



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105753982 B

(45)授权公告日 2019.10.08

(21)申请号 201610129944.8

(22)申请日 2016.03.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105753982 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(73)专利权人 湖北工业大学
地址 430068 湖北省武汉市武昌南湖李家
墩一村一号
专利权人 湖北华龙生物制药有限公司

(72)发明人 胡征 董俊 杨波

(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.
G07K 16/12(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

WO 2014027697 A1,2014.02.20,
Hazeline Roche et al.,.Relative roles
of genetic background and variation in
PspA in the ability of antibodies to PspA
to protect against capsular type 3 and 4
strains of Streptococcus pneumoniae.
《INFECTION AND IMMUNITY》.2003,第71卷(第8
期),4498-4505.

Maria Cristina C. Brandileone et
al.,.Typing of pneumococcal surface
protein A (PspA) in Streptococcus
pneumoniae isolated during
epidemiological surveillance in Brazil:
towards novel pneumococcal protein
vaccines.《Vaccine》.2004,第22卷(第29-30
期),3890-3896.

审查员 刘俊

权利要求书4页 说明书11页
序列表1页

(54)发明名称

抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体及
应用该抗体的免疫层析试剂盒

(57)摘要

本发明涉及抗人肺炎链球菌fam1家族PspA
蛋白抗体及应用该抗体检测人肺炎链球菌的免
疫层析试剂盒,抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋
白抗体是分别识别人肺炎链球菌fam1家族PspA
蛋白71-84位以及357-370位氨基酸所组成的两个
线性抗原表位的抗体,人肺炎链球菌fam1家族
PspA蛋白在GenBank序列号是AAF27703.1;人肺
炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位以及357-
370位的氨基酸序列分别为KAAQKKYDEDQKKT及
APKPEKPAEQPKAE。本发明所提供的两种兔抗人肺
炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体具有特异性好、
纯度高、效价高、制备成本低廉的特点。

CN 105753982 B

1. 一种基于抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体所形成的免疫层析试剂盒,其特征在于:所述试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒或基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒;

抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体是AbP1以及AbP2,AbP1以及AbP2的制备方法是:

1) 经结构生物学分析及相关实验研究后,选定人肺炎链球菌 fam1家族 PspA蛋白71-84位的14个氨基酸及357-370位的14氨基酸组成的短肽分别作为制备兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的两个线性抗原表位,该两段氨基酸序列分别为KAAQKKYDEDQKKT及APKPEKPAEQPKAE,将此二序列分别命名为P1及P2;

2) 将步骤1)所述的氨基酸序列P1的C端、P2的N端分别添加一个半胱氨酸后,用多肽自动合成仪分别合成多肽并纯化,纯化后的两条多肽分别与载体蛋白KLH偶联,形成P1-KLH复合蛋白及P2-KLH复合蛋白;

3) 分别将步骤2)所合成的两种复合蛋白乳化,乳化后分别在兔腹部皮下多点注射,先后注射三次,每次间隔7-10天;

4) 第三次注射10-12天后,分别收集、分离得到两种含有兔抗人肺炎链球菌 fam1家族 PspA蛋白抗体的血清,ELISA分别检测血清中兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的效价,所述的两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的效价均在1:60000以上;

5) 将步骤2)合成并纯化的两条多肽分别与溴化氰活化的Sepharose 4B偶联,形成两组多肽亲和层析柱;

6) 将步骤4)获得的两种含有兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的血清分别对应的加入到步骤5)制备的两种亲和层析柱中,并在4℃孵育过夜后,洗脱抗体,得到两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体;经SDS-PAGE鉴定其纯度均在97%以上,将这两种纯化的抗体分别命名为AbP1及AbP2;

所述试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒时,所述试剂盒的制备方法是:

1) 量子点标记抗体AbP1溶液:

向微量离心管中依次加入0.4 nmol羧基水溶性量子点和800 nmol碳二亚胺EDC,以MES缓冲液定容为1 ml,混合溶液,37℃反应5 min后,再加入0.4 mg的制备得到的抗体AbP1,避光反应2 h,加入单端氨基聚乙二醇PEG2000-NH₂至终浓度为1%*m/v*,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1 h;反应后的样品用超滤管离心,6500g离心5min,至体积200u1,将超滤后样品转移至普通EP管内,离心除团聚,得到上部清液以及下部沉淀,10000g条件下离心3min;将上部清液加到分离柱Superdex-200上纯化,待上部清液自然流入柱体中,然后用PBS冲洗,用紫外光照射柱体观察样品的位置,待样品开始从下部流出时开始收集,收集1 ml后停止收集;将纯化后的样品用超滤管以6500g离心浓缩至200u1后转移至普通EP管内离心除团聚,对普通EP管进行离心的条件是10000g,3min;获取上清后以磷酸盐保存液稀释200倍,4℃保存备用;至此制得量子点标记抗体AbP1溶液;

