



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105585635 B

(45)授权公告日 2019.01.11

(21)申请号 201610130233.2

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2016.03.08

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105585635 A

CN 105203768 A,2015.12.30,
WO 2006/083322 A2,2006.08.10,
CN 104198703 A,2014.12.10,
CN 103059109 A,2013.04.24,

(43)申请公布日 2016.05.18

(73)专利权人 湖北工业大学
地址 430068 湖北省武汉市武昌南湖李家
墩一村一号

王丽琼等.肺炎支原体主要黏附蛋白的研究
进展.《现代生物医学进展》.2014,第14卷(第19
期),第3757-3760页.

专利权人 湖北华龙生物制药有限公司

ARMELLE MARAIS等.Expression in
Spiroplasma citri of an Epitope Carried
on the G Fragment of the Cytadhesin P1
Gene from.《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》.1993,
第175卷(第9期),第2783-2787页.

(72)发明人 胡征 董俊 杨波

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 余晓雪 王敏锋

审查员 李婧文

(51)Int.Cl.

C07K 16/12(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表1页

(54)发明名称

抗人肺炎支原体P1蛋白抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒

(57)摘要

本发明涉及抗人肺炎支原体P1蛋白抗体及应用该抗体检测人肺炎支原体的免疫层析试剂盒,抗人肺炎支原体P1蛋白抗体是分别识别人肺炎支原体P1蛋白504-517位以及535-548位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的抗体,人肺炎支原体P1蛋白在GenBank序列号是AC025351.1;人肺炎支原体P1蛋白504-517位以及535-548位的氨基酸序列分别为KPKKVIQSDKLDDD及FGTDHSTQPQPQL。本发明所提供的两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体具有特异性好、纯度高、效价高、制备成本低廉的特点。

1. 一种人肺炎支原体P1蛋白抗原表位,其中所述抗原表位是GenBank序列号为AC025351.1的人肺炎支原体P1蛋白504-517位氨基酸、即KPKKVIQSDKLDDD所组成的线性抗原表位。

2. 抗人肺炎支原体P1蛋白抗体,其中所述抗体识别根据权利要求1所述的人肺炎支原体P1蛋白抗原表位。

3. 一种包含如权利要求2所述抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的免疫层析试剂盒,其特征在于:所述试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒或者基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒。

抗人肺炎支原体P1蛋白抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,涉及抗人肺炎支原体P1蛋白抗体及应用该抗体检测人肺炎支原体的免疫层析试剂盒。

背景技术

[0002] 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, Mp) 是人类支原体肺炎的病原体,主要经飞沫传染,潜伏期2-3周,发病率以青少年最高。Mp感染在小儿肺炎病原的发生率高达10-30%,近年来逐渐成为小儿感染呼吸道疾病的主要病原体之一。该病极易引发咽炎、扁桃体炎等呼吸道感染,甚至可能同时继发脑膜炎、肝炎、心肌炎等多脏器损伤,严重时也可导致患儿死亡。

[0003] 由于Mp感染与其它病原体引起的呼吸道感染症状类似,不做病原学检查,很难将Mp与其它病原体引起的呼吸道感染相区别。Mp无细胞壁,常用的 β -内酰胺类药物对其无效,故其引起的感染的治疗与其它细菌和病毒感染的治疗方案完全不同,因此建立简便、快速、可行、能早期诊断肺炎支原体感染的方法非常必要。

[0004] 目前Mp的检测方法主要有3类:一是分离培养法,其是证实感染的“金标准”,但由于Mp的生长周期极为缓慢,培养周期长,导致该法在临床上不能进行快速诊断;二是血清学方法,即采用酶联免疫法、胶体金免疫法、微量免疫荧光法和间接血凝试验等,检测被检者血清中Mp抗体水平,可间接提示Mp感染的存在。然而,血清学试验只能提供一种回顾性的诊断,而且有时需要双份血清。另外,抗体出现的时机不易掌握,儿童、青少年与成人之间又存在Mp特异性抗体的差异,并且,Mp细胞膜上的糖脂抗原与其他微生物及机体组织存在非特异性交叉反应,故现有血清学方法的检测质量受到一定限制;三是利用分子生物学技术检测MpDNA的存在,其中最常用的是聚合酶链式反应(PCR),该方法快速、灵敏、特异,是目前研究Mp感染的重要手段,但由于PCR对实验设备以及操作要求较高,且易出现假阳性,在我国还不能作为常用的临床诊断方法。因此,建立Mp特异性抗原诊断方法十分必要。目前,已公开报道的检测Mp抗原的方法主要为双抗夹心ELISA法,间接免疫荧光法,量子点标记免疫层析法等,但这些方法均不能实行床旁检测,需要到特定的场合利用特定的仪器(如酶标仪、荧光仪等)来检测,不仅不够方便快捷而且时间较长,临床应用较为不便。

