



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109021094 A

(43)申请公布日 2018.12.18

(21)申请号 201810864508.4

(22)申请日 2018.08.01

(71)申请人 陕西医药控股医药研究院有限公司

地址 710075 陕西省西安市高新区科技二路69号陕西医药控股医药研究院有限公司

(72)发明人 肖志强 高湘 苏建英

(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200

代理人 范巍

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

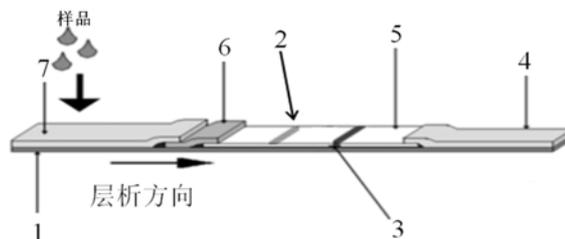
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条。本发明所述的唾液酸人工抗原中,载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;用所述人工抗原免疫动物,得到相应的抗体,可特异性结合人体唾液样本中的唾液酸。本发明建立了由上述抗体、包被抗原制备的胶体金免疫试纸条,用于检测人唾液样本中的唾液酸,快速判定流感易感人群。本发明所述试纸条灵敏度高,特异性强,使用方便,检测结果容易观察区别,适合于临床快速测定和基层大规模应用。



1. 一种唾液酸人工抗原,其特征在于:该人工抗原包括载体蛋白以及与载体蛋白偶联的唾液酸,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白或卵清蛋白,所述人工抗原中唾液酸与牛血清白蛋白的偶联比为9:1,或者唾液酸与卵清蛋白的偶联比为6.5:1。

2. 根据权利要求1所述一种唾液酸人工抗原,其特征在于:所述人工抗原是采用混合酸酐法或碳二亚胺法制成的。

3. 一种如权利要求1所述的唾液酸人工抗原的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

将10~20mg唾液酸、30 μ L三乙胺及30 μ L氯甲酸异丁酯加入10mL PBS缓冲液中后于20~30 $^{\circ}$ C反应30min,得A液;将20mg牛血清白蛋白或卵清蛋白加入1~2mL PBS缓冲液中,得B液;将A液加入B液中后于20~30 $^{\circ}$ C下避光反应24小时,得反应液,将该反应液依次经透析、冷冻干燥,得人工抗原;

或者,将2~20mg唾液酸及5~12mg碳二亚胺盐酸盐加入1~2mL PBS缓冲液中,得A液;将10~20mg牛血清白蛋白或卵清蛋白加入0.4~1mL PBS缓冲液中,得B液;将A液加入B液中后用NaHCO₃调节pH值至6.8,然后于20~30 $^{\circ}$ C下避光反应24小时,得反应液,将该反应液依次经透析、冷冻干燥,得人工抗原。

4. 一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的试纸条,其特征在于:该试纸条包括沿层析方向依次设置的样品垫(7)、胶体金标记垫、检测反应区以及吸水垫(4);所述胶体金标记垫包括胶体金-多抗结合物,所述多抗是利用唾液酸免疫原免疫动物获得的多克隆抗体;所述检测反应区包括检测线(2)和质控线(3),检测线(2)包括唾液酸包被原,唾液酸包被原、唾液酸免疫原分别选自唾液酸人工抗原中的任意一种,质控线(3)包括可以与所述多抗特异结合的二抗,所述人工抗原包括载体蛋白以及与载体蛋白偶联的唾液酸,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白或卵清蛋白,所述人工抗原中唾液酸与牛血清白蛋白的偶联比为9:1,或者唾液酸与卵清蛋白的偶联比为6.5:1。

5. 根据权利要求4所述的试纸条,其特征在于:所述胶体金标记垫还包括用于包被所述胶体金-多抗结合物的硝酸纤维素膜或玻璃纤维膜。

6. 根据权利要求4所述的试纸条,其特征在于:所述检测反应区还包括用于固定所述检测线(2)和质控线(3)的硝酸纤维素膜。

7. 根据权利要求4所述的试纸条,其特征在于:在同一试纸条中选择不同的唾液酸人工抗原作为所述唾液酸免疫原和唾液酸包被原。

8. 一种如权利要求4所述的利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将所述胶体金-多抗结合物涂布于玻璃纤维膜或硝酸纤维素膜上后冷冻干燥,得到胶体金标记垫;

2) 将所述唾液酸包被原以及二抗分别涂布于硝酸纤维素膜上,然后经干燥制备得到检测线(2)以及质控线(3);

3) 将样品垫(7)、胶体金标记垫、含有检测线(2)和质控线(3)的硝酸纤维素膜以及吸水垫(4)组装成试纸条。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述步骤1)中,将浓度为0.2~0.6mg/mL胶体金-多抗结合物按照40~200 μ L/cm²涂布于玻璃纤维膜或硝酸纤维素膜上;所述步骤2)中,将浓度均为0.2~0.6mg/mL的唾液酸包被原以及二抗分别涂布于硝酸纤维素膜上。

