



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613236 A

(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201811515744.1

(22)申请日 2018.12.12

(71)申请人 安邦(厦门)生物科技有限公司

地址 362106 福建省厦门市海沧区新阳街  
道翁角西路2016号

(72)发明人 汪大明 钟乾兴 胡啸 张利伟  
肖江群 王保丹 江应玲 乐宜萃

(74)专利代理机构 福州市景弘专利代理事务所  
(普通合伙) 35219

代理人 林祥翔 黄以琳

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/6816(2018.01)

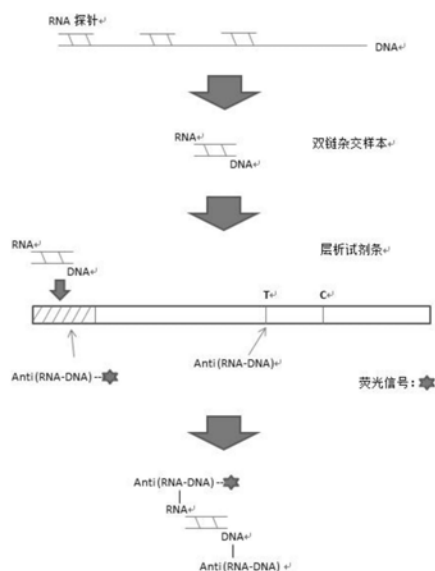
权利要求书2页 说明书10页  
序列表1页 附图2页

## (54)发明名称

一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法、免疫  
荧光层析试条及试剂盒

## (57)摘要

发明人提出一种杂交捕获免疫荧光分析法，  
通过杂交捕获获取待测样本中的目标核酸片段，  
通过荧光信号识别，对样本中目标核酸进行检测  
和一种用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫  
荧光层析试条和试剂盒。核酸杂交捕获免疫荧光  
检测方法快速，操作简单，加样后的反应过程中  
在常温中进行，无变温环节，而且检测灵敏度与  
市场上同类产品一致。



1. 一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

待测液制备:将待测单链DNA样本和RNA探针混合,得到含有RNA-DNA杂交体的待测液;

免疫荧光层析试条制备:将荧光素标记第一捕获抗体包被在免疫荧光层析试条一个端部的加样区,将第二捕获抗体包被在免疫荧光层析试条的检测区;

加样:将待测液加入所述加样区,待测液在加样区进行孵育,形成荧光素标记第一捕获抗体与RNA-DNA杂交体二元复合物;

荧光迁移:向加样区中加入冲洗液,荧光素标记第一捕获抗体与RNA-DNA杂交体二元复合物在毛细管作用下从加样区向设置在免疫荧光层析试条另一个端部的吸水垫迁移,并与包被在检测区的第二捕获抗体结合,形成最终的荧光素标记第一抗体、RNA-DNA杂交体与第二捕获抗体的三元复合物;

荧光检测:将免疫荧光层析试条的检测区进行荧光检测,读取检测结果;

所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述待测液制备步骤,将待测单链DNA样本、RNA探针工作液以及核酸缓冲液混合,所述待测单链DNA样本的浓度为 $10^5$ copies/ml,所述RNA探针工作液的浓度为100ng/ $\mu$ l,所述待测单链DNA样本、RNA探针工作液、核酸缓冲液的体积比为50:1:49。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述荧光素标记第一捕获抗体的浓度为10 $\mu$ g/ml-20 $\mu$ g/ml,所述第二捕获抗体的浓度为0.5mg/ml-2mg/ml。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述RNA探针为待测样品的RNA环状探针。

5. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,所述待测液制备步骤中,所述待测单链DNA样本与RNA探针工作液混合后,在20-70 $^{\circ}$ C温育5-60分钟。

6. 根据权利要求5所述的检测方法,其特征在于,所述待测单链DNA样本与RNA探针工作液混合后,在37-65 $^{\circ}$ C温育5-45分钟。

7. 一种用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条,其特征在于,包括设置于所述试条一个端部区域上的吸水垫、设置于所述试条另一个端部区域上,包被有荧光素标记第一捕获抗体的加样区,以及设置在所述吸水垫和所述加样区之间的层析基质,所述层析基质上设置包被有第二捕获抗体的检测区,

所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体。

8. 根据权利要求7所述的免疫荧光层析试条,其特征在于,所述检测区为窄条形式,其纵向方向与所述加样区指向所述吸水垫的延伸方向大致垂直。

9. 一种核酸杂交捕获免疫荧光检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求7或8所述的免疫荧光层析试条和RNA探针。

