



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105203764 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201410405730. X

(22) 申请日 2014. 08. 18

(71) 申请人 董俊

地址 432800 湖北省孝感市大悟县城关镇长
征路 8 号湖北华龙生物制药有限公司

(72) 发明人 胡征 杨波 董俊

(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

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书5页 说明书12页

(54) 发明名称

基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒分型检测的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒分型检测的方法和试剂盒, 其中, 该试剂盒由具有富集人流感病毒抗原功能的抗人流感病毒免疫纳米磁珠、多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针、质控品、样品处理液以及 PBST 缓冲液所组成; 质控品包括阳性质控品以及阴性质控品; 阳性质控品由灭活的人甲、乙流感病毒共同干燥结合到拭子上而成; 阴性质控品是经临床确定为人甲、乙流感病毒均为阴性的人群的咽拭子。本发明提供了一种基于磁性分离和多色量子点标记的能简便、快速、高灵敏度的分型检测人流感病毒抗原的检测方法和试剂盒, 以及该试剂盒的制备及使用方法。

1. 一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

1) 分别将兔抗人甲、乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体与纳米磁珠通过共价偶联,分别制备抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠及抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠;将抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠及抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠等量混合即制得抗人流感病毒免疫纳米磁珠;

2) 将鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体与发射波长为 520nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人甲型流感病毒纳米探针;将鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体与发射波长为 600nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人乙型流感病毒纳米探针;将抗人甲型流感病毒纳米探针与抗人乙型流感病毒纳米探针等量混合即制得多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针;

3) 取人呼吸道分泌物样本,用样品处理液溶解后,加入步骤 1) 制备得到的抗人流感病毒免疫纳米磁珠,充分混合,反应 10-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 2 遍后,向磁分离得到的沉淀物中加入步骤 2) 制备得到的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,反应 10-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 2 遍后,使用荧光酶标仪在 Ex 同为 405nm, Em 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别读取荧光值;所述样品处理液中各组分含量分别为:8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.3g/L NaN_3 , 5ml/L Nonidet P-40, 5ml/L Triton X-100, 所述样品处理液 pH = 7.4;所述 PBST 缓冲液中各组分含量分别为:8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.3g/L NaN_3 , 0.5ml/L Tween-20;所述 PBST 缓冲液 pH = 7.4;

4) 根据步骤 1)-步骤 3) 的方法分别检测四份经临床确定为人甲、乙型流感病毒均为阴性的人群的呼吸道分泌物样品,分别读取 Em 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;所述人甲、乙型流感病毒均为阴性的人群的呼吸道分泌物样品简称人流感病毒阴性对照样品;所述四份人流感病毒阴性对照样品在 Em 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;所述四份人流感病毒阴性对照样品在 Em 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人甲型流感病毒抗原为阳性;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人甲型流感病毒抗原为阴性;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人乙型流感病毒抗原为阳性;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人乙型流感病毒抗原为阴性。

2. 一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由具有富集人流感病毒抗原功能的抗人流感病毒免疫纳米磁珠、多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针、质控品、样品处理液以及 PBST 缓冲液所组成;所述质控品包括阳性质控品以及阴性质控品;所述阳性质控品由灭活的人甲、乙流感病毒共同干燥结合到拭子上而成;所述阴性质控品是经临床确定为人甲、乙流感病毒均为阴性的人群的咽拭子。

3. 一种用于制备如权利要求 2 所述的基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒

抗原分型检测试剂盒的方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

1) 抗人流感病毒免疫纳米磁珠的制备:

1.1) 取5mg磁珠,用1ml MES缓冲液洗涤三次,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清;所述磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为1150nm的羧基磁珠;所述MES缓冲液是质量浓度是2g/L的2-(N-吗啉代)乙磺酸;所述MES缓冲液的 $\text{pH} = 6.0$;所述纳米磁分离器的磁性强度是0.4T;

1.2) 依次加入用步骤1.1)中的MES缓冲液配制的浓度是8-12mg/ml的EDC溶液以及用步骤1.1)中的MES缓冲液配制的浓度是6-10mg/ml的sulfo-NHS溶液各0.5ml,以10-40rpm/min于旋转混合仪中活化1hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用1ml步骤1.1)中的MES缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

1.3) 取5个离心管,在每个离心管中加入200 μL 步骤1.2)所得到的活化后的磁珠,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,向各离心管中加入用PBS缓冲液稀释的浓度为50-200 $\mu\text{g/ml}$ 的兔抗人甲型流感病毒NP蛋白多克隆抗体溶液各1ml,室温下以15rpm/min于旋转混合仪中反应2-6h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入1ml含1mg/ml乙醇胺的上述PBS缓冲液,室温下以15rpm/min于旋转混合仪中反应2h以封闭磁珠上未与抗体反应的羧基;所述PBS缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,所述PBS缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

1.4) 封闭反应完成后,将该5个离心管置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,各用1ml洗涤缓冲液洗涤三遍;所述洗涤缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.5ml/L Tween-20,所述洗涤缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

1.5) 向各个离心管中分别加入1ml保存缓冲液重悬磁珠,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,至此制得抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠;所述保存缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,5g/L 牛血清白蛋白,所述保存缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

1.6) 按与步骤1.1)-1.5)相同的方法利用兔抗人乙型流感病毒NP蛋白多克隆抗体制得抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠;将上述两种免疫纳米磁珠悬液按体积比1:1混合,即制得抗人流感病毒免疫纳米磁珠;

2) 多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针的制备:

其具体制备方法包括:

2.1) 向微量离心管中依次加入4nmol羧基水溶性量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 以及600nmol 碳二亚胺 EDC,以磷酸盐缓冲液定容为2ml,混合溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min后,透析去除过量的作为活化剂的 sulfo-NHS 及 EDC,得到活化后的量子点;所述羧基水溶性量子点的发射波长是520nm;所述磷酸盐缓冲液中各成分含量如下:2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,4g/L 氯化钠;所述磷酸盐缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

