



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102411053 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 11

(21) 申请号 201110229465. 0

(22) 申请日 2011. 08. 11

(71) 申请人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市江干区石桥路  
198 号

(72) 发明人 周育 张巧艳 徐俊锋 王强

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务有限公  
司 33201

代理人 黄美娟 王兵

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌  
共检测试条

(57) 摘要

本发明公开了一种大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条,所述测试条为镶嵌在支撑板内的免疫胶体金测试条,所述的免疫胶体金测试条由胶体金垫和硝酸纤维素膜和吸水材料连接而成,所述的胶体金垫一端连接有下端吸水材料,所述的硝酸纤维素膜一端连接有上端吸水材料,所述的胶体金垫是将大肠杆菌 0157 抗体和单核细胞增生李斯特氏菌抗体分别用胶体金标记制成的胶体金垫,所述的硝酸纤维素膜有大肠杆菌 0157 检测条带 (A 区)、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带 (B 区) 及抗鼠 IgG 抗体对照条带 (C 区);本发明试剂条的操作简单方便、省时省力、节约成本,不需特殊仪器设备。

1. 大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条, 所述测试条为镶嵌在支撑板内的免疫胶体金试条, 其特征在于: 所述的免疫胶体金测试条由胶体金垫和硝酸纤维素膜、吸水材料连接而成, 所述的胶体金垫与硝酸纤维素膜连接, 所述的胶体金垫一端连接有下端吸水材料, 所述的硝酸纤维素膜一端连接有上端吸水材料, 所述的胶体金垫是将大肠杆菌 0157 抗体和单核细胞增生李斯特氏菌抗体分别用胶体金标记, 以玻璃纤维膜作为载体, 以 BIODOT 平台上的 BIRJET 气压喷头喷到玻璃纤维膜上制成的胶体金垫, 所述的硝酸纤维素膜上分段包被有大肠杆菌 0157 抗体、单核细胞增生李斯特氏菌抗体和抗鼠 IgG 抗体, 并分别形成大肠杆菌 0157 检测条带、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带及抗鼠 IgG 抗体对照条带。

2. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条, 其特征在于所述的免疫胶体金测试条上方还覆盖有一开有视窗和加样口的盖板, 所述视窗和加样口与镶嵌在支撑板内的测试条配合。

3. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条, 其特征在于所述的下端吸水材料与胶体金垫上覆盖有保护膜, 所述的保护膜在对应加样口位置设有与加样口配合的通道。

4. 如权利要求 3 所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条, 其特征在于所述的保护膜为聚乙烯保鲜膜、聚氯乙烯保鲜膜或聚偏二氯乙烯保鲜膜。

5. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条, 其特征在于所述的硝酸纤维素膜上检测条带和对照条带按如下方法制备: 分别将大肠杆菌 0157 抗体、单核细胞增生李斯特氏菌抗体和抗鼠 IgG 抗体以 BIODOT 平台上的 BIRJET 气压喷头喷到硝酸纤维素膜对应的条带上, 冷冻干燥制成。

6. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条, 其特征在于所述的胶体金制备方法为: 将质量浓度 0.5 ~ 1.5% 四氯化金溶液与质量浓度 0.5 ~ 1.5% 柠檬酸钠溶液和双蒸水混合, 滴加适量单宁酸和 25mmol/L 碳酸钾溶液, 将四氯化金还原成为 15-20nm 直径的胶体金颗粒, 所述四氯化金溶液与柠檬酸钠溶液和双蒸水的体积比为 1 : 3 ~ 5 : 70 ~ 88。

7. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条的应用, 其特征在于: 所述的测试条在加入待测样品增菌液后, 若所述的测试条抗鼠 IgG 抗体对照条带位置出现肉眼可见的红色, 则说明试条有效, 抗鼠 IgG 抗体对照条带位置如无肉眼可见的红色条带, 则说明试条失效; 若所述的测试条上大肠杆菌 0157 检测条带、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带出现肉眼可见红色条带, 说明待样品增菌液中含大肠杆菌 0157 和 / 或单核细胞增生李斯特氏菌抗原; 若上大肠杆菌 0157 检测条带、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带位置未出现肉眼可见红色条带, 说明待样品增菌液中不含大肠杆菌 0157 和 / 或单核细胞增生李斯特氏菌抗原。

