

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910084970.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月21日

[11] 公开号 CN 101561436A

[22] 申请日 2009.6.5

[21] 申请号 200910084970.3

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100025 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

[72] 发明人 王静 王振国 谢士嘉 杨宇
孙肖红 胡孔新 张晓龙

[74] 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理有限公司

代理人 尹振启

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

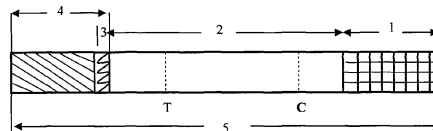
[54] 发明名称

一种单增李斯特菌胶体金试纸条及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开了一种检测试纸，该试纸包含：

(1)反应支持物；(2)吸水垫；(3)硝酸纤维膜，该膜包被有单增李斯特菌 P60 抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；(4)金标抗体吸附膜，其中含有胶体金标记的单增李斯特菌 P60 抗体；(5)样品垫。本发明试纸可以配合小型仪器进行半定量检测，不需专业培训，结果清晰易辨并能客观保存数据，操作简单，易于推广，适合基层，适合于突发事件的现场检测，适合流行病学调查，并对单增李斯特菌的感染诊断起到辅助作用。



1、一种检测试纸，其特征在于，它包含：

(1) 反应支持物；

(2) 吸水垫；

(3) 硝酸纤维膜，该膜包被有单增李斯特菌抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；

(4) 金标抗体吸附膜，其中含有胶体金标记的单增李斯特菌 P60 抗体；

(5) 样品垫。

2、根据权利要求 1 所述的试纸，其中，吸水垫选用滤纸，反应支持物选用 PVC 板，金标抗体吸附膜的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维，样品垫的材料选自聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

3、根据权利要求 1-2 任一项所述的试纸，其中，反应支持物 (5) 位于底层；硝酸纤维膜 (2) 位于反应支持物 (5) 上的中部，该膜的 T 处是单增李斯特菌 P60 多克隆抗体包被的检测条带，并且 C 处是羊抗兔 IgG 包被的质控条带；金标抗体吸附膜 (3) 位于硝酸纤维膜上部的一侧并与之部分重叠，该膜含有胶体金标记的单增李斯特菌 P60 多克隆抗体；吸水垫 (1) 位于硝酸纤维膜 (2) 上部的相对于金标抗体吸附膜 (3) 而言的另一侧并与硝酸纤维膜 (2) 部分重叠；样品垫 (4) 位于硝酸纤维膜 (2) 上与吸水垫 (1) 相反的一侧并与金标抗体吸附膜 (3) 部分重叠。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的试纸，其中，吸水垫一侧为起始端，样品垫一侧为末端，检测抗体的条带位于接近末端，质控条带接近于起始端。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的试纸，其中，所述抗单增李斯特菌的抗体可以是多抗，也可是单抗；质控抗体根据金标抗体的免疫源可选择羊抗兔、鼠抗兔、人抗兔、兔抗羊、鼠抗羊、人抗羊、羊抗鼠、人抗

鼠、兔抗鼠等的 IgG。

6、根据权利要求 1-5 任一项所述的试纸，其中，所述抗单增李斯特菌 P60 多克隆抗体的浓度为 0.5-5mg/ml。

7、根据权利要求 1-6 任一项所述的试纸，其中，质控抗体浓度为 0.1-2 mg/ml。

8、根据权利要求 1-7 任一项所述的试纸，其中，所述抗单增李斯特菌 P60 抗体标记 1ml 胶体金的量为 5-20ug。

9、一种制备权利要求 1-8 任一项所述的单增李斯特菌的检测试纸的制备方法，该方法包括：

(1) 用隔流喷金划线机以一定喷膜速度喷涂抗单增李斯特菌抗体和质控抗体两个条带的硝酸纤维膜；

(2) 制备一种含有胶体金标记的抗单增李斯特菌抗体的玻璃纤维膜，将胶体金标记的抗单增李斯特菌抗体均匀涂布在玻璃纤维膜上，并烘干或冷冻干燥。

10、权利要求 1-8 任一项所述的试纸在检测单增李斯特菌中的应用，其中包括将待测标本与样品稀释液混匀，再将样品混合液加入试纸样品孔处，样品中的液体依靠虹吸作用上行，10-15 分钟判读结果。

