



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110346553 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201810318419.X

(22)申请日 2018.04.04

(71)申请人 南京东纳生物科技有限公司

地址 211112 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技创新园2号楼北区6-7层

(72)发明人 张宇 王建国 韩国志

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

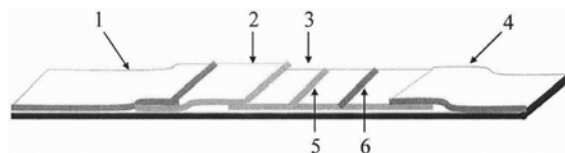
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法,所述试剂盒由PCR产物磁珠法纯化试剂、荧光免疫层析定量检测试纸条组成。磁珠法纯化试剂由超顺磁性磁珠分散在核酸吸附液中组成,通过选择性富集PCR产物,可有效地去除寡聚核苷酸、引物二聚体、盐、蛋白质等污染;所述检测试纸条由样品垫、包被荧光微球抗体(抗DNA扩增产物一端标记物)偶联物的结合垫、包含检测线(抗DNA扩增产物另一端标记物)和质控线的NC膜、吸水纸以及PVC胶板组成。本发明试剂盒,操作简便、快捷,结果准确并且判读实现数字化定量,有利于实际应用。



1. 一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒由PCR产物磁珠法纯化试剂、洗涤液、洗脱液、荧光免疫层析定量检测试纸条组成。

2. 根据权利要求1所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述PCR产物磁珠法纯化试剂由磁珠分散在吸附液中组成。

3. 根据权利要求2所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述磁珠由具有超顺磁性的铁氧体纳米粒子,包括 Fe_3O_4 纳米粒子、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子或掺杂过渡金属元素及其化合物的铁氧体纳米粒子等构成的微球或与高分子复合而形成的微球,尺寸100nm-10 μm ,其外壳使用二氧化硅包覆或含有羧基的高分子包覆。

4. 根据权利要求2所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于,吸附液为高盐低pH溶液,其主要成分包括1-5M的氯化钠、氯化钾、醋酸钠、醋酸钾,5%-50%质量的PEG、PVP,10-50%体积的乙醇、异丙醇,由其中两种或两种以上组分组成,所用高分子分子量介于2000-50000g/mol。

5. 根据权利要求1所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述荧光免疫层析定量检测试纸条组成包括底板、吸水纸、硝酸纤维膜、结合垫、样品垫;所述底板上粘贴硝酸纤维膜,硝酸纤维膜的一端连接吸水纸、另一端粘贴结合垫,所述结合垫上搭接样品垫;所述硝酸纤维膜上设有一条包被有二抗的质控线C线,还设有一条与所述质控线C线平行的包被有抗B抗体(能与DNA一端标记物特异结合)的检测线T线;所述结合垫包被有荧光微球抗A抗体(能与DNA另一端标记物特异结合)偶联物;所述试纸条装在卡克中,上盖上设置有加样窗口和信号读取窗口,其中加样窗口与样品垫对应,信号读取窗口与质控线C线、检测线T线对应。

6. 根据权利要求5所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述的抗A抗体和抗B抗体,可选自链霉亲和素、抗地高辛抗体或抗荧光染料抗体,所述抗荧光染料抗体可选自抗Fam抗体、抗FITC抗体、抗Cy3抗体、抗Cy5抗体、抗Tetramethylrhodamine抗体、抗AlexaFlour抗体等;抗B抗体应选用与抗A抗体不同的抗体。

7. 根据权利要求5所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于进行PCR扩增的引物上标记有特定标记物,可选自生物素、地高辛、荧光染料等,使扩增后的DNA产物两端分别含有不同的标记物。

8. 根据权利要求1所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述的PCR产物,包括PCR直接扩增DNA产物、从凝胶样本回收的PCR扩增DNA产物以及等温扩增DNA产物。

9. 根据权利要求1-8所述一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒的检测方法为:

- 1) 将PCR产物磁珠法纯化试剂与PCR产物混匀,形成固液均相分散混浊液;
- 2) 利用磁场将吸附有PCR产物的磁珠从分散悬浊液中磁分离吸附在管壁上,吸弃上清液;
- 3) 使用洗涤液将吸附有PCR产物的磁性纳米复合材料洗涤两次,洗涤过程中无需将磁性纳米材料吹打散开;其中,所述洗涤液为85%乙醇溶液或以高浓度钠盐、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐为主要组分,辅以5~50mM的乙二胺四乙酸二钠、乙酸钠的高盐溶液;
- 4) 待磁性纳米复合材料表面洗涤液挥发完全后,使用洗脱液将DNA从磁性纳米复合材