所述MES缓冲液中各组分含量分别是:10.66 g/L MES以及0.74 g/L EDTA,所述MES缓冲液的pH 7.4;

所述磷酸盐保存液的制备方式是称取0.29 g磷酸氢二钠、0.0295 g磷酸二氢钠、0.2 g氯化钠、1 g牛血清白蛋白BSA以及0.1 gNa₃,溶解于90 ml的去离子水中,用1 mol/L NaOH

调pH至7.3后用去离子水定容至100 ml；

2) 制备结合垫

将聚酯纤维膜浸入步骤1)所得到的量子点标记抗体AbP1溶液中1 h,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；

3) 制备样品垫

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3 h,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℃密封保存；

所述样品垫处理液的制备方式是称取0.29 g磷酸氢二钠、0.0295 g磷酸二氢钠、0.2 g氯化钠、2 g牛血清白蛋白BSA、1 ml吐温-20、2 g蔗糖以及0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮PVP-10,溶解于90 ml的去离子水中,用1 mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100 ml；

4) 制备检测层

将硝酸纤维素膜剪成4cm×4cm大小；将制备得到的抗体AbP2和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0 mg/mL及1.0 mg/mL；将稀释好的抗体AbP2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,质控线与检测线间距为0.7 cm；将喷好的硝酸纤维素膜37℃干燥2 h,剪裁成4cm×4cm的规格,4℃密封干燥保存；至此制得检测层；

所述磷酸盐缓冲液的制备方式是：称取0.29 g磷酸氢二钠、0.0295 g磷酸二氢钠以及0.2 g氯化钠,溶解于90 ml的去离子水中,用1 mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100 ml；

5) 组装检测卡

5.1) 将底板裁剪成4cm×7.3cm大小,备用；

5.2) 将吸水滤纸裁剪成4cm×3cm大小,作为吸水垫,备用；

5.3) 将步骤5.1)制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4)所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并抹平膜面；

5.4) 将步骤5.2)准备好的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层右末端有0.2 cm的重叠,吸水垫的右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并抹平；再将步骤2)所描述的结合垫按0.3 cm重叠于检测层的左边缘处,0.3 cm粘于底板上；

5.5) 将步骤3)所描述的样品垫则按一边0.3 cm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；将组装好的检测板于切条机下载成4.0 mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存；

所述试剂盒是基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒时,所述试剂盒的制备方法是：

1) 胶体金标记抗体AbP1

1.1) 制备30 nm胶体金溶液：

取一个硅化好的250ml三角瓶,加入99ml超纯水,将1ml 1% m/v HAuCl₄溶液加入250ml三角瓶中并与超纯水混匀,油浴加热并搅拌至沸腾；向250ml三角瓶中快速加入2ml 1% m/v 柠檬酸三钠水溶液,溶液继续沸腾10min,待250ml三角瓶中的溶液由蓝色转变为红色时停止加热,将250ml三角瓶中的溶液自然冷却至室温,然后向250ml三角瓶中加入超纯水补齐至100ml；

1.2) 胶体金标记抗体AbP1:

1.2.1) 取一个硅化好的50ml三角瓶,加入10 ml步骤1.1)所制备的胶体金溶液,向胶体金液中加入240ul 0.2 mol/L K_2CO_3 调节pH至8.5;

1.2.2) 在电磁搅拌器搅拌下,将抗体AbP1加入胶体金溶液中,至抗体终浓度为10 ug/ml,加入抗体时逐滴加入,加完后继续搅拌45 min~60 min;

1.2.3) 反应完成加入2.5ml 5% m/v牛血清白蛋白BSA至终浓度为1% m/v,搅拌15~30分钟,4℃保存备用;

1.2.4) 将标记好的抗体AbP1取出后装入50ml离心管,2500g,4℃离心5分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉下层沉淀,上层清液转移至另一只50ml离心管,12000g,4℃离心30分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉上层清液,将下层沉淀用10 ml胶体金缓冲液重悬沉淀,然后再12000g,4℃离心30分钟,再次得到下层沉淀及上层清液,将下层沉淀最后用3ml胶体金缓冲液重悬,4℃保存备用;

所述胶体金缓冲液中各组分含量分别是:10mM Tris、1% m/v BSA、1% v/v Tween-20、5% m/v 蔗糖以及3‰ m/v聚乙烯吡咯烷酮,所述胶体金缓冲液的pH为10.5;

2) 制备结合垫

将聚酯纤维膜浸入步骤1)所得到的胶体金标记抗体AbP1溶液中1 h,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;

3) 制备样品垫

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2 h,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,剪裁成规格为4cm×1.5cm/条后,即制得样品垫,25℃密封保存;

所述样品垫处理液的制备方式是称取0.242g Tris、1 g牛血清白蛋白BSA、1 ml吐温-20、5 g蔗糖以及0.3g 聚乙烯吡咯烷酮PVP-10,溶解于90 ml的去离子水中,用1 mol/L NaOH调pH至11后用去离子水定容至100 ml;