11、由权利要求 10 所述的方法制备的检测单增李斯特菌的试纸。

一种单增李斯特菌胶体金试纸条及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于生物检测领域，具体涉及一种单增李斯特菌的检测试纸及其制备方法和在单增李斯特菌中的应用。

背景技术

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 单增李斯特菌)，是李斯特菌属 (*Listeria*) 中最重要的食源性病原菌，也是一种人畜共患的致病菌，属李斯特菌属，它可引起人和动物患脑膜炎、脑炎、败血症、心内膜炎、流产、死胎及脓肿等，发病者死亡率可达30%~40%。近年来已有不少国家报道了由于污染单增李斯特菌发生的食物中毒事件。因此，世界各国政府部门对单增李斯特菌引起的食物中毒越来越重视，纷纷制定了一些新的食品安全法规，并把单增李斯特菌纳入法定强检项目。目前单增李斯特菌的检测方法主要依靠传统的分离培养和生化鉴定，该方法费时费力。胶体金快速诊断试纸条技术是20世纪90年代以来发展起来的一项新型体外诊断技术。近年来该方法发展迅速，在生物医学领域特别是医学检验中得到了广泛应用，但用于食品卫生领域检测的产品较少。本研究针对单增李斯特菌研制出了食品污染单增李斯特菌的免疫胶体金检测试纸条。本研究建立的胶体金检测方法灵敏、准确、特异性强，可进一步应用到检验检疫部门对进出口食品中单增李斯特菌的检测实际工作中。此方法建立后，可与经典常规方法互补，预计将在检验检疫、食品工业部门及卫生监控部门具有较广的应用前景，有一定的经济和社会效益。同时，可为食品微生物检验国际方法的修订或增补提供科学依据。

荧光定量PCR和传统细菌培养，此两种方法检测时间均较长，最快仍需8小时，并且需要指定的实验环境和昂贵的仪器，PCR还易出现假阳性，不适合现场快速检测，并且不能进行定量检测。

发明内容

本发明的目的是提供一种方便、快捷地检测单增李斯特菌的试纸，同时可利用金标免疫分析仪进行的半定量检测方法。该试纸的工作原理是利用特异性抗原-抗体的结合，用胶体金标记抗体，与待检抗原结合后，使与试纸上结合的捕获抗体显色。本发明还涉及制备上述检测试纸的制备方法。

本发明能够基于一份标本和一个试纸，快速方便地检测出标本中的单增李斯特菌，节省了大量人力物力，方便、快速、简捷。

本发明涉及一种方便、快捷地检测单增李斯特菌的检测试纸，它包含：

(1) 反应支持物；

(2) 吸水垫；

(3) 硝酸纤维膜，该膜包被有单增李斯特菌 P60 多克隆抗体（例如可来自吉林省出入境检验检疫局）检测条带和质控羊抗兔 IgG（例如购自鼎国生物技术有限公司）的质控条带。（熊国华，于莉，曹际娟等，单增李斯特菌免疫胶体金试纸条快速检测【J】中国公共卫生杂志 2008 年 2 月第 24 卷第 2 期）

(4) 金标抗体吸附膜，其中含有胶体金标记的单增李斯特菌 P60 多抗。

本发明涉及的上述单增李斯特菌的检测试纸，它还包含样品垫。

本发明涉及的上述单增李斯特菌的检测试纸，其中反应支持物选用 PVC 板。

本发明涉及的上述单增李斯特菌型的检测试纸，其中吸水垫选用滤纸。

本发明涉及的上述单增李斯特菌的检测试纸，其中金标抗体吸附膜选用聚脂膜、玻璃纤维或滤纸纤维。

另一方面，本发明涉及的上述单增李斯特菌的检测试纸，其中吸水垫、硝酸纤维膜、金标抗体吸附膜、样品垫和反应支持物按照附图 1 所示方式构成；反应支持物 5 位于底层，硝酸纤维膜 2 位于反应支持物 5 上的中部，该膜的 T 处是单增李斯特菌 P60 多克隆抗体包被的检测条带，

