



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107144686 A

(43)申请公布日 2017.09.08

(21)申请号 201710236713.1

(22)申请日 2017.04.12

(71)申请人 程秋萍

地址 401520 重庆市合川区嘉滨南路666号
兰滨一号8幢楼26层三号

申请人 王云志

(72)发明人 程秋萍 王云志

(74)专利代理机构 北京布瑞知识产权代理有限公司 11505

代理人 孟潭

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

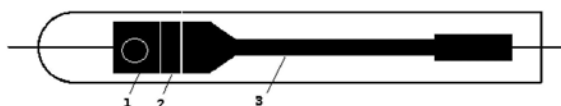
权利要求书1页 说明书9页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种精确荧光定量检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种精确荧光定量检测方法，特别涉及一种利用荧光融合蛋白的精确定量检测方法，并且提供了一种荧光融合蛋白，以及精确荧光定量检测试剂条、试剂盒及其制备方法。使用本发明的方法以及试剂条，能够增加检测灵敏度，减少反应时间，减少成本。



1. 一种精确荧光定量检测方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:
 - a) 取血液, 混入磷酸盐缓冲液后加到试纸条的加样垫上, 所述试纸条包含有cTNI单克隆抗体荧光蛋白复合物, 所述荧光融合蛋白为荧光蛋白-ProteinG融合蛋白或荧光蛋白-ProteinA融合蛋白, 所述的复合物为荧光融合蛋白和抗体按1:2摩尔比制备而成;
 - b) 将试纸条放入免疫荧光定量分析仪中, 定量得出被测物质的浓度;
 - c) 依据参考值判定阴阳性。
2. 根据权利要求1的所述方法, 其特征在于, 所述荧光蛋白为红色荧光蛋白或绿色荧光蛋白。
3. 一种荧光融合蛋白, 其特征在于, 所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
4. 包含权利要求3所述荧光融合蛋白的编码DNA、载体以及重组菌。
5. 一种精确荧光定量检测试剂条, 其特征在于, 所述试剂条包含硝酸纤维素膜-PVC底板、吸水垫、样品垫、荧光结合垫, 所述荧光结合垫中包含抗体-荧光融合蛋白复合物, 所述荧光融合蛋白为荧光蛋白-proteinG融合蛋白或荧光蛋白-proteinA融合蛋白。
6. 根据权利要求5所述的试剂条, 其特征在于, 所述荧光融合蛋白为SEQ ID NO:1所示的蛋白。
7. 根据权利要求6所述的试剂条, 其特征在于, 所述荧光融合蛋白和抗体1:2摩尔比混合后, 通过分子筛纯化形成抗体-荧光蛋白复合物。
8. 根据权利要求6-7任意一项所述的试剂条, 其特征在于, 所述硝酸纤维素膜切成Y型细条。
9. 根据权利要求6-7任意一项所述的试剂条, 其特征在于, 荧光标记物还可以是荧光微球, 荧光分子或过渡元素。
10. 一种精确荧光定量检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - 1) 硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板的制备: 将硝酸纤维素膜切成Y型细条, 贴在PVC底板上, 将鼠抗人单抗在硝酸纤维素膜上划线得到检测线; 将兔抗鼠在硝酸纤维素膜上划线得到质控线, 然后将硝酸纤维素膜-PVC底板置于干燥箱干燥;
 - 2) 将荧光融合蛋白和抗体1:2摩尔比混合后, 通过分子筛纯化得到抗体-荧光蛋白复合物, 保存备用;
 - 3) 结合垫的制备: 将结合垫切成细条, 将鼠抗人cTNI单克隆抗体荧光蛋白复合物、按照2:1混合, 均匀铺在结合垫上, 放入烘箱烤干;
 - 4) 样品垫的制备: 将玻璃纤维膜切成细条;
 - 5) 吸收垫的制备: 将吸水纸切成细条;
 - 6) 组装: 将上述吸水垫、样品垫、荧光结合垫依次贴在PVC底板上, 切成合适形状的试剂条。

一种精确荧光定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种精确荧光定量检测方法,特别涉及一种利用荧光融合蛋白的精确定量检测方法。

背景技术

[0002] 至上世纪70年代,发明酶标检测技术平台以来,免疫诊断行业已发生了翻天覆地的变化,使免疫检测领域得到了快速成长。但由于酶标检测体系检测时间长,中间过程操作烦琐,试剂检测范围窄,灵敏度低等缺点,因此该系统也慢慢的退出了临床检测的历史舞台。随之而来的相继又发明了胶体金标技术平台,化学发光,时间分辨荧光检测技术平台以及免疫芯片技术平台等。

