



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106990248 A

(43)申请公布日 2017.07.28

(21)申请号 201710277582.1

(22)申请日 2017.04.25

(71)申请人 重庆理工大学

地址 400054 重庆市巴南区李家沱红光大道69号

(72)发明人 吴胜昔 罗彬彬 王玲玲 张中豪
徐杨非 蒋棚俊 吴海晶 万金平

(74)专利代理机构 重庆博凯知识产权代理有限公司 50212

代理人 张先芸

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/551(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的制作方法及检测方法

(57)摘要

本发明提供一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的制作方法,包括如下步骤:NDV F蛋白单克隆抗体的制备及鉴定; 81° -TFG 的表面修饰;表面处理,最终构成对NDV抗原具有特异性检测能力的 81° -TFG免疫传感器。采用本方法制备的 81° -TFG免疫传感器,充分利用其高RI灵敏度、极低的温度敏感系数及很窄的共振带宽,能够克服基于长周期光纤光栅(LPG)或小角度倾斜光纤光栅的免疫传感器存在的问题。利用“葡萄球菌A蛋白(Staphylococcal protein A,SPA)”将高特异性的“NDV单克隆抗体”固定在 81° -TFG表面,用于对NDV进行特异性的结合,极大提高免疫传感器的灵敏度、稳定性及特异性。相对于传统的PCR技术、酶联免疫等生化检测等方法,具有免标记、操作简便、快速检测等优点。

1. 一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的制作方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) NDVF蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

将已构建的含有NDVF蛋白基因的重组表达载体阳性菌进行诱导表达,表达产物经镍柱亲和层析纯化,以此蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞用PEG-1500进行细胞融合,建立间接ELISA,用于筛选阳性克隆,采用体内诱生法制备单抗腹水,并使用Protein A柱纯化腹水中的抗体;

2) 81° -TFG的表面修饰

在免疫传感器表面修饰中使用SPA蛋白,均匀分布在金黄色葡萄球菌细胞壁表面上,通过羧基端('COOH')与细胞壁肽聚糖呈共价连接;SPA多肽链由A、B、C、D四个同源区组成,每个同源区都能与人及多种哺乳动物血清中IgG的'Fc位点结合',而且不会封闭抗体上能与抗原结合的'Fab活性位点',并能使Fab的活性位点片段裸露在修饰膜的外层而伸向流动相;

表面修饰方法如下: HNO_3 溶液(5%)浸泡 81° 倾斜光栅1-1.5h,然后用去离子水和无水乙醇清洗光栅表面3-5次并晾干;将光栅晾干后置于洁净的玻璃器皿内,加入 H_2SO_4 (98% H_2SO_4 :30% $\text{H}_2\text{O}_2=5:1$ 现配现用)浸泡1-1.5h后,70 $^\circ\text{C}$ 连续烘干过夜,以激活在光栅表面激活羟基('OH');在干燥环境下用硅烷偶联剂APTES(10%,无水乙醇配置)浸泡光栅40min以在光栅表面生成氨基基团('NH $_2$ '),用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面5-7次并晾干;

3) 表面处理方法

使用浓度为0.1mg/ml的NDV-MAb溶液(0.01M, pH7.4 PBS配制),浸泡经过SPA修饰的 81° 倾斜光栅40min,在此孵化过程中,NDV-MAb的'Fc位点'将与SPA分子的多肽链相连接;再使用PBS冲洗上述 81° 倾斜光栅表面3-5次以去除光栅表面未结合的NDV-MAb分子,最终构成对NDV抗原具有特异性检测能力的 81° TFG免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的制作方法,其特征在于,所述光栅表面处理方法还可用于制作检测其他类型病毒的高度特异性及可重复利用的免疫传感器。

3. 一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的检测方法,包括如下步骤:

1) 首先对 81° 倾斜光栅表面进行生物传感功能化处理,经过光纤表面硅烷化、包被SPA和固定NDV-MAb三个步骤,其中SPA分子通过共价键方式与硅烷层牢固的连接;

2) 通过检测不同浓度等级的高纯度NDV抗原溶液,得到该免疫传感器对NDV抗原的检测极限为 $\sim 0.1\text{ng/ml}$,检测饱和点为 $\sim 1.0\text{ng/ml}$,在 $0\sim 1.0\text{ng/ml}$ 范围内具有良好的线性度($R^2, \sim 0.982$),灵敏度为 $\sim 342\text{pm}/(\text{ng/ml})$;

3) 通过所配置的洗脱液将 81° 倾斜光栅表面的NDV-MAb分子与SPA分子的连接断开,并重新固定新的NDV-MAb分子,实现传感器良好的可重复利用性;

4) 通过对AIV尿囊液、NDV尿囊液两种不同的禽类病毒原液和空白尿囊液的对比检测实验,表明NDV免疫传感器对NDV具有高度的特异性。

一种基于81°-TFG的NDV免疫传感器的制作方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽医生物技术领域,具体设计到兽医学、免疫学及生物医学工程。

背景技术

[0002] 新城疫(Newcastle Disease,ND)是一种急性、败血性、高度接触性传染病,其传播迅速,发病率和死亡率高,国际兽医局(OIE)将其列为必须报告的疫病,我国将其列为一类传染病。近年来新城疫病毒检出率在 0.5%~2%之间,如防控工作稍有松懈,不排除局部点状散发甚至引起大规模流行的可能。因此,各地畜牧兽医部门和规模化养禽企业都把禽新城疫作为重大动物疫病加以防控。