4) 制备检测层

将硝酸纤维素膜剪成4cm×4cm大小;将制备得到的抗体AbP2和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0 mg/mL及1.0 mg/mL;将稀释好的抗体AbP2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,质控线与检测线间距为0.5 cm;将喷好的硝酸纤维素膜37℃干燥18h,剪裁成4cm×2cm的规格,4℃密封干燥保存;至此制得检测层;

所述磷酸盐缓冲液的制备方式是:称取0.29 g磷酸氢二钠、0.0295 g磷酸二氢钠以及0.2 g氯化钠,溶解于90 ml的去离子水中,用1 mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100 ml;

5) 组装检测卡

5.1) 将底板裁剪成4cm×6cm大小,备用;

5.2) 将吸水滤纸裁剪成4cm×2.5cm大小,作为吸水垫,备用;

5.3) 将步骤5.1)制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4)所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并抹平膜面;

5.4) 将步骤5.2)准备好的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层右末端有

0.2 cm的重叠,吸水垫的右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并抹平;再将步骤2)所描述的结合垫按0.2cm重叠于检测层的左边缘处,0.4cm粘于底板上;

5.5) 将步骤3)所描述的样品垫则按一边0.2cm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;将组装好的检测板于切条机下载成4.0 mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,涉及抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体及应用该抗体检测人肺炎链球菌的免疫层析试剂盒。

背景技术

[0002] 人肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp) 是儿童呼吸道感染的重要病原体。主要经飞沫传播而进入呼吸道,从而寄生于人体的鼻咽部,或侵入人体不易清除的部位引起一系列的疾病,如大叶性肺炎,脑膜炎,支气管炎,中耳炎等。它是全球所有年龄组高发病率和病死率的主要病原菌。其中,在发展中国家,婴幼儿、老年人及免疫缺陷人群中尤为严重。肺炎链球菌于1881年首次由巴斯德 (Louis Pasteur) 及G.M.Sternberg分别在法国及美国从患者痰液中分离出。其为革兰氏染色阳性,菌体似矛头状,成双或成短链状排列的双球菌,有毒株菌体外有化学成分为多糖的荚膜。其荚膜具有抗原性,是肺炎链球菌分型的依据。根据荚膜多糖抗原性的不同将肺炎球菌分为91个血清型。其菌体抗原主要为C多糖,其存在于肺炎链球菌细胞壁中,具有种特异性,为各型菌株所共有。C多糖可被血清中C-反应蛋白沉淀。在钙离子存在时,C多糖可与正常人血清中称为C-反应蛋白 (C reactive protein, CRP) 的β球蛋白结合,发生沉淀。目前针对人肺炎链球菌抗原的检测亦主要是针对此抗原,而该抗原非肺炎链球菌独有,如缓和链球菌亦含有该抗原。并且C多糖的提纯过程困难,造成生产成本较高。在肺炎链球菌表面还有一种与毒力相关的重要抗原,为肺炎链球菌表面蛋白A (PspA),其存在于所有肺炎链球菌血清型中,是肺炎链球菌的特异性抗原。PspA分为3个家族,其中具有Fam1或Fam2家族PspA蛋白的人肺炎链球菌占到了临床分离的人肺炎链球菌种类的99%以上。

[0003] 临床病人由于不同的呼吸道病原体 (如肺炎支原体、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] 尽管肺炎链球菌在全球范围内传播,婴幼儿的感染尤其普遍,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] 实验室诊断肺炎链球菌的金标准是分离人肺炎链球菌毒株。采用鼻咽分泌物作为病原体分离的标本,可以用血培养的方法分离病原体。但是该法有严重的缺陷,因为肺炎链球菌是苛养菌,营养要求高,培养所需时间长,阳性率低,更重要的是,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,检测被检者血清中肺炎链球菌抗

体水平,可间接提示肺炎链球菌感染的存在。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,如果恢复期中抗人肺炎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,抗体出现的时机不易掌握,且因为菌体血清型种类过多,导致其诱生的抗荚膜多糖抗体种类过多,对抗体的检测造成了很大的困难,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] 直接检查人肺炎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方法快速、灵敏、特异,是目前研究肺炎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,检测人肺炎链球菌抗原的方法主要为胶体金法检测其C多糖抗原,但是该法敏感度较低,对待检样品材料质量要求较高,同时还存在与其他链球菌如缓和链球菌存在交叉反应等缺陷。PspA蛋白则是一个极具特异性的检测标的。目前,关于抗人肺炎链球菌PspA蛋白抗体报道得最多的为相应的多克隆抗体。多克隆抗体主要由基因工程表达的PspA蛋白免疫家兔等动物制备而成。其制备方法简单,成本低,但是其具有特异性低、效价低、纯度低等缺陷。因此,低成本的制备高特异性、高效价的抗人肺炎链球菌PspA蛋白抗体就显得十分重要。