料中解析出来;其中,所述洗脱液为去离子水或10mM三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液,其pH为8.0;

5) 在核酸洗脱液保存管中加入运行缓冲液至终体积100 μ L并混合均匀;

6) 滴加100微升样品到荧光免疫层析定量检测试纸条的样品垫上,1-3分钟后用免疫荧光定量分析仪读取荧光信号值。

一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料技术、分子生物学技术、侧流层析技术等领域。更具体的,本发明涉及一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 随着分子生物学的发展,聚合酶链式反应(PCR)技术、等温扩增技术、基因芯片、探针杂交等技术已经广泛应用于微生物检测、感染性和遗传性疾病的诊断、基因表达及突变的检测等诸多领域等的研究。然而,检测结果的判断主要依赖于传统的琼脂糖凝胶电泳检测,该方法不但耗时费力,而且由于涉及核酸染料等,安全性问题也有待提高。目前虽然逐渐出现多种核酸检测方法,然而基本受制于昂贵的仪器和试剂成本(如荧光定量PCR)或检测灵敏度不高(比色法、浊度法)等因素的限制,难以真正普及到基层和实际临床检验工作中。

[0003] 以免疫反应为基础的蛋白质胶体金试纸条检测技术目前正逐步应用于核酸检测,主要是在PCR上下游引物的5'端分别修饰如生物素和异硫氰酸荧光素(FITC),核酸试纸条上的控制线以及检测线处分别标记有链霉亲和素及抗FITC抗体。在扩增产物与运行缓冲液混合后点在试纸条上时,当有扩增产物存在时,其会与金标上修饰有FITC的胶体金结合,到达检测线时,线上的抗FITC抗体将标有FITC的产物捕获,从而显色。其余的胶体金向质控线处运行与生物素结合而显色。此方法方便快捷,但无法避免引物二聚体带来的假阳性结果的产生,特异性不够好。有鉴于此,基于特异性核酸序列扩增物的探针法,此方法避免了引物二聚体带来的影响,但其本质是基于核酸杂交原理,不但增加了方案设计难度和成本,而且需要温度控制等条件,也难以彻底解决引物(探针)二聚体的问题,操作繁琐费时,灵敏度也有待提高。而基于核酸变性剂的方法则因在解决引物二聚体的同时对DNA扩增产物也会产生较大影响而检测限受到限制。因此,本领域亟需一种特异性更好、灵敏度更高的PCR产物检测试纸条和检测方法。

发明内容

[0004] 为了解决上述现有技术中存在的问题,本发明提供一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法,具有操作便捷,灵敏度高、可定量的特点。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明具体方案如下:

[0006] 一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒由PCR产物磁珠法纯化试剂、洗涤液、洗脱液、荧光免疫层析定量检测试纸条组成。

[0007] 所述PCR产物磁珠法纯化试剂由磁珠分散在吸附液中组成。

[0008] 所述磁珠由具有超顺磁性的铁氧体纳米粒子,包括 Fe_3O_4 纳米粒子、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子或掺杂过渡金属元素及其化合物的铁氧体纳米粒子等构成的微球或与高分子复合而形成的微球,尺寸100nm-10 μm ,其外壳使用二氧化硅包覆或含有羧基的高分子包覆。

[0009] 吸附液为高盐低pH溶液,其主要成分包括1-5M的氯化钠、氯化钾、醋酸钠、醋酸钾,5%-50%质量的PEG、PVP,10-50%体积的乙醇、异丙醇等,由其中两种或两种以上组分组成,所用高分子分子量介于2000-50000g/mol。

[0010] 所述荧光免疫层析定量检测试纸条组成包括底板、吸水纸、硝酸纤维膜、结合垫、样品垫。所述底板上粘贴硝酸纤维膜,硝酸纤维膜的一端连接吸水纸、另一端粘贴结合垫,所述结合垫上搭接样品垫。所述硝酸纤维膜上设有一条包被有二抗的质控线C线,还设有一条与所述质控线C线平行的包被有抗B抗体(能与DNA一端标记物特异结合)的检测线T线。所述结合垫包被有荧光微球抗A抗体(能与DNA另一端标记物特异结合)偶联物。所述试纸条装在卡克中,上盖上设置有加样窗口和信号读取窗口,其中加样窗口与样品垫对应,信号读取窗口与质控线C线、检测线T线对应。