[0003] 目前,对新城疫的主要检测技术有鸡胚分离方法、血凝-血凝抑制(HA-HI) 试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)和聚合酶链式反应(PCR)等。鸡胚分离方法是一种敏感特异的方法,但整个过程约需3周左右,且操作烦琐,不利于现场检疫或监测;HA-HI 试验比较敏感,但受外界因素影响较大而削弱了其实用价值;ELISA方法适合于大批量血清学调查,但因其耗时较长,特异性不强,程序相对复杂,现场操作不便;PCR方法虽然可直接检出病毒的基因,但所需的设备昂贵,在临床检测方面受到了很大的限制。CN1827775A(专利申请号为200510008997.6)“检测新城病毒的核苷序列、试剂盒及检验方法”,该发明选择新城疫病毒F 基因(合成F 蛋白)作为靶区域,选择能够反映裂解位点特性且缺乏二级结构的保守区设计多对引物和探针,建立荧光PCR 检测新城疫病毒,该方法比传统的PCR 方法灵敏度高100-1000 倍,但从样品处理到出结果需要4小时左右,该方法的实施还需荧光定量PCR仪等昂贵仪器,不宜在基层推广。因此,研发一种快速检测新城疫病毒的诊断方法,以便对疫情进行现场及时诊断是目前养禽生产中急需解决的问题。

[0004] 过去的十多年,由于光纤光栅传感器不仅具有光纤传感器家族固有的微型尺寸、远程传感、灵敏度高共同的特点,还具有波长调制(不受光强度噪声影响)、绝对测量等诸多优点,已经备受关注和研究,并应用于众多的交叉领域,比如:智能结构工程监测、环境环保的监测等。其中,对于长周期光纤光栅(Long Period fiber grating, LPFG)和小角度倾斜光纤光栅,由于它们固有的对外部介质折射率(Refractive index,RI)敏感的特性,国内外众多学者对它们的表面进行生化功能修饰之后,应用于生物医学、生物化学及生命科学等领域的各种生物化学参考的实时、快速检测研究,然而,普通的LPFG对RI的敏感度并不高(~20nm/RIU),因此需要腐蚀其包层以提高其RI灵敏度,但这样会降低传感器的机械强度和鲁棒性,而且,LPFG对环境温度和应变十分的敏感,因此将它实际应用于生化方面的传感时,会存在严重的交叉敏感问题,从而降低传感器的稳定性和重复性。而对于基于小角度倾斜光纤光栅的生化传感器,所存在的主要问题是,由于存在众多密集的反向包层模式,不便于波长信号的鉴别和提取。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明解决耗时长,特异性不强,程序相对复杂,现场操作

不便等问题,提供一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的制作方法,以及用于对疫情进行现场及时诊断的检测方法。

[0006] 本发明通过以下技术方案来实现:一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的制作方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) NDV蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

将已构建的含有NDV蛋白基因的重组表达载体阳性菌进行诱导表达(是现有技术),表达产物经镍柱亲和层析纯化,以此蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞用PEG-1500进行细胞融合,建立间接ELISA,用于筛选阳性克隆,采用体内诱生法制备单抗腹水,并使用Protein A柱纯化腹水中的抗体;

2) 81° -TFG的表面修饰

在免疫传感器表面修饰中使用SPA蛋白,均匀分布在金黄色葡萄球菌细胞壁表面上,通过羧基端('COOH')与细胞壁肽聚糖呈共价连接;SPA多肽链由A、B、C、D四个同源区组成,每个同源区都能与人及多种哺乳动物血清中IgG的'Fc位点结合',而且不会封闭抗体上能与抗原结合的'Fab活性位点',并能使Fab的活性位点片段裸露在修饰膜的外层而伸向流动相;

表面修饰方法如下:HNO₃溶液(5%)浸泡 81° 倾斜光栅1-1.5h,然后用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面3-5次并晾干;将光栅晾干后置于洁净的玻璃器皿内,加入H₂SO₄(98% H₂SO₄:30%H₂O₂=5:1现配现用)浸泡1-1.5h后,70℃连续烘干过夜,以激活在光栅表面激活羟基('OH');在干燥环境下用硅烷偶联剂APTES(10%,无水乙醇配置)浸泡光栅40min以在光栅表面生成氨基基团('NH₂'),用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面5-7次并晾干;

3) 表面处理方法

使用浓度为0.1mg/ml的NDV-MAb溶液(0.01M, pH7.4 PBS配制),浸泡经过SPA修饰的 81° 倾斜光栅40min,在此孵化过程中,NDV-MAb的'Fc位点'将与SPA分子的多肽链相连接;再使用PBS冲洗上述 81° 倾斜光栅表面3-5次以去除光栅表面未结合的NDV-MAb分子,最终构成对NDV抗原具有特异性检测能力的 81° -TFG免疫传感器。

[0007] 进一步,所述光栅表面处理方法还可用于制作检测其他类型病毒的高度特异性及可重复利用的免疫传感器。

[0008] 本发明还提供一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器的检测方法,包括如下步骤:

1) 首先对 81° 倾斜光栅表面进行生物传感功能化处理,经过光纤表面硅烷化、包被SPA和固定NDV-MAb三个步骤,其中SPA分子通过共价键方式与硅烷层牢固的连接;

2) 通过检测不同浓度等级的高纯度NDV抗原溶液,得到该免疫传感器对NDV抗原的检测极限为~0.1ng/ml,检测饱和点为~1.0ng/ml,在0~1.0ng/ml范围内具有良好的线性度(R^2 , ~0.982),灵敏度为~342pm/(ng/ml);

3) 通过所配置的洗脱液将 81° 倾斜光栅表面的NDV-MAb分子与SPA分子的连接断开,并重新固定新的NDV-MAb分子,实现传感器良好的可重复利用性;

4) 通过对AIV尿囊液、NDV尿囊液两种不同的禽类病毒原液和空白尿囊液的对比检测实验,表明NDV免疫传感器对NDV具有高度的特异性。

[0009] 本发明通过设计并制作一种基于 81° -TFG的NDV免疫传感器,并在此基础上建立快速检测NDV(新城疫病毒)的方法。相比现有技术,具有如下有益效果:

1、本发明采用 81° 倾斜光纤光栅(TFG)，充分利用其高RI灵敏度、极低的温度敏感系数及很窄的共振带宽，能够克服基于LPPFG或TFG的免疫传感器存在的问题。利用“葡萄球菌A蛋白(Staphylococcal protein A, SPA)”将高特异性的“NDV单克隆抗体”固定在Ex-TFG表面，用于对NDV进行特异性的结合，极大提高免疫传感器的灵敏度、稳定性及特异性。

[0010] 2、本发明基于 81° TFG的NDV免疫传感器，相对于传统的PCR技术、酶联免疫等生化检测等方法，具有免标记、操作简便、快速检测等优点。该发明提供的NDV检测方法目前国内尚未报道。

[0011] 3、本发明检测方法，首先对光栅表面进行生物传感功能化处理，经过光纤表面硅烷化、包被SPA和固定NDV-MAb三个步骤，其中SPA分子通过共价键方式与硅烷层牢固的连接。通过检测不同浓度等级的高纯度NDV抗原溶液，得到该免疫传感器对NDV抗原的检测极限为 $\sim 0.1\text{ng/ml}$ ，检测饱和点为 $\sim 1.0\text{ng/ml}$ ，在 $0\sim 1.0\text{ng/ml}$ 范围内具有良好的线性度($R^2, \sim 0.982$)，灵敏度为 $\sim 342\text{pm}/(\text{ng/ml})$ ；通过所配置的洗脱液将光栅表面的NDV-MAb分子与SPA分子的连接断开，并重新固定新的NDV-MAb分子，实现了传感器良好的可重复利用性。通过对AIV尿囊液、NDV尿囊液两种不同的禽类病毒原液和空白尿囊液的对比检测实验，结果表明该传感器对NDV具有高度的特异性，而且达到了临床应用的水平。该光栅表面处理方法也可以用于制作检测其他类型病毒的高度特异性及可重复利用的免疫传感器。

附图说明

[0012] 图1 是基于 81° -TFG的NDV免疫传感器实验测试系统。

[0013] 图2是 NDV F蛋白诱导表达温度及IPTG浓度的优化图；

其中，M：蛋白质分子质量标准；1.未诱导对照；2.PET32a空载体；3. 16°C ；4. 30°C ；5. 37°C ；6. IPTG为 0.1mmol/L ；7. IPTG为 0.5mmol/L ；8. IPTG为 1mmol/L 。

[0014] 图3 是纯化后的重组F蛋白的SDS-PAGE电泳；

其中，M：蛋白分子质量标准；1-3： 30mM 咪唑；4-7： 300mM 咪唑；8-9： 500mM 咪唑；10： 2M 咪唑。

[0015] 图4 是重组F蛋白的Western-blot检测图；

其中，1-3：纯化后的重组F蛋白。

[0016] 图5(a)是 NDV-MAb的SDS-PAGE鉴定结果。

[0017] 图5(b)是NDV-MAb的Western-blot鉴定结果。

[0018] 图6是倒置荧光显微镜($200\times$)下的(a)硅烷化光纤；(b)标记FITC的SPA修饰过的光纤。

[0019] 图7(a)是光栅表面的化学键链接机制；(b)是 81° TFG表面处理过程的光谱变化图

图8 是 81° TFG免疫传感器(a)测定不同浓度等级NDV抗原溶液的光谱变化($0\sim 24.0\text{ng/ml}$)；(b)对应的谐振波长变化。(插图：线性区拟合 $0\sim 1.0\text{ng/ml}$)。

[0020] 图9 是 81° TFG免疫传感器的重用性、特异性和临床性测试的谐振波长变化。

具体实施方式

[0021] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0022] 一、基于 81° -TFG的NDV免疫传感器实验测试系统的设计

本发明设计的基于81°TFG的NDV免疫传感实验系统如图1所示,光纤光栅传感解调系统(MOI-SM125,波长精度±1pm)中集成有扫频率激光光源(1510nm~1590nm,1Hz)。宽带光从其中的一个通道(CH1)输出注入到单模光纤传输到光纤隔离器(IsoIator),以避免背向散射光和反射光对光源稳定性的影响;然后连接到在线起偏器(PoIarizer)和偏振控制器(PC),以产生和控制线偏振光工作在81°TFG的TM模全激励的状态;81°TFG传感器水平放置于生化反应器皿内,其另一端通过单模光纤连接到光纤光栅解调系统的另一个通道(CH2),解调后的光谱通过串口输入到计算机上实时显示。

