



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104374914 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 25

(21) 申请号 201410657289. 4

(22) 申请日 2014. 11. 14

(71) 申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818 号

(72) 发明人 章礼平 李登峰 方静 刘联合国
刘飞 陈梅娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 底板,特点是在 PVC 底板上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,该结合垫上包被有所述的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,该硝酸纤维素膜上分别包被有恶臭假单胞菌超声波破碎液构成的检测线和兔抗鸡卵黄抗体构成的质控线,优点是灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确性高。

1. 一种恶臭假单胞菌检测试纸条,其特征在于:所述的试纸条由 PVC 底板和在 PVC 底板上依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫;所述的结合垫上包被有抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,所述的硝酸纤维素膜上分别设置有由恶臭假单胞菌超声波破碎液包被的检测线和由兔抗鸡卵黄抗体(IgY)包被的质控线。

2. 根据权利要求 1 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条,其特征在于所述的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物的制备方法如下:将抗恶臭假单胞菌卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 25-50nm 的胶体金溶液按 6-8 μg :1mL 混合后,在 pH 5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min,加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂,采用低速离心 2000-3500rpm,10-20min,再高速离心 12000-15000rpm,1-1.5h,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物。

3. 一种根据权利要求 1 所述的恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 样品垫的制备

将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 pH 7.2 的 0.01M PBS 缓冲液中 30min 后取出,于 37°C 干燥 2-3h 即得到样品垫,真空封装,4°C 保存备用;

(2) 特定包被的结合垫的制备

将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖,1wt% 吐温-20 的 pH7.2 的 0.01M PBS 缓冲液中 30min 后,于 37°C 干燥 1-2h 后,在每平方厘米的玻璃纤维纸上均匀喷涂 10-20 μL 的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,真空冷冻干燥 1-2h,即得到结合垫,真空封装,4°C 保存备用;

(3) 特定包被的硝酸纤维素膜的制备

将恶臭假单胞菌超声波破碎液用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成检测线,将兔抗鸡卵黄抗体用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成质控线,即得到特定包被的硝酸纤维素膜,真空冷冻干燥 1-1.5h,真空封装,4°C 保存备用;其中检测线与质控线相互平行,所述的检测线靠近结合垫端,所述的质控线靠近吸水垫端;

(4) 试纸条的制备

将步骤 (1) 得到的样品垫、步骤 (2) 得到的特定包被的结合垫、步骤 (3) 得到的特定包被的硝酸纤维素膜和吸水垫按序搭接并粘贴于底板上,裁成 4-6mm 宽的细条,即得恶臭假单胞菌检测试纸条,真空封装,4°C 保存。

4. 根据权利要求 3 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法,其特征在于所述的恶臭假单胞菌抗原的制备方法如下:取实验室 -80°C 保存的恶臭假单胞菌种,在 LB 固体培养基中划线活化,28°C 倒置培养 24h 后挑取单菌落接种于含 5mL LB 液体培养基的试管中,28°C,200rpm 培养 12-18h,将培养的菌液用 LB 液体培养基按 1:100 稀释到三角烧瓶中,28°C,200rpm 扩大培养,每隔一段时间测其 OD600 值,当其 OD600 值达到 0.4-0.6 时停止培养。将培养的菌液在 4°C 进行 5000rpm 离心 10min,弃上清,下层沉淀用 pH 7.2 的 0.01M PBS 重悬洗涤,再次 5000rpm 离心 10min,沉淀再次用 PBS 重复上述洗涤 2 次,最终得到的沉淀即为恶臭假单胞菌抗原。

5. 根据权利要求 4 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法,其特征在于所述

的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物的制备方法如下：

(1) 抗恶臭假单胞菌卵黄抗体的制备

将上述恶臭假单胞菌抗原与无菌生理盐水混合得到恶臭假单胞菌悬液，加入甲醛使甲醛体积终浓度达 0.5%，然后 37℃ 恒温水浴灭活 24h，即得到灭活的恶臭假单胞菌抗原；取健康的初产蛋的母鸡作为免疫对象，将灭活恶臭假单胞菌抗原用生理盐水稀释后和弗氏完全佐剂等体积混合，充分乳化后对母鸡的双翅、双腿、背部和胸肌部位肌肉注射进行基础免疫，每只母鸡免疫剂量为 4×10^9 CFU，15-20 天后，将灭活的恶臭假单胞菌抗原和弗氏不完全佐剂进行等体积混合，充分乳化后对母鸡肌肉注射进行加强免疫，每只母鸡免疫剂量为 2×10^9 CFU，加强免疫重复进行三次，每次间隔时间为 7-10 天，然后收集鸡蛋测定效价，当卵黄抗体效价 $> 1 : 20000$ 时收集鸡蛋，分离卵黄，用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体；

