



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105242040 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201410406527. 4

(22) 申请日 2014. 08. 18

(71) 申请人 董俊

地址 432800 湖北省孝感市大悟县城关镇长  
征路 8 号湖北华龙生物制药有限公司

(72) 发明人 胡征 杨波 董俊

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 余晓雪 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书4页 说明书13页

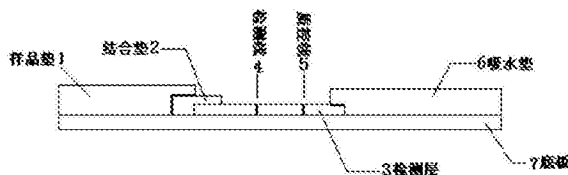
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用,该检测卡包括底板、样品垫、吸水垫、结合垫和检测层;结合垫包被有量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针;检测层是由带有一条检测线以及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;检测线包被有鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体;质控线包被有抗兔 IgG;检测层粘贴在底板上;结合垫和吸水垫分别设置在检测层两端部上方且与检测层部分重叠后分别与检测层和底板粘贴;样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴。本发明具有操作简便、检测快速、可定量及高灵敏度等优点。



1. 一种人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡包括底板、样品垫、结合垫、检测层以及吸水垫;所述结合垫包被有量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针;所述检测层是由带有一条检测线及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;所述检测线包被有鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体;所述质控线包被有抗兔 IgG;所述检测层粘贴在底板上;所述结合垫以及吸水垫分别设置在检测层两端部的上方且与检测层部分重叠后分别与检测层以及底板粘贴在一起;所述样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴在一起。

2. 根据权利要求 1 所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述抗兔 IgG 包括但不限于羊抗兔 IgG。

4. 根据权利要求 3 所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述检测层长 2cm,所述检测层粘贴在长度是 6.6-7.7cm 的底板表面中间段;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 2.5-3cm 的吸水垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 0.5-0.8cm 的结合垫重叠 0.2-0.4cm;所述结合垫与粘贴在结合垫以及底板上的长度是 2.5cm 的样品垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测线与质控线的间距是 0.5-0.8cm;所述底板的宽度是 0.3-0.5cm。

5. 根据权利要求 4 所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述吸水垫是吸水滤纸;所述底板是 PVC 板。

6. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

1) 结合垫的制备:

1.1) 重组 P6-His 融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1) 对人流感嗜血杆菌表面蛋白 P6 进行生物信息学分析,获取其胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段;

1.1.2) 找到步骤 1.1.1) 中所得肽段对应的基因编码序列,并在序列的 5' 端及 3' 端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记记为 P6;

1.1.3) 将步骤 1.1.2) 中所得到的 P6 按分子生物学方法克隆入表达载体 pET-28a(+) 后转入大肠杆菌中表达重组 P6-His 融合蛋白;所述重组 P6-His 融合蛋白以可溶性表达方式存在于菌体中;

1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.3) 所得到的重组蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整蛋白浓度为 0.2mg/mL 后备用;

1.2) 兔及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

1.2.1) 以步骤 1.1.4) 中所得到的重组 P6-His 融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清;所述兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清的间接 ELISA 效价均大于  $1 \times 10^5$ ;

1.2.2) 采用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清中的多克隆抗体 IgG;

1. 2. 3) 用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定步骤 1. 2. 2) 所得到的二种多克隆抗体 IgG 的浓度, 将其蛋白浓度均调整为 3mg/mL 后备用;

1. 3) 量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针的制备与纯化:

1. 3. 1) 向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N- 羟基琥珀酰亚胺和 300nmol 碳二亚胺, 以磷酸盐缓冲液定容为 2ml, 于旋转混合仪中, 以 15rpm/min, 37°C 反应 30min 后, 透析去除过量的 N- 羟基琥珀酰亚胺以及碳二亚胺; 所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为: 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠, 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7. 3;

1. 3. 2) 在活化的量子点中, 加入 4-12nmol 的步骤 1. 2) 所制备的兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG, 避光反应 2h, 加入端氨基化聚乙二醇至终浓度为 1. 5%, 封闭未反应的活化羧基位点, 继续避光反应 1h; 用 0. 2 μ m PES 过滤器过滤除去抗体聚集物, 然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min, 除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物; 收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液, 溶于 2ml 磷酸盐洗涤液中, 再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min, 收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液, 溶于 1ml 磷酸盐保存液中, 至此制得量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针;

所述磷酸盐洗涤液中各组分含量分别为: 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、5ml/L 吐温-20 以及 1g/L 叠氮钠; 所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7. 3; 所述磷酸盐保存液中各组分含量分别为: 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、10g/L BSA 以及 1g/L 叠氮钠; 所述磷酸盐保存液的 pH = 7. 3;

1. 4) 量子点标记抗体的负载:

将聚酯纤维膜浸入步骤 1. 3. 2) 所得到的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针溶液中 1h, 取出, 25°C 干燥后 4°C 密封保存备用, 至此制得结合垫;

2) 样品垫的制备:

取玻璃纤维素膜一张, 将玻璃纤维素膜在样品垫处理液中浸泡至少 3h 以上, 再置于生物安全柜内 37°C 通风干燥后, 25°C 密封干燥保存; 至此制得样品垫;

所述样品垫处理液中各组分含量分别为: 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、20g/L 牛血清白蛋白、10ml/L 吐温-20、20g/L 蔗糖以及 5g/L 聚乙烯吡咯烷酮, 所述样品垫处理液的 pH = 7. 3;

3) 检测层的制备:

3. 1) 将步骤 1. 2) 制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液均调整至终浓度为 0. 5-2. 5mg/mL 后备用; 所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为: 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠, 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7. 3;

3. 2) 将稀释好的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0. 8-2. 5 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上, 形成检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0. 8-2. 5 μ l/cm 的量按照与检测线 0. 5-0. 8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线;

