



(21)申请号 201811058685.X

(22)申请日 2018.09.11

(71)申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路155号

(72)发明人 姜海 李广强 王升启 荣振
赵鸿雁

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种快速检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫
层析试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种快速检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条,由样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫相互重叠1~1.5mm依次粘贴在PVC底板上制得,所述层析膜是由一条检测线和一条质控线组成的固相硝酸纤维素膜,所述检测线包被有布鲁氏菌全菌蛋白,所述质控线包被二抗,所述结合垫包被有量子点标记的布鲁氏菌全菌蛋白,本发明还提供了制备该试纸条的方法,大大简化了标记步骤,提高了标记效率;制备的试纸条缩短了检测时长,还具有特异性强、稳定性好、血清用量少等优点,能够实现对人、动物血清中布鲁氏菌抗体的检测,对布鲁氏菌病的现场快速筛选、诊断具有重要意义。

1. 一种检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条,由样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫相互重叠1~1.5mm依次粘贴在PVC底板上制得,所述层析膜是由一条检测线和一条质控线组成的固相硝酸纤维素膜,其特征在于,所述检测线包被有布鲁氏菌全菌蛋白,所述质控线包被二抗,所述结合垫包被有量子点标记的布鲁氏菌全菌蛋白。

2. 如权利要求1所述的量子点免疫层析试纸条,其特征在于,所述量子点标记的布鲁氏菌全菌蛋白是按照活化后的量子点与布鲁氏菌全菌蛋白的体积质量比25 μ L:(14.5-15.5) μ g偶联后,加入牛血清白蛋白溶液封闭得到。

3. 如权利要求2所述的量子点免疫层析试纸条,其特征在于,活化后的量子点是通过以下方法制得:选用活化剂EDC:NHS:量子点溶液体积比1:1.5:5混合后配制得到。

4. 如权利要求1-3任一所述的量子点免疫层析试纸条,其特征在于,所述质控线包被二抗为金黄色葡萄球菌蛋白A,即SPA,质控线包被SPA的浓度为1mg/mL;所述检测线包被布鲁氏菌全菌蛋白的浓度为2mg/mL。

5. 一种制备检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白:

a、分别将超纯水、0.1mol/L pH5.5~6.5MES溶液、量子点溶液加入离心管,混匀,离心备用;所述量子点溶液是羧基化CdSe/ZnS的核壳结构量子点,激发波长为300~450nm,发射波长为610nm;

b、配制EDC、NHS溶液,加入上述a步骤的离心管中快速混匀进行量子点活化;反应结束,超声分散,防止聚沉现象,离心后弃上清,加入0.01mol/L pH5.5~6.5的MES溶液混匀,备用;

c、向b步骤得的混合液中加入布鲁氏菌全菌蛋白,混匀;

d、在c步骤反应结束后,封闭液进行封闭,同时超声分散,反应结束后离心并弃去上清液,除去未进行偶联的抗体以及反应中的副产物,之后加入微量稀释液,收集量子点-布鲁氏菌全菌蛋白偶联物溶液,备用;

e、取一定体积d步骤制得的溶液,用0.01mol/L pH7.2~7.4磷酸盐缓冲液稀释150倍,均匀喷涂在玻璃纤维素膜上,冷冻干燥;

(2) 硝酸纤维素膜的包被:SPA稀释至1.0mg/ml浓度喷膜作为质控线C,布鲁氏菌全菌蛋白稀释至2.0mg/ml浓度喷膜作检测线T;

(3) 组装检测用试纸条。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤(1)的b步骤中,EDC、NHS溶液浓度分别为1.9mg/ml、2.1mg/ml。

7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,EDC:NHS:量子点溶液体积分数配比为1:1.5:5。

8. 如权利要求5-7任一所述的方法,其特征在于,步骤(1)的c步骤中,每25 μ L量子点偶联15 μ g布鲁氏菌全菌蛋白,置于30-40 $^{\circ}$ C反应2-4h。

9. 如权利要求5-8任一所述的方法,其特征在于,步骤(1)的d步骤中,封闭液为牛血清白蛋白,用量与量子点偶联布鲁氏菌全菌蛋白偶联物溶液体积相同。

10. 权利要求1-4任一所述的量子点免疫层析试纸条或权利要求5-9任一所述的方法制

得的试纸条在检测或辅助检测待测动物布鲁氏菌疫苗是否免疫合格中的应用,或在人或动物布鲁氏菌病疫苗免疫群抗体水平监测中的应用。

一种快速检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种量子点免疫层析试纸条,具体地说是一种检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌病是一种流行范围广、危害严重的细菌性传染病。我国《传染病防治法》将布鲁氏菌病列为乙类传染病。该病是由布鲁氏菌引起的人畜共患传染病,每年新发病例数约50万例,人体主要通过接触感染的动物或消费未经消毒的奶制品而致病。目前已分离的布鲁氏菌致病因子已有12种,即:羊种(*B.melitensis*)、牛种(*B.abortus*)、猪种(*B.suis*)、绵羊附睾种(*B.ovis*)、犬种(*B.canis*)、沙林鼠种(*B.neotomae*)、鲸型布鲁氏菌(*B.ceti*)、鳍型布鲁氏菌(*B.pinnipedialis*)、田鼠种布鲁氏菌(*B.microti*)、分离自人体(*B.inopinata*)、分离自狒狒种(*B.papionis*)以及分离自赤狐种(*B.vulpis*),在我国,主要流行猪、牛、羊三种布氏杆菌,其中以羊布氏杆菌病最为多见,且病情较复杂、严重。近年来,我国布病疫情快速上升,流行趋势逐渐加重,疫情相对集中在内蒙古地区及毗邻省份,并且波及范围逐渐扩大,这对养殖业的发展和公共卫生安全带来了极大的挑战。

