



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738631 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201910051438.5

(22)申请日 2019.01.21

(71)申请人 潍坊医学院

地址 261000 山东省潍坊市奎文区胜利东
街4948号

(72)发明人 崔齐 刘志军 王文涛 黄亦巍
张曼 李宏政 王金冬

(74)专利代理机构 北京君泊知识产权代理有限
公司 11496

代理人 王程远

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

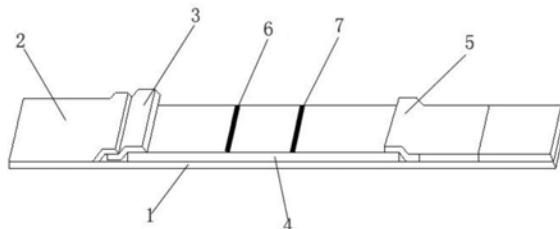
权利要求书2页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备
方法

(57)摘要

本发明提供了一种人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的其制备方法,具体步骤如下:(1)先制造试纸承载板和试纸;试纸由滴样垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸样垫组成;(2)将滴样垫粘贴于试纸承载板的一端,滴样垫的一端粘接胶体金结合垫,胶体金结合垫的另一端粘接硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的另一端粘接吸样垫;硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测T线和质控C线,检测T线为抗IgM μ 链单克隆抗体,质控C线为人巨细胞病毒pp150-gB-pp65融合蛋白IgM抗体;胶体金结合垫内含有标记人巨细胞病毒特异性的抗原pp150-gB-pp65融合蛋白。本发明要解决的技术问题是提供一种检测率更高,效果更好,所需时间短、费用低的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法。



A

CN 109738631

CN

1. 一种人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:(1)先制造试纸承载板和试纸;所述的试纸承载板为长条状PVC板,所述的试纸由滴样垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸样垫组成;所述的滴样垫由玻璃纤维膜或无纺布制成,所述的吸样垫由吸水滤纸制成;(2)将所述的滴样垫粘贴于所述的试纸承载板的一端,所述的滴样垫的一端粘接所述的胶体金结合垫,所述的胶体金结合垫的另一端粘接所述的硝酸纤维素膜,所述的硝酸纤维素膜的另一端粘接所述的吸样垫;所述的硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测T线和质控C线,所述的检测T线为抗IgM μ 链单克隆抗体,所述的质控C线为人巨细胞病毒pp150-gB-pp65融合蛋白IgM抗体;所述的胶体金结合垫内含有标记人巨细胞病毒特异性的抗原pp150-gB-pp65融合蛋白。

2. 根据权利要求1所述的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法,其特征在于:可用pp28(UL99)或gH(gpUL75)替代pp150-gB-pp65融合蛋白中的一种。

3. 根据权利要求2所述的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法,其特征在于:可在pp150-gB-pp65融合蛋白中增加pp28(UL99)和gH(gpUL75)的一种或两种。

4. 根据权利要求3所述的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法,其特征在于:所述的试纸的制备方法为以下步骤:

(1) 重组基因构建及融合蛋白分离提取,①聚合酶链反应引物,根据目的片段的DNA序列,设计三对引物(P1,P2),(P3,P4)和(P5,P6),P1和P2用于扩增pp150基因片段,P3和P4用于扩增gB基因片段,P5和P6用于扩增pp65基因片段,P1和P6引物带有NdeI和XhoI酶切位点,P2和P3、P4和P5引物的顺序互补,P2、P3共同对应于pp150上述片段的3'末端和gB上述片段的5'末端序列,P4、P5共同对应于gB上述片段的3'末端和pp65上述片段的5'末端序列;

②目的基因的克隆,取病毒培养液1 μ l,加入10×Pfu高保真酶缓冲液5 μ l,浓度2mmol/L dNTPS 5 μ l,P1、P2引物各2 μ l,Pfu高保真酶0.5 μ l,加灭菌双蒸水至50 μ l并充分混匀;反应条件为变性94℃30s,退火65℃30s,复性72℃60s,进行30个循环,再72℃延伸10min;P3、P4和P5、P6引物克隆方法同上;然后以第一轮PCR扩增得到的pp150片段、gB(UL55)为模板,加入引物P1和P4,扩增pp150-gB片段,反应条件为pp150片段、gB分别为1 μ l,加入10×Pfu高保真酶缓冲液5 μ l,浓度2mmol/L的dNTPS5 μ l,P1、P4引物各2 μ l,Pfu高保真酶0.5 μ l,加灭菌双蒸水至50 μ l,充分混匀,反应条件为变性94℃30s,退火65℃30s,复性72℃90s,进行30个循环,再72℃延伸10min,得到串联的目的基因重组片段pp150-gB;之后以第一、二轮PCR扩增得到的pp150-gB片段、pp65片段为模板,加入引物P1和P6,扩增pp150-gB-pp65片段,反应条件同上,得到串联的目的基因重组片段pp150-gB-pp65;