[0003] 免疫层析快速检测技术是近年发达国家发展起来的一种快速免疫分析技术。其原理是样本液在毛细迁移作用下在硝酸纤维素膜上迁移,其中的待测物与膜上一定区域的抗体(抗原)结合,通过有色标记物,十几分钟甚至几分钟内即可得到肉眼可见的直观结果。免疫层析快速检测技术不需将游离的抗体(抗原)和形成复合物的抗体(抗原)进行分离,省去了繁琐洗涤步骤,因而操作便捷,出报告时间短,在基层医疗机构、急诊、现场、家庭自检等场所得到了广泛的应用。常用的标记物为胶体金颗粒、酶、荧光蛋白以及微球等。

[0004] 其中,荧光标记技术具有灵敏度高、操作简单等特点,已被广泛用于生物检测领域。如DNA测序、蛋白表达分析、细胞成像、活体成像、临床诊断等。荧光微球技术是将聚苯乙烯羧基微球、荧光染料标记系统、激光技术、应用流体学及微球专用流式细胞仪等有机整合在一起的一项新技术,通过荧光微球信号来进行实验数据采集和分析,具有快速分析多重生物反应的特点及高灵敏度和特异性,可用于抗原抗体、核酸探针检测等领域的研究。

[0005] 荧光检测生物体液中疾病标志蛋白的有干式免疫方法采用荧光微球偶联抗体,结合疾病标志蛋白,然后用激发光激发荧光物质,光电转换器转换光信号为电信号,通过计算机计算电信号强弱来测定疾病标志蛋白含量。例如,实用新型CN205679621U涉及一种心衰疾病检测系统,具体涉及一种用于心脑血管疾病检测的免疫荧光检测仪,包括横向免疫荧光层析试剂卡和微型数字化检测仪,微型数字化检测仪包括冷光源荧光检测组件、光电强度数字转换计算组件和显示器,横向免疫荧光层析试剂卡活动插接在冷光源荧光检测组件内,冷光源荧光检测组件获取横向免疫荧光层析试剂卡的荧光信号并将其传输至光电强度数字转换计算组件,所述光电强度数字转换计算组件将荧光信号转化为电信号并输送至显示器。所述的检测仪,使检测者在家就能进行心脑血管疾病检查,并直接获取数据结果,可实现快速定量的获取横向免疫荧光层析试剂卡的检测数据。

[0006] 然而,通常的荧光微球多为表面偶联抗体,即将抗体分子通过特定的官能团偶联到微球表面制得,由于荧光微球大小不一致,表面修饰的反应基团量非恒定,荧光均一性较差等不足,采用荧光微球检测抗体时通常存在以下缺陷,例如:1)不能定量偶联抗体,荧光值与抗体结合比不固定;2)固定过程中pH,盐浓度变化等对抗体活性造成影响,一般批量生产后需要对检测试剂,工艺复杂;3)荧光微球偶联抗体会导致空间位阻,影响与抗原结合,

定量不准确;4) 荧光微球为10-100um直径,在横向免疫中扩散速度较慢一般需要15分钟左右时间。因此,如今迫切需要一种新的检测方法,即可以快速检测、又可以精确定量,并且还便于携带,随时随地都可以使用。

[0007] 抗体结合蛋白A(Protein A)来源于金黄色葡萄球菌的一个株系,它含有5个可以和抗体IgG分子的Fc段特异性结合的结构域。蛋白A作为亲和配基被偶联到琼脂糖基质上,可以特异性的和样品中的抗体分子结合,而使其他杂蛋白流穿,具有极高的选择性,一步亲和层析就可达到超过95%的纯度。1个蛋白A分子至少可以结合2个IgG。蛋白A也可以结合另一些免疫球蛋白,如用于某些种属的IgA、IgM的纯化。

[0008] 抗体结合蛋白G是一种源自链球菌G族的细胞表面蛋白,为三型Fc受体。其通过类似于蛋白A的非免疫机制与抗体的Fc段结合。像蛋白A样,蛋白G可以与IgG的Fc区域特异性结合,不同的是,Protein G琼脂糖凝胶可以广泛、更强地结合更多类型的IgG,多克隆IgG及人IgG,同时血清蛋白结合水平更低,纯度更高,配基脱落也相对更低。此外,蛋白G还可以和某些抗体的Fab和F(ab')₂段结合。

[0009] 因此可以看出,抗体结合蛋白如(Protein A/G)是不同来源抗体纯化首选介质,约70-80%的抗体纯化使用Protein A、Protein G亲和层析。因此,在本领域的广泛认知中,蛋白G和蛋白A在抗体领域一般都是用于抗体纯化,本领域中还未见利用在荧光检测中使用抗体结合蛋白如(Protein A/G)进行定量标记抗体的报道。