3. 3) 将喷有检测线以及质控线的硝酸纤维素膜在 37°C 干燥 2h, 4°C 密封干燥保存; 至

此制得检测层；

4) 底板的制备

将 PVC 材质的底板按实际要求裁剪后备用；

5) 吸水垫的制备

将吸水滤纸按实际要求裁剪后备用；

6) 人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的组装：

6.1) 将步骤 4) 所制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉；

6.2) 将步骤 3) 所制备得到的检测层粘贴到底板的中部区域，并抹平膜面；

6.3) 将步骤 5) 所制备得到的吸水垫组装到底板上，使吸水垫的左边与检测层有部分重叠，同时将其右边缘与底板的右边缘对齐粘好并抹平；

6.4) 将步骤 1) 所制备得到的结合垫按部分重叠的方式重叠于硝酸纤维素膜的左边缘处，同时将结合垫粘于底板上；

6.5) 将步骤 2) 所制备得到样品垫则按部分重叠的方式重叠于结合垫的左边缘处，另一边与底板的左边缘对齐，粘于底板上并抹平；

6.6) 将组装好的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡进行裁剪，4℃密封干燥避光保存；

所述步骤 6.1) 至步骤 6.6) 均是在生物安全柜内进行操作。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1.3.2) 中加入 6nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG；

所述步骤 3.1) 中将步骤 1.2) 制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为 1.5-2.0mg/mL 以及 0.5-1.5mg/mL；

所述步骤 3.2) 中，将稀释好的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中，设置 1.0-2.0  $\mu$ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上，形成检测线；将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中，设置 1.0-2.0  $\mu$ l/cm 的量按照与检测线 0.5-0.8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线。

8. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡作为非诊断性检测人流感嗜血杆菌的应用。

9. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的非诊断性检测方法，其特征在于：所述检测方法包括以下步骤：

1) 将待检样品用 500  $\mu$ l 的样品处理液充分溶解后，取出 120  $\mu$ l 滴于检测卡的样品垫上，15 分钟后于紫外灯下观察检测结果；所述样品处理液中各组分含量分别为磷酸氢二钠 2.9g/L、磷酸二氢钠 0.295g/L、Triton x-100 10mL/L 以及氯化钠 2g/L，所述样品处理液的 pH = 7.3；

2) 若待检样品中含有人流感嗜血杆菌抗原，则与结合垫中的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针结合，通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线，未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线；

若待检样品中无人流感嗜血杆菌抗原，则仅出现一条荧光质控线；若荧光质控线未出

现,则该检测卡失效。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述待检样品是包括但不限于咽拭子。

## 人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,具体为一种人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*, Hi) 是感染人类的一种重要的呼吸道病原微生物,该菌由波兰细菌学家费佛博士在 1892 年的一次流行性感冒瘟疫中发现的,在随后的时间里被研究者们广泛研究。现仅知人是该病原体的宿主。免疫力较差的老人和儿童为易感人群,特别是 5 岁以下的婴幼儿。Hi 可引发肺炎、结膜炎、中耳炎、脑膜炎和菌血症等,在全球每年至少有 300 万严重病例发生,可造成患儿致残甚至死亡。Hi 分为有荚膜的 a、b、c、d、e、f 共 6 个血清型和无荚膜的不可分型流感嗜血杆菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi),一度以荚膜 b 型 Hi 最为流行。目前我国开展的 Hi 血清学检查大多也只针对侵袭力较强的荚膜 b 型。而由于该型菌株荚膜多糖疫苗的成功研发与应用,其流行已被有效控制。近来的研究多显示,在感染 Hi 的患者中最常见的菌株是 NTHi,其分离率已达 50% 以上。

[0003] 临床上由于 Hi 与其他呼吸道病原体引起的感染症状类似,因此常难以根据临床表现、x-射线检查等得出结论,确诊往往依赖于实验室诊断。婴幼儿疾病的特点是起病急、转归快,因此敏感、快速、实用的 Hi 检测对及早进行有效的临床干预具有非常重要的意义。

[0004] 尽管流感嗜血杆菌在全球范围内传播,但可用于实验室诊断的标准化商品试剂的种类极少。目前,Hi 感染的诊断方法有血清学检测法,核酸检测法和病原体直接检测法。检测血清中 Hi IgG、IgA、IgM 抗体常用的方法有:微量免疫荧光抗体检测 (MIF),补体结合试验 (CF),重组酶免疫测定 (rEIA),血清补体结合一酶免疫测定试验 (SeroCF—EIA) 等。然而 Hi 抗体的检出只能说明该个体感染过 Hi,却不能反映体内是否仍有 Hi 活菌存在,并且血清学特异性抗体检测常需要根据 IgM 抗体的动态结果进行判断,需要较长的时间。更重要的是,血清学检测的主要检测对象为抗荚膜抗体,而 NTHi 由于没有荚膜,则会造成漏检。同时,这些技术均存在灵敏度低、操作步骤复杂、需要专业人员操作、重复性差、检测时间长、检测特异性差、成本较高等缺陷,因而难以满足临床的实际需要。

[0005] 核酸检测包括核酸杂交和聚合酶链式反应 (PCR),核酸杂交检测 Hi 的特异性强,但敏感性不高,主要用于 PCR 结果的检测、判定,尚未直接用于临床标本的检测;PCR 具有较高的敏感性,但 PCR 实验对实验室有特殊要求,标本处理、扩增和检测要求严格,且易出现假阳性,在我国还不能作为常用的临床诊断方法。

[0006] 病原体检测方法主要为病原分离培养法,将标本接种于添加了 V 和 X 因子的巧克力血琼脂培养基上,经 24 小时培养后,挑取可疑菌落经形态学鉴定后,用 Hi 鉴定卡、Vitek—60 细菌自动分析系统鉴定到种,系统自动进行生物分型。但该法存在操作步骤复杂,细胞培养时间长等明显缺陷,并不适合临床应用。更重要的是,其中的荚膜肿胀实验等仅限于

对有荚膜的菌株进行鉴定,而无荚膜型(NTHi)则全部漏检。

[0007] 因此,目前建立具高灵敏度、高特异性的人流感嗜血杆菌抗原快速检测法以满足临床的检测需求就显得非常必要了。

## 发明内容

[0008] 本发明针对背景技术中现存的几种人流感嗜血杆菌在检测方式中遇到的技术瓶颈,提出了一种具有操作简便、检测快速、可定量及高灵敏度等优点的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术手段来实现的:

[0010] 一种人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡包括底板、样品垫、结合垫、检测层以及吸水垫;所述结合垫包被有量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针;所述检测层是由带有一条检测线及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;所述检测线包被有鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体;所述质控线包被有抗兔 IgG;所述检测层粘贴在底板上;所述结合垫以及吸水垫分别设置在检测层两端部的上方且与检测层部分重叠后分别与检测层以及底板粘贴在一起;所述样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴在一起。