## 大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条

### （一）技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫胶体金快速检测微生物试条,特别涉及大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌同步检测试条及快速检测大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌的技术。

### （二）背景技术

[0002] 在食源性疾病中细菌性食物中毒发生率占首位,据统计我国每年发生的细菌性食物中毒事件占食物中毒事件总数的 30%~90%,人数占食物中毒总人数的 60%~90%,细菌性食物中毒严重危害着人们的身体健康。

[0003] 大肠杆菌 0157 (*Escherichia coli* 0157) 和单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 是两类引起人类食物中毒重要的致病菌。大肠杆菌 0157 是肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 的一种主要血清型,可引起出血性结肠炎,感染病人的典型症状为血便、腹痛、低热或不发热,约有 10% 的病人发展为溶血性尿毒综合症,并可对被感染病人的肠道、肝、脾、肾、淋巴、脑、呼吸系统和神经系统造成损伤,平均死亡率为 2%~7%。老人和儿童为高危人群,一旦感染,死亡率高达 30% 以上。世界卫生组织把大肠杆菌 0157 出血性肠炎列为新发传染病。单核细胞增生李斯特氏菌是一种能引起人畜共患病的致病菌,在 4℃ 的环境中仍可生长繁殖,可通过眼睛及破损的皮肤、粘膜进入体内而造成感染,可使人 and 动物患脑膜炎、败血症、及造成怀孕妇女流产、死胎等疾病,死亡率高达 30%~70%。国内外对单核细胞增生李斯特氏菌给以高度重视,WHO 将其列为 90 年代食品中四大高危性致病菌之一。大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌主要是通过污染水产品、乳制品 (生奶和软奶酪)、畜禽产品、生熟肉制品、蔬菜等,引起食源性疾病的爆发。

[0004] 从各类食品中快速、准确地检测大肠杆菌 0157 和 / 或单核细胞增生李斯特氏菌,可预防和控制这两类致病菌感染疫情的发生及蔓延。目前,对大肠杆菌 0157 和单核增生李斯特氏菌的检测主要利用微生物培养和生化鉴定的方法以及分子生物学方法。细菌培养诊断技术需要较长时间,一般需要 24 小时以上,甚至几天,不利于及时确诊。另外,无论是培养诊断技术还是 PCR 检测技术,都需要一定的仪器设备和专业的检测技术人员才能顺利进行。近年来,由于胶体金免疫层析技术敏感性高、特异性强、检测方便快捷,且具有操作安全 (无放免检测技术产生放射性污染)、适于单人份检测 (放免技术和酶标试剂盒不适于单人份或少量样品的检测) 等优点,已被逐渐应用于设计各类病原微生物诊断试剂盒。虽然国内外市场上已有大肠杆菌 0157 快速检测相关产品,但是大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌在食品及医药卫生行业中,有着相似的污染途径和污染特点,常常在食品加工过程和医疗卫样品中同时污染,通过大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌同步检测技术的应用,可有效的提高两类食源性致病菌的检测效率,并降低检测成本。

### （三）发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种简便、快捷的能够同步检测食品或医疗卫生样品中大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌测试条及快速检测大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌的检测技术,该试条简便、快捷,能同步检测食品或医疗卫生样品中大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌。

[0006] 本发明的目的之二是提供一对针对大肠杆菌 0157 的不同抗原位点的特异性抗体和一对针对单核细胞增生李斯特氏菌的不同抗原位点的特异性抗体,两种菌每对抗体中的一个抗体被标记胶体金。

[0007] 本发明的目的之三是提供一种适合于同时标记大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌特异性抗体的胶体金制备方法。