发明内容

[0012] 针对背景技术中存在的这些技术问题,本发明的目的在于提供识别人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位以及357-370位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的两种抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒。

[0013] 抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体,其特征在于:所述抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体是分别识别人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位以及357-370位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的两种抗体,所述人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白在GenBank序列号是AAF27703.1;所述人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的14个氨基酸以及357-370位的14个氨基酸的氨基酸序列分别为KAAQKKYDEDQKKT及APKPEKPAEQPKAE;将人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的14个氨基酸以及357-370位的14个氨基酸的序列分别命名为P1及P2;所述抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体是AbP1以及AbP2。

[0014] 一种基于如前所述的抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体所形成的免疫层析试剂盒,其特征在于:所述试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒或基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒。

[0015] 作为优选,本发明所提供的试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒时,所述试剂盒的制备方法是:

[0016] 1) 量子点标记抗体AbP1溶液:

[0017] 向微量离心管中依次加入0.4nmol羧基水溶性量子点和800nmol碳二亚胺EDC,以MES缓冲液定容为1ml,混合溶液,37℃反应5min后,再加入0.4mg的制备得到的抗体AbP1,避光反应2h,加入单端氨基聚乙二醇PEG2000-NH₂至终浓度为1% (m/v),封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h;反应后的样品用超滤管离心(截留分子量100k),6500g离心5min,

至体积200 μ l,将超滤后样品转移至普通EP管内,离心除团聚,得到上部清液以及下部沉淀,10000g条件下离心3min;将上部清液加到分离柱Superdex-200上纯化,待上部清液自然流入柱体中,然后用PBS冲洗,用紫外光照射柱体观察样品的位置,待样品开始从下部流出时开始收集,收集1ml后停止收集;将纯化后的样品用超滤管(截留分子量100k)以6500g离心浓缩至200 μ l后转移至普通EP管内离心除团聚,对普通EP管进行离心的条件是10000g,3min;获取上清后以磷酸盐保存液稀释200倍,4 $^{\circ}$ C保存备用;至此制得量子点标记抗体AbP1溶液;

[0018] 所述MES缓冲液中各组分含量分别是:10.66g/L MES以及0.74g/L EDTA,所述MES缓冲液的pH 7.4;

[0019] 所述磷酸盐保存液的制备方式是称取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以及0.1gNaN₃,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;

[0020] 2) 制备结合垫

[0021] 将聚酯纤维膜浸入步骤1)所得到的量子点标记抗体AbP1溶液中1h,取出,25 $^{\circ}$ C干燥后裁成后规格为4cm \times 0.6cm/条后,4 $^{\circ}$ C密封保存备用,至此制得结合垫;

[0022] 3) 制备样品垫

[0023] 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,剪裁成规格为4cm \times 2.5cm/条后,即制得样品垫,25 $^{\circ}$ C密封保存;

[0024] 所述样品垫处理液的制备方式是称取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蔗糖以及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;

[0025] 4) 制备检测层

[0026] 将硝酸纤维素膜剪成4cm \times 4cm大小;将制备得到的抗体AbP2和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL;将稀释好的抗体AbP2装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0 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1.0 μ l/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,质控线与检测线间距为0.7cm;将喷好的硝酸纤维素膜37 $^{\circ}$ C干燥2h,剪裁成4cm \times 4cm的规格,4 $^{\circ}$ C密封干燥保存;至此制得检测层;

[0027] 所述磷酸盐缓冲液的制备方式是:称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠以及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;

[0028] 5) 组装检测卡

[0029] 5.1) 将底板裁剪成4cm \times 7.3cm大小,备用;

[0030] 5.2) 将吸水滤纸裁剪成4cm \times 3cm大小,作为吸水垫,备用;

[0031] 5.3) 将步骤5.1)制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4)所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并抹平膜面;

[0032] 5.4) 将步骤5.2)准备好的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层右末端有0.2cm的重叠,吸水垫的右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并抹平;再将步骤2)所描述的

结合垫按0.3cm重叠于检测层的左边缘处,0.3cm粘于底板上;

[0033] 5.5) 将步骤3) 所描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。

[0034] 作为优选,本发明所提供的试剂盒是基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒时,所述试剂盒的制备方法是:

[0035] 1) 胶体金标记抗体AbP1

[0036] 1.1) 制备30nm胶体金溶液:

[0037] 取一个硅化好的250ml三角瓶,加入99ml超纯水,将1ml 1% (m/v) H₂AuCl₄溶液加入250ml三角瓶中并与超纯水混匀,油浴加热并搅拌至沸腾;向250ml三角瓶中快速加入2ml 1% (m/v) 柠檬酸三钠水溶液,溶液继续沸腾10min,待250ml三角瓶中的溶液由蓝色转变为红色时停止加热,将250ml三角瓶中的溶液自然冷却至室温,然后向250ml三角瓶中加入超纯水补齐至100ml;