[0023] 二、基于81°-TFG的NDV免疫传感器的制作及其检测方法的建立

2.1NDVF蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

将已构建的含有NDV F蛋白基因的重组表达载体阳性菌进行诱导表达,表达产物经镍柱亲和层析纯化,以此蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞用PEG-1500进行细胞融合,建立间接ELISA,用于筛选阳性克隆,采用体内诱生法制备单抗腹水,并使用Protein A柱纯化腹水中的抗体。制备的高效价NDV F蛋白单克隆抗体(NDV -MAb),为81°-TFG免疫传感器提供了有效试剂。

[0024] 2.2、81°-TFG 的表面修饰

在免疫传感器表面修饰中使用的SPA是一种表面蛋白,均匀分布在金黄色葡萄球菌细胞壁表面上,通过羧基端(‘-COOH’)与细胞壁肽聚糖呈共价连接。SPA多肽链由A、B、C、D四个同源区组成,每个同源区都能与人及某些哺乳动物血清中IgG的‘Fc位点结合’,而且不会封闭抗体上能与抗原结合的‘Fab活性位点’,并能使Fab的活性位点片段裸露在修饰膜的外层而伸向流动相,从而不影响抗体与抗原的反应活性。

[0025] 采用表面修饰方法如下:HN0₃溶液(5%)浸泡81°倾斜光栅1h,然后用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面3-5次并晾干;将光栅晾干后置于洁净的玻璃器皿内,加入H₂SO₄(98%H₂SO₄:30%H₂O₂=5:1现配现用)浸泡1h后,70℃连续烘干过夜,以激活在光栅表面激活羟基(‘-OH’);在干燥环境下用硅烷偶联剂APTES(10%,无水乙醇配置)浸泡光栅40min以在光栅表面生成氨基基团(‘-NH₂’),用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面5-7次并晾干。

[0026] 其中,81°-TFG 的表面修饰尤其是SPA通过共价键方式与硅烷层牢固的连接是本发明的主要创新之一。

[0027] 2.3、基于81°-TFG的NDV免疫传感器检测方法的建立

使用浓度为0.1mg/ml 的NDV-MAb溶液(0.01M,pH7.4 PBS配制)浸泡经过SPA修饰的光栅40min,在此孵化过程中,NDV-MAb的‘Fc位点’将与SPA分子的多肽链相连接;再使用PBS冲洗光栅表面3次以去除光栅表面未结合的NDV-MAb分子,最终构成对NDV抗原具有特异性检测能力的81°TFG免疫传感器。

[0028] 2.4、基于81°-TFG的NDV免疫传感器可重用性测试

完成NDV抗原溶液检测之后,为了去除81°TFG免疫传感器表面特异性结合的NDV抗原分子,本发明将光栅浸泡在平衡液(亲和平衡液20mM Tris-HCl,pH 7.3-7.5,添加150mM NaCl)中平衡3个体积,用洗脱液(亲和洗脱液 0.2M Gly-HCl,pH 3.0-3.2)洗脱6~7次,最后用再生液(亲和再生液 5.8mI/L无水醋酸,pH 3.0)清洗3次。然后,将传感器置于在PBS溶液中检测其光谱。

[0029] 2.5、基于81°-TFG的NDV免疫传感器特异性及临床性测试

传感器的特异性和临床检测鉴定分步同时进行,其方案为:首先使用重新固定了NDV-MAb分子的传感器检测禽流感病毒原液(即AIV尿囊液),以及检测不含NDV的病毒原液(即NDV空白尿囊液),每次检测反应30min之后使用PBS和去离子水冲洗多次,并记录传感器在PBS环境下的光谱。由于尿囊液中含有许多其他生物分子杂质(如:杂蛋白、生物盐、细胞等),SPA分子也能够与其他多种病毒抗体或抗原相结合,因此,这两个检测步骤不仅能够鉴定该NDV免疫传感器对NDV抗原结合的特异性,还能够鉴定传感器表面的活性SPA分子的多肽链是否完全已经被NDV-MAb的Fc位点所占据。

[0030] 实施例:

1、NDV F蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

1.1 NDV F蛋白原核表达及鉴定

为实现NDV F蛋白在大肠杆菌中高效表达,本发明在不改变NDV F蛋白氨基酸序列的情况下,根据大肠杆菌密码子偏好性优化基因序列,以优化后的NDV F全基因组为模板,设计并合成引物,采用RT-PCR法扩增NDV F基因,并将其克隆到pET32a(+)载体中,构建重组质粒pET32a(+)/NDV-F,转化BL21工程菌进行诱导表达,利用His-tag镍柱纯化NDV F重组蛋白,并对纯化后的重组蛋白进行鉴定。结果表明重组菌株在诱导条件为16℃,IPTG为0.1mmol/L诱导20h,F蛋白表达量最高(图2)。SDS-PAGE电泳显示经镍柱纯化后F蛋白达到了电泳纯(图3),Western-blot显示在78KD处有明显的蛋白印迹条带,与预期蛋白大小相符(图4)。