[0008] 为实现本发明目的,本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条,所述测试条为镶嵌在支撑板内的免疫胶体金测试条,所述的免疫胶体金测试条由胶体金垫和硝酸纤维素膜、吸水材料连接而成,所述胶体金垫和硝酸纤维素膜连接,所述的胶体金垫一端连接有下端吸水材料,所述的硝酸纤维素膜一端连接有上端吸水材料,所述的胶体金垫是将大肠杆菌 0157 抗体和单核细胞增生李斯特氏菌抗体分别用胶体金标记,以玻璃纤维膜作为载体,以 BIODOT 平台上的 BIRJET 气压喷头喷到玻璃纤维膜上制成的胶体金垫,所述的硝酸纤维素膜上分段包被有大肠杆菌 0157 抗体、单核细胞增生李斯特氏菌抗体和抗鼠 IgG 抗体,并分别形成大肠杆菌 0157 检测条带(A区)、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带(B区)及抗鼠 IgG 抗体对照条带(C区)。

[0010] 所述的免疫胶体金测试条上方还覆盖有一开有视窗和加样口的盖板,所述的视窗和加样口与镶嵌在支撑板内的测试条配合,所述视窗优选长方形。

[0011] 所述的下端吸水材料与胶体金垫上覆盖有保护膜,所述的保护膜在对应加样口位置设有与加样口配合的通口。

[0012] 本发明的胶体金垫是用免疫胶体金标记技术制得,主要是利用了胶体金颗粒具有高电子密度的特性,在金标蛋白结合处,显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点,可用于定性或半定量的快速免疫检测方法中。

[0013] 在同一硝酸纤维素膜上分为三个区段,A区是包被有大肠杆菌 0157 抗体的检测条带,B区是包被有单核细胞增生李斯特氏菌抗体的检测条带,C区包被有已知阳性复合物的对照条带。当样品增菌液进入加样口中,增菌液可通过在纤维素膜的层析作用,逐渐向前延伸。当样品增菌液延伸到A区时,如样品中存在大肠杆菌 0157,则被包被在A区的抗体捕获,形成夹心复合物并呈现红色反应条带,即可判为大肠杆菌 0157 阳性反应;当样品增菌液延伸到B区时,如样品中存在单核细胞增生李斯特氏菌,则被包被在B区的抗体捕获,形成夹心复合物并呈现红色反应条带,即可判为单核细胞增生李斯特氏菌阳性反应;当多余的检测液继续层析到对照C区时,样品增菌液中不论是否含有这两种致病菌,由于受潮即起反应,会出现一条红色条带,如C区无红色条带,表明该测试条已失效。

[0014] 主要原理是:一种免疫胶体金标记技术,将待测目的大肠杆菌 0157 抗体、单核细胞增生李斯特氏菌抗体标记胶体金,然后以此标记了的抗体结合待测样本中的目的抗原(两种致病菌),最终被固定在硝酸纤维素膜上(检测区)相应的另一个抗体捕获,形成肉眼

可见的检测带,说明样本中存在目的细菌。

[0015] 本发明所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条下端吸水材料和胶体金垫上的保护膜优选为聚乙烯 (PE) 保鲜膜或聚氯乙烯 (PVC) 保鲜膜或聚偏二氯乙烯 (PDVC) 保鲜膜。

[0016] 本发明所述的硝酸纤维素膜上检测条带和对照条带按如下方法制备:分别将大肠杆菌 0157 抗体、单核细胞增生李斯特氏菌抗体和抗鼠 IgG 抗体以 BIODOT 平台上的 BIRJET 气压喷头喷到硝酸纤维膜对应的条带上,冷冻干燥制备而成。

[0017] 所述胶体金的制备方法为:将质量浓度 0.5 ~ 1.5% 四氯化金溶液与质量浓度 0.5 ~ 1.5% 柠檬酸钠溶液和双蒸水混合,滴加适量单宁酸和 25mmol/L 碳酸钾溶液,将四氯化金还原成为 15-20nm 直径的胶体金颗粒,所述四氯化金溶液与柠檬酸钠溶液和双蒸水的体积比为 1 : 3 ~ 5 : 70 ~ 88。

