



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106841601 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201611272846.6

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 广州市达瑞生物技术股份有限公司

地址 510665 广东省广州市高新技术产业
开发区荔枝山路6号

(72)发明人 吴英松 邓传欢 董志宁 李志雄

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页
序列表4页 附图3页

(54)发明名称

寨卡病毒多片段融合蛋白的制备及IgG/IgM
抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种简便快速的寨卡病毒检测试剂盒。该试剂盒优选的融合表达蛋白作为诊断抗原,抗人IgG单克隆抗体A374、抗人IgM单克隆抗体A371和生物素-BSA偶联物分别包被在硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线,配以胶体金标记的融合表达蛋白和胶体金标记的链霉亲和素及其他试剂,采用免疫层析捕获法原理定性检测人血清中的寨卡病毒特异性的IgM抗体、IgG抗体,从而实现寨卡病毒感染的快速、特异诊断。

1. 一种寨卡病毒多片段融合蛋白的制备及IgG/IgM抗体检测试剂盒,其特征在于应用生物信息学技术分析比较寨卡病毒与登革热病毒基因序列,选取寨卡病毒特有的线性表位进行多表位融合表达纯化,并优选出重组蛋白ZIKV-Ag2作为诊断抗原,用胶体金标记来检测样本中寨卡病毒;且试剂盒包括1)检测试剂卡、2)样品处理液和3)分隔并集中包装这些试剂瓶或管的包装盒。

2. 一种寨卡病毒多片段融合蛋白的制备及IgG/IgM抗体检测试剂盒,其特征在于寨卡病毒多片段融合蛋白的制备过程包括以下步骤:

1) 生物信息学比对:选取寨卡病毒与登革热病毒基因全长序列进行生物信息学比对分析,分析寨卡病毒特异的线性抗原表位;

2) 特异基因片段的组合:筛选出寨卡病毒特异的线性抗原表位对应的基因片段序列1、2、3;并对片段1、2、3分别进行单独或组合,分别为①片段1;②片段2;③片段3;④片段1+片段2融合;⑤片段1+片段3融合;⑥片段2+片段3融合;⑦片段1+片段2+片段3融合;

4) 基因片段的克隆表达与纯化:将7种基因片段组合各自进行PCR引物设计、扩增、构建重组质粒并诱导表达,经提取重组质粒并进行酶切、测序验证后大量诱导表达融合蛋白;

5) 交叉配对实验:将4)中获得的融合蛋白标记金分别与抗人IgG单克隆抗体、抗人IgM单克隆抗体进行交叉配对实验,确定与单克隆抗体配的对灵敏度、特异度最高的融合蛋白,即为用于金标诊断的抗原;

6) 制备胶体金试剂:利用5)中筛选出的抗原制备寨卡病毒IgG/IgM抗体胶体金检测试剂。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于该试剂盒中的检测试剂卡由1)样品垫、2)胶体金结合垫、3)层析膜、4)吸水材料和5)衬板组成,且上述1)~4)首尾互相衔接并附着在5)上;且所述胶体金结合垫为包被有金标记融合抗原ZIKV-Ag2以及金标记链霉亲和素的玻璃纤维膜;层析膜为包被有抗人IgG单克隆抗体A371、抗人IgM单克隆抗体A372、生物素-BSA的硝酸纤维素膜;衬板为PVC材质。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于该试剂盒中的样品处理液由1~50mg/mL的异嗜性抗体阻断剂和0.02%~0.06%NaN₃防腐剂组成。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于步骤2中)所述的特异基因为以下3个片段基因序列,

1) 片段1:

ATGGAATAATAAAGAAGTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCATGCTGAGAATAATCAATGCTAGGAAGGAGAAGA
AGAGACGAGGCGCAGATACTAATGTGCGAATTGTTGGCCTCTGCTGACCACAGCTATGGCAGCGGAGGTCACTAGA
CGTGGGAGTGCATACTATATGTACTTGGACAGA;

2) 片段2:

GAATGCCCTATGCTGGATGAGGGGTGGAACCAGATGACGTCGATTGTTGGTGCAACACGACGTCAACTTGGG
TTGTGTACGGAACCTGCCATCACAAAAAGGTGAAGCACGGAGATCTAGAAGAGCTGTGACGCTCCCCTCCCATTCC
ACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCAAACCTTGGTTGGAATCAAGAGAATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAA
TTGGATATTCAGGAACCTTGGCTTCGCGTTAGCAGCAGTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAA
AAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGG;

2) 片段3:

ATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCT
GCAAAAGAACGTTAGTGACAGAGGCTGGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTGACATGCGCT
AAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTGCT
TCATGGCTCCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGCGAAGGTTGAGA
TAACGCCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGGTTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACA
GGCCTTGACTTTTCAGATTTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAG。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征还在于试剂盒最终筛选的片段组合为:⑤片
段1+片段3融合,且相对应的PCR扩增引物序列分别为:

1) Primer3F: 5'-CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGG-3'

Primer3R: 5'-TAGGGCATTCTCTGTCCAAGTACATA-3';

2) Primer4F: 5'-ACTTGGACAGAATGGCTTCGGACAGCCGC-3'

Primer4R: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGCTCCTTGT-3'。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征还在于步骤5)中所述抗原为ZIKV-Ag2。