[0003] 目前检测布鲁氏菌病的方法有病原的分离培养和鉴定、虎红平板凝集试验、胶体金免疫层析法、试管凝集试验、补体结合实验、酶联免疫吸附试验等。针对于每种检测方法都有其自身的优缺点。试管凝集试验(SAT)是布鲁氏菌病血清学检测的方法,多用于半定量和定量试验,是我国诊断布病的标准方法之一。该方法准确性高,具有较高的特异性,可用于疾病的早期诊断。但是SAT在灵敏度、特异性方面较低,并且操作繁琐,耗时,不适应于现场疫情的快速检测。而对于现场检测布鲁氏菌病,要求耗时短、检测方法简便、灵敏度高等特点已成为目前研究快速检测布鲁氏菌病新技术的趋势。

[0004] 相较于目前比较成熟的胶体金标记技术,量子点作为一种新型的荧光标记材料,其具有较大的斯托克斯位移,化学稳定性好,激发光波长范围宽,发射光谱窄,光稳定性强,荧光寿命长等优良特性,可用于替代胶体金进行抗原/抗体标记。量子点免疫层析法检测布鲁氏菌抗原/抗体是利用免疫层析的原理,将量子点标记技术、免疫层析技术相结合,以硝酸纤维素膜为载体,通过抗原抗体结合,并利用紫外灯激发量子点呈现颜色反应,检测抗原/抗体。因此,本发明拟在已有量子点试纸条检测其他目标物的基础上,通过改良现有技术、改进试验方法,制备一种灵敏度高、特异性强、可快速检测布鲁氏菌病量子点免疫层析试纸条。

发明内容

[0005] 针对上述不足,本发明提供一种用于检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条,其制备方法鉴定,检测灵敏度高,特异性强,稳定性和重复性好,避免漏检,具有良好的应用前景。

[0006] 本发明提供的一种检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条,由样品垫、结合

垫、层析膜、吸水垫相互重叠1~1.5mm依次粘贴在PVC底板上制得,所述层析膜是由一条检测线和一条质控线组成的固相硝酸纤维素膜,其特征在于,所述检测线包被有布鲁氏菌全菌蛋白,所述质控线包被二抗,所述结合垫包被有量子点标记的布鲁氏菌全菌蛋白。

[0007] 所述层析膜粘贴在PVC上,吸水垫粘贴在层析膜一侧,相互重叠部分为1~1.5mm;所述结合垫和样品垫粘贴在层析膜另一侧,相互重叠部分为1~1.5mm,所有部分均紧密粘贴在PVC底板上。

[0008] 作为优选,本发明所采用的吸水垫为吸水滤纸,所述底板为PVC底板,所述层析膜为硝酸纤维素膜,所述样品垫和结合垫为玻璃纤维素膜。所述试纸条各部分之间重叠部分为1~1.5mm,试纸条长度为6.5cm,宽度为3.5cm。吸水垫长度为2.2cm,层析膜长度为2.6cm,结合垫长度为0.5cm,样品垫长度为1.8cm,吸水垫和层析膜之间、结合垫和层析膜之间、结合垫和样品垫之间相互重叠1~1.5mm,并粘贴于PVC底板上。结构如图1。

[0009] 本发明的量子点免疫层析试纸条,所述量子点标记的布鲁氏菌全菌蛋白是按照活化后的量子点与布鲁氏菌全菌蛋白的体积质量比25 μ L:(14.5-15.5) μ g偶联后,加入牛血清白蛋白溶液封闭得到。

[0010] 上述活化后的量子点是通过以下方法制得:选用活化剂EDC:NHS:量子点溶液体积比1:1.5:5混合后配制得到。

[0011] 所述质控线包被二抗为金黄色葡萄球菌蛋白A,即SPA,质控线包被SPA的浓度为1mg/mL;所述检测线包被布鲁氏菌全菌蛋白的浓度为2mg/mL。

[0012] 本发明提供了一种制备检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条的方法,包括以下步骤:

[0013] (1)量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白:

[0014] a、分别将超纯水、0.1mol/L pH5.5~6.5MES溶液、量子点溶液加入离心管,混匀,离心备用;所述量子点溶液是羧基化CdSe/ZnS的核壳结构量子点,激发波长为300~450nm,发射波长为610nm;

[0015] b、配制EDC、NHS溶液,加入上述a步骤的离心管中快速混匀进行量子点活化;反应结束,超声分散,防止聚沉现象,离心后弃上清,加入0.01mol/L pH5.5~6.5的MES溶液混匀,备用;

[0016] c、向b步骤得的混合液中加入布鲁氏菌全菌蛋白,混匀;

[0017] d、在c步骤反应结束后,封闭液进行封闭,同时超声分散,反应结束后离心并弃去上清液,除去未进行偶联的抗体以及反应中的副产物,之后加入微量稀释液,收集量子点-布鲁氏菌全菌蛋白偶联物溶液,备用;

[0018] e、取一定体积d步骤制得的溶液,用0.01mol/L pH7.2~7.4磷酸盐缓冲液(PBS)稀释150倍,均匀喷涂在玻璃纤维素膜上,冷冻干燥;

[0019] (2)硝酸纤维素膜的包被

[0020] SPA稀释至1.0mg/ml浓度喷膜作为质控线C,布鲁氏菌全菌蛋白稀释至2.0mg/ml浓度喷膜作检测线T。

[0021] (3)组装检测用试纸条。

[0022] 本发明的方法中,步骤(1)的b步骤中,EDC、NHS溶液浓度分别为1.9mg/ml、2.1mg/ml。

[0023] 步骤(1)中,EDC:NHS:量子点溶液体积分数配比为1:1.5:5。

[0024] 步骤(1)的c步骤中,每25ul量子点偶联15ug布鲁氏菌全菌蛋白,置于30-40℃反应2-4h;优选地,置于37℃反应3h。

[0025] 步骤(1)的d步骤中,封闭液为牛血清白蛋白,用量与量子点偶联布鲁氏菌全菌蛋白偶联物溶液体积相同。

[0026] 步骤(2)中,本发明C线包被SPA浓度为1mg/ml,T线包被布氏全菌蛋白浓度为2mg/ml,将稀释好的T线溶液和C线溶液分别吸入划膜仪,T线处喷量设置为0.6ul/cm,C线处喷量设置为1ul/cm,将其划到硝酸纤维素膜上。

