



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105277694 B

(45)授权公告日 2017.01.18

(21)申请号 201410406457.2

(22)申请日 2014.08.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105277694 A

(43)申请公布日 2016.01.27

(73)专利权人 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 33/532(2006.01)

(56)对比文件

US 2008032420 A1,2008.02.07,

CN 101490083 A,2009.07.22,

WO 2013166460 A1,2013.11.07,

CN 103926403 A,2014.07.16,

审查员 张绚

权利要求书3页 说明书14页

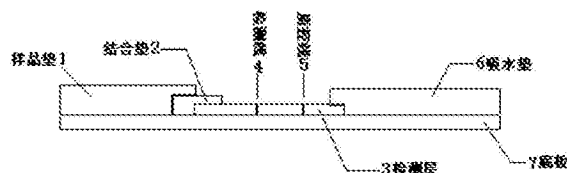
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

人A群链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种人A群链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用,其中检测卡包括底板、样品垫、结合垫、检测层以及吸水垫;结合垫包被有量子点标记的抗人A群链球菌纳米探针;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;检测线包被有鼠抗人A群链球菌M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;结合垫以及吸水垫分别与检测层以及底板粘贴在一起;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。本发明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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。



1. 一种人A群链球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M-His融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1)对人A群链球菌1,3,5,6,24型M蛋白进行生物信息学分析,分别获取其N端型特异性序列中含胞外抗原表位且不与其他抗原抗体起交叉反应的肽段,分别标记为M1,M3,M5,M6及M24;

1.1.2)找到步骤1.1.1)中所得五个肽段一一对应的基因编码序列,按M1-M3-M5-M6-M24的顺序进行序列拼接并根据大肠杆菌中密码子的偏好性对该序列进行密码子优化,在上述经密码子优化后的重组基因的序列的5'端及3'端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记为m;

所述标记为m的基因序列是:

CATATGGCTAACGGTGACGGTAACCCGCGTGAAGTTCGAAGACCTGGCTGCTAACA
NdeI
ACCCGGCTATCCAGAACATCCGTCTGCGTTACGAAAACAAAGACCTGAAAGCTCGTCT
GGAAAACGCTATGGAAGTTGCTGGTTCGTGACTTCAAACGTGCTGAAGAAAACCTGCT
GGACCAGGTTACCCAGCTGTACACCAAACACAACCTCTAACTACCAGCAGTACAACGCT
CAGGCTGGTTCGTCTGGACCTGCGTCAGAAAAGCTGAATACCTGAAAGGTCTGAACGAC
TGGGCTGAACGTCTGCTGCAGGAACCTGAACTCTGCTGCTCCGCTGACCCGTGCTACCG
CTGACAACAAAGACGAACTGATCAAACGTGCTAACGACTACGAAATCCAGAACCCACC
AGCTGACCGTTGAAAACAAAAAAGCTGAAAACCGACAAAGAAGCTGACGCTCGTTCGT
TTAACGGTGAATTCCTCCGCGTCACGTTAACTGAAAACGAAATCGAAAACCTGCTGGA
CCAGGTTACCCAGCTGTACACCAAACACAACCTCTAACTACCAGCAGTACAACGCTCAG
GCTGGTTCGTCTGGACCTGCGTCAGAAAAGCTGAATACCTGAAAGGTCTGATCGAAGACC
TGGCTGCCTAACAAACCCGGCTATCCAGAACATCCGTCTGCGTCACGAAAACAAAGACCT
GAAAGCTCGTCTGGAAAACGCTATGGAAGTTGCTGGTTCGTGACTTCAAACGTGCTGAA
GAACTGGAAAAGCTAAACAGGCTTAACTCGAG
XhoI

1.1.3)将步骤1.1.2)中所得到的m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M-His融合蛋白;所述重组M-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A群链球菌M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M-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A群链球菌M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌M蛋白抗血清;所述兔抗人A群链球菌M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌M蛋白抗血清的间接ELISA效价均大于 1×10^5 ;

1.2.2)采用Protein G亲和层析柱分别纯化兔抗人A群链球菌M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌M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A群链球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,37℃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A群链球菌M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0.2μm 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;收集超滤离心管滤膜上层量子点-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℃下离心15min,收集超滤离心管滤膜上层量子点-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A群链球菌纳米探针;