并且C处是羊抗兔IgG包被的质控条带；金标抗体吸附膜3位于硝酸纤维素膜上部的一侧并与之部分重叠，该膜含有胶体金标记的单增李斯特菌P60多克隆抗体；吸水垫1位于硝酸纤维素膜2上部的相对于金标抗体吸附3而言的另一侧并与2部分重叠；样品垫4位于2上与1相反的一侧并与3部分重叠。

又一方面，本发明涉及的上述单增李斯特菌的检测试纸，以吸水垫一侧为起始端，样品垫一侧为末端，单增李斯特菌P60多克隆抗体的检测条带位于接近末端，羊抗兔IgG包被的质控条带接近于起始端。

本发明再一个目的是提供制备所述检测单增李斯特菌的试纸的方法，该方法包括以下步骤：胶体金探针的制备，金标抗体吸附膜的制备，硝酸纤维素膜的喷涂包被。

1、胶体金探针的制备

(1) 将HAuCl₄先配制为0.01%水溶液。磁力搅拌下准确加入1 ml 1%的HAuCl₄，同时加入1.5-3ml 1%的柠檬酸三钠水溶液。颜色稳定后继续加热，冷却至室温后加纯水补足至100 ml，4℃避光保存。

(2) 用K₂CO₃调PH值为约7-9，优选为约7.8-8.9，更优选约8.2-8.5。

(3) 将胶体金调至pH 8.2-8.5，用5 mM PB (pH 7.2) 稀释抗体至0.2 mg/ml。

(4) 保持胶体金稳定。

本发明还在于提供一种获得维持胶体金稳定的抗体最佳标记剂量的方法，该方法包括：

a. 取10支洁净的1.5 ml离心管，分别加入胶体金溶液1ml。

b. 在1-10号管内分别加入10 ml、20 ml、30 ml、40 ml、50ml、60 ml、70 ml、80 ml、90 ml、100 ml的PBS，再依次加入稀释好的0.2 mg/ml的待标记抗体90 ml、80 ml、70 ml、60 ml、50 ml、40 ml、30 ml、20 ml、10 ml、0 ml，混匀，静置2分钟。

c. 在10个管内分别加入10% NaCl 溶液100 ml，混匀后室温静置2小时，观察颜色变化。

未加抗体及加入量不足以稳定胶体金的试管中的液体颜色呈现由红变蓝的变化，而加入抗体量达到或超过最低稳定剂量的试管则保持红色

不变。与对照管（1号管）相比，颜色最接近、含抗体剂量最低的试管所含的抗体剂量，即为1 ml 胶体金所必须的抗体稳定剂量，在此基础上再加20%抗体，即为抗体最佳标记剂量。本发明经过反复试验和分析，得出的结果表明：维持胶体金溶液适宜抗体量为2-10ug，优选抗体量5-9ug，更优选6.2-8.2ug，最优选为7.2ug。

2、金标抗体吸附膜的制备

取上述 pH 的胶体金以 1ml/管分装于 1.5 ml 的离心管中。每支管中加入 3-8 ug 标记剂量，优选抗体量 4-6 ug，更优选 4.5-5.5 ug，最优选为 5ug 的抗体，轻摇混匀后放置。每管中加入 10%的 BSA100 ?1，混匀放置。将上面初步制得的胶体金探针在 12000 rpm、4℃下离心 30 分钟，弃上清液。每支离心管中加入 1 ml 重悬液悬浮沉淀后同上离心。弃上清液，管底得到暗红色的疏松状沉淀，加入 500 ?1 重悬液重悬后于 4℃，1000 rpm，离心 10 分钟；取上清液，均匀滴加在 1cm 宽的玻璃纤维上，37℃干燥。

3、硝酸纤维膜的喷涂包被

(1) 利用隔流喷金划线机以 50mm/s 的喷膜速度包被单增李斯特菌 P60 多克隆抗体和质控羊抗兔 IgG 两个条带的硝酸纤维膜；

在该喷涂包被膜的步骤中，喷膜速度优选是 10-100mm/s，更优选是 45-55mm/s，最优选是 50mm/s；所述单增李斯特菌 P60 多克隆抗体，其加入量为 1-5mg/ml，该多克隆抗体的稀释液可以为 PBS；质控羊抗兔 IgG 可以购自鼎国生物技术公司，其浓度为 0.1-5 mg/ml 更优选是 0.5-2.5 mg/ml，最优选为 1mg/ml；