[0005] 因此,建立人肺炎支原体特异性抗原的快速诊断方法十分必要。由于人流感肺炎支原体P1蛋白序列上的高度保守性,使其成为了一个重要的检测标的。因此获得高特异性的抗人肺炎支原体P1蛋白抗体就是一个十分重要的工作。目前,关于抗人肺炎支原体P1蛋白抗体报道得最多的为相应的单克隆抗体及多克隆抗体。单克隆抗体最大的优点就是特异性高,但是制备方法繁琐,生产成本低,限制了其应用。多克隆抗体主要由基因工程表达的P1蛋白免疫家兔等动物制备而成。其制备方法简单,成本低,但是其具有特异性低、效价低、纯度低等缺陷。因此,低成本的制备高特异性、高效价的抗人肺炎支原体P1蛋白抗体就显得十分重要。

发明内容

[0006] 针对背景技术中存在的这些技术问题,本发明的目的在于提供识别人肺炎支原体P1蛋白504-517位以及535-548位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的两种抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒。

[0007] 抗人肺炎支原体P1蛋白抗体,其特征在于:所述抗人肺炎支原体P1蛋白抗体是分别识别人肺炎支原体P1蛋白504-517位以及535-548位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的两种抗体,所述人肺炎支原体P1蛋白在GenBank序列号是AC025351.1;所述人肺炎支原体P1蛋白504-517位的14个氨基酸以及535-548位的14氨基酸的氨基酸序列分别为KPKKVIQSDKLDDD及FGTDHSTQPQPQSL;将人肺炎支原体P1蛋白504-517位的14个氨基酸以及535-548位的14氨基酸的序列分别命名为P1A及P1B;所述抗人肺炎支原体P1蛋白抗体是AbP1A以及AbP1B。

[0008] 一种基于如前所述的抗人肺炎支原体P1蛋白抗体所形成的免疫层析试剂盒,其特征在于:所述试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒或基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒。

[0009] 作为优选,本发明所提供的试剂盒是基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒时,所述试剂盒的制备方法是:

[0010] 1) 量子点标记抗体AbP1A溶液:

[0011] 向微量离心管中依次加入0.4nmol羧基水溶性量子点和800nmol碳二亚胺EDC,以MES缓冲液定容为1ml,混合溶液,37℃反应5min后,再加入0.34mg的制备得到的抗体AbP1A,避光反应2h,加入单端氨基聚乙二醇PEG2000-NH₂至终浓度为1% (m/v),封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h;反应后的样品用超滤管离心(截留分子量100k),6500g离心5min,至体积200ul,将超滤后样品转移至普通EP管内,离心除团聚,得到上部清液以及下部沉淀,10000g条件下离心3min;将上部清液加到分离柱Superdex-200上纯化,待上部清液自然流入柱体中,然后用PBS冲洗,用紫外光照射柱体观察样品的位置,待样品开始从下部流出时开始收集,收集1ml后停止收集;将纯化后的样品用超滤管(截留分子量100k)以6500g离心浓缩至200ul后转移至普通EP管内离心除团聚,对普通EP管进行离心的条件是10000g,3min;获取上清后以磷酸盐保存液稀释200倍,4℃保存备用;至此制得量子点标记抗体AbP1A溶液;

[0012] 所述MES缓冲液中各组分含量分别是:10.66g/L MES以及0.74g/L EDTA,所述MES缓冲液的pH 7.4;

[0013] 所述磷酸盐保存液的制备方式是称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠、0.2g氯化钠、1g牛血清白蛋白BSA以及0.1gNaN₃,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100ml;

[0014] 2) 制备结合垫

[0015] 将聚酯纤维膜浸入步骤1)所得到的量子点标记抗体AbP1A溶液中1h,取出,25℃干燥后裁成后规格为4cm×0.6cm/条后,4℃密封保存备用,至此制得结合垫;

[0016] 3) 制备样品垫

[0017] 取玻璃纤维素膜一张,将玻璃纤维素膜在样品垫处理液中浸泡至少3h,再置于生

物安全柜内37℃通风干燥后,剪裁成规格为4cm×2.5cm/条后,即制得样品垫,25℃密封保存;

