

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 12 月 14 日 (14.12.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/211214 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/577 (2006.01) **G01N 33/531** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/086561
- (22) 国际申请日: 2017 年 5 月 31 日 (31.05.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610396856.4 2016年6月7日 (07.06.2016) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800
号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 匡华(KUANG, Hua); 中国江苏省无锡市
滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122
(CN)。 王文彬(WANG, Wenbin); 中国江苏省

无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 胥传来(XU, Chuanlai); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 徐丽广(XU, Liguang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 马伟(MA, Wei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 刘丽强(LIU, Liqiang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 吴晓玲(WU, Xiaoling); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 宋珊珊(SONG, Shanshan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号胡拥明, Jiangsu 214122 (CN)。 胡拥明(HU, Yongming); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(54) Title: PREPARATION METHOD OF *SALMONELLA*-DETECTING COLLOIDAL GOLD TEST STRIP FOR FOOD BASED ON *SALMONELLA* CORE POLYSACCHARIDE MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 发明名称: 基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法

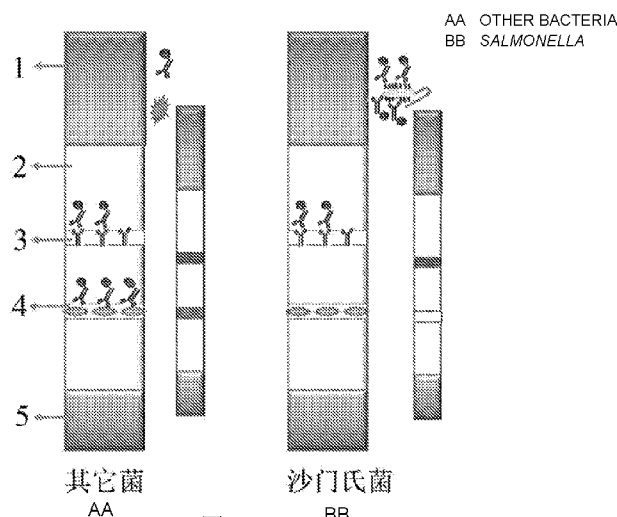


图 1

(57) Abstract: The present invention relates to the field of immunological assays, and provides a preparation method of a *Salmonella*-detecting colloidal gold test strip for food based on a *Salmonella* core polysaccharide monoclonal antibody SQX6D8. A conjugate of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide (LPS) synthesized by a sodium periodate-based method with bovine serum albumin (BSA) is used as a coating antigen of a test line (T line) of the colloidal gold test strip. The *Salmonella* core polysaccharide monoclonal antibody SQX6D8 is used as a gold-labeled antibody. In contrast to the sandwich principle employed by conventional pathogenic bacterium colloidal gold test strips, the *Salmonella* colloidal gold test strip method of the present invention employs a concept of indirect competition to perform an assay; in addition, a monoclonal antibody specific to a *Salmonella* core polysaccharide is used to ensure that the method is cross-reactive with a bacterium in the *Salmonella* genus and is not cross-reactive with a bacterium not in the *Salmonella* genus, thus providing an analytical means to a comprehensive, simple, convenient, and rapid assay for detecting *Salmonella* in food.

(74) 代理人: 北京中恒高博知识产权代理有限公司 (BEIJING CHINAGOURB INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市朝阳区东土城路8号夏晏平, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明 (细则13之二. 4(d) (i) 和 48. 2(a) (viii))。

(57) 摘要: 基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法, 属于免疫分析领域。以高碘酸钠法合成的鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 (LPS) 与牛血清白蛋白 (BSA) 的偶联物作为胶体金试纸条测试线 (T线) 的包被原, 以沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8作为金标抗体。区别于常规致病菌胶体金试纸条夹心法的原理, 该沙门氏菌胶体金试纸条方法采用间接竞争原理进行检测, 并且沙门氏菌属核心多糖特异性单克隆抗体保证了方法对属内沙门氏菌均有交叉同时对属外细菌无交叉反应, 为食品中沙门氏菌属的全面、简便、快速检测提供了分析手段。

基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法

5 技术领域

本发明涉及一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法，属于免疫分析领域。

背景技术

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是一种全球性的食源性致病菌。生物学上沙门氏菌是一类两端钝圆的革兰氏阴性菌，无芽孢，一般无荚膜，主要抗原有 O 抗原、H 抗原、Vi 抗原。动物性食品如禽肉、蛋类、乳品容易污染沙门氏菌。人体摄入含菌食物后会引发急性肠胃炎，伤寒，免疫力低下的儿童等人群中甚至出现败血症等症状。