(2) 制备一种含有胶体金标记的单增李斯特菌 P60 多抗的玻璃纤维膜，将胶体金标记的单增李斯特菌 P60 多抗均匀涂布在玻璃纤维膜上。抗体用 PBS 稀释，pH 为 7-9，优选 7.5-9，最适 PH 值为 8.5。

本发明还公开了所述试纸在检测单增李斯特菌型中的应用，参见附图 2。

在本发明检测单增李斯特菌的方法中，先将待测标本放入装有稀释液的小瓶内，再用移液器将样品混合液加入试纸“4”处（即末端），样品中的液体依靠虹吸作用上行，一般需 10-15 分钟判读结果：

如标本中含有单增李斯特菌，则它将与试纸上胶体金标记的单增李

斯特菌P60多克隆抗体形成相应的复合物，液体展开上行并与硝酸纤维膜上的单增李斯特菌P60多克隆抗体结合，形成红色线条，即在“T”处形成红色条带。

无论是否含有相对应的抗原，胶体金标记多克隆抗体继续随液体继续上行并与该膜上的羊抗兔IgG形成红色沉淀线，即在“C”处形成红色条带。此线是质控线，如胶体金失效，此线就不会出现，说明试纸失效。

阳性结果会出现2条红色沉淀线，阴性结果出现1条红色沉淀线，如不出现线条说明试纸失效。如若肉眼无法辨别T处红色条带，可利用金标免疫分析仪进行半定量检测。

本发明的技术方案是：采用纯化的单增李斯特菌P60多克隆抗体、和羊抗兔IgG分别固相于硝酸纤维膜上，结合胶体金标记的单增李斯特菌P60多抗，应用膜层析双抗体夹心法的原理检测标本中的单增李斯特菌。

附图说明

图1A本发明试纸的正面示意图。

图1B本发明试纸的侧面示意图。

其中，图1A和1B：1：吸水垫；2：硝酸纤维膜（T：包被单增李斯特菌P60多克隆抗体检测条带；C：包被羊抗兔IgG的质控条带）；3：含有胶体金标记单增李斯特菌P60多克隆抗体的玻璃纤维膜；4：样品垫；5：反应支持物。

图2：检测结果示意图；T、C两条线阳性；C一条线阴性；无效。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1、检测单增李斯特菌的胶体金试纸的制备

1、胶体金探针的制备

（1）将HAuCl₄先配制成0.01%水溶液，取100 ml纯水加热至沸腾。磁力搅拌下准确加入1 ml 1%的HAuCl₄，同时加入1.5 ml 质量分数为1%的柠檬酸三钠水溶液。颜色稳定后继续加热煮沸15分钟，冷却至室温后加纯水补足至100ml，4℃避光保存。

(2) K₂CO₃调PH值为8.2-8.5左右。

(3) 将胶体金调至适宜的pH, 优选8.0-8.5, 更优选8.2, 用5mM PB (pH 7.2) 稀释抗体至0.2 mg/ml。

2、金标抗体吸附膜的制备

取pH 8.2的胶体金以1ml/管分装于1.5 ml的离心管中。每支管中加入最佳标记剂量的抗体, 轻摇混匀后放置5分钟或稍长, 此步为抗体与胶体金颗粒结合。每管中加入10%的BSA 100 ml, 混匀放置15分钟或稍长, 此步为封闭。将上面初步制得的胶体金探针以12000 rpm, 离心30分钟, 4 °C, 弃上清液。每支离心管中加入1 ml重悬液悬浮沉淀后同上离心。弃上清液, 留下管底暗红色疏松状沉淀, 加入500 ml重悬液重悬后于4 °C, 1000 rpm, 离心10分钟; 取上清液, 均匀的滴加在1cm宽的玻璃纤维上, 37° 干燥2.5-3小时。

3、硝酸纤维膜的喷涂包被

(1) 利用隔流喷金划线机以50mm/s的喷膜速度包被单增李斯特菌P60多克隆抗体 (1.5mg/ml+2%BSA)和质控羊抗兔IgG (购自鼎国生物技术公司, 1mg/ml) 两个条带的硝酸纤维膜;