(2) 胶体金标记抗恶臭假单胞菌卵黄抗体

将抗恶臭假单胞菌卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 25-50nm 的胶体金溶液按 6-8 μ g : 1mL 混合，在 pH 5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min，加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂，采用低速离心 2000-3500rpm，10-20min，再高速离心 12000-15000rpm，1-1.5h，取离心管底部暗红色沉淀即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物，用含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、0.02wt% 叠氮化钠的 pH 7.2 的 0.01M PBS 缓冲液重悬至所述胶体金溶液体积的 1/10-1/20 作为其工作浓度。

6. 根据权利要求 5 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法，其特征在于用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体的具体方法如下：称取适量步骤 (1) 分离得到的卵黄，按体积比 1 : 9 加入 pH 5.0 的 0.05M 的乙酸-乙酸钠缓冲液，搅拌均匀后 4℃ 静置过夜，8000g 离心 20min，取上清液加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%，4℃ 搅拌 6h，10000g 离心 20min，沉淀用 10-20 倍卵黄质量的双蒸馏水重悬，加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%，4℃ 搅拌过夜，10000g 离心 20min，沉淀用少量 pH7.2 的 0.01M 的 PBS 缓冲液重悬后，在 PBS 缓冲液中透析即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体。

7. 根据权利要求 5 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法，其特征在于步骤 (2) 中胶体金制备方法如下：将 100mL 0.01wt% 的氯金酸溶液，加热煮沸后，边搅拌边加入 1-2mL 1wt% 柠檬酸三钠迅速摇匀，继续加热，溶液由淡黄色变黑变红色，至颜色稳定后继续加热 5-10min，冷却后补足失水至 100mL，无菌密封，4℃ 避光保存。

8. 根据权利要求 5 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法，其特征在于：所述的检测线距离所述的结合垫 6-8mm；所述的质控线距离所述的吸水垫 6-8mm，所述的检测线和所述的质控线的宽度分别为 0.8-1mm，两条线相距为 5mm。

9. 根据权利要求 3 所述的一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法，其特征在于：所述的恶臭假单胞菌超声波破碎液的包被量为 1-2 μ L/cm；所述的兔抗鸡卵黄抗体的包被量为 1-2 μ L/cm，所述的恶臭假单胞菌超声波破碎液是将所述的恶臭假单胞菌抗原用 PBS 重悬，经超声波破碎后 4000rpm 离心 5min 所得的上清液。

一种恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学检测技术,尤其是涉及一种基于卵黄抗体的胶体金免疫层析技术用以快速检测环境、食品、人和动物各种组织,血液及粪便样品中恶臭假单胞菌的检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 假单胞菌属是微生物的重要类群,也是自然界分布最广泛的微生物之一。恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 属假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*), 为革兰氏阴性菌,广泛存在于土壤、海水、淡水动植物体表及各种含蛋白食品中,为人或动物源性或机会致病菌。目前,国内也陆续报道了一些由恶臭假单胞菌引起的养殖鱼类和甲壳动物的疾病,如欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 的烂鳃病、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的肝肾白点病,罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的黑鳃病及三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的牛奶病等,这些疾病一旦爆发,传播迅速,死亡率高,给养殖产业造成了巨大的损失。环境中的恶臭假单胞菌也可能随食物进入肠道,在一定条件下该菌异常增殖,破坏了肠道内正常菌群的平衡而造成鱼体发病,已经成为养殖鱼类的重要病原。同时恶臭假单胞菌也是人的条件致病菌,在一定条件下攻击机体免疫力低下人群,该菌感染人体自溶后释放出内毒素可致中毒症状,多系统感染,败血症,甚至感染性休克。恶臭假单胞菌为一种人畜共患病菌,近年来,随着广谱抗菌药物的广泛使用,恶臭假单胞菌的感染有上升趋势,且该菌对多种抗菌药物具有较高的耐药性,因此,若能确定病因,及时对症下药,势必能给养殖产业减少损失,同时,在医学方面也具有重要意义。

[0003] 目前,病原体的检测方法主要有分离培养、电镜观察、PCR、ELISA、色谱分析等,这些方法多耗时耗力,需要专用场地和仪器设备,需要专业人员操作。对于恶臭假单胞菌感染,根据微生物检测标准需先对其进行增菌实验,挑选特定菌株用全自动微生物分析仪分析鉴定,整个过程操作繁琐,而且需要专业人员在无菌条件下进行,结果也需数天才能获得,不利于对病源的确定及病情的及时控制。

[0004] 胶体金免疫层析试验 (gold-immunochromatography assay GICA) 是 20 世纪 80 年代开始发展起来的新的免疫分析方式,是应用胶体金标记技术,以胶体金作为示踪物,基于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术,它具有简便,快速,特异性强,灵敏度高,费用低等优点。依据胶体金免疫层析技术,在国内外无论人医应用方面,还是兽医应用方面,都已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测各种病原和有毒有害物质的试纸条。但是,目前国内外还没有公开任何关于恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法的相关研究报道。