③pET28a-pp150-gB-pp65重组质粒的构建与鉴定,将纯化的PCR产物pp150-gB-pp65用NdeI和XhoI酶切,并与经过同样处理的pET28a原核表达载体连接,转化到大肠杆菌TOP10中,抽取质粒DNA,进行酶切鉴定,并转化到大肠杆菌BL21中;

④pET28a-pp150-gB-pp65融合蛋白的诱导表达,将含pET28a-pp150-gB-pp65重组质粒的BL21菌液以1:100的比例加入到L.B培养液中,37℃振荡培养2小时后加入IPTG至终浓度为1mmol/L,37℃诱导3小时后离心收集菌体,重悬于2X样品缓冲液中,100℃煮沸,进行SDS-PAGE电泳分析;

⑤表达蛋白的纯化,取诱导后的菌体培养液离心收集菌体,经超声破碎后利用Ni蛋白纯化柱进行纯化,分别收集洗脱峰蛋白,并进行SDS-PAGE凝胶电泳分析;

⑥重组蛋白的抗原性分析,将重组的菌体蛋白经SDS-PAGE凝胶电泳后,切胶进行蛋白质电转移,将目的蛋白电转至PVDF膜上,用含质量浓度50g/L脱脂奶的PBS封闭PVDF膜,4℃过夜,PBS洗膜3次,以封闭液1:20稀释阳性血清,与PVDF膜于37℃共同孵育2h后,用PBS洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG,37℃孵育1h,PBS洗膜后TMB显色,至目的条带显色清晰时终止反应;

(2)胶体金结合垫的制造,以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为30-50nm的胶体金溶液,制备完成后取100ml胶体金液放在烧杯内,用0.2MK2CO3调至pH8.0,按100ml胶体金溶液加入0.5-2mg人巨细胞病毒pp150-gB-pp65抗原,室温搅拌2小时,加入1%牛血清白蛋白BSA,1%聚乙二醇PEG20000封闭20min,12000r/m离心30分钟,弃上清,用胶体金工作液复溶至100ml,按1ml溶液铺20cm²的比例均匀地铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置干燥间,温度20-25℃,湿度小于30%,干燥2-5小时,制成胶体金结合垫;

(3)硝酸纤维素膜的检测T线和质控C线制造,将抗IgM μ 链McAb用50mmol/L Tris-HCl溶液(pH 7.8)稀释至4 μ g/ml,用喷膜仪在硝酸纤维素膜下部以1-1.5 μ l/cm的参数进行划线,包被检测T线,同时在硝酸纤维素膜上部包被pp150-gB-pp65融合蛋白IgM抗体作为质控C线,划线后将硝酸纤维素膜在干燥温度20-25℃,湿度小于30%,干燥2-5小时;

(4)试纸的装配,在干燥室内,温度20-25℃,湿度小于40%,取试纸承载板,将已包被的硝酸纤维素膜放置在试纸承载板的中部粘贴,在硝酸纤维素膜的检测T线侧搭接胶体金结合垫的1/3处粘贴,在胶体金结合垫另一侧搭接粘贴滴样垫,搭胶体金结合垫的1/5;在硝酸纤维素膜质控C线一侧搭接吸样垫,搭吸样垫的1/10;最后形成试纸。

一种人巨细胞病毒 IgM 抗体检测试纸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试纸的制备方法,尤其是人巨细胞病毒 IgM 抗体检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 临床实践中的人巨细胞病毒检测除采用医院采血加设备分析的方法外,一般使用单克隆抗体制作的人巨细胞病毒 IgM 抗原检测试纸,但是该方法所用蛋白特异性较低,因此检出率低,所用时间长,效果较差,不能用于准确的诊断。