[0011] 作为优选,本发明所采用的量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点。

[0012] 作为优选,本发明所采用的抗兔 IgG 包括但不限于羊抗兔 IgG。

[0013] 作为优选,本发明所采用的检测层长 2cm,所述检测层粘贴在长度是 6.6-7.7cm 的底板表面中间段;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 2.5-3cm 的吸水垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 0.5-0.8cm 的结合垫重叠 0.2-0.4cm;所述结合垫与粘贴在结合垫以及底板上的长度是 2.5cm 的样品垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测线与质控线的间距是 0.5-0.8cm;所述底板的宽度是 0.3-0.5cm。

[0014] 作为优选,本发明所采用的吸水垫是吸水滤纸;所述底板是 PVC 板。

[0015] 一种基于上述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

[0016] 1) 结合垫的制备:

[0017] 1.1) 重组 P6-His 融合蛋白的制备、纯化:

[0018] 1.1.1) 对人流感嗜血杆菌表面蛋白 P6 进行生物信息学分析,获取其胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段;

[0019] 1.1.2) 找到步骤 1.1.1) 中所得肽段对应的基因编码序列,并在序列的 5' 端及 3' 端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记记为 P6;其序列参见序列列表;

[0020] 1.1.3) 将步骤 1.1.2) 中所得到的 P6 按分子生物学方法克隆入表达载体 pET-28a(+) 后转入大肠杆菌中表达重组 P6-His 融合蛋白;所述重组 P6-His 融合蛋白以可溶性表达方式存在于菌体中;

[0021] 1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.3) 所得到的重组蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整蛋白浓度为 0.2mg/mL 后备用;

[0022] 1.2) 兔及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

[0023] 1.2.1) 以步骤 1.1.4) 中所得到的重组 P6-His 融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清;所述兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清的间接 ELISA 效价均大于  $1 \times 10^5$ ;

[0024] 1.2.2) 采用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清中的多克隆抗体 IgG;

[0025] 1.2.3) 用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定步骤 1.2.2) 所得到的二种多克隆抗体 IgG 的浓度,将其蛋白浓度均调整为 3mg/mL 后备用;

[0026] 1.3) 量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针的制备与纯化:

[0027] 1.3.1) 向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺和 300nmol 碳二亚胺,以磷酸盐缓冲液定容为 2ml,于旋转混合仪中,以 15rpm/min,37°C 反应 30min 后,透析去除过量的 N-羟基琥珀酰亚胺以及碳二亚胺;所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为:2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠,所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.3;

[0028] 1.3.2) 在活化的量子点中,加入 4-12nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG,避光反应 2h,加入端氨基化聚乙二醇至终浓度为 1.5%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应 1h;用 0.2  $\mu$ m PES 滤器过滤除去抗体聚集物,然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min,除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物;收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 2ml 磷酸盐洗涤液中,再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min,收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 1ml 磷酸盐保存液中,至此制得量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针;

[0029] 所述磷酸盐洗涤液中各组分含量分别为:2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、5ml/L 吐温-20 以及 1g/L 叠氮钠;所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7.3;所述磷酸盐保存液中各组分含量分别为:2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、10g/L BSA 以及 1g/L 叠氮钠;所述磷酸盐保存液的 pH = 7.3;

[0030] 1.4) 量子点标记抗体的负载:

[0031] 将聚酯纤维膜浸入步骤 1.3.2) 所得到的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针溶液中 1h,取出,25°C 干燥后 4°C 密封保存备用,至此制得结合垫;

[0032] 2) 样品垫的制备:

[0033] 取玻璃纤维素膜一张,将玻璃纤维素膜在样品垫处理液中浸泡至少 3h 以上,再置于生物安全柜内 37°C 通风干燥后,25°C 密封干燥保存;至此制得样品垫;

[0034] 所述样品垫处理液中各组分含量分别为:2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、20g/L 牛血清白蛋白 (BSA)、10ml/L 吐温-20、20g/L 蔗糖以及 5g/L 聚乙烯吡咯烷酮,所述样品垫处理液的 pH = 7.3;

[0035] 3) 检测层的制备:

[0036] 3.1) 将步骤 1.2) 制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液均调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL 后备用;所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为:2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠,所述磷酸盐缓冲液的 pH

= 7.3 ;

[0037] 3.2) 将稀释好的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 0.8-2.5  $\mu$  l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 0.8-2.5  $\mu$  l/cm 的量按照与检测线 0.5-0.8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线;

[0038] 3.3) 将喷有检测线以及质控线的硝酸纤维素膜在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2h,4 $^{\circ}$ C 密封干燥保存;至此制得检测层;

[0039] 4) 底板的制备

[0040] 将 PVC 材质的底板按实际要求裁剪后备用;

[0041] 5) 吸水垫的制备

[0042] 将吸水滤纸按实际要求裁剪后备用;

[0043] 6) 人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的组装:

[0044] 6.1) 将步骤 4) 所制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉;

[0045] 6.2) 将步骤 3) 所制备得到的检测层粘贴到底板的中部区域,并抹平膜面;

[0046] 6.3) 将步骤 5) 所制备得到的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层有部分重叠,同时将其右边缘与底板的右边缘对齐粘好并抹平;

[0047] 6.4) 将步骤 1) 所制备得到的结合垫按部分重叠的方式重叠于硝酸纤维素膜的左边缘处,同时将结合垫粘于底板上;

[0048] 6.5) 将步骤 2) 所制备得到样品垫则按部分重叠的方式重叠于结合垫的左边缘处,另一边与底板的左边缘对齐,粘于底板上并抹平;

[0049] 6.6) 将组装好的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡进行裁剪,4 $^{\circ}$ C 密封干燥避光保存;

[0050] 所述步骤 6.1) 至步骤 6.6) 均是在生物安全柜内进行操作。

[0051] 作为优选,本发明所采用的步骤 1.3.2) 中加入 6nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG;

[0052] 作为优选,本发明所采用的步骤 3.1) 中将步骤 1.2) 制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为 1.5-2.0mg/mL 以及 0.5-1.5mg/mL;

[0053] 作为优选,本发明所采用的步骤 3.2) 中,将稀释好的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0-2.0  $\mu$  l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0-2.0  $\mu$  l/cm 的量按照与检测线 0.5-0.8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线。

[0054] 一种基于上述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡作为非诊断性检测人流感嗜血杆菌的应用。

[0055] 一种基于上述的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的非诊断性检测方法,其特征在于:所述检测方法包括以下步骤:

[0056] 1) 将待检样品用 500  $\mu$  l 的样品处理液充分溶解后,取出 120  $\mu$  L 滴于检测卡的样品垫上,15 分钟后于紫外灯下观察检测结果;所述样品处理液中各组分含量分别为磷酸氢二钠 2.9g/L、磷酸二氢钠 0.295g/L、Triton x-10010mL/L 以及氯化钠 2g/L,所述样品处理

液的 pH = 7.3 ;

[0057] 2) 若待检样品中含有人流感嗜血杆菌抗原, 则与结合垫中的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针结合, 通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线, 未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线 ;

[0058] 若待检样品中无人流感嗜血杆菌抗原, 则仅出现一条荧光质控线 ; 若荧光质控线未出现, 则该检测卡失效。

[0059] 作为优选, 本发明所采用的待检样品是包括但不限于咽拭子。

[0060] 与现有技术相比, 本发明具有如下优点 :

[0061] 1、本发明的检测人流感嗜血杆菌抗原的方法是将免疫层析与量子点标记技术综合起来, 利用本发明制备的高效价、高特异性多克隆抗体, 通过激发荧光来对样品进行检测, 具有灵敏度高的特点 ( 其对人流感嗜血杆菌的检测底线为  $2 \times 10^4$  CFU/ml ), 用其对临床样品的检测结果与目前对该病原体的检测“金标准”- 培养法的相比无统计学差异。

[0062] 2、本发明所用的抗体均是识别人流感嗜血杆菌特异性 P6 抗原胞外保守区的多克隆抗体, 其特异性高, 同时其较目前最广泛使用的单克隆抗体而言制备成本低廉, 因此, 本发明检测成本较低。

[0063] 3、由于本发明首次以人流感嗜血杆菌所独有的外膜蛋白 P6 作为抗原标靶, 而该抗原不仅存在于所有类型的流感嗜血杆菌细胞表面, 包括有荚膜及无荚膜型, 且保守性高 ( 菌株间蛋白质保守性为 100% ), 属于流感嗜血杆菌特异性抗原, 因此该检测卡可高度特异性的检测所有类型人流感嗜血杆菌的感染。而市场上目前未见任何一种与本检测卡一样能快速检测所有类型人流感嗜血杆菌的工具存在。

[0064] 4、本发明检测方法简单, 检测快速, 易于判定, 结果判定在 20 分钟内完成, 既可以用紫外检测仪进行定性检测, 亦可结合 CCD 扫描等技术进行定量检测, 检测成本低廉, 克服了现有技术 ( 如 ELISA ) 检测成本高、操作复杂繁琐、耗时长、且必需专业人员才能操作的不足。

[0065] 5、由于检测卡检测的是人流感嗜血杆菌抗原而非抗体 ( 抗体的出现需要感染几天至几周以后 ), 故该方法在人流感嗜血杆菌的早期临床诊断和防治、病原体亚型鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

[0066] 6、本发明检测方法所用的临床样本为呼吸道分泌物如痰液等, 而非血液, 可免除婴幼儿患者抽血检查的痛苦与家长的心理负担, 故较易于推广。

#### 附图说明

[0067] 图 1 是本发明所提供检测卡的纵向剖面结构示意图 ;

[0068] 图 2 是本发明所提供检测卡的在完成组装后的结构示意图 ;

[0069] 其中 :

[0070] 1- 样品垫 ; 2- 结合垫 ; 3- 检测层 ; 4- 检测线 ; 5- 质控线 ; 6- 吸水垫 ; 7- 底板。

#### 具体实施方式

[0071] 本发明的工作原理是：本发明是在免疫层析测定法（双抗体夹心）的前提下，以多克隆抗体为基础，采用量子点标记探针技术，通过量子点标记技术研制检测人流感嗜血杆菌抗原的量子点免疫层析检测卡。首先是兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体和鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体的制备、纯化以及量子点标记，其次为喷膜，然后将检测卡各组成成分进行组装，最后制备人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡。本发明所提供的检测卡具有敏感、快速和特异性好等特点，并且可定量检测，能进行样品的高通量筛查，具有较好的市场应用前景。

[0072] 如附图 1 所示，本发明所提供了一种人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡，包括样品垫 1、结合垫 2、检测层 3、吸水垫 6 及底板 7 组成。结合垫 2 上包被有量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针；检测层 3 是喷有检测线 4 以及质控线 5 的固相硝酸纤维素膜简称 NC 膜；检测线 4 包被有鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体；质控线 5 包被有抗兔 IgG；量子点为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点；吸水垫 6 材质为吸水滤纸；底板 7 材质为 PVC。

[0073] 其具体结构是：检测层长 2cm，检测层粘贴在长度是 6.6-7.7cm 的底板表面中间段；检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 2.5-3cm 的吸水垫重叠 0.2-0.4cm；检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 0.5-0.8cm 的结合垫重叠 0.2-0.4cm；结合垫与粘贴在结合垫以及底板上的长度是 2.5cm 的样品垫重叠 0.2-0.4cm；检测线与质控线间距是 0.5-0.8cm；底板的宽度是 0.3-0.5cm。

[0074] 其中，上述参数优选方案是：检测层 3 长 2cm，粘贴在底板 7 长 7.3cm 表面中间段，此检测层右端与粘贴在底板 7 右末端的吸水垫 6 长 3cm 重叠 0.2cm，其另一端与结合垫 2 长 0.6cm 重叠 0.3cm；结合垫 2 则与粘贴在底板 7 左端的样品垫 (1) 长 2.5cm 重叠 0.3cm；检测层 3 上的检测线 4 及质控线 5 间距 0.7cm。整条检测卡的宽度为 0.4cm。

[0075] 制备上述人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的方法，其主要步骤包括：

[0076] 一、结合垫的制备

[0077] (1) 重组 P6-His 融合蛋白的制备、纯化：

[0078] 对人流感嗜血杆菌 P6 蛋白进行生物信息学分析，获取人流感嗜血杆菌 P6 蛋白胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段，找到其对应的基因序列；在此二基因序列的 5' 端及 3' 端分别引入酶切位点并分别化学合成全基因序列，同时标记记为 P6。其基因序列参见序列列表。将该基因序列按常规方法克隆入表达载体 pET-28a(+) 后表达重组 P6-His 融合蛋白。此融合蛋白以可溶性表达形式存在于基因工程菌体中。用镍柱纯化基因工程菌体中的重组 P6-His 融合蛋白，SDS-PAGE 检测其纯度后，再以 Bradford 法测定蛋白质浓度，调整蛋白浓度为 0.2mg/mL 后备用；