[0005] 鸡卵黄抗体即卵黄中的免疫球蛋白 (immunoglobulin of yolk, IgY), 是针对特定抗原的,具有持续效价的高亲和力抗体。用鸡做宿主来产生抗特定抗原的 IgY, 饲养简单,无需采血,只需使用少量抗原即可产生大量抗体,从卵黄中提取的 IgY 纯度高、含量大。在疾病的检测、诊断方面, IgY 因免疫学特性独特,动物种系发生学距离远,其特异性和针对性较哺乳动物抗体更强,应用于免疫诊断中,可减少假阳性的出现,从而提高检测的特异性,是

近年来新兴的研究领域。但是,目前国内外还没有公开任何关于恶臭假单胞菌 IgY 的报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种基于胶体金免疫层析技术的特异性强、灵敏度高、检测速度快、成本低并且操作简便的恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法,满足了现场快速检测的需求。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种恶臭假单胞菌检测试纸条,所述的试纸条由 PVC 底板和在 PVC 底板上依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫;所述的结合垫上包被有抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,所述的硝酸纤维素膜上分别设置有由恶臭假单胞菌超声波破碎液包被的检测线和由兔抗鸡卵黄抗体(IgY)包被的质控线。

[0008] 所述的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物的制备方法如下:将抗恶臭假单胞菌卵黄抗体与胶体金溶液(颗粒直径为 25-50nm)按 6-8 μ g:1mL 混合,在 pH 5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合,加入加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂,采用低速离心 2000-3500rpm, 10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物,再高速离心 12000-15000rpm, 1-1.5h 去除未结合的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物。

[0009] 一种恶臭假单胞菌检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 样品垫的制备

[0011] 将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 0.01M pH 7.2 的 PBS 缓冲液中 30min 后取出,于 37 $^{\circ}$ C 干燥 2-3h 即得到样品垫,真空封装,4 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0012] (2) 特定包被的结合垫的制备

[0013] 将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 0.01M pH 7.2 的 PBS 缓冲液中 30min 后,于 37 $^{\circ}$ C 干燥 1-2h 后,在每平方厘米的玻璃纤维纸上均匀喷涂 10-20 μ L 的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,真空冷冻干燥 1-2h,即得到结合垫,真空封装,4 $^{\circ}$ C 保存备用;

[0014] (3) 特定包被的硝酸纤维素膜的制备

[0015] 将恶臭假单胞菌超声波破碎液用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成检测线,将兔抗鸡卵黄抗体用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上形成质控线,即得到特定包被的硝酸纤维素膜,真空冷冻干燥 1-1.5h,真空封装,4 $^{\circ}$ C 保存备用;其中检测线与质控线相互平行,所述的检测线靠近结合垫端,所述的质控线靠近吸水垫端;

[0016] (4) 试纸条的制备

[0017] 将步骤(1)得到的样品垫、步骤(2)得到的特定包被的结合垫、步骤(3)得到的特定包被的硝酸纤维素膜和吸水垫按序搭接并粘贴于底板上,裁成 4-6mm 宽的细条,即得恶臭假单胞菌检测试纸条,真空封装,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0018] 所述的恶臭假单胞菌抗原的制备方法如下:取实验室-80 $^{\circ}$ C 保存的恶臭假单胞菌种,在 LB 固体培养基中划线活化,28 $^{\circ}$ C 倒置培养 24h 后挑取单菌落接种于含 5mL LB 液体培养基的试管中,28 $^{\circ}$ C, 200rpm 培养 12-18h,将培养的菌液用 LB 液体培养基按 1:100 稀

释到三角烧瓶中,28℃,200rpm 扩大培养,每隔一段时间测其 OD600 值,当其 OD600 值达到 0.4-0.6 时停止培养。将培养的菌液在 4℃ 进行 5000rpm 离心 10min,弃上清,下层沉淀用 pH 7.2 的 0.01M PBS 重悬洗涤,再次 5000rpm 离心 10min,沉淀用 PBS 重复上述洗涤 2 次,最终得到的沉淀即为恶臭假单胞菌抗原。

[0019] 所述的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物的制备方法如下:

[0020] (1) 抗恶臭假单胞菌卵黄抗体的制备

[0021] 将上述恶臭假单胞菌抗原与无菌生理盐水混合得到恶臭假单胞菌悬液,加入甲醛使甲醛体积终浓度达 0.5%,然后 37℃ 恒温水浴灭活 24h,即得到灭活的恶臭假单胞菌抗原;取健康的初产蛋的母鸡作为免疫对象,将灭活的恶臭假单胞菌抗原和弗氏完全佐剂等体积混合,充分乳化后对母鸡的双翅、双腿、背部和胸肌部位肌肉注射进行基础免疫,每只母鸡免疫剂量为 4×10^9 CFU,15-20 天后,将灭活的恶臭假单胞菌抗原和弗氏不完全佐剂进行等体积混合,充分乳化后对母鸡肌肉注射进行加强免疫,每只母鸡免疫剂量为 2×10^9 CFU,加强免疫重复进行三次,每次间隔时间为 7-10 天,然后收集鸡蛋测定效价,当卵黄抗体效价 $> 1 : 20000$ 时收集鸡蛋,分离卵黄,用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体;