[0031] 1.2 NDV F蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

以NDV全病毒及纯化的NDV F蛋白为免疫原分别免疫小鼠,采用PEG融合方法进行细胞融合,筛选出阳性克隆,利用有限稀释法进行3-4次克隆化筛选,得到能分泌抗体且效价高的杂交瘤细胞株,采用小鼠体内诱生法将杂交瘤细胞腹腔注射小鼠大量制备单克隆抗体并纯化,通过SDS-PAGE电泳及Western-blot分别对纯化后的单抗纯度进行鉴定。由图5(a)可见,制备的NDV单抗腹水经过Protein A亲和层析柱纯化,收集纯化后的洗脱峰,经SDS-PAGE电泳鉴定后只出现两条带,一条为25KD的轻链,另一条为50KD左右的重链,表明抗体纯度达到了电泳纯,图5(b)鉴定结果可见获得的单抗是针对NDV F蛋白(60KD),从而获得能稳定分泌抗体且纯度较高、特异性强的NDV单克隆抗体。

[0032] 2. 81°-TFG 的表面修饰及鉴定

采用表面修饰方法如下: HNO₃溶液(5%)浸泡81°倾斜光栅1h,然后用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面3~5次并晾干;将光栅晾干后置于洁净的玻璃器皿内,加入H₂SO₄(98% H₂SO₄:30%H₂O₂=5:1现配现用)浸泡1h后,70℃连续烘干过夜,以激活在光栅表面激活羟基('OH');在干燥环境下用硅烷偶联剂APTES(10%,无水乙醇配置)浸泡光栅40min以在光栅表面生成氨基基团('NH₂'),用去离子水和无水乙醇清洗清洗光栅表面5~7次并晾干。在使用SPA包被硅烷化光栅表面之前,采用活化剂EDC/NHS体系活化SPA,活化反应体系配比为:4mg/ml的EDC 10μL;7mg/ml的NHS、10μL;5mg/ml的SPA 48μL;缓冲液为0.1M的MES 132μL,反应体系的pH在5.5~6.0之间。

[0033] 为了证明本发明能够在光纤表面有效的包被SPA分子层,在以上表面处理过程中,同时处理几根标准单模裸光纤,其中一根硅烷化后的裸光纤采用标记了FITC的SPA进行表面修饰,然后将仅硅烷化的光纤和SPA(标记FITC)修饰过的光纤放置在倒置荧光显微镜(Olympus Venox)下进行观测,分别如图6(a)、(b)所示,可见硅烷化的光纤没有激发任何荧

光,而SPA修饰的光纤表面激发出了明显的荧光,说明该修饰方法能在光纤表面包被一层稳定的SPA分子层。

[0034] 3、基于 81° -TFG的NDV免疫传感器检测方法的建立

本发明使用浓度为 $0.1\text{mg}/\text{mI}$ 的NDV-MAb溶液(0.01M , $\text{pH}7.4$ PBS配制)浸泡经过SPA修饰的光栅 40min ,在此孵化过程中,NDV-MAb的'Fc位点'将与SPA分子的多肽链相连接;再使用PBS冲洗光栅表面3次以去除光栅表面未结合的NDV-MAb分子,最终构成对NDV抗原具有特异性检测能力的 81° TFG免疫传感器。经过以上表面处理过程,光栅表面的化学键链接如图7(a)、 81° TFG表面处理过程的光谱变化图(b)所示。本发明采用 0.01M , $\text{pH}7.4$ PBS稀释NDV抗原溶液,浓度分别为 $0.05\text{ng}/\text{mI}$ 、 $0.1\text{ng}/\text{mI}$ 、 $0.2\text{ng}/\text{mI}$ 、 $0.6\text{ng}/\text{mI}$ 、 $1.0\text{ng}/\text{mI}$ 和 $24.0\text{ng}/\text{mI}$ 。采用图1的实验系统,对于每个浓度等级的测试,用移液体器将 0.3mI 的NDV抗原溶液滴定并覆盖整个 81° TFG的表面,每次反应约 30min 完成;然后用PBS冲洗光纤表面和生化反应器皿后,再滴定 1mI 的PBS覆盖整个 81° TFG,并记录其在C波段TM模全激励条件下的光谱。实验得到 81° TFG免疫传感器的光谱随NDV抗原溶液浓度等级的变化如图8(a)所示,对应的谐振中心波长的变化如图8(b)所示。