10. 根据权利要求9所述的检测试剂盒,其特征在于,所述RNA探针为经过冻干处理的RNA探针粉末,在使用前稀释为RNA探针工作液。

11. 一种HPV杂交捕获免疫荧光检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

待测液制备:将待测单链DNA样本和HPV RNA探针混合,得到含有HPV RNA-DNA杂交体的待测液;

免疫荧光层析试条制备:将荧光素标记第一捕获抗体包被在免疫荧光层析试条一个端

部的加样区,将第二捕获抗体包被在免疫荧光层析试条的检测区;

加样:将待测液加入所述加样区,待测液在加样区进行孵育,形成荧光素标记第一捕获抗体与HPV RNA-DNA杂交体二元复合物;

荧光迁移:向加样区中加入冲洗液,荧光素标记第一捕获抗体与HPV RNA-DNA杂交体二元复合物在毛细管作用下从加样区向设置在免疫荧光层析试条另一个端部的吸水垫迁移,并与包被在检测区的第二捕获抗体结合,形成最终的荧光素标记第一抗体、HPV RNA-DNA杂交体与第二捕获抗体的三元复合物;

荧光检测:将免疫荧光层析试条的检测区进行荧光检测,读取检测结果;

所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗HPV RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体;

所述HPV RNA探针的核苷酸序列分别是SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,所述HPV RNA探针为环状探针。

12.根据权利要求11所述的检测方法,其特征在于,所述待测液制备步骤,将待测单链DNA样本、HPV RNA探针工作液以及核酸缓冲液混合,所述待测单链DNA样本的浓度为 $10^5$ copies/ml,所述HPV RNA探针工作液的浓度为100ng/ $\mu$ l,所述待测单链DNA样本、HPV RNA探针工作液、核酸缓冲液的体积比为50:1:49;所述荧光素标记第一捕获抗体的浓度为10 $\mu$ g/ml-20 $\mu$ g/ml,所述第二捕获抗体的浓度为0.5mg/ml-2mg/ml。

13.根据权利要求11所述的检测方法,其特征在于,所述待测单链DNA样本与HPV RNA探针工作液混合后,在37-65 $^{\circ}$ C温育5-45分钟。

14.一种用于HPV核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条,其特征在于,包括设置于所述试条一个端部区域上的吸水垫、设置于所述试条另一个端部区域上,包被有荧光素标记第一捕获抗体的加样区,以及设置在所述吸水垫和所述加样区之间的层析基质,所述层析基质上设置包被有第二捕获抗体的检测区,

所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗HPV RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体,所述检测区为窄条形式,其纵向方向与所述加样区指向所述吸水垫的延伸方向大致垂直。

15.一种HPV核酸杂交捕获免疫荧光检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求14所述的免疫荧光层析试条和HPV RNA探针,所述HPV RNA探针的核苷酸序列分别是SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,所述HPV RNA探针为环状探针。

## 一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法、免疫荧光层析试条及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子检测领域,特别涉及一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法、免疫荧光层析试条及试剂盒。

### 背景技术

[0002] 在分子检测领域,用于靶标检测的方法包括PCR-直接测序法、PCR-焦磷酸测序法、荧光定量PCR法、PCR-基因芯片法、PCR-电泳分析、原位杂交 (ISH) 等多种方法。

[0003] PCR-Sanger测序法的操作过程主要包括PCR扩增和PCR产物纯化、测序反应、测序和结果分析四个主要步骤;PCR-Sanger的主要不足是:灵敏度不高,对试剂和仪器有特殊要求,不易普及;操作复杂,成本相对较高,速度慢、通量低;PCR-焦磷酸测序法检测灵敏度较高,通过特殊的试剂和仪器主要进行短片段的分析;不能对长片段进行分析。实时荧光PCR法灵敏度高,分型准确,但该方法通量不高,探针成本较高,需在特殊的实验室区域进行PCR-电泳分析该方法是指对待分析的目的基因片段进行PCR扩增,并通过琼脂糖凝胶电泳或毛细管电泳分析,根据PCR产物的大小对基因多态性位点进行基因分型;PCR-电泳分析需要反复打开反应管进行操作,易造成环境污染。原位杂交 (ISH) 是在细胞核原位对基因的异常进行检测,成本高,通量低,时间较长。

[0004] 目前,由经美国食品和药品监督管理局 (FDA)、欧洲CE和中国食品药品监督管理局 (SFDA) 共同认证的Digene杂交捕获二代测试,即HC2,是一种通过将RNA探针与单束HPV DNA杂交,随后通过化学发光检测到RNA/DNA杂交物的新晋分子检测技术,相比于PCR,HC2无需专业的环境,反应时间3.5-5个小时,可以实时监控实验质量,全程无扩散,污染小。近几年来渐渐在分子检测市场崭露头角。