寨卡病毒多片段融合蛋白的制备及IgG/IgM抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明数据生物技术领域,涉及一种利用基因工程多片段融合快速表达技术制备寨卡病毒诊断抗原,及寨卡病毒IgG/IgM抗体快速检测试剂盒(胶体金法)的制备及其使用。

背景技术

[0002] 2015年,寨卡病毒在全球快速蔓延,已有24个国家和地区出现疫情报道,世界卫生组织于2016年2月1日宣布,将寨卡病毒及小头症列为全球紧急公共卫生事件。

[0003] 寨卡病毒病(Zika virus disease)属于黄热病毒科的黄病毒属,是由寨卡病毒(Zika virus),引起的一种自限性急性传染病。寨卡病毒通过受到感染的伊蚊属蚊子叮咬传播到人,还可能由怀孕的母亲在怀孕或生产过程中传播给胎儿或婴儿,也可能发生性传播,或输血传播。感染后,仅有20%的患者出现症状,包括发热、皮疹、结膜炎、肌肉和关节痛、全身乏力以及头痛等,这些症状通常持续2~7天。寨卡病毒可能会造成神经和自身免疫系统的并发症,如格林-巴利综合征(Guillian-Barré syndrome),孕妇感染寨卡病毒可能引起婴儿小头畸形。

[0004] 目前,全世界已发现超过4000例新生儿小头畸形病例。我国已发现输入病例共8例。寨卡病毒在全球流行态势已异常严峻。因此,需要一种快速、简便、特异的检测试剂盒来应对。而寨卡病毒与同种属的登革热病毒有很高的同源性,且两种病毒均是经蚊虫传播,因此,如何能区别开寨卡病毒和登革热病毒感染就显得尤为重要。

[0005] 近期,也有些国内外的厂家寨卡病毒诊断抗原问世,但往往由于抗原上游的基因序列对应的抗原表位未做任何修饰,导致不可避免的与登革热病毒的交叉反应。

[0006] 因此,本发明利用生物信息学分析技术对寨卡病毒和登革热病毒进行表位分析,选取差异表位,然后利用一步法融合表达技术对特异的抗原表位进行融合表达,分别比较其诊断效果,并最终选定灵敏度高、特异性强(与登革热病毒无交叉反应)的融合蛋白作为诊断抗原。

[0007] 免疫胶体金技术作为一种近年来免疫类新技术发展十分迅速,在生物医学各研究领域特别是在医学检验中得到了日益广泛的应用,它具有操作简单、检测快速、特异性好、灵敏度高的优点。

[0008] 在此基础上,利用快速简便的胶体金技术进行试剂盒的制备,让寨卡病毒的诊断更加灵敏、特异、便捷,从而更好地为公众健康提供快速检测技术。

[0009] 本发明即是利用基因工程融合表达技术及胶体金方法学的优势,研制成功一种可区别登革热病毒感染的寨卡病毒的快速诊断试剂盒。本试剂盒具有灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便及成本低廉等显著优点。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供一种简便快速的寨卡病毒检测试剂盒(胶体金法)。该试剂盒采用自主研发优选的融合表达蛋白作为诊断抗原,抗人IgG单克隆抗体A374、抗人IgM单

克隆抗体A371和生物素-BSA偶联物分别包被在硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线,配以胶体金标记的融合表达蛋白和胶体金标记的链霉亲和素及其他试剂,采用免疫层析捕获法原理定性检测人血清中的寨卡病毒特异性的IgM抗体、IgG抗体,从而实现寨卡病毒感染的快速、特异诊断。

[0011] 本发明在于应用生物信息学技术分析比较寨卡病毒与登革热病毒基因序列,选取寨卡病毒特有的线性表位进行多表位融合表达纯化,并优选出重组蛋白ZIKV-Ag2作为诊断抗原,用胶体金标记来检测样本中寨卡病毒。

[0012] 本发明的试剂盒包括1) 检测试剂卡、2) 样品处理液和3) 分隔并集中包装这些试剂瓶或管的包装盒。其中,检测试剂卡由1) 样品垫、2) 胶体金结合垫、3) 层析膜、4) 吸水材料和5) 衬板组成,且上述1)~4) 首尾互相衔接并附着在5) 上;且所述胶体金结合垫为包被有金标记融合抗原ZIKV-Ag2以及金标记链霉亲和素的玻璃纤维膜;层析膜为包被有抗人IgG单克隆抗体A371、抗人IgM单克隆抗体A372、生物素-BSA的硝酸纤维素膜;衬板为PVC材质;样品处理液由1~50mg/mL的异嗜性抗体阻断剂和0.02%~0.06%NaN₃防腐剂组成。

[0013] 为了实现本发明,发明人采用了以下技术方案:

[0014] (1) 生物信息学比对:选取寨卡病毒与登革热病毒基因全长序列进行生物信息学比对分析,分析寨卡病毒特异的线性抗原表位;

[0015] (2) 特异基因片段的组合:筛选出寨卡病毒特异的线性抗原表位对应的基因片段序列1、2、3;并对片段1、2、3分别进行单独或组合,分别为:

[0016] ①片段1;

[0017] ②片段2;

[0018] ③片段3;

[0019] ④片段1+片段2融合;

[0020] ⑤片段1+片段3融合;

[0021] ⑥片段2+片段3融合;