[0018] 所述样品垫处理液的制备方式是称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠、0.2g氯化钠、2g牛血清白蛋白BSA、1ml吐温-20、2g蔗糖以及0.5g聚乙烯吡咯烷酮PVP-10,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100ml;

[0019] 4) 制备检测层

[0020] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×4cm大小;将制备得到的抗体AbP1B和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL;将稀释好的抗体AbP1B装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,质控线与检测线间距为0.7cm;将喷好的硝酸纤维素膜37℃干燥2h,剪裁成4cm×4cm的规格,4℃密封干燥保存;至此制得检测层;

[0021] 所述磷酸盐缓冲液的制备方式是:称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠以及0.2g氯化钠,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100ml;

[0022] 5) 组装检测卡

[0023] 5.1) 将底板裁剪成4cm×7.3cm大小,备用;

[0024] 5.2) 将吸水滤纸裁剪成4cm×3cm大小,作为吸水垫,备用;

[0025] 5.3) 将步骤5.1) 制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4) 所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并抹平膜面;

[0026] 5.4) 将步骤5.2) 准备好的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层右末端有0.2cm的重叠,吸水垫的右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并抹平;再将步骤2) 所述的结合垫按0.3cm重叠于检测层的左边缘处,0.3cm粘于底板上;

[0027] 5.5) 将步骤3) 所述的样品垫则按一边0.3cm重叠于结合垫的左边缘处,另一边与底板的左边缘对齐,粘于底板上并抹平;将组装好的检测板于切条机下载成4.0mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

[0028] 作为优选,本发明所提供的试剂盒是基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒时,所述试剂盒的制备方法是:

[0029] 1) 胶体金标记抗体AbP1A

[0030] 1.1) 制备30nm胶体金溶液:

[0031] 取一个硅化好的250ml三角瓶,加入99ml超纯水,将1ml 1% (m/v) HAuCl₄溶液加入250ml三角瓶中并与超纯水混匀,油浴加热并搅拌至沸腾;向250ml三角瓶中快速加入2ml 1% (m/v) 柠檬酸三钠水溶液,溶液继续沸腾10min,待250ml三角瓶中的溶液由蓝色转变为红色时停止加热,将250ml三角瓶中的溶液自然冷却至室温,然后向250ml三角瓶中加入超纯水补齐至100ml;

[0032] 1.2) 胶体金标记抗体AbP1A:

[0033] 1.2.1) 取一个硅化好的50ml三角瓶,加入10ml步骤1.1) 所制备的胶体金溶液,向胶体金液中加入240ul 0.2mol/L K₂CO₃调节pH至8.5;

[0034] 1.2.2) 在电磁搅拌器搅拌下,将抗体AbP1A加入胶体金溶液中,至抗体终浓度为

10ug/ml,加入抗体时逐滴加入,加完后继续搅拌45min~60min;

[0035] 1.2.3) 反应完成加入2.5ml 5% (m/v) 牛血清白蛋白BSA至终浓度为1% (m/v),搅拌15~30分钟,4℃保存备用;

[0036] 1.2.4) 将标记好的抗体AbP1A取出后装入50ml离心管,2500g,4℃离心5分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉下层沉淀,上层清液转移至另一只50ml离心管,12000g,4℃离心30分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉上层清液,将下层沉淀用10ml胶体金缓冲液重悬沉淀,然后再12000g,4℃离心30分钟,再次得到下层沉淀及上层清液,将下层沉淀最后用3ml胶体金缓冲液重悬,4℃保存备用;

[0037] 所述胶体金缓冲液中各组分含量分别是:10mM Tris、1% m/vBSA、1% v/v Tween-20、5% m/v蔗糖以及3% om/v聚乙烯吡咯烷酮,所述胶体金缓冲液的pH为10.5;

[0038] 2) 制备结合垫

[0039] 将聚酯纤维膜浸入步骤1) 所得到的胶体金标记抗体AbP1A溶液中1h,取出,25℃干燥后裁成后规格为4cm×0.6cm/条后,4℃密封保存备用,至此制得结合垫;

[0040] 3) 制备样品垫

[0041] 取玻璃纤维素膜一张,将玻璃纤维素膜在样品垫处理液中浸泡至少2h,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,剪裁成规格为4cm×1.5cm/条后,即制得样品垫,25℃密封保存;

[0042] 所述样品垫处理液的制备方式是称取0.242g Tris、1g牛血清白蛋白BSA、1ml吐温-20、5g蔗糖以及0.3g聚乙烯吡咯烷酮PVP-10,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至11后用去离子水定容至100ml;

