



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103543262 B

(45) 授权公告日 2015.07.22

(21) 申请号 201310485288.1

(22) 申请日 2013.10.16

(73) 专利权人 北京华卫天和生物科技有限公司
地址 100054 北京市西城区白纸坊东街 10 号泰然居 B 座 11 层

(72) 发明人 文德敏 申有长 于晓永

(74) 专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有限公司 11335

代理人 吴甘棠

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1811449 A, 2006.08.02, 权利要求 1, 3, 说明书第 3 页、第 5 页.

CN 102520165 A, 2012.06.27, 权利要求 1, 19.

CN 1811449 A, 2006.08.02, 权利要求 1, 3,

说明书第 3-5 页.

CN 101551398 A, 2009.10.07, 权利要求 1-2.

CN 101339196 A, 2009.01.07, 全文.

US 2009/0220941 A1, 2009.09.03, 全文.
孙秀萍等. 水泡性口炎病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立. 《中国预防兽医学报》. 2012, 第 34 卷 (第 8 期), 637-641.

杨俊兴等. 蓝舌病病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立. 《中国兽医科学》. 2009, 第 39 卷 (第 1 期), 50-53.

审查员 李宏悦

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

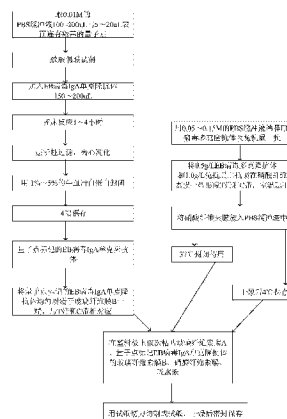
(54) 发明名称

一种量子点标记免疫层析试纸的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及医学免疫检测方法,特别是涉及使用量子点标记免疫层析试纸,以免疫学的方法检测 EB 病毒的方法。一种量子点标记免疫层析试纸,在塑料板上从下到上依次粘贴有玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;其中,所述硝酸纤维素膜一端有 EB 病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗,以此形成检测带 T 和质控带 C;所述量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的另一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体位于进样点一端。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种检测方法的检测灵敏度高 1000 倍左右。

CN 103543262 B



1. 一种量子点标记免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 量子点与 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的偶联:

取 0.01M 的 PBS 缓冲液 100 ~ 200 μ L 与 5 ~ 20 μ L 表面连有羧基的 CdTe/ZnSe 核壳量子点;

选取偶联试剂;

加入 EB 病毒 IgA 单克隆抗体 150 ~ 200 μ L;

摇床反应 1 ~ 4 小时;

层析柱过滤,离心纯化;

用 1% ~ 5% 的牛血清白蛋白封闭;

4 $^{\circ}$ C 保存;

(2) 试纸的制备:

用 0.05 ~ 0.15M 的 PBS 缓冲液稀释 EB 病毒多克隆抗体及兔抗鼠二抗,将 0.5g/L EB 病毒多克隆抗体和 1.0g/L 兔抗鼠二抗喷在硝酸纤维素膜上,形成检测带 T 和质控带 C, T 带和 C 带间隔 5mm,室温晾干,将硝酸纤维素膜放入 PBS 缓冲液中,37 $^{\circ}$ C 封闭待用,或者干燥后 4 $^{\circ}$ C 保存;

将量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体均匀喷覆于玻璃纤维膜 B 上,室温干燥,4 $^{\circ}$ C 保存;

在粘性 PVC 底板上依次粘帖玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

用试纸切刀切割成试纸,干燥后密封保存。

2. 如权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,步骤 (1) 中的偶联试剂选自羟基硫代琥珀酸亚胺、1-(3-二甲基氨丙基)-3 乙基碳二胺盐酸盐。

一种量子点标记免疫层析试纸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫检测方法,特别是涉及使用量子点标记免疫层析试纸,以免疫学的方法检测 EB 病毒的方法。

背景技术

[0002] EB 病毒是 Epstein 和 Barr 于 1964 年首次成功地将 Burkitt 非洲儿童淋巴瘤细胞通过体外悬浮培养而建株,并在建株细胞涂片中用电镜观察到疱疹病毒颗粒,认为该病毒是多种恶性肿瘤(如鼻咽癌)的病因之一,它主要感染人类口咽部的上皮细胞和 B 淋巴细胞。在中国南方鼻咽癌患病人群中大多都检测到有 EB 病毒基因组存在。本病分布广泛,多呈散发性,亦可引起流行。病毒携带者和病人是本病的传染源。经口密切接触为主要传播途径,飞沫传播虽有可能,但并不重要。发病以 15~30 岁的年龄组为多,6 岁以下多呈不显性感染。全年均有发病,似以晚秋初冬为多。一次得病后可获较持久的免疫力。