[0035] 结果分析,由图7可见,浓度为 $0.05\text{ng}/\text{mI}$ 的NDV抗原溶液,传感器的谐振光谱基本未发生变化和漂移。当NDV抗原溶液的浓度为 $0.1\text{ng}/\text{mI}$ 时,传感器的谐振光谱发生了 $\sim 15\text{pm}$ 的红移,已知实验中使用的高纯度NDV蛋白的分子量高达 60KD (见图5(b)),因此当光栅表面的NDV-MAb与NDV抗原发生极少量的特异性结合时就能观测到谐振光谱的红移,据此,该免疫传感器的最低检测极限为 $\sim 0.1\text{ng}/\text{mI}$ 。当NDV抗原溶液的浓度为 $1.0\text{ng}/\text{mI}$ 和 $24\text{ng}/\text{mI}$ 时,谐振光谱的红移量基本相同(分别为 $\sim 325\text{pm}$ 和 $\sim 335\text{pm}$),这是由于随着测试次数的增加和NDV抗原溶液浓度等级的增大,光栅表面能够对NDV抗原进行特异性结合的NDV-MAb分子的'Fab位点'越来越少(即,逐步趋于饱和),因此,该免疫传感器对NDV的检测饱和点为 $\sim 1.0\text{ng}/\text{mI}$ 。对图7(b)中 $0 \sim 1.0 \text{ ng}/\text{mI}$ 的NDV浓度区域进行线性拟合,可得该浓度范围内传感器的灵敏度为 $\sim 342\text{pm}/(\text{ng}/\text{mI})$ 、线性度 R^2 为 ~ 0.982 (见其中的插图),表明该光栅免疫传感器在其检测范围内具有良好的线性度。

[0036] 2.4 基于 81° -TFG的NDV免疫传感器可重用性测试

完成NDV抗原溶液检测之后,为了去除 81° TFG免疫传感器表面特异性结合的NDV抗原分子,本发明将光栅浸泡在平衡液(亲和平衡液 20mM Tris-HCl, $\text{pH} 7.3-7.5$,添加 150mM NaCl)中平衡3个体积,用洗脱液(亲和洗脱液 0.2M Gly-HCl, $\text{pH} 3.0-3.2$)洗脱 $6\sim 7$ 次,最后用再生液(亲和再生液 $5.8\text{mI}/\text{L}$ 无水醋酸, $\text{pH} 3.0$)清洗3次。然后,将传感器置于在PBS溶液中检测其光谱,结果表明其在C波段TM模的谐振波长为 $\sim 1545.250\text{nm}$,与第一次表面处理中SPA修饰后的谐振波长基本一致($\sim 1545.240\text{nm}$,见图7(b)),这说明用于NDV检测灵敏度测试之后的传感器经以上表面处理过程,其表面的NDV-MAb分子已经基本上从呈酰胺反应固定的SPA分子层解离出去(见图7(a)中的解离示意)。最后,用浓度为 $0.1\text{mg}/\text{mI}$ 的NDV-MAb溶液(PBS配置)浸泡光栅 40min ,再用PBS和去离子水将光栅清洗多次后,在PBS环境下检测其谐振波长的相对漂移量,结果如图9的Step2和表1的对应数据(第四行第2列)所示,其谐振波长发生了 $\sim 0.29\text{nm}$ 的红移,与第一次固定NDV-MAb分子时的相对红移量($\sim 0.255\text{nm}$)相当,说明NDV-MAb已重新成功固定于光栅表面的SPA分子层。

[0037] 2.5 基于 81° -TFG的NDV免疫传感器特异性及临床性测试

传感器的特异性和临床检测鉴定分步同时进行,其方案为:首先使用重新固定了NDV-MAb分子的传感器检测禽流感病毒原液(既,AIV尿囊液),以及检测不含NDV的病毒原液(即,NDV空白尿囊液),每次检测反应30min之后使用PBS和去离子水冲洗多次,并记录传感器在PBS环境下的光谱。由于尿囊液中含有许多其他生物分子杂质(如:杂蛋白、生物盐、细胞等),SPA分子也能够与其他多种病毒抗体或抗原相结合,因此,这两个检测步骤不仅能够鉴定该NDV免疫传感器对NDV抗原结合的特异性,还能够鉴定传感器表面的活性SPA分子的多肽链是否完全已经被NDV-MAb的Fc位点所占据。检测结果如图9的Step3、4 和表1的对应数据(第四行的第3、4列)所示,可见这两个步骤中传感器的谐振波长相对于重新固定NDV-MAb分子步骤(即,Step2)的变化仅为 $\pm 5\text{pm}$,均在系统的误差范围之内,可认为未发生光谱红移。

[0038] 因此,说明该NDV免疫传感器对AIV尿囊液和NDV空白尿囊液没有任何结合特异性的能力,同时说明使用 0.1mg/ml 的NDV-MAb溶液包被该光栅传感器,足以将其表面的SPA多肽链完全封闭。

[0039] 表1传感器第一次表面修饰谐振波长的相对变化量,重用性、特异性及临床测试谐振波长的相对变化量

Step of First surface Modification	APTES	SPA	NDV-MAb	—
Relative Wavelength Shift (nm)	0.385	0.255	0.21	—
Step of Reusability, Specificity and Clinical Experiment	NDV-MAb	AIV Allantoic Fluid	NDV-Blank Allantoic Fluid	NDV Allantoic Fluid
Relative Wavelength Shift (nm)	0.29	-0.005	0.005	0.28

一种基于 81° 倾斜光纤光栅(81° Tilted Fiber Grating, 81° -TFG)的NDV免疫传感器的制作方法,创新在于针对NDV的光栅免疫传感器光栅条纹倾斜角度大于 80° 的特种倾斜光纤光栅(excessively tilted fiber grating, Ex-TFG),能充分利用其高RI灵敏度、极低的温度敏感系数及很窄的共振带宽,能够克服基于长周期光纤光栅(LPFG)或小角度倾斜光栅的免疫传感器存在的问题, 81° - 84° 都可以,一般常用的是 81° 。