2.2) 在步骤2.1)所得到的活化的量子点中,加入4-16nmol的鼠抗人甲型流感病毒NP蛋白单克隆抗体,避光反应2h,加入单端氨基化聚乙二醇 PEG2000-NH₂至终浓度为1%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h;

2.3) 用0.2 μm PES 滤器过滤除去步骤2.2)中的抗体聚集物,然后将滤液转移到50000MW超滤离心管中,以8000g离心力在4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心15min,除去未发生偶联反应的抗体和

反应中的副产物；

2.4) 收集步骤 2.3) 中超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 2ml 磷酸盐洗涤液中,再将此溶液转移到一个新的 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min,收集超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 1ml 磷酸盐保存液中,置于 4℃ 保存备用,至此制得量子点标记的抗人甲型流感病毒纳米探针;所述磷酸盐洗涤液中各成分含量如下:2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,4g/L 氯化钠,5ml/L 吐温-20,0.3g/L 叠氮钠,所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7.4;所述磷酸盐保存液中各成分含量如下:2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,10g/L 牛血清白蛋白,0.3g/L 叠氮钠;所述磷酸盐保存液的 pH = 7.4;

2.5) 按与步骤 2.1)-2.4) 相同的方法利用鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体及发射波长为 600nm 的羧基水溶性量子点制得量子点标记的抗人乙型流感病毒纳米探针;将上述两种含不同发射波长量子点标记的纳米探针的溶液按体积比 1:1 混合,即制得多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针;

3) PBST 缓冲液的配制:

其具体配制方法包括:

取 8g NaCl,0.2g KCl,0.24 KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄,0.3g NaN₃,0.5ml Tween-20 溶解于 800ml 蒸馏水中,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml;

4) 样品处理液的配制:

取 8g NaCl,0.2g KCl,0.24 KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄,0.3g NaN₃,5ml Nonidet P-40,5ml Triton X-100,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml;

5) 质控品的制备:

5.1 阳性质控品:阳性质控品由灭活的人甲、乙型流感病毒共同干燥结合到拭子上而成;

5.2 阴性质控品:阴性质控品即经临床确定为人甲、乙流感病毒均为阴性的人群的咽拭子。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:所述步骤 1.2) 中,依次加入用步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液配制的浓度是 10mg/ml 的 EDC 溶液以及用步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液配制的浓度是 8mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml,以 15rpm/min 于旋转混合仪中活化 1hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用 1ml 步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

所述步骤 1.3) 中,向各离心管中加入用 PBS 缓冲液稀释的浓度为 100 μg/ml 的兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体溶液各 1ml,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 3h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液;

所述步骤 2.2) 中,在步骤 2.1) 所得到的活化的量子点中,加入 12nmol 的鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体,避光反应 2h。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其特征在于:所述量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:所述磁珠是以超顺磁性 Fe₃O₄ 为内核、壳

材料为聚苯乙烯、表面官能团为羧基、粒径为 1150nm 的羧基磁珠。

7. 一种基于如权利要求 2 所述的基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒的使用方法,其特征在于:所述使用方法包括以下步骤:

1) 将待检样本用 0.5ml 样本处理液溶解后将溶解液转入 1.5ml 普通离心管中;所述样本处理液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,5ml/L Nonidet P-40,5ml/L Triton X-100;所述样本处理液的 $\text{pH} = 7.4$;

2) 向步骤 1) 中的离心管中加入基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的抗人流感病毒免疫纳米磁珠 50-200 μl ,室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 10-45min 后取下,将离心管插入纳米磁分离器磁分离 3min,用移液器吸出上清;

3) 添加试剂盒中的 PBST 缓冲液 1ml 洗涤两遍,采用纳米磁分离器磁分离后吸出洗涤液,最后用 1ml PBS 缓冲液重悬磁珠,制得免疫纳米磁珠-病毒抗原复合物;所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ;所述 PBS 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

4) 取 100 μl 步骤 3) 得到的免疫纳米磁珠-病毒抗原复合物于另一离心管中,再加入 100 μl 基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 10-45min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的病毒抗原的免疫结合,量子点被标记到病毒抗原表面,形成磁珠-病毒抗原-量子点“三明治”复合物;

5) 反应完成后,采用纳米磁分离器磁分离 3min,除去多余的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,用试剂盒中的 PBST 缓冲液液清洗 2 遍,复合物重新分散在 100 μl PBS 缓冲液中,使用荧光酶标仪在 Ex 同为 405nm,Em 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别对其荧光值进行分别检测;所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ;所述 PBS 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

6) 按上述同样的方法检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样品及一份阳性质控品样品,分别读取 Em 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;四份阴性质控品样品在 Em 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;四份阴性质控品样品在 Em 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;若步骤 5) 中待检样品在 Em 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为待检样本中人甲型流感病毒抗原为阳性;若步骤 5) 中待检样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值,则判断为人待检样本中人甲型流感病毒抗原为阴性;若步骤 5) 中待检样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值,则判断为待检样本中人乙型流感病毒抗原为阳性;若步骤 5) 中待检样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值,则判断为待检样本中人乙型流感病毒抗原为阴性;若阳性质控品样品的荧光值小于 CUT-OFF1 或 CUT-OFF2 值,则表明试剂盒失效。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于:所述步骤 2) 中,向步骤 1) 中的离心管中加入基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的抗人流感病毒免疫纳米磁珠 140 μl ,室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min 后取下,将离心管插入磁力架分离 3min,用移液器吸出上清;

所述步骤 4) 中,取 100 μl 步骤 3) 得到的免疫纳米磁珠-病毒抗原复合物于另一离心

管中,再加入 100 μ l 基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的病毒抗原的免疫结合,量子点被标记到病毒抗原表面,形成磁珠-病毒抗原-量子点“三明治”复合物。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法,其特征在于:所述待检样本包括但不限于咽拭子。

基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒分型检测的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,具体为一种基于磁性分离和多色量子点标记的检测人流感病毒抗原的快速检测方法及检测试剂盒,以及该检测试剂盒的制备及使用方法。

