



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 203870107 U

(45) 授权公告日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201420217173. 4

(22) 申请日 2014. 04. 29

(73) 专利权人 广州市微米生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市广州高新技术产
业开发区科学城科丰路 31 号华南新材
料创新园 G8 栋 502 号

(72) 发明人 汤永平 张晓丽 潘秀华

(74) 专利代理机构 广州市越秀区海心联合专
利代理事务所 (普通合伙)
44295

代理人 黄为

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(ESM) 同样的发明创造已同日申请发明专利

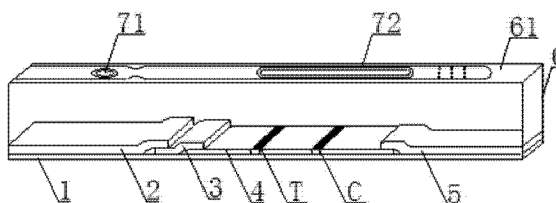
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 实用新型名称

A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡

(57) 摘要

本实用新型公开了一种 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,旨在提供一种检测方法简单、快速,灵敏度高,检测结果可靠的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡;该检测试剂卡包括带盒盖的箱体 (6),箱体 (6) 内设有检测试纸,所述的箱体 (6) 的盒盖 (61) 上设有加样孔 (71) 和结果观察窗口 (72);所述的检测试纸包括底板 (1),底板 (1) 上依次衔接有样品垫 (2)、抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 (3)、包被膜 (4) 和吸水垫 (5),所述的包被膜 (4) 上设有一条 A 族链球菌抗体检测区 T 线和一条羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线,两条线平行排列;属于荧光免疫检测领域。



1. 一种 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,包括带盒盖的箱体 (6),箱体 (6) 内设有检测试纸,其特征在于,所述的箱体 (6) 的盒盖 (61) 上设有加样孔 (71) 和结果观察窗口 (72);所述的检测试纸包括底板 (1),底板 (1) 上依次衔接有样品垫 (2)、抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 (3)、包被膜 (4) 和吸水垫 (5),所述的包被膜 (4) 上设有一条 A 族链球菌抗体检测区 T 线和一条羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线,两条线平行排列。

2. 根据权利要求 1 所述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,其特征在于,所述的包被膜 (4) 两端分别与吸水垫 (5) 和抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 (3) 相互交叠连接,在抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 (3) 上压贴有样品垫 (2)。

3. 根据权利要求 1 所述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,其特征在于,所述的样品垫 (2) 为玻璃纤维样品垫。

4. 根据权利要求 1 所述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,其特征在于,所述的包被膜 (4) 为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求 1 所述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,其特征在于,所述的抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫为包被量子点标记 A 族链球菌抗体聚酯纤维素膜。

6. 根据权利要求 1 所述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,其特征在于,样品垫 (2) 压在抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 (3) 的 $1/3 \sim 1/4$ 处,抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 (3) 压在包被膜 (4) 的 1mm 处,吸水垫 (5) 压在包被膜 (4) 1 ~ 2.5mm 处,A 族链球菌抗体检测区 T 线距离包被膜 (4) 左端 10mm,羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线距离包被膜 (4) 右端 10mm,C、T 线间距 4 ~ 7mm。

A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡

技术领域

[0001] 本实用新型公开了一种检测试剂卡,具体地说,是一种测定咽部拭子中 A 族链球菌的检测试剂卡,本实用新型还公开了该检测试剂卡的制备方法,属于荧光免疫检测领域。

背景技术

[0002] 小儿上呼吸道感染的常见病原体之一,在呼吸道感染患儿中 A 族链球菌阳性率约为 23.2%。如不及时接受抗感染治疗,包括急性咽炎、脓胞病、中毒性休克综合征、侵袭性筋膜炎、猩红热、肺炎、丹毒和 A 族链球菌感染后引起的变态反应性疾病,如急性风湿热、风湿性心脏病、急性肾小球肾炎。目前普遍的 A 族链球菌鉴定方法主要有临床经验甄别、细菌培养法。

[0003] 根据临床经验诊断 A 族链球菌的准确率偏低,据资料统计,即使经验丰富的医生诊断的准确率也只有 45% -75%。细菌培养法是 A 族链球菌诊断的“金标准”,该方法是将采取的咽拭子接种于血琼脂平板上孵育 24 ~ 48h,10% CO₂ 或厌氧条件下可增加 A 族链球菌的分离率,最终采取血清学方法鉴别 A 族链球菌与其他 β 溶血性链球菌,特别是 C 族和 G 族,但是需要的时间较长。