[0011] 所述的抗A抗体和抗B抗体,可选自链霉亲和素、抗地高辛抗体或抗荧光染料抗体,所述抗荧光染料抗体可选自抗Fam抗体、抗FITC抗体、抗Cy3抗体、抗Cy5抗体、抗Tetramethylrhodamine抗体、抗AlexaFlour抗体等;抗B抗体应选用与抗A抗体不同的抗体。

[0012] 进行PCR扩增的引物上标记有特定标记物,可选自生物素、地高辛、荧光染料等,使扩增后的DNA产物两端分别含有不同的标记物。

[0013] 所述的PCR产物,包括PCR直接扩增DNA产物、从凝胶样本回收的PCR扩增DNA产物以及等温扩增DNA产物等。

[0014] 一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒的检测方法为:

[0015] 1) 将PCR产物磁珠法纯化试剂与PCR产物混匀,形成固液均相分散混浊液;

[0016] 2) 利用磁场将吸附有PCR产物的磁珠从分散悬浊液中磁分离吸附在管壁上,吸弃上清液;

[0017] 3) 使用洗涤液将吸附有PCR产物的磁性纳米复合材料洗涤两次,洗涤过程中无需将磁性纳米材料吹打散开。其中,所述洗涤液为85%乙醇溶液或以高浓度钠盐、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐为主要组分,辅以5~50mM的乙二胺四乙酸二钠、乙酸钠的高盐溶液。

[0018] 4) 待磁性纳米复合材料表面洗涤液挥发完全后,使用洗脱液将DNA从磁性纳米复合材料中解析出来。其中,所述洗脱液为去离子水或10mM三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液,其pH为8.0。

[0019] 5) 在核酸洗脱液保存管中加入运行缓冲液至终体积100 μ L并混合均匀;

[0020] 6) 滴加100微升样品到荧光免疫层析定量检测试纸条的样品垫上,1-3分钟后用免疫荧光定量分析仪读取荧光信号值,优选2分钟。

[0021] 本发明的有益效果在于:将蛋白质快速检测技术的原理用于核酸检测,同时结合PCR产物快速纯化技术,创造出一种新型的核酸检测试纸条,操作简单快捷,特异性好、灵敏度高。相较于已有的核酸检测试纸条,本发明创新性地应用磁珠法PCR产物纯化技术以解决引物(探针)二聚体等的干扰,无需额外设计杂交探针,也无需温控孵育试纸条等条件。利用双抗夹心法对PCR产物进行可视化判读和定量检测,结果更准确并且判读实现数字化,更适于推广到基层和实际临床检验工作中。

[0022] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述。本发明的保护范围并不以具体实施方式为限,而是由权利要求加以限定。

附图说明

[0023] 图1为核酸试纸条的结构示意图。其中1为样品垫,2为连接垫,3为纤维膜,4为吸附垫,5为检测线,6为控制线。

[0024] 图2为试纸条检测结果显示示意图。其中,当检测线和控制线处均有条带时为阳性(如图2的左图),当只有控制线有色时为阴性(如图2的右图)。

[0025] 图3为阳性样本PCR产物纯化前和PCR产物纯化后琼脂糖凝胶电泳检测对比图。

[0026] 图4为阳性样本PCR产物纯化前和PCR产物纯化后使用试纸条检测对比图。

[0027] 图5为阴性样本PCR产物(含引物二聚体)纯化前和PCR产物纯化后琼脂糖凝胶电泳检测对比图。

[0028] 图6为阴性样本PCR产物(含引物二聚体)纯化前和PCR产物纯化后使用试纸条检测对比图。

[0029] 图7为PCR检测灵敏度试验琼脂糖凝胶电泳实验结果图。

[0030] 图8为本发明PCR产物检测试纸条的灵敏度试验结果图。

[0031] 图9为本发明PCR产物检测试纸条的灵敏度试验线性关系图。

具体实施方式

[0032] 下面通过具体实施例对本发明所述的技术方案给予进一步详细的说明,但有必要指出,以下实施例只用于对发明内容的描述,并不构成对本发明保护范围的限制。

[0033] 实施例1:沙门氏菌PCR扩增产物的制备

[0034] 1.沙门氏菌菌株样本:沙门氏菌菌株由中国农业科学院江苏省家禽科学研究所龚建森老师惠赠。

[0035] 2.核酸提取:核酸提取使用南京东纳生物科技有限公司的细菌DNA提取试剂盒(磁珠法),提取步骤如下:

[0036] (1)裂解

[0037] a.菌体收集:取1mL菌液加入2mL离心管中,8000rpm离心3min,弃上清。

[0038] b.菌体裂解:向离心管中加入600 μ L裂解液S1-2、40 μ L裂解液S2和20 μ L溶菌酶(50mg/mL),用枪头反复吹吸或涡旋混匀至彻底悬浮菌体(无块状菌体),60 $^{\circ}$ C水浴25min。

[0039] c.DNA萃取:取出反应管,待冷却至室温,加入400 μ L氯仿,剧烈振荡15s,静置3min,12000rpm,离心10min。

[0040] (2)结合

[0041] 尽量取尽上清于新的1.5mL EP管中,加入等体积的异丙醇以及振荡混匀的50 μ L磁珠,颠倒混匀1min,静置3min。将EP管置于磁铁上进行磁分离,吸弃废液(吸净管盖及管底残液)。

[0042] (3)洗涤

[0043] 加入600 μ L 70%乙醇,轻柔混匀1min,将EP管置于磁铁上进行磁分离,吸净管盖及管底的残液。重复本步骤一次。

[0044] (4)洗脱

[0045] 室温晾干5-10min至乙醇挥发完全(参考标准:侧面观察磁珠无反光即可),加入

100 μ L洗脱液,缓慢抽吸混匀,56 $^{\circ}$ C水浴10min。每隔2-3min轻摇EP管几下混匀。然后置于磁铁上进行磁分离,小心吸取上清液至新的EP管中,保存备用。

[0046] 所提取核酸浓度为约350ng/ μ L,A260/280为1.75,A260/230为2.3。

[0047] 3.沙门氏菌通用扩增引物制备:

[0048] 引物序列的设计参考本专利申请人另一授权专利(公开号CN 103898222 B)。

[0049] 上游引物序列为5'-Biotin-CCGACAAACGATTCTGGTA-3' ,

[0050] 下游引物序列为5'-Dig-CCGACATCGGCATTATCCG-3' ;

[0051] 引物委托苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0052] 4.PCR扩增:PCR反应试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司(产品号:R004A),PCR反应采用20 μ L体系,包括18.5 μ L的PCR反应液和1.5 μ L的模板。反应体系如下所示:

	<试剂>	<用量>
[0053]	2 \times PCR mix	10 μ L
	上游引物 (10 μ M)	0.5 μ L
	下游引物 (10 μ M)	0.5 μ L
	待检样品DNA	1.5 μ L
[0054]	无菌去离子水	7.5 μ L
	合计	20.0 μ L/反应

[0055] 上述反应体系配制于PCR管中,同时设置阳性对照和阴性对照。

[0056] 5.PCR反应条件:将上述配置完成的含反应体系的PCR管混匀后离心,PCR检测体系扩增参数具体为:先94 $^{\circ}$ C预变性5min,之后开始扩增循环,每个循环的程序为:94 $^{\circ}$ C变性20s,56 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸20s;共36个循环;循环结束后,72 $^{\circ}$ C延伸8min,4 $^{\circ}$ C保存。结果判断:反应结束取5 μ L产物使用2%浓度琼脂糖凝胶电泳检测。

[0057] 实施例2:PCR产物快速纯化试剂盒的使用

[0058] 1.PCR扩增产物纯化的组装:

[0059] 将磁性纳米复合材料与吸附液混合均匀,形成终浓度7.5mg/mL的固液均相混合溶液,分装于5mL的产品试剂瓶中备用。配制85%乙醇溶液作为洗涤液分装于50mL的产品试剂瓶中备用。配制10mM的Tris-HCl溶液(pH=8.0),分装于10mL的洗脱液产品试剂瓶中备用。

[0060] 2.PCR扩增产物纯化,步骤如下:

