



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106290881 A

(43) 申请公布日 2017. 01. 04

(21) 申请号 201510292054. 4

(22) 申请日 2015. 06. 01

(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 丁晓辉

(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 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒及其用途。本发明提供的一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒,包括位于背板上的试剂条,试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有抗沙门氏菌抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所提供的检测试剂盒结合近红外荧光检测技术,可快速,准确地检测出人全血、血清或血浆中的沙门氏菌抗原。

1. 一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒,包括位于背板上的试剂条,试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有抗沙门氏菌单克隆抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸,所述免疫荧光探针为抗沙门氏菌单克隆抗体包被的近红外荧光乳胶微球颗粒。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体和所述近红外荧光乳胶微球颗粒上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为相同的抗沙门氏菌单克隆抗体,或者为不同的抗沙门氏菌单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],所述近红外荧光乳胶微球颗粒上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],或所述硝酸纤维素膜上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],所述近红外荧光乳胶微球颗粒上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhi 抗体 [AC04]。

4. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述荧光乳胶微球颗粒的直径为 140-160nm。

5. 根据权利要求1-4任一权利要求所述的检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

1) 用缓冲液将荧光乳胶微粒离心清洗并将乳胶颗粒分散,在清洗好的乳胶颗粒分散液中加入抗沙门氏菌单克隆抗体;加入 EDCA 使抗体与颗粒偶联;再加入封闭液封闭乳胶颗粒上多余的基团,制备获得探针溶液;

2) 将含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液喷加到硝酸纤维素膜上,烘干备用;

3) 将步骤1)制备获得的探针溶液浸润玻璃纤维薄膜,干燥备用;

4) 将步骤2)所得的硝酸纤维素膜、步骤3)所得的标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、样品垫、吸水纸及背板组装制备成沙门氏菌近红外荧光检测试剂盒。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)中,再加入封闭液封闭乳胶颗粒上多余的基团,并加入冠醚,制备获得探针溶液,所述冠醚选自二环己基-18-冠-6、15-冠醚-5、18-冠醚-6中的一种或多种的组合;

和/或,步骤1)制备获得的探针溶液中冠醚的浓度为 0.1-20mg/ml;

和/或,所述步骤1)中,缓冲液为 PBS 缓冲液;

和/或,所述步骤1)中,乳胶颗粒、抗沙门氏菌单克隆抗体、EDCA 的重量比为 9-11:0.9-1.1:0.9-1.1;

和/或,所述封闭液为乙醇胺。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤2)中,含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液中还含有冠醚,所述冠醚选自二环己基-18-冠-6、15-冠醚-5、18-冠醚-6中的一种或多种的组合;

和/或,所述含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液中冠醚的浓度为 0.1-20mg/ml;

和/或,含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液中抗沙门氏菌单克隆抗体的浓度为 1.8-2.2mg/ml;

和/或,抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液的喷加量为 0.9-1.1ul/cm;

和 / 或,所述步骤 2) 中,所述缓冲溶液为 PBS 缓冲液。

8. 根据权利要求 1-4 任一权利要求所述的检测试剂盒在沙门氏菌检测领域的用途。

9. 根据权利要求 8 所述的用途,其特征在于,所述用途具体为使用所述沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒对样品中的沙门氏菌进行检测,所述样品选自人全血、血清或血浆中的一种或多种的组合。

沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种沙门氏菌近红外法荧光检测试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] 沙门氏菌 (*Salmonella*) 为沙门氏菌属肠杆菌科,是一类条件性细胞内寄生的革兰氏阴性肠杆菌。菌体大小为 $(0.6 \sim 0.9) \times (1 \sim 3) \mu\text{m}$,无芽胞,一般无荚膜,除鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌外,大多有周身鞭毛。沙门氏菌是人畜共患病的病原体,不仅能导致鸡白痢、仔猪副伤寒、流产等动物疾病,还能使人类发生伤寒、副伤寒、败血症、胃肠炎和食物中毒,是细菌性食物中毒重要致病菌。