### 发明内容

[0005] 为此,需要提供一种操作简便、反应时间短、灵敏度高的杂交捕获免疫荧光检测方法。

[0006] 为实现上述目的,发明人提供了一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0007] 待测液制备:将待测单链DNA样本和RNA探针混合,得到含有RNA-DNA杂交体的待测液;

[0008] 免疫荧光层析试条制备:将荧光素标记第一捕获抗体包被在免疫荧光层析试条一个端部的加样区,将第二捕获抗体包被在免疫荧光层析试条的检测区;

[0009] 加样:将待测液加入所述加样区,待测液在加样区进行孵育,形成荧光素标记第一捕获抗体与RNA-DNA杂交体二元复合物;

[0010] 荧光迁移:向加样区中加入冲洗液,荧光素标记第一捕获抗体与RNA-DNA杂交体二元复合物在毛细管作用下从加样区向设置在免疫荧光层析试条另一个端部的吸水垫迁移,

并与包被在检测区的第二捕获抗体结合,形成最终的荧光素标记第一抗体、RNA-DNA杂交体与第二捕获抗体的三元复合物;

[0011] 荧光检测:将免疫荧光层析试条的检测区进行荧光检测,读取检测结果;

[0012] 所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体。

[0013] 优选的,所述待测液制备步骤,将待测单链DNA样本、RNA探针工作液以及核酸缓冲液混合,所述待测单链DNA样本的浓度为 $10^5$ copies/ml,所述RNA探针工作液的浓度为100ng/u1,所述待测单链DNA样本、RNA探针工作液、核酸缓冲液的体积比为50:1:49。

[0014] 优选的,所述荧光素标记第一捕获抗体的浓度为10 $\mu$ g/ml-20 $\mu$ g/ml,所述第二捕获抗体的浓度为0.5mg/ml-2mg/ml。优选的,所述RNA探针为待测样品的RNA环状探针。

[0015] 优选的,所述待测液制备步骤中,所述待测单链DNA样本与RNA探针工作液混合后,在20-70 $^{\circ}$ C温育5-60分钟。

[0016] 优选的,所述待测单链DNA样本与RNA探针工作液混合后,在37-65 $^{\circ}$ C温育5-45分钟。

[0017] 发明人还提供了一种用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条,包括设置于所述试条一个端部区域上的吸水垫、设置于所述试条另一个端部区域上,包被有荧光素标记第一捕获抗体的加样区,以及设置在所述吸水垫和所述加样区之间的层析基质,所述层析基质上设置包被有第二捕获抗体的检测区,

[0018] 所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体。

[0019] 优选的,所述检测区为窄条形式,其纵向方向与所述加样区指向所述吸水垫的延伸方向大致垂直。

[0020] 发明人进一步提供了一种核酸杂交捕获免疫荧光检测试剂盒,包括权利要求上述的免疫荧光层析试条和RNA环状探针。

[0021] 优选的,所述RNA环状探针为经过冻干处理的RNA探针粉末,在使用前稀释为RNA探针工作液。

[0022] 发明人还提供了一种HPV杂交捕获免疫荧光检测方法,包括以下步骤:

[0023] 待测液制备:将待测单链DNA样本和HPV RNA探针混合,得到含有RNA-DNA杂交体的待测液;

[0024] 免疫荧光层析试条制备:将荧光素标记第一捕获抗体包被在免疫荧光层析试条一个端部的加样区,将第二捕获抗体包被在免疫荧光层析试条的检测区;

[0025] 加样:将待测液加入所述加样区,待测液在加样区进行孵育,形成荧光素标记第一捕获抗体与HPV RNA-DNA杂交体二元复合物;

[0026] 荧光迁移:向加样区中加入冲洗液,荧光素标记第一捕获抗体与HPV RNA-DNA杂交体二元复合物在毛细管作用下从加样区向设置在免疫荧光层析试条另一个端部的吸水垫迁移,并与包被在检测区的第二捕获抗体结合,形成最终的荧光素标记第一抗体、HPV RNA-DNA杂交体与第二捕获抗体的三元复合物;

[0027] 荧光检测:将免疫荧光层析试条的检测区进行荧光检测,读取检测结果;

[0028] 所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗HPV RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体;

[0029] 所述HPV RNA探针的核苷酸序列分别是SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,所述HPV

RNA探针为环状探针。

[0030] 优选的,所述待测液制备步骤,将待测单链DNA样本、HPV RNA探针工作液以及核酸缓冲液混合,所述待测单链DNA样本的浓度为 $10^5$ copies/ml,所述HPV RNA探针工作液的浓度为100ng/u1,所述待测单链DNA样本、HPV RNA探针工作液、核酸缓冲液的体积比为50:1:49;所述荧光素标记第一捕获抗体的浓度为10 $\mu$ g/ml-20 $\mu$ g/ml,所述第二捕获抗体的浓度为0.5mg/ml-2mg/ml。