发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是提供一种检测率更高,效果更好,所需时间短、费用低的人巨细胞病毒 IgM 抗体检测试纸的制备方法。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供了人巨细胞病毒 IgM 抗体检测试纸的制备方法,具体步骤如下:(1)先制造试纸承载板和试纸;所述的试纸承载板为长条状PVC板,所述的试纸由滴样垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸样垫组成;所述的滴样垫由玻璃纤维膜或无纺布制成,所述的吸样垫由吸水滤纸制成;(2)将所述的滴样垫粘贴于所述的试纸承载板的一端,所述的滴样垫的一端粘接所述的胶体金结合垫,所述的胶体金结合垫的另一端粘接所述的硝酸纤维素膜,所述的硝酸纤维素膜的另一端连接所述的吸样垫;所述的硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测T线和质控C线,所述的检测T线为抗 IgM μ 链单克隆抗体,所述的质控C线为人巨细胞病毒 pp150-gB-pp65 融合蛋白 IgM 抗体;所述的胶体金结合垫内含有标记人巨细胞病毒特异性的抗原 pp150-gB-pp65 融合蛋白。

[0005] 本方案所选蛋白均为特异性强、结合力高的蛋白,预计结合率可达95%以上,若由于某些不可知原因导致结合率未达标,则可通过更换蛋白来解决,可用 pp28 (UL99) 或 gH (gpUL75) 替代 pp150-gB-pp65 融合蛋白中的一种;可在 pp150-gB-pp65 融合蛋白中增加 pp28 (UL99) 和 gH (gpUL75) 的一种或两种。

[0006] 优选的,作为进一步的优化改进,所述的试纸的制备方法为以下步骤:

[0007] (1) 重组基因构建及融合蛋白分离提取,①聚合酶链反应引物,根据目的片段的 DNA 序列,设计三对引物 (P1,P2), (P3,P4) 和 (P5,P6), P1 和 P2 用于扩增 pp150 基因片段, P3 和 P4 用于扩增 gB 基因片段, P5 和 P6 用于扩增 pp65 基因片段, P1 和 P6 引物带有 Nde I 和 Xho I 酶切位点, P2 和 P3、P4 和 P5 引物的顺序互补, P2、P3 共同对应于 pp150 上述片段的 3' 末端和 gB 上述片段的 5' 末端序列, P4、P5 共同对应于 gB 上述片段的 3' 末端和 pp65 上述片段的 5' 末端序列;②目的基因的克隆,取病毒培养液 1 μ l, 加入 10 \times Pfu 高保真酶缓冲液 5 μ l, 浓度 2mmol/L dNTPS 5 μ l, P1、P2 引物各 2 μ l, Pfu 高保真酶 0.5 μ l, 加灭菌双蒸水至 50 μ l 并充分混匀;反应条件为变性 94°C 30s, 退火 65°C 30s, 复性 72°C 60s, 进行 30 个循环, 再 72°C 延伸 10min; P3、P4 和 P5、P6 引物克隆方法同上;然后以第一轮 PCR 扩增得到的 pp150 片段、gB (UL55) 为模板, 加入引物 P1 和 P4, 扩增 pp150-gB 片段, 反应条件为 pp150 片段、gB 分别为 1 μ l, 加入 10 \times Pfu 高保真

酶缓冲液5μl,浓度2mmol/L的dNTPS5μl,P1、P4引物各2μl,Pfu高保真酶0.5μl,加灭菌双蒸水至50μl,充分混匀,反应条件为变性94℃30s,退火65℃30s,复性72℃90s,进行30个循环,再72℃延伸10min,得到串联的目的基因重组片段pp150-gB;之后以第一、二轮PCR扩增得到的pp150-gB片段、pp65片段为模板,加入引物P1和P6,扩增pp150-gB-pp65片段,反应条件同上,得到串联的目的基因重组片段pp150-gB-pp65;

[0008] ③pET28a-pp150-gB-pp65重组质粒的构建与鉴定,将纯化的PCR产物pp150-gB-pp65用NdeI和XhoI酶切,并与经过同样处理的pET28a原核表达载体连接,转化到大肠杆菌TOP10中,抽取质粒DNA,进行酶切鉴定,并转化到大肠杆菌BL21中;