背景技术

[0002] 流行性感冒病毒,简称流感病毒,是一种造成人类及动物患流行性感冒的 RNA 病毒,在分类学上,流感病毒属于正黏液病毒科,它会造成急性上呼吸道感染,并借由空气迅速的传播,在世界各地常会有周期性的大流行。病毒最早是在 1933 年由英国人威尔逊·史密斯(Wilson Smith)发现的,他称为 H1N1。H 代表血凝素;N 代表神经氨酸酶。数字代表不同类型。

[0003] 流感病毒呈球形或丝状,直径 80 ~ 120nm。病毒由三层构成,内层为病毒核衣壳,含核蛋白(NP)、P 蛋白和 RNA。NP 是可溶性抗原(S 抗原),具有型特异性,抗原性稳定。P 蛋白(P1、P2、P3)可能是 RNA 转录和复制所需的多聚酶。中层为病毒囊膜,由一层类脂体和一层膜蛋白(MP)构成,MP 抗原性稳定,也具有型特异性。外层为两种不同糖蛋白构成的辐射状突起,即血凝素(hemagglutinin, H)和神经氨酸酶(neuraminidase, N)。H 能引起红细胞凝集,是病毒吸附于敏感细胞表面的工具, N 则能水解粘液蛋白,水解细胞表面受体特异性糖蛋白末端的 N-乙酰神经氨酸,是病毒复制完成后脱离细胞表面的工具。H 和 N 均有变异特性,故只有株特异的抗原性,其抗体具有保护作用。

[0004] 根据 NP 抗原性,将流感病毒分为甲、乙、丙三型。按 H 和 N 抗原不同,同型病毒又分若干亚型。临床上流行的绝大部分为甲型及乙型,丙型较为罕见。流感病毒的临床特征与病毒毒株、人群年龄、生理状况等相关,主要表现发热、畏寒、干咳、头痛、喉咙痛、周身不适、乏力、鼻塞和流涕等。该病潜伏期短,传染性强,传播迅速,对婴幼儿、年迈者及体质弱的人危害较大。三型流感中以甲型流感威胁最大。由于流感病毒致病力强,易发生变异,若人群对变异株缺乏免疫力,则易引起暴发流行,已有数千万人死亡,对社会影响甚大。

[0005] 由于流感症状与副流感病毒肺炎、呼吸道合胞病毒肺炎及腺病毒肺炎临床上几乎无法区别,不做病原学检查,很难确诊流感病毒感染。因此建立简便、快速、可行、能早期诊断流感病毒感染的方法非常必要。

[0006] 目前流感病毒的检测方法主要有 3 类:一是分离培养法,其是证实感染的“金标准”,但由于培养周期较长,操作步骤较多,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,检测被检者血清中流感病毒抗体水平,可间接提示流感病毒感染的存在。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流感病毒特异性抗体的差异,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流感病毒 DNA 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,是目前研究人流感病毒感染的重要手段,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,建立人流感病毒特异性抗原诊断方法十分必要。目前,已公开报道的检测人流感病毒抗原的方法主要为双抗夹心 ELISA 法、胶体金免疫层析法、间接免疫荧光法等,但这些方法或存在操作步骤繁多、检测时间长,或存在检测灵敏度低、检测成本高等问题。

发明内容

[0007] 针对背景技术中存在的这些技术问题,本发明提供了一种基于磁性分离和多色量子点标记的能简便、快速、高灵敏度的分型检测人流感病毒抗原的检测方法和试剂盒,以及该试剂盒的制备及使用方法。

[0008] 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0009] 一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

[0010] 1) 分别将兔抗人甲、乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体与纳米磁珠通过共价偶联,分别制备抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠及抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠;将抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠及抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠等量混合即制得抗人流感病毒免疫纳米磁珠;

[0011] 2) 将鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体与发射波长为 520nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人甲型流感病毒纳米探针;将鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体与发射波长为 600nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人乙型流感病毒纳米探针;将抗人甲型流感病毒纳米探针与抗人乙型流感病毒纳米探针等量混合即制得多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针;

[0012] 3) 取人呼吸道分泌物样本(包括但不限于咽拭子),用样品处理液溶解后,加入步骤 1) 制备得到的抗人流感病毒免疫纳米磁珠,充分混合,反应 10-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 2 遍后,向磁分离得到的沉淀物中加入步骤 2) 制备得到的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,反应 10-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 2 遍后,使用荧光酶标仪在 Ex 同为 405nm,Em 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别读取荧光值;所述样品处理液中各组分含量分别为:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,5ml/L Nonidet P-40,5ml/L Triton X-100,所述样品处理液 pH = 7.4;所述 PBST 缓冲液中各组分含量分别为:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,0.5ml/L Tween-20;所述 PBST 缓冲液 pH = 7.4;

[0013] 4) 根据步骤 1)-步骤 3) 的方法分别检测四份经临床确定为人甲、乙型流感病毒均为阴性的人群的呼吸道分泌物样品,分别读取 Em 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;所述人甲、乙型流感病毒均为阴性的人群的呼吸道分泌物样品简称人流感病毒阴性对照样品;所述四份人流感病毒阴性对照样品在 Em 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;所述四份人流感病毒阴性对照样品在 Em 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人甲型流感病毒抗原为阳性;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人甲型流感病毒抗原为阴性;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em

为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人乙型流感病毒抗原为阳性;若步骤 3) 中人呼吸道分泌物样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人乙型流感病毒抗原为阴性。

[0014] 一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由具有富集人流感病毒抗原功能的抗人流感病毒免疫纳米磁珠、多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针、质控品、样品处理液以及 PBST 缓冲液所组成;所述质控品包括阳性质控品以及阴性质控品;所述阳性质控品由灭活的人甲、乙流感病毒共同干燥结合到拭子上而成;所述阴性质控品是经临床确定为人甲、乙流感病毒均为阴性的人群的咽拭子。

[0015] 一种用于制备基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒的方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

[0016] 1) 抗人流感病毒免疫纳米磁珠的制备:

[0017] 1.1) 取 5mg 磁珠,用 1ml MES 缓冲液洗涤三次,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清;所述磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为 1150nm 的羧基磁珠;所述 MES 缓冲液是质量浓度是 2g/L 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸;所述 MES 缓冲液的 $\text{pH} = 6.0$;所述纳米磁分离器的磁性强度是 0.4T;