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、0.295 g/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A群链球菌纳米探针溶液中1h,取出,25℃干燥后4℃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,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,25℃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A群链球菌M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A群链球菌M蛋白多克隆抗体装入BIODOT划膜仪喷头中,设置0.8-2.5μI/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0.8-2.5μI/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℃干燥2h,4℃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A群链球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A群链球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；

所述人A群链球菌是人A群链球菌M1,3,5,6,24血清型。

2.根据权利要求1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A群链球菌M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A群链球菌M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A群链球菌M蛋白多克隆抗体装入BIODOT划膜仪喷头中，设置1.0-2.0 μ I/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 μ I/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。

人A群链球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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 链球菌广泛分布于自然界和动物体内,可长期寄居于人体鼻咽部和肠道中。为革兰氏阳性菌,呈球状或卵圆形,为需氧或兼性厌氧菌,对营养要求较高。链球菌种类繁多,根据溶血能力分为 α 、 β 、 γ 溶血性链球菌,又称之甲型、乙型、丙型溶血性链球菌。根据链球菌胞壁所含多糖(C抗原)的不同分为A~V等20族(其中缺I和J),(Lancefield分型)。对人类有致病性的链球菌90%属于A群。链球菌C抗原的外层还具有M、T、R、S 4种型特异性抗原。M抗原主要见于A群,根据M抗原的不同又可分为90多个血清型,其中在我国能引起风湿热的临床上最常见的血清型为M1,M3,M5,M6,M18,M24等。A群链球菌(group A streptococci,GAS)又称化脓性链球菌(streptococcus pyogenes),为 β 溶血性链球菌。A群链球菌感染和后遗症一直是困扰公共健康和国民经济的严重问题,尤对儿童和青年影响最大。A群链球菌感染最常发生于冬春季和雨季,在儿童发病年龄多见于5~15岁,临床可把A群链球菌感染分为四类:①浅表部位感染:咽炎、皮肤和软组织感染、脓疱疮、丹毒、阴道炎、产后感染;②深部感染:菌血症、坏死性筋膜炎、深部组织感染、蜂窝织炎、肌炎、脓毒败血症、心包炎、脑膜炎、肺炎、化脓性关节炎;③毒素介导:猩红热、链球菌中毒性休克综合征;④免疫介导:风湿热、链球菌感染后肾小球肾炎、反应性关节炎。

[0003] 临床病人由于不同的呼吸道病原体(如副流感病毒、流感嗜血杆菌、流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒等)感染引起疾病症状可以十分相似,这导致了流行诊断比较困难,确诊往往依赖于实验室诊断。快速有效的诊断方法应该是在疾病的发病初期就可以得到明确的诊断,便于实施针对性的治疗,阻止病情的发展迁延。

[0004] 尽管A群链球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,A群链球菌的检测主要有以下几种方法:

[0005] 一、常规实验室检测

[0006] 1、细菌分离

[0007] 细菌培养是诊断A群链球菌感染的“金标准”。样本采集后最好立即接种到血琼脂培养基上。若无条件及时接种,应使用转运培养基。将标本接种在血琼脂平皿,35~37℃,含有5%~10%CO₂或厌氧条件下孵育,可增加A群链球菌的分离率。血琼脂平皿孵育24~48h。A群链球菌菌落常不能与其他 β -溶血性链球菌区别,特别是C群和G群,需采用血清学方法进行最后鉴定。该法培养所需时间长,操作步骤繁多,且若采样前患者使用过抗菌药物,会造成培养结果的假阳性。这样在临床方面对病人的治疗就有一定的局限性。

[0008] 2、血清学检测

[0009] 即采用酶联免疫法、放免法、微量免疫荧光法等,检测被检者血清中A群链球菌抗体水平,可间接提示A群链球菌感染的存在。然而,血清学试验只能提供一种回顾性的诊断,

它需要同时检测患者急性期和恢复期的双份血清,如果恢复期中抗人A群链球菌抗体效价比急性期高4倍或4倍以上才有诊断意义。另外,临床上主要检测的抗体为抗链球菌素O,而统计学研究表明大约20%的病人并不出现出现抗链球菌素O水平的升高,故现有血清学方法的检测质量受到一定限制。