10. 一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 酶解

向检测样本或经过稀释后的检测样本中加入神经氨酸苷酶,通过酶解使得检测样本中的结合性唾液酸全部转化为游离唾液酸,得检测样品;

2) 将检测样品加样至试纸条;该试纸条包括沿层析方向依次设置的样品垫(7)、胶体金标记垫、检测反应区以及吸水垫(4);所述胶体金标记垫包括胶体金-多抗结合物,所述多抗是利用唾液酸免疫原免疫动物获得的多克隆抗体;所述检测反应区包括检测线(2)和质控线(3),检测线(2)包括唾液酸包被原,唾液酸包被原、唾液酸免疫原分别选自唾液酸人工抗原中的任意一种,质控线(3)包括可以与所述多抗特异结合的二抗,所述人工抗原包括载体蛋白以及与载体蛋白偶联的唾液酸,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白或卵清蛋白,所述人工抗原中唾液酸与牛血清白蛋白的偶联比为9:1,或者唾液酸与卵清蛋白的偶联比为6.5:1;

3) 利用检测样品中的游离唾液酸与唾液酸包被原竞争性与多抗-胶体金标记物结合,形成检测结果,检测结果判定如下:

若检测线(2)以及质控线(3)均显色,则判定易感流感病毒;

若仅质控线(3)显色,则判定具有较强抵抗流感病毒的能力;

若质控线(3)不显色,则判定该试纸条无效。

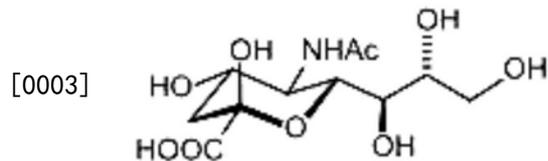
一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化工技术领域,具体涉及一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条。

背景技术

[0002] 流行性感冒简称流感,是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,能引起心肌炎、肺炎、支气管炎等多种并发症。由于流感病毒具有高度传染性,所以极易发生流行,甚至是世界范围的大流行。流感病毒属于正粘病毒科,病毒颗粒呈球形,由外膜和包围于其中的核衣壳组成。外膜表面有一种重要的结构蛋白,呈H聚体的形式存在,称为血凝素(HA),流感病毒侵入人体的方式主要是通过其表面的HA与宿主细胞表面糖蛋白末端与唾液酸链接的特异性糖链受体结合进而感染宿主,HA的受体结合位点和宿主细胞膜上的唾液酸糖链受体结合,从而启动病毒感染过程。即HA主要识别糖蛋白末端与糖链结合的唾液酸分子,而由于人体唾液中具有可封闭病毒表面HA的受体结合位点的糖链末端唾液酸分子结构,足够量的唾液酸糖蛋白(即结合唾液酸)将占据流感病毒的结合位点,使流感病毒无法与宿主细胞结合,因此结合唾液酸含量的多少可以用来判断对于流感病毒的易感性。糖蛋白具有结构的复杂性与多样性,且生物样本测定干扰因素较多,准确定量具有一定的困难,而唾液酸却具有明确、唯一的结构,唾液酸(SA)结构如下:



[0004] 胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下,聚合而成的特定大小的金颗粒,并由于静电作用形成一种稳定的胶体状态。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性。免疫胶体金技术(Immune colloidal gold technique)是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。胶体金标记实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。吸附机理可能是胶体金颗粒表面负电荷,与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成牢固结合。用还原法可以方便地从氯金酸制备各种不同粒径、也就是不同颜色的胶体金颗粒。这种球形的粒子对蛋白质有很强的吸附功能,可以与葡萄球菌A蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗生素、激素、牛血清白蛋白、多肽缀合物等非共价结合,因而在基础研究和临床实验中成为非常有用的工具。胶体金免疫层析法将特异性的抗原或抗体以条带状固定在膜上,胶体金标记试剂(抗体)吸附在结合垫上,当待检样本加到试纸条一端的样品垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应,在移动至固定抗原或抗体的区域时,待检物与金标记试剂(胶体金标记试剂)的结合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带

上,可通过肉眼观察到显色结果。该法现已发展成为诊断试纸条,使用十分方便。

[0005] 中国专利“快速检测禽流感和人流感易感人群的方法以及试纸条”(公开号:CN106771120A,公开日:2017.05.31)披露了基于胶体金层析技术快速检测禽流感和人流感病毒易感人群的试纸条,其检测原理为双凝集素夹心法。但是,凝集素与唾液酸糖蛋白在结合的特异性上,无法与抗原抗体结合反应相提并论,因此,上述双凝集素夹心法仍属于定性检测,且更关注于如何提高检测方法或试剂对特定类别唾液酸糖蛋白的识别能力。而随着流感病毒变种在人、禽之间交叉感染的事件不断报道,以及不同年龄、地域特征人群在与流感易感性相关的唾液酸糖蛋白量化特征上的差异,目前迫切需要研发一种可以简单、快速、低成本完成流感易感性检测的方法及试剂,并且可以通过对检测结果的定量或半定量分析,对于特定人群的流感易感性作出更可靠的评估。