[0018] 1.2) 依次加入用步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液配制的浓度是 8-12mg/ml 的 EDC 溶液以及用步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液配制的浓度是 6-10mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml,以 10-40rpm/min 于旋转混合仪中活化 1hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用 1ml 步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

[0019] 1.3) 取 5 个离心管,在每个离心管中加入 200 μL 步骤 1.2) 所得到的活化后的磁珠,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,向各离心管中加入用 PBS 缓冲液稀释的浓度为 50-200 $\mu\text{g/ml}$ 的兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体溶液各 1ml,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 2-6h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 2h 以封闭磁珠上未与抗体反应的羧基;所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,所述 PBS 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0020] 1.4) 封闭反应完成后,将该 5 个离心管置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,各用 1ml 洗涤缓冲液洗涤三遍;所述洗涤缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.5ml/L Tween-20,所述洗涤缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0021] 1.5) 向各个离心管中分别加入 1ml 保存缓冲液重悬磁珠,置于 4℃ 保存备用,至此制得抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠;所述保存缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,5g/L 牛血清白蛋白 (BSA),所述保存缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0022] 1.6) 按与步骤 1.1)-1.5) 相同的方法利用兔抗人乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体制得抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠;将上述两种免疫纳米磁珠悬液按体积比 1:1 混合,即制得抗人流感病毒免疫纳米磁珠;

[0023] 2) 多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针的制备:

[0024] 其具体制备方法包括:

[0025] 2.1) 向微量离心管中依次加入 4nmol 羧基水溶性量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 以及 600nmol 碳二亚胺 EDC, 以磷酸盐缓冲液定容为 2ml, 混合溶液, 37℃ 反应 30min 后, 透析去除过量的作为活化剂的 sulfo-NHS 及 EDC, 得到活化后的量子点; 所述羧基水溶性量子点的发射波长是 520nm; 所述磷酸盐缓冲液中各成分含量如下: 2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 4g/L 氯化钠; 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.4;

[0026] 2.2) 在步骤 2.1) 所得到的活化的量子点中, 加入 4-16nmol 的鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体, 避光反应 2h, 加入单端氨基化聚乙二醇 PEG2000-NH₂ 至终浓度为 1%, 封闭未反应的活化羧基位点, 继续避光反应 1h;

[0027] 2.3) 用 0.2 μm PES 滤器过滤除去步骤 2.2) 中的抗体聚集物, 然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min, 除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物;

[0028] 2.4) 收集步骤 2.3) 中超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液, 溶于 2ml 磷酸盐洗涤液中, 再将此溶液转移到一个新的 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min, 收集超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液, 溶于 1ml 磷酸盐保存液中, 置于 4℃ 保存备用, 至此制得量子点标记的抗人甲型流感病毒纳米探针; 所述磷酸盐洗涤液中各成分含量如下: 2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 4g/L 氯化钠, 5ml/L 吐温-20, 0.3g/L 叠氮钠, 所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7.4; 所述磷酸盐保存液中各成分含量如下: 2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 2g/L 氯化钠, 10g/L 牛血清白蛋白, 0.3g/L 叠氮钠; 所述磷酸盐保存液的 pH = 7.4;

[0029] 2.5) 按与步骤 2.1)-2.4) 相同的方法利用鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体及发射波长为 600nm 的羧基水溶性量子点制得量子点标记的抗人乙型流感病毒纳米探针; 将上述两种含不同发射波长量子点标记的纳米探针的溶液按体积比 1:1 混合, 即制得多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针;

[0030] 3) PBST 缓冲液的配制:

[0031] 其具体配制方法包括:

[0032] 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24KH₂PO₄, 1.44g Na₂HPO₄, 0.3g NaN₃, 0.5ml Tween-20 溶解于 800ml 蒸馏水中, 用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4, 再定容至 1000ml;

[0033] 4) 样品处理液的配制:

[0034] 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24KH₂PO₄, 1.44g Na₂HPO₄, 0.3g NaN₃, 5ml Nonidet P-40, 5ml Triton X-100, 用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4, 再定容至 1000ml;

[0035] 5) 质控品的制备:

[0036] 5.1 阳性质控品: 阳性质控品由灭活的人甲、乙型流感病毒共同干燥结合到拭子上而成;

[0037] 5.2 阴性质控品: 阴性质控品即经临床确定为人甲、乙流感病毒均为阴性的人群的咽拭子。

[0038] 作为优选, 本发明在步骤 1.2) 中, 依次加入用步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液配制的浓度是 10mg/ml 的 EDC 溶液以及用步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液配制的浓度是 8mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml, 以 15rpm/min 于旋转混合仪中活化 1hr, 置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清, 用 1ml 步骤 1.1) 中的 MES 缓冲液重悬, 得到活化后的磁珠;

[0039] 所述步骤 1.3) 中,向各离心管中加入用 PBS 缓冲液稀释的浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ 的鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体溶液各 1ml ,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 3h ,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液;

[0040] 所述步骤 2.2) 中,在步骤 2.1) 所得到的活化的量子点中,加入 12nmol 的鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体,避光反应 2h 。

[0041] 作为优选,本发明所采用的量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点。

[0042] 作为优选,本发明所采用的磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、壳材料为聚苯乙烯、表面官能团为羧基、粒径为 1150nm 的羧基磁珠。

[0043] 一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒的使用方法,其特征在于:所述使用方法包括以下步骤:

[0044] 1) 将待检样本用 0.5ml 样本处理液溶解后将溶解液转入 1.5ml 普通离心管中;所述样本处理液中各成分含量如下: 8g/L NaCl , 0.2g/L KCl , $0.24\text{g/L KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4$, 0.3g/L NaN_3 , $5\text{ml/L Nonidet P-40}$, $5\text{ml/L Triton X-100}$;所述样本处理液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0045] 2) 向步骤 1) 中的离心管中加入基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的抗人流感病毒免疫纳米磁珠 $50\text{--}200\mu\text{l}$,室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 $10\text{--}45\text{min}$ 后取下,将离心管插入纳米磁分离器磁分离 3min ,用移液器吸出上清;