[0003] 沙门氏菌病被认为是目前世界范围内最重要的食源性致病菌之一,严重威胁着人畜健康,已经成为公共卫生所关注的问题。在人和畜禽体内,肠炎沙门氏菌的分离率较高,该菌主要引起畜禽食物胃肠炎以及人类肠炎和食物中毒^[2]。食物传播是人类感染沙门氏菌的主要途径,肉类(尤其是禽肉)、蛋类及蛋制品、未经巴氏消毒的牛奶及奶制品、海产品等很多食品都与沙门氏菌病有关。人类沙门氏菌病的特征是恶心、呕吐、腹泻、腹痛或痉挛、发烧及头痛。潜伏期从 8h-72h 不等。患者通常在进食受污染的食物 12h-36h 后发病,症状可能长达一个星期。

[0004] 因此,及时检测沙门氏菌抗原,为临床诊断提供可靠地诊断依据,采取正确有效的治疗措施是非常重要的。

发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒及其用途,用于建立高效可行的沙门氏菌近红外荧光检测技术,解决现有技术中的问题。本发明所提供的检测试剂盒结合近红外荧光检测技术,可快速,准确的检测出人全血/血清/血浆中沙门氏菌。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 本发明的第一方面提供一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒,包括位于背板上的试剂条,试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有抗沙门氏菌单克隆抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0008] 优选的,所述免疫荧光探针为抗沙门氏菌单克隆抗体包被的近红外荧光乳胶微球颗粒。

[0009] 优选的,硝酸纤维素膜上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体和所述近红外荧光乳胶微球颗粒上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体可以为相同的抗沙门氏菌单克隆抗体,也可以为不同的抗沙门氏菌单克隆抗体。

[0010] 更优选的,所述硝酸纤维素膜上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],所述近红外荧光乳胶微球颗粒上包被的抗

沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6], 或所述硝酸纤维素膜上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6], 所述近红外荧光乳胶微球颗粒上包被的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhi 抗体 [AC04]。

[0011] 更优选的, 所述荧光乳胶微球颗粒的直径为 140-160nm。

[0012] 近红外光 (NIR), 是介于可见光 (VIS) 和中红外光 (MIR) 之间的电磁波, ASTM 定义 NIR 为波长在 780nm-2526nm 范围内的电磁波。在近红外光区, 生物体自吸收或荧光强度很小, 可避免背景干扰。同时由于散射光强度与波长的四次方呈反比, 近红外区的散射干扰大为减少。

[0013] 本发明的第二方面提供所述沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒的制备方法, 包括如下步骤:

[0014] 1) 用缓冲液将荧光乳胶微粒离心清洗并将乳胶颗粒分散, 在清洗好的乳胶颗粒分散液中加入抗沙门氏菌单克隆抗体; 加入 EDCA 使抗体与颗粒偶联; 再加入封闭液封闭乳胶颗粒上多余的基团, 制备获得探针溶液;

[0015] 2) 将含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液喷加到硝酸纤维素膜上, 烘干备用;

[0016] 3) 将步骤 1) 制备获得的探针溶液浸润玻璃纤维薄膜, 干燥备用;

[0017] 4) 将步骤 2) 所得的硝酸纤维素膜、步骤 3) 所得的标记有免疫荧光探针的玻璃纤维膜、样品垫、吸水纸及背板组装制备成沙门氏菌近红外荧光检测试剂盒。

[0018] 优选的, 所述步骤 1) 中, 再加入封闭液封闭乳胶颗粒上多余的基团, 并加入冠醚, 制备获得探针溶液, 所述冠醚选自二环己基 -18- 冠 -6、15- 冠醚 -5、18- 冠醚 -6 中的一种或多种的组合。