[0043] 4) 制备检测层

[0044] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×2cm大小;将制备得到的抗体AbP1B和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL;将稀释好的抗体AbP1B装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,质控线与检测线间距为0.5cm;将喷好的硝酸纤维素膜37℃干燥18h,剪裁成4cm×2cm的规格,4℃密封干燥保存;至此制得检测层;

[0045] 所述磷酸盐缓冲液的制备方式是:称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠以及0.2g氯化钠,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100ml;

[0046] 5) 组装检测卡

[0047] 5.1) 将底板裁剪成4cm×6cm大小,备用;

[0048] 5.2) 将吸水滤纸裁剪成4cm×2.5cm大小,作为吸水垫,备用;

[0049] 5.3) 将步骤5.1) 制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4) 所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并抹平膜面;

[0050] 5.4) 将步骤5.2) 准备好的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层右末端有0.2cm的重叠,吸水垫的右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并抹平;再将步骤2) 所述的结合垫按0.2cm重叠于检测层的左边缘处,0.4cm粘于底板上;

[0051] 5.5) 将步骤3) 所述的样品垫则按一边0.2cm重叠于结合垫的左边缘处,另一边

与底板的左边缘对齐,粘于底板上并抹平;将组装好的检测板于切条机下裁成4.0mm宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

[0052] 本发明的优点是:

[0053] 本发明提供了抗人肺炎支原体P1蛋白抗体,该抗人肺炎支原体P1蛋白抗体识别人肺炎支原体P1蛋白504-517位的14个氨基酸以及535-548位的14氨基酸所组成的两个线性抗原表位,人肺炎支原体P1蛋白在GenBank序列号是AC025351.1;人肺炎支原体P1蛋白504-517位的14个氨基酸以及535-548位的14氨基酸的氨基酸序列分别为KPKKVIQSDKLDDD及FGTDHSTQPQPQSL;将人肺炎支原体P1蛋白504-517位的14个氨基酸以及535-548位的14氨基酸的序列分别命名为P1A及P1B;抗人肺炎支原体P1蛋白抗体是AbP1A以及AbP1B。基于人肺炎支原体单一线性抗原表位所制备的上述两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体具有特异性好、纯度高、效价高、制备成本低廉的特点,可用于生产各种基于抗原-抗体反应的原理的高灵敏度检测人肺炎支原体的检测试剂盒。同时,基于该抗人肺炎支原体P1蛋白抗体还制备得到了两种不同的免疫层析试剂盒。两种不同的免疫层析试剂盒能快速、准确检测生物样品中的人肺炎支原体,其均包括本发明所述的两种抗体;两种免疫层析试剂盒均可用于人肺炎支原体感染的辅助诊断,具有更高的灵敏性与特异性,同时兼顾了简单、快速、稳定以及制造成本低等优势,适用于临床标本的检查,而且由于可以进行大批量的快速检查,也适合于流行病学调查。因此,本发明所述的两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体,两种免疫层析试剂盒均具有广泛的应用前景和实用价值。

具体实施方式

[0054] 为了有助于本领域的普通技术人员进一步理解本发明,下文特举较佳实施例详细说明本发明。

[0055] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0056] 1、样品垫处理液:称取0.242g Tris,1g牛血清白蛋白(BSA),1ml吐温-20,5g蔗糖,0.3g聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10),溶解于90ml的去离子水中,用1mol/LNaOH调pH至11后用去离子水定容至100ml。

[0057] 2、磷酸盐保存液:称取0.29g磷酸氢二钠、0.0295g磷酸二氢钠、0.2g氯化钠、1g牛血清白蛋白BSA以及0.1gNaN₃,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100ml;

[0058] 3、磷酸盐缓冲液(PBS):称取0.29g磷酸氢二钠,0.0295g磷酸二氢钠,0.2g氯化钠,溶解于90ml的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.3后用去离子水定容至100ml。

[0059] 4、样品处理液:称取0.0121g三羟甲基氨基甲烷,0.17g氯化钠,0.025g溶菌酶溶解于90ml去离子水中,用盐酸调pH至8.0后用去离子水定容至100ml。

[0060] 5、抗体AbP1A:为本发明自制,用PBS稀释,摇匀,使溶液中抗体浓度为3mg/ml。

[0061] 6、抗体AbP1B:为本发明自制,用PBS稀释,摇匀,使溶液中抗体浓度为3mg/ml。

[0062] 7、羊抗兔IgG:为武汉博士德生物工程有限公司产品,用PBS稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为1mg/ml。