[0022] ⑦片段1+片段2+片段3融合;

[0023] (4) 基因片段的克隆表达与纯化:将7种基因片段组合各自进行PCR引物设计、扩增、构建重组质粒并诱导表达,经提取重组质粒并进行酶切、测序验证后大量诱导表达融合蛋白;

[0024] (5) 交叉配对实验:将4) 中获得的融合蛋白标记金分别与抗人IgG单克隆抗体、抗人IgM单克隆抗体进行交叉配对实验,确定与单克隆抗体配的对灵敏度、特异度最高的融合蛋白,即为用于金标诊断的抗原;

[0025] (6) 制备胶体金试剂:利用5) 中筛选出的抗原制备寨卡病毒IgG/IgM抗体胶体金检测试剂。

[0026] 本发明中寨卡病毒特异性基因片段分别为以下3个片段基因序列,

[0027]

片段	基因序列 (5'→3')
片段 1	ATGGAAATAATAAAGAAGTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCATGCTGAGAATAAT CAATGCTAGGAAGGAGAAGAAGAGACGAGGCCGAGATACTAATGTTCGGAATT GTTGGCCTCCTGCTGACCACAGCTATGGCAGCGGAGGTCCTAGACGTGGGAG TGCATACTATATGTACTTGGACAGA GAATGCCCTATGCTGGATGAGGGGGTGAACCAGATGACGTCGATTGTTGGTG CAACACGACGTCAACTTGGGTTGTGTACGGAACCTGCCATCACAAAAAGGTG AAGCACGGAGATCTAGAAGAGCTGTGACGCTCCCCTCCCATCCACTAGGAAG CTGCAAACGCGGTCGAAACTTGGTTGGAATCAAGAGAATACACAAAGCACTT GATTAGAGTCGAAAATTGGATATTCAGGAACCCTGGCTTCGCGTTAGCAGCAG CTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTG GTCATGATACTGCTGATTGCCCGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAG CAATAGG ATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCA ATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAACGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGA AATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTGACATGCGCTAAGTTTGC ATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTAC CGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGA CACAGGACATGAACTGATGAGAATAGAGCGAAGGTTGAGATAACGCCCAAT TCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGGTTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTG TGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTCAGATTTGTATTACTTGACTATGAATAA CAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAG
片段 2	
片段 3	

[0028] 优选的,上述技术方案中的7种重组中④、⑤与⑥三种组合分别进行PCR扩增、重组、表达,最终获得阳性重组质粒;三种组合对应的扩增引物依次如下所示:

	10×K Buffer	2.0 μl
	PCR Product/pET-28a(+) vector	8.0 μl
[0042]	BamH I	1.0μl
	Xho I	1.0μl
	<u>dd H₂O</u>	<u>8.0μl</u>
	Total volume	20.0 μl

[0043] 2、多片段PCR产物的制备(原理请见附图2):设计相应的扩增引物,插入片段1、2、3分别PCR扩增。

[0044] PCR反应体系如下:

	10×ExTaq buffer (containing Mg ²⁺)	2μl
	dNTP mixture	2μl
	ExTaq	0.5μl
[0045]	F1	1μl
	R1	1μl
	模版	0.5μl
	<u>ddH₂O</u>	<u>13μl</u>
	total	20μl

[0046] PCR反应条件:

	95°C	5min	
	94°C	1min	} 30 循环
[0047]	60°C	1min	
	72°C	2min	
	72°C	10min	

[0048] PCR扩增产物如图3所示,可见扩增出所需目的条带。

[0049] 3、重组质粒的制备:将上述步骤1、2制备的线性化表达载体和插入片段扩增产物配制重组反应体系,37°C反应30min即可快速完成重组反应,实现两线状DNA的体外环化,即获得重组质粒。

[0050] 4、反应产物转化、涂板:重组产物直接转化,挑取阳性单克隆,放入LB培养基,37°C,200~250rpm,振荡孵育培养4~5h。

[0051] 5、提取质粒再行双酶切验证,后测序验证。

[0052] 6、将重组质粒ZIKV-P1、ZIKV-P2、ZIKV-P3分别转化至大肠杆菌BL21/DE3, IPTG诱导表达融合蛋白,纯化融合蛋白ZIKV-Ag1、ZIKV-Ag2、ZIKV-Ag3,结果如图4所示,可获得所需的蛋白。

[0053] 实施例2 融合抗原配对筛选实验

[0054] 1. 将纯化后的融合蛋白ZIKV-Ag1、ZIKV-Ag2、ZIKV-Ag3分别标记金,与外购的抗人IgG单克隆抗体A371、抗人IgM单克隆抗体A372分别进行配对实验,以棋盘滴定法交叉配对,灵敏度、特异度最高的配对抗原抗体。结果见表-4。

[0055] 表-4抗原抗体配对筛选实验结果

	抗原	抗体	灵敏度	特异度	交叉反应
	ZIKV-Ag1	A371、 A372	75% (15/20)	90% (18/20)	25% (5/20)
[0056]	ZIKV-Ag2	A371、 A372	100% (20/20)	100% (20/20)	0 (0/20)
	ZIKV-Ag3	A371、 A372	85% (17/20)	90% (18/20)	15% (3/20)