[0022] (2) 胶体金标记抗恶臭假单胞菌卵黄抗体

[0023] 将抗恶臭假单胞菌卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 25-50nm 的胶体金溶液按 6-8 μ g :unL 混合,在 pH 5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合,加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂,采用低速离心 2000-3500rpm,10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物,再高速离心 12000-15000rpm,1-1.5h 去除未结合的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,用含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、0.02wt% 叠氮化钠的 pH 7.2 的 0.01M PBS 重悬至所述胶体金溶液体积的 1/10-1/20 作为其工作浓度。

[0024] 用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体的具体方法如下:称取适量步骤 (1) 分离得到的卵黄,按质量比 1 : 9 加入 pH 5.0 的 0.05M 的乙酸-乙酸钠缓冲液,搅拌均匀后 4℃ 静置过夜,8000g 离心 20min,取上清液加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%,4℃ 搅拌 6h,10000g 离心 20min,沉淀用 10-20 倍卵黄质量的双蒸馏水重悬,加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%,4℃ 搅拌过夜,10000g 离心 20min,沉淀用少量 pH 7.2 的 0.01M 的 PBS 缓冲液重悬后,在 PBS 缓冲液中透析即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体。

[0025] 步骤 (2) 中胶体金制备方法如下:将 100mL 0.01wt% 的氯金酸溶液,加热煮沸后,边搅拌边加入 1-2mL 1wt% 柠檬酸三钠迅速摇匀,继续加热,溶液由淡黄色变黑变红色,至颜色稳定后继续加热 5-10min,冷却后补足失水至 100mL,无菌密封,4℃ 避光保存。

[0026] 所述的检测线距离所述的结合垫 6-8mm;所述的质控线距离所述的吸水垫 6-8mm,所述的检测线和所述的质控线的宽度分别为 0.8-1mm,两条线相距为 5mm。

[0027] 所述的 LB 液体培养基的配方如下:胰化蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌;

[0028] 所述的 LB 固体培养基的配方如下:胰化蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g、琼脂 15g,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌;

[0029] 所述的 PBST 缓冲液配制方法如下:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g,500 μ L 吐温-20,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌;

[0030] 所述的 PBS 缓冲液配制方法如下:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.2,高压灭菌;

[0031] 所述的乙酸-乙酸钠缓冲液配方如下:乙酸钠 2.604g、冰乙酸 1.095g,补足双蒸水至 1L,调 pH 至 5.0,高压灭菌。

[0032] 所述的恶臭假单胞菌超声波破碎液的包被量为 $1-2 \mu\text{L}/\text{cm}$;所述的兔抗鸡卵黄抗体的包被量为 $1-2 \mu\text{L}/\text{cm}$,所述的恶臭假单胞菌超声波破碎液是将所述的恶臭假单胞菌抗原用 PBS 重悬,经超声波破碎后 4000rpm 离心 5min 所得的上清液。

[0033] 本发明选用恶臭假单胞菌超声波破碎液作为检测线,抗恶臭假单胞菌特异性卵黄抗体作为胶体金标记的抗体,利用竞争法来检测待测样品中是否含有恶臭假单胞菌。通过待检样品中的恶臭假单胞菌与包被于硝酸纤维膜上的恶臭假单胞菌抗原共同竞争结合抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物。若待检样品中恶臭假单胞菌的量高于试纸条的检测限,抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物与样品中恶臭假单胞菌全部结合,从而不与固定在硝酸纤维膜上的菌液结合而不出现红色条带而显阳性;若待检样品中不含恶臭假单胞菌或其量低于试纸条的检测限,抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物不能与样品中恶臭假单胞菌全部结合,这样金标抗体在层析过程中会被固定在硝酸纤维素膜上的菌液结合而出现红色条带而显阴性。因此,若待测样品试纸条的检测线和质控线同时出现红色条带,则判断为阴性样品;若待测样品试纸条检测线不出现红色条带,同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品;若质控线上没有红色条带出现,则该试纸条无效。