实用新型内容

[0004] 针对上述不足,本实用新型的目的在于提供一种操作简单,诊断迅速,检测结果可靠的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡。

[0005] 为解决上述技术问题,本实用新型提供的技术方案是这样的:该 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,包括带盒盖的盒体,盒体内设有检测试纸,所述的盒体的盒盖上设有加样孔和结果观察窗口;所述的检测试纸包括底板,底板上依次衔接有样品垫、抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫、包被膜和吸水垫,所述的包被膜上设有一条 A 族链球菌抗体检测区 T 线和一条羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线,两条线平行排列。

[0006] 上述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,所述的包被膜两端分别与吸水垫和抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫相互交叠连接,在抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫上压贴有样品垫。

[0007] 进一步的,上述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,所述的样品垫为玻璃纤维样品垫。

[0008] 进一步的,上述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,所述的包被膜为硝酸纤维素膜。

[0009] 进一步的,上述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,所述的抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫为包被量子点标记 A 族链球菌抗体聚酯纤维素膜。

[0010] 更进一步的,上述的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,样品垫压在抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫的 1/3 ~ 1/4 处,抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫压在包被膜的 1mm 处,吸水垫压在包被膜 1 ~ 2.5mm 处, A 族链球菌抗体检测区 T 线距离包被膜左端 10mm,羊

抗兔多克隆抗体质控区 C 线距离包被膜右端 10mm, C、T 线间距 4 ~ 7mm。

[0011] 与现有技术相比,本实用新型所提供的 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡具有如下优点:

[0012] 本实用新型提供的技术方案,利用两种抗体的特异结合反应,形成特异的“三明治”结构,即“抗体-抗原-抗体”免疫复合物,结合免疫层析技术,应用荧光免疫层析法检测 A 族链球菌抗原,并与手持式紫外灯相配合,大幅度提高 A 族链球菌的检出率。

[0013] 本方法操作简单,诊断迅速,特异性强,灵敏度高,易储存,无须专门的计时操作人员,配合简单的仪器设备,即可得出结果。这样有利于医护人员抓住最佳治疗时间,避免抗生素的滥用,同时降低 A 族链球菌变态反应的几率。

附图说明

[0014] 图 1 是本实用新型提供的检测试剂卡结构示意图;

[0015] 图 2 是本实用新型提供的检测试剂卡的盒盖俯视图;

[0016] 图 3 是本实用新型提供的检测试纸结构示意图;

[0017] 图 4 是本实用新型提供的检测试纸俯视图;

[0018] 图 5 是本实用新型提供的检测卡判定结果为阴性时示意图;

[0019] 图 6 是本实用新型提供的检测卡判定结果为阳性时示意图。

[0020] 其中:底板 1,样品垫 2,抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 3,包被膜 4,吸水垫 5, A 族链球菌抗体检测区 T 线,羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线,箱体 6,盒盖 61,加样孔 71,结果观察窗口 72。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例的方式对本实用新型的权利要求做进一步的详细说明,但并不构成对本实用新型的任何限制,任何人在本实用新型权利要求范围内所做的有限次的修改,仍在本实用新型的权利要求范围之内。

[0022] 实施例 1

[0023] 本实用新型提供的一种 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡,参阅图 1 至图 4,所述的检测试剂卡包括带盒盖 61 的箱体 6,为了方便加样和观察检测结果,所述的盒盖 61 上设有加样孔 71 和结果观察窗口 72。

[0024] 箱体 6 内设有检测试纸,所述的检测试纸包括底板 1,所述的底板 1 为 PVC 板,在底板 1 上依次衔接有样品垫 2、抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 3、包被膜 4 和吸水垫 5,在包被膜 4 上设有一条 A 族链球菌抗体检测区 T 线和一条羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线,两条线平行排列。为了达到快速、准确的检测结果,所述的样品垫 2 优选玻璃纤维样品垫;所述的包被膜 4 优选硝酸纤维素膜;所述的抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 3 为包被量子点标记 A 族链球菌抗体聚酯纤维素膜。

[0025] 更具体的说,所述的包被膜 4 压贴在底板 1 中间部位,包被膜 4 的两端分别与吸水垫 5 和抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 3 相互交叠连接,在抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 3 上压贴有样品垫 2。