[0003] 目前,常用的检测方法是胶体金法,此法虽然检测快速简便,容易操作,但是准确率较低,灵敏度也较低。因此寻求一种价格便宜、操作简便、灵敏度和特异性都较高的检测方法是迫切需要解决的问题。

发明内容

[0004] 针对上述技术的不足之处,本发明提供一种价格便宜、操作简便、灵敏度和特异性都较高的检测试纸以及用该试纸检测 EB 病毒的方法。

[0005] 一种量子点标记免疫层析试纸,设有塑料板、硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、吸水纸;

[0006] 其中,所述塑料板上依次粘贴有玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

[0007] 其中,所述硝酸纤维素膜一端有 EB 病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗,以此形成检测带 T 和质控带 C;

[0008] 其中,所述量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的另一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体位于进样点一端。

[0009] 优选的,所述量子点为 CdTe/ZnSe 核壳量子点。

[0010] 优选的,所述塑料板为粘性 PVC 底板。

[0011] 优选的,所述 EB 病毒多克隆抗体的浓度为 0.5g/L。

[0012] 优选的,所述兔抗鼠二抗的浓度为 1.0g/L。

[0013] 优选的,所述检测带 T 和质控带 C 间距不少于 5mm。

[0014] 如上所述的试纸的制备方法,包括如下步骤:

[0015] (1) 量子点与 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的偶联:

[0016] 取 0.01M 的 PBS 缓冲液 100~200 μ L 与 5~20 μ L 表面连有羧基的量子点;

[0017] 选取偶联试剂,偶联试剂选自羟基琥珀酸亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基

碳二胺盐酸盐；

[0018] 加入 EB 病毒 IgA 单克隆抗体 150 ~ 200uL；

[0019] 摇床反应 1 ~ 4 小时；

[0020] 层析柱过滤，离心纯化；

[0021] 用 1% ~ 5% 的牛血清白蛋白封闭；

[0022] 4℃ 保存；

[0023] (2) 试纸的制备：

[0024] 用 0.05 ~ 0.15M 的 PBS 缓冲液稀释 EB 病毒多克隆抗体及兔抗鼠二抗，将 0.5g/L EB 病毒多克隆抗体和 1.0g/L 兔抗鼠二抗喷在硝酸纤维素膜一端，形成检测带 T 和质控带 C，T 带和 C 带间隔 5mm，室温晾干，将硝酸纤维素膜放入 PBS 缓冲液中，37℃ 封闭待用，或者干燥后 4℃ 保存；

[0025] 将量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体均匀喷覆于玻璃纤维膜 B 一端，与形成的 T 带和 C 带相对应，室温干燥，4℃ 保存；

[0026] 在塑料板上依次粘帖玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸；

[0027] 用试纸切刀切割成试纸，干燥后密封保存。

[0028] 用所述的试纸检测 EB 病毒，包括如下步骤：将样品点样在组装好的试纸上接近 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的一端，反应 5min 后，在紫外分析仪中观察结果。

[0029] 与现有技术相比，本发明具有以下优点：由于在所制备的试纸中加入了核壳量子点，特别是采用了 CdTe/ZnSe 水溶性核壳量子点，将水溶性的量子点与特异性的通过共价偶联，然后利用双抗夹心原理结合量子点的荧光性质检测样品中是否含有目标物。在紫外灯的照射下，通过观察免疫层析试纸条上检测带和质控带的荧光信号，判断检测结果。本发明将免疫反应的高特异性和量子点的荧光特性相结合，利用量子点多波长激发，高强度荧光发射，发射峰窄，峰形对称，发光稳定性好的荧光特性，建立了快速，特异，简便，灵敏的免疫层析检测方法。通过观察荧光信号达到了定量检测的目的。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种快速检测方法 - 胶体金的检测灵敏度高约 1000 倍左右。

附图说明

[0030] 图 1 为试纸制备的工艺流程图。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明。

[0032] 实施例 1：一种量子点标记免疫层析试纸，设有塑料板、硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、吸水纸，所述玻璃纤维素膜 A 为没有点样的市场上购买的玻璃纤维素膜；

[0033] 其中，所述塑料板上依次粘帖有玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸；

[0034] 其中，所述硝酸纤维素膜一端有 EB 病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗，以此形成检测带 T 和质控带 C；

[0035] 其中,所述量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的另一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体位于进样点一端。

[0036] 优选的,所述量子点为 CdTe/ZnSe 核壳量子点。

[0037] 优选的,所述塑料板为粘性 PVC 底板。

[0038] 优选的,所述 EB 病毒多克隆抗体的浓度为 0.5g/L。

[0039] 优选的,所述兔抗鼠二抗的浓度为 1.0g/L。

[0040] 优选的,所述检测带 T 和质控带 C 间距不少于 5mm。

[0041] 实施例 2 :如上所述的试纸的制备方法,如图 1 所示,包括如下步骤 :