沙门氏菌有 2000 多种血清型，临床中常见的血清型主要是肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌等。良好规范的生产操作过程和危害分析与关键点控制 (HACCP) 等管理体系的应用可以很大程度上减少食源性致病菌的发生。然而对原料和生产过程、产品的质量监测也是保障食品生物安全的重要手段。

目前检测沙门氏菌的方法主要有生化培养法、免疫学检测方法、分子检测方法。传统的生化培养法是检测沙门氏菌的国标方法，尽管权威可靠，但一般需要 5-10 天得到结果，且操作过程繁琐，不能适应快速检测的要求；分子检测方法是基于沙门氏菌脱氧核糖核酸 (DNA) 聚合酶链式反应 (PCR) 建立起来的。目前发展为传统 PCR、实时荧光定量 PCR (RT-PCR)、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。与传统 PCR 相比，RT-PCR 具有实现定量检测目标 DNA、特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点。LAMP 方法具有简单、快速、特异性强的特点。该技术在灵敏度、特异性和检测范围等方面不亚于常规 PCR 技术，不依赖专门的仪器设备，可以现场高通量快速检测，而且检测成本远低于实时荧光定量 PCR。然而，有文献报道 LAMP 方法在检测牛乳中的沙门氏菌时，会出现假阴性的问题。这可能是与引物受到样品基质影响所引起的。同样常规 PCR 和实时荧光 PCR 也面临着检测成本高、对操作人员技术要求较高的问题。

胶体金试纸条方法检测病原微生物具有简便、快速、成本低的优点。目前在菌属水平上检测沙门氏菌的胶体金试纸条未见报道，主要难点集中在交叉均一、亲和力高的单克隆抗体的制备，以及用于双抗体夹心的配对抗体的获得。在之前的专利中我们公开了交叉性免疫原的合成 (专利申请号：201410314040.3)、交叉型双抗体夹心法 ELISA 方法的建立 (201510183851.9)。然而用配对抗体建立胶体金试纸条方法时面临着 T 线不显色的问题，其中原因可能有：(1) 筛选的单克隆抗体的亲和力满足 ELISA 但不足以满足胶体金试纸条要求；(2) 核心多糖难以暴露在菌体表面，在胶体金试纸条方法反应时间很

短(10 min)的情况下,固定在T线的抗体难以有效捕获样品中的沙门氏菌。因此,我们采用新制备的、具有更高亲和力的单克隆抗体 SQX6D8,并合成异源 LPS 偶联物作为 T 线包被原,用竞争法原理进行检测,克服了 T 线上抗体难以捕获沙门氏菌的难题。该方法对测试的 12 株沙门氏菌的检测灵敏度为 $10^5 - 5 \times 10^6$ CFU/mL,交叉较为均一,同时对于其它测试菌如 E.coli、E.coli O157:H7、阪崎肠杆菌、空肠弯曲菌、结肠弯曲杆菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应。

发明内容

本发明的目的是建立一种在菌属水平上检测沙门氏菌属的胶体金试纸条,用于食品中沙门氏菌属的高特异性、高准确性快速检测。

本发明的技术方案,为实现上述目的,本发明建立了一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的竞争法原理检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条方法,该方法还包括优化过程。

其中,单克隆抗体 SQX6D8 是采用 EDC 法 LPS-BSA 人工抗原作为免疫原免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠并经杂交瘤技术融合、筛选得到的,具有亲和力高、抑制效果好的特点。

其中,T 线包被原采用 NaIO_4 法合成的 LPS-BSA 偶联物,相比同源的 EDC 法 LPS-BSA 抑制效果更好。

本发明方法的检测分析原理:采用间接竞争原理进行检测,测试线(T 线)喷有合成的 LPS-BSA 偶联物做包被原,沙门氏菌核心多糖特异性单克隆抗体 SQX6D8 与红色的金纳米粒子进行偶联作为金标抗体。检测时,样品中的沙门氏菌先与金标抗体结合从而抑制了金标抗体与 T 线上包被原的结合,T 线的显色强度与样品中沙门氏菌的数量成反比。沙门氏菌属核心多糖特异性单克隆抗体保证了方法对属内沙门氏菌均有交叉同时对属外细菌无交叉反应。

一株基于沙门氏菌核心多糖的单克隆细胞株 SQX6D8,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称 CGMCC,保藏编号为 CGMCC No.12019。

基于沙门氏菌核心多糖的单克隆抗体 SQX6D8,它由所述保藏编号为 CGMCC No.12019 的单克隆细胞株 SQX6D8 分泌产生。

一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法,具体步骤为:

(1) 沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的制备:采用保藏编号为 CGMCC No.12019 的菌株免疫得到单克隆抗体;