[0046] 3) 添加试剂盒中的 PBST 缓冲液 1ml 洗涤两遍,采用纳米磁分离器磁分离后吸出洗涤液,最后用 1ml PBS 缓冲液重悬磁珠,制得免疫纳米磁珠-病毒抗原复合物;所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下: 8g/L NaCl , 0.2g/L KCl , $0.24\text{g/L KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4$;所述 PBS 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0047] 4) 取 $100\mu\text{l}$ 步骤 3) 得到的免疫纳米磁珠-病毒抗原复合物于另一离心管中,再加入 $100\mu\text{l}$ 基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 $10\text{--}45\text{min}$,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的病毒抗原的免疫结合,量子点被标记到病毒抗原表面,形成磁珠-病毒抗原-量子点“三明治”复合物;

[0048] 5) 反应完成后,采用纳米磁分离器磁分离 3min ,除去多余的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,用试剂盒中的 PBST 缓冲液清洗 2 遍,复合物重新分散在 $100\mu\text{l}$ PBS 缓冲液中,使用荧光酶标仪在 Ex 同为 405nm , Em 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别对其荧光值进行分别检测;所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下: 8g/L NaCl , 0.2g/L KCl , $0.24\text{g/L KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4$;所述 PBS 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0049] 6) 按上述同样的方法检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样品及一份阳性质控品样品,分别读取 Em 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;四份阴性质控品样品在 Em 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;四份阴性质控品样品在 Em 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;若步骤 5) 中待检样品在 Em 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为待检样本中人甲型流感病毒抗原为

阳性；若步骤 5) 中待检样本在 E_m 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值，则判断为人待检样本中人甲型流感病毒抗原为阴性；若步骤 5) 中待检样本在 E_m 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值，则判断为待检样本中人乙型流感病毒抗原为阳性；若步骤 5) 中待检样本在 E_m 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值，则判断为待检样本中人乙型流感病毒抗原为阴性；若阳性质控品样品的荧光值小于 CUT-OFF1 或 CUT-OFF2 值，则表明试剂盒失效。

[0050] 作为优选，本发明所提出的步骤 2) 中，向步骤 1) 中的离心管中加入基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的抗人流感病毒 免疫纳米磁珠 140 μ l，室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min 后取下，将离心管插入磁力架分离 3min，用移液器吸出上清；

[0051] 所述步骤 4) 中，取 100 μ l 步骤 3) 得到的免疫纳米磁珠 - 病毒抗原复合物于另一离心管中，再加入 100 μ l 基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗原分型检测试剂盒中的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针，室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min，通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的病毒抗原的免疫结合，量子点被标记到病毒抗原表面，形成磁珠 - 病毒抗原 - 量子点“三明治”复合物。

[0052] 作为优选，本发明所提供的待检样本包括但不限于咽拭子。

[0053] 本发明所需的发射波长为 520nm、600nm 的羧基水溶性纳米量子点、1150nm 直径的羧基磁珠，鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体，鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体，兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体，兔抗人乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体可到相关专业的研究单位、公司购买或定制；所需的仪器、设备、药品均有市售。

[0054] 本发明相比现有技术具有如下优点：

[0055] 1、本发明利用了免疫纳米磁珠对样品的可富集性、分离的速度快、效率高等优点，同时结合量子点光化学稳定性高、荧光强度高特性，使得检测体系具备多重信号协同放大的效果，从而具有超高的检测灵敏度（如其对人甲型流感病毒（ATCC 编号 VR-1743）的检测底线为 0.1ng/ml，对人乙型流感病毒（ATCC 编号 VR-790）的检测底线亦为 0.1ng/ml），从而大大降低了对临床取样的质量要求，提高了阳性率，用其对临床样品的检测结果与目前对该病原体的检测“金标准”- 培养法的相比无统计学差异。

[0056] 2、本发明检测方法简单，检测快速，易于判定，检测成本低廉，可进行两型人流感病毒的同步共检，克服了现有技术检测阳性率低、成本高、操作复杂繁琐、耗时长、无法进行临床应用的不足。

[0057] 3、由于检测试剂盒检测的是人流感病毒抗原而非抗体（抗体的出现需要感染几周以后），故而可进行早期诊断和防治，临床诊断符合率高。该方法在人流感病毒的临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

[0058] 4、本发明检测方法所用的临床样本为呼吸道分泌物如痰液等，而非血液，可免除婴幼儿患者抽血检查的痛苦与家长的心理负担，故较易于推广。

具体实施方式

[0059] 本发明是根据免疫学中的双抗夹心原理，利用免疫纳米磁珠对样品的可富集性、分离的速度快、效率高等优点，结合量子点光化学稳定性高、荧光强度高特性，建立的一套具备多重信号协同放大、具有超高灵敏度及高度特异性的快速分型检测人流感病毒的新

方法,具有广阔的市场应用前景。

[0060] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0061] 各种试剂的配制及所需材料的说明

[0062] 1. PBS 缓冲液:称取 1.44g 磷酸氢二钠,0.24g 磷酸二氢钾,8g 氯化钠,0.2g 氯化钾,溶解于 900ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4 后用去离子水定容至 1000ml。

[0063] 2. 兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体:为 Abcam 公司产品,货号 ab91648,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/ml。

[0064] 3. 兔抗人乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体:购自上海超研生物科技有限公司产品,货号 ab70783,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/ml。

[0065] 4. 鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体:为 Abcam 公司产品,货号 ab128193,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/ml。

[0066] 5. 鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体:为 Abcam 公司产品,货号 ab20711,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/ml。

[0067] 6. 量子点:本发明中所用的两种量子点均为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点,其发射波长分别为 520nm 及 600nm,自武汉珈源量子点技术开发有限公司购买,产品名称为羧基水溶性量子点-520 及羧基水溶性量子点-600。