[0042] (1) 量子点与 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的偶联 :

[0043] 取 0.01M 的 PBS 缓冲液 100 ~ 200uL 与 5 ~ 20uL 表面连有羧基的量子点 ;

[0044] 选取偶联试剂,偶联试剂选自羟基琥珀酸亚胺、1-(3- 二甲基氨丙基)-3 乙基碳二胺盐酸盐 ;

[0045] 加入 EB 病毒 IgA 单克隆抗体 150 ~ 200uL ;

[0046] 摇床反应 1 ~ 4 小时 ;

[0047] 层析柱过滤,离心纯化 ;

[0048] 用 1% ~ 5% 的牛血清白蛋白封闭 ;

[0049] 4℃ 保存 ;

[0050] (2) 试纸的制备 :

[0051] 用 0.05 ~ 0.15M 的 PBS 缓冲液稀释 EB 病毒多克隆抗体及兔抗鼠二抗,将 0.5g/L EB 病毒多克隆抗体和 1.0g/L 兔抗鼠二抗喷在硝酸纤维素膜一端,形成检测带 T 和质控带 C, T 带和 C 带间隔 5mm,室温晾干,将硝酸纤维素膜放入 PBS 缓冲液中,37℃ 封闭待用,或者干燥后 4℃ 保存 ;

[0052] 将量子点标记的 EB 病毒 IgA 单克隆抗体均匀喷覆于玻璃纤维膜 B 一端,与 T 带和 C 带相对应,室温干燥,4℃ 保存 ;

[0053] 在塑料板上依次粘帖玻璃纤维素膜 A、量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸 ;

[0054] 用试纸切刀切割成试纸,干燥后密封保存。

[0055] 其中,步骤 (1) 中偶联效果的检测方法如下 :

[0056] 凝胶电泳法 :采用 0.8 琼脂糖凝胶,电压为 80V,电泳 15min 后,在紫外分析仪中观察电泳结果。

[0057] 斑点印迹法 :将 0.3g/L EB 病毒-BSA 液点在硝酸纤维素膜上,晾干后浸泡于含 5% BSA 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, 10nmol/L, PH = 7.4, 含 NaCl 8.5g/L) 中,封闭膜上剩余的蛋白结合位点,于 37℃ 孵育 1h,封闭后取出,PBS 洗涤。制备三个完全相同的 EB 病毒印迹膜,晾干后分别放入量子点标记 EB 病毒 IgA 单克隆抗体,量子点-BSA 及量子点溶液,于 37℃ 摇床反应 30min, PBS 洗涤。紫外分析仪中观察结果。

[0058] 实施例 3 :用所述的试纸检测 EB 病毒,包括如下步骤 :将样品点样在组装好的试纸上接近 EB 病毒 IgA 单克隆抗体的一端,反应 5min 后,在紫外分析仪中观察结果。用 PBS 缓冲液及正常人的血液设为空白对照。

[0059] 结果判定 :在 C 带显现红色荧光带的前提下,目视 T 带的荧光带强度,与空白对照,

荧光越弱,代表待测液中含被检物的浓度越低。

[0060] 实施例 4:试纸检测有效性验证,配制四种浓度的 EB 病毒溶液,浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0ug/L。利用检测试纸和化学发光试纸盒对样本进行检测,每个浓度检测 6 次,测定试纸检出结果的有效性。如表一所示,结果表明用本发明制备的试纸检测出来的呈现阳性,并且溶液浓度越大荧光强度越大。

[0061] 表一:各种浓度 EB 病毒的试纸条检测结果

[0062]

	对照组		实验组 EB 病毒溶液 (ug/L)			
	水	PBS 溶液	0.5	1.0	2.0	5.0
1	C+, T—	C+, T—	C+, T+	C+, T++	C+, T+++	C+, T++++
2	C+, T—	C+, T—	C+, T+	C+, T++	C+, T+++	C+, T++++
3	C+, T—	C+, T—	C+, T+	C+, T++	C+, T+++	C+, T++++
4	C+, T—	C+, T—	C+, T+	C+, T++	C+, T+++	C+, T++++
5	C+, T—	C+, T—	C+, T+	C+, T++	C+, T+++	C+, T++++
6	C+, T—	C+, T—	C+, T+	C+, T++	C+, T+++	C+, T++++

Note: — 表示隐形, +表示阳性, +越多, 荧光强度越大

[0063] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,举凡熟悉此项技艺的专业人士在了解本发明的技术手段之后,自然能依据实际的需要在本发明的教导下加以变化。因此凡依本发明申请专利范围所作的同等变化与修饰,曾应仍属本发明专利涵盖的范围内。