[0018] 本发明所述的大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条的应用如下:所述的测试条在加样口处加入待测样品增菌液后,若所述的测试条抗鼠 IgG 抗体对照条带位置 (C 区) 出现肉眼可见的红色条带,则说明试条有效,抗鼠 IgG 抗体对照条带位置如无肉眼可见的红色条带,则说明测试条失效;若所述的测试条上大肠杆菌 0157 检测条带 (A 区) 和 / 或单核细胞增生李斯特氏菌检测条带 (B 区) 出现肉眼可见红色条带,说明待测样本中含有大肠杆菌 0157 和 / 或单核细胞增生李斯特氏菌;若上述大肠杆菌 0157 检测条带、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带位置未出现肉眼可见红色条带则说明待测样本中不含大肠杆菌 0157 和 / 或单核细胞增生李斯特氏菌,如检测结果出现目的抗原阳性检测条带,可进行相应病原菌的鉴定。

[0019] 与现有技术相比,本发明的有益效果主要体现在:

[0020] 本发明测试条既可单独定性检测大肠杆菌 0157 或单核细胞增生李斯特氏菌,又可同时检测这两种菌,与同类试剂盒相比,操作简单方便、省时省力、节约成本,不需特殊仪器设备,不需专业培训,适合基层,适合突发事件的大批量现场检测,也适合流行病学初筛调查。

#### (四) 附图说明

[0021] 图 1 本发明测试条结构示意图:1- 下端吸水材料,1' - 上端吸水材料,2- 硝酸纤维素膜,3- 胶体金垫,4- 保护膜,5- 测试条,A- 大肠杆菌 0157 检测条带,B- 单核细胞增生李斯特氏菌检测条带,C- 抗鼠 IgG 抗体对照条带;

[0022] 图 2 本发明测试条外形图:A- 大肠杆菌 0157 检测条带,B- 单核细胞增生李斯特氏菌检测条带,C- 抗鼠 IgG 抗体对照条带,6- 加样口,7- 视窗;

[0023] 图 3 本发明测试条检测结果示意图:A- 大肠杆菌 0157 检测条带,B- 单核细胞增生李斯特氏菌检测条带,C- 抗鼠 IgG 抗体对照条带;1 为待测样本中含有大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌,2 为待测样本中含有单核细胞增生李斯特氏菌,3 为待测样本中含有大肠杆菌 0157,4 为待测样本中不含大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌,5 为本试条失效。

#### (五) 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于

此：

[0025] 实施例 1

[0026] 1、配对抗体的选择：

[0027] 配对抗体的选择是选用目前市场上已有的商品化抗体，运用夹心法进行验证实验，找到特异性和亲和力最佳的一对抗体。

[0028] 我们分别将 40 对大肠杆菌 0157 和 40 对单核细胞增生李斯特氏菌的相关抗体作配对实验，经反复验证，找到特异性和亲和力最佳的一对大肠杆菌 0157 抗体和一对单核增生李斯特氏菌抗体。

[0029] 2、胶体金垫的制备：

[0030] 分别将大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌的其中一个抗体用胶体金标记，以玻璃纤维膜作为载体，以 BIODOT 平台上的 BIRJET 气压喷头喷到玻璃纤维膜上冷冻干燥制成胶体金垫。

[0031] 3、硝酸纤维素膜的制备：

[0032] 分别将大肠杆菌 0157、单核细胞增生李斯特氏菌对应的另一个抗体以 BIODOT 气压喷头喷到硝酸纤维素膜上形成检测条带，同时将抗鼠 IgG 抗体也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照条带，以中性蛋白封闭，冷冻干燥。