[0010] 二、快速诊断

[0011] 直接检查人A群链球菌蛋白抗原和菌体核酸可达到快速诊断的目的,目前主要有免疫荧光法、免疫酶法和PCR法等。免疫荧光法和免疫酶法均不能进行一步检测,均存在操作步骤复杂,需要专业人员操作,检测时间长(2h以上),成本较高等缺点。PCR法主要是检测链球菌特异性rRNA序列,其检测快速、灵敏、特异,是目前研究A群链球菌感染的重要手段,但由于PCR对实验设备以及操作要求较高,且易出现假阳性,在我国还不能作为常用的临床诊断方法。目前,检测人A群链球菌抗原的方法主要为胶体金法检测其C多糖抗原,但是胶体金法敏感度较低,对样品材料质量要求较高,同时在检测前还必须对样品进行细胞裂解以释放C多糖,而添加细胞裂解液的量又对检测灵敏度有较大的影响。因此,建立具备快速、高灵敏度的A群链球菌特异性抗原快速诊断法十分必要。

发明内容

[0012] 本发明针对背景技术中现存的几种人A群链球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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

[0013] 本发明的目的是通过以下技术手段来实现的:

[0014] 一种人A群链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述人A群链球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A群链球菌纳米探针;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A群链球菌M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;所述人A群链球菌是人A群链球菌M1,3,5,6,24血清型。

[0015] 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。

[0016] 作为优选,本发明所采用的抗兔IgG包括但不限于羊抗兔IgG。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 一种基于上述的人A群链球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:

[0020] 1)结合垫的制备:

[0021] 1.1)重组M-His融合蛋白的制备、纯化:

[0022] 1.1.1)对人A群链球菌1,3,5,6,24型M蛋白进行生物信息学分析,分别获取其N端型特异性序列(高变区)中含胞外抗原表位且不与其他抗原抗体起交叉反应的肽段,分别标记为M1,M3,M5,M6及M24;

[0023] 1.1.2)找到步骤1.1.1)中所得五个肽段一一对应的基因编码序列,按M1-M3-M5-M6-M24的顺序进行序列拼接并根据大肠杆菌中密码子的偏好性对该序列进行密码子优化,在上述经密码子优化后的重组基因的序列的5'端及3'端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记为m;其基因序列如列表所示;

[0024] 1.1.3)将步骤1.1.2)中所得到的m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M-His融合蛋白;所述重组M-His融合蛋白以可溶性表达方式存在于菌体中;

[0025] 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;

[0026] 1.2)兔及鼠抗人A群链球菌M蛋白多克隆抗体IgG的制备:

[0027] 1.2.1)以步骤1.1.4)中所得到的重组M-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A群链球菌M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌M蛋白抗血清;所述兔抗人A群链球菌M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌M蛋白抗血清的间接ELISA效价均大于 1×10^5 ;

[0028] 1.2.2)采用Protein G亲和层析柱分别纯化兔抗人A群链球菌M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌M蛋白抗血清中的多克隆抗体IgG;

[0029] 1.2.3)用凯基Braford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;

[0030] 1.3)量子点标记的抗人A群链球菌纳米探针的制备与纯化:

[0031] 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,37℃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;

[0032] 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A群链球菌M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0.2μm 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磷酸盐保存液中,至此制得量子点标记的抗人A群链球菌纳米探针;

[0033] 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；

[0034] 1.4)量子点标记抗体的负载：

[0035] 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A群链球菌纳米探针溶液中1h,取出,25℃干燥后4℃密封保存备用,至此制得结合垫；

[0036] 2)样品垫的制备：

[0037] 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,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,25℃密封干燥保存；至此制得样品垫；

[0038] 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)、10mI/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；

[0039] 3)检测层的制备：

[0040] 3.1)将步骤1.2)制备的鼠抗人A群链球菌M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；

[0041] 3.2)将稀释好的鼠抗人A群链球菌M蛋白多克隆抗体装入BIODOT划膜仪喷头中,设置0.8-2.5μI/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0.8-2.5μI/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；

