



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212208 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811250033.6

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.10.25

(71)申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新区科学大道100号

(72)发明人 李朝辉 陈娟 孟红敏 杨冉
屈凌波

(74)专利代理机构 郑州优盾知识产权代理有限公司 41125

代理人 郑园

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

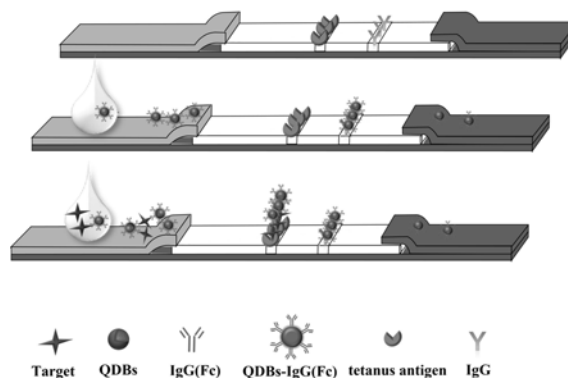
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法

(57)摘要

本发明属于横向侧流层析技术、生物分析技术领域,特别是指基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法,解决了快速、低耗、便携的检测破伤风抗体含量中遇到的技术问题。所述试纸条的制备方法为:先用质量浓度为0.5-5%TW20溶液对样品垫进行封闭,然后在NC膜上依次划检测线和质控线,将处理过的样品垫和NC膜于37℃真空干燥1h,再把样品垫、NC膜和吸水垫依次粘贴于PVC底板上,两两重叠2-3mm,最后裁切成3.9mm宽,即得成品试纸条。本发明与传统胶体金免疫层析法试纸条相比,本发明具有量子点微球标记物稳定性好,检测的灵敏度高,可实现对低浓度目标物的定量检测。



1. 基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 包括样品垫、NC膜和吸水垫, 其特征在于: 所述NC膜上由样品垫方向向吸水垫方向依次设有检测线和质控线, 检测线为破伤风原抗原, 质控线为羊抗人抗体, 所述羊抗人抗体为羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体。

2. 如权利要求1所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于: 破伤风原抗原的浓度为0.5-2.8 mg/mL, 羊抗人抗体的浓度为0.2-4mg/mL。

3. 如权利要求2所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于, 所述羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体的制备步骤为:

a、对羧基化的量子点微球进行离心处理, 复溶于MES缓冲溶液中, 然后加入一定量的EDC, 于暗室中旋转反应20-60 min, 对羧基化量子点微球进行活化处理, 随后进行离心, 弃上清得活化的羧基化量子点微球;

b、将活化的羧基化量子点微球用硼酸缓冲溶液进行超声复溶, 然后加入羊抗人抗体, 暗室旋转反应30-120 min, 再进行离心, 弃上清得偶联产物;

c、将偶联产物加入到封闭液中复溶, 于暗室旋转反应30-60 min后, 进行离心处理, 弃上清得到与羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体, 于2-8℃保存于硼酸缓冲保存液中。

4. 如权利要求3所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于: 所述步骤a中羧基化的量子点微球为表面羧基化的聚苯乙烯包裹的CdSe/ZnS纳米微球; MES缓冲溶液浓度为 10-100 mM、pH 4.0-6.0。

5. 如权利要求3所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于: 所述步骤b中羊抗人抗体为IgG, 为含氨基的不同蛋白或者蛋白的一个结构域、单克隆抗体、多克隆抗体或者单克隆抗体或多克隆抗体的一段多肽链。

6. 如权利要求3所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于: 所述步骤b中活化的羧基化量子点微球与羊抗人抗体的摩尔质量比为(2-10):1; EDC的终浓度为1-2 mM; 硼酸缓冲液浓度为20-100 mM、pH 7.0-7.5。

7. 如权利要求3所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于: 所述步骤c中封闭液为0.5%-5% 的牛血清蛋白、酪蛋白或甘氨酸溶液; 硼酸缓冲保存液为质量浓度为0.01-0.1 wt % TW 20的硼酸缓冲液。