(2) T 线包被原 LPS-BSA 偶联物的合成:

a、活化:取突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 10mg 用超纯水溶解按照反应质量比 NaIO_4 :Ra-LPS 5:1 滴加 47 μL 浓度为 200mM/L 的 NaIO_4 溶液到突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 溶液中,25℃反应 2h;然后取 10 μL 1M/L 的乙二醇溶液到反应液中,25℃反应 2h;

b、偶联：按照反应摩尔比 Ra-LPS : BSA 为 5 : 1 的比例将步骤 a 活化后的突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 反应液滴加到 BSA 溶液中，用 0.01M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 CB 调节反应液 pH 至 8.5；室温反应过夜，透析后即得到合成的 LPS-BSA 偶联物；

5 (3) 金纳米粒子的合成：采用柠檬酸还原法合成 30nm 的金纳米粒子，在洗净的烧瓶中加入 300mL 质量浓度 0.01% 的氯金酸溶液，在磁力搅拌下加热至完全沸腾，向溶液中快速加入 4.8mL 质量浓度 1% 的柠檬酸三钠溶液，将溶液煮沸 10min 直至颜色变为透亮的酒红色，将烧瓶置于室温冷却，并在 4℃ 保藏；

(4) 金标抗体的偶联：用 0.1M 碳酸钾溶液将 1mL 胶体金溶液 pH 调至 8；
10 加入 10μg 的沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 并在室温下反应 2h；加入 50 μL 质量体积比 10% 的 BSA 溶液进行封闭，室温反应 2h；4℃、6000g、20min 条件下离心胶体金溶液，去除未偶联的胶体金和单克隆抗体；用含有 0.2% Tween、0.2% 蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤金标抗体；

(5) 金标试纸条的制备：将硝酸纤维素膜固定于 PVC 底板上，将吸水垫
15 粘附在硝酸纤维素膜与 PVC 底板靠近质控线的一端，将样品垫粘附在硝酸纤维素膜与 PVC 底板的靠近测试线的另一端；质控线与测试线之间间隔 6mm；将 LPS-BSA 偶联物用喷膜机喷至测试线处，0.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 二抗喷至质控线处；37℃ 烘干 2h 并切条备用，得到基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条。

20 所述沙门氏菌包括 12 株，依次为甲型副伤寒 (A 群)，阿贡那沙门 (B 群)、鼠伤寒沙门 (B 群)、乙型副伤寒 (B 群)、汤普逊沙门 (C1 群)、布洛克利沙门 (C2 群)、肯塔基沙门 (C3 群)、肠炎沙门 (D 群)、伤寒沙门 (D 群)、都柏林沙门 (D 群)、鸭沙门 (E 群)、亚利桑那沙门。

本发明的有益效果：本发明提供的沙门氏菌属特异性胶体金试纸条不同于
25 常规大分子胶体金试纸条双抗体夹心法的原理，而是采用了竞争法进行检测。

沙门氏菌核心多糖特异性的单克隆抗体 SQX6D8 亲和力更高、交叉较均一，通过合成的 LPS-BSA 偶联物作为 T 线包被原与样品中沙门氏菌竞争 SQX6D8 偶联金纳米粒子的金标抗体，建立的胶体金试纸条可以在菌属水平上检测沙门氏菌，并与其它测试菌没有交叉反应。该方法操作简便快速、稳定性好、成本
30 低的特点，具有推广和应用价值。

生物材料样品保藏：单克隆细胞株 SQX6D8，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，保藏日期：2016 年 1 月 20 日，保藏编号 CGMCC No.12019。

35 附图说明

图 1 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条的原理示意图。

图 2 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条检测突变型脂多糖 (RaLPS)。

图 3 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条检测沙门氏菌。

图 4 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条交叉反应。

具体实施方式

实施例 1

5 该胶体金试纸条开发的具体步骤为：

(1) 沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的制备：

采用专利申请号：201410314040.3 中公开的免疫原合成方法，用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 法合成突变型沙门氏菌脂多糖 (Ra-LPS) 与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 完全抗原，并作为
10 免疫原免疫小鼠，通过常规细胞融合以及 LPS、不同 O 抗原的沙门氏菌菌体作为包被原进行阳性细胞筛选，最终制备了对沙门氏菌属内亲和力高，交叉较均一的属特异性单克隆抗体 SQX6D8。

(2) T 线包被原 LPS-BSA 偶联物的合成：采用专利申请号：2014103140403 中公开的合成方法合成偶联物，具体步骤如下：

15 a、活化：取突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 10mg 用超纯水溶解，按照反应质量比 NaIO_4 : Ra-LPS 5 : 1 滴加 47 μL 浓度为 200mM/L 的 NaIO_4 溶液到突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 溶液中，25℃ 反应 2h；然后取 10 μL 1M/L 的乙二醇溶液到反应液中，25℃ 反应 2h；

b、偶联：按照反应摩尔比 Ra-LPS : BSA 为 5 : 1 的比例将活化后的突变型
20 鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 反应液滴加到 BSA 溶液中，用 0.01M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 CB 调节反应液 pH 至 8.5；室温反应过夜，透析后即得到合成的 LPS-BSA 偶联物；