[0019] 更优选的, 步骤 1) 制备获得的探针溶液中冠醚的浓度为 0.1-20mg/ml, 更优选为 4-8mg/ml。

[0020] 优选的, 所述步骤 1) 中, 缓冲液为磷酸盐 (PBS) 缓冲液。

[0021] 更优选的, 所述 PBS 缓冲液为 0.009-0.011mol/L, PH7.25-7.35 的 PBS 缓冲液。

[0022] 优选的, 所述步骤 1) 中, 荧光乳胶微粒的直径为 140-160nm。

[0023] 优选的, 所述步骤 1) 中, 乳胶颗粒、抗沙门氏菌单克隆抗体、EDCA 的重量比为 9-11:0.9-1.1:0.9-1.1。

[0024] 在本发明一优选实施例中, 乳胶颗粒、抗沙门氏菌单克隆抗体、EDCA 的投料量分别为 1mg、100ug、100ug。

[0025] 优选的, 所述封闭液为乙醇胺, 加入量为适量, 本领域技术人员可根据实际情况调整乙醇胺的用量。

[0026] 优选的, 所述步骤 2) 中, 所述缓冲溶液为 PBS 缓冲液。

[0027] 本领域技术人员可选取适当浓度和 pH 的 PBS 缓冲液, 更优选为 0.009-0.011mol/L, PH7.25-7.35 的 PBS 缓冲液。

[0028] 优选的, 所述步骤 2) 中, 含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液中还含有冠醚, 所述冠醚选自二环己基 -18- 冠 -6、15- 冠醚 -5、18- 冠醚 -6 中的一种或多种的组合。

[0029] 更优选的, 所述含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液中冠醚的浓度为

0.1-20mg/ml,更优选为 4-8mg/ml。

[0030] 优选的,所述步骤 2) 中,含有抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液中抗沙门氏菌单克隆抗体的浓度为 1.8-2.2mg/ml。

[0031] 优选的,所述步骤 2) 中,抗沙门氏菌单克隆抗体的缓冲溶液的喷加量为 0.9-1.1ul/cm。

[0032] 优选的,所述步骤 2) 中,烘干的具体条件为 36-38℃烘箱烘干。

[0033] 所述喷加过程利用微量蛋白点膜系统。

[0034] 优选的,所述步骤 1) 中的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],所述步骤 2) 中的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],或所述步骤 1) 中的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6],所述步骤 2) 中的抗沙门氏菌单克隆抗体为 Abcam® Anti-Salmonella typhi 抗体 [AC04]。

[0035] 优选的,所述步骤 3) 中,干燥的具体条件为真空干燥机干燥。

[0036] 本发明的第三方面提供了所述沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒在沙门氏菌检测领域的用途。

[0037] 所述用途具体为使用所述沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒对样品中的沙门氏菌进行检测,所述样品选自人全血、血清或血浆中的一种或多种的组合。

[0038] 本发明所提供的检测试剂盒以人全血 / 血清 / 血浆为检测样本,结合近红外荧光检测技术,可快速、准确的检测出患者标本中的沙门氏菌抗原。所述试剂盒采用免疫荧光层析法,其最小可测量可达 1CFU/mL,检测方便、成本低,灵敏度高,特异性好,比同类定量诊断试剂价格低 20-30%,大大节约了社会医疗成本,检测过程中样品收集及处理简单,可快速准确的获得结果,非常适合突发事件现场和基层使用,并可应用到临床检测中,为临床治疗提供定性依据。

具体实施方式

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 等。

[0043] 本发明各实施例中试验样品由浦东新区人民医院提供。近红外荧光检测仪,由上海凯创生物技术有限公司开发提供。

[0044] 实施例 1

[0045] 1. 免疫荧光抗沙门氏菌抗体颗粒制备:

[0046] 用 0.01mol/L, PH7.3±0.05 的磷酸盐缓冲液将直径为 150nm 的荧光乳胶微粒离心清洗 2 遍并将乳胶颗粒分散,在清洗好的乳胶颗粒中加入 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6];加入 EDCA 使抗体与颗粒偶联;加入封闭液封闭乳胶颗粒上多余的基团,再加入二环己基-18-冠-6。按每毫克微球乳胶 100 微克的待标记抗体,100 微克的 EDCA 用量标记。每毫克的微球乳胶最后加相当于 20 微克的乙醇胺当量的封闭液进行封闭,冠醚的终浓度为 6mg/ml。

[0047] 2. 试剂盒的制备:

[0048] 用 0.01M pH7.2 的 PBS 缓冲液稀释 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6] 至浓度 2.0mg/ml,并加入冠醚,冠醚的终浓度为 6mg/ml,再利用微量蛋白点膜系统将溶液喷加到适当孔径的硝酸纤维素膜上,按 1ul/cm 的量进行喷膜,37℃烘箱烘干备用。