[0027] 作为优选,本发明用甲醇原液和0.01mol/L PB溶液对硝酸纤维素膜C、T线二抗和抗原进行稀释。C线和T线均配置30ul体系,均用甲醇和PB溶液稀释,甲醇溶液固定使用5ul,全菌蛋白使用15.38ul,不足30ul加PB溶液补齐;蛋白A使用6ul,不足30ul加PB溶液补齐。

[0028] 层析膜的检测线中各组分的含量分别为:布鲁氏菌全菌蛋白(3.9mg/ml)为15.38ul/30ul,甲醇原液为5ul/30ul,0.01mol/L PB溶液为9.62ul/30ul;所述质控线中各组分的含量分别为:SPA(5mg/ml)为6ul/30ul,甲醇原液为5ul/30ul,0.01mol/L PB溶液为19ul/30ul。

[0029] 上述制备方法制得的量子点免疫层析试纸条属于本发明的保护范围。

[0030] 本发明提供了上述量子点免疫层析试纸条在检测或辅助检测待测动物布鲁氏菌疫苗是否免疫合格中的应用,或在人或动物布鲁氏菌病疫苗免疫群抗体水平监测中的应用。

[0031] 在本发明的实施例中,量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白结合垫的制备步骤如下:a、将25ul QDs610nm溶液,5ul 0.1mol/L pH6.0MES溶液和20ul超纯水加入1.5ml离心管,混匀离心10s;

[0032] b、称取交联剂EDC、NHS,加入超纯水使其浓度分别为1.9mg/ml、2.1mg/ml,加入步骤a中的离心管,快速混匀后37℃反应15min;反应结束,超声分散2min,离心20min,8000rcf弃上清,加入25ul 0.01mol/L MES溶液至溶液初始体积。

[0033] c、加入15ug布鲁氏菌全菌蛋白,振荡混匀,置于37℃隔水式恒温培养箱反应3h;

[0034] d、上述反应结束后,加入25ul封闭剂37℃反应30min,超声分散2min,8000rcf离心10min后弃去上清液,根据需要用所需溶液重悬,混匀备用;

[0035] e、取一定体积偶联有布鲁氏菌全菌蛋白的量子点,稀释至150倍,均匀喷涂在结合垫上,-60℃冷冻干燥3~4h,之后按照实际要求裁剪后加入干燥剂密封保存,备用。

[0036] 本发明制备的试纸条是一种以硝酸纤维素膜为固相载体的快速诊断技术。将待测血清稀释10倍,总体积70ul滴加到样品垫上,样品在层析作用下向着吸水纸的方向迁移。当样品中存在布鲁氏菌抗体时,释放垫上QDs标记物会和抗体结合,形成QDs-Ag-抗体免疫复合物,流经检测线时,该免疫复合物和固定在检测线上的抗原结合,发生特异性免疫反应,此时一部分量子点固定在检测线上,形成T线。未与抗原发生反应的免疫复合物继续向前迁移,流经质控线时被固定的二抗(SPA)捕获,发生特异性免疫反应,使多余的QDs滞留在质控线处,形成C线。如果还有剩余的QDs,则继续会往吸水纸的方向迁移,最终随着测试液到达吸水垫处。当待检样品中无布鲁氏菌抗体时,则T线无荧光条带,C线出现肉眼可见的荧光条带;无论试纸条T线有无荧光条带,只要C线没有荧光条带时,该试纸条即为无效。

[0037] 作为优选,本发明所用待测样品不局限于人类血清,也包括动物(猪、牛、羊等)血清。

[0038] 本发明布鲁氏菌抗体量子点免疫层析试纸条使用方法如下:取待测样品10u1用样品稀释液充分稀释至100u1,取出70u1滴加在试纸条样品垫位置处,10min后在便携式紫外灯下观察检测结果,所述的样品稀释液主要成分为FBS(胎牛血清)和含吐温-20的PBS(磷酸盐缓冲液),其体积比为1:9。如图2所示,当样品中存在布鲁氏菌抗体时,释放垫上QDs标记物会和抗体结合,形成QDs-Ag-抗体免疫复合物,流经检测线时,该免疫复合物和固定在检测线上的抗原结合,发生特异性免疫反应,此时一部分量子点固定在检测线上,形成T线。未与抗原发生反应的免疫复合物继续向前迁移,流经质控线时被固定的二抗(SPA)捕获,发生特异性免疫反应,使多余的QDs滞留在质控线处,形成C线。如果还有剩余的QDs,则继续会往吸水纸的方向迁移,最终随着测试液到达吸水垫处。当待检样品中无布鲁氏菌抗体时,则T线无荧光条带,C线出现肉眼可见的荧光条带;无论试纸条T线有无荧光条带,只要C线没有荧光条带时,该试纸条即为无效。

[0039] 与现有量子点标记技术相比,本发明具有以下优点:

[0040] 1、本发明在现有量子点标记技术的基础上,改进实验技术,优化标记条件,选择EDC和NHS联合作为活化剂,优化了它们的使用剂量,选用牛血清白蛋白1%BSA作为封闭剂(将BSA溶解于0.1mol/L甘氨酸溶液中),提高了标记效率,标记过程简单快速,省去了对结合垫的处理的步骤,加样后即可达到层析快速、反应充分、并且获得高灵敏度,其最低检测血清效价为1:25。

[0041] 2、本发明获取的试纸条采用了量子点标记技术,经过对血清的验证,特异性强,血清用量仅需10u1,反应时间仅需10min即可观察结果,达到对布鲁氏菌病抗体的检测;