[0034] 与现有技术相比,本发明的优点在于

[0035] 1、检测快速:整个检测过程只需 3-5 分钟,能够满足现场检测的需要。

[0036] 2、检测准确率高、特异性强:本反应与其他细菌没有交叉反应,检测准确性能达到 95%以上,与操作复杂的 ELISA 水平基本相同。

[0037] 3、携带方便,操作简便:本发明改变了对恶臭假单胞菌的检测必须由专业人员才能进行检测的局限性,使各个养殖场及医院均可即时、即地进行检测。

[0038] 4、本发明的检测试纸条制备工艺简单,成本低廉,不需要任何特殊仪器、设备。

[0039] 5、本发明的检测试纸条储存方便,对温度要求不高,在 4°C 可有效保存半年以上。

附图说明

[0040] 图 1 为本发明试纸条的结构示意图,图中 1 为样品垫,2 为结合垫,3 为硝酸纤维素膜,4 为吸收垫,5 为检测线,6 为质控线,7 为 PVC 底板;

[0041] 图 2 为本发明试纸条的制备工艺流程图。

具体实施方式

[0042] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0043] 具体实施例 1

[0044] 一种恶臭假单胞菌检测试纸条,如图 1 所示,该试纸条由 PVC 底板 7 和在 PVC 底板 7 上依次搭接的样品垫 1、结合垫 2、硝酸纤维素膜 3 及吸水垫 4;结合垫 2 上包被有抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,硝酸纤维素膜 3 上分别设置有由恶臭假单胞菌抗原超声波菌液包被的检测线 5 和由兔抗鸡卵黄抗体 (IgY) 包被的质控线 6。

[0045] 上述抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物的制备方法如下:将抗恶臭假单胞菌卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 25-50nm 的胶体金溶液按 6-8 μg :1mL 混合,在 pH 5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合,加含 10wt% 的牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂,采用低速离心 2000-3500rpm, 10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物,再高速离心 12000-15000rpm, 1-1.5h 去除未结合的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物。

[0046] 具体实施例 2

[0047] 快速检测恶臭假单胞菌胶体金试纸条的制备方法,如图 2 所示,其具体操作步骤如下:

[0048] (1) 恶臭假单胞菌的制备

[0049] 恶臭假单胞菌抗原的制备方法如下:取实验室 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的恶臭假单胞菌种,在 LB 固体培养基中划线活化,28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24h 后挑取单菌落接种于含 5mL LB 液体培养基的试管中,28 $^{\circ}\text{C}$, 200rpm 培养 12-18h,将培养的菌液用 LB 液体培养基按 1:100 稀释到三角烧瓶中,28 $^{\circ}\text{C}$, 200rpm 扩大培养,每隔一段时间测其 OD600 值,当其 OD600 值达到 0.4-0.6 时停止培养。将培养的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行 5000rpm 离心 10min,弃上清,下层沉淀用 pH 7.2 的 0.01M PBS 重悬洗涤,5000rpm 离心 10min,沉淀再次用 PBS 重复上述洗涤 2 次,最终得到的沉淀即为恶臭假单胞菌抗原。

[0050] (2) 抗恶臭假单胞菌卵黄抗体的制备

[0051] 将上述恶臭假单胞菌抗原与无菌生理盐水混合得到恶臭假单胞菌悬液,加入甲醛使甲醛体积终浓度达 0.5%,然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴灭活 24h,即得到灭活的恶臭假单胞菌抗原;取健康的初产蛋的母鸡作为免疫对象,将灭活的恶臭假单胞菌抗原用生理盐水稀释后和弗氏完全佐剂等体积混合,充分乳化后对母鸡的双翅、双腿、背部和胸肌部位肌肉注射进行基础免疫,每只母鸡免疫剂量为 4×10^9 CFU, 15-20 天后,将灭活的恶臭假单胞菌抗原和弗氏不完全佐剂进行等体积混合,充分乳化后对母鸡肌肉注射进行加强免疫,每只母鸡免疫剂量为 2×10^9 CFU,加强免疫重复进行三次,每次间隔时间为 7-10 天,进行三次免疫后收集鸡蛋测定效价,当卵黄抗体效价 $> 1:20000$ 时收集鸡蛋,分离卵黄,用饱和硫酸铵沉淀法纯化卵黄抗体。卵黄抗体的纯化的具体方法如下:称取适量卵黄,按质量比 1:9 加入 pH 5.0 的 0.05M 乙酸-乙酸钠缓冲液,搅拌均匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,8000g 离心 20min,取上清液加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%,4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 6h,10000g 离心 20min,沉淀用 10-20 倍卵黄质量的双蒸馏水重悬,加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%,4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜,10000g 离心 20min,取沉淀用少量 pH 7.2 的 0.01M PBS 溶液重悬,在 PBS 溶液中透析即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体。

[0052] (3) 胶体金标记抗恶臭假单胞菌卵黄抗体的方法

[0053] 用柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金。用新制的去离子水配制 100mL 0.01wt% 的氯金酸溶液,加热煮沸后,边搅拌边加入 1-2mL 1wt% 柠檬酸三钠溶液后迅速摇匀,继续加热,溶液由淡黄色变黑变红色,至颜色稳定后继续加热 5-10min,冷却后补足失水至 100mL,无菌密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;