[0063] 8、量子点:本发明中所用量子点为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性CdSe/ZnS量子点,其发射波长为565nm,购买自武汉珈源量子点技术开发有限公司,产品名称为羧基水溶

性量子点-565。

[0064] 9、玻璃纤维素膜：厚度为0.4mm，吸水量为42mg/cm²，玻璃纤维直径为0.6-3μm，具有良好的亲水性，购买于上海金标生物科技有限公司（型号为BT40）。

[0065] 10、聚酯纤维膜：厚度为0.48mm，吸水速度为18s/4cm，具有极好的亲水性，用于结合垫的制备，购买于上海金标生物科技有限公司（型号为DL42）。

[0066] 11、硝酸纤维素膜：型号为Millipore Corp SHF135，有衬板，购买于Millipore公司。

[0067] 12、吸水滤纸：厚度为0.95mm，吸水速度为60s/4cm，吸水量为700mg/cm²，具有良好的吸水性，作为制作吸水垫的材料。购买于上海金标生物科技有限公司（型号为CH37K）。

[0068] 13、底板：为高白度PVC材质，表面涂布单层高聚合物压敏胶SM31-40，购买于上海金标生物科技有限公司。

[0069] 14、人肺炎支原体：购自美国典型培养物保藏中心（ATCC），编号为ATCC15531。

[0070] 15、本发明所用到的微生物样品均购自美国典型培养物保藏中心（ATCC）。

[0071] 下面结合实施例对本发明所提供的技术方案进行详细说明：

[0072] 实施例1两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的制备

[0073] 两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的制备方法如下：

[0074] 1) 经结构生物学分析及相关实验研究后，选定人肺炎支原体P1蛋白（GenBank序列号AC025351.1）504-517位的14个氨基酸及535-548位的14氨基酸组成的短肽分别作为制备兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的两个线性抗原表位，该两段氨基酸序列分别为KPKKVIQSDKLDDD及FGTDHSTQPQPQSL，将此二序列分别命名为P1A及P1B；

[0075] 2) 将步骤1)所述的氨基酸序列P1A的N端、P1B的N端分别添加一个半胱氨酸后，用多肽自动合成仪分别合成多肽并纯化，纯化后的两条多肽分别与载体蛋白KLH偶联，形成P1A-KLH复合蛋白及P1B-KLH复合蛋白；

[0076] 3) 分别将步骤2)所合成的两种复合蛋白乳化，乳化后分别在兔腹部皮下多点注射，先后注射三次，每次间隔7-10天；

[0077] 4) 第三次注射10-12天后，分别收集、分离得到两种含有兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的血清，ELISA分别检测血清中兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的效价，所述的两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的效价均在1:60000以上；

[0078] 5) 将步骤2)合成并纯化的两条多肽分别与溴化氰活化的Sepharose 4B偶联，形成两组多肽亲和层析柱；

[0079] 6) 将步骤4)获得的两种含有兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体的血清分别对应的加入到步骤5)制备的两种亲和层析柱中，并在4℃孵育过夜后，洗脱抗体，得到两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体；经SDS-PAGE鉴定其纯度均在97%以上，将这两种纯化的抗体分别命名为AbP1A及AbP1B。

[0080] 本实施例中步骤2)-6)皆是现有成熟技术，多家生物科技公司都可以提供程序化的技术服务。本实施例中上述步骤中相关实验环节的具体实施，系委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

[0081] 本发明所述“抗体”应该解释为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任何特异性结合因子。因而，这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物、人源化抗体以及抗体的功

能同等物 and 同源物。抗体的实例是免疫球蛋白亚型 (如 IgG、IgE、IgM、IgD 和 IgA) 及其亚型亚类; 也可以是包含抗原结合结构域的片段如 Fab、scFv、Fv、dAb、Fd 和双链抗体。