[0061] 1)充分混合震荡磁珠,使管内磁珠完全均匀悬浮起来。

[0062] 2)向样品管中加入待纯化的DNA样品溶液5微升。

[0063] 3)取1.8 \times 样品体积的磁珠溶液加入样品管中,漩涡震荡5秒后,室温静止结合5min。

[0064] 注:放置期间如出现磁珠沉降现象应及时颠倒或者旋窝混匀,以保证磁珠处于悬浮状态。

[0065] 4)将样品管置于磁力架上2min左右或待磁珠被磁力架装置完全吸附,保持样品管在磁力架上静止,用移液枪吸取上清并弃掉,操作过程中避免触碰到磁珠团。

[0066] 5)保持样品管在磁力架上,向管内慢慢加入300 μ L 85%乙醇,保持样品管不离开磁力架以及磁珠团始终被吸附在管壁上,禁止分散开。

[0067] 6) 将样品管置于磁力架上2min左右或待磁珠被磁力架完全吸附,保持样品管在磁力架上静止,用移液枪吸取上清并弃掉,操作过程中避免触碰到磁珠团。

[0068] 7) 重复步骤5~6,将管内的液体全部吸除干净。

[0069] 8) 将样品管从磁力架上取出,于室温放置3~5min,使残留乙醇充分挥发。

[0070] 注:避免真空干燥,磁珠过于干燥将会降低DNA洗脱效率。

[0071] 9) 向管内加入15 μ L洗脱液,并用移液枪轻轻吹打5-10次,使磁珠重悬混匀,操作过程中应避免产生气泡。

[0072] 10) 室温放置5min以充分洗脱。

[0073] 注:为了提高洗脱效率,放置期间如出现磁珠沉降现象应及时颠倒或者旋窝混匀,以保证磁珠处于悬浮状态。

[0074] 11) 将洗脱样品管放回磁力架上2min或待所有磁珠都被磁力架装置完全吸附。

[0075] 12) 小心地将洗脱上清转移到新的灭过菌的管子中。

[0076] 实施例3:PCR产物检测试纸条的应用

[0077] 1.PCR产物检测试纸条的组装

[0078] PCR产物检测试纸条,其组成包括底板、吸水纸、硝酸纤维膜、结合垫、样品垫。所述底板上粘贴硝酸纤维膜,硝酸纤维膜的一端连接吸水纸、另一端粘贴结合垫,所述结合垫上搭接样品垫,硝酸纤维膜上设有一条包被有一种抗A抗体的质控线C线,其特征在于,所述硝酸纤维膜上还设有一条与所述质控线C线平行的包被有抗B抗体的检测线T线,所述结合垫为固定有已标记链霉亲和素的荧光微球的玻璃纤维膜。所述试纸条还设有一个上盖,所述上盖上设置有加样窗口和信号读取窗口,其中加样窗口与样品垫对应,信号读取窗口与质控线C线、检测线T线对应。

[0079] 具体制备过程如下:

[0080] (1) 选用亲水的玻璃纤维为样品垫和结合垫,将样品垫、结合垫浸泡在100mL缓冲液与效应物的混合溶液中,2min后取出,然后在70 $^{\circ}$ C烘箱中干燥待用;将标记链霉亲和素的荧光微球探针以5 μ L/cm的量,喷洒在结合垫上、干燥,制得固定有探针的结合垫以及经过处理的样品垫。所述缓冲液为pH=9.0.002M的磷酸缓冲液,所述效应物为占处理液总质量1wt%的分子量为400~20000的PEG、1wt%的叠氮钠、0.05wt%的酪蛋白、0.05wt%的胎牛血清蛋白、0.01wt%的海藻糖。

[0081] (2) 选用跑水速度为90s的硝酸纤维膜,将硝酸纤维膜放置在湿度为25~65%的密闭箱中平衡1h,将120 μ g抗地高辛抗体用pH为6.5的Tris-盐酸缓冲液稀释至2mg/mL,60 μ g羊抗鼠IgG抗体用缓冲液稀释至1mg/mL,将上述两种抗体在硝酸纤维膜上划线,划线量为0.8 μ L/cm,划线结束后,干燥备用;所述用于稀释羊抗鼠IgG抗体的缓冲液为pH=7.4、浓度为0.005M的磷酸盐缓冲液。

[0082] (3) 在带有粘性的PVC底板中部粘贴步骤(2)制备的硝酸纤维膜,所述硝酸纤维膜一端粘贴吸水纸,二者重叠宽度为2cm;所述硝酸纤维膜另一端接结合垫,二者相互交错,重叠宽度为4cm;样品垫覆盖在结合垫上,将底板固定,最后裁切成免疫层析试纸条。