[0040] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

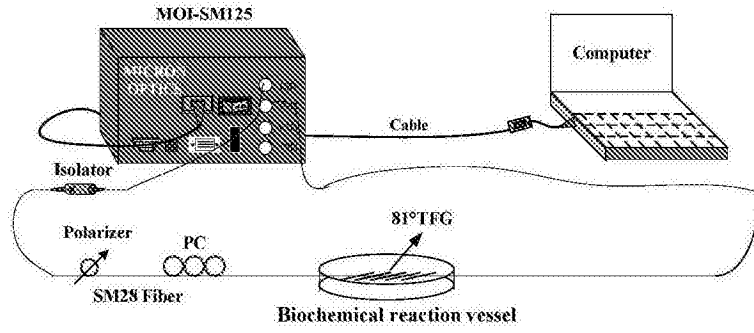


图1

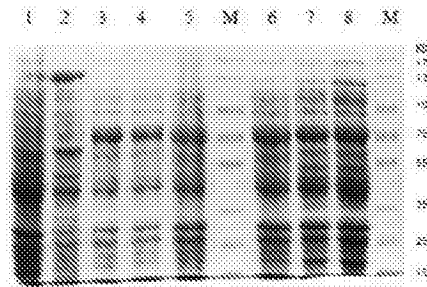


图2

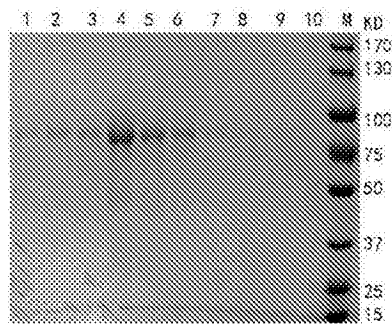


图3

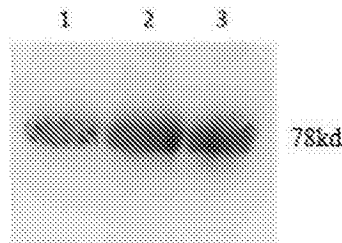


图4

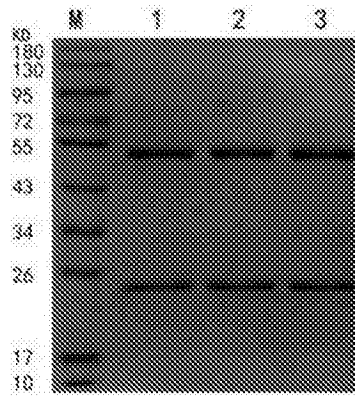


图5 (a)

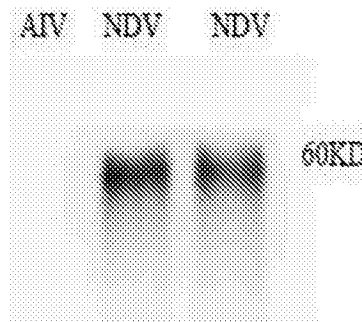


图5 (b)

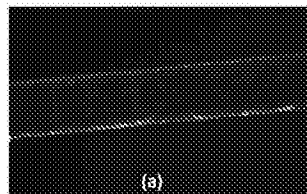


图6 (a)

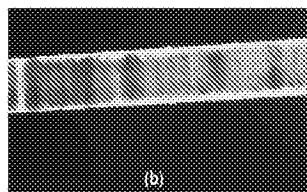


图6 (b)

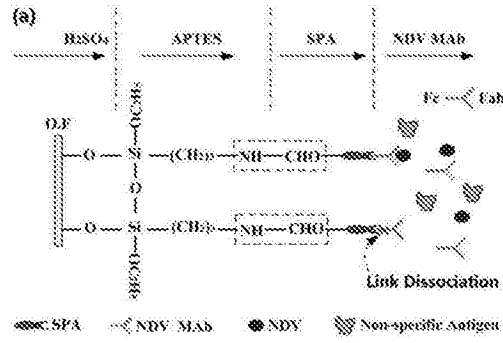


图7 (a)

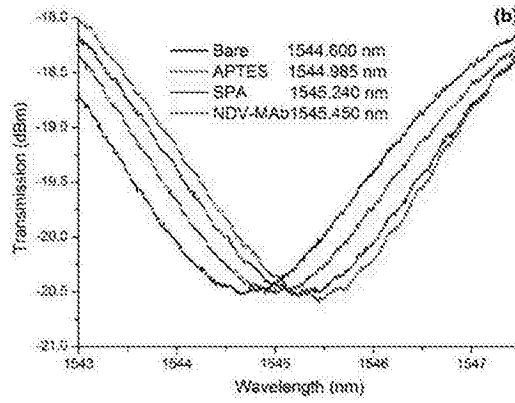


图7 (b)