[0042] 3.本发明所用的二抗(SPA)能与人及多种哺乳动物血清IgG分子中的Fc片段结合,还能与血清中IgM和IgA结合,其制备容易,性质稳定,价格低廉;选用标记抗原为布鲁氏菌全菌蛋白,该抗原是布氏杆菌培养物中提取的蛋白,具有很高的抗原特异性,在疫情现场可对其他症状类似的疾病如风湿病等进行鉴别诊断。

[0043] 4.该试纸条用途范围广,可适用于人和动物的血清。利用本方法制备的试纸条,方便快捷,省去了赴医疗机构检查的繁琐过程,在疫情现场即可进行检测,在快速检测方面具有重要意义。

[0044] 5.本发明制备的试纸条所选用的量子点具备很高的稳定性,信号不易减弱,可用便携式紫外灯或者荧光免疫分析仪进行检测,克服了现有技术如SAT操作繁琐、耗时耗力、需要专业人员检测、特异性低等不足。

附图说明

[0045] 图1是本发明所述量子点免疫层析试纸条模型图。

[0046] 图2是本发明检测试纸条示意图,使用手持式紫外灯进行照射,试纸条C、T线呈现红色,左图仅C线呈红色,判定为阴性,中图C、T线均呈现红色,判定为阳性,右图C线无红色,T线处呈现红色,判定为试纸条无效。

[0047] 图3是不同标记抗原使用量对试纸条T值的影响,曲线分别是10ug、15ug、20ug对应的T值,相比于10ug、20ug,试纸条在15ug处对应的T值最大。

[0048] 图4是标记过程中EDC:NHS:量子点体积比的确定,试纸条从左到右分别是阴性对照、1:1.5:5、1:2:5、1.5:1:5、2:1:5。使用手持式紫外灯进行照射,根据T线处呈现红色的强度,除阴性对照之外,其余试纸条T线处红色亮度依次减弱,可说明1:1.5:5对应的试纸条荧光强度最强。

[0049] 图5(a)是分别使用BSA和酪蛋白作为封闭剂对试纸条T线的影响,从左到右分别是使用BSA、酪蛋白,使用手持式紫外灯进行照射,左试纸条相对于右试纸条T线荧光强度更强,即使用BSA作为封闭剂更能提高荧光强度;(b)是使用BSA作为封闭剂,不同用量对试纸条T线的影响,从左到右是阴性对照、50 μ l、25 μ l。根据紫外灯的照射呈现红色的强度,第三条试纸条T线相比第二条更亮,即25 μ l封闭剂使用量更能提高荧光强度。

[0050] 图6是不同抗原包被浓度对试纸条T线的影响,从左到右分别是1mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml。相较于其他两个包被浓度,曲线在包被浓度为2mg/ml时T值达到峰值。

[0051] 图7是对标记抗原和包被抗原的筛选,从左到右分别是阴性对照、标记凝集抗原包被凝集抗原、标记凝集抗原包被全菌蛋白、标记全菌蛋白包被全菌蛋白、标记全菌蛋白包被凝集抗原。根据手持式紫外灯照射T线呈现红色强度情况,对应的第四条试纸条T线荧光强度相比于其他试纸条达到最强。

[0052] 图8是结合垫的处理与未处理的比较,从左到右分别是处理1的方式、处理2的方式、未处理。根据C线处的荧光强度,第三条相比于其它两条C线更亮。

[0053] 图9是本发明依次检测是阳性血清不同血清效价,从左到右分别是阴性对照、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200。根据T线处的荧光强度,除阴性对照外,其余六条试纸条T线荧光强度依次增强。

[0054] 图10是本发明依次检测不同稀释倍数阳性血清,从左到右分别是原液、稀释2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、128倍。根据T线处的荧光强度,试纸条T线荧光强度依次减弱。

具体实施方式

[0055] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0056] 本发明所需的羧基化CdSe/ZnS的核壳结构量子点购于NanoGen公司;所需的吸水垫、层析膜、样品垫、PVC底板、结合垫购于上海杰一生物技术有限公司;所需的其它仪器、试剂、设备均有市售。

[0057] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的浓度:布鲁氏菌全菌蛋白:由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所制备而成,浓度为3.9mg/ml;金黄色葡萄球菌蛋白A蛋白(SPA)购自Sigma公司,浓度为5mg/ml;量子点:本发明所用量子点为羧基化CdSe/ZnS的核壳结构量子点,购自于NanoGen公司,规格为FM610C;磷酸盐缓冲液(PBS):购自于gibco公司;硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、吸水垫、PVC底板购自于上海杰一生物技术有限公司;所用超纯水(18.2M Ω)由Milli-Q纯水系统提供。其它试剂均为分析纯。下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行说明。

[0058] 实施例1 布鲁氏菌全菌蛋白的制备过程

[0059] 选择抗原性良好的布鲁氏菌16M制备全菌蛋白。

[0060] 1.收集菌体将培养基上生长良好的培养物取出,置于70~80℃水浴锅加热杀菌1小时,离心,弃去上清液,收集沉淀菌体。

[0061] 2.收集全菌蛋白将上述步骤1收集到的菌体悬浮于0.5%石炭酸生理盐水中,使悬液浓度是布鲁氏菌试管凝集抗原原液2倍以上。随后将上述悬液置于108℃蒸气压力下加温40~60分钟,加温后的菌悬液置于冷暗处两周以上。用离心沉淀法提取上清液,上清液经无菌过滤,滤过液即为布鲁氏菌全菌蛋白。最后用蛋白浓度测定仪对全菌蛋白进行浓度测定,该布鲁氏菌全菌蛋白浓度为3.9mg/ml。

[0062] 实施例2 检测布鲁氏菌抗体量子点免疫层析试纸条的制备方法

[0063] 1、量子点活化和偶联过程:

[0064] a、将25ul羧基化CdSe/ZnS的核壳结构量子点QDs_{610nm}溶液,5ul 0.1mol/L pH6.0MES溶液和20ul超纯水加入1.5ml离心管,混匀简短离心10s;

[0065] b、称取活化剂EDC、NHS,分别将其配制成1.9mg/ml、2.1mg/ml,分别取5ul和7.5ul加入步骤a离心管中,快速混匀后置于37℃隔水式恒温培养箱反应15min;