[0009] ④pET28a-pp150-gB-pp65融合蛋白的诱导表达,将pET28a-pp150-gB-pp65重组质粒的BL21菌液以1:100的比例加入到L.B培养液中,37℃振荡培养2小时后加入IPTG至终浓度为1mmol/L,37℃诱导3小时后离心收集菌体,重悬于2X样品缓冲液中,100℃煮沸,进行SDS-PAGE电泳分析;

[0010] ⑤表达蛋白的纯化,取诱导后的菌体培养液离心收集菌体,经超声破碎后利用Ni蛋白纯化柱进行纯化,分别收集洗脱峰蛋白,并进行SDS-PAGE凝胶电泳分析;

[0011] ⑥重组蛋白的抗原性分析,将重组的菌体蛋白经SDS-PAGE凝胶电泳后,切胶进行蛋白质电转移,将目的蛋白电转至PVDF膜上,用含质量浓度50g/L脱脂奶的PBS封闭PVDF膜,4℃过夜,PBS洗膜3次,以封闭液1:20稀释阳性血清,与PVDF膜于37℃共同孵育2h后,用PBS洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG,37℃孵育1h,PBS洗膜后TMB显色,至目的条带显色清晰时终止反应;

[0012] (2)胶体金结合垫的制造,以氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为30-50nm的胶体金溶液,制备完成后取100ml胶体金液放在烧杯内,用0.2MK2C03调至pH8.0,按100ml胶体金溶液加入0.5-2mg人巨细胞病毒pp150-gB-pp65抗原,室温搅拌2小时,加入1%牛血清白蛋白BSA,1%聚乙二醇PEG20000封闭20min,12000r/m离心30分钟,弃上清,用胶体金工作液复溶至100ml,按1ml溶液铺20cm²的比例均匀地铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置干燥间,温度20-25℃,湿度小于30%,干燥2-5小时,制成胶体金结合垫;

[0013] (3)硝酸纤维素膜的检测T线和质控C线制造,将抗IgM μ 链McAb用50mmol/L Tris-HCl溶液(pH 7.8)稀释至4μg/ml,用喷膜仪在硝酸纤维素膜下部以1-1.5μl/cm的参数进行划线,包被检测T线,同时在硝酸纤维素膜上部包被pp150-gB-pp65融合蛋白IgM抗体作为质控C线,划线后将硝酸纤维素膜在干燥温度20-25℃,湿度小于30%,干燥2-5小时;

[0014] (4)检测试纸的装配,在干燥室内,温度20-25℃,湿度小于40%,取试纸承载板,将已包被的硝酸纤维素膜放置在试纸承载板的中部粘贴,在硝酸纤维素膜的检测T线侧搭接胶体金结合垫的1/3处粘贴,在胶体金结合垫另一侧搭接粘贴滴样垫,搭胶体金结合垫的1/5;在硝酸纤维素膜质控C线一侧搭接吸样垫,搭吸样垫的1/10;最后形成试纸。

[0015] 与现有技术相比,本发明的优点是:本发明所采用的胶体金免疫层析试纸方法较原有方法有更强的放大作用,本发明将金标颗粒标记在pp150-gB-pp65融合蛋白上,人体内HCMVpp150-gB-pp65融合蛋白抗体与pp150-gB-pp65融合蛋白相结合,从而间接地与金标颗粒结合,融合蛋白上的抗原决定簇更多,因此增加了抗体与抗原的结合率,使检测率更高,效果更好。

[0016] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

附图说明

- [0017] 图1是本发明的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的简图。
- [0018] 图2是本发明的重组基因构建及融合蛋白分离简图。
- [0019] 图3是本发明的试纸分解简图。
- [0020] 图4是本发明的试纸检测原理简图。

具体实施方式

[0021] 为使本发明的上述目的、特征和优点能更明显易懂，下文的本发明的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法及其制造方法，将以较佳实施例，配合所附相关附图，作详细说明。

[0022] 在本发明的描述中，需要说明的是，术语“上”、“下”、“竖直”、“水平”、“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系，仅是为了便于描述本发明和简化描述，而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作，因此不能理解为对本发明的限制。