(2) 含有胶体金标记单增李斯特菌P60 7.2ug的玻璃纤维膜, PB稀释; 最适PH值为8.5。

实施例 2、单增李斯特菌检测试纸

参见图 1, 反应支持物为 6.2cm × 0.4cm PCV 板; 吸水垫为 2cm × 0.4cm 的滤油纸; 1.8cm × 0.4cm 的硝酸纤维膜依次包被羊抗兔 IgG (购自鼎国生物技术公司, 1mg/ml), 单增李斯特菌 P60 多克隆抗体 2mg/ml (含有 1%BSA 封闭剂), 含有 0.4cm × 0.4cm 胶体金标记的单增李斯特菌 P60 多克隆抗体 (标金浓度: 7.2ug PB 稀释; 最适 PH 值为 8.5) 玻璃纤维膜; 样品垫为 2.7cm × 0.4cm 的玻璃纤维膜; 即形成了单增李斯特菌检测试纸。

实施例 3、检测方法

参见附图 2, 将待测标本与样品稀释液混匀, 再用移液器将样品混合液加入试纸样品孔处, 样品中的液体依靠虹吸作用上行, 10-15 分钟判

读结果:

如含有单增李斯特菌, 则与试纸上胶体金标记的单增李斯特菌 P60 多抗形成相应的复合物, 上行与包被在硝酸纤维膜上的流单增李斯特菌 P60 多抗结合, 形成红色线条, 即在“T”处形成红色条带。

无论是否含有相对应的抗原, 胶体金标记多抗继续向上爬行与包被在膜上的羊抗兔 IgG 形成红色沉淀线, 即在“C”处形成红色条带。此线是质控线, 如胶体金失效, 此线就不会出现, 说明试纸失效。

阳性结果会出现 2 条红色沉淀线, 阴性结果出现 1 条红色沉淀线, 如不出现线条说明试纸失效。

实施例 4、DJM-3 定量金标免疫分析仪半定量检测

- 1、可先用检测法检测单增李斯特菌试纸条 20 个阴性值, 利用金标仪检测其 T/C 的比值平均计算出金葡菌肠毒素 B 型试纸条的定阈值。
- 2、其次利用定阈值来用金标仪机器检测单增李斯特菌试纸条能达到的最低浓度。
- 3、判读结果时大于或等于定阈值为阳性, 小于定阈值为阴性。

检测不同浓度单增李斯特菌, 经过计算判定值 (CUT-OFF) 为 0.017, 浓度为 10¹ cfu/ml、10² cfu/ml 的单增李斯特菌的平均 T/C 比值为 0.00, 低于 0.017, 为阴性; 10³cfu/ml~10⁸ cfu/ml 的单增李斯特菌的平均 T/C 比值分别为 0.02~0.115, 结果均为阳性; 当单增李斯特菌浓度大于 10³cfu/ml 时, T/C 比值平均值大于 0.017, 故定量检测灵敏度为 10³cfu/ml。

表 1 单增李斯特菌胶体金免疫层析试纸条各浓度检测结果

序号	检测值 T (V)		质控值 C (V)		T/C			结果判读
	T ₁	T ₂	C ₁	C ₂	T/C ₁	T/C ₂	T/C _平	
阴性	0.003	0	0.557	0.553	0	0	0	-
10 ¹ cfu/ml	0.00	0.00	0.602	0.589	0	0	0	-
10 ² cfu/ml	0.00	0.00	0.611	0.654	0	0	0	-
10 ³ cfu/ml	0.015	0.013	0.589	0.636	0.02	0.02	0.02	+
10 ⁴ cfu/ml	0.088	0.085	0.717	0.796	0.12	0.11	0.115	+

10^5 cfu/ml	0.216	0.03	1.028	0.753	0.25	0.04	0.145	+
10^6 cfu/ml	2.713	1.129	14.454	9.004	0.188	0.125	0.1565	+
10^7 cfu/ml	2.066	1.487	10.222	11.662	0.202	0.128	0.165	+
10^8 cfu/ml	2.806	1.188	15.024	11.464	0.187	0.164	0.1755	+

本发明的优点:

本发明所述的试纸可以配合小型仪器进行半定量检测, 不需专业培训, 结果清晰易辨并能客观保存数据, 操作简单, 易于推广, 适合基层, 适合于突发事件的现场检测, 适合流行病学调查, 并对单增李斯特菌的感染诊断起到辅助作用。