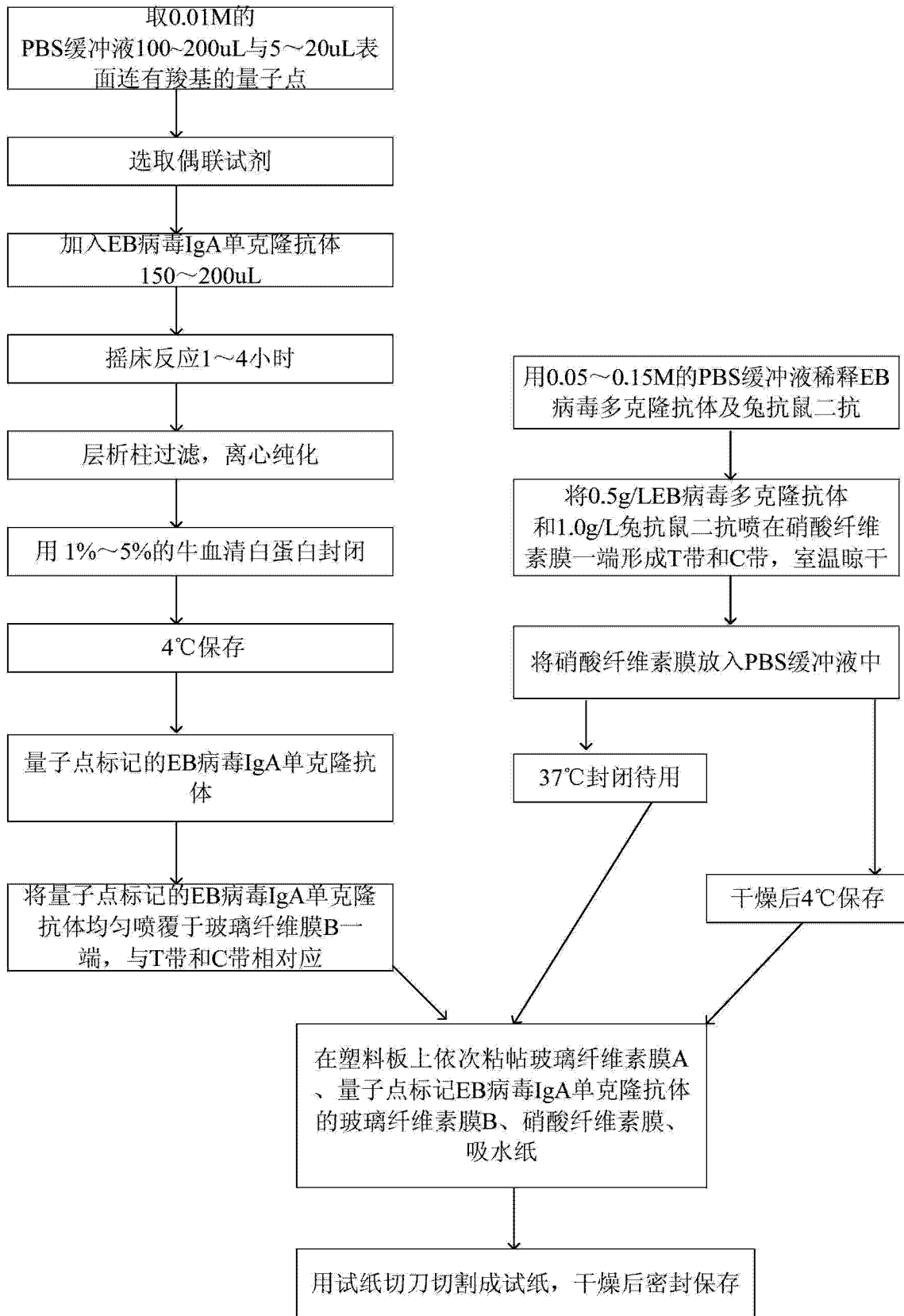


图 1

专利名称(译)	一种量子点标记免疫层析试纸的制备方法		
公开(公告)号	CN103543262B	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201310485288.1	申请日	2013-10-16
[标]发明人	文德敏 申有长 于晓永		
发明人	文德敏 申有长 于晓永		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56983 G01N33/56994 G01N33/577 G01N2333/05		
其他公开文献	CN103543262A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学免疫检测方法，特别是涉及使用量子点标记免疫层析试纸，以免疫学的方法检测EB病毒的方法。一种量子点标记免疫层析试纸，在塑料板上从下到上依次粘贴有玻璃纤维素膜A、量子点标记EB病毒IgA单克隆抗体的玻璃纤维素膜B、硝酸纤维素膜、吸水纸；其中，所述硝酸纤维素膜一端有EB病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗，以此形成检测带T和质控带C；所述量子点标记的EB病毒IgA单克隆抗体位于玻璃纤维素膜B的另一端，与检测带T和质控带C相对应，并且量子点标记的EB病毒IgA单克隆抗体位于进样点一端。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种检测方法的检测灵敏度高1000倍左右。