[0010] 当前,心血管疾病如急性心肌梗死(Acute myocardial infarction,AMI)在世界范围内已成为成年人最大的潜在杀手,近年来统计,我国心血管病的死亡率在人口死亡中占40%,已高于欧美国家,属心血管病高发国。因此,只有做到早预防、早发现及早救治,才能最大限度的防止致残、致死后果,最大限度的改善心血管患者的预后和生活质量。20世纪90年代以来,临床化学家们逐渐将诊断AMI的研究重点转移到心肌蛋白标志物上。其中心肌肌钙蛋白(Cardiac troponin, cTn)是唯一存在于心肌中的收缩蛋白,对心肌坏死具有高度的敏感性和特异性。

[0011] 心肌肌钙蛋白是由cTnI、cTnC以及cTnT组成的复合物,在肌肉收缩和舒张过程中起重要调节作用。其中,cTnC没有心肌特异性,较少用于心肌损伤的检查。在正常状态下,cTnI和cTnT均不能透过细胞膜进入血液循环,故健康人血内不含或含极低量的cTnI、cTnT;当心肌细胞受损后,cTnI及cTnT弥散进入细胞间质,较早的出现在外周血中。通常,心肌肌钙蛋白在发病后3h~5h即可升高,15h~24h达高峰,持续时间久,5d~10d后降至正常。但cTnT在心脏中具有四个亚型,特异性低于cTnI,且在肾衰竭、横纹肌溶解病、肺炎和败血症等疾病中,血液中cTnT通常也可增高,故在检测中会出现假阳性现象。与此相反,cTnI在心肌中无其它亚型,特异性高于cTnT,此外其分子量亦小于cTnT,在AMI发病时,更早被释放于血液中,因此,cTnI可谓目前诊断AMI最好的心肌损伤标志物之一。

[0012] 现有技术中多用放射免疫法、酶联免疫吸附法、化学发光法及胶体金免疫层析法等测定cTnI。但放射免疫法和酶联免疫吸附法操作复杂,检测耗时长;化学发光法对技术要求高,不易在临床实验室中进行常规开展。胶体金免疫层析法虽然具有标本用量少,简便快速,便宜的优势,然而当遇到某些样品中抗原或抗体含量极低时,胶体金的颜色将很浅,很难用肉眼来判断结果,容易出现误判,灵敏度较低。而普通的荧光免疫层析方法又存在无法定量偶联抗体、对抗体活性有影响等缺陷。因此基于上述,本发明的发明人还将本发明所述

荧光融合蛋白应用到cTnI诊断中,从而实现cTnI精确定量检测。

发明内容

[0013] 在阅读了优选实施方案和所附权利要求的详细描述后,本发明的这些和其他目的、优点和用途将对本领域技术人员显示出来。本发明旨在提供一种精确荧光定量检测方法,特别涉及一种利用荧光融合蛋白的精确定量检测方法,还涉及一种荧光融合蛋白,以及一种精确荧光定量检测试剂条、试剂盒及其制备方法。

[0014] 申请人人意料的发现,利用抗体结合蛋白如(Protein A/G)在抗体Fc段结合2个抗体分子,能定量、定向固定抗体;同时抗体结合蛋白如(Protein A/G)上预先通过基因工程技术融合红色荧光蛋白。该方法能定量标记抗体,且在一般缓冲液中反应;红色荧光在血液自发光中背景低;由于蛋白分子小,在横向免疫扩散中穿透速度快,反应时间一般5-8分钟就可以结束,减少长反应时间中抗原在结合垫中沉积效应。

[0015] 因此,本发明提供了一种精确荧光定量检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0016] a) 取血液,混入磷酸盐缓冲液后加到试纸条的加样垫上,所述试纸条包含有cTnI单克隆抗体荧光蛋白复合物,所述荧光融合蛋白为荧光蛋白-ProteinG融合蛋白或荧光蛋白-ProteinA融合蛋白,所述的复合物为荧光融合蛋白和抗体按1:2摩尔比制备而成;

[0017] b) 将试纸条放入免疫荧光定量分析仪中,定量得出被测物质的浓度;

[0018] c) 依据参考值判定阴阳性。

[0019] 在本发明的一个实施方式中,所述的精确荧光定量检测方法包括以下步骤:

[0020] a) 用采血管10ul血液,混入90ul磷酸盐缓冲液后加到试纸条的加样垫上,所述试纸条包含有cTnI单克隆抗体荧光蛋白复合物,所述荧光融合蛋白为荧光蛋白-ProteinG融合蛋白或荧光蛋白-ProteinA融合蛋白,所述的复合物为荧光融合蛋白和抗体按1:2摩尔比制备而成;

[0021] b) 将试纸条放入免疫荧光定量分析仪中,免疫荧光定量分析仪对光学信号进行测量和分析处理,5-8分钟后读取数据,定量得出被测物质的浓度;