8. 如权利要求3所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条, 其特征在于: 离心的条件为10000-15000 rpm、10-30 min。

9. 权利要求1-8任一项所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条的制备方法, 其特征在于步骤如下: 先用质量浓度为0.5-5%TW20水溶液对样品垫进行封闭, 然后在NC膜上依次划检测线和质控线, 将处理过的样品垫和NC膜于37℃真空干燥1h, 再把样品垫、NC膜和吸水垫依次粘贴于PVC底板上, 两两重叠2-3mm, 最后裁切成3.9mm宽, 即得成品试纸条。

10. 权利要求1-8任一项所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条的使用方法, 其特征在于步骤为:

(1) 用50 mM pH 7.4硼酸缓冲溶液配制梯度浓度分别为0, 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 18, 20, 22mIU的破伤风抗体标准溶液, 不同梯度浓度的破伤风抗体标准溶液分别取10μL与1.5μL羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体混合, 用硼酸缓冲定容至200μL, 然后取80-

120 μ L混合溶液滴在样品垫上,5-30min后记录破伤风抗体标准液浓度为0时检测到的荧光强度,以及不同梯度浓度的破伤风抗体标准液检测到的荧光峰强度,计算得出相对荧光强度;以破伤风抗体浓度为横坐标,以相对荧光强度为纵坐标,绘制响应的Reader光谱图及线性关系图,线性关系为 $y=118.34x+27.44$, $R^2=0.996$;

(2) 将10 μ L未知浓度的破伤风抗体样品和1.5 μ L羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体混合后,取80-120 μ L混合溶液滴在样品垫上,5-30min后记录荧光强度;

(3) 根据荧光强度值和线性关系图计算破伤风抗体样品的浓度。

基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于横向侧流层析技术、生物分析技术领域，特别是指基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 破伤风又称为强直症，俗名锁口风。它是破伤风梭菌经由皮肤或黏膜伤口侵入人体，在缺氧环境下生长繁殖，当进入人体后，会作用于中枢神经系统，产生强神经毒素而引起肌痉挛的一种特异性感染。多数患者发病后，表现为肌肉紧张性收缩和痉挛，使脸部呈“苦笑面容”。还会阻断脊髓对交感神经的抑制，出现血压增高、心率加快、冒汗等症状。同时还会引起局部组织坏死和心肌损伤，酸中毒、脱水等症状，最终导致死亡。这种疾病有很高的致死率，术后据不完全统计，每年全世界有80-100万人因感染破伤风死亡。破伤风病例绝大多数发生在一些发展中国家，由于医疗条件比较差，人们感染破伤风后不能得到很好的治疗，其中老年人、产妇和新生儿群体病发率较高。尽管接种破伤风疫苗是预防破伤风最有效的手段，但最近报道的“吉林长生假疫苗案”给人深思。疫苗可能存在本身效价不足，或者即使注射了疫苗，在人体内发生免疫反应究竟能够产生多少抗体，能否达到免疫水平，另外破伤风疫苗有一定的免疫期限，不是终生免疫，免疫后所产生的抗体到一定期限会下降，到达一定年限后能否继续达到免疫水平，这些问题都是亟待解决的。因此，能够快速、准确地了解人体血清中的破伤风抗体水平，对于破伤风的预防及治疗起着重要的指导作用。

[0003] 目前，破伤风抗毒素的体外检测方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA)、凝胶电泳免疫分析法、荧光免疫分析法、放射免疫分析法、微流控平台法等。但是这些方法需要昂贵的仪器，操作程序复杂，费用高，灵敏度也不尽人意。ELISA法是比较商业化的方法，该方法有较好的特异性，但是不同批次之间差异性大，检测时间长，且易出现一些假阳性或假阴性的结果。这些检测方法在我们遇到一些突发事件，或者需要现场快速检测时，没有很好的适应性。因此发展一种快速检测破伤风抗体的方法是非常有必要的。本发明制备的新型荧光层析试纸条即可用于高灵敏快速的检测血清中破伤风抗体含量。

