



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105319360 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201410406479.9

审查员 赵晓明

(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 105319360 A

(43)申请公布日 2016.02.10

(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)

权利要求书3页 说明书13页

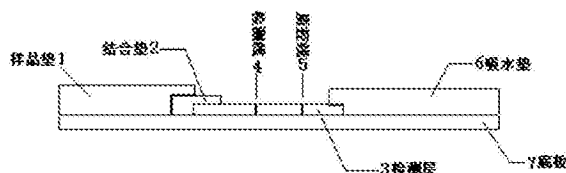
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

人肺炎衣原体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肺炎衣原体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肺炎衣原体纳米探针;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肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体;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。



1.一种基于人肺炎衣原体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M98-His融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1)对人肺炎衣原体98KD膜蛋白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,同时标记为m98;

所述m98基因序列是:

```

CAATATGACAAACGGTCTACTACAGGTCAGGGAAACGCTTTCCTTCAGCAGGAGGCGTAAATTTAGAAATAT
NdeI
TGGTAAACTTTGTASTTGGCTGGGAATTTTCTACTGCGAGTGGTGGAGCTATCAAAAGGAGCGTCTTTCTCT
TTTAACTGGCACTTCTGGAGATGCTCTTTTAACTAACAACTCTTCATCAACAAAGGAGGAAACAATTCG
TACTACAGCAGGCGCTCCCATAGCAAATTAACACAGCGTTATGCTTACATTCCTATCTAACATAAGCGCTAC
GTCAGAAKKGCTATCGATGGATGGAGGCAAGTGCATACATCGAACAACAAATTTCTATATTTTGAAGG
GAATTCAGCGAAAACTACTGCGCGGTGCGATCTGCAACACCAAGGCGAGTGGATCTCCTGAACTGATAAT
CTCTAACAAATAAGACTCTGATCTTTCCTTCAAACGTTACGACAAACRAGCGCGTGGCGCCATCCATGCTAA
AAAGCTAGCGCCCTTTCCTCTGGAGGCTTACAGAGTTTCTACGAAATATGTCTAACICGAG
NdeI

```

1.1.3)将步骤1.1.2)中所得到的m98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M98-His融合蛋白;所述重组M98-His融合蛋白以包涵体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)兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备:

1.2.1)以步骤1.1.4)中所得到的重组M98-His融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清;所述兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清的间接ELISA效价均大于1×10⁵;

1.2.2)采用Protein G亲和层析柱分别纯化兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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)量子点标记的抗人肺炎衣原体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)在步骤1.3.1)所制得的活化的量子点中,加入4-12nmol的步骤1.2)所制备的兔

抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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 $^{\circ}$ 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2mI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 $^{\circ}$ 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1mI磷酸盐保存液中,至此制得量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针;

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、5mI/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)量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针负载:

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肺炎衣原体纳米探针溶液中1h,取出,25 $^{\circ}$ C干燥后4 $^{\circ}$ 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,再置于生物安全柜内37 $^{\circ}$ C通风干燥后,25 $^{\circ}$ 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、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;

3)检测层的制备:

3.1)将步骤1.2)制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG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)将稀释好的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置0.8-2.5 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0.8-2.5 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;

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;

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)人肺炎衣原体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)将组装好的人肺炎衣原体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。

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)所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG;

所述步骤3.1)中将步骤1.2)制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG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,将稀释好的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG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。

人肺炎衣原体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,具体为一种人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)作为衣原体属的一种重要的呼吸道病原微生物,自从上个世纪80年代中期由Grayston等人正式命名,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,感染方式可能为人与人之间通过呼吸道分泌物传播。5岁以下儿童极少受染,8岁以上儿童及青年易被感染,尤其是人群聚集处,如家庭、学校、军营中易流行,经血清流行病学调查,证实成人中至少有40%已受到该衣原体感染,大部分为亚临床型。肺炎衣原体是专性细胞内寄生的微生物,寄居于人呼吸道和咽喉等处,在儿童和成人中产生上呼吸道和呼吸道感染,常引起肺炎和支气管炎等呼吸道疾病。目前研究表明,其还与动脉粥样硬化综合症、老年痴呆症、心肌炎、哮喘等疾病有关。临床上由于其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。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。