[0042] 3.3)将喷有检测线以及质控线的硝酸纤维素膜在37℃干燥2h,4℃密封干燥保存；至此制得检测层；

[0043] 4)底板的制备

[0044] 将PVC材质的底板按实际要求裁剪后备用；

[0045] 5)吸水垫的制备

[0046] 将吸水滤纸按实际要求裁剪后备用；

[0047] 6)人A群链球菌量子点免疫层析检测卡的组装：

[0048] 6.1)将步骤4)所制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉；

[0049] 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；

[0050] 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；

[0051] 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；

[0052] 6.5)将步骤2)所制备得到样品垫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；

[0053] 6.6)将组装好的人A群链球菌量子点免疫层析检测卡进行裁剪,4℃密封干燥避光保存；

[0054] 所述步骤6.1)至步骤6.6)均是在生物安全柜内进行操作；

[0055] 所述人A群链球菌是人A群链球菌M1,3,5,6,24血清型。

[0056] 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A

群链球菌M蛋白多克隆抗体IgG;

[0057] 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A群链球菌M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;

[0058] 作为优选,本发明所采用的步骤3.2)中,将稀释好的鼠抗人A群链球菌M蛋白多克隆抗体装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0-2.0 μ I/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 μ I/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。

[0059] 一种基于上述的人A群链球菌量子点免疫层析检测卡作为非诊断性检测人A群链球菌的应用;所述人A群链球菌是人A群链球菌M1,3,5,6,24血清型。

[0060] 一种基于上述的人A群链球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:

[0061] 1)将待检样品用500 μ I的样品处理液充分溶解后,取出120 μ 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;

[0062] 2)若待检样品中含有人A群链球菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人A群链球菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人A群链球菌M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;

[0063] 若待检样品中无人A群链球菌抗原,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;

[0064] 所述人A群链球菌是人A群链球菌M1,3,5,6,24血清型。

[0065] 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。

[0066] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0067] 1、本发明的检测人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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(其对临床上最常见的可导致风湿热的M1、M3、M5、M6、M24血清型人A群链球菌的检测底线分别为 2×10^4 CFU/mL、 1×10^4 CFU/mL、 2×10^4 CFU/mL、 2×10^4 CFU/mL、 2×10^4 CFU/mL,低于目前任何一种已报道的检测方法)。

[0068] 2、本发明所用的抗体是识别人A群链球菌特异性M抗原N端高变区胞外结构域的多克隆抗体,其特异性高,可实现对临床上最常见的可导致风湿热的M1、M3、M5、M6、M24血清型人A群链球菌的特异性检测,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。

[0069] 3、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。

[0070] 4、由于检测卡检测的是人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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。

[0071] 5、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

[0072] 图1是本发明所提供检测卡的纵向剖面结构示意图;

[0073] 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;

[0074] 其中:

[0075] 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

[0076] 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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)抗原的量子点免疫层析检测卡。首先是兔抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体和鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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。

[0077] 如附图1所示,本发明所提供了一种人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 制备上述人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)量子点免疫层析检测卡的方法,其主要步骤包括:

[0081] 一、结合垫的制备

[0082] (1)重组M-His融合蛋白的制备、纯化:

[0083] 对人A群链球菌1,3,5,6,24型M蛋白进行生物信息学分析,分别获取其N端型特异性序列(高变区)中含胞外抗原表位且不与其他抗原抗体起交叉反应的肽段,分别标记为M1,M3,M5,M6及M24;找到上述五个肽段一一对应的基因编码序列,按M1-M3-M5-M6-M24的顺序进行序列拼接并根据大肠杆菌中密码子的偏好性对该序列进行密码子优化,在上述经密码子优化后的重组基因的序列的5'端及3'端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记为m;其基因序列参见序列表;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M-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M-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;

[0084] (2)兔及鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG的制备:

[0085] 以纯化的重组M-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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白抗血清及鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白抗血清。该二种抗血清的间接ELISA效价均大于 1×10^5 ,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Braford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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG用作量子点标记试验;鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG用作检测线的包被。

[0086] (3)量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)纳米探针的制备与纯化

[0087] 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(suIfo-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,37℃反应30min后,透析去除过量的活化剂(suIfo-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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h,加入端氨基化聚乙二醇(PEG2000-NH₂)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0.2μm 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,pH 7.3)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,pH 7.3)中,制得量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)纳米探针。