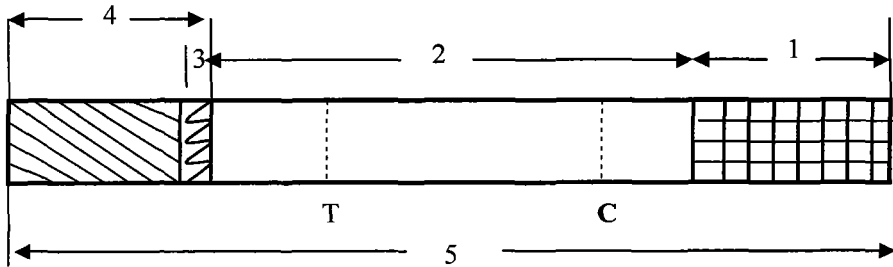


图 1A

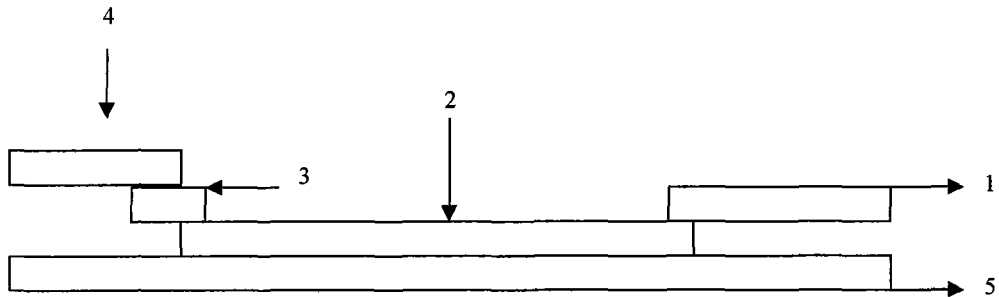


图 1B

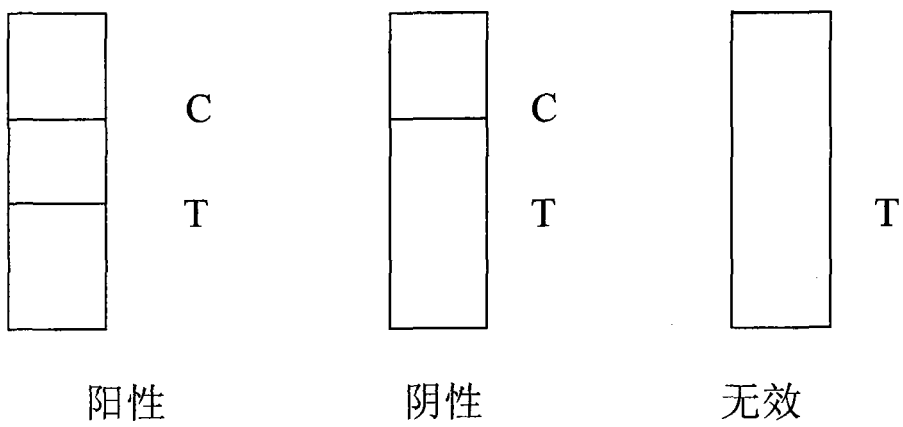


图 2

专利名称(译)	一种单增李斯特菌胶体金试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101561436A	公开(公告)日	2009-10-21
申请号	CN200910084970.3	申请日	2009-06-05
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	王静 王振国 谢士嘉 杨宇 孙肖红 胡孔新 张晓龙		
发明人	王静 王振国 谢士嘉 杨宇 孙肖红 胡孔新 张晓龙		
IPC分类号	G01N33/551 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/569 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测试纸，该试纸包含：(1)反应支持物；(2)吸水垫；(3)硝酸纤维膜，该膜包被有单增李斯特菌P60抗体和质控抗体的检测条带和质控条带；(4)金标抗体吸附膜，其中含有胶体金标记的单增李斯特菌P60抗体；(5)样品垫。本发明试纸可以配合小型仪器进行半定量检测，不需专业培训，结果清晰易辨并能客观保存数据，操作简单，易于推广，适合基层，适合于突发事件的现场检测，适合流行病学调查，并对单增李斯特菌的感染诊断起到辅助作用。