[0022] c) 据已知荧光蛋白数量的光学信号值计算血液中抗体结合的抗原量。

[0023] 优选的,所述荧光融合蛋白为荧光蛋白-proteinG融合蛋白或荧光蛋白-proteinA融合蛋白。进一步地,所述荧光融合蛋白为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的蛋白。优选的,所述荧光蛋白为红色荧光蛋白或过渡金属(如Eu²⁺标记)的时间分辨荧光蛋白。

[0024] 本发明还涉及一种荧光融合蛋白,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。进一步地涉及编码所述荧光融合蛋白的DNA、载体以及重组菌。

[0025] 进一步地,本发明还涉及一种精确荧光定量检测试剂条,以及包含所述试剂条的或试剂盒。所述试剂条包含硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板、吸水垫、样品垫、荧光结合垫,所述结合垫中包含抗体-荧光融合蛋白复合物。所述荧光融合蛋白为荧光蛋白-proteinG融合蛋白或荧光蛋白-proteinA融合蛋白。进一步地,所述荧光融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。优选的,所述荧光蛋白为红色荧光蛋白或过渡金属(如Eu²⁺标记)的时间分辨荧光蛋白。

[0026] 优选地,所述荧光融合蛋白和抗体按固定摩尔比,优选为按照1:2摩尔比混合后,通过分子筛纯化形成抗体-荧光蛋白复合物。

[0027] 优选地,所述硝酸纤维素膜为切成Y型细条。

[0028] 进一步地,所述荧光标记物还可以是荧光微球,荧光分子,过渡元素等。

[0029] 此外,本申请还涉及一种含荧光融合蛋白的试纸条的制备方法,具体方法如下:

[0030] 1) 硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板的制备:将硝酸纤维素膜切成Y型细条,贴在PVC底板上,将鼠抗人单抗在硝酸纤维素膜上划线得到检测线;将兔抗鼠在硝酸纤维素膜上划线得到质控线,然后将硝酸纤维素膜-PVC底板置于干燥箱干燥;

[0031] 2) 将荧光融合蛋白和抗体1:2摩尔比混合后,通过分子筛纯化得到抗体-荧光蛋白复合物,保存备用;

[0032] 3) 结合垫的制备:将结合垫切成细条,将鼠抗人cTNI单克隆抗体荧光蛋白复合物按照2:1混合,均匀铺在结合垫上,放入烘箱烤干;

[0033] 4) 样品垫的制备:将玻璃纤维膜切成细条;

[0034] 5) 吸收垫的制备:将吸水纸切成细条;

[0035] 6) 组装:将上述吸水垫、样品垫、荧光结合垫依次贴在PVC底板上,切成合适形状的试剂条。

[0036] 在本发明一个优选的实施方式中,所述的含荧光融合蛋白的试纸条的制备方法,具体方法如下:

[0037] 1) 硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板的制备:将硝酸纤维素膜切成Y型细条(40-60) mm × (2-4) mm,贴在PVC底板上。将鼠抗人单抗在硝酸纤维素膜上划线得到检测线;将兔抗鼠在硝酸纤维素膜上划线得到质控线。然后将硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板置于干燥箱干燥;

[0038] 2) 将荧光融合蛋白和抗体1:2摩尔比混合后,通过分子筛纯化得到抗体-荧光蛋白复合物。保存备用;

[0039] 3) 结合垫的制备:将结合垫切成(40-60) mm × (6-12) mm细条,将鼠抗人cTNI单克隆抗体-荧光蛋白复合物按照2:1混合,均匀铺在结合垫上,放入烘箱烤干;

[0040] 4) 样品垫的制备:将玻璃纤维膜切成(6-12) mm × (6-12) mm细条;

[0041] 5) 吸收垫的制备:将吸水纸切成(3-6) mm × (6-12) mm细条;

[0042] 6) 组装:将上述吸水垫、样品垫、荧光结合垫依次贴在PVC底板上,将贴好的中间物,用激光切割机切成合适形状的试剂条。

[0043] 基于上述,本发明利用荧光蛋白融合抗体结合蛋白,能定量标记抗体,且不影响抗体结合的空间位阻,增加了检测灵敏度,减少反应时间,减少成本。此外,本发明的试剂条采用Y型结构,加快流速,减少反应时间,采集荧光利用CMOS叠加和MPPC单光子技术,增加灵敏度。

附图说明

[0044] 图1表示本发明荧光定量检测试剂条俯视图,其中1为样品垫,2为吸收垫,3为结合垫。

[0045] 图2表示本发明荧光定量检测试剂条侧视图,其中1为样品垫,2为吸收垫,3为结合垫。

[0046] 图3表示本发明的荧光检测方法与普通荧光检测方法曲线比较。

[0047] 图4表示本发明的荧光检测方法与普通荧光检测方法曲线极限值比较。

具体实施方式

[0048] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0049] 实施例1荧光融合蛋白的制备

[0050] 1) 通过载体序列扩增红色荧光蛋白基因,同时扩增抗体结合蛋白基因,扩增序列通过平末端连接,然后用PCR扩增融合蛋白基因,引物序列、反应体系以及扩增体系分别见表1和表2。