(3) 金纳米粒子的合成：采用柠檬酸还原法合成 30nm 的金纳米粒子，在洗净的烧瓶中加入 300mL 质量浓度 0.01% 的氯金酸溶液，在磁力搅拌下加热至
25 完全沸腾，向溶液中快速加入 4.8mL 质量浓度 1% 的柠檬酸三钠溶液，将溶液煮沸 10min 直至颜色变为透亮的酒红色，将烧瓶置于室温冷却，并在 4℃ 保藏；

(4) 金标抗体的偶联：用 0.1M 碳酸钾溶液将 1mL 胶体金溶液 pH 调至 8；加入 10 μg 的沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 并在室温下反应 2h；加入
30 50 μL 10% (M/V) 的 BSA 溶液进行封闭，室温反应 2h。4℃、6000g、20min 条件下离心胶体金溶液，去除未偶联的胶体金和单克隆抗体；用含有 0.2% Tween、0.2% 蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤金标抗体；

(5) 金标试纸条的制备：在聚氯乙烯 PVC 底板和硝酸纤维素膜 2 上按图示位置固定吸水垫 1 和样品垫 5，依次标记好测试线 4 和质控线 3 的位置，间隔
35 6mm；将 LPS-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG 二抗 (0.5mg/mL) 用喷膜机 BioJet Quanti3000 分别喷至测试线 4 和质控线 3 处；37℃ 烘干 2h 并切条备用。

实施例 2 采用该胶体金试纸条检测沙门氏菌 Ra LPS:

首先将 Ra LPS (1mg/mL) 用 0.01M 的磷酸盐缓冲液梯度稀释到 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL 和 5 ng/mL，空白 0.01M 的磷酸盐缓冲液作对照；随后采用湿法检测 Ra LPS，取 7 μL 实施例 1 步骤(4)中制备的金标抗体与 47 μL

重悬液（0.1% Tween、0.2%蔗糖,1% BSA 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液）到微孔板中，用移液枪混合。将不同浓度的 Ra LPS 各取 150 μL 分别加入不同的微孔板中，用移液枪混合均匀，室温反应 5 分钟；将制备的胶体金试纸条插入微孔板中，室温反应 10 分钟后进行判读。判读依据：空白样品，质控线和测试线同时有颜色，且测试线显色较深，阳性样品。质控线有颜色，测试线显色与空白样品相比很浅或不显色，阴性样品。具体检测结果如图 2 所示。

实施例 3 采用该胶体金试纸条检测 12 株沙门氏菌：

12 株菌株依次为甲型副伤寒（A 群）CMCC 50093、阿贡那沙门（B 群）CICC 21586、乙型副伤寒（B 群）CMCC 50094、鼠伤寒沙门（B 群）ATCC 13311、汤普逊沙门（C1 群）CICC21480、布洛克利沙门（C2 群）CICC 21489、肯塔基沙门（C3 群）CICC 21488、肠炎沙门（D 群）ATCC13076、伤寒沙门氏菌（D 群）CMCC 50071、都柏林沙门（D 群）CICC 21497、鸭沙门（E 群）CICC21498、亚利桑那沙门 ATCC 13314。

具体检测过程为：将测试的沙门氏菌纯培养物用 0.01M 的磷酸盐缓冲液梯度稀释到 10^7 CFU/mL， 10^6 CFU/mL， 10^5 CFU/mL 和 10^4 CFU/mL，用稀释液做空白对照，其它过程同实施例 2。具体检测结果如图 3 所示。

实施例 4 测试沙门氏菌属特异性胶体金试纸条的交叉反应：

8 株测试的其它细菌分别是：金黄色葡萄球菌，单增李斯特菌，大肠杆菌 O157，普通大肠杆菌，克罗诺肠杆菌，副溶血性弧菌，空肠弯曲杆菌，结肠弯曲杆菌。测试浓度均为 5×10^8 CFU/mL，检测过程同实施例 2，结果如图 4 所示。

权 利 要 求 书

1、一株基于沙门氏菌核心多糖的单克隆细胞株 SQX6D8，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，简称 CGMCC，保藏编号为 CGMCC No.12019。

2、基于沙门氏菌核心多糖的单克隆抗体 SQX6D8，其特征在于：它由所述保藏编号为 CGMCC No.12019 的单克隆细胞株 SQX6D8 分泌产生。

3、一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法，其特征在于具体步骤为：

(1) 沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的制备：采用保藏编号为 CGMCC No.12019 的菌株免疫得到单克隆抗体；