[0054] 将抗恶臭假单胞菌卵黄抗体与胶体金颗粒直径为 25-50nm 的胶体金溶液按 6-8 μg :1mL 混合,在 pH 5.4 的条件下通过搅拌振荡 30-60min 使其结合,加含 10wt% 的牛

血清蛋白的 PBST 缓冲液作为稳定剂,采用低速离心 2000-3500rpm,10-20min 去除未充分稳定的胶体金颗粒及其凝聚物,再高速离心 12000-15000rpm,1-1.5h 去除未结合的卵黄抗体,取离心管底部暗红色沉淀即得到抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,用含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、0.02wt% 叠氮化钠的 pH 7.2 的 0.01M PBS 重悬至所述胶体金溶液体积的 1/10-1/20 作为其工作浓度。

[0055] (4) 结合垫的包被

[0056] 将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 pH 7.2 的 0.01M PBS 缓冲液中 30min 后,37℃ 干燥 1-2h 后,在每平方厘米的玻璃纤维纸上均匀喷涂 10-20 μ L 抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物,真空冷冻干燥 1-2h,即得到结合垫,真空封装,4℃ 保存备用。

[0057] (5) 样品垫的处理

[0058] 将玻璃纤维纸浸泡于含 1wt% 牛血清白蛋白、2.5wt% 蔗糖、1wt% 海藻糖、1wt% 吐温-20 的 pH 7.2 的 0.01M PBS 缓冲液中 30min 后取出,37℃ 干燥 2-3h 即得到样品垫,真空封装,4℃ 保存备用。

[0059] (6) 硝酸纤维膜的包被

[0060] 将恶臭假单胞菌超声波破碎液用点膜仪将其包被于硝酸纤维膜上形成检测线,包被量为 1-2 μ L/cm;将兔抗鸡卵黄抗体用点膜仪将其包被于硝酸纤维膜上形成质控线,包被量为 1-2 μ L/cm,即得到特定包被的硝酸纤维素膜,真空冷冻干燥 1-1.5h,真空封装,4℃ 保存备用;其中检测线与质控线相互平行,所述的检测线靠近结合垫端,所述的质控线靠近吸水垫端;恶臭假单胞菌超声波破碎液是将所述的恶臭假单胞菌抗原用 PBS 重悬,经超声波破碎后 4000rpm 离心 5min 所得的上清液。

[0061] (7) 试纸条组装

[0062] 将样品垫 (1)、结合垫 (2)、硝酸纤维膜 (3)、吸水垫 (4) 按图 2 所示的顺序依次粘附在 PVC 底板 (7) 上,PVC 底板作为支撑载体,由下及上是由玻璃纤维纸组成的样品吸收区,然后是吸附了胶体金所标记的卵黄抗体的玻璃纤维层,其次是硝酸纤维素膜,最上一层是吸水层,由滤纸组成,外面用胶带封住,成为手持部分。各层之间均有 1.5mm 左右的重叠交叉。将试纸条切成 4-6mm 宽的小条,真空封装,4℃ 保存。

[0063] 其中步骤 (1) 中采用的 LB 液体培养基的配方如下:胰化蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌;LB 固体培养基的配方如下:胰化蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g、琼脂 15g,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌。

[0064] 步骤 (2) 中的采用的乙酸-乙酸钠缓冲液配方如下:乙酸钠 2.604g、冰乙酸 1.095g,补足双蒸水至 1L,调 pH 至 5.0,高压灭菌。

[0065] 步骤 (3) 中采用的 PBST 缓冲液配制方法如下:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g,500 μ L 吐温-20,补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.4,高压灭菌。

[0066] 步骤 (1) (2) (3) (4)、(5) 中采用 PBS 缓冲液配制方法是:NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g 补足双蒸水至 1L,调节 pH 至 7.2,高压灭菌。

[0067] 具体实施例 3

[0068] 胶体金试纸条对临床样品的检测,具体步骤如下:

[0069] 从当地超市购买鳗鱼、梭子蟹、鲫鱼、虾等各种鱼类样品以及本地各池塘水样,解剖取其肠、鳃和肝等样品共 41 份,将 PBS 缓冲液滴加于组织样品上,破碎组织,2000-3000rpm 离心 5min 后取上清液,将检测试纸条插入待检样品中,10 分钟后观察结果:若只在检测试纸条的质控区出现一条红线者为阳性结果,即样品中带有恶臭假单胞菌;若试纸条的检测线和质控线同时出现红线者为阴性结果,即样品中不含有恶臭假单胞菌。每个样品做 5 次重复,所有临床样品检测结果用酶联免疫吸附法 (ELISA) 进行比较。