[0088] (4)量子点标记抗体的负载

[0089] 将聚酯纤维膜浸入步骤(3)所得到的量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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。

[0090] 二、样品垫的制备

[0091] 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),10mI/L吐温-20,20g/L蔗糖,5g/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10),pH 7.3)中浸泡至少3h,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。

[0092] 三、检测层的制备

[0093] 检测层的制备,是通过分别将由步骤一中所制备的鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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:

[0094] 将步骤一中制备的鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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,pH 7.3)分别均调整至终浓度为0.5-2.5mg/mL,其中鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置0.8-2.5μI/cm,优选为1.0-2.0μI/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0.8-2.5μI/cm,优选为1.0-2.0μI/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。

[0095] 四、底板的加工

[0096] 将PVC材质的底板裁剪成4cm*7.3cm的规格后备用。

[0097] 五、吸水垫的制备

[0098] 将吸水滤纸裁剪成4cm*3cm的规格,即制成吸水垫,备用。

[0099] 六、检测卡的组装

[0100] 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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)量子点免疫层析检测卡。

[0101] 上述人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)量子点免疫层析检测卡的使用方法,步骤如下:

[0102] 将待检样品(如咽拭子等)用500μI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,pH 7.3)充分溶解后,取出120μL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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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。

[0103] 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。

[0104] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0105] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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 NaN₃,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。

[0109] 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。

[0110] 5、兔抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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。

[0111] 6、鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 9、玻璃纤维素膜:厚度为0.4mm,吸水量为42mg/cm²,玻璃纤维直径为0.6-3μm,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)。

[0115] 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)。

[0116] 11、硝酸纤维素膜:型号为Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于Millipore公司。

[0117] 12、吸水滤纸:厚度为0.95mm,吸水速度为60s/4cm,吸水量为700mg/cm²,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)。

[0118] 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。

[0119] 14.人M1血清型A群链球菌:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为ATCC

700294。

[0120] 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)。

[0121] 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：

[0122] 实施例1(制备实施例)

[0123] 结合垫的制备

[0124] (一)重组M-His融合蛋白的制备、纯化

[0125] 1.相关基因的克隆

[0126] 对人A群链球菌1,3,5,6,24型M蛋白(其NCBI蛋白质数据库中的accession number 分别为AAK34694、NP_802987、WP_023079553、EZN36963及WP_027968818)进行生物信息学分析,分别获取其N端型特异性序列(高变区)中含胞外抗原表位且不与其他抗原抗体起交叉反应的肽段,分别标记为M1,M3,M5,M6及M24;找到该五个肽段一一对应的基因编码序列,按M1-M3-M5-M6-M24的顺序进行序列拼接并根据大肠杆菌中密码子的偏好性对该序列进行密码子优化,在上述经密码子优化后的重组基因的序列的5'端及3'端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记为m。其基因全序列如列表所示。具体的说,m基因编码的蛋白质序列为天然人A群链球菌1型M蛋白41-92aa,3型M蛋白61-112aa,5型M蛋白41-82aa,6型M蛋白41-100aa,24型M蛋白51-100aa所组成的连接肽。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m基因连入pET-28a(+)载体中,并转化大肠杆菌TOP10,构建pET-M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M-His融合蛋白。

[0127] 2.重组M-His融合蛋白的表达与纯化

[0128] 将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)pIysS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-M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 $^{\circ}$ C培养过夜。取出菌液后,按1:100接种于100mL含有50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基中,于30 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀=0.6时,加入1mM IPTG至终浓度为1mM,于30 $^{\circ}$ C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 KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄pH=7.4)洗涤3次并用10mL上样缓冲液(20mM Na₃PO₄,0.5M 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M-his融合蛋白以可溶性表达方式存在于菌体中。

[0129] 将上述获得的超声破碎上清液用0.45 μ m的滤膜进行过滤后用His Trapaffinity columns(GE healthcare公司产品),按照说明书的方法进行重组M-His融合蛋白的纯化。具体方法如下:

[0130] 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。

[0131] 2)用10mL上样缓冲液平衡,1mL/min流速。

[0132] 3)将融合蛋白上样,1mL/min流速。

[0133] 4)用10mL上样缓冲液,以1mL/min流速洗柱。

[0134] 5)用10mL洗脱缓冲液(20mM Na_3PO_4 ,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。