[0068] 7. 磁珠:本发明中所用磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、壳材料为聚苯乙烯、表面官能团为羧基、粒径为分别为 50nm、180nm、350nm、1150nm、3 μm 的羧基磁珠,可从陕西北美基因股份有限公司、上海奥润微纳新材料科技有限公司购买。

[0069] 8. 人甲型流感病毒:H1N1 亚型,购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC VR-1743。

[0070] 9. 人乙型流感病毒:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC VR-790。

[0071] 10. 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)。

[0072] 实施例 1 抗人流感病毒免疫纳米磁珠的制备

[0073] 1. 抗人流感病毒多克隆抗体偶联磁珠反应条件的优化:

[0074] 以偶联了抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体的磁珠作为固相载体,量子点标记的抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体作为检测抗体,通过双抗夹心法原理检测人甲型流感病毒抗原,观察磁珠与多抗的偶联情况。分别对磁珠的粒径,以及 EDC/NHS 活化剂浓度、偶联抗体浓度、偶联时间、封闭剂种类等偶联条件进行了一系列的优化选择。

[0075] 1.1 磁珠粒径的选择

[0076] 选择粒径为 50nm、180nm、350nm、1150nm、3 μm 的羧基磁珠,均加入含 4mg/ml EDC 及 4mg/ml NHS 的 PBS 缓冲液进行活化反应后,分别与兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体进行偶联反应。分别将制备好的免疫纳米磁珠检测 10ng/mL 的人甲型流感病毒(ATCC 编号 VR-1743),荧光显微镜下观察结果,选择荧光强度大,背景荧光干扰少,以及在磁场作用下分离速度较快者为最适磁珠粒径。结果表明粒径 1150nm 的磁珠最符合本发明的要求,确定最适磁性微球粒径为 1150nm。

[0077] 1.2 EDC/NHS 活化剂浓度的选择

[0078] 将反应体系中 EDC 和 NHS 浓度各自设为 1 ~ 10mg/ml 后进行浓度梯度组合,分别

活化粒径 1150nm 的羧基磁珠。将制备好的免疫纳米磁珠检测 10ng/mL 的人甲型流感病毒 (ATCC 编号 VR-1743), 选择荧光最强者为 EDC 和 NHS 溶液的最适活化浓度。结果表明当 EDC 浓度为 5mg/ml、NHS 浓度为 4mg/ml 时偶联效果最好。

[0079] 1.3 偶联抗体浓度的选择

[0080] 将 20 μ g、40 μ g、60 μ g、80 μ g、100 μ g、120 μ g、140 μ g、160 μ g、200 μ g 的兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体分别与 1mg 按上述最优方法活化的粒径为 1150nm 的磁珠进行偶联。将制备好的免疫纳米磁珠检测 10ng/mL 的人甲型流感病毒 (ATCC 编号 VR-1743), 结果发现, 当抗体的投放量小于 100 μ g/mg 时, 荧光强度随着抗体的浓度增加而增加, 而当抗体的质量浓度大于 100 μ g/mg 时, 荧光强度基本不变甚至略有减小, 因此本实施例选择兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体的偶联量为 100 μ g/mg。

[0081] 1.4 偶联时间的选择

[0082] 确定磁珠的粒径、EDC/NHS 活化剂浓度及抗体偶联量后, 将抗体与磁珠的偶联反应时间分别设为 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h, 将制备好的免疫纳米磁珠检测 10ng/mL 的人甲型流感病毒 (ATCC 编号 VR-1743)。结果发现, 当偶联时间 >3h 时, 荧光强度趋于稳定, 此后再延长偶联时间, 荧光不再增强。因此, 确定兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体与磁珠的最适偶联反应时间为 3h。偶联时间远少于传统 ELISA 法的 24h。

[0083] 1.5 封闭剂的选择

[0084] 按照上述确定的最优条件选择磁珠的粒径、EDC/NHS 活化剂浓度、抗体偶联量及偶联时间后进行偶联反应。偶联结束后, 选择 BSA, 乙醇胺, Tris 和 D-氨基葡萄糖盐酸盐作为免疫纳米磁珠封闭剂, 制得成品免疫纳米磁珠。将制备好的免疫纳米磁珠检测 10ng/mL 的人甲型流感病毒 (ATCC 编号 VR-1743)。结果发现, 采用乙醇胺作为封闭剂的免疫纳米磁珠的检测荧光值最高。推测由于乙醇胺的分子较小, 可以较好的消耗由于空间位阻未与抗体结合的表面羧基, 使封闭更为完全, 并且有效减少空间位阻效应对已连接抗体的结构影响。

[0085] 兔抗人乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体偶联磁珠反应条件的优化结果与上述步骤 1.1-1.5 描述的兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体与磁珠偶联反应相关反应条件的优化结果完全一致。

[0086] 2. 偶联过程:

[0087] 取 5mg 磁珠 (以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为 1150nm 的羧基磁珠) 于 1.5ml 普通离心管中, 用 1ml MES 缓冲液 (2g/L MES, pH6.0) 洗涤三次, 置于纳米磁分离器中进行磁分离 (0.4T) 后移除上清, 依次加入用上述 MES 缓冲液配制的浓度为 10mg/ml 的 EDC 溶液及用上述 MES 缓冲液配制的浓度为 8mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml, 以 15rpm/min 于旋转混合仪中活化 1hr, 磁分离后移除上清, 用 1ml 上述的 MES 缓冲液重悬; 取 5 个离心管, 每个离心管中加入 200 μ L 上述活化的磁珠, 磁分离后吸出上清, 向各管中加入用 PBS 缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH7.4) 稀释的浓度为 100 μ g/ml 的兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体溶液各 1ml, 室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 3h, 磁分离移除上清后, 各加入 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液, 室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 2h 以封闭磁珠上未与抗体反应的羧基。磁分离后移除各管上清, 各用 1ml 洗涤缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.5ml/L Tween-20, pH7.4) 洗涤三遍, 最后各用 1ml 保存缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl,

0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.3g/L NaN_3 , 5g/L BSA, pH7.4) 重悬磁珠, 置于 4℃ 保存备用, 至此制得抗人甲型流感病毒免疫纳米磁珠。