[0083] (4) 将裁切好的免疫层析试纸条加上上盖,上盖上设置有加样窗口和信号读取窗口,其中加样窗口与样品垫对应,信号读取窗口与质控线C线、检测线T线对应。

[0084] 2.PCR产物检测试纸条的使用

- [0085] (1) 在核酸洗脱液保存管中加入运行缓冲液至终体积100微升并混合均匀。
- [0086] (2) 向PCR产物检测测试纸条的加样窗口滴加100微升混合液,室温静置2分钟后用荧光检测设备读取荧光信号值。
- [0087] (3) 判读参考标准:
- [0088] 阳性反应:检测线、质控线均有亮带,荧光信号值大于2000。
- [0089] 阴性反应:质控线有亮带,检测线无亮带,荧光信号值小于1000。
- [0090] 若质控线处无亮带,则检测失败或试纸条失败,建议重新检测。
- [0091] 阳性样品结果如下:

平行样	PCR 产物纯化前		PCR 产物纯化后	
	T	C	T	C
[0092] A1	26393	25351	25597	26035
A2	23016	26669	21959	24292
A3	28389	27637	25264	25678
运行缓冲液	0	43063		

- [0093] 阴性样本检测结果如下:

平行样	PCR 产物纯化前		PCR 产物纯化后	
	T	C	T	C
[0094] B1	28621	16703	198	48362
B2	33423	11439	202	47623
B3	9285	45086	135	49351
运行缓冲液	0	47258		

- [0095] 实施例4:灵敏度评价实验

[0096] 本实施例测试本发明PCR产物检测测试纸条的灵敏度。方法为:首先将提取的沙门氏菌DNA进行10倍梯度稀释(原始浓度 1.5×10^8 cfu/mL,稀释倍数从 10^1 到 10^7),按照实施例1-3中的方法提取DNA之后依次进行PCR扩增、产物纯化,5 μ LPCR产物纯化得到20 μ L洗脱液备用。向核酸洗脱液保存管中加入运行缓冲液至终体积100微升并混合均匀。向PCR产物检测测试纸条的加样窗口滴加100微升混合液,室温静置2分钟后用荧光检测设备读取荧光信号值。

- [0097] 判读参考标准:
- [0098] 阳性反应:检测线、质控线均有亮带,荧光信号值大于2000。
- [0099] 阴性反应:质控线有亮带,检测线无亮带,荧光信号值小于1000。
- [0100] 若质控线处无亮带,则检测失败或试纸条失败,重新检测。
- [0101] PVR产物检测测试纸条结果如下:

样品	荧光信号强度	
	T	C
1.5×10^7	48125	11703
1.5×10^6	45136	15439
1.5×10^5	38162	22086
1.5×10^4	32026	25487
1.5×10^3	25185	36825
1.5×10^2	12153	43125
1.5×10^1	762	45165
阴性对照	198	46372
运行缓冲液	0	47258

[0102]

[0103] 以上所述的实施实例对本发明的技术方案进行了详细的说明,应理解的是以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用于限制本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述揭示的技术内容做出些许改动或修饰为等同变化的等效实施例,但是,凡在本发明的原则范围内所做的任何修改或改进等,均应包含在本发明范围之内。