(2) T 线包被原 LPS- BSA 偶联物的合成：

a、活化：取突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 10mg 用超纯水溶解，按照反应质量比 NaIO_4 : Ra-LPS 5 : 1 滴加 47 μL 浓度为 200mM/L 的 NaIO_4 溶液到突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 溶液中，25℃ 反应 2h；然后取 10 μL 1M/L 的乙二醇溶液到反应液中，25℃ 反应 2h；

b、偶联：按照反应摩尔比 Ra-LPS : BSA 为 5 : 1 的比例将步骤 a 活化后的突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖 Ra-LPS 反应液滴加到 BSA 溶液中，用 0.01M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 CB 调节反应液 pH 至 8.5；室温反应过夜，透析后即得到合成的 LPS-BSA 偶联物；

(3) 金纳米粒子的合成：采用柠檬酸还原法合成 30nm 的金纳米粒子，在洗净的烧瓶中加入 300mL 质量浓度 0.01% 的氯金酸溶液，在磁力搅拌下加热至完全沸腾，向溶液中快速加入 4.8mL 质量浓度 1% 的柠檬酸三钠溶液，将溶液煮沸 10min 直至颜色变为透亮的酒红色，将烧瓶置于室温冷却，并在 4℃ 保藏；

(4) 金标抗体的偶联：用 0.1M 碳酸钾溶液将 1mL 胶体金溶液 pH 调至 8；加入 10 μg 的沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 并在室温下反应 2h；加入 50 μL 质量体积比 10% 的 BSA 溶液进行封闭，室温反应 2h；4℃、6000g、20min 条件下离心胶体金溶液，去除未偶联的胶体金和单克隆抗体；用含有 0.2% Tween、0.2% 蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液洗涤金标抗体；

(5) 金标试纸条的制备：将硝酸纤维素膜 (2) 固定于 PVC 底板 (7) 上，将吸水垫 (1) 粘附在硝酸纤维素膜 (2) 与 PVC 底板 (7) 靠近质控线 (3) 的一端，将样品垫 (5) 粘附在硝酸纤维素膜 (2) 与 PVC 底板 (7) 的靠近测试线 (4) 的另一端；质控线 (3) 与测试线 (4) 之间间隔 6mm；将 LPS 与 BSA 偶联物用喷膜机喷至测试线 (4) 处，0.5mg/mL 的羊抗鼠 IgG 二抗喷至质控线 (3) 处；37℃ 烘干 2h 并切条备用，得到基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体

SQX6D8 的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条。

4、根据权利要求 3 所述基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体 SQX6D8 的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法，其特征在于：所述沙门氏菌包括 12 株，依次为甲型副伤寒（A 群），阿贡那沙门（B 群）、鼠伤寒沙门（B 群）、乙型副伤寒（B 群）、汤普逊沙门（C1 群）、布洛克利沙门（C2 群）、肯塔基沙门（C3 群）、肠炎沙门（D 群）、伤寒沙门（D 群）、都柏林沙门（D 群）、鸭沙门（E 群）、亚利桑那沙门。