[0057] 结果显示:当ZIKV-Ag2作为标记抗原,A371、A372作为标记抗体时,灵敏度、特异度均最高(均可达100%),所以选择ZIKV-Ag2和A371、A372用于本检测试剂的配对抗原抗体。

[0058] 实施例3 试剂盒的组成

[0059] 1、检测试剂卡:①样品垫、②胶体金结合垫(玻璃纤维膜):膜上吸附着干燥的金标抗原和金标链霉亲和素(流动带)、③层析膜(硝酸纤维素膜),膜上包被着抗原或抗体条带和能与标记物直接起反应的质控物条带(检测带)、④吸水材料(吸水纸)、⑤衬板(PVC胶板)。以上各组份首尾互相衔接且附着在PVC胶板上(如图5所示)。

[0060] 2、样品处理液:1瓶(10人份装:1.0mL;25人份装:2.5mL;50人份装:5.0mL),主要成分为异嗜性抗体阻断剂(浓度范围1~50mg/mL)。防腐剂:0.02%~0.06%NaN₃。

[0061] 实施例4 试剂盒的使用方法

[0062] 1. 取出试剂,撕开试剂卡包装,滴2滴样品处理液至加样孔。

[0063] 2. 滴1滴待测血清至加样孔,5~20min内判断结果,20分钟后判读结果无效。

[0064] 3. 结果判读:

[0065] ①阳性(+):观察窗内有三条紫红色条带出现,分别位于检测区(M、G)和质控区(C)内,提示为样本中含有寨卡病毒特异性IgM、IgG抗体。

[0066] ②阳性(+):观察窗内有三条紫红色条带出现,分别位于检测区(M)和质控区(C)内,提示为样本中含有寨卡病毒特异性IgM抗体。

[0067] ③阳性(+):观察窗内有三条紫红色条带出现,分别位于检测区(G)和质控区(C)内,提示为样本中含有寨卡病毒特异性IgG抗体。

[0068] ④阴性(-):仅质控区(C)出现一条紫红色条带,在检测区(M、G)内无紫红色条带出现,提示样本中不含寨卡病毒特异性IgM、IgG抗体。

[0069] ⑤无效:质控区(C)未出现紫红色条带,表明不正确的操作过程或试剂已变质损坏。在这种情况下,应重新测试。

[0070] 直接示意图,见附图6。

[0071] 实施例5 反应体系的建立与优化

[0072] 1. 蛋白质的预处理:获得优选的重组融合蛋白ZIKV-Ag2后,需对其进行预处理方

可用于金标记。①蛋白质应先对低离子强度的水透析,去除盐类成份。盐类成份能影响胶体金对蛋白质的吸附,并可使胶体金聚沉,应避免磷酸根离子和硼酸根离子的存在。②用微孔滤膜或超速离心除去蛋白质溶液中的细小微粒。③胶体金对蛋白的吸附主要取决于pH值,在接近蛋白质的等电点或略偏碱的条件下,二者容易形成牢固的结合物。如果胶体金的pH值低于蛋白质的等电点时,则会聚集而失去结合能力。

[0073] 2. 蛋白质最适用量测定:将待标记的蛋白质(ZIKV-Ag2)储存液作系列稀释后,分别取0.1ml加到1ml胶体金溶液中,另设一管不加蛋白质的对照管,5分钟后加入0.1ml 10% NaCl溶液,混匀后静置2小时,具体如下表-6所示。

[0074] 表-6蛋白质最适用量测定

	1	2	3	4	5	6	7
[0075] 胶体金 (ml)	1	1	1	1	1	1	1
蛋白质 (μg)	0	10	15	20	25	30	35
10%NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

[0076] 结果判断:对照管若加入蛋白量不足,胶体金出现由红变蓝的凝聚现象;加入蛋白质质量达到或超过稳定量,则胶体金保持红色不变。

[0077] 不稳定的金溶胶将发生聚沉,对照管(未加蛋白质)和加入蛋白质的量不足以稳定胶体金的各管,均呈现出由红变蓝的聚沉现象;而加入蛋白量达到或超过最低稳定量的各管仍保持红色不变。以稳定1ml胶体金溶液红色不变的最低蛋白质用量,即为该标记蛋白质的最低用量,在实际工作中,可适当增加10%,在此情况下蛋白质分子在金颗粒表面的吸附量最大。

[0078] 胶体金与蛋白质偶联后,加入稳定剂,以避免产生凝集。一般选用PEG(分子量为20000)和牛血清白蛋白作稳定剂。加入的量:3%BSA使溶液终浓度为1%;10%聚乙二醇加至总溶液的1/10。

[0079] 具体操作如下:

[0080] ①用0.1mol/L K_2CO_3 或0.1mol/L HCl调节金溶胶至所需pH。

[0081] ②于100ml金溶胶中加入最佳标记量的蛋白质溶液搅拌2~3分钟。

[0082] ③加入5ml 1%PEG20000溶液。

[0083] ④于10000~100000g离心30~60分钟小心吸去上清液(切忌倾倒)。

[0084] ⑤将沉淀悬浮于一定体积含0.2~0.5mg/ml PEG20000的缓冲液中,离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,浓度以 $A_{540\text{nm}}=1.5$ 左右为宜,防腐置4℃保存。

[0085] ⑥包被后的金溶胶也可浓缩后于Sephadex G-200柱进行凝胶层析分离纯化,以含0.1%BSA的缓冲溶液洗脱。通常用IgG包被的金溶胶洗脱液pH为8.2。