[0033] 4、试条的组装：

[0034] 参照图 1，大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条为嵌入在塑料外壳内的免疫胶体金测试条 5，具体结构为：所述的免疫胶体金测试条 5 由胶体金垫 3 和硝酸纤维素膜 2 和吸水材料连接而成，所述的 胶体金垫 3 和硝酸纤维素膜 2 连接，所述的胶体金垫 3 一端连接有下端吸水材料 1，所述的硝酸纤维素膜 2 一端连接有上端吸水材料 1'，所述下端吸水材料 1 与胶体金垫 3 上覆盖有保护膜 4，所述的胶体金垫是将大肠杆菌 0157 抗体和单核细胞增生李斯特氏菌抗体分别用胶体金标记，以玻璃纤维膜作为载体，以 BIODOT 平台上的 BIRJET 气压喷头喷到玻璃纤维膜上制成的胶体金垫，所述的硝酸纤维素膜上分段包被有大肠杆菌 0157 另一个抗体、单核细胞增生李斯特氏菌另一个抗体和抗鼠 IgG 抗体，并分别形成大肠杆菌 0157 检测条带 A、单核增生李斯特菌检测条带 B 及抗鼠 IgG 抗体对照条带 C；所述的胶体金是将质量浓度 1% 四氯化金溶液与质量浓度 1% 柠檬酸钠溶液和双蒸水混合，滴加适量单宁酸和 25mmol/L  $K_2CO_3$  溶液，将四氯化金还原成为 15-20nm 胶体金颗粒，所述四氯化金溶液与柠檬酸钠溶液、双蒸水体积比为 1 : 4 : 80。

[0035] 所述的保护膜为聚氯乙烯保鲜膜。

[0036] 所述免疫胶体金测试条上方还覆盖有一开有视窗 7 和加样口 6 的盖板，所述的视窗 7 和加样口 6 与镶嵌在支撑板内的测试条 5 配合，所述的下端吸水材料 1 与胶体金垫 3 上覆盖有保护膜 4，所述的保护膜 4 在对应加样口 6 位置设有与加样口 6 配合的通口。

[0037] 测试条按上述方法组装、裁剪、包装成 1.5cm×7.0cm 长条形，所述长方形外壳上设有加样口 6 和长方形视窗 7，所述长方形视窗对应于硝酸纤维素膜上的检测条带和对照条带。

[0038] 5、检测方法：

[0039] 用移液器取待测样品增菌液，加入测试条的加样口，平稳放置 5 ~ 15 分钟观察结果，检测结果应在加样后 15 分钟内观察读取，如果反应超过 20 分钟，可能会造成显色过度

而形成误判。

[0040] 6、待检样品的处理

[0041] 打开待检牛奶样品包装,取 25mL 牛奶样品,立即接种于 225mL 的脑心浸出肉汤(BHI),30 摄氏度恒温培养 10 小时,取出增菌液待检。

[0042] 7、检测步骤:

[0043] 用移液器取增菌液样品 200  $\mu$  L,加入测试条下端的加样口,平稳放置 15 分钟,观察结果,如图 3 所示,4 中 C 区出现肉眼可见的红色条带,即为增菌液出现阴性结果,可判断为阴性,即检测样品增菌液不含目的抗原;5 中没有出现肉眼可见的红色条带,为试条失效;1 中 A、B、C 区均出现肉眼可见的红色条带,即为增菌液含有大肠杆菌 0157 和单核细胞增生李斯特氏菌,2 中 B、C 区出现肉眼可见的红色条带,即为检测样品增菌液含有单核细胞增生李斯特菌,3 中 A、C 区出现肉眼可见的红色条带,即为检测样品增菌液含有大肠杆菌 0157,如检测结果出现目的抗原阳性检测条带,可进行相应病原菌的鉴定。