[0023] 本实施例的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法，具体步骤如下：(1)先制造试纸承载板1和试纸；试纸承载板1为长条状PVC板，试纸由滴样垫2、胶体金结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸样垫5组成；滴样垫2由玻璃纤维膜或无纺布制成，吸样垫5由吸水滤纸制成；(2)将滴样垫2粘贴于试纸承载板1的一端，滴样垫2的一端粘接胶体金结合垫3，胶体金结合垫3的另一端粘接硝酸纤维素膜4，硝酸纤维素膜4的另一端粘接吸样垫5；硝酸纤维素膜4包被有相互分离的检测T线6和质控C线7，检测T线6为抗IgM μ 链单克隆抗体，质控C线7为人巨细胞病毒pp150-gB-pp65融合蛋白IgM抗体；胶体金结合垫3内含有标记人巨细胞病毒特异性的抗原pp150-gB-pp65融合蛋白。

[0024] 可用pp28(UL99)和/或gH(gpUL75)替代pp150、gB和pp65中的两种或一种。

[0025] 人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的使用方法：将被检血清或血浆平衡至室温，将检测试纸平放，在样品垫上加入5-20 μ l被检样品，再加入50-100 μ l的样品稀释液，使胶体金溶解并在硝酸纤维素膜上层析，然后用肉眼直接观察10分钟内质控C线、检测T线的出现情况，并判定检测结果。

[0026] 综上所述，本发明将金标颗粒标记在pp150-gB-pp65融合蛋白上，人体内HCMVpp150-gB-pp65融合蛋白抗体与pp150-gB-pp65融合蛋白相结合，从而间接地与金标颗粒结合，融合蛋白上的抗原决定簇更多，因此增加了抗体与抗原的结合率，使检测率更高，效果更好。因此，本发明具有突出的实质性特点和显著的进步。