[0070] 检测结果见表 1,我们可以看到在收集的 41 份样品中,只有 1 份鳗鱼样品在试纸条检测结果中呈阳性,对于其余各种鱼类样品均为阴性结果。所有检测样品均与 ELISA 结果相同,说明两者具有高度一致性,胶体金试纸条的准确率高达 100%。由此可见,这种研发的恶臭假单胞菌胶体金试纸条是可行的,我们可以通过胶体金试纸条对各养殖场中的发病鱼类进行检测确定病因,从而对症下药,及时防治,防止病情扩大,减少养殖户损失,也可以作为在苗种引进时的一种初步筛选工具,这种胶体金试纸条方便实用,非常适合现场检测。同时,由于恶臭假单胞菌是一种“人-畜-渔”共患病,因此,这种恶臭假单胞菌检测试纸条也可以广泛应用于各大医院进行急诊。

[0071] 表 1 恶臭假单胞菌试纸条检测临床样品结果

[0072]

检测样品	胶体金试纸条	酶联免疫吸附法
虾 (6 只)	—(6); + (0)	—(6); + (0)
鳗鱼 (6 只)	—(5); + (1)	—(5); + (1)
大黄鱼 (6 只)	—(6); + (0)	—(6); + (0)

[0073]

梭子蟹 (8 只)	—(8); + (0)	—(8); + (0)
鲫鱼 (8 只)	—(8); + (0)	—(8); + (0)
池塘水样 (7 份)	—(7); + (0)	—(7); + (0)

[0074] +: 试纸条只出现质控线一条红线,为阳性结果;

[0075] -: 试纸条出现两条红线,为阴性结果。

[0076] 具体实施例 4

[0077] 胶体金试纸条的灵敏度检测,具体步骤如下:

[0078] 按具体实施例 2 中步骤 (1) 的方法,将活化培养的菌液用 LB 液体培养基以 10 的倍数进行梯度稀释,将 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 稀释的菌液在 LB 固体培养基平板上进行涂布,每个稀释度涂三个平板,28℃ 倒置培养 48h 后进行菌落计数,确定恶臭假单胞菌液浓度。用 PBS 缓冲液将培养的恶臭假单胞菌稀释成 10^4 CFU/mL, 10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^7 CFU/mL, 10^8 CFU/mL。吸取恶臭假单胞菌液 (100 μ L) 滴加于检测试纸条的样品垫上,静置 10 分钟后观察结果。以检测线消失的最低检测浓度为其最低检测极限。每种浓度做 5 次重复。

[0079] 检测结果见表 2,我们可以看出在恶臭假单胞菌浓度为 10^4 CFU/mL, 10^5 CFU/mL 时试

纸条上均出现两条线,检测结果为阴性,而当恶臭假单胞菌浓度为 10^6 CFU/mL, 10^7 CFU/mL, 10^8 CFU/mL 时,检测线消失,只有质控线出现一条红色条带,检测结果为阳性。因此,恶臭假单胞菌检测试纸条的检测极限为 10^6 CFU/mL。

[0080] 表 2 恶臭假单胞菌试纸条灵敏度检测结果

[0081]

恶臭假单胞菌浓度	检测结果
10^4 CFU/mL	—
10^5 CFU/mL	—
10^6 CFU/mL	+
10^7 CFU/mL	+
10^8 CFU/mL	+

[0082] +:试纸条只出现质控线一条红线,为阳性结果;

[0083] -:试纸条出现两条红线,为阴性结果。

[0084] 具体实施例 5

[0085] 恶臭假单胞菌检测试纸条的特异性检测,其具体步骤如下:

[0086] 将铜绿假单胞菌、格式乳球菌、弗氏柠檬酸杆菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌、迟钝爱德华菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌和恶臭假单胞菌分别稀释至 10^8 CFU/mL,用制备的试纸条分别检测这 9 种细菌,每种细菌做 5 个重复,10 分钟后观察结果。若试纸条只在质控线出现一条红色条带,则检测结果为阳性,若试纸条的检测区和质控区都分别出现一条红色条带,则检测结果为阴性。

[0087] 检测结果见表 3,我们可以看出用试纸条检测铜绿假单胞菌、格式乳球菌、弗氏柠檬酸杆菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌、迟钝爱德华菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌时,在试纸条的检测线和质控线分别都出现了一条红色条带,即检测结果为阴性;而用试纸条检测恶臭假单胞菌时只在试纸条的质控区出现了一条红色条带,检测结果为阳性。由此可见,这种恶臭假单胞菌检测试纸条具有良好的特异性,它不与铜绿假单胞菌、格式乳球菌、弗氏柠檬酸杆菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌、迟钝爱德华菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌发生交叉反应。

[0088] 表 3 恶臭假单胞菌试纸条特异性检测结果

[0089]