[0066] c、反应结束,先对其进行超声分散2min,将上述反应后产物置于低温高速离心机离心,离心力设置为8000rcf,离心时间为20min。离心结束后,弃去上清液,加入25ul 0.01mol/L pH6.0MES溶液,混匀,随后加入15ug实施例1制得的布鲁氏菌全菌蛋白,振荡混匀,置于37℃隔水式恒温培养箱反应3h;

[0067] e、上述反应结束后,超声分散2min,加入25ul的1%BSA作为封闭剂(将BSA溶解于0.1mol/L甘氨酸溶液中得到)置于37℃隔水式恒温培养箱反应30min,反应结束后取出超声分散2min,置于低温高速离心机离心,离心力设置为8000rcf,离心时间为10min,后弃去上清液,根据需要用所需溶液重悬,超声进行分散。

[0068] 2.结合垫的制备

[0069] 取结合垫一张,用按照长15cm,宽0.5cm的尺寸进行剪裁。取2.5ul偶联有布鲁氏菌全菌蛋白的量子点标记物用0.01mol/l pH7.2~7.4磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至150倍,均匀喷涂在结合垫上,置于冷冻干燥机-60℃冷冻干燥3~4h,之后取出放在室温,按照实际要求裁剪后,加入干燥剂密封保存备用。经过试验验证,与经过处理的玻璃纤维素膜相比,该玻璃纤维素膜在没有经过特殊处理的情况下,量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白的释放率达到最优。

[0070] 3.硝酸纤维素膜的包被

[0071] 选择SPA稀释至1.0mg/ml浓度喷膜作C线(质控线),布鲁氏菌全菌蛋白稀释至2.0mg/ml浓度喷膜作T线(检测线),将SPA溶液和布鲁氏菌全菌蛋白溶液吸入划膜仪吸头,划膜仪喷量T线调至0.6ul/cm,C线调至1.0ul/cm,将膜放到相对湿度20%,温度37℃条件下干燥2~3小时。

[0072] 4.层析膜的制备将步骤3获得的硝酸纤维素膜按实际要求裁剪后,加入干燥剂密封保存备用;

[0073] 5.样品垫的制备将玻璃纤维素膜材质的样品垫按实际要求裁剪后密封干燥备用;

[0074] 6.吸水纸的制备将吸水滤纸按照实际要求裁剪后密封干燥备用;

[0075] 7.底板的制备将PVC底板按实际要求裁剪后密封干燥备用。

[0076] 8.本试纸条组装过程方法包括对底板两端吸水纸、样品垫、层次膜、结合垫进行粘

贴的步骤。

[0077] 8.1将步骤7制备的底板表面保护膜揭开；

[0078] 8.2将步骤4制备的层析膜粘贴在底板的层析膜粘贴区域，压紧；

[0079] 8.3将步骤6制备的吸水滤纸与层析膜一侧重叠1~1.5mm，压紧；

[0080] 8.4将步骤2制备的结合垫与层析膜另一侧重叠1~1.5mm，压紧；

[0081] 8.5将步骤5制备的样品垫与结合垫一侧重叠1~1.5mm，压紧

[0082] 8.6将组装好的试纸条放置自动斩切机上按照长6.5cm*宽3.5mm进行切割，加入一定量干燥剂后室温密封保存。组装工作在室温，干燥的环境下进行。所有试纸条组装完成以后，加入干燥剂装于铝箔袋中，抽干空气，储存于常温下备用。

[0083] 实施例3检测布鲁氏菌抗体量子点免疫层析试纸条制备方法优化实验

[0084] 1.量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白反应条件优化：

[0085] 1.1布鲁氏菌全菌蛋白最佳使用量的优化与确定

[0086] 将标记用抗原用量分别设置为10ug,15ug,20ug,进行标记后，使用免疫荧光分析仪对其进行T线荧光强度检测，观察三种不同用量对量子点标记抗原后检测线的荧光强度。最终确定以15ug作为最佳偶联抗原用量，结果见图3。

[0087] 1.2活化剂与量子点的比例的优化与确定

[0088] 取量子点25ul作为基础用量，EDC:NHS:量子点体积比分别设置为1:1.5:5、1:2:5、1.5:1:5、2:1:5进行标记后，按照上述检测方法使用免疫荧光分析仪对其进行T线荧光强度检测，观察四种不同EDC、NHS和量子点的体积比例对量子点标记抗原后检测线的荧光强度见图4。最终确定以1:1.5:5作为最佳体积比例。

[0089] 1.3量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白封闭剂的选择及用量的确定

[0090] 以BSA或者酪蛋白作为封闭剂，用量分别取25ul和50ul，按照步骤1.1和1.2确定的最佳条件进行标记后，使用免疫荧光分析仪对其进行T线荧光强度检测，观察两种不同封闭剂以及不同用量对量子点标记抗原后检测线的荧光强度，见图5。最终确定以25ul BSA作为最佳封闭剂使用量和最佳封闭剂。

[0091] 1.4硝酸纤维素膜T线包被抗原浓度的确定

[0092] 将布鲁氏菌全菌蛋白(3.9mg/ml)分别稀释至1mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml，按照上述包被条件进行包被，按照步骤1.1、1.2和1.3确定的结合垫进行组装试纸条，使用待测样品检测后观察三种包被浓度对T线信号的影响，见图6。最终确定以2mg/ml作为布鲁氏菌全菌蛋白包被浓度。

[0093] 1.5标记抗原与包被抗原最优组合的筛选

[0094] 使用实施例2中量子点免疫层析制备试纸条的方法，分别以布鲁氏菌全菌蛋白、布鲁氏菌凝集抗原作为目的标记抗原，分别以布鲁氏菌全菌蛋白、布鲁氏菌凝集抗原作为目的包被抗原，标记抗原和包被抗原两两组合进行试纸条的组装，即对四种试纸条进行T线信号值的检测，以筛选最优标记与包被组合，见图7。结果显示当标记抗原和包被抗原为同种抗原且抗原选择类型为布鲁氏菌全菌蛋白时，T线信号值达到最优。最终确定使用布鲁氏菌全菌蛋白作为包被和标记抗原。