[0088] 按上述步骤用相同的方法利用兔抗人乙型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体制得抗人乙型流感病毒免疫纳米磁珠。将上述两种免疫纳米磁珠悬液按体积比 1:1 混合, 即制得抗人流感病毒免疫纳米磁珠。

[0089] 实施例 2 多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针的制备

[0090] 1. 纳米羧基量子点标记鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体反应条件的优化:

[0091] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记 pH 的确定

[0092] 将标记反应中磷酸盐缓冲液 pH 分别设为 5, 6, 7, 8, 9, 对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定, 观察不同 pH 值对偶联反应的影响, 确定了量子点标记单抗反应的最佳 pH 为 7.0-8.0。本实验选择 pH7.4。

[0093] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0094] 将量子点摩尔浓度与单抗浓度之比分别设置为 1:1, 1:2, 1:3 及 1:4, 进行标记反应后, 对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定, 观察二者不同浓度比对偶联反应的影响, 确定量子点标记鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体反应的最佳摩尔浓度比为量子点与抗体摩尔比为 1:3。本实验选择该最优浓度比来确定标记量。

[0095] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0096] 以乙醇胺、Tris、PEG2000- NH_2 或者 BSA 作为封闭剂, 进行标记反应后, 对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定, 观察不同的封闭剂对于标记反应的影响, 结果发现, PEG2000- NH_2 为最佳封闭剂, 其可显著提高标记复合物的胶体稳定性及免疫活性。

[0097] 纳米羧基量子点标记鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体反应的条件优化结果与上述步骤 1.1-1.3 描述的纳米羧基量子点标记鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体反应相关条件的优化结果均完全一致。

[0098] 2. 标记过程:

[0099] 向微量离心管中依次加入 4nmol 羧基水溶性量子点 (发射波长 520nm)、600nmol N- 羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和 600nmol 碳二亚胺 (EDC), 以磷酸盐缓冲液 (2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 4g/L 氯化钠, pH7.4) 定容为 2ml, 不停地混合溶液, 37℃ 反应 30min 后, 透析去除过量的作为活化剂的 sulfo-NHS 与 EDC。在活化的量子点中, 加入 12nmol 的鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体, 避光反应 2h, 加入单端氨基化聚乙二醇 (PEG2000- NH_2) 至终浓度为 1%, 封闭未反应的活化羧基位点, 继续避光反应 1h。用 0.2 μm PES 滤器过滤除去抗体聚集物, 然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min, 除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物。收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液, 溶于 2ml 磷酸盐洗涤液 (2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 4g/L 氯化钠, 5ml/L 吐温-20, 0.3g/L 叠氮钠, pH7.4) 中, 再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min, 收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液, 溶于 1ml 磷酸盐保存液 (2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 2g/L 氯化钠, 10g/L BSA, 0.3g/L 叠氮钠, pH7.4) 中, 置于 4℃ 保存备用, 至此制得量子点标记的抗人甲型流感病毒纳米探针。

[0100] 按上述相同方法利用鼠抗人乙型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体及发射波长为 600nm 的羧基水溶性量子点制得量子点标记的抗人乙型流感病毒 NP 蛋白纳米探针。将上述两种不同发射波长量子点标记的纳米探针溶液按体积比 1:1 混合,即制得多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针。

[0101] 实施例 3 免疫纳米磁珠对人流感病毒抗原进行免疫捕获条件的优化

[0102] 以偶联了兔抗人甲型流感病毒 NP 蛋白多克隆抗体的免疫纳米磁珠作为固相载体,量子点标记的鼠抗人甲型流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体作为检测抗体,通过双抗夹心法原理,建立人流感病毒抗原的检测体系。分别对检测体系中免疫纳米磁珠的用量,捕获时间等条件进行了一系列的优化选择。

[0103] 1. 免疫纳米磁珠加入量的选择

[0104] 将 20 μ l、40 μ l、60 μ l、80 μ l、100 μ l、120 μ l、140 μ l、160 μ l、180 μ l、200 μ l 的由实施例 1 所制备好的免疫纳米磁珠分别加入到 0.5ml 含 10ng/mL 的人甲型流感病毒 (ATCC 编号 VR-1743) 的样品处理液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.3g/L NaN_3 , 5ml/L Nonidet P-40, 5ml/L Triton X-100, pH7.4) 中,进行免疫捕获,再由实施例 2 所描述的量子点标记探针进行检测,记录荧光值。结果发现,随着免疫纳米磁珠加入量的增加,荧光值逐渐增大,当免疫纳米磁珠加入量达到 140 μ l 时,荧光值达到最大。再继续增加免疫纳米磁珠的量,荧光值反而降低。故本实验选择 140 μ l 作为免疫纳米磁珠的最佳加入量。

[0105] 2. 免疫捕获时间的选择

[0106] 确定磁珠的加入量后,取四份实施例 1 所制备好的免疫纳米磁珠,在室温下以 10r/min,对 10ng/mL 的人流感病毒 (ATCC 编号 VR-1743) 进行 10min、15min、20min、30min、45min 及 60min 的免疫捕获,再由实施例 2 所描述的量子点标记探针进行检测,记录荧光值。结果发现,荧光值在免疫捕获 15min 时即达到最大值,故本实验选择 15min 作为免疫捕获的最佳时间。

[0107] 实施例 4 PBST 缓冲液的配制

[0108] 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24g KH_2PO_4 , 1.44g Na_2HPO_4 , 0.3g NaN_3 , 0.5ml Tween-20 溶解于 800ml 蒸馏水中,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml。

[0109] 实施例 5 样品处理液的配制

[0110] 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24g KH_2PO_4 , 1.44g Na_2HPO_4 , 0.3g NaN_3 , 5ml Nonidet P-40, 5ml Triton X-100,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml。

[0111] 实施例 6 质控品的制备

[0112] 1. 阳性质控品:将用 1% 甲醛灭活的人甲型流感病毒 (0.25 μ g) 及人乙型流感病毒 (0.25 μ g) 共同干燥结合到拭子上,即为阳性质控品。