[0082] 实施例2基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的制备及应用

[0083] 1. 量子点标记抗体AbP1A

[0084] 向微量离心管中依次加入0.4nmol羧基水溶性量子点和800nmol碳二亚胺(EDC), 以MES缓冲液(10.66g/L MES, 0.74g/L EDTA pH 7.4)定容为1ml, 不停地混合溶液, 37℃反应5min后, 再加入0.34mg的实施例1所制备的抗体AbP1A, 避光反应2h, 加入单端氨基聚乙二醇(PEG2000-NH₂)至终浓度为1% (m/v), 封闭未反应的活化羧基位点, 继续避光反应1h。反应后的样品用超滤管离心(截留分子量100k), 6500g离心5min, 至体积200ul, 将超滤后样品转移至普通EP管内, 离心除团聚(10000g, 3min)。将上部清液加到分离柱(Superdex-200)上纯化, 待其自然流入柱体中, 然后用PBS冲洗(液体自然流下), 用紫外光照射柱体随时观察样品的位置, 待样品开始从下部流出时开始收集, 收集1ml后停止收集。将纯化后的样品用超滤管(截留分子量100k)以6500g离心浓缩至200ul后转移至普通EP管内离心(10000g, 3min)除团聚。获取上清后以磷酸盐保存液稀释200倍, 4℃保存备用。至此制得量子点标记抗体AbP1A。

[0085] 2. 结合垫的制备

[0086] 将聚酯纤维膜浸入步骤1所得到的量子点标记抗体AbP1A溶液中1h, 取出, 25℃干燥后裁成后规格为4cm×0.6cm/条后, 4℃密封保存备用, 至此制得结合垫。

[0087] 3. 样品垫的制备

[0088] 取玻璃纤维素膜一张, 将其在样品垫处理液中浸泡至少3h, 再置于生物安全柜内37℃通风干燥后, 剪裁成规格为4cm×2.5cm/条后, 即制得样品垫, 25℃密封保存。

[0089] 4. 检测层的制备

[0090] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×4cm大小。将实施例1中所制备的抗体AbP1B和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL。将稀释好的抗体AbP1B装入BIODOT划膜仪喷头中, 设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上, 形成检测线; 将稀释好的抗兔IgG装入BIODOT划膜仪喷头中, 设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线, 其与检测线间距为0.7cm。将喷好的硝酸纤维素膜37℃干燥2h, 剪裁成4cm×4cm的规格, 4℃密封干燥保存。至此制得检测层。

[0091] 5. 检测卡的组装

[0092] 将底板裁剪成4cm×7.3cm大小, 备用。

[0093] 将吸水滤纸裁剪成4cm×3cm大小, 作为吸水垫, 备用。

[0094] 组装工作于生物安全柜内操作, 首先将底板上的粘性保护膜揭掉, 将步骤4所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上, 并小心抹平膜面。其次, 将事先裁好的吸水垫组装到底板上, 使其左边与检测层右末端有0.2cm的重叠, 其右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将步骤2所述的结合垫按0.3cm重叠于检测层的左边缘处, 0.3cm粘于底板7上。最后将步骤3所述的样品垫则按一边0.3cm重叠于结合垫的左边缘处, 另一边与底板的左边缘对齐, 粘于底板上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下裁成4.0mm宽的检测卡, 4℃密封干燥避光保存。

[0095] 6. 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的组成

[0096] 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒由步骤5所述的检测卡及样品处理液所组成。

[0097] 7. 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法

[0098] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有500 μ l样品处理液的软质塑料管中,挤压塑料管壁,使拭子上的样品充分溶解后取出120 μ L滴于检测卡的样品垫上,15分钟后于紫外分析仪下(型号为WD-9403A,北京六一仪器厂生产,紫外激发波长365nm)观察检测结果。若咽拭子中含有人肺炎支原体抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗体AbP1A结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的抗体AbP1B结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与羊抗兔IgG结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若待检咽拭子中无相关抗原,则仅出现一条荧光质控线。如果荧光质控线未出现,则该检测卡失效。

[0099] 8. 基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的应用效果举例

[0100] 本实施例中所述的基于量子点标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法参照步骤7所述的操作步骤。

[0101] 1) 特异性试验

[0102] 用呼吸道常见病原体如人III型副流感病毒病毒(ATCC VR-93)、人流感嗜血杆菌(ATCC 53781)、人肺炎衣原体(AR-39株,ATCC编号53592)、人腺病毒3型(GB株,ATCC编号VR-3)、人腺病毒7型(Gomen株,ATCC编号VR-7)、人甲型流感病毒(H1N1,ATCC编号VR-1743)、人乙型流感病毒(ATCC编号VR-790)、人呼吸道合胞病毒(ATCC编号VR26)、人肺炎链球菌(ATCC编号700670)等代替人肺炎支原体进行检测,试剂盒检测含这些微生物的磷酸盐缓冲液稀释液都为阴性。