[0079] (2) 兔及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备：

[0080] 以纯化的重组 P6-His 融合蛋白为完全抗原，按常规方法免疫新西兰大白兔及豚鼠，分别制备兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗血清。该二种抗血清的间接 ELISA 效价均大于  $1 \times 10^5$ ，用 Protein G 亲和层析柱分别纯化二种抗血清中的多克隆抗体 IgG，用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并均调整为 3mg/mL 后备用。其中兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 用作量子点标记试验；鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 用作检测线的包被。

[0081] (3) 量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针的制备与纯化

[0082] 其操作步骤如下：向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和 300nmol 碳二亚胺 (EDC)，以磷酸盐缓冲液 (2.9g/L 磷酸氢二钠，0.295g/L 磷酸二氢钠，2g/L 氯化钠，pH 7.3) 定容为 2ml，于旋转混合仪中，以 15rpm/min，37℃ 反应 30min 后，透析去除过量的活化剂 (sulfo-NHS 与 EDC)。在活化的量子点中，加入 4-12nmol (优选为 6nmol) 的步骤 (2) 所制备的兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG，避光反应 2h，加入端氨基化聚乙二醇 (PEG2000-NH<sub>2</sub>) 至终浓度为 1.5%，封闭未反应的活化羧基位点，继续避光反应 1h。用 0.2 μm PES 滤器过滤除去抗体聚集物，然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中，以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min，除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物。收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液，溶于 2ml 磷酸盐洗涤液 (2.9g/L 磷酸氢二钠，0.295g/L 磷酸二氢钠，2g/L 氯化钠，5ml/L 吐温-20，1g/L 叠氮钠，pH7.3) 中，再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中，以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min，收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液，溶于 1ml 磷酸盐保存液 (2.9g/L 磷酸氢二钠，0.295g/L 磷酸二氢钠，2g/L 氯化钠，10g/L BSA，1g/L 叠氮钠，pH7.3) 中，制得量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针。

[0083] (4) 量子点标记抗体的负载

[0084] 将聚酯纤维膜浸入步骤 (3) 所得到的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针溶液中 1h，取出，25℃ 干燥后裁成 4cm\*0.6cm 的规格后 4℃ 密封保存备用，至此制得结合垫。

[0085] 二、样品垫的制备

[0086] 取玻璃纤维素膜一张，将其在样品垫处理液 (2.9g/L 磷酸氢二钠，0.295g/L 磷酸二氢钠，2g/L 氯化钠，20g/L 牛血清白蛋白 (BSA)，10ml/L 吐温-20，20g/L 蔗糖，5g/L 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-10)，pH7.3) 中浸泡至少 3h 以上，再置于生物安全柜内 37℃ 通风干燥后，剪裁成 4cm\*2.5cm 的规格，25℃ 密封干燥保存。至此制得样品垫。经试验证实玻璃纤维素膜经该方法处理后，显著地提高了量子点标记抗体的释放率。

[0087] 三、检测层的制备

[0088] 检测层的制备，是通过分别将由步骤一中所制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用专用的喷膜机在硝酸纤维素膜上形成检测线和控制线；其具体制备方法包括如下步骤：

[0089] 将步骤一中制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液 (2.9g/L 磷酸氢二钠，0.295g/L 磷酸二氢钠，2g/L 氯化钠，pH7.3) 分别均调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL，其中鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 优选的稀释终浓度为 1.5-2.0mg/mL，抗兔 IgG 优选的稀释终浓度为 0.5-1.5mg/mL。将稀释好的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中，设置 0.8-2.5 μl/cm，优选为 1.0-2.0 μl/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上，形成检测线；将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中，设置 0.8-2.5 μl/cm，优选为 1.0-2.0 μl/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线，其与检测线间距为 0.7cm。将喷好的硝酸纤维素膜 37℃ 干燥 2h，剪裁成 4cm\*4cm 的规格，4℃ 密封干燥保存。至此制得检测层。

[0090] 四、底板的加工

[0091] 将 PVC 材质的底板裁剪成 4cm\*7.3cm 的规格后备用。

### [0092] 五、吸水垫的制备

[0093] 将吸水滤纸裁剪成 4cm\*3cm 的规格,即制成吸水垫,备用。

### [0094] 六、检测卡的组装

[0095] 组装工作于生物安全柜内操作,首先将步骤四所述的底板上的粘性保护膜揭掉,将上文步骤三所述的检测层(即带有 1 条质控线和 1 条检测线的硝酸纤维素膜)粘贴到底板的中部区域,并小心抹平膜面。其次,将上文步骤五所述的吸水垫组装到底板上,使其左边与检测层有 0.2cm 的重叠,同时将其右边缘与底板的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将上文步骤一所述的结合垫按 0.3cm 重叠于硝酸纤维素膜的左边缘处,0.3cm 粘于底板上。最后将上文步骤二所述的样品垫则按一边 0.3cm 重叠于结合垫的左边缘处,另一边与底板的左边缘对齐,粘于底板上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下裁成 4.0mm 宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。至此制得人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡。

[0096] 上述人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的使用方法,步骤如下:

[0097] 将待检样品(如咽拭子等)用 500  $\mu$ l 的样品处理液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,10mL/L Triton x-100,2g/L 氯化钠,pH7.3)充分溶解后,取出 120  $\mu$ l 滴于检测卡的样品垫上,15 分钟后于紫外灯下观察检测结果。若待检样品中含有人流感嗜血杆菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若待检样品中无相关抗原,则仅出现一条荧光质控线。如果荧光质控线未出现,则该检测卡失效。

[0098] 本发明所需的羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点可到例如武汉珈源量子点技术开发有限公司等专业性公司购买;所需的 PVC 材质底板、吸水滤纸、硝酸纤维素膜、聚酯纤维膜、玻璃纤维素膜等可到 Millipore 及上海金标生物科技有限公司等专业性公司购买,所需的其他常规仪器、设备、生化药品均有市售。

[0099] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0100] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0101] 1、样品垫处理液:称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,2g 牛血清白蛋白(BSA),1ml 吐温-20,2g 蔗糖,0.5g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10),溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0102] 2、磷酸盐洗涤液:称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,0.5ml 吐温-20,0.1g 叠氮化钠,溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0103] 3、磷酸盐保存液:称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,1g 牛血清白蛋白(BSA),0.1g  $\text{NaN}_3$ ,溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0104] 4、磷酸盐缓冲液(PBS):称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0105] 5、兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG:为本发明自制,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 3mg/ml。