[0031] 优选的,所述待测单链DNA样本与HPV RNA探针工作液混合后,在37-65 $^{\circ}$ C温育5-45分钟

[0032] 发明人还提供了一种用于HPV核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条,包括设置于所述试条一个端部区域上的吸水垫、设置于所述试条另一个端部区域上,包被有荧光素标记第一捕获抗体的加样区,以及设置在所述吸水垫和所述加样区之间的层析基质,所述层析基质上设置包被有第二捕获抗体的检测区,

[0033] 所述第一捕获抗体和第二捕获抗体均为抗HPV RNA-DNA杂交体的特异性结合抗体,所述检测区为窄条形式,其纵向方向与所述加样区指向所述吸水垫的延伸方向大致垂直。

[0034] 优选的,包括上述的免疫荧光层析试条和HPV RNA探针,所述HPV RNA探针的核苷酸序列分别是SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,所述HPV RNA探针为环状探针。

[0035] 区别于现有技术,上述技术方案提出一种方法学,杂交捕获免疫荧光分析法,通过杂交捕获获取待测样本中的目标核酸片段,通过荧光信号识别,对样本中目标核酸进行检测和一种用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条和试剂盒。核酸杂交捕获免疫荧光检测方法快速,操作简单,加样后的反应过程中在常温中进行,无变温环节,而且检测灵敏度与市场上同类产品一致。

## 附图说明

[0036] 图1为核酸杂交捕获免疫荧光法的检测原理示意图;

[0037] 图2为用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条的装配示意图;

[0038] 图3为HPV RNA环形探针的示意图。

## 具体实施方式

[0039] 为详细说明技术方案的技术内容、构造特征、所实现目的及效果,以下结合具体实施例并配合附图详予说明。

[0040] 本实施方式中,“RNA-DNA杂交体”是指一种核酸,其含有DNA链和RNA链,所述的DNA链和RNA链的核苷酸序列是基本上互补且形成双链的。

[0041] 本实施方式中,所述待测DNA样本包括血、涂片、痰、尿、粪便、体液、胆汁、骨髓、胃肠道分泌物、器官穿刺物或抽吸物、活组织检查样品或淋巴。

[0042] 本实施方式中,环状探针是基于对靶核酸直接杂交的一种探针。该环状探针由于在其5端和3端人为添加3-10个碱基,使其互补或者部分互补,使探针形成一个茎环结构。环形结构易于打开,因此对靶核酸的杂交不受影响。环状探针较合适的长度一般为30-200碱基,能有效降低杂交时间。环状探针不易形成非特异结合,提高了杂交捕获检测的灵敏度和

特异性。没有靶核酸存在时,探针在溶液中自行成环状结构,避免探针间或探针与非靶核酸间形成非特异结合。当杂交反应体系中存在靶核酸时,探针和靶核酸碱基配对结合,使探针环状打开。环状探针易于设计合成,适合用于核酸杂交反应,检测靶核酸。

[0043] 本实施方式中,核酸缓冲液的配方如下:纯化水1000ml加入0.02%的Tris和0.03%的EDTA-Na配置,用0.1%的HCl和1%的Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>将pH值调节为7.4,室温保存。

[0044] 本实施方式中,核酸裂解液的配方如下:100ml纯化水中加入苯酚1%、异硫氰酸胍0.05%、0.5% SDS。

[0045] 本实施方式中,冻干保存液配方如下:100ml纯化水中,加入海藻糖8.0g,加入甘露醇14.0g,牛血清白蛋白14.0g,搅拌均匀后,形成冻干处理液,2-8℃保存。

[0046] 本实施方式中,所述待测单链DNA样本由待测DNA样本解链后形成。

[0047] 本实施方式中,可以用于杂交捕获免疫荧光分析法的荧光标记信号物包括但不限于包括:

[0048] a) FITC荧光素,

[0049] b) 荧光微球,

[0050] c) 荧光颗粒。

[0051] d) 生物荧光素,

[0052] e) 其他可发出荧光的物质。

[0053] 本实施方式中,用于杂交捕获免疫荧光分析法的试剂卡可采用的方法包括但不限于包括层析法,渗滤法。

[0054] 本实施方式中,信号物为荧光信号,另外还可包括激发光信号,可见光信号,化学反应变色信号。

[0055] 本实施方式中,还可运用反应管作为检测反应容器,替代检测试剂卡。

[0056] 本实施方式中,还可通过葡聚糖支架将第一捕获抗体与检测区相连接。

[0057] 本实施方式中,RNA探针也可以是携带标记物的,而检测区则包被对应标记物连接物质,例如生物素与亲和素。

[0058] 本实施方式中,所述试条还可包括用于判定检测有效性的质控带,所述质控带与设置于所述层析介质上,并布置在检测区和吸水垫之间,所述质控带与所述加样区大致平行。