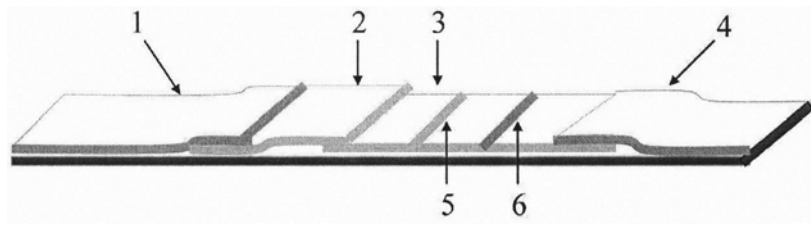


图1

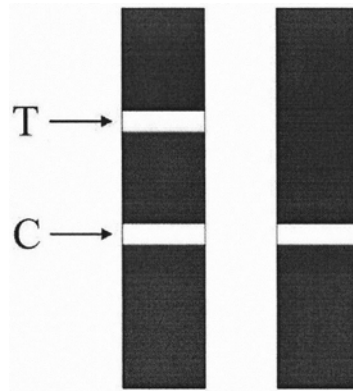


图2

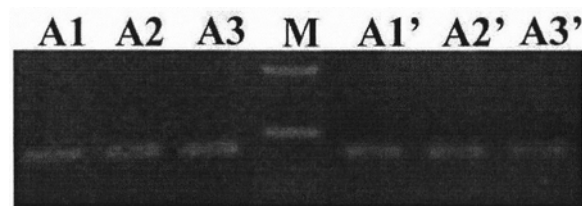


图3

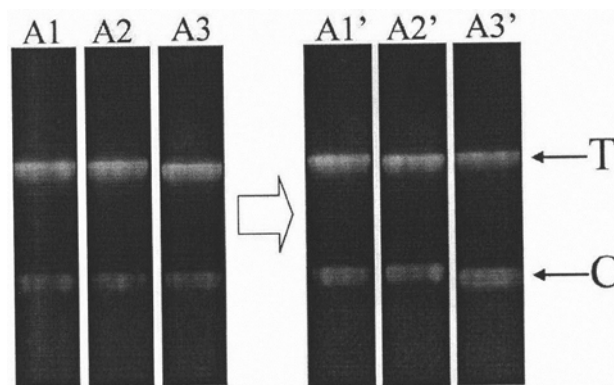


图4

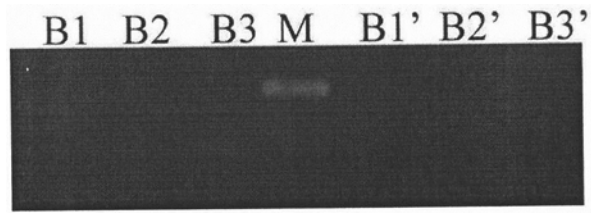


图5

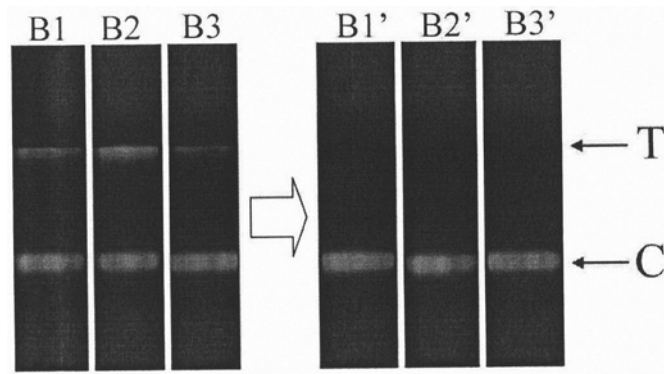


图6

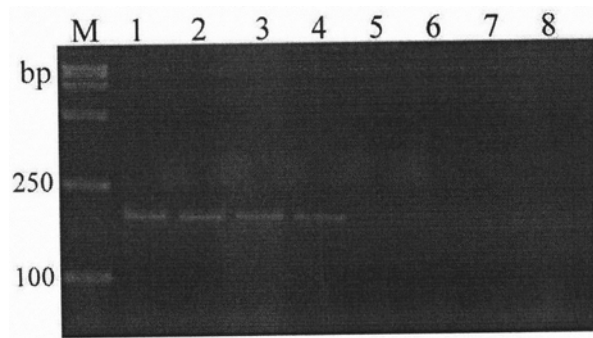


图7

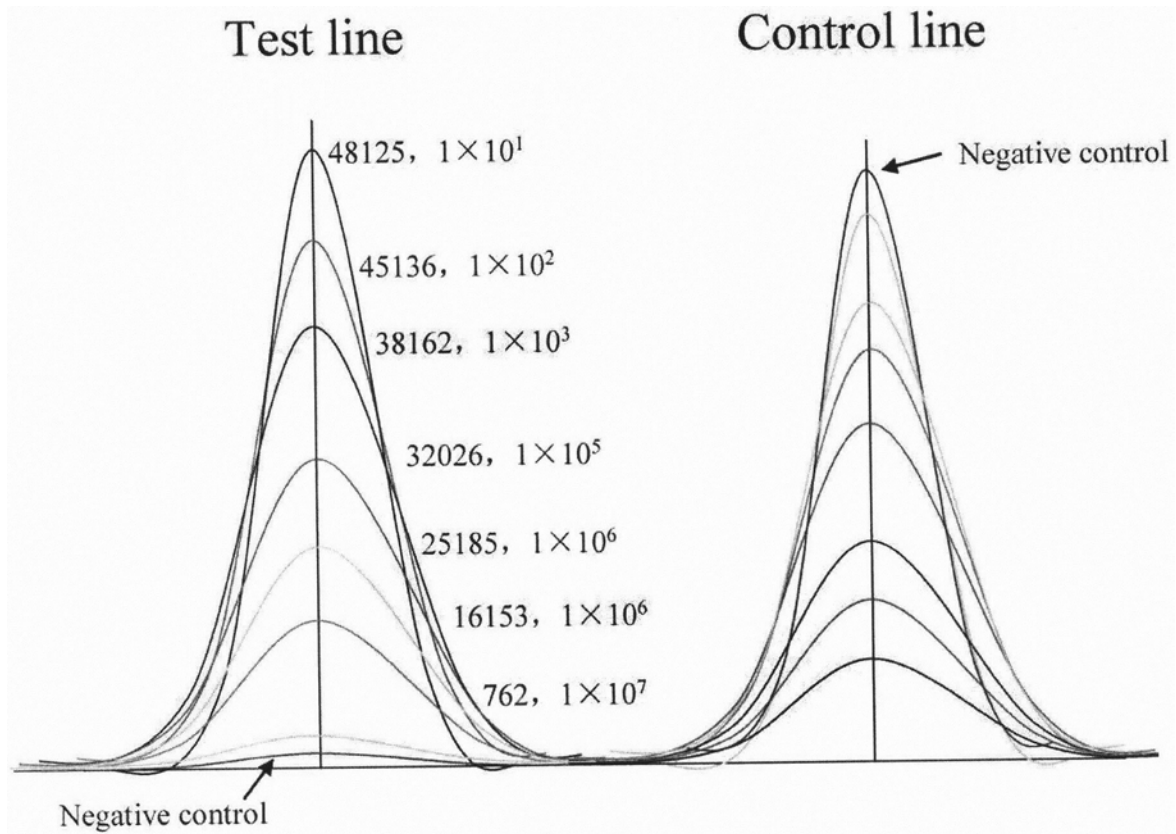


图8

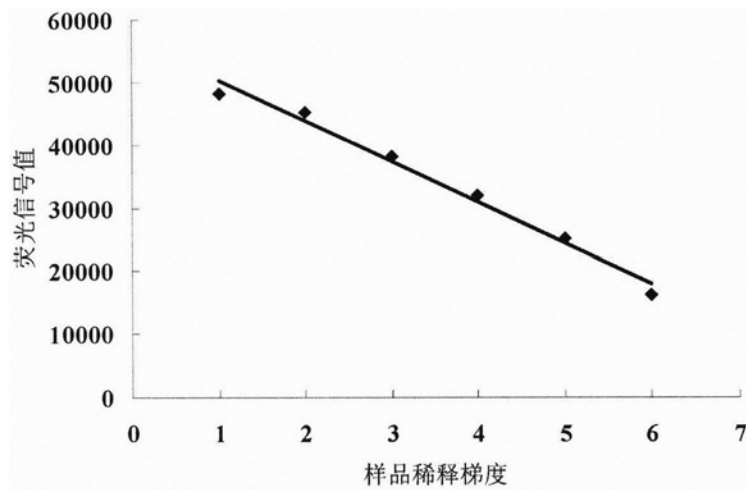


图9

专利名称(译)	一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN110346553A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201810318419.X	申请日	2018-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
[标]发明人	张宇 王建国 韩国志		
发明人	张宇 王建国 韩国志		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种PCR产物磁珠法纯化联合快速荧光定量检测试剂盒及其检测方法，所述试剂盒由PCR产物磁珠法纯化试剂、荧光免疫层析定量检测试纸条组成。磁珠法纯化试剂由超顺磁性磁珠分散在核酸吸附液中组成，通过选择性富集PCR产物，可有效地去除寡聚核苷酸、引物二聚体、盐、蛋白质等污染；所述检测试纸条由样品垫、包被荧光微球抗体(抗DNA扩增产物一端标记物)偶联物的结合垫、包含检测线(抗DNA扩增产物另一端标记物)和质控线(NC膜、吸水纸以及PVC胶板组成。本发明试剂盒，操作简便、快捷，结果准确并且判读实现数字化定量，有利于实际应用。