[0106] 6、鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG :为本发明自制,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 3mg/ml。

[0107] 7、羊抗兔 IgG :为博士德公司产品,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 1mg/ml。

[0108] 8、量子点 :本发明中所用量子点为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点,其发射波长为 565nm,购买自武汉珈源量子点技术开发有限公司,产品名称为羧基水溶性量子点 -565。

[0109] 9、玻璃纤维素膜 :厚度为 0.4mm,吸水量为 42mg/cm<sup>2</sup>,玻璃纤维直径为 0.6-3 μ m,具有良好的亲水性,购买于上海金标生物科技有限公司(型号为 BT40)。

[0110] 10、聚酯纤维膜 :厚度为 0.48mm,吸水速度为 18s/4cm,具有极好的亲水性,用于结合垫的制备,购买于上海金标生物科技有限公司(型号为 DL42)。

[0111] 11、硝酸纤维素膜 :型号为 Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于 Millipore 公司。

[0112] 12、吸水滤纸 :厚度为 0.95mm,吸水速度为 60s/4cm,吸水量为 700mg/cm<sup>2</sup>,具有良好的吸水性,作为制作吸水垫的材料。购买于上海金标生物科技有限公司(型号为 CH37K)。

[0113] 13、底板 :为高白度 PVC 材质,表面涂布单层高聚合物压敏胶 SM31,购买于上海金标生物科技有限公司。

[0114] 14、人流感嗜血杆菌菌株 :购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC53781。

[0115] 15、本发明所用到的微生物样品均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0116] 下面结合实施例对本发明所提供的技术方案进行详细说明 :

[0117] 实施例 1(制备实施例)

[0118] 结合垫的制备

[0119] (一) 重组 P6-His 融合蛋白的制备、纯化

[0120] 1. 相关基因的克隆

[0121] 对人流感嗜血杆菌表面蛋白 P6(其 NCBI 蛋白质数据库中的 accession number 为 AAA24994)进行生物信息学分析,获取其胞外保守结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的 DNA 编码序列,同时在其 5' 引入酶切位点 NdeI、3' 端引入终止信号 TAA 和酶切位点 XhoI 后化学合成全基因序列(全序列合成交由金斯瑞生物科技有限公司完成,交货时人工合成的基因片段连于载体 pUC57 上),记为 P6。其基因全序列如列表所示。具体的说,P6 基因编码的蛋白质序列为天然人流感嗜血杆菌表面蛋白 P6(accession number:AAA24994)的 48-153aa。将含有该段人工合成的 DNA 片段的载体 pUC57 用 NdeI 及 XhoI 进行双酶切后按常规方法回收目的片段,备用。同时采用 NdeI 及 XhoI 对载体 pET-28a(+) 进行双酶切,并按常规方法将经双酶切后获得的 P6 基因连入 pET-28a(+) 载体中,并转化大肠杆菌 TOP10,构建 pET-P6 表达载体。经酶切和序列测定证实表达载体构建无误。该载体表达重组 P6-His 融合蛋白。

[0122] 2. 重组 P6-His 融合蛋白的表达与纯化

[0123] 鉴定正确的阳性克隆菌培养后提取质粒,按常规技术转入感受态 E. coli BL21(DE3)plysS 中,转化完成后将菌液涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上,按常规方

法筛选表达菌株。挑取 pET-P6 转化的具有外源蛋白表达能力的单个菌落并接种入 100mL LB 培养基中,于 30℃ 培养过夜。取出菌液后,按 1:100 接种于 100mL 含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,于 30℃ 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6 时,加入 1mol/L IPTG 至终浓度为 1mmol/L,于 30℃ 摇菌培养,诱导融合蛋白表达。诱导 4h 后于 8000r/min 下离心 10min 收集菌体。将此菌体用 20mL 磷酸盐缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.44g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7.4) 洗涤 3 次并用 10mL 上样缓冲液 (20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl ; 30mM 咪唑, pH7.4) 重悬后进行超声破碎,操作条件为 :50HZ, 200W, 超声 3S, 间歇 5S, 工作 100 次。超声完成后,12000g 离心 15min 分别收集沉淀和上清后进行电泳检测。发现重组 P6-His 融合蛋白以可溶性表达方式存在于菌体中。

[0124] 将上述获得的超声破碎上清液用 0.45  $\mu$ m 的滤膜进行过滤后用 His Trap affinity columns (GE healthcare 公司产品),按照说明书的方法进行重组 P6-His 融合蛋白的纯化。具体方法如下:

[0125] 1) 用 5mL 注射器吸满蒸馏水,拧开柱的塞子,用提供的接头将柱和注射器连接上,以 1mL/min 流速洗柱。

[0126] 2) 用 10mL 上样缓冲液平衡,1mL/min 流速。

[0127] 3) 将融合蛋白上样,1mL/min 流速。

[0128] 4) 用 10mL 上样缓冲液,以 1mL/min 流速洗柱。

[0129] 5) 用 10mL 洗脱缓冲液 (20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, 300mM 咪唑, pH7.4),以 1mL/min 流速洗脱,分管收集,每管 1ml,12% SDS-PAGE 检测,合并洗脱组分中含有目的蛋白的样品。经 Bradford 试剂盒进行蛋白质浓度测定后,调整浓度为 0.2mg/mL。

[0130] (二) 兔及鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0131] 1. 兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0132] 用步骤 (一) 纯化的重组 P6-His 融合蛋白按照 200  $\mu$ g (1mL) 与 1mL 弗氏完全佐剂混匀乳化后免疫雄性新西兰大白兔 (由湖北省疾病预防控制中心提供),于背部皮下多点注射,间隔 7d 后再免疫一次,再过 14d 后用上述纯化的重组 P6-His 融合蛋白按照 200  $\mu$ g (1mL) 与 1mL 弗氏不完全佐剂混匀乳化后进行加强免疫,加强免疫 7d 后再按上述同样方法再加强免疫一次。7d 后取血分析抗体滴度。若不满意,可重复进行一到两次加强免疫,至抗体滴度满意 (用 ELISA 法测定抗体效价大于  $1 \times 10^5$ )。若满意则心脏采血,分离血清,以 Protein G 亲和层析柱 (GE healthcare 公司产品),严格按照操作说明书纯化多克隆抗体 IgG,用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.44g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.4) 调整为 2mg/mL, -20℃ 保藏备用,至此制得兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG。Western blot 试验表明,此多克隆抗体 IgG 能特异性识别人流感嗜血杆菌全长 P6 蛋白。