[0059] 实施例1:一种HPV检测免疫荧光层析试条的制备

[0060] 玻纤垫处理:将纯化水均匀涂抹在玻纤垫两侧,待玻纤垫完全润透后,将润湿的玻纤垫至于平整铁盘内,放入35℃烘箱,烘干1个小时。烘干结束后2个小时内,将荧光素标记第一捕获抗体(采购自生一(苏州)生物科技有限公司,产品名称为HPV核酸复合物识别抗体(荧光标记),编号为SY0031,1mg/ml稀释至15μg/ml的浓度,对玻纤垫进行包被。其中,荧光素标记第一捕获抗体稀释液成分如下:以20mmol的PBS作为溶剂,其中包含0.02%的Tris(三羟甲基氨基甲烷)和0.03%的EDTA-Na。

[0061] 硝酸纤维膜处理:将第二捕获抗体(采购自生一(苏州)生物科技有限公司,产品名称为HPV核酸复合物识别抗体,编号为SY0029,浓度为10mg/ml)稀释成1mg/ml的浓度,对硝酸纤维膜的T线检测区进行包被,包被后于20℃放置8小时后使用。其中,第二捕获抗体稀释液配方如下:以纯化水作为溶剂,其中包含0.02%的Tris(三羟甲基氨基甲烷),0.03%的

EDTA-Na, 0.02%的Dextran 5000。

[0062] 将处理过的玻纤垫、处理过的硝酸纤维膜、以及吸水垫依序搭接在PVC底板上, (彼此间有1mm的重叠), 切割成设定宽度的试纸条, 即得所述HPV检测免疫荧光层析试条。具体见图2, 用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条的装配示意图。

[0063] 实施例1制备的HPV免疫荧光层析试条, 包括设置于所述试条一个端部区域上的吸水垫、设置于所述试条另一个端部区域上, 包被有荧光素标记第一捕获抗体的加样区, 以及设置在所述吸水垫和所述加样区之间的硝酸纤维膜, 所述硝酸纤维膜上设置包被有第二捕获抗体的T线检测区。

[0064] 实施例2-3: 一种HPV检测免疫荧光层析试条的制备

[0065] 实施例2-3与实施例1的区别为, 荧光素标记第一捕获抗体的浓度分别为10 $\mu$ g/ml、20 $\mu$ g/ml, 第二捕获抗体的浓度分别为0.5mg/ml、2mg/ml。

[0066] 实施例4: HPV DNA检测试剂盒制备:

[0067] 试剂盒1包括: RNA探针工作液、实施例1制备的一种HPV检测免疫荧光层析试条。

[0068] RNA探针工作液: 将-HPV的RNA环状探针, 用核酸稀释液进行稀释, 稀释为核酸浓度为100ng/ $\mu$ l的探针工作液。所述RNA环状探针的核苷酸序列为: GGGGGCGCAUCUACUUCAGAACC UACAUAUAAAAUACUAACUUUAAAGAGUACCUACGACAUGGG GAGGAAUAUGAUUUACAGCGCCCAC, 其结构示意图见图3。

[0069] 试剂盒2在试剂盒1基础上, 还包括层析冲洗液。层析冲洗液配方如下: 1000ml纯水中, 加入8.5gNaCl, 2.2gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4gNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tris 0.2g。

[0070] 试剂盒3包括: RNA探针粉末、探针稀释液(同核酸缓冲液)、实施例1制备的一种HPV检测免疫荧光层析试条。

[0071] RNA探针粉末的制备方法: HPV的RNA探针加入核酸缓冲液, 稀释为浓度100ng/ $\mu$ l的探针稀释液, 在探针稀释液中加入等体积的冻干保存液, 混合均匀后静置30分钟, 进行冻干处理。冻干处理方式为: 在-30 $^{\circ}$ C冻干5h, 后续的12h冻干过程中逐步升温至-10 $^{\circ}$ C, 升温速率为5 $^{\circ}$ C/3h, 最后在-10 $^{\circ}$ C冻干7-19h小时。冻干时间为24-36小时, 真空度为0.12mbar, 冻干结束后得到可室温保存的RNA探针粉末。