[0038] 1.2) 胶体金标记抗体AbP1:

[0039] 1.2.1) 取一个硅化好的50ml三角瓶,加入10ml步骤1.1) 所制备的胶体金溶液,向胶体金液中加入240ul 0.2mol/L K₂CO₃调节pH至8.5;

[0040] 1.2.2) 在电磁搅拌器搅拌下,将抗体AbP1加入胶体金溶液中,至抗体终浓度为10ug/ml,加入抗体时逐滴加入,加完后继续搅拌45min~60min;

[0041] 1.2.3) 反应完成加入2.5ml 5% (m/v) 牛血清白蛋白BSA至终浓度为1% (m/v),搅拌15~30分钟,4℃保存备用;

[0042] 1.2.4) 将标记好的抗体AbP1取出后装入50ml离心管,2500g,4℃离心5分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉下层沉淀,上层清液转移至另一只50ml离心管,12000g,4℃离心30分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉上层清液,将下层沉淀用10ml胶体金缓冲液重悬沉淀,然后再12000g,4℃离心30分钟,再次得到下层沉淀及上层清液,将下层沉淀最后用3ml胶体金缓冲液重悬,4℃保存备用;

[0043] 所述胶体金缓冲液中各组分含量分别是:10mM Tris、1% (m/v) BSA、1% (v/v) Tween-20、5% (m/v) 蔗糖以及3‰ (m/v) 聚乙烯吡咯烷酮,所述胶体金缓冲液的pH为10.5;

[0044] 2) 制备结合垫

[0045] 将聚酯纤维膜浸入步骤1) 所得到的胶体金标记抗体AbP1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;

[0046] 3) 制备样品垫

[0047] 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2h,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,剪裁成规格为4cm×1.5cm/条后,即制得样品垫,25℃密封保存;

[0048] 所述样品垫处理液的制备方式是称取0.242g Tris、1g牛血清白蛋白BSA、1ml吐温-20、5g蔗糖以及0.3g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11后用去离子水定容至100ml;

[0049] 4) 制备检测层

[0050] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×4cm大小;将制备得到的抗体AbP2和羊抗兔IgG用磷酸

盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL;将稀释好的抗体AbP2装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0 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1.0 μ l/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,质控线与检测线间距为0.5cm;将喷好的硝酸纤维素膜37 $^{\circ}$ C干燥18h,剪裁成4cm \times 2cm的规格,4 $^{\circ}$ C密封干燥保存;至此制得检测层;

[0051] 所述磷酸盐缓冲液的制备方式是:称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠以及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;

[0052] 5) 组装检测卡

[0053] 5.1) 将底板裁剪成4cm \times 6cm大小,备用;

[0054] 5.2) 将吸水滤纸裁剪成4cm \times 2.5cm大小,作为吸水垫,备用;

[0055] 5.3) 将步骤5.1) 制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4) 所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并抹平膜面;

[0056] 5.4) 将步骤5.2) 准备好的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层右末端有0.2cm的重叠,吸水垫的右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并抹平;再将步骤2) 所描述的结合垫按0.2cm重叠于检测层的左边缘处,0.4cm粘于底板上;

[0057] 5.5) 将步骤3) 所描述的样品垫则按一边0.2cm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;将组装好的检测板于切条机下载成4.0mm宽的检测卡,4 $^{\circ}$ C密封干燥避光保存。

[0058] 本发明的优点是:

[0059] 本发明提供了抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体,该抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体识别人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的14个氨基酸以及357-370位的14氨基酸所组成的两个线性抗原表位,人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白在GenBank序列号是AAB59852.1;人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的14个氨基酸以及357-370位的14氨基酸的氨基酸序列分别为SKYTIQRSTGDSID及FGIAQSSTRGGSRV;将人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的14个氨基酸以及357-370位的14氨基酸的序列分别命名为P1及P2;抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体是AbP1以及AbP2。基于人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白单一线性抗原表位所制备的上述两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体具有特异性好、纯度高、效价高、制备成本低廉的特点,可用于生产各种基于抗原-抗体反应的原理的高灵敏度检测人肺炎链球菌的检测试剂盒。同时,基于该抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体还制备得到了两种不同的免疫层析试剂盒。两种不同的免疫层析试剂盒能快速、准确检测生物样品中的具有fam1家族PspA蛋白的人肺炎链球菌,其均包括本发明所述的两种抗体;两种免疫层析试剂盒均可用于人肺炎链球菌感染的辅助诊断,具有更高的灵敏性与特异性,同时兼顾了简单、快速、稳定以及制造成本低等优势,适用于临床标本的检查,而且由于可以进行大批量的快速检查,也适合于流行病学调查。因此,本发明所述的两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体,两种免疫层析试剂盒均具有广泛的应用前景和实用价值。