[0003] 尽管肺炎衣原体在全球范围内传播,但可用于实验室诊断的标准化商品试剂的种类极少。目前,肺炎衣原体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。检测血清中肺炎衣原体IgG、IgA、IgM抗体常用的有5种方法: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),OY酶免疫试剂盒(LoY—EIA)。这5种方法要求肺炎衣原体不同成分做为抗原,而且肺炎衣原体抗体的检出只能说明该个体感染过肺炎衣原体,却不能反映体内是否仍有肺炎衣原体活菌存在,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。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。

[0004] 核酸检测包括核酸杂交和聚合酶链式反应(PCR),核酸杂交检测肺炎衣原体的特异性强,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,应用肺炎衣原体外膜蛋白基因片段的一对特异性引物对临床咽拭子进行PCR测定,其结果与血清学检测具有较好的一致性。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。

[0005] 抗原检测方法有鸡胚卵黄囊分离培养和细胞培养法(常用HL和Hep-2两种细胞),然后采用荧光标记或酶标记抗体检测标本中的衣原体,但该方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。近年也尝试直接应用于临床标本的检验,其敏感性与标本采集有关:痰液和咽拭子涂片后用EIA可检测肺炎衣原体抗原的存在,其敏感性、特异性和可重复性不理想,且仅限于急性呼吸道感染;酶联免疫吸附试验(ELISA)也可以直

接检出病原体,主要检测肺炎衣原体外膜蛋白-2,所用抗体为抗衣原体属特异性抗体,不能直接识别肺炎衣原体,与“金标准”(MIF)相比,虽然很灵敏,特异性却不高。

[0006] 因此,目前建立具高灵敏度、高特异性的人肺炎衣原体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

[0007] 本发明针对背景技术中现存的几种人肺炎衣原体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肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术手段来实现的:

[0009] 一种人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述人肺炎衣原体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肺炎衣原体纳米探针;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肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体;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。

[0010] 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。

[0011] 作为优选,本发明所采用的抗兔IgG包括但不限于羊抗兔IgG。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 一种基于上述的人肺炎衣原体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:

[0015] 1)结合垫的制备:

[0016] 1.1)重组M98-His融合蛋白的制备、纯化:

[0017] 1.1.1)对人肺炎衣原体98KD膜蛋白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;

[0018] 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,同时标记为m98;其基因序列如列表所示;

[0019] 1.1.3)将步骤1.1.2)中所得到的m98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M98-His融合蛋白;所述重组M98-His融合蛋白以包涵体表达方式存在于菌体中;

[0020] 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;

[0021] 1.2)兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备:

[0022] 1.2.1)以步骤1.1.4)中所得到的重组M98-His融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清;所述兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清的间接ELISA效价均大于 1×10^5 ;

[0023] 1.2.2)采用Protein G亲和层析柱分别纯化兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清中的多克隆抗体IgG;

[0024] 1.2.3)用凯基B 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;

[0025] 1.3)量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的制备与纯化:

[0026] 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;

[0027] 1.3.2)在步骤1.3.1)所制得的活化的量子点中,加入4-12nmol的步骤1.2)所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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肺炎衣原体纳米探针;

[0028] 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;

[0029] 1.4)量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针负载:

[0030] 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肺炎衣原体纳米探针溶液中1h,取出,25℃干燥后4℃密封保存备用,至此制得结合垫;

[0031] 2)样品垫的制备:

[0032] 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;

[0033] 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;

[0034] 3)检测层的制备:

[0035] 3.1)将步骤1.2)制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG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;

[0036] 3.2)将稀释好的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置0.8-2.5 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0.8-2.5 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;

[0037] 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;

[0038] 4)底板的制备

[0039] 将PVC材质的底板按实际要求裁剪后备用;

[0040] 5)吸水垫的制备

[0041] 将吸水滤纸按实际要求裁剪后备用;

[0042] 6)人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡的组装:

[0043] 6.1)将步骤4)所制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉;

[0044] 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;

[0045] 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;

[0046] 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;

[0047] 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;

[0048] 6.6)将组装好的人肺炎衣原体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;

[0049] 所述步骤6.1)至步骤6.6)均是在生物安全柜内进行操作。

[0050] 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)所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG;

[0051] 作为优选,本发明所采用的步骤3.1)中将步骤1.2)制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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;

[0052] 作为优选,本发明所采用的步骤3.2)中,将稀释好的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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。

[0053] 一种基于上述的人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡作为非诊断性检测人肺炎衣原体的应用。

[0054] 一种基于上述的人肺炎衣原体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:

[0055] 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、Nonidet P-40 10mI/L,SDS 1mI/L以及氯化钠2g/L,所述样品处理液的pH=7.3;