[0095] 2.标记过程

[0096] 将25ul QDs610nm溶液，5ul 0.1mol/L pH6.0MES溶液和20ul超纯水加入1.5ml离

心管,混匀简短离心10s;称取活化剂EDC、NHS,分别将其配制成1.9mg/ml、2.1mg/ml,使EDC、NHS、量子点体积比例为1:1.5:5,加入上述离心管中,快速混匀后置于37℃隔水式恒温培养箱反应15min;反应结束,先对其进行超声分散2min,将上述反应后产物置于低温高速离心机离心,离心力设置为8000rcf,离心时间为20min。离心结束后,弃去上清液,加入25ul 0.01mol/L pH6.0MES溶液,混匀,随后加入15ug布鲁氏菌全菌蛋白,振荡混匀,置于37℃隔水式恒温培养箱反应3h;上述反应结束后,超声分散2min,加入25ulBSA封闭剂置于37℃隔水式恒温培养箱反应30min,反应结束后取出超声分散2min,置于低温高速离心机离心,离心力设置为8000rcf,离心时间为10min,后弃去上清液,根据需要用所需溶液重悬,超声进行分散。

[0097] 取结合垫一张,用按照长15cm,宽0.5cm的尺寸进行剪裁。取2.5ul偶联有布鲁氏菌全菌蛋白的量子点标记物用所需稀释液稀释至150倍,均匀喷涂在结合垫上,置于冷冻干燥机-60℃冷冻干燥3~4h,之后取出放在室温,按照实际要求裁剪后,加入干燥剂密封保存备用。

[0098] 3.结合垫处理与未处理对试纸条检测线信号的影响

[0099] 取结合垫若干张,按照长15cm,宽10cm的尺寸进行剪裁成2张,分别对其进行特殊处理。处理1:使用0.1%牛血清白蛋白和0.5%吐温-20进行处理,处理2:使用5%蔗糖和0.6%吐温-20进行处理,将上述两张经过处理的结合垫和未作处理的结合垫按照实际需要剪裁。取2.5ul量子点偶联物用项目所需稀释液稀释150倍,分别喷涂在上述三张结合垫上,置于冷冻干燥机-60℃冷冻干燥3~4小时,组装成试纸条滴加阴性对照进行检测。试验结果显示,经过处理的结合垫其C线信号值造成抑制,信号强度下降,未做处理的结合垫C线信号明显强于处理的结合垫,见图8。因此,与经过处理的结合垫相比,该结合垫不用经过特殊处理的情况下,量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白的释放达到最优。

[0100] 实施例4 本发明制得的试纸条的使用方法

[0101] 取待测样品10ul用样品稀释液充分稀释至100ul,取出70ul滴加在实施例2制得的试纸条样品垫位置处,10min后在便携式紫外灯下观察检测结果,所述的样品稀释液主要成分为FBS(胎牛血清)和含吐温-20的PBS(磷酸盐缓冲液),其体积比为1:9。

[0102] 当样品中存在布鲁氏菌抗体时,释放垫上QDs标记物会和抗体结合,形成QDs-Ag-抗体免疫复合物,流经检测线时,该免疫复合物和固定在检测线上的抗原结合,发生特异性免疫反应,此时一部分量子点固定在检测线上,形成T线。未与抗原发生反应的免疫复合物继续向前迁移,流经质控线时被固定的二抗(SPA)捕获,发生特异性免疫反应,使多余的QDs滞留在质控线处,形成C线。如果还有剩余的QDs,则继续会往吸水纸的方向迁移,最终随着测试液到达吸水垫处。当待检样品中无布鲁氏菌抗体时,则T线无荧光条带,C线出现紫外灯照射下下呈现荧光条带;无论试纸条T线有无荧光条带,只要C线没有荧光条带时,该试纸条即为无效。

[0103] 实施例5 本发明的应用效果举例

[0104] 用正常人阴性血清、人阳性血清、羊阳性血清、胎牛血清对试纸条进行特异性验证。检测方法参照实施例2。10min后使用手持式紫外灯观察检测线,最终试纸条检测出来阴性血清、胎牛血清均为阴性,人阳性血清、羊阳性血清均为阳性。

[0105] 通过测定布鲁氏菌阳性血清不同血清效价来做初步检测。如图9所示,各试纸条从

左到右分别是阴性对照、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200。在采用目前已有量子点标记技术获得的检测布鲁氏菌试纸条对上述相同血清进行检测时,和本发明所获得试纸条进行对比,检测结果表明本发明所获得的试纸条在效价1:100以上阳性血清均可检出阳性,阴性对照无假阳性的出现。

[0106] 通过测定布鲁氏菌阳性血清不同稀释倍数做敏感度测试。如图10所示,该试纸条从左到右分别是原液、稀释2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、128倍。在采用目前已有量子点标记技术获得的检测布鲁氏菌试纸条对上述相同血清进行检测时,和本发明所获得试纸条进行对比,检测结果表明本发明获得的试纸条在阳性血清稀释128倍(血清效价为1:25)即可检测阳性,灵敏度远远超过其它标记技术。

[0107] 上述制取量子点标记全菌蛋白的方法,不仅标记效率高,而且简单易重复,操作便利。通过本方法制备的量子点标记全菌蛋白免疫层析试纸条,在检测布鲁氏菌抗体时具有很高的灵敏度,无非特异的产生。结果易观察,具有可靠性,可以作为快速布鲁氏菌抗体检测的一种工具。