[0135] (二)兔及鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0136] 1.兔抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0137] 用步骤(一)纯化的重组M-His融合蛋白按照200 μg (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M-His融合蛋白按照200 μg (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 1×10^5)。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Braford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_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 pH7.4)调整为1mg/mL,-20℃保藏备用,至此制得兔抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)全长M蛋白。

[0138] 2.鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0139] 用步骤(一)纯化的重组M-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 μg /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 1×10^5)。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Braford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_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 pH=7.4)调整为1mg/mL,备用,至此制得鼠抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)全长M蛋白。

[0140] (三)量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)纳米探针的制备

[0141] 1.纳米羧基量子点标记兔抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG反应条件的优化:

[0142] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记pH的确定

[0143] 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。

[0144] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0145] 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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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。

[0146] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0147] 以乙醇胺、Tris、PEG2000-NH₂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-NH₂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。

[0148] 2.标记过程:

[0149] 向微量离心管中依次加入2nmol羧基水溶性量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺(suIfu-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,pH 7.4)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suIfu-NHS与EDC。在活化的量子点中,加入6nmol的步骤(二)制备的兔抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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-NH₂)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0.2μm 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,pH 7.4)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,pH 7.4)中,至此制得量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)纳米探针,置于4℃保存备用。

[0150] (四)量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)纳米探针的负载

[0151] 将聚酯纤维膜浸入步骤(三)所得到的量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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。

[0152] 实施例2(制备实施例)

[0153] 样品垫的制备

[0154] 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。

[0155] 实施例3(制备实施例)

[0156] 检测层的制备

[0157] 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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M蛋白多克隆抗体IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0μL/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1.0μL/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。

[0158] 实施例4(制备实施例)

[0159] 检测卡的组装

[0160] 下面结合附图1及附图2对检测卡的组装作进一步说明。

[0161] 将底板裁剪成4cm*7.3cm大小,备用。

[0162] 将吸水滤纸裁剪成4cm*3cm大小,作为吸水垫,备用。

[0163] 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裁成4.0mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

[0164] 实施例5(应用实施例)

[0165] 检测卡的使用方法

[0166] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有500μl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120μL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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)M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。

[0167] 实施例6(应用实施例)

[0168] 本发明的应用效果举例

[0169] 本实施例中所指的人A群链球菌(M1,3,5,6,24血清型)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。

[0170] 1)特异性试验

[0171] 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)、流感嗜血杆菌(ATCC编号53781)、肺炎链球菌(ATCC编号700670)等代替人A群链球菌进行检测,检测卡检测含这些微生物的PBST稀释液都为阴性。

[0172] 2)敏感性试验

[0173] 将人M1血清型A群链球菌(ATCC编号700294)样品用PBST缓冲液进行系列稀释后,

用实施例4所述检测卡进行检测,结果表明其检测底限为 2×10^4 CFU/ml。而用来自生产商Binax的名为Binax NOW Strep A test(胶体金法)的试剂盒进行检测,发现其检测底限为 5×10^5 CFU/ml。通过测定人A群链球菌(M3,5,6,24血清型)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M3、M5、M6、M24血清型人A群链球菌的检测底线分别为 1×10^4 CFU/ml、 2×10^4 CFU/ml、 2×10^4 CFU/ml、 2×10^4 CFU/ml。