[0056] 2)若待检样品中含有人肺炎衣原体抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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;

[0057] 若待检样品中无人肺炎衣原体抗原,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。

[0058] 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。

[0059] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0060] 1、本发明的检测人肺炎衣原体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(其对肺炎衣原体的检测底线为1ng/mI),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。

[0061] 2、本发明所用的抗体均是识别人肺炎衣原体特异性98KD表面抗原胞外保守区的多克隆抗体,其特异性高,属于种特异性抗体,不与沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体起交叉反应,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。

[0062] 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。

[0063] 4、由于检测卡检测的是肺炎衣原体抗原而非抗体(抗体的出现需要感染几天至几周以后),故该方法在肺炎衣原体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。

[0064] 5、本发明首次以肺炎衣原体所独有的98KD表面膜蛋白作为目标抗原,其检测特异性高,不与其他任何衣原体起交叉反应。而传统ELISA法的检测标的为Cpn外膜蛋白-2(OMP-2),所用抗体为抗衣原体属特异性抗体,不能直接识别Cpn,其存在与鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体等起交叉反应的缺点。

[0065] 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

[0066] 图1是本发明所提供检测卡的纵向剖面结构示意图;

[0067] 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;

[0068] 其中:

[0069] 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

[0070] 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肺炎衣原体抗原的量子点免疫层析检测卡。首先是兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体和鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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，最后制备人肺炎衣原体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。

[0071] 如附图1所示，本发明所提供了一种人肺炎衣原体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肺炎衣原体纳米探针；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包被有鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体；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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 制备上述人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡的方法，其主要步骤包括：

[0075] 一、结合垫的制备

[0076] (1)重组M98-His融合蛋白的制备、纯化：

[0077] 对人肺炎衣原体98KD膜蛋白进行生物信息学分析，获取人肺炎衣原体98KD膜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，同时标记为m98。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M98-His融合蛋白。此融合蛋白以包涵体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M98-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；

[0078] (2)兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备：

[0079] 以纯化的重组M98-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，分别制备兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清。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。其中兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG用作量子点标记试验；鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG用作检测线的包被。

[0080] (3)量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的制备与纯化

[0081] 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)所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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肺炎衣原体纳米探针。

[0082] (4)量子点标记抗体的负载

[0083] 将聚酯纤维膜浸入步骤(3)所得到的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针溶液中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。

[0084] 二、样品垫的制备

[0085] 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),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种方法处理后,显著地提高了量子点标记抗体的释放率。

[0086] 三、检测层的制备

[0087] 检测层的制备,是通过分别将由步骤一中所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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:

[0088] 将步骤一中制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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,其中鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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。将稀释好的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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。

[0089] 四、底板的加工

[0090] 将PVC材质的底板裁剪成4cm*7.3cm的规格后备用。

[0091] 五、吸水垫的制备

[0092] 将吸水滤纸裁剪成4cm*3cm的规格,即制成吸水垫,备用。

[0093] 六、检测卡的组装

[0094] 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载成4.0mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。至此制得人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡。

[0095] 上述人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡的使用方法,步骤如下:

[0096] 将待检样品(如咽拭子等)用500 μ l的样品处理液(2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,Nonidet P-40 10ml/L,SDS 1ml/L,2g/L氯化钠,pH7.3)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。若待检样品中含有人肺炎衣原体抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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。

[0097] 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。

[0098] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0099] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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 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。

[0103] 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。

[0104] 5、兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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。

[0105] 6、鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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] 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。

[0107] 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。

[0108] 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)。

[0109] 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)。

[0110] 11、硝酸纤维素膜:型号为Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于Millipore公司。

[0111] 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)。

[0112] 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。

[0113] 14、人肺炎衣原体菌株:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为ATCC53592。

[0114] 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)。

[0115] 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:

[0116] 实施例1(制备实施例)

[0117] 结合垫的制备

[0118] (一)重组M98-His融合蛋白的制备、纯化

[0119] 1. 相关基因的克隆

[0120] 对人肺炎衣原体98KD膜蛋白(其NCBI蛋白质数据库中的accession number为CAA04672)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m98。其基因全序列如列表所示。具体的说,m98基因编码的蛋白质序列为天然人肺炎衣原体98KD膜蛋白(accession number:CAA04672)的130-305aa。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m98基因连入pET-28a(+)载体中,并转化大肠杆菌TOP10,构建pET-M98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M98-His融合蛋白。