[0103] 2) 临床测试例

[0104] 以人肺炎支原体检测“金标准”-培养法作为参照,取120例呼吸科呼吸道感染者的咽拭子标本用步骤6所述的试剂盒进行检测,培养法阳性率为13%(13/100),本试剂盒为12%(12/100),2种方法的符合率为97%(97/100)。具体结果如表1所示。

[0105] 表1 临床标本的检测结果

	本试剂盒			总计
	痰培养法	阳性	阴性	
[0106] 阳性		11	2	13
阴性		1	86	87
总计		12	88	100

[0107] 实施例3基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的制备及应用

[0108] 1. 胶体金标记抗体AbP1A

[0109] a. 30nm胶体金的制备

[0110] 取一硅化好的250ml三角瓶,加入99ml超纯水,将1ml 1%(m/v)HAuCl₄溶液加入其中混匀,油浴加热并搅拌至沸腾。向其中快速加入2ml 1%(m/v)柠檬酸三钠水溶液,溶液继续沸腾10min(这个过程中溶液由蓝色转变为红色)。停止加热,让溶液自然冷却至室温,然

后向其中加入超纯水补齐至100ml。

[0111] b. 胶体金标记抗体AbP1A

[0112] 1) 取一硅化好的50ml三角瓶,加入10ml步骤a所制备的胶体金金液,向金液中加入240 μ l 0.2mol/L K_2CO_3 调节pH至8.5;

[0113] 2) 在电磁搅拌器搅拌下,将抗体AbP1A加入胶体金溶液中,至抗体终浓度为10 μ g/ml,加入抗体时应逐滴加入,加完后继续搅拌45min~60min;

[0114] 3) 反应完成加入2.5ml 5% (m/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 至终浓度为1% (m/v),搅拌15~30分钟,4 $^{\circ}C$ 保存备用。

[0115] 4) 将标记好的抗体AbP1A取出后装入50ml离心管,2500g,4 $^{\circ}C$ 离心5分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉下层沉淀,上层清液转移至另一只50ml离心管,12000g,4 $^{\circ}C$ 离心30分钟,得到下层沉淀及上层清液,弃掉上层清液,将下层沉淀用10ml胶体金缓冲液重悬沉淀,然后再12000g,4 $^{\circ}C$ 离心30分钟,再次得到下层沉淀及上层清液,将下层沉淀最后用3ml胶体金缓冲液重悬,4 $^{\circ}C$ 保存备用;上述胶体金缓冲液中各组分含量分别是:10mM Tris、1% (m/v) BSA、1% (v/v) Tween-20、5% (m/v) 蔗糖以及3‰ (m/v) 聚乙烯吡咯烷酮,所述胶体金缓冲液的pH为10.5。

[0116] 2. 结合垫的制备

[0117] 将聚酯纤维膜浸入步骤1所得到的胶体金标记抗体AbP1A溶液中1h,取出,25 $^{\circ}C$ 干燥后裁成后规格为4cm \times 0.6cm/条后,4 $^{\circ}C$ 密封保存备用,至此制得结合垫。

[0118] 3. 样品垫的制备

[0119] 取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液中浸泡至少2h,再置于生物安全柜内37 $^{\circ}C$ 通风干燥后,剪裁成规格为4cm \times 2.5cm/条后,即制得样品垫,25 $^{\circ}C$ 密封保存。

[0120] 4. 检测层的制备

[0121] 将硝酸纤维素膜剪成4cm \times 2cm大小。将实施例1中所制备的抗体AbP1B和羊抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为2.0mg/mL及1.0mg/mL。将稀释好的抗体AbP1B装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0 μ l/cm的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0 μ l/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,其与检测线间距为0.5cm。将喷好的硝酸纤维素膜37 $^{\circ}C$ 干燥2h,剪裁成4cm \times 2cm的规格,4 $^{\circ}C$ 密封干燥保存。至此制得检测层。

[0122] 5. 检测卡的组装

[0123] 将底板裁剪成4cm \times 6cm大小,备用。

[0124] 将吸水滤纸裁剪成4cm \times 2.5cm大小,作为吸水垫,备用。

[0125] 组装工作于生物安全柜内操作,首先将底板上的粘性保护膜揭掉,将步骤4所述的检测层即带有质控线和检测线的硝酸纤维素膜粘贴到底板上,并小心抹平膜面。其次,将事先裁好的吸水垫组装到底板上,使其左边与检测层右末端有0.2cm的重叠,其右边缘则与底板的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将步骤2所述的结合垫按0.2cm重叠于检测层3的左边缘处,0.4cm粘于底板上。最后将步骤3所述的样品垫则按一边0.2cm重叠于结合垫的左边缘处,另一边与底板的左边缘对齐,粘于底板上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下裁成4.0mm宽的检测卡,4 $^{\circ}C$ 密封干燥避光保存。