[0113] 2. 阴性质控品:阴性质控品即经临床确定为人甲、乙型流感病毒均为阴性的人群的咽拭子样品。

[0114] 实施例 7 试剂盒的制备

[0115] 由实施例 1 所描述的抗人流感病毒免疫纳米磁珠、实施例 2 所描述的多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针、实施例 4 所描述的 PBST 缓冲液、实施例 5 所描述的样品处理液、实施例 6 所描述的质控品共同组成基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒抗

原分型检测试剂盒。

[0116] 实施例 8 试剂盒的使用方法

[0117] 按常规临床手段获得人咽拭子,用 0.5ml 试剂盒中的样品处理液溶解咽拭子上的临床样本后,将溶解液转入 1.5ml 普通离心管中,向该离心管中加入试剂盒中的抗人流感病毒免疫纳米磁珠 140 μ l,室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min 后取下,将离心管插入磁力架分离 3min,用移液器吸出上清。添加试剂盒中的 PBST 缓冲液 1ml 洗涤两遍,磁分离后吸出洗涤液,最后用 1mL PBS 缓冲液重悬磁珠。取 100 μ l 上述的免疫纳米磁珠-病毒抗原复合物于另一离心管中,再加入 100 μ l 试剂盒中的量子点标记的抗人流感病毒纳米探针,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的病毒抗原的免疫结合,量子点被标记到病毒抗原表面,形成磁珠-病毒抗原-量子点“三明治”复合物。反应完成后,磁分离 3min,除去多余的量子点标记探针,并用 PBST 缓冲液清洗 2 遍,复合物重新分散在 100 μ l PBS 缓冲液中,使用荧光酶标仪在 Ex 同为 405nm,Em 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别对其荧光值进行分别检测;再按上述同样的方法检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样品及一份阳性质控品样品,分别读取 Em 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;四份阴性质控品样品在 Em 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;四份阴性质控品样品在 Em 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;若上述临床人咽拭子样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为上述临床人咽拭子样本中人甲型流感病毒抗原为阳性;若上述临床人咽拭子样本在 Em 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值,则判断为上述临床人咽拭子样本中人甲型流感病毒抗原为阴性。若上述临床人咽拭子样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值,则判断为上述临床人咽拭子样本中人乙型流感病毒抗原为阳性;若上述临床人咽拭子样本在 Em 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值,则判断为上述临床人咽拭子样本中人乙型流感病毒抗原为阴性。

[0118] 若阳性质控品样品的荧光值小于 CUT-OFF1 或 CUT-OFF2 值,则表明试剂盒失效。

[0119] 实施例 9 试剂盒的检测敏感性和特异性试验

[0120] 将人甲型流感病毒 H1N1 亚型毒株 (ATCC 编号 VR-1743) 样品用样品处理液进行系列稀释后,用本试剂盒进行检测,结果表明其检测底限为 0.1ng/ml。将人乙型流感病毒 (ATCC 编号 VR-790) 样品用样品处理液进行系列稀释后,用本试剂盒进行检测,结果表明其检测底线亦为 0.1ng/ml。同时,用解脲支原体 (ATCC 编号 27618)、人型支原体 (ATCC 编号 23114)、肺炎衣原体 (AR-39 株, ATCC 编号 53592)、肺炎链球菌 (ATCC 编号 49619) 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)、流感嗜血杆菌 (ATCC 编号 53781)、卡他莫拉菌 (ATCC 编号 25238)、呼吸道合胞病毒 (ATCC 编号 VR26)、人 I 型副流感病毒 (ATCC 编号 VR-94)、人 II 型副流感病毒 (ATCC 编号 VR-92)、人 III 型副流感病毒 (ATCC 编号 VR-93) 等进行检测,试剂盒检测含这些微生物的样品处理液都为阴性。

[0121] 实施例 10 敏感性的对比试验

[0122] 将人流感病毒 H1N1 亚型毒株 (ATCC 编号 VR-1743) 的鸡胚培养上清用样品处理液做系列稀释后,分别用本发明实施例 7 所述试剂盒和美国 Quidel 公司检测试剂盒做对比检测,结果发现,美国 Quidel 公司试剂盒的检测底线为 800 倍稀释,而本发明提供的试剂盒的

检测底线为 32000 倍稀释。

[0123] 实施例 11 临床测试例

[0124] 以人流感病毒检测“金标准”分离培养法作为参照,在流行季节,取 200 例临床咽拭子标本进行人甲型流感病毒抗原的检测,培养法阳性率为 10.5% (21/200),本试剂盒为 11.0% (22/200),2 种方法的符合率为 98.5% (197/200)。具体结果如表 1 所示。

[0125] 表 1 临床标本的检测结果

[0126]

培养法	本试剂盒		
	阳性	阴性	总计
阳性	20	1	21
阴性	2	177	179
总计	22	178	200

[0127] 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。

专利名称(译)	基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒分型检测的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN105203764A	公开(公告)日	2015-12-30
申请号	CN201410405730.X	申请日	2014-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	董俊		
申请(专利权)人(译)	董俊		
当前申请(专利权)人(译)	董俊		
[标]发明人	胡征 杨波 董俊		
发明人	胡征 杨波 董俊		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN105203764B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于磁性分离和多色量子点标记的人流感病毒分型检测的方法和试剂盒，其中，该试剂盒由具有富集人流感病毒抗原功能的抗人流感病毒免疫纳米磁珠、多色量子点标记的抗人流感病毒纳米探针、质控品、样品处理液以及PBST缓冲液所组成；质控品包括阳性质控品以及阴性质控品；阳性质控品由灭活的人甲、乙流感病毒共同干燥结合到拭子上而成；阴性质控品是经临床确定为人甲、乙流感病毒均为阴性的人群的咽拭子。本发明提供了一种基于磁性分离和多色量子点标记的能简便、快速、高灵敏度的分型检测人流感病毒抗原的检测方法和试剂盒，以及该试剂盒的制备及使用方法。

培养法	本试剂盒		
	阳性	阴性	总计
阳性	20	1	21
阴性	2	177	179
总计	22	178	200