[0121] 2. 重组M98-His融合蛋白的表达与纯化

[0122] 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.coIi BL21(DE3)中,转化完成后将菌液涂布于含50μg/mL卡那霉素的LB平板上,按常规方法筛选表达菌株。挑取pET-M98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37℃培养过夜。取出菌液后,按1:100接种于100mL含有50μg/mL卡那霉素的LB培养基中,于37℃培养至OD₆₀₀=0.6时,加入1mM IPTG至终浓度为1mM,于37℃摇菌培养,诱导融合蛋白表达。诱导4h后分别于8000r/min下离心10min收集菌体。将菌体用20mL PBS缓冲液洗涤3次并再次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收集沉淀,即为包涵体。将此包涵体用洗涤缓冲液(20mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;3M尿素,30mM咪唑,pH7.4)洗涤两次后,12000g离心15min收集沉淀。将沉淀用Binding buffer(20mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;8M尿素,30mM咪唑,pH7.4)于室温下溶解后,12000g离心15min,上清用0.45μm的滤膜进行过滤。此溶解液中的重组蛋白用His Trap affinity columns(GE healthcare公司产品),按照说明书的方法进行纯化。具体方法如下:

[0123] 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。

[0124] 2)用10mL Binding buffer平衡,1mL/min流速。

[0125] 3)将融合蛋白上样,1mL/min流速。

[0126] 4)用10mL Binding buffer,以1mL/min流速洗柱。

[0127] 5)用10mL Elution buffer(20mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;8M尿素,500mM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。

[0128] (二)兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0129] 1.兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0130] 用步骤(一)纯化的重组M98-His融合蛋白按照200μg(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M98-His融合蛋白按照200μg(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 KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄pH7.4)调整为1mg/mL,-20℃保藏备用,至此制得兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG。Westen blot试验表明,此多克隆抗体IgG能特异性识别人肺炎衣原体全长98KD膜蛋白。

[0131] 2.鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0132] 用步骤(一)纯化的重组M98-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200μg/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, 至此制得鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG。Western blot试验表明, 此多克隆抗体IgG能特异性识别人肺炎衣原体全长98KD膜蛋白。

[0133] (三)量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的制备

[0134] 1. 纳米羧基量子点标记兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG反应条件的优化:

[0135] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记pH的确定

[0136] 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。

[0137] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0138] 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肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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。

[0139] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0140] 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。

[0141] 2. 标记过程:

[0142] 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(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, 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suIfo-NHS与EDC。在活化的量子点中, 加入6nmol的步骤(二)制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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肺炎衣原体纳米探针, 置于4℃保存备用。

[0143] (四)量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的负载

[0144] 将聚酯纤维膜浸入步骤(三)所得到的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针溶液中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。

[0145] 实施例2(制备实施例)

[0146] 样品垫的制备

[0147] 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。

[0148] 实施例3(制备实施例)

[0149] 检测层的制备

[0150] 将硝酸纤维素膜剪成4cm*4cm大小。将实施例1中所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体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。将稀释好的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0 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 μ I/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。

[0151] 实施例4(制备实施例)

[0152] 检测卡的组装

[0153] 下面结合附图1及附图2对检测卡的组装作进一步说明。

[0154] 将底板裁剪成4cm*7.3cm大小,备用。

[0155] 将吸水滤纸裁剪成4cm*3cm大小,作为吸水垫,备用。

[0156] 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裁成4.0mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

[0157] 实施例5(应用实施例)

[0158] 检测卡的使用方法

[0159] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有500 μ I的样品处理液(2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,Nonidet P-40 10mI/L,SDS 1mI/L,2g/L氯化钠,pH 7.3)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 μ L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。若咽拭子中含有人肺炎衣原体抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜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。

[0160] 实施例6(应用实施例)

[0161] 本发明的应用效果举例

[0162] 本实施例中所指的人肺炎衣原体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。

[0163] 1)特异性试验

[0164] 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)等代替人肺炎衣原体进行检测,检测卡检测含这些微生物的样品处理液都为阴性。

[0165] 2)敏感性试验

[0166] 通过测定人肺炎衣原体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肺炎衣原体菌株(AR-39株,ATCC编号53592)的检测下限为1ng/ml。

[0167] 3)临床测试例

[0168] 以人肺炎衣原体检测金标准-培养法作为参照,取68例呼吸科下呼吸道感染者的肺泡灌洗液标本用实施例4所描述的检测卡进行检测,培养法阳性率为27.9%(19/68),本检测卡为26.5%(18/68),2种方法的符合率为95.6%(65/68)。