[0086] 以上操作中应注意,一切溶液中不应含杂质微粒,可用高速离心或微孔滤膜预处理。

[0087] 3. 胶体金的制备(以100ml胶体金溶液为例):

[0088] 3.1 制备胶体金溶液(100ml):

[0089] 3.1.1 准备工作:量取100ml纯化水倒入圆底烧瓶中,加入搅拌子在磁力搅拌器上搅拌加热至沸腾,将水倒掉,用纯化水清洗两遍。

[0090] 3.1.2量取100mI纯化水倒入已清洗的圆底烧瓶中,加入搅拌子后在180℃条件下的磁力搅拌器上加热;加热到80-90℃时,加入3%HAuCl₄溶液2mI;继续加热搅拌至沸腾,转速调至900rpm;充分沸腾1-2min后,加入现配的5.8%柠檬酸三钠水溶液3mI;等颜色稳定后,300rpm,继续加热10min后关闭磁力搅拌器,将制备好的胶体金溶液冷却至室温,用0.22 μm过滤器过滤到干净的玻璃瓶待用,2-8℃保存。

[0091] 3.2胶体金的标记、喷膜、干燥:

[0092] 3.2.1按照喷金划线机清洗规程清洗喷金管道。

[0093] 3.2.2寨卡病毒重组抗原-胶体金结合物的制备与纯化(100mI胶体金溶液为例)

[0094] 3.2.2.1寨卡病毒重组抗原-胶体金结合物的制备(100mI胶体金溶液为例)

[0095] (1)向100mI胶体金溶液中加入12mI 0.8M K₂CO₃并搅拌均匀。

[0096] (2)在磁力搅拌下,按每毫升胶体金溶液加入50μg寨卡病毒重组抗原,室温搅拌40min。

[0097] (3)在磁力搅拌下,加入10mI 1%BSA溶液,搅拌20min。

[0098] 3.2.2.2寨卡病毒重组抗原-胶体金结合物的纯化(100mI胶体金溶液为例)

[0099] (1)将3.2.2.1所得的金标记寨卡病毒重组抗原在冷冻离心机中4~10℃,8000rpm离心5min,收集沉淀至干净离心管中,将离心后上清转移至另一离心管中于4~10℃、6000rpm条件下离心20min,收集沉淀,将此次离心后上清再转移至另一离心管中于4~10℃、6000rpm条件下离心20min收集沉淀,如此反复多次收集沉淀,直至上清无色为止。

[0100] (2)将收集到的沉淀集于一离心管中,加入20mI纯化水后混匀,在冷冻离心机中4~10℃,6000rpm离心5min,收集沉淀至于净离心管中,将离心后上清转移至另一离心管中于4~10℃、6000rpm条件下离心5min,收集沉淀,将此次离心后上清再转移至另一离心管中于4~10℃、6000rpm条件下离心20min收集沉淀,如此反复多次收集沉淀,直至上清无色为止。

[0101] (3)沉淀用生理盐水溶解,每100mI原胶体金溶液沉淀先加150μI生理盐水后混匀,从中取出10μI溶液用生理盐水做1:20稀释后,以生理盐水作为空白对照用分光光度计测535nm波长下的吸收值,从而计算得出复溶后金溶液的OD值[例如:设1:200稀释后溶液吸收值为X,空白对照的吸收值为Y;则复溶后金溶液的OD值=(X-Y)*200],依据初始测定的OD值的情况再加入适量的生理盐水[例如:计算出的OD值为X,积为V1,则要加入的生理盐水体积分V=(X*V1/90)-V1],使得OD值为20,2-8℃保存备用。

[0102] 3.2.3链霉亲和素-胶体金结合物的制备与纯化(100mI胶体金溶液为例)

[0103] 3.2.3.1链霉亲和素-胶体金结合物的制备

[0104] (1)向100mI胶体金溶液中加入500μI 0.1M Na₂CO₃。

[0105] (2)在磁力搅拌下,按每毫升胶体金溶液加入5μg链霉亲和素,室温搅拌40min。

[0106] (3)在磁力搅拌下,加入2mI 1%BSA溶液,搅拌20min。

[0107] 3.2.3.2链霉亲和素-胶体金结合物的纯化

[0108] (1)将3.2.3.1所得的金标记链霉亲和素在冷冻离心机中4~10℃,8000rpm离心20min,收集沉淀至于净离心管中,将离心后上清转移至另一离心管中于4~10℃、10000rpm条件下离心20min,收集沉淀,将此次离心后上清再转移至另一离心管中于4~10℃、12000rpm条件下离心20min收集沉淀,如此反复多次收集沉淀,直至上清无色为止。

[0109] (2) 将收集到的沉淀集于一离心管中,加入30mI PB清洗液后混匀,在冷冻离心机中4~10℃,8000rpm离心20min,收集沉淀至干净离心管中,将离心后上清转移至另一离心管中于4~10℃、10000rpm条件下离心20min,收集沉淀,将此次离心后上清再转移至另一离心管中于4~10℃、12000rpm条件下离心20min收集沉淀,如此反复多次收集沉淀,直至上清无色为止。