[0108] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

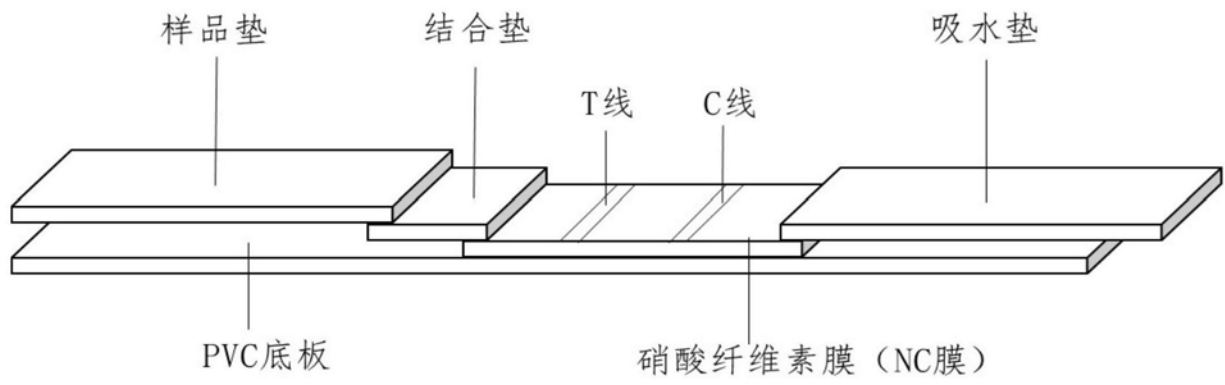


图1

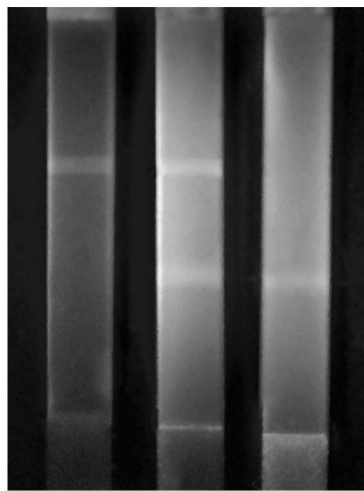


图2

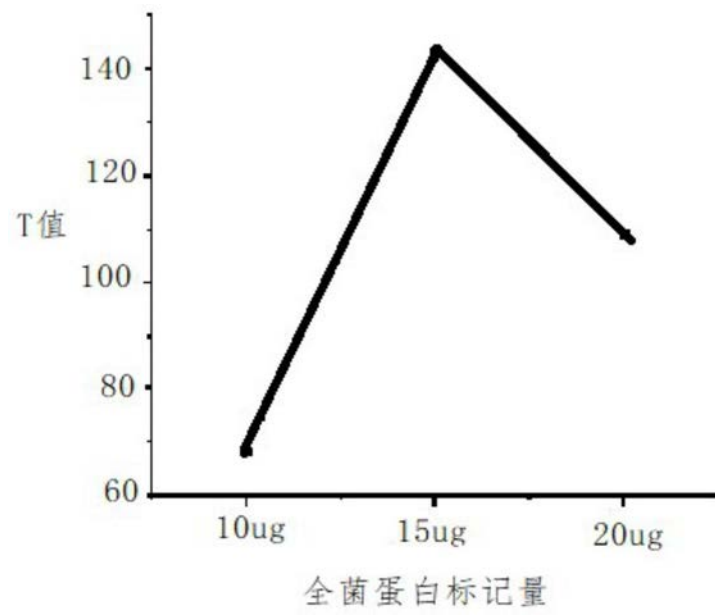


图3

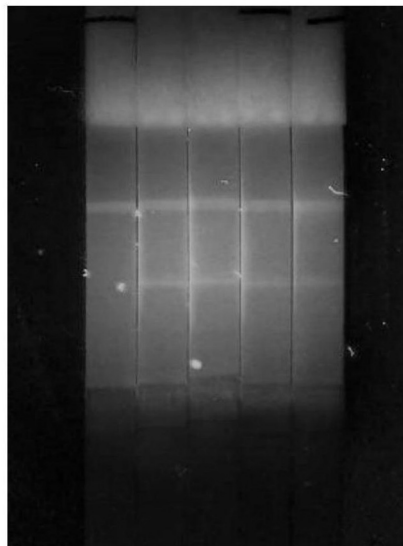


图4

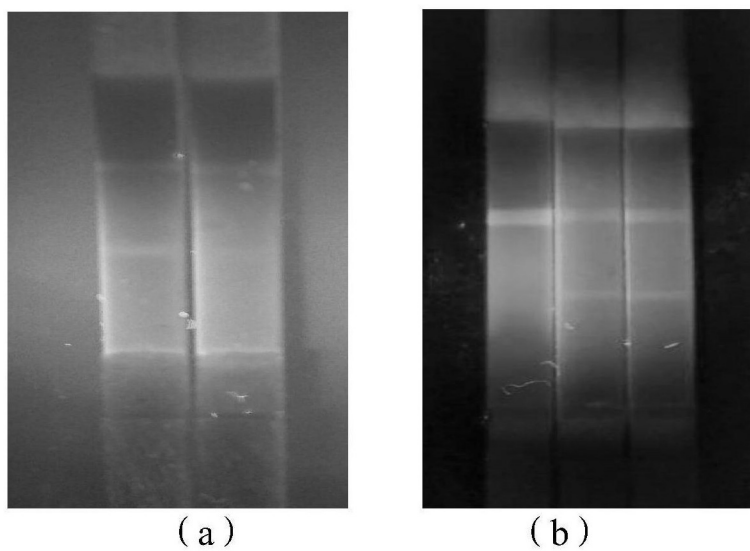


图5

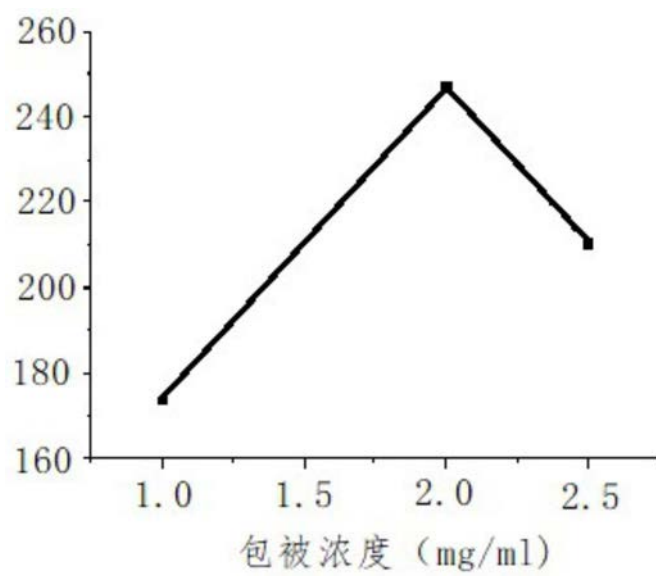


图6

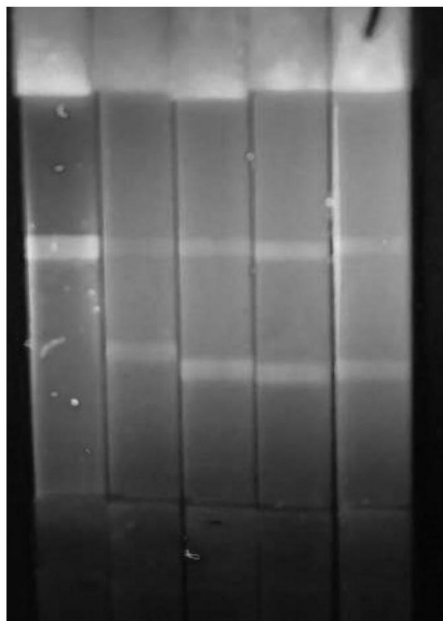


图7

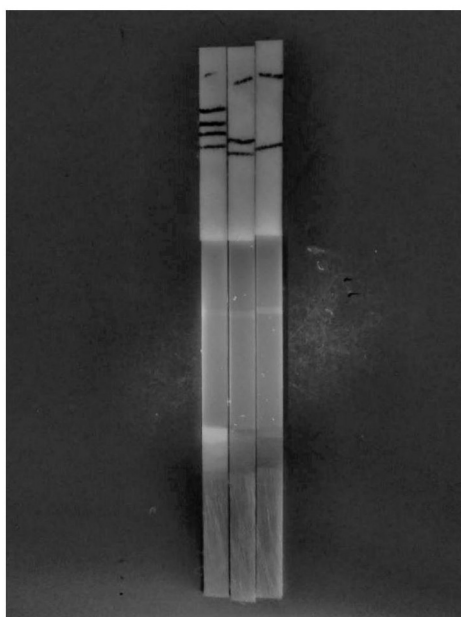


图8

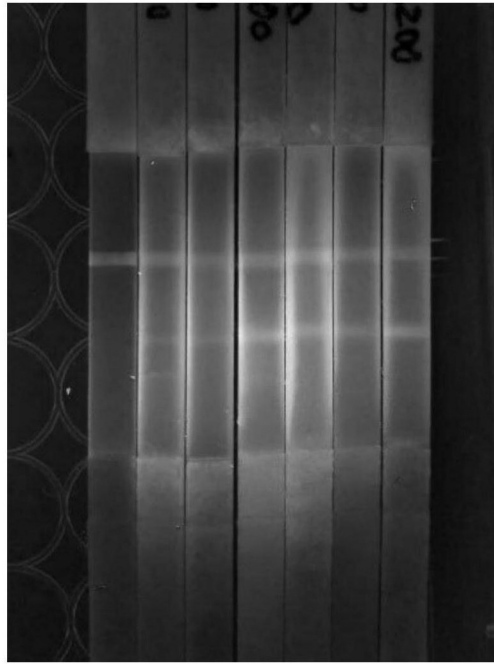


图9

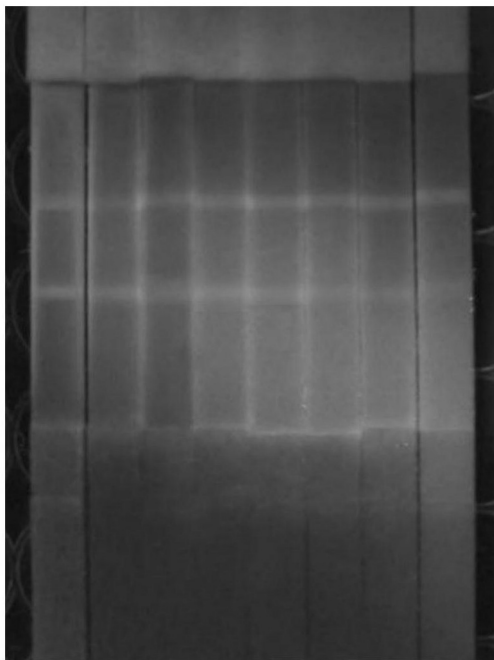


图10

专利名称(译)	一种快速检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN109212203A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811058685.X	申请日	2018-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	姜海 李广强 王升启 荣振 赵鸿雁		
发明人	姜海 李广强 王升启 荣振 赵鸿雁		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/56911 G01N33/6854 G01N2333/23 G01N2333/47		
代理人(译)	王文君 陈征		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种快速检测布鲁氏菌抗体的量子点免疫层析试纸条，由样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫相互重叠1~1.5mm依次粘贴在PVC底板上制得，所述层析膜是由一条检测线和一条质控线组成的固相硝酸纤维素膜，所述检测线包被有布鲁氏菌全菌蛋白，所述质控线包被二抗，所述结合垫包被有量子点标记的布鲁氏菌全菌蛋白，本发明还提供了制备该试纸条的方法，大大简化了标记步骤，提高了标记效率；制备的试纸条缩短了检测时长，还具有特异性强、稳定性好、血清用量少等优点，能够实现对人、动物血清中布鲁氏菌抗体的检测，对布鲁氏菌病的现场快速筛选、诊断具有重要意义。