[0006] 目前未见到利用唾液酸人工抗原制备快速检测流感易感人群的方法以及试纸条的报道。唾液酸作为小分子物质,不具有免疫原性,需采用蛋白质交联方法合成人工抗原,由人工抗原免疫动物后获得与唾液酸特异性结合的多克隆抗体。但是由于唾液酸结构中含有较多的羟基,增加了唾液酸人工抗原的制备难度。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0009] 一种唾液酸人工抗原,该人工抗原包括载体蛋白以及与载体蛋白偶联的唾液酸(SA),所述载体蛋白选自牛血清白蛋白(对应人工抗原简称为SA-BSA)或卵清蛋白(对应人工抗原简称为SA-OVA),所述人工抗原(SA-BSA或SA-OVA)中唾液酸(SA)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联比为9:1,或者唾液酸(SA)与卵清蛋白(OVA)的偶联比为6.5:1。

[0010] 优选的,所述人工抗原(SA-BSA或SA-OVA)是采用混合酸酐法或碳二亚胺法制成的。

[0011] 上述唾液酸人工抗原的制备方法,具体包括以下步骤:

[0012] 将10~20mg唾液酸、30 μ L三乙胺及30 μ L氯甲酸异丁酯加入10mL PBS缓冲液中后于20~30 $^{\circ}$ C反应30min,得A液;将20mg牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)加入1~2mL PBS缓冲液中,得B液;将A液加入B液中后于20~30 $^{\circ}$ C下避光反应24小时,得反应液,将该反应液依次经透析、冷冻干燥,得人工抗原;

[0013] 或者,将2~20mg唾液酸及5~12mg碳二亚胺盐酸盐加入1~2mL PBS缓冲液中,得A液;将10~20mg牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)加入0.4~1mL PBS缓冲液中,得B液;将A液加入B液中后用NaHCO₃调节pH值至6.8,然后于20~30 $^{\circ}$ C下避光反应24小时,得反应液,将该反应液依次经透析、冷冻干燥,得人工抗原。

[0014] 一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的试纸条,该试纸条包括沿层析方向依次设置的样品垫、胶体金标记垫、检测反应区以及吸水垫;所述胶体金标记垫包括胶体金-多抗结合物,所述多抗是利用唾液酸免疫原免疫动物获得的多克隆抗体(鼠源、兔源、羊源、马源、骆驼源或豚鼠源等);所述检测反应区包括检测线和质控线,检测线包括唾液酸包被原,唾液酸包被原、唾液酸免疫原分别选自上述唾液酸人工抗原中的任意一种,质控线

包括可以与所述多抗特异结合的二抗。

[0015] 优选的,所述胶体金标记垫还包括与样品垫相连的用于包被所述胶体金-多抗结合物的硝酸纤维素膜或玻璃纤维膜。

[0016] 优选的,所述检测反应区还包括用于固定所述检测线和质控线的硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜分别与所述胶体金标记垫以及吸水垫相连。

[0017] 优选的,在同一试纸条中选择不同的唾液酸人工抗原作为所述唾液酸免疫原和唾液酸包被原,从而确保待检样品中唾液酸在与所述多抗的结合中相对于唾液酸包被原处于竞争性优势地位,从而能够在层析泳动的短暂时间内(达到检测线),将样品中的唾液酸充分、快速结合至胶体金-多抗结合物上,提高定量检测可靠性;并且若唾液酸免疫原为SA-BSA,唾液酸包被原为SA-OVA,所形成的试纸条检测敏感性更高。

[0018] 上述利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0019] 1) 将所述胶体金-多抗结合物的溶液按照 $40\sim 200\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (抗体的浓度为 $0.2\sim 0.6\text{mg}/\text{mL}$)涂布于玻璃纤维膜或硝酸纤维素膜上,冷冻干燥,得到胶体金标记垫(简称金标垫);

[0020] 2) 将所述唾液酸包被原的溶液以及所述二抗的溶液(唾液酸包被原、二抗浓度均为 $0.2\sim 0.6\text{mg}/\text{mL}$)分别涂布于另一硝酸纤维素膜上,经干燥制备得到检测线以及质控线(检测线更靠近金标垫);

[0021] 3) 将样品垫、胶体金标记垫、含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜以及吸水垫组装成试纸条。

[0022] 一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法,包括以下步骤:

[0023] 1) 酶解

[0024] 向检测样本或经过稀释后的检测样本中加入神经氨酸苷酶,通过酶解使得检测样本中的结合性唾液酸全部转化为游离唾液酸,得检测样品;

[0025] 2) 将检测样品加样至上述试纸条的样品垫;

[0026] 3) 检测结果判定:

[0027] 若检测线以及质控线均显色,则判定不同程度(依据检测线颜色深浅)易感流感病毒;

[0028] 若仅质控线显色,则判定具有较强抵抗流感病毒的能力;

[0029] 若质控线不显色,则无论检测线是否显色,该试纸条均判为无效。

[0030] 优选的,所述检测样本选自唾液;酶解的具体步骤为:向 1mL 唾液原液或经过稀释后的唾液中按照每 0.1mL 唾液原液中加入 $6\sim 10\text{U}$ 的比例加入神经氨酸苷酶,然后于 $36.5\sim 37.5^\circ\text{C}$ 反应 $1\sim 5$ 分钟。