[0051] 表1引物序列

[0052]

红色荧光蛋白基因	正向序列: GTGAGCAAGGGCGAGGAGGA (SEQ ID NO: 2) 反向序列: CTTGTACAGCTCGTCCATGC (SEQ ID NO: 3)
抗体结合蛋白基因	正向序列: GAAAAACCAGAAGTGATCGATGCGT (SEQ ID NO: 4) 反向序列: GTCTTCTTTACGTTTTGAAGCGACC (SEQ ID NO: 5)
融合蛋白	正向序列: CGGGATCC GAAAAACCAGAAGTG (SEQ ID NO: 6) 反向序列: CCGCTCGAG CTTGTACAGCTCGTCC (SEQ ID NO: 7)

[0053] 表2反应体系以及扩增程序

[0054]

反应体系	扩增程序
1μL 合成基因模板 1μL 正向引物 1μL 反向引物 8μL dNTP 模板 5μL 10×LA taq buffer 1μL LA taq 34μL 水	第一步 95°C 3 分钟 第二步 95°C 30 秒 第三步 55°C 30 秒 第四步 72°C 2 分钟 第二步到第四步 35 个循环 第五步 72°C 5 分钟

[0055] 2) 通过基因工程手段,把SEQ ID NO:1装入表达载体,表达荧光蛋白-protein G融合蛋白。把基因序列装入pet-28a表达载体后,转化入BL21 (DE3) 菌,用IPTG诱导表达,具体步骤如下:

[0056] 插入PGEM-Teasy载体,连接体系:PCR产物与PGEM-Teasy连接:PCR产物15μL,PGEM-

Teasy 0.5μL, T4连接酶2μL, 连接缓冲液2μL, 4℃连接24-48小时。

[0057] 连接产物取出10μL, 加入100μL感受态细胞, 静置30-60分钟, 放入42℃水浴中45-90秒后立刻置冰上2分钟, 然后加入800μL LB培养基, 37℃摇动1-2小时。取出100μL涂于含有80μg/mL X-gal和100μg/mL氨苄青霉素的LB琼脂糖培养平板。

[0058] 挑取白斑后在1mL含有100μg/mL氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇动4-12小时, 通过测序验证插入片段序列。选取完全一致序列的克隆, 然后在5mL含有100μg/mL氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇动24小时。

[0059] 通过康为抽提质粒试剂盒抽提质粒, 获得5μg质粒后进行酶切。用内切酶BamHI 2μL、XhoI 2μL、Smartcut buffer 5μL、质粒和水40μL、37℃水浴4-12小时。通过琼脂糖电泳后切取目的条带, 通过胶回收试剂盒提取目的DNA片段。

[0060] 连接PET28a质粒: 预切PET28a质粒1μL, 融合蛋白DNA15μL, T4连接酶2μL连接缓冲液2μL, 4℃连接24-48小时。

[0061] 连接产物取出10μL, 加入100μL感受态细胞, 静置30-60分钟, 放入42℃水浴中45-90秒后立刻置冰上2分钟, 然后加入800μL LB培养基, 37℃摇动1-4小时。取出100μL涂于含有卡那霉素的LB琼脂糖培养平板。

[0062] 挑取白斑后在1mL含有50μg/mL卡那霉素的LB培养基中37℃摇动4-12小时, 通过测序验证插入片段序列。选取完全一致序列的克隆, 然后在5mL含有50μg/mL卡那霉素的LB培养基中37℃摇动24-48小时。

[0063] 通过康为抽提质粒试剂盒抽提质粒, 获得5ng-1μg质粒后加入100μL DE3感受态细胞, 静置30分钟, 放入42℃水浴中45-90秒后立刻置冰上2分钟, 然后加入800μL LB培养基, 37℃摇动1-4小时。取出100μL涂于含有50μg/mL卡那霉素的LB琼脂糖培养平板。

[0064] 挑取白斑后在1mL含有50μg/mL卡那霉素的LB培养基中37℃摇动4-12小时。然后加入500mL含有50μg/mL卡那霉素的LB培养基, 待菌液浓度达到OD₆₀₀=0.8时, 加入IPTG试剂诱导。37℃摇动8-12小时。离心收获菌体。

[0065] 涉及的裂解缓冲液、清洗液、洗脱液见表3

[0066] 表3裂解缓冲液、清洗液、洗脱液

[0067]