[0049] 用制备好的探针(步骤 1 制得的标记有 Abcam® Anti-Salmonella typhimurium 0-4 抗体 [1E6])的近红外荧光乳胶微球)溶液浸润玻璃纤维薄膜,真空干燥机中干燥备用。

[0050] 将包被抗沙门氏菌抗体的硝酸纤维素膜、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维膜、样品垫、吸水纸及背板组装制备成沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒。

[0051] 实施例 2

[0052] 试剂盒检测:

[0053] 以沙门氏菌和 PBS 缓冲液分别配置浓度为 1CFU/ml、2CFU/ml、4CFU/ml、6CFU/ml、10CFU/ml、20CFU/ml、50CFU/ml、100CFU/ml、200CFU/ml、300CFU/ml、400CFU/ml、500CFU/ml、1000CFU/ml 的沙门氏菌标准品,以 0CFU/ml 作为空白对照,空白对照及每个浓度的标准品均重复测定 6 次。标准品及试剂盒均平衡至室温后再开始检测,用滴管在每个试剂盒的加样孔内滴加 3 滴样本(约 120-150ul)。15 分钟时,用近红外荧光检测仪检测荧光信号,并用荧光仪器进行判断,分析仪的对荧光信号的检测范围是 AD 值 0-10000。以沙门氏菌浓度为横坐标,近红外荧光检测仪检测荧光信号(平均值)为纵坐标,建立标准曲线。在标准曲

线上,随着标准品浓度的升高,测得的荧光信号值也随之升高。

[0054] 根据标准曲线计算可知,本试剂盒对 1CFU/mL 的样品可以部分检出,对 2.0CFU/mL 的样品全部检出,其最低检出限 $\leq$ 2.0CFU/mL,并在 2-10002.0CFU/mL 的范围具有良好的线性。

[0055] 各浓度的批内最大 CVs 为 4.1%,平均 CVs 为 3.55% (每个浓度的样品同批进行测试),各浓度的批间最大 CVs 为 5.6%,平均 CVs 为 4.5% (每个浓度的样品分 5 批进行测试)表明本发明所提供的试剂盒具有良好的重复性。

[0056] 选择未检测出沙门氏菌进行加标回收实验,加入沙门氏菌标准品,将沙门氏菌的浓度分别调整至 10CFU/ml、20CFU/ml、50CFU/ml、100CFU/ml、200CFU/ml,空白对照及每个浓度的样品均重复测定 6 次。各浓度的批内最大 CVs 为 4.1%,平均 CVs 为 3.5%,各浓度的加标回收率为 97.6% -100.2%,表明本发明所提供的试剂盒具有良好的准确度。

[0057] 将本发明所提供的沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒密封保存,并存放于 4℃ 及室温 (25℃ 左右) 下,观察不同存放温度对试剂盒稳定性的影响。保存于 4℃ 的试剂盒每周取出 4 盒,分别检测 1CFU/ml、2CFU/ml、4CFU/ml、6CFU/ml、10CFU/ml、20CFU/ml、50CFU/ml、100CFU/ml 的沙门氏菌标准品;保存于室温 (25℃) 的试剂盒每 3 天取出 4 盒,分别检测 1CFU/ml、2CFU/ml、4CFU/ml、6CFU/ml、10CFU/ml、20CFU/ml、50CFU/ml、100CFU/ml 的沙门氏菌标准品。经验证,试纸盒在 4℃ 下可保存 24 个月,且最低检出限和重复性没有明显变化,在室温下可保存 18 个月,且最低检出限和重复性没有明显变化;在可保存的期限内,试剂盒均可达到 2.0CFU/ml 的检测灵敏度。

[0058] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0059] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106290881A	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201510292054.4	申请日	2015-06-01
[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	丁晓辉		
发明人	丁晓辉		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/56916		
代理人(译)	郭婧婧		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒及其用途。本发明提供的一种沙门氏菌近红外荧光法检测试剂盒，包括位于背板上的试剂条，试剂条从加样端开始依次为样品垫、标记有免疫荧光探针的玻璃纤维素膜、包被有抗沙门氏菌抗体的硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所提供的检测试剂盒结合近红外荧光检测技术，可快速，准确地检测出人全血、血清或血浆中的沙门氏菌抗原。