[0026] 样品垫 2 压在抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫 3 的 1/3 ~ 1/4 左右,抗 A 族链球

菌抗体量子点标记垫 3 压在包被膜 4 的 1mm 处, A 族链球菌抗体检测区 T 线距离包被膜 4 左端 10mm, 羊抗兔多克隆抗体质控区 C 线距离包被膜 4 右端 10mm, C、T 线间距 4 ~ 7mm (优选 5mm), 吸水垫压在包被膜 4 的 1 ~ 2.5mm (优选 2mm) 处。

[0027] 该 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡的制备方法:

[0028] 1) 样品垫的制备方法是: 将样品垫用含 0.5 ~ 5wt% BSA、0.5 ~ 5wt% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5 ~ 5wt% 聚乙二醇、0.1 ~ 5wt% 吐温 -20、1 ~ 5wt% 曲拉通 -100 的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (0.01M 磷酸氢二钠 : 0.01M 磷酸二氢钠 = 81:19 (V:V)) (pH7.4) 浸泡完全后, 37°C 烘干或在相对湿度 ≤ 35% 的环境下干燥。

[0029] 缓冲液优选为 0.01M 磷酸盐缓冲液中 0.5wt% BSA、0.5wt% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5wt% 聚乙二醇、0.25wt% 吐温 -20、1wt% 曲拉通 -100。

[0030] 2) 抗 A 族链球菌抗体量子点标记垫的制备方法是:

[0031] ①用 10mM pH8.4 的硼酸缓冲液 (2.5mM 硼砂 : 10mM 硼酸 = 4.5:5.5 (V:V)) 将水性羧基量子点 8 μM 的 QD525 稀释至 1 μM。

[0032] ②取 1mL 1 μM 的量子点, 加入 30 μL 10mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液, 室温反应 1 ~ 2 小时。用 30kDa 的超滤管超滤, 除去未反应的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸, 吸取超滤管内剩余液体, 加入 10mM 的硼酸缓冲液恢复为体积至 1mL。

[0033] ③将抗 A 族链球菌抗体加入 100kDa 的超滤管中, 用 10mM 硼酸缓冲液调整抗体含量为 4mg/mL 的。

[0034] ④按 200 μg/1mL 的量, 将步骤②制备的抗体加入到步骤①量子点溶液中, 室温反应 1 ~ 2 小时。

[0035] ⑤按 10 μL/1mL 的量, 向步骤③中加入 10mg/mL 的甘氨酸, 封闭未偶联抗体的活化羧基位点, 反应 30 ~ 60min。

[0036] ⑥将偶联抗体的量子点溶液加入到 30kDa 的超滤管中, 加入 pH9.0 浓度 0.05M Tris-HCl 溶液置换溶液缓冲体系。重复 3 ~ 5 次, 吸取超滤管中的液体, 加 Tris-HCl 至终体积为 100 μL。

[0037] ⑦将步骤⑥中的溶在液 4°C 1800g 离心, 取上清液。

[0038] ⑧在步骤⑦所得的上清液中加入 100 μL 抗体保存液, 所述的体保存液为含 1% BSA, 20% 蔗糖, 10% 海藻糖, 0.1% 吐温 -20 和 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮的 0.05M Tris-HCl 缓冲液。

[0039] ⑧将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至聚酯纤维素膜上, 喷量为 1 ~ 5 μL/cm (优选 2 μL/cm), 放入 37°C 烘箱, 干燥 2 ~ 5 小时。

[0040] 3) 包被膜的制备方法是:

[0041] ①将羊抗兔抗体用 0.02M 磷酸盐缓冲液稀释至 1mg/mL, 加入 3% 的甲醇, 即为质控区工作液。

[0042] ②将抗 A 族链球菌抗体用 0.02M 磷酸盐缓冲液稀释至 1.2mg/mL, 加入 3% 的甲醇, 即为检测区工作液。

[0043] ③将①、②所得的溶液, 用喷金划膜仪以 1 μL/cm 包被到硝酸纤维膜上。检测区与质控区间距为 0.4 ~ 0.7cm (优选 0.5cm), 位于硝酸纤维膜中间位置。

[0044] ④将步骤③硝酸纤维膜放入 37℃烘箱中,干燥过夜。

[0045] 4) 组装:

[0046] ①硝酸纤维素膜的粘贴:轻轻揭开 PVC 板上 NC 膜粘贴处的保护膜,将 NC 膜从左向右均匀推进,使其牢固的粘贴在 PVC 板上。

[0047] ②吸水垫的粘贴:将 PVC 板平铺于工作台上;轻轻揭开 PVC 板上吸收垫粘贴处的保护膜,将吸收垫粘附于其上,均匀、轻微滚动式推进,以加强粘合力,并防止产生气泡,吸收垫覆盖在 NC 膜上 1mm。

[0048] ③量子点标记垫的粘贴:将量子点标记垫裁为 5mm×300mm。轻轻揭开 NC 膜上缘量子点标记垫粘贴处的保护膜,将胶体金量子点标记垫粘附于其上,方法同吸收垫。胶体金量子点标记垫覆盖在 NC 膜上 1mm。

[0049] ④样品垫的粘贴:将干燥后的样品垫裁为 18mm×300mm 后,轻轻揭开薄板最上端的保护膜,将样品垫粘附于胶体金量子点标记垫上部,方法同吸收垫。样品垫覆盖在胶体金量子点标记垫上 2mm。

[0050] ⑤量子点标记垫的加固:将衔接胶带裁为 12mm×300mm,粘贴到样品垫处,顶端距试纸条样品垫端 15mm。

[0051] ⑥切条与装卡:将粘贴好的 PVC 板切成 3.0mm(2.5~4.5mm) 宽的试纸条。将每一试纸条装入塑料卡内,将每一试剂卡置于铝膜袋中,并加入 1g 干燥剂 1 包,热合封口。

[0052] 该 A 族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡的具体使用方法:

[0053] 取样后,在抽提管中加入裂解液 A(1M 亚硝酸钠)和裂解液 B(2M 乙酸)各 3~4 滴,放入棉拭子后挤压几次,静置 3~5min。

[0054] 检测时,参阅图 5 和图 6,将样本裂解液滴入本检测试剂的加样孔中 3~4 滴,由于毛细管作用检测样品将沿着检测试纸向吸水板端移动,样品中的 A 族链球菌经过裂解液裂解后,可与抗 A 族链球菌多克隆抗体荧光标记探针发生特异结合,然后继续移动与包被在硝酸纤维素膜上的抗体结合,从而被抗 A 族链球菌的多克隆抗体识别,即发生双抗体夹心的特异结合,用手持式紫外线灯照射观察窗口,检测区出现量子点荧光条带,从而通过检测样本中的 A 族链球菌进行呼吸道感染病源的鉴定。检测过程中,当上行液面即滞留于检测区的荧光探针将显示相应的荧光。即设定 A 族链球菌界限值为 10^3 CFU/mL,当质控区和检测区都有荧光出现时,说明样品中 A 族链球菌的含量超过 10^3 CFU/mL,为阳性;当只有质控区有荧光而检测区无荧光出现时,说明样品中不含 A 族链球菌或者含量低于 10^3 CFU/mL,为阴性。

[0055] 当移动至羊抗兔多克隆抗体质控区时,无论样品中有无 A 族链球菌,荧光探针都会与硝酸纤维素膜上包被的羊抗兔 IgG 结合滞留,使质控区显示荧光。因此质控区无荧光产生则代表操作有误或检测结果无效,需重复试验。

[0056] 为了更好的说明本实用新型的有益效果,下面给出采用本实用新型提供的检测试剂卡与传统的细菌培养检测法,临床经验甄别发的结果对比实验。

[0057] 检测例 1

[0058]

	细菌培养法	血清学诊断	分子生物学	胶体金免疫层析法	本实用新型
原理	血琼脂平板细菌培养后，杆菌肽片敏感试验	普遍使用乳胶凝集法检测血液中 A 族链球菌具有溶血作用和抗原性的代谢物链球菌溶血素 O	检测 A 族链球菌的特异性 rRNA、emm 等基因序列分析	双抗体夹心法，检测 A 族链球菌特异性抗原	
检测时间	36~48 小时	15~20min	3~4h	8~15min	8~15 分钟
操作方法	复杂	简单	复杂	简单	简单
所需仪器	培养箱、生物安全柜等	无	PCR 仪	无	荧光免疫层析读卡器
特异性	较强	较差,其他疾病如病毒性肝炎、	较强	较强	非常好,与其他化脓
		结核病也会引起 ASO 升高			性细菌无交叉
灵敏度	较低, 10^6 CFU/mL	低, 10^6 CFU/mL	高, 10^2 CFU/mL	较高, 10^5 CFU/mL	高, 10^3 CFU/mL
一致性	为“金标准”	较低,其他细菌感染也会导致结果为阳性	目前为实验室阶段,由于 A 族链球菌遗传差别较大,差异性较大	82.1%	实验阶段, >88.5%