[0072] 试剂盒4在试剂盒3基础上, 还包括层析冲洗液。

[0073] 实施例5: 采用实施例4的试剂盒4进行HPV DNA检测

[0074] 核酸杂交捕获免疫荧光法的检测原理示意图见图1。

[0075] RNA探针工作液制备: 将RNA探针粉末用核酸缓冲液进行复溶, 配置为浓度为100ng/ $\mu$ l的RNA探针工作液。

[0076] 样本前处理: 将宫颈脱落细胞样本中取200 $\mu$ l加入到1.5ml的离心管中, 并加入核酸裂解液20 $\mu$ l, 震荡混匀2分钟;

[0077] 靶核酸解链: 用化学试剂法或加热法变性核酸, 使双链核酸变为单链的待测液样本。

[0078] 1.) 化学试剂变性靶核酸

[0079] 采用1.7M氢氧化钠溶液使双链DNA变性为单链, 1ml样本加入0.5ml变性剂。如果靶核酸是DNA, 选择上述强碱性溶液是适合的; 若靶核酸是RNA, 则选择温和的方式使其变性, 如pH值在8-9.5之间的溶液。变性完后加入盐酸, 使其pH值恢复中性。

[0080] 2.) 温度变性靶核酸

[0081] 若靶核酸是DNA,于85℃-95℃加热5min后,立即放置于冰浴10min,可得到单链核酸。若靶核酸是RNA时,采用温和的方式使其变性,如65℃到80℃间加热2-5分钟,立即置于冰浴10min。

[0082] 待测液准备:将50u1单链DNA样本、1u1 HPV的RNA探针工作液和49u1的核酸缓冲液混合,在65℃水浴45分钟,得到100u1含有RNA-DNA杂交体的待测液;RNA探针工作液由RNA探针用核酸缓冲液稀释得到,浓度为100ng/ $\mu$ l。

[0083] 加样、检测:将60u1的待测液加入实施例1所制备的HPV检测免疫荧光层析试条的加样区,90s后,从加样区再次加入冲洗液100u1,等待10分钟后,将免疫荧光层析试条的检测区进行荧光检测,读取检测结果。

[0084] 检测结果的判断如下:

[0085] 使用480nm的激发光进行照射,识别520nm的荧光发出信号,存在荧光发出信号的情况判读为阳性,反之则为阴性。根据需要可以发出信号的强弱来判读反应的强弱,识别仪器运用一般的荧光读数仪即可,例如苏州和迈科技生产的便携式免疫荧光分析仪。

[0086] 实施例6:

[0087] 实施例与实施例5的区别为:待测液准备步骤中,将50u1单链DNA样本、1u1 HPV的RNA探针工作液和49u1的核酸缓冲液混合,在65℃水浴5分钟。

[0088] 实施例7:

[0089] 实施例7与实施例5的区别为:待测液准备步骤中,将50u1单链DNA样本、1u1 HPV的RNA探针工作液和49u1的核酸缓冲液混合,在37℃水浴60分钟。

[0090] 实施例8:

[0091] 实施例8与实施例5的区别为:待测液准备步骤中,将50u1单链DNA样本、1u1 HPV的RNA探针工作液和49u1的核酸缓冲液混合,在70℃水浴5分钟。

[0092] 实施例9:

[0093] 实施例9与实施例5的区别为:待测液准备步骤中,将50u1单链DNA样本、1u1 HPV的RNA探针工作液和49u1的核酸缓冲液混合,在20℃水浴60分钟。

[0094] 性能研究-参考品检测

[0095] 用实施例4中的试剂盒4,对参考品进行检测,检测过程中的RNA探针工作液制备、解链、待测液准备、加样、检测、判断步骤溶实施例5。

[0096] 鉴于HPV病毒尚不能体外培养,企业参考品采用人工合成的HPV质粒DNA,并测序确认其基因型。使用前稀释到工作浓度。(HPV质粒DNA合成公司为:生工生物工程(上海)股份有限公司。)

[0097] 1、检测限:

[0098] 检测下表13种检测限参考品:

	参考品编号	浓度	基因型
[0099]	HPV L16	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV16
	HPV L18	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV18
	HPVL31	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV31
	HPV L33	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV33
	HPV L35	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV35
	HPV L39	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV39
	HPV L45	10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV45
	[0100]	HPV L51	10 <sup>5</sup> copies/ml
HPV L52		10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV52
HPV L56		10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV56
HPV L58		10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV58
HPV L59		10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV59
HPV L68		10 <sup>5</sup> copies/ml	HPV 68

[0101] 每种检测限参考品重复检测20次，

[0102] 本发明的试剂盒对13种检测限参考品，在20次重复检测中，均100%检出阳性，证明了本发明试剂盒的敏感性。

[0103] 2、阴阳性参考品符合率：

[0104] 检测下表的HPV Y阳性参考品3次，检测结果均为阳性。检测下部的HPV N阴性参考品3次，检测结果均为阴性。

[0105]