[0031] 优选的,检测样本的稀释方法为:用注射水、生理盐水(0.9% 氯化钠溶液)、磷酸盐缓冲液或硼酸盐缓冲液将检测样本稀释 $2\sim 5$ 倍。

[0032] 本发明的有益效果体现在:

[0033] 本发明首次利用温和的反应条件制备得到了具有免疫原性的唾液酸-载体蛋白复合物,即唾液酸人工抗原,利用该人工抗原的多克隆抗体对唾液酸的特异性识别、结合能力,并确定胶体金-多抗结合物的包被浓度,即可制备得到用于快速、半定量检测游离唾液

酸的试纸条,满足了流感易感人群检测的实际需求,适合于临床快速检测和基层流行病学调查大规模应用。通过将样本中的结合唾液酸转化为游离唾液酸,并利用所制备的试纸条就可以对流感易感性进行检测,检测结果容易观察区别,使用方便,既可以定性检测,也可以半定量检测。

附图说明

- [0034] 图1为混合酸酐法合成的唾液酸免疫原的紫外可见光谱扫描结果。
[0035] 图2为碳二亚胺法合成的唾液酸免疫原的紫外可见光谱扫描结果。
[0036] 图3为混合酸酐法合成的唾液酸包被原的紫外可见光谱扫描结果。
[0037] 图4为碳二亚胺法合成的唾液酸包被原的紫外可见光谱扫描结果。
[0038] 图5为试纸条的结构示意图;图中:1为PVC板,2为检测线,3为质控线,4为吸水垫,5为NC膜,6为金标垫,7为样品垫。

具体实施方式

[0039] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明。

[0040] 1、免疫原制备

[0041] (1) 混合酸酐法合成唾液酸免疫原(SA-BSA)

[0042] 称取唾液酸20mg溶于10mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,再加入30 μ L三乙胺,以及30 μ L氯甲酸异丁酯,室温反应30min,得A液。称取20mg BSA溶解于1mLPBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,得B液。将A液缓慢加入B液中,室温下避光振荡反应24小时。待反应完成后,将所得反应液转移到用蒸馏水清洗干净的透析袋(1kD)中,并于4 $^{\circ}$ C蒸馏水中透析72小时,中间更换蒸馏水3~6次。将透析后的产物分装,冷冻干燥,干燥产物记为SA-BSA。经紫外可见光谱扫描,并通过比较扫描结果发现:作为载体蛋白的BSA在276nm波长处有强吸收;而作为半抗原的SA最大吸收波长在210nm,在276nm处没有吸收。偶联物SA-BSA的紫外吸收曲线与载体蛋白的紫外吸收曲线在图形和趋势上明显不同,证明SA与载体蛋白发生有效偶联,参见图1。通过HPLC法检测偶联前后游离唾液酸的含量,Brandford法测定偶联前BSA含量,计算偶联比为SA:BSA=9:1。

[0043] (2) 碳二亚胺法合成唾液酸免疫原(SA-BSA)

[0044] 称取唾液酸20mg及碳二亚胺盐酸盐12mg,溶解于2mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,得A液。称取BSA 20mg充分溶于1mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,得B液。将A液逐滴加入B液中,并于反应体系中加入4%NaHCO₃调pH值至6.8,室温下避光振荡反应24小时。待反应完成后,将所得反应液转移到用蒸馏水清洗干净的透析袋(1kD)中,并于4 $^{\circ}$ C蒸馏水中透析72小时,中间更换蒸馏水3~6次。将透析后的产物分装,冷冻干燥,干燥产物记为SA-BSA。经紫外可见光谱扫描,并通过比较扫描结果发现:偶联物SA-BSA的紫外吸收曲线与作为载体蛋白的BSA的紫外吸收曲线在图形和趋势上明显不同,证明SA与载体蛋白发生有效偶联,参见图2。通过HPLC法检测偶联前后游离唾液酸的含量,Brandford法测定偶联前BSA含量,计算偶联比为9:1。

[0045] 2、包被原制备

[0046] (1) 混合酸酐法合成唾液酸包被原(SA-OVA)

[0047] 称取唾液酸20mg溶于10mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,再加入30 μ L三乙胺,以及30 μ L氯甲酸异丁酯,室温反应30min,得A液。称取20mg OVA溶解于1mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,得B液。将A液缓慢加入B液中,室温下避光振荡反应24小时。待反应完成后,将所得反应液转移到用蒸馏水清洗干净的透析袋(1kD)中,并于4 $^{\circ}$ C蒸馏水中透析72小时,中间更换蒸馏水3~6次。将透析后的产物分装,冷冻干燥,干燥产物记为SA-OVA。经紫外可见光谱扫描,并通过比较扫描结果发现:作为载体蛋白的OVA在278nm波长处有强吸收;而SA最大吸收波长在210nm,在278nm处没有吸收。偶联物SA-OVA的紫外吸收曲线与载体蛋白的紫外吸收曲线在图形和趋势上明显不同,证明SA与载体蛋白发生有效偶联。通过HPLC法检测偶联前后游离唾液酸的含量,Brandford法测定偶联前OVA含量,计算偶联比为6.5:1。