[0133] 2. 鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0134] 用步骤 (一) 纯化的重组 P6-His 融合蛋白作为完全抗原免疫豚鼠 (由湖北省疾病预防控制中心提供),肩胛下注射抗原 200  $\mu$ g/只。基础免疫为等体积的抗原与弗氏完全佐剂进行乳化,每隔 2 周进行一次加强免疫,加强免疫用等体积抗原与等体积弗氏不完全佐剂进行乳化,总共免疫 4 次。末次免疫 10d 后取血分析抗体滴度。若不满意,可重复进行一到两次加强免疫,至抗体滴度满意 (用 ELISA 法测定抗体效价大于  $1 \times 10^5$ )。若满意则处

死豚鼠取血清,以Protein G亲和层析柱(GE healthcare公司产品),严格按照操作说明书纯化多克隆抗体 IgG,用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,1.44g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,pH = 7.4)调整为2mg/mL,备用,至此制得鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG。Western blot 试验表明,此多克隆抗体 IgG 能特异性识别人流感嗜血杆菌全长 P6 蛋白。

[0135] (三) 量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针的制备

[0136] 1. 纳米羧基量子点标记兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 反应条件的优化:

[0137] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记 pH 的确定

[0138] 将标记反应中磷酸盐缓冲液 pH 分别设为 5,6,7,8,9,对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定,观察不同 pH 值对偶联反应的影响,确定了量子点标记多抗反应的最佳 pH 为 7.0-8.0。本实验选择 pH7.4。

[0139] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0140] 将量子点摩尔浓度与多抗浓度之比分别设置为 1:1,1:2,1:3 及 1:4,进行标记反应后,对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定,观察二者不同浓度比对偶联反应的影响,确定量子点标记兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 反应的最佳摩尔浓度比为量子点与抗体摩尔比为 1:3。本实验选择该最优浓度比来确定标记量。

[0141] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0142] 以乙醇胺、Tris、PEG2000-NH<sub>2</sub> 或者 BSA 作为封闭剂,按步骤 1.1 及 1.2 确定的条件进行标记反应后,对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定,观察不同的封闭剂对于标记反应的影响,结果发现,PEG2000-NH<sub>2</sub> 为最佳封闭剂,其可显著提高标记复合物的胶体稳定性及免疫活性。

[0143] 2. 标记过程:

[0144] 向微量离心管中依次加入 2nmol 羧基水溶性量子点、300nmol N-羧基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS) 和 300nmol 碳二亚胺(EDC),以磷酸盐缓冲液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,4g/L 氯化钠,pH7.4)定容为 2ml,不停地混合溶液,37℃反应 30min 后,透析去除过量的作为活化剂的 sulfo-NHS 与 EDC。在活化的量子点中,加入 6nmol 的步骤(二)制备的兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG,避光反应 2h,加入单端氨基化聚乙二醇(PEG2000-NH<sub>2</sub>)至终浓度为 1%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应 1h。用 0.2 μm PES 滤器过滤除去抗体聚集物,然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4℃下离心 15min,除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物。收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 2ml 磷酸盐洗涤液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,4g/L 氯化钠,5ml/L 吐温-20,0.3g/L 叠氮钠,pH7.4)中,再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4℃下离心 15min,收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 1ml 磷酸盐保存液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,10g/L BSA,0.3g/L 叠氮钠,pH7.4)中,至此制得量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针,置于 4℃保存备用。

[0145] (四) 量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针的负载

[0146] 将聚酯纤维膜浸入步骤(三)所得到的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针

溶液中 1h,取出,25℃干燥后裁成后规格为 4cm\*0.6cm/条后,4℃密封保存备用,至此制得结合垫。

#### [0147] 实施例 2(制备实施例)

##### [0148] 样品垫的制备

[0149] 配制不同配方的样品垫处理液,观察量子点标记抗体的释放效果,通过多次正交试验优化,得到最优的样品垫处理液配方(即本发明所述)。取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液中浸泡至少 3h,再置于生物安全柜内 37℃通风干燥后,剪裁成规格为 4cm\*2.5cm/条后,即制得样品垫,25℃密封干燥保存。经试验证实该样品垫的使用,大大提高了结合垫上量子点标记抗体的释放率,达到了较好的应用效果。

#### [0150] 实施例 3(制备实施例)

##### [0151] 检测层的制备

[0152] 将硝酸纤维素膜剪成 4cm\*4cm 大小。将实施例 1 中所制备的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为 2.0mg/mL 及 1.0mg/mL。将稀释好的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0 μl/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0 μl/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,其与检测线间距为 0.7cm。将喷好的硝酸纤维素膜 37℃干燥 2h,剪裁成 4cm\*4cm 的规格,4℃密封干燥保存。至此制得检测层。

#### [0153] 实施例 4(制备实施例)

##### [0154] 检测卡的组装

[0155] 下面结合附图 1 及附图 2 对检测卡的组合作进一步说明。

[0156] 将底板裁剪成 4cm\*7.3cm 大小,备用。

[0157] 将吸水滤纸裁剪成 4cm\*3cm 大小,作为吸水垫,备用。

[0158] 组装工作于生物安全柜内操作,首先将底板 7 上的粘性保护膜揭掉,将实施例 3 所述的检测层 3 即带有质控线 5 和检测线 4 的硝酸纤维素膜粘贴到底板 7 上附图 1 所指的具体区域,并小心抹平膜面。其次,将事先裁好的吸水垫 6 组装到底板 7 上,使其左边与检测层右末端有 0.2cm 的重叠,其右边缘则与底板 7 的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将实施例 1 所描述的结合垫 2 按 0.3cm 重叠于检测层 3 的左边缘处,0.3cm 粘于底板 7 上。最后将实施例 2 所描述的样品垫 1 则按一边 0.3cm 重叠于结合垫 2 的左边缘处,另一边与底板 7 的左边缘对齐,粘于底板 7 上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下载成 4.0mm 宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