配裂解缓冲液	清洗液	洗脱液
0.25mM Tris.HCl pH8.0-8.5	0.25mM Tris.HCl pH8.0-8.5	0.25mM Tris.HCl pH8.0-8.5
0.5M NaCl	0.5M NaCl 10mM Imidazol	0.5M NaCl
5%(w/v) glycerol	0.25% Tween-20	500mM Imidazol
10mM Imidazol		0.25% Tween-20
100mg(1mg/ml)lysozyme		
0.25% Tween-20		

[0068] 3) 用GE Healthcare Ni²⁺Sepharose 4B纯化, 随后用Sephacryl S-200纯化43kD融

合蛋白,蛋白为深红色,其纯度可达95%以上。具体步骤如下:

[0069] 5g湿菌体中加入50mL的裂解缓冲液,冰浴并用超声破碎,4℃12,000g离心30分钟,收集上清,然后使用GE Healthcare的蛋白纯化填料Ni-sepharose琼脂纯化融合蛋白,4℃过柱平衡过夜,用清洗液洗Ni-sepharose琼脂,清洗20mL后加入洗脱液洗脱蛋白。

[0070] 所获纯化蛋白用半透膜透析,然后用PEG8000稀释浓缩样品(10倍浓缩)。融合蛋白和抗体按固定比例混合,4℃混匀过夜。然后样品用分子筛分离,取最先流出组份。测量浓度后备用。

[0071] 实施例2荧光定量检测试剂条或试剂盒的制备

[0072] 1) 硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板的制备:将硝酸纤维素膜切成Y型细条52mm×3mm,贴在PVC底板上。将鼠抗人单抗在硝酸纤维素膜上划线得到检测线;将兔抗鼠在硝酸纤维素膜上划线得到质控线。然后将硝酸纤维素膜(NC膜)-PVC底板置于干燥箱干燥。

[0073] 2) 将荧光融合蛋白和抗体1:2摩尔比混合后,通过分子筛纯化得到抗体-荧光蛋白复合物,保存备用。

[0074] 3) 结合垫的制备:将结合垫切成52mm×10mm细条,将鼠抗人cTnI单克隆抗体-荧光蛋白复合物、按照2:1比例混合后的纯化液,均匀铺在结合垫上,放入烘箱烤干。

[0075] 4) 样品垫:将玻璃纤维膜切成10mm×10mm细条。

[0076] 5) 吸收垫:将吸水纸切成5mm×10mm细条。

[0077] 6) 组装:将上述吸水垫、样品垫、荧光结合垫依次贴在PVC底板上,将贴好的中间物,用激光切割机切成合适形状的试剂条,如图1和图2所示,1为样品垫,2为吸收垫,3为结合垫。

[0078] 实施例3试纸条或试剂盒的检测标准曲线的建立以及检测效果评价

[0079] 3.1标准品建立标准曲线

[0080] 将购买的cTnI荧光蛋白-ProteinG融合蛋白用50%的小牛血清缓冲液配制0,0.5,2.5,5,10,25,50,100ng/mL八个浓度。在测试区加入100μL样品后,等待5分钟,用仪器读取荧光值。建立标准曲线为: $Y=f(x)$ 。Y:样品浓度;x:荧光信号值。每批的每个样品重复测试5次记录其相应的荧光信号值。荧光值由机器读出。待测样品浓度通过 $Y' = (M_{cTnI}/M_{融合蛋白}) * \delta * Y$ 计算得到。M表示分子量; δ 为荧光融合蛋白和抗体的稀释比例。

[0081] 3.2试剂条检测速度评价

[0082] 稀释cTnI标准品(芬兰Hytest公司),用不含有cTnI的标准血清(芬兰Hytest公司),制成0.5ng/L的样品。取十个试剂条加入测试样品0.5ng/mL后在3分钟,5分钟,10分钟和其他商业化试剂条15分钟后通过荧光值判定数值,结果见表4。

[0083] 表4试纸条检测速度验证

[0084]

序号	3 分钟	6 分钟	9 分钟	15 分钟 (普通)
1	0.264	0.471	0.492	0.507
2	0.275	0.486	0.502	0.506
3	0.281	0.495	0.521	0.519
4	0.282	0.472	0.519	0.520
5	0.306	0.503	0.524	0.522
6	0.290	0.476	0.510	0.514
7	0.289	0.497	0.486	0.505

[0085]

8	0.267	0.477	0.479	0.490
9	0.290	0.499	0.505	0.502
10	0.279	0.506	0.521	0.520
平均	0.282	0.488	0.505	0.515