[0110] (3) 沉淀用生理盐水溶解,每100mI原胶体金溶液沉淀先加150μI生理盐水后混匀,从中取出10μI溶液用生理盐水做1:200稀释后,以生理盐水作为空白对照用分光光度计测535nm波长下的吸收值,从而计算得出复溶后金溶液的OD值,依据初始测定的OD值的情况再加入适量的生理盐水,使得OD值为20,2-8℃保存备用。

[0111] 3.2.4将OD₅₃₅=20的金标链霉亲和素与OD₅₃₅=90的金标寨卡病毒重组抗原等体积混匀即为胶体金标记物。

[0112] 3.2.5将3.2.4所得的胶体金标记物上样到喷金划线机中,按照喷金量2μI/mm,喷金速度20mm/s喷到已处理的金结合垫玻璃纤维上,完成后将其放入20~37℃,湿度≤40%干燥室中16~18小时,烘干,干燥密封室温保存,即为胶体金结合垫。

[0113] 4划线:

[0114] 4.1配制C线、G线和M线溶液:

[0115] 4.1.1用50mM PBS (pH7.0±0.1) 包被缓冲液稀释生物素-BSA偶联物,稀释浓度至2mg/mI为C线的划线溶液。

[0116] 4.1.2用100mM PBS (pH7.0±0.1) 包被缓冲液稀释抗人IgG单克隆抗体A371,稀释浓度至0.2mg/mI为G线的划线溶液。

[0117] 4.1.3用100mM PB (pH7.0±0.1) 溶液稀释抗人IgM单克隆抗体A372,稀释浓度至0.2mg/mI为M线的划线溶液。

[0118] 4.2揭开PVC板上NC膜粘贴处的保护膜,将NC膜(305±1)mm从左向右均匀推进,使其牢固的粘贴在PVC板上。

[0119] 4.3划线:

[0120] 4.3.1按照喷金划线机清洗规程清洗喷膜管道。

[0121] 4.3.2在贴于PVC板上的NC膜上划线,在膜的一端用笔做好C线、G线和M线的标记,C线和G线的距离为4mm,G线与M线的距离为4mm,M线与NC膜下缘的距离为6mm,划线量均为1μI/mm,速度10mm/s,先划G、M线,后划C线,完成后将片材放入20~37℃,湿度≤40%干燥室中16~18小时,烘干,干燥密封室温保存。

[0122] 5组装:

[0123] 5.1备料:将吸水纸裁剪成19mm×300mm即为吸收垫;经处理并且裁剪备用的样品垫和胶体金结合垫;在温度22~30℃,相对湿度≤40%的环境中进行组装。

[0124] 5.2将PVC板平铺于工作台面上。

[0125] 5.3揭开PVC板顶端吸收垫粘贴处的保护膜,将吸收垫粘附于其上,均匀、轻微滚动式推进,以加强粘合力,吸收垫覆盖NC膜2-3mm。

[0126] 5.4轻轻揭开NC膜下缘胶体金结合垫粘贴处的保护膜,将胶体金结合垫粘附于其上,方法同吸收垫。胶体金结合垫应覆盖NC膜2-3mm。

[0127] 5.5揭开PVC板最下端的保护膜,将样品垫粘附于胶体金结合垫上,底端对齐,方法

同吸收垫。样品垫覆盖胶体金结合垫3-4mm。

[0128] 5.6在自动切条机上将贴好的PVC板切成 (3.5 ± 0.1) mm宽的试剂条。

[0129] 5.7将试剂条装入塑料卡内,将试剂卡置于单人份铝膜袋中,并加入1g干燥剂1包,热合封口,贴上标签,作为试剂半成品,室温保存。

[0130] 实施例6 试剂盒稳定性实验

[0131] 将试剂盒放于37℃、4℃,21天后做性能评价,要求:①阴性参考品符合率:10份阴性参考品检测结果应全为阴性,不得出现假阳性,符合率为100% (10/10)。②阳性参考品符合率:10份阳性参考品检测结果应全为阳性,不得出现假阴性,符合率为100% (10/10)。③精密性:以精密性参考品平行测定10人份试剂,反应结果应一致,显色度应均一。

[0132] 实验结果显示:与4℃相比,37℃21天后各项指标仍能满足要求。因此,初步设定该试剂盒2~30℃阴凉避光干燥处保存,自包装之日起,有效期18个月。

[0133] 实施例7 试剂盒的实验室性能

[0134] 对实施例3的试剂盒进行实验室性能分析,结果如下:

[0135] 1) 阴性参考品符合率:10份阴性参考品检测结果应全为阴性,不得出现假阳性,符合率为100% (10/10)。

[0136] 2) 阳性参考品符合率:10份阳性参考品检测结果应全为阳性,不得出现假阴性,符合率为100% (10/10)。

[0137] 3) 精密性:以精密性参考品平行测定10人份试剂,反应结果应一致,显色度应均一。

[0138] 4) 交叉反应:检测20例登革热病毒阳性血清,未见交叉反应。

[0139] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的人和附图标记视为限制所涉及的权利要求。

<110> 广州市达瑞生物技术股份有限公司
<120> 寨卡病毒多片段融合蛋白的制备及 IgG/IgM 抗体检测试剂盒
<140>
<141>
<160>12

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。
<400> 1
CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGA

[0001] <210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。
<400> 2
TAGGGCATTCTCTGTCCAAGTACAT