#### [0159] 实施例 5(应用实施例)

##### [0160] 检测卡的使用方法

[0161] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有 500 μl 的添加了 1% Tritonx-100(体积百分比)的磷酸盐缓冲液(PBST)的软质塑料管中,挤压塑料管壁,使拭子上的样品充分溶解后,取出 120 μL 滴于检测卡的样品垫上,15 分钟后于紫外分析仪下(型号为 WD-9403A,北京六一仪器厂生产,紫外激发波长 365nm)观察检测结果。若咽拭子中含有人流感嗜血杆菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白多克隆抗体结合后

在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若待检测咽拭子中无相关抗原,则仅出现一条荧光质控线。如果荧光质控线未出现,则该检测卡失效。

[0162] 实施例 6(应用实施例)

[0163] 本发明的应用效果举例

[0164] 本实施例中所指的人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡的使用方法参照实施例 5 所述的操作步骤。

[0165] 1) 特异性试验

[0166] 用呼吸道常见病原体如人呼吸道合胞病毒(Long 株,ATCC 编号 VR26)、人肺炎支原体(ATCC 编号 15531)、人肺炎衣原体(AR-39 株,ATCC 编号 53592)、人腺病毒 3 型(GB 株,ATCC 编号 VR-3)、人腺病毒 7 型(Gomen 株,ATCC 编号 VR-7)、人甲型流感病毒(H1N1,ATCC 编号 VR-1743)、人乙型流感病毒(ATCC 编号 VR-790)、卡他莫拉菌(ATCC 编号 25238)、肺炎链球菌(ATCC 编号 700670)等代替人流感嗜血杆菌进行检测,检测卡检测含这些微生物的 PBST 稀释液都为阴性。

[0167] 2) 敏感性试验

[0168] 通过测定人流感嗜血杆菌培养物稀释液来做敏感性研究,确定实施例 4 所述的检测卡检测人流感嗜血杆菌菌株(ATCC 编号 53781)的检测下限为  $2 \times 10^4$ CFU/ml。

[0169] 3) 临床测试例

[0170] 以流感嗜血杆菌检测金标准-培养法作为参照,取 88 例呼吸科呼吸道感染者的咽拭子标本用实施例 4 所描述的检测卡进行检测,培养法阳性率为 20.5%(18/88),本检测卡为 21.6%(19/88),2 种方法的符合率为 96.6%(85/88)。具体结果如表 1 所示。

[0171] 表 1 临床标本的检测结果

[0172]

纳米量子点免疫层析法			
痰培养法	阳性	阴性	总计
阳性	17	1	18
阴性	2	68	70
总计	19	69	88

[0173] 需要指出的是,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明精神和原则之内所做的任何修改、等同替换等均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

## 序 列 表

---

**P6 基因序列****CATATG**TACAACACCGTATATTTGGTTTTGATAAATACGACATCACCGGTGAATACGTTCAAATCTT*NdeI*

AGATGCGCACGCAGCATATTTAAATGCAACGCCAGCTGCTAAAGTATTAGTAGAAGGTAATACTGATGA

ACGTGGTACACCAGAATACAACATCGCATTAGGACAACGTCGTGCAGATGCAGTTAAAGGTTATTTAGC

AGGTAAAGGTGTTGATGCTGGTAAATTAGGCACAGTATCTTACGGTGAAGAAAAACCTGCAGTATTAGG

TCACGATGAAGCTGCATATTCTAAAAACCGTCGTGCAGTGTTAGCGTAC**TAACCTCGAG***XhoI***P6 蛋白质序列**

YNTVYFGFDKYDITGEYVQILDAAHAAYLNATPAAKVLVEGNTDERGTPEYNIALGQRRADAVKGYLAGK

GVDAGKLGTVSYGEEKPAVLGHDEAAYSKNRRVLAAY

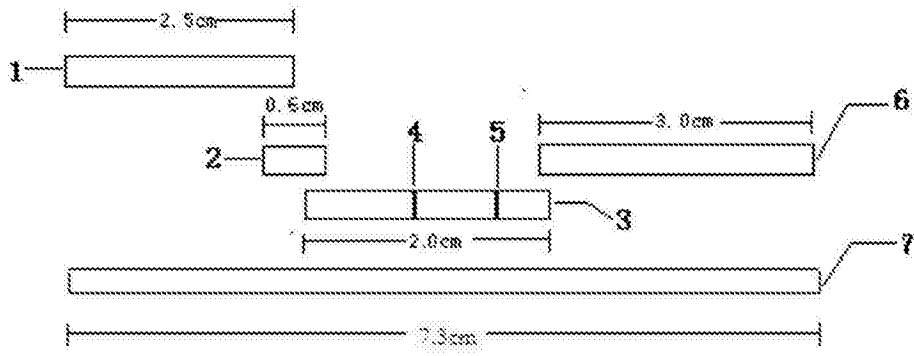


图 1

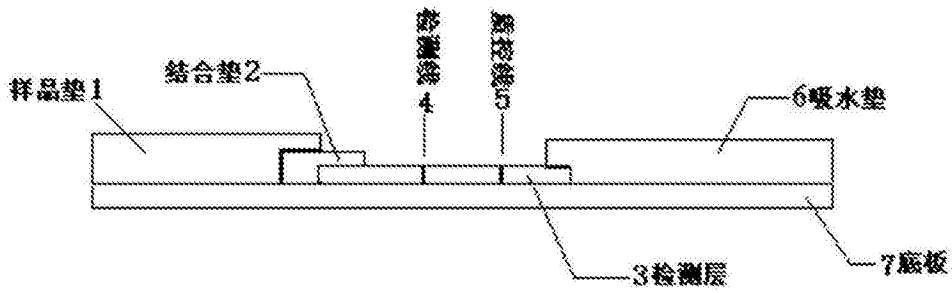


图 2

专利名称(译)	人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105242040A</a>	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201410406527.4	申请日	2014-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	董俊		
申请(专利权)人(译)	董俊		
当前申请(专利权)人(译)	董俊		
[标]发明人	胡征 杨波 董俊		
发明人	胡征 杨波 董俊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/533		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN105242040B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种人流感嗜血杆菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用，该检测卡包括底板、样品垫、吸水垫、结合垫和检测层；结合垫包被有量子点标记的抗人流感嗜血杆菌纳米探针；检测层是由带有一条检测线以及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成；检测线包被有鼠抗人流感嗜血杆菌P6蛋白多克隆抗体；质控线包被有抗兔IgG；检测层粘贴在底板上；结合垫和吸水垫分别设置在检测层两端部上方且与检测层部分重叠后分别与检测层和底板粘贴；样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴。本发明具有操作简便、检测快速、可定量及高灵敏度等优点。