[0048] (2) 碳二亚胺法合成唾液酸包被原(SA-OVA)

[0049] 称取唾液酸10mg及碳二亚胺盐酸盐5mg,溶解于1mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,得A液。称取OVA 10mg溶于0.4mL PBS缓冲液(0.01mol/L, pH7.2~7.4)中,得B液。将A液逐滴加入B液中,并于反应体系中加入4%NaHCO₃调节pH值至6.8,室温下避光振荡反应24小时。待反应完成后,将所得反应液转移到用蒸馏水清洗干净的透析袋(1kD)中,并于4 $^{\circ}$ C蒸馏水中透析72小时,中间更换蒸馏水3~6次。将透析后的产物分装,冷冻干燥,干燥产物记为SA-OVA。经紫外可见光谱扫描,并通过比较扫描结果发现:作为载体蛋白的OVA在278nm波长处有强吸收;偶联物SA-OVA的紫外吸收曲线与载体蛋白的紫外吸收曲线在图形和趋势上明显不同,证明SA与载体蛋白发生有效偶联,参见图4。通过HPLC法检测偶联前后游离唾液酸的含量,Brandford法测定偶联前OVA含量,计算偶联比为6.5:1。

[0050] 参见图1及图2、图3及图4,若载体蛋白一定时,碳二亚胺法与混合酸酐法两种方法制备的免疫原结构一致。

[0051] 3、利用唾液酸人工抗原制备胶体金免疫层析试纸条

[0052] S1、动物免疫

[0053] 饲养8周龄雄性BALB/c小鼠4只,用唾液酸免疫原(SA-BSA)免疫其中3只,另外1只则不免疫,用来作为阴性对照。免疫方法具体如下:将唾液酸免疫原稀释成0.5~2.0mg/mL,取500 μ L,与500 μ L弗氏完全佐剂(FCA)混合,充分乳化成油包水(W/O)状态,将乳化好的免疫原采用背部皮下多点注射,0.1mL/只;2周后进行第一次加强免疫,用500 μ L的弗氏不完全佐剂(FIA)将免疫原(0.5~2.0mg/mL, 500 μ L)充分乳化,进行背部皮下多点注射,0.1mL/只;此后每隔2周加强免疫1次,方法同第一次加强免疫;四次加强免疫后2周,相同方法进行五免(第五次加强免疫)。

[0054] S2、多克隆抗体收集

[0055] 五免后10天,心脏采血,将所取血液于37 $^{\circ}$ C放置30min后,在4 $^{\circ}$ C以3000rpm离心10min,取上清,分离血清,分装后置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存,备用。

[0056] S3、多克隆抗体纯化

[0057] 采用辛酸-硫酸铵方法分离纯化抗体(参考《应用辛酸硫酸铵法提取小鼠腹水和血清中的抗体》)。

[0058] S4、包被胶体金-多抗结合物的金标垫的制备

[0059] 胶体金制备:将氯金酸(HAuCl₄)配成质量分数1%的氯金酸溶液,取1mL氯金酸溶

液加入99mL去离子水中,加热至沸腾后立即加入2mL质量分数1%的枸橼酸钠溶液,迅速搅拌均匀,继续加热沸腾10分钟,冷却至室温,补充去离子水至100mL,得胶体金溶液。

[0060] 将胶体金溶液的pH值调节至8.0,加入抗唾液酸多克隆抗体,混匀,抗体的浓度为20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;室温静置1~2h,2000rpm离心,去沉淀,对上清液12000rpm离心,然后弃上清,沉淀溶于含0.2%BSA的0.01mol/L且pH8.0的PBS中,使抗体的浓度为0.2~0.6mg/mL(例如,0.5mg/mL);将溶液均匀地喷涂在玻璃纤维膜上,涂布量为40~200 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ (例如,200 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$),冷冻干燥,得到包被有胶体金-多抗结合物的玻璃纤维膜,即金标垫6。

[0061] S5、检测线和质控线的制备

[0062] 检测线:将制备得到的唾液酸包被原(SA-OVA)与0.01mol/L且pH8.0的PBS缓冲液混合,配制成浓度为0.2~0.6mg/mL(例如,0.5mg/mL)的溶液,将溶液喷涂在硝酸纤维素膜(NC膜5)上的检测线2位置处。

[0063] 质控线:将羊抗鼠IgG二抗与0.01mol/L且pH8.0的PBS缓冲液混合,配制成浓度为0.2~0.6mg/mL(例如,0.5mg/mL)的溶液,将溶液喷涂在所述硝酸纤维素膜上的质控线3位置处。

[0064] 最后将所述硝酸纤维素膜于40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱干燥15小时,在该硝酸纤维素膜上制得固定的检测线2和质控线3。