具体实施方式

[0060] 为了有助于本领域的普通技术人员进一步理解本发明,下文特举较佳实施例详细说明本发明。

[0061] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0062] 1、样品垫处理液:称取0.242g Tris,1g牛血清白蛋白(BSA),1ml吐温-20,5g蔗糖,0.3g聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10),溶解于90ml的去离子水中,用1mol/LNaOH调pH至11后用去离子水定容至100ml。

[0063] 2、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以及0.1gNaN₃,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;

[0064] 3、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。

[0065] 4、样品处理液:称取0.0121g三羟甲基氨基甲烷,0.17g氯化钠,0.025g溶菌酶溶解于90ml去离子水中,用盐酸调pH至8.0后用去离子水定容至100ml。

[0066] 5、抗体AbP1:为本发明自制,用PBS稀释,摇匀,使溶液中抗体浓度为3mg/ml。

[0067] 6、抗体AbP2:为本发明自制,用PBS稀释,摇匀,使溶液中抗体浓度为3mg/ml。

[0068] 7、羊抗兔IgG:为武汉博士德生物工程有限公司产品,用PBS稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为1mg/ml。

[0069] 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。

[0070] 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)。

[0071] 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)。

[0072] 11、硝酸纤维素膜:型号为Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于Millipore公司。

[0073] 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)。

[0074] 13、底板:为高白度PVC材质,表面涂布单层高聚合物压敏胶SM31-40,购买于上海金标生物科技有限公司。

[0075] 14、人肺炎链球菌亚型菌株Sp6B:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为ATCC 700670。

[0076] 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)。

[0077] 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:

[0078] 实施例1两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的制备

[0079] 两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的制备方法如下:

[0080] 1) 经结构生物学分析及相关实验研究后,选定人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白(GenBank序列号AAF27703.1)71-84位的14个氨基酸及357-370位的14氨基酸组成的短肽分

别作为制备兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的两个线性抗原表位,该两段氨基酸序列分别为KAAQKKYDEDQKKT及APKPEKPAEQPKAE,将此二序列分别命名为P1及P2;

[0081] 2) 将步骤1)所述的氨基酸序列P1的C端、P2的N端分别添加一个半胱氨酸后,用多肽自动合成仪分别合成多肽并纯化,纯化后的两条多肽分别与载体蛋白KLH偶联,形成P1-KLH复合蛋白及P2-KLH复合蛋白;

[0082] 3) 分别将步骤2)所合成的两种复合蛋白乳化,乳化后分别在兔腹部皮下多点注射,先后注射三次,每次间隔7-10天;

[0083] 4) 第三次注射10-12天后,分别收集、分离得到两种含有兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的血清,ELISA分别检测血清中兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的效价,所述的两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的效价均在1:60000以上;

[0084] 5) 将步骤2)合成并纯化的两条多肽分别与溴化氰活化的Sepharose 4B偶联,形成两组多肽亲和层析柱;

[0085] 6) 将步骤4)获得的两种含有兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体的血清分别对应的加入到步骤5)制备的两种亲和层析柱中,并在4℃孵育过夜后,洗脱抗体,得到两种兔抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体;经SDS-PAGE鉴定其纯度均在97%以上,将这两种纯化的抗体分别命名为AbP1及AbP2。

[0086] 本实施例中步骤2)-6)皆是现有成熟技术,多家生物科技公司都可以提供程序化的技术服务。本实施例中上述步骤中相关实验环节的具体实施,系委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

[0087] 本发明所述“抗体”应该解释为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任意特异性结合因子。因而,这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物、人源化抗体以及抗体的功能同等物和同源物。抗体的实例是免疫球蛋白亚型(如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)及其亚型亚类;也可以是包含抗原结合结构域的片段如Fab、scFv、Fv、dAb、Fd和双链抗体。

[0088] 实施例2基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的制备及应用

[0089] 1. 量子点标记抗体AbP1

[0090] 向微量离心管中依次加入0.4nmol羧基水溶性量子点和800nmol碳二亚胺(EDC),以MES缓冲液(10.66g/L MES,0.74g/L EDTA pH 7.4)定容为1ml,不停地混合溶液,37℃反应5min后,再加入0.4mg的实施例1所制备的抗体AbP1,避光反应2h,加入单端氨基聚乙二醇(PEG2000-NH₂)至终浓度为1%(m/v),封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h。反应后的样品用超滤管离心(截留分子量100k),6500g离心5min,至体积200ul,将超滤后样品转移至普通EP管内,离心除团聚(10000g,3min)。将上部清液加到分离柱(Superdex-200)上纯化,待其自然流入柱体中,然后用PBS冲洗(液体自然流下),用紫外光照射柱体随时观察样品的位置,待样品开始从下部流出时开始收集,收集1ml后停止收集。将纯化后的样品用超滤管(截留分子量100k)以6500g离心浓缩至200ul后转移至普通EP管内离心(10000g,3min)除团聚。获取上清后以磷酸盐保存液稀释200倍,4℃保存备用。至此制得量子点标记抗体AbP1。