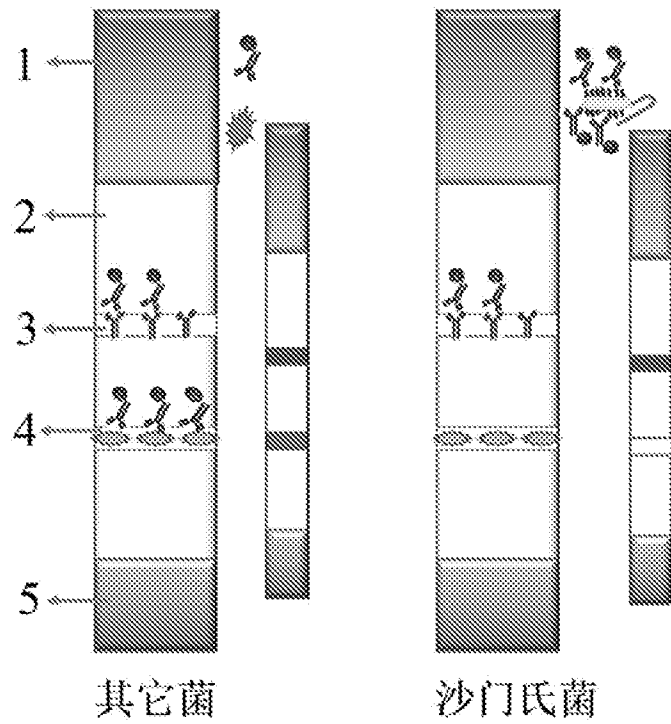


图 1

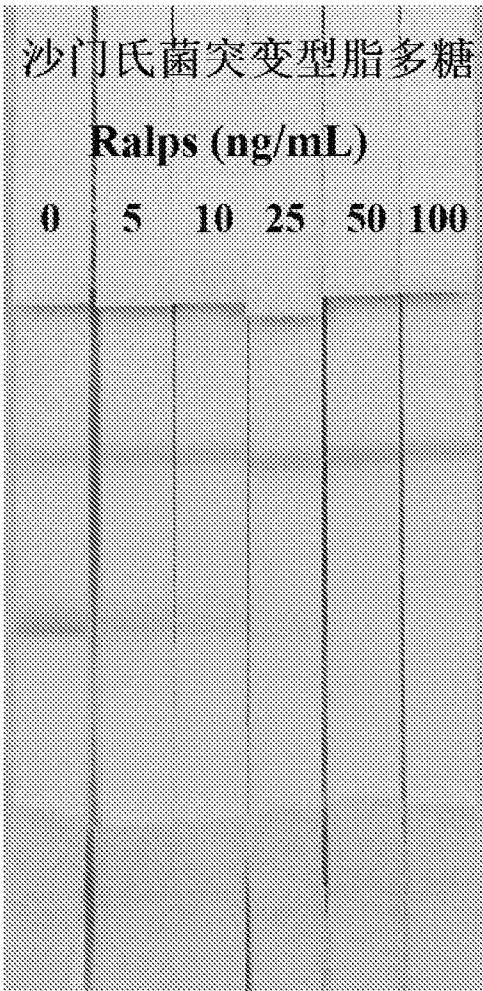


图 2

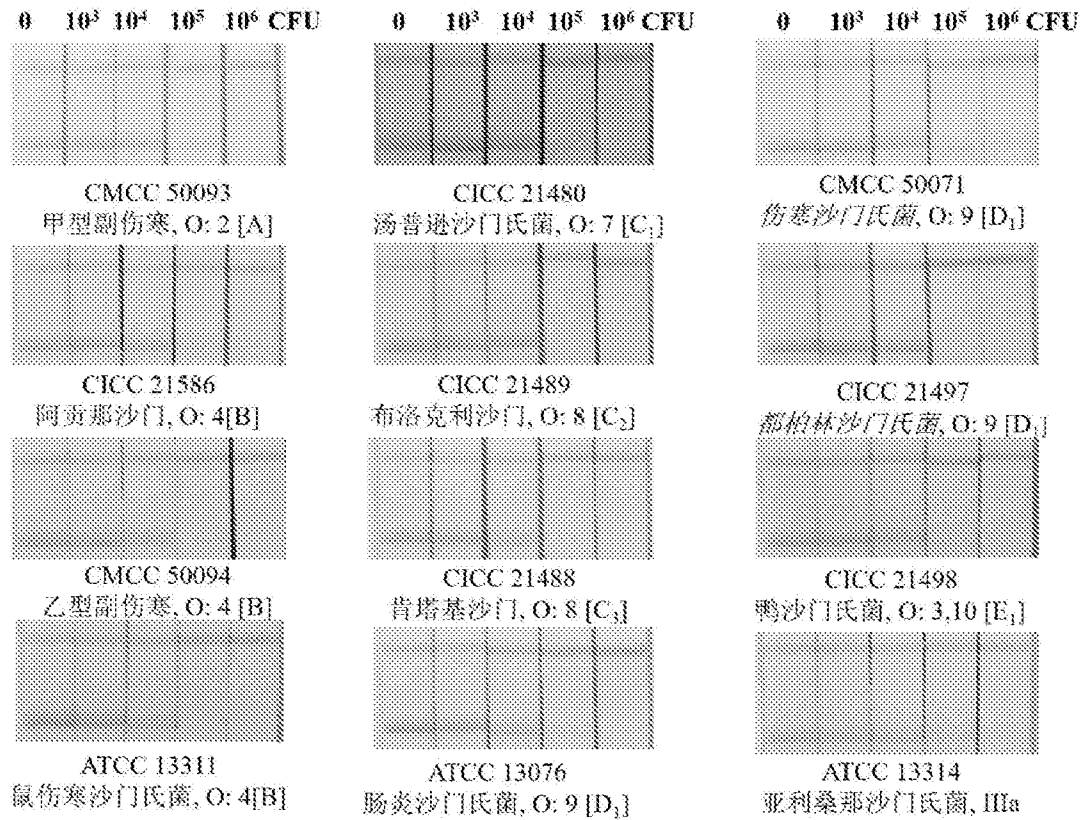


图 3

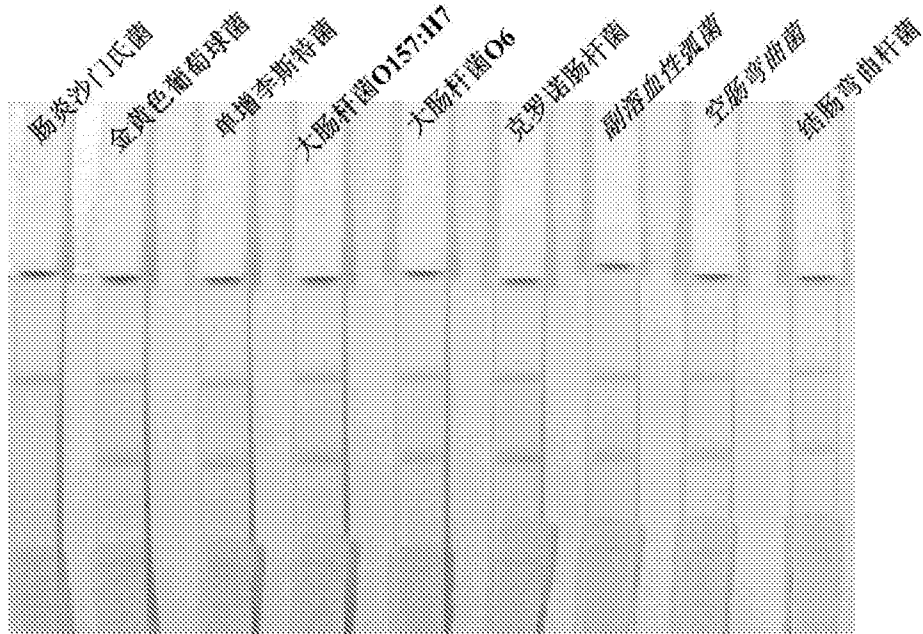


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/086561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/577 (2006.01) i; G01N 33/531 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED: JIANGNAN UNIVERSITY; KUANG, Hua; WANG, Wenbin; XU, Chuanlai; XU, Liguang; MA, Wei; LIU, Liqiang; WU, Xiaoling; SONG, Shanshan; HU, Yongming; petrifilm plate, GICA, detecting plate, reagent strip, test tape, core polysaccharide, strip, immuno chromatography, dipstick, test piece, indicator paper, test paper, reagent paper, lateral flow, salmonella, gold, competitive, LPS, lipopolysaccharide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106093409 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 09 November 2016 (09.11.2016), claims 1-4	1-4
X	CN 104792991 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 22 July 2015 (22.07.2015), claim 1, and description, paragraph [0006]	1-2
Y	CN 104792991 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 22 July 2015 (22.07.2015), claim 1, and description, paragraph [0006]	3-4
Y	CN 103940991 A (HENAN ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 23 July 2014 (23.07.2014), abstract, and description, paragraphs [0027]-[0038]	3-4