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。
<400> 3

CTTGGACAGAGAATGCCCTATGCTGGAT

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 4

GTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGCCTATTGC

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002] <220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 5

CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGG

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 6

TAGGGCATTCTCTGTCCAAGTACATA

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 7

ACTTGGACAGAATGGCTTCGGACAGCCGC

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 8

GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCTCCTTGT

[0003]

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 9

CAGCAAATGGGTCGCGGATCCGA

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

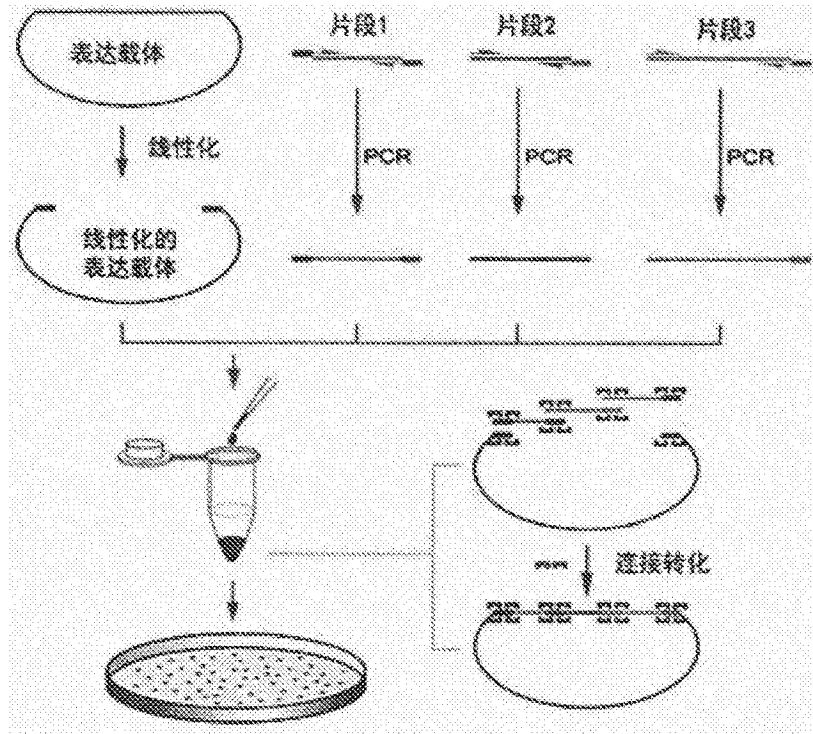


图1

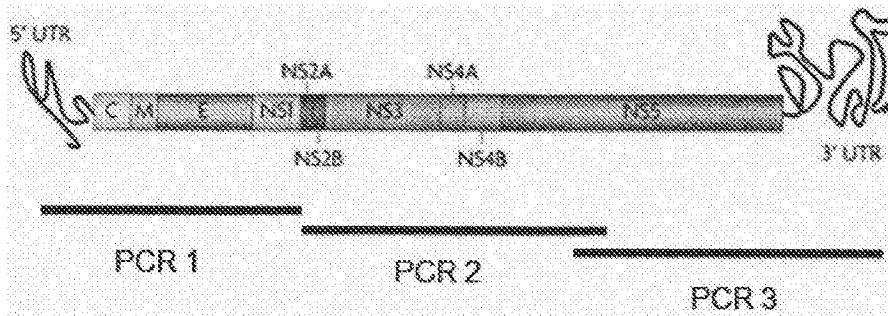


图2

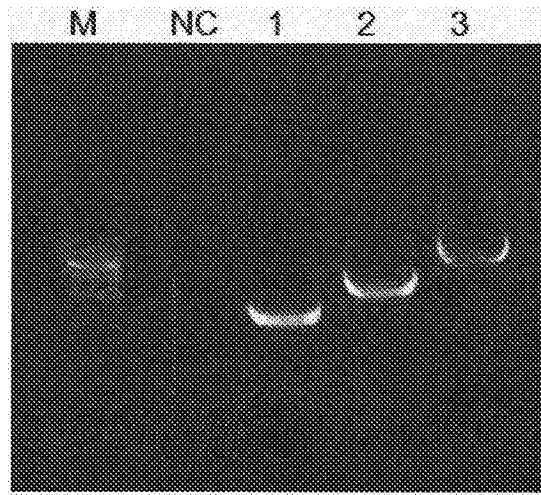


图3

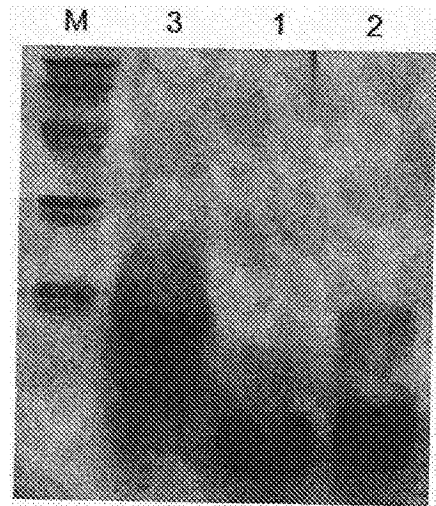


图4

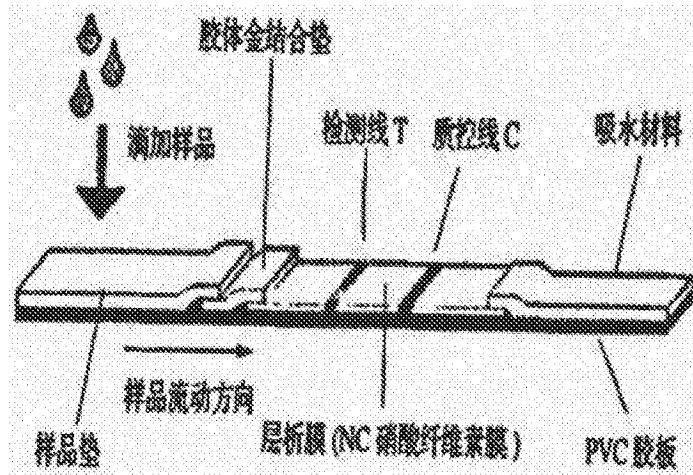


图5

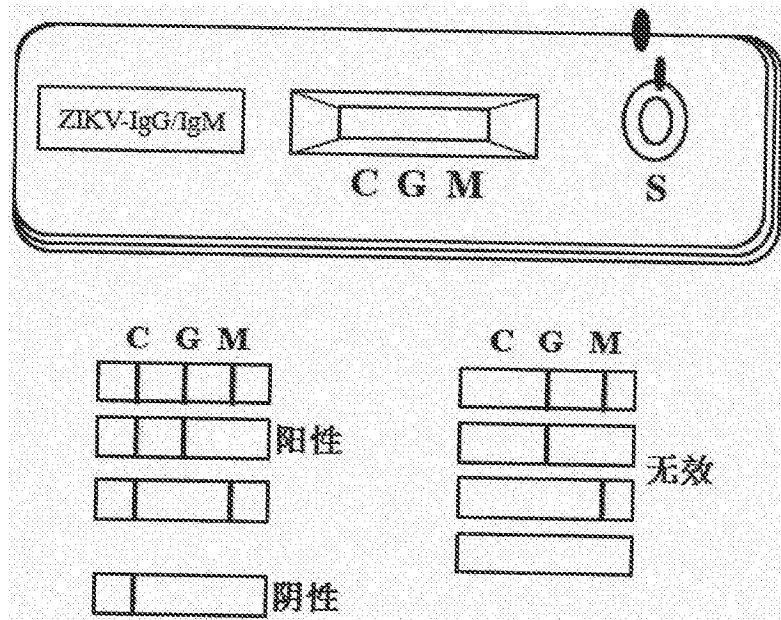


图6

专利名称(译)	寨卡病毒多片段融合蛋白的制备及IgG/IgM抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106841601A	公开(公告)日	2017-06-13
申请号	CN201611272846.6	申请日	2016-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	广州市达瑞生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市达瑞生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市达瑞生物技术股份有限公司		
[标]发明人	吴英松 邓传欢 董志宁 李志雄		
发明人	吴英松 邓传欢 董志宁 李志雄		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/569		