[0027] 以上所述仅为本发明的优选实施例，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

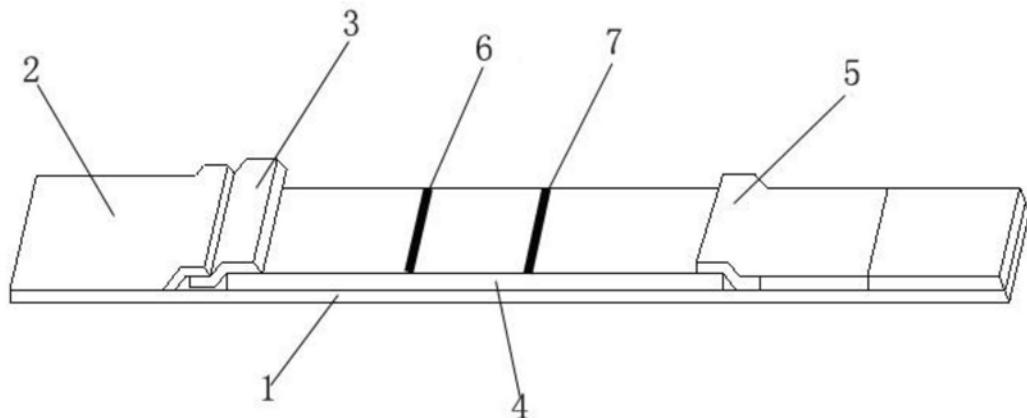


图1

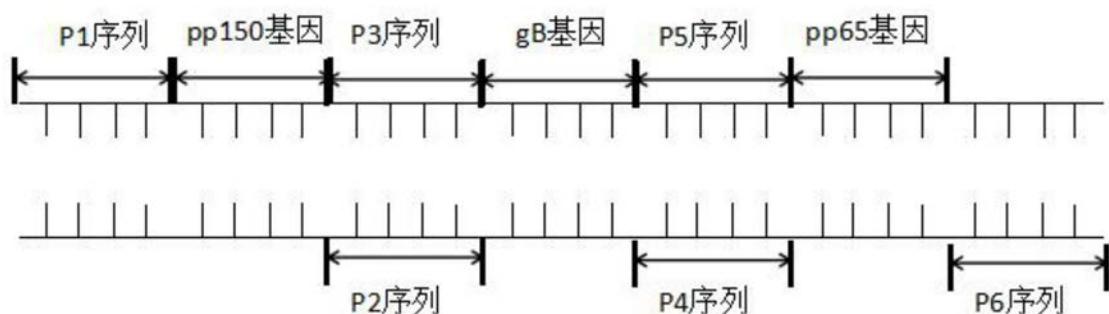


图2

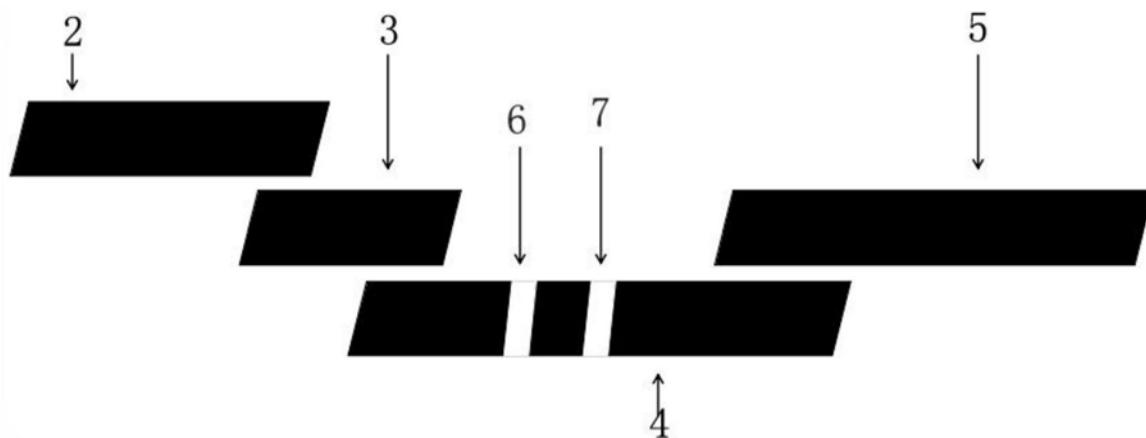


图3

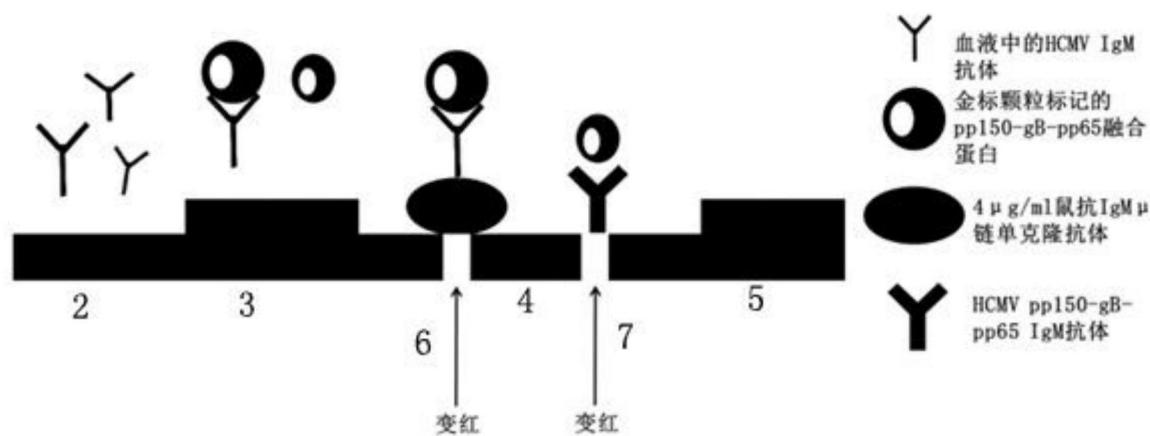


图4

专利名称(译)	一种人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法		
公开(公告)号	CN109738631A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201910051438.5	申请日	2019-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊医学院		
[标]发明人	崔齐 刘志军 王文涛 张曼 李宏政 王金冬		
发明人	崔齐 刘志军 王文涛 黄亦巍 张曼 李宏政 王金冬		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/553 G01N33/558 G01N33/68		
代理人(译)	王程远		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的其制备方法，具体步骤如下：(1)先制造试纸承载板和试纸；试纸由滴样垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸样垫组成；(2)将滴样垫粘贴于试纸承载板的一端，滴样垫的一端粘接胶体金结合垫，胶体金结合垫的另一端粘接硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜的另一端粘接吸样垫；硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测T线和质控C线，检测T线为抗IgMp链单克隆抗体，质控C线为人巨细胞病毒pp150-gB-pp65融合蛋白IgM抗体；胶体金结合垫内含有标记人巨细胞病毒特异性的抗原pp150-gB-pp65融合蛋白。本发明要解决的技术问题是提供一种检测率更高，效果更好，所需时间短、费用低的人巨细胞病毒IgM抗体检测试纸的制备方法。