Y	LIU, D.F. et al., "An Immuno-Magnetic Nanobead Probe Competitive Assay for Rapid Detection of Salmonella Choleraesuis", JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, volume 16, 31 March 2016 (31.03.2016), abstract	3-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 July 2017 (24.07.2017)	Date of mailing of the international search report 02 August 2017 (02.08.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Juanjuan Telephone No.: (86-10) 82246978

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/086561**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004132211 A1 (LI, J.K. et al.), 08 July 2004 (08.07.2004), description, pages 2-5	3-4
A	CN 103941006 A (UNIVERSITY OF SHANGHAI FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY), 23 July 2014 (23.07.2014), the whole document	1-4
A	CN 101839908 A (LI, Jinbo), 22 September 2010 (22.09.2010), the whole document	1-4
A	EP 0884594 A2 (TORELLI, G.), 16 December 1998 (16.12.1998), the whole document	1-4
A	US 2007238138 A1 (ROYDS, R.B. et al.), 11 October 2007 (11.10.2007), the whole document	1-4
A	SINGH, J. et al., "Nanogold Based Lateral Flow Assay for the Detection of Salmonella Typhi in Environmental Water Samples", ANALYTICAL METHODS, volume 7, 31 December 2015 (31.12.2015), pages 9281-9288	1-4
A	WU, B. et al., "Determination of Salmonella Pulum with Nanoparticles Immune Based Lateral Flow Strip Assay", ADVANCES IN MICROBIOLOGY, volume 5, 25 May 2015 (25.05.2015), pages 364-369	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/086561