[0086] 结果表明在5分钟时就可以得到阳性数据,9分钟达到稳定,比普通商业化试剂的15分钟要节省40%的时间。

[0087] 3.3试剂条检测灵敏度

[0088] 每批的每个样品重复测试20次记录其相应的荧光信号值。

[0089] 取标准cTnI样品(芬兰Hytest公司)试剂0,0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1.0,1.5,2.0,3.0ng/mL点样,然后读取荧光值,同时比较普通荧光检测试剂条,结果见图3,从图中可以看出融合蛋白荧光曲线高于普通荧光微球,显示较高的灵敏度。通过对极限值判读,见图4,可以在0.01ng/mL读出阳性。灵敏度检测发现在0.01ng/mL的cTNI即可检测到,上述灵敏度对心衰或心肌梗塞诊断有典型的临床意义(图3)。

[0090] 实施例4试纸条或试剂盒的使用方法以及临床评估

[0091] 1、用采血管吸取10uL血液,混入90uL磷酸缓冲液后加到试纸条的加样垫上;

[0092] 2、将试纸条放入免疫荧光定量分析仪中,8分钟后读取数据;

[0093] 3、采用免疫荧光定量分析仪对光学信号进行测量和分析处理,定量得出被测物质的浓度;

[0094] 4、依据参考值判定阴阳性。

[0095] 荧光采集方法:用395nm激光通过光纤在膜表面形成均匀光斑,再成像组件CMOS相机用600nm滤镜过滤,每隔20ms采集一次,每次曝光后图像叠加优化。共叠加20次。或用光子计数器MPPC直接读取数值。

[0096] 本发明的融合荧光蛋白方法检测心梗患者阳性率与一般荧光微球法检测阳性率进行比较,结果见下表5。可见,本发明的融合荧光蛋白方法阳性检出率高于一般荧光微球法检测阳性率,能够很好地取代一般荧光微球法检测方法以及试剂条。

[0097] 表5本发明的融合荧光蛋白方法与荧光微球方法比较

样品	样本数	融合荧光蛋白		荧光微球	
		阳性	阳性率	阳性	阳性率
患者	193	187	96. 8%	179	92. 7%
正常	187	0	0	0	0

[0099] 基于上述原理,制备其他疾病标志蛋白的荧光蛋白-proteinG/proteinA融合蛋白试剂条或试剂盒,检测结果如准确度、灵敏度均优于所采用的现有市售酶联免疫或荧光检测试剂盒,因此,利用本发明提供的荧光融合蛋白检测试剂盒能够提供更为准确有效的检测相关信息。

[0100] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式的部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

SEQUENCE LISTING

<110> 程秋萍、王云志

<120> 一种精确荧光定量检测方法

<130> 2017

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 341

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

```

Met Val Ser Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met
1           5           10           15
Glu Gly Thr Val Asn Asn His His Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu
          20           25           30
Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys Ala Val Glu
        35           40           45
Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Met
        50           55           60
Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe
65           70           75           80
Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Val Thr Thr
          85           90           95
Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr Ser Leu Gln
        100          105          110
Asp Gly Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val Asn Phe Pro
        115          120          125
Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Gly Trp Glu Ala Ser
        130          135          140
Thr Glu Thr Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly Arg Ala Asp
145          150          155          160
Met Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Gly His Leu Ile Cys Asn Leu Lys
          165          170          175
Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly
          180          185          190
Val Tyr Tyr Val Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asp Lys
          195          200          205
Glu Thr Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Val Ala Arg Tyr Cys Asp

```

210	215	220
Leu Pro Ser Lys Leu Gly His Arg Gly Gly Gly Leu Lys Gly Glu		
225	230	235
Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys		240
	245	250
Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp		255
	260	265
Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala		270
	275	280
Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly		285
	290	295
Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr		300
305	310	315
Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly		320
	325	330
Glu Trp Thr Tyr Asp		335
	340	

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gtgagcaagg gcgaggagga 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cttgtacagc tcgtccatgc 20

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gaaaaaccag aagtgatcga tgcgt 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5
gtcttcttta cgttttgaag cgacc 25
<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 6
cgggatccga aaaaccagaa gtg 23
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
ccgctcgagc ttgtacagct cgtcc 25