CPC分类号	Y02A50/53 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/577 G01N2333/183 G01N2333/46 G01N2800/26		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种简便快速的寨卡病毒检测试剂盒。该试剂盒优选的融合表达蛋白作为诊断抗原，抗人IgG单克隆抗体A374、抗人IgM单克隆抗体A371和生物素-BSA偶联物分别包被在硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线，配以胶体金标记的融合表达蛋白和胶体金标记的链霉亲和素及其他试剂，采用免疫层析捕获法原理定性检测人血清中的寨卡病毒特异性的IgM抗体、IgG抗体，从而实现寨卡病毒感染的快速、特异诊断。

片段	基因序列 (5'→3')
片段 1	ATGGAAATAATAAAGAAGTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCATGCTGAGAATAAT CAATGCTAGGAAGGAGAAGAAGAGACGAGGCGCAGATACTAATGTCGGAATF GTTGGCTCCTGCTGACCACAGCTATGGCAGCGGAGGTCAGTACGCTGGGAG TGCATACTATATGTACTTGGACAGA GAATGCCCTATGCTGGATGAGGGGGTGGAAACCAGATGACGTCGATTGTTGGT CAACACGACGTCACACTTGGGTTGTACGGAACCTGCCATCACAAAAAGGTG AAGCACGGAGATCTAGAAGAGCTGTGACGCTCCCTCCCACTTAGGAAG CTGAAAACGCGGTCGCAACTTGGTGGAAATCAAGAGAATACACAAAGCACTT GATTAGAGTCGAAAATGGATATTCAGGAACCCCTGGCTTCGCGTTAGCAGCAG CTGCCATCGCTGGCTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTG GTCATGATACTGCTGATTGCCCGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAG CAATAGG
片段 2	ATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCTACCTTGACAAGCA ATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGACGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGA AATGGATGTGGACTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTACATGCGCTAAGTTTGC ATGCTCAAGAAAATGACCGGGAAGGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTAC CGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGA CACAGGACATGAACTGATGAGAATAGAGCGAAGGTTGAGATAACGCCCAAT TCACCAAGAGCCGAAGCCACCTGGGGGTTTGAAGCCTAGGACTTGATTG TGAACCGAGGACAGGCTTGACTTTTCAGATTGTATTACTTGACTATGAATAA CAAGCACTGGTTCACAAGGAG
片段 3	