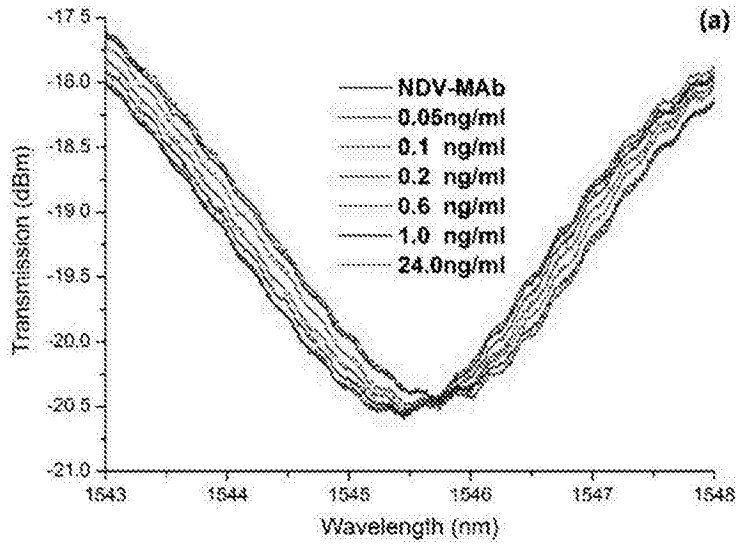


图8 (a)

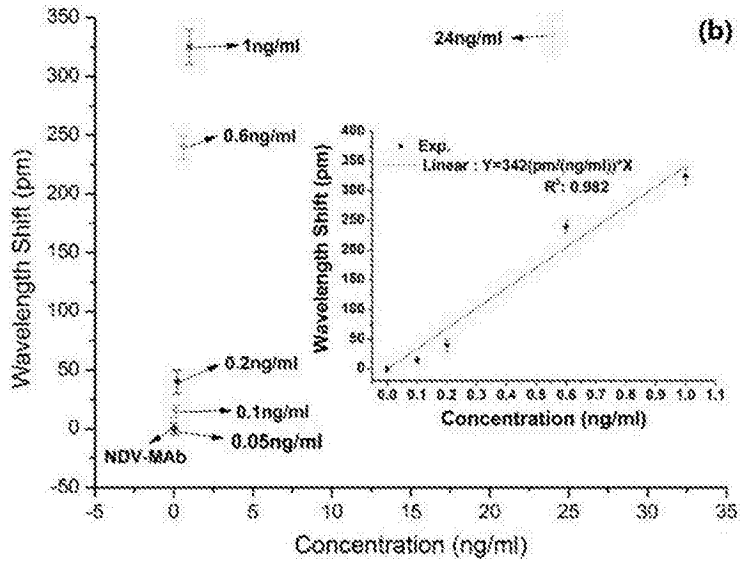


图8 (b)

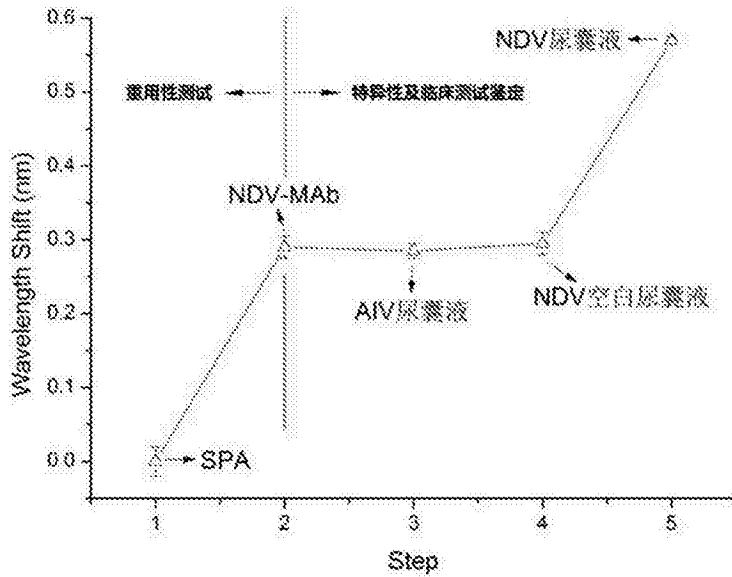


图9

专利名称(译)	一种基于81°-TFG的NDV免疫传感器的制作方法及检测方法		
公开(公告)号	CN106990248A	公开(公告)日	2017-07-28
申请号	CN201710277582.1	申请日	2017-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	重庆理工大学		
申请(专利权)人(译)	重庆理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	重庆理工大学		
[标]发明人	吴胜昔 罗彬彬 王玲玲 张中豪 徐杨非 蒋棚俊 吴海晶 万金平		
发明人	吴胜昔 罗彬彬 王玲玲 张中豪 徐杨非 蒋棚俊 吴海晶 万金平		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/551 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/551 G01N33/56983 G01N2333/125		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于81°-TFG的NDV免疫传感器的制作方法，包括如下步骤：NDV F蛋白单克隆抗体的制备及鉴定；81°-TFG的表面修饰；表面处理，最终构成对NDV抗原具有特异性检测能力的81°-TFG免疫传感器。采用本方法制备的81°-TFG免疫传感器，充分利用其高RI灵敏度、极低的温度敏感系数及很窄的共振带宽，能够克服基于长周期光纤光栅（LPGF）或小角度倾斜光纤光栅的免疫传感器存在的问题。利用“葡萄球菌A蛋白（Staphylococcal protein A, SPA）”将高特异性的“NDV单克隆抗体”固定在81°-TFG表面，用于对NDV进行特异性的结合，极大提高免疫传感器的灵敏度、稳定性及特异性。相对于传统的PCR技术、酶联免疫等生化检测等方法，具有免标记、操作简便、快速检测等优点。