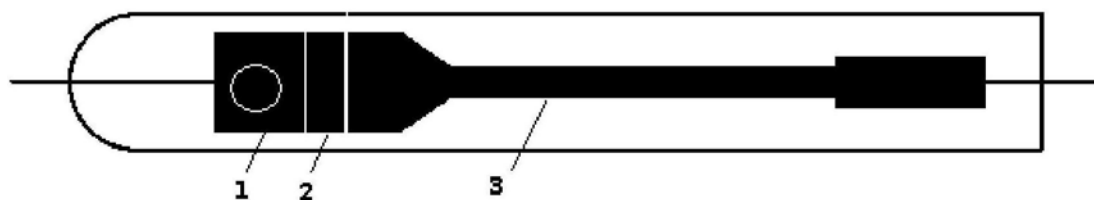


图1

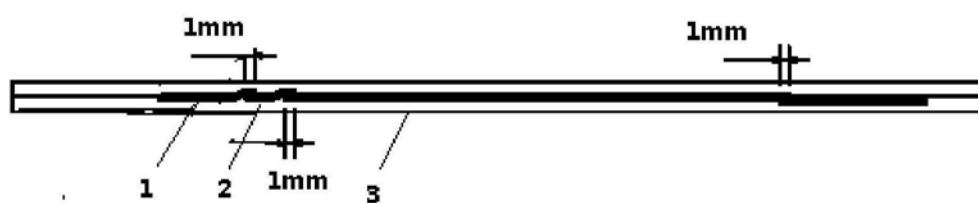


图2

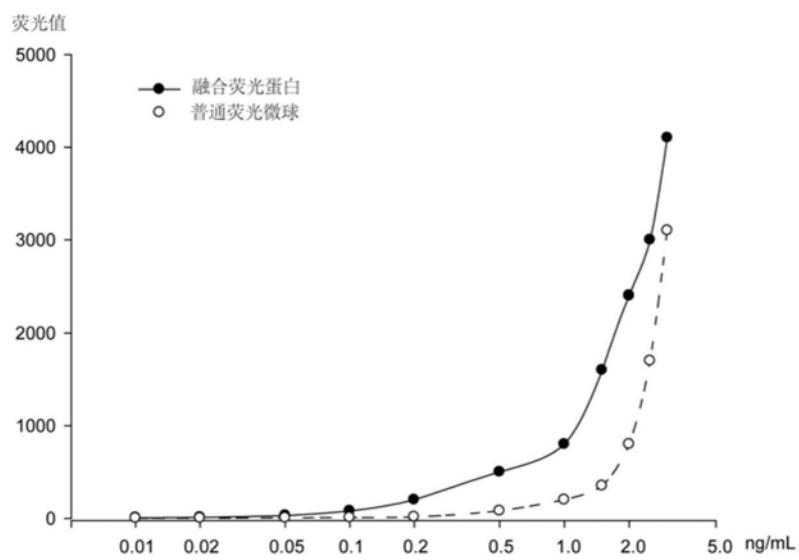


图3

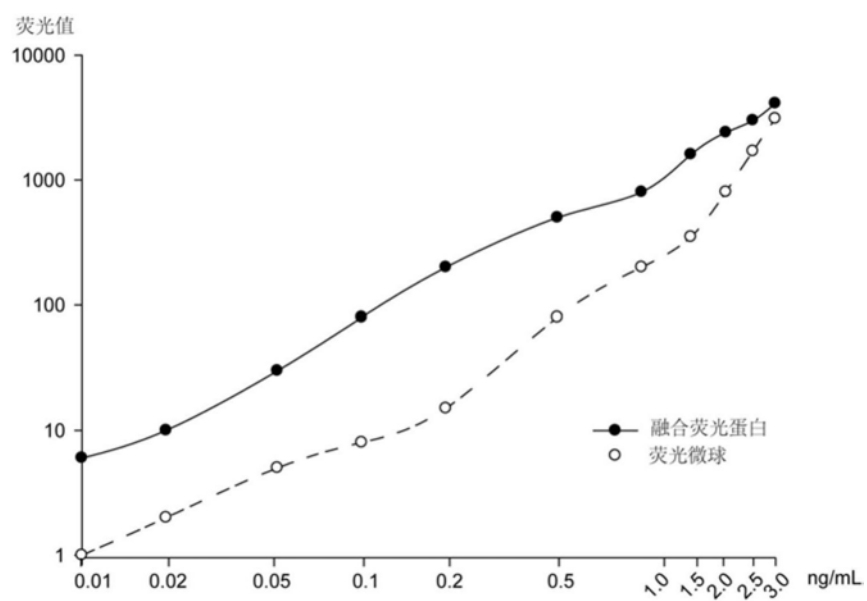


图4

专利名称(译)	一种精确荧光定量检测方法		
公开(公告)号	CN107144686A	公开(公告)日	2017-09-08
申请号	CN201710236713.1	申请日	2017-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	程秋萍 王云志		
申请(专利权)人(译)	程秋萍 王云志		
当前申请(专利权)人(译)	程秋萍 王云志		
[标]发明人	程秋萍 王云志		
发明人	程秋萍 王云志		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/536		
其他公开文献	CN107144686B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种精确荧光定量检测方法，特别涉及一种利用荧光融合蛋白的精确定量检测方法，并且提供了一种荧光融合蛋白，以及精确荧光定量检测试剂条、试剂盒及其制备方法。使用本发明的方法以及试剂条，能够增加检测灵敏度，减少反应时间，减少成本。