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106093409 A	09 November 2016	None	
CN 104792991 A	22 July 2015	CN 104792991 B	17 August 2016
CN 103940991 A	23 July 2014	CN 103940991 B	16 March 2016
US 2004132211 A1	08 July 2004	AU 2003295448 A1	14 July 2004
		EP 1565745 A4	27 June 2007
		EP 1565745 A2	24 August 2005
		AU 2003295448 A8	14 July 2004
		US 7241626 B2	10 July 2007
		WO 2004057301 A3	23 September 2004
		WO 2004057301 A2	08 July 2004
CN 103941006 A	23 July 2014	CN 103941006 B	30 December 2015
CN 101839908 A	22 September 2010	CN 101839908 B	20 August 2014
EP 0884594 A2	16 December 1998	IT MI971406 A1	14 December 1998
		IT 1292163 B1	25 January 1999
		IT MI971406 D0	13 June 1997
		EP 0884594 A3	30 December 1998
US 2007238138 A1	11 October 2007	EP 2008104 A2	31 December 2008
		US 2009136633 A1	28 May 2009
		US 7776266 B2	17 August 2010
		US 7527765 B2	05 May 2009
		WO 2007116324 A3	31 January 2008
		WO 2007116324 A2	18 October 2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/086561

A. 主题的分类 G01N 33/577(2006.01)i; G01N 33/531(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N 33 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED:江南大学, 匡华, 王文彬, 胥传来, 徐丽广, 马伟, 刘丽强, 吴晓玲, 宋珊珊, 胡拥明, 试纸, 检测片, 免疫层析, GICA, 检测板, 试剂条, 试条, 测试带, 沙门氏, 金, 竞争, 脂多糖, LPS, 核心多糖, strip, immuno chromatography, dipstick, test piece, indicator paper, test paper, reagent paper, lateral flow, salmonella, gold, competitive, LPS, lipopolysaccharide		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106093409 A (江南大学) 2016年 11月 9日 (2016 - 11 - 09) 权利要求1-4	1-4
X	CN 104792991 A (江南大学) 2015年 7月 22日 (2015 - 07 - 22) 权利要求1、说明书第【0006】段	1-2
Y	CN 104792991 A (江南大学) 2015年 7月 22日 (2015 - 07 - 22) 权利要求1、说明书第【0006】段	3-4
Y	CN 103940991 A (河南省农业科学院) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 摘要, 说明书【0027】-【0038】段	3-4
Y	LIU, D.F. 等. "An immuno-magnetic nanobead probe competitive assay for rapid detection of salmonella choleraesuis" Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 第16卷, 2016年 3月 31日 (2016 - 03 - 31), 摘要	3-4
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2017年 7月 24日		2017年 8月 2日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		李娟娟
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)82246978

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	US 2004132211 A1 (LI, J.K. 等) 2004年 7月 8日 (2004 - 07 - 08) 说明书第2-5页	3-4
A	CN 103941006 A (上海理工大学) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 全文	1-4
A	CN 101839908 A (李金波) 2010年 9月 22日 (2010 - 09 - 22) 全文	1-4
A	EP 0884594 A2 (TORELLI GIORGIO) 1998年 12月 16日 (1998 - 12 - 16) 全文	1-4
A	US 2007238138 A1 (ROYDS, R.B. 等) 2007年 10月 11日 (2007 - 10 - 11) 全文	1-4
A	SINGH, J. 等. "Nanogold based lateral flow assay for the detection of Salmonella typhi in environmental water samples" Analytical Methods, 第7卷, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 第9281 - 9288页	1-4
A	WU, B. 等. "Determination of Salmonella pullorum with Nanoparticles Immune Based Lateral Flow Strip Assay" Advances in Microbiology, 第5卷, 2015年 5月 25日 (2015 - 05 - 25), 第364-369页	1-4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/086561

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106093409	A	2016年 11月 9日	无	
CN	104792991	A	2015年 7月 22日	CN	104792991 B 2016年 8月 17日
CN	103940991	A	2014年 7月 23日	CN	103940991 B 2016年 3月 16日
US	2004132211	A1	2004年 7月 8日	AU	2003295448 A1 2004年 7月 14日
				EP	1565745 A4 2007年 6月 27日
				EP	1565745 A2 2005年 8月 24日
				AU	2003295448 A8 2004年 7月 14日
				US	7241626 B2 2007年 7月 10日
				WO	2004057301 A3 2004年 9月 23日
				WO	2004057301 A2 2004年 7月 8日
CN	103941006	A	2014年 7月 23日	CN	103941006 B 2015年 12月 30日
CN	101839908	A	2010年 9月 22日	CN	101839908 B 2014年 8月 20日
EP	0884594	A2	1998年 12月 16日	IT	MI971406 A1 1998年 12月 14日
				IT	1292163 B1 1999年 1月 25日
				IT	MI971406 D0 1997年 6月 13日
				EP	0884594 A3 1998年 12月 30日
US	2007238138	A1	2007年 10月 11日	EP	2008104 A2 2008年 12月 31日
				US	2009136633 A1 2009年 5月 28日
				US	7776266 B2 2010年 8月 17日
				US	7527765 B2 2009年 5月 5日
				WO	2007116324 A3 2008年 1月 31日
				WO	2007116324 A2 2007年 10月 18日