[0065] S6、胶体金试纸条的组装

[0066] 试纸条主要包括由样品垫7、金标垫6、NC膜5(固化有检测线2和质控线3)及吸水垫4构成的试纸以及固定支撑试纸的基底。其中,基底采用PVC板1;吸水垫4可采用吸水滤纸,吸收检测样品中多余液体;样品垫7可以采用玻璃纤维膜,接触待检测样品,具体结构参见图5。

[0067] 在PVC板1上,沿着层析方向依次布置试纸条的各个试纸部分,其中,在下游端为吸水垫4,上游端为样品垫7,中段以固化有检测线2和质控线3的NC膜5作为检测反应区,在NC膜5与样品垫7之间放置金标垫6。

[0068] 试纸贴附于PVC板1上,裁切成4mm宽的条形带;其中,先将NC膜5贴附在PVC板1上,然后将吸水垫4和金标垫6贴附在PVC板1上,并且与NC膜5两端分别部分重叠,最后将样品垫7贴附在PVC板1上,并且与金标垫6部分重叠。试纸条密封干燥保存,备用。

[0069] 将试纸组装于卡壳(带有窗口)内,即可形成试纸卡。

[0070] 4、基于人工抗原的唾液酸胶体金检测方法

[0071] S1、样本稀释:若采集的唾液样本清澈透亮,则无需稀释;对于浑浊浓稠的唾液,可用0.9%氯化钠溶液稀释2~5倍。

[0072] S2、酶解:取1mL唾液原样(或稀释后唾液),向其中加入神经氨酸苷酶(0.1mL唾液原样中加入10U),37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1~5分钟,得样品。

[0073] S3、加样:将样品加入到上述试纸条的样品垫7中,静置1~5分钟。

[0074] S4、检测结果判定:

[0075] 1) 检测线2以及质控线3均显色,例如呈现紫红色条带,则判定易感流感病毒;

[0076] 2) 仅质控线3显色,则判定具有较强抵抗流感病毒的能力;

[0077] 3) 质控线3不显色,则无论检测线2是否显色,该试纸条均判为无效。

[0078] 5、检测原理

[0079] 所述试纸条中,胶体金标记垫(金标垫)包被有人工唾液酸抗原的多抗-胶体金标记物;检测线包被有唾液酸包被原;质控线包被有与人工唾液酸抗原的多抗相对应的动物二抗。在提供任何样本前,检测线和质控线都不显示颜色。当(稀释后的)样本中加入酶解液后,样本中的结合唾液酸变为游离唾液酸,酶解后的样本加至样品垫后,样本中的游离唾液酸与胶体金标记垫上的多抗-胶体金标记物一起层析泳动到检测反应区。由于游离唾液酸与唾液酸包被原竞争性与多抗-胶体金标记物结合,当样本中的游离唾液酸浓度超过一定量时,多抗-胶体金标记物就不能与检测线上的唾液酸包被原结合,此时检测线位置不出现例如紫红色线条;当样本中没有游离唾液酸或者样本中游离唾液酸浓度低于一定量时,多抗-胶体金标记物就与检测线上的唾液酸包被原结合,从而在检测线位置显示出一条例如紫红色线条;而无论样本中是否含有游离唾液酸,质控线都会出现紫红色线条,以示检测用试纸条有效。

[0080] 将显色结果与比色卡(或与标准品的显色结果)对照,从而可以对检测样本中游离唾液酸的浓度进行半定量检测。

[0081] 6、试纸条灵敏度

[0082] 在人工唾液中添加唾液酸标准品,配制成0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列浓度样品。将上述系列浓度样品进行定量(加样量100 μL)梯度检测,最低检出量的试验结果如表1所示,试验结果表明试纸条检测灵敏度良好:

[0083] 表1. 试纸条最低检出量结果

[0084]

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
结果	—	—	—	+	+	+	+

[0085] 注:“—”表示阴性(指检测线显色),“+”表示阳性(指检测线不显色)。

[0086] 7、半定量试纸条举例

[0087] 根据抽样统计的平均唾液酸含量(64 $\mu\text{g}/\text{mL}$),以70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为限,大于70 $\mu\text{g}/\text{mL}$,则检测线不显色,依据粉红色、红色、紫红色三个标准,依次确定了对应的唾液酸浓度为60、40、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。若检测线颜色处于两个标准色之间,例如粉红色与红色之间,则唾液酸含量定量至大于40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且小于60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