发明内容

[0004] 本发明提出一种基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法，解决了快速、低耗、便携的检测破伤风抗体含量中遇到的技术问题。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的：

基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条，包括样品垫、NC膜和吸水垫，所述NC膜上由样品垫方向向吸水垫方向依次设有检测线和质控线，检测线为破伤风原抗原，质控线为羊抗人抗体，所述羊抗人抗体为与羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体。

[0006] 破伤风原抗原的浓度为0.5-2.8 mg/mL，羊抗人抗体的浓度为0.2-4mg/mL。

[0007] 所述与羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体的制备步骤为：

a、对羧基化的量子点微球进行离心处理,复溶于MES缓冲溶液中,然后加入一定量的EDC,于暗室中旋转反应20-60 min,对羧基化量子点微球进行活化处理,随后进行离心,弃上清得活化的羧基化量子点微球;

b、将活化的羧基化量子点微球用硼酸缓冲溶液进行超声复溶,然后加入羊抗人抗体,暗室旋转反应30-120 min,再进行离心,弃上清得偶联产物;

c、将偶联产物加入到封闭液中复溶,于暗室旋转反应30-60 min后,进行离心处理,弃上清得到与羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体,于2-8℃保存于硼酸缓冲保存液中。

[0008] 所述步骤a中羧基化的量子点微球为表面羧基化的聚苯乙烯包裹的CdSe/ZnS纳米微球;MES缓冲液浓度为 10-100 mM、pH 4.0-6.0。

[0009] 所述步骤b中羊抗人抗体为IgG,为含氨基的不同蛋白或者蛋白的一个结构域、单克隆抗体、多克隆抗体或者单克隆抗体或多克隆抗体的一段多肽链。

[0010] 所述步骤b中羧基化量子点微球与羊抗人抗体的质量比为(2-10):1;EDC的终浓度为1-2 mM;硼酸缓冲液浓度为20-100 mM、pH 7.0-7.5。

[0011] 所述步骤c中封闭液为0.5%-5%的牛血清蛋白、酪蛋白或甘氨酸溶液;硼酸缓冲保存液为含0.01-0.1 wt % TW 20的硼酸缓冲液;离心的条件为10000-15000 rpm、10-30 min。

[0012] 基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条的制备方法,步骤如下:先用质量浓度为0.5-5%TW20溶液对样品垫进行封闭,然后在NC膜上依次划检测线和质控线,将处理过的样品垫和NC膜于37℃真空干燥1h,再把样品垫、NC膜和吸水垫依次粘贴于PVC底板上,两两重叠2-3mm,最后裁切成3.9mm宽,即得成品试纸条。

[0013] 所述的基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条的使用方法,步骤为:

(1)用50 mM pH 7.4硼酸缓冲溶液配制梯度浓度分别为0,0.2,0.5,1,3,5,7,9,10,12,14,18,20,22mIU的破伤风抗体标准溶液,不同梯度浓度的破伤风抗体标准溶液分别取10μL与1.5μL羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体混合,用硼酸缓冲定容至200μL,然后取80-120μL混合溶液滴在样品垫上,5-30min后记录破伤风抗体标准液浓度为0时检测到的荧光强度,以及不同梯度浓度的破伤风抗体标准液检测到的荧光峰强度,计算得出相对荧光强度;以破伤风抗体浓度为横坐标,以相对荧光强度为纵坐标,绘制响应的Reader光谱图及线性关系图,线性关系为 $y=118.34x+27.44$, $R^2=0.996$;

(2)将10μL未知浓度的破伤风抗体样品和与羧基化的量子点微球偶联的羊抗人抗体混合后,取80-120μL混合溶液滴在样品垫上,5-30min后记录荧光强度;

(3)根据荧光强度值和线性关系图计算破伤风抗体样品的浓度。

[0014] 相对于现有技术,本发明所产生有益效果为:

(1)本发明方法采用量子点荧光微球为信号标签,可克服外界环境对量子点荧光微球的干扰,如猝灭作用,增加量子点荧光微球的稳定性;更重要的是,量子点荧光微球粒径较大,表面提供了很多的羧基化位点,使更多的生物抗体分子连接在微球表面上,只需很少量样品就能检测,可以起到信号放大作用,大大提高了检测的灵敏度并且降低了其他物质的非特异性干扰。

[0015] (2)将本方法与现存的其他方法相比较,如ELISA、荧光免疫分析法、微流控平台法等,该方法,利用破伤风抗体与破伤风抗原之间高特异性,大大降低其他物质干扰,消除了

假阳性或者假阴性结果,这是POCT检测所特需的。并且该操作简单不需要专业人员进行操作,不需要大型仪器,检测速度非常快,灵敏度非常高。同时将本发明与传统胶体金免疫层析法试纸条相比,本发明具有量子点微球标记物稳定性好,检测的灵敏度高,可实现对低浓度目标物的定量检测,与胶体金法相比,检测限能提高2-3个数量级。远远低于破伤风抗体的国际标准(0.01 IU),该方法有望成为一种检测破伤风抗体的新标准,而不再是只给出阴性或者阳性的检测结果。

附图说明

[0016] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0017] 图1为本发明基于量子点荧光微球免疫层析检测破伤风抗体的示意图。

[0018] 图2 为实施例1中量子点荧光微球标记蛋白的制备方法及人IgG(Fc)量的选择。

[0019] 图3 为实施例2中标准溶液中不同浓度破伤风抗体检测的线性关系图及照片图。

[0020] 图4 为实施例3中基于试纸条检测破伤风抗体干扰实验的柱形图。

具体实施方式

[0021] 下面将结合本发明实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有付出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0022] 实施例1

量子点荧光微球标记蛋白的制备,步骤如下:

(1)首先对100 μ L羧基化量子点微球(QDNB)进行离心处理15000,30 min,然后复溶于100 μ L 50 mM pH 6.0 MES缓冲中。再加入15 μ L 8 mM的N-(3-二甲氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),暗室旋转反应30 min,对量子点微球进行活化处理,随后进行离心处理15000,30 min。

[0023] (2)用100 μ L 50 mM pH 7.4硼酸缓冲进行超声复溶,接着加入不同体积的5mg/ml Fc,分别为 2 μ L,3 μ L,5 μ L,7 μ L,10 μ L,暗室旋转反应60 min,再进行离心处理15000,30 min。

[0024] (3)加入100 μ L 2% BSA封闭液复溶并进行封闭处理,暗室旋转反应50 min后,进行离心处理15000,30 min,最终制得的QDNB-Fc保存于的100 μ L硼酸缓冲保存液(含0.01% TW 20)中,置于4 $^{\circ}$ C待用。

[0025] (4)取20 μ L 0.1 IU 破伤风抗体与 1.5 μ L 的上述不同偶联比例的 QDNB-Fc 混合,分别取出90 μ L 混合液滴加到制备好的试纸条上,进行跑样,10 min后记录荧光强度值,如图2所示,可得出在量子点微球与抗体Fc质量之比为4:1时,能达到破伤风抗体检测的最佳效果。

[0026] 实施例2

基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条的制备方法,步骤如下:先用质量浓度为0.5-5%TW20溶液对样品垫进行封闭,然后在NC膜上依次划检测线和质控线,将处理过的样品垫和NC膜于37℃真空干燥1h,再把样品垫、NC膜和吸水垫依次粘贴于PVC底板上,两两重叠2-3mm,最后裁切成3.9mm宽,即得成品试纸条。

[0027] 荧光微球免疫层析试纸条对破伤风抗体的检测:

将通过上述步骤制备得到的试纸条,配置好一定浓度梯度的破伤风抗体标准溶液(0-0.022IU),将浓度梯度的破伤风抗体标准溶液分别与一定量的QDNB-Fc 混合后,取90 μ L混合溶液滴在破伤风抗体检测试纸条的样品垫上,10 min 后,记录不同浓度的破伤风抗体对应的荧光峰强度,计算得出相对荧光强度见3c。如图3a所示,随着破伤风抗体浓度的增加,检测线上荧光强度逐渐增强,并对其进行拍摄紫外灯下的荧光照片。随后对荧光强度与破伤风抗体的浓度进行线性拟合,发现破伤风抗体的浓度范围为0.0002-0.018IU时,荧光强度与浓度呈现很好的线性关系见图3b,线性方程为 $y=118.34x+27.44$ ($R^2=0.996$),且具有很高的灵敏度,可以应用于实际血清样本中破伤风抗体的检测。

[0028] 实施例3

不同种类的抗体对破伤风抗体检测的干扰:

将通过上述步骤制备得到量子点微球抗体的复合物与包被有抗原的试纸条,随后配置破伤风抗体标准溶液浓度为0.01 IU,干扰抗体的浓度为其10当量,如百日咳抗体浓度为0.1 IU,狂犬抗体为0.1 IU,细胞角蛋白抗体为5 μ g/ml,甲状腺转录因子抗体为5 μ g/ml,浓度为0.1 IU的百日咳抗体与浓度为0.01 IU的破伤风抗体的混合溶液,分别将上述样品与一定量的QDNB-Fc 混合后,取90 μ L混合溶液滴在破伤风抗体检测试纸条的样品垫上,10 min 后,记录不同抗体对应的荧光峰强度,每组实验重复平行3次。如图4所示,结果表明该检测方法对破伤风抗体具有很高的选择性,其他抗体的干扰都比较小。

[0029] 实施例4

该发明在阴性血清中对破伤风抗体的加标回收实验:

为了进一步探索本发明在复杂样品中的应用,设计并进行了实际样品的加标回收实验。首先对阴性血清进行稀释100倍,分别加入不同量的5 mIU,7.5 mIU,10 mIU,破伤风抗体,将其标号为1.2.3,如表1所示,将上述浓度的破伤风抗体分别与1.5 μ L QDNB-Fc 混合后,取90 μ L混合溶液滴在破伤风抗体检测试纸条的样品垫上,10 min 后,记录不同抗体对应的荧光峰强度,每组实验重复平行3次。

[0030] 表1基于试纸条在阴性血清中对破伤风抗体的加标回收

Samples	Added (mIU)	Found (mIU)	Recovery (%)	RSD (n=3;%)
1	5	5.07	101.4%	1.62
2	7.5	7.253	96.7%	2.17
3	10	9.93	99.3%	2.35