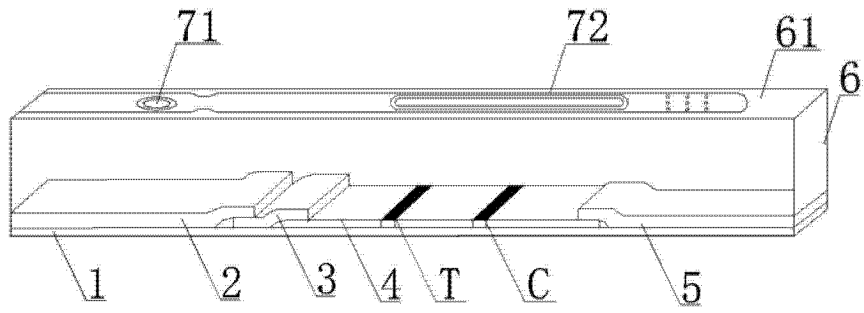


图 1

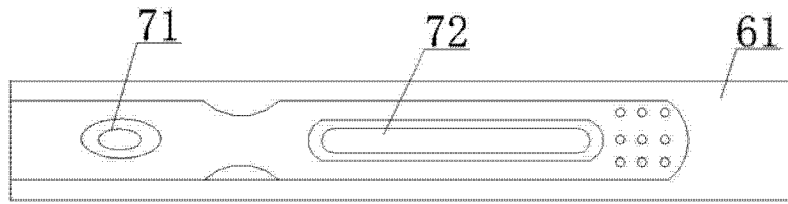


图 2

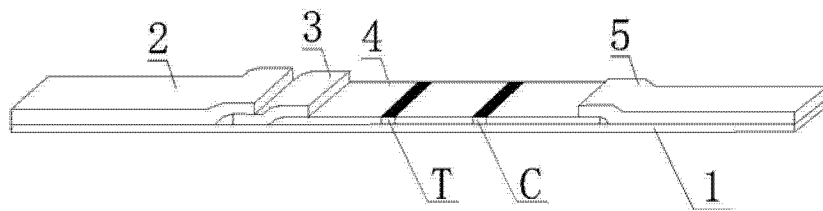


图 3

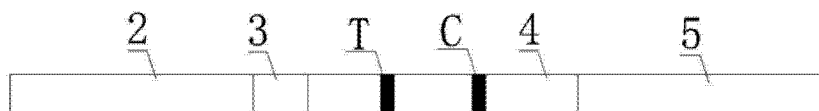


图 4



图 5

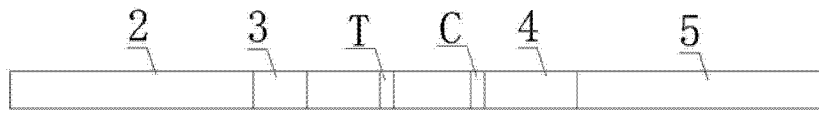


图 6

专利名称(译)	A族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡		
公开(公告)号	CN203870107U	公开(公告)日	2014-10-08
申请号	CN201420217173.4	申请日	2014-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市微米生物科技有限公司		
[标]发明人	汤永平 张晓丽 潘秀华		
发明人	汤永平 张晓丽 潘秀华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	黄为		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种A族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡，旨在提供一种检测方法简单、快速，灵敏度高，检测结果可靠的A族链球菌量子点免疫层析检测试剂卡；该检测试剂卡包括带盒盖的盒体(6)，盒体(6)内设检测试纸，所述的盒体(6)的盒盖(61)上设有加样孔(71)和结果观察窗口(72)；所述的检测试纸包括底板(1)，底板(1)上依次衔接有样品垫(2)、抗A族链球菌抗体量子点标记垫(3)、包被膜(4)和吸水垫(5)，所述的包被膜(4)上设有一条A族链球菌抗体检测区T线和一条羊抗兔多克隆抗体质控区C线，两条线平行排列；属于荧光免疫检测领域。