[0174] 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

m 基因序列

CATATGGCTAACGGTGACGGTAACCCGCGTGAAGTTATCGAAGACCTGGCTGCTAACA

NdeI

ACCCGGCTATCCAGAACATCCGTCTGCGTTACGAAAACAAAGACCTGAAAGCTCGTCT
GGAAAACGCTATGGAAGTTGCTGGTCGTGACTTCAAACGTGCTGAAGAAAACCTGCT
GGACCAGGTTACCCAGCTGTACACCAAACACAACCTCTAACTACCAGCAGTACAACGCT
CAGGCTGGTCGTCTGGACCTGCGTCAGAAAGCTGAATACCTGAAAGGTCTGAACGAC
TGGGCTGAACGTCTGCTGCAGGAACTGAACTCTGCTGCTCCGCTGACCCGTGCTACCG
CTGACAACAAAGACGAACTGATCAAACGTGCTAACGACTACGAAATCCAGAACCACC
AGCTGACCGTTGAAAACAAAAAACTGAAAACCGACAAAGAAGCTGACGCTCGTTCTG
TTAACGGTGAATTCCCGCGTCACGTCTAACTGAAAACGAAATCGAAAACCTGCTGGA
CCAGGTTACCCAGCTGTACACCAAACACAACCTCTAACTACCAGCAGTACAACGCTCAG
GCTGGTCGTCTGGACCTGCGTCAGAAAGCTGAATACCTGAAAGGTCTGATCGAAGACC
TGGCTGCTAACAACCCGGCTATCCAGAACATCCGTCTGCGTCACGAAAACAAAGACCT
GAAAGCTCGTCTGGAAAACGCTATGGAAGTTGCTGGTCGTGACTTCAAACGTGCTGAA
GAACTGGAAAAAGCTAAACAGGCTTAACTCGAG

XhoI

M 蛋白质序列

ANGDGNPREVIEDLAANNPAIQNIRLRYENKDLKARLENAMVAGRDFKRAEENLLDQV
TQLYTKHNSNYQQYNAQAGRLDLRQKAEYLGKGLNDWAERLLQELNSAAPLTRATADNK
DELIKRANDYEIQNHQLTVENKKLKTDEADARSVNGEFPRHVKLKNEIENLLDQVTQLY
TKHNSNYQQYNAQAGRLDLRQKAEYLGKGLIEDLAANNPAIQNIRLRHENKDLKARLENA
MEVAGRDFKRAEELEKAKQA

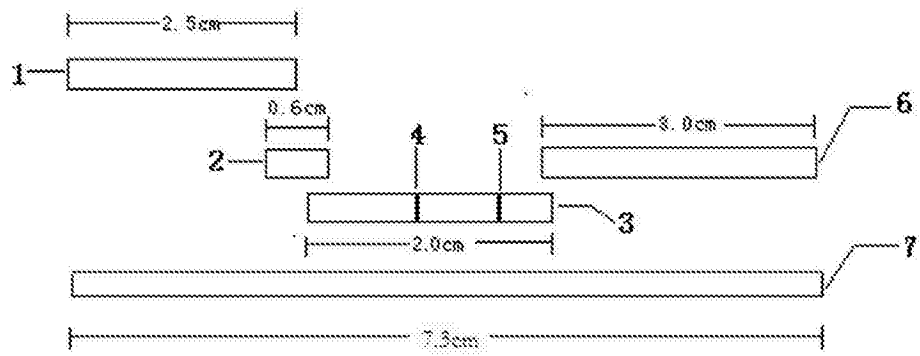


图1

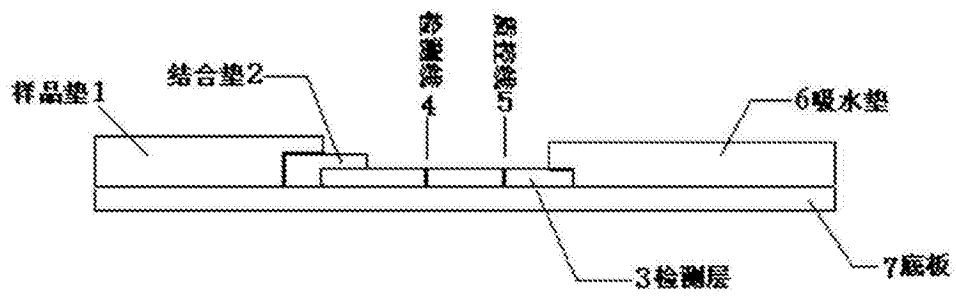


图2

专利名称(译)	人A群链球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	CN105277694B	公开(公告)日	2017-01-18
申请号	CN201410406457.2	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 G01N33/532		
代理人(译)	王敏锋		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN105277694A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人A群链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用，其中检测卡包括底板、样品垫、结合垫、检测层以及吸水垫；结合垫包被有量子点标记的抗人A群链球菌纳米探针；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；检测线包被有鼠抗人A群链球菌M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；结合垫以及吸水垫分别与检测层以及底板粘贴在一起；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。本发明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A群链球菌（M1，3，5，6，24血清型）量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