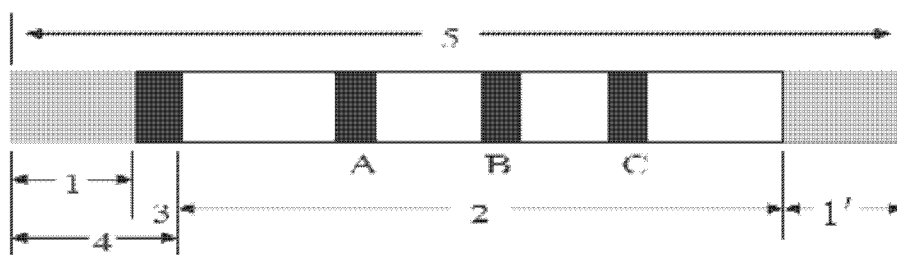


图 1

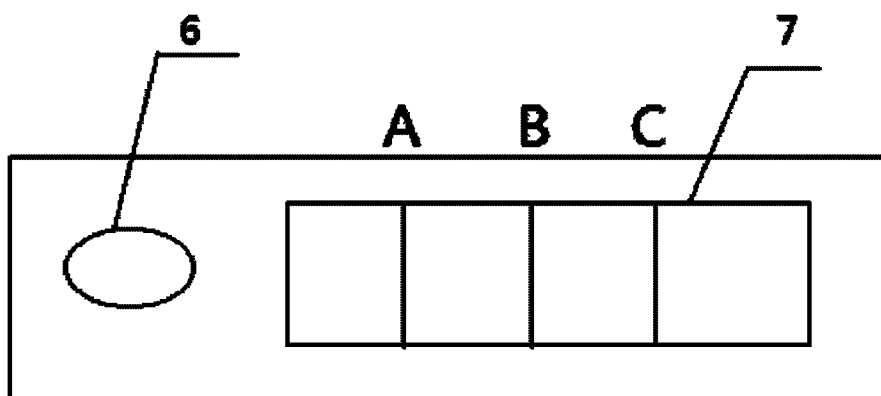


图 2

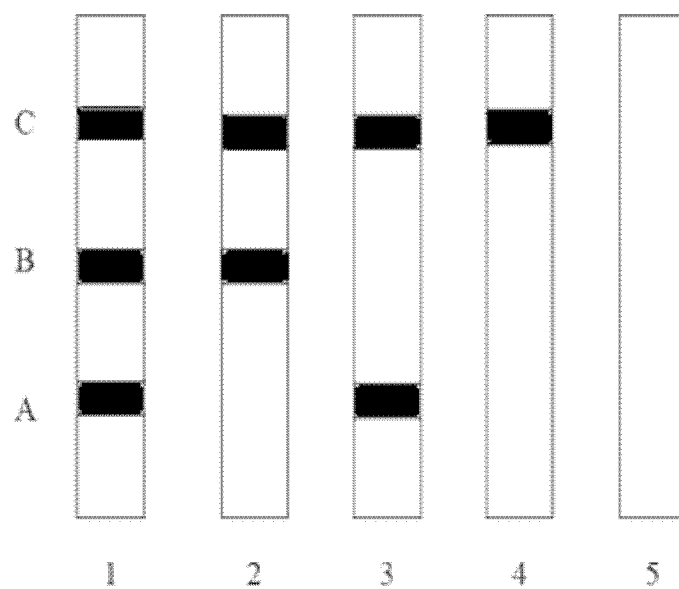


图 3

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 大肠杆菌O157和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102411053A</a>                   | 公开(公告)日 | 2012-04-11 |
| 申请号            | CN201110229465.0                               | 申请日     | 2011-08-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 浙江省农业科学院                                       |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 浙江省农业科学院                                       |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 浙江省农业科学院                                       |         |            |
| [标]发明人         | 周育<br>张巧艳<br>徐俊锋<br>王强                         |         |            |
| 发明人            | 周育<br>张巧艳<br>徐俊锋<br>王强                         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/558 G01N33/544 G01N33/531    |         |            |
| 代理人(译)         | 黄美娟<br>王兵                                      |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种大肠杆菌O157和单核细胞增生李斯特氏菌共检测试条，所述测试条为镶嵌在支撑板内的免疫胶体金测试条，所述的免疫胶体金测试条由胶体金垫和硝酸纤维素膜和吸水材料连接而成，所述的胶体金垫一端连接有下端吸水材料，所述的硝酸纤维素膜一端连接有上端吸水材料，所述的胶体金垫是将大肠杆菌O157抗体和单核细胞增生李斯特氏菌抗体分别用胶体金标记制成的胶体金垫，所述的硝酸纤维素膜有大肠杆菌O157检测条带(A区)、单核细胞增生李斯特氏菌检测条带(B区)及抗鼠IgG抗体对照条带(C区)；本发明试剂条的操作简单方便、省时省力、节约成本，不需特殊仪器设备。