将荧光强度值带入到线性关系图中,计算可得到加标回收率在96.7-101.4%且最大RSD

值为2.35%，表明本发明在实际血清样品中检测破伤风抗体中具有好的精密性和可靠性。

[0031] 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。

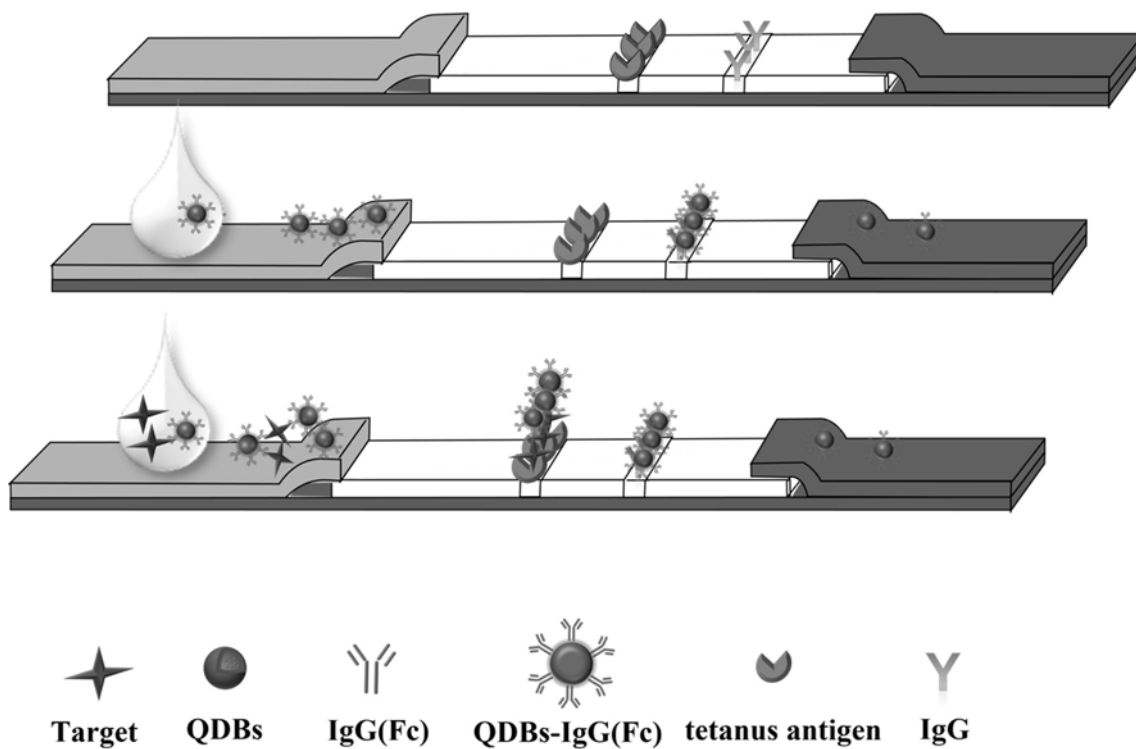


图1

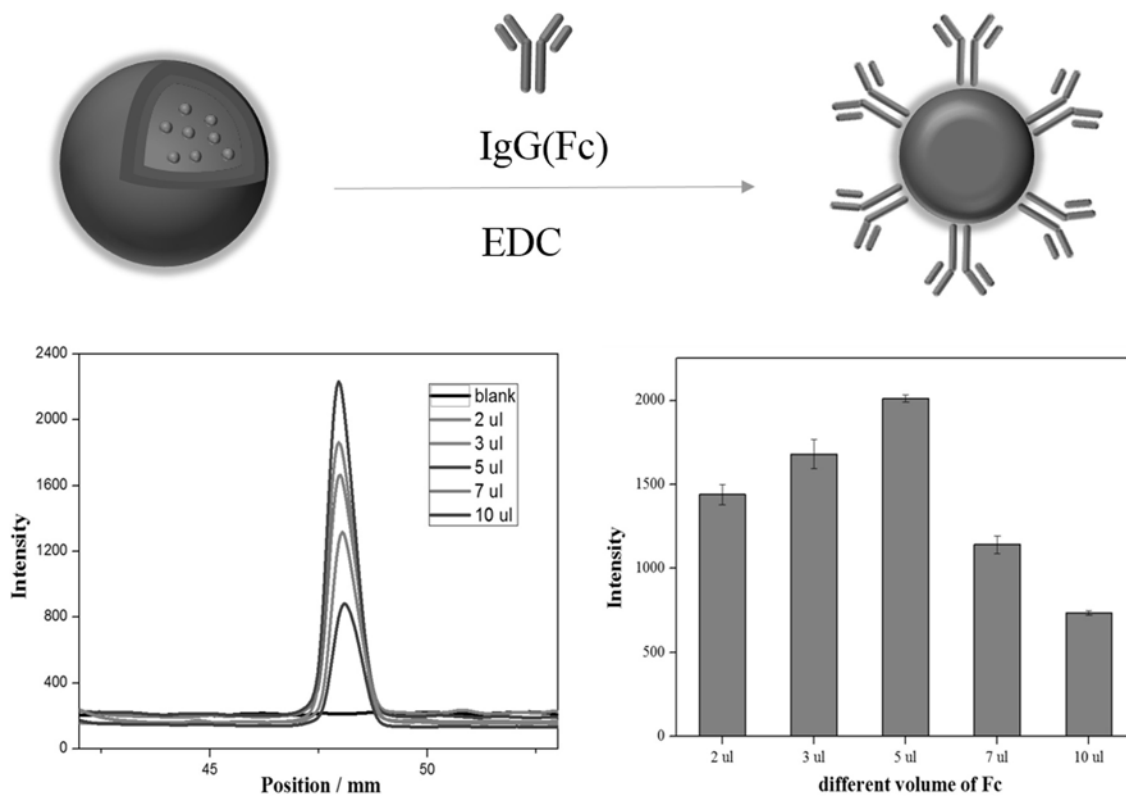


图2

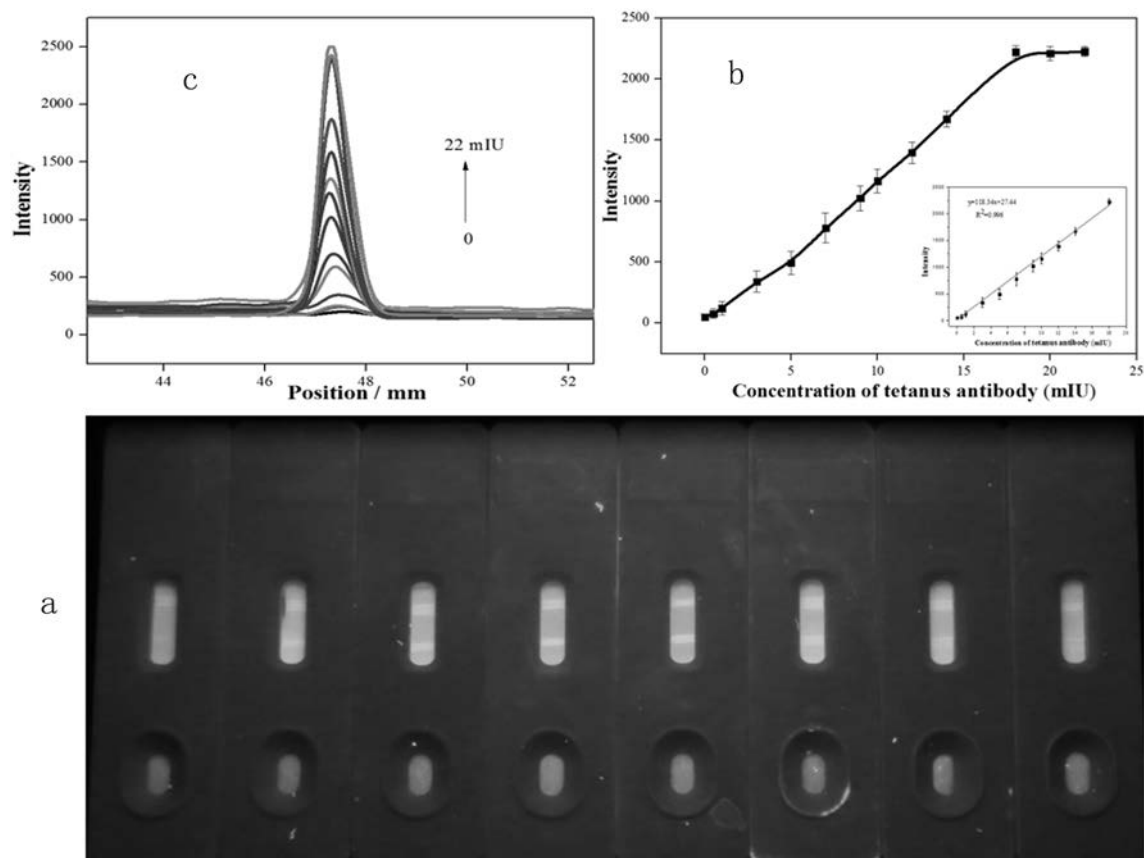


图3

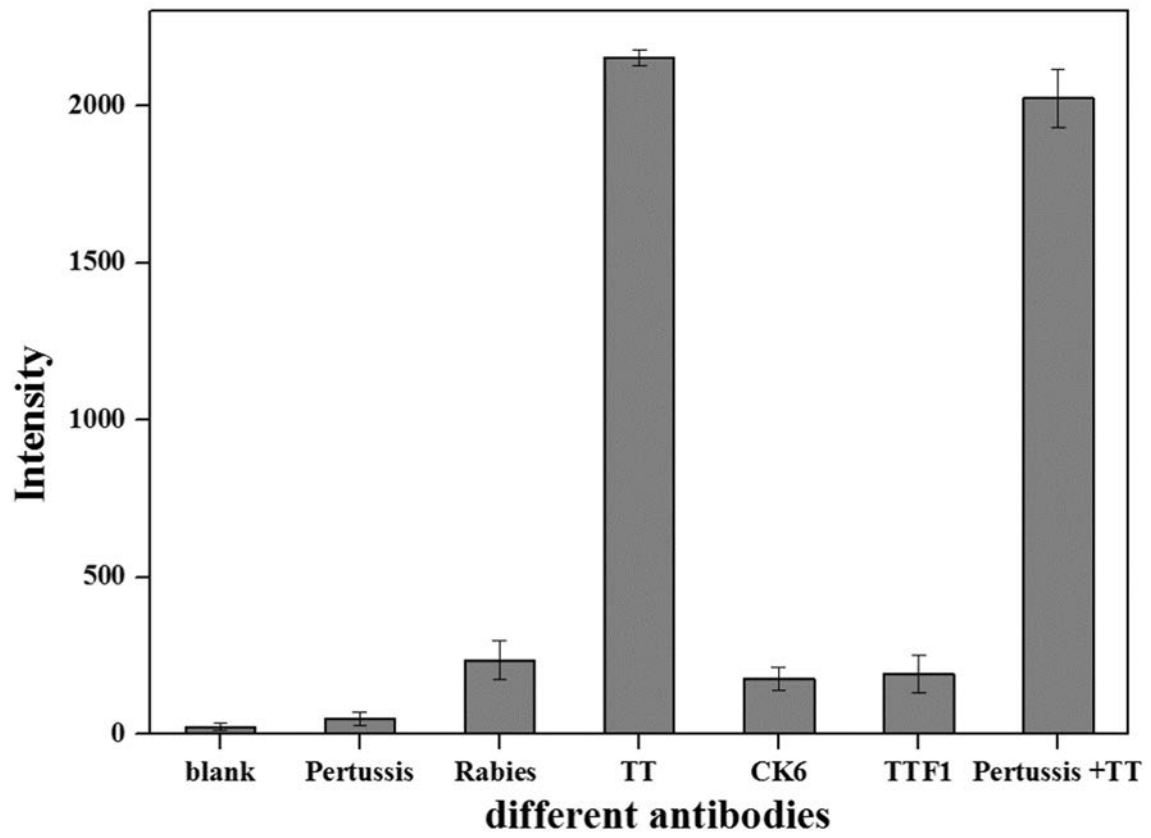


图4

专利名称(译)	基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN109212208A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811250033.6	申请日	2018-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	李朝辉 陈娟 杨冉 屈凌波		
发明人	李朝辉 陈娟 孟红敏 杨冉 屈凌波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/558 G01N33/588		
代理人(译)	郑园		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于横向侧流层析技术、生物分析技术领域，特别是指基于量子点荧光微球层析检测破伤风抗体的试纸条及其制备方法和使用方法，解决了快速、低耗、便携的检测破伤风抗体含量中遇到的技术问题。所述试纸条的制备方法为：先用质量浓度为0.5-5%TW20溶液对样品垫进行封闭，然后在NC膜上依次划检测线和质控线，将处理过的样品垫和NC膜于37℃真空干燥1h，再把样品垫、NC膜和吸水垫依次粘贴于PVC底板上，两两重叠2-3mm，最后裁切成3.9mm宽，即得成品试纸条。本发明与传统胶体金免疫层析法试纸条相比，本发明具有量子点微球标记物稳定性好，检测的灵敏度高，可实现对低浓度目标物的定量检测。