参考品编号	浓度	基因型
HPV Y	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV 高危基因型： HPV16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68
HPV N		HPV 低危型： 6/11/16/18/26/31/33/35/39/40/42/43/44/45/51/52/53/54/56/58/59/61，大肠杆菌，HBV 病毒质粒，HCV 病毒质粒

[0106] 3、特异性

[0107] 检测特异性参考品HPV P16、HPV P18、HPV P31、HPV P33、HPV P35、HPV P39、HPV P45、HPV P51、HPV P52、HPV P56、HPV P58、HPV P59、HPV P68各3次，均为阳性。

[0108]

参考品编号	浓度	基因型
HPV P16	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV16
HPV P18	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV18
HPV P31	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV31
HPV P33	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV33
HPV P35	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV35
HPV P39	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV39
HPV P45	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV45
HPV P51	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV51
HPV P52	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV52
HPV P56	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV56
HPV P58	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV58
HPV P59	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV59
HPV P68	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV68

[0109] 4、精密度

[0110] 检测下表的精密度参考品：

[0111]

参考品编号	浓度	基因型
HPV J16	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV16

[0112]	HPV J18	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV18
	HPV J31	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV31
	HPV J33	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV33
	HPV J35	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV35
	HPV J39	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV39
	HPV J45	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV45
	HPV J51	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV51
	HPV J52	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV52
	HPV J56	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV56
	HPV J58	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV58
	HPV J59	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV59
	HPV J68	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV 68
	HPV PN1	10 <sup>6</sup> copies/ml	HPV 低危型 : 6/11/16/18/26/31/33/35/39/40/42/43/44/45/51/52/53/54/56/58/59/61 ,

[0113] 检测精密度参考品HPV J16、HPV JP18、HPV J31、HPV J33、HPV J35、HPV J39、HPV J45、HPV J51、HPV J52、HPV J56、HPV J58、HPV J59、HPV J68,每种精密度参考品重复检测10次,均检测为阳性。检测精密度参考品HPV PN110次,均检测为阴性。

[0114] 通过以上检测结果对比,得出结论,该试剂盒的检测结果符合企业标准品检测要求,符合HPV检测的基础性能要求。

[0115] 性能研究-对比检测

[0116] 选取了杭州美联医学控股有限公司生产的人乳头瘤病毒 (HPV) 核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 作为对照试剂进行了性能比较,性能对比项包括特异性,灵敏度,分别以阳性符合率和阴性符合率作为试剂对比参数。

[0117] 针对已知检测结果的HPV阳性标本100例与阴性标本各100例,分别以”本实施例4中的试剂盒4和人乳头瘤病毒 (HPV) 核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 进行检测。(检测过程中的RNA探针工作液制备、解链、待测液准备、加样、检测、判断步骤溶实施例5)

[0118] 检测结果如下:

[0119]

	杂交捕获免疫荧光分析法	荧光PCR法
灵敏度(阳性符合率)	98%	97%
特异性(阴性符合率)	95%	95%
总符合率	96.5%	96%

[0120] 人乳头瘤病毒(HPV)核酸检测试剂盒(荧光PCR法)的产品注册证号为国食药监械(准)字2014第3400587号(更)。

[0121] 通过上述检测结果,我们可以得出结论:针对HPV检测,杂交捕获免疫荧光分析法有着不低于荧光检测法的检测准确性。

[0122] 核酸杂交捕获免疫荧光检测方法的检测时间60分钟内,检测更为快速,操作简单,而且检测灵敏度与市场上同类产品一致。相比一般的荧光免疫检测,本专利涵盖了核酸检测,实现了核酸检测荧光识别;相比一般的HC2检测,本专利运用了荧光粒子作为识别信号,比起一般的化学发光检测,信号强度更强,特异性更好,检测时间更短,无需专业技术人员操作,加样后的反应过程中在常温中进行,无变温环节。

[0123] 需要说明的是,在本文中,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者终端设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者终端设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括……”或“包含……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者终端设备中还存在另外的要素。此外,在本文中,“大于”、“小于”、“超过”等理解为不包括本数;“以上”、“以下”、“以内”等理解为包括本数。

[0124] 需要说明的是,尽管在本文中已经对上述各实施例进行了描述,但并非因此限制本发明的专利保护范围。因此,基于本发明的创新理念,对本文所述实施例进行的变更和修改,或利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,直接或间接地将以上技术方案运用在其他相关的技术领域,均包括在本发明的专利保护范围之内。

[0001]

<110> 安邦(厦门)生物科技有限公司

<120> 一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法、免疫荧光层析试条及试剂盒

<130> 2012

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 91

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial)