检测样品	检测结果
铜绿假单胞菌	—
格式乳球菌	—
弗氏柠檬酸杆菌	—
哈维氏弧菌	—
鳃弧菌	—
迟钝爱德华菌	—
副溶血弧菌	—
溶藻弧菌	—
恶臭假单胞菌	+

[0090] 当然,上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的

保护范围。

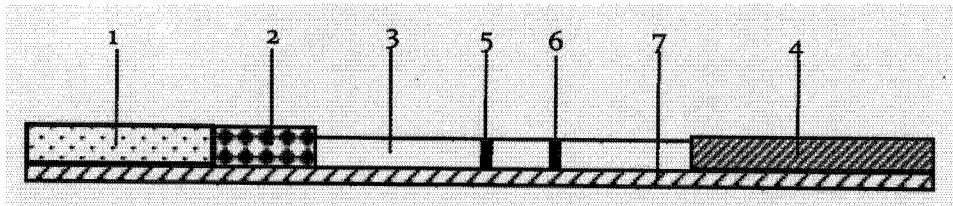


图 1

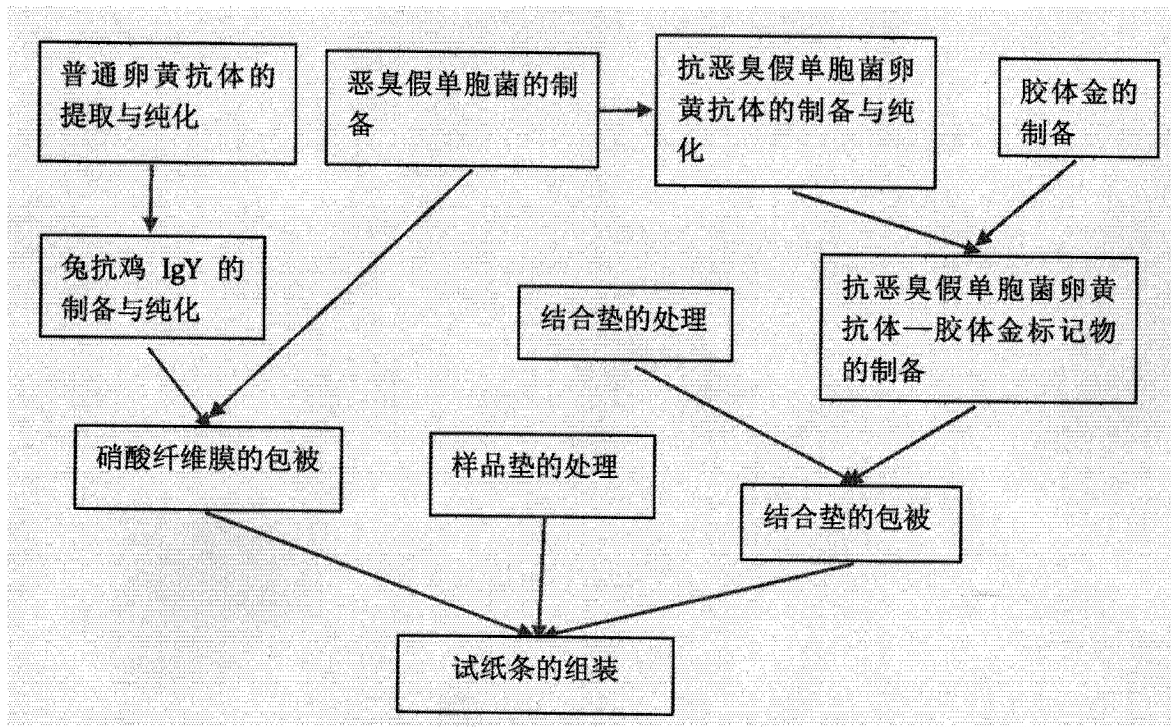


图 2

专利名称(译)	一种恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN104374914A	公开(公告)日	2015-02-25
申请号	CN201410657289.4	申请日	2014-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	章礼平 李登峰 方静 刘联国 刘飞 陈梅娟		
发明人	章礼平 李登峰 方静 刘联国 刘飞 陈梅娟		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56916		
其他公开文献	CN104374914B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种恶臭假单胞菌检测试纸条及其制备方法，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC底板，特点是在PVC底板上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，该结合垫上包被有所述的抗恶臭假单胞菌卵黄抗体-胶体金标记物，该硝酸纤维素膜上分别包被有恶臭假单胞菌超声波破碎液构成的检测线和兔抗鸡卵黄抗体构成的质控线，优点是灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确性高。

检测样品	胶体金试纸条	酶联免疫吸附法
虾(6只)	-(6);+(0)	-(6);+(0)
鳊鱼(6只)	-(5);+(1)	-(5);+(1)
大黄鱼(6只)	-(6);+(0)	-(6);+(0)