[0169] 表1临床标本的检测结果

		纳米量子点免疫层析法		
		阳性	阴性	总计
痰培养法	阳性	17	2	19
	阴性	1	48	49
	总计	18	50	68

[0171] 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

m98 基因序列

CATATGACAACGGTTACTACAGGTCAGGGAACGCTTTCCTCAGCAGGAGGCGTAAATTTAGAAAATAT

NdeI

TCGTAAACTTGTAGTTGCTGGGAATTTTTCTACTGCAGATGGTGGAGCTATCAAAGGAGCGTCTTTCCT
TTTAACTGGCACTTCTGGAGATGCTCTTTTTAGTAACAACCTTCATCAACAAAGGGAGGAGCAATTGC
TACTACAGCAGGCGCTCGCATAGCAAATAACACAGGTTATGTTAGATTCCTATCTAACATAGCGTCTAC
GTCAGGAGGCGCTATCGATGATGAAGGCACGTCGATACTATCGAACAACAAATTTCTATATTTTGAAGG
GAATGCAGCGAAAACACTACTGGCGGTGCGATCTGCAACACCAAGGCGAGTGGATCTCCTGAACTGATAAT
CTCTAACAAATAAGACTCTGATCTTTGCTTCAAACGTAGCAGAAACAAGCGGTGGCGCCATCCATGCTAA
AAAGCTAGCCCTTTCCTCTGGAGGCTTTACAGAGTTTCTACGAAATAATGCTTAACTCGAG

XhoI

M98 蛋白质序列

TTVTTGQGTLS SAGGVNLENIRKLVVAGNFSTADGGAIKGASFLLTGTSGDALFSNNSSTKGGAIATT
AGARIANNTGYVRFLSNIASTSGGAIDDEGTSILSNKFLYFEGNAAKTTGGAICNTKASGPELIISN
NKTLIFASNVAETSGGAIHAKKLALSSGGFTEFLRNNV

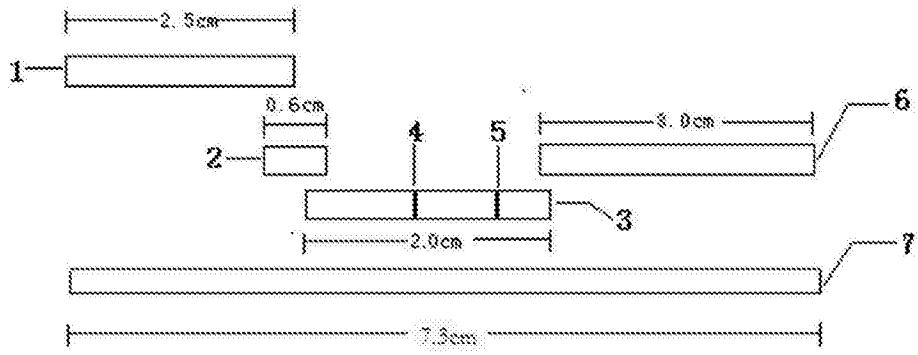


图1

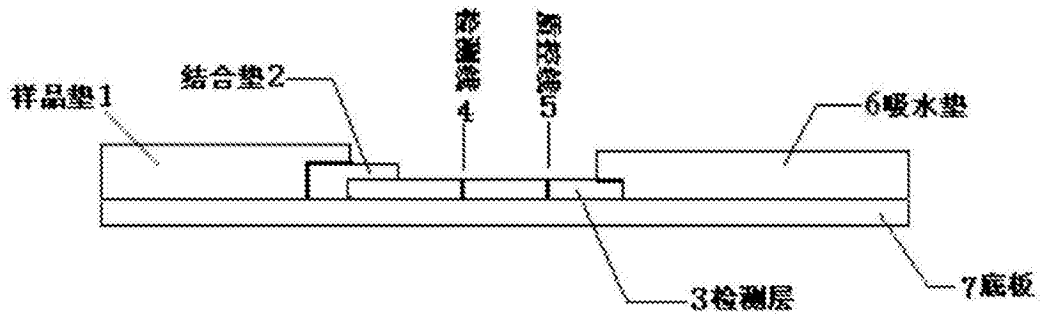


图2

专利名称(译)	人肺炎衣原体量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105319360B	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201410406479.9	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		
[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)	赵晓明		
其他公开文献	CN105319360A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人肺炎衣原体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肺炎衣原体纳米探针；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肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体；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。