[0126] 6. 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的组成

[0127] 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒由步骤5所述的检测卡及样品处理液所组成。

[0128] 7. 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法

[0129] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有500 μ l样品处理液的软质塑料管中,挤压塑料管壁,使拭子上的样品充分溶解并50 $^{\circ}$ C水浴20min后,后取出120 μ L滴于检测卡的样品垫上,(15)分钟后肉眼观察检测结果。若咽拭子中含有人肺炎支原体抗原,则与结合垫中的胶体金标记的抗体AbP1A结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的抗体AbP1B结合后在在检测线处会形成肉眼可见的一条红色检测线,未结合完的胶体金标记抗体继续层析与羊抗兔IgG结合后形成肉眼可见的第二条红色质控线;若待检咽拭子中无相关抗原,则仅出现一条红色质控线。如果红色质控线未出现,则该检测卡失效。

[0130] 8. 基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的应用效果举例

[0131] 本实施例中所指的基于胶体金标记技术的免疫层析试剂盒的使用方法参照步骤7所述的操作步骤。

[0132] 1) 特异性试验

[0133] 用呼吸道常见病原体如I型人副流感病毒(ATCC VR-94)、II型人副流感病毒(ATCC VR-92)、III型人副流感病毒病毒(ATCC VR-93)、人流感嗜血杆菌(ATCC 53781)、人肺炎衣原体(AR-39株,ATCC编号53592)、人腺病毒3型(GB株,ATCC编号VR-3)、人腺病毒7型(Gomen株,ATCC编号VR-7)、人甲型流感病毒(H1N1,ATCC编号VR-1743)、人乙型流感病毒(ATCC编号VR-790)、人呼吸道合胞病毒(ATCC编号VR26)、人肺炎链球菌(ATCC编号700670)等代替人肺炎支原体进行检测,试剂盒检测含这些微生物的磷酸盐缓冲液稀释液都为阴性。

[0134] 2) 临床测试例

[0135] 以人肺炎支原体检测“金标准”-培养法作为参照,取100例呼吸科呼吸道感染者的咽拭子标本用步骤6所述的试剂盒进行检测,培养法阳性率为13%(16/120),本试剂盒为11%(1/100),2种方法的符合率为96%(96/100)。具体结果如表1所示。

[0136] 表1 临床标本的检测结果

	本试剂盒			总计
	痰培养法	阳性	阴性	
[0137] 阳性		10	3	13
阴性		1	86	87
总计		11	89	100

[0138] 需要指出的是,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明精神和原则之内所做的任何修改、等同替换等均应包含在本发明的保护范围之内。

人肺炎支原体P1蛋白504-517位的氨基酸序列为:

KPKKVIQSDKLDDD

[0001]

人肺炎支原体P1蛋白535-548位的氨基酸序列为:

FGTDHSTQPQPQSL

专利名称(译)	抗人肺炎支原体P1蛋白抗体及应用该抗体的免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	CN105585635B	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201610130233.2	申请日	2016-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	湖北工业大学 湖北华龙生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖北工业大学 湖北华龙生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖北工业大学 湖北华龙生物制药有限公司		
[标]发明人	胡征 董俊 杨波		
发明人	胡征 董俊 杨波		
IPC分类号	C07K16/12 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	C07K16/1253 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56933 G01N2333/30		
代理人(译)	王敏锋		
审查员(译)	李婧文		
其他公开文献	CN105585635A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗人肺炎支原体P1蛋白抗体及应用该抗体检测人肺炎支原体的免疫层析试剂盒，抗人肺炎支原体P1蛋白抗体是分别识别人肺炎支原体P1蛋白504-517位以及535-548位氨基酸所组成的两个线性抗原表位的抗体，人肺炎支原体P1蛋白在GenBank序列号是ACO25351.1；人肺炎支原体P1蛋白504-517位以及535-548位的氨基酸序列分别为KPKKVIQSDKLDDD及FGTDHSTQPQPQSL。本发明所提供的两种兔抗人肺炎支原体P1蛋白抗体具有特异性好、纯度高、效价高、制备成本低廉的特点。

痰培养法	本试剂盒		
	阳性	阴性	总计
阳性	11	2	13
阴性	1	86	87
总计	12	88	100