<400> 1

gggggcgcgau cuacuucaga accuacauau aaaaauacua acuuuaaaga guaccuacga 60

cauggggagg aauaugauuu acagcgccca c 91

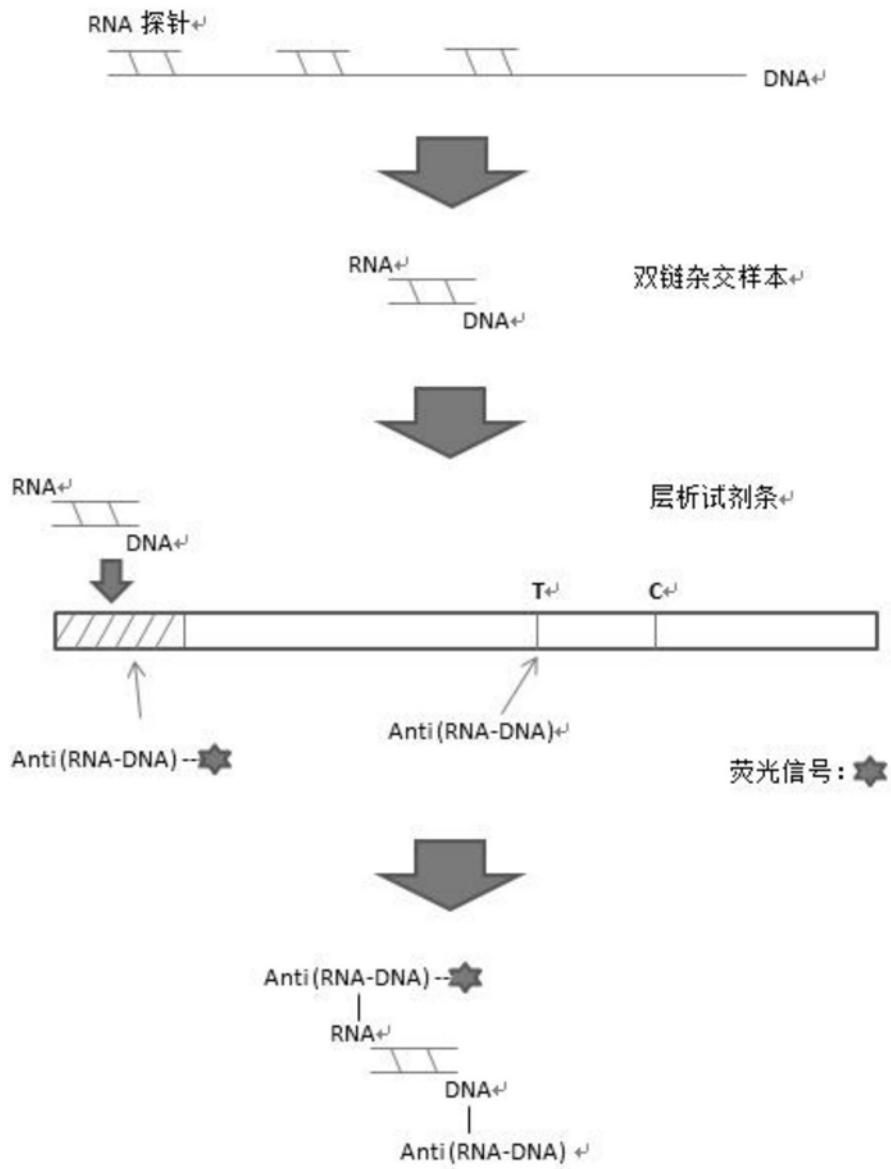


图1



图2



专利名称(译)	一种核酸杂交捕获免疫荧光检测方法、免疫荧光层析试条及试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109613236A</a>	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN2018111515744.1	申请日	2018-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	安邦(厦门)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	安邦(厦门)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安邦(厦门)生物科技有限公司		
[标]发明人	汪大明 钟乾兴 胡啸 张利伟 肖江群 王保丹 江应玲 乐宜萃		
发明人	汪大明 钟乾兴 胡啸 张利伟 肖江群 王保丹 江应玲 乐宜萃		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/53 C12Q1/6816		
CPC分类号	G01N33/558 C12Q1/6816 G01N33/5308 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

发明人提出一种杂交捕获免疫荧光分析法，通过杂交捕获获取待测样本中的目标核酸片段，通过荧光信号识别，对样本中目标核酸进行检测和一种用于核酸杂交捕获免疫荧光检测的免疫荧光层析试条和试剂盒。核酸杂交捕获免疫荧光检测方法快速，操作简单，加样后的反应过程中在常温中进行，无变温环节，而且检测灵敏度与市场上同类产品一致。