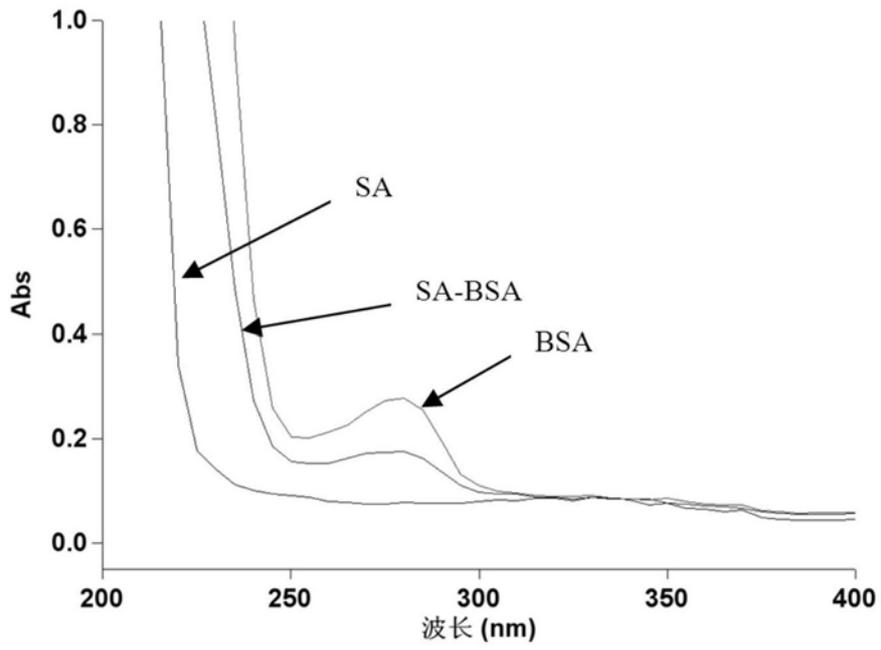


图1

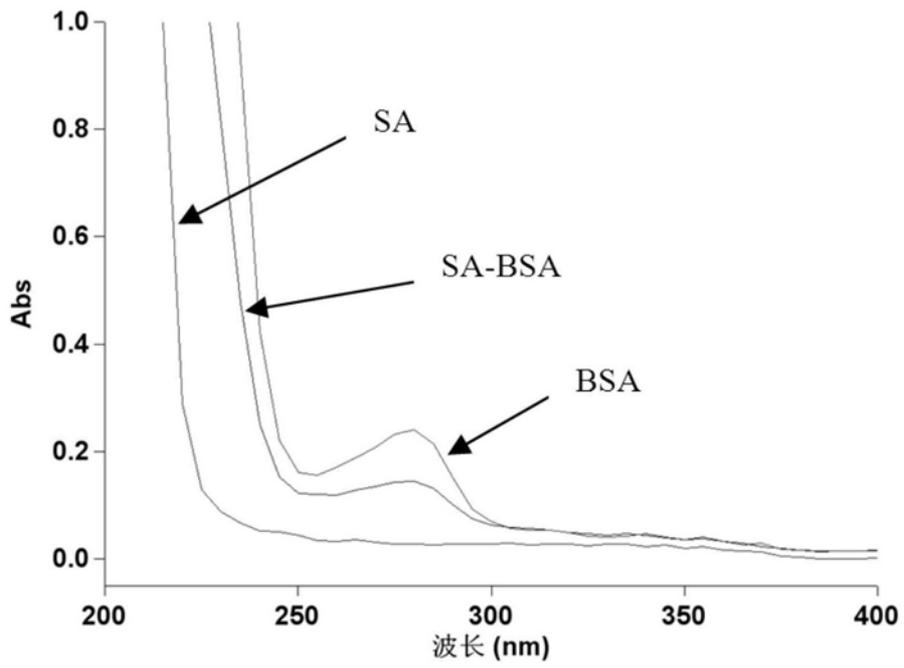


图2

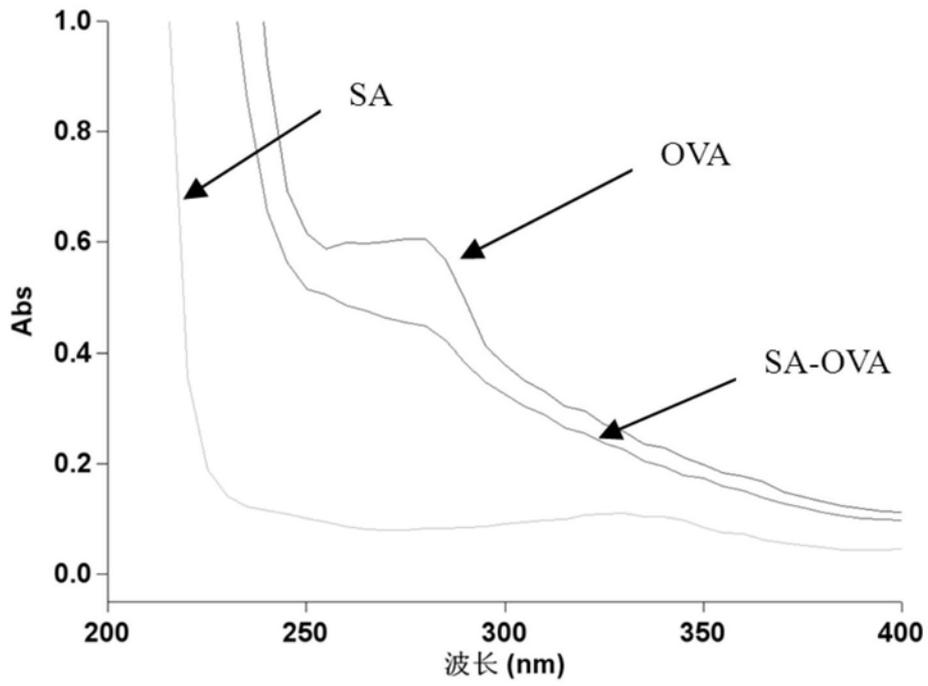


图3

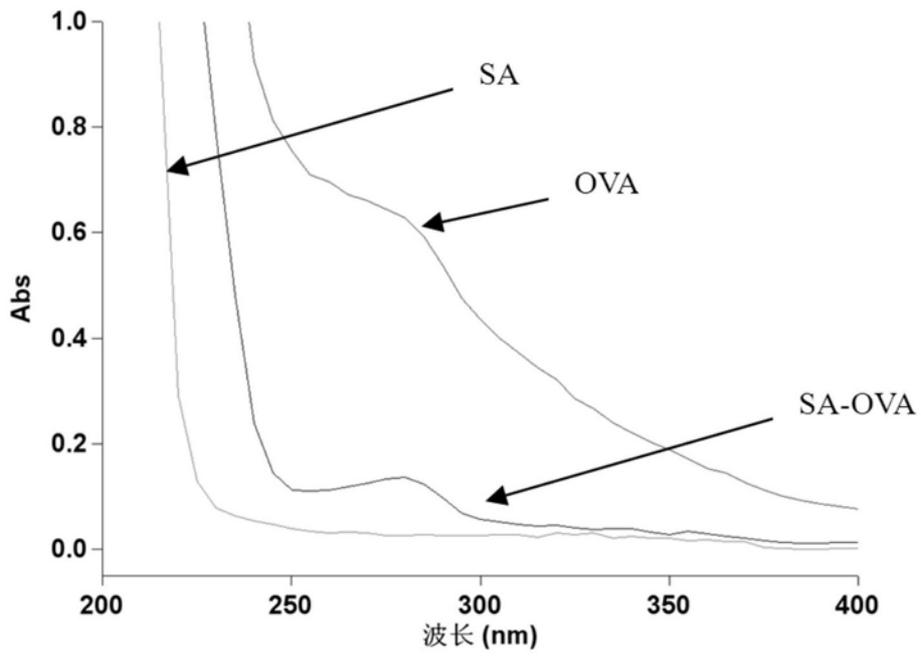


图4

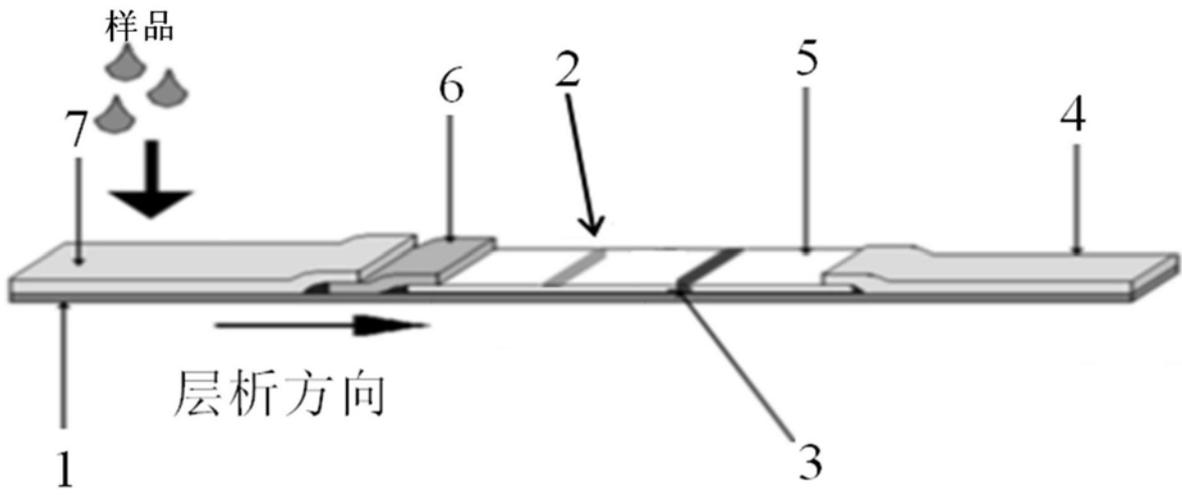


图5

专利名称(译)	一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条		
公开(公告)号	CN109021094A	公开(公告)日	2018-12-18
申请号	CN201810864508.4	申请日	2018-08-01
[标]发明人	肖志强 高湘 苏建英		
发明人	肖志强 高湘 苏建英		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K19/00 G01N33/53		
代理人(译)	范巍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用唾液酸人工抗原快速检测流感易感人群的方法以及试纸条。本发明所述的唾液酸人工抗原中，载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白；用所述人工抗原免疫动物，得到相应的抗体，可特异性结合人体唾液样本中的唾液酸。本发明建立了由上述抗体、包被抗原制备的胶体金免疫试纸条，用于检测人唾液样本中的唾液酸，快速判定流感易感人群。本发明所述试纸条灵敏度高，特异性强，使用方便，检测结果容易观察区别，适合于临床快速测定和基层大规模应用。