[0091] 2. 结合垫的制备

[0092] 将聚酯纤维膜浸入步骤1所得到的量子点标记抗体AbP1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。

[0093] 3. 样品垫的制备

[0094] 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℃密封保存。

[0095] 4. 检测层的制备

[0096] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×4cm大小。将实施例1中所制备的抗体AbP2和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL。将稀释好的抗体AbP2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。

[0097] 5. 检测卡的组装

[0098] 将底板裁剪成4cm×7.3cm大小, 备用。

[0099] 将吸水滤纸裁剪成4cm×3cm大小, 作为吸水垫, 备用。

[0100] 组装工作于生物安全柜内操作, 首先将底板上的粘性保护膜揭掉, 将步骤4所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上, 并小心抹平膜面。其次, 将事先裁好的吸水垫组装到底板上, 使其左边与检测层右末端有0.2cm的重叠, 其右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将步骤2所描述的结合垫按0.3cm重叠于检测层的左边缘处, 0.3cm粘于底板7上。最后将步骤3所描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。

[0101] 6. 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的组成

[0102] 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒由步骤5所述的检测卡及样品处理液所组成。

[0103] 7. 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法

[0104] 按常规方法获得待检者的咽拭子, 将其插入装有500μl样品处理液的软质塑料管中, 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。若咽拭子中含有具fam1PspA抗原的人肺炎链球菌, 则与结合垫中的量子点标记的抗体AbP1结合, 通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的抗体AbP2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羊抗兔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。

[0105] 8. 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的应用效果举例

[0106] 本实施例中所述的基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法参照步骤7所述的操作步骤。

[0107] 1) 特异性试验

[0108] 用呼吸道常见病原体如人III型副流感病毒病毒(ATCC VR-93)、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)、人呼吸道合胞病毒(ATCC编号VR26)等代替肺炎链球菌进行检测,试剂盒检测含这些微生物的磷酸盐缓冲液稀释液都为阴性。

[0109] 2) 敏感性试验

[0110] 通过测定肺炎链球菌培养物稀释液来做敏感性研究。将具有fam1PspA抗原肺炎链球菌亚型菌株Sp6B(ATCC编号700670)样品用磷酸盐缓冲液进行系列稀释后,用步骤6所述试剂盒进行检测,结果表明其检测底限为 1.5×10^4 CFU/ml。而用来自生产商Binax的名为Binax NOW Streptococcus pneumoniae 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。本发明试剂盒之检测下限较其明显降低。

[0111] 实施例3基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的制备及应用

[0112] 1. 胶体金标记抗体AbP1

[0113] a. 30nm胶体金的制备

[0114] 取一硅化好的250ml三角瓶,加入99ml超纯水,将1ml 1% (m/v) H₂AuCl₄溶液加入其中混匀,油浴加热并搅拌至沸腾。向其中快速加入2ml 1% (m/v) 柠檬酸三钠水溶液,溶液继续沸腾10min(这个过程中溶液由蓝色转变为红色)。停止加热,让溶液自然冷却至室温,然后向其中加入超纯水补齐至100ml。

[0115] b. 胶体金标记抗体AbP1

[0116] 1) 取一硅化好的50ml三角瓶,加入10ml步骤a所制备的胶体金溶液,向溶液中加入240ul 0.2mol/L K₂CO₃调节pH至8.5;

[0117] 2) 在电磁搅拌器搅拌下,将抗体AbP1加入胶体金溶液中,至抗体终浓度为10ug/ml,加入抗体时应逐滴加入,加完后继续搅拌45min~60min;

[0118] 3) 反应完成加入2.5ml 5% (m/v) 牛血清白蛋白(BSA)至终浓度为1% (m/v),搅拌15~30分钟,4℃保存备用。

[0119] 4) 将标记好的抗体AbP1取出后装入50ml离心管,2500g,4℃离心5分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉下层沉淀,上层清液转移至另一只50ml离心管,12000g,4℃离心30分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉上层清液,将下层沉淀用10ml胶体金缓冲液重悬沉淀,然后再12000g,4℃离心30分钟,再次得到下层沉淀及上层清液,将下层沉淀最后用3ml胶体金缓冲液重悬,4℃保存备用;

[0120] 上述胶体金缓冲液中各组分含量分别是:10mM Tris、1% (m/v) BSA、1% (v/v) Tween-20、5% (m/v) 蔗糖以及3% (m/v) 聚乙烯吡咯烷酮,所述胶体金缓冲液的pH为10.5;

[0121] 2. 结合垫的制备

[0122] 将聚酯纤维膜浸入步骤1所得到的胶体金标记抗体AbP1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。

[0123] 3. 样品垫的制备

[0124] 取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液中浸泡至少2h,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,剪裁成规格为4cm×1.5cm/条后,即制得样品垫,25℃密封保存。

[0125] 4. 检测层的制备

[0126] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×2cm大小。将实施例1中所制备的抗体AbP2和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL。将稀释好的抗体AbP2装入

BIODOT划膜仪喷头中,设置 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 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 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,其与检测线间距为 0.5cm 。将喷好的硝酸纤维素膜 37°C 干燥 18h ,剪裁成 $4\text{cm}\times 2\text{cm}$ 的规格, 4°C 密封干燥保存。至此制得检测层。

[0127] 5. 检测卡的组装

[0128] 将底板裁剪成 $4\text{cm}\times 6.0\text{cm}$ 大小,备用。

[0129] 将吸水滤纸裁剪成 $4\text{cm}\times 2.5\text{cm}$ 大小,作为吸水垫,备用。

[0130] 组装工作于生物安全柜内操作,首先将底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并小心抹平膜面。其次,将事先裁好的吸水垫组装到底板上,使其左边与检测层右末端有 0.2cm 的重叠,其右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将步骤2所描述的结合垫按 0.2cm 重叠于检测层3的左边缘处, 0.4cm 粘于底板上。最后将步骤3所描述的样品垫则按一边 0.2cm 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°C 密封干燥避光保存。

[0131] 6. 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的组成

[0132] 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒由步骤5所述的检测卡及样品处理液所组成。

[0133] 7. 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法

[0134] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有 $500\mu\text{l}$ 样品处理液的软质塑料管中,挤压塑料管壁,使拭子上的样品充分溶解后于 50°C 水浴 20min ,取出 $120\mu\text{L}$ 滴于检测卡的样品垫上,(15)分钟后肉眼观察检测结果。若咽拭子中含有具fam1PspA抗原的人肺炎链球菌,则与结合垫中的胶体金标记的抗体AbP1结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的抗体AbP2结合后在在检测线处会形成肉眼可见的一条红色检测线,未结合完的胶体金标记抗体继续层析与羊抗兔IgG结合后形成肉眼可见的第二条红色质控线;若待检咽拭子中无相关抗原,则仅出现一条红色质控线。如果红色质控线未出现,则该检测卡失效。

[0135] 8. 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的应用效果举例

[0136] 本实施例中所指的基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法参照步骤7所述的操作步骤。

[0137] 1) 特异性试验

[0138] 用呼吸道常见病原体如I型人副流感病毒(ATCC VR-94)、II型人副流感病毒(ATCC VR-92)、III型人副流感病毒(ATCC VR-93)、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)、人呼吸道合胞病毒(ATCC编号VR26)等代替人肺炎链球菌进行检测,试剂盒检测含这些微生物的磷酸盐缓冲液稀释液都为阴性。

[0139] 2) 敏感性试验

[0140] 通过测定肺炎链球菌培养物稀释液来做敏感性研究。将具有fam1PspA抗原人肺炎链球菌亚型菌株Sp6B(ATCC编号700670)样品用磷酸盐缓冲液进行系列稀释后,用步骤6所述试剂盒进行检测,结果表明其检测底限为 $1\times 10^5\text{CFU}/\text{ml}$ 。而用来自生产商Binax的名为

Binax NOW Streptococcus pneumoniae 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。本发明试剂盒之检测下限较其明显降低。

[0141] 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。

人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的氨基酸序列为:

KAAQKKYDEDQKKT

[0001]

人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白357-370位的氨基酸序列为:

APKPEKPAEQPKAE

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN105753982B | 公开(公告)日 | 2019-10-08 |
| 申请号 | CN201610129944.8 | 申请日 | 2016-03-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 湖北工业大学 湖北华龙生物制药有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 湖北工业大学 湖北华龙生物制药有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 湖北工业大学 湖北华龙生物制药有限公司 | | |
| [标]发明人 | 胡征 董俊 杨波 | | |
| 发明人 | 胡征 董俊 杨波 | | |
| IPC分类号 | C07K16/12 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 | | |
| 代理人(译) | 王敏锋 | | |
| 审查员(译) | 刘俊 | | |
| 其他公开文献 | CN105753982A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体及应用该抗体检测人肺炎链球菌的免疫层析试剂盒，抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体是分别识别人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位以及357-370位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的抗体，人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白在GenBank序列号是AAF27703.1；人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位以及357-370位的氨基酸序列分别为KAAQKKYDEDQKKT及APKPEKPAEQPKAE。本发明所提供的两种免抗人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白抗体具有特异性好、纯度高、效价高、制备成本低廉的特点。

人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白71-84位的氨基酸序列为：

KAAQKKYDEDQKKT

人肺炎链球菌fam1家族PspA蛋白357-370位的氨基酸序列为：

APKPEKPAEQPKAE