抗霍乱弧菌O1型单克隆抗体I，免疫硝酸纤维素膜上设有包被了抗霍乱弧菌O1型单克隆抗体II的检测线和包被了羊抗兔IgG的质控线。本发明的霍乱弧菌O1乳胶法检测试剂盒反应灵敏，检测方便、检测结果稳定，节约成本。

| 检验对象         | 实施例1 试剂盒检测结果 |       |
|--------------|--------------|-------|
|              | 阳性(例)        | 阴性(例) |
| 正常人          | 0            | 100   |
| 感染大肠杆菌患者     | 0            | 100   |
| 感染痢疾杆菌患者     | 0            | 100   |
| 感染霍乱弧菌 O1 患者 | 100          | 0     |

| 检验对象         | 对比试剂盒检测结果 |       |
|--------------|-----------|-------|
|              | 阳性(例)     | 阴性(例) |
| 正常人          | 3         | 97    |
| 感染大肠杆菌患者     | 8         | 92    |
| 感染痢疾杆菌患者     | 6         | 94    |
| 感染霍乱弧菌 O1 患者 | 97